

技术与方法

重组分枝杆菌噬菌体检测分枝杆菌的发光研究*

吕 斌¹⁾ 徐顺清^{1)**} 符志军²⁾ 陈志飞²⁾ 李开赏²⁾ 周宜开¹⁾⁽¹⁾ 同济医科大学环境医学研究所, 武汉 430030; ⁽²⁾ 武汉市结核病防治所, 武汉 430020

摘要 采用生物发光方法检测重组的分枝杆菌噬菌体对不同细菌的发光反应, 并比较了仅在特定的温度范围内才能繁殖的温敏噬菌体 Phage 88 和正常噬菌体 Phage 40 对分枝杆菌感染活力测定时发光强度的差异, 以建立用不同类型重组噬菌体检测结核分枝杆菌耐药性的方法和条件. 结果显示两种噬菌体对各种分枝杆菌作用后均有发光, 对非分枝杆菌发光值很低, 两者差异有显著性; 不同的分枝杆菌发光值有差异: 卡介苗的发光值最高, 结核分枝杆菌的发光值最低; 温敏噬菌体 Phage 88 的检测灵敏度大于正常噬菌体 Phage 40, 差异显著. 因此可认为两株噬菌体均可特异地检测结核分枝杆菌, 但 Phage 88 的效果优于 Phage 40.

关键词 重组分枝杆菌噬菌体, 生物发光, 结核分枝杆菌

学科分类号 Q93-332

结核耐药菌株在近年明显增加, 给结核病的防治带来了很大的困难. 由于常规结核杆菌检测和药物敏感试验方法需 6~12 周, 无法给临床提供及时、准确的用药参考. 因此, 研究使用新的快速检测方法已引起国内外学者关注. 有研究认为重组的可表达荧光素酶的结核分枝杆菌噬菌体可用于快速检测结核分枝杆菌耐药性. 本实验比较两株不同类型的重组分枝杆菌噬菌体 (温敏株 Phage 88 和正常株 Phage 40) 对结核分枝杆菌的发光分析.

1 材料与方 法

1.1 菌株及噬菌体

卡介苗 (BCG) 购自卫生部上海生物制品研究所. 结核分枝杆菌 H37Ra (ATCC25177) 和 H37Rv (ATCC36801) 购自中国药品生物制品检定所. 耻垢分枝杆菌 mcl55 (*M. smegmatis*, ATCC19420) 和大肠杆菌 (*Escherichia coli*, ATCC25922) 分别由同济医科大学分子生物学教研室和微生物教研室提供. 本实验用分枝杆菌噬菌体 Phage 40 (P40) 和 Phage 88 (P88) 由 Albert Einstein University 的 William Jacobs 教授提供.

1.2 细菌培养

BCG 及慢长型分枝杆菌在 M7H9 培养基中培养, 耻垢分枝杆菌等快长型分枝杆菌在 SUTON 培养基中培养, 大肠杆菌在普通琼脂培养基中培养.

细菌浓度采用 722 分光光度计测量, $A = 1$ 时的细菌数约为 2×10^9 个.

1.3 分枝杆菌噬菌体的增殖与分离

按 Carriere 等的方法进行增殖和分离^[1,2].

1.4 分枝杆菌噬菌体的计数

分枝杆菌噬菌体浓缩液先进行一系列 10 倍梯度稀释后加入在苦味酸培养基中生长的耻垢分枝杆菌菌苔中, 培养 48 h 观察噬菌斑并计算噬斑形成单位数 (PFU).

1.5 发光分析测定各种分枝杆菌感染活力

按 Jacobs 的方法^[1,3] 在用 M7H9 进行系列 10 倍稀释的卡介苗、耻垢分枝杆菌、结核分枝杆菌标准株 1 ml 菌液中加入高滴度的 Phage 40 (PFU = 6.1×10^9 /ml) 或 Phage 88 (PFU = 4.8×10^9 /ml) 的噬菌体 0.1 ml, 感染噬菌体后开始计时, 在最佳发光条件下 (荧光素 0.22 mmol 100 μ l, ATP 0.1 mmol 100 μ l, 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 100 μ l), 分别测定 30 h 内发光值.

1.6 测量和统计方法

每个因素平行做 3 管测发光值, 每次测量重复两次, 每次测量 6 s 的积分发光值. 所有结果进行统计分析.

* 国家自然科学基金资助项目 (39770679).

** 通讯联系人.

Tel: 027-83692724, E-mail: shqxu@tjmu.edu.cn

收稿日期: 1999-11-04, 接受日期: 2000-01-14

2 结 果

2.1 两株噬菌体对不同细菌的发光分析

从图 1 可见大肠杆菌的发光值与阴性对照很难区分 ($P > 0.05$), 而不同分枝杆菌的发光值与阴性对照相比则有显著差别. 两株噬菌体在分枝杆菌的监测中, BCG 的发光值最高, 耻垢分枝杆菌次

之, 结核分枝杆菌最低, H37Ra 和 H37Rv 的发光值无明显差别 ($P > 0.05$). Phage 88 在各种分枝杆菌中的发光值均明显高于 Phage 40. 两株噬菌体达到最高发光值的时间也不同, Phage 40 在反应开始后 4 h 达到最高发光值, 而 Phage 88 则在反应开始后 12 h 才达到最高发光值.

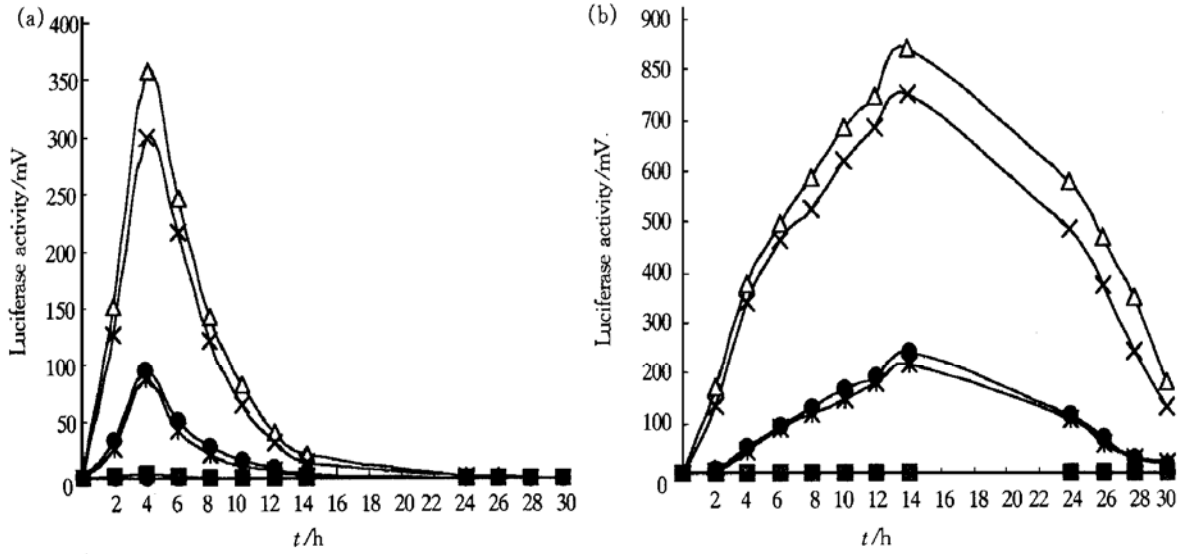


Fig. 1 Luciferase activity of Phage 40 and Phage 88 in different bacteria

(a) Phage 40; (b) Phage 88.

◆◆: negative control; □—□: *E. coli*; △—△: BCG; ×—×: mcl55; *—*: H37Ra; ●—●: H37Rv.

2.2 噬菌体对不同分枝杆菌的感染活力测定

2.2.1 卡介苗感染活力的测定: 从图 2 可见在 Phage 40 中, BCG 4.2×10^4 个/ml 即可有较明显的发光 (4.2×10^4 个/ml 最高发光值为 41.38 mV),

4.2×10^2 个/ml 和 4.2×10^3 个/ml 浓度对 BCG 的发光值与阴性对照相比无明显区别 ($P > 0.05$), 表明 Phage 40 对 BCG 的灵敏度为 4.2×10^4 个/ml, 反应开始 4 h 后达到最高发光值. 在 Phage 88 中,

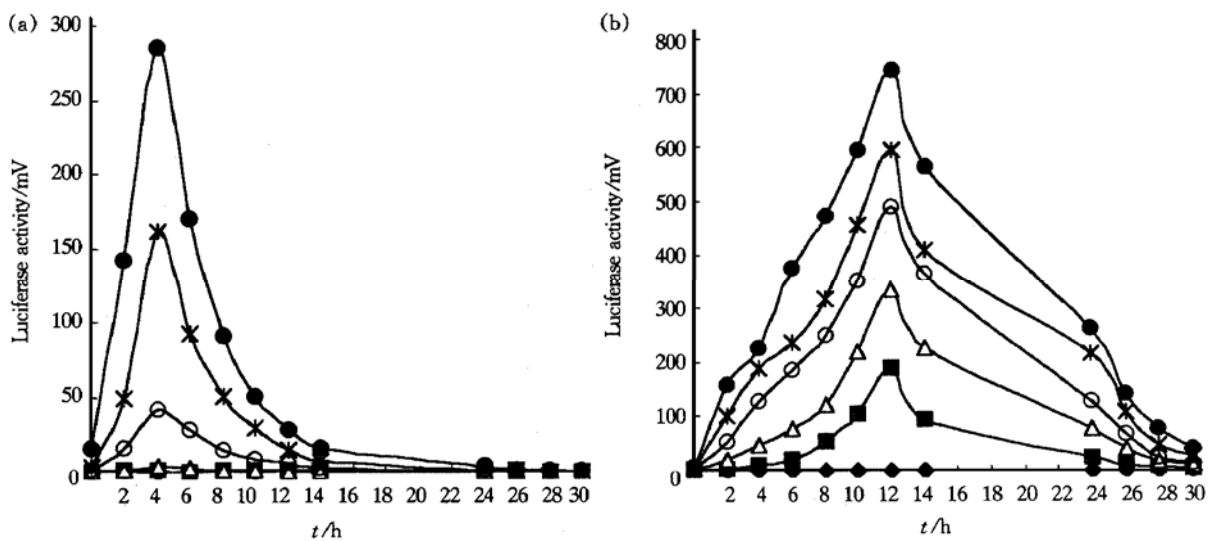


Fig. 2 Sensitive test of Phage 40 and Phage 88 in BCG

(a) Phage 40; (b) Phage 88. ◆◆: negative control; □—□: 4.2×10^2 /ml BCG; △—△: 4.2×10^3 /ml BCG;

○—○: 4.2×10^4 /ml BCG; *—*: 4.2×10^5 /ml BCG; ●—●: 4.2×10^6 /ml BCG.

BCG 4.2×10^2 个/ml 即可有较明显的发光 (4.2×10^2 个/ml 最高发光值为 189.5 mv), 表明 Phage 88 对 BCG 的灵敏度为 4.2×10^2 个/ml, 反应开始 12 h 后达到最大发光值.

2.2.2 耻垢分枝杆菌感染活力的测定: 从图 3 可见在 Phage 40 中, 耻垢分枝杆菌 mc155 9.3×10^4 个/ml 即可有较明显的发光 (9.3×10^4 最高发光值为 20.49 mV), 9.3×10^2 个/ml 和 9.3×10^3 个/ml

浓度的 mc155 发光值与阴性对照相比无明显区别 ($P > 0.05$), 表明 Phage 40 对 mc155 的灵敏度为 9.3×10^4 个/ml, 反应开始 4 h 后达到最高发光值. 在 Phage 88 中, mc155 9.3×10^2 个/ml 时即可有较明显的发光 (9.3×10^2 最高发光值为 102.8 mV), 表明 Phage 88 对 mc155 的灵敏度为 9.3×10^2 个/ml, 反应开始 12 h 后达到最高发光值.

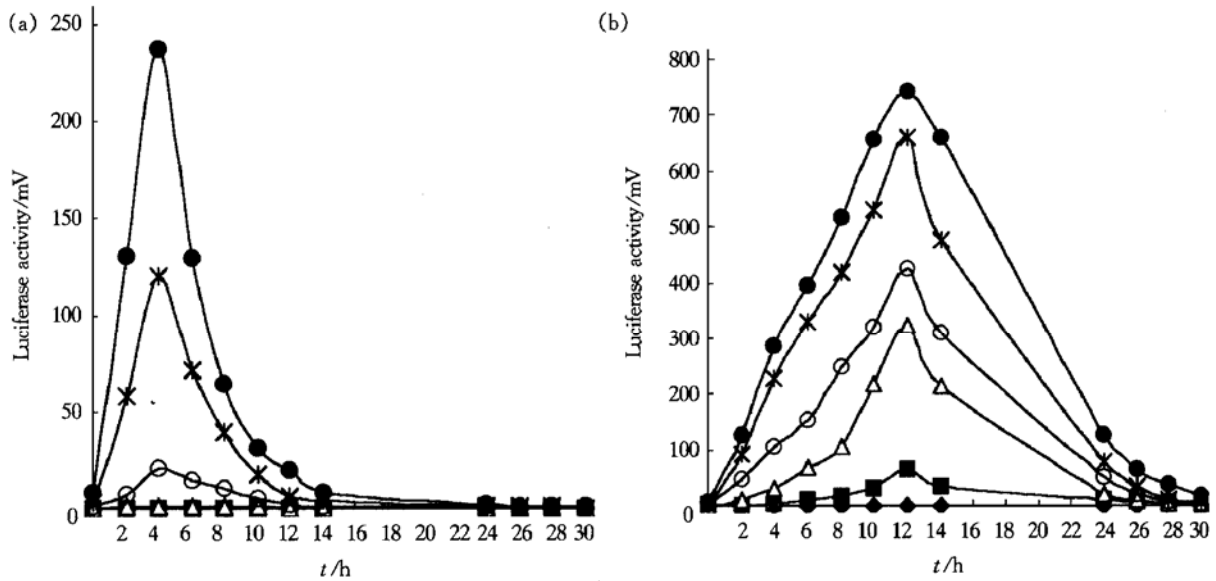


Fig. 3 Sensitive test of Phage 40 and Phage 88 in mc155

(a) Phage 40; (b) Phage 88. ◆◆: negative control; ■—■: 9.3×10^2 /ml mc155; △—△: 9.3×10^3 /ml mc155; ○—○: 9.3×10^4 /ml mc155; *—*: 9.3×10^5 /ml mc155; ●—●: 9.3×10^6 /ml mc155.

2.2.3 结核分枝杆菌 H37Ra 感染活力的测定: 从图 4 可见在 Phage 40 中, H37Ra 6.4×10^5 个/ml 即

可有较明显的发光 (6.4×10^5 个/ml 最高发光值为 45.66mV), 低于 6.4×10^5 个/ml 浓度的 H37Ra

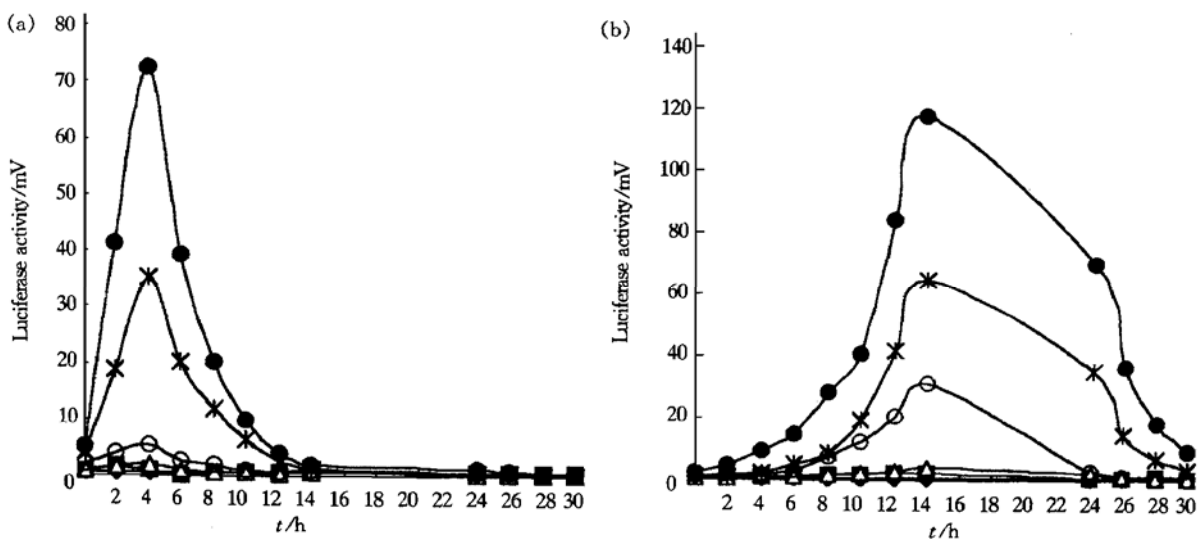


Fig. 4 Sensitive test of Phage 40 and Phage 88 in H37Ra

(a) Phage 40; (b) Phage 88; ◆◆: negative control; ■—■: 6.4×10^2 /ml H37Ra; △—△: 6.4×10^3 /ml H37Ra; ○—○: 6.4×10^4 /ml H37Ra; *—*: 6.4×10^5 /ml H37Ra; ●—●: 6.4×10^6 /ml H37Ra.

的发光值与阴性对照相比无明显区别 ($P > 0.05$), 表明 Phage 40 对 H37Ra 的灵敏度为 6.4×10^5 个/ml, 反应开始 4 h 后达到最高发光值. 在 Phage 88 中, H37Ra 6.4×10^4 个/ml 即可有较明显的发光 (6.4×10^4 个/ml 最高发光值为 32.47 mV), 表明 Phage 88 对 H37Ra 的灵敏度为 6.4×10^4 个/ml, 反应开始 14 h 后达到最高发光值.

2.2.4 结核分枝杆菌 H37Rv 感染活力的测定: 从图 5 可见在 Phage 40 中, H37Rv 7.6×10^5 个/ml 即

可有较明显的发光 (7.6×10^5 个/ml 最高发光值为 35.19 mV), 低于 7.6×10^5 个/ml 浓度的 H37Rv 发光值与阴性对照相比无明显区别 ($P > 0.05$), 表明 Phage 40 对 H37Rv 的灵敏度为 7.6×10^5 个/ml, 反应开始 4 h 后达到最高发光值. 在 Phage 88 中, H37Rv 7.6×10^4 个/ml 即可有较明显的发光 (7.6×10^4 个/ml 最高发光值为 31.09 mV), 表明 Phage 88 对 H37Rv 的灵敏度为 7.6×10^4 个/ml, 反应开始 14 h 后达到最高发光值.

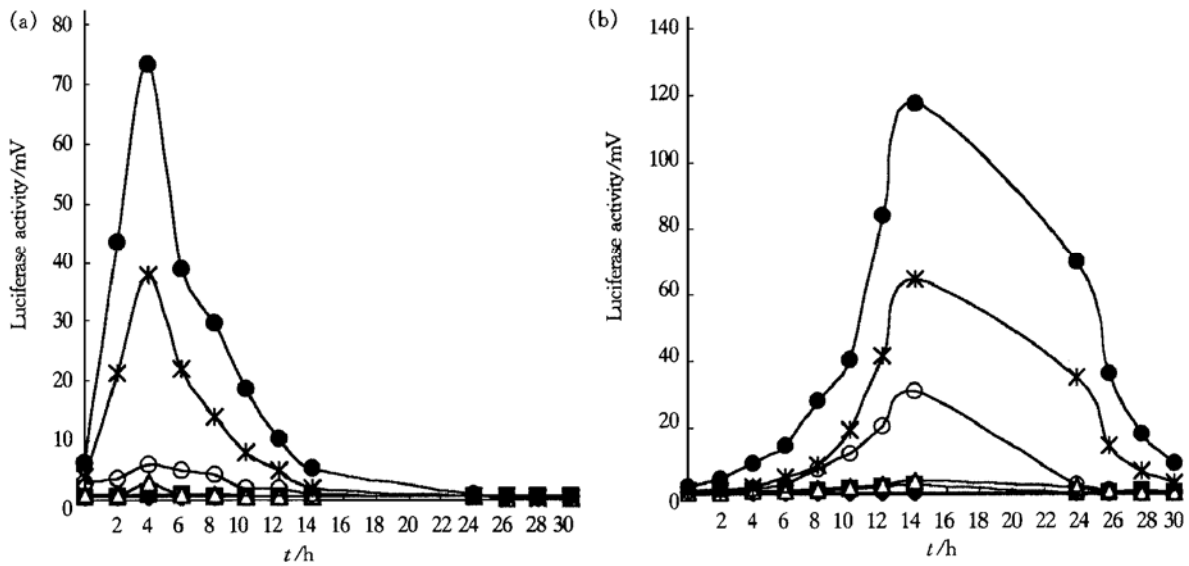


Fig. 5 Sensitive test of Phage 40 and Phage 88 in H37Rv

(a) Phage 40; (b) Phage 88; ◆—◆: negative control; □—□: 7.6×10^2 /ml H37Rv; △—△: 7.6×10^3 /ml H37Rv; ○—○: 7.6×10^4 /ml H37Rv; *—*: 7.6×10^5 /ml H37Rv; ●—●: 7.6×10^6 /ml H37Rv.

3 讨 论

3.1 两株噬菌体检测的灵敏度和特异度的比较

从上可见两株噬菌体均特异地对分枝杆菌有发光反应, 对非分枝杆菌 (如大肠杆菌) 的发光值与阴性对照相比无显著差异 ($P > 0.05$). 在对分枝杆菌的灵敏度分析中, 发现两株噬菌体在不同分枝杆菌中的灵敏度有差异, Phage 88 对不同分枝杆菌的检测灵敏度均大于 Phage 40, 而且 Phage 88 的发光值高于 Phage 40 的发光值. 表明温敏株 Phage 88 的基因突变可提高其表达荧光素酶的能力, 并使发光反应的灵敏度增大, 使其检测活菌的水平升高, 目前研究认为这与温敏突变噬菌体中部分基因的改变可使噬菌体表达荧光素酶蛋白的功能增强, 表达时间延长有关. 具体地说, 由于荧光素酶表达基因的插入位点在 Phage 40 和 Phage 88 中不同, 位于 Phage 88 中的荧光素酶插入序列前的强

顺式作用启动子可大大促进荧光素酶基因的表达, 同时临近的噬菌体 RNA 可被固定, 有助于繁衍, 最终使荧光素酶的表达明显加强, 导致发光反应增强^[2,4,5]. 但 Phage 88 的增殖要求在 37℃ 以下, 增殖的速度与 Phage 40 相比较低, 发光反应的时间后移, 但发光值却较高, 更适合用于临床.

3.2 两株噬菌体感染受体菌后发光时间的比较

两株噬菌体的最高发光时间总的规律是 Phage 40 在发光反应开始后 2 h 在各种细菌中均已出现有检测意义的发光值 (即相对发光值 > 10); Phage 88 在发光反应开始后 8 h 在各种细菌中均出现有意义的发光值. Phage 40 的发光时间在各株分枝杆菌中均高于 Phage 88. 该差异与噬菌体基因组的结构不同而引起噬菌体在不同的细菌中敏感度不同及增殖速度不同有关. Phage 88 在宿主菌中的增殖速度较慢, 所以相应的发光时间延长; Phage 40 的增殖速度较快, 最高发光时间也相应提

前^[1-3].

3.3 对结核分枝杆菌标准株的检测效果的比较

两株噬菌体对结核分枝杆菌标准株的灵敏度均较低, Phage 88 在 10^4 个/ml 水平, Phage 40 仅在 10^5 个/ml 范围内, 表明分枝杆菌噬菌体可用于对标准株和临床分离株的测定, 但当前需进一步改进发光反应条件, 以增加对结核分枝杆菌的检测灵敏度.

本实验分别采用两株噬菌体对 10 倍系列稀释的卡介苗、耻垢分枝杆菌、结核分枝杆菌标准株进行发光分析, 发现两株噬菌体在 10^5 个/ml 范围以上均有良好的检测效果, Phage 88 的灵敏度高于 Phage 40, 在同一细菌浓度下 Phage 88 的平均发光值也比 Phage 40 高. Phage 88 对各种结核分枝杆菌的灵敏度和发光值均高于 Phage 40, 更适合实际应用.

参 考 文 献

- 1 Arain T M, Resconi A E, Singh D C, *et al.* Reporter gene technology to assess activity of antimycobacterial agents in mycophages. *Antimicrob Agents Chemother*, 1996, **40** (6): 1540~ 1542
- 2 Carriere C, Riska P, Zimhony O, *et al.* Conditional replicating luciferase reporter phages: improved sensitivity for rapid detection and assessment of drug susceptibility of mycobacterium tuberculosis. *J Clin Microb*, 1997, **35** (12): 3232~ 3239
- 3 Jacobs W R, Barletta R G, Udani R, *et al.* Rapid assessment of drug susceptibilities of mycobacterium tuberculosis by means of luciferase reporter phages. *Science*, 1993, **260** (5109): 819~ 822
- 4 Cooksey R C, Crawford J T, Jacobs W R, *et al.* A rapid method for screening antimicrobial agents for activities against a strain of mycobacterium tuberculosis expressing firefly luciferase. *Antimicrob Agents Chemother*, 1993, **37** (6) 1348~ 1352
- 5 Fullner K J, Hatfull G F. Mycobacteriophage L5 infection of mycobacterium bovis BCG: implication for phage genetics in the slow-growing mycobacteria. *Mol Microbiol*, 1997, **26** (4): 755 ~ 766

A Comparison Study of Luminescent Characters of Two Recombinant Mycobacteriophages*

L Ü Bin¹⁾, XU Shun-Qing^{1)**}, FU Zhì-Jun²⁾, CHEN Zhì-Fei²⁾, LI Kai-Chang²⁾, ZHOU Yi-Kai¹⁾

¹⁾Institute of Environmental Medicine, Tongji Medical University, Wuhan 430030, China;

²⁾Institute of Tuberculosis Prevention, Wuhan 430030, China)

Abstract To compare the luminescent characters in different bacteria of two different recombinant mycobacteriophages by using bioluminescent methods in order to understand the differences between sensitivity and specificity of these phages, and to set up methods to use recombinant mycobacteriophages in detecting drug susceptibility of mycobacteria. Result showed that both two phages have high light production in action with mycobacterium selectively and have almost no light production with *E. coli*, the difference is very obvious. Among different mycobacterium, BCG has the highest light production and mycobacterium tuberculosis has the lowest light production. The sensitivity of Phage 88 is higher than Phage 40, the difference is obviously. It can be considered that both recombinant mycobacteriophages can detect mycobacterium specifically, but Phage 88 is more suitable for clinical usage.

Key words recombinant mycobacteriophages, bioluminescence, mycobacteria

* This work is supported by a grant from National Natural Sciences Foundation of China (39770679).

** Corresponding author. Tel: 86-27-83692724, E-mail: shqxu@tjmu.edu.cn

Received: November 04, 1999

Accepted: January 14, 2000