

## 论著

## 食源性希拉肠球菌 R17 基因组中前噬菌体的结构特征及其与宿主菌的相互影响

彭子欣<sup>1</sup>, 张思雨<sup>2</sup>, 闫韶飞<sup>1</sup>, 王伟<sup>1</sup>, 王帅<sup>2</sup>, 甘辛<sup>1</sup>, 张建中<sup>3</sup>, 李凤琴<sup>1</sup>

(1. 国家食品安全风险评估中心 卫生部食品安全风险评估重点实验室, 北京 100021;

2. 北京农学院食品科学与工程学院, 北京 102206; 3. 中国疾病预防控制中心

传染病预防控制所, 北京 102206)

**摘要:**目的 了解生鲜猪肉中分离的希拉肠球菌 R17 基因组中前噬菌体的结构特征及其和宿主菌的相互影响。方法 利用 PHAST 软件预测希拉肠球菌 R17 基因组中前噬菌体基因的分布及其编码基因特征, 分析前噬菌体中含有的毒力基因、耐药基因和环境抗性基因。结果 在希拉肠球菌 R17 染色体上有 3 个前噬菌体, 其中 Prophage-1 和 Prophage-2 是不完整的前噬菌体, Prophage-3 是完整的前噬菌体。染色体上的噬菌体携带了多个细菌功能编码基因, 包括与核苷酸转运和代谢功能相关的基因。希拉肠球菌 R17 质粒上有一个不完整、携带了红霉素和杆菌肽耐药基因的前噬菌体 Prophage-p, 推测前噬菌体介导的基因水平转移使希拉肠球菌 R17 对红霉素和杆菌肽产生了耐药性。结论 希拉肠球菌基因组中的前噬菌体具有多样性。前噬菌体在肠球菌向耐药菌进化过程中发挥了重要作用, 应重视监控噬菌体介导的耐药性和致病性在食品中的扩散。

**关键词:**前噬菌体; 希拉肠球菌; 毒力基因; 耐药基因; 相互影响; 食源性致病菌; 宿主

**中图分类号:**R155 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-8456(2017)04-0393-07

**DOI:**10.13590/j.cjfh.2017.04.002

### The structure characteristics of prophages of foodborne *Enterococcus hirae* R17 and their interaction relationships with host bacterium

PENG Zi-xin<sup>1</sup>, ZHANG Si-yu<sup>2</sup>, YAN Shao-fei<sup>1</sup>, WANG Wei<sup>1</sup>, WANG Shuai<sup>2</sup>,  
GAN Xin<sup>1</sup>, ZHANG Jian-zhong<sup>3</sup>, LI Feng-qin<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Food Safety Risk Assessment of Ministry of Health, China National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100021, China; 2. Food Science and Engineering College, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China; 3. National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease and Prevention, Beijing 102206, China)

**Abstract: Objective** This study was to understand the structure characteristics of prophages in the genome of *Enterococcus hirae* R17, and also to analyze their interaction relationships with the host bacterium. **Methods** The gene distribution and gene encoding characteristics of prophages in the genome of *Enterococcus hirae* R17 were identified using the PHAST software. The virulence gene, antimicrobial resistance genes, and environmental resistance genes in the prophages were also analyzed. **Results** Three prophages were found on the chromosome of *Enterococcus hirae*, including two incomplete prophage elements (Prophage-1 and Prophage-2) and one complete prophage (Prophage-3). Some function genes of bacteria were found in the sequence of three prophages, including nucleotide transportation and metabolism related genes. One incomplete prophage carrying erythromycin- and bacitracin-resistance genes was identified in the plasmid, which suggested that prophage induced gene horizontal transfer caused erythromycin- and bacitracin-resistance of *Enterococcus hirae* R17. **Conclusion** This study laid a solid foundation for the diversity analysis of prophages of *Enterococcus hirae*. Prophages played an important role in promotion of antimicrobial resistance of enterococci. Scientists should pay more attention to the spread of antimicrobial resistance and pathogenicity induced by prophages.

收稿日期:2017-03-13

基金项目:国家自然科学基金(31601574);中国博士后基金(2016M590072);北京青年拔尖人才(2014000021223ZK46);北京市科技新星交叉学科合作项目(Z161100004916029)

作者简介:彭子欣 女 副研究员 研究方向为食品微生物学 E-mail:pengzixin@cfsa.net.cn

通信作者:李凤琴 女 研究员 研究方向为食品微生物学 E-mail:lifengqin@cfsa.net.cn

**Key words:** Prophage; *Enterococcus hirae*; virulence gene; antimicrobial resistance gene; interaction relationship; foodborne pathogens; host

温和噬菌体(也称溶原性噬菌体)可将其自身基因组整合于宿主菌基因组中,和其宿主菌之间建立起一种稳定的寄生关系,并随细菌基因组进行复制和传代,而不裂解宿主菌<sup>[1]</sup>。整合于宿主菌基因组的温和噬菌体基因组被称为前噬菌体,带有前噬菌体基因组的细菌称为溶原性细菌。前噬菌体是细菌间基因水平转移的重要载体,其诱导的基因整合事件可帮助宿主菌获得对自身进化有用的DNA序列,例如使白喉棒状杆菌、大肠埃希菌和霍乱弧菌等细菌获得新的毒力基因和耐药基因,增强其致病性和耐药性,提高宿主菌对生存环境的适应能力<sup>[2]</sup>。

肠球菌广泛存在于人体、动物、植物、土壤、水和食品中,目前细菌分类学上已将肠球菌划分为近50个种<sup>[3]</sup>。作为乳酸菌,肠球菌常被用于食品发酵,改善食品风味和延长货架期。而且,肠球菌还是一种益生菌,可用于改善人畜免疫系统,维持肠道菌群平衡<sup>[4]</sup>。然而,近几十年来发现,肠球菌也是社区和医院获得性感染的重要病原菌,常具有多重耐药性,可引起心内膜炎、菌血症、盆腔炎、新生儿感染、尿道炎等多种疾病<sup>[5]</sup>。有报道<sup>[1-2]</sup>显示,医院内高致病风险的粪肠球菌克隆群CC2携带有较多的前噬菌体,其在促进菌株医院内适应性进化方面发挥了重要作用。属于CC2克隆群的粪肠球菌致病株V583基因组中的多个前噬菌体对宿主菌的致病性和耐药性有重要贡献,并且导致了人类心内膜炎感染。

希拉肠球菌是一种可引起人畜共患病的肠球菌。近年来,临床上由希拉肠球菌引起的急重症感染多有报道<sup>[6-8]</sup>,但是对于希拉肠球菌的基因组信息还了解甚少<sup>[9-11]</sup>,尤其是希拉肠球菌基因组中前噬菌体结构特征鲜有报道。前期工作中,已经从北京市市售生鲜猪肉中分离出1株达托霉素耐药希拉肠球菌R17,并对这株菌的全基因组开展了测序研究<sup>[12-14]</sup>。本研究将分析希拉肠球菌R17基因组中前噬菌体的分布及其结构特征,探讨前噬菌体与其宿主菌的毒力基因和耐药基因之间的进化关系,以期对前噬菌体与其食源性宿主菌的相互影响有进一步认识。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株及基因组信息

希拉肠球菌R17分离自北京市市售生鲜猪肉,

对达托霉素、红霉素、环丙沙星、四环素和杆菌肽具有耐药性<sup>[13]</sup>。通过PacBio(Pacific Biosciences, Menlo Park, USA)平台对希拉肠球菌R17开展全基因组测序,其基因组含有一个环状的染色体和一个闭合的环形质粒pRZ1,GenBank登录号分别为CP015516和CP015517<sup>[14]</sup>。

### 1.2 生物信息学分析

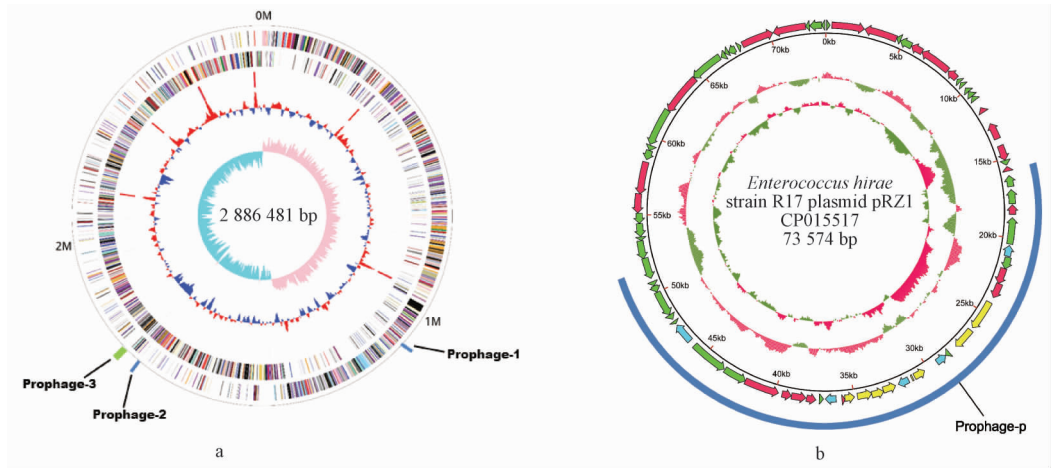
通过噬菌体查寻软件<sup>[15]</sup>(PHAST, <http://phast.wishartlab.com/>)在线预测和注释希拉肠球菌R17基因组中的前噬菌体。使用美国国家生物技术信息中心(NCBI)网站中的BLAST工具软件(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 在GeneBank数据库中比对前噬菌体的同源序列。蛋白质直系同源簇数据库(COG, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>)用于对同源蛋白功能进行分类。分别使用抗生素抗性基因数据库<sup>[16]</sup>(CARD, <https://card.mcmaster.ca/analyze>)、毒力因子数据库<sup>[17]</sup>(VFDB, <http://www.mgc.ac.cn/VFs/main.htm>)和环境杀菌剂和重金属抗性基因数据库<sup>[18]</sup>(BacMet, <http://bacmet.biomedicine.gu.se/>)对前噬菌体中的抗生素耐药基因、毒力基因、环境杀菌剂和重金属抗性基因进行预测。其中,VFDB数据库BLAST分值在50分以上的基因被预测为毒力基因。

## 2 结果与分析

### 2.1 前噬菌体在希拉肠球菌R17基因组中的分布

使用PHAST软件对希拉肠球菌R17基因组中染色体和质粒上的前噬菌体进行分析预测,结果显示R17染色体上有3个前噬菌体(图1A),其中Prophage-1和Prophage-2是不完整的噬菌体,Prophage-3是完整的前噬菌体。质粒pRZ1中有一个不完整的噬菌体Prophage-p(图1B)。Prophage-1和聚球藻噬菌体S-SKS1最为相似,Prophage-2和Prophage-3分别和肠球菌噬菌体 $\phi$ Efl1和 $\phi$ FLIA相似,质粒上的Prophage-p和葡萄球菌的SP $\beta$ -like噬菌体相似(见表1)。

希拉肠球菌R17基因组上4个前噬菌体的起始位点和终止位点信息如表1所示。在4个噬菌体中,Prophage-3最长,达到35.7 kb,染色体上的3个噬菌体总长为66.0 kb,占染色体全长(2 886.5 kb)的2.29%。质粒上的Prophage-p长达35.2 kb,占到质粒全长(73.6 kb)的47.83%。Prophage-1的



注:A为希拉肠球菌 R17 染色体中前噬菌体位置分布图;B为希拉肠球菌 R17 质粒中前噬菌体位置分布图

图 1 希拉肠球菌 R17 染色体和质粒中前噬菌体位置分布

Figure 1 Positions of prophages on chromosome and plasmid of *Enterococcus hirae* R17

表 1 希拉肠球菌 R17 基因组中前噬菌体的分布及特征

Table 1 Distribution and characteristics of prophages in the genome of *Enterococcus hirae* R17

原噬菌体名称	最相似噬菌体	完整性	序列定位	序列长度/kb	蛋白编码序列 (CDS) 个数	序列位置/bp	GC 含量 /%
Prophage-1	聚球藻噬菌体 S-SKS1	不完整(30)	染色体	13.3	13	1 153 628 ~ 1 166 955	38.57
Prophage-2	肠球菌噬菌体 $\phi$ Ef11	不完整(20)	染色体	17.0	11	1 784 095 ~ 1 801 146	33.68
Prophage-3	肠球菌噬菌体 $\phi$ FL1A	完整(150)	染色体	35.7	49	1 807 515 ~ 1 843 264	34.00
Prophage-p	葡萄球菌噬菌体 SP $\beta$ -like	不完整(60)	质粒	35.2	13	15 443 ~ 50 734	36.24

注:括号中的数字表示噬菌体完整性评分;GC 含量指鸟嘌呤和胞嘧啶所占比例

GC 含量 (38.57%) 高于染色体 GC 含量 (36.96%), Prophage-2 和 Prophage-3 的 GC 含量低于染色体的 GC 含量,其中 Prophage-2 的 GC 含量最低,为 33.68%, Prophage-p 的 GC 含量 (36.24%) 高于质粒的 GC 含量 (35.57%)。

使用 BLAST 软件比对发现, Prophage-1 与希拉肠球菌 (ATCC 9790) 中相似序列的覆盖率达到 100%, 同源性高达 98%; Prophage-2 与希拉肠球菌 (ATCC 9790) 相似序列的覆盖率为 69%, 但匹配序列的最高同源性是 99%; Prophage-3 与屎肠球菌 ISMMS\_VRE\_11 相似序列的覆盖率为 47%, 匹配序列的最高同源性是 90%; Prophage-p 与屎肠球菌 VRE001 相似序列的覆盖率为 39%, 匹配序列的最高同源性是 96%。

## 2.2 希拉肠球菌 R17 基因组中前噬菌体的结构和功能特征

如图 2 和表 2 所示, Prophage-1 中有 13 个蛋白编码区, 其中 8 个是前噬菌体序列, 5 个是细菌序列。5 个细菌蛋白中除一个是假设蛋白外, 其余 4 个蛋白的 COG 功能分类都属于核苷酸转运和代谢功能相关蛋白。Prophage-2 序列两端有噬菌体附着位点 *attL* 和 *attR*, 中间有 11 个蛋白编码区, 其中一个编码区编码噬菌体毒力蛋白 (见表 3)。Prophage-3 有完整的噬菌体编码序列, 包含了 49 个编码区, 编

码了典型的噬菌体特征蛋白, 如裂解酶、穿孔素、尾部蛋白、类尾丝蛋白、衣壳蛋白、头部蛋白、末端酶等蛋白 (见表 4)。Prophage-3 序列中还有 18 个细菌编码蛋白, 其中 17 个是假设蛋白, 一个编码 TIGR02391 家族蛋白。Prophage-2、Prophage-3 和 Prophage-p 的编码蛋白在 COG 数据库中均没有功能分类注释。

在 CARD 抗生素抗性基因数据库、VFDB 毒力基因数据库和 BacMet 环境杀菌剂和重金属抗性基因数据库中预测发现, 定位于染色体上的 Prophage-1、Prophage-2 和 Prophage-3 中不含有抗生素抗性基因、毒力基因、环境杀菌剂抗性基因和重金属抗性基因。

Prophage-p 中含有 13 个编码序列, 5 个噬菌体附着 *att* 序列 (见图 2 和表 5)。13 个编码序列中编码前噬菌体基因 8 个, 其中 3 个编码转座酶蛋白。编码细菌基因的 CDS 有 5 个, 分别编码红霉素抗性基因、杆菌肽抗性基因和噬菌体流产感染蛋白。

## 3 讨论

噬菌体诱导的基因水平转移是细菌进化的主要驱动力之一, 能使细菌快速获得生境适应性基因, 在细菌多样性分化中起着重要作用<sup>[19]</sup>。温和性噬菌体整合入细菌的过程中, 宿主菌会保留能增

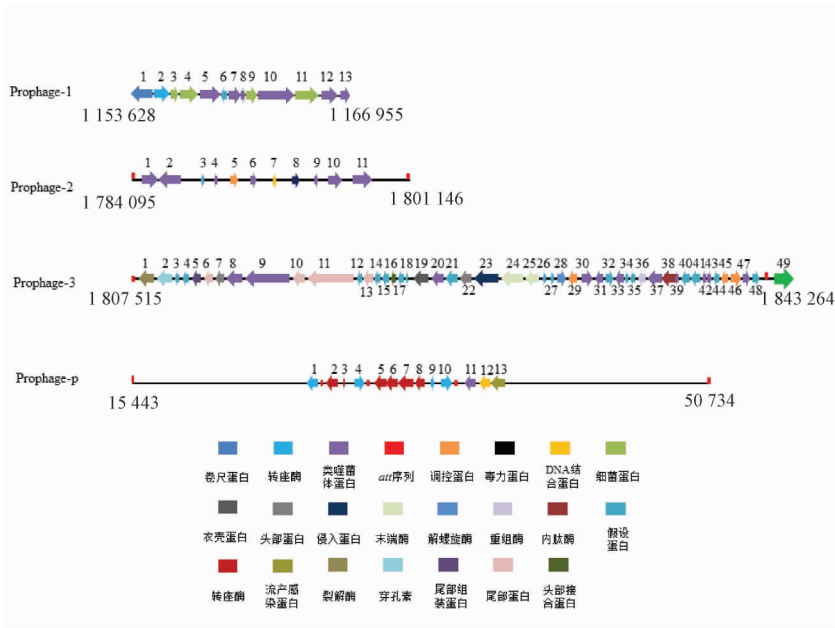


图2 希拉肠球菌基因组中前噬菌体编码基因示意图

Figure 2 Coding genes of prophages in the genome of *Enterococcus hirae* R17

表2 希拉肠球菌 R17 染色体中前噬菌体 Prophage-1 基因特征

Table 2 Gene characteristics of Prophage-1 in the *Enterococcus hirae* R17 chromosome

CDS	位置/bp	长度/bp	序列类别	预测蛋白功能	COG 功能
1	1 153 628 ~ 1 154 905	1 278	前噬菌体序列	噬菌体尾部卷尺蛋白	NA
2	1 155 205 ~ 1 156 170	966	前噬菌体序列	转座酶	NA
3	1 156 277 ~ 1 156 765	489	细菌序列	5-氨基咪唑核苷酸变位酶	核苷酸转运和代谢功能
4	1 156 749 ~ 1 157 882	1 134	细菌序列	5-氨基咪唑核苷酸合成酶	核苷酸转运和代谢功能
5	1 157 896 ~ 1 159 203	1 308	前噬菌体序列	类噬菌体蛋白	NA
6	1 159 360 ~ 1 159 737	378	细菌序列	假设蛋白	—
7	1 159 999 ~ 1 160 715	717	前噬菌体序列	磷酸核糖酰氨咪唑琥珀酸甲酰胺合酶	NA
8	1 160 730 ~ 1 160 984	255	前噬菌体序列	5,5-phosphoribosyl formylglycinamide amidotransferase	NA
9	1 160 986 ~ 1 161 657	672	细菌序列	磷酸核糖甲酰甘氨酸合成酶 I	核苷酸转运和代谢功能
10	1 161 659 ~ 1 163 881	2 223	前噬菌体序列	磷酸核糖甲酰甘氨酸合成酶 II	NA
11	1 163 866 ~ 1 165 308	1 443	细菌序列	酰氨基磷酸核糖基转移酶	核苷酸转运和代谢功能
12	1 165 322 ~ 1 166 365	1 044	前噬菌体序列	氨基咪唑核苷酸合成酶	NA
13	1 166 362 ~ 1 166 955	594	前噬菌体序列	蓝藻磷酸核糖甘氨酸酰胺合酶	NA

注:—表示假设蛋白;NA 表示功能未知

表3 希拉肠球菌 R17 染色体中前噬菌体 Prophage-2 基因特征

Table 3 Gene characteristics of Prophage-2 in the *Enterococcus hirae* R17 chromosome

CDS	位置/bp	长度/bp	序列类别	预测蛋白功能
N	1 784 095 ~ 1 784 108	14	细菌序列	附着位点 attL
1	1 784 300 ~ 1 785 247	948	前噬菌体序列	细菌萜醇葡萄糖基转移酶
2	1 785 326 ~ 1 786 690	1 365	前噬菌体序列	类噬菌体蛋白
3	1 786 975 ~ 1 787 175	201	细菌序列	假设蛋白
4	1 787 223 ~ 1 787 411	189	前噬菌体序列	类噬菌体蛋白
5	1 787 511 ~ 1 787 984	474	前噬菌体序列	XRE 家族转录调控蛋白
6	1 788 098 ~ 1 788 454	357	前噬菌体序列	双功能 S24 家族肽酶
7	1 788 563 ~ 1 788 781	219	前噬菌体序列	DNA 结合蛋白
8	1 789 294 ~ 1 789 776	483	前噬菌体序列	毒力蛋白
9	1 789 880 ~ 1 790 080	201	前噬菌体序列	类噬菌体蛋白
10	1 790 101 ~ 1 790 973	873	前噬菌体序列	类噬菌体蛋白
11	1 791 136 ~ 1 792 296	1 161	前噬菌体序列	整合酶
N	1 801 146 ~ 1 801 159	14	细菌序列	附着位点 attR

注:N 表示前噬菌体的附着位点

表 4 希拉肠球菌 R17 染色体中前噬菌体 Prophage-3 基因特征

Table 4 Gene characteristics of Prophage-3 in the *Enterococcus hirae* R17 chromosome

CDS	位置/bp	长度/bp	序列类别	预测蛋白功能
N	1 807 515 ~ 1 807 526	12	细菌序列	附着位点 <i>attL</i>
1	1 807 641 ~ 1 808 621	981	前噬菌体序列	裂解酶
2	1 808 605 ~ 1 808 892	288	前噬菌体序列	穿孔素
3	1 808 934 ~ 1 809 215	282	细菌序列	假设蛋白
4	1 809 372 ~ 1 809 725	354	细菌序列	假设蛋白
5	1 809 741 ~ 1 810 265	525	前噬菌体序列	尾部组装蛋白
6	1 810 265 ~ 1 810 624	360	前噬菌体序列	尾部蛋白
7	1 811 367 ~ 1 811 852	486	前噬菌体序列	类尾丝蛋白
8	1 812 124 ~ 1 813 026	903	前噬菌体序列	类噬菌体蛋白
9	1 813 039 ~ 1 815 750	2 712	前噬菌体序列	内肽酶
10	1 815 747 ~ 1 816 487	741	前噬菌体序列	尾部组分蛋白
11	1 816 477 ~ 1 819 266	2 790	前噬菌体序列	尾部蛋白
12	1 819 508 ~ 1 819 849	342	细菌序列	假设蛋白
13	1 819 849 ~ 1 820 466	618	前噬菌体序列	尾部蛋白
14	1 820 467 ~ 1 820 844	378	细菌序列	假设蛋白
15	1 820 846 ~ 1 821 243	398	细菌序列	假设蛋白
16	1 821 236 ~ 1 821 607	372	前噬菌体序列	头部接合蛋白
17	1 821 607 ~ 1 821 948	342	细菌序列	假设蛋白
18	1 821 960 ~ 1 822 175	216	细菌序列	假设蛋白
19	1 822 198 ~ 1 823 088	891	前噬菌体序列	衣壳蛋白
20	1 823 103 ~ 1 823 717	615	前噬菌体序列	丙氨酰 tRNA 合成酶
21	1 823 850 ~ 1 824 167	318	细菌序列	假设蛋白
22	1 824 169 ~ 1 825 047	879	前噬菌体序列	头部蛋白
23	1 825 139 ~ 1 826 594	1 456	前噬菌体序列	侵入蛋白
24	1 826 682 ~ 1 828 098	1 417	前噬菌体序列	末端酶 B 蛋白
25	1 828 091 ~ 1 828 924	834	前噬菌体序列	末端酶小亚基
26	1 829 039 ~ 1 829 281	243	细菌序列	假设蛋白
27	1 829 524 ~ 1 829 850	327	细菌序列	假设蛋白
28	1 830 180 ~ 1 830 674	495	前噬菌体序列	DNA 解螺旋酶
29	1 830 975 ~ 1 831 442	468	前噬菌体序列	ArpU 转录调控蛋白
30	1 831 712 ~ 1 832 401	690	前噬菌体序列	类噬菌体蛋白
31	1 832 501 ~ 1 832 998	498	前噬菌体序列	类噬菌体蛋白
32	1 833 166 ~ 1 833 381	216	细菌序列	假设蛋白
33	1 833 712 ~ 1 833 999	288	前噬菌体序列	类噬菌体蛋白
34	1 834 017 ~ 1 834 211	195	细菌序列	假设蛋白
35	1 834 212 ~ 1 834 541	330	细菌序列	假设蛋白
36	1 834 980 ~ 1 835 468	489	前噬菌体序列	重组酶
37	1 835 508 ~ 1 836 383	876	前噬菌体序列	RecT 家族蛋白
38	1 836 385 ~ 1 837 326	942	前噬菌体序列	内肽酶 YqaJ 家族
39	1 837 398 ~ 1 837 643	246	前噬菌体序列	类噬菌体蛋白
40	1 837 684 ~ 1 837 869	186	细菌序列	假设蛋白
41	1 837 886 ~ 1 838 116	231	细菌序列	假设蛋白
42	1 838 113 ~ 1 838 667	555	前噬菌体序列	类噬菌体蛋白
43	1 838 955 ~ 1 839 782	828	细菌序列	TIGR02 391 家族蛋白
44	1 839 723 ~ 1 839 974	252	细菌序列	假设蛋白
45	1 839 986 ~ 1 840 225	240	前噬菌体序列	转录调控蛋白
46	1 840 364 ~ 1 840 756	393	前噬菌体序列	转录抑制蛋白
47	1 840 763 ~ 1 841 191	429	前噬菌体序列	假设蛋白
48	1 841 253 ~ 1 841 882	630	细菌序列	假设蛋白
N	1 841 921 ~ 1 841 932	12	细菌序列	附着位点 <i>attR</i>
49	1 842 041 ~ 1 843 264	1 224	前噬菌体序列	小尾部蛋白

注: N 表示前噬菌体的附着位点; NA 表示功能未知

表5 希拉肠球菌 R17 质粒中前噬菌体 Prophage-p 基因特征

Table 5 Gene characteristics of Prophage-p in the *Enterococcus hirae* R17 plasmid

CDS	位置/bp	长度/bp	序列类别	预测蛋白功能	功能注释
N	15 443 ~ 15 454	12	细菌序列	附着位点 <i>attL</i>	NA
1	28 639 ~ 29 319	681	前噬菌体序列	转座酶	NA
N	29 378 ~ 29 393	16	细菌序列	附着位点 <i>attL</i>	NA
2	30 253 ~ 30 990	738	细菌序列	红霉素抗性基因 <i>ermB</i>	红霉素耐药基因
3	31 115 ~ 31 198	84	细菌序列	23S rRNA 甲基转移酶	红霉素耐药基因
4	31 420 ~ 32 106	687	前噬菌体序列	整合酶核心域蛋白/转座酶	NA
N	32 144 ~ 32 159	16	细菌序列	附着位点 <i>attR</i>	NA
5	32 303 ~ 33 133	831	细菌序列	杆菌肽抗性基因 <i>bcrD</i>	杆菌肽耐药基因
6	33 133 ~ 33 882	750	细菌序列	杆菌肽抗性基因 <i>bcrB</i>	杆菌肽耐药基因
7	33 875 ~ 34 792	918	前噬菌体序列	杆菌肽抗性基因 <i>bcrA</i> /类噬菌体蛋白	杆菌肽耐药基因
8	34 975 ~ 35 589	615	前噬菌体序列	杆菌肽抗性转录调控基因 <i>bcrR</i> /免疫抑制蛋白	杆菌肽耐药基因
9	35 579 ~ 35 776	198	前噬菌体序列	结合转移蛋白	NA
10	36 139 ~ 36 825	687	前噬菌体序列	整合酶核心域蛋白/转座酶	NA
N	36 863 ~ 36 878	16	细菌序列	附着位点 <i>attR</i>	NA
11	36 936 ~ 37 196	261	前噬菌体序列	类噬菌体蛋白	NA
12	37 562 ~ 38 047	486	前噬菌体序列	DNA 单链结合蛋白	NA
13	38 050 ~ 38 949	900	细菌序列	噬菌体流产感染蛋白	NA
N	50 734 ~ 50 745	12	细菌序列	附着位点 <i>attR</i>	NA

注: N 表示前噬菌体的附着位点; NA 表示功能未知

强其环境适应能力的基因,使其最终成为细菌基因组的一部分,同时选择性删除无用 DNA,降低整合过程给宿主菌带来的基因复制负担。另外,整合入细菌基因组的前噬菌体间会发生同源重组或基因等位交换现象,加速细菌基因组的多样性分化<sup>[20]</sup>。在希拉肠球菌 R17 基因组上发现的 4 个前噬菌体中,有 3 个前噬菌体可能发生了基因删除事件,从而造成了噬菌体序列缺失。

对多株细菌的基因组开展测序分析发现,前噬菌体是细菌短期内表现出种内或种间生物多样性的主要原因<sup>[20]</sup>。临床分离致病株粪肠球菌 V583 基因组中含有 7 个完整的前噬菌体,序列总长超过染色体大小的 25%<sup>[1]</sup>。尽管 Prophage-1、Prophage-2、Prophage-3 仅占希拉肠球菌 R17 染色体总长的 2.29%, Prophage-p 仅占质粒全长的 47.83%,但 Prophage-2、Prophage-3 和 Prophage-p 序列与肠球菌属种内和种间序列的覆盖度都较低,最低为 39%。这不仅说明前噬菌体是造成肠球菌种内和种间基因分化的主要动力,也说明了希拉肠球菌 R17 前噬菌体中曾普遍发生过基因删除和重组事件。

前噬菌体与细菌的致病力、耐药性以及环境抗性也有重要关系<sup>[20]</sup>。细菌基因组中携带的前噬菌体往往是造成菌株之间致病性差异的主要原因。肠球菌是人体肠道常驻菌群的重要组成部分,但是致病株粪肠球菌 V583 基因组中就携带了前噬菌体编码的类血小板结合蛋白(platelet-binding-like protein),这种蛋白可黏附人类血小板,造成人类菌血症感染<sup>[2]</sup>。近年来有研究<sup>[2]</sup>发现,在很多粪肠球

菌的临床分离株的基因组中都发现了多聚前噬菌体现象(polylysogeny),这说明前噬菌体在增加致病株的医院环境适应性方面发挥着重要作用。尽管在希拉肠球菌 R17 的前噬菌体中没有发现毒力基因,但应注意前噬菌体导致的菌株致病性变化。

噬菌体是造成抗生素耐药性快速扩散的主要原因之一。近年来研究<sup>[2]</sup>发现,氟喹诺酮类抗生素可以增强噬菌体的活性,导致细菌耐药性的加速传播。对奥地利市售 50 份鸡肉样品进行分析,发现有近一半样品遭到了噬菌体污染,而这种噬菌体可以有效地将抗生素耐药基因在细菌之间进行转移<sup>[21]</sup>。本研究发现,市售生鲜猪肉中分离的希拉肠球菌 R17 的红霉素抗性、杆菌肽抗性都是由 Prophage-p 介导的,这说明前噬菌体在增加菌株多重耐药性方面发挥了关键作用。由于噬菌体对于食品工业常用消毒剂如酒精等,具有极强的耐受性,提示应密切关注噬菌体导致的耐药基因在食源性细菌中的扩散,合理采取消毒措施。

噬菌体作为应对抗生素抗性蔓延的重要武器,也引起了广泛关注。由于噬菌体抗细菌感染的高特异性以及对人体的低毒性,可以减少抗生素的使用,一些前苏联国家长期使用噬菌体疗法对抗细菌感染类疾病<sup>[22]</sup>,因此,研究细菌和噬菌体的相互影响,不仅可以深入认识细菌尤其是致病菌的致病性、耐药性和环境适应性的分子机制,而且对于监控致病菌变异、开发新型无抗生素抗菌疗法具有重要意义。

## 参考文献

- [ 1 ] STEVENS R H, EKTEFAIE M R, FOUTS D E. The annotated complete DNA sequence of *Enterococcus faecalis* bacteriophage  $\phi$ EF1 and its comparison with all available phage and predicted prophage genomes [ J ]. FEMS Microbiol Letters, 2011, 317 ( 1 ): 9-26.
- [ 2 ] MATOS R C, LAPAQUE N, RIGOTTIER-GOIS L, et al. *Enterococcus faecalis* prophage dynamics and contributions to pathogenic traits [ J ]. PLoS Genet, 2013, 9 ( 6 ): e1003539.
- [ 3 ] ABRIQUEL H, OMAR N B, MOLINOS A C, et al. Comparative analysis of genetic diversity and incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococcal populations from raw fruit and vegetable foods, water and soil, and clinical samples [ J ]. Int J Food Microbiol, 2008, 123 ( 1/2 ): 38-49.
- [ 4 ] BONACINA J, SUAREZ N, HORMIGO R, et al. A genomic view of food-related and probiotic *Enterococcus* strains [ J ]. DNA Res, 2016, 24 ( 1 ): 11-24.
- [ 5 ] VAN S W, TOP J, RILEY D R, et al. Pyrosequencing-based comparative genome analysis of the nosocomial pathogen *Enterococcus faecium* and identification of a large transferable pathogenicity island [ J ]. BMC Genomics, 2010, 11 ( 1 ): 239-256.
- [ 6 ] GHOSH A, BORST L, STAUFFER S H, et al. Mortality in kittens is associated with a shift in ileum mucosa-associated enterococci from *Enterococcus hirae* to biofilm-forming *Enterococcus faecalis* and adherent *Escherichia coli* [ J ]. J Clin Microbiol, 2013, 51 ( 11 ): 3567-3578.
- [ 7 ] ANGHINAH R, WATANABE R G, SIMABUKURO M M, et al. Native valve endocarditis due to *Enterococcus hirae* presenting as a neurological deficit [ J ]. Case Rep Neurol Med, 2013: 636070.
- [ 8 ] BOURAF A N, LOUCIF L, BOUTEFNOUCHET N, et al. *Enterococcus hirae*, an unusual pathogen in humans causing urinary tract infection in a patient with benign prostatic hyperplasia: first case report in Algeria [ J ]. New Microbes New Infect, 2015, 8: 7-9.
- [ 9 ] GAECHTER T, WUNDERLIN C, SCHMIDHEINI T, et al. Genome sequence of *Enterococcus hirae* (*Streptococcus faecalis*) ATCC 9790, a model organism for the study of ion transport, bioenergetics, and copper homeostasis [ J ]. J Bacteriol, 2012, 194 ( 18 ): 5126-5127.
- [ 10 ] PORCELLATO D, OSTLIE H M, SKEIE S B. Draft genome sequence of *Enterococcus hirae* strain INF E1 isolated from cultured milk [ J ]. Genome Announc, 2014, 2 ( 4 ): e00948.
- [ 11 ] KATYAL I, CHABAN B, HILL J E. Comparative genomics of cpn60-defined *Enterococcus hirae* ecotypes and relationship of gene content differences to competitive fitness [ J ]. Microb Ecol, 2016, 72 ( 4 ): 917-930.
- [ 12 ] 彭子欣, 王伟, 胡豫杰, 等. 食品及环境样品中肠球菌快速检验方法的建立及优化 [ J ]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7 ( 6 ): 2240-2246.
- [ 13 ] 彭子欣, 张爽, 王伟, 等. 北京市集贸市场生鲜猪肉肠球菌的耐药特征分析 [ J ]. 中国食品卫生杂志, 2016, 28 ( 6 ): 736-743.
- [ 14 ] PENG Z X, WANG W, HU Y J, et al. Complete genome sequence of *Enterococcus hirae* R17, a daptomycin-resistant bacterium isolated from retail pork in China [ J ]. Genome Announc, 2016, 4 ( 3 ): 606-616.
- [ 15 ] ZHOU Y, LIANG Y J, LYNCH K, et al. PHAST: a fast phage search tool [ J ]. Nucl Acids Res, 2011, 39 ( suppl 2 ): 347-352.
- [ 16 ] MCARTHUR A G, WAGLECHNER N, NIZAM F, et al. The comprehensive antibiotic resistance database [ J ]. Antimicrob Agents Ch, 2013, 57 ( 7 ): 3348-3357.
- [ 17 ] CHEN L H, ZHENG D D, LIU B, et al. VFDB 2016: hierarchical and refined dataset for big data analysis—10 years on [ J ]. Nucleic Acids Res, 2016, 44: 694-697.
- [ 18 ] PAL C D, BENGTSSON-PALME J, RENSING C, et al. BacMet: antibacterial biocide and metal resistance genes database [ J ]. Nucleic Acids Res, 2014, 42: 737-743.
- [ 19 ] 蔡刘体, 刘艳霞, 孟琳, 等. 烟草青枯菌 FQY\_4 基因组中原噬菌体生物信息学分析 [ J ]. 中国烟草学报, 2015, 21 ( 1 ): 82-88.
- [ 20 ] 黎庶, 胡福泉. 前噬菌体 [ J ]. 微生物通报, 2009, 36 ( 3 ): 432-438.
- [ 21 ] SHOUSHA A, AWAIWANONT N, SOFKA D, et al. Bacteriophages isolated from chicken meat and the horizontal transfer of antimicrobial resistance genes [ J ]. Appl Environ Microbiol, 2015, 81 ( 14 ): 4600-4606.
- [ 22 ] REARDON S. Phage therapy gets revitalized [ J ]. Nature, 2014, 510 ( 7503 ): 15-16.