

耐药鲍曼不动杆菌噬菌体 Abgy202162 的分离、鉴定及治疗效果评价

田 询^{1,2}, 谭文才^{1,2}, 杨 碧^{1,2}, 刘 翔^{1,2}, 禹文峰^{1,2}, 齐晓岚^{1,2}, 江银辉^{1,2}

(¹ 贵州医科大学分子生物学重点实验室, 贵阳 550004;

² 贵州医科大学地方病与少数民族疾病教育部重点实验室, 贵阳 550004)

摘要 目的 从地下污水中分离出一株鲍曼不动杆菌噬菌体并对其进行研究,为噬菌体治疗鲍曼不动杆菌感染提供理论基础。方法 以鲍曼不动杆菌 GY-6 为宿主菌,采用双层琼脂平板法分离噬菌体,对其进行生物学特性检测、治疗效果评价及遗传信息分析。结果 分离到鲍曼不动杆菌噬菌体 Abgy202162。透射电镜(TEM)分析显示,Abgy202162 的形态呈二十面体结构。生物学特性分析表明其最佳感染复数为 1,潜伏期为 5 min,暴发量大小约为每个细胞 520 PFU。此外,Abgy202162 在不同浓度的三氯甲烷以及不同 pH 水平和温度下保持稳定。经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析,其含有 10 种蛋白质,分子量为 15~100 ku。Abgy202162 的双链 DNA 基因组由 40 889 bp 组成,G+C 含量为 38.85%,包含 47 个开放阅读框(ORFs),其中 26 个 ORFs 具有特异性功能,未发现毒力相关基因或抗生素耐药基因。系统发育分析显示,Abgy202162 是自转录噬菌体科,拜耶林克噬菌体亚科,弗留纳病毒属的一个新的噬菌体。Abgy202162 在大蜡螟幼虫体内模型中表现出了治疗鲍曼不动杆菌感染的能力。结论 噬菌体 Abgy202162 对环境耐受性强、安全性高,提示其有望成为抗生素的代替治疗剂用于治疗鲍曼不动杆菌引起的感染。

关键词 鲍曼不动杆菌;噬菌体;生物学特性;基因组分析;治疗效果评价;大蜡螟幼虫

中图分类号 R 372

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)10-1742-10

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.10.008

鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*, Ab)是严重院内感染中最常见的条件致病菌,且极易引起老年患者、危重患者及机体免疫力低下患者的感染。鲍曼不动杆菌对临床上常用的抗菌药物耐药严重,这给临床抗菌治疗带来了极大的挑战^[1]。噬菌体是一类可以感染细菌等微生物的病毒,在自然界中广泛存在。由于细菌耐药越来越严重,研发新型抗生素的速度低于耐药菌产生的速度,因此,噬菌体成为代替抗生素的新型抗菌剂^[1]。目前已有部分研究^[2]表明鲍曼不动杆菌噬菌体能够有效清除宿主菌。该研究分离得到一株新的鲍曼不动杆菌噬菌体 Abgy202162,并对其进行了生物学特性分析、全基因组序列分析,利用大蜡螟感染模型对噬菌体与抗生素联合用药的治疗效果进行了评价,以期 Abgy202162 的临床应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、噬菌体样品及实验动物 鲍曼不动杆菌 GY-6 来自贵州医科大学附属医院。贵阳市居民区地下污水用于分离噬菌体。大蜡螟幼虫购自天津惠裕德生物科技有限公司,质量为 250 mg 左右,通体呈奶油色且无灰色印记。

1.1.2 培养基 卢里亚-贝尔塔尼(Luria-Bertani, LB)液体培养基:酵母提取物 5 g,NaCl 10 g,胰蛋白胨 10 g,溶于 1 L 去离子水中,pH 7.0,121 ℃ 灭菌 20 min,常温保存。LB 半固体培养基:在 LB 液体培养基的基础上加入琼脂粉 7.5 g,其他条件不变。LB 固体培养基:在 LB 液体培养基的基础上加入琼脂粉 15 g,其他条件不变。

1.1.3 主要试剂与仪器 NaCl 购自天津市风船化学试剂科技有限公司;DNA 提取酚试剂、PBS 缓冲溶液、亚胺培南(imipenem, IPM)、琼脂粉均购自北京索莱宝科技有限公司;氨苄西林(ampicillin, AMP)购自中国食品药品检定研究院;酵母粉、胰蛋白胨均购自生工生物工程(上海)股份有限公司;恒

2024-05-24 接收

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:32000017、31660012)

作者简介:田 询,女,硕士研究生;

江银辉,男,教授,博士生导师,通信作者,E-mail: jyh5265

@163.com

温培养箱购自天津赛得利实验分析仪器制造厂;超净台购自苏州市金净净化设备科技有限公司;透射电子显微镜(transmission electron microscopy, TEM)(JEM 2100)购自日本 JEOL 公司。

1.2 方法

1.2.1 菌种活化 将鲍曼不动杆菌 GY-6 菌种接种至 LB 液体培养基中后置于 37 ℃ 恒温摇床以 150 r/min 培养至对数生长期。

1.2.2 噬菌体的分离与纯化 该实验参照文献^[3]进行,略有修改,以鲍曼不动杆菌 GY-6 为宿主菌,从贵阳市居民区地下污水中分离噬菌体。用 CaCl_2 处理约 250 ml 污水 10 min 后,将污水在 4 ℃ 下,以 8 000 r/min 离心 10 min。向上清液中加入 50 ml LB 液体培养基和 1 ml 宿主菌液后,将混合物在 37 ℃ 下以 200 r/min 培养过夜后离心过滤。采用双层琼脂平板法测得滤液中单个噬菌斑。噬菌体纯化至少进行 3 次。过滤培养物后,将上清液置于 4 ℃ 下保存备用。

1.2.3 噬菌体的透射电镜观察 该实验参照文献^[4]进行,略有修改,用 2% (W/V) 磷钨酸对纯化的噬菌体悬液(约 1×10^{12} PFU/ml)进行染色。使用 TEM 在 200 kV 下观察噬菌体的形态特征。

1.2.4 双层琼脂平板试验 该试验参照文献^[5]进行,略有修改,将 0.1 ml 噬菌体液与 0.1 ml 宿主菌液混合后静置 15 min。将混合物加入 5 ml LB 半固体培养基中,快速混匀并平铺在 LB 固体培养基平板上,静置 30 min。将平板置于 37 ℃ 下孵育过夜以获得单个噬菌斑。

1.2.5 噬菌体最佳感染复数测定 该实验参照文献^[6]进行,略有修改,将宿主菌与处于不同感染复数(multiplicity of infection, MOI)(0.000 01、0.000 1、0.001、0.01、0.1、1 和 0)的噬菌体悬液混合后置于 37 ℃ 下,以 150 r/min 进行孵育。采用 PBS 缓冲液作为对照。每隔 30 min 测量 OD_{600} 值,持续测量 6 h。

1.2.6 噬菌体吸附率和一步生长曲线测定 该实验操作参照文献^[7]进行,略有修改。采用 $\text{MOI} = 1$ 的噬菌体悬液与宿主菌液混匀后进行孵育。分别在 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50、60、90、120、180 和 240 min 时收集 1 ml 样品,将其过滤后测定噬菌体滴度。

1.2.7 噬菌体热稳定性和 pH 稳定性测定 该实验参照文献^[7]进行,略有修改。取 1 ml 噬菌体悬液在不同温度(4、37、45、55、65 或 75 ℃)下处理 1 h

后,测定噬菌体滴度。取 100 μl 噬菌体悬液加入到 900 μl 不同 pH 的 PBS 缓冲液中混匀,将混合物置于 37 ℃ 孵育 1 h 后,测定噬菌体滴度。

1.2.8 噬菌体三氯甲烷敏感性测定 该实验参照论文^[8]进行。将噬菌体悬液(100 μl)与 900 μl 不同浓度(0、1%、3% 和 5%)的三氯甲烷溶液混匀后于 37 ℃ 下孵育 1 h,测定噬菌体滴度。

1.2.9 噬菌体基因组提取、测序和基因组分析 基因组提取参照文献^[9],略有修改。将提取的基因组送往生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序和组装。利用 RAST (<http://rast.nmpdr.org/rast.cgi>) 在线网站对全基因组序列进行注释;利用 BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) 在线网站验证预测的开放阅读框(open reading frame, ORF),利用 BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) 在线网站检测噬菌体基因组序列的相似性。在 CDD 数据库中搜索基因组序列中的保守结构域。利用在线网站 VFDB (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/VirulenceFinder/>) 和 CRDB (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>) 搜索基因组中可能存在的毒力因子和抗生素抗性基因^[10]。利用 CGview Server (http://stothard.afns.ualberta.ca/cg-view_server/) 绘制全基因组图谱和 GC 偏移情况。利用 Easyfig(2.2.5)创建 Abgy2021-6-2 的全基因组比对图。利用 RNA 聚合酶的氨基酸序列和最大似然法构建系统发育树。

1.2.10 噬菌体蛋白十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分析 该实验参照文献^[11]进行,略有修改。将纯化的噬菌体颗粒悬液负载在 12% SDS-PAGE 凝胶上,采用考马斯亮蓝快速染液(免脱色)对凝胶进行染色和脱色后,观察蛋白质条带。

1.2.11 大蜡螟幼虫模型的体内协同作用 幼虫的注射及孵育方法参照文献^[12]进行。将 70 条大蜡螟幼虫随机分为 7 组,每 5 条幼虫装于铺有滤纸的 9 cm 干净培养皿中。实验组分别取 10 μl 不同浓度的宿主菌液(10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} CFU/L)注射到大蜡螟幼虫中。设 3 种形式对照,即 PBS 组(注射 PBS 10 μl)、空白对照(Untouched larva)组(不做任何处理)、穿刺(Pierced larva)组(注射穿刺但不注射 PBS)。对身体接触没有反应的幼虫被认为死亡,每 24 h 观察死亡数量并统计数据,以确定该菌在后续实验中的最适感染浓度(96 h 使 80% 幼虫死亡的浓

度)^[12]。

将 80 条大蜡螟幼虫随机分为 8 组,取 10 μ l 具有不同 MOI(50、10、1 和 0.1)的噬菌体悬液注射到感染宿主菌(10^{10} CFU/L)20 min 后的幼虫中。设 4 种形式对照,即 PBS 组(注射 PBS 10 μ l)、空白对照(Untouched larva)组(不做任何处理)、穿刺(Pierced larva)组(注射穿刺但不注射 PBS)、宿主菌液(10^{10} CFU/L) + PBS 组。统计数据以确定该噬菌体在后续实验中的 MOI。

将 100 条大蜡螟幼虫随机分为 10 组。由于 GY-6 对 AMP 耐药,但对 IPM 敏感。因此,选择 IPM 作为阳性对照,AMP 作为阴性对照。并将 AMP 或 IPM 与噬菌体联合用于治疗感染鲍曼不动杆菌后的幼虫。根据临床剂量,向幼虫注射 10 μ l 的抗生素,最终浓度为 18.75 mg/kg AMP 或 50 mg/kg IPM^[13]。设 5 种形式对照,即宿主菌液(10^{10} CFU/L) + PBS 组、噬菌体组(MOI = 10)、PBS 组(注射 PBS 10 μ l)、空白对照(Untouched larva)组(不做任何处理)、穿刺(Pierced larva)组(注射穿刺但不注射 PBS)。统计数据。

1.3 统计学处理 所有实验数据均采用 GraphPad Prism 8.0.2 和 SPSS Statistics 21.0 软件进行统计分析和绘图。采用 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线,采用对数秩检验(Log-rank)进行生存曲线分析。每组实验平行重复 3 次。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 透射电镜观察 从贵阳市居民区地下污水中分离得到一株裂解鲍曼不动杆菌 GY-6 的噬菌体,将其命名为 *Acinetobacter virus* Abgy202162。经双层琼脂平板法检测显示,Abgy202162 形成了直径约 9.8 mm 的透明圆形斑块(图 1A)。TEM 分析显示,Abgy202162 的形态呈二十面体结构(直径约 54 nm)(图 1B)。

2.2 最佳感染复数 如图 2 所示,Abgy202162 有效地减少了宿主菌的生长,当 MOI = 1 时,OD₆₀₀ 值的下降速度比在其他 MOI (0.1、0.01、0.001、0.000 1 或 0.000 01)时更快。即噬菌体 Abgy202162 的最佳感染复数为 1。

2.3 吸附率检测 如图 3 所示,Abgy202162 与宿主菌一接触便迅速吸附,约 93% 的 Abgy202162 颗粒在 1 min 内吸附到宿主菌表面。

2.4 一步生长曲线 如图 4 所示,Abgy202162 的

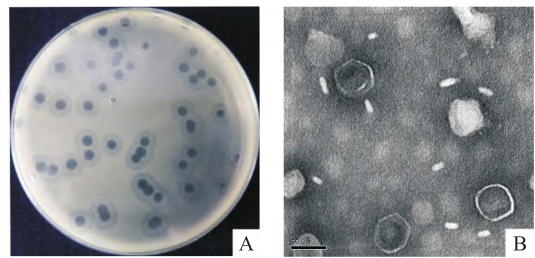


图 1 噬菌体 Abgy202162 形态学鉴定 $\times 50\ 000$

Fig. 1 Morphological identification of phage

Abgy202162 $\times 50\ 000$

A: Plaques formed by Abgy202162 after 12 h incubation at 37 °C;
B: Transmission electron microscope image of Abgy202162, the purified phage suspension was stained with 2% (W/V) phosphotungstic acid.

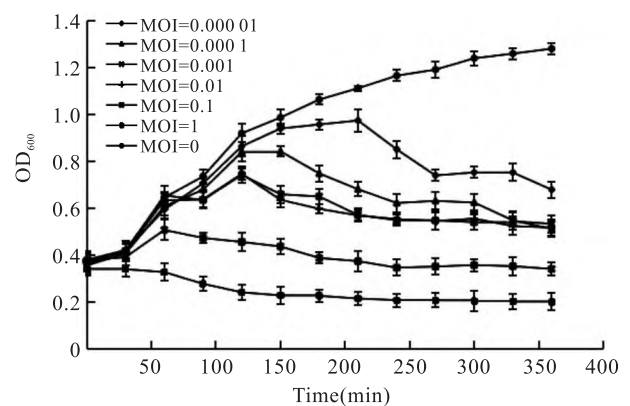


图 2 噬菌体 Abgy202162 的最佳感染复数检测

Fig. 2 Detection of optimal multiple infection of phage Abgy202162

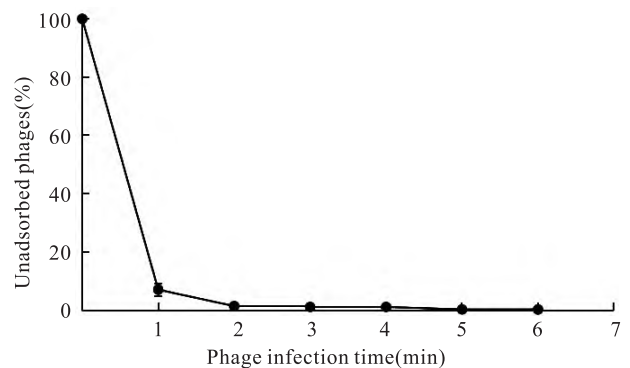


图 3 噬菌体 Abgy202162 的吸附率检测

Fig. 3 Detection of adsorption rate of phage Abgy202162

潜伏期约为 5 min,暴发期持续时间约为 25 min,暴发量约为每个细胞 520 PFU。

2.5 热稳定性检测 如图 5 所示,当温度从 4 °C 到 55 °C 时,Abgy202162 的滴度范围为 1.5×10^{10} PFU/ml 至 3.4×10^{10} PFU/ml,表明 Abgy202162 受温度影响较小。当温度达到 75 °C 时,Abgy202162 活性完全丧失。结果表明 Abgy202162 的热稳定性较好。

2.6 pH 稳定性检测 如图 6 所示, Abgy202162 的活性在 pH = 5 至 pH = 12 之间保持稳定, 但在 pH < 5 或 pH > 12 时没有噬菌体存活。说明极端的 pH 值可能会影响 Abgy202162 的稳定性。

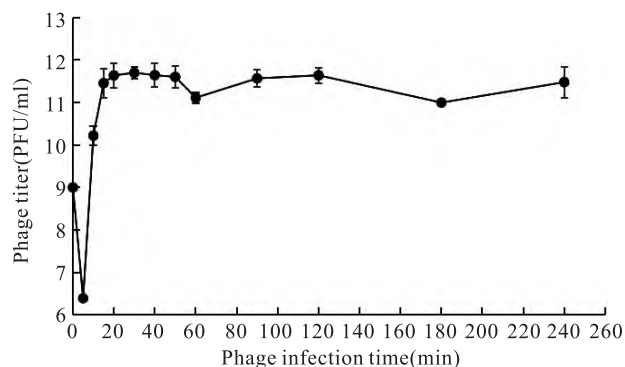


图 4 噬菌体 Abgy202162 的一步生长曲线检测

Fig. 4 Detection of one step growth curve of phage Abgy202162

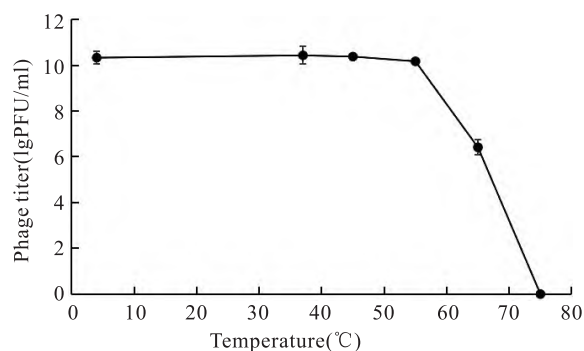


图 5 噬菌体 Abgy202162 的热稳定性检测

Fig. 5 Thermal stability testing of phage Abgy202162

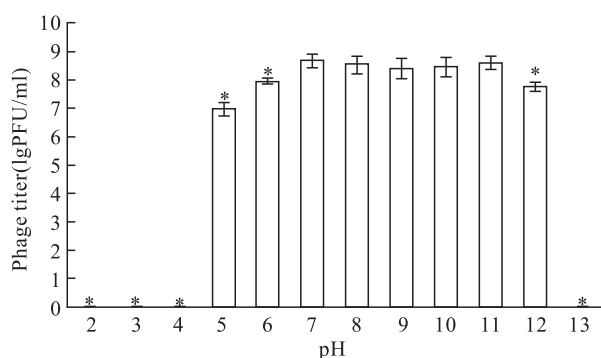


图 6 噬菌体 Abgy202162 的 pH 稳定性检测

Fig. 6 Detection of pH stability of phage Abgy202162

* $P < 0.05$ vs pH = 7.

2.7 三氯甲烷敏感性检测 如图 7 所示, Abgy202162 的滴度不随三氯甲烷浓度变化而变化, 说明 Abgy202162 对三氯甲烷不敏感, 可以判定其表面没有包膜。该结果与噬菌体 UBCT628 的结果一

致^[8]。

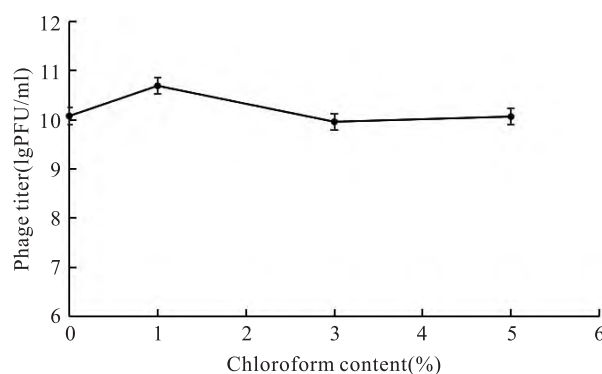


图 7 噬菌体 Abgy202162 的三氯甲烷敏感性检测

Fig. 7 Detection of trichloromethane sensitivity of phage Abgy202162

2.8 蛋白 SDS-PAGE 分析 如图 8 所示, 噬菌体 Abgy202162 含有 10 个蛋白条带, 所有条带的分子量大小在 15 ~ 100 ku 之间。其中分子量为 36 ku 和 60 ku 的蛋白条带含量最多, 推测它们为组成该噬菌体的主要蛋白。

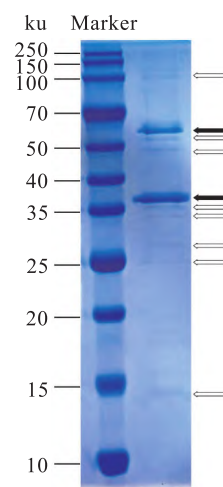


图 8 噬菌体 Abgy202162 蛋白 SDS-PAGE 分析

Fig. 8 SDS-PAGE analysis of protein of phage Abgy202162

Solid arrows: major protein bands; Blank arrows: minor protein bands.

2.9 基因组注释与结果分析 Abgy202162 的基因组已上传至 NCBI, 登录号为 OR770644。如表 1 和图 9 所示, 该噬菌体基因组是一条线状双链 DNA, 基因组大小为 40 889 bp, G + C 含量为 38.85%, 共含有 47 个开放阅读框 (open reading frame, ORF), 其中 26 个 ORFs 编码功能已知的蛋白, 剩余 21 个 ORFs 编码功能未知的假定蛋白, 未检测到毒力基

因、耐药基因以及与溶源性相关的基因,表明 Abgy202162 是一株裂解性的噬菌体。

为确定 Abgy202162 与其他噬菌体之间基因组的相似性,通过对 Abgy202162 的基因组进行 BLASTn 比对后发现,有两个噬菌体与 Abgy202162 最相似。采用 Easyfig 软件对它们的基因组进行相似性比较。如图 10 所示,功能相同的基因在不同基

因组中分布不同,表明 Abgy202162 是一株新的噬菌体。

如表 1 和图 9 所示,在 Abgy202162 的裂解相关基因中,ORF45 编码裂解酶,ORF46 编码穿孔素蛋白,穿孔素可在宿主菌的细胞膜上形成非特异性通道或孔,使裂解酶逃逸并裂解细胞壁的肽聚糖,从而裂解宿主菌^[14]。

表 1 噬菌体 Abgy202162 基因组中预测的 ORF

Tab. 1 Predicted ORF in the genome of phage Abgy202162

ORF	Nucleotide position		Gene product		Putative function and best match	Accession No.	Blastp result		
	Start	Stop	PI	MW(ku)			Query cover(%)	Identity (%)	E value
1	709	3594	7.66	105.76	internal virion protein B [Acinetobacter virus fBenAci001]	QOV07746.1	100	98.75	0
2	3607	4281	8.80	23.51	internal virion protein A [Acinetobacter phage vB_AbaP_APK2]	AZU99239.1	100	98.21	3.00E-157
3	4281	6572	5.00	84.35	tail protein [Acinetobacter phage phiAB1]	YP_009189376.1	100	98.69	0
4	6581	7141	9.46	21.59	tail tabular protein A [Acinetobacter phage vB_AbaP_PMK34]	QGF20169.1	100	98.92	6.00E-132
5	7305	7490	4.71	6.43	tail protein [Acinetobacter phage AB3]	YP_008060142.1	100	100.00	5.00E-33
6	7546	8577	5.41	38.36	capsid and scaffold protein [Acinetobacter phage vB_AbaP_ZHSHW]	UPT53553.1	100	100.00	0
7	8593	9453	5.38	30.51	head scaffolding protein [Acinetobacter phage vB_AbaP_B5]	YP_009610424.1	100	98.60	0
8	9462	11018	4.97	58.89	head-to-tail joining protein [Acinetobacter phage vB_AbaP_APK14]	AYR04384.1	100	100.00	0
9	11027	11278	6.21	9.04	hypothetical protein [Acinetobacter phage Abp1]	YP_008058228.1	100	100.00	4.00E-53
10	11275	11472	5.25	7.69	hypothetical protein [Acinetobacter phage Abp1]	YP_008058227.1	100	100.00	8.00E-40
11	11594	14011	6.44	90.84	RNA polymerase [Acinetobacter phage Abp1]	YP_008058226.1	100	99.50	0
12	14020	14670	4.87	25.03	deoxynucleoside monophosphate kinase [Acinetobacter phage vB_AbaP_APK48-3]	QGH71555.1	100	96.30	6.00E-150
13	14670	15605	7.28	35.50	phosphoesterase with HTH domain [Acinetobacter phage AB_SZ6]	URQ05085.1	100	99.68	0
14	15609	16049	9.77	16.61	endonuclease VII [Acinetobacter phage vB_AbaP_B1]	YP_009610315.1	100	100.00	4.00E-105
15	16046	16615	5.16	21.81	tRNA nucleotidyltransferase [Acinetobacter phage vB_Ab4_Hep4]	UVD33001.1	99	95.21	3.00E-130
16	16605	17558	5.64	35.95	5'-3' exonuclease [Acinetobacter phage APK77]	UAW09898.1	100	99.68	0
17	17551	17883	8.93	13.16	hypothetical protein [Acinetobacter phage vB_AbaP_ABWU2101]	UFJ83450.1	100	100.00	4.00E-77
18	18056	18946	5.14	32.35	5'-3' exonuclease [Acinetobacter phage AbpL]	UVD42114.1	100	98.65	0
19	18964	19443	9.59	18.63	HNH endonuclease [Acinetobacter phage SWH-Ab-1]	YP_009949038.1	100	98.74	1.00E-114
20	19452	21752	5.69	87.38	DNA polymerase [Acinetobacter phage SWH-Ab-1]	YP_009949037.1	100	99.22	0
21	22118	23098	6.34	36.87	hypothetical protein [Acinetobacter phage Abp1]	YP_008058213.1	100	99.08	0

续表

ORF	Nucleotide position		Gene product		Putative function and best match	Accession No.	Blastp result		
	Start	Stop	PI	MW(ku)			Query cover(%)	Identity (%)	E value
22	23101	24399	5.44	48.34	putative DNA helicase [Acinetobacter phage Abp1]	YP_008058212.1	100	99.77	0
23	24412	24648	6.88	8.87	hypothetical protein [Acinetobacter phage Abp1]	YP_008058211.1	100	100.00	1.00E-50
24	24648	24965	4.70	11.81	hypothetical protein [Acinetobacter phage Abp1]	YP_008058210.1	100	99.05	9.00E-69
25	24965	25720	8.72	28.89	DNA primase [Acinetobacter phage Abp1]	YP_008058209.1	100	99.60	0%
26	25750	26199	9.49	16.90	HNH endonuclease [Acinetobacter phage Abp1]	YP_008058208.1	100	100.00	6.00E-107
27	26221	26430	8.98	7.86	hypothetical protein [Acinetobacter phage Ab124]	QMP19146.1	100	100.00	7.00E-43
28	26420	26638	9.05	7.91	hypothetical protein [Acinetobacter phage Abp1]	YP_008058206.1	100	100.00	9.00E-44
29	26635	26826	9.83	7.12	hypothetical protein [Acinetobacter phage Abp1]	YP_008058205.1	100	100.00	1.00E-38
30	26813	26980	10.15	6.83	hypothetical protein [Acinetobacter phage vB_AbaP_PD-AB9]	YP_009189862.1	100	100.00	1.00E-29
31	26991	27425	9.32	16.29	hypothetical protein [Acinetobacter phage vB_AbaP_PD-AB9]	YP_009189863.1	100	100.00	2.00E-102
32	27427	27915	9.49	18.10	hypothetical protein [Acinetobacter phage Abp1]	YP_008058202.1	100	100.00	6.00E-116
33	27986	28384	6.39	14.80	hypothetical protein [Acinetobacter phage Abp1]	YP_008058201.1	100	99.24	2.00E-92
34	28543	28647	4.87	3.87	hypothetical protein [Acinetobacter phage Abp1]	YP_008058200.1	100	100.00	9.00E-16
35	28640	28819	9.86	6.58	hypothetical protein [Acinetobacter phage MRABP9]	WAK44726.1	100	100.00	1.00E-36
36	28816	29412	6.15	22.63	hypothetical protein [Acinetobacter phage Abp1]	YP_008058198.1	100	100.00	5.00E-147
37	29487	29720	6.57	9.32	hypothetical protein [Acinetobacter phage vB_AbaP_PD-AB9]	YP_009189868.1	100	100.00	7.00E-49
38	29817	30191	4.67	14.51	hypothetical protein [Acinetobacter phage Abp1]	YP_008058196.1	100	100.00	2.00E-86
39	30193	30702	6.52	18.59	hypothetical protein [Acinetobacter phage Abp1]	YP_008058195.1	100	98.82	7.00E-119
40	30775	31056	4.50	9.98	hypothetical protein [Acinetobacter phage Abp1]	YP_008058194.1	100	100.00	4.00E-60
41	31486	31692	9.30	7.98	hypothetical protein [Acinetobacter phage Abp1]	YP_008058193.1	100	100.00	6.00E-43
42	32820	32954	8.10	5.13	DNA binding protein [Acinetobacter phage IME-200]	YP_009216494.1	100	100.00	1.00E-21
43	32951	34888	6.54	72.86	terminase large subunit [Acinetobacter phage Abp1]	YP_008058244.1	100	99.84	0
44	34898	35206	4.40	11.19	DNA maturase A [Acinetobacter phage vB_AbaP-APK14]	AYR04397.1	100	99.02	2.00E-65
45	35266	35823	9.48	21.01	putative endolysin [Acinetobacter phage vB_AbaP-PMK34]	QGF20176.1	100	99.46	1.00E-130
46	35810	36145	5.70	11.94	holin/anti-holin [Acinetobacter phage SH-Ab 15519]	YP_009598267.1	100	100.00	4.00E-73
47	36159	38240	5.10	75.35	tail fiber protein [Acinetobacter phage SH-Ab 15519]	YP_009598268.1	100	99.57	0

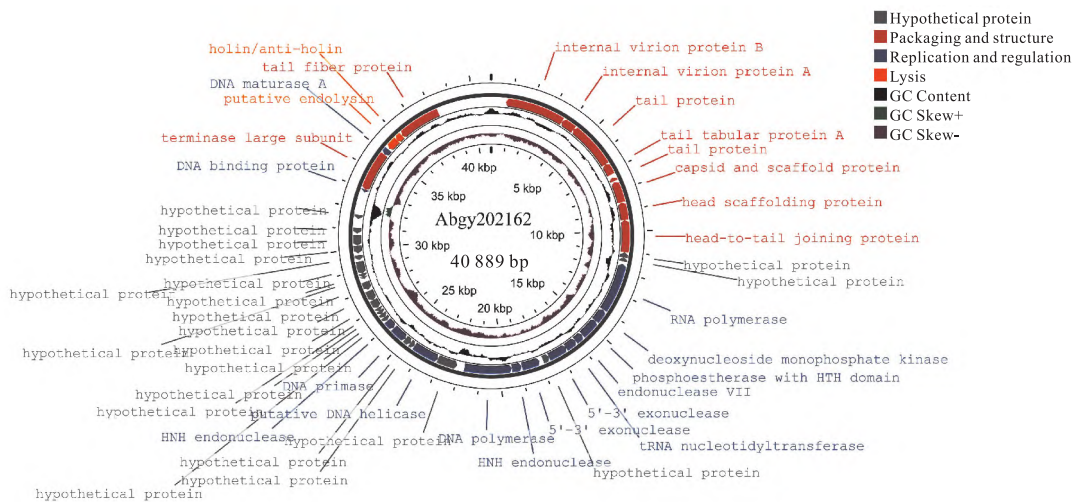


图9 噬菌体 Abgy202162 的基因组结构示意图

Fig. 9 Schematic diagram of the genomic structure of phage Abgy202162

Solid arrow: read direction of the coding region.

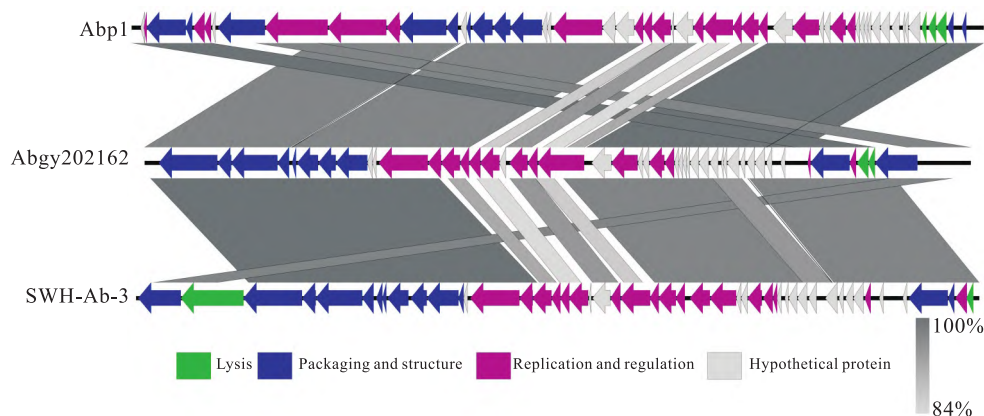


图10 Abgy202162(中)与 Acinetobacter phage Abp1(上)和 Acinetobacter phage SWH-Ab-3(下)的基因组比较

Fig. 10 Comparison of the genome of Abgy202162 (middle) to Acinetobacter phage Abp1 (top), and Acinetobacter phage SWH-Ab-3 (bottom)

Different colored arrows indicate CDS in the full length of the genome sequence; Each direction arrow showed CDS transcription direction; Homology: sloping grey lines; Sequence similarity: gray intensity.

在 Abgy202162 的包装与结构相关基因中, ORF3、ORF4、ORF5、ORF47 编码的尾部相关蛋白与噬菌体的宿主范围有关; ORF6 编码的衣壳和支架蛋白可以保护噬菌体基因组在恶劣的细胞外环境中不被降解。

在 DNA 复制和调控相关基因中, ORF12 编码的脱氧核苷单磷酸激酶参与脱氧核苷酸的生物合成; ORF19、ORF26 编码的 HNH 核酸内切酶可通过切割 DNA 片段从而介导 DNA 同源重组, 以加强 DNA 序列的保守性; ORF44 编码的 DNA 成熟酶 A 在 DNA 序列重排和外源序列并入 DNA 的机制中发

挥作用。

为进一步研究 Abgy202162 的分类地位, 该实验采用 Abgy202162 的 RNA 聚合酶构建了系统发育树, 如图 11 所示, 相关噬菌体的氨基酸序列来自 NCBI, 登录号如图所示。Abgy202162 与 Friunavirus 属的 Acinetobacter phage SWH-Ab-3 和 Acinetobacter phage Abp1 的亲缘关系更近。表明 Abgy202162 属于 Autographiviridae 科 Friunavirus 属。

2.10 大蜡螟幼虫模型的体内协同作用 如图 12 所示, 将不同浓度的宿主菌液注射到幼虫体内后显示, 与其他组相比, 当注射浓度为 1×10^{10} CFU/L

时,幼虫的病死率在 48 h 时达到了 100%,因此,将该浓度作为最适感染浓度。

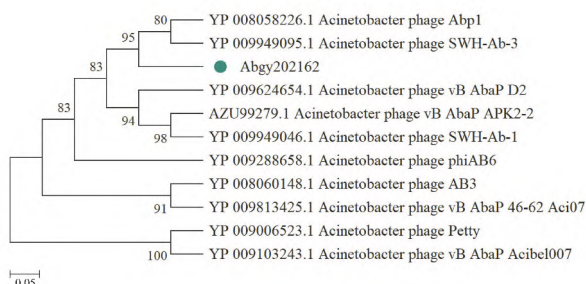


图 11 使用 Abgy202162 的 RNA 聚合酶和相关噬菌体构建最大似然树

Fig. 11 The Maximum Likelihood tree was constructed using RNA polymerase of Abgy202162 and related phages

Green dot: Abgy202162 position; The numbers in the branch: support for branching degree; Rod: genetic distance.

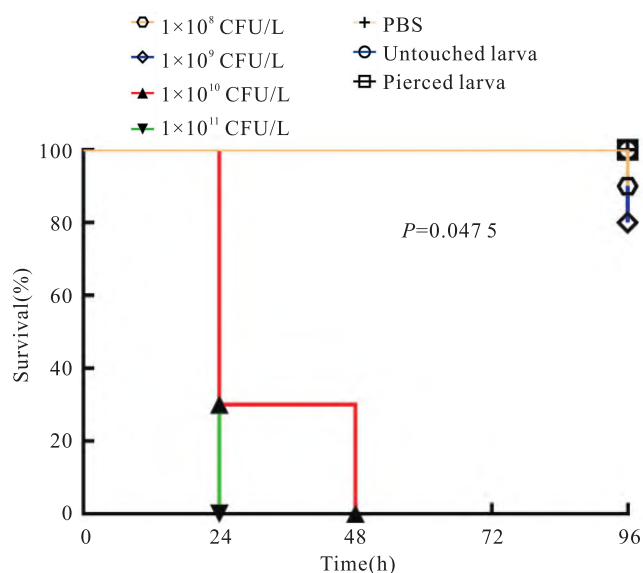


图 12 不同浓度鲍曼不动杆菌 GY-6 菌株感染大蜡螟幼虫的存活率

Fig. 12 Survival of *Galleria mellonella* larvae infected with different concentrations of *A. baumannii* strain GY-6

将不同 MOI 的 Abgy202162 悬液注射到感染宿主菌(1×10^{10} CFU/L)20 min 后的幼虫中显示,幼虫的存活率随着该噬菌体 MOI 的增加而增加。与其他 MOI 组相比,当 MOI = 50 时,幼虫的存活率在 120 h 时最高,达到了 90% (图 13)。

采用抗生素与噬菌体联合治疗感染 GY-6 后的大蜡螟。如图 14 所示,用 PBS、AMP、IPM 或 Abgy202162 单独治疗感染宿主菌后的大蜡螟时,幼虫的存活率在 120 h 时分别为 0、0、90% 和 80%。当

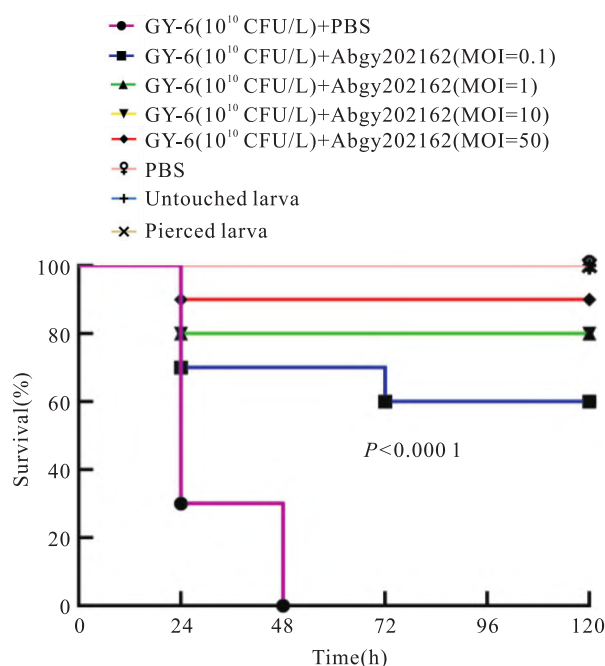


图 13 采用噬菌体 Abgy202162 治疗感染鲍曼不动杆菌 GY-6 菌株后的大蜡螟幼虫的存活率

Fig. 13 Survival rates after application of phage Abgy202162 for treating *A. baumannii* strain GY-6 infection in *Galleria mellonella* larvae

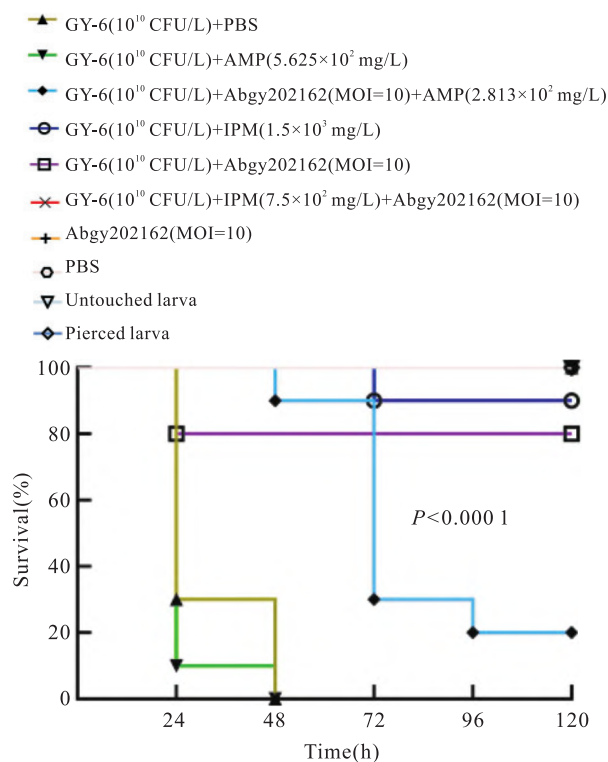


图 14 采用噬菌体 Abgy202162 与抗生素联合治疗感染鲍曼不动杆菌 GY-6 后的大蜡螟的存活率

Fig. 14 Survival rates after treatment with phage Abgy202162 combined with antibiotics for *A. baumannii* GY-6 infection in *Galleria mellonella* larvae

用 IPM 与 Abgy202162 联合治疗感染宿主菌后的大蜡螟时,幼虫的存活率在 120 h 时达到了 100%。当只注射 Abgy202162 (MOI = 10) 时,没有观察到幼虫死亡或变黑。与 PBS 和 AMP 治疗组相比,Abgy202162 治疗组显著提高了幼虫的存活率。与其他治疗组相比,IPM 与 Abgy202162 联合用药时,幼虫的存活率最高。结果表明,抗生素与噬菌体的联合用药可能是最佳的治疗方法。

3 讨论

近年来,由于人类滥用抗生素导致了鲍曼不动杆菌耐药性不断加重,目前已成为全球抗感染领域的重大挑战。因此,寻求新的抗感染手段迫在眉睫^[14]。噬菌体是一类可以裂解细菌等微生物的病毒,广泛存在于大自然中。噬菌体疗法的多样性(噬菌体裂解酶、单一噬菌体、噬菌体鸡尾酒等)决定了其具有极大的抗感染潜力^[14],因此,分离出更多新的噬菌体具有重要意义。

该研究分离到鲍曼不动杆菌噬菌体 Abgy202162。通过研究表明,极端 pH 环境可能影响 Abgy202162 的稳定性。Abgy202162 属于 *Autographiviridae* 科 *Friunavirus* 属。Abgy202162 以穿孔素-裂解酶的模式裂解宿主细菌^[14]。从系统发育树可以看出,Abgy202162 与已报道的 *Acinetobacter* phage SWH-Ab-3^[1] 的相似性很高,通过对比分析显示,它们对热和酸碱环境都具有较高的耐受性。但 *Acinetobacter* phage SWH-Ab-3 的潜伏期为 40 min,暴发量为每个细胞 31.4 PFU,而 Abgy202162 的潜伏期为 5 min,暴发量为每个细胞 520 PFU,说明 Abgy202162 的繁殖能力更强。但两者的基因组大小和 G + C 含量不同,*Acinetobacter* phage SWH-Ab-3 的基因组大小为 41 730 bp, G + C 含量为 39.38%,而 Abgy202162 的基因组大小为 40 889 bp, G + C 含量为 38.85%,说明 Abgy202162 是一株新的鲍曼不动杆菌噬菌体。从动物实验中可以看出,当只注射 Abgy202162 (MOI = 10) 时,幼虫全部存活,表明 Abgy202162 没有毒性。采用 IPM 与 Abgy202162 联合治疗感染鲍曼不动杆菌后的大蜡螟时,幼虫的存活率最高。表明抗生素与噬菌体联合用药可能是最佳的治疗方案,这在之前的研究中也得到了证实^[15]。

噬菌体 Abgy202162 的潜伏期短、繁殖力强、对热和酸碱环境的耐受性好及安全性高,与抗生素联合用药,可有效治疗鲍曼不动杆菌引起的感染。该研究为噬菌体的生物学特性和治疗效果评价等研究

提供了参考,并为进一步开发噬菌体制剂提供了依据。

参考文献

- [1] 孙千姿, 宁年智, 王 慧. 基于同源重组原理快速验证 fim 家族基因簇对鲍曼不动杆菌蹭动的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2024, 59(1): 8 - 14. doi:10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2024.01.002.
- [1] Sun Q Z, Ning N Z, Wang H. Rapid verification of the effect of fim family genes on the motility of *Acinetobacter baumannii* based on homologous recombination[J]. Acta Univ Med Anhui, 2024, 59(1): 8 - 14. doi:10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2024.01.002.
- [2] 张 然, 罗 娟, 吴 柳, 等. 鲍曼不动杆菌噬菌体 SWH-Ab-3 的生物学特性及其全基因组初步研究[J]. 第三军医大学学报, 2019, 41(13): 1192 - 9. doi:10.16016/j.1000 - 5404.201902048.
- [2] Zhang R, Luo J, Wu L, et al. Biological characteristics and preliminary genome analysis of *Acinetobacter baumannii* bacteriophage SWH-Ab-3[J]. J Third Mil Med Univ, 2019, 41(13): 1192 - 9. doi:10.16016/j.1000 - 5404.201902048.
- [3] Yang Z, Liu X, Shi Y, et al. Characterization and genome annotation of a newly detected bacteriophage infecting multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*[J]. Arch Virol, 2019, 164(6): 1527 - 33. doi:10.1007/s00705 - 019 - 04213 - 0.
- [4] Yuan X, Zhang S, Wang J, et al. Isolation and characterization of a novel *Escherichia coli* Kayfunavirus phage DY1[J]. Virus Res, 2021, 293: 198274. doi:10.1016/j.virusres.2020.198274.
- [5] Hao X, Cen X, He M, et al. Isolation, biological and whole genome characteristics of a *Proteus mirabilis* bacteriophage strain [J]. BMC Microbiol, 2023, 23(1): 215. doi:10.1186/s12866 - 023 - 02960 - 4.
- [6] Wei B, Cong C, Zheng L, et al. Isolation, characterization and whole genome analysis of the novel genus *Lederbergvirus*, phage vB_EcoP_E212 infecting enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 [J]. Virus Res, 2023, 331: 199125. doi:10.1016/j.virusres.2023.199125.
- [7] Wu M, Hu K, Xie Y, et al. A novel phage PD-6A3, and its endolysin Ply6A3, with extended lytic activity against *Acinetobacter baumannii*[J]. Front Microbiol, 2019, 9: 3302. doi:10.3389/fmicb.2018.03302.
- [8] 朱一诺. 两株鲍曼不动杆菌噬菌体的分离鉴定及生物学特性和基因组学的分析[D]. 北京: 北京化工大学, 2022. doi:10.26939/d.cnki.gbhgu.2022.002092.
- [8] Zhu Y N. Isolation and identification of *Acinetobacter baumannii* phages and their biological characteristics and genomics analysis [D]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology, 2022. doi:10.26939/d.cnki.gbhgu.2022.002092.
- [9] Pickard D J. Preparation of bacteriophage lysates and pure DNA [J]. Methods Mol Biol, 2009, 502: 3 - 9. doi:10.1007/978 - 1 - 60327 - 565 - 1_1.

- [10] Liu B, Zheng D, Zhou S, et al. VFDB 2022: a general classification scheme for bacterial virulence factors[J]. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50(D1): D912–7. doi:10.1093/nar/gkab1107.
- [11] Yang H, Liang L, Lin S, et al. Isolation and characterization of a virulent bacteriophage AB1 of *Acinetobacter baumannii* [J]. *BMC Microbiol*, 2010, 10:131. doi:10.1186/1471-2180-10-131.
- [12] 魏文娟. 临床分离泛耐药鲍曼不动杆菌的体外联合用药研究[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2016. doi: 10.7666/d.D01025757.
- [12] Wei W J. *In vitro* and *in vivo* antimicrobial combinations for extensively drug resistant *Acinetobacter baumannii* [D]. Hefei: Anhui Medical University, 2016. doi:10.7666/d.D01025757.
- [13] Wang Y C, Huang S W, Chiang M H, et al. *In vitro* and *in vivo* activities of imipenem combined with BLI-489 against class D β -lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2021, 76(2): 451–9. doi:10.1093/jac/dkaa421.
- [14] 彭文仪. 鲍曼不动杆菌噬菌体 5W 的生物学特性和基因组测序及前噬菌体的生物信息学分析[D]. 衡阳: 南华大学, 2021. doi:10.27234/d.cnki.gnhuu.2021.000952.
- [14] Peng W Y. Analysis of biological characteristics, genome sequencing of *Acinetobacter baumannii* phage 5W and bioinformatics of *Acinetobacter baumannii* prophage [D]. Hengyang: University of South China, 2021. doi:10.27234/d.cnki.gnhuu.2021.000952.
- [15] Jansen M, Wahida A, Latz S, et al. Enhanced antibacterial effect of the novel T4-like bacteriophage KARL-1 in combination with antibiotics against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 14140. doi:10.1038/s41598-018-32344-y.

Isolation, identification and treatment effectiveness evaluation of resistant *Acinetobacter baumannii* phage Abgy202162

Tian Xun^{1,2}, Tan Wencal^{1,2}, Yang Bi^{1,2}, Liu Xiang^{1,2}, Yu Wenfeng^{1,2}, Qi Xiaolan^{1,2}, Jiang Yinhui^{1,2}

(¹Key Laboratory of Medical Molecular Biology of Guizhou Province, Guizhou Medical University, Guiyang 550004; ²Guiyang & Key Laboratory of Endemic and Ethnic Diseases, Ministry of Education, Guizhou Medical University, Guiyang 550004)

Abstract Objective To isolate a *Acinetobacter baumannii* (Ab) phage from underground sewage, study its properties, and to provide a theoretical basis for phage treatment of Ab infection. **Methods** Double-layer agar technique was used to isolate phages by using Ab GY-6 as the host strain. Biological characterization and therapeutic effect of the phage was tested. Genetic information of the phage was analyzed. **Results** Ab phage Abgy202162 was isolated. Transmission electron microscopy (TEM) analysis showed that the morphology of Abgy202162 exhibited an icosahedral structure. Biological characteristic analysis showed that the optimal multiplicity of infection was 1, the latent period was 5 min, and the burst size was approximately 520 PFU per cell. In addition, Abgy202162 remained stable at different concentrations of chloroform, pH, and temperatures. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) analysis showed that it contained 10 proteins with molecular weights ranging from 15 to 100 ku. The double-stranded (ds) DNA genome of Abgy202162 consisted of 40 889 bp and its G + C content was 38.85%. It contained 47 open reading frames (ORFs), of which 26 had specific functions, but no virulence related genes or antibiotic resistance genes were found. Phylogenetic analysis showed that Abgy202162 was a new phage in the Autographiviridae family, Beijerinckvirinae subfamily, and Friunavirus genus. Abgy202162 showed the ability to prevent Ab infection in the *Galleria mellonella* *in vivo* model. **Conclusion** The phage Abgy202162 has strong environmental tolerance and high safety, indicating its potential as an antibiotic alternative used in the treatment of infections caused by Ab.

Key words *Acinetobacter baumannii*; phage; biological characteristics; genomic analysis; therapeutic evaluation; *Galleria mellonella* larvae

Fund programs National Natural Science Foundation of China (Nos. 32000017, 31660012)

Corresponding author Jiang Yinhui, E-mail: jyh5265@163.com