

## 研究报告

## 四株耻垢分枝杆菌噬菌体的分离与鉴定

徐博<sup>#1,2</sup>, 郭慧敏<sup>#1,2</sup>, 徐正中<sup>1,2</sup>, 郑成坤<sup>\*1,2</sup>, 陈祥<sup>\*1,2</sup>, 焦新安<sup>1,2</sup>

1 扬州大学 江苏省人兽共患病学重点实验室 江苏省动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 江苏 扬州 225009

2 扬州大学 农业农村部农产品质量安全生物性危害因子(动物源)控制重点实验室, 江苏 扬州 225009

徐博, 郭慧敏, 徐正中, 郑成坤, 陈祥, 焦新安. 四株耻垢分枝杆菌噬菌体的分离与鉴定[J]. 微生物学通报, 2025, 52(2): 833-847.

XU Bo, GUO Huimin, XU Zhengzhong, ZHENG Chengkun, CHEN Xiang, JIAO Xin'an. Isolation and identification of four strains of *Mycobacterium smegmatis* bacteriophages[J]. Microbiology China, 2025, 52(2): 833-847.

**摘要:**【背景】分枝杆菌属(*Mycobacterium*)是一类细长略弯曲、可呈分枝状生长的杆菌,部分严重威胁人类和动物健康;噬菌体因其高效特异及易于制备的特性,成为抗生素替代疗法的研究热点。【目的】分离鉴定耻垢分枝杆菌(*Mycobacterium smegmatis*)噬菌体并对其进行生物学特性分析,评价其在不同环境下的适应能力及体外抑菌能力。【方法】以耻垢分枝杆菌 mc<sup>2</sup>155 为宿主菌,从奶牛场污水、粪便、土壤、垫料中分离纯化烈性噬菌体,并对其进行生物学特性研究。【结果】分离纯化鉴定并获得 4 株耻垢分枝杆菌噬菌体,分别命名为 MP2201、MP2202、MP2203、MP2204,其效价分别为  $1 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 、 $3 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^8$  PFU/mL;透射电子显微镜结果显示,4 株噬菌体均属于长尾噬菌体;MP2204 最佳感染复数为 1,其余 3 种噬菌体最佳感染复数均为 0.1;噬菌体 MP2201 暴发量最高,可达 500 PFU/cell;4 株噬菌体在 40–60 °C 时均可稳定存活,当 pH 3.0–11.0 时,效价变化不显著;制备噬菌体鸡尾酒能够显著抑制宿主菌生长;噬菌体全基因组测序结果表明:MP2201、MP2202、MP2203 和 MP2204 的基因组全长分别为 69 720、68 282、47 622 和 70 950 bp, G+C 含量分别为 59.14%、66.58%、63.22%和 59.02%,并且不含耐药基因。【结论】分离鉴定 4 株耻垢分枝杆菌噬菌体,为开发针对分枝杆菌感染的新型生物防治手段提供了生物材料和理论依据。

**关键词:** 分枝杆菌属;噬菌体;分离鉴定;噬菌体鸡尾酒

资助项目:国家重点研发计划(2021YFD1800403);江苏省农业科技自主创新基金[CX(21)1004];高等学校学科创新引智计划(D18007);江苏高校优势学科建设工程项目(PAPD)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFD1800403), the Agricultural Science and Technology Independent Innovation Fund of Jiangsu Province [CX(21)1004], the Higher Education Discipline Innovation and Introduction Program (D18007), and the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions (PAPD).

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work.

<sup>\*</sup>Corresponding authors. E-mail: CHEN Xiang, chenxiang@yzu.edu.cn; ZHENG Chengkun, zhengchengkun@yzu.edu.cn

Received: 2024-08-31; Accepted: 2025-01-02; Published online: 2025-01-07

## Isolation and identification of four strains of *Mycobacterium smegmatis* bacteriophages

XU Bo<sup>#1,2</sup>, GUO Huimin<sup>#1,2</sup>, XU Zhengzhong<sup>1,2</sup>, ZHENG Chengkun<sup>\*1,2</sup>, CHEN Xiang<sup>\*1,2</sup>, JIAO Xin'an<sup>1,2</sup>

1 Jiangsu Key Laboratory of Zoonosis, Jiangsu Co-Innovation Center for the Prevention and Control of Important Animal Infectious Diseases and Zoonoses, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu, China

2 Key Laboratory of Prevention and Control of Biological Hazard Factors (Animal Origin) for Agrifood Safety and Quality, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu, China

**Abstract:** [Background] *Mycobacterium* is a genus of slender, slightly curved, and branching bacilli, some of which seriously threaten human and animal health. Bacteriophages have emerged as a substitute of antibiotics because of their high efficiency, high specificity, and easy preparation. [Objective] To isolate and identify bacteriophages of *Mycobacterium smegmatis*, analyze their biological characteristics, and evaluate their adaptability in different environments and their antibacterial activity *in vitro*. [Methods] Using *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 as the host, we isolated virulent bacteriophages from dairy farm wastewater, feces, soil, and bedding and studied their biological characteristics. [Results] Four strains of *M. smegmatis* bacteriophages were isolated, identified, and named MP2201, MP2202, MP2203, and MP2204, with titers of  $1 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^8$ ,  $3 \times 10^8$ , and  $1 \times 10^8$  PFU/mL, respectively. Transmission electron microscopy results showed that the four strains were long-tailed bacteriophages. The optimal multiplicity of infection of MP2204 was 1, while that of the other three strains was 0.1. Strain MP2201 had the highest burst size, which reached 500 PFU/cell. All the four strains remained stable at 40–60 °C, and their titers did not change significantly within the range of pH 3.0–11.0. Preparing a bacteriophage cocktail significantly inhibited the growth of the host strain. Whole genome sequencing of the phages revealed that MP2201, MP2202, MP2203, and MP2204 had the genome lengths of 69 720, 68 282, 47 622, and 70 950 bp, in which the corresponding G+C content was 59.14%, 66.58%, 63.22%, and 59.02%, respectively. Notably, none of these genomes harbored antibiotic resistance genes. [Conclusion] Four strains of *M. smegmatis* bacteriophages were successfully isolated and identified, which provided biological materials and a theoretical basis for the development of new biocontrol methods for mycobacterial infection.

**Keywords:** *Mycobacterium*; bacteriophage; isolation and identification; bacteriophage cocktail

分枝杆菌属(*Mycobacterium*)是一类细长略弯曲、可呈分枝状生长的杆菌,包括结核分枝杆菌复合群(*Mycobacterium tuberculosis* complex)、非结核分枝杆菌(non-tuberculous *Mycobacterium*, NTM)和麻风分枝杆菌(*Mycobacterium leprae*)三大类。分枝杆菌广泛存在于土壤、灰尘、岩石、生物气溶胶和水中,它们越来越多地从条

件恶劣(即低营养、低 pH 值和极端温度)的环境中识别出来<sup>[1]</sup>,很难通过常见的方法根除,并且对氯、有机汞和碱性戊二醛等标准消毒剂(与大肠菌群相比)具有相对耐药性<sup>[2-3]</sup>。

非结核分枝杆菌(NTM)是分枝杆菌的一种,以耻垢分枝杆菌(*Mycobacterium smegmatis*)、脓肿分枝杆菌(*Mycobacterium abscessus*)等较为常

见, 并广泛存在于土壤和水等自然环境中<sup>[4-6]</sup>。由 NTM 引起疾病的临床表现因所涉及的物种及每种物种的繁殖速度而异, 其可引起肺部感染、淋巴结炎、皮肤感染、骨髓炎和播散性疾病<sup>[7]</sup>, 因此针对防控分枝杆菌感染所面临的挑战及使用噬菌体代替抗生素治疗感染, 成为研究的前沿焦点<sup>[8]</sup>。

分枝杆菌噬菌体属于双链 DNA 病毒, 分为长尾病毒科和肌病毒科, 现有的分枝杆菌噬菌体大多以耻垢分枝杆菌 mc<sup>2</sup>155 为宿主进行分离, 极少数以结核分枝杆菌 H37Rv 和其他分枝杆菌为宿主进行分离<sup>[9-10]</sup>。由放线菌噬菌体数据库 (<http://phagesdb.org>) 可知, 截至 2024 年 8 月, 已分离出 13 556 个分枝杆菌噬菌体, 并对 2 457 个分枝杆菌噬菌体基因组进行了测序。有研究表明, 运用噬菌体扩增技术、噬菌体展示文库、荧光素酶报告噬菌体等技术可以用于分枝杆菌诊断<sup>[11]</sup>, 此外, 治疗方面主要用噬菌体鸡尾酒及噬菌体与抗生素联用等技术。2021 年, 一项针对囊性纤维化患者的临床试验结果显示, 每 12 h 皮下注射噬菌体鸡尾酒, 持续 7 个月, 发现可以促进该患者的恢复<sup>[12]</sup>。

本实验通过以耻垢分枝杆菌 mc<sup>2</sup>155 为宿主菌分离得到 4 株耻垢分枝杆菌噬菌体, 并对其生物学特性及抑菌能力进行鉴定研究, 以期分为分枝杆菌的防控提供新的思路和方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品

宿主菌耻垢分枝杆菌 mc<sup>2</sup>155 由本实验室保存; 牛粪便、垫料、污水、土壤等样品采自江苏某奶牛场。

### 1.2 主要培养基

7H9 和 7H10 培养基, BD 公司; LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl

10.0; 7H9 培养基: 1.88 g 7H9 粉末, 200  $\mu$ L Tween-80, 定容至 360 mL ddH<sub>2</sub>O, 121 °C 灭菌 10 min 后加入 40 mL ADC 增菌液; 7H10 培养基: 7.69 g 7H10 粉末, 2 mL 甘油, 定容至 360 mL ddH<sub>2</sub>O, 121 °C 灭菌 10 min 后加入 40 mL OADC 增菌液; Top agar 半固体培养基(g/L): 7H9 5.2, agar 5.0。

### 1.3 主要试剂和仪器

OADC 和 ADC, BD 公司。生物安全柜和恒温培养箱, 上海跃进医疗器械厂; 透射电子显微镜, 日立高新技术公司。

### 1.4 噬菌体的分离与纯化

将样品充分溶于 15–20 mL MP buffer 中 4 °C 孵育过夜, 12 000 r/min 离心 10 min, 将上清用 0.22  $\mu$ m 的微孔滤器过滤至新的 50 mL 离心管中, 滤液即为样品原液。噬菌体的分离采用双层琼脂平板法, 即将 1 mL 样品原液、200  $\mu$ L 耻垢分枝杆菌 mc<sup>2</sup>155 ( $OD_{600}=0.8$ ) 和 6 mL Top agar 半固体培养基(50 °C)混匀后倾倒入 LB 固体培养基上, 静置晾干后 37 °C 培养 48 h, 观察是否出现噬菌斑。

挑选面积较大、清晰透亮且边缘光滑规则的单个噬菌斑充分溶于 1 mL MP buffer, 4 °C 孵育 4 h 后用 0.22  $\mu$ m 滤器过滤后得到噬菌体原液, 将噬菌体原液连续倍比稀释, 各梯度稀释液均与宿主菌和 Top agar 半固体培养基按上述比例混合做双层平板, 即为纯化 1 次噬菌体, 重复上述方法直到平板上出现形态大小一致的噬菌斑为止。

### 1.5 噬菌体效价的测定

噬菌体原液经连续倍比稀释后测定各梯度稀释液的效价, 将 100  $\mu$ L 各梯度稀释后的噬菌体分别与 100  $\mu$ L 耻垢分枝杆菌 mc<sup>2</sup>155 和 6 mL Top agar 半固体培养基混合后均匀铺在 LB 固体培养基上, 静置晾干后置于 37 °C 恒温培养箱培养 48 h 后对噬菌斑进行计数。

## 1.6 噬菌体透射电子显微镜观察

采用磷钨酸负染法用透射电子显微镜观察噬菌体形态。负染步骤具体如下：向铜片上滴加 100  $\mu\text{L}$  效价为  $1 \times 10^9$  PFU/mL 的噬菌体原液，10 min 后吸干水分，滴加 100  $\mu\text{L}$  磷钨酸，避光染色 2 min 后吸干水分，65  $^{\circ}\text{C}$  烤干 30 min。

## 1.7 噬菌体最佳感染复数测定

使用 7H9 培养基在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 的条件下将耻垢分枝杆菌  $\text{mc}^2155$  培养至对数期 ( $OD_{600} \approx 0.6$ )，并调浓度至  $1 \times 10^8$  CFU/mL。将噬菌体 MP2201、MP2202、MP2203、MP2204 与细菌按照感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 为 0.001、0.01、0.1、1、10 和 100 的比例混合，补加 2 mL 7H9 液体培养基使总体积相等。37  $^{\circ}\text{C}$ 、160 r/min 振荡培养 12 h 后利用双层琼脂平板法测定各个感染复数的噬菌体效价，效价最高者为噬菌体的 MOI。

## 1.8 噬菌体一步生长曲线的测定

将噬菌体 MP2201、MP2202、MP2203、MP2204 与耻垢分枝杆菌  $\text{mc}^2155$  以最佳 MOI 混合于 7H9 培养基中，37  $^{\circ}\text{C}$  静置 5 min，使噬菌体充分吸附于细菌上，以 10 000 r/min 离心 1 min，弃去上清，以 7H9 培养基重悬沉淀，37  $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 摇床培养，每 15 min 取样计算噬菌体效价。噬菌体暴发量 = 感染末期噬菌体效价 / 感染初期细菌数。

## 1.9 噬菌体 pH 稳定性的测定

使用 pH 仪调节 MP buffer pH，分别将 0.9 mL pH 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0 和 13.0 的 MP buffer，以及 0.1 mL 噬菌体 MP2201、MP2202、MP2203、MP2204 纯培养物混匀，37  $^{\circ}\text{C}$  恒温水浴 2 h 后测各管噬菌体效价。

## 1.10 噬菌体热稳定性的测定

将噬菌体 MP2201、MP2202、MP2203、

MP2204 纯培养物分别置于 40、50、60、70、80  $^{\circ}\text{C}$  恒温水浴锅中静置 30 min 和 60 min，温度较高的 70  $^{\circ}\text{C}$  和 80  $^{\circ}\text{C}$  设置 15 min 取样，测定不同温度下的噬菌体效价，并设置 3 组平行实验取均值。

## 1.11 噬菌体最佳抑菌比例的测定

将耻垢分枝杆菌  $\text{mc}^2155$  培养至对数期 ( $OD_{600} \approx 0.6$ )，并调浓度至  $1 \times 10^8$  CFU/mL。将噬菌体 MP2201、MP2202、MP2203、MP2204 按照 MOI 为 100、10、1、0.1、0.01、0.001 与耻垢分枝杆菌  $\text{mc}^2155$  共孵育，噬菌体与宿主菌按照 1:1 混合，对照组将噬菌体替换为等体积 MP buffer，并于 0、12、24、48 h 检测  $OD_{600}$ 。

## 1.12 噬菌体的体外抑菌活性

将耻垢分枝杆菌  $\text{mc}^2155$  培养至对数期 ( $OD_{600} \approx 0.6$ )，并调浓度至  $1 \times 10^8$  CFU/mL。将噬菌体 MP2201、MP2202、MP2203、MP2204 分别按照最佳 MOI 与耻垢分枝杆菌  $\text{mc}^2155$  共孵育。同时，取最佳 MOI 条件下的 4 株噬菌体各 200  $\mu\text{L}$  混合，制备噬菌体鸡尾酒与耻垢分枝杆菌  $\text{mc}^2155$  共孵育，对照组将噬菌体替换为等体积 MP buffer，每隔 30 min 用酶标仪检测  $OD_{600}$ 。

## 1.13 噬菌体在牛奶中的应用

将耻垢分枝杆菌  $\text{mc}^2155$  培养至对数期 ( $OD_{600} \approx 0.6$ )，并调浓度至  $1 \times 10^8$  CFU/mL。将噬菌体 MP2201、MP2202、MP2203、MP2204 分别与细菌按照最佳 MOI 混合 (保持细菌终浓度不变)，各吸取 200  $\mu\text{L}$  噬菌体与细菌混合物分别加入 5 mL 巴氏杀菌牛奶中，同时将以上 4 株噬菌体按照 1.12 方法混合制备噬菌体鸡尾酒加入 5 mL 巴氏杀菌牛奶中；振荡混匀，置于 180 r/min、37  $^{\circ}\text{C}$  恒温摇床培养。0、12、24 h 分别吸取 100  $\mu\text{L}$  梯度稀释检测宿主菌浓度。

## 1.14 噬菌体全基因组测序分析

将噬菌体 MP2201、MP2202、MP2203、

MP2204 扩大培养并浓缩后送至武汉贝纳科技有限公司, 使用二代测序技术平台测序并使用 UniCycler 对二代数据进行组装, 再使用 BWA (0.7.17-r1188)软件将 Illumina 短序列与拼接完成的基因组进行比对; 采用 Prokka (1.14.6)软件对组装后的基因组进行编码基因预测, 最终将预测出的各类基因元件加以汇总并完成初步注释; 将预测得到的基因序列与 COG、KEGG、UniProt、RefSeq 等功能数据库进行 BLAST+ (2.11.0)比对, 得到基因功能注释结果; 使用软件 HMMER (3.3.2)基于 Pfam、TIGRFAMs 数据库进行功能注释; 使用 BLASTp 基于毒力因子数据库 (Virulence Factor Database, VFDB)对目的蛋白质序列进行注释; 通过综合抗生素耐药性数据库 (Antibiotic Resistance Database, CARD)注释, 以获得每个基因组中包含的耐药基因信息。噬菌体全基因组测序结果已上传至国家微生物科学数据中心, 噬菌体 MP2201、MP2202、MP2203 和 MP2204 的 NMDC 编号分别为 NMDC10019538、NMDC10019535、NMDC10019536 和 NMDC10019537。

## 2 结果与分析

### 2.1 噬菌斑形态

本研究共分离纯化出 4 株耻垢分枝杆菌噬菌体, 分别将其命名为 MP2201、MP2202、MP2203 和 MP2204。如图 1 所示, 此 4 株噬菌体均呈典型的裂解性噬菌体特征。

### 2.2 噬菌体效价测定结果

噬菌体效价 (PFU/mL) = 噬菌斑数 × 稀释倍数 × 10。按照此公式测得的噬菌体效价为: MP2201 =  $1 \times 10^8$  PFU/mL、MP2202 =  $5 \times 10^8$  PFU/mL、MP2203 =  $3 \times 10^8$  PFU/mL、MP2204 =  $1 \times 10^8$  PFU/mL。

### 2.3 噬菌体透射电子显微镜观察结果

如图 2 所示, 在透射电子显微镜下, 噬菌

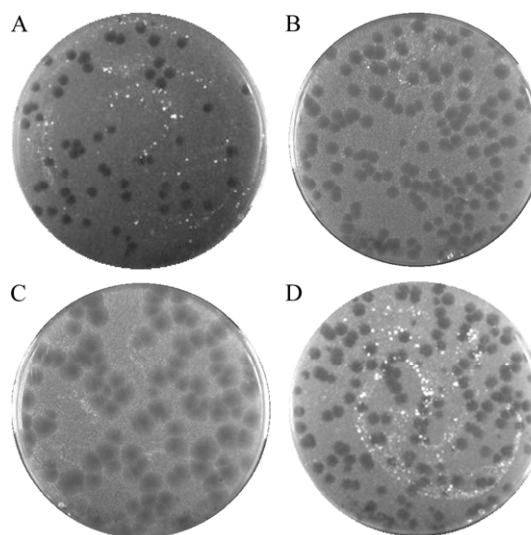


图 1 纯化后的噬菌体

Figure 1 The purified phage. A: MP2201; B: MP2202; C: MP2203; D: MP2204.

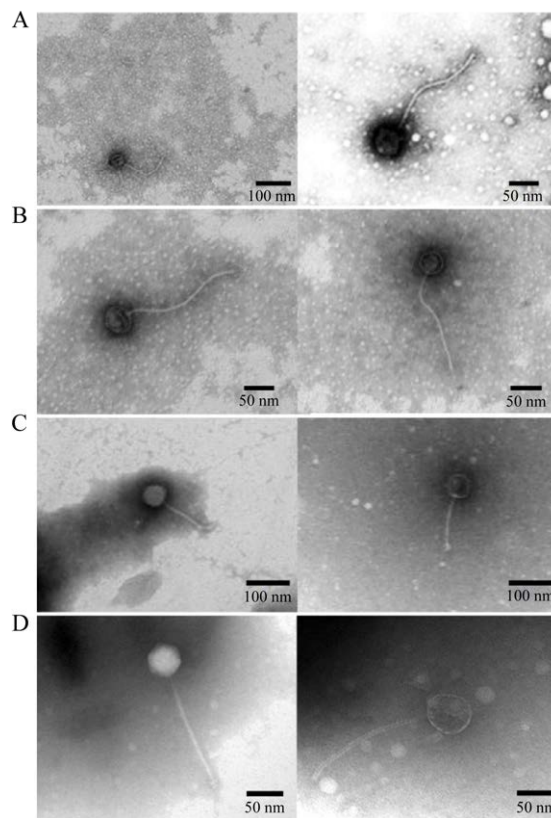


图 2 噬菌体透射电子显微镜结果

Figure 2 Electronic microscope of phages. A: MP2201; B: MP2202; C: MP2203; D: MP2204.

体 MP2201 头部平均直径约 50 nm, 尾部长约 232 nm; 噬菌体 MP2202 头部平均直径约 67 nm, 尾部长约 153 nm; 噬菌体 MP2203 头部平均直径约 49 nm, 尾部长约 105 nm; 噬菌体 MP2204 头部平均直径约 49 nm, 尾部长约 193 nm。根据参考文献[13]有关噬菌体的分类, 该 4 株噬菌体均属于长尾噬菌体。

## 2.4 噬菌体最佳感染复数

当 MOI 为 0.1 时, 噬菌体 MP2201、MP2202 和 MP2203 的效价在每组中最高; 当 MOI 为 1 时, 噬菌体 MP2204 效价在每组中最高; 因此噬菌体 MP2201、MP2202 和 MP2203 的最佳 MOI 为 0.1; 噬菌体 MP2204 的最佳 MOI 为 1 (图 3)。

## 2.5 噬菌体暴发量测定结果

根据一步生长曲线(图 4), 可以得到该 4 株噬菌体的暴发量分别为 500、160、400 和

200 PFU/cell, 其中噬菌体 MP2201 暴发量最高。

## 2.6 pH 对噬菌体活性的影响

由图 5 所示, 噬菌体 MP2201、MP2202、MP2203 和 MP2204 在 pH 3.0–11.0 范围时, 效价较稳定, pH<3.0 或 pH>11.0 都会引起效价的明显减少, pH≤2.0 或 pH≥12.0 时, 无法检测到噬菌体活性。

## 2.7 温度对噬菌体活性的影响

由图 6 所示, 噬菌体 MP2201、MP2202、MP2203 和 MP2204 在 40–60 °C 条件下能够基本维持初始效价, 70 °C 时存活略有差异, 80 °C 时均检测不到噬菌体存活。

## 2.8 噬菌体最佳抑菌比例测定结果

如图 7 所示, 相较于 MP buffer 对照组, 噬菌体 MP2201、MP2202、MP2203 和 MP2204 的最佳抑菌比例分别为 0.1、0.1、0.1 和 1.0。

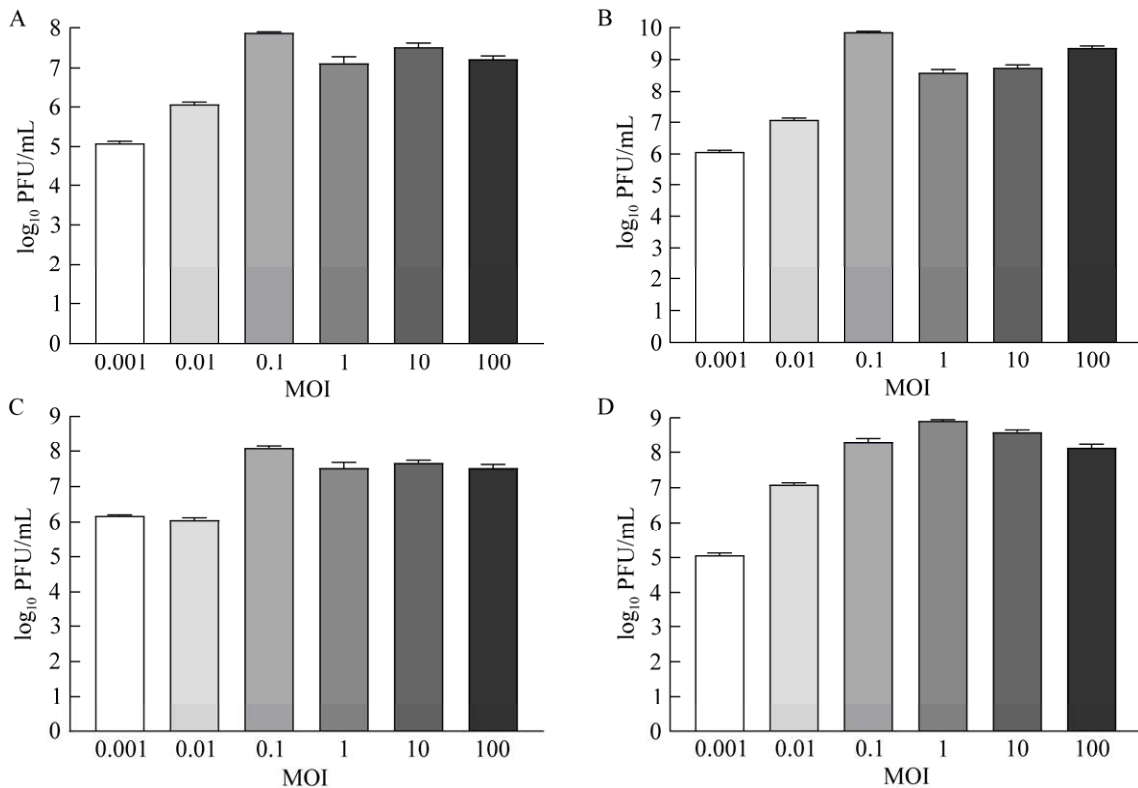


图 3 噬菌体最佳感染复数

Figure 3 Optimal multiplicity of infection. A: MP2201; B: MP2202; C: MP2203; D: MP2204.

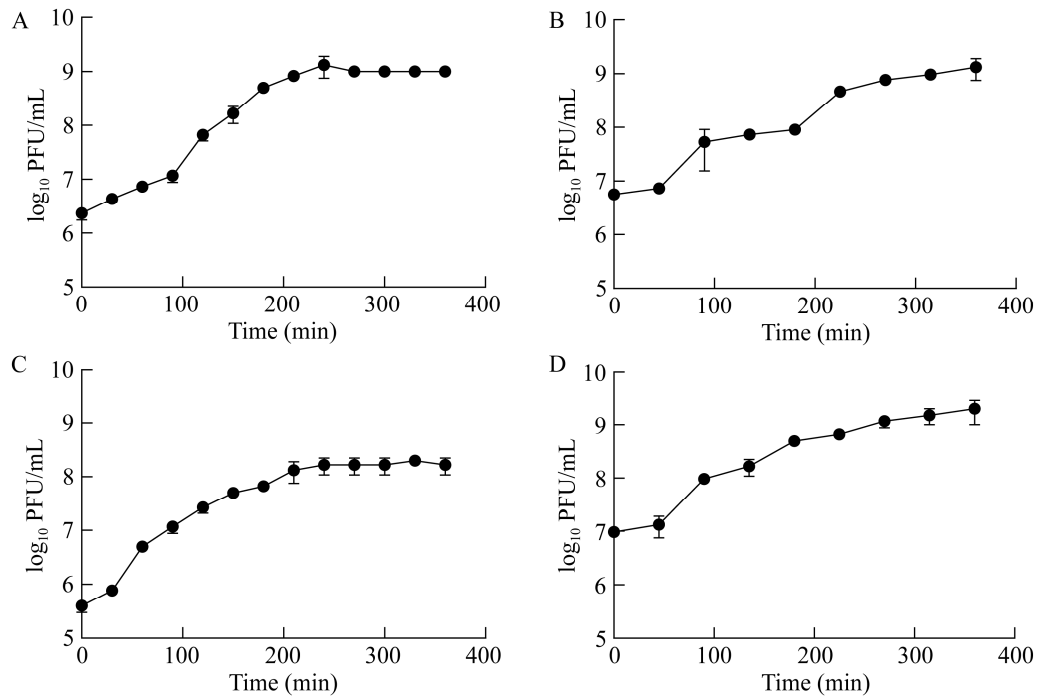


图 4 噬菌体一步生长曲线

Figure 4 One-step growth kinetics of phages. A: MP2201; B: MP2202; C: MP2203; D: MP2204.

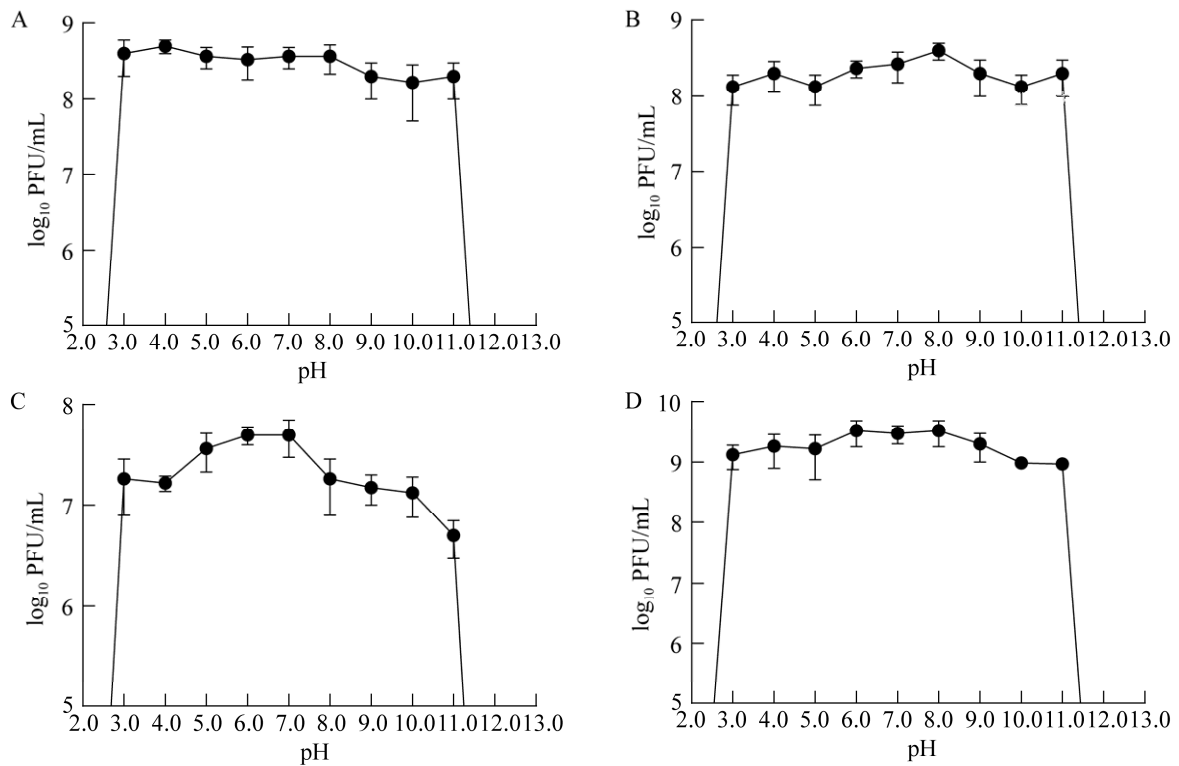


图 5 噬菌体 pH 稳定性

Figure 5 pH stability of phages. A: MP2201; B: MP2202; C: MP2203; D: MP2204.



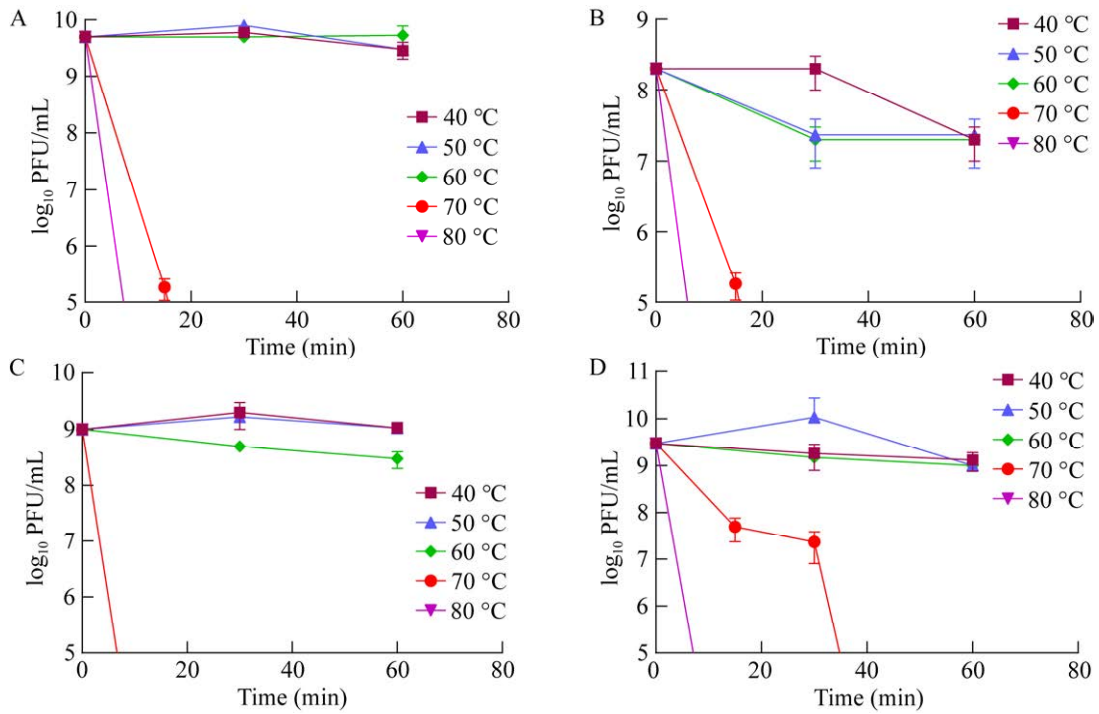


图 6 噬菌体热稳定性

Figure 6 Thermal stability of phages. A: MP2201; B: MP2202; C: MP2203; D: MP2204.

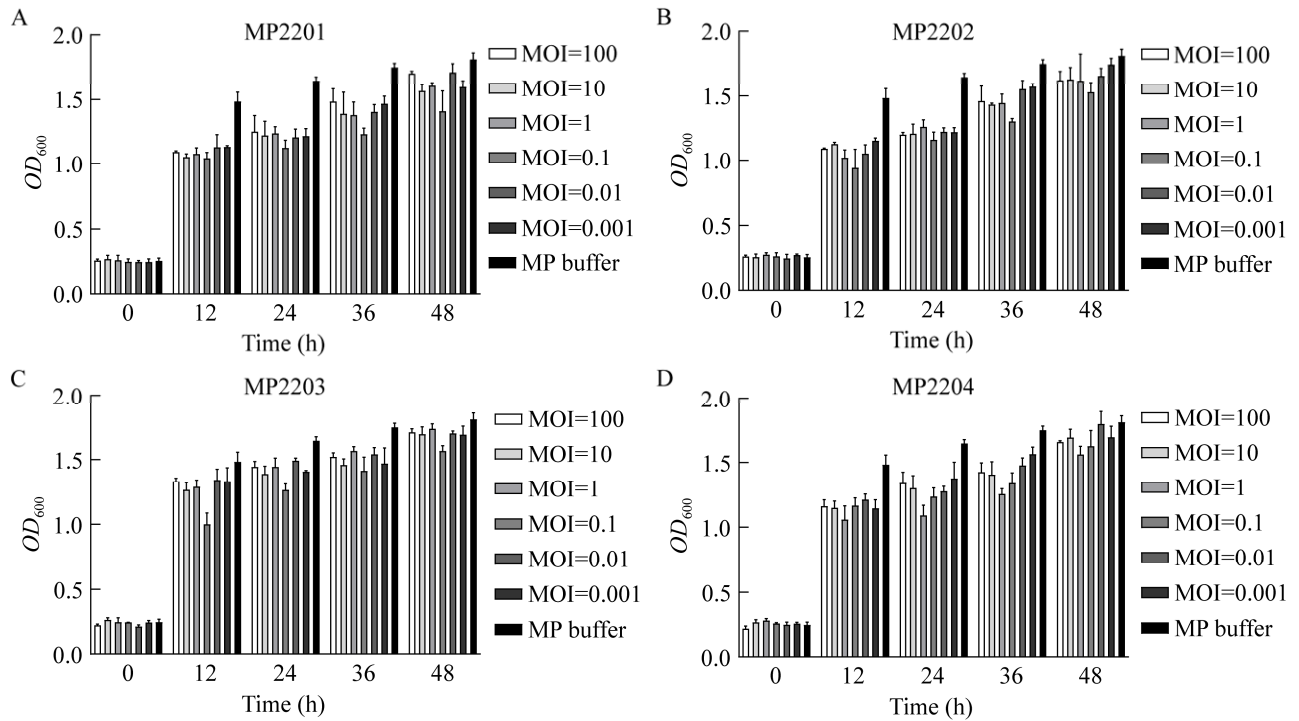


图 7 噬菌体最佳抑菌比例 MP buffer 为空白对照。

Figure 7 Determination of the optimal inhibitory ratio of phages. MP buffer serves as a blank control.



## 2.9 噬菌体鸡尾酒抑菌结果

由图 8 所示, 4 株噬菌体单独使用时, 均可抑制耻垢分枝杆菌  $mc^2155$  的生长, 且混合制备噬菌体鸡尾酒时, 其对宿主菌的抑制作用更加显著。

## 2.10 噬菌体在牛奶中的杀菌作用

由图 9 所示, 将 4 株噬菌体分别按最佳 MOI 加入牛奶中, 12 h 内耻垢分枝杆菌  $mc^2155$  数量均出现显著下降(噬菌体 MP2202 和 MP2204 约下降约 2 个 log 值; 噬菌体 MP2201、MP2203 下降约 3–4 个 log 值), 而相较于处理 12 h, 噬菌体 MP2204 处理 24 h 后宿主菌浓度略有上升, 其余 3 株噬菌体处理 24 h 后宿主菌浓度均略有下降; 将以上 4 株噬菌体混合制备鸡尾酒

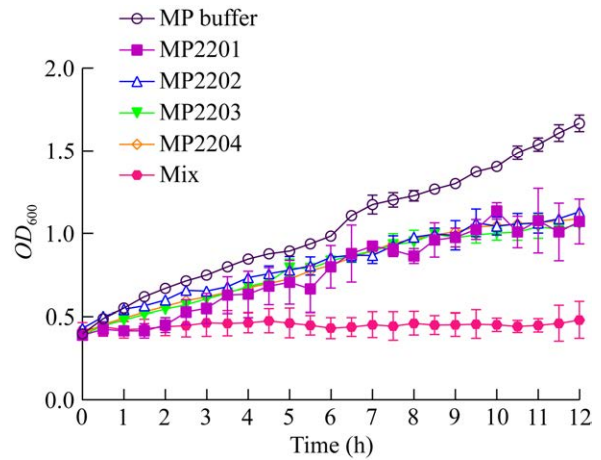


图 8 噬菌体鸡尾酒体外抑菌 MP buffer: 空白对照; Mix: 噬菌体鸡尾酒。

Figure 8 Phage cocktail *in vitro* antibacterial. MP buffer: Blank control; Mix: The phage cocktail.

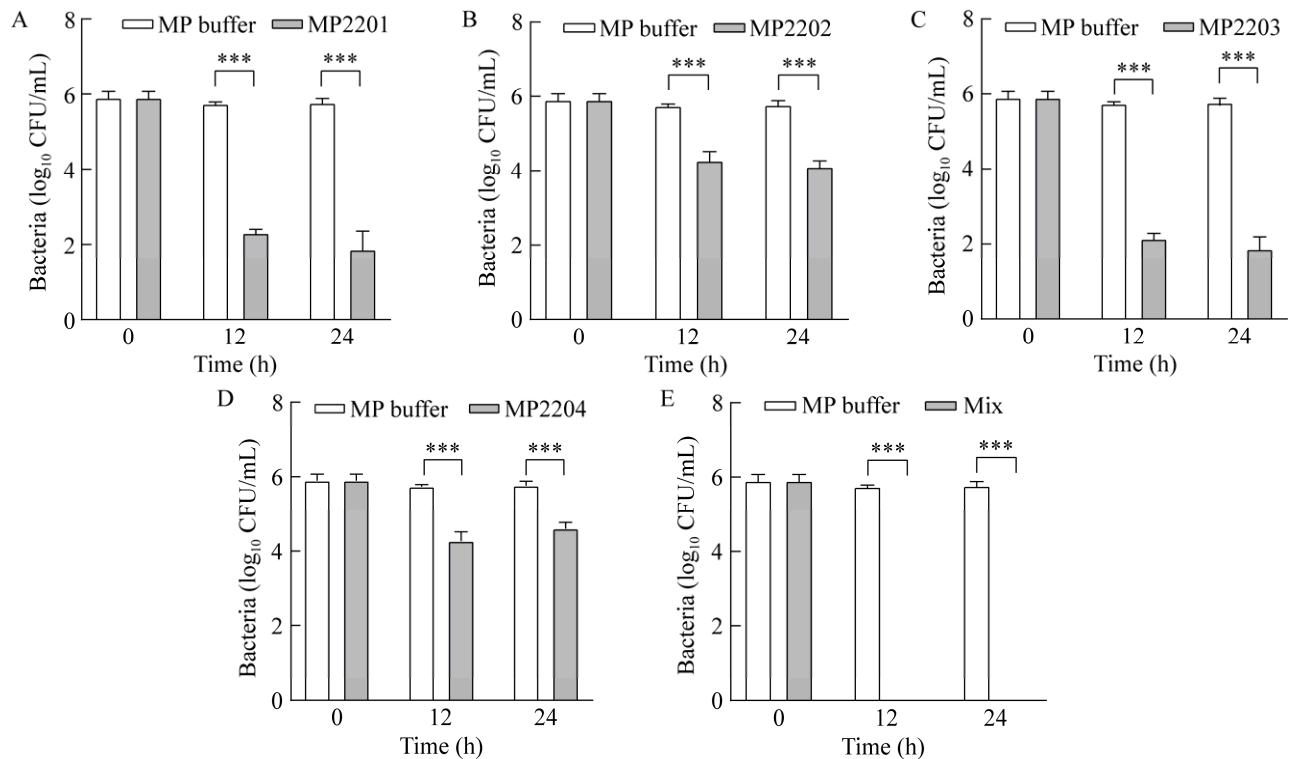


图 9 噬菌体在牛奶中的杀菌作用 A: MP2201; B: MP2202; C: MP2203; D: MP2204; E: 噬菌体鸡尾酒。MP buffer: 空白对照。

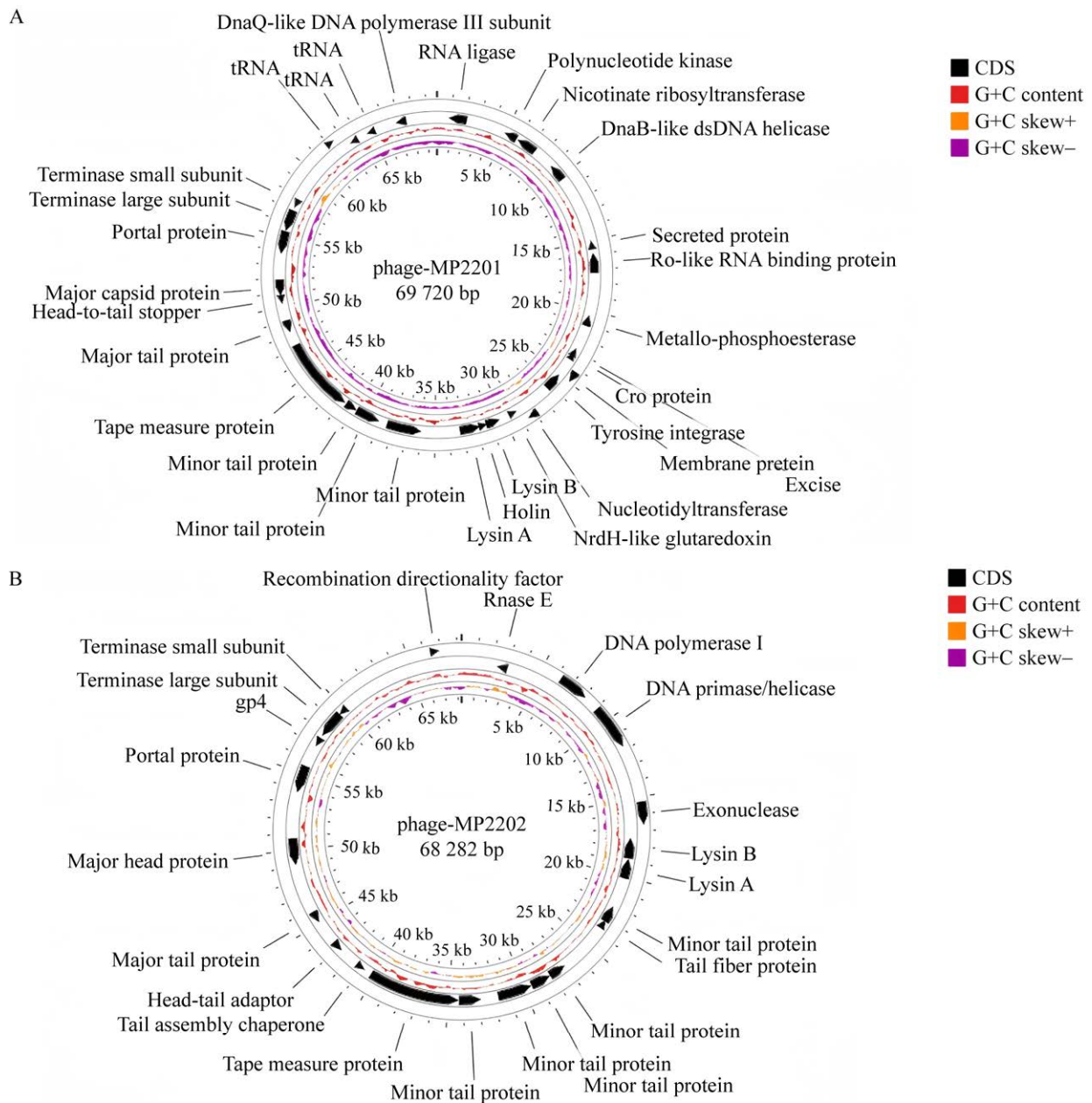
Figure 9 Bactericidal effects of phages in milk. A: MP2201; B: MP2202; C: MP2203; D: MP2204; E: The phage cocktail. MP buffer: Blank control. \*\*\*:  $P < 0.001$ .

处理时, 12 h 和 24 h 均检测不到宿主菌, 即无耻垢分枝杆菌 *mc*<sup>2</sup>155 存活(图 9E)。以上结果说明, 在牛奶中, 噬菌体单独使用时均可抑制并杀死宿主菌, 而噬菌体鸡尾酒的杀菌作用更好 ( $P < 0.001$ )。

## 2.11 噬菌体全基因组测序结果

全基因组测序分析结果显示(图 10), 噬菌体 MP2201、MP2202、MP2203 和 MP2204 均

为双链环状 DNA, 基因组全长分别为 69 720、68 282、47 622 和 70 950 bp, G+C 含量分别为 59.14%、66.58%、63.22%和 59.02%。其中, 噬菌体 MP2201 基因组中预测有 115 个开放阅读框(open reading frame, ORF), 基因平均长度为 539 bp, 并包含 10 个 tRNA; 噬菌体 MP2202 基因组中预测有 95 个 ORF, 基因平均长度为 669 bp, 无 tRNA 和 rRNA; 噬菌体 MP2203 基



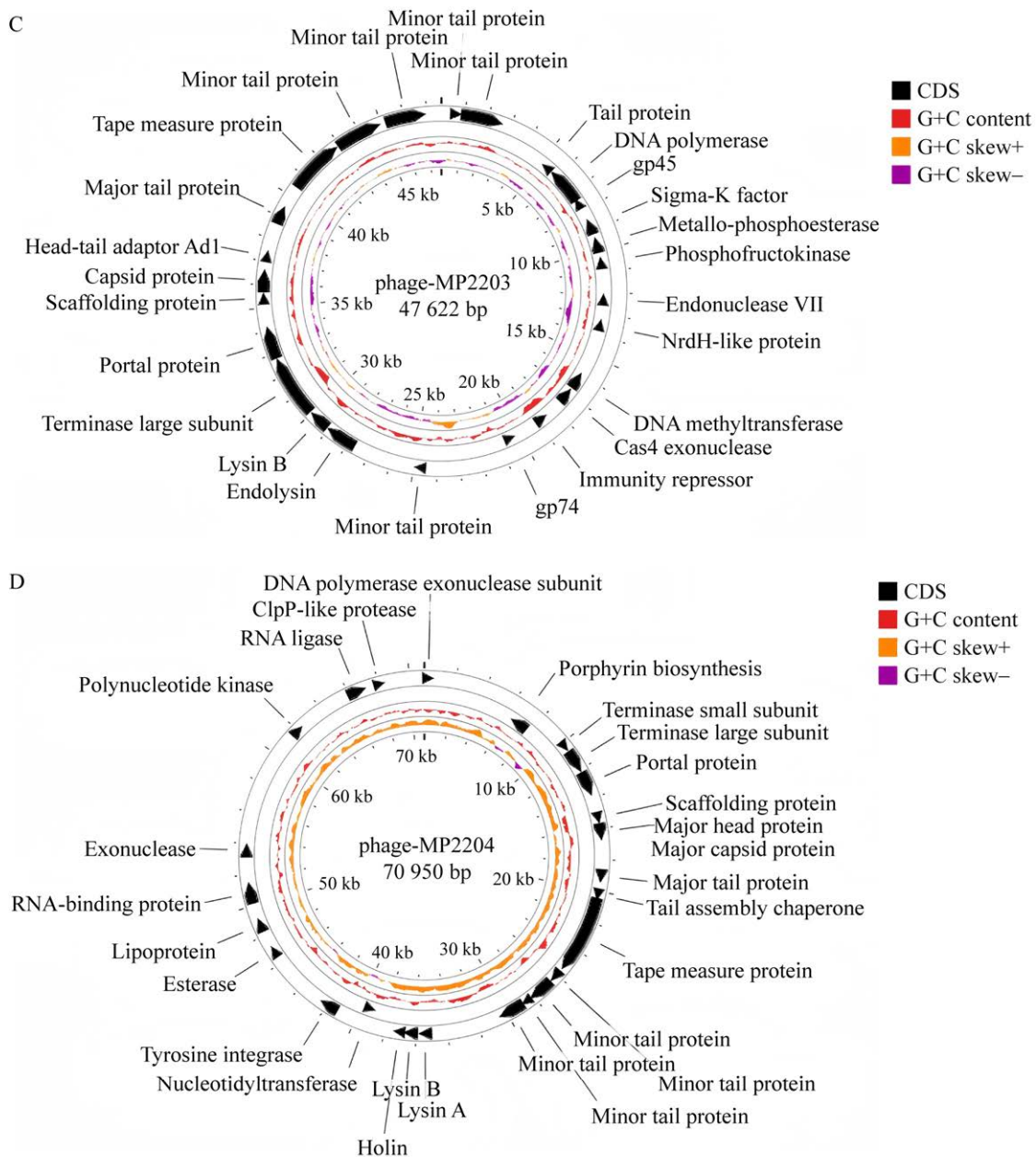


图 10 噬菌体 MP2201 (A)、MP2202 (B)、MP2203 (C)、MP2204 (D)基因组圈图 最外面一圈为 CDS (编码序列); 第二圈为 G+C 含量, 向外的部分表示该区域 G+C 含量高于全基因组平均 G+C 含量, 向内的部分表示该区域 G+C 含量低于全基因组平均 GC 含量, 峰值越高表示与平均 G+C 含量差值越大; 最内一圈为 G+C skew 值, 具体算法为 $(G-C)/(G+C)$ 。

Figure 10 The genome circle map of phage MP2201 (A), MP2202 (B), MP2203 (C) and MP2204 (D). From the outside to the inside: circle 1 indicates CDSs (coding sequences); Circle 2 indicates G+C content information; The outward part indicates that the G+C content of the region is higher than the average G+C content of the whole genome, while the inward part is the opposite; the higher the peak value is, the greater the difference from the average G+C content is; The innermost circle is the G+C skew value, whose specific algorithm is  $(G-C)/(G+C)$ .

基因组中预测有 78 个 ORF, 基因平均长度为 548 bp, 并包含 1 个 tRNA; 噬菌体 MP2204 基因组中预测有 121 个 ORF, 基因平均长度为 529 bp, 并包含 12 个 tRNA; 通过对基因组预测分析发现, 此 4 株噬菌体均无耐药基因。

通过 BLAST 比较全基因组序列, 结果显示: 噬菌体 MP2201 的全基因组序列与分枝杆菌噬菌体 DuncansLeg (序列号 ON755181.1) 具有 96.84% 的一致性, 与其余分枝杆菌噬菌体的一致性均在 95% 以下; 噬菌体 MP2202 的全基因组序列与分枝杆菌噬菌体 Roscoe (序列号 MK279877.1)、Eremos (序列号 NC\_028690.1)、CheetO (序列号 MH230875.1)、Boehler (序列号 MT897902.1) 和 Olive (序列号 MH077582.1) 具有较高的一致性且达 98% 以上; 噬菌体 MP2203 的全基因组序列与分枝杆菌噬菌体 Graduation (序列号 NC\_022979.1) 具有 97.35% 的一致性, 与分枝杆菌噬菌体 MrGordo (序列号 NC\_042329.1) 具有 97.33% 的一致性; 噬菌体 MP2204 的全基因组序列与分枝杆菌噬菌体 MS810 (序列号 PP465982.1)、Vetrix (序列号 OL455899.1)、LilDestine (序列号 MH779511.1) 和 Crossroads (序列号 NC\_022077.1) 具有较高的一致性且达 99% 以上。

通过基因组功能注释, 噬菌体 MP2201、MP2202、MP2203 和 MP2204 基因组分别注释了 102、95、77 和 109 个蛋白, 并且均能在非冗余蛋白质序列数据库(Non-Redundant Protein Sequence Database)中找到同源蛋白。其中, 在噬菌体 MP2201 中, 52 个为假设蛋白; 50 个为功能已知的蛋白, 主要为结构和装配相关蛋白(首尾衔接器、尾部组装伴侣蛋白、主要尾蛋白等)、DNA 复制和转录相关蛋白(如 RNA 连接酶、单链 DNA 结合蛋白、DNA 结合蛋白、WhiB 家族转录因子等)及宿主菌裂解相关蛋白(如类

ClpP 蛋白酶、lysin A、lysin B 等)。在噬菌体 MP2202 中, 62 个为假设蛋白; 33 个为功能已知的蛋白, 主要为结构和装配相关蛋白(如末端酶大亚基、末端酶小亚基、通道蛋白等)、DNA 复制和转录相关蛋白[如核糖核酸酶 E、DNA 聚合酶 I、DNA 引物酶/解旋酶、queuine(Q)tRNA-核糖基转移酶等]及宿主菌裂解相关蛋白(如 lysin A、lysin B 等)。在噬菌体 MP2203 中, 36 个为假设蛋白; 41 个为功能已知的蛋白, 主要为结构和装配相关蛋白(如衣壳蛋白、具有溶菌酶活性的次要尾蛋白、螺旋-转角-螺旋 DNA 结合蛋白等)、DNA 复制和转录相关蛋白(如 DNA 引物酶、Cas4 外切核酸酶、金属-磷酸酯酶等)及宿主菌裂解相关蛋白(如 lysin B、内容素等)。在噬菌体 MP2204 中, 55 个为假设蛋白; 54 个为功能已知的蛋白, 主要为结构和装配相关蛋白(如末端酶大亚基、末端酶小亚基、主要头部蛋白等)、DNA 复制和转录相关蛋白(如 DNA 聚合酶外切核酸酶亚基、NrdH 样谷氧还蛋白、RNA 结合蛋白等)及宿主菌裂解相关蛋白(如 lysin A、lysin B、穿孔素等)。

### 3 讨论

NTM 在自然界中普遍存在, 在免疫功能低下的个体中, NTM 感染可干扰结核病诊断并诱发人兽共患病<sup>[14]</sup>。有报道显示, 耻垢分枝杆菌可引起奶牛的肉芽肿性复发性临床乳腺炎<sup>[15]</sup>及人类皮肤软组织感染, 对人类和动物健康造成重大威胁。目前的防控策略主要以使用抗生素为主, 并且国内对于分枝杆菌噬菌体分离数量较少, 而抗生素会引起更严重的细菌耐药性问题, 所以在国内分离能够特异性裂解 NTM 且安全高效的噬菌体变得尤为迫切。

近年来, 应用噬菌体来防控细菌病原菌得到了新的关注和认识<sup>[16-18]</sup>, 有报道称, 使用个

性化分枝杆菌噬菌体方案治疗 20 例耐药分枝杆菌感染患者, 为超过一半的患者带来了福音<sup>[19]</sup>; Broxmeyer 等<sup>[20]</sup>已经证明噬菌体 TM4 有可能杀死巨噬细胞内的鸟分枝杆菌(*Mycobacterium avium*)和结核分枝杆菌; 对感染鸟分枝杆菌的小鼠进行的体内试验表明, 使用 TM4 治疗可显著减少脾脏中鸟分枝杆菌的数量<sup>[21]</sup>; Trigo 等<sup>[22]</sup>首次证明了噬菌体疗法对溃疡分枝杆菌(*Mycobacterium ulcerans*)感染的潜力。分枝杆菌噬菌体 D29 是一种烈性噬菌体, 病毒粒子尾长约为 129 nm, 有研究表明以耻垢分枝杆菌 mc<sup>2</sup>155 为宿主菌的条件下, D29 的潜伏期为 50 min; 暴发期为 90 min, 持续时间为 125 min 左右; 噬菌斑直径约为 5 mm<sup>[23]</sup>。因噬菌体 D29 能够快速裂解结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)和耻垢分枝杆菌(*Mycobacterium smegmatis*, MS)等分枝杆菌, Wilson 等<sup>[24]</sup>于 1997 年利用噬菌体 D29 这一特性建立了一种快速检测 MTB 的新技术 PhaB, 这表明分枝杆菌烈性噬菌体在抗结核治疗和应用中具有潜在价值, 但由于工程噬菌体作为治疗药物方面进展缓慢<sup>[25]</sup>, 能够实现有效治疗且具有广泛宿主范围的天然烈性噬菌体较少, 所以不断分离更多有效的分枝杆菌噬菌体尤为重要。

相同实验条件下, 烈性噬菌体所形成的噬菌斑大小与噬菌体自身生物学特性有关, 例如噬菌体本身大小、潜伏期和吸附指数等<sup>[26]</sup>, 从噬菌斑大小可以判定本研究分离得到的 4 株噬菌体均为烈性噬菌体, 并且噬菌斑直径比已知的分枝杆菌噬菌体噬菌斑直径大(大多数分枝杆菌噬菌体噬菌斑直径为 1–2 mm)。此外, 噬菌斑大小与病毒粒子大小有关, 病毒颗粒越小对吸附宿主速度更快, 潜伏期更短。噬菌体 MP2201、MP2202 和 MP2204 的噬菌斑直径约 5 mm, 尾长分别约为 232、153 和 193 nm, 而

噬菌体 MP2203 的噬菌斑直径约为 8 mm, 尾长约为 105 nm。相较于上述 3 株噬菌体和 D29, 噬菌体 MP2203 因其病毒粒子更小, 因此具有更快的吸附速度、更短的潜伏期及更大的噬菌斑。

噬菌体 MP2204 最佳感染复数为 1, 其余 3 株噬菌体的最佳感染复数均为 0.1, 说明以上 4 株噬菌体裂解能力较高效, 在较低浓度时就能起到良好的杀菌作用。一步生长曲线表明, 4 株噬菌体潜伏期均为 30 min 左右, 较 D29 缩短了近 20 min; 暴发期分别持续 210、240、180、240 min, 暴发量分别为 500、160、400、200 PFU/cell, 其中噬菌体 MP2201 暴发量最高, 可达 500 PFU/cell, 这表明此 4 株噬菌体较 D29 能够在更早的时间内发挥杀菌作用, 并在较长时间内抑制宿主菌的繁殖; 而通过噬菌体最佳抑菌比例测定, 发现以上 4 株噬菌体最佳抑菌比例与最佳感染复数结果相似, 这说明噬菌体的抑菌能力与效价及暴发量具有显著相关性。通过噬菌体温度和 pH 稳定性测定发现, 4 株噬菌体在 40–60 °C 时均可以稳定存在, 在 pH 3.0–11.0 时基本维持原来效价, 这表明 4 株噬菌体对不良环境的抵抗力较强。

将 4 株噬菌体分别单独使用和混合制备噬菌体鸡尾酒, 并与耻垢分枝杆菌 mc<sup>2</sup>155 共培养进行体外抑菌活性测定, 发现将其单独使用时对耻垢分枝杆菌 mc<sup>2</sup>155 均有明显抑制作用, 且制备鸡尾酒使用时其对宿主菌抑制作用更好; 因耻垢分枝杆菌可引起奶牛的肉芽肿性复发性临床乳腺炎, 我们进行了牛奶模拟试验, 使用耻垢分枝杆菌 mc<sup>2</sup>155 人工污染牛奶后, 将上述 4 株噬菌体分别单独和混合使用检测其在牛奶模型中的杀菌作用, 结果显示, 以上 4 株噬菌体单独使用时均可显著降低牛奶中宿主菌含量, 使用噬菌体鸡尾酒处理后, 消杀效果更明显( $P < 0.001$ )。



对该 4 株噬菌体进行全基因组测序分析,结果显示噬菌体 MP2201、MP2202、MP2203 和 MP2204 均为双链环状 DNA,基因组全长分别为 69 720、68 282、47 622、70 950 bp, G+C 含量分别为 59.14%、66.58%、63.22%、59.02%。其中 MP2201 基因组中预测有 115 个 ORF,并包含 10 个 tRNA; MP2202 基因组中预测有 95 个 ORF,无 tRNA 和 rRNA; MP2203 基因组中预测有 78 个 ORF,并包含 1 个 tRNA; MP2204 基因组中预测有 121 个 ORF,包含 12 个 tRNA。此外,通过检索 CARD 数据库,发现此 4 株噬菌体均不存在耐药基因,说明其具有代替或辅助抗生素治疗耻垢分枝杆菌感染的潜力。

## 4 结论

四株噬菌体均具备优良的温度及酸碱耐受范围,并且能高效特异性裂解耻垢分枝杆菌 mc<sup>2</sup>155,可以为分枝杆菌引起疾病的诊断和治疗,以及防治奶牛肉芽肿性复发性临床乳腺炎提供新的生物材料和理论依据。

## REFERENCES

- [1] de GROOTE MA, HUITT G. Infections due to rapidly growing mycobacteria[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2006, 42(12): 1756-1763.
- [2] SELVARAJU SB, KHAN IUH, YADAV JS. Biocidal activity of formaldehyde and nonformaldehyde biocides toward *Mycobacterium immunogenum* and *Pseudomonas fluorescens* in pure and mixed suspensions in synthetic metalworking fluid and saline[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(1): 542-546.
- [3] CARSON LA, PETERSEN NJ, FAVERO MS, AGUERO SM. Growth characteristics of atypical mycobacteria in water and their comparative resistance to disinfectants[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1978, 36(6): 839-846.
- [4] CHUNG J, INCE D, FORD BA, WANAT KA. Cutaneous infections due to nontuberculosis *Mycobacterium*: recognition and management[J]. *American Journal of Clinical Dermatology*, 2018, 19(6): 867-878.
- [5] CHIRASUTHAT P, TRIYANGKULSRI K, RUTNIN S, CHANPRAPAPH K, VACHIRAMON V. Cutaneous nontuberculous mycobacterial infection in Thailand: a 7-year retrospective review[J]. *Medicine*, 2020, 99(10): e19355.
- [6] FALKINHAM JO 3rd. Surrounded by mycobacteria: nontuberculous mycobacteria in the human environment[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, 107(2): 356-367.
- [7] PHILLIPS MS, von REYN CF. Nosocomial infections due to nontuberculous mycobacteria[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2001, 33(8): 1363-1374.
- [8] HOSSEINIPORGHAM S, SECHI LA. A review on mycobacteriophages: from classification to applications[J]. *Pathogens*, 2022, 11(7): 777.
- [9] HATFULL GF. Mycobacteriophages: windows into tuberculosis[J]. *PLoS Pathogens*, 2014, 10(3): e1003953.
- [10] ANES E, PORTUGAL I, MONIZ-PEREIRA J. Insertion into the *Mycobacterium smegmatis* genome of the *aph* gene through lysogenization with the temperate mycobacteriophage Ms6[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1992, 95(1): 21-25.
- [11] FU XY, DING MX, ZHANG N, LI JC. Mycobacteriophages: an important tool for the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* (review)[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2015, 12(1): 13-19.
- [12] NICK JA, DEDRICK RM, GRAY AL, VLADAR EK, SMITH BE, FREEMAN KG, MALCOLM KC, ELAINE EPPERSON L, HASAN NA, HENDRIX J, CALLAHAN K, WALTON K, VESTAL B, WHEELER E, RYSAVY NM, POCH K, CACERES S, LOVELL VK, HISERT KB, de MOURA VC, et al. Host and pathogen response to bacteriophage engineered against *Mycobacterium abscessus* lung infection[J]. *Cell*, 2022, 185(11): 1860-1874.e12.
- [13] 冯焯, 刘军, 孙洋, 冯书章. 噬菌体最新分类与命名[J]. *中国兽医学报*, 2013, 33(12): 1954-1958.  
FENG Y, LIU J, SUN Y, FENG SZ. An introduction to current classification and nomenclature of bacterial viruses[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2013, 33(12): 1954-1958 (in Chinese).
- [14] ORŁOWSKA B, MAJCHRZAK M, DIDKOWSKA A, ANUSZ K, KRAJEWSKA-WĘDZINA M, ZABOST A, BRZEZIŃSKA S, KOZIŃSKA M, AUGUSTYNOWICZ-KOPEĆ E, URBAŃSKA K, WELZ M, PARNIEWSKI P. Mycobacterial interspersed repeat unit-variable number tandem repeat typing of *Mycobacterium avium* strains isolated from the lymph nodes of free-living carnivorous animals in Poland[J]. *Pathogens*, 2023, 12(9): 1184.
- [15] SUPRÉ K, ROUPIE V, RIBBENS S, STEVENS M, BOYEN F, ROELS S. Short communication: *Mycobacterium smegmatis*, basonym *Mycobacterium smegmatis*, causing pyogranulomatous mastitis and its cross-reactivity in bovine (Para) tuberculosis testing[J]. *Journal of Dairy Science*, 2019, 102(9): 8405-8409.
- [16] 许燕萍, 徐正中, 陈祥, 焦新安. 噬菌体在食源性病原菌防控中的应用[J]. *中国人兽共患病学报*, 2018, 34(10): 927-930.  
XU YP, XU ZZ, CHEN X, JIAO XA. Application of bacteriophage for the control of foodborne pathogenic bacteria[J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2018, 34(10): 927-930 (in Chinese).
- [17] GE HJ, FU SS, GUO HM, HU MZ, XU ZZ, ZHOU XH, CHEN X, JIAO XA. Application and challenge of bacteriophage in the food protection[J]. *International*

- Journal of Food Microbiology, 2022, 380: 109872.
- [18] GE HJ, HU MZ, ZHAO G, DU Y, XU NN, CHEN X, JIAO XA. The “fighting wisdom and bravery” of tailed phage and host in the process of adsorption[J]. Microbiological Research, 2020, 230: 126344.
- [19] DEDRICK RM, SMITH BE, CRISTINZIANO M, FREEMAN KG, JACOBS-SERA D, BELESSIS Y, WHITNEY BROWN A, COHEN KA, DAVIDSON RM, van DUIN D, GAINEY A, GARCIA CB, ROBERT GEORGE CR, HAIDAR G, IP W, IREDELL J, KHATAMI A, LITTLE JS, MALMIVAARA K, McMULLAN BJ, MICHALIK DE, et al. Phage therapy of *Mycobacterium* infections: compassionate use of phages in 20 patients with drug-resistant mycobacterial disease[J]. Clinical Infectious Diseases, 2023, 76(1): 103-112.
- [20] BROXMEYER L, SOSNOWSKA D, MILTNER E, CHACÓN O, WAGNER D, McGARVEY J, BARLETTA RG, BERMUDEZ LE. Killing of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium tuberculosis* by a mycobacteriophage delivered by a nonvirulent *Mycobacterium*: a model for phage therapy of intracellular bacterial pathogens[J]. The Journal of Infectious Diseases, 2002, 186(8): 1155-1160.
- [21] DANELISHVILI L, YOUNG LS, BERMUDEZ LE. *In vivo* efficacy of phage therapy for *Mycobacterium avium* infection as delivered by a nonvirulent *Mycobacterium*[J]. Microbial Drug Resistance, 2006, 12(1): 1-6.
- [22] TRIGO G, MARTINS TG, FRAGA AG, LONGATTO-FILHO A, CASTRO AG, AZEREDO J, PEDROSA J. Phage therapy is effective against infection by *Mycobacterium ulcerans* in a murine footpad model[J]. PLoS Neglected Tropical Diseases, 2013, 7(4): e2183.
- [23] 邹亭亭, 刘平, 罗永艾, 郭述良. 分枝杆菌噬菌体 D29 的生物学特性研究及其抗耐药结核潜力的探讨[J]. 世界科技研究与发展, 2012, 34(2): 314-317.
- WU TT, LIU P, LUO YA, GUO SL. Exploration of biological characteristics of mycobacteriophage D29 and potentials in control of drug-resistant tuberculosis[J]. World Sci-Tech R&D, 2012, 34(2): 314-317 (in Chinese).
- [24] WILSON SM, AL-SUWAIDI Z, McNERNEY R, PORTER J, DROBNIEWSKI F. Evaluation of a new rapid bacteriophage-based method for the drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Nature Medicine, 1997, 3(4): 465-468.
- [25] HATFULL GF, DEDRICK RM, SCHOOLEY RT. Phage therapy for antibiotic-resistant bacterial infections[J]. Annual Review of Medicine, 2022, 73: 197-211.
- [26] ABEDON ST, YIN J. Bacteriophage plaques: theory and analysis[J]. Methods in Molecular Biology, 2009, 501: 161-174.