

学校编码: 10384

密级__

学号: 20520121151457

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

重组噬菌体在致病菌检测中的应用

The Application of Recombinant Bacteriophages in
Pathogenic Bacteria Detection

栾 天

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: 2015 年 月

论文答辩时间: 2015 年 月

学位授予日期: 2015 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2015 年 5 月

**The Application of Recombinant Bacteriophages in
Pathogenic Bacteria Detection**

A Thesis Presented

by

Tian Luan

Supervisor: Professor Xiaomei Yan

Submitted to the Graduated School of Xiamen University

for the Degree of Master of Science

May, 2015

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

目 录

摘 要	I
Abstract.....	III
第一章 绪论	1
1.1 引言	1
1.2 致病菌的检测方法	1
1.3 基于噬菌体探针的致病菌检测技术	2
1.3.1 噬菌体.....	2
1.3.2 噬菌体探针在致病菌检测中的应用.....	3
1.3.3 基于重组噬菌体的致病菌检测技术.....	6
1.4 双砷染料—四半胱氨酸标签蛋白标记体系	10
1.5 超高灵敏流式检测技术在生化分析中的应用	12
1.5.1 超高灵敏流式检测仪简介.....	13
1.5.2 超高灵敏流式检测仪在生化分析中的应用.....	13
1.6 本论文的选题思路与研究内容	15
1.7 参考文献	17
第二章 TC-PPO1-FIAsH 检测体系的建立.....	31
2.1 引言	31
2.2 实验部分	33
2.2.1 实验仪器和试剂.....	33
2.2.2 实验步骤.....	35
2.3 实验结果与讨论	42
2.3.1 重组噬菌体 PPO1-TCSOC 的构建.....	42
2.3.2 重组噬菌体 PPO1-TCSOC 生物活性的研究.....	44
2.3.3 TC-PPO1-FIAsH 检测体系条件的优化.....	45
2.3.4 TC-PPO1-FIAsH 检测体系检测 <i>E. coli</i> O157:H7	51
2.3.5 荧光显微镜检测 <i>E. coli</i> O157:H7	52
2.3.6 TC-PPO1-FIAsH 检测体系特异性的考察.....	53

2.3.7 TC-PPO1-FIAsH 体系检测混合菌中的 <i>E. coli</i> O157:H7	54
2.4 本章小结	55
2.5 参考文献	56
第三章 双功能噬菌体检测致病菌体系的建立	58
3.1 引言	58
3.2 实验部分	59
3.2.1 实验仪器和试剂.....	59
3.2.2 实验步骤.....	62
3.3 实验结果与讨论	71
3.3.1 重组噬菌体 O157S-M13KE-AvS 的构建	71
3.3.2 O157S-M13KE-AvS 重组噬菌体用于检测致病菌可行性的考察	73
3.3.3 O157S-M13KE-AvS 检测 <i>E. coli</i> O157:H7 体系实验条件的优化.....	76
3.3.4 双功能噬菌体 O157S-M13KE-AvS 检测 <i>E. coli</i> O157:H7.....	81
3.3.5 荧光显微镜检测 <i>E. coli</i> O157:H7	82
3.3.6 双功能噬菌体 O157S-M13KE-AvS 检测方法特异性的考察	83
3.3.7 O157S-M13KE-AvS 检测混合菌中的 <i>E. coli</i> O157:H7.....	84
3.4 本章小结	86
3.5 参考文献	87
第四章 双功能噬菌体“鸡尾酒”检测多种致病菌	88
4.1 引言	88
4.2 实验部分	90
4.2.1 实验仪器和试剂.....	90
4.2.2 实验步骤.....	92
4.3 实验结果与讨论	100
4.3.1 重组噬菌体 SaS-M13KE-AvS 与 PaS-M13KE-AvS 的构建	100
4.3.2 双功能重组噬菌体用于目标致病菌的检测.....	101
4.3.3 不同靶标菌与重组噬菌体之间交叉反应的考察.....	102
4.3.4 噬菌体“鸡尾酒”检测混合菌中的靶标菌	104
4.4 本章小结	107
4.5 参考文献	108

第五章 总结与展望	109
在校期间发表论文	111
致 谢	112

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 Methods of pathogenic bacteria detection 1

1.3 Detect pathogenic bacteria based on bacteriophages2

 1.3.1 Bacteriophages 2

 1.3.2 Application of phages in pathogenic bacteria detection3

 1.3.3 Recombinant phages applied in pathogenic bacteria detection 6

1.4 The biarsenical-tetracysteine probes system 10

1.5 High sensitive flow cytometer 12

 1.5.1 Introduction of HSFCM 13

 1.5.2 Applications of HSFCM in chemical biology..... 13

1.6 Objective and main contents of this dissertation 15

1.7 References 17

Chapter 2. Construction of the TC-PPO1-FIAsH detection system ..31

2.1 Preface.....31

2.2 Experimental Section.....33

 2.2.1 Instruments and reagents..... 33

 2.2.2 Experiment Procedures 35

2.3 Results and discussion 42

 2.3.1 Construction of PPO1-TCSOC42

 2.3.2 Bioactivity characterization of PPO1-TCSOC 44

 2.3.3 Optimization of TC-PPO1-FIAsH strategy..... 45

 2.3.4 Detecting E. coli O157:H7 by TC-PPO1-FIAsH strategy 51

 2.3.5 Detecting E. coli O157:H7 by fluorescence micrscope 52

 2.3.6 Specificity characterization TC-PPO1-FIAsH strategy 53

 2.3.7 Detecting E. coli O157:H7 in bacteria mixture 54

2.4 Conclusion	55
2.5 References	56
Chapter 3. Construction of bifunctional phage probe for E. coli	
O157:H7 detection	58
3.1 Preface.....	58
3.2 Experimental Section.....	59
3.2.1 Instruments and reagents.....	59
3.2.2 Experiment procedures	62
3.3 Results and discussion	71
3.3.1 Construction of O157S-M13KE-AvS	71
3.3.2 O157S-M13KE-AvS used in target bacteria detection	73
3.3.3 Optimization of O157S-M13KE-AvS strategy	76
3.3.4 O157S-M13KE-AvS applied in E. coli O157:H7 detection	81
3.3.5 Detecting E. coli O157:H7 by fluorescence microscope	82
3.3.6 Specificity characterization O157S-M13KE-AvS strategy.....	84
3.3.7 Detecting E. coli O157:H7 in bacteria mixture	85
3.4 Conclusion	86
3.5 References	87
Chapter 4. Multiple pathogenic bacteria detection using bifunctional phage ‘cocktail’	88
4.1 Preface.....	88
4.2 Experimental Section.....	90
4.2.1 Instruments and reagents.....	90
4.2.2 Experiment Procedures	92
4.3 Results and discussion	100
4.3.1 Construction of SaS-M13KE-AvS and PaS-M13KE-AvS.....	100
4.3.2 Target bacteria detection using SaS-M13KE-AvS and PaS-M13KE-AvS	101
4.3.3 Cross-reaction between different bifunctional phages and target bacteria	102

4.3.4 Detection of target bacteria in bacteria mixture by phage ‘cocktail’	104
4.4 Conclusion	107
4.5 References	108
Chapter 5. Conclusion	109
Publication during master study	111
Acknowledgements	112

厦门大学博硕士学位论文摘要库

摘要

致病菌的快速、灵敏、特异性检测对食品质量监管、公共安全、环境卫生监测、细菌致病机理研究、疾病的诊断与治疗等具有重要意义。依靠各种生化反应的传统致病菌检测方法不仅操作复杂、检测周期长，且无法用于检测难培养的致病菌；而以抗原—抗体识别为基础的检测方法需要使用价格昂贵并难以获取的特异性抗体，限制了该方法的适用性。噬菌体是一类以细菌为宿主的病毒，广泛存在于自然界中，种类繁多，能够快速繁殖，对宿主菌具有良好的专一识别性。噬菌体基因组简单且易于改造，目前，利用分子生物学技术构建的重组噬菌体探针已成为致病菌检测的重要研究工具，被广泛应用于多种致病菌的特异性检测。

肠出血性大肠杆菌 *E. coli* O157:H7 是一种对人类具有极大危害的致病菌。论文第二章主要介绍了构建以 *E. coli* O157:H7 为宿主的重组噬菌体 PPO1-TCSOC，结合四半胱氨酸标签—双砷染料体系建立 *E. coli* O157:H7 的特异性检测方法。四半胱氨酸标签—双砷染料体系是一种具有广阔应用前景的活细胞蛋白荧光标记方法。该方法使用一种能够跨膜的荧光探针（如 FIAsh-EDT₂），能够与连接在蛋白上的四半胱氨酸标签（简称 TC-tag，氨基酸序列为 CCXXCC，其中 X 代表半胱氨酸 C 以外的任意氨基酸）发生特异性结合，形成发出强荧光的 TC—双砷染料复合物。TC-tag 体积小，不会干扰被标记蛋白的生物活性以及细胞的生命活动；此外，该体系荧光量子产率高，分子间相互作用稳定性强，标记速度快，是一种适用性更加广泛的蛋白质荧光标记方法。我们通过对噬菌体 PPO1 进行基因改造得到 PPO1-TCSOC，使其 SOC 蛋白上携带 TC-tag。重组噬菌体侵染 *E. coli* O157:H7 后短时间内在细菌内部大量扩增，其 SOC 蛋白上的 TC-Tag 与侵染时共同加入的双砷染料 FIAsh 特异性结合，产生较强的荧光信号，使 *E. coli* O157:H7 能够在荧光显微镜以及本实验室搭建的超高灵敏流式检测仪（HSFCM）上被特异地检出，发展了一种快速、灵敏、特异性强的致病菌检测方法。

噬菌体展示（Phage Display）是一种将外源多肽DNA序列与噬菌体基因组中特定蛋白的基因进行连接，并将外源多肽表达于噬菌体表面的技术。本论文第三章主要介绍了利用噬菌体展示技术构建双功能重组噬菌体，并将其应用于致病菌

的检测。我们以商品化的噬菌体M13KE为模型，通过在其pVIII衣壳蛋白上插入能够特异结合亲和素的AvS多肽序列作为荧光标记位点，在pIII蛋白上插入*E. coli* O157:H7的表面脂多糖（LPS）识别多肽序列O157S作为*E. coli* O157:H7的捕获位点，构建了pVIII与pIII蛋白上分别展示两种多肽的双功能重组噬菌体探针O157S-M13KE-AvS。这种噬菌体能够通过pIII蛋白上携带的细菌表面LPS识别多肽大量吸附在*E. coli* O157:H7的表面，而其pVIII衣壳蛋白上展示的AvS多肽在加入荧光标记的亲合素后将会与其发生特异性结合，使噬菌体以及与噬菌体所结合的靶标菌*E. coli* O157:H7发出荧光，通过荧光显微镜以及超高灵敏流式检测仪可检测到单个菌体的荧光信号。通过噬菌体展示技术能够快速得到专一识别靶标致病菌的重组噬菌体，解决了致病菌的特异性抗体难以获取的难题，为致病菌的检测提供了简便、准确、灵敏的新方法。

论文第四章主要介绍了利用多种双功能重组噬菌体组成噬菌体“鸡尾酒”，并将其应用于致病菌的检测，希望建立一种步骤简单、检测成本低并适用于多种致病菌快速检测的方法。以第三章的工作为基础，我们分别构建了对鼠伤寒沙门氏杆菌以及铜绿假单胞杆菌具有特异识别效应的双功能重组噬菌体探针。通过将几种噬菌体制成“鸡尾酒”，实现了*E. coli* O157:H7、鼠伤寒沙门氏杆菌与铜绿假单胞杆菌3种致病菌的同时定量检测，初步建立一套简便、灵敏、普适性强的致病菌检测体系，简化了致病菌的检测流程并缩短了实验周期。

本论文的主要成果如下：1、建立了 TC-PPO1-FlAsH 体系，实现了致病菌*E. coli* O157:H7 的特异性检测。该检测体系不仅检测周期短、操作简单，而且克服了单克隆抗体难以获取、价格昂贵的缺点，为致病菌的专一性检测提供了一种快速、灵敏、适用性广泛的新方法；2、以商品化的 M13KE 噬菌体展示体系为模型，建立双功能噬菌体展示平台，构建了重组噬菌体 O157S-M13KE-AvS、PaS-M13KE-AvS 与 SaS-M13KE-AvS，并将其应用于 *E. coli* O157:H7、铜绿假单胞杆菌与鼠伤寒沙门氏杆菌等致病菌的检测，为设计与合成用于病原微生物检测的探针提供了新的思路；3、运用噬菌体“鸡尾酒”策略，实现了复杂样品中多种致病菌的同时准确检测，建立了具有广泛适用性的病原微生物检测体系，扩展了重组噬菌体探针在致病菌检测方面的应用前景。

关键词： 致病菌 重组噬菌体 双砷染料—四半胱氨酸体系 双功能噬菌体

Abstract

Rapid, specific and sensitive detection of pathogenic bacteria is vital to food quality control, proper clinical diagnostics, environment contaminant monitoring and anti-bioterrorism. Conventional methods for bacteria detection always rely on laborious and time-consuming biochemical analysis, novel methods such as PCR technique and immunoassay require sample pretreatment and costly agents, although with improved sensitivity. Bacteriophages (or Phage for short) are the most abundant entities in nature. They are exclusive parasites that only infect bacteria. Phages can specifically attack target host bacteria strains and fast multiply during their life cycle. Besides, they have capability to distinguish among viable, dead and viable but non-culturable bacteria. In addition, phages are cost-effectively produced and can be easily genetically modified, thus make recombinant phages an excellent tool for the detection and identification of pathogens.

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 remains one of the worst public health threats because of its severe manifestations and low infective dose. Chapter two introduces a novel TC-PPO1-FIAsH strategy applied in *E. coli* O157:H7 detection. Tetracysteine-Biarsenical (TC-FIAsH) labeling system is an innovative method for fluorescent labeling of recombinant protein, which is site-specific and suitable for in-situ protein labeling of live cells. The short peptide CCXXCC (TC-tag) integrated to a protein can specifically bind with a membrane-permeable fluorogenic molecule such as FIAsH-EDT₂. Our TC-PPO1-FIAsH strategy depends on a recombinant phage PPO1-TCSOC, which is specific to *E. coli* O157:H7 and displays a TC-tag on the Small Outer Caspid protein (SOC). When the phage infects *E. coli* O157:H7 and replicates within the bacteria, the TC-tagged SOC protein will combine with large amount of FIAsH. The significant fluorescence enhancement of *E. coli* O157:H7 would be sensitively detected by fluorescence microscope and a lab-built high sensitive flow cytometer (HSFCM). The TC-PPO1-FIAsH strategy represents a

rapid, specific and sensitive method for pathogenic bacteria detection.

Phage display is a high-throughput protein screening technology and is widely used in molecular recognition study. In Chapter three, we develop a ‘Bifunctional phage display’ system for simple and sensitive pathogenic bacteria detection. By modifying the genome of phage M13KE, we construct a bifunctional phage probe O157S-M13KE-AvS. This recombinant phage simultaneously displays avidin specific peptide AvS (on pVIII coat protein) and *E. coli* O157:H7 bacterial surface lipopolysaccharide (LPS) specific peptide O157S (on pIII protein). The phage probe acts as an antibody with multiple bacteria capture site and large copy number of reporter site thereby mediating *E. coli* O157:H7 recognition and fluorescence signal amplification by utilizing fluorescently labeled avidin. The bifunctional phage strategy provides a general way to acquire target-specific probes and could be extensively used for pathogen detection.

In Chapter four, we establish a bifunctional phage ‘cocktail’ assay applied in identifying different pathogenic bacteria species, aiming at developing a simplified detection procedure with lower cost and shorter time. We construct bifunctional phages that specifically recognize *Salmonella typhimurium* (phage SaS-M13KE-AvS) and *Pseudomonas aeruginosa* (phage PaS-M13KE-AvS). Using bifunctional phage mixture as ‘cocktail’, we are able to simultaneously detect *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium* and *Pseudomonas aeruginosa* in complex samples with excellent accuracy. The phage ‘cocktail’ assay demonstrates a specific, convenient and pervasive pathogen detection system.

In summary, the major achievement of this thesis is the development of recombinant phages for sensitive and specific pathogenic bacteria detection strategies. First, benefits from host-specificity and the advantages of TC-FIAsH method, we develop TC-PPO1-FIAsH system and use it in rapid detection of *E. coli* O157:H7. Using PPO1-TCSOC as a probe, we can quantitatively detect *E. coli* O157:H7 in bacteria mixture within 1 hour. Second, based on phage display system, we construct bifunctional phage O157S-M13KE-AvS, SaS-M13KE-AvS and PaS-M13KE-AvS. These recombinant phages are successfully applied in identifying *E. coli* O157:H7,

Salmonella typhimurium and *Pseudomonas aeruginosa*, respectively. Using these specific phage probes, we are able to accurately discriminate target bacteria from other bacteria species in complex samples. Besides, taking advantages of bifunctional phage ‘cocktail’, we achieve the detection of multiple target bacteria species at same time, proving that the phage ‘cocktail’ maintain the same specificity to target bacteria as single bifunctional phages. In a word, we establish a perspective method for the simultaneous identification of pathogens.

Key Words: Pathogenic bacteria; Recombinant Bacteriophage; Tetracysteine Tag-Biarsenical Dye; Bifunctional phage

第一章 绪论

1.1 引言

致病菌无处不在，对人类健康造成的威胁日益严重^[1]。长期以来，由致病菌引起的公共卫生安全事件时有发生，如20世纪九十年代法、美等国出现的单核球增多性李斯特氏菌中毒事件，中国苏皖等地肠出血性大肠杆菌*E. coli* O157:H7的大规模感染，2000年日本雪印牛奶的葡萄球菌肠毒素中毒事件，“9.11”事件之后美国多地发生的炭疽杆菌生物袭击案例以及2011年欧洲多国爆发的“毒黄瓜”事件等都是由各种致病菌所引起，可以说，致病菌给人类带来了巨大的灾难与损失^[2]。抗生素的临床应用曾被预言将成为传染性疾病流行的终结，然而近年来随着抗生素滥用出现的“超级细菌”（即对多种抗生素产生耐药性突变的菌株）却给疾病监控与医疗卫生等领域带来了更为严峻的挑战^[3]；而据世界卫生组织（WHO）统计，全球每年约有380万人死于摄入了受到致病微生物污染的食品和饮用水而引起的疾病，且其中大部分的患者是儿童^[4]。目前，人类已知的由病原菌引起的疾病只是实际发生疾病的冰山一角，实际上由致病菌导致的疾病种类可能是已报告疾病数量的上百倍^[5]；由于气候的改变、贸易全球化进程的加快以及大规模人口迁移日益频繁等因素的影响，由致病菌引起流行性疾病大规模爆发的潜在风险也随之急剧增加^[6]，因此亟需建立致病菌的快速、灵敏、准确检测方法，为医学诊断、食品卫生、公共安全、环境检测和生物恐怖袭击的防范等提供可靠的科学依据^[7]。

1.2 致病菌的检测方法

平板培养法是致病菌检测的“金标”方法。该方法是将样品在含某些特定物质（如各种抗生素或生化显色物质）的固体培养基上进行培养，观察是否得到菌落作为判断目标菌存在与否的标准，需要对细菌进行长时间的富集与培养^[8]，操作既耗时又复杂，且不同细菌的种间竞争可能会导致目标菌的生长受抑制，产生假阴性等情况，无法满足突发公共安全事件应急处理的需要。

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts 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.