

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 7/00

A61K 35/76



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03807080.4

[43] 公开日 2005 年 7 月 20 日

[11] 公开号 CN 1643139A

[22] 申请日 2003. 3. 19 [21] 申请号 03807080.4

[30] 优先权

[32] 2002. 3. 25 [33] GB [31] 0207021.7

[32] 2002. 8. 7 [33] US [31] 10/215,056

[86] 国际申请 PCT/GB2003/001190 2003. 3. 19

[87] 国际公布 WO2003/080823 英 2003. 10. 2

[85] 进入国家阶段日期 2004. 9. 27

[71] 申请人 沃里克大学

地址 英国康文特里

[72] 发明人 马克·爱德华·拉普桑

法伊思·阿代莱代·伯登

利乌德米拉·彭切瓦·格兰锡

戴维·艾伦·霍德格桑

尼古拉斯·哈罗德·曼恩

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责任
公司

代理人 孙粹芳

权利要求书 3 页 说明书 14 页 序列表 5 页

[54] 发明名称 抗菌剂

[57] 摘要

一种噬菌体系列物，包括第一种 vir 突变噬菌体，它能够感染并裂解第一种菌株，以及第二种 vir 突变噬菌体，它能够感染并裂解第二种菌株。一种药物组合物包括上述噬菌体系列物。一种鉴定能杀死某种细菌的噬菌体的方法，通过从被细菌感染的人或地方获得细菌样品，鉴定细菌一种或多种噬菌体敏感性，将鉴定结果和噬菌体库已知宿主范围比较，噬菌体库包括能感染和裂解第一种菌株的第一种 vir 突变噬菌体，以及能感染和裂解第二种菌株的第二种 vir 突变噬菌体，和从噬菌体系列物中鉴定一种或多种可以杀死细菌的噬菌体。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种噬菌体系列物,包括第一种 vir 突变噬菌体,它能够感染并裂解第一种菌株,以及第二种 vir 突变噬菌体,它能够感染并裂解第二种菌株。
2. 如权利要求 1 所述的噬菌体系列物,其中所述的每一种菌株都是一种人或动物或植物的病原体。
3. 如权利要求 1 所述的噬菌体系列物,包括不同的噬菌体。
4. 如权利要求 1 所述的噬菌体系列物,包括至少一种宿主范围变化突变噬菌体。
5. 如权利要求 1 所述的噬菌体系列物,其中至少一种所述的菌株对一种或多种抗生素有抗性。
6. 一种含有如权利要求 1 所述噬菌体系列物的药物组合物,它和一种药物载体结合。
7. 如权利要求 6 所述的药物组合物,适用于局部用药。
8. 如权利要求 6 所述的药物组合物,作为药剂使用。
9. 如权利要求 6 所述的药物组合物作为预防的应用。
10. 一种含有如权利要求 1 所述噬菌体系列物的抗菌组合物,它和一种载体结合。
11. 如权利要求 10 所述的抗菌组合物作为一种消毒剂的应用。
12. 如权利要求 10 所述的抗菌组合物作为一种防腐剂的应用。
13. 如权利要求 10 所述的抗菌组合物作为外科或医疗设备的一种组成物的应用。
14. 一种鉴定能杀死某种细菌的噬菌体的方法,包括以下步骤:
 - (i) 从被所述细菌感染的人,动物,或植物中获得所述细菌样品;
 - (ii) 鉴定所述细菌的一种或多种噬菌体敏感性;
 - (iii) 将步骤(ii)的鉴定结果和噬菌体库的每一种噬菌体的已知宿主范围比较,所述噬菌体库包括能感染和裂解第一种菌株的第一种 vir 突变噬菌体,以及能感染和裂解第二种菌株的第二种 vir 突变噬菌体;和
 - (iv) 从噬菌体系列物中鉴定一种或多种可以杀死所述细菌的噬菌体。
15. 如权利要求 14 所述的方法,其中在所述的细菌中是否存在一种或多种原噬菌体可以通过 PCR 测定,用一对引物扩增来自所述细菌的原噬菌体 DNA。
16. 一种鉴定细菌中是否存在一种或多种噬菌体的方法,包括一对引物,它可以

在高度严格的条件下和原噬菌体核苷酸序列杂交，并用 PCR 鉴定所述原噬菌体是否存在。

17. 一种机读数据存储介质，包括数据存储材料，经机读数据编码，其中的数据明确了权利要求 1 限定的噬菌体系列物中每一种噬菌体的一种或多种性质。

18. 一种机读数据存储介质，包括数据存储材料，经机读数据编码，其中的数据明确了权利要求 14 限定的噬菌体库中每一种噬菌体的一种或多种性质。

19. 一种生产如权利要求 1 所述的噬菌体系列物的方法，包括培养一种供体菌，鉴定来自所述供体菌的一种或多种温和性噬菌体，诱变温和性噬菌体和分离所述噬菌体的一种或多种 vir 突变体。

20. 一种生产如权利要求 19 所述的噬菌体系列物的方法，包括以下步骤：

- (i) 分离所述的第一种供体菌；
- (ii) 将所述的第一种菌和第二种能够被噬菌体感染的培养菌株共培养；
- (iii) 鉴定来自所述的第一种供体菌的温和性噬菌体；
- (iv) 用诱变剂诱变步骤 (iii) 鉴定的所述温和性噬菌体；和
- (v) 将所述第一种供体菌和步骤 (iv) 得到的突变噬菌体共培养以鉴定能够裂解所述的第一种供体菌的 vir 突变体。

21. 一种生产如权利要求 19 所述的噬菌体系列物的方法，包括以下步骤：

- (i) 分离所述的第一种供体菌；
- (ii) 用化学或物理试剂诱导所述的供体菌产生温和性噬菌体；
- (iii) 鉴定来自所述的第一种供体菌的温和性噬菌体；
- (iv) 用诱变剂诱变步骤 (iii) 鉴定的所述温和性噬菌体；和
- (v) 将所述第一种供体菌和步骤 (iv) 得到的突变噬菌体共培养以鉴定能够裂解所述的第一种供体菌的 vir 突变体。

22. 一种生产如权利要求 1 所述的噬菌体系列物的方法，包括：

- (i) 分离所述的第一种供体菌；
- (ii) 将第一种菌和第二种能够被噬菌体感染的培养菌株共培养；
- (iii) 鉴定来自所述的第一种供体菌的一种或多种温和性噬菌体；
- (iv) 用诱变剂诱变步骤 (iii) 鉴定的所述温和性噬菌体；和
- (v) 将步骤 (iv) 得到的突变温和性噬菌体和之前未被噬菌体感染的第

三种菌株共培养，以鉴定一种或多种宿主范围变化噬菌体。

23. 一种生产如权利要求 1 所述的噬菌体系列物的方法，包括：

- (i) 分离所述的第一种供体菌；
- (ii) 用化学或物理试剂诱导所述的供体菌产生温和性噬菌体；
- (iii) 鉴定来自所述的第一种供体菌的一种或多种温和性噬菌体；
- (iv) 用诱变剂诱变步骤 (iii) 鉴定的所述温和性噬菌体；和
- (v) 将步骤 (iv) 得到的突变温和性噬菌体和之前未被噬菌体感染的第三种菌株共培养，以鉴定一种或多种宿主范围变化噬菌体。

24. 一种鉴定用于治疗被病原菌感染的动物或植物的噬菌体的方法，包括：

- (i) 分离所述的病原菌；
- (ii) 从细菌中分离一种溶原性噬菌体；和
- (iii) 诱变所述的溶原性噬菌体产生此溶原性噬菌体的 vir 突变体。

25. 如权利要求 24 所述的方法，其中 vir 突变体和一种或多种药物载体混合。

26. 如权利要求 24 所述的方法，包括使用经此法鉴定的所述的 vir 突变体治疗所述的细菌感染的步骤。

27. 如权利要求 1 所述的噬菌体系列物，包括一种经如权利要求 24 所述的方法鉴定的 vir 突变体。

28. 一对引物用于 PCR 鉴定噬菌体中是否有整合酶基因存在，包括选自于下面的核苷酸序列：

CGT CAA CTC GGA GAT ATG AA; GTA TCC GAA TCC TTC CTC GT
ATT CGT TGC ACT CAT GAC AG; CTC GCA ACT TCT GCT ACT CA
CTG TTG GCT ATG CAC GAT CT; CTG GGA ATA GGA GTT ACC GA
GCA CCG TCC ACA TCT ACA TT; CTG CAC GCA TGC CTG TAT AT
GCG TGA AGC TAA TTC TGC TG; ACT GAC ACG ACA ACC CGT AC
GCG AAG CTA TGG CTC TTG TT; CAC GTT GAT GTC GTT CAG TT
GCG AAT TGG TGA AGC TAC TG; AGC ATG AGA ATG CCG TAA CC
GGC ACT ATC AAA GAG ACA AC; CTA CAT GCT CTT GCA TTG TC

抗菌剂

本应用涉及含 vir 突变的噬菌体系列物，含这些突变体的组合物，鉴定及生产这些噬菌体以及将它们作为治疗细菌感染和预防的抗菌剂的方法。

抗菌剂，以化学抗生素（即，非病毒试剂）的形式，如青霉素或四环素是公众所知的。这些抗生素的问题在于抗药性日益严重。有抗生素抗药性或编码抗生素抗药性酶如青霉素酶的突变体在病菌中越来越多。例如，二甲氧基苯青霉素抗性 *Staphylococcus aureus* (MRSA) 菌，是一种日益常见的感染方式，一般会在医院进行外科手术时被感染。MRSA 感染和传统的抗菌治疗是明显不同的。

一种治疗细菌感染的方法是用一种病毒，所谓的噬菌体感染细菌。这种“噬菌体治疗”在二十世纪早期首先发展，但因为四十年代抗生素的出现，在西方很少采用。更多广泛的工作已经在东欧开展。

噬菌体对特定种类的细菌体有特异性。由于重要的胞内机制以及细胞表面成分的不同，它们不能感染较复杂的微生物的细胞。大多数噬菌体有结构，如尾部，使它们能够结合到靶细菌表面特定的分子上。然后，噬菌体的病毒 DNA 通过尾部注射到宿主细胞中，指导新噬菌体的产生。

不同类的噬菌体感染不同类的细菌。一般而言，它们可以从特定的细菌生长的环境中被分离出来，如污水或排泄物。鉴定噬菌体是否存在可以通过在适当的培养基中培养细菌，离心分离液体培养基，分离到的培养液经可以阻挡细菌的滤膜过滤。过滤抽提物和培养基混合，加入细菌，然后铺板，如琼脂板。在形成的菌落上出现清晰的斑点，称为噬菌斑，说明存在一种或多种噬菌体引起细菌裂解。

仅可以杀死细菌的噬菌体称为裂解性噬菌体。裂解性噬菌体在菌体外以核酸物质通常是 DNA 的形式存在，外有蛋白质衣壳包被。蛋白质衣壳上有一种或多种分子，可使其附着到细菌表面特定的分子上。与菌体结合后，DNA 进入宿主，转录翻译成不同的新噬菌体复制和包装必需的蛋白质。DNA 也被复制并包装到新的噬菌体中，细菌体裂解后噬菌体被释放。

除裂解性噬菌体还有温和性噬菌体，或溶原性噬菌体。这些温和性噬菌体

有两种生活史，一种是它们裂解被感染的细胞，另一种是它们进入原噬菌体状态。裂解性噬菌体总是要从外面感染细胞，对宿主细胞重新编程，通过突然的打开或裂解释放大量的噬菌体。这些溶原性噬菌体可以将它们的 DNA 整合到宿主菌 DNA 中形成原噬菌体，在特定的细菌及其后代中稳定存在。一些噬菌体并不整合到染色体中，而是作为自主复制子存在。原噬菌体指导一种阻遏物的合成，阻断其自身基因以及任何密切相关的溶原性噬菌体的基因的表达。原噬菌体偶尔也会逃脱阻遏物的调控。然后原噬菌体 DNA 通过位点特异性重组从基因组中切出，复制，大多通过裂解从宿主细胞中释放。

裂解性噬菌体已被用于治疗细菌感染。分离的裂解性噬菌体已被用于伤口或静脉注射杀死细菌。噬菌体的优点在于它们可以自我复制，仅一百个左右的噬菌体就可以杀死数以亿计的细菌。噬菌体通过杀死细菌简单地自我复制直到细菌从人体或环境中清除。如 WO 01/51066 揭示了一种方法，用一种或多种噬菌体治疗病人。类似的，US 4957686 揭示了一种用噬菌体治疗龋齿的方法。

用噬菌体治疗可能产生的问题，是病人机体对噬菌体常常会产生免疫反应将其从血液中清除。US 5660812, US 5688501 和 US 5766892 都显示了选择噬菌体以提高其在病人血液中的半衰期的方法。US 5811093 讨论扩增一种编码一种衣壳（包被）蛋白（衣壳蛋白 E）的基因，可以使噬菌体在动物的体循环系统中存在较长时间。在最近的专利中，基因经点突变修饰。

一般而言，溶原性噬菌体并非是好的噬菌体治疗候选。因为它们可能引起细菌致病基因的转移。一些噬菌体携带毒素基因，因此溶原体可能表现出提高的侵入性。然而，并非所有的温和性噬菌体携带侵入性基因。而且，细菌基因在噬菌体感染的过程中可以从一个宿主转移到另一个宿主，这些基因包括侵入性基因。第一个过程称为噬菌体转化，第二个过程称为转导。因此，溶原性噬菌体在传统上被认为很难解决它将致病基因传播给其它细菌的问题。然而，裂解性噬菌体也会引起转导。

我们知道裂解性噬菌体已被用于治疗细菌感染，鉴定裂解性噬菌体需花大量时间，因为一些病菌的裂解性噬菌体很少且难以分离。

发明人意识到，溶原性噬菌体更普遍存在于一些细菌中。他们意识到，根据其感染不同菌株的能力，和例如，缺少编码某些毒素或其它和细菌致病性有关

的物质的基因，通过选择大量不同的溶原性噬菌体，可以产生一系列的噬菌体。可以选择其中的一些，例如用于治疗相同细菌的不同菌株。

发明人也认识到，大多数溶原性噬菌体的问题在于，感染一个细胞后，噬菌体 DNA 往往整合到细菌的基因组中，而不是杀死细菌。通过在噬菌体系列物中鉴定一个或多个“vir”突变体用于治疗可以解决这个问题。这些噬菌体突变体通常在温和性噬菌体 DNA 操纵子区有一个突变，阻止阻遏蛋白结合到操纵子上。阻遏蛋白一般会结合到操纵子上，原噬菌体就不能转录和翻译，也不会进入裂解周期。然而，vir 突变体中的突变意味着感染噬菌体 DNA 转录并翻译造成细菌的裂解。

因此，本发明的第一方面提供了噬菌体系列物，包括第一种 vir 突变体，它能够感染并裂解细菌的第一种菌株，以及第二种 vir 突变体，它能够感染并裂解细菌的第二种菌株。

溶原性噬菌体通常含有 DNA，编码一种或多种整合酶，解离酶，转座酶，切除酶，attP，复制原点，及其它和维持原噬菌体在宿主细胞基因组中稳定性有关的基因。

一种温和性噬菌体的 vir 突变体，可以裂解性地感染携带野生型原噬菌体的溶原体宿主。较佳的 vir 突变体在噬菌体 DNA 中含有一个或多个突变的操纵子区，操纵子区控制原噬菌体 DNA 的转录，突变后和野生型原噬菌体相比，降低了和阻遏蛋白结合的特异性。理论上，阻遏蛋白基因的一个显性负突变可以得到一个 vir 突变体。阻遏蛋白调控操纵子区，它可能来自噬菌体本身或者不同但相关的噬菌体。

第一种菌株和第二种菌株可以是细菌的相同种属，也可以是细菌的不同种属。两种菌株可以通过其中的不同原噬菌体得以区分。如之前说明的，细菌中的原噬菌体可以抵抗相同噬菌体的感染，或者是不同的但相关的噬菌体的感染。因此，有一系列不同的噬菌体就可以选择一种或多种不同的噬菌体，这样，两种或多种噬菌体可以有效地抗多种细菌，或者可以选择一种噬菌体治疗特定的细菌。

较佳地，每种菌株都是一种动物或植物病原体，特别是人的病原。较佳地，细菌是 *Staphylococcus*（特别是 *S.aureus*），*Helicobacter*（特别是 *H.pylori*），*Klebsiella*，*Listeria*，*Mycobacterium*，*Escherichia*（较佳是 *E.coli*，特别是 *E.coli*

0157), *Meningococcus*, *Campylobacter*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Clostridium*, *Legionella*, *Acinetobacter* 或 *Salmonella*. 较佳地, 噬菌体系列包括至少 5 种, 至少 10 种, 至少 15 种, 至少 20 种, 至少 25 种, 至少 30 种, 至少 35 种或至少 40 种不同的噬菌体。较佳地, 至少 50%, 至少 60%, 至少 70%, 至少 80%, 至少 90%, 更佳地至少 95%, 最佳地 100% 的噬菌体系列物是 *vir* 突变体。系列物也可以含有一种或多种裂解性噬菌体。

系列物可以含有至少一种宿主范围变化突变噬菌体。宿主范围变化噬菌体是一种噬菌体, 从原宿主菌中分离得到, 不能感染第二种菌株, 但经诱变剂突变后, 可以感染第二种菌株。

较佳地, 至少一种菌株对一种或多种抗生素有抗性。抗生素指一种或多种化学抗生素。即, 不是功能性地能够感染细胞的病毒。抗生素包括青霉素, 四环素和氨基糖苷类。或者菌株可以无抗生素抗性。

含有如本发明第一个方面定义的噬菌体系列物的药物组合物, 最好和一种药物载体结合。这种载体允许噬菌体系列物应用于被治疗动物或人的部分或体内。

给药途径包括, 但不限于口, 鼻, 耳, 静脉, 肌肉, 腹腔, 鞘内, 阴道, 直肠, 局部, 通过腰部穿刺, 或直接用于脑或其相关膜组织。可以通过装置给药, 如气雾剂所用的鼻部喷雾器或吸入器。药物组合物可进一步制成片剂或栓剂。

较佳地, 药物组合物用于局部, 通过, 例如, 将噬菌体系列物和适当的基质混合, 使噬菌体局部应用于伤口或鼻腔。这种基质包括石蜡和羊毛脂类基质等本领域技术人员熟知的类型。较佳地, 噬菌体可掺入绷带或伤口敷料。

噬菌体可以加到商品中如香皂, 手霜或面霜, 刮胡膏和泡沫状物, 牙线, 牙粉, 牙膏等。这可以用洗的方法治疗皮肤病, 如粉刺, 或通过用含有噬菌体的牙膏刷牙治疗龋齿。

使用本发明的药物组合物作为药剂或用于预防也包括在本发明的范围内。根据本发明, 用噬菌体系列物治疗细菌感染的人, 动物或植物的方法, 也包括在本发明的范围内。

噬菌体系列物可作为预防剂在细菌引起感染前杀死携带的不引起症状的细菌。例如, 细菌可能是二甲氧基苯青霉素抗性的 *Staphylococcus aureus* (MRSA),

可以引发全身感染和脓肿。这些细菌可能寄生在鼻腔并不引发任何明显的病症。然而，细菌可能在人群中传播，使免疫力降低的人发病。因此，杀死细菌能够促进疾病的预防。噬菌体系列物可以简单的用于局部乳剂通过棉拭经鼻部给药。

噬菌体系列物也可以与适当的载体结合作为一种抗菌或防腐剂。这种抗菌组合物可简单的用于例如地板的表面消毒。或者，器皿，如手术器皿的消毒，可以简单的放在含有噬菌体系列物的抗菌溶液中。制造这些器皿的材料中也可以加入这些噬菌体。

噬菌体系列物可以进一步通过这些技术如结合，粘附，或共聚加到材料例如塑料中。然后用这些材料生产仪器如导管或插管等等。同样，噬菌体系列物也可以加到生产出的这些仪器中。

较佳地，噬菌体系列物含有两种或多种不同的噬菌体，为了治疗或消毒多种不同的菌株。

或者，得到要治疗或消毒的细菌样品后，对细菌进行鉴定，可以从噬菌体系列物种选择适当的杀死这种细菌的噬菌体。

噬菌体也可用来处理牛奶和奶制品。在相关的作用中，噬菌体可用于预防或治疗乳腺炎，或将噬菌体系列物加到全套挤奶杯中，或通过局部擦拭治疗。

本发明进一步的方面提供了一种鉴定杀死细菌的适当的噬菌体的方法，包括以下步骤：

- (i) 从被感染的人，动物，或植物中获得细菌样品；
- (ii) 鉴定细菌的一种或多种噬菌体敏感性；
- (iii) 将步骤(ii)的鉴定结果和噬菌体库的每一种噬菌体的已知宿主范围比较，噬菌体库包括能感染和裂解第一种菌株的第一种 vir 突变噬菌体，以及能感染和裂解第二种菌株的第二种 vir 突变噬菌体；和
- (iv) 从噬菌体系列物中鉴定一种或多种可以杀死细菌的噬菌体。

噬菌体库可以是包括本发明的第一方面的系列物之外的噬菌体的噬菌体集合。

细菌的一个特性是可以含有或不含有原噬菌体。是否含有原噬菌体可以用一对引物经聚合酶链式反应(PCR)扩增来自细菌的部分原噬菌体DNA进行鉴定。

本发明进一步提供一种鉴定细菌中是否有原噬菌体的方法，提供一对引物

能够在高度严格的条件下和原噬菌体的核酸序列杂交，通过 PCR 鉴定是否有原噬菌体存在。

原噬菌体 DNA 的 PCR 扩增部分，接着可用传统的测序技术进行测序。

较佳地，引物对原噬菌体特异性序列如整合酶有特异性。

高度严格包括，例如 2mM MgCl₂ 和 48°C 退火温度。

本发明更进一步提供一种机读数据存储介质，包括一种数据存储材料，经机读数据编码，其中的数据明确了噬菌体系列或噬菌体库中的每一种噬菌体的一种或多种性质。数据存储介质可以是软盘，CD-ROM，计算机存储器，或其它机读介质。较佳地，数据能够用于选择一种或多种适当的噬菌体治疗细菌感染或对细菌污染进行消毒。

本发明也提供根据本发明第一个方面提供的一种噬菌体系列物的生产方法，包括分离第一种供体菌，鉴定一种或多种温和性噬菌体，突变温和性噬菌体和分离一种或多种噬菌体 vir 突变体，也应属于本发明范围内。

较佳地，噬菌体系列物的生产方法包括以下步骤，

- (i) 分离第一种供体菌；
- (ii) 将第一种菌和第二种培养的能够被噬菌体感染的菌株共培养；
- (iii) 鉴定从第一种供体菌得到的温和性噬菌体；
- (iv) 用诱变剂将步骤 (iii) 鉴定的温和性噬菌体诱变，和
- (v) 培养第一种供体菌和步骤 (iv) 得到的第二种供体菌突变噬菌体，以鉴定能够裂解第一种供体菌的 vir 突变体。

或者，代替步骤 (ii)，通过化学或物理试剂也能够诱导和分离噬菌体。

噬菌体系列物宿主范围变化突变体可以通过以下步骤生产：

- (i) 分离第一种供体菌；
- (ii) 将第一种菌和第二种培养的能够被噬菌体感染的菌株共培养；
- (iii) 鉴定从第一种供体菌得到的一种或多种温和性噬菌体；
- (iv) 用诱变剂将步骤 (iii) 鉴定的温和性噬菌体诱变；和
- (v) 培养从步骤 (iv) 得到的温和性噬菌体突变体，之前未感染噬菌体的第三种菌株，以鉴定一种或多种宿主范围变化噬菌体。

采用的诱变剂较佳的是羟胺。其它诱变剂，如紫外线和其它已知的 DNA 诱

变剂也可使用。

或者，代替步骤 (ii)，通过化学或物理试剂也能够诱导和分离噬菌体。

常常发现的进一步的问题是发现植物或动物例如病人受到抗生素抗性细菌的感染。发明人已经意识到可以分离这种病原菌，鉴定细菌中的任何一种溶原性噬菌体，将来自病原菌的溶原性噬菌体突变，生产溶原性噬菌体的 vir 突变体。这种 vir 突变体可以和一种或多种适当的药物载体混合，用于治疗细菌感染。因此，来自病原菌自身细胞的原噬菌体可以杀死此病原菌。

通过这种方法鉴定的 vir 突变体可以反过来加入到本发明第一个方面定义的噬菌体系列物中。

本发明将以实例描述。

温和性葡萄球菌噬菌体的共培养和分离

含两种 *Staphylococcus aureus* 异型 (SAI) 的过夜培养物在 37°C 培养过夜 (o/n)，在 Hettich Zentrifugen EBA12 离心机中用 1116 转子以 5000rpm 离心后无菌过滤 (0.22 μ m)。一种 SAI 是培养菌株，另一种是供体菌株。100 μ l 滤液加到 100 μ l 培养菌株过夜培养物中，在室温下 (RT) 温育 40 分钟。3ml 上层琼脂加到共培养物中。混合物倒于 Luria Broth (LB) (Sambrook, et al., 1989, *Molecular Cloning, a Laboratory Approach*. 2nd Ed. Cold Spring Harbour Press) +10mM Mg²⁺ +8mM Ca²⁺ 平板上，在 37°C 过夜培养。挑取噬菌斑在 PBS+10mM Mg²⁺ 中 4°C 过夜培养，然后在 LB+Mg²⁺+Ca²⁺ 平板上划线接种。培养菌株 (100 μ l 过夜培养菌株+上层琼脂) 倒在划线平板上。从划线平板挑取噬菌斑在氯仿中于 4°C 保存。

诱变和突变体分离

羟胺诱变

在 0.2ml 无菌过滤的噬菌体储存物中加入 0.4 ml EDTA 缓冲液 (0.5 M KPO₄(pH6.0)+5 mM EDTA)+0.2 ml 无菌水(sH₂O)+0.1 ml 无菌 0.2 M MgSO₄+0.8 ml 羟胺溶液。羟胺溶液 (1MNH₂HO (pH6.0)) 新鲜配制，将 0.56 ml 4 M NaOH 加到 0.35 g NH₂OH 中，加入无菌水至终浓度为 5 ml。在 37°C 温育 31 小时。在对照混合物中，噬菌体储存物溶于 0.2 ml 无菌水。温育 31 小时后，混合物加到 8ml LB+10mM MgSO₄+8mM Ca(NO₃)₂ 的透析管中。透析管置于 500ml 锥形瓶，锥形瓶中加入 300ml LB+Mg²⁺+Ca²⁺。于 4°C 放置 7 小时。LB+Mg²⁺+Ca²⁺换液两

次。在 4°C 下温育第二个 7 小时后第三次换液。然后，噬菌体储存物放在无菌通用瓶中在 4°C 下在 LB+Mg²⁺+Ca²⁺中再一次温育 7 小时。

杀菌曲线

99.9%杀菌率（31 小时）在一段时间中在适当的时间点测定。样品在 LB+Mg²⁺+Ca²⁺中梯度稀释。稀释液和培养菌株以相同的体积 100μl 在室温下温育 40 分钟。向此混合物中加入上层琼脂，倒在 LB+Mg²⁺+Ca²⁺平板上。平板在 37°C 下过夜培养后噬菌斑计数。在噬菌斑形成单位（pfu）中的 10³ 倍作为 99.9%杀菌率。

分离侵入性（vir）突变体

侵入性（vir）突变体在表达和富集后分离。1ml 羟胺处理的噬菌体和 1ml 过夜培养菌株加到 15ml LB+Mg²⁺+Ca²⁺中于 37°C 温育，1 小时后加入 1ml 过夜培养菌株源。过夜培养后，培养物在 Hettich Zentrifugen EBA12 离心机中用 1116 转子以 5000rpm 离心 3 分钟后无菌过滤（0.22μm）。滤膜为 0.22μm 小孔，细菌不能通过但噬菌体可以通过，因此滤液中没有细菌而含有噬菌体。100μl 滤液加到 100μl 过夜培养菌株源中在室温下温育 40 分钟。在此混合物中加入上层琼脂，倒在 LB+Mg²⁺+Ca²⁺平板上。过夜培养后，用玻璃吸管挑取单个噬菌斑。将噬菌斑加到含 100μl PBS+Mg²⁺+Ca²⁺的 Eppendorf 管中，振荡后在 4°C 下过夜培养。然后用无菌环将培养物在两块 LB+Mg²⁺+Ca²⁺板上划线接种。一块板上倒入菌株源（3ml 上层琼脂+100μl 菌株源），另一块板上倒入培养菌株（3ml 上层琼脂+100μl 培养菌株），在 37°C 下过夜培养。如果噬菌体能够同时感染菌株源和培养菌株，可初步认为是 vir 突变体。为确证纯度，用玻璃吸管从源 SAI 板上挑取单个噬菌斑。将噬菌斑加到含 100μl PBS+Mg²⁺+Ca²⁺的 Eppendorf 管中，振荡后在 4°C 下过夜培养。

vir 对照

为确定作为 vir 突变体分离出来的噬菌体不是从培养菌株中活化的原噬菌体，需要设置对照。15ml LB+Mg²⁺+Ca²⁺用菌株源和培养菌株接种。在 37°C 过夜培养后，培养物在 Hettich Zentrifugen EBA12 离心机中用 1116 转子以 5000rpm 离心 3 分钟后无菌过滤（0.22μm）。100μl 滤液加到 100μl 过夜培养菌株源中在室

温下温育 40 分钟。在此混合物中加入上层琼脂，倒在 LB+Mg²⁺+Ca²⁺平板上。在 37°C 过夜培养后如有噬菌斑出现则 vir 诱导不成功。

分离 hrc (宿主范围变化) 突变体

hrc 突变体在如上所述的表达和富集步骤后分离。一些菌株对 vir 突变体噬菌体不敏感：vir 抗性宿主 (VRH)。1ml 羟胺处理的噬菌体和 1ml 过夜培养菌株加到 15ml LB+Mg²⁺+Ca²⁺中，在 37°C 下温育。1 小时后，加入 1ml 过夜培养的 VRH 菌株。过夜培养后，培养物在 Hettich Zentrifugen EBA12 离心机中用 1116 转子以 5000rpm 离心 3 分钟后无菌过滤 (0.22μm)。100μl 滤液加到 100μl 过夜培养的 VRH 菌株中在室温下温育 40 分钟。在此混合物中加入上层琼脂，倒在 LB+Mg²⁺+Ca²⁺平板上。用玻璃吸管挑取单个噬菌斑。将噬菌斑加到含 100μl PBS+Mg²⁺+Ca²⁺的 Eppendorf 管中，振荡后在 4°C 下过夜培养。然后用无菌环将培养物在三块 LB+Mg²⁺+Ca²⁺板上划线接种。一块板上倒入菌株源 (3ml 上层琼脂+100μl 菌株源)，第二块板上倒入培养菌株 (3ml 上层琼脂+100μl 培养菌株)，第三块板上倒入 VHR 菌株 (3ml 上层琼脂+100μlVRH 菌株)，在 37°C 下过夜培养。如果噬菌体能够感染 VRH 菌株，可初步认为是 hrc 突变体。此时菌体不应感染菌株源或培养菌株。为确证其纯度，用玻璃吸管从源菌株板上挑取单个噬菌斑。将噬菌斑加到含 100μl PBS+Mg²⁺+Ca²⁺的 Eppendorf 管中，振荡后在 4°C 下过夜培养。培养前划线接种，再挑取，振荡后在 4°C 下保存。

PBS 在 Sambrook, et al.中描述

hrc 对照

为确定作为 hrc 突变体分离出来的噬菌体不是从培养菌株或源菌株中活化的原噬菌体，需要设置对照。两个接种体如下所示加到 15ml LB+Mg²⁺+Ca²⁺中：

菌株 A	菌株 B
源	VRH
培养	VRH

在 37°C 过夜培养后，培养物在 Hettich Zentrifugen EBA12 离心机中用 1116 转子以 5000rpm 离心 3 分钟后无菌过滤 (0.22μm)。100μl 滤液加到 100μl 过夜培养的 VRH 菌株中在室温下温育 40 分钟。在此混合物中加入上层琼脂，倒在 LB+Mg²⁺+Ca²⁺平板上。在 37°C 过夜培养后如有噬菌斑出现则 hrc 诱导不成功。

氯化铯梯度纯化噬菌体

4ml 静置的 SAI 过夜培养物加到 4 个有 400ml 的 LB+Mg²⁺+Ca²⁺的 2 升锥形瓶中, 在 37°C 下振荡 (300rpm)。1 小时后, 40μl 噬菌体 (2×10⁷pfu) 加到振荡的培养物中。4 小时后, 培养物完全裂解。集合培养物, 加入固体 NaCl 使终浓度为 1M。裂解的培养物冰冷 1 小时后在 4°C 下以 11000g 离心 10 分钟。

10%(w/v)PEG6000 溶于混合物中, 在 4°C 下于冰上放置过夜。根据 Sambrook et al. (1989)所述的转子在 4°C 下以 11000g 离心 10 分钟形成沉淀, 沉淀悬浮在 4ml PBS 中。加入等体积氯仿。混合物振荡 30 秒。3000g 离心除去氯仿。加入氯化铯 (CsCl) 至终浓度为 0.5 g/ml。悬浮液加到氯化铯梯度上层, 聚丙烯管中含以下氯化铯浓度: 1.4, 1.5 和 1.6 g/ml PBS。管以 22000rpm (Beckman SW28) 离心 4 小时。沿管壁小心插入 21 号针头抽提噬菌体条带。重复三次在 PBS+Mg²⁺+Ca²⁺中透析 7 小时除去氯化铯。纯化的噬菌体在 4°C 下保存。

整合酶特异性 PCR

Staphylococcus aureus 分离物几乎总是含有至少一个温和性噬菌体整合到它们的 DNA 中。温和性噬菌体能够插入宿主 DNA 必须有一种途径, 一般是通过酶, 整合酶来达到, 它可以催化噬菌体 DNA 整合到宿主菌 DNA 中。

大量的 PCR 引物被设计来扩增和鉴定在可以感染 *Staphylococcus aureus* 的噬菌体中发现的特有的整合酶基因。这种技术也可在其它细菌/噬菌体系统中用于类似的重要基因, 如解离酶基因(在 *listeria* 噬菌体整合中起重要作用)。细菌 DNA 中含有整合酶基因说明有前噬菌体或噬菌体相关元件如病原岛的存在。

在设计 PCR 引物时已有大约 27 个 *Staphylococcus aureus* 噬菌体整合酶基因被测序。这些整合酶基因经比较测定其系统相关性, 并绘出种系树。从图上可看出 *Staphylococcus aureus* 噬菌体或噬菌体相关元件中的整合酶基因, 可能有 8 个明显的“家族”。因此利用前面提到的引物进行 PCR 实验可以确定在金黄色葡萄球菌的 DNA 中存在哪一个家族的噬菌体或噬菌体相关元件。

PCR 引物

以下这些引物被用以扩增和鉴定特定家族的整合酶基因:

第 1 族正向:CGT CAA CTC GGA GAT ATG AA

第 1 族反向:GTA TCC GAA TCC TTC CTC GT

第 2 族正向:ATT CGT TGC ACT CAT GAC AG

第 2 族反向:CTC GCA ACT TCT GCT ACT CA

第 3 族正向:CTG TTG GCT ATG CAC GAT CT

第 3 族反向:CTG GGA ATA GGA GTT ACC GA

第 4 族正向:GCA CCG TCC ACA TCT ACA TT

第 4 族反向:CTG CAC GCA TGC CTG TAT AT

第 5 族正向:GCG TGA AGC TAA TTC TGC TG

第 5 族反向:ACT GAC ACG ACA ACC CGT AC

第 6 族正向:GCG AAG CTA TGG CTC TTG TT

第 6 族反向:CAC GTT GAT GTC GTT CAG TT

第 7 族正向:GCG AAT TGG TGA AGC TAC TG

第 7 族反向:AGC ATG AGA ATG CCG TAA CC

第 8 族正向:GGC ACT ATC AAA GAG ACA AC

第 8 族反向:CTA CAT GCT CTT GCA TTG TC

PCR 反应条件

用于此反应的退火温度为 48℃。一般进行 30 个循环。

可用于进行 8 个反应的 PCR 体系如下:

1.5μl Taq 聚合酶 -从 Gibco life Tech 得到

4 μl dNTP (25μM) - 从 Invitrogen 得到

40 μl 10x buffer(200mM Tris •HCl, 500mM KCl, pH8.4)- 从 Gibco life Tech 得到

16μl MgCl₂ (50mM)

280μl 水 (无菌, 去离子)

3.2ul 引物混合物体系 (正向和反向引物比率为 1: 1) (贮存液约为 10μM)

45μl 上述混合物加入 5μl 待测样品 (每个克隆悬浮于 100μl 水中, 取 5μl)

PCR 能够检测和鉴定细菌中噬菌体和噬菌体相关元件的存在。

志愿者鼻实验结果

设计以下实验检测一种局部用药的 vir 突变噬菌体的效价作为鼻携带 MRSA 的对照

方法:

Ψ134/B1 vir, 浓度为 2×10^8 pfu/ml, 施用于一名鼻携带 SAI134 菌株的健康志愿者的鼻前孔中。另一名志愿者为 MRSA 阳性但不是 SAI 携带者作为对照。对照志愿者施用条件除噬菌体外与前述非对照志愿者相同。两名志愿者都为男性, 25 岁, 体重和体型相同, 都是最后一年博士生, 工作于同一领域, 实验室住同一房间, 用同样的方法擦拭和接种。

将噬菌体的 PBS 溶液通过棉签施于鼻前孔。棉签在噬菌体的 PBS 溶液中浸泡然后轻轻排去水分。溶液分别施用于 3 个位置, 每处 20 分钟(时间: 0-20, 60-80, 120-140 分)。每个位置用不同的棉签, 以圆周转动棉签保证溶液最大范围的覆盖鼻黏膜。

样品取三份置于 Baird Parker 平板中(对 *Staphylococcus aureus* 有选择性), 设置不同的时间点(0, 20, 60, 80, 120, 140min, 8, 18, 24 小时, 2, 3, 4, 5 天)。接种后观察平板计算克隆数并按照以下范围分级:

- 0: 无克隆
- 1: <10 个克隆
- 2: 10-100 个克隆
- 3: > 100 个克隆

结果

无噬菌体

时间(小时)	擦拭			平均值
	1	2	3	
0.0	3	3	3	3.0
0.3	2	3	3	2.7
1.0	1	2	3	2.0
1.3	3	3	2	2.7
2.0	3	3	2	2.7
2.3	3	3	1	2.3
5.0	1	1	2	1.3
8.0	3	2	1	2.0
18.0	3	3	3	3.0
48.0	3	2	3	2.7
96.0	3	2	3	2.7
120.0	3	3	3	3.0

噬菌体

时间 (小时)	擦拭			平均值
	1	2	3	
0.0	3	3	3	3.0
0.3	3	3	3	3.0
1.0	2	2	2	2.0
1.3	1	1	1	1.0
2.0	2	2	2	2.0
2.3	1	2	1	1.3
5.0	1	1	1	1.0
8.0	1	1	1	1.0
18.0	1	1	1	1.0
48.0	1	2	1	1.3
96.0	2	2	2	2.0
120.0	3	2	3	2.7

从以上结果可以看出细菌数的平均值在接受噬菌体的志愿者中下降得较快。在这个志愿者身上细菌的数量维持在低水平时间更长。至第 5 天两个志愿者的 *Staphylococcus aureus* 数量都恢复了

结论

这个初步的实验说明以上述方式施加噬菌体能降低志愿者鼻腔中 *Staphylococcus aureus* 的数量。仅使用佐剂时菌量减少水平如上。还需要持续治疗以保证细菌的清除。

动物伤害模型

在一个感染了 SAI 134 的鼠外伤模型上施用 $\Psi 134/B1$ vir, 细菌数的恢复显著减少, 由此可防止动物的临床感染。动物实验采用 2×10^8 pfu/ml 浓度的噬菌体。

噬菌体系列物

噬菌体系列物对于 Warwick 大学 SAI 库中的约 100 个细菌菌株有活性, 包括 17 个已知的 EMRSA (传染性二甲氧基苯青霉素抗性 *Staphylococcus aureus*) 菌株, 以及其它从欧洲和共享资源如 NCIMB 和 ATCC 中获得的菌株。菌株最好是从全国范围内医院中的病人收集得来, 以得到一个大的菌株库。

分离出一个温和噬菌体即获得了一个致病突变噬菌体。将野生型和 vir 突变体噬菌体在不同的细菌菌株上进行测试。当至少, 例如 70%, 80%, 90%, 95%,

最好是 100%的细菌菌株数量能被 vir 突变体控制时噬菌体系列物就可纯化并生产医疗或疾病预防试剂。

这种产品可与标准的药物基质结合能局部使用。另外其他的药物赋形剂也可与噬菌体系列物结合。

噬菌体系列物应定期升级以应对可能产生的新的抗性细菌。

如果噬菌体对于某一种菌株明显无效，那么可以分离这种细菌及其原噬菌体，从而分离温和噬菌体即能抵抗这种新菌株的 vir 突变体，并将这些 vir 突变体引入到原噬菌体系列物中。

在极端情况下当噬菌体株系中没有一种能侵染某种与感染有关的细菌时，可分离这种细菌，并突变某一噬菌体来产生 vir 突变体来治疗这种感染。

-
- <110> 沃里克大学
- <120> 抗菌剂
- <130> P706370US
- <150> GB 0207021.7
<151> 2002-03-25
- <150> US 10/215,056
<151> 2002-07-08
- <160> 16
- <170> PatentIn version 3.2
- <210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223> PCR 引物: 第1族正向
- <400> 1
cgtcaactcg gagatatgaa 20
- <210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223> PCR 引物: 第1族反向
- <400> 2
gtatccgaat ccttcctcgt 20
- <210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223> PCR 引物: 第2族正向

<400> 3
attcgttgca ctcatgacag 20

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PCR 引物: 第2族反向

<400> 4
ctcgcaactt ctgctactca 20

<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PCR 引物: 第3族正向

<400> 5
ctgttggcta tgcacgatct 20

<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PCR 引物: 第3族反向

<400> 6
ctgggaatag gagttaccga 20

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PCR 引物: 第4族正向

<400> 7		
gcaccgtcca catctacatt		20
<210> 8		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> PCR 引物: 第4族反向		
<400> 8		
ctgcacgcat gcctgtatat		20
<210> 9		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> PCR 引物: 第5族正向		
<400> 9		
gcgtgaagct aattctgctg		20
<210> 10		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> PCR 引物: 第5族反向		
<400> 10		
actgacacga caaccgtag		20
<210> 11		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> PCR 引物: 第6族正向		
<400> 11		

gcgaagctat ggctcttggt	20
<210> 12	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR 引物: 第6族反向	
<400> 12	
cacgttgatg tcgttcagtt	20
<210> 13	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR 引物: 第7族正向	
<400> 13	
gcgaattggt gaagctactg	20
<210> 14	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR 引物: 第7族反向	
<400> 14	
agcatgagaa tgccgtaacc	20
<210> 15	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR 引物: 第8族正向	
<400> 15	
ggcactatca aagagacaac	20

<210> 16
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> PCR 引物: 第8族反向

<400> 16
ctacatgctc ttgcattgtc

20