



研究报告

一株金黄色葡萄球菌噬菌体的分离鉴定与生物学特性

葛志毅 韩生义 曹小安 周建华 刘婷婷 刘永生 李学瑞*

中国农业科学院兰州兽医研究所 家畜疫病病原生物学国家重点实验室 甘肃 兰州 730046

摘要:【背景】金黄色葡萄球菌作为一种条件致病菌,在临床感染中扮演着重要的角色,需要研究更多更有效的防治手段。【目的】分离金黄色葡萄球菌噬菌体,研究其生物学特性,从而为金黄色葡萄球菌的替代防治提供理论借鉴。【方法】以金黄色葡萄球菌 D085 为宿主从污水中分离得到一株噬菌体,命名为 vB_SauS_SAP3,用 PEG8000 浓缩、氯化铯密度梯度离心获得高纯度的噬菌体,1% 乙酸双氧铀染色噬菌体进行电镜观察。测定噬菌体宿主谱、最佳感染复数(Multiplicity of Infection, MOI)、一步生长曲线、热稳定性、pH 值稳定性及有机溶剂对噬菌体活性的影响。平衡酚法获取噬菌体基因组, Illumina 测序技术和 SPAdes 软件进行基因组测序分析。【结果】电镜下,噬菌体 SAP3 头部直径为 60 ± 5 nm,尾部长 170 ± 5 nm。噬菌体 vB_SauS_SAP3 还能裂解 5 株金黄色葡萄球菌和 1 株产色葡萄球菌,其最佳感染复数为 0.1。噬菌体 vB_SauS_SAP3 潜伏期为 20 min,60 min 后进入平台期,裂解量约为 210 PFU/cell;对 45 °C 以下温度有一定耐受性,超过 45 °C 开始急剧失活;能在中性 pH 值时保持稳定活性,酸性环境会使其急剧失活,对碱性环境有一定的抵抗力;对氯仿和异戊醇不耐受。其基因组分析结果表明:噬菌体基因组大小为 41 950 bp,GC 含量为 35.42%,预测有 65 个开放阅读框(Open Reading Frame, ORF)。进化分析表明,噬菌体 vB_SauS_SAP3 属于长尾科噬菌体,是一种新型的噬菌体。【结论】噬菌体 vB_SauS_SAP3 是一株窄谱的能够耐受一定温度和碱性环境的长尾科新型噬菌体,对其研究可为金黄色葡萄球菌噬菌体的研究提供理论材料。

关键词: 金黄色葡萄球菌,噬菌体,生物学特性,基因组分析

Isolation and biological characterization of a bacteriophage against *Staphylococcus aureus*

GE Zhiyi HAN Shengyi CAO Xiaolan ZHOU Jianhua LIU Tingting LIU Yongsheng LI Xuerui*

State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou, Gansu 730046, China

Abstract: [Background] As a conditioned pathogen, *Staphylococcus aureus* plays an important role in clinical infection. Therefore, the effective prevention and treatment methods should be studied more. [Objective] To isolate and analyze the biological characteristics of *Staphylococcus aureus* phage, and to

Foundation item: National Key Research and Development Program of China (2018YFD0500900)

*Corresponding author: Tel: 86-931-8342771; E-mail: lixuerui@caas.cn

Received: 09-07-2020; Accepted: 20-08-2020; Published online: 20-10-2020

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFD0500900)

*通信作者: Tel: 0931-8342771; E-mail: lixuerui@caas.cn

收稿日期: 2020-07-09; 接受日期: 2020-08-20; 网络首发日期: 2020-10-20

provide theoretical reference for the alternative prevention and treatment of *Staphylococcus aureus*. **[Methods]** A phage was isolated from sewage using pathogenic *Staphylococcus aureus* D085 as host and called vB_SauS_SAP3. The phage was obtained by PEG8000 concentration and cesium chloride density gradient centrifugation. It was stained with uranium acetate and observed via transmission electron microscopy. The phage host spectrum, optimal multiplicity of infection (MOI), one-step growth curve, temperature sensitivity, pH sensitivity and the effects of organic reagents on the activity of phage were determined. The phage's genome was obtained by the equilibrium phenol method and Illumina sequencing technology for genome sequencing analyzed. **[Results]** Via transmission electron microscopy, phage vB_SauS_SAP3 has a head with diameter of 60 ± 5 nm and a tail with length of 170 ± 5 nm. It was also able to lyse five strains of *Staphylococcus aureus* and one strain of *Staphylococcus chromogenes*. The optimal multiplicity of infection was 0.1. One step growth curve showed that the latent period and the burst period was 20 min and 60 min. The burst size was about 210 PFU per infected cell. The phage vB_SauS_SAP3 was resistant to temperatures below 45 °C and sharply inactivated beyond 45 °C. It can maintain stable activity in neutral pH and has a certain resistance in alkaline environment, but acid environment will make it sharply inactivated. The phage vB_SauS_SAP3 were completely inactivated when treatment with chloroform and isoamyl alcohol. The size of phage vB_SauS_SAP3 genome was 41 950 base pairs (bp) and encoding 65 ORFs by predicted. The genome include GC content was 35.42%. Phylogenetic analysis indicated that the phage vB_SauS_SAP3 was a member of *Siphoviridae* and a new *Staphylococcus aureus* phage. **[Conclusion]** The phage vB_SauS_SAP3 has a narrow host spectrum and can withstand certain temperature and alkaline environment, which was a new *Staphylococcus aureus* phage. The study of vB_SauS_SAP3 can provide theoretical materials for the study of *Staphylococcus aureus* phage.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, phage, biological characterization, genomic analysis

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)是一种革兰氏阳性菌,属于葡萄球菌属^[1]。该菌是自然界中分布广泛的一种常见致病菌,可致人或动物发生多种感染性疾病,如局部脓肿、败血症、脓毒血症、心内膜炎、骨髓炎、致死性肺炎^[2]。同时该菌也是奶牛乳腺炎主要的致病菌之一,常常造成奶牛产奶量下降,污染奶制品,影响奶制品的安全,给畜牧业生产造成了巨大的经济损失^[3]。临床常用抗生素治疗金黄色葡萄球菌的感染,如青霉素、磺胺类、喹诺酮类等^[4]。但抗生素的滥用导致耐药菌株甚至多重耐药菌株的出现,如耐甲氧西林(Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)菌株和耐万古霉素(Vancomycin Resistant *Staphylococcus aureus*, VRSA)菌株^[5-6],尤其近几年金黄色葡萄球菌耐药现象越来越严重,给治疗防控带来了很大的麻烦^[7]。

噬菌体是一种细菌病毒,通过对细菌的专性吸附完成裂解或者溶源周期。烈性噬菌体主要通过裂解周期达到繁殖噬菌体子代的目的,同时也

可以达到裂解细菌的目的^[8],因此,烈性噬菌体具有“杀伤”细菌的效果,可以作为一种治疗细菌感染的手段。噬菌体用于治疗具有特异性强、指数级增长和不对其他正常菌群产生作用的特点^[9],而且可以与抗生素进行协同治疗以达到最好的治疗效果^[10],是一种很有希望的抗生素替代品。

目前国内外有许多金黄色葡萄球菌噬菌体治疗奶牛乳腺炎的报道,如:Basdew等有3株噬菌体(sabp-p1、sabp-p2和sabp-p3)在体外可以治愈奶牛乳腺炎^[11];孙利利等分离纯化得到了一株金黄色葡萄球菌的噬菌体,通过临床实验发现,该噬菌体对奶牛乳腺炎具有显著的治疗效果^[12]。汤婷婷建立了小鼠乳腺炎模型,应用噬菌体治疗后发现噬菌体能够有效地降低乳腺组织中的细菌数^[13]。然而金黄色葡萄球菌噬菌体的研究和治疗还是有限,仍需要更多的科研探索来支持。

本实验以患奶牛乳腺炎的奶牛乳汁中分离的致病性金黄色葡萄球菌为宿主进行噬菌体的分离筛选,对筛选的噬菌体进行生物学特性分析及基

基因组分析, 以期为金黄色葡萄球菌噬菌体的研究和后续的治疗防控提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

实验用金黄色葡萄球菌菌株及其他葡萄球菌菌株都源于实验室分离, 主要分离于患乳腺炎奶牛乳汁样品。金黄色葡萄球菌株鉴定采用鉴别培养基结合测序的方式。

1.2 主要试剂和仪器

PEG8000、平衡酚、氯化铯, 北京索莱宝科技有限公司; 异戊醇、氯仿、丙三醇、乙醇、甲醇, 天津市汇杭化工科技发展有限公司; 1% 乙酸双氧铀, 上海吉至生化科技有限公司; DNA 酶(DNase I)、RNA 酶(RNase)、绿豆核酸酶, 宝生物工程(大连)有限公司。

巴氏吸管, 上海晶安生物科技有限公司; 恒温摇床, 上海智城分析仪器制造有限公司; 铜网, 中镜科仪(北京)膜科技有限公司; 0.22 μm 滤器, Merck Millipore 公司; 恒温培养箱, 上海一恒科技有限公司; 高速离心机, Eppendorf 公司; 超速离心机, 贝克曼库尔特商贸(中国)有限公司; 透射电镜, 日立公司; 生物安全柜, 苏净安泰空气技术有限公司。

1.3 主要溶液配制

参照《分子克隆实验指南》第 3 版^[14]配制 SM 缓冲液和 0.7% 水琼脂, SM 缓冲液中不加入明胶, 0.7% 水琼脂只加琼脂粉。

1.4 噬菌体的分离

所有采自奶牛场的样品(奶样、粪便、污水)中加入 SM 缓冲液(1:6)。37 °C、200 r/min 振荡培养 5–6 h 后, 4 °C、8 000 r/min 离心 10 min, 吸出上清液再次离心, 重复离心 3 次。离心后的上清用 0.22 μm 滤器过滤, 所有滤液备用。将 37 °C、200 r/min 过夜复苏好的金黄色葡萄球菌取 500 μL 与 500 μL 的滤液混合, 置于恒温培养箱中 37 °C 孵育 15 min。将混合液用 SM 缓冲液连续稀释

3 个梯度(10^{-1} 、 10^{-3} 、 10^{-5}), 取 500 μL 加入到含有 5 mL 水琼脂的试管中, 混匀后倒入 LB 平板上, 室温放置 30 min 后放入恒温培养箱中 37 °C 培养过夜。次日观察有无噬菌斑的形成。

1.5 噬菌体的纯化

将出现噬菌斑的 LB 平板用巴氏吸管挑取单个噬菌斑, 加入到含有 500 μL SM 缓冲液的 EP 管中, 4 °C 解离 4–6 h 后, 连续梯度稀释, 双层平板培养。待双层平板培养长出噬菌斑后, 挑取单个噬菌斑, 继续解离梯度稀释继续双层平板培养, 如此重复 5–6 次, 获得纯化的噬菌体。

1.6 噬菌体的浓缩

噬菌体的浓缩方法参考《分子克隆实验指南》第 3 版^[14], 略有调整。

将过夜复苏好的菌液取 1 mL 于 8 000 r/min 离心 10 min, 弃掉上清, 用 100 μL SM 缓冲液重悬菌体, 加入 100 μL 噬菌体解离液, 恒温培养箱 37 °C 放置 15 min 后, 将混合液加入到 100 mL LB 培养基中, 37 °C、200 r/min 振荡培养 8 h。培养液于 4 °C、8 000 r/min 离心 10 min 收集上清, 用 0.22 μm 滤器过滤上清; 加入终浓度 1 $\mu\text{g/mL}$ 的 DNA 酶和 RNA 酶, 37 °C 消化 30 min; 加入 1 mol/L 的 NaCl 混匀溶解, 冰浴 1 h, 4 °C、11 000 $\times g$ 离心 10 min, 收集上清; 加入 10% PEG 8 000 混匀溶解, 冰浴 1 h 以上, 4 °C、11 000 $\times g$ 离心 20 min, 小心除去上清, 用 1 mL SM 缓冲液重悬噬菌体碎片收集备用。

1.7 噬菌体的超速离心

将浓缩后的噬菌体样品按照每 1 mL 加入 0.5 g 氯化铯的比例加入氯化铯混匀溶解。在离心管中分别加入 1.70、1.50、1.45 g/mL 氯化铯 2 mL。含有氯化铯的噬菌体溶液加入离心管中, 4 °C、25 000 r/min 离心 4 h, 在 1.50–1.45 g/mL 密度之间收集噬菌体带。

1.8 噬菌体的电镜观察

取 10 μL 超速离心后的噬菌体样品滴加到铜

网上吸附 10 min, 小心地用滤纸吸除噬菌体溶液。滴加入 5 μL 的 1% 乙酸双氧铀溶液, 染色 2 min 后吸除染液, 室温晾干后用透射电镜观察。

1.9 噬菌体的生物学特性分析

1.9.1 宿主谱测定

对除了金黄色葡萄球菌 D085 之外的其他 21 株金黄色葡萄球菌和葡萄球菌进行宿主谱测定: 将 21 株金黄色葡萄球菌于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养过夜后, 取 100 μL 菌液与 100 μL 噬菌体混匀后, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 15 min 后双层平板法培养过夜, 观察有无噬菌斑的形成。

1.9.2 最佳感染复数测定(Multiplicity of Infection, MOI)

参照 Li 等^[15]的方法略有调整。将过夜复苏好的宿主菌液重新接到 10 mL LB 培养基中(1:100)培养至对数前期(OD_{600} 为 0.2–0.4)。将不同稀释浓度的噬菌体按照不同的感染复数(MOI=0.001、0.01、0.1、1、10、100)与等体积的对数前期的菌液进行混合, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min 后 8 000 r/min 离心 5 min, 将沉淀重悬后加入到 10 mL LB 液体中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养 5 h, 8 000 r/min 离心 10 min 收集噬菌体上清液, 0.22 μm 滤器过滤稀释成不同的梯度与宿主菌混合后双层平板法培养, 次日计算噬菌体效价。重复 3 次, 计算平均值。

1.9.3 一步生长曲线测定

一步生长曲线的测定参照 Pajunen 等方法^[16], 略有调整。

将过夜复苏好的宿主菌液重新接到 100 mL LB 液体中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 振荡培养至对数前期(OD_{600} 为 0.2–0.4), 按最佳感染复数加入噬菌体混匀后, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 继续振荡培养, 每隔 10 min 取样进行双层平板测效价, 连续取至 120 min。平行重复 3 次, 计算平均值。

1.9.4 热稳定性测定

各取 1 mL 噬菌体(10^9 PFU/mL)分别于 25、35、45、55、65 和 75 $^{\circ}\text{C}$ 中孵育 1 h 后进行双层平

板测效价, 每组重复 3 次。

1.9.5 不同 pH 对噬菌体活性影响的测定

将噬菌体(10^9 PFU/mL)按体积分数为 1:9 分别添加到 pH 值为 2.0、4.0、6.0、7.0、8.0、10.0 和 12.0 的 SM 缓冲液中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1 h 后进行双层平板测效价, 每组重复 3 次。

1.9.6 有机试剂对噬菌体活性影响的测定

将噬菌体(10^9 PFU/mL)按体积分数为 1:1 分别添加到异戊醇、丙三醇、甲醇、氯仿、乙醇和 SM 溶液(对照)中, 室温作用 30 min 后进行双层平板测效价, 每组重复 3 次。

1.10 噬菌体基因组分析

1.10.1 基因组的提取和核酸类型鉴定

基因组的提取和核酸类型鉴定方法参考《分子克隆实验指南》第 3 版, 略有调整^[14]。

取 1 mL 超速离心后的噬菌体样品, 加入终浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 的蛋白酶 K 和 0.5% 的 SDS, 轻轻上下颠倒混匀数次, 56 $^{\circ}\text{C}$ 1 h 溶解外壳蛋白; 加入等体积平衡酚(酚:氯仿:异戊醇=25:24:1, 体积分数), 轻轻上下颠倒混匀有机相和水相, 直至形成完全的乳浊液; 12 000 r/min 离心 10 min, 收集上清, 移至新离心管; 再次加入等体积平衡酚, 12 000 r/min 离心 10 min, 收集上清; 加入等体积氯仿:异戊醇(24:1, 体积分数), 上下颠倒混匀, 12 000 r/min 离心 10 min, 收集上清; 加入 2 倍体积的无水乙醇沉淀噬菌体 DNA, 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 30 min, 12 000 r/min 离心 20 min, 收集沉淀, 等乙醇挥发完全后加入适量 TE 缓冲液或去离子水溶解沉淀; 对噬菌体基因组进行核酸电泳鉴定, 取 10 μL 噬菌体基因组分别加入 DNA 酶、RNA 酶、绿豆核酸酶, 37 $^{\circ}\text{C}$ 酶切 2 h。全部酶切产物进行核酸电泳鉴定。

1.10.2 基因组分析

采用 Illumina 测序技术对样品的 DNA 进行 Paired-End (PE)测序, 有效 Reads 依据 Overlap 在 Linux 环境下进行 Contig 组装, Contigs 在 SPAdes 软件环境下循环填充边界直至无法延伸, 生成完

整的 Scaffolds。将预测基因的蛋白序列分别与 Nr、COG、eggNOG、KEGG、Swissprot 和 GO 数据库进行 BLAST 比对(BLAST 2.2.30+, 比对标准: *E* 值不大于 1E-5), 从而获得预测基因的注释信息。

全基因组序列和主要蛋白基因与 GenBank 数据库进行比较, 选取同一性较高的噬菌体基因于 MEGA 7.0 软件中用 Neighbor-Joining 方法构建系统发育树, 进行进化分析。

2 结果与分析

2.1 噬菌体的分离及纯化

通过双层平板法分离得到一株噬菌体, 命名为 vB_SauS_SAP3。对 vB_SauS_SAP3 反复纯化, 得到纯化后的噬菌体, 噬菌斑直径大小为 1-2 mm, 噬菌斑透亮明显, 有晕环。vB_SauS_SAP3 噬菌斑见图 1。

2.2 噬菌体的浓缩、超速离心及电镜观察

通过 PEG8000 浓缩后噬菌体 vB_SauS_SAP3 效价可达到 10⁷ PFU/mL, 超速离心后其效价可达到 10⁹ PFU/mL。在透射电镜下观察发现, 该噬菌体具有清晰的正二十面体头部和细而长的尾部, 尾部还具有明显的纤突结构。头部直径为 60±5 nm, 尾部长 170±5 nm。电镜结果如图 2 所示。

2.3 噬菌体的生物学特性分析

2.3.1 宿主谱测定

对除了金黄色葡萄球菌 D085 之外的其他 21 株

金黄色葡萄球菌和葡萄球菌进行宿主谱测定, 发现除了 D085, 噬菌体 vB_SauS_SAP3 还能裂解 S008、Q168、Q092、Q620 和 Q130 这 5 株金黄色葡萄球菌和一株葡萄球菌 S229。结果见表 1。

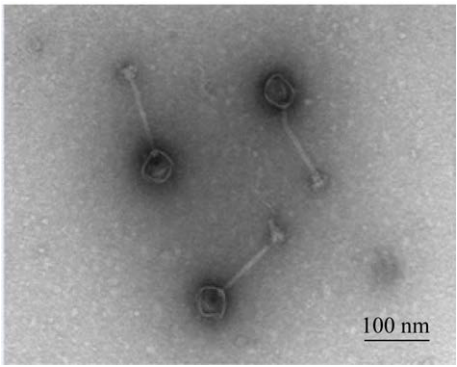


图 2 噬菌体 vB_SauS_SAP3 的电镜照片
Figure 2 Transmission electron microscopy of phage vB_SauS_SAP3

表 1 噬菌体 vB_SauS_SAP3 宿主谱
Table 1 The host spectrum of phage vB_SauS_SAP3

菌株 Bacterial strains	敏感性 Sensitivity
<i>S. aureus</i> S008	+
<i>S. aureus</i> Q168	+
<i>S. aureus</i> Q092	+
<i>S. aureus</i> Q620	+
<i>S. aureus</i> Q130	+
<i>S. chromogenes</i> S229	+
<i>S. aureus</i> S001	-
<i>S. aureus</i> S002	-
<i>S. aureus</i> J025	-
<i>S. aureus</i> Q549	-
<i>S. aureus</i> Q273	-
<i>S. aureus</i> Q185	-
<i>S. aureus</i> Q87-Y	-
<i>S. aureus</i> Q112	-
<i>S. aureus</i> Q432	-
<i>S. aureus</i> Q098	-
<i>S. aureus</i> Q640	-
<i>S. aureus</i> Q261	-
<i>S. aureus</i> Q121	-
<i>S. aureus</i> ATCC6538	-
<i>S. aureus</i> D470	-
<i>S. aureus</i> D039	-
<i>Staphylococcus</i> B1-10	-
<i>Staphylococcus</i> J1	-
<i>Staphylococcus</i> J5	-
<i>Staphylococcus</i> J14	-

注: +: 能裂解; -: 不能裂解
Note: +: Lytic; -: Not lytic

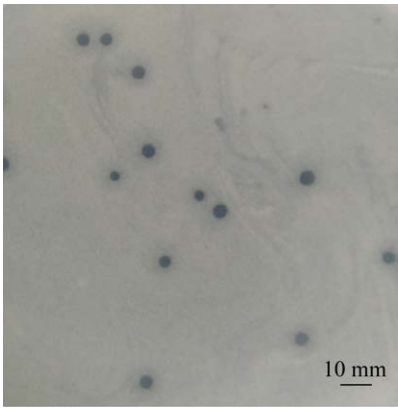


图 1 vB_SauS_SAP3 噬菌斑
Figure 1 Plaques of phage vB_SauS_SAP3

2.3.2 最佳感染复数(MOI)测定

双层平板培养计效价后发现,感染复数为 1:1 和 1:0.1 时噬菌体效价为 10^9 PFU/mL, 而且 1:0.1 感染比例下噬菌体效价达到 7.2×10^9 PFU/mL 为最佳, 因此 1:0.1 为最佳感染复数(表 2)。

2.3.3 一步生长曲线测定

通过一步生长曲线测定发现噬菌体 vB_SauS_SAP3 的潜伏期为 20 min, 之后噬菌体数量开始快速增长, 60 min 到达 10^9 PFU/mL, 进入平台期, 裂解量约为 210 PFU/cell (图 3A)。

2.3.4 热稳定性测定

对不同温度的噬菌体进行双层平板效价测

表 2 噬菌体 vB_SauS_SAP3 最佳感染复数测定

Table 2 Determination of optimal multiplicity of infection for phage vB_SauS_SAP3

感染复数 Multiplicity of infection (MOI)	菌落数 Numbers of bacteria (CFU/mL)	噬菌体数 Numbers of phages (PFU/mL)	噬菌体效价 Phage titer
1:100	10^7	10^9	3.3×10^8
1:10	10^7	10^8	3.7×10^8
1:1	10^7	10^7	4.5×10^9
1:0.1	10^7	10^6	7.2×10^9
1:0.01	10^7	10^5	4.9×10^8
1:0.001	10^7	10^4	3.0×10^7

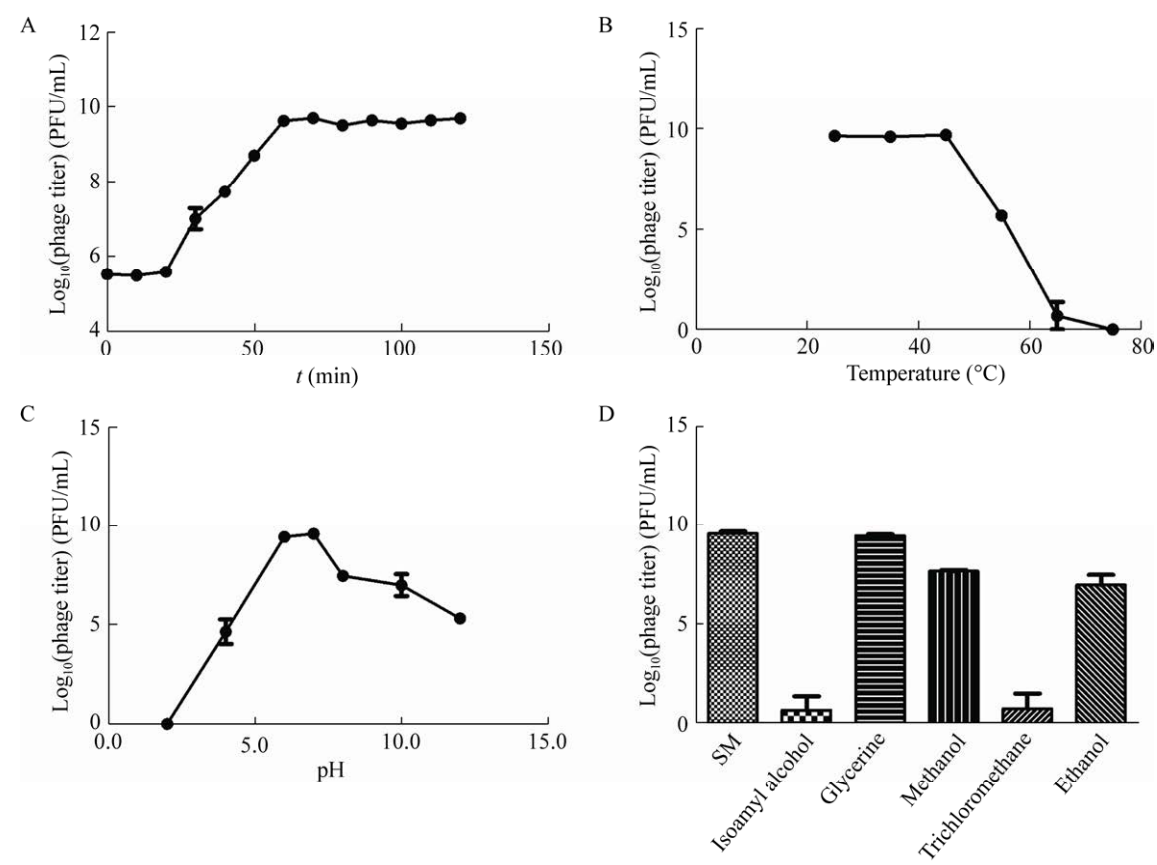


图 3 噬菌体 vB_SauS_SAP3 生物学特性

Figure 3 Biological characteristics of phage vB_SauS_SAP3

注: A: 噬菌体 vB_SauS_SAP3 的一步生长曲线; B: 噬菌体 vB_SauS_SAP3 的热稳定性测定; C: 不同 pH 对噬菌体 vB_SauS_SAP3 活性影响的测定; D: 有机试剂对噬菌体 vB_SauS_SAP3 的影响

Note: A: One-step growth curve of phage vB_SauS_SAP3; B: Determination of thermal stability of phage vB_SauS_SAP3; C: The influence of different pH on activity of phage vB_SauS_SAP3; D: The effect of organic solvents on phage vB_SauS_SAP3

定, 结果显示: 在低于 45 °C 时噬菌体效价没有变化, 保持恒定; 当温度高于 45 °C 时效价开始急剧下降, 65 °C 基本失活, 75 °C 时完全失活。表明该噬菌体对温度有一定的耐受性(<45 °C), 但是高温也能使其迅速失活(图 3B)。

2.3.5 不同 pH 对噬菌体活性影响的测定

实验结果表明: 在 pH 6.0–7.0 时噬菌体活性保持稳定, 超过这个范围噬菌体效价开始下降, 在 pH 2.0 时噬菌体能够彻底失活, 而在 pH>7.0 的碱性环境中下降相对缓慢, 有一定耐受力(图 3C)。

2.3.6 有机试剂对噬菌体活性影响的测定

通过和几种有机溶剂混合作用后, 双层平板法测噬菌体效价的结果表明: 噬菌体 vB_SauS_SAP3 对异戊醇和氯仿不耐受, 室温作用 30 min 后几乎完全失活, 而对甲醇和乙醇表现出部分耐受, 丙三醇不影响其活性(图 3D)。

2.4 噬菌体基因组的分析

2.4.1 噬菌体基因组的提取和核酸类型鉴定

提取成功的噬菌体基因组进行核酸类型鉴定。核酸电泳结果显示, DNA 酶能够完全消化噬菌体基因组, 其他 2 种酶不能够消化, 表明其基因组类型为双链 DNA (图 4)。

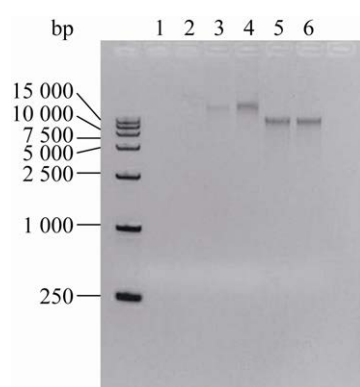


图 4 噬菌体 vB_SauS_SAP3 基因组核酸类型鉴定结果
Figure 4 Identification results of nucleic acid type of phage vB_SauS_SAP3 genome

注: 1、2: DNase; 3、4: RNase; 5、6: 绿豆核酸酶

Note: 1, 2: DNase; 3, 4: RNase; 5, 6: Mung bean nuclease

2.4.2 噬菌体基因组分析

基因测序分析结果表明: 噬菌体 vB_SauS_SAP3 基因组全长 41 950 bp, GC 含量为 35.42%, 预测到含有 65 个开放阅读框(Open Reading Frame, ORF), GenBank 登录号为 MT724048。

噬菌体 vB_SauS_SAP3 全基因组序列与 GenBank 数据库进行比较, 发现噬菌体 vB_SauS_SAP3 与数据库中 12 株噬菌体基因组具有较高同一性(77.55%–89.61%), 基于 13 株噬菌体的基因组构建系统发育树, 分析其进化关系。结果表明噬菌体 vB_SauS_SAP3 与长尾科噬菌体 Bacteriophage EW 在同一进化分支上, 具有共同的进化起源, 噬菌体 vB_SauS_SAP3 应同属于长尾科噬菌体。进一步与 GenBank 数据库进行比较, 分析保守功能蛋白基因(衣壳蛋白, Major Capsid Protein)和裂解酶基因, 发现噬菌体 vB_SauS_SAP3 主要衣壳蛋白基因与数据库中 10 株噬菌体衣壳蛋白基因具有较高的同一性(87.67%–88.53%), 裂解酶基因与数据库中 16 株噬菌体裂解酶具有较高的同一性(72.76%–73.67%)。基于这些噬菌体的基因信息分别构建系统发育树, 分析噬菌体 vB_SauS_SAP3 的进化关系, 发现在主要衣壳蛋白基因和裂解酶基因上, 噬菌体 vB_SauS_SAP3 都位于单独的进化分支。综上结果表明噬菌体 vB_SauS_SAP3 是一个新型的噬菌体。具体结果如图 5 所示。

基因功能预测结果表明噬菌体 vB_SauS_SAP3 具有 26 个已知的功能基因, 其余基因皆为预测蛋白, 已知的 ORF 注释结果如表 3 所示。

3 讨论与结论

本研究以患病奶牛乳汁中分离的金黄色葡萄球菌为宿主分离得到一株噬菌体, 对其进行一系列生物学特性分析和基因组分析。实验结果表明, 该噬菌体能够耐受 45 °C 以下的温度, 超过 45 °C 会急剧失活, 相比于其他分离的噬菌体(如 phisA-Bs1 和 VB-SauM)^[17-18]其耐热性较差。然而

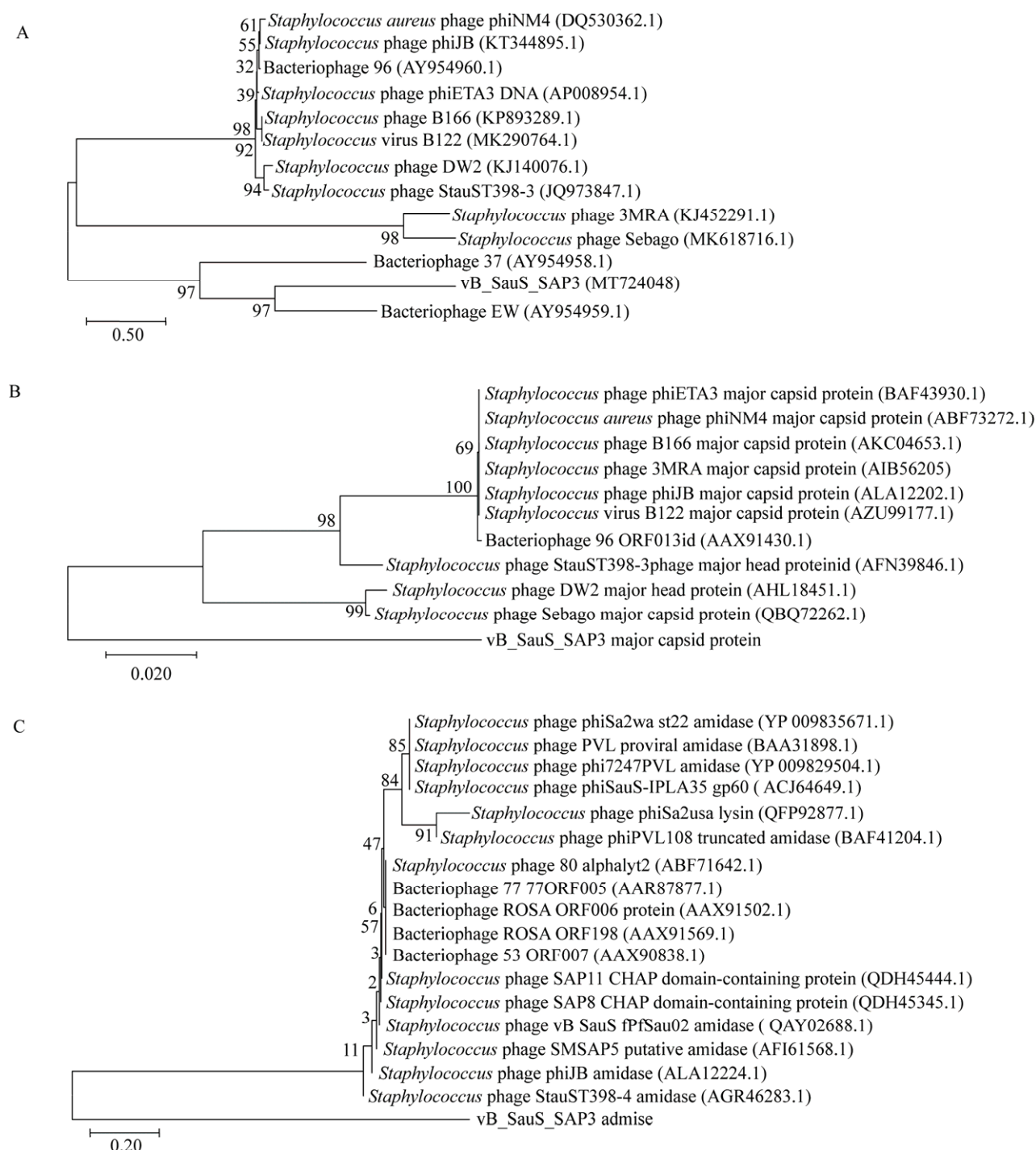


图 5 噬菌体基因进化分析

Figure 5 Phylogenetic analysis of phages

注：A：全基因组核酸序列进化分析；B：主要衣壳蛋白基因进化分析；C：裂解酶基因进化分析。系统发育树中括号中数字代表 GenBank 序列号，分支数字代表可信度，标尺代表遗传距离

Note: A: Phylogenetic analysis of full genome of phages; B: Phylogenetic analysis of major capsid proteins of phages; C: Phylogenetic analysis of lyase of phages. In the phylogenetic trees, the numbers in brackets means the GenBank accession numbers, the branch numbers means the confidence level, and the scale means the genetic distance

表 3 已知 ORF 注释结果
Table 3 The results of ORF annotation

ORF	功能 Function	起始位点 Start site	终止位点 Termination site	一致性 Identity (%)	E 值 E value
12	Deoxyuridine triphosphate nucleotidohydrolase	2 862	3 392	77.160	7.70E-85
15	Helix-turn-helix transcriptional regulator	3 714	4 109	96.947	6.76E-88
17	Terminase	4 907	5 455	97.802	9.53E-130
18	Terminase small subunit	5 489	5 905	99.275	1.18E-93
19	Terminase large subunit	5 898	7 121	81.095	0
20	Portal protein	7 124	8 548	58.465	0
22	Alanyl-trna synthetase	9 587	10 171	98.454	5.67E-135
23	Major capsid protein	10 188	11 123	94.894	4.32E-162
25	Head-tail adapter protein	11 265	11 615	86.207	3.33E-69
29	Major tail protein	12 800	13 363	93.750	7.84E-118
33	Tail protein	17 317	18 204	54.392	1.60E-112
34	Prophage_tail domain-containing protein	18 214	19 659	99.376	0
35	Phosphodiester glycosidase family protein	19 659	21 392	60.511	0
36	BppU_N domain-containing protein	21 408	23 267	97.092	0
41	Cell wall hydrolase	24 632	26 536	60.502	0
42	Tail protein	26 546	29 014	88.060	0
43	Holin	29 060	29 356	59.375	5.22E-34
44	Amidase	29 382	30 770	53.617	2.17E-165
46	Integrase	31 827	32 963	82.521	0
49	Transcriptional regulator	34 185	34 178	55.670	1.46E-32
50	Putative phage regulatory protein	34 670	34 894	47.826	3.17E-14
51	Phage repressor protein	34 918	35 655	55.691	6.51E-86
57	Single-stranded DNA binding protein	37 528	37 971	80.189	1.39E-55
61	DnaB_2 domain-containing protein	39 060	39 773	53.527	9.68E-78
63	Replicative DNA helicase	40 118	41 356	94.175	0
65	Endodeoxyribonuclease	41 558	41 949	82.308	1.74E-76

该噬菌体对于碱性溶液表现出一定的抵抗力，甚至强碱溶液(pH 12.0)中都可以保持一定的抗性，但是对酸性溶液耐受性很差。综合这两个特性表明，该噬菌体不太适合通过口服途径尝试治疗，但是可以考虑环境消毒的应用，尤其配合一些碱性消毒剂会有很好的效果。

通过基因组序列进化分析和电镜观察得知该噬菌体是一株长尾科噬菌体，其基因组长度为 41 952 bp，GC 含量为 35.42%，与典型的金黄色葡萄球菌噬菌体按基因组大小分类(长尾噬菌体基因组大小在 40 000 bp 左右)吻合^[19]，而且 GC 含量普

遍在 35%左右。通过电镜观察到该噬菌体末端有一个膨大的纤突，而这也与葡萄球菌长尾科噬菌体的特征相符^[20]。但是金黄色葡萄球菌长尾噬菌体一般是溶源性噬菌体，相比于烈性噬菌体不太适合用于治疗^[21]，而该噬菌体的整合酶基因表明其也是溶源性噬菌体，不太适合进行体内治疗。然而该噬菌体可以尝试用于环境消毒，主要是该噬菌体表现出的短潜伏期(20 min)和快速的裂解期(60 min)特性使其可以很好地与环境消毒剂匹配。

进一步将全基因组在 GenBank 数据库进行比

较, 绘制系统发育树, 分析进化关系。发现我们分离得到的噬菌体仅跟长尾科噬菌体 Bacteriophage EW 在同一进化分支上, 具有共同的进化起源, 而且其主要的衣壳蛋白基因和裂解酶基因都位于一个单独的分支。基因预测注释结果表明其 65 个 ORF 中已知 26 个具有功能, 其余 39 个都是未知功能蛋白。综合这些分析, 该噬菌体属于一个新型的噬菌体, 对于后续金黄色葡萄球菌噬菌体的分析提供了一定的材料补充。

总之, 现在人们都在积极地寻找着抗生素疗法的替代品, 如植物提取物、益生菌及噬菌体等^[22], 而噬菌体由于其独有的专性细菌寄生特性, 是一种很有潜力的抗生素替代品^[23]。但是目前噬菌体的研究有限, 还需要更深层次的研究。

REFERENCES

- [1] Li Y. Advancement in researches of *Staphylococcus aureus* and its enterotoxin[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2004, 14(4): 392-395 (in Chinese)
李毅. 金黄色葡萄球菌及其肠毒素研究进展[J]. 中国卫生检验杂志, 2004, 14(4): 392-395
- [2] Luo YQ. The research of resistance phenotype and chloramphenicol resistance gene in *E. coli*, *Salmonella* and *S. aureus* from livestock[D]. Chongqing: Master's Thesis of Southwest University, 2017 (in Chinese)
罗永乾. 动物源大肠杆菌、沙门氏菌和金黄色葡萄球菌耐药表型与氯霉素类抗菌药物耐药基因型的研究[D]. 重庆: 西南大学硕士学位论文, 2017
- [3] Medrano-Galarza C, Gibbons J, Wagner S, De Passillé AM, Rushen J. Behavioral changes in dairy cows with mastitis[J]. Journal of Dairy Science, 2012, 95(12): 6994-7002
- [4] Cong MQ. Distribution characteristics and molecular epidemiology of resistance of *Staphylococcus aureus*[J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2020, 41(11): 1382-1386 (in Chinese)
丛萌倩. 金黄色葡萄球菌耐药性分布特征及分子流行病学研究[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(11): 1382-1386
- [5] Sun YS, Zeng X, Li XL, Huang XL. Identification and drug resistance analysis of 188 strains of *Staphylococcus aureus* from Shekou area, Shenzhen[J]. Chinese Journal of Misdiagnostics, 2004, 4(6): 889-890 (in Chinese)
孙延生, 曾训, 李绪黎, 黄小兰. 深圳蛇口地区葡萄球菌 188 株鉴定及耐药分析[J]. 中国误诊学杂志, 2004, 4(6): 889-890
- [6] Francoz D, Wellemans V, Dupré JP, Roy JP, Labelle F, Lacasse P, Dufour S. Invited review: a systematic review and qualitative analysis of treatments other than conventional antimicrobials for clinical mastitis in dairy cows[J]. Journal of Dairy Science, 2017, 100(10): 7751-7770
- [7] Vázquez-Sánchez D, López-Cabo M, Saá-Ibusquiza P, Rodríguez-Herrera JJ. Incidence and characterization of *Staphylococcus aureus* in fishery products marketed in Galicia (Northwest Spain)[J]. International Journal of Food Microbiology, 2012, 157(2): 286-296
- [8] Díaz-Muñoz SL, Koskella B. Bacteria-phage interactions in natural environments[J]. Advances in Applied Microbiology, 2014, 89: 135-183
- [9] Jia HY. Isolation, biological characterization and comparative genome analysis of *Staphylococcus aureus* phages[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2014 (in Chinese)
贾红颖. 金黄色葡萄球菌噬菌体的分离鉴定、生物学特性和比较基因组分析[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2014
- [10] Wei HP. Bacteriophages, revitalized after 100 years in the shadow of antibiotics[J]. Virologica Sinica, 2015, 30(1): 1-2
- [11] Basdew IH, Laing MD. Stress sensitivity assays of bacteriophages associated with *Staphylococcus aureus*, causal organism of bovine mastitis[J]. African Journal of Microbiology Research, 2014, 8(2): 200-210
- [12] Sun LL, Yang Y, Tong YG, Ma DS. Treatment effect of *Staphylococcus aureus* bacteriophage on cows' mastitis[J]. Journal of Shenyang University (Natural Science), 2015, 27(1): 7-11 (in Chinese)
孙利利, 杨毓, 童贻刚, 马德顺. 金黄色葡萄球菌噬菌体对奶牛乳腺炎的治疗效果[J]. 沈阳大学学报: 自然科学版, 2015, 27(1): 7-11
- [13] Tang TT. Isolation and identification of *Staphylococcus aureus* phage and the preliminary application in treating mastitis[D]. Harbin: Master's Thesis of Northeast Agricultural University, 2019 (in Chinese)
汤婷婷. 金黄色葡萄球菌噬菌体的分离鉴定及对治疗乳腺炎的初步应用[D]. 哈尔滨: 东北农业大学硕士学位论文, 2019
- [14] Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. Huang PT, trans. 3rd ed. Beijing: Science Press, 2002: 185-198 (in Chinese)
萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂, 译. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002: 185-198
- [15] Li F, Xing SZ, Fu KF, Zhao SP, Liu JF, Tong YG, Zhou LJ. Genomic and biological characterization of the *Vibrio alginolyticus*-infecting "Podoviridae" bacteriophage, vB_ValP_IME271[J]. Virus Genes, 2019, 55(2): 218-226
- [16] Pajunen M, Kiljunen S, Skurnik M. Bacteriophage

- φYeO3-12, specific for *Yersinia enterocolitica* serotype O:3, is related to coliphages T3 and T7[J]. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(18): 5114-5120
- [17] Jin XD, Zhang CH, Zhong J. Biological characteristics and genomics of two new virulent *Staphylococcus aureus* phages[J]. *Journal of Microbes and Infections*, 2018, 13(6): 335-341 (in Chinese)
靳晓东, 张聪慧, 钟江. 两株新的金黄色葡萄球菌烈性噬菌体的生物学特性和基因组学研究[J]. *微生物与感染*, 2018, 13(6): 335-341
- [18] Wu LF, Wang ZF, Wang ZH, Gao C, Chen G, Yan YX, Sun JH. Isolation of a phage effectively lysing multi-drug resistant *Staphylococcus aureus* and preparation of its lysin[J/OL]. *Chinese Journal of Animal Infectious Diseases*, 2020: 1-14 (2020-02-25). <https://www.cnki.net/KCMS/detail/31.2031.S.20200225.1128.018.html> (in Chinese)
吴丽飞, 王兆飞, 王中华, 高超, 陈冈, 严亚贤, 孙建和. 高效裂解多重耐药金黄色葡萄球菌的噬菌体分离及裂解酶的制备[J/OL]. *中国动物传染病学报*, 2020: 1-14 (2020-02-25). <https://www.cnki.net/KCMS/detail/31.2031.S.20200225.1128.018.html>
- [19] Kwan T, Liu J, DuBow M, Gros P, Pelletier J. The complete genomes and proteomes of 27 *Staphylococcus aureus* bacteriophages[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(14): 5174-5179
- [20] Moodley A, Kot W, Nälgård S, Jakociune D, Neve H, Hansen LH, Guardabassi L, Vogensen FK. Isolation and characterization of bacteriophages active against methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*[J]. *Research in Veterinary Science*, 2019, 122: 81-85
- [21] Ingmer H, Gerlach D, Wolz C. Temperate phages of *Staphylococcus aureus*[J]. *Microbiology Spectrum*, 2019, 7(5). DOI: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0058-2018
- [22] Gao X, Liu E, Zhao R, Li J, Shan CQ, Wang GQ, Liu Y, Jiang GT. Research progress of antibiotic substitutes[J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2020(1): 41-44,47 (in Chinese)
高鑫, 刘恩, 赵荣, 李娟, 单春乔, 王杲强, 刘艳, 江国托. 抗生素替代品研究进展[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2020(1): 41-44,47
- [23] Górski A, Międzybrodzki R, Weber-Dąbrowska B, Fortuna W, Letkiewicz S, Rogóż P, Jończyk-Matysiak E, Dąbrowska K, Majewska J, Borysowski J. Phage therapy: combating infections with potential for evolving from merely a treatment for complications to targeting diseases[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1515