网络出版时间:2012-04-16 15:38
网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20120416.1538.018.html

致仔猪痢疾沙门氏菌特异性噬菌体的分离与纯化

席利萌,李陇平,徐 坤,张智英
(西北农林科技大学 动物科技学院,陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 【目的】筛选仔猪痢疾病原菌沙门氏菌特异性噬菌体,为噬菌体制剂的研制和仔猪痢疾的生物防治提供参考。【方法】从患痢疾仔猪粪便中分离致病菌沙门氏菌,鉴定后以其为宿主菌,从生活污水中筛选、纯化出特异性噬菌体,并以金黄色葡萄球菌和大肠杆菌为对照,检测该噬菌体的特异性。【结果】分离到了致病菌沙门氏菌,并得到了纯化的沙门氏菌噬菌体;经检测,该噬菌体只能裂解沙门氏菌,而对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌没有作用。【结论】得到了纯化的可裂解沙门氏菌的特异性噬菌体。

[关键词] 仔猪痢疾;沙门氏菌;噬菌体
[中图分类号] S858.286.4 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9387(2012)05-0001-04

Isolation and purification of bacteriophage against *Salmonella* associated piglets dysentery

XI Li-meng, LI Long-ping, XU Kun, ZHANG Zhi-ying
(*College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi* 712100, *China*)

Abstract: 【Objective】 The study was to screen bacteriophage against *Salmonella* isolated in domestic sewage, and to provide certain reference for the development of diarrhea and disease prevention in piglets dysentery. 【Method】 *Salmonella* was isolated and identified as host bacteria from the sicken piglet's feces, the specific bacteriophage screened from sewage through it; After mixing the isolated phage with *Staphylococcus aureus* (Sau) and *Escherichia coli* (Eco), the specificity of the phage was validated. 【Result】 The *Salmonella* were identified, and the specific phage isolated and purified can not kill Sau and Eco. 【Conclusion】 We got the specific bacteriophage which can only kill the *Salmonella*, and the bacteriophage is specific.

Key words: piglets dysentery; *Salmonella*; bacteriophage

噬菌体又称细菌依赖性病毒,于 20 世纪初由 Twort 和 D'Herelle 先后独立发现。D'Herelle 于 1919 年用噬菌体疗法成功地治疗了 1 例患有细菌性痢疾的 12 岁男孩,并于 1925 年在埃及成功治疗了 4 例淋巴腺鼠疫患者,印度的霍乱病人死亡率也因此大大减少[1-2]。噬菌体一旦感染宿主细菌,通常会随着宿主细菌的增殖而呈指数级增长(200^n),而且其感染率极高,一小颗粒噬菌体就足以裂解大量的细菌并致其死亡。噬菌体通过自身特定的配体与细菌表面的特定受体相识并结合,引发细菌的裂解反应,因此特定的噬菌体只能导致特定的宿主细菌裂解死亡,对其他菌种则不产生影响,也不会引发体内菌群失调或使宿主菌产生耐药性。由于噬菌体普遍存在于自然界中,对动植物细胞没有任何影

* [收稿日期] 2011-10-21
[基金项目] 陕西省"13115"科技创新重大专项(2009ZDKG-18)
[作者简介] 席利萌(1989-),男,陕西商洛人,在读硕士,主要从事动物遗传育种与繁殖研究。E-mail:xlm0223@163.com
[通信作者] 张智英(1958-),男,陕西兴平人,教授,博士,博士生导师,主要从事动物基因组学、动物病毒及其在癌症治疗中的应用研究。E-mail:zhangzhy@nwsuaf.edu.cn

响[3-4],具有较高的安全性。因此,噬菌体被认为是治疗细菌感染及进行环境消毒的一种有效手段。但是,20世纪40年代抗生素的出现,致使此方面的研究几近停滞,直到80年代初,Smith 和 Huggins[5]根据小鼠试验,将噬菌体应用于细菌感染的大型家畜(如小牛、羔羊等),结果表明,噬菌体治疗可以大大降低这些家畜的发病率和死亡率。2002年,国外学者以小鼠为试验对象,用大肠杆菌(取自于一患脑膜炎的孩童)诱导小鼠大肠杆菌败血症,单一肌肉注射噬菌体后发现,其疗效比抗生素(如四环素、氨苄西林、氯霉素、甲氧苄氨嘧啶加等)更好[6]。之后 Cerveny 等[7]发现,噬菌体可以保护静脉注射10倍致死剂量细菌的小鼠免于死亡。自此,噬菌体治疗被确定为一种治疗细菌病的方法。

仔猪痢疾也叫黏液性下痢,是由沙门氏菌、大肠杆菌、魏氏梭菌、猪痢密螺旋体、弓形体、轮状病毒等病原感染引起的一种肠道传染病,以腹泻发烧和高死亡率为主要特征,多发生于30日龄以内的哺乳仔猪,是影响仔猪成活率的主要原因[8]。据调查,本病的发病率约为75%,致死率为5%~25%[9]。病猪即使病愈,往往也会生长发育不良,成为制约养猪业快速发展的重要因素[10]。国内目前最为常用的防治仔猪痢疾的方法为抗生素治疗,但长期大剂量使用抗生素势必会造成药物残留、抗药性以及超级细菌等问题[11]。因此,人们急于寻求一种不会产生上述问题且又具有同样疗效的方法,于是噬菌体以其在细菌性疾病治疗方面的优势而凸显出来,但目前尚未见用噬菌体治疗仔猪痢疾的报道。为此,本试验以从患痢疾仔猪粪便中分离出的沙门氏菌为宿主菌,从生活污水中筛选特异性噬菌体,并对筛选出的噬菌体进行分离纯化和特异性检验,以期为噬菌体制剂的研究以及仔猪痢疾的有效防治提供参考。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 *粪样的采集* 试验用粪样于2011-04采自西北农林科技大学畜牧生态养殖场,选取3窝出现痢疾、年龄小于1月且没有进行过药物治疗的仔猪,用灭菌枪头取其少许粪便装于事先灭菌的2 mL离心管内,共取8份,贴好标签带回实验室,用于细菌培养和后续试验。

1.1.2 *污水样的采集* 试验所用水样来自于生活污水,将污水样收集于灭菌的50 mL离心管中,贴好标签带回实验室,用于噬菌体的分离。

1.2 仔猪痢疾致病菌沙门氏菌的分离与PCR鉴定

1.2.1 *粪样中沙门氏菌的分离* 将8份粪样中的4份保存于-80 ℃备用,其余4份分别加2 000 μL灭菌超纯水,混匀后分装到2个离心管中,4份样品共8管,每管约1 mL,8 000 *g* 离心5 min,弃上清取沉淀,如此重复收集3~5次后,将每份样品其中的一管作原浓度备用,另一管作 10^{-1}、10^{-2}、10^{-3}、10^{-4}、10^{-5}、10^{-6}、10^{-7} 梯度稀释,重悬混匀后各取200 μL,于超净台内无菌涂板接种于15 g/L琼脂培养基上,隔水式培养箱内倒置,37 ℃培养过夜(约16 h),可得标准沙门氏菌菌液,第2天观察菌落形态。用灭菌枪头挑取大小、形态特征、色泽各不同的单克隆,接种于装有20 μL灭菌水的小试管中,做好标记置于4 ℃冰箱备用。

1.2.2 *PCR鉴定* (1)引物设计与合成。试验所用沙门氏菌引物参照文献[12],引物由上海博尚生物有限公司合成,上游引物序列为 sal F1:5′-TGCCTACAAGCATGAAATGG-3′,下游引物序列为 sal R1:5′-CCAATCGCACGCTTCGCCTA-3′。

(2)PCR。用少量菌液为模板进行PCR扩增。PCR反应体系为25 μL:10×*Taq* 酶缓冲液 2.5 μL、$MgCl_2$(25 mmol/L) 1.5 μL、dNTP(25 mmol/L) 2.5 μL、细菌菌液 0.5 μL、sal F1(10 μmol/L)0.5 μL、sal R1(10 μmol/L)0.5 μL、*Taq* 酶 0.2 μL、ddH_2O 16.8 μL。反应程序为:94 ℃预变性5 min;94 ℃ 30 s,56 ℃ 45 s,72 ℃ 1 min,35个循环;72 ℃ 5 min。取PCR扩增产物0.5 μL进行琼脂糖凝胶(20 g/L)电泳检测,设2个试验组和1个纯水对照组。

1.3 沙门氏菌噬菌体的分离与纯化

1.3.1 *污水样处理* 取20 mL污水样,4 ℃下8 000 *g* 离心15 min,以除去其中的细菌杂物,上清液用灭菌的0.22 μm微孔滤膜过滤除菌,滤液收集于灭菌的小锥形瓶中,取少量滤液涂板,37 ℃培养箱内培养过夜,进行无菌检查。

1.3.2 *噬菌体的富集* 取1.3.1中滤液15 mL,加入15 mL液体LB培养基,接种经鉴定的标准沙门氏菌菌液约1 mL,充分混匀,于37 ℃、200 r/min振荡培养过夜,次日上午于4 ℃、8 000 *g* 离心10 min,取上清液作为下一步噬菌体富集的接种液,重复此过程3~5次;取富集所得上清液10 mL,加10 mL液体LB培养基,接种0.2 mL经鉴定的标准沙门氏菌菌液,超净台中放置0.5 h,然后37 ℃、200 r/min振荡培养5 h,4 ℃、10 000 *g* 离心30 min,在严格无

菌条件下将上清液用 0.22 μm 滤膜过滤除菌，所得滤液即为含有仔猪痢疾病原菌沙门氏菌噬菌体的原液，4 ℃冰箱中保存备用。

1.3.3　噬菌体的筛选　所得原液为淡黄色液体，采用双层平板培养技术，取 0.2 mL 沙门氏菌菌液，加入 0.2 mL 噬菌体原液，轻轻混匀后于超净台内放置约 30 min，使噬菌体吸附于宿主菌体上；然后加入 48 ℃、4 g/L 半固体软琼脂培养基约 4 mL，轻轻混匀后倒入 15 g/L 固体培养基中制成双层平板。静置待上层软琼脂培养基凝固后，倒置于 37 ℃恒温培养箱中培养 8 h 左右，观察有无噬菌斑，若出现噬菌斑，说明筛选到了仔猪痢疾病原菌沙门氏菌的特异性噬菌体。

1.3.4　噬菌体的纯化　用灭菌小枪头在培养噬菌体原液的双层平板中挑取相对独立、大而边缘光滑的噬菌斑，接种于经鉴定的标准沙门氏菌菌液中；37 ℃、200 r/min 振荡培养 8 h 左右，然后 4 ℃、8 000 *g* 离心约 15 min，0.22 μm 滤膜过滤除菌，将滤液与标准沙门氏菌菌液进行双层平板培养，重复上述步骤 3～5 次，即可得到纯化的噬菌体。

1.3.5　噬菌体与宿主菌的相互作用　于超净台内用灭菌小枪头挑取标准单克隆噬菌斑接种于标准沙门氏菌菌液中，37 ℃、160 r/min 振荡培养 24 h 以上，观察菌液的变化。

以金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*，Sau）和大肠杆菌（*Escherichia coli*，Eco）为对照菌，以沙门氏菌为宿主菌，对噬菌体的特异性进行检测。

2　结果与分析

2.1　致仔猪痢疾沙门氏菌的分离与鉴定

通过菌液 PCR 鉴定，致仔猪痢疾沙门氏菌的扩增产物片段长 457 bp（图 1）。该细菌在 15 g/L 琼脂培养基上培养 16 h 后，形成了无色透明、圆形、光滑、扁平的小菌落。

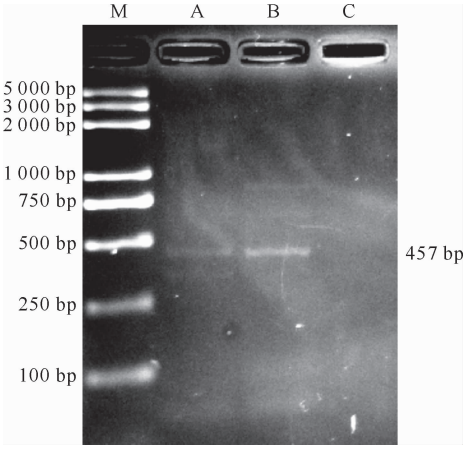

图 1　致仔猪痢疾沙门氏菌的 PCR 鉴定

M. Trans2K Plus DNA Marker；

A、B. 试验组；C. 纯水对照组

Fig. 1　PCR identification of *Salmonella*

M. Trans2K Plus DNA Marker; A, B. The experimental group with bacteria; C. Control group with pure water

2.2　致仔猪痢疾沙门氏菌特异性噬菌体的分离与纯化

经过几次富集之后，初步分离到了致仔猪痢疾沙门氏菌的特异性噬菌体，其可在双层平板上形成大小、形态特征差异较大的透明噬菌斑（图 2a）。经 3～5 次纯化之后，获得了纯化的致仔猪痢疾沙门氏菌特异性噬菌体，其在双层平板上形成了整齐、透明、边缘光滑、形状一致、大小均一、直径 1～2 mm 的噬菌斑（图 2b）。

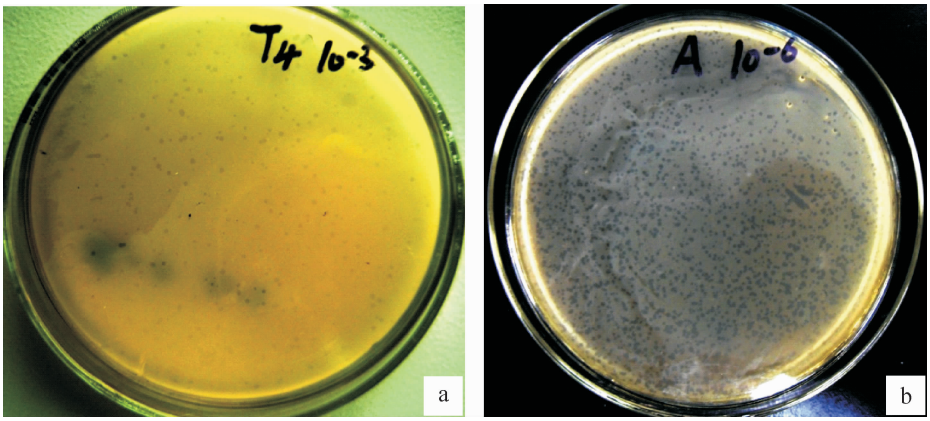

图 2　初步分离（a）和纯化后（b）的致仔猪痢疾沙门氏菌特异性噬菌体所形成的噬菌斑

Fig. 2　Plaques of phage isolated(a) and purified(b)

2.3 致仔猪痢疾沙门氏菌特异性噬菌体与宿主菌的相互作用

图 3 结果显示,分离纯化的噬菌体可以使浑浊的菌液重新变得澄清,表明该噬菌体能裂解沙门氏菌;但该噬菌体不能使金黄色葡萄球菌和大肠杆菌菌液重新变澄清,说明其不能裂解金黄色葡萄球菌和大肠杆菌。

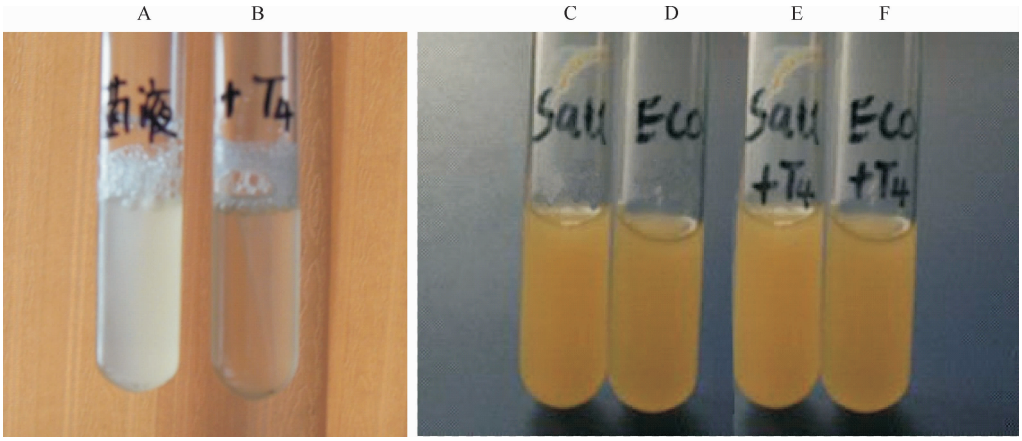

图 3 致仔猪痢疾沙门氏菌特异性噬菌体对宿主菌液的裂解作用及其特异性检测

A. 沙门氏菌菌液;B. 加特异噬菌体的沙门氏菌菌液;C. 金黄色葡萄球菌菌液;D. 大肠杆菌菌液;E. 加特异噬菌体的金黄色葡萄球菌菌液;F. 加特异噬菌体的大肠杆菌菌液

Fig. 3 Effect and specific detection about the isloated phage to the *Salmonella*

A. Liquid of *Salmonella*; B. Co-cultured *Salmonella* and the isolated phage; C. The liquid of *Staphylococcus aureus* (Sau); D. The liquid of *Escherichia coli* (Eco); E. Co-cultured Sau and the phage; F. Co-cultured Eco and the isloated phage

3 结论与讨论

本研究从自然界中分离纯化出了能裂解致仔猪痢疾沙门氏菌的特异性噬菌体。在整个试验过程中,要严防杂菌污染,否则就可能分离出非目的噬菌体。另外,在纯化试验中发现,噬菌体侵染细菌需要一定的外界条件,其中宿主细菌的生理状态对噬菌体的侵染能力影响较大,在 37 ℃恒温培养箱中进行双层平板培养时,12 h 之前噬菌斑长势一般较好,而这个时期正是宿主菌的快速分裂期,12 h 后双层平板上的噬菌斑不再扩展,噬菌体基本失去侵染力,而此时宿主菌基本处于稳定期,这充分说明噬菌体对宿主菌的侵染能力与宿主菌的生理状态有关。此外,如果噬菌体滤液稀释倍数过低,会导致噬菌斑过密以至于细菌全部被蚕食而无法形成噬菌斑,本试验中将滤液稀释到 10^{-6} 的效果较好。

噬菌体普遍存在于大自然中,它只攻击细菌,具有较强的宿主特异性,能高效特异地杀死病原菌,而对动植物细胞没有任何影响。噬菌体能生长于生物体表面,表明噬菌体制剂能用于体表及环境消毒[13]。噬菌体可在动物体内定植[14-15],表明噬菌体制剂也可用于细菌性感染的治疗。Sanders[16] 发现,噬菌体还可应用于酸奶的生产中。

噬菌体来源广泛,其制剂生产流程简单、生产周期短、见效快、无毒副作用、安全性好,具有较好的经济效益、社会效益及应用前景。而目前研究仅仅停留在实验室内的小剂量试验,一旦将之应用到实际生产中,就会出现诸如产品保存、大剂量使用、使用方法等一系列问题,这些问题还有待更深入的研究。

[参考文献]

[1] Sulakvelidze A, Kutter E. Bacteriophage therapy in humans [M]// Kutter E, Sulakvelidze A. Bacteriophages: Biology and applications. Boca Raton, USA: CRC Press, 2005: 381-436.

[2] Kutter E. Phage therapy: Bacteriophages as natural, self-limiting antibiotics [M]//Pizzorno J E, murray M T. Natural medicine. London, UK: Churchill Livingstone, 2005: 1147-1161.

[3] Boyd E F, Brussow H. Common themes among bacteriophage-encoded virulence factors and diversity among the bacteriophages involved [J]. Trends Microbiol, 2002, 10: 521-529.

[4] Rohwer F, Edwards R. The phage proteomic tree: A genome-based taxonomy for phage [J]. Bacteriol, 2002, 184: 4529-4535.

[5] Smith H W, Huggins M B. Effectiveness of phage in treating experimental *Escherichia coli* diarrhoea in calves, piglets and lambs [J]. Gen Microbiol, 1983, 129: 2659-2675.

[6] Bull J J, Levin B R, DeRouin T, et al. Dynamics of success and failure in phage and antibiotic therapy in experimental infections [J]. BMC Microbiol, 2002, 2: 35.

(下转第 10 页)