

DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694.2017.09.012

沙雷菌裂解性噬菌体 PS2 生物学特性 及其全基因组测序

张 改¹, 李振江¹, 薛 静^{1,2}, 王书伟¹, 陈松建¹, 李亚辉¹, 黄德海¹, 王小亭², 王山梅³, 王中全²

摘要: 目的 明确一株粘质沙雷菌裂解性噬菌体 PS2 的生物学特性及全基因组序列。方法 电镜观察 PS2 的形态; 双层平板法分析 PS2 噬菌谱、生长曲线及理化稳定性; 采用 MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit 提取噬菌体基因组, 酶解作用鉴定基因组类型; 构建噬菌体 PS2 测序文库, 采用 MiSeq™ 系统测序, Velvet 1.2.08 进行序列拼接。结果 PS2 为肌尾型噬菌体。其感染 S2 菌株的潜伏期为 21 min, 爆发量为 70 PFU。PS2 在 pH5 到 pH10 的环境中具有较好的稳定性, 在 50 °C 和 60 °C 的环境中活性也无明显变化。PS2 基因组为双链 DNA, 全长 167 266 bp, 平均 GC 含量为 41.7%, 共预测到 276 个 ORF。BLASTN 初步比对结果提示其与多株 T4-like 噬菌体基因组核酸序列具有显著相似性。结论 分离鉴定了一株粘质沙雷菌属噬菌体, 进行了生物学特性、全基因组测序和生物信息学初步分析, 为噬菌体治疗多重耐药细菌及噬菌体生物信息学深入分析奠定了基础。

关键词: 粘质沙雷菌, 噬菌体, 生物学特性, 基因组测序**中图分类号:** Q939.48 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-2694(2017)09-0814-07

Characterization and genomic sequencing of PS2, a lytic phage that infects *Serratia marcescens* clinical isolates

ZHANG Gai¹, LI Zhen-Jiang¹, JIN Jing¹, WANG Shu-wei¹, CHEN Song-jian¹, LI Ya-hui¹, HUANG De-hai¹, WANG Xiao-ting², WANG Shan-mei³, WANG Zhong-quan²

(1. Department of Pathogen Biology and Immunology, Henan Medical College, Zhengzhou 451191, China;
 2. Department of Pathogen Biology, Basic Medical College, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China;
 3. Department of Laboratory, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou 450001, China)

Abstracts: The present study focused on the characterization and genomic sequence of phage PS2 that infects *Serratia marcescens* clinical isolates. The morphology of phage PS2 was observed with electron microscope. The one-step growth curve, host range, and stability of PS2 were investigated. In addition, Phage DNA was extracted from the purified phage particles using a MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit. DNA sample was analyzed by digesting with restriction enzymes. The phage DNA was used for constructing the sequencing library. The library was sequenced on a MiSeq™ platform. The whole genome sequence was obtained by Velvet (version: 1.2.08) assembling. Phage PS2 belongs to the *Myoviridae* family. The linear, circularly permuted, 167 266-bp double-stranded DNA genome of PS2 has high similarities to T4-like phages. The phage DNA contains 41.7% GC and 276 ORFs. PS2 exhibited a 21-minute latent period and 70 PFU per cell at burst size when the pathogenic *S. marcescens* strain S2 served as a host. Further investigation suggested that PS2 is stable in a wide pH range (pH5 to pH10) and at extreme temperatures (50 °C and 60 °C) after incubation alone at different pHs and different temperatures, respectively. The paper focused on the isolation and identification of a novel lytic *S. marcescens* phage, the biological characteristics, the whole genome sequencing and the preliminary study of bioinformatics, which laid the foundation for deeply analysis to the phage therapy of multi-drug resistant bacteria and the phage biological information.

河南省科技厅重点科技攻关项目(No. 142102310440), 河南省医学科技攻关计划项目(No. 201303199)

通讯作者: 薛静, Email: jing77772006@126.com

作者单位: 1. 河南医学高等专科学校病原生物学与免疫学教研室, 郑州 451191;

2. 郑州大学基础医学院病原生物学教研室, 郑州 450000;

3. 河南省人民医院检验科, 郑州 450000

Keywords: *Serratia marcescens*; phage; characterization; genomic sequencing

Supported by the Key Projects of Science and Technology Department of Henan Provincial Science and Technology Department (No. 142102310440) and the Project of Medical Science and Technology Project of Henan Province (No. 201303199)

Corresponding author: Jin Jing, Email: jing77772006@126.com

粘质沙雷菌,革兰氏阴性短杆菌,是目前所发现的最小的细菌,最初被命名为灵杆菌,广泛分布于自然界,是水和土壤中的常居菌群,也可生长在动物性和植物性食品中^[1]。粘质沙雷菌最初被认为是非病原微生物。然而,1951年,Wheat首次报道了粘质沙雷菌可以引起感染^[2],随后的一些报道显示,该菌可引起败血症、心内膜炎、脑膜炎、肺炎、创伤,呼吸道和泌尿道等多种感染^[1],尤其在儿科病房和重症监护室可以引起严重甚至致死性感染^[3],此后该菌被视为一种非常重要的条件致病菌。这种微生物可通过直接接触,或通过导管、滴液、呼吸机等方式传播^[4]。此外,粘质沙雷菌还是一种容易污染实验室培养皿的常见细菌。

由于粘质沙雷菌对多种抗生素的耐药性不断加剧,致使其感染的治疗日趋困难^[5],因此,临幊上急需寻找新的替代治疗方法。噬菌体疗法被认为是一种可能的替代方法。因为噬菌体是可以裂解细菌的病毒,所以自1917年人们首次发现噬菌体后不久,就曾用它成功的防治过多种细菌感染^[6]。然而,随着抗生素的发现及其成功推广,很多国家停止了对噬菌体治疗的继续研究。近年来,随着多重耐药菌株的不断出现^[7],噬菌体治疗又重新受到人们的关注,许多针对噬菌体的研究已经进行^[8-10]。已有报道显示出噬菌体在治疗大肠杆菌^[11]、粪肠球菌^[12]、肺炎克雷伯菌^[13]、铜绿假单胞菌^[14]和金黄色葡萄球菌^[6]等的动物感染模型中有效性,因此,很多可以裂解临床耐药菌的噬菌体被分离和研究,然而,对可以裂解粘质沙雷菌噬菌体的分离研究,尤其是对其基因组的研究却非常有限。本研究以粘质沙雷菌临床菌株S2为宿主菌,从环境中分离到一株噬菌体,命名为PS2。本文对其生物学特性及基因组序列进行报道。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 营养琼脂粉、营养肉汤粉和琼脂粉均购自杭州天和微生物试剂有限公司;噬菌体保存液SM(NaCl 5.8 g、MgSO₄ · 7H₂O 2 g、1 mol/L Ttris · HCl 50 mL、2%明胶 5 mL,加超纯水至1 000 mL,分装,121 ℃高压灭菌20 min,4 ℃保存),上层培养基(营养肉汤粉22.0 g、琼脂粉7.0 g溶于1 L蒸馏水中,加热煮沸至完全溶解,2.5 mL/

支分装于试管中,121 ℃高压灭菌15 min,4 ℃保存备用)和下层琼脂培养基(营养琼脂粉38.0 g溶于1 L蒸馏水中,加热煮沸至完全溶解,121 ℃高压灭菌15 min,倾倒分装于灭菌平皿内,4 ℃保存备用)由本实验室制备。MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit Ver. 4.0(TAKARA BIO Inc., Tokyo, Japan)。

1.2 菌株及其鉴定 16株粘质沙雷菌、一株粘质沙雷菌标准菌株(ATCC14756),6株铜绿假单胞菌、5株金黄色葡萄球菌和20株大肠埃希菌用于噬菌体噬菌谱的调查。各菌株均于河南省人民医院住院病人的送检标本中分离(如痰液、血液、脓液和分泌物),菌株的表型鉴定及药敏实验均用细菌自动鉴定系统BD Phoenix(Becton Dickinson Diagnostic Systems, Sparks, MD, USA)完成。其中被PS2裂解的菌株进一步采用通用引物27F(5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3')和1492R(5' GGT TAC CTT GTT ACG ACT T 3')扩增16S rRNA基因,并将此序列于NCBI网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/index.html>)进行BLASTN比对并建树。

1.3 噬菌体的分离、增殖和形态观察 从郑州新郑龙湖镇的鱼塘中采集水样,离心(12 000 × g,4 ℃,15 min)去除藻细胞和污水碎片。取上清液用0.22 μm SFCA康宁滤器过滤(纽约康宁公司)后,与过夜培养的粘质沙雷菌菌液(100:1,v/v)混合,再加入等体积的双倍营养肉汤中培养(37 ℃,150 r/min)过夜。次日离心(12 000 × g,4 ℃,10 min)去上清并过滤除菌。将0.2 mL的滤液和0.1 mL的新鲜菌液加入2.5 mL预热的上层培养基(0.7%琼脂,47 ℃)中混合,平铺在下层培养基(1.5%琼脂)表面,自然凝固后,置于37 ℃温箱中过夜培养。用穿刺接种针进行6次单斑纯化。

采用双层平板法增殖噬菌体。将10 mL新鲜S2细菌菌液离心浓缩至1 mL(3 000 × g,10 min),取0.1 mL浓缩液(10¹⁰ CFU/mL)与0.1 mL噬菌体PS2悬液(10⁶ PFU/mL),混合后加入2.5 mL提前融化的上层培养基中(50 ℃,0.7%琼脂),快速手搓试管混匀,平铺在下层培养基表面(1.5%琼脂)。待凝固后将平板在37 ℃孵育6~8 h,在平板中加入SM液5 mL,在4 ℃洗脱后可得到高浓度的噬菌体

悬液(10^{11} PFU/mL)。此悬液通过 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 的滤器过滤后置 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

用生理盐水将噬菌体PS2的储存液(10^{11} PFU/mL)稀释至 10^9 PFU/mL。将稀释液用3%戊二醛溶液在 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 固定30 min。将固定液滴在300目铜网上,2%的磷钨酸(2% w/v,pH 7.2)负染30 s,干燥后用透射电子显微镜JEM-1400于80 kV下观察。

1.4 噬菌体噬菌谱的调查和对不同宿主菌敏感性的测定 采用滴斑法用本实验室现有的细菌,包括16株粘质沙雷菌、一株粘质沙雷菌标准菌株(ATCC14756),6株铜绿假单胞菌、5株金黄色葡萄球菌和20株大肠埃希菌对PS2的噬菌谱进行了调查。挑取各病原菌单个菌落于营养肉汤中培养过夜。分别将 0.1 mL 过夜培养的细菌(10^9 CFU / mL)加入 2.5 mL 预热的上层培养基中($47\text{ }^{\circ}\text{C}$, 0.7% 琼脂),快速手搓试管混匀,倾倒于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预热的下层培养基(1.5% 琼脂)上,自然凝固。取 10^{10} PFU / mL噬菌体裂解液进行梯度稀释后,取 $5\text{ }\mu\text{L}$ 噬菌体溶液滴加在每块琼脂平板表面,待所滴裂解液完全吸收后,将平板置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。次日观察滴斑区细菌生长情况,呈透明无菌生长者即为PS2的宿主菌,并记录比较PS2在不同宿主菌苔表面形成完全透明滴斑区的最小噬菌体浓度,此浓度的大小由噬菌斑大小及成斑率高低决定。

1.5 一步生长曲线的测定 将过夜培养的S2菌株($100\text{ }\mu\text{L}$)接种到 20 mL 新鲜的营养肉汤中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 振动培养约2 h,菌量约 6×10^7 CFU / ml($\text{OD}_{600} = 0.15$)。将此 1 mL 菌液(1.7×10^5 CFU/mL)和 1 mL 噬菌体PS2(6×10^7 PFU / mL)混合(MOI约为0.01)。将混合物置于一个 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的水浴摇床中震荡培养1 min后离心($12\,000 \times g$, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$,2 min),弃去含游离噬菌体的上清液,从而使噬菌体感染同步。将沉淀(含有噬菌体吸附的细菌细胞)重悬于一个含有 20 mL 新鲜营养肉汤的锥形瓶中(预热至 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$),震荡培养($37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 240 r/min)。定时取样,用 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 营养肉汤适当稀释后测定总噬菌体活性。爆发量的大小等于第一个平台期平均总噬菌体活性,除以潜伏期平均总噬菌体活性。实验进行3次,求平均测量值土标准差(SD)。

1.6 稳定性和突变率的测定 用 1 mol/L HCl 和 1 mol/L NaOH 调整营养液的pH获得了pH为2到pH为11的SM各溶液。将 $100\text{ }\mu\text{L}$ 噬菌体悬液(3×10^{11} PFU/mL)加入 10 mL 不同pH的营养肉汤中孵育1 h($37\text{ }^{\circ}\text{C}$)后,检测活性噬菌体数量。此

外,采用双层平板法,检测PS2的热稳定性。将噬菌体(3×10^{10} PFU/mL)放入营养肉汤(pH 7.2)中,置于不同温度的水浴作用一定时间后,测定不同温度下噬菌体活性的变化规律。

将浓度为 10^7 CFU/mL, 10^8 CFU/mL,和 10^9 CFU/mL的细菌细胞 $100\text{ }\mu\text{L}$ 分别与PS2的噬菌体颗粒 $10\text{ }\mu\text{L}$ (10^{10} PFU/mL)作用5 min。将混合物与 3 mL 0.7%的琼脂溶液混合,立即平铺于下层培养基上,待上层自然凝固后将平板置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温箱中孵育48 h,计数菌落个数。

1.7 基因组类型的鉴定和序列测定 使用MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit Ver. 4.0(TAKARA BIO Inc., Tokyo, Japan)从噬菌体裂解液中提取和纯化噬菌体PS2的核酸。噬菌体DNA于上海生工生物工程技术服务有限公司进行测序。通过自动聚焦声波样本处理仪Covaris S220将噬菌体DNA打成片段。 $3'$ 和 $5'$ 端分别加上接头后,使用QIAquick[®] PCR extraction kit (Qiagen, Venlo, The Netherlands)进行扩增和纯化文库;最后在MiSeqTM(2X250)(San Diego, CA, USA)测序仪上进行测序。通过Velvet(version: 1.2.08;<http://www.ebi.ac.uk/~zerbino/velvet/>)拼接后,得到无重叠序列全长为 $167\,266\text{ bp}$ 的噬菌体PS2的全基因组序列,并登录NCBI(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)利用BLASTN在现有数据库中进行全基因组核苷酸序列的相似性比对分析。GenMarkS在线软件用于ORF的预测(<http://linux1.softberry.com/berry.phtml>)。

1.8 基因组序列 噬菌体PS2的全长基因组序列已提交GenBank[Accession Number: KJ025957]。

2 结 果

2.1 粘质沙雷菌噬菌体的分离及其形态 噬菌体PS2是以粘质沙雷菌临床株S2作为宿主菌从鱼塘水中分离得到的。PS2在宿主菌S2的菌苔上形成直径约 $1\sim 2\text{ mm}$ 的清晰透明斑块,见图1,左图为PS2在粘质沙雷氏菌S2菌苔上形成的噬菌斑,此菌并未产生明显色素;右图为PS2在粘质沙雷氏菌S4菌苔上形成的噬菌斑,此菌产生的红色色素非常明显。

我们以S2作为宿主菌来扩增,纯化和鉴定噬菌体。噬菌体的电镜图显示(如图2a,图2b为噬菌体在电镜下的图片)。PS2包含一个二十面体立体对称的头部,收缩的尾部(小白箭头所示),一个基板(黑色箭头所示)和一个尾领(大白箭头所示)。PS2有

一个细长的二十面体头部(约 106 nm×75 nm)和一套收缩的尾部(约 93 nm×15 nm 宽)。因此,按照国际病毒分类委员会的分类方法,PS2 属于有尾噬菌体目,肌尾噬菌体科。此外,其尾部含有基板和尾领(图 2a)。此噬菌体的形态类似 T 系偶列噬菌体^[15]。

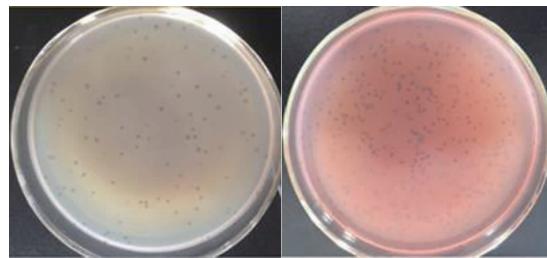


图 1 粘质沙雷氏菌噬菌体 PS2 的噬菌斑

Fig. 1 Plaques of *Serratia marcescens* phage PS2

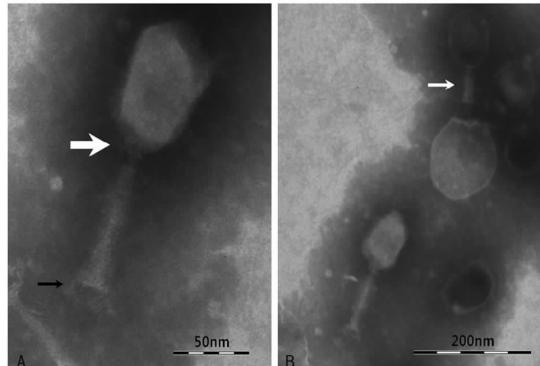


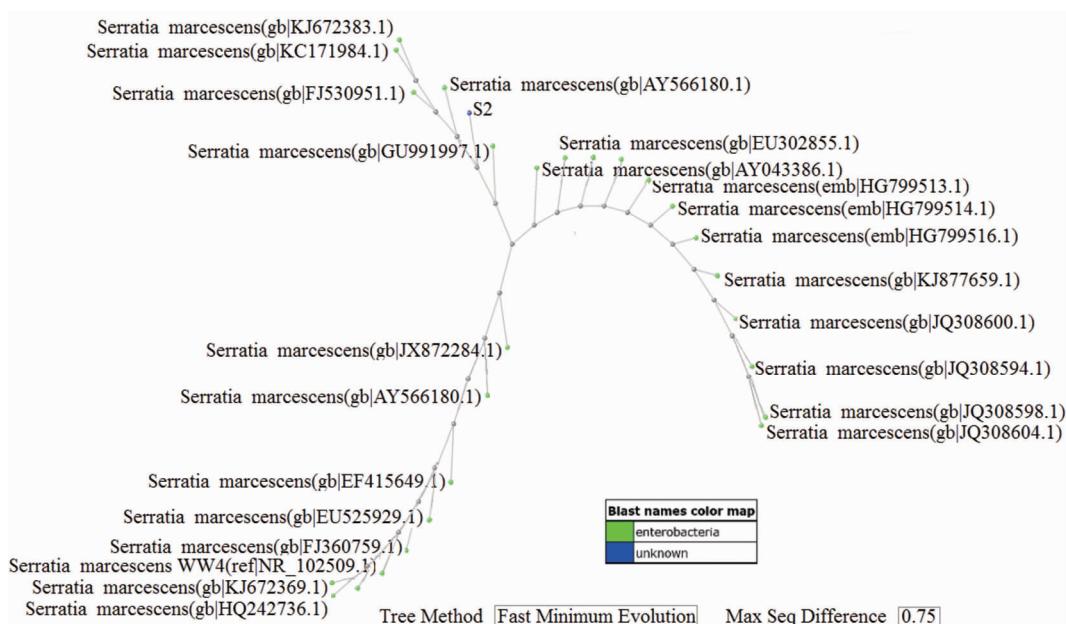
图 2 PS2 的电镜图

Fig. 2 Electron micrographs of phage PS2

2.2 PS2 的噬菌谱和宿主菌的鉴定 16 株粘质沙雷菌的临床分离株、一株粘质沙雷菌的标准菌株(ATCC14756),6 株铜绿假单胞菌临床分离株、5 株金黄色葡萄球菌临床分离株和 20 株大肠埃希菌临床分离株参与了噬菌体 PS2 的噬菌谱调查。但其中只有 4 株(S2,S4,S10, 和 S14)可被 PS2 感染。其中 S2 和 S4 是其最为敏感的宿主菌,PS2 在这两株宿主菌的菌苔上形成噬菌斑的大小和成斑率均明显高于其他宿主菌。16 S rRNA 基因测序结果的进一步系统进化分析如图 3 所示:S2 和 S4 均为粘质沙雷菌,其 16 S rRNA 基因测序结果已提交给 GenBank。S2 和 S4 的登录号分别为 KJ025958 和 KJ025959。

抗生素敏感试验中,4 株 PS2 的宿主菌均对头孢唑啉,氨苄青霉素,四环素,多粘菌素,氨苄西林/舒巴坦,阿莫西林/克拉维酸和氯霉素耐药。其中,S2 的耐药形式最为严峻,只对 5 种抗生素敏感,包括亚胺培南,美罗培南,头孢他啶,左氧氟沙星和哌拉西林/他唑巴坦。如此严峻的耐药形势迫使我们对噬菌体这种新型抗菌药物进行研究。噬菌体 PS2 可以有效杀死多重耐药菌株 S2 和 S4,且这些菌株对噬菌体 PS2 的抗性突变率均仅为 10⁻⁷。

2.3 一步生长曲线 一步生长曲线结果如图 4 所示:以培养时间为横坐标,以培养体系中总噬菌体活性取对数为纵坐标绘制一步曲线。PS2 感染 S2 的潜伏期约为 21 min,爆发量约为 70 PFU/cell。爆发期约为 5 min。



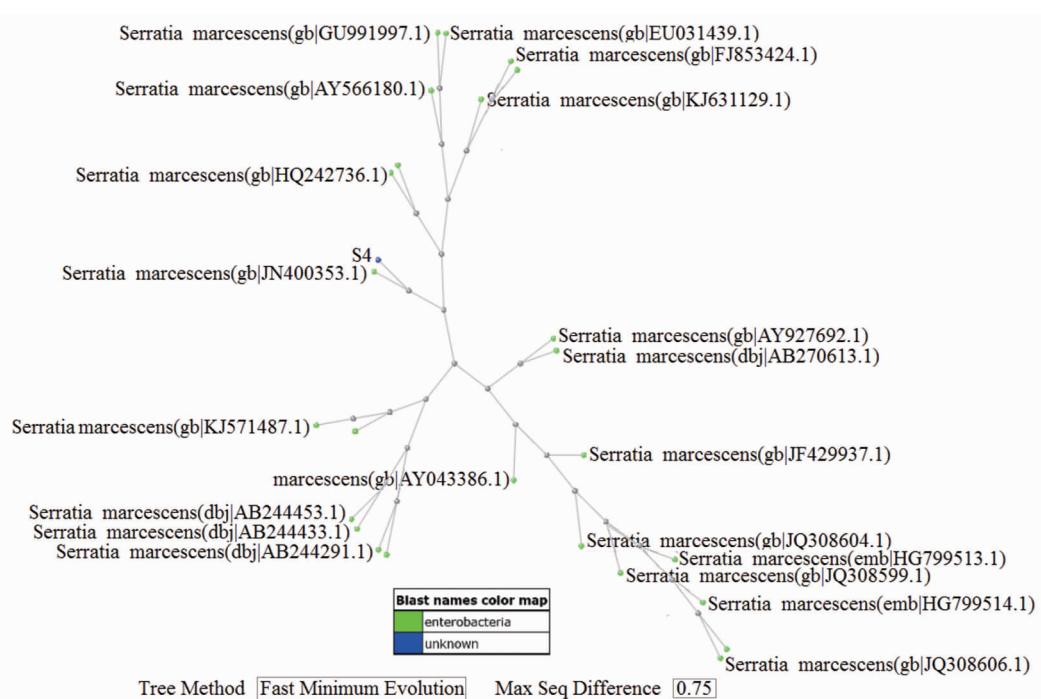
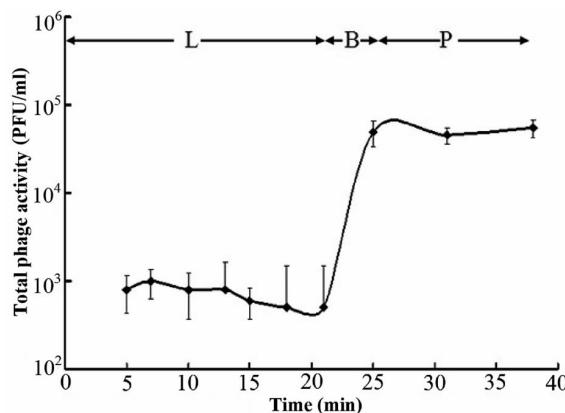


图 3 菌株 S2(左)和菌株 S4(右)分类鉴定的树状图

Fig. 3 Phylogenetic trees of the strain S2 (up) and the strain S4 (down)



L: 潜伏期; B: 爆发期; P: 平台期。

L: latent period; B: burst period; P: plateau period.

图 4 PS2 的一步生长曲线

Fig. 4 One-step growth curve of phage PS2 stability

2.4 稳定性 PS2 可耐受的高温极限环境为 50 °C。如图 5 所示:在 50 °C 孵育 1 h,其活性无显著变化;但随温度进一步升高,其活性即可受显著影响:在 60 °C 孵育 1 h 其活性可减少 2 个数量级;在 70 °C,其活性迅速下降,10 min 内被完全灭活;在 80 °C,其活性在 10 s 内即可完全丧失。另外,PS2 能够在相对极端的酸碱环境中保持其稳定性。如图 6 所示:其活性在 pH 为 5~10 之间均较稳定,但在 pH ≥ 11 和 pH ≤ 4 时,其活性很快丧失。

2.5 基因组序列初步分析 噬菌体 PS2 的核酸可被 DNase 和某些限制性内切酶(*Eco*RI 和 *Hind*III)

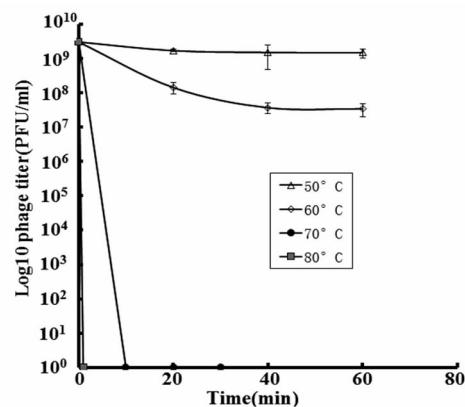


图 5 噬菌体 PS2 的热稳定性

Fig. 5 Phage PS2 heat stability test

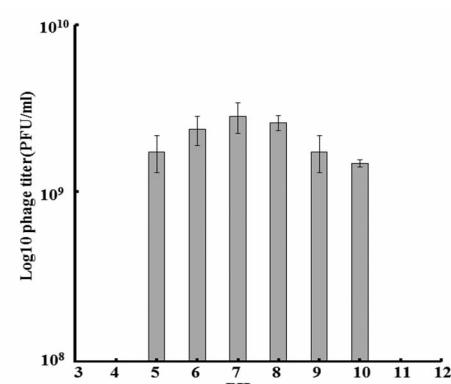


图 6 PS2 pH 稳定性

Fig. 6 Phage PS2 stability test based on pH

降解,但不能被 RNase 降解。因此,PS2 基因组的核酸类型为双链 DNA。利用 Velvet 软件最终拼接出噬菌体 PS2 的序列为 167 360 bp,因其两端带有 94 bp 重复序列(占全基因组的 0.06%),由此我们推测:可能和大肠杆菌噬菌体 T4 一样^[16],噬菌体 PS2 的病毒颗粒中包含了一个可以成环的线状 ds-DNA。因此噬菌体 PS2 基因组非重叠序列为 167 266 bp(GC 含量为 41.7%),共预测到 276 个 ORF。在 NCBI 网站对全长为 167 266 bp 的 PS2 全基因组核酸序列进行初步 BLASTN 比对分析,结果显示:PS2 与 GenBank 数据库中现有的噬菌体序列存在有限相似性。其中与 PS2 最为相似的为 T4-like 肠杆菌科的噬菌体 *Enterobacteria* phage CC31[GenBank: GU323318]^[17],但 Max score 仅为 2286(26% of coverage, 69% of max identity)。另外,在 BLASTN 比对结果中,与 PS2 基因组序列相似的噬菌体几乎均属于 T4-like 噬菌体。其中,噬菌体 T4(T4-like 噬菌体的代表噬菌体)基因组序列排在比对结果的第 22 位,其 Max score 为 1469(23% of coverage, 70% of max identity)。进一步与 T4 基因组进行比对分析,结果如图 7 所示:PS2 与大肠肝菌噬菌体 T4 基因组核酸序列比对的点阵图显示为较为笔直的不连续的对角线,他们之间具有显著相似性的序列片段基本呈同线性排列。这些对 PS2 全基因组序列的初步分析结果均显示:噬菌体 PS2 极有可能是目前被分离到并获得全基因组序列的一株新的沙雷菌属 T4-like 噬菌体。

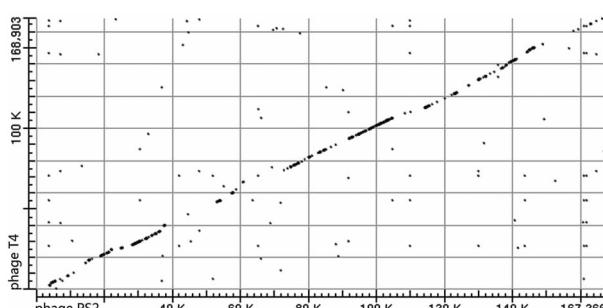


图 7 噬菌体 PS2 与大肠肝菌噬菌体 T4 的基因组比对点阵图

Fig. 7 Dot plot image displaying sequence homology comparisons of PS2 and T4

3 讨 论

细菌对抗菌药物耐药形式的不断加剧重新激起了科学家们对噬菌体治疗的研究兴趣。在噬菌体用于临床治疗前,需要大量的从环境中分离到裂解活性强的噬菌体并明确他们的生物学特性。本研究以

粘质沙雷菌临床分离株 S2 为宿主菌,从鱼塘水中分离得到了一株噬菌体,命名为 PS2。噬菌体 PS2 在宿主菌 S2 菌苔上形成完全透明的噬菌斑,这是裂解性噬菌体的典型特征(见图 1);一步生长曲线的结果也进一步提示:PS2 具有 70 PFU/cell 的较大爆发量和约为 20 min 的较短潜伏期(见图 4)。这些特性均符合裂解性噬菌体的特性。本研究完成了对 PS2 全基因组的鉴定和测序,基因组的初步研究结果如表 1 和图 7 所示:这株噬菌体极有可能是 T4-like 噬菌体家族中的一株新成员,这对 PS 基因组的进一步深入研究奠定重要基础。噬菌谱的初步调查结果显示:噬菌体 PS2 有很强的杀灭粘质沙雷菌 S2 和 S4 的能力,这些菌株均为多重耐药临床分离株。并且 S2 对 PS2 的突变率非常低。此外,噬菌体 PS2 在一个较宽的 pH 范围内(pH 5~10)和较高的温度范围内(50 °C 和 60 °C)都比较稳定。所有这些特点均使噬菌体 PS2 有望成为生物抗菌剂的有效成分之一。由于噬菌体 PS2 较窄的宿主范围不适合直接使用,未来需要分离得到更多的噬菌体,将之制成混合制剂,可以克服噬菌谱窄的缺点^[11]。

噬菌体是自然界最为丰富和多样的生命形式,但目前被报道的全基因组测序的粘质沙雷菌噬菌体种类和数目却非常有限。自 2000 年之前得到分离并命名的沙雷菌属的噬菌体共有 87 株(<http://www.phage.org/names/2000/>),它们均属于有尾噬菌体目(包括长尾噬菌体科、肌尾噬菌体科和短尾噬菌体科)。但自 2000 年之后分离并鉴定的沙雷菌属噬菌体却非常有限,它们包括短尾噬菌体科的 KSP100^[18]、PPV^[19]、SmPjn^[20],长尾噬菌体科的 SM701^[21],以及肌尾噬菌体科的 phiIF3^[22]、KSP20^[18]、KSP90^[18] 和 ΦSM9-3Y^[23]。这些噬菌体均未做全基因组测序,一些噬菌体仅根据部分序列的分析结果进行了初步分类,其中的 KSP90 属于 T4-like 噬菌体。另外,目前 GenBank 上基因组完全测序的沙雷菌属噬菌体只有 3 株,包括:Matilla^[24]等分离到的一株肌尾型的 ViI-like 沙雷菌属噬菌体 phiMAM1[NC_020083],Denyes^[25]等分离到的一株长尾型未分类的不稳定溶原性粘质沙雷氏菌噬菌体 Eta[NC_021563],以及本室分离到的肌尾型粘质沙雷氏菌的噬菌体 PS2。迄今为止,PS2 是 GenBank 数据库中唯一一株与 T4-like 噬菌体近似的沙雷菌属噬菌体。对噬菌体基因组的研究将有助于我们深入理解噬菌体的生物学特性、遗传和变异、以及其与细菌的相互关系及其进化演化的规律。本研究完全明确了新分离噬菌体 PS2 的基因组类型

和全基因组的序列,这将为后续进行的PS2全基因组序列的生物信息学分析奠定重要基础。

参考文献:

- [1] Hejazi A, Falkiner FR. *Serratia marcescens*[J]. J Medical Microbiol, 1997, 46(11): 903-912. DOI: 10.1099/00222615-46-11-903
- [2] Wheat RP, Zuckerman A, Rank LA. Infection due to Chromobacteria: report of eleven cases[J]. Arch Internal Med, 1951, 88(4): 461-466.
- [3] Urmeyni AM, Franklin AW. Neonatal death from pigmented coliform infection[J]. Lancet, 1961, 1(7172): 313-315.
- [4] Samuelsson A, Isaksson B, Hanberger H, et al. Late-onset neonatal sepsis, risk factors and interventions: an analysis of recurrent outbreaks of *Serratia marcescens*, 2006-2011[J]. J Hospital Infect, 2014, 88(1): 57-63. DOI: 10.1016/j.jhin.2013.09.017
- [5] Sisirak M, Hukic M. An outbreak of multidrug-resistant *Serratia marcescens*: the importance of continuous monitoring of nosocomial infections[J]. Acta Medica Academica, 2013, 42(1): 25-31. DOI: 10.5644/ama2006-124.67
- [6] Kutateladze M, Adamia R. Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics[J]. Trends Biotechnol, 2010, 28(12): 591-595. DOI: 10.1016/j.tibtech.2010.08.001
- [7] Adjidé CC, Li-Thiao-Te V, Biendo M, et al. Case control study of extended-spectrum betalactamase producing *Serratia marcescens* outbreak in a paediatric intensive care unit[J]. Pathologie Biologie (Paris), 2004, 52(8): 423-428. DOI: 10.1016/j.patbio.2004.07.019
- [8] Jiang LS, Wu TT, Liu P, et al. Biological characteristics of mycobacteriophage Leo and its bactericidal effect on *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Chin J Zoonoses, 2015, 31(3): 193-198. (in Chinese)
江莉莎, 邬亭亭, 刘平, 等. 分支杆菌噬菌体 Leo 生物学特性及抗结核作用[J]. 中国人兽共患病学报, 2015, 31(3): 193-198.
- [9] Liu Y, Jiang LS, Yao YY, et al. Lysis of mycobacteriophages in stationary cells of *M. tuberculosis*[J]. Chin J Zoonoses, 2016, 32(1): 28-32. (in Chinese)
柳岩, 江莉莎, 姚义勇, 等. 噬菌体 TM4、Guo1 和 D29 对静止期结核菌裂解作用初步研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2016, 32(1): 28-32.
- [10] Zhang HJ, Liu DL, Li HE, et al. Detection and identification of *Bacillus cereus* susceptible to phage AP631[J]. Chin J Zoonoses, 2016, 32(6): 507-511. (in Chinese)
张慧娟, 刘东立, 贺莉, 等. AP631 炭疽噬菌体裂解蜡样芽孢杆菌的发现和鉴定[J]. 中国人兽共患病学报, 2016, 32(6): 507-511.
- [11] Bruttin A, Brüssow H. Human volunteers receiving *Escherichia coli* phage T4 orally: a safety test of phage therapy[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49(7): 2874-2878. DOI: 10.1128/AAC.49.7.2874-2878.2005
- [12] Letkiewicz S, Miedzybrodzki R, Fortuna W, et al. Eradication of *Enterococcus faecalis* by phage therapy in chronic bacterial prostatitis-case report[J]. Folia Microbiol (Praha), 2009, 54 (5): 457-461. DOI: 10.1007/s12223-009-0064-z
- [13] Hung CH, Kuo CF, Wang CH, et al. Experimental phage therapy in treating *Klebsiella pneumoniae*-mediated liver abscesses and bacteremia in mice[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 55(4): 1358-1365. DOI: 10.1128/AAC.01123-10
- [14] Watanabe R, Matsumoto T, Sano G, et al. Efficacy of bacteriophage therapy against gut-derived sepsis caused by *Pseudomonas aeruginosa* in mice[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51(2): 446-452. DOI: 10.1128/AAC.00635-06
- [15] Ackermann HW, Krisch HM. A catalogue of T4-type bacteriophages[J]. Arch Virol, 1997, 142(12): 2329-2345.
- [16] Miller ES, Kutter E, Mosig G, et al. Bacteriophage T4 genome[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2003, 67(1): 86-156.
- [17] Petrov VM, Ratnayaka S, Nolan JM, et al. Genomes of the T4-related bacteriophages as windows on microbial genome evolution[J]. Virol J, 2010, 28(7): 292-311. DOI: 10.1186/1743-422X-7-292
- [18] Matsushita K, Uchiyama J, Kato S, et al. Morphological and genetic analysis of three bacteriophages of *Serratia marcescens* isolated from environmental water[J]. FEMS Microbiol Letters, 2009, 291(2): 201-208. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2008.01455.x
- [19] Friman VP, Hiltunen T, Jalasvuori M, et al. High temperature and bacteriophages can indirectly select for bacterial pathogenicity in environmental reservoirs[J]. PLoS One, 2011, 6: e17651. DOI: 10.1371/journal.pone.0017651
- [20] Xu FY, Liu YJ, Ma HM, et al. Identification of *Serratia marcescens* podoviridae Chinese isolates[J]. J Virol, 2012, 28(4): 439-443. (in Chinese)
徐凤宇, 刘永杰, 马红霞等. 黏质沙雷菌短尾噬菌体中国分离株的鉴定[J]. 病毒学报, 2012, 28(4): 439-443.
- [21] Yu L, Wen ZB, Yang WH, et al. Isolation and characterization of a lytic phage wastewater from *Serratia marcescens*[J]. J Microbiol, 2008, 48(4): 498-502. (in Chinese)
于龙, 温占波, 杨文慧, 等. 一株粘质沙雷氏菌裂解性噬菌体污水分离及特性[J]. 微生物学报, 2008, 48(4): 498-502.
- [22] Petty NK, Foulds IJ, Pradel E, et al. A generalized transducing phage (phiIF3) for the genomically sequenced *Serratia marcescens* strain Db11: a tool for functional genomics of an opportunistic human pathogen[J]. Microbiology, 2006, 152(6): 1701-1708. DOI: 10.1099/mic.0.28712-0
- [23] Xu H, Yu JD, Wang D, et al. Isolation and characterization of a novel lytic phage ΦSM9-3Y of *Serratia marcescens*[J]. Progr Microbiol Immunol, 2013, 41(2): 1-6. (in Chinese)
徐花, 余静丹, 王丹, 等. 粘质沙雷菌裂解性噬菌体 ΦSM9-3Y 的分离和鉴定[J]. 微生物学免疫学进展, 2013, 41(2): 1-6.
- [24] Matilla MA, Salmond GP. Complete genome sequence of *Serratia plymuthica* bacteriophage ΦMAM1[J]. J Virol, 2012, 86(24): 13872-13873. DOI: 10.1128/JVI.02702-12
- [25] Denyes JM, Krell PJ, Manderville RA, et al. The genome and proteome of *Serratia* bacteriophage which forms unstable lysogens[J]. Virol J, 2014, 11: 6-13. DOI: 10.1186/1743-422X-11-6