

研究报告

诺卡氏菌烈性噬菌体 vB_Ncarnea_KYD1 的分离纯化与基因组分析

熊文斌, 卢晗, 刘新春*

中国科学院大学资源与环境学院, 北京 101408

熊文斌, 卢晗, 刘新春. 诺卡氏菌烈性噬菌体 vB_Ncarnea_KYD1 的分离纯化与基因组分析[J]. 微生物学通报, 2022, 49(11): 4832-4847

Xiong Wenbin, Lu Han, Liu Xinchun. Isolation, purification, and genomic analysis of the virulent phage vB_Ncarnea_KYD1 from *Nocardia* spp.[J]. Microbiology China, 2022, 49(11): 4832-4847

摘要:【背景】诺卡氏菌是一种广泛分布的好氧放线菌, 可在人体内引起局部或播散性感染, 尤其是在免疫功能低下的个体中。诺卡氏菌感染在临床上较难鉴定, 而且不断有新型诺卡氏菌种被发现。不同类型、不同地域的诺卡氏菌具有流行差异和抗生素敏感性差异, 阻碍了适当治疗方式的选择。利用病灶处的宿主菌分离得到噬菌体来控制诺卡氏菌感染的这种方法在近年来受到了各界的关注。【目的】尝试从环境中分离出能够用于临床治疗的针对诺卡氏菌的烈性噬菌体, 并研究其基因组学特征。【方法】利用双层平板法分离得到目标噬菌体, 观察其噬菌斑形态, 并对噬菌体进行分离纯化, 在透射电镜下鉴定其特征。提取噬菌体 DNA 进行全基因组测序与注释, 并与数据库内已知噬菌体基因组进行比较, 同时构建系统进化树以进行遗传进化分析。【结果】本文以肉色诺卡氏菌为宿主, 从环境样本中分离出一株烈性噬菌体 vB_Ncarnea_KYD1, 在双层平板上可形成直径<2 mm 的透亮均匀的噬菌斑。基因组分析表明, vB_Ncarnea_KYD1 DNA 为环状, 大小为 66 621 bp, 共发现 102 个蛋白质编码区(coding sequence, CDS)及一个 tRNA-Ser 编码序列。透射电镜观察与系统进化树综合分析可以确定, vB_Ncarnea_KYD1 为长尾噬菌体科的一个新属。其在进化过程中经历了复杂的基因重组过程。暂未发现毒力因子相关基因与抗性基因, 具备实用价值。【结论】从环境水体中分离出一株烈性肉色诺卡氏菌噬菌体 vB_Ncarnea_KYD1, 通过电镜观察与基因组分析可知, 此株噬菌体为长尾噬菌体, 基因组中暂未发现不利于临床应用的相关基因, 是一株相对安全的烈性诺卡氏菌噬菌体。研究结果丰富了国内噬菌体资源库, 并为后续诺卡氏菌感染疾病的治疗提供支持。

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金; 魏桥国科低碳技术专项(GYY-DTFZ-2022-008)

Supported by: Fundamental Research Funds for Central Universities; Weiqiao-UCAS Special Projects on Low-Carbon Technology Development (GYY-DTFZ-2022-008)

*Corresponding author: E-mail: xcliu@ucas.ac.cn

Received: 2022-03-10; Accepted: 2022-04-20; Published online: 2022-05-09

关键词: 肉色诺卡氏菌; 噬菌体; 基因组分析

Isolation, purification, and genomic analysis of the virulent phage vB_Ncarnea_KYD1 from *Nocardia* spp.

XIONG Wenbin, LU Han, LIU Xinchun*

College of Resources and Environment, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 101408, China

Abstract: [Background] *Nocardia* belongs to aerobic actinomycete. Being widely distributed, *Nocardia* can cause local or disseminated infection in human, especially in those with low immune function. The *Nocardia* infection is difficult to be clinically identified, and novel *Nocardia* strains are constantly being discovered. Different types of *Nocardia* from different regions have different prevalences and antibiotic sensitivities, which hinders the treatment. The treatment of *Nocardia* infection by the phage isolated from the host bacteria at the lesion has attracted great attention in recent years. [Objective] To isolate the virulent phage against *Nocardia* from the environment that can be used in clinic and explore the genomic characteristics. [Methods] The target phage was isolated by the double-layer plate method, and the plaque morphology was observed. The phage was purified, and the characteristics were observed through the transmission electron microscope. The DNA of the phage was extracted, and the whole genome was sequenced, annotated, and compared with the known phage genomes in the database. The phylogenetic tree was constructed for genetic evolution analysis. [Results] The virulent phage vB_Ncarnea_KYD1 with *Nocardia carnea* as the host, isolated from the environmental samples, formed transparent and uniform plaques with a diameter <2 mm on the double-layer plate. Genome analysis showed that the DNA of vB_Ncarnea_KYD1 was circular with a size of 66 621 bp. A total of 102 proteins and 1 tRNA-Ser were found in coding sequences (CDS). According to the transmission electron microscope observation and phylogenetic tree analysis, vB_Ncarnea_KYD1 was a new phage in the *Siphophages*, which experienced complex gene recombination in the evolution. vB_Ncarnea_KYD1 had practical value, and no virulence factor-related genes or antibiotic-resistance genes were found. [Conclusion] The novel virulent phage vB_Ncarnea_KYD1 of *N. carnea* was isolated from the environmental water sample. The transmission electron microscope observation and genome analysis showed that vB_Ncarnea_KYD1 belonged to the *Siphophages*. Since no relevant genes unfavorable to clinical application were found in the genome, vB_Ncarnea_KYD1 was a relatively safe virulent phage of *Nocardia*. The findings of this study provided references for the follow-up treatment of *Nocardia* infection, and enriched the domestic phage resources.

Keywords: *Nocardia carnea*; phage; genomic analysis

诺卡氏菌通常被认为是一种机会性致病菌^[1]。一般通过呼吸道吸入或经外伤进入人体引发感染, 常见于免疫缺陷病人, 例如实体器官移植

(solid organ transplantation, SOT)受者^[2]。诺卡氏菌也可能感染那些患有慢性肺部疾病、支气管扩张症、糖尿病或酗酒的人^[3]。在肺部疾

病患者中,诺卡氏菌病主要由奶牛乳房性炎诺卡菌(*Nocardia cyriacigeorgica*)、豚鼠耳炎诺卡氏菌(*Nocardia otidiscaviarum*)、鼻疽诺卡氏菌(*Nocardia farcinica*)、肉色诺卡氏菌(*Nocardia carnea*)、毛虫诺卡氏菌(*Nocardia testacea*)和亚洲诺卡氏菌(*Nocardia asiatica*)^[4]这6种诺卡氏菌引起。

肉色诺卡氏菌(*N. carnea*)于1891年首次被描述为肉色链球菌(*Streptothrix carnea*)。1985年, Akgün 等^[5]报告了一例由肉色诺卡氏菌感染引起的女性肾移植患者腿部和锁骨上区域的多发性皮肤脓肿。肉色诺卡氏菌主要引起呼吸道感染。最近在西班牙进行的研究表明,肉色诺卡氏菌的感染率约为5%^[6]。目前,甲氧苄啶磺胺甲恶唑(trimethoprim-sulfamethoxazole, TMP-SMX)仍然是治疗诺卡菌病的首选药物,但抗生素的大量滥用导致诺卡氏菌出现耐药性。多年来,研究者们对诺卡氏菌病患者体内分离得到的诺卡氏菌进行耐药性分析表明,该菌正在逐渐发展对磺胺甲恶唑和甲氧苄啶磺胺甲恶唑的耐药性^[7-8]。因此,我们需要寻找新的抑菌剂来对抗耐药性诺卡氏菌。

同时,诺卡氏菌病在水产养殖方面的危害也很大,在养殖鱼类中诺卡氏菌病的自然发病率可达15%–30%^[9]。患鱼的内脏器官损伤较大,存在一定的治愈难度。目前治疗鱼类诺卡氏菌病仍以抗生素为主,但由于抗生素的使用可能会对水体或人体健康造成影响,我国已将一些抗生素列为水产养殖生产养殖过程中禁止投放的药品^[10]。然而,目前市场上尚无临床应用效果理想的相关疫苗^[11],亟须开发新的抑菌剂用于鱼类的抗病治疗。此外,诺卡氏菌细胞壁含有分枝菌酸,具有强烈的疏水性。因此,当诺卡氏菌在城市污水处理厂中大量增殖并到达某一阈值时,会使池水表面的泡沫变得稳定

难以去除,使得出水中含有大量悬浮物,影响最终消毒效果,导致出水恶化^[12]。泡沫携带大量悬浮物质进入管道,可能导致管道堵塞。不仅如此,泡沫破裂会使得其中的致病菌以气溶胶的形式散入空气,造成较为严重的安全隐患。

噬菌体(bacteriophage, phage)是感染细菌、真菌、藻类、放线菌或螺旋体等微生物的病毒总称,其因杀菌的优势成为现如今的研究焦点。目前,噬菌体已经在医学^[13]、渔业^[14]、食品行业^[15]等领域获得了应用。烈性噬菌体可专一性裂解目标细菌,在杀灭一些特定的病原菌或某些不利于生产生活的细菌时一般不会造成其他附带伤害,由此具有良好的应用前景。目前针对诺卡氏菌分离纯化的噬菌体种类还很少,尚无具有实际应用价值的噬菌体制剂。由此,亟须扩充针对诺卡氏菌的噬菌体库,为研发生物抑菌剂提供更多的噬菌体材料。本研究以诺卡氏菌为宿主,从水体中分离得到了一株长尾噬菌体 vB_Ncarnea_KYD1,并从形态学及基因组学方面对其特性进行研究鉴定,以期丰富该噬菌体种质资源。

1 材料与方法

1.1 材料

以肉色诺卡氏菌(CGMCC 4.1167)为宿主菌进行噬菌体的分离纯化,该菌株购自中国科学院微生物研究所普通微生物菌种保藏管理中心(China General Microbiological Culture Collection Center, CGMCC),使用蛋白胨酵母钙培养基(peptone-yeast-calcium, PYCa)^[16]于30℃、120 r/min培养宿主菌。

鉴于诺卡氏菌不仅是污泥发泡菌,更是一种鱼类致病菌,因此,所取水样优先但不限于污水处理厂中曝气池的泥水混合样,还包括各

类水产养殖场水样及自然湖水样。实验所用水样包括北京市某污水厂曝气池泥水混合样、北京市两个渔场水样、重庆市某人工湖水样及南昌市某河水样。

1.2 噬菌体的分离与纯化增殖

1.2.1 噬菌体的分离

取 100 mL 水样 $5\,000\times g$ 离心 10 min, 以去除大颗粒悬浮固体物质。随后用注射器吸取上清液, 过 $0.22\,\mu\text{m}$ 滤器除菌。将滤液加入无菌容量瓶中, 置于 $4\,^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。将 1 mL 对数生长期(10^6 CFU/mL)的菌液与 15 mL 水样及 30 mL PYCa 液体培养基混合, 室温静置 1 h, 随后置于 $30\,^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 的振荡培养箱中培养 24 h。 $4\,^{\circ}\text{C}$ 、 $8\,000\times g$ 离心 10 min 后, 用注射器吸取上清液, 过 $0.22\,\mu\text{m}$ 滤器除菌, 得到噬菌体原液。

首先采取点滴法测定原液中是否已分离出噬菌体。将 20 mL 宿主菌液置于玻璃匀浆器中进行研磨, 以破碎絮体, 获得相对均质的菌液。吸取 100 μL 均质菌液于固体 PYCa 培养基上, 用一次性涂布棒均匀涂布。待其干燥后, 吸取噬菌体原液垂直滴于培养基上。随后倒置于 $30\,^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养 48 h, 观察是否有透明规则的噬菌斑出现。

用无菌针头小心挑取单个噬菌斑置于 1 mL SM 缓冲液中。室温静置 1 h, 使噬菌斑中的噬菌体充分进入缓冲液中。随后将缓冲液 10 倍比梯度稀释至 10^{-6} 。将不同稀释度下的缓冲液与均质菌液按 1:2 的比例混合于 7 mL 离心管中, 随后加入 $45\,^{\circ}\text{C}$ 的半固体培养基, 快速倒在固体培养基表面并铺匀。待其凝固后, 将其倒置培养于 $30\,^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中。48 h 后得到初次纯化的噬菌斑。重复此步骤至少 3 次, 以得到大小、形态均一的噬菌斑。

1.2.2 噬菌体的增殖

为了方便后续实验的进行, 需要得到具有

较高效价的噬菌体悬液。取 1 mL 噬菌体原液与 1 mL 均质菌液混合于装有 25 mL PYCa 液体培养基的 50 mL 离心管中, 室温静置 1 h, 随后置于振荡培养箱中培养 24 h。向澄清液中加入氯仿, 于 $30\,^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 振荡 15 min 后, 将上清液置于无菌离心管中, $4\,^{\circ}\text{C}$ 、 $10\,000\times g$ 离心 10 min 后, 取上清液过 $0.22\,\mu\text{m}$ 滤器, 得到噬菌体增殖液。用双层平板法测定噬菌体效价。噬菌体效价(PFU/mL)=平均噬菌斑数 $\times$ 稀释倍数 $\times 10$ PFU/mL, 重复以上步骤 3–5 次, 即可获得效价较高的噬菌体增殖液。高效价的噬菌体增殖液可采用两种方法保存:(1) 加入 1%氯仿, 置于 $4\,^{\circ}\text{C}$ 用于短期保存;(2) 将噬菌体液与 SM 缓冲液以 1:9 的比例混合, 随后在混合液中加入无菌甘油至终浓度为 50%, 并在 $-80\,^{\circ}\text{C}$ 长期保存。

1.3 粗制颗粒制取

取 30 mL 对数期(10^6 CFU/mL)宿主菌液, 与 1 mL 高效价噬菌体悬液混合置于无菌摇瓶中, 室温静置 15 min。随后放入恒温振荡培养箱中, $30\,^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 连续振荡至菌液澄清。在澄清液中加入少量氯仿, 继续振荡 10 min。随后取出, $4\,^{\circ}\text{C}$ 、 $8\,000\times g$ 离心 10 min, 取上清。重复离心一次并取上清液。加入 DNase I 与 RNase A, $37\,^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min。加入 1 mL 氯仿至终浓度为 1% (体积分数), $37\,^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min, 按 5.84 g/100 mL 的比例加入氯化钠, 充分溶解后冰浴 1 h, $9\,000\times g$ 离心 10 min, $0.22\,\mu\text{m}$ 滤膜过滤上清。量取滤液, 按每 10 g/100 mL 的比例加入 PEG8000, 轻轻晃动使其溶解, 然后冰浴过夜。 $4\,^{\circ}\text{C}$ 、 $15\,000\times g$ 离心 30 min, 弃上清。将离心管略微倾斜以排除全部液体。按每 100 mL 原始菌液 2 mL SM 的比例, 缓慢加入 SM 溶液以浸泡沉淀。室温静置, 用宽口吸管轻柔重悬并冲洗管壁。加入等体积氯仿振荡

30 s。5 000×g 离心 10 min, 收集上层水相重复氯仿抽提一次。

1.4 噬菌体的电镜观察

采用磷钨酸负染色进行电镜观察, 方法为: 将纯化的噬菌体悬液 20 μ L 滴于铜网上, 待其自然干燥 15 min 后, 用滤纸从侧面吸去多余噬菌体液; 加 1 滴 2% 磷钨酸于铜网上染色 10 min, 用滤纸从侧面吸去染液, 干燥后进行透射电镜观察并摄像。

1.5 噬菌体热稳定性测定

取 100 μ L 噬菌体液分别于 0、10、20、30、40 和 50 $^{\circ}$ C 的水浴中作用 1 h。随后取出, 10 倍倍比梯度稀释后测定效价, 效价以噬菌斑形成单位(plaque forming unit, PFU)表示。实验重复 3 次。表 2 中所用细菌均购自中国科学院微生物研究所普通微生物菌种保藏管理中心(CGMCC)。

1.6 噬菌体酸碱稳定性测定

利用氢氧化钠与盐酸调节 PYCa 液体培养基的 pH 值分别至 1.0–12.0 (整数), 取 900 μ L 不同 pH 值的液体培养基于 30 $^{\circ}$ C 恒温水浴, 温度平衡后加入 100 μ L 噬菌体液, 恒温作用 1 h。随后将样品 10 倍倍比梯度稀释并采用双层平板法测定噬菌体效价。实验重复 3 次。

1.7 噬菌体最佳感染复数测定

最佳感染复数(multiplicity of infection, MOI)是指初始感染时加入噬菌体的数量与宿主菌适量的比值, 也称感染倍数。实验方法为: 将菌悬液以 1:100 的比例接种到 10 mL PYCa 液体培养基中, 30 $^{\circ}$ C、150 r/min 振荡至对数前期(10^6 CFU/mL), 通过菌落计数法测算菌液浓度。按照感染复数为 0.001、0.01、0.1、1、10 的比例, 加入噬菌体液和宿主菌, 同时加入 PYCa 培养液使各管体积相同, 置于恒温振荡器中 30 $^{\circ}$ C、150 r/min 振荡培养 3 h。培养完毕后,

在 4 $^{\circ}$ C、10 000×g 离心 10 min, 取上清液测定效价。以产生最高噬菌体效价的 MOI 为最佳感染复数, 实验重复 3 次。

1.8 噬菌体宿主谱测定

采用双层平板法测定噬菌体的宿主谱: 将 100 μ L 宿主菌、100 μ L 噬菌体液和 4.5 mL 的半固体培养基混匀倒入固体培养基上, 干燥后, 30 $^{\circ}$ C 倒置培养 48 h 观察结果。边缘清晰的噬菌斑记为“+”, 无噬菌斑记为“-”。

1.9 噬菌体基因组提取与鉴定

噬菌体 DNA 提取方法在 Moineau 等^[17]方法的基础上稍作修改。向粗制颗粒中加入 DNase I 和 RNase A 以降解宿主菌的 DNA 和 RNA。加入 pH 8.0 的 EDTA 溶液至终浓度为 20 mmol/L, 于 65 $^{\circ}$ C 水浴使剩余的 DNase I 失活。加入蛋白酶 K 与 10% 的 SDS 溶液, 混匀, 37 $^{\circ}$ C 水浴 30 min, 随后 56 $^{\circ}$ C 水浴 1h, 冰浴冷却。加入等体积的酚-氯仿-异戊醇(25:24:1, 体积比), 温和混匀, 直至形成白色乳状液。5 000×g 离心 10 min, 吸取亲水相抽提两次, 收集上层水相。加入等体积氯仿对水相进行抽提。5 000×g 离心 10 min, 收集上层水相。加入 1/10 体积的 pH 5.2、浓度为 3 mol/L 的醋酸钠和两倍体积的无水冰乙醇(-20 $^{\circ}$ C), 随后置于-20 $^{\circ}$ C 使核酸充分沉淀析出。4 $^{\circ}$ C、14 000×g 离心 20 min。加入 70%、4 $^{\circ}$ C 乙醇。4 $^{\circ}$ C、12 000×g 离心 10 min, 弃上清。重复两次以上。最后再用-20 $^{\circ}$ C 无水乙醇对沉淀进行洗涤。4 $^{\circ}$ C、12 000×g 离心 10 min, 弃上清。100 μ L TE 充分溶解沉淀, 保存于-20 $^{\circ}$ C。

1.10 基因组注释与分析

通过 PHASTER 在线预测这株噬菌体的开放阅读框(open reading frame, ORF)^[18]。利用 BLASTp ($E<10^{-5}$)对开放阅读框假定基因编码的蛋白序列进行功能注释, ExPASy Compute pI/Mw tool (https://web.expasy.org/compute_pi/)

用于计算蛋白的分子量大小、等电点^[19]。

VFDB (http://www.mgc.ac.cn/VFs/search_VFs.htm)^[20]和 ResFinder 3.2 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>)^[21]用于检测毒力因子和抗性基因; tRNAscan-SE V2.0 预测基因的 tRNA^[22]; TMHMM Server V2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>) 预测基因中的跨膜区域^[23]; 利用 GC View (<http://cgview.ca/>)绘制基因图谱^[24]。为了更好地了解噬菌体的进化关系, 用 MEGA X 构建 neighbor-joining 树, bootstrap 值设置为 1 000^[25]。使用线上软件 Circoletto (<http://tools.bat.infospire.org/circoletto/>), 将不同基因及基因组之间的相似性进行具象化^[26]。

2 结果与分析

2.1 诺卡氏菌噬菌体的分离

以肉色诺卡氏菌 CGMCC 4.1167 为宿主菌从水样中分离出一株噬菌体, 命名为 vB_Ncarnea_KYD1。此噬菌体可在平板上形成清晰、透明的噬菌斑, 如图 1 所示。透射电镜结果如图 2 所示。噬菌体 vB_Ncarnea_KYD1 尾部长约 329.71 nm, 头部直径约为 67.79 nm, 尾部直径约为 10.87 nm。

2.2 噬菌体热稳定性测定结果

如图 3 所示, vB_Ncarnea_KYD1 能在 0–40 °C 时均能保持 10^9 PFU/mL 以上的效价, vB_Ncarnea_KYD1 的效价在环境温度高于 40 °C 时出现明显降低。此后随着温度升高, 效价下降速率加快; 环境温度到 50 °C 时, 噬菌体 vB_Ncarnea_KYD1 的效价已不足 10^6 PFU/mL; 温度达 60 °C 时已完全失活。该实验结果表明, 此株噬菌体的热耐受性均一般。

然而, 实际应用环境中, 人体体温并不会出现 40 °C 以上的温度, 所以并不影响噬菌体 vB_Ncarnea_KYD1 在临床上的使用价值。



图 1 噬菌体 vB_Ncarnea_KYD1 噬菌斑形态
Figure 1 Plaque morphology of phage vB_Ncarnea_KYD1.

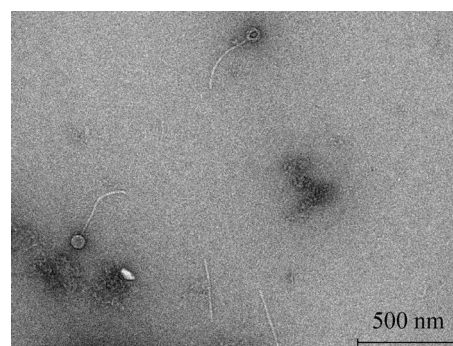


图 2 噬菌体 vB_Ncarnea_KYD1 在透射电镜下的形态
Figure 2 Morphology of bacteriophages vB_Ncarnea_KYD1 observed under TEM.

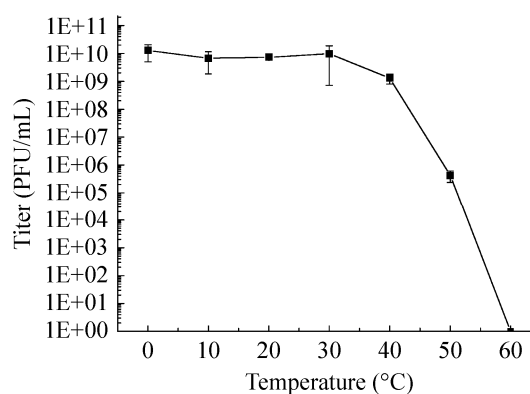


图 3 温度对 vB_Ncarnea_KYD1 稳定性的影响
Figure 3 Thermal Stability of phage vB_Ncarnea_KYD1.

2.3 噬菌体酸碱耐受性测定结果

如图 4 所示, vB_Ncarnea_KYD1 在 $\text{pH} \leq 2.0$ 或 ≥ 13.0 的环境下完全失活, 在 pH 值为 8.0 的环境下活性最高; 当环境 $\text{pH} > 8.0$ 或 < 6.0 时, 该噬菌体活性开始急剧下降; 在环境 $\text{pH} \geq 12.0$ 时, 该噬菌体效价衰减速度最快。实验结果表明, 此株噬菌体对于强酸强碱的耐受性均较差, 在中性环境下具有较高的活性。

2.4 噬菌体最佳感染复数的测定结果

由表 1 可知, 当 $\text{MOI}=0.1$ 时, 噬菌体 vB_Ncarnea_KYD1 达到了 6.27×10^{11} PFU/mL, 在所有 MOI 中噬菌体效价最高。所以此噬菌体最佳 MOI 为 0.1。最佳 MOI 可以指导我们如何投加噬菌体以获得最大的产出量。

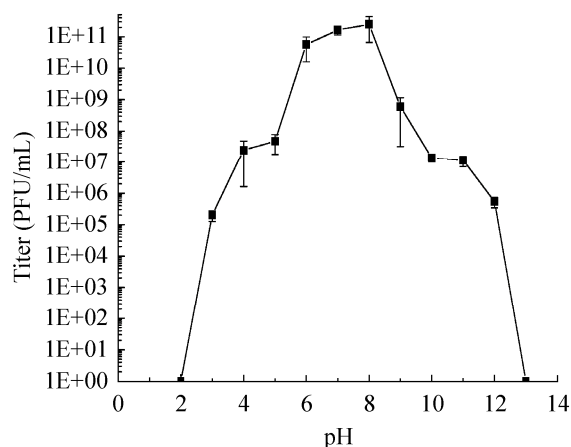


图 4 噬菌体 vB_Ncarnea_KYD1 的酸碱耐受性
Figure 4 pH stability of phage vB_Ncarnea_KYD1.

表 1 噬菌体 vB_Ncarnea_KYD1 的最佳感染复数

Table 1 The optimal MOI of phage vB_Ncarnea_KYD1

序号	细菌数	感染复数	vB_Ncarnea_KYD1 效价
Serial number	Bacterial quantity (CFU/mL)	Multiplicity of infection (MOI)	Titer of vB_Ncarnea_KYD1(PFU/mL)
1	10^6	0.0001	1.13×10^6
2	10^6	0.001	8.6×10^7
3	10^6	0.01	1.33×10^9
4	10^6	0.1	6.27×10^{11}
5	10^6	1	5.59×10^9
6	10^6	10	4.40×10^8

2.5 噬菌体宿主谱的测定结果

采用点滴法来测定此株噬菌体的宿主谱, 发现除了宿主肉色诺卡氏菌以外, 噬菌体 vB_Ncarnea_KYD1 还能侵染豚鼠耳炎诺卡氏菌 (4.1168)、南非诺卡氏菌 (4.1169) 和星状诺卡氏菌 (4.1165)。结果见表 2。

2.6 诺卡氏菌噬菌体 vB_Ncarnea_KYD1 的全基因组分析

噬菌体 DNA 由北京开源公司进行测序。采用鸟枪法 (shotgun method) 测序, 将样本 DNA 随机打断并收集所需长度的 DNA 片段, 使用 NEB 标准建库试剂盒选择特定接头, 对 DNA 进行文库制备并使用 agilent 2100 检测文库片段大小, qPCR 检测文库摩尔浓度。库检合格后使用 Illumina 平台测序。将得到的序列利用 Spades 进行拼接, 得到完整噬菌体基因组序列。

2.6.1 基因组基本信息

利用 Spades 技术测定了噬菌体 vB_Ncarnea_KYD1 的基因组序列 (图 5)。该噬菌体基因组大小为 66 621 bp, 为完整环状噬菌体。从 BLAST 比对结果来看, 其为一株高度新颖的噬菌体, 与其序列一致性最高的是噬菌体 Helpful (77.31%), 其宿主为分枝杆菌 (*Mycobacterium*)。但并未在 Web of Science 数据库中检索到 *Mycobacterium* phage Helpful 的相关文章, 在 GenBank 数据库中并未记录有其相关的生理特性。因此无法与

表 2 噬菌体 vB_Ncarnea_KYD1 的宿主谱
Table 2 The host range of phage vB_Ncarnea_KYD1

Strain (type)	Source	vB_Ncarnea_KYD1
豚鼠耳炎诺卡氏菌(4.1168) <i>Nocardia otitidiscaviarum</i> (4.1168)	CGMCC	+
新诺卡氏菌(4.1705) <i>Nocardia nova</i> (4.1705)	CGMCC	-
肉色诺卡氏菌(4.1167) <i>Nocardia carnea</i> (4.1167)	CGMCC	+
南非诺卡氏菌(4.1169) <i>Nocardia transvalensis</i> (4.1169)	CGMCC	+
星状诺卡氏菌(4.1165) <i>Nocardia asteroides</i> (4.1165)	CGMCC	+

注：+：有噬菌斑形成；-：无噬菌斑形成
Note: +: There is plaque formation; -: No plaque formed.

vB_Ncarnea_KYD1 进行生物学特性上的比较。通过 PHASTER 在线预测这株噬菌体的开放阅读框，共发现 102 个 ORF 及一个 tRNA-Ser 的编码基因。从匹配结果来看，该基因组具有典型的噬菌体模块化结构。包括 DNA 复制模块、结构蛋白基因、裂解模块及 DNA 包装基因组成。vB_Ncarnea_KYD1 基因序列已提交至 GenBank 中，登录号为 MW582532.1。

2.6.2 结构蛋白基因及其蛋白质组学

噬菌体结构蛋白基因通常位于 DNA 包装模块附近，通常从头部形态发生基因开始，然后是尾部形态发生基因^[27]。噬菌体 vB_Ncarnea_KYD1 的基因排列大致上遵循这个规律。在头部组装模块中，vB_Ncarnea_KYD1 具有较为丰

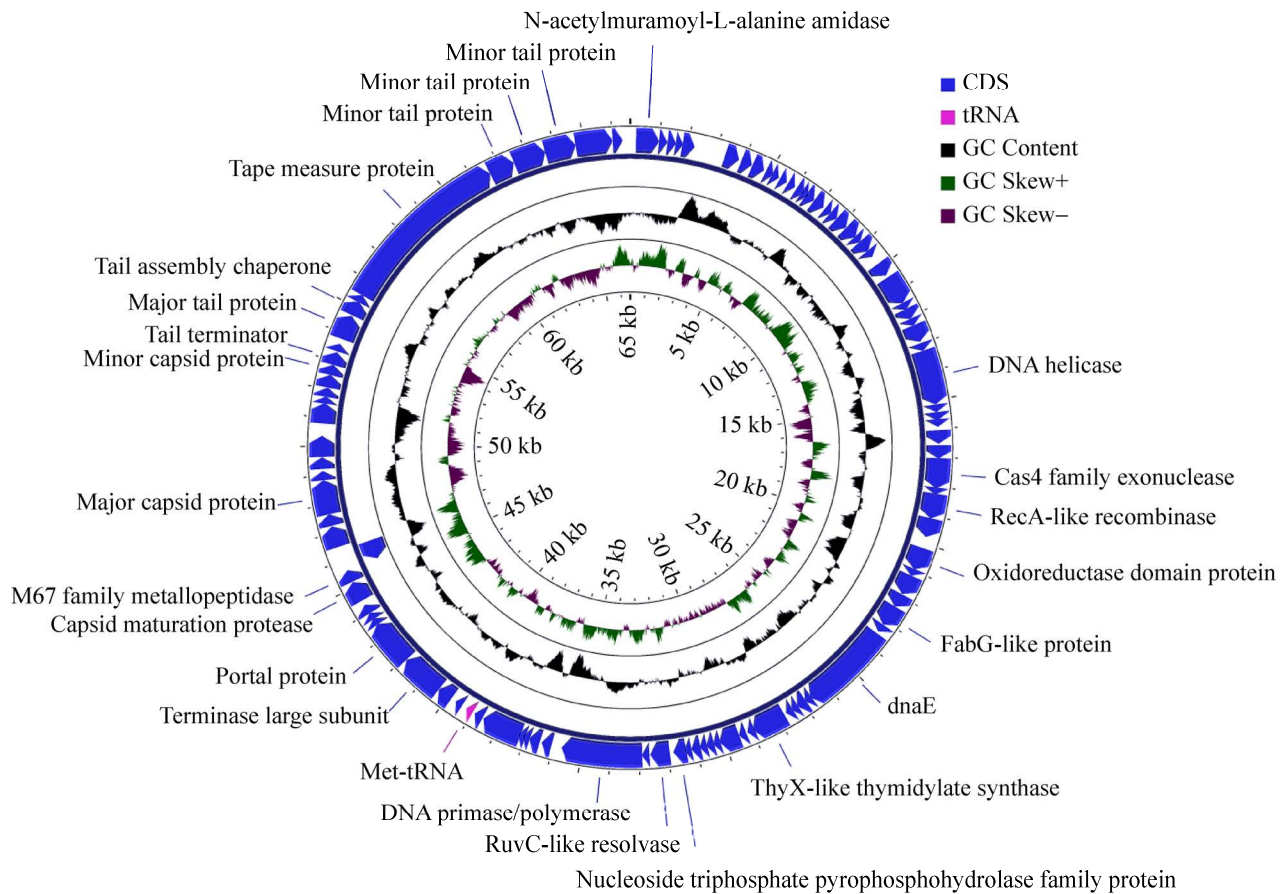


图 5 噬菌体 vB_Ncarnea_KYD1 的基因图谱
Figure 5 Genetic map of phage vB_Ncarnea_KYD1.

富的结构蛋白,包括主要衣壳蛋白(major capsid protein)与次要衣壳蛋白(minor capsid protein)、衣壳成熟蛋白酶(capsid maturation protease)及门户蛋白(portal protein)等。长尾噬菌体一般会通过主要衣壳蛋白与内部支架蛋白的共同组装来构建衣壳,然后利用衣壳成熟蛋白酶原位消化后从组装结构中退出^[28]。值得注意的是,vB_Ncarnea_KYD1 中的 *orf79* 位于结构基因模块中衣壳成熟蛋白酶的下游,似乎编码 M67 family metalloprotease,是一种活性依赖一种或多种金属离子、催化肽类和蛋白质中肽键水解的一类蛋白酶。该蛋白酶在噬菌体组装过程中的具体作用目前并不清楚。

噬菌体的尾部是宿主细胞识别、结合和穿透细胞膜所需的复杂结构,允许 DNA 注入宿主细胞质中。噬菌体长尾的组装涉及许多不同蛋白质的活性,这些蛋白质以高度协调的多步骤组装。尾部的保守成分,包括尾管蛋白(tail tube protein, TTP)和卷尺蛋白(tape measure protein, TMP)。TMP 决定了尾部的长度,是 TTP 聚合的结构。一般来说,卷尺蛋白由最长的基因编码,这在长尾科噬菌体中很常见。其中,vB_Ncarnea_KYD1 噬菌体中编码假定卷尺蛋白的 *orf97* 序列最长,为 2 051 个氨基酸长,与其在扫描电镜下的观察结果相吻合。TMP 在 DNA 注入过程中也起着重要作用,可以介导尾部发生构象转变,使基因组通过尾部穿过细胞膜,进入细菌细胞质。编码卷尺蛋白的上游含有假定的尾部组装伴侣(tail assembly chaperone, TAC),TACs 的基因一般位于尾管蛋白和卷尺蛋白之间,常存在于长尾噬菌体中。这种伴侣蛋白似乎参与高度保守的移码翻译,用于以精确的比率产生两个不同但相关的基因产物^[29]。

2.6.3 噬菌体裂解模块

大多数噬菌体携带有“穿孔素-裂解酶”二

元裂解系统。一般来说,穿孔素可以在细胞质膜上积累,并在特定时间产生活性,在膜上形成较大的孔隙以便裂解酶穿过细胞质膜进入周质,随后裂解酶降解肽聚糖细胞壁^[30-31]。vB_Ncarnea_KYD1 含有 N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸酰胺酶(N-acetylmuramoyl-l-alanine amidase, NAMLAA),该酶位于基因编码的最前端。肽聚糖(peptidoglycan, PGN)是大多数细菌细胞壁中的主要结构聚合物。N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸酰胺酶是肽聚糖水解酶,可切断壁氨酸的内酰胺基和 L-丙氨酸的 α -氨基之间的酰胺键^[32]。在基因组中暂未比对到已知穿孔素序列。事实上,并非所有噬菌体都具备二元裂解系统,独立的裂解酶结构也能发挥裂解细菌细胞的作用。但我们仍尝试从基因组分析中预测,噬菌体 vB_Ncarnea_KYD1 是否存在可能编码穿孔素蛋白的基因。一般来说,穿孔素基因通常位于裂解酶基因附近,多为小分子疏水性膜蛋白,穿孔素具有共同的拓扑结构特点,即至少含有一个跨膜区结构域(transmembrane helices, TMHs)^[33]。我们针对全基因组功能未知蛋白进行跨膜域及理化特性分析,结果如表 3 所示。综合来看,我们认为 *orf3* 所编码的蛋白有可能是穿孔素蛋白,未来可进行进一步验证。

2.6.4 DNA 复制/组装基因

截至目前,已测序的大多数放线菌基因组中的 DNA 复制模块以模块化结构排列^[34]。噬菌体 DNA 的包装过程通常需要两种末端酶亚基参与,即末端酶小亚基和末端酶大亚基^[35]。但在 vB_Ncarnea_KYD1 基因组中仅匹配到 *orf73* 所编码蛋白与 *Mycobacterium phage Fowlmouth* 末端酶大亚基同源性为 58.87%,在 *orf73* 上游的数个基因(*orf65-72*)功能未知。

在 vB_Ncarnea_KYD1 的 DNA 组装复制模块中,存在 DNA 解旋酶(DNA helicase)、Cas4

表 3 未知功能跨膜域蛋白分析

Table 3 Analysis of hypothetical proteins possessing transmembrane domains

开放阅读框 Open reading frame	链极性 Strand	序列坐标 Coordinates	氨基酸数量 Size (aa)	跨膜域预测数量 Number of predicted TMHs	等电点 Isoelectric point (pI)	脂溶指数 Aliphatic index	总平均亲水性 Grand average of hydropathicity
3	+	1 285–1 584	99	1	5.07	106.36	−0.084
5	+	1 805–2 230	141	4	9.51	94.89	0.188
8	+	4 322–4 750	142	1	4.48	80.35	−0.226
16	+	6 771–7 163	130	3	5.76	105.69	0.927
34	+	15 682–15 942	86	1	9.58	88.49	−0.152

Note: +: On the positive chain; -: On the negative chain.

家族核酸外切酶(Cas4 family exonuclease)、RecA 样重组酶(RecA-like recombinase)、氧化还原酶结构域蛋白(oxidoreductase domain protein)、DnaE 样 DNA 聚合酶(DnaE-like DNA polymerase III)、DNA 聚合酶(DNA primase/polymerase)等。表明 vB_Ncarnea_KYD1 存在非常复杂且多样的 DNA 组装复制模块,而且根据 BLASTp 比对结果来看, vB_Ncarnea_KYD1 复杂的 DNA 组装模块似乎源于多次基因重组,其多个酶来源于不同种属细菌的噬菌体。

值得注意的是,在 vB_Ncarnea_KYD1 中发现了 RuvC 样解离酶(RuvC-like resolvase),在 DNA 重组中起关键作用。另外, RuvC-like resolvase 通常出现在革兰氏阴性细菌中,而革兰氏阳性物种如南非诺卡氏菌(*Nocardia transvalensis*)通常缺乏 RuvC 样解离酶。相反地,这类缺乏 RuvC 样解离酶的菌种一般会利用另一种不相关的连接解析酶,即 RecU^[36]。由此表明,噬菌体可能经历了复杂的基因重组事件,以帮助其进化成更适应宿主环境的形态。

2.6.5 比较基因组学分析

将噬菌体 vB_Ncarnea_KYD1 的全基因组序列在 NCBI 上进行 BLASTn 比对。结果显示,噬菌体 vB_Ncarnea_KYD1 的全基因组序列与 GenBank 数据库中所有已知噬菌体基因组序列

的覆盖率均低于 2%,同源片段的一致性均低于 80%。利用 Circoletto 在线分析软件,将比对结果中同源片段一致性相对较高的 22 条基因组序列进行深入的同源性分析,并将序列相似性以 Circos 的形式进行可视化处理。结果表明, GenBank 中已知的噬菌体全基因组序列与 vB_Ncarnea_KYD1 的全基因组序列共享的基因数均小于 5 个。说明噬菌体 vB_Ncarnea_KYD1 是一株高度新颖的噬菌体,而且相较于其他诺卡氏菌噬菌体,噬菌体 vB_Ncarnea_KYD1 似乎与分枝杆菌噬菌体(*Mycobacterium* phage)的亲缘关系更接近。说明此噬菌体可能经历过较复杂的基因重组进化过程。

目前,在 GenBank 数据库中已知的 *Nocardia* phage 数据较少,仅能检索到包括 vB_Ncarnea_KYD1 在内的 10 株 *Nocardia* phage 基因组数据,如表 4 所示,仅有 6 株 *Nocardia* phage 具有完整的基因组数据。为了更加深入地了解 vB_Ncarnea_KYD1 的进化历程及与其他 *Nocardia* phage 的亲缘关系,我们对这 6 株噬菌体及相似性最接近的 *Mycobacterium* phage Helpful 的进行了进一步的共线性分析和系统发育树的构建。

通过 Progressive Mauve 对几株噬菌体进行全基因组比对,共线性分析结果如图 6 所示。

表 4 GenBank 数据库检索 *Nocardia* phage 结果
Table 4 Search results of *Nocardia* phage in GenBank database

名称	是否完整	长度	线性/环状	GC 含量	GenBank 登录号
Name	Sequence integrity	Length (bp)	Linear/Circular	GC content (%)	GenBank accession No.
vB_Ncarnea_KYD1	Complete sequence	66 621	Circular	57.03	MW582532
P69	Complete sequence	68 903	Linear	65.56	MW582531
KYD2	Complete sequence	46 380	Circular	67.03	MW654182
NC1	Complete sequence	68 913	Circular	65.56	MW452562
NJL	Cohesive ends	123	Linear	N/A	D12696.1
NOC1	Partial genome	34 189	Linear	56.70	KF879861
NOC2	Partial genome	28 456	Linear	61.17	KF879862
NOC3	Partial genome	28 465	Linear	67.49	KF879863
NBR1	Complete sequence	46 140	Linear	67.51	NC_016569
NTR1	Complete sequence	65 275	Circular	68.17	MF477236

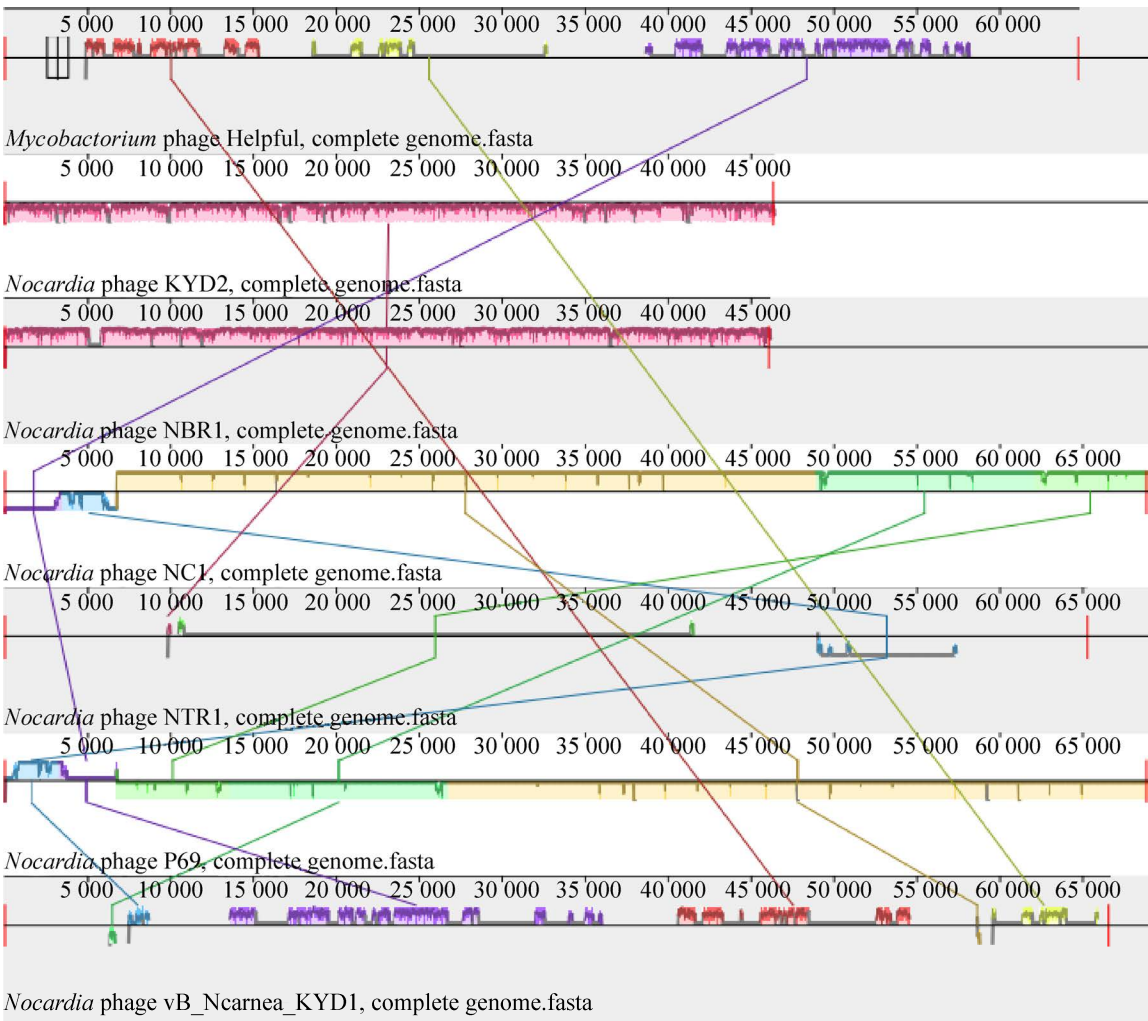


图 6 噬菌体 vB_Ncarnea_KYD1 全基因组的共线性分析 相同颜色表示同源序列
Figure 6 Progressive MAUVE alignment of vB_Ncarnea_KYD1 and homologous phages genome. The same colored local colinear blocks indicate homologous regions among the genomes.

结果分析表明, 这 7 株噬菌体并不具有局部共线性模块(LCB), 而 LCB 也是表示序列相似性, 说明噬菌体 vB_Ncarnea_KYD1 与另外 6 株噬菌体均具有较低的相似性。随后, 针对 vB_Ncarnea_KYD1 与 *Mycobacterium* phage Helpful 进行单独的共线性分析。结果如图 7 所示, 二者之间仅存在 2 个局部共线性模块, 表明二者并不具备较高的相似性。

利用 MEGA X 软件, 针对此 7 株噬菌体全基因组构建系统发育树, 选用 maximum likelihood method, 结果如图 8 所示。从结果中不难看出, *Nocardia* phage NBR1 与 KYD2、NTR1 亲缘关系较近; 而 vB_Ncarnea_KYD1 则与 *Mycobacterium* phage Helpful 及 *Nocardia* phage P69、NC1 亲缘关系更为接近。但进化树分支距离数值显示, 此 7 株噬菌体之间的亲缘关系并不太接近, 尽

管系统发育树的结果提示 vB_Ncarnea_KYD1 可能可以与 Helpful、NC1 及 P69 归为一类, 但说服力仍不够。需要针对 vB_Ncarnea_KYD1 进行进一步的进化树构建, 以探究噬菌体 vB_Ncarnea_KYD1 的亲缘关系与进化历程。

2.6.6 亲缘关系分析

进一步通过软件 MEGA X 构建末端酶大亚基及主要衣壳蛋白的系统进化树。综合图 9 的两种系统进化树显示, 噬菌体 vB_Ncarnea_KYD1 与贡多氏菌噬菌体(*Gordonia* phage)和分枝杆菌噬菌体(*Mycobacterium* phage)存在一定的亲缘关系。表明噬菌体 vB_Ncarnea_KYD1 经历过复杂的基因组进化过程, 其先祖可能可以侵染贡多氏菌。基于这些结果, 我们建议将噬菌体 vB_Ncarnea_KYD1 归类为长尾噬菌体科。

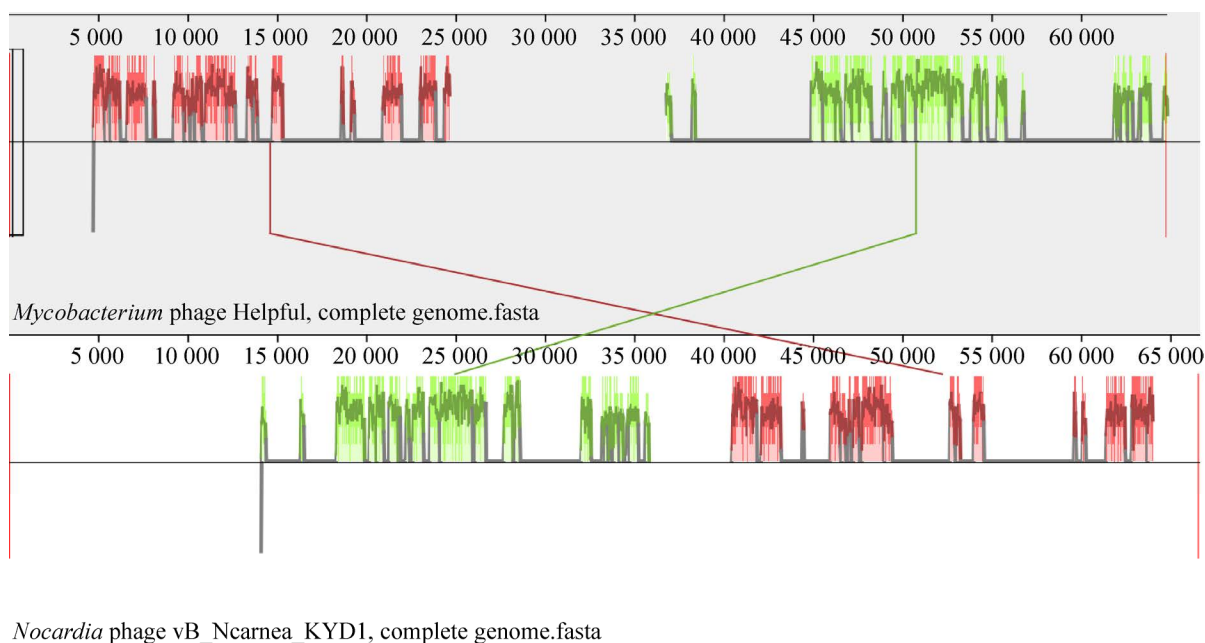


图 7 噬菌体 vB_Ncarnea_KYD1 与 *Mycobacterium* phage Helpful 全基因组的共线性分析 相同颜色表示同源序列

Figure 7 Progressive MAUVE alignment of vB_Ncarnea_KYD1 与 *Mycobacterium* phage Helpful and homologous phages genome. The same colored local colinear blocks indicate homologous regions among the genomes.

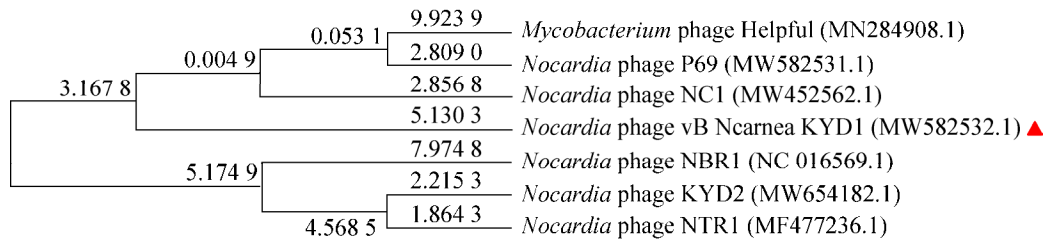


图 8 以全基因组构建 vB_Ncarnea_KYD1 与其他 *Nocardia* phage 及 *Mycobacterium* phage Helpful 的系统发育树 GenBank 数据库中噬菌体并未标注其宿主全称，图中噬菌体学名为 GenBank 数据库中作者上传的噬菌体学名全名；括号中为噬菌体 NCBI 登录号；分支数字代表亲缘关系距离，数字越大表明亲缘关系越远

Figure 8 The phylogenetic trees of vB_Ncarnea_KYD1 with were other *Nocardia* phage and *Mycobacterium* phage Helpful constructed with the whole genome. The phage in GenBank database is not marked with the full name of its host. The bacteriological name in the figure is the full name of the bacteriophage uploaded by the author in GenBank database; The number in brackets is the accession number of phage; The number of branches represents the distance of kinship, and the larger the number, the farther the kinship.

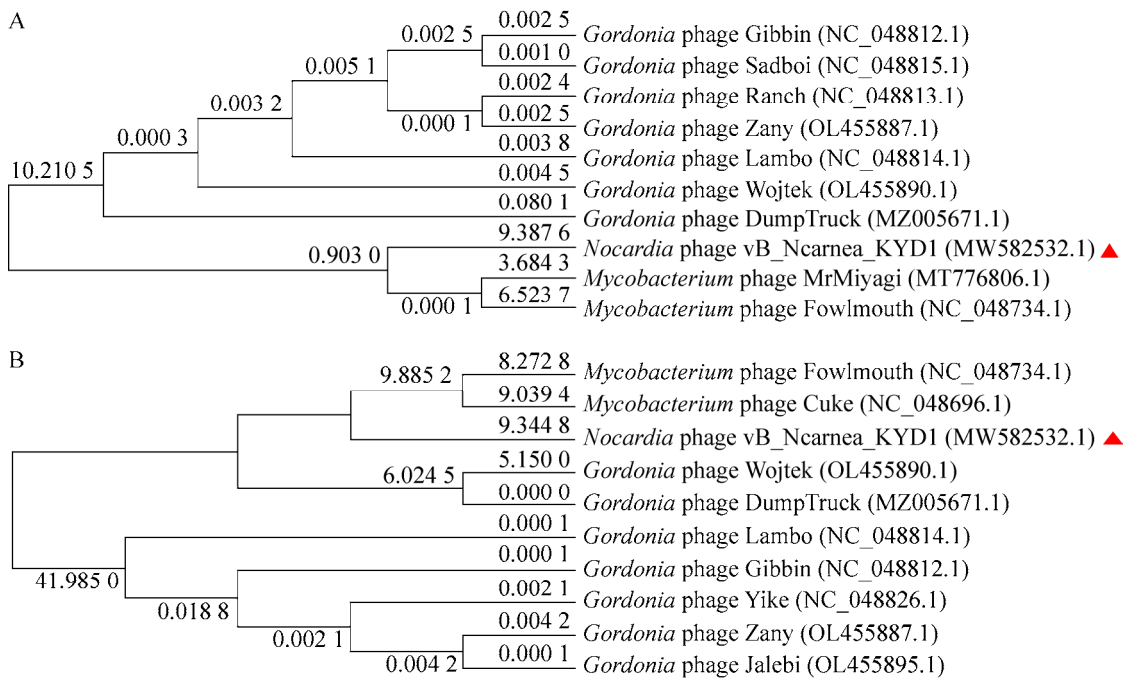


图 9 以氨基酸水平构建 vB_Ncarnea_KYD1 的系统发育树 A：主要衣壳蛋白编码氨基酸为靶标构建的系统发育树；B：末端酶大亚基编码氨基酸为靶标构建的系统发育树 GenBank 数据库中噬菌体并未标注其宿主全称，图中噬菌体学名为 GenBank 数据库中作者上传的噬菌体学名全名；括号中为噬菌体 NCBI 登录号；分支数字代表亲缘关系距离，数字越大表明亲缘关系越远

Figure 9 The phylogenetic trees of vB_Ncarnea_KYD1 were constructed at the amino acid level. A: Major capsid protein-encoded amino acid level; B: Terminase large subunit-encoded amino acid level. The phage in GenBank database is not marked with the full name of its host. The bacteriological name in the figure is the full name of the bacteriophage uploaded by the author in GenBank database; The number in brackets is the accession number of phage; The number of branches represents the distance of kinship, and the larger the number, the farther the kinship.

3 讨论与结论

诺卡氏菌属(*Nocardia*)是一种环境分布广泛的放线菌,是一种机会性致病菌,能造成肺部、皮肤和中枢神经系统的一系列临床感染^[4]。基层医院常常不具备检测条件,因此延误临床治疗^[37]。各种诺卡氏菌之间的差异性及抗生素耐药性都在一定程度上影响临床上治疗诺卡氏菌病的效率^[38]。

噬菌体曾在发现之初就被期望用于临床治疗细菌感染等,但并非所有噬菌体都适用于临床治疗。事实上,有相当一部分噬菌体的基因组中携带有耐药基因,这些噬菌体是促成超级细菌出现的一大原因。此外,温和噬菌体仅在特定环境条件刺激下才会进入烈性循环。因此,在临床利用噬菌体之前,需要对噬菌体进行复杂的基因组分析,才能确定其是否足够安全。

本文从环境样本中分离得到针对肉色诺卡氏菌的噬菌体 vB_Ncarnea_KYD1,从宏观表现来看,其能够在双层平板上产生均匀透亮的噬菌斑,表明 vB_Ncarnea_KYD1 大概率是一株烈性噬菌体。随后制取噬菌体粗制颗粒,在扫描电镜下观察其微观形态,并提取其 DNA 进行基因组分析。在电镜下可以看到噬菌体 vB_Ncarnea_KYD1 尾部长 329.71 nm,头部直径为 67.79 nm,尾部直径为 10.87 nm。

通过基因组分析,发现噬菌体 vB_Ncarnea_KYD1 基因组呈现经典的模块化结构,大致可分为衣壳组成模块、尾部组成模块、裂解模块及 DNA 复制模块。其中不含有整合酶、转座酶、抗性基因以及毒力因子等相关基因。说明噬菌体 vB_Ncarnea_KYD1 属于相对安全的烈性噬菌体。一般来说,噬菌体利用“穿孔素-裂解酶”二元裂解系统来达到裂解宿主细胞的目的。通过基因注释发现,噬菌体 vB_Ncarnea_KYD1

仅含有裂解酶,在基因组中暂未比对到已知穿孔素序列。进一步对全基因组进行跨膜域分析等,我们发现 *orf3* 所编码的蛋白可能为穿孔素蛋白,但这需要进一步验证。在未来的应用研究过程中,不仅可以直接应用噬菌体 vB_Ncarnea_KYD1 来进行疾病治疗,还可以通过蛋白表达手段,直接运用裂解酶来控制肉色诺卡氏菌的生长繁殖。通过构建系统进化树及基因组比较可以发现,噬菌体 vB_Ncarnea_KYD1 可能经历了复杂的基因重组过程,与贡多氏菌噬菌体以及分枝杆菌噬菌体的亲缘关系更接近。结合 vB_Ncarnea_KYD1 在扫描电镜下的镜检结果,我们可以判定噬菌体 vB_Ncarnea_KYD1 属于长尾噬菌体科。

本研究分离并鉴定了一株高度新颖的长尾噬菌体科诺卡氏菌烈性噬菌体 vB_Ncarnea_KYD1, GenBank 登录号为 MW582532.1。通过基因组分析可知,此噬菌体不含有毒力因子、抗性基因等相关基因,是一株相对安全的烈性噬菌体,含有 N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸酰胺酶。该噬菌体的获得为今后治疗诺卡氏菌感染提供了一株新颖且安全的生物抑菌剂。

致谢: 感谢中国科学院动物研究所膜生物国家重点实验室公共仪器平台(Public Facilities of State Key Laboratory of Membrane Biology)提供 200 kV 冷冻场发射透射电子显微镜(200 kV TEM electronic microscope)。

REFERENCES

- [1] 张媛, 张媛媛, 李振军, 万康林. 诺卡氏菌研究进展[J]. 中国人兽共患病学报, 2012, 28(6): 628-634
Zhang Y, Zhang YY, Li ZJ, Wan KL. Research progress on *Nocardia*[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2012, 28(6): 628-634 (in Chinese)
- [2] Radcliffe C, Peaper D, Grant M. *Nocardia veterana* infections: case report and systematic review[J]. New Microbes and New Infections, 2020, 39: 100833

- [3] Lynch JP III, Reid G, Clark NM. *Nocardia* spp.: a rare cause of pneumonia globally[J]. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 2020, 41(4): 538-554
- [4] Taj-Aldeen SJ, Deshmukh A, Doiphode S, Abdul Wahab A, Allangawi M, AlMuzrkchi A, Klaassen CH, Meis JF. Molecular identification and susceptibility pattern of clinical *Nocardia* species: emergence of *Nocardia crassostreae* as an agent of invasive nocardiosis[J]. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 2013, 24: 256025
- [5] Akgün Y, Ozsan K. Multiple skin abscesses caused by *Nocardia carnea*[J]. *Mikrobiyoloji Bulteni*, 1985, 19(2): 100-103
- [6] Guede López GV, Rodríguez Tejedor M, de Pablos Gómez M, Sánchez Castellano M, Díaz Pollán B, Cadiñanos Loidi J, Mora M, Mingorance J, De Miguel Buckley R. Pacemaker pocket infection by *Nocardia carnea*. First case description and literature review[J]. *Microbes and Infection*, 2022, 24(4): 104944
- [7] Uhde KB, Pathak S, McCullum I, Jannat-Khah DP, Shadomy SV, Dykewicz CA, Clark TA, Smith TL, Brown JM. Antimicrobial-resistant *Nocardia* isolates, United States, 1995-2004[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2010, 51(12): 1445-1448
- [8] Larruskain J, Idigoras P, Marimón JM, Pérez-Trallero E. Susceptibility of 186 *Nocardia* sp. isolates to 20 antimicrobial agents[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2011, 55(6): 2995-2998
- [9] 李思源, 王国良, 徐益军. 养殖鱼类诺卡氏菌病的危害及防治[J]. *科学养鱼*, 2010(5): 52
Li SY, Wang GL, Xu YJ. Hazards and control of nocardiosis in cultured fish[J]. *Scientific Fish Farming*, 2010(5): 52 (in Chinese)
- [10] 朱志东, 吕莉, 邓剑壕, 冯豆, 许佳楠, 蔡延渠, 辛年香, 朱盛山. 鱼类诺卡氏菌病的研究进展[J]. *水产养殖*, 2018, 39(1): 48-52
Zhu ZD, Lu L, Deng JH, Feng D, Xu JN, Cai YQ, Xin NX, Zhu SS. Research review of fish nocardiosis[J]. *Journal of Aquaculture*, 2018, 39(1): 48-52 (in Chinese)
- [11] 多甜, 张超, 赵晓进, 李莉, 裴超, 吕爱军. 鳊鱼诺卡氏菌研究进展[J]. *水产科学*, 2017, 36(3): 391-394
Duo T, Zhang C, Zhao XJ, Li L, Pei C, Lü AJ. A review of research progress of *Nocardia seriolae*[J]. *Fisheries Science*, 2017, 36(3): 391-394 (in Chinese)
- [12] 宋阳, 姜成英, 王爱杰, 刘双江. 城市污水处理厂活性污泥生物泡沫研究进展[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(8): 1954-1970
Song Y, Jiang CY, Wang AJ, Liu SJ. Research progress towards biological foaming of activated sludge in municipal wastewater treatment plants[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(8): 1954-1970 (in Chinese)
- [13] Ujmajuridze A, Chanishvili N, Goderdzishvili M, Leitner L, Mehnert U, Chkhotua A, Kessler TM, Sybesma W. Adapted bacteriophages for treating urinary tract infections[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1832
- [14] Nikapitiya C, Dananjaya SHS, Chandrarathna HPSU, Senevirathne A, Zoysa M, Lee J. Isolation and characterization of multidrug resistance *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* and its infecting novel phage ASP-1 from goldfish (*Carassius auratus*)[J]. *Indian Journal of Microbiology*, 2019, 59(2): 161-170
- [15] Chibeu A, Balamurugan S. Application of a virucidal agent to avoid overestimation of phage kill during phage decontamination assays on ready-to-eat meats[J]. *Methods in Molecular Biology*: Clifton, N J, 2018, 1681: 97-105
- [16] Petrovski S, Seviour RJ, Tillett D. Genome sequence and characterization of the *Tsukamurella* bacteriophage TPA2[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(4): 1389-1398
- [17] Moineau S, Pandian S, Klaenhammer TR. Evolution of a lytic bacteriophage via DNA acquisition from the *Lactococcus lactis* chromosome[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, 60(6): 1832-1841
- [18] Arndt D, Grant JR, Marcu A, Sajed T, Pon A, Liang YJ, Wishart DS. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool[J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(W1): W16-W21
- [19] Bjellqvist B, Basse B, Olsen E, Celis JE. Reference points for comparisons of two-dimensional maps of proteins from different human cell types defined in a pH scale where isoelectric points correlate with polypeptide compositions[J]. *Electrophoresis*, 1994, 15(1): 529-539
- [20] Liu B, Zheng DD, Jin Q, Chen LH, Yang J. VFDB 2019: a comparative pathogenomic platform with an interactive web interface[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(D1): D687-D692
- [21] Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, Aarestrup FM, Larsen MV. Identification of acquired antimicrobial resistance genes[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2012, 67(11): 2640-2644
- [22] Lowe TM, Chan PP. tRNAscan-SE On-line: integrating search and context for analysis of transfer RNA genes[J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(W1): W54-W57
- [23] Krogh A, Larsson B, Von Heijne G, Sonnhammer ELL.

- Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2001, 305(3): 567-580
- [24] Petkau A, Stuart-Edwards M, Stothard P, Van Domselaar G. Interactive microbial genome visualization with GView[J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(24): 3125-3126
- [25] Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR. A method and server for predicting damaging missense mutations[J]. *Nature Methods*, 2010, 7(4): 248-249
- [26] 何洋, 秦旭颖, 荆兆元, 杨洪江. 一株类志贺单胞菌噬菌体生物学特性及全基因组分析[J]. *微生物学报*, 2022, 62(2): 650-660
- He Y, Qin XY, Jing ZY, Yang HJ. Biological characteristics and genomic analysis of a *Plesiomonas shigelloides* phage phiP4-7[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(2): 650-660 (in Chinese)
- [27] Pedulla ML, Ford ME, Houtz JM, Karthikeyan T, Wadsworth C, Lewis JA, Jacobs-Sera D, Falbo J, Gross J, Pannunzio NR, et al. Origins of highly mosaic mycobacteriophage genomes[J]. *Cell*, 2003, 113(2): 171-182
- [28] Duda RL, Oh B, Hendrix RW. Functional domains of the HK97 capsid maturation protease and the mechanisms of protein encapsidation[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2013, 425(15): 2765-2781
- [29] Maxwell KL, Davidson AR. A shifty chaperone for phage tail assembly[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2014, 426(5): 1001-1003
- [30] Bernhardt TG, Wang IN, Struck DK, Young R. A protein antibiotic in the phage q β virion: diversity in lysis targets[J]. *Science*, 2001, 292(5525): 2326-2329
- [31] Srividhya KV, Krishnaswamy S. Subclassification and targeted characterization of prophage-encoded two-component cell lysis cassette[J]. *Journal of Biosciences*, 2007, 32(5): 979-990
- [32] Mesnage S, Foster SJ. N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase[M]. *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier, 2013: 1401-1407
- [33] 史一博. 猪链球菌噬菌体穿孔素(holin)基因的定位、功能确认及生物学特性研究[D]. 上海: 上海交通大学博士学位论文, 2012
- Shi YB. Identification and characterization of holin gene from *Streptococcus suis* phage[D]. Shanghai: Doctoral Dissertation of Shanghai Jiao Tong University, 2012 (in Chinese)
- [34] Dyson ZA, Tucci J, Seviour RJ, Petrovski S. Lysis to kill: evaluation of the lytic abilities, and genomics of nine bacteriophages infective for *Gordonia* spp. and their potential use in activated sludge foam biocontrol[J]. *PLoS One*, 2015, 10(8): e0134512
- [35] Petrovski S, Seviour RJ, Tillett D. Genome sequence and characterization of a *Rhodococcus equi* phage REQ1[J]. *Virus Genes*, 2013, 46(3): 588-590
- [36] Taylor S, Brown TL, Tucci J, Lock P, Seviour RJ, Petrovski S. Isolation and characterization of bacteriophage NTR1 infectious for *Nocardia transvalensis* and other *Nocardia* species[J]. *Virus Genes*, 2019, 55(2): 257-265
- [37] 王景程, 卢虎强. 诺卡氏菌致全身多发感染 1 例[J]. *临床急诊杂志*, 2018, 19(10): 709-712
- Wang JC, Lu HQ. One case of recurrent infection caused by *Nocardia*[J]. *Journal of Clinical Emergency*, 2018, 19(10): 709-712 (in Chinese)
- [38] Valdezate S, Garrido N, Carrasco G, Medina-Pascual MJ, Villalón P, Navarro AM, Saéz-Nieto JA. Epidemiology and susceptibility to antimicrobial agents of the main *Nocardia* species in Spain[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2016, 72(3): 754-761