

K39 型肺炎克雷伯菌噬菌体 IME330 的生物学特性及基因组特性分析

魏晋攀, 王 灿, 赵 磊

(安徽医科大学附属阜阳医院呼吸内科, 阜阳 236000)

摘要 目的 从医院未经处理的污水中分离一株靶向 K39 型肺炎克雷伯菌裂解性噬菌体, 并系统分析其生物学特性及基因组学信息。方法 以基于荚膜多糖基因序列鉴定的 K39 型肺炎克雷伯菌 Kp 1000 为宿主菌, 采用双层琼脂平板法进行噬菌体的分离与纯化。通过负染法结合透射电子显微镜观察噬菌体的形态特征, 利用噬斑法评估其裂菌谱。进一步测定噬菌体的最佳感染复数(MOI), 完成一步生长曲线、温度及酸碱等耐受性实验, 评估其生物学特性。最后, 提取噬菌体 DNA, 利用 Illumina HiSeq2000 测序平台进行全基因组测序, 并对测序结果进行注释与分析。结果 成功分离到一株特异性靶向 K39 型肺炎克雷伯菌的裂解性噬菌体, 命名为 IME330。透射电镜显示, 该噬菌体头部直径为 (75 ± 1) nm, 尾长为 (185 ± 1) nm。裂菌谱分析表明, IME330 能裂解 K39 型肺炎克雷伯菌, 显示出较窄的宿主范围和高度特异性。其最佳感染复数(MOI) 为 0.1, 裂解量达 168 PFU/cell。理化特性实验表明, IME330 对高温及酸碱环境(pH 4~10) 具有较强的耐受性。基因组分析显示, IME330 基因组全长 144 245 bp, 分子量为 46 463 MDa, G+C 含量为 44.8%, 共编码 320 个开放阅读框。结论 IME330 被鉴定为一株新型裂解性肺炎克雷伯菌噬菌体, 隶属于有尾噬菌体目。该噬菌体对温度、酸碱等理化因素具有较强耐受性, 且表现出高效的裂解能力, 但其裂菌谱较窄, 宿主特异性较高。

关键词 肺炎克雷伯菌; 噬菌体; 生物学特性; 基因组特性分析; 透射电镜; 一步生长曲线

中图分类号 R 459.9

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)09-1631-07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.09.009

肺炎克雷伯菌是一种致病性革兰氏阴性菌, 可引起严重的侵袭性感染^[1]。肺炎克雷伯菌能够合成荚膜多糖, 这一特性使其在医院感染中展现出较强的致病力, 并增强了其对消毒剂和抗生素的耐受性^[2]。噬菌体被认为是地球上最丰富的微生物之一^[3], 有研究^[4]表明噬菌体疗法是治疗高毒力、抗生素耐药性病原体(如肺炎克雷伯菌)感染的一种很有前途的替代方案。噬菌体作为细菌的天然捕食者之一, 能够显著影响微生物群落的大小、组成、结构及其发育过程。目前噬菌体疗法被认为是抗生素耐药性危机的一种潜在解决方案^[5]。

该研究以实验室保存的肺炎克雷伯菌(Kp 1000)为宿主菌, 从医院污水中成功分离出裂解性噬菌体 IME330, 系统分析其生物学特性及全基因组

序列, 为 K39 型肺炎克雷伯菌的防控及治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料

1.1.1 样品来源 研究使用的 103 株肺炎克雷伯菌(包含宿主菌 Kp 1000), 均由安徽医科大学附属阜阳医院检验科微生物室分离、鉴定并保存。污水采集自安徽医科大学附属阜阳医院污水处理站。

1.1.2 主要试剂和仪器 琼脂粉、酵母提取物和蛋白胨(英国 OXOID 公司); 氯化钠(重庆川东化工集团公司); 噬菌体基因组 DNA 提取试剂盒(北京庄盟国际生物科技有限公司); ThermoFisher Micro 21R 离心机(美国赛默飞世尔科技有限公司); HH-WS-II-450 电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械有限公司); JEM-1400Plus 透射电子显微镜(日本精工公司); HiSeq 2000 高通量测序仪(美国 Illumina 公司)。

1.2 方法

1.2.1 培养基配制 LB 液体培养基(氯化钠 10.0 g、蛋白胨 10.0 g、酵母提取物 5.0 g); 3 × LB 培养基

2025-05-09 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金青年项目(编号: 2108085QH310); 安徽省转化医学研究院科研基金项目(编号: 2023zhyx-C100)

作者简介: 魏晋攀, 男, 硕士研究生;

赵 磊, 男, 博士, 博士生导师, 通信作者, E-mail: ayefyzh-aolei@163.com

(氯化钠 30.0 g、蛋白胨 30.0 g、酵母提取物 15.0 g); 半固体培养基(氯化钠 10.0 g、蛋白胨 10.0 g、酵母提取物 5.0 g、琼脂粉 7.5 g); 固体培养基(氯化钠 10.0 g、蛋白胨 10.0 g、酵母提取物 5.0 g、琼脂粉 15.0 g); 加水至 1 L 灭菌备用。

1.2.2 细菌培养 使用接种环将库存肺炎克雷伯菌甘油液接种于 LB 固体培养基表面,并在 37 °C 恒温培养箱中过夜培养。随后采用无菌枪头挑取形态一致的单菌落,接种至 LB 液体培养基中,置于 37 °C、200 r/min 恒温摇床中振荡培养,直至细菌生长至对数期。

1.2.3 噬菌体的分离与纯化 噬菌体的分离与纯化过程参考文献^[6]中的方法进行,实验过程略有改动。首先,将未处理的污水样品以 12 000 r/min 离心 15 min,并通过 0.22 μm 过滤器进行过滤。接着,将 4 mL 过滤液与对数期的 Kp 1000 菌液($OD_{600} = 0.6 \sim 0.8$) 100 μL 混合,并加入 2 mL(3 ×) LB 培养基。将 Kp 1000 与污水滤液混合物在室温下静置 30 min,随后转移至 37 °C、200 r/min 恒温摇床中振荡培养,每隔 20 min 观察 1 次。待培养液变为透明后,取出并以 12 000 r/min 离心 5 min,吸取上清液用 0.22 μm 过滤器再次过滤,所得液体为分离出的噬菌体液。

为了进一步纯化噬菌体液,取 500 μL 对数期的宿主菌液,与约 5 mL 半固体琼脂液(55 °C 水浴加热)混合,倒入含有下层琼脂的 LB 平板中(双法)^[7]。待上层琼脂凝固后,吸取上一步中 5 μL 的噬菌体液点加在上层琼脂层表面,并将平板放入 37 °C 恒温培养箱中过夜培养。次日,选择单一透明噬菌斑,接种于宿主细菌中进行扩增,循环上述操作,直至看到形态单一,大小一致的透明噬菌斑,此时所得液体作为纯化的噬菌体液。纯化的菌体与甘油溶液(甘油占溶液体积 50%)等体积混匀后放于 4 °C 冷藏备用,噬菌体原液于 -80 °C 冰箱长期保存。

1.2.4 噬菌体形态观察 取 50 μL 纯化的 IME330 滴在含碳膜的铜网上吸附过夜,再用磷钨酸负染 5 min,使用 Philips TECNAI-40 型透射电子显微镜观察噬菌体 IME330 的形状。

1.2.5 噬菌体裂解谱测定 对本实验所用的菌株采用荚膜分型的方法对菌株进行分型^[8],明确细菌类型。噬菌体的裂解谱采用点板试验方法进行测定。受试菌株为 103 株肺炎克雷伯菌。将噬菌体液吸取 5 μL 点加至各菌株接种的平板上,观察是否出现规则的透明空斑,若出现空斑则判定为裂菌试验

阳性。

1.2.6 噬菌体感染复数(multiplicity of infection, MOI)和一步生长曲线的测定 首先,测定噬菌体的最佳 MOI,梯度稀释明确噬菌体 IME330 与宿主菌 Kp 1000 的滴度。设定噬菌体与宿主菌的不同 MOI 值,包括 0.01、0.1、1、10、100,进行共培养,培养后测定各 MOI 条件下的噬菌体滴度,选择滴度最高的 MOI 值作为最佳 MOI。随后,按照最佳 MOI 的比例,将噬菌体与宿主菌混合共培养,并在 0 min 及每隔 10 min 取样,测定样品中的噬菌体滴度。设置重复平行实验 3 次,最终,根据测得的实验数据绘制噬菌体的一步生长曲线。

1.2.7 噬菌体温度敏感性的测定 将 1 mL 液体 LB 培养基分别加入无菌 EP 管中,每个温度点设置 2 个平行管。分别在 4、25、30、37、45、50、55、60、65、70、80、90 °C 的水浴中孵育 30 min,待试管内外温度稳定后,加入 1 mL 噬菌体液。随后,将含噬菌体的 EP 管在上述温度条件下再孵育 30 和 60 min,孵育结束后立即将试管内的噬菌体液进行梯度稀释,再采用双层琼脂平板法测定噬菌体滴度,并设置重复平行实验 3 次。根据实验结果绘制噬菌体的热稳定性曲线。

1.2.8 噬菌体 pH 敏感性的测定 用 0.2 mol/L 醋酸钠缓冲液(pH = 2 ~ 6)、0.2 mol/L 磷酸钠缓冲液(pH = 7 ~ 8)或 0.2 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH = 9 ~ 12),将液体 LB 培养基调至目标 pH 值(2 ~ 12),高压灭菌处理后。再分别取 900 μL 的不同 pH 值的 LB 培养基与噬菌体原液 IME330 按 10 : 1 的体积比混合,并在 37 °C 条件下静置 1 h。随后,对管中的噬菌体液进行梯度稀释($10^{-1} \sim 10^{-10}$ PFU/mL),再采用双层平板法测定各试验组的噬菌体滴度,并设置重复平行实验 3 次。根据实验数据绘制噬菌体的酸碱敏感性曲线。

1.2.9 噬菌体紫外线耐受性的测定 将 10 mL 噬菌体原液加入培养皿中,并置于紫外线灯下照射。每 15 min 取样 1 次,持续照射共计 3 h。每次取样 100 μL,同时进行梯度稀释($10^{-1} \sim 10^{-10}$ PFU/mL),再采用双层琼脂平板法测定噬菌体滴度,并设置重复平行实验 3 次。根据实验所得结果,绘制噬菌体的紫外线耐受性曲线。

1.2.10 全基因组测序和序列分析以及系统发育树的构建 用噬菌体基因组 DNA 提取试剂盒从噬菌体 IME330 中提取基因组 DNA。提取后的噬菌体 DNA 通过超声仪器打断,并使用 Illumina MiSeq 测

序平台进行全基因组测序。对高通量测序产生的原始数据,由本实验室研究人员使用 SPAdes3. 1. 11 软件进行拼接。随后,通过基于子系统的快速标注技术 (rapid annotation using subsystem technology, RAST) 平台对基因组进行在线功能注释。对于部分未能注释的序列,采用 NCBI 提供的 ORF Finder 工具重新预测开放阅读框 (open reading frame ORF), 并进行验证。将功能未知的 ORF 翻译为氨基酸序列,并通过在线 BLASTp (basic local alignment search tool) 网站 <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> 进一步进行详细注释,确定其基因功能。

基于噬菌体末端酶大亚基构建噬菌体 IME330 系统发育树,先将 IME330 末端酶大亚基氨基酸序列通过 BLASTp 比对,根据比对结果,选取其中 19 个最为相近的序列结果,通过 MEGA11.0 软件构建发育树。

2 结果

2.1 噬菌体的裂解谱测定结果 通过荚膜分型方法,对所用菌株进行分型,明确宿主菌 (Kp 1000) 为 K39 型肺炎克雷伯菌。噬菌体 IME330 对实验室的 103 株菌株的裂解性如“表 1”所示,噬菌体 IME330 特异性的靶向 K39 的宿主菌 (6 株),对于其他类型的细菌,未表现出敏感性。结果表明该噬菌体有较窄的裂解谱及较强的特异性。

2.2 噬菌体噬菌斑及电镜结果 本研究从未处理的污水样本中,以 Kp 1000 为宿主菌成功分离到一种肺炎克雷伯菌噬菌体,命名为 vB_KpS_IME330 (简称 IME330)。如图 1A 所示,在双层琼脂平板上,将 IME330 的稀释液与宿主菌混合后,能够形成清晰的噬菌斑。

噬菌体 IME330 的透射电镜图像如图 1B 所示,图中可见其衣壳为正 20 面体结构,直径为 (75 ± 1) nm,尾鞘长度为 (185 ± 1) nm,尾丝结构可隐约观察到,根据电镜图结果,本噬菌体为长尾噬菌体。

2.3 MOI 测定结果 如表 2 结果所示,在不同的 MOI 下,噬菌体感染 Kp 1000 后噬菌体滴度略有差异,其中在 MOI = 0.1 时,噬菌体 IME33 滴度最大,因此 IME330 的最佳 MOI 为 0.1。

2.4 一步生长曲线 通过实验数据,绘制了噬菌体感染宿主细菌后的复制动力学曲线,如图 2 所示。在感染后初期的 5 min 内,噬菌体的数量未见显著变化,此阶段被称为潜伏期。随后的 140 min 内,噬菌体数量呈现明显增加,进入爆发期。之后,噬菌体

表 1 噬菌体 IME330 的裂解谱

Tab. 1 Lysis spectrum of bacteriophage IME330

Category	Bacterial number	Number of bacteria	Phage sensitivity
K1	Kp 217/Kp 229/Kp 230/Kp 960/Kp 995/Kp 402/ Kp 1155/Kp 607/Kp 9/Kp 46/Kp 884/Kp 1265	12	-
K2	Kp 2406/Kp 2418/Kp 2521	3	-
K3	Kp 336/Kp 1011/Kp 1215/Kp 1408/Kp 1860/ Kp 26/Kp 894/Kp 1986/Kp 145/Kp 1965	10	-
K5	Kp 38/Kp 45/Kp 56/Kp 72/Kp 200/Kp 97/ Kp 145/Kp 2237/Kp 1745/Kp 1757	10	-
K14	Kp 938/Kp 954/Kp 955/Kp 1053/Kp 1073/ Kp 1079/Kp 1080/Kp 1082	8	-
K16	Kp 1098/Kp 1100/Kp 1241/Kp 1763/Kp 1788/ Kp 1809/Kp 2060/Kp 2061/Kp 2062/Kp 2095/Kp 2098	11	-
K19	Kp 180/Kp 1744/Kp 1751	3	-
K20	Kp 226/Kp 551/Kp 696	3	-
K22	Kp 2412/ Kp 2419/ Kp 231/ Kp 178/ Kp 864	5	-
K23	Kp 231/ Kp 970/ Kp 948/ Kp 1416	4	-
K25	Kp 1183/Kp 1618/Kp 1619/Kp 1620/Kp 1621/ Kp 1642/Kp 1732/Kp 1737/Kp 1740/Kp 1812	3	-
K27	Kp 1852/Kp 592/Kp 899/Kp 844/Kp 1589/Kp 356/Kp 74	7	-
K28	Kp 439/ Kp 626	2	-
K29	Kp 1129/ Kp 129 / Kp 1573/ Kp 2384/ Kp 370	5	-
K39	Kp 1000/Kp 1301/Kp 1307/Kp 189/Kp 1356/Kp 1447	6	+
K40	Kp 706/Kp 2059/Kp 2234	3	-
K47	Kp 1616/Kp 1738/Kp 1746/Kp 1563/Kp 1615/ Kp 1617/Kp 2238/Kp 2240	8	-

+ : Lytic; - : Not lytic



图 1 噬菌体 IME330 的形态特征

Fig. 1 Morphological characteristics of phage IME330

A: Phage plaque; B: Phage transmission electron microscope image × 100 000.

表 2 最佳感染复数的测定结果

Tab. 2 Determination results of the optimal multiple infections

Group	Total number of bacteria (CFU)	Total number of bacteriophages (PFU)	MOI	Phage titer (PFU/mL)
1	5 × 10 ⁷	5 × 10 ⁵	0.01	5.4 × 10 ⁸
2	5 × 10 ⁶	5 × 10 ⁵	0.1	8.4 × 10 ⁸
3	5 × 10 ⁵	5 × 10 ⁵	1	6.2 × 10 ⁸
4	5 × 10 ⁴	5 × 10 ⁵	10	3.1 × 10 ⁸
5	5 × 10 ³	5 × 10 ⁵	100	2.2 × 10 ⁸

数量趋于平稳,进入平稳期。根据噬菌体裂解量的公式 [(总菌体数 - 初始噬菌体浓度 + 宿主细菌数量 × MOI) / 宿主细菌数量] 计算得出,噬菌体的裂解量为 168 PFU/cell。

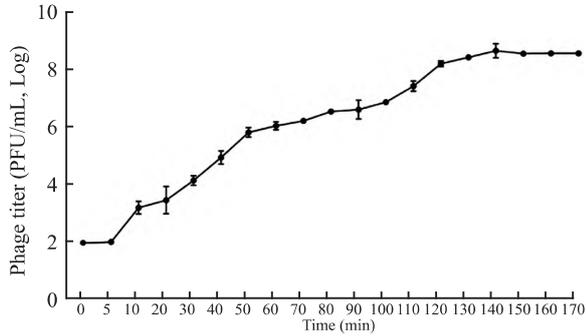


图2 噬菌体 IME330 的一步生长曲线
Fig. 2 One-step growth curve of phage IME330

2.5 温度敏感性的结果 根据实验数据,绘制噬菌体 IME330 的温度敏感性变化图。如图 3 所示,随着温度的升高,噬菌体的滴度在 30 min 和 60 min 时均呈现非线性下降趋势。水浴时间 60 min 时,温度低于 50 °C,可见滴度下降较为缓慢,而在温度超过 50 °C,噬菌体滴度下降的速率明显加快。当温度在 70 °C 条件下,其活性几乎完全丧失。水浴时间为 30 min 时,可见类似结果,温度低于 55 °C 时,曲线较为平缓,而在温度超过 55 °C 时,噬菌体呈现明显下降趋势。当温度为 80 °C 时,噬菌体已完全丧失活性。

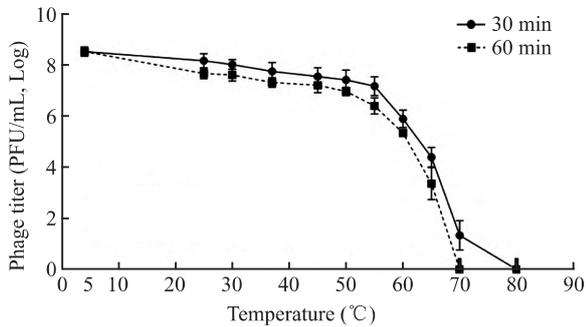


图3 噬菌体 IME330 的温度敏感性变化图
Fig. 3 The temperature sensitivity changes graph of phage IME330

2.6 pH 敏感性的结果 根据实验结果,绘制噬菌体 IME330 的 pH 值敏感性变化图。当 pH = 3 ~ 6 时,随着 pH 值的增加,噬菌体滴度呈现上升趋势,当 pH = 6 ~ 9 时,随着 pH 值的增加,噬菌体滴度变化较小,基本保持稳定,其中 pH = 7 时,滴度达到最大;当 pH > 10 时噬菌体滴度开始急速下降,pH = 11

时,噬菌体滴度几乎降至为 0, pH = 12 时,噬菌体完全失活。如图 4 所示。

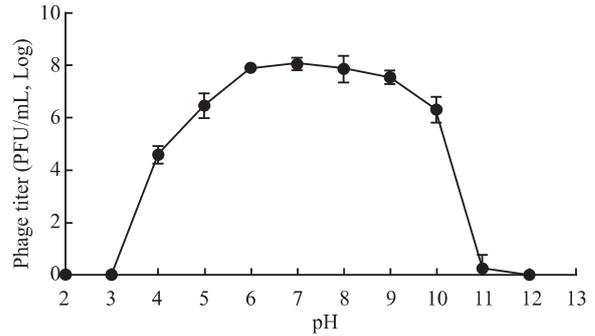


图4 噬菌体 IME330 的 pH 敏感性变化图
Fig. 4 The pH sensitivity changes graph of phage IME330

2.7 紫外线耐受情况 根据实验数据,绘制噬菌体 IME330 的紫外线耐受性变化图。如图 5 所示,随着照射时间的延长,噬菌体的存活率逐渐降低。经 120 min 紫外线照射后,噬菌体几乎完全失活。

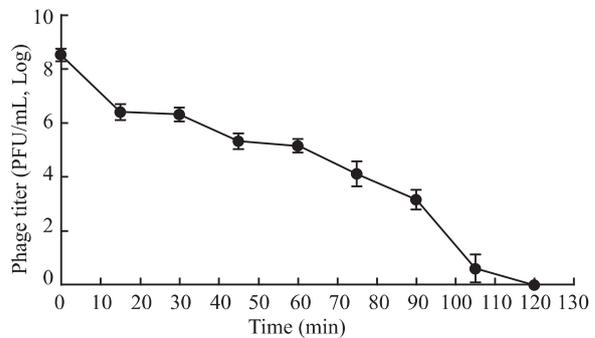


图5 噬菌体 IME330 的紫外线耐受性变化图
Fig. 5 The ultraviolet tolerance changes graph of bacteriophage IME330

2.8 全基因组序列分析及系统发育树构建 对噬菌体 IME330 进行全基因组测序及分析,结果显示其基因组大小为 144 245 bp,分子量为 46 463 MDa, A、T、C、G 含量分别为 27.4%、27.9%、23.2% 和 21.5%,其中 G + C 含量为 44.8%,并编码 320 个 ORF,通过 BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 对基因组所编码的蛋白进行预测,部分结果如图 6 所示。通过进一步比对分析,IME330 的全基因组与噬菌体 IME309 具有较高的相似性,序列一致性达到 45.03%,表明该噬菌体序列相对较新。对 IME330 的全基因组序列与 NCBI 数据库中已提交的序列进行比对,结果显示 IME330 与 *K. pneumoniae* 噬菌体 vB_KpnM_BIS47 的同一性为

98.16%，与 *K. pneumoniae* 噬菌体 vB_Kpn_K23PH08C 的同一性为 94.13%。

为进一步分析 IME330 与其他噬菌体的亲缘关系，基于末端酶大亚基氨基酸序列构建进化树，如图 7 所示，IME330 与 Proteus phage Mydo、Raaultella phage Ro1、*K. pneumoniae* phage VLCpiM5a、*K. pneumoniae* phage vB_KpnM_KB57 等噬菌体都位于 Mydovirus 病毒科。因此，根据国际病毒分类系统^[9]，可将此噬菌体命名为 vB_KpS_IME330，简称

IME330，其属于 Caudoviricetes 目，Vequintavirinae 科，Mydovirus 亚科。

3 讨论

细菌感染是导致患者死亡的主要原因之一。美国传染病学会，欧洲临床微生物学和传染病学会认为多重耐药病原体是人类最大的威胁之一。随着细菌对抗生素敏感性的降低，国内外科学家们都在试图寻找抗生素的补充与替代产品。噬菌体作为细菌

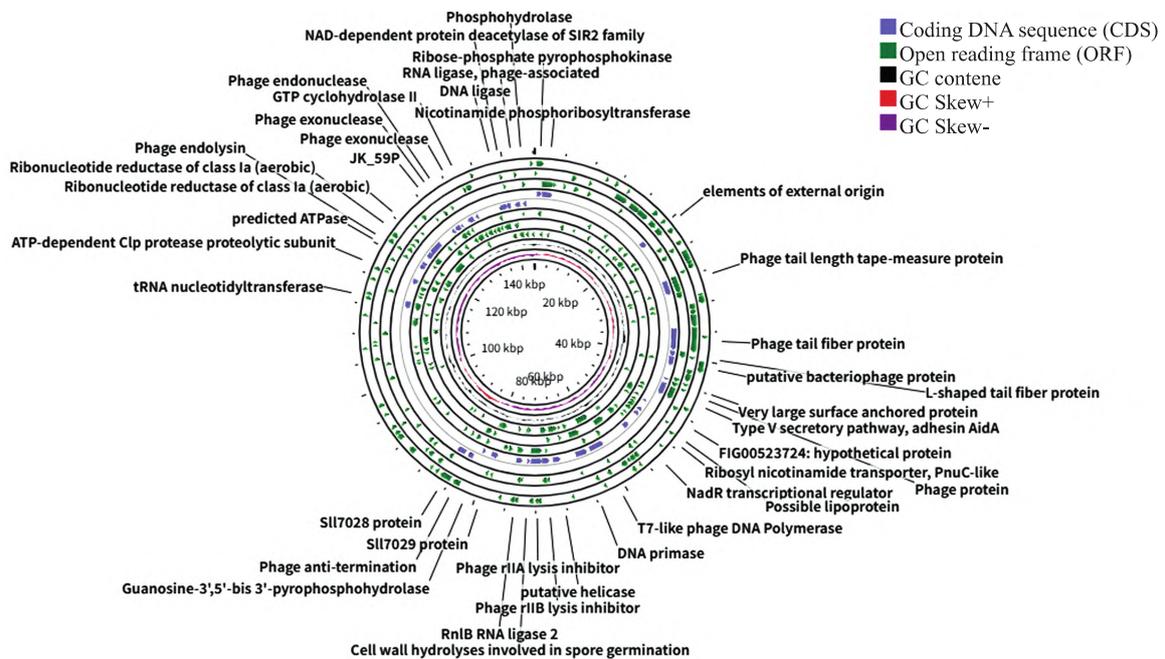


图 6 噬菌体 IME330 全基因组圈图

Fig. 6 Whole-genome circle diagram of phage IME330

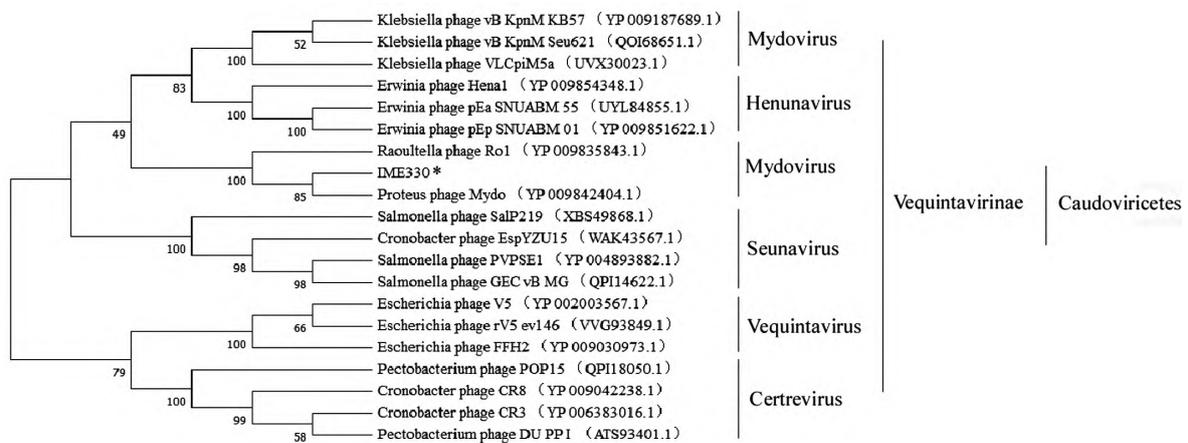


图 7 IME330 系统发育树分析

Fig. 7 Phylogenetic tree analysis of IME330

The numbers on the branch points represent credibility. The closer the value is to 100, the stronger the credibility; The shorter the scale, the closer the kinship; The numbers in parentheses represent the GenBank sequence login numbers. IME330 belongs to the Mydovirus subfamily.

的病毒,在克服细菌耐药领域的潜力巨大,噬菌体疗法有望成为抗生素补充或替代策略。

在本研究中,本研究以 Kp 1000 为宿主菌,从安徽医科大学附属阜阳医院未处理的污水样本中成功分离出 1 株靶向 K39 型肺炎克雷伯菌裂解性噬菌体,命名为 vB_KpS_IME330(简称 IME330)。该噬菌体可裂解所有 K39 型的肺炎克雷伯菌,说明其具有很好的应用前景,针对 K39 型肺炎克雷伯菌噬菌体目前尚未有相关文献报道。

根据系统发育树的结果显示该噬菌体属于有尾噬菌体目,Mydovirus 病毒亚科,其头部直径为(75 ± 1) nm,尾长约为(185 ± 1) nm。IME330 的裂解谱较窄,仅能裂解 6 株 K39 型肺炎克雷伯菌(共 103 株菌株),其最佳感染复数为 0.1。该噬菌体的潜伏期为 5 min,爆发期为 5 ~ 140 min,裂解量为 168 PFU/cell。IME330 对温度和酸碱度的耐受性较高,表现出较强的环境适应能力,有文献报道^[10-12],鲍曼不动杆菌噬菌体 pIsf-AB 02 和噬菌体 vB_AbaS_TCUP 2199 在 50 °C 时略有下降,在 70 °C 时急剧下降,噬菌体 vABWU 2101 在 60 °C 时存活率为 60%,但在 70 °C 时失活。与上述噬菌体的理化性质与 IME330 的类似,这些研究结果都表明该噬菌体具有较高的应用价值。

为了进一步研究该噬菌体的基因组特征,本研究利用 Illumina MiSeq 高通量测序平台对 IME330 进行了全基因组测序,并通过拼接获得了完整的基因组序列。IME330 的基因组大小为 144 245 bp,分子量为 46 463 MDa。全基因组序列的比对分析显示,IME330 与已知的肺炎克雷伯菌噬菌体相比存在较大差异。并通过生物信息学方法对其进行了注释,预测了相关基因的功能,然而其中很多基因的功能依旧未知,但这也说明该噬菌体具有一定的独特性和新颖性。

本研究发现本噬菌体的噬菌斑较小,而导致噬菌斑形态的因素多种多样,但有时噬菌斑表型与噬菌体形态相关,其中较大的噬菌斑与较小的病毒粒子相关,而小噬菌斑是巨型噬菌体的特征^[13]。电子显微镜观察结果也表明,IME330 属于巨型噬菌体类型。较大的体积可能意味着噬菌体的尾部具有更多的蛋白结构域,因此可以通过分子杂交技术改造其尾部的宿主结合位点,从而扩展其裂解谱。此外,本研究基因组分析揭示,IME330 具有较大的基因组,这为进一步了解噬菌体编码的蛋白及其功能提供了有利条件,且较大的体积和基因组为噬菌体的改造

提供了更多操作空间。通过技术手段改进野生型噬菌体以产生效果更强大的新型噬菌体来对抗细菌感染^[14]。然而,过大的体积和基因组也可能带来不利影响。在噬菌体生命周期中,宿主体内需要合成更多的蛋白质和核酸,这会消耗更多的能量和资源,从而限制了噬菌体的杀菌效果。噬菌体基因组的复杂性也使得理解巨型噬菌体生物学成为挑战,其编码大多数蛋白质也功能未知^[15]。此外,本研究电子显微镜结果还显示,IME330 具有较长的尾部,这可能会延长噬菌体与宿主结合后核酸注入过程的时间,从而进一步限制其裂解活性。

总之,IME330 为一株新分离的肺炎克雷伯菌裂解性噬菌体,属于有尾噬菌体目,Mydovirus 病毒亚科。该噬菌体对温度、酸碱等理化因素表现出较高的耐受性,裂解能力较强。在目前耐药细菌感染治疗的严峻形势下,IME330 具有较好的远期应用价值。本研究的研究结果也为其在未来的临床应用提供了理论基础。

参考文献

- [1] Xu L, Li J, Wu W, et al. *Klebsiella pneumoniae* capsular polysaccharide: mechanism in regulation of synthesis, virulence, and pathogenicity [J]. *Virulence*, 2024, 15(1): 2439509. doi: 10.1080/21505594.2024.2439509.
- [2] Olawade D B, Fapohunda O, Egbon E, et al. Phage therapy: a targeted approach to overcoming antibiotic resistance [J]. *Microb Pathog*, 2024, 197: 107088. doi: 10.1016/j.micpath.2024.107088.
- [3] Zünd M, Dunham S J B, Rothman J A, et al. What lies beneath? taking the plunge into the murky waters of phage biology [J]. *mSystems*, 2023, 8(1): e0080722. doi: 10.1128/msystems.00807-22.
- [4] Chen H, Liu H, Gong Y, et al. A *Klebsiella*-phage cocktail to broaden the host range and delay bacteriophage resistance both *in vitro* and *in vivo* [J]. *NPJ Biofilms Microbiomes*, 2024, 10(1): 127. doi: 10.1038/s41522-024-00603-8.
- [5] Lauman P, Dennis J J. Advances in phage therapy: targeting the *Burkholderia cepacia* complex [J]. *Viruses*, 2021, 13(7): 1331. doi: 10.3390/v13071331.
- [6] Kosznik-Kwaśnicka K, Topka G, Mantej J, et al. Propagation, purification, and characterization of bacteriophages for phage therapy [J]. *Methods Mol Biol*, 2024, 2738: 357-400. doi: 10.1007/978-1-0716-3549-0_22.
- [7] Zhao Q, Xu J, Song M, et al. An efficient method for visualizing the plaques of *Bdellovibrio bacteriovorus* [J]. *Arch Microbiol*, 2024, 207(1): 13. doi: 10.1007/s00203-024-04212-z.
- [8] Mazumdar D, Sarma A, Medhi D, et al. Capsular typing of *Streptococcus pneumoniae* isolated from clinical specimens in Gauhati Medical College and hospital, Assam, India [J]. *Indian J Med*

- Microbiol, 2023, 44: 100350. doi: 10.1016/j.ijmm.2023.01.008.
- [9] 范在丰. 病毒分类与命名的新规则 [C] // 中国植物病理学会 2023 年学术年会论文集. 泰安, 2023: 445. doi: 10.26914/c.cnkihy.2023.039059.
- [9] Fan Z F. New rules for virus classification and nomenclature [C] // Proceedings of the 2023 Academic Annual Conference of the Chinese Society of Plant Pathology. Taian, 2023: 445. doi: 10.26914/c.cnkihy.2023.039059.
- [10] Sisakhtpour B, Mirzaei A, Karbasizadeh V, et al. The characteristic and potential therapeutic effect of isolated multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* lytic phage [J]. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 2022, 21(1): 1. doi: 10.1186/s12941-022-00492-9.
- [11] Wintachai P, Surachat K, Singkhaman K. Isolation and characterization of a novel *Autographiviridae* phage and its combined effect with tigecycline in controlling multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*-associated skin and soft tissue infections [J]. *Viruses*, 2022, 14(2): 194. doi: 10.3390/v14020194.
- [12] Mardiana M, Teh S H, Lin L C, et al. Isolation and characterization of a novel *Siphoviridae* phage, vB_AbaS_TCUP2199, infecting multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* [J]. *Viruses*, 2022, 14(6): 1240. doi: 10.3390/v14061240.
- [13] Valencia-Toxqui G, Ramsey J. How to introduce a new bacteriophage on the block: a short guide to phage classification [J]. *J Virol*, 2024, 98(10): e0182123. doi: 10.1128/jvi.01821-23.
- [14] Barnard A M L, Fairhead H I M. A commentary on the development of engineered phage as therapeutics [J]. *Drug Discov Today*, 2021, 26(9): 2095-8. doi: 10.1016/j.drudis.2021.06.013.
- [15] Harding K R, Kyte N, Fineran P C. Jumbo phages [J]. *Curr Biol*, 2023, 33(14): R750-1. doi: 10.1016/j.cub.2023.05.056.

Biological and genomic characterization of phage IME330 of *Klebsiella pneumoniae* type K39

Wei Jinpan, Wang Can, Zhao Lei

(Dept of Respiratory Medicine, Fuyang Hospital Affiliated to Anhui Medical University, Fuyang 236000)

Abstract Objective To isolate a lytic phage targeting *K. pneumoniae* type K39 from untreated sewage and systematically analyze its biological characteristics and genomic information. **Methods** The bacteriophage of *K. pneumoniae* K39 Kp 1000 was identified based on the sequence of the capsular polysaccharide gene. It was isolated and purified using the double agar plate method. The morphology of the phage was observed through negative staining and transmission electron microscopy, and its bacteriophage spectrum was evaluated by phagocytosis. The biological characteristics of the bacteriophage were assessed by determining the optimal multiplicity of infection (MOI), constructing a one-step growth curve, and conducting temperature and pH tolerance tests. Finally, the phage DNA was extracted, and its whole genome was sequenced using the Illumina HiSeq2000 sequencing platform. The sequencing results were then annotated and analyzed. **Results** A lytic phage specifically targeting *K. pneumoniae* type K39 was successfully isolated and named IME330. Transmission electron microscopy showed that the head diameter of the phage was (75 ± 1) nm and the tail length was (185 ± 1) nm. The lytic spectrum analysis revealed that IME330 lysed *K. pneumoniae* type K39, demonstrating a narrow host range and high specificity. The optimal multiplicity of infection (MOI) was 0.1, The lysis amount reached 168 PFU/cell. Physicochemical experiments indicated that IME330 exhibited strong tolerance to high temperatures and a broad pH range (pH 4-10). Genomic analysis demonstrated that the IME330 genome had a length of 144,245 bp, a molecular weight of 46,463 MDa, G+C content of 44.8%, and encoded 320 open reading frames (ORFs). **Conclusion** IME330 is a novel lytic *K. pneumoniae* phage belonging to the order Caudovirales. This phage exhibits strong tolerance to physicochemical factors (e.g., temperature, acidic/alkaline conditions) and demonstrates high lytic activity, while its lytic spectrum remains narrow with strict host specificity.

Key words *K. pneumoniae*; phage; biological characteristics; analysis of genomic characteristics; transmission electron microscopy; one-step growth curve

Fund programs Natural Science Foundation of Anhui Province (No. 2108085QH310); Research Project of Anhui Provincial Institute of Translational Medicine (No. 2023zhyx-C100)

Corresponding author Zhao Lei, E-mail: ayefyzhaolei@163.com