



## 研究报告

## 屎肠球菌噬菌体 vB\_EfaS\_29 生物学特性及基因组分析

仲召鑫<sup>1,2</sup> 朱树娇<sup>1</sup> 张辉<sup>1</sup> 周艳<sup>1</sup> 王冉<sup>\*1</sup> 包红朵<sup>\*1</sup>

1 江苏省食品质量安全重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地 江苏省农业科学院农产品质量安全与营养研究所 农业农村部农产品质量安全风险评估实验室(南京) 江苏 南京 210014

2 江苏沿海地区农业科学研究所 江苏 盐城 224002

**摘要:**【背景】随着屎肠球菌耐药性越来越严重,亟需筛选获得新的、裂解效率高且遗传背景清晰的裂解性噬菌体,丰富噬菌体资源,为噬菌体疗法提供可用的菌株。【目的】从江苏省南京市西岗奶牛场粪便样品中分离出一株裂解性屎肠球菌噬菌体,研究其生物学特性及分析基因组学特征。

【方法】通过双层平板法对其进行纯化,观察噬菌斑特征,透射电镜观察噬菌体形态,测定一步生长曲线、pH 耐受性、温度耐受性以及最佳感染复数,对噬菌体进行全基因组测序及遗传进化分析。【结果】分离并纯化的一株裂解性屎肠球菌噬菌体命名为 vB\_EfaS\_29,其噬菌斑圆形透亮,外周无晕环。该噬菌体头部呈二十面体,头部直径约 52.4 nm,尾长约 157.1 nm,为长尾噬菌体科。该噬菌体的最佳感染复数为 0.1,最高耐受温度为 70 °C 左右,当 pH 值在 6.0–9.0 时其效价稳定。一步生长曲线表明,其潜伏期为 10 min,暴发期约为 50 min,暴发量为 80。基因组全长 41 014 bp,GC 含量为 34.99%,共有 63 个开放阅读框(Open Reading Frame, ORF),其中 36 个被注释出已知基因,基因组中不含毒力基因、耐药基因及整合基因。进化分析显示以裂解酶编码氨基酸为靶标对比,该噬菌体与 GenBank 上的粪肠球菌噬菌体 vB\_EfaS\_DELF1 相似性大于 99%,但是以噬菌体衣壳蛋白编码氨基酸为靶标对比发现,该噬菌体肠球菌与其他噬菌体遗传距离均较远。【结论】分离出一株裂解性屎肠球菌噬菌体,对其进行生物学特性及基因组分析,为噬菌体研究和应用提供理论依据及研究基础。

**关键词:** 屎肠球菌, 噬菌体, 生物学特性, 基因组分析

**Foundation items:** National Key Research and Development Program of China (2018YFE0101900); National Natural Science Foundation of China (31972764); Agricultural Science and Technology Innovation Fund of Jiangsu Province (cx(20)3012)

**\*Corresponding authors:** E-mail: WANG Ran: ranwang@jaas.ac.cn; BAO Hongduo: baohongduo@163.com

**Received:** 09-08-2021; **Accepted:** 24-08-2021; **Published online:** 27-08-2021

**基金项目:** 国家重点研发计划(2018YFE0101900); 国家自然科学基金(31972764); 江苏省农业科技自主创新资金(cx(20)3012)

**\*通信作者:** E-mail: 王冉: ranwang@jaas.ac.cn; 包红朵: baohongduo@163.com

**收稿日期:** 2021-08-09; **接受日期:** 2021-08-24; **网络首发日期:** 2021-08-27

## Biological characteristics and genome analysis of a virulent *Enterococcus faecium* bacteriophage vB\_EfaS\_29

ZHONG Zhaoxin<sup>1,2</sup> ZHU Shujiao<sup>1</sup> ZHANG Hui<sup>1</sup> ZHOU Yan<sup>1</sup> WANG Ran<sup>\*1</sup>  
BAO Hongduo<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup> Key Laboratory of Food Quality and Safety of Jiangsu Province, State Key Laboratory Breeding Base, Institute of Agricultural Product Safety and Nutrition, Jiangsu Academy of Agricultural Science, Key Laboratory of Agro-Product Safety Risk Evaluation (Nanjing), Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Nanjing, Jiangsu 210014, China

<sup>2</sup> Institute of Agricultural Sciences in Jiangsu Coastal Area, Yancheng, Jiangsu 224002, China

**Abstract:** [Background] With the increasingly serious drug resistance of *Enterococcus faecium*, it is urgent to screen and obtain new lytic bacteriophages with high lysis efficiency and clear genetic background, to enrich phage resources and provide appropriate strains for phage therapy. [Objective] To evaluate the biological characteristics and genome analysis of an *Enterococcus faecium* bacteriophage isolated from the fecal sample of Nanjing Xigang Dairy Farm. [Methods] The bacteriophage was purified by double-layer agar plate. The purified bacteriophage was negatively stained with phosphotungstic acid and observed by the transmission electron microscope (TEM). Then, one-step growth curve, pH tolerance, temperature tolerance, and optimal multiplicity of infection were detected. Also, its genomics characteristics and evolutionary history were analyzed. [Results] The results are as follows: A lytic *Enterococcus faecium* bacteriophage, named as vB\_EfaS\_29, was isolated and purified. Its plaques were round, bright, and clear. TEM analysis revealed that bacteriophage vB\_EfaS\_29 had a twenty-side head and a long tail. The head diameter was about 52.4 nm, and the tail length was about 157.1 nm. It belongs to the Siphoviridae family. The optimal multiplicity of infection of bacteriophage vB\_EfaS\_29 was 0.1; the maximum tolerable temperature was about 70 °C; during pH 6.0–9.0, it was stable. The complete genome sequences of bacteriophage vB\_EfaS\_29 comprised of 41 014 bp with a GC content of 34.99% and contained 63 putative open reading frame (ORF). Only 36 of the ORF were well predicted for functions. Undesirable genes such as lysogenic, antibiotic resistance, or virulence were not detected in the genome. The phylogenetic analysis of vB\_EfaS\_29 based on amino acid of the endolysin, demonstrated that vB\_EfaS\_29 had more than 99% of sequence homology to FelixO1-like phages. However, using the amino acid of capsid as the targeted protein, vB\_EfaS\_29 had a long genetic distance with other *Enterococcus* bacteriophages. [Conclusion] The above results provided theoretical data and resources for bacteriophage research and bacteriophage therapy.

**Keywords:** *Enterococcus faecium*, bacteriophage, biological characteristics, genome analysis

肠球菌(*Enterococci*)是一种广泛出现在自然环境里的革兰氏阳性菌,其中在人和动物体中,主要存在于胃肠道里<sup>[1-2]</sup>。此外肠球菌还是一种条件致病菌,对于恶劣环境的适应力强,极易对人和动物造成极大伤害<sup>[3]</sup>。当机体免疫力下降时,屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)常常会引发尿道感染、腹腔感染、肺炎以及脑膜炎等疾病,是医院引起感染的主要病原菌之一<sup>[4]</sup>。在畜牧生产中,个别屎肠球菌菌株通常可以作为益生菌使用,可以一定程度促进

动物的生长性能,但是据报道,屎肠球菌也会对畜牧生产造成一定的损失,因此,屎肠球菌的使用安全性还有待继续考证<sup>[5-6]</sup>。近些年来,由于抗生素的大量使用,导致屎肠球菌出现严重耐药性,并且屎肠球菌本身就极易形成耐药,这就导致耐药菌屎肠球菌感染病例不断增加,对畜牧生产和公共卫生造成严重影响。由于噬菌体不受细菌耐药性的影响,目前越来越多科学家已经开始研究噬菌体疗法<sup>[7-8]</sup>。

噬菌体(Bacteriophage)是一种广泛分布在自然界中的天然生物,能够对宿主细菌产生特异性感染,从而达到灭菌的效果<sup>[9]</sup>。此外,噬菌体感染宿主菌非常高效,而且对动物机体没有异常反应,不影响正常菌群<sup>[10]</sup>。因此,噬菌体具有成为新型抗菌产品的潜力和应用前景。本研究从南京西岗奶牛场粪样中分离出一株裂解性的屎肠球菌噬菌体,对其进行生物学特性、全基因组测序分析及进化分析等,为屎肠球菌噬菌体研究及应用提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

10 份奶牛粪便样品采自江苏省南京市西岗奶牛场。

### 1.2 培养基、主要试剂和仪器

常规培养基参照 Bao 等<sup>[11]</sup>配制。LB 培养基、琼脂,青岛海博生物技术有限公司;PEG8000,国药集团化学试剂有限公司;RNase A, TaKaRa 公司;蛋白酶, Sigma 公司;十二烷基硫酸钠(Sodium Dodecyl Sulfate, SDS),北京鼎国昌盛生物科技有限公司。噬菌体保存稀释液(Sodium Chloride Magnesium Sulfate Buffer, SM Buffer): NaCl 5.8 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2.0 g, 1 mol/L 的 Tris·HCl 50 mL (pH 7.0), 5 mL 2% Gelatin, 加入 ddH<sub>2</sub>O 补足 1 L。胰蛋白胨水:称取 10 g 胰蛋白胨干粉融至 1 L 水中, 0.1 MPa 灭菌 15 min。20% SDS:称取 20 g SDS 加入 100 mL 水中充分溶解。高压灭菌锅, Hirayama 公司;超净台,苏州真田洁净设备有限公司;pH 计, Mettler Toledo 公司;电热恒温鼓风干燥箱,上海精宏实验设备有限公司;数显恒温水浴锅,金坛市安普实验仪器厂;电热恒温培养箱,上海一恒科技有限公司。

### 1.3 宿主菌制备

将屎肠球菌 EF29 接种于 LB 液体培养基中,在 37 °C、180 r/min 的摇床中培养过夜,备用。

### 1.4 噬菌体分离纯化

参考文献[11]并稍加修改,将粪样样品与 SM

按照 1:50 的比例配制, 37 °C、180 r/min 振荡培养 2 h, 4 °C、10 000 r/min 离心 10 min, 上清经 0.22 μm 滤膜过滤。取上述滤液 50 mL 加入 500 μL 宿主菌悬液和适量固体 CaCl<sub>2</sub> (终浓度为 1 mmol/mL), 静置 15 min 后 37 °C、180 r/min 振荡培养 5 h, 4 °C、10 000 r/min 离心 10 min 后取上清液。采用双层平板法检测和筛选裂解性噬菌体, 挑取单个形态均匀、清晰的菌斑, 放入含宿主菌的液体 LB 试管中, 37 °C、180 r/min 共培养 5 h, 检测噬菌体。如此反复进行 8–10 次, 获得纯噬菌体菌株。

### 1.5 噬菌体颗粒制备及透射电镜分析

参考文献[11]方法, 首先使用 PEG8000 和 NaCl 法沉淀噬菌体颗粒, 然后用 2% 磷钨酸(Phosphotungstic Acid, PTA, pH 7.0)对置于铜网的噬菌体颗粒进行负染, 自然干燥后电镜观察。

### 1.6 噬菌体最佳感染复数的测定

参考文献[11]方法, 并略微改动。将相应数量的噬菌体液按照感染复数 (Multiplicity of Infection, MOI) 为 0.01、0.1、1、10 加入到宿主菌液(1.0×10<sup>8</sup> CFU/mL), 37 °C、180 r/min 振荡培养 5 h。用双层平板法测定裂解液中噬菌体的效价, 产生最高效价的感染复数即为最佳 MOI。

### 1.7 噬菌体对屎肠球菌 EF29 的体外裂解动力的测定

将培养过夜的屎肠球菌 EF29 按照 1:100 的比例转接到 5 mL LB 液体培养基, 放入振荡培养箱中 37 °C、180 r/min 振荡培养至 OD<sub>600</sub> 值为 1.0 (浓度约为 1×10<sup>9</sup> CFU/mL)。对照组(Control, CON)取 1.0 mL 细菌混合液与等体积的 SM Buffer 混匀; 其余实验各组按 MOI 为 0.01、0.1、1、10 加入噬菌体。以上 5 组分别用 LB 调整其 OD<sub>600</sub> 为 0.5 左右, 每组体积相同, 于 37 °C、160 r/min 培养。分别每隔 30 min 进行(0–300 min)取样检测细菌 OD<sub>600</sub> 值的变化, 每个处理 3 个重复。

### 1.8 噬菌体一步生长曲线的测定

参考文献[12]方法, 取对数生长期的宿主菌液

加入噬菌体按 MOI>10 混匀, 离心洗涤。将沉淀加入 10 mL LB 液体培养基, 37 °C、180 r/min 振荡培养并计时, 在 0 时及之后每隔 10 min 取样一次, 共取 13 次。采用双层平板法测定噬菌体滴度, 绘制噬菌体的一步生长曲线。

### 1.9 噬菌体热稳定性测定

取已知滴度的噬菌体悬液于 30、40、50、60、70、80 °C 分别处理 30 min 和 60 min 后, 利用双层平板法测定处理后的噬菌体效价。

### 1.10 噬菌体 pH 稳定性测定

将已知效价噬菌体悬液 100  $\mu$ L 分别加入 pH 值为 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、8.0、9.0、10.0、11.0 和 12.0 的胰蛋白胍水(900  $\mu$ L)中, 37 °C 水浴 2 h。利用双层平板法测定效价。

### 1.11 噬菌体基因组 DNA 提取及测序

噬菌体基因组 DNA 提取及测序参照文献[13]方法, 略有修改。取适量纯化过滤噬菌体液, 加入 DNase I 和 RNase A 至 1  $\mu$ g/mL, 37 °C 孵育 30 min, 加入 50  $\mu$ L 的 0.5 mol/L EDTA 并在 65 °C 下处理 10 min 终止核酸内切酶反应。加入蛋白酶 (50  $\mu$ g/mL) 和 SDS (终浓度 0.5%), 然后将混合物在 56 °C 下孵育过夜。用苯酚-氯仿-异戊醇(25:24:1, 体积比)提取, 重复 2 次, 用 75%乙醇洗涤离心后的沉淀, 噬菌体基因组溶解在 50  $\mu$ g/mL RNase A 的蒸馏水中。

全基因组测序工作委托武汉贝纳科技服务有限公司完成, 测序数据使用 SeqMan II 序列分析软件组装。使用蛋白质比对搜索工具 BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 基于与已知蛋白质序列的同源性预测蛋白质序列的功能。噬菌体 vB\_EfaS\_29 全基因组序列上传至 GenBank 数据库, 序列号为 MZ666130。

### 1.12 噬菌体基因组比对分析以及构建进化树

使用 BLASTn 在线工具对噬菌体基因组进行比对, 并下载相似性近的肠球菌噬菌体基因组, 通过 MAUVE 2.3.1 基于核酸水平对基因组进行比对

分析。同样对裂解酶以及衣壳蛋白编码氨基酸序列进行相似性分析, 通过软件 MEGA 7.0 基于氨基酸序列构建进化树。

## 2 结果与分析

### 2.1 噬菌体的分离纯化及透射电镜观察

本试验以屎肠球菌 EF29 为宿主菌, 用双层平板法纯化噬菌斑 8–10 次, 命名为 vB\_EfaS\_29。其噬菌斑形态如图 1A 所示, 透亮、大小形态一致、边缘整齐且无晕环。如图 1B 所示, 噬菌体 vB\_EfaS\_29 头部呈正二十面体, 头部直径约 52.4 nm, 尾长约 9.5 nm $\times$ 157.1 nm, 可将其归类为长尾噬菌体科。

### 2.2 噬菌体最佳感染复数的测定

由表 1 可知, 当感染复数为 0.1 时, 噬菌体滴度最高, 因此最佳感染复数为 0.1。

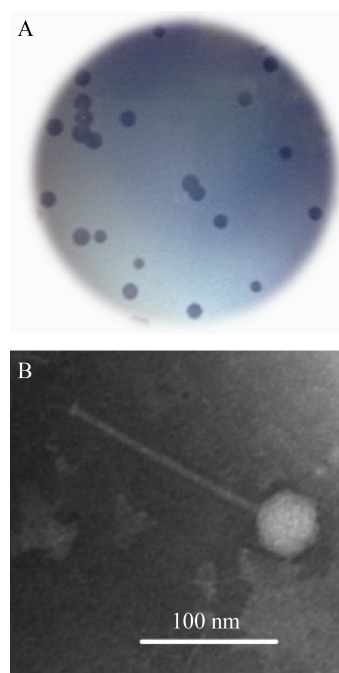


图 1 噬菌体 vB\_EfaS\_29 噬菌斑及形态

Figure 1 The plaques and morphology of bacteriophage vB\_EfaS\_29

注: A: 噬菌斑; B: 透射电镜形态

Note: A: The plaques of bacteriophage vB\_EfaS\_29; B: The morphology of bacteriophage vB\_EfaS\_29

表 1 噬菌体 vB\_EfaS\_29 最佳感染复数的测定

Table 1 Determination of optional multiplicity of infection of bacteriophage vB\_EfaS\_29

试管号 No.	细菌数 Bacteria (CFU/mL)	噬菌体数 Number of bacteriophage (PFU/mL)	感染复数 MOI	噬菌体滴度 Bacteriophage titer (PFU/mL)
1	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^4$	0.01	$1.0 \times 10^7$
2	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^5$	0.1	$8.2 \times 10^8$
3	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^6$	1	$4.2 \times 10^8$
4	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^7$	10	$3.5 \times 10^8$

### 2.3 噬菌体对屎肠球菌 EF29 的体外裂解动力

由图 2 可知,噬菌体 vB\_EfaS\_29 与屎肠球菌 EF29 在不同感染复数的混合培养后,在 90 min 之前培养液  $OD_{600}$  缓慢增加,120 min 后,实验各组培养液的  $OD_{600}$  均开始下降,表明噬菌体 vB\_EfaS\_29 可在不同 MOI 下裂解细菌,MOI 值越大裂解效果越好,300 min 左右,MOI=10、1 和 0.1 组,细菌基本被裂解完全。

### 2.4 噬菌体一步生长曲线的测定

由图 3 可知,噬菌体感染宿主菌的潜伏期约 10 min,暴发期约为 50 min,裂解量约为 80 个/细菌。

### 2.5 噬菌体稳定性的测定

由图 4A 可知,噬菌体 vB\_EfaS\_29 在 30–60 °C 下作用 30 min 和 60 min 其效价较为稳定,70 °C

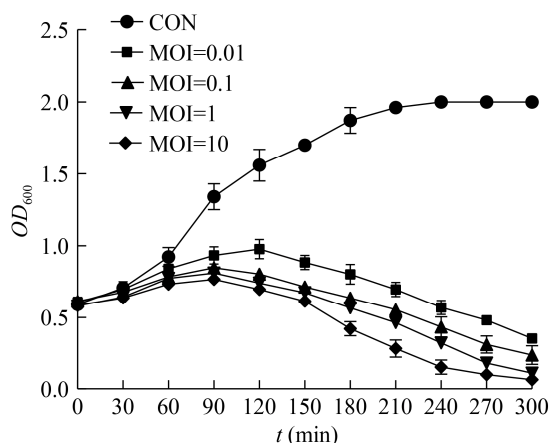


图 2 噬菌体的体外裂解动力

Figure 2 *In vitro* lysis kinetics of *Enterococcus faecium* bacteriophage vB\_EfaS\_29

注: CON 组为对照组,其余均为噬菌体处理组

Note: The CON group is the control group, and the rest are the bacteriophage treatment group

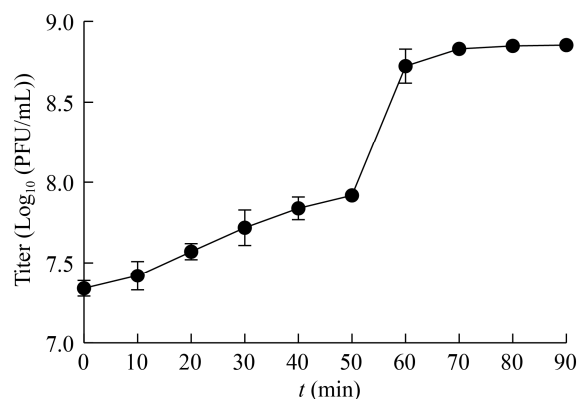


图 3 噬菌体 vB\_EfaS\_29 一步生长曲线

Figure 3 One-step growth curve of bacteriophage vB\_EfaS\_29

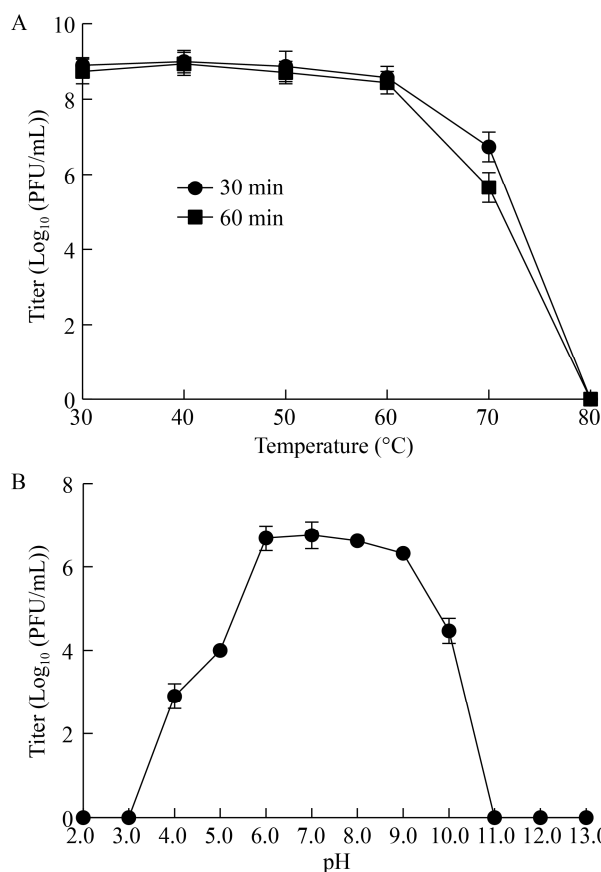


图 4 噬菌体 vB\_EfaS\_29 稳定性的测定

Figure 4 Determination of stability of bacteriophage vB\_EfaS\_29

注: A: 噬菌体 vB\_EfaS\_29 不同温度稳定性的结果; B: 对不同 pH 稳定性的结果

Note: A: Thermal stability of bacteriophage vB\_EfaS\_29; B: pH stability of bacteriophage vB\_EfaS\_29

作用下其效价下降约 2 Log<sub>10</sub>, 80 °C 作用 30 min, 噬菌体失活。由图 4B 可知, 当 pH 值在 6.0–9.0 时, 噬菌体 vB\_EfaS\_29 效价较稳定。当培养液的 pH 值小于 6.0 或 pH 值大于 9.0 时, 噬菌体的活力稳定性下降。当 pH 值小于 3.0 或者大于 11.0 时噬菌体完全失活。综上, 噬菌体 vB\_EfaS\_29 的 pH 耐受范围为 6.0–9.0。

2.6 噬菌体的全基因组分析

噬菌体 vB\_EfaS\_29 的测序结果显示, 其全基因组总长度为 41 014 bp, GC 含量为 34.99%。如表 2 所示, 噬菌体 vB\_EfaS\_29 共有 63 个开放阅读框(Open Reading Frame, ORF), 其中 36 个 ORF 已被注释, 不含毒力基因、耐药基因以及整合基因, 注释率为 57.14% (36/63)。其中 ORF1、ORF63 为编码穿孔蛋白基因, ORF2–9 为尾部相关蛋白基因, ORF10–13 为头尾连接相关蛋白基因, ORF14 为编码噬菌体衣壳蛋白基因, ORF15 为编码噬菌体头部成熟蛋白酶基因, ORF18 为编码末端酶大亚基基因, ORF19、44、47 为编码 HNH 归巢核酸内切酶基因, ORF20 为编码末端酶小亚基基因, ORF23 为编码 HNH 内切酶基因, ORF28 为 XRE 家族转录调节因子, ORF29 为编码  $\gamma$ -谷氨酰激酶

基因, ORF34 为编码 DNA 复制蛋白基因, ORF41 为编码解旋酶基因, ORF43 为编码 DNA 引物/解旋酶基因, ORF48 为编码  $\beta$ -内酰胺酶基因, ORF57 为编码含有 TM2 结构域的蛋白质基因, ORF59 为编码 DNA 聚合酶基因, ORF61 为编码谷氧还蛋白基因, ORF62 为编码裂解酶编码蛋白基因。

2.7 噬菌体基因组比对及遗传进化分析

通过 MAUVE 2.3.1 将该噬菌体 vB\_EfaS\_29 的基因组与其他 5 株肠球菌噬菌体的基因组进行核酸水平比对分析, 结果如图 5 所示。图 5 中可以直观看出各个噬菌体基因序列中编码序列(Coding Sequence, CDS)的比对情况, 通过观察基因组长度、功能蛋白基因的大小、分布、方向以及相似程度, 可以得出该噬菌体为一株新的肠球菌噬菌体。

进化树结果如图 6A 和 6B 所示, 以裂解酶编码蛋白(ORF62)进行 BLAST 对比, 发现该噬菌体与肠球菌噬菌体 vB\_EfaS\_DELF1 (GenBank 登录号为 BBQ04299)相似性大于 99%。以噬菌体衣壳蛋白(ORF14)编码氨基酸为靶标进行比对发现, 该噬菌体 GenBank 上的肠球菌噬菌体遗传距离均较远, 也说明该噬菌体为一株新的肠球菌噬菌体。

表 2 噬菌体 vB\_EfaS\_29 全基因组注释信息

Table 2 Summary of CDSes and function of bacteriophage vB\_EfaS\_29

开放阅读框 ORF	开始 Start	终止 Stop	基因长度 Length (bp)	正负链 Strand	功能 Function
1	861	580	282	–	Bacteriophage holin
2	1 150	872	279	–	Tail fiber protein
3	2 274	1 327	948	–	Tail assembly protein
4	3 690	2 287	1 404	–	Minor tail protein
5	5 820	3 754	2 067	–	Phage protein
6	10 222	5 897	4 326	–	Phage tail length tape-measure protein
7	10 487	10 290	198	–	Tail tape measure chaperone protein
8	10 849	10 520	330	–	Putative tail tape measure chaperone protein
9	11 519	10 956	564	–	Phage major tail protein
10	11 957	11 592	366	–	Head-tail joining protein
11	12 364	11 954	411	–	Putative head-tail joining protein
12	12 702	12 367	336	–	Head-tail adaptor protein
13	12 977	12 702	276	–	Head-tail joining protein
14	14 228	13 047	1 182	–	Phage capsid protein
15	14 792	14 298	495	–	Phage head maturation protease

(待续)

(续表 2)

16	15 999	14 800	1 200	—	Phage portal protein
17	16 179	16 006	174	—	Sensor histidine kinase
18	18 028	16 250	1 779	—	Phage terminase, large subunit
19	18 557	18 018	540	—	HNH homing endonuclease
20	19670	19206	465	—	Phage terminase, small subunit
21	19 963	19 676	288	—	Hypothetical protein
22	20 148	19 966	183	—	Hypothetical protein
23	20 882	20 493	390	—	HNH endonuclease
24	21 125	20 916	210	—	Hypothetical protein
25	21 310	21 125	186	—	Hypothetical protein
26	21 490	21 323	168	—	Hypothetical protein
27	21 675	21 487	189	—	Hypothetical protein
28	22 253	22 555	303	+	XRE family transcriptional regulator
29	22 558	22 848	291	+	Gamma-glutamyl kinase
30	22 850	23 068	219	+	Hypothetical protein
31	23 065	23 388	324	+	Hypothetical protein
32	23 462	23 641	180	+	Hypothetical protein
33	23 634	23 822	189	+	Hypothetical protein
34	23 887	25 473	1 587	+	DNA replication protein
35	25 485	25 703	219	+	Hypothetical protein
36	25 792	26 058	267	+	Hypothetical protein
37	26 165	26 377	213	+	Hypothetical protein
38	26 374	26 562	189	+	Hypothetical protein
39	26 559	26 909	351	+	Hypothetical protein
40	26 960	27 649	690	+	Phage-associated homing endonuclease
41	27 633	28 937	1 305	+	Helicase
42	28 934	29 101	168	+	Hypothetical protein
43	29 159	29 902	744	+	DNA primase/helicase, phage-associated
44	29 856	30 416	561	+	HNH homing endonuclease
45	30 419	30 631	213	+	Hypothetical protein
46	30 787	31 260	474	+	Hypothetical protein
47	31 275	31 799	525	+	HNH homing endonuclease
48	31 780	32 535	756	+	Beta-lactamase
49	32 572	32 811	240	+	Hypothetical protein
50	32 801	33 235	435	+	Hypothetical protein
51	33 250	33 417	168	+	Hypothetical protein
52	33 407	34 216	810	+	Hypothetical protein
53	34 213	34 425	213	+	Hypothetical protein
54	34 492	35 184	693	+	Hypothetical protein
55	35 273	35 509	237	+	Hypothetical protein
56	35 521	35 739	219	+	Hypothetical protein
57	35 776	36 102	327	+	TM2 domain-containing protein
58	36 119	36 325	207	+	Hypothetical protein
59	36 427	38 715	2 289	+	DNA polymerase B region
60	38 791	39 561	771	+	Putative methyltransferase
61	39 561	39 785	225	+	Glutaredoxin
62	40 829	39 801	1 029	—	Endolysin
63	40 976	40 845	132	—	Phage holin

注: +: 正链, -: 负链

Note: +: Positive, -: Negative



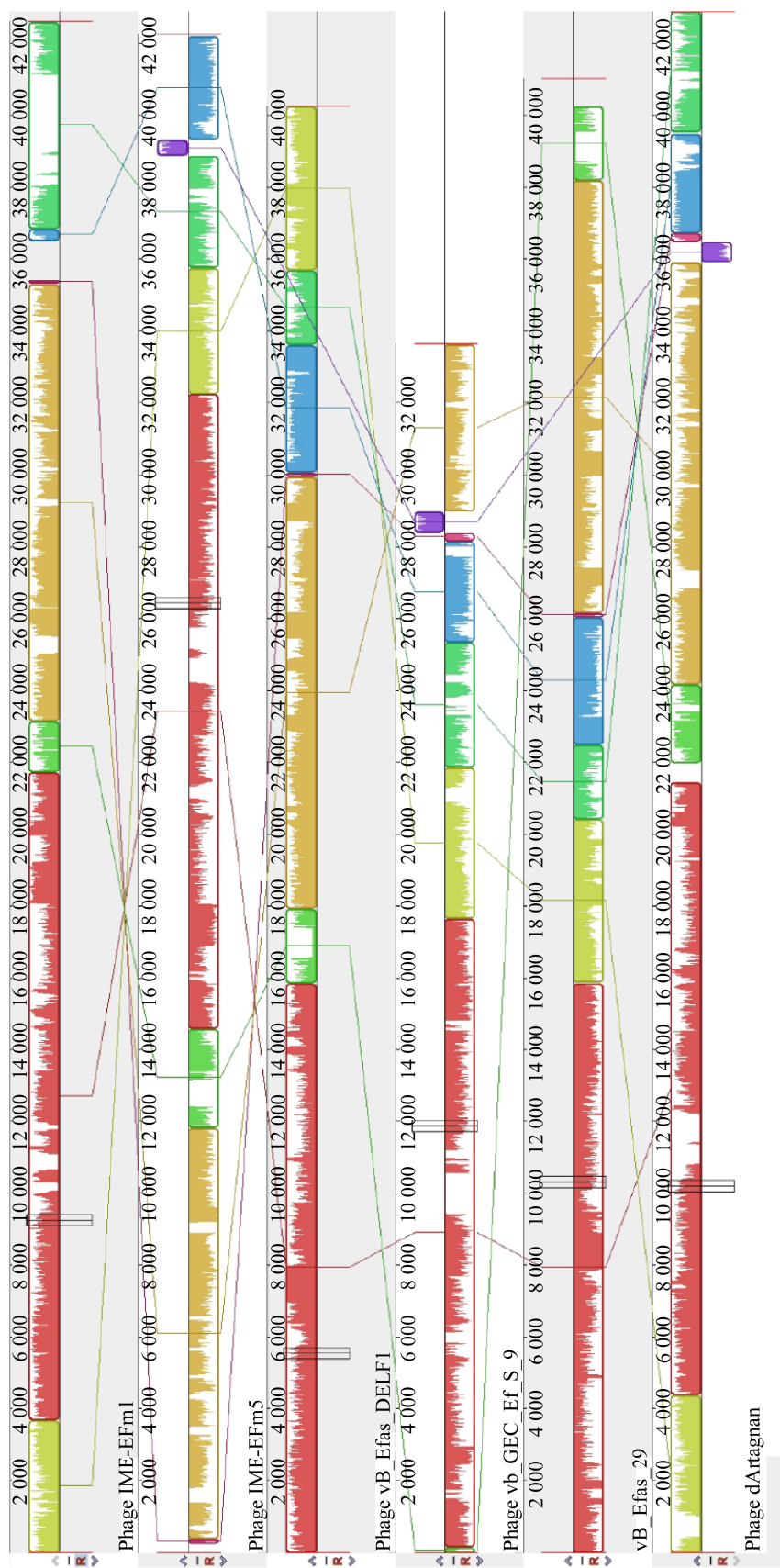


图 5 vB\_EfaS\_29 核酸水平基因组比对

Figure 5 The comparison between vB\_EfaS\_29 and other bacteriophages on nucleic acid level



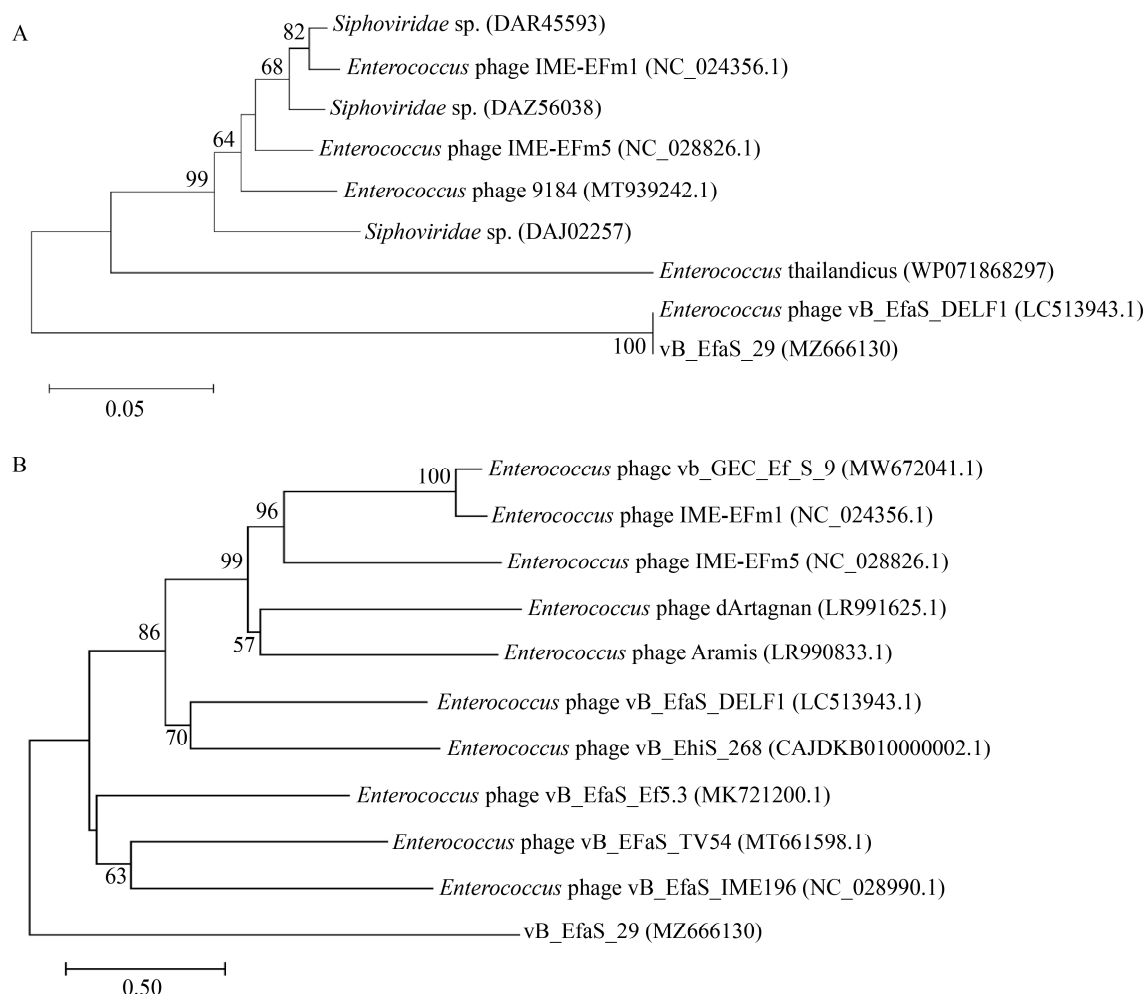


图 6 以氨基酸水平构建 vB\_EfaS\_29 的进化树

Figure 6 The phylogenetic trees of vB\_EfaS\_29 were constructed at the amino acid level

注：A：裂解酶编码氨基酸为靶标构建的进化树；B：衣壳蛋白编码氨基酸为靶标构建的进化树。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

Note: A: Lyase-encoded amino acid level; B: Capsid protein-encoded amino acid level. The number in the brackets: The genome sequence number in GenBank; The number at the branch point: The confidence level; Scale: The genetic distance

### 3 讨论

近年来由于抗生素的滥用导致大量的耐药性肠球菌出现，这对人体健康、畜牧生产及环境都造成很大影响<sup>[14]</sup>。因此关于细菌耐药性的问题越来越受到关注，自 2020 年 7 月开始，饲料端严禁添加药物饲料添加剂<sup>[15]</sup>。为了解决抗生素耐药性及对人体和环境的影响，新的抗菌方案越来越多，其中噬菌体成为研究热点之一。但是由于噬菌体有宿主特异性，不能完全满足抗菌要求，噬菌体混合制

剂的“鸡尾酒”疗法正在热烈地讨论和研究当中<sup>[16-17]</sup>。

本试验通过双层平板法对从奶牛粪样中的噬菌体进行分离、纯化，再进行透射电镜观察其特征，命名该噬菌体为 vB\_EfaS\_29。在本试验中，纯化噬菌体初期时其噬菌斑呈蚕噬状、大小不一，表明此时噬菌体的种类不止一种<sup>[18]</sup>，再经多次纯化后得到形态大小一致的噬菌斑。透射电镜观察显示噬菌体 vB\_EfaS\_29 头部呈正二十面体，头部直径约 52.4 nm，尾长约 9.5 nm×157.1 nm，与宫鹏娟等<sup>[19]</sup>

发现的尾长为 160 nm 的尿肠球菌噬菌体类似, 同属于长尾噬菌体科, 其头部也都为二十面体, 头部直径大小相近, 并且对不同的 pH 及温度的稳定性都十分相似。噬菌体 vB\_EfaS\_29 在体外对尿肠球菌 EF29 有很强的裂解作用, 当 MOI 为 0.1 时, 该噬菌体滴度最高。此外, 本试验结果还显示, 该噬菌体潜伏期约 10 min, 暴发期约为 50 min, 裂解量约为 80, 温度耐受范围为 30–60 °C, pH 耐受范围为 6.0–9.0, 与张倩等<sup>[20]</sup>发现的尿肠球菌噬菌体相比, 尾部不同, 潜伏期和暴发期都更短, 暴发量相近, 耐受温度更高, pH 耐受范围较窄。

通过全基因组测序分析发现该噬菌体总长度 41 014 bp, GC 含量为 34.99%, 共有 63 个 ORF, 基因注释率为 57.14% (36/63), 无毒力基因、耐药基因、整合基因, 因此, 具有作为抗菌杀菌剂的应用前景。此外, 通过以裂解酶编码氨基酸为靶标进行比对和进化树分析, 发现其与粪肠球菌噬菌体 vB\_EfaS-DELFI<sup>[21]</sup>十分相似, 相似性大于 99%, 2 个噬菌体同属长尾噬菌体科, 基因组长度相近, GC 含量比值几乎无差异, vB\_EfaS-DELFI 基因组编码有 62 个 ORF, 并且也无毒力基因、耐药基因及整合基因。但是以噬菌体衣壳蛋白(ORF14)编码氨基酸为靶标进行进化树构建, 发现该噬菌体与 GenBank 上的肠球菌噬菌体遗传距离均较远, 也可以说明该噬菌体为一株新的肠球菌噬菌体。因此为了进一步了解其区别, 我们通过核酸水平比对分析发现, 本试验噬菌体 vB\_EfaS\_29 的基因组长度、功能蛋白基因的大小、分布、方向与其他肠球菌噬菌体(包括噬菌体 vB\_EfaS-DELFI)有明显差异, 从而可以得出该噬菌体为一株新的肠球菌噬菌体。与邢少贞等<sup>[22]</sup>分离的粪肠球菌噬菌体基因组相比差异较大, 其噬菌体基因组长度 18 607 bp, ORF 数量为 27 个, GC 含量只有 33%, 但是其功能蛋白相较于该噬菌体并没有明显缺失, 此外其潜伏期更短, pH 耐受范围更广。相比张倩等<sup>[20]</sup>分离出的裂解性的尿肠球菌噬菌体, vB\_EfaS\_29 基因组长度长, 但是 GC 含量更低, 而且该噬菌体与肌尾噬菌

体科的沙门氏菌噬菌体亲缘性更高。结合裂解酶编码蛋白和衣壳蛋白的进化树分析结果, 发现本试验噬菌体与其他肠球菌噬菌体都有差异, 因此我们推断本试验获得的噬菌体具有一定程度的独特性。

基于以上对噬菌体 vB\_EfaS\_29 生物学特性的研究及基因组分析, 该噬菌体为一株新尿肠球菌噬菌体, 具有强裂解活性, 丰富了噬菌体资源。

## 4 结论

分离鉴定出一株裂解性长尾噬菌体科尿肠球菌噬菌体 vB\_EfaS-29, 头部呈二十面体, 头部直径约 52.4 nm, 尾长约 9.5 nm×157.1 nm, 潜伏期约 10 min, 暴发期约为 50 min, 裂解量约为 80, 最佳 MOI 为 0.1, 最高耐受温度 70 °C, pH 耐受范围为 6.0–9.0, 基因组全长总长度为 41 014 bp, GC 含量为 34.99%, 共有 63 个 ORF, 无毒力基因、耐药基因和整合基因。该噬菌体的发现为深入研究噬菌体裂解机制及噬菌体治疗多重耐药菌奠定了基础。

## REFERENCES

- [1] Karumidze N, Thomas JA, Kvatadze N, Goderdzishvili M, Hakala KW, Weintraub ST, Alavidze Z, Hardies SC. Characterization of lytic *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages via biological properties and genomic sequences[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 94(6): 1609-1617
- [2] Zheng H. Analysis of complete genome of a lytic bacteriophage ec-ZZ2 infecting *Enterococcus faecium*[D]. Changchun: Master's Thesis of Jilin University, 2017 (in Chinese)  
郑辉. 尿肠球菌裂解性噬菌体 Ec-ZZ2 全基因组序列的初步分析[D]. 长春: 吉林大学硕士学位论文, 2017
- [3] Karki S, Houston L, Land G, Bass P, Kehoe R, Borrell S, Watson K, Spelman D, Kennon J, Harrington G, et al. Prevalence and risk factors for VRE colonisation in a tertiary hospital in Melbourne, Australia: a cross sectional study[J]. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 2012, 1(1): 31
- [4] Jett BD, Huycke MM, Gilmore MS. Virulence of enterococci[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 1994, 7(4): 462-478
- [5] Wen FQ, Xiang HT, Hao BC, Xing XY, Bao SJ, Hu YH. Isolation and identification of *Enterococcus faecium* isolated from lambs[J]. *Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine*, 2020, 39(5): 13-16 (in Chinese)

- 温峰琴, 项海涛, 郝宝成, 邢小勇, 包世俊, 胡永浩. 羊源屎肠球菌的分离鉴定与生物学特性研究[J]. 中兽医医药杂志, 2020, 39(5): 13-16
- [6] Franz CMAP, Huch M, Abriouel H, Holzapfel W, Gálvez A. Enterococci as probiotics and their implications in food safety[J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 151(2): 125-140
- [7] Matsuzaki S, Rashel M, Uchiyama J, Sakurai S, Ujihara T, Kuroda M, Imai S, Ikeuchi M, Tani T, Fujieda M, et al. Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases[J]. Journal of Infection and Chemotherapy, 2005, 11(5): 211-219
- [8] Barrow PA, Soothill JS. Bacteriophage therapy and prophylaxis: rediscovery and renewed assessment of potential[J]. Trends in Microbiology, 1997, 5(7): 268-271
- [9] Brüssow H. Phage therapy: the *Escherichia coli* experience[J]. Microbiology, 2005, 151(Pt 7): 2133-2140
- [10] Tang N, Yin Y, Ren HY, Zhang C, Liu WH. Isolation, purification and detection of biological characteristics of a high-titer and wide-spectrum *Salmonella* phage[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2021, 48(7): 2577-2583 (in Chinese)
- 唐宁, 殷茵, 任慧英, 张灿, 刘文华. 沙门氏菌高效价宽谱噬菌体的分离纯化及生物学特性测定[J]. 中国畜牧兽医, 2021, 48(7): 2577-2583
- [11] Bao HD, Shahin K, Zhang QY, Zhang H, Wang Z, Zhou Y, Zhang XH, Zhu SJ, Stefan S, Wang R. Morphologic and genomic characterization of a broad host range *Salmonella enterica* serovar Pullorum lytic phage vB\_SPuM\_SP116[J]. Microbial Pathogenesis, 2019, 136: 103659
- [12] Lu Z, Breidt F Jr., Fleming HP, Altermann E, Klaenhammer TR. Isolation and characterization of a *Lactobacillus plantarum* bacteriophage, ΦJL-1, from a cucumber fermentation[J]. International Journal of Food Microbiology, 2003, 84(2): 225-235
- [13] Bao H, Zhang H, Wang R. Isolation and characterization of bacteriophages of *Salmonella enterica* serovar Pullorum[J]. Poultry Science, 2011, 90(10): 2370-2377
- [14] Zhang Z. Observation on the effect of reduced use of antibacterial drugs and alternative antibacterial drugs in broiler farms[D]. Baoding: Master's Thesis of Hebei Agricultural University, 2021 (in Chinese)
- 张哲. 肉鸡场抗菌药物减量使用与替抗药物效果研究[D]. 保定: 河北农业大学硕士学位论文, 2021
- [15] Zhu ZP, Tan HZ, He J, Feng GD, Li B, Gu CS. Nutritional strategy and feeding management of animal husbandry under antibiotics-free feed age[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2020, 32(10): 4831-4840 (in Chinese)
- 朱正鹏, 谭会泽, 何健, 冯光德, 李彬, 古长松. 饲料无抗时代动物生产的营养策略与饲养管理[J]. 动物营养学报, 2020, 32(10): 4831-4840
- [16] Gao MM. Application of wide spectrum phages cocktails to combat prevalent capsule-type *Klebsiella pneumoniae* infection in mice[D]. Zhangjiakou: Master's Thesis of Hebei North University, 2020 (in Chinese)
- 高明明. 广谱噬菌体鸡尾酒在流行荚膜型肺炎克雷伯菌感染小鼠中的应用[D]. 张家口: 河北北方学院硕士学位论文, 2020
- [17] Bao HD, Zhang PY, Zhou Y, Zhang LL, Zhang H, Tao MX, Wang R. Isolation and biological characteristics of lytic *Salmonella* bacteriophage[J]. Food Science, 2015, 36(5): 131-136 (in Chinese)
- 包红朵, 张鹏禹, 周艳, 张莉莉, 张辉, 陶明煊, 王冉. 沙门氏菌裂解性噬菌体的分离鉴定及其生物学特性[J]. 食品科学, 2015, 36(5): 131-136
- [18] Adibi M, Mobasher N, Ghasemi Y, Mohkam M, Mobasher MA. Isolation, purification and identification of *E. coli* O157 phage for medical purposes[J]. Trends in Pharmaceutical Sciences, 2017, 3(1): 43-48
- [19] Gong PJ, Zhang L, Xia FF, Cheng MJ, Hu LY, Sun CJ, Feng X, Gu JM, Han WY. Bacteriophage m5 therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2016, 36(5): 746-749, 762 (in Chinese)
- 宫鹏娟, 张蕾, 夏翡翠, 程梦琪, 胡丽媛, 孙长江, 冯新, 顾敬敏, 韩文瑜. 屎肠球菌噬菌体 m5 的分离鉴定及其对小鼠菌血症的治疗研究[J]. 中国兽医学报, 2016, 36(5): 746-749, 762
- [20] Zhang Q, Yu HJ, Sun YQ, Zhang XLL, Zhang PS, Liu G, Qu YG, Tong YG, Li Y. Isolation and characterization of a lytic phage infecting *Enterococcus faecium* of bovine mastitis[J]. Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences, 2017, 48(4): 706-713 (in Chinese)
- 张倩, 于会举, 孙耀强, 张湘莉兰, 张培生, 刘鸽, 屈勇刚, 童贻刚, 李岩. 一株裂解性奶牛乳房炎源屎肠球菌噬菌体的分离及其生物学特性分析[J]. 畜牧兽医学报, 2017, 48(4): 706-713
- [21] Soleimani-Delfan A, Bouzari M, Wang R. vB\_EfaS-DELFI, a novel *Siphoviridae* bacteriophage with highly effective lytic activity against vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*[J]. Virus Research, 2021, 298: 198391
- [22] Xing SZ, Zhang XLL, Pei GQ, Fang Y, Cheng S, Mi ZQ, An XP, Tong YG. Characterization and genome analysis of a novel bacteriophage vB\_EfaP\_IME195 infecting *Enterococcus faecalis*[J]. Microbiology China, 2017, 44(2): 305-313 (in Chinese)
- 邢少贞, 张湘莉兰, 裴广倩, 方云, 程实, 米志强, 安小平, 童贻刚. 粪肠球菌噬菌体 vB\_EfaP\_IME195 的生物学特性及其全基因组分析[J]. 微生物学通报, 2017, 44(2): 305-313