

噬菌体 Guo1 复苏结核休眠菌的初步研究

杨 婷,杜丽娟,曹 俊,郭述良*

(重庆医科大学附属第一医院呼吸与危重症医学科,重庆 400016)

[摘要] 目的:探索分枝杆菌噬菌体 Guo1 对结核休眠菌的复苏作用。方法:采用缺钾 Sauton 培养基培养对数生长期结核菌构建结核休眠菌模型;采用药敏检测、透射电子显微镜(电镜)观察和金胺 O-尼罗红双荧光染色作为模型检测方法;采用菌落计数作为复苏的检测指标。结果:缺钾结核休眠菌模型构建成功。混合培养第 1 天时,空白对照组、上清组、TM4 组、Guo1 组菌落计数分别为 $(2.67\pm 0.58)\times 10^2$ 、 $(3.00\pm 1.00)\times 10^2$ 、 $(2.67\pm 0.58)\times 10^2$ 、 $(2.33\pm 0.58)\times 10^2$ CFU/mL;培养第 15 天时,各组菌落计数分别为 $(7.33\pm 1.53)\times 10^4$ 、 $(6.67\pm 2.08)\times 10^{10}$ 、 $(3.00\pm 1.00)\times 10^{10}$ 、 $(3.33\pm 1.53)\times 10^{10}$ CFU/mL。结论:分枝杆菌噬菌体 Guo1 能够复苏结核休眠菌。

[关键词] 噬菌体 Guo1;结核休眠菌;复苏;结核病

[中图分类号] R446.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)10-1234-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20171002

Resuscitation of mycobacteriophage Guo1 in dormant cells of *M.tuberculosis*

Yang Ting, Du Lijuan, Cao Jun, Guo Shuliang*

(Department of Respiratory and Critical Care Medicine, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the resuscitative potential of mycobacteriophage Guo1 on dormant cells of *M.tuberculosis*. **Methods:** Dormant cells of *M.tuberculosis* were induced by potassium-deficient culture of logarithmic phase of *M.tuberculosis* at 37 °C, which were proven through drug sensitivity test, transmission electron microscope(TEM) and auramine O-Nile red double fluorescent staining. *M.tuberculosis* colony count was used to detect whether the dormant cells of *M.tuberculosis* had been resuscitated by Guo1. **Results:** Dormant cells of *M.tuberculosis* were obtained successfully by potassium-deficient cultivation for 30 days at 37 °C. The concentration of *M.tuberculosis* in control, supernatant (SN), TM4 and Guo1 groups was $(2.67\pm 0.58)\times 10^2$, $(3.00\pm 1.00)\times 10^2$, $(2.67\pm 0.58)\times 10^2$, $(2.33\pm 0.58)\times 10^2$ CFU/mL, respectively, after culture for 1 d. And the concentration of *M.tuberculosis* in above groups increased to $(7.33\pm 1.53)\times 10^4$, $(6.67\pm 2.08)\times 10^{10}$, $(3.00\pm 1.00)\times 10^{10}$, $(3.33\pm 1.53)\times 10^{10}$ CFU/mL at the 15th day, respectively. **Conclusion:** Mycobacteriophage Guo1 can resuscitate dormant cells of *M.tuberculosis*.

[Key words] bacteriophage Guo1; dormant *M.tuberculosis*; resuscitation; tuberculosis

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(10): 1234-1238]

目前,结核病(tuberculosis, TB)在全球的流行仍十分严重,世界卫生组织(WHO)全球结核病报告显示,2014 年全世界有 960 万人罹患结核病,150 万人死于 TB(包括 40 万艾滋病病毒阳性患者)^[1]。当前结核病的控制主要依赖长疗程的化疗,虽然可以清除患者体内绝大部分结核菌,但仍然有少量结核菌能逃避机体的免疫杀伤并对结核化疗药物耐药,而在机体内长期潜伏下来,形成潜伏结核感染(latent tuber-

culosis infection, LTBI)^[2-3]。目前,全球有近 1/3 人口存在潜伏结核菌感染^[4-5]。潜伏感染的结核菌处于休眠状态,其细胞壁增厚、染色体复制停止、代谢降低,但能在机体免疫力下降时恢复生长,发展为活动性结核病。因此,控制潜伏感染的结核休眠菌对控制结核病疫情至关重要。

然而,目前临床上尚无可直接杀灭结核休眠菌的药物,仅有部分可以杀灭结核休眠菌的药物处于基础实验或临床试验阶段,采用疫苗或者化合物阻止结核休眠菌复苏也存在着各种实践及伦理上的争议^[6]。本课题组前期提出,短期主动集中复苏结核休眠菌并联合短程强效化疗彻底杀灭和根除结核菌,

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81570010);国家临床重点专科专项(2012-649)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: guos1999@sina.com

是较理想的方法^[7]。研究发现,复苏促进因子(re-suscitation promoting factor, Rpf) 能在体外有效复苏结核休眠菌^[8]。分枝杆菌噬菌体 TM4 的尾部卷尺蛋白含 motif3 基序,此种基序具有 Rpf 样水解肽聚糖的活性,本课题组前期研究证实噬菌体 TM4 能够复苏结核休眠菌^[9]。分枝杆菌噬菌体 Guo1 是本课题组前期自主分离出的一株噬菌体,前期研究发现其含有与噬菌体 TM4 相似的 motif3 基序^[10],推测其有复苏结核休眠菌的潜力。本研究进一步探索分枝杆菌噬菌体 Guo1 对结核休眠菌的复苏作用。

1 材料和方法

1.1 材料

中性罗氏培养基 CON I 型、金胺 O(珠海贝索公司);Middlebrook 7H9 Broth、Middlebrook 7H10 Agar、Middlebrook ADC 增菌液、Agar(BD 公司,美国);Tris-base、尼罗红(Sigma 公司,美国);异烟肼注射液(重庆西南药业公司);利福平胶囊(重庆天圣制药公司)。

1.2 方法

1.2.1 菌株培养

结核菌标准株 H37Rv(CMCC93004)由重庆市肺科医院提供,接种于中性罗氏培养基培养 3~4 周后,转种于 Sauton 液体培养基(0.5 g KH₂PO₄,1.4 g MgSO₄·7H₂O,4 g 左旋门冬酰胺,60 mL 甘油,0.05 g 枸橼酸铁铵,2 g 柠檬酸钠,0.1 mL 1% ZnSO₄·7H₂O,加 ddH₂O 至 1 L,用 1 mol/L NaOH 调节 pH 至 7.0,以 10% 体积比加入 ADC,以 0.05% 体积比加入 Tween-80),置于 37 °C 200 r/min 摇床中振荡培养 10~12 d。结核分枝杆菌 mc2155(CMCC93202)由中国药品生物制品检定所王国治教授馈赠,划线接种于 7H10 琼脂培养基(1.9 g 7H10 Agar + 10 mL ADC + 0.5 mL 98% 甘油 + 89 mL ddH₂O + 0.1 mL 1 mol/L CaCl₂) 培养 3 d,后转种于 7H9 Broth (0.47 g 7H9 Broth + 10 mL ADC + 0.2 mL 95% 甘油 + 90 mL ddH₂O + 0.1 mL 1 mol/L CaCl₂),37 °C 摇床振荡过夜培养。TM4 噬菌体由美国匹兹堡大学 Hatfull 教授惠赠,Guo1 噬菌体由本实验室分离。

1.2.2 构建结核休眠菌缺钾模型

参考文献[11]方法,将在 Sauton 培养基中培养 10~12 d 的 H37Rv 离心(3 000~4 000 r/min)后去除培养液,并用等体积的灭菌 ddH₂O 漂洗 2~3 次以清除钾离子。去除漂洗液后加入与吸弃液等体积的缺钾 Sauton 培养基(8.9 g Na₂HPO₄·12H₂O,1.4 g MgSO₄·7H₂O,4 g 左旋门冬酰胺,60 mL 甘油,0.05 g 枸橼酸铁

铵,2 g 柠檬酸钠,0.1 mL 1% ZnSO₄·7H₂O,加 ddH₂O 至 1 L,用 1 mol/L NaOH 调节 pH 至 7.0,以 10% 体积比加入 ADC,以 0.05% 体积比加入 Tween-80),置于 37 °C 摇床中振荡培养约 30 d。

1.2.3 结核休眠菌耐药检测

参考文献[12]方法,分别对对数生长期和缺钾培养 30 d 的结核菌液进行取样,加入 100 μg/mL 异烟肼(isoniazid,INH)、利福平(rifampin,RIF)溶液,使药物终浓度为 5 μg/mL,对照组加入等量灭菌 ddH₂O,将所有 EP 管置于 37 °C 恒温箱静止培养 7 d。7 d 后用 Sauton 液体培养基将各 EP 管内液体 10 倍梯度稀释到 1×10⁻¹⁰,取各梯度菌液接种于 48 孔板(每孔 500 μL 菌液,每个梯度均设 3 个复孔),将 48 孔板密封后置于 37 °C 恒温箱静止培养。静止培养 15 d 后,进行刃天青染色^[13],即向 48 孔板中每孔加入 75 μL 过滤除菌的 0.01% 刃天青溶液,48 孔板密封后 37 °C 恒温箱静止培养,3 d 后观察液体颜色改变情况(活细胞中的乳酸脱氢酶能将蓝色的刃天青转化为粉红色的荧光物质试卤灵,无活性或死亡的细胞丧失代谢能力而不能还原刃天青^[14])。若菌液由蓝色变为粉红色则记为阳性,若仍为蓝色则记为阴性,统计后查 MPN 表计算菌量,并计算耐药率(耐药率=实验组菌量/对照组菌量×100%)。

1.2.4 透射电镜观察

参考文献[9]方法,分别取对数生长期和缺钾培养 30 d 的结核菌液,4 000 r/min 离心 10 min,除去上清液,保留 1.5 mL 细菌液体。用枪头吹打混匀,10 000 r/min 离心 15 min,小心除去上清液,沿管壁缓缓加入 4% 戊二醛固定液 1.5 mL 后放入 4 °C 保存过夜。0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液清洗 3 次,后经 1% 四氧化锇固定 2 h,常规乙醇和丙酮梯度脱水,环氧树脂浸透、包埋后切片,醋酸铀和枸橼酸铅染色,H-7500 型电镜(Hitachi 公司,日本)观察,Gatan-780CCD 拍照。采用 Digimizer 软件测量电镜图片中结核菌细胞壁厚度。

1.2.5 金胺 O-尼罗红双荧光染色

参考文献[15]方法,略有改动。分别取对数生长期和缺钾培养约 30 d 的结核菌液 20 μL 均匀涂于载玻片上,酒精灯加热固定,滴加金胺 O 染色液(10 μg/mL)染色 30 min 后 ddH₂O 冲洗,3% 盐酸-酒精脱色 3~5 min 至看不见染色剂为止,滴加尼罗红(10 μg/mL)染色 15 min 后 ddH₂O 冲洗,0.5% 高锰酸钾复染 1 min,水洗,晾干,50% 甘油封片,后在共聚焦显微镜下多视野观察并拍照。

1.2.6 结核休眠菌的复苏

参考文献[16]方法制备对数期结核菌上清液,将培养至对数期的结核菌液离心,收集上清液 4 ℃ 12 000 r/min 离心 20 min, 0.22 μm 过滤器过滤,分装后-70 ℃冻存(解冻后的上清液应立即使用,且不可再次冻存)。参考文献[17]方法制备噬菌体液,采用双层平板法(下层 7H10 琼脂培养基,上层 7H9 琼脂培养基)扩增噬菌体,37 ℃恒温箱培养 24 h,加入 Phage buffer 后 37 ℃恒温箱孵育,约 1 h 后收集液体,4 ℃ 10 000 r/min 离心 10 min, 0.22 μm 过滤器过滤除菌,测定滴度。

复苏实验参考文献[9]方法,略有改动。取缺钾培养 30 d 的模型菌液入研磨器中研磨均匀,每管分别加入 100 μL 研磨均匀的模型菌液和 7 mL Sauton 液体培养基,分为 4 组,其中 3 组分别加入 50 μL 上清液、噬菌体 TM4 液、噬菌体 Guo1 液,第 4 组加入 50 μL 灭菌 ddH₂O 作为空白对照。每组 3 个复管。所有试管置于 37 ℃摇床中振荡培养。将培养 1、15 d 的各组混合液漩涡振荡混匀后吸取 100 μL,用灭菌 ddH₂O 10 倍梯度稀释至 1×10⁻¹⁰,再吸取混匀后的各个梯度液 100 μL 接种于中性罗氏培养管中,置于 37 ℃恒温箱中培养,约 30 d 后进行菌落计数。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析。定量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。各组间差异采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P\leq 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 结核休眠菌模型检测

2.1.1 耐药检测结果

对数生长期和缺钾培养 30 d 的 H37Rv 药敏实验结果显示,对数期结核菌对终浓度为 5 μg/mL 的 INH、RIF 耐药率分别为 (44.42±19.73)%、(28.14±6.63)%,缺钾培养 30 d 的 H37Rv 对两种药物的耐药率分别为 (98.37±2.89)%、(93.55±11.17)%,两组间比较差异有统计学意义($P_{\text{INH}}=0.008$, $P_{\text{RIF}}=0.001$, $n=3$, 图 1)。

2.1.2 透射电镜观察结果

在电镜视野下可见,与对数期结核菌(图 2A)相比,缺钾培养后的结核菌(图 2B)细胞壁增厚。对数期结核菌细胞壁厚(11.19±2.21)nm,缺钾培养结核菌细胞壁厚(35.28±7.14)nm,差异有统计学意义($P<0.001$, $n=14$)。

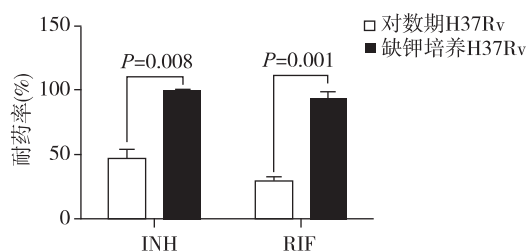


图 1 对数期及缺钾培养 H37Rv 对异烟肼、利福平的耐药率
Figure 1 Drug resistance rate of *M.tuberculosis* H37Rv in logarithmic phase and cultivated in potassium-deficient medium

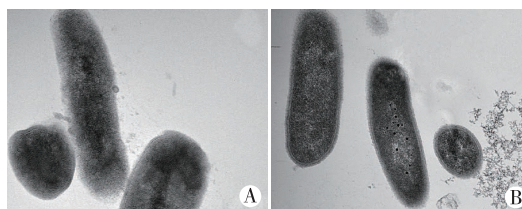


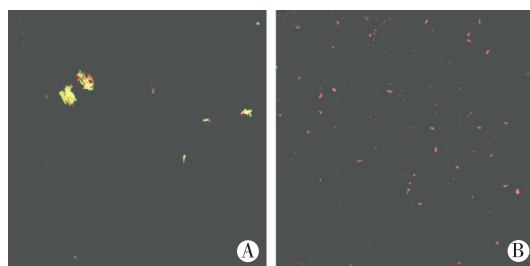
图 2 对数期及缺钾培养 H37Rv 电镜图片
A: 对数期的薄壁 H37Rv(x100 000); B: 缺钾培养 30 d 的厚壁 H37Rv(x50 000)。

2.2 对数期及缺钾培养 H37Rv 电镜图片

Figure 2 Electron microscope images of *M.tuberculosis* H37Rv in logarithmic phase and under potassium-deficient conditions

2.1.3 金胺 O-尼罗红双荧光染色结果

将对数生长期和缺钾培养 30 d 的 H37Rv 进行金胺 O-尼罗红双荧光染色后在共聚焦显微镜下观察,见对数期 H37Rv(图 3A)绝大部分发出绿色荧光;缺钾培养 30 d 的 H37Rv(图 3B)基本均发出红色荧光。



A: 对数期 H37Rv; B: 缺钾培养约 30 d 的 H37Rv。

图 3 对数期及缺钾培养 H37Rv 金胺 O-尼罗红荧光染色图(x800)

Figure 3 Micrographs of *M.tuberculosis* H37Rv in logarithmic phase and under potassium-deficient medium fluoresced by auramine-O and Nile red(x800)

2.2 噬菌体液的制备

按照双层平板扩增法扩增噬菌体 TM4 和噬菌体 Guo1,加入 Phage buffer 孵育后收集噬菌体液,采用小平板法(直径 70 mm)测噬菌体 TM4、Guo1 滴度分别为 8.9×10^{10} 、 5.6×10^{10} PFU/mL。用 Phage buffer 调整 2 种噬菌体液滴度后再行小平板法测滴度,经调整后噬

菌体 TM4、噬菌体 Guo1 滴度均为 5.6×10^{10} PFU/mL。

2.3 结核休眠菌复苏检测

混合培养第 1 天时,空白对照组、上清组、TM4 组、Guo1 组菌落计数分别为 $(2.67 \pm 0.58) \times 10^2$ 、 $(3.00 \pm 1.00) \times 10^2$ 、 $(2.67 \pm 0.58) \times 10^2$ 、 $(2.33 \pm 0.58) \times 10^2$ CFU/mL; 培养第 15 天时,各组菌落计数分别为 $(7.33 \pm 1.53) \times 10^4$ 、 $(6.67 \pm 2.08) \times 10^{10}$ 、 $(3.00 \pm 1.00) \times 10^{10}$ 、 $(3.33 \pm 1.53) \times 10^{10}$ CFU/mL。混合培养 15 d 后,各组菌量均较第 1 天明显增多,差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。混合培养 15 d 后,各组间菌量差异有统计学意义 ($P = 0.003$);与空白对照组相比,上清组、TM4 组、Guo1 组菌量均明显增多,差异有统计学意义 ($P < 0.001$, $P = 0.029$, $P = 0.018$)。其中,上清组菌量较 TM4 组、Guo1 组菌量明显增多,差异有统计学意义 ($P = 0.012$, $P = 0.018$),但 TM4 组与 Guo1 组菌量的差异无统计学意义($P = 0.776$,图 4)。

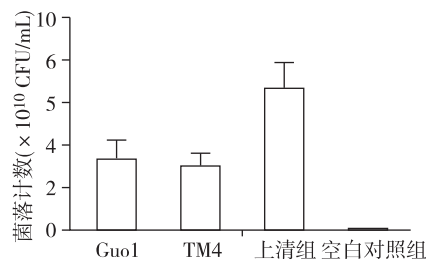


图 4 结核休眠菌复苏检测菌落计数结果

Figure 4 Colony count results of *M.tuberculosis* after resuscitated from dormant phase

3 讨论

目前已成功构建的结核休眠菌模型有多种,缺钾模型是国外报道的较新颖的结核休眠菌模型,该模型诱导结核菌进入休眠状态所需时间短,所诱导的结核休眠菌比例高,模型菌表现出明显的代谢停止且对异烟肼和利福平高度耐药。基于以上优点,本研究选择了结核休眠菌缺钾模型,是国内首次利用该模型进行相关研究。根据结核休眠菌对抗结核药物耐药,发生形态学改变以及脂质聚集和失去抗酸性的特点^[15-16,18-21],采用药敏检测、电镜观察和荧光双标记法对模型进行检测。本研究缺钾培养约 30 d 模型菌对异烟肼和利福平两种抗结核药物产生高度耐药性,电镜观察见细胞壁明显增厚,金胺 O-尼罗红双荧光染色证实模型菌发生脂质聚集及失去抗酸染色特性(金胺 O 可使具有抗酸性的活跃结核菌着绿色荧光,尼罗红可使发生脂质聚集的结核休眠菌着红色荧光^[15,20])。以上均说明结核休眠菌模型构建成功。

Mukamolova 等^[22]研究发现,将膝黄微球菌(*Microrococcus lylae*)的培养上清液过滤除菌后,加到不可培养状态的细菌中能有效促进其恢复生长。Sun 等^[23]研究发现对数生长期的结核菌上清液也能有效促进陈旧结核菌的复苏生长。以上均提示上清液中存在复苏促进因子(Rpf)。研究者们从生长活跃的结核菌培养液中纯化出了这种具有促进结核休眠菌复苏的蛋白,研究证实结核菌的 Rpf 是一个蛋白家族,包含 RpfA(Rv0867c)、RpfB(Rv1009)、RpfC(Rv1884c)、RpfD(RV2389c)、RpfE(Rv2450c)5 个成员^[24],有研究表明 Rpf 能够在体外显著促进结核休眠菌复苏^[8]。Rpf 水解结核休眠菌细胞壁肽聚糖是其能复苏结核休眠菌的关键因素^[25-26]。Piuri 和 Dusthacker 等^[27-28]研究发现尾部卷尺蛋白中含有 motif3 基序的裂解性分枝杆菌噬菌体能够特异性识别、感染休眠的耻垢分枝杆菌,并将其 DNA 注入休眠菌胞内复制增殖。motif3 基序是一种肽聚糖水解酶基序,具有与 Rpf 相似的水解肽聚糖的能力^[27,29]。分枝杆菌噬菌体 TM4、Guo1 尾部卷尺蛋白均含有 motif3 基序,其中,分枝杆菌噬菌体 Guo1 是本实验室自主分离并具有自主知识产权的一株噬菌体。本课题组前期研究报道,噬菌体 TM4 能够在体外复苏结核休眠菌,噬菌体 TM4、Guo1 均能在体外裂解结核休眠菌,且裂解能力无明显差异^[17]。本研究再次证实了噬菌体 TM4 体外复苏结核休眠菌的能力,表明噬菌体 Guo1 也能够体外复苏结核休眠菌,但 2 株噬菌体复苏能力无明显差异。2 株噬菌体复苏能力均低于上清液的复苏能力,这可能是噬菌体复苏和裂解结核休眠菌同时进行,也可能是在复苏休眠菌后因新合成噬菌体的释放而裂解了结核菌所导致。空白对照组结核菌量的增加可能是未进入休眠状态的少部分结核菌在营养丰富的培养基中生长繁殖,和(或)少部分休眠菌在恢复有钾条件后缓慢自动复苏,进而生长繁殖所致。近年来由于细菌耐药情况日趋严重,使得噬菌体治疗再度受到注意。本课题组前期研究发现分枝杆菌噬菌体鸡尾酒制剂具有比单一噬菌体更强的杀灭耐药结核菌的能力,且高浓度的噬菌体鸡尾酒组比低浓度组对耐药结核菌的杀灭作用更强^[30]。那么,是否可以将噬菌体 TM4 和噬菌体 Guo1 制成噬菌体鸡尾酒制剂,其对结核休眠菌的复苏及杀灭作用是否强于单一噬菌体,其与休眠菌之间的相互作用是否存在浓度效应关系或最佳的感染复数,且以何种途径进入体内能发挥最大作用,这些都还需要后续实验进一步研究。

[参考文献]

- [1] World Health Organization. Global tuberculosis report 2015 [R]. Geneva:WHO,2015
- [2] Chao MC,Rubin EJ. Letting sleeping dogs lie:does dormancy play a role in tuberculosis?[J]. *Annu Rev Microbiol*,2010,64:293-311
- [3] Ahmad S. New approaches in the diagnosis and treatment of latent tuberculosis infection[J]. *Respir Res*,2010,11:169
- [4] Glaziou P,Sismanidis C,Floyd K,et al. Global epidemiology of tuberculosis[J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*,2015,5(2):a017798
- [5] Tuberculosis global facts 2010/2011[J]. *Cent Eur J Public Health*,2010,18(4):197
- [6] Gan Y,Guo S. Controlling strategy of dormant *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Chin Med J(Engl)*,2014,127(18):3316-3321
- [7] Gan Y,Yao Y,Guo S. The dormant cells of *Mycobacterium tuberculosis* may be resuscitated by targeting-expression system of recombinant mycobacteriophage-Rpf:implication of shorter course of TB chemotherapy in the future[J]. *Med Hypotheses*,2015,84(5):477-480
- [8] 佺静,朱雪薇,刘忠泉. 复苏因子促进休眠结核杆菌复苏作用的研究[J]. *中国医学工程*,2008,16(2):92-95
- [9] 甘易玲,郭述良. 噬菌体 TM4 复苏结核休眠菌的初步研究[J]. *上海交通大学学报(医学版)*,2014,34(1):13-22
- [10] 姚义勇,江莉莎,张莉,等. 分枝杆菌噬菌体 Guo1 环状基因组特征及生物学特性分析[J]. *微生物学通报*,2015,42(8):1529-1538
- [11] Salina E,Ryabova O,Kaprelyants A,et al. New 2-thiopyridines as potential candidates for killing both actively growing and dormant *Mycobacterium tuberculosis* cells [J]. *Antimicrob Agents Chemother*,2014,58(1):55-60
- [12] 江莉莎,姚义勇,张莉,等. 缺氧模型和多因素模型构建结核休眠菌模型比较研究[J]. *中国人兽共患病学报*,2016,32(4):327-331
- [13] Caleffi-Ferracioli KR,Maltempe FG,Siqueira VL,et al. Fast detection of drug interaction in *Mycobacterium tuberculosis* by a checkerboard resazurin method[J]. *Tuberculosis (Edinb)*,2013,93(6):660-663
- [14] Memillian MK,Li L,Parker JB,et al. An improved resazurin-based cytotoxicity assay for hepatic cells[J]. *Cell Biol Toxicol*,2002,18(3):157-173
- [15] Deb C,Lee CM,Dubey VS,et al. A novel *in vitro* multiple-stress dormancy model for *Mycobacterium tuberculosis* generates a lipid-loaded,drug-tolerant,dormant pathogen [J]. *PLoS One*,2009,4(6):e6077
- [16] Shleeva MO,Kudykina YK,Vostroknutova GN,et al. Dormant ovoid cells of *Mycobacterium tuberculosis* are formed in response to gradual external acidification [J]. *Tuberculosis(Edinb)*,2011,91(2):146-154
- [17] 柳岩,江莉莎,姚义勇,等. 噬菌体 TM4、Guo1 和 D29 对静止期结核菌裂解作用初步研究[J]. *中国人兽共患病学报*,2016,32(1):28-32
- [18] Wayne LG,Hayes LG. An *in vitro* model for sequential study of shutdown of *Mycobacterium tuberculosis* through two stages of nonreplicating persistence[J]. *Infect Immun*,1996,64(6):2062-2069
- [19] Cunningham AF,Spreadbury CL. Mycobacterial stationary phase induced by low oxygen tension:cell wall thickening and localization of the 16-kilodalton alpha-crystallin homolog[J]. *J Bacteriol*,1998,180(4):801-808
- [20] Kapoor N,Pawar S,Sirakova TD,et al. Human granuloma *in vitro* model,for TB dormancy and resuscitation [J]. *PLoS One*,2013,8(1):e53657
- [21] Zhang Y. Persistent and dormant tubercle bacilli and latent tuberculosis[J]. *Front Biosci*,2004,9:1136-1156
- [22] Mukamolova GV,Kaprelyants AS,Young DI,et al. A bacterial cytokine[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,1998,95(15):8916-8921
- [23] Sun Z,Zhang Y. Spent culture supernatant of *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra improves viability of aged cultures of this strain and allows small inocula to initiate growth[J]. *J Bacteriol*,1999,181(24):7626-7628
- [24] Tufariello JM,Jacobs WR,Chan J. Individual *Mycobacterium tuberculosis* resuscitation-promoting factor homologues are dispensable for growth *in vitro* and *in vivo*[J]. *Infect Immun*,2004,72(1):515-526
- [25] Hett EC,Chao MC,Deng LL,et al. A mycobacterial enzyme essential for cell division synergizes with resuscitation-promoting factor[J]. *PLoS Pathog*,2008,4(2):e1000001
- [26] Hett EC,Chao MC,Rubin EJ. Interaction and modulation of two antagonistic cell wall enzymes of mycobacteria[J]. *PLoS Pathog*,2010,6(7):e1001020
- [27] Piuri M,Hatfull GF. A peptidoglycan hydrolase motif within the mycobacteriophage TM4 tape measure protein promotes efficient infection of stationary phase cells [J]. *Mol Microbiol*,2006,62(6):1569-1585
- [28] Dusthacker A,Hassan VN,Kumar V. Tape measure protein having MT3 motif facilitates phage entry into stationary phase cells of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Comput Biol Chem*,2008,32(5):367-369
- [29] Pedulla ML,Ford ME,Houtz JM,et al. Origins of highly mosaic mycobacteriophage genomes[J]. *Cell*,2003,113(2):171-182
- [30] 邹亭亭. 分枝杆菌噬菌体鸡尾酒制剂应用于耐药结核病治疗的探索性研究[D]. 重庆:重庆医科大学,2012

[收稿日期] 2016-11-06