



贾旭晨, 肖天石, 朱晓林, 郝智慧. 一株可裂解耐黏菌素大肠杆菌噬菌体的分离鉴定及全基因组分析[J]. 中国农业大学学报, 2024, 29(02): 131-140.
JIA Xuchen, XIAO Tianshi, ZHU Xiaolin, HAO Zhihui. Isolation, identification and complete genomic analysis of a bacteriophage capable of lysing colistin-resistant *Escherichia coli*[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2024, 29(02): 131-140.
DOI: 10.11841/j.issn.1007-4333.2024.02.13

一株可裂解耐黏菌素大肠杆菌噬菌体的分离鉴定及全基因组分析

贾旭晨^{1,2} 肖天石² 朱晓林² 郝智慧^{2*}

(1. 新疆农业大学 动物医学学院, 乌鲁木齐 830052;
2. 中国农业大学 动物医学院/兽医公共卫生安全全国重点实验室, 北京 100193)

摘要 为研究耐黏菌素大肠杆菌的噬菌体治疗方法, 本研究以耐黏菌素大肠杆菌为宿主菌, 采用双层琼脂平板法从山东烟台某养鸡场污水样中分离纯化得到裂解性噬菌体 SDYTW1-F1-2-2。通过透射电镜观察, 最佳感染复数, 一步生长曲线, 温度稳定性, 酸碱度稳定性等生物学特性测定, 并对其进行全基因组测序分析。结果表明: 1) 噬菌体 SDYTW1-F1-2-2 噬菌斑呈现透亮, 外周无晕圈, 形态学观察显示其具有可伸缩性尾鞘。2) 生物学特性分析表明, 噬菌体最佳感染复数为 0.1, 潜伏期为 50 min, 爆发期为 40 min, 爆发量为 (331 ± 9) PFU/cell。在温度 4~40 °C, pH 为 4~12 的环境下, 噬菌体活性较为稳定。3) 通过噬菌体全基因组测序及核酸类型鉴定显示, 该噬菌体基因组全长为 74 752 bp, 双链 DNA, GC 含量 42.1%。在噬菌体基因组中共鉴定出 121 个编码蛋白(CDS), 包括结构组成、DNA 代谢与复制和包装以及细菌裂解相关的功能基因, 发现一个 tRNA 基因, 且未检测到如 *stx-1* 等致病性基因和 *mcr-1* 等耐药基因相关的基因。综上, 噬菌体 SDYTW1-F1-2-2 裂解谱较宽, 具有良好的酸碱性和热稳定性以及安全性。本研究为后续开展针对耐黏菌素大肠杆菌的噬菌体治疗研究提供依据。

关键词 裂解性噬菌体; 耐黏菌素大肠杆菌; 全基因组

中图分类号 S85

文章编号 1007-4333(2024)02-0131-10

文献标志码 A

Isolation, identification and complete genomic analysis of a bacteriophage capable of lysing colistin-resistant *Escherichia coli*

JIA Xuchen^{1,2}, XIAO Tianshi², ZHU Xiaolin², HAO Zhihui^{2*}

(1. College of Veterinary Medicine, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China;
2. College of Veterinary Medicine/National Key Laboratory of Veterinary Public Health Security, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract To study bacteriophage (phage) therapy for colistin-resistant *Escherichia coli* (*E. coli*), phage SDYTW1-F1-2-2 was isolated and purified by double AGAR plate method using colistin-resistant *E. coli* as host bacteria from sewage samples collected from a chicken farm in Yantai, Shandong Province. The biological characteristics of the bacteriophage were analyzed by transmission electron microscopy, optimum infection complex number, one-step growth curve, temperature stability and pH stability, and the whole genome was sequenced. The results showed as follows: 1) The plaque of bacteriophage SDYTW1-F1-2-2 was transparent, halo free and had a flexible tail sheath. 2) The analysis of biological characteristics

收稿日期: 2023-08-25

基金项目: 十四五重点研发计划项目(2022YFD1801105)

第一作者: 贾旭晨(ORCID:0009-0002-7166-291X), 硕士研究生, E-mail: jiaxuchen2021@163.com

通讯作者: 郝智慧(ORCID:0000-0001-9516-6270), 教授, 主要从事中兽药药理学与毒理学研究, E-mail: haozhihui@cau.edu.cn

showed the optimal number of phage infection was 0.1, the incubation period was 50 min, the outbreak period was 40 min, and the amount of outbreak was (331 ± 9) PFU/cell. The phage activity was stable when the temperature was 4–40 °C and the pH was 4–12. The total length of the bacteriophage genome was 7 4752 bp, with double strands of DNA, GC content of 42.1%. A total 121 sequence coding for amino acids in protein (CDS) were identified in the genome of phage, including functional genes associated with structure composition, nucleotide metabolism and replication, packaging and bacterial lysis, a tRNA genome were discovered and no genes associated with pathogenicity genes such as *stx-1* and drug resistant genes such as *mcr-1* were identified. In summary, phage SDYTW1-F1-2-2 has a wide cleavage spectrum, strong acid and base tolerance, thermal stability and safety. This study provides a basis for further research on phage therapy of colistin resistant *E. coli*.

Keywords lytic bacteriophage; colistin-resistance *E. coli*; genomewide

畜牧养殖产业中,经常使用大量抗生素类药物用以防控动物疾病,提高经济效益^[1]。但是,随着抗生素的滥用,抗生素耐药性问题也愈发严峻。例如,被视为治疗多重耐药革兰氏阴性菌感染“最后一道防线”的黏菌素^[2],因其可转移的黏菌素耐药基因 *mcr-1* 的发现,使得黏菌素耐药性问题日益严重。此外,鉴于新抗生素昂贵的开发成本,药物研制对制药业的吸引力也逐渐降低^[3]。2019年,世界卫生组织宣布(WHO)抗生素耐药性问题是人类面临的十大全球公共卫生威胁之一^[4]。因此,抗生素耐药性已经成为亟待解决的全球性问题,而噬菌体治疗的应用,恰恰为解决当前的紧迫性问题提供了新的可能。

噬菌体作为一种天然抗菌药物,具有低毒性、高特异性、开发周期短等特点,被誉为“后抗生素时代”较好的治疗耐药方法^[5]。噬菌体分为温和性噬菌体与裂解性噬菌体,温和性噬菌体感染宿主菌后,会将其自身遗传物质整合到宿主菌染色体中,并伴随宿主菌的复制而复制,但对宿主菌不会产生致死性危害,因而温和性噬菌体不宜用作抗菌治疗。而裂解性噬菌体在感染宿主菌后,会将自身遗传物质注入宿主细胞,同时利用宿主细胞条件合成、并组装为完整的子代噬菌体,最后裂解宿主菌从而释放子代噬菌体^[6]。因此,常选用裂解性噬菌体进行抗菌治疗。有关噬菌体在治疗耐药菌导致的细菌性疾病的案例已被广泛报道^[7-10]。例如,Porter等^[11]采用大肠杆菌噬菌体鸡尾酒,成功抑制了导致乳腺炎的大肠埃希氏菌分离菌株的生长;陈松建等^[12]采用肺炎克雷伯菌裂解性噬菌体 F20 成功治疗了小鼠肺炎克雷伯菌引起的败血症,表明裂解性噬菌体 F20 可作为一种安全的生物制剂在临床中使用。目前,噬菌体已经被应用于各个领域的细

菌控制,噬菌体制剂也被研制开发并广泛应用于禽类养殖业^[13-14]。然而,噬菌体对耐黏菌素大肠杆菌治疗却鲜有报道,基于此,本研究以禽源耐黏菌素大肠杆菌为宿主,对山东烟台某养鸡场污水样品中分离出的一株裂解性噬菌体进行生物学特性测定和全基因组测序分析,旨在为噬菌体治疗由黏菌素耐药大肠杆菌引发的感染提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与样品

94株耐黏菌素大肠杆菌由本实验室分离保存,用于测定噬菌体裂解谱;以耐黏菌素大肠杆菌 F1-2-2 作为宿主菌,用于噬菌体分离纯化及生物学特性测定;污水样品采集自山东烟台某养鸡场,用于分离噬菌体。

1.1.2 试剂与耗材

LB肉汤、LB琼脂购于青岛海博生物技术有限公司;琼脂粉、DNase I、Rnase A 以及蛋白酶 K、十二烷基硫酸钠(SDS)、DNA提取液(苯酚:氯仿 25:24)、核酸提取液(氯仿:异戊醇 24:1)购于北京索莱宝科技有限公司;Mung Bean Nuclease 购于 TaKaRa 公司;SM缓冲液(氯化钠 5.8 g,七水硫酸镁 1.58 g, Tris-HCL (1 mol/L pH=7.5) 50 mL, 2% 的明胶 5 mL,用无菌水定容到 1 L, 121 °C 高压灭菌)。

1.2 方法

1.2.1 噬菌体的分离纯化

取适量污水样品到 2 mL 离心管中, 12 000 g 离心 10 min, 取上清用 0.22 μm 滤器过滤, 滤液为噬菌体原液。双层琼脂平板法, 将 100 μL 噬菌体原液与 100 μL 的对数期宿主菌 ($OD_{600}=0.3 \sim 0.4$) F1-2-2 混匀于 5 mL 半固体琼脂培养基, 然后平铺到 LB 琼

脂平板表面,待凝固后,37℃过夜培养。从双层琼脂平板上挑取单个透亮噬菌斑到SM缓冲液中,然后取含有噬菌斑的SM缓冲液继续通过双层琼脂平板培养,重复3次以上,即可得到纯化后的噬菌体。

1.2.2 噬菌体形态学观察

采用PEG沉降的方法对噬菌体进行浓缩^[15],将浓缩后的噬菌体滴加于载玻片上,并用精细镊子夹取铜网,放于噬菌体浓缩液上,室温静置10 min后用吸水纸从侧面吸干铜网上的多余液体,滴一滴2%磷钨酸(PTA, pH=7)到铜网上,静置10 min后将铜网放置于吸水纸上,待自然干燥,通过透射电子显微镜进行形态观察。

1.2.3 噬菌体裂解谱测定

采用96孔板接种器将过夜培养的94株大肠杆菌接种于含有180 μL LB肉汤的96孔板中。试验组,每孔加入20 μL噬菌体(约 10^8 PFU/mL),对照组,加入20 μL的LB肉汤。37℃孵育24 h,分别在0、2、4、6、8、10、12和24 h测定OD₆₀₀,以此来评估对照组与试验组的细菌生长状态。同时选取生长受抑制的菌株,进行斑点法试验。取100 μL对数期细菌加入5 mL半固体琼脂培养基,待其凝固后,在琼脂表面滴加3 μL噬菌体(约 10^8 PFU/mL),待其晾干,37℃静置孵育过夜,观察是否有噬菌斑出现。

1.2.4 噬菌体最佳感染复数

将100 μL噬菌体分别与100 μL不同浓度的宿主菌F1-2-2按照感染复数为10、1、0.1、0.01、0.001和0.0001的比例混合于800 μL的LB肉汤(每个比例3个重复),室温静置吸附15 min,37℃,180 r/min培养6 h后,双层琼脂平板法测定噬菌体效价,效价最高的比例作为噬菌体最佳感染复数。

1.2.5 噬菌体一步生长曲线测定

参照Yu等^[16]的方法,将对数期宿主菌F1-2-2与噬菌体悬液按照最佳感染复数0.1比例混匀,加入到800 μL的LB肉汤培养基中,37℃孵育5 min,12 000 g离心1 min。弃上清,加入等体积LB肉汤洗涤沉淀2次。取重悬液1 mL到9 mL的LB肉汤中,37℃,180 r/min培养,在不同时间点(0、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100和110 min)取样测定噬菌体效价(每个时间点3个重复),并根据效价绘制噬菌体的一步生长曲线图。

1.2.6 噬菌体热稳定性测定

将噬菌体分装到多个1.5 mL离心管中,每管1 mL。将分装后的噬菌体分别置于4、25、37、40、50、60、70、80、90和100℃环境中1 h后,测定噬菌体效价(每组3个重复)。

1.2.7 噬菌体pH稳定性测定

使用10%盐酸与0.1 mol/L的氢氧化钠调节LB肉汤pH,采用pH计(METTLER TOLEDO)测定其pH值。将其pH分别调整为2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13和14,取噬菌体100 μL加入到900 μL不同pH的LB肉汤中,37℃孵育1 h后测定噬菌体效价(每组3个重复)。

1.2.8 噬菌体基因组提取及生物信息学分析

参考Ding等^[17]的方法提取噬菌体基因组,将PEG8000沉淀浓缩后的噬菌体悬液中分别加入DNase I(终浓度为5 μg/mL)及Rnase A(终浓度为10 μg/mL),37℃孵育30 min。加入蛋白酶K(终浓度为10 mg/mL)与20% SDS,混匀,56℃孵育1 h后取出加入等体积DNA提取液,抽提2次,取上层亲水相,再用等体积核酸提取液抽提,冰无水乙醇沉淀基因组,将所得基因组沉淀物用70%乙醇进行洗涤后溶解于无菌蒸馏水中。

北京赛默百合生物科技有限公司进行二代测序、拼接。RAST(<https://rast.nmpdr.org>)进行注释分析;Proksee(<https://proksee.ca/>)绘制基因图谱;VICTOR(<https://ggdc.dsmz.de/victor.php>)构建系统发育树^[18-20];Virulence Factor Database(VFDB: <http://www.mgc.ac.cn/VFs/>)^[21]和Comprehensive Antibiotic Resistance Database(CARD: <http://arpcard.mcmaster.ca>)^[22]进行毒力基因和耐药基因筛查。

1.2.9 噬菌体核酸类型的鉴定

将提取到的基因组分别用DNase I、Rnase A和Mung Bean Nuclease在37℃水浴处理30 min,采用1%的琼脂糖核酸电泳对消化产物进行检测。

2 结果与分析

2.1 裂解性噬菌体的分离与纯化

本研究以一株鸡源*mcr-1*阳性大肠杆菌F1-2-2为宿主菌,从山东烟台某养鸡场污水样品中分离出一株裂解性噬菌体,可在*E. coli* F1-2-2的菌苔上呈

现且形态大小均匀一致,无晕圈,边缘整齐,直径为(0.5 mm)的透亮的噬菌斑,因而结果表明该噬菌体为裂解性噬菌体(图1),将其命名为SDYTW1-F1-2-2。

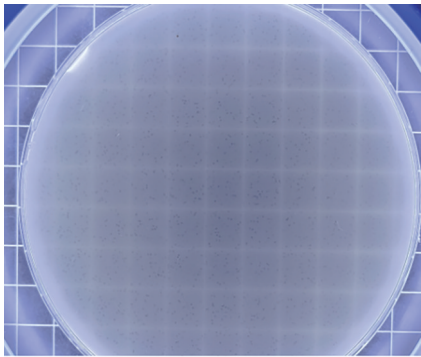


图1 裂解性噬菌体SDYTW1-F1-2-2噬菌斑
Fig. 1 Plaque of lytic phage SDYTW1-F1-2-2

2.2 裂解性噬菌体形态学观察

如图2所示,通过电镜观察,噬菌体SDYTW1-F1-2-2头部为多面体结构,长尾,有伸缩性尾鞘,头部直径为(115 nm),尾长(275 nm)。噬菌体SDYTW1-

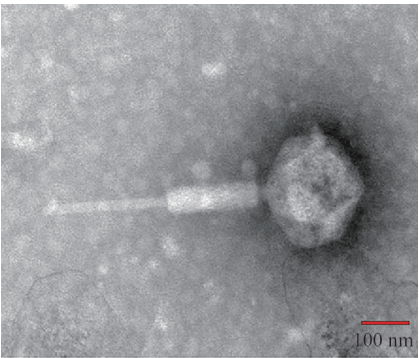


图2 裂解性噬菌体SDYTW1-F1-2-2透射电镜形态
Fig. 2 Transmission electron microscope of lytic phage SDYTW1-F1-2-2

F1-2-2属于有尾噬菌体目,肌尾噬菌体科。

2.3 裂解性噬菌体裂解谱测定

噬菌体裂解谱如表1所示,通过对94株耐黏菌素大肠杆菌裂解情况的观察,可看到噬菌体SDYTW1-F1-2-2可以有效裂解94株耐黏菌素大肠杆菌中的14株,裂解率为14.8%。结果表明,噬菌体SDYTW1-F1-2-2对耐黏菌素大肠杆菌有一定的裂解作用。

表1 裂解性噬菌体SDYTW1-F1-2-2宿主范围

Table 1 Host range of lytic phage SDYTW1-F1-2-2

宿主菌 Host bacteria	敏感性 Sensitivity	宿主菌 Host bacteria	敏感性 Sensitivity	宿主菌 Host bacteria	敏感性 Sensitivity
4	—	25	—	39	—
19HB4RK42	—	19HB4RK8	—	19NM3RK27	—
DF15	—	DF16	—	DF41	—
EC17	—	EC19	++	EC20	—
G34	—	G51	—	G58	—
HN346	—	HN35	—	HN351	—
HP41	—	HP43	—	HP464	—
RN28	+	RN29	—	TW23-2	++
44	—	45	—	132	—
19SC13RX7	—	19SC7DZ3	—	246	—
DFH2	—	DFH23	—	DFH24	—
EC21	—	EC23	—	EC25	—
HN137	—	HN15	—	HN173	—
HN360	—	HN44	—	HN48	—
JLP255	—	RN13	—	RN17	—

表 1（续）

宿主菌 Host bacteria	敏感性 Sensitivity	宿主菌 Host bacteria	敏感性 Sensitivity	宿主菌 Host bacteria	敏感性 Sensitivity
TW5-2	—	W139	—	W140	—
171	—	179	—	252	++
63	—	79*	++	89	—
DFH3	—	EC1	—	EC10	—
EC29	—	EC6	—	G105	—
HN175	—	HN187	—	HN25	—
HN52	++	HN55	++	HP13	—
RN18	+	RN19	+	RN20	+
W156	++	W157	—	W159	+
260	—	177	—	DF1	—
92(L)	—	92	—	EC16	—
EC12	—	EC14	—	G18	—
G129	—	G155	—	HN325	—
HN281	—	HN31	—	HP174	—
HP169	—	HP172	—	RN27	—
RN21	+	RN24	+		
W168	—	19BJ2DK15	—		

注：++：强裂解性；+：弱裂解性；—：无裂解性。
Note: ++: Strong lysis; +: Weak lysis; —: No lysis.

2.4 裂解性噬菌体最佳感染复数测定

如图 3 所示,当感染复数为 0.1 时,噬菌体效价最高,为 9.6×10^8 PFU/mL。结果表明,噬菌体 SDYTW1-F1-2-2 的最佳感染复数为 0.1。

2.5 裂解性噬菌体一步生长曲线

如图 4 所示,噬菌体 SDYTW1-F1-2-2 在感染宿主菌后的 50 min 以内效价没有明显变化,在 50~

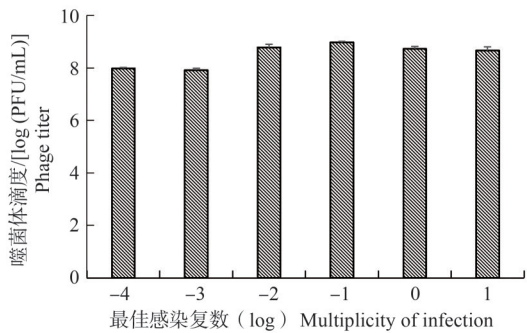


图 3 裂解性噬菌体 SDYTW1-F1-2-2 最佳感染复数
Fig. 3 Multiplicity of infection for lytic phage SDYTW1-F1-2-2

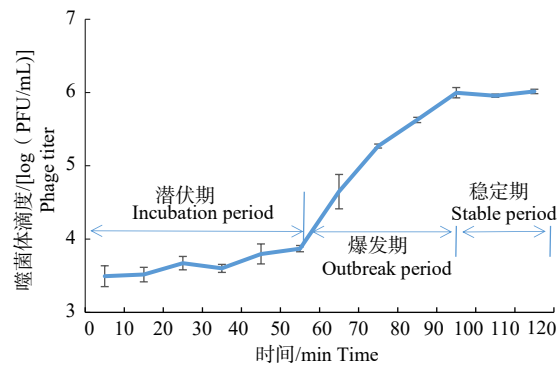


图 4 裂解性噬菌体 SDYTW1-F1-2-2 一步生长曲线
Fig. 4 One-step growth curve of lytic phage SDYTW1-F1-2-2

90 min 期间,噬菌体效价呈现快速升高趋势,随后趋于平稳进入稳定期,结果表明噬菌体潜伏期为 50 min,爆发期为 40 min,爆发量约为 (331 ± 31) PFU/cell。

2.6 裂解性噬菌体酸碱度稳定性及热稳定性

酸碱度稳定性如图 5(a)所示,噬菌体在 pH 为

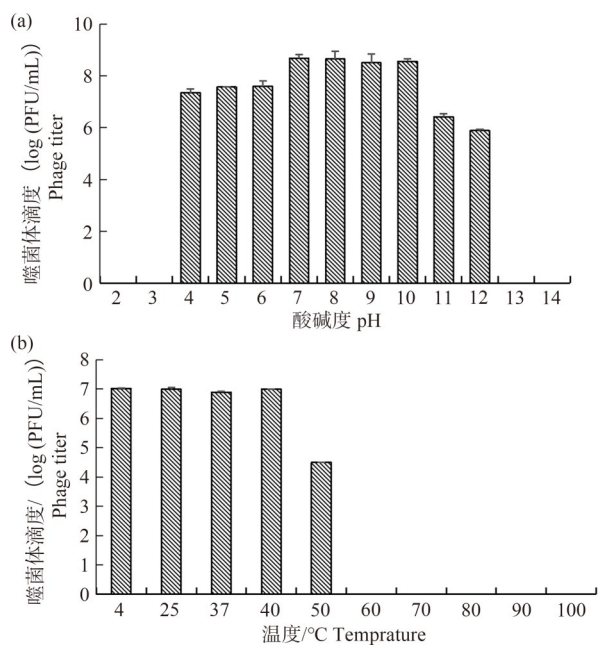


图5 裂解性噬菌体SDYTW1-F1-2-2 pH稳定性(a)和热稳定性(b)

Fig. 5 pH stability (a) and thermal stability (b) of lytic phage SDYTW1-F1-2-2

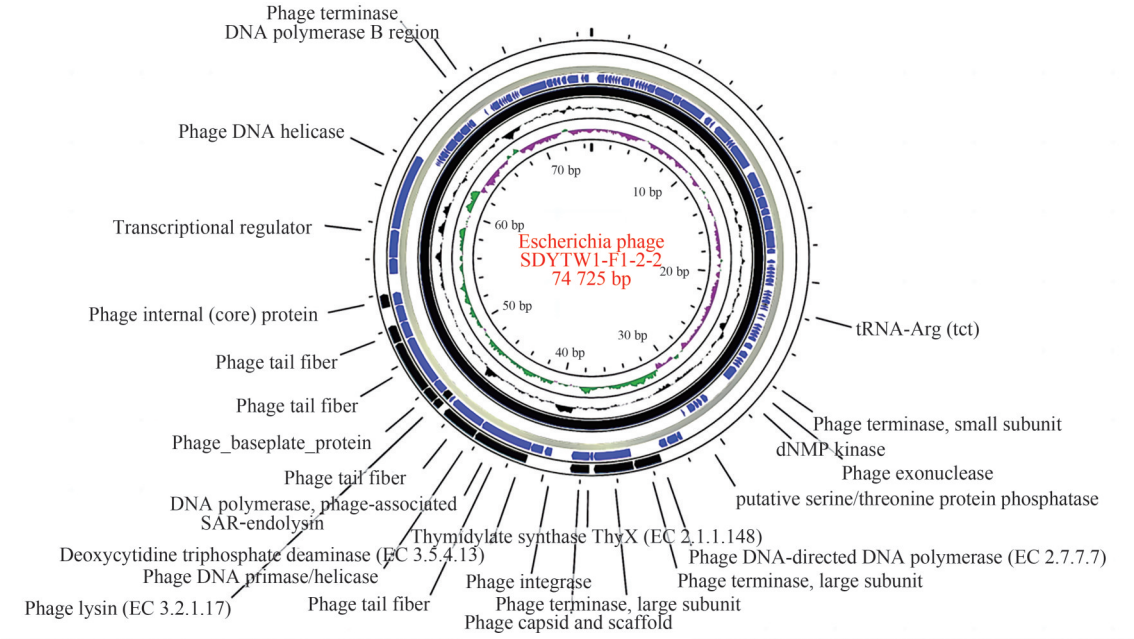
7~10时,噬菌体效价变化幅度最小,pH为4~6时,噬菌体效价下将约1 log,pH为10~12时,噬菌体效价下降超过2 log,当pH≥13或pH≤3时,噬菌体效

价为0。热稳定性如图5(b)所示,噬菌体在4~40℃条件下作用1 h噬菌体效价稳定。在50℃环境下作用1 h后效价下降明显,到60℃时噬菌体效价为0。结果表明噬菌体在pH为7~10,温度为4~40℃时噬菌体稳定性最好。

2.7 裂解性噬菌体基因组学分析

噬菌体SDYTW1-F1-2-2基因组全长74 752 bp, GC含量为42.1%,预测到121个编码蛋白(CDS), 45个CDS被注释为编码功能性蛋白,其中包含一个tRNA(tRNA-Arg-TCT)。噬菌体F1-2-2的注释蛋白被分为4个模板:结构组成模板、DNA复制代谢与调节模板、DNA包装模板和裂解模板。30个CDS负责结构组成模板;11个CDS负责DNA复制代谢与调节模板;2个CDS负责DNA包装模板;还有1个为Phage lysin负责噬菌体裂解模板。利用Proksee软件制作噬菌体SDYTW1-F1-2-2基因图谱(图6)。同时通过VFDB和CARD的筛查,全基因组中并未检测到如*stx-1*等毒力基因以及*mcr-1*等耐药基因存在。

基于噬菌体保守型结构区域的末端酶大亚基构建系统进化树,采用Genome-BLAST距离系统发育(GBDP)方法进行系统进化树绘制,通过



箭头方向表示每个基因组的转录方向。

The arrows indicate the direction of transcription of each gene.

图6 裂解性噬菌体SDYTW1-F1-2-2基因组图谱

Fig. 6 Genome map of lytic phage SDYTW1-F1-2-2

Blastn 发现噬菌体 SDYTW1-F1-2-2 与 NCBI 上发布的大肠杆菌噬菌体 1 721 相似度最高(序列号:NC_028903.1),相似度达 95.95%,其次是大肠杆菌噬菌体 pEC-N1203-2Af.1(序列号:OQ540978.1),相似度达 95.59%,最后是大肠杆菌噬菌体 NJ01(序列号 NC_028903.1),相似度达 94.95%。系统发育树分析如图 7(a)所示,噬菌体 SDYTW1-F1-2-2 与噬菌

体 1 721 噬菌体、pEC-N1203-2Af.1 以及噬菌体 NJ01 位于同一节点,均属于考多维里斯(Caudoviricetes)纲,库拉病毒(Kuravirus)属。如图 7(b)所示,其噬菌体均属于同一科。同时结合噬菌体 NCBI 比对,结果表明噬菌体 SDYTW1-F1-2-2 属于考多维里斯(Caudoviricetes)纲,库拉病毒(Kuravirus)属。



图7 基于裂解性噬菌体SDYTW1-F1-2-2末端酶大亚基构建同源系统进化树

Fig. 7 Homologous phylogenetic tree was constructed based on the large subunit of the terminal enzyme of the lytic bacteriophage SDYTW1-F1-2-2

通过 DNaseI、Rnase A 消化结果如图 8(a)所示,Mung Bean Nuclease 消化反应结果如图 8(b)所示,噬菌体 SDYTW1-F1-2-2 的核酸不能被 Rnase A 和 Mung Bean Nuclease 降解,而被 DNaseI 完全降解,结果表明噬菌体 SDYTW1-F1-2-2 为双链 DNA 噬菌体。

3 讨论

鸡大肠杆菌病是家禽养殖业中发病率最高、经济损失占比最大的疾病之一。在当前养殖业全面限抗的环境下,噬菌体凭借着高度特异性、无毒副作用以及不会产生药物残留等特点成为目前抗生

素替代品的热点产品之一^[23]。

分析裂解性噬菌体的生物特性对噬菌体的后续临床应用具有极其重要的指导作用。本研究分离到的裂解性噬菌体 SDYTW1-F1-2-2 在温度 4~50℃期间效价稳定,与廉乐乐^[24]分离的大肠杆菌噬菌体 Hab-EA 相比,该噬菌体拥有较好的温度稳定性。导致这种差异性的原因可能是由于噬菌体本身吸附蛋白或宿主自身对于温度耐受差异引起^[25]。此外,该噬菌体的酸碱耐受性也较强,较杨慧敏等^[26]分离的大肠杆菌噬菌体 Ecp5 可以在 pH 为 7~10 内保持稳定,该噬菌体却可以在 pH 为 4~12 期间保证活性。当 pH≤3 或者 pH≥13 时噬菌体则完全

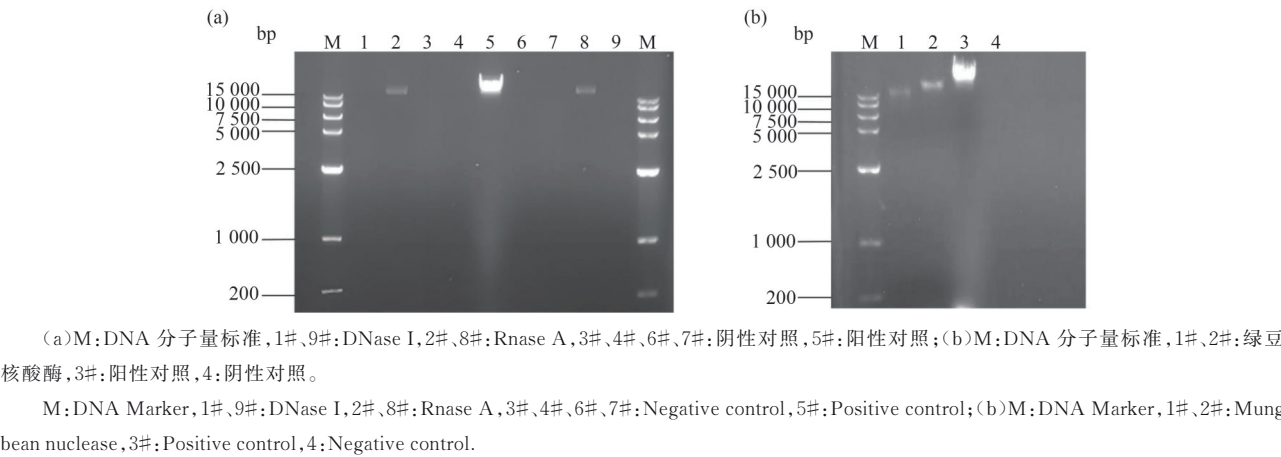


图8 裂解性噬菌体基因组鉴定

Fig. 8 The identification of the lytic phage genome

失活,证明了噬菌体不能耐受强酸与强碱的环境^[27]。噬菌体SDYTW1-F1-2-2在最佳感染复数为0.1时,噬菌体裂解期为40 min,爆发量为(331±9)PFU/cell,较Zhang等^[28]与Vera-Mansilla等^[29]分离的大肠杆菌相比,该噬菌体爆发量更大,可能在临床应用中展现出较佳的治疗效果。

将噬菌体序列上传至NCBI,其登录号:OR296290。通过全基因组注释分析,结构组成模块中的编码蛋白(尾部纤维蛋白)作为噬菌体尾部位纤维上的功能蛋白,负责噬菌体与细菌细胞表面的特异性结合,后通过尾部纤维顶部具有的可以穿透肽聚层的酶,直接将遗传物质释放到宿主细胞中,从而完成基因组注射;在DNA包装模块中存在的编码蛋白(末端酶大亚基与小亚基),末端酶作为双链DNA病毒包装过程中重要的功能性蛋白,其中小亚基决定了DNA包装的特异性,大亚基通过与结构组成模块中的编码蛋白(门户蛋白)结合,构成DNA包装所需的“马达”(五聚体),从而将DNA装入衣壳中^[30];裂解模块中的编码蛋白(裂解酶),作为噬菌体裂解细菌的相关蛋白,其主要作用是在噬菌体侵染后期通过破坏细胞壁而完成子代噬菌体释放^[31],以上均为噬菌体繁殖过程不可或缺的重要功能性蛋白。当前,除了针对噬菌体自身研究外,还针对其所编码的特殊蛋白质,如:噬菌体裂解酶和噬菌体解聚酶等,探索其单独使用或与其他药物联合使用时的抗菌效果^[32]。在噬菌体SDYTW1-F1-2-2中还发现了tRNA(tRNA-Arg-TCT)的存在。有研究表明,噬菌体本身携带tRNA可以有效地降低噬菌体对自身宿主菌tRNA的依赖性,在一

定程度上可以有效提高噬菌体的裂解能力,从而起到扩大裂解谱范围的作用^[33]。最后,在噬菌体基因组中也并未发现如*stx-1*等毒力基因以及*mcr-1*等耐药基因的存在,说明噬菌体SDYTW1-F1-2-2具有一定的安全性。

目前噬菌体在临床应用中存在诸多问题,如噬菌体裂解谱窄。本研究筛选到的裂解性噬菌体SDYTW1-F1-2-2裂解谱广,可有效裂解94株*mcr-1*大肠杆菌中的14株,具有良好的应用前景,有望替代抗生素来防控养殖场中含有耐药基因*mcr-1*大肠杆菌引起的细菌性感染。此外,对于噬菌体裂解谱窄的问题,未来可以将多株不同裂解谱的噬菌体混合,组成噬菌体鸡尾酒,以此来解决。对于噬菌体鸡尾酒的临床应用,可以采用饲料添加剂的形式进行治疗,也可以药剂的形式直接进行注射、饮水等^[34]。总而言之,噬菌体抗菌有着良好的应用前景。其独特的机制和潜在的治疗效果使其成为未来抗生素治疗的有力补充。随着技术的进步深入研究,相信噬菌体疗法将逐渐成为一种常规的治疗手段。

4 结 论

本研究成功从山东某养鸡场污水样品中分离出一株对耐黏菌素大肠杆菌有裂解作用的噬菌体SDYTW1-F1-2-2,该噬菌体属于考多维尔氏(Caudoviricetes)纲,库拉病(*Kuravirus*)属。该噬菌体热稳定性较好、酸碱度耐受范围广、安全性良好。本研究为后续开展针对耐药黏菌素大肠杆菌噬菌体治疗的研究奠定一定基础。

参考文献 References

- [1] Roth N, Käsbohrer A, Mayrhofer S, Zitz U, Hofacre C, Domig K J. The application of antibiotics in broiler production and the resulting antibiotic resistance in *Escherichia coli*: A global overview [J]. *Poultry Science*, 2019, 98(4): 1791-1804
- [2] Wang Y, Xu C Y, Zhang R, Chen Y Q, Shen Y B, Hu F P, Liu D J, Lu J Y, Guo Y, Xia X, Jiang J Y, Wang X Y, Fu Y L, Yang L, Wang J Y, Li J, Cai C, Yin D D, Che J, Fan R, Wang Y Q, Qing Y, Li Y, Liao K, Chen H, Zou M X, Liang L, Tang J, Shen Z Q, Wang S L, Yang X R, Wu C M, Xu S X, Walsh T R, Shen J Z. Changes in colistin resistance and *mcr-1* abundance in *Escherichia coli* of animal and human origins following the ban of colistin-positive additives in China: An epidemiological comparative study [J]. *The Lancet. Infectious Diseases*, 2020, 20(10): 1161-1171
- [3] Liu Y Y, Wang Y, Walsh T R, Yi L X, Zhang R, Spencer J, Doi Y, Tian G B, Dong B L, Huang X H, Yu L F, Gu D X, Ren H W, Chen X J, Lv L C, He D D, Zhou H W, Liang Z S, Liu J H, Shen J Z. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study [J]. *The Lancet. Infectious Diseases*, 2016, 16(2): 161-168
- [4] Zhang H, Zhao D, Quan J, Hua X, Yu Y. *mcr-1* facilitated selection of high-level colistin-resistant mutants in *Escherichia coli* [J]. *Clinical Microbiology and Infection*, 2019, 25(4): 517. e1-517. e4
- [5] Kortright K E, Chan B K, Koff J L, Turner P E. Phage therapy: A renewed approach to combat antibiotic-resistant bacteria [J]. *Cell Host & Microbe*, 2019, 25(2): 219-232
- [6] 吕金晖, 于诗筠, 喻鑫婷, 张雅倩, 崔玉军, 黄海龙, 米志强, 张加力. 大肠杆菌裂解性噬菌体生物学特性及其解聚酶活性验证 [J]. *中国兽医学报*, 2022, 42(12): 2394-2400
- Lv J H, Yu S J, Yu X T, Zhang Y Q, Cui Y J, Huang H L, Mi Z Q, Zhang J L. Biological characterization of *Escherichia coli* lytic phages and validation of their depolymerase activity [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2022, 42(12): 2394-2400 (in Chinese)
- [7] Vila J, Moreno-Morales J, Ballesté-Delpierre C. Current landscape in the discovery of novel antibacterial agents [J]. *Clinical Microbiology and Infection: the Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 2020, 26(5): 596-603
- [8] 刘畅, 刘教, 陈进, 王勉之, 熊文广, 曾振灵. 1株可裂解 *bla_{NDM-5}* 及 *mcr-1* 阳性大肠杆菌噬菌体的分离与生物学特性 [J]. *畜牧兽医学报*, 2022, 53(3): 857-866
- Liu C, Liu J, Chen J, Wang M Z, Xiong W G, Zeng Z L. Isolation and biological characteristics of a bacteriophage capable of lysing *bla_{NDM-5}* and *mcr-1* positive *Escherichia coli* [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2022, 53(3): 857-866 (in Chinese)
- [9] 钟希娜, 何涛, 葛展霞, 王冉. 一种对 *mcr-1* 阳性大肠杆菌具有裂解作用的噬菌体生物学特性 [J]. *江苏农业学报*, 2018, 34(2): 452-458
- Zhong X N, He T, Ge Z X, Wang R. Characterization of a lytic bacteriophage infecting *mcr-1*-positive *Escherichia coli* [J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2018, 34(2): 452-458 (in Chinese)
- [10] Phuadraksa T, Wichit S, Arikitt S, Songtawee N, Yainoy S. Co-occurrence of *mcr-2* and *mcr-3* genes on chromosome of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from healthy individuals in Thailand [J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2022, 60(4): 106662
- [11] Porter J, Anderson J, Carter L, Donjacour E, Paros M. *In vitro* evaluation of a novel bacteriophage cocktail as a preventative for bovine coliform mastitis [J]. *Journal of Dairy Science*, 2016, 99(3): 2053-2062
- [12] 陈松建, 王书伟, 张改, 李振江, 李亚辉, 王山梅, 王中全, 靳静. 超广谱 β -内酰胺酶肺炎克雷伯菌噬菌体 F20 的分离鉴定及其对小鼠败血症治疗效果 [J]. *微生物学通报*, 2019, 46(6): 1502-1509
- Chen S J, Wang S W, Zhang G, Li Z J, Li Y H, Wang S M, Wang Z Q, Jin J. Characterization and application of a novel phage F20 in the rescue septicemia mice caused by extended spectrum beta-lactamases-producing *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Microbiology China*, 2019, 46(6): 1502-1509 (in Chinese)
- [13] 葛龙, 贺永超, 董强, 郑倩, 于凌云, 潘强. 噬菌体制剂对肉鸡生长性能、肠道菌群及免疫功能的影响 [J]. *饲料研究*, 2020, 43(4): 111-115
- Ge L, He Y C, Dong Q, Zheng Q, Yu L Y, Pan Q. Effect of bacteriophage preparation on growth performance, intestinal flora and immune organs of broilers [J]. *Feed Research*, 2020, 43(4): 111-115 (in Chinese)
- [14] 王君雁, 范秋丽, 兰瑞霞, 蒋守群. 噬菌体制剂在家禽生产中的应用及安全性评价 [J]. *动物营养学报*, 2022, 34(12): 7555-7563
- Wang J Y, Fan Q L, Lan R X, Jiang S Q. Application and safety evaluation of phage preparation in poultry production [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2022, 34(12): 7555-7563 (in Chinese)
- [15] Viazis S, Akhtar M, Feirtag J, Brabban A D, Diez-Gonzalez F. Isolation and characterization of lytic bacteriophages against enterohaemorrhagic *Escherichia coli* [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2011, 110(5): 1323-1331
- [16] Yu P F, Mathieu J, Li M Y, Dai Z Y, Alvarez P J J. Isolation of polyvalent bacteriophages by sequential multiple-host approaches [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 82(3): 808-815
- [17] Ding T Y, Sun H Z, Pan Q, Zhao F, Y Zhang Z Z, Ren H Y. Isolation and characterization of vibrio parahaemolyticus bacteriophage vB_VpaS_PG07 [J]. *Virus Research*, 2020, 286: 198080
- [18] Lefort V, Desper R, Gascuel O. FastME 2.0: A comprehensive, accurate, and fast distance-based phylogeny inference program [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2015, 32(10): 2798-2800
- [19] Meier-Kolthoff J P, Auch A F, Klenk H P, Göker M. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions [J]. *BMC Bioinformatics*, 2013, 14: 60
- [20] Meier-Kolthoff J P, Göker M. VICTOR: Genome-based phylogeny and classification of prokaryotic viruses [J]. *Bioinformatics*, 2017, 33(21): 3396-3404
- [21] Liu B, Zheng D D, Zhou S Y, Chen L H, Yang J. VFDB 2022: A general classification scheme for bacterial virulence factors [J]. *Nucleic Acids Research*, 2022, 50(D1): D912-D917
- [22] Alcock B P, Raphenya A R, Lau T T Y, Tsang K K, Bouchard M, Edalatmand A, Huynh W, Nguyen A L V, Cheng A A, Liu S H, Min S Y, Miroshnichenko A, Tran H K, Werfalli R E, Nasir J A, Oloni M, Speicher D J, Florescu A, Singh B, Faltyn M, Hernandez-Koutoucheva A, Sharma A N, Bordeleau E, Pawlowski A C, Zubyk H L, Dooley D, Griffiths E, Maguire F, Winsor G L, Beiko R G, Brinkman F S L, Hsiao W W L, Domselaar G V, McArthur A G. CARD 2020: Antibiotic resistance surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database [J]. *Nucleic Acids Research*, 2020, 48(D1): D517-D525
- [23] Ghosh C, Sarkar P, Issa R, Haldar J. Alternatives to conventional antibiotics in the era of antimicrobial resistance [J]. *Trends in Microbiology*, 2019, 27(4): 323-338

- [24] 廉乐乐. 大肠杆菌噬菌体的分离鉴定与初步应用[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2017
- Lian L L. Isolation, identification and preliminary application of *E. coli* *E. coli* bacteriophage[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2017 (in Chinese)
- [25] 钟文诗, 宋鹏, 王佳, 史晓洁, 张国梁, 任慧英. 驴源大肠杆菌噬菌体的分离鉴定与生物学特性研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2020(17): 92-95, 98
- Zhong W S, Song P, Wang J, Shi X J, Zhang G L, Ren H Y. Isolation, identification and biological characteristics of *Escherichia coli* phage from donkey[J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2020 (17): 92-95, 98 (in Chinese)
- [26] 杨慧敏, 吴圆圆, 屈勇刚, 谢静怡, 于会举, 宋敏, 任敏. 一株鸡致病性大肠杆菌裂解性噬菌体的生物学特性及其对肠道菌群影响分析[J]. 中国家禽, 2018, 40(23): 18-22
- Yang H M, Wu Y Y, Qu Y G, Xie J Y, Yu H J, Song M, Ren M. Biological characteristics of a chicken pathogenic *Escherichia coli* lytic phage and its effect on intestinal flora [J]. *Chinese Poultry*, 2018, 40 (23): 18-22 (in Chinese)
- [27] Dion M B, Oechslin F, Moineau S. Phage diversity, genomics and phylogeny[J]. *Nature Reviews. Microbiology*, 2020, 18(3): 125-138
- [28] Zhang C, Li W L, Liu W H, Zou L, Yan C, Lu K, Ren H Y. T4-like phage Bp7, a potential antimicrobial agent for controlling drug-resistant *Escherichia coli* in chickens[J]. *Applied And Environmental Microbiology*, 2013, 79(18): 5559-5565
- [29] Vera-Mansilla J, Sánchez P, Silva-Valenzuela C A, Molina-Quiroz R C. Isolation and characterization of novel lytic phages infecting multidrug-resistant *Escherichia coli* [J]. *Microbiology Spectrum*, 2020, 10(1): e0167821
- [30] 杨娇, 钟佑宏, 彭朴仙, 刘攀, 王鹏, 王磊. 首株分离自云南元谋猫的鼠疫噬菌体裂解谱及基因组学特性研究[J]. 疾病监测, 2022, 37(9): 1159-1164
- Yang J, Zhong Y H, Peng P X, Liu P, Wang P, Wang L. Study on the splitting spectrum and genomic characteristics of the first *Yersinia pestis* phage isolated from Yuanmou cat in Yunnan Province [J]. *Disease Surveillance*, 2022, 37(9): 1159-1164 (in Chinese)
- [31] Kim S, Lee D W, J in J S, Kim J. Antimicrobial activity of LysSS, a novel phage endolysin, against *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 2020, 22: 32-39
- [32] Linden S B, Alreja A B, Nelson D C. Application of bacteriophage-derived endolysins to combat streptococcal disease: Current state and perspectives[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2021, 68: 213-220
- [33] Yoshikawa G, Askora A, Blanc-Mathieu R, Kawasaki T, Li Y Z, Nakano M, Ogata H, Yamada T. *Xanthomonas citri* jumbo phage XacN1 exhibits a wide host range and high complement of tRNA genes [J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 4486
- [34] 杭柏林, 程舒畅, 刘保国. 噬菌体在动物养殖中的应用[J]. 广东饲料, 2023, 32(5): 35-39
- Hang B L, Cheng S C, Liu B G. Application of phage in animal breeding [J]. *Guangdong Feed*, 2023, 32(5): 35-39 (in Chinese)

责任编辑: 秦梅



第一作者简介:贾旭晨, 本科毕业于扬州大学, 硕士就读于新疆农业大学。主要研究方向为噬菌体分离鉴定及生物学活性测定, 本人在读研期间一直秉持着对科研的热情和期待, 具有很强的团队合作意识, 希望能在探索生命的过程中充分发挥自己的价值。



通讯作者简介:郝智慧, 教授, 主要从事中兽药药理学与毒理学、中兽药现代化、新兽药创制和兽医公共卫生相关研究工作。担任农业部新兽药审评委员会委员、农业部耐药性监控与残留委员会委员、农业部兽药典委员会委员、农业部中药材专家指导组成员。兼任中国畜牧兽医学会兽医药理毒理学分会副秘书长、中国畜牧兽医学会动物药品学分会常务理事、中国畜牧兽医学会兽医食品卫生学会常务理事、中国畜牧兽医学会动物毒理学分会秘书长兼委员、中国兽医协会中兽医学分会副会长。主持或参与科研项目40余项, 包括国家重点研发计划、国家948计划项目、国家十四五支撑计划、国际合作交流专项、国家自然科学基金项目、农业部公益性行业专项项目等, 在 *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *Toxicology and Applied Pharmacology*, *Phytotherapy Research*, *Pharmaceutical Research* 等国内外期刊杂志发表论文130余篇, 获得授权发明专利51项, 其中第一发明人44项, 4项实用新型专利; 主编(译)或副主编、参编《小动物毒理学》《山东省药用植物志》等著作18部; 主导开展了包括3个国家一类新中兽药(紫锥菊药材及其散、末)在内的37个新兽药的研制, 已获批22个新兽药并转化应用, 填补了国内空白, 取得了较好的经济和社会、生态效益; 主持和作为主要完成人获颁布的国家标准和地方标准27项, 其中制订新兽药产品标准22项, 陆续被收录到2010版、2015版《中国兽药典》中; 获得各类科研奖励14项, 其中省部级以上奖励5项; 获得软件著作权20项。