



重组 T4 噬菌体 gp37 基因可扩大其在沙门氏菌中的宿主范围

李艳秀¹, 石冬琳¹, 李敏¹, 肖宇屹¹, 张子博¹, 陈正阳¹, 钟黄新¹, 刘庆新^{1,2*}, 姚火春¹, 张炜^{1*}

¹南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095

²江苏农林职业技术学院畜牧兽医学院, 江苏 句容 212400

摘要:【目的】将 T4 噬菌体 WG01 宿主决定区的 gp37 基因片段, 与另一株 T4 噬菌体 QL01 的相应基因进行同源重组, 从而获得嵌合噬菌体并进行宿主谱分析, 为阐明 T4 噬菌体的宿主谱形成机制以及快速筛选针对特定病原菌的噬菌体奠定了基础。【方法】通过同源重组的方法将 WG01 gp37 上的 8 个基因片段分别替换给 QL01, 用沙门氏菌作为宿主菌筛选嵌合噬菌体, 并对嵌合噬菌体进行宿主谱、最佳感染复数、一步生长曲线和遗传稳定性测定。【结果】本研究共获得了 5 株嵌合噬菌体(QWA、QWC、QWF、QWG、QWFG)。宿主谱试验结果表明, 与噬菌体 QL01 相比, 嵌合噬菌体对 21 株沙门宿主菌分别可以多裂解 7、8、4、10 和 9 株菌, 即嵌合噬菌体都获得了相对较宽的宿主谱, 其中 QWG 的沙门氏菌宿主菌拓宽最多。生物学特性试验结果表明, 嵌合噬菌体 QWG 生物学特性稳定。嵌合噬菌体 QWG 经连续传代培养 20 代, 测序分析第 1 代和第 20 代嵌合噬菌体尾丝蛋白基因在传代过程中的稳定性, 测序结果表明, 嵌合噬菌体改造部分的基因能稳定遗传。【结论】用基因改造的方法可以产生宿主谱拓宽且能稳定遗传的嵌合噬菌体, 为快速筛选针对特定病原菌的噬菌体提供了可能。

关键词: 基因改造, 嵌合噬菌体, 宿主谱, 同源重组, 生物学特性

沙门氏菌是一种常见的食源性致病菌, 能引起人和多种动物发病^[1]。目前, 有超过 2600 个沙门氏菌血清型^[2]。抗生素作为治疗剂通常被用来控制沙门氏菌病, 然而抗生素的不恰当使用使得越来越

多的耐药菌株产生, 给公共卫生和人类健康造成威胁^[3-4]。由于使用噬菌体作为生物控制剂具有许多优点, 因此利用烈性噬菌体生物控制沙门氏菌已成为一种有吸引力的方法。

基金项目: 国家重点研发项目(2018YFC1602500); 国家自然科学基金新疆联合项目(U1803109); 江苏农林职业技术学院院级基金扶持类项目(2016kj003); 南京农业大学 srt 项目(2018syzx016)

*通信作者。张炜, Tel/Fax: +86-25-84395328, E-mail: vszw@njau.edu.cn; 刘庆新, Tel: +86-511-87268613, Fax: +86-511-87290000, E-mail: lqx199108@hotmail.com

收稿日期: 2019-07-02; 修回日期: 2019-09-20; 网络出版日期: 2019-12-19

噬菌体是一种裂解细菌细胞的病毒。作为传统抗菌药物的天然替代品,噬菌体已被证明可以有效控制农业、食品等工业中的耐药性病原体,防止细菌疾病的传播^[5-6]。有报道也证明了噬菌体在治疗细菌性疾病方面的可行性^[7]。但噬菌体的宿主特异性和较窄的宿主范围使得噬菌体的应用受到了限制。将多种噬菌体混合制备成噬菌体鸡尾酒使该制剂宿主谱拓宽是解决该问题的常用的方法^[8-9]。利用基因工程技术对噬菌体宿主决定区基因进行改造,得到宿主谱拓宽的噬菌体是另一个有潜力的提议^[10]。T4 噬菌体的尾丝蛋白(gene protein 37, gp37)可能是决定噬菌体受体特异性的重要区域^[11], Yoichi 等^[12]通过同源重组的方法将 T2 噬菌体的 gp37 和 gp38 与 PP01 噬菌体交换,产生的重组 T2 噬菌体可感染异种宿主细胞大肠杆菌 O157:H7。

本课题组前期通过将 QL01 尾丝蛋白的部分片段替换给 WG01,使得改造后的 WG01 宿主谱发生改变,并确定了尾丝蛋白(gp37)为噬菌体 WG01 的宿主决定关键区域^[13]。本文根据前期研究结果在噬菌体 WG01 gp37 基因片段上选取了 8 段片段,通过同源重组的方法对噬菌体 QL01 gp37 的相应部分进行改造,研究结果为临床应用中快速筛选特定病原体的噬菌体提供思路。

1 材料和方法

1.1 细菌菌株、噬菌体及质粒

大肠杆菌 DE205B 由本实验室分离并保存;大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞购自南京诺唯赞生物科技有限公司;T4 烈性噬菌体 QL01 (NC_028847.1) 和 WG01 (NC_031928.1)由本实验室分离并保存。质粒 pUC118 购自 TaKaRa 公司。

1.2 主要试剂和仪器

胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自 Sigma 公司;Primer Star 高保真酶、同源重组试剂盒、DH5 α 感受态细胞购自南京诺唯赞生物科技有限公司;片段回收试剂盒、限制性核酸内切酶 *Bam*H I 和 *Eco*R I 购自日本 TaKaRa 生物公司。

PCR 仪、37 °C 恒温培养箱、台式冷冻离心机购自 Thermo 公司;电穿孔仪,凝胶自动成像系统购自美国 Bio-Rad 公司;台式离心机购自 Beckman 公司。

1.3 目的片段的选取和克隆

宽谱噬菌体 WG01 和窄谱噬菌体 QL01 分别作为供体噬菌体和受体噬菌体,参照本课题组前期对 WG01 和 QL01 氨基酸序列分析的结果^[13],最终选取了噬菌体 WG01 gp37 基因上的 8 段不同片段,分别命名为 QWA、QWB、QWC、QWD、QWE、QWF、QWG、QWFG (图 1)。

使用南京诺唯赞生物科技有限公司提供的 CE Design V1.04 软件设计并合成引物,用于扩增目的片段和同源序列,引物委托南京金斯瑞生物科技有限公司合成(表 1)。以 WG01 或 QL01 噬菌体富集液为模板,通过 PCR 和融合 PCR 获得目的片段。产物经胶回收试剂盒回收后于 -20 °C 保存。质粒 pUC118 用限制性核酸内切酶 *Bam*H I 和 *Eco*R I 进行双酶切,酶切产物经胶回收试剂盒回收后于 -20 °C 保存。

1.4 重组载体的构建

用一步克隆试剂盒(One-Step Cloning Kit)将目的片段分别与双酶切后的线性载体进行连接构建重组载体,重组载体分别命名为 pUC118WA、pUC118WB、pUC118WC、pUC118WD、pUC118WE、pUC118WF、pUC118WG 和 pUC118WFG。

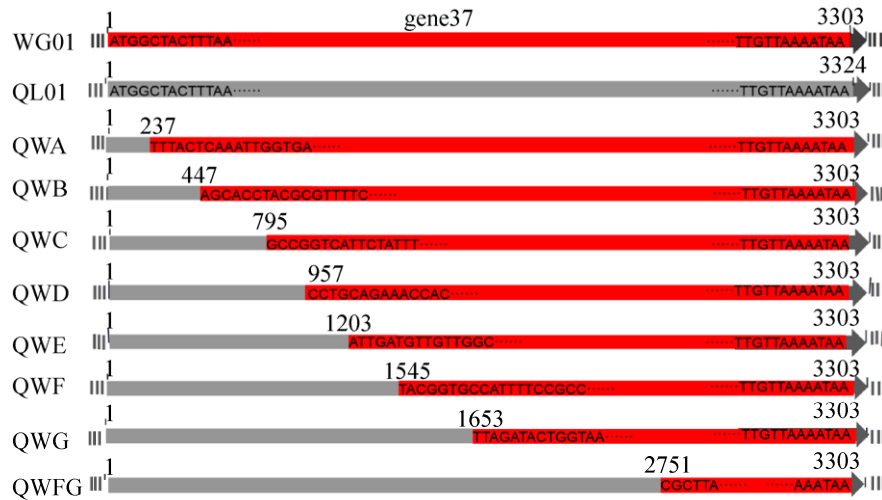


图 1. 噬菌体 WG01 gp37 上替换片段的位置和大小

Figure 1. Position and size of the replacement fragment on phage WG01 gp37. Red and gray represent the phage WG01 and QL01 gp37 fragments, respectively. The red segments in QWA, QWB, QWC, QWD, QWE, QWF, QWG and QWFG represent the nucleic acid sequence in which the QL01 gp37 was replaced by WG01.

表 1. 试验中使用的引物对

Table 1. Primer pairs used in the test

Functions	Sequences of primer pairs (5'→3')
Amplification of WA fragment	F1 ^a CAGGTCGACTCTAGAGGATCCATGGCTACTTTAAAGCAAATCCAA R1 TGAGTAAAAGTACCAGACAGATTATAATTACCGGTT F2 CTGTCTGGTACTTTTACTCAAATTGGTGATTCAATCTC R2 ^b TATGACCATGATTACGAATCTTATTTAACAATGATTTAATTAGTGCTTTAA
Amplification of WB fragment	R1 TTGGACGCGAACGTTCAAGATTTGCTTGGTATCC F2 TCTTGAACGTTCCGCTCCAAGATTACGCTG
Amplification of WC fragment	F1 CAGGTCGACTCTAGAGGATCCAAAGGCGGTAATATCGACGGA R1 ATGACCGGCTTGA AAACCACCGGAATAAGCA F2 GTGGTTTTCAAGCCGGTCATTCTATTTCTGTAGG
Amplification of WD fragment	F1 CAGGTCGACTCTAGAGGATCCATGGGCGAAGTTTTGGTACG R1GTGGTTTTCTGCAGGAGTTGTAAGTAAAGTATAAGCTCCATTATTAATT F2 ACAACTCCTGCAGAAACCACCAAGTCTTAG
Amplification of WE fragment	F1CAGGTCGACTCTAGAGGATCCAATACTGTTAATACAGACAGTAAGAATATTGGC R1 CAATGTTACCAGGAGTAACCAACAACCC F2 GGTTACTCCTGGTAACATTGATGTTGTTGGCGGTTCCG
Amplification of WE fragment	F1CAGGTCGACTCTAGAGGATCCGCTTATACTTTACTTACA ACTCCA ACTGAA R1 TGGCACCGTACTTATCGTTCCAATACGAAGACCA F2 GAACGATAAGTACGGTGCCATTTCCGC
Amplification of WG fragment	F1CAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCATTAGTTATTGTTAATACTACTAATGATAAAAA R1 CCTTACCAGTATCTAATGTAATACTTAACGGTCGTAATGGG F2 TACATTAGATACTGGTAAGGTTGTTATTCCTGA
Amplification of WFG fragment	F1CAGGTCGACTCTAGAGGATCCACCAAAGAAGGTA ACTTTATAACTCGG R1 GAGTTAAGCGGCCAGTCATTGTATCGCCGC F2 AATGACTGGCCGCTTA ACTCTTAAAACCAACTCAGA R2 AATGGCGATAGAAGAAGCGCCCAATCCATTATC F3 GCGCTTCTCTATCGCCATTGGGGACG R3TATGACCATGATTACGAATTCACCAAAGAATAATAGCTCTTCCTGT

^a: Primer was used as F1 primer to amplify WA and WB fragments. ^b: Primer was used as R2 primer to amplify other fragments other than WFG.

将重组载体转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中。用通用检测引物 M13F/M13R 进行 PCR 鉴定。阳性菌株委托南京金斯瑞生物有限公司进行测序鉴定。

1.5 嵌合噬菌体的分离和鉴定

将阳性重组载体电转化到 DE205B 感受态细胞中。将转化株接种于含有 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 摇床培养。待菌液达到对数生长期时, 加入 QL01 进行侵染。培养 4 h 后, 将噬菌体裂解液进行离心。取离心后的噬菌体裂解液和沙门氏菌 1758 铺双层平板进行嵌合噬菌体的分离^[14]。使用相应引物对嵌合噬菌体进行 PCR 检测, PCR 产物委托南京金斯瑞生物有限公司进行测序鉴定。

1.6 WG01、QL01 和嵌合噬菌体 QWG 的生物学特性分析

1.6.1 噬菌体的宿主谱检测: 用双层平板法测定 WG01、QL01 和嵌合噬菌体的宿主谱^[14]。

1.6.2 pH 稳定性的测定: 用 NaOH 或 HCl 溶液将 SM 液的 pH 分别调节到 3、4、5、6、7、8、9、10 和 11。取 100 μL 噬菌体增殖液(约 1.0×10^8 PFU/mL) 分别加入 900 μL 上述不同 pH 值的 SM 液中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 60 min。温育结束后, 培养物在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、5000 $\times g$ 条件下离心 10 min, 取上清进行梯度稀释, 使用双层平板法进行噬菌体效价测定。

1.6.3 温度稳定性的测定: 取 100 μL 噬菌体增殖液(约 1.0×10^8 PFU/mL) 加入到 900 μL SM 缓冲液中, 混合物分别放在 28、37、45、50、55、60 和 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中温育 60 min。温育结束后, 如上所述测定噬菌体效价。

1.6.4 最佳感染复数(multiplicity of infection, MOI)的测定: 将噬菌体增殖液和宿主菌按照感染

复数为 0.001、0.01、0.1、1、10、100 的比例混合, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 4 h。如上所述测定噬菌体效价。

1.6.5 一步生长曲线: 将 1 mL 宿主菌和 1 mL 噬菌体增殖液以最佳感染复数的比例混合。混合物在 37 $^{\circ}\text{C}$ 静置 10 min, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、5000 $\times g$ 条件下离心 1 min。弃上清, 将样品重悬于 10 mL 新鲜 LB 液体培养基中, 并置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养。每间隔 10 min 取 1 次样, 样品离心后通过双层平板法测定噬菌体效价。潜伏期是指噬菌体的核酸侵入宿主细胞后至第一次爆发开始之间的时间间隔, 爆发量为爆发期末期噬菌体滴度与初始宿主菌浓度的比值^[15]。

1.7 嵌合噬菌体的遗传稳定性

为了确定嵌合噬菌体重组片段在噬菌体应用过程中是否会发生突变, 我们将第 1 代和第 20 代嵌合噬菌体 QWG 的 gp37 基因通过上述相应的引物进行扩增。PCR 产物由南京金斯瑞生物有限公司进行测序鉴定。

1.8 统计分析

活菌和噬菌体的计数为平均值和平均值的标准偏差。所有统计分析均使用 GraphPad Prism 5 软件包进行。

2 结果和分析

2.1 重组载体的构建

阳性菌株经通用引物 M13F/M13R 扩增获得大小分别为 3303、3306、3135、2973、2727、2385、2277、939 bp 的基因片段(图 2), 测序结果显示无基因突变, 表明含 WG01 不同 gp37 基因片段的重组载体构建成功。

2.2 嵌合噬菌体的筛选和鉴定

本研究共分离出 5 株嵌合噬菌体, 分别为

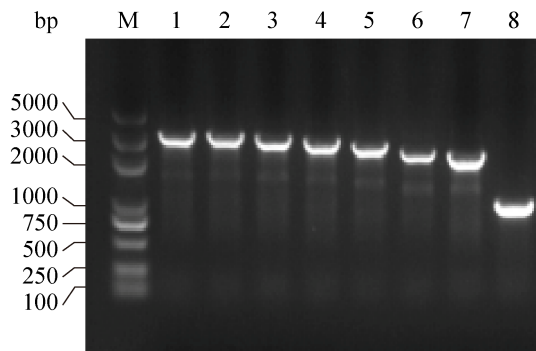


图 2. 重组载体的 PCR 产物鉴定

Figure 2. Identification of recombinant vectors PCR products. M: Marker; lane 1: pUC118WA; lane 2: pUC118WB; lane 3: pUC118WC; lane 4: pUC118WD; lane 5: pUC118WE; lane 6: pUC118WF; lane 7: pUC118WG; lane 8: pUC118WFG.

QWA、QWC、QWF、QWG 和 QWFG (图 3)。WG01、QL01 和嵌合噬菌体在 1758 沙门氏菌的平板上形成的噬菌斑的形态如图 3 所示。

嵌合噬菌体的 PCR 检测结果显示每个嵌合噬菌体所对应的条带大小与预期大小一致(图 4)。嵌合噬菌体改造部分测序结果显示其部分尾丝蛋白基因序列是由 WG01 gp37 部分基因序列替换给 QL01 gp37 相应基因序列组成, 表明嵌合噬菌体筛选成功。

2.3 嵌合噬菌体与亲本株噬菌体的宿主谱分析

表 2 显示了 WG01、QL01 和嵌合噬菌体的宿

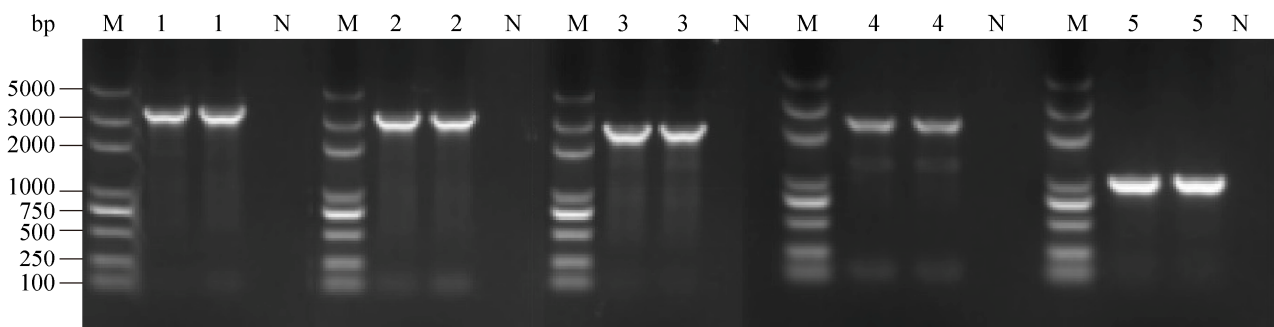


图 4. 嵌合噬菌体的 PCR 产物鉴定

Figure 4. Identification of chimeric phage PCR products. M: Marker; lane 1: QWA (3303 bp); lane 2: QWC (3135 bp); lane 3: QWF (2385 bp); lane 4: QWG (2277 bp); lane 5: QWFG (939 bp).

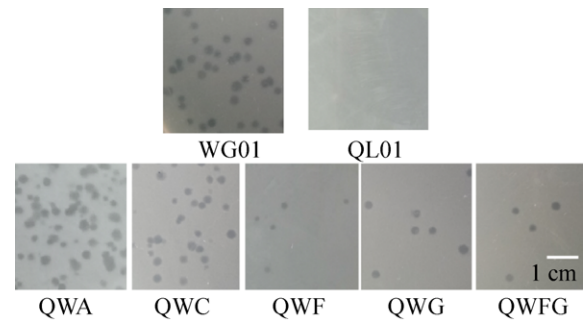


图 3. WG01、QL01 和嵌合噬菌体在 1758 菌株平板上形成的噬菌斑

Figure 3. Plaque formed by WG01, QL01 and chimeric phages on the 1758 strain plate.

主谱。由表 2 可知 WG01、QL01、QWA、QWC、QWF、QWG 和 QWFG 分别可裂解 14、4、11、12、8、14 和 13 株沙门氏菌。宿主谱分析结果表明, 与 QL01 相比, 嵌合噬菌体都获得了相对较宽的宿主谱。QWG 替换片段短且宿主谱变化范围大, 我们选择 QWG 进行后续研究。

2.4 噬菌体的 pH 稳定性

由图 5 可知, 3 种噬菌体在 pH 为 7.0 时, 噬菌体量最多, 即 WG01、QL01 和嵌合噬菌体 QWG 的最适 pH 为 7.0。3 种噬菌体量在 pH 为 4、5、6、7、8、9 和 10 时保持稳定, 但当 pH 为 3.0 时, 噬菌体量减少超过 1.5 lgPFU/mL, 当 pH 为 11.0 时, 噬菌体量减少超过 1 lgPFU/mL。

表 2. WG01、QL01 和嵌合噬菌体的宿主谱

Table 2. Host range of WG01, QL01 and chimeric phage

Strains	WG01	QL01	QWA	QWC	QWF	QWG	QWFG
1083 ^a	-	-	-	-	-	-	-
1758 ^a	+	-	+	+	+	+	+
1762 ^a	+	-	+	+	+	+	+
1766 ^a	+	-	+	+	-	+	+
1782 ^a	-	-	-	-	-	-	-
1808 ^a	+	-	-	+	-	+	+
1563 ^a	-	-	-	-	-	-	-
1760 ^a	+	+	+	+	+	+	+
1765 ^a	+	-	+	+	-	+	+
1780 ^a	-	-	-	-	-	-	-
1786 ^a	-	-	-	-	-	-	-
1812 ^a	-	-	-	-	-	-	-
SA049 ^b	+	-	+	+	+	+	+
SA062 ^b	+	-	-	-	-	+	+
SA115 ^b	+	+	+	+	+	+	+
SA130 ^b	-	-	-	-	-	-	-
SA144 ^b	+	-	+	+	+	+	+
SA061 ^b	+	-	-	-	-	+	-
SA109 ^b	+	+	+	+	+	+	+
SA129 ^b	+	-	+	+	-	+	+
SA133 ^b	+	+	+	+	+	+	+

+: *Salmonella* that can be infected by phage; -: *Salmonella* that cannot be infected by phage; ^a: Strains of *Salmonella* were presented by Professor M. Schifferli of the University of Pennsylvania; ^b: Strains of *Salmonella* were isolated and preserved by our laboratory.

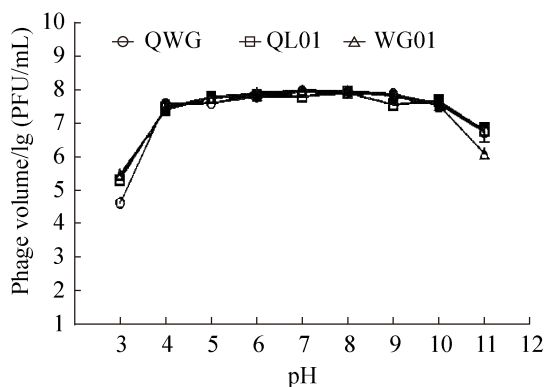


图 5. WG01、QL01 和嵌合噬菌体 QWG 的 pH 稳定性
Figure 5. pH stability of WG01, QL01 and chimeric phage QWG.

2.5 噬菌体的温度稳定性

图 6 显示了 WG01、QL01 和嵌合噬菌体 QWG 的温度稳定性。由图可知, 在 28、37 和 45 °C 条件下噬菌体的活性可以达到 60% 以上, 在 50 °C 后噬菌体的活性降低到 50% 以下, 在 65 °C 时噬菌体则完全失活。

2.6 噬菌体的最佳感染复数(MOI)

由表 3 可知, 当噬菌体 WG01、QL01 和 QWG 的感染复数为 0.001 时, 3 株噬菌体的增殖倍数都达到最高值, 分别是初始噬菌体量的 5.0×10^4 、 1.7×10^4 和 9.0×10^4 倍。因此 3 株噬菌体的最佳感染复数均为 0.001。

2.7 一步生长曲线

噬菌体 WG01、QL01 和 QWG 的一步生长曲线如图 7 所示。由图 7 可知, 3 株噬菌体的潜伏期均为 10 min, WG01、QL01 和嵌合噬菌体 QWG 的爆发量分别为 130、300 和 180 PFU/细胞。

2.8 重组噬菌体 QWG 遗传稳定性分析

嵌合噬菌体 QWG 尾丝蛋白 gp37 基因序列测序结果显示, QWG gp37 氨基酸序列未发生突变,

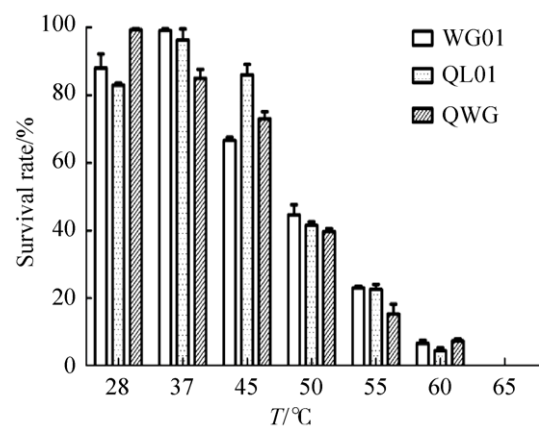


图 6. WG01、QL01 和嵌合噬菌体 QWG 的温度稳定性
Figure 6. Thermal stability of WG01, QL01 and chimeric phage QWG.

表 3. WG01、QL01 和嵌合噬菌体 QWG 的最佳感染复数
Table 3. MOI of WG01, QL01 and the chimeric phage QWG

Concentration of host bacterial/ (CFU/mL)	Concentration of phage/ (PFU/mL)	MOI	Multiples of the proliferation of phage		
			WG01	QL01	QWG
1×10^8	1×10^{10}	100	3	1.1	1.3
1×10^8	1×10^9	10	25	6.7	2.3
1×10^8	1×10^8	1	1.2×10^2	1.0×10^2	2.3×10^1
1×10^8	1×10^7	0.1	1.5×10^2	3.1×10^2	1.0×10^2
1×10^8	1×10^6	0.01	4.0×10^2	8.0×10^2	4.3×10^2
1×10^8	1×10^5	0.001	5.0×10^4	1.7×10^4	9.0×10^4

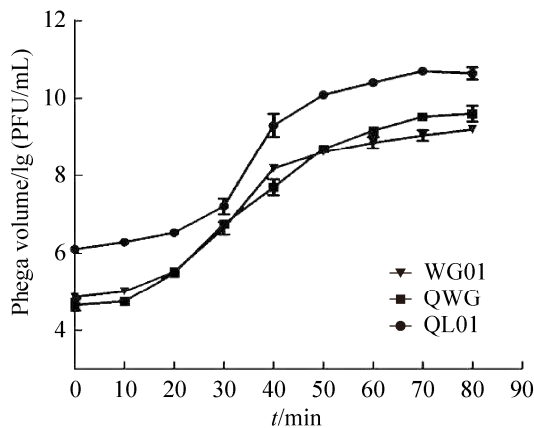


图 7. WG01、QL01 和嵌合噬菌体 QWG 的一步生长曲线

Figure 7. One-step growth curve of WG01, QL01 and the chimeric phage QWG.

表明噬菌体改造部分的尾丝蛋白序列稳定，即 QWG 具有遗传稳定性(图 8)。

3 讨论

噬菌体自 20 世纪初被发现后，其作为一种抗菌制剂就得到了人们的重视^[16]。抗生素的发现，使得噬菌体治疗被人们逐渐忽略。随着多重耐药菌的不断出现和新型抗生素的缺乏，噬菌体治疗再一次成为研究热点^[17-19]。然而噬菌体具有严格的宿主特异性，这就限制了噬菌体治疗的发展。随着基因工程技术的发展，人们可利用基因工程技术对噬菌体蛋白或基因进行人工改造，改变噬菌体的宿主谱^[20]。

在这项研究中，我们发现 T4 噬菌体 QL01 和 WG01 不仅可以侵染大肠杆菌菌株还可以侵染沙门氏菌菌株。这证明了噬菌体可以感染不同物种甚至不同属间的细菌^[21]。噬菌体的尾丝蛋白负责识别宿主的特异性结合位点^[22]。在早期的报道中，Le 等^[23]利用同源重组的方法将 Pap1 和 JG004 噬菌体的尾丝蛋白进行替换，Ando 等^[24]将 T3 和 T7 噬菌体的尾丝蛋白进行替换，结果发现，噬菌体的宿主谱都发生了改变。因此本研究利用同源重组的方法构建了 8 株嵌合噬菌体，但在嵌合噬菌体的分离中，本研究仅分离选出 5 株嵌合噬菌体，3 株嵌合噬菌体未被分离出来。这可能是由于噬菌体的宿主决定区发生了改变，而本研究中所用到的沙门氏菌有限，导致噬菌体没有识别到相应的宿主特异性结合位点，从而不能被分离出来。分离出的嵌合噬菌体的宿主谱都发生改变，并且存在差异。从理论上讲，QWA 应具有更广泛的宿主范围，因为它替换了 WG01 gp37 的大部分片段，但试验结果表明，QWG 具有最广泛的宿主谱，其次是 QWFG。据报道，T4 噬菌体的 C 末端决定受体识别特异性^[25-26]。因此，QL01 gp37 的第 554-924 位氨基酸区域可能是噬菌体宿主谱改变的重要区域。

本研究还测定了嵌合噬菌体 QWG 与两株亲本噬菌体(WG01 和 QL01)的生物学特性。嵌合噬菌体 QWG 在 pH 为 3-11 或温度为 28-60 °C 的条

QWG1st 1 MATLKQIQFKRSKVAGVRPAPAQLAEGELAINLKDRLFLTKDDTGAIIDLGFAGKGNIDGNV
 QWG20st 1 MATLKQIQFKRSKVAGVRPAPAQLAEGELAINLKDRLFLTKDDTGAIIDLGFAGKGNIDGNV
 QWG1st 63 IHNGNYQTGNYNLSGTFQTGYSYTTSGSITANGDITAKSRLMTDMGEVLVRNGTAHVRF
 QWG20st 63 IHNGNYQTGNYNLSGTFQTGYSYTTSGSITANGDITAKSRLMTDMGEVLVRNGTAHVRF
 QWG1st 124 QDLADARERAIYSQNRTGDTKQILNVRVQDYTNSTSNIFAFNGDGLFYAPSISAGTSVKSPV
 QWG20st124 QDLADARERAIYSQNRTGDTKQILNVRVQDYTNSTSNIFAFNGDGLFYAPSISAGTSVKSPV
 QWG1st 187 IYTNTVNTDSKNIGDYDISSLANNNSATDKNYLRVVRTDPASAILHEICENNGISWYSGSTPT
 QWG20st187 IYTNTVNTDSKNIGDYDISSLANNNSATDKNYLRVVRTDPASAILHEICENNGISWYSGSTPT
 QWG1st 250 DYMLSFAYSGGFQAGHSIAVGMESGPLYSTLKGKSIVLGDNDTGFKWKQDGLFYTINNGA
 QWG20st250 DYMLSFAYSGGFQAGHSIAVGMESGPLYSTLKGKSIVLGDNDTGFKWKQDGLFYTINNGA
 QWG1st 311 YTLTTPTEVTSLKQLVAGYSTNGSDLILPTTQNYPLVIVNTTNDKNSFGDGTLLGYHQSG
 QWG20st311 YTLTTPTEVTSLKQLVAGYSTNGSDLILPTTQNYPLVIVNTTNDKNSFGDGTLLGYHQSG
 QWG1st 373 KYHHYFRGKGVNTVNTAGLLVTPGNVVRGGSVNIDGLSNASTVLFKGNITGYSSVDNI
 QWG20st373 KYHHYFRGKGVNTVNTAGLLVTPGNVVRGGSVNIDGLSNASTVLFKGNITGYSSVDNI
 QWG1st 433 ELKVWGDFTFNTVGGSRKNVMETS DATGWMHYIQRTEGKVESYLNGTMNVIEGLTVNQD
 QWG20st433 ELKVWGDFTFNTVGGSRKNVMETS DATGWMHYIQRTEGKVESYLNGTMNVIEGLTVNQD
 QWG1st 492 TSLKRNLVVSNEIKVRAASGLRIWNDKYGVIFRNSEDQLHIPTNANAGESGGLPLRPLSIT
 QWG20st492 TSLKRNLVVSNEIKVRAASGLRIWNDKYGVIFRNSEDQLHIPTNANAGESGGLPLRPLSIT
 QWG1st 555 LDTGKVVIPDLDSHTTFAENGFIFKFGHGAGAGGYDIQYAAAPIFQEIDDDAVSKYYPIV
 QWG20st555 LDTGKVVIPDLDSHTTFAENGFIFKFGHGAGAGGYDIQYAAAPIFQEIDDDAVSKYYPIV
 QWG1st 617 KQKFLQGKAVWSLGEINSGTFVLHHYKEDGTQGHSTRFNADGTVNFPDNVQVGGGEATI
 QWG20st617 KQKFLQGKAVWSLGEINSGTFVLHHYKEDGTQGHSTRFNADGTVNFPDNVQVGGGEATI
 QWG1st 677 ARNGNIFSDIWNFGAGNITNIRDAIATRVSKEGDTMTGRLTLKTNSDAVVIDYPADEAGY
 QWG20st677 ARNGNIFSDIWNFGAGNITNIRDAIATRVSKEGDTMTGRLTLKTNSDAVVIDYPADEAGY
 QWG1st 739 VKGKKGVDNWWYVGNNGADNGLAFWSFQSQGGININPNGEVILSPQGTSIFSINRDIYMN
 QWG20st739 VKGKKGVDNWWYVGNNGADNGLAFWSFQSQGGININPNGEVILSPQGTSIFSINRDIYMN
 QWG1st 800 GAHWVARKSGAWGDQWGLEAPYFLEFGSVGEDSYYPHIGRSVISGQGYTTSVELGMRRTPT
 QWG20st800 GAHWVARKSGAWGDQWGLEAPYFLEFGSVGEDSYYPHIGRSVISGQGYTTSVELGMRRTPT
 QWG1st 861 QQWGWQAIRVGN AERGDGPV GIFEHSSGRFYS PPSV QTPSISVNTDNLGASSIAIGDNDTG
 QWG20st861 QQWGWQAIRVGN AERGDGPV GIFEHSSGRFYS PPSV QTPSISVNTDNLGASSIAIGDNDTG
 QWG1st 924 LVHGGDGRINMYANSMHASWGAGYHIHEGLWDTTGALWTETGRAIISFGHLVQQNDSYS
 QWG20st924 LVHGGDGRINMYANSMHASWGAGYHIHEGLWDTTGALWTETGRAIISFGHLVQQNDSYS
 QWG1st 984 TFVRDVYVRSDIRVKKDLVKFENASQTLKINGYTYMQKRGLDEEGNQKWEPNAGLIAQE
 QWG20st984 TFVRDVYVRSDIRVKKDLVKFENASQTLKINGYTYMQKRGLDEEGNQKWEPNAGLIAQE
 QWG1st 1044 VQAILPELVEGDPDGEALLRLNNGVIGLNTAAINEHTAEIAELKSEIEELKALIKSLLK
 QWG20st1044 VQAILPELVEGDPDGEALLRLNNGVIGLNTAAINEHTAEIAELKSEIEELKALIKSLLK

图 8. 嵌合噬菌体 QWG 遗传稳定性

Figure 8. Genetic stability of Chimeric phage QWG.

件下均能存活, 与两株亲本噬菌体的 pH 稳定性 (3–11) 和热稳定性 (28–60 °C) 结果相近。3 株噬菌体在感染复数为 0.001 时, 噬菌体的增殖倍数均达到了最大值。此外, 嵌合噬菌体 QWG 与两株亲本噬菌体的潜伏期均为 10 min, WG01、QL01 和嵌合噬菌体 QWG 的爆发量分别为 130 PFU/细胞、300 PFU/细胞和 180 PFU/细胞。这表明嵌合噬菌体 QWG 生物学特性稳定。嵌合噬菌体的遗传稳定性试验结果表明, 嵌合噬菌体改造部分基因在传代过程中可以稳定遗传。这些试验结果均显示了通过基

因改造技术可以得到具有遗传稳定性并且宿主谱发生改变的噬菌体, 为快速筛选针对特定临床病原菌的噬菌体提供了一种思路。

参考文献

- [1] Rukambile E, Sintchenko V, Muscatello G, Kock R, Alders R. Infection, colonization and shedding of *Campylobacter* and *Salmonella* in animals and their contribution to human disease: A review. *Zoonoses and Public Health*, 2019, 66(6): 562–578.
- [2] Jajere SM. A review of *Salmonella enterica* with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host

- specificity and antimicrobial resistance including multidrug resistance. *Veterinary World*, 2019, 12(4): 504–521.
- [3] Qiao M, Ying GG, Singer AC, Zhu YG. Review of antibiotic resistance in China and its environment. *Environment International*, 2018, 110: 160–172.
- [4] Monira S, Shabnam SA, Ali SI, Sadique A, Johura FT, Rahman KZ, Alam NH, Watanabe H, Alam M. Multi-drug resistant pathogenic bacteria in the gut of young children in Bangladesh. *Gut Pathogens*, 2017, 9: 19.
- [5] Nair DVT, Venkitanarayanan K, Johny AK. Antibiotic-resistant *Salmonella* in the food supply and the potential role of antibiotic alternatives for control. *Foods*, 2018, 7(10): E167.
- [6] Dy RL, Rigano LA, Fineran PC. Phage-based biocontrol strategies and their application in agriculture and aquaculture. *Biochemical Society Transactions*, 2018, 46(6): 1605–1613.
- [7] Oduor JMO, Onkoba N, Maloba F, Nyachio A. Experimental phage therapy against haematogenous multi-drug resistant *Staphylococcus aureus* pneumonia in mice. *African Journal of Laboratory Medicine*, 2016, 5(1): 435.
- [8] Yu L, Wang S, Guo ZM, Liu HT, Sun DG, Yan GM, Hu DL, Du CT, Feng X, Han WY, Gu JM, Sun CJ, Lei LC. A guard-killer phage cocktail effectively lyses the host and inhibits the development of phage-resistant strains of *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(2): 971–983.
- [9] Gu JM, Liu XH, Li Y, Han WY, Lei LC, Yang YJ, Zhao HL, Gao Y, Song J, Lu R, Sun CJ, Feng X. A method for generation phage cocktail with great therapeutic potential. *PLoS One*, 2012, 7(3): e31698.
- [10] Bárdy P, Pantůček R, Benešík M, Doškař J. Genetically modified bacteriophages in applied microbiology. *Journal of Applied Microbiology*, 2016, 121(3): 618–633.
- [11] Kaźmierczak Z, Piotrowicz A, Owczarek B, Hodyra K, Miernikiewicz P, Lecion D, Harhala M, Gorski A, Dabrowska K. Molecular imaging of T4 phage in mammalian tissues and cells. *Bacteriophage*, 2014, 4(2): e28364.
- [12] Yoichi M, Abe M, Miyanaga K, Unno H, Tanji Y. Alteration of tail fiber protein gp38 enables T2 phage to infect *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Biotechnology*, 2005, 115(1): 101–107.
- [13] Chen MM, Zhang L, Abdelgader SA, Yu L, Xu JT, Yao HC, Lu CP, Zhang W. Alterations in gp37 expand the host range of a T4-like phage. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017, 83(23): AEM.01576–17.
- [14] Carey-Smith GV, Billington C, Cornelius AJ, Hudson JA, Heinemann JA. Isolation and characterization of bacteriophages infecting *Salmonella* spp.. *FEMS Microbiology Letters*, 2006, 258(2): 182–186.
- [15] Wang CB, Chen QM, Zhang C, Yang J, Lu ZX, Lu FX, Bie XM. Characterization of a broad host-spectrum virulent *Salmonella* bacteriophage fmb-p1 and its application on duck meat. *Virus Research*, 2017, 236: 14–23.
- [16] Abedon ST, Kuhl SJ, Blasdel BG, Kutter EM. Phage treatment of human infections. *Bacteriophage*, 2011, 1(2): 66–85.
- [17] Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris JG Jr. Bacteriophage therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2001, 45(3): 649–659.
- [18] Cisek AA, Dabrowska I, Gregorczyk KP, Wyżewski Z. Phage therapy in bacterial infections treatment: one hundred years after the discovery of bacteriophages. *Current Microbiology*, 2017, 74(2): 277–283.
- [19] Dufour N, Debarbieux L. Phage therapy: a realistic weapon against multidrug resistant bacteria. *Médecine Sciences*, 2017, 33(4): 410–416.
- [20] Pires DP, Cleto S, Sillankorva S, Azeredo J, Lu TK. Genetically engineered phages: a review of advances over the Last Decade. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2016, 80(3): 523–543.
- [21] Weitz JS, Poisot T, Meyer JR, Flores CO, Valverde S, Sullivan MB, Hochberg ME. Phage-bacteria infection networks. *Trends in Microbiology*, 2013, 21(2): 82–91.
- [22] Davidson AR, Cardarelli L, Pell LG, Radford DR, Maxwell KL. Long noncontractile tail machines of bacteriophages//Rossmann M, Rao V. *Viral Molecular Machines*. Boston, MA: Springer, 2012.
- [23] Le S, He XS, Tan YL, Huang GT, Zhang L, Lux R, Shi WY, Hu FQ. Mapping the tail fiber as the receptor binding protein responsible for differential host specificity of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages PaP1 and JG004. *PLoS One*, 2013, 8(7): e68562.
- [24] Ando H, Lemire S, Pires DP, Lu TK. Engineering modular viral scaffolds for targeted bacterial population editing. *Cell Systems*, 2015, 1(3): 187–196.
- [25] Dabrowska K, Switała-Jelen K, Opolski A, Weber-Dabrowska B, Gorski A. Bacteriophage penetration in vertebrates. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, 98(1): 7–13.
- [26] Montag D, Hashemolhosseini S, Henning U. Receptor-recognizing proteins of T-even type bacteriophages: The receptor-recognizing area of proteins 37 of phages T4 TuLa and TuLb. *Journal of Molecular Biology*, 1990, 216(2): 327–334.

Recombinant T4 coliphage gp37 gene can expand its host range in *Salmonella*

Yanxiu Li¹, Donglin Shi¹, Min Li¹, Yuyi Xiao¹, Zibo Zhang¹, Zhengyang Chen¹, Huangxin Zhong¹, Qingxin Liu^{1,2*}, Huochun Yao¹, Wei Zhang^{1*}

¹ School of Animal Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu Province, China

² School of Animal Husbandry and Veterinary, Jiangsu Agriculture and Forestry Vocational and Technical College, Jurong 212400, Jiangsu Province, China

Abstract: [Objective] In this study, the host range of phage QL01 was changed by replacing the gene fragment of QL01 gp37. This lays the foundation for studying the host range mechanism of T4 phage and rapid screening of phages targeting specific pathogens. [Methods] Eight gene fragments on WG01 gp37 were substituted by QL01 using homologous recombination, and then the different chimeric phages were screened and their host range determined by using *Salmonella* as the host strain. Finally, the biological characteristics such as the optimal multiplicity of infection, one-step growth curve, and other biological characteristics of the chimeric phage QWG were analyzed, as well as the genetic stability. [Results] A total of five chimeric phages (QWA, QWC, QWF, QWG, QWFG) were obtained in this experiment. The results of the host range analysis test showed that chimeric phage could lyse 7, 8, 4, 10 and 9 strains of *Salmonella*, respectively, compared to phage QL01. That is to say, chimeric phages have all obtained a relatively broad host range of which the host bacteria of QWG widened the most. The results of biological characteristics test showed that the chimeric phage QWG has stable biological properties. We cultured the chimeric phage QWG continuously for 20 generations, sequenced the tail genes from the first and 20th generation chimeric phage and analyzed their hereditary stability. The sequencing results indicated that the gene fragment of the chimeric phage engineered part could stably inherit. [Conclusion] Genetic engineering can generate chimeric phage with broadened host range and hereditary stability, which provides a possibility for rapid screening of phage against specific pathogens.

Keywords: genetic engineered, chimeric phage, host range, homologous recombination, biological characteristics

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Key Research and Development Project (2018YFC1602500), by the National Natural Science Foundation of Xinjiang Joint Project (U1803109), by the Jiangsu Agricultural and Forestry Vocational and Technical College Hospital-level Fund Supporting Project (2016kj003) and by the Nanjing Agricultural University srt Project (2018syzx016)

*Corresponding author. Wei Zhang, Tel/Fax: +86-25-84395328, E-mail: vszw@njau.edu.cn; Qingxin Liu, Tel: +86-511-87268613, Fax: +86-511-87290000, E-mail: lqx199108@hotmail.com

Received: 2 July 2019; Revised: 20 September 2019; Published online: 19 December 2019