

· 论著 · 烧伤后炎症与免疫 ·

胸骨正中切口感染患者耐甲氧西林金黄色葡萄球菌噬菌体的基因组学信息及生物学特性分析



张建 燕荣帅 杨子晨 石茜 李翔 毛彤春 张一鸣

陆军军医大学(第三军医大学)第二附属医院整形美容外科,重庆 400037

通信作者:张一鸣,Email:zhangyiming@tmmu.edu.cn

【摘要】 目的 分离提纯 1 株新型耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的噬菌体,并对其基因组学信息和生物学特性进行分析。方法 采用实验研究方法。取分离自陆军军医大学(第三军医大学)第二附属医院收治的 1 例胸骨正中切口感染的 63 岁女性患者创面的 MRSA(下称宿主菌)液,采用污水共培养法和双层琼脂平板法从该院污水中分离提纯得到噬菌体,并命名为噬菌体 SAP23,观察噬菌斑形态。采用磷酸钨负染法将噬菌体 SAP23 染色,采用透射电子显微镜观察其形态。采用十二烷基磺酸钠/蛋白酶裂解方案制备噬菌体 SAP23 DNA,在 Illumina NovaSeq PE150 平台下进行全基因组测序,并完成序列组装、注释、系统发生树等基因组学分析。将噬菌体 SAP23 液分别按 10.000 0、1.000 0、0.100 0、0.010 0、0.001 0、0.000 1 感染复数与宿主菌液共培养 4 h 后,采用点滴法测定噬菌体效价,筛选最佳感染复数,此处及以下样本数均为 3。按测得的最佳感染复数取噬菌体 SAP23 液与宿主菌液分别共同孵育 5、10、15 min 后,同前测定噬菌体效价,筛选最佳吸附时间。按测得的最佳感染复数取噬菌体 SAP23 液与宿主菌液按最佳吸附时间孵育后,分别于培养 0(即刻)、5、10、15、20、30、40、50、60、80、100、120 min,同前测定噬菌体效价,绘制一步生长曲线。取噬菌体 SAP23 液分别在温度为 4、37、50、60、70、80 °C 下,在 pH 值为 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 下孵育 1 h,测定稳定性。取陆军军医大学(第三军医大学)微生物教研室储存的 41 株 MRSA,完成噬菌体 SAP23 的宿主谱范围检测。结果 噬菌体 SAP23 能在宿主菌双层琼脂板上形成透明噬菌斑。噬菌体 SAP23 头部是直径为(88±4)nm 的多面体,其尾部长度为(279±21)nm、宽度为(22.6±2.6)nm。噬菌体 SAP23 基因组为全长 151 618 bp 的线状双链 DNA,序列两端有 11 681 bp 的长末端重复序列,预测出 220 个开放阅读框,噬菌体可编码 4 个转运 RNA,未预测出毒力因子或抗性基因,注释功能的噬菌体 SAP23 基因可分为 5 个组,GenBank 登录号为 MZ427930,噬菌体 SAP23 全基因组序列与共线性分析中的 6 个葡萄球菌噬菌体全基因组序列有 5 个局部共线区域,但在局部共线区域内部或外部存在差异。噬菌体 SAP23 属于 Herelleviridae 科 Twortvirinae 亚科 Kayvirus 病毒属。噬菌体 SAP23 的最佳感染复数为 0.010 0,最佳吸附时间为 10 min,潜伏期约为 20 min,裂解期约为 80 min;在 4~37 °C 温度条件及 pH 值为 4~9 的条件中,稳定性较好。噬菌体 SAP23 可裂解 41 株 MRSA 中的 3 株。结论 噬菌体 SAP23 为 Herelleviridae 科 Twortvirinae 亚科 Kayvirus 病毒属成员,潜伏期短,其对温度和酸碱耐受性好,可有效裂解 MRSA,为不含毒力因子和抗性基因的新型烈性窄谱噬菌体。

【关键词】 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌; 细菌噬菌体; 基因组学; 伤口感染; 生物学特性

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(82002051);重庆市自然科学基金面上项目

DOI: 10.3760/cma.j.cn501120-20211130-00400

本文引用格式:张建,燕荣帅,杨子晨,等.胸骨正中切口感染患者耐甲氧西林金黄色葡萄球菌噬菌体的基因组学信息及生物学特性分析[J].中华烧伤与创面修复杂志,2022,38(2):137-146. DOI: 10.3760/cma.j.cn501120-20211130-00400.

Zhang J, Yan RS, Yang ZC, et al. Analysis of genomic information and biological characteristics of a bacteriophage against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in patients with median sternal incision infection[J]. Chin J Burns Wounds, 2022, 38(2): 137-146. DOI: 10.3760/cma.j.cn501120-20211130-00400.



(cstc2021jcyj-msxm0655)

Analysis of genomic information and biological characteristics of a bacteriophage against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in patients with median sternal incision infection

Zhang Jian, Yan Rongshuai, Yang Zichen, Shi Xi, Li Xiang, Mao Tongchun, Zhang Yiming

Department of Plastic and Cosmetic Surgery, the Second Affiliated Hospital of Army Medical University (the Third Military Medical University), Chongqing 400037, China

Corresponding author: Zhang Yiming, Email: zhangyiming@tmmu.edu.cn

[Abstract] Objective To isolate and purify a bacteriophage against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), and to analyze its genomic information and biological characteristics.

Methods The experimental research methods were adopted. MRSA (hereinafter referred to as host bacteria) solution was collected from the wound of a 63-year-old female patient with the median sternum incision infection admitted to the Second Affiliated Hospital of Army Medical University (the Third Military Medical University). The bacteriophage, named bacteriophage SAP23 was isolated and purified from the sewage of the Hospital by sewage co-culture method and double-layer agar plate method, and the plaque morphology was observed. The morphology of bacteriophage SAP23 was observed by transmission electron microscope after phosphotungstic acid negative staining. The whole genome of bacteriophage SAP23 was sequenced with NovaSeq PE15 platform after its DNA was prepared by sodium dodecyl sulfonate/protease cleavage scheme, and genomic analysis including sequence assembly, annotation, and phylogenetic tree were completed. The bacteriophage SAP23 solution was co-incubated with the host bacterial solution for 4 h at the multiplicity of infection (MOI) of 10.000 0, 1.000 0, 0.100 0, 0.010 0, 0.001 0, and 0.000 1, respectively, and then the bacteriophage titer was measured by the drip plate method to select the optimal MOI, with here and the following sample numbers of 3. The bacteriophage SAP23 solution was co-incubated with the host bacterial solution at the optimal MOI for 5, 10, and 15 min, respectively, and the bacteriophage titer was measured by the same method as mentioned above to select the optimal adsorption time. After the bacteriophage SAP23 solution was co-incubated with the host bacterial solution at the optimal MOI for the optimal adsorption time, the bacteriophage titers were measured by the same method as mentioned above at 0 (immediately), 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, and 120 min after culture, respectively, and a one-step growth curve was drawn. The bacteriophage SAP23 solution was incubated at 4, 37, 50, 60, 70, and 80 °C and pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, and 12 for 1 h, respectively, to determine its stability. A total of 41 MRSA strains stored in the Department of Microbiology of Army Medical University (the Third Military Medical University) were used to determine the host spectrum of bacteriophage SAP23. **Results** The bacteriophage SAP23 could form a transparent plaque on the host bacteria double-layer agar plate. The bacteriophage SAP23 has a polyhedral head with (88±4) nm in diameter and a tail with (279±21) nm in length and (22.6±2.6) nm in width. The bacteriophage SAP23 has a linear, double-stranded DNA with a full length of 151 618 bp and 11 681 bp long terminal repeats sequence in the sequence ends. There were 220 open reading frames predicted and the bacteriophage could encode 4 transfer RNAs, while no resistance genes or virulence factors were found. The annotation function of bacteriophage SAP23 genes could be divided into 5 groups. The GenBank accession number was MZ427930. According to the genomic collinearity analysis, there were 5 local collinear blocks in the whole genome between the bacteriophage SAP23 and the chosen 6 *Staphylococcus* bacteriophages, while within or outside the local collinear region, there were still some differences. The bacteriophage SAP23 belonged to the *Herelleviridae* family, *Twortvirinae* subfamily, and *Kayvirus* genus. The optimal MOI of bacteriophage SAP23 was 0.010 0, and the optimal adsorption time was 10 min. The bacteriophage SAP23 had a latent period of 20 min, and a growth phase of 80 min. The bacteriophage SAP23 was able to remain stable at the temperature between 4 and 37 °C and at the pH values between 4 and 9. The bacteriophage SAP23 could lyse 3 of the 41 tested MRSA strains. **Conclusions** The bacteriophage SAP23 is a member of the *Herelleviridae* family, *Twortvirinae* subfamily, and *Kayvirus* genus. The bacteriophage SAP23 has a good tolerance for temperature and acid-base and a short latent period, and can lyse MRSA effectively. The bacteriophage SAP23 is a new type of potent narrow-spectrum bacteriophage without virulence factors and resistance genes.

[Key words] Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; Bacteriophages; Genomics; Wound infection; Biological characteristics

Fund program: Youth Science Foundation Project of National Natural Science Foundation of China (82002051); General Program of Natural Science Foundation of Chongqing of China (cstc2021jcyj-msxm 0655)

创面修复是一个复杂的生物学过程^[1],任何一种不利因素,如感染、年龄和营养等均会影响正常修复过程^[2],其中感染是影响创面愈合的一个重要因素^[3-4]。目前金黄色葡萄球菌已经成为创面感染的主要致病菌之一^[5],随着抗生素广泛应用甚至过量使用,耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)菌株引起的感染越来越多,与普通金黄色葡萄球菌引起的感染相比,其治疗难度更大、致死率更高^[6]。MRSA 耐药机制复杂,包括细胞壁增厚、细胞膜外排泵增加、细胞质药物靶点突变和药物修饰等,可对各类抗生素耐药^[7]。当前,世界卫生组织已将 MRSA 列为抗生素耐药菌清单的重点细菌之一,大力寻求新的治疗方案,并促进新药品的研究和开发^[8]。因此探索针对 MRSA 感染的有效治疗方式具有重要意义。

噬菌体在 1915 年被发现即被用来治疗细菌感染性疾病,但抗生素的快速发展使噬菌体研究放缓^[9]。如今由于抗生素耐药菌的出现,噬菌体疗法重新受到关注^[10-12]。已有将噬菌体用于治疗感染性疾病,如急性细菌性腹泻^[13-14]、烧伤感染^[15]、尿路感染^[16]等的相关报道。与此同时,噬菌体衍生物的应用也在研究中,例如内溶素的抗感染、工程融合蛋白 NPT088 治疗阿尔茨海默病等^[17-18]。大量研究表明,噬菌体疗法可安全有效治疗抗生素耐药菌。

本实验宿主菌为 1 株从 1 例胸骨正中切口感染患者创面分离获得的 MRSA,采用污水共培养法分离提纯到该菌株的特异性噬菌体,完成基因组分析和生物学功能验证,以期为下一步在体实验及探索临床针对 MRSA 的噬菌体疗法提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器来源

胰蛋白胍大豆肉汤(TSB)培养基粉剂购自英国 Oxoid 公司,DNA 酶 I、RNA 酶 A、0.22 μm 聚醚砜树脂(PES)针头式过滤器(以下简称滤器)、聚乙二醇 8000 粉剂购自生工生物工程(上海)股份有限公司。ZS-CR 型振荡培养箱购自浙江华源仪器有限公司,Eppendorf AG 22331 型超速离心机购自德国 Eppendorf 公司,HTT700 型透射电子显微镜购自日本日立公司,Smartspec™ 3000 型分光光度计购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 临床资料及细菌准备

1 例 63 岁女性患者于陆军军医大学(第三军医

大学)第二附属医院心血管外科行心脏外科手术,术后 45 d 出现胸骨正中切口感染,并于 2020 年 6 月转入整形美容外科治疗。从该例患者伤口组织和分泌物分离获得菌株,于该院临床检验科采用全自动微生物鉴定系统完成细菌鉴定,并进一步行药物敏感试验。该株细菌是一株金黄色葡萄球菌,且对青霉素、阿莫西林/克拉维酸、苯唑西林、氨苄西林、复方磺胺甲噁唑、环丙沙星、利福平、庆大霉素、四环素、红霉素耐药,最终鉴定为 MRSA(下称宿主菌)。

将宿主菌单菌落接种至 TSB 液体培养基,扩增菌液,并与体积分数为 50% 甘油等比例混合后,于 -80 °C 冰箱冻存保菌。每次实验菌液都选用单菌落扩增菌液。

1.3 噬菌体分离纯化与噬菌斑形态观察和噬菌体浓缩

使用污水共培养法分离噬菌体^[19]。取该院污水处理中心未经处理的污水,以 10 000×g 在超速离心机中离心 10 min 后取上清液 100 mL。取宿主菌液 1 mL,加入 100 mL TSB 液体培养基中混合,于 37 °C 下,在振荡培养箱中以 180 r/min 振荡培养(以下简称常规振荡培养)获得对数生长期菌液(分光光度计测得波长 600 nm 处吸光度值为 0.3~0.6),与污水上清液混合,常规振荡培养过夜以富集到更多噬菌体。次日,取 10 mL 共培养物,以 10 000×g 离心 10 min,取上清液,用滤器过滤掉上清液中的细菌。采用双层琼脂平板法检测过滤后的上清液中是否含有相应的噬菌体:取 100 μL 过滤后的上清液,在室温下与 200 μL 宿主菌液孵育 10 min,加入约 3 mL 约 45 °C 半固体 TSB 培养基,混合均匀后浇注上层平板,下层平板为适量的 TSB 固体培养基,37 °C 培养过夜。次日,若观察到双层琼脂板上有透明噬菌斑形成,则可确定筛选到特异性噬菌体。挑选单个透明噬菌斑再次与宿主菌液共培养,重复以上实验步骤 3 次以获得纯化的噬菌体。收集最终纯化的噬菌体,命名为噬菌体 SAP23。相机拍照,观察噬菌斑形态。

取噬菌体 SAP23 单个噬菌斑,与 100 mL 对数生长期宿主菌液混合后常规振荡培养过夜。次日,将 100 mL 共培养物以 10 000×g 离心 10 min,取上清液,用滤器过滤掉上清液中的细菌,向过滤后的上清液中加入 DNA 酶 I、RNA 酶 A 至二者终质量浓度均为 1 μg/mL,并在 37 °C 下孵育 30 min。向混合物

中加入氯化钠粉剂至终质量浓度为 0.584 g/L, 0 °C 冰浴 1 h。将混合物再次以 10 000×g 离心 10 min 后, 收集上清液。加入聚乙二醇 8000 粉剂至终体积分数为 10%, 溶解后 0 °C 冰浴过夜, 形成噬菌体 SAP23 沉积物, 然后以 12 000×g 离心 10 min 收集沉积物, 加入 2 mL TM 缓冲液重新悬浮沉积物。最后, 加入 2 mL 氯仿并振荡 30 s, 以 5 000×g 离心 10 min 并收集上清液, 再次加入 2 mL 氯仿重复上述步骤 1 次, 收集上清液, 置于 4 °C 冰箱保存备用。

1.4 噬菌体 SAP23 形态观察及测量

采用磷钨酸负染法将噬菌体染色: 取 10 μL 噬菌体 SAP23 上清液, 然后滴加到碳涂层铜网格上吸附 15 min, 用 0.2 g/L 磷钨酸负染 30 s。于 40 000 倍透射电子显微镜下观察噬菌体 SAP23 的形态并拍照。采用 Image Pro Plus 6.0 图像分析软件(美国 Media Cybernetics 公司)测量 3 个噬菌体, 每个噬菌体重复测量 3 次, 结果取均值。

1.5 噬菌体 SAP23 DNA 制备

采用十二烷基磺酸钠/蛋白酶裂解方案制备噬菌体 DNA^[20]。取 100 mL 噬菌体 SAP23 上清液, 加入 DNA 酶 I、RNA 酶 A 至终质量浓度分别为 5 μg/mL 和 1 μg/mL, 37 °C 水浴 1 h, 再添加 pH 值为 8.0 的乙二胺四乙酸至终物质的量浓度为 20 mmol/L。向混合物中加入蛋白酶 K、十二烷基磺酸钠至终质量浓度分别为 50 μg/mL 和 0.05 g/L, 混匀后, 56 °C 金属浴 1 h 以裂解噬菌体衣壳。然后加入约 1 mL pH 值为 8.0 的平衡酚, 振荡, 5 000×g 离心 10 min 后收集上层水相。再次加入等体积氯仿抽提并以 5 000×g 离心 10 min 收集上层水相。最后加入约 0.6 mL 异丙醇, 混匀后, 置于 -20 °C 冰箱过夜, 以沉淀噬菌体 DNA。次日, 将混合物在 4 °C 下, 以 12 000×g 离心 20 min, 弃去上清液, 晾干沉淀。将沉淀用体积分数 70% 乙醇和无水乙醇分别洗涤 1 次, 在 4 °C 下, 以 10 000×g 离心 10 min, 弃去乙醇, 室温晾干。将沉淀溶解在 500 μL 蒸馏水中, 制得噬菌体 SAP23 DNA。

1.6 噬菌体 SAP23 基因组序列分析

将噬菌体 SAP23 基因组送至北京诺禾致源科技股份有限公司, 在 Illumina NovaSeq PE150 平台下进行全基因组测序, 从头组装获得噬菌体 SAP23 基因组序列。使用 PhageTerm 软件^[21] 预测噬菌体 SAP23 基因组末端, 用基因组预测软件 GeneMarkS 4.17^[22]、RAST 2.0^[23-24]、PHASTER^[25] 对已组装的噬菌体 SAP23 基因组序列进行开放阅读框(ORF)预

测, 并手动检查不同数据库预测出的 ORF, 然后使用非编码 RNA 预测软件 tRNAscan-SE 1.3.1^[26]、rRNAmmer 1.2^[27] 对非编码 RNA 进行预测, 通过与致病菌毒力因子数据库和抗性基因数据库比对预测毒力因子与抗性基因。使用美国国家生物技术信息中心(NCBI)网站的 Blastx 功能, 将核苷酸序列翻译为蛋白质序列, 然后在 NCBI 的 GenBank 数据库中寻找最高相似性的蛋白质, 对预测的 ORF 进行功能注释, 并将注释后噬菌体 SAP23 基因组序列上传至 NCBI 的 GenBank 数据库, 获得 GenBank 登录号, 最后使用基因可视化软件 CGView Server^{BETA} 将基因可视化。使用 NCBI 数据库 BLAST 功能与已知噬菌体进行全基因组序列比对, 选择部分已知噬菌体, 采用共线性分析软件 Mauve 20150226 进行全基因组共线性分析^[28-29]。使用系统发生树分析软件 MEGA-X 10.0.2 制作分析基于噬菌体 SAP23 主要大衣壳氨基酸序列^[30] 的系统发生树, 采用的方法为邻近矩阵法, 替换模型为泊松模型; 同时使用多序列比对程序 MAFFT 7.0 将噬菌体 SAP23 全基因组序列与已知噬菌体全基因组序列进行比对, 使用系统发生树分析软件 MEGA-X 10.0.2 制作系统发生树, 采用的方法为最大似然法, 替换模型为 Kimura-2 模型, 最终选择可信度最高的系统发生树图形。完成共线性比对及系统发生树分析以确定噬菌体 SAP23 的种属。

1.7 噬菌体 SAP23 最佳感染复数测定

取 5 mL 对数生长期宿主菌液, 采用平板菌落计数法测得浓度, 并将其调整为 1×10^8 CFU/mL。取噬菌体 SAP23 液, 采用点滴法测定噬菌体效价。先用约 5 mL TSB 固体培养基在带小方格的方平板中浇注下层平板, 将各小方格进行标记; 取 200 μL 宿主菌液与约 5 mL TSB 半固体培养基混合后浇注上层平板, 将 10 000×g 离心 10 min 过滤后的共培养物上清液使用 TSB 液体培养基 1:10 梯度稀释后, 取不同稀释比例上清液 5 μL, 滴至方平板中对应小方格, 待水分蒸发后, 在 37 °C 孵箱中静置培养过夜。次日对各小方格内噬菌斑计数以计算噬菌体效价, 噬菌体效价=(噬菌斑数÷5)×1 000×稀释倍数, 此次噬菌体 SAP23 效价为 7.6×10^9 噬斑形成单位(PFU)/mL。

参考文献[31]方法并适当改进。取 6 支试管, 每管加入 500 μL 宿主菌液, 再加入 500 μL 按照 10.000 0、1.000 0、0.100 0、0.010 0、0.001 0、0.000 1 感染复数稀释后的噬菌体 SAP23 液, 迅速加

入 4 mL TSB 液体培养基,常规振荡培养 4 h 后,在 $10\,000\times g$ 下离心取上清液,并使用滤器过滤,采用点滴法测定噬菌体效价。本实验重复 3 次,结果取均值,效价最高者的感染复数为最佳感染复数。

1.8 噬菌体 SAP23 最佳吸附时间测定

取 4 mL 宿主菌液并同 1.7 调整为相同浓度,以 1.7 测得的最佳感染复数加入 $40\ \mu\text{L}$ 噬菌体 SAP23 液于试管中混合均匀,于室温下共同孵育 5、10、15 min(每个时间点 3 管)后,在 $10\,000\times g$ 下离心 10 min 取上清液,同 1.7 采用点滴法测定噬菌体效价,当上清液中噬菌体效价最低时,说明噬菌体吸附宿主菌最多,此为最佳吸附时间。

1.9 噬菌体 SAP23 对宿主菌的裂解规律测定

参考本研究团队之前的实验方法^[19]进行。取 4 mL 宿主菌液并同 1.7 调整为相同浓度,以 1.7 测得的最佳感染复数加入 $40\ \mu\text{L}$ 噬菌体 SAP23 液,于室温下按 1.8 测得的最佳吸附时间孵育。4 °C 下,以 $12\,000\times g$ 离心 1 min,弃去上清液,在冰上使用 TSB 液体培养基洗涤沉淀 2 次,去除未吸收的噬菌体。之后,加入 5 mL TSB 液体培养基重新悬浮沉淀,常规振荡培养。分别于培养 0(即刻)、5、10、15、20、30、40、50、60、80、100、120 min 取 $100\ \mu\text{L}$ 样本,以 $10\,000\times g$ 离心 1 min 后取上清液,同 1.7 采用点滴法测定噬菌体效价。本实验重复 3 次,取均值后,以时间为横坐标,噬菌体效价为纵坐标绘制噬菌体 SAP23 一步生长曲线。

1.10 噬菌体 SAP23 稳定性测定

取效价为 7.6×10^9 PFU/mL 噬菌体 SAP23 液分装至 6 支 EP 管(每管 $500\ \mu\text{L}$),分别在温度为 4、37、50、60、70、80 °C 情况下孵育 1 h,按照 1.7 点滴法测定噬菌体效价。取 11 支 EP 管,分别加入 pH 值为 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 的 TM 缓冲液 $900\ \mu\text{L}$,每管加入效价 3.2×10^9 PFU/mL 噬菌体 SAP23 液 $100\ \mu\text{L}$,37 °C 下孵育 1 h 后,按照 1.7 点滴法测定各噬菌体效价。重复 3 次温度稳定性和 pH 稳定性试验,并取均值,分别以温度、pH 值为横坐标,噬菌体 SAP23 效价为纵坐标绘制温度稳定性曲线和 pH 稳定性曲线。

1.11 噬菌体 SAP23 宿主谱范围检测

取陆军军医大学(第三军医大学)微生物教研室储存的 41 株已完成耐药基因检测的 MRSA 并编号,各菌株取 $200\ \mu\text{L}$ 菌液与约 3 mL TSB 半固体培养基混合后浇注上层平板,下层平板由约 3 mL TSB 固体培养基浇注。取 $5\ \mu\text{L}$ 噬菌体 SAP23 液滴至平板

上层,37 °C 孵箱静置培养过夜,观察噬菌斑形成情况。若无噬菌斑,则认为噬菌体 SAP23 不能裂解该菌株;若见透明噬菌斑,则认为噬菌体 SAP23 能裂解该菌株;若噬菌斑混浊,则认为噬菌体 SAP23 对该菌株裂解能力弱。

1.12 数据处理

噬菌体的形态测量、裂解规律和稳定性测定结果,均使用 GraphPad 9.0.0 软件进行分析并制图,计量资料数据均符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 噬菌体 SAP23 的形态及噬菌斑形态

噬菌体 SAP23 能在宿主菌双层琼脂板上形成直径 0.5~1.5 mm 的透明噬菌斑(图 1A)。噬菌体 SAP23 头部是直径为 $(88\pm 4)\text{nm}$ 的多面体,尾部长度为 $(279\pm 21)\text{nm}$ 、宽度为 $(22.6\pm 2.6)\text{nm}$ (图 1B)。

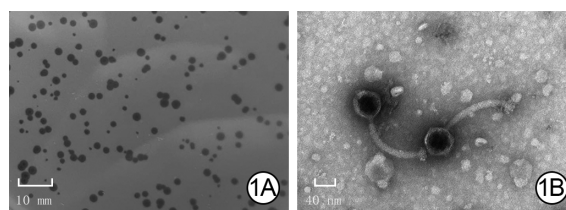


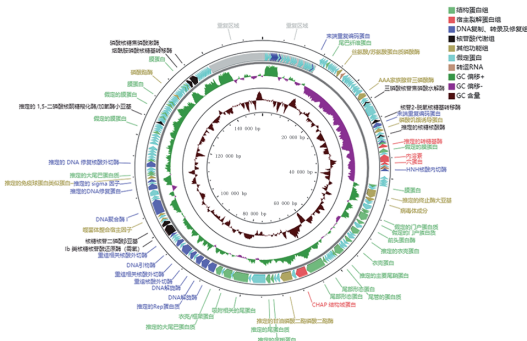
图 1 从 1 例胸骨正中切口感染患者创面标本中分离的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌噬菌体 SAP23 及噬菌斑形态。1A.噬菌体 SAP23 形成透明噬菌斑 图中标尺为 10 mm;1B.噬菌体 SAP23 头部为多面体,并有尾部 透射电子显微镜 $\times 40\,000$,图中标尺为 40 nm

2.2 噬菌体 SAP23 基因组序列分析结果

噬菌体 SAP23 基因组为全长 151 618 bp 的线状双链 DNA,其中鸟嘌呤+胞嘧啶所占比例为 30.38% ($46\,057/151\,618$)。通过 PhageTerm 软件预测出噬菌体 SAP23 基因组序列两端有 11 681 bp 的长末端重复序列。预测出 220 个 ORF,平均每个 ORF 长 564.02 bp。220 个 ORF 中有 72 个 ORF 与 GenBank 数据库中具有注释功能的基因相似,148 个 ORF 与未鉴定的蛋白质具有同源性。预测出噬菌体 SAP23 编码 4 个转运 RNA(tRNA),它们都位于反链上,平均长度为 70.00 bp,其中 Asp-tRNA、Phe-tRNA 和 Trp-tRNA 连续出现,而 pseu-tRNA 单独位于另一个区域。未预测出毒力因子或抗性基因。

注释功能的噬菌体 SAP23 基因可分为 5 个组:结构蛋白组,DNA 复制、转录及修复组,核苷酸代谢组,宿主裂解组和其他功能组。结构蛋白组包含噬菌体衣壳蛋白、噬菌体尾鞘蛋白、头部蛋白、基板蛋

白、门户蛋白、尾蛋白及膜蛋白。DNA 复制、转录及修复组包括 DNA 聚合酶、DNA 解螺旋酶、核酸内切酶、核酸外切酶、DNA 连接酶、Rep、DNA 引物、末端重复编码蛋白、DNA 修复蛋白。核苷酸代谢组包括磷酸核糖焦磷酸激酶、核糖核酸酶、核苷 2-脱氧核糖基转移酶等功能性蛋白。宿主裂解蛋白组包括内溶素、糖基转移酶、穴蛋白及 CHAP 结构域蛋白。其他功能组包括 AAA 族 ATP 酶、AST、磷酸酯酶等功能性酶。噬菌体 SAP23 的 GenBank 登录号为 MZ427930。噬菌体 SAP23 基因可视化结果见图 2。



注:每个箭头代表 1 个开放阅读框,不同颜色代表编码蛋白不同功能分类;GC 为鸟嘌呤胞嘧啶

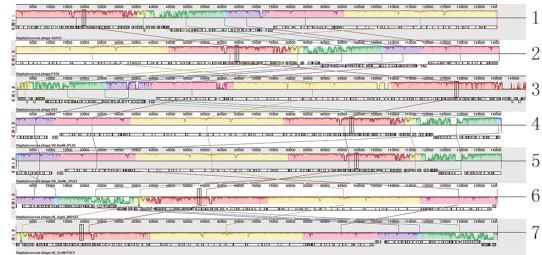
图 2 从 1 例胸骨正中切口感染患者创面标本中分离的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌噬菌体 SAP23 基因注释记录图

通过与 NCBI 数据库中已知噬菌体全基因组序列比对,可知噬菌体 SAP23 与葡萄球菌噬菌体 P108、葡萄球菌噬菌体 vB_SauH_IME522、葡萄球菌噬菌体 VB_SavM_JYL01、葡萄球菌噬菌体 VB_SavM_JYL02 及葡萄球菌噬菌体 vB_ScoM-PSC1 相似度为 92%,与葡萄球菌噬菌体 812 相似度为 86%。Mauve 20150226 软件行全基因组共线性分析结果可知,噬菌体 SAP23 基因组与上述 6 株噬菌体基因组有 5 个局部共线区域(LCB),存在 LCB 重排及倒置,同时各个 LCB 中部分基因存在差异,包括基因的变异、重排和插入等情况。见图 3。

从主要大衣壳蛋白氨基酸序列和全基因组序列系统发生树结果可见噬菌体 SAP23 与葡萄球菌噬菌体 P108 在同一分支,可信度为 100%,遗传距离极短,可以确定噬菌体 SAP23 与葡萄球菌噬菌体 P108 为同一病毒属,属于 *Herellevirinae* 亚科 *Kayvirus* 病毒属。见图 4。

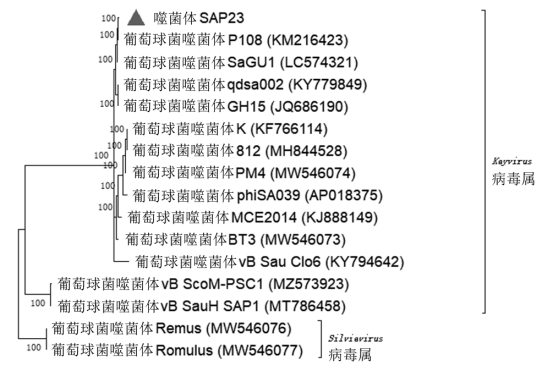
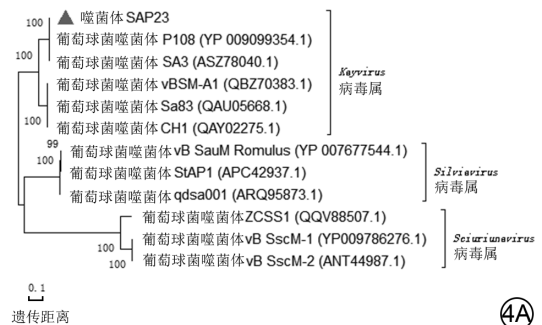
2.3 噬菌体 SAP23 最佳感染复数

当感染复数分别为 10.000 0、1.000 0、0.100 0、0.010 0、0.001 0、0.000 1 时,培养 4 h 后,噬菌体



注:1.噬菌体 SAP23,2.葡萄球菌噬菌体 P108,3.葡萄球菌噬菌体 812,4.葡萄球菌噬菌体 VB_SavM_JYL02,5.葡萄球菌噬菌体 VB_SavM_JYL01,6.葡萄球菌噬菌体 vB_SauH_IME522,7.葡萄球菌噬菌体 vB_ScoM-PSC1;5 种颜色块代表 5 个局部共线区域;局部共线区域内部或外部的空白区域代表基因组之间的差异区域

图 3 从 1 例胸骨正中切口感染患者创面标本中分离的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌噬菌体 SAP23 基因组与 6 株葡萄球菌噬菌体基因组的全基因组共线性记录图



注:系统发生树中括号中编号为 GenBank 登录号,左侧分支数据代表可信度

图 4 从 1 例胸骨正中切口感染患者创面标本中分离的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌噬菌体 SAP23 系统发生树记录图。4A.主要大衣壳蛋白氨基酸序列系统发生树;4B.全基因组序列系统发生树

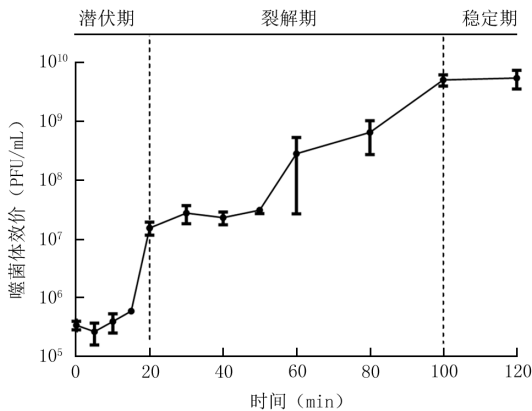
SAP23 效价分别为 (11.0±3.5)、(10.7±0.6)、(25.0±9.2)、(54.6±7.3)、(44.0±3.3)、(5.1±1.7)×10⁷ PFU/mL。当感染复数为 0.0 100 时,噬菌体 SAP23 效价最高,说明噬菌体 SAP23 的最佳感染复数为 0.0 100。

2.4 噬菌体 SAP23 最佳吸附时间

孵育 5、10、15 min, 噬菌体 SAP23 效价分别为 (29.5 ± 3.0) 、 (12.7 ± 3.8) 、 $(28.7 \pm 10.8) \times 10^7$ PFU/mL, 因此噬菌体 SAP23 最佳吸附时间为 10 min。

2.5 噬菌体 SAP23 对宿主菌的裂解规律

噬菌体 SAP23 与宿主菌共培养的前 20 min 内, 其效价较培养 0 min 时无明显变化, 即潜伏期约为 20 min; 在共培养的 20~100 min, 其效价迅速升高, 并在 100 min 后趋于稳定, 则噬菌体 SAP23 裂解期约为 80 min。见图 5。



注: PFU 为菌斑形成单位; 该图为经过 lg 处理的数据形成的描记图; 坐标轴数据为未经 lg 处理的原始数据

图 5 从 1 例胸骨正中切口感染患者创面标本中分离的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌噬菌体 SAP23 与宿主菌共培养不同时间点的噬菌体效价 ($\bar{x} \pm s$, 样本数为 3)

2.6 噬菌体 SAP23 的稳定性

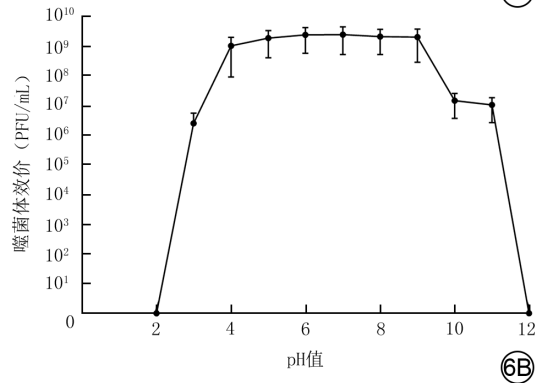
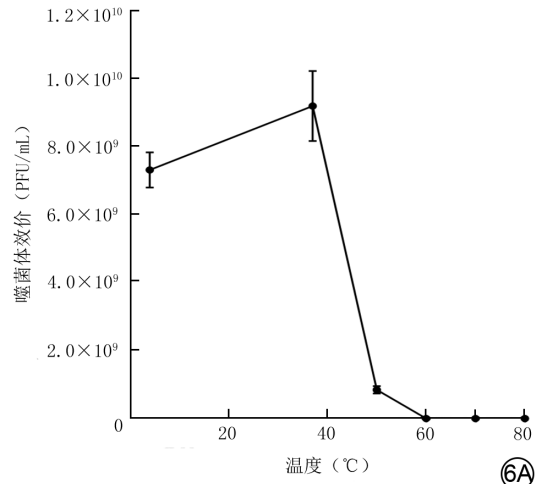
在 4~37 °C 的温度下, 噬菌体 SAP23 孵育 1 h 后效价无明显变化; 而在 50~80 °C 的温度下, 噬菌体 SAP23 孵育 1 h 后效价迅速下降, 最终完全失活 (图 6A)。pH 值在 4~9, 噬菌体 SAP23 的效价趋于稳定, 但当 pH 值 <4 或 >9 时, 噬菌体的效价迅速降低, 最后完全失活 (图 6B)。

2.7 噬菌体 SAP23 宿主谱

噬菌体 SAP23 对 41 株 MRSA 中的 3 株有裂解能力, 其中在接种菌株 CY6、SY17 的平板上可见圆形透明噬菌斑, 在接种菌株 NF90 的平板上可见混浊噬菌斑。见表 1。

3 讨论

预防或消除病原菌能够降低创面感染发病率和促进创面愈合。当前, MRSA 是感染创面的重要致病菌^[32], 常规抗生素针对 MRSA 无效, 给临床治疗带来极大困扰。本研究中的 MRSA 菌株对多种抗生



注: PFU 为菌斑形成单位; 图 6B 为经过 lg 处理的数据形成的描记图, 坐标轴数据为未经 lg 处理的原始数据

图 6 从 1 例胸骨正中切口感染患者创面标本中分离的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌噬菌体 SAP23 在不同温度和 pH 值条件下的稳定性 ($\bar{x} \pm s$, 样本数均为 3)。6A. 不同温度条件孵育 1 h 后噬菌体效价; 6B. 不同 pH 值条件下孵育 1 h 后噬菌体效价

表 1 胸骨正中切口感染患者耐甲氧西林金黄色葡萄球菌噬菌体 SAP23 对 41 株耐甲氧西林金黄色葡萄球菌裂解情况

菌株编号	噬菌斑	菌株编号	噬菌斑	菌株编号	噬菌斑	菌株编号	噬菌斑
DP100	-	CY6	++	NF99	-	G15	-
CY15	-	NF7	-	SY14	-	G26	-
CY14	-	NF70	-	SY19	-	G25	-
CY19	-	NF71	-	SY33	-	G31	-
CY18	-	NF73	-	SY17	++	G34	-
CY5	-	NF75	-	SY5	-	G13	-
CY11	-	NF8	-	SY13	-	G21	-
CY16	-	NF84	-	SY23	-	G17	-
CY7	-	NF88	-	SY6	-	G36	-
CY8	-	NF90	+	SY15	-	G16	-
CY20	-						

注: “++”表示可见透明噬菌斑, “+”表示可见混浊噬菌斑, “-”表示未见噬菌斑

素耐药,万古霉素为其敏感抗生素,但也存在起效慢、肝肾毒性及抗生素抵抗等问题^[33],亟须探索新的治疗药物和方法^[34-35]。噬菌体杀菌能力不受耐药基因影响,可有效杀灭细菌,已有少数关于将其用于治疗临床感染的研究^[36-37],但针对 MRSA 的噬菌体研究和治疗,仍然存在 MRSA 对噬菌体产生抵抗的问题^[38]。不断从自然界分离新的野生噬菌体,丰富更新现有噬菌体库,制订个性化的噬菌体鸡尾酒配方是减少和解决细菌对噬菌体抵抗问题的最常见方法^[39-40]。

本研究团队通过污水共培养法获得的噬菌体 SAP23,在双层琼脂板上能够形成透明的噬菌斑,表明其对宿主 MRSA 有明确的裂解能力,且属于烈性噬菌体。与温和噬菌体不同,烈性噬菌体在感染宿主后,即刻利用宿主系统,完成子代的复制,然后裂解宿主,以达到抗菌作用^[36]。通过全基因组共线性分析比对和系统发生树分析可知,噬菌体 SAP23 与葡萄球菌噬菌体 P108 亲缘关系最近,根据 2019 年国际微生物学会联合会更新原核病毒分类^[41],噬菌体 SAP23 应为 *Herelleviridae* 科 *Twortvirinae* 亚科 *Kayvirus* 病毒属新成员。此类噬菌体基因组长约 140 000 bp,拥有 200 多个 ORF^[42],其对金黄色葡萄球菌有很强的裂解能力^[42-43]。本研究结果为将噬菌体 SAP23 用于抗感染治疗提供了基础。

通过对噬菌体 SAP23 进行功能注释,可以推测其拥有 4 个裂解相关蛋白:ORF71 预测编码糖基转移酶、ORF74 预测编码内溶素、ORF75 预测编码穴蛋白和 ORF113 预测编码 CHAP 结构域蛋白。ORF71 预测编码的糖基转移酶是一种非水解酶,通过切割 N-乙酰胞壁酰和 N-乙酰氨基葡萄糖残基之间的糖苷键以裂解细胞壁^[44]。与内溶素不同,CHAP 结构域蛋白(ORF113)可从外部单独裂解细菌胞壁,同时也可与酰胺酶域或 SH3b 域结合以增强其裂解能力^[45-46]。ORF74 预测编码的内溶素与已知的内溶素 LysGH15、LysMR-5 相似度为 99%;LysGH15^[47]、LysMR-5^[48]裂解活性高,有快速的杀菌动力学,对其敏感的宿主葡萄球菌菌株表现出强烈的溶菌作用。而穴蛋白(ORF75)主要功能是在细菌膜上形成通道,使内溶素进入周质以降解细菌细胞壁^[49]。噬菌体 SAP23 的裂解相关蛋白丰富,具有不同的切割特异性,在裂解过程中能够产生协同作用,以增加裂解宿主菌的能力^[50]。可从理论上解释噬菌体 SAP23 能够裂解其宿主,并形成透明的噬菌

斑的原因。噬菌体 SAP23 中 tRNA 的预测结果与大多数 *Kayvirus* 属金黄色葡萄球菌噬菌体结构相同^[51-52]。tRNA 主要功能是弥补噬菌体的缺失偏向,维持基因组的稳定性,也可以更有效地翻译噬菌体蛋白质、缩短其潜伏时间和提高繁殖率^[53-54]。此外,噬菌体 SAP23 中并未检测到毒力基因和抗性基因,为其应用于临床提供了又一安全依据^[55-56]。

在完成基因组分析后,本研究团队进一步对噬菌体 SAP23 生物学功能进行测定。噬菌体 SAP23 的潜伏期较短,与部分 *Kayvirus* 病毒属噬菌体的潜伏期时间^[31,51,57]相似,能短时间内在宿主菌内合成其子代,裂解宿主菌,以达到杀菌的作用。噬菌体 SAP23 对酸碱和温度耐受性较好,与部分金黄色葡萄球菌噬菌体的酸碱及温度耐受能力^[58-60]相似,这提示噬菌体 SAP23 在人体生理环境中(温度 36.3~37.2 °C,pH 值 7.35~7.45)能保持稳定的效价。噬菌体 SAP23 的裂解谱测试结果表明,与噬菌体 JD007、ESa1、JD419 和 SaGU1 等相比^[52,59-60],噬菌体 SAP23 杀菌范围更窄,特异性更强。以上实验结果进一步表明噬菌体 SAP23 有在临床应用的可能性。

当前有 MRSA 噬菌体成功治疗感染性疾病的报道,如 MRSA 所致的慢性假体关节感染^[61]、严重局部放射烧伤^[62]、糖尿病足^[35]等。这些用于临床的噬菌体具有一些相似的特性,如为烈性噬菌体,大多数噬菌体为肌病毒科,基因组中均不存在毒力和抗生素抗性基因等。噬菌体 SAP23 与当前报道的临床应用噬菌体相似,具有临床应用潜力。噬菌体临床应用大规模应用仍存在一些阻碍,如伦理、机体免疫、细菌对噬菌体抵抗等^[63]。

通过对噬菌体 SAP23 基因组分析和生物学特性验证,本研究团队确定噬菌体 SAP23 为 *Herelleviridae* 科 *Twortvirinae* 亚科 *Kayvirus* 病毒属噬菌体新成员,其温度及酸碱稳定性较好,且潜伏期短,安全性高,可有效裂解 MRSA,是一株新的烈性窄谱噬菌体,丰富了针对 MRSA 的噬菌体文库。这为本研究团队进一步的动物实验打下了基础,也为临床探索针对 MRSA 的噬菌体疗法提供了依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 张建: 酝酿和设计实验、实施研究、采集数据、分析/解释数据、文章起草; 燕荣帅: 酝酿和设计实验、对文章的知识性内容作批评性审阅、指导; 杨子晨: 酝酿和设计实验、对文章的知识性内容作批评性审阅、获取研究经费、指导、支持性贡献; 石茜: 实施研究、采集数据; 李翔、毛彤春: 酝酿和设计实验、采集数据; 张一鸣: 酝酿和设计实验、文章起草、对文章的知识性内容作批评性审阅、行政、技术或材料支持、指导、支持性贡献

参考文献

- [1] Wang PH, Huang BS, Horng HC, et al. Wound healing[J]. J Chin Med Assoc, 2018, 81(2):94-101. DOI:10.1016/j.jcma.2017.11.002.
- [2] Wilkinson HN, Hardman MJ. Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes[J]. Open Biol, 2020, 10(9): 200223. DOI:10.1098/rsob.200223.
- [3] Sarhan WA, Azzazy HME, El-Sherbiny IM. Honey/chitosan nanofiber wound dressing enriched with allium sativum and cleome droserifolia: enhanced antimicrobial and wound healing activity[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2016, 8(10): 6379-6390. DOI:10.1021/acsami.6b00739.
- [4] Han G, Ceilley R. Chronic wound healing: a review of current management and treatments[J]. Adv Ther, 2017, 34(3): 599-610. DOI:10.1007/s12325-017-0478-y.
- [5] Siddiqui AR, Bernstein JM. Chronic wound infection: facts and controversies[J]. Clin Dermatol, 2010, 28(5): 519-526. DOI: 10.1016/j.clindermatol.2010.03.009.
- [6] Lakhundi S, Zhang KY. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: molecular characterization, evolution, and epidemiology [J]. Clin Microbiol Rev, 2018, 31(4): e0020-18. DOI: 10.1128/CMR.00020-18.
- [7] Song Rh, Yu B, Friedrich D, et al. Naphthoquinone-derivative as a synthetic compound to overcome the antibiotic resistance of methicillin-resistant S. aureus[J]. Commun Biol, 2020, 3(1): 529. DOI:10.1038/s42003-020-01261-0.
- [8] Hernández-Aristizábal I, Ocampo-Ibáñez ID. Antimicrobial peptides with antibacterial activity against vancomycin-resistant Staphylococcus aureus strains: classification, structures, and mechanisms of action[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(15): 7927. DOI: 10.3390/ijms22157927.
- [9] Crocker TF, Brown L, Lam N, et al. Information provision for stroke survivors and their carers[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2021, 11(11): CD001919. DOI: 10.1002/14651858. CD001919. pub4.
- [10] Cisek AA, Dąbrowska I, Gregorczyk KP, et al. Phage therapy in bacterial infections treatment: one hundred years after the discovery of bacteriophages[J]. Curr Microbiol, 2017, 74(2): 277-283. DOI:10.1007/s00284-016-1166-x.
- [11] Kortright KE, Chan BK, Koff JL, et al. Phage therapy: a renewed approach to combat antibiotic-resistant bacteria[J]. Cell Host Microbe, 2019, 25(2):219-232. DOI:10.1016/j.chom.2019.01.014.
- [12] Summers WC. The strange history of phage therapy[J]. Bacteriophage, 2012, 2(2):130-133. DOI:10.4161/bact.20757.
- [13] Sarker SA, Sultana S, Reuteler G, et al. Oral phage therapy of acute bacterial diarrhea with two coliphage preparations: a randomized trial in children from Bangladesh[J]. EBioMedicine, 2016, 4:124-137. DOI:10.1016/j.ebiom.2015.12.023.
- [14] Furfaro LL, Payne MS, Chang BJ. Bacteriophage therapy: clinical trials and regulatory hurdles[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2018, 8:376. DOI:10.3389/fcimb.2018.00376.
- [15] Jault P, Leclerc T, Jennes S, et al. Efficacy and tolerability of a cocktail of bacteriophages to treat burn wounds infected by Pseudomonas aeruginosa (PhagoBurn): a randomised, controlled, double-blind phase 1/2 trial[J]. Lancet Infect Dis, 2019, 19(1): 35-45. DOI:10.1016/S1473-3099(18)30482-1.
- [16] Leitner L, Ujmajuridze A, Chanishvili N, et al. Intravesical bacteriophages for treating urinary tract infections in patients undergoing transurethral resection of the prostate: a randomised, placebo-controlled, double-blind clinical trial[J]. Lancet Infect Dis, 2021, 21(3):427-436. DOI:10.1016/S1473-3099(20)30330-3.
- [17] Carvalho C, Costa AR, Silva F, et al. Bacteriophages and their derivatives for the treatment and control of food-producing animal infections[J]. Crit Rev Microbiol, 2017, 43(5):583-601. DOI: 10.1080/1040841X.2016.1271309.
- [18] Michelson D, Grundman M, Magnuson K, et al. Randomized, placebo controlled trial of NPT088, a phage-derived, amyloid-targeted treatment for Alzheimer's disease[J]. J Prev Alzheimers Dis, 2019, 6(4):228-231. DOI:10.14283/jpad.2019.37.
- [19] Yang ZC, Liu XZ, Shi YL, et al. Characterization and genome annotation of a newly detected bacteriophage infecting multidrug-resistant Acinetobacter baumannii[J]. Arch Virol, 2019, 164(6): 1527-1533. DOI:10.1007/s00705-019-04213-0.
- [20] Lu SG, Le S, Tan YL, 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. DOI:10.1371/journal.pone.0062933.
- [21] Garneau JR, Depardieu F, Fortier LC, et al. PhageTerm: a tool for fast and accurate determination of phage termini and packaging mechanism using next-generation sequencing data[J]. Sci Rep, 2017, 7(1):8292. DOI:10.1038/s41598-017-07910-5.
- [22] Besemer J, Lomsadze A, Borodovsky M. GeneMarkS: a self-training method for prediction of gene starts in microbial genomes. Implications for finding sequence motifs in regulatory regions[J]. Nucleic Acids Res, 2001, 29(12): 2607-2618. DOI: 10.1093/nar/29.12.2607.
- [23] Brettin T, Davis JJ, Disz T, et al. RASTtk: a modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes[J]. Sci Rep, 2015, 5:8365. DOI:10.1038/srep08365.
- [24] Aziz RK, Bartels D, Best AA, et al. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology[J]. BMC Genomics, 2008, 9:75. DOI:10.1186/1471-2164-9-75.
- [25] Arndt D, Grant JR, Marcu A, et al. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool[J]. Nucleic Acids Res, 2016, 44(W1):W16-21. DOI:10.1093/nar/gkw387.
- [26] Lowe TM, Eddy SR. tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence[J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25(5):955-964. DOI:10.1093/nar/25.5.955.
- [27] Lagesen K, Hallin P, Rødland EA, et al. RNAmmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes[J]. Nucleic Acids Res, 2007, 35(9):3100-3108. DOI:10.1093/nar/gkm160.
- [28] Darling ACE, Mau B, Blattner FR, et al. Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements[J]. Genome Res, 2004, 14(7):1394-1403. DOI:10.1101/gr.2289704.
- [29] Anisimova M. Evolutionary genomics: statistical and computational methods[M]. New York: Springer New York, 2019: 121-147.
- [30] El-Arabi TF, Griffiths MW, She YM, et al. Genome sequence and analysis of a broad-host range lytic bacteriophage that infects the Bacillus cereus group[J]. Virol J, 2013, 10: 48. DOI: 10.1186/1743-422X-10-48.
- [31] 吴丽飞, 王兆飞, 王中华, 等. 高效裂解多重耐药金黄色葡萄球菌的噬菌体分离及裂解酶的制备[J]. 中国动物传染病学报, 2021, 29(3):1-9. DOI:10.19958/j.cnki.cn31-2031/s.2021.03.001.
- [32] Yang S, Yang Y, Cui SX, et al. Chitosan-polyvinyl alcohol nanoscale liquid film-forming system facilitates MRSA-infected wound healing by enhancing antibacterial and antibiofilm properties[J]. Int J Nanomedicine, 2018, 13: 4987-5002. DOI: 10.2147/IJN.S161680.
- [33] Dou JL, Jiang YW, Xie JQ, et al. New is old, and old is new: recent advances in antibiotic-based, antibiotic-free and ethnomedical treatments against methicillin-resistant Staphylococcus aureus wound infections[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(5):617. DOI:10.3390/

- ijms17050617.
- [34] Maciejewska B, Olszak T, Drulis-Kawa Z. Applications of bacteriophages versus phage enzymes to combat and cure bacterial infections: an ambitious and also a realistic application? [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102(6): 2563-2581. DOI: 10.1007/s00253-018-8811-1.
- [35] Morozova VV, Vlassov VV, Tikunova NV. Applications of bacteriophages in the treatment of localized infections in humans [J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 1696. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01696.
- [36] Ooi ML, Drilling AJ, Morales S, et al. Safety and tolerability of bacteriophage therapy for chronic rhinosinusitis due to *Staphylococcus aureus* [J]. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*, 2019, 145(8):723-729. DOI:10.1001/jamaoto.2019.1191.
- [37] Fish R, Kutter E, Bryan D, et al. Resolving digital staphylococcal osteomyelitis using bacteriophage—a case report [J]. *Antibiotics (Basel)*, 2018, 7(4):87. DOI:10.3390/antibiotics7040087.
- [38] 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. DOI:10.3969/j.issn.2096-3351.2021.05.001.
- [39] Regeimbal JM, Jacobs AC, Corey BW, et al. Personalized therapeutic cocktail of wild environmental phages rescues mice from *Acinetobacter baumannii* wound infections [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2016, 60(10): 5806-5816. DOI: 10.1128/aac.02877-15.
- [40] Gill JJ, Hyman P. Phage choice, isolation, and preparation for phage therapy [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2010, 11(1):2-14. DOI: 10.2174/138920110790725311.
- [41] Krupovic M, Dutilh BE, Adriaenssens EM, et al. Taxonomy of prokaryotic viruses: update from the ICTV bacterial and archaeal viruses subcommittee [J]. *Arch Virol*, 2016, 161(4):1095-1099. DOI: 10.1007/s00705-015-2728-0.
- [42] Łobocka M, Hejnowicz MS, Dąbrowski K, et al. Genomics of staphylococcal Twort-like phages—potential therapeutics of the post-antibiotic era [J]. *Adv Virus Res*, 2012, 83: 143-216. DOI: 10.1016/B978-0-12-394438-2.00005-0.
- [43] Azam AH, Tanji Y. Peculiarities of *Staphylococcus aureus* phages and their possible application in phage therapy [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2019, 103(11):4279-4289. DOI: 10.1007/s00253-019-09810-2.
- [44] Głowacka-Rutkowska A, Ulatowska M, Empel J, et al. A Kayvirus distant homolog of staphylococcal virulence determinants and VISA biomarker is a phage lytic enzyme [J]. *Viruses*, 2020, 12(3): 292. DOI:10.3390/v12030292.
- [45] Donovan DM, Lardeo M, Foster-Frey J. Lysis of staphylococcal mastitis pathogens by bacteriophage phi11 endolysin [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2006, 265(1):133-139. DOI:10.1111/j.1574-6968.2006.00483.x.
- [46] Paul VD, Rajagopalan SS, Sundarajan S, et al. A novel bacteriophage tail-associated muralytic enzyme (TAME) from Phage K and its development into a potent antistaphylococcal protein [J]. *BMC Microbiol*, 2011, 11:226. DOI:10.1186/1471-2180-11-226.
- [47] Gu JM, Xu W, Lei LC, et al. LysGH15, a novel bacteriophage lysin, protects a murine bacteremia model efficiently against lethal methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection [J]. *J Clin Microbiol*, 2011, 49(1):111-117. DOI:10.1128/JCM.01144-10.
- [48] Kaur J, Singh P, Sharma D, et al. A potent enzymatic agent against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *Virus Genes*, 2020, 56(4):480-497. DOI:10.1007/s11262-020-01762-4.
- [49] Cahill J, Young R. Phage lysis: multiple genes for multiple barriers [J]. *Adv Virus Res*, 2019, 103: 33-70. DOI: 10.1016/bs.aivir.2018.09.003.
- [50] Linden SB, Zhang H, Heselpoth RD, et al. Biochemical and biophysical characterization of PlyGRCS, a bacteriophage endolysin active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99(2): 741-752. DOI: 10.1007/s00253-014-5930-1.
- [51] 高明明, 刘慧莹, 李璞媛, 等. 金黄色葡萄球菌噬菌体 vB_SauH_IME522 的分离鉴定及全基因组分析 [J]. *第三军医大学学报*, 2020, 42(3):229-240. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201909016.
- [52] Shimamori Y, Pramono AK, Kitao T, et al. Isolation and characterization of a novel phage SaGU1 that infects *Staphylococcus aureus* clinical isolates from patients with atopic dermatitis [J]. *Curr Microbiol*, 2021, 78(4):1267-1276. DOI:10.1007/s00284-021-02395-y.
- [53] Bailly-Bechet M, Vergassola M, Rocha E. Causes for the intriguing presence of tRNAs in phages [J]. *Genome Res*, 2007, 17(10):1486-1495. DOI:10.1101/gr.6649807.
- [54] Nunes A, Ribeiro DR, Marques M, et al. Emerging roles of tRNAs in RNA virus infections [J]. *Trends Biochem Sci*, 2020, 45(9): 794-805. DOI:10.1016/j.tibs.2020.05.007.
- [55] McCallin S, Sarker SA, Barretto C, et al. Safety analysis of a Russian phage cocktail: from metagenomic analysis to oral application in healthy human subjects [J]. *Virology*, 2013, 443(2): 187-196. DOI:10.1016/j.virol.2013.05.022.
- [56] Quirós P, Colomer-Lluch M, Martínez-Castillo A, et al. Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of human fecal samples [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014, 58(1): 606-609. DOI:10.1128/AAC.01684-13.
- [57] 靳晓东, 张聪慧, 钟江. 两株新的金黄色葡萄球菌烈性噬菌体的生物学特性和基因组学研究 [J]. *微生物与感染*, 2018, 13(6): 335-341. DOI:10.3969/j.issn.1673-6184.2018.06.003.
- [58] Ji JW, Liu Q, Wang R, et al. Identification of a novel phage targeting methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in vitro and in vivo [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2020, 149: 104317. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104317>.
- [59] Gutiérrez D, Vandenheuvel D, Martínez B, et al. Two phages, phiPLA-RODI and phiPLA-C1C, lyse mono- and dual-species *Staphylococcal* biofilms [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2015, 81(10): 3336-3348. DOI:10.1128/aem.03560-14.
- [60] Feng TT, Leptihn S, Dong K, et al. JD419, a *Staphylococcus aureus* phage with a unique morphology and broad host range [J]. *Front Microbiol*, 2021, 12:602902. DOI:10.3389/fmicb.2021.602902.
- [61] Doub JB, Ng VY, Johnson AJ, et al. Salvage bacteriophage therapy for a chronic MRSA prosthetic joint infection [J]. *Antibiotics (Basel)*, 2020, 9(5):241. DOI:10.3390/antibiotics9050241.
- [62] Jikia D, Chkhaidze N, Imedashvili E, et al. The use of a novel biodegradable preparation capable of the sustained release of bacteriophages and ciprofloxacin, in the complex treatment of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*-infected local radiation injuries caused by exposure to Sr90 [J]. *Clin Exp Dermatol*, 2005, 30(1):23-26. DOI:10.1111/j.1365-2230.2004.01600.x.
- [63] Luong T, Salabarria AC, Roach DR. Phage therapy in the resistance era: where do we stand and where are we going? [J]. *Clin Ther*, 2020, 42(9):1659-1680. DOI:10.1016/j.clinthera.2020.07.014.