

引文格式:

周燕, 袁盛建, 严庭玮, 等. 一株新型杀鲑气单胞菌烈性类 T4 噬菌体 Asfd-1 的分离鉴定和生物学特性分析 [J]. 集成技术, 2019, 8(3): 10-18.

Zhou Y, Yuan SJ, Yan TW, et al. Isolation and characterization of a novel lytic T4-like bacteriophage Asfd-1 infecting *Aeromonas salmonicida* [J]. Journal of Integration Technology, 2019, 8(3): 10-18.

一株新型杀鲑气单胞菌烈性类 T4 噬菌体 Asfd-1 的分离鉴定和生物学特性分析

周 燕^{1,2} 袁盛建^{1,2} 严庭玮³ 马迎飞^{1,2}

¹(中国科学院深圳先进技术研究院合成生物学研究所(筹)定量合成生物学研究中心 深圳 518055)

²(中国科学院大学 北京 100049)

³(暨南大学 广州 510632)

摘 要 噬菌体是自然界中最普遍的生物之一, 其专一性裂解细菌的能力在针对耐药菌感染治疗方面具有很大的应用前景。杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*)是水产养殖业中一种主要病原菌, 其引发的疔疮病是一种常见的水产养殖动物疾病, 具有高死亡率和高发病率, 一旦爆发, 将给水产养殖业带来重大的经济损失。该研究以杀鲑气单胞菌 MF663675.1 为宿主菌, 从深圳海鲜市场的污水中, 采用双层琼脂平板法分离纯化得到单个噬菌体, 通过电镜对其表观形态特征进行观察, 并运用生物信息的方法进一步确定其基因型特征及遗传分类地位。研究表明, 分离出的烈性噬菌体命名为 Asfd-1, 噬菌斑呈圆形, 轮廓分明、透明, 直径约 1 mm。电镜观察显示, Asfd-1 具有对称的二十面体头部, 以及长度为 51 nm 的收缩尾部。基因组测序和基因对比分析表明, Asfd-1 含双链脱氧核糖核酸(dsDNA), 全基因组大小为 168 962 bp, 鸟嘌呤(G)和胞嘧啶(C)所占的比例为 41.53%, 共编码 263 个开放阅读框和 16 个转移核糖核酸(tRNA)序列, Genbank 登录号为 MK577502。根据国际病毒分类委员会规定的病毒分类方法, 与同源的 *Aeromonas* phage 31 GCA_000862645.1 和 *Aeromonas* phiSA4 GCA_002710125.1 全基因组对比结果显示, Asfd-1 是新型噬菌体。综合电镜观察结果及系统进化树分析, Asfd-1 属于肌尾科下的 T4 噬菌体属、肌尾噬菌体科、有尾噬菌体目的新成员。该研究可为应用噬菌体治疗细菌感染提供进一步的参考。

关键词 Asfd-1 噬菌体; 杀鲑气单胞菌; 噬菌体治疗; 生物信息

中图分类号 Q 93-331 **文献标志码** A **doi:** 10.12146/j.issn.2095-3135.20190305001

收稿日期: 2019-03-05 修回日期: 2019-04-01

基金项目: 深圳市科创委基础研究学科布局项目(JYCJ20160229201759414); 深圳市科创委基础研究探索项目(JCYJ20160122143446357); 国家自然科学基金项目(31570115、31500104); 深圳市孔雀团队项目(KQTD2015033117210153)

作者简介: 周燕, 硕士研究生, 研究方向为生物信息; 袁盛建, 博士研究生, 研究方向为生物化学; 严庭玮, 本科生, 研究方向为噬菌体分离; 马迎飞(通讯作者), 研究员, 博士研究生导师, 研究方向为生物信息, E-mail: yingfei.ma@siat.ac.cn.

Isolation and Characterization of a Novel Lytic T4-Like Bacteriophage Asfd-1 Infecting *Aeromonas salmonicida*

ZHOU Yan^{1,2} YUAN Shengjian^{1,2} YAN Tingwei³ MA Yingfei^{1,2}

¹(Center for Quantitative Synthetic Biology, Institute of Synthetic Biology (iSynBio), Shenzhen Institutes of Advanced Technology,
Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China)

²(University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

³(Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract Bacteriophages are one of the most common microorganisms on the earth, and are potential biocontrol agents for multidrug-resistant bacteria. *Aeromonas salmonicida* is a major bacterial pathogen in aquaculture. It can be responsible for furunculosis, which is a ubiquitous disease in aquaculture operation and featured by high mortality and morbidity, causing significant economic loss of aquaculture. In this study, *Aeromonas salmonicida* MF663675.1 was used as host to isolate bacteriophage from the sewage of a seafood market in Shenzhen, China. A novel lytic phage Asfd-1 was isolated and purified by double-layer agar plate. The morphological characteristics were observed by transmission electron microscope (TEM). The plaque characteristics were observed as well. The whole genome and phylogenetic analysis of phage Asfd-1 were carried out by bioinformatics methods. The results show that plaque of the phage was round and transparent with size of about 1 mm in diameter. TEM shows that Asfd-1 has an isometric, elongated and icosahedral head of 100 nm in diameter by 71 nm in width and a 51 nm contracted tail. Comparative genomics analysis indicates that Asfd-1 has a double-stranded DNA of 168 962 bp in length, and the content ratio of guanine and cytosine is 41.53%. Asfd-1 genome encodes 263 open reading frames and 16 tRNA genes, indicating that Asfd-1 is not totally dependent on host cell transcription machinery. Combined with TEM and phylogenetic analysis, it proposes that Asfd-1 belongs a new member of the T4 virus, Myoviridae family, Caudovirales order. Based on its microbiological traits, phage Asfd-1 is a promising agent that can be used for controlling *Aeromonas salmonicida* infection.

Keywords Asfd-1 phage; *Aeromonas salmonicida*; phage therapy; bioinformatics

1 引 言

杀鲑气单胞菌 (*Aeromonas salmonicida*) 属于变形菌门下的兼性需氧型革兰氏阴性杆菌, 在世界各地的海洋和淡水中分布极为广泛, 尤其在水生动物的肠道中, 是鲑鱼疔疮病最主要的致病因子^[1]。杀鲑气单胞菌的宿主范围广, Rachna 等^[2]发现其能感染大多数脊椎动物, 会造成人肠道的感染性疾病。在高密度的养殖条件下, 被感染的鱼类经常会出现败血症和炎症等症状^[3-4], 甚至会爆发急性感染导致鱼群的大面积死亡^[5]。

因此, 该类致病菌不仅会造成水产养殖业的巨大经济损失, 而且还会造成严重的环境污染。目前养殖生产中, 通常会使用大量抗生素来防治, 如喹诺酮和磺胺类等^[6-7]。虽然抗生素是目前治疗细菌感染最有效的方式, 但随着抗生素在临床治疗和畜牧业中的过度生产和使用, 致病菌的耐药性问题日益严重^[8]。如 Liao 等^[9]在患病动物体内发现的一株广谱耐药性杀鲑气单胞菌, 其耐药种类多达 9 种。

噬菌体是能感染细菌的病毒, 在自然界中分布广泛, 具有极高的宿主特异性, 通过靶向感

染, 在宿主菌体内大量繁殖, 最终导致宿主菌的裂解死亡^[10]。噬菌体疗法是指利用噬菌体专一性裂解并杀死宿主病原菌, 从而治疗病原菌感染疾病的治疗手段。与抗生素相比, 噬菌体疗法具有更高的细菌专一性, 而对人体和其他菌群无影响^[11]。早在 1921 年, 噬菌体就被应用于治疗由葡萄球菌引起的皮肤病, 但是由于抗生素的出现以及对噬菌体疗法安全性评估的不足, 噬菌体疗法^[11-12]研究被停滞。近十几年来, 由于大量耐药菌及超级细菌的出现, 针对细菌感染性疾病的噬菌体疗法又重新被人们重视。2014 年美国国家过敏与传染病研究所将噬菌体疗法列为对抗生素抗性的重要武器之一, 具有极大的临床应用潜力^[13-14]。本文利用杀鲑气单胞菌 MF663675.1 为宿主菌, 旨在从深圳海鲜市场的污水中分离出一种新型的、可以特异性感染并杀死杀鲑气单胞菌的裂性噬菌体, 并通过形态学观察、生物学特性和基因组分析对噬菌体进行分类鉴定。实验结果表明, 本研究发现的新型噬菌体 Asfd-1 有望成为代替抗生素治疗鱼群疔疮病的生物制剂, 为进一步噬菌体疗法的应用提供了理论依据。

2 材料与方 法

2.1 细菌菌株、噬菌体的分离和纯化

本实验中用于噬菌体分离的样本来自于深圳海鲜市场污水, 宿主菌杀鲑气单胞菌 MF663675.1 由本单位实验室保存。噬菌体的分离采用双层平板法, 即该菌株先在 Luria-Bertani (LB) 液体培养基中于 30 °C 培养过夜, 再将环境样本和含有杀鲑气单胞菌的 LB 液体培养基混合, 于 30 °C 培养 12 h 后, 在 12 000 rpm 转速下离心 10 min 除去沉淀, 上清液用 0.22 μm 滤膜过滤除菌。取 200 μL 滤液与 200 μL 菌液混匀, 加入到含有 0.7% (质量体积比) 的琼脂糖 LB 中, 迅速混匀平铺在含有 1.5% (质量体积比) 的

琼脂平板上, 待琼脂糖凝固, 于 30 °C 过夜培养。挑取双层琼脂平板上的单个噬菌斑到 LB 肉汤培养基中, 反复纯化, 直至获得形态大小一致的噬菌斑, 并通过双层平板法测定噬菌体的浓度^[13]。

2.2 噬菌体的浓缩

为了制备用于拍摄透射电子显微镜的噬菌体浓缩液, 加入 1 mol/L NaCl 和 10% 聚乙二醇 (PEG) 8000 沉淀噬菌体颗粒, 将悬浮液在 4 °C 培育 60 min, 8 500 rpm 转速下离心 15 min^[14]。除去上清液, 使用 LB 重悬沉淀, 并用氯仿纯化噬菌体。离心后, 收集水相于 4 °C 保存。

2.3 透射电子显微镜的拍摄

先将浓缩的噬菌体颗粒吸取到有碳涂布的 Formvar 膜的铜网格上, 然后用磷钨酸负染, 随后使用 120 KV1 下操作的 Tecnai G2 F20 S-Twin 透射电子显微镜进行观察^[15]。通过透射电子显微镜拍摄的图像测量出噬菌体衣壳的直径和尾部长度。

2.4 噬菌体宿主谱的测定

取 200 μL 待测菌液加入到含有 0.7% (质量体积比) 的琼脂糖 LB 中, 迅速混匀平铺在含有 1.5% (质量体积比) 的琼脂平板上。待琼脂凝固, 取 10 μL 噬菌体滴在板上, 30 °C 过夜培养后观察是否形成噬菌斑。

2.5 基因组提取和生物信息学的分析

本文使用快速提取 λ 噬菌体基因组的 DNA 试剂盒 (DN22, Aidlab, China), 从纯化的噬菌体颗粒中提取噬菌体的脱氧核糖核酸 (DNA); 采用 illumina HiSeq1500 测序仪 (Illumina Inc., USA) 进行基因组测序, 测序产生的读长序列 (reads) 采用 Soapdenovo^[16] 组装成完整的噬菌体基因组; 采用 GeneMark^[17] 软件预测基因组上的开放阅读框 (Open Reading Frame, ORF); 采用 BLASTp 比对非冗余蛋白质数据库对 ORF 进行基因功能注释 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)^[18]; 采用 tRNAscan-SE 1.21 (<http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/>)^[18] 预测基因组中编码 tRNA 序列

的基因。下载不同属但同属于肌尾噬菌体科、有尾噬菌体目(Myoviridae, Caudovirales)的末端大亚基的氨基序列,通过 ClustalW 比对,再用 MEGA 5.02 软件中的邻接算法(Neighbor-joining)绘制系统发育树^[18]。从 Genbank 下载 *Aeromonas phage* 31 GCA_000862645.1 和 *Aeromonas phiSA4* GCA_002710125.1 的全基因组序列,用 Easyfig (<http://mjsull.github.io/Easyfig/>)^[19]对噬菌体进行全基因组序列比对。

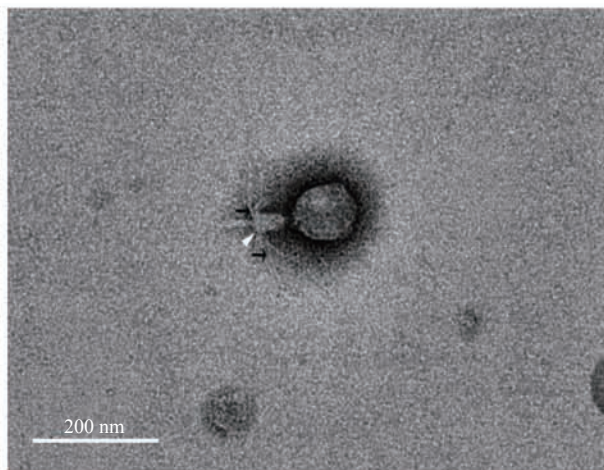
3 结果和分析

3.1 噬菌体的分离纯化

利用杀鲑气单胞菌为宿主菌从中国深圳海鲜市场的污水样本中分离出一株噬菌体 Asfd-1。该噬菌体在双层平板中生长形成圆形、轮廓分明、透明的噬菌斑,直径约 1 mm,呈现出裂解性噬菌体的噬菌斑特征。上述形态学观察表明,Asfd-1 噬菌体可初步被认为是裂解性噬菌体^[20]。

3.2 Asfd-1 噬菌体的形态特征

纯化和浓缩的噬菌体 Asfd-1 在负染后用透射电子显微镜^[15]观察。如图 1 所示,噬菌体 Asfd-1



注:图中白色箭头表示可收缩的尾部;黑色箭头表示可移动的尾部纤维

图 1 噬菌体 Asfd-1 透射电镜照片

Fig. 1 Transmission electron microscope image of Asfd-1

拥有直径为 100 nm、宽度为 71 nm 的等长的二十面体头部,以及具有长度为 51 nm 的收缩尾部,基底盘周围还存在着可移动的针型扭结状尾部纤维。该形态特征表明,噬菌体 Asfd-1 为肌尾噬菌体科、有尾噬菌体目^[21]。

3.3 噬菌体 Asfd-1 的宿主谱

本文采用双层平板点板法,选取实验室现有的具有明确 16S 序列的、且具有美国国立生物技术信息中心(NCBI)编号的 14 株菌进行实验,结果如表 1 所示。噬菌体 Asfd-1 对不同的杀鲑气

表 1 Asfd-1 的宿主谱

Table 1 Host range of phage Asfd-1

菌株名称	NCBI 编号	感染性
<i>A. salmonicida</i> *	MF663675.1	+
<i>A. salmonicida</i> S44 ^a	CP022181.1	+
<i>A. salmonicida</i> S68 ^a	CP022186.1	+
<i>A. salmonicida</i> S121 ^a	CP022175.1	+
<i>Vibrio spp.</i> ^b	MH298560	-
<i>V. parahaemolyticus</i> ^b	MH298543	-
<i>V. parahaemolyticus</i> ^b	MH298545	-
<i>V. parahaemolyticus</i> ^b	MH298562	-
<i>V. parahaemolyticus</i> ^b	MK377081	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ^c	MH298553	-
<i>E. faecalis</i> Ef-X24 ^c	MH298552	-
<i>E. faecalis</i> Ef-X22 ^c	MH298551	-
<i>B. cereus</i> ^d	MH298554	-
<i>B. cereus</i> ^d	MH298576	-

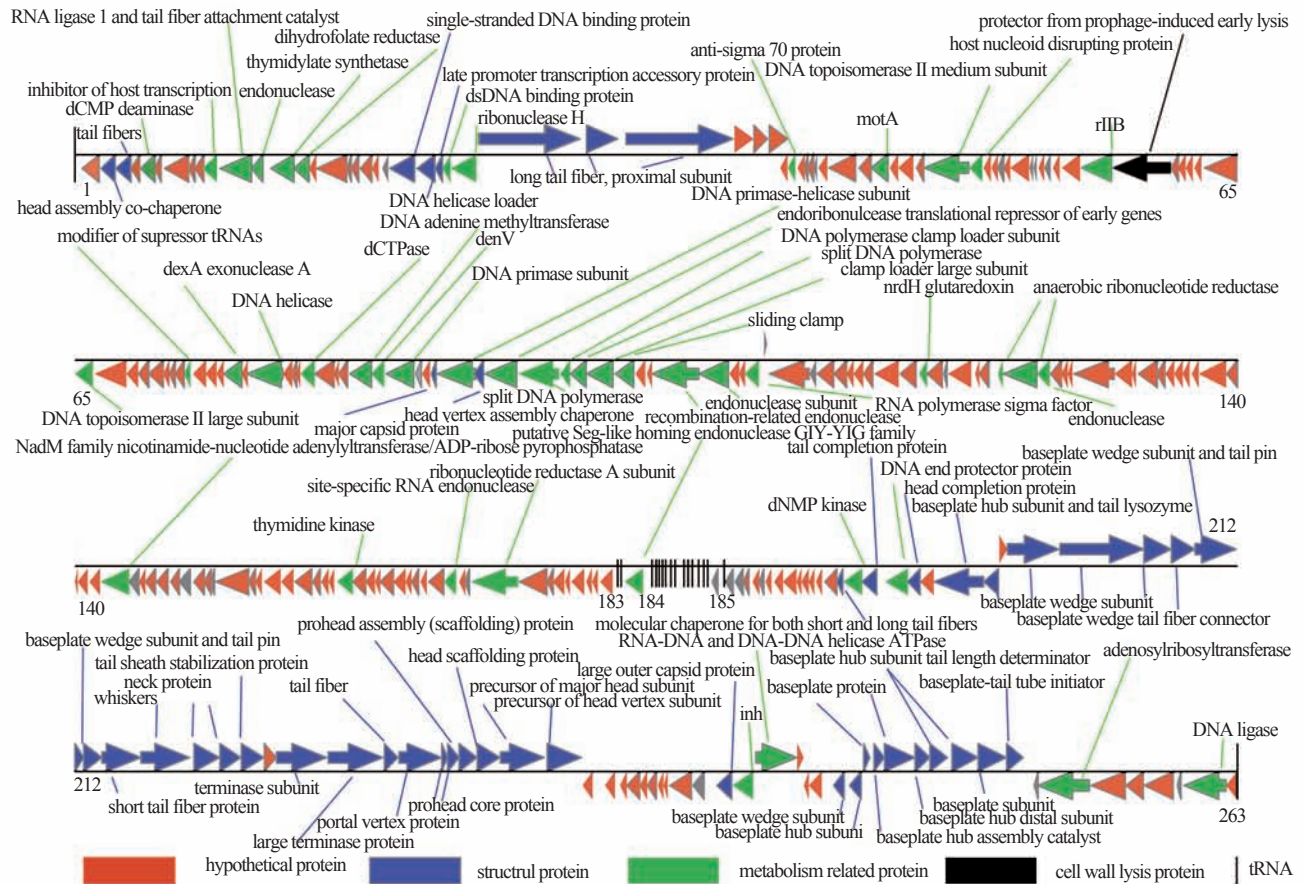
注: *A. salmonicida* 表示杀鲑气单胞菌; *A. salmonicida* S44 表示杀鲑气单胞菌 S44; *A. salmonicida* S68 表示杀鲑气单胞菌 S68; *A. salmonicida* S121 表示杀鲑气单胞菌 S121; *Vibrio spp.* 表示弧菌; *V. parahaemolyticus* 表示副溶血弧菌; *E. faecalis* 表示屎肠球菌; *B. cereus* 表示蜡样芽胞杆菌; “*”表示用来分离噬菌体的宿主菌来自本单位实验室; “a”表示宿主菌由中国科学院微生物研究所微生物资源国家重点实验室提供; “b”表示宿主菌由本单位实验室从广东省汕尾市某水产养殖场病虾肠道分离来的; “c”表示宿主菌由中国科学院水生生物研究所淡水生态与生物技术国家重点实验室提供; “d”表示宿主菌由四川农业大学提供; “+”表示强裂解性; “-”表示无裂解

单胞菌均有强裂解的效果，形成明显的噬菌圈，但对弧菌、大肠杆菌和芽孢杆菌没有噬菌圈的形成。该结果表明，噬菌体 Asfd-1 不能裂解弧菌、大肠杆菌和芽孢杆菌这 3 种菌株，但可以特异性感染杀鲑气单胞菌，也保障了其应用于噬菌体治疗的安全性。

3.4 噬菌体 Asfd-1 基因组的生物信息学分析

Asfd-1 的基因组是一个长度为 168 962 bp 的双链 DNA，鸟嘌呤(G)和胞嘧啶(C)的含量为 41.53%，有 16 个转移核糖核酸(tRNA)序列。该结果表明，噬菌体 Asfd-1 并不完全依赖宿主细胞转录，具有一定的自主转录能力。通过 NCBI 数据库比对得出，在 Asfd-1 基因组编码的 263 个

ORF 中，有 125 个 ORF 能被注释成已知功能的蛋白，余下的 138 个(约占总数的 52.47%)ORF 均为未知蛋白，即 Asfd-1 基因组上有大约 50% 的蛋白为新型蛋白。该结果也说明 Asfd-1 噬菌体为新型噬菌体。根据注释结果将 Asfd-1 基因组分为 4 个不同的功能模块：结构蛋白功能基因模块、核苷酸代谢相关蛋白功能基因模块、细胞裂解相关蛋白功能基因模块和假想蛋白基因模块(图 2)。其中，编码结构蛋白的基因在 Asfd-1 基因组中呈分散状态。263 个 ORF 中有 46 个编码结构蛋白，包括主要衣壳蛋白、颈蛋白、基板蛋白、尾纤维蛋白和尾部蛋白等。全基因组对比表明，Asfd-1 噬菌体基因组与同源噬



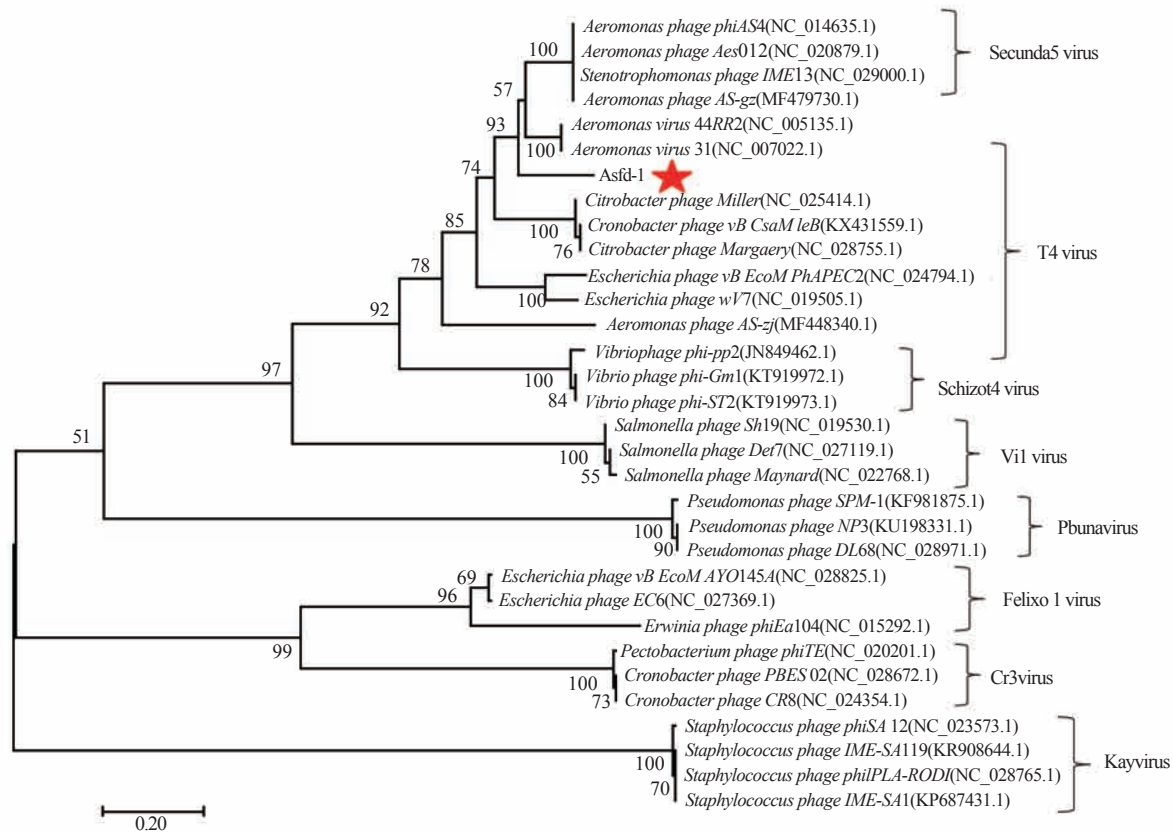
注：箭头表示预测的基因；不同颜色表示不同的功能蛋白；红色表示假设蛋白；紫色表示功能性蛋白；绿色表示代谢相关蛋白；黑色表示细胞裂解相关蛋白；“|”表示 tRNA

图 2 噬菌体 Asfd-1 基因组示意图

Fig. 2 Schematic representation of phage Asfd-1 genome

菌体 *Aeromonas* phage 31 GCA_000862645.1 和 *Aeromonas* phiSA4 GCA_002710125.1 基因组相似性均为 77%, 根据国际病毒分类委员会 (ICTV) 规定的病毒分类, 当基因组序列相似性高达 95% 以上时, 认为这两个病毒属于同一种^[22]。因此, 进一步说明了 Asfd-1 噬菌体是一株新型噬菌体。其中, Asfd-1 的尾部蛋白 (YP_238880.1) 与 p31 和 phiSA4 的尾部蛋白 (YP_238880.1) 具有 85% 的相似性, 表明这 3 种噬菌体可能拥有相似的尾部包装体系^[23]。ORF30 被注释为编码尾丝蛋白的基因, 该尾丝蛋白与 p31 和 phiSA4 编码的尾丝蛋白 (YP_238875.1) 基因分别有 62%、69% 的相似性。尾部和尾丝蛋白是 T4 噬菌体高效感染宿主菌的部位, 表明这 3 个蛋白可能具有相似的受体并且拥有相似的宿主谱。在 Asfd-1 噬菌

体中, 至少有 46 个 ORF 编码与核苷酸代谢相关的蛋白基因, 包括 DNA 解旋酶载体、RNA 聚合酶、核酸内切酶、DNA 引物亚基以及与重组相关的核酸内切酶等。与 p31 和 phiSA4 相比, RNA 聚合酶结合蛋白基因是噬菌体 Asfd-1 独有的。Asfd-1 也携带编码细胞裂解相关的蛋白基因, 只有 ORF60 被注释为原噬菌体诱导的早期裂解的保护蛋白基因, 该蛋白携带 HSP90 蛋白结构域。而噬菌体 phiSA4 和 p31 都携带编码穴蛋白 (holin) (ORF36^{phiSA4}、ORF221^{p31}) 和溶菌酶 (lysis) (ORF35^{phiSA4}、ORF220^{p31}) 的基因^[24]。这两个蛋白是噬菌体裂解宿主菌细胞外膜的主要功能蛋白, Asfd-1 基因组没有发现编码这两个蛋白的基因序列, 说明 Asfd-1 可能以新的机制实现对宿主细胞的裂解, 也可能携带的基因编码蛋白与已



注: ★ 表示噬菌体 Asfd-1; 左下角标度尺表示相对进化距离为 0.2

图 3 基于终止酶大亚基蛋白氨基酸序列的噬菌体 Asfd-1 的系统进化树图

Fig. 3 Phylogenetic tree of phage Asfd-1 based on large terminase subunit amino acid sequence

知蛋白序列存在较大的差异性，具体原因需要进一步验证。

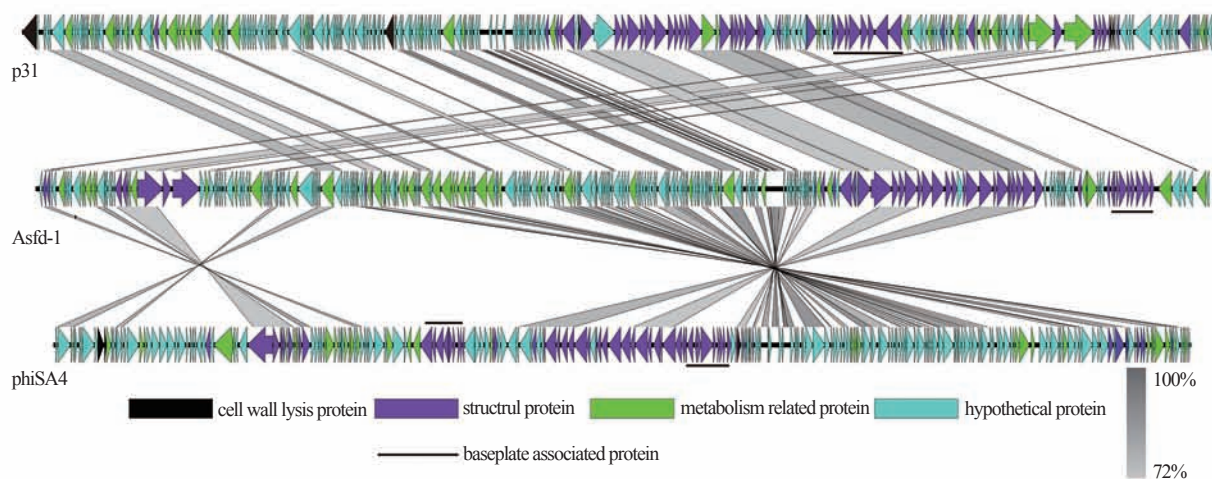
3.5 噬菌体 Asfd-1 的系统进化树

从 NCBI 上下载 31 种属于肌尾噬菌体科、有尾噬菌体目的噬菌体的终止酶大亚基蛋白的氨基酸序列，并与 Asfd-1 的终止酶大亚基序列进行对比，构建系统进化树(图 3)。终止酶大亚基蛋白基因常作为噬菌体的标志基因被用于系统进化树分析^[25]。如图 3 所示，31 个已知的噬菌体按照 ICTV 规定分成了 8 个属，而 Asfd-1 被归类到 T4 病毒属中。其与噬菌体 phiSA4 (Secunda5 类噬菌体)和 p31 (T4 类噬菌体)在进化过程中可能是由于基因点突变、漂移和重组，由共同祖先进化成了不同的分支^[25]。系统进化树表明，噬菌体 Asfd-1 属于 T4 病毒属的成员。

3.6 同源基因组的对比

为进一步探究该新型噬菌体 Asfd-1 的生物学特性，将 Asfd-1 和同源的 *Aeromonas* phage 31 GCA_000862645.1 和 *Aeromonas* phiSA4 GCA_002710125.1 基因组序列 ORF 进行对比

分析(图 4)。如图 4 所示，Asfd-1 和 p31 蛋白质组相似性很高，而与 phiSA4 相比，虽然蛋白相似性高但转录方向相反。三种噬菌体对比的主要差异是位于尾部的基板蛋白(baseplate protein, baseplate subunit)、尾管蛋白(baseplate-tail tube initiator, baseplate hub subunit tail length determinator)、尾鞘蛋白(baseplate hub assembly catalyst, baseplate wedge subunit, baseplate hub subunit and baseplate hub distal subunit)等。噬菌体侵染宿主菌时，末端的尾丝蛋白一旦吸附于宿主菌膜上，尾板蛋白形态发生变化与菌膜融合，并给感染初期提供能量，尾鞘收缩形成一个压缩波，尾部溶菌酶活化，DNA 被注入到宿主菌中^[26-27]。而 T4 噬菌体属的末端尾丝蛋白研究表明，该属的尾丝蛋白具有较强的适应性，其基因同源性较高，但却能够识别不同的宿主受体^[9]。因此，尽管 Asfd-1 与 p31、phiSA4 噬菌体尾丝蛋白的同源相似性分别是 62% 和 69%，但在尾板蛋白区域的低同源性表明，它们在侵染宿主菌时识别不同的宿



注：不同颜色表示不同的功能蛋白；蓝色表示假设的蛋白质；紫色表示功能性蛋白质；绿色表示代谢相关的蛋白质；黑色是细胞裂解相关蛋白；右下角灰色梯度表示氨基酸的相似度范围为 72%~100%；“—”表示尾部相关的基底蛋白存在的位置

图 4 噬菌体 Asfd-1 与气单胞菌噬菌体 31 和 phiSA4 基因组对比图

Fig. 4 Schematic representation of the genomic organization of phage Asfd-1 compared to those of *Aeromonas* phage 31 and phiSA4

主受体。对于 3 种噬菌体相似度高的结构蛋白和代谢相关蛋白编码基因区域, 相比 Asfd-1, p31 基因相似度高且转录方向相同, 但在基因组中所处的位置发生了偏移; 而相比 Asfd-1, phiSA4 基因不仅在基因组中的位置发生了偏移, 而且转录方向也发生了翻转。这表明在噬菌体的进化过程中, 染色体的倒位和易位起着重要作用。

4 讨论与分析

国内外许多研究^[6-7]表明, 现阶段养殖业通过抗生素来防治鱼群中疔疮病的爆发。这样不仅会对环境造成很大的污染, 也会加大生态环境中致病菌与抗生素的接触, 从而产生更多的超级细菌。而本文分离出的新杀鲑气单胞菌噬菌体 Asfd-1 有望成为新型的抗疔疮病的生物制剂, 即环境友好又大大提高了水产养殖业的产值。

本研究在 Asfd-1 宿主谱的研究中, 关于宿主菌的选择有 3 方面的原因: (1) 从本单位实验室保存的菌种中选取; (2) 具有明确的 16S 序列和 NCBI 号; (3) 参考实验室前期实验经验的积累。最终选择 3 种易感染杀鲑气单胞菌类噬菌体的菌种的不同株, 共 14 株菌。其中副溶血弧菌的 5 株菌种是常见的易引起人类肠胃炎的另一种致病菌^[28]。研究结果证实, Asfd-1 对该病原菌没有感染性, 表明未来可以采用噬菌体鸡尾酒的疗法^[29]混合专一感染副溶血弧菌的噬菌体, 制备多功效的生物制剂。另外的 5 株粪肠球菌菌种的菌是人肠道中普遍存在的益生菌。实验结果表明, 杀鲑气单胞菌噬菌体 Asfd-1 对人肠道中普遍存在的益生菌没有感染, 这为未来 Asfd-1 作为生物制剂提供了安全保障。当然本实验选取的宿主菌株有一定的局限性, 后续的生物制剂的应用需要补充更详细的宿主谱^[28] (如人肠道中同样普遍存在的益生菌乳酸菌属和双歧杆菌属等) 以及该噬菌体的理化特性^[30] (如最适 pH 值、最适温度、一步生

长曲线等)。但本实验的研究结果在一定程度上为未来噬菌体疗法的应用奠定了理论基础。

5 结 论

本研究从深圳海鲜市场的废水中分离出了一株新型烈性噬菌体 Asfd-1, 其 Genbank 登记号为 MK577502。表型特征和基因组特征分析表明, Asfd-1 属于肌尾噬菌体科 T4 噬菌体属, 且未在 Asfd-1 基因组中发现溶源性因子和毒力因子相关基因。新型 Asfd-1 噬菌体的发现丰富了噬菌体基因库的多样性, 为进一步研究噬菌体和细菌之间的相互作用、噬菌体改造和研发新型抗菌制剂奠定了理论基础。

参 考 文 献

- [1] Vanden BP, Frey J. *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* in the light of its type-three secretion system [J]. *Microbial Biotechnology*, 2014, 7(5): 381-400.
- [2] Rachna T, Mridu D, Shyamasree N, et al. Isolation of *Aeromonas salmonicida* from human blood sample: a case report [J]. *Journal of Clinical & Diagnostic Research Jcdr*, 2014, 8(2): 139-140.
- [3] Mccarthy DH. An experimental model for fish furunculosis caused by *Aeromonas salmonicida* [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2010, 6(3): 231-237.
- [4] Scott M. The pathogenicity of *Aeromonas salmonicida* (Griffin) in sea and brackish waters [J]. *Journal of General Microbiology*, 1968, 50(2): 321.
- [5] Dallaire-Dufresne S, Tanaka KH, Trudel MV, et al. Virulence, genomic features, and plasticity of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, the causative agent of fish furunculosis [J]. *Veterinary Microbiology*, 2014, 169(1-2): 1-7.
- [6] Stoffregen DA, Chako AJ, Backman S, et al. Successful therapy of furunculosis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., using the fluoroquinolone antimicrobial agent enrofloxacin [J]. *Journal of Fish Diseases*, 1993, 16(3): 219-228.

- [7] Flakas K. Sulfonamide therapy of furunculosis in brown trout [J]. Transactions of the American Fisheries Society, 2011, 78(1): 117-127.
- [8] Liu PF, Du YS, Meng LJ, et al. ALDH7A1 is a protein that protects Atlantic salmon against *Aeromonas salmonicida* at the early stages of infection [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2017, 70: 30-39.
- [9] Liao WC, Ng WV, Lin IH, et al. T4-like genome organization of the *Escherichia coli* O157: H7 lytic phage AR1 [J]. Journal of Virology, 2011, 85(13): 6567-6578.
- [10] Sulakvelidze A. Bacteriophage: a new journal for the most ubiquitous organisms on Earth [J]. Bacteriophage, 2011, 1(1): 1.
- [11] Carlton RM. Phage therapy: past history and future prospects [J]. Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis, 1999, 47(5): 267-274.
- [12] Ernst B, Kolb H, Cutting B, et al. Drug discovery today [J]. Frontiers in Medicinal Chemistry-Online, 2005, 2(1): 533-543.
- [13] Yuan SJ, Chen L, Liu Q, et al. Characterization and genomic analyses of *Aeromonas hydrophila* phages AhSzq-1 and AhSzw-1, isolates representing new species within the T5virus genus [J]. Archives of Virology, 2018, 163(7): 1985-1988.
- [14] Yamamoto KR, Alberts BM, Benzinger R, et al. Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethylene glycol and its application to large-scale virus purification [J]. Virology, 1970, 40(3): 734-744.
- [15] Williams DB, Carter CB. Transmission electron microscopy [J]. Springer Science+Business Media, 1996, 4: 729.
- [16] Luo R, Liu B, Xie Y, et al. SOAPdenovo2: an empirically improved memory-efficient short-read de novo assembler [J]. Gigascience, 2012, 1(1): 18.
- [17] John B, Mark B. GeneMark: web software for gene finding in prokaryotes, eukaryotes and viruses [J]. Nucleic Acids Research, 2005, 33(33): 451-454.
- [18] Lavigne R, Seto D, Mahadevan P, et al. Unifying classical and molecular taxonomic classification: analysis of the *Podoviridae* using BLASTP-based tools [J]. Research in Microbiology, 2008, 159(5): 406-414.
- [19] Sullivan MJ, Petty NK, Beatson SA. Easyfig: a genome comparison visualizer [J]. Bioinformatics, 2011, 27(7): 1009-1010.
- [20] Morita M, Tanji Y, Mizoguchi K, et al. Characterization of a virulent bacteriophage specific for *Escherichia coli* O157: H7 and analysis of its cellular receptor and two tail fiber genes [J]. FEMS Microbiology Letters, 2002, 211(1): 77-83.
- [21] Maniloff J, Ackermann HW. Taxonomy of bacterial viruses: establishment of tailed virus genera and the other *Caudovirales* [J]. Archives of Virology, 1998, 143(10): 2051-2063.
- [22] Adriaenssens E, Brister JR. How to name and classify your phage: an informal guide [J]. Viruses, 2017, 9(4): 70.
- [23] Rackwitz HR, Zehetner G, Murialdo H, et al. Analysis of cosmids using linearization by phage lambda terminase [J]. Gene, 1985, 40(2): 259-266.
- [24] Martín AC, López R, García P. Functional analysis of the two-gene lysis system of the pneumococcal phage Cp-1 in homologous and heterologous host cells [J]. Journal of Bacteriology, 1998, 180(2): 210.
- [25] Fouts DE, Rasko DA, Cer RZ, et al. Sequencing bacillus anthracis typing phages gamma and cherry reveals a common ancestry [J]. Journal of Bacteriology, 2006, 188(9): 3402-3408.
- [26] Kao SH, McClain WH. Baseplate protein of bacteriophage T4 with both structural and lytic functions [J]. Journal of Virology, 1980, 34(1): 95-103.
- [27] Bo H, William M, Molineux IJ, et al. Structural remodeling of bacteriophage T4 and host membranes during infection initiation [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2015, 112(35): 4919-4928.
- [28] Fan JQ, Chen LM, Mai GQ, et al. Dynamics of the gut microbiota in developmental stages of *Litopenaeus vannamei* reveal its association with body weight [J]. Scientific Reports, 2018, 9: 734.
- [29] Chen L, Yuan SJ, Liu Q, et al. *In vitro* design and evaluation of phage cocktails against *Aeromonas salmonicida* [J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 1476.
- [30] 傅强, 单文雅, 王兆飞, 等. 一株强裂解性大肠杆菌 T1 样噬菌体新成员的分离与鉴定 [J]. 微生物学通报, 2017(12): 18-30.