

研究报告

## 粪肠球菌噬菌体 *vB\_EfaP\_IME195* 的生物学特性及其全基因组分析

邢少贞<sup>1,2</sup> 张湘莉<sup>1</sup> 裴广倩<sup>1</sup> 方云<sup>1</sup> 程实<sup>1</sup> 米志强<sup>1</sup> 安小平<sup>1</sup> 童贻刚<sup>1\*</sup>

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

(2. 河北师范大学生命科学院 河北 石家庄 050024)

**摘要:**【目的】以粪肠球菌为宿主菌,从医院的污水中筛选出相应的粪肠球菌噬菌体 *vB\_EfaP\_IME195*,简称 IME195,研究其生物学特性;并通过高通量测序得到其全基因组,深入研究其基因组学特征。【方法】以临床的耐药粪肠球菌为宿主菌,利用医院污水筛选噬菌体并纯化;对噬菌体 IME195 生物学特性进行了深入研究,包括电镜观察噬菌体形态、最佳感染复数、一步生长曲线、噬菌体 IME195 对紫外线的敏感度、对温度的耐受程度、对 pH 的耐受程度、对氯仿是否敏感;通过蛋白酶 K/SDS 法提取噬菌体 IME195 全基因组;Ion Torrent 高通量测序;测序后进行噬菌体全基因组序列组装、注释、进化分析和比较分析。【结果】通过噬菌体梯度稀释,双层培养基平板法得到噬菌斑边缘分明、斑体透明的裂解性噬菌体 IME195,最佳感染复数为 0.01,一步生长曲线显示 IME195 的潜伏期为 30 min,暴发量为 11。该噬菌体对紫外线比较敏感,对 5%浓度的氯仿不敏感,噬菌体对高温比较敏感,该噬菌体在 pH 6.0–8.0 范围内具有良好的裂解活性;电镜观察结果显示该噬菌体属于尾病毒目短尾噬菌体科;全基因组分析表明:噬菌体 IME195 基因组大小只有 18 607 bp (GenBank 登录号为 KT932700),G+C 含量仅为 33%。BLASTn 比对结果表明,该噬菌体和 GenBank 中的噬菌体 *vB\_Efae230P-4* 只有 82%的相似性。对噬菌体 IME195 进行了全基因组功能注释和进化分析。【结论】分离鉴定了一株粪肠球菌噬菌体,进行了生物学特性、全基因组测序和生物信息学深入分析,为噬菌体治疗多重耐药细菌奠定了基础。

**关键词:** 粪肠球菌,噬菌体,生物学特性,全基因组测序,基因组分析

**Foundation item:** China Mega-Project on Infectious Disease Prevention (No. 2013ZX10004-605, 2013ZX10004-217, 2013ZX10004-607, 2011ZX10004-001); National High-Tech Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2014AA021402, 2012AA022-003); National Natural Science Foundation of China (No. 81572045)

**\*Corresponding author:** E-mail: tong.yigang@gmail.com

**Received:** July 07, 2016; **Accepted:** November 04, 2016; **Published online** (www.cnki.net): November 09, 2016

**基金项目:** 科技重大专项“十二五”实施计划项目(No. 2013ZX10004-605, 2013ZX10004-217, 2013ZX10004-607, 2011ZX10004-001); 国家高技术研究发展计划项目(863 计划)(No. 2014AA021402, 2012AA022-003); 国家自然科学基金项目(No. 81572045)

**\*通讯作者:** E-mail: tong.yigang@gmail.com

**收稿日期:** 2016-07-07; **接受日期:** 2016-11-04; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2016-11-09

## Characterization and genome analysis of a novel bacteriophage *vB\_EfaP\_IME195* infecting *Enterococcus faecalis*

XING Shao-Zhen<sup>1,2</sup> ZHANG Xiang-Li-Lan<sup>1</sup> PEI Guang-Qian<sup>1</sup> FANG Yun<sup>1</sup> CHENG Shi<sup>1</sup>  
MI Zhi-Qiang<sup>1</sup> AN Xiao-Ping<sup>1</sup> TONG Yi-Gang<sup>1\*</sup>

(1. State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Beijing Institute of Microbiology and Epidemiology,  
Beijing 100071, China)

(2. Hebei Normal University, Shijiazhuang, Hebei 050024, China)

**Abstract:** [Objective] Multidrug-resistant strains of *Enterococcus faecalis* are becoming increasingly common worldwide. Therefore, we aimed to find novel agents to control antibiotic-resistant *E. faecalis*. We isolated a lytic bacteriophage from hospital sewage. [Methods] Phage morphology was observed using transmission electron microscopy (TEM), and its genome was sequenced using the Ion Torrent sequencing platform. Genome annotation and comparative and evolutionary analyses were performed following assembly of the complete genome sequence. [Results] Lytic bacteriophage *vB\_EfaP\_IME195* was successfully isolated from infected *E. faecalis* host cells. TEM analysis indicated that the isolated bacteriophage resembled members of the Podoviridae family. The complete genome of *vB\_EfaP\_IME195* was 18 607 bp long, and was comprised of circular dsDNA (GenBank accession No. KT932700). The genome had a G+C content of 33%, and contained only 27 coding sequences. BLASTn analysis showed that *vB\_EfaP\_IME195* shared the highest homology (82%) with *E. faecalis* phage *vB\_Efae230P-4*. [Conclusion] The isolation and characterization of this novel lytic *E. faecalis* phage provides the basis for potential treatment alternatives for multidrug-resistant *E. faecalis* infection.

**Keywords:** *Enterococcus faecalis*, Bacteriophage, Biological Characteristics, Whole genome sequencing, Genomic analysis

粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)属于肠球菌科肠球菌属,是革兰氏阳性菌,过氧化氢阴性球菌,普遍存在于自然界,广泛分布在畜、禽养殖场所和生产加工的环境中,是人和动物肠道内主要菌群之一,属于条件致病菌。正常生长时,粪肠球菌能产生天然抗生素,改善肠道微环境,有利于人体健康;异位寄生时,肠球菌感染是新生儿败血症病因之一,是尿路感染、腹腔感染、盆腔感染的致病菌<sup>[1]</sup>,是主要的医院内感染致病菌。

由于抗生素的持续过度使用以及滥用,同时肠球菌极易形成耐药性,使得耐药菌不断产生<sup>[2-3]</sup>。2014年世界卫生组织在全球监测报告中提出,细菌耐药性是各个国家所关注的健康问题中最严峻的问题,我们每个人都有受耐药菌感染的可能,是21世纪最需要关注的健康问题之一<sup>[4]</sup>。随着新型抗生素的不断开发和使用,新的耐药菌也在不断增加。这使得寻找可替代抗生素的治疗方法刻不容

缓。科学家把研究方向指向了由来已久的噬菌体<sup>[5-6]</sup>。许多国家也开始重新审视噬菌体疗法<sup>[7-8]</sup>。噬菌体已经首先在农业和食品工业中使用<sup>[9-10]</sup>。噬菌体在美国开始应用于食品行业生物防控<sup>[11]</sup>。多重耐药肠球菌噬菌体的发现也为临床噬菌体治疗提供了很多资源<sup>[12]</sup>。

本研究中,我们利用一株从医院临床分离到的多重耐药肠球菌,从医院污水中分离出一株基因组较小的裂解性噬菌体 *vB\_EfaP\_IME195*,并对其进行了生物学特性研究,包括电镜观察噬菌体形态、最佳感染复数、一步生长曲线、噬菌体 *IME195* 对紫外线的敏感度、对温度的耐受程度、对 pH 的耐受程度、对氯仿是否敏感。对全基因组进行测序后进行噬菌体全基因组序列组装,噬菌体 *IME195* 是少有的基因组较小的噬菌体。本研究进一步对该噬菌体基因组进行了注释,深入基因组功能分析,注释结果表明该噬菌体基因组只有 27 个开放阅读框,

基因组基因密度高达 94.6%, 并对该噬菌体进行了比较分析及进化分析, 为深入研究噬菌体机制及噬菌体治疗多重耐药细菌奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

粪肠球菌(2003)来自于珠海迪尔公司所收集的医院妇产科女性患者分泌物和呕吐物, 经过生化性质鉴定和药敏实验及 16S rRNA 基因序列测序鉴定, 保存于本实验室细菌库。BHI (Brain Heart Infusion)培养基购自 BD 医疗器械有限公司。

### 1.2 噬菌体的分离与鉴定

从 307 医院污水处理站取回的污水, 10 000 r/min 离心 10 min。取上清, 用 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜进行过滤; 取上述滤液 100  $\mu\text{L}$  加入到 5 mL 培养至对数期的粪肠球菌液体培养物中, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 培养过夜, 12 000 r/min 离心 2 min, 收集上清, 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜进行过滤, 所得滤液即为噬菌体原液。利用噬菌体原液点板实验检测是否分离到敏感性噬菌体。噬菌体的纯化按照文献[13]所描述的步骤进行。

### 1.3 噬菌体最佳感染复数测定

参照李晓玉等<sup>[13]</sup>的方法, 略有改动。

感染复数(Multiplicity of infection, MOI), 是感染时噬菌体与细菌的数量比值。而最佳感染复数, 是可使噬菌体获得最佳生长状态时的感染复数。详细测定方法为: 将噬菌体混合液和宿主菌液分别按照 MOI 为 0.01、0.1、1、10、100 的拷贝数比例混合各 2 mL 加入新鲜的 BHI 培养基补足体积至 10 mL, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 振荡培养 6 h; 12 000 r/min 离心 1 min, 分别用 0.45  $\mu\text{m}$  滤器过滤; 梯度稀释后, 双层平板法测定噬菌体的滴度, 其中噬菌体滴度最高的 MOI 即为最佳感染复数。

### 1.4 噬菌体一步生长曲线测定

参照李晓玉等<sup>[13]</sup>的方法, 略有改动。

将粪肠球菌 2003 培养至  $OD_{600}$  值为 0.6 左右, 取 100  $\mu\text{L}$  菌液倍比稀释进行涂板, 确定在此状态下每毫升菌液所含的细菌个数; 将粪肠球菌 2003 接种

至适量体积的新鲜 BHI 培养基, 培养至对数期后 12 000 r/min 离心 2 min 后重悬于 BHI 培养基, 使其浓度达到  $10^8$  CFU/mL, 以感染复数 MOI 为 0.01 加入噬菌体 IME195, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 振荡培养; 自加入噬菌体开始计时, 分别在 0、10、20、30、40、50、60、90 和 120 min 时间点取样, 并测定噬菌体滴度; 以感染时间为横坐标, 以各时间点噬菌体滴度为纵坐标绘制 IME195 的一步生长曲线。

### 1.5 噬菌体 *vB\_EfaP\_IME195* 裂解谱测定

通过点板试验, 将受试菌(26 株粪肠球菌、28 株屎肠球菌、5 株金黄色葡萄球菌和 5 株大肠杆菌)培养至  $OD_{600}$  为 0.6 左右, 取出 400  $\mu\text{L}$  铺双层平板, 室温静置 5 min, 将 2.5  $\mu\text{L}$  噬菌体原液滴于双层平板上, 室温静置 20 min, 待噬菌体原液被吸收后, 倒置于 37  $^{\circ}\text{C}$  温箱中 9 h 后观察有无噬菌斑产生。

### 1.6 噬菌体 *vB\_EfaP\_IME195* 对紫外线的敏感性

取 20 mL 噬菌体原液( $10^8$  PFU/mL), 倒入 8 cm 的无菌培养皿中, 置于紫外灯下照射(20 W, 30 cm), 分别在处理 0、15、30、45、60、75、90、105、120 min 后, 各取 3 个 100  $\mu\text{L}$  噬菌体进行 10 倍梯度稀释, 采用双层平板法观察是否有噬菌斑并计算噬菌体的滴度, 没有进行紫外灯照射的噬菌体设置为对照组。

### 1.7 噬菌体 *vB\_EfaP\_IME195* 对氯仿的敏感性

将噬菌体原液( $10^8$  PFU/mL)与氯仿按照 0、1%、2%、5%的比例进行混合, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 培养 30 min。0、1%、2%、5%的分层液中各取 3 个上层噬菌体 100  $\mu\text{L}$  进行 10 倍的梯度稀释, 利用双层平板法计算噬菌体滴度。

### 1.8 噬菌体 *vB\_EfaP\_IME195* 的热稳定性

用无菌 1.5 mL 离心管分别取 900  $\mu\text{L}$  的 BHI 液体培养基分别于 40、50、60、70、80  $^{\circ}\text{C}$  水浴预热 60 min, 设置 3 组平行实验; 待温度稳定后, 加入 100  $\mu\text{L}$  噬菌体原液( $10^8$  PFU/mL), 分别在作用 30 min 和 60 min 后取出样品管置于 4  $^{\circ}\text{C}$  冷却至室温; 用 PBS 缓冲液进行 10 倍梯度稀释后, 分别取 100  $\mu\text{L}$  与 400  $\mu\text{L}$  对数期宿主菌 2003 混合, 采用双

层平板法计算噬菌体滴度,并记录。

### 1.9 噬菌体 *vB\_EfaP\_IME195* 对 pH 的敏感性

用 1 mol/L HCl 和 1 mol/L NaOH 将 BHI 培养基调至 pH 值为 2.0–14.0; 分别取 900  $\mu$ L 的不同 pH 值的 BHI 培养基于无菌 1.5 mL 离心管中, 每个 pH 值设置 3 个平行实验; 置于 37  $^{\circ}$ C 温箱中预热 60 min; 每管加入 100  $\mu$ L 噬菌体原液( $10^8$  PFU/mL); 在 37  $^{\circ}$ C 温箱作用 60 min 后, 用 PBS 进行 10 倍梯度稀释, 每管取出 100  $\mu$ L 与 400  $\mu$ L 对数期宿主菌 2003 混合, 利用双层平板法计算噬菌体滴度, 并记录。

### 1.10 噬菌体 *vB\_EfaP\_IME195* 的电镜观察

取已纯化的噬菌体样品 20  $\mu$ L 滴入碳膜铜网上吸附 20 min, 使用 2% 磷钨酸(PTA)染色 5 min, 室温干燥后在 Philips TECNAI-10 型透射电子显微镜(TEM)下观察噬菌体的形态。

### 1.11 噬菌体 *vB\_EfaP\_IME195* 基因组 DNA 的提取

噬菌体基因组利用蛋白酶 K/SDS 的方法提取按照李晓玉等<sup>[13]</sup>所述方法, 略有改动。取 600  $\mu$ L 已纯化过滤的噬菌体液体, 加入 DNase I 和 RNase A 至终浓度 1 mg/L, 37  $^{\circ}$ C 孵育 16 h; 80  $^{\circ}$ C 灭活 20 min, 使酶充分失活; 加入裂解缓冲液(终浓度, 0.02 mol/L EDTA 50 g/L 蛋白酶 K 0.5% SDS) 56  $^{\circ}$ C 水浴 1 h。加入等体积平衡酚抽提核酸, 12 000 r/min 离心 10 min, 转移上层水相至新的 1.5 mL 离心管中; 再加入等体积的酚-氯仿-异戊醇(25:24:1, 体积比), 温和混匀后 12 000 r/min 离心 10 min, 以去除蛋白质、糖类等污染物质, 取上层水相至新的 1.5 mL 离心管中; 加入等体积的异丙醇, -20  $^{\circ}$ C 静置 4 h 后 12 000 r/min 离心 15 min, 收集沉淀; 用 75% 的乙醇(预冷)洗涤上述 DNA 沉淀, 室温干燥后用适量去离子水重悬上述 DNA 沉淀。

### 1.12 噬菌体 *vB\_EfaP\_IME195* 高通量测序文库的构建与高通量测序

噬菌体 *vB\_EfaP\_IME195* 的 DNA 全基因组测序是用的 Life technologies 公司第二代高通量测序仪(PGM)来完成。主要分为构建 DNA 文库和上机

测序两大部分。DNA 文库的构建是严格按照 NEB 公司的构建文库手册(NEBNext Fast DNA Library Prep Set for Ion Torrent protocol)来完成。主要流程为取 100 ng 的高质量噬菌体基因组 DNA, 超声打断约 15 min, 末端补平, 两端加接头; 加入 1.8 倍体积的 AMPure XP Beads 纯化 DNA, 使用 E-Gel 胶选择长约 350 bp 的 DNA 片段; PCR 扩增上述 DNA 片段, 加入 1 倍体积的 AMPure XP Beads 纯化 PCR 扩增产物。随后进行上机包括油包水 PCR 反应, 碱法制备单链 DNA 测序模板; 将带有模板的微磁珠离心到 318C 芯片微孔中, 上机测序。

### 1.13 噬菌体 *vB\_EfaP\_IME195* 的全基因组序列分析

噬菌体 *vB\_EfaP\_IME195* 全基因组序列组装使用 Newbler V2.9 软件和 CLC 软件。全基因组注释使用 RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology)<sup>[14]</sup> 和 BASys (Bacterial Annotation System)在线注释。序列相似性比对分析使用 BLAST 在线工具<sup>[15]</sup>及 Mauve V. 2.3.1, 使用 MEGA 6.0 建立进化树。

## 2 结果与分析

### 2.1 噬菌体 *vB\_EfaP\_IME195* 的形态

以从医院临床患者分离出的粪肠球菌 2003 为指示菌, 从医院污水中分离到一株裂解性粪肠球菌噬菌体, 命名为 IME195, IME195 能在铺有 400  $\mu$ L 指示菌和 100  $\mu$ L 噬菌体混合的双层平板<sup>[13]</sup>上形成直径约 1 mm 清晰透亮的噬菌斑, 见图 1A。电镜照片表明该噬菌体具有典型的二十面体结构和以收缩的尾部, 头部直径约 60 nm, 尾部长约 80 nm, 归属于短尾噬菌体科(Podoviridae), 见图 1B。根据国际委员会关于噬菌体命名的方法中, 该噬菌体命名为 *vB\_EfaP\_IME195*。

### 2.2 噬菌体 *vB\_EfaP\_IME195* 的最佳感染复数

按表 1 所示比例加入噬菌体和宿主菌培养 9 h, 分别测定各 MOI 的噬菌体滴度。从表 1 中看出当 MOI 为 0.01 时噬菌体滴度最高, 该结果表明噬菌体的最佳感染复数为 0.01。

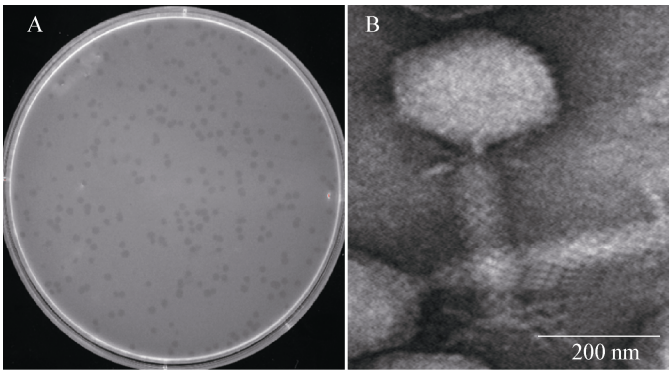


图 1 噬菌体 IME195 的形态  
Figure 1 The morphology of phage IME195

注：A：噬菌体 IME195 所形成噬菌斑；B：透射电镜下噬菌体 IME195 的形态(10 000×).  
Note: A: The plaque formed by IME195; B: The morphology of phage IME195 in transmission electron microscopy (TEM×10 000).

表 1 噬菌体最佳感染复数 Table 1 Determination of optimal multiplicity of infection (MOI)				
编号 No.	细菌浓度 Bacteria (CFU/mL)	噬菌体浓度 Phage (PFU/mL)	感染复数 MOI	9 h 滴度 9 h Titer (PFU/mL)
1	10 <sup>8</sup>	10 <sup>9</sup>	0.01	5.8×10 <sup>9</sup>
2	10 <sup>8</sup>	10 <sup>8</sup>	0.10	1.2×10 <sup>9</sup>
3	10 <sup>8</sup>	10 <sup>7</sup>	1.00	2.3×10 <sup>8</sup>
4	10 <sup>8</sup>	10 <sup>6</sup>	10.00	2.1×10 <sup>7</sup>
5	10 <sup>8</sup>	10 <sup>5</sup>	100.00	3.1×10 <sup>7</sup>

2.3 噬菌体 *vB\_EfaP\_IME195* 的一步生长曲线  
通过研究噬菌体的一步生长曲线规律，来测定噬菌体的裂解能力。由图 2 可知，在前 30 min 为噬菌体的潜伏期，噬菌体的裂解量约为噬菌体滴度/细菌的浓度=1.1×10<sup>9</sup>/1×10<sup>8</sup>=11。30 min 后噬菌体呈指数增长趋势。

2.4 噬菌体 *vB\_EfaP\_IME195* 的裂解谱的测定  
噬菌体 IME195 只对 2 株粪肠球菌有裂解能

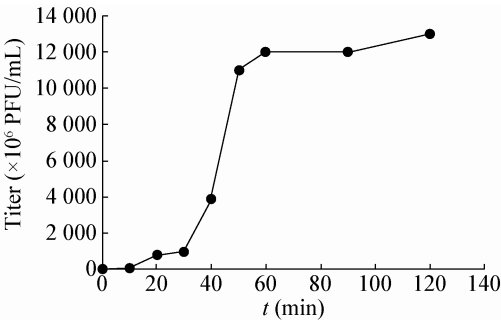


图 2 噬菌体 IME195 的一步生长曲线  
Figure 2 One-step growth curve of phage IME195

力。IME195 对其他粪肠球菌、屎肠球菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌无裂解能力。

2.5 噬菌体 *vB\_EfaP\_IME195* 对紫外线的敏感性  
由图 3 可以看出，噬菌体 IME195 经紫外线处理后，随着时间的增长，噬菌体的存活率急剧下降，当作用 45 min 后，噬菌体的存活率仅为 6%，120 min 后噬菌体基本全部失活，说明该噬菌体对紫外线比较敏感。

2.6 噬菌体 *vB\_EfaP\_IME195* 对氯仿的敏感性  
由于氯仿具有脂溶性，所以将氯仿与噬菌体原液以 0、1%、2%、5%的比例作用后，效价分别为 5.0×10<sup>8</sup>、7.0×10<sup>8</sup>、6.8×10<sup>8</sup>、7.0×10<sup>8</sup> PFU/mL，用氯仿处理后与未经处理的噬菌体滴度无明显差异，说明该噬菌体的活性并不受氯仿影响，暗示该噬菌体可能不含脂类物质<sup>[16]</sup>。

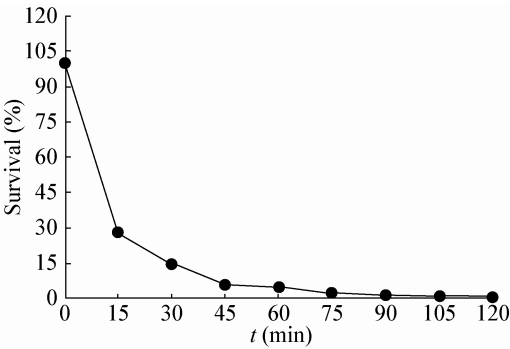


图 3 噬菌体 IME195 对紫外线的敏感性  
Figure 3 Sensitivity of phage IME195 to ultraviolet

## 2.7 噬菌体 *vB\_EfaP\_IME195* 的热稳定性

如图 4 所示,噬菌体 IME195 随着温度的升高,噬菌体的滴度急剧下降,在 40–80 °C 作用 30 min 和 60 min 后噬菌体滴度均急剧下降;80 °C 作用下噬菌体基本全部失活;该结果表明噬菌体对高温比较敏感。

## 2.8 噬菌体 *vB\_EfaP\_IME195* 的 pH 稳定性

如图 5 所示,噬菌体 IME195 在 pH 6.0–8.0 范围具有良好的裂解活性。随着 pH 值的升高,噬菌体的滴度急剧下降。pH 为 12.0 时,噬菌体基本失去活性;随着 pH 值的降低,噬菌体的活性急剧下降,当 pH 为 3.0 时,噬菌体基本失活。

## 2.9 噬菌体 *vB\_EfaP\_IME195* 全基因组测序和组装

约 100 ng 的噬菌体基因组用于构建 DNA 测序文库,测序约产生 45 350 条平均长度为 296 bp 的高质量测序片段(Reads),组装结果产生长约 18 kb 的单一 CONTIG (重叠群),选取约环化后完整基因组长度为 18 607 bp。平均覆盖倍数为

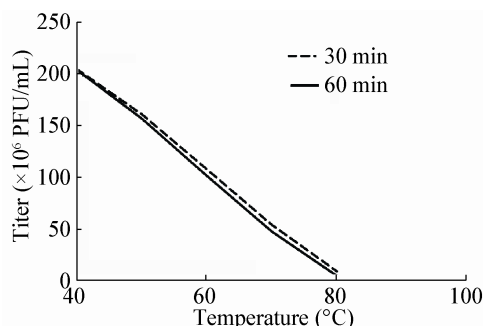


图 4 噬菌体 IME195 的热稳定性

Figure 4 Thermal stability of phage IME195

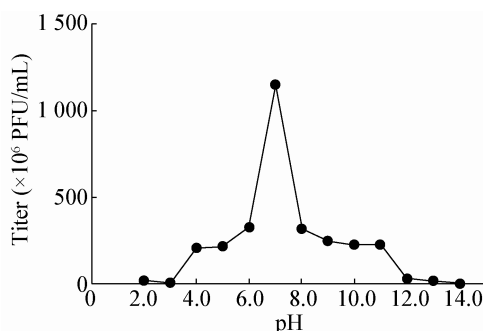


图 5 噬菌体 IME195 的 pH 稳定性

Figure 5 pH stability of phage IME195

721 (13 423 600÷18 607=721)倍。噬菌体 IME195 基因组组装结果产生长约 18 kb 的单一 CONTIG (重叠群),运用末端高频序列方法分析<sup>[17]</sup>,没有发现高频序列,即由测序数据分析可知该噬菌体基因组是环状存在。

## 2.10 噬菌体 *vB\_EfaP\_IME195* 全基因组分析概述

噬菌体 *vB\_EfaP\_IME195* 全基因组长度仅为 18 607 bp,是少有的小基因组噬菌体,其核酸序列 NCBI 登录号为 KT932700。基因组 A、C、G、T 碱基含量分别为 34%、16%、17%和 33%,G+C 含量仅为 33%。BLASTn 比对表明与 *vB\_EfaP\_IME195* 具有同源性的序列仅有一条即粪肠球菌噬菌体 *vB\_Efae230P-4* (GenBank 登录号 JQ309827, 18 kb),二者的同源区仅为 80%,最高同源性为 82%。RAST 注释结果表明只有 27 个开放阅读框(ORFs),27 个 ORF 中起始密码均为 ATG。CDS 核酸序列长度在 159–2 349 bp 之间,对应的蛋白质序列长度在 52–750 aa 之间。全部的 ORF 共含 17 604 bp 的碱基,基因组基因密度高达 94.6%。图 6 为 MAUVE V.2.3.1 所作两株噬菌体之间的同源分析图,发现有很大的缺失,基因组间同源性有很大差异。

## 2.11 噬菌体 *vB\_EfaP\_IME195* 功能性 ORF 分析

使用 BLASTp 对蛋白序列分析表明,ORF9 (噬菌体包装蛋白)在噬菌体包装时起重要作用。结构蛋白 ORF25 (主要衣壳蛋白) 1 566 bp 是噬菌体主要衣壳蛋白。ORF20–ORF22 编码噬菌体尾部相关蛋白,ORF23–ORF26 主要负责噬菌体尾部基底板,这两个基因簇在噬菌体感染、吸附宿主菌时发挥重要作用。

在噬菌体 DNA 复制及调控相关基因中只包括: ORF10 (DNA 聚合酶)和 ORF3 (单链 DNA 结合蛋白),由于基因组较小,没有发现复制过程中相关的 DNA 引物酶、DNA 拓扑异构酶、DNA 解旋酶和转录调控因子等。

ORF16 (噬菌体裂解酶)是噬菌体裂解相关基因。ORF19 编码穿孔蛋白,使细菌细胞膜穿孔。该噬菌体可能是通过同时表达上述两种蛋白来介导宿主细胞裂解的。

已知功能的 ORF 的详细说明见表 2。



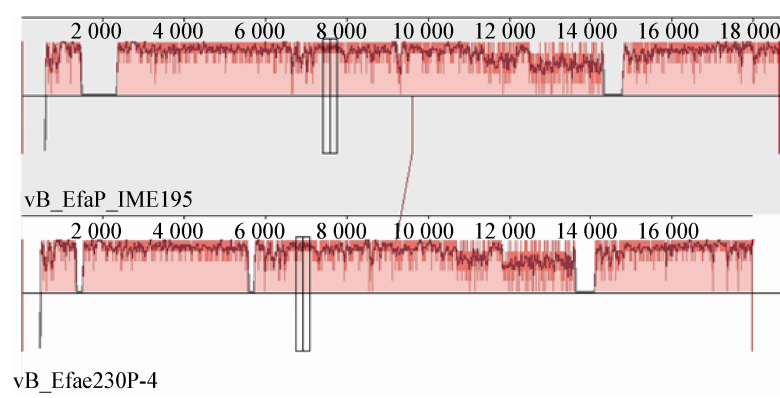


图 6 vB\_EfaP\_IME195 与其近源噬菌体 vB\_Efae230P-4 的同源分析  
Figure 6 The homology comparison between vB\_EfaP\_IME195 and vB\_Efae230P-4

表 2 噬菌体 IME195 的 ORF 功能预测 Table 2 ORF analysis of the IME195 genome				
ORF	Top BLAST hit <sup>a</sup>	Identity <sup>b</sup> (%) (aa)	E value	Accession No.
1	No hits			
2	Hypothetical protein [Enterococcus phage vB_Efae230P-4]	56 (54/97)	1.00E-25	YP_009103980.1
3	Putative single-stranded DNA binding protein [Enterococcus phage vB_Efae230P-4]	95 (104/110)	3.00E-69	YP_009103979.1
4	Hypothetical protein [Lachnospiraceae bacterium C6A11]	100 (59/59)	5.00E-33	YP_009191322.1
5	Schlafen family member 13 [Chelonia mydas]	35 (19/54)	2.0	EMP28893.1
6	No hits			
7	Nitrite reductase large subunit [Salmonella enterica]	31 (14/45)	8.5	WP_049292941.1
8	Hypothetical protein[Enterococcus phage vB_Efae230P-4]	98 (137/140)	3.00E-98	YP_009103977.1
9	Putative encapsidation protein [Enterococcus phage vB_Efae230P-4]	94 (390/413)	0	YP_009103976.1
10	Putative DNA polymerase [Enterococcus phage vB_Efae230P-4]	96 (748/782)	0	YP_009103975.1
11	Hypothetical protein[Enterococcus phage vB_Efae230P-4]	89 (50/56)	2.00E-27	YP_009103973.1
12	Hypothetical protein[Enterococcus phage vB_Efae230P-4]	68 (46/68)	1.00E-28	YP_009103972.1
13	Hypothetical protein[Enterococcus phage vB_Efae230P-4]	56 (32/57)	1.00E-11	YP_009103971.1
14	Hypothetical protein[Enterococcus phage vB_Efae230P-4]	67 (51/76)	9.00E-29	YP_009103970.1
15	Putative HNH DNase [Enterococcus phage vB_Efae230P-4]	93 (156/167)	1.00E-111	YP_009103969.1
16	Phage lysin [Enterococcus phage vB_Efae230P-4]	91 (429/472)	0	YP_009103968.1
17	Hypothetical protein[Enterococcus phage vB_Efae230P-4]	66 (68/103)	0	YP_009103967.1
18	Putative N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase [Enterococcus phage vB_Efae230P-4]	90 (233/258)	1.00E-168	YP_009103966.1
19	Putative holin [Enterococcus phage vB_Efae230P-4]	96 (125/130)	2.00E-87	YP_009103965.1
20	Putative tail structural protein [Enterococcus phage vB_Efae230P-4]	72 (424/586)	0	YP_009103964.1
21	No hits			
22	Putative calcineurin-like phosphoesterase [Enterococcus Phage vB_Efae230P-4]	49 (259/526)	1.00E-161	YP_009103962.1
23	Putative lower collar protein [Enterococcus phage vB_Efae230P-4]	74 (131/178)	8.00E-94	YP_009103961.1
24	Putative head-tail connector protein [Enterococcus phage vB_Efae230P-4]	92 (316/344)	0	YP_009103960.1
25	Putative major head protein [Enterococcus phage vB_Efae230P-4]	94 (372/394)	0	YP_009103959.1
26	No hits			
27	No hits			

注：<sup>a</sup>：最相近的基因组的微生物物种的基因和名称。No hits：没有比对到相近的氨基酸序列。<sup>b</sup>：BLASTp 搜索到比对百分比。  
Note: <sup>a</sup>: The most closely related genes and names of the organisms. No hits: Indicates no significant homology detected for a particular amino acid sequence. <sup>b</sup>: Percent identity for top hits in BLASTp searches.

## 2.12 噬菌体 *vB\_EfaP\_IME195* 进化分析

为了分析 *vB\_EfaP\_IME195* 与其他噬菌体之间的关系, 采用噬菌体 *vB\_EfaP\_IME195* 主要衣壳蛋白(ORF25)序列构建了进化树。使用 MEGA 6.0 建立进化树分析, 软件中 ClustalW multiple alignments 比对主要衣壳蛋白氨基酸序列, 使用 Neighbor-Joining 建树, Bootstrap 值>68。括号为用于比对的各噬菌体蛋白质序列登录号(图 7)。进化树反映, 节点的数值代表可信度, 支长代表遗传距离, *vB\_EfaP\_IME195* 与粪肠球菌噬菌体 *vB\_Efae230P-4* 亲缘关系最近, 与其他的噬菌体亲缘关系较远。

## 3 讨论

自抗生素投入临床以来, 细菌耐药就一直是对研究者的很大挑战, 目前世界卫生组织更是认为细菌耐药是 21 世纪以后的最大难题之一。为解决抗生素耐药性的问题, 噬菌体成为最优的候选者, 更是有些临床已经开始应用, 甚至公司开始生产噬菌体制剂, 由于噬菌体有宿主特异性, 单一噬菌体制剂有可能不满足治疗要求, 噬菌体混合制剂的

“鸡尾酒”疗法以及个性化噬菌体治疗的方法可能是未来噬菌体治疗的研究选择方向之一。

本研究利用临床分离的多重耐药粪肠球菌筛选到一株新型裂解性噬菌体, 通过电镜观察噬菌体, 命名为 *vB\_EfaP\_IME195*。基因测序表明, 噬菌体 *IME195* 大小只有 18 607 bp (GenBank 登录号为 KT932700), 噬菌体基因组之小罕有见到, 而且为裂解性噬菌体, 目前没有文献报道。BLASTn 比对表明与 *vB\_EfaP\_IME195* 具有同源性的序列仅有一条, 即粪肠球菌噬菌体 *vB\_Efae230P-4* (GenBank 登录号 JQ309827, 18 kb), 二者的一致区仅为 80%, 最高相似性为 82%。通过 RAST 基因组功能注释, 结果表明, 该噬菌体由于基因组较小, 只有 27 个 ORF, 功能蛋白相较于其他噬菌体并未减少, 后续可以用作模式噬菌体来研究噬菌体的其他功能, 以及是如何进行复制、繁殖、组装、释放的。ORF16 (噬菌体裂解酶)是噬菌体裂解相关基因。ORF19 编码穿孔蛋白, 使细菌细胞膜穿孔。该噬菌体可能是通过同时表达上述两种蛋白来介导宿主细胞裂解的。穿孔蛋白和裂解酶基因相差距离较远, 有待于研究; 后续裂解酶的研究有利于未来利

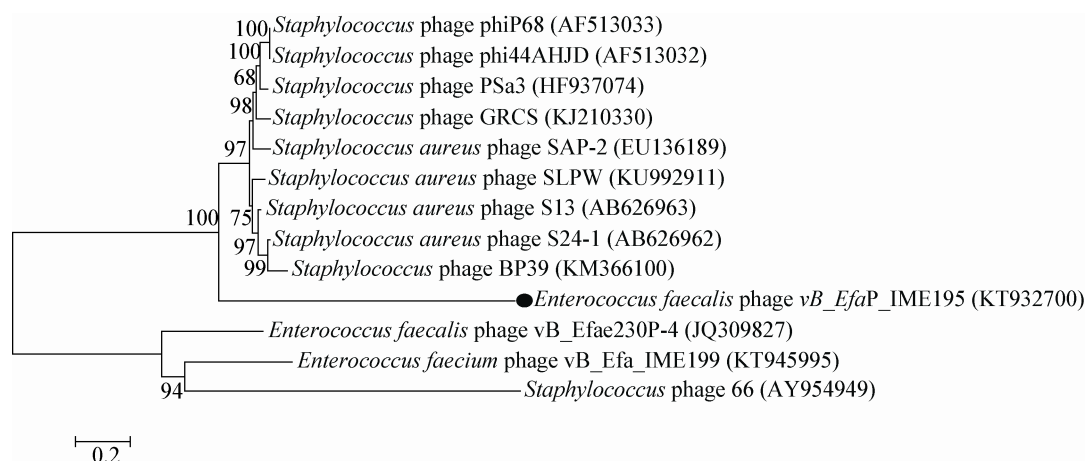


图 7 使用噬菌体主要衣壳蛋白制作的进化树

Figure 7 Phylogenetic tree was formed by major capsid protein of phage

注: 括号中的序号: 代表噬菌体基因组序列号; 分支点上的数字: 代表可信度, 数值越接近 100, 可信度越强; 标尺: 代表遗传距离, 标尺越短代表亲缘关系越近; 黑色圆点: *vB\_EfaP\_IME195*。

Note: The number in the brackets: The genome sequence number in GenBank; The number at the branch point: The confidence level; Scale: The genetic distance; Black ball: *vB\_EfaP\_IME195*.



用酶来治疗细菌感染,酶的作用表现出比噬菌体更稳定的优势。对噬菌体感染宿主时受体机制的研究有待于深入<sup>[18]</sup>。

本研究中噬菌体 *vB\_EfaP\_IME195* 对氯仿不敏感,氯仿具有脂溶性,表明该噬菌体衣壳内可能不含有脂类物质,所以若在提取噬菌体全基因组时,将氯仿加入噬菌体培养液中,可以破坏宿主的细胞壁,进而释放出更多宿主细菌内的噬菌体,提高噬菌体滴度<sup>[18]</sup>。

由于人们对噬菌体的认识还不是很充分,还有更广阔的空间待人们去发掘<sup>[16]</sup>。噬菌体治疗还有更广阔的发展空间<sup>[19]</sup>。

## 参 考 文 献

- [1] Anderson TF. Bacteriophages[J]. Annual Review of Microbiology, 1950, 4(1): 21-34
- [2] Klare I, Witte W, Wendt C, et al. Vancomycin-resistant enterococci (VRE). Recent results and trends in development of antibiotic resistance[J]. Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz, 2012, 55(11/12): 1387-1400
- [3] Karki S, Houston L, Land G, et al. Prevalence and risk factors for VRE colonisation in a tertiary hospital in Melbourne, Australia: a cross sectional study[J]. Antimicrobial Resistance & Infection Control, 2012, 1: 31
- [4] World Health Organization. Antimicrobial resistance: global report on surveillance[R]. Geneva: World Health Organization, 2014
- [5] Sulakvelidze A, Morris JG. Bacteriophages as therapeutic agents[J]. Annals of Medicine, 2001, 33(8): 507-509
- [6] Clark JR, March JB. Bacteriophages and biotechnology: vaccines, gene therapy and antibacterials[J]. Trends in Biotechnology, 2006, 24(5): 212-218
- [7] Matsuzaki S, Uchiyama J, Takemura-Uchiyama I, et al. Perspective: the age of the phage[J]. Nature, 2014, 509(7498): S9
- [8] Reardon S. Phage therapy gets revitalized[J]. Nature, 2014, 510(7503): 15-16
- [9] Sulakvelidze A. Using lytic bacteriophages to eliminate or significantly reduce contamination of food by foodborne bacterial pathogens[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2013, 93(13): 3137-3146
- [10] Guenther S, Huwyler D, Richard S, et al. Virulent bacteriophage for efficient biocontrol of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(1): 93-100
- [11] Flaherty JE, Harbaugh BK, Jones JB, et al. H-mutant bacteriophages as a potential biocontrol of bacterial blight of geranium[J]. HortScience, 2001, 36(1): 98-100
- [12] Zhang WH, An XP, Fan H, et al. Isolation and characterization of an *Enterococcus faecalis* phage[J]. Letters in Biotechnology, 2013, 24(4): 484-487 (in Chinese)  
张文惠, 安小平, 范航, 等. 一株粪肠球菌噬菌体的分离及其生物学特性研究[J]. 生物技术通讯, 2013, 24(4): 484-487
- [13] Li XY, Ding P, Han CY, et al. Isolation of a novel *Enterococcus faecalis* phage IME-EF3 and its potential therapeutic advantages[J]. Biomedical Engineering and Clinical Medicine, 2014, 18(2): 113-118 (in Chinese)  
李晓玉, 丁鹏, 韩传银, 等. 粪肠球菌噬菌体IME-EF3的分离及其治疗优势的发掘[J]. 生物医学工程与临床, 2014, 18(2): 113-118
- [14] Aziz RK, Bartels D, Best AA, et al. The RAST server: rapid annotations using subsystems technology[J]. BMC Genomics, 2008, 9(1): 75
- [15] Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs[J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(17): 3389-3402
- [16] Kährström CT. With a little help from my phage friends[J]. Nature Reviews Microbiology, 2013, 11(8): 507
- [17] Fan H, Zhao QM, Guo XF, et al. Complete genome sequence of Xishuangbanna flavivirus, a novel mosquito-specific flavivirus from China[J]. Archives of Virology, 2016, 161(6): 1723-1727
- [18] Alonso MDC, Rodríguez J, Borrego JJ. Characterization of marine bacteriophages isolated from the Alboran Sea (Western Mediterranean)[J]. Journal of Plankton Research, 2002, 24(10): 1079-1087
- [19] Wootton L. A new barrier at mucosal surfaces[J]. Nature Reviews Microbiology, 2013, 11(7): 430-431