

## 研究报告

## 食源性致病性大肠杆菌 O157:H7 和 O55:H7 特异性噬菌体的分离与鉴定

申丹丹<sup>1,2,3</sup>, 兰佳鑫<sup>1,2,3</sup>, 李诚昊<sup>1,2,3</sup>, 陆健<sup>1,2,3</sup>, 李晓敏<sup>\*1,2,3</sup>

1 江南大学生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

2 江南大学粮食发酵与食品生物制造国家工程研究中心, 江苏 无锡 214122

3 江南大学江苏省生物活性制品加工工程技术研究中心, 江苏 无锡 214122

申丹丹, 兰佳鑫, 李诚昊, 陆健, 李晓敏. 食源性致病性大肠杆菌 O157:H7 和 O55:H7 特异性噬菌体的分离与鉴定[J]. 微生物学通报, 2022, 49(8): 3358-3372

Shen Dandan, Lan Jiaxin, Li Chenghao, Lu Jian, Li Xiaomin. Isolation and identification of phages of food-borne pathogenic *Escherichia coli* O157:H7 and O55:H7[J]. Microbiology China, 2022, 49(8): 3358-3372

**摘要:**【背景】肠出血性大肠杆菌(enterohemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC) O157:H7 和肠致病性大肠杆菌(enteropathogenic *E. coli*, EPEC) O55:H7 是 2 株常见食源性致病菌, 能导致腹泻及肠道外疾病, 其特异性噬菌体具有制备新型抗菌制剂的应用前景。【目的】分离能特异裂解 O157:H7 和 O55:H7 的噬菌体, 并分析其生物学特性和基因组特征, 探索致病性大肠杆菌防控的抗生素替代方法。【方法】利用双层平板法从环境水样中分离噬菌体, 对其形态、感染复数、宿主范围、一步曲线等生物学特性进行鉴定, 使用 Illumina MiSeq 平台对其全基因组进行测序, 利用 RAST、Prokka、BLASTp 等软件进行生物信息学分析。【结果】分别以 *E. coli* O157:H7 和 O55:H7 为宿主分离出 2 株特异性烈性噬菌体: vB\_EcoM\_P251 和 vB\_EcoM\_P255, 均属于肌尾病毒科(Myoviridae)。最佳感染复数均为 1, 在培养 15 min 内能以 91.9%和 90.8%的速率吸附到宿主细胞上, 而且在 37–60 °C、pH 4.0–11.0 条件下保持高且稳定的活性; P251 仅对大肠杆菌 O157:H7 和 O78:H11 菌株具有感染性, P255 对 O55:H7、O157:H7 等 11 株不同血清型的 EHEC 和 EPEC 均具有感染性。P251 基因组全长为 136 254 bp, P255 基因组全长为 111 068 bp, GC 含量分别为 37%和 35%; 分别含有 227、173 个开放阅读框(open reading frame, ORF), 其中, 80、73 个 ORF 与已知功能基因具有显著相似性; P251 还含有 2 个 tRNA。比较基因组显示, P251 和 P255 基因组在其 48% 的长度上共享 72.24%的核苷酸同一性。【结论】分离鉴定了 2 株新的 O157:H7 和 O55:H7 噬菌体 P251 和 P255, 宿主范围广泛, 具有防控食源性致病性大肠杆菌的潜力。

**关键词:** O157:H7; O55:H7; 噬菌体; 宿主范围; 生物学特征; 生物信息学分析

基金项目: 国家自然科学基金(31701730)

Supported by: National Natural Science Foundation of China (31701730)

\*Corresponding author: E-mail: xiaomin@jiangnan.edu.cn

Received: 2021-12-24; Accepted: 2022-03-10; Published online: 2022-04-05

## Isolation and identification of phages of food-borne pathogenic *Escherichia coli* O157:H7 and O55:H7

SHEN Dandan<sup>1,2,3</sup>, LAN Jiabin<sup>1,2,3</sup>, LI Chenghao<sup>1,2,3</sup>, LU Jian<sup>1,2,3</sup>, LI Xiaomin<sup>\*1,2,3</sup>

1 Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 National Engineering Research Center for Cereal Fermentation and Food Biomanufacturing, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

3 Jiangsu Provincial Engineering Research Center for Bioactive Product Processing, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

**Abstract: [Background]** Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7 and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) O55:H7 are common food-borne pathogens, causing intestinal infection and other diseases. The specific bacteriophages are of great potential for the development of new antibacterial agents. **[Objective]** To isolate the phages of O157:H7 and O55:H7 and to characterize their biological and genomic characteristics for future development of phage therapy. **[Methods]** Phages were separated from environmental water samples by the double agar overlay plaque assay. Their biological characteristics, including morphology, multiplicity of infection (MOI), host range, as well as one-step growth curve, were studied. Their genomes were sequenced by the Illumina MiSeq and then analyzed with RAST, Prokka, BLASTp. **[Results]** We isolated two potent phages of Myoviridae family, vB\_EcoM\_P251 and vB\_EcoM\_P255, using *E. coli* O157:H7 and O55:H7 as host, respectively. Their optimal MOI were both 1, and 91.9% and 90.8% of them adsorbed to the respective host within 15 min. Their lysis activity was high and stable at 37–60 °C and pH 4.0–11.0. P251 was only infectious to *E. coli* O157:H7 and O78:H11, while P255 was infectious to 11 EHEC and EPEC strains, including O55:H7 and O157:H7. The P251 genome and P255 genome are 136 254 bp and 111 068 bp in length separately, with GC content of 37% and 35%, respectively. Their genomes contain 227 and 173 open reading frames (ORFs), separately, 80 and 73 of which share significant similarities to functional genes. Besides, P251 contains 2 tRNAs. In addition, genomes of P251 and P255 share 72.24% nucleotide identity over 48% of their length. **[Conclusion]** Two new O157:H7 and O55:H7 phages, P251 and P255, with strong lysis activity, wide host range, as well as a great application potential in food-borne pathogenic *E. coli* control, were isolated and identified.

**Keywords:** O157:H7; O55:H7; phage; host range; biological characteristics; bioinformatics analysis

大肠杆菌(*Escherichia coli*)是人体肠道中的正常菌群之一, 部分菌株携带致病基因, 可诱发不同程度的腹泻及肠道外感染<sup>[1-2]</sup>。其中, 肠出血性大肠杆菌(enterohemorrhagic *E. coli*, EHEC)感染会导致出血性肠炎、血性腹泻和溶血性尿毒症综合征, 最常见的血清型<sup>[3]</sup>是

O157:H7<sup>[4]</sup>; 肠致病性大肠杆菌(enteropathogenic *E. coli*, EPEC)是儿童死亡和发病的主要原因之一<sup>[5]</sup>, 血清型 O55:H7 于 2003 年在德国分离, 是首先完成基因组测序分析的 2 株 EPEC 之一, O55:H7 也被证明是 O157:H7 的最新前体<sup>[6]</sup>。在治疗 EHEC 和 EPEC 的感染中, 抗生素的大量

使用导致多重耐药菌株的出现,已发展成为全球公共卫生问题。因此,新型抗菌制剂的研发成为目前的研究热点。

噬菌体是感染细菌细胞的病毒,只有在其宿主细菌存在的情况下才能复制,因此不会感染非特异性细菌、动物、人类或植物<sup>[7]</sup>。裂解性噬菌体可在新噬菌体颗粒复制后诱导宿主细菌细胞裂解,对宿主菌以外的生命体不具有毒性作用,可用作控制细菌病原体的生物保护剂。近年来,关于噬菌体控制食源性致病菌的研究及应用多有报道<sup>[8-9]</sup>,针对沙门氏菌<sup>[10]</sup>、单核细胞性李斯特菌<sup>[11]</sup>、发酵乳杆菌<sup>[12]</sup>和金黄色葡萄球菌<sup>[13]</sup>的特异性噬菌体制剂已用于食品工业,而且前两者已获得美国食品和药物管理局批准用于食品工业和噬菌体治疗<sup>[14]</sup>。

本研究分别以 EHEC O157:H7 EDL933 和 EPEC O55:H7 CB9615 为宿主菌,从污水中分离出 2 株噬菌体 vB\_EcoM\_P251 和 vB\_EcoM\_P255 (以下简称 P251 和 P255),对其形态、感染复数、感染特征、宿主范围进行鉴定,并进一步对其全基因组进行测序和生物信息学分析,对探索致病性大肠杆菌防控的抗生素替代方法、减少致病菌耐药性提高的风险、促进人类健康具有参考意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

大肠杆菌 O157:H7 EDL933 (ATCC 43895)、O103:K:H8、O78:K80 和 O78:H11 等购自美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC),大肠杆菌 O55:H7 CB9615、O128:H2、O114:H2、O145:H28 和 O111:H8 等购自中国普通微生物菌种保藏管理中心(China General Microbiological Culture Collection Center, CGMCC)。噬菌体 P251 和 P255 为本研

究分离。

### 1.2 培养基和主要试剂、仪器

LB 液体培养基(g/L): NaCl 10.0, 蛋白胨 10.0, 酵母粉 5.0。LB 固体培养基: 含 20.0 g/L 琼脂的 LB 液体培养基。LB 半固体培养基: 含 5.0 g/L 琼脂的 LB 液体培养基。

SM 缓冲液: NaCl 5.8 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2.0 g, 1 mol/L Tris-HCl 50 mL, 2%明胶 5 mL, 溶于 1 L 蒸馏水中, 1×10<sup>5</sup> Pa 灭菌 20 min, 常温保存备用。

小型冷冻高速离心机, 艾本德公司; 透射电子显微镜, 日立株式会社; 恒温恒湿培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 噬菌体的分离与优化

参照 Bujak 等的方法<sup>[15]</sup>, 将采集的污水(青岛)经过滤纸过滤后 12 000 r/min 离心 6 min, 并通过 0.22 μm 滤膜过滤除菌。将滤液与 LB 液体培养基、对数期(*OD*<sub>600</sub> 为 0.6)宿主菌液混合, 37 °C、160 r/min 培养过夜, 培养液经过 12 000 r/min 离心 6 min 及 0.22 μm 滤膜过滤除菌, 收集的滤液即为样品液。

吸取 100 μL 宿主菌液涂布于 LB 平板上, 吸取 10 μL 上述样品液滴于其上, 晾干后 37 °C 倒置培养 12 h。挑取平板上的单个噬菌斑, 加入 1 mL SM 缓冲液并涡旋, 静置后上清即为噬菌体悬液。重复上述步骤 1 次, 并采用双层平板法继续纯化 3-5 次, 获得纯噬菌体, 于-80 °C 保存(与 30%甘油等比例混匀)。使用噬斑试验和 10 倍倍比系列稀释测定噬菌体效价<sup>[16]</sup>。

#### 1.3.2 噬菌体的形态测定

将连续稀释的噬菌体涂布于含有其宿主细菌的 LB 平板上, 37 °C 培养 12 h 后使用游标卡尺测量噬菌斑直径(mm)。

参照 Yang 等的方法<sup>[17]</sup>利用 PEG 法浓缩噬

菌体, 用 2% 磷钨酸钠(pH 6.7)进行负染色, 利用透射电子显微镜在 100 kV 电压下观察。选取 4 个相同的噬菌体颗粒估计噬菌体的形态结构和平均大小。

### 1.3.3 噬菌体的宿主谱测定

本研究的测试菌株包括大肠杆菌 O157:H7、O55:H7、O111:K58:H21、O103:H8、O78:K80、O78:H11、O128:H2、O114:H2、O145:H28、O26:H11、O111:H8 等常见食源性致病性大肠杆菌和模式菌株 DH5 $\alpha$ 、JM109、K12, 及金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、酵母菌等。

参照 Han 等的方法<sup>[18]</sup>, 通过潜在宿主平板上的斑点试验确定待测噬菌体宿主谱。

### 1.3.4 噬菌体的最佳感染复数(multiplicity of infection, MOI)和体外裂解动力的测定

将噬菌体与对数期宿主细菌( $10^8$  CFU/mL)以 100、10、1、0.1 和 0.01 PFU/CFU 的比例混合, 37 °C 孵育 15 min, 8 000 r/min 离心 2 min, 用 6 mL 的 LB 液体培养基重悬沉淀, 37 °C、220 r/min 培养 3 h, 分装于 1.5 mL EP 管, 12 000 r/min 离心 10 min, 经 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤; 取 100  $\mu$ L 滤液梯度稀释, 每个稀释梯度 3 个重复, 用双层平板法测定噬菌体滴度, 最终噬菌体滴度为 3 个平行实验的平均值, 其中效价最高的 MOI 值为该噬菌体的最佳感染复数。

将 O157:H7 和 O55:H7 培养至  $OD_{600}$  为 1.0 (浓度约为  $1 \times 10^9$  CFU/mL), 分别按 MOI 为 0.01、0.1、1、10 加入对应噬菌体, 对照组为 1 mL 菌液与等体积 SM Buffer 混合液。以上 5 组分别用 LB 调整至  $OD_{600}$  为 0.5 且体积相同, 37 °C、160 r/min 培养, 每隔 30 min (0–300 min) 取样测定  $OD_{600}$ 。每组 3 个重复。

### 1.3.5 噬菌体的吸附速率和一步生长曲线测定

参照 Yildirim 等的方法<sup>[19]</sup>, 按 MOI 为 0.01

分别将 P251 和 P255 加入 O157:H7 和 O55:H7 对数期培养液中(感染复数 MOI 为 0.01), 室温孵育 5、10 和 15 min 时各收集 100  $\mu$ L 样品, 5 000 $\times$ g 离心 1 min 去除噬菌体吸附的细胞, 未吸附噬菌体滴度通过双层板滴定法测定, 根据未吸附噬菌体的初始滴度和测试滴度之间的比率确定吸附的噬菌体数量。数据来自 3 次重复实验。

按最佳感染复数比例分别将 P251 和 P255 加入  $OD_{600}$  为 1.0 的 O157:H7 和 O55:H7 培养液中, 37 °C 吸附 15 min, 8 000 $\times$ g 离心 15 min, 用 LB 液体培养基洗涤沉淀 2 次, 去除未吸附的噬菌体颗粒。加入 100 mL LB 液体培养基, 37 °C 孵育, 每 5 min 取样一次, 用双层平板法测定每个时间点的噬菌体效价。绘制一步生长曲线, 计算噬菌体潜伏期和暴发量。数据来自 3 次重复实验。

### 1.3.6 噬菌体的温度和 pH 敏感性测定

将 200  $\mu$ L 噬菌体原液分别于 37、50、60 和 70 °C 孵育 2 h<sup>[16]</sup>, 每 20 min 取 100  $\mu$ L 样品梯度稀释, 双层平板法测定效价。每个温度 3 次重复。

取 900  $\mu$ L LB 液体培养基(pH 1.0–13.0)分别与 100  $\mu$ L 噬菌体原液混合, 37 °C 孵育 2 h, 取 100  $\mu$ L 样品梯度稀释, 双层平板法测定效价。每个 pH 值 3 次重复。

### 1.3.7 噬菌体的基因组分析

采用苯酚-氯仿法提取噬菌体 P251 和 P255 的基因组<sup>[20]</sup>。对提取的基因组进行核酸类型鉴定: 将提取的核酸分别与 DNase I (20 U/ $\mu$ g)和 RNase A (5 U/ $\mu$ g)混合并孵育; 对 P251 基因组采用限制性内切酶 *Sma* I、对 P255 基因组采用 *Apa* I 酶切并进行琼脂糖凝胶电泳检测。DNA 文库构建使用 Illumina TruSeq™ Nano DNA Sample Prep Kit 完成。利用上海美吉生物医药科技有限公司的 MiSeq PE300 测序仪完成序列

测定。基因组序列拼装结果由上海美吉生物公司提供,通过 RAST 和 Prokka 综合确定的开放阅读框的结果,并根据 BLASTp 对功能注释结果进行了补充<sup>[21]</sup>。核苷酸起始编号被设置在编码末端酶大亚基的基因起点的上游<sup>[22]</sup>。利用 SnapGene 制作全基因组图谱<sup>[23]</sup>。选择末端酶大亚基蛋白,采用 MEGA 6.0 软件 neighbor-joining 方法构建系统发育树。

## 2 结果与分析

### 2.1 噬菌体的分离与优化

两株噬菌体是独立分离的。分别以大肠杆菌 O157:H7 和 O55:H7 为宿主,从污水样品中分离出 2 株噬菌体,参照 Adriaenssens 等<sup>[24]</sup>提出的分类命名规则,分别命名为大肠杆菌噬菌体 vB\_EcoM\_P251 和大肠杆菌噬菌体 vB\_EcoM\_P255。两株噬菌体在平板上对其宿主细胞形成不同大小的圆形透明区。P251 噬菌斑经游标卡尺测量的直径大小为 $(0.48 \pm 0.03)$  mm,边缘无晕环(图 1A); P255 噬菌斑直径大小为 $(0.90 \pm 0.03)$  mm,边缘有晕环(图 1B)。

### 2.2 噬菌体的生物学特性

#### 2.2.1 噬菌体的形态

使用透射电子显微镜(transmission electron

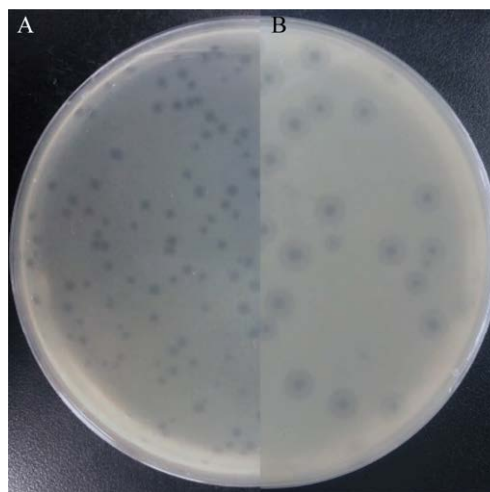


图 1 P251 (A)和 P255 (B)的噬菌斑  
Figure 1 Plaque of phage P251 (A) and P255 (B).

microscope, TEM)观察噬菌体样品。P251 噬菌体头部为二十面体结构,尾部由一个可伸缩的外层尾鞘和一个内部尾管组成,头部直径约为 $(88.00 \pm 2.11)$  nm,尾部结构约长 $(52.00 \pm 2.44)$  nm,该病毒在形态上类似于肌尾病毒科(Myoviridae)的噬菌体(图 2A)。P255 噬菌体具有典型的二十面体头部结构和长的可收缩的尾巴,包含长径为 $(90.00 \pm 2.11)$  nm、横径为 $(61.00 \pm 1.95)$  nm 的头部和 $(109.00 \pm 1.53)$  nm 长度、 $(18.00 \pm 1.62)$  nm 厚度的尾部,具有肌尾病毒科(Myoviridae)的特点(图 2B)。

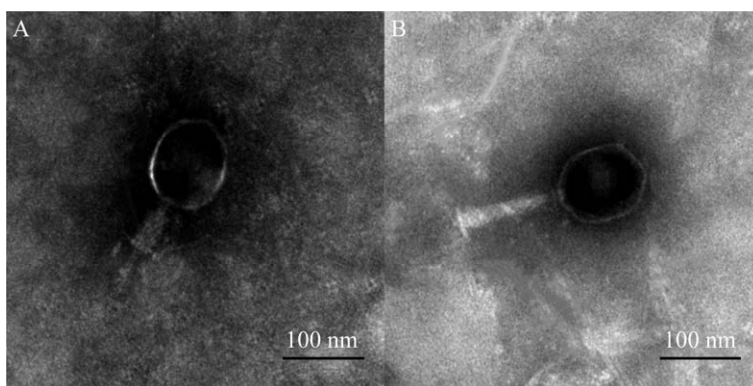


图 2 噬菌体 P251 (A)和 P255 (B)在 TEM 下的形态  
Figure 2 Morphology of bacteriophages P251 (A) and P255 (B) under TEM.

2.2.2 噬菌体的宿主谱

针对不同血清型的大肠杆菌, 评估了 2 株噬菌体的宿主范围。P251 噬菌体仅对测试的 2 株大肠杆菌菌株 O157:H7 和 O78:H11 具有裂解活性。P255 噬菌体的宿主覆盖了 EHEC 和 EPEC 的多个菌株, 包括大肠杆菌 O157:H7、O55:H7、O78:H11、O128:H2、O26:H11、O111:H8 等不同血清型, P255 对它们均具有裂解活性。

此外, P255 噬菌体对大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、JM109 和 K12 也有感染性。两株噬菌体对于其他种属的菌株, 如金黄色葡萄球菌、地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、沙门氏菌、酵母菌均不具有裂解活性(表 1)。

2.2.3 噬菌体的最佳感染复数(MOI)

MOI 值是感染性噬菌体与宿主细胞的比率, 最佳 MOI 值被认为是以最大水平产生噬菌体的 MOI 值。最终的菌体滴度为 3 个平行实验的平均值, 其中效价最高的 MOI 值为该噬菌体的最佳感染复数。如表 2 所示, 随着感染复数比例的提高, 噬菌体活性呈增长趋势, 但并非完全正相关, 噬菌体与宿主菌比例达到一定程度后趋于稳定, 甚至出现下降趋势。当 MOI 为 1 时, P251 和 P255 噬菌体的效价均达到最大, 说明 2 株噬菌体的最佳感染复数均为 1。

如图 3 所示, 噬菌体 P251 与宿主菌在不同感染复数的混合培养中, 120 min 前培养液 OD<sub>600</sub> 缓慢增加; 120 min 后实验各组培养液的 OD<sub>600</sub> 均开始下降, 表明噬菌体 P251 可在不同 MOI 下裂解细菌, MOI 为 1 时裂解效果最好; 180 min 后细菌基本被裂解完全。对噬菌体 P255 而言, OD<sub>600</sub> 一直缓慢增加。

表 1 噬菌体 P251 和 P255 宿主范围

Table 1 Host range of bacteriophage P251 and P255

Strains	Source or No.	P251	P255
<i>E. coli</i> O157:H7	ATCC 43895	+	+
<i>E. coli</i> O55:H7	CB9615	-	+
<i>E. coli</i> O157:H7	ATCC 35150	-	+
<i>E. coli</i> O157:H7	ATCC 700728	-	+
<i>E. coli</i> O111:K58:H21	ATCC 29552	-	-
<i>E. coli</i> O103:H8	ATCC 11229	-	-
<i>E. coli</i> O78:K80	CICC 10421	-	-
<i>E. coli</i> O78:H11	ATCC 35401	+	+
<i>E. coli</i> K12	ATCC 23631	-	+
ETEC control bacteria	CMCC(B)44817	-	-
<i>E. coli</i> O128:H2	JN1095	-	+
<i>E. coli</i> O114:H2	JN1316	-	-
<i>E. coli</i> O145:H28	CB9723	-	-
<i>E. coli</i> O26:H11	CB8962	-	+
<i>E. coli</i> O111:H8	CB7322	-	+
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	Thermo	-	+
<i>E. coli</i> JM109	Thermo	-	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	-	-
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	ATCC 14901	-	-
<i>Bacillus licheniformis</i>	ATCC 14580	-	-
<i>Blastobotrys adenivorans</i>	CICC 33224	-	-

注: +: 有裂解性; -: 无裂解性

Note: +: Cracking capacity; -: No cracking capacity.

表 2 MOI 测定

Table 2 Multiplicity of infection

感染复数 MOI	宿主菌浓度 Host bacteria concentration (CFU/mL)	噬菌体浓度 Phage concentration (PFU/mL)	P251 效价 Titer of P251 (PFU/mL)	P255 效价 Titer of P255 (PFU/mL)
100	10 <sup>4</sup>	10 <sup>6</sup>	7.80 $\times$ 10 <sup>7</sup>	8.66 $\times$ 10 <sup>7</sup>
10	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	2.16 $\times$ 10 <sup>9</sup>	2.54 $\times$ 10 <sup>9</sup>
1	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	2.56 $\times$ 10 <sup>10</sup>	2.86 $\times$ 10 <sup>10</sup>
0.1	10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>	1.04 $\times$ 10 <sup>9</sup>	9.40 $\times$ 10 <sup>8</sup>
0.01	10 <sup>8</sup>	10 <sup>6</sup>	1.55 $\times$ 10 <sup>9</sup>	1.48 $\times$ 10 <sup>7</sup>

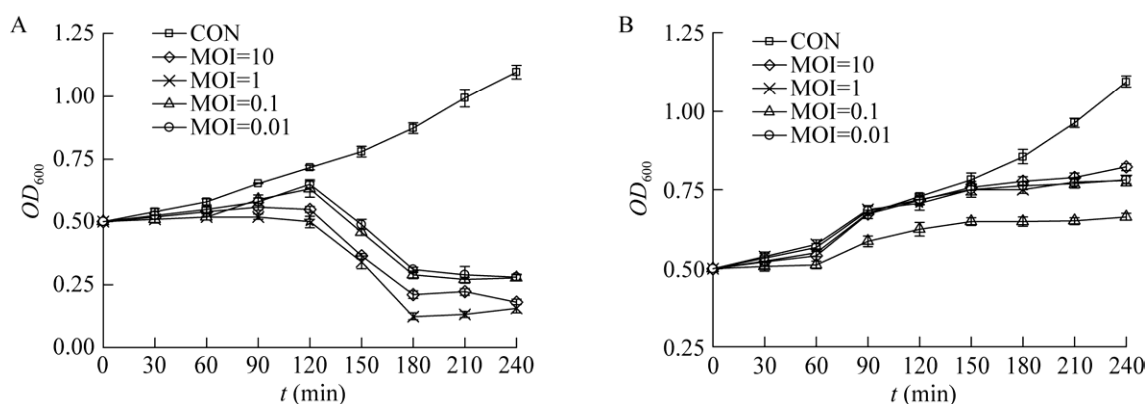


图3 噬菌体 P251 (A)和 P255 (B)的体外裂解动力

Figure 3 *In vitro* lysis kinetics of bacteriophages P251 (A) and P255 (B).

#### 2.2.4 噬菌体的吸附速率和一步生长曲线

噬菌体吸附到宿主细胞的速率、裂解后释放的噬菌体数量和暴发大小是任何病毒的基本生物学特性，也是噬菌体-宿主的特征值。噬菌体吸附实验显示，在培养的前 5 min，游离噬菌体含量均降低到 20%以下；作用 15 min 后游离噬菌体含量分别降低到 8.1%和 9.2%，吸附速率分别达到 91.9%和 90.8% (图 4)。

对 2 株噬菌体进行了一步生长曲线测定，以确定其潜伏期和噬菌体暴发量。P251 和 P255

的潜伏期为 20 min 和 15 min，此后释放的病毒颗粒数量逐渐增加，上升期分别为 20 min 和 30 min，分别在 35 min 和 45 min 后进入平台期 (图 5)。

#### 2.2.5 噬菌体的温度和 pH 敏感性

噬菌体的酸碱度和热稳定性是噬菌体评估的重要指标。两株噬菌体对温度都有一定的稳定性，P251 在 37、50 和 60 °C 作用 120 min 效价基本保持稳定，70 °C 作用 60 min 后效价开始下降，80 min 后效价急剧下降，实验结

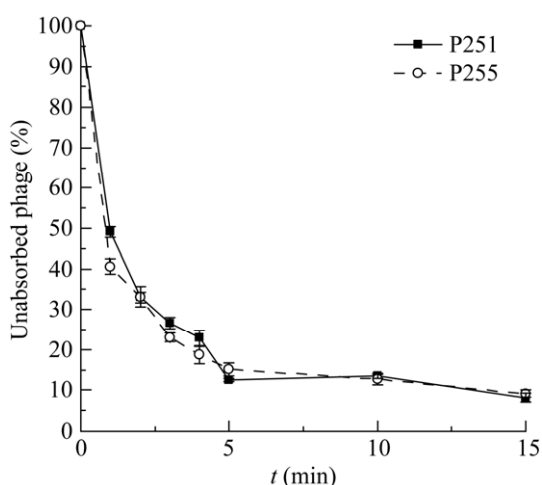


图4 噬菌体 P251 和 P255 的吸附曲线

Figure 4 Adsorption rate curves of bacteriophages P251 and P255.

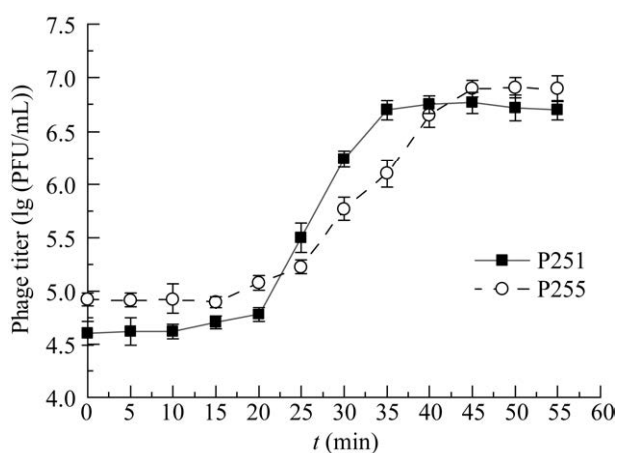


图5 噬菌体 P251 和 P255 的一步生长曲线

Figure 5 One-step growth curve of bacteriophages P251 and P255.

束时, 噬菌体效价下降了 4.6 lg (PFU/mL)(图 6A)。P255 在 37、50 和 60 °C 作用 120 min 效价基本保持稳定, 无下降趋势; 70 °C 作用 40 min 后效价开始持续下降; 120 min 后效价为 0 (图 6B)。

噬菌体 P251 和 P255 分别在 pH 3.0–11.0 和 pH 4.0–11.0 可保持裂解活性, 超出该范围时噬菌体效价有所降低。在 pH 2.0 时, P251 和 P255 的效价分别降低 2.44、5.29 lg (PFU/mL); 在 pH 12.0 时, 其效价滴度分别下降了 3.91、2.68 lg (PFU/mL); 当 pH 为 1.0 或 13.0 时, 2 株噬菌体效价均为 0 (图 7)。

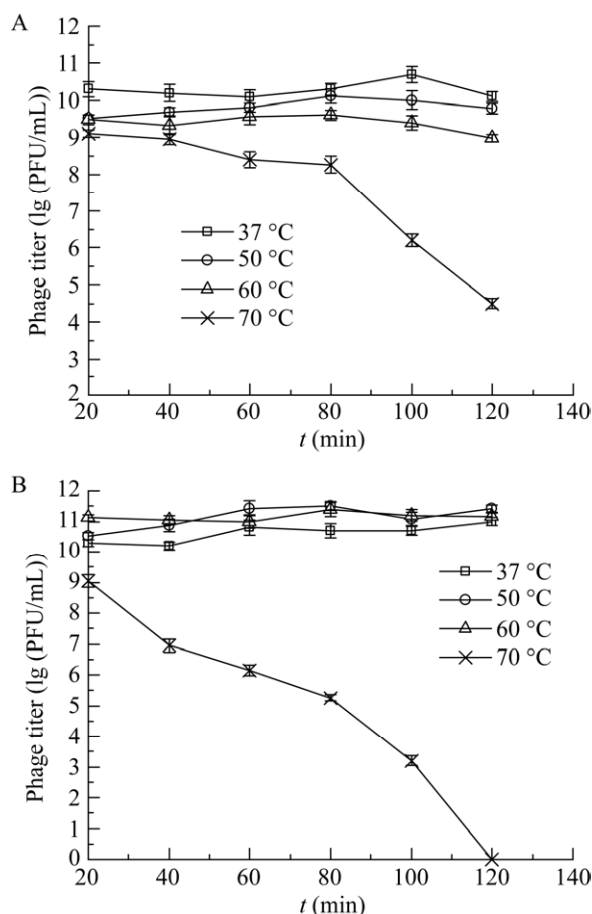


图 6 噬菌体 P251 (A)和 P255 (B)在不同温度下的生物稳定性

Figure 6 Biological stability of P251 (A) and P255 (B) under different temperature.

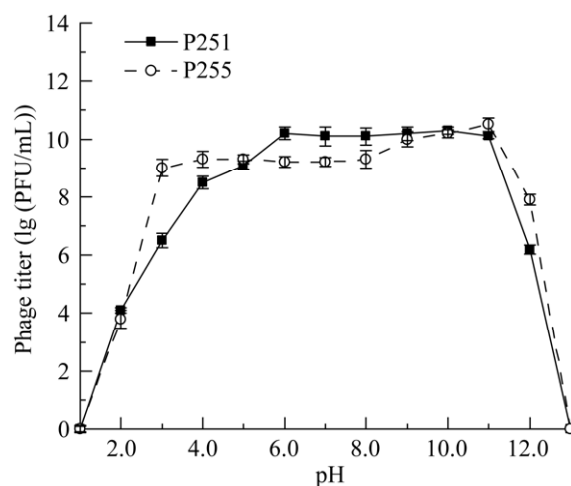


图 7 噬菌体 P251 和 P255 在不同 pH 条件下的生物稳定性

Figure 7 Biological stability of P251 and P255 under different pH.

## 2.3 噬菌体的基因组和进化分析

### 2.3.1 核酸类型分析

如图 8A、8B 所示, 2 株噬菌体基因组均仅能被 DNase I 消化, 对 RNase A 具有抗性, 表明其核酸类型为 DNA。选用的限制性内切酶均可作用于噬菌体基因组, 说明其遗传物质是双链 DNA (dsDNA)。经测序, P251 基因组存在 3 个 *Sma* I 酶切位点, 在图 8C 电泳图中显示 4 个条带, P255 基因组存在 2 个 *Apa*L I 酶切位点, 在图 8C 电泳图中显示 2 个条带且条带大小相符。因此, P251 基因组为线性 dsDNA, P255 基因组为环状 dsDNA。

### 2.3.2 基因组组织和注释

通过 RAST 和 Prokka 综合确定开放阅读框, 并利用 BLASTp 对功能注释结果进行了补充。核苷酸起始编号被设置在编码末端酶小亚基的基因起点的上游。

P251 基因组全长为 136 254 bp, GC 含量为 37%, 含 227 个开放阅读框, 具有明确功能的 ORF 有 80 个, 而且具有 2 个 tRNA 编码区,



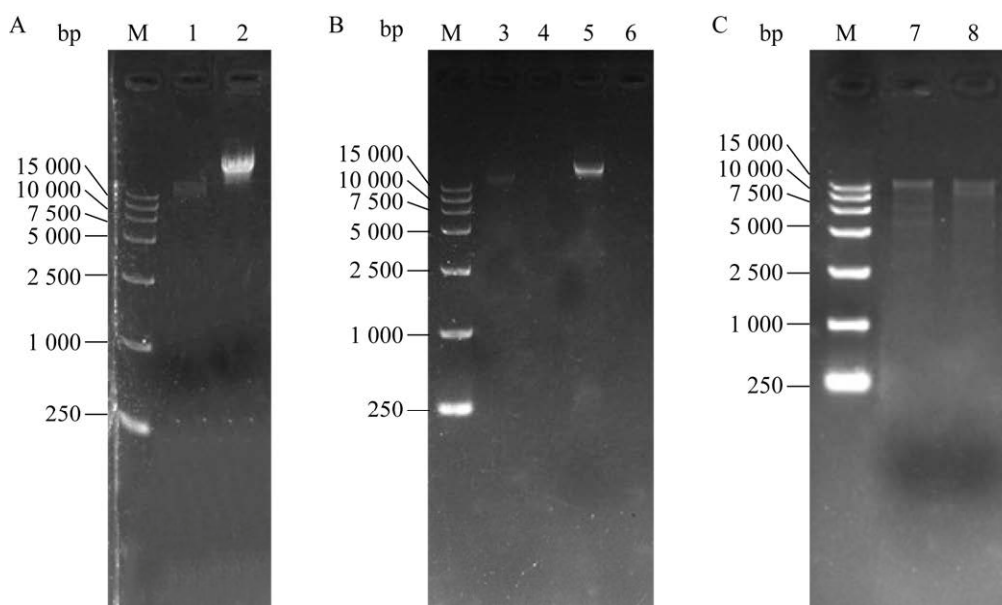


图 8 噬菌体核酸类型分析 A: 1: P251 基因组; 2: P255 基因组。B: 3: P251 基因组 RNA 酶酶切; 4: P251 基因组 DNA 酶酶切; 5: P255 基因组 RNA 酶酶切; 6: P255 基因组 DNA 酶酶切。C: 7: *Sma* I 酶酶切; 8: *Apa*L I 酶酶切。M: 15000 DNA Marker

Figure 8 Analysis of the nucleic acid type. A: 1: P251 genome; 2: P255 genome. B: 3: p251 genomic RNA enzyme digestion; 4: P251 genomic DNA enzyme digestion; 5: P255 genomic RNA enzyme digestion; 6: P255 genomic DNA enzyme digestion. C: 7: *Sma* I enzyme digestion; 8: *Apa*L I enzyme digestion. M: 15000 DNA Marker.

具有一般双链噬菌体共有的 4 个结构单元: 核苷酸代谢和复制, 结构, 裂解, 以及 DNA 包装和代谢, 不包括假定蛋白。核苷酸代谢模块主要包括 DNA 核酸外切酶(ORF154, ORF156)、核酸内切酶(ORF222, ORF61)、重组修复蛋白(ORF140)、核糖核苷酸还原酶(ORF64)等, 它们共同提供合成噬菌体基因组的原材料。DNA 连接酶(ORF37)、DNA 聚合酶(ORF147, ORF151)、DNA 解旋酶(ORF22, ORF23)等催化合成噬菌体 DNA。RNA 聚合酶(ORF161)等可以修饰宿主 RNA 聚合酶并识别噬菌体基因组的启动子区域, 实现噬菌体基因表达。在 DNA 包装模块中, ORF1 和 ORF2 分别被注释为末端酶大亚基和小亚基, 共同组成了噬菌体末端酶, 大亚基是多功能酶, 在包装中起主要作用;

小亚基与基因组特异性结合, 引导包装进程的进行; ORF6 被注释为门户蛋白, 是噬菌体侵染过程中的 DNA 介导通道。此外, 也发现了如 ORF89 的穿孔素表达基因, 以及 ORF224 等与裂解有关的基因。在 ORF84–89 之间的尾部相关基因模块, hhpred 结构域注释显示可能与受体识别和溶菌酶基因相关; 同时还注释到了 ORF10–12 等与衣壳结构有关的蛋白模组。

P255 基因组全长为 111 068 bp, GC 含量为 35%, 含有 173 个 ORF, 其中有明确功能的有 73 个, 未找到编码 tRNA 的区域。注释了 DNA 包装模块和门户蛋白如 ORF1、ORF2、ORF5, 衣壳蛋白如 ORF8–11, 结构蛋白模块, 核酸解旋酶模块如 ORF17、ORF18, 以及核苷酸还原酶如 ORF68。另外, ORF84–90 的尾部相关模

块及穿孔素蛋白反映了 P255 的裂解模块。同样地, 可以找到核酸代谢模块和 DNA 包装模块等聚集在一个区域的功能模块。

利用 *snappgene* 绘制噬菌体 P251 (图 9) 和 P255 (图 10) 的全基因组图谱。ORF 分别用蓝色(噬菌体结构蛋白)、红色(宿主裂解)、绿色(DNA 装配与复制)及白色(假定蛋白)三角箭头表示。

比较基因组显示, 噬菌体 P251 和 P255 基因组在其 48% 的长度上共享 72.24% 的核苷酸同一性。91 个 ORF 共享氨基酸同一性, 包括核苷酸代谢和复制、结构、裂解、DNA 包装和代谢等不同方面。

### 2.3.3 比较基因组分析和进化分析

对噬菌体基因组核苷酸序列的 BLASTn 分

析显示, 在噬菌体基因组数据库中与其最相似的噬菌体是 AR1 (NCBI ID: 11034)。为更好地分析噬菌体之间的氨基酸统一性, 使用 *Easyfig* 将 P251、P255 和 AR1 的开放阅读框进行比较 (图 11)。

P251 和 AR1 在 55% 的长度上具有 72.5% 的相似度, 包括末端酶及衣壳、门户蛋白质等结构蛋白。对于裂解相关模块和尾部相关模块, P251-ORF45 与 AR1-ORF217 具有 76% 的氨基酸相似度, 而且均被注释为裂解抑制辅助蛋白。穿孔素蛋白 P251-ORF45 和 AR1-ORF254 具有 64% 的氨基酸相似度。P251-ORF84 与 AR1-ORF255 共享 57% 的氨基酸相似度, 均被标注为尾部纤维蛋白。利用 *hppred* 在 AR1 和

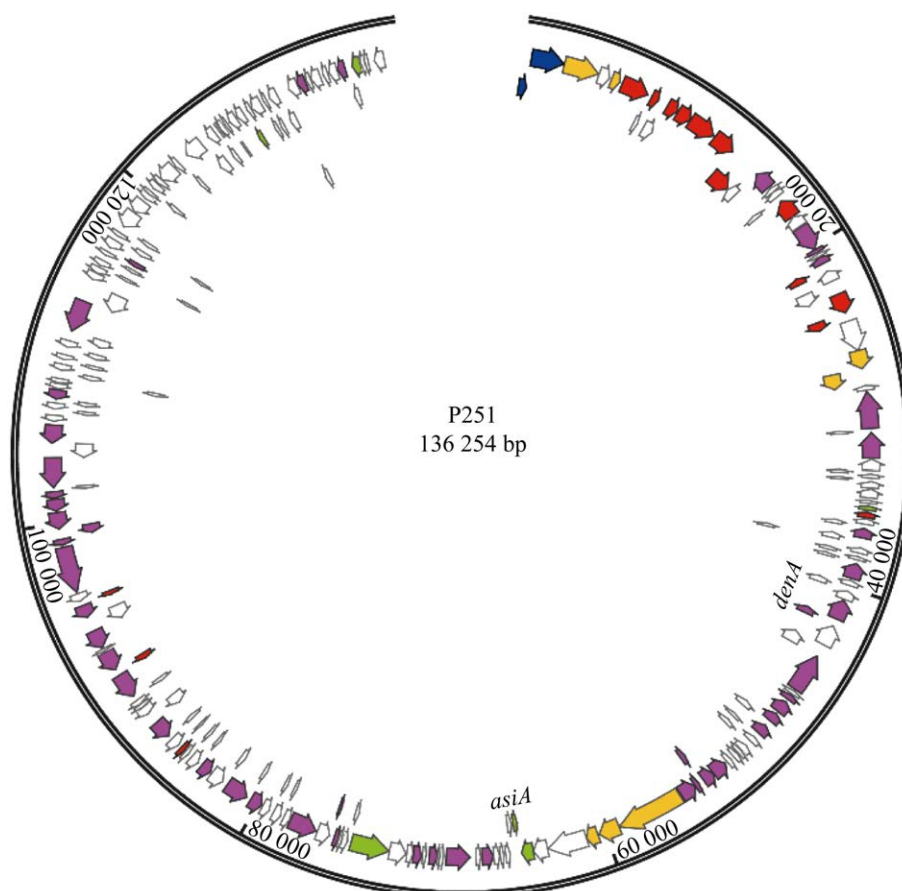


图 9 噬菌体 P251 全基因组图谱

Figure 9 The genome-wide map of bacteriophages P251.

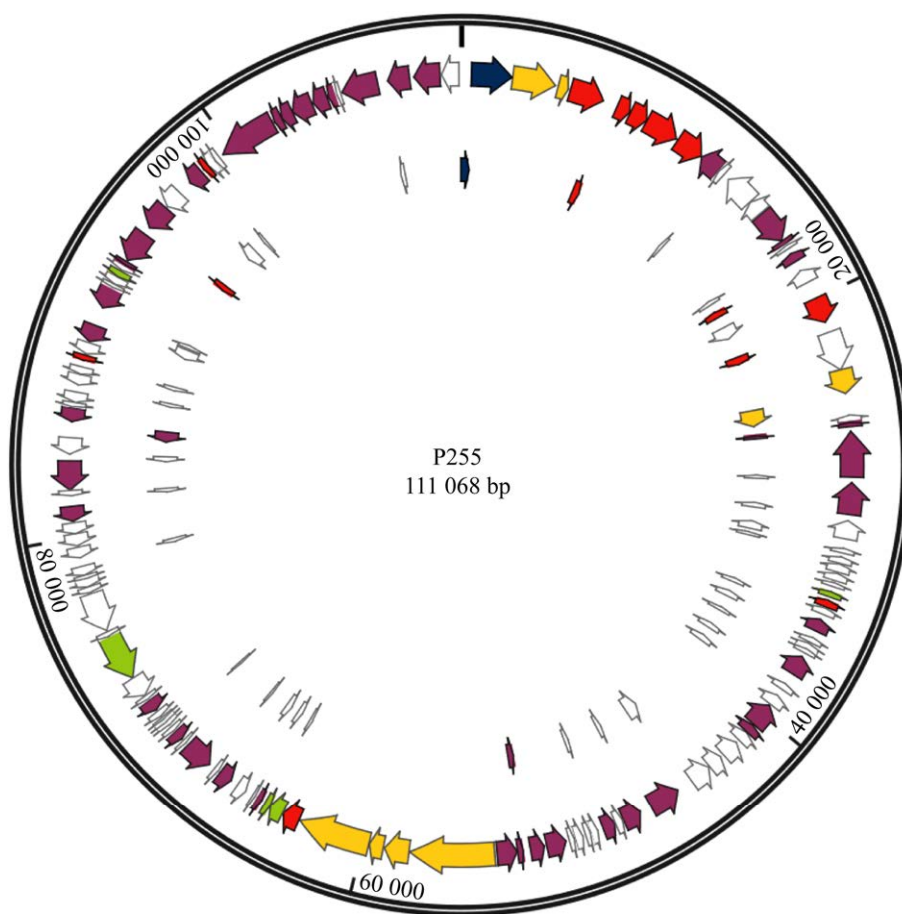


图 10 噬菌体 P255 全基因组图谱

Figure 10 The genome-wide map of bacteriophages P255.

P251 的氨基酸序列中检测到了代号为 PF00959 的 phage lysozyme 的结构域。BLASTp 结果显示被标记为远端亚基的 P251-ORF87 蛋白与 AR1-ORF258 具有一定相似度,均含有参与病毒释放的 endo-N-acetylneuraminidase 编码区。P251-ORF88 和 AR1-ORF259 中同时发现了 gp38 这个和受体识别有关的基因区域,将 P251-ORF89 进一步注释为受体识别蛋白。

P255 和 AR1 在 94% 的长度上具有 92.82% 的相似度,而且在噬菌体进化中的保守序列如末端酶和衣壳蛋白等氨基酸序列相似度都在 95% 及以上。与 P251 类似,AR1 中被注释为和裂解模块及尾部相关模块的蛋白同样可以在

P255 中找到类似的对应区域,而且与 P251 相比二者氨基酸序列相似度更高。

如图 12 所示,系统发育树显示噬菌体 P251 和 CC31 处于同一分支,亲缘关系最近;噬菌体 P255 和 Enterobacteria phage RB53 亲缘关系最近。噬菌体 CC31 和 RB33 均属于肌尾噬菌体科,结合电镜结果,可以基本确定噬菌体 P251 和 P255 属于肌尾噬菌体科。

### 3 讨论与结论

本研究分别以 EHEC O157:H7 和 EPEC O55:H7 为宿主菌,从污水样品中分离出 2 株特异性噬菌体 vB\_EcoM\_P251 和 vB\_EcoM\_P255,并

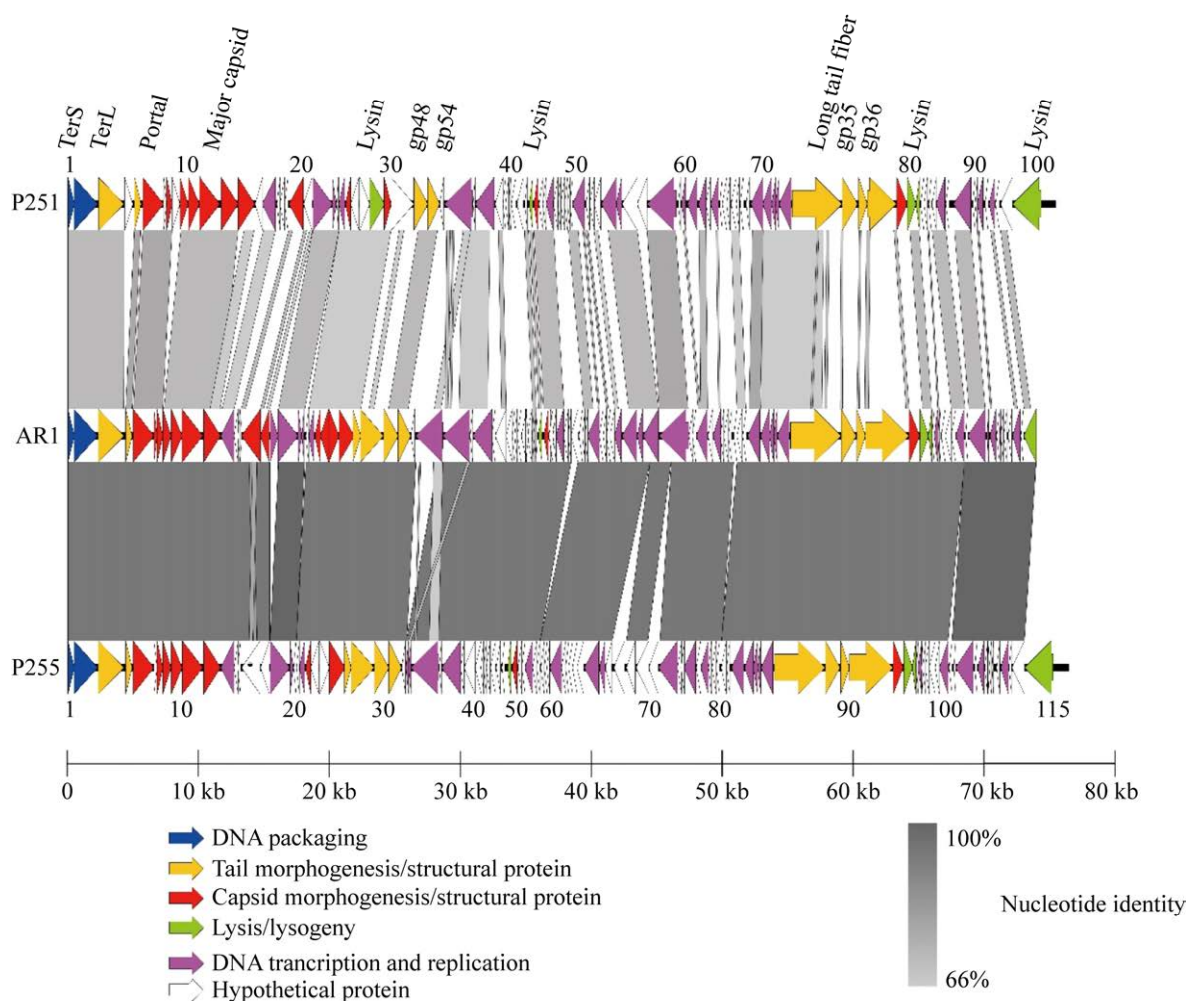


图 11 大肠杆菌噬菌体 P251 和 P255 与大肠杆菌噬菌体 AR1 的成对 BLASTn 比较 图中标注了选定基因和编码保守的蛋白质。TerS: 终止小亚单位; TerL: 终止子大亚基; TMP: 尾卷尺测量蛋白质; DIT: 远端尾蛋白; Tal: 尾部相关赖氨酸

Figure 11 Paired BLASTn comparison of P251 and P255 and AR1. The selected genes and proteins encoding conserved genes are marked in the figure. TerS: Termination of small subunit; TerL: Terminator large subunit; TMP: Tail tape to measure protein; DIT: Distal tail protein; Tal: Tail associated lysine.

对其形态、最佳感染系数、温度和 pH 敏感性、宿主谱等生物学特性进行了研究。结果表明, P251 直径为 $(0.48 \pm 0.03)$  mm, 边缘无晕环, 效价为 $2.6 \times 10^8$  PFU/mL; P255 直径为 $(0.90 \pm 0.03)$  mm, 边缘有晕环, 效价为 $6.1 \times 10^8$  PFU/mL。透射电子显微镜显示噬菌体 P251 和 P255 具有典型的二十面体头部和可收缩尾部, 均属于肌尾病毒科(Myoviridae)。P251 和 P255 的最佳感

染复数均为 1 且具有较高的吸附效率。Yildirim 等<sup>[19]</sup>筛选的 10 株噬菌体在前 5 min 均表现出 90%以上的吸附速率; Topka 等<sup>[25]</sup>报道中称 50%的噬菌体在孵育 2 min 内吸附到其宿主细胞上, 与本文筛选的噬菌体表现出了近似特征。噬菌体 P251 和 P255 在 37–60 °C、pH 4.0–11.0 条件下保持稳定的生物学活性, 因此具有较宽的温度和酸碱适用性范围, 其表现出的耐热、耐



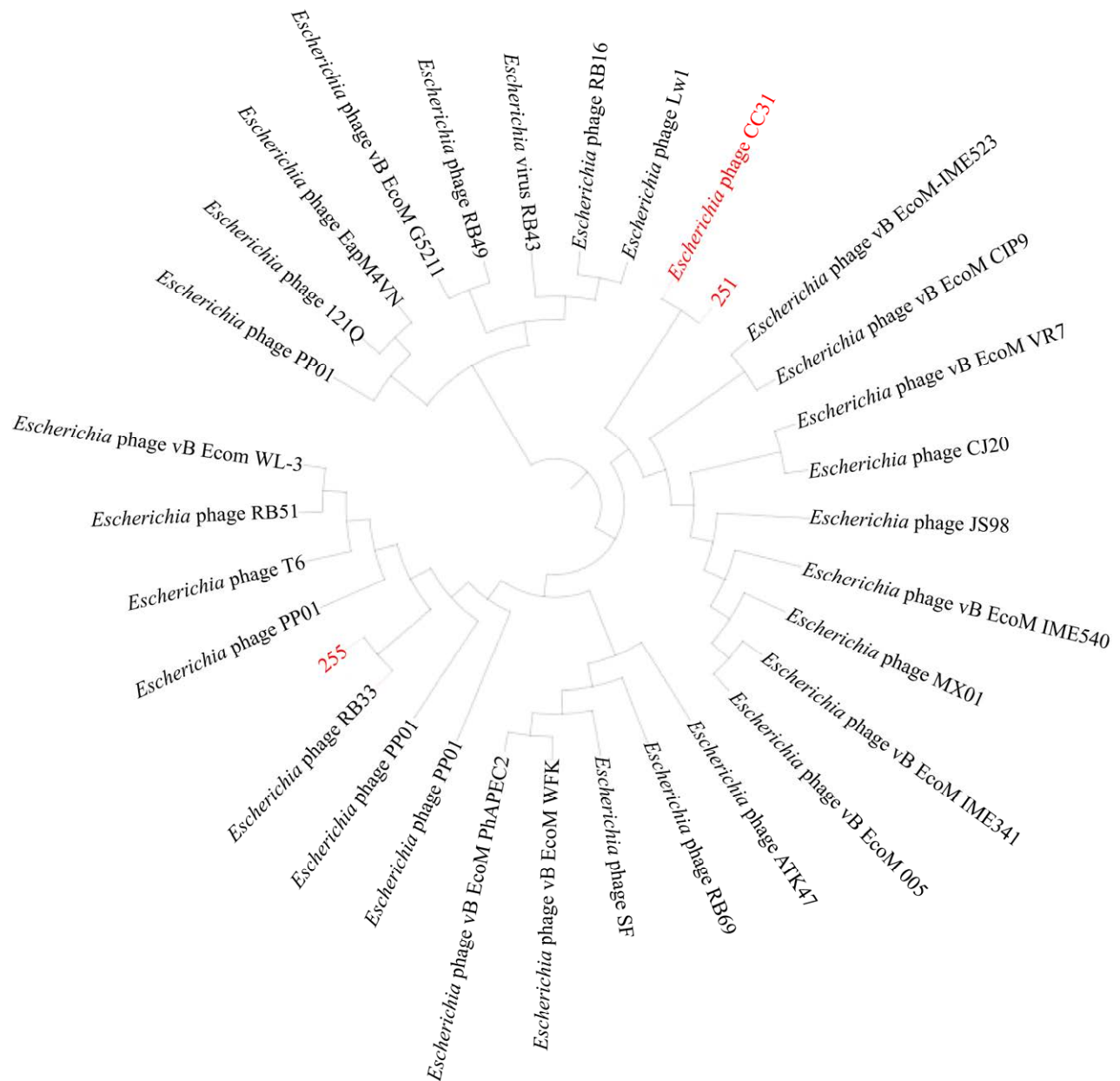


图 12 同源进化树

Figure 12 Evolutionary tree.

酸碱能力为其实际应用提供了参考。与感染大肠杆菌的其他噬菌体相比, P251 和 P255 具有相对较高的暴发量、较短的潜伏期和较长的暴发时间, 表明其对宿主细胞具有较高的感染效果和较强的溶解活性, 在实践中可用于快速生产应用。Zhao 等<sup>[26]</sup>观察到大多数肌尾病毒

科的潜伏期和暴发量分别在 21–120 min 和 50–100 PFU/cell 之间, 本研究中 P251 和 P255 作为肌尾病毒科符合这一规律; Litt 等<sup>[27]</sup>观察到的 7 种噬菌体的上升期和暴发量分别在 19–40 min 和 89–631 PFU/cell 之间变化, 与本研究结果相似。在本研究的测试宿主中, P251

仅对 O157:H7 和 O78:H11 具有感染性, P255 对 11 种不同血清型的 EHEC 和 EPEC 大肠杆菌均具有感染性, 表现出对致病性大肠杆菌的广泛裂解能力。此外, P251 和 P255 基因组均为双链 DNA, 其基因组全长分别为 136 254 bp 和 111 068 bp, GC 含量分别为 37%和 35%, 分别含有 227 个和 173 个开放阅读框, 其中分别有 80 个和 73 个 ORF 与已知功能的蛋白质具有显著相似性。P251 和 P255 基因组在其 48%的长度上共享 72.24%的核苷酸同一性; 91 个开放阅读框共享氨基酸同一性, 包括核苷酸代谢和复制、结构、裂解、DNA 包装和代谢等不同方面。系统发育树进一步证实了 P251 和 P255 均属于肌尾噬菌体科。

新分离的 O157:H7 和 O55:H7 特异性噬菌体 vB\_EcoM\_P251 和 vB\_EcoM\_P255 具有短潜伏期、高暴发量和高吸附率的特点, 表现出较强的温度稳定性和酸碱稳定性。这些特性使新分离的噬菌体成为食品工业、兽医和医学中抗 O157:H7、O55:H7、O78:H11、O128:H2、O26:H11、O111:H8 等致病性大肠杆菌的潜在理想生物活性剂, 同时对于控制食源性致病菌的流行及减少致病菌耐药性提高的风险具有重要的意义。

## REFERENCES

- [1] Safwat Mohamed D, Farouk Ahmed E, Mohamed Mahmoud A, Abd El-Baky RM, John J. Isolation and evaluation of cocktail phages for the control of multidrug-resistant *Escherichia coli* serotype O104:H4 and *E. coli* O157:H7 isolates causing diarrhea[J]. FEMS Microbiology Letters, 2017, 365(2): fnx275
- [2] Kyle JL, Cummings CA, Parker CT, Quiñones B, Vatta P, Newton E, Huynh S, Swimley M, Degoricija L, Barker M, et al. *Escherichia coli* serotype O55:H7 diversity supports parallel acquisition of bacteriophage at shiga toxin phage insertion sites during evolution of the O157:H7 lineage[J]. Journal of Bacteriology, 2012, 194(8): 1885-1896
- [3] Sharma M, Ryu JH, Beuchat LR. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in biofilm on stainless steel by treatment with an alkaline cleaner and a bacteriophage[J]. Journal of Applied Microbiology, 2005, 99(3): 449-459
- [4] Tozzoli R, Grande L, Michelacci V, Fioravanti R, Gally D, Xu XF, La Ragione R, Anjum M, Wu GH, Caprioli A, et al. Identification and characterization of a peculiar vtx2-converting phage frequently present in verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 isolated from human infections[J]. Infection and Immunity, 2014, 82(7): 3023-3032
- [5] Weiss-Muszkat M, Shakh D, Zhou YZ, Pinto R, Belausov E, Chapman MR, Sela S. Biofilm formation by and multicellular behavior of *Escherichia coli* O55:H7, an atypical enteropathogenic strain[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(5): 1545-1554
- [6] Zhou ZM, Li XM, Liu B, Beutin L, Xu JG, Ren Y, Feng L, Lan RT, Reeves PR, Wang L. Derivation of *Escherichia coli* O157:H7 from its O55:H7 precursor[J]. PLoS One, 2010, 5(1): e8700
- [7] Sulakvelidze A. Phage therapy: an attractive option for dealing with antibiotic-resistant bacterial infections[J]. Drug Discovery Today, 2005, 10(12): 807-809
- [8] Cieplak T, Soffer N, Sulakvelidze A, Nielsen DS. A bacteriophage cocktail targeting *Escherichia coli* reduces *E. coli* in simulated gut conditions, while preserving a non-targeted representative commensal normal microbiota[J]. Gut Microbes, 2018, 9(5): 391-399
- [9] Dissanayake U, Ukhanova M, Moye ZD, Sulakvelidze A, Mai V. Bacteriophages reduce pathogenic *Escherichia coli* counts in mice without distorting gut microbiota[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 1984
- [10] Yi Y, Abdelhamid AG, Xu YM, Yousef AE. Characterization of broad-host lytic *Salmonella* phages isolated from livestock farms and application against *Salmonella enteritidis* in liquid whole egg[J]. LWT, 2021, 144: 111269
- [11] Sanlibaba P, TEZEL BU. Isolation of phages infecting *Listeria monocytogenes*[J]. 2019. DOI: 10.15237/gida.GD19036
- [12] Liu M, Bischoff KM, Gill JJ, Mire-Criscione MD, Berry JD, Young R, Summer EJ. Bacteriophage application restores ethanol fermentation characteristics

- disrupted by *Lactobacillus fermentum*[J]. Biotechnology for Biofuels, 2015, 8: 132
- [13] Horiuk Y, Horiuk V, Kukhtyn M, Tsvihun A, Kernychnyi S. Characterization of lytic activity of phage SAvB14 on *Staphylococcus aureus* variant bovis[J]. Journal of Advanced Veterinary and Animal Research, 2020, 7(3): 509-513
- [14] 郭浩然, 许菁彦, 周洋, 李子齐, 董星星, 李锦铨. 噬菌体的分布广泛性以及口服安全性[J]. 中国食品学报, 2021, 21(2): 349-357
- Guo HR, Xu JY, Zhou Y, Li ZQ, Dong XX, Li JQ. Extensive distribution of bacteriophage and the safety of oral application[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(2): 349-357 (in Chinese)
- [15] Bujak K, Decewicz P, Kaminski J, Radlinska M. Identification, characterization, and genomic analysis of novel *Serratia* temperate phages from a gold mine[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(18): 6709
- [16] Litt PK, Saha J, Jaroni D. Characterization of bacteriophages targeting non-O157 shiga toxigenic *Escherichia coli*[J]. Journal of Food Protection, 2018, 81(5): 785-794
- [17] Yang HJ, Liang L, Lin SX, Jia SR. Isolation and characterization of a virulent bacteriophage AB1 of *Acinetobacter baumannii*[J]. BMC Microbiology, 2010, 10: 131
- [18] Han H, Wei XT, Wei Y, Zhang XF, Li XM, Jiang JZ, Wang R. Isolation, characterization, and bioinformatic analyses of lytic *Salmonella enteritidis* phages and tests of their antibacterial activity in food[J]. Current Microbiology, 2017, 74(2): 175-183
- [19] Yildirim Z, Sakin T, Akçelik M, Akçelik N. Identification and characterization of lytic bacteriophages specific to foodborne pathogenic *Escherichia coli* O157:H7[J]. Food Science and Technology International, 2021, 27(1): 56-72
- [20] Summer EJ, Gonzalez CF, Bomer M, Carlile T, Embry A, Kucherka AM, Lee J, Mebane L, Morrison WC, Mark L, et al. Divergence and mosaicism among virulent soil phages of the *Burkholderia cepacia* complex[J]. Journal of Bacteriology, 2006, 188(1): 255-268
- [21] Yuan YH, Gao MY, Peng Q, Wu DD, Liu PM, Wu Y. Genomic analysis of a phage and prophage from a *Bacillus thuringiensis* strain[J]. The Journal of General Virology, 2014, 95(Pt 3): 751-761
- [22] Lu SG, Le S, Tan YL, Zhu JM, Li M, Rao XC, Zou LY, Li S, Wang J, Jin XL, 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
- [23] Philippe C, Levesque S, Dion MB, Tremblay DM, Horvath P, Lüth N, Cambillau C, Franz C, Neve H, Fremaux C, et al. Novel genus of phages infecting *Streptococcus thermophilus*: genomic and morphological characterization[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2020, 86(13): e00227-e00220
- [24] Adriaenssens E, Brister JR. How to name and classify your phage: an informal guide[J]. Viruses, 2017, 9(4): 70
- [25] Topka G, Bloch S, Nejman-Faleńczyk B, Gąsior T, Jurczak-Kurek A, Necel A, Dydecka A, Richert M, Węgrzyn G, Węgrzyn A. Characterization of bacteriophage vB-EcoS-95, isolated from urban sewage and revealing extremely rapid lytic development[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 9: 3326
- [26] Zhao FY, Sun HZ, Zhou XY, Liu GQ, Li ML, Wang C, Liu S, Zhuang YT, Tong YG, Ren HY. Characterization and genome analysis of a novel bacteriophage vB\_SpuP\_Spp16 that infects *Salmonella enterica* serovar pullorum[J]. Virus Genes, 2019, 55(4): 532-540
- [27] Litt PK, Jaroni D. Isolation and physiomorphological characterization of *Escherichia coli* O157:H7-infecting bacteriophages recovered from beef cattle operations[J]. International Journal of Microbiology, 2017, 2017: 7013236