

研究报告

## 粪肠球菌噬菌体 vB\_ *E. faecalis* \_IME196 的生物学特性及其全基因组分析

邢少贞<sup>1,2</sup> 张湘莉兰<sup>2</sup> 舒鹏<sup>2</sup> 孙强<sup>2</sup> 裴广倩<sup>2</sup> 米志强<sup>2</sup> 安小平<sup>2</sup> 王景林<sup>2</sup>  
赵宝华<sup>1\*</sup> 童贻刚<sup>2\*</sup>

(1. 河北师范大学 河北 石家庄 050024)

(2. 军事医学科学院微生物流行病学研究所 北京 100071)

**摘要:**【目的】从医院污水中分离一株能裂解多耐药粪肠球菌的噬菌体, 分析该噬菌体的生物学特性, 并进行全基因组测序和分析, 为治疗和控制多耐药粪肠球菌感染提供基础。【方法】以耐药粪肠球菌为宿主, 从医院污水分离噬菌体, 双层平板法检测噬菌体效价、最佳感染复数(MOI)和一步生长曲线, 纯化后负染法电镜观察噬菌体形态; 蛋白酶 K/SDS 法提取噬菌体全基因组, 酶切处理后琼脂糖凝胶电泳分析, 使用 Ion Torrent 测序平台进行噬菌体全基因组测序, 测序后进行噬菌体全基因组序列组装、注释、进化分析和比较分析。【结果】分离到一株粪肠球菌噬菌体, 命名为 vB\_ *E. faecalis* \_IME196 (IME196); 其最佳感染复数为 0.01, 一步生长曲线显示 IME196 的潜伏期为 30 min, 暴发量为 50 PFU, 电镜观察该噬菌体为长尾噬菌体, 结合 BLASTp 分析确定其属于尾病毒目长尾噬菌体科, 基因测序表明, 噬菌体 IME196 核酸类型为 DNA, 基因组全长为 38 895 bp, G+C 含量为 33.9%。【结论】分离鉴定一株粪肠球菌噬菌体, 进行了全基因组测序和分析, 为以后预防和控制粪肠球菌的感染提供了一个新的途径, 为噬菌体治疗多重耐药细菌奠定了基础。

**关键词:** 噬菌体, 粪肠球菌, 生物学特性, 全基因组测序, 基因组分析

**Foundation item:** China Mega-Project on Infectious Disease Prevention (No. 2013ZX10004-605, 2013ZX10004-217, 2013ZX10004-607, 2011ZX10004-001); National High-Tech Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2014AA021402, 2012AA022-003); National Natural Science Foundation of China (No. 81572045)

**\*Corresponding authors:** E-mail: ZHAO Bao-Hua: zhaobaohua@hebtu.edu.cn; TONG Yi-Gang: tong.yigang@gmail.com

**Received:** December 22, 2015; **Accepted:** March 29, 2016; **Published online** (www.cnki.net): April 08, 2016

基金项目: 科技重大专项“十二五”实施计划项目(No. 2013ZX10004-605, 2013ZX10004-217, 2013ZX10004-607, 2011ZX10004-001); 国家高技术研究发展计划项目(863 计划)(No. 2014AA021402, 2012AA022-003); 国家自然科学基金项目(No. 81572045)

\*通讯作者: E-mail: 赵宝华: zhaobaohua@hebtu.edu.cn; 童贻刚: tong.yigang@gmail.com

收稿日期: 2015-12-22; 接受日期: 2016-03-29; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-04-08

## Characterization and complete genome sequence analysis of *Enterococcus faecalis* bacteriophage vB\_ *E. faecalis*\_IME196

XING Shao-Zhen<sup>1,2</sup> ZHANG Xiang-Li-Lan<sup>2</sup> SHU Peng<sup>2</sup> SUN Qiang<sup>2</sup> PEI Guang-Qian<sup>2</sup>  
MI Zhi-Qiang<sup>2</sup> AN Xiao-Ping<sup>2</sup> WANG Jing-Lin<sup>2</sup> ZHAO Bao-Hua<sup>1\*</sup> TONG Yi-Gang<sup>2\*</sup>

(1. Hebei Normal University, Shijiazhuang, Hebei 050024, China)

(2. Beijing Institute of Microbiology and Epidemiology, Beijing 100071, China)

**Abstract:** [Objective] We isolated a novel virulent bacteriophage specifically infecting antibiotics-resistant *Enterococcus faecalis* from hospital sewage, to study its morphology and to analyze its genome so as to provide basis for treatment and infection control of antibiotics-resistant *E. faecalis*. [Methods] We used *E. faecalis* as the host to isolate phage from raw sewage from the sewage treatment center of a hospital. Transmission electromicroscopy, optimal multiplicity of infection (optimal MOI) and one-step growth curve were conducted. The genome DNA was extracted and sequenced by high-throughput sequencing technology. The feature of whole genome, and evolutionary relationship were analyzed. [Results] A lytic bacteriophage designated as vB\_ *E. faecalis*\_IME196 (IME196) was isolated. The optimal multiplicity of infection (optimal MOI) of IME196 is 0.01. One-step growth curve shows that IME196 has a burst size of 50 PFU and a latent period of 30 min. The genome of IME196 is a 38 895 bp in length, linear, terminally non-redundant double-stranded DNA and has a G+C content of 33.9%. [Conclusion] Isolation and characterization of a lytic *Enterococcus faecalis* phage will help supply a new way to prevent and control the infection of *E. faecalis*, and laid a foundation to the treatment of multiple drug resistant bacteria in the future.

**Keywords:** Phage, *Enterococcus faecalis*, Biological characteristics, Whole genomic sequencing, Genomics

肠道微生态系统中寄居着大量菌群, 其中既有益生菌、中间型菌群, 也有致病菌<sup>[1]</sup>。益生肠球菌作为一类重要的益生菌, 已普遍用于食品的加工<sup>[2]</sup>。目前, 粪肠球菌是最常用的益生肠球菌, 主要应用于食品发酵的工艺中, 许多食物中均添加了粪肠球菌, 例如香肠、奶酪、橄榄油等<sup>[3]</sup>。粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)属于肠球菌属<sup>[4]</sup>。当粪肠球菌异位寄生时可引起败血症、尿路感染、心内膜炎和化脓性腹部感染等疾病, 尤其随着抗生素的不断更新换代, 耐药肠球菌感染疾病病例逐渐增加<sup>[5]</sup>, 万古霉素曾经被认为是对付耐药菌株的最后一道防线, 但在 1986 年出现了首例耐万古霉素肠球菌(VRE), 随着肠球菌的耐药性愈加扩大, 对人类的健康造成严重威胁, 也向临床治疗耐药粪肠球菌提出了极大的挑战<sup>[6]</sup>。

噬菌体是一类能感染细菌等微生物的病毒。类似于感染动物和植物的病毒, 噬菌体必需依靠

宿主菌才能进行复制和繁殖。噬菌体是细菌的天然杀手, 广泛存在于自然界中, 随着细菌耐药性问题日益严重, 新抗生素研发的速度远低于耐药菌产生的速度<sup>[7]</sup>。作为可替代抗生素成为新型抗菌剂的噬菌体, 引起了国内外研究者的重视。噬菌体的治疗具有独特优势: 特异性强, 只针对相应的病原菌, 而不会破坏正常菌群; 噬菌体的作用机制与抗生素完全不同, 治疗效果不受细菌耐药性影响; 噬菌体的指数增殖能力是噬菌体治疗的显著优势; 副作用少; 不易对噬菌体产生抗性<sup>[8]</sup>。

除此之外, 通过高通量测序得知全基因组序列, 预测基因功能, 这些研究有利于噬菌体治疗应用, 对噬菌体的进化分析也将有助于对其生命规律进行深入了解。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

10 株粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)和 10 株屎

肠球菌(*Enterococcus faecium*)均来自珠海迪尔公司收集医院临床分离女性阴道分泌物或者粪便。经生化鉴定和 16S rRNA 基因测序鉴定,由本实验室保存。4 株金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、2 株大肠杆菌(*Escherichia coli*)来自本实验室细菌库所保存样品。BHI (Brain heart infusion)培养基, BD 医疗器械有限公司;酚:氯仿:异戊醇液(25:24:1, 体积比), 北京索莱宝科技有限公司;聚乙二醇 8000 (PEG8000), AMRESCO 公司;蛋白酶 K、RNase、DNase, Fermentas 公司。

### 1.2 噬菌体的分离

取未经处理的 307 医院污水, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 用 0.22  $\mu\text{m}$  的滤器过滤污水, 将上述过滤液 100  $\mu\text{L}$  加入到 5 mL 对数期指示菌粪肠球菌中。于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 振荡培养过夜, 然后 10 000 r/min 离心 10 min, 收集上清, 用微孔滤膜(孔径 0.22  $\mu\text{m}$ )过滤处理, 所得滤液即为噬菌体原液。

### 1.3 噬菌体的纯化与浓缩

在有噬菌斑形成的双层 BHI 培养基平板<sup>[4]</sup>上挑取形态大小一致、单个独立噬菌斑, 加入到 5 mL 的  $OD_{600}$  值为 0.4–0.6 的宿主菌液内, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 摇床培养 6 h 左右, 10 000 r/min 离心 1 min, 取上清液体, 加入至 500 mL 的  $OD_{600}$  值为 0.4–0.6 的宿主菌液内, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 摇床培养 12 h 左右, 然后用 PEG 沉淀法浓缩噬菌体<sup>[4]</sup>。

### 1.4 透射电子显微镜下观察噬菌体形态及大小

将浓缩噬菌体液体取出 50  $\mu\text{L}$ , 加 50  $\mu\text{L}$  0.5% 的戊二醛和 4% 的多聚甲醛, 充分混合固定, 取出 30  $\mu\text{L}$  滴入覆盖有 Formvar 膜的铜网上, 大约静置 30 min, 用滤纸吸收多余液体, 然后用 2% 的磷钨酸染色, 静置 10 min, 室温下自然干燥后, 在 Philips TECNAI-10 型的透射电镜下观察并记录噬菌体的形态和大小。

### 1.5 噬菌体最佳感染复数测定

参照张文惠等<sup>[4]</sup>的方法, 略有改动。

感染复数(Multiplicity of infection, MOI), 是感

染时噬菌体与细菌的数量比值, 也就是平均每个细菌所感染噬菌体的数量。而最佳感染复数, 是可使噬菌体获得最佳生长状态时的感染复数。具体测定方法为: 按 MOI 分别为 0.01、0.1、1、10、100 混合噬菌体悬液和宿主菌悬液, 加入新鲜的 BHI 培养基补足体积至 8 mL, 于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 振荡培养 5 h; 10 000 r/min 离心 1 min, 分别用 0.22  $\mu\text{m}$  滤器过滤; 梯度稀释后, 双层平板法测定噬菌体的滴度, 其中噬菌体滴度最高的 MOI 即为最佳感染复数。

### 1.6 噬菌体一步生长曲线测定

参照张文惠等<sup>[4]</sup>的方法, 略有改动。

将粪肠球菌 2007 培养至  $OD_{600}$  值为 0.4–0.6, 取适量菌液倍比稀释后涂板, 确定在此状态下每毫升菌液所含细菌个数; 将粪肠球菌 2007 接种至适量体积的新鲜 BHI 培养基, 培养至对数期后离心并重悬于 BHI 培养基, 使其浓度达到  $10^8$  CFU/mL, 以感染复数 MOI 为 0.01 加入噬菌体 IME196; 置于 37  $^{\circ}\text{C}$  振荡培养; 自加入噬菌体开始计时, 分别在 5、10、20、25、30、40、50、60、90 和 120 min 时间点取样, 测定样品滴度; 以感染时间为横坐标, 以各时间点滴度为纵坐标绘制 IME196 的一步生长曲线。

### 1.7 噬菌体裂解谱测定

测定噬菌体对受试菌是否有裂解作用是通过点板试验来测试, 将受试菌(10 株粪肠球菌、10 株屎肠球菌、4 株金黄色葡萄球菌和 2 株大肠杆菌)培养至  $OD_{600}$  为 0.6 左右, 取出 500  $\mu\text{L}$  铺双层平板, 室温静置 5 min, 将 1.5  $\mu\text{L}$  噬菌体原液滴于双层平板上, 室温静置 20 min, 待噬菌体原液被吸收后倒置于 37  $^{\circ}\text{C}$  温箱中 10 h 后观察有无噬菌斑产生。

### 1.8 提取噬菌体 IME196 基因组

取 600  $\mu\text{L}$  已纯化的浓缩噬菌体液体, 参照张文惠等<sup>[4]</sup>蛋白酶 K/SDS 法提取核酸, 有改动。

加入 DNase I 和 RNase A 至终浓度 1 mg/L, 37  $^{\circ}\text{C}$  过夜处理, 80  $^{\circ}\text{C}$  灭活 15 min, 使上述酶失活。然后加入 0.5 mol/L EDTA (终浓度 0.02 mol/L), 20 g/L 蛋白酶 K (终浓度 50 mg/L), 10% SDS (终浓度 0.5%), 56  $^{\circ}\text{C}$  水浴 1 h。加入等体积酚抽提核

酸, 10 000 r/min 离心 5 min, 转移上层水相到新的 1.5 mL 离心管中。向上述离心管中加入等体积的酚-氯仿-异戊醇(25:24:1, 体积比), 温和混匀后 10 000 r/min 离心 10 min, 以去除蛋白、糖类等物质污染。取上述离心管中水相到一个新的离心管中, 并加入等体积异戊醇,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  放置 4 h 后 12 000 r/min 离心 15 min, 收集沉淀。用 75% 的冰乙醇洗涤上述 DNA 沉淀, 12 000 r/min 离心 20 min, 室温干燥后用去离子水重悬浮上述 DNA 沉淀。

### 1.9 噬菌体 IME196 的全基因组测序

构建大约 290 bp 的测序文库利用 Life Technologies 公司的 Ion Torrent 测序仪 PGM 完成噬菌体全基因组的测序。主要流程如下: 基因组 DNA 进行超声打断, 末端补平, 加上特异接头, 纯化筛选 DNA 即为构建的测序文库; 将测序文库片段克隆至特定磁珠, 通过 Emulsion PCR 扩增测序文库。

### 1.10 噬菌体 IME196 全基因组序列分析

噬菌体 IME196 全基因组序列利用软件 Newbler 2.9 进行序列拼接, 全基因组使用 RAST (<http://rast.nmpdr.org/>) 和 BASys (Bacterial Annotation System) 在线基因功能注释, 序列相似性比对分析使用 BLAST 在线工具 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) 进一步通过 NCBI

Microbial Genome Submission Check 验证注释序列是否有问题, 将无误基因组注释序列向 NCBI 提交, 获取序列号。利用 CGView 软件构建 (<http://wishart.biology.ualberta.ca/cgview/>) 噬菌体全基因组图谱。

通过 Ion Torrent 高通量测序产生 58 M 数据, 平均读长为 290 bp, 拼接出全长为 38 895 bp 能够环化的噬菌体基因组。

## 2 结果与分析

### 2.1 噬菌体 IME196 形态及大小

粪肠球菌 2007 分离于临床女性阴道分泌物, 抗生素耐药性见表 1。所铺双层平板培养 5 h 后结果如图 1A 所示, 噬菌体边缘清晰, 噬菌斑透亮, 稀释  $10^{-8}$  的平板上长出 36 个噬菌斑, 纯化后的噬菌体颗粒经负染后在透射电子显微镜下(图 1B)观察, 结果显示该噬菌体呈蝌蚪状, 头部直径约为 58 nm, 尾部长约 230 nm, 该噬菌体被命名为 vB\_E. faecalis\_IME196, 属长尾噬菌体科(Siphoviridae)。

### 2.2 噬菌体 IME196 的最佳感染复数

如表 2 所示, 按照比例加入噬菌体和宿主菌培养 5 h, 分别测各管的噬菌体滴度。从表 2 中看出当 MOI=0.01 时噬菌体滴度最高, 该结果表明噬菌体的最佳感染复数为 0.01。

表 1 粪肠球菌 2007 抗生素耐药性

Table 1 *Enterococcus faecalis* 2007 antibiotic resistance

抗菌药物 Antimicrobial drugs	MIC (mg/L)	敏感度 Sensitivity	抗菌药物 Antimicrobial drugs	MIC (mg/L)	敏感度 Sensitivity
复方新诺明 Cotrimoxazole	$\leq 20$	S	奎奴普丁 Quinupristin	$\leq 4$	R
左氧氟沙星 Levofloxacin	0.5	S	头孢曲松 Ceftriaxone	$\leq 1$	S
哌拉西林 Piperacillin	$\leq 4$	S	头孢唑啉 Cefazolin	$\geq 64$	R
高链霉素 High streptomycin	4	R	呋喃妥因 Nitrofurantoin	$\leq 16$	S
头孢他啶 Ceftazidime	$\leq 1$	S	头孢吡肟 Cefepime	$\leq 1$	S
哌拉西林 Ampicillin	$\leq 4$	S	庆大霉素 Gentamicin	$\leq 1$	S
美罗培南 Meropenem	$\leq 0.25$	S	四环素 Tetracycline	$\geq 64$	R

注: S: 敏感; I: 中介度; R: 耐药。

Note: S: Sensitivity; I: Betweenness; R: Drug resistance.

### 2.3 噬菌体 IME196 的一步生长曲线

通过研究噬菌体的生长规律来测定噬菌体的裂解能力,由图2可知,前30 min为噬菌体的潜伏期,暴发期为60 min,噬菌体的裂解量约为噬菌体滴度/细菌的浓度= $1.5 \times 10^9 / 3 \times 10^7 = 50$  PFU。

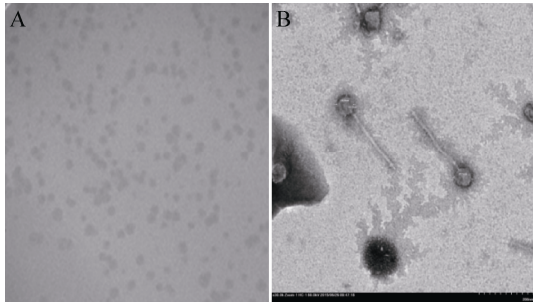


图1 噬菌体 IME196 形成的噬菌斑(A)及透射电镜下噬菌体 IME196 的形态(B) (10 000×)

Figure 1 The plaque formed by IME196 (A) and the morphology of phage IME196 (B) (TEM 10 000×)

表2 噬菌体最佳感染复数(MOI)的测定  
Table 2 Determination of optimal multiplicity of infection (MOI)

编号 Number	细菌浓度 Bacteria (CFU/mL)	噬菌体滴度 Phage (PFU/mL)	感染复数 MOI	6 h 滴度 6 h Titer (PFU/mL)
1	$10^8$	$10^9$	0.01	$4.8 \times 10^9$
2	$10^8$	$10^8$	0.1	$1.0 \times 10^9$
3	$10^8$	$10^7$	1	$2.2 \times 10^8$
4	$10^8$	$10^6$	10	$3.1 \times 10^8$
5	$10^8$	$10^5$	100	$3.1 \times 10^7$

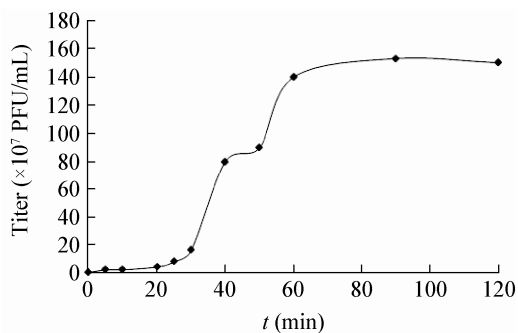


图2 噬菌体 IME196 的一步生长曲线

Figure 2 One-step growth curve of phage IME196

### 2.4 噬菌体裂解谱的测定

噬菌体 IME196 只对 3 株粪肠球菌有裂解能力。IME196 对其他粪肠球菌、屎肠球菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌无裂解能力。

### 2.5 噬菌体 IME196 全基因组高通量测序和组装及高频率序列分析

约 100  $\mu$ g 所提取的噬菌体基因组 DNA 样品用于构建测序文库,测序约产生 686 350 条平均长度为 287 bp 的高质量测序片段(Reads),选取约 14 657 条平均长度约 268 bp 的 Reads 用于基因组序列组装,参与组装碱基约 892 810 个,平均覆盖倍数为 23 ( $892\ 810 \div 38\ 895 \approx 23$ )倍。噬菌体 IME196 基因组组装结果产生长约 39 kb 的单一重叠群(Contig),即测序数据分析可知该噬菌体基因组是环状的。环化后完整基因组长度为 38 895 bp。

噬菌体末端序列通常在其基因组复制、包装等方面有重要作用。序列分析发现,噬菌体高通量测序中高频出现的序列就是噬菌体末端。根据文献[9]建立的病毒基因组末端结构分析方法,通过把所有原始高通量测序的 Reads 映射到(Mapping)组装好的基因组上,统计分析所有 Reads 的出现次数,并根据出现次数从高到低排序。大部分高通量测序的 Reads 重复次数小于 200,出现两个频率特别高的 Reads。如图 3 所示,只有两个序列的频率极高,分别是序列 1 (5'-ATTGTGTTGAGTAAGAATTGGAGGGGGGCAAAAATTTT-3')和序列 2 (5'-CTTTCGCTTAAACGAATTTCTAAAACGAAAGTTGAAAAC-3')。所以 IME196 有固定的基因组末端序列,复制时的开环及末端切割是同一位点(图 4)。

### 2.6 噬菌体 IME196 的全基因组概述

噬菌体 IME196 基因组全长 38 895 bp,该基因组是一条环状双链 DNA 分子,G+C 含量为 33.9%。噬菌体 vB\_E\_faecalis\_IME196 全基因组核酸序列已经提交 GenBank,登录号为 KT932701。BLASTn 比对表明 IME196 与粪肠球菌噬菌体 EfaCPT1 (40 kb)的相似性最高,其次是粪

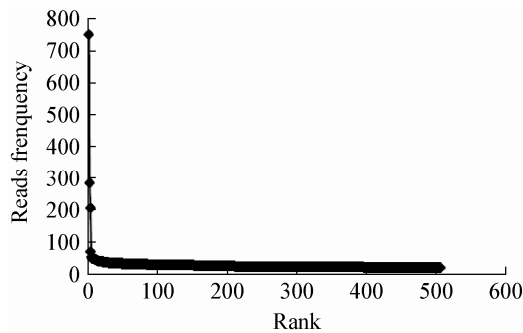


图3 噬菌体 IME196 末端的 Reads 发生频率

Figure 3 Frequencies of sequence reads representing the genomic termini of IME196

注: X 轴表示 Reads 重复次数取值范围; Y 轴表示 Reads 条数的统计。

Note: X axis is the span of Reads frequency; Y axis is the statistic of the number of Reads.

肠球菌噬菌体 IME-EF4 (40 kb), 比对覆盖率为 92%。核酸序列 GenBank 登录号分别为 JX193904 和 KF733017。通过全基因组 RAST 在线初步注释和 NCBI 的 BLASTp 分析, 结果显示, 该基因组共有 57 个开放阅读框(ORFs), 其中 11 个 ORFs 为假想蛋白(Hypothetical protein)序列, 46 个 ORFs 的功能已知, 如表 3 所示。ORF1 (噬菌体末端酶小亚基) 和 ORF2 (噬菌体末端酶大亚基)在噬菌体包装时起重要作用。ORF20 (噬菌体孔蛋白)编码的蛋白质能使细菌细胞膜形成空洞, 这有利于噬菌体基因组核酸注入到受体细菌, 同时该蛋白还具有连接噬菌体头部与尾部的功能。通常上述 3 个 ORF 在基

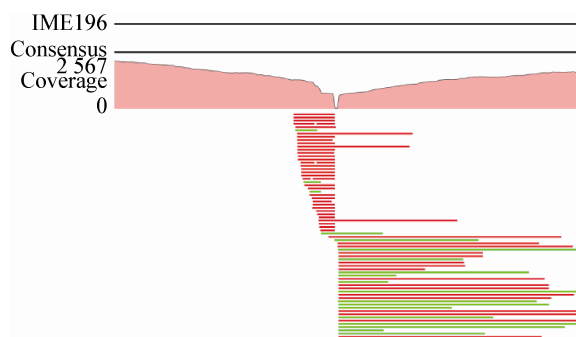


图4 噬菌体 IME196 的末端分析

Figure 4 The genomic termini of phage IME196

因组上临近。结构蛋白 ORF6 (主要衣壳蛋白)是噬菌体主要衣壳蛋白, 与包装蛋白邻近。ORF7-ORF16 编码噬菌体尾部相关蛋白, 这个基因簇在噬菌体感染、吸附宿主菌时发挥重要作用。

噬菌体 DNA 复制及调控相关基因主要包括: ORF24 (DNA 聚合酶)、ORF45 (DNA 引物酶)、ORF187 (DNA 拓扑异构酶)、ORF251 (单链 DNA 结合蛋白)、ORF38 (DNA 解旋酶)和 ORF184 (转录调控因子)等。

ORF21 (噬菌体裂解酶)和 ORF20 (穿孔蛋白)是噬菌体裂解相关基因。ORF20 编码穿孔蛋白, 使细菌细胞膜穿孔。该噬菌体可能是通过同时表达上述两种蛋白来介导宿主细胞裂解的。

使用在线的 CGview 制作噬菌体全基因组模式图, 如图 5 所示: 共 4 圈, 由外到内依次为位于最外圈蓝色代表 IME196 正链所编码的 CDS, 其次是里圈蓝色代表负链所编码的 CDS; 黑色代表 G+C 含量, 向外表示大于全基因组平均 G+C 含量, 向内表示低于平均 G+C 含量; 最里面的绿色和紫色圈分别代表 G+C 偏嗜性 G-C/G+C, 绿色代表大于 0, 紫色代表小于 0。

### 3 讨论

噬菌体是细菌的天然杀手, 有严格的宿主特异性和副作用较小等特点, 这使得噬菌体个体化治疗成为具有潜力的研究方向之一<sup>[10]</sup>, 这种新的治疗方案未来将极有可能成为治疗人类细菌感染的有效武器。面对日益严峻的细菌耐药性问题, 噬菌体疗法备受人们的关注。例如, 为了解决抗生素耐药问题, 美国在 20 世纪 90 年代兴起一些噬菌体研究公司<sup>[9]</sup>。由于噬菌体具有严格的宿主特异性, 以及细菌与噬菌体相互作用进化过程中会对噬菌体产生耐受, 单一噬菌体制剂将不能满足治疗要求。所以, 噬菌体混合制剂鸡尾酒疗法及个性化噬菌体治疗方法可能是未来噬菌体治疗的研究方向之一。但并不是所有的噬菌体都具有用于治疗的价值, 有些噬菌体可能携带耐药基因甚至

表3 噬菌体 IME196 的 ORF 功能预测  
Table 3 ORF analysis of the IME196 genome

ORF	Top BLAST hit <sup>a</sup>	IDENTITY <sup>b</sup> (%) (aa)	E value	Accession No.
1	Terminase small subunit [Enterococcus phage EFAP-1]	98 (154/157)	2.00E-108	YP_002727893.1
2	Terminase large subunit [Enterococcus phage IME-EF4]	98 (562/572)	0	YP_009004370.1
3	Hypothetical protein [Enterococcus phage IME_EF3]	93 (50/54)	2.00E-23	YP_009008897.1
4	Putative portal protein [Enterococcus phage EfaCPT1]	98 (377/383)	0	YP_009103820.1
5	Head maturation protease [Enterococcus phage IME_EF3]	99 (186/187)	3.00E-131	YP_009008895.1
6	HK97 family major capsid protein [Enterococcus phage AUEF3]	89 (370/418)	0	AHN83328.1
7	Major tail protein [Enterococcus phage IME-EF4]	100 (66/66)	2.00E-37	YP_009004365.1
8	Head-tail joining protein [Enterococcus phage EFRM31]	99 (97/98)	2.00E-63	YP_004306647.1
9	Head-tail adaptor protein [Enterococcus phage EFRM31]	48 (282/585)	1.00E-73	YP_004306648.1
10	Head-tail joining protein [Enterococcus phage EFRM31]	98 (132/135)	4.00E-93	YP_004306649.1
11	Head-tail joining protein [Enterococcus phage EFRM31]	98 (118/121)	9.00E-83	YP_004306650.1
12	Major tail protein [Enterococcus phage EFRM31]	99 (187/188)	2.00E-129	YP_004306651.1
13	Hypothetical protein EFAP1_gp09 [Enterococcus phage EFAP-1]	99 (102/103)	3.00E-66	YP_002727881.1
14	Putative tail tape measure chaperone frameshift protein [Enterococcus phage efactp1]	90 (35/39)	4.00E-16	YP_009103829.1
15	Putative tail tape measure protein [Enterococcus phage efactp1]	86 (1 253/1 456)	0	YP_009103831.1
16	Tail family protein [Enterococcus phage AUEF3]	94 (653/693)	0	AHN83270.1
17	Minor structural N-terminal region domain protein [Enterococcus phage AUEF3]	92 (619/676)	0	AHN83271.1
18	Hypothetical protein efactp1_gp17 [Enterococcus phage efactp1]	93 (88/95)	6.00E-59	YP_009103834.1
19	Hypothetical protein IME-EF4_44 [Enterococcus phage IME-EF4]	94 (76/81)	5.00E-37	YP_009004355.1
20	Holin class II [Enterococcus phage IME_EF3]	99 (77/78)	9.00E-47	YP_009008947.1
21	Lysin, N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase [Enterococcus phage IME_EF3]	98 (320/328)	0	YP_009008946.1
22	Putative glutaredoxin [Enterococcus phage efactp1]	87 (65/75)	4.00E-39	YP_009103838.1
23	HNH endonuclease family protein [Enterococcus phage EFRM31]	50 (75/150)	1.00E-31	YP_004306639.1
24	DNA polymerase [Enterococcus phage IME-EF4]	96 (735/763)	0	YP_009004351.1
25	Hypothetical protein CO47_0108 [Enterococcus phage AUEF3]	99 (219/220)	9.00E-156	AHN83279.1
26	Hypothetical protein IME-EF4_36 [Enterococcus phage IME-EF4]	54 (45/83)	2.00E-20	YP_009004347.1
27	Hypothetical protein [Enterococcus phage IME_EF3]	83 (38/46)	2.00E-17	YP_009008938.1
28	Hypothetical protein CO47_0111 [Enterococcus phage AUEF3]	98 (259/265)	0	AHN83282.1
29	Hypothetical protein IME-EF4_34 [Enterococcus phage IME-EF4]	100 (62/62)	9.00E-36	YP_009004345.1
30	Beta-lactamase superfamily domain protein [Enterococcus phage AUEF3]	97 (250/258)	0	AHN83284.1
31	Putative HNH homing endonuclease-like protein [Enterococcus phage IME_EF3]	98 (156/159)	1.00E-110	YP_009008933.1
32	Hypothetical protein [Enterococcus phage IME_EF3]	99 (71/72)	6.00E-180	YP_009008932.1
33	Hypothetical protein IME-EF4_30 [Enterococcus phage IME-EF4]	98 (165/168)	3.00E-118	YP_009004341.1
34	Hypothetical protein IME-EF4_29 [Enterococcus phage IME-EF4]	94 (64/68)	1.00E-140	YP_009004340.1
35	Putative prim-pol domain protein [Enterococcus phage efactp1]	81 (235/290)	9.00E-164	YP_009103851.1
36	Hypothetical protein IME-EF4_26 [Enterococcus phage IME-EF4]	98 (61/62)	8.00E-35	YP_009004337.1
37	Hypothetical protein IME-EF4_25 [Enterococcus phage IME-EF4]	100 (65/65)	4.00E-39	YP_009004336.1
38	DNA helicase [Enterococcus phage IME_EF3]	88 (383/434)	0	YP_009008926.1

(待续)



(续表)				
39	HNH homing endonuclease [Enterococcus phage IME_EF3]	67 (108/162)	5.00E-67	YP_009008925.1
40	Hypothetical protein [Enterococcus phage IME_EF3]	91 (112/123)	2.00E-60	YP_009008924.1
41	Hypothetical protein [Enterococcus phage IME_EF3]	83 (54/65)	1.00E-28	YP_009008923.1
42	Hypothetical protein IME-EF4_21 [Enterococcus phage IME-EF4]	98 (50/51)	3.00E-24	YP_009004332.1
43	Hypothetical protein CO47_0128 [Enterococcus phage AUEF3]	88 (79/90)	1.00E-47	AHN83299.1
44	Hypothetical protein [Enterococcus phage IME_EF3]	90 (56/62)	6.00E-31	YP_009008919.1
45	Putative primase [Enterococcus phage efactp1]	99 (522/526)	0	YP_009103865.1
46	Hypothetical protein [Enterococcus phage IME_EF3]	85 (55/65)	2.00E-30	YP_009008915.1
47	Hypothetical protein [Enterococcus phage IME_EF3]	92 (68/74)	6.00E-40	YP_009008910.1
48	Hypothetical protein EFLK1_ORF093 [Enterococcus phage EFLK1]	54 (25/46)	2.00E-10	AKC05052.1
49	No hits			
50	No hits			
51	No hits			
52	Hypothetical protein efactp1_gp55 [Enterococcus phage efactp1]	56 (77/131)	3.00E-33	YP_009103872.1
53	APC amino acid-polyamine-organocation transporter [Enterococcus phage EFRM31]	96 (55/57)	3.00E-31	YP_004306633.1
54	No hits			
55	Daunorubicin resistance transmembrane protein [Enterococcus phage EFRM31]	94 (101/108)	2.00E-68	YP_004306631.1
56	No hits			
57	No hits			

注：<sup>a</sup>：最相近基因组的微生物物种的基因和名称。No hits：没有比对到相近的氨基酸序列。<sup>b</sup>：BLASTp 搜索到比对百分比。

Note: <sup>a</sup>: The most closely related genes and names of the organisms. No hits: Indicates no significant homology detected for a particular amino acid sequence. <sup>b</sup>: Percent identity for top hits in BLASTp searches.

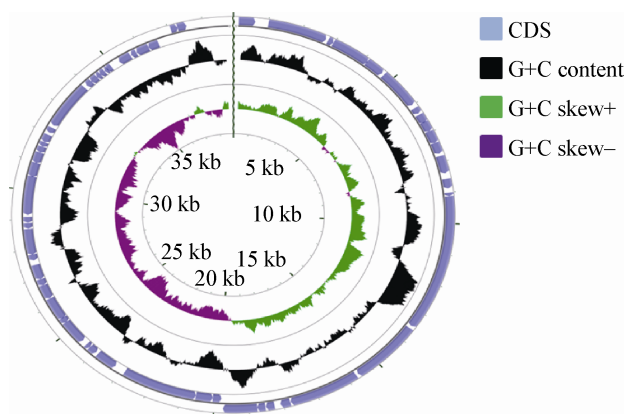


图 5 IME196 全基因组图谱  
Figure 5 Genome map of IME196

毒力基因，可能会使患者陷入更大的感染威胁。因此，需要对分离到的噬菌体进行全基因组测序，这样不仅能够知道该噬菌体的基本生物学特性及全基因组结构，更为噬菌体的实际应用提供保障。

综上所述，本实验从 307 医院污水处理站的污水中分离出一株噬菌体，命名为 vB\_ *E. faecalis*\_IME196，通过透射电镜观察，按照噬菌体分类学中的分类标准，判断该噬菌体属于长尾噬菌体科(Siphoviridae)，进一步进行生物学特性研究发现该噬菌体最佳感染复数为 0.01，一步生长曲线显示 IME196 的潜伏期为 30 min，暴发期为 60 min，暴发量为 50 PFU，裂解量大，加上噬菌体 IME196 可裂解多株粪肠球菌，不能裂解屎肠球菌和金黄色葡萄球菌，既具有一定的广谱性，又具有宿主专一性，所以适合用于噬菌体治疗的进一步研究。

此外，本文利用 Ion Torrent PGM 高通量测序仪进行全基因组测序，生物信息学分析得到全长基因组序列；通过查找其末端高频序列，证明了该噬菌体基因组的完整性和滚环复制时末端切割点同一性；通过预测该噬菌体 ORF 功能，为以后研究噬



菌体的基因功能奠定基础,也为未来使用该噬菌体治疗粪肠球菌异位感染提供了安全保障。噬菌体IME196裂解酶实验与动物实验值得深入研究。

## 参 考 文 献

- [1] Bonilla N, Santiago T, Marcos P, et al. Enterophages, a group of phages infecting *Enterococcus faecalis*, and their potential as alternate indicators of human faecal contamination[J]. *Water Science & Technology*, 2010, 61(2): 293-300
- [2] Dejea C, Wick E, Sears CL. Bacterial oncogenesis in the colon[J]. *Future Microbiology*, 2013, 8(4): 445-460
- [3] Lavilla-Lerma L, Pérez-Pulido R, Martínez-Bueno M, et al. Characterization of functional, safety, and gut survival related characteristics of *Lactobacillus* strains isolated from farmhouse goat's milk cheeses[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2013, 163(2/3): 136-145
- [4] Zhang WH, An XP, Fan H, et al. Isolation and characterization of an *Enterococcus faecalis* phage[J]. *Letters in Biotechnology*, 2013, 24(4): 484-487 (in Chinese)  
张文惠, 安小平, 范航, 等. 一株粪肠球菌噬菌体的分离及其生物学特性研究[J]. *生物技术通讯*, 2013, 24(4): 484-487
- [5] Takakusagi Y, Kobayashi S, Sugawara F, et al. Camptothecin binds to a synthetic peptide identified by a T7 phage display screen[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2005, 15(21): 4850-4853
- [6] Funatsu T, Taniyama T, Tajima T, et al. Rapid and sensitive detection method of a bacterium by using a GFP reporter phage[J]. *Microbiology and Immunology*, 2002, 46(6): 365-369
- [7] Wang S, Tong YG. Recent advance in bacteriophage therapy[J]. *Microbiology China*, 2009, 36(7): 1019-1024 (in Chinese)  
王盛, 童贻刚. 噬菌体治疗研究进展[J]. *微生物学通报*, 2009, 36(7): 1019-1024
- [8] Li SS, Fan H, An XP, et al. Utility of high throughput sequencing technology in analyzing the terminal sequence of caudovirales bacteriophage genome[J]. *Chinese Journal of Virology*, 2013, 29(1): 39-42 (in Chinese)  
李莎莎, 范航, 安小平, 等. 采用高通量测序技术分析尾病毒目噬菌体基因组末端序列特点[J]. *病毒学报*, 2013, 29(1): 39-42
- [9] Abedon ST, Kuhl SJ, Blasdel BG, et al. Phage treatment of human infections[J]. *Bacteriophage*, 2011, 1(2): 66-85
- [10] Li XY, Ding P, Han CY. Isolation of a novel *Enterococcus faecalis* phage IME-EF3 and its potential therapeutic advantages[J]. *Biomedical Engineering and Clinical Medicine*, 2014, 18(2): 113-118 (in Chinese)  
李晓玉, 丁鹏, 韩传银, 等. 粪肠球菌噬菌体 IME-EF3 的分离及其治疗优势的发掘[J]. *生物医学工程与临床*, 2014, 18(2): 113-118