

噬菌体及其裂解酶在食源性致病菌检测和 控制中的应用

江艳华¹ 姚琳¹ 王鹏² 翟毓秀¹ 王联珠^{1*}

- (1. 农业部水产品质量安全检测与评价重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 山东 青岛 266071)
(2. 中国海洋大学 食品科学与工程学院 山东 青岛 266003)

摘要: 微生物致病菌引起的食源性疾病在全世界频频发生, 对人类健康造成严重危害, 尤其是致病菌耐药性的出现使常规治疗陷入困境。噬菌体及其编码的裂解酶的发现及应用, 为食源性致病菌的检测及生物防治开辟了新的途径。综述噬菌体及其裂解酶在构建食源性致病菌的快速检测方法和生物防治方面的应用。

关键词: 噬菌体, 裂解酶, 食源性致病菌, 检测, 控制

Application of bacteriophages and their lysins for detection and control of foodborne pathogens

JIANG Yan-Hua¹ YAO Lin¹ WANG Peng² ZHAI Yu-Xiu¹ WANG Lian-Zhu^{1*}

- (1. *Key Laboratory of Test and Evaluation on Quality and Safety of Aquatic Products, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, Shandong 266071, China*)
(2. *College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao, Shandong 266003, China*)

Abstract: The outbreaks of foodborne disease caused by foodborne pathogens are happened frequently and have a hazardous impact on public health, especially the emergence of antibiotic-resistant pathogens which may cause the failure of regular antimicrobial therapy. The discovery and application of bacteriophages and their lysins opened up a new path for detection and biocontrol of foodborne pathogens. This review intends to briefly summarize the application of bacteriophages and their lysins for constructing the rapid detection methods and biocontrol of foodborne pathogens.

Keywords: Bacteriophages, Lysins, Foodborne pathogens, Detection, Control

食源性疾病引发的食品安全问题对人类健康造成严重危害, 受到世界各国的高度关注。其中微生物致病菌是引起食源性疾病的最主要因素, 在国内外微生物致病菌引起的食源性疾病事件频频发生,

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金; 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金(博士基金, No. BS2010SW041)

* 通讯作者: Tel: 86-532-85821813; ✉: wanglz@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2011-03-19; 接受日期: 2011-06-07

各国每年在食源性疾病治疗上花费巨额的资金。尤其是致病菌耐药性的出现,对疾病的治疗是一个巨大的挑战。为此,各国都在投入大量的经费和人力进行食源性致病菌的检测和控制新技术的研发,也取得了一定的进展。

噬菌体(Bacteriophage)是一种能够侵染细菌并在宿主细菌体内进行增殖的病毒,是由 Frederick W. Twort 和 Félix d'Herelle 于 1915 年和 1917 年先后各自发现的。由于具有拮抗细菌、裂解细菌的特性,d'Herelle 将它命名为噬菌体。噬菌体的发现至今已有近 100 年的历史,最初科学家们对其的研究倾向于噬菌体在治疗临床疾病的可能性应用方面,随着生物技术的发展,噬菌体的特性逐渐被揭示,其应用领域也逐步扩大。噬菌体由于其比较简单的结构和在宿主细胞内快速复制的能力,已被广泛用于遗传工程中外源基因克隆和表达的载体,加上噬菌体对宿主菌高度的特异性,在构建致病菌的快速检测方法和控制致病菌方面具有良好的应用前景。噬菌体裂解酶(Endolysin 或 Lysin, 或称为内溶素)最早于 20 世纪 50 年代确定,已有的研究表明,裂解酶在生物控制方面具有比噬菌体更大的优势。本文就噬菌体及其裂解酶在食源性致病菌检测和控制方面的应用做一综述。

1 噬菌体的特性

噬菌体分布极广,凡是有细菌的场所,就可能存在相应噬菌体的存在。据估计,噬菌体的丰度是原核生物的 5-10 倍左右,是自然界最丰富的生物体^[1]。噬菌体有严格的宿主特异性,只寄居在易感宿主菌体内。已知的噬菌体都是在细菌细胞内利用细菌的核糖体、蛋白质合成所需的各种因子、各种氨基酸和能量产生系统来实现其自身的生长和增殖,一旦离开了宿主细胞,噬菌体既不能生长,也不能复制。

1.1 噬菌体的结构特征和分类

依据噬菌体颗粒的结构划分,噬菌体有 3 种基本类型,即无尾部结构二十面体型、具尾部结构二十面体型和线状体型,多数噬菌体为具尾部结构二十面体型。头部衣壳和尾部的化学组成是蛋白质,

头部衣壳内含有噬菌体的遗传物质核酸 DNA 或 RNA,尾部有能识别宿主菌细胞表面的特殊受体,与噬菌体吸附有关。噬菌体的核酸,最常见的是双链线形 DNA,此外,还发现有双链环形 DNA、单链环形 DNA、单链线形 DNA 以及单链 RNA 等多种形式的噬菌体。2005 年,国际病毒分类委员会把核酸类型、形态结构、基本特性、宿主菌类型等特性作为噬菌体分类的依据,将噬菌体分为 5 个级阶,共 4 群 14 科 37 属,“群”后根据情况设立“目”,“属”后为“种”^[2]。

除了以上的分类标准外,还可以根据噬菌体的生活周期分为两类:裂解性噬菌体(Lytic phage)和温和性噬菌体(Temperate phage)。侵入宿主细胞后,随即引起宿主细胞裂解的噬菌体称作裂解性噬菌体,裂解性噬菌体被看作正常表现的噬菌体。若噬菌体侵入宿主细胞后,其核酸附着并整合在宿主染色体上和宿主核酸同步复制,宿主细胞不裂解而继续生长,这种不引起宿主细胞裂解的噬菌体称作温和性噬菌体,噬菌体的这种特性称为溶原性(Lysogeny)。只有当条件改变导致溶原周期终止时,噬菌体才会增殖而裂解宿主菌。在溶原状态下,宿主细菌表型会发生改变甚至增强致病性,同时细菌会对与前噬菌体亲缘关系较近的能感染的噬菌体产生抗性。因此,通常认为温和性噬菌体不适合杀灭有害细菌,不能用于致病菌的消除,而裂解性噬菌体一旦感染细菌就必然使宿主死亡,既可用于致病菌的检测也可用于致病菌的防控。

1.2 噬菌体的溶菌机制及裂解酶特性

噬菌体感染细菌首先吸附于细菌表面受体,受体通常为蛋白质或多糖,这种吸附具有种特异性甚至株特异性,能感染多种细菌的多价噬菌体极其少见。当吸附到细菌表面后,噬菌体 DNA 被注入细胞浆中,在细菌体内进行生物合成和装配。在感染后期,对于大部分双链 DNA 噬菌体(丝状噬菌体除外),是通过噬菌体表达的裂解酶的作用导致宿主菌细胞壁破坏而溶解,噬菌体裂解酶可以打开细胞壁上各种分子的共价键使细胞壁水解,从而杀死细菌。目前研究最清楚的是大肠杆菌的 λ 噬菌体,其溶菌过程是由噬菌体编码的孔蛋白(Holin)和裂解酶的协同

作用完成。孔蛋白能在细菌的细胞膜上“打孔”,使裂解酶能顺利到达外部的肽聚糖层,引起细菌迅速裂解。据报道,也有少数噬菌体的裂解酶具有信号肽序列,可不依赖孔蛋白穿过细胞膜^[3]。对于缺乏裂解酶的小基因组噬菌体,其溶菌机制是利用多肽在不同阶段抑制宿主菌的胞壁质合成酶,从而在不同阶段溶解宿主菌,例如大肠杆菌单链噬菌体 Q β 主要利用衣壳蛋白 A2 抑制宿主菌胞壁质生物合成关键步骤的催化剂 MurA,从而导致新合成的肽聚糖降解,逐渐使宿主细胞溶解^[4]。

不同细菌的噬菌体编码的裂解酶在结构和作用机制上存在差异,根据作用于细菌细胞壁肽聚糖共价键位点的不同可以分为葡糖苷酶[Glucosidase, 包括 N-乙酰胞壁酸酶 N-acetylmuramidase (EC 3.2.1.17) 和 N-乙酰氨基葡萄糖苷酶 N-acetylglucosaminidases (EC 3.2.1.96)]、酰胺酶(Amidase, EC 3.5.1.28)、内肽酶(Endopeptidase, EC 3.4.99.-) 和转糖基酶(Transglycosylase, EC 3.2.1.-),前3类为细胞壁水解酶,后一类为糖基转移酶^[5]。经序列比较发现,所有噬菌体裂解酶在结构上具有相似性,由结合功能域(C 端)和催化功能域(N 端)两部分组成。研究发现,无论在体外还是体内,裂解酶单独的催化功能域是没有催化活性的,只有两者结合才具备催化活性。噬菌体裂解酶对宿主菌的作用具有以下几方面特点:(1) 细菌对裂解酶不产生抗性;(2) 裂解酶具有特异性,但裂解谱比噬菌体宽;(3) 杀菌作用迅速;(4) 裂解酶的抗体不会削弱其杀菌作用等^[6-8]。因此,噬菌体裂解酶是一种极具潜力的杀菌剂。

2 噬菌体在食源性致病菌检测中的应用

食源性致病菌的检测主要采用传统的细菌分离培养法进行,该方法虽然经典、准确,但是操作繁琐、耗时长、灵敏度低。随着生物技术的发展,基于分子生物学和免疫学建立起多种致病菌快速检测方法,包括多聚酶链式反应(PCR)法、生物芯片技术和免疫学方法等,这些方法在致病菌检测中发挥了重要的作用,提高了检测的灵敏度、准确性和自动化程度,但也存在着各自的不足,例如费时费力、价

格昂贵、特异性或灵敏度低、国内试剂供应不配套等。而基于噬菌体开发的检测技术具有简便、快速、特异性强、灵敏度高,能区分死菌和活菌等优点,某些方法能实现现场快速检测,检测时间缩短至 10-60 min,这些新技术能满足食源性致病菌监控工作对于检测方法的快速和灵敏的要求,是目前国内外研究的热点(各种方法特性及优缺点比较见表 1、表 2)。

2.1 噬菌体分型

噬菌体分型是一种区分细菌不同分离株的有效工具。由于噬菌体对宿主菌具有高度的特异性,一种噬菌体只能裂解一种或与该种相近的细菌,所以可用于细菌的鉴定和分型。虽然目前分型的方法很多,有核糖体分型、随机扩增多态性 DNA 指纹图谱、脉冲场凝胶电泳等,但由于噬菌体分型简单、价格低廉,仍是一种很实用的分型技术,尤其与其他分型技术结合,更能全面反映致病菌的信息,在流行病学调查上,对追查和分析这些细菌性感染的传染源很有帮助。目前噬菌体分型已经应用于沙门氏菌、弯曲菌、大肠杆菌、李斯特氏菌等食源性致病菌中^[9-11]。

2.2 噬菌体扩增法

该方法原理是将噬菌体与目标宿主菌共同孵育,使噬菌体进入宿主菌体内,再用杀灭噬菌体的化学物质杀灭未进入菌内的噬菌体,在菌体内的噬菌体不受影响而复制增殖,最终裂解目标宿主菌释放出子代噬菌体,通过裂解另一无致病性的辅助菌形成的噬菌斑数量或测定菌悬液细胞含量的减少来判定噬菌体的量。该方法可用于临床结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)的检测,Galí 等^[12]报道了一种高通量的噬菌体检测多重耐药性的结核分枝杆菌方法,该方法利用利福平抗性来作为多重耐药性的标记,通过将最终裂解的子代噬菌体滴加在辅助菌耻垢分枝杆菌(*M. smegmatis*)菌苔上产生新噬菌斑来辨认。目前商品化的噬菌体扩增法检测试剂盒有英国 Biotec Laboratories Ltd.公司生产的结核分枝杆菌快速诊断噬菌体法(FAST Plaque TBTM)试剂盒。该方法也可用于其他分枝杆菌、沙门氏菌等的检测^[13-14]。

表 1 基于噬菌体的几种检测方法的特性
Table 1 Characteristic of some phage-based detection assays

检测方法 Detection method	噬菌体 Phage	目标菌 Bacterial target	基质 Matrix	检出限 Detection limit	反应时间 Response time	参考文献 Reference
噬菌体扩增法 Phage amplification	D29	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	培养物	未报道	48 h	[12]
	D29	<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	奶制品	≤ 10 CFU/mL	48 h	[13]
	SJ2	<i>Salmonella enterica</i>	培养物	<10 ⁴ CFU/mL	4–5 h	[15]
	SJ2	<i>S. enteritidis</i>	奶粉、鸡清洗液、碎牛肉	2–3 CFU/25 g(mL)	20 h	[16]
	LG1	<i>Escherichia coli</i> O157: H7	碎牛肉	2 CFU/25g	23 h	
噬菌体介导的 生物发光法 Phage-mediated bioluminescence	NCIMB 10359	<i>E. coli</i>	培养物	10 ⁴ cells/mL	1 h	[18]
	Newport	Salmonella	培养物	10 ⁴ cells/mL	2 h	
	AT20	<i>E. coli</i>	培养物	10 ³ CFU/mL	2 h	[19]
	SJ2	Salmonella	培养物	10 ³ CFU/mL	2 h	
报告噬菌体技术 Reporter phage (<i>luxAB</i>)			巧克力布丁、意大利奶酪 虾、牛奶、白干酪、 卷心菜、生菜 肝香肠、软奶酪 硬奶酪、绞肉	0.1 CFU/g 1 CFU/g 10 CFU/g 1–10 CFU/g	20 h 20 h 20 h 44 h	[22]
	A511	<i>Listeria monocytogenes</i>				
	P22	<i>S. typhimurium</i>	禽的饲料、粪便、垫草 苹果汁	10 ⁶ CFU/mL 1 CFU/mL	16 h 22 h	[23]
报告噬菌体技术 Reporter phage (<i>luxI</i> 和 <i>luxR</i>)	PP01	<i>E. coli</i>	自来水 菠菜清洗液	1 CFU/mL 1 CFU/mL	12.5 h 6 h	[24]
报告噬菌体技术 Reporter phage (<i>inaW</i>)	P22	Salmonella	牛奶、鸡蛋	10 cells/mL	2 h	[25]
报告噬菌体技术 Reporter phage (<i>lacZ</i>)	T4	<i>E. coli</i>	培养物	10 CFU/mL	8 h	[26]
报告噬菌体技术 Reporter phage (<i>gfp</i>)	PP01	<i>E. coli</i> O157: H7	<i>E. coli</i> O157: H7 和 <i>E. coli</i> K12 混合培养物	未报道	10 min	[27]
荧光标记的噬菌体技术 Fluorescently labeled phage	LG1	<i>E. coli</i> O157: H7	碎牛肉 鲜奶	2.2 CFU/g 10–100 CFU/mL	6 h 10 h	[28]
	O-I	Salmonella	虾仁、鲜牛肉、 熟食制品、牡蛎、鲜奶	100 CFU/mL	6 h	[29]
电化学法 Electrochemistry	λ	<i>E. coli</i>	培养物	1 CFU/100 mL	6–8 h	[30]
SEPTIC 技术 SEPTIC	λ 和 T5	<i>E. coli</i>	培养物	1 CFU/mL	10 min	[31]
量子点技术 Quantum dots	T7	<i>E. coli</i>	培养物	10 cells/mL	1 h	[32]

当样品中的目标致病菌含量较少时会影响检测结果, 可以通过免疫磁性分离技术特异性地吸附目标菌, 提高目标菌的浓度。Favrin 等人^[15]将该免疫磁性分离-噬菌体扩增法用于肉汤中肠道沙门氏菌(*Salmonella enterica*)的检测, 在 4–5 h 检出限低于 10⁴ CFU/mL。此外, 该方法用于脱脂奶粉、鸡清洗液和碎牛肉中肠炎沙门氏菌(*S. enteritidis*)的

检测, 在大约 20 h (包括 16 h 的增菌)后检出限达 2–3 CFU/25 g (mL), 用于牛肉中大肠杆菌 O157: H7 的检测同样具有良好的效果^[16]。

2.3 噬菌体介导的生物发光法

该方法通过噬菌体裂解宿主菌, 从而将细菌的胞内物质如三磷酸腺苷(ATP)、腺苷酸激酶(AK)等释放出来, 在荧光素酶及底物等物质作用下发光, 通

表 2 基于噬菌体的几种检测方法优缺点比较
Table 2 Comparative advantages and disadvantages of some phage-based detection assays

检测方法 Detection method	优点 Advantages	缺点 Disadvantages
噬菌体分型 Phage typing	不需复杂的仪器, 价格便宜; 特异性强; 经过长期的实验验证有效	耗时较长, 耗劳力; 需要保存大量的噬菌体
噬菌体扩增法 Phage amplification	高度特异性; 只检测活菌; 不需构建基因工程噬菌体	效果不好的杀噬菌体制剂会导致假阳性结果; 样品中的正常菌群能与辅助菌竞争从而抑制辅助菌的生长
噬菌体介导的生物发光法 Phage-mediated bioluminescence	操作简单、快速; 特异性强; 不需构建基因工程噬菌体	灵敏度较低; 非噬菌体引起的菌体裂解导致假阳性结果
报告噬菌体技术 Reporter phage	只检测活菌; 检测快速; 灵敏度高, 特异性强	前期需要构建基因工程噬菌体; 含荧光素酶基因和 β -半乳糖苷酶基因的报告噬菌体技术需要添加外源底物
荧光标记的噬菌体技术 Fluorescently labeled phage	标记方法简单, 应用广泛; 检测快速; 不同波长的荧光染料能检测多种目标菌	不能区分死菌和活菌; 标记的噬菌体能吸附到非宿主菌或样品颗粒上影响测定结果

过检测荧光强度可以判定出噬菌体感染的目标菌的含量。Sanders^[17]利用噬菌体介导释放出 ATP 含量的方法测定李斯特氏菌, 但是由于样品中本底 ATP 含量的影响, 导致检测限较高。为此, 一些学者改进了该方法, 应用噬菌体介导的 AK 作为目标菌的标记, AK 可催化二磷酸腺苷(ADP)向 ATP 转化, 提高了样品中 ATP 的含量, 从而提高了发光强度, 使得检出限降低^[18-19]。此外, 还可利用细菌胞内还原性辅酶酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)作为标记物, 在 FMN-NADH 氧化还原酶和荧光素酶作用下发光的原理测定目标菌^[20]。

2.4 报告噬菌体技术

该技术是将报告基因通过噬菌体插入到目标菌体的 DNA 中, 报告基因随着目标菌体 DNA 的复制而表达, 目标菌体便可快速得到检测。自 Ulitzur 等^[21]首次将携带 *lux* 基因的报告噬菌体用于大肠杆菌的检测后, 这一技术在致病菌的检测方面发展迅速。目前, 应用在这一技术的报告系统除了原核生物和真核生物的荧光素酶基因(*lux*、*luc*)外, 还有细菌冰核蛋白基因(*ina*)、大肠杆菌 β -半乳糖苷酶基因(*lacZ*)、绿色荧光蛋白基因(*gfp*)等。

由于荧光素酶基因在自然界广泛存在, 比较容易获得, 且生物发光检测方法相对简便, 目前荧光素酶基因在报告噬菌体检测技术中应用最为广泛。当荧光素酶基因在目标菌体内表达后, 荧光素酶在 O₂、ATP 等物质存在条件下催化底物发光, 借助发

光检测仪检测光强度来判定目标菌的含量。Loessner 等^[22]利用宽宿主谱的裂解性单核细胞增生李斯特氏菌噬菌体 A511 (可以侵染约 95% 的单核细胞增生李斯特氏菌临床血清型)构建含荧光素酶基因 *luxAB* 的报告噬菌体 A511::*luxAB*, 该报告噬菌体在 20 h 内检出目标菌。Thouand 等^[23]构建了含荧光素酶基因 *luxAB* 的报告噬菌体 P22::*luxAB*, 用于鼠伤寒沙门氏菌(*S. typhimurium*)的检测, 该报告噬菌体在 16 h 内检测到样品中的鼠伤寒沙门氏菌。Ripp 等^[24]构建的含荧光素酶基因的报告噬菌体用于检测大肠杆菌 O157:H7, 在不同的样品基质中需要的检测时间不同, 但检出限均可达到 1 CFU/mL。

冰核细菌由于 *ina* 基因编码在细胞外膜上形成冰核活性蛋白, 从而能在 -10 °C - -2 °C 条件下产生冰核而引起霜冻。*ina* 基因能使没有成冰核能力的细菌具有成冰核能力, 这是细菌冰核检测的基础。Wolber 等^[25]将 *inaW* 基因插入到沙门氏菌噬菌体 P22 中, 当该报告噬菌体感染目标菌后得到表达, 在大约 -10 °C 条件下, 样品就会出现霜冻, 通过荧光冷冻指示染料进行判定, 该方法检出限可达到 10 个细胞/mL。

大肠杆菌的 *lacZ* 基因编码 β -半乳糖苷酶, 该酶能催化水解 β -半乳糖苷显色。Goodridge 等^[26]将 *lacZ* 基因插入噬菌体 T4 中构建报告噬菌体用于大肠杆菌的检测, 检出限为 100 CFU/mL, 该技术结合最大可能数法进行时可在 8 h 内检出目标菌, 检出限达

10 CFU/mL。

Oda 等^[27]应用绿色荧光蛋白(GFP)标记 T2 类噬菌体检测大肠杆菌,该噬菌体是通过同源重组将 *gfp* 基因与噬菌体主要衣壳蛋白基因 *soc* 融合,一旦标记过的噬菌体吸附在目标致病菌上,可以在荧光显微镜下观察到,该方法除了检测活细菌外,还可检测活的非可培养状态的细菌。

2.5 荧光标记的噬菌体技术

由于报告噬菌体的构建受基因组容量和非必需区域缺乏的限制,而直接对噬菌体粒子进行荧光标记能够弥补这些缺陷。Goodridge 等^[28]报道了利用免疫磁性分离结合荧光标记噬菌体技术用于检测大肠杆菌 O157:H7,当目标致病菌大肠杆菌 O157:H7 与特异性的免疫磁珠结合后,侵入大肠杆菌 O157:H7 的荧光噬菌体也就吸附在磁珠上,通过荧光显微镜、流式细胞仪或扫描电镜均可检测,该方法可以检测经 6 h 增菌后的碎牛肉中 2.2 CFU/g 的大肠杆菌 O157:H7,经 10 h 增菌后的鲜奶中 10–100 CFU/mL 的大肠杆菌 O157:H7。蒋鲁岩等^[29]用核酸荧光染料 SYBR@gold 标记噬菌体 O-I,用于食品中沙门氏菌的检测,样品经 6 h 增菌后用荧光标记的噬菌体进行侵染,该方法检出限为 100 CFU/mL。

2.6 其他方法

Neufeld 等^[30]报道了一种利用电化学法快速检测致病菌的方法,该方法利用特异性噬菌体裂解目标宿主菌,释放出该细菌的胞内酶类,通过包埋了特异性生物识别因子的电学生物传感器对胞内酶类进行测定,在该模式系统中,利用大肠杆菌特异性裂解噬菌体(带 β -半乳糖苷酶活性作为标记)可以在 6–8 h 内检测出 1 CFU/100 mL 的大肠杆菌。

Dobozi-King 等^[31]提出了 SEPTIC (Sensing of phage-triggered ion cascade)技术,其原理是:噬菌体感染目标菌时会在细菌细胞膜上“打孔”,导致细胞内离子释放出来从而改变周围的电位,将这一微范围内的电位变化用一种称为纳米阱的微器件进行检测,通过电压噪声的谱或波形分析即可判断细菌是否被噬菌体感染,利用该技术在 10 min 内可以检出低至 1 CFU/mL 的大肠杆菌。

Edgar 等^[32]于 2006 年首次将量子点(Quantum dot)与噬菌体结合构建大肠杆菌的检测方法。量子点是一种由半导体纳米微晶体组成的荧光材料,具有丰富的颜色,可以作为荧光探针标记在生物体上。将量子点融合在噬菌体上,同时构建能表达生物素的工程噬菌体,该噬菌体感染目标菌后表达生物素,释放出的子代噬菌体能够被亲和素捕获,从而噬菌体上的量子点能在荧光显微镜或流式细胞仪下检测,该方法在 1 h 内可以检出低至 10 个细胞/mL 的大肠杆菌。

近几年已成为研究热点的噬菌体展示技术在致病菌检测方面也有良好的应用前景。该技术是利用噬菌体表达外源基因的一项新技术,将待选的基因片段定向插入噬菌体衣壳蛋白基因,使外源蛋白质或多肽表达并展示于噬菌体表面,通过亲和富集法筛选表达有特异的蛋白质或多肽的噬菌体,可用于识别生物毒素、细菌、孢子和病毒的抗体等^[33–34]。

此外,可以利用噬菌体裂解酶替代噬菌体裂解目标宿主菌进行快速检测。Gasson 等报道了单核细胞增生李斯特氏菌噬菌体 phiLM4 来源的裂解酶检测宿主菌的方法,当裂解酶裂解菌体后,释放出 ATP 和磷酸酶等物质,通过荧光素酶反应发出荧光,从而检测目标致病菌的存在^[35]。

3 噬菌体及其裂解酶在食源性致病菌控制方面的应用

3.1 噬菌体在食源性致病菌控制中的应用

利用噬菌体控制致病菌早在噬菌体被发现不久后就开始被提出和应用,其效果是明显的。然而抗生素的发现削弱了噬菌体在这方面的应用。随着抗生素的使用引发的耐药菌问题越来越严重,人们又重新对噬菌体疗法产生了兴趣,但是近十几年其应用才扩展到食品安全领域。在 2000 年度的 Everygreen 噬菌体国际会议上,研究者报道的实验结果表明,噬菌体是有效、安全的致病菌治疗和生态环境净化生物制剂,此外,许多动物实验和人体实验表明,噬菌体对动物和人体是安全的^[36–37]。因此,在致病菌的控制方面具有优于抗生素的良好应

用前景。

目前全世界有多家公司在研发噬菌体抗菌制剂,尤其是美国的 OmniLytics 公司这方面走在世界前列,目前已获多项专利,并在应用方面得到政府部门的支持。2006年,美国食品和药品管理局(FDA)批准了一种由6种李斯特氏菌噬菌体组成的产品作为食品添加剂,可以有效杀灭食品中多种李斯特氏菌,这是噬菌体首次被批准在食品中使用。美国农业部(USDA/FSIS)在2007年批准噬菌体用于控制家畜中出血性大肠杆菌 O157:H7,在2008年批准噬菌体用于禽类中沙门氏菌的控制。此外,许多文献报道了噬菌体在控制沙门氏菌、李斯特氏菌、大肠杆菌 O157:H7、弯曲菌、致病性弧菌等方面有良好的效果。

3.1.1 噬菌体在控制沙门氏菌中的应用:沙门氏菌是引起食源性疾病的最主要的致病菌之一,尤其在美国,每年都有大规模沙门氏菌中毒事件的报道。利用噬菌体控制沙门氏菌已有报道,但是多应用于禽畜类中。噬菌体可直接用于肉鸡中沙门氏菌的控制,口服了高剂量噬菌体的实验组沙门氏菌数量显著地降低,然而,沙门氏菌数量的降低持续了3周多,并不能完全消除^[38]。Borie等^[39]将3种裂解性噬菌体混合物通过添加到饮用水中降低了鸡肠道内肠炎沙门氏菌的数量。当然,噬菌体并非对所有禽类体内沙门氏菌都具有减除作用,噬菌体到达肠道内目标菌的途径以及目标菌的生理状态都会影响噬菌体的作用效果。Bigwood等^[40]用沙门氏菌人工污染生的和熟的牛肉,然后将噬菌体 P7 接种于污染的牛肉上,分别于 5 °C 和 24 °C 下培养 24 h 后,沙门氏菌均有一定程度的减少,感染复数越高,细菌的减少量越多。

3.1.2 噬菌体在控制李斯特氏菌中的应用:在李斯特氏菌中,引起食品安全性问题最严重的是单核细胞增生李斯特氏菌,是一种人畜共患病的病原菌,能引起人畜的李氏杆菌病。虽然单核细胞增生李斯特氏菌引起的感染几率不高,但是感染后导致的死亡率高达30%,该菌在4 °C 的环境中仍可生长繁殖,所以这是一种严重危害人类健康的致病菌。单核细

胞增生李斯特氏菌在环境中普遍存在,能够耐受一些加工处理方式,在食品加工过程极易污染该菌,通过噬菌体的处理可以杀灭食品中的单核细胞增生李斯特氏菌。目前研究最多的单核细胞增生李斯特氏菌噬菌体为裂解性噬菌体 A511 和 P100,二者均具宽宿主谱,其中 P100 经美国 FDA 和 USDA 认可可用于食品中。Guenther 等^[41]报道 A511 和 P100 对各种即食食品(包括肉、鱼、乳制品及植物性食品)中单核细胞增生李斯特氏菌均有一定的减除作用,同时研究发现杀菌效果与噬菌体的添加量和食品的质构有关系,噬菌体较高的添加量比较低的添加量杀菌效果好,在液态食品中比在固态食品中的杀菌效果好。Soni 等^[42-43]研究了噬菌体 P100 对生鲑鱼片和鲜鳕鱼片污染的血清型 1/2a 和 4b 单核细胞增生李斯特氏菌的减除作用,对生鲑鱼片分别感染 2.0、3.0、4.5 log CFU/g 的单核细胞增生李斯特氏菌,然后用 10⁸ PFU/g 的噬菌体 P100 进行处理,在 4 °C 或 22 °C 条件下使原浓度分别减少 1.8、2.5、3.5 log CFU/g,且在 4 °C 储存 10 d 以上时, P100 活性几乎不变,能明显抑制单核细胞增生李斯特氏菌的生长, P100 对鲜鳕鱼片同样具有良好的效果。

3.1.3 噬菌体在控制大肠杆菌 O157:H7 中的应用:大肠杆菌 O157:H7 能引起严重甚至是致命的出血性肠炎,一般反刍动物携带该菌株,通常在挤奶或屠杀时污染食品。Abuladze 等^[44]将3种噬菌体的混合物作用于污染了大肠杆菌 O157:H7 的食品(土豆、菠菜、花椰菜和牛肉)中,结果发现噬菌体能够明显地降低食品中大肠杆菌 O157:H7 的量。Viazis 等^[45]考察了噬菌体混合物 BEC8 对绿叶蔬菜上大肠杆菌 O157:H7 的作用效果,将大肠杆菌 O157:H7 以低、中、高3种剂量喷洒在蔬菜叶片上,然后用 10⁶ PFU/叶浓度的 BEC8 处理叶片,于 4 °C、8 °C、23 °C 和 37 °C 培养,结果发现,低剂量致病菌处理的叶片在 23 °C、37 °C 培养 24 h 后,检测不到大肠杆菌 O157:H7,而致病菌剂量升高或培养温度降低,噬菌体对大肠杆菌 O157:H7 的减除作用降低。BEC8 若与反式肉桂醛同时使用,在 10 min 后所有致病菌剂量和不同培养温度的叶片中均检测不到大肠杆菌

O157:H7。

3.1.4 噬菌体在控制弯曲菌中的应用: 弯曲菌是一类重要的食源性致病菌, 禽类是主要的传染源。该类菌中多种细菌可导致腹泻, 包括空肠弯曲菌 (*Campylobacter jejuni*)、结肠弯曲菌 (*C. coli*) 等, 其中以空肠弯曲菌引起的肠炎最为常见。Bigwood 等^[40]用空肠弯曲菌人工污染生的和熟的牛肉, 然后将噬菌体 Cj6 接种于污染的牛肉上, 分别于 5 °C 和 24 °C 下培养 24 h 后, 空肠弯曲菌均有一定程度的减少。EI-Shibiny 等^[46]将弯曲菌噬菌体 CP220 用于肉鸡中空肠弯曲菌和结肠弯曲菌的减除, 以控制弯曲菌进入食物链中, 实验结果表明, 对肉鸡接种 7 log PFU 的噬菌体, 在 48 h 后空肠弯曲菌减少了 2 log CFU/g, 而要使结肠弯曲菌获得同样的效果则需接种 9 log PFU 的噬菌体。

3.1.5 噬菌体在控制致病性弧菌中的应用: 能引起人类疾病的弧菌主要有霍乱弧菌 (*Vibrio cholera*)、副溶血性弧菌 (*V. parahaemolyticus*) 和创伤弧菌 (*V. vulnificus*), 其中最为严重的是霍乱弧菌, 它能引起流行性霍乱, 副溶血性弧菌能引起急性肠胃炎, 而创伤弧菌会引发严重的软组织感染和败血症。早在噬菌体被发现后不久, 就被成功地用于印度爆发的霍乱的治疗, 而在 20 世纪 60 年代后期, 世界卫生组织在巴基斯坦建立了噬菌体治疗霍乱的国际性临床实验计划, 开展了一系列的噬菌体治疗霍乱的研究^[47]。对于副溶血性弧菌和创伤弧菌的控制作用则极少有报道, 主要是针对引起水产动物病害的副溶血性弧菌防治作用为主^[48-49]。

3.2 噬菌体裂解酶在食源性致病菌控制中的应用

噬菌体在致病菌的控制中具有良好的效果, 但是也存在一些缺点。例如, 细菌对噬菌体有可能产生抗性^[50], 某些噬菌体可以在细菌间传播致病基因^[51], 使用过程中噬菌体需要宿主菌进行增殖, 受一定宿主的限制, 此外, 噬菌体在食品中应用的安全性仍是消费者顾虑的因素。应用噬菌体裂解酶替代噬菌体可以解决这些问题, 而且裂解酶对宿主菌作用迅速, 可以通过基因工程技术大量产酶, 可能比噬菌体具有更广泛的应用前景。第一个噬菌体

裂解酶是在 20 世纪 50 年代确定的, 但是该裂解酶对死细胞有作用, 对活细胞没有作用^[52]。此后, 陆续发现了各种噬菌体裂解酶及其对致病菌的溶菌作用。Nelson 等^[6]将这些噬菌体裂解酶称为“酶抗生素 (Enzybiotic)”, 由此定义了一类全新的抗生素, 为抗生素耐药性致病菌的出现提供一个新的防控手段。

目前研究报道最多的是肺炎链球菌噬菌体的裂解酶^[6,53-54], 此外也有关于噬菌体裂解酶对金黄色葡萄球菌、肠球菌、李斯特氏菌等食源性致病菌的溶菌作用的报道。O'Flaherty 等^[55]将噬菌体 K 的裂解酶 LysK 克隆并在乳酸乳球菌中表达, 该裂解酶对较大范围的葡萄球菌有溶菌作用, 实验表明, LysK 可以杀死 9 种葡萄球菌, 包括耐药甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA)。Donovan 等^[56]报道的金黄色葡萄球菌噬菌体 phi11 裂解酶对金黄色葡萄球菌和其他 6 种凝固酶阴性的葡萄球菌有裂解作用, 该裂解酶在牛奶的 pH 和 Ca²⁺ 浓度下保持良好的活性, 显示了该酶可直接用于牛奶中致病菌的控制。Obeso 等^[57]将金黄色葡萄球菌噬菌体 ΦH5 的裂解酶 LysH5 克隆并在大肠杆菌中表达, 纯化后的酶用于巴氏消毒奶中金黄色葡萄球菌的消除, 在 37 °C 培养 4 h 后样品中检测不到金黄色葡萄球菌。Yoong 等^[7]报道了一种来自肠球菌噬菌体 Φ1 的裂解酶 PlyV12 的溶菌作用, 该裂解酶能够裂解 14 株肠球菌, 包括耐万古霉素的 2 株粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*) 和 3 株屎肠球菌 (*E. faecium*); 此外, 该裂解酶对致病性链球菌、金黄色葡萄球菌也有溶菌作用, 显示出非同种异的宽宿主谱特性。将李斯特氏菌噬菌体 A511 编码的裂解酶 Ply511 基因在乳球菌中进行克隆和表达, 获得高活力的裂解酶, 可用于李斯特氏菌的消除^[58]。

4 研究展望

已有的研究表明, 噬菌体及其裂解酶为我们提供了一个可以用于人类致病菌检测和控制的巨大宝库。随着生物技术的发展, 预计基于噬菌体的检测技术会逐步完善并应用于食源性致病菌监控工作

中,随着耐药菌的不断出现,噬菌体也将会被人们接受用于食品和环境中的致病菌的消除。但是,噬菌体一般宿主谱较窄,往往只对细菌某种血清型或分离株有特异性,这就限制了它们的应用,因此,筛选宽宿主谱且种特异的噬菌体是目前研究需要解决的关键问题。某些噬菌体携带致病基因的特点限制了其在食品中的应用。因此,噬菌体的使用安全性也将是研究者们关注的重点。将噬菌体裂解酶用于致病菌的控制或疾病的治疗是比较新的领域,目前报道的噬菌体裂解酶在溶菌作用方面只成功地应用于革兰氏阳性菌,还没有应用于革兰氏阴性菌,因此,扩大噬菌体裂解酶的种类及作用对象,构建“酶抗生素”库,为食源性疾病的防控提供更多的选择和帮助,势必成为将来的一个研究趋势和热点。

参 考 文 献

- [1] Wommack KE, Colwell RR. Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2000, 64(1): 69-114.
- [2] Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, et al. *Virus Taxonomy, Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*[M]. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005.
- [3] São-José C, Parreira R, Vieira G, et al. The N-terminal region of the *Oenococcus oeni* bacteriophage fOg44 lysin behaves as a bona fide signal peptide in *Escherichia coli* and as a *cis*-inhibitory element, preventing lytic activity on oenococcal cells[J]. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(20): 5823-5831.
- [4] Bernhardt TG, Wang IN, Struck DK, et al. A protein antibiotic in the phage Q β virion: diversity in lysis targets[J]. *Science*, 2001, 292(5525): 2326-2329.
- [5] 孙卫忠, 胡晓梅, 胡福泉. 噬菌体内溶素的酶学特性及其应用前景[J]. *生命的化学*, 2007, 27(1): 94-97.
- [6] Nelson D, Loomis L, Fischetti VA. Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(7): 4107-4112.
- [7] Yoong P, Schuch R, Nelson D, et al. Identification of a broadly active phage lytic enzyme with lethal activity against antibiotic-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(14): 4808-4812.
- [8] Leoffler JM, Djurkovic S, Fischetti VA. Phage lytic enzyme Cpl-1 as a novel antimicrobial for pneumococcal bacteremia[J]. *Infection and Immunity*, 2003, 71(11): 6199-6204.
- [9] Cho S, Whittam TS, Boxrud DJ, et al. Use of multiple-locus variable number tandem repeat analysis and phage typing for subtyping of *Salmonella* Enteritidis from sporadic human cases in the United States[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, 108(3): 859-867.
- [10] Hopkins KL, Desai M, Frost JA, et al. Fluorescent amplified fragment length polymorphism genotyping of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains and its relationship with host specificity, serotyping, and phage typing[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, 42(1): 229-235.
- [11] Gasanov U, Hughes D, Hansbro PM. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2005, 29(5): 851-875.
- [12] Galí N, Domínguez J, Blanco S, et al. Utility of an in-house mycobacteriophage-based assay for rapid detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003, 41(6): 2647-2649.
- [13] Foddai A, Elliott CT, Grant IR. Optimization of a phage amplification assay to permit accurate enumeration of viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* cells[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(12): 3896-3902.
- [14] Rees CED, Dodd CER. Phage for rapid detection and control of bacterial pathogens in food[J]. *Advances in Applied Microbiology*, 2006, 59: 159-186.
- [15] Favrin SJ, Jassim SA, Griffiths MW. Development and optimization of a novel immunomagnetic separation-bacteriophage assay for detection of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in broth[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(1): 217-224.
- [16] Favrin SJ, Jassim SA, Griffiths MW. Application of a novel immunomagnetic separation-bacteriophage assay for the detection of *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* O157: H7 in food[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, 85(1/2): 63-71.
- [17] Sanders MF. A rapid bioluminescent technique for the detection and identification of *Listeria monocytogenes* in the presence of *Listeria innocua*[M]//Campbell AK, Kricka LJ, Stanley PE. *Bioluminescence and Chemiluminescence: Fundamental and Applied Aspects*. New York: Wiley Press, 1995: 454-457.
- [18] Blasco R, Murphy MJ, Sanders MF, et al. Specific assays for bacteria using phage mediated release of adenylate

- kinase[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 1998, 84(4): 661–666.
- [19] Wu Y, Brovko L, Griffiths MW. Influence of phage population on the phage-mediated bioluminescent adenylate kinase (AK) assay for detection of bacteria[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2001, 33(4): 311–315.
- [20] Mei CX, Wang JX, Lin H. Rapid detection of *Klebsiella* by bacterial luciferase system combined with the bacteriophage lysis[C]//Proceeding of International Conference of Natural Products and Traditional Medicine, Xi'an, 2009, Oct. 16–18: 235–239.
- [21] Ulitzur S, Kuhn J. Introduction of *lux* genes into bacteria, a new approach for specific determination of bacteria and their antibiotic susceptibility[M]//Sclomerich J, Andreesen R, Kapp A, et al. *Bioluminescence and Chemiluminescence New Perspective*. Bristol: Wildy Interscience, 1987: 463–472.
- [22] Loessner MJ, Rudolf M, Scherer S. Evaluation of luciferase reporter bacteriophage A511::luxAB for detection of *Listeria monocytogenes* in contaminated foods[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(8): 2961–2965.
- [23] Thouand G, Vachon P, Liu S, et al. Optimization and validation of a simple method using P22::luxAB bacteriophage for rapid detection of *Salmonella enterica* serotypes A, B, and D in poultry samples[J]. *Journal of Food Protection*, 2008, 71(2): 380–385.
- [24] Ripp S, Jegier P, Johnson CM, et al. Bacteriophage-amplified bioluminescent sensing of *Escherichia coli* O157: H7[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2008, 391(2): 507–514.
- [25] Wolber PK, Green RL. Detection of bacteria by transduction of ice nucleation genes[J]. *Trends in Biotechnology*, 1990, 8(10): 276–279.
- [26] Goodridge L, Griffiths M. Reporter bacteriophage assays as a means to detect foodborne pathogenic bacteria[J]. *Food Research International*, 2002, 35(9): 863–870.
- [27] Oda M, Morita M, Unno H, et al. Rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 by using green fluorescent protein-labeled PP01 bacteriophage[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(1): 527–534.
- [28] Goodridge L, Chen JR, Griffiths M. The use of a fluorescent bacteriophage assay for detection of *Escherichia coli* O157:H7 in inoculated ground beef and raw milk[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 1999, 47(1/2): 43–50.
- [29] 蒋鲁岩, 姜琴, 黄克和, 等. 用荧光标记 O-I 噬菌体快速检测食品源沙门氏菌[J]. *微生物学报*, 2009, 49(3): 372–377.
- [30] Nuefeld T, Schwartz-Mittelmann A, Biran D, et al. Combined phage typing and amperometric detection of released enzymatic activity for the specific identification and quantification of bacteria[J]. *Analytical Chemistry*, 2003, 75(3): 580–585.
- [31] Dobozi-King M, Seo S, Kim JU, et al. Rapid detection and identification of bacteria: SENSING of Phage-Triggered Ion Cascade (SEPTIC)[J]. *Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2005, 5: 3–7.
- [32] Edgar R, McKinstry M, Hwang J, et al. High-sensitivity bacterial detection using biotin-tagged phage and quantum-dot nanocomplexes[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(13): 4841–4845.
- [33] Petrenko VA, Vodyanoy VJ. Phage display for detection of biological threat agents[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2003, 53(2): 253–262.
- [34] Turnbough CL Jr. Discovery of phage display peptide ligands for species-specific detection of *Bacillus* spores[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2003, 53(2): 263–271.
- [35] Dorval Courchesne NM, Parisien A, Lan CQ. Production and application of bacteriophage and bacteriophage-encoded lysins[J]. *Recent Patents on Biotechnology*, 2009, 3(1): 37–45.
- [36] Carlton RM, Noordman WH, Biswas B, et al. Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: genome sequence, bioinformatic analysis, oral toxicity study, and application[J]. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2005, 43(3): 301–312.
- [37] Bruttin A, Brüssow H. Human volunteers receiving *Escherichia coli* phage T4 orally: a safety test of phage therapy[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2005, 49(7): 2874–2878.
- [38] Fiorentin L, Vieira ND, Barioni W Jr. Oral treatment with bacteriophages reduces the concentration of *Salmonella enteritidis* PT4 in caecal contents of broilers[J]. *Avian Pathology*, 2005, 34(3): 258–263.
- [39] Borie C, Albala I, Sánchez P, et al. Bacteriophage treatment reduces *Salmonella* colonization of infected chickens[J]. *Avian Diseases*, 2008, 52(1): 64–67.
- [40] Bigwood T, Hudson JA, Billington C, et al. Phage inactivation of foodborne pathogens on cooked and raw meat[J]. *Food Microbiology*, 2008, 25(2): 400–406.
- [41] Guenther S, Huwyler D, Richard S, et al. Virulent bacteriophage for efficient biocontrol of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(1): 93–100.
- [42] Soni KA, Nannapaneni R. Bacteriophage significantly reduces *Listeria monocytogenes* on raw salmon fillet tis-

- sue[J]. Journal of Food Protection, 2010, 73(1): 32–38.
- [43] Soni KA, Nannapaneni R, Hagens S. Reduction of *Listeria monocytogenes* on the surface of fresh channel catfish filets by bacteriophage Listex P100[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2010, 7(4): 427–434.
- [44] Abuladze T, Li MR, Menetrez MY, et al. Bacteriophages reduce experimental contamination of hard surfaces, tomato, spinach, broccoli, and ground beef by *Escherichia coli* O157: H7[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(20): 6230–6238.
- [45] Viazis S, Akhtar M, Feirtag J, et al. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 viability on leafy green vegetables by treatment with a bacteriophage mixture and *trans*-cinnamaldehyde[J]. Food Microbiology, 2011, 28(1): 149–157.
- [46] EI-Shibiny A, Scott A, Timms A, et al. Application of a group II *Campylobacter* bacteriophage to reduce strains of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* colonizing broiler chickens[J]. Journal of Food Protection, 2009, 72(4): 733–740.
- [47] Summers WC. Cholera and plague in India: the bacteriophage inquiry of 1927–1936[J]. Journal of the History of Medicine and Allied Sciences, 1993, 48(3): 275–301.
- [48] 蔺红苹, 邱德全, 谭龙艳. 水体使用副溶血弧菌噬菌体对对虾体内宿主的防治研究[J]. 渔业现代化, 2007, 34(2): 29–31.
- [49] 邱德全, 周鲜娇, 邱明生. 氨氮胁迫下凡纳滨对虾抗病力和副溶血弧菌噬菌体防病效果研究[J]. 水生生物学报, 2008, 32(4): 455–461.
- [50] Matthey M, Spencer J. Bacteriophage therapy-cooked goose or Phoenix rising?[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2008, 19(6): 608–612.
- [51] Chen J, Novick RP. Phage-mediated intergeneric transfer of toxin genes[J]. Science, 2009, 323(5910): 139–141.
- [52] Ralston DJ, Baer BS, Lieberman M, et al. Virolysin: a virus-induced lysin from staphylococcal phage lysates[J]. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1955, 89(4): 502–507.
- [53] Leoffler JM, Nelson D, Fischetti VA. Rapid killing of *Streptococcus pneumoniae* with a bacteriophage cell wall hydrolase[J]. Science, 2001, 294(5549): 2170–2172.
- [54] Jado I, López R, García E, et al. Phage lytic enzymes as therapy for antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* infection in a murine sepsis model[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2003, 52(6): 967–973.
- [55] O’Flaherty S, Coffey A, Meaney W, et al. The recombinant phage lysin LysK has a broad spectrum of lytic activity against clinically relevant staphylococci, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. Journal of Bacteriology, 2005, 187(20): 7161–7164.
- [56] Donovan DM, Lardeo M, Foster-Frey J. Lysis of staphylococcal mastitis pathogens by bacteriophage phi11 endolysin[J]. FEMS Microbiology Letters, 2006, 265(1): 133–139.
- [57] Obesa JM, Martínez B, Rodríguez A, et al. Lytic activity of the recombinant staphylococcal bacteriophage PH5 endolysin active against *Staphylococcus aureus* in milk[J]. International Journal of Food Microbiology, 2008, 128(2): 212–218.
- [58] Gaeng S, Scherer S, Neve H, et al. Gene cloning and expression and secretion of *Listeria monocytogenes* bacteriophage-lytic enzymes in *Lactococcus lactis*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(7): 2951–2958.

论文中有关正、斜体的约定

物种的学名: 菌株的属名、种名(包括亚种、变种)用拉丁文斜体。属的首字母大写, 其余小写, 属以上用拉丁文正体。病毒一律用正体, 首字母大写。

限制性内切酶: 前3个字母用斜体, 后面的字母和编码正体平排, 例如: *Bam*H I、*Msp* I、*Sau*3A I 等。

氨基酸和碱基的缩写: 氨基酸缩写用3个字母表示时, 仅第一个字母大写, 其余小写, 正体。碱基缩写为大写正体。

基因符号用小写斜体, 蛋白质符号首字母大写, 用正体。