



一株类志贺邻单胞菌噬菌体生物学特性及全基因组分析

何洋, 秦旭颖, 荆兆元, 杨洪江*

天津科技大学生物工程学院, 工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津市工业微生物重点实验室,
天津 300457

何洋, 秦旭颖, 荆兆元, 杨洪江. 一株类志贺邻单胞菌噬菌体生物学特性及全基因组分析. 微生物学报, 2022, 62(2): 650–660.

He Yang, Qin Xuying, Jing Zhaoyuan, Yang Hongjiang. Biological characteristics and genomic analysis of a *Plesiomonas shigelloides* phage phiP4-7. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(2): 650–660.

摘要:【目的】多重耐药菌株的出现给食品安全带来严重威胁。噬菌体是不同于抗生素的一类重要杀菌因子, 对其生物学特性及基因组的研究和分析可为噬菌体的抗菌应用提供依据。【方法】对噬菌体 phiP4-7 的生物学特性、基因组学、分类学进行研究。【结果】经透射电子显微镜观察, 确定 phiP4-7 头部直径为(50.59±1.68) nm, 尾部长度为(76.53±4.90) nm, 属于长尾噬菌体科; 一步生长曲线结果表明, 其潜伏期时间约为 25 min, 每个感染中心释放的噬菌体数量约为 63 PFU/infection center; 抑菌曲线结果表明, phiP4-7 能够有效地抑制宿主菌的生长。基因组测序组装结果显示, phiP4-7 基因组长度为 39 825 bp, GC 含量为 48.67%。通过生物信息学软件对基因组进行注释, 发现 phiP4-7 的基因组上共编码 72 个蛋白, 不编码 tRNA 基因, 未发现已知的耐药基因和毒力基因。比较基因组学和分类学结果显示, 将其归类为长尾噬菌体科中的一个新属。【结论】分离得到了一株新类志贺邻单胞菌噬菌体, 并对其生物学特性和基因组进行了分析。

关键词: 类志贺邻单胞菌; 噬菌体; 基因组学; 比较基因组学; 分类学

基金项目: 国家自然科学基金(31970150)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31970150)

*Corresponding author. E-mail: hongjiangyang@tust.edu.cn

Received: 15 May 2021; Revised: 25 July 2021; Published online: 4 August 2021

Biological characteristics and genomic analysis of a *Plesiomonas shigelloides* phage phiP4-7

HE Yang, QIN Xuying, JING Zhaoyuan, YANG Hongjiang*

Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology, Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology of Ministry of Education, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China

Abstract: [Objective] The emergence of the multidrug resistant bacterial pathogens is posing great threats to food safety. Phages are the important bactericidal factors different from antibiotics. The evidence of phage application can be provided by analyzing the phage biological characteristics and genome. **[Methods]** In this study, one lytic phage phiP4-7 specific to the strain *Plesiomonas shigelloides* P4-7 was investigated on its biological characteristics, genome annotations, and taxonomic analysis. **[Results]** The images of transmission electron microscopy (TEM) showed that the phage has an icosahedral head with a diameter of (50.59±1.68) nm, a noncontractile tail with a length of (76.53±4.90) nm, belonging to the family of *Siphoviridae*. One-step growth curve suggested that phiP4-7 has a latent period of 25 min and its burst size was about 63 PFU/infection center. Additionally, phiP4-7 can effectively inhibit the growth of the host bacteria. The genome of phiP4-7 has been sequenced, assembled, and curated. It has a total of 39 825 bp with the GC content of 48.67%. Bioinformatic tools reveals that the phiP4-7 genome has 72 protein encoding genes, and no tRNA genes, antibiotic resistance genes, or virulence genes were identified. Comparative genomic and taxonomic analyses indicated that the genome of phiP4-7 showed little homology to any known viruses, and it can be classified as a member of a new genus of the *Siphoviridae* family. **[Conclusion]** A new *Plesiomonas shigelloides* phage was isolated, and its biological characteristics and genome were analyzed.

Keywords: *Plesiomonas shigelloides*; phage; genomics; comparative genomic; taxonomy

类志贺邻单胞菌(*Plesiomonas shigelloides*)是一种兼性厌氧、有鞭毛、革兰氏阴性杆菌。这种细菌经常能够从淡水、表层水以及野生动物和家养动物中分离得到^[1]。类志贺邻单胞菌能够引起多种类型的肠道感染,包括严重的分泌型肠炎^[2]、攻击性类志贺感染^[3]、类似霍乱感染^[4]以及人类疾病包括败血症^[5]等感染性疾病。因此,受到国内外学者广泛关注。由于抗菌素的长期滥用,造成了约90%的细菌对1种以上抗菌素具有耐药性,20%的细菌对5种以上抗菌素具有耐药性,对食品安全造成了严重威胁。为了缓解抗菌素滥用带来的危害,亟需研发对

环境和人类健康无害的抗菌素替代产品。

噬菌体(bacteriophage, phage)是一种通过裂解细菌,调节细菌种群的天然抗菌剂。噬菌体对多重耐药的革兰氏阳性菌^[6-7]和革兰氏阴性菌^[8-12]都具有杀菌活性。由于噬菌体的杀菌机制与抗生素的完全不同,所以噬菌体可以杀死多重耐药的细菌^[13]。另一方面,噬菌体具有宿主特异性,因此噬菌体疗法的抗菌谱较窄,仅能抑制单一物种,甚至在某些情况下,某种噬菌体仅能抑制种内(species)的某些菌株。

本实验室前期从淡水养殖的鱼肠道内容物中分离了2株类志贺邻单胞菌P4-1和P4-7,分

别以它们为指示菌,从鱼肠道内容物中分离了噬菌体 phiP4-1 和 phiP4-7,它们的宿主范围较窄,只能特异性地裂解各自的宿主菌。噬菌体 phiP4-1 裂解液滴度较低,仅为 1.40×10^5 PFU/mL,而 phiP4-7 裂解液滴度可达 2.96×10^9 PFU/mL^[14]。本文以 phiP4-7 为研究对象,对其生物学特性、基因组以及分类学进行了初步研究,以期为将来噬菌体在控制食品中类志贺邻单胞菌污染的应用开发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、噬菌体和生长条件

本文所用指示菌类志贺邻单胞菌 P4-7 和噬菌体 phiP4-7 分离于养殖淡水鱼肠道内容物^[14]。LB (Luria-Bertani)培养基、固体 LB 培养基(1.5% *W/V* agar)和半固体培养基(0.5% *W/V* agar)用于实验中类志贺邻单胞菌 P4-7 和噬菌体 phiP4-7 的培养,培养温度为 37 °C。

1.2 噬菌体的扩增与纯化

噬菌体颗粒的扩增以及纯化参考以前的实验方法^[15],将宿主菌培养至对数期($OD_{600}=0.6$),加入适量噬菌体裂解液,使感染复数(multiplicity of infection, MOI)约等于 0.1,继续培养 4–6 h 后得到噬菌体裂解液。加入终浓度为 0.1 mol/L 的 NaCl,冰浴 1 h,4 000 r/min 离心 10 min,除去多余的细胞碎片以及宿主菌 DNA 和 RNA。向上清液中加入终浓度为 5 µg/mL 的 DNase I 和 RNase A,37 °C 水浴 1 h。加入 PEG6000 至终浓度为 10% (*W/V*),充分振荡溶解后 4 °C 静置过夜,12 000 r/min 离心 20 min,沉淀重悬于 TM 缓冲液(0.05 mol/L Tris-HCl pH 7.5, 0.2% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$)中,用等体积的氯仿抽提 3 次去除 PEG6000。上清液中加入终浓度为 1 µg/mL 的 DNase I 和 RNase A,37 °C 水浴 1 h。进一步将噬菌体溶液用 100 kDa 超滤管离心

(Merck, USA)过滤,并用 0.1 mol/L 的乙酸铵溶液(pH 7.0)洗涤噬菌体,截留液为纯化的噬菌体溶液。

1.3 透射电子显微镜分析噬菌体的形态

参照之前的方法,利用透射电子显微镜观察噬菌体的形态^[15]。取 10 µL 纯化的噬菌体溶液加到包被碳膜的 230 目铜网上,结合 1 min 后用含有 0.5 mg/L 杆菌肽的 2%磷钨酸钠溶液(pH 6.7)负染色 3–5 min。噬菌体通过日立 HT7700 型透射电子显微镜成像。

1.4 一步生长曲线的测定

宿主菌(100 mL)培养至对数期($OD_{600}=0.6$),离心收集菌体重悬至 1 mL 的 LB 液体培养基中。噬菌体加入到宿主菌中,使 MOI 约等于 0.001,吸附 1 min 后,12 000 r/min 离心 30 s 收集菌体重悬至 100 mL 的 LB 液体培养基中。每 5 min 取样 1 次,进行适当稀释后与对应的指示菌混合,倒双层平板。37 °C 培养 12 h 后,对双层平板进行计数,确定噬菌体的滴度^[15]。

1.5 抑菌曲线的测定

噬菌体抑制宿主菌生长的实验参照之前报道的方法^[16]。具体为:将过夜培养的类志贺邻单胞菌 P4-7 转接于 50 mL 新鲜 LB 液体培养基中,使得 $OD_{600}=0.1$ (10^7 CFU/mL)。将培养物稀释 10 倍,以不同感染复数(MOI=100, 10, 1, 0.1, 0)加入适量噬菌体。培养物在 37 °C 下振荡培养,每 30 min 测定 1 次 OD_{600} 。

1.6 噬菌体基因组的测序

通过纯化的噬菌体颗粒用 TM 缓冲液重悬,加入终浓度为 0.1 mol/L 的 EDTA (pH 8.0),并将混合物 68 °C 水浴 10 min。然后,在混合物中加入终浓度为 0.4%的 SDS (十二烷基磺酸钠)以及 1 mg/mL 的蛋白酶 K,55–65 °C 水浴 2–3 h。水浴过后,混合物中加入等体积的 Tris 平衡酚以及氯仿/异戊醇(24:1),温和振荡 30 s,

10 000 r/min 离心 10 min。抽提至相界面几乎无蛋白膜。再用氯仿/异戊醇(24:1)抽提上清液 2 次, 10 000 r/min 离心 5 min。向上清液中加入 2 倍体积的无水乙醇, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 20 min。收集絮状物沉淀, 并室温干燥。纯化的噬菌体基因组 DNA 通过 $0.5\times\text{TE}$ 缓冲液(pH 8.0)重悬, 储存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ^[16]。

委托苏州金唯智有限公司使用 HiSeq Illumina 2500 平台对噬菌体基因组进行测序。测序结果通过软件 Trimmomatic v0.30 对数据进行过滤^[17]。序列通过软件 Velvet_v1.12.10 进行拼接^[18]。运用软件 GapCloser v1.12 对组装结果进行局部内洞填充和碱基校正(<http://soap.genomics.org.cn/about.html#resource2>)。

利用限制性内切酶 *Hind* III、*Bam*H I、*Xho* I 和 *Xba* I, 对噬菌体基因组 DNA 进行酶切, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保温 2 h。酶切产物用含 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳 45 min, 电压 121 V。利用软件 DNA Master 模拟的环状基因组的酶切结果, 与噬菌体基因组的酶切图谱对比, 确定噬菌体基因组的结构。

1.7 噬菌体基因组的功能注释

使用软件 DNA Master 对基因组进行注释, 并以 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 上非冗长蛋白数据库为参考^[19]。通过软件 tRNAscan-SE v1.21 预测 tRNA^[20]。GC skew 通过软件 DNAPlotter 完成^[21]。

1.8 比较基因组学分析

在 NCBI 的 GenBank 数据库检索噬菌体保守基因的蛋白质序列, 并将其载入软件 ClustalW 中^[22], 进行氨基酸序列比对, 并且使用 MEGA 7.0 以及 500 次的 bootstrap replicates 构建 UPGMA 树^[23]。软件 Circoletto 是一种对基因以及基因组之间相似性具象化的在线软件^[24], 通过将需要比对的基因组序列编辑成 FASTA

格式, 并设定合适的参数, 即可获得具象化的图片报告。线上软件 CoreGenes (<https://coregenes.ngrok.io/>) 被用来计算噬菌体基因组间的基因分享率, 依据同源性, 选择 9 株噬菌体基因组序列进行比对分析。当基因分享率 $>40\%$, 可将噬菌体归类为同一个属^[25-26]。

1.9 通过 BLASTn 以及 Figtree v1.4.3 构建全基因组系统进化树

全基因组序列通过 BLAST (basic local alignment search tool) 进行比对, 选择同源序列利用 distance tree of results 进行分析。选择 neighbor joining 法, 下载 Newick 格式的比对结果, 进一步利用记事本编辑, 另存为 dnd 格式, 这个文件通过软件 FigTree V1.4.3 打开后, 可生成全基因组进化树^[27]。

2 结果与分析

2.1 噬菌体生物学特性

按照材料与方法所述, 扩增类志贺邻单胞菌噬菌体 phiP4-7, 负染色后利用透射电子显微镜分析噬菌体形态。如图 1A 所示, 两个视野中显示多个噬菌体分别吸附在细胞碎片或囊泡结构上。phiP4-7 头部为正二十面体对称结构, 直径约为 $(50.59\pm 1.68)\text{ nm}$ 。噬菌体尾部不可伸缩, 为典型的长尾噬菌体, 尾部长度的约为 $(76.53\pm 4.90)\text{ nm}$ 。

在 MOI 约为 0.001 时, 测定噬菌体 phiP4-7 的一步生长曲线。结果显示, 其潜伏期约为 25 min。利用平台期(P)的噬菌体滴度除以潜伏期(L)的滴度, 发现每个感染中心释放的噬菌体数量约为 63 PFU/infection center (图 1B)。在不同 MOI 下将噬菌体 phiP4-7 与宿主菌 P4-7 共同培养, 测定噬菌体对宿主菌的抑制作用, 当 MOI=100 时, 宿主菌的生物量几乎不增长, 随着 MOI 的减少, 抑菌效果逐渐减弱。

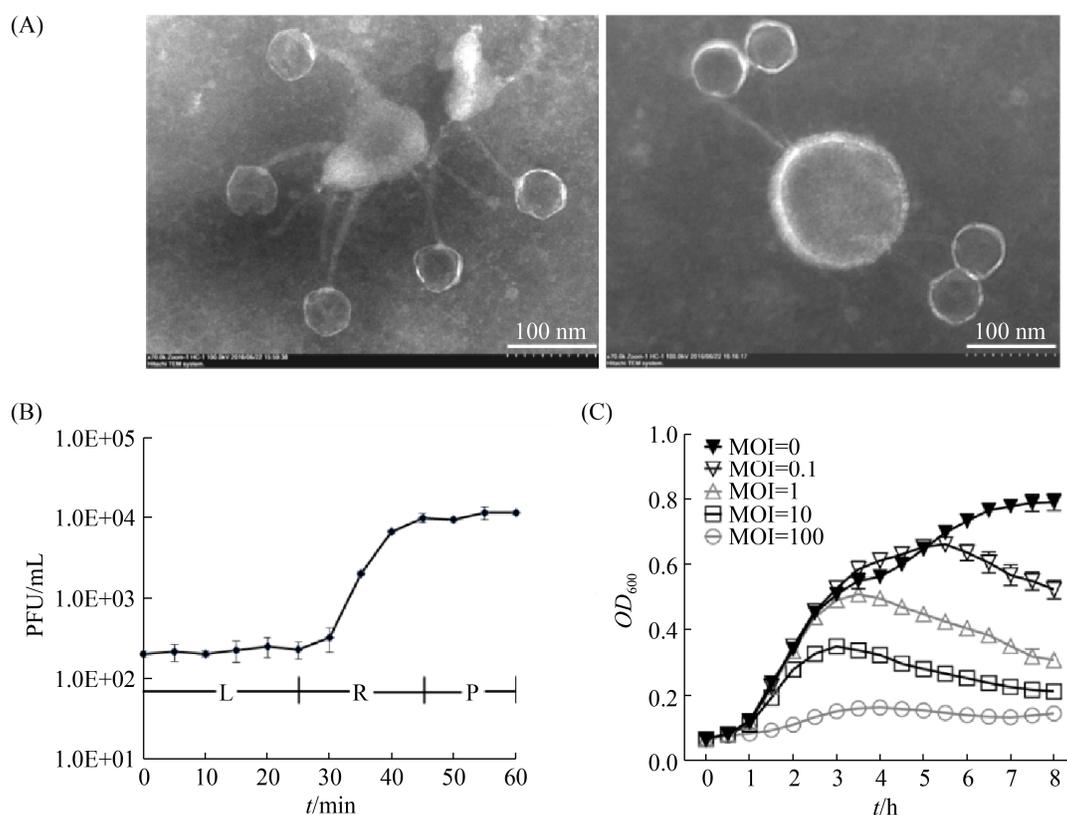


图 1 噬菌体 phiP4-7 生物学特性

Figure 1 The characteristics of phage phiP4-7. A: transmission electron microscopy (TEM) image of phage phiP4-7; B: one-step growth curve of phage phiP4-7; C: growth inhibition curve of phage phiP4-7.

2.2 phiP4-7 基因组基本特征

通过对 phiP4-7 的全基因组测序以及组装后,确定其基因组为双链 DNA,长度为 39 825 bp, GC%为 48.67%。将 phiP4-7 的基因组序列上传至 NCBI 的 GenBank 数据库,接收号为 MG696115.1。通过生物信息学软件对基因组进行注释,发现 phiP4-7 的基因组上共编码 72 个开放读码框,不编码 tRNA 基因,未发现已知的耐药基因和毒力因子基因。预测 ORF 的长度范围为 105–2 892 bp。在这些基因中,有 28 个基因的转录方向为正向。

2.3 phiP4-7 基因组为环状 DNA 分子

提取噬菌体的基因组 DNA,分别用 4 种限制性内切酶以及它们的组合进行酶切,包括

Hind III、*Bam*H I、*Xho* I、*Xba* I、*Xho* I/*Bam*H I、*Xho* I/*Hind* III、*Xba* I/*Xho* I、*Xba* I/*Bam*H I、*Xba* I/*Hind* III 和 *Bam*H I/*Hind* III,随后进行电泳分析。通过软件 DNA Master 分析组装的基因组序列,模拟的环状基因组酶切结果(图 2A)与实际的基因组酶切结果(图 2B)基本一致,因此初步确定 phiP4-7 的基因组为环状双链 DNA 分子。

2.4 phiP4-7 基因组功能注释

按照材料与方法所述,对噬菌体基因组进行功能注释,共发现 25 个具有已知功能的蛋白以及 47 个假定蛋白。依据编码蛋白功能进行分类,包括转录(phage regulatory protein Rha)、DNA 修饰[假定的 dam 甲基化酶(putative dam methylase),

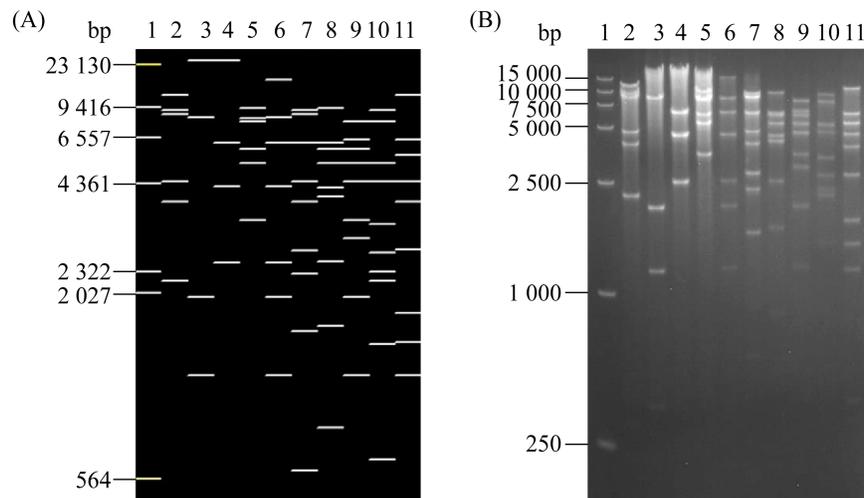


图 2 噬菌体 phiP4-7 的基因组酶切分析

Figure 2 Physical map of the phage phiP4-7 genomic DNA. A: genomic restriction map simulated by DNA Master; B: genomic restriction map. Lane 1: DNA Marker; Lane 2–11: *Hind* III, *Bam*H I, *Xho* I, *Xba* I, *Xho* I+ *Bam*H I, *Xho* I+*Hind* III, *Xba* I+*Xho* I, *Xba* I+*Bam*H I, *Xba* I+*Hind* III, *Bam*H I+*Hind* III.

甲基化转移酶(methyltransferase), 假定的脱氧核糖核酸酶(putative exodeoxyribonuclease), 假定的核酸内切酶(putative endonuclease), 假定的重组蛋白(putative recombination protein)、宿主裂解[噬菌体裂解蛋白(Rz-like phage lysis protein), 裂解酶(endolysin)]、结构蛋白[假定的尾部蛋白(putative tail protein), 假定的尾部亚基(putative tail subunit), 假定的病毒颗粒结构蛋白(putative virion structural protein), 假定的主要头部蛋白(putative major head protein), 假定的头部蛋白(putative head protein), 假定的尾丝蛋白(putative tail fiber protein)]以及 DNA 包装[假定的末端酶大亚基(putative large terminase subunit), 假定的归巢核酸内切酶(putative homing endonuclease), 假定的末端酶小亚基(putative terminase small subunit), 假定的门蛋白(putative portal protein)](图 3)。

转录调控: phiP4-7 基因组携带 2 个噬菌体调节蛋白 Rha (regulatory protein Rha)编码基因 *orf013* 和 *orf026*, 噬菌体调节蛋白 Rha 蛋白家

族成员是在温和性噬菌体以及前噬菌体基因组上发现的。Rha 蛋白在缺乏整合宿主因子(integration host factor, IHF)菌株中, 会阻止噬菌体感染的发生^[28]。

DNA 代谢: phiP4-7 编码 5 种与 DNA 代谢以及修饰的相关蛋白, 包括假定的 *dam* 甲基化酶(*orf059*)、假定的核酸内切酶(*orf063*)、假定的核糖核酸酶(*orf065*)、假定的重组蛋白(*orf066*)、甲基化转移酶 (*orf072*)。假定的 *dam* 甲基化酶可在 GATC 序列中的腺嘌呤 N6 位置上引入甲基, 使得一些生物体编码的限制性内切酶不能够消化对应的被甲基化的位点^[29]。通过结构域预测, 发现 *orf065* 属于 exodeoxyribonuclease VIII superfamily, 能够降解线状 dsDNA, 对线状的 ssDNA 也有活性。该酶并不能够降解环状的 dsDNA 以及 ssDNA^[30]。exodeoxyribonuclease VIII 是一种具有 5'到 3'水解活性的核酸外切酶, 它不依赖 ATP 提供能量, 也不需要 DNA 单链上的任何识别位点, 但是需要有游离的 5'-OH 基团^[31]。*orf068* 被预测有 Erf 重组酶的结构域。

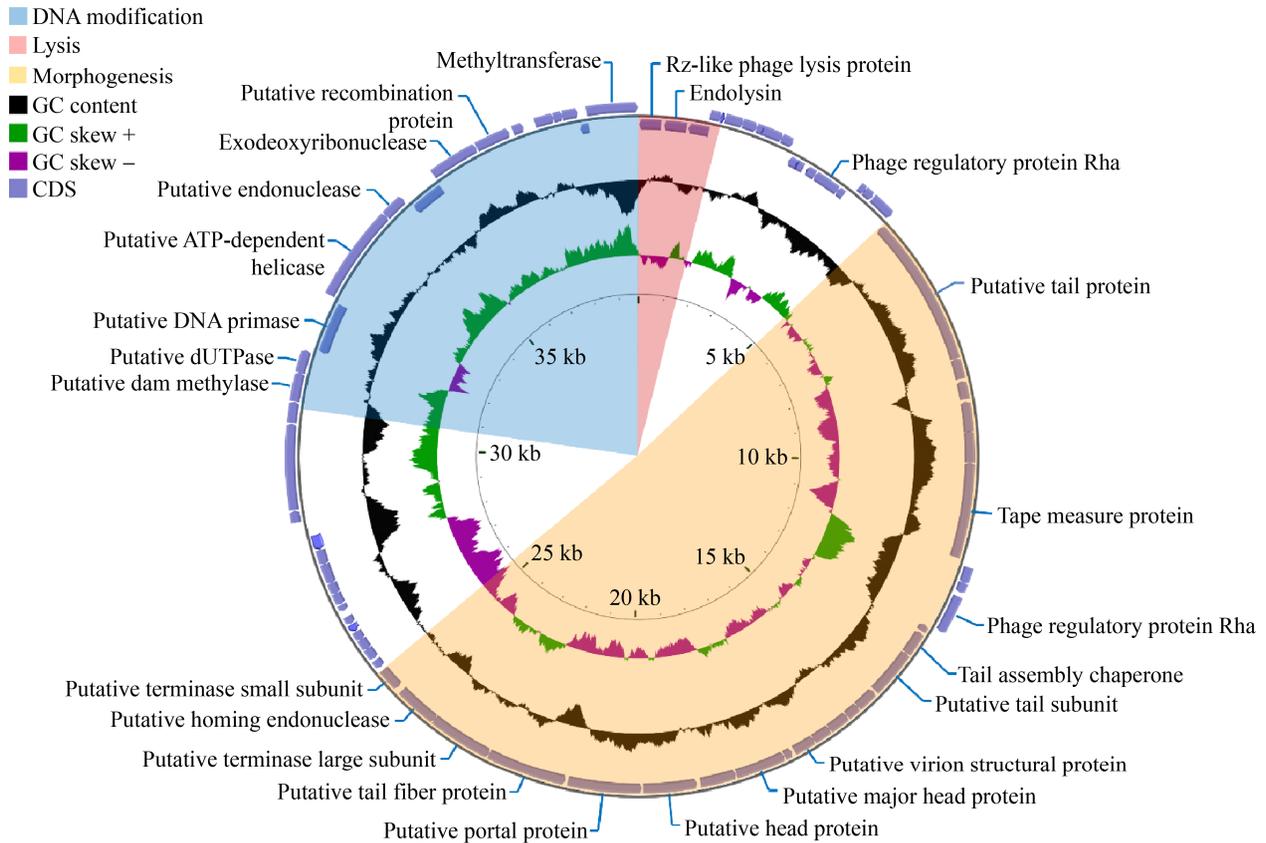


图 3 噬菌体 phiP4-7 基因组的功能注释

Figure 3 Genome annotation of phage phiP4-7.

Erf (essential recombination function) 是一种通过噬菌体 P22 编码的早期蛋白, 体外实验的结果显示, 它能够促进互补的 ssDNA 进行互补配对^[32]。在鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)中, Erf 对于噬菌体 P22 在重组酶缺失的突变子中生长是有必要的^[33-34]。orf072 被发现具有 Dam 甲基化酶 (N-6adenine-specific DNA methylase) 的结构域 (EC:2.1.1.72), 这个结构域来源于 Type I 以及 Type I C 的 RM 系统(restriction systems)^[35-36]。RM 系统是一种保护细菌细胞对抗外源 DNA 的特殊机制, 它能够水解缺乏特殊位点的外源 DNA。Type I 类型的系统是最为复杂的 RM 系统, 包含 3 种亚基: R (restriction domain, 限制核酸内切酶结构域)、M (modification domain, DNA 甲基化酶结构

域)以及 S (specificity domain, 识别结构域)。这样的结果导致了这个系统能够进行 DNA 的水解以及甲基化。这两个反应都需要消耗 ATP 并且水解位点距识别位点的距离非常远。S 亚基能够确定限制性内切酶和甲基化酶识别的特殊位点。

宿主裂解: phiP4-7 共编码 2 个参与细胞裂解的基因, 分别为 *Rz* (orf001) 和 *RzI* (orf002)。*Rz* 和 *RzI* 的基因产物能够降解革兰氏阴性菌的肽聚糖。在这种情况下, 如果 *Rz* 或 *RzI* 缺失一个, 将会导致裂解障碍并导致球形体的形成。*RzI* 能够水解 N-乙酰胞壁酸和 N-乙酰葡萄糖胺之间的 β -1,4 糖苷键。*Rz* 和 *RzI* 之间能够形成 *Rz-RzI* 复合物, 并且该复合物能够降解宿主菌的外膜(outer membrane, OM), 从而促进子代

噬菌体的释放^[37]。

结构蛋白: phiP4-7 共编码 6 种病毒颗粒结构蛋白: 包括假定的尾部蛋白(*orf018*)、假定的尾部亚基(*orf029*)、假定的病毒颗粒结构蛋白(*orf034*)、假定的主要头部蛋白(*orf036*)、假定的头部蛋白(*orf038*)、假定的尾丝蛋白(*orf040*)。

DNA 包装: 通过基因组注释, 我们注释出了 3 个与 DNA 包装相关的基因, 包括假定的末端酶大亚基(*orf041*)、假定的归巢核酸内切酶(*orf042*)以及假定的末端酶小亚基(*orf043*)。

2.5 phiP4-7 的比较基因组学分析

将噬菌体基因组序列在 NCBI 的数据库 GenBank 中进行同源性检索比对, 结果发现 phiP4-7 基因组序列与所有已知噬菌体基因组序列的覆盖率很低, 均低于<2%, 同源片段的一致性均低于 80%。选取 9 株噬菌体基因组序列, 它们与噬菌体 phiP4-7 基因组序列覆盖率为 1%–2%, 一致性为 66%–75%。进一步对 phiP4-7 基因组与其他 9 株噬菌体基因组之间的基因分享率进行分析, 包括 5 株长尾噬菌体科

(*Salmonella* phage IME207, *Aeromonas* phage pIS4-A, *Salmonella* phage E1, *Enterobacteria* phage Cajan, *Escherichia* phage Seurat), 1 株短尾噬菌体科(*Enterobacteria* phage CUS-3)以及 3 株未分类的噬菌体(*Salmonella* phage LPST10, *Vibrio* phage pYD38-A, *Salmonella* phage 64795_sal3)。结果如图 4B 所示, 10 株噬菌体可以被分为 4 个组。噬菌体分类学方法建议分享超过 40%的基因的噬菌体是同属噬菌体。因此, 4 个组也就是 4 个噬菌体属。而噬菌体 phiP4-7 与其他 9 株噬菌体之间仅分享 6.94%–20.83%的基因。所以, 噬菌体与目前测序的长尾噬菌体都不属于同一个属。通过 Circoletto 在线软件的分析结果显示, 在噬菌体 phiP4-7 所编码的所有基因中, 仅有 2 个基因(*orf002*, *orf060*)能够在其他基因组上被找到(图 4A)。

2.6 phiP4-7 的分类研究

进一步通过软件 Mega 7.0 以及 FigTree v1.4.3, 构建 DNA 聚合酶、末端酶大亚基、主要衣壳蛋白以及全基因组的系统进化树, 如图 5 所示。

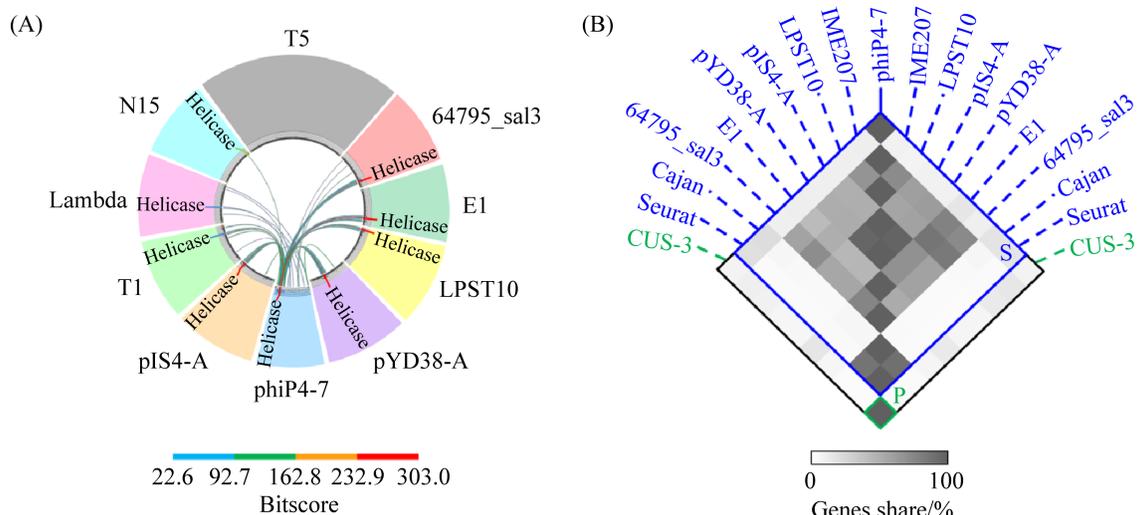


图 4 噬菌体 phiP4-7 的比较基因组学和分类学

Figure 4 Comparative genomics and taxonomy of phage phiP4-7. A: comparative genomics of phage phiP4-7; B: percentage of shared genes between phage phiP4-7 and other phages.

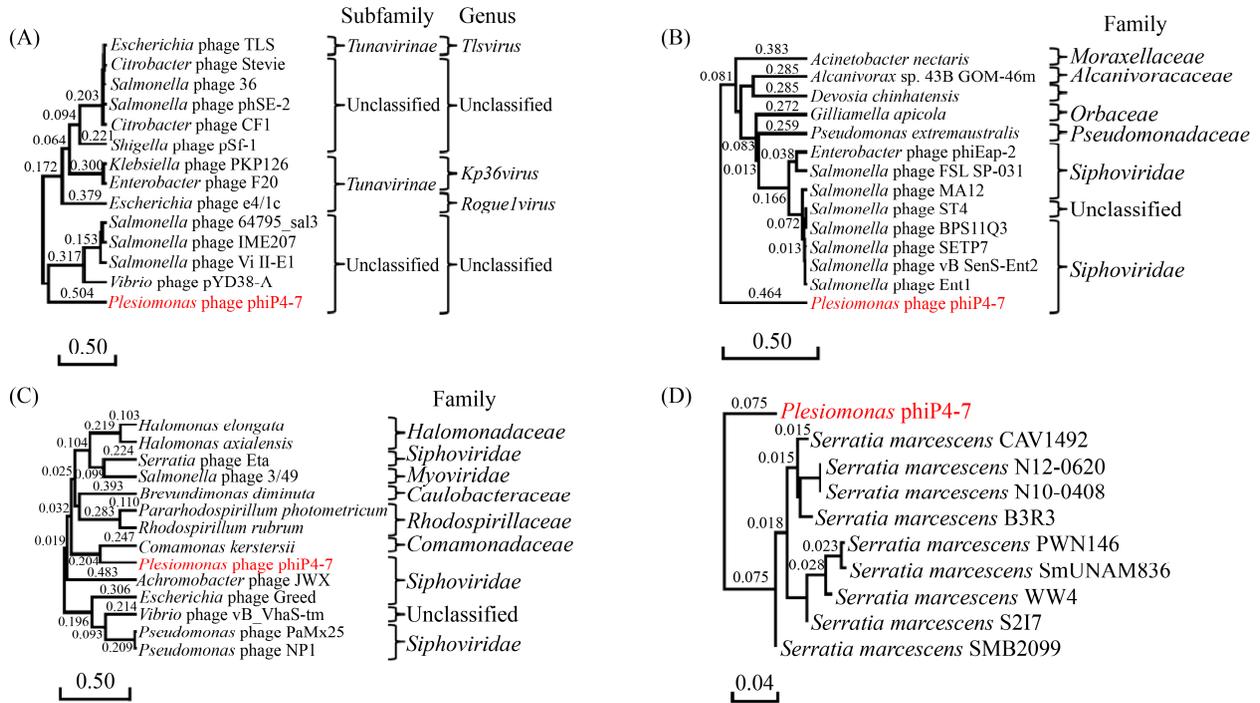


图 5 噬菌体 phiP4-7 亲缘关系分析

Figure 5 Phylogenetic relationships of phage phiP4-7. A: phylogenetic tree of the DNA polymerase; B: phylogenetic tree of the terminase large subunit; C: phylogenetic tree of the major capsid protein; D: phylogenetic tree of the phage phiP4-7 genome.

主要衣壳蛋白以及末端酶大亚基的系统进化树显示, 进化树中包含一些细菌编码的假定蛋白或者噬菌体相关蛋白, 并且 phiP4-7 与细菌编码蛋白之间的亲缘性要高于与噬菌体编码蛋白的亲缘性(图 5B 和 5C)。如图 5D 所示, 全基因组进化树的结果显示, phiP4-7 与一些粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)具有较高的相关性, 而与其他噬菌体的关系较远。基于这些结果, 以及国际病毒分类学会议(International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV)制定的一般准则, 我们建议将 phiP4-7 归类为长尾噬菌体科中的一个新属。

3 讨论与结论

水产养殖中的抗菌素滥用, 会导致包括类

志贺邻单胞菌在内的病原菌产生耐药性, 并且耐药基因的水平或垂直转移会导致病原菌的耐药性逐渐增强, 增加了病原菌的防治难度。由于噬菌体的特异性, 噬菌体疗法的抗菌谱较窄, 仅能特异性地抑制单一物种, 甚至在某些情况下, 仅能裂解种内(species)的某些菌株。因此, 噬菌体在防治水产致病菌方面的应用, 需要分离和研究大量的噬菌体, 以期满足噬菌体应用的需求。噬菌体是自然界数量最多的生物, 具有巨大的遗传多样性, 广泛地分布在自然界所有的生态环境中, 为研究和利用噬菌体提供了丰富的资源。

在前期研究中, 我们在国际上首次分离了 2 株类志贺邻单胞菌噬菌体 phiP4-1 和 phiP4-7。在本文中, 我们对噬菌体 phiP4-7 展开了进一步

研究。一步生长曲线的结果显示, 该噬菌体潜伏期较短, 且释放量较大, 易于制备, 为未来工业化生产噬菌体制剂带来便利。抑菌实验的结果表明, 该噬菌体具有良好的抑菌能力, 为将来应用于水产养殖防控水产致病菌提供了可靠保证。

开展噬菌体基因组学研究, 能够提高我们对噬菌体基因组的理解, 并提高该噬菌体应用于噬菌体疗法的可靠性、安全性。在本文中, 基因组学的研究结果显示, phiP4-7 编码肽聚糖水解酶, *orf002* 基因编码的裂解酶 Gp2 已经在大肠杆菌中表达, 显示出较高的杀菌活性和应用潜力^[38]。比较基因组学和形态学的研究结果显示, 该噬菌体与目前已测序、已分类的噬菌体基因组之间的基因分享率较低, 且基因组没有携带任何已知的耐药基因、毒力因子基因和重组整合相关基因, 保证了该噬菌体作为抗菌剂应用于防治食品中类志贺邻单胞菌污染的安全性。综上所述, 噬菌体 phiP4-7 的生物学特性及基因组学的研究结果表明, 该噬菌体具有作为抑菌剂应用于防控食品中类志贺邻单胞菌污染的潜力。

参考文献

- [1] Levin RE. Bacteria: *Plesiomonas shigelloides*. Encyclopedia of Food Safety. Amsterdam: Elsevier, 2014: 480–485.
- [2] Mandal BK, Whale K, Morson BC. Acute colitis due to *Plesiomonas shigelloides*. *British Medical Journal: Clinical Research Ed.*, 1982, 285(6354): 1539–1540.
- [3] McNeeley D, Ivy P, Craft JC, Cohen I. *Plesiomonas*. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 1984, 3(2): 176–181.
- [4] Tsukamoto T, Kinoshita Y, Shimada T, Sakazaki R. Two epidemics of diarrhoeal disease possibly caused by *Plesiomonas shigelloides*. *The Journal of Hygiene*, 1978, 80(2): 275–280.
- [5] Xia FQ, Liu PN, Zhou YH. Meningoencephalitis caused by *Plesiomonas shigelloides* in a Chinese neonate: case report and literature review. *Italian Journal of Pediatrics*, 2015, 41(1): 3.
- [6] Matsuzaki S, Yasuda M, Nishikawa H, Kuroda M, Ujihara T, Shuin T, Shen Y, Jin Z, Fujimoto S, Nasimuzzaman MD, Wakiguchi H, Sugihara S, Sugiura T, Koda S, Muraoka A, Imai S. Experimental protection of mice against lethal *Staphylococcus aureus* infection by novel bacteriophage phi MR11. *The Journal of Infectious Diseases*, 2003, 187(4): 613–624.
- [7] Biswas B, Adhya S, Washart P, Paul B, Trostel AN, Powell B, Carlton R, Merrill CR. Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Infection and Immunity*, 2002, 70(1): 204–210.
- [8] Vinodkumar CS, Neelagund YF, Kalsurmath S. Bacteriophage in the treatment of experimental septicemic mice from a clinical isolate of multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae*. *The Journal of Communicable Diseases*, 2005, 37(1): 18–29.
- [9] Wang J, Hu B, Xu MC, Yan Q, Liu SY, Zhu XH, Sun ZY, Reed E, Ding L, Gong JP, Li QQ, Hu JB. Use of bacteriophage in the treatment of experimental animal bacteremia from imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Molecular Medicine*, 2006, 17(2): 309–317.
- [10] Wang J, Hu B, Xu MC, Yan Q, Liu SY, Zhu XH, Sun ZY, Tao DD, Ding L, Reed E, Gong JP, Li QQ, Hu JB. Therapeutic effectiveness of bacteriophages in the rescue of mice with extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* bacteremia. *International Journal of Molecular Medicine*, 2006, 17(2): 347–355.
- [11] Hanlon GW. Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2007, 30(2): 118–128.
- [12] Yang HJ, Liang L, Lin SX, Jia SR. Isolation and characterization of a virulent bacteriophage AB1 of *Acinetobacter baumannii*. *BMC Microbiology*, 2010, 10: 131.
- [13] Kim JH, Son JS, Choi YJ, Choresca CH, Shin SP, Han JE, Jun JW, Park SC. Complete genomic sequence of a T4-like bacteriophage, phiAS4, infecting *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. *Archives of Virology*, 2012, 157(2): 391–395.
- [14] He Y, Yang HJ. The gastrointestinal phage communities of the cultivated freshwater fishes. *FEMS Microbiology Letters*, 2015, 362(5): 1–8. DOI: 10.1093/femsle/fnu027.
- [15] Jin J, Li ZJ, Wang SW, Wang SM, Huang DH, Li YH, Ma YY, Wang J, Liu F, Chen XD, Li GX, Wang XT, Wang ZQ, Zhao GQ. Isolation and characterization of ZZ1, a novel lytic phage that infects *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *BMC Microbiology*, 2012, 12: 156.

- [16] Cui XL, You JJ, Sun L, Yang XJ, Zhang T, Huang KC, Pan XW, Zhang FJ, He Y, Yang HJ. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* phage C11 and identification of host genes required for virion maturation. *Scientific Reports*, 2016, 6: 39130.
- [17] Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics: Oxford, England*, 2014, 30(15): 2114–2120.
- [18] Zerbino DR, Birney E. Velvet: algorithms for *de novo* short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Research*, 2008, 18(5): 821–829.
- [19] Cuervo A, Vaney MC, Antson AA, Tavares P, Oliveira L. Structural rearrangements between portal protein subunits are essential for viral DNA translocation. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(26): 18907–18913.
- [20] Schattner P, Brooks AN, Lowe TM. The tRNAscan-SE, snoscan and snoGPS web servers for the detection of tRNAs and snoRNAs. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(Web Server issue): W686–W689.
- [21] Carver T, Thomson N, Bleasby A, Berriman M, Parkhill J. DNAPlotter: circular and linear interactive genome visualization. *Bioinformatics: Oxford, England*, 2009, 25(1): 119–120.
- [22] Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Current Protocols in Bioinformatics*, 2003, 00(1): 2.3.1–2.3.22.
- [23] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 2016, 33(7): 1870–1874.
- [24] Darzentas N. Circoletto: visualizing sequence similarity with Circos. *Bioinformatics: Oxford, England*, 2010, 26(20): 2620–2621.
- [25] Portugal JS, Allerdice M, Moraru GM, King J, Paddock CD, Becker T, Smith TC, Goddard J. Molecular phylogeny of *Dermacentor parumapertus* (Acari: Ixodidae) from two locations within its geographical range. *Journal of Medical Entomology*, 2019, 56(4): 979–983.
- [26] Lavigne R, Seto D, Mahadevan P, Ackermann HW, Kropinski AM. Unifying classical and molecular taxonomic classification: analysis of the *Podoviridae* using BLASTP-based tools. *Research in Microbiology*, 2008, 159(5): 406–414.
- [27] Holmfeldt K, Solonenko N, Shah M, Corrier K, Riemann L, VerBerkmoes NC, Sullivan MB. Twelve previously unknown phage genera are ubiquitous in global oceans. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(31): 12798–12803.
- [28] Henthorn KS, Friedman DI. Identification of related genes in phages phi 80 and P22 whose products are inhibitory for phage growth in *Escherichia coli* IHF mutants. *Journal of Bacteriology*, 1995, 177(11): 3185–3190.
- [29] Schneider-Scherzer E, Auer B, De Groot EJ, Schweiger M. Primary structure of a DNA (N6-adenine)-methyltransferase from *Escherichia coli* virus T1. DNA sequence, genomic organization, and comparative analysis. *Journal of Biological Chemistry*, 1990, 265(11): 6086–6091.
- [30] Joseph JW, Kolodner R. Exonuclease VIII of *Escherichia coli*. II. Mechanism of action. *Journal of Biological Chemistry*, 1983, 258(17): 10418–10424.
- [31] Poteete AR, Fenton AC. Efficient double-strand break-stimulated recombination promoted by the general recombination systems of phages lambda and P22. *Genetics*, 1993, 134(4): 1013–1021.
- [32] Botstein D, Matz MJ. A recombination function essential to the growth of bacteriophage P22. *Journal of Molecular Biology*, 1970, 54(3): 417–440.
- [33] Yamagami H, Yamamoto N. Contribution of the bacterial recombination function to replication of bacteriophage P22. *Journal of Molecular Biology*, 1970, 53(2): 281–285.
- [34] Susskind MM, Botstein D. Molecular genetics of bacteriophage P22. *Microbiological Reviews*, 1978, 42(2): 385–413.
- [35] Mahan MJ, Garzón A, Casadesús J. Host RecJ is required for growth of P22 erf bacteriophage. *Journal of Bacteriology*, 1993, 175(1): 288–290.
- [36] Schouler C, Clier F, Lerayer AL, Ehrlich SD, Chopin MC. A type IC restriction-modification system in *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180(2): 407–411.
- [37] Berry J, Savva C, Holzenburg A, Young R. The lambda spanin components Rz and Rz1 undergo tertiary and quaternary rearrangements upon complex formation. *Protein Science*, 2010, 19(10): 1967–1977.
- [38] 何洋, 荆兆元, 杨洪江. 类志贺邻单胞菌噬菌体 ΦP4-7 裂解酶 Gp2 的表达及活性测定. 天津科技大学学报, 2017, 32(3): 16–22.
He Y, Jing ZY, Yang HJ. Characterization and activity determination of Gp2 endolysin from *Plesiomonas shigelloides* phage ΦP4-7. *Journal of Tianjin University of Science & Technology*, 2017, 32(3): 16–22. (in Chinese)

(本文责编 张晓丽)