微生物学通报
Microbiology China
tongbao@im.ac.cn
http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn

Dec. 20, 2019, 46(12): 3402−3413
DOI: 10.13344/j.microbiol.china.190032

研究报告

一株肺炎克雷伯菌噬菌体的生物学特性及全基因组分析

王九儒[1] 赵飞扬[2,3] 李曼莉[2] 裴广倩[2] 范航[2] 张湘莉兰[2] 米志强[*2] 童贻刚[*1,2]

1 北京化工大学生命科学与技术学院 北京 100029
2 军事科学院军事医学研究院微生物流行病研究所 病原微生物生物安全国家重点实验室 北京 100071
3 青岛农业大学动物医学院 山东 青岛 266109

摘 要:【背景】随着抗生素的广泛使用甚至滥用，细菌耐药性问题日益显著，利用噬菌体治疗耐药致病菌的方法重新开始被人们关注。【目的】对一株烈性肺炎克雷伯菌噬菌体 vB_KpnP_IME279 进行生物学特性研究及生物信息学分析。【方法】以一株多重耐药的肺炎克雷伯菌为宿主菌，从医院污水中分离噬菌体，应用双层平板法检测噬菌体效价、最佳感染复数(Optimal MOI)、一步生长曲线以及裂解谱，纯化后通过透射电镜观察噬菌体形态；应用蛋白酶 K/SDS 法提取噬菌体全基因组，使用 Illumina MiSeq 测序平台进行噬菌体全基因组测序，测序后对噬菌体全基因组序列进行组装、注释、进化和比较基因组学分析。【结果】分离到一株新的肺炎克雷伯菌噬菌体，命名为 vB_KpnP_IME279；其最佳感染复数为 0.1，一步生长曲线显示潜伏期为 20 min，平均裂解量 140 PFU/cell，电镜观察显示该噬菌体属于短尾噬菌体科(*Podoviridae*)。基因组测序表明，噬菌体基因组全长为 42 518 bp，(G+C)mol%含量为 59.3%。BLASTn 比对结果表明，该噬菌体与目前已知噬菌体的相似性较低，基因组仅 70%区域与已知噬菌体有同源性。构建噬菌体主要衣壳蛋白的基因进化树，分析了噬菌体 IME279 与其他短尾科噬菌体的进化关系，结果表明该噬菌体是短尾科噬菌体的一名新成员。【结论】分离鉴定了一株新的肺炎克雷伯菌噬菌体，进行了生物学特性、全基因组测序和生物信息学分析，为研究肺炎克雷伯菌噬菌体与宿主之间的相互作用关系以及治疗多重耐药细菌感染奠定了基础。

关键词: 肺炎克雷伯菌，噬菌体，生物学特性，全基因组分析

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (81572045); National key Research and Development Program of China (2018YFA0903000)
***Corresponding authors:** MI Zhi-Qiang: Tel: 86-10-66948407; E-mail: hiqiangmi_ime@163.com
TONG Yi-Gang: Tel: 86-10-64451781; E-mail: tongyigang@mail.buct.edu.cn
Received: 10-01-2019; **Accepted:** 02-04-2019; **Published online:** 24-04-2019
基金项目: 国家自然科学基金(81572045)；国家重点研发计划(2018YFA0903000)
***通信作者:** 米志强：Tel：010-66948407；E-mail：hiqiangmi_ime@163.com
童贻刚：Tel：010-64451781；E-mail：tongyigang@mail.buct.edu.cn
收稿日期: 2019-01-10；**接受日期:** 2019-04-02；**网络首发日期:** 2019-04-24

Characterization and genome analysis of a novel *Klebsiella pneumoniae* phage

WANG Jiu-Ru[1] ZHAO Fei-Yang[2,3] LI Man-Li[2] PEI Guang-Qian[2] FAN Hang[2]
ZHANG Xiang-Li-Lan[2] MI Zhi-Qiang[*2] TONG Yi-Gang[*1,2]

1 College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China
2 State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Beijing Institute of Microbiology and Epidemiology, Beijing 100071, China
3 College of Veterinary Medicine, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China

Abstract: [Background] With the widespread use and even abuse of antibiotics, the problem of bacterial resistance has become increasingly prominent. The use of phage to treat drug-resistant pathogens has begun to attract attention. **[Objective]** Biological characteristics and bioinformatics analysis of a newly found phage vB_KpnP_IME279 of *Klebsiella pneumoniae*. **[Methods]** A multi-drug resistant *Klebsiella pneumoniae* was used as the host strain to isolate phage from hospital sewage. We used the double-layer plate method to conduct the titer, optimal multiplicity of infection (optimal MOI), one-step growth curve and lysis spectrum of the phage. Phage morphology was observed by transmission electron microscopy after purification. Its genome was sequenced using the Illumina MiSeq sequencing platform. Complete genome sequence was used for genome annotation, comparative genomics and evolutionary analyses. **[Results]** A novel phage vB_KpnP_IME279 was successfully isolated from infected host cells. The optimal MOI of IME279 is 0.1. One-step growth curve shows that IME279 has a burst size of 140 PFU/cell and a latent period of 20 min. The genome of IME279 is 42 518 bp and 59.3% (G+C)mol%. Electron microscopic observation showed that the phage was belongs to the family *Podoviridae*. The BLASTn alignment showed that the genome of the phage had limited similarity with the currently known phages. The evolutionary relationship between phage IME279 and other *Podoviridae* phage was analyzed by gene phylogenetic tree of phage major capsid protein, which suggests IME279 is a new member of the *Podoviridae* phage. **[Conclusion]** Isolation and identification of the new phage of *Klebsiella pneumonia* and the biological characteristics, genome-wide sequencing and bioinformatics analysis will help study the relationship between *Klebsiella pneumoniae* phage and host and the treatment of multi-drug resistant bacteria with phages.

Keywords: *Klebsiella pneumonia*, Phage, Biological characteristics, Genomic analysis

肺炎克雷伯菌(*K. peneumoniae*)属于肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)，为革兰氏阴性杆菌。肺炎克雷伯菌对人致病性较强，能导致败血症、肺炎及尿路感染，严重时可能致人死亡，是重要的条件致病菌和医源性病原体之一。随着各类广谱抗生素的广泛应用，肺炎克雷伯菌出现耐药性的现象也越来越普遍[1]。据世界卫生组织全球抗微生物耐药性监测系统(Global antimicrobial resistance surveillance system，GLASS)报道[2]，肺炎克雷伯菌已成为七类主要的耐药性致病菌之一，其耐药性问题已经引起了世界范围的关注。在临床环境中过量使用头孢菌素和 β-内酰胺酶是导致肺炎克雷伯菌耐药的主要原因。近年来，由于第三代头孢菌素耐药肺炎克雷伯菌的出现，碳青霉烯类抗生素被广泛用于治疗多重耐药性肺炎克雷伯菌引起的严重感染[3]，这加速了碳青霉烯类耐药菌株的出现。据 CHINET 报道，截至 2017 年，肺炎克雷伯菌对碳青霉烯类的耐药率均大于20%，较 2014 年上升 8 倍之多[4-5]。而且相关研究表明[6]致病菌产生耐药性的速度已远大于新抗生素研发速度。

噬菌体作为一类特异性感染细菌的病毒，是一种天然抗菌物。在全球医疗领域面临日益严峻的细菌耐药性威胁时，噬菌体治疗逐渐显现出潜

力。陈松建等[7]使用一株肺炎克雷伯菌噬菌体治疗感染了产超广谱 β-内酰胺酶(Extended spectrum β-lactamase, ESBLs)耐药菌的小鼠，实验组败血症小鼠存活率为 87.5%，对照组败血症小鼠 24 h 后全部死亡。一些研究[8-9]表明，对于噬菌体的个体化治疗手段，鸡尾酒疗法可能会比使用单一噬菌体治疗有更好的疗效。噬菌体与其宿主菌是共同进化的，有时噬菌体进化速度甚至要大于其宿主产生抗性的速度，这都使得噬菌体治疗重新成为人们关注的热点。

本研究通过对一株新发现的肺炎克雷伯菌噬菌体进行分离鉴定并分析其生物学特性，为耐药性肺炎克雷伯菌的噬菌体治疗提供依据。此外，本研究还通过高通量测序及基因组分析对噬菌体基因功能进行预测，有助于人们更加深刻地认识其生物学行为。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

从医院污水中分离得到的一株肺炎克雷伯菌噬菌体，由军事医学科学院微生物流行病研究所分离鉴定并保存；从病人尿液中分离出的一株具有多重耐药性的肺炎克雷伯菌，由军事医学科学院微生物流行病研究所分离鉴定并保存；20 株肺炎克雷伯菌，由 307 医院提供并于军事医学科学院微生物流行病研究所分离鉴定并保存。

1.1.2 培养基

肺炎克雷伯菌培养基为 LB 培养基[10] (固体培养基加 1.5%琼脂粉，半固体培养基加 0.7%琼脂粉)。

1.1.3 主要试剂和仪器

酚:氯仿:异戊醇液(25:24:1，体积比)，北京索莱宝科技有限公司；蛋白酶 K、RNase A、DNase Ⅰ，Fermentas 公司。Amicon Ultra-15 离心超滤管(截留分子量 100 kD)，AMRESCO 公司；MiSeq 测序仪，Illumina 公司。

1.2 方法

1.2.1 宿主菌的准备

将分离出的肺炎克雷伯菌接种于普通 LB 琼脂平板上，37 °C 培养过夜，挑取单菌落接种于 5 mL 液体 LB 培养基中，37 °C、220 r/min 振荡培养 6 h，OD_{600} 约为 0.5 时用于分离肺炎克雷伯菌噬菌体。

1.2.2 宿主菌的药物敏感性实验

通过测定药物的最小抑菌浓度(Minimum inhibitory concentration，MIC)确定宿主菌的药敏性。

1.2.3 噬菌体的分离纯化

将医院取回的污水于 10 000 r/min 离心 20 min 取上清，经 0.2 μm 微孔滤器过滤，取滤液 100 μL 加入 5 mL 对数期(OD_{600} 约为 0.5)的肺炎克雷伯菌中，在 37 °C、220 r/min 培养过夜，8 000 r/min 离心 10 min 后，经 0.2 μm 微孔滤器过滤，收集上清即为噬菌体原液。将上述噬菌体原液进行梯度稀释 10^{-1}–10^{-8}，分别取 100 μL 不同浓度的稀释液铺双层板，37 °C 倒置培养直至长出透亮的单个噬菌斑。用枪头挑取单斑加入 5 mL LB 液体培养基，再加入 100 μL 菌液后于 37 °C、220 r/min 振荡培养 5–8 h，8 000 r/min 离心取上清，经 0.2 μm 微孔滤器过滤，取滤液梯度稀释，如此重复 3 次，以达到纯化的效果。

1.2.4 噬菌体的大量培养及浓缩

将细菌接种至 500 mL LB 液体培养基中，培养至 OD_{600} 约为 0.5，加入 5 μL 噬菌体原液，37 °C 振荡培养直至液体变澄清。12 000 r/min 离心 10 min 取上清，将该液体经 0.2 μm 微孔滤器过滤，按照参考文献[10]的方法，使用超滤管进行浓缩。

1.2.5 透射电镜观察噬菌体形态

采用磷钨酸负染法观察噬菌体的形态，将镀碳支持膜铜网放在封口膜上，吸取 1 滴纯化的噬菌体悬液滴在铜网上，放置 2–5 min，用带尖的滤纸从铜网边缘吸去多余的噬菌体悬液，干燥 1 min。加 1 滴 2%磷钨酸溶液，染色 1 min。用滤纸吸去多余的染液，室温放置 30 min 后置于电镜下观察。

1.2.6 噬菌体最佳感染复数(Multiplicity of infection, MOI)测定

将宿主菌培养至对数期，按照噬菌体浓度(PFU/mL)/细菌浓度(CFU/mL)为 0.01、0.1、1、10、100 的比例混合，37 °C 孵育 5 min 后，8 000 r/min 离心 5 min 弃去上清，去除未吸附的噬菌体，用 5 mL 液体 LB 将沉淀重悬，37 °C 振荡培养 2 h，12 000 r/min 离心过滤取上清，利用双层平板法测定噬菌体效价并统计结果[9,11]。

1.2.7 噬菌体裂解谱的测定

通过点板试验，将受试菌(共 20 株肺炎克雷伯菌)培养至 OD_{600} 约为 0.5，取出 400 μL 铺双层平板，室温静置 5 min，将 3 μL 噬菌体浓缩液滴于双层平板上，室温静置至噬菌体浓缩液被吸收后，倒置于 37 °C 温箱中 9 h 后观察有无噬菌斑产生。

1.2.8 一步生长曲线的测定

在最佳 MOI 条件下,将噬菌体和宿主菌混合，总体积 20 mL，37 °C 温孵 5 min，12 000 r/min 离心 30 s，弃去上清；加入适量 LB (37 °C)培养基，12 000 r/min 离心 1 min 后弃去上清，重复 3 次，以除去未吸附的宿主菌噬菌体；加入 20 mL 液体 LB 培养基，37 °C 振荡培养，从 0 时刻起每隔 10 min 取样，4 °C、12 000 r/min 离心 10 min，收集上清液，测定噬菌体的滴度，试验重复 3 次。以感染时间(t)为横坐标，噬菌体滴度(PFU/mL)为纵坐标，绘制一步生长曲线,得出噬菌体的潜伏期、裂解期，并计算裂解量。裂解量=裂解末期噬菌体滴度/感染初期宿主菌浓度。

1.2.9 提取噬菌体基因组

参考文献[9,12-13]的蛋白酶 K/SDS 法提取噬菌体核酸，方法略有改动，具体方法：取 600 μL 已纯化的噬菌体，加入 DNase Ⅰ和 RNase A 至终浓度 1 mg/L，在 37 °C 金属浴孵育过夜，80 °C 灭活 15 min，使酶失活。然后加入 0.5 mol/L EDTA 至终浓度 0.02 mol/L，20 g/L 蛋白酶 K 至终浓度 50 mg/L，10% SDS 至终浓度 0.5%，56 °C 水浴 1 h。加入 650 μL 平衡酚溶液抽提，振荡混匀 1 min，10 000 r/min 离心 5 min，转移上层水相到新的 1.5 mL 离心管中。向上述液体中加入 620 μL 的酚-氯仿-异戊醇(25:24:1，体积比)，温和振荡 1 min 后 10 000 r/min 离心 10 min。将上述离心管中上层水相移到一个新的离心管中，并加入 550 μL 异戊醇。在−20 °C 放置 2 h 后于 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min，弃去所有液体。用 75%的−20 °C 预冷乙醇洗涤上述沉淀，4 °C、12 000 r/min 离心 20 min 弃上清,将沉淀置于室温至完全干燥，用无核酸水重悬干燥的 DNA 沉淀，置于−20 °C 保存。

1.2.10 噬菌体的全基因组测序及生物信息学分析

使用 NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep Kit 构建 600 bp 测序文库。主要流程：基因组 DNA 超声打断(160 W，工作 30 s，停歇 90 s，共 11 min)，末端补平，加上特异接头，扩增纯化筛选 DNA 即为构建的测序文库。使用 Illumina MiSeq 测序仪对噬菌体进行全基因组测序。使用软件 Newbler V3.0 (Roche diagnostics company，Indianapolis，IN)对噬菌体原始测序数据进行组装和拼接。使用 RAST (http://rast.nmpdr.org/)在线注释对全基因组进行快速注释，使用在线 BLASTp 工具(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)进一步对注释蛋白进行功能预测[14]。用软件 MEGA 6.0 (http://www.megasoftware.net)对噬菌体衣壳蛋白进行进化分析。

2 结果与分析

2.1 宿主菌的药敏性

宿主菌药敏性检测结果如表 1 所示。

2.2 噬菌体的形态学特征

从医院污水中分离得到一株肺炎克雷伯菌噬菌体，命名为 vB_KpnP_IME279。噬菌体 vB_KpnP_IME279 的透射电镜照片如图 1 所示,衣壳呈正 20 面体，直径约 60 nm，尾鞘长约 15 nm，无收缩性，可隐约看到尾丝。依据最新国际病毒分

表 1 宿主菌药敏性

Table 1 Drug sensitivity of host bacteria

抗生素名称 Antimicrobial drugs name	最小抑菌浓度 MIC (μg/mL)	药敏性 Sensitivity
丁胺卡那霉素 Amikacin	16	S
头孢呋辛纳 Cefuroxime-Sodium	≥64	R
环丙沙星 Ciprofloxacim	≥4	R
庆大霉素 Gentamicin	≥16	R
亚胺培南 Imipenem	≤1	S
美洛培南 Meropenem	≤0.25	S
哌拉西林 Piperacillin	≥128	R
妥布霉素 Tobramycin	≥16	R
复方新诺明 Cotrimoxazole	≥320	R
左旋氧氟沙星 Levofloxacin	≥8	R
呋喃妥因 Nitrofurantoin	64	I
氨苄西林/舒巴坦 Ampicillin/Sulbactam	≥32	R
氨曲南 Aztreonam	≥64	R
头孢吡肟 Cefepime	16	I
头孢替坦 Cefotetan	≤4	S
头孢他啶 Ceftazidime	16	R
头孢曲松 Ceftriaxone	≥64	R

注：S：敏感；I：中介度；R：耐药.

Note: S: Sensitive; I: Intermediary; R: Resistant.

类方法[15]，vB_KpnP_IME279 属于有尾噬菌体目短尾噬菌体科(*Podoviridae*)。

2.3 噬菌体最佳感染复数

结果如图 2 所示，当 MOI 为 0.1 时，噬菌体感染宿主后释放的子代噬菌体的数量最多，即噬菌体 vB_KpnP_IME279 的最佳感染复数为 0.1。

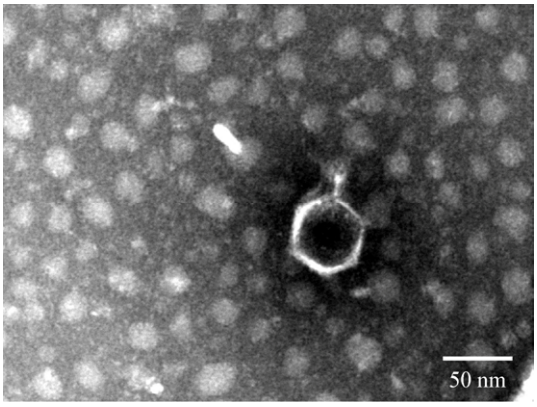

图 1 噬菌体 vB_KpnP_IME279 的形态

Figure 1 The morphology of phage vB_KpnP_IME279

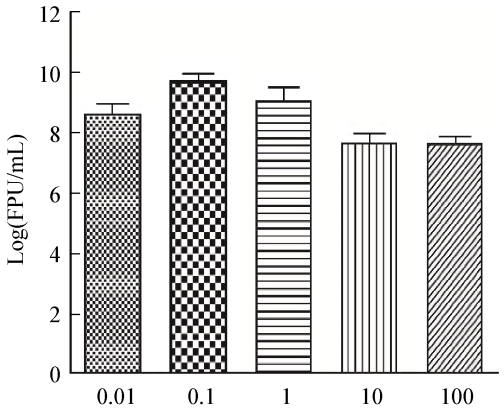

图 2 最佳感染复数的测定结果

Figure 2 Determination of optimal multiplicity of infection (MOI)

2.4 噬菌体的一步生长曲线

依据实验数据绘制噬菌体的一步生长曲线，如图 3 所示。噬菌体 vB_KpnP_IME279 的潜伏期(Latent period)是 20 min，其暴发期持续约 50 min，随后进入平稳期，理论上裂解释放应该是瞬时出现的，但由于每个细菌细胞的裂解无法同步，所以暴发期较长。噬菌体的裂解量约为噬菌体滴度/细菌的浓度=$(1.4\times10^9)/(1\times10^7)$=140。

2.5 噬菌体 vB_KpnP_IME279 裂解谱测定结果

通过对共计 20 株肺炎克雷伯菌的双层板点板实验表明，该噬菌体对其中 10 株有裂解能力，结果如表 2 所示。

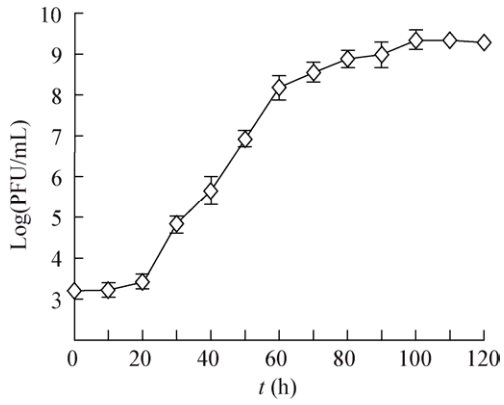

图 3 噬菌体 vB_KpnP_IME279 的一步生长曲线

Figure 3 One-step growth curve of phage vB_KpnP_IME279

表 2 噬菌体 IME279 裂解谱

Table 2 Lysis spectrum of phage IME279

肺炎克雷伯菌编号 *Klebsiella pneumoniae* No.	裂解性 Lytic ability
1731	−
1732	+
1733	−
1734	−
1735	−
1736	−
1737	+
1738	+
1739	+
1740	+
465	−
474	+
497	−
501	−
510	+
529	+
530	+
551	+
553	−
554	−

注：+：裂解；−：不裂解.

Note: +: Indicates cleavage; −: Indicates no cleavage.

2.6 噬菌体 vB_KpnP_IME279 全基因组分析概述

噬菌体 vB_KpnP_IME279 全基因组长度为 42 518 bp，基因组为线性，其核酸序列 NCBI 登录号为 MF614100。基因组 A、C、G 和 T 碱基含量分别为 18.7%、29.7%、29.6%和 22.0%，(G+C)mol%为 59.3%。BLASTn 分析结果如表 3 所示，共有 4 株噬菌体与噬菌体 vB_KpnP_IME279 基因组进行了对比，覆盖率为 22%−70%，相似度在 69%−80%之间，基因相似性较低。噬菌体 vB_KpnP_IME279 与其中 2 株相似度最高的噬菌体的基因组对比分析结果见图 4。RAST 基因注释结果显示共有 59 个开放阅读框(Open reading frame，ORF)，其中有 2 个 ORF 起始密码为 GTG，56 个 ORF 起始密码为 ATG，仅有 1 个 ORF 起始密码为 GCG。CDS 核酸序列长度在 174−3 144 bp 之间，对应的蛋白质序列长度在 57−1 047 aa 之间。全部的 ORF 共含 39 765 bp 的碱基，基因组基因密度高达 93.5%。

2.7 噬菌体 vB_KpnP_IME279 功能性 ORF 分析

使用 BLASTp 对蛋白序列进行在线分析，共得到 59 个开放阅读框(Open reading frame，ORF)，已知功能的 ORF 如表 4 所示。其中 ORF1 为 AAA 家族三磷酸腺苷酶，该类酶通常与各类细胞活动有着密切关系[16]。ORF16 为 Dcm 甲基化酶，可将 CCAGG 和 CCTGG 序列中的胞嘧啶变为 5-甲基胞嘧啶，该酶确切功能尚不清楚[17]。与噬菌体结构相关的蛋白为 ORF12 (头尾连接处蛋白)、ORF25 (基底板相关蛋白)、ORF28 (尾部纤维蛋白)、ORF37 (噬菌体衣壳蛋白)、ORF38 (支架蛋白)和 ORF44 (噬菌体门蛋白)。噬菌体门蛋白可以在衣壳中形成通道并有助于噬菌体基因组注入宿主细胞[18]。

ORF34 和 ORF35 是 DNA 稳定蛋白，属于噬菌体稳定超家族(Phage_stabilize superfamily)，研究表明该蛋白可能参与了噬菌体包装过程中的 DNA 凝缩过程[19]。

表 3 噬菌体 vB_KpnP_IME279 基因组一致性对比

Table 3 Genomic homology comparison of phage vB_KpnP_IME279

Description	Query cover (%)	*E* value	Identity (%)	Accession No.
Salmonella phage Lumpael	70	0	71	MK125141.1
Enterobacteria phage IME_EC2	70	0	80	KF591601.1
Escherichia phage Skarpretter	26	0	72	MK105855.1
Escherichia phage C130_2	22	2.00E−153	69	MH363708.1
Citrobacter farmeri strain AUSMDU00008141	0	2.00E−77	80	CP022695.1
Citrobacter amalonaticus Y19	0	1.00E−73	79	CP011132.1
Citrobacter amalonaticus strain FDAARGOS_122	0	4.00E−73	79	CP014015.2
Citrobacter freundii complex sp. CFNIH2 chromosome	0	4.00E−73	79	CP025757.1

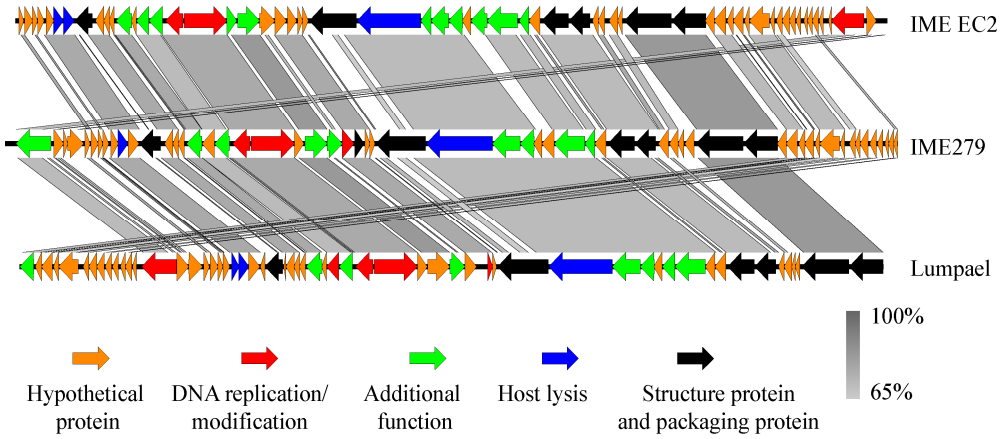

图 4　vB_KpnP_IME279 与其近源噬菌体同源分析

Figure 4　The homology comparison between vB_KpnP_IME279 and its proximal phages

表 4　噬菌体 IME279 的 ORF 功能预测

Table 4　ORF analysis of the IME279 genome

ORF	Top BLAST hit[a]	Identity (aa)[b] (%)	*E* value	Accession No.
1	AAA family ATPase [*Enterobacter bugandensis*]	527/553 (95%)	0	WP_047367159.1
2	Hypothetical protein DI533_21445 [*Rhodobacter sphaeroides*]	149/151 (99%)	2.00E-101	PZQ94814.1
3	No hits			
4	Hypothetical protein DI533_21165 [*Rhodobacter sphaeroides*]	147/151 (97%)	2.00E-105	PZQ94762.1
5	Hypothetical protein [*Enterobacter bugandensis*]	75/81 (93%)	1.00E-44	WP_047367155.1
6	Hypothetical protein DI533_21175 [*Rhodobacter sphaeroides*]	114/115 (99%)	1.00E-79	PZQ94764.1
7	Hypothetical protein DI533_21180 [*Rhodobacter sphaeroides*]	72/73 (99%)	1.00E-43	PZQ94765.1
8	Hypothetical protein DI533_21185 [*Rhodobacter sphaeroides*]	91/92 (99%)	1.00E-60	PZQ94766.1
9	Hypothetical protein [*Enterobacter bugandensis*]	112/116 (97%)	2.00E-79	WP_082131788.1
10	Lysin [*Rhodobacter sphaeroides*]	150/154 (97%)	2.00E-106	PZQ94768.1
11	DUF2514 domain-containing protein [*Rhodobacter sphaeroides*]	170/172 (99%)	4.00E-114	PZQ94817.1
12	Neck whiskers protein [*Rhodobacter sphaeroides*]	322/333 (97%)	0	PZQ94769.1
13	Hypothetical protein DI533_21210 [*Rhodobacter sphaeroides*]	129/130 (99%)	6.00E-89	PZQ94770.1
14	No hits			
15	No hits			
16	Dcm methylase [*Rhodobacter sphaeroides*]	244/245 (99%)	0	PZQ94774.1
17	Hypothetical protein DI533_21235 [*Rhodobacter sphaeroides*]	188/194 (97%)	5.00E-139	PZQ94775.1
18	Phage N-6-adenine-methyltransferase [*Rhodobacter sphaeroides*]	229/233 (98%)	2.00E-169	PZQ94776.1
19	DNA primase/helicase [*Escherichia* phage C130_2]	140/279 (50%)	3.00E-87	AXC34353.1
20	DNA helicase, phage-associated [*Rhodobacter sphaeroides*]	680/684 (99%)	0	PZQ94778.1
21	Hypothetical protein [*Enterobacter bugandensis*]	147/148 (99%)	2.00E-104	WP_052954301.1
22	Putative exodeoxyribonuclease VIII [*Enterobacteria* phage IME_EC2]	293/341 (86%)	0	AGZ17810.1
23	Recombinase [*Escherichia* phage C130_2]	157/238 (66%)	2.00E-100	AXC34349.1

(待续)

(续表 4)

24	Single-stranded DNA-binding protein [*Rhodobacter sphaeroides*]	180/182 (99%)	8.00E-125	PZQ94782.1
25	Baseplate wedge protein [*Enterobacteria* phage IME_EC2]	110/146 (75%)	3.00E-78	AGZ17813.1
26	No hits			
27	No hits			
28	Phage tail fibers [*Enterobacter bugandensis*]	751/787 (95%)	0	WP_052954300.1
29	Lytic transglycosylase domain-containing protein [*Enterobacter bugandensis*]	889/976 (91%)	0	WP_120247335.1
30	Prophage DNA injection protein [*Enterobacteria* phage IME_EC2]	175/232 (75%)	1.00E-103	AGZ17819.1
31	DNA transfer protein [*Rhodobacter sphaeroides*]	218/220 (99%)	1.00E-151	PZQ94785.1
32	Hypothetical protein DI533_21305 [*Rhodobacter sphaeroides*]	128/131 (98%)	8.00E-91	PZQ94786.1
33	Hypothetical protein DI533_21310 [*Rhodobacter sphaeroides*]	185/192 (96%)	3.00E-129	PZQ94787.1
34	DNA stabilization protein [*Enterobacteria* phage IME_EC2]	328/481 (68%)	0	AGZ17823.1
35	DNA stabilization protein [*Enterobacteria* phage IME_EC2]	91/149 (61%)	3.00E-61	AGZ17824.1
36	Hypothetical protein [*Enterobacter bugandensis*]	157/181 (87%)	1.00E-104	WP_047367130.1
37	Phage capsid protein [*Rhodobacter sphaeroides*]	418/420 (99%)	0	PZQ94791.1
38	Scaffold protein [*Enterobacteria* phage IME_EC2]	163/339 (48%)	8.00E-83	AGZ17827.1
39	Hypothetical protein DI533_21345 [*Rhodobacter sphaeroides*]	148/149 (99%)	6.00E-103	PZQ94794.1
40	Hypothetical protein DI533_21350 [*Rhodobacter sphaeroides*]	131/138 (95%)	2.00E-82	PZQ94795.1
41	No hits			
42	Hypothetical protein DI533_21355 [*Rhodobacter sphaeroides*]	141/145 (97%)	5.00E-99	PZQ94796.1
43	Phage portal protein [*Rhodobacter sphaeroides*]	743/744 (99%)	0	PZQ94797.1
44	Phage terminase, large subunit [*Enterobacter bugandensis*]	523/540 (97%)	0	KLQ32567.1
45	Hypothetical protein ABR33_06125 [*Enterobacter bugandensis*]	140/146 (96%)	2.00E-101	KLQ32566.1
46	Hypothetical protein [*Enterobacter bugandensis*]	163/173 (94%)	3.00E-114	WP_047367174.1
47	Hypothetical protein DI533_21380 [*Rhodobacter sphaeroides*]	96/97 (99%)	1.00E-66	PZQ94801.1
48	Hypothetical protein DI533_21385 [*Rhodobacter sphaeroides*]	95/138 (69%)	1.00E-33	PZQ94802.1
49	No hits			
50	Hypothetical protein DI533_21395 [*Rhodobacter sphaeroides*]	296/312 (95%)	0	PZQ94804.1
51	No hits			
52	Hypothetical protein [*Enterobacter bugandensis*]	83/91 (91%)	1.00E-52	WP_047367168.1
53	No hits			
54	Hypothetical protein DI533_21415 [*Rhodobacter sphaeroides*]	121/126 (96%)	2.00E-83	PZQ94808.1
55	Hypothetical protein DI533_21420 [*Rhodobacter sphaeroides*]	95/104 (91%)	2.00E-64	PZQ94809.1
56	Hypothetical protein DI533_21425 [*Rhodobacter sphaeroides*]	80/85 (94%)	2.00E-51	PZQ94810.1
57	No hits			
58	Hypothetical protein DI533_21430 [*Rhodobacter sphaeroides*]	72/78 (92%)	5.00E-33	PZQ94811.1
59	No hits			

注：[a]：最相近基因组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；[b]：BLASTp 搜索到比对百分比.

Note: [a]: The most closely related genes and names of the organisms; No hits: Indicates no significant homology detected for a particularamino acid sequence; [b]: Percent identity for top hits in BLASTp searches.

在噬菌体 DNA 复制及调控相关基因中包括：ORF19 (引物酶/解旋酶)、ORF20 (解旋酶)、ORF23 (重组酶)、ORF24 (DNA 单链结合蛋白)。由于 DNA 复制的半不连续性，导致后随链的复制过程需要引物酶的参与[20]。此外，引物酶可以与解旋酶的 N-末端结合形成复制子，其在 DNA 复制、修复和转录中具有广泛作用。

ORF10 (溶菌酶)能诱导宿主菌的裂解，从而释放出子代噬菌体。ORF44(末端酶大亚基)基因是终止酶全酶的重要组成部分，据相关研究[21]表明，末端酶复合物可以与门蛋白组装到一起，形成一个基因组包装马达，在噬菌体的包装过程中发挥重要的作用。ORF29 (糖基转移酶)可以催化糖基与核酸或者蛋白质等物质之间形成糖苷键，进而形成具有独特生物学活性的糖基化合物[22]。

使用 Inkscape 软件制作噬菌体全基因组模式图，如图 5 所示，共 4 圈。

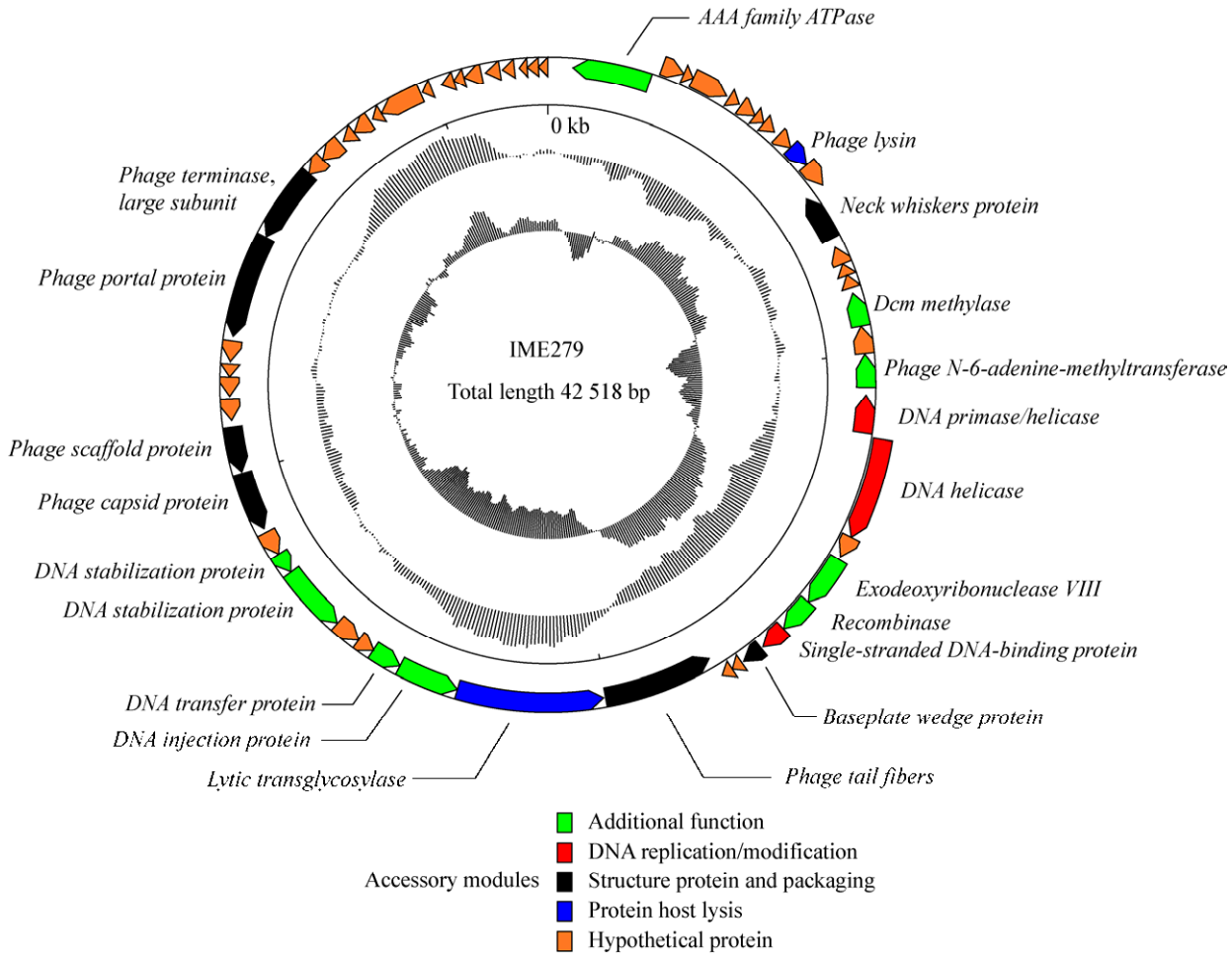

图 5　IME279 全基因组图谱

Figure 5　Genome map of IME279

注：从外到里分别是：最外侧代表基因组正向阅读框，其次内侧代表负向阅读框；黑色代表(G+C)mol%，向外表示含量大于全基因组平均(G+C)mol%，向内表示含量低于平均(G+C)mol%；最里面圈代表 G+C 偏嗜性 G-C/G+C，向外代表大于 0，向内代表小于 0.

Note: Patterns are divided into four circles. From the outside to the inside: The outermost represents the forward reading frame, followed by the outermost circle represents the reverse reading frame; Black represents the (G+C)mol% (outward is more than the whole genome average (G+C)mol% and inwardly is the opposite); The innermost green and purple circles represent G+C skew of G-C/G+C (outward represents greater than 0, inward represents less than 0).

2.8 噬菌体 IME279 系统进化树的构建

为了更好地分析噬菌体 IME279 与其它噬菌体之间的关系。选取具有进化意义且保守的噬菌体主要衣壳蛋白(ORF39)和其他短尾科噬菌体的主要衣壳蛋白氨基酸序列构建系统进化树[23], 如图 6 所示。进化树结果显示噬菌体 IME279 与 IME EC2 、C130-2 、Lumpael 和 Skarpretter 位于 *Sepvirinae* 亚科中一个新的分支，而且不属于已知属，我们建议组成一个新的属。

3 讨论与结论

在抗生素广泛应用的今天,致病菌产生耐药性的问题越发严重,世界卫生组织更是认为细菌耐药性威胁是 21 世纪的最大威胁之一。在 1921 年，Bruynoghe 等[24]首次运用噬菌体治疗细菌感染之后，噬菌体治疗曾经受到了一定程度的关注，但是由于当时技术所限，噬菌体的培养和提取受到了很大程度的限制。在抗生素诞生后，其高效便捷的特性更使得噬菌体治疗被人们所遗忘。但是

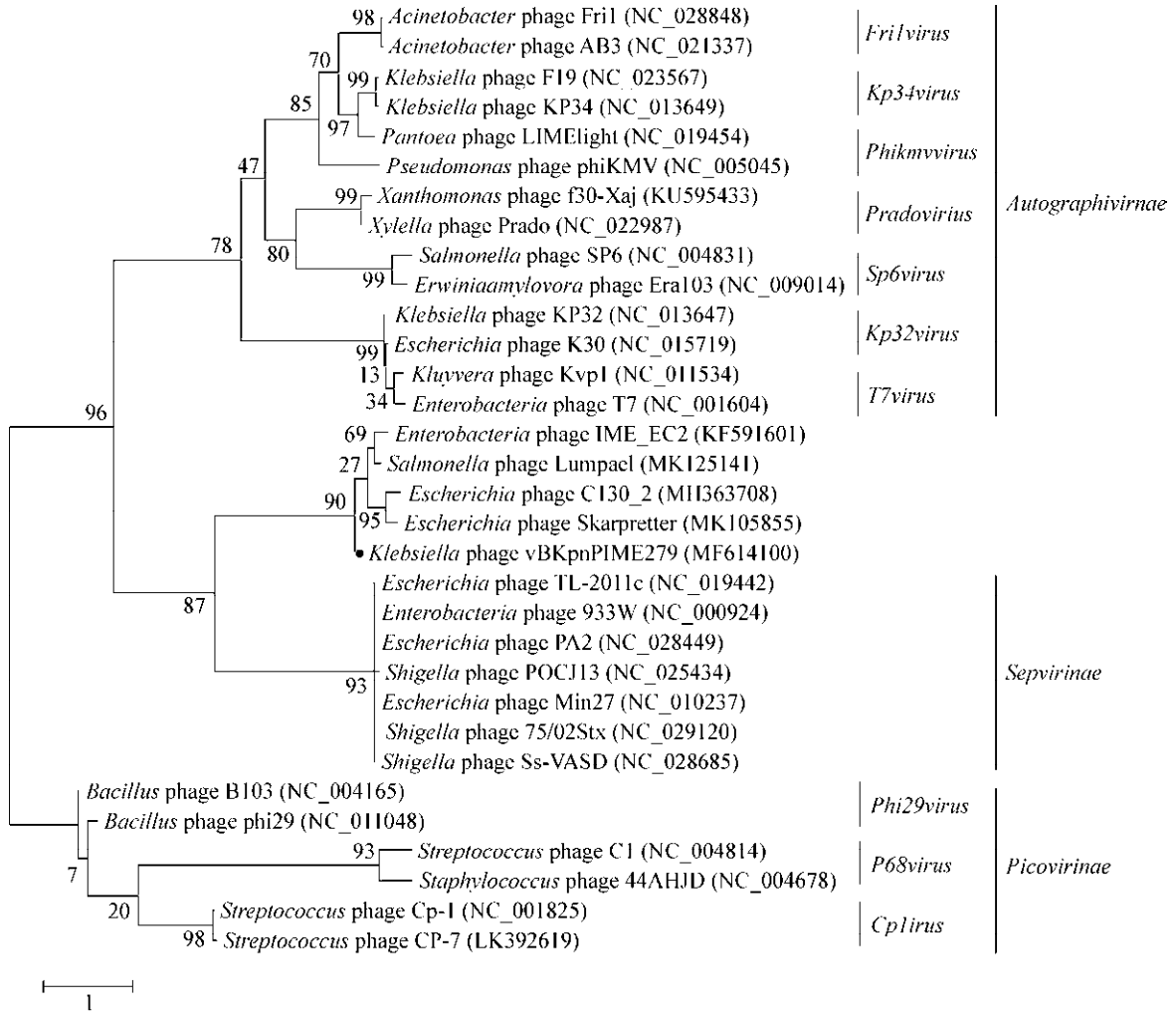

图 6 使用噬菌体主要衣壳蛋白制作的进化树

Figure 6 Phylogenetic tree was formed by major capsid protein of phage

注：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_KpnP_IME279；括号内：GenBank 序列号.

Note: The number at the branch point: The confidence level; Scale: The genetic distance; Black ball: vB_KpnP_IME279; In brackets: GenBank accession No..

由于当前全球面临的细菌耐药性提升的严峻形势，而抗生素的开发速度远远低于抗药性的产生速度，从而使噬菌体治疗手段再次受到了全世界范围的关注。目前噬菌体治疗已经取得了很多成果[25]。2009 年，Wright 等[26]首次用噬菌体治疗多重耐药铜绿假单胞菌感染导致的慢性耳炎患者，一段时间后患者症状均显著改善，且未发现任何毒副作用。

本实验利用从医院污水中分离得到的肺炎克雷伯菌噬菌体进行研究，命名为 vB_KpnP_IME279。通过透射电镜观察，按照噬菌体分类学中的分类标准，判断该噬菌体属于短尾噬菌体科(*Podoviridae*)，进一步进行生物学特性研究发现该噬菌体最佳感染复数为 0.1，一步生长曲线显示 IME279 的潜伏期 20 min，暴发量为 140 PFU/cell。此外，本研究利用 Illumina MiSeq 高通量测序仪进行全基因组测序，利用 BLASTn 进行在线分析，发现 IME279 与目前已知的噬菌体一致性均较低。通过 BLASTp 预测了 ORF 功能，为后续对噬菌体进行更深入的基因研究奠定了基础。在 ORF 分析中，并未找到穿孔蛋白(Holin)与 DNA 聚合酶(DNA polymerase)的 CDS 序列，通过与噬菌体 IME EC2 和 Lumpael 基因组同源分析得知，ORF11 可能是穿孔蛋白，利用 TMHMM server (http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/)在线分析得知该 ORF 有一段跨膜区，可能为Ⅲ型穿孔蛋白，其结果还需要进行进一步实验验证。在 IME 279 与另外两株参与对比的噬菌体基因组中均未找到末端酶小亚基的 CDS 序列。ORF16 (Dcm 甲基化酶)与 ORF18 (N-6-腺嘌呤甲基转移酶)可能参与了宿主基因组的修饰，ORF44 (重组酶)可以催化链的断裂与连接。

尽管噬菌体治疗被给予了很高的期望来抗争所谓“超级耐药菌”，但是仍然有很多亟待解决的问题，尤其是噬菌体制剂的质量评价标准难以确定。为了系统评价噬菌体治疗的安全性，欧盟曾在 2015 年启动了 Phagoburn 计划[27]。我们相信，随着科学家对噬菌体研究的不断深入，噬菌体制剂标准化问题会得到解决，噬菌体治疗会更好地应用于临床治疗，以解决当前的耐药性问题。

REFERENCES

[1] Shi ZY, Liu XH, Li G, et al. Drug resistance changes of clinical isolation of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*[J]. Laboratory Medicine and Clinic, 2018, 15(22): 3349-3352 (in Chinese)
师志云, 刘香花, 李刚, 等. 临床分离大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌耐药性变迁[J]. 检验医学与临床, 2018, 15(22): 3349-3352

[2] Organization WH. Antimicrobial resistance global report on surveillance: 2014 summary[C]. World Health Organization, 2014

[3] Cheng GY, Li J, Gu YF, et al. Antimicrobial resistance surveillance systems of WHO, EU and China[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2018, 43(6): 665-674 (in Chinese)
程古月, 李俊, 谷宇锋, 等. 世界卫生组织、欧盟和中国抗生素耐药性监测现状[J]. 中国抗生素杂志, 2018, 43(6): 665-674

[4] Hu FP, Zhu DM, Wang F, et al. CHINET 2014 surveillance of bacterial resistance in China[J]. Chinese Journal of Infection and Chemotherapy, 2015, 15(5): 401-410 (in Chinese)
胡付品, 朱德妹, 汪复, 等. 2014 年 CHINET 中国细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2015, 15(5): 401-410

[5] Hu FP, Guo Y, Zhu DM, et al. Antimicrobial resistance profile of clinical isolates in hospitals across China: report from the CHINET Surveillance Program, 2017[J]. Chinese Journal of Infection and Chemotherapy, 2018, 18(3): 241-251 (in Chinese)
胡付品, 郭燕, 朱德妹, 等. 2017 年 CHINET 中国细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2018, 18(3): 241-251

[6] Wang S, Tong YG. Recent advance in bacteriophage therapy[J]. Microbiology China, 2009, 36(7): 1019-1024 (in Chinese)
王盛, 童贻刚. 噬菌体治疗研究进展[J]. 微生物学通报, 2009, 36(7): 1019-1024

[7] Chen SJ, Wang SW, Zhang G, et al. Characterization and application of a novel phage F20 in the rescue septicemia mice caused by extend[J]. Microbiology China, 2019, 46(6): 1502-1509 (in Chinese)
陈松建, 王书伟, 张改, 等. 超广谱 β-内酰胺酶肺炎克雷伯菌噬菌体 F20 的分离鉴定及其对小鼠败血症治疗效果[J]. 微生物学通报, 2019, 46(6): 1502-1509

[8] Oliveira A, Sereno R, Azeredo J. *In vivo* efficiency evaluation of a phage cocktail in controlling severe colibacillosis in confined conditions and experimental poultry houses[J]. Veterinary Microbiology, 2010, 146(3/4): 303-308

[9] Xing SZ, Zhang XLL, Shu P, et al. Characterization and complete genome sequence analysis of *Enterococcus faecalis* bacteriophage vB_*E. faecalis*_IME196[J]. Microbiology China, 2016, 43(9): 2040-2048 (in Chinese)
邢少贞, 张湘莉兰, 舒鹏, 等. 粪肠球菌噬菌体 vB_*E. faecalis*_IME196 的生物学特性及其全基因组分析[J]. 微生物

学通报, 2016, 43(9): 2040-2048

[10] Han CY, Zhang FX, Tong YG. Comparison of different bacteriophage concentration methods[J]. Letters in Biotechnology, 2013, 24(5): 695-697,721 (in Chinese)
韩传银, 张飞雄, 童贻刚. 噬菌体浓缩方法的比较[J]. 生物技术通讯, 2013, 24(5): 695-697,721

[11] Zhu JM, Rao XC, Tan YL, et al. Identification of lytic bacteriophage MmP1, assigned to a new member of T7-like phages infecting *Morganella morganii*[J]. Genomics, 2010, 96(3): 167-172

[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] Lu SG, Le S, Tan YL, et al. Genomic and proteomic analyses of the terminally redundant genome of the *Pseudomonas aeruginosa* phage PaP1: establishment of genus PaP1-like phages[J]. PLoS One, 2013, 8(5): e62933

[14] 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

[15] Lefkowitz EJ, Dempsey DM, Hendrickson RC, et al. Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)[J]. Nucleic Acids Research, 2018, 46(D1): D708-D717

[16] Wang H, Jin S, Chen X, et al. Target deletion of the AAA ATPase *PpCDC48II* in *Physcomitrella patens* results in freezing sensitivity after cold acclimation[J]. Science China Life Sciences, 2012, 55(2): 156-157

[17] Gao J, Han TS, Feng J, et al. Pleiotropic effects on *Streptomyces lividans* growth by Dcm expression[J]. Microbiology China, 2014, 41(9): 1925-1931 (in Chinese)
高婕, 韩铁生, 丰俊, 等. 大肠杆菌甲基转移酶 *dcm* 基因的表达对变铅青链霉菌的多效性影响[J]. 微生物学通报, 2014, 41(9): 1925-1931

[18] Prevelige PE, Cortines JR. Phage assembly and the special role of the portal protein[J]. Current Opinion in Virology, 2018, 31: 66-73

[19] Eppler K, Wyckoff E, Goates J, et al. Nucleotide sequence of the bacteriophage P22 genes required for DNA packaging[J]. Virology, 1991, 183(2): 519-538

[20] Guilliam TA, Keen BA, Brissett NC, et al. Primase-polymerases are a functionally diverse superfamily of replication and repair enzymes[J]. Nucleic Acids Research, 2015, 43(14): 6651-6664

[21] Sun SY, Rao VB, Rossmann MG. Genome packaging in viruses[J]. Current Opinion in Structural Biology, 2010, 20(1): 114-120

[22] Gloster TM. Advances in understanding glycosyltransferases from a structural perspective[J]. Current Opinion in Structural Biology, 2014, 28: 131-141

[23] Benson SD, Bamford JKH, Bamford DH, et al. Viral evolution revealed by bacteriophage PRD1 and human adenovirus coat protein structures[J]. Cell, 1999, 98(6): 825-833

[24] Bruynoghe R, Maisin J. Essais de the rapeutique au moyen du bacteriophage[J]. Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie et de Ses Filiales, 1921, 85: 1120-1121

[25] Fu LN, Wang LL, Li XY, et al. Advances in phage control of three drug-resistant strains[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2017, 42(10): 836-841 (in Chinese)
付丽娜, 王丽丽, 李晓宇, 等. 噬菌体对三大耐药菌的防控作用研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2017, 42(10): 836-841

[26] Wright A, Hawkins CH, Änggård EE, et al. A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; a preliminary report of efficacy[J]. Clinical Otolaryngology, 2009, 34(4): 349-357

[27] Yang YH, Le S. Progress on *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage therapy[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2017, 42(10): 814-820 (in Chinese)
杨雨卉, 乐率. 铜绿假单胞菌噬菌体治疗的研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2017, 42(10): 814-820