

• 生物技术与方法 •

噬菌体裂解细菌过程中冷光实时监测活菌方法的建立

樊粉霞¹, 李旭^{1,2}, 阚飙¹

1 中国疾病预防控制中心 传染病预防控制所 传染病预防控制国家重点实验室, 北京 102206

2 北京工商大学 轻工科学技术学院, 北京 100048

樊粉霞, 李旭, 阚飙. 噬菌体裂解细菌过程中冷光实时监测活菌方法的建立. 生物工程学报, 2021, 37(4): 1406-1414.

Fan FX, Li X, Kan B. Development of a luminescence real-time method for monitoring live bacteria during phage lysis. Chin J Biotech, 2021, 37(4): 1406-1414.

摘要: 产毒素的霍乱弧菌 *Vibrio cholerae* 可导致严重腹泻, 已引起 7 次全球大流行。对于烈性噬菌体清除霍乱弧菌的效果评价上, 一般使用传统的活细胞培养计数及噬菌斑进行观察分析, 但操作费时耗力, 尤其不能实时获得菌株被裂解及残存细胞的数量变化。进一步探索简便、能够实时监测噬菌体裂解霍乱弧菌的方法是非常必要的。利用荧光报告质粒的策略, 将可在霍乱弧菌中高表达生物冷光的质粒转化至 O1 血清群霍乱弧菌耐药菌株中, 通过测定比较生物冷光以及活菌计数, 实时分析了噬菌体对液体培养状态下霍乱弧菌的裂解效果, 结果显示: 冷光值作为监测指标与传统的活细胞计数方法有很高的相关性, 通过测定霍乱弧菌耐药株的冷光值监测霍乱弧菌活细胞的数量, 可实时分析噬菌体裂解霍乱弧菌过程中细菌残存数量。这种分析方法与菌落计数和噬斑形成观察相比, 能够重复对同一样本进行无干扰的连续多时间点检测, 没有经过再培养或噬斑形成的时间迟滞, 有利于进行噬菌体与宿主菌相互作用的实时监测分析。

关键词: 噬菌体, 霍乱弧菌, 冷光值, 实时监测, 相关系数

Development of a luminescence real-time method for monitoring live bacteria during phage lysis

Fenxia Fan¹, Xu Li^{1,2}, and Biao Kan¹

1 State Key Laboratory of Infectious Disease Prevention and Control, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

2 School of Light Industry, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China

Abstract: The toxin-producing bacterium *Vibrio cholerae* can cause severe diarrhea and has caused seven global pandemics. Traditional viable cell counts and phage plaques are commonly used to evaluate the efficacy of virulent phage clearance of *V. cholerae*, but these operations are time-consuming and labor-intensive, and difficult to provide real-time changes. It is desirable to develop a simple and real-time method to monitor *V. cholerae* during phage lysis. In this study, a luminescence-generating plasmid pBBR-pmdh-luxCDABE was transformed into three O1 serogroup drug-resistant strains

Received: January 10, 2021; **Accepted:** March 15, 2021

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 81501724), National Science and Technology Major Project (No. 2018ZX10713003-002-009).

Corresponding author: Biao kan. Tel: +86-10-58900744; E-mail: kanbiao@icdc.cn

国家自然科学基金 (No. 81501724), 国家十三五重大专项 (No. 2018ZX10713003-002-009) 资助。

of *V. cholerae*. The results showed that the luminescence value as a monitoring index correlates well with the traditional viable cell count method. Monitoring the number of live cells of *V. cholerae* by measuring the luminescence allowed real-time analysis of the number of bacteria remaining during phage lysis. This method enables repeated, interference-free, continuous multiple-time-point detection of the same sample without the time delay of re-culture or plaque formation, facilitating real-time monitoring and analysis of the interaction between the phage and the host bacteria.

Keywords: phage, *Vibrio cholerae*, luminescence, real-time monitoring, correlation coefficient

霍乱弧菌 *Vibrio cholerae* 主要栖息在自然界水体环境中^[1], 属于革兰氏阴性、兼性厌氧菌, 能够定殖于水体中浮游生物表面。通过水或食物摄入产毒素的霍乱弧菌可引起严重腹泻^[2], 并可导致人群暴发流行。霍乱弧菌已引起 7 次全球霍乱大流行, 且当前仍处在第 7 次霍乱大流行之中。按照霍乱弧菌脂多糖抗原的不同, 已分出 200 多个血清群, 目前引起流行的几乎均为 O1 及 O139 群霍乱弧菌产毒株^[3]。数十年间, O1 血清群霍乱弧菌的耐药菌株逐渐出现^[4-6], 尤其出现耐药质粒介导的菌株耐药^[7]。

耐药菌株的出现和流行, 已造成临床治疗的障碍, 除寻找新的抗生素外, 利用噬菌体裂解致病细菌用于治疗的方法也在积极探索中^[8]。生物界中噬菌体的数量非常庞大, 并且其对宿主的裂解有很高的特异性。已有利用噬菌体治疗铜绿假单胞菌^[9]、大肠杆菌^[10]及结核分枝杆菌^[11]等的报道。同时, 噬菌体作为人体及动物微生物群的重要组成部分, 也可影响与人类共生的细菌群的结构和功能, 进一步影响人类健康, 已有研究表明噬菌体也成为一些非感染性疾病肿瘤、酒精性肝病及糖尿病等不错的预防或辅助治疗方法^[12-16]。噬菌体进入宿主细胞后指数增殖, 能在短时间内杀灭细菌。目前分析噬菌体裂解病原菌的效果, 主要依靠稀释细胞计数或者琼脂双层实验观察噬菌斑, 这些实验操作费时, 尤其不能实现实时监测和大批量操作, 因此研究实时监测分析噬菌体裂解菌体的方法, 非常有利于噬菌体-宿主相互作用的研究。

生物冷光在宿主菌内表达是一种很好的指示

细菌数量的标记。已有研究利用生物冷光来指示启动子的生物活性^[17]、定量蛋白质互作强度^[18]和分析细菌的定位^[17]等。本研究在噬菌体对霍乱弧菌的裂解研究中, 将高表达生物冷光的质粒转化到霍乱弧菌宿主菌中, 分析霍乱弧菌活细胞计数与同时间点的培养体系冷光值对应关系, 发现两者具有很高的相关性, 并进一步利用冷光的实时监测分析了噬菌体 VP3 对霍乱弧菌的裂解过程, 建立了简便可行的对噬菌体裂解宿主菌过程的实时监测方法, 也能为后续深入研究噬菌体对耐药霍乱弧菌的靶向裂解、水产品处理或临床治疗的探索提供快捷、可行的分析工具。

1 材料与方法

1.1 重组发光质粒的构建

PCR 扩增霍乱弧菌中 4 个管家基因 (*rplJ* 基因、*mdh* 基因、*dnaK* 基因以及 *pntA* 基因), 分别得到了这 4 个管家基因的启动子片段 (引物序列见表 1)。扩增片段经切胶回收和纯化, 用 *Xba* I 和 *Bam*H I 限制性内切酶双酶切每个启动子 DNA 片段及生物发光质粒 pBBRlux, DNA 连接酶将启动子区域分别克隆到质粒 pBBRlux 上, 化学转化到菌株 DH5 α λ pir 中, 经适当稀释后, 涂布含有氯霉素 (30 μ g/mL) 的抗性平板, 在 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养过夜, 化学发光成像仪下挑取黑色的阳性重组克隆, 并测序, 最终成功构建质粒 pBBR-*prplJ*-luxCDABE、pBBR-*pmdh*-luxCDABE、pBBR-*pdnaK*-luxCDABE 以及 pBBR-*ppntA*-luxCDABE (表 2)。

表 1 研究所用引物

Table 1 primers used in this study

Primer name	Sequence (5'-3') ^a	Enzyme
rpIJ-F	CGG <u>TCTAG</u> ATAGAAGCTCTGCTGGTTGCTCTGAA	<i>Xba</i> I
rpIJ-R	CGC <u>GGATCC</u> CTTGGATTAACCTCCTGGTTGTCGTT	<i>Bam</i> H I
dnaK-F	CGG <u>TCTAG</u> AGTGTTTAACCCCTGAATTCCACCAAG	<i>Xba</i> I
dnaK-R	CGC <u>GGATCC</u> CAGGCTATCTCCAAAAAATTCTAT	<i>Bam</i> H I
mdh-F	CGG <u>TCTAG</u> AGCCAAAGCGTTCTTCTTTTAGTAA	<i>Xba</i> I
mdh-R	CGC <u>GGATCC</u> CGTAAATCTCCTTGAGAGTAATCTC	<i>Bam</i> H I
pntA-F	CGG <u>TCTAG</u> TCGTTTTATTTCGCTCTGATTTGGTT	<i>Xba</i> I
pntA-R	CGC <u>GGATCC</u> AGCGGTTCTTGACTATTGGCACAA	<i>Bam</i> H I

^aRestriction sites are underlined.

表 2 研究所用菌株及质粒

Table 2 Strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Relevant genotype	Reference/resource
Strains		
ICDC-VC70	O1 serogroup, antibiotic resistance (TET, NIT, TMP-SMX)	Lab collection
ICDC-VC81	O1 serogroup, antibiotic resistance (NAL, TET, DOX)	Lab collection
ICDC-VC2231	O1 serogroup, antibiotic resistance (NAL, TET, NIT, TMP-SMX)	Lab collection
<i>Vc</i> (<i>prpIJ</i>)	N16961 transformed with plasmid pBBR- <i>prpIJ</i> -luxCDABE	This study
<i>Vc</i> (<i>ppntA</i>)	N16961 transformed with plasmid pBBR- <i>ppntA</i> -luxCDABE	This study
<i>Vc</i> (<i>pmdh</i>)	N16961 transformed with plasmid pBBR- <i>pmdh</i> -luxCDABE	This study
<i>Vc</i> (<i>pdnaK</i>)	N16961 transformed with plasmid pBBR- <i>pdnaK</i> -luxCDABE	This study
VC70(<i>pmdh</i>)	ICDC-VC70 transformed with plasmid pBBR- <i>pmdh</i> -luxCDABE	This study
VC81(<i>pmdh</i>)	ICDC-VC81 transformed with plasmid pBBR- <i>pmdh</i> -luxCDABE	This study
VC2231(<i>pmdh</i>)	ICDC-VC2231 transformed with plasmid pBBR- <i>pmdh</i> -luxCDABE	This study
N16961	Spontaneous mutant of N16961, Inaba, Sm ^s	Lab collection
SM10 λ pir	Km, thi thr leu tonA lacY supE recA::RP4-2-TC::Mu λ pir	Lab collection
DH5 α λ pir	sup E44, Δ lacU169 (Φ lacZ Δ M15), recA1, endA1, hsdR17, thi-1, gyrA96, relA1	Lab collection
Plasmids		
pBBRlux	luxCDABE, CHL ^R	Lab collection
pBBR- <i>prpIJ</i> -luxCDABE	Promoter region of <i>prpIJ</i> in pXEN-luxCDABE	This study
pBBR- <i>pmdh</i> -luxCDABE	Promoter region of <i>pmdh</i> in pXEN-luxCDABE	This study
pBBR- <i>pdnaK</i> -luxCDABE	Promoter region of <i>pdnaK</i> in pXEN-luxCDABE	This study
pBBR- <i>ppntA</i> -luxCDABE	Promoter region of <i>ppntA</i> in pXEN-luxCDABE	This study

NAL: nalidixic acid; TMP-SMX: trimethoprim/sulfamethoxazole; TET: tetracycline; NIT: nitrofurantoin; DOX: doxycycline; CHL: chloramphenicol.

1.2 菌落冷光观察

将涂有细菌单克隆的培养皿过夜培养, 利用化学发光凝胶成像系统 (美国 UVP) 拍照。首先正常光线拍下平板照片, 然后在暗室条件下拍摄细菌发光的平板照片, 此时白色背景下, 阳性菌

落为黑色。

1.3 菌液冷光值测定

取菌液 200 μ L 至 96 孔板 (Costar 3917), 利用 Tecan Infinite M200 Pro 酶标仪检测样品冷光值和菌液浓度 (OD_{600})。冷光值 = (测得的冷光值 - 本

底值)/(OD_{600} -本底值),“本底值”是培养基空白对照或特定时间点 0.22 μm 的滤器过滤后的培养液的冷光值和浊度值。每组实验取 3 个生物重复的均值,计算标准差。

1.4 噬菌体琼脂双层裂解实验

向每管 4 mL 的 0.7% 的半固体培养基中分别加入 100 μL 宿主菌,振荡混匀,倒入底层铺有 LB 固体培养基的平皿中,形成固体双层平板。待上层半固体琼脂凝固后(约 5 min),滴加 10 μL 噬菌体种子液,晾干后正置放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中,培养过夜。

2 结果与分析

2.1 *pmdh* 基因的启动子可高效促进冷光基因的高表达

选取霍乱弧菌中 *rplJ*、*dnaK*、*pntA* 和 *mdh* 这 4 个管家基因的启动子,克隆并插入到质粒 pBBRlux 表达生物冷光的基因 *luxCDABE* 上游,分别得到质粒:pBBR-*prplJ*-*luxCDABE*、pBBR-*pmdh*-*luxCDABE*、pBBR-*pdnaK*-*luxCDABE* 和 pBBR-*ppntA*-*luxCDABE*。将这 4 个质粒分别转化到霍乱弧菌 N16961 中,分别得到菌株 Vc(*prplJ*)、Vc(*pmdh*)、Vc(*pdnaK*)和 Vc(*ppntA*),含空白质粒的阴性对照菌株为 Vc(NC),对平板上的单菌落进行生物发光观察及液体培养测定生物冷光值(图 1),结果显示:与含对照质粒的霍乱弧菌相比,分别含有 4 个质粒的菌株,均能观察到发光(在白色背景下阳性克隆显示黑色),但含有 pBBR-*pmdh*-*luxCDABE* 质粒的菌株单菌落颜色最黑,冷光值表达最强(图 1A);液体培养 4 种菌株至 $OD_{600}=0.6$,分别测定冷光值,相同浓度及生长条件下,含有 pBBR-*pmdh*-*luxCDABE* 质粒的霍乱弧菌冷光表达最高,此结果与单克隆平板观察结果一致,说明基因 *pmdh* 的启动子活性最高,所以本研究中我们选择了重组生物发光质粒 pBBR-*pmdh*-*luxCDABE*,进行生物发光霍乱弧菌的构建和后续实验。

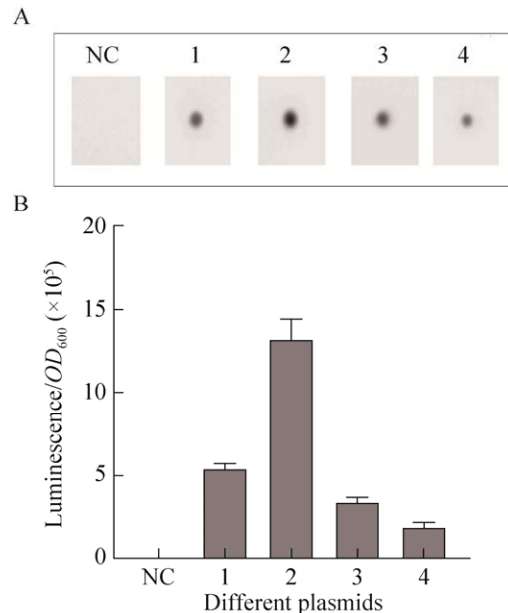


图 1 *pmdh* 的启动子促进冷光的高表达

Fig. 1 The promoter of *pmdh* gene can promote high expression of *luxCDABE*. (A) The luminescence observation of the clones from plates by the chemiluminescence system. (B) The luminescence value analysis of bacterial liquid culture. NC: Vc(NC); 1: Vc(*prplJ*); 2: Vc(*pmdh*); 3: Vc(*pdnaK*); 4: Vc(*ppntA*).

2.2 冷光值可作为细菌浓度的指示标准

将液体培养霍乱弧菌菌株 Vc(*pmdh*),每隔 2 h 测定其在 10 h 内生长过程中的冷光值,并用传统的细胞计数方法计算样本的细胞数量,最终分析每个时间点的冷光值和细胞计数值,如图 2A 所示:两种方法测定细菌的浓度所做趋势线是基本一致的,整体看细胞计数的数值(CFU)均高于特定时间点的冷光值(Luminescence),进一步分析两组数据,发现两组数据有非常高的相关系数 $R^2=0.988$,结果表明冷光值测定可作为衡量细胞浓度的指示标准。

2.3 VP3 噬菌体裂解霍乱弧菌耐药菌株

本研究最终目的是通过分析霍乱弧菌生物冷光值的表达指示噬菌体裂解霍乱弧菌的过程。首先,挑选了 3 株 O1 血清群、具有耐药表型的霍乱弧菌 ICDC-70、ICDC-81 和 ICDC-VC2231(4),

利用烈性噬菌体 VP3 对固体平板及悬浮培养状态的霍乱弧菌分别用双层琼脂噬斑实验及菌液浊度观察进行了裂解实验 (图 3), 如图所示: 与对照实验组 (不加噬菌体) 相比, 3 株耐药菌株 ICDC-70、ICDC-81 和 ICDC-VC2231 均可被 VP3 裂解, 产生明显的噬斑 (图 3A); 悬浮状态的培养菌液, 在 $OD_{600}=0.3$ 时, 按感染复数 multiplicity of infection (MOI)=0.1 加入 VP3 噬菌体, 振荡培养 6 h 后, 加入噬菌体的培养液均为澄清状态, 表明 3 种菌株均可被 VP3 裂解。

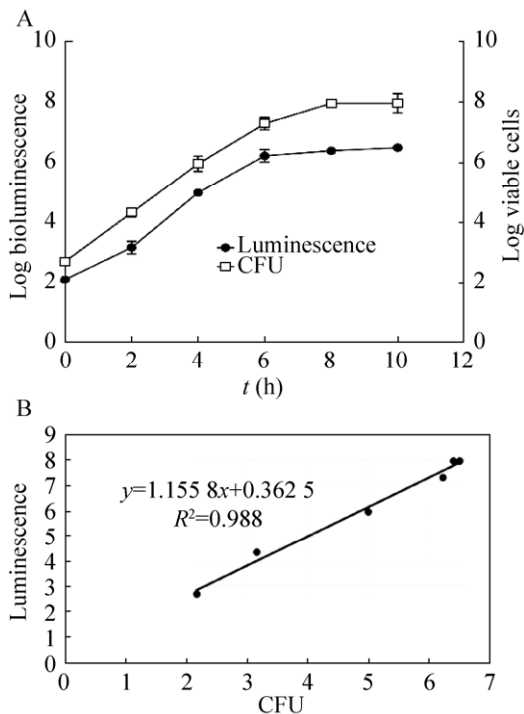


图 2 冷光值与传统的细胞计数值具有很高的相关系数

Fig. 2 High correlation coefficient was observed between the luminescence value and viable cell count value. (A) Real-time analysis of luminescence and cell count value during *V. cholerae* growth process. Luminescence of left longitudinal axis: the value of luminescence value after logarithmic analysis. CFU of right longitudinal axis: the logarithmic analysis number of viable cells per milliliter of bacterial solution calculated by plate counting method. (B) The correlation coefficient between luminescence values and the corresponding cell count values from the same samples.

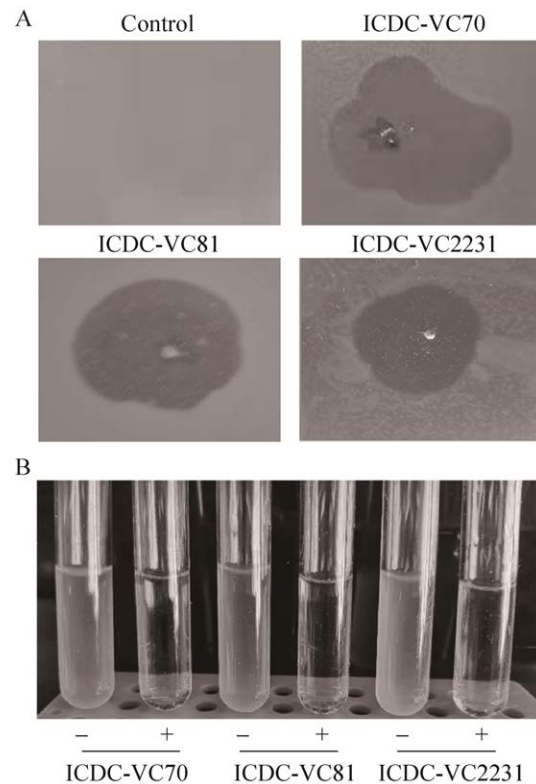


图 3 噬菌体 VP3 裂解霍乱弧菌耐药菌株

Fig. 3 VP3 phage sensitivity detection of *V. cholerae* drug resistant strains. (A) VP3 plaque observation of *V. cholerae*, the VP3 sensitivity detection was performed by double-layer plaque assay, plaque formation indicates that the strain is sensitive to VP3. Control: *V. cholerae* sample without VP3. (B) Determination of VP3 sensitivity of *V. cholerae* drug resistant strains in liquid culture. Phage was mixed with *V. cholerae* and cultured for 6 hours, after observation by naked eye, the liquid culture was stored in the refrigerator at 4 °C overnight and the result was saved by photo.

2.4 冷光值实时监测分析噬菌体对霍乱弧菌耐药菌株的裂解过程

本研究已明确冷光值可很好地指示活细菌的生长数量、噬菌体 VP3 能够裂解霍乱弧菌耐药菌株 ICDC-VC70、ICDC-VC81 和 ICDC-VC2231 的基础上, 我们进一步将两者结合起来, 深入分析冷光值是否可指示噬菌体裂解霍乱弧菌的整个过程。将质粒 pBBR-pmdh-luxCDABE 分别转化至菌株 ICDC-VC70、ICDC-VC81 和 ICDC-VC2231 中, 分别得到菌株 VC70(pmdh)、VC81(pmdh)和 VC2231 (pmdh) (表 2)。连续 8 h 的监测分析结果如图 4 所示:

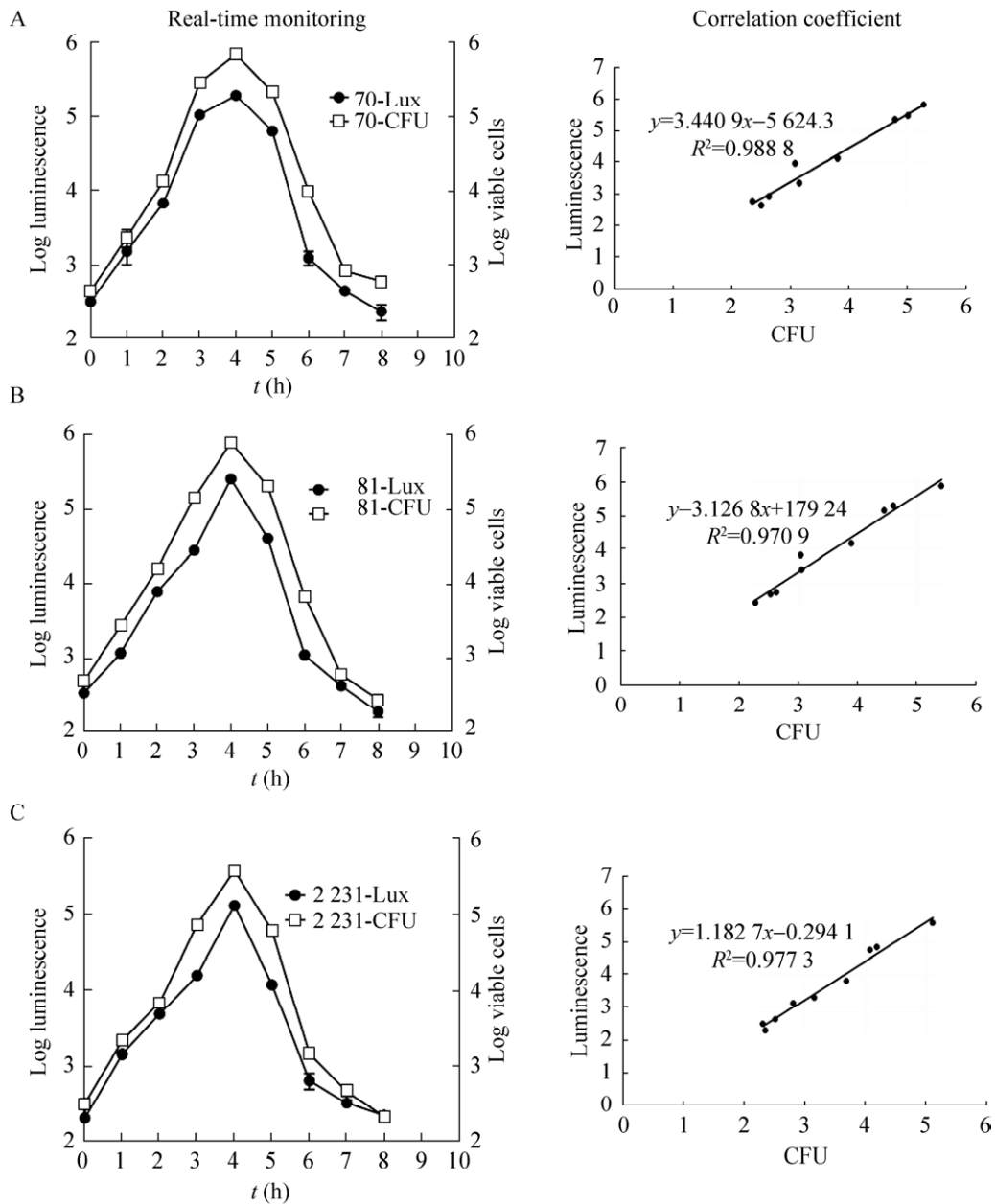


图4 冷光值实时监测噬菌体裂解霍乱弧菌残存细胞的数量

Fig. 4 Real-time monitoring of the residual viable cells of *V. cholerae* during VP3 lysis process. (A) The lysis process of ICDC-VC70 by VP3 was monitored in real time. After cells were cultured for 2 hours, VP3 was added according to MOI = 0.1. The luminescence value and the viable cell count were detected every hour. The monitoring curve was drawn to analyze the correlation between the luminescence value and the number of living cells. (B) The VP3 lysis process of ICDC-VC81 was monitored in real time. The same as mentioned above. (C) The VP3 lysis process of ICDC-VC2231 was monitored in real time. The left column is the real-time analysis curve, and the right column is the correlation coefficient of the two kinds of values.

图4A、4B和4C分别为各菌株冷光监测过程及两种统计方式的相关系数。结果显示：3种菌株在

液体培养状态下均可被VP3裂解，冷光值均低于同时时间点的细胞计数值，冷光值监测曲线和活细

胞计数曲线的趋势基本一致, 3 种菌株监测过程中冷光值和细胞计数值的相关系数 R^2 都很高, 分别为 0.988 8、0.970 9 和 0.977 3, 表示冷光值可作为很好的指示标准用来分析液体培养状态下霍乱弧菌耐药菌被噬菌体裂解的全过程。

3 讨论

生物冷光作为细胞数量的指示系统有其明显优势。*luxCDABE* 位于多拷贝质粒上, 构建冷光表达质粒首先需要考虑质粒携带的抗性, 因本研究或者将来的实验过程中, 噬菌体的裂解靶细菌是耐药菌株, 在选取携带冷光表达的质粒时, 需避免质粒的抗生素抗性与耐药菌株相同, 如果两者携带相同的抗生素, 可能会引起质粒丢失问题。同时, 需要考虑 *luxCDABE* 冷光表达基因的上游启动子的选择, 必须是霍乱弧菌的高表达的管家基因, 这样在不加任何诱导剂情况下, 启动子仍能启动冷光值的高表达。利用霍乱弧菌管家基因的高强度启动子控制生物冷光的表达, 实验过程中不需要外源激发光或外加任何底物就能发光; 检测背景噪音较低; *luxCDABE* 的报告系统操作方便, 可实时连续监测^[19]。本研究结果明确了宿主细胞内表达的生物冷光值与传统的细胞计数的数值有非常高的相关性, 很好地指示了噬菌体裂解霍乱弧菌时残存的霍乱弧菌的数量。传统的细胞计数方法, 需要平板制备、不同梯度稀释样本, 菌落计数等耗时很长的操作过程, 第 2 天才能拿到结果, 并且在进行平板活细胞计数的操作过程中细胞内携带噬菌体的细胞有少数可能也会被裂解, 不能及时反映当时培养液里的细菌状态。本研究建立的方法操作简单、省时省力, 可对同一生物样本或实验动物进行重复操作, 减少实验重复误差, 既保证实验结果的一致性, 又可节约实验成本, 实现了样本的实时监测分析, 在监测样本量大和时间长的情况下, 也不会繁琐。

生物冷光报告系统应用的范围非常广泛, 并

具有很好的应用价值。利用冷光进行检测可用于多个领域: 在基础研究领域, 可利用其研究基因的转录、表达及调控; 在农业微生物领域, 可跟踪病原菌致病过程动态及分布规律^[20]; 在医学微生物领域, 可以用于疾病的快速诊断及防治结核等顽固疾病的新药筛选^[21]; 在食品卫生领域, 可用于微生物污染检测^[22]; 在环境领域, 可监测环境污染物的遗传毒性^[23]。本研究主要是将该技术应用到了噬菌体裂解细菌的监测过程。生物冷光的监测方便, 不仅可用于液体培养细胞的分析, 也可以用于定植于动物体表或体内的菌株数量的指示, 这样除了用噬菌体治疗时可用, 利用抗生素治疗时也可以应用, 在研究细菌对外界理化因素的耐受及微生态菌群之间互作时也可以应用。

冷光值可准确指示活的霍乱弧菌的数量。根据我们的实验数据, 冷光质粒在活的霍乱弧菌中表达, 可被检测到, 并且冷光值和活细菌的数量正相关; 当噬菌体裂解细菌后, 大量菌体死亡, 可监测到冷光值迅速下降, 样品中能监测到的冷光值与剩余活的菌体数量仍呈现正相关性, 说明菌体死亡后释放的细胞内容物的冷光值很快就消失。虽然在我们研究中发现: 细菌被裂解后释放到培养物中的细胞内容物会产生一定的本底冷光, 但这个本底值非常低, 几乎可忽略不计。但为了精确分析, 我们可以在每个特定时间点取样测定时, 用滤器过滤后的少量培养液作为背景值, 实验组的测定值减去培养基的背景值就是活细胞表达的冷光值, 很容易就排除了由不同的监测时间点引起的背景干扰因素, 让数据更加准确可靠。噬菌体实验研究过程中会出现这样的现象: 实验开始菌株的裂解效果很明显, 后期又会出现菌液变浑浊的情况, 再重新出现的细菌可能是原有病原菌突变产生了噬菌体抗性^[24], 也可能是污染了其他新细菌, 这种情况下很难区分。如果原始菌株携带冷光指示, 就可以对后期生长的菌株进行

检测,分析其冷光值,如果冷光值很低,预示着是感染的新细菌,反之,为原有的菌株产生了噬菌体抗性,这样大大简化和缩短了实验分析流程。

针对霍乱弧菌与噬菌体相互作用的研究,可应用于噬菌体感染机制、菌株抗性变异、克隆群演化以及在临床中探索噬菌体治疗。本研究探索使用荧光报告质粒的策略,将可在霍乱弧菌中高表达生物冷光的质粒转化到 O1 血清群霍乱弧菌耐药菌株中,通过测定比较生物冷光以及活菌计数,实时分析了噬菌体对液体培养状态下霍乱弧菌的裂解效果,通过测定霍乱弧菌耐药株的冷光值监测霍乱弧菌活细胞的数量,可实时分析噬菌体裂解霍乱弧菌过程中细菌残存数量。这种分析方法与菌落计数和噬斑形成观察相比,能够重复对同一样本进行无干扰的连续多时间点检测,没有经过再培养或噬斑形成的时间迟滞,有利于进行噬菌体与宿主菌相互作用的实时监测分析。

REFERENCES

- [1] Colwell RR, Huq A. Environmental reservoir of *Vibrio cholerae*, the causative agent of cholera. *Ann N Y Acad Sci*, 1994, 740: 44-54.
- [2] Kaper JB, Morris JG Jr, Levine MM. Cholera. *Clin Microbiol Rev*, 1995, 8(1): 48-86.
- [3] Nusrin S, Khan GY, Bhuiyan NA, et al. Diverse CTX phages among toxigenic *Vibrio cholerae* O1 and O139 strains isolated between 1994 and 2002 in an area where cholera is endemic in Bangladesh. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(12): 5854-5856.
- [4] Wang RB, Li J, Kan B. Sequences of a co-existing SXT element, a chromosomal integron (CI) and an IncA/C plasmid and their roles in multidrug resistance in a *Vibrio cholerae* O1 El Tor strain. *Int J Antimicrob Agents*, 2016, 48(3): 305-309.
- [5] Wang RB, Lou J, Liu J, et al. Antibiotic resistance of *Vibrio cholerae* O1 El Tor strains from the seventh pandemic in China, 1961-2010. *Int J Antimicrob Agents*, 2012, 40(4): 361-364.
- [6] Pourshafie MR, Grimont F, Saifi M, et al. Molecular epidemiological study of *Vibrio cholerae* isolates from infected patients in Teheran, Iran. *J Med Microbiol*, 2000, 49(12): 1085-1090.
- [7] Waldor MK, Tschöpe H, Mekalanos JJ. A new type of conjugative transposon encodes resistance to sulfamethoxazole, trimethoprim, and streptomycin in *Vibrio cholerae* O139. *J Bacteriol*, 1996, 178(14): 4157-4165.
- [8] Summers WC. Bacteriophage therapy. *Annu Rev Microbiol*, 2001, 55: 437-451.
- [9] Dery KJ, Górski A, Międzybrodzki R, et al. Therapeutic perspectives and mechanistic insights of phage therapy in allotransplantation. *Transplantation*, 2020, doi: 10.1097/TP.0000000000003565.
- [10] Korf IHE, Kittler S, Bierbrodt A, et al. In vitro evaluation of a phage cocktail controlling infections with *Escherichia coli*. *Viruses*, 2020, 12(12): 1470.
- [11] Bajpai U, Mehta AK, Eniyan K, et al. Correction: Isolation and characterization of bacteriophages from India, with lytic activity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Can J Microbiol*, 2020, 66(7): 455.
- [12] Galtier M, De Sordi L, Sivignon A, et al. Bacteriophages targeting adherent invasive *Escherichia coli* strains as a promising new treatment for crohn's disease. *J Crohn's Colitis*, 2017, 11(7): 840-847.
- [13] Dong X, Pan P, Zheng DW, et al. Bioinorganic hybrid bacteriophage for modulation of intestinal microbiota to remodel tumor-immune microenvironment against colorectal cancer. *Sci Adv*, 2020, 6(20): eaba1590.
- [14] Gogokhia L, Buhrke K, Bell R, et al. Expansion of bacteriophages is linked to aggravated intestinal inflammation and colitis. *Cell Host Microbe*, 2019, 25(2): 285-299.e8.
- [15] Ma YF, You XY, Mai GQ, et al. A human gut phage catalog correlates the gut phageome with type 2 diabetes. *Microbiome*, 2018, 6: 24.
- [16] Duan Y, Llorente C, Lang S, et al. Bacteriophage targeting of gut bacterium attenuates alcoholic liver disease. *Nature*, 2019, 575(7783): 505-511.
- [17] Wang JZ, Yan MY, Gao H, et al. *Vibrio cholerae*

- colonization of soft-shelled turtles. *Appl Environ Microbiol*, 2017, 83(14): e00713-17.
- [18] Fan FX, Li X, Pang B, et al. The outer-membrane protein TolC of *Vibrio cholerae* serves as a second cell-surface receptor for the VP3 phage. *J Biol Chem*, 2018, 293(11): 4000-4013.
- [19] 尹守亮, 常亚婧, 邓苏萍, 等. 以病原菌群体感应系统为靶标的新型抗菌药物的研究进展. *药学报*, 2011, 46(6): 613-621.
Yin SL, Chang YJ, Deng SP, et al. Research progress of new antibacterial drugs that target bacterial quorum sensing systems. *Acta Pharm Sin*, 2011, 46(6): 613-621 (in Chinese).
- [20] 王平, 胡正嘉, 李阜棣. 发光酶基因标记的荧光假单胞菌 X16L2 在小麦根圈的定殖动态. *微生物学报*, 2000, 40(2): 38-42.
Wang P, Hu ZJ, Li FD. Boot colonization of wheat by *lux-AB* genes marked *Pseudomonas fluorescens* X16L2. *Acta Microbiol Sin*, 2000, 40(2): 38-42 (in Chinese).
- [21] Sheehan BJ, Foster TJ, Dorman CJ, et al. Osmotic and growth-phase dependent regulation of the *eta* gene of *Staphylococcus aureus*: a role for DNA supercoiling. *Mol Gen Genet*, 1992, 232(1): 49-57.
- [22] 蒋爱民, 魏素红, Wang HF, 等. *lux* 基因发光菌的研究及其在食品科学中的应用. *中国食品学报*, 2003, 3(2): 87-92.
Jiang AM, Wei SH, Wang HF, et al. Studies of *lux* genes luminescent microorganisms and their applications in food science. *J Chin Inst Food Sci Technol*, 2003, 3(2): 87-92 (in Chinese).
- [23] 刘和, 王晓云. *lux* 基因及其在环境检测中的应用. *环境与健康杂志*, 2001, 18(4): 253-256.
Liu H, Wang XY. The *lux* gene and its application in the environmental detection. *J Environ Health*, 2001, 18(4): 253-256 (in Chinese).
- [24] Yen MM, Cairns LS, Camilli A. A cocktail of three virulent bacteriophages prevents *Vibrio cholerae* infection in animal models. *Nat Commun*, 2017, 8: 14187.

(本文责编 郝丽芳)