

· 基础研究 ·

广谱铜绿假单胞菌噬菌体 PAPX 的生物学特性及生物膜清除能力的研究

谢萧屹¹, 汪心婕¹, 戎 誉¹, 陈淑华², 刘根焰³, 白 莉^{4*}, 汤华民^{1*}

¹南京医科大学基础医学院免疫学系, 江苏 南京 211166; ²常州市肿瘤医院重症医学科, 江苏 常州 213000; ³南京医科大学附属第一医院检验科, 江苏 南京 210029; ⁴南京医科大学康达学院基础医学部, 江苏 连云港 222000

[摘要] 目的: 分离纯化新的铜绿假单胞菌噬菌体。方法: 从南京医科大学校园天元湖中分离得到铜绿假单胞菌噬菌体, 并对纯化后的噬菌体进行基因组测序和生物学性状解析、体外抑菌曲线绘制及生物膜清除实验。结果: 分离出一株铜绿假单胞菌噬菌体, 将其命名为 PAPX, 基因组分析表明它与假单胞菌噬菌体 Epa12 亲缘关系较近(同源性为 98%), 属于假单胞菌病毒家族 *Pbunavirus* 属分支。透射电子显微镜观察显示, 它具有直径约 90 nm 的球形头部和长约 50 nm、直径 26 nm 的收缩性尾部, 是一种肌尾噬菌体。生物学性状分析表明, 它能裂解 24 株临床菌株中的 17 株, 表明其对宿主菌有很强的裂解作用。噬菌体的体外抑菌实验显示, 该株噬菌体 PAPX 能在细菌增殖初期就表现出抑制菌株生长的能力。生物膜裂解实验, 证明该噬菌体 PAPX 能有效清除铜绿假单胞菌的生物膜, 减少菌株定植。结论: 本研究成功分离纯化了一株铜绿假单胞菌噬菌体 PAPX, 通过生物学特性研究、体外实验及生物膜清除实验的验证, 揭示了其在治疗铜绿假单胞菌感染方面具有广阔的临床应用前景。

[关键词] 铜绿假单胞菌; 噬菌体; 噬菌体治疗; 生物膜

[中图分类号] R446.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2025)07-945-09

doi: 10.7655/NYDXBNSN250416

Biological characterization and biofilm removing ability of the broad-spectrum *Pseudomonas aeruginosa* phage PAPX

XIE Xiaoyi¹, WANG Xinjie¹, RONG Yu¹, CHEN Shuhua², LIU Genyan³, BAI Li^{4*}, TANG Huamin^{1*}

¹Department of Immunology, School of Basic Medical Sciences, Nanjing Medical University, Nanjing 211166;

²Intensive Care Unit, Changzhou Cancer Hospital, Changzhou 213000; ³Department of Laboratory Medicine, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029; ⁴Department of Basic Medicine, Kangda College

of Nanjing Medical University, Lianyungang 222000, China

[Abstract] **Objective:** To isolate and purify novel *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) bacteriophages. **Methods:** Bacteriophages were isolated from Nanjing Medical University campus Tianyuan lake, followed by genome sequencing and biological characterization of purified phages. *In vitro* antibacterial assays, including growth inhibition curves and biofilm eradication experiments, were conducted. **Results:** A novel *P. aeruginosa* phage named PAPX was successfully isolated. Genomic analysis revealed 98% identity with *Pseudomonas* phage Epa12, classifying it within the *Pbunavirus* genus. Transmission electron microscopy demonstrated its myoviral morphology featuring an icosahedral head (~90 nm diameter) and a contractile tail (~50 nm length, 26 nm diameter). Biological characterization showed a strong lytic activity against 17 of 24 clinical strains. *In vitro* experiments confirmed its ability to suppress bacterial growth during early proliferation phase and effectively eradicate *P. aeruginosa* biofilms. **Conclusion:** The successful isolation and characterization of phage PAPX, validated through biological profiling and *in vitro* assays, demonstrates its promising clinical potential for treating *P. aeruginosa* infections, particularly in combating antibiotic-resistant strains and biofilm-

[基金项目] 南京医科大学-齐鲁临床医学研究基金项目(2024KF0260); 南京医科大学康达学院第一期“科研人才培养计划”(KD2021KYRC017)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: htang@njmu.edu.cn (ORCID: 0000-0002-5724-3973); baili_2012bs@126.com (ORCID: 0009-0003-9812-9258)

associated infections.

[Key words] *Pseudomonas aeruginosa*; bacteriophage; phage therapy; biofilm

[J Nanjing Med Univ, 2025, 45(07): 945-953]

铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*, *P. aeruginosa*) 是假单胞菌科 (γ -变形杆菌属) 的一种革兰阴性杆菌, 在自然界中广泛存在, 属于机会性致病病原体, 主要侵袭免疫力低下的患者, 包括囊性纤维化、烧伤、癌症、慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 的患者, 或因严重感染 (如 COVID-19) 而需要机械通气的患者^[1-4]。铜绿假单胞菌是医院获得性感染的主要致病菌, 给公共卫生领域带来了极大的负担, 当前抗生素仍是针对铜绿假单胞菌的主要治疗策略, 可以单独使用或联合几种不同的抗生素使用以期获得更好的杀菌效果^[2, 5-6]。然而, 不当使用抗生素导致多重耐药菌的分离逐年增加, 自 2017 年起, 铜绿假单胞菌就被世界卫生组织列入优先关注的细菌名单之一, 因此迫切需要替代治疗方法来应对这一严峻挑战^[7-8]。

噬菌体是一类专门感染细菌的病毒, 由于其独特的宿主特异性、快速复制能力和在各种环境中的耐受性, 噬菌体成为临床抗生素耐药菌治疗的潜在解决方案^[9-11], 如对包括铜绿假单胞菌在内的多重耐药菌 (multi-drug resistance, MDR) 的治疗。已有不少实例证明了噬菌体疗法的有效性, 例如我国早在 1958 年, 由余瀟教授牵头组织了从环境中分离噬菌体应用于烧伤患者的铜绿假单胞菌感染治疗, 获得了良好的效果, 患者成功治愈出院^[12-15]。然而, 截至 2024 年 11 月, 在美国国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 分类数据库的 24 419 个条目中, 仅有 1 600 个铜绿假单胞菌特异性噬菌体被收录, 表明具有临床用途的噬菌体少, 迫切需要从自然环境中分离强效裂解性噬菌体。

由于噬菌体种类繁多, 来自不同环境的噬菌体往往表现出独特的生物学特性和遗传特征。本研究纯化了一株从南京医科大学天元湖中分离到的广谱铜绿假单胞菌噬菌体, 通过分析该噬菌体基因组、解析生物学性状及生物膜清除能力, 揭示了其在铜绿假单胞菌感染治疗中的潜在应用前景。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

宿主铜绿假单胞菌是实验室前期从校园土壤中分离得来, 是对各种经验性治疗铜绿假单胞菌的抗生素均敏感的低毒性菌株。宿主菌谱探索实验由南京医科大学附属第一人民医院检验科刘根焰课题组协助完成, 所用临床菌株是从患者体液样本中分离得到的铜绿假单胞菌, 储存于江苏省妇幼保健院检验科细菌库, 标准株 PAO1 由南京医科大学第一附属医院检验科赠予。实验已通过南京医科大学第一附属医院伦理委员会审查, 伦理批准号: 2024-SR-075。水样本采自于南京医科大学江宁校区天元湖。

1.1.2 试剂与耗材

琼脂粉、营养肉汤 (luria-bertani, LB) 培养基 (青岛海博生物技术有限公司); 胰蛋白胨、酵母粉、脑心浸出液肉汤 (brain-heart infusion, BHI) 培养基 (Oxoid 公司, 英国); 氢氧化钠、浓盐酸、二甲基亚砜、结晶紫、甲醇 (上海国药集团化学试剂有限公司)。氯化钠-硫酸镁 (sodium chloride magnesium, SM) 缓冲液 (上海生工生物工程技术有限公司); 0.45 μm 无菌膜 (Millipore 公司, 美国)。聚乙二醇 8000 (Bioshark 公司, 美国); DNA/RNA 提取试剂盒 (北京天根生化科技有限公司)。

1.1.3 仪器与设备

5810R 台式高速冷冻离心机 (Eppendorf 公司, 德国); 超净工作台 (ESCO 公司, 新加坡); 高速大容量离心机 (Superma TOMY 公司, 日本); 空气恒温摇床 (上海新苗医疗器械制造厂); 智能生化培养箱 (宁波江南仪器厂); DELTA320pH 仪 (Mettler Toledo 公司, 瑞士); 80 $^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱 (山东海尔公司); 透射电子显微镜 (Thermo Fisher Scientific 公司, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 噬菌体的富集与分离

从南京医科大学天元湖采集的污水样本中分离出铜绿假单胞菌的特异性噬菌体。样品经定性

滤纸过滤后,在4℃下以8 000 g离心10 min以去除碎片。上清液经0.45 μm 无菌膜过滤后,与铜绿假单胞菌过夜培养物一起在37℃下培养,以扩增噬菌体种群。再次过滤并储存培养物的上清液,以备进一步分析。接着进行噬菌体纯化以分离单个噬菌体。将100 μL富集的噬菌体溶液与100 μL过夜铜绿假单胞菌培养物混合,再加入4 mL半固体BHI培养基。将混合物覆盖在BHI琼脂平板上,37℃培养过夜。分离出单个斑块,将其转移到装有SM缓冲液的试管中,并通过数次重复纯化,以确保噬菌斑大小的均匀稳定性。为了浓缩噬菌体,将200 mL噬菌体感染的细菌培养物与等体积的10%聚乙二醇8000(PEG8000)在4℃下混合过夜。10 000 g离心10 min后,将颗粒重悬于SM缓冲液中并用氯仿萃取,得到的含有噬菌体的上清液储存在4℃以备进一步实验。

1.2.2 噬菌体宿主菌谱实验

通过斑点实验评估分离出的噬菌体的宿主范围。耐多药铜绿假单胞菌菌株来自江苏省妇幼保健院检验科细菌库。将这些菌株的隔夜培养物与半固体BHI培养基混合,倒入BHI固体平板,在室温下凝固。然后将5 μL浓度约为 1×10^9 PFU/mL的噬菌体上清液,滴加到平板上。干燥后,将平板在37℃下培养过夜,评估裂解区以确定噬菌体的敏感性。

1.2.3 噬菌体的形态学观察

通过双层琼脂平板法,噬菌体能在上层半固体培养基中显示出单个噬斑的形态。使用透射电子显微镜观察分离出的噬菌体的形态结构,将10 μL纯化的噬菌体悬浮液(浓度约 1×10^{10} PFU/mL)涂抹在带碳支撑膜的铜网上,室温晾干后用2%磷钨酸染液进行复染。10 min后,吸去多余的染液并晾干^[16]。使用Thermo Scientific Helios 5 Hydra DualBeam TEM对制备好的样品进行观察。

1.2.4 噬菌体的pH稳定性及温度稳定性检测

使用不同pH值的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)将纯化的噬菌体溶液(浓度约为 1×10^9 PFU/mL)稀释10倍。然后将稀释样品在室温下培养1 h,以评估该噬菌体对不同pH溶液的稳定性。共培养结束后,使用双层琼脂平板法测定噬菌体滴度。

在进行热稳定性分析时,将噬菌体溶液(浓度为 1×10^9 PFU/mL)置于37℃、45℃、55℃、65℃和75℃的水浴锅中,并在这些温度下保持1 h。共培养结束后,使用双层琼脂平板法测噬菌体浓度,以

评估噬菌体的热稳定性。

1.2.5 噬菌体基因组提取、测序及生物信息学分析

使用病毒DNA/RNA提取试剂盒提取噬菌体的基因组DNA,其二代全基因组测序及拼接由上海派森诺生物科技有限公司完成。基于Illumina NovaSeq平台上进行测序,并使用A5-MiSeq和SPAdes工具将原始数据组装成基因组信息。使用BLAST将高覆盖序列与NCBI NT数据库进行比对,以确认噬菌体基因组的同一性。使用MUMmer软件和Pilon软件进一步完善等位基因,以生成最终的基因组组装^[17-18]。基因注释采用DIAMOND软件,使用NCBI NR数据库进行蛋白质功能预测,显著性阈值为 1×10^{-6} ^[19]。最终将获得的噬菌体基因组序列提交GenBank,获得登录号PV189959。

1.2.6 噬菌体最佳感染复数及一步生长曲线

使铜绿假单胞菌培养物生长至对数期($D(600 \text{ nm})=0.6$,约 1×10^7 CFU/mL),以确定最佳感染复数(multiplicity of infection, MOI)。将连续稀释的噬菌体与细菌培养物混合,在37℃温度下培养4 h,振荡频率为180 r/min。采用双层琼脂法测定上清液中的噬菌体滴度。产生最高噬菌体滴度的MOI被确定为最佳。

利用噬菌体感染处于对数生长期的铜绿假单胞菌(MOI=10),绘制一步生长曲线。混合物在37℃培养箱温育15 min,以确保每个细菌都被噬菌体侵染,然后12 000 r/min离心30 s,尽量弃去上清,此时看不到菌体沉淀。每管加入适量BHI培养基再12 000 r/min 30 s离心弃去上清,重复2次,充分洗去或者稀释未吸附的噬菌体。接着用预热的BHI培养基混悬两个EP管底的细菌沉淀并将其充分混匀,转移到一个新的10 mL EP管中,迅速置于37℃摇床中160 r/min振荡培养,同时开始计时。每10 min取样1次。离心样品,测定上清液中的噬菌体滴度。噬菌体滴度与时间的关系曲线揭示了潜伏期、暴发大小和暴发持续时间等关键参数。

1.2.7 体外抑菌曲线

在24孔板中进行体外抑菌实验,评估噬菌体的杀菌能力,取铜绿假单胞菌标准株在BHI培养基中培养至 $D(600 \text{ nm})=0.2$ 。以最佳MOI加入噬菌体溶液,对照孔加入等量的BHI培养基。使用Biotek SynergyMX酶标仪在10 h内每隔1 h记录1次 $D(600 \text{ nm})$ 测量值。对数据进行统计分析,结果以均值±标准差(standard deviation, SD)的形式报告。为了比较两组之间的统计差异,采用了双向方差分析。统计显著性的标准是 $P < 0.05$ 。

1.2.8 生物膜清除实验

将铜绿假单胞菌液用LB培养基1:100传代后37℃摇约3h达到对数生长期,接着进行10倍稀释后作为形成生物膜的初始菌液,此时浓度约为 1×10^7 CFU/mL。取96孔板,每个孔内分别加入100 μ L菌液和100 μ L新鲜LB培养基,37℃孵育24h。第2天吸出培养液,用无菌PBS缓冲液清洗2次,此时生物膜已形成且黏附于孔壁及孔底。对照组继续加入LB培养基而实验组加入噬菌体PAPX液,共培养6h后,取出并弃去培养液,然后使用0.1%结晶紫染液进行生物膜染色10min,用流动水冲去多余染液,再次室温晾干,最后将已染色的生物膜用95%乙醇溶解,置于酶标仪(Biotek synergyMX)测量 $D(600\text{ nm})$ 值并记录。

1.3 统计学方法

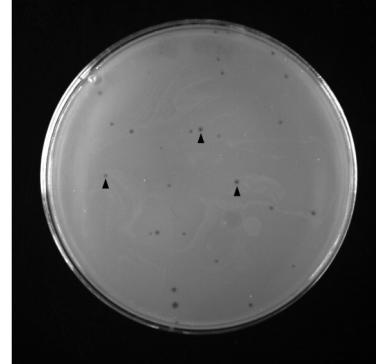
实验数据用GraphPad Prism10软件进行了统计学分析。数据以均值 \pm 标准误($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$)或均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组数据组间比较采用非配对 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 环境中分离噬菌体的噬斑特性

以土壤中分离出的一种低毒力药敏性铜绿假单胞菌为宿主,从南京医科大学天元湖分离出了1株针对其裂解的新型噬菌体并命名为PAPX。双层琼脂平板显示,噬菌体PAPX形成了直径1~2mm的

圆形半透明斑块,边缘清晰明确,显示出强大的噬菌活性(图1)。



The black arrows indicate the plaques formed by phage PAPX. The translucent plaques measuring approximately 2 mm in diameter with well-defined edges highlight its lytic activity.

图1 噬菌体PAPX噬斑图

Figure 1 PAPX phage plaques were shown in a double-layer agar plate

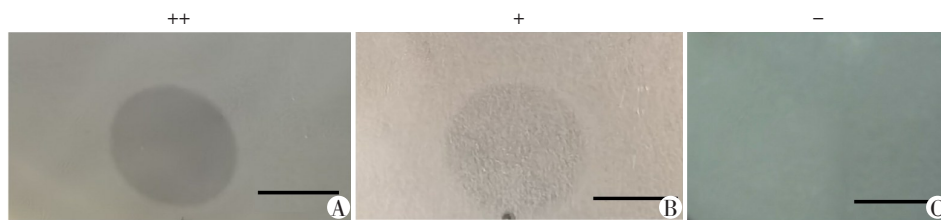
2.2 噬菌体PAPX针对各类临床菌株显示出广泛的裂解效应

为探索噬菌体PAPX的潜在临床应用前景,对24株不同的铜绿假单胞菌临床菌株进行了点滴实验,以评估其裂菌能力^[20]。结果表明PAPX对临床菌株具有广谱裂解活性,能裂解24株菌株中的17株,在宿主范围上很可能超过了之前报道的一些噬菌体,表明它具有广泛的临床应用潜力(表1、图2)。

表1 噬菌体PAPX对临床菌株裂解效应

Table 1 Lytic activity of PAPX on clinical strains

Clinical strains	Lytic activity			Lytic effect [n(%)]
	++	+	-	
Sensitive strains	8	1	1	9.00(90.00)
Multidrug-resistant <i>P. aeruginosa</i> (MDRPA)	2	1	0	3.00(100.00)
Carbapenem resistant <i>P. aeruginosa</i> (CRPA)	2	3	6	5.00(45.45)



Lytic effect representative images. A: “++” indicates a stronger lytic effect. B: “+” indicates a moderate lytic effect; C: “-” signifies no lytic activity (scale bar=1 cm).

图2 噬菌体PAPX裂解能力示意图

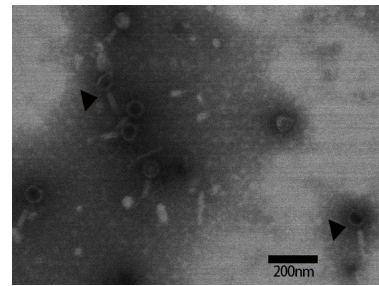
Figure 2 Cleavage capacity of phage PAPX

2.3 噬菌体 PAPX 的形态学分析

为进一步解析噬菌体 PAPX, 对 PAPX 进行了透射电镜呈现及形态学分析。TEM 成像显示, 噬菌体 PAPX 具有直径约 90 nm 的球形头部和长约 50 nm、直径 26 nm 的收缩性尾部(图 3), 这些结构特征提示其属于肌病毒科。

2.4 噬菌体 PAPX 展现了良好的 pH 稳定性及热稳定性

噬菌体的 pH 耐受性和热稳定性是影响其临床应用的重要因素, 因此, 对噬菌体 PAPX 进行了稳定性测试。结果表明, 噬菌体 PAPX 具有高度的 pH 稳定性, 在 pH 值为 4~11 的范围内都能保持生物活性。虽然在 pH 值为 12 和 3 时滴度明显下降, 但噬菌体的滴度仍然很高 ($>1 \times 10^5$ PFU/mL), 只有在 pH 值为 1 时才检测不到任何有活力的噬菌体(图

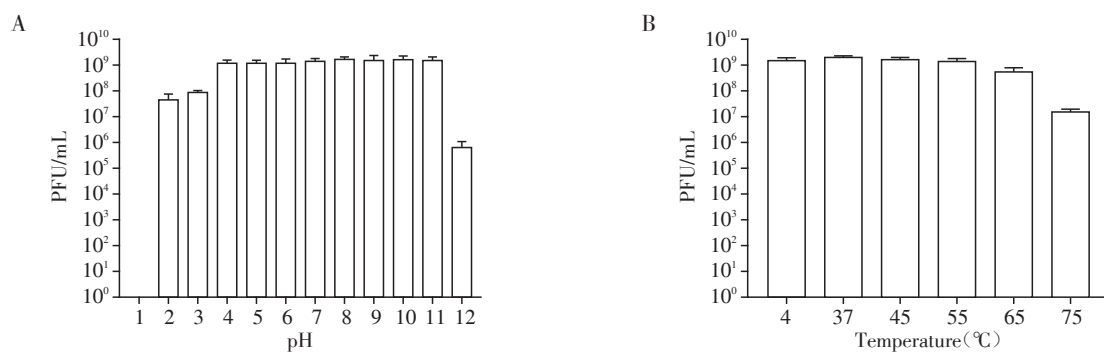


PAPX phage was fixed, stained and viewed under a transmission electron microscope to assess morphology (scale bar=200 nm). The black arrows indicate representative individual phages.

图3 噬菌体 PAPX 电镜照片

Figure 3 TEM image of phage PAPX

4A)。对于热稳定性实验, 只有当温度超过 75 °C 时, 噬菌体 PAPX 滴度才显示出急剧下降(图 4B), 说明其可耐受各种生存环境, 维持其稳定的裂解能力。



A: Phage PAPX was kept in PBS solutions of different pH for one hour. Then the phage concentrations were measured by gradient dilutions and double-layer agar plates ($n=3$). B: Phage PAPX was incubated in several temperatures for one hour, the mixtures were serially diluted separately and spread onto BHI agar plates to enumerate the phage quantity in each different temperature groups ($n=3$).

图4 噬菌体 PAPX 具有良好的 pH 稳定性及热稳定性

Figure 4 PAPX possesses good thermal and pH stability

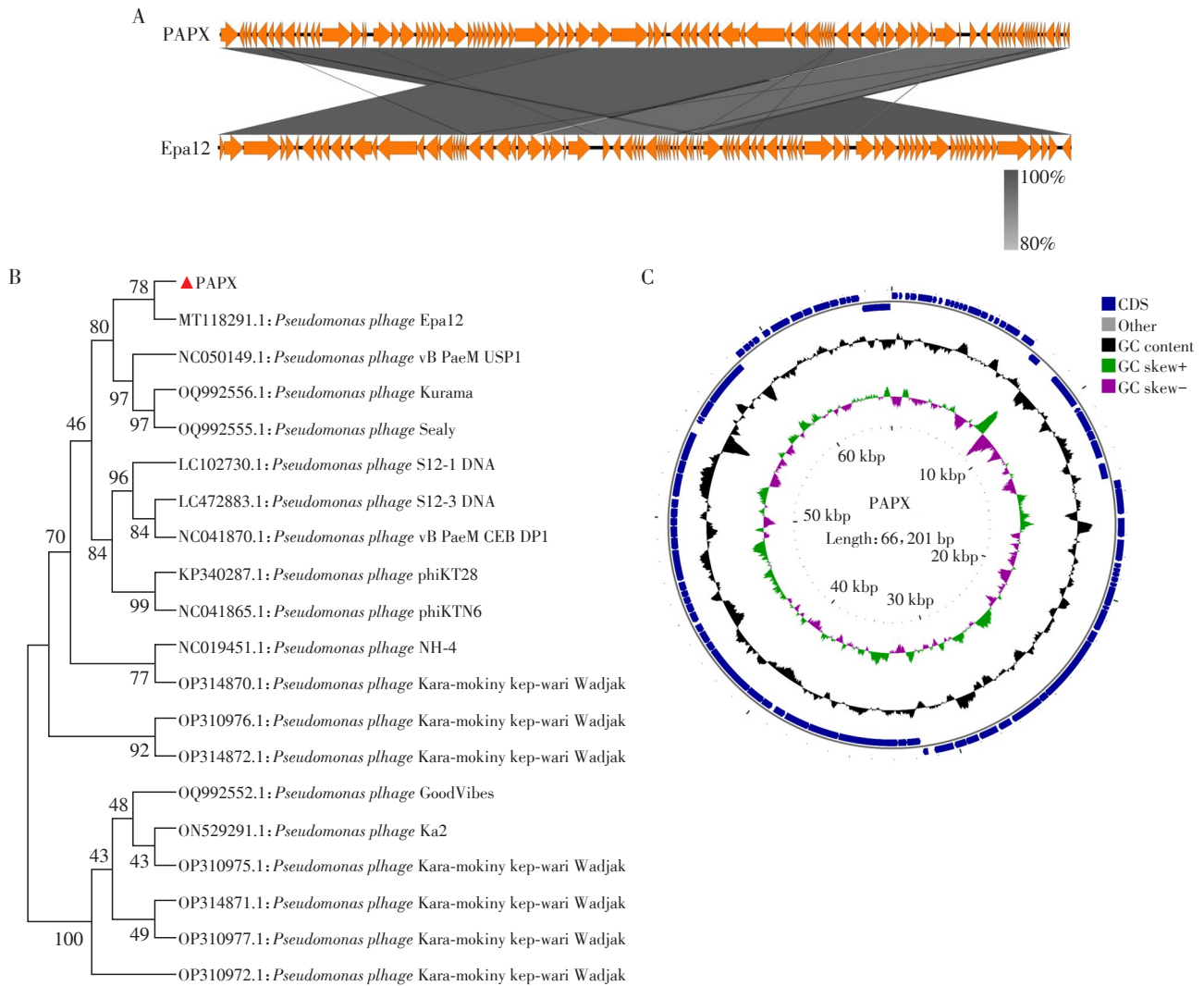
2.5 噬菌体 PAPX 的基因组测序及遗传进化分析

为更全面了解噬菌体 PAPX, 对其进行了基因组提取, 证实它是一种双链 DNA 噬菌体, 其基因组约为 66 kb, 总体 G+C 含量为 55.68%。对其开放阅读框(open reading frames, ORF)的进一步分析表明, 它有 92 个 ORF, 其中 57 个是预测蛋白, 35 个编码已知的功能蛋白(图 5A)。关键结构蛋白包括 ORF64 和 ORF73, 其中 ORF92 编码大终止酶亚基。重要的功能基因包括 ORF57(溶菌酶, 可促进宿主裂解)以及与 DNA 复制和修复机制有关的 ORF(ORF38-47)。重要的是, 没有发现毒力基因或抗生素抗性基因, 这表明 PAPX 可较为安全地用于治疗。通过 Easyfig 软件进行的基因组比较分析(图 5B)清楚地显示了被鉴定的噬菌体 PAPX 基因组与假单胞菌噬

菌体 Epa12(登录号: MT118291.1)基因之间的共线性关系, 其与假单胞菌噬菌体 Epa12 亲缘关系较近, 同源率为 98%, 属于假单胞菌病毒家族 *Pbunavirus* 属分支。再根据其末端酶大亚基的保守性, 通过 BLAST 搜索发现了约 20 个具有较高亲缘关系的噬菌体, 随后构建了图 5B 所示的基因进化树。使用 PhageTerm 软件对 PAPX 噬菌体基因组序列的分析表明, 该噬菌体具有环状基因组(图 5C)。

2.6 噬菌体 PAPX 具有强大的复制扩增能力

为明确噬菌体 PAPX 的复制周期, 并确定其感染宿主菌过程中的潜伏期、暴发量大小等关键参数, 初步确定了 PAPX 的 MOI 为 0.01(图 6A)。噬菌体一步生长曲线显示噬菌体滴度为 1×10^{10} PFU/mL 达到峰值, 标志着噬菌体数量的显著增加(图 6B)。



A: Genome alignment analysis of phage PAPX and phage Epa12. B: Evolutionary tree analysis of phage PAPX. C: Phage PAPX genome circle map.

图5 噬菌体 PAPX 基因组测序和遗传进化分析
Figure 5 Genome sequencing and analysis of PAPX phage

噬菌体 PAPX 感染细菌时,前 80 min 为潜伏期,随后 120~165 min 对数爆发期,而后是维持稳定期,估算每个受感染细胞裂解约释放 45 个病毒。

2.7 噬菌体 PAPX 能有效抑制铜绿假单胞菌扩增并且清除细菌生物膜

为评估噬菌体 PAPX 复制对铜绿假单胞菌生长的影响,进行了体外抑菌实验,研究表明,与铜绿假单胞菌标准株混合培养 4 h 就能检测到抑制作用,随着共培养时间的增加,抑制作用也在增强。而随着时间的推移,观察到实验组的 $D(600\text{ nm})$ 不再降低,表明细菌已完全裂解从而使细菌裂解碎片的吸光度达到了一个稳定的水平(图 7A、B)。铜绿假单胞菌生物膜的形成是其感染定植且难以清除的重要原因,进一步地进行了生物膜裂解实验,噬菌体 PAPX 作用 6 h 后进行生物膜染色并测量 $D(600\text{ nm})$,两组间呈现

显著差异(图 7C、D)。综上所述,该噬菌体 PAPX 可能是有潜力的临床噬菌体制剂。

3 讨论

临床难治菌株 ESKAPE 病原体包括粪肠球菌 (*Enterococcus faecium*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、鲍曼不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 和肠杆菌属 (*Enterobacter species*)。由于抗生素的广泛和不当使用,具有多重耐药性的菌株分离率极大提高,对临床感染造成了重大威胁,也带来了沉重的公共卫生负担^[21]。作为需氧细菌,铜绿假单胞菌展现出卓越的生存优势,不仅能够耐受极端环境,还能在营养匮乏的条件下维持生存,与各种严重的院内感染有关,危及

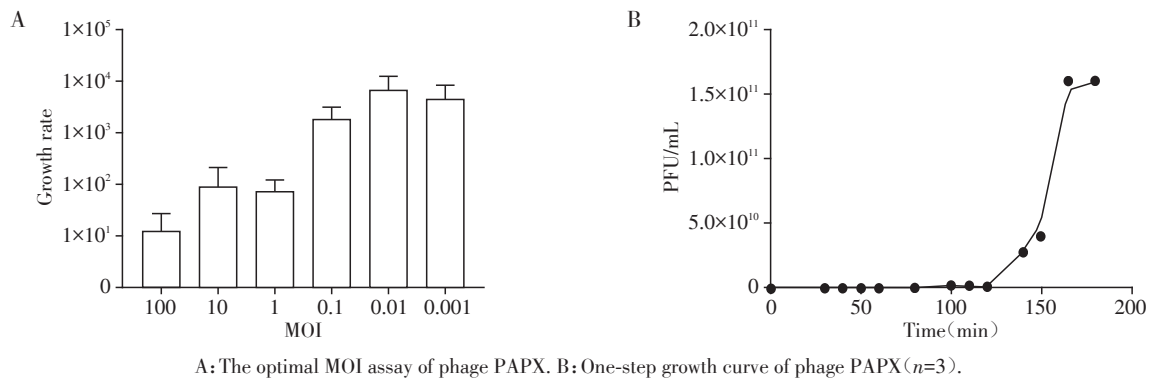


图6 噬菌体PAPX的生物学特性分析

Figure 6 Biological characterizations of phage PAPX

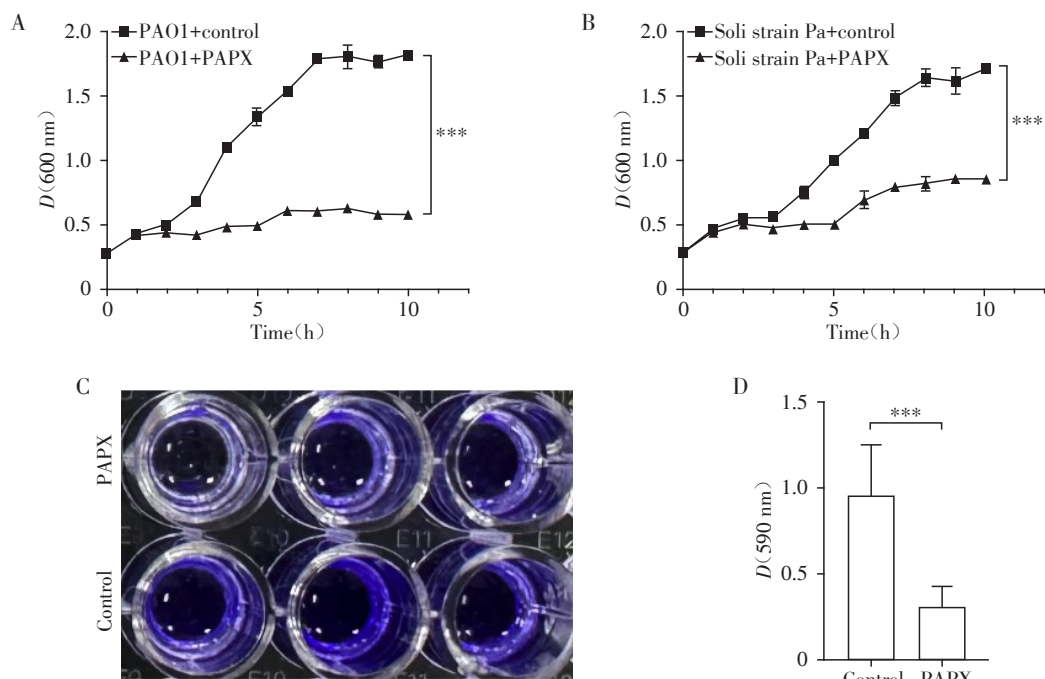


图7 噬菌体PAPX抑制铜绿假单胞菌生长且清除其生物膜

Figure 7 Inhibition of *P. aeruginosa* growth and removal of its biofilm by phage PAPX

患者生命,乃至动物中耐抗生素细菌感染的事例也屡见不鲜^[22]。综上所述,亟须开发新的抗菌和抑菌策略以应对这一严峻挑战。近年来,新型抗生素的研发周期长且成功率低,投入与回报失衡,噬菌体治疗逐渐成为一种十分可行的替代疗法^[23]。

本研究成功分离并鉴定了一株新型裂解性噬菌体PAPX,通过基因组分析表明,PAPX基因组结构紧凑、组织有序,不含毒力基因或抗性基因,突出了其治疗的安全性。PAPX的自我增殖能力强大,当MOI为0.01时,噬菌体PAPX的滴度达到 1×10^{10} PFU/mL,说明PAPX可以迅速增殖以达到杀菌作用,理论上单

次给药即可持续作用直至宿主菌清除^[24]。这一特性显著区别于抗生素的浓度依赖性杀菌机制,尤其在深部感染或生物膜环境中,噬菌体可穿透生物膜并显示出较高生物膜清除能力^[25]。此外,通过一步生长曲线结果显示,噬菌体PAPX的潜伏期约为80 min,于180 min时达到峰值并进入稳定期,其效价维持稳定。相比已报道N4样噬菌体DSS3Φ2和EE36Φ,潜伏期分别为3 h和2 h,PAPX的潜伏期较短,能更快发挥裂菌能力^[26]。在噬菌体PAPX针对各类临床菌株的裂解实验中,该噬菌体表现出较高的裂解活性,但尚需在更多的临床耐药菌株中进

行验证^[27-28]。

现有的研究表明噬菌体PAPX有良好的应用前景,但治疗方案仍需进一步研究和细化,包括给药方法、给药剂量以及噬菌体组合(噬菌体鸡尾酒)的方案^[29]。未来的研究将侧重于扩充噬菌体库、探索与抗生素的协同作用以及阐明噬菌体-宿主相互作用的分子机制,以提高疗效^[30-32]。在后续的研究中,将针对与PAPX一样潜伏期短、裂解性强以及环境稳定性良好的噬菌体进行分离和组合,在小鼠感染模型上验证其有效性。当下有关铜绿假单胞菌噬菌体的基因工程改造处于起步阶段,下一步可以持续在噬菌体生物制剂的道路上深耕,通过基因组解析、ORF预测及同源臂重组等工具,利用分子生物学方法,进一步构建噬菌体基因组改造的实验体系,多策略构建基因编辑噬菌体,多方案制备噬菌体衍生剂,拓宽噬菌体临床应用场景,从而为临床耐药菌的治疗带来新策略。

利益冲突声明:

所有作者声明没有利益冲突。

Conflict of Interests:

The authors declare no conflict of interests.

作者贡献声明:

谢萧屹负责主体实验操作和实验数据分析;汪心婕和白莉负责部分生信分析和论文撰写;戎誉负责部分实验操作和实验数据分析;陈淑华、刘根焰、汤华民负责研究设计、课题指导、论文修改。

Author's Contributions:

XIE Xiaoyi was responsible for main experiments and data analysis; WANG Xinjie and BAI Li were responsible for bioinformatics analysis and paper writing; RONG Yu was responsible for part of the experiments and data analysis; CHEN Shuhua, LIU Genyan, and TANG Huamin were responsible for research design, experimental guidance, and paper revision.

[参考文献]

- [1] CHEVALIER S, BOUFFARTIGUES E, BODILIS J, et al. Structure, function and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* porins[J]. FEMS Microbiol Rev, 2017, 41(5): 698-722
- [2] QIN S G, XIAO W, ZHOU C M, et al. *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics[J]. Signal Transduct Target Ther, 2022, 7(1): 199
- [3] POTTIER M, GRAVEY F, CASTAGNET S, et al. A 10-year microbiological study of *Pseudomonas aeruginosa* strains revealed the circulation of populations resistant to both carbapenems and quaternary ammonium compounds[J]. Sci Rep, 2023, 13(1): 2639
- [4] BONGIOVANNI M, BARDA B. *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections in SARS-CoV-2 infected patients: a systematic review[J]. J Clin Med, 2023, 12(6): 2252
- [5] REYNOLDS D, KOLLEF M. The epidemiology and pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections: An update[J]. Drugs, 2021, 81(18): 2117-2131
- [6] PANG Z, RAUDONIS R, GLICK B R, et al. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies [J]. Biotechnol Adv, 2019, 37(1): 177-192
- [7] REEM A, ALMANSOOB S, SENAN A M, et al. *Pseudomonas aeruginosa* and related antibiotic resistance genes as indicators for wastewater treatment[J]. Heliyon, 2024, 10(9): e29798
- [8] TACCONELLI E, SIFAKIS F, HARBARTH S, et al. Surveillance for control of antimicrobial resistance [J]. Lancet Infect Dis, 2018, 18(3): e99-e106
- [9] ZHANG M J, HAO Y L, YI Y, et al. Unexplored diversity and ecological functions of transposable phages[J]. ISME J, 2023, 17(7): 1015-1028
- [10] ALIPOUR-KHEZRI E, SKURNIK M, ZARRINI G. *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages and their clinical applications[J]. Viruses, 2024, 16(7): 1051
- [11] HIBSTU Z, BELEW H, AKELEW Y, et al. Phage therapy: a different approach to fight bacterial infections [J]. Biologics, 2022, 16: 173-186
- [12] LI L L, ZHONG Q, ZHAO Y Z, et al. First-in-human application of double-stranded RNA bacteriophage in the treatment of pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infection[J]. Microb Biotechnol, 2023, 16(4): 862-867
- [13] WÜRSTLE S, LEE A, KORTRIGHT K E, et al. Optimized preparation pipeline for emergency phage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* at Yale University[J]. Sci Rep, 2024, 14(1): 2657
- [14] ZOU X, XIAO X H, MO Z R, et al. Systematic strategies for developing phage resistant *Escherichia coli* strains[J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 4491
- [15] PANG Z, GU M D, TANG T. *Pseudomonas aeruginosa* in cancer therapy: current knowledge, challenges and future perspectives[J]. Front Oncol, 2022, 12: 891187
- [16] MEIDANINIKJEH S, MOHAMMADI P, ELIKAEI A. A simplified method of bacteriophage preparation for transmission electron microscope [J]. J Virol Methods, 2024, 328: 114951
- [17] BANKEVICH A, NURK S, ANTIPOV D, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing[J]. J Comput Biol, 2012, 19(5):

- 455-477
- [18] COIL D, JOSPIN G, DARLING A E. A5-miseq: an updated pipeline to assemble microbial genomes from Illumina MiSeq data[J]. *Bioinformatics*, 2015, 31(4): 587-589
- [19] BUCHFINK B, XIE C, HUSON D H. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND [J]. *Nat Methods*, 2015, 12(1): 59-60
- [20] CHEN F, CHENG X J, LI J B, et al. Novel lytic phages protect cells and mice against *Pseudomonas aeruginosa* infection[J]. *J Virol*, 2021, 95(8): e01832-20
- [21] MILLER W R, ARIAS C A. ESKAPE pathogens: antimicrobial resistance, epidemiology, clinical impact and therapeutics[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2024, 22(10): 598-616
- [22] GIBSON J S, MORTON J M, COBBOLD R N, et al. Risk factors for multidrug-resistant *Escherichia coli* rectal colonization of dogs on admission to a veterinary hospital[J]. *Epidemiol Infect*, 2011, 139(2): 197-205
- [23] HALAWA E M, FADEL M, AL-RABIA M W, et al. Antibiotic action and resistance: updated review of mechanisms, spread, influencing factors, and alternative approaches for combating resistance [J]. *Front Pharmacol*, 2024, 14: 1305294
- [24] LU H, LI Z, ELBAZ A, et al. Synergistic action of phages and lytic proteins with antibiotics: a combination strategy to target bacteria and biofilms[J]. *BMC Microbiol*, 2023, 23(1): 149
- [25] HOU X L, ZHAI L, FU L Y, et al. Advances in engineered phages for disease treatment[J]. *Small Meth*, 2025, 9(5): 2401611
- [26] ZHAO Y L, WANG K, JIAO N Z, et al. Genome sequences of two novel phages infecting marine roseobacters [J]. *Environ Microbiol*, 2009, 11(8): 2055-2064
- [27] 吴柳, 罗娟, 杨竹兰, 等. 铜绿假单胞菌噬菌体PA-27-1的分离及其生物学特性[J]. 第三军医大学学报, 2019, 41(4): 315-322
- WU L, LUO J, YANG Z L, et al. Isolation and biological characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* phage PA-27-1 [J]. *Journal of Third Military Medical University*, 2019, 41(4): 315-322
- [28] AGGARWAL R, MAHAJAN P, PANDIYA S, et al. Antibiotic resistance: a global crisis, problems and solutions [J]. *Crit Rev Microbiol*, 2024, 50(5): 896-921
- [29] ANON. The promise of phages [J]. *Nat Biotechnol*, 2023, 41(5): 583
- [30] ZHAO X, SHEN M Y, JIANG X Y, et al. Transcriptomic and metabolomics profiling of phage-host interactions between phage PaP1 and *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Front Microbiol*, 2017, 8: 548
- [31] KIM E S, BAE H W, CHO Y H. A pilin region affecting host range of the *Pseudomonas aeruginosa* RNA phage, PP7 [J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 247
- [32] HO M K Y, ZHANG P F, CHEN X, et al. Bacteriophage endolysins against gram-positive bacteria, an overview on the clinical development and recent advances on the delivery and formulation strategies [J]. *Crit Rev Microbiol*, 2022, 48(3): 303-326

[收稿日期] 2025-04-08

(本文编辑: 戴王娟)

本刊现已启用网上稿件管理系统, 作者登陆
<http://jnmn.njmu.edu.cn/>即可在线投稿并查询
稿件审理情况。