

论著·基础研究

耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌噬菌体 SH-Ab 15599 的生物学特性及基因组学分析

季佳伟^{1,2}, 王睿¹, 罗婷婷⁴, 徐梦莎¹, 郭晓奎¹, 胡付品³, 李敏², 何平¹

1. 上海交通大学基础医学院免疫学与微生物学系, 上海 200025; 2. 上海交通大学医学院附属仁济医院检验科, 上海 200127; 3. 复旦大学附属华山医院抗生素研究所, 上海 200040; 4. 浙江医药高等专科学校制药工程学院, 宁波 315100

[摘要] **目的**·寻找具有感染耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌 (carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*, CRAB) 潜力的烈性噬菌体, 进行生物学特性及基因组学分析。**方法**·采集污水, 富集分离纯化得到噬菌体, 通过电子显微镜观察噬菌体形态, 研究其理化特征。抽取噬菌体 DNA, 进行测序和基因分析。**结果**·分离得到 1 株鲍曼不动杆菌噬菌体, 命名为 SH-Ab 15599。电子显微镜观察结果显示该噬菌体为肌尾噬菌体。SH-Ab 15599 能够裂解 51 株 CRAB 临床分离株中的 15 株 (29.4%); 在 4 ~ 50℃ 和 pH 值 6 ~ 9 的环境下, 1 h 内能保持活性; 与宿主菌共培养 5 min 后, 吸附率约为 90%; 其潜伏期约 10 min, 裂解期约 20 min, 每个细胞裂解量约 43 pfu。在体外实验中, 宿主菌的生长受到抑制。SH-Ab 15599 的基因组为双链线状 DNA, 含 143 204 bp, GC 含量为 38.45%。**结论**·SH-Ab 15599 是一株全新的噬菌体, 具有治疗 CRAB 感染的潜力。

[关键词] 鲍曼不动杆菌; 耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌; 噬菌体; 生物学特性; 基因组学

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2018.11.002 **[中图分类号]** R378.99 **[文献标志码]** A

Characterization and genome sequencing of SH-Ab 15599, a novel bacteriophage targeting carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*Ji Jia-wei^{1,2}, Wang Rui¹, Luo Ting-ting⁴, Xu Meng-sha¹, Guo Xiao-kui¹, Hu Fu-pin³, Li Min², He Ping¹

1. Department of Immunology and Microbiology, Shanghai Jiao Tong University College of Basic Medical Sciences, Shanghai 200025, China; 2. Department of Laboratory Medicine, Renji Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200127, China; 3. Institute of Antibiotics, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China; 4. Department of Pharmaceutical Engineering, Zhejiang Pharmaceutical College, Ningbo 315100, China

[Abstract] **Objective**·To find lytic bacteriophages which have potential to combat carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* (CRAB) infections and analyze the biological characterizations and genomic sequences of the phages. **Methods**·The phages were isolated from sewage followed by amplification and purification. They were characterized by the transmission electron microscopy, the host specificity, the biological characterizations, the lysis assay *in vitro* and the genome sequence analysis. **Results**·A novel bacteriophage, SH-Ab 15599, was isolated from sewage. The electron microscope revealed SH-Ab 15599 belongs to Myoviridae. Among the 51 clinical CRAB isolates tested, 15 (29.4%) were lysed by the phage. SH-Ab 15599 was relatively stable at temperature range from 4 °C to 50 °C or between pH 6 and 9. About 90% of the phage was approximately adsorbed to the host CRAB isolate in 5 min. The one-step growth curve showed that the latent period was about 10 min and the growth period was about 20 min. The burst size was estimated at 43 pfu per infected cell. The growth of the host CRAB isolate was inhibited by the phage *in vitro*. The genome of SH-Ab 15599 was a linear, 143 204 bp double-stranded DNA with GC content of 38.45%. **Conclusion**·SH-Ab 15599 is a novel phage targeting CRAB and has potential as an alternative against CRAB infections in the future.

[Key words] *Acinetobacter baumannii*; carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*; bacteriophage; biological characteristics; genomics

鲍曼不动杆菌是一种常见的条件致病菌, 能够导致许多严重的院内感染, 例如肺炎、菌血症、皮肤感染、创伤、泌尿道感染等^[1]。近年来, 由于抗生素的广泛使用,

导致多重耐药菌不断出现。在中国, 耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌 (carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*, CRAB) 比例显著增加, 碳青霉烯类抗生素耐药率从 2005

[基金项目] 国家自然科学基金 (81471908) (National Natural Science Foundation of China, 81471908)。

[作者简介] 季佳伟 (1988—), 男, 硕士生; 电子信箱: randll-jjw@163.com。

[通信作者] 何平, 电子信箱: hpatsh@sjtu.edu.cn。



年的 31.0% 快速增长至 2014 年的 66.7%^[2]。有研究表明,对碳青霉烯类抗生素耐药可能会增加鲍曼不动杆菌感染的死亡风险^[3]。然而,作为临床治疗 CRAB 主要手段之一的多黏菌素 E,却由于其药代动力学特性及肾脏毒性,使用及疗效受到限制^[4]。虽然联合用药比单独用药效果更好,但是也会有新问题不断出现,如多种抗生素的不良反应等^[4]。

噬菌体疗法是众多抗 CRAB 感染中较有潜力的一种。噬菌体是一种能够专一杀死宿主菌的病毒。与传统抗生素相比,噬菌体有许多优势,如其对宿主菌的专一性可以减少对正常组织的影响,没有严重的不良反应,可以在感染部位大量复制^[5]。已有一些研究运用动物模型证明鲍曼不动杆菌噬菌体能够有效地清除宿主菌,治疗 CRAB 感染^[6-7]。

本研究从污水中分离出鲍曼不动杆菌噬菌体 SH-Ab 15599,对其生物学特性以及基因组学进行了分析,以期 SH-Ab 15599 的临床应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌株的来源

用于筛选噬菌体的 48 株 CRAB 临床分离株来自复旦大学附属华山医院。用于宿主谱测定的菌株来源情况如下:51 株 CRAB 临床分离株来自复旦大学附属华山医院;4 株大肠埃希菌临床分离株、5 株铜绿假单胞菌临床分离株、5 株肺炎克雷伯菌临床分离株来自上海交通大学医学院附属仁济医院;金黄色葡萄球菌标准株 ATCC29213、ATCC25923,大肠埃希菌标准株 ATCC25922、ATCC35218 购自上海市临床检验中心。所有临床分离株皆通过 VITEK2 compact 系统鉴定且没有重复。

将血平板上的单个菌落接种到液体 LB 培养基中,放入摇床振荡培养过夜 (37 ℃, 200 r/min, 16 h)。次日取一部分菌液加入等体积的 50% 甘油,颠倒混匀,保存于 -80℃ 冰箱。

1.2 噬菌体的分离、扩增与纯化

污水标本取自复旦大学附属华山医院和上海交通大学医学院附属瑞金医院。分装于 50 mL 离心管,4 000 × g,离心 15 min 后,取上清液,与处于对数生长期的 CRAB 临床分离株振荡培养过夜 (37 ℃, 200 r/min)。次日离心 (4 ℃, 4 000 × g, 15 min),取 100 μL 上清液与 100 μL 菌液以及 3 mL 的 0.7% 琼脂 LB 培养基混合于 5 mL 的无菌 EP 管中,铺板于 1.5% 琼脂 LB 培养基之上,37 ℃

过夜培养。次日用注射器针头挑取透明噬菌斑。每个噬菌斑都需重复分离 3 次,直至观察到均一稳定的噬菌斑形态。

采用双层平板法扩增噬菌体。宿主菌与噬菌体 37 ℃ 过夜培养,次日用 SM 缓冲液洗脱平板,以 80 r/min 振荡洗脱 4 h。混合液中加入终浓度 2% 的氯仿,4 ℃ 静置 30 min。将混合液在 4 ℃ 下 6 500 r/min ($r=15.8$ cm) 离心 15 min,取上清液,加入终质量浓度 1 μg/mL 的 DNA 酶及 RNA 酶,常温放置 30 min。加入氯化钠至终浓度 0.5 mol/L,冰浴 1 h,4 ℃ 下 11 000 × g 离心 10 min。取上清液,加入固体 PEG8000 至终浓度 10%,混匀后静置于 4 ℃ 过夜。次日将含有 PEG8000 的混合液,4 ℃ 下 8 500 r/min ($r=15.8$ cm) 离心 20 min,弃上清液,用 SM 缓冲液重悬沉淀。加入等体积氯仿,4 000 × g 离心 10 min,保留上清液。采用氯化铯密度梯度法纯化噬菌体 (1.33、1.45、1.50、1.70 g/mL),4 ℃ 下 33 000 r/min ($r=15.9$ cm) 离心 4 h。用注射器小心吸出富含噬菌体的条带,透析之后过 0.22 μm 滤膜,保存于 4 ℃ 待用^[8]。

1.3 噬菌体效价测定

运用双层平板法测定噬菌体的效价。取 10 μL 用 SM 缓冲液适当稀释的噬菌体液,与 400 μL 对数生长期宿主菌液混合于 5 mL 无菌 EP 管,室温孵育 10 min 后,与 3 mL 0.7% 琼脂 LB (加热融化于水浴 56 ℃ 备用) 混匀,浇注于 1.5% 琼脂 LB 培养基之上,37 ℃ 过夜培养。次日,计数透亮噬菌斑个数。噬菌体效价 (pfu/mL) = 透亮噬菌斑个数 × 稀释倍数 × 100。

1.4 噬菌体的电子显微镜观察

将之前纯化及透析后的噬菌体液离心 (4 ℃, 40 000 × g, 40 min),弃上清液,用 2% 戊二醛重悬沉淀物,固定噬菌体。室温静置 30 min 后,以 44 000 × g 离心 40 min,弃上清后用 PBS 重悬噬菌体。之后,将噬菌体液滴加在含有碳膜的铜网上,沉淀 4 min,再滴加一滴 2% 磷钨酸染色 4 min。室温干燥后,使用透射电子显微镜 (电镜) 进行噬菌体的观察。

1.5 噬菌体的宿主谱测定

运用点滴法^[9]共检测 51 株 CRAB 临床分离株、4 株大肠埃希菌临床分离株、5 株铜绿假单胞菌临床分离株、5 株肺炎克雷伯菌临床分离株、2 株金黄色葡萄球菌标准株 ATCC29213 和 ATCC25923、2 株大肠埃希菌标准株 ATCC25922 和 ATCC35218。先将细菌摇至对数生长期,

再取 400 μL 菌液与 3 mL 0.7% 琼脂半固体 LB 混匀, 铺板于下层的 1.5% 琼脂固体 LB 培养基。待上层干燥后, 滴加 2 μL 噬菌体液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。次日, 通过噬菌斑的产生情况判断噬菌体的宿主谱。

1.6 噬菌体稳定性 (温度和 pH 值) 测试

先将准备好的噬菌体液用 SM 缓冲液稀释, 分别置于 4、37、40、50、60、70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中孵育 1 h。或是与 pH 值 2 ~ 13 的 SM 缓冲液在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 1 h, 即刻用双层平板法测定噬菌体效价。

1.7 噬菌体吸附实验

以感染复数 (multiplicity of infection, MOI)=0.01 比例混合噬菌体和宿主分离株 CRAB 599 (对数生长期)。分别于混合后的 0、1、2、3、4、5、10、15、20、25 min 时, 各取 100 μL 加至 900 μL SM 缓冲液中, 混匀。即刻在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 13 000 $\times g$ 离心 1 min, 用双层平板法测定上清液中噬菌体效价。

1.8 噬菌体一步生长曲线及体外裂解能力的测定

以 MOI=0.01 比例混合噬菌体和宿主分离株 CRAB 599 (对数生长期), 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 5 min。13 000 $\times g$ 离心 1 min, 弃上清。之后, 用 10 mL 预热的 LB 培养液重悬沉淀。混匀后, 放入摇床振荡培养 (37 $^{\circ}\text{C}$, 200 r/min)。每隔 5 min 取 100 μL 重悬液, 运用双层平板法测定其中的噬菌体效价。

将宿主菌培养至对数生长期, 以 MOI=10、1、0.1、0 (作为对照) 比例混合噬菌体和宿主菌, 放入摇床振荡培养 5 h (37 $^{\circ}\text{C}$, 100 r/min), 每隔 30 min 在 600 nm 处测定吸光度值 [$D(600\text{ nm})$]。

1.9 噬菌体基因组的抽提及数据分析

采用平衡酚-氯仿-异戊醇法进行 DNA 抽提^[10]。将 DNA 送至上海派森诺公司进行基因组测序, 由 Illumina 高通量测序平台 (IlluminaHiSeq3000) 完成。采用 SOAPdenovo2 软件组装基因、优化结果。GeneMarkS 软件则用于分析噬菌体基因组的开放阅读框 (open reading frame, ORF)。应用 RAST 网站 (<http://rast.nmpdr.org/rast.cgi>) 进行功能基因注释。采用 ProParam 软件分析功能基因编码蛋白质的稳定性, SOPMA 软件分析二级结构, 与毒力因子数据库 (VFDB, <http://www.mgc.ac.cn/VFs/main.htm>)、耐药基因数据库 (ARDB, <http://ardb.cbcb.umd.edu/>) 进行比对, 以确保噬菌体临床应用的安全性。采用

GraphPad Prism 6.0 统计软件进行数据分析。所有图片的误差线皆用 $\bar{x} \pm se$ 表示。

2 结果

2.1 噬菌体 SH-Ab 15599 的分离及其形态

噬菌体 SH-Ab 15599 分离自污水, 能够在双层 LB 平板上形成直径 2 ~ 3 mm 的噬菌斑, 中间为透明小点, 外围有淡淡的晕圈 (图 1A)。电镜结果显示其头部为多面体立体对称结构, 直径约 85 nm, 尾长约 90 nm (图 1B)。根据国际病毒委员会的分类标准^[11], 噬菌体 SH-Ab 15599 属于肌尾噬菌体科。

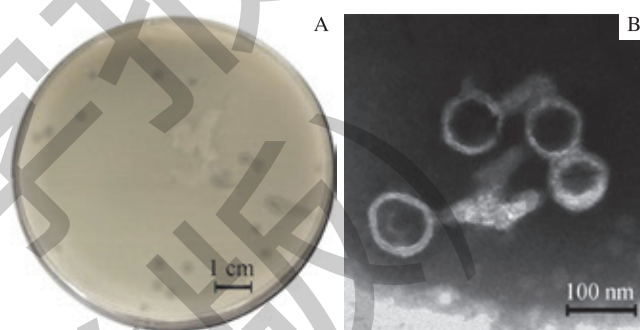


图 1 噬菌体 SH-Ab 15599 的噬菌斑 (A) 和透射电镜图 (B)

Fig 1 Plaque morphology (A) and transmission electron micrograph (B) of SH-Ab 15599

2.2 噬菌体 SH-Ab 15599 的宿主谱

检测了 51 株 CRAB 临床分离株, 其中 15 株 (29.4%) 能够被该噬菌体裂解。另外, 4 株大肠埃希菌临床分离株、5 株铜绿假单胞菌临床分离株、5 株肺炎克雷伯菌临床分离株、2 株金黄色葡萄球菌标准株 ATCC29213 和 ATCC25923、2 株大肠埃希菌标准株 ATCC25922 和 ATCC35218 都不能被该噬菌体裂解。结果显示 SH-Ab 15599 的宿主专一性比较强。

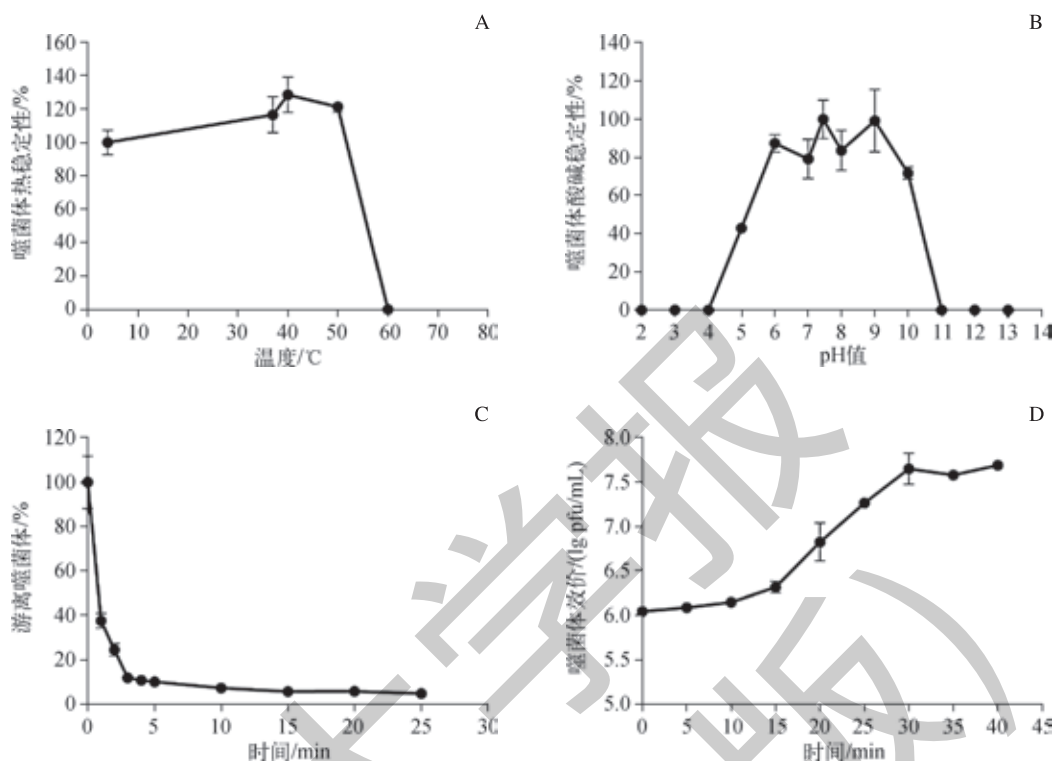
2.3 噬菌体 SH-Ab 15599 的生物学特性

SH-Ab 15599 能够在 4 ~ 50 $^{\circ}\text{C}$ 保持活性 1 h。升温至 60 $^{\circ}\text{C}$ 时, 噬菌体活力完全丧失 (图 2A)。除此之外, SH-Ab 15599 能够在 pH 值 6 ~ 9 的环境中稳定 1 h, 在 pH 值为 7.45 时活力最高, pH ≤ 4 以及 ≥ 11 时则活力完全丧失 (图 2B)。

SH-Ab 15599 在与宿主菌共培养 5 min 后, 约有 90% 的噬菌体吸附到宿主菌上 (图 2C)。一步生长曲线表明, 噬菌体 SH-Ab 15599 在宿主菌中生长一代噬菌体的时间为

30 min, 其潜伏期约为 10 min, 裂解期约为 20 min。根据计算公式 (裂解量 = 裂解末期噬菌体效价 / 感染初期噬菌

体效价), 每个细胞裂解量约为 43 pfu (图 2D)。



注:A. 噬菌体 SH-Ab 15599 的热稳定性 (纵坐标表示相对于 4 °C 效价的百分比); B. 噬菌体 SH-Ab 15599 的酸碱稳定性 (纵坐标表示相对于 pH 值 7.45 效价的百分比); C. 噬菌体 SH-Ab 15599 的吸附曲线; D. 噬菌体 SH-Ab 15599 的一步生长曲线。

图 2 噬菌体 SH-Ab 15599 的生物学特性

Fig 2 Biological characterization of SH-Ab 15599

2.4 噬菌体 SH-Ab 15599 在体外对宿主菌生长的抑制作用

为了测试该噬菌体能否在体外抑制宿主菌的生长, 将不同 MOI 的噬菌体与宿主菌共培养, 检测宿主菌的生长情况。结果显示, 在 MOI=10、1、0.1 的情况下, 宿主菌的生长受到抑制 (图 3)。

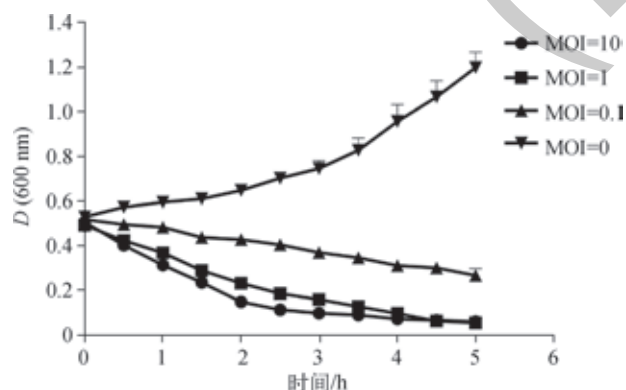


图 3 噬菌体 SH-Ab 15599 的体外裂解能力

Fig 3 Lysis assay of SH-Ab 15599 in vitro

2.5 噬菌体 SH-Ab 15599 的基因组分析

使用 SOAPdenovo2 工具对 SH-Ab 15599 的核苷酸序列进行组装, 得到一条双链线状 DNA, 含 143 204 bp, GC 含量为 38.45%。经 GeneMarkS 工具分析, 该噬菌体含有 181 个 ORF, 平均长度为 740 bp。其中, 58 个 ORF 编码的蛋白具有明确功能, 其余蛋白称为假定蛋白。可将功能明确的蛋白分为 4 类: DNA 组装及结构 (DNA packaging and morphogenesis) 蛋白 (23 个), DNA 复制、重组及修饰 (DNA replication/recombination/modification) 蛋白 (25 个), 裂解宿主 (host lysis) 蛋白 (5 个), 未分类 (unclassified) 蛋白 (5 个)。经分析, 未发现毒力基因和耐药基因 (图 4)。

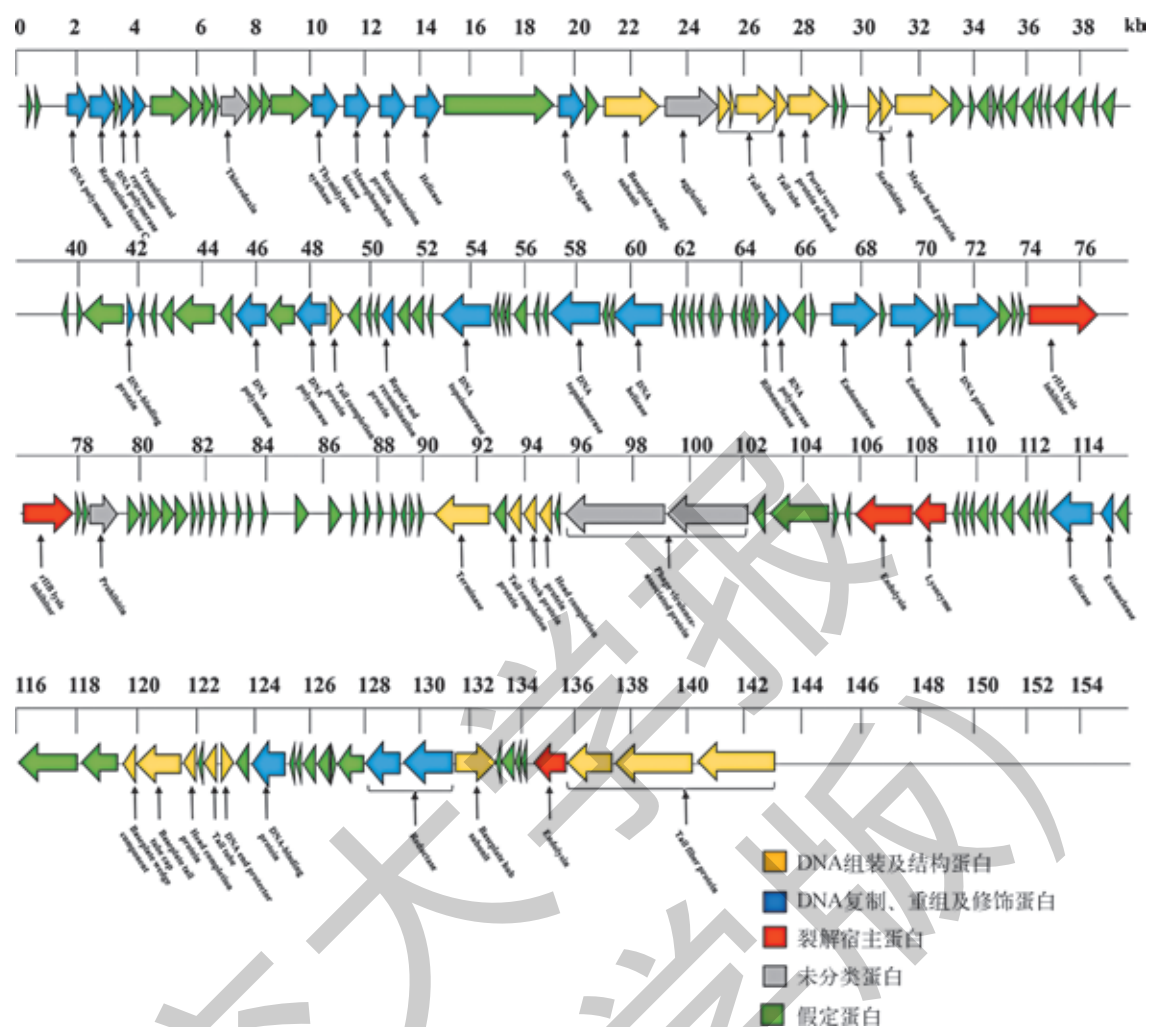


图4 噬菌体 SH-Ab 15599 的基因组结构图
Fig 4 Genome structure of SH-Ab 15599

3 讨论

近年来,在中国 CRAB 的感染情况越发严重^[2]。除了传统抗生素疗法外,越来越多的研究表明噬菌体疗法具有抗 CRAB 感染的潜力^[6-7]。然而,由于噬菌体的宿主特异性很强,若将来能够广泛投入到临床应用中,就需要分离出更多新的噬菌体。

在本研究中,从污水中分离出了新噬菌体 SH-Ab 15599 并且研究了其生物学特性和基因组学。SH-Ab 15599 能够裂解 51 株 CRAB 临床分离株中的 15 株,宿主专一性比较强。在临床应用时,可以考虑通过与其他噬菌体联合使用实施鸡尾酒疗法,以扩大噬菌体宿主谱^[5]。SH-Ab 15599 能够在 4 ~ 50 ℃ 以及 pH 值 6 ~ 9 的环境中稳定 1 h,该噬菌体能够在变化较大的温度及酸碱环境

下保持稳定,这有利于噬菌体的保存以及在治疗上的应用。SH-Ab 15599 在与宿主菌共培养 5 min 后,约 90% 的噬菌体吸附到宿主菌上,吸附速度较快。噬菌体吸附到宿主菌的速度很重要,快速的吸附才能更好地保证噬菌体的疗效^[12]。在体外实验中,SH-Ab 15599 能够以不同效价 (MOI=10、1、0.1) 抑制宿主菌的生长。这为将来的体内实验以及临床应用建立了良好的基础。

基因测序结果显示,SH-Ab 15599 的基因组为双链线性 DNA,长度为 143 204 bp,GC 含量为 38.45%。经与数据库已有噬菌体进行比对,SH-Ab 15599 为一株全新噬菌体。其编码的内容素有 2 种,均为新型蛋白(与已有蛋白比对相似度 <60%): ORF 141 编码的蛋白由 486 个氨基酸组成,有 2 个保守区域,分属溶菌酶样超家族和 Gp5_0B 超家族,功能为裂解壳多糖;ORF 178 编码的蛋白由 203

个氨基酸组成, 功能为 N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸酰胺酶。未来可设计实验进行分子克隆, 所得的裂解细菌蛋白有望用于临床, 以解决多重耐药细菌 (比如 CRAB) 感染的问题。

综上所述, 从污水中分离得到的鲍曼不动杆菌噬菌体

SH-Ab 15599 可以适应不同温度和 pH 值的环境, 较快地吸附到宿主细胞, 能够在体外实验中抑制宿主 CRAB 临床分离株 599 的生长。SH-Ab 15599 是一株全新的噬菌体, 它的 2 个内容素蛋白皆为新型蛋白。本研究结果为该噬菌体治疗 CRAB 感染的临床应用提供参考和依据。

参 · 考 · 文 · 献

- [1] Antunes LC, Visca P, Towner KJ. *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen[J]. Pathog Dis, 2014, 71(3): 292-301.
- [2] Hu FP, Guo Y, Zhu DM, et al. Resistance trends among clinical isolates in China reported from CHINET surveillance of bacterial resistance, 2005-2014[J]. Clin Microbiol Infect, 2016, 22 (Suppl 1): S9-S14.
- [3] Lemos EV, de la Hoz FP, Einarson TR, et al. Carbapenem resistance and mortality in patients with *Acinetobacter baumannii* infection: systematic review and meta-analysis[J]. Clin Microbiol Infect, 2014, 20(5): 416-423.
- [4] Viehman JA, Nguyen MH, Doi Y. Treatment options for carbapenem-resistant and extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections[J]. Drugs, 2014, 74(12): 1315-1333.
- [5] Sarhan WA, Azzazy HM. Phage approved in food, why not as a therapeutic?[J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2015, 13(1): 91-101.
- [6] Jeon J, Ryu CM, Lee JY, et al. *In vivo* application of bacteriophage as a potential therapeutic agent to control OXA-66-like carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* strains belonging to sequence type 357[J]. Appl Environ Microbiol, 2016, 82(14): 4200-4208.
- [7] Hua Y, Luo T, Yang Y, et al. Phage therapy as a promising new treatment for lung infection caused by carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in mice[J]. Front Microbiol, 2018, 8: 2659.
- [8] Cui Z, Feng T, Gu F, et al. Characterization and complete genome of the virulent Myoviridae phage JD007 active against a variety of *Staphylococcus aureus* isolates from different hospitals in Shanghai, China[J]. Virol J, 2017, 14(1): 26.
- [9] Sasikala D, Srinivasan P. Characterization of potential lytic bacteriophage against *Vibrio alginolyticus* and its therapeutic implications on biofilm dispersal[J]. Microb Pathog, 2016, 101: 24-35.
- [10] Salem M, Virtanen S, Korkeala H, et al. Isolation and characterization of *Yersinia*-specific bacteriophages from pig stools in Finland[J]. J Appl Microbiol, 2015, 118(3): 599-608.
- [11] Adams MJ, Lefkowitz EJ, King AM, et al. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2016)[J]. Arch Virol, 2016, 161(10): 2921-2949.
- [12] Furusawa T, Iwano H, Hiyashimizu Y, et al. Phage therapy is effective in a mouse model of bacterial equine keratitis[J]. Appl Environ Microbiol, 2016, 82(17): 5332-5339.

[收稿日期] 2018-05-18

[本文编辑] 吴 洋