

## 阪崎肠杆菌噬菌体的分离及其生物学特性

赵贵明, 仇庆文, 姚李四, 陈颖

(中国检验检疫科学研究院, 北京 100123)

**摘要:** 【目的】以阪崎肠杆菌模式菌株及分离菌株为指示菌, 从污水中分离出该菌噬菌体, 并对其基本生物学特性进行研究。【方法】以双层琼脂法从污水中分离噬菌体, 通过同属和同科参考菌株测定噬菌体的特异性和宿主谱; 电镜观察噬菌体颗粒形态; 随机扩增多态性 DNA(RAPD)实验分析噬菌体的分子生物学特性。【结果】从污水中分离得到 5 株噬菌体, 表现出较窄的宿主范围, 仅裂解阪崎肠杆菌, 以 ATCC 51329 分离的噬菌体 SK2 可裂解 27 株阪崎肠杆菌中的 24 株 (89%), 负染经电镜观察, 5 株噬菌体都是由多面体头部和尾部组成; 随机引物(5'-GAAACGGGTG-3')扩增 DNA 分析, 5 株噬菌体 DNA 明显不同。【结论】分离出的 5 株噬菌体仅对阪崎肠杆菌敏感, 在阪崎肠杆菌的分型、预防、治疗、以及生态环境的净化等方面具有潜在用途。

**关键词:** 阪崎肠杆菌; 噬菌体

**中图分类号:** X172      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2008) 10-1373-05

近年来, 阪崎肠杆菌 (*Enterobacter sakazakii*) 通过婴幼儿配方奶粉引起新生儿发病、导致死亡而受到广泛关注<sup>[1]</sup>, 2002 国际食品微生物标准委员会将其定为威胁特殊人群生命或产生严重后遗症的食源性病原菌。该菌 1984 年前被称为产黄色素的阴沟肠杆菌, 之后重新划分为肠杆菌属的一个新种<sup>[2]</sup>。目前已从工厂加工环境、食品原料及多种食品中分离出阪崎肠杆菌<sup>[3, 4]</sup>, 为此, 各国食品安全管理部门、生产婴幼儿食品的企业对阪崎肠杆菌开始控制, 研究人员对其生物学特性、控制方法及溯源性方面开展研究。作为细菌病毒的噬菌体, 以其严格的宿主特异性, 应用于细菌的分型鉴定, 并逐步在应对多重耐药菌株、医学治疗和预防、食品加工卫生、建立新型畜牧和发酵工厂的消毒程序等方面开发其应用价值, 被认为是未来有效、安全的病原体治疗和生态环境净化生物制剂<sup>[5]</sup>。

尽管噬菌体的研究历史很长, 但对于阪崎肠杆菌噬菌体而言, 直到 2007 年才第一次报道, 也是目前

查到的仅有的一篇文章<sup>[6]</sup>。本文以 ATCC 标准菌株和分离菌株为指示菌, 从污水中分离得到对阪崎肠杆菌具有特异性的噬菌体, 并对噬菌体、噬斑形态、宿主范围、分子生物学特性等方面进行了研究。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 菌株:** 阪崎肠杆菌: ATCC29544, ATCC 29004, ATCC 12868, ATCC 51329; 阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)ATCC 13047, 产气肠杆菌(*Enterobacter aerogene*)ATCC 13048, 大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)ATCC 11775, 弗氏枸橼酸杆菌(*Citrobacter freundii*)ATCC 8090, 奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*)ATCC 10005, 产酸克雷伯氏菌(*Klebsiella oxytoca*)ATCC 43165, 肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)ATCC 4352, 来自美国典型菌种保藏中心 (American Type Culture Collection, ATCC)。其余 27 株阪崎肠杆菌 IQCC10403、IQCC10403.1-10403.26 为本实验室收集的从奶粉中分离菌株\*。ATCC

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划(2006BAD05A06-Z02); 国家自然科学基金资源共享平台(2005DKA21204)

作者简介: 赵贵明(1963-), 男, 山西人, 研究员, 学士, 从事食品微生物学检测技术研究。Tel: +86-10-85773355 转 2187; Fax: +86-10-85774634;

E-mail: zhaoguiming@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-04-24; 修回日期: 2008-06-13

29544、ATCC 51329、ATCC29004, 分离株 10403.7 和 10403-14 用于噬菌体的增殖。

**1.1.2 主要试剂和仪器:** 脑心浸液肉汤 (BHI), difco 公司; 胰酪胨大豆胨琼脂 (TSA), 营养琼脂, 北京陆桥技术有限责任公司生产。M-13 DNA 纯化试剂盒, 美国 promega 公司产品, 随机引物, 购自上海博亚生物技术有限公司。扩增设备为 GeneAmp PCR 9700PCR (ABI), 美国应用生物系统公司出品。

## 1.2 阪崎肠杆菌噬菌体分离及纯化培养

参照文献[6]的方法, 取北京市朝阳区高碑店河水样本, 经脱脂棉过滤除去杂质, 取 100 mL, 加入 1:100 稀释的阪崎肠杆菌普通营养肉汤 24 h 培养物 6 mL, 37°C 培养过夜。培养液经无菌滤器(0.22 μm 微孔滤膜)过滤除菌。取滤液 100 μL 滴加到制备噬菌体生长双层平板, 置 37°C 培养 3~4h 后观察噬菌斑。取双层平板上单个噬菌斑(透明、宽直径)的琼脂块加入 5 mL 营养肉汤中, 室温放置 1~2h 后 4°C 过夜, 次日取其 0.1 mL 加入 2 mL 肉汤培养基中, 再加 50 μL 相应宿主菌增菌液, 混合后室温放置 15 min, 37°C 培养过夜, 培养液经无菌滤器(0.22 μm 微孔滤膜)过滤, 将滤液分装 4°C 保存。滤液适当稀释后, 重复以上步骤至少 3 次, 即得到纯化的噬菌体。

## 1.3 噬菌体滴度测定

将噬菌体原种用液体培养基作 10 倍连续稀释后, 每稀释度取 10 μL, 加入到 0.2 mL 宿主菌增菌液中, 在双层平板测定噬斑滴度, 滴度(pfu/mL) = 密度适当的平板上的噬斑数 × 稀释倍数 × 100<sup>[7]</sup>, 通过观察形成噬菌斑的情况确定工作滴度 (Routine test dilution, RTD)。

## 1.4 特异性与裂解谱试验

将 27 株阪崎肠杆菌分离株和其他 7 种来自 ATCC 的肠杆菌科细菌参考菌株和分离菌株的工作菌株经 BHI 增菌后, 用无菌棉签沾取培养液涂布于营养琼脂, 将 10 μL 滴度为 10<sup>6</sup>~10<sup>9</sup> pfu/mL 的噬菌体滴在阪崎肠杆菌涂布区域, 37°C 培养 18~24h, 通过观察菌苔上是否形成噬菌斑测定噬菌体的宿主范围。

## 1.5 噬菌体的电子显微镜观察

挑取 3~4 个噬菌斑转接到约 400 μL, SM 的缓冲液中 (5.8 g NaCl, 2.0 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 50 mL 的 1 mol/L Tris (pH=7.5), 0.1 g 明胶, 于 1 L 去离子水中, 100 kPa 灭菌 15 min), 样品在室温下放置 1 h, 然后滴到碳质栅网上用乙酸双氧铀进行负染, 使用 Philips/ Tecnai12 透射电镜观察和拍照。

## 1.6 噬菌体分子生物学特性

按照使用说明用 M-13 DNA 提取试剂盒提取噬菌体 DNA。通过引物 5'-GAAACGGGTG-3' 对提取的噬菌体 DNA 进行随机扩增多态性(Random amplified polymorphic DNA, RAPD)实验分析, 比较扩增片段的大小, 初步得到分离噬菌体的分子生物学特性<sup>[8]</sup>。50 μL 反应液中含 25 μL 2 x PCR 混合液(Promega), 0.5 μmol (2 μL)引物, 1 μL 分离 DNA 作为模板, 22 μL 蒸馏水,。循环条件为: 94°C 5 min; 94°C 1 min, 37°C 1 min, 72°C 2 min, 40 个循环; 72°C 10 min。通过 2% 琼脂糖凝胶电泳检查扩增产物。首先检查 RAPD-PCR 选择的 10 个碱基长引物, 在所有反应中设阴性对照, 以确证扩增的可靠性。

## 2 结果

### 2.1 噬菌体的分离与确证

按照 1.6 方法操作, 有 5 份样品增殖物能使阪崎肠杆菌裂解或在其菌苔上产生单独噬菌斑, 产生裂解区域或噬菌斑的物质能够转接或纯化特性说明这些物质不是抗生素或细菌毒素。经随机扩增多态性 (RAPD) 分析, 表明它们为 5 株不同的噬菌体, 分别命名为 SK1、SK2、SK3、SK4 和 SK5, 图 1 为 5 株噬菌体随机扩增多态 DNA 结果。

5 株噬菌体的工作滴度 (RTD) 和每 mL 空斑形成单位 (PFU/mL): SK1 为 10<sup>-4</sup> 和 4.4×10<sup>10</sup>; SK2 为 10<sup>-2</sup> 和 1.58×10<sup>9</sup>; SK3 为 10<sup>-2</sup> 和 1.78×10<sup>7</sup>; SK4 为 10<sup>-2</sup> 和 2.12×10<sup>6</sup>; SK5 为 10<sup>-2</sup> 和 1.12×10<sup>6</sup>。

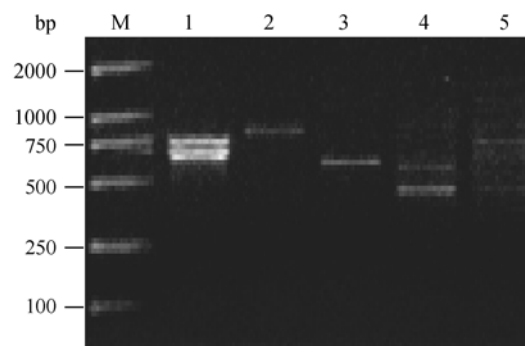


图 1 噬菌体 SK1, SK2, SK3, SK4 和 SK5 随机扩增多态 DNA 结果

Fig. 1 Fragments from five phage DNAs with RAPD. Gel showing lane 1, 2, 3, 4 and 5 are the fragments of phage SK5, SK4, SK3, SK2 and SK1 with RAPD. Lane M is marker.

## 2.2 噬菌体粒子形态

电镜照片显示(图2), 5株噬菌体均由多面体的

头部和尾部组成, 噬菌体头部较大, 尾部粗长, 5株噬菌体的整体形态相似, 大小略有差异。

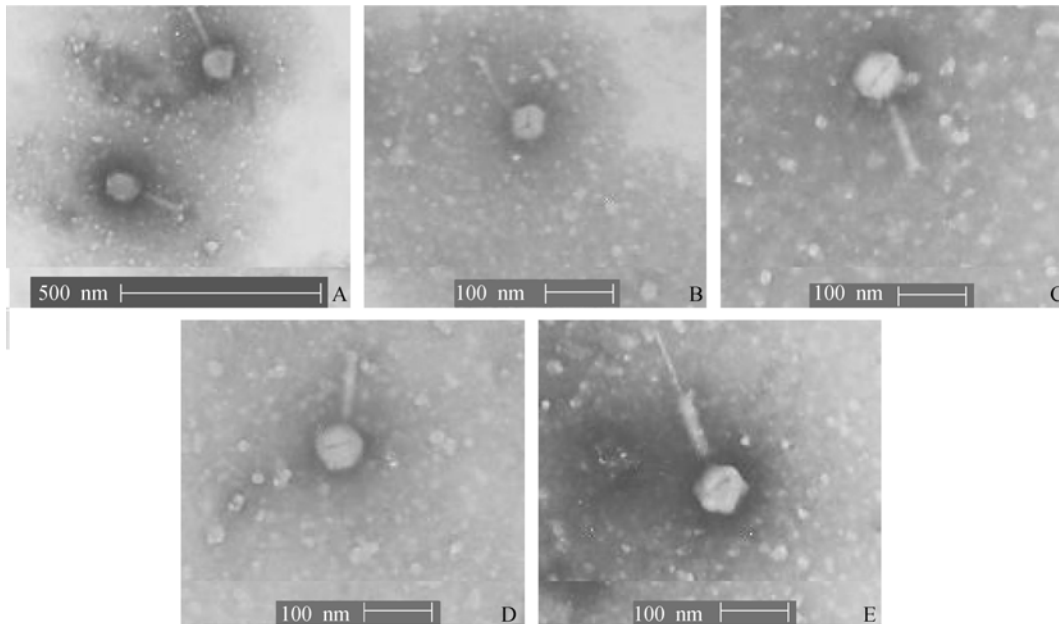


图2 五株噬菌体电镜照片

Fig. 2 Electron photomicrographs of five phages. The icosahedral head and rigid contractile tail are typical features of the *Myoviridae* family. A: SK1; B: SK2; C: SK3; D: SK4; E: SK5. Bar in picture A represents 250 nm, the others are 100 nm. All electron photomicrographs taken at 100,000 magnification with a Philips/Tecnai12 transmission electron microscope.

## 2.3 噬菌体生物学特性

**2.3.1 对 ATCC 参考菌株的易感性:** 分别测试了 5 株噬菌体对阪崎肠杆菌 ATCC, 29544, 29004, 12868 和 51329 的敏感性。SK1 仅仅对其分离菌株 ATCC 29544 敏感, 并表现出较高的滴度。根据 ATCC 的信息资料, 阪崎肠杆菌 ATCC 29544 也是用于 DNA 杂交的参考菌株。SK2, 对所有 4 株阪崎肠杆菌参考菌株敏感, 并具有较高滴度。值得注意的是, 其宿主 ATCC 12868 最初是作为阴沟肠杆菌被收集保藏的。SK3 除对其宿主 ATCC 29004 敏感外, 还对 ATCC 29544, 51329 表现出裂解活性。噬菌体 SK4 和 SK5 的指示菌为奶粉中分离的阪崎肠杆菌,

SK4 对 ATCC 的参考菌株均不敏感, 而 SK5 对 ATCC 的参考菌株产生混浊的噬菌斑(表1)。

**2.3.2 宿主范围:** 为准确评价噬菌体的裂解活性, 在测定宿主范围时, 采用纯化后的噬菌体的工作滴度即 RTD, 除 27 株阪崎肠杆菌外, 还使用了 7 株肠杆菌科其他参考菌株, 表 2 为裂解活性。

5 株噬菌体 SK1, SK2, SK3, SK4, 和 SK5 对非阪崎肠杆菌以外的 7 株肠杆菌科细菌不敏感。SK1 仅能裂解 27 株分离株中的 6 株 (22%), SK2 则能裂解 24 株 (89%), 是 5 株噬菌体中裂解范围最宽的噬菌体, SK5 也表现出较宽的裂解范围 (74%), 但

表 1 分离的噬菌体在阪崎肠杆菌菌苔上形成的空斑形态及其来源

Table 1 Isolated *E. sakazakii* phages: plaque morphology and source

Phages	Source	Plaque morphology on reference <i>E. sakazakii</i> from ATCC				
		29544	29004	12868	51329	
SK1	ATCC29544	Clinical species <sup>a</sup>	clear plaques	- <sup>b</sup>	-	-
SK2	ATCC51329	unknown	clear plaques	clear plaques	clear plaques	clear plaques
SK3	ATCC29004	Clinical species <sup>a</sup>	clear plaques	clear plaques	-	clear plaques
SK4	10403-7	Milk powder	-	-	-	-
SK5	10403-14	Milk powder	-	turbid plaques	-	turbid plaques

a: Information from ATCC. b: No plaque.

是其形态学特征不同于 SK2, 对于 SK2 而言, 63% 为完全裂解或融合性裂解 (confluent lysis, CL), 而 SK5, 63% 的裂解模式为不透明裂解 (opaque lysis, OL), 详见表 2。对 4 株 ATCC 参考菌株不敏感的噬菌体 SK4, 表现出较窄的裂解范围, 仅能裂解 27 株试验菌株中的 4 株, 而且, 只有 1 株为 CL 裂解。

表 2 噬菌体宿主范围

Table 2 Host ranges of phages specific to the *E. sakazakii*

Strain	SK1	SK2	SK3	SK4	SK5
<i>E. sakazakii</i>					
10403	-	CL	CL	-	OL
10403.1	-	OL	-	OL	OL
10403.2	-	CL	-	-	OL
10403.3	-	CL	OL	-	OL
10403.4	CL	CL	OL	-	OL
10403.5	-	OL	-	OL	OL
10403.6	-	-	-	OL	OL
10403.7	-	-	-	CL	OL
10403.8	-	CL	OL	-	OL
10403.9	-	OL	OL	-	-
10403.10	-	CL	OL	-	OL
10403.11	-	OL	-	-	OL
10403.12	-	CL	-	-	OL
10403.13	-	-	OL	-	-
10403.14	-	OL	-	-	CL
10403.15	-	CL	-	-	-
10403.16	-	OL	-	-	-
10403.17	CL	CL	CL	-	-
10403.18	-	CL	CL	-	OL
10403.19	-	CL	-	-	-
10403.20	-	CL	CL	-	OL
10403.21	OL	OL	OL	OL	OL
10403.22	-	CL	OL	-	OL
10403.23	-	CL	OL	-	-
10403.24	CL	CL	CL	-	CL
10403.25	OL	CL	-	OL	OL
10403.26	OL	CL	CL	OL	CL
<i>E. cloacae</i>	ATCC13047	-	-	-	-
<i>E. aerogene</i>	ATCC13048	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	ATCC11775	-	-	-	-
<i>C. freumdi</i>	ATCC8090	-	-	-	-
<i>P.mirabilis</i>	ATCC10005	-	-	-	-
<i>K oxytoca</i>	ATCC43165	-	-	-	-
<i>k.pneumoniae</i>	ATCC4352	-	-	-	-

“-”Not sensitive; “CL”confluent lysis; “OL”opaque lysis.

### 3 讨论

以来源于临床和环境标本、具有代表性的阪崎肠杆菌作为指示菌, 从污水中分离出的 5 株阪崎肠杆菌噬菌体, SK1、SK2、SK3、SK4 和 SK5, 在生物

学特性试验中, 表现出清晰的相同的种特异性, 但对同种菌株的易感程度却表现出宽窄不同的范围。

分离的阪崎肠杆菌噬菌体通过电子显微镜来观察, 所释放噬菌体的头部为 20 面体, 尾部为较粗长尾, 根据 2005 年国际病毒分类委员会第八次报告所提出的分类准则, 本研究所分离的 5 株噬菌体的形态较为符合肌尾噬菌体科(myoviridae)特征, 5 株噬菌体的核酸应为 dsDNA<sup>[9]</sup>。进一步通过 DNA 分析, 显示这些噬菌体具有不同的基因型, 不同的特征反映了阪崎肠杆菌的多样性。

肠杆菌科细菌的分类和命名在近年来一直在变化。阪崎肠杆菌最初被认为是产黄色素的阴沟肠杆菌。噬菌体 SK4 和 SK5 对阪崎肠杆菌参考菌株不敏感, 说明了地方株和参考菌株之间在某些方面存在着差异; 仅能裂解其分离宿主 ATCC 29544 的噬菌体 SK1, 显示了其特殊性, 因为 ATCC 29544 是用于 DNA 杂交的模式菌株; 对 4 株 ATCC 菌株均易感的噬菌体 SK2, 对绝大部分分离菌株也表现出较好的裂解性; 最初被称为阴沟肠杆菌保存的、现在被更名为阪崎肠杆菌的参考菌株 ATCC12868, 也仅能被 SK2 裂解。上述结果提示我们, 噬菌体 SK1, SK2 和 SK3 可用于阪崎肠杆菌的分类和鉴别。

尽管分离的噬菌体没有一种能够完全裂解 27 株阪崎肠杆菌, 但是按照 5 株噬菌体的宿主范围, SK2, SK3, SK4 和 SK5 结合使用能够裂解 27 株试验菌株, 在噬菌体被认为是一种消除病原体或减少其危害的有效手段前提下, 通过进一步试验, 希望能够用于婴幼儿配方粉生产过程及环境中阪崎肠杆菌的控制。

### 参 考 文 献

- [1] Gurtler JB, Kornacki JL, Beuchat LR. *Enterobacter sakazakii*: A coliform of increased concern to infant health. *Int J Food Microbiology*, 2005, 104: 1-34.
- [2] Farmer JJ, Asbury MA, Hickman FW, et al. *Enterobacter sakazakii*: a new species of “*Enterobacteriaceae*” isolated from clinical specimens. *Int J Syst Bacteriol*, 1980. 30: 569-584.
- [3] Kandhai MC, Reij MW, Gorris LGM, et al. Occurrence of *Enterobacter sakazakii* in food production environments and households. *J Lancet*, 2004, 363: 39-40.
- [4] Iversen C, Forsythe S. Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacteriaceae* from powdered infant formula milk and related products. *Food Microbiology*, 2004, 21: 771-777.
- [5] Thiel K. Old dogma, new tricks—21st century phage therapy.

- Nat Biotechnol*, 2004, 22: 31–36.
- [6] Kim, KP; Klumpp, J; Loessner, MJ. *Enterobacter sakazakii* bacteriophages can prevent bacterial growth in reconstituted infant formula. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, 1(115): 195–203.
- [7] 徐焰, 熊鸿燕, 苏明权, 等. 医院内污水中噬菌体的分离及其生物学特性观察. 第四军医大学学报(*Journal of Fourth Military Medical University*), 2003, 24 (9): 846–848.
- [8] Lim W, Mudge KW, Weston LA. Utilization of RAPD markers to assess genetic diversity of wild populations of North American ginseng (*Panax quinquefolium*). *Planta Med*, 2007, 73: 71–76.
- [9] 冯书章, 刘军, 孙洋. 细菌的病毒—噬菌体最新分类与命名. 中国兽医学报(*Chinese Journal of Veterinary Science*), 2007年, 27(4): 604–608.

## Isolation and characterization of bacteriophages of *Enterobacter sakazakii*

Guiming Zhao<sup>\*</sup>, Qingwen Zhang, Lisi Yao, Ying Chen

(Chinese Academy Inspection and Quarantine, Beijing 100123, China)

**Abstract:** [Objective] To isolate bacteriophage of *Enterobacter sakazaki* from sewage using reference and isolated strains as indicators, and to observe the biological characteristics of the bacteriophage. [Methods] Bacteriophages were isolated from sewage with double layer agar. Specificity and host ranges of the bacteriophages were determined by reference bacterium from same genus and family. Phage particles were observed by electron microscope and its molecular character was analyzed by Random amplified polymorphic DNA. [Results] Five bacteriophages of *E. sakazakii* were isolated from sewage and showed relatively narrow host ranges, only *E. sakazakii* could be lysed. The phage SK2 isolated from ATCC 51329 could form plaques on 24 of all 27 *E. sakazakii* strains (89%). All five phage particles had the hexagonal heads and tails after observing with negatively stained method by electron microscope. Random amplified polymorphic DNA analysis showed the polymorphism of the five phages. [Conclusion] *E. sakazakii* phages isolated from sewage were only sensitive to *E. sakazakii*, and had potential usage in typing, preventing, treating *E. sakazakii* and environment protection.

**Keywords:** *Enterobacter sakazakii*; bacteriophage

Supported by the 11<sup>th</sup> Five Year Project for National Key Technology R&D Program (2006BAD05A06-Z02) and the National infrastructure of Nature Resource for Science and Technology (2005DKA21204)

<sup>\*</sup>Corresponding author. Tel: +86-10-85773355 ext 2187; Fax: +86-10-85774634; E-mail: zhaoguiming@yahoo.com.cn

Received: 24 April 2008/ Revised: 13 June 2008

### 《微生物学报》答作者问——关于投稿

问: 我的文章现已审查完毕, 并收到了编辑部发来的“审稿意见”。我想咨询, 如果文章修改后, 再次投递, 是否还需要交稿件受理费? 是否仍然用原论文编号提交?

答: 这要分两种情况,

- (1) 如果你的文章已经被通知“退稿”了, 那么修改之后再投来的文章将按“新稿件”处理, 从程序上来讲和新投稿件是一样的, 仍需要缴纳稿件受理费。但是为便于稿件审理, 请作者在投稿时在文题的后面加上“原稿件号+修后再投”字样。
- (2) 如果是编辑部在审稿意见中要求您修改后再经本刊“复审”, 则不作为新稿处理, 请作者直接将修改稿上传到远程系统中, 不再另交稿件受理费。

问: 投稿《微生物学报》有没有字数的限制? 是否要按照正式出版时的格式排版?

答: 投稿时没有字数上的限制, 稿件的学术质量是第一位的, 其次要注意写作质量。我们建议作者注意几点。

- (1) 在投稿时首先考虑如何将你工作内容和创新点表达清楚, 以便审稿人可以清楚地判断稿件水平。
- (2) 在文章评审通过之后, 编辑部要通知作者修改, 届时会提出字数等方面的具体要求。
- (3) 投稿时也不需要按本刊出版物上的字号、字号、双栏形式排版, 可适当放大字号, 具体要求详见“投稿要求”, 以便于专家阅读