

网络出版时间:2016/1/28 14:23:09 网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160128.1423.002.html

◇基础医学研究◇

一株弗氏柠檬酸杆菌噬菌体 IME-CF2 的分离、测序及全基因组分析

刘小东^{1,2}, 王伟², 黄勇², 张湘莉兰², 孙强², 安小平², 米志强², 童贻刚^{1,2}

摘要 目的 从医院污水中分离一株能裂解弗氏柠檬酸杆菌的噬菌体,观察其形态,并进行全基因组测序和全基因组分析,为治疗和控制弗氏柠檬酸杆菌感染提供基础。方法 以弗氏柠檬酸杆菌为宿主,从医院污水分离噬菌体,用透射电镜观察其形态;使用 Ion Torrent 测序平台进行噬菌体全基因组测序,测序后进行噬菌体全基因组序列组装、注释、进化分析和比较分析。结果 成功分离一株弗氏柠檬酸杆菌噬菌体,命名为 IME-CF2;电镜观察显示,该噬菌体具有二十面体的头部,形态类似肌尾噬菌体科;IME-CF2 核酸类型为 DNA,基因组全长为 177 685 bp, GC 含量为 43.2%;编码 267 个编码区(CDS),2 个 tRNA;进化分析表明,IME-CF2 属于 T4 类噬菌体,全基因组比较分析表明,IME-CF2 与柠檬酸杆菌噬菌体 Miller 同源性最高。结论 分离鉴定了一株弗氏柠檬酸杆菌噬菌体,进行了全基因组测序和分析,为噬菌体治疗多重耐药细菌奠定了基础。

关键词 弗氏柠檬酸杆菌;噬菌体;全基因组测序;基因组分析

中图分类号 Q 939.48

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)03-0315-05

弗氏柠檬酸杆菌属肠杆菌科枸橼酸杆菌属,是发酵型革兰阴性菌,广泛存在于自然环境中,是人体肠道正常菌群,也是条件致病菌。近年来,随着抗生素的滥用,弗氏柠檬酸杆菌对常见的抗生素产生耐药^[1],给临床感染治疗带来极大挑战。噬菌体是一种能特异性感染细菌的病毒,广泛存在于自然环境中,毒性噬菌体能引起宿主菌裂解死亡^[2]。噬菌体

是一种潜在的抗生素替代品,能有效治疗细菌性感染,同时减轻细菌耐药的发生。目前,噬菌体与抗生素联合用药及多种噬菌体鸡尾酒疗法对细菌性感染的治疗效果较好^[3-4]。该研究从医院污水中分离一株毒性弗氏柠檬酸杆菌噬菌体 IME-CF2,并对其进行了全基因组测序、基因组分析及进化分析。现将结果报告如下。

1 材料与方 法

1.1 材料 弗氏柠檬酸杆菌分离于中国人民解放军 307 医院检验科,经过生化性质鉴定和 16S rDNA 测序鉴定,保藏于本实验室。

1.2 方 法

1.2.1 IME-CF2 的分离与鉴定 取未经处理的解放军 307 医院污水,12 000 r/min 离心 10 min,收集上清液,并通过 0.45 μm 的滤膜。取上述过滤液 0.100 ml,加入到 5 ml 对数期指示菌弗氏柠檬酸杆菌中,于 37 °C 震荡过夜培养。第 2 天,取培养液 12 000 r/min 离心 10 min,收集上清液,并通过 0.45 μm 的滤器,所得过滤液即为噬菌体原液。使用噬菌体原液点滴法检测是否分离到敏感性噬菌体。在铺有指示菌的双层平板 2 区域滴加 0.001 5 ml 的噬菌体原液,1 区域滴加 0.001 5 ml 的 PBS(磷酸盐缓冲液)作为阴性对照组;观察有无噬菌斑。

将上述敏感性噬菌体原液梯度系列稀释后与对数期指示菌混匀铺板做空斑形成实验。37 °C 温箱孵育 6 h,挑取单个噬菌斑接种到对数期的指示菌中;37 °C 震荡培养 6 h 后,再次铺双层琼脂板观察噬菌斑,重复 3 次挑取单个空斑过程,分离到纯种噬菌体。

1.2.2 IME-CF2 电镜观察 噬菌体样品使用磷钨酸染色 2 min,室温干燥后在 Philips TECNAI-10 型透射电子显微镜(TEM)下观察噬菌体的形态。

1.2.3 IME-CF2 基因组 DNA 提取 参照 Lu et al^[5]的方法(略有改动),抽提核酸。取 0.600 ml 的噬菌体液(滴度约 4.3×10^{12} PFU/L),加入胰 DNase

2016-01-08 接收

基金项目:国家高技术研究发展计划(863 计划)(编号:2012AA022003,2014AA021402);国家科技重大专项课题(编号:2013ZX10004605,2013ZX10004217-002-003)

作者单位:¹安徽医科大学军事医学科学院微生物流行病学研究所,合肥 230032

²军事医学科学院微生物流行病学研究所,病原微生物生物安全国家重点实验室,北京 100071

作者简介:刘小东,男,硕士研究生;

童贻刚,男,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: tong62035@gmail.com

I 和 RNase A 至终浓度 1 mg/L, 37 °C 过夜处理, 随后 80 °C 灭活 15 min, 以使上述酶失活。然后加入 0.5 mol/L EDTA (终浓度 0.02 mol/L), 20 g/L 蛋白酶 K (终浓度 50 mg/L), 10% SDS (终浓度 0.5%), 56 °C 水浴 1 h。加入等体积酚抽提核酸, 10 000 r/min 离心 5 min, 转移上层水相到一新的 1.5 ml 离心管中。向上述离心管中加入等体积的酚-氯仿-异戊醇 (25:24:1), 温和混匀后 10 000 r/min 离心 5 min, 以去除蛋白、糖类等物质污染。取上述离心管中水相到一个新的离心管中, 并加入等体积异戊醇, -20 °C 下静置 3 h 后 12 000 r/min 离心 25 min, 收集沉淀。用 75% 的冰乙醇洗涤上述 DNA 沉淀, 室温干燥后用去离子水重悬浮上述 DNA 沉淀。

1.2.4 IME-CF2 高通量测序文库的构建与上机
取 0.100 mg 的高质量噬菌体基因组 DNA 加水稀释到 0.050 mg, 超声打断约 20 min, 末端补平, 两端链接接头。加入 1.8 倍体积的 AMPure XP Beads 纯化 DNA, 使用 E-Gel 胶选择长约 380 bp 的 DNA 片段。PCR 扩增上述 DNA 片段, 加入 1 倍体积的 AMPure XP Beads 纯化 PCR 扩增产物。随后取上述文库进行油包水 PCR 反应, 碱法制备单链 DNA 测序模板。最后将带有模板的微磁珠离心到 318C 芯片的微孔中, 上机测序。

1.2.5 IME-CF2 全基因组序列分析 IME-CF2 全基因组序列组装使用 Newbler v2.9 (454 Life Sciences Corporation) 软件。全基因组使用 RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology)^[6] 和 BASys (Bacterial Annotation System) 在线注释。序列相似性比对分析使用 BLAST 在线工具及 mauve v. 2.3.1, 使用 MEGA5.0 建立进化树。使用 DNA-Plot1.11 绘制基因组圈图。

2 结果

2.1 IME-CF2 的形态 弗氏柠檬酸杆菌 888 分离于解放军 307 医院患者血液, 抗生素耐药性见表 1。以上述弗氏柠檬酸杆菌 888 作指示菌, 成功从污水中分离到一株毒性弗氏柠檬酸杆菌噬菌体, 命名为 IME-CF2。IME-CF2 能在铺有指示菌的双层平板上 2 区形成透亮的圆形噬菌环, 而点有 PBS 的对照区 1 区无明显变化, 见图 1A。IME-CF2 能形成直径约 1 mm 清晰透亮的噬菌斑, 见图 1B。电镜照片表明该噬菌体具有典型的二十面体结构和以收缩的尾部, 头部直径约 0.080 μm, 尾部长约 0.120 μm, 属于肌尾噬菌体科, 见图 2。根据国际委员会关于

噬菌体命名的方法, 该噬菌体可命名为 vB_CFRM-IME-CF2。

表 1 弗氏柠檬酸杆菌 888 抗生素耐药性

抗菌药物	MIC (mg/L)	敏感度	抗菌药物	MIC (mg/L)	敏感度
复方新诺明	≤20	S	头孢替坦	≤4	R
左氧氟沙星	0.5	S	头孢曲松	≤1	S
哌拉西林	≤4	S	头孢唑啉	≥64	R
头孢呋辛酯	4	R	呋喃妥因	≤16	S
头孢呋辛	4	S	妥布霉素	≤1	S
头孢他啶	≤1	S	头孢吡肟	≤1	S
哌拉西林	≤4	S	庆大霉素	≤1	S
美罗培南	≤0.25	S	氨基糖苷	≤1	S
环丙沙星	≤0.25	S	亚胺培南	≤1	S

S: 敏感; I: 中介度; R: 耐药

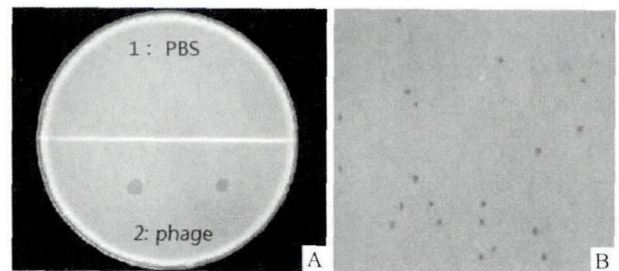


图 1 铺板实验结果

A: 噬菌体原液点板实验; B: 噬菌体 IME-CF2 稀释 107 倍后铺板



图 2 噬菌体 IME-CF2 电镜图 ×30 000

2.2 IME-CF2 全基因组测序和组装 约 0.600 ml 的噬菌体液 (滴度约 4.3×10^{12} PFU/L) 用于基因组 DNA 提取, 成功提取浓度为 178 g/L 的高质量噬菌体核酸。约 0.100 mg 的噬菌体基因组 DNA 用于构建测序文库, 测序约产生 694 679 条平均长度 287 bp 的高质量测序片段 (Reads), 约 200 543 826 个碱基, 测序深度高达 1 129 倍 ($200\ 543\ 826 \div 177\ 689 \approx 1\ 129$)。约有 17 280 条平均长度约 266 bp 的 Reads 用于基因组序列组装, 参与组装碱基约 4 606 735 个, 平均覆盖倍数为 26 ($4\ 606\ 735 \div 177\ 689 \approx 26$) 倍。噬菌体 IME-CF2 基因组组装结果产生长约 177 kbp 的单一 contig (重叠群), 随后成功环化此重叠群, 即测序数据分析可知该噬菌体基因组是环状的。

环化后完整基因组长度为 177 685 bp。

2.3 IME-CF2 高通量测序 (HTS) 高频序列分析

噬菌体末端序列通常在其基因组复制、包装等方面有重要作用。序列分析发现,噬菌体高通量测序中高频出现的测序序列就是该噬菌体末端序列^[7]。根据文献^[8]建立的病毒基因组末端结构分析方法,通过把所有原始高通量测序的 Reads 映射到(mapping)到组装好基因组上,统计分析所有 Reads 的出现次数,并根据出现次数从高到底排序。大部分高通量测序 Reads 重复次数小于 10,没有特别高频的测序 Reads 出现,见图 3(X 轴表示 Reads 重复次数取值范围。例如, X = 10 表示 Reads 重复次数在 0 到 10 之间的所有测序 Reads 总数, X = 15 表示 Reads 重复次数在 10 到 15 之间的所有测序 Reads 总数。Y 轴表示 Reads 条数的统计)。高通量测序 Reads 的排序,见图 4,只列出前 20 条。从该图可以看出最高频的序列大概出现 20 多次,没有特别高频的序列出现,符合上述统计。所以,IME-CF2 没有固定的基因组末端序列,复制时开环及末端切割是随机的。

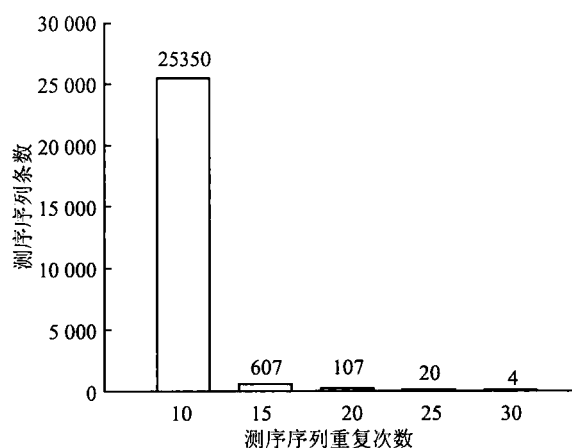


图 3 HTS 数据 Reads 统计图

2.4 IME-CF2 基因组分析 IME-CF2 全基因组长度为 177 685 bp, 基因组 A、C、G、T 碱基含量分别为 28.3%、21.8%、21.4% 和 28.5%, GC 含量为 43.2%, 共有 269 个开放阅读框 (ORFs), 包括 267 个 CDS 和 2 个 tRNA。269 个 ORF 中大部分 ORF 的

起始密码是 ATG, 约占 91%。CDS 核酸序列长度在 117 ~ 3 360 bp, 对应的蛋白质序列长度在 38 ~ 1 219 aa。全部的 ORF 共含 166 089 bp 的碱基, 基因组基

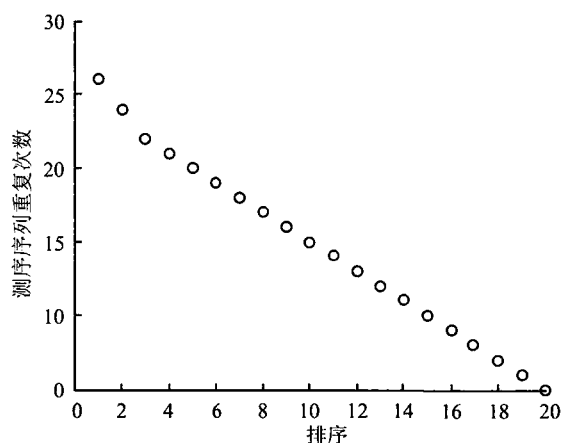


图 4 前 20 个高频 Reads 的排序

因密度高达 94%。图 5 为 IME-CF2 全基因组圈图: 共 6 圈, 由外到内依次为线性基因组长度代表、位于正链 CDS、位于负链 CDS、gene 和 tRNA、GC 含量和 GC 偏移。由图可以看出编码区在该噬菌体正负链上长度大约相等, 基因成簇分布, 相似功能的基因邻近, 符合 T4 类噬菌体基因组特征。BLASTN 比对表明 IME-CF2 与柠檬酸杆菌噬菌体 Miller (178 Kbp) 的同源性最高, 其次是肠道菌噬菌体 RB43 (179 Kbp), 比对覆盖率分别为 97% 和 92%。Miller 分离于美国、RB43 分离于法国, 核酸序列 GenBank 登录号分别为 KM236237 和 HE858210。表 2 为三株噬菌体碱基组成比较。图 6 为 MAUVE v. 2.3.1 所作三株噬菌体之间的同源分析图, 可见基因组高度同源, 没有发现大的插入、缺失等突变, 基因组间同源性较高。

2.5 IME-CF2 功能性 ORF 分析 使用 BLASTP 分析, 将具有推定基因功能的 ORF 分成 4 类: 结构与包装模块 (红色); 生物合成与代谢模块 (蓝色); 裂解相关基因 (黄色); 假想蛋白 (灰色), 见图 5。

使用 BLASTP 对蛋白序列分析表明, ORF262 (噬菌体末端酶大亚基) 和 ORF264 (噬菌体末端酶小亚基) 在噬菌体包装时起重要作用。ORF259 (噬

表 2 IME-CF2 与其近源株噬菌体基因组碱基组成的比较

噬菌体	基因组长度 (bp)	A 含量 (%)	C 含量 (%)	G 含量 (%)	T 含量 (%)	G + C (%)	CDS	tRNA
IME-CF2	177 685	28.3	21.8	21.4	28.5	43.2	267	2
Miller	178 171	28.5	21.4	21.8	28.4	43.1	277	1
RB43	179836	28.5	21.4	21.8	28.3	43.2	285	0

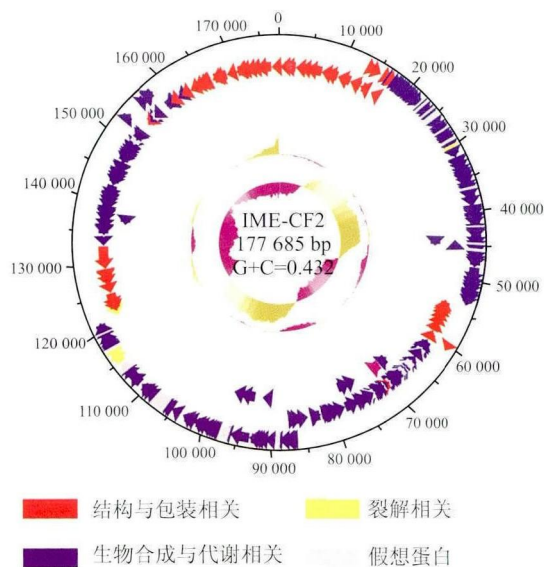


图5 噬菌体 IME-CF2 全基因组圈图

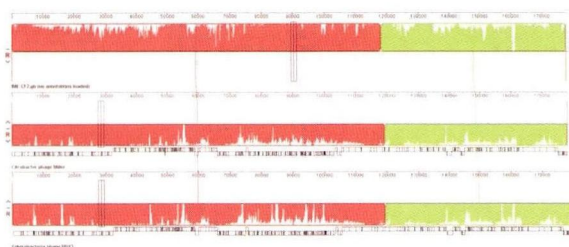


图6 IME-CF2 与其他 2 株近源噬菌体的同源分析

菌体口蛋白)编码的蛋白质能使细菌细胞膜形成空洞,这有利于噬菌体基因组核酸注入到受体细菌,同时该蛋白还具有链接噬菌体头部与尾部的功能。通常上述三个 ORF 在基因组上临近。结构蛋白 ORF254(主要衣壳蛋白)1 575 bp 是噬菌体主要衣壳蛋白,与包装蛋白邻近。ORF201 ~ ORF207 编码噬菌体尾部相关蛋白,ORF93 ~ ORF100 主要负责噬菌体尾部基板,这两个基因簇在噬菌体感染、吸附宿主菌时发挥重要作用。

噬菌体 DNA 复制及调控相关基因主要包括: ORF159(DNA 聚合酶), ORF162(DNA 引物酶), ORF187(DNA 拓扑异构酶), ORF251(单链 DNA 结合蛋白), ORF248(DNA 解旋酶)和 ORF184(转录调控因子)等。ORF160(噬菌体重组蛋白)与噬菌体基因组 DNA 整合到宿主基因组有关。

ORF50(噬菌体裂解酶)和 ORF200(溶菌蛋白)是噬菌体裂解相关基因。ORF200 编码穿孔蛋白,使细菌细胞膜穿孔。该噬菌体可能是通过同时表达上述两种蛋白来介导宿主细胞裂解的。

2.6 IME-CF2 进化分析 为了分析 IME-CF2 与其他噬菌体之间的关系,采用噬菌体 IME-CF2 主要衣壳蛋白(ORF254)序列构建了进化树。ClustalW multiple alignments 软件比对主要衣壳蛋白氨基酸序列,使用 Neighbor-Joining 建树。括号为用于比对的各噬菌体蛋白质序列登录号。(图 7)。IME-CF2 与柠檬酸杆菌噬菌体 Miller 及肠道菌噬菌体 RB43 处于同一分支,即 IME-CF2 与 Miller 及 RB43 亲缘关系最近,属 T4 类噬菌体,与全基因组比较分析相吻合。

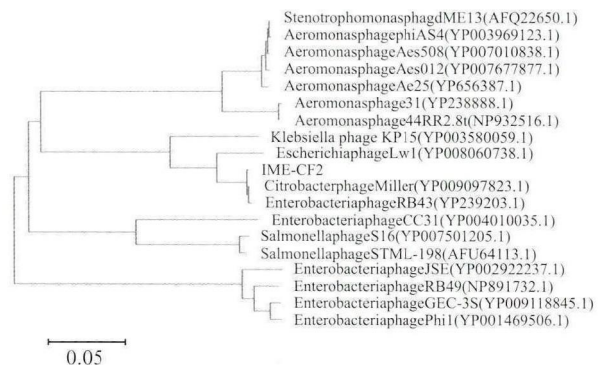


图7 使用噬菌体主要衣壳蛋白制作的进化树

3 讨论

噬菌体是细菌病毒,是自然界中最具多样性的生物之一。相对于抗生素治疗,噬菌体疗法具有其突出优势,噬菌体是自然界存在的生物,生产成本低,对细菌有高度特异性,不破坏有益菌群,一旦目标细菌被清除噬菌体也自动消失^[9]。面对日益严峻的细菌耐药问题,噬菌体疗法重新获得人们的关注,展现出广阔的前景。为了解决抗生素耐药问题,美国在 20 世纪 90 年代兴起一些噬菌体研究公司^[10]。由于噬菌体具有严格的宿主特异性,以及细菌在与噬菌体相互进化过程中会对噬菌体产生耐受,单一噬菌体制剂将不能满足治疗要求。噬菌体混合制剂鸡尾酒疗法及个性化噬菌体治疗方法可能是未来噬菌体治疗的研究方向之一。此外,有些噬菌体携带耐药基因甚至毒力基因,使得它们不可直接用于治疗^[11]。因此,对噬菌体进行分离、鉴定、全基因组测序及基因组学分析显得十分重要,不仅能够获得该噬菌体全面清晰的遗传信息及进化信息而且能为噬菌体治疗奠定理论基础。

综上所述,本实验利用分离于 307 医院检验科的耐药弗氏柠檬酸杆菌作指示菌,成功从医院污水中分离一株毒性噬菌体,命名为 IME-CF2。该噬菌

体可在铺有指示菌的双层平板上形成清晰透亮的噬菌斑,预示着 IME-CF2 是一株毒性弗氏柠檬酸杆菌噬菌体,在预防和治疗弗氏柠檬酸杆菌感染方面具有潜在应用价值。电镜下 IME-CF2 具有典型的二十面体结构及可收缩的尾部,具有典型的肌尾噬菌体科噬菌体形态。基因组学分析表明,IME-CF2 与 Miller 及 RB43 相似,功能相关基因成簇分布,具有典型的 T4 类噬菌体基因结构,同时进化分析表明三者聚类到同一分支。综合以上分析,可以确定噬菌体 IME-CF2 属双链 DNA 噬菌体下有尾噬菌体目、肌尾噬菌体科的 T4 类噬菌体。噬菌体 IME-CF2 生物学活性实验与动物实验值得深入研究。

(噬菌体 IME-CF2 全基因组核酸序列 GenBank 登录号:KR869820)

参考文献

- [1] Nayar R, Shukla I, Ali S M. Evaluation of the virulence markers in the clinical isolates of citrobacter species: the first report from India [J]. J Clin Diagn Res, 2013, 7(6): 1031-4.
- [2] Sulakvelidze A. Bacteriophage: A new journal for the most ubiquitous organisms on Earth [J]. Bacteriophage, 2011, 1(1): 1-2.
- [3] Schmerer M, Molineux I J, Bull J J. Synergy as a rationale for phage therapy using phage cocktails [J]. Peer J, 2014, 2: e590.
- [4] Hagens S, Habel A, Bläsi U. Augmentation of the antimicrobial efficacy of antibiotics by filamentous phage [J]. Microb Drug Resist, 2006, 12(3): 164-8.
- [5] Lu S, Le S, Tan Y, et al. Genomic and proteomic analyses of the terminally redundant genome of the Pseudomonas aeruginosa phage PaP1: establishment of genus PaP1-like phages [J]. PLoS One, 2013, 8(5): e62933.
- [6] Overbeek R, Olson R, Pusch G D, et al. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST) [J]. Nucleic Acids Res, 2014, 42(D1): D206-D14.
- [7] 李莎莎, 范航, 安小平, 等. 采用高通量测序技术分析尾病毒目噬菌体基因组末端序列特点 [J]. 病毒学报, 2013, 1(29): 39-43.
- [8] Li S, Fan H, An X, et al. Scrutinizing virus genome termini by high-throughput sequencing [J]. PLoS One, 2014, 9(1): e85806.
- [9] Kutateladze M, Adamia R. Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics [J]. Trends Biotechnol, 2010, 28(12): 591-5.
- [10] Abedon S T, Kukl S J, Blasdel B G, et al. Phage treatment of human infections [J]. Bacteriophage, 2011, 1(2): 66-85.
- [11] Li X, Ding P, Han C, et al. Genome analysis of Enterococcus faecalis bacteriophage IME-EF3 harboring a putative metallo-beta-lactamase gene [J]. Virus Genes, 2014, 49(1): 145-51.

Isolation, sequencing and complete genome sequence analysis of bacteriophage IME-CF2 infecting *Citrobacter freundii*

Liu Xiaodong^{1,2}, Wang Wei², Huang Yong², et al

(¹Anhui Medical University, Hefei 230032; ²State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Beijing Institute of Microbiology and Epidemiology, Beijing 100071)

Abstract Objective To isolate a lytic bacteriophage against *Citrobacter freundii* from hospital sewage, study its morphology and analyze its genome so as to provide basis for treatment and infection control of antibiotics-resistant *Citrobacter freundii*. **Methods** A bacteriophage was isolated from hospital sewage using *Citrobacter freundii* as host cell. Phage morphology was observed using a transmission electron microscope and its genome was sequenced using Ion Torrent sequencing platform. Genome annotation, comparative and evolutionary analysis were performed after the complete genome sequence was assembled. **Results** A lytic bacteriophage designed as IME-CF2 was successfully isolated against *Citrobacter freundii*. Transmission electron microscopy analysis indicated that the isolated bacteriophage IME-CF2 had an icosahedral head and displayed morphology resembling Myoviridae family. The complete genome of IME-CF2 was 177 685 bp circular dsDNA and had a G + C content of 43.2%. The genome encodes 2 putative tRNA and 267 coding sequences (CDSs). Phylogenetic analysis demonstrated that IME-CF2 belonged to T4-like virus and comparative analysis showed that IME-CF2 has the highest homology with previously reported *Citrobacter* phage Miller. **Conclusion** Isolation and characterization of a lytic *Citrobacter* phage, lay a foundation of the treatment of multiple drug resistant bacteria in the future.

Key words *Citrobacter freundii*; bacteriophage; whole genome sequencing; genomic analysis