

DOI:10.13350/j.cjpb.231112

• 论著 •

一株新型肺炎克雷伯菌裂解性噬菌体 Pdz533 的生物学特性及全基因组分析*

张改¹, 靳静^{1**}, 王山梅^{2**}, 陈松建¹, 王书伟¹, 李振江¹, 刘肖¹, 李亚辉¹, 王中全³

(1. 河南医学高等专科学校病原生物学与免疫学教研室, 河南郑州 451191; 2. 河南省人民医院检验科; 3. 郑州大学基础医学院病原生物学教研室)

【摘要】 目的 分析 1 株新型可裂解高黏液表型肺炎克雷伯菌及耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌的噬菌体 Pdz533 的生物学特性及全基因组信息。方法 以留置导尿管尿液中的肺炎克雷伯菌 Fb533 为宿主菌, 从市政污水中分离噬菌体 Pdz533, 观察其噬菌斑形态, 电镜下观察噬菌体的形态结构; 分析其噬菌谱、一步生长曲线以及理化稳定性。应用蛋白酶 K/SDS 法提取噬菌体 Pdz533 全基因组, 对其进行全基因组测序、拼装; 对全基因组中可能存在的开放阅读框进行预测; 基于其保守蛋白构建进化树, 进行比较基因组学分析。结果 分离的 Pdz533 可裂解耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌及高黏液表型肺炎克雷伯菌, 该噬菌体在宿主菌 Fb533 菌苔上形成直径 5~8 mm 的透明噬菌斑, 外周有宽 1 mm 的半透明晕环。电镜观察 Pdz533 具有二十面体头部和较短的非收缩性尾部。一步生长曲线显示 Pdz533 感染 Fb533 的潜伏期约 10 min, 裂解量约 40 PFU/cell。Pdz533 在一个较宽的 pH 范围内(6~10)和较高的温度下(50 °C)活性仍能保持稳定。Pdz533 基因组全长 40 416 bp, (G+C)摩尔百分比含量为 52.9%, 预测含有 50 个开放阅读框。噬菌体全基因组共线性分析显示 Pdz533 与 *Autographiviridae* 科 *Studiervirinae* 亚科 *Przondovirus* 属噬菌体有相似的保守框架。噬菌体保守蛋白进化树表明, Pdz533 为 *Przondovirus* 属的一个新成员。结论 分离鉴定了 1 株新的裂解肺炎克雷伯菌噬菌体, 为 *Przondovirus* 属的一个新成员。该噬菌体具有一定的酸碱耐受和温度耐受性, 可望用于预防和治疗具有高黏液表型及耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌的感染。

【关键词】 肺炎克雷伯菌; 噬菌体; 生物学特性; 全基因组分析

【中图分类号】 R378.99

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2023)11-1303-08

[*Journal of Pathogen Biology*. 2023 Nov.;18(11):1303-1310.]

Biological characteristics and complete genome analysis of a novel *Klebsiella pneumoniae* lytic phage Pdz533

ZHANG Gai¹, JIN Jing¹, WANG Shanmei², CHEN Songjian¹, WANG Shuwei¹, LI Zhenjiang¹, LIU Xiao¹, LI Yahui¹, WANG Zhongquan³ (1. Department of Pathogen Biology and Immunology, Henan Medical College, Zhengzhou 451191, China; 2. Laboratory Department of Henan Province People's Hospital; 3. Department of Pathogen Biology, Basic Medical College of Zhengzhou University)***

【Abstract】 **Objective** To analyze the biological characteristics and the complete genome sequence information of Pdz533, a novel lytic phage of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* and hypermucoviscous *K. pneumoniae*.

Methods The bacteriophage Pdz533 was isolated from municipal sewage by taking *K. pneumoniae* Fb533 in the urine of an indwelling urinary catheter as the host bacteria, and its plaque morphology was observed, and the morphological structure of the bacteriophage was observed with electron microscopy. Its bacteriophage spectrum, one-step growth curve, and physicochemical stability were analyzed. The whole genome of bacteriophage Pdz533 was extracted by proteinase K/SDS method, and the whole genome was sequenced and assembled. The possible open reading frames in the complete genome were predicted; an evolutionary tree was constructed based on its conserved proteins for comparative genomic analysis.

Results A lytic phage of carbapenem-resistant *K. pneumoniae* and hypermucinous *K. pneumoniae* was isolated and named Pdz533. It can form transparent plaque with a diameter of 5-8mm and a translucent halo with a width of 1mm on the host bacterium Fb533 lawn. Pdz533 has an icosahedral head and a short, non-contractile tail. The one-step growth curve showed that the latent period of Pdz533 infection with Fb533 was about 10 min, and a burst size was about 40 PFU/

* **【基金项目】** 河南省医学科技攻关计划联合共建项目(No. LHGJ20210169); 河南省高等学校重点科研项目(No. 23B310012); 河南省科技厅科技发展计划项目(No. 222102310449; 202102310098)。

** **【通讯作者】** 靳静, E-mail: Jing7772006@126.com; 王山梅, E-mail: wsm1997@sina.com

【作者简介】 张改(1980-), 女, 河南长葛人, 硕士研究生, 讲师, 主要从事噬菌体方面的研究。E-mail: 39435236@qq.com

cell. Pdz533 can remain stable in a wide pH range (6–10) and high temperature (50 °C). The genome of Pdz533 is 40 416 bp in length, with a molar percentage (G+C) content of 52.9%, and is predicted to contain 50 open reading frames. Phage genome-wide colinearity analysis shows that Pdz533 has a similar conserved framework to bacteriophages of the genus *Przondovirus* in the family *Studiervirinae*. The phage-conserved protein evolutionary tree indicates that Pdz533 is a new member of the genus *Przondovirus*. **Conclusion** A novel strain of *K. pneumoniae* bacteriophage was isolated and identified, which is a new member of the genus *Przondovirus*. The bacteriophage can adapt to a wide pH and high temperature, and is expected to be used for the prevention and treatment of infection with hypermucoviscous phenotype and carbapene-resistant *K. pneumoniae*.

【Key words】 *Klebsiella pneumoniae*; phage; biological characteristics; genomic analysis

肺炎克雷伯菌是一种有荚膜的革兰阴性菌,广泛分布于自然界和人的呼吸道及肠道内。既可使免疫力低下的患者发生医院获得性感染,也可使年轻、健康的个体发生社区获得性感染^[1]。据报道,高黏液表型的肺炎克雷伯菌(Hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae*, HMKP)往往表现为高毒力,引起的感染往往具有侵袭性(常常由化脓性肝脓肿并发心内膜炎、脑膜炎、脑脓肿、肺炎、眼内炎、骨髓炎、肾炎、脾脓肿和坏死性筋膜炎等)^[2],致死率高达80%,目前这种感染以亚洲为中心向全球播散^[2]。同样棘手的是,随着碳青霉烯类药物的临床应用,耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌(Carbapenem-resistant *K. pneumoniae*, CRKP)在临床上的检出率逐年攀升。全国耐药菌监测网监测报告显示,2021年我国CRKP检出率为11.3%,较2020年上升了0.4个百分点,其中以河南省最高,为28.1%^[3]。更令人担心的是,目前已经出现了耐碳青霉烯高黏液表型的肺炎克雷伯菌^[4-5],给临床治疗带来极大的麻烦。由于耐药菌的不断出现,噬菌体治疗受到了越来越多的关注。

噬菌体是细菌的病毒,广泛存在于自然界及人和动物体内,在自然界中的数量是细菌的10倍。噬菌体被发现后即被应用于临床治疗细菌感染,至今已经有一百多年的历史^[6]。裂解性噬菌体在杀菌时特异性强,杀伤力大,并且可随细菌的变异而进化出新的能够裂解变异菌噬菌体的优点。细菌耐抗生素的危机驱动了噬菌体这种古老疗法的复苏。目前,噬菌体疗法作为一种治疗耐药菌感染的新手段,目前已经取得了巨大进展^[7]。除了单独使用噬菌体进行治疗外,还有噬菌体鸡尾酒疗法,噬菌体-抗生素联合应用,以及使用噬菌体相关的酶治疗等新的策略,均取得了很好的治疗效果,因而受到广泛关注^[7]。本实验室3年来收集了省内多家医院分离的肺炎克雷伯菌,对其黏液表型和耐药性进行了检测。以留置导尿管尿液中的肺炎克雷伯菌 Fb533 为宿主菌,从市政污水中分离得到1株可裂解高黏液表型和耐碳青霉烯的肺炎克雷伯菌噬菌体,并对其生物学特性和全基因组特征进行了检测分析,结果报告如下。

对象与方法

1 材料

1.1 菌株来源及鉴定 肺炎克雷伯菌菌株收集自河南省人民医院及河南省各地市医院,细菌表型鉴定及药敏试验采用 Phoenix-100 (Becton Dickinson Diagnostic Systems, System, MD, USA) 进行。使用肠杆菌科的通用引物 16S-F (5'-AGAGTTTGATCCTG-GCTCAG-3') 和 16S-R (5'-ACGGCTACCTTGT-TACGACTT-3') 对肺炎克雷伯菌的 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增和测序以作进一步鉴定。

1.2 主要试剂和仪器 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;噬菌体保存液及上、下层培养基由本室制备^[8];试剂盒 2×Taq PCR Master Mix 购自天根生化科技有限公司;DNA 提取试剂盒购自天根生化科技有限公司;蛋白酶 K 及 DNase 和 RNase 购于美国 Thermo Fisher Scientific 公司;SDS 购于上海碧云天生物技术有限公司;EDTA 购于天津市风船化学试剂科技有限公司。PCR 扩增仪购于德国 Eppendorf 公司;JEM-1400 型透射电镜显微镜购于日本电子株式会社。

2 方法

2.1 拉丝试验 将肺炎克雷伯菌接种于 MAC 平板上,于 37 °C 培养 16 h。挑取单个菌落观察拉丝长度,并按以下标准对拉丝情况进行定级。I 级:无拉丝现象;II 级:1~4 mm;III 级:5~10 mm;IV 级:11~20 mm;V 级:特粘拉不断。将拉丝 III 级及以上的菌株定义为高黏液表型肺炎克雷伯菌(HMKP)。试验重复 3 次。

2.2 噬菌体的分离、增殖、纯化及形态观察 以肺炎克雷伯菌 Fb533 为宿主菌,按照文献[8]的方法从郑州市新郑龙湖镇鱼塘水中分离获得 1 株裂解性噬菌体,命名为 Pdz533。挑取单个噬菌斑经 6 次分离得到纯净噬菌体。采用双层平板法^[9]增殖噬菌体,得到高浓度的噬菌体 SM 悬液(10¹¹ PFU/mL),用 0.22 μm 的无菌滤器过滤后 4 °C 保存备用。

将噬菌体 Pdz533 的 SM 悬液于 4 °C、40 000 g 离

心 12 h 进行浓缩,用 3% 的戊二醛溶液于 0 °C 固定 30 min;取 20 μ L 固定液滴在 300 目铜网上,自然沉淀 10 min,用滤纸吸去多余液体;用 2% (w/v) 的磷钨酸 (pH7.2) 负染 30 s,干燥后用透射电镜观察噬菌体形态。

2.3 噬菌体宿主谱的调查 采用滴斑法^[8],以本室保存的肺炎克雷伯菌为宿主菌对 Pdz533 的噬菌谱进行调查。

2.4 噬菌体稳定性、一步生长曲线测定 参考文献^[8]的方法对噬菌体进行热稳定性、酸碱稳定性和一步生长曲线测定。将噬菌体悬液 (10^9 PFU/ml) 分别置于 50 °C、60 °C、70 °C、80 °C 的水浴中,每间隔 10 min 取定量溶液检测活性噬菌体的数量。将 100 μ L 噬菌体悬液 (10^9 PFU/mL) 置于不同 pH 值 (pH1-12) 的 SM 溶液中,37 °C 孵育 1 h 后检测活性噬菌体的数量。将等体积的噬菌体 (10^8 PFU/mL) 和处于对数生长前期的细菌悬液 (10^7 PFU/mL) 混合 (MOI 约为 10 : 1),置于摇床中震荡培养 1 min,12 000 g 离心 2 min,弃上清,沉淀重悬于 20 mL 新鲜营养肉汤中于 37 °C、240 r/min 振荡培养,每隔 5 min 取样,用 0 °C 营养肉汤稀释后测定噬菌体活性。以上试验均重复 3 次。

2.5 噬菌体基因组的提取和测序 参考文献^[10]采用蛋白酶 K/SDS 法提取噬菌体全基因组。取已纯化过滤的高浓度噬菌体悬液,加入 DNase 和 RNase,充分涡旋后置于 37 °C 温箱中孵育 1 h 进行酶消化,然后加入裂解缓冲液 (终浓度:蛋白酶 K 为 50 mg/mL,SDS 为 0.5%,EDTA 为 20 mmol/L),置 56 °C 水浴 1 h。加入等体积的平衡酚,充分混匀后 12 000 g 离心 10 min。将上层水相转移至新 EP 中,加入等体积苯酚:氯仿:异戊醇 (体积比为 25 : 24 : 1),充分混匀后离心 (方法同上)。再次转移上层水相于新 EP 管中,加入等体积异丙醇,离心 (方法同上),回收噬菌体 DNA,委托上海生工生物工程技术有限公司测序。

2.6 噬菌体全基因组分析 使用软件 Velvet sequence assembler (1.2.10) 对原始测序数据进行组装和拼接,得到无重叠全长 40 416 bp 的基因组序列。采用 DNASTAR 软件分析基因组的碱基组成及 G+C 含量。联合使用 RAST 在线数据库 (<http://www.rast.nmpdr.org>) 和 GenMarkS 在线软件 (进行开放阅读框 (open reading frame, ORF) 预测,对结果进行综合分析,并使用 NCBI 的 BLASTp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 手动验证。使用 CGview (<https://cgview.ca/>) 进行基因组图谱的绘制。tRNA 预测采用 tRNAscan-SE Search Server (<http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/>)。毒力因子基因

和抗生素抗性基因预测采用 VFDB (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/>)。使用 Mauve 软件对噬菌体 Pdz533 及与之相似噬菌体进行共线性分析。运用 DeepTMHMM (<https://dtu.biolib.com/DeepTMHMM>) 筛选具有跨膜结构域得蛋白质。平均核苷酸同一性 (Average Nucleotide Identity, ANI) 数值计算使用在线软件 ANI calculator (<http://enve-omics.ce.gatech.edu/ani/>);用 NCBI 的 BLASTp 对噬菌体 Pdz533 的 DNA 多聚酶 (ORF25) 和主要衣壳蛋白 (ORF35) 的蛋白序列进行同源性分析,选择同源蛋白,联合 ICTV (international committee on taxonomy of viruses) 库中 *Autographiviridae* 科噬菌体的部分同源蛋白序列,运用 MEGA11.0 软件构建系统进化树,分析噬菌体 Pdz533 与其他 *Autographiviridae* 科噬菌体的进化发育关系。系统发育分析采用 ClustalW 和 Neighbor-Joining 的方法。氨基酸序列对齐方式选择 ClustalW 多重比对,建树方法采用邻接法并进行 1 000 次 bootstrap 检验。

结 果

1 Pdz533 宿主菌信息

宿主谱检测显示,噬菌体 Pdz533 可感染 32 株肺炎克雷伯菌 (表 1)。其中有 2 株对美罗培南耐药 (拉丝试验分属 I 级和 II 级),其余均对美罗培南敏感。高黏液表型菌株有 24 株,非高黏液表型菌株 8 株。标本类型为痰液、肺泡灌洗液、抽出痰液、咽拭子、肛拭子、胃肠术后分泌物、穿刺液、粪便等。标本来源于普通病房 (消化内科、血液内科、老年医学科、妇科、神经外科、感染科等) 及重症监护室和呼吸内镜介入诊疗中心等。患者年龄 32~73 岁不等。

2 Pdz533 噬菌斑及电镜下的形态特征

以 Fb533 为宿主菌,从市政污水中分离得到一株噬菌体,命名为 Pdz533。如图 1A 所示,在双层平板上培养 16 h 后,噬菌体 Pdz533 形成直径 5~8 mm 完全透亮、周围环绕宽度为 1 mm 左右半透明晕的噬菌斑 (图 1A)。电镜观察 Pdz533 具有一个 20 面体立体的头部 (直径约 60 nm) 和非收缩性尾部 (长度约 10 nm) (图 1B)。根据形态确定 Pdz533 为有尾噬菌体。

3 Pdz533 的生物学特性

以培养时间为横坐标,以培养体系中总活性噬菌体数量的对数为纵坐标,绘制 Pdz533 一步生长曲线,结果如图 2A。Pdz533 感染 Fb533 的潜伏期为 10 min,爆发期约为 5 min,爆发量约为 40 PFU/cell。

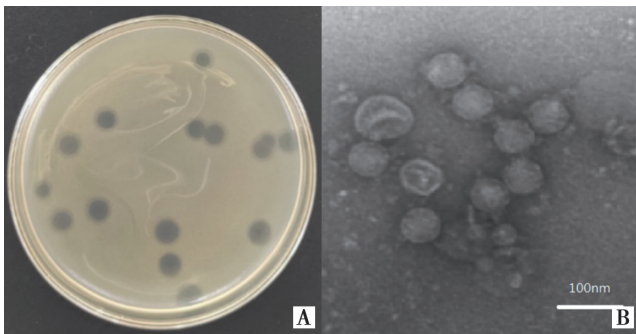
如图 2B 所示,在 50 °C 条件下,噬菌体 Pdz533 活性 1 h 内无显著变化,说明 Pdz533 能耐受 50 °C;在 60 °C 条件下,噬菌体活性 1 h 内降低一个数量级;在 70

℃条件下,噬菌体活性在 1 h 时变为 0;在 80 ℃条件下,噬菌体 2 min 内完全被灭活。

如图 2C 所示,噬菌体在 pH6~10 时活性无明显变化;在 pH5 和 pH11 时,其活性下降 4 个数量级;在 pH4 和 pH12 时,其活性完全丧失。

表 1 32 株人体感染肺炎克雷伯菌信息
Table 1 Host bacteria information of phage PdZ533

临床特征	例数	占比(%)
Clinical features	Number of cases	Proportion
收入年份	2019	4
	2020	17
	2021	11
拉丝分级	I	6
	II	2
	III	3
	IV	4
	V	17
美罗培南药敏	敏感	30
	耐药	2
来源患者的年龄	30~39	3
	40~49	5
	50~59	10
	60~69	11
	70~79	3
标本类型	咽拭子	6
	血液	5
	痰液	4
	尿液	4
	肺泡灌洗液	3
	肛拭子	3
	穿刺液	2
	粪便	2
	脑脊液	1
	分泌物	1
来源科室	ICU	15
	非 ICU	17



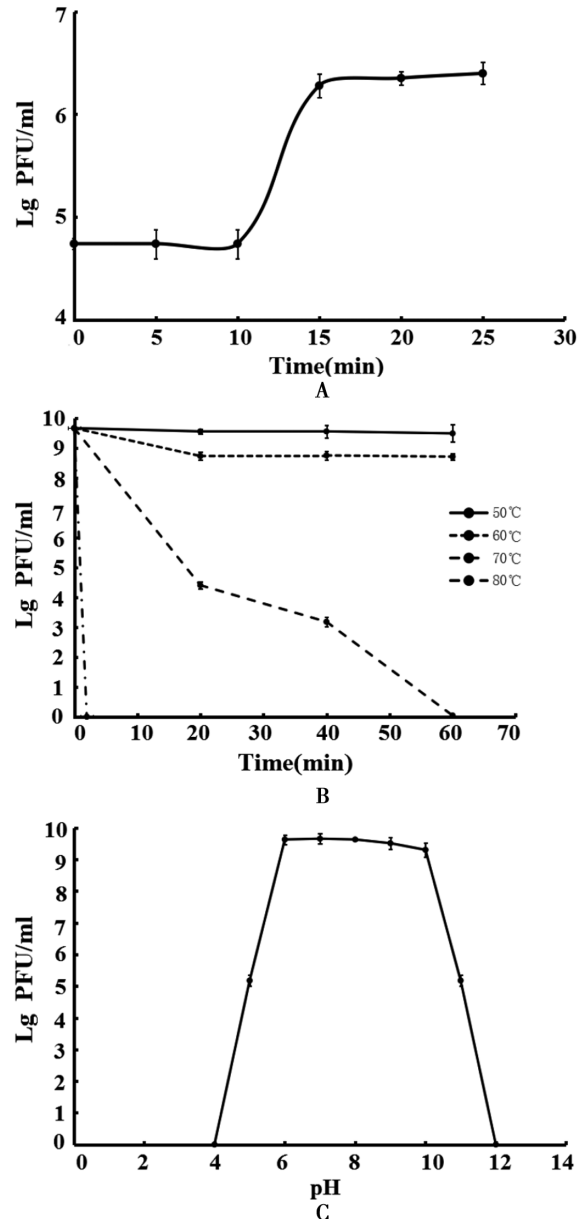
A 噬菌斑 B 电镜照片
图 1 噬菌体 PdZ533 的形态

A Plaque morphology of phage B Electron micrograph of phage
Fig. 1 The characteristics of Phage PdZ533

4 噬菌体 PdZ533 的全基因组分析

4.1 基因组基本特征 测序显示,噬菌体 PdZ533 的基因组属于双链线性 DNA,全长 40 416 bp,其核酸序

列 NCBI 登录号为 OQ863736(数据公开日期为 2026 年 5 月 1 日)。基因组中 A、T、G、C 碱基含量分别为 25.2%、21.9%、27.9%、25.0%;G+C 含量为 52.9%,低于肺炎克雷伯菌基因组的平均(G+C)百分含量(57.2%)。所有 ORF 的编码方向均为正向。在噬菌体 PdZ533 全基因组末端存在由 177 个碱基组成的重复序列。tRNAscan-SE 在线预测 PdZ533 含有 tRNA。VFDB 预测未发现已知的毒力因子基因及抗生素抗性基因。经在线软件 DeepTMHMM 预测,噬菌体 PdZ533 的 ORF 编码蛋白中有 7 个属于跨膜蛋



白,35 个属于细胞内蛋白,8 个属于细胞外蛋白。 A PdZ533 一步生长曲线 B PdZ533 的热稳定性 C PdZ533 的酸碱稳定性。

图 2 噬菌体 PdZ533 的生物学特性
A One-step growth curve B Thermostability C pH stability

Fig. 2 Biological properties of phage PdZ533

4.2 基因组注释 人工校验 RAST 和 GeneMarks
在线预测结果,综合分析后发现,噬菌体 PdZ533 共有 50 个开放阅读框(表 2),其中 18 个 ORFs 注释为假定蛋白或未知功能蛋白,其余 32 个 ORFs 为功能编码序列(coding sequence,CDS)。根据注释结果,该功能可分为 5 个模块:调节蛋白、复制和代谢蛋白、结构蛋白、裂解蛋白和包装蛋白。基因组注释图谱如图 3 所示。

表 2 噬菌体 ORF 预测
Table 2 ORF analysis of the phage PdZ533

开放阅读框 ORF	最相似蛋白所属微生物物种的基因和名称 Top BLAST hit	BLASTp 比对百分比 Amino acid identity (%)	E 值 E value	序列编号 Accession No.
1	Overcome classical restriction [Klebsiella phageKp9]	96%(110/115)	5E-74	UQK57894.1
2	Hypothetical protein [Klebsiella virus KP32]	93%(56/60)	2.00E-35	YP_009801439.1
3	Hypothetical protein [Klebsiella phage 066024]	100%(57/57)	6.00E-33	QOV06649.1
4	Hypothetical protein [Escherichia phage HZP2]	73%(108/148)	3.00E-71	YP_009820202.1
5	Protein kinase [Klebsiella phage vB_Kp_IME531]	92%(308/334)	0	UEP18948.1
6	DNA-dependent RNA polymerase [Klebsiella phage Pharr]	99%(900/906)	0	YP_009821344.1
7	Hypothetical protein [Klebsiella phage AmPh_EK52]	92%(172/187)	7.00E-124	QFR57232.1
8	Hypothetical protein [Klebsiella phage K5-4]	100%(69/69)	8.00E-42	YP_009788604.1
9	Hypothetical protein [Klebsiella phage AmPh_EK52]	94%(80/85)	3.00E-52	QFR57234.1
10	Hypothetical protein [Klebsiella phage vB_KpnP_IME205]	100%(142/142)	6.00E-101	YP_009785866.1
11	DNA ligase [Klebsiella phage vB_KpnP_IME321]	90%(318/352)	0	YP_009806218.1
12	BC10 family protein [Klebsiella virus KP32]	100%(87/87)	6.00E-56	YP_009801357.1
13	Nucleotide kinase [Klebsiella phage Kund-ULIP47]	99%(139/141)	6.00E-98	QAU05516.1
14	Hypothetical protein [Klebsiella phage IME183]	98%(44/45)	1.00E-21	UDW09601.1
15	Hypothetical protein [Klebsiella phage IME183]	100%(41/41)	2.00E-22	UDW09602.1
16	Bacterial RNA polymerase inhibitor [Klebsiella virus KP32]	98%(48/49)	3.00E-26	YP_009801318.1
17	DUF2815 family protein [Klebsiella phage KP32]	100%(231/231)	4.00E-167	YP_003347531.1
18	Endonuclease I [Escherichia phage K30]	100%(149/149)	1.00E-104	YP_004678737.1
19	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase [Klebsiella phage KMI2]	99%(150/151)	2.00E-109	QEG09962.1
20	Hypothetical protein [Klebsiella phage 066019]	93%(37/40)	4.00E-19	QOV06495.1
21	DNA primase/helicase [Klebsiella virus KP32]	99%(506/508)	0	YP_009801452.1
22	Hypothetical protein [Klebsiella phage Henu1]	99%(68/69)	4.00E-35	YP_009818413.1
23	Gp4.5[Klebsiella phage K11]	98%(101/103)	6.00E-66	YP_002003810.1
24	Hypothetical protein [Klebsiella phage TUN1]	98%(130/133)	1.00E-91	CAF0683027.1
25	DNA polymerase [Klebsiella phage 2044-307w]	99%(698/708)	0	YP_009791675.1
26	HNS binding protein [Klebsiella phage Kp_Pokalde_002]	96%(90/94)	7.00E-59	QKE60362.1
27	Hypothetical protein [Escherichia phage vB_EcoP_PHB19]	55%(22/40)	1.00E-05	QHI00755.1
28	Exonuclease [Klebsiella phage vB_Kp1]	99%(300/301)	0	YP_009190981.1
29	Gp6.3[Klebsiella phage K11]	100%(35/35)	1.00E-13	YP_002003817.1
30	DUF2717 domain-containing protein [Klebsiella phage SH-Kp 152410]	100%(81/81)	3.00E-52	
31	DUF5476 domain-containing protein [Klebsiella phage vB_KpnP_KpV763]	100%(73/73)	1.00E-43	YP_009786775.1
32	Hypothetical protein AVU19_gp34 [Klebsiella phage vB_KpnP_KpV289]	99%(85/86)	8.00E-51	YP_009215487.1
33	Head-tail connector protein [Klebsiella phage 2044-307w]	99%(534/535)	0	YP_009791683.1
34	Capsid assembly protein [Klebsiella phage vB_KpnP_BIS33]	100%(319/319)	0	YP_009787488.1
35	Major capsid protein [Klebsiella virus KP32]	99%(342/343)	0	YP_009801376.1
36	Putative minor capsid protein [Klebsiella phage 2044-307w]	98%(82/84)	1.00E-51	YP_009791686.1
37	Tail protein [Klebsiella phage KN1-1]	100%(192/192)	3.00E-140	YP_009817978.1
38	Tail fiber [Klebsiella phage Kund-ULIP47]	99%(785/791)	0	QAU05540.1
39	Internal virion protein A [Klebsiella phage SH-Kp 152410]	100%(137/137)	5.00E-98	YP_009797011.1
40	Putative DNA endonuclease VII [Klebsiella phage Kp_Pokalde_002]	99%(127/128)	1.00E-86	QKE60375.1
41	Internal virion protein B [Klebsiella phage kpssk3]	93%(182/196)	5.00E-128	YP_009817025.1
42	Internal (core) protein [Klebsiella phage KN3-1]	98%(737/751)	0	YP_009818023.1
43	Internal virion protein [Klebsiella phage vB_KpnP_ZK2]	99%(1303/1321)	0	UGC97351.1
44	Tail fibers protein [Klebsiella phage vB_KpnP_FZ12]	76%(222/291)	4.00E-162	QCG76439.1
45	Putative tail fiber protein [Klebsiella phage vB_KpnP_KpV767]	72%(417/581)	0	YP_009786838.1
46	Class II holin [Klebsiella virus KP32]	99%(66/67)	1.00E-38	YP_009801432.1
47	Putative DNA packaging protein A [Klebsiellaphage vB_KpnP_KpV767]	99%(84/85)	8.00E-54	YP_009786841.1
48	Spanin inner membrane subunit [Klebsiella phage vB_KpnP_FZ12]	100%(148/148)	6.00E-104	QCG76478.1
49	DNA packaging protein [Klebsiella phage Kund-ULIP54]	99%(583/585)	0	QBG78391.1
50	Homing endonuclease [Klebsiella phage vB_KpnP_IME321]	99%(142/144)	6.00E-102	YP_009806256.1

注释结果中有 4 个调节蛋白。ORF1 编码 OCR (overcome classical restriction)蛋白,该蛋白在噬菌体

基因组进入宿主细胞质时由细菌的 RNA 聚合酶转录后翻译, 然后与细菌的限制修饰系统 (Restriction-Modification, RM) 结合, 抑制细菌的限制性内切酶活性并保护噬菌体基因组免受降解^[10]。ORF5 的编码产物具有丝氨酸/苏氨酸激酶功能, 磷酸化宿主 RNA 聚合酶, 阻断宿主转录, 开启病毒 RNA 聚合酶的转录^[11]。ORF6 编码 DNA 依赖的 RNA 聚合酶, 可催化中晚期噬菌体基因的转录^[12]; ORF23 编码 Gp4.5, 该蛋白可与宿主蛋白酶离子相互作用, 以中和抗毒素的降解, 抑制宿主的免疫系统—毒素抗毒素 (TA) 系统, 防止细菌自杀导致感染失败^[13]。

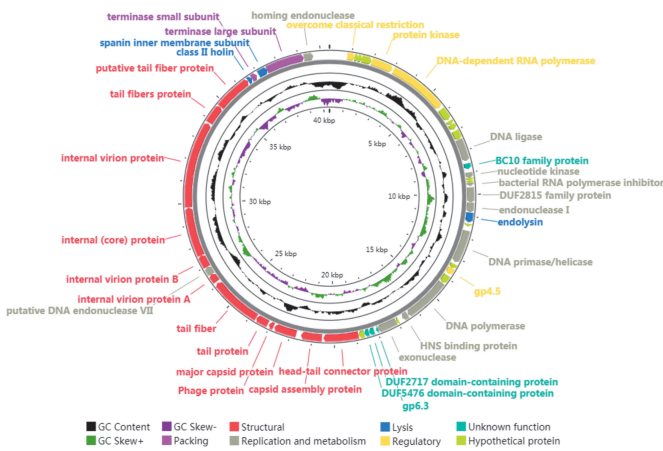


图 3 噬菌体 Pdz533 基因组注释图谱
Fig. 3 Genomic map of phage Pdz533 with annotation

与噬菌体 DNA 复制和代谢相关的蛋白有 11 个。其中, 与 DNA 复制相关的蛋白有 10 个: ORF11 编码噬菌体相关的 DNA 连接酶, 此酶具有转录开关的功能, 可取消噬菌体早期基因的转录, 允许中晚期基因的转录; ORF16 编码细菌 RNA 聚合酶抑制剂; ORF17 属于单链 DNA 结合蛋白, 参与病毒 DNA 的复制; ORF18 编码核酸内切酶 I, ORF21 的编码产物兼具解旋酶和引物酶的作用, 参与病毒 DNA 的复制和重组; ORF25 编码 DNA 聚合酶, ORF26 编码 HNS 结合蛋白; ORF28 编码核酸外切酶, 参与去除 DNA 连接的 RNA 引物, ORF40 定编码假定的 DNA 内切酶 VII, ORF50 编码归巢核酸内切酶。与代谢相关的蛋白为 ORF13(核苷酸激酶), 可催化 dGMP 和 dTMP 磷酸化为 dGDP 和 dTDP。

结构蛋白 12 个: ORF33(头尾连接蛋白), ORF34(支架蛋白), ORF35(主要衣壳蛋白), ORF36(假定次要衣壳蛋白), ORF37(尾管蛋白 A), ORF38(尾管蛋白 B), ORF39(内部病毒体蛋白 A), ORF41(内部病毒体蛋白 B), ORF42(内部核心蛋白), ORF43(内部病毒体蛋白), ORF44(尾丝蛋白), ORF45(假定尾丝蛋白)。

与宿主裂解相关的蛋白 3 个: ORF19, ORF46, ORF48。其中, ORF19 具有内溶素的功能, 可降解细胞的肽聚糖; ORF46 是 II 类胆碱, 作用于细菌的细胞膜, 与 ORF19 一起参与宿主细胞的裂解; ORF48 是 Spanin inner membrane subunit, 可破坏宿主细胞外膜并参与细胞裂解, 在胆碱 (ORF46) 和内溶素 (ORF19) 与细胞膜和肽聚糖的作用完成后, Spanin inner membrane subunit 通过破坏外膜完成裂解宿主细胞的最后一步。

包装蛋白 2 个: ORF47(末端酶小亚基) 和 ORF49(末端酶大亚基)。ORF47 参与识别被包被的病毒 DNA, ORF49 具有核酸内切酶的活性, 可精确切割病毒基因组以启动和结束包装反应。

4.3 噬菌体 Pdz533 的比较基因组分析 使用 NCBI 网站上的 BLASTn 程序对 Pdz533 进行全基因组比对, 结果显示 Pdz533 与 *Autographiviridae* 科 *Studiervirinae* 亚科 *Przondovirus* 属的噬菌体基因组相似度高, 选择 Score 最高的 *Klebsiella* phage K5-2 (NC_047798.1, 覆盖度 90%, 一致性 91.35%, E=0)、*Klebsiella* phage Kund-ULIP47 (MK380015.1, 覆盖度 88%, 一致性 96.39%, E=0)、*Klebsiella* phage KN1-1 DNA (NC_048129.1, 覆盖度 87%, 一致性 90.93%, E=0) 和 *Klebsiella* phage Kp_Pokalde_002 (MT425185.1, 覆盖度 88%, 一致性 90.87%, E=0) 4 株噬菌体, 使用 Mauve 软件进行共线性分析, 结果如图 4。5 株噬菌体的同源基因排布顺序一致, 未出现序列的重排、插入及倒置等。表明 Pdz533 与 *Przondovirus* 属噬菌体具有相似的保守框架, 共线性强。

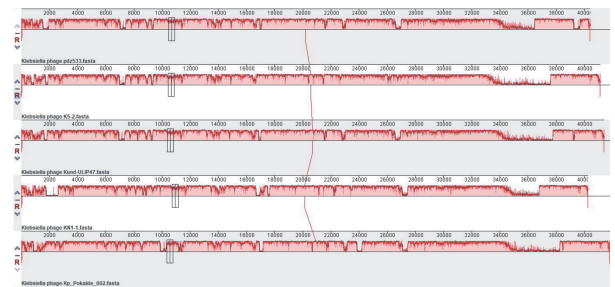


图 4 噬菌体 Pdz533 共线性分析图谱
Fig. 4 Collinearity analysis of phage Pdz533

根据国际病毒分类委员会 (ICTV) 制定的物种划分标准, 同一物种的两个噬菌体之间的核苷酸序列差异应小于 5%^[12]。为了进一步检查 Pdz533 和相似度最高的 *Klebsiella* phage K5-2 (NC_047798.1, 覆盖度 90%, 一致性 91.35%, E=0) 之间的关系, 计算两者的 ANI 分值为 91.27%, 进一步表明噬菌体 Pdz533 是 *Przondovirus* 属的一个新物种的成员。

4.4 噬菌体 Pdz533 进化分析 为明确噬菌体

Pdz533 的进化关系,选择 Pdz533 中具有进化意义的主要衣壳蛋白(ORF35)和 DNA 多聚酶(ORF25)的蛋白序列,在 NCBI 数据库中用 blastp 进行蛋白比对,选择与之相似蛋白序列及 *Autographiviridae* 科噬菌体相关蛋白序列构建系统进化树,结果如图 5。根据 ICTV 的分类,确定噬菌体 Pdz533 为 *Autographiviridae* 科 *Studiervirinae* 亚科的 *Przondovirus* 属的一个种。

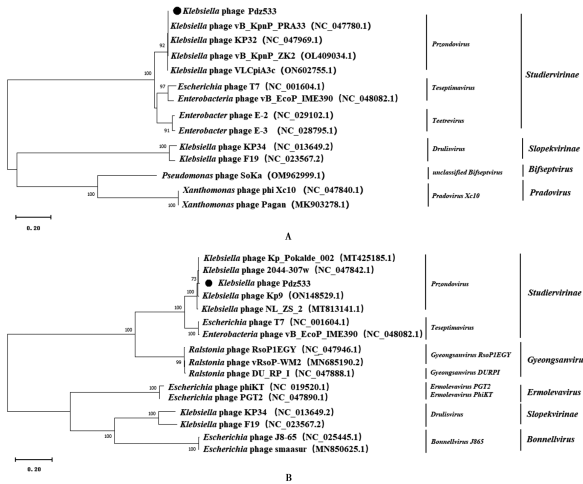


图 5 噬菌体 Pdz533 主要衣壳蛋白(A)和 DNA 聚合酶(B)系统进化树
Fig. 5 Phylogenetic trees were formed by major capsid protein(A) and DNA polymerase(B)

讨论

细菌抗生素耐药日趋严重,而新抗生素的开发进入瓶颈^[14],寻找替代或辅助抗生素治疗的抗菌制剂成为新的研究方向,其中噬菌体的使用备受关注。有关噬菌体治疗的项目研究正在进行中,目前全球已有 8 家企业开发上市了近 30 种噬菌体制剂^[7]。噬菌体裂解细菌具有宿主特异性强这一优点,但这也导致其噬菌谱窄。当前全噬菌体治疗最常见的是噬菌体混合制剂的鸡尾酒疗法^[7]。所以不断筛选新噬菌体可以为临床治疗提供更多的支持。

本研究以留置导尿管尿液中的肺炎克雷伯菌 Fb533 为宿主菌,从市政污水中筛选到了 1 株裂解性噬菌体 Pdz533。Pdz533 的 32 株宿主菌分别分离自河南省的不同医院、不同科室。其中有 2 株为耐碳青霉烯菌株(占比 6.25%),24 株为高黏液表型菌株(占比 75%),其余 6 株为普通菌株。菌株来源患者的年龄从 30 岁到 73 岁不等,其中 50 岁以上的患者占 75%。宿主菌的标本类型呈多样化,其中呼吸道标本(咽拭子、痰液、肺泡灌洗液和气道)14 份(占 43.75%),血液标本 5 份(占 15.6%),消化道标本 5 份(占 15.6%),尿液标本 4 份(占 12.5%),其他来源 4 份(占 12.5%)。宿主菌标本来自普通病房占 53.1%,略高于 ICU。其

中,耐碳青霉烯菌标本来自普通病房和 ICU 各 1 份。

噬菌体 Pdz533 可在 Fb533 菌苔上形成完全透明且周围有一圈晕的噬菌斑,表明该噬菌体不但裂解能力强,而且还可产生多糖解聚酶^[15]。通常噬菌体的尾丝蛋白、尾刺蛋白或尾管蛋白具有解聚酶的活性,可降解细菌外面的黏液层即荚膜多糖和胞外多糖,丢失了荚膜的肺炎克雷伯菌致病力显著降低,很容易被体内免疫系统或噬菌体消灭。电镜观察 Pdz533 为短尾噬菌体,具有二十面体头部和非收缩性尾部。一步生长曲线显示 Pdz533 潜伏期为 10 min,爆发量约为 40 PFU/ml。Pdz533 具有一定的热稳定性和酸碱稳定性,在 4~50 °C 及 pH6~10 范围内其活性无明显变化。以上表明 Pdz533 具有替代或辅助抗菌药物用于临床治疗肺炎克雷伯菌感染的潜力。

对 Pdz533 的基因组进行测序,其基因全长 40 416 bp,双链线性 DNA。在 NCBI 上用 Blastn 程序对 Pdz533 的全基因组比对,结果显示其与 *Studiervirinae* 亚科的 *Przondovirus* 属肺炎克雷伯菌噬菌体 K5-2(NC_047798.1)、Kund-ULIP47(MK380015.1)、KN1-1 DNA(NC_048129.1)和 Kp_Pokalde_002(MT425185.1)相似度高。比较基因组学分析表明,Pdz533 与 *Przondovirus* 属噬菌体具有相似的保守框架结构。使用噬菌体保守蛋白构建进化树,进一步证明 Pdz533 与 *Przondovirus* 属的噬菌体亲缘关系较近。因此认为 Pdz533 为 *Przondovirus* 属的一个新成员。ICTV 数据库显示,目前该属有 29 个种,所有成员几乎均是肺炎克雷伯菌噬菌体。该属噬菌体基因组较小,在 40~42 kb 之间,(G+C)百分含量在 51.4%~53.5% 范围内。Pdz533 的基因组大小和(G+C)百分含量与 *Przondovirus* 属成员一致。对噬菌体基因组进行预测,Pdz533 不含 tRNA、毒力因子基因及抗生素抗性基因,表明该噬菌体用于临床治疗具有安全性。

本研究分析了 1 株肺炎克雷伯菌裂解性噬菌体 Pdz533 的生物学特性及全基因组特点。有关 Pdz533 的体内动物实验和药代动力学尚需进一步研究。对于耐碳青霉烯和高黏液表型的肺炎克雷伯菌感染的治疗,除了直接应用噬菌体外,Pdz533 解聚酶的作用也值得进一步探索。

【参考文献】

- [1] 蒋玉婷,张珂,刘唐娟,等.高毒力肺炎克雷伯菌毒力和耐药机制研究进展[J].中国感染控制杂志,2021,20(5):473-480.
- [2] 田李均,王晓丽,肖淑珍,等.医院内高黏液性肺炎克雷伯菌的流行分布、毒力基因及临床特征分析[J].上海交通大学学报(医学版),2017,37(1):43-48.
- [3] 全国细菌耐药监测网.2021年全国细菌耐药监测报告(简要版)

- [EB/OL]. (2023-1-10)[2023-3-01]. <http://www.carss.cn/Report/Details?aid=862>.
- [4] Li W, Sun G, Yu Y, et al. Increasing occurrence of antimicrobial-resistant hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* isolates in China[J]. Clin Infect Dis, 2014, 58(2): 225-232.
- [5] Yao B, Xiao X, Wang F, et al. Clinical and molecular characteristics of multi-clone carbapenem-resistant hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* isolates in a tertiary hospital in Beijing, China[J]. Int J Infect Dis, 2015, 37: 107-112.
- [6] 胡福泉. 噬菌体的过去、现在与未来[J]. 西南医科大学学报, 2021, 44(5): 417-424.
- [7] 张志宏, 钟佑宏, 王鹏. 噬菌体疗法的研究现状[J]. 中国热带医学, 2021, 21(7): 698-703.
- [8] 张改, 黄德海, 靳静, 等. 肺炎克雷伯菌噬菌体 LH-02 的生物学特性及基因组初步研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2016, 11(1): 9-12.
- [9] Ye F, Kotta-Loizou I, Jovanovic M, et al. Structural basis of transcription inhibition by the DNA mimic protein Ocr of bacteriophage T7[J]. Elife, 2020, 9: e52125-45.
- [10] 高明明, 王灿, 李璞媛, 等. 一株新型裂解 K63 荚膜型肺炎克雷伯菌的噬菌体分离鉴定和生物学特性研究及全基因组分析[J]. 微生物学通报, 2020, 47(1): 210-221.
- [11] Marchand I, Nicholson AW, Dreyfus M. Bacteriophage T7 protein kinase phosphorylates RNase E and stabilizes mRNAs synthesized by T7 RNA polymerase[J]. Mol Microbiol, 2001, 42(3): 767-776.
- [12] Zhang H, Lee SJ, Zhu B, et al. Helicase-DNA polymerase interaction is critical to initiate leading-strand DNA synthesis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(23): 9372-9377.
- [13] Sberro H, Leavitt A, Kiro R, et al. Discovery of functional toxin/antitoxin systems in bacteria by shotgun cloning[J]. Mol Cell, 2013, 50(1): 136-148.
- [14] Willyard C. The drug-resistant bacteria that pose the greatest health threats[J]. Nature, 2017, 543(7643): 15.
- [15] Majkowska-Skrobek G, Latka A, Berisio R, et al. Phage-borne depolymerases decrease *Klebsiella pneumoniae* resistance to innate defense mechanisms[J]. Front Microbiol, 2018, 9: 2517-2528.

【收稿日期】 2023-05-16 【修回日期】 2023-08-06

(上接 1302 页)

- [31] Shannon P, Markiel A, Ozier O, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks[J]. Genome Res, 2003, 13(11): 2498-2504.
- [32] 李锦田, 马瑞丽, 吕国栋, 等. 细粒棘球绦虫蛋白激酶 B AKT2 的生物信息学及系统发育树分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2020, 15(12): 1411-1416, 1421.
- [33] 库尔班尼沙·阿马洪, 刘辉, 李锦田, 等. 细粒棘球绦虫葡萄糖转运蛋白 GLUT3 的生物信息学分析及系统发育树[J]. 中国病原生物学杂志, 2020, 15(8): 910-916.
- [34] 颜明智, 李锦田, 刘辉, 等. 细粒棘球绦虫腺苷酸活化蛋白激酶 AMPK α 生物信息学分析[J]. 新疆医科大学学报, 2021, 44(3): 266-273.
- [35] Tang B, Pan Z, Yin K, et al. Recent advances of deep learning in bioinformatics and computational biology[J]. Front Genet, 2019, 10: 214.
- [36] Itahana Y, Han R, Barbier S, et al. The uric acid transporter SLC2A9 is a direct target gene of the tumor suppressor p53 contributing to antioxidant defense[J]. Oncogene, 2015, 34(14): 1799-1810.
- [37] 唐媛, 李春花, 张瑗, 等. 蛋白质的二级结构预测研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(26): 5180-5182.
- [38] Tani K, Fujiyoshi Y. Water channel structures analysed by electron crystallography[J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1840(5): 1605-1613.
- [39] Jiang X. An overview of the *Plasmodium falciparum* hexose transporter and its therapeutic interventions[J]. Proteins, 2022, 90(10): 1766-1778.
- [40] Deng D, Yan N. GLUT, SGLT, and SWEET: Structural and mechanistic investigations of the glucose transporters[J]. Protein Sci, 2016, 25(3): 546-558.
- [41] Schiano Lomoriello I, Sigismund S, Day KJ. Biophysics of endocytic vesicle formation: A focus on liquid-liquid phase separation[J]. Curr Opin Cell Biol, 2022, 75: 102068.
- [42] de Jong OG, Murphy DE, Mager I, et al. A CRISPR-Cas9-based reporter system for single-cell detection of extracellular vesicle-mediated functional transfer of RNA[J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 1113.

【收稿日期】 2023-05-26 【修回日期】 2023-08-17