

应用噬菌体 GH15 和 K 治疗金黄色葡萄球菌感染

刘晓贺, 顾敬敏, 韩文瑜*, 李跃, 韩东, 张庆明, 路荣, 宋军, 冯新, 雷连成

吉林大学畜牧兽医学院, 长春 130062

摘要: 【目的】研究金黄色葡萄球菌噬菌体 GH15 和 K 的生物学特性及联合用于治疗金黄色葡萄球菌感染的潜力。【方法】通过透射电镜观察噬菌体 GH15 和 K 的形态;测定二者的裂解谱和一步生长曲线;通过体外裂解实验和体内治疗实验分别测定单独使用 GH15、K 及二者混合使用时的裂解能力和对菌血症小鼠的保护效果。【结果】通过电镜观察发现两个噬菌体的外形相似,但 GH15 的尾部比 K 的长。GH15 裂解谱较宽,可以裂解 28 株金葡菌,而 K 仅能裂解 7 株金葡菌。通过对两株噬菌体感染 7 株共同宿主菌形成的一步生长曲线进行拟合曲线分析,表明二者对不同宿主菌的增殖趋势是不同的。在体外,混合噬菌体与单个噬菌体的抑菌活性无明显差别;在体内实验中,混合噬菌体表现出优于单个噬菌体的治疗效果,用较低的剂量即可以达到高剂量单个噬菌体的治疗效果。【结论】GH15 和 K 所形成的混合噬菌体在治疗金黄色葡萄球菌感染具有更大的应用潜力。

关键词: 噬菌体, 多重耐药金黄色葡萄球菌, 鸡尾酒疗法

中图分类号: R37 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2013)05-0498-09

金黄色葡萄球菌(金葡菌)是一种常见的病原菌,可以引起多种感染性疾病^[1]。由于近几年金葡菌感染几率的增加以及多重耐药菌的出现,使该菌引起感染的治疗变得越来越困难。尤其是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)的出现,除了万古霉素以外,几乎对所有常用的抗生素都表现耐药^[2]。因此,迫切需要研发能够有效治疗这种多重耐药菌引起感染的新型药物。

噬菌体以细菌作为宿主,可以特异性的杀灭相应的宿主菌,因此噬菌体是一种很有潜力的新型治疗制剂^[3]。虽然在早期阶段抗生素的问世严重影响了噬菌体疗法的发展,但是由于目前在全球范围

内抗生素滥用导致的耐药性菌株不断增加,使人们开始重新审视对噬菌体的研究,许多研究人员展开了利用噬菌体来杀灭病原细菌以治疗感染的研究,并取得了可喜的成果^[4-6]。除了直接利用噬菌体来杀灭病原性细菌以外,还有研究人员利用噬菌体来提高抗生素对耐药菌的抑制能力。Timothy Lu 和 James Collins 等利用噬菌体处理耐喹诺酮类大肠杆菌,从而向细菌中插入一段基因,达到阻碍细菌对喹诺酮类抗生素造成的核酸损伤的修复作用,使抗生素的作用提高了将近一万倍^[7];Udi Qimron 等通过利用噬菌体,使得耐药的大肠杆菌重新恢复了对链霉素和萘啶酸的敏感性^[8]。

高度的特异性是制约噬菌体治疗细菌感染的一

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(31130072)

* 通信作者。Tel: +86-431-87836001; E-mail: hanwy@jlu.edu.cn

作者简介: 刘晓贺(1987-),女,辽宁鞍山人,硕士研究生,主要从事微生物与免疫学方面的研究。E-mail: 148038953@qq.com

收稿日期: 2012-10-31; **修回日期:** 2013-01-10

个主要因素,而混合噬菌体可以有效的“拓宽”裂解谱,从而在很大程度上提高噬菌体的可应用性^[9]。本实验室前期分离得到一株金黄色葡萄球菌的烈性噬菌体,命名为 GH15,测序结果表明 GH15 是一株没有致病因子及溶原性相关蛋白的噬菌体^[10]。GH15 与已报道的 K 噬菌体在基因组水平上显示出很高的同源性,并且 K 噬菌体具有很广的宿主范围^[11-12]。本文对 GH15 和 K 的生物学特性进行比较,并对 GH15 噬菌体和 K 噬菌体联合应用治疗金黄色葡萄球菌感染的潜力进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 噬菌体株和菌株: GH15 噬菌体由本实验室分离获得,其宿主菌为 MRSA 菌株 W3275^[13]。K 噬菌体购买自美国典型培养物保藏中心(ATCC),其宿主菌为金黄色葡萄球菌 19685。临床分离及购买的金黄色葡萄球菌菌株共 55 株,其中 25 株为 MRSA,30 株为 MSSA,所有的菌株都于 37℃ 条件下在 BHI 液体培养基中以 200r/min 振荡培养 16 - 18 h。

1.1.2 主要仪器和试剂: Hitachi H7650 透射电子显微镜(TEM, Hitachi Co. Ltd., Tokyo, Japan); DHP-120 恒温培养箱,上海实验仪器总厂;HZQ-C 空气浴振荡器,哈尔滨市东明医疗仪器厂;低温台式离心机,德国 Thermo;超速离心机,德国 SORVALL;分光光度计,德国 Eppendorf;0.22 μm 水系滤膜,美国 PALL;BHI 培养基,购自上海博耀生物科技有限公司;PEG8000、磷钨酸和 CsCl 购自 Sigma 公司;其它试剂均为国产或进口分析纯。

1.2 噬菌体制备

将 GH15 和 K 噬菌体分别加入到培养到对数生长早期的 W3275 和 19685 培养液中,直至将金葡菌裂解完全。然后对裂解液进行离心(10000 × g, 30 min),并使用 0.22 微米孔径的滤器过滤上清液,储存于 4℃ 备用。

1.3 透射电子显微镜观察

噬菌体的裂解液经 PEG8000 沉淀后进行 CsCl 密度梯度离心^[14]。将纯化的噬菌体样品滴于铜网上,自然沉淀 15 min,利用 2% 的磷钨酸(PTA)对噬菌体进行染色,用透射电子显微镜进行观察。

1.4 噬菌体的宿主谱、最佳 MOI 和一步生长曲线的测定

使用双层琼脂平板法测定噬菌体的宿主范围^[15]。GH15 和 K 的共同宿主菌株生长至早期对数期,然后调节到菌株浓度约 1×10^7 CFU/mL。细菌与噬菌体在 MOI 为 0.001、0.01、0.1、1、10、100 时,分别于 37℃ 下孵育振荡培养 8 h,测定噬菌体的滴度。处于对数生长中期的宿主菌经过离心后悬于新鲜的 BHI 培养基中,将噬菌体以最佳 MOI 的比例侵染宿主菌,在 4℃ 孵育 15 min 后再次离心,将细菌的沉淀物用新鲜的 BHI 悬起后置于 37℃ 振荡培养,每隔 5 min 取一次样品,测定其噬菌体的滴度。

1.5 噬菌体对金葡菌体外裂解活性测定

混合噬菌体由等量的 GH15 和 K 混合而成,当宿主菌在早期对数生长期时,分别将噬菌体 GH15、K 及二者的混合液在 MOI 分别为 0.1 时加入宿主菌培养液中,测定 OD_{600} 的变化。

1.6 小鼠体内治疗实验

1.6.1 最小致死量 MLD: 每个实验组 10 只小鼠,共设 4 个实验组,选用雌性 BALB/c 小鼠(20 - 22 克)。每个实验组分别腹腔注射不同剂量的共同宿主菌 W4661 (2×10^7 ; 2×10^8 ; 2×10^9 和 2×10^{10} CFU/只小鼠;W4661 对甲氧西林敏感,属于 MSSA,但对其它常用的多种抗生素均耐药),对照组注射同等剂量的生理盐水,重复 3 次。定期观察小鼠的死亡个数,将导致一组小鼠全部死亡的最小剂量定为最小致死量(MLD)^[16]。当 MLD 确定后,以 $2 \times$ MLD 作为小鼠的感染剂量。

1.6.2 噬菌体治疗效果测定: 测定感染 W4661 后小鼠血液中的菌量变化,当小鼠血液内菌含量达到 10^5 CFU 以上时,开始注射不同的噬菌体(单独 GH15、单独 K、GH15 与 K 的混合液)进行治疗,剂量分别为 2×10^5 、 2×10^6 、 2×10^7 、 2×10^8 和 2×10^9 PFU/只,每个剂量组均为 10 只小鼠。噬菌体对感染小鼠的治疗效果用生存率(%)来表示,进行 3 次重复。另外对噬菌体治疗后小鼠血液内菌含量的情况进行了测定。

1.7 统计分析

统计学分析均使用 13.0 版本的 SPSS 统计软件(SPSS 公司,芝加哥,IL)。小鼠的生存曲线采用 Kaplan-Meier 方法进行统计分析,将 $P < 0.01$ 认为显著差异。

2 结果

2.1 GH15 与 K 噬菌体生物学特性比较

通过电镜观察发现噬菌体 GH15 和 K 在形态上有很大的相似(图 1)。两株噬菌体的头部直径均为 65 ± 5 nm,噬菌体的头部及可收缩的尾鞘均通过颈部连接。但是可以发现它们的尾部长度有明显不同。当尾部没有收缩时,K 噬菌体的尾部为 210 ± 5 nm,比 GH15 噬菌体的尾部(170 ± 5 nm)要长很多。当尾部处于收缩状态时,GH15 尾部和刺突的长度分别为 80 nm 和 40 nm,而此时 K 噬菌体的尾部和刺突则分别为 120 nm 和 60 nm。

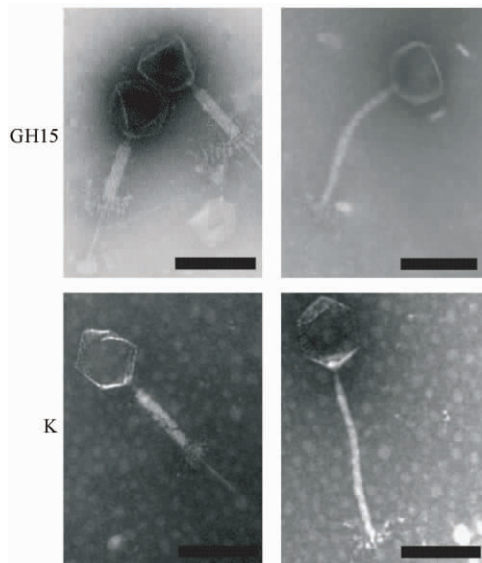


图 1. 透射电子显微镜下噬菌体 GH15 和 K 的形态

Figure 1. The morphologies of phage GH15 and K as revealed by transmission electron micrographs (The bars represent 100 nm).

裂解谱测定实验表明 GH15 的宿主谱要比 K 噬菌体宽,GH15 噬菌体能够裂解 16 株 MRSA (64%),同时还可以裂解 12 株 MSSA (40%)。相比之下,K 噬菌体所表现的宿主谱要窄很多,只能裂解其中的 7 株金葡菌,分别为 19685、ATCC19685、ATCC25923、USA300、J-2、W-1 和 W4661。并且,对 K 噬菌体敏感的这 7 株菌株完全包含于 GH15 的宿主谱之内。噬斑形成实验表明 GH15 和 K 分别侵染相同的宿主菌时,在平板上所形成的噬菌斑的直径和形态有明显不同,GH15 噬菌体侵染所产生的噬菌斑的直径大于 K 噬菌体侵染所产生的,并且形成的噬菌斑比 K 噬菌体的要透亮。噬菌斑形成早期,

两种噬菌体形成的噬菌斑都为澄清、边缘整齐的斑,随着时间的延长,噬菌斑变大并且边缘产生晕环。

MOI 测定实验表明 GH15 和 K 噬菌体对大多共同宿主菌的最佳 MOI 有所不同。以 MOI = 0.01 进行一步生长曲线的测定。结果显示,GH15 和 K 噬菌体的潜伏期均为 25min, GH15 的释放量为 105 pfu, K 的释放量为 115 pfu。为了更好的揭示两个噬菌体的生长趋势,我们绘制了一步生长曲线的拟合曲线。如图 2 所示,除了 J-2 和 W4661, GH15 和 K 噬菌体侵染同一种细菌的一步生长曲线的趋势是不同的。

2.2 单个噬菌体与混合噬菌体对金黄色葡萄球菌的体外裂解活性的比较

将噬菌体加入细菌培养液,最初一段时间内培养液的 OD_{600} 依然保持着升高的趋势,经过 20 - 30min,随着细菌的崩解,培养液的 OD_{600} 开始逐渐下降,最后变澄清。从图 3 可以看出,对于 19685、25923、USA300 及 W-1, GH15 的裂解效率要高于 K 噬菌体。而对于 26003、J-1 和 W4661, GH15 和 K 噬菌体的裂解效率没有明显差别。另外,当把 GH15 和 K 噬菌体混合进行应用时,除了 19685 和 25923 以外,其它 5 株共同宿主菌与混合噬菌体作用时的 OD_{600} 变化与单独一种噬菌体作用时的变化无明显差别。

2.3 体内治疗效果比较

用 3×10^9 cfu 和 3×10^{10} cfu 的 W4661 腹腔感染小鼠时可以在 3 d 内使小鼠的死亡率达到 100%,而当腹腔注射 2×10^8 cfu 的 W4661 时,小鼠的死亡率为 80%。因此,可以确定 W4661 的 MLD 为 3×10^9 cfu ($P < 0.01$)。以 2 × MLD 作为攻毒剂量,攻毒后 1 h,血液内细菌含量 $> 2 \times 10^5$ cfu,达到菌血症状态,此时小鼠表现出嗜睡,卷曲等症状。

在攻毒后 1 h 腹腔注射不同剂量的 GH15、K 或二者的混合液。从图 4 可以看到,噬菌体治疗呈现剂量依赖性,当我们给予 5×10^7 pfu 的 GH15、 5×10^8 pfu 的 K 和 5×10^6 pfu 的混合噬菌体时,可以使对小鼠感染模型的存活率达到 100%。作为对照,应用缓冲液对感染模型进行治疗,未发现保护作用,3 d 内所有小鼠均死亡。而当我们分别单独给予 5×10^6 pfu 的 GH15 或者 K 噬菌体时,小鼠的存活率分别为 80% 和 20%。将混合噬菌体进行加热失活处理,然后对感染小鼠进行治疗,确未发现保护作用。

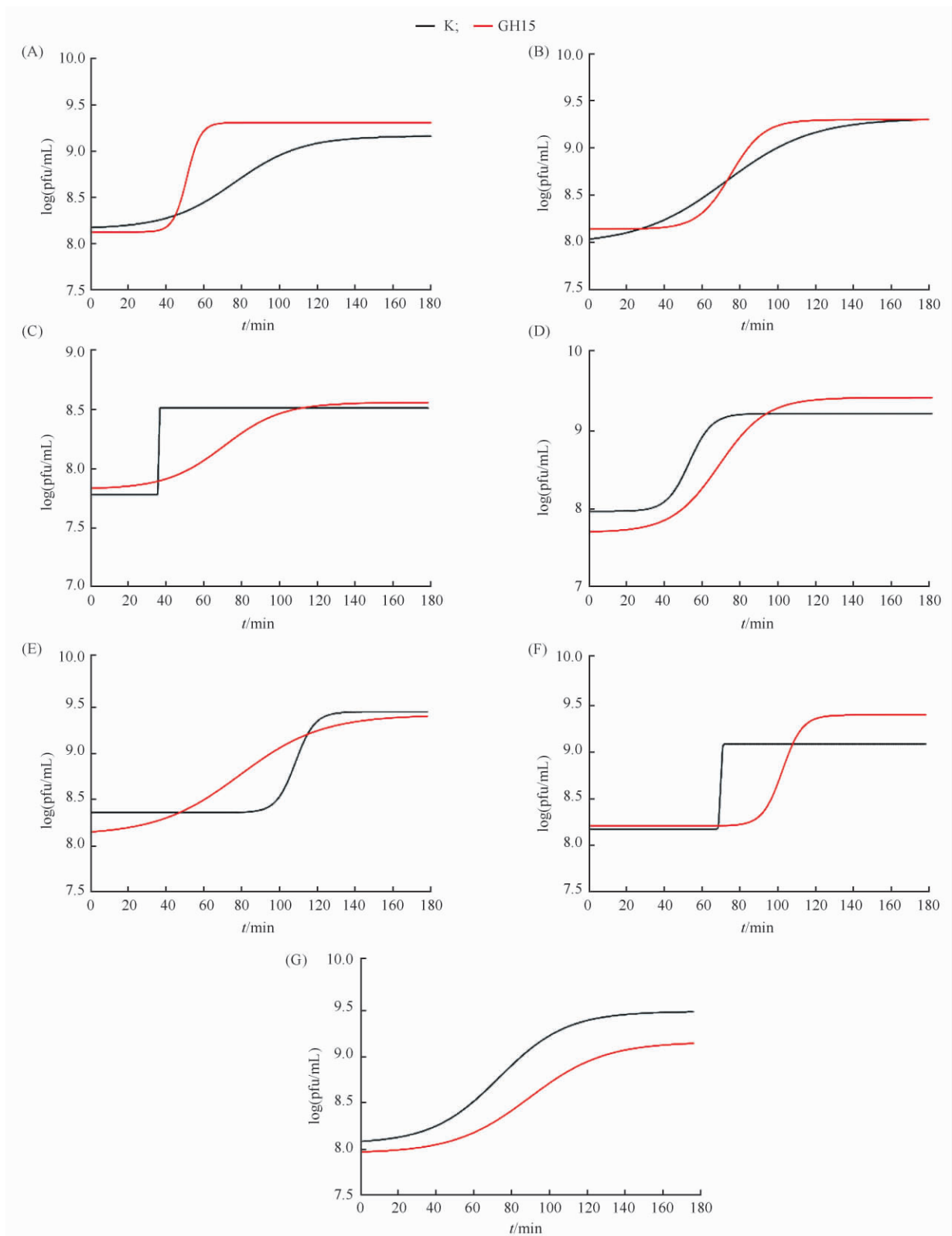


图 2. 噬菌体 GH15 和 K 侵染共同宿主菌形成的一步生长曲线的拟合曲线分析

Figure 2. The nonlinear fit curve of one-step growth curve of phage GH15 and K. A: 19685; B: 25923; C: 26003; D: J-2; E: USA300; F: W1; G: W4661.

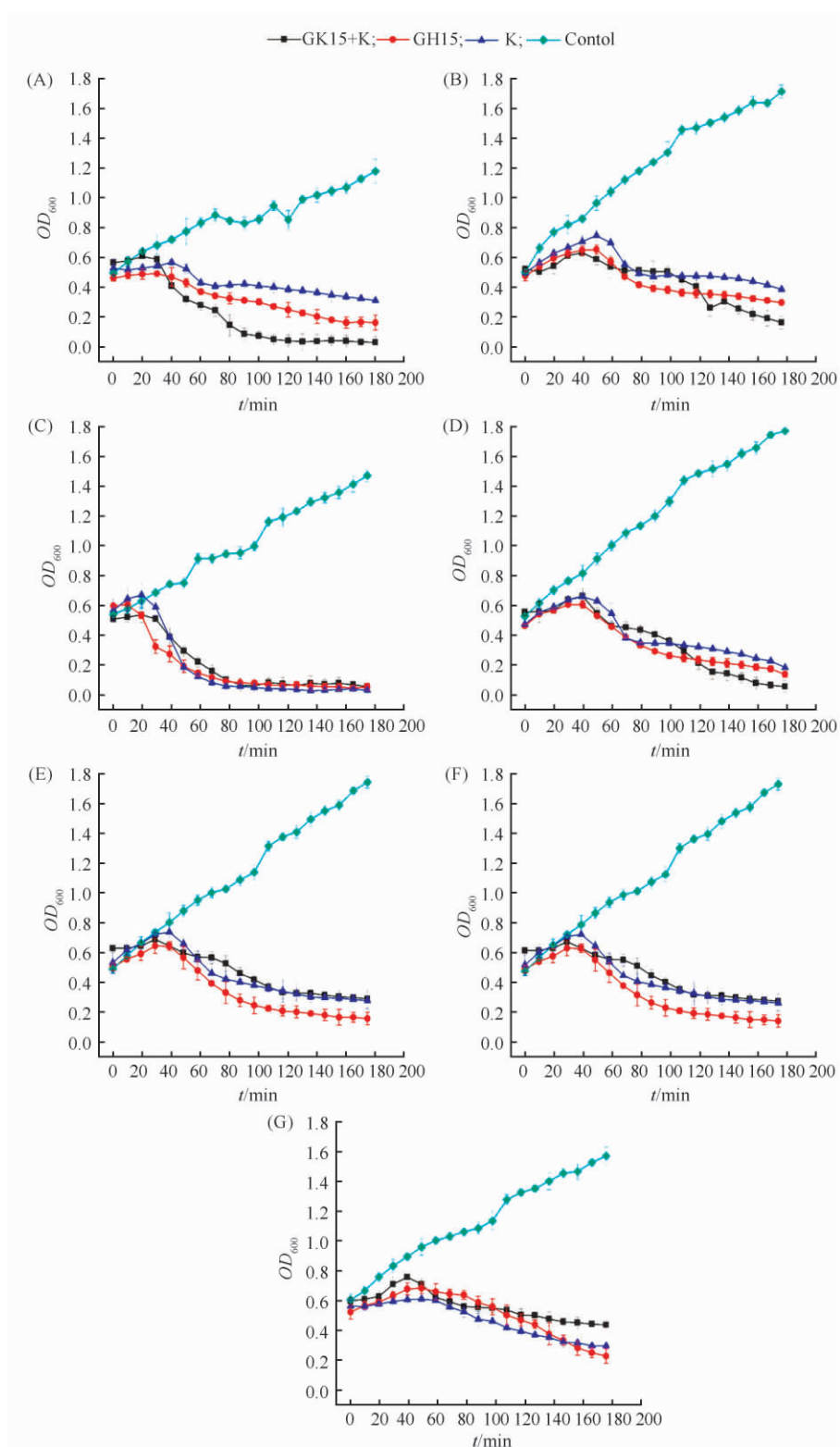


图 3. 噬菌体在体外对共同宿主菌的裂解活性

Figure 3. Lytic activity of the phages on the common host strains in vitro. A: 19685; B: 25923; C: 26003; D: J-2; E: USA300; F: W1; G: W4661.

用。在攻菌后使用 5×10^7 pfu 的 GH15、 5×10^8 pfu 的 K 和 5×10^6 pfu 的混合噬菌体进行治疗时,同时测定了小鼠血液内菌含量的变化(以缓冲液作为空白对照),发现这 3 个噬菌体治疗组中的小鼠血液内菌含量均得到了明显的降低(如图 5),尤其是混

合噬菌体组,其效果要优于单独噬菌体治疗组,而空白对照组的小鼠血液内菌含量呈快速升高,直至死亡。另外,我们单独将 5×10^{11} pfu 的混合噬菌体腹腔注射到小鼠体内,以腹腔注射等体积的缓冲液作为对照,经过长期观察,小鼠均未发生明显异常。

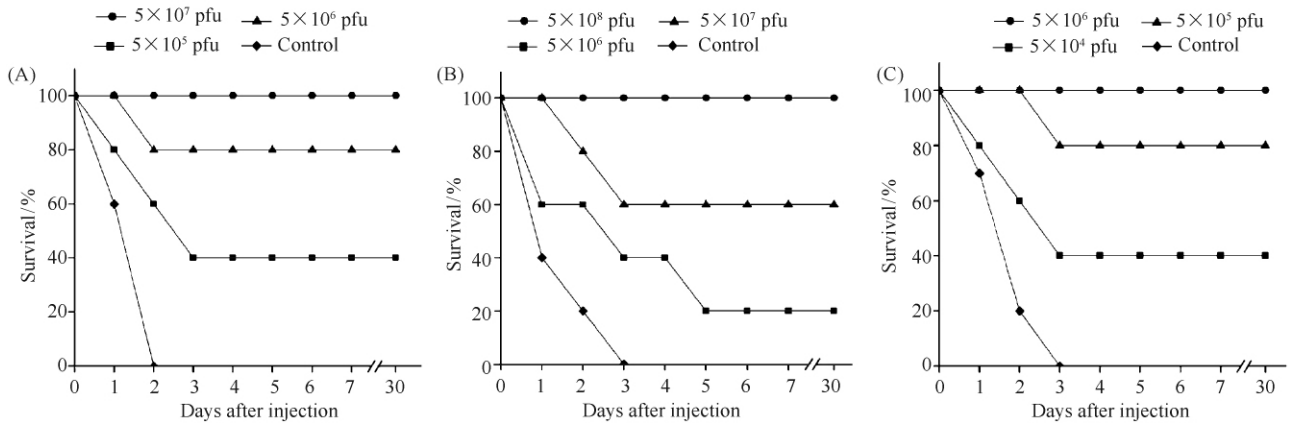


图 4. 噬菌体对感染 W4661 小鼠的保护作用

Figure 4. Rescue of mice from lethal W4661 infection by phages. Mice were inoculated i. p. with $2 \times \text{MLD}$ W4661. One hour later, (A) 5×10^7 pfu of GH15 (black circles), 5×10^6 pfu of GH15 (black triangles), or 5×10^5 pfu of GH15 (black squares) were injected into the mouse peritoneal cavity; (B) 5×10^8 pfu of K (black circles), 5×10^7 pfu of K (black triangles), or 5×10^6 pfu of K (black squares) were injected into the mouse peritoneal cavity; (C) 5×10^6 pfu of cocktail (black circles), 5×10^5 pfu of cocktail (black triangles), or 5×10^4 pfu of cocktail (black squares) were injected into the mouse peritoneal cavity. Control mice (black diamonds) were treated with elution buffer under the same conditions. Each symbol represents the average of three experiments.

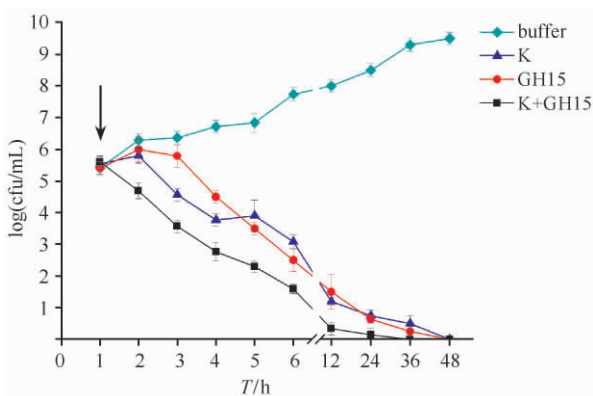


图 5. 治疗后小鼠体内菌量测定

Figure 5. The colony count of blood samples at regular intervals. Mice were inoculated i. p. with $2 \times \text{MLD}$ W4661. One hour later, 5×10^8 pfu phage K, 5×10^7 pfu phage GH15, 5×10^6 pfu phage cocktail and buffer were injected into the mouse peritoneal cavity. The arrow indicates the moment at which the lysis or elution buffer was injected (1 h after challenge). At the indicated times, bacterial counts (cfu/mL) in mice were determined from peripheral blood samples taken from the caudal vein.

3 讨论

GH15 与 K 噬菌体侵染同一株宿主菌时所形成的噬菌斑不相同。噬菌斑的形态是噬菌体的一种固有特性,就像不同的菌株会形成不同大小的菌落^[17]。噬菌斑周围的环形圆晕表明该噬菌体在侵染相应宿主菌时可以产生解聚酶,而这种酶可以帮助噬菌体降解掉细菌形成的荚膜^[18],促进噬菌体扩散到生物膜内部以达到细菌上的作用靶位^[19],可以增加噬菌体作为治疗制剂的潜力。

据国外报道,K 噬菌体是一株高效的、宿主范围很广的金黄色葡萄球菌噬菌体^[11-12]。然而在本研究中,噬菌体 K 对测试菌株表现出了比较窄的宿主谱。所得结果的差异性可能与噬菌体的地域性和特异性有关^[20]。本研究中所使用的 GH15 以及大多数金黄色葡萄球菌菌株是在中国的长春分离得到的。而噬菌体 K 购买于 ATCC,其分离地点距离大多数的检测菌株比较远(确切位置无法得知,但不

在亚洲),由于缺少接触,因此表现出不敏感性。

这两株噬菌体均表现出对金黄色葡萄球菌裂解作用的高效性和广谱性。GH15 和 K 都具有很高的释放量,显示了它们高效的感染效率。两个噬菌体的裂解谱都很宽,但是宿主范围交集却很小,有较大的差异性。正因为如此, GH15 和 K 噬菌体的混合应用就可以覆盖更广的宿主范围,从而提高其可应用性^[21]。噬菌体的尾丝蛋白决定着其细菌特异性^[22-24], GH15 和 K 具有共同的宿主菌株,且它们的尾部相关蛋白彼此间具有极高的同源性^[18]。因此所有可被 GH15 感染的菌株也应该可以被 K 识别。然而,有一些金黄色葡萄球菌只能被 GH15 感染,而对 K 不敏感。所以这可能是因为 K 虽然能识别 GH15 特异性菌株的细胞壁受体,但不能在这些菌株中进行有效增殖,也不能裂解这些菌株。造成这一现象的原因可能有两个:第一, GH15 特异性宿主菌株可以在发生有效感染之前破坏 K 噬菌体的基因组;第二, K 不能利用这些金黄色葡萄球菌的转录和翻译系统^[25]。实际上, K 的基因组中存在着一个 5'-GGTCC-3'位点,可以被金黄色葡萄球菌内的位点特异性核酸内切酶切断^[26]。但这个位点及其相关限制位点在 GH15 的基因组中并不存在^[10]。宿主范围的不同可以确保 GH15 和 K 能够作为一种更合理、有效的混合制剂。

体外实验表明, GH15 和 K 的混合使用对 19685 和 25923 菌株的抑制能力比任何一种单独使用的噬菌体都要强。对于其他常见的菌株,它们也显示出了同等水平的抑制能力。从体内实验来看,混合噬菌体对小鼠致死性感染表现出了比任何单个噬菌体更有效的保护作用。单次小剂量注射混合噬菌体即足以有效的保护感染致死剂量 MRSA 的小鼠,这显示 GH15 和 K 很可能在杀灭体内感染菌株的过程中存在着协同效应^[27]。另外,有报道称两个噬菌体同时应用时,其裂解阈值比单个噬菌体的要低^[28],低剂量的混合噬菌体就可以得到快速的增殖,直接导致小鼠体内菌含量的快速下降。达到由于可能会而对混合噬菌体进行热灭活处理后,这种保护作用就消失了,这说明对感染小鼠的保护作用是由于噬菌体对体内金黄色葡萄球菌的裂解作用产生的,而不是由特异性免疫效应产生的。

利用噬菌体对病原细菌引起的感染进行治疗的研究很早就有报道,然而制约其应用的一个关键因

素就是噬菌体的裂解谱窄。本研究通过将两株烈性噬菌体混合使用,大大的增宽裂解谱,从而增强噬菌体治疗应用的可行性。另外,通过实验的比较,混合应用噬菌体的效果要明显优于单个噬菌体的使用效果。因此,混合噬菌体的应用在治疗多重耐药性金黄色葡萄球菌引起的感染上具有更大的潜力。

参考文献

- [1] Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. *New England Journal of Medicine*, 1998, 339 (8) :520-532.
- [2] Miller LG, Perdreaux-Remington F, Rieg G, Mehdi S, Perlroth J, Bayer AS, Tang AW, Phung TO, Spellberg B. Necrotizing fasciitis caused by community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Los Angeles. *New England Journal of Medicine*, 2005, 352 (14) :1445-1453.
- [3] Hudson JA, Billington C, Carey-Smith G, Greening G. Bacteriophages as biocontrol agents in food. *Journal of Food Protection*, 2005, 68 (2) :426-437.
- [4] Breithaupt H. The new antibiotics. *Nature Biotechnology*, 1999, 17 (12) :1165-1169.
- [5] Fischetti VA. Phage antibacterials make a comeback. *Nature Biotechnology*, 2001, 19 (8) :734-735.
- [6] Merrill CR, Scholl D, Adhya SL. The prospect for bacteriophage therapy in Western medicine. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2003, 2 (6) :489-497.
- [7] Timothy KL, James JC. Engineered bacteriophage targeting gene networks as adjuvants for antibiotic therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2009, 106 (12) : 4629-4634.
- [8] Rotem E, Nir F, Shahar MM, Udi Q. Reversing Bacterial Resistance to Antibiotics by Phage-Mediated Delivery of Dominant Sensitive Genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78 (3) : 744-751.
- [9] Lauren G. Turning a new phage. *Nature Medicine*, 2012, 18 (9) :1318-20.
- [10] Gu J, Liu X, Lu R, Li Y, Song J, Lei L, Sun C, Feng X, Du C, Yu H, Yang Y, Han W. Complete Genome Sequence of *Staphylococcus aureus* Bacteriophage GH15. *Journal of Virology*, 2012, 86 (16) :8914-8915.
- [11] O'Flaherty S, Coffey A, Meaney W, Fitzgerald GF, Ross RP. The recombinant phage lysin LysK has a broad spectrum of lytic activity against clinically relevant staphylococci, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187 (20) :7161-7164.

- [12] O'Flaherty S, Ross RP, Meaney W, Fitzgerald GF, Elbreki MF, Coffey A. Potential of the polyvalent anti-Staphylococcus bacteriophage K for control of antibiotic-resistant staphylococci from hospitals. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71 (4) :1836-1842.
- [13] Gu J, Xu W, Lei L, Huang J, Feng X, Sun C, Du C, Zuo J, Li Y, Du T, Li L, Han W. LysGH15, a novel bacteriophage lysin, protects a murine bacteremia model efficiently against lethal methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 2011, 49 (1) :111-117.
- [14] Matsuzaki S, Yasuda M, Nishikawa H, Kuroda M, Ujihara T, Shuin T, Shen Y, Jin Z, Fujimoto S, Nasimuzzaman MD, Wakiguchi H, Sugihara S, Sugiura T, Koda S, Muraoka A, Imai S. Experimental protection of mice against lethal *Staphylococcus aureus* infection by novel bacteriophage phi MR11. *Journal of Infectious Diseases*, 2003, 187 (4) :613-624.
- [15] Ellis EL, Delbrück M. The Growth of Bacteriophage. *Journal of General Physiology*, 1939, 22 (3) :365-384.
- [16] Isabel J, Rubens L, Ernesto G, Asunción F, Julio C, Pedro G. Phage lytic enzymes as therapy for antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* infection in a murine sepsis model. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2003, 52 (6) :967-73.
- [17] Cox KL, Baltz RH. Restriction of bacteriophage plaque formation in *Streptomyces* spp. . *Journal of Bacteriology*, 1984, 159 (2) :499-504.
- [18] Verma V, Harjai K, Chhibber S. Characterization of a T7-like lytic bacteriophage of *Klebsiella pneumoniae* B5055: a potential therapeutic agent. *Current Microbiology*, 2009, 59 (3) :274-281.
- [19] Verma V, Harjai K, Chhibber S. Structural changes induced by a lytic bacteriophage make ciprofloxacin effective against older biofilm of *Klebsiella pneumoniae*. *Biofouling*, 2010, 26 (6) :729-737.
- [20] Pirisi A. Phage therapy—advantages over antibiotics? *Lancet*, 2000, 356 (9239) :1418.
- [21] Zhang J, Kraft BL, Pan Y, Wall SK, Saez AC, Ebner PD. Development of an anti-Salmonella phage cocktail with increased host range. *Foodborne Pathogens & Disease*, 2010, 7 (11) :1415-1419.
- [22] Clark JR, March JB. Bacteriophages and biotechnology: vaccines, gene therapy and antibacterials. *Trends in Biotechnology*, 2006, 24 (5) :212-218.
- [23] Hermoso JA, García JL, García P. Taking aim on bacterial pathogens: from phage therapy to enzybiotics. *Current Opinion in Microbiology*, 2007, 10 (5) :461-472.
- [24] Skurnik M, Strauch E. Phage therapy: facts and fiction. *International Journal of Medical Microbiology*, 2006, 296 (1) :5-14.
- [25] Martínez-Borra J, González S, López-Larrea C. The origin of the bacterial immune response. *Advances in Cirrhosis, Hyperammonemia, and Hepatic Encephalopathy*, 2012, 738: 1-13.
- [26] O'Flaherty S, Coffey A, Edwards R, Meaney W, Fitzgerald GF, Ross RP. Genome of staphylococcal phage K: a new lineage of Myoviridae infecting gram-positive bacteria with a low G + C content. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186 (9) :2862-2871.
- [27] Gu J, Liu X, Li Y, Han W, Lei L, Yang Y, Zhao H, Gao Y, Song J, Lu R, Sun C, Feng X. A method for generation phage cocktail with great therapeutic potential. *PLoS One*, 2012, 7 (3) :e31698.
- [28] Merrill CR, Biswas B, Carlton R, Jensen NC, Creed GJ, Zullo S, Adhya S. Long-circulating bacteriophage as antibacterial agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1996, 93 (8) :3188-3192.

Combination utility of phages GH15 and K against *Staphylococcus aureus*

Xiaohe Liu, Jingmin Gu, Wenyu Han*, Yue Li, Dong Han, Qingming Zhang, Rong Lu, Jun Song, Xin Feng, Liancheng Lei

College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China

Abstract: [Objective] In the present report, we compared the biological characteristic of staphylococci phage GH15 and K. We also determined the therapeutic potential of the combination utility of two phages. [Methods] The patterns of GH15 and K were detected using transmission electron microscopy. We also detected the host range and the one-step curve of phage GH15 and K. The lytic ability of mono-phage and phage cocktail was compared *in vitro*. Finally, the treatment effect of mono-phage and phage cocktail against lethal methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection in mice was detected. [Results] The length of GH15 tail was longer than that of K either in the state of contraction or noncontraction. GH15 had broader host range than K whereas both possess 7 common host strains. Although the phage cocktail had equivalent bactericidal capacity with mono-phage to most common host strains, the phage cocktail manifested more effective protection against lethal W4661 infection in mice than any mono-phage. A single smaller dose injection of phage cocktail was sufficient to protect mice effectively from fatal infection. [Conclusion] Our results provide strong evidence towards the therapeutic use of phage cocktail as an alternative to antibiotics for acute infection caused by multi-drug resistant *Staphylococcus aureus*.

Keywords: phage therapy, multi-drug resistant *Staphylococcus aureus*, cocktail

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31130072)

* Corresponding author. Tel: +86-431-87836001; E-mail: hanwy@jlu.edu.cn

Received: 31 October 2012/ Revised: 10 January 2013

系统发育树的构建方法

构建系统树是为了鉴定菌株的分类学地位,应该使用正确的方法构建。具体要求如下:

1. 将鉴定菌的 16S rRNA 序列递交 GenBank,用 Blast 软件搜索相似的 16S rRNA,然后一起构树。
2. 采用能反应分支长度的软件(如 NJ 法),并用 Bootstrap 值分析分支聚类的稳定性。
3. 用国际较为通用的一些建树方法,如 Neighbour - Joining 等,这样结果就更为可靠,更直观。
4. 请严格按照下列具体要求写作 [参见:微生物学报,2004,44(2):143.]

① 系统树中:菌名应列出全称,且属和种名应斜体,名称后再加括号,其内含序列号。

② 图注(本刊的图注要求用英文写作):应标明“树”上所有的内容,包括:括号中的序号、分支点上的数字涵义、0.01 代表的意义。

③ 作图要求:要求达到印刷清晰,字体为“Time New Roman”,字号为“8p”。可以选用两种方式——(A)文件格式为“*.Tif”,分辨率为 600 线;(B)文件格式为“word”,画出树,输入文字。