

研究报告

林麝源铜绿假单胞菌噬菌体 vB_PaeM_PAMD02 的生物学特性与全基因组序列分析

李依濛¹, 刘洁¹, 焦升镜¹, 伍茜¹, 丁慧¹, 付文龙², 周磊², 程建国², 吴杰², 罗燕^{*1}

1 四川农业大学动物医学院, 四川 成都 611130

2 四川养麝研究所, 四川 都江堰 611830

李依濛, 刘洁, 焦升镜, 伍茜, 丁慧, 付文龙, 周磊, 程建国, 吴杰, 罗燕. 林麝源铜绿假单胞菌噬菌体 vB_PaeM_PAMD02 的生物学特性与全基因组序列分析[J]. 微生物学通报, 2023, 50(7): 3020-3034.

LI Yimeng, LIU Jie, JIAO Shengjing, WU Xi, DING Hui, FU Wenlong, ZHOU Lei, CHENG Jianguo, WU Jie, LUO Yan. Biological characterization, and whole genome sequencing of bacteriophage against *Pseudomonas aeruginosa* isolated from forest musk deer (*Moschus berezovskii*)[J]. Microbiology China, 2023, 50(7): 3020-3034.

摘要: 【背景】圈养林麝一半以上的死亡是由铜绿假单胞菌引起的化脓性疾病导致。另外, 由于细菌的抗性增加, 噬菌体是继抗生素后的另一抗菌选择。【目的】以分离自病死林麝肺脏的铜绿假单胞菌为宿主菌分离一株噬菌体, 对其进行生物学特性、全基因组序列分析与体内抑菌试验。

【方法】通过双层平板法分离纯化一株裂解性噬菌体, 测定其裂解谱、最佳感染复数、一步生长曲线、热稳定性、最适生长 pH 等生物学特性, 通过电镜观察其具体形态, 进行全基因组测序与序列分析, 并进行小鼠体内抑菌试验。【结果】分离到一株裂解性铜绿假单胞菌噬菌体并命名为 vB_PaeM_PAMD02, 该噬菌体具有透明且边缘清晰无晕环的噬菌斑, 其裂解谱较窄, 最佳感染复数为 0.1, 裂解潜伏期为 40 min, 裂解暴发量较高, 热稳定性较高, 可耐受弱碱环境。其全基因组大小为 66 264 bp, GC 含量为 55.59%, 序列注释结果显示该噬菌体具有 92 个开放阅读框, 不含毒力与耐药基因, 属于肌尾噬菌体科。小鼠体内抑菌试验结果显示了 PAMD02 对其宿主菌良好的抑菌效果。【结论】本研究分离的噬菌体 PAMD02 有较高的裂解效率, 对不利环境有较好的耐受性, 不含毒力基因与耐药基因, 具有应用于临床治疗铜绿假单胞菌感染的潜力。

关键词: 噬菌体; 铜绿假单胞菌; 生物学特性; 全基因组序列分析; 林麝

资助项目: 四川省科技厅省级科研院所科技成果转化项目(2022JDZH0026)

This work was supported by the Science and Technology Achievements Transfer Project from Scientific Research Institutions of Sichuan Provincial Science and Technology Department (2022JDZH0026).

*Corresponding author. E-mail: lycjg@163.com

Received: 2022-10-08; Accepted: 2023-01-03; Published online: 2023-02-22

Biological characterization, and whole genome sequencing of bacteriophage against *Pseudomonas aeruginosa* isolated from forest musk deer (*Moschus berezovskii*)

LI Yimeng¹, LIU Jie¹, JIAO Shengjing¹, WU Xi¹, DING Hui¹, FU Wenlong², ZHOU Lei², CHENG Jianguo², WU Jie², LUO Yan^{*1}

¹ College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, Sichuan, China

² Sichuan Institute of Musk Deer Breeding, Dujiangyan 611830, Sichuan, China

Abstract: [Background] *Pseudomonas aeruginosa* (PA) is a common opportunistic pathogen. The septic diseases caused by PA account for more than 50% of the deaths in captive forest musk deer populations. Phages have become popular substitutes of antibiotics due to the increased resistance of bacteria. [Objective] To isolate a bacteriophage using PA isolated from the lungs of dead forest musk deer as the host bacteria, and to conduct biological characterization, whole genome sequencing, and *in vivo* bacteriostasis test on it. [Methods] Double-layer agar culture method was used to isolated a phage against PA from the daily drinking water of forest musk deer in Sichuan Institute of Musk Deer Breeding. The same method was used to determine the host range, optimal multiplicity of infection (MOI), one-step growth, thermostability, and pH range of this phage. Phage morphology was observed by transmission electron microscopy (TEM). The whole genome of the phage was sequenced and analyzed, and *in vivo* bacteriostasis test was carried out in mice. [Results] A phage strain against PA was isolated and named as vB_PaeM_PAMD02. It produced a transparent plaque with clear edge and no halo ring and had a narrow host range. The phage strain had high thermostability and was stable in weak basic environment, with the optimal MOI of 0.1 and the incubation period of 40 min. The whole genome sequencing showed that the genome of this phage had a length of 66 264 bp and the GC content of 55.59%. The annotation results showed that the phage had 92 open reading frames and carried no virulence gene or resistance gene. The results indicated that the phage belonged to the *Myoviridae* family. Animal experiments showed that the phage effectively inhibited the pathogenicity of bacteria in mice. [Conclusion] The isolated phage vB_PaeM_PAMD02 has high lysis efficiency and good tolerance to adverse environments. It has great potential to be applied in clinical prevention and treatment of PA infection.

Keywords: bacteriophage; *Pseudomonas aeruginosa*; biological characterization; whole genome sequencing; forest musk deer

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA)是一种致病性革兰氏阴性菌,属假单胞菌科(*Pseudomonadaceae*)假单胞菌属(*Pseudomonas*),主要攻击上皮细胞和免疫细胞,常引起化脓性

疾病,如心内膜炎、胃肠炎、脓胸甚至败血症,某些情况还会导致免疫缺陷^[1]。PA 可通过感染动物的粪便和分泌物污染农业环境^[2]。2016 年 PA 的临床分离率为 8.66%^[3],2017 年为 8.69%^[4],

2018 年 PA 的临床分离率在所有分离菌株中位列第四, 为 9.57%^[5], 呈逐年上升趋势。2014–2019 年, 中国抗微生物耐药性监测系统从血液样本中分离出的前 10 种细菌中, PA 是临床上第七常见的病原体^[6]。2021 年, 在中国细菌耐药监测网收集到的临床分离株中, 不发酵糖革兰氏阴性杆菌数占总数的五分之一, 其中铜绿假单胞菌的分离率为 34.9%, 占据第一^[7]。同时, 由于 PA 对于碳青霉烯类抗生素的敏感性越来越低, 临床上对于铜绿假单胞菌的治疗用药也越来越艰难。

林麝(*Moschus berezovskii*)是我国的一级保护动物, 隶属于偶蹄目麝科(*Moschidae*)麝属(*Moschus*)^[8], 于 2003 年被指定为保护动物^[9], 并在《中国濒危动物红皮书》中被列为濒危或易危动物^[10]。由于人为及环境因素, 野生麝类资源濒临枯竭, 人工养殖是保护濒危林麝较为有效的方式。林麝化脓性疾病是制约人工大规模养殖林麝的重要因素之一^[11], 是我国圈养麝群中发病率最高和危害最严重的群发性疾病之一。引起该种疾病的病原菌种类繁多, 如铜绿假单胞菌^[12]、化脓隐秘杆菌^[13]、大肠杆菌^[11]、沙门氏菌^[14]、葡萄球菌^[15]等。从多年流行情况看, 患化脓性疾病的林麝在所有病麝中占 50% 以上^[16]。

噬菌体(bacteriophage, phage)于 20 世纪初被发现并命名^[17], 它们可以在细菌体内繁殖并杀死细菌细胞, 可以分为裂解性噬菌体和溶原性噬菌体^[18]。其中, 裂解性噬菌体被广泛应用于细菌感染治疗, 即噬菌体治疗^[19]。目前利用噬菌体治疗皮肤软组织感染和呼吸道感染已经在不同的动物模型实验中得到了广泛的研究和测试^[20–21], 噬菌体相关基因工程改造酶也表现出了对于其宿主菌高效的控制效果^[22]。相较于传统的抗生素药物, 噬菌体对于机体几乎无毒

副作用^[23–25]。因其高效和特异的抗菌性, 噬菌体治疗相关研究已在国内外引起广泛的关注^[26]。

本研究以分离自病死林麝肺脏的铜绿假单胞菌为宿主菌, 从四川养麝研究所圈养林麝的日常饮水中分离到一株裂解性噬菌体 vB_PaeM_PAMD02, 对其进行生物学特性和全基因组序列分析, 并进行小鼠体内抑菌试验, 以期后续利用噬菌体防治细菌性疾病的研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、水样和试验动物

本研究所使用细菌均为四川农业大学动物医学院动检实验室分离并保存。所用铜绿假单胞菌分离于病死林麝肺脏^[27], 基因型为 ST1249, 为该麝场流行菌株。水样收集自四川养麝研究所圈养林麝的日常饮水。

试验所用小鼠为六周龄 SPF 级昆明小鼠, 雌性 12 只, 雄性 12 只, 购自成都达硕实验动物有限公司。根据有关实验动物护理和使用的所有机构和国家指南, 四川农业大学科技管理处动物福利委员会批准了动物试验(批准编号为 20220263)。

1.2 主要试剂和仪器

DNase I、RNase A、绿豆酶、6×loading buffer、TaKaRa MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit, 宝生物(大连)有限公司; 1 mol/L Tris-HCl (pH 7.4)、DL2000 DNA Marker, 北京索莱宝科技有限公司; 0.22 μm 与 0.45 μm 一次性针头式过滤器, Millipore 公司; 其余试剂均为国产分析纯试剂, 购自万科化学试剂公司。

SM buffer: NaCl 5.8 g, MgSO₄·7H₂O 2.0 g, 1 mol/L Tris-HCl (pH 7.4) 50 mL, 2%明胶 5 mL, 加蒸馏水至 1 000 mL, 1×10⁵ Pa 高压灭菌 20 min, 4 °C 冰箱保存。

核酸电泳仪(NanoDrop ND-2000)、Quantity One 凝胶成像仪, Bio-Rad 公司; 水平电泳槽、电泳仪, 北京六一仪器厂; 冷冻型 18 孔离心机, 艾本德有限公司; 透射电子显微镜, 成都里来生物科技有限公司。

1.3 噬菌体分离与纯化

使用双层平板法分离及纯化噬菌体^[28]。将水样在 12 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清过滤处理后, 与菌液按体积比 1:1 混合放置 30 min, 加入到 3 mL 60 °C 预热融化的 LB 半固体培养基(质量体积分数为 0.6%)中混匀, 倒入 LB 固体培养基(质量体积分数为 1.2%)平板内铺平, 待其凝固后放置于恒温培养箱中 37 °C 培养 24 h, 以获得单独的噬菌斑。

挑取单个噬斑置于 1 mL SM Buffer 中, 37 °C、180 r/min 振荡过夜。10 倍梯度稀释后, 使用双层平板法获得单独噬斑。此步骤重复 3 次保证获得纯化的噬菌体。选择噬菌斑数目在 30–300 之间的平板计算噬菌体效价。噬菌体效价计算公式为:

效价(PFU/mL)=噬菌斑数目×稀释倍数×10。

1.4 噬菌体形态观察

将纯化后的噬菌体原液滴在覆有碳膜的铜网上, 静置 15 min, 用滤纸吸干铜网上多余的液体, 滴加 2% 磷钨酸(pH 7.0)染色 10 min, 静置使其干燥。使用透射电子显微镜观察噬菌体形态。

1.5 噬菌体裂解谱测定

测试菌为肺炎克雷伯氏菌 3 株、大肠杆菌 2 株、金黄色葡萄球菌 2 株, 志贺氏菌 2 株, 以及创口博德特氏菌、波氏杆菌、沙门氏菌各一株。采用点样法^[29], 取 300 μL 测试菌液, 与 LB 半固体培养基混合, 铺在 LB 固体培养基上。将噬菌体均匀滴于平板上, 每次 5 μL, 37 °C 培养 8 h, 观察平板上是否出现噬菌斑。如果有噬

菌斑, 则细菌可以被该噬菌体裂解。

1.6 噬菌体生物学特性测定

1.6.1 最佳感染复数测定

取噬菌体与菌液按噬菌体数量/细菌数量=10、1、0.1、0.01、0.001、0.000 1 混合。于 37 °C 培养 6 h。双层平板法计算各组噬菌斑数目。产生噬斑数目最多的比例即为最佳感染复数。以上试验重复 3 次。

1.6.2 一步生长曲线测定

按最佳感染复数的比例混合噬菌体与菌液, 在恒温水浴培养箱中 37 °C 培养。每隔 20 min 取 100 μL 培养物。10 倍梯度稀释后, 使用双层平板法测定其效价, 重复 3 次。以噬菌体效价(PFU/mL)为纵坐标、时间(min)为横坐标绘制一步生长曲线, 得到噬菌体的潜伏期、裂解期和稳定期, 并计算裂解量。裂解量计算公式^[30]为: 裂解量(PFU/cell)=裂解末期噬菌体效价/感染初期宿主菌浓度。

1.6.3 热稳定性、最适生长 pH 值与氯仿敏感性检测

将噬菌体在 37、50、60、70、80 °C 分别静置 20、40、60 min。将噬菌体与 pH 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 的 SM 缓冲液混合分别静置 5、10、15 min。取噬菌体与氯仿置于无菌离心管中混合, 剧烈振荡 2 min, 37 °C 处理 1 h 后, 收集含有噬菌体的上层液体。

使用双层平板法测定以上试验中的噬菌体效价, 计算各组噬菌斑数目。以上试验重复 3 次。其中氯仿敏感性试验需同时进行正常的噬菌体噬菌斑试验对比观察。

1.7 噬菌体全基因组测序与序列分析

1.7.1 噬菌体基因类型测定

使用 TaKaRa MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit 提取噬菌体核酸, 将提取物分为 DNase I 组、RNase A 组、绿豆酶组和对照组。加入适量的 DNase I、RNase A 和绿豆酶, 分别

在 37 °C 处理 60、60、10 min。使用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳, 使用凝胶成像系统对条带进行可视化和分析。

1.7.2 噬菌体全基因组测序

全基因组测序在 Illumina NovaSeq 二代测序平台上进行双末端(paired-end, PE)测序, 构建文库类型为 PE400。使用 ABySS 2.0^[31] 和 MIRA 4.0^[32] 拼接噬菌体基因组序列。使用 GeneMark^[33] (<http://topaz.gatech.edu/GeneMark>) 预测基因组蛋白编码基因, 对预测结果进行分析, 并与 Rfam 数据库^[34] (<http://rfam.xfam.org/>) 进行比较, 得到非编码 RNA 的预测结果。使用 BLAST 在线工具 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 验证序列的相似性。

将基因组序列和基因预测信息整合成标准的 GenBank 格式文件, 使用 CGView (http://stothard.afns.ualberta.ca/cgview_server/) 绘制噬菌体基因组图谱。运用 MEGA 7.0 和 neighbor-joining 方法构建系统发育树。

1.8 小鼠体内抑菌试验

将 24 只小鼠分为 4 组, 分别为对照组(control group)、噬菌体组(phage group)、攻毒组(challenge group)和抑菌组(antibacterial group), 每组 3 只雄性和 3 只雌性。各组在经水合氯醛注射麻醉后进行滴鼻, 其中对照组、噬菌体组和攻毒组分别在滴注 SM 缓冲液、噬菌体液、菌液 4 h 后滴注磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS), 抑菌组在滴注菌液后 4 h 滴注噬菌体, 具体方案如表 1 所示。根据最佳感染复数, 细菌使用浓度为 10^8 CFU/mL, 噬菌体使用浓度为 10^7 PFU/mL。于 48 h 后, 用 10% 水合氯醛麻醉所有小鼠并解剖。取出小鼠肺脏观察病理变化后, 进行肺脏菌落计数。同时, 取不超过 2.0 cm×2.0 cm×0.5 cm 的明显病灶区域,

表 1 小鼠体内抑菌试验滴鼻方案

Table 1 Nasal drops for each group of mice

组别 Groups	SM 缓冲液 SM buffer (μL)	噬菌体 Phage (μL)	铜绿假 单胞菌 PA (μL)	1×PBS (μL)
Control group	20	—	—	20
Phage group	—	20	—	20
Challenge group	—	—	20	20
Antibacterial group	—	20	20	—

—: 不进行滴鼻

—: Without injection.

浸泡在 4% 甲醛固定液中, 送成都里来生物公司进行病理切片分析。

2 结果与分析

2.1 铜绿假单胞菌噬菌体的分离与纯化结果

在本试验中, 分离到一株裂解性的铜绿假单胞菌噬菌体, 并命名为 vB_PaeM_PAMD02。其噬菌斑边缘清晰、光滑、无晕环(图 1A)。原始噬菌体效价为 1.59×10^9 PFU/mL。透射电镜显示, PAMD02 衣壳直径约为 70 nm, 尾部结构长约 140 nm (图 1B), 具有典型的有尾噬菌体目肌尾噬菌体科的特征。

2.2 噬菌体 vB_PaeM_PAMD02 裂解谱

试验重复 3 次后, 除宿主菌外, 其他受试细菌平板上均未出现明显清晰的噬菌斑(表 2)。PAMD02 无法裂解其他被测试的细菌, 其裂解谱较窄。

2.3 噬菌体的生物学特性

2.3.1 最佳感染复数与一步生长曲线

根据试验结果, PAMD02 在 MOI=0.1 时获得最高滴度, 因此噬菌体 PAMD02 的最佳感染复数为 0.1。具体结果见表 3。

根据一步生长曲线(图 2), PAMD02 的潜伏期为 0–40 min, 裂解期为 40–80 min, 裂解量为 65.8 PFU/cell。

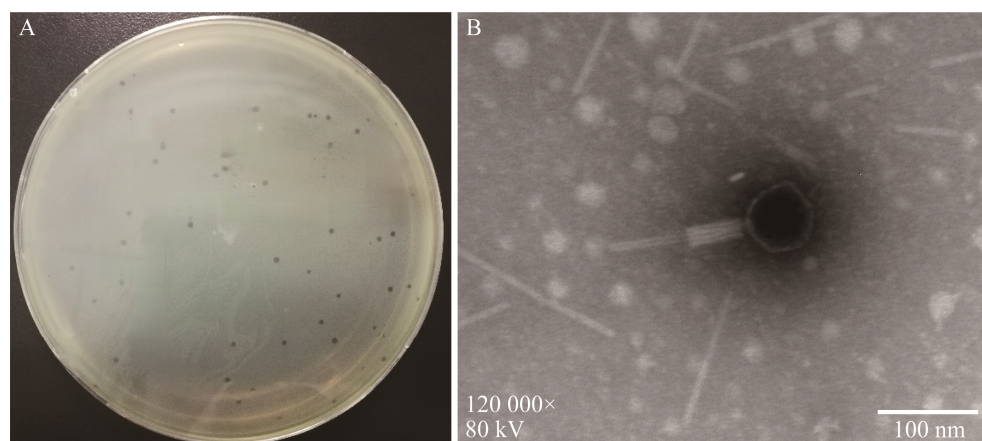


图 1 噬菌体 vB_PaeM_PAMD02 的形态 A: 噬菌体在双层琼脂平板上的噬菌斑形态. B: 噬菌体透射电镜图

Figure 1 Morphology of the phage vB_PaeM_PAMD02. A: Plaques of the phage. B: Transmission electron micrograph of the phage.

表 2 噬菌体 vB_PaeM_PAMD02 的裂解谱

Table 2 Host range of vB_PaeM_PAMD02

编号 No.	细菌 Bacteria	来源 Source	噬菌体 vB_PaeM_PAMD02
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Forest musk deer	+
KP1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Forest musk deer	—
KP2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Cattle	—
KP3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Pig	—
<i>E. coli</i> 1	<i>Escherichia coli</i>	Forest musk deer	—
<i>E. coli</i> 2	<i>Escherichia coli</i>	Cattle	—
SA1	<i>Staphylococcus aureus</i>	Forest musk deer	—
SA2	<i>Staphylococcus aureus</i>	Cattle	—
Bb	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	Forest musk deer	—
Bo	<i>Bordetella trematum</i>	Forest musk deer	—
Sa	<i>Salmonella</i>	Forest musk deer	—
SC1	<i>Shigella castellani</i>	Pig	—
SC2	<i>Shigella castellani</i>	Pig	—

+: 裂解; —: 不裂解

+: Lysis; —: No lysis.

2.3.2 热稳定性、最适生长 pH 值与氯仿敏感性
试验中, PAMD02 在 50 °C 处理后的活性明显高于 37 °C 处理后的活性; 但在 60 °C 和 70 °C 处理后, 其活性明显下降。可以看出, PAMD02

对 50–70 °C 有很高的耐受性(图 3A), 同时其明显更能耐受弱碱性环境(图 3B)。然而经氯仿处理后噬菌体 PAMD02 的效价并未发生明显变化, 说明其对氯仿不敏感。

表 3 噬菌体 vB_PaeM_PAMD02 的最佳感染复数测定

Table 3 Determination of MOI of phage vB_PaeM_PAMD02

感染复数 MOI	噬菌体 Phage (PFU/mL)	铜绿假单胞菌 PA (CFU/mL)	噬菌体效价 Phage titer (PFU/mL)
0.01	10^6	10^8	4.55×10^9
0.10	10^7	10^8	3.62×10^{10}
1.00	10^8	10^8	1.78×10^{10}
10.00	10^9	10^8	8.73×10^9
100.00	10^9	10^8	3.83×10^9
1 000.00	10^9	10^7	2.06×10^9

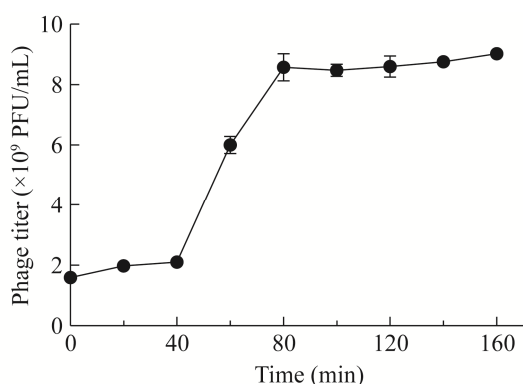
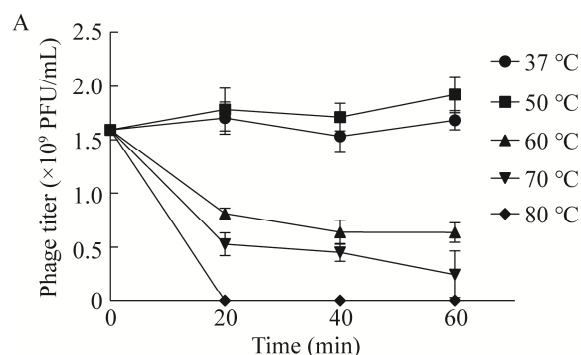


图 2 噬菌体 vB_PaeM_PAMD02 一步生长曲线
Figure 2 One-step grown curve of phage vB_PaeM_PAMD02.



2.4 全基因组测序与分析结果

2.4.1 基因组测序分析结果

根据琼脂糖凝胶电泳结果, PAMD02 经 DNase I 处理的样品泳道无条带, 经 RNase A 和绿豆酶处理的样品泳道有清晰条带, 大小与噬菌体基因组大小相同。因此噬菌体 vB_PaeM_PAMD02 是线性双链 DNA 噬菌体^[35]。具体结果如图 4 所示。

全基因组测序表明, vB_PaeM_PAMD02 的完整基因组大小为 66 264 bp (图 5), GC 含量为 55.59%。上传到 NCBI SRA 库后获得的登录号为 SRP345538。BLASTn 比较结果表明, 噬菌体与 PA 噬菌体 PHW2 最相似(GenBank 登录号为 MT349888.1), 具有 98.00% 的全基因组覆盖率和 98.63% 的序列一致性。全基因组的注释表明, PAMD02 包含 92 个开放阅读框, 38 个在正义链上, 54 个在反义链上, 无 tRNA。PAMD02 蛋白的功能预测结果表明, 有 23 种具有已知功能的蛋白质基因被预测, 包括 13 种结构蛋白基因, 其中有 3 种尾部相关蛋白基因, 这些基因编码的蛋白在噬菌体吸附到宿主菌表面的过程中起到重要作用; 9 种 DNA 复制及表达相关基

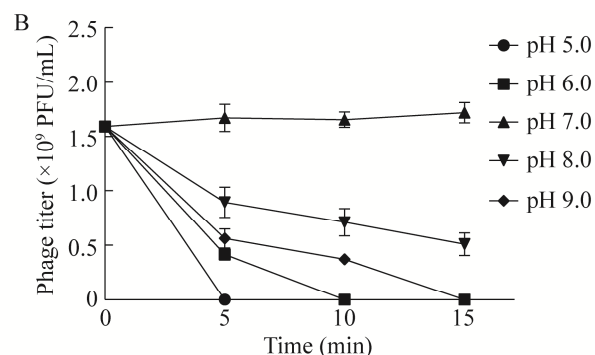


图 3 噬菌体 vB_PaeM_PAMD02 热稳定性及最适生长 pH A: 不同温度下噬菌体的效价变化. B: 不同 pH 下噬菌体的效价变化

Figure 3 Resistance of phage vB_PaeM_PAMD02 to temperature and pH. A: Phage activity at different temperatures. B: Phage activity at different pH values.

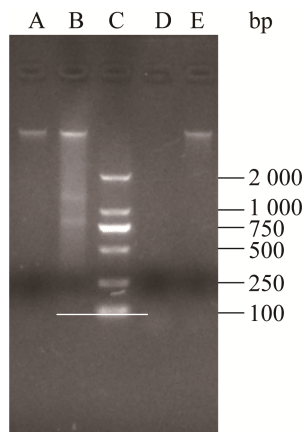


图 4 酶切电泳图 A: RNase A 酶切组; B: 阴性对照组; C: DL2000 DNA Marker; D: DNase I 酶切组; E: 绿豆酶切组

Figure 4 Results of agarose gel electrophoresis after vB_PaeM_PAMD02 digestion. A: vB_PaeM_PAMD02 nucleic acid treated by RNase A; B: vB_PaeM_PAMD02 nucleic acid that has not been digested; C: DL2000 DNA Marker; D: vB_PaeM_PAMD02 nucleic acid treated by DNase I; E: vB_PaeM_PAMD02 nucleic acid treated by mung bean enzyme.

因, 位于基因组后半段, 在噬菌体基因进入细菌细胞后, 这些基因表达的蛋白会参与噬菌体核酸的复制、转录和表达等过程; 1 个裂解过程相关的内溶素基因, 与尾部蛋白相关基因位置相近, 这是一种糖基水解蛋白, 在噬菌体子代完成组装后, 从细胞内部裂解宿主菌, 使子代噬菌体释放。在全基因组序列中未发现毒力或耐药相关基因。

2.4.2 vB_PaeM_PAMD02 的系统发育树

使用邻近法, 基于主要的衣壳蛋白和末端大亚基来构建系统发育树。系统发育树分析表明, vB_PaeM_PAMD02 的主要衣壳蛋白与噬菌体 SN 和噬菌体 LMA2 的主要衣壳蛋白最紧密相关(图 6A)。此外, PAMD02 的末端大亚基与噬菌体 PASA16 的末端大亚基最密切相关(图 6B)。以上 3 个噬菌体均属于 Myoviridea 噬菌体家族的 Pbunavirus。因此, vB_PaeM_PAMD02 可能属于 Pbunavirus。

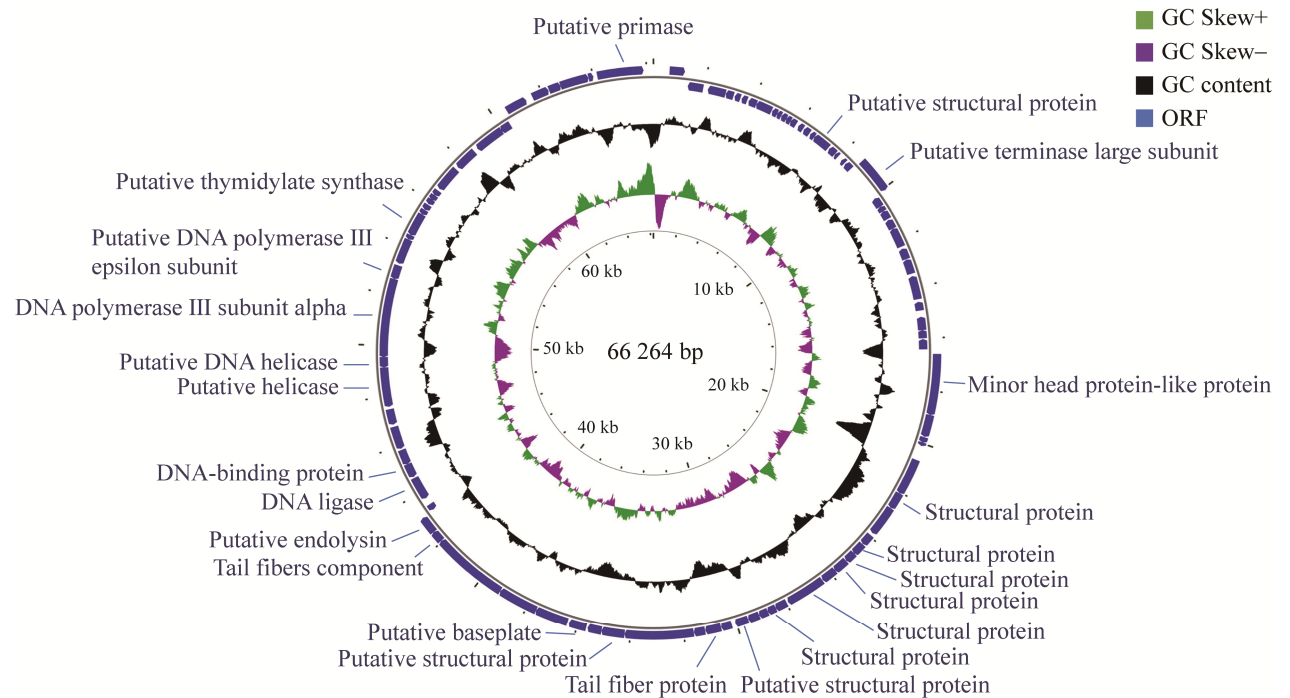


图 5 噬菌体 vB_PaeM_PAMD02 全基因组图谱
Figure 5 Genomic circle map of vB_PaeM_PAMD02.

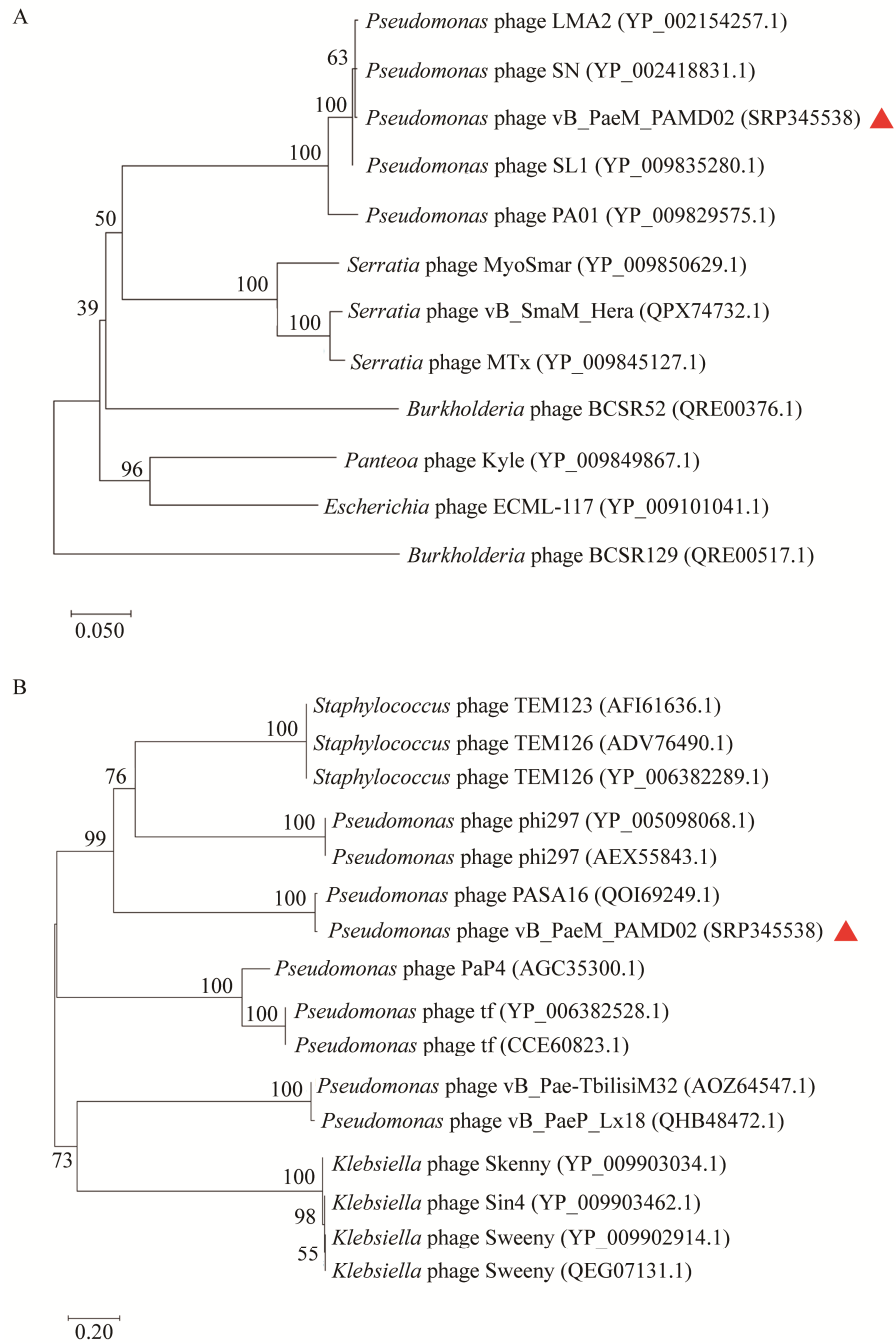


图 6 使用噬菌体主要衣壳蛋白(A)和末端酶大亚基(B)构建系统发育树 分支点上的数字代表可信度, 数值越接近 100, 可信度越强; 标尺: 代表遗传距离, 标尺越短代表亲缘关系越近; 红色三角形: 噬菌体 vB_PaeM_PAMD02

Figure 6 Phylogenetics trees were formed based on major capsid protein (A) and terminase large subunit (B) of the phage. The number on the branch point represents the credibility, the closer to 100 the bootstrap value is, the higher confidence level would be; Scale: The genetic distance, the shorter the ruler is, the closer the relationship is; Red triangle: Phage vB_PaeM_PAMD02.

2.5 小鼠体内抑菌试验结果

小鼠攻毒和治疗试验过程中, 每隔 2 h 观察小鼠精神状况和死亡情况。24 h 内仅攻毒组死亡 3 只小鼠, 其在 14 h 后又死亡 1 只, 共死亡 4 只, 其余组小鼠全部存活。在 48 h 后解剖全部试验小鼠, 观察剖检结果。各组均选取特征性病变明显的肺脏组织, 小鼠组织病理剖检图如图 7 所示。

滴鼻后观察, 空白对照组与噬菌体组小鼠精神不振, 呼吸急促, 采食量下降, 后逐渐恢

复正常, 无死亡情况。剖检后对照组小鼠肺脏组织有少量出血, 无明显病变。噬菌体组小鼠肺间质轻度增厚, 可见少量炎性细胞浸润, 主要为中性粒细胞和淋巴细胞。

攻毒组小鼠精神萎靡, 行动缓慢, 抱团眯眼, 采食量减少, 在 24 h 内小鼠死亡 3 只, 14 h 后又死亡 1 只, 存活 2 只, 存活小鼠呼吸急促并抱团, 剖检后肺脏组织有明显的病变, 局部肺泡上皮细胞变性坏死, 见坏死细胞结构模糊, 胞质溶解, 胞核固缩或碎裂, 肺泡间质不同程

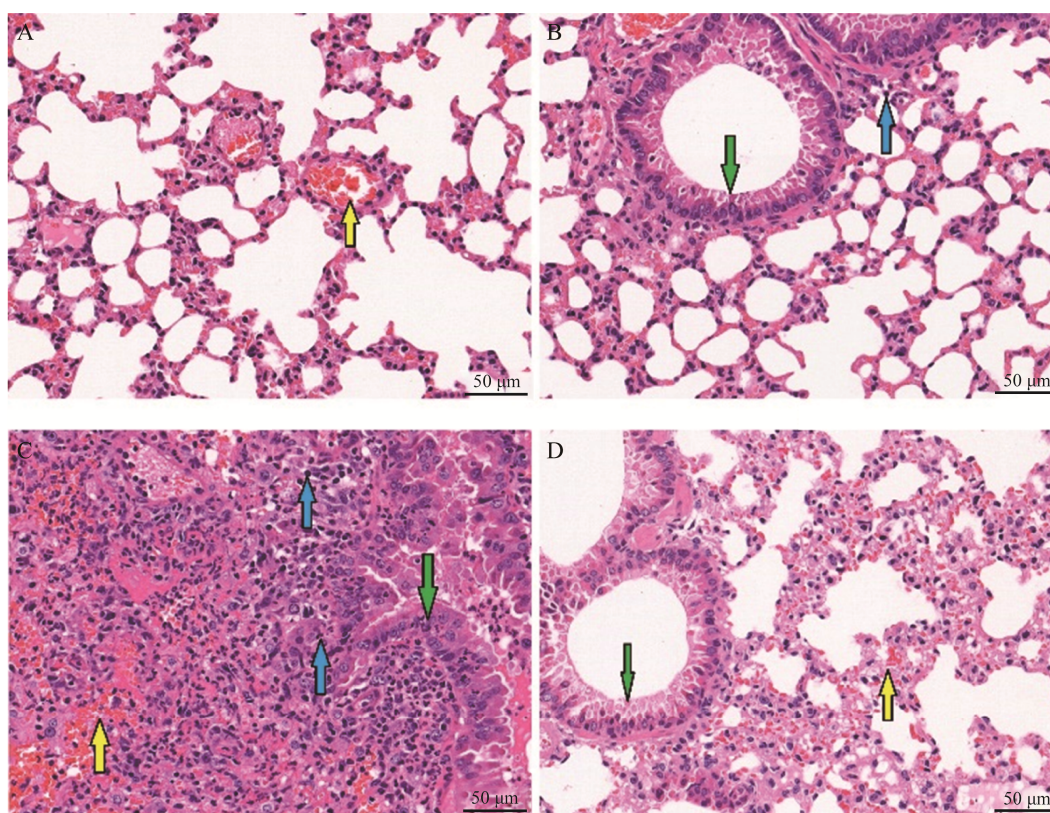


图 7 小鼠肺脏病理切片图(400×) A: 对照组小鼠肺脏病理切片. B: 噬菌体组小鼠肺脏病理切片. C: 攻毒组小鼠肺脏病理切片. D: 抑菌组小鼠肺脏病理切片. 出血(黄色箭头); 炎症细胞(蓝色箭头); 肺间质增厚(绿色箭头)

Figure 7 The micrographs of lung and liver tissues in four-group mice (400×). A: Lung section of control group mice. B: Lung section of phage group mice. C: Lung section of challenge group mice. D: Lung section of antibacterial group mice. Bleeding or congestion (yellow arrows); Inflammatory cells (blue arrows); Pulmonary interstitial thickening (green arrows).

度增厚,可见不同程度炎性细胞浸润,也可见巨噬细胞增多且肺血管内充血,并且血管内多量红细胞聚集。

抑菌组小鼠精神不振呼吸困难,在滴注噬菌体后 24 h 内临床症状得到缓解,48 h 内小鼠精神基本恢复正常,但精神状况和行动能力仍不及对照组小鼠,剖检后肺脏组织肺泡腔及肺间质内轻微出血,红细胞溢出,肺间质见部分纤维组织增生,其他未见明显病理改变。

小鼠肺脏细菌载量显示(图 8),在对照组与噬菌体组小鼠肺组织中均未分离到铜绿假单胞菌,而在攻毒组与抑菌组小鼠肺组织中均分离到铜绿假单胞菌,其中攻毒组的细菌载量为 4.27×10^8 CFU/mL,抑菌组肺部细菌载量为 4.62×10^7 CFU/mL,攻毒组细菌小鼠肺部载量明显高于抑菌组。

3 讨论与结论

多重耐药已成为阻碍治疗细菌性感染的主要问题。2017 年 2 月,世界卫生组织公布了 12 种“超级细菌”的名单,其中铜绿假单胞菌是最重要的碳青霉烯类耐药细菌之一。使用噬菌体是

克服病原体耐药性的一种有潜力的方法,应将其作为抗菌治疗生物制剂予以重视^[36]。与抗生素治疗相比,噬菌体的优势尤为突出^[25],同时也有噬菌体和抗生素联合使用的研究^[37]。本研究分离到一株裂解性噬菌体 vB_PaeM_PAMD02,其最佳感染复数为 0.1,少量的噬菌体在短时间内可以实现大量增殖,产生大量子代。与 PAMD02 的遗传序列最为相似的噬菌体 PHW2 的 MOI 也为 0.1^[30]。确定最佳感染复数有助于决定噬菌体制剂的最佳组成比和储备浓度的有效性^[38]。由于噬菌体的宿主特异性,如果将多个噬菌体混合形成“鸡尾酒疗法”,可以扩大单个噬菌体的裂解谱^[39]。PAMD02 具有较高的裂解末期暴发量,短时间的大量复制有助于裂解相关蛋白的产生与聚集。PAMD02 在不利环境有较好的耐受性,对氯仿不敏感,用氯仿处理宿主细菌可以提高其感染和裂解效率。

PAMD02 是一种 dsDNA 噬菌体,属于有尾噬菌体目(Caudovirales),以可伸缩尾巴为特征的肌尾噬菌体科(Myoviridae)^[40-41]。PAMD02 的基因组全长为 66 264 bp,GC 含量为 55.59%,显著低于其宿主细菌(65.97%)。与 A 和 T/U 相比,G 和 C 的合成需要更高的能源成本,因此依赖宿主细菌生存的噬菌体比宿主含有更少的 G 和 C^[42]。基因组测序阐明了 23 个具有可预测功能的蛋白质,其 13 种结构蛋白中有 3 种与尾部结构有关,1 种裂解相关蛋白,9 种生命活动相关酶蛋白。全基因组注释表明,PAMD02 不编码毒力或耐药基因,也不编码 tRNA,表明 PAMD02 未水平传递毒力和耐药基因^[26,43]。tRNA 相关基因的缺乏与宿主特异性有关,tRNA 越多,噬菌体宿主特异性越低,噬菌体裂解谱越宽^[44]。这一观察结果与我们在实验中的裂解谱结果一致。

PAMD02 在整个抗菌试验过程中一直具有良好的抑菌作用。在滴鼻后,抑菌组小鼠能在

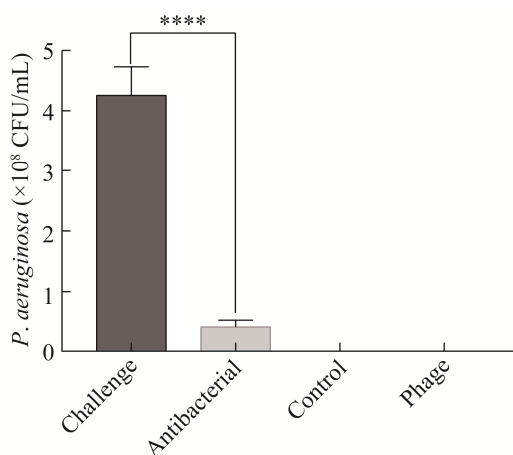


图 8 肺部细菌载量比较

Figure 8 Comparison of pulmonary bacterial load.

****: $P < 0.0001$.

较短时间内恢复正常进食, 精神状况较攻毒组小鼠更好, 无颤栗抱团现象; 抑菌组小鼠组织病理分析显示其肺脏、肝脏受损情况均好于攻毒组小鼠, 肺脏细菌载量也明显低于攻毒组小鼠, 表现出了明显的抑菌效果。攻毒组小鼠 24 h 内死亡率为 50.00%, 48 h 内死亡率为 66.67%, 抑菌组与噬菌体组小鼠无死亡, 并且组织病理切片显示其组织受损情况轻微, 表明在试验所用浓度与剂量下 PAMD02 对于小鼠是安全的。目前大多数噬菌体治疗都采用“鸡尾酒疗法”, 若选择噬菌体相关裂解蛋白作为抑菌制剂而不是整个噬菌体, 或许可以避免一些潜在的问题, 如水平基因转移^[45]。噬菌体相关裂解蛋白比噬菌体具有更好的裂解性能, 它们可以有效地溶解细菌而不产生耐药性, 裂解谱也更为广泛, 更适合广泛应用^[46]。

噬菌体疗法被认为是治疗耐药性铜绿假单胞菌感染的有效措施之一^[47]。近年来, 已经有很多烈性噬菌体特异性治疗铜绿假单胞菌感染的研究, 如特异性铜绿假单胞菌噬菌体 KPP12 眼药水作为辅助或替代疗法, 治疗感染性角膜炎中的耐药性细菌^[48]; 噬菌体也被用来控制和治理多重耐药性铜绿假单胞菌的肺部感染^[49]。化脓性疾病一直是阻碍林麝的人工养殖产业的重要疾病, 而铜绿假单胞菌是引起林麝化脓性疾病的重要病原菌之一。本研究使用的铜绿假单胞菌为该人工养殖麝场的流行株, 目前对于林麝化脓性疾病与病原的研究尚未涉及噬菌体, 本研究分离的噬菌体 PAMD02 为首株针对麝源铜绿假单胞菌的噬菌体, 基于本研究对 PAMD02 进行的相关试验分析, 其在小鼠体内对铜绿假单胞菌有良好的抑菌效果, 而且安全性较好, 具有成为安全抑菌剂的潜力以及备为特异性生物治疗剂的价值, 并在林麝养殖业化脓性性疾病防控中有良好的应用前景。

REFERENCES

- [1] THI MTT, WIBOWO D, REHM BHA. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(22): 8671.
- [2] QI J, LI LL, DU YJ, WANG SR, WANG JW, LUO YB, CHE J, LU JX, LIU H, HU GC, LI JX, GONG YW, WANG GS, HU M, YAN SG, LIU YQ. The identification, typing, and antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from mink with hemorrhagic pneumonia[J]. Veterinary Microbiology, 2014, 170(3-4): 456-461.
- [3] 胡付品, 郭燕, 朱德妹, 汪复, 蒋晓飞, 徐英春, 张小江, 张朝霞, 季萍, 谢轶, 康梅, 王传清, 王爱敏, 徐元宏, 沈继录, 孙自镛, 陈中举, 倪语星, 孙景勇, 褚云卓, 等. 2016 年 CHINET 中国细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2017, 17(5): 481-491.
HU FP, GUO Y, ZHU DM, WANG F, JIANG XF, XU YC, ZHANG XJ, ZHANG ZX, JI P, XIE Y, KANG M, WANG CQ, WANG AM, XU YH, SHEN JL, SUN ZY, CHEN ZJ, NI YX, SUN JY, CHU YZ, et al. CHINET surveillance of bacterial resistance across China: report of the results in 2016[J]. Chinese Journal of Infection and Chemotherapy, 2017, 17(5): 481-491 (in Chinese).
- [4] 胡付品, 郭燕, 朱德妹, 汪复, 蒋晓飞, 徐英春, 张小江, 张朝霞, 季萍, 谢轶, 康梅, 王传清, 王爱敏, 徐元宏, 沈继录, 孙自镛, 陈中举, 倪语星, 孙景勇, 褚云卓, 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.
HU FP, GUO Y, ZHU DM, WANG F, JIANG XF, XU YC, ZHANG XJ, ZHANG ZX, JI P, XIE Y, KANG M, WANG CQ, WANG AM, XU YH, SHEN JL, SUN ZY, CHEN ZJ, NI YX, SUN JY, CHU YZ, 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).
- [5] 胡付品, 郭燕, 朱德妹, 汪复, 蒋晓飞, 徐英春, 张小江, 张朝霞, 季萍, 谢轶, 康梅, 王传清, 王爱敏, 徐元宏, 沈继录, 孙自镛, 陈中举, 倪语星, 孙景勇, 褚云卓, 等. 2018 年 CHINET 中国细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2020, 20(1): 1-10.
HU FP, GUO Y, ZHU DM, WANG F, JIANG XF, XU YC, ZHANG XJ, ZHANG ZX, JI P, XIE Y, KANG M, WANG CQ, WANG AM, XU YH, SHEN JL, SUN ZY, CHEN ZJ, NI YX, SUN JY, CHU YZ, et al. CHINET surveillance of bacterial resistance in China: 2018

- report[J]. Chinese Journal of Infection and Chemotherapy, 2020, 20(1): 1-10 (in Chinese).
- [6] 中国抗菌药物耐药性监测系统. 全国细菌耐药监测网2014–2019年血标本病原菌耐药性变迁[J]. 中国感染控制杂志, 2021, 20(2): 124-133.
- SYSTEM CARS. Change in antimicrobial resistance of pathogens from blood specimens: surveillance report from China Antimicrobial Resistance Surveillance System in 2014–2019[J]. Chinese Journal of Infection Control, 2021, 20(2): 124-133 (in Chinese).
- [7] 胡付品, 郭燕, 朱德妹, 汪复, 蒋晓飞, 徐英春, 张小江, 张朝霞, 季萍, 谢轶, 康梅, 王传清, 王爱敏, 徐元宏, 黄颖, 孙自镛, 陈中举, 倪语星, 孙景勇, 褚云卓, 等. 2021年CHINET中国细菌耐药监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2022, 22(5): 521-530.
- HU FP, GUO Y, ZHU DM, WANG F, JIANG XF, XU YC, ZHANG XJ, ZHANG ZX, JI P, XIE Y, KANG M, WANG CQ, WANG AM, XU YH, HUANG Y, SUN ZY, CHEN ZJ, NI YX, SUN JY, CHU YZ, et al. CHINET surveillance of antimicrobial resistance among the bacterial isolates in 2021[J]. Chinese Journal of Infection and Chemotherapy, 2022, 22(5): 521-530 (in Chinese).
- [8] 王涓, 姜海瑞, 薛文杰, 徐玲, 徐宏发. 林麝 (*Moschus berezovskii*)研究概况和进展[J]. 四川动物, 2006, 25(1): 195-200.
- WANG Y, JIANG HR, XUE WJ, XU L, XU HF. Advances in research of forest musk deer (*Moschus berezovskii*)[J]. Sichuan Journal of Zoology, 2006, 25(1): 195-200 (in Chinese).
- [9] 宋兴超, 杨福合, 邢秀梅. 中国麝科动物的种类、分布、价值及其保护对策[J]. 特种经济动植物, 2008, 11(9): 5-7.
- SONG XC, YANG FH, XING XM. Species, distribution, value and protection countermeasures of muscidae in China[J]. Special Economic Animal and Plant, 2008, 11(9): 5-7 (in Chinese).
- [10] 汪松. 中国濒危动物红皮书-兽类[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 237-240.
- WANG S. China Red Data Book of Endangered Animals[M]. Beijing: Science Press, 1998: 237-240 (in Chinese).
- [11] 罗燕, 程建国, 李秋波, 蔡永华, 贾炼, 赵翠. 麝大肠杆菌性化脓病的病原分离鉴定[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2006(11): 81-83.
- LUO Y, CHENG JG, LI QB, CAI YH, JIA L, ZHAO C. Isolation and identification of the pathogen of *Escherichia coli* suppurative disease in musk deer[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2006(11): 81-83 (in Chinese).
- [12] 李秋波, 颜其贵, 康纪平, 李萍, 熊卫平. 麝化脓病细菌性病原诊断鉴定[J]. 野生动物, 2012, 33(4): 211-213.
- LI QB, YAN QG, KANG JP, LI P, XIONG WP. Isolation and identification of purulent bacteria from forest musk deer (*Moschus berezovskii*)[J]. Chinese Journal of Wildlife, 2012, 33(4): 211-213 (in Chinese).
- [13] 唐婕, 胡罕, 王永奇, 李斐然, 刘文华. 林麝化脓棒状杆菌的分离和鉴定[J]. 中国草食动物, 2011, 31(2): 71-73.
- TANG J, HU H, WANG YQ, LI FR, LIU WH. Isolation and identification of *Corynebacterium pyogenes* from forest musk deer[J]. China Herbivores, 2011, 31(2): 71-73 (in Chinese).
- [14] 罗燕, 程建国, 李秋波, 陈三, 蔡永华, 贾炼, 赵翠. 麝沙门氏菌性化脓病的病原分离鉴定[J]. 中国兽医杂志, 2007, 43(2): 22-23.
- LUO Y, CHENG JG, LI QB, CHEN S, CAI YH, JIA L, ZHAO C. Isolation and identification of the pathogen of *Salmonella* musk deer purulent disease[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2007, 43(2): 22-23 (in Chinese).
- [15] 付文龙, 付春梅, 王建明, 蔡永华. 林麝喉头后侧深部脓肿的诊断与治疗[J]. 经济动物学报, 2010, 14(4): 222-224.
- FU WL, FU CM, WANG JM, CAI YH. Diagnosis and treatment of deep part abscess on the rearward of forest musk deer throat[J]. Journal of Economic Animal, 2010, 14(4): 222-224 (in Chinese).
- [16] 吕向辉, 乔继英, 吴晓民, 苏丽娜. 主要危害麝类的化脓性、呼吸系统疾病及寄生虫病研究[J]. 经济动物学报, 2009, 13(2): 104-107.
- LÜ XH, QIAO JY, WU XM, SU LN. A review of mainly affected on musk-deer diseases: purulent, respiratory system and parasitic diseases[J]. Journal of Economic Animal, 2009, 13(2): 104-107 (in Chinese).
- [17] TWORT FW. An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses[J]. The Lancet, 1915, 186(4814): 1241-1243.
- [18] FORDE A, HILL C. Phages of life-the path to pharma[J]. British Journal of Pharmacology, 2018, 175(3): 412-418.
- [19] ALISKY J, ICZKOWSKI K, RAPOPORT A, TROITSKY N. Bacteriophages show promise as antimicrobial agents[J]. Journal of Infection, 1998, 36(1): 5-15.

- [20] CHADHA P, KATARE OP, CHHIBBER S. *In vivo* efficacy of single phage versus phage cocktail in resolving burn wound infection in BALB/c mice[J]. Microbial Pathogenesis, 2016, 99: 68-77.
- [21] SAUSSEREAU E, DEBARBIEUX L. Bacteriophages in the experimental treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections in mice[J]. Advances in Virus Research, 2012, 83: 123-141.
- [22] BRIERS Y, WALMAGH M, van PUYENBROECK V, CORNELISSEN A, CENENS W, AERTSEN A, OLIVEIRA H, AZEREDO J, VERWEEN G, PIRNAY JP, MILLER S, VOLCKAERT G, LAVIGNE R. Engineered endolysin-based “artilysins” to combat multidrug-resistant Gram-negative pathogens[J]. mBio, 2014, 5(4): e01379-14.
- [23] SLOPEK S, DURLAKOWA I, WEBER-DABROWSKA B, KUCHAREWICZ-KRUKOWSKA A, DABROWSKI M, BISIIEWICZ R. Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections. II. Detailed evaluation of the results[J]. Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis, 1983, 31(3): 293-327.
- [24] GORDILLO ALTAMIRANO FL, BARR JJ. Phage therapy in the postantibiotic era[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2019, 32(2): e00066-e00018.
- [25] SKURNIK M, STRAUCH E. Phage therapy: facts and fiction[J]. International Journal of Medical Microbiology, 2006, 296(1): 5-14.
- [26] WRIGHT A, HAWKINS CH, ANGGÅRD EE, HARPER DR. 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: Official Journal of ENT-UK; Official Journal of Netherlands Society for Oto-Rhino-Laryngology & Cervico-Facial Surgery, 2009, 34(4): 349-357.
- [27] 伍茜, 杨威, 赵位, 程建国, 罗燕, 王印, 杨泽晓, 姚学萍. 林麝肺源 ST1249 型铜绿假单胞菌的分离鉴定及其全基因组序列分析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2020, 48(10): 9-17.
- WU X, YANG W, ZHAO W, CHENG JG, LUO Y, WANG Y, YANG ZX, YAO XP. Isolation, identification and whole genome sequence analysis of *Pseudomonas aeruginosa* (ST1249) from lung of forest musk deer[J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2020, 48(10): 9-17 (in Chinese).
- [28] CHANG HC, CHEN CR, LIN JW, SHEN GH, CHANG KM, TSENG YH, WENG SF. Isolation and characterization of novel giant *Stenotrophomonas maltophilia* phage phiSMA5[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(3): 1387-1393.
- [29] KUTTER E. Phage host range and efficiency of plating[J]. Methods in Molecular Biology (Clifton, N J), 2009, 501: 141-149.
- [30] 吴芷莹, 金泽源, 李万霞, 曾飞, 朱明卓, 陈少贤, 彭文仪, 徐艳萍, 童贻刚, 柏琴琴. PB1 样铜绿假单胞菌噬菌体 PHW2 的生物学特性[J]. 微生物学通报, 2021, 48(9): 3205-3217.
- WU ZY, JIN ZY, LI WX, ZENG F, ZHU MZ, CHEN SX, PENG WY, XU YP, TONG YG, BAI QQ. Characterization of a PB1-like phage PHW2 infecting *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Microbiology China, 2021, 48(9): 3205-3217 (in Chinese).
- [31] JACKMAN SD, VANDERVALK BP, MOHAMADI H, CHU J, YEO S, HAMMOND SA, JAHESH G, KHAN H, COOMBE L, WARREN RL, BIROL I. ABySS 2.0: resource-efficient assembly of large genomes using a Bloom filter[J]. Genome Research, 2017, 27(5): 768-777.
- [32] CHEVREUX B, WETTER T, SUHAI S. Genome sequence assembly using trace signals and additional sequence information[C]. German conference on bioinformatics, 1999, 99(1): 45-46.
- [33] BESEMER J, BORODOVSKY M. GeneMark: web software for gene finding in prokaryotes, eukaryotes and viruses[J]. Nucleic Acids Research, 2005, 33(suppl_2): W451-W454.
- [34] KALVARI I, ARGASINSKA J, QUINONES-OLVERA N, NAWROCKI EP, RIVAS E, EDDY SR, BATEMAN A, FINN RD, PETROV AI. Rfam 13.0: shifting to a genome-centric resource for non-coding RNA families[J]. Nucleic Acids Research, 2018, 46(D1): D335-D342.
- [35] 刘悦, 李菁华, 史红艳, 温剑平, 孙延波. 肠出血性大肠埃希菌 O157 噬菌体的生物学特性[J]. 吉林大学学报(医学版), 2012, 38(1): 79-83.
- LIU Y, LI JH, SHI HY, WEN JP, SUN YB. Biological characteristics of enterohemorrhagic *E. coli* O157-specific bacteriophages isolated from raw sewage[J]. Journal of Jilin University (Medicine Edition), 2012, 38(1): 79-83 (in Chinese).
- [36] PALLAVALI RR, DEGATI VL, LOMADA D, REDDY MC, DURBAKA VRP. Isolation and *in vitro* evaluation of bacteriophages against MDR-bacterial

- isolates from septic wound infections[J]. PLoS One, 2017, 12(7): e0179245.
- [37] LIN Y, CHANG RYK, BRITTON WJ, MORALES S, KUTTER E, CHAN HK. Synergy of nebulized phage PEV20 and ciprofloxacin combination against *Pseudomonas aeruginosa*[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2018, 551(1/2): 158-165.
- [38] O'FLYNN G, ROSS RP, FITZGERALD GF, COFFEY A. Evaluation of a cocktail of three bacteriophages for biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(6): 3417-3424.
- [39] YU L, WANG S, GUO ZM, LIU HT, SUN DG, YAN GM, HU DL, DU CT, FENG X, HAN WY, GU JM, SUN CJ, LEI LC. A guard-killer phage cocktail effectively lyses the host and inhibits the development of phage-resistant strains of *Escherichia coli*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(2): 971-983.
- [40] QURESHI S, SAXENA HM, IMAM N, KASHOO Z, SHARIEF BANDAY M, ALAM A, MALIK MZ, ISHRAT R, BHAT B. Isolation and genome analysis of a lytic *Pasteurella multocida* bacteriophage PMP-GAD-IND[J]. Letters in Applied Microbiology, 2018, 67(3): 244-253.
- [41] LU SG, LE S, TAN YL, ZHU JM, LI M, RAO XC, ZOU LY, LI S, WANG J, JIN XL, HUANG GT, ZHANG L, ZHAO X, HU FQ. 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.
- [42] ROCHA EPC, DANCHIN A. Base composition bias might result from competition for metabolic resources[J]. Trends in Genetics, 2002, 18(6): 291-294.
- [43] AZAM AH, TANJI Y. Bacteriophage-host arm race: an update on the mechanism of phage resistance in bacteria and revenge of the phage with the perspective for phage therapy[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(5): 2121-2131.
- [44] MORGADO S, VICENTE AC. Global *In-silico* scenario of tRNA genes and their organization in virus genomes[J]. Viruses, 2019, 11(2): 180.
- [45] DOSS J, CULBERTSON K, HAHN D, CAMACHO J, BAREKZI N. A review of phage therapy against bacterial pathogens of aquatic and terrestrial organisms[J]. Viruses, 2017, 9(3): 50.
- [46] FISCHETTI VA. Development of phage lysins as novel therapeutics: a historical perspective[J]. Viruses, 2018, 10(6): 310.
- [47] HARPER DR, ENRIGHT MC. Bacteriophages for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections[J]. Journal of Applied Microbiology, 2011, 111(1): 1-7.
- [48] FUKUDA K, ISHIDA W, UCHIYAMA J, RASHEL M, KATO SI, MORITA T, MURAOKA A, SUMI T, MATSUZAKI S, DAIBATA M, FUKUSHIMA A. *Pseudomonas aeruginosa* keratitis in mice: effects of topical bacteriophage KPP12 administration[J]. PLoS One, 2012, 7(10): e47742.
- [49] ALEMAYEHU D, CASEY PG, McAULIFFE O, GUINANE CM, MARTIN JG, SHANAHAN F, COFFEY A, ROSS RP, HILL C. Bacteriophages ϕ MR299-2 and ϕ NH-4 can eliminate *Pseudomonas aeruginosa* in the murine lung and on cystic fibrosis lung airway cells[J]. mBio, 2012, 3(2): e00029-e00012.