

学校编码: 10384

密级_

学号: 20520081151759

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

噬菌体在致病菌检测中的应用

Application of Bacteriophages for the Detection of
Pathogenic microorganisms

黄 婷 婷

指导教师姓名: 颜晓梅 教授

专 业 名 称: 化学生物学

论文提交日期: 2011 年 月

论文答辩时间: 2011 年 月

学位授予日期: 2011 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2011 年 6 月

**Application of Bacteriophages for the Detection of
Pathogenic Microorganisms**

A Thesis Presented

by

Tingting Huang

Supervisor: Professor Xiaomei Yan

Submitted to the Graduated School of Xiamen University

for the Degree of Master of Science

June, 2011

Department of Chemical Biology, Xiamen University

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文(包括纸质版和电子版)，允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

()1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于
年 月 日解密，解密后适用上述授权。

()2. 不保密，适用上述授权。

(请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。)

声明人(签名)：

年 月

摘要

致病菌的快速、灵敏检测将为食品安全、环境监测、疾病的诊断与治疗等提供重要科学依据。建立在抗体特异性识别基础上的免疫分析方法是致病菌检测最为常用的方法，然而特异性的单克隆抗体不仅价格昂贵，而且难以获取。自然界中存在着各种各样的噬菌体，为细菌的特异检测提供了一个天然的宝库。噬菌体能在活的具有感受性的菌体内繁殖，并且每种细菌基本都具有特异的噬菌体。基于噬菌体的寄生专一性以及生长速度快等特点，噬菌体常被用来鉴定一些特定的致病菌。

双砷染料是诺贝尔化学奖获得者钱永健实验室研发的一种适用于活细胞蛋白标记的荧光探针，它是一类含有双砷基团的有机小分子（如 FIAsh-EDT₂），能够穿透细胞膜，与连在重组蛋白标记的六肽标签 CCXXCC 序列（简称四半胱氨酸 TC，其中 X 是除半胱氨酸外的任意氨基酸）发生特异性结合，生成强荧光的共价结合的双砷染料-四半胱氨酸复合物（荧光强度约为 FIAsh-EDT₂ 的 50000 倍）。与其它的蛋白荧光标记方法（如绿色荧光蛋白）相比较，四半胱氨酸六肽标记序列体积小，不会影响被标记蛋白质或细胞的正常生理功能。此外，双砷染料具有量子产率高、稳定性强、标记速度快并且能够提供除了荧光之外的其它读出方式等优点，是一种更理想的蛋白质荧光探针。

本论文的第一章为绪论，首先对噬菌体在致病菌检测中的应用进行综述，随后对课题研究的相关背景如噬菌体展示肽库技术、双砷染料-四半胱氨酸体系进行介绍。

第二、三章主要介绍利用噬菌体对细菌的专一寄生性，建立噬菌体与双砷染料-四半胱氨酸蛋白标记的联合运用体系，发展新型的致病菌快速鉴别诊断方法。我们首先分别对噬菌体 M13 和 T7 进行基因改造，在其外壳上插入四半胱氨酸序列（FLNCCPGCCMEP）。重组噬菌体侵染特异的宿主菌并在其体内快速繁殖，噬菌体衣壳蛋白上所表达的四半胱氨酸序列与后续加入的跨膜双砷染料共价结合，发出强烈的荧光信号，使细菌可在传统流式细胞仪、荧光显微镜上进行检测，扩大了细菌的检测种类。

第四章是结合噬菌体展示肽库技术，建立应用于致病菌检测的双功能噬菌体探针构建实验技术平台。通过重叠延伸 PCR 定点法突变 M13KE 质粒的三个位点，在 pVIII 基因区插入 *PstI* 和 *BamHI* 双酶切位点，在多克隆区删除 *PstI* 位点。在突变成功的噬菌体的 pVIII 蛋白插入 Streptavidin 的特异识别序列-VSS 片段，作为报告位点，在 pIII 衣壳蛋白中插入 O157:H7 的 H7 抗原的识别序列-LHI 片段，作为捕获 O157:H7 的位点。尝试使用构建成功的双功能噬菌体作为探针在传统流式细胞仪上检测 O157:H7。

第五章是利用实验室自行研制的超高灵敏流式检测仪，发展噬菌体的绝对计数方法。我们采用 SYTOX Orange 荧光染料对噬菌体 T7 和 M13 的 DNA 进行染色，进而在双通道超高灵敏流式检测仪（HSFCM）上检测。HSFCM 可以检测到单个 T7 和 M13 的微弱荧光信号，实现了对 T7 噬菌体的绝对计数，实验结果与传统的平板计数法有良好的对应关系。

本论文的主要成果是：1、建立了双砷染料-四半胱氨酸重组噬菌体体系，对细菌进行特异性识别及信号放大，不仅可突破抗体难以获取的瓶颈，而且能扩大细菌的检测种类；2、建立了应用于致病菌检测的双功能噬菌体构建实验技术平台，为细菌检测中探针的设计合成拓宽了道路；3、充分发挥仪器优势，采用课题组自行研制的双通道超高灵敏流式检测仪，发展了一种快速、灵敏的单个噬菌体检测技术。

关键词 噬菌体 致病菌 双砷染料-四半胱氨酸体系 双功能噬菌体 噬菌体计数

Abstract

Rapid and sensitive detection of pathogenic bacteria is vital to clinical diagnostics, environmental and food safety, and biodefense. Antibody-based immunoassay is the most commonly used methods for bacterial detection, yet specific monoclonal antibodies are difficult to acquire and are very expensive. Bacteriophages (or phages for short) are the most abundant organism in the environment with a population approaching 10^{31} . Phages are obligate parasites of bacteria, using the resources of the bacterial cell to replicate. Typically, one phage can attack only specific strains of targeted bacterial species, and host specificity is usually determined by the outer proteins (receptors) of the bacterium to which a phage attaches during the initial infection process. Naturally occurring phages are ubiquitous and extremely numerous and represent a practical source of reagents for bacterial recognition and identification. Various phage-mediated assays have been developed for specific bacterial detection.

The Nobel Prize winner Roger Tsien and his coworkers have developed an innovative method for site-specific fluorescent labeling of recombinant proteins in live cells. A tetracysteine (TC, Cys-Cys-Xaa-Xaa-Cys-Cys) peptide tag is genetically incorporated into the target protein of interest where it can be specifically recognized by a membrane-permeant fluorogenic biarsenical dye such as fluorescein arsenical helix binder (FlAsH). TC residues are significantly smaller than fluorescent proteins and therefore are less likely to disrupt protein function. There are several additional advantages of using biarsenical-tetracysteine probes for site-specific labeling of intracellular proteins: 1) the TC motif is detectable by biarsenical dye immediately after synthesis, and the requirement of folding or post-translational modifications are not needed; 2) biarsenical dyes are membrane-permeant and can be easily loaded into intact cells; 3) many biarsenical

analogues of FIAsh with improved photophysical properties have been synthesized, and the addition of new colors to the palette of biarsenical dyes greatly increases assay flexibility.

Chapter two and three describe the development of a novel method for bacterial detection that integrates the benefits of natural phage specificity and rapid phage replication within bacterial hosts with the high sensitivity of biarsenical labeling of tetracysteine-tagged proteins. A recombinant (“reagent”) phage is constructed by cloning a DNA sequence encoding a TC motif into a phage (M13 and T7) coat protein gene. The recombinant TC-tagged phage is used to inoculate the bacterial sample. After recognition and binding, phage DNA is injected into the host cell’s cytoplasm, where it directs the production of progeny phages. Phage replication in the infected host yields a large number of progeny phages with capsids displaying TC-tags that can be fluorescently labeled by the membrane-permeant biarsenical dye FIAsh-EDT2 to illuminate the bacterium. The labeled bacteria are readily detectable by flow cytometry and fluorescence microscopy.

Chapter four describes the construction of a bifunctional phage probe for pathogen bacteria detection based on phage display technology. We mutant three sites of M13KE by overlap extension PCR, insert the *Pst*I/*Bam*HI double endonuclease sites in the pVIII gene and delete the *Pst*I at the multiple clone sites. For the detection of *E.coli* O157:H7 by flow cytometry, we constructed a recombinant bifunctional phages probe. The pVIII coat protein is inserted by a VSS fragment which can be specific recognized by streptavidin as the report site. And the pIII coat protein is fused with LHI fragment which can be recognized by the H7 antigen as the capture site.

Chapter five presents the development of bacteriophage counting approach based on a laboratory-built high sensitive flow cytometer. We incubate the SYTOX Orange with the M13 and T7 bacteriophage. The weak fluorescence emitted by each individual bacteriophage can be detected by HSF-CM, and bacteriophage T7 can be enumerated accurately.

In summary, the main contribution of this thesis is the development of new analytical methods for bacteria detection using bacteriophages. Firstly, we developed a novel method for bacterial detection that integrates the benefits of natural phage specificity and rapid phage replication within bacterial hosts with the high sensitivity of biarsenical labeling of tetracysteine-tagged proteins. Secondly, we constructed a bifunctional phage probe for pathogenic bacteria detection. In the end, employing a laboratory built high HSFCM, we developed a rapid and sensitive method of single bacteriophage enumeration.

Key words: Bacteriophage; Pathogenic bacteria; Biarsenical dye-tetracysteine tags; Bifunctional phage; Phage enumeration

目录

中文摘要.....	I
Abstract.....	III
第一章 绪论	1
1.1 引言.....	1
1.2 基于噬菌体探针的致病菌检测	2
1.3 噬菌体展示肽库技术.....	3
1.3.1 M13 噬菌体展示技术	4
1.3.2 T7 噬菌体展示体系	7
1.4 噬菌体计数.....	9
1.5 双砷染料-四半胱氨酸标签体系	11
1.6 本论文的研究设想和目的.....	12
1.7 参考文献.....	14
第二章 TC-M13-FIAsH 检测体系的构建	24
2.1 引言.....	24
2.2 实验部分.....	25
2.2.1 实验仪器和试剂.....	25
2.2.2 实验步骤.....	27
2.3 实验结果与讨论.....	33
2.3.1 M13KE-TC 噬菌体的构建	33
2.3.2 TC-M13-FIAsH 检测体系条件的优化.....	34
2.3.3 TC-M13-FIAsH 检测体系检测宿主菌 ER2738.....	41
2.3.4 荧光显微镜检测宿主菌.....	41
2.3.5 TC-M13-FIAsH 检测体系的特异性考察.....	42
2.3.6 TC-M13-FIAsH 体系检测混合菌中的宿主菌.....	43
2.4 本章小结.....	44
2.5 参考文献.....	45
第三章 TC-T7-FIAsH 检测体系的建立	47

3.1 引言	47
3.2 实验部分	48
3.2.1 实验仪器与试剂	48
3.2.2 实验步骤	50
3.3 实验结果与讨论	54
3.3.1 T7-TC 噬菌体的构建	54
3.3.2 感染复数 MOI 的优化	54
3.3.3 荧光显微镜观察宿主菌	56
3.3.4 TC-T7-FlAsH 体系特异性的考察	57
3.4 本章小结	58
3.5 参考文献	59
第四章 构建检测 <i>E.coli</i> O157:H7 的双功能噬菌体探针	60
4.1 引言	60
4.2 实验部分	62
4.2.1 实验仪器与试剂	62
4.2.2 实验步骤	64
4.3 实验结果与讨论	76
4.3.1 重叠延伸 PCR 定点突变法突变 M13KE RfDNA	76
4.3.2 构建 VSS-M13 噬菌体	79
4.3.3 双功能 VSS-LHI 噬菌体探针的构建	81
4.4 本章小结	82
4.5 参考文献	83
第五章 应用超高灵敏流式检测仪 (HSFCM) 对噬菌体计数	84
5.1 引言	84
5.2 实验部分	84
5.2.1 实验仪器与试剂	84
5.2.2 实验步骤	85
5.2.3 实验结果与讨论	86
5.3 本章小结	87
5.4 参考文献	87

第六章 总结与展望	89
附录.....	91
在校期间发表论文	92
致谢.....	93

厦门大学博硕士论文摘要库

Contents

Abstract in Chinese.....	I
Abstract in English	III
Chapter 1 Overview	1
1.1 Preface	1
1.2 Detection of pathogenic bacteria based on bacteriophages.....	2
1.3 Phage display technology.....	3
1.3.1 M13 phage display	4
1.3.2 T7 phage display	7
1.4 Bacteriophage enumeration	9
1.5 The biarsenical-tetracysteine system.....	11
1.6 Research plan and aims of present thesis	12
1.7 References	14
Chapter 2 Construction of the TC-M13-FIAsH detection system.....	24
2.1 Preface	24
2.2 Experimental part	25
2.2.1 Instruments and reagents.....	25
2.2.2 Experimental approaches	27
2.3 Results and discussion	33
2.3.1 Construction of M13KE-TC	33
2.3.2 Optimization of TC-M13-FIAsH strategy.....	34
2.3.3 Host strain ER2738 detection by TC-M13-FIAsH strategy.....	41
2.3.4 Bacterial detection by fluorescence microscope.....	41
2.3.5 Specificity characterization of TC-M13-FIAsH strategy.....	42
2.3.6 Host strain detection in a mixture	43
2.4 Conclusions	44
2.5 References	45
Chapter 3 Construction of the TC-T7-FIAsH detection system.....	47

3.1 Preface	47
3.2 Experimental part	48
3.2.1 Instruments and reagents	48
3.2.2 Experimental approaches	50
3.3 Results and discussion	54
3.3.1 Construction of T7-TC	54
3.3.2 Optimization of multiplicity of infection	54
3.3.3 Bacterial detection with fluorescence microscope	56
3.3.4 Specificity characterization of TC-T7-FIAsH strategy	57
3.4 Conclusions	58
3.5 Reference	59
Chapter 4 Construction the bifuntinal phage probe for O157:H7	
detection	60
4.1 Preface	60
4.2 Experimental part	62
4.2.1 Instruments and reagents	62
4.2.2 Experimental approaches	64
4.3 Results and discussion	76
4.3.1 M13KE RfDNA mutation	76
4.3.2 Construction of VSS-M13 recombiant phage	79
4.3.3 Construction of VSS-LHI bifuntional phage probe	80
4.4 Conclusions	81
4.5 References	82
Chapter 5 Counting the bacteriophages by a laboratory-built high	
sensitive flow cytometry (HSFCM)	83
5.1 Preface	83
5.2 Experimental part	83
5.2.1 Instruments and reagents	83
5.2.2 Experimental approaches	84
5.2.3 Results and discussion	85

5.3 Conclusions	86
5.4 References	86
Chapter 6 Summary and prospect	88
Appendix.....	90
Publications during master study.....	91
Acknowledgements	92

厦门大学博硕士学位论文摘要库

第一章 绪论

1.1 引言

致病菌无处不在，不断对人类的健康造成威胁。以食品安全方面为例，据世界卫生组织(WHO)统计，全球每年仅5岁以下儿童的腹泻病例达15亿例，造成300万儿童死亡，其中约70%是由于各种致病微生物污染的食品和饮水所致^[1]。据美国疾病预防控制中心(CDC)的统计，美国每年约发生7,600万例食源性疾病，其中约32.5%入院治疗，每年约5,000人死于该病，而其中致病菌因素的比例达39%以上^[2]。而我国致病性微生物引起的食源性疾病现状表明，由肠道致病菌(主要为沙门氏菌、副溶血性弧菌、大肠埃希氏菌 O157:H7、单核细胞增生李斯特菌、伤寒沙门菌、霍乱弧菌、痢疾杆菌等)污染食品而引起的食物中毒以及疾病散播是直接造成人体健康损害的主要食源性危害^[3]。但是我国尚没有建立起完善的食源性疾病报告系统。

据WHO估计，目前被认知并得到报告的食源性疾病仍然只占实际发生的很少一部分，实际发生的食源性疾病数量可能是报告数量的300~350倍。因此，快速、灵敏、特异的致病菌检测对食品安全、环境监测、疾病诊断治疗和生物恐怖袭击的防范等具有重要意义，建立致病菌的快速鉴定和检测方法势在必行。传统的病原微生物检测方法需要对细菌进行分离、培养及一系列生化反应，操作复杂、检测周期长，无法适用于难以培养的病原菌，同时存在国内试剂供应不配套等问题，很难适应公共卫生事件应急处理及快速反应的需要。近年来，运用分子生物学及生物技术的最新研究成果，科研人员发展了一系列新的细菌快速检测技术，如PCR相关技术^[4,5]、DNA杂交技术^[6-8]、ELISAs技术、噬菌体鉴定技术^[9,10]、流式细胞检测技术^[11,12]和生物传感技术^[13,14]等。其中，流式细胞术(Flow cytometry, FCM)因其具有检测速度快、精度高和多参数分析等特点，在细菌检测和鉴定方面独具优势，已成为产品质量控制、细菌致病机理以及微生物群落结构研究的重要手段^[15]。例如，通过对细菌的核酸或蛋白进行荧光标记，FCM可以快速、准确地检测样本中的细菌总数、活菌数目和死菌数目。随着技术的不断改进，流式技术在细菌检测方面的成功应用层出不穷，Hammes等用FCM快速检测饮用水中

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库