



# 一株铅黄肠球菌噬菌体的生物学特性和全基因组分析

张洁琼<sup>1,2,3</sup>, 沈俊涛<sup>2,3</sup>, 莫洛菲<sup>2,3,4</sup>, 马迎飞<sup>2,3\*</sup>, 尤晓颜<sup>1\*</sup>

1 河南科技大学河南省食品微生物工程技术研究中心, 河南 洛阳 471023

2 中国科学院深圳先进技术研究院, 深圳合成生物学创新研究院, 中国科学院定量工程生物学重点实验室, 广东 深圳 518055

3 中国科学院深圳理工大学(筹), 合成生物学院, 广东 深圳 518055

4 中国科学院大学, 北京 100049

张洁琼, 沈俊涛, 莫洛菲, 马迎飞, 尤晓颜. 一株铅黄肠球菌噬菌体的生物学特性和全基因组分析. 微生物学报, 2022, 62(10): 4008–4018.

Zhang Jieqiong, Shen Juntao, Mo Luofei, Ma Yingfei, You Xiaoyan. Characterization of a novel phage specifically infecting *Enterococcus casseliflavus*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(10): 4008–4018.

**摘要:**【目的】铅黄肠球菌是医源感染的机会致病菌, 可引起危及生命的败血症、脑膜炎等, 但针对其噬菌体的研究尚属空白。噬菌体作为细菌病毒, 具有宿主特异性。本研究首次分离到可培养的铅黄肠球菌烈性噬菌体, 对其基因组序列的分析和其他特征研究为进一步探讨噬菌体与宿主的作用机制及治疗应用提供参考。【方法】噬菌体 Ecf\_virus\_SZ01 以健康人粪便中分离的铅黄肠球菌(DO55)作为宿主菌, 分离自深圳市南山区未经处理的生活污水样本, 利用透射电镜观察噬菌体形态并对其生物学特征和基因组特点进行研究。【结果】透射电镜显示, 噬菌体 Ecf\_virus\_SZ01 头部直径约为 106 nm, 尾部直径约为 150 nm, 尾长且无伸缩性尾鞘, 属长尾噬菌体科; 该噬菌体的最佳感染复数为 0.01; 一步生长曲线显示, 潜伏期约为 30 min, 每个受感染细胞产生子代的平均数量为 50 PFU/cell; 抑菌曲线显示 MOI=0.01 时对宿主菌具有很好的抑制效果; 宿主特异性强, 不能实现跨属侵染; 测序结果显示其基因组为 dsDNA, 长度为 59 409 bp, GC 含量为 43.2%; 该噬菌体共有 102 个开放阅读框, BLASTn 比对显示该噬菌体与 NCBI 数据库中其他噬

**基金项目:** 国家重点研发计划(2018YFA0903100); 中国科学院战略性先导 B 培育项目(XDPB18); 国家自然科学基金(31200035)

Supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFA0903100), by the Strategic Priority Research Program of the Chinese Academy of Sciences (XDPB18) and by the National Natural Science Foundation of China (31200035)

\*Corresponding authors. E-mail: YOU Xiaoyan, xiaoyanyou@haust.edu.cn; MA Yingfei, yingfei.ma@siat.ac.cn

Received: 25 February 2022; Revised: 27 March 2022; Published online: 10 June 2022

菌体相似性极低。【结论】首次分离到宿主为铅黄肠球菌的噬菌体, 具有潜伏期短、裂解能力强、宿主专一的特征, 基因组与数据库中现有噬菌体相比十分新颖, 并对其生物学特性和基因组进行了分析。

**关键词:** 铅黄肠球菌; 噬菌体; 生物学特性; 基因组分析; 比较基因组学; 分类学

## Characterization of a novel phage specifically infecting *Enterococcus casseliflavus*

ZHANG Jieqiong<sup>1,2,3</sup>, SHEN Juntao<sup>2,3</sup>, MO Luofei<sup>2,3,4</sup>, MA Yingfei<sup>2,3\*</sup>, YOU Xiaoyan<sup>1\*</sup>

1 Henan Engineering Research Center of Food Microbiology, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, Henan, China

2 CAS Key Laboratory of Quantitative Engineering Biology, Shenzhen Institute of Synthetic Biology, Shenzhen Institute of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, Guangdong, China

3 Institute of Synthetic Biology, Shenzhen Institute of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, Guangdong, China

4 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

**Abstract:** [Objective] *Enterococcus casseliflavus*, an opportunistic pathogen, could cause life-threatening sepsis and meningitis. Up to now, little has been known about the phage specifically infecting *E. casseliflavus*. The isolation, genomic analysis, and characterization of the *E. casseliflavus* phage can provide a reference for exploring the mechanism of interaction between phage and host and further applying the phage in therapy. [Methods] The phage Ecf\_virus\_SZ01 was isolated from untreated domestic sewage in Nanshan district, Shenzhen. We employed transmission electron microscopy (TEM) to observe the morphology of Ecf\_virus\_SZ01 and then studied its biological and genomic characteristics. [Results] Ecf\_virus\_SZ01 had a non-contractile tail with the length of 150 nm and a head with the diameter of 106 nm, belonging to the Siphoviridae family. The optimal multiplicity of infection (MOI) of the phage was 0.01. The one-step growth curve showed that the phage had an incubation period of about 30 min and the burst size of 50 PFU/cell. Ecf\_virus\_SZ01 inhibited the growth of host bacteria. Furthermore, the genome of Ecf\_virus\_SZ01 was 59 409 bp in length, which had the GC content of 43.2% and 102 open reading frames. Blastn comparison showed that this phage had low sequence similarity with other phages deposited in the NCBI database. [Conclusion] In this study, for the first time, we reported a phage that could specifically infect and lyse *E. casseliflavus*. Both the genomic and phylogenetic analyses indicated the novelty of this phage.

**Keywords:** *Enterococcus casseliflavus*; phage; biological characteristics; genomic analysis; comparative genomics; taxonomy

铅黄肠球菌(*Enterococcus casseliflavus*)是一种兼性厌氧的革兰氏阳性球菌, 属肠球菌第二群, 对万古霉素天然耐药, 在自然界的土壤、植物和动物中都有分布, 可在人类肠道中定殖<sup>[1]</sup>。

铅黄肠球菌是机会致病菌, 在免疫力低下人群体内可引发严重感染, 如主动脉瓣心内膜炎<sup>[2]</sup>, 内源性眼内炎<sup>[1]</sup>、肝移植术后并发肾周血肿败血症<sup>[3]</sup>以及感染中枢神经系统的细菌性脑膜炎<sup>[4]</sup>

等。肠球菌由于细胞壁坚厚,表现为多种抗生素固有耐药,在抗生素选择压力下可以通过基因突变或质粒接受外来基因获得耐药能力。在抗生素广泛应用的时代,耐药菌的不断衍生给临床治疗带来困难,噬菌体疗法作为抗生素替代性的治疗方法,引起相关的研究热潮。

噬菌体(phage)在自然界中广泛存在,能特异性地识别和裂解宿主菌,是一种来源于环境的天然抗菌剂,将其应用于细菌感染治疗已经有一百多年的研究历史<sup>[5]</sup>。在一定条件下,噬菌体疗法相比抗生素疗法具有独特的优势<sup>[6]</sup>:(1)噬菌体的宿主特异性使其感染特定种属细菌,不会破坏其他菌群;(2)噬菌体在自然界中数量极其丰富,因此在噬菌体治疗中可有多种选择;(3)噬菌体可随着细菌的进化而进化,产生可感染耐药菌的新噬菌体。随着抗生素在感染治疗中的副作用日益严峻,针对耐药菌感染,噬菌体已然成为应对抗生素耐药性细菌感染多维策略的一部分<sup>[7]</sup>。

在此之前,还未有铅黄肠球菌的噬菌体被分离到。本研究首次从环境中分离出铅黄肠球菌的烈性噬菌体,并对其生物学特性和基因组特征进行研究,为噬菌体应用于治疗铅黄肠球菌感染提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 噬菌体的分离和纯化

实验所用菌株 DO55 由实验室前期从健康人类粪便中分离。噬菌体 Ecf\_virus\_SZ01 分离自深圳市南山区污水厂未经处理的生活污水样本。污水样本在 10 000 r/min 转速下离心 10 min 除去杂质,取上清并用 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤。取 1 mL 培养至对数期( $OD_{600}=0.5$ )的宿主菌 DO55 加入 7 mL 滤液和 4 mL 3 倍 BHI 新鲜液体培养基混匀,37  $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 条件下培养过夜。培养过

夜的噬菌体富集液用离心机在 12 000 r/min 转速下离心 5 min,取上清用 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜进行过滤。滤液使用 SM 缓冲液进行梯度稀释,在每个稀释梯度下用 100  $\mu\text{L}$  滤液和 400  $\mu\text{L}$  宿主菌混合孵育,并用双层平板法测定噬菌体效价。噬菌体的纯化采用双层平板法,挑选单个噬菌斑进行培养,重复以上操作,3 轮纯化将获得单一噬菌体,平板上的噬菌斑特征一致。噬菌体的裂解液和 50%灭菌甘油 1:1 混合,-80  $^{\circ}\text{C}$  保存,新鲜裂解液置于 4  $^{\circ}\text{C}$  保存<sup>[8]</sup>。

### 1.2 噬菌体最佳感染复数的测定

噬菌体最佳感染复数测定宿主细胞裂解子代噬菌体的数量<sup>[8]</sup>,将噬菌体( $3.5\times 10^8$  PFU/mL)和培养至对数期的宿主菌( $3\times 10^8$  CFU/mL)按照 0.001、0.01、0.1、1、10、100 比例混合,37  $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养 6 h,用双层平板法测定最终噬菌体滴度,效价最高的即为噬菌体的最佳感染复数(multiplicity of infection, MOI), $\text{MOI}=\text{噬菌体颗粒数}/\text{宿主细菌个数}$ 。

### 1.3 噬菌体一步生长曲线的测定

一步生长曲线测定<sup>[8]</sup>利用噬菌体的潜伏期时长和暴发量的大小表征。取 1 mL 培养至对数期的宿主菌,加入噬菌体裂解液使其 MOI 约等于 0.01,混匀,37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min,10 000 r/min 离心 1 min,去上清,沉淀用 10 mL 新鲜 BHI 培养基进行重悬,37  $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 振荡培养。在 0、10、20、30、45、60、75、90、120、150 min 时间点取样。样品进行梯度稀释后,采用双层平板法 37  $^{\circ}\text{C}$  培养过夜,对噬菌斑计数,计算噬菌体效价,绘制一步生长曲线。

### 1.4 噬菌体抑菌曲线的测定

将过夜培养的宿主菌按 5%接种量转接到 10 mL 新鲜 BHI 液体培养基中培养至对数期,与噬菌体裂解液按照不同感染复数(MOI 为 100、10、1、0、0.1、0.01)分别按比例混合均

匀, 37 °C 条件下振荡培养, 每 15 min 测量 1 次  $OD_{600}$  处的吸光值<sup>[8]</sup>, 共测量 6 h。

### 1.5 噬菌体透射电镜观察

噬菌体的形态用透射电镜(transmission electron microscope, TEM)进行观察。选择效价约  $10^8$  (PFU/mL)的噬菌体裂解液滴取 10  $\mu$ L 覆于铜网碳膜, 正面静置 5 min 后用滤纸吸走多余样本, 再用 2% (W/V)磷钨酸染色液 10  $\mu$ L 滴于铜网正面负染 1 min, 将铜网放置在滤纸上自然干燥。使用 JEM-F200 场发射透射电镜观察噬菌体形态。

### 1.6 噬菌体基因组提取和测序

取噬菌体裂解液 20 mL, 加入 PEG8000 (终浓度 10%) 和 NaCl (终浓度 1.0 mol/L) 进行沉淀, 4 °C 静置 16 h, 10 000 r/min 离心 20 min 获得沉淀, 用 400  $\mu$ L SM 缓冲液 (Tris-HCl/MgSO<sub>4</sub>/NaCl/H<sub>2</sub>O, pH 7.5) 对噬菌体沉淀进行重悬。重悬样品再加入 8 U DNase I、20 U 的 RNase A、40  $\mu$ L 的 10 倍 DNA 缓冲液(生工生物工程(上海)股份有限公司)混匀, 37 °C 温浴 1 h 进行酶消化。处理后的样本使用 MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit Ver.5.0 (TaKaRa) 试剂盒提取基因组。提取的基因组浓度使用 Qubit 荧光计 (Thermo Fisher Scientific) 进行荧光定量。

全基因组文库构建使用 Nextera™ DNA Library Preparation Kits (Illumina) 文库制备试剂盒, 用 Qubit 进行文库浓度定量, 并用 Agilent 4150 TapeStation 系统进行文库构建质量检验。文库样本使用 Illumina MiSeq 测序平台进行测序。测序结果使用软件 SPAdes<sup>[9]</sup> 进行拼接组装。

### 1.7 噬菌体基因组功能注释

用 Prodigal v2.63 软件<sup>[10]</sup> 预测 Ecf\_virus\_SZ01 基因组上编码的开放阅读框, 并使用 Pfam (<http://pfam.xfam.org/>) 数据库<sup>[11]</sup> 对预测的开放阅读框进行注释, 注释结果手动校正并分类,

使用在线工具 CGview Sever<sup>BETA</sup> (<http://cgview.ca/>) 对基因组注释结果进行可视化<sup>[12]</sup>。利用在线网站 RGI (Resistance Gene Identifier: <https://card.mcmaster.ca/analyze/rgi>) 预测基因组上的抗性基因<sup>[13]</sup>, 采用在线网站 tRNAscan-SE (<http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/>) 进行了基因组上 tRNA 预测<sup>[14]</sup>。

### 1.8 噬菌体比较基因组分析

参考美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI) 病毒数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/virus/vssi/#/>) 对 Ecf\_virus\_SZ01 基因组进行 BLASTn 比对, 比较其基因组序列相似性。使用软件 MAUVE2.0 对噬菌体基因组同源性进行分析, 线段相连表示保守基因所在同源性区域<sup>[15]</sup>。

### 1.9 噬菌体系统发育分析

通过 BLASTp 对 Ecf\_virus\_SZ01 的衣壳蛋白、门户蛋白和末端酶大亚基氨基酸序列进行同源性比对, 筛选来自 Siphoviridae 家族的同源蛋白并利用 MEGA 5.0 软件构建系统进化树, 分析噬菌体的进化趋势。氨基酸序列对齐方式选择 ClustalW 多重比对<sup>[16]</sup>, 建树方法采用邻接法并进行 1 000 次 bootstrap 检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 噬菌体 Ecf\_virus\_SZ01 生物学特性

从深圳市南山区生活污水中分离到 1 株以铅黄肠球菌(DO55)为宿主菌的噬菌体, 命名为 Ecf\_virus\_SZ01。噬菌斑在 BHI 双层平板上呈现出圆形的透明斑块, 边界清晰, 直径平均为 0.15 mm, 无外部晕圈(图 1A)。噬菌体经 2% 磷钨酸染色后, 透射电镜观察显示其形态整体为蝌蚪形, 头部扁长(图 1B), 直径约为 106 nm, 尾部长度约为 150 nm, 尾部较长, 无可伸缩性尾鞘, 属于长尾噬菌体科。

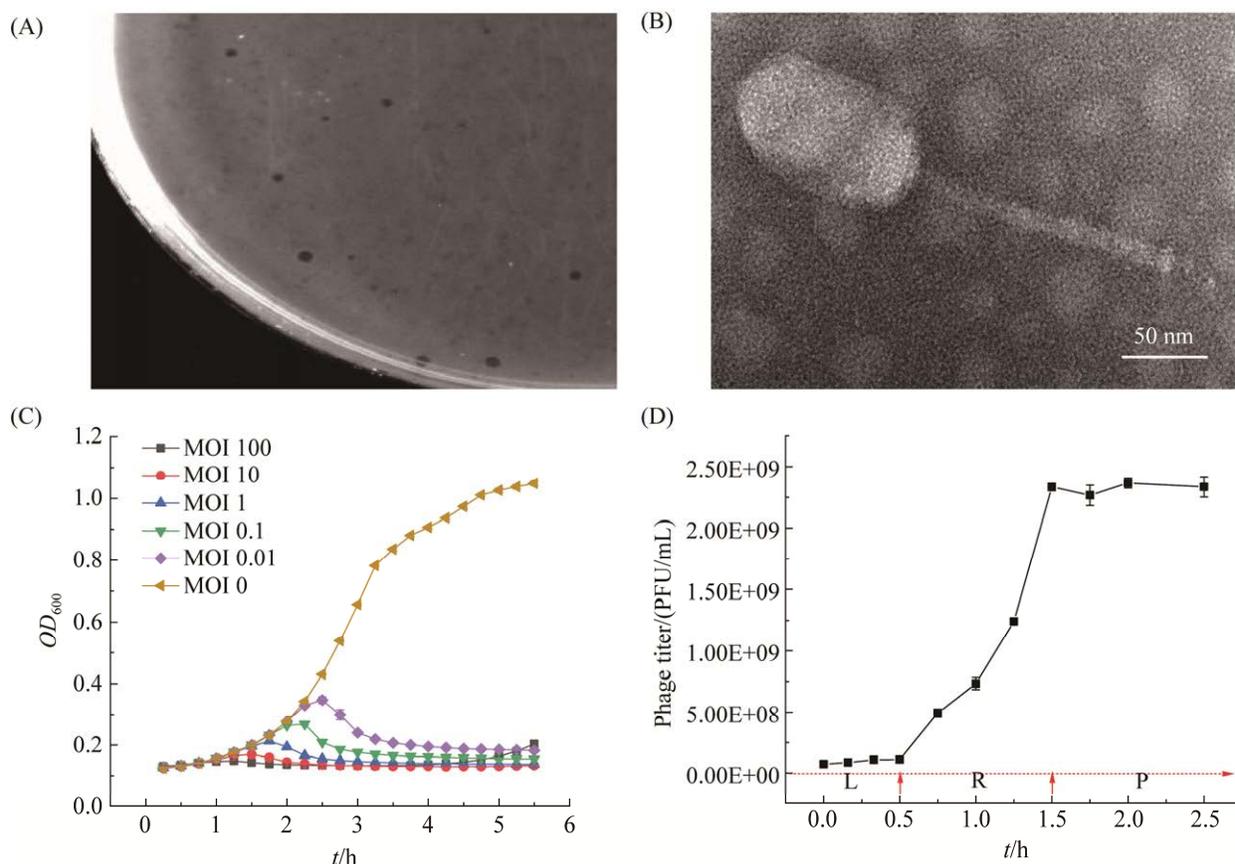


图 1 噬菌体 Ecf\_virus\_SZ01 生物学特性

Figure 1 The characteristics of phage Ecf\_virus\_SZ01. A: plaque morphology of phage; B: transmission electron microscopy (TEM) image of phage; C: growth inhibition curve of phage; D: one-step growth curve of phage. L: latent period; R: lytic period; P: stable period.

将噬菌体与宿主菌 MOI (100、10、1、0.1、0.01) 比例混合培养 6 h, 测定不同感染复数下的噬菌体效价, 当感染复数 MOI 为 0.01 时, 培养的噬菌体效价最高(表 1)。噬菌体一步生长曲线用来展示噬菌体在细胞中的生命周期, 包括潜伏期、裂解期和稳定期。噬菌体和宿主菌以最佳感染复数 0.01 比例混合测定一步生长曲线(L: 潜伏期, R: 裂解期, P: 稳定期), 结果显示其潜伏期约为 30 min, 每个受感染细胞产生子代的平均数量为 50 PFU/cell (图 1D); 在实验时间内随着 MOI 增高, 噬菌体对宿主菌的抑制作用依次增强, 在 MOI=100 时宿主菌几乎不再生长(图 1C)。

## 2.2 噬菌体 Ecf\_virus\_SZ01 基因组特征

噬菌体 Ecf\_virus\_SZ01 测序结果显示, 基因组为线性双链 DNA, 基因组长度为 59 409 bp, GC 含量为 43.2%。基因组核酸序列经 BLASTn

表 1 噬菌体最佳 MOI 测定

Table 1 Multiplicity of infection (MOI)

	Bacterial concentration/ (CFU/mL)	Phage concentration/ (PFU/mL)	Multiplicity of infection (MOI)	6 h titer/ (PFU/mL)
1	$10^8$	$10^5$	0.001	$2.4 \times 10^9$
2	$10^8$	$10^6$	0.01	$6.4 \times 10^9$
3	$10^8$	$10^7$	0.1	$3.2 \times 10^9$
4	$10^8$	$10^8$	1	$1.5 \times 10^9$
5	$10^7$	$10^8$	10	$2.0 \times 10^8$

比对,与数据库中可培养的噬菌体基因组相似性均较低。在覆盖度 2%情况下,核酸相似性在 70%以上的噬菌体序列仅有 4 条,均是宿主为肠球菌的噬菌体分别为 EfsWh\_1 (MN871443.1)、EfsWh-1 (MH791415.1)、vB\_EfaS\_Ef7.1 (MK721194.1) 与 vB\_EfaS\_EF1c55 (MN103542.1),表明噬菌体 Ecf\_virus\_SZ01 基因组序列新颖性很高。Pradigal 软件预测其基因组序列共编码 102 个开放阅读框,不含编码 tRNA 的基因,与任何已知的抗生素抗性基因或毒力基因没有显著的相似性,绝大部分基因转录方向为正向,有 18 个基因位于负链。

### 2.3 噬菌体 Ecf\_virus\_SZ01 功能注释

对噬菌体 Ecf\_virus\_SZ01 的基因组进行功

能注释,经 BLASTp 比对只有 34 个开放阅读框 (open reading frames, ORFs) 编码已知功能蛋白,另外 68 个 ORFs 编码假设蛋白和未知功能蛋白。在线工具 tRNAscan-SE 预测其基因组上无 tRNA 存在,对 68 个未知的 ORFs 进行分类,其中 46 个为假设蛋白,22 个编码未知功能的蛋白。34 个已知功能的 ORFs 依据注释结果进行分类,可分为与噬菌体结构相关蛋白(9 个 ORFs)、包装蛋白(3 个 ORFs)、宿主裂解相关蛋白(3 个 ORFs)、噬菌体 DNA 复制和代谢相关蛋白(6 个 ORFs)以及其他与噬菌体和宿主生命活动有关的功能蛋白(13 个 ORFs)。这些蛋白互相配合,完成噬菌体复制、裂解宿主释放子代的过程(图 2)。

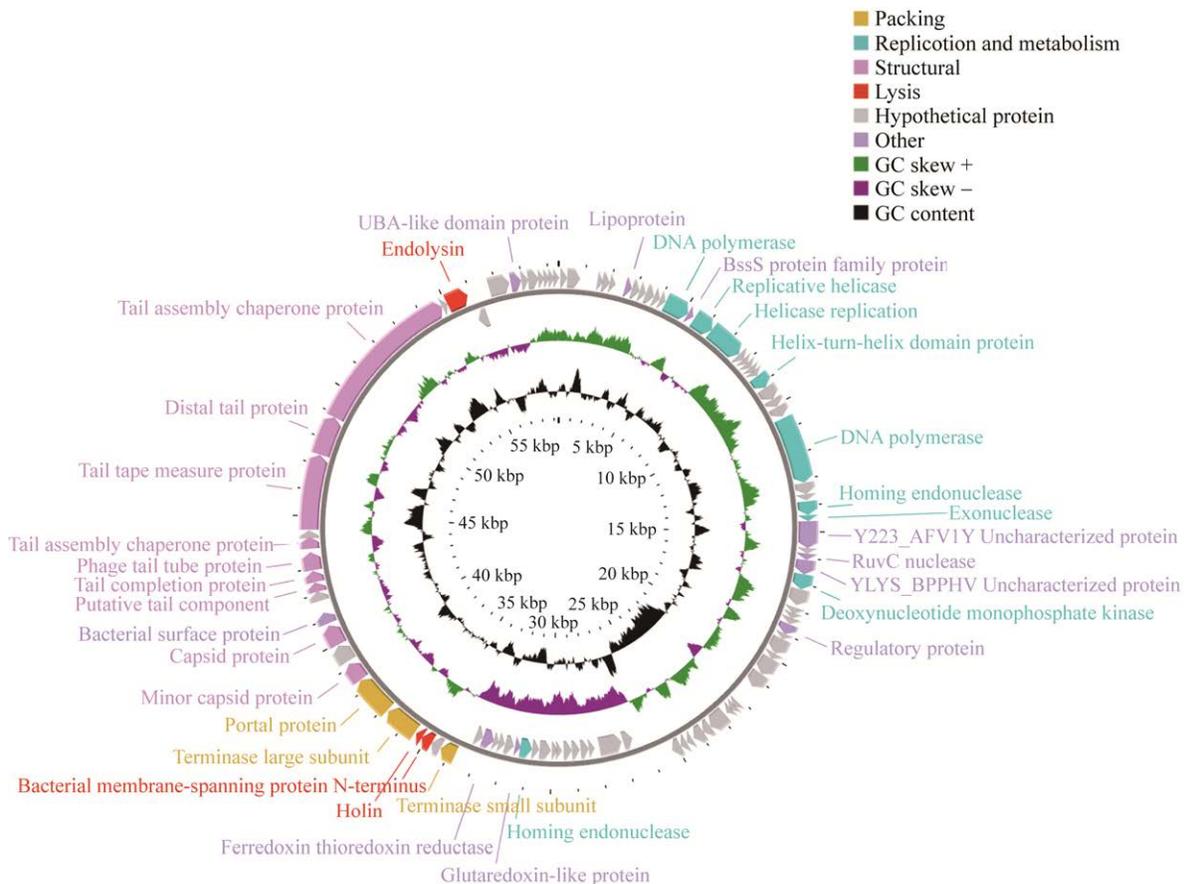


图 2 噬菌体 Ecf\_virus\_SZ01 基因组功能注释

Figure 2 Genome annotation of phage Ecf\_virus\_SZ01.

结构蛋白：在噬菌体结构相关蛋白中，ORF78 和 ORF80 编码衣壳蛋白，ORF84–ORF91 编码噬菌体尾部结构蛋白，分别为假定的尾部蛋白(ORF84)、尾部完成蛋白(ORF85)、尾管蛋白(ORF86)、尾巴组合伴侣蛋白(ORF87)、尾部远端蛋白(ORF90)、尾部卷尺蛋白(ORF89)为噬菌体尾部卷尺蛋白，决定噬菌体尾部长度的，尾部组合伴侣蛋白(ORF91)是与噬菌体尾部组装有关的伴侣蛋白。

DNA 包装：在噬菌体 *Ecf\_virus\_SZ01* 中与子代包装相关的蛋白有 3 个，分别为末端酶小亚基(ORF72)、末端酶大亚基(ORF76)、门户蛋白(ORF77)，它是有尾 dsDNA 噬菌体衣壳组装的调配器。

宿主裂解相关蛋白：有 3 个与裂解相关的蛋白，分别为 holin (ORF75)、endolysin (orf93) 和细菌跨膜蛋白 N 端(ORF74)，holin 和 endolysin 这 2 个蛋白是噬菌体裂解宿主所必需的，endolysin 降解细菌细胞壁，holin 控制裂解噬菌体感染周期的长短，噬菌体裂解宿主菌释放子代过程是由 holin- endolysin 互相配合来完成，从而实现从内到外裂解宿主菌<sup>[17]</sup>。

噬菌体 DNA 复制和代谢相关蛋白：DNA 复制和修饰相关的蛋白有 6 个，包含 2 个 DNA 聚合酶(ORF13, ORF26)、2 个复制解旋酶(ORF15, ORF16)、1 个核酸外切酶(ORF30)、1 个螺旋-转角-螺旋 DNA 结合结构域(ORF22)，其中 ORF22 是转录因子中最普遍存在的基序之一，它是转录调控的基础<sup>[18]</sup>；与噬菌体代谢相关的是 3 个蛋白，包含 2 个归巢核酸内切酶(ORF29, ORF65)，它们参与 DNA 内含子的水平转移和基因表达的调控<sup>[19]</sup>，1 个脱氧核苷酸磷酸激酶(ORF35)，它可以使 5-hydroxymethyl-

dCMP 发生磷酸化，是子代噬菌体形成 DNA 基因组的重要一步。

其他相关蛋白：细菌表面蛋白(ORF81)是噬菌体识别细菌表面受体的蛋白，YLYS\_BPPHV uncharacterized protein (ORF34) 和调节蛋白(ORF40)调控噬菌体对宿主感染，UBA-like 结构域(ORF96)为细胞凋亡的信号分子，类谷氨还原蛋白(ORF66)是噬菌体核糖核苷酸还原酶的还原剂，是许多病毒生命周期中的一种重要酶<sup>[20]</sup>。其余的一些蛋白可能来源于宿主，如脂蛋白(ORF7)与宿主代谢有关，BssS 家族蛋白(ORF14)用来调控生物膜的形成，RuvC 核酸酶(ORF33)编码在 Cas9 蛋白切割单链 RNA 区域，铁氧硫氧还原蛋白还原酶(ORF70)则与核孔形成有关。

## 2.4 噬菌体 *Ecf\_virus\_SZ01* 比较基因组分析

将该噬菌体基因组与 NCBI Virus 数据库中序列完整且宿主来源为细菌的长尾噬菌体科噬菌体全基因组序列进行同源性比对。结果显示，该噬菌体与已知的噬菌体序列覆盖率为 1%–2%，覆盖率较低，且同源片段的相似性低于 80%。将覆盖度在 2%、同源片段相似性在 70%以上的 4 株宿主是粪肠球菌的噬菌体的全基因组序列和噬菌体 *Ecf\_virus\_SZ01* 全基因组进一步用 MAUVE2.0 软件进行基因组同源序列分析，结果如图 3 所示。每个噬菌体基因组都是水平排列，以中心黑线为基准线，以 *Ecf\_virus\_SZ01* 基因组为参考基因组，黑线以上为与参考基因组同向序列，黑线以下为反向互补序列，各个颜色局部共线块的共线区域(LCBs)代表不同的同源区域。从图 3 整体来看，噬菌体 *Ecf\_virus\_SZ01* 与其他 4 株粪肠球菌噬菌体的基因组长度基本相同，但差异基因较多，大部分

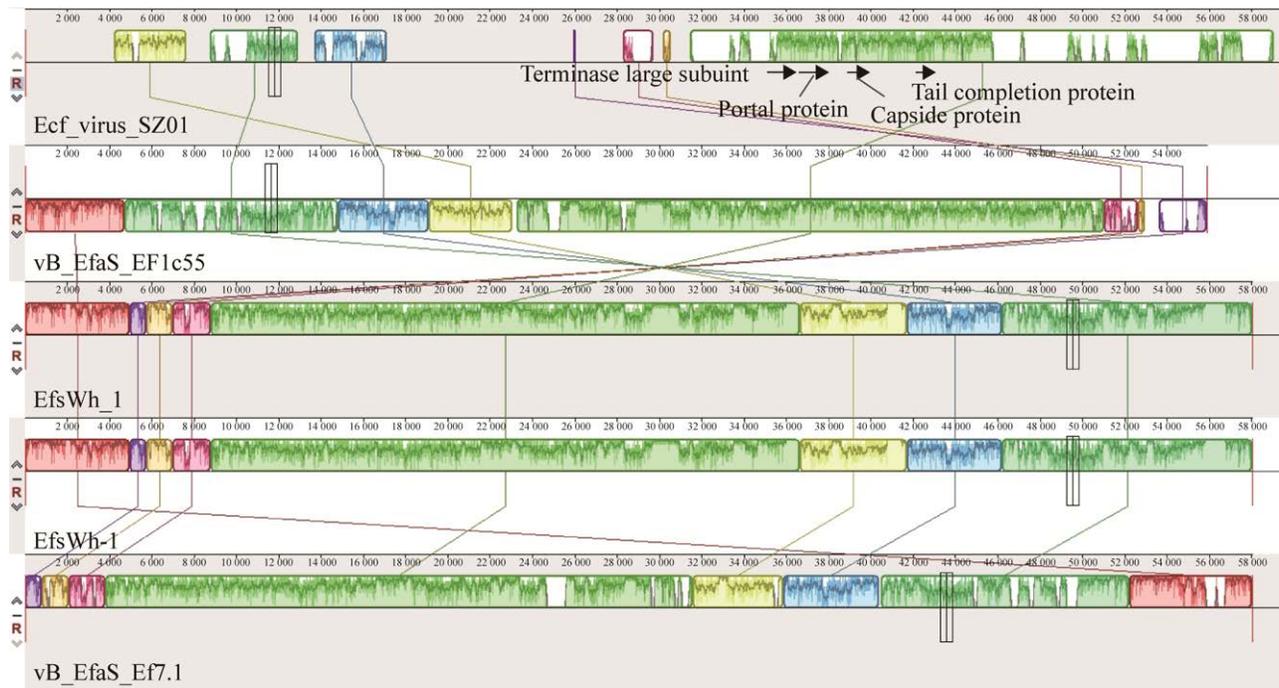


图3 噬菌体 *Ecf\_virus\_SZ01* 与近缘噬菌体基因组之间的同源性分析

Figure 3 Homology analysis between the genomes of phage *Ecf\_virus\_SZ01* and its relatives.

基因相似性均较低, 仅有少部分基因具有同源关系且同源基因所在区域的位置、长度以及丰度均有较大不同, 表明其新异性很高。噬菌体 *Ecf\_virus\_SZ01* 与 4 株肠球菌噬菌体在基因组结构分布上共存在 5 个同源区块, 存在规律的模块基因分布, 在进化过程中这些区域属于较为保守区域, 编码蛋白质的功能较为一致。进一步研究其中比重最大的共线区域, 此区域编码的功能蛋白主要包括噬菌体衣壳蛋白 (ORF91)、尾部蛋白 (ORF85) 和末端酶大亚基 (ORF76) 等, 为包装蛋白和结构蛋白所在模块, 基因的大小和方向均有差异, 且相似性也较低, 证明该噬菌体为 1 株新的噬菌体。

### 2.5 噬菌体 *Ecf\_virus\_SZ01* 系统进化分析

BLASTn 分析显示, *Ecf\_virus\_SZ01* 基因组与数据库中目前已发表的噬菌体同源性较

低, 且经电镜观察其为长尾噬菌体科, 为了明确进化关系, 选择长尾噬菌体保守序列编码的衣壳蛋白 (orf80)、门户蛋白 (orf77) 和末端酶大亚基 (orf76) 的氨基酸序列使用 MEGA 5.0 中的邻接法构建系统发育树 (图 4)。

将挑选的蛋白序列在 NCBI Virus 数据库中进行 BLAST, 选择属于长尾噬菌体科的同源蛋白质序列。门户蛋白和末端酶大亚基的进化树显示噬菌体 *Ecf\_virus\_SZ01* 与肠球菌属噬菌体亲缘关系较近, 衣壳蛋白、门户蛋白和末端酶大亚基的系统进化树均显示, 虽然 3 个系统进化树存在一定差异, 但噬菌体 *Ecf\_virus\_SZ01* 与分析中包含的其他噬菌体进化关系均较远, 且图中所示噬菌体均为长尾噬菌体。基于这些结果认为, 噬菌体 *Ecf\_virus\_SZ01* 应该属于有尾噬菌体目长尾噬菌体科的一个新的噬菌体。

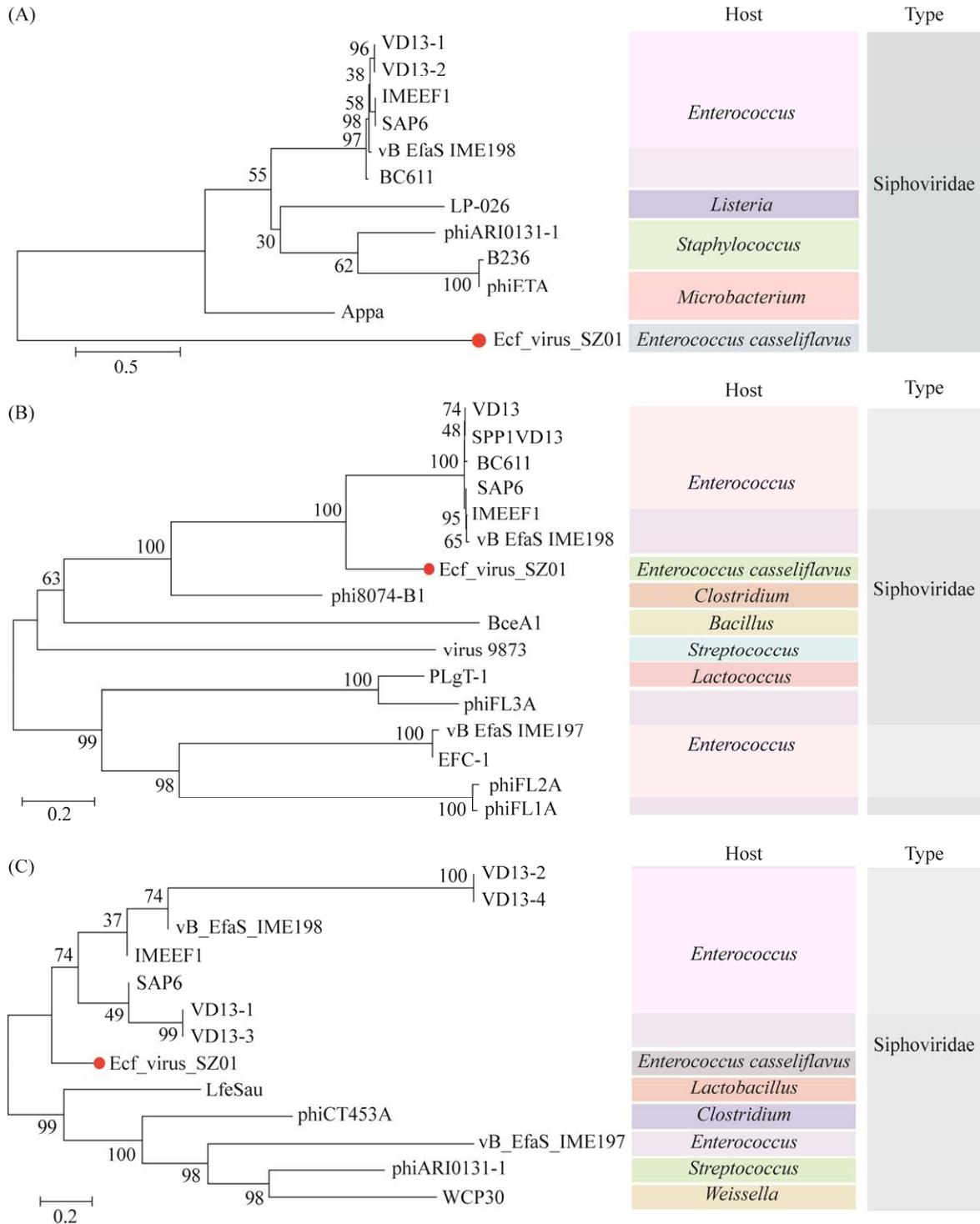


图 4 噬菌体 Ecf\_virus\_SZ01 进化关系分析

Figure 4 Phylogenetic relationships of phage Ecf\_virus\_SZ01. A: phylogenetic tree of the capsid protein; B: phylogenetic tree of the portal protein; C: phylogenetic tree of the terminase large subunit. The color part is the host source of phage, and the gray part represent the Siphoviridae family. Scale: the genetic distance. Branch number: the confidence level.

### 3 讨论与结论

铅黄肠球菌作为老年人以及免疫力低下的患者医院和社区多种侵入性感染的感染源而被研究。相比于革兰氏阴性菌, 治疗耐药革兰氏阳性球菌的选择范围更少, 人类感染铅黄肠球菌后由于其固有的万古霉素耐药性, 其治疗方式是需要解决的主要问题之一, 也使得发展抗生素替代和补充治疗更为紧迫。自抗生素首次应用于临床以来, 细菌对抗生素的耐药性一直以来都是研究人员的重大挑战。噬菌体用于人体治疗具有一百多年的历史, 胃肠道、呼吸道、尿路感染以及伤口感染都有用噬菌体治疗的前例<sup>[21]</sup>。

本研究中分离的铅黄肠球菌噬菌体 Ecf\_virus\_SZ01 与 NCBI Virus 数据库中宿主来源为粪肠球菌的噬菌体具有相似性, 从核酸相似性水平来看, 基因组覆盖率只有 1%–2%, 同源片段相似性低于 80%, 基因大小和方向均有差异, 表明 Ecf\_virus\_SZ01 基因组新颖性很高; 系统进化分析也显示噬菌体 Ecf\_virus\_SZ01 与其他宿主为肠球菌属细菌的噬菌体进化关系较远, 基于这些结果认为噬菌体 Ecf\_virus\_SZ01 与长尾噬菌体科的其他噬菌体具有较低的同源性, 应属于长尾噬菌体科新的分支。其最佳感染复数是 0.01, 一步生长曲线显示其具有较短的潜伏期和强的裂解能力。基因组测序显示其基因组长度为 59 409 bp; 102 个 ORFs 中仅有 34 个 ORFs 编码已知功能的蛋白, 大部分蛋白的功能是未知的, 不携带已知的抗生素抗性基因和毒力因子。从环境中分离培养活性噬菌体颗粒是噬菌体治疗得以应用的重要一步, 对分离噬菌体的生物学特性及其基因组进一步研究, 能使我们更清楚地了解噬菌体作用于细菌的机理, 为噬菌体治疗细菌感染打下坚实的基础。

### 参考文献

- [1] Stephens A, Sivapathasuntharam C, James HK. Monocular loss of vision following an open tibial fracture: a case of *Enterococcus casseliflavus* endogenous endophthalmitis. *BMJ Case Reports*, 2021, 14 (4): e241292.
- [2] Okumura N, Watanabe T, Teranishi S, Suzuki D, Hashimoto T, Takahashi K, Hara T. Successful treatment of aortic valve endocarditis caused by *Enterococcus casseliflavus*: a case report. *BMC Infectious Diseases*, 2021, 21(1): 447.
- [3] Heda RP, Savage Y, Nair SP, Verma R. *Enterococcus casseliflavus*, *Streptococcus equinus* and *Klebsiella oxytoca* septicaemia associated with perinephric haematoma in a post-liver transplant patient with allograft cirrhosis. *BMJ Case Reports*, 2019, 12(8): e230096.
- [4] Iaria C, Stassi G, Costa GB, Di Leo R, Toscano A, Cascio A. Enterococcal meningitis caused by *Enterococcus casseliflavus*. First case report. *BMC Infectious Diseases*, 2005, 5(1): 3.
- [5] Salmond GPC, Fineran PC. A century of the phage: past, present and future. *Nature Reviews Microbiology*, 2015, 13(12): 777–786.
- [6] Esvelt KM, Carlson JC, Liu DR. A system for the continuous directed evolution of biomolecules. *Nature*, 2011, 472(7344): 499–503.
- [7] Gordillo AFL, Barr JJ. Phage therapy in the postantibiotic era. *Clinical Microbiology Reviews*, 2019, 32(2): e00066-18.
- [8] 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*. *Journal of Virology*, 2020, 94(10): e00066-20.
- [9] Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Prjibelski AD, Pyshkin AV, Sirotkin AV, Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology*, 2012, 19(5): 455–477.
- [10] Hyatt D, Chen GL, Locascio PF, Land ML, Larimer FW, Hauser LJ. Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics*, 2010, 11: 119.
- [11] Mistry J, Chuguransky S, Williams L, Qureshi M,

- Salazar GA, Sonnhammer ELL, Tosatto SCE, Paladin L, Raj S, Richardson LJ, Finn RD, Bateman A. Pfam: the protein families database in 2021. *Nucleic Acids Research*, 2020, 49(D1): D412–D419.
- [12] Grant JR, Stothard P. The CGView Server: a comparative genomics tool for circular genomes. *Nucleic Acids Research*, 2008, 36(suppl\_2): W181–W184.
- [13] Alcock BP, Raphenya AR, Lau TTY, Tsang KK, Bouchard M, Edalatmand A, Huynh W, Nguyen ALV, Cheng AA, Liu SH, Min SY, Miroshnichenko A, Tran HK, Werfalli RE, Nasir JA, Oloni M, Speicher DJ, Florescu A, Singh B, Faltyn M, Hernandez-Koutoucheva A, Sharma AN, Bordeleau E, Pawlowski AC, Zubyk HL, Dooley D, Griffiths E, Maguire F, Winsor GL, Beiko RG, Brinkman FSL, Hsiao WWL, Domselaar GV, McArthur AG. CARD 2020: antibiotic resistance surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Research*, 2020, 48(D1): D517–D525.
- [14] Lowe TM, Chan PP. tRNAscan-SE on-line: integrating search and context for analysis of transfer RNA genes. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(W1): W54–W57.
- [15] Darling ACE, Mau B, Blattner FR, Perna NT. Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Research*, 2004, 14(7): 1394–1403.
- [16] Li KB. ClustalW-MPI: ClustalW analysis using distributed and parallel computing. *Bioinformatics*, 2003, 19(12): 1585–1586.
- [17] Young R, Bläsi U. Holins: form and function in bacteriophage lysis. *FEMS Microbiology Reviews*, 1995, 17(1/2): 191–205.
- [18] Aravind L, Anantharaman V, Balaji S, Babu MM, Lyer LM. The many faces of the helix-turn-helix domain: transcription regulation and beyond. *FEMS Microbiology Reviews*, 2005, 29(2): 231–262.
- [19] Yuan Y, Xi HY, Dai JX, Zhong YH, Lu SG, Wang TQ, Yang LH, Guan Y, Wang P. The characteristics and genome analysis of the novel *Y. pestis* phage JC221. *Virus Research*, 2020, 283: 197982.
- [20] Xiang YY, Li WY, Song F, Yang XH, Zhou J, Yu HB, Ji XL, Wei YL. Biological characteristics and whole-genome analysis of the *Enterococcus faecalis* phage PEF771. *Canadian Journal of Microbiology*, 2020, 66(9): 505–520.
- [21] Ciacci N, D'Andrea MM, Marmo P, Demattè E, Amisano F, Di Pilato V, Fraziano M, Lupetti P, Rossolini GM, Thaller MC. Characterization of vB\_Kpn\_F48, a newly discovered lytic bacteriophage for *Klebsiella pneumoniae* of sequence type 101. *Viruses*, 2018, 10(9): 482.