(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119242596 A
(43)申请公布日 2025.01.03

(21)申请号 202411540729.8

(22)申请日 2024.10.31

(83)生物保藏信息
GDMCC NO:64594-B1 2024.05.14

(71)申请人 广西壮族自治区人民医院
地址 530021 广西壮族自治区南宁市青秀区桃源路6号

(72)发明人 蒋洁 袁育林 梁亮 陈杏春 赵丽

(74)专利代理机构 南宁深之意专利代理事务所(特殊普通合伙) 45123
专利代理师 张珣

(51)Int.Cl.
C12N 7/00(2006.01)
A61K 35/76(2015.01)
A61P 31/04(2006.01)
A01N 63/40(2020.01)
A01P 1/00(2006.01)
A23K 10/18(2016.01)
C12R 1/92(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页 附图6页

(54)发明名称

一种耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌噬菌体及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌噬菌体,所述的耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌噬菌体保藏于广东省微生物菌种保藏中心,保藏时间为2024年05月04日,保藏编号为GDMCC No:64594-B1。所述耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌噬菌体最佳感染复数为0.01,在-20℃～60℃的温度下保持噬菌体活性,在PH为4～11下保持噬菌体活性。同时本发明公开了一种噬菌体制剂,其包括所述的耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌噬菌体。所述的耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌噬菌体或所述的噬菌体制剂可以用于制备抑菌剂,并将所述抑菌剂用于制备抑制耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌的产品。本发明所述噬菌体对耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌具有抑制作用,可以解决耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌的耐药问题。



CN 119242596 A

1.一种耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌噬菌体,其特征在于:所述的耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌噬菌体保藏于广东省微生物菌种保藏中心,保藏时间为2024年05月04日,保藏编号为GDMCC No:64594-B1。

2.根据权利要求1所述的耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌噬菌体,其特征在于:所述耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌噬菌体最佳感染复数为0.01,在-20℃～60℃的温度下保持噬菌体活性,在PH为4～11下保持噬菌体稳定性。

3.一种噬菌体制剂,其特征在于:包括所述的耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌噬菌体。

4.一种抑菌剂,其特征在于:所述抑菌剂是采用如权利要求1～2中任意一项所述的耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌噬菌体或如权利要求3所述的噬菌体制剂制备得到的。

5.根据权利要求4所述的抑菌剂,其特征在于:所述抑菌剂的剂型为溶液剂、粉剂、凝胶剂、颗粒剂和冻干剂中的任意一种。

6.如权利要求4或5所述的抑菌剂的应用,其特征在于:将所述抑菌剂用于制备抑制耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌的产品,所述产品包括药物、饲料、杀菌剂、消毒剂和清洁剂。

一种耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌噬菌体及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌噬菌体及其应用。

背景技术

[0002] 铜绿假单胞菌(Pseudomonas aeruginosa,PA)是一种革兰氏阴性机会病原体,是引起医院感染最常见的病原体之一。铜绿假单胞菌严重影响免疫功能低下的患者,可造成患者菌血症和败血症,在各种皮肤感染中也经常出现。传统抗生素是治疗铜绿假单胞菌感染的首要选择。然而,铜绿假单胞菌对许多抗生素药物表现为固有耐药,这使得抗生素的治疗效果大打折扣。近年来,由于多重耐药菌的出现,噬菌体治疗因其具有与抗生素治疗完全不同的抗菌作用机制而引起广泛关注。

[0003] 噬菌体是专门感染细菌的病毒,是抗生素的替代治疗策略,可以作为新型的治疗制剂来治疗细菌感染,尤其是多重耐药菌。与使用广谱抗生素相比,噬菌体疗法具有明显的优势,它对目标细菌病原体具有高度的特异性,不会对宿主及其微生物群产生不利影响。铜绿假单胞菌、噬菌体和抗生素联合使用可以有效抑制细菌生长和生物被膜的形成。但是,在铜绿假单胞菌肺部感染治疗时通常使用传统抗生素治疗,噬菌体及噬菌体鸡尾酒疗法用于控制铜绿假单胞菌肺部感染的报道较少。并且在此过程中,研究噬菌体应用相关的各个方面都需要大量不同的噬菌体。因此,开发新的铜绿假单胞菌噬菌体将具有重要意义。

发明内容

[0004] 针对上述不足,本发明公开了一种耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌噬菌体及其应用,所述噬菌体对耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌具有抑制作用,可以解决耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌的耐药问题。

[0005] 本发明是采用如下技术方案实现的:

一种耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌噬菌体,其保藏于广东省微生物菌种保藏中心,保藏时间为2024年05月04日,保藏编号为GDMCC No:64594-B1。

[0006] 所述耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌噬菌体最佳感染复数为0.01,在-20℃～60℃的温度下保持噬菌体活性,在PH为4～11下保持噬菌体稳定性,对耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌生长有明显抑制作用。

[0007] 一种噬菌体制剂,其包括所述的耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌噬菌体。

[0008] 一种抑菌剂,其是采用上述的耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌噬菌体或噬菌体制剂制备得到的。

[0009] 所述抑菌剂的剂型为溶液剂、粉剂、凝胶剂、颗粒剂和冻干剂中的任意一种。

[0010] 所述抑菌剂用于制备抑制耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌的产品,所述产品包括药物、饲料、杀菌剂、消毒剂和清洁剂。

[0011] 本技术方案与现有技术相比较具有以下有益效果:

目前已开发的铜绿假单胞菌噬菌体多针对普通PA或多重耐药PA,而本发明提供的噬菌体的宿主菌除了普通铜绿假单胞菌外,还有几乎对市面所有常用抗生素(包括头孢他啶/阿维巴坦,多粘菌素等)耐药的超级耐药铜绿假单胞菌CRPA190。经过试验验证,本发明所述的耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌噬菌体对铜绿假单胞菌,特别是对于超级耐药铜绿假单胞菌CRPA190具有良好的抗菌性,而且制取保存方便,将其制备成噬菌体制剂可以作为一种潜在的消毒剂和治疗剂,单独或与抗生素联合使用,用于预防和治疗致病性铜绿假单胞菌,尤其是多重耐药铜绿假单胞菌。

附图说明

[0012] 图1是实施例1中所述噬菌体CRPAP1904的噬菌斑。

[0013] 图2是实验例1中所述噬菌体CRPAP1904基因组圈图。

[0014] 图3是实验例1中所述噬菌体CRPAP1904基因组进化树图。

[0015] 图4是实验例1中所述噬菌体CRPAP1904颗粒的电镜图片。

[0016] 图5是实验例2中滴加噬菌体CRPAP1904的实验组测试图片。

[0017] 图6是实验例2中滴加LB液体的对照组测试图片。

[0018] 图7是实验例3中所述噬菌体CRPAP1904最佳感染复数检测结果数据图。

[0019] 图8是实验例4中所述噬菌体CRPAP1904对温度的敏感性测结果试数据图。

[0020] 图9是实验例5中噬菌体CRPAP1904对PH的敏感性测试结果数据图。

[0021] 图10是实验例6中噬菌体CRPAP1904体外杀菌能力测试结果图。

具体实施方式

[0022] 以下通过实施例进一步说明本发明,但不作为对本发明的限制。下列实施例中未注明的具体实验条件和方法,所采用的技术手段通常为本领域技术人员所熟知的常规手段。

[0023] 实施例1:本发明所述的耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌噬菌体的分离和纯化,其包括以下步骤:

(1)于广西壮族自治区人民医院(地址为广西壮族自治区南宁市青秀区桃源路6号)的污水处理中心采集1000mL未经过处理的生活及医疗废水得到采样液,接着向采样液中加入固体$CaCl_2$充分溶解后静置30min,然后分装至100mL离心管,每个离心管在8000rpm的条件下离心40min后取上清液得到预处理液,并且将预处理液置于4℃下保存备用;所述固体$CaCl_2$的加入量为采样液重量的0.6%;

(2)取100mL步骤(1)中得到的预处理液移入无菌锥形瓶中,依次加入25mL的培养至对数生长期的CRPA190菌株和100mL的 LB肉汤液体培养基,接着于37℃温箱中培养24h得到培养悬液,然后取10mL的培养悬液,在8000rpm的条件下离心20min,取上清液用0.22μm的一次性过滤器进行过滤,所得到的滤液即为噬菌体初提液,将噬菌体初提液置于4℃下保存备用;

(3)采用空斑试验法进行噬菌体检测,吸取100μL的对数生长期的CRPA190菌株移入无菌锥形瓶中,接着加入5mL的冷却至50±2℃的LB半固体培养基,然后轻轻摇晃,混匀,再快速将其倒入LB琼脂平板表面,待培养基凝固冷却至室温后,在其表面滴加10μL的噬菌

体初提液,接着在室温下静置10min,待平板上表面液体被完全吸收后,置于37℃下培养12h,并观察LB琼脂平板上是否有空斑出现。

[0024] (4)挑取步骤(3)中所述LB琼脂平板的噬菌斑,并将其加入至2mL的处于对数期的宿主菌菌液中,接着于37℃下温培养12h,然后在8000rpm的条件下离心20min,收集上清液用0.22μm的一次性过滤器进行过滤,所得到的滤液为噬菌体原液;

(5)将步骤(4)中得到的噬菌体原液按10倍递比稀释得到稀释液,接着吸取100μL的稀释液与100μL的生长对数期的宿主菌菌液混合,再加入5mL的冷却至50±2℃的LB半固体培养基,轻轻摇晃,混匀,接着快速均匀倒入LB琼脂平板表面,在室温静置15min待上层半固体培养基完全凝固后,置于37℃下培养过夜,次日挑取透明且较大的单个噬菌斑,重复上述操作至噬菌斑大小变得均一,如图1所示,LB琼脂平板上观察到噬菌体的噬菌斑,纯化后的噬菌体(标记为CRPAP1904)于4℃下保存在SM缓冲液中。

[0025] 实验例1:将实施例1中纯化后的噬菌体进行扩增并且提取DNA,对提取得到的DNA进行全基因组测序,全基因组测序结果如图2显示,噬菌体CRPAP1904含有长度为62,430bp的双链DNA,GC含量为60.4%,有83个ORF,无tRNA,在VFDB和CARD数据库中尚未检索到噬菌体中存在毒力基因和耐药基因,说明此噬菌体安全可用。

[0026] 通过Blast与所有NCBI上已知的噬菌体相比较,CRPA1904与噬菌体YMC17/07/R4900a亲缘性最近,同源性98.11%,覆盖率95%,系统进化树分析结果参见图3,可知此噬菌体是一种新型噬菌体。

[0027] 同时采用负染法处理从高浓度的噬菌体CRPAP1904裂解液中纯化浓缩得到的噬菌体颗粒,取20μL的噬菌体颗粒滴加在铜网上,然后滴加一滴质量分数为2%的磷钨酸,染色1min,待室温干燥后,放置在透射电镜中80kV电压下进行观察、拍照照片参见图4。

[0028] 实验例2:噬菌体CRPAP1904 在半固体培养基中对全耐药铜绿假单胞菌的抑制作用

将实施例1中纯化后的噬菌体进行抗菌性试验,其具体是采用空斑试验法进行噬菌体检测,分别吸取100μL对数生长期的全耐药铜绿假单胞菌CRPA190,再加入5mL的冷却至50℃的LB半固体培养基,轻轻摇晃,混匀,接着快速将其倒入LB琼脂平板表面,待LB半固体培养基凝固冷却至室温,在其表面滴加10μL的实施例1中纯化浓缩后的噬菌体CRPAP1904,同时对照组滴加10μL的 LB液体,结果参见图5和图6。

[0029] 实验结果显示,滴加噬菌体CRPAP1904的实验组可见明显可见的空斑,全耐药铜绿假单胞菌CRPA190无法生长,而对照组未见空斑,全耐药铜绿假单胞菌CRPA190可正常生长,说明噬菌体CRPAP1904对全耐药铜绿假单胞菌生长起到显著抑菌作用。

[0030] 实验例3:噬菌体CRPAP1904的最佳感染复数

将已知滴度的噬菌体液进行稀释,按照噬菌体与宿主菌浓度比例分别为100、10、1、0.1、0.01、0.001的不同感染复数(MOI),将100μL噬菌体液和100μL宿主加入1mL LB液体培养基中,在37℃下,恒温摇床(160rpm)处理12h,取上清液用0.22μm一次性滤器进行过滤,再采用双层琼脂法测定所得滤液滴度,显示最高滴度的感染复数即为噬菌体的最佳感染复数,结果如图7所示,噬菌体CRPAP1904最佳感染复数为0.01。

[0031] 实验例4:噬菌体CRPAP1904的温度敏感性检测

将得到的CRPAP1904噬菌体悬液用双层琼脂平板法进行复苏,通过稀释将其效价

调整为1×10^{8}PFU/mL,取1mL初始效价为1×10^{8}PFU/mL的噬菌体分别在4℃,25℃,37℃,40℃,50℃,60℃,70℃,80℃水浴中孵育1 h后取出样品,采用双层琼脂法测滴度,结果如图8所示,噬菌体CRPAP1904在-20℃～60℃作用1h后,效价保持稳定,在70 ℃下作用1h后,噬菌体活性显著降低,80℃下作用1h活性完全失活,所以本发明所述噬菌体在60℃高温下仍能保持相当的活力,表明该噬菌体具有较广的应用范围。

[0032] 实验例5:噬菌体CRPAP1904 的PH敏感性检测

将得到的CRPAP1904噬菌体悬液用双层琼脂平板法进行复苏,通过稀释将其效价调整为1×10^{8}PFU/mL,取1mL初始效价为1×10^{8}PFU/mL的噬菌体分别在PH 2,3,4,5, 6,7,8,9,10,11,12,13溶液中孵育1 h后取出样品,采用双层琼脂法测滴度,结果如图9所示,噬菌体CRPAP1904在PH为 5,6,7,8,9下作用1h后,效价保持稳定,在PH为 4,10,11下作用1h后,仍具有一定活性,表明该噬菌体具有较广PH适用范围。

[0033] 实验例6:噬菌体CRPAP1904体外杀菌效果测试:

将耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌CRPA190在LB培养基中培养至对数生长期后,9000g下离心2min,利用PBS (pH 7.4)调整细菌浓度为10^{6}CFU/mL,将该菌悬液(2.5mL)与噬菌体(10^{9}Pfu/ml)按照MOI(1000:1)等体积比例混合,阳性对照组不添加噬菌体,加入等量LB培养基,37℃培养12 h,查看实验结果,分别测定实验组和阳性对照组中液体OD620值。

[0034] 实验结果如图10所示,B试管在没有噬菌体处理的情况下,12h后,阳性对照组菌液显著浑浊,测得OD620为0.282。然而,A试管中在经过噬菌体CRPAP190按1000 MOI处理后,对比可明显发现,菌液清澈透亮,测得OD值为0.063,明显低于阳性对照组的0.282,抑菌效果明显,表明本发明中噬菌体CRPAP1904在LB培养基中对耐碳青霉烯类铜绿假单胞菌生长起到显著抑制作用。

[0035] 此外,应当理解,虽然本说明书按照实施方式加以描述,但并非每个实施方式仅包含一个独立的技术方案,说明书的这种叙述方式仅仅是为清楚起见,本领域技术人员应当将说明书作为一个整体,各实施例中的技术方案也可以经适当组合,形成本领域技术人员可以理解的其他实施方式。



图 1

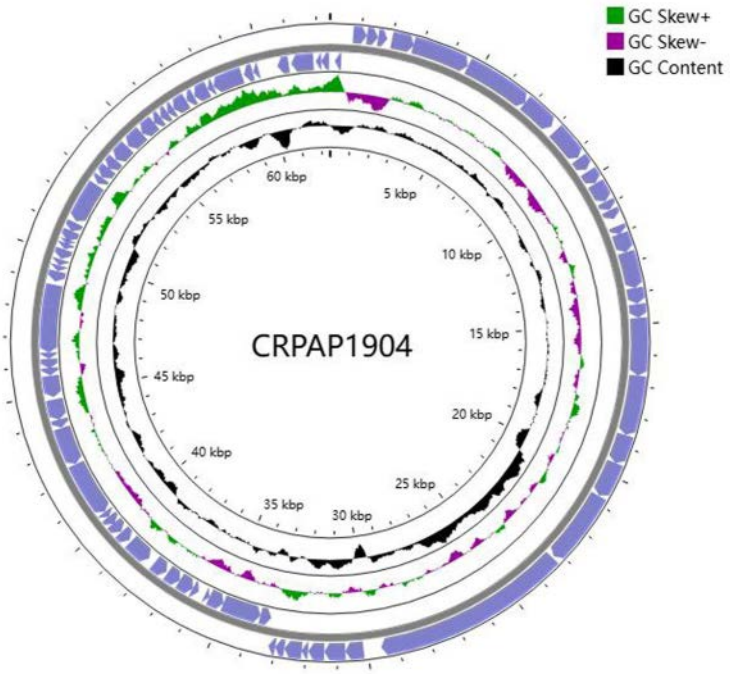
GC Skew+
GC Skew-
GC Content
CRPAP1904
5 kbp
10 kbp
15 kbp
20 kbp
25 kbp
30 kbp
35 kbp
40 kbp
45 kbp
50 kbp
55 kbp
60 kbp

图 2

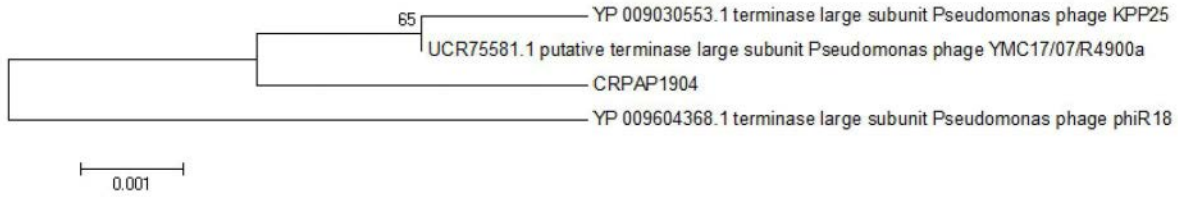
65
YP 009030553.1 terminase large subunit Pseudomonas phage KPP25
UCR75581.1 putative terminase large subunit Pseudomonas phage YMC17/07/R4900a
CRPAP1904
YP 009604368.1 terminase large subunit Pseudomonas phage phiR18
0.001

图 3

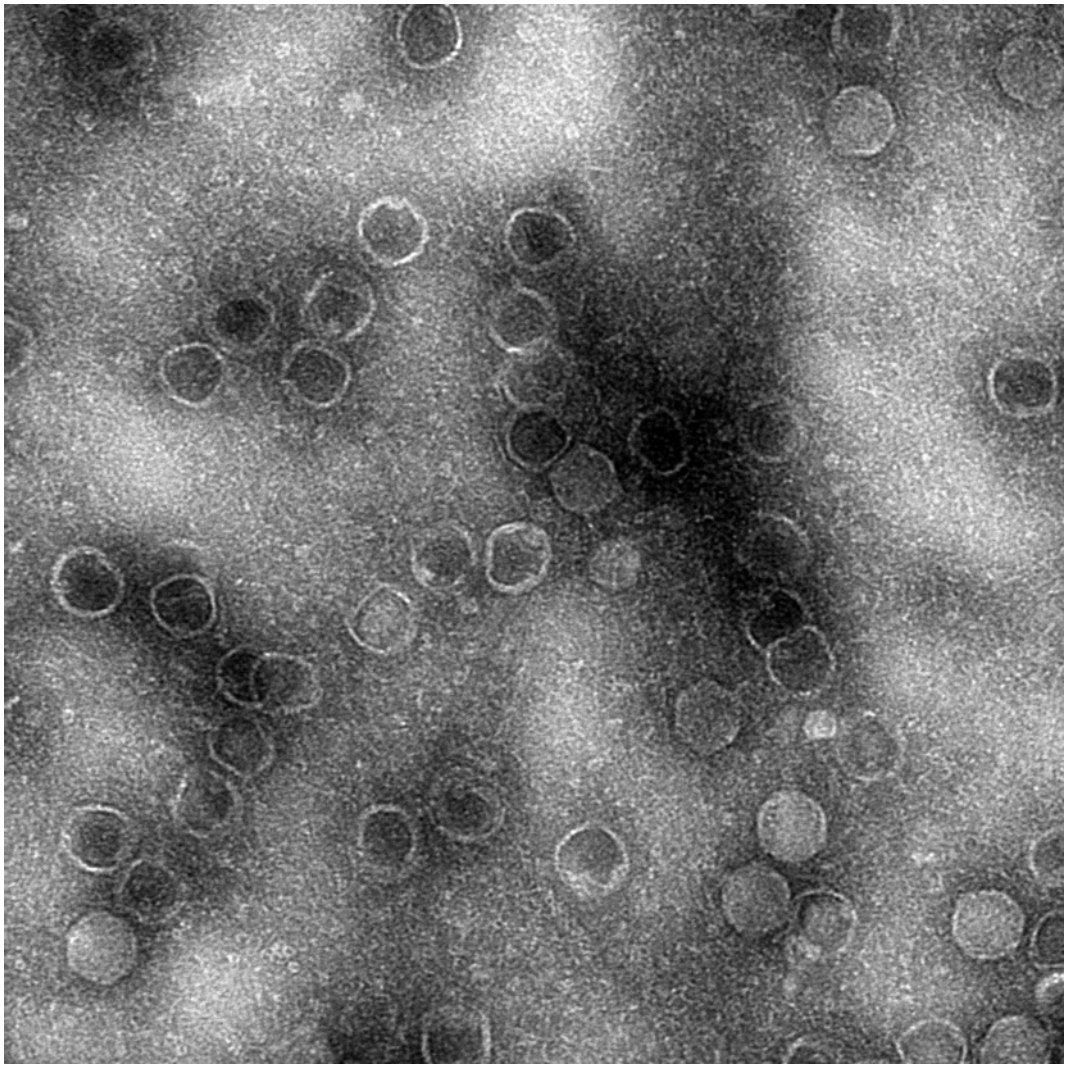

图 4



图 5

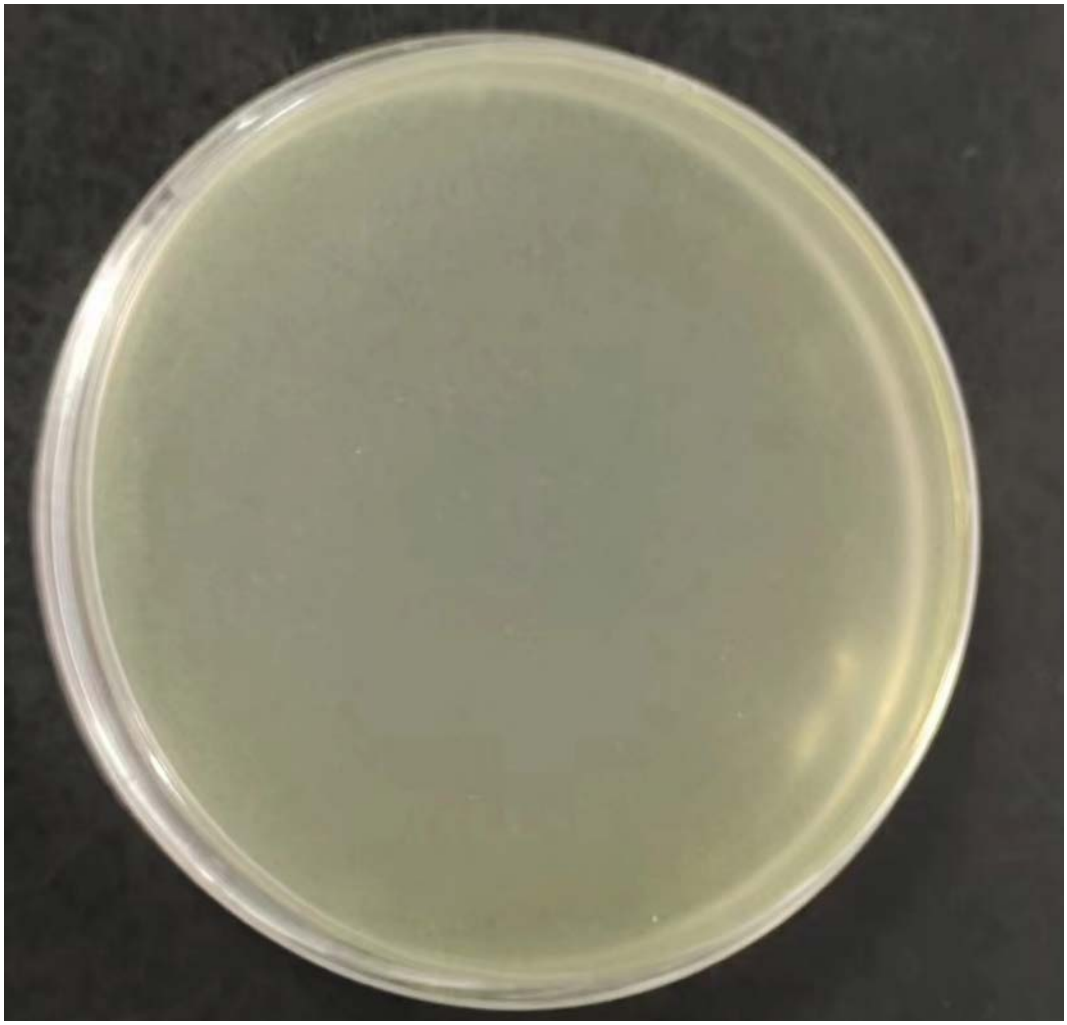

图 6

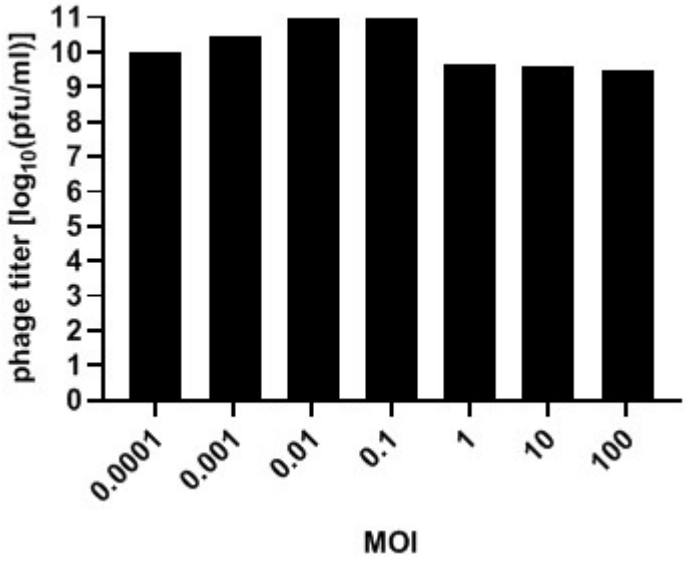
phage titer [log10(pfu/ml)]
11
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
MOI

图 7

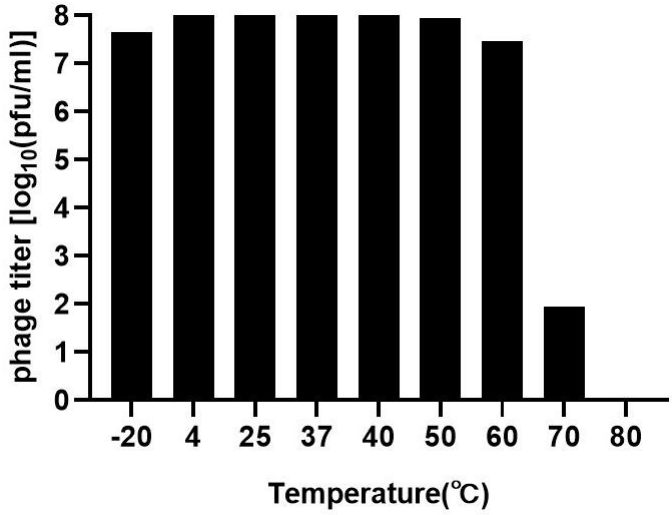
phage titer [log10(pfu/ml)]
0
1
2
3
4
5
6
7
8
-20
4
25
37
40
50
60
70
80
Temperature(℃)

图 8

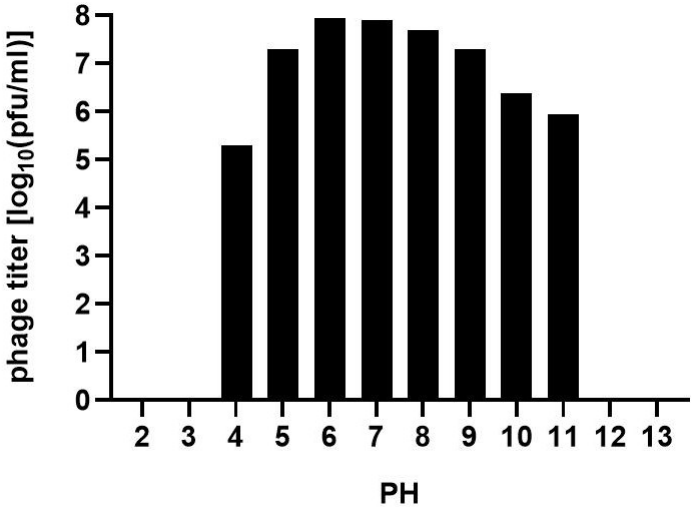
phage titer [log10(pfu/ml)]
0
1
2
3
4
5
6
7
8
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
PH

图 9

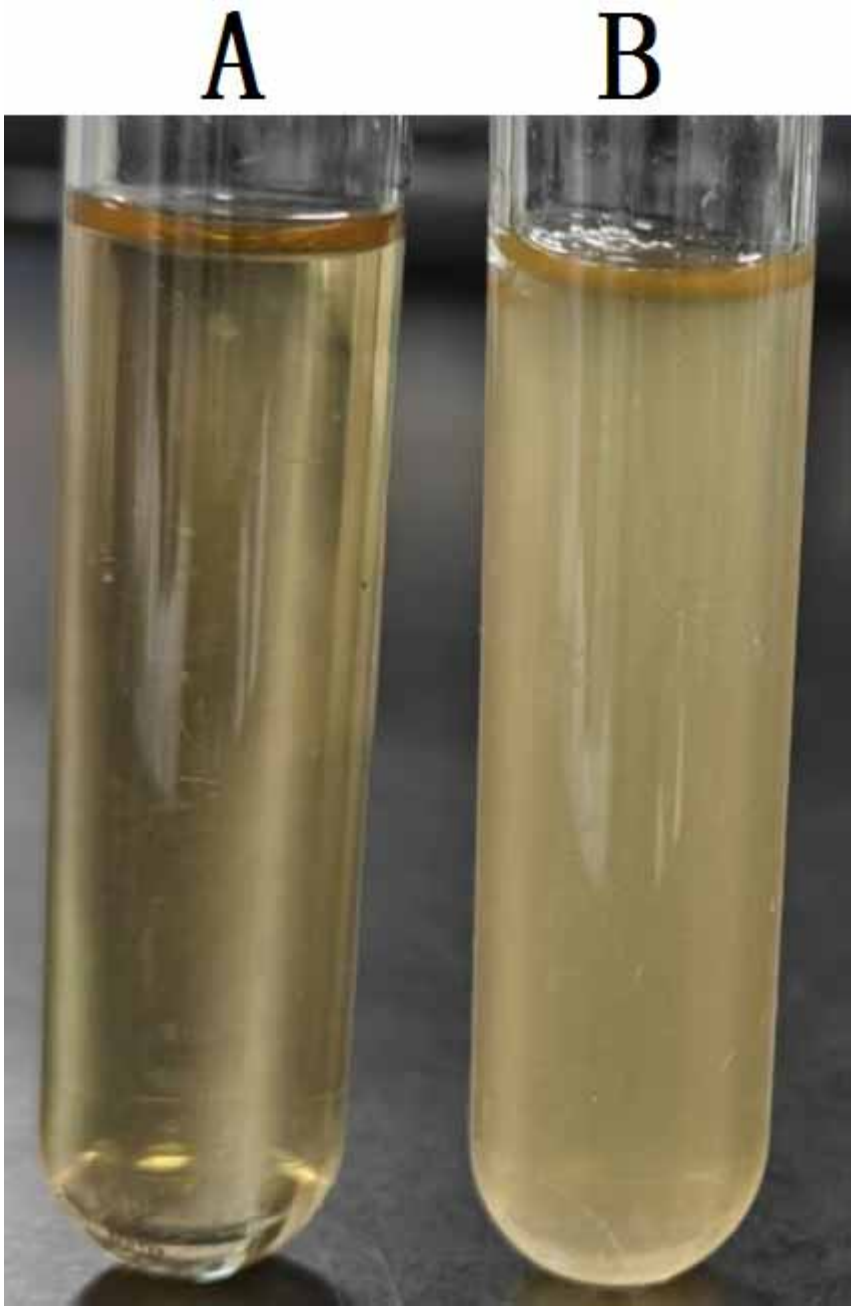

图 10