

4株金黄色葡萄球菌噬菌体的分离鉴定、生物学特性及其基因组分析

李旋¹, 叶军航¹, 赵尹蕾¹, 吉婷婷¹, 李雅洁¹, 周文渊^{1,2*}

(1. 扬州大学食品科学与工程学院, 江苏扬州 225127) (2. 扬州大学兽医学院, 江苏扬州 225009)

摘要: 金黄色葡萄球菌能够引起食源性疾病, 易产生多重耐药性, 因此噬菌体在金黄色葡萄球菌防控方面的应用受到了广泛关注。该研究分离了4株噬菌体 SAPYZU-04、SAPYZU-15、SAPYZU-Sap_{M13} 和 SAPYZU-Sap_{M14}。并对其形态学特征, 生物学特性以及全基因组序列进行分析。结果表明, 烈性噬菌体 SAPYZU-04 和 SAPYZU-15 属于 Herelleviridae 科, 温和噬菌体 SAPYZU-Sap_{M13} 和 SAPYZU-Sap_{M14} 属于 Azeroedovirinae 亚科。而且, 烈性噬菌体 SAPYZU-04 和 SAPYZU-15 裂解率高达 100% (51/51), 然而温和噬菌体 SAPYZU-Sap_{M13} 和 SAPYZU-Sap_{M14} 的裂解率分别为 94% (48/51) 和 86% (44/51)。当温度为 40~60 °C, pH 值为 3~12 时, 4株噬菌体的活性较高。一步生长曲线显示, 烈性噬菌体 SAPYZU-04 和 SAPYZU-15 的潜伏期均为 10 min, 裂解量分别为每个细胞 210 和 322 PFU; 而温和噬菌体 SAPYZU-Sap_{M13} 和 SAPYZU-Sap_{M14} 的潜伏期分别为 15 和 30 min, 裂解量分别为每个细胞 52 和 49 PFU。全基因组序列分析结果表明 4 株噬菌体均不含任何毒力、耐药基因, 但烈性噬菌体 SAPYZU-04 和 SAPYZU-15 具有多个裂解酶基因和 DNA 代谢相关基因。该研究证实 2 株烈性噬菌体 SAPYZU-04 和 SAPYZU-15 的裂解谱更广、潜伏期更短、爆发量更大, 更适合作为潜在的生物抑菌剂, 应用于食品安全领域。

关键词: 金黄色葡萄球菌; 噬菌体; 生物抑菌剂

文章编号: 1673-9078(2023)12-130-141

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.12.1580

Isolation, Identification, Biological Characteristics, and Genome Analysis of Four Strains of *Staphylococcus aureus* Phages

LI Xuan¹, YE Junhang¹, ZHAO Yinlei¹, JI Tingting¹, LI Yajie¹, ZHOU Wenyuan^{1,2*}

(1. College of Food Science and Engineering, Yangzhou University, Yangzhou 225127, China)

(2. College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: *Staphylococcus aureus* can cause food-borne diseases and develop multidrug resistance. Therefore, applying phages in preventing and controlling *S. aureus* has garnered considerable attention. Four *S. aureus* bacteriophages SAPYZU-04, SAPYZU-15, SAPYZU-Sap_{M13}, and SAPYZU-Sap_{M14} were isolated and their morphology, biological characteristics, and whole-genome sequences were analyzed. The results of transmission electron microscopy showed that the lytic phages SAPYZU-04 and SAPYZU-15 belonged to the Herelleviridae family, and the temperate phages SAPYZU-Sap_{M13} and SAPYZU-Sap_{M14} belonged to the Azeroedovirinae family. The SAPYZU-04 and SAPYZU-15 exhibited the broadest host range, being lytic towards all the 51 (100%, 51/51) *S. aureus* isolates. However, the SAPYZU-Sap_{M13} and SAPYZU-Sap_{M14} were lytic to 48 (94%, 48/51) and 44 (86%, 44/51) *S. aureus* isolates, respectively. Stability experiments showed that the activity of the four phages was enhanced within the temperature range of 40~60 °C and pH range of 3~12. The one-step growth curve suggested that the incubation period of SAPYZU-04 and SAPYZU-15 was 10 min, and the lysis volume were 210 and 322 PFU per cell,

引文格式:

李旋, 叶军航, 赵尹蕾, 等. 4 株金黄色葡萄球菌噬菌体的分离鉴定、生物学特性及其基因组分析[J]. 现代食品科技, 2023, 39(12): 130-141

LI Xuan, YE Junhang, ZHAO Yinlei, et al. Isolation, identification, biological characteristics, and genome analysis of four strains of *Staphylococcus aureus* phages [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(12): 130-141

收稿日期: 2022-12-13

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (32102100); 中国博士后面上项目 (2022M712695)

作者简介: 李旋 (2002-), 女, 学士, 研究方向: 食源性病原菌检测和控制技术, E-mail: 2930958541@qq.com

通讯作者: 周文渊 (1990-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 食源性病原菌检测和控制技术, E-mail: wenyuanzhou@yzu.edu.cn

respectively. The incubation period of SAPYZU-Sap_{M13} and SAPYZU-Sap_{M14} was 15 min and 30 min, respectively, and the lysis volume was 52 and 49 PFU per cell, respectively. Genome sequencing showed none of the four phages contained typical virulence and drug-resistance genes. However, the virulence phages SAPYZU-04 and SAPYZU-15 had multiple lyase genes and genes related to DNA metabolism. This study showed that the two strains SAPYZU-04 and SAPYZU-15 exhibited broader lytic spectra, shorter latent periods, and larger burst sizes and were more suitable for utilization as potential biological bacteriostatic agents in food safety.

Key words: *Staphylococcus aureus*; phage; biological bacteriostatic agent

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, SA) 是一种常见的食源性致病菌, 广泛存在于水、空气、人和动物的皮肤等环境中^[1]。它可以引起伤口感染, 诱发各种炎症, 甚至污染食品和食用农产品, 导致食物中毒事件的发生^[2]。使用抗生素 (如氨苄西林、卡那霉素和万古霉素等) 来预防和控制 SA 是最直接有效的方法, 但是过度使用抗生素会使金葡菌产生耐药菌株, 对人类和动物健康造成危害, 甚至对生态环境安全构成威胁^[3]。因此, 寻找可代替抗生素治疗的生物制剂非常重要。

噬菌体是细菌的病毒, 能够专一性地裂解宿主细菌, 作用机理明确^[4]。噬菌体对宿主细菌具有专一性能够直接攻击并杀害相应致病菌^[5], 并且具有易于筛选、数量庞大^[6]、成本低廉的优点。最重要的是用于人体和动物较为安全, 不会导致菌群出现耐药性, 甚至可以杀死耐药菌^[7], 适合用于食品中多重耐药 SA 的控制。目前, 一些基于噬菌体的产品已经在市场上上市, 如 ListexTMP100 和 ListShieldTM[8], 它们的安全性得到美国食品和药物管理局 (FDA) 的认可, 并被美国农业部 (USDA) 批准可以作为抗菌加工助剂, 用于食品抗菌。噬菌体根据是否能进行溶原途径的生活史分为烈性噬菌体和温和噬菌体, 研究表明烈性噬菌体和温和噬菌体均具有控制 SA 生长的潜力。Ngassam-Tchamba 等^[9]分离的三株烈性噬菌体 (Romulus、Remus 和 ISP) 在体外对与牛乳腺炎相关的 SA 具有良好裂解活性。Zhang 等^[10]分离的温和噬菌体 JS02 对 SA 表现出较强的清除能力, 并且能抑制 SA 生物膜的形成。Chang 等^[11]将温和噬菌体 SA13 随机缺失突变后的突变噬菌体 SA13m 应用于牛奶中抑制 SA, 结果显示金葡菌在冰箱温度 (4 °C) 和室温 (25 °C) 下均降低至不可检测的水平。Al-Anany 等^[12]研究发现温和噬菌体 HK97 与亚抑菌浓度的抗生素环丙沙星联合使用, 对 SA 具有良好清除效果。然而, 尚未有研究系统性比较温和噬菌体和烈性噬菌体在形态、生物学特性以及基因组组成上的差异。

本研究分离出 4 株 SA 的噬菌体 (包括 2 株烈性噬菌体和 2 株温和噬菌体), 利用透射电镜观察其形态特征差异, 随后对所分离噬菌体的效价、宿主谱、耐

酸碱能力、热稳定性、一步生长曲线、最佳感染复数 (Multiplicity of Infection, MOI) 值等生物学特性进行比较研究, 最后通过全基因组测序比较分析烈性噬菌体和温和噬菌体基因组特征。本文通过比较温和噬菌体和烈性噬菌体在形态、生物学特性以及基因组组成的差异, 为筛选更加高效的噬菌体作为生物抑菌剂, 用于控制食品加工过程中金葡菌污染奠定理论基础和数据支持。

1 材料与方法

1.1 菌株及样品来源

47 株 SA 菌株 YZUsa1-YZUsa47 分离自江苏省内养猪场; ATCC 29213 购自北京百欧博伟生物技术有限公司; 3 株 SA 菌株 MRSA 85/2082、MRSA JCSC4744 和 MRSA WZ153 来自扬州大学生物危害因素防控重点实验室; 霍氏肠杆菌 (*Enterobacter hormaechei*) Eh-YZU05 分离自猪粪便, 单核增生性李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*) ATCC 1911、肠炎沙门氏菌 (*Salmonella enteritidis*) CICC 21513、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) CICC 10664 及最小弧菌 (*Vibrio mimicus*) CICC 21613 购自 CICC 菌种保藏中心。

1.2 主要试剂和仪器

卢里亚-贝尔塔尼 (Luria-Bertani, LB) 培养基, 购自青岛高科技工业园海博生物技术有限公司; Baird-Parker 琼脂基础, 购自青岛高科技工业园海博生物技术有限公司; 脑心浸出液肉汤 (Brain Heart Infusion, BHI), 购自青岛高科技工业园海博生物技术有限公司; 7.5%氯化钠肉汤, 购自广东环凯微生物科技有限公司; 丝裂霉素 C 购自上海麦克林生物公司。

SW-CJ-1F 型无菌操作台, 苏州净化设备制造有限公司; JEM-1200EX 型透射电镜, 日本电子株式会社; HC-2066 型高速离心机, 安徽中科中佳科学仪器有限公司; H/T16MM 型冷冻离心机, 北京博励仪器有限公司; BDY-2012 型恒温摇床, 上海百典仪器设备有限公司。

1.3 噬菌体分离

1.3.1 烈性噬菌体分离

利用 SA 菌株 ATCC 29213 作为宿主进行 SA 噬菌体分离。采集扬州市内污水样品 500 mL, 污水样品的前处理过程以及噬菌体分离纯化过程参照 Chang 等^[11]的方法进行。用 8 000 r/min 的高速离心机离心 10 min 以除去杂质, 之后使用 0.45 μm 和 0.22 μm 滤器过滤除菌后, 得到噬菌体原液。将 3 mL 2 \times 的 LB 培养基培养液和 100 μL 培养至对数生长期的 SA 菌株 ATCC29213 加入处理后的污水中, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 的温度下摇床培养 8 h 以上。将培养后的培养物经过离心、过滤得到原液, 并保存在 4 $^{\circ}\text{C}$ 的冰箱。

1.3.2 温和噬菌体分离

挑取纯化后的金葡菌 YZUsa13 和 YZUsa14 单菌落于 LB 液体培养基中^[13], 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下摇床培养 12 h, 调整菌液浓度为 2×10^7 CFU/mL。分别在 LB 培养基中加入 167 μL 浓度为 0.3 mmol/L 的丝裂霉素 C 和菌液, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下摇床培养 6 h, 每隔 1 h 取 1 mL 通过 0.22 μm 滤膜后, 与菌液各 100 μL 加入 10 mL 离心管中, 利用层平板法测定噬菌体滴度。

1.4 透射电镜观察

噬菌体的形态学观察参考文献^[11]进行, 并略作修改。先将噬菌体液进行浓缩, 然后在 200 目碳涂层铜网上滴加 20 μL 的浓缩后的噬菌体 (10^{10} PFU/mL) 悬浮液, 充分吸附约 15 min 后取出铜网使其自然干燥 2~3 min。然后用 2% (m/V) 的磷钨酸钠 (pH 值为 7.6) 溶液染色 2 min 后, 使用透射电镜 (TEM, Hitachi H600A) 观察噬菌体形态。

1.5 噬菌体宿主谱的测定

噬菌体的宿主谱采用空斑法^[11]进行测定, 通过双层平板法将 100 μL 菌液 (10^8 CFU/mL) 和 5 mL 的 LB 半固体培养基混匀后倒在 LB 固体培养基上, 自然干燥后取 10 μL 噬菌体培养液 (MOI=100) 滴在表面, 倒放在 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中培养。每组实验平行重复 3 次。

1.6 生物学特性测定

1.6.1 最佳感染复数的测定

最佳 MOI 的测定方法参考文献^[13]的测定方法, 略有改动。将菌液浓度调整至 1×10^6 CFU/mL, 按照噬菌体和宿主菌的不同比例 (0.000 1、0.001、0.01、0.1、1、10 和 100) 将噬菌体和宿主菌混匀后 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床培养 8 h 后, 于 8 000 r/min 条件下离心 10 min, 过滤并测定

效价, 效价最高的比例即为最佳 MOI。每组做三次平行实验。

1.6.2 一步生长曲线 (One-step Growth) 的测定

一步生长曲线的测定方法参考文献^[10]进行测定, 略有改动。将噬菌体和 10^8 CFU/mL 宿主菌按照最佳 MOI 混合, 37 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 7 min 后 8 000 r/min 离心 10 min, 弃上清后加入 5 mL 的 LB 培养基重悬沉淀, 放在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养。分别于不同时间点 (0、5、10、15、30、45、60、75 和 90 min) 或 (0、10、20、30、40、50、60、75、90、105、120、135、150、165、180、200、220 和 240 min) 取 100 μL 梯度稀释后与宿主菌各 100 μL 倒双层平板。每组实验平行重复 3 次。

1.6.3 耐酸碱性实验

噬菌体的耐酸碱性实验参考文献^[11]进行测定, 分别取 1 mL 噬菌体于若干 10 mL 的离心管中, 分别加入 1 mL pH 值为 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0 的 SM 缓冲液中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 下作用 2 h 后测定效价。

1.6.4 热稳定性实验

噬菌体热稳定性实验参考文献^[10]进行测定, 取 1 mL 效价约为 10^8 PFU/mL 的噬菌体于试管中并放在 40、50、60、70 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温金属浴中依次作用 20、40 和 60 min 后测定效价。

1.7 基因组测序及分析

对噬菌体 SAPYZU-04、SAPYZU-15、SAPYZU-Sap_{M13} 和 SAPYZU-Sap_{M14} 的全基因组序列进行测定和分析。噬菌体基因组 DNA 提取参考文献^[14]中所述方法。分别采用琼脂糖凝胶电泳和 Qubit @ dsDNA HS 分析试剂盒 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) 对噬菌体基因组 DNA 进行定性定量。

通过 Illumina HiSeq 平台 (Illumina, San Diego, CA, USA) 对噬菌体基因组序列进行测定, 插入片段大小为 500 bp。使用 FGENESB (<http://www.softberry.com>)、GeneMarkS^[15]和 Glimmer v3.02^[16]软件对开放阅读框 (Open Reading Frames, ORFs) 进行预测。通过 InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>) 和 BLASTp^[17]对 ORFs 进行注释。将基因组信息上传至 NCBI 网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), SAPYZU-04、SAPYZU-15、SAPYZU-Sap_{M13} 和 SAPYZU-Sap_{M14} 的 GenBank 编号分别为 OP432864、MW864252、ON229621 和 ON220160。

1.8 噬菌体系统进化树构建

截至 2021 年 4 月, GenBank 数据库中记录 192

个金黄色葡萄球菌噬菌体基因组序列。本研究通过软件 kSNP3 v3.0 对噬菌体 SAPYZU-04、SAPYZU-15、SAPYZU-Sap_{M13}、SAPYZU-Sap_{M14} 和上述 192 个 SA 噬菌体基因组序列的单核苷酸多态性 (Single-Nucleotide Polymorphisms, SNPs) 进行解析并构建系统进化树^[18]。以噬菌体 *Erwinia phage phiEa2809* 作为外组噬菌体, 并使用 iTOL 进行注释^[19]。

1.9 数据分析

实验数据表示为平均值±标准差 (Mean±SD, $n=3$), 每组实验重复 3 次, 取平均值。实验数据中点线图、柱状图由 Origin 2023 软件绘制完成。

2 结果与讨论

如图 1, 本研究以金葡菌 ATCC 29213 为宿主菌, 通过双层平板法, 从扬州市内污水样品中分离得 2 株 SA 烈性噬菌体, 分别命名为 SAPYZU-04 和 SAPYZU-15。利用丝裂霉素 C 从已分离纯化的金葡菌 YZUsa13 和 YZUsa14 中诱导出 2 株温和噬菌体, 分别命名为 SAPYZU-Sap_{M13} 和 SAPYZU-Sap_{M14}。4 株噬菌体的噬菌斑均呈圆形透亮、边界清晰, 直径为 0.8~1.5 mm。

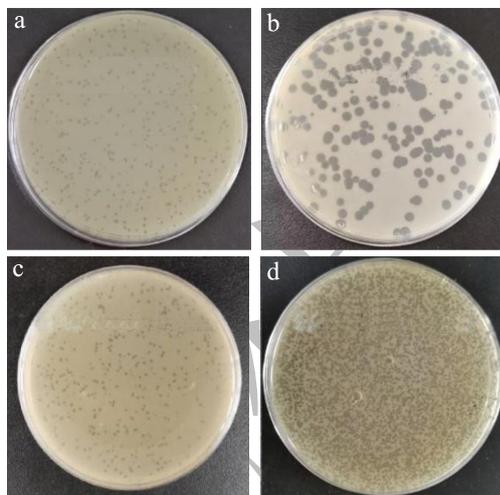


图 1 噬菌斑形态图

Fig.1 Morphology of phage plaque

注: a: SAPYZU-04; b: SAPYZU-15; c: SAPYZU-Sap_{M13}; d: SAPYZU-Sap_{M14}。图 2~6 同。

2.1 噬菌体的电镜形态

通过透射电镜观察噬菌体微观形态, 结果如图 2 所示。烈性噬菌体 SAPYZU-04 和 SAPYZU-15 均有一个呈正多面体结构头部和一个可伸缩的尾巴, 头部长度分别约为 64.96 nm 和 88.68 nm, 尾部长度约为 165.03 nm 和 176.89 nm。而温和噬菌体

SAPYZU-Sap_{M13} 和 SAPYZU-Sap_{M14} 均有一个呈椭圆形头部和一个不可伸缩的长尾, 头部长度分别约为长直径: 84.26、71.82 nm 和短直径: 44.73、47.71 nm, 尾部长度约为 254.43 nm 和 266.17 nm。结果显示烈性噬菌体 SAPYZU-04 和 SAPYZU-15 的显微形态与党瑞莹等^[20]、张志宏等^[21]和涂尊方等^[22]的研究一致; 而温和噬菌体 SAPYZU-Sap_{M13} 和 SAPYZU-Sap_{M14} 的电镜形态与 Zhang 等^[10]、Yang 等^[23]和 Feng 等^[24]的研究结果一致。

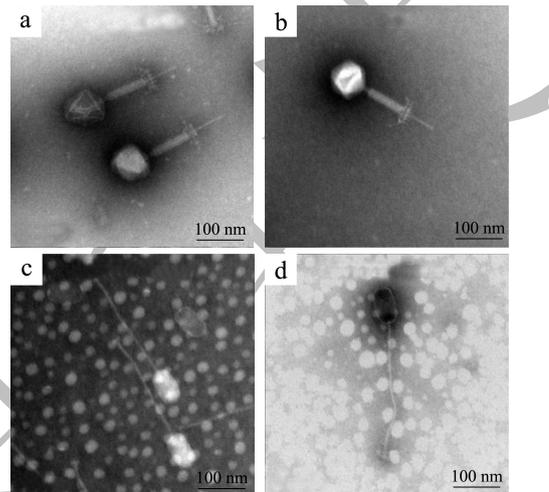


图 2 噬菌体的形态

Fig.2 Morphology of phage

2.2 裂解谱

应用空斑法测试噬菌体 SAPYZU-04、SAPYZU-15、SAPYZU-Sap_{M13} 和 SAPYZU-Sap_{M14} 对 51 株金黄色葡萄球菌 YZUsa1-YZUsa47、ATCC 29213、MRSA 85/2082、MRSA JCSC4744、MRSA WZ153 和 5 株其他菌属菌株的裂解特性, 结果如表 1 所示。烈性噬菌体 SAPYZU-04 和 SAPYZU-15 均能裂解 51 株金黄色葡萄球菌, 裂解率为 100%, 并且噬菌斑较透亮, +++ 数量均达到 56%; 而噬菌体 SAPYZU-Sap_{M13} 能裂解 48 株 SA 菌株, 裂解率为 94%, 噬菌体 SAPYZU-Sap_{M14} 能裂解 44 株 SA 菌株, 裂解率为 86%。然而, 这 4 株噬菌体对于单核增生性李斯特菌 ATCC 1911、肠炎沙门氏菌 CICC 21513、大肠杆菌 CICC 10664、最小弧菌 CICC21613 以及霍氏肠杆菌 Eh-YZU05 均没有裂解能力。4 株噬菌体 SAPYZU-04、SAPYZU-15、SAPYZU-Sap_{M13} 和 SAPYZU-Sap_{M14} 均比王一帆等^[25] (1/11, 9%)、Yang 等^[23] (13/30, 43%)、党瑞莹等^[20] (23/63, 36%)、Feng 等^[24] (61/138, 44%) 和张志宏等^[21] (10/37, 27%) 分离的噬菌体的裂解谱更宽。噬菌体较宽的宿主谱是其用于生物防治的重要特性^[26], 因此, 噬菌体裂解谱的测定对于选择应用于食

品中的生物抑菌剂至关重要。此外，温和噬菌体 SAPYZU-Sap_{M13} 和 SAPYZU-Sap_{M14} 在进行宿主谱测定实验时，对他们的溶原菌仍有裂解作用，该结果与 Zhang 等^[10]和 Feng 等^[24]的研究一致。研究表明一些噬菌体裂解宿主菌是一种“从外裂解”的过程，这个过程

是高浓度噬菌体吸附宿主菌后快速破坏宿主细菌细胞^[27]。因此，本研究的温和噬菌体 SAPYZU-Sap_{M13} 和 SAPYZU-Sap_{M14} 进行宿主谱测定时浓度远大于宿主细菌细胞是其显示裂解特性的原因之一。

表 1 噬菌体的宿主谱

Table 1 Host spectrum of phage

序号	菌株	属种	SAPYZU-04	SAPYZU-15	SAPYZU-Sap _{M13}	SAPYZU-Sap _{M14}
1	YZUsa1	SA	++	++	+	+
2	YZUsa2	SA	+	+	+	+
3	YZUsa3	SA	+	+	+	+
4	YZUsa4	SA	+	+	+	+
5	YZUsa5	SA	+	+	+	+
6	YZUsa6	SA	+	+	+	+
7	YZUsa7	SA	+	+	+	+
8	YZUsa8	SA	+	+	+	+
9	YZUsa9	SA	+	+	+	+
10	YZUsa10	SA	+	+	+	+
11	YZUsa11	SA	+++	+++	+	+
12	YZUsa12	SA	+	+	+	+
13	YZUsa13	SA	+++	+++	+	+
14	YZUsa14	SA	+++	+++	+	+
15	YZUsa15	SA	+	+	-	+
16	YZUsa16	SA	+++	+++	+	+
17	YZUsa17	SA	+	+	+	+
18	YZUsa18	SA	+	+	+	+
19	YZUsa19	SA	+++	+++	-	++
20	YZUsa20	SA	+	+	+	+
21	YZUsa21	SA	+++	+++	+	-
22	YZUsa22	SA	+	+	+	-
23	YZUsa23	SA	+	+	+	+
24	YZUsa24	SA	+++	+++	+	-
25	YZUsa25	SA	+++	+++	+	-
26	YZUsa26	SA	+	+	++	+
27	YZUsa27	SA	+++	+++	+	+
28	YZUsa28	SA	+++	+++	++	+
29	YZUsa29	SA	+++	+++	++	++
30	YZUsa30	SA	+++	+++	++	++
31	YZUsa31	SA	+++	+++	++	+
32	YZUsa32	SA	+++	+++	++	+
33	YZUsa33	SA	+++	+++	++	++
34	YZUsa34	SA	+++	+++	++	+
35	YZUsa35	SA	+++	+++	++	++
36	YZUsa36	SA	+++	+++	++	+
37	YZUsa37	SA	+++	+++	++	+

续表 1

序号	菌株	属种	SAPYZU-04	SAPYZU-15	SAPYZU-Sap _{M13}	SAPYZU-Sap _{M14}
38	YZUsa38	SA	+++	+++	++	+
39	YZUsa39	SA	+++	+++	++	+
40	YZUsa40	SA	+++	+++	++	+
41	YZUsa41	SA	+	+	++	++
42	YZUsa42	SA	+++	+++	+	+
43	YZUsa43	SA	+++	+++	+	+
44	YZUsa44	SA	+++	+++	+	+
45	YZUsa45	SA	+++	+++	+	+
46	YZUsa46	SA	+++	+++	+	+
47	YZUsa47	SA	+	+	+	+
48	ATCC 29213	SA	++	++	+	+
49	MRSA 85/2082	SA	+++	+++	+	-
50	MRSA JCSC 4744	SA	++	++	+	-
51	MRSA WZ153	SA	+++	+++	-	-
52	CICC 10664	大肠杆菌	-	-	-	-
53	Eh-YZU05	霍氏肠杆菌	-	-	-	-
54	CICC 21513	肠炎沙门氏菌	-	-	-	-
55	ATCC 1911	单增李斯特菌	-	-	-	-
56	CICC 21613	最小弧菌	-	-	-	-

注: +++表示有透亮裂解圈, 裂解能力强; ++表示有较透亮裂解圈, 裂解能力较强; +表示有裂解圈, 不透亮; -表示无裂解圈。

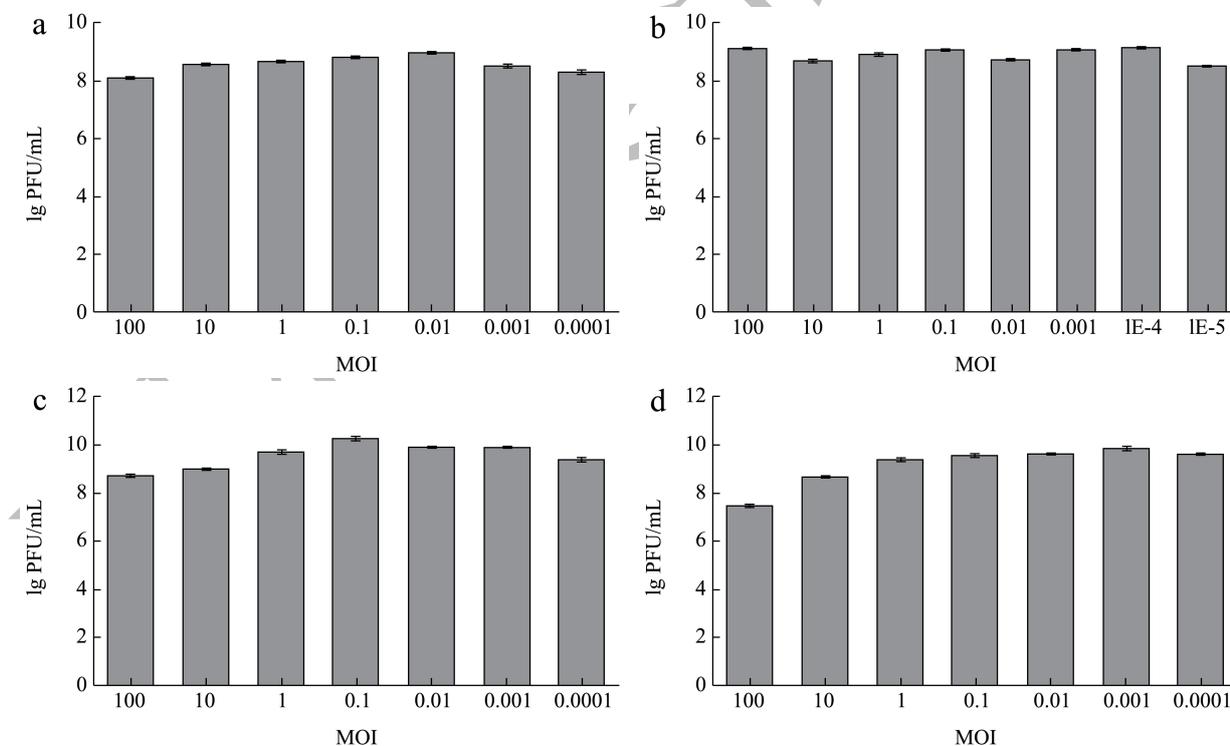


图3 噬菌体最佳 MOI 测定结果

Fig.3 Results of determination of the optimal complex number of phage infection

2.3 最佳 MOI

用不同 MOI 比例的噬菌体 SAPYZU-04、

SAPYZU-15、SAPYZU-Sap_{M13} 和 SAPYZU-Sap_{M14} 感染宿主菌, 培养 8 h 后测定噬菌体效价。如图 3 所示, 噬菌体 SAPYZU-04 在 MOI 为 0.01 ($P < 0.05$) 时,

效价最高 (约为 10^9 PFU/mL)；噬菌体 SAPYZU-15 在 MOI 为 0.000 1 时, 效价最高 (约为 10^{10} PFU/mL)；噬菌体 SAPYZU-Sap_{M13} 在 MOI 为 0.1 时, 效价最高 (约为 10^{10} PFU/mL)；噬菌体 SAPYZU-Sap_{M14} 在 MOI

为 0.01 ($P < 0.01$) 时, 效价最高 (约为 10^9 PFU/mL)。因此, 噬菌体 SAPYZU-04、SAPYZU-15、SAPYZU-Sap_{M13} 和 SAPYZU-Sap_{M14} 的最佳 MOI 分别为 0.01、0.000 1、0.1 和 0.01。

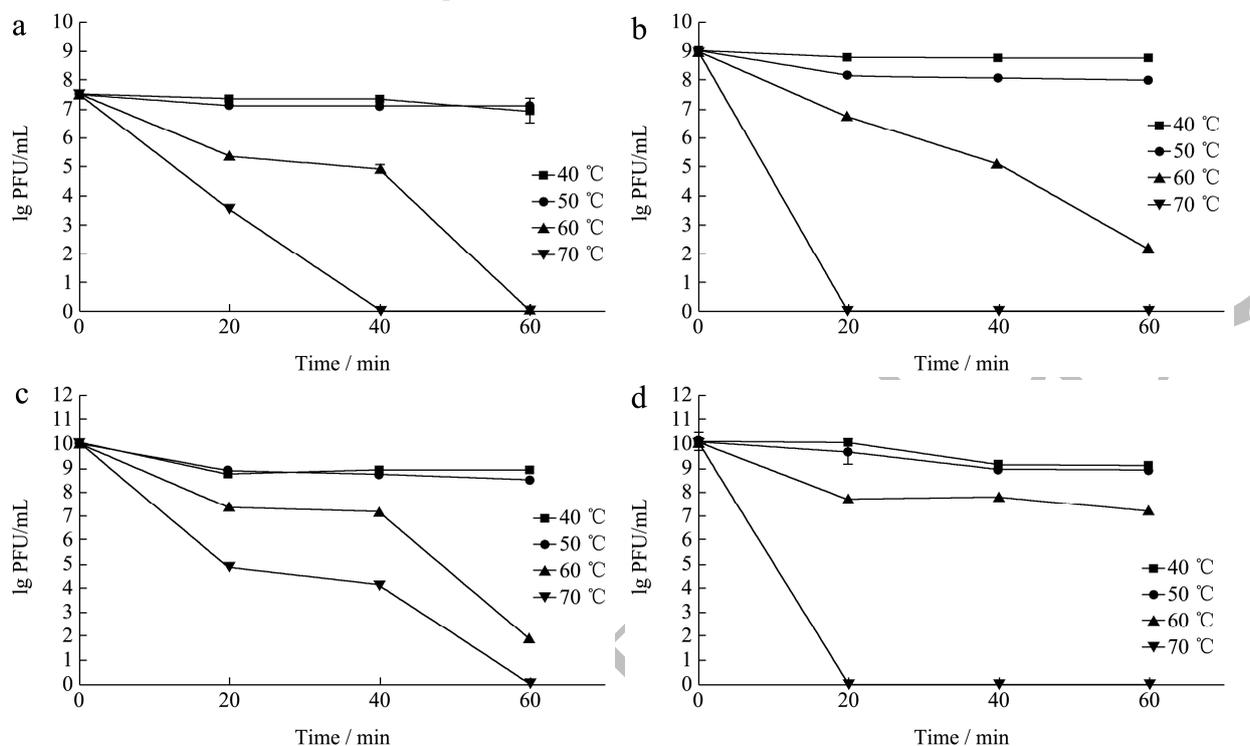


图 4 噬菌体的热稳定性

Fig.4 Thermal stability of phages

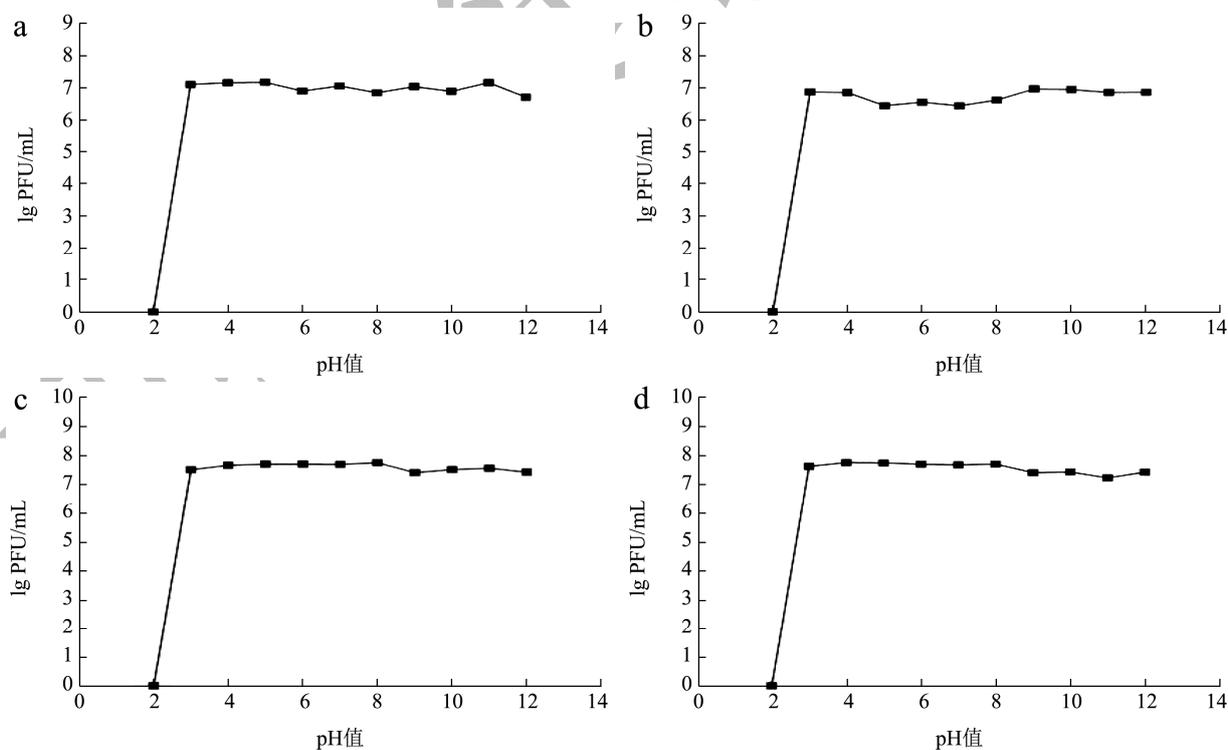


图 5 噬菌体的耐酸碱能力

Fig.5 Resistance of phages to acidity and alkalinity

2.4 噬菌体的热稳定性

如图 4 所示,金黄色葡萄球菌噬菌体 SAPYZU-04、SAPYZU-15、SAPYZU-Sap_{M13} 和 SAPYZU-Sap_{M14} 在 40 °C 和 50 °C 条件下作用 1 h 效价基本不变,效价分别为 5.63×10^7 、 1.34×10^9 、 1.12×10^9 和 1.27×10^{10} PFU/mL; 在 60 °C 条件下随着作用时间越长,噬菌体 SAPYZU-04、SAPYZU-15、SAPYZU-Sap_{M13} 和 SAPYZU-Sap_{M14} 效价越低。分别在 70 °C 孵育 40、20 和 20 min 时,噬菌体 SAPYZU-04、SAPYZU-15 和 SAPYZU-Sap_{M14} 完全失活,而噬菌体 SAPYZU-Sap_{M13} 在 70 °C 孵育 60 min 时完全失活。结果表明 4 株噬菌体 SAPYZU-04、SAPYZU-15、SAPYZU-Sap_{M13} 和 SAPYZU-Sap_{M14} 对高温的耐受能力均强于 Kraushaar 等^[28]报道的金葡萄噬菌体。

2.5 噬菌体的耐酸碱能力

如图 5 所示,噬菌体 SAPYZU-04、SAPYZU-15、SAPYZU-Sap_{M13} 和 SAPYZU-Sap_{M14} 在酸度较高的环境 (pH 值为 2) 中会完全失活; 在 pH 值为 3~12 时活性较稳定。在 pH 值为 5 时,噬菌体 SAPYZU-04 的效价最高为 1.31×10^7 PFU/mL ($P < 0.05$); pH 值为 9 时,噬菌体 SAPYZU-15 的效价最高为 8.94×10^6 PFU/mL; 而噬菌体 SAPYZU-Sap_{M13} 和 SAPYZU-Sap_{M14} 在 pH 值为 8 时效价最高,分别为 9.18×10^7 PFU/mL 和 9.52×10^7 PFU/mL。结果表明噬菌体 SAPYZU-04、SAPYZU-15、SAPYZU-Sap_{M13} 和 SAPYZU-Sap_{M14} 在 pH 值为 3~12 范围内均保持良好活性,其对酸碱的耐受能力均强于卢玮等^[29]分离的金葡萄噬菌体 (pH 值为 6~11 范围内稳定)。

2.6 一步生长曲线

将噬菌体 SAPYZU-04、SAPYZU-15、SAPYZU-Sap_{M13} 和 SAPYZU-Sap_{M14} 分别与宿主菌混合后培养,得到噬菌体的一步生长曲线。如图 6 所示,烈性噬菌体 SAPYZU-04 和 SAPYZU-15 侵染宿主的 10 min 内效价无明显变化,表明它们的潜伏期均为 10 min。在 10~150 min 内,噬菌体 SAPYZU-04 和 SAPYZU-15 的效价一直保持升高趋势,随后趋于稳定,表明它们的裂解期均约为 140 min,裂解量分别约为每个细胞 210 和 322 PFU。而温和噬菌体 SAPYZU-Sap_{M13} 和 SAPYZU-Sap_{M14} 的潜伏期较长,分别约为 15 和 30 min; 裂解期较短,分别约为 30 和 45 min,裂解量分别为每个细胞 52 和 49 PFU。上述结果显示,烈性噬菌体 SAPYZU-04 和 SAPYZU-15

的裂解量均高于 Gutierrez 等^[30]分离的金葡萄烈性噬菌体 (每个细胞 15 和 25 PFU)。温和噬菌体 SAPYZU-Sap_{M13} 和 SAPYZU-Sap_{M14} 的裂解量比 Feng 等^[24]分离的温和噬菌体 JD419 裂解量 (每个细胞 33 PFU) 更高。潜伏期和爆发量是表示噬菌体裂解能力的重要生物学特性,具有较短潜伏期和较大爆发量的噬菌体更适合作为生物防治剂^[31]。

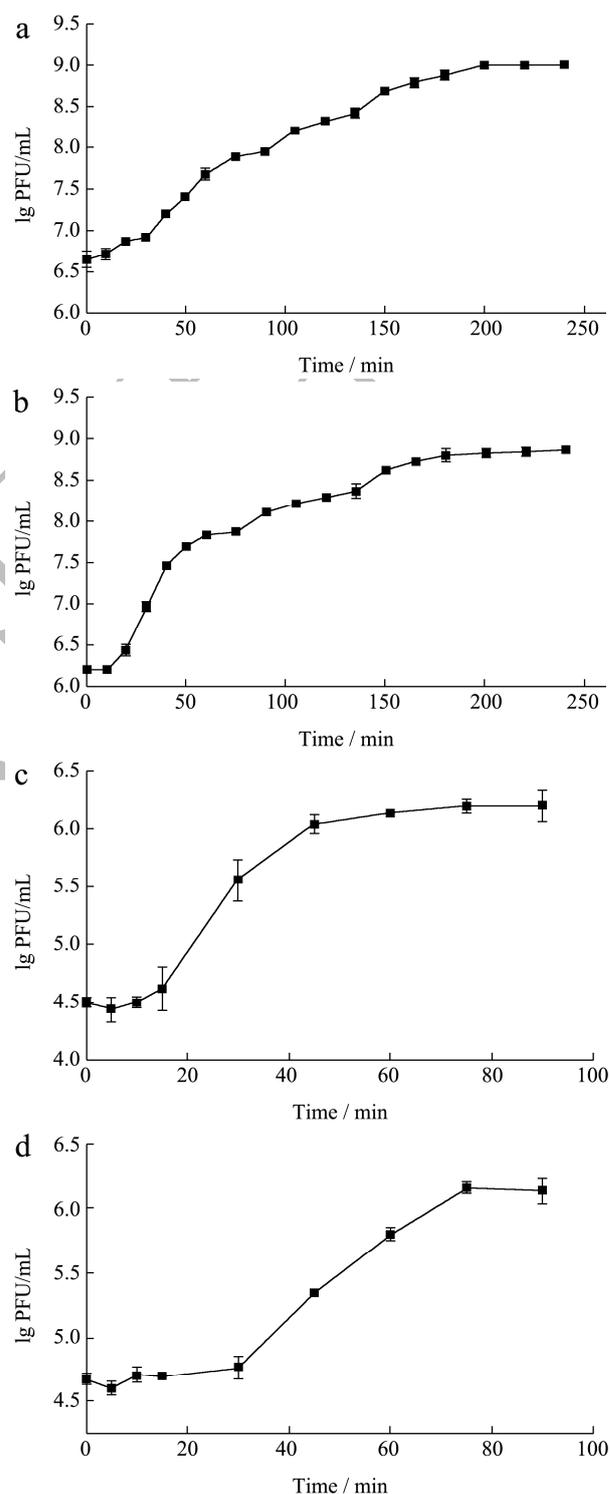


图 6 噬菌体的一步生长曲线

Fig.6 One step growth curve of phages

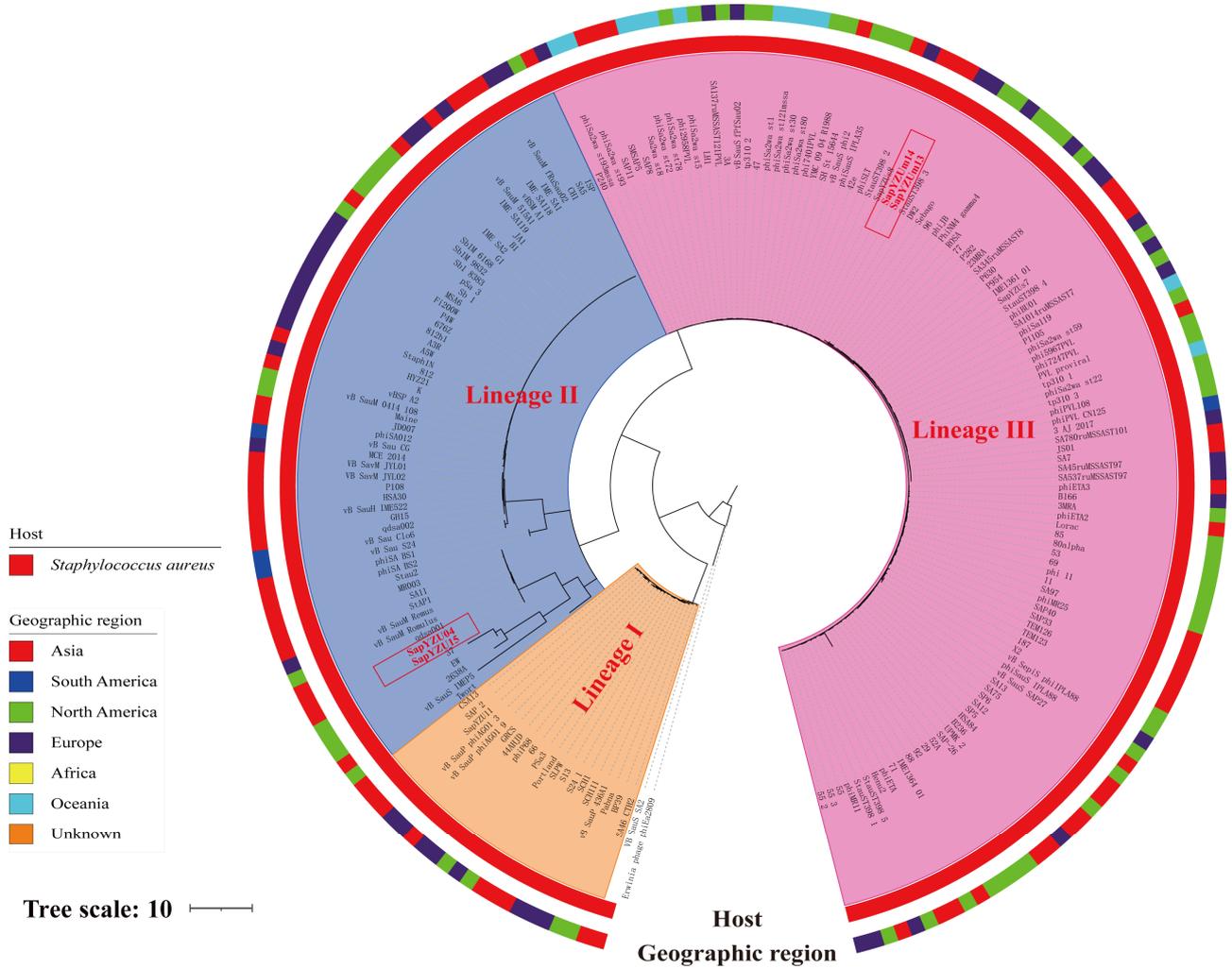


图7 系统发育分析

Fig.7 Phylogenetic analysis

注：外环表示不同地理区域，中环表示宿主来源，内环表示不同噬菌体科。

2.7 系统发育树

全基因组序列分析结果显示烈性噬菌体 SAPH1 和 SAPH2 基因组全长分别为 140 584 bp 和 135 178 bp，而温和噬菌体 SAPH3-Sap_{M13} 和 SAPH3-Sap_{M14} 的基因组全长分别为 44 922 bp 和 44 232 bp。其中噬菌体 SAPH1 的 GC 含量为 31.48%，预测到 188 个 ORFs；噬菌体 SAPH2 的 GC 含量为 29.90%，预测到 187 个 ORFs；噬菌体 SAPH3-Sap_{M13} 的 GC 含量为 33.98%，包含 71 个 ORFs；噬菌体 SAPH3-Sap_{M14} 的 GC 含量为 33.89%，包括 73 个 ORFs。

截至 2021 年 4 月，GenBank 数据库中记录 192 个金黄色葡萄球菌噬菌体基因组序列。本研究通过这些金黄色葡萄球菌噬菌体基因组序列进行系统发育分

析，解析 4 株噬菌体和其他金黄色葡萄球菌噬菌体之间的关系。此树形图（图 7）划分了 3 个主要的遗传谱系（I-III）。聚类分析结果表明，烈性噬菌体 SAPH1 和 SAPH2 与 Hellelleviridae 科的噬菌体聚在一个谱系中（谱系 II），且 SAPH1 和 SAPH2 与噬菌体 qdsa001 基因组核苷酸序列最相似，相似性 >99.0%；温和噬菌体 SAPH3-Sap_{M13} 和 SAPH3-Sap_{M14} 与 Azerovirinae 亚科 *Dubovirus* 属的噬菌体聚在一个谱系中（谱系 III），且 SAPH3-Sap_{M13} 和 SAPH3-Sap_{M14} 与 TEM126 和 SAPH3 的基因组核苷酸序列一致性 >95%。因此，根据 ICTV2022 年最新的分类标准^[32]，噬菌体 SAPH1 和 SAPH2 属于 Hellelleviridae 科；而 SAPH3-Sap_{M13} 和 SAPH3-Sap_{M14} 属于 Azerovirinae 亚科 *Dubovirus* 属。

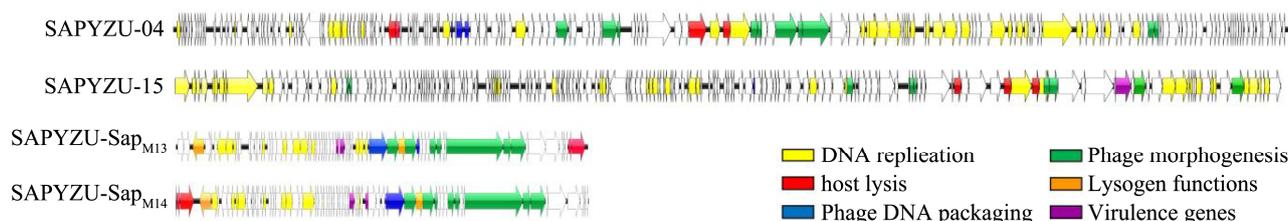


图8 全基因组分析

Fig.8 Whole genome analysis

注：黄色为DNA代谢、转录相关基因；红色为宿主裂解基因；蓝色为DNA包装基因；绿色为噬菌体形态发生基因；橙色为溶原基因；紫色为毒力基因。

2.8 全基因组序列分析

对4株噬菌体基因组携带基因的蛋白功能进行注释，结果如图8所示。噬菌体SAPYZU-04的基因组编码32个DNA代谢相关基因，包括核酸内切酶基因(*orf38*)、DNA解旋酶基因(*orf115*)和DNA聚合酶I基因(*orf144*)等；噬菌体SAPYZU-15的基因组包含多个DNA代谢基因，其中包括3个DNA合成相关基因(*orf1*、*orf3*和*orf5*)、2个DNA聚合酶I(*orf10*、*orf11*)和DNA结合蛋白(*orf82*)；噬菌体SAPYZU-Sap_{M13}的基因组编码13个与噬菌体DNA复制、调节和转录相关的基因，包括核酸外切酶基因(*orf7*)、转录因子(*orf9*)、DNA复制基因(*orf25*)和DNA解旋酶(*orf45*)等；而噬菌体SAPYZU-Sap_{M14}编码11个与噬菌体DNA代谢相关的基因，包括转录因子(*orf11*)、DNA结合蛋白(*orf24*)、DNA解旋酶(*orf28*)和核酸内切酶(*orf51*)等。其中SAPYZU-15基因组编码丰富的DNA合成基因加速了噬菌体大分子的合成。SAPYZU-04的基因组编码3个DNA组装基因(*orf66*、*orf68*和*orf69*)，SAPYZU-15的基因组编码1个DNA组装基因(*orf117*)，SAPYZU-Sap_{M13}和SAPYZU-Sap_{M14}均包含2个DNA包装基因(分别为*orf48*、*orf49*、*orf52*和*orf53*)。其中SAPYZU-15编码的DNA包装基因与噬菌体LSA2308^[33]的氨基酸序列具有95.9%的相似性；LSA2308的爆发量约为407 PFU/cell。DNA包装蛋白可以有效地将DNA泵入尾部噬菌体原衣壳中，加速噬菌体的组装^[34]。噬菌体SAPYZU-04和SAPYZU-15的基因组中分别包含3个和1个尾部蛋白基因(分别为*orf108*、*orf110*、*orf158*和*orf142*)，噬菌体SAPYZU-Sap_{M13}编码5个尾部相关蛋白基因，包括尾管蛋白基因(*orf57*)和主要尾部蛋白基因(*orf58*和*orf62*)等；而SAPYZU-Sap_{M14}编码6个尾部相关蛋白基因，包括尾部蛋白基因(*orf57*、*orf61*、*orf62*)等。这些独特的尾部蛋白基因可能是此4株噬菌体具有广泛的裂解谱的原因。其中SapYZU-15

含有的尾蛋白基因与噬菌体KSAP11^[35]的基因组氨基酸序列有95.90%的相似性。KSAP11具有广泛的裂解谱，对30株SA菌株(包括MSSA和MRSA菌株)具有裂解活性。噬菌体SAPYZU-04包含1个穿孔素基因(*orf53*)和3个裂解酶基因(*orf52*、*orf100*和*orf102*)，SAPYZU-15包含1个穿孔素基因(*orf107*)、5个裂解酶基因(*orf103*、*orf105*、*orf149*、*orf153*和*orf155*)；而SAPYZU-Sap_{M13}和SAPYZU-Sap_{M14}的基因组均只包含1个穿孔素基因(分别为*orf70*和*orf2*)和1个裂解酶基因(分别为*orf71*和*orf3*)。穿孔素基因在裂解过程中诱导宿主细胞膜去极化，调节裂解时间^[36]。其中SAPYZU-15基因组中有2个裂解酶基因(*orf103*和*orf155*)与MR003具有较高的氨基酸序列相似性(97.90%和99.00%)，MR003^[37]是高效的SA烈性噬菌体。因此，在这些基因的协同作用下，噬菌体SAPYZU-04和SAPYZU-15潜伏期更短，裂解量更高。此外，温和噬菌体基因组中的整合酶基因和CI阻遏蛋白是决定其生命周期的重要因素，整合酶基因通过催化两个DNA分子之间重组使得噬菌体在宿主染色体中进行基因的整合和切除^[38]，并且温和噬菌体通过CI阻遏蛋白阻断裂解基因的转录和翻译，从而进入溶原周期；而抗阻遏蛋白控制噬菌体在侵染时进入裂解周期^[39]。本文的温和噬菌体SAPYZU-Sap_{M13}和SAPYZU-Sap_{M14}基因组编码特异性整合酶证明它们具有溶原性，均预测到抗阻遏蛋白，但是未预测到CI阻遏蛋白和噬菌体抗性基因，可能导致温和噬菌体SAPYZU-Sap_{M13}和SAPYZU-Sap_{M14}在宿主谱测定时易进入裂解周期，上述结果与Tian等^[13]的研究结果一致。

3 结论

金黄色葡萄球菌严重威胁食品安全，同时也是全球关注的重大公共卫生问题之一。因此，迫切需要开发安全可靠的生物防治方法，以提高公共卫生水平，确保消费者安全。本研究分离的烈性噬菌体SAPYZU-04和SAPYZU-15效价均达到10⁹ PFU/mL，

而且具有较宽的裂解谱,两株噬菌体对 51 株 SA 菌株的裂解率均高达 100%;在 40~60 °C 温度范围内、pH 值在 3~12 范围内均保持良好活性;潜伏期较短、裂解能力强,裂解量分别高达每个细胞 210 和 322 PFU。全基因组序列分析结果显示 SAPYZU-04 和 SAPYZU-15 均包含多种 DNA 代谢基因、多个裂解酶基因、独特的 DNA 包装基因及尾部蛋白基因。因此,烈性噬菌体 SAPYZU-04 和 SAPYZU-15 是一种更合适、更有前景的生物防治选择,有望应用于控制食品中金葡菌的污染。

参考文献

- [1] Mccarthy A J, Lindsay J A. Genetic variation in *Staphylococcus aureus* surface and immune evasion genes is lineage associated: implications for vaccine design and host-pathogen interactions [J]. BMC Microbiology, 2010, 10(1): 173.
- [2] Sergelidis D, Angelidis A S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A controversial food-borne pathogen [J]. Letters in Applied Microbiology, 2017, 64(6): 409-418.
- [3] Courvalin P. Why is antibiotic resistance a deadly emerging disease? [J]. Clinical Microbiology and Infection, 2016, 22(5): 405-407.
- [4] Galarce N E, Bravo J L, Robeson J P, et al. Bacteriophage cocktail reduces *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* counts in raw and smoked salmon tissues [J]. Revista Argentina de Microbiología, 2014, 46(4): 333-337.
- [5] Golkar Z, Bagasra O, Pace D G. Bacteriophage therapy: A potential solution for the antibiotic resistance crisis [J]. The Journal of Infection Developing Countries, 2014, 8(2): 129-136.
- [6] 朱育玮,李玉保,王守荣,等.噬菌体及其治疗细菌感染的研究进展[J].中国畜牧兽医,2015,42(3):769-773.
- [7] Kortright K E, Chan B K, Koff J L, et al. Phage therapy: A renewed approach to combat antibiotic-resistant bacteria [J]. Cell Host & Microbe, 2019, 25(2): 219-232.
- [8] Xu C, Yu M, Xie Y, et al. Screening and identification of vancomycin anti-idiotypic antibodies for against *Staphylococcus aureus* from a human phage display domain antibody library [J]. Immunology Letters, 2022, 246: 1-9.
- [9] Ngassam-Tchamba C, Duprez J N, Fergestad M, et al. *In vitro* and *in vivo* assessment of phage therapy against *Staphylococcus aureus* causing bovine mastitis [J]. Journal of Global Antimicrobial Resistance, 2020, 22: 762-770.
- [10] Zhang L, Shahin K, Soleimani-Delfan A, et al. Phage JS02, a putative temperate phage, a novel biofilm-degrading agent for *Staphylococcus aureus* [J]. Letters in Applied Microbiology, 2022, 75(3): 643-654.
- [11] Chang Y, Bai J, Lee J H, et al. Mutation of a *Staphylococcus aureus* temperate bacteriophage to a virulent one and evaluation of its application [J]. Food Microbiology, 2019, 82: 523-532.
- [12] Al-Anany A M, Fatima R, Hynes A P. Temperate phage-antibiotic synergy eradicates bacteria through depletion of lysogens [J]. Cell Rep, 2021, 35(8): 109172.
- [13] Tian F, Li J, Li L, et al. Molecular dissection of the first *Staphylococcus cohnii* temperate phage IME1354_01 [J]. Virus Research, 2022, 318: 198812.
- [14] Yang Z Q, Tao X Y, Zhang H, et al. Isolation and characterization of virulent phages infecting *Shewanella baltica* and *Shewanella putrefaciens*, and their application for biopreservation of chilled channel catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. International Journal of Food Microbiology, 2019, 292: 107-117.
- [15] 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.
- [16] Lefkowitz E J, Dempsey D M, Hendrickson R C, et al. Virus taxonomy: The database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) [J]. Nucleic Acids Research, 2018, 46(D1): D708-D717.
- [17] Li L, Zhang Z. 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.
- [18] Zhou W, Wen H, Li Y, et al. Whole-genome analysis reveals that bacteriophages promote environmental adaptation of *Staphylococcus aureus* via gene exchange, acquisition, and loss [J]. Viruses, 2022, 14(6): 1199.
- [19] Letunic I, Bork P. Interactive tree of life (iTOL) v5: An online tool for phylogenetic tree display and annotation [J]. Nucleic Acids Res, 2021, 49(W1): W293-W296.
- [20] 党瑞莹,常军帅,梁晏,等.奶牛乳腺炎源金黄色葡萄球菌噬菌体 P82 的分离及特性研究[J].中国畜牧兽医,2022,49(6): 2318-2325.
- [21] 张志宏,杨娇,张海鹏,等.一株金黄色葡萄球菌噬菌体的裂解谱特异性和分子分类研究[J].微生物学报,2021,61(7): 2043-2052.

- [22] 涂尊方,税斐,何汶璐,等.耐甲氧西林金黄色葡萄球菌裂解性噬菌体 PhMASA-WJ 的生物学特性及其对小鼠败血症的疗效[J].中国生物制品学杂志,2020,33(5):521-526.
- [23] Yang D, Wang S, Sun E, et al. A temperate Siphoviridae bacteriophage isolate from Siberian tiger enhances the virulence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* through distinct mechanisms [J]. Virulence, 2022, 13(1): 137-148.
- [24] Feng T, Leptihn S, Dong K, et al. JD419, a *Staphylococcus aureus* phage with a unique morphology and broad host range [J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 602902.
- [25] 王一帆,吴圆圆,屈勇刚,等.一株奶牛乳房炎源金黄色葡萄球菌短尾噬菌体的分离及其生物学特性分析[J].中国动物传染病学报,2022,30(4):104-109.
- [26] Atterbury R J, Van Bergen M A, Ortiz F, et al. Bacteriophage therapy to reduce *Salmonella* colonization of broiler chickens [J]. Appl Environ Microbiol, 2007, 73(14): 4543-4549.
- [27] Chan B K, Abedon S T. Bacteriophages and their enzymes in biofilm control [J]. Curr Pharm Des, 2015, 21(1): 85-99.
- [28] Kraushaar B, Thanh M D, Hammerl J A, et al. Isolation and characterization of phages with lytic activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains belonging to clonal complex 398 [J]. Archives of Virology, 2013, 158(11): 2341-2350.
- [29] 卢玮,刘英玉,白梓好,等.新疆骆驼源 SA 噬菌体的鉴定及对生物被膜的清除作用[J/OL].中国动物传染病学报,DOI: 10.19958/j.cnki.cn31-2031/s.20220407.002.
- [30] Gutierrez D, Vandenheuvel D, Martinez B, et al. Two phages, phiPLA-RODI and phiPLA-C1C, lyse mono- and dual-species *Staphylococcal* biofilms [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(10): 3336-3348.
- [31] Gill J J, Hyman P. Phage choice, isolation, and preparation for phage therapy [J]. Current Pharmaceutical Biotechnology, 2010, 11(1): 2-14.
- [32] Turner D, Shkoporov A N, Lood C, et al. Abolishment of morphology-based taxa and change to binomial species names: 2022 taxonomy update of the ICTV bacterial viruses subcommittee [J]. Arch Virol, 2023, 168(2): 74.
- [33] Ma F, Ning Y, Wan Q, et al. Bacteriophages LSA2308 and LSA2366 infecting drug-resistant *Staphylococcus aureus*: Isolation, characterization and potential application for milk safety [J]. LWT, 2021, 152: 112298.
- [34] Yang Y, Yang P, Wang N, et al. Architecture of the herpesvirus genome-packaging complex and implications for DNA translocation [J]. Protein Cell, 2020, 11(5): 339-351.
- [35] Kitamura N, Sasabe E, Matsuzaki S, et al. Characterization of two newly isolated *Staphylococcus aureus* bacteriophages from Japan belonging to the genus Silviavirus [J]. Archives of Virology, 2020, 165(10): 2355-2359.
- [36] Young R. Phage lysis: Do we have the hole story yet? [J]. Current Opinion in Microbiology, 2013, 16(6): 790-797.
- [37] Peng C, Hanawa T, Azam A H, et al. Silviavirus phage phiMR003 displays a broad host range against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of human origin [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(18): 7751-7765.
- [38] Stark W M. Making serine integrases work for us [J]. Current Opinion in Microbiology, 2017, 38: 130-136.
- [39] Nuidate T, Kuaphiriyakul A, Surachat K, et al. Induction and genome analysis of HY01, a newly reported prophage from an emerging shrimp pathogen *Vibrio campbellii* [J]. Microorganisms, 2021, 9(2): 400.