

文章编号: 1004-0374(2011)09-0917-04

# 合成噬菌体的贡献与风险

赵向娜, 杨瑞馥\*

(军事医学科学院微生物流行病学研究所, 病原微生物生物安全国家重点实验室, 北京 100071)

**摘要:** 噬菌体 (bacteriophage, phage) 是感染细菌、真菌、放线菌或螺旋体等微生物的细菌病毒的总称。噬菌体在生态、微生物进化、细菌性疾病预防和治疗、细菌鉴定与疾病诊断等方面扮演重要角色。基因组测序技术和高效合成平台促进了合成基因组学的发展。利用合成基因组学技术, 对噬菌体基因组进行设计或者合成出新的噬菌体来服务人类在不久的将来可能成为现实。但与此同时, 合成噬菌体带来的风险也必须认真考虑。

**关键词:** 噬菌体; 合成基因组学; 细菌性疾病

**中图分类号:** O621.33; Q939.48      **文献标志码:** A

## Contribution and risk of synthetic bacteriophage

ZHAO Xiang-Na, YANG Rui-Fu\*

(State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Institute of Microbiology and Epidemiology, Chinese Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

**Abstract:** Phages are viruses, which infect bacteria, fungi, actinomycetes, spiral bacteria and other microorganisms. Phages play an important role in ecology, microbial evolution, prevention and treatment of bacterial diseases, bacterial identification and disease diagnosis etc. Genome sequencing technology and efficient synthesis platform promote the development of synthetic genomics. Designing phage genomes or synthesizing novel phages to serve human with synthetic genomics technology could become a reality in the near future. Meanwhile, risks brought by synthetic phage must be considered seriously.

**Key words:** phage; synthetic genomics; bacterial diseases

### 1 噬菌体

噬菌体 (bacteriophage, phage) 被认为是地球上分布最多的也可能是种类最多的微生物, 在数目上超出细菌十倍左右<sup>[1]</sup>。它们是一类只能在电子显微镜下观察到的超显微非细胞类生物, 是寄生于原核生物, 如细菌、真菌、放线菌或螺旋体等细胞内的病毒。尽管噬菌体的形态多样, 但基本上可以分为四种类型, 即有尾型、多面体型、丝状型和多晶体型, 其中 96% 的噬菌体属于有尾型。噬菌体结构比细菌和真菌等要简单得多, 有严格的宿主特异性, 只寄居在易感宿主菌体内, 它会感染并杀死细菌, 但对人体无害。作为病毒的一种, 噬菌体具有病毒特有的一些特性: 个体微小; 不具有完整细胞结构;

只含有单一核酸。噬菌体基因组含有许多个基因, 但所有已知的噬菌体都是在细菌细胞中利用细菌的核糖体、蛋白质合成时所需的各种因子、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。噬菌体对于细菌细胞裂解作用的特异性主要取决于两个因素: 一是噬菌体对细菌细胞壁上特异性受体的吸附; 二是噬菌体在细菌细胞内的复制。一般来说, 一个细菌细胞有一个噬菌体吸附和侵入,

收稿日期: 2011-05-04

基金项目: 国家自然科学基金项目(30930001)

\*通信作者: E-mail: ruiyuyang@gmail.com

在细胞内复制、装配成成熟的噬菌体而释放,即可导致细菌细胞的破裂和死亡,这种增殖性的裂解称为内因裂解;但是,有的噬菌体吸附并侵入细菌细胞后不能复制,细菌细胞不能裂解,只有当大量的噬菌体吸附在细菌细胞壁上,才能直接引起细菌细胞的破裂与死亡,这种非增殖性的裂解称为外因裂解,外因裂解的特异性仅由受体的特异性所决定。

## 2 噬菌体的作用

在微生物界,同样存在类似动植物界的食物链一样的关系。“捕食”细菌的生物——噬菌体正是科学家们研究微生物的一种强有力的工具。近年来科学家对噬菌体研究的兴趣主要基于以下事实:(1)它们是基因组和进化研究中出色的靶标;(2)它们是水平基因转移的重要赋形剂;(3)它们是潜在的治疗因子;(4)它们自身可以作为细菌遗传学研究的工具,并且它们的基因产物正在作为分子生物学研究的工具<sup>[2]</sup>。

对于细菌鉴定和疾病诊断来说,特异性噬菌体裂解仍然是一种重要的手段。噬菌体在临床上可以作为一套检测工具,从患者样品中检测特异性病原菌,快速鉴定抗生素耐药性细菌菌株。另一方面,随着抗生素耐药性的威胁不断增加,噬菌体正在频繁地被考虑作为细菌感染的治疗手段<sup>[3-5]</sup>。如噬菌体 P3-CHA 对多重耐药铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 引起的肺部感染有显著的治疗和预防效果<sup>[3]</sup>,噬菌体 M<sup>Sa</sup> 在控制耐药性金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 所引起的人局部感染和全身感染中显示出潜在的应用价值方面<sup>[5]</sup>。实际上,与其他治疗方法相比,噬菌体治疗可能具有更多优势,例如对于给定细菌菌株的高度专一性、易于生产、易于工程改造等。噬菌体治疗在疾病预防和治疗方面正在经历一个“文艺复兴”<sup>[1]</sup>。而噬菌体-宿主之间的动力学对重新兴起的噬菌体治疗领域至关重要。从病原菌的进化到海洋的碳循环都有噬菌体与宿主的相互作用的参与。

噬菌体基因组信息为我们提供了特有的敏感宿主蛋白,对于药物开发和设计具有重要的指导意义。噬菌体在进化过程中发展出独特的蛋白与细菌的关键蛋白结合并使之失活,切断细菌主要的代谢进程,从而阻止关键细胞过程并将细菌新陈代谢转向噬菌体子代的繁殖。例如在金黄色葡萄球菌噬菌体中已发现 31 个新的多肽家族,它们在金黄色葡萄球菌中表达可以抑制细菌生长。其中,有些多肽的靶标

是细菌 DNA 复制和转录的基本组分<sup>[6]</sup>。

## 3 合成噬菌体

目前,噬菌体合成主要是利用合成基因组学技术对已有噬菌体基因组的改造或者参照天然范本合成噬菌体。合成基因组学 (synthetic genomics) 是将 DNA 的化学合成与基于计算机的功能设计有机结合,可以实现生命的设计和组装基因组,实现基因或基因途径,甚至整个基因组功能的改造。

2002 年,美国 Wimmer 实验室报道了化学合成脊髓灰质炎病毒 cDNA,并用 RNA 聚合酶将它转成有感染活力的病毒,从而开辟了利用已知基因组序列,不需要天然模板,从化合物单体合成感染性病毒的先河。Wimmer 从装配平均长度为 69 bp 的寡核苷酸入手,结合了化学合成与无细胞体系的从头合成,用了 3 年时间完成了这个划时代的工作<sup>[7]</sup>。

2003 年,美国 Venter 实验室用两周时间合成了含完整感染性基因组 (5.4 kb) 的 ΦX174 噬菌体。Craig Venter 在这次试验中实现了用合成寡核苷酸的方法精确合成了 5~6 kb 的 DNA 序列。整个流程包括三个关键的步骤:(1)混合的寡核苷酸通过胶回收来去除错误长度分子的污染;(2)在严格退火条件 (55 °C) 下来实现寡核苷酸的连接以去除错配;(3)连接产物组装成全长的基因组是通过聚合酶的循环组装。在一个非指数反应里,每一个寡核苷酸末端只发生一次延伸以产生全长的 DNA 分子。在没有任何 PCR 扩增的条件下,聚合酶循环组装产物的凝胶分析发现了全长组装产物的一条不连续带,随后使用 PCR 扩增得到更多纯的全长基因组用于环化和感染性检测。合成的 DNA 比天然的感染力下降,提示每 500 bp 大概包含一个致死性突变。然而,将合成的 DNA 电转化到大肠杆菌中后,完整的感染性 ΦX174 噬菌体得到了恢复。若干个感染株的序列分析验证了合成基因组的正确性。其中一株和天然序列完全相同<sup>[8]</sup>。

2005 年,Endy 课题组采用重构方法对大肠杆菌噬菌体 T7 的基因组进行改造,在不改变基因组外部功能的基础上,去除基因重叠。重构的第一步是将野生型噬菌体的基因组划分为六个区域,每个区域之间用限制性内切酶位点区分从而确保可以独立的重组、检测和调控每个区域。第二步是将 T7 噬菌体基因组划分为 73 个单元,每个单元的边界和区域内部均不出现编码重叠。通过这两大步骤得到的噬菌体 T7.1 的基因组比野生型 T7 噬菌体基因

组增加了 1 424 bp。重构的噬菌体 T7.1 成功地存活了下来, 说明利用合成生物学的技术重构复杂进化的生物系统是完全可能的<sup>[9]</sup>。

2007 年, Collins 课题组使用改造后的噬菌体来对抗耐药菌, 赋予噬菌体特有的遗传特性来阻止细菌产生耐药性。病原菌包裹在生物膜 (biofilm) 中, 能避开宿主免疫系统的攻击, 对抗菌疗法产生固有的抵抗, 并可以持续感染。为了有效穿透这层保护, 被改造后的 T7 噬菌体在感染细菌时可以表达伴放线放线杆菌 (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*) 的生物膜降解酶 dispersin B (DspB)。DspB 是一种能够水解细菌生物膜形成所需要的关键胞外聚合物 (EPS) 的  $\beta$ -1,6-乙酰-D-葡萄糖胺糖苷键的酶, 通过降解 EPS 使生物膜松弛。T7 噬菌体本身诱导的裂解进一步促进了 DspB 的扩散, 最终的结果是去除了 99.997% 的产生物膜的细菌<sup>[10]</sup>。

对细菌特定功能的抑制可以提高抗生素治疗的效果。2009 年, Collins 课题组针对大肠杆菌的抗生素耐药性故意将 M13 噬菌体改造成非致死性的, 这样就不会诱导出细菌的抵抗机制, 相反, 一个非裂解性的 M13 噬菌体通过过量表达一种 SOS 反应系统的阻遏蛋白 *lexA3* 来抑制细菌的 SOS DNA 损伤应答, 从而损害细菌修复受损的 DNA 的能力, 使细菌更容易受到损害细菌 DNA 的药物的攻击。改造后的噬菌体与  $\beta$ -内酰胺 ( $\beta$ -lactam) 和氨基糖苷类 (aminoglycoside) 抗生素协同作用显著增强了杀菌效果, 提高了被大肠杆菌感染的小鼠的存活率, 降低了耐药菌的发生率<sup>[11]</sup>。

#### 4 合成噬菌体的前景与风险

基因组测序技术和高效合成平台是合成生物学发展的两大支柱, 在后基因组时代, 基因测序和 DNA 合成成本已经十分低廉。2010 年 10 月美国 Craig Venter 课题组发明了迄今最简单有效的基因合成技术, 并以此合成了实验小鼠的线粒体基因组。Craig Venter 使用的是一种合成基因组的新方法, 使用的基本合成单元是只含 60 bp 的 DNA 片段, 将它们置于实验所需的环境中, 就可以连接成整个基因组。这项技术被认为是迄今为止最简单的人工合成基因组的办法<sup>[12]</sup>。Craig Venter 的下一步计划是通过基因失活等方法考查基因组中每一个基因的功能, 期望对整个基因组有一个全面的了解。同时, 敲除那些非必需的基因, 获得一个“最小”的基因组。进而, 在此基础之上, 向“最小基因组”中插入特

殊的功能模块, 以制造出能够完成特定功能、具有某种特性的基因组和细胞。因为合成生物学的目标之一是能够更加简单的设计生物学<sup>[13]</sup>。

合成生物学的挑战主要在于三个方面: 生物恐怖、实验室人员和公众的健康、合成微生物的意外流出对环境的可能危害<sup>[14]</sup>。人们主要的担忧在于少数高致病性且难以得到的病毒或者细菌的合成。想得到任何致病性病毒或者细菌, 比起其他途径, 合成可能更为容易<sup>[14]</sup>。而噬菌体只感染特定的细菌, 而非人、植物和动物的病原, 因此, 合成噬菌体无需考虑伦理安全以及其他合成基因组学带来的风险。随着 DNA 合成技术的发展, 合成病毒、噬菌体这样的小基因组已不再是难事。对于噬菌体的合成, 只需要合成出感染性的 DNA 分子电转化到宿主细胞即可恢复完整的噬菌体。在过去数年中, 完成测序的噬菌体基因组数目在逐年增加, 美国国立生物技术信息中心 (NCBI) 噬菌体数据库中已登录了 530 多个噬菌体基因序列。在不远的未来, 合成基因组学技术可以合成出任何已知 DNA 序列的噬菌体和病毒<sup>[15]</sup>。

尽管合成生物学尚有许多未解决的问题; 但对于合成噬菌体来说, 实现起来可能更为简单易行。一个完整的感染性 DNA 分子, 在合适的宿主内能够正常复制, 科学家就可以利用合成基因组学技术根据自己的意愿设计噬菌体基因组, 赋予噬菌体特定的功能, 获得理想的噬菌体 (如合成出广宿主谱的噬菌体来杀死多种病原菌), 而在此之前, 大量的基础研究是必需的, 否则, 只能依靠天然范本合成出已存在的噬菌体或对已知噬菌体进行轻微改造。正如 Craig Venter 所说, 人工合成出微生物不仅能帮助科学家更好理解细胞的基本过程, 推动对人体生物机制的认识, 而且相关技术进步也会大大增强科学家操控微生物的能力, 这些技术在能源和环保领域将大有用武之地。同样, 对噬菌体进行遗传操作、人工合成出噬菌体对于理解噬菌体生物学、噬菌体—细菌—宿主之间的相互作用, 促进实现噬菌体治疗等方面将起到重要作用。

合成噬菌体对于生态和进化的影响是不容忽视的。噬菌体在微生物生态和进化中扮演着重要的角色, 细菌和噬菌体之间的快速共进化 (coevolution) 在构造自然界微生物群落上起着关键作用<sup>[16-17]</sup>。合成噬菌体的意外泄漏对环境的可能危害也是必须认真考虑的。

对合成生物学研究建立有效的监管体系是保证

生物安全的必要措施, 这需要国内和国际的政府机构、官方组织、法律部门和专业机构的密切合作, 才能实现监管的目标<sup>[18-19]</sup>。

总之, 噬菌体诸多的生物学功能与合成基因组学技术相结合, 必将在科学研究中发挥巨大的作用。

#### [参 考 文 献]

- [1] Labrie SJ, Samson JE, Moineau S. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat Rev Microbiol*, 2010, 8(5): 317-27
- [2] Kiljunen S, Hakala K, Pinta E, et al. Yersiniophage phiR1-37 is a tailed bacteriophage having a 270 kb DNA genome with thymidine replaced by deoxyuridine. *Microbiology*, 2005, 151(Pt 12): 4093-102
- [3] Morello E, Saussereau E, Maura D, et al. Pulmonary bacteriophage therapy on *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis strains: first steps towards treatment and prevention. *PLoS One*, 2011, 6(2): e16963
- [4] Capparelli R, Nocerino N, Iannaccone M, et al. Bacteriophage therapy of *Salmonella enterica*: a fresh appraisal of bacteriophage therapy. *J Infect Dis*, 2010, 201(1): 52-61
- [5] Capparelli R, Parlato M, Borriello G, et al. Experimental phage therapy against *Staphylococcus aureus* in mice. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51(8): 2765-73
- [6] Liu J, Dehbi M, Moeck G, et al. Antimicrobial drug discovery through bacteriophage genomics. *Nat Biotechnol*, 2004, 22(2): 185-91
- [7] Cello J, Paul AV, Wimmer E. Chemical synthesis of poliovirus cDNA: generation of infectious virus in the absence of natural template. *Science*, 2002, 297(5583): 1016-8
- [8] Smith HO, Hutchison CA, 3RD, Pfannkoch C, et al. Generating a synthetic genome by whole genome assembly: phiX174 bacteriophage from synthetic oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(26): 15440-5
- [9] Chan LY, Kosuri S, Endy D. Refactoring bacteriophage T7. *Mol Syst Biol*, 2005, 1: 2005 0018
- [10] Lu TK, Collins JJ. Dispersing biofilms with engineered enzymatic bacteriophage. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(27): 11197-202
- [11] Lu TK, Collins JJ. Engineered bacteriophage targeting gene networks as adjuvants for antibiotic therapy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(12): 4629-34
- [12] Gibson DG, Smith HO, Hutchison CA, 3RD, et al. Chemical synthesis of the mouse mitochondrial genome. *Nat Methods*, 2010, 7(11): 901-3
- [13] Schmidt M. Diffusion of synthetic biology: a challenge to biosafety. *Syst Synth Biol*, 2008, 2(1-2): 1-6
- [14] Garfinkel MS, Endy D, Epstein GL, et al. Synthetic genomics: Options for governance. *Bio Secur Bioterror*, 2007, 5(4): 359-62
- [15] Tucker JB, Zilinskas RA. The promise and perils of synthetic biology. *New Atlantis*, 2006, 12: 25-45
- [16] Pal C, Macia MD, Oliver A, et al. Coevolution with viruses drives the evolution of bacterial mutation rates. *Nature*, 2007, 450(7172): 1079-81
- [17] Gomez P, Buckling A. Bacteria-phage antagonistic coevolution in soil. *Science*, 2011, 332(6025): 106-9
- [18] Kaiser J. Bioethics. Oversight but no strict rules for synthetic biology. *Science*, 2010, 330(6008): 1166
- [19] Race MS, Hammond E. An evaluation of the role and effectiveness of institutional biosafety committees in providing oversight and security at biocontainment laboratories. *Bio Secur Bioterror*, 2008, 6(1): 19-35