

一株裂解性奶牛乳房炎源屎肠球菌噬菌体的分离及其生物学特性分析

张倩^{1#}, 于会举^{1#}, 孙耀强¹, 张湘莉兰², 张培生¹, 刘 鸽¹, 屈勇刚^{1*}, 童贻刚^{2*}, 李 岩³

(1. 石河子大学动物科技学院, 石河子 832003; 2. 军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京 100071; 3. 新疆生产建设兵团畜牧兽医工作总站, 乌鲁木齐 830063)

摘要: 从新疆石河子地区奶牛粪样中分离裂解性屎肠球菌噬菌体, 对其进行纯化及生物学特性分析, 为治疗和控制细菌性感染提供基础。利用双层平板培养法从奶牛粪样中分离、纯化噬菌体, 并观察噬菌斑特征, 将纯化后的噬菌体浓缩液用磷钨酸负染, 通过透射电子显微镜观察其形态特征。对该噬菌体进行全基因组测序和遗传进化分析, 用双层平板培养法测定其宿主谱、最佳感染复数、一步生长曲线、热稳定性及 pH 稳定性。结果如下: 分离并纯化出一株裂解性屎肠球菌噬菌体, 命名为 vB_EfaM_XJ3, 其噬菌斑圆形透明、无晕环且边缘整齐, 直径 1.2~1.5 mm; 电镜观察其头部呈廿面体, 头长约 53.15 nm, 尾长约 14.42 nm×199.62 nm; 核酸类型为 dsDNA, 基因组全长为 157.189 kb, GC 含量为 50.27%; 其基因序列与沙门菌噬菌体 SKML-39 的相似性高达 98%。生物学特性研究显示 vB_EfaM_XJ3 目前只裂解其宿主菌; 最佳感染复数为 0.001, 潜伏期为 15 min, 爆发期为 175 min, 裂解量约为 84; 能耐受 50 °C 左右高温, 在 pH 5.0~11.0 范围内效价稳定。分离鉴定出一株裂解性肌尾科屎肠球菌噬菌体, 对它进行了生物学特性和亲缘性分析, 为沙门菌和屎肠球菌抑菌剂的研究与应用奠定了基础。

关键词: 奶牛乳房炎; 屎肠球菌; 裂解性噬菌体; 生物学特性; 进化树分析

中图分类号: S852.61

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2017)04-0706-08

Isolation and Characterization of a Lytic Phage Infecting *Enterococcus faecium* of Bovine Mastitis

ZHANG Qian^{1#}, YU Hui-ju^{1#}, SUN Yao-qiang¹, ZHANGXIANG Li-lan², ZHANG Pei-sheng¹, LIU Ge¹, QU Yong-gang^{1*}, TONG Yi-gang^{2*}, LI Yan³

(1. College of Animal Science and Technology, Shihezi University, Shihezi 832003, China; 2. Beijing Institute of Microbiology and Epidemiology, The Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China; 3. The General Station of Animal Husbandry and Veterinary Medicine of Xinjiang Production and Construction Corps, Urumqi 830063, China)

Abstract: The aim of the present study was to isolate and characterize the phage that could lyse *Enterococcus faecium* from fecal samples of dairy cattle in Shihezi, Xinjiang, and provide the basic data for the phage therapy as well as prevention. The phage was isolated and purified from dairy cattle fecal samples by double-layer agar plate method. And its plaque characteristics was observed. The purified phage was concentrated, negatively stained with phosphotungstic acid and observed by transmission electron microscopy. The genome of the isolated phage was sequenced. Its genetic and evolutionary history were analyzed. The host range, optimal multiplicity of infec-

收稿日期: 2016-11-23

基金项目: 国家自然科学基金(31560699); 新疆生产建设兵团应用基础研究计划项目(2015AG012)

作者简介: 张倩(1990-), 女, 河北保定人, 硕士生, 主要从事动物传染病诊断与防治研究, E-mail: 1585705024@qq.com; 于会举(1990-), 男, 河南平顶山人, 硕士生, 主要从事动物传染病诊断与防治研究, E-mail: 609859455@qq.com; 张倩和于会举并列第一作者

* 通信作者: 屈勇刚, 副教授, 研究生导师, E-mail: quyonggang@shzu.edu.cn; 童贻刚, 教授, 博士生导师, E-mail: tong.yigang@gmail.com

tion (MOI), one-step growth curve, temperature, and pH stability of the phage were investigated by double-layer agar plate methods. A lytic phage of *Enterococcus faecium* was isolated and purified, and named vB_EfaM_XJ3. The phage plaques were circular, clear and transparent with smooth edge, and its diameter was 1.2-1.5 mm. The electron microscope observation showed that the phage particles, whose head was twenty-sided, head length was about 53.15 nm, tail length was about 14.42 nm × 199.62 nm. The genome of the phage was comprised of double strand DNA, the size was 157.189 kb with GC content of 50.27%. The homology of amino acid sequence of phage vB_EfaM_XJ3 with *Salmonella* phage SKML-39 was 98%. The study of biological characteristics showed that the vB_EfaM_XJ3 only crack its host bacteria at present. The optimal MOI was 0.001, the incubation period was 15 min, the burst period was 175 min and the burst size was 84. The phage could withstand the temperature up to 50 °C and keep stable titer under pH 5.0-11.0. A lytic phage of *Enterococcus faecium* was isolated and identified. Its biological characteristics and genetic were analyzed. The results laid the foundation for the further research and application of the antibacterial agent for *Salmonella* and *Enterococcus faecium*.

Key words: bovine mastitis; *Enterococcus faecium*; lytic phage; biological characteristics; phylogenetic analysis

奶牛乳房炎在畜牧、兽医、食品卫生等领域一直受到人们的广泛关注,是影响奶牛业发展及其经济效益的常见病和多发病,其病原种类繁多,目前公认的最常见的主要致病菌有金黄色葡萄球菌、链球菌和大肠杆菌。目前国外对肠球菌性乳房炎时有报道,而国内很少有肠球菌引起奶牛乳房炎的研究报道,主要是以肠球菌在内的多种病原菌的混合感染为主,尽管其危害不及由主要病原菌引起的奶牛乳房炎,但其能引起牛奶质量的下降和奶牛乳腺的损伤。肠球菌性乳房炎不仅给养殖业造成了严重的经济损失,同时也给公共卫生安全和人类健康等带来了诸多问题^[1-3]。自2002年我国新疆北部地区的羔羊在春季发生的急性死亡传染病中分离到β溶血的粪肠球菌和屎肠球菌以来^[4],肠球菌性乳腺炎也引起了足够的重视。在临床上由于长期、大量使用广谱抗菌药物,致使其临床耐药菌株不断出现,并导致其耐药机制和耐药特点不断发生变化。因此,迫切需要研发新型药物,以控制耐药性病原菌引起的感染。而噬菌体作为一种特异性感染细菌的病毒,其对宿主菌具有高度的特异性和高效性,且对动植物基本没有副作用,减少了随之带来的耐药性问题。因此,越来越多的研究者开始重新探索应用噬菌体防治细菌病的道路。近年来噬菌体治疗的临床应用逐渐增多,并取得了较好的效果,S. K. Wall等^[5]用噬菌体鸡尾酒法明显降低出栏猪的盲肠和回肠沙门菌浓度;张哲^[6]分离的四株粪肠球菌噬菌体为噬

菌体疗法应用于耐药性肠球菌的感染提供了依据;B. Biswas等^[7]和宫鹏娟等^[8]均利用耐万古霉素屎肠球菌噬菌体成功治疗了小鼠菌血症等。基于奶牛乳房炎防治研究的现状,笔者以奶牛乳房炎源肠球菌为宿主菌,分离筛选裂解性噬菌体,研究其生物学特性,为噬菌体作为一种生物制剂用于治疗奶牛乳房细菌性感染提供资源。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株和样品采集 4株屎肠球菌(编号1~4),6株粪肠球菌(编号5~10),4株金黄色葡萄球菌,4株大肠杆菌,2株沙门菌均为石河子大学动物传染病实验室分离鉴定所得的奶牛乳房炎源菌株,粪样采自石河子周边5个奶牛场。

1.1.2 主要试剂及培养基 PEG8000(天津市光复精细化工研究所);DNase I、RNaseA、Mung Bean Nuclease、病毒核酸提取试剂盒(TaKaRa);核酸Marker D15000(TIANGEN);SM缓冲液、PBS缓冲液、液体LB培养基、半固体LB培养基、固体LB培养基,均由石河子大学动物科技学院传染病实验室常规配制;19种抗菌药物纸片购自杭州微生物试剂有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 宿主菌的准备 将10株肠球菌分别接种于液体LB培养基中,于37 °C、180 r·min⁻¹摇床中

过夜培养,置 4℃保存。

1.2.2 噬菌体的富集与分离 参考文献方法^[9]

将采自石河子周边 5 个奶牛场的粪样过滤液静置于 4℃冰箱过夜。将所得滤液、10 株肠球菌的菌悬液以及液体 LB 培养基混匀于锥形瓶中,37℃摇床培养 24 h,将培养液于 4℃、10 000 r·min⁻¹离心 10 min,取上清液与肠球菌菌液混匀后采用双层平板法培养,观察结果。

1.2.3 噬菌体的纯化与保存 如出现噬菌斑则

用灭菌牙签挑取单个噬菌斑接种于其相应的宿主菌中,于 LB 液体培养基 37℃振荡培养 8 h,将培养液离心后取上清,将稀释的上清液与宿主菌混匀后采用双层平板法培养,如此重复三次以上,直至形成形状和大小均一的噬菌斑,即可得到较纯的噬菌体。将噬菌体与 50%甘油等体积混匀后放于-80℃冻存、备用。

1.2.4 噬菌体的浓缩及电镜观察 噬菌体浓缩液

的制备参照《分子克隆实验指南》第三版中 λ 噬菌体颗粒提取方法^[10]进行。取噬菌体浓缩液经 2%的磷钨酸负染后用透射电子显微镜观察噬菌体形态^[11]。

1.2.5 噬菌体核酸类型的鉴定 参考文献方法

^[12]利用病毒基因组提取试剂盒对纯化的噬菌体浓缩液进行基因组提取,操作严格按照说明书进行。分别用 DNase I (20 U·μg⁻¹),RNase A (5 U·μg⁻¹)和 Mung Bean Nuclease (20 U·μg⁻¹)对提取的噬菌体基因组在 37℃水浴锅中消化 2 h,取消化产物进行琼脂糖凝胶核酸电泳检测。

1.2.6 噬菌体全基因组测序 将噬菌体的基因组

处理为约 290 bp 的测序文库,利用 Life technologies 公司的 Ion Torrent 测序仪 PGM 完成,利用 Newbler 2.9 软件对基因组进行拼接处理。该部分的测序内容由北京军事医学科学院微生物学流行病学研究所完成。

1.2.7 噬菌体的生物学特性 将分离纯化的裂解性尿肠球菌噬菌体进行裂解谱、最佳感染复数 (MOI)、一步生长曲线、热稳定性、pH 稳定性的研究。

1.2.7.1 噬菌体裂解谱的测定:取纯化后的噬菌体原液 100 μL,分别加入到 10 株肠球菌、4 株金黄色葡萄球菌、4 株大肠杆菌、2 株沙门菌菌悬液(50 μL)中,采用双层平板法培养,观察结果。

1.2.7.2 噬菌体的最佳感染复数 (multiplicity of infection, MOI):按照感染复数分别为 0.001、0.01、0.1、1、10、100 的比例将噬菌体液和宿主菌液

混合、静置、离心,沉淀分别用液体 LB 重悬,使不同比例的培养体系总体积一致。振荡培养 5 h。利用双层平板法对噬菌体增殖液进行滴度测定,每组做三个重复,获得最高滴度的噬菌体/细菌比例即为 MOI。

1.2.7.3 一步生长曲线测定:将培养至对数生长期的宿主菌与噬菌体按照最佳 MOI 的比例混匀、静置、离心,将所得沉淀重悬于 3 mL 的液体 LB 中,置于 37℃、180 r·min⁻¹摇床中振荡培养,同时开始计时取样,在 0 时刻和此后每隔 5、10、20 min(各取 6 次)取样,测定噬菌体的滴度,从而绘制出噬菌体感染宿主菌的一步生长曲线。

1.2.7.4 热稳定性测定:将已知滴度的噬菌体液等体积分装若干,分别在 40、50、60、70℃水浴锅中培养 3 h,于 0、20、40、60、80、100、120、140、160、180 min 分别取样,倒板。通过观察噬菌斑的形成情况,可得出在不同温度下、不同时间噬菌体的滴度,并绘制曲线,即可得噬菌体对热的稳定性。

1.2.7.5 pH 稳定性测试:将等体积的噬菌体分别加到不同 pH(pH=2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0)的 PBS 缓冲液中,在 37℃水浴中孵育 2 h,采用双层平板法测定其滴度,绘制曲线,观察不同 pH 处理后噬菌体生长情况,即噬菌体 pH 稳定性。

2 结果

2.1 噬菌体的分离、纯化

从奶牛粪样中分离到一株裂解性尿肠球菌噬菌体,对其进行三次以上纯化,得到噬菌斑透亮、大小均一、形态一致、无晕环且边缘整齐的纯化噬菌体(图 1)。将该分离株命名为 vB_EfaM_XJ3。

2.2 噬菌体的电镜观察

纯化的噬菌体浓缩液经负染后,在透射电子显微镜下观察其形态,如图 2,噬菌体 vB_EfaM_XJ3 其头部呈廿面体,头部长约 53.15 nm,尾长约 14.42 nm×199.62 nm。根据 2011 年国际病毒分类委员会第 9 次报告提出的噬菌体分类与命名标准,该噬菌体符合有尾噬菌体目(Caudovirales),肌尾噬菌体(Myoviridae)的特征^[13]。

2.3 噬菌体 vB_EfaM_XJ3 的核酸类型鉴定

噬菌体 vB_EfaM_XJ3 的核酸经 DNase I、RNase A 和 Mung Bean Nuclease 消化处理后,其消化产物进行琼脂糖凝胶核酸电泳结果表明(图 3),vB_EfaM_XJ3 核酸能被 DNase I 消化,但不能

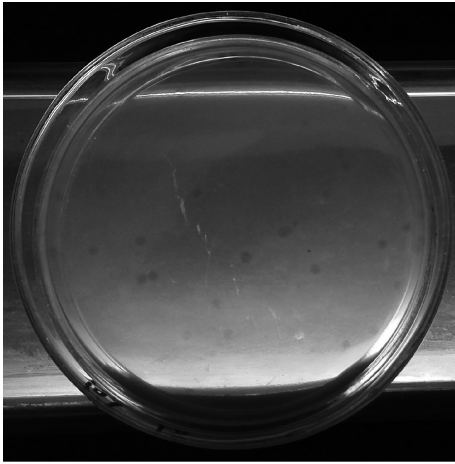


图 1 双层平板法纯化噬菌体

Fig. 1 Purified phage by double-layer plate method

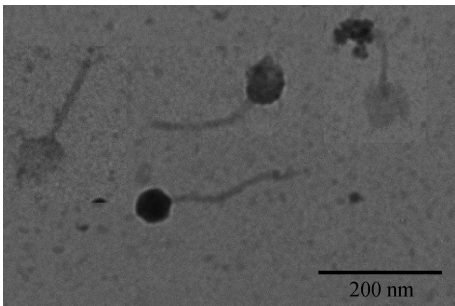
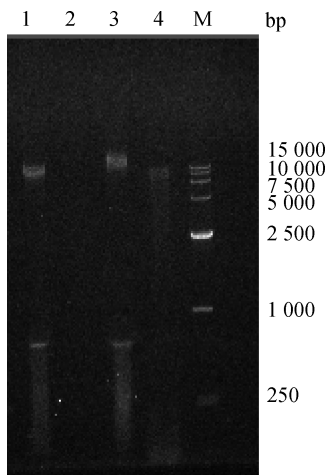


图 2 噬菌体 vB_EfaM_XJ3 的电镜照片

Fig. 2 Electron micrograph of phage vB_EfaM_XJ3



M. D15000 相对分子质量标准; 1. vB_EfaM_XJ3 核酸; 2. DNase I; 3. RNase A; 4. Mung Bean Nuclease M. D15000 DNA molecular weight marker; 1. Nucleic acid of vB_EfaM_XJ3; 2. DNase I enzyme; 3. RNase A enzyme; 4. Mung Bean Nuclease enzyme

图 3 噬菌体 vB_EfaM_XJ3 核酸类型

Fig. 3 Nucleic acid type of phage vB_EfaM_XJ3

被 RNase A 消化,说明此核酸为 DNA;同时不能被 Mung Bean Nuclease 消化,说明为双链;因此证明 vB_EfaM_XJ3 基因组为双链 DNA。

2.4 噬菌体 vB_EfaM_XJ3 全基因组测序及亲缘性分析

噬菌体 vB_EfaM_XJ3 的测序结果显示,其完整基因组由 157 189 个核苷酸组成,G+C 含量为 50.27%。与 NCBI 上已公布的亲缘噬菌体的全基因组进行比对,得知 vB_EfaM_XJ3 与沙门菌噬菌体 SKML-39 相似性高达 98%。且在进化树中与沙门菌噬菌体 SKML-39 在同一支上,而与尿肠球菌噬菌体亲缘性较远(图 4),说明 vB_EfaM_XJ3 在核苷酸序列方面确实与沙门菌噬菌体相似性较高,且是肌尾科噬菌体。

2.5 噬菌体 vB_EfaM_XJ3 的生物学特性

2.5.1 噬菌体裂解谱的测定

通过裂解谱的测定得知此噬菌体目前只能裂解其宿主菌(3 号尿肠球菌),而对其余 9 株肠球菌、4 株金黄色葡萄球菌、4 株大肠杆菌和 2 株沙门菌均无裂解能力,见表 1。

2.5.2 噬菌体 vB_EfaM_XJ3 的最佳感染复数(MOI)测定

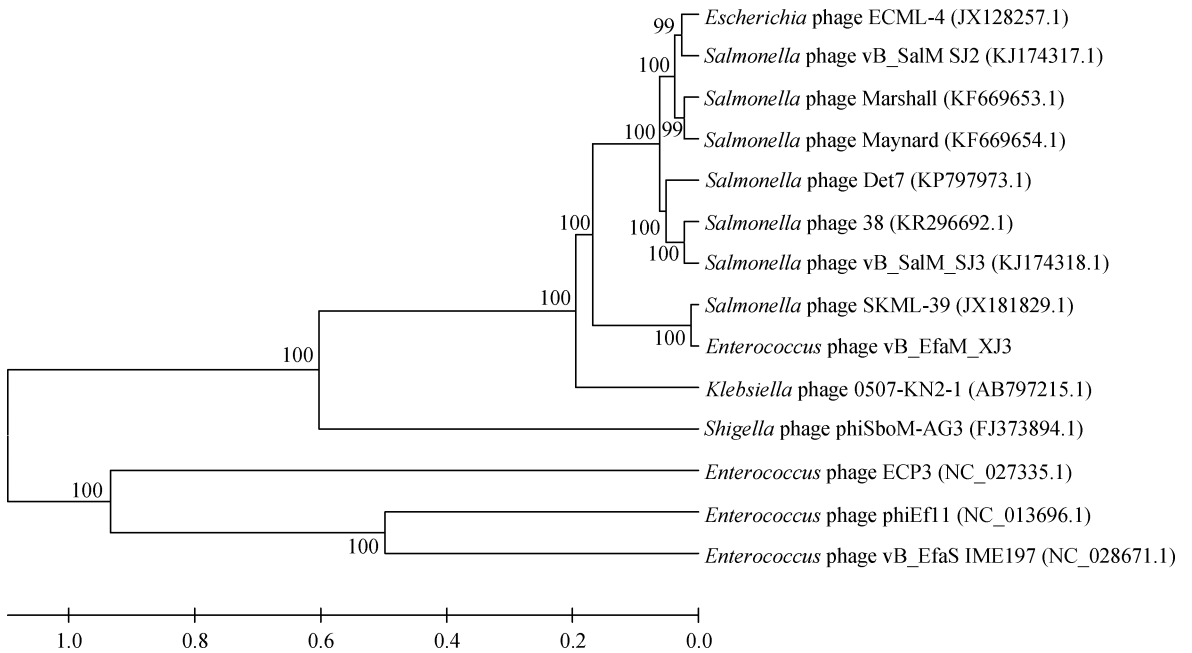
试验结果(图 5)表明 vB_EfaM_XJ3 的最佳 MOI 为 0.001,此时产生的子代噬菌体数量最多。在后续的生物特性中均以最佳 MOI 扩增以实现回收率最大。

2.5.3 噬菌体 vB_EfaM_XJ3 的一步生长曲线测定

从结果(图 6)可以看出 vB_EfaM_XJ3 感染宿主 15 min 内,噬菌体的量基本没有增加,这段时间被称为噬菌体的潜伏期,感染后 15~190 min 噬菌体的量急剧增加,这段时间称为噬菌体的爆发期,之后噬菌体的数量基本保持平衡。本试验测得的 vB_EfaM_XJ3 感染宿主菌的潜伏期是 15 min,爆发期是 175 min,裂解量约为 84,表明此噬菌体具有较强的裂解能力,可选为临床用噬菌体生物制剂的备选对象。

2.5.4 噬菌体 vB_EfaM_XJ3 的热稳定性测定

vB_EfaM_XJ3 对温度的耐受结果(图 7)表明,随着温度升高、处理时间延长,噬菌体的存活率逐渐降低。室温至 50 °C 时,噬菌体基本可以保持其原活性;温度高于 60 °C 时,滴度开始下降但不明显,60 °C 作用 1.5 h 时滴度下降三个数量级;70 °C 作用 40 min 噬菌体全部失活。



进化树利用 MEGA 5.2 软件中的 Construct/Test UPGMA Tree 法构建；分支上的数字是在 1 000 次重复后获得的置信值。比例尺对应于每 0.2 个核苷酸

The tree was constructed with the MEGA 5.2 program using Construct/Test UPGMA Tree. Numbers at the branches are bootstrap confidence values obtained after 1 000 replicates. The scale bar corresponds to 0.2 substitution per nucleotide position

图 4 噬菌体 vB_EfaM_XJ3 系统发育分析

Fig. 4 Phylogenetic analysis of phage vB_EfaM_XJ3

表 1 噬菌体 vB_EfaM_XJ3 对多株临床分离菌株的灵敏度

Table 1 The sensitivity of phage vB_EfaM_XJ3 to many strains of clinical isolates

菌株	敏感性	菌株	敏感性	菌株	敏感性	菌株	敏感性
Bacterial strains	Sensitivity	Bacterial strains	Sensitivity	Bacterial strains	Sensitivity	Bacterial strains	Sensitivity
<i>E. faecium</i> 01	-	<i>E. faecalis</i> 06	-	<i>S. aureus</i> 01	-	<i>E. coli</i> 02	-
<i>E. faecium</i> 02	-	<i>E. faecalis</i> 07	-	<i>S. aureus</i> 02	-	<i>E. coli</i> 03	-
<i>E. faecium</i> 03	+	<i>E. faecalis</i> 08	-	<i>S. aureus</i> 03	-	<i>E. coli</i> 04	-
<i>E. faecium</i> 04	-	<i>E. faecalis</i> 09	-	<i>S. aureus</i> 04	-	<i>Salmonella</i> 01	-
<i>E. faecalis</i> 05	-	<i>E. faecalis</i> 10	-	<i>E. coli</i> 01	-	<i>Salmonella</i> 02	-

+ . 代表裂解；- . 代表不裂解

+ mean lytic；- mean not lytic

2.5.5 噬菌体 vB_EfaM_XJ3 的 pH 稳定性测定

从结果(图 8)可以看出噬菌体 vB_EfaM_XJ3 经不同的 pH 处理 2 h 后, pH 为 2.0 时噬菌体失活, 而

pH 在 5.0 至 11.0 之间时酸碱度对噬菌体的影响不大, 且当 pH 为 7.0 时噬菌体活性最好。此结果表明该噬菌体具有很强的酸碱耐受性。

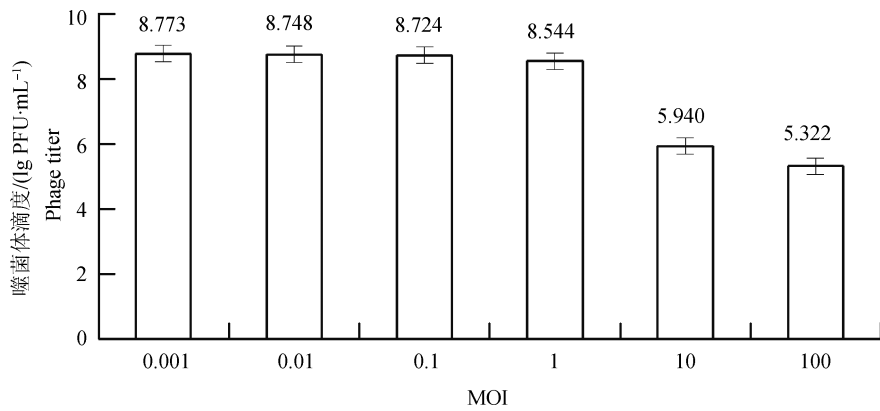


图 5 噬菌体 vB_EfaM_XJ3 的最佳 MOI 测定

Fig. 5 Determination of optimal multiplicity of infection for phage vB_EfaM_XJ3

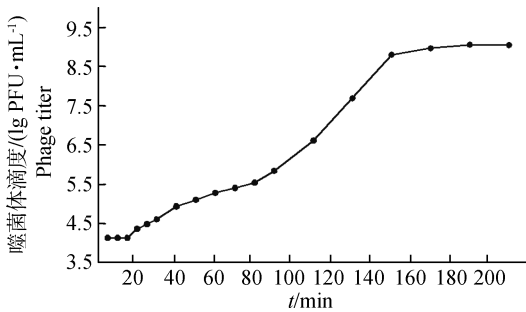


图 6 噬菌体 vB_EfaM_XJ3 的一步生长曲线

Fig. 6 One-step growth curve of phage vB_EfaM_XJ3

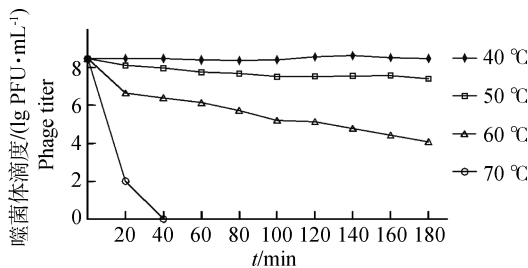


图 7 噬菌体 vB_EfaM_XJ3 的热稳定性测定

Fig. 7 Determination of thermal stability of phage vB_EfaM_XJ3

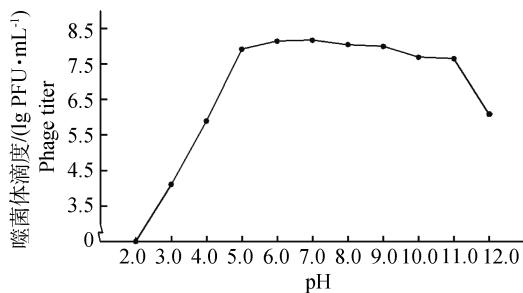


图 8 噬菌体 vB_EfaM_XJ3 的 pH 稳定性测定

Fig. 8 Determination of pH stability of phage vB_EfaM_XJ3

3 讨论

在噬菌体的分离、纯化与计数中,噬菌斑试验和双层平板培养法被认为是既基本又经典的方法,本试验噬菌体的分离、纯化同样采用此方法。依据包红朵等^[14]和 E. Bueno 等^[15]对其分离出的噬菌体进行命名,本试验分离纯化的尿肠球菌噬菌体暂时命名为 vB_EfaM_XJ3,其中 vB 表示 viruses bacteriophage(病毒噬菌体);Efa 表示 *Enterococcus faecium*(尿肠球菌);M 表示 *Myoviridae*(肌尾噬菌体科)。《国际病毒分类委员会第 8 次报告》^[16]与《国际病毒分类委员会第 9 次报告》^[17]中均将噬菌体按核酸类型及单双链分为 4 个“群”,“群”是噬菌体分类的第一个级阶,而 dsDNA 病毒群最为常见,种类最多,本试验分离得到的噬菌体也不例外。

该噬菌体通过全基因组测序及序列比对和进化树分析得知其与肌尾噬菌体科的沙门菌噬菌体 SKML-39 十分相似,基因序列相似性高达 98%,但通过裂解谱试验得知其目前不裂解沙门菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌,只能裂解其宿主菌尿肠球菌,属特异性较强的噬菌体。其特性与 H. Anany 等^[18]分离的志贺菌噬菌体 ΦSboM-AG3 特性相似。志贺菌噬菌体 ΦSboM-AG3 的功能蛋白与沙门菌噬菌体 ViI 相近,但其却是志贺菌噬菌体,只能裂解志贺菌而不能裂解沙门菌。对于此株噬菌体的功能蛋白分析以及其是否能裂解其他尿肠球菌或沙门菌需要在后期的试验中进行验证。目前此株尿肠球菌噬菌体只能裂解其宿主菌,在后续的试验中可以尝试通过其裂解酶的原核表达拓宽裂解范围。

本试验分离得到的噬菌体 vB_EfaM_XJ3 属于有尾噬菌体目肌尾噬菌体科的裂解性 dsDNA 噬菌体,基因组全长为 157.189 kb,GC 含量为 50.27%,目前此噬菌体只能裂解其宿主菌屎肠球菌,能耐受 50℃左右的高温且在 pH 5.0~11.0 时 vB_EfaM_XJ3 的活性基本没有明显的变化,繁殖迅速,对环境的适应能力强。与张文惠等^[19]和邢少贞等^[20]报道的裂解性粪肠球菌噬菌体相比,vB_EfaM_XJ3 的潜伏期短、裂解期长,裂解量高。这株基因序列与沙门菌噬菌体极为相似的裂解性屎肠球菌噬菌体,为肠球菌性奶牛乳房炎的防治和治疗提供了一种新的解决途径,同时也为沙门菌和屎肠球菌抑菌剂的应用奠定了基础。

4 结 论

分离鉴定出一株裂解性肌尾科屎肠球菌噬菌体 vB_EfaM_XJ3,可裂解其宿主菌;最佳感染复数 0.001,潜伏期 15 min,爆发期 175 min,裂解量约 84;能耐受 50℃左右高温,在 pH 5.0~11.0 范围内效价稳定。

参考文献 (References):

[1] 阚 威. 奶牛乳房炎链球菌和肠球菌的分离鉴定及毒力基因的检测[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2014.
KAN W. Isolation, characterization and virulence gene analysis of *Streptococcus* and *Enterococcus* collected from bovine mastitis[D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2014. (in Chinese)

[2] 董翔宸. 奶牛乳房炎肠球菌 ESP 基因真核重组质粒的构建与表达[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2015.
DONG X C. Construction and expression of eukaryotic vector of ESP gene from bovine *Enterococcus* [D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2015. (in Chinese)

[3] KLIMIENĖ I, RUŽAUSKAS M, ŠPAKAUSKAS V, et al. Prevalence of gram positive bacteria in cow mastitis and their susceptibility to beta-lactam antibiotics[J]. *Vet Med Zoot*, 2011, 56(78): 65-72.

[4] 齐亚银, 剡根强, 王静梅, 等. 致羔羊脑炎型粪肠球菌的分离及鉴定[J]. 石河子大学学报: 自然科学版, 2005, 23(2): 200-202.
QI Y Y, YANG Q, WANG J M, et al. Isolation and identification of *Enterococcus faecalis* in lambs with meningitis[J]. *Journal of Shihezi University (Natural Science)*, 2005, 23(2): 200-202. (in Chinese)

[5] WALL S K, ZHANG J, ROSTAGNO M H, et al. Phage therapy to reduce preprocessing *Salmonella* infections in market-weight swine[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(1):48-53.

[6] 张 哲. 两株裂解性粪肠球菌噬菌体的分离鉴定及生物学特性分析[D]. 长春: 吉林大学, 2015.
ZHANG Z. Isolation and biological characteristic of two lytic *Enterococcus* bacteriophages active against *Enterococcus faecalis*[D]. Changchun: Jilin University, 2015. (in Chinese)

[7] BISWAS B, ADHYA S, WASHART P, et al. Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*[J]. *Infect Immun*, 2002, 70(1): 204-210.

[8] 宫鹏娟, 张 蕾, 夏翡翠, 等. 屎肠球菌噬菌体 m5 的分离鉴定及其对小鼠菌血症的治疗研究[J]. 中国兽医学报, 2016, 36(5): 746-749,762.
GONG P J, ZHANG L, XIA F F, et al. Bacteriophage m5 therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2016, 36(5):746-749,762. (in Chinese)

[9] JAMALLUDEEN N, JOHNSON R P, FRIENDSHIP R, et al. Isolation and characterization of nine bacteriophages that lyse O149 enterotoxigenic *Escherichia coli*[J]. *Vet Microbiol*, 2007, 124: 47-57.

[10] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南 [M]. 3 版. 黄培堂, 译. 北京: 科学出版社, 2002.
SAMBROOK J, RUSSELL D W. Molecular cloning: A laboratory manual[M]. 3rd ed. HUANG P T, trans. Beijing: Science Press, 2002. (in Chinese)

[11] 余静丹. 鲍曼不动杆菌噬菌体的分离鉴定及生物学特性的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2013.
YU J D. Isolation, characterization and biological features of lytic bacteriophages infecting *Acinetobacter baumannii* clinical isolates[D]. Changchun: Jilin University, 2013 (in Chinese).

[12] NASU H, IIDA T, SUGAHARA T, et al. A filamentous phage associated with recent pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 strains[J]. *J Clin Microbiol*, 2000, 38(6): 2156-2161.

[13] 冯 焱, 刘 军, 孙 洋, 等. 噬菌体最新分类与命名[J]. 中国兽医学报, 2013, 33(12): 1954-1958.
FENG Y, LIU J, SUN Y, et al. An introduction to current classification and nomenclature of bacterial viruses[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2013, 33(12): 1954-1958. (in Chinese)

- [14] 包红朵, 张鹏禹, 周 艳, 等. 沙门氏菌裂解性噬菌体的分离鉴定及其生物学特性[J]. 食品科学, 2015, 36(5):131-136.
BAO H D, ZHANG P Y, ZHOU Y, et al. Isolation and biological characteristics of lytic *Salmonella* bacteriophage[J]. *Food Science*, 2015, 36(5):131-136. (in Chinese)
- [15] BUENO E, GARCÍA P, MARTÍNEZ B, et al. Phage inactivation of *Staphylococcus aureus* in fresh and hard-type cheeses [J]. *Int J Food Microbiol*, 2012, 158(1): 23-27.
- [16] FAUQUET C M, MAYO M A, MANILOFF J, et al. Virus taxonomy: VIII th report of the international committee on taxonomy of viruses[M]. Amsterdam; Elsevier Academic Press, 2005.
- [17] KING A M Q, ADAMS M J, CARSTENS E B, et al. Virus taxonomy; ninth report of the international committee on taxonomy of viruses[M]. Amsterdam; Elsevier Academic Press, 2011.
- [18] ANANY H, LINGOHR E J, VILLEGAS A, et al. A *Shigella boydii* bacteriophage which resembles Salmonella phage Vi1[J]. *Virology*, 2011, 8(1):242.
- [19] 张文惠, 安小平, 范 航, 等. 一株粪肠球菌噬菌体的分离及其生物学特性研究[J]. 生物技术通讯, 2013, 24(4): 484-487.
ZHANG W H, AN X P, FAN H, et al. Isolation and characterization of an *Enterococcus faecalis* phage [J]*Letters in Biotechnology*, 2013, 24(4):484-487. (in Chinese)
- [20] 邢少贞, 张湘莉兰, 舒 鹏, 等. 粪肠球菌噬菌体 vB_ *E. faecalis*_IME196 的生物学特性及其全基因组分析[J]. 微生物学通报, 2016, 43(9):2040-2048.
XING S Z, ZHANGXIANG L L, SHU P, et al. Characterization and complete genome sequence analysis of *Enterococcus faecalis* bacteriophage vB_ *E. faecalis*_IME196[J]. *Microbiology China*, 2016, 43(9):2040-2048. (in Chinese)

(编辑 白永平)