

研究报告

一株嗜麦芽窄食单胞菌裂解性噬菌体的分离及生物学特性

喻鑫婷¹, 于诗筠³, 吕金晖³, 文会淇³, 张雅倩³, 刘慧莹², 米志强³, 柏长青^{*1,2}

1 安徽医科大学解放军 307 临床学院, 北京 100071

2 中国人民解放军总医院第五医学中心南区呼吸与危重症医学科, 北京 100071

3 军事科学院军事医学研究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

喻鑫婷, 于诗筠, 吕金晖, 文会淇, 张雅倩, 刘慧莹, 米志强, 柏长青. 一株嗜麦芽窄食单胞菌裂解性噬菌体的分离及生物学特性[J]. 微生物学通报, 2022, 49(3): 1084-1094

Yu Xinting, Yu Shijun, Lyu Jinhui, Wen Huiqi, Zhang Yaqian, Liu Huiying, Mi Zhiqiang, Bai Changqing. Isolation and biological characterization of a novel virulent phage targeting *Stenotrophomonas maltophilia*[J]. Microbiology China, 2022, 49(3): 1084-1094

摘要:【背景】嗜麦芽窄食单胞菌是一种广泛存在于医院和自然环境中的条件致病菌, 其分离率与耐药率逐年增加。噬菌体是一类能特异性感染并杀灭细菌的病毒。【目的】分离一株新型嗜麦芽窄食单胞菌噬菌体, 为临床嗜麦芽窄食单胞菌感染及防控提供补充手段。【方法】以临床分离的嗜麦芽窄食单胞菌为宿主菌, 用点板法从医院污水中分离鉴定噬菌体; 用双层平板法测定噬菌体效价及一步生长曲线等生物学特性; 用透射电镜观察噬菌体形态; 提取噬菌体基因组 DNA 进行全基因组测序, 拼接噬菌体基因组并进行注释。【结果】分离到一株嗜麦芽窄食单胞菌裂解性噬菌体, 命名为 vB_SmaS_P11。该噬菌体感染宿主菌的潜伏期小于 5 min, 快速增殖 60 min 后达到平稳期, 爆发量为 100 PFU/cell。透射电镜观察该噬菌体为长尾噬菌体, 具有典型的二十面体头和不可收缩的尾部。基因组测序结果表明, 该噬菌体基因组全长 44 600 bp, GC 含量为 63.7%, 无抗生素耐受基因、毒力基因和 tRNA, 与 NCBI 数据库中所有已知嗜麦芽窄食单胞菌噬菌体相比同源性很低。基因组注释显示该噬菌体含有 66 个开放阅读框(open reading frame, ORF), 其中 25 个 ORF 预测为有功能的蛋白, 15 个 ORF 是未知功能的假定蛋白, 26 个 ORF 比对结果显示没有相似的序列。序列比对与系统发育分析表明, 该噬菌体属于有尾噬菌体目(Caudovirales)长尾噬菌体科(Siphoviridae)。【结论】本研究分离鉴定到一株裂解性强、相似性低的嗜麦芽窄食单胞菌噬菌体, 该噬菌体有望用于抗生素耐受嗜麦芽窄食单胞菌感染控制。

关键词: 嗜麦芽窄食单胞菌; 噬菌体; 生物学特性; 基因组分析

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFC1602500, 2017YFF0108605)

Supported by: National Key Research and Development Program of China (2018YFC1602500, 2017YFF0108605)

*Corresponding author: E-mail: mlp1604@sina.com

Received: 2021-09-03; Accepted: 2021-11-10; Published online: 2021-12-06

Isolation and biological characterization of a novel virulent phage targeting *Stenotrophomonas maltophilia*

YU Xinting¹, YU Shijun³, LYU Jinhui³, WEN Huiqi³, ZHANG Yaqian³, LIU Huiying², MI Zhiqiang³, BAI Changqing^{*1,2}

1 307 Clinical College of the People's Liberation Army, Anhui Medical University, Beijing 100071, China

2 Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Southern District, The Fifth Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100071, China

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

Abstract: [Background] *Stenotrophomonas maltophilia* is an opportunistic pathogen that exists widely in hospitals and environments, with intrinsic antibiotic resistance. **[Objective]** This study aims to isolate virulent phages to provide an alternative therapeutic method for *S. maltophilia* infection. **[Methods]** A phage was isolated from hospital sewage with a clinical strain of *S. maltophilia* as the host. The phage genome was sequenced on Illumina platform and its morphology was observed with transmission electron microscopy. The one-step growth curve was established by double-layer plate method. **[Results]** The isolated phage vB_SmaS_P11 had an icosahedral head and a long tail, belonging to Siphoviridae of Caudovirales. The genome of the phage had a length of 44 600 bp and the G+C content of 63.7%, encoding 66 open reading frames (ORFs), with no tRNA, virulence genes or resistance-related regions. The phage vB_SmaS_P11 was able to lyse 7 strains among 18 clinical isolates of *S. maltophilia*. The one-step growth curve showed that the strain had the latent time less than 5 min, the lysis period of about 60 min, and the burst size of 100 plaque forming units per cell, which indicated high virulence. **[Conclusion]** The isolated phage vB_SmaS_P11 is a novel virulent phage targeting *S. maltophilia*, which provides a candidate phage for treating *S. maltophilia* infection in the future.

Keywords: *Stenotrophomonas maltophilia*; phage; biological characterization; genomic analysis

嗜麦芽窄食单胞菌 (*Stenotrophomonas maltophilia*, Sm) 是一种革兰氏阴性非发酵的临床常见病原菌, 植物、动物、水和土壤中也广泛存在, 以前称嗜麦芽假单胞菌或嗜麦芽黄单胞菌^[1-2]。根据 2019 年中国细菌耐药监测网 CHINET (<http://www.chinets.com/>) 对国内主要地区 36 所三级医院临床分离菌的分布监测, 嗜麦芽窄食单胞菌占有菌株的 2.49%, 占革兰氏阴性非发酵菌的 10.5%, 仅次于铜绿假单胞菌(36.5%)和鲍曼不动杆菌(38.2%)^[3]。临床嗜麦芽窄食单胞菌主要分离自重症监护室呼吸内科患者, 尤其是合并基础性疾病、免疫力低

下、历经气管插管或切开等创伤性操作的患者^[4]。嗜麦芽窄食单胞菌对多种抗生素天然耐药, 包括 β -内酰胺类、氨基糖苷类和喹诺酮类抗生素, 耐药的主要原因是嗜麦芽窄食单胞菌产 β -内酰胺酶、氨基糖苷类修饰酶、主动外排泵系统和外膜通透性低^[5]。 β -内酰胺类的耐药机制主要是嗜麦芽窄食单胞菌分泌的 β -内酰胺酶水解 β -内酰胺类抗生素的 β -内酰胺环^[6]; 氨基糖苷类的耐药机制主要是嗜麦芽窄食单胞菌分泌的氨基糖苷类修饰酶^[7]; 喹诺酮类药物的耐药机制主要与嗜麦芽窄食单胞菌的主动外排泵系统和外膜通透性低有关^[8-9]。

噬菌体是一类能够感染细菌的病毒,其种类繁多、数量巨大。根据对宿主菌裂解能力的不同,噬菌体可分为裂解性噬菌体和溶源性噬菌体。溶源性噬菌体通常是将基因组整合到宿主的染色体中,随着宿主染色体复制并遗传到子代;裂解性噬菌体感染后通过裂解宿主以释放子代噬菌体来杀死其宿主细菌,由于能杀死被感染的细菌,裂解性噬菌体在 100 多年前就用于噬菌体治疗以控制细菌感染^[10]。随着抗生素的大量使用,细菌耐药愈发严重,噬菌体用于控制细菌感染重新受到重视^[11]。嗜麦芽窄食单胞菌在临床上越来越多地被分离到,因其对多种抗生素具有天然耐药性,所以给临床治疗带来了极大的困难^[12]。噬菌体治疗有望为抗生素耐受菌感染提供替代方案。噬菌体治疗的难点之一是特异性较强,针对同一种细菌感染,通常需要多株噬菌体以涵盖不同血清型细菌。本研究针对我国嗜麦芽窄食单胞菌临床分离株,分离到一株裂解性较强的噬菌体,为涵盖我国嗜麦芽窄食单胞菌主要流行株裂解性噬菌体库建设提供基本支撑。

1 材料与方法

1.1 菌株来源与培养条件

嗜麦芽窄食单胞菌分离自中国人民解放军总医院,按照 High Pure PCR Template Preparation Kit 说明书提取细菌基因组,菌株经 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-TACGGYTACCTTACGACTT-3') PCR 扩增后,产物送北京诺赛基因组研究中心有限公司进行一代测序,测序结果通过 BLAST 比对确定分类地位。菌种于军事医学研究院微生物流行病学研究所-80 °C 保存,细菌在 LB 培养基 37 °C 培养。

1.2 主要试剂和仪器

胰蛋白胨、酵母提取物、琼脂粉,OXOID 公司;氯化钠,北京索莱宝科技有限公司;0.22 μm 微孔过滤器, Pall Corporation 公司;蛋白酶 K、RNase A、DNase I, Thermo Fisher Scientific 公司; High Pure Viral RNA Kit, High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche Diagnostics 公司; NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit, New England Biolabs 公司。Illumina MiSeq, Illumina 公司;超速离心管、超速离心机, Beckman 公司。

1.3 噬菌体的分离与鉴定

以分离菌作为宿主菌(编号为 Sm11),从医院污水分离裂解性噬菌体。取污水 10 000 $\times g$ 离心 10 min,取上清,经 0.22 μm 微孔过滤器过滤后备用;取对数期(OD_{600} 约 0.6)菌 Sm11 培养液 100 μL 加至 2 mL LB 液体培养基,与 4 mL 污水混匀;37 °C、200 r/min 摇床振荡培养至菌液澄清;10 000 $\times g$ 离心 10 min,取上清用 0.22 μm 微孔过滤器过滤得到噬菌体原液。取 500 μL 对数期(OD_{600} 约 0.6) Sm11 菌液加至 4.5 mL LB 半固体培养基中,吹吸混匀,倒在 LB 固体培养基平板上,待培养基完全凝固后,在平板中央点 3 μL 的噬菌体原液,自然晾干后将平板倒置于 37 °C 温箱培养过夜,观察有无噬菌斑出现(点板法)。

1.4 噬菌体单斑纯化

取 100 μL 噬菌体原液混合 900 μL PBS 后 10 倍梯度稀释,取 100 μL 10^{-5} – 10^{-8} 梯度的稀释液和 500 μL 对数期 Sm11 培养液混合后加入 4.5 mL LB 半固体培养基,混匀后倒在含有 LB 固体培养基的平板上(双层平板法)。待琼脂凝固后倒置于 37 °C 恒温培养箱培养过夜。然后,选择单个透明噬菌斑加入对数期的 Sm11 菌液中,置于 37 °C、200 r/min 摇床振荡培养至

澄清, 10 000×g 离心 10 min, 取上清用 0.22 μm 微孔过滤器过滤得初步纯化的噬菌体。将上述步骤重复 3 次, 得到纯化后的噬菌体。将纯化后的噬菌体 4 °C 保存。

1.5 一步生长曲线

测定细菌数和噬菌体效价后将噬菌体和细菌按照感染复数 0.001 的比例混合, 将混合物置于 37 °C 恒温培养箱孵育 5 min, 使噬菌体与细菌充分吸附, 然后将混合物以 10 000×g 离心 2 min, 去除上清, 将沉淀用 6 mL LB 液体培养基重悬, 37 °C、200 r/min 摇床振荡培养。分别在感染后的 0、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90 min 收集样品并过滤, 用双层琼脂平板法测定噬菌体效价, 每次实验重复 3 次。以时间为横坐标, 噬菌体效价为纵坐标绘制一步生长曲线。

1.6 噬菌体裂解谱

将该菌分离并通过 16S rRNA 基因鉴定的 18 株嗜麦芽窄食单胞菌培养至对数期后铺双层平板, 取 3 μL 噬菌体点在各个平板上, 晾干后倒置于温箱观察有无噬菌斑出现。

1.7 电镜观察噬菌体形态

将 30 μL 4 °C 保存的噬菌体加至 30 mL 对数期(OD_{600} 约 0.6)宿主菌中, 置于 37 °C、200 r/min 摇床振荡培养至澄清, 得到噬菌体 30 mL, 10 000×g 离心 10 min, 上清用 0.22 μm 微孔过滤器过滤; 将上清加至 50 mL 超速离心管, 用移液器从底部缓慢注入 30% (质量体积分数)蔗糖溶液, 4 °C、30 000×g 离心 3 h; 弃上清, 噬菌体沉淀用 200 μL 1×TNE (10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, 100 mmol/L NaCl) 重悬得到超速离心纯化的噬菌体; 取超速离心纯化的噬菌体 1 μL, 滴在铜网片上, 磷钨酸负染, 干燥后通过透射电镜观察噬菌体形态。

1.8 噬菌体基因组提取、测序及序列分析

取 400 μL 噬菌体分别加入 DNase I (终浓度 1 μg/mL)和 RNase A (终浓度 1 μg/mL), 37 °C 孵育过夜, 80 °C 恒温 15 min 灭活核酸酶, 参照 High Pure Viral RNA Kit 说明书提取噬菌体基因组。根据 NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit 使用说明构建基因文库, 通过本实验室 Illumina MiSeq 测序平台进行全基因组测序, 所得原始数据使用 SPAdes-3.13.0 和 CLC Genomics Workbench 3.6.1 软件拼接全基因组序列, RAST 在线数据库(<https://rast.nmpdr.org/>)注释全基因组序列, 所有的开放阅读框使用 BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)在线比对确定基因功能。采用 MEGA 7.0 软件中邻接法(neighbor-joining method)对噬菌体进行进化分析。

2 结果与分析

2.1 噬菌体的分离与鉴定

本研究从医院污水中分离到一株嗜麦芽窄食单胞菌噬菌体, 命名为 vB_SmaS_P11, 其能够在铺有宿主菌的双层平板上形成透明噬菌斑, 12 h 噬菌斑大小约 30 mm² (图 1)。透射电镜(图 2)观察显示该噬菌体具有典型的二十面体头部和不可收缩的尾部, 其头部直径约 50 nm, 尾部长约 175 nm。电镜结果表明 vB_SmaS_P11 属于尾病毒目(Caudovirales), 长尾病毒科(Siphoviridae)。噬菌体 vB_SmaS_P11 GenBank 登录号为 MZ701794。

2.2 一步生长曲线

vB_SmaS_P11 感染宿主菌 Sm11 后, 通过双层平板法测定不同时间点的 vB_SmaS_P11 效价, 得到一步生长曲线(图 3)。结果显示, vB_SmaS_P11 的潜伏期小于 5 min, 快速增殖 60 min 后到达平台期, 平均暴发裂解量为 100 PFU/cell。

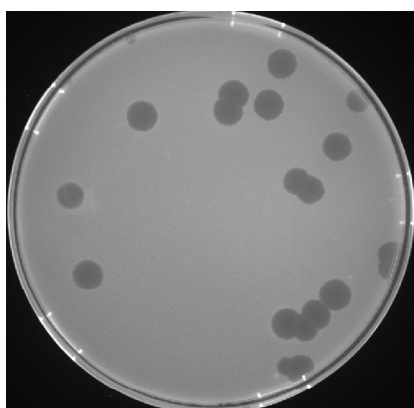


图 1 vB_SmaS_P11 在宿主菌双层平板上形成的噬菌斑

Figure 1 Plaques of phage vB_SmaS_P11.

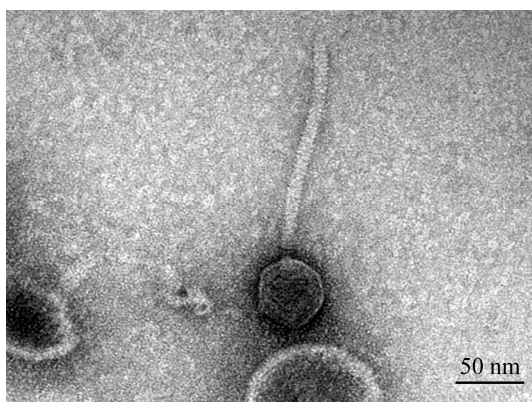


图 2 噬菌体 vB_SmaS_P11 电镜图

Figure 2 Transmission electron microscopy of phage vB_SmaS_P11.

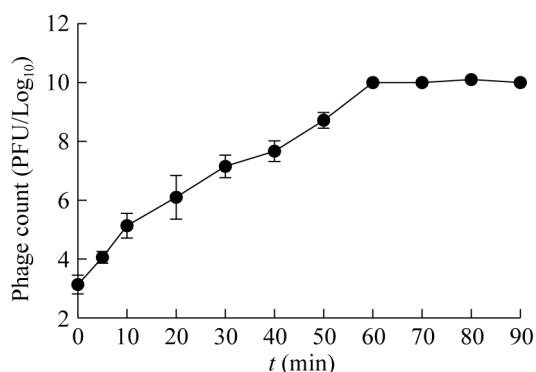


图 3 噬菌体 vB_SmaS_P11 的一步生长曲线

Figure 3 One-step growth curve of phage vB_SmaS_P11.

2.3 噬菌体裂解谱

通过点板法观察到 18 株嗜麦芽窄食单胞菌中有 7 株可以形成噬菌斑(表 1), 包括 5 个透亮的噬菌斑, 2 个不透亮的噬菌斑(图 4)。

表 1 噬菌体 vB_SmaS_P11 裂解谱

Table 1 The lytic spectrum of phage vB_SmaS_P11

| 细菌编号 Bacterial No. | 敏感性 Sensitivity |
|--------------------|-----------------|
| Sm1 | — |
| Sm2 | ++ |
| Sm5 | — |
| Sm6 | ++ |
| Sm8 | — |
| Sm9 | — |
| Sm10 | — |
| Sm12 | + |
| Sm15 | — |
| Sm16 | — |
| Sm18 | — |
| Sm19 | + |
| Sm20 | — |
| Sm21 | — |
| Sm22 | — |
| Sm29 | ++ |
| Sm548 | ++ |
| Sm1785 | ++ |

注: ++: 形成透亮噬菌斑; +: 形成不透亮的噬菌斑; —: 未观察到噬菌斑

Note: ++: Transparent plaques; +: Semi-transparent plaques; —: No plaques.

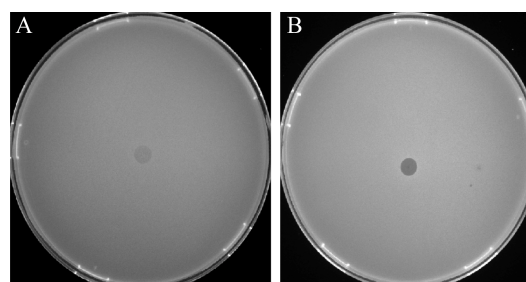


图 4 vB_SmaS_P11 点板法在不同菌株平板上形成不同的噬菌斑 A: 不透亮噬菌斑; B: 透亮噬菌斑

Figure 4 Different plaques were formed on plates of different strains by the spot test. A: Semi-transparent plaques; B: Transparent plaques.

2.4 噬菌体基因组分析

全基因组测序结果分析表明, vB_SmaS_P11 基因组全长 44 600 bp, GC 含量为 63.7%, 无抗生素耐受基因、毒力基因和 tRNA。经 NCBI 数据库 BLASTn 比对发现 vB_SmaS_P11 与数据库中所有已知噬菌体序列相比相似性低, 只与其中一株 *Stenotrophomonas* phage BUCT603 (GenBank 登录号 MW934263.1) 相似性较高, 覆盖率 92%, 相似度 99.78%。噬菌体头部和尾部的结构蛋白和组装蛋白在进化中较保守^[13], 为了解该噬菌体的进化关系, 采用 MEGA 7.0 的邻接法对噬菌体保守序列末端酶大亚基构建系统进化树(图 5)。进化树结果表明噬菌体 vB_SmaS_P11 只与噬菌体 BUCT603 聚在同一进化分支上, 说明具有共

同进化起源, 同属于长尾噬菌体科。以上结果表明该噬菌体是一株基因序列很新的噬菌体。基因组 RAST 注释结果显示噬菌体含有 66 个开放阅读框(open reading frame, ORF), 结合 NCBI 数据库 BLASTp 比对结果(表 2), 其中 25 个 ORF 预测为有功能的蛋白, 包括病毒结构蛋白、组装蛋白、复制蛋白、调节蛋白和裂解蛋白, 26 个 ORF 比对结果显示没有相似的序列, 15 个 ORF 是未知功能的假定蛋白(图 6)。

从基因组结构上分析, 预测包装模块含有: 末端酶大亚基(ORF51)、头颈蛋白(ORF52)、原头蛋白酶(ORF53)和主要衣壳蛋白(ORF54)^[14], 该噬菌体基因组中未发现末端酶小亚基序列。

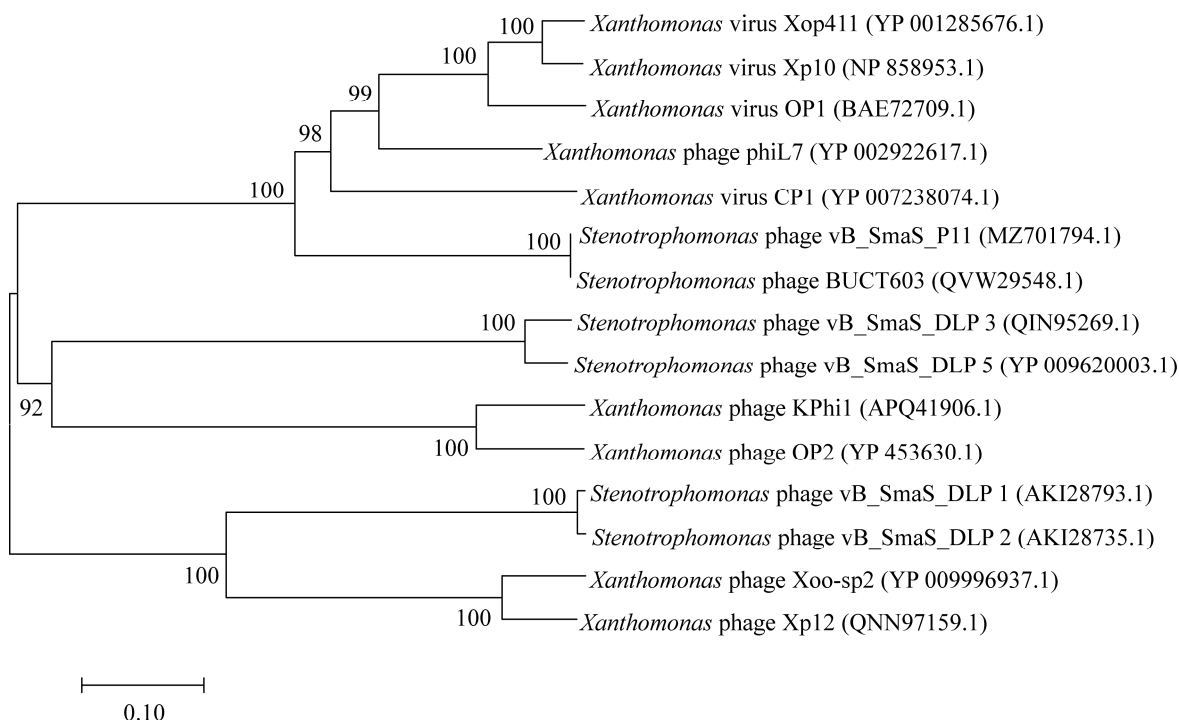


图 5 基于噬菌体末端酶大亚基蛋白序列的系统发育树 分支数字代表可信度; 标尺代表遗传距离

Figure 5 Phylogenetic tree based on protein sequence of phages terminase large subunit. The branch numbers represent the confidence level; The scale represents the genetic distance.

表 2 噬菌体 vB_SmaS_P11 ORF 功能分析

Table 2 ORFs function analysis of phage vB_SmaS_P11

| ORFs | 起始 Star site | 终止 Termination site | 长度 Length (bp) | 功能 Function | <i>E</i> 值 <i>E</i> value | 相似度 Identity (%) | GenBank accession No. |
|------|-----------------|---------------------------|----------------------|---------------------------------|------------------------------|---------------------|--------------------------|
| 1 | 3 | 2 267 | 2 265 | Putative tail component protein | 6E-161 | 38.81 | YP_453579.1 |
| 2 | 2 310 | 3 485 | 1 176 | Phage tail protein | 2E-05 | 27.57 | GJH_77789.1 |
| 3 | 3 489 | 3 785 | 297 | Hypothetical protein | 1E-43 | 72.45 | WP_164186364.1 |
| 4 | 3 785 | 4 453 | 669 | Hypothetical protein | 6E-100 | 66.97 | WP_099473297.1 |
| 5 | 4 440 | 4 907 | 468 | Hypothetical protein | 1E-06 | 29.57 | YP_002922638.1 |
| 6 | 4 971 | 5 189 | 219 | Holin | 2E-07 | 41.43 | YP_002922641.1 |
| 7 | 5 161 | 5 688 | 219 | Endolysin | 1E-76 | 66.03 | YP_002922642.1 |
| 8 | 5 672 | 5 989 | 318 | I-spanin | 5E-13 | 44.76 | YP_008859435.1 |
| 9 | 6 054 | 6 173 | 120 | O-spanin | 1E-07 | 60.00 | YP_008859435.1 |
| 10 | 6 225 | 6 428 | 204 | No similarity | | | |
| 11 | 6 425 | 7 090 | 666 | No similarity | | | |
| 12 | 7 087 | 7 302 | 216 | No similarity | | | |
| 13 | 7 299 | 7 505 | 207 | No similarity | | | |
| 14 | 7 583 | 7 747 | 165 | No similarity | | | |
| 15 | 7 744 | 7 881 | 138 | No similarity | | | |
| 16 | 7 895 | 10 360 | 2 466 | T3/T7-like RNA Polymerase | 0 | 55.42 | YP_002922649.1 |
| 17 | 10 365 | 10 769 | 405 | No similarity | | | |
| 18 | 10 760 | 10 909 | 150 | No similarity | | | |
| 19 | 10 906 | 11 751 | 846 | No similarity | | | |
| 20 | 11 828 | 12 655 | 828 | Hypothetical protein | 1E-26 | 48.55 | YP_002922651.1 |
| 21 | 12 769 | 13 668 | 900 | Exonuclease | 2E-130 | 61.11 | YP_009276320.1 |
| 22 | 13 681 | 14 085 | 405 | Endonuclease | 1E-46 | 58.54 | YP_008859405.1 |
| 23 | 14 082 | 15 020 | 939 | 5'→3' endonuclease | 6E-94 | 50.59 | YP_002922655.1 |
| 24 | 15 085 | 15 924 | 840 | Hypothetical protein | 1E-50 | 48.59 | YP_002922657.1 |
| 25 | 15 936 | 18 440 | 2 505 | DNA polymerase | 0 | 63.10 | YP_008859402.1 |
| 26 | 18 442 | 18 999 | 558 | Hypothetical protein | 1E-15 | 33.90 | YP_009275485.1 |
| 27 | 19 042 | 20 343 | 1 302 | DNA helicase | 3E-172 | 54.63 | YP_002922661.1 |
| 28 | 20 340 | 21 161 | 822 | DNA primase | 1E-113 | 60.08 | YP_002922662.1 |
| 29 | 21 318 | 21 662 | 345 | Exonuclease of the HNH family | 3E-27 | 49.56 | NP_858964.1 |
| 30 | 21 665 | 21 943 | 279 | No similarity | | | |
| 31 | 21 956 | 22 264 | 309 | Hypothetical protein | 1E-09 | 41.57 | YP_007238113.1 |
| 32 | 22 261 | 22 536 | 276 | No similarity | | | |
| 33 | 22 606 | 22 911 | 306 | No similarity | | | |
| 34 | 22 908 | 23 573 | 666 | No similarity | | | |
| 35 | 23 646 | 23 819 | 174 | No similarity | | | |
| 36 | 23 823 | 24 062 | 240 | No similarity | | | |
| 37 | 24 116 | 24 289 | 174 | No similarity | | | |

(待续)

(续表 2)

| | | | | | | | |
|----|--------|--------|-------|----------------------------------|--------|-------|----------------|
| 38 | 24 286 | 24 462 | 177 | No similarity | | | |
| 39 | 24 459 | 24 917 | 459 | No similarity | | | |
| 40 | 24 920 | 25 054 | 135 | No similarity | | | |
| 41 | 25 051 | 25 206 | 156 | No similarity | | | |
| 42 | 25 268 | 25 519 | 252 | No similarity | | | |
| 43 | 25 512 | 25 733 | 222 | No similarity | | | |
| 44 | 25 730 | 26 302 | 573 | No similarity | | | |
| 45 | 26 359 | 26 697 | 339 | Hypothetical protein | 3E-04 | 27.62 | YP_009850942.1 |
| 46 | 26 760 | 27 140 | 381 | No similarity | | | |
| 47 | 27 198 | 27 464 | 267 | No similarity | | | |
| 48 | 27 530 | 27 883 | 354 | No similarity | | | |
| 49 | 28 338 | 28 691 | 354 | Hypothetical protein | 0.039 | 31.03 | EUB25753.1 |
| 50 | 29 022 | 29 393 | 372 | Hypothetical protein | 2E-10 | 43.48 | YP_001285675.1 |
| 51 | 29 390 | 31 123 | 1 734 | Terminase large subunit | 0 | 57.96 | YP_002922617.1 |
| 52 | 31 136 | 32 476 | 1 341 | Putative head portal protein | 8E-128 | 50.25 | YP_007238076.1 |
| 53 | 32 477 | 33 262 | 786 | The prohead protease | 2E-90 | 60.42 | WP_058358269.1 |
| 54 | 33 292 | 34 494 | 1 203 | Major head protein | 1E-173 | 64.04 | YP_002922620.1 |
| 55 | 34 550 | 34 981 | 432 | Head-tail connector protein | 5E-17 | 38.52 | WP_058358294.1 |
| 56 | 34 983 | 35 360 | 378 | Hypothetical protein | 0.005 | 29.17 | YP_007238081.1 |
| 57 | 35 344 | 35 808 | 465 | Hypothetical protein | 1E-38 | 46.90 | YP_007238081.1 |
| 58 | 35 810 | 36 202 | 393 | Phage coat protein II | 3E-17 | 36.54 | YP_002922625.1 |
| 59 | 36 229 | 36 888 | 660 | Major tail | 8E-78 | 55.71 | YP_002922628.1 |
| 60 | 36 888 | 37 190 | 303 | Hypothetical protein | 8E-127 | 46.00 | YP_453571.1 |
| 61 | 37 382 | 37 498 | 117 | Hypothetical protein | 4E-06 | 55.56 | YP_007238086.1 |
| 62 | 37 502 | 40 813 | 3 312 | Tail length tape measure protein | 0.0 | 43.52 | YP_002922630.1 |
| 63 | 40 830 | 41 198 | 369 | Hypothetical protein | 6E-46 | 56.90 | WP_058358292.1 |
| 64 | 41 185 | 41 649 | 465 | DUF1833 family protein | 3E-68 | 66.89 | WP_058358293.1 |
| 65 | 41 630 | 42 010 | 381 | Peptidoglycan hydrolase | 5E-23 | 37.60 | NP_858968.1 |
| 66 | 41 998 | 44 598 | 2 601 | Phage tail protein | 0.0 | 43.92 | YP_001285691.1 |

预测穿孔素(ORF6, holin)、裂解酶(ORF7, endolysin)、内膜斯潘宁(ORF8, i-spanin)、外膜斯潘宁(ORF9, o-spanin)和肽聚糖水解酶(ORF65, peptidoglycan hydrolase)是关于裂解细菌的蛋白。革兰氏阴性宿主菌的噬菌体可以编码 3 种功能性裂解蛋白质: holin、endolysin 和 spanin。holin 在细胞内膜聚集达到临界浓度后形成孔洞激活 endolysin 进入细胞壁, endolysin 到达细胞壁后水解肽聚糖, spanin 被激活发生

构象变化并破坏外膜^[15]。holin 通常小且与 endolysin 相邻^[16]。endolysin 主要包括 C 端结合结构域, 特异性结合细胞壁; N 端催化结构域, 水解肽聚糖的糖苷键、酰胺键或肽键, 破坏细胞壁^[17]。ORF65 是裂解酶的一种, 水解肽聚糖^[18]。革兰氏阴性宿主菌的大多数噬菌体具有 2 个 spanin, 包括编码完整内膜蛋白的 i-spanin (以前命名为 Rz)及编码外膜脂蛋白的 o-spanin (以前命名为 Rz1)。Rz 具有定位在

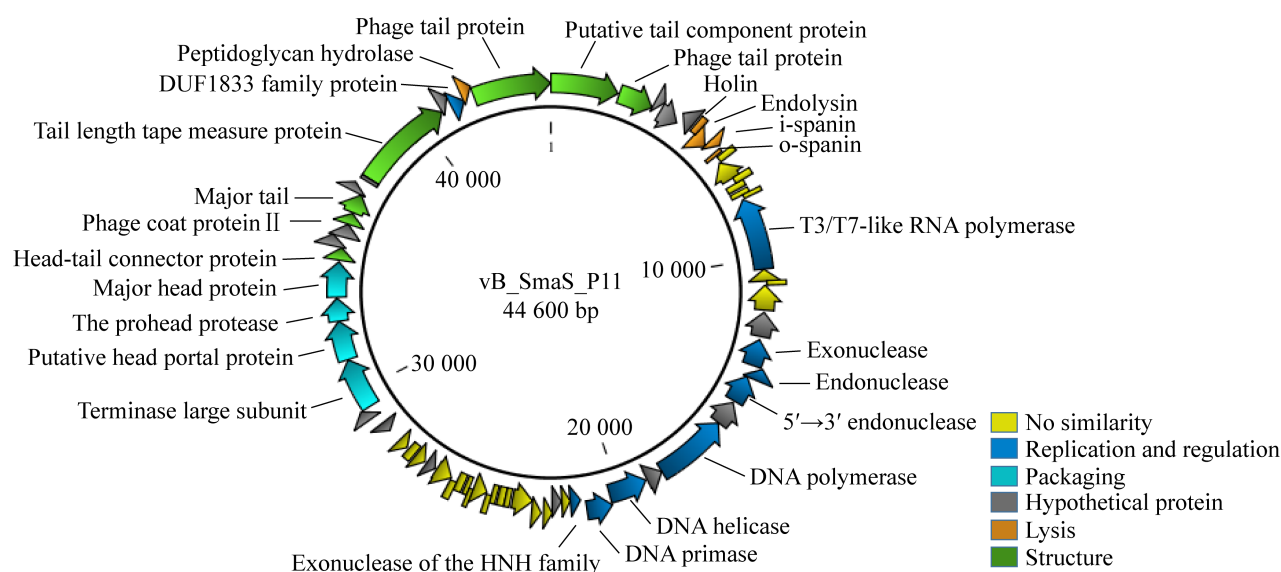


图6 噬菌体 vB_SmaS_P11 基因功能模块图 不同颜色代表具有不同功能的 ORF (顺时针箭头表示在基因组正链上的开放阅读框, 逆时针箭头表示在基因组负链上的开放阅读框)

Figure 6 Genomic functional modular diagram of phage vB_SmaS_P11. Different colors represent different functions (clockwise arrows represent ORFs in sense strand, anti-clockwise arrows represent ORFs in anti-sense strand).

内膜上的 N 末端跨膜结构域, Rz1 编码区域可以是单独的, 也可以嵌入或者与 Rz 重叠, 这 2 种蛋白质可以形成复合物, 这是宿主裂解的最后一步所必需的^[19]。

预测结构蛋白包括 ORF1、ORF2、ORF55、ORF58、ORF59、ORF 62 和 ORF66, 是组成噬菌体尾或与尾相关的蛋白。

预测 ORF16、ORF21、ORF22、ORF23、ORF25、ORF27、ORF28、ORF29 和 ORF64 是参与噬菌体复制与调节的蛋白, 包括 DNA 解螺旋酶、DNA 引物酶、DNA 聚合酶、核酸内切酶和核酸外切酶。

3 讨论与结论

嗜麦芽窄食单胞菌是一种全球范围内与人类严重感染相关的条件致病菌, 可引起呼吸道、血液和泌尿系统感染, 通常从呼吸道感染

患者中被发现, 尤其是免疫功能低下、囊性纤维化合并肺部感染及慢性感染患者^[20]。嗜麦芽窄食单胞菌对大多数抗生素耐药, 并能迅速改变其多重耐药表型^[21]。除了固有耐药性外, 该菌还可通过多种分子机制获得耐药性, 如获得性耐药基因的存在、外膜通透性降低、染色体和质粒编码的转座子及外排泵^[20]。嗜麦芽窄食单胞菌对不同的抗菌剂表现出高水平的固有或获得性耐药, 大大减少了可用于治疗的抗生素选择, 因此, 嗜麦芽窄食单胞菌感染后治疗困难^[2]。自然环境中广泛存在嗜麦芽窄食单胞菌, 任何潮湿的地方都可以发现^[22]。该菌很少感染健康人群, 主要感染免疫力低下的人群, 如住院时间长, 长期使用广谱抗生素、免疫抑制剂或糖皮质激素, 大于 60 岁的老年患者, 合并基础性疾病, 有侵入性操作等^[4,23]。随着老年人口、长期卧床和慢性肺部疾病患者等高危人

群的不断增多,嗜麦芽窄食单胞菌感染的发病率和医院分离率呈现逐年增加趋势,随着抗生素的不合理使用,许多嗜麦芽窄食单胞菌对现有的广谱抗生素产生耐药,抗菌敏感性降低,研发新型抗菌制剂替代或补充手段也不得不提上日程,噬菌体制剂就是一种很有前景的抗菌方法。

自大约 100 年前 Frederick Twort 和 Felix d'Herelle 发现噬菌体以来,噬菌体已经成功用于治疗各种细菌感染^[11,24]。在 D'Herelle 发现并积极研究噬菌体后不久,1919 年巴黎一名 12 岁严重痢疾患者首次使用噬菌体治疗,在使用噬菌体治疗后痢疾的症状在几天内恢复^[25]。早期对噬菌体的研究主要集中在 20 世纪 20–30 年代,并且有公司开始销售噬菌体制剂^[26]。然而,由于缺乏对噬菌体生物学特性的了解、噬菌体制剂使用及保存不当,以及 20 世纪 40 年代抗生素的发现与临床应用,噬菌体疗法逐渐淡出视野^[25]。近年来抗生素耐药问题日益严重,新抗生素的研发面临技术与商业上的障碍,促使人们寻求新的替代或补充抗菌剂,噬菌体治疗的研究再次引起人们的关注。噬菌体治疗相比传统抗生素具有很多优势:特异性强,不会影响机体正常菌群;可以破坏细菌生物被膜;引起的副作用少;增长速度快;噬菌体可单独使用,也可与抗生素联合应用。噬菌体治疗也还有不足之处:噬菌体作为活病毒具有免疫原性,可诱导机体免疫反应,被吞噬细胞清除;噬菌体裂解细菌会产生内毒素。要将噬菌体作为抗菌剂广泛应用,还需要解决一些问题,例如,噬菌体进入宿主体内会被宿主免疫系统清除,噬菌体应用的最佳时间和剂量。

vB_SmaS_P11 潜伏期短,快速增殖约 1 h 到达平台期,表明该噬菌体裂解能力很强。将噬菌体全基因组在 NCBI 数据库 BLASTn 比对

发现,vB_SmaS_P11 与数据库中所有已知噬菌体序列相比相似性低,只与其中一株噬菌体 BUCT 603 有较高相似性。基因注释结果表明,vB_SmaS_P11 含有 66 个开放阅读框,结合 NCBI 数据库 BLASTp 比对结果,其中 25 个 ORF 预测为有功能的蛋白,15 个 ORF 是未知功能的假定蛋白,26 个 ORF 比对结果显示没有相似的序列。以上结果表明 vB_SmaS_P11 是一株新型噬菌体。目前,已分离鉴定的嗜麦芽窄食单胞菌噬菌体只有 26 株,包括 16 个裂解性噬菌体:IME13、IME15、Smp14、DLP1、DLP2、DLP6、AXL3、SM1、BUCT548、BUCT555、phiSMA5、Ponderosa、Pokken、Mendera、Moby 和 Salva;6 个温和性噬菌体:DLP3、DLP4、DLP5、S1、Smp131 和 phiSHP3;4 个丝状噬菌体:phiSMA6、phiSMA7、phiSHP1 和 phiSMA9。因为噬菌体裂解细菌的数量和类型是有限的,因此,分离新型的嗜麦芽窄食单胞菌噬菌体以裂解更多的嗜麦芽窄食单胞菌是很有必要的。通过对噬菌体生物学和基因组特性的研究也为噬菌体治疗提供临床理论基础。

REFERENCES

- [1] Denton M, Kerr KG. Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*[J]. Clinical Microbiology Reviews, 1998, 11(1): 57-80
- [2] Nicodemo AC, Paez JIG. Antimicrobial therapy for *Stenotrophomonas maltophilia* infections[J]. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2007, 26(4): 229-237
- [3] 胡付品,郭燕,朱德妹,汪复,蒋晓飞,徐英春,张小江,张朝霞,季萍,谢轶,等. 2019 年 CHINET 三级医院细菌耐药监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2020, 20(3): 233-243
- Hu FP, Guo Y, Zhu DM, Wang F, Jiang XF, Xu YC, Zhang XJ, Zhang ZX, Ji P, Xie Y, et al. CHINET surveillance of bacterial resistance across tertiary hospitals in 2019[J]. Chinese Journal of Infection and

- Chemotherapy, 2020, 20(3): 233-243 (in Chinese)
- [4] 菅记涌, 解泽强, 全秀秀, 孙盼盼, 陈亮. 1129 株嗜麦芽窄食单胞菌的临床分布和耐药性分析[J]. 标记免疫分析与临床, 2020, 27(11): 1869-1872
- Jian JY, Xie ZQ, Quan XX, Sun PP, Chen L. The clinical distribution and antimicrobial resistance of 1129 *Stenotrophomonas maltophilia* strains[J]. Labeled Immunoassays and Clinical Medicine, 2020, 27(11): 1869-1872 (in Chinese)
- [5] Adegoke AA, Stenström TA, Okoh AI. *Stenotrophomonas maltophilia* as an emerging ubiquitous pathogen: looking beyond contemporary antibiotic therapy[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 2276
- [6] Gould VC, Okazaki A, Avison MB. Beta-lactam resistance and beta-lactamase expression in clinical *Stenotrophomonas maltophilia* isolates having defined phylogenetic relationships[J]. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2006, 57(2): 199-203
- [7] Okazaki A, Avison MB. Aph(3')-IIc, an aminoglycoside resistance determinant from *Stenotrophomonas maltophilia*[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2007, 51(1): 359-360
- [8] Shimizu K, Kikuchi K, Sasaki T, Takahashi N, Ohtsuka M, Ono Y, Hiramatsu K. Sm *qnr*, a new chromosome-carried quinolone resistance gene in *Stenotrophomonas maltophilia*[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2008, 52(10): 3823-3825
- [9] Sánchez MB, Hernández A, Rodríguez-Martínez JM, Martínez-Martínez L, Martínez JL. Predictive analysis of transmissible quinolone resistance indicates *Stenotrophomonas maltophilia* as a potential source of a novel family of Qnr determinants[J]. BMC Microbiology, 2008, 8(1): 1-14
- [10] Housby JN, Mann NH. Phage therapy[J]. Drug Discovery Today, 2009, 14(11/12): 536-540
- [11] Moelling K, Broecker F, Willy C. A wake-up call: we need phage therapy now[J]. Viruses, 2018, 10(12): 688
- [12] Looney WJ, Narita M, Mühlemann K. *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging opportunist human pathogen[J]. The Lancet Infectious Diseases, 2009, 9(5): 312-323
- [13] Zhang WJ, Zhang RR, Hu YJ, Liu YJ, Wang LQ, An XP, Song LH, Shi TX, Fan HH, Tong YG, et al. Biological characteristics and genomic analysis of a *Stenotrophomonas maltophilia* phage vB_SmaS_BUCT548[J]. Virus Genes, 2021, 57(2): 205-216
- [14] Lee CN, Lin JW, Weng SF, Tseng YH. Genomic characterization of the intron-containing T7-like phage phiL7 of *Xanthomonas campestris*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(24): 7828-7837
- [15] Young R. Phage lysis: do we have the hole story yet?[J]. Current Opinion in Microbiology, 2013, 16(6): 790-797
- [16] Wang IN, Smith DL, Young R. Holins: the protein clocks of bacteriophage infections[J]. Annual Review of Microbiology, 2000, 54: 799-825
- [17] 杜丽娟, 杨婷, 张宗德, 郭述良. 一种新型抗菌剂: 噬菌体裂解酶的研究进展[J]. 重庆医科大学学报, 2018, 43(7): 883-887
- Du LJ, Yang T, Zhang ZD, Guo SL. Research progress of a novel antimicrobial agent-phage lytic enzyme[J]. Journal of Chongqing Medical University, 2018, 43(7): 883-887 (in Chinese)
- [18] Etobayeva I, Linden S, Alem F, Harb L, Rizkalla L, Mosier P, Johnson A, Temple L, Hakami R, Nelson D. Discovery and biochemical characterization of PlyP56, PlyN74, and PlyTB40—*Bacillus* specific endolysins[J]. Viruses, 2018, 10(5): 276
- [19] Summer EJ, Berry J, Tran TAT, Niu LL, Struck DK, Young R. Rz/Rz1 lysis gene equivalents in phages of Gram-negative hosts[J]. Journal of Molecular Biology, 2007, 373(5): 1098-1112
- [20] Brooke JS. New strategies against *Stenotrophomonas maltophilia*: a serious worldwide intrinsically drug-resistant opportunistic pathogen[J]. Expert Review of Anti-Infective Therapy, 2014, 12(1): 1-4
- [21] Kanderi T, Shrimanker I, Mansoor Q, Shah K, Yumen AN, Komanduri S. *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging pathogen of the respiratory tract[J]. The American Journal of Case Reports, 2020, 21: e921466
- [22] Anđelković MV, Janković SM, Kostić MJ, Živković Zarić RS, Opančina VD, Živić MŽ, Milosavljević MJ, Pejčić AV. Antimicrobial treatment of *Stenotrophomonas maltophilia* invasive infections: systematic review[J]. Journal of Chemotherapy, 2019, 31(6): 297-306
- [23] Brooke JS. *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging global opportunistic pathogen[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2012, 25(1): 2-41
- [24] Gill JJ, Hyman P. Phage choice, isolation, and preparation for phage therapy[J]. Current Pharmaceutical Biotechnology, 2010, 11(1): 2-14
- [25] Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris JG Jr. Bacteriophage therapy[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2001, 45(3): 649-659
- [26] Salmond GP, Fineran PC. A century of the phage: past, present and future[J]. Nature Reviews Microbiology, 2015, 13(12): 777-786