



一株 C3 形态多重耐药大肠杆菌噬菌体生物学特性和基因组分析

左君豪^{1,2}, 王雪², 曾君^{1,2}, 王猛^{2,4}, 郭志良^{1,2}, 季芳², 徐莉莉³, 韦燕文^{2,5}, 王倩^{2,5}, 赵瑞利^{1*}, 王承民^{2*}

- 1 天津农学院动物科学与动物医学学院 天津市农业动物繁育与健康养殖重点实验室, 天津 300392
- 2 广东省科学院动物研究所 广东省动物保护与资源利用重点实验室 广东省野生动物保护与利用公共实验室, 广东 广州 510260
- 3 优宜邦生物科技(上海)有限公司, 上海 201103
- 4 河北农业大学动物医学院, 河北 保定 071000
- 5 五邑大学生物科技与大健康学院, 广东 江门 529020

左君豪, 王雪, 曾君, 王猛, 郭志良, 季芳, 徐莉莉, 韦燕文, 王倩, 赵瑞利, 王承民. 一株 C3 形态多重耐药大肠杆菌噬菌体生物学特性和基因组分析[J]. 微生物学报, 2023, 63(12): 4752-4768.

ZUO Junhao, WANG Xue, ZENG Jun, WANG Meng, GUO Zhiliang, JI Fang, XU Lili, WEI Yanwen, WANG Qian, ZHAO Ruili, WANG Chengmin. Biological characteristics and genome of a C3-morphotype phage against multidrug-resistant *Escherichia coli*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(12): 4752-4768.

摘要:【目的】多重耐药菌的出现对公共卫生安全构成严重威胁, 本研究分离多重耐药大肠杆菌噬菌体, 研究其生物学特性和基因组特征, 为耐药菌的噬菌体疗法提供理论依据。【方法】使用双层平板法从污水样本中分离纯化大肠杆菌噬菌体; 磷钨酸染色后通过透射电镜观察形态; 测定其宿主范围, 测定温度和 pH 稳定性、一步生长曲线和体外抑菌效果等生物学特性; 体内抑菌试验评估噬菌体对多重耐药大肠杆菌 N1203-1Af 感染的大蜡螟幼虫的保护作用; 基于全基因组测序对其基因组特点进行分析。【结果】本研究分离共得到 5 株大肠杆菌噬菌体, 分别命名为 pEC-S163-2.1、pEC-S163-2.2、pEC-M1167-5Ar.1、pEC-m1291-2Dr.1 和 pEC-N1203-2Af.1; 电镜结果显示噬菌体 pEC-N1203-2Af.1 属于短尾噬菌体中罕见的 C3 形态型, 头部较长, 长是宽的 2–3 倍; pEC-N1203-2Af.1 可裂解受试 15 株大肠杆菌中的 3 株; 感染 10 min 后进入指数增长期, –20–50 °C、

资助项目: 优宜邦生物科技(上海)有限公司资助产业化项目(UYB20220001)

This work was supported by the Union Biotechnology (Shanghai) Co., Ltd. Supporting Industrialization Project (UYB20220001).

*Corresponding authors. E-mail: WANG Chengmin, wangchm@giz.gd.cn; ZHAO Ruili, Zhaoruili1109@126.com

Received: 2023-05-05; Accepted: 2023-07-25; Published online: 2023-08-08

pH 值为 4.0–10.0 的环境下均能够保持稳定活性; 大蜡螟幼虫感染大肠杆菌 N1203-2Af 后噬菌体 pEC-N1203-2Af.1 治疗感染复数(multiplicity of infection, MOI)=100、1 和 0.01 在 48 h 内存活率均达到 70%以上(7/10); 噬菌体 pEC-N1203-2Af.1 基因组全长 77 334 bp, (G+C)%含量为 42.18%, 不携带耐药基因和毒力因子; 功能基因预测表明, 噬菌体 pEC-N1203-2Af.1 基因组共有 121 个 CDS, 其中 CDS53–CDS64 是编码噬菌体结构和裂解模块的序列。【结论】多重耐药大肠杆菌噬菌体 pEC-N1203-2Af.1 具有良好的抑菌活性, 生物学特性稳定, 可能为 Kuravirus 属的新成员, 其具有罕见的 C3 形态, 这种头部细长的特殊形态可能与 CDS63 编码的主要头部蛋白有关。不同地区的 C3 形态噬菌体长尾纤维远端三聚体蛋白一致性小于 50%, 推测该形态噬菌体为适应不同的环境可能发生了不同方向的进化。

关键词: 多重耐药大肠杆菌; C3 形态噬菌体; 生物学特性; 结构蛋白基因; 基因组学

Biological characteristics and genome of a C3-morphotype phage against multidrug-resistant *Escherichia coli*

ZUO Junhao^{1,2}, WANG Xue², ZENG Jun^{1,2}, WANG Meng^{2,4}, GUO Zhiliang^{1,2}, JI Fang², XU Lili³, WEI Yanwen^{2,5}, WANG Qian^{2,5}, ZHAO Ruili^{1*}, WANG Chengmin^{2*}

1 Tianjin Key Laboratory of Agricultural Animal Breeding and Healthy Husbandry, College of Animal Science and Veterinary Medicine, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300392, China

2 Guangdong Key Laboratory of Animal Conservation and Resource Utilization, Guangdong Public Laboratory of Wild Animal Conservation and Utilization, Institute of Zoology, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou 510260, Guangdong, China

3 Union Biotechnology (Shanghai) Co., Ltd., Shanghai 201103, China

4 College of Veterinary Medicine, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, Hebei, China

5 School of Biotechnology and Health Sciences, Wuyi University, Jiangmen 529020, Guangdong, China

Abstract: [Objective] The emergence of multidrug-resistant bacteria represents a serious challenge to public health security. In this study, we isolated the phages against multidrug-resistant *Escherichia coli* and studied their biological and genomic features, aiming to provide a theoretical foundation for the development of phage therapies against drug-resistant bacteria. [Methods] We used the double plate method to isolate *E. coli* phages from sewage. We employed phosphotungstic acid staining and transmission electron microscopy to observe the phage morphology, and subsequently assessed the biological properties, including host range, thermal and pH stability, one-step growth curve, and *in vitro* antibacterial effect of the phages. Furthermore, we conducted an *in vivo* bacteriostasis test to evaluate the protective effects of the phages on *Galleria mellonella* larvae infected with multidrug-resistant *E. coli* N1203-1Af. Finally, we carried out whole genome sequencing to analyze the genomic characteristics of the phages. [Results] Five *E. coli* phages (pEC-S163-2.1, pEC-S163-2.2, pEC-M1167-5Ar.1, pEC-m1291-2DR.1, and pEC-N1203-2Af.1) were isolated. The phage pEC-N1203-2Af.1 presented a C3 morphotype rare among short-tailed phages and was characterized by a long head

with the length 2–3 times that of the width. Furthermore, pEC-N1203-2Af.1 demonstrated lytic activity against three out of the 15 tested *E. coli* strains. Ten minutes after infection, the phage entered an exponential growth phase and exhibited stable activity within the temperature range of –20 to 50 °C and pH 4.0–10.0. After treatment with pEC-N1203-2Af.1 at the multiplicity of infection (MOI) levels of 100, 1, and 0.01 for 48 h, the survival of *G. mellonella* larvae infected with *E. coli* N1203-2Af reached over 70% (7/10). The genome of phage pEC-N1203-2Af.1 had a total length of 77 334 bp and the G+C content of 42.18%. Notably, the phage did not carry any drug resistance gene or virulence factor. Functional gene prediction revealed a total of 121 CDS in the phage genome, with CDS53–CDS64 encoding the phage structure and lysis module. **[Conclusion]** The phage pEC-N1203-2Af.1 against multidrug-resistant *E. coli* exhibits potent antibacterial activity and stable biological characteristics. Our findings suggest that pEC-N1203-2Af.1 may represent a new member of the Kuravirus genus, characterized by a rare C3 morphotype that may be attributed to the main head protein encoded by CDS63. Notably, the distal trimeric protein of bacteriophages with a C3 morphotype exhibits less than 50% consistency across different regions, which indicates that the bacteriophages with this morphotype may have evolved in diverse directions to adapt to varying environmental conditions.

Keywords: multidrug-resistant *Escherichia coli*; bacteriophage with a C3-morphotype; biological characteristics; structural protein genes; genomics

大肠杆菌(*Escherichia coli*)是肠杆菌科的重要成员,其广泛分布于自然界,普遍栖息在人类和温血动物胃肠道中,也是最重要的条件致病菌之一^[1]。大肠杆菌是引起肠炎、尿路感染、败血症和其他临床感染(如新生儿脑膜炎)的主要病原体^[2],2011–2014年美国国家医疗安全网络报告指出,美国境内出现的临床相关感染中12%由大肠杆菌引起^[3]。目前,抗生素仍然是大肠杆菌感染的主要治疗手段,然而由于抗生素的滥用,大肠杆菌的耐药率不断提高。2021年中国细菌耐药监测报告称大肠杆菌对头孢曲松、头孢噻肟、哌拉西林、甲氧苄啶-磺胺甲噁唑、环丙沙星和左氧氟沙星的耐药率均超过50%^[4]。碳青霉烯耐药大肠杆菌在全球范围存在,在一部分国家和地区已经造成严峻的公共卫生问题,2022年Ledda等报道了某地区医院爆发的ST399型碳青霉烯耐药大肠杆菌,其质粒

携带碳青霉烯酶编码基因 *bla*_{OXA-48}^[5]。2018年,河南某医院的大肠杆菌分离株中发现 *bla*_{NDM-5} 和 *mcr-1* 共存的现象,该分离株对包括粘菌素在内的所有受试抗生素均表现出耐药性^[6]。多重耐药菌的出现对医疗工作和公共卫生构成严重威胁,传统抗生素疗法面临治疗无效的困境,需要加强对抗生素使用的管理和监控,亟需发展新型抗菌药物加以应对,而噬菌体疗法具备治疗耐药菌株感染潜力,有望成为替代抗生素疗法的新型绿色生态技术^[7]。

噬菌体是一种能够特异性感染细菌、真菌和古菌等宿主的微生物病毒,在自然界分布极广^[8]。基于噬菌体基因组类型,可分为最常见的双链DNA类型(double stranded deoxyribonucleic acid, dsDNA),和不常见的单链DNA类型(single stranded deoxyribonucleic acid, ssDNA)、双链RNA类型(double stranded ribonucleic acid,

dsRNA) 和单链 RNA 类型 (single stranded ribonucleic acid, ssRNA)^[9]。迄今为止绝大多数 dsDNA 基因组类型的噬菌体都属于尾噬菌体目 (Caudovirales)^[10], 值得注意的是, C3 形态型噬菌体短尾噬菌体中较为罕见的类型, 其头部呈细长的椭圆形, 长是宽的 2-3 倍, 通过 5 500 株噬菌体的电镜观察试验, 观察到的 C3 样噬菌体仅占比 0.5%^[11]。依据 2019 年国际病毒分类委员会发布的噬菌体分类学研究, 以 phiEco32 为代表的 C3 形态型噬菌体被归类至 Kuravirus 属^[12], phiEco32 具有该类型噬菌体的典型结构, 能够以大肠杆菌作为宿主, 2008 年 Dhruvi Savalia 等在大规模筛选治疗牛乳腺炎的噬菌体时, 首次从格鲁吉亚第比利斯的库拉河中分离得到^[13]。目前绝大多数 C3 形态型噬菌体以革兰氏阴性菌作为宿主菌, 中国首次报道的 C3 形态噬菌体 NJ01 分离自江苏省南京市, 其以禽致病性大肠杆菌为宿主菌^[14], 肠道沙门氏菌噬菌体 7-11 则发现于加拿大, 其在转录过程中不依赖 $\sigma 70$ 转录的关闭, 不存在中间启动子^[15]。革兰氏阳性菌中, 具有 C3 形态的噬菌体仅由 Alain Chopin 等报道, 它以乳酸乳球菌为宿主菌, 具有 T7-like 转录系统, 基因组组分与其他 C3 样噬菌体同源性很低^[16]。

由于抗生素的过度使用, 多种临床常见菌株产生耐药性并广泛传播于细菌界, 若不加以遏制, 细菌感染引发的病症将面临无药可用的困境。噬菌体具有宿主特异性高、自我快速复制和安全性高等优势, 作为细菌的“专业杀手”, 噬菌体有望成为抗生素的优良替代疗法。在针对多重耐药大肠杆菌的研究中, 本研究分离得到 1 株 C3 形态的大肠杆菌噬菌体, 命名为 pEC-N1203-2Af.1。尽管噬菌体 pEC-N1203-2Af.1 宿主谱较窄但它的 3 株宿主菌均为多重耐药菌, 同时该噬菌体的形态特殊罕见、生物学特性稳定且具有良好的抑菌活性, 因此基于其生物学表型和基因组

特征进行深入研究, 为提供进一步合理利用噬菌体资源的理论依据, 以及研发新型噬菌体疗法奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

分离噬菌体所用的 15 株大肠杆菌由本实验室分离, 置于 -20 °C 条件下 50% 甘油水冻存保藏。

1.2 噬菌体分离纯化

样本采集自广州市西朗污水处理厂, 并使用双层平板法分离纯化噬菌体。将 10 mL 污水样品 8 000 r/min 离心 10 min, 使用 0.22 μm 滤膜过滤后备用。重新复壮 15 株大肠杆菌, 取滤液 1 mL 与菌液 100 μL 在 5 mL M-H 肉汤 (Mueller-Hinton broth, MHB) 培养基中充分混匀, 连续培养 12 h 后 8 000 r/min 离心 10 min, 上清液过 0.22 μm 水系微孔滤膜至另一离心管。取 100 μL 菌液与 8 mL 预热的半固体培养基 (MHB+0.7% 琼脂) 混匀, 倾倒入底层固体 MHA 平板并在表面滴加 10 μL MHB 培养基滤液, 37 °C 条件下连续培养 12 h, 期间多次观察是否有透明噬菌斑出现。

使用双层平板法对噬菌体进行纯化^[17], 挑取双层平板表面出现的单个噬菌斑, 10 倍梯度连续稀释, 吸取适宜稀释度下 100 μL 噬菌体液与等体积宿主菌液混匀, 35 °C 条件下吸附 10 min, 加入 8 mL 预热的半固体培养基, 颠倒混匀后倒入 M-H 琼脂 (Mueller-Hinton agar, MHA) 平板, 冷却凝固后 35 °C 条件下倒置培养 12 h。以上步骤重复 3-5 次, 至噬菌斑形态、大小均一不再变化, 即获得单一噬菌体。上述操作均在无菌条件下进行。

1.3 噬菌体生物学特性检测

1.3.1 形态学观察

使用负染色法进行电镜样品染色, 将 10 μL 样品滴于石蜡封口膜, 铜网正面朝下倒扣至样

品静置 1 min, 吸走多余样品液后以同样方法倒扣于磷钨酸染色液, 静置 1 min, 室温下干燥。通过透射电子显微镜 JEM-1400 flash 在 120 kV 下观察并拍摄噬菌体的形态特征。

1.3.2 宿主谱

参照 Ahmed R. Sofy 等的方法^[18], 取本实验室保藏的大肠杆菌重新复壮至对数生长期, 将 100 μL 菌液与预热的半固体培养基混匀, 倾倒入固体平板表面, 待上层培养基凝固后, 取 10 μL 噬菌体富集液滴于半固体培养基表面, 于恒温培养箱 35 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养 12 h 以确认宿主范围。

1.3.3 温度及酸碱稳定性

将 1 mL 噬菌体纯化液分别置于 -20、4、25、37、50、60 和 70 $^{\circ}\text{C}$ 条件下处理 1 h, 通过双层平板法测定效价以评估其温度稳定性。

使用 HCl 和 NaOH 溶液将 MHB 培养基调整 pH 值至 2.0、4.0、6.0、7.0、8.0、10.0 和 12.0, 取噬菌体纯化液 100 μL 与 900 μL 上述液体混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 通过双层平板法测定效价以评估其酸碱稳定性^[19]。

1.3.4 一步生长曲线

噬菌体与宿主菌以感染复数(multiplicity of infection, MOI)=0.01 比例充分混匀, 35 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 10 min 以吸附噬菌体, 10 000 r/min 离心 1 min 收集菌体沉淀并弃去上清, 用新鲜 MHB 洗涤 2 次, 10 000 r/min 离心 1 min 后重悬沉淀并添加 MHB 至 5 mL, 将离心管振荡混匀, 此时计为 0 时刻, 间隔 10 min 多次取样, 10 000 r/min 离心 1 min 取上层清液, 通过双层平板法测定其效价并绘制一步生长曲线。

1.3.5 体外抑菌试验

使用 MHB 稀释调整对数生长期宿主菌液至 $OD_{595}=0.10$ [7×10^7 colony forming unit (CFU)/mL], 稀释后的菌液分装至 4 支无菌离心管内, 设置 4 个分组(1 个对照组和 3 个试验组)。对照组, 10 mL 菌液+10 mL MHB 培养基;

试验组 1 (MOI=100), 10 mL 菌液+10 mL 噬菌体液(以 MOI 为 100 的比例); 试验组 2 (MOI=1), 10 mL 菌液+10 mL 噬菌体液(以 MOI 为 1 的比例); 试验组 3 (MOI=0.01), 10 mL 菌液+10 mL 噬菌体液(以 MOI 为 0.01 的比例)。各组充分混匀后分装至 1.5 mL 离心管, 37 $^{\circ}\text{C}$, 180 r/min, 每 3 h 取样并测定 595 nm 处的吸光度, 连续测定 24 h, 每组重复 3 次, 绘制噬菌体体外抑菌曲线。

1.3.6 噬菌体对大蜡螟幼虫的体内抑菌效果

重新复苏多重耐药菌 *Escherichia coli* N1203-2Af, 活菌计数后用 MHB 稀释菌液调整其菌量为 6×10^6 、 6×10^7 、 6×10^8 和 6×10^9 CFU/mL。将体重为 200–250 mg 的大蜡螟幼虫随机分为 4 组, 每组 10 只, 饥饿处理 24 h。使用 75% 乙醇对大蜡螟幼虫进行体表消毒, 从尾部左侧第一腹足处注射菌液(*Escherichia coli* N1203-2Af, 10 μL /只, 6×10^4 、 6×10^5 、 6×10^6 和 6×10^7 CFU), 注射完成后的大蜡螟幼虫置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗环境中禁食观察, 每隔 3 h 记录存活率, 连续记录 24 h。

将体重为 200–250 mg 的大蜡螟幼虫随机分为 6 组, 每组 10 只, 禁食处理 24 h, 使用 75% 乙醇进行体表消毒。对于空白对照组及噬菌体安全性检验组, 首先自尾部左侧第一腹足处注射 10 μL 生理盐水, 30 min 后自右侧第一腹足处注射等量生理盐水或噬菌体 pEC-N1203-2Af.1 [5×10^7 PFU (plaque formation unit)]; 对于其余试验组, 首先自尾部左侧第一腹足处注射 *Escherichia coli* N1203-2Af 菌液 10 μL (5×10^5 CFU), 30 min 后在右侧第一副足分别注射等量生理盐水或噬菌体 pEC-N1203-2Af.1 (5×10^7 、 5×10^5 和 5×10^3 PFU, 表 1)。将大蜡螟幼虫置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗环境中禁食观察, 每隔 3 h 记录存活率, 连续记录 48 h 记录大蜡螟幼虫黑化情况和存活率^[20]。

表 1 噬菌体对大蜡螟幼虫的体内抑菌试验分组

Table 1 Grouping of bacteriophage protection tests against the larvae of *Galleria mellonella*

Group	The first injection ^a	30 minutes later ^b
Infection control	N1203-2Af (5×10 ⁵ CFU)	Physiological saline
Blank control	Physiological saline	Physiological saline
Phage safety group	Physiological saline	pEC-N1203-2Af.1 (5×10 ⁷ PFU)
Postinfection phage treatment group (MOI=100)	N1203-2Af (5×10 ⁵ CFU)	pEC-N1203-2Af.1 (5×10 ⁷ PFU)
Postinfection phage treatment group (MOI=1)	N1203-2Af (5×10 ⁵ CFU)	pEC-N1203-2Af.1 (5×10 ⁵ PFU)
Postinfection phage treatment group (MOI=0.01)	N1203-2Af (5×10 ⁵ CFU)	pEC-N1203-2Af.1 (5×10 ³ PFU)

^a: Injection of physiological saline or *Escherichia coli* N1203-2Af, 10 μL; ^b: Injection of physiological saline or phage pEC-N1203-2Af.1, 10 μL.

1.4 噬菌体全基因组测序

利用 illumina Novaseq 6000 测序平台进行全基因组测序(广东美格基因科技有限公司, 广州)。DNA 样品检测合格后构建文库, 采用软件 Soapnuke 对测序的数据质量进行评估以及去除低质量数据, 确保结果可信度。使用 Megahit 软件对 clean data 进行 de novo 组装。

1.5 噬菌体基因组功能注释分析

基于美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)在线工具 BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>)进行噬菌体全基因组序列比对, 使用 MetaGeneMark (v3.38)进行基因组基因预测, 利用 BLASTp ($e < 10^{-3}$)将所预测基因氨基酸序列与 UniProtKB 数据库的病毒序列(ViralZone, reviewed protein, <https://viralzone.expasy.org/>)进行比对, 同时将噬菌体序列提交至 pfam 数据库(<http://pfam.xfam.org/>)进行注释, 结合以上两种方法获得校正注释结果。使用软件 SnapGene software (from insightful science; available at snapgene.com)绘制噬菌体全基因组图谱; 基于耐药基因数据库 CARD (<https://card.mcmaster.ca/>)进行分析, 预测是否携带抗生素耐药基因 (antibiotics resistance genes, ARG); 下载毒力因子数据库 VFDB (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/>)的 set A 核心数据库, 通过 BLAST 比对预测噬菌体是否携带毒力因子。使用 BLAST ring image generator

(BRIG)软件将噬菌体 pEC-N1203-2Af.1 基因组与 C3 形态大肠杆菌噬菌体 O18-11、NJ01、172-1 和 phiEco32, 非大肠杆菌宿主 C3 形态噬菌体 7-11、KSY1 和 Vb_PmiP-P59 基因组进行比较。

1.6 噬菌体全基因组系统进化分析

在 GenBank 数据库中下载噬菌体全基因组序列, 建立数据集。包括 C3 形态噬菌体分离来源、国家和宿主菌等信息, 通过 VICTOR^[21] (<https://ggdc.dsmz.de/victor.php#>)构建噬菌体全基因组系统发育树, 使用 iTOL (<https://itol.embl.de/>)对系统发育树进行可视化处理。

2 结果与分析

2.1 噬菌斑及形态特征

本研究选取 15 株 *Escherichia coli* 作为宿主菌, 共分离得到 5 株噬菌体, 分别命名为 pEC-S163-2.1、pEC-S163-2.2、pEC-M1167-5Ar.1、pEC-m1291-2Dr.1 和 pEC-N1203-2Af.1。其中, 噬菌体 pEC-N1203-2Af.1 分离自污水厂污水样本, 能够裂解多重耐药大肠杆菌 N1203-2Af。pEC-N1203-2Af.1 呈现边缘光滑的圆形噬菌斑, 直径约为 2 mm (图 1A), 透射电镜下观察显示其头部形态呈特殊的椭圆型, 长约为 129.68 nm, 宽约为 48.92 nm, 尾部长约 19.44 nm (图 1B), 形态学鉴定表明 pEC-N1203-2Af.1 属于短尾噬菌体中较为罕见的 C3 形态^[22]。

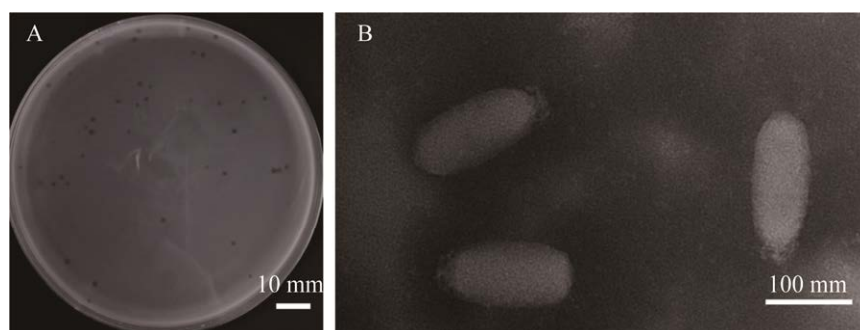


图 1 噬菌体 pEC-N1203-2Af.1 噬菌斑和电镜照片

Figure 1 Phage pEC-N1203-2Af.1 plaque and electron micrograph. A: Phage pEC-N1203-2Af.1 plaque. B: Phage pEC-N1203-2Af.1 electron micrograph.

2.2 宿主谱

噬菌体 pEC-N1203-2Af.1 除裂解多重耐药大肠杆菌 N1203-2Af 外, 还可裂解 15 株受试菌中的 2 株马来穿山甲来源多重耐药大肠杆菌 S163-2、M172-1 (表 2)。

2.3 噬菌体稳定性及一步生长曲线

噬菌体 pEC-M1203-2Af.1 在 4–37 °C 孵育 1 h 后保持稳定效价, 60 °C 孵育 1 h 后噬菌体效价降至最低, 70 °C 孵育 1 h 后完全失活(图 2A); pH 值在 4.0–10.0 保持稳定, pH 值 7.0 时效价最高, pH 值 2.0 和 pH 值 12.0 时完全失活(图 2B);

潜伏期小于 10 min, 裂解期持续至 80 min, 80 min 后进入平台期(图 2C)。

2.4 噬菌体体外抑菌效果

pEC-N1203-2Af.1 在感染宿主菌的前 6 h 内抑菌效果十分明显, MOI=100、MOI=1 和 MOI=0.01 条件下 OD_{595} 均小于 0.15, 6 h 后试验组 OD_{595} 迅速升高, 但 MOI=100 组在 6–24 h 内升高速率低于其他试验组 (MOI=1 和 MOI=0.01), 且 24 h 内均低于对照组, 而 MOI=1 和 MOI=0.01 的试验组 OD_{595} 在 6–9 h 迅速升高, 9 h 后已经高于对照组数值(图 2D)。

表 2 噬菌体 pEC-N1203-2Af.1 细菌宿主谱

Table 2 Bacterial host spectrum of phage pEC-N1203-2Af.1

Strain name	Specie	Host	Drug resistance	Lytic
S163-2	<i>Escherichia coli</i>	<i>Manis javanica</i>	MDR	+
S171-1	<i>Escherichia coli</i>	<i>Manis javanica</i>	MDR	–
M171-1	<i>Escherichia coli</i>	<i>Manis javanica</i>	MDR	–
M172-1	<i>Escherichia coli</i>	<i>Manis javanica</i>	MDR	+
M159-1	<i>Escherichia coli</i>	<i>Manis javanica</i>	MDR	–
M2929-1AR	<i>Escherichia coli</i>	<i>Rhinopithecus</i>	NO	–
M2158-1Ar	<i>Escherichia coli</i>	<i>Homo sapiens</i>	NO	–
M1167-5Ar	<i>Escherichia coli</i>	<i>Homo sapiens</i>	MDR	–
M1291-2Dr	<i>Escherichia coli</i>	<i>Homo sapiens</i>	MDR	–
N1203-2Af	<i>Escherichia coli</i>	<i>Homo sapiens</i>	MDR	+
M2149-3Ar	<i>Escherichia coli</i>	<i>Homo sapiens</i>	NO	–
N2603-1at	<i>Escherichia coli</i>	<i>Ailuropoda melanoleuca</i>	NO	–
N2607-1at	<i>Escherichia coli</i>	<i>Ailuropoda melanoleuca</i>	NO	–
N2926-2AT	<i>Escherichia coli</i>	<i>Rhinopithecus</i>	NO	–
N2615-1aT	<i>Escherichia coli</i>	<i>Rhinopithecus</i>	NO	–

MDR: Multidrug resistant bacteria; NO: Non multidrug-resistant bacteria; +: Lytic; –: No lytic.

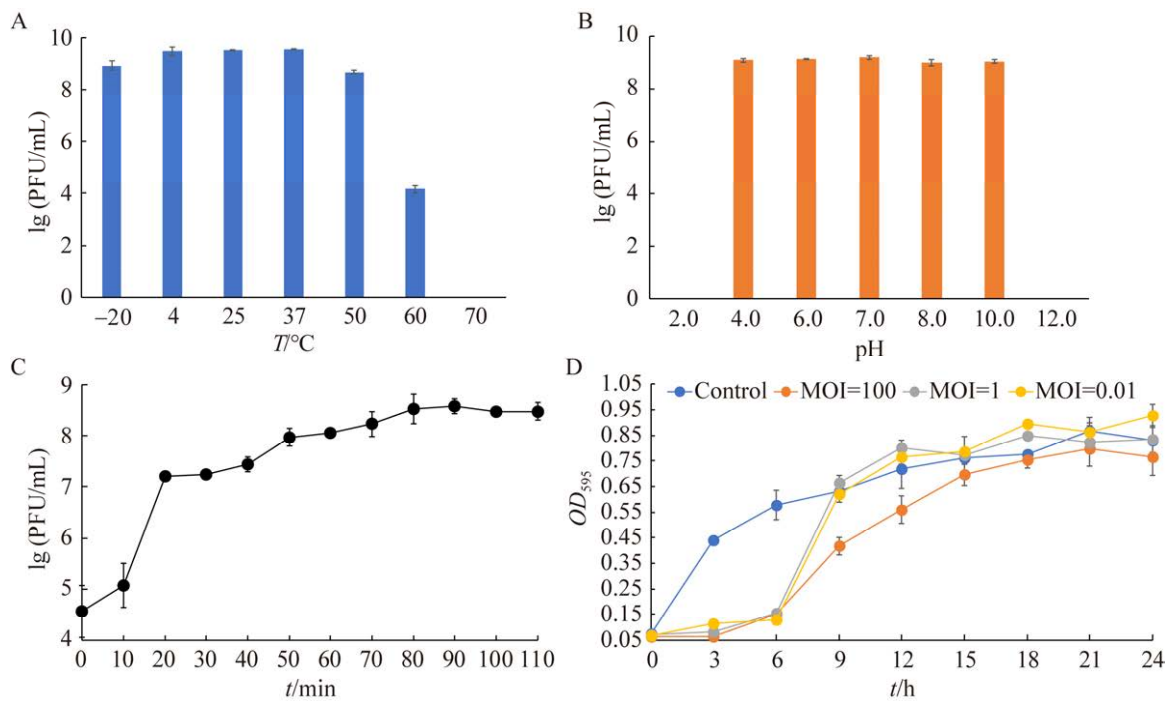


图2 噬菌体 pEC-N1203-2Af.1 生物学特性和体外抑菌效果

Figure 2 Biological characteristics and bacteriostatic effect *in vitro* of phage pEC-N1203-2Af.1. A: Temperature stability. B: pH stability. C: One-step growth curve. D: Bacteriostatic effect of phage pEC-N1203-2Af.1 *in vitro*. Each point represents the means SD from three replicate experiments.

2.5 噬菌体对大蜡螟幼虫的体内抑菌效果

以 6×10^5 CFU 感染量接种大肠杆菌 N1203-2Af 的大蜡螟幼虫在 24 h 内死亡率为 100%, 6×10^4 CFU 感染量接种的大蜡螟幼虫在 24 h 内死亡率为 60%。以 6×10^5 CFU 为感染量时大蜡螟幼虫死亡过快, 而 6×10^4 CFU 感染量下的大蜡螟幼虫死亡率较低, 因此选取 5×10^5 CFU 用于正式试验的感染菌量。

未注射 pEC-N1203-2Af.1 的大蜡螟幼虫在注射 N1203-2Af 后 48 h 内死亡率高达 70% (图 3A), 空白对照组和噬菌体安全性检验组大蜡螟幼虫正常存活(图 3B、3C)。不同 MOI 条件下噬菌体对感染 N1203-2Af 的大蜡螟幼虫保护效率不同, MOI=100、MOI=1 和 MOI=0.01 组死亡率分别为 0%、20%和 30%, 48 h 内死亡率与 MOI 值呈正相关, 噬菌体保护组大蜡螟幼虫与空白对照组相比颜色略微发黑(图 3D-3F), Kaplan-Meier 分析显示, 感染组与噬菌体保护组(MOI=100、

MOI=1 和 MOI=0.01)间的大蜡螟幼虫存活率呈现显著差异($P < 0.05$, 图 3G)。

2.6 噬菌体基因组特征分析

噬菌体 pEC-N1203-2Af.1 基因组全长 77 334 bp, G+C 含量为 42.18%, 耐药基因数据库和毒力基因数据库比对显示该噬菌体未携带耐药基因和毒力因子。通过 BLASTn 比对, 该噬菌体与大肠杆菌噬菌体 NJ01、172-1 和 O18-11 同源片段一致性大于 95%, 其中 *Escherichia* phage O18-11 的同源片段一致性最高(NC_070985.1, query cover=83%, per. ident=96%)。上述大肠杆菌噬菌体均属于 Caudoviricetes 纲 Kuravirus 属成员, 根据国际病毒分类委员会(International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV)分类标准, 与现有噬菌体核酸序列超过 95%归类为相同种, 相似性大于 50%归类为相同属^[23]。因此认为噬菌体 pEC-N1203-2Af.1 属于 Kuravirus 属的一员, 这与其 C3 形态特征一致。

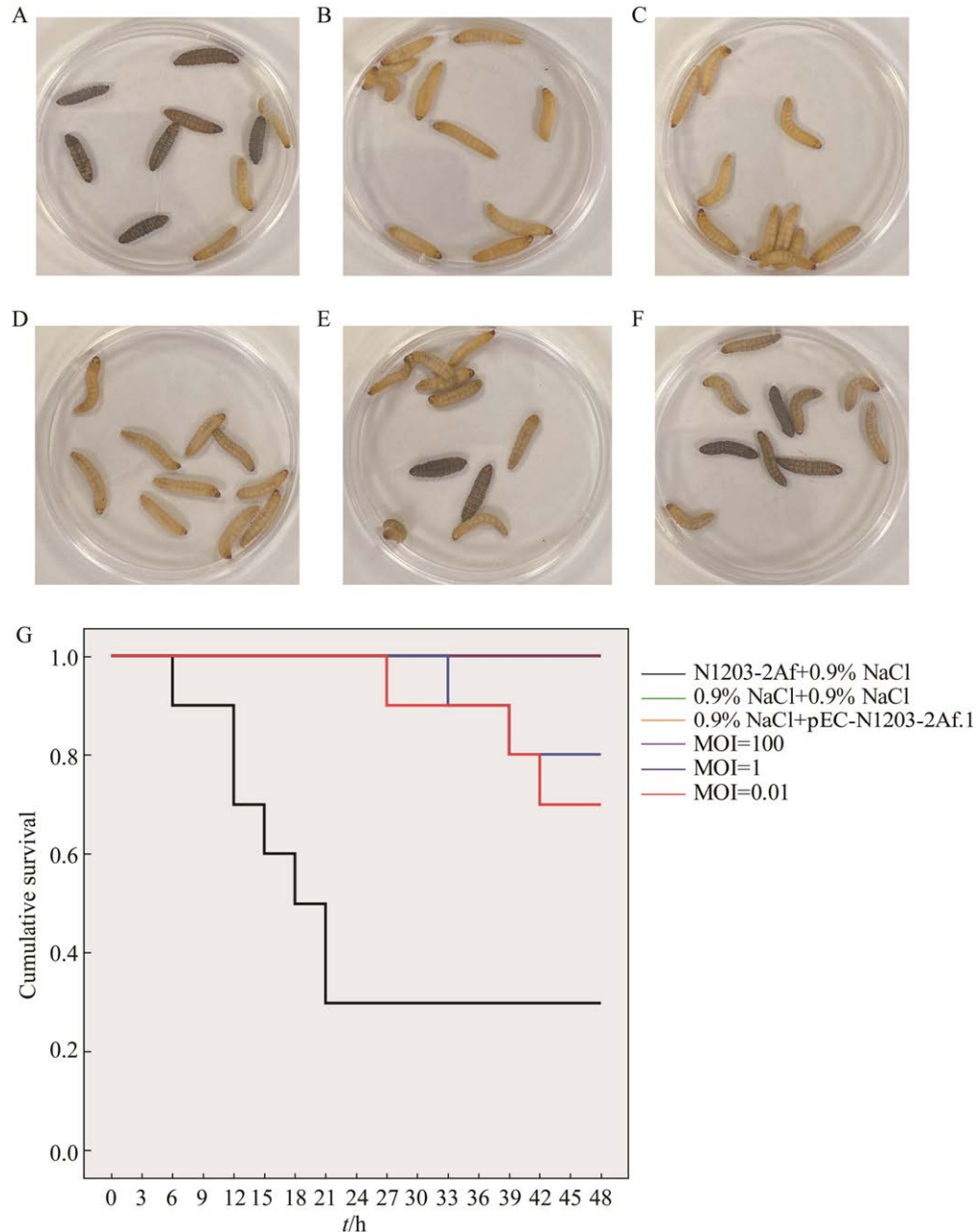


图3 噬菌体 pEC-N1203-2Af.1 对大蜡螟幼虫体内抑菌效果

Figure 3 Bacteriostatic effect of phage pEC-N1203-2Af.1 on the larvae of *Galleria mellonella*. A: The control was injected with N1203-2Af and physiological saline. B: Blank control, injection of physiological saline alone. C: Injected with physiological saline and phage. D: Injected N1203-2Af and phage (MOI=100). E: Injected N1203-2Af and phage (MOI=1). F: Injected N1203-2Af and phage (MOI=0.01). G: Survival curve of the larva of the *Galleria mellonella*.

根据功能基因预测,基因组包括4个已知的基因簇模块:(1)DNA复制与修饰模块,包括DNA解旋酶、DNA聚合酶、噬菌体整合酶、核酸外切

酶和自体运输粘附蛋白等基因;(2)DNA包装模块,包括噬菌体末端酶大亚基和噬菌体末端酶小亚基等基因;(3)裂解模块,包括裂解酶、穿孔素

和裂解转糖苷酶等基因；(4) 结构蛋白，包括噬菌体尾纤维蛋白、噬菌体门蛋白、噬菌体底板、噬菌体衣壳和支架等基因(图 4A)。基于噬菌体 pEC-N1203-2Af.1 基因组与 C3 形态大肠杆菌噬菌体 O18-11、NJ01、172-1、phiEco32，非大肠杆菌

宿主 C3 形态噬菌体 7-11、KSY1、Vb_PmiP-P59 基因组比对，pEC-N1203-2Af.1 与 C3 形态大肠杆菌噬菌体高度同源(query cover>80%, per. ident>95%)，与非大肠杆菌宿主菌 C3 形态噬菌体同源性较低(query cover<5%, per. ident<85%，图 4B)。

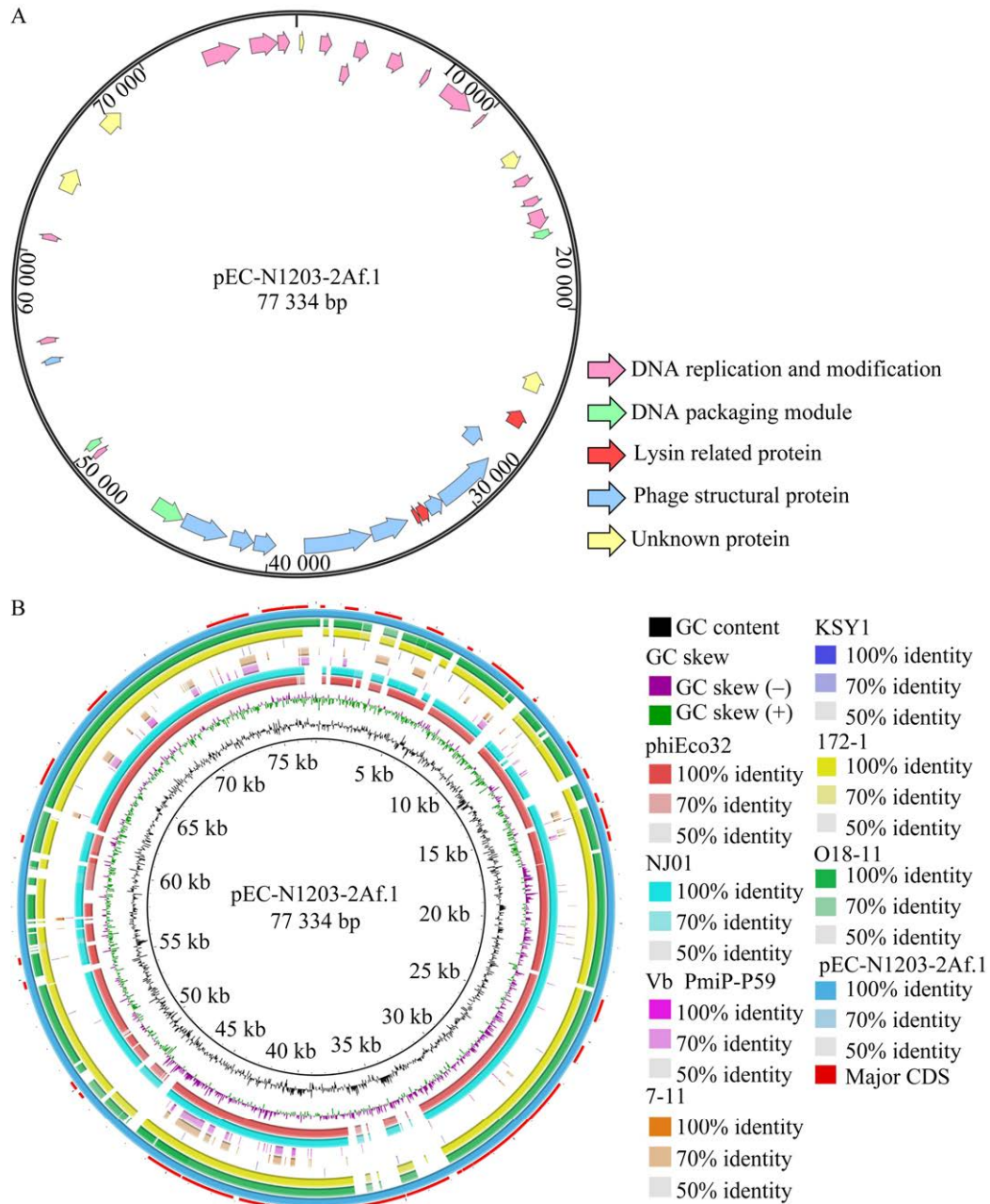


图 4 噬菌体 pEC-N1203-2Af.1 基因组结构与同源性比较

Figure 4 Phage pEC-N1203-2Af.1 genome and homology comparison of phage pEC-N1203-2Af.1. A: Genome structure of pEC-N1203-2Af.1; B: Whole genome sequence comparison of phage pEC-N1203-2Af.1 with seven C3 phages.

2.7 pEC-N1203-2Af.1 功能基因组特征分析

根据功能基因预测, 决定 pEC-N1203-2Af.1 C3 样形态与结构相关蛋白基因主要分布于 27 022–41 848 bp 碱基片段中。该片段由两部分组成, 第 1 部分为编码噬菌体头部蛋白的基因片段(38 281–41 848 bp); 其中 CDS63 和 CDS64 编码头部衣壳蛋白、CDS62 编码 Ig 结构域样蛋白、CDS61 编码连接蛋白, 其中 CDS63 与 Kuravirus 属中所有 C3 形态大肠杆菌噬菌体同源性很高(query cover>95%, per. ident>85%); 第 2 部分(27 022–38 271 bp)编码噬菌体尾部蛋白和裂解相关蛋白, 其中 CDS60、CDS59、CDS55、CDS54 和 CDS53 编码尾部蛋白, CDS57、CDS56 则为分别编码穿孔素(holin)和内溶素(endolysin)的裂解酶同源序列。GenBank 数据库中保存了 24 株携带该片段同源序列的噬菌体(query cover>50%, per. ident>80%), 这些噬菌体其中 13 株来源于亚洲, 它们主要集中在东亚和南亚地区(中国、印度、日本和韩国), 8 株来自于欧洲, 3 株来自于美洲(菌株信息 NMDCX0000212

储存在国家微生物科学数据中心, 链接为 <https://nmdc.cn/resource/attachment/detail/NMDCX0000212>)。本研究自东向西选取来自于东亚地区的 IME267 (中国)、172-1 (中国)和 vB_EcoP_YF01 (日本), 来自于中亚的 MN03 (孟加拉), 来自于亚欧交界处的 phiEco32 (格鲁尼亚), 来自中欧的 vB_EcoP-101114UKE3 (奥地利), 来自北欧的 vB_EcoP_SU7 (瑞典), 来自于南美洲的 vB_EcoP_EcoN5 (哥伦比亚)和来自于北美洲的 Paul (美国)共 9 株代表性噬菌体的同源序列(图 5)进行比较, 不同地区的长尾纤维蛋白显示出较低的同源性(query cover<40%, per. ident<85%)。

2.8 噬菌体全基因组系统发育树

基于 GenBank 数据库中记录的 C3 形态噬菌体核酸序列, 全基因组系统发育树进一步证实噬菌体 pEC-N1203-2Af.1 与处于同一进化分支的 Kuravirus 属大肠杆菌噬菌体 O18-11、LAMP、NJ01、172-1 和 MN05 亲缘关系最为密切(图 6)除 LAMP 来自欧洲外, 其余序列均来自亚洲, MN05 分离自印度, O18-11、NJ01 和 172-1 分离自中国。

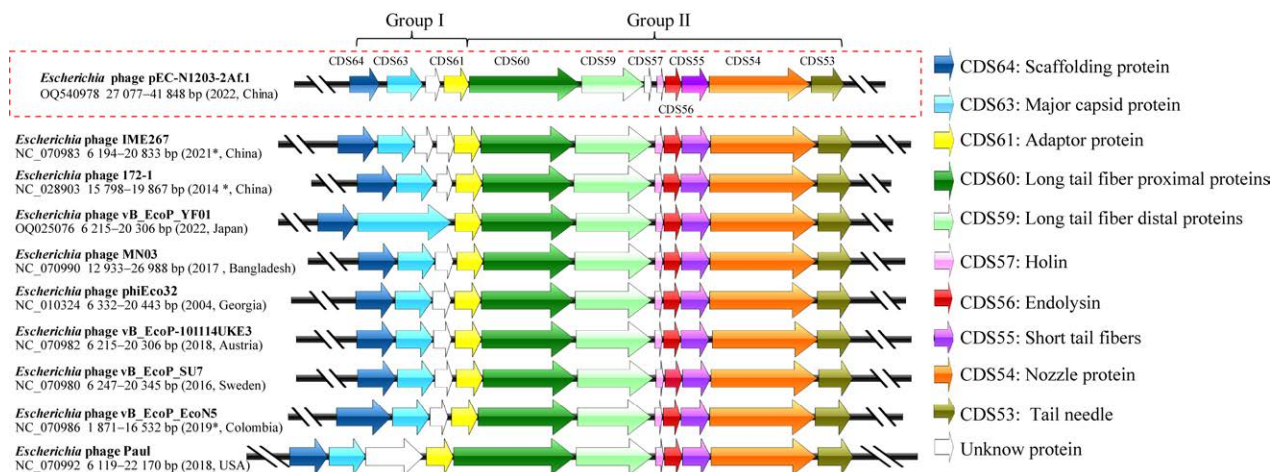


图 5 噬菌体 pEC-N1203-2Af.1 结构蛋白和裂解蛋白相关片段与 9 个相似序列的比较

Figure 5 Comparison of phage pEC-N1203-2Af.1 structural protein and lytic protein-related fragments with 9 similar sequences.

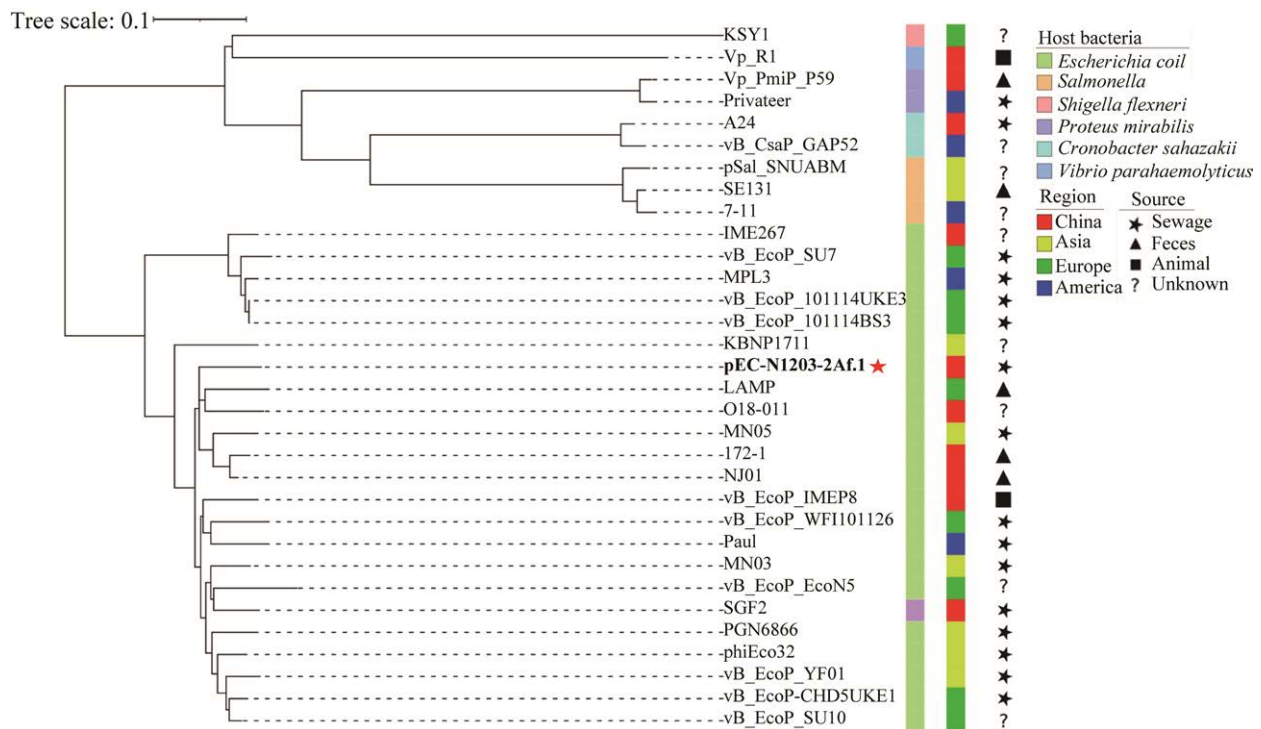


图 6 噬菌体 pEC-N1203-2Af.1 全基因组系统发育树

Figure 6 Phage pEC-N1203-2Af.1 whole-genome phylogenetic tree.

3 讨论与结论

噬菌体是地球生物圈中含量最丰富的生物实体, 几乎存在于各类生境中, 它们在调节细菌种群和物质循环等方面的作用至关重要^[24]。噬菌体能够特异性裂解其宿主菌, 该特性令噬菌体在后抗生素时代逐渐成为治疗细菌感染的研究热点^[25]。本研究以 15 株大肠杆菌为宿主菌, 从污水样本中获得 5 株大肠杆菌噬菌体, 其中 pEC-1203-2Af.1 属于 Kuravirus 属, 为罕见的 C3 形态短尾噬菌体(图 1B), 全基因组测序结果和全基因组进化树显示噬菌体 pEC-N1203-2Af.1 与中国分离的 *Escherichia* phage O18-011 相似度最高(query cover=83%, per. ident=96%, 图 6)。噬菌体 pEC-M1203-2Af.1 在 4–37 °C 保持稳定活性, 37 °C 时达到最高效价(图 2A), pH 值为 4.0–10.0 时保持稳定的活性, pH 值为 7.0 时达到

最高, 但在 70 °C 高温或 pH 值 2.0、pH 值 12.0 时失活(图 2B)。噬菌体是由蛋白质和核酸组成, 大多数蛋白质会在 60 °C 以上的温度下发生变性, 因此仅有少数噬菌体能在高温、强酸和强碱的极端环境下存活^[26]。噬菌体温度稳定性和蛋白质的折叠稳定性和蛋白质-蛋白质互作稳定性有关。噬菌体 φX174am3 突变体的耐高温可能是由突变区域的疏水性升高引起的^[27]。Kuo Hao Lee 等报道噬菌体对高温的耐受能力可能是它所在的高温环境导致衣壳蛋白的突变产生的, 突变可能加强了衣壳蛋白五聚体之间的相互作用, 从而稳定衣壳蛋白, 使噬菌体更耐高温^[28]。

噬菌体的体外抑菌试验显示, 不同 MOI 条件下(MOI=100、MOI=1 和 MOI=0.01), 6 h 内 pEC-N1203-2Af.1 抑菌效果良好, MOI=100 组抑菌效果最好, 在 9–12 h 时 OD_{595} 显著低于对照组、MOI=1 组和 MOI=0.01 组($P < 0.05$), 且在 24 h

内 OD_{595} 一直低于对照组(图 2D); 但 3 组噬菌体 OD_{595} 数值在 6 h 后均出现升高现象, 这可能是大肠杆菌 N1203-2Af 在噬菌体的压力下产生了抗性突变^[29]。细菌在受到噬菌体攻击时, 噬菌体受体基因发生突变使噬菌体受体的结构改变, 导致了噬菌体无法识别受体, 这是细菌对噬菌体产生抗性最简单最直接的方法^[30]。Alita R. Burmeister 等报道大肠杆菌通过突变外排泵蛋白和脂多糖基因从而对噬菌体 U136B 产生抗性^[31]。细菌也可以通过掩盖或阻断细菌表面噬菌体受体来阻断噬菌体黏附, F 质粒编码的蛋白 *TraT* 与大肠杆菌外膜孔蛋白 A 的表面暴露区域结合, 使噬菌体无法与之结合^[32]。噬菌体宿主防御系统是细菌预防或抑制噬菌体感染的分子途径, 目前已知最广泛的噬菌体防御系统是限制修饰(restriction-modification, R-M)系统, 它通过甲基转移酶在特定位点甲基化内源 DNA, 使内源 DNA 不被限制性核酸内切酶识别, 而外源的未修饰的 DNA 会被限制性核酸内切酶识别并将其切除^[33]。噬菌体衍生的噬菌体防御系统是由于噬菌体与其他噬菌体竞争, 而使宿主受益。噬菌体 T5 产生脂蛋白 *Llp* 可以将自身的受体外膜蛋白 *FhuA* 隐藏, 从而防止相同或密切相关的噬菌体的感染^[34]。

大蜡螟幼虫保护试验显示, 噬菌体安全性检验组大蜡螟幼虫在注射噬菌体 48 h 内未发生黑化和死亡(图 3C), 表明噬菌体具有良好的生物学安全性^[35]。噬菌体保护组试验中 MOI=100、MOI=1 和 MOI=0.01 组大蜡螟幼虫存活率分别为 100%、80%和 70% (图 3D-3F), 治疗效果与噬菌体数量呈正相关性, 表明高剂量噬菌体 pEC-N1203-2Af.1 应用于大肠杆菌 N1203-2Af 感染可能具有更好的治疗效果^[36]。MOI=100 条件下, 大蜡螟幼虫虽然未出现死亡, 但与空白对照组相比, 3-6 h 内大蜡螟幼虫体色略微黑化(图

3D), 6 h 后黑化情况不再明显变化。据报道大蜡螟幼虫免疫系统工作会产生黑色素导致感染细菌的大蜡螟幼虫黑化^[37]。结合一步生长曲线结果, 噬菌体 pEC-N1203-2Af.1 潜伏期低于 10 min (图 2C), 产生这种现象可能是由于感染大肠杆菌 N1203-2Af 的大蜡螟幼虫在注射噬菌体后, 高剂量的噬菌体在大蜡螟幼虫体内快速大量增殖, 短时间内消灭了大蜡螟幼虫体内的大部分细菌; MOI=100 保护组大蜡螟幼虫在 6 h 出现略微黑化, 可能是因为细菌的入侵启动了大蜡螟幼虫免疫系统工作, 6 h 后黑化情况不再明显变化可能是由于噬菌体消灭了大部分细菌后剩余的少量细菌也在 6 h 内被大蜡螟幼虫自身免疫系统清除; 体外抑菌结果显示大肠杆菌 N1203-2Af 在噬菌体作用后 6 h 以后会产生抗性菌, 而 MOI=100 噬菌体保护组在噬菌体和大蜡螟幼虫免疫系统的协同作用下很可能在 6 h 内就已经完全清除了大蜡螟幼虫体内的大肠杆菌, 避免了抗性菌的产生, 从而达到良好的大蜡螟幼虫保护效果。

CDS64 编码头部支架蛋白, 支架蛋白参与噬菌体的组装, 在大多数噬菌体中, 支架蛋白在组装完成后从衣壳中排出或被蛋白酶水解^[38]。CDS63 编码噬菌体 pEC-N1203-Af.1 的主要衣壳蛋白, 衣壳蛋白构成噬菌体头部的二十面体结构, 起到保护噬菌体 DNA 的作用^[39], CDS62 被预测为 Ig 结构域蛋白, 当前对其功能知之甚少。CDS61 编码连接蛋白, 即用于噬菌体的头部和尾部的蛋白结构^[40]。CDS60、CDS59、CDS55、CDS54 和 CDS53 编码噬菌体尾部蛋白, 其中 CDS64 和 CDS63 分别编码长尾纤维的近端蛋白和远端蛋白, 噬菌体通过长尾纤维附着在细菌表面, 这种噬菌体与宿主菌的初始结合是可逆的被称为初级结合, 初级结合的主要受体为细菌荚膜、脂多糖、磷壁酸和通道蛋白等^[41]。CDS55 编码短尾纤维蛋白, 短尾纤维蛋白与细菌表面的

次级受体结合是不可逆的,次级结合引起噬菌体向细菌注射 DNA^[42]。CDS54 编码喷嘴蛋白,喷嘴蛋白可以运输噬菌体 DNA 进入宿主菌;CDS53 编码尾针,尾针可以刺穿细菌外膜。C3 形态大肠杆菌噬菌体尾部蛋白相互配合将噬菌体 DNA 注入到大肠杆菌中,据报道 C3 噬菌体首先通过 6 根长尾纤维蛋白远端三聚体与大肠杆菌发生初级结合,使噬菌体的长轴垂直于大肠杆菌外膜。此时短尾纤维和喷嘴蛋白的构象发生改变,短尾纤维向细胞膜旋转与细菌发生不可逆的次级结合,而喷嘴蛋白伸直与短尾纤维蛋白交替形成喷嘴。尾针从喷嘴中突出刺穿大肠杆菌外膜,随后尾针脱落,打开噬菌体尾部通道。喷射蛋白从头部释放,形成一条穿过周质的通道,噬菌体 DNA 通过喷嘴被喷射到大肠杆菌细胞质中^[43]。编码裂解酶相关的 CDS 中,CDS57 编码穿孔素(holin),holin 可以调节细胞裂解的时间,因此被称为“裂解时钟”^[44]。CDS56 编码内溶素(endolysin),在 holin-endolysin 裂解途径中,holin 在细胞膜上形成微米级的孔后,内溶素从孔中释放出来裂解肽聚糖致使细菌裂解^[45]。

基于 GenBank 数据库的 C3 形态大肠杆菌噬菌体 pEC-N1203-2Af.1 全基因组分析表明,具有该形态的大肠杆菌噬菌体主要由亚洲地区分离报道,欧美地区则仅存在一小部分(图 6)。通过对比 9 条来自不同地区的 C3 形态噬菌体序列(携带与 pEC-N1203-2Af.1 结构与裂解蛋白相关基因结构同源片段,图 5),结果显示所有 C3 形态大肠杆菌噬菌体的主要头部蛋白基因序列与 CDS63 基因高度同源(query cover>95%, per. ident>85%),而长尾纤维蛋白基因序列同源性较低(query cover<40%, per. ident<85%)。一个可能的推测是,C3 型大肠杆菌噬菌体头部细长的形态可能与 CDS63 编码的主要头部蛋白有关,Mohammadali 等报道拥有细长的衣壳可能是一

种进化趋势,虽然细长的衣壳需要更多的能量进行繁殖,但可以容纳更大的基因组,更大的基因组可以包含更多的可以对抗细菌噬菌体耐药系统的基因^[46]。Marta Šiborová 等的研究指出,C3 形态的大肠杆菌噬菌体与大肠杆菌外膜受体的初始结合由长尾纤维介导,长尾纤维在其远端具有受体结合域^[43]。因此,C3 形态噬菌体在不同的环境压力下,与细菌受体结合相关的长尾纤维蛋白可能发生了适应环境的进化。

综上所述,本研究针对多重耐药大肠杆菌噬菌体 pEC-N1203-2Af.1 生物学特性及全基因组进行了系统分析,噬菌体 pEC-N1203-Af.1 具有罕见的 C3 形态,属于 Kuravirus 属,且具有较为稳定的生物学表型。pEC-N1203-2Af.1 与其他 10 株不同地区 C3 形态大肠杆菌噬菌体长尾纤维蛋白编码基因序列相似性很低,由于长尾纤维蛋白与识别宿主菌株密切相关,因此噬菌体在应对不同地区的宿主菌株时,可能存在多个不同的适应环境进化方向。而不同地区的噬菌体编码主要头部蛋白的基因序列相似性超过 80%,该基因可能是导致形成头部细长的 C3 型态噬菌体关键基因,明确该功能结构的生物学意义将为我们进一步研究并应用 C3 形态噬菌体提供重要科学依据。

参考文献

- [1] ALLOCATI N, MASULLI M, ALEXEYEV MF, DI ILIO C. *Escherichia coli* in Europe: an overview[J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2013, 10(12): 6235-6254.
- [2] ALIZADE H. *Escherichia coli* in Iran: an overview of antibiotic resistance: a review article[J]. Iranian Journal of Public Health, 2018, 47: 1-12.
- [3] WEINER LM, Webb AK, LIMBAGO B, DUDECK MA, PATEL J, KALLEN AJ, EDWARDS JR, SIEVERT DM. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections:

- summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011–2014[J]. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 2016, 37(11): 1288-1301.
- [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, 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).
- [5] LEDDA A, CUMMINS M, SHAW LP, JAUNEIKAITE E, COLE K, LASALLE F, BARRY D, TURTON J, ROSMARIN C, ANARAKI S, WAREHAM D, STOEISSER N, PAUL J, MANUEL R, CHERIAN BP, DIDELOT X. Hospital outbreak of carbapenem-resistant enterobacterales associated with a bla OXA-48 plasmid carried mostly by *Escherichia coli* ST399[J]. *Microbial Genomics*, 2022, 8(4): 000675.
- [6] LI Y, SUN QL, SHEN YB, ZHANG Y, YANG JW, SHU LB, ZHOU HW, WANG Y, WANG B, ZHANG R, WANG SL, SHEN ZQ. Rapid increase in prevalence of carbapenem-resistant enterobacteriaceae (CRE) and emergence of colistin resistance gene *mcr-1* in CRE in a hospital in Henan, China[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2018, 56(4): e01932-e01917.
- [7] SALAZAR KC, MA L, GREEN SI, ZULK JJ, TRAUTNER BW, RAMIG RF, CLARK JR, TERWILLIGER AL, MARESSO AW. Antiviral resistance and phage counter adaptation to antibiotic-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*[J]. *mBio*, 2021, 12(2): e00211-e00221.
- [8] HATFULL GF, DEDRICK RM, SCHOOLEY RT. Phage therapy for antibiotic-resistant bacterial infections[J]. *Annual Review of Medicine*, 2022, 73: 197-211.
- [9] DION MB, OECHSLIN F, MOINEAU S. Phage diversity, genomics and phylogeny[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2020, 18(3): 125-138.
- [10] SIMMONDS P, AIEWSAKUN P. Virus classification-where do you draw the line?[J]. *Archives of Virology*, 2018, 163(8): 2037-2046.
- [11] ACKERMANN H-W. 5500 Phages examined in the electron microscope[J]. *Archives of Virology*, 2007, 152(2): 227-243.
- [12] BARYLSKI J, ENAULT F, DUTILH BE, SCHULLER MB, EDWARDS RA, GILLIS A, KLUMPP J, KNEZEVIC P, KRUPOVIC M, KUHN JH, LAVIGNE R, OKSANEN HM, SULLIVAN MB, BIN JANG H, SIMMONDS P, AIEWSAKUN P, WITTMANN J, TOLSTOY I, BRISTER JR, KROPINSKI AM, et al. Analysis of spounaviruses as a case study for the overdue reclassification of tailed phages[J]. *Systematic Biology*, 2020, 69(1): 110-123.
- [13] SAVALIA D, WESTBLADE LF, GOEL M, FLORENS L, KEMP P, AKULENKO N, PAVLOVA O, PADOVAN JC, CHAIT BT, WASHBURN MP, ACKERMANN HW, MUSHEGIAN A, GABISONIA T, MOLINEUX I, SEVERINOV K. Genomic and proteomic analysis of phiEco32, a novel *Escherichia coli* bacteriophage[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2008, 377(3): 774-789.
- [14] LI YZ, CHEN MM, TANG F, YAO HC, LU CP, ZHANG W. Complete genome sequence of the novel lytic avian pathogenic coliphage NJ01[J]. *Journal of Virology*, 2012, 86(24): 13874-13875.
- [15] LAVYSH D, MEKLER V, KLIMUK E, SEVERINOV K. Regulation of gene expression of phiEco32-like bacteriophage 7-11[J]. *Viruses*, 2022, 14(3): 555.
- [16] CHOPIN A, DEVEAU H, EHRlich SD, MOINEAU S, CHOPIN MC. KSY1, a lactococcal phage with a T7-like transcription[J]. *Virology*, 2007, 365(1): 1-9.
- [17] CHEN L, LIU Q, FAN JQ, YAN TW, ZHANG HR, YANG JF, DENG D, LIU CL, WEI T, MA YF. Characterization and genomic analysis of ValSw3-3, a new *Siphoviridae* bacteriophage infecting *Vibrio alginolyticus*[J]. *Journal of Virology*, 2020, 94(10): e00066- e00020.
- [18] SOFY AR, EL-DOUGDOUG NK, REFAEY EE, DAWOUD RA, HMED AA. Characterization and full genome sequence of novel KPP-5 lytic phage against *Klebsiella pneumoniae* responsible for recalcitrant infection[J]. *Biomedicines*, 2021, 9(4): 342.

- [19] ESTRADA BONILLA B, COSTA AR, van den BERG DF, van ROSSUM T, HAGEDOORN S, WALINGA H, XIAO MF, SONG WC, HAAS PJ, NOBREGA FL, BROUNS SJJ. Genomic characterization of four novel bacteriophages infecting the clinical pathogen *Klebsiella pneumoniae*[J]. DNA Research, 2021, 28(4): dsab013.
- [20] PU MF, HAN PJ, ZHANG GY, LIU YC, LI YH, LI F, LI MZ, AN XP, SONG LH, CHEN YM, FAN HH, TONG YG. Characterization and comparative genomics analysis of a new bacteriophage BUCT610 against *Klebsiella pneumoniae* and efficacy assessment in *Galleria mellonella* larvae[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(14): 8040.
- [21] MEIER-KOLTHOFF JP, GÖKER M. VICTOR: genome-based phylogeny and classification of prokaryotic viruses[J]. Bioinformatics, 2017, 33(21): 3396-3404.
- [22] ACKERMANN H-W. Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000[J]. Archives of Virology, 2001, 146(5): 843-857.
- [23] ADRIAENSSENS E, BRISTER JR. How to Name and classify your phage: an informal guide[J]. Viruses, 2017, 9(4): 70.
- [24] DÍAZ-MUÑOZ SL, KOSKELLA B. Bacteria-phage interactions in natural environments[J]. Advances in Applied Microbiology, 2014, 89: 135-183.
- [25] KORTRIGHT KE, CHAN BK, KOFF JL, TURNER PE. Phage therapy: a renewed approach to combat antibiotic-resistant bacteria[J]. Cell Host & Microbe, 2019, 25(2): 219-232.
- [26] MUNSON-MCGEE J, SNYDER J, YOUNG M. Archaeal viruses from high-temperature environments[J]. Genes, 2018, 9(3): 128.
- [27] KADOWAKI KI, SHIBATA T, TAKEUCHI K, HIMENO M, SAKAI H, KOMANO T. Identification of a temperature-resistant bacteriophage X174 mutant[J]. Journal of General Virology, 1987, 68(9): 2443-2447.
- [28] LEE KH, MILLER CR, NAGEL AC, WICHMAN HA, JOYCE P, YTREBERG FM. First-step mutations for adaptation at elevated temperature increase capsid stability in a virus[J]. PLoS One, 2011, 6(9): e25640.
- [29] GORDILLO ALTAMIRANO F, FORSYTH JH, PATWA R, KOSTOULIAS X, TRIM M, SUBEDI D, ARCHER SK, MORRIS FC, OLIVEIRA C, KIELTY L, KORNEEV D, O'BRYAN MK, LITHGOW TJ, PELEG AY, BARR JJ. Bacteriophage-resistant *Acinetobacter baumannii* are resensitized to antimicrobials[J]. Nature Microbiology, 2021, 6(2): 157-161.
- [30] CHAPMAN-MCQUISTON E, WU XL. Stochastic receptor expression allows sensitive bacteria to evade phage attack. Part I: experiments[J]. Biophysical Journal, 2008, 94(11): 4525-4536.
- [31] BURMEISTER AR, FORTIER A, ROUSH C, LESSING AJ, BENDER RG, BARAHMAN R, GRANT R, CHAN BK, TURNER PE. Pleiotropy complicates a trade-off between phage resistance and antibiotic resistance[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2020, 117(21): 11207-11216.
- [32] RIEDE I, ESCHBACH ML. Evidence that TraT interacts with OmpA of *Escherichia coli*[J]. FEBS Letters, 1986, 205(2): 241-245.
- [33] TOCK MR, DRYDEN DT. The biology of restriction and anti-restriction[J]. Current Opinion in Microbiology, 2005, 8(4): 466-472.
- [34] PEDRUZZI I, ROSENBUSCH JP, LOCHER KP. Inactivation *in vitro* of the *Escherichia coli* outer membrane protein FhuA by a phage T5-encoded lipoprotein[J]. FEMS Microbiology Letters, 1998, 168(1): 119-125.
- [35] LIU D, van BELLEGHEM JD, de VRIES CR, BURGNER E, CHEN QQ, MANASHEROB R, ARONSON JR, AMANATULLAH DF, TAMMA PD, SUH GA. The safety and toxicity of phage therapy: a review of animal and clinical studies[J]. Viruses, 2021, 13(7): 1268.
- [36] WINTACHAI P, NAKNAEN A, THAMMAPHET J, POMWISED R, PHAONAKROP N, ROYTRAKUL S, SMITH DR. Characterization of extended-spectrum- β -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* phage KP1801 and evaluation of therapeutic efficacy *in vitro* and *in vivo*[J]. Scientific Reports, 2020, 10: 11803.
- [37] TSAI CJY, LOH JMS, PROFT T. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing[J]. Virulence, 2016, 7(3): 214-229.

- [38] CHANG JR, POLIAKOV A, PREVELIGE PE, MOBLEY JA, DOKLAND T. Incorporation of scaffolding protein gpO in bacteriophages P2 and P4[J]. *Virology*, 2008, 370(2): 352-361.
- [39] TAVARES P. The bacteriophage head-to-tail interface[M]//*Subcellular Biochemistry*. Singapore: Springer Singapore, 2018: 305-328.
- [40] AUZAT I, PETITPAS I, LURZ R, WEISE F, TAVARES P. A touch of glue to complete bacteriophage assembly: the tail-to-head joining protein (THJP) family[J]. *Molecular Microbiology*, 2014, 91(6): 1164-1178.
- [41] NOBREGA FL, VLOT M, de JONGE PA, DREESENS LL, BEAUMONT HJE, LAVIGNE R, DUTILH BE, BROUNS SJJ. Targeting mechanisms of tailed bacteriophages[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2018, 16(12): 760-773.
- [42] CASJENS SR, MOLINEUX IJ. Short noncontractile tail machines: adsorption and DNA delivery by podoviruses[M]//*Viral Molecular Machines*. Boston, MA: Springer US, 2011: 143-179.
- [43] ŠIBOROVÁ M, FÜZIK T, PROCHÁZKOVÁ M, NOVÁČEK J, BENEŠÍK M, NILSSON AS, PLEVKA P. Tail proteins of phage SU10 reorganize into the nozzle for genome delivery[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 5622.
- [44] REDDY BL, SAIER MH Jr. Topological and phylogenetic analyses of bacterial holin families and superfamilies[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 2013, 1828(11): 2654-2671.
- [45] CAHILL J, YOUNG R. Phage lysis: multiple genes for multiple barriers[J]. *Advances in Virus Research*, 2019, 103: 33-70.
- [46] KHAN MIRZAEI M, ERIKSSON H, KASUGA K, HAGGÅRD-LJUNGQUIST E, NILSSON AS. Genomic, proteomic, morphological, and phylogenetic analyses of vB_EcoP_SU10, a Podoviridae phage with C3 morphology[J]. *PLoS One*, 2014, 9(12): e116294.