

一株屎肠球菌烈性噬菌体的分离鉴定及基因组测序分析

曹海玲, 张澳晴, 王麒睿, 郑可向, 宋国森, 张兴林, 马俊飞*

临沂大学农林科学学院, 山东 临沂 276000

曹海玲, 张澳晴, 王麒睿, 郑可向, 宋国森, 张兴林, 马俊飞. 一株屎肠球菌烈性噬菌体的分离鉴定及基因组测序分析[J]. 微生物学通报, 2023, 50(11): 5084-5096.

CAO Hailing, ZHANG Aoqing, WANG Qirui, ZHENG Kexiang, SONG Guosen, ZHANG Xinglin, MA Junfei. Isolation, identification and genome sequencing of a virulent phage infecting *Enterococcus faecium*[J]. Microbiology China, 2023, 50(11): 5084-5096.

摘要:【背景】屎肠球菌为 ESKAPE (由屎肠球菌、金黄色葡萄球菌、肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌、铜绿假单胞菌和肠杆菌属六大超级细菌的拉丁学名首字母组成)病原体之一, 对多种抗菌药物具有耐药性, 严重威胁全球人类健康, 被世界卫生组织列入亟须研发新抗菌药的病原体名单。

【目的】分离针对屎肠球菌的烈性噬菌体, 测定其基本生物学特性并进行基因组测序分析, 为屎肠球菌噬菌体疗法提供原料。【方法】从牧场污水中分离筛选出一株烈性屎肠球菌噬菌体, 命名为 *Enterococcus phage 1A11*, 通过透射电镜观察噬菌体的形态, 测定其最佳感染复数、一步生长曲线和裂解谱, 并进行全基因组的测序和分析, 以阐释该噬菌体的基本生物学特性。【结果】电镜下可观察到屎肠球菌噬菌体 1A11 具有典型的正二十面体头部结构和较长的尾部结构, 属于有尾病毒目长尾病毒科, 而且测得其最佳感染复数为 0.01, 裂解周期为 70 min, 潜伏期为 30 min, 暴发期为 40 min, 并特异性地对部分屎肠球菌产生裂解作用。噬菌体 1A11 的基因组大小为 42 750 bp, GC 含量为 34.71%, 含有 70 个推定的开放阅读框(open reading frame, ORF), 不含抗生素抗性基因和毒力基因, 可作为屎肠球菌噬菌体疗法的原料。【结论】本研究分离到一株新的屎肠球菌噬菌体 1A11, 具有一定的研究价值和应用潜力, 为屎肠球菌噬菌体疗法研究奠定了基础。

关键词: 噬菌体; 屎肠球菌; 生物学特性; 全基因组测序

资助项目: 临沂大学大学生创新创业训练计划(S202210452002)

This work was supported by the Innovation and Entrepreneurship Training Program of Linyi University Students (S202210452002).

*Corresponding author. E-mail: majunfei@lyu.edu.cn

Received: 2023-03-18; Accepted: 2023-04-22; Published online: 2023-06-16

Isolation, identification and genome sequencing of a virulent phage infecting *Enterococcus faecium*

CAO Hailing, ZHANG Aoqing, WANG Qirui, ZHENG Kexiang, SONG Guosen, ZHANG Xinglin, MA Junfei*

College of Agriculture and Forestry, Linyi University, Linyi 276000, Shandong, China

Abstract: [Background] *Enterococcus faecium* is one of ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Enterobacter* species) pathogens. Due to the resistance to a variety of antimicrobial agents, *E. faecium* seriously threatens human health and is included in the WHO priority pathogens list for R&D of new antibiotics. [Objective] To isolate, characterize, and sequence the genome of the virulent phage against *E. faecium*, so as to provide raw materials for the phage therapy of *E. faecium*. [Methods] A phage strain 1A11 against *E. faecium* was isolated from pasture sewage. The phage was observed in a transmission electron microscope, and its optimal multiplicity of infection, one-step growth curve, and lysis spectrum were determined. The biological characteristics of the strain were analyzed and the whole genome was sequenced. [Results] *E. faecium* phage 1A11 had a typical icosahedral head and a long tail, belonging to the Siphoviridae of the Caudovirales. The strain showed the optimum multiplicity of infection of 0.01, a lysis cycle of 70 min, an incubation period of 30 min, and an outbreak period of 40 min. It exerted specific lysis effects on several strains of *E. faecium*. Phage 1A11 had a genome of 42 750 bp with the GC content of 34.71%, 70 putative open reading frames (ORFs), and no antibiotic resistance genes or virulence genes. It can be used for the phage therapy of *E. faecium*. [Conclusion] A new strain of *E. faecium* phage 1A11 was isolated, which has certain research value and application potential, and laid a foundation for the study of *E. faecium* phage therapy.

Keywords: phage; *Enterococcus faecium*; biological characteristics; whole genome sequencing

屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)属于革兰氏阳性菌,具有耐药、耐酸、耐胆盐和耐热等特性,其共生于人类下消化道、口腔和阴道等部位,并在土壤、水体和动植物中广泛分布^[1-4]。粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)和屎肠球菌是肠球菌属细菌中最常见的两种细菌,均可导致院内感染,其中引起院内感染的肠球菌主要是粪肠球菌,其次是屎肠球菌,但屎肠球菌获得和表达抗生素耐药性基因的几率却更高^[3-5]。肠球菌为条件致病菌,通常不会对宿主产生不

利影响,但当肠球菌获得毒力因子和高水平抗生素耐药性时,则容易引起宿主感染^[1,6]。屎肠球菌主要感染免疫功能低下的患者,特别是重症监护、烧伤、肿瘤和器官移植的患者,易引起较高的发病率和死亡率,常见疾病有心内膜炎、腹部脓肿、菌血症和尿路感染等^[4,6-7]。江苏省扬子江沿岸曾发生有关屎肠球菌引起人类和猪相关败血症暴发的疫情,不仅对畜牧业造成沉重打击,还严重危害了公共卫生安全^[8]。屎肠球菌具有固有耐药性和获得耐药性,它快

速获得抗生素抗性基因来抵抗多种抗生素的能力增加了治疗感染的难度,因此需要寻找一种抗生素替代疗法,以避免将来处于无药可医的地步^[4,9]。

噬菌体(bacteriophage)是一种能够侵染细菌等原核微生物的病毒,是地球上最丰富和最普遍的生物^[10-11]。噬菌体具有许多优点:高度特异性;作用部位集中专一;能在体内稳定存在,且不影响正常微生物群落;对于哺乳动物有一定的安全性;能产生变异来对抗细菌耐药性;分布广,高效廉价;可自我复制到一定滴度,生产成本相对更低;在噬菌体-抗生素组合、噬菌体衍生酶和噬菌体生物工程等方面有多重可能性^[10,12-14]。噬菌体作为抗菌剂已经使用了一个多世纪^[15]。在20世纪20年代,噬菌体疗法被广泛应用于印度霍乱、淋巴腺鼠疫及苏联东欧数百项噬菌体疗法的研究^[16]。直到有效化学抗生素的出现致使人们将更多的注意力转向对抗生素的研究。现如今新抗生素的产生滞缓,而多重耐药病原菌不断进化,迫使人们重新关注噬菌体疗法^[15]。噬菌体实际应用的前提是对噬菌体本身有足够详细的了解,而国内有关屎肠球菌噬菌体的研究尚有不足。本研究以屎肠球菌为宿主菌,从牧场污水中分离一株烈性噬菌体,并对其进行生物学特性及全基因组分析,以期噬菌体疗法防控屎肠球菌感染奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株及来源

研究所用的菌株包括屎肠球菌 E1039、E1162、E0679、E1071、E1623、粪肠球菌 V583、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC 27660 和大肠杆菌(*Escherichia coli*) ATCC 25922,

由临沂大学微生物与宿主健康研究所保藏。

1.1.2 培养基

脑心浸液(brain-heart infusion, BHI)肉汤(g/L):胰蛋白胨 10.0,牛心浸粉 17.5,氯化钠 5.0,葡萄糖 2.0, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.5。BHI 半固体琼脂: BHI 肉汤, 5 g/L 琼脂粉; BHI 固体琼脂: BHI 肉汤, 15 g/L 琼脂粉。

1.1.3 主要试剂和仪器

无菌溶液(sterile solution, SM)缓冲液,生工生物工程(上海)股份有限公司; PEG-8000、CsCl、氯仿和磷钨酸,阿拉丁生化科技股份有限公司;病毒核酸提取试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司。透射电子显微镜, Philips-FEI 公司;超速离心机, Beckman 公司; 0.22 μm 过滤器, MilliPore 公司。

1.2 噬菌体的分离纯化

将采集的牧场污水在 4 °C、5 000 r/min 条件下离心 10 min 后,取上清液用 0.22 μm 过滤器过滤,将滤液置于 4 °C 冰箱保存备用。将滤液与 1.0 mL 屎肠球菌悬液加入 100.0 mL BHI 液体培养基中,37 °C、200 r/min 振荡培养过夜。取 1.0 mL 混合培养液经 12 000 r/min 离心 5 min 后,使用 0.22 μm 过滤器过滤获得噬菌体初液。噬菌体初液与宿主菌 E1039 悬液混合,静置 10 min 后,将混合液加入 BHI 半固体培养基混匀,铺在下层 BHI 固体培养基上,待上层 BHI 半固体培养基凝固后,倒置于 37 °C 温箱中培养过夜,次日观察是否出现噬菌斑。挑取清透明亮、边缘清晰、大小均一的单个噬菌斑加入 BHI 液体培养基中,并与 100 μL 宿主菌混合,37 °C、200 r/min 培养获得澄清透明培养液。重复操作 3-5 次,得到纯化的噬菌体。

1.3 最佳感染复数的测定

噬菌体的最佳感染复数是指噬菌体与宿主菌按照不同的比例混合来进行噬菌体的扩增所

测定的最高噬菌体效价的比例^[17]。

将屎肠球菌 E1039 培养至对数生长中期 (OD_{600} 约为 0.7), 测定细菌浓度, 将其调整为 2×10^8 CFU/mL。将噬菌体按照感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 为 100、10、1、0.1、0.01 和 0.001 的比例进行梯度稀释后, 分别与屎肠球菌 E1039 混合加入 BHI 液体培养基, 37 °C、200 r/min 振荡培养 6 h。用双层平板法测定不同比例混合液中噬菌体的效价, 获得最高效价的混合比例即为噬菌体的最佳感染复数。

1.4 一步生长曲线的测定

取 1.0 mL 培养至对数生长中期 (OD_{600} 约为 0.7) 的屎肠球菌 E1039, 在 4 °C、5 000 r/min 条件下离心 10 min 后弃去上清液, 用 1.0 mL 无菌 BHI 培养液将沉淀重悬。按照最佳 MOI=0.01 加入噬菌体后, 在 37 °C 恒温箱静置 10 min, 然后 12 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液, 用 5 mL 无菌 BHI 培养液将沉淀重悬, 于 37 °C、200 r/min 振荡培养。每隔 10 min 取出 50 μ L 培养液进行噬菌体滴度的测定, 每个时间点做 3 次平行试验, 取平均值。以取样时间、噬菌体滴度的对数分别作为横、纵坐标绘制屎肠球菌噬菌体的一步生长曲线。

1.5 透射电镜观察

将纯化的噬菌体进行大量繁殖, 在 PEG-8000 的作用下形成沉淀, 4 °C 过夜后, 12 000 r/min 离心 10 min 弃去上清液, 再用 2 mL SM 缓冲液重悬沉淀, 然后加入等体积的氯仿抽提, 即得到噬菌体浓缩液。将噬菌体浓缩液缓慢加入 CsCl 梯度液后离心处理, 再用注射器收集噬菌体浓缩液, 然后转入磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffered saline, PBS) 透析过夜, 即获得纯化的噬菌体颗粒。使用磷钨酸负染法对获得的样品进行染色, 15 min 后, 于 80 kV 条件下的透射电

子显微镜中进行观察和记录。

1.6 噬菌体 1A11 的基因组测序及分析

对噬菌体 1A11 进行扩增和浓缩, 按照病毒核酸提取试剂盒说明书提取噬菌体核酸, 送至上海派森诺公司进行全基因组测序, 全基因组测序上机及数据分析参考 Han 等^[18]的方法。基因组数据已上传至国家微生物科学数据中心, 编号为 NMDC60046433。使用 BRIG 软件对相似基因组进行比对分析。

1.7 构建系统发育树

基于相对保守的噬菌体末端酶大亚基序列, 对噬菌体 1A11 与多株其他屎肠球菌噬菌体进行系统发育树分析, 使用 MAFFT version 7 (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) 和 MEGA11.0 对序列进行分析并构建系统发育树。

1.8 裂解谱的测定

以点滴法对噬菌体 1A11 进行裂解谱的初步测定, 对存在点滴斑的菌株用双层平板法进一步验证, 出现噬菌斑的菌株最终认定为裂解阳性。每组试验平行重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 噬菌体的分离鉴定与透射电镜观察

以屎肠球菌 E1039 为宿主菌, 在牧场污水中分离并纯化到一株烈性屎肠球菌噬菌体, 利用双层平板法对噬菌体进行纯化, 直至平板上出现清透明亮、边缘光滑、大小均一的噬菌斑, 即得到了纯化单一的噬菌体, 将其命名为 *Enterococcus* phage 1A11。如图 1A 所示, 培养皿中的噬菌体 1A11 形成清晰透亮的圆形噬菌斑。透射电子显微镜下观察到噬菌体 1A11 (图 1B), 其具有典型的正二十面体头部结构和较长的尾部结构, 头部直径约为 37.5 nm, 尾长约 150 nm。根据形态特点分析, 噬菌体 1A11 属于有尾病毒目长尾病毒科。

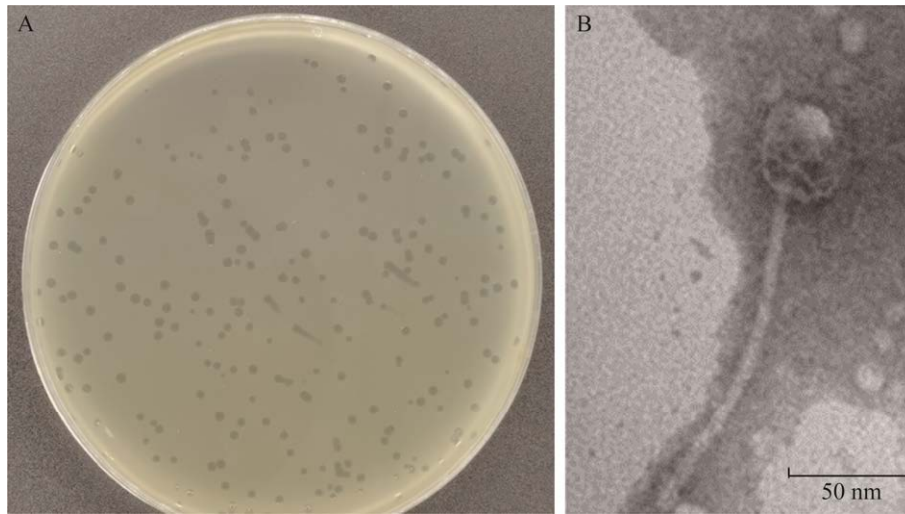


图1 噬菌体 1A11 所形成的噬菌斑(A)及在透射电镜下的噬菌体形态(10 000×) (B)

Figure 1 Plaques formed by phage 1A11 (A) and morphology of phage 1A11 by transmission electron microscope (TEM, 10 000×) (B).

2.2 最佳感染复数

如表 1 所示,将噬菌体与宿主菌按照 100、10、1、0.1、0.01 和 0.001 的比例培养 6 h 后,用双层平板法测定噬菌体 1A11 的滴度。当 MOI=0.01 时,噬菌体 1A11 的滴度最高,可达 2.3×10^9 PFU/mL,即噬菌体 1A11 的最佳感染复数为 0.01。

2.3 一步生长曲线

在 MOI=0.01 的条件下,测定噬菌体 1A11 的一步生长曲线。结果显示 30 min 内噬菌体滴度变化不明显,30–70 min 内噬菌体滴度明显

快速增加,70 min 后噬菌体滴度趋于平稳,进入平台期。说明噬菌体 1A11 的潜伏期约为 30 min,暴发期约为 40 min,一个裂解周期约为 70 min (图 2)。

2.4 基因组测序及结果分析

对噬菌体 1A11 的全基因组进行测序和比较基因组分析(图 3),结果表明,噬菌体 1A11 的基因组是一条环状双链 DNA 分子,其基因

表 1 噬菌体 1A11 的最佳感染复数测定

Table 1 Determination of optimal multiplicity of infection (MOI) of the phage 1A11

编号 No.	细菌浓度 Bacteria (CFU/mL)	噬菌体浓度 Phage (PFU/mL)	感染复数 MOI	6 h 滴度 6 h titer (PFU/mL)
1	2×10^8	2×10^{10}	100	3.4×10^7
2	2×10^8	2×10^9	10	6.3×10^7
3	2×10^8	2×10^8	1	2.3×10^8
4	2×10^8	2×10^7	0.1	7.0×10^8
5	2×10^8	2×10^6	0.01	2.3×10^9
6	2×10^8	2×10^5	0.001	1.3×10^8

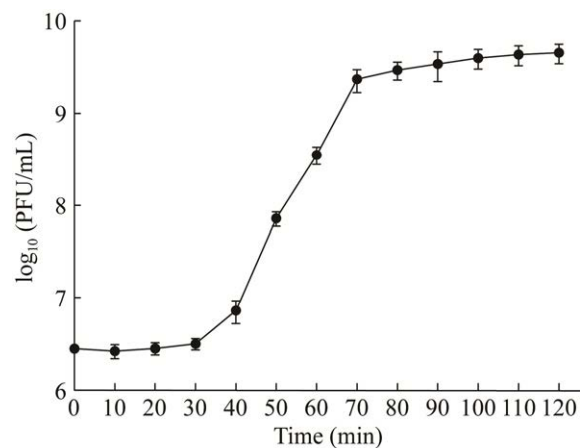


图2 噬菌体 1A11 的一步生长曲线

Figure 2 One-step growth curve of the phage 1A11.

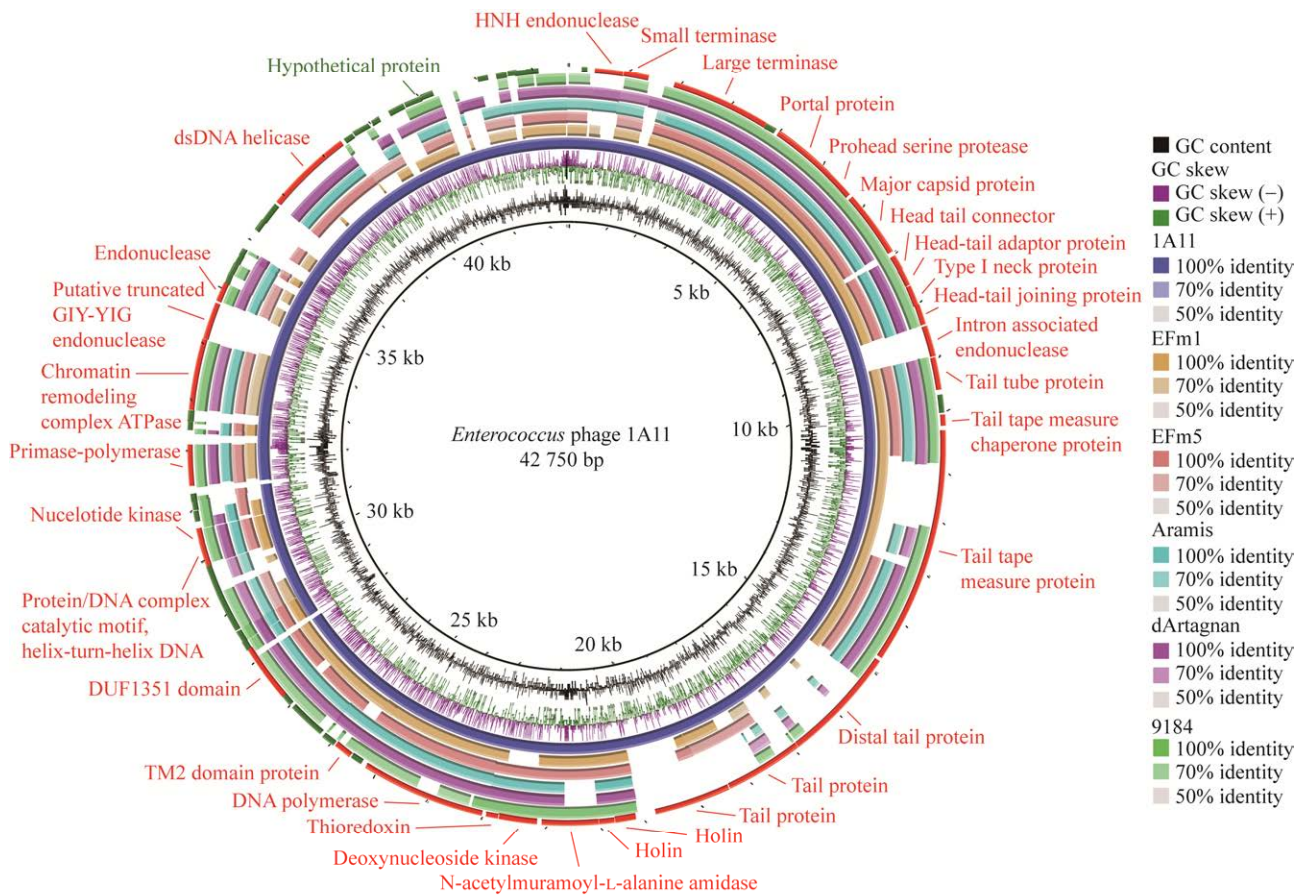


图3 噬菌体 1A11 的全基因组分析 最内侧黑圈表示基因组的大小和标识;带有波峰的黑圈表示 GC 含量: 峰值向外(内)表示该区域 GC 含量高(低)于全基因组平均的 GC 含量, 峰值越高, 与平均 GC 含量差值越大; 带有波峰的紫绿色圆圈表示 GC-skew [$GC \text{ 偏移}, GC \text{ skew}=(G-C)/(G+C)$], 绿色代表 GC-skew 大于 0, 紫色代表 GC-skew 小于 0, 可用于判断环状 DNA 的复制起点; 深蓝色圆圈代表 1A11 的基因组序列; 橙色、粉色、天蓝色、玫红色、青色的 5 个圆圈分别代表 5 种相似肠球菌噬菌体 IME-EFm1、IME-EFm5、Aramis、dArtagnan 和 9184 的基因组序列(颜色深浅表示基因的一致性程度); 最外侧圆圈为基因注释(红色为已注释蛋白, 绿色为假定蛋白)

Figure 3 Whole genome analysis of phage 1A11. The innermost black circle represents the size and identity of the genome; The black circle with peak indicates GC content: The outward (inward) peak indicates that the GC content in this region is high (low) than the average GC content in the whole genome; The higher the peak is, the larger the difference from the average GC content would be; A violet-green circle with a peak indicates GC-skew ($GC \text{ skew}=(G-C)/(G+C)$), green indicates that GC-skew is greater than 0, and purple indicates that GC-skew is less than 0, which could be used to determine the origin of replication of cyclic DNA; The dark blue circle represents the genomic sequence of 1A11; The five circles of orange, pink, sky blue, rose red and cyan respectively represent the genomic sequences of five similar *Enterococcus* bacteriophage IME-EFm1, IME-EFm5, Aramis, dArtagnan and 9184 (the color shades indicate the degree of gene identity); The outermost circle is the gene annotation (red for annotated proteins and green for hypothetical proteins).

组大小为 42 750 bp, GC 含量为 34.71%。通过 BLAST 数据分析, 噬菌体 1A11 含有 70 个推定的开放阅读框(open reading frame, ORF), 其中 32 个 ORF 的功能已被注释, 注释率约为 45.71% (32/70), 有 37 个 ORF 的功能被注释为假定蛋白(hypothetical protein), 还有 1 个独特的 ORF45 未比对到同源的蛋白质序列。该噬菌体的 CDS 核酸序列长度在 93–4 317 bp 之间, 全部的 ORF 共含 38 568 bp 的碱基, 基因组中基因密度可达到约 90.2%。

通过比较基因组分析, 该噬菌体的全基因组序列与屎肠球菌噬菌体 IME-EFm1、IME-EFm5 等的基因组有较高的相似性: 与 IME-EFm1 有 89%的相似性; 与 IME-EFm5 有 92%的相似性, 且 1A11 的基因组与现有任一肠球菌噬菌体的差异都在 5%以上, 确认其为一种新的肠球菌噬菌体。

2.5 开放阅读框功能预测

通过 BLASTp 蛋白序列分析, 噬菌体 1A11 的 70 个 ORF (表 2)中具有与噬菌体结构和结构组装、DNA 复制和调控、穿孔素和裂解酶等有关的基因, 不含抗生素抗性基因和毒力基因, 不会造成跨物种的基因转移, 具有用于屎肠球菌噬菌体治疗的潜在价值。

噬菌体的结构蛋白基因和噬菌体衣壳组装过程相关基因中, ORF3 编码终止酶小亚基, 与识别噬菌体基因组中包装起始位点有关; ORF4 编码终止酶大亚基, 大亚基具有核酸内切酶结构域和 ATP 酶结构域, 可为 DNA 包装反应提供动力; ORF6 编码门户蛋白, 是衣壳蛋白的组成成分, 与噬菌体的成熟和侵入有关; ORF7 编码前头部丝氨酸蛋白酶, 通过切割支架蛋白参与噬菌体前头部蛋白的成熟; ORF8 为编码噬菌体主要衣壳蛋白的基因; ORF9、ORF10 和 ORF12 编码头尾衔接相关蛋白; ORF11 编码 I 型颈部蛋白; ORF14–ORF20 编码噬菌体尾部相关蛋白。

噬菌体 DNA 复制和调控相关基因中, ORF25 编码脱氧核苷激酶, 是脱氧核苷酸生物合成补救途径中的关键酶; ORF27 编码 DNA 聚合酶; ORF39 编码蛋白质/DNA 复合物催化基序的蛋白质参与许多过程, 其中包括 DNA 的修复、RNA 代谢和蛋白质-蛋白质相互作用; ORF40 编码核苷酸激酶。ORF44 编码引物酶聚合酶; ORF48 编码 ATP 依赖性染色质重塑复合物, 能利用 ATP 水解的能量通过重新定位、组装、动员和重组核小体来改变染色质结构; ORF58 编码 dsDNA 解旋酶。此外, 还有一些

表 2 噬菌体 1A11 的 ORF 功能预测

Table 2 ORF analysis of the 1A11 genome

ORF	Start-End	Top BLAST hit	Identity (%) (aa)	E value	Accession No.
1	264–377	Hypothetical protein DAR_1 (<i>Enterococcus</i> phage dArtagnan)	92 (34/37)	2.00E–15	CAD7767745.1
2	507–1 022	HNH endonuclease (<i>Enterococcus</i> phage Aramis)	78 (133/171)	2.00E–91	CAD7757451.1
3	1 026–1 484	TPA: Terminase small subunit (<i>Caudoviricetes</i> sp.)	97 (147/152)	2.00E–103	DAM42399.1
4	1 967–3 766	TPA: Terminase large subunit (<i>Caudoviricetes</i> sp.)	99 (582/590)	0	DAQ52195.1
5	3 787–3 978	Hypothetical protein EF36P1_00058 (<i>Enterococcus</i> phage EF36P1)	94 (59/63)	9.00E–35	WAX14874.1
6	4 040–5 245	Portal protein (<i>Enterococcus</i> phage IME-EFm5)	98 (393/401)	0	YP_009200917.1

(待续)

(续表 2)

ORF	Start-End	Top BLAST hit	Identity (%) (aa)	E value	Accession No.
7	5 190-5 741	TPA: Prohead serine protease (<i>Caudoviricetes</i> sp.)	99 (181/183)	6.00E-128	DAQ52193.1
8	5 811-7 031	TPA: Major capsid protein (<i>Caudoviricetes</i> sp.)	96 (397/412)	0	DAZ56031.1
9	7 108-7 386	TPA: Head tail connector (<i>Caudoviricetes</i> sp.)	99 (91/92)	6.00E-60	DAQ52191.1
10	7 376-7 711	Head-tail adaptor protein (<i>Enterococcus</i> phage vb_GEC_Ef_S_9)	98 (109/111)	5.00E-73	QUR34588.1
11	7 714-8 088	TPA: Type I neck protein (<i>Caudoviricetes</i> sp.)	98 (121/124)	9.00E-83	DAQ52189.1
12	8 085-8 450	Head-tail joining protein (<i>Enterococcus</i> phage vb_GEC_Ef_S_9)	98 (119/121)	2.00E-79	QUR34586.1
13	8 502-9 050	TPA: Intron associated endonuclease (<i>Caudoviricetes</i> sp.)	94 (171/182)	7.00E-124	DAR45597.1
14	9 091-9 666	TPA: Tail tube protein (<i>Caudoviricetes</i> sp.)	96 (184/191)	8.00E-128	DAQ52200.1
15	9 771-10 100	TPA: Hypothetical protein (<i>Caudoviricetes</i> sp.)	95 (104/109)	9.00E-67	DAQ29452.1
16	10 124-10 330	TPA: Tail tape measure chaperone protein (<i>Caudoviricetes</i> sp.)	94 (64/68)	2.00E-38	DAR45575.1
17	10 398-14 714	TPA: Tail tape measure (<i>Caudoviricetes</i> sp.)	82 (1 178/1 438)	0	DAQ29425.1
18	14 794-16 908	TPA: Distal tail protein (<i>Caudoviricetes</i> sp.)	90 (619/704)	0	DAS03751.1
19	16 920-18 344	TPA: Tail protein (<i>Caudoviricetes</i> sp.)	81 (383/473)	0	DAS03753.1
20	18 358-19 758	TPA: Tail protein (<i>Siphoviridae</i> sp. ctu8P6)	91 (146/160)	4.00E-93	DAE25834.1
21	19 784-20 050	Hypothetical protein (<i>Enterococcus casseliflavus</i>)	36 (30/84)	3.00E-05	WP_156237020.1
22	20 131-20 502	Holin (<i>Enterococcus</i> phage IME-EFm1)	99 (91/92)	2.00E-57	YP_009042670.1
23	20 515-20 796	Holin (<i>Enterococcus</i> phage vb_GEC_Ef_S_9)	100 (93/93)	2.00E-59	QUR34577.1
24	20 813-21 838	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase (<i>Bacteriophage</i> sp.)	96 (327/341)	0	UVM85172.1
25	21 916-22 611	TPA: Deoxynucleoside kinase (<i>Caudoviricetes</i> sp.)	93 (214/231)	4.00E-156	DAQ52179.1
26	22 630-22 851	Thioredoxin (<i>Enterococcus</i> phage Aramis)	99 (72/73)	5.00E-45	CAD7757444.1
27	22 915-25 194	TPA: DNA polymerase (<i>Caudoviricetes</i> sp.)	96 (732/759)	0	DAZ56037.1
28	25 296-25 502	TPA: Hypothetical protein (<i>Caudoviricetes</i> sp.)	94 (64/68)	8.00E-39	DAR45627.1
29	25 517-25 849	TM2 Domain protein (<i>Bacteriophage</i> sp.)	78 (86/110)	1.00E-48	UVM85167.1
30	25 884-26 135	TPA: Hypothetical protein (<i>Siphoviridae</i> sp. ctu8P6)	97 (68/70)	2.00E-39	DAE25888.1
31	26 184-26 876	Hypothetical protein AVU90_gp23 (<i>Enterococcus</i> phage IME-EFm5)	98 (225/230)	2.00E-162	YP_009200893.1
32	26 940-27 158	TPA: Hypothetical protein (<i>Caudoviricetes</i> sp.)	96 (69/72)	2.00E-40	DAQ52253.1
33	27 155-27 073	TPA: Protein of unknown function (DUF1351) (<i>Caudoviricetes</i> sp.)	97 (264/272)	0	DAZ56016.1
34	28 099-28 191	Hypothetical protein (<i>Enterococcus</i> phage vB_Efm_LG62)	100 (31/31)	4.00E-12	UUW40485.1
35	28 181-28 348	TPA: Hypothetical protein (<i>Caudoviricetes</i> sp.)	98 (54/55)	1.00E-29	DAQ52252.1
36	28 350-28 577	Hypothetical protein (<i>Lactobacillus</i> sp.)	100 (75/75)	2.00E-45	MBN2918471.1
37	28 607-29 362	TPA: Hypothetical protein (<i>Siphoviridae</i> sp. ctu8P6)	94 (235/251)	2.00E-172	DAE25826.1
38	29 349-29 870	Hypothetical protein (<i>Enterococcus</i> phage vB_EfaS-DELF1)	84 (144/172)	1.00E-104	BBQ04314.1
39	29 867-30 331	TPA: PROTEIN/DNA Complex catalytic motif, Helix-turn-helix DNA (<i>Caudoviricetes</i> sp.)	95 (147/154)	2.00E-107	DAT36877.1

(待续)

(续表 2)

ORF	Start-End	Top BLAST hit	Identity (%) (aa)	E value	Accession No.
40	30 321-30 554	TPA: Nucelotide kinase (Siphoviridae sp. ctu8P6)	91 (70/77)	3.00E-41	DAE25852.1
41	30 690-30 890	TPA: Hypothetical protein (Caudoviricetes sp.)	95 (63/66)	5.00E-39	DAT36878.1
42	30 890-31 066	Hypothetical protein AVU90_gp14 (<i>Enterococcus</i> phage IME-EFm5)	79 (46/58)	5.00E-24	YP_009200884.1
43	31 066-31 188	Hypothetical protein AVU90_gp14 (<i>Enterococcus</i> phage IME-EFm5)	80 (32/40)	9.00E-14	YP_009200884.1
44	31 342-32 082	Primase-polymerase (<i>Enterococcus</i> phage vB_Efm_LG62]	88 (216/245)	6.00E-161	UUW40492.1
45	32 079-32 288	No hits			
46	32 348-32 503	TPA: Hypothetical protein (Caudoviricetes sp.)	92 (47/51)	1.00E-23	DAR45618.1
47	32 516-32 716	TPA: Hypothetical protein (Caudoviricetes sp.)	77 (51/66)	5.00E-29	DAF84392.1
48	32 716-34 017	TPA: Chromatin remodeling complex ATPase (Caudoviricetes sp.)	90 (386/428)	0	DAQ52206.1
49	34 007-34 696	Putative truncated GIY-YIG endonuclease (<i>Enterococcus</i> phage Bp29)	90 (206/228)	8.00E-153	QYW06746.1
50	34 747-35 097	Endonuclease (<i>Enterococcus</i> phage 9184)	89 (103/116)	4.00E-70	QOI68866.1
51	35 094-35 282	Hypothetical protein (Bacteriophage sp.)	95 (58/61)	8.00E-33	UVX34538.1
52	35 279-35 494	Hypothetical protein EF36P1_00038 (<i>Enterococcus</i> phage EF36P1)	92 (61/71)	3.00E-38	WAX14854.1
53	35 496-35 675	Hypothetical protein (Bacteriophage sp.)	92 (55/60)	1.00E-30	UVM91509.1
54	35 677-35 805	Hypothetical protein (<i>Enterococcus</i> phage vB_Efm_LG62)	100 (30/30)	1.00E-10	UUW40501.1
55	35 829-36 134	Hypothetical protein (<i>Enterococcus</i> phage Bp29)	49 (43/88)	1.00E-18	QYW06742.1
56	36 183-36 401	Hypothetical protein (Bacteriophage sp.)	92 (66/72)	1.00E-39	UVM85201.1
57	36 401-36 766	Hypothetical protein (<i>Enterococcus faecalis</i>)	62 (80/130)	1.00E-44	EGO8906807.1
58	36 825-38 411	TPA: dsDNA helicase (Caudoviricetes sp.)	99 (522/528)	0	DAQ52197.1
59	38 490-38 663	TPA: Hypothetical protein (Caudoviricetes sp.)	86 (49/57)	6.00E-27	DAZ56077.1
60	38 680-38 991	TPA: Hypothetical protein (Caudoviricetes sp.)	79 (81/103)	5.00E-54	DAT36889.1
61	39 055-39 216	Hypothetical protein (<i>Lactobacillus</i> sp.)	98 (52/53)	3.00E-29	MBN2918448.1
62	39 429-39 716	Hypothetical protein IME_058 (<i>Enterococcus</i> phage IME-EFm1)	88 (83/94)	7.00E-51	P_009042706.1
63	39 728-40 054	Hypothetical protein, DUF1140 (<i>Enterococcus</i> phage Aramis)	91 (98/108)	7.00E-65	CAD7757482.1
64	40 048-40 281	Hypothetical protein (<i>Enterococcus</i> phage vB_Efm_LG62)	81 (62/77)	2.00E-36	UUW40510.1
65	40 359-40 643	Hypothetical protein (<i>Staphylococcus saprophyticus</i>)	50 (45/90)	9.00E-22	WP_107640701.1
66	41 134-41 328	Hypothetical protein (<i>Lactobacillus</i> sp.)	94 (60/64)	2.00E-34	MBN2918443.1
67	41 473-41 655	TPA: Hypothetical protein (Caudoviricetes sp.)	92 (55/60)	2.00E-29	DAQ52224.1
68	41 669-41 851	TPA: Hypothetical protein (Caudoviricetes sp.)	95 (57/60)	4.00E-32	DAS03801.1
69	41 817-42 020	Hypothetical protein (<i>Lactobacillus</i> sp.)	88 (49/56)	2.00E-27	MBN2918440.1
70	42 020-42 226	TPA: Hypothetical protein (Caudoviricetes sp.)	84 (57/68)	9.00E-31	DAQ29485.1

核酸内切酶类基因, ORF2 编码 NHN 核酸内切酶; ORF13 编码内含子相关内切酶, ORF49 编码推定的截短 GIY-YIG 核酸内切酶; ORF50 编码核酸内切酶。

该噬菌体采用穿孔素-裂解酶二元裂解系统的裂菌模式来裂解宿主菌。ORF22 和 ORF23 编码的穿孔素蛋白能在宿主菌的细胞膜上形成孔道, 使裂解酶到达细胞壁的肽聚糖层发挥裂解作用。ORF24 编码 N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸酰胺酶, 即噬菌体裂解酶, 能作用于细菌细胞壁肽聚糖, 发挥裂解功能。

2.6 系统发育树分析

基于噬菌体末端酶大亚基(terminase large subunit)氨基酸序列构建的系统发育树如图 4 所示, 噬菌体 1A11 与 IME-EFm5、vB_EhiS_268

和 vB_EfaS-DELFI 等长尾病毒科(Spivoviridae)的噬菌体具有更近的亲缘关系, 而与肌尾病毒科(Myococcyviridae)噬菌体在系统发育树上有较为明显的区分。

2.7 裂解谱的测定结果

选用 6 株肠球菌、1 株金黄色葡萄球菌和 1 株大肠杆菌对噬菌体 1A11 进行裂解谱的测定(表 3), 结果显示, 噬菌体 1A11 对 4 株屎肠球菌具有裂解活性, 对 1 株屎肠球菌和 1 株粪肠球菌无裂解活性。这表明噬菌体 1A11 具有一定的宿主特异性, 主要对部分屎肠球菌敏感。

3 讨论与结论

治疗多重耐药肠球菌引起的院内感染是世界要面对的医疗难题之一。在全球许多机构

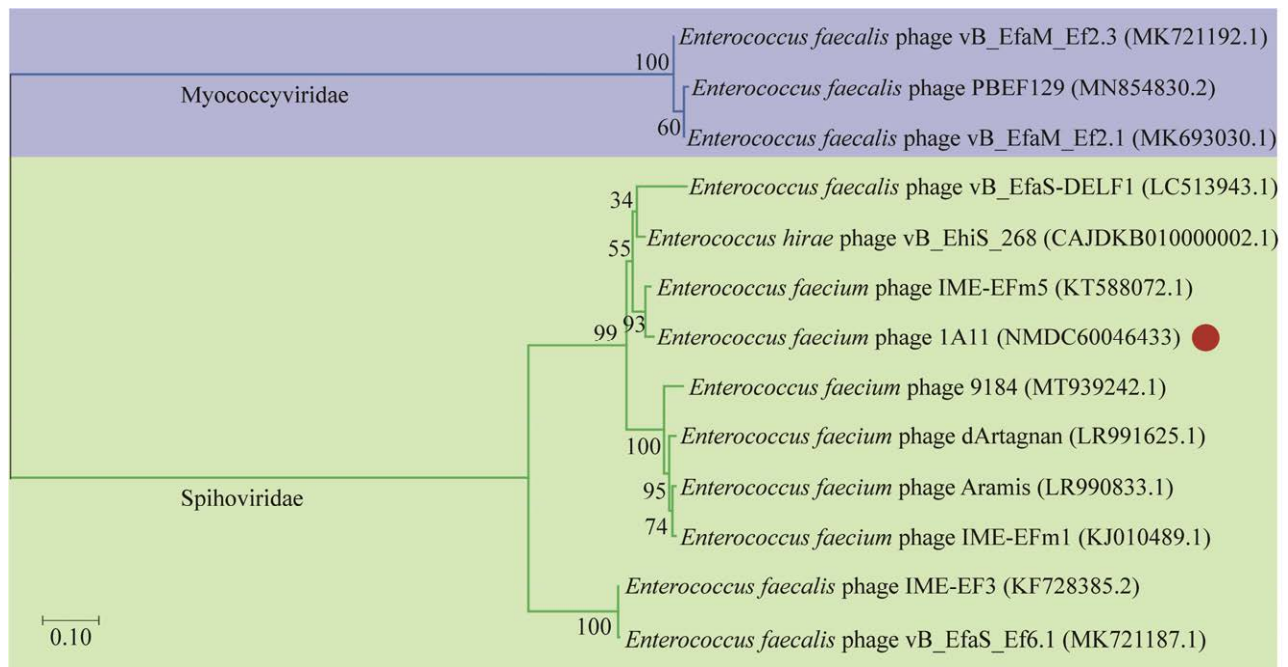


图 4 基于噬菌体末端酶大亚基氨基酸序列的系统发育树 括号中的序号为噬菌体基因组的序列号; 分支上的数字表示可信度, 数值越接近 100, 可信度越强; 标尺: 遗传距离

Figure 4 Phylogenetic tree based on amino acid sequence of large subunit of phage terminal enzyme. Sequence number in parentheses: The sequence number of phage genome; The number on the branch: Indicates the credibility, and the closer the value is to 100, the stronger the credibility; Scale: The genetic distance.

表3 噬菌体 1A11 的裂解谱测定

Table 3 The lysis spectrum of the phage 1A11

Strains	Lysis ability
<i>Enterococcus faecium</i> E1039	+
<i>Enterococcus faecium</i> E1162	-
<i>Enterococcus faecium</i> E0679	+
<i>Enterococcus faecium</i> E1071	+
<i>Enterococcus faecium</i> E1623	+
<i>Enterococcus faecalis</i> V583	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27660	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	-

+: 可形成透亮点滴斑; -: 无点滴斑形成

+: Can form bright spots; -: No spot formation.

中, 耐万古霉素屎肠球菌引起的感染呈现继续上升的趋势^[19]。有报道提出万古霉素耐药基因不仅在肠球菌中传播, 还可以转移至金黄色葡萄球菌、链球菌等多种革兰氏阳性微生物, 造成更大的耐药菌威胁, 引起严重公共卫生安全问题^[20-21]。噬菌体作为天然的细菌杀手, 具有得天独厚的抗菌优势。有报道表明噬菌体疗法被成功用于治疗威胁生命的多重耐药性细菌感染, 且已有多种不同用途的噬菌体产品获得批准^[22-25]。日益严重的多重耐药性细菌危机使得噬菌体疗法备受关注, 但目前国内外报道的肠球菌噬菌体仍然较少, 需要筛选更多肠球菌噬菌体来加深了解并进一步扩充肠球菌噬菌体库, 为肠球菌噬菌体疗法的应用奠定基础^[26]。

本研究分离到一株烈性屎肠球菌噬菌体, 将其命名为 1A11, 该噬菌体属于有尾病毒目长尾病毒科。分离得到的噬菌体 1A11 能够对部分屎肠球菌菌株产生裂解作用, 但不能裂解同属的粪肠球菌 V583 和屎肠球菌 E1162, 初步证明噬菌体 1A11 具有较高的宿主特异性。ORF22 和 ORF23 编码穿孔素蛋白, ORF24 编码裂解酶, 该噬菌体通过表达上述两种蛋白, 以穿孔素-裂解酶二元裂解系统的裂菌模式裂

解宿主菌, 且不含重组和整合相关基因, 确认为一株烈性噬菌体^[27]。比较基因组结果显示 1A11 的基因组与现有任一肠球菌噬菌体的差异都在 5% 以上, 因此说明噬菌体 1A11 为一种新的屎肠球菌噬菌体。从电镜观察、系统发育树和比较基因组结果可以看出, 噬菌体 1A11 与已有相关研究的屎肠球菌噬菌体 IME-EFm5^[28] 存在很高的相似性。通过对 IME-EFm5 和 1A11 的最佳感染复数和一步生长曲线对比分析发现, 两株噬菌体的最佳感染复数均为 0.01, 潜伏期均为 30 min, 暴发期均为 40 min, 在生物学特性方面具有部分一致性。但两株噬菌体在裂解谱方面存在一定的差异, IME-EFm5 只能裂解测定菌株中的 4P-SA, 而 1A11 能裂解测定菌株中的 4 株细菌, 因此噬菌体 1A11 具有更为广谱的种内裂解能力, 适合进行噬菌体治疗的深入研究。在噬菌体的包装和结构基因簇顺序上, 1A11 (ORF3-19) 与 IME-Efm1^[29] (ORF2-12) 存在比较高的相似性, 均涉及终止酶小亚基、终止酶大亚基、假设蛋白、门蛋白、prohead 蛋白酶、衣壳蛋白、头尾衔接蛋白和尾部蛋白。说明 1A11 与 IME-Efm1 的相似性也较高。相对于 IME-Efm5 和 IME-Efm1, 1A11 不含假定的金属 β -内酰胺酶基因, 不会造成耐药基因的转移和重组, 具有更高的安全性。

噬菌体 1A11 潜伏期较短、增殖力强且安全性高, 在预防和治疗耐药性屎肠球菌感染方面具有一定的应用潜力。此外, 噬菌体 1A11 在屎肠球菌感染治疗方面的能力还需要动物试验的验证, 其裂解酶也可进行表征以评判它作为抗菌蛋白酶制剂的潜力, 对此值得进行更加深入的研究。本研究为以噬菌体疗法防控耐药屎肠球菌感染提供了材料, 并为细菌噬菌体生物学特性和基因组测序分析等研究提供了一定的借鉴。

REFERENCES

- [1] YOONG P, SCHUCH R, NELSON D, FISCHETTI VA. Identification of a broadly active phage lytic enzyme with lethal activity against antibiotic-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*[J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186(14): 4808-4812.
- [2] 雷喜玲, 叶金云, 陈丽仙, 李爱科, 王薇薇, 乔琳, 王丽. 屎肠球菌的作用机制及其在水产动物中的应用[J]. 饲料工业, 2022, 43(22): 9-15.
LEI XL, YE JY, CHEN LX, LI AK, WANG WW, QIAO L, WANG L. The mechanisms and its application of *Enterococcus faecium* in aquatic animals[J]. Feed Industry, 2022, 43(22): 9-15 (in Chinese).
- [3] JETT BD, HUYNCKE MM, GILMORE MS. Virulence of enterococci[J]. Clinical Microbiology Reviews, 1994, 7(4): 462-478.
- [4] LEE T, PANG S, ABRAHAM S, COOMBS GW. Antimicrobial-resistant CC17 *Enterococcus faecium*: the past, the present and the future[J]. Journal of Global Antimicrobial Resistance, 2019, 16: 36-47.
- [5] WERNER G, NEUMANN B, WEBER RE, KRESKEN M, WENDT C, BENDER JK, BECKER K, BORGMANN S, DIEFENBACH A, HAMPRECHT A, HOGARDT M, WICHELHAUS T, KEMP V, HUEBNER NO, KAASCH A, GEGINAT G, KOHNEN W, MENZER A, KRAUSE T, MIETHKE T, et al. Thirty years of VRE in Germany—"expect the unexpected": the view from the National Reference Centre for *Staphylococci* and *Enterococci*[J]. Drug Resistance Updates, 2020, 53: 100732.
- [6] 傅希贤. 肠球菌感染[J]. 中国实用内科杂志, 1997(3): 134-136.
FU XX. *Enterococcus* infection[J]. Chinese Journal of Practical Internal Medicine, 1997(3): 134-136 (in Chinese).
- [7] MURRAY BE. The life and times of the *Enterococcus*[J]. Clinical Microbiology Reviews, 1990, 3(1): 46-65.
- [8] LU HZ, WENG XH, LI HJ, YIN YK, PANG MY, TANG YW. *Enterococcus faecium*-related outbreak with molecular evidence of transmission from pigs to humans[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2002, 40(3): 913-917.
- [9] DENISSEN J, REYNEKE B, WASO-REYNEKE M, HAVENGA B, BARNARD T, KHAN S, KHAN W. Prevalence of ESKAPE pathogens in the environment: antibiotic resistance status, community-acquired infection and risk to human health[J]. International Journal of Hygiene and Environmental Health, 2022, 244: 114006.
- [10] GORDILLO ALTAMIRANO FL, BARR JJ. Phage therapy in the postantibiotic era[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2019, 32(2): e00066-18.
- [11] 梁冰纯, 赵文鹏, 韩博, 高健. 噬菌体治疗动物细菌感染性疾病的研究进展[J]. 中国兽医杂志, 2023, 59(1): 107-110.
LIANG BC, ZHAO WP, HAN B, GAO J. Research progress of Phage therapy for animal bacterial infectious diseases[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2023, 59(1): 107-110 (in Chinese).
- [12] NIKOLICH MP, FILIPPOV AA. Bacteriophage therapy: developments and directions[J]. Antibiotics, 2020, 9(3): 135.
- [13] BURROWES B, HARPER DR, ANDERSON J, MCCONVILLE M, ENRIGHT MC. Bacteriophage therapy: potential uses in the control of antibiotic-resistant pathogens[J]. Expert Review of Anti-infective Therapy, 2011, 9(9): 775-785.
- [14] SPECK P, SMITHYMAN A. Safety and efficacy of phage therapy via the intravenous route[J]. FEMS Microbiology Letters, 2016, 363(3): fnv242.
- [15] ABEDON ST, KUHL SJ, BLASDEL BG, KUTTER EM. Phage treatment of human infections[J]. Bacteriophage, 2011, 1(2): 66-85.
- [16] MONK AB, REES CD, BARROW P, HAGENS S, HARPER DR. Bacteriophage applications: where are we now?[J]. Letters in Applied Microbiology, 2010, 51(4): 363-369.
- [17] PAJUNEN M, KILJUNEN S, SKURNIK M. Bacteriophage ϕ YeO3-12, specific for *Yersinia enterocolitica* serotype O:3, is related to coliphages T3 and T7[J]. Journal of Bacteriology, 2000, 182(18): 5114-5120.
- [18] HAN GL, ZHANG JR, LUO ZD, LU B, ZHANG PF, YONG K, WANG Y, LUO Y, YANG ZX, REN MS, CAO SZ, Y XP. Characteristics of a novel temperate bacteriophage against *Staphylococcus arlettae* (vB_SarS_BM31)[J]. International Microbiology, 2023, 26(2): 327-341.
- [19] HOWDEN BP, HOLT KE, LAM MMC, SEEMANN T, BALLARD S, COOMBS GW, TONG SYC, GRAYSON ML, JOHNSON PDR, STINEAR TP. Genomic insights to control the emergence of vancomycin-resistant enterococci[J]. mBio, 2013, 4(4): e00412-13.

- [20] RANOTKAR S, KUMAR P, ZUTSHI S, PRASHANTH KS, BEZBARUAH B, ANAND J, LAHKAR M. Vancomycin-resistant enterococci: troublemaker of the 21st century[J]. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 2014, 2(4): 205-212.
- [21] NOBLE WC, VIRANI Z, CREE RGA. Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1992, 93(2): 195-198.
- [22] SCHOOLEY RT, BISWAS B, GILL JJ, HERNANDEZ-MORALES A, LANCASTER J, LESSOR L, BARR JJ, REED SL, ROHWER F, BENLER S, SEGALL AM, TAPLITZ R, SMITH DM, KERR K, KUMARASWAMY M, NIZET V, LIN L, McCAULEY MD, STRATHDEE SA, BENSON CA, et al. Development and use of personalized bacteriophage-based therapeutic cocktails to treat a patient with a disseminated resistant *Acinetobacter baumannii* infection[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2017, 61(10): e00954-17.
- [23] ESKENAZI A, LOOD C, WUBBOLTS J, HITES M, BALARJISHVILI N, LESHKASHELI L, ASKILASHVILI L, KVACHADZE L, VAN NOORT V, WAGEMANS J, JAYANKURA M, CHANISHVILI N, DE BOER M, NIBBERING P, KUTATELADZE M, LAVIGNE R, MERABISHVILI M, PIRNAY JP. Combination of pre-adapted bacteriophage therapy and antibiotics for treatment of fracture-related infection due to pandrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 302.
- [24] DEDRICK RM, GUERRERO-BUSTAMANTE CA, GARLENA RA, RUSSELL DA, FORD K, HARRIS K, GILMOUR KC, SOOTHILL J, JACOBS-SERA D, SCHOOLEY RT, HATFULL GF, SPENCER H. Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant *Mycobacterium abscessus*[J]. *Nature Medicine*, 2019, 25(5): 730-733.
- [25] HUANG YL, WANG WH, ZHANG ZH, GU YF, HUANG AX, WANG JH, HAO HH. Phage products for fighting antimicrobial resistance[J]. *Microorganisms*, 2022, 10(7): 1324.
- [26] STRATHDEE SA, HATFULL GF, MUTALIK VK, SCHOOLEY RT. Phage therapy: from biological mechanisms to future directions[J]. *Cell*, 2023, 186(1): 17-31.
- [27] 史一博, 孙建和. λ 噬菌体穿孔素(holin)蛋白触发裂菌的分子机制[J]. *微生物学报*, 2012, 52(2): 141-145. SHI YB, SUN JH. Current advance in the topological structure and function of holin encoded by bacteriophage lambda: a review[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52(2): 141-145 (in Chinese).
- [28] 宫鹏娟. 屎肠球菌噬菌体 IME-EFm5 的分离鉴定及其裂解酶关键作用位点的研究[D]. 长春: 吉林大学硕士学位论文, 2016. GONG PJ. The isolation and researches of *Enterococcus faecium* bacteriophage IME-EFm5 and the key residues of its lysin[D]. Changchun: Master's Thesis of Jilin University, 2016 (in Chinese).
- [29] WANG YH, WANG W, LV YQ, ZHENG WL, MI ZQ, PEI GQ, AN XP, XU XM, HAN CY, LIU J, ZHOU CL, TONG YG. Characterization and complete genome sequence analysis of novel bacteriophage IME-EFm1 infecting *Enterococcus faecium*[J]. *Journal of General Virology*, 2014, 95(11): 2565-2575.