

# 绒山羊源大肠杆菌噬菌体 $\phi$ PTK 的分子生物学特性及对小鼠大肠杆菌感染的防治效果

李托<sup>1,2</sup>, 李陇平<sup>\*1</sup>, 董书伟<sup>1</sup>, 屈雷<sup>1</sup>

1 榆林学院陕西省陕北绒山羊工程技术研究中心, 陕西 榆林 719000

2 榆林学院生命科学学院, 陕西 榆林 719000

李托, 李陇平, 董书伟, 屈雷. 绒山羊源大肠杆菌噬菌体  $\phi$ PTK 的分子生物学特性及对小鼠大肠杆菌感染的防治效果[J]. 微生物学通报, 2023, 50(8): 3479-3494.

LI Tuo, LI Longping, DONG Shuwei, QU Lei. Molecular biological characteristics of cashmere goat-derived *Escherichia coli* phage  $\phi$ PTK and the effect on mice infected with *E. coli*[J]. Microbiology China, 2023, 50(8): 3479-3494.

**摘要:**【背景】抗生素耐药问题是影响人类及养殖业健康的重要因素, 噬菌体能特异性裂解细菌, 成为抗生素替代品研究热点, 是解决抗生素耐药难题、促进养殖业健康发展的新途径。【目的】通过研究绒山羊源大肠杆菌烈性噬菌体  $\phi$ PTK (phage target of K1)的分子生物学特性, 同时利用小鼠感染模型研究  $\phi$ PTK 对小鼠大肠杆菌感染的防治效果, 为绒山羊大肠杆菌病的防控提供新策略。【方法】用聚乙二醇-氯化钠(PEG 8000-NaCl)浓缩  $\phi$ PTK 后, 采用透射电子显微镜观察其超微形态结构; 运用苯酚-氯仿法提取  $\phi$ PTK 核酸后通过 Illumina HiSeq 高通量测序分析其全基因组结构, 使用 Mauve 比较基因组学分析, 通过 MEGA 绘制噬菌体进化树; 通过构建小鼠感染模型分析  $\phi$ PTK 对小鼠感染大肠杆菌的防治效果。【结果】透射电镜显示  $\phi$ PTK 头部为正多面体形, 直径 90 nm, 有长约 112 nm、直径约 18 nm 的可收缩长尾;  $\phi$ PTK 基因组全长 169 688 bp, GC 含量 37.72%, 有 264 个开放阅读框, 含穿孔素-裂解酶(holin-lysine)裂解系统, 有抗穿孔素蛋白和裂解抑制辅助蛋白, 未发现抗生素耐药基因和毒力基因; 比较基因组分析表明,  $\phi$ PTK 为一株新的绒山羊源大肠杆菌烈性噬菌体; 小鼠大肠杆菌感染前和感染后分别使用  $\phi$ PTK 进行预防 and 治疗的试验表明, 未使用  $\phi$ PTK 的阳性对照组小鼠全部死亡, 预防组和治疗组小鼠存活率分别为 80%和 60%。【结论】噬菌体  $\phi$ PTK 是一株能够在小鼠大肠杆菌感染中具有较好预防效果的有尾噬菌体目(Caudovirales)肌尾噬菌体科(Myoviridae)绒山羊源大肠杆菌烈性噬菌体, 本研究为绒山羊噬菌体生物制剂的创制奠定了基础。  
**关键词:** 绒山羊; 大肠杆菌噬菌体  $\phi$ PTK; 全基因组测序; 比较基因组分析; 防治效果

资助项目: 陕西省科技厅自然科学基金基础研究计划项目(2022JQ-187); 陕西化生基础科学研究项目(22JHQ069)

This work was supported by the Shaanxi Provincial Department of Science and Technology Natural Science Basic Research Program (2022JQ-187) and Shaanxi Fundamental Science Research Project for Chemistry & Biology (22JHQ069).

\*Corresponding author. E-mail: llp\_315@163.com

Received: 2022-11-05; Accepted: 2022-12-15; Published online: 2023-01-12

# Molecular biological characteristics of cashmere goat-derived *Escherichia coli* phage $\phi$ PTK and the effect on mice infected with *E. coli*

LI Tuo<sup>1,2</sup>, LI Longping<sup>\*1</sup>, DONG Shuwei<sup>1</sup>, QU Lei<sup>1</sup>

1 Shaanxi Province Engineering & Technology Research Center of Cashmere Goat, Yulin University, Yulin 719000, Shaanxi, China

2 College of Life Sciences, Yulin University, Yulin 719000, Shaanxi, China

**Abstract:** [Background] Antibiotic resistance is arguably the biggest current threat to global health and animal husbandry development. As an emerging solution, bacteriophage can specifically infect and kill bacteria, thus becoming a candidate substitute of antibiotics to enable healthy development of the animal husbandry. [Objective] To study the molecular biological characteristics of the cashmere goat-associated *Escherichia coli* virulent bacteriophage  $\phi$ PTK, and use mouse model to examine the effect of  $\phi$ PTK in the prevention and treatment of *E. coli* infections, so as to provide a new strategy for effective control of *E. coli* infections in cashmere goats. [Methods] The  $\phi$ PTK was concentrated with polyethylene glycol (PEG) 8000-sodium chloride (NaCl) and then the morphological structure was observed by transmission electron microscopy. The nucleic acid of  $\phi$ PTK was extracted with phenol-chloroform method, and the whole genome was sequenced by Illumina HiSeq. Mauve was employed for comparative genomics analysis, and the phylogenetic tree was plotted by MEGA. Finally, the effect of  $\phi$ PTK in the prevention and treatment of *E. coli* infection in mice was analyzed. [Results] The  $\phi$ PTK had isometric head (90 nm diameter) and long contractile tail (about 112 nm in length and 18 nm in diameter). The genome was 169 688 bp with GC content of 37.72% and 264 open reading frames (ORFs). It had the holin-lysins lysis system, anti-holin and lysis inhibition accessory protein, and no virulence-associated and antibiotic resistance genes. The comparative genome analysis indicated it was a novel lytic cashmere goat-associated *E. coli* bacteriophage.  $\phi$ PTK was applied before and after *E. coli* infection in mice for prevention and treatment. The result showed that all mice in the positive control group without  $\phi$ PTK died, and the survival rate of mice in the prevention and treatment groups reached 80% and 60%, respectively. [Conclusion] The virulent cashmere goat-associated *E. coli* phage  $\phi$ PTK (Myoviridae, Caudovirales) is effective in the prevention and treatment of *E. coli* infections. This study lays a basis for the development of bacteriophage agents for biological control of colibacillosis in cashmere goats.

**Keywords:** cashmere goat; *E. coli* phage  $\phi$ PTK; whole genome sequencing; comparative genomic analysis; control effect

大肠杆菌诱发绒山羊初生羔羊多种致死性疾病,也会导致母羊乳房炎的发生,严重危害羊业的健康发展<sup>[1]</sup>。然而,抗生素的持续、大量

使用不仅会导致细菌产生耐药性,造成抗生素耐药基因大范围快速传播,威胁动物健康和环境安全<sup>[2]</sup>,而且药物残留也危害人类健康<sup>[3]</sup>。抗生素

耐药问题已经成为 21 世纪人类不得不面临的重要话题, 后抗生素时代必然来临。鉴于抗生素耐药性传播造成的威胁日益严重, 世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 和欧盟委员会 (European Commission, EC) 已经认识到研究抗微生物耐药性制剂的重要性, 并强调需要制定适当的控制策略<sup>[4]</sup>。因此, 探索和研究绿色、安全、高效的抗生素替代产品, 为动物健康养殖和无抗养殖提供新思路和新方法, 是实现羊产业健康发展、提升我国畜禽养殖业国际竞争力和保障人类健康的关键<sup>[5]</sup>。

噬菌体是一类细菌病毒, 具有特异性强、增殖快、无残留和不易产生耐药性等特点, 可以准确、快速地裂解宿主细菌从而发挥杀菌效果<sup>[6-7]</sup>。近年来, 很多专门从事噬菌体生物制剂研发的公司或机构应运而生<sup>[8-9]</sup>。在食品科学研究领域, 现已有多个噬菌体食品添加剂产品被批准进入市场。美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 于 2006 年、2013 年、2014 年分别批准针对单核细胞增生李斯特氏菌的 6 种噬菌体的混合物 ListShield (Intralix, Inc., Baltimore, MD, USA)、靶向 6 种沙门氏菌噬菌体的混合物 SalmoFresh (Intralix)、针对大肠杆菌 O157:H7 的 3 种噬菌体 (ECP-100) 的混合物 EcoShield (Intralix) 在食品中应用<sup>[9-11]</sup>。这些噬菌体产品被允许在食品中用作食品防腐剂, 以控制特定的食源性病原体, 证实了噬菌体产品对人和动物的安全性。此外, 噬菌体还可以用来防止食品生产过程中接触材料和食品加工设施中病原体的交叉污染<sup>[12]</sup>。

目前, 成熟的噬菌体生物制剂在我们国家的研究比较少, 关于山羊疾病相关的噬菌体生物防治研究鲜见报道。本试验以陕北白绒山羊源多重耐药致病性大肠杆菌烈性噬菌体  $\phi$ PTK (phage target of K1) 为研究对象, 采用透射电镜观察其

超微形态, 利用 Illumina HiSeq 高通量测序技术分析其基因组结构特征, 同时通过小鼠体内感染试验评价噬菌体 PTK 对小鼠大肠杆菌感染的预防和治疗效果, 以期为绒山羊大肠杆菌病的噬菌体生物防治及噬菌体生物制剂的创制提供新的策略和参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

噬菌体  $\phi$ PTK 是一株从污水中分离和鉴定的陕北白绒山羊源特异性烈性噬菌体, 噬菌体  $\phi$ PTK 的宿主菌是从患严重痢疾的陕北白绒山羊羔羊粪便中分离得到的一株多重耐药致病性大肠杆菌 K1, 均为本实验室保存<sup>[13]</sup>。

SM 缓冲液: NaCl 5.8 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2.0 g, 1 mol/L pH 7.5 的 Tris-HCl 50 mL/L, 2% 明胶 5 mL/L。LB 液体培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0; 半固体 LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0, 琼脂粉 6.0; 固体 LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0, 琼脂粉 15.0。

DNase I、RNase A 和蛋白酶 K, 宝生物工程(大连)有限公司; 酚-氯仿-异戊醇(体积比为 25:24:1)、饱和平衡酚和聚乙二醇 8000 (PEG-8000), 北京索莱宝科技有限公司; 其他试剂均为国产分析纯。

0.22  $\mu$ m 微孔滤器, PALL 公司; 恒温培养箱, 上海精宏实验设备有限公司; 琼脂糖水平电泳槽, 北京六一生物科技有限公司; 恒温金属浴, 杭州博日科技股份有限公司; 超纯水仪, Millipore 公司; 透射电镜, Hitachi 公司。

### 1.2 噬菌体 $\phi$ PTK 复苏和浓缩

保存在 -80 °C 的噬菌体  $\phi$ PTK 解冻后取 0.2 mL 加入 1 mL LB 液体培养基中, 再加入 0.1 mL 宿主菌 K1, 混合均匀后, 于 37 °C、220 r/min 振

荡培养 6 h, 菌液变澄清后 10 000 r/min 离心 10 min, 上清通过 0.22  $\mu\text{m}$  滤器过滤后用 SM 缓冲液 10 倍比梯度稀释后测定效价。噬菌体  $\phi\text{PTK}$  的浓缩参照文献[13]报道的方法。

### 1.3 噬菌体 $\phi\text{PTK}$ 透射电镜形态观察

取 50  $\mu\text{L}$  噬菌体浓缩液与 50  $\mu\text{L}$  的 4%多聚甲醛-0.5%戊二醛溶液充分混合固定, 取 50  $\mu\text{L}$  滴加于铜网上静置沉淀 30 min, 用滤纸吸干多余液体; 加 2%的磷钨酸染液于铜网上染色, 静置 10 min; 常温干燥 10 min, 使用透射电镜于 100 kV 条件下观察噬菌体的形态, 并电镜成像。

### 1.4 噬菌体 $\phi\text{PTK}$ 基因组提取

噬菌体核酸的提取参照黄景晓等<sup>[14]</sup>的方法, 略有所修改。噬菌体  $\phi\text{PTK}$  浓缩液 600  $\mu\text{L}$  分别加入 DNase I 和 RNase A 至终浓度 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  温育过夜, 80  $^{\circ}\text{C}$  灭活 15 min; 加入 0.5 mol/L 的 EDTA (pH 8.0) 至终浓度 0.02 mmol/L, 蛋白酶 K 至终浓度 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 10%的 SDS 至终浓度 0.5%, 混匀后 56  $^{\circ}\text{C}$  水浴 1 h; 加入等体积平衡酚(pH 8.0)轻轻上下颠倒混匀, 12 000 r/min 离心 10 min 收集上层水相; 加入等体积的酚-氯仿-异戊醇(体积比 25:24:1), 颠倒混匀后 12 000 r/min 离心 10 min; 转移亲水层后加入 500  $\mu\text{L}$  异丙醇,  $-20^{\circ}\text{C}$  放置 1 h; 4  $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 20 min, 沉淀用 75%乙醇漂洗后 12 000 r/min 离心 10 min; 倒掉乙醇, 加入 30  $\mu\text{L}$  双蒸水溶解沉淀, 获得噬菌体基因组 DNA, 于  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用。

### 1.5 噬菌体 $\phi\text{PTK}$ 全基因组测序和基因组分析

噬菌体 DNA 随机打断成长度约 350 bp 的片段, 经末端修复、加 A 尾、加测序接头、纯化、PCR 扩增等步骤构建测序文库并进行 Illumina HiSeq 测序。过滤测序得到的原始数据(raw data), 得到有效数据(clean data), 过滤标准: (1)

去除所含低质量碱基(质量值 $\leq 38$ )超过一定比例(默认设为 40 bp)的 reads; (2) 去除 N 碱基达到一定比例的 reads (默认设为 10 bp); (3) 去除与 Adapter 之间 overlap 超过一定阈值(默认设为 15 bp)的 reads。

基因组组装: (1) 经过预处理后得到 clean data 使用 SOAP denovo (V 2.04)<sup>[15-16]</sup>、SPAdes<sup>[17]</sup>、ABYSS<sup>[18]</sup> 组装软件进行组装, 并最终使用 CISA<sup>[19]</sup> 软件进行整合; (2) 采用 gapclose (V 1.12) 软件对初步组装结果进行优化和补洞, 从而得到最终的组装结果; (3) 过滤掉 500 bp 以下的片段, 并进行评估和统计分析以及后续基因预测。全基因组序列使用 RAST 在线注释, 使用 GeneMarkS (V 4.17)<sup>[20]</sup>(<http://topaz.gatech.edu/GeneMark/>) 软件对基因组进行编码基因预测, 通过 tRNAscan-SE 软件<sup>[21]</sup>(V 1.3.1) 对 tRNA 进行预测。用 MEGA 6.0 构建进化树; 用 Mauve V 2.3.1 绘制  $\phi\text{PTK}$  与多个基因组之间的全基因组同源性比较图。用 DeepTMHMM (<https://dtu.biolib.com/DeepTMHMM>) 在线工具对噬菌体  $\phi\text{PTK}$  的穿孔素和抗穿孔素蛋白跨膜结构域进行分析<sup>[22]</sup>。

### 1.6 噬菌体 $\phi\text{PTK}$ 在小鼠上的预防和治疗效果

本研究小鼠试验在榆林学院陕西省陕北绒山羊工程技术研究中心进行, 经榆林学院实验动物伦理委员会批准(YLU2021-2), 动物实验方案符合动物保护、动物福利和伦理原则, 符合国家实验动物福利伦理相关规定。

#### 1.6.1 噬菌体 $\phi\text{PTK}$ 对小鼠(雌鼠)的安全性试验

将 20 只雌性 BALB/c 小鼠(平均体重 21 g) 随机分为两组, 每组 10 只。噬菌体组通过腹腔接种噬菌体  $\phi\text{PTK}$  ( $5.6 \times 10^{11}$  PFU/kg), 对照组腹腔注射等量生理盐水; 分别在处理后第 1-10 天检测小鼠盲肠噬菌体含量。

### 1.6.2 确定大肠杆菌对小鼠的最小致死剂量

将 40 只雌性 BALB/c 小鼠(平均体重 21 g)随机分为 5 组, 每组 8 只。4 个试验组小鼠分别每只腹腔注射  $6.5 \times 10^{10}$ 、 $3.5 \times 10^9$ 、 $6.5 \times 10^7$  和  $3.7 \times 10^4$  CFU 的大肠杆菌 0.5 mL; 1 个对照组小鼠注射 0.5 mL 生理盐水。记录各组小鼠死亡数, 大肠杆菌的最小致死剂量为导致一组小鼠全部死亡的最小剂量。

### 1.6.3 噬菌体 $\phi$ PTK 对大肠杆菌感染小鼠的防治

将 40 只雌性 BALB/c 小鼠(平均体重 21 g)分为 4 组, 每组 10 只。治疗组小鼠腹腔接种 0.5 mL 大肠杆菌 K1 ( $3.5 \times 10^8$  CFU/只) 2 h 后再腹腔接种 0.5 mL 噬菌体  $\phi$ PTK ( $10^9$  PFU/只)。预防组小鼠腹腔接种 0.5 mL 噬菌体  $\phi$ PTK ( $10^9$  PFU/只), 2 h 后再腹腔接种  $3.5 \times 10^8$  CFU/只的大肠杆菌 K1。以只接种  $3.5 \times 10^8$  CFU 大肠杆菌 K1 的小鼠组为阳性对照组。以只接种 0.5 mL 生理盐水的小鼠为空白对照组。观察所有试验小鼠的活动情况和临床表现, 记录死亡时间和死亡数, 统计存活率, 整个试验期一直持续到第 14 天。使用 GraphPad

Prism 5 软件绘制小鼠生存曲线。

## 2 结果与分析

### 2.1 噬菌体 $\phi$ PTK 形态

噬菌体  $\phi$ PTK 经磷钨酸负染后的超微形态结构见图 1。结果表明, 该噬菌体头部为正多面体, 直径约 90 nm; 具有可收缩的尾巴, 长度 112 nm, 直径 18 nm (图 1)。噬菌体  $\phi$ PTK 属于有尾噬菌体目(Caudovirales)肌尾噬菌体科(Myoviridae)噬菌体。

### 2.2 噬菌体 $\phi$ PTK 基因组序列分析

#### 2.2.1 噬菌体 $\phi$ PTK 基因组序列

噬菌体  $\phi$ PTK 全基因组序列已经上传至 GenBank 数据库, 登录号为 MW512264–MW512267。

#### 2.2.2 噬菌体 $\phi$ PTK 基因组结构组成

噬菌体  $\phi$ PTK 基因全长 169 688 bp, GC 含量 37.72%, 共有 264 个开放阅读框(open reading frame, ORF), 其中 86 个编码蛋白, 176 个为功能未知的假定蛋白(hypothetical protein), 有 2 个 tRNA (ORF142、ORF143), 未在噬菌体  $\phi$ PTK 基因组中发现细菌毒力基因和抗生素耐药基因。图 2 是  $\phi$ PTK 的基因长度统计图。

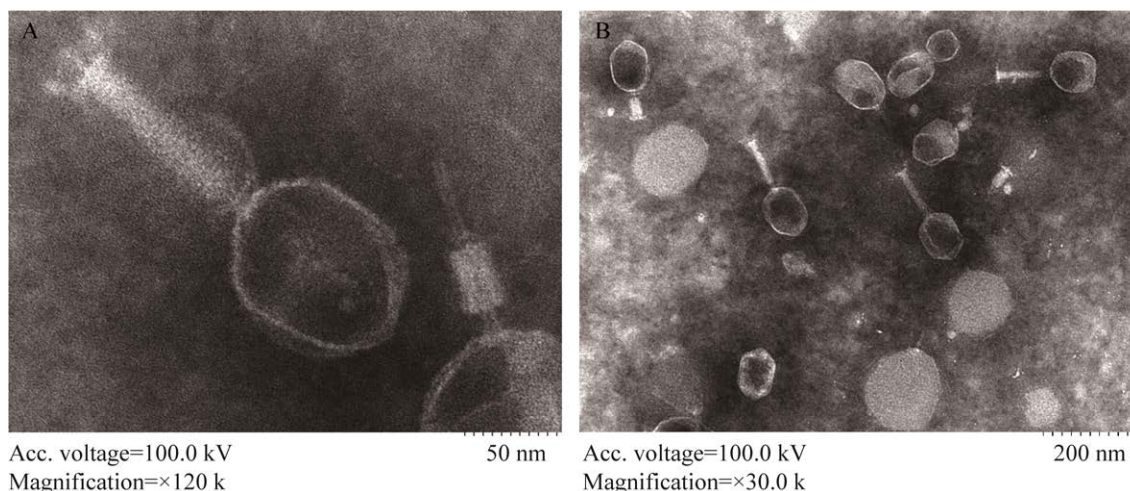


图 1 噬菌体  $\phi$ PTK 在透射电镜下的形态 A: 单个噬菌体  $\phi$ PTK. B: 聚集噬菌体  $\phi$ PTK

Figure 1 Morphological of phage  $\phi$ PTK under transmission electron microscopy. A: Single phage  $\phi$ PTK. B: Aggregation of phage  $\phi$ PTKs.

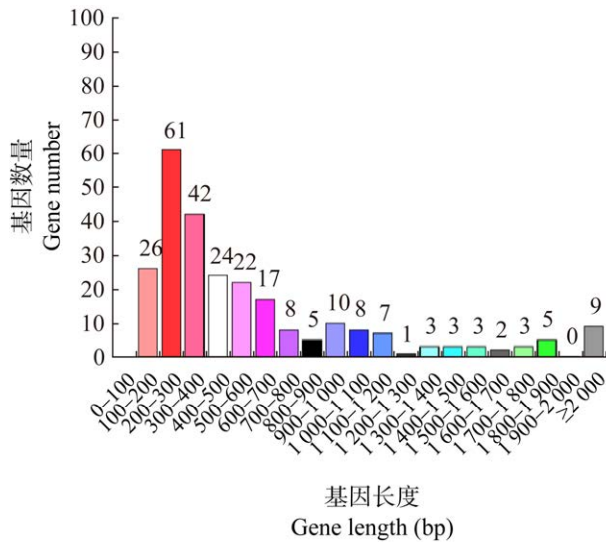


图2 噬菌体  $\phi$ PTK 基因长度分布图

Figure 2 The distribution of phage  $\phi$ PTK gene lengths.

表1列出了噬菌体  $\phi$ PTK 的88个预测的功能蛋白。主要包含噬菌体  $\phi$ PTK 的DNA复制及调控模块: DNA 外切酶(ORF12、ORF57、ORF60), DNA 转移酶(ORF16), DNA 引物酶(ORF27), DNA 解旋酶(ORF13、ORF38、ORF187、ORF188), DNA 聚合酶(ORF50、ORF243), DNA 重组及修复蛋白(ORF40、ORF191), DNA 内切酶(ORF79、ORF110、ORF230), 单链DNA结合蛋白(ORF240)和双链DNA结合蛋白(ORF244)等; 噬菌体PTK结构模块: 头蛋白(ORF24、ORF39), 基板结构相关蛋白(ORF155-156、ORF158-164、ORF192、ORF194-195、ORF198-199), 尾丝蛋白(ORF165、ORF246-248), 颈蛋白(ORF167-168), 尾鞘蛋白(ORF172), 尾管蛋白(ORF173), 头组装蛋白(ORF176), 衣壳组装蛋白(ORF178、ORF214), 主要衣壳蛋白(ORF179), 衣壳顶蛋白(ORF181)等; 噬菌体PTK组装模块: 尾丝组装蛋白(ORF150、ORF152、

ORF169), 末端酶小亚基(ORF170), 末端酶大亚基(ORF171)和头部组装蛋白(ORF176、ORF177), 衣壳组装蛋白(ORF214); 噬菌体PTK裂解模块: 裂解酶(ORF122), 穿孔素(ORF251), 裂解抑制辅助蛋白(ORF213)和抗穿孔素蛋白(ORF101)。

### 2.3 噬菌体 $\phi$ PTK 的比较基因组学分析

利用进化上比较保守的噬菌体末端酶大亚基核苷酸序列构建系统发育树(图3)。结果表明, 噬菌体  $\phi$ PTK 与噬菌体 *Escherichia* phage vB\_EcoM\_PhAPEC2 (KF562341)聚成一族, 亲缘关系较近, 两者之间有较高的序列相似性(86%)。另外, 选择和噬菌体  $\phi$ PTK 在同一进化分支和不同进化分支上的其他几株大肠杆菌噬菌体, 包括 *Escherichia* phage vB\_EcoM\_PhAPEC2 (KF562341)、*Escherichia* phage phiC120 (KY703222)、*Escherichia* phage vB\_EcoM\_WFL6982 (MK373774)和 *Escherichia* phage vB\_EcoM\_WFK (MK373775)。使用软件 Mauve V2.3.1 进行  $\phi$ PTK 与这些噬菌体的全基因组序列比对分析(图4)。结果表明, 噬菌体  $\phi$ PTK 与其他几株噬菌体均存在较大的差异, 特别是在结构蛋白模块(编码头部、尾部和基板形成)的基因序列存在较大差异。

### 2.4 噬菌体 $\phi$ PTK 裂菌相关蛋白跨膜结构域分析

使用在线工具 DeepTMHMM (<https://dtu.biolib.com/DeepTMHMM>)预测噬菌体  $\phi$ PTK 穿孔素、裂解酶、裂解抑制辅助蛋白和抗穿孔素蛋白的跨膜结构域。只在噬菌体穿孔素蛋白(219个氨基酸)结构中发现2个 $\alpha$ 型无信号肽的螺旋形跨膜结构域, 这2个跨膜结构域均位于细胞膜上(图5)。

表 1 噬菌体  $\phi$ PTK 具有编码功能的开放阅读框Table 1 Open reading frame (ORF) analysis of the phage  $\phi$ PTK genome

开放阅读框	起始位点	终止位点	氨基酸大小	蛋白功能
Open reading frame (ORF)	Start sites	Stop sites	Amino acid size	Protein functions
1	325	2 538	738	Protein rIIA
12	8 706	9 383	226	Exodeoxyribonuclease
13	9 393	10 706	438	ATP-dependent DNA helicase Dda
16	11 917	12 525	609	NAD-protein ADP-ribosyltransferase ModA
24	14 744	14 980	79	Small outer capsid protein
27	15 831	16 853	341	DNA primase
31	18 232	18 525	98	Protein spackle
32	18 589	18 837	83	Immunity protein
35	19 542	19 733	64	Antitoxin Dmd
38	20 568	22 010	481	ATP-dependent helicase 41
39	22 020	22 361	114	Head formation protein
40	22 354	23 526	391	Recombination and repair protein
50	30 218	32 929	904	DNA-directed DNA polymerase
51	33 011	33 388	126	Translation repressor protein
52	33 382	33 945	188	Sliding-clamp-loader Gp44 subunit
53	33 947	34 909	321	Sliding-clamp-loader Gp44 subunit
54	34 985	35 671	229	DNA polymerase processivity component
57	36 386	38 074	563	Exonuclease subunit 2
60	38 551	39 570	340	Exonuclease subunit 1
65	40 558	41 115	186	RNA polymerase sigma factor
78	44 549	45 019	157	Anaerobic ribonucleoside-triphosphate reductase
79	45 016	46 833	606	Recombination endonuclease VII
84	48 310	48 588	93	Glutaredoxin
101	57 932	58 234	101	Antiholin
108	60 129	60 476	116	Valyl-tRNA ligase modifier
110	61 024	61 506	161	Endoribonuclease RegB
120	64 625	65 038	138	Endonuclease V
122	65 375	65 863	163	Endolysin
142	74 378	74 454	26	tRNA-Arg
143	74 461	74 534	24	tRNA-Met
148	76 040	76 327	96	Internal protein I
150	76 860	77 090	77	Tail fiber assembly helper protein
151	77 095	77 829	245	Deoxynucleotide monophosphate kinase
152	77 884	78 468	195	Tail tube terminator protein
155	79 978	80 481	168	Baseplate wedge protein Gp53
156	80 481	82 214	578	Baseplate central spike complex protein Gp5
158	82 735	83 028	98	Baseplate puncturing device Gp5.4
159	83 037	85 007	657	Baseplate wedge protein Gp6
160	85 004	88 102	1 033	Baseplate wedge protein Gp7
161	88 095	89 099	335	Baseplate wedge protein Gp8
162	89 162	90 025	288	Baseplate protein Gp9
163	90 025	91 839	605	Baseplate wedge protein Gp10
164	91 839	92 498	220	Baseplate wedge protein Gp11

(待续)

(续表 1)

开放阅读框	起始位点	终止位点	氨基酸大小	蛋白功能
Open reading frame (ORF)	Start sites	Stop sites	Amino acid sizes	Protein functions
165	92 495	94 045	517	Short tail fiber protein Gp12
166	94 055	95 497	481	Fibrin
167	95 530	96 456	309	Neck protein Gp13
168	96 458	97 222	255	Neck protein Gp14
169	97 323	98 096	258	Tail completion protein Gp15
170	98 106	98 600	165	Terminase, small subunit
171	98 584	100 419	612	Terminase, large subunit
172	100 450	102 432	661	Tail sheath protein
173	102 545	103 036	164	Tail tube protein Gp19
174	103 121	104 692	524	Portal protein
176	104 925	105 350	142	Prohead assembly protein Gp68
177	105 350	105 991	214	Prohead core protein protease
178	106 025	106 837	271	Capsid assembly scaffolding protein
179	106 855	108 423	523	Major capsid protein
181	108 847	110 130	428	Capsid vertex protein
182	110 163	111 170	336	RNA ligase 2
185	111 833	113 251	473	Highly immunogenic outer capsid protein
187	113 980	115 494	505	ATP-dependent DNA helicase UvsW
188	115 520	115 753	78	ATP-dependent DNA helicase UvsW
191	116 235	116 729	165	Recombination protein UvsY
192	116 729	117 127	133	Baseplate wedge protein Gp25
194	117 801	118 553	251	Baseplate central spike complex protein Gp27
195	118 550	119 722	391	Baseplate hub assembly protein Gp28
198	121 981	123 090	370	Baseplate tail-tube junction protein Gp48
199	123 090	124 052	321	Baseplate tail-tube junction protein Gp54
213	132 023	132 271	83	Lysis inhibition accessory protein
214	132 396	132 728	111	Capsid assembly protein Gp31
216	133 084	133 665	194	Deoxycytidylate deaminase
222	135 753	136 529	259	Polynucleotide kinase
229	138 606	139 730	375	T4 RNA ligase I
230	139 786	140 196	137	Endonuclease II
232	141 456	143 711	752	Ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit
234	144 055	144 915	287	Thymidylate synthase
236	145 266	145 883	206	Dihydrofolate reductase
240	146 945	147 847	301	Single-stranded DNA-binding protein
241	147 964	148 617	218	Protein Gp59
243	149 290	149 628	113	RNA polymerase-associated protein Gp33
244	149 606	149 893	96	Double-stranded DNA-binding protein
245	149 883	150 800	306	Ribonuclease H
246	150 921	154 754	1 278	Long-tail fiber proximal subunit
247	154 763	155 887	375	Long-tail fiber protein Gp35
248	155 947	156 603	219	Long-tail fiber protein Gp36
251	163 134	163 793	220	Holin
252	163 794	164 066	91	10 kDa anti-sigma factor
260	165 928	166 560	211	Middle transcription regulatory protein MotA



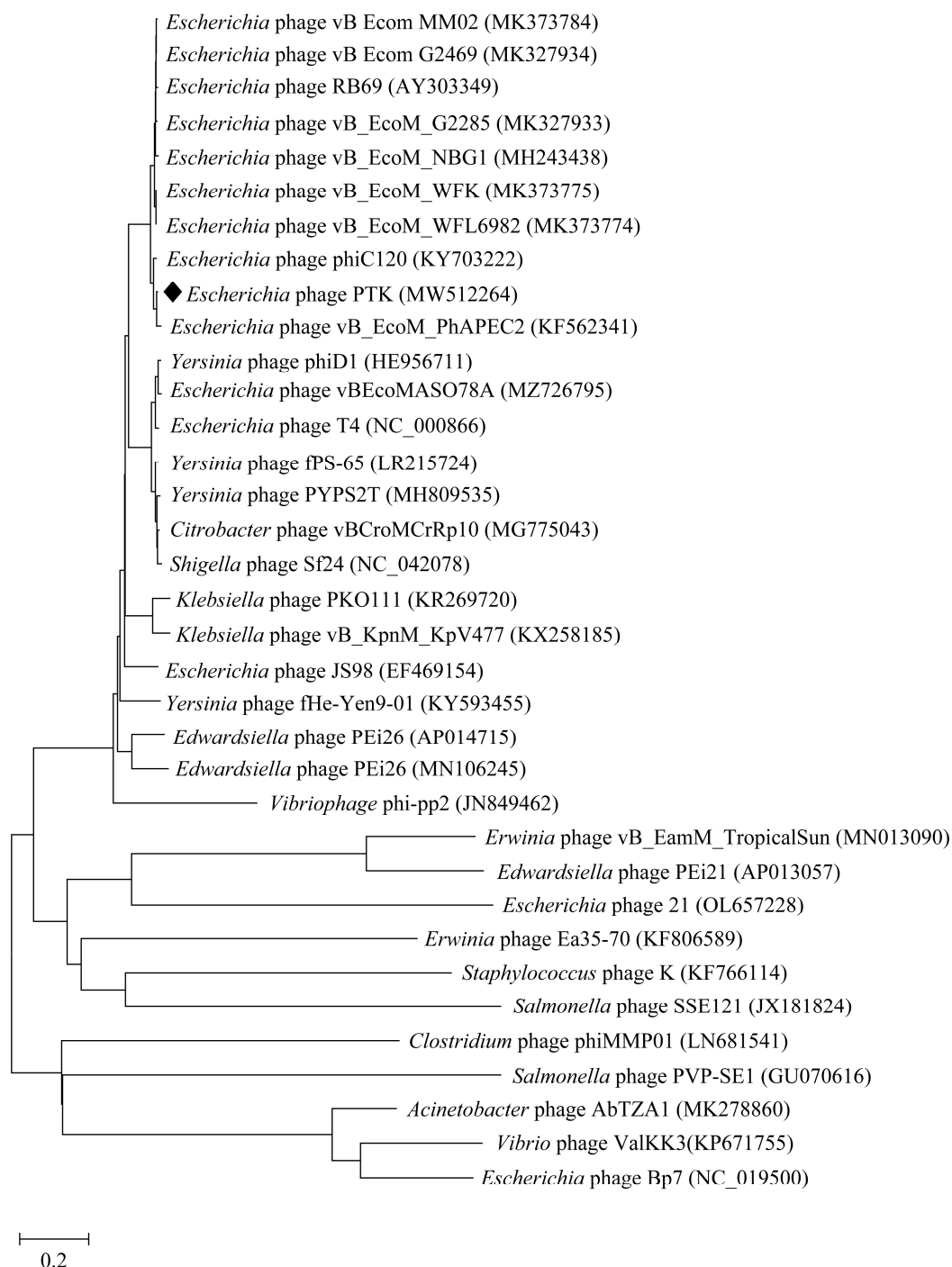


图 3 利用噬菌体末端酶大亚基构建的系统发育树 用 ClustalW 多序列比对软件分析末端酶大亚基, 用 MEGA 6 构建系统发育树, 括号中内容为相应噬菌体的 GenBank 登录号, 斜黑方框为噬菌体  $\phi$ PTK

Figure 3 Phylogenetic tree constructed using phage-encoded large terminase subunit. Use ClustalW multiple alignments software to analyze the terminal enzyme large subunit, the polygenetic tree was plotted by MEGA 6. The content in the brackets represents the GenBank accession number of the phage, and the diagonal black box represents the phage  $\phi$ PTK.

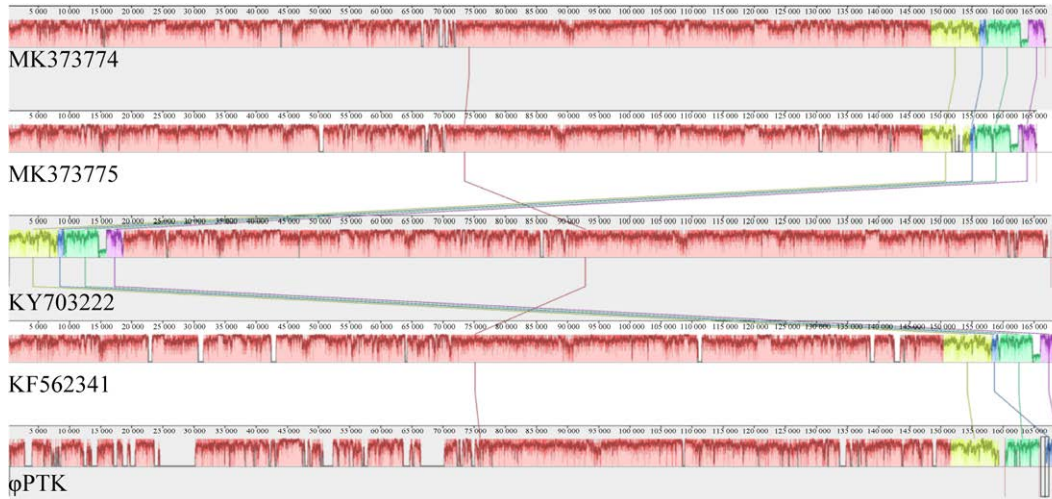


图 4 噬菌体  $\phi$ PTK 与 *Escherichia* phage vB\_EcoM\_PhAPEC2 (KF562341)、*Escherichia* phage phiC120 (KY703222)、*Escherichia* phage vB\_EcoM\_WFL6982 (MK373774)和 *Escherichia* phage vB\_EcoM\_WFK (MK373775)的全基因组共线性分析 每 1 个彩色块代表 1 个 LCB (locally collinear blocks), 相同颜色模块代表噬菌体基因组之间共线的部分, 模块中空白区域代表该基因组特有区域, 倒立的模块代表基因在互补链

Figure 4 Global alignment of phage genome for the phage  $\phi$ PTK and *Escherichia* phage vB\_EcoM\_PhAPEC2 (KF562341), *Escherichia* phage phiC120 (KY703222), *Escherichia* phage vB\_EcoM\_WFL6982 (MK373774) and *Escherichia* phage vB\_EcoM\_WFK (MK373775). Each colored block represents one LCB (locally collinear blocks), and the same colored block represents the collinear portion of phage genome. The blank space in the module represents the specific region in the phage genome, and the inverted modules represent complementary strand.

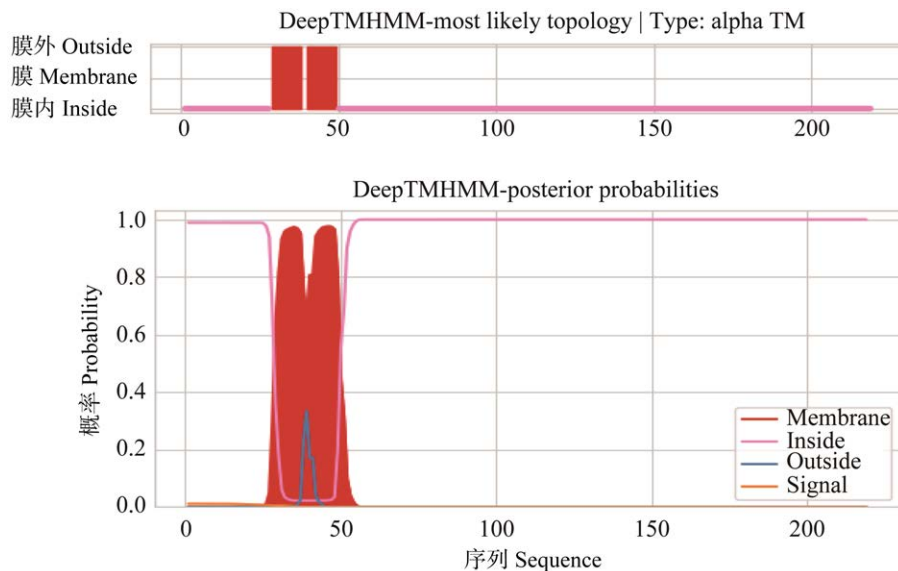


图 5 DeepTMHMM 预测噬菌体  $\phi$ PTK 穿孔素蛋白跨膜结构域

Figure 5 DeepTMHMM predicts the transmembrane structural domain of phage  $\phi$ PTK's holin.

表 2 小鼠盲肠内容物噬菌体效价随时间的变化

Table 2 Phage titers of cecal contents of mice in different time groups (PFU/g)

组别 Groups	处理不同时间后的噬菌体效价 Phage titer after treatment different days									
	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	9 d	10 d
噬菌体组 Phage group	$2.3 \times 10^7$	$6.8 \times 10^3$	$3.0 \times 10^1$	0	0	0	0	0	0	0
对照组 Control group	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

## 2.5 噬菌体 $\phi$ PTK 对小鼠的安全性试验结果

小鼠腹腔接种高剂量噬菌体  $\phi$ PTK ( $5.6 \times 10^{11}$  PFU/kg) 后对其日常活动和健康等均无影响。随着接种噬菌体时间的延长, 试验组小鼠盲肠噬菌体效价不断降低。具体表现为: 处理第 1 天后盲肠内容物噬菌体效价降为  $2.3 \times 10^7$  PFU/g, 处理第 2 天后降为  $6.8 \times 10^3$  PFU/g, 处理第 3 天后为  $3.0 \times 10^1$  PFU/g, 处理第 4 天后变为 0 (表 2)。说明小鼠接种噬菌体  $\phi$ PTK 后能将其排出体外, 不会造成体内残留。另外, 噬菌体组小鼠和对照组小鼠比较发现, 两组小鼠的日常活动、采食和饮水等均正常, 均未出现嗜睡和较难睁开眼睛(仅能微睁)等症状; 剖解后小鼠心、肝、脾、肾、肺、小肠和盲肠等组织均未发现异常或出血点等不良症状。

## 2.6 大肠杆菌对小鼠的最小致死剂量

剂量为  $6.5 \times 10^{10}$  CFU/只和  $3.5 \times 10^9$  CFU/只的大肠杆菌感染小鼠 3 d 后的死亡率均达到 100%, 而剂量为  $6.5 \times 10^7$  CFU/只和  $3.7 \times 10^4$  CFU/只的大肠杆菌接种小鼠 7 d 后的死亡率分别为 50% 和 10% (表 3)。因此, 本试验确定大肠杆菌对小鼠的最小致死剂量为  $3.5 \times 10^9$  CFU/只。

## 2.7 噬菌体 $\phi$ PTK 对大肠杆菌感染小鼠的防治效果

由图 6 可知, 阳性对照组小鼠接种大肠杆菌

表 3 大肠杆菌最小致死剂量的确定

攻毒剂量 Toxic dose (CFU/mice)	攻毒 7 d 后的死亡率 Mortality of treatment for 7 days (%)
$6.5 \times 10^{10}$	100
$3.5 \times 10^9$	100
$6.5 \times 10^7$	50
$3.7 \times 10^4$	10

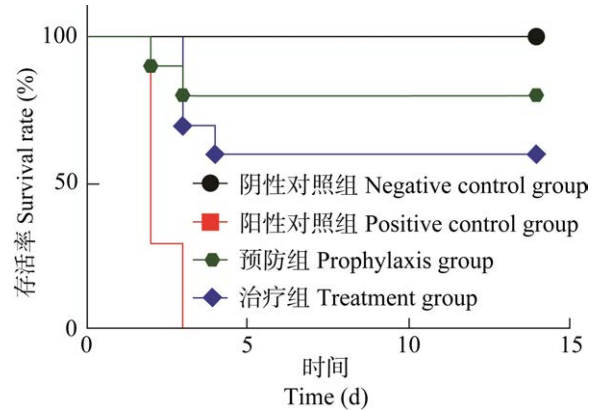


图 6 噬菌体  $\phi$ PTK 对小鼠大肠杆菌感染的防治效果  
Figure 6 The effects of phage  $\phi$ PTK against *Escherichia coli* infection in mice.

( $3.5 \times 10^9$  CFU/只) 12 h 后表现出感染症状, 包括活动力降低、嗜睡、眼睛仅能微睁和眼周变红等症状, 随后出现死亡, 3 d 后试验小鼠全部死亡; 噬菌体  $\phi$ PTK 提前 1 h 预防组的小鼠存活率为 80%, 发病症状也比阳性对照组小鼠轻, 4 d 后发病小鼠逐渐开始恢复活动; 噬菌体  $\phi$ PTK 治疗组小鼠的发病症状比阳性对照组小鼠的发病症状轻, 但是小鼠的存活率和精神状态比噬菌体预防组差。所有试验组小鼠连续试验 14 d 后, 阳性对照组小鼠全部死亡, 预防组小鼠存活率 80%, 治疗组小鼠存活率 60%。与阳性对照组相比, 噬菌体  $\phi$ PTK 的预防效果优于其治疗效果。

## 3 讨论

近年来, 噬菌体及其生物制剂成为抗生素替代品研究热点, 在食品安全<sup>[23]</sup>、医疗卫生<sup>[24]</sup>、牛羊养殖<sup>[13, 25-26]</sup>、病原检测<sup>[27]</sup>等众多领域都有所研究。特别是噬菌体能够有效治疗鸡<sup>[28]</sup>、猪<sup>[29]</sup>、牛<sup>[30]</sup>等畜禽大肠杆菌病, 表现出较大的应用潜

力。然而,针对山羊疾病防治的噬菌体生物制剂研究鲜有报道。目前只见喻胜猛<sup>[31]</sup>对陕西省富平县不同羊场采集的腹泻羊粪便样品和剖检样品中致病性大肠杆菌特异性噬菌体进行了分离鉴定,并评估了这些噬菌体在环境中的杀菌效果。另外,我们前期对噬菌体  $\phi$ PTK 的生物学特性研究发现,噬菌体  $\phi$ PTK 裂菌能力强且对温度、pH 和紫外线等具有较强的抵抗能力<sup>[13]</sup>。因此,本研究进一步对噬菌体  $\phi$ PTK 的形态结构和全基因组序列进行分析,结合小鼠感染模型,评价噬菌体  $\phi$ PTK 对小鼠感染大肠杆菌的防治效果,为研制绒山羊源噬菌体生物制剂提供基础。

根据国际病毒分类委员会(International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV)分类标准,目前分离鉴定的大部分噬菌体均属于双链 DNA 的有尾噬菌体目,只有微小噬菌体科(Microviridae)和丝杆状噬菌体科(Inoviridae)噬菌体基因组为单链 DNA<sup>[32-33]</sup>,这与我们的研究结果相一致。测序结果表明,噬菌体  $\phi$ PTK 基因组全长 169 688 bp, GC 含量 37.72%,有 264 个开放阅读框(open reading frame, ORF),其中有 88 个 ORF 具有编码蛋白的功能,未在其基因组中发现整合酶、抗生素耐药基因和毒力因子等基因,证实了噬菌体  $\phi$ PTK 进一步应用的安全性。本研究发现噬菌体  $\phi$ PTK 含有 2 个 tRNA 基因(ORF142 和 ORF143),康怀兴等<sup>[34]</sup>对沙门菌烈性噬菌体 IME-SAL1 (基因组全长 113 183 bp)的研究中发现了 23 个 tRNA 基因,这个数量远远高于我们的研究结果。有研究表明噬菌体 tRNA 基因与溶原性噬菌体的位点整合有关,而与其对应的遗传密码嗜性无直接关联<sup>[35]</sup>。但是噬菌体  $\phi$ PTK 仅有的 2 个 tRNA 基因的具体功能有待进一步深入研究。另外,噬菌体  $\phi$ PTK 含有穿孔素-裂解酶(holin-lysin)系统,目前发现的大多数噬菌体都是通过穿孔素和裂解酶协同作用实现

对宿主菌的裂解,而且有些噬菌体基因组中含有多个穿孔素和裂解酶基因,穿孔素基因位于裂解酶基因的上游<sup>[14,36]</sup>。本研究中,我们发现噬菌体  $\phi$ PTK 只有 1 对穿孔素-裂解酶基因,而且穿孔素(ORF251)和裂解酶(ORF122)基因在噬菌体  $\phi$ PKT 基因组上的位置距离较远,裂解酶基因在穿孔素基因的上游,这与之前研究报道的结果<sup>[14,36]</sup>不同。此外,我们在噬菌体  $\phi$ PTK 穿孔素(ORF251)和裂解酶(ORF122)基因上游分别发现了裂解抑制辅助蛋白基因(ORF213)和抗穿孔素蛋白基因(ORF101)。抗穿孔素蛋白和穿孔素蛋白相互作用,对噬菌体裂解细菌具有重要的调节功能<sup>[37]</sup>。根据研究报道,经典的噬菌体穿孔素蛋白按照其拓扑结构分为 3 大类<sup>[38]</sup>: (I)  $\lambda$  噬菌体 S105,有 3 个跨膜结构域, N 末端在细胞周质, C 末端在胞质; (II) 噬菌体 21 的 S<sup>21</sup>86,有 2 个跨膜结构域, N 末端和 C 末端均在胞质; (III) T4 噬菌体 T,有 1 个跨膜结构域, N 末端在胞质, C 末端在细胞周质。这 3 类穿孔素蛋白均为大肠埃希菌噬菌体,穿孔素蛋白的功能受抗穿孔素蛋白的负调控。其中, I 类噬菌体的穿孔素蛋白 S105 和抗穿孔素蛋白 S107 (3 个跨膜结构域)都是由具有双起始基序的 S 基因编码<sup>[39]</sup>; II 类的穿孔素蛋白 S<sup>21</sup>86 和抗穿孔素蛋白 S<sup>21</sup>71 也都是由具有双起始基序的具有 2 个跨膜结构域的 S 基因编码<sup>[40]</sup>; III 类 T4 噬菌体穿孔素蛋白 T 由 218 个氨基酸构成<sup>[41-42]</sup>,与前两类噬菌体的不同之处在于存在裂解抑制的机制(lysis inhibition, LIN),即受 T4 感染的细胞再次受到另外 T4 噬菌体感染时会引起裂解抑制现象的发生。LIN 相关的蛋白有 *rI*、*rIIA/B*、*rIII* 和 *rV*<sup>[42-44]</sup>。其中, RI 蛋白(*rI* 基因编码)具有抗穿孔素蛋白的功能,在细胞受到超感染时 RI 会抑制穿孔素蛋白 T 对膜损伤<sup>[42-43]</sup>。*rV* 蛋白(T 的等位基因 *rV* 基因编码)为 T4 抗穿孔素蛋白, *rIIA* (*rIIA* 基因编码)和 *rIIB* (*rIIB* 基因编

码)蛋白的作用机制未知<sup>[44]</sup>。RIII 蛋白(*rIII* 基因编码)在 LIN 过程中对 RI-T 复合物的稳定性发挥重要的维持作用<sup>[44]</sup>。然而,本研究对噬菌体  $\phi$ PTK 穿孔素蛋白(ORF251)、裂解抑制辅助蛋白(ORF213 即 *rIII*)和抗穿孔素蛋白(ORF101 即 *rI* 基因)利用在线工具 DeepTMHMM (<https://dtu.biolib.com/DeepTMHMM>) 进行跨膜结构域的预测发现,噬菌体  $\phi$ PTK 穿孔素蛋白的 219 个氨基酸中具有 2 个跨膜结构域,而抗穿孔素蛋白的 100 个氨基酸中未预测到任何跨膜结构域,并且噬菌体  $\phi$ PTK 基因组中无 *rIIB* 和 *rV* 基因,暗示噬菌体  $\phi$ PTK 的裂菌机理和 T4 噬菌体有所不同。结合系统进化树结果也不难发现,噬菌体  $\phi$ PTK 和 T4 噬菌体不在同一个进化分支上,两者的进化距离较远。因为噬菌体穿孔素蛋白不仅是构成跨膜孔的重要元件,而且是触发细菌裂解的“分子定时器”,在调控噬菌体裂菌过程中发挥关键作用,所以对噬菌体  $\phi$ PTK 裂菌机制的进一步深入研究对认识和改造噬菌体  $\phi$ PTK 并将其应用到羊生产中具有重要的参考价值。另外,有研究证实,霍乱弧菌噬菌体 VP882 通过编码受体蛋白感知由细菌产生的群体感应自诱导物并与其结合后,诱导 Qtip 蛋白的表达并整合裂解抑制蛋白 cl,促进噬菌体的裂菌进程,从而实现噬菌体通过利用细菌群体感应系统感知细菌密度达到裂菌或溶菌;利用该裂解调控系统可以构建重组噬菌体,使其感应特定的信号后启动裂菌过程,实现人为操控噬菌体的裂菌程序<sup>[45]</sup>。结合噬菌体  $\phi$ PTK 的裂解相关蛋白特征和基因结构,这些研究线索为我们通过改造噬菌体  $\phi$ PTK 实现噬菌体  $\phi$ PTK 生物杀菌制剂的应用提供了线索和参考。

本研究中我们通过构建小鼠感染模型来评估噬菌体  $\phi$ PTK 对小鼠感染大肠杆菌的预防效果。安全性试验结果表明,小鼠腹腔接种  $5.6 \times$

$10^{11}$  PFU/kg 剂量的噬菌体  $\phi$ PTK 第 3 天后未检测到噬菌体残留,而且小鼠的日常活动活跃、采食和饮水均正常、对外界声音等刺激反应灵敏,未出现眼睛较难睁开或睁不开眼睛和嗜睡等症状,说明噬菌体  $\phi$ PTK 对小鼠是安全的。在确定最小致死剂量后,应用噬菌体  $\phi$ PTK 对感染大肠杆菌的小鼠分别进行预防和治疗处理。结果表明,预防组和治疗组的小鼠存活率高于阳性对照组,并且预防组高于治疗组。本研究的治疗效果高于张珊瑚等<sup>[46]</sup>报道的鼠疫噬菌体 57% 的治疗效果,稍低于赵影等<sup>[47]</sup>对鼠伤寒沙门氏菌噬菌体的研究(90%),但是与赵影等<sup>[48]</sup>对大肠杆菌 K99 噬菌体( $\Phi$ K99-1)在小鼠上的防治效果类似。

## 4 结论

本研究对陕北白绒山羊源多重耐药致病性大肠杆菌烈性噬菌体  $\phi$ PTK 的分子生物学特性和对小鼠感染的防治效果进行研究。噬菌体  $\phi$ PTK 基因组全长 169 688 bp, GC 含量 37.72%, 有 264 个开放阅读框(ORF), 含有 holin-lysin 裂菌系统,还具有抗穿孔素蛋白和裂解抑制辅助蛋白,基因组中未发现整合酶、抗生素耐药和毒力相关基因,结合透射电镜结果和比较基因组学分析结果,确定噬菌体  $\phi$ PTK 为一株新的绒山羊源大肠杆菌烈性肌尾噬菌体科噬菌体。噬菌体  $\phi$ PTK 在小鼠体内不会残留,而且对小鼠大肠杆菌感染具有较好的预防效果。

## REFERENCES

- [1] 李托, 李陇平, 张起艳, 高妮, 薛佳敏. 致羔羊腹泻大肠杆菌的分离鉴定及药敏试验[J]. 中国兽医杂志, 2020, 56(4): 52-55.  
LI T, LI LP, ZHANG QY, GAO N, XUE JM. Isolation, identification and drug sensitivity test of *Escherichia coli* causing diarrhea in lambs[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2020, 56(4): 52-55 (in Chinese).
- [2] ZHU YG, ZHAO Y, LI B, HUANG CL, ZHANG SY,

- YU S, CHEN YS, ZHANG T, GILLINGS MR, SU JQ. Continental-scale pollution of estuaries with antibiotic resistance genes[J]. *Nature Microbiology*, 2017, 2: 16270.
- [3] FERRER M, MÉNDEZ-GARCÍA C, ROJO D, BARBAS C, MOYA A. Antibiotic use and microbiome function[J]. *Biochemical Pharmacology*, 2017, 134: 114-126.
- [4] PITOUT JDD, LAUPLAND KB. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern[J]. *The Lancet Infectious Diseases*, 2008, 8(3): 159-166.
- [5] TOUTAIN PL, FERRAN AA, BOUSQUET-MELOU A, PELLIGAND L, LEES P. Veterinary medicine needs new green antimicrobial drugs[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1196.
- [6] GILL JJ, HYMAN P. Phage choice, isolation, and preparation for phage therapy[J]. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2010, 11(1): 2-14.
- [7] KUTATELADZE M, ADAMIA R. Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics[J]. *Trends in Biotechnology*, 2010, 28(12): 591-595.
- [8] BAI J, KIM YT, RYU S, LEE JH. Biocontrol and rapid detection of food-borne pathogens using bacteriophages and endolysins[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 474.
- [9] ENDERSEN L, O'MAHONY J, HILL C, ROSS RP, McAULIFFE O, COFFEY A. Phage therapy in the food industry[J]. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2014, 5: 327-349.
- [10] LU TK, KOERIS MS. The next generation of bacteriophage therapy[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2011, 14(5): 524-531.
- [11] SHARMA M. Lytic bacteriophages: potential interventions against enteric bacterial pathogens on produce[J]. *Bacteriophage*, 2013, 3(2): e25518.
- [12] SULAKVELIDZE A. Using lytic bacteriophages to eliminate or significantly reduce contamination of food by foodborne bacterial pathogens[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2013, 93(13): 3137-3146.
- [13] 李陇平, 杨吉, 白蹉蹉, 杨悦, 屈雷. 一株绒山羊源大肠杆菌噬菌体  $\phi$ PTK 的分离鉴定及生物学特性分析[J]. *江苏农业学报*, 2018, 34(4): 847-853.
- LI LP, YANG J, BAI CC, YANG Y, QU L. Isolation, identification and biological properties of a lytic phage against goat (*Capra hircus*)-associated *Escherichia coli*[J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2018, 34(4): 847-853 (in Chinese).
- [14] 黄景晓, 尚俊康, 陈慧敏, 沈嘉旻, 黎圆圆, 喻玉立, 倪进东, 林伯坤. 一株烈性沙门氏菌噬菌体的生物学特性及基因组分析[J]. *生物技术通报*, 2021, 37(6): 136-146.
- HUANG JX, SHANG JK, CHEN HM, SHEN JM, LI YY, YU YL, NI JD, LIN BK. Biological characterization and genome analysis of a lytic phage infecting *Salmonella*[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2021, 37(6): 136-146 (in Chinese).
- [15] LI RQ, ZHU HM, RUAN J, QIAN WB, FANG XD, SHI ZB, LI YR, LI ST, SHAN G, KRISTIANSEN K, LI SG, YANG HM, WANG J, WANG J. De novo assembly of human genomes with massively parallel short read sequencing[J]. *Genome Research*, 2010, 20(2): 265-272.
- [16] LI RQ, LI YR, KRISTIANSEN K, WANG J. SOAP: short oligonucleotide alignment program[J]. *Bioinformatics*, 2008, 24(5): 713-714.
- [17] 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[J]. *Journal of Computational Biology: a Journal of Computational Molecular Cell Biology*, 2012, 19(5): 455-477.
- [18] SIMPSON JT, WONG K, JACKMAN SD, SCHEIN JE, JONES SJM, BIROL I. AB<sub>1</sub>SS: a parallel assembler for short read sequence data[J]. *Genome Research*, 2009, 19(6): 1117-1123.
- [19] LIN SH, LIAO YC. CISA: contig integrator for sequence assembly of bacterial genomes[J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e60843.
- [20] BESEMER J, LOMSADZE A, BORODOVSKY M. GeneMarkS: a self-training method for prediction of gene starts in microbial genomes. Implications for finding sequence motifs in regulatory regions[J]. *Nucleic Acids Research*, 2001, 29(12): 2607-2618.
- [21] LOWE TM, EDDY SR. tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence[J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(5): 955-964.
- [22] LI B, MENDENHALL J, CAPRA JA, MEILER J. A multitask deep-learning method for predicting membrane associations and secondary structures of proteins[J]. *Journal of Proteome Research*, 2021, 20(8): 4089-4100.
- [23] WANG LL, QU KL, LI XY, CAO ZH, WANG XT, LI Z, SONG YX, XU YP. Use of bacteriophages to control

- Escherichia coli* O157:H7 in domestic ruminants, meat products, and fruits and vegetables[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2017, 14(9): 483-493.
- [24] ZHVANIA P, HOYLE NS, NADAREISHVILI L, NIZHARADZE D, KUTATELADZE M. Phage therapy in a 16-year-old boy with netherton syndrome[J]. Frontiers in Medicine, 2017, 4: 94.
- [25] LI LP, ZHANG ZY. Isolation and characterization of a virulent bacteriophage SPW specific for *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis of lactating dairy cattle[J]. Molecular Biology Reports, 2014, 41(9): 5829-5838.
- [26] 李隼平. 奶牛乳房炎病原菌噬菌体的筛选和预防应用研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2011.
- LI LP. Isolation and application of bacteriophage in prevention of mastitis in dairy cows[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2011 (in Chinese).
- [27] YU JP, ZHANG Y, ZHANG Y, LI H, YANG H, WEI HP. Sensitive and rapid detection of *staphylococcus aureus* in milk via cell binding domain of lysin[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2016, 77: 366-371.
- [28] NABIL NM, TAWAKOL MM, HASSAN HM. Assessing the impact of bacteriophages in the treatment of *Salmonella* in broiler chickens[J]. Infection Ecology & Epidemiology, 2018, 8(1): 1539056.
- [29] SKARADZIŃSKA A, ŚLIWKA P, KUŹMIŃSKA-BAJOR M, SKARADZIŃSKI G, RZAŚA A, FRIESE A, ROSCHANSKI N, MURUGAIYAN J, ROESLER UH. The efficacy of isolated bacteriophages from pig farms against ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* from pig and Turkey farms[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 530.
- [30] CALLAWAY TR, EDRINGTON TS, BRABBAN AD, ANDERSON RC, ROSSMAN ML, ENGLER MJ, CARR MA, GENOVESE KJ, KEEN JE, LOOPER ML, KUTTER EM, NISBET DJ. Bacteriophage isolated from feedlot cattle can reduce *Escherichia coli* O157:H7 populations in ruminant gastrointestinal tracts[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2008, 5(2): 183-191.
- [31] 喻胜猛. 致羊腹泻大肠杆菌噬菌体的分离鉴定及其在环境中的杀菌效果评估[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2022.
- YU SM. Isolation and identification of *Escherichia coli* bacteriophages causing sheep diarrhea and evaluation of their bactericidal efficacy in environment[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A & F University, 2022 (in Chinese).
- [32] DION MB, OECHSLIN F, MOINEAU S. Phage diversity, genomics and phylogeny[J]. Nature Reviews Microbiology, 2020, 18(3): 125-138.
- [33] LEFKOWITZ EJ, DEMPSEY DM, HENDRICKSON RC, ORTON RJ, SIDDELL SG, SMITH DB. Virus taxonomy: the database of the international committee on taxonomy of viruses (ICTV)[J]. Nucleic Acids Research, 2018, 46(D1): D708-D717.
- [34] 康怀兴, 徐晓蒙, 张湘莉兰, 王亚慧, 米志强, 童贻刚. 一株新的沙门菌烈性噬菌体 IME-SAL1 的分离、全基因组测序和比较基因组分析[J]. 生物技术通讯, 2015, 26(3): 311-315.
- KANG HX, XU XM, ZHANG X, WANG YH, MI ZQ, TONG YG. Isolation, whole genome sequencing and comparative genome analysis of a novel lytic *Salmonella* bacteriophage IME-SAL1[J]. Letters in Biotechnology, 2015, 26(3): 311-315 (in Chinese).
- [35] 张怀斌, 金晓琳, 陈志瑾, 朱军民, 饶贤才, 胡福泉. 铜绿假单胞菌噬菌体 PaP3 的密码使用偏嗜性与 tRNA 基因[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(4): 385-388.
- ZHANG KB, JIN XL, CHEN ZJ, ZHU JM, RAO XC, HU FQ. Codon usage bias and tRNA genes analysis in genome of *Pseudomonas aeruginosa* phage PaP3[J]. Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae, 2002, 24(4): 385-388 (in Chinese).
- [36] BAO HD. Morphologic and genomic characterization of a broad host range *Salmonella enterica* serovar Pullorum lytic phage vB\_SPuM\_SP116[J]. Microbial Pathogenesis, 2019, 136: 103659.
- [37] 乔阳, 张硕勋, 谭银玲. 噬菌体编码的穴蛋白在细菌裂解中的作用[J]. 生命的化学, 2009, 29(6): 883-887.
- QIAO Y, ZHANG SX, TAN YL. The structure and function of holin encoded by bacteriophage in bacterial lysis[J]. Chemistry of Life, 2009, 29(6): 883-887 (in Chinese).
- [38] GRÜNDLING A, BLÄSI U, YOUNG R. Biochemical and genetic evidence for three transmembrane domains in the class I holin, lambda S[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2000, 275(2): 769-776.
- [39] 史一博, 孙建和.  $\lambda$  噬菌体穿孔素(holin)蛋白触发裂解的分子机制[J]. 微生物学报, 2012, 52(2): 141-145.
- SHI YB, SUN JH. Current advance in the topological structure and function of holin encoded by bacteriophage Lambda—a review[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2012, 52(2): 141-145 (in Chinese).
- [40] PARK T, STRUCK DK, DEATON JF, YOUNG R.

- Topological dynamics of holins in programmed bacterial lysis[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(52): 19713-19718.
- [41] RAMANCULOV E. Genetic analysis of the T4 holin: timing and topology[J]. Gene, 2001, 265(1/2): 25-36.
- [42] RAMANCULOV E, YOUNG R. An ancient player unmasked: T4 rI encodes a t-specific antiholin[J]. Molecular Microbiology, 2001, 41(3): 575-583.
- [43] DRESSMAN HK, DRAKE JW. Lysis and Lysis inhibition in bacteriophage T4: rV mutations reside in the holin t gene[J]. Journal of Bacteriology, 1999, 181(14): 4391-4396.
- [44] RAMANCULOV E, YOUNG R. Functional analysis of the phage T4 holin in a  $\lambda$  context[J]. Molecular Genetics and Genomics, 2001, 265(2): 345-353.
- [45] SILPE JE. A host-produced quorum-sensing autoinducer controls a phage Lysis-lysogeny decision[J]. Cell, 2019, 176(1/2): 268-280.e13.
- [46] 张珊瑚, 祁芝珍, 张青雯, 赵海红, 辛有全, 金泳, 仇杰. 鼠疫噬菌体对感染鼠疫小鼠的疗效[J]. 中国生物制品学杂志, 2013, 26(4): 531-533.
- ZHANG SH, QI ZZ, ZHANG QW, ZHAO HH, XIN YQ, JIN Y, QIU J. Curative effect of plaque bacteriophage on *Yersinia pestis* infection in mice[J]. Chinese Journal of Biologicals, 2013, 26(4): 531-533 (in Chinese).
- [47] 赵影, 刘秀侠, 李金敏, 徐海燕, 谷魏. 一株鼠伤寒沙门氏菌噬菌体的分离鉴定及对小鼠的防制效果研究[J]. 中国畜牧兽医, 2018, 45(1): 234-241.
- ZHAO Y, LIU XX, LI JM, XU HY, GU W. Isolation and identification of a phage against *Salmonella typhimurium* and its control effect on mice[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2018, 45(1): 234-241 (in Chinese).
- [48] 赵影, 刘秀侠, 李金敏, 徐海燕, 谷魏, 刘元香, 陈梅楠. 大肠杆菌 K99 噬菌体的分离鉴定及在小鼠上的防治效果[J]. 微生物学通报, 2018, 45(5): 1082-1089.
- ZHAO Y, LIU XX, LI JM, XU HY, GU W, LIU YX, CHEN MN. Isolation and identification of a phage against Enterotoxigenic *Escherichia coli* K99 and its function verification in mice[J]. Microbiology China, 2018, 45(5): 1082-1089 (in Chinese).