

分类号: S852.61+1

单位代码: 10183

研究生学号: 2019851014

密 级: 公 开



# 吉林大学

## 博士学位论文

(学术学位)

腹泻断奶仔猪肠道噬菌体组特征及其相关耐药和裂解酶基  
因研究

Study on the characteristics of intestinal phageome and its  
related drug resistance and lysin genes in weaned piglets with  
diarrhea

作者姓名: 冀亚路

专 业: 预防兽医学

研究方向: 兽医微生物学与免疫学

指导教师: 韩文瑜 教授

培养单位: 动物医学学院

2023 年 6 月



腹泻断奶仔猪肠道噬菌体组特征及其相关耐药和裂解酶  
基因研究

Study on the characteristics of intestinal phageome and its  
related drug resistance and lysin genes in weaned piglets with  
diarrhea

作者姓名：冀亚路

专业名称：预防兽医学

研究方向：兽医微生物学与免疫学

指导教师：韩文瑜 教授

学位类别：农学博士

培养单位：动物医学学院

论文答辩日期：2023年6月1日

学位授予日期： 年 月 日

答辩委员会组成：

	姓名	职称	工作单位
主席：	涂长春	研究员	军事医学科学院军事兽医研究所
委员：	郭学军	研究员	军事医学科学院军事兽医研究所
	扈荣良	教授	军事医学科学院
	胡桂学	教授	吉林农业大学
	曹欣	教授	吉林农业大学
	付云贺	教授	吉林大学
	龚文杰	教授	吉林大学

本研究由“国家自然科学基金”项目（U19A2038；  
32072824； 32222083）和国家重点研发计划  
（2021YFA0911210）资助

# 中文摘要

## 腹泻断奶仔猪肠道噬菌体组特征及其相关耐药和裂解酶基因研究

猪养殖业是我国畜牧业中的重要产业，仔猪断奶后腹泻（PWD）的高发病率和死亡率给养猪业带来巨大经济损失。引起 PWD 的因素复杂多样，但均与肠道微生物群失衡有关。此外，人类肠道菌群宏基因组目录中的功能性通路中有 96% 同样存在于猪肠道微生物组基因目录中。因此，猪肠道微生物引起了广泛关注。近年来，病毒宏基因组学研究揭示了人类肠道环境中的病毒群落，属于原核病毒的噬菌体占主导地位，并在维持人体健康状态方面发挥着重要作用。然而，断奶仔猪肠道微生物及其与腹泻相关性的研究主要集中在细菌组分上，尚未发现关于断奶仔猪肠道噬菌体组的研究报道。由于噬菌体及其编码的裂解酶基因被认为是一种有前途的抗生素替代物，因此，猪肠道噬菌体组可能是一个潜在的生物制剂库。此外，由于抗生素在猪养殖过程中的广泛使用，猪养殖业被认为是抗生素抗性基因（ARGs）潜在传播热点之一。噬菌体作为一种重要的可移动转移元件，可通过溶原转化或水平基因转移促进 ARGs 在细菌群落中的传播。然而，断奶仔猪肠道噬菌体相关 ARGs 的分布及其转导的途径和驱动因素未知。综上，揭示断奶仔猪肠道噬菌体群落，探索肠道噬菌体及其与腹泻以及 ARGs 之间的关系具有重要意义。

本课题选用断奶仔猪应激性腹泻自然病例，通过对仔猪粪便评分和肠道组织病理观察鉴定选择健康和腹泻断奶仔猪，收集各仔猪回肠（小肠）内容物，盲肠（大肠）内容物和新鲜粪便（直肠内容物）作为研究样本，分别提取样本中总 DNA 和病毒 DNA 进行宏基因组测序，取得以下研究结果：

首先，对所有仔猪肠道病毒组测序结果进行了分析，共鉴定出 50,756 条病毒序列，其中高达 99.88% 的病毒序列与 NCBI-NT 病毒数据库中的病毒序列不匹配，表明了仔猪肠道病毒组序列的高度新颖性。注释的肠道病毒主要由有尾噬菌体目（*Caudovirales*）和微小噬菌体科（*Microviridae*）以及 *Smacoviridae* 病毒群组成。对不同样本中病毒及其功能基因丰度和多样性进行分析，结果表明健康仔猪回肠，盲肠和粪便样本中病毒群丰富度和多样性具有显著差异。相比之下，腹泻改变了仔猪不同肠道样本中病毒群的分布和多样性。

第二，对健康和腹泻断奶仔猪肠道噬菌体及其与肠道菌群的关系进行了分析。结果显示健康和腹泻仔猪肠道 *Microviridae* 病毒群丰度显著高于 *Caudovirales* ( $P < 0.01$ )。与健康

仔猪相比, 腹泻仔猪样本(尤其是粪便)中的 *Caudovirales* 病毒群丰度增加。健康仔猪回肠、盲肠和粪便样本中噬菌体群落组成及物种多样性具有极大差异, 腹泻导致这三个肠道部位噬菌体物种多样性发生改变, 且群落结构趋于更高的相似性。此外, 仔猪肠道菌群与肠道噬菌体病毒群发生平行变化。然而, 噬菌体丰富度和多样性与菌群丰富度和多样性在仔猪健康和腹泻状态下呈显著反相关关系 ( $P < 0.05$ )。其中显著相关的噬菌体群落主要体现在 *Caudovirales* 病毒群, 而具有显著性关系的细菌类群包括普雷沃氏菌科、乳酸杆菌科、梭菌科、毛螺菌科、瘤胃球菌科、链球菌科、肠杆菌科以及拟杆菌科, 这表明腹泻仔猪肠道噬菌体与细菌群落相关性的改变仅限于特定分类群。噬菌体-宿主预测结果表明, 丰度较高的噬菌体匹配的宿主主要是一些常见病原菌属, 且腹泻引起这些噬菌体丰度在不同肠道部位发生变化。在仔猪肠道菌群测序结果中, 这些菌属的相对丰度与对应的噬菌体发生了一致的变化。此外, 与健康仔猪相比, 腹泻仔猪粪便中多价噬菌体物种多样性显著更高 ( $P < 0.05$ ), 匹配的宿主细菌种类趋向与常见致病菌, 例如弯曲杆菌属、链球菌属、葡萄球菌属、肠球菌属、肺炎克雷伯氏菌属和沙门氏菌属, 其中弯曲杆菌和沙门氏菌是常见腹泻致病菌。总之, 这些结果表明, 断奶仔猪腹泻与肠道噬菌体有关, 噬菌体在维持仔猪肠道生态健康方面扮演着重要角色。

第三, 对仔猪肠道噬菌体相关 ARGs 进行了分析, 并探索了噬菌体介导 ARGs 转移的潜在途径和驱动因素。通过与 CARD 数据库比对, 从 59,955 个噬菌体基因中筛选出 112 个 ARGs。这些噬菌体相关 ARGs 主要来自仔猪盲肠内容物, 且腹泻仔猪粪便样本中噬菌体相关 ARGs 的丰度显著 ( $P < 0.05$ ) 高于健康仔猪。根据 Spearman 相关性分析, 11 个 ARGs 分别与长尾噬菌体科、短尾噬菌体科、肌尾噬菌体科和微小噬菌体科噬菌体呈显著正相关。此外, 通过比对和筛选, 在 59,955 个噬菌体基因中发现 303 个可移动转移元件(MEG)同源基因。其中转座酶基因数量和相对丰度最高, 其次是重组酶和整合酶基因。与噬菌体相关 ARGs 的分布特征一致, 噬菌体相关 MGEs 基因主要来自盲肠样本, 且腹泻仔猪粪便样品中 MGEs 基因丰度显著 ( $P < 0.05$ ) 高于健康仔猪。值得注意的是, 共有 18 个噬菌体 contigs (包括一个多价噬菌体 contigs) 同时携带 ARGs 和 MGEs 基因并均被注释为链球菌噬菌体, 且这些 ARGs 和 MGEs 基因之间存在显著正相关, 表明 ARGs 和 MGEs 基因在噬菌体中的共定位与特定的噬菌体宿主(链球菌)有关。重要的是, 这些噬菌体基因组编码的 ARGs 序列片段与 NCBI 核苷酸数据中包括链球菌在内的多种细菌中的质粒、ICEs 或转座子等多种移动元件的序列表现出高度共线性。此外, 噬菌体相关 ARG (ANT(9)-Ia) 体

外表达菌株对抗生素表现出了耐药性，证明了仔猪肠道噬菌体携带具有真正耐药性能的 ARG。以上结果表明断奶仔猪肠道噬菌体组是 ARGs 重要储存库和可移动载体。噬菌体相关 MGEs 基因是影响 ARGs 维持和转移的重要因素。此外，腹泻导致仔猪粪便中携带 ARGs 和 MGEs 基因的噬菌体丰度显著增加，多价噬菌体（具有广泛宿主范围的噬菌体）多样性同时显著增加，这将有助于 ARGs 在细菌群落中的转染和更广泛的分布。值得注意的是，腹泻粪便中多价噬菌体的预测宿主谱倾向于潜在的肠道致病菌属，这大大增加了肠道病原体获得 ARGs 的风险。

最后，从断奶仔猪肠道病毒预测基因中共筛选出 75 个噬菌体裂解酶基因。基于已鉴定的多价噬菌体序列，从中筛选出 1 个序列新颖且预测为链球菌噬菌体裂解酶（Lys33795）基因。将裂解酶基因序列合成后，成功完成载体构建与目的蛋白表达，对该裂解酶裂解谱、pH 稳定性、温度稳定性、体外杀菌活性及生物膜清除能力进行了测定。结果表明裂解酶 Lys33795 具有广泛的裂解谱，不仅对猪链球菌有裂解活性，而且靶向裂解无乳链球菌、马链球菌兽疫亚种以及马链球菌马亚种。重要的是，Lys33795 对多重耐药猪链球菌表现出高效的杀菌活性，且不易诱导菌株抗性的产生。此外，Lys33795 可在较宽 pH 值（pH 值 = 3 ~ 10）和温度（4 ~ 45 ℃）范围内保持其裂解活性，且可以显著清除猪链球菌及马链球菌培养 72 h 形成的成熟生物膜。这些结果均有助于 Lys33795 成为应对多重耐药猪链球菌感染的后备临床药物。

总之，本研究极大地扩展和丰富了人们对断奶仔猪肠道病毒组（特别是噬菌体组）的认识，为进一步揭示仔猪肠道噬菌体组在正常与腹泻状态下的演替规律提供了参考，为猪场 ARGs 污染的预防和控制提供了依据，为仔猪肠道疾病的微生态防控以及多重耐药细菌新型噬菌体及其抗菌蛋白的挖掘提供了新的思路。

#### 关键词：

断奶仔猪，腹泻，肠道微生物群，肠道噬菌体组，抗生素抗性基因，链球菌裂解酶

## Abstract

### **Study on the characteristics of intestinal phageome and its related drug resistance and lysin genes in weaned piglets with diarrhea**

Pig breeding is an important industry in China's animal husbandry. The high incidence rate and mortality of post-weaning diarrhea (PWD) in piglets has brought huge economic losses to the pig industry. The factors that cause PWD are complex and varied, but they are all related to the imbalance of intestinal microflora. In addition, 96% of the functional pathways in the macro genome directory of human intestinal microflora also exist in the gene directory of porcine intestinal microflora. Therefore, the intestinal microflora of weaned piglets has attracted extensive attention. In recent years, the study of viral macrogenomics has revealed the virus community in human intestinal environment. Phages belonging to prokaryotic viruses dominate and play an important role in maintaining human health. However, Studies on intestinal microorganisms and their correlation with diarrhea in weaned piglets mainly focus on bacterial components, but no reports have been found on the intestinal phageome in weaned piglets. Phages and their encoded lytic enzyme genes are considered to be a promising alternative to antibiotics. Therefore, pig intestinal phageome may be a potential library of biological agents. In addition, due to the widespread use of antibiotics in pig farming, the pig farming industry is considered to be one of the potential transmission hotspots of antibiotic resistance genes (ARGs). As an important mobile transfer element, phages can promote the spread of ARGs in bacterial communities through lysogenic transformation or horizontal gene transfer. However, the distribution of phages related ARGs in the gut of weaned piglets and the pathways and drivers of their transduction are unknown. In summary, it is of great significance to reveal the intestinal phage community of weaned piglets and explore the relationship between intestinal phages and diarrhea as well as ARGs.

This study selects natural cases of stress diarrhea in weaned piglets to identify and select healthy (4) and diarrhea weaned piglets (4) through the score of piglets' feces and the observation of intestinal tissue pathology. The contents of ileum (small intestine), cecum (large intestine) and fresh feces (rectal contents) of piglets were collected as study samples (24 in total). The total DNA and virus DNA in the samples were extracted separately for metagenomic sequencing, the following research results were obtained:

First, the sequencing results of all piglet enterovirus genome was analyzed, a total of 50756 virus sequences were identified, of which up to 99.88% did not match the virus sequence in the NCBI-NT virus database, indicating that the piglet enterovirus group sequence was highly novel. The annotated enteroviruses are mainly composed of *Caudovirales*, *Microviridae* and *Smacoviridae* virus contigs. The analysis of the abundance and diversity of virus in different samples showed that there were significant differences in the enrichment and diversity of virus species in the ileum, caecum and fecal samples of healthy piglets. In contrast, diarrhea changed the distribution and diversity of virus groups in different intestinal samples of piglets.

Second, the relationship between intestinal phages and intestinal microflora in healthy and diarrhea weaned piglets was analyzed. The results showed that the abundance of intestinal *Microviridae* contigs was significantly higher than that of *Caudovirales* ( $P < 0.01$ ) in healthy and diarrhea piglets. Compared with healthy piglets, the abundance of *Caudovirales* contigs in diarrhea piglet samples (especially feces samples) increased. The composition and species diversity of phage community in ileum, caecum and fecal samples of healthy piglets are very different. Diarrhea led to changes in the species diversity of phages in these three intestinal sites, and the community structure tended to be more similar. In addition, the intestinal microflora and intestinal phage community of piglets changed in parallel. However, the abundance and diversity of phage and the abundance and diversity of bacterial flora were significantly inversely correlated under the condition of health



and diarrhea in piglets ( $P < 0.05$ ). Among them, the phage community with significant correlation is mainly reflected in the *Caudovirales* taxonomy. However, the bacterial communities with significant relationship include *Prevotellaceae*, *Lactobacillaceae*, *Clostridiaceae*, *Lachnospiraceae*, *Rumococcaceae*, *Streptococcidae*, *Enterobacteriaceae* and *Bacteroidaceae*, which indicates that the change in the correlation between intestinal phage and bacterial communities in diarrhea piglets is limited to specific taxonomy. In the result of phage-host prediction, it was found that the host matched by higher abundance phages was mainly some common pathogenic bacteria, and diarrhea caused changes in the abundance of these phages in different intestinal sites. In the sequencing results of intestinal microflora of piglets, the relative abundance of these bacteria and corresponding phages changed in the same way. In addition, compared with healthy piglets, the diversity of polyvalent phage species in the feces of diarrhea piglets is significantly higher ( $P < 0.05$ ). The matched host bacteria tend to be common pathogenic bacteria, such as *Campylobacter*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Klebsiella pneumoniae* and *Salmonella*, among which *Campylobacter* and *Salmonella* are common pathogenic bacteria for diarrhea. In conclusion, these results show that piglet diarrhea is related to intestinal phages, which play an important role in maintaining piglet intestinal ecological health.

Third, the intestinal phage-related ARGs of piglets and explored the potential pathway and driving factors of phage-mediated ARGs transfer were analyzed. Through comparison with CARD database, 112 ARGs were screened from 59,955 phage genes. These phage-related ARGs mainly come from the caecum contents of piglets, and the abundance of phage-related ARGs in fecal samples of diarrhea piglets is significantly higher ( $P < 0.05$ ) than that of healthy piglets. According to Spearman correlation analysis, 11 ARGs were significantly positively correlated with *Siphoviridae*, *Podoviridae*, *Myoviridae* and *Microviridae*, respectively. In addition, 303 MEGs homologous genes were found in 59,955 phage genes through comparison and screening. The number and relative abundance of transposase genes

are the highest, followed by recombinase and integrase genes. Consistent with the distribution characteristics of phage-associated ARGs, phage-associated MGE gene mainly comes from cecum samples, and the abundance of MGE gene in fecal samples of diarrhea piglets is significantly higher ( $P < 0.05$ ) than that of healthy piglets. It is noteworthy that a total of 18 phage contigs (including a polyvalent phage contig) carry both ARGs and MGE genes and are all annotated as streptococcal phages, and there is a significant positive correlation between these ARGs and MGE genes, indicating that the co-location of ARGs and MGE genes in the phage is related to specific phage host (*Streptococcus*). Importantly, the ARGs sequence fragments encoded by phage genomes and the sequences of multiple mobile elements such as plasmids, ICEs or transposons in various bacteria (including *Streptococcus*) in the NCBI nucleotide data showed high collinearity. In addition, the phage-associated ARG (ANT(9)-Ia) expression strains *in vitro* showed resistance to antibiotics, which proved that the piglet intestinal phage carried ARG with real resistance function. The above results show that piglet intestinal phage group is an important storage and mobile carrier of ARGs. The phage-associated MGE gene is an important factor affecting the maintenance and transfer of ARGs. In addition, diarrhea caused a significant increase in the abundance of phages carrying ARGs and MGEs genes in piglet feces, and a significant increase in the diversity of polyvalent phages (phages with a wide host range), which would contribute to the transfection and wider distribution of ARGs in bacterial communities. It is worth noting that the predicted host spectrum of polyvalent phages in diarrheal feces tends to be potential intestinal pathogenic bacteria, which greatly increases the risk of intestinal pathogens acquiring ARGs.

Finally, a total of 75 phage lysin genes were screened from the predicted genes of weaned piglet enterovirus. Based on the identified multivalent phage sequence, a novel and predicted gene of *Streptococcus* phage lysin (Lys33795) was screened. After the lysin sequence was synthesized, the vector construction and protein expression were successfully completed. The lytic spectrum, pH stability,

temperature stability, *in vitro* bactericidal activity and biofilm scavenging ability of the lysin were determined. The results showed that Lys33795 had a wide spectrum of cleavage, not only had cleavage activity against *Streptococcus suis*, but also targeted to cleave *Streptococcus lactis*, *Streptococcus equi subsp. zooepidemicus* and *Streptococcus equi subsp. equi*. Importantly, Lys33795 showed high bactericidal activity against multidrug resistant *Streptococcus suis* and was not easy to induce resistance. In addition, Lys33795 can maintain its lyase activity in a wide range of pH (pH = 3 ~ 10) and temperature (4 ~ 45 °C), and can significantly remove the mature biofilm formed by *Streptococcus suis* and *Streptococcus equi* cultured for 72 h. These results will help Lys33795 become a backup clinical drug against multi-drug resistant *Streptococcus suis* infection.

In conclusion, this study has greatly expanded and enriched our understanding of the intestinal virome (especially the phageome) of weaned piglets. It provides a reference for further revealing the succession of intestinal phages in piglets under normal and diarrhea conditions, and provides a basis for the prevention and control of ARGs pollution in pig farms. And it provides a new idea for the micro-ecological prevention and control of piglet intestinal diseases and the mining of new phages and antimicrobial proteins of multidrug resistant bacteria.

**Keywords:**

Weaned piglets, Diarrhea, Intestinal microflora, Intestinal phage, Antibiotic resistance gene, *Streptococcus* lysin

# 目 录

前言.....	1
第一篇 文献综述 .....	3
第 1 章 仔猪断奶后腹泻及动物肠道微生物群相关 ARGs 研究进展 .....	3
1.1 断奶应激对仔猪肠道健康的影响.....	3
1.2 仔猪断奶后腹泻与肠道菌群的关系.....	3
1.3 仔猪断奶后腹泻的预防措施.....	5
1.4 猪肠道微生物群相关 ARGs 研究进展 .....	7
1.5 ARGs 基因内在和流动阻力.....	8
1.6 噬菌体及相关移动元件介导 ARGs 转导 .....	9
1.7 由噬菌体或噬菌体相关元件组成的 MGE.....	10
1.8 ARGs 传播现状.....	11
第 2 章 哺乳动物肠道噬菌体组研究进展 .....	13
2.1 宏基因组学概述.....	13
2.2 病毒宏基因组概述.....	13
2.3 人类肠道病毒组组成及影响因素.....	14
2.4 肠道噬菌体-细菌相互作用 .....	16
2.5 猪肠道病毒组研究进展.....	20
第 3 章 猪链球菌及其噬菌体裂解酶研究进展 .....	23
3.1 猪链球菌概述.....	23
3.2 猪链球菌的危害.....	23
3.3 猪链球菌的预防和治疗.....	26
3.4 噬菌体裂解酶研究进展.....	26
3.5 展望.....	29
第二篇 研究内容 .....	31
第 1 章 断奶仔猪肠道病毒组成和功能基因分析 .....	31
1.1 材料.....	31
1.2 方法.....	32
1.3 结果.....	36
1.4 讨论.....	48
1.5 小结.....	49
第 2 章 腹泻断奶仔猪肠道噬菌体群特异性改变及其与菌群相关性 .....	51
2.1 材料.....	51

2.2 方法.....	52
2.3 结果.....	53
2.4 讨论.....	66
2.5 小结.....	68
第 3 章 断奶仔猪肠道噬菌体介导 ARGs 转移的潜在途径和驱动要素 .....	69
3.1 材料.....	69
3.2 方法.....	70
3.3 结果.....	72
3.4 讨论.....	83
3.5 小结.....	85
第 4 章 断奶仔猪肠道噬菌体组猪链球菌裂解酶预测基因序列的重组表达与体外裂解活性测定 .....	87
4.1 材料.....	87
4.2 方法.....	89
4.3 结果.....	94
4.4 讨论.....	104
4.5 小结.....	106
结论.....	107
参考文献.....	109
附录.....	129

## 英文缩写词

英文缩写	英文名称	中文名称
ETEC	Enterotoxigenic Escherichia Coli	产肠毒素大肠杆菌
IBD	Inflammatory Bowel Disease	炎症性肠病
PWD	Post-Weaning Diarrhea	断奶后腹泻
MDR	Multidrug Resistance	多药耐药性
HGT	Horizontal Gene Transfer	水平基因转移
ICE	Integrative Conjugative Element	整合接合元件
MGE	Mobile Genetic Element	可移动遗传元件
GTA	Gene Transfer Agent	基因转移因子
T <sub>1</sub> D	Type 1 Diabetes	1 型糖尿病
T <sub>2</sub> D	Type 2 Diabetes	2 型糖尿病
GI	Genomic Islands	基因岛
STEC	Shiga toxin-producing Escherichia coli	产志贺毒素大肠杆菌
eDNA	environmental DNA	环境脱氧核糖核酸
CD	Catalytic Domain	催化域
CBD	Cell-Binding Domain	结合域
TGEV	Transmissible GastroEnteritis Virus	传染性胃肠炎病毒
PEDV	Porcine Epidemic Diarrhea Virus	猪流行性腹泻病毒
RV	Rotavirus	轮状病毒
ARGs	Antibiotic resistance genes	抗生素抗性基因
BWA	Burrow-Wheeler Aligner	Burrow-Wheeler 比对软件
NT	Nucleotide	核苷酸
NR	Non-Redundant	非冗余
HMM	Hidden Markov Model	隐马尔可夫模型
RPKM	Reads Per Kilobase per Million	每百万 reads 中来自于某基因 每千碱基长度的 reads 数

---

PCoA	Principal Co-ordinates Analysis	主坐标分析
PCA	Principal Component Analysis	主成分分析
GSA	Genome Sequence Archive	组学原始数据归档库
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes	京都基因与基因组百科全书
ORF	Open Reading Frame	开放阅读框
CRT	CRISPR Recognition Tool	CRISPR 识别工具
LEfSe	Linear discriminant analysis Effect Size	线性判别分析
LDA	Linear Discriminant Analysis	线性判别分析
AMR	Anti-microbial Resistance	抗微生物耐药性
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside	异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷
CARD	The Comprehensive Antibiotic Resistance Database	综合抗生素耐药性数据库
RAST	Rapid Annotation using Subsystem Technology	利用 Subsystem 技术快速注释 工具

---

## 前言

猪是我国畜牧业的主要物种，在现代密集饲养条件下，断奶是猪生命过程中的关键时期<sup>[1]</sup>。仔猪断奶后腹泻的高发病率和死亡率给养猪业造成了巨大的经济损失<sup>[2]</sup>。肠道微生物群的破坏被认为是导致断奶仔猪腹泻的关键因素<sup>[3,4]</sup>。此外，猪被广泛用作分析各种人类生理功能和疾病的首选模式物种，人类肠道菌群宏基因组目录中的功能性通路中有 96% 同样存在于猪肠道微生物组基因目录中，这证实了猪作为人类生物医学模型的重要性<sup>[5,6]</sup>。因此，猪肠道微生物组已引起越来越多的关注。尽管已有大量研究已经描述了猪肠道微生物及其与腹泻之间的相关性。然而，这些研究主要集中在猪肠道微生物细菌组分上，断奶仔猪肠道病毒组及其与腹泻相关性未知。由于噬菌体及其编码的裂解酶基因被认为是一种有前途的抗生素替代物，因此，猪肠道噬菌体组可能是一个潜在的生物制剂库。此外，由于抗生素在养猪业中的广泛使用，临床抗生素耐药性的出现和蔓延已引起全球关注，猪养殖业被认为是 ARGs 传播的潜在热点之一<sup>[7]</sup>。研究表明，猪肠道是 ARGs 的丰富库，但猪肠道微生物与 ARGs 之间关系的研究同样集中于细菌相关组分，肠道噬菌体病毒 ARGs 的研究鲜有报道<sup>[8]</sup>。因此，需要对猪肠道病毒相关 ARGs 进行进一步研究，以更好的了解 ARGs 来源和载体，缓解 ARGs 相关传播风险。

噬菌体是寄生于细菌的病毒，是地球上最丰富的生物，在维持地球上的微生物平衡方面发挥着至关重要的作用，已被公认为一种巨大的未开发资源<sup>[9]</sup>。病毒宏基因组研究表明，哺乳动物肠道中存在大量噬菌体，并主导肠道微生物群的病毒成分<sup>[10]</sup>。肠道噬菌体存在两种生活模式状态，即感染性病毒颗粒和整合到细菌染色体中的元噬菌体<sup>[11,12]</sup>。在没有疾病的情况下，肠道噬菌体种群在个体之间表现出显著的多样性和时间上的稳定性。然而，疾病状态下肠道噬菌体则发生特异性改变，并可能在肠道生理中发挥直接作用或通过捕食者与猎物的关系改变细菌微生物组。已有研究揭示了人肠道噬菌体群与炎症性肠病（IBD）、2 型糖尿病和语言记忆之间的相关性，表明肠道噬菌体在维持人体健康状态方面发挥着重要作用<sup>[13-16]</sup>。此外，作为水平基因转移的重要效应因子，噬菌体可以通过基因转移将细菌基因组中的一些基因轻松转移到噬菌体基因组，然后通过噬菌体遗传转化将其转移到其他细菌，这很容易促进这些基因的传播和污染<sup>[17]</sup>。

目前，关于断奶仔猪肠道噬菌体组的研究尚未报道。断奶仔猪肠道噬菌体组可能代表



一种新的未开发资源，并可能在维持肠道稳态及 ARGs 的转移方面起着重要作用。基于以上研究背景，本研究以健康和腹泻断奶仔猪为研究对象，以各仔猪回肠内容物、盲肠内容物以及直肠内容物（新鲜粪便）为研究样本，分别提取样本中总 DNA 和病毒 DNA 进行宏基因测序，利用生物信息学分析断奶仔猪肠道噬菌体群落组成及其与腹泻之间的相关性，并进一步探索仔猪肠道噬菌体介导 ARGs 转移的潜在途径和驱动因素，最终从仔猪肠道噬菌体组中挖掘新型噬菌体裂解酶抗菌蛋白。本研究极大的加深了人们对断奶仔猪肠道微生物群落了解，为猪养殖业中 ARGs 污染的预防和控制提供了参考和依据，并为仔猪肠道微生物生态防控以及多重耐药菌株新型药物的挖掘提供了新的思路。

## 第一篇 文献综述

### 第1章 仔猪断奶后腹泻及动物肠道微生物群相关 ARGs 研究进展

仔猪腹泻是养猪业最具挑战性的疾病之一，给全球生猪养殖业造成巨大的经济损失。仔猪腹泻具有群发性特点，多发生于1~3月龄的仔猪。仔猪肠道发育不完善，病原体感染，自身免疫力差，断奶后饮食结构和饲养环境等因素改变导致的应激反应，均可引发腹泻。PWD会严重损害肠胃健康，对生猪养殖极为不利。抗生素耐药性问题已受到全世界前所未有的关注，被列为影响世界经济的五大因素之一。在临床和农业环境中引入抗生素后，细菌已经进化出抵抗迄今发现的几乎所有抗生素的机制。众所周知，抗生素耐药性是由ARGs介导的。事实上，ARGs已被证实在自然环境中是古老的，例如，甚至在30,000年前的冰冻沉积物中也是如此<sup>[18]</sup>。近年来，通过基于宏基因组功能或基于序列的策略，在自然和宿主相关环境的整个微生物群中对ARGs进行了表征<sup>[19,20]</sup>。因此，抗生素耐药性不仅是一个公共卫生问题，也是一个与环境、动物和人类有关的生态问题。

#### 1.1 断奶应激对仔猪肠道健康的影响

断奶被认为是养猪生产中最关键的时期之一，关系到养猪场的经济效益。在规模化养猪业中，仔猪通常在21~28日龄左右进行断奶。断奶是一种突然的、短暂的、压力大的、复杂的事件，其特征是饮食和生活环境的变化，它会深刻影响仔猪的健康，有时甚至导致死亡率<sup>[21]</sup>。从易消化的液态奶换成不易消化的固体饲料，对仔猪胃肠道的生理机能具有重要影响<sup>[2]</sup>。饮食变化与饲料和水摄入量低且不稳定有关。一些胃肠道变化与整体断奶过渡有关，例如荷尔蒙活性变化、与炎症反应相关的通路激活、胃动力降低、小肠萎缩和绒毛高度降低的诱导、营养、体液减少和电解质吸收，并增加对抗原和毒素的渗透性<sup>[22-24]</sup>。

#### 1.2 仔猪断奶后腹泻与肠道菌群的关系

现在越来越多的研究表明仔猪断奶后的环境变化、饮食转变与肠道微生物群的改变有

关，肠道微生物群的破坏被认为是导致断奶后腹泻的关键因素之一<sup>[3]</sup>。数以亿计的微生物群栖息在哺乳动物胃肠道中，它们在营养物质消化、肠道屏障、免疫反应、内分泌和其他生理过程的调节中起着重要作用。猪肠道微生物群是一个非常复杂的生态系统，显示出随着时间和整个胃肠道变化的动态组成和多样性<sup>[5]</sup>。肠道在仔猪出生时是无菌的，随后被来自母亲和环境的微生物定居，开始是乳酸菌、肠杆菌和链球菌。在引入固体饲料后，专性厌氧菌的数量和多样性增加，直到达到成体类型模式<sup>[25, 26]</sup>。哺乳动物的肠道微生物群有许多有益于宿主的作用，例如维生素的生产、碳水化合物消化和发酵、调节免疫反应、维持肠道绒毛的正常功能和保护免受病原菌的侵害<sup>[27, 28]</sup>。在哺乳期，品种和哺乳母亲引起仔猪粪便微生物群的进一步分化<sup>[29]</sup>。

仔猪断奶时，突然被饲喂含有谷物和高浓度粗蛋白的日粮，此外，一般建议哺乳仔猪采用提前日粮，以减少断奶时食物的突然变化。多项研究表明，乳杆菌属细菌数量减少，微生物多样性丧失，而普雷沃氏菌属、梭状芽孢杆菌属，或兼性厌氧菌，如变形杆菌科，受到很大的影响。蛋白质或纤维的来源和水平决定了断奶仔猪肠道微生物组组成和多样性<sup>[30]</sup>。肠道微生物生态系统的这种干扰和生命早期多样性的丧失会显著增加胃肠道疾病的风险。乳酸杆菌属是疾病预防的重要参与者，在断奶期间的突然减少可能导致疾病发生的风险增加<sup>[31]</sup>。

鼠伤寒沙门氏菌和大肠杆菌是影响养猪业的两种主要病原体<sup>[32]</sup>。在致病性大肠杆菌中，产肠毒素大肠杆菌（ETEC）是仔猪断奶后腹泻的主要传染源，每年造成全世界 50% 的仔猪死亡<sup>[33]</sup>。宿主的遗传背景在推动肠道微生物群落定居方面起关键作用，也是仔猪感染的诱发因素。另一方面，猪基因组粘蛋白 4 基因内含子内的多态性可使特定 ETEC F4 受体的产生无效，从而保护这些猪免受 ETEC F4 感染<sup>[34]</sup>。与非易感猪相比，ETEC 易感猪也显示出肠道细菌多样性降低（图 1）。

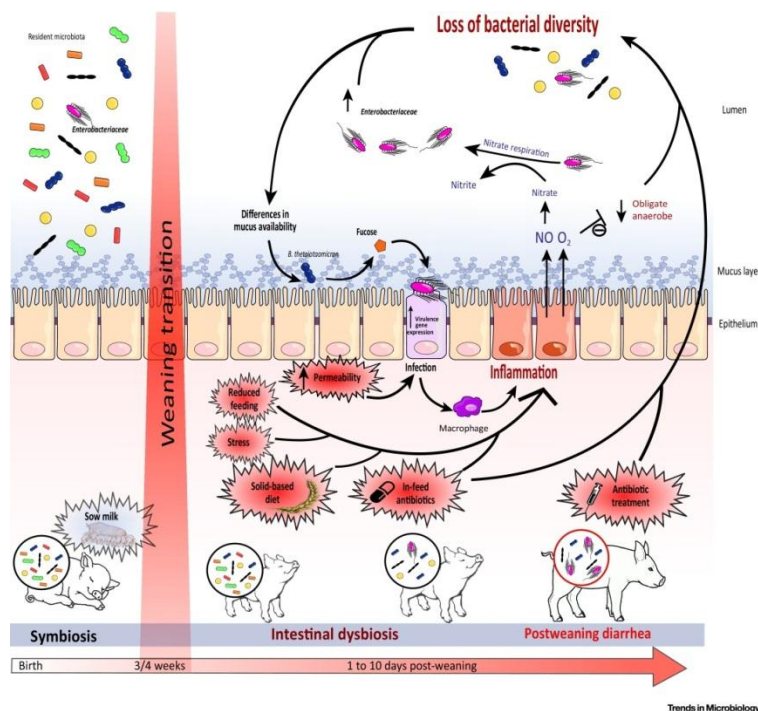


图 1 断奶过渡期对仔猪肠道微生物群的影响和传染性因素的扩大<sup>[1]</sup>

Fig 1 Impact of Weaning Transition on Piglet Gut Microbiota and Expansion of Infectious Agents

### 1.3 仔猪断奶后腹泻的预防措施

#### 1.3.1 建立强健的肠道微生物群

新生仔猪的肠道是无菌的，但很快就会被数量相对较少的微生物占据，并且在生命的最初几周内多样性增加。消化道的建群是一个渐进的过程，在该过程中，一些微生物虽然能够建群于消化道，但会被更适应发育中动物不断变化的胃肠生态系统的其他微生物所取代。这种早期建群的动力学以共同的模式为特征，即兼性厌氧和耐氧物种最初建群，随着肠道环境变得更加厌氧，严格厌氧物种增殖，并建立更多样的微生物群<sup>[31, 35, 36]</sup>。这种早期微生物群落演替的动力学是影响导致 PWD 微生物紊乱风险的重要因素，即，它影响宿主在断奶前后的关键时期的复原力。一项对仔猪的研究表明，与没有 PWD 的动物相比，患 PWD 的动物在断奶前具有不同的粪便微生物群组成、均匀性和多样性<sup>[37]</sup>，这表明断奶前的微生物群组成可影响对 PWD 的易感性。确定这种“预防性”微生物群的组成是一个尚未解决的挑战。

为仔猪研究的几种喂养策略都属于这种作用模式，例如，添加益生菌、益生元和合生

素来改变微生物群的组成。这种治疗应该在仔猪生命的早期进行(出生后尽快进行)。因此,在母畜饲料中添加添加剂是一种方便可行的方法<sup>[38, 39]</sup>。这种做法背后的基本原理是,通过向母畜提供改善其肠道微生物群组成的成分/添加剂,仔猪将从出生起就在阴道通道和围栏环境中暴露于这种有益的微生物群。原则上,每一个对母猪肠道微生物群有益影响的策略都会有益地影响后代的早期定居。因此,饲料成分如纤维来源和含量也可以包括在内。还有一些报道,其中在出生后不久就直接给仔猪提供益生菌<sup>[40]</sup>,这种策略被认为是增加了调节肠道微生物群的机会,以改善肠道健康/对疾病的抵抗力。在这些研究中,仔猪出生后多次被单独提供特定的益生菌,试图促进它们的定居或有益地影响微生物群的建立,即使益生菌可能不会自己建立。

### 1.3.2 在断奶前促进肠道成熟

仔猪断奶时最显著的突变之一是饲料成分和稠度的变化。母猪奶主要以植物为基础的干饲料的转变通常会导致低采食量或厌食。在实践中,给乳猪提供蠕虫饲料,通常是干的,较少作为液体饲料,以让它们熟悉这种形式的饲料,并作为母猪奶的营养补充,用于那些不能充分哺乳的仔猪<sup>[41]</sup>。此外,蠕虫饲料的摄入可能通过刺激胃肠道的发育水解植物来源的底物所必需的微生物群和消化酶(例如胰酶)的活性,这将意味着当仔猪断奶时,它们的消化系统更发达,比不摄入任何蠕虫饲料的仔猪更能消化和吸收膳食营养,并且它们的肠道微生物群能更好地承受断奶时发生的干扰。但旨在检验这一假设的研究显示了模棱两可的结果<sup>[42]</sup>。此外,提供浓度更接近牛奶的饲料,即液体饲料而不是干饲料,被认为有助于动物断奶过渡期,并因此被认为部分防止了断奶后采食量的减少<sup>[42, 43]</sup>。

### 1.3.3 抑制/减少病原体的生长

PWD的一些主要病原体是各种 ETEC 菌株,主要是那些表达 F4 和 F18 菌毛的菌株。因此,降低 PWD 的一个明显策略是降低这些细菌的水平。诸如添加有机酸、具有抗菌效果的植物成分、包括细菌素在内的抗微生物肽、单结构域抗体(纳米抗体)、噬菌体、益生菌、纤维的策略,以及降低胃/小肠腔 pH 的策略,例如发酵液体饲料和粗磨饲料,都可以抑制或降低 ETEC 的生长。这些策略中的一些已经用于养猪生产,其他的正在作为预防/治疗 PWD 的潜在候选策略进行研究。旨在最佳地获得抗菌效果意味着追求目标抗菌效果,即,意图是阻止 ETEC 的生长而不影响有益细菌的生长。这个原理在噬菌体的情况下是清楚的,因为噬菌体具有高度的特异性。另一个被认为重要的方面是该策略应该降低胃中已

经存在的 ETEC/大肠杆菌的水平。这背后的理论是胃可以充当屏障。因此，如果病原体在胃中被杀死，很少会进入小肠，否则它们可能会在小肠定居并导致疾病。同时，粪便中的病原体减少，从而减少了猪之间的病原体水平传播<sup>[44]</sup>。

### 1.3.4 促进有益细菌的生长并间接减少病原体

除了直接杀死特定病原体或抑制其生长之外，另一种减少病原体繁殖的策略是促进有益细菌的生长，从而通过几种可能的机制间接地减少或阻止病原体的生长。喂养益生菌、益生元和合生元是这一群体的一些策略。因此，要么通过饲料提供有益微生物本身(益生菌)，要么提供底物以刺激肠道中目标有益微生物的生长(益生元)。一旦有益微生物在肠道中增殖，它们减少/阻止病原体生长的技术被认为涉及以下一种或几种机制：(i) 通过产生发酵产物，例如乳酸，降低 pH 值；(ii) 竞争性排斥，即通过附着位点的物理阻碍来抑制病原体的附着；(iii) 抗菌物质如细菌素、过氧化氢、抗生素和有机酸的生产；(iv) 营养竞争；免疫反应的调节；(v) 肠毒素的灭活；(vi) 通过群体感应维持体内平衡。

### 1.3.5 免疫反应的调节/免疫保护的提供

在影响个体宿主患 PWD 病的风险中，一个被认为至关重要的因素是其免疫能力以及其如何受到断奶过程的影响。共生细菌的存在对免疫成熟有直接影响，并且微生物暴露影响大量免疫相关基因的表达<sup>[45]</sup>。因此，与断奶有关的非宿主因素，如影响肠道微生物群的营养和饲养环境，也可能影响免疫激活。据报道，断奶后厌食症方面的营养应激及其对肠道形态学的影响是断奶后即刻期间局部肠道炎症的主要原因<sup>[46]</sup>。此外，ETEC 分泌毒素并产生毒力因子，利用宿主细胞功能促进细菌定居。许多这些细菌蛋白破坏宿主细胞的炎症反应。这些机制包括有利于细菌存活和生长的促炎和抗炎反应<sup>[47]</sup>。可以预期几种添加剂、成分或策略通过调节免疫反应来发挥其有益作用，例如代乳品、益生菌、免疫球蛋白、疫苗、抗微生物肽、植物/植物提取物、藻类、氨基酸等。事实上，大多数策略都会直接或间接地对宿主的免疫反应产生影响。

## 1.4 猪肠道微生物群相关 ARGs 研究进展

与自然环境相比，与宿主相关的环境，尤其是肠道微生物群，无疑是一个更复杂的抗生素耐药库，因为肠道细菌更频繁地接触抗生素。与宿主相关耐药库中特别重要的一个是农场动物的肠道细菌。长期以来，抗生素广泛用于猪生长促进、疾病预防和治疗<sup>[48]</sup>。因此，

这些动物及其相关环境构成了一个巨大的 ARG 库。例如, 在包括粪便和堆肥在内的农场样本中, Zhu 等人使用定量 PCR 检测到 149 种独特的 ARGs, 其中前 63 种 ARGs 与各自的对照样本相比富集 192 倍 (中值) 至 28000 倍 (最大值)<sup>[49]</sup>。Xiao 等人<sup>[5]</sup>在 2016 年通过建立了猪肠道微生物组的参考基因目录。其中 ARGs 分析表明, 编码对杆菌肽、头孢菌素、大环内酯、链球菌素 B 和四环素耐药的 ARGs 在不同国家的猪中普遍存在, 国家特定的农场系统和抗生素使用策略明显影响猪肠道抗生素耐药性。此外, wang 等人<sup>[50]</sup>对中国工业化饲养场猪肠道微生物组和抗生素耐药性的表征, 结果显示工业化饲养场猪肠道菌群与人类肠道菌群之间的共享比例略高于基因参考目录与人类肠道菌群之间的共享比例 (基因组分别为 14.7%对 12.6%, 功能组分别为 94.1%对 87.7%)。此外, 猪, 人和小鼠的抗药性基因组均鉴定出大量的抗生素抗性蛋白 (n = 141), 表明抗药性基因水平转移的潜力。在猪和人共有的抗生素抗性蛋白中, 有 50 种蛋白与四环素抗性有关, 有 49 种与氨基糖苷抗性有关, 重要肠道菌群被认为与宿主的许多重要物理功能密切相关。最近, Li 等人<sup>[51]</sup>利用宏基因组学对 14 个大型 (每年 10,000 头) 集约化商业养猪场的抗生素耐药性进行了研究。结果在所有样本中鉴定出高丰度和多样化的 ARGs (609,966.8 个, 1433 种类型, 属于 38 种不同的抗生素类别), 包括那些编码对临床重要抗生素 (如 mcr、tetX、optrA、poxtA、qnr 和 blaCTX-M) 的耐药性的样本。大约 75%的 ARGs 由可移动的遗传元件 (主要是质粒) 携带, 这表明它们在接收环境中具有很高的传播潜力。宿主追踪分析确定梭状芽胞杆菌、粪杆菌和大肠杆菌是移动 ARGs 的主要细菌宿主。值得注意的是, 基因组分箱产生了 246 个高度完整的基因组草图。分箱基因组中多重抗性 (MDR) 基因的遗传背景分析显示插入序列(IS)、整合子和 SGI2 基因组岛的参与, 暗示它们在促进 MDR 细菌发育中的重要作用。此外, yang 等人<sup>[52]</sup>对从中国七个不同地区的 45 家猪场废水处理厂收集的水样中的细菌/噬菌体介导的抗生素抗性基因 (b/pARGs) 进行了监测。结果发现在所有水样中检出了 8 种主要类型的 b/pARGs, 其亚型为 112 种, 检出数量在 53 至 92 之间。MGEs, 细菌群落和环境因素是影响 b/pARGs 谱的重要因素。在这些因素中, 细菌群落是影响 bARGs 谱图的主要驱动力, 而细菌群落和 MGEs 是影响 pARGs 谱图的主要协同驱动力。

## 1.5 ARGs 基因内在和流动阻力

由于抗生素耐药性可分为内在耐药性和获得耐药性, 因此抗生素耐药性可相应地分为内在耐药和移动耐药。尽管在自然环境和宿主相关环境中发现了许多 ARGs, 但这些 ARGs

的实际风险被认为是高估的<sup>[53]</sup>。可通过水平基因转移 (HGT) 在细菌中传播的移动 ARGs 通常被认为具有更高的抗生素耐药性转移风险。内源性 ARGs 不仅是赋予耐药表型的抗生素决定因素, 而且参与与细菌生理学密切相关的复杂代谢网络<sup>[54]</sup>。更重要的是, 一种内在的 ARGs 在进化的某个阶段有可能被 MGE 捕获, 并成为一种易于传播的移动 ARGs。因此, 了解内在耐药性将有助于预测未来抗生素耐药性的出现和演变<sup>[55]</sup>。与相对固定的固有 ARGs 不同, 移动 ARGs 具有高度的可转移性。移动 ARGs 的转移主要由 MGE 介导, MGE 被视为细菌基因组创新和进化的主要贡献者<sup>[56, 57]</sup>。这些携带 ARGs 的 MGEs 包括质粒、转座子、整合子、整合结合元件、基因组岛和噬菌体。Hu 等人<sup>[58]</sup>在 23000 多个细菌基因组、约 980 万个和近 30 万个动物肠道细菌基因中展示了移动抗药性的概况。结果显示移动 ARGs 主要由四个细菌门 (变形杆菌门、厚壁菌门、拟杆菌门和放线菌门) 组成, 并且在变形杆菌中高度富集。含有 40 多种可移动 ARGs 的细菌均来自变形杆菌。此外, ARGs 转移在这个细菌门中是最活跃的。在物种层面上, 四环素抗性基因 tet (M) 和 tet (Q) 以及磺胺抗性基因 sul1 是广泛转移的 ARGs 的前三位, 而在属层面上是 tet (C)、tet (W) 和 sul1。此外, 近 70% 的已知移动 ARGs 与整合酶/重组酶和/或转座酶的迁移基因共存, 这些基因是 MGE 的关键组成部分, 这再次表明 MGE 在促进移动 ARGs 转移中发挥了作用。

## 1.6 噬菌体及相关移动元件介导 ARGs 转导

由于 HGT 对 ARGs 的转移起着关键作用, 影响 HGT 的因素无疑会影响细菌之间的 ARGs 交换。HGT 的机制主要包括转化、转导和偶联转移<sup>[57]</sup>。转化是指从环境中自然吸收和整合裸 DNA。这一过程取决于受体细菌的能力。转导通常由噬菌体感染介导, 将先前宿主的 DNA 带到新宿主。共轭转移是 DNA 通过载体 (如质粒、共轭转座子等) 的转移。

由于其显著的持久性, 噬菌体似乎是更不利的细胞外条件下的合适 DNA 载体。它们的存活能力, 加上多价噬菌体在不同细菌属中表现出广泛的感染性, 使得噬菌体特别适合于不同生物群落之间移动。噬菌体可以通过专门或普遍的转导来调动基因。专门转导仅涉及少数特定基因的转移, 而广义转导可动员细菌基因组的任何片段。一旦通过任一机制动员 ARGs 的噬菌体到达受体细菌, 细菌基因的存活取决于序列整合到细菌基因组中的能力。如果 ARGs 已被动员到专门的转导噬菌体中, 则噬菌体的完整基因组内容将包括一个整合酶基因, 这将增加成功整合的机会<sup>[57]</sup>。如果粒子不再是噬菌体, 而是源自广义转导的粒子, 那么 ARGs 的成功流行将需要重组 (同源、非法或位点特异性重组) 进入宿主染色体。编



码重组和整合酶的基因（例如来自残余前噬菌体的 Rec、重组酶或整合酶、转座酶或拓扑异构酶等）的存在将决定 ARGs 的获得频率<sup>[59, 60]</sup>。这种整合要求的一些例外情况可以在以环状或线性质粒形式存在的少数噬菌体（P1、N15、LE1、 $\phi$ 20 和  $\phi$ BB-1）中找到<sup>[61]</sup>。

## 1.7 由噬菌体或噬菌体相关元件组成的 MGE

### 1.7.1 质粒噬菌体

在铜绿假单胞菌中，亚胺培南、氨曲南和头孢他啶的转导由噬菌体 AP-1 和 AP-12 介导。此外，这些基因也可以通过缀合而动员，这表明环状复制形式并掺入缀合质粒中。目前尚不清楚在本研究中是否发现噬菌体处于质粒复制形式、噬菌体复制周期的中间质粒阶段，或者它们是否实际上面临 ICE 和广义转导事件。此外，来自肺炎克雷伯菌菌株 KP4aC 的质粒 pRYCE21 在 blaCTX-M-10 的上游含有一个新的噬菌体相关元件。这种噬菌体相关元件在肠杆菌科的不同产 blaCTX-M-10 菌株中是保守的<sup>[62]</sup>。

### 1.7.2 转座子噬菌体

伴放线放线杆菌 (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*) 含有一个具有四环素抗性的转座子和一个名为 Aa phi ST1 元件的温带噬菌体。这种噬菌体可以通过动员 Tn 元件来转导四环素抗性<sup>[63]</sup>。类似地，化脓性链球菌中编码大环内酯类抗性的基因 *mefA* 位于由转座子组成的 58.8 Kb 遗传元件中。转座子位于原噬菌体中<sup>[63]</sup>。同样在链球菌中，已在质粒或噬菌体中鉴定出含有 tet(M) 的 Tn916 样元件；但此外，最近在致病岛内报道了具有抗菌素耐药性的 Tn916 样元素的证据<sup>[64]</sup>。

### 1.7.3 GI 噬菌体

金黄色葡萄球菌噬菌体可以有效地包装各种细菌基因，MGE 也可以包装不同频率的葡萄球菌盒式染色体 *mec* (SCC*mec*)<sup>[65]</sup>。因此，作为需要在要动员的细胞之间紧密接触的元件的 GIs 也可以通过噬菌体或噬菌体样元件在没有细胞间接触的情况下转移。

### 1.7.4 基因转移因子(GTA)

GTA 是尾噬菌体样实体，能够包装和转移宿主基因组的随机片段 PMID:2355299。它们以类似于源自广义转导的噬菌体颗粒所经历的过程移动细菌 DNA。GTA 已在从海洋中分离的细菌物种中报道，并且通常在  $\alpha$ -变形菌中。

## 1.8 ARGs 传播现状

ARGs 在自然环境、动物和人类之间转移循环。先前的一项研究发现，包括 9 个基因家族的 40 多个独特的 ARGs 在人类和农场分离株之间转移<sup>[66]</sup>。在大规模细菌基因组数据挖掘分析中，ARGs 在动物和人类细菌之间交换最频繁，其次是动物和水生细菌之间，然后是动物和陆生细菌之间，强调了动物在传播 ARGs 中的作用<sup>[58]</sup>。其他研究还揭示了 ARGs 或携带 ARGs 的细菌从城市和医院废水到水生环境、粪便到土壤、食用动物和人类等的特定转移<sup>[67-70]</sup>。

ARGs 或携带 ARGs 的细菌的传播途径涉及不同方面，包括直接途径和间接途径，不同的部门和环境<sup>[71]</sup>。这些部门可能包括食用动物、水产养殖、工业和家用抗菌化学品、人类等，核心环境包括农场废水和粪便扩散、商业屠宰场/加工厂、河流和溪流、食品处理、制备和消费等。所有这些部门和环境都相互关联，有助于 ARGs 的传播。其中一个特别重要的途径是食物链传播途径。一方面，在食品生产过程中，抗菌剂可用于提高系统的效率，从而导致选择性压力，从而提高抵抗力<sup>[72]</sup>。另一方面，由于肉类、鱼类和蔬菜等食物的污染或准备不当，耐药性细菌可能会从农场转移到叉子。通过这种方式传播 ARGs 的典型例子可能是最近发现的 *mcr-1* 大肠杆菌素抗性基因。*mcr-1* 基因首先在动物和零售肉类中发现，然后在食物样本和人体肠道微生物组中发现，这表明了一个完整的食物链传播途径<sup>[73]</sup>（图 2）。

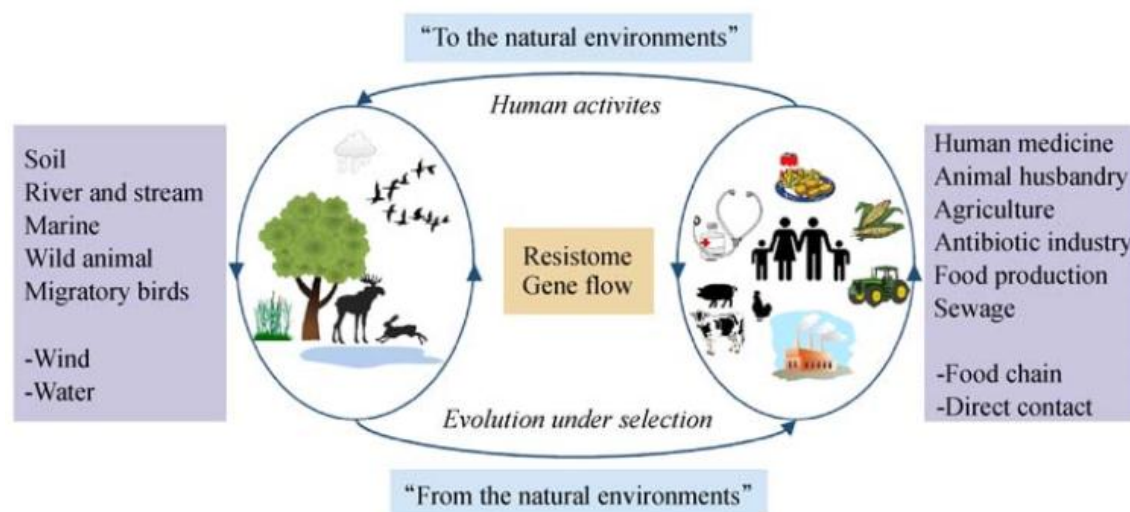


图 2 抗生素耐药基因在环境、人和动物中的流动<sup>[8]</sup>

Fig 2 The antibiotic resistome gene flow in environments, human and animals



## 第2章 哺乳动物肠道噬菌体组研究进展

肠道微生物组的研究是一个不断发展的研究领域，包括对大量微生物(细菌、古细菌、真菌和病毒)的综合分析。各种胃肠疾病都与肠道微生物群的不稳定性有关，但所有研究都集中在细菌群落对健康和疾病的重要性上。近年来，病毒宏基因组学领域取得了长足的进步。病毒的作用，特别是噬菌体，最近开始出现，并对宿主产生深远的影响。许多研究报告了不同疾病状态下病毒组的改变。绝大多数人类肠道病毒组由噬菌体组成，噬菌体是感染细菌的病毒。肠道细菌种群和噬菌体之间的动态关系受到环境因素的影响，环境因素也会影响宿主健康和疾病，因此，动物肠道噬菌体组的研究成为研究热点。

### 2.1 宏基因组学概述

宏基因组 (Metagenome)，也称微生物环境基因组或元基因组，即生境中全部微生物遗传物质的总和。它包含了可培养的和未可培养的微生物的基因，目前主要指环境样品中细菌、古菌和真菌的基因组总和。宏基因组学或元基因组学 (metagenomics) 是一种以环境样品中的微生物群体基因组为研究对象，以测序分析和功能基因筛选为研究手段，以微生物物种多样性、种群结构、功能活性、相互协作关系、进化关系及微生物与环境之间的关系为研究目的新的微生物研究方法<sup>[74]</sup>。先前利用宏基因组文库构建加上短序列测序的方法研究了酸性矿山废水生物膜上及 Sargasso 海洋中微生物群落的组成及功能构成<sup>[75]</sup>。但是研究存在很大的限制，例如宿主选择、载体插入片段长度以及基因在宿主菌中的表达能力等。随着二代测序平台例如 ABI 公司的 SOLID 测序仪、Roche 454 焦磷酸测序仪、HiSeq 测序仪以及 Illumina 的 MiSeq 的应用，给测序通量上的带来大幅提高<sup>[76]</sup>。此外，宏基因组测序避免了由体外扩增系统和遗传标记基因带来的偏差。对于低丰富度物种组成的生境进行大规模测序，使得群落中优势物种基因组的重建成为可能，同时基于极端生境中主要代谢网络的构建对于微生物生存机制也有所了解。

### 2.2 病毒宏基因组概述

病毒宏基因组又称宏病毒组 (Virome)，是在宏基因组学理论的基础上，结合现有的病毒分子生物学检测技术而兴起的一个新的学科分支。宏病毒组以样本中所有病毒的遗传物

质为研究对象，富集病毒颗粒后获取基因组序列信息，然后鉴定其中病毒组成和相对丰度<sup>[77]</sup>。宏病毒组是一种发现新病毒、病毒感染预警和控制的有力手段。在病毒的起源和进化模式、遗传多样性以及病毒和宿主的相互关系等研究领域都具有重要意义<sup>[78]</sup>。宏病毒组研究可应用于分析人体或动物血液、粪便、组织等样本中的病毒群落。然而，由于病毒基因组普遍较小，病毒核酸在样本中的相对含量非常低，宿主的基因组序列干扰严重，且已知病毒的数量和基因组信息有限等问题，使得宏病毒组研究从样本制备开始到数据分析都存在着一一定的困难。

## 2.3 人类肠道病毒组组成及影响因素

### 2.3.1 人类肠道病毒组组成

噬菌体是感染细菌的病毒，也是地球上最丰富和遗传多样性最丰富的生物实体<sup>[79]</sup>。几乎所有存在细菌的生态系统都含有噬菌体群落，包括复杂的肠道微生态系统。随着病毒宏基因组学的发展，肠道病毒群落被广泛关注，肠道噬菌体群落的真实面目逐渐被揭开。人类肠道病毒体由遍布胃肠道的所有病毒及其基因组组成。据估计，人类肠道在 1 克粪便中含有大约 35-2800 个活性细菌病毒<sup>[80, 81]</sup>。全球病毒组数据库表明，97.7% 的人类肠道病毒组是噬菌体，2.1% 是真核病毒，0.1% 是古细菌病毒，这些噬菌体中有 88% 尚未被国际病毒分类委员会分类<sup>[1]</sup>。人类肠道噬菌体主要由双链 DNA 噬菌体家族的肌尾噬菌体科 (*Myoviridae*)、长尾噬菌体科 (*Siphoviridae*) 和短尾噬菌体科 (*Podoviridae*)，以及属于单链 DNA 噬菌体家族的微小噬菌体科 (*Microviridae*) 组成<sup>[82]</sup>。个体具有独特的肠道噬菌体库，只含有几个共享的核心噬菌体<sup>[82, 83]</sup>。例如，在 2000 个地理上分散的病毒体中，69% 的病毒群体存在于少于 0.5% 的样品中，0.38% 的病毒群体存在于超过 20% 的样品中<sup>[84]</sup>。

### 2.3.1 影响肠道噬菌体组成的因素

影响肠道噬菌体组成的因素包括饮食、年龄、遗传因素和疾病状态。与正常饮食相比，饮食干预减少了无关个体中噬菌体的变异，并显著改变了病毒组的组成。有人认为遗传因素在噬菌体组成中起作用，因为同卵双胞胎比无关个体具有更多相似的病毒组。一项较早的研究发现，遗传相关性不会导致病毒组相似性，但该研究的结果在最近的一份出版物中被驳斥，该研究使用了更大的人类样本队列<sup>[85]</sup>。此外，肠道噬菌体组成随年龄的增长发生改变。婴儿中噬菌体的获得被认为是通过细菌介导的原噬菌体传播而发生的。新生儿在出

生后4天内没有肠道噬菌体,并在出生后一个月出现噬菌体肠道占据的迹象,这表明肠道噬菌体是在出生后获得的<sup>[86]</sup>。子宫内肠道噬菌体的缺乏反映了细菌宿主的缺乏,因为微生物群被广泛认为是在出生期间和出生后获得的<sup>[87]</sup>。饮食和分娩方式等因素会影响婴儿肠道的噬菌体组成。与配方奶粉喂养的婴儿相比,母乳喂养的婴儿体内细菌种类及其相应的前噬菌体过多<sup>[86]</sup>。此外,来自婴儿粪便的噬菌体与来自其相应母亲的乳汁微生物群结合,平均30%的噬菌体存在于婴儿粪便和母乳中<sup>[88]</sup>。新生病毒体主要由温和的噬菌体组成,并且随着时间的推移变得更具毒性<sup>[89]</sup>。从新生儿肠道细菌中分离的前噬菌体显示出与婴儿噬菌体的高度相似性,并且在新生儿肠道细菌丰度和病毒体中该细菌前噬菌体的丰度之间具有很强的正相关性<sup>[86]</sup>。最近研究表明肠道病毒组的多样性是年龄依赖性的,肠道噬菌体丰富度在婴儿期增加,在青春期减少,在成年期达到高丰度,而在老年人中丰度下降。婴儿病毒组组成是暂时的,随着时间的推移,*Microviridae*和*Siphoviridae*的丰度增加,而*Siphoviridae*的丰度减少。成人病毒组的特点是具有高水平的*Podoviridae*、*Microviridae*和*Siphoviridae*。而*Podoviridae*和*Microviridae*在老年人中的丰度仍然很高<sup>[84]</sup>。

目前,研究表明肠道噬菌体与炎症性肠病(IBD),2型糖尿病(T<sub>2</sub>D)以及肝病等多种人类疾病密切相关<sup>[13, 16, 90]</sup>。患有IBD个体中*Caudovirales*的丰度增加,而*Microviridae*的丰度降低,表明疾病与*Caudovirales*噬菌体的扩增有关。被鉴定为与克罗恩病唯一相关的噬菌体与乳酸杆菌、梭菌、肠球菌和链球菌噬菌体密切相关,而在溃疡性结肠炎患者中未观察到这些噬菌体,这突出表明特定的噬菌体与不同的疾病相关<sup>[13]</sup>。Ma等人<sup>[16]</sup>通过对细菌属和pOTU的共现/排除分析,揭示了细菌和噬菌体之间复杂的核心相互作用,而不是特定于其细菌宿主的噬菌体的相互关系。并表明噬菌体中与T<sub>2</sub>D相关的变化不能简单地解释为与其改变的细菌宿主的共变。除了主要和高度特异性的细菌-噬菌体相互作用外,其他机制可能会控制肠道生态系统中的噬菌体。此外,与无酒精使用障碍的对照组相比,在酒精性肝炎患者粪便样本中观察到病毒多样性的增加。在这些患者中,埃希菌属、肠杆菌和肠球菌噬菌体的比例过高,而葡萄球菌属噬菌体丰度的增加与疾病的严重程度高度相关。有趣的是,重症非酒精性脂肪肝患者肠道病毒多样性更低,与其他肠道病毒相比,噬菌体比例显著降低<sup>[90]</sup>。

## 2.4 肠道噬菌体-细菌相互作用

### 2.4.1 噬菌体复制策略

噬菌体分为温和（溶原）噬菌体或烈性（非溶原）噬菌体。温和噬菌体通过整合到细菌染色体中作为原噬菌体或作为染色体外附加体<sup>[91]</sup>。稳定维持的染色体原噬菌体在宿主群体中垂直传递。响应宿主细胞应激或其他刺激，前噬菌体被诱导并进入裂解性复制循环，在细胞裂解后释放感染性病毒体(图 3a)。一些噬菌体不形成稳定的溶源，并严格通过裂解循环复制。烈性噬菌体通常是寄生的，并在宿主细菌群体中水平传播(图 3b)。一些噬菌体，如丝状病毒，不需要宿主细胞裂解来释放感染性病毒体，并可随着病毒颗粒从细胞包膜的持续挤出而建立慢性感染<sup>[92]</sup> (图 3c 和 d)。

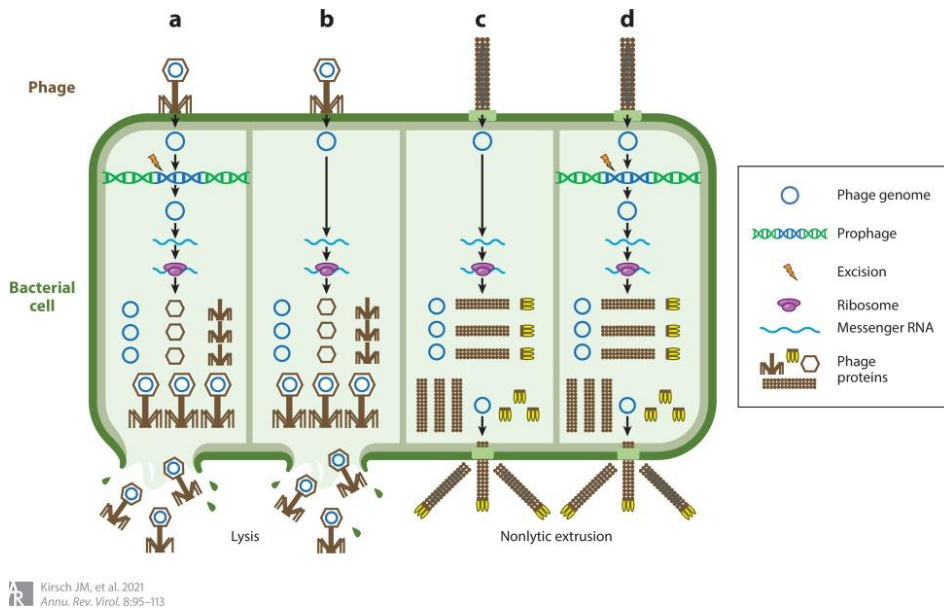


图 3. 噬菌体复制策略<sup>[93]</sup>

Fig 3 Phage replication strategy

### 2.4.2 肠道噬菌体通过肠道菌群调节对宿主的影响

肠道微生物栖息地是由复杂的肠道宏观解剖和微观解剖形成的。细菌可以充分利用这种解剖结构，在粘蛋白中寻找躲避噬菌体攻击的避难所。噬菌体也可以利用粘蛋白的粘附作用防止其被清除。人类微生物群中的数百种细菌在肠腔和粘膜表面占据不同的生态位，在几个营养水平上形成复杂的拮抗和交叉摄食网络，为烈性和温和噬菌体提供完美的环境。

肠道微生物群和肠道结构的复杂性代表多种生物和非生物选择力，塑造分类组成并指导物种的短期和长期进化，这种组合似乎有利于噬菌体和细菌宿主之间更复杂的生态和进化动力学类型。对噬菌体如何调节肠道细菌进行更深入的了解将有助于设计有效的靶向噬菌体疗法。

#### 2.4.2.1 噬菌体介导的肠道微生物群调节

噬菌体通过对肠道微生物组组成、结构和功能的贡献间接影响人类健康和疾病。肠道病毒体的改变与 IBD 患者的细菌生态失调和肠道炎症相关:克罗恩病或溃疡性结肠炎<sup>[13]</sup>。在 IBD 患者中也发现了 *Caudovirales* 噬菌体丰度增加的结果，尽管导致每种疾病微生物组变化的病毒不同，这表明每种疾病都有特定的病毒组特征。此外，移植来自 UC 患者的噬菌体改变了肠道微生物群的组成，并增加了人类微生物群相关小鼠的结肠炎严重程度<sup>[94]</sup>。除了裂解宿主细菌外，烈性噬菌体还可以直接或间接塑造非宿主细菌群落。例如，烈性粪肠球菌噬菌体在感染时可通过诱导粪肠球菌 VII 型分泌系统抑制非宿主细菌<sup>[95]</sup>。此外，烈性噬菌体可以通过级联效应引起肠道细菌的转移，其中噬菌体诱导的细菌调节影响肠道代谢组，减少神经递质的产生并改变胆汁酸代谢<sup>[96]</sup>。

IBD 患者体内的常见细菌，如 *Faecalibacterium prausnitzii*，通常会耗尽<sup>[97]</sup>。先前的研究报告，与健康对照组相比，IBD 患者粪便样本中的 *P.prausnitzii* 噬菌体的丰度或流行率有所增加，这表明温和的噬菌体介导的细菌杀灭会加剧肠道炎症并促进生物失调。与 IBD 患者的病毒组变化相比，IBD 患者的噬菌体  $\alpha$  多样性显著低于健康对照组<sup>[98]</sup>。然而，正如 IBD 中所描述的那样，这在核心噬菌体生命周期没有从溶原性转变为裂解性的情况下发生，其中个体特异性向诱导的温和噬菌体转变取代了健康的核心病毒组，其诱导可能是由于与炎症肠道相关的环境应激因素<sup>[99]</sup>。此外，肠道炎症和肠道疾病被显示为触发鼠伤寒沙门氏菌 (S.Tm) 原噬菌体 SopE $\Phi$  的诱导<sup>[100]</sup>。这是由炎症引发的细菌应激反应的结果，这促进了原噬菌体的诱导，导致细菌溶解和生物失调的增加。

#### 2.4.2.2 肠道噬菌体对远端器官疾病的影响

一些肠道病毒可以通过多种途径到达远处的器官<sup>[101]</sup>。肠道噬菌体能够粘附到粘膜表面并通过特异性摄取穿过上皮细胞，其中病毒被上皮细胞受体识别，这允许它们交叉和迁移到体内，或非特异性转胞作用。噬菌体可以遍布人体，到达血液和淋巴，以及肝脏、肾脏、肺部、尿道等主要器官，甚至大脑。在淋巴系统中，噬菌体与巨噬细胞和循环树突状细胞相互作用，从而触发体液免疫反应并刺激细胞因子的产生 (图 4)。此外，在循环中的细胞



外细菌膜泡内发现噬菌体 DNA，这表明噬菌体在肠道外运输和传播的另一种途径。

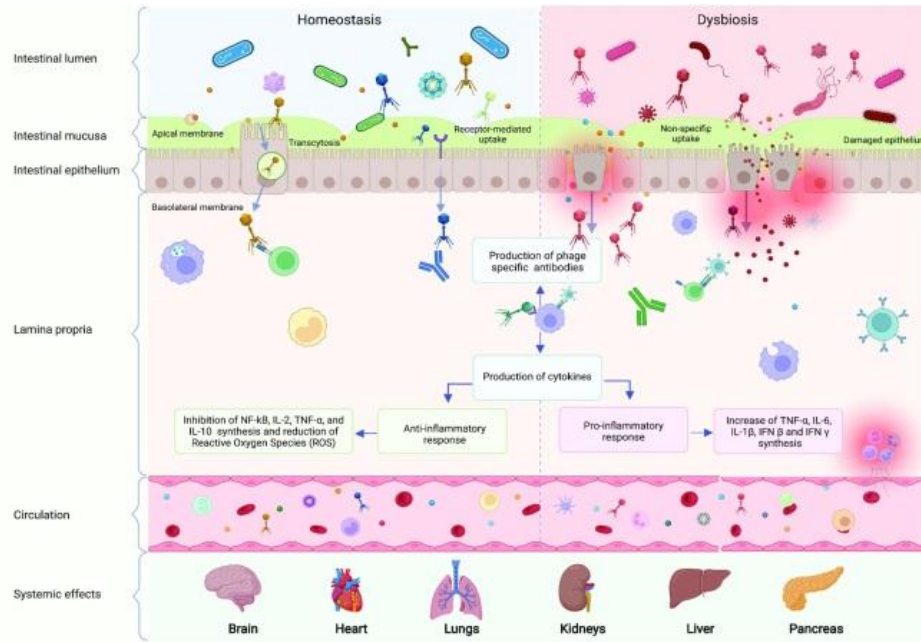


图 4 噬菌体与免疫系统在稳态中的直接相互作用<sup>[101]</sup>

Fig 4 Direct interaction between phage and immune system in steady-state

肠道噬菌体组成的变化和肠道致病生物及其感染噬菌体丰度的增加会影响远处器官疾病的发展,包括肺动脉高压<sup>[102]</sup>、帕金森氏病<sup>[103]</sup>、非酒精性脂肪肝疾病<sup>[104]</sup>、1型糖尿病(T<sub>1</sub>D)<sup>[105]</sup>和2型糖尿病(T<sub>2</sub>D)<sup>[16]</sup>。肠道通透性增加可由噬菌体诱导的微生物群改变引起,并可引发或加剧远处器官的疾病<sup>[103]</sup>。肠道噬菌体也能对远处的器官产生积极影响。人类中 *Caudovirales*, 特别是 *Siphoviridae* 病毒家族的水平增加与言语记忆和执行过程功能的改善有关,而 *Microviridae* 水平增加的受试者表现出执行能力受损。相比之下,来自人类供体的富含 *Siphoviridae* 的微生物群移植提高了小鼠和果蝇的记忆功能<sup>[14]</sup>,增加了肠道噬菌体对远处器官的积极作用。温和性大肠杆菌噬菌体对 T<sub>1</sub>D 等自身免疫反应具有保护作用,在 T<sub>1</sub>D 中,它们降低大肠杆菌的丰度并诱导细菌类淀粉,后者可作为浆细胞样树突状细胞的抗原并引发疾病进展。这些例子证实了肠道噬菌体在调节远处器官疾病进展中的重要作用。为了评估噬菌体在远处疾病发病机制中的确切作用,还需要进一步的研究。

### 2.4.3 噬菌体通过水平基因转移影响肠道菌群

噬菌体通过捕食和水平基因转移调节大多数生态系统中的细菌群落结构。它们有助于宿主毒力、定殖、复制和传播。通过噬菌体介导的 HGT,噬菌体为其宿主提供在之前感染

期间获得的功能基因，并为其宿主带来适应性优势<sup>[106, 107]</sup>。

#### 2.4.3.1 噬菌体对肠道细菌毒力的影响

噬菌体在细菌进化中起着重要作用，并表现出病毒性，这受细菌刚性、噬菌体能力和其他环境条件的影响。由于细菌群落内的横向基因转移，噬菌体感染可能对细菌有害或有益，噬菌体可以编码在许多细菌的致病性中起重要作用的毒素基因。STEC 是一种临床上重要的食源性病原体，它会产生溶血性尿毒症综合征等并发症，严重时可能致命，这是由于噬菌体编码的志贺毒素基因的作用<sup>[108]</sup>。抗生素的使用可诱导前噬菌体的裂解周期，这最终可导致受感染个体的致命发病率。在金黄色葡萄球菌和霍乱弧菌等细菌中观察到类似的毒素产生机制，它们分别带有毒性休克综合征毒素和副霍乱外毒素。噬菌体也可以编码宿主细菌细胞内的毒力因子，例如，温和噬菌体 Sopφ 编码 sopE 效应蛋白的产生促进了沙门氏菌物种进入宿主肠上皮。噬菌体也可以直接通过病毒颗粒结构(例如，与噬菌体紧密结合的透明质酸酶)直接增加细菌的致病性，或通过复制和转录噬菌体编码的基因，如白喉棒状杆菌产生的白喉毒素。此外，噬菌体可以通过编码作为疾病因子的基因来促进细菌的致病性。据报道，噬菌体通过介导囊性纤维化患者体内铜绿假单胞菌和大肠杆菌等细菌的生物膜形成，从而增加对抗生素和脱水的粘附力和抵抗力，从而促进疾病的发生<sup>[109]</sup>。

#### 2.4.3.2 噬菌体对肠道细菌耐药性的影响

噬菌体可以介导编码抗生素耐药基因的转移。例如，Marta 等人<sup>[110]</sup>报道，金黄色葡萄球菌噬菌体中的 β-内酰胺酶基因 blaTEM 和 blaCTX-M9 可以侧向转移到环境分离物中，从而赋予新的金黄色葡萄球菌菌株对氨苄青霉素的耐药性。温和噬菌体被认为是伤寒沙门氏菌菌株中多抗生素耐药基因转导的主要载体<sup>[110]</sup>。一项关于动物模型中抗生素诱导应激后病毒体在细菌适应中作用的研究表明，在抗生素处理后噬菌体基因经历了强大的富集。这样的基因富集可以促进噬菌体对给药药物产生相应耐药基因，并随后将其转移到细菌群落，从而作为耐药菌株的储存库<sup>[111]</sup>。

#### 2.4.4 噬菌体和免疫系统之间的相互作用

噬菌体是病毒组的重要组成部分，在塑造和调节哺乳动物免疫方面具有巨大潜力。纯化的金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌噬菌体与外周血单核细胞体外孵育可诱导免疫反应，如增加 IL-1、IL-6 和肿瘤坏死因子 (TNF) 的转录<sup>[112]</sup>。用纯化的和不含脂多糖 (LPS) 的大肠杆菌噬菌体对无菌小鼠进行口服治疗，导致治疗小鼠的 Peyer 斑中产生 IFN-γ 的 CD4<sup>+</sup>T

细胞和 CD8<sup>+</sup>T 细胞的扩增<sup>[113]</sup>。M13 噬菌体可触发干扰素产生并保护小鼠免受痘苗病毒引起的尾部损伤，乳杆菌、大肠杆菌和拟杆菌噬菌体能够通过 toll 样受体 9 (TLR9) 依赖性途径激活 IFN- $\gamma$ ，从而加剧结肠炎<sup>[113]</sup>。尽管如此，噬菌体是弱免疫调节剂，它们通常具有较差的促炎作用。对 T4 噬菌体对免疫系统影响的研究表明，当用低内毒素水平的纯化噬菌体处理细胞时，LPS 诱导的外周血多形核白细胞响应细菌感染产生的活性氧 (ROS) 减少<sup>[114]</sup>。此外，噬菌体能够通过抑制核转录因子 NF- $\kappa$ B 对病毒攻击的反应来抑制人 T 细胞的活化和增殖，并在培养基中存在时阻断其他致病性病毒感染<sup>[115]</sup>。因此噬菌体是双重免疫调节剂，它们可以触发预防免疫和抗炎免疫途径，这进一步巩固了它们作为疾病发展调节剂的作用，无论是通过它们对微生物组的调节还是通过刺激免疫反应，其程度尚不清楚，需要进一步研究。

## 2.5 猪肠道病毒组研究进展

经过查阅相关文献，迄今为止，有关猪肠道病毒组的研究很少，猪肠道噬菌体组相关的研究报道更是屈指可数。

Allen 等人研究了饲喂抗生素对猪肠道菌群及肠道噬菌体的影响。2011 年的一项研究<sup>[116]</sup>表明抗生素不会引起猪肠道噬菌体和细菌群落的显著转移。该研究在病毒体中鉴定出了 ARGs，例如多药耐药性外排泵基因，但饲料中的抗生素并未引起其丰度的显著变化。载药猪病毒中的噬菌体整合酶编码基因的丰度显著高于未载药猪病毒中的噬菌体整合酶编码基因，表明用抗生素治疗诱导了原噬菌体。对噬菌体种群动态进行观察发现，当链球菌噬菌体（捕食者）富集时，链球菌细菌（猎物）的相对丰度下降，支持了猪粪微生物组中种群动态的“杀死者”生态模型。总之，该研究数据表明了猪肠道生态系统动力学受到噬菌体的影响，而噬菌体的诱导是饲料中抗生素的附带作用。

随后，Allen 等人<sup>[117]</sup>在 2017 年使用宏基因组学评估了饲料中的抗生素对猪肠道微生物基因表达（粪便宏转录组）和噬菌体种群动态（粪便 dsDNA 病毒组）的体内纵向影响。通过使用 FIG fam（等功能同源序列）和 SEED 子系统数据库，对微生物宏基因组、转录组和病毒组序列进行了注释，以用于分类推断和基因功能。当比较微生物 FIG fam 注释的  $\beta$  多样性时，在引入抗生素后 2 天，对照和抗生素群落是不同的。这种效应是由与微生物呼吸、碳水化合物利用和 RNA 代谢相关的与抗生素相关 FIG fams 的低表达驱动的。有趣的是，在引入卡巴多后 2 天，抗生素治疗导致与噬菌体裂解周期的所有阶段相关的 FIG fams

的更大表达,表明抗生素介导前噬菌体诱导和噬菌体 DNA 重组。该研究在病毒组中发现一些编码对四环素、氨基糖苷和  $\beta$ -内酰胺类抗生素耐药的基因,但这些基因的频率不会随着时间或治疗而改变。总之,该研究结果表明,抗生素导致猪肠道细菌群落中的细菌生长和代谢、原噬菌体诱导和细菌适应性基因的潜在转导减少。

最近, Tao 等人<sup>[118]</sup>对腹泻早期断奶仔猪粪便中 DNA 和 RNA 病毒组进行了研究。对于 DNA 病毒,腹泻早期断奶仔猪在科和种水平上的丰富度指数显著高于健康仔猪,而两组仔猪的丰富度指数在门、纲、目和属水平上没有显著差异。此外,早期断奶健康仔猪和腹泻仔猪的 Shannon 和 Simpson 指数在任何生物学分类水平上没有差异。对于 RNA 病毒,腹泻早期断奶仔猪的丰富度指数在属和种水平上显著大于健康仔猪,而两组仔猪的丰富度指数在门、纲、目和科水平上没有显著差异。与早期断奶的健康仔猪相比,患有腹泻的仔猪在门、纲、目、科和属水平上的香农指数显著更高,而在物种水平上没有变化。此外, Simpson 指数在门和科水平上在患有腹泻的早期断奶仔猪中显著增加,而在其他生物分类水平上没有变化。健康和腹泻早期断奶仔猪粪便中 DNA 病毒和 RNA 病毒特征在所有生物分类水平上没有显著差异。对于门水平的 DNA 病毒, *Uroviricota*、*Nucleocytoviricota* 和 *Peploviricota* 是健康仔猪粪便中的主要病毒,而 *Uroviricota*、*Nucleocytoviricota* 和 *Negarnaviricota* 是腹泻仔猪粪便中的主要病毒。在目水平层面上,健康仔猪粪便中的主要病毒是 *Caudovirales*、*Algavirales* 和 *Herpesvirales*, 而腹泻仔猪粪便中主要病毒是 *Caudovirales*、*Pimascovirales* 和 *Imintervirales*。在科水平层面上, *Siphoviridae*、*Podoviridae* 和 *Myoviridae* 是健康和腹泻仔猪粪便中的主要病毒。在物种层面上,埃希氏菌属噬菌体 FV3、crAss 噬菌体 cr116\_1 和粪杆菌噬菌体 FP\_oengus 是健康仔猪粪便中的主要病毒,而埃希氏菌属噬菌体 FV3、噬菌体 cr116\_1 和噬菌体 cr8\_1 是腹泻仔猪粪便中的主要病毒,表明无论是健康还是腹泻仔猪,粪便病毒组中均含有大量噬菌体组成分。



## 第3章 猪链球菌及其噬菌体裂解酶研究进展

抗生素耐药性病原体越来越普遍,传统抗生素不再是处理多重耐药微生物的可行选择,新候选抗生素的减少以及抗生素耐药性的增加使得开发替代抗生素成为必要。噬菌体编码的裂解酶是一类肽聚糖水解酶,已被提议用于填补这种抗菌空白。近年来,这些裂解酶因其特异性、作用方式、工程潜力和缺乏抗性机制而受到科学界的广泛关注。靶向链球菌属的细胞裂解酶可能是下一个用于开发的路线。

### 3.1 猪链球菌概述

猪链球菌是一种人畜共患病原体,可导致猪和人的败血症和脑膜炎。此外,猪链球菌感染是造成生猪养殖业遭受巨大经济损失的重要原因。由于缺乏有效的疫苗来预防这种疾病,促使全世界广泛使用抗生素。随后引起抗生素耐药性的出现,并在全球蔓延。猪链球菌耐药性的遗传来源是多种多样的,包括靶修饰酶和抗生素灭活酶的产生以及抗生素靶点的突变。猪链球菌基因组包含水平基因转移的特征。许多可移动的基因元件携带了多种赋予抗生素耐药性的基因以及自主 DNA 转移的基因。因此,猪链球菌可以迅速获得多重耐药性。此外,猪链球菌在宿主组织上形成微菌落,这些微生物通过多种机制产生对抗生素的耐受性,并有利于遗传物质的交换。因此,迫切需要替代目前使用的抗生素。深入了解猪链球菌对抗生素产生耐药性或耐受性的机制可能有助于开发新的抗微生物分子或组合来对抗这些感染。

### 3.2 猪链球菌的危害

#### 3.2.1 人畜共患病原体

猪链球菌作为正常微生物群的一部分,无症状定居于猪的上呼吸道,即扁桃体、鼻腔、肠道和生殖器。仔猪可以通过水平和垂直传播进行定植,分别由产仔期间的鼻-鼻接触和鼻-阴道接触引起,定植率可达 100%。然而,当猪链球菌穿透粘膜屏障并进入血液、关节和中枢神经系统时,它可能会导致疾病的发生,如菌血症、心内膜炎、关节炎、肺炎,甚至猝死<sup>[119]</sup>。上皮粘膜的渗透和先天免疫防御的逃避是入侵的重要步骤。为此,猪链球菌会产

生多种毒力因子, 包括蛋白酶、DNase 等酶和毒素, 这些都有助于宿主免疫系统的逃避和宿主体内的营养获取。在入侵过程中, 猪链球菌还可以利用呼吸道病毒感染(特别是猪流感病毒和猪繁殖与呼吸综合征病毒)对黏膜免疫的抑制。因此, 猪链球菌被认为是一种致病生物<sup>[120]</sup>。由猪链球菌感染引起的链球菌性猪病是全球猪养殖业死亡和经济损失的主要原因。据估计, 发病率在 5%至 20%之间, 但这在地区和农场之间有很大差异。值得注意的是, 该病是 4 至 12 周龄仔猪死亡的主要原因, 但也可能影响年轻和年长的猪。大约 70% 的感染到达神经系统的病例以死亡告终。大部分经济损失归因于死亡率、生猪管理和控制感染的努力, 但这种疾病也会减少体重增加并提高生产成本。

### 3.2.2 猪链球菌对 ARGs 的储存和转移

猪链球菌被认为是 ARGs 的重要储存库, 这些基因在猪链球菌复制克隆中共享, 也可以通过 HGT 转移到其他细菌物种<sup>[121, 122]</sup>。猪链球菌更喜欢通过 MGE 分享其 ARGs。最近的一项研究表明, 来自于 26 种不同血清型的耐药猪链球菌分离株的 214 个基因组中鉴定的所有 ARGs 都位于 MGEs<sup>[123]</sup>。

### 3.2.3 猪链球菌生物膜在耐药性和微生物持久性中的作用

生物膜的形成增加了细菌对抗生素的耐受性和耐药性。生物膜的这一特征是由几种机制引起的, 这些机制在细菌种类之间甚至在菌株之间有所不同, 最终取决于生物膜形成的动力学, 生物膜结构以及胞外基质组成<sup>[124]</sup>。

#### 3.2.3.1 生物膜介导抗生素耐受性

生物膜的形成是通过浮游细菌与基质的结合而开始的, 这是一种由从细胞表面突出的长附件(包括鞭毛、菌毛或菌毛)介导的活动。猪链球菌可以产生丰富而灵活的菌毛, 但它们不产生鞭毛。在建立与基质的结合后, 较短的表面暴露结构, 如纤维蛋白原结合蛋白, 建立额外的接触并稳定结合。这些蛋白质含有介导粘附到不同宿主结构或促进细菌间相互作用的特定基序<sup>[125]</sup>。然而, 在许多细菌中, 细胞表面暴露的蛋白质与基质或胞外基质的结合可以被胶囊阻断, 猪链球菌也证明了这一点<sup>[126]</sup>。因此, 囊膜的丢失增强了生物膜的形成, 从而增强了抗生素耐受性。在与基质建立密切接触后, 细菌增殖形成微菌落, 即源自同一亲代细胞的细菌的小聚集体, 并分泌胞外基质, 以稳定细胞间和细胞间基质的相互作用。微殖民地可以相互作用形成大殖民地。最后, 基质上生物量的空间组织定义了生物膜结构, 生物膜结构在生物膜发育过程中发生变化。一般来说, 成熟的生物膜比年轻的生物膜更耐

抗生素<sup>[127]</sup>，因此，对抗生素的耐受水平根据生物膜动力学而变化。

对非生物表面上形成的猪链球菌生物膜的电子显微镜检查显示，不同大小的相互连接的聚集体之间具有明确的介入空间<sup>[126, 128]</sup>。这些空间可以构成生物膜群落内分子和资源交换的通道。生物量的这种组织产生分散梯度，影响抗生素在生物膜内的分布。与位于生物膜上层的细胞相比，集群内的细胞暴露于较低的抗生素浓度。分散梯度也限制了细菌营养物质和氧气的可用性，并在深层产生过量的废物。这会导致饥饿和缺氧，迫使细菌减缓新陈代谢和生长，从而进入静止状态<sup>[129]</sup>。静止状态的细菌对抗生素不太敏感，因为抗生素针对的关键过程被阻止了。因此，抗生素与其靶标的结合不会产生杀菌活性<sup>[130]</sup>。

此外，胞外基质成分影响抗生素疗效。胞外基质可能含有细胞外多糖、DNA 和 RNA、蛋白质、膜囊泡和细胞碎片。胞外基质成分可以与某些抗生素相互作用，从而影响抗生素的有效性。胞外多糖是多种细菌胞外基质的相关成分。它们的性质是多样的，包括直链或支链多糖，不同的细菌种类也不同。值得注意的是，胞外基质中存在的非结构化多糖，即粘液，会强烈影响生物膜对抗生素的耐受性。除了胞外多糖外，eDNA 是许多细菌胞外基质的相关成分，它肯定比胞外多糖类更保守。eDNA 通过参与与基质的粘附和生物膜的结构完整性，在促进和调节生物膜发育方面发挥着重要作用。此外，eDNA 可以增强对抗生素的耐药性。在表皮葡萄球菌中，eDNA 将万古霉素的耐受性提高约 100 倍<sup>[131]</sup>。据报道，几种致病性链球菌的生物膜胞外基质中存在 eDNA，包括肺炎链球菌、变异链球菌和中间链球菌。对于猪链球菌，只有中性粒细胞存在时形成的生物膜对 DNase 敏感<sup>[132]</sup>。

### 3.2.3.2 生物膜介导 ARGs 转移

生物膜的形成极大地增强了 HGT，从而增强了抗性基因的转移。这是由几种机制造成的。首先，生物膜可以由多种细菌形成，这些细菌建立了紧密的联系。猪链球菌可以与其他物种形成混合生物膜，这种混合生物膜增加了两种物种中毒力因子的表达，增强了抗生素耐药性。其次，生物膜中细胞流动性降低和细菌密度高有利于细菌间的相互作用。这促进了猪链球菌广泛用于基因转移的接合过程。携带编码四环素抗性基因的 Tn916 家族的共轭转座子被证明在口腔细菌的多相生物膜内转移<sup>[133]</sup>。此外，eDNA 和细胞外小泡的存在促进了转化过程。在猪链球菌中已经证实了转化和细胞外小泡的存在。这可能有助于突变等位基因的分散，如 DNA 回旋酶和 PBPs 等位基因，或编码抗生素降解酶的基因。



### 3.3 猪链球菌的预防和治疗

抗生素曾被用于预防猪链球菌病例，并且用于治疗猪链球菌感染的抗生素是多种多样的，它们来自不同的类别，包括  $\beta$ -内酰胺类、氨基糖苷类（通常与  $\beta$ -内酰胺类结合使用）、安非尼可和氟喹诺酮类。不同国家、地区甚至农场的抗生素使用模式各不相同，这在很大程度上影响了猪链球菌的耐药性<sup>[134]</sup>。在上个世纪 80 年代左右首次报告了猪链球菌的 AMR，此后，全球范围内的 AMR 率随着时间的推移而增加。猪链球菌对抗生素的耐药性成为一个世界性的问题，尤其是四环素类、大环内酯类和林可酰胺类抗生素的耐药率非常高。相比之下， $\beta$ -内酰胺类、氟喹诺酮类和安非尼可类药物的耐药率仍然很低，但最近的报告表明耐药率呈上升趋势。这与多药耐药性的发生有关，即同时对至少三种不同类别的抗菌药物产生耐药性，并随着时间的推移而增加。令人担忧的是，据 Hoa 等人报道，已经从患病人群中回收了多药耐药菌株<sup>[135]</sup>。他们在猪链球菌感染患者中显示出对四环素、红霉素和氯霉素的多药耐药，多药耐药率从 1999 年的 6% 显著增加到 2006 年和 2007 年的 23%。这些数据表明，猪链球菌是一种全球传播的超级细菌。因此，现在许多国家禁止使用抗生素治疗猪链球菌感染。

此外，疫苗接种用于预防猪链球菌感染，但其效果有限。只有疫苗用于仔猪或母猪的免疫接种。细菌是从某些农场收集的入侵克隆中制备的完全杀灭细菌的悬浮液。细菌提供的保护是菌株特异性的，通常是不可预测的<sup>[136]</sup>。与疫苗相关的主要缺点是：(i) 猪链球菌产生的抗原的高度多样性；(ii) 表面暴露结构的抗原性变异性，以及 (iii) 在疫苗产生所需的细胞灭活过程中许多抗原的三级结构丢失。因此，疫苗并不是万能的，在预防猪链球菌暴发方面效果有限。在这种情况下，该疾病的治疗主要基于抗生素疗法和使用疫苗以避免疾病扩大，而预防仅限于管理环境条件，尤其是受某些克隆影响的农场，仅限于使用疫苗。由于缺乏有效和通用的疫苗配方来预防或减少猪链球菌感染的出现，以及感染的高发病率和高死亡率，导致长期以来抗生素的大量使用。此外，猪链球菌作为一种共生细菌，暴露于促进生长、预防和治疗其他传染病的抗生素。所有因素共同为抗药性猪链球菌分离株的出现创造了良好的前景。

### 3.4 噬菌体裂解酶研究进展

新抗生素候选物的减少加上抗生素耐药性的增加使得开发替代性抗菌剂成为必要。噬

菌体编码的裂解酶被提出来填充这种抗菌空隙。在过去的 20 年里,关于裂解酶的发现、结构/功能、工程、免疫原性、毒性/安全性和动物模型中的功效的研究急剧扩展。

### 3.4.1 噬菌体裂解酶概述

噬菌体裂解酶(Lysin, 又被称为 endolysins 和 virolysin), 是噬菌体感染细菌后期由噬菌体基因编码合成的一种细胞壁水解酶。裂解酶能够靶标性的作用于细菌细胞壁的肽聚糖, 引起肽聚糖裂解从而使细菌细胞壁破裂从而导致细菌死亡<sup>[137]</sup>。由于革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌在细胞壁结构存在差异, 为适应不同的受体, 裂解酶进化出针对不同种细菌的不同结构<sup>[138]</sup>。

### 3.4.2 裂解酶结构

目前研究较多的是革兰氏阳性菌的噬菌体裂解酶。革兰氏阳性菌噬菌体编码的裂解酶具有模块化结构, 通常包含 N-末端酶活性结构域(Catalytic domain, CD), 通过柔性接头序列连接到 C-末端细胞壁结合结构域(CBD)。这种排列可以有变化或含有多个 CD(图 5)<sup>[139]</sup>。CD 在进化上是保守的, 负责酶的溶解活性。根据肽聚糖内被切割的特定键, 裂解酶的 CDs 可以被组织成不同的机制组: N-乙酰胞壁酰胺酶(N-acetylmuramidases), N-乙酰基-β-D-氨基葡萄糖苷酶(N-acetyl-β-D-glucosaminidases), N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸酰胺酶(N-acetylmuramoyl-L-alanine amidases), 或者内肽酶类(endopeptidases)。相反, CBD 在进化上是可变的, 它通过与特定细胞壁相关表位的可逆结合, 负责将裂解酶引导至其底物, 该表位通常是细胞裂解酶的一种组分。对磷壁酸或其他表面碳水化合物有效的切割需要 CBD 与其独特的细胞壁配体结合, 从而赋予物种、菌株或血清型对裂解酶的特异性。

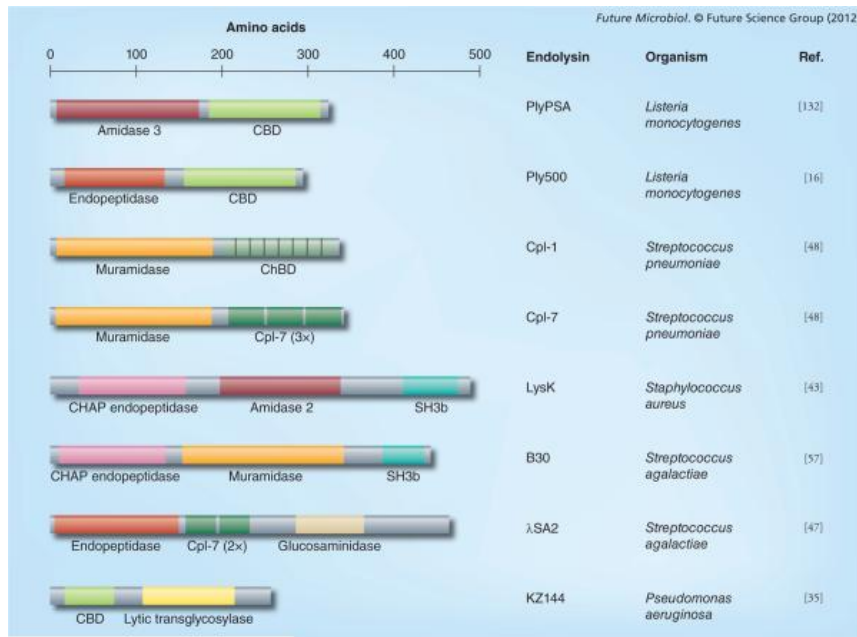


图 5 裂解酶结构<sup>[139]</sup>

Fig. 5 Structure of lysine

### 3.4.3 噬菌体裂解酶在对抗链球菌感染中的应用

链球菌感染普遍发生在暴露的表面或外部可触及的粘膜表面，即皮肤、口腔、鼻咽腔、肺部、阴道等。而大多数链球菌病是由单一物种感染而非多菌感染引起的，这表明可以使用靶向裂解酶方法。此外，尽管大多数链球菌裂解酶对链球菌属以外的物种不起作用，但链球菌肽聚糖（特别是杂交桥）中的一种常见结构，允许大多数链球菌裂解酶对几种链球菌物种显示抗微生物活性，从而确保开发出丰富的治疗酶库。

噬菌体裂解酶为动物链球菌感染提供了治疗机会。乳腺炎感染可由多种细菌引起，其中包括几种链球菌：乳房链球菌、无乳链球菌和乳链球菌亚种。裂解酶 PlyC、Ply700、PlySs2 和 PlySs9 显示出抗乳房链球菌的活性<sup>[140]</sup>。此外，裂解酶 λSA2 和 B30 的组合被证明覆盖了与牛乳腺炎相关的所有链球菌（即无乳链球菌、乳链球菌亚种和乳房链球菌），在全脂牛奶中保持活性，并在小鼠乳腺炎模型中显示出对每种链球菌性乳腺炎病原体的有效性<sup>[141]</sup>。使用裂解酶进行消毒的概念也被扩展到马腺疫病，这是一种由马链球菌兽疫亚种和马链球菌马亚种引起的马上呼吸道疾病。为了实现这一目标，PlyC 裂解酶被评估为一种喷洒消毒剂，可用于马厩常见物品上的马链球菌，包括尼龙笼头、棉围绳、皮革笼头、聚酯胸领、木材和不锈钢<sup>[142]</sup>。此外，已有一些关于噬菌体裂解酶对猪链球菌感染治疗的研究<sup>[140]</sup>，在腹腔模型中，猪链球菌原噬菌体裂解酶和被证明可以保护小鼠免受猪链球菌的攻击。猪链

球菌原噬菌体裂解酶 PlySs2 被证明可以减少猪链球菌的鼻内定植。此外,猪链球菌原噬菌体裂解酶 Ply5218 在仔猪中进行了评估,肌肉注射可缓解链球菌病的临床症状,显著降低血液中的链球菌负担,并降低促炎细胞因子水平。

#### 3.4.4 裂解酶在革兰氏阳性菌抗生物膜中的应用

近年来,裂解酶在体内,体外或离体针对生物膜相关感染的研究令人鼓舞。裂解酶可清除金黄色葡萄球菌、猪链球菌、肺炎链球菌和化脓性链球菌形成的生物被膜<sup>[140]</sup>。裂解酶可以消除心内膜炎和导管相关感染动物模型中的生物膜。在体外用抗生素治疗后,裂解酶可以杀死残留的持久性细菌<sup>[143]</sup>。猪链球菌 SS2-4 菌株可形成致密的生物膜,裂解酶 LySMP 可以分散和去除猪链球菌形成的生物膜,去除率> 80%。除了破坏生物膜结构外,猪链球菌细胞本身也被 LySMP 灭活。LySMP 的功效不是剂量依赖性的,与抗生素联合使用时,可以协同发挥作用,以最大程度地分散猪链球菌生物膜并灭活释放的细胞<sup>[144]</sup>。肺炎链球菌裂解酶 LytA,在分解肺炎链球菌生物膜方面显示出高效率<sup>[145]</sup>,而裂解酶 PlyC 以时间依赖的方式扩散通过基质时,则会破坏生物膜<sup>[146]</sup>。这些数据表明噬菌体裂解酶可以构成治疗包括猪链球菌感染在内革兰氏阳性细菌有效策略的一部分,并代表一类新的抗生物膜药物。

### 3.5 展望

随着宏基因组学和生物信息学技术的发展,位于肠道微生物的“暗物质”逐渐被了解,肠道噬菌体与人类疾病间关联的发现,重新引起了人们对肠道噬菌体组的关注。目前,关于猪肠道微生物的研究主要集中在菌群部分,但已有猪肠道病毒组的研究表明猪肠道微生物系统支持噬菌体群落,可能在维持肠道稳态方面起着重要的作用。对猪肠道噬菌体的研究,有助于更好的了解猪肠道微生物,而且有望找到一种代替抗生素的方法来治疗仔猪断奶后腹泻及其他肠道传染性疾病。此外,噬菌体和细菌之间的竞争对全球抗生素耐药性的变化做出了重要贡献,猪肠道微生物是 ARGs 重要的储存库,对猪肠道噬菌体组的研究有助于了解 ARGs 的载体和来源以及潜在的 ARGs 转移机制。与抗生素耐药性持续蔓延相关的危险促成了裂解酶以及其他替代抗生素的研究工作的急剧扩大。裂解酶技术的验证可能会加速裂解酶从发现到临床前研究或临床前到临床研究的转化。对猪肠道噬菌体组的研究可能会发掘大量噬菌体编码的新型裂解酶,这将有助于丰富现有的裂解酶库,提高裂解酶作为抗菌制剂的应用价值。



## 第二篇 研究内容

### 第1章 断奶仔猪肠道病毒组成和功能基因分析

猪是我国畜牧业的主要物种，猪肉消费在我国肉类消费中占62%，生猪养殖产业是我国农业的重要组成部分，该行业的发展关系到国计民生。提供优质健康的仔猪是生猪生产的重要保障。在现代密集饲养条件下，断奶是猪生命过程中的关键时期<sup>[6]</sup>。断奶仔猪腹泻发病率和相关死亡率较高，给养猪业造成了巨大的经济损失<sup>[2]</sup>。肠道微生物群的破坏被认为是导致断奶仔猪腹泻的关键因素<sup>[3,4]</sup>。此外，猪被广泛用作分析各种人类生理功能和疾病的首选模式物种，在人类肠道菌群基因目录中发现的96%的功能通路都存在于猪肠道微生物组基因目录中，这证实了猪作为人类生物医学模型的重要性<sup>[5,6]</sup>。因此，猪肠道微生物组已引起越来越多的关注。尽管已有大量研究已经描述了猪肠道微生物组及其与腹泻之间的相关性。然而，这些主要集中在猪肠道微生物细菌成分上，关于猪肠道病毒成分的研究很少。新一代测序的出现极大地扩展了人们对肠道微生物组在人类健康和疾病中的作用的理解<sup>[15,16]</sup>。病毒宏基因组学研究揭示了人类肠道环境中的病毒群落，极大扩展了人们对肠道微生物的认识。然而，人们对断奶仔猪不同肠段病毒群落结构和组成以及肠道病毒群落与仔猪腹泻相关性了解有限。因此，揭示断奶仔猪肠道病毒群落结构和组成，探索断奶仔猪肠道病毒群落与宿主健康之间的关系有利于人们更深的了解猪肠道微生物群如何与机体系统保持稳定互惠的关系。

基于以上研究背景，本研究选用仔猪断奶后应激性腹泻猪自然病例，选择健康和腹泻断奶仔猪为研究对象，以仔猪回肠（小肠）内容物，盲肠（大肠）内容物和新鲜粪便为研究样本，使用病毒宏基因组学和生物信息学方法分析健康断奶仔猪肠道病毒群落组成及腹泻断奶仔猪肠道病毒群落的改变。

#### 1.1 材料

##### 1.1.1 主要试剂

硫酸庆大霉素、氯胺酮、戊巴比妥钠、甲苯噻嗪、特拉唑（Telazol）、生理盐水、4%福尔马林、HE染料、琼脂糖、SB缓冲液、28%（w/v）蔗糖、酶混合缓冲液（EMB）、酶

混合物 (EM)、SS 液、微量样本全基因组和全转录组扩增试剂盒 (Qiagen 150054)、核酸定量分析试剂盒 (Life Technologies, 美国)、文库制备试剂盒 (NEB 公司, 美国)、猪传染性胃肠炎病毒(TGEV)酶联免疫分析试剂盒 (酶联生物科技有限公司, 上海)、猪流行性腹泻病毒 (PEDV) 酶联免疫分析试剂盒 (酶联生物科技有限公司, 上海)、猪轮状病毒(RV)酶联免疫分析试剂盒 (酶联生物科技有限公司, 上海)

### 1.1.2 主要仪器

0.45  $\mu\text{m}$  滤器、0.22  $\mu\text{m}$  滤器、4  $^{\circ}\text{C}$  离心机(Thermo, 美国)、超速离心机(Himac CP 100WX, 日立, 日本东京)、分光光度计 (NanoDrop One, Thermo, 美国)、自动化病毒总核酸纯化系统 (Magen R6662-02)、荧光定量仪 (Qubit 4.0, Life Technologies, 美国)、生物分析仪 (Agilent 4200 TapeStation, 美国)

### 1.1.3 实验动物

长白猪 (25 ~ 28 日龄, 断奶), 来自吉林省德惠市的某规模化养猪场, 本研究中进行的所有动物实验均严格按照国家实验动物福利指南 (中国科学技术部, 2006 年) 进行, 并经中国长春吉林大学动物福利和研究伦理委员会批准 (批准号: SY202110010)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 健康和腹泻断奶仔猪的选择

本研究选用仔猪断奶后应激性腹泻的自然病例, 在中国吉林省德惠市的某规模化养猪场进行。实验仔猪的选择和处理按照先前研究中的描述进行, 并进行了一些修改<sup>[3]</sup>。仔猪品种为长白猪, 所有实验仔猪都是具有相同遗传背景的长白母猪的后代。仔猪出生后, 常规给予 2 mg 硫酸庆大霉素 (80000 IU) 以防止细菌感染。这些仔猪被喂养到 21 日龄后进行断奶。断奶仔猪喂食相同的饲料 (吉林省, 长春市, 公主岭新康饲料有限公司的仔猪浓缩饲料 H806), 并可自由获得饮用水, 仔猪耳朵通过切口进行个体识别。断奶后检查每只仔猪粪便的一致性, 并密切关注每只仔猪的健康状况。根据 Zhou 等人<sup>[4]</sup>描述的标准对粪便进行评分定义腹泻或健康仔猪。腹泻指数评分如下: 1=致密成型; 2=正常稠度; 3=局部形成柔软; 4=松散、半液体; 5=水样粪便。连续三天得分为 4 分或 5 分的仔猪被指定为腹泻仔猪, 而连续三天评分为 1 分或 2 分的仔猪则被指定为健康仔猪。所选健康仔猪和腹泻仔

猪在不同窝中。所有腹泻仔猪在样本采集前均未使用抗生素。最后，分别选择了4只腹泻仔猪和4只健康仔猪进行样本采集。

### 1.2.2 断奶仔猪肠道样本的收集和处理

在仔猪肌肉中注射氯胺酮(8 mg/kg)、甲苯噻嗪(4 mg/kg)和特拉唑(6 mg/kg)的混合物麻醉仔猪后,通过心内注射戊巴比妥钠(26%溶液)(1 mL/4.5 kg)对仔猪实施安乐死<sup>[147]</sup>。安乐死前收集各仔猪的新鲜粪便,安乐死后立即收集各仔猪回肠和盲肠内容物。所有样品均在液氮中速冻,用于细菌和病毒的核酸提取。此外,用无菌生理盐水清洗仔猪的回肠、盲肠和结肠组织,切成直径为1~2 cm的小块,立即放入4%福尔马林中,浸泡48 h,用HE染色并用于制作组织切片。另外,根据酶联免疫分析试剂盒说明书测定各仔猪粪便中TGEV、PEDV和RV,最终依序测量各孔的OD<sub>450nm</sub>值,每个粪便样本三次重复。

### 1.2.3 病毒DNA提取

遵循之前描述的病毒样颗粒提取方法,并稍作修改<sup>[148]</sup>。简而言之,取3 g肠道内容物或新鲜粪便样本添加5倍体积的预冷无菌SB缓冲液,涡旋5 min,经过三轮冷冻—解冻后,使用离心机(4℃)对样品在12,000 × g离心5 min后移除沉淀,使用0.45 μm和0.22 μm的滤膜移除细胞碎片,将滤液转移至含有28% (w/v)蔗糖的超速离心管,用超速离心机在4℃条件下160,000 × g离心2 h。移除上清后将沉淀重悬在200 μl SB缓冲液,按比例(100:1)加入EMB和EM,37℃孵育60 min;按比例(1:1)加入SS液(终止液)(2 μl),充分混匀,65-75℃,10 min失活酶反应(去除游离DNA),2000 × g离心5 min,上清即为VLP,取200 μl上清保存于-20℃留待后续实验。

### 1.2.4 病毒总核酸的提取、纯化与质检

采用自动化病毒总核酸纯化系统对样品中DNA和RNA病毒进行共抽提,并用微量样本全基因组和全转录组扩增试剂盒进行全基因组扩增,最后使用分光光度计、荧光定量仪和1.5%琼脂糖电泳进行扩增产物的质检。

### 1.2.5 文库构建与测序

质检合格的样品使用文库制备试剂盒,并根据其附带的说明书完成建库。随后使用核酸定量分析试剂盒和生物分析仪对文库进行质检,按照Illumina Novaseq 6000平台的UserGuide进行上机样本制备,并运行150 bp paired-end模式进行测序。



## 1.2.6 原始数据质量控制与初步病毒分类

使用软件 Trimmomatic (v.0.36)<sup>[149]</sup>对原始 reads 进行质量控制去除低质量序列。使用 SOAPaligner<sup>[150]</sup>和 BWA<sup>[151]</sup> (v.0.7.17, 默认参数: mem -k 30)软件把 clean reads 分别与核糖体数据库 (Silva.132) 和宿主数据库比对, 过滤比对长度低于 reads 总长 80%的比对结果, 然后去除相应宿主序列。为快速获得样本中的病毒组成信息, 使用 BWA 软件把去除污染后的 clean reads 比对到病毒参考数据库 (NT 病毒数据库), 过滤比对长度低于 reads 总长 80%的比对结果, 根据 NCBI taxonomy 数据库注释信息, 统计病毒分类信息, 进行初步病毒分类。

## 1.2.7 序列组装与非冗余基因集构建

使用 Megahit<sup>[152]</sup> (v.1.1.2, 默认参数: --presetsmeta-large--min-contig-len300)软件对 clean reads 进行组装, 使用 BWA (v.0.7.17)软件把 clean reads 与组装结果比对, 计算 reads 利用率。同时使用 Blast (v.2.9.0+)软件把组装 contigs 与宿主序列比对, 去除宿主序列。使用 CDHIT<sup>[153]</sup> (v.4.7, 默认参数: -c0.95-aS0.8)软件对所有样本的 contigs 进行聚类, 获得 unique.contig。

## 1.2.8 病毒序列鉴定

使用两种方法鉴定病毒序列, 首先基于已知病毒序列进行鉴定, 使用 Blast (v.2.9.0+) 软件, 将获得的 unique.contig 与病毒数据库 (从 NT 数据库中分离) 比对, 满足比对相似性 $\geq 80\%$ , 比对长度 $\geq 500$  bp,  $e \leq 1e-5$  的定义为病毒序列; 满足比对长度 $\geq 100$  bp,  $e \leq 1e-5$  的定义为疑似病毒序列。

通过比对参考数据存在两个缺陷: 一是只能鉴定已知病毒; 二是结果中存在假阳性。为了鉴定未知病毒并降低假阳性, 利用多个数据库, 使用新的方法来进一步鉴定病毒序列<sup>[79, 154-156]</sup>。首先将 contigs 与多个数据库比对, 寻找候选病毒序列, 满足如下三个条件中一个即可:

- A、使用 Blastn (v.2.9.0+) 与 NT 病毒数据库比对, 筛选  $e \leq 1e-5$  的比对结果;
- B、使用 Blastx (v.2.9.0+) 与 NR 病毒数据库比对, 筛选  $e \leq 1e-3$  的比对结果;
- C、使用 MetaGeneMark<sup>[157]</sup> (v.3.38) 预测基因, 随后使用 hmmsearch (v.3.2.1) 软件, 将蛋白序列与 HMM 数据库比对 (VPFs<sup>[79]</sup>和 vFam<sup>[156]</sup>), 筛选  $e \leq 1e-5$  的比对结果。

然后排除假阳性:

- A、将上述获得的候选病毒序列与 NT 数据库比对, 筛选  $e \leq 1e-10$  的比对结果;

B、将未比对上的序列前一步与 NR 数据库比对，筛选  $e \leq 1e-3$  的比对结果；

C、使用 Taxonomy 数据库对上述比对结果进行注释，如果在前 50 个比对结果中，有 20% 以上的比对结果为非病毒序列（注释结果为 Eukaryota、Bacteria、Archaea），则该序列被认为是非病毒序列，其余序列被认为是病毒序列；

D、根据病毒 contigs 与 Virus-NT 的 best hit 比对结果（length  $\geq 100$  bp， $e \leq 1e-5$ ），对病毒 contigs 进行注释。

根据 NCBI taxonomy 注释信息（2020/6/2 更新），分别统计两种方法鉴定的序列中噬菌体和其他病毒的数量，以及 RNA 和 DNA 类型。在后续的分析中，去除了上述过程中鉴定为 RNA 病毒的 contigs，保留了鉴定为 DNA 病毒的 contigs 和无法确定为哪类病毒的 contigs。比较上述两种方法获得 DNA 病毒和未知病毒 contigs 序列的差异，绘制韦恩图，保留 Novel 和 Confirmed 中的病毒序列，作为最终的病毒鉴定结果。

### 1.2.9 病毒丰度统计、基因预测和功能基因注释

根据病毒 contigs 与 virus-NT 数据库 Blast 比对结果，选择  $e < 1e-5$  的 best hit 的比对结果，进行物种注释。使用 BWA(v.0.7.17，默认参数：mem -k 30)软件，将去除宿主后的 clean reads 与病毒 contigs 比对，过滤比对长度低于 reads 总长 80% 的比对结果，统计病毒 reads 比例，然后根据病毒 contigs 的注释结果统计病毒 reads 的分布，最后计算每条病毒 contig 的 RPKM 值。

$$RPKM = \frac{\text{Contig reads}}{\text{Total mapped reads(millions)} * \text{Contig length(KB)}}$$

注：（1）Contig reads: 对上某 contig 的 reads 数

（2）Total mapped reads: 比对上的 reads 总数，以百万为单位；

（3）Contig length: Contig 长度，以 KB 为单位。

使用 Prokka<sup>[158]</sup>(v1.13)软件对病毒 contigs 进行基因预测，评估预测出来的基因数目、长度，过滤基因核酸长度小于 200 bp 的 contigs 序列。使用 Blastp (v.2.9.0+) 软件把基因的蛋白序列与 Pfam 数据库<sup>[159]</sup>和 UniProtKB/Swiss-Prot 数据库的病毒序列 (ViralZone<sup>[160]</sup>) 比对，筛选  $e < 1e-3$  的 besthit 比对结果，获取病毒的功能信息。使用 Diamond Blastp(v.2.9.0+) 软件把基因的蛋白序列分别与 KEGG 数据库<sup>[161]</sup>进行基因的同源性比对，筛选  $e < 1e-3$  的 besthit 比对结果，进行功能基因注释。

### 1.2.10 数据分析

本研究涉及的数据分析和可视化过程使用 R 软件 (v.3.6.3), Cytoscape 软件 (v.3.2.1) 和 Excel 2013 进行。使用 R 包 *vegan* 进行相关性计算和 Bray-curits 距离计算, 使用 R 包 *ggplot2* 绘制 PCoA 图, 柱形图, 箱线图和热图。使用 R 包 *circlize* 绘制圈图。使用 Excel 2013 绘制饼图。使用 R 软件基础包进行统计分析。差异星号对应的 p 值: \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ 。

### 1.2.11 数据可用性

这项研究中产生的所有原始序列数据都已存入基因组序列档案 (GSA) (<https://bigd.big.ac.cn/gsub/>) 中国科学院北京基因组研究所 BIG 数据中心, 登录号 CRA006589。

## 1.3 结果

### 1.3.1 健康与腹泻断奶仔猪选取与鉴定

#### 1.3.1.1 健康与腹泻断奶仔猪描述与粪便评分

健康和腹泻仔猪的详细信息见表 1.1。所有仔猪均在 21 日龄断奶, 健康仔猪粪便均致密成型, 而腹泻仔猪呈半水样或水样粪便。腹泻仔猪的腹泻评分和粪便含水量高于未腹泻仔猪 (健康仔猪) (表 1.1, 图 1.1)。

表 1.1 健康和腹泻断奶仔猪的队列描述

Table 1.1 Cohort description of healthy and diarrheal weaned piglets.

动物编号	品种	日龄	断奶日龄	粪便形态
健康仔猪-1	长白猪	25	21	致密成型
健康仔猪-2	长白猪	25	21	致密成型
健康仔猪-3	长白猪	26	21	致密成型
健康仔猪-4	长白猪	26	21	正常稠度
腹泻仔猪-1	长白猪	25	21	松散, 半水样
腹泻仔猪-2	长白猪	26	21	水样
腹泻仔猪-3	长白猪	28	21	水样
腹泻仔猪-4	长白猪	28	21	水样

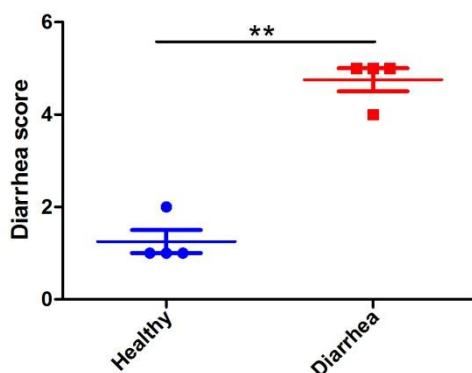


图 1.1 断奶仔猪腹泻评分。\*\*,  $P < 0.01$

Fig. 1.1 Diarrhea score in weanling piglets. \*\*,  $P < 0.01$

### 1.3.1.2 健康与腹泻断奶仔猪肠道组织 HE 染色观察

肠道组织 HE 染色结果显示健康仔猪空肠、回肠和盲肠绒毛正常完整, 粘膜层无炎性细胞浸润。相比之下, 具有腹泻症状的仔猪回肠, 盲肠和结肠组织均发生严重的病理损伤。各组织绒毛变短发生脱落, 尤其是结肠组织绒毛几乎全部脱落。此外, 在结肠粘膜下层有大量中性粒细胞浸润 (图 1.2)。

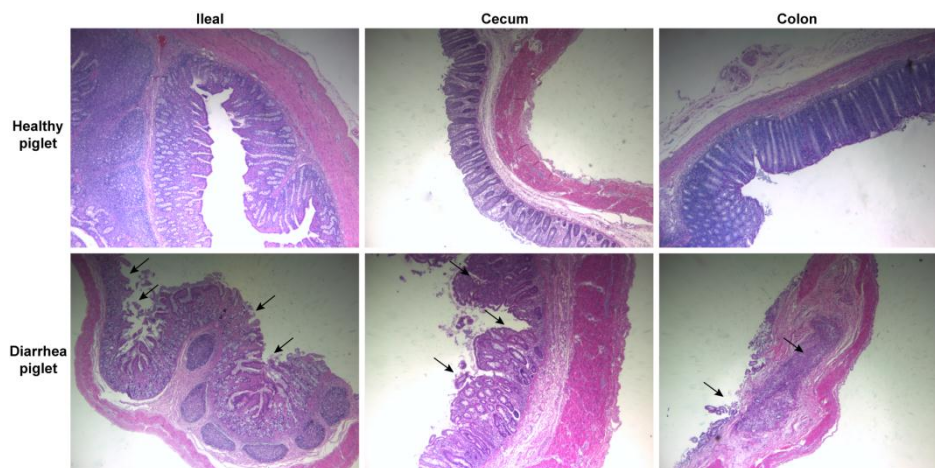


图 1.2 健康和腹泻仔猪肠道的组织病理学观察

Fig. 1.2 Histopathological observation of the intestine of healthy and diarrheal piglets

### 1.3.1.3 断奶仔猪粪便中 TGEV、PEDV 和 RV 的抗原检测

各断奶仔猪粪便病毒检测结果表明, 8 只断奶仔猪粪便中均未检测到 TGEV、PEDV 和 RV 抗原 (表 1.2), 排除了断奶仔猪病毒性腹泻的可能性。

表 1.2 健康和腹泻断奶仔猪粪便中的病毒抗原检测

Table 1.2 Detection of virus antigen in serum of healthy and diarrhea weaned piglets

粪便样本来源	TGEV			PEDV			RV		
健康仔猪-1	0.074	0.062	0.071	0.084	0.066	0.077	0.082	0.056	0.074
健康仔猪-2	0.082	0.073	0.064	0.087	0.063	0.074	0.082	0.053	0.064
健康仔猪-3	0.061	0.052	0.064	0.062	0.096	0.084	0.072	0.091	0.094
健康仔猪-4	0.055	0.076	0.091	0.059	0.090	0.081	0.051	0.066	0.071
腹泻仔猪-1	0.075	0.067	0.069	0.085	0.062	0.065	0.075	0.072	0.067
腹泻仔猪-2	0.076	0.066	0.089	0.076	0.066	0.059	0.079	0.076	0.089
腹泻仔猪-3	0.072	0.069	0.089	0.062	0.065	0.089	0.065	0.064	0.069
腹泻仔猪-4	0.084	0.089	0.078	0.088	0.102	0.069	0.058	0.092	0.064
阴性对照	0.068	0.059	0.071	0.076	0.055	0.066	0.076	0.059	0.077

注：表中数值为 OD<sub>450nm</sub> 值，每个血液样本三次重复。计算和结果判定：试验有效性：阳性对照孔平均值 ≥ 1.00；阴性对照平均值 ≤ 0.10；临界值计算：临界值=阴性对照孔平均值+0.15；阴性判定：样品 OD 值 < 临界值者为病毒阴性；阳性判定：样品 OD 值 ≥ 临界值者为病毒阳性。

### 1.3.2 测序数据预处理

#### 1.3.2.1 原始序列数据质控

本研究共获得 24 份猪肠道内容物样本，包括 12 份健康仔猪样本[4 份回肠内容物（HI 组）、4 份盲肠内容物（HC 组）和 4 份新鲜粪便（HF 组）]和 12 份腹泻仔猪样本[四份回肠内容物（DI 组）、四份盲肠内容物（DC 组）和四份新鲜粪便（DF 组）]。

为初步了解断奶仔猪肠道病毒，对 24 个肠道内容物样品中病毒 DNA 进行宏基因组测序，每个样品获得了 11.05±1.05G 原始数据，包括 29358614 个±3331435 个配对末端序列（图 1.3A，表 1.3），质量控制后每个样品数据降低至 8.7±1.0G，最终共获得 207.7G 的质控数据（表 1.3）。

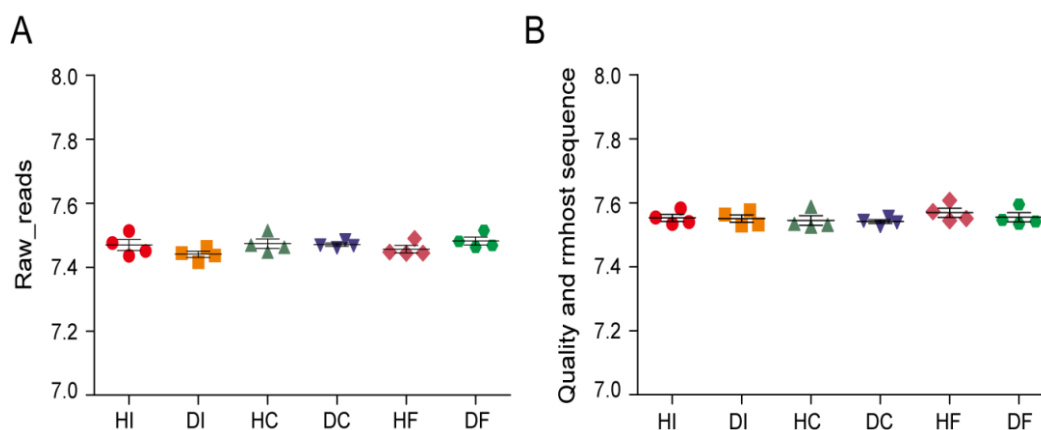


图 1.3 样本中检测到的病毒序列统计

Fig. 1.3 Statistics of virus sequences detected in samples

(A) 所有样本的原始序列总数；(B) 质量过滤和冗余序列去除。

(A) Total number of original sequences; (B) Quality filtration and redundant sequence removal.

表 1.3 质控数据处理统计

Table 1.3 Quality control data processing statistics

#Sample	Raw_base(G)	Raw_reads(PE)	Clean_base(G)	Clean_reads(PE)	Percent(%)
DC1	10.4	34575218	8.7	29409310	85.06
DC2	10.8	35963313	8.7	29328074	81.55
DC3	10.5	34947311	9.1	30529290	87.36
DC4	10.1	33688504	8.6	28898333	85.78
DF1	10.6	35195122	9	30258256	85.97
DF2	10.4	34801160	8.6	28974687	83.26
DF3	11.8	39328486	9.7	32690049	83.12
DF4	10.3	34168376	8.7	29391793	86.02
DI 1	11	36551253	7.7	26027178	71.21
DI 2	10.2	34016626	8.1	27335277	80.36
DI 3	10.1	33764581	8.2	27867137	82.53
DI 4	11.3	37666317	8.6	29151693	77.39
HC1	10	33483723	8.6	28979217	86.55

续表 1.3 质控数据处理统计

Continued Table 1.3 Quality control data processing statistics

HC2	10.2	34148370	8.7	29425239	86.17
HC3	10.2	33895365	8.3	27994517	82.59
HC4	11.6	38626884	9.7	32621689	84.45
HF1	12.1	40460239	9.1	30863663	76.28
HF2	10.6	35485393	8.2	28014972	78.95
HF3	11.2	37300421	8.2	27738068	74.36
HF4	10.5	34975972	8.2	27806846	79.5
HI 1	11.5	38232230	9.7	32575335	85.2
HI 2	10.2	34147221	8.8	29871271	87.48
HI 3	10.4	34640990	8.1	27250914	78.67
HI 4	10.7	35792151	8.4	28228741	78.87

注：(1) Sample: 样本名称；

(2) Raw base: 原始下机数据量，单位是 G；

(3) Raw reads: 原始下机 reads 条数，统计的是双端 (PE) 的序列数；

(4) Clean base: 过滤后碱基总数，单位是 G；

(5) Clean reads: 过滤后 reads 条数，统计的是双端 (PE) 的序列数；

(6) Percent: 质控后得到的 Clean Reads 数占 Raw Reads 数的比例。

### 1.3.2.2 去除宿主序列污染

对质控后的序列进行宿主去除后，每个样本包括 29357445 个 $\pm$  3330787 个 clean reads (图 1.3B, 表 1.4)。

表 1.4 去除宿主序列统计

Table 1.4 Sequence statistics after host removal

#Sample	Clean_reads(PE)	Host_reads(PE)	Surplus(PE)	Surplus_Percent(%)
HF1	30863663	1535	30862128	100
HF2	28014972	367	28014605	100
HF3	27738068	932	27737136	100

续表 1.4 去除宿主序列统计

Continued Table 1.4 Sequence statistics after host removal

#Sample	Clean_reads(PE)	Host_reads(PE)	Surplus(PE)	Surplus_Percent(%)
HF4	27806846	9018	27797828	99.97
DF1	30258256	2248	30256008	99.99
DF2	28974687	3505	28971182	99.99
DF3	32690049	1817	32688232	99.99
DF4	29391793	2244	29389549	99.99
HC1	28979217	1396	28977821	100
HC2	29425239	9129	29416110	99.97
HC3	27994517	913	27993604	100
HC4	32621689	313	32621376	100
DC1	29409310	3367	29405943	99.99
DC2	29328074	936	29327138	100
DC3	30529290	4840	30524450	99.98
DC4	28898333	19122	28879211	99.93
HI1	32575335	3104	32572231	99.99
HI2	29871271	6299	29864972	99.98
HI3	27250914	751	27250163	100
HI4	28228741	545	28228196	100
DI1	26027178	521	26026657	100
DI2	27335277	19671	27315606	99.93
DI3	27867137	64550	27802587	99.77
DI4	29151693	99998	29051695	99.66

注：(1) Sample: 样本名称;

(2) Clean reads: 1.3 质控后 reads 数;

(3) Host\_reads: 比对到宿主的 reads 条数, 统计的是双端 (PE) 的序列数;

(4) Surplus: 最后剩余 reads 数;

(5) Surplus\_Percent: 最后剩余 reads 数占 clean reads 数的比例。



### 1.3.3 病毒组成初步分析

为快速获得样本中的病毒组成信息，将所有 clean reads 映射到 NT – Virus 数据库比对进行初步病毒分类（选取 reads 比例大于 1% 的物种），结果显示这些序列主要分配给了 *Myoviridae*、*Podoviridae*、*Siphoviridae*、*Adenoviridae*、*Circoviridae*、*Inoviridae*、*Microviridae*、*Parvoviridae* 以及 *Smacoviridae* 十个病毒科序列，这些病毒的丰度在健康仔猪回肠（HI），盲肠（HC）和粪便（HF）中具有差异性，且腹泻导致这些病毒丰度在各部位发生改变（图 1.4）。

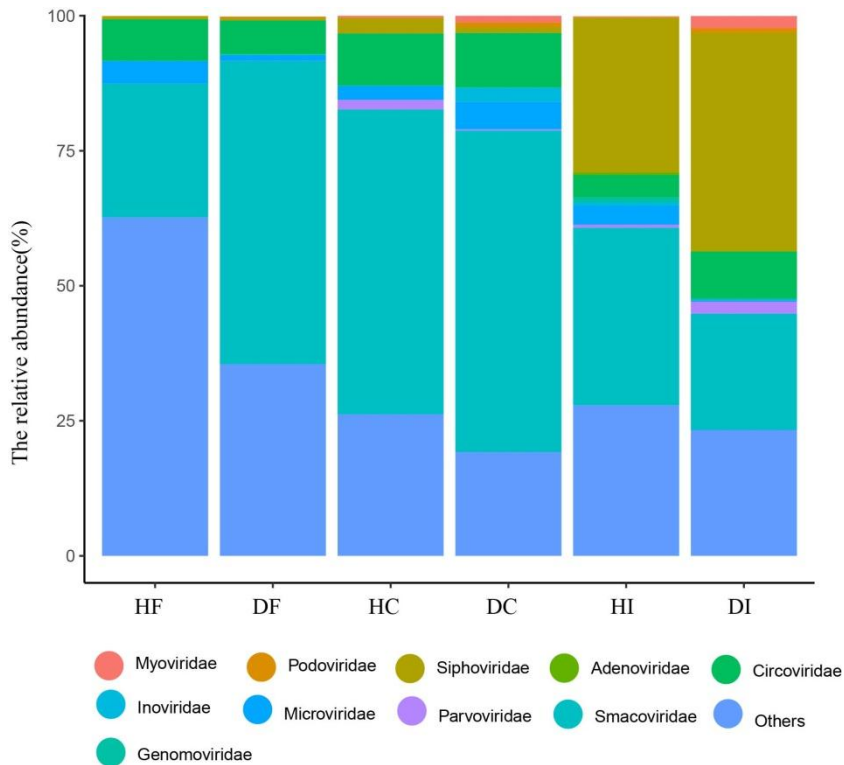


图 1.4 病毒注释结果统计（科水平）

Fig 1.4 Statistics of virus annotation result (family level)

### 1.3.4 数据组装

由于 reads 较短，以及比对软件的局限性，初步病毒分类结果可能会与实际情况出现一些偏差，因此需要对 clean reads 进行组装后进一步进行病毒鉴定。将去除污染的 clean reads 进行组装后获得的序列称为 unique.contigs。有趣的是，尽管所获得的总序列没有显著差异，但是与健康仔猪粪便组相比，健康仔猪盲肠和回肠组中的 unique.contigs 数量显著增加。此外，与健康组样本相比，腹泻仔猪回肠中 unique.contigs 数量显著降低，而腹泻粪便组显著增高（图 1.5）。

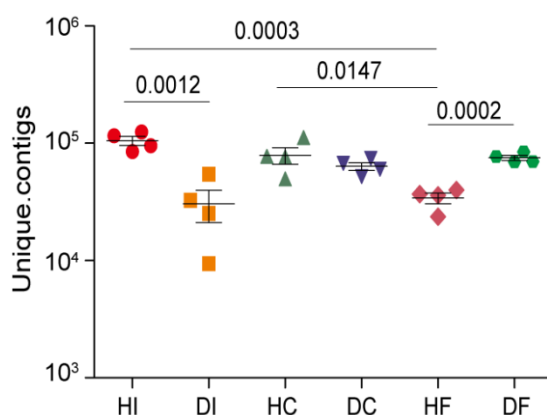


图 1.5 不同组中 unique contigs 的数量

Fig 1.5 Number of unique contigs in different group

### 1.3.5 病毒序列鉴定

为进一步鉴定病毒序列，基于两种病毒序列鉴定方法（见材料方法），最终获得 50,756 个病毒 contigs，大约 73.40% 的 contigs 长度小于 1 Kb，13.04% 为 1 至 2 Kb，9.36% 为 2 至 5 Kb，3.21% 为 5 至 10 Kb，0.96% 大于 10 Kb（图 1.6）。

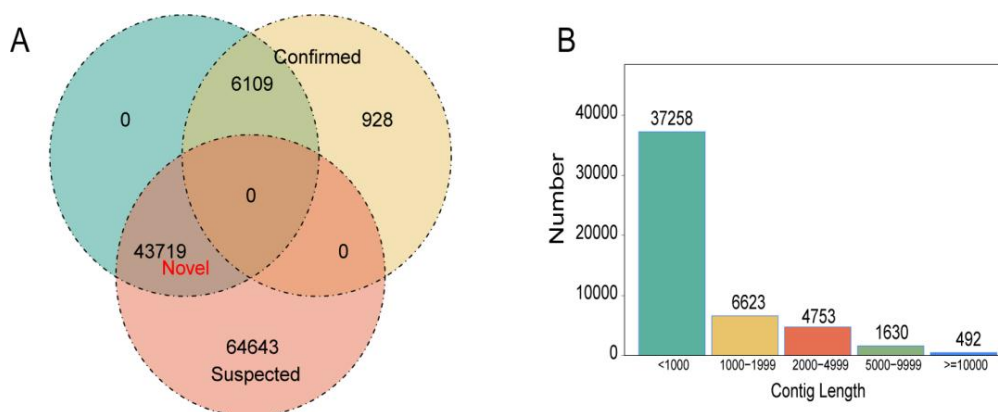


图 1.6 病毒序列鉴定统计

Fig 1.6 Virus sequence identification statistics

(A) 基于已知病毒序列比对和新方法获得的病毒群数量。Novel 代表通过新方法获得的病毒序列；Confirmed 表示已确认的病毒序列；Suspected 表示可疑病毒的序列。Novel and Confirmed 病毒序列是最终的病毒鉴定结果；(B) 最终确定的病毒 contigs 的长度分布。

(A) Number of virus contigs obtained based on known virus sequence alignment and the new method. Novel represents the virus sequences obtained by the new method; Confirmed indicates the confirmed virus sequences; Suspected indicates the sequences of suspected virus. The Novel and Confirmed virus sequences are the final virus identification results. (B) The length distribution of the finally identified virus contigs.

### 1.3.6 断奶仔猪肠道病毒组成与相对丰度分析

将鉴定的病毒 contigs 映射到 NT-Virus 数据库,结果显示除一些未被注释的病毒序列外,鉴定的病毒 contigs 主要分配给了属于 dsDNA 的 *Caudovirales* (28.41%) 和 ssDNA 的 *Microviridae* (32.75%) (图 1.7A), 这两种病毒分类群均属于噬菌体分类群 (共 61.16%)。其中, *Caudovirales* 病毒群主要由长尾噬菌体科 (*Siphovirida*) (50.238%), 短尾噬菌体科 (*Podoviridae*) (36.987%), 肌尾噬菌体科 (*Myoviridae*) (7.538%) 和赫勒噬菌体科 (*Herelleviridae*) (5.204%) 组成, 此外还包括微量的阿科尔曼噬菌体科 (*Ackermannviridae*) (0.001%) (图 1.7B)。这些数据表明噬菌体是断奶仔猪肠道病毒的主要成分。除噬菌体病毒分类群外, 鉴定的病毒 contigs 还主要分配给了 *Smacoviridae* 病毒类群 (27.43%)。在有限数量的样本中检测到其他病毒分类群, 这些病毒分类群平均占总病毒序列的 6.55% 或更少 (图 1.7A)。将精选的 50,756 个病毒 contigs 与 NCBI-NT 病毒数据库中的原核病毒序列进行比对, 结果显示高达 99.88% 的病毒 contigs 与 NCBI-NT 数据库中病毒序列不匹配 (图 1.7C), 这表明仔猪肠道病毒组在遗传谱方面具有高度新颖性, 极大扩展了已有数据库中病毒序列数据。

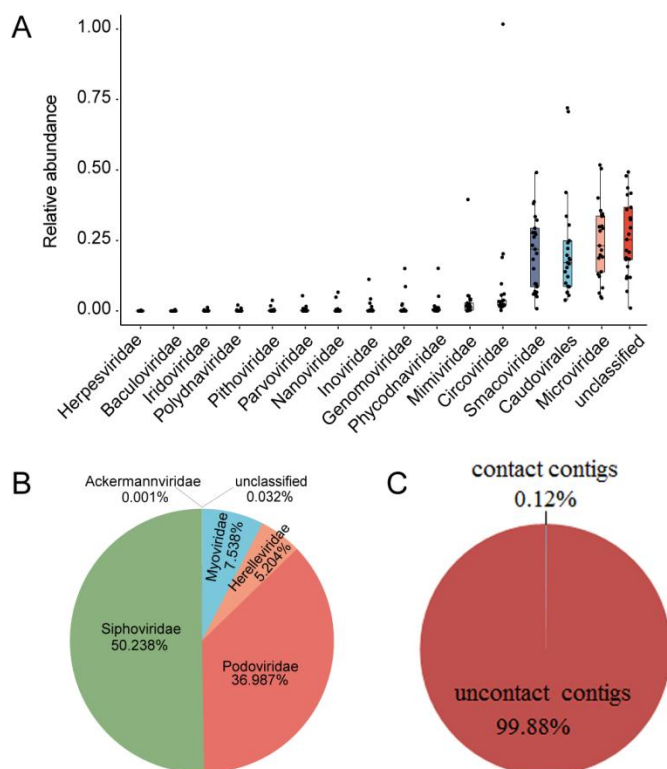


图 1.7 断奶仔猪肠道病毒主要组成成分

Fig 1.7 Main components of intestinal virus in weaned piglets

(A) 分配给特定病毒分类群序列的相对丰度, 显示了前 15 种的相对丰度; (B) 属于

*Caudovirales* 家族分类群(科水平)的相对丰度比例;(C)断奶仔猪肠道病毒序列与 NT-Virus 数据库比对结果。

(A) Relative abundance of sequences assigned to the specified virus taxa. The relative abundance of the top 15 species was shown; (B) Proportion of the relative abundance of family level taxa assigned to *Caudovirales*; (C) Comparison results of weaned piglet intestinal virus sequence with NT-Virus database.

### 1.3.7 健康和腹泻断奶仔猪肠道病毒丰度和多样性分析

为进一步了解健康和腹泻仔猪肠道病毒群落组成与结构,对来自不同样本的病毒 contigs 丰富度进行比较分析。结果显示健康仔猪回肠,盲肠和粪便样本中主要病毒物种的富集具有明显差异(图 1.8A)。例如健康仔猪回肠内容物中 *Herpesvirales*、*Herelleviridae*、*Marseilleviridae*、*Baculoviridae*、*Adenoviridae*、*Caudovirales*、*Hytrosaviridae*、*Alloherpesviridae* 和 *Crucivirida* 富集。盲肠内容物中 *Parvoviridae* 和 *Ackermannviridae* 富集。而粪便中 *Genomoviridae*、*Nanoviridae*、*Nudiviridae*、*Phycodnaviridae* 和 *Pithoviridae* 富集。相比之下,腹泻仔猪不同肠段样本中病毒的富集种类发生了改变,例如与健康仔猪相比,腹泻仔猪粪便中 *Hepadnaviridae* 和 *Tolecutellitidae* 发生富集(图 1.8A)。

多样性分析结果显示健康仔猪粪便病毒物种多样性显著低于回肠内容物 ( $P < 0.05$ ) 和盲肠内容物 ( $P < 0.05$ ),而腹泻仔猪粪便样本病毒物种多样性显著升高 ( $P < 0.05$ ),回肠和盲肠内容物样本物种多样性降低,丧失与粪便样本的显著性差异(图 1.8B)。此外,主坐标分析(PCoA)显示健康仔猪回肠内容物,盲肠内容物及粪便样本分开聚集,而腹泻仔猪三个部位样本发生交叉聚集(图 1.8C)。这些结果表明健康仔猪回肠,盲肠和直肠中病毒群落结构和物种多样性具有极大差异,腹泻改变了断奶仔猪肠道病毒群落分布模式。

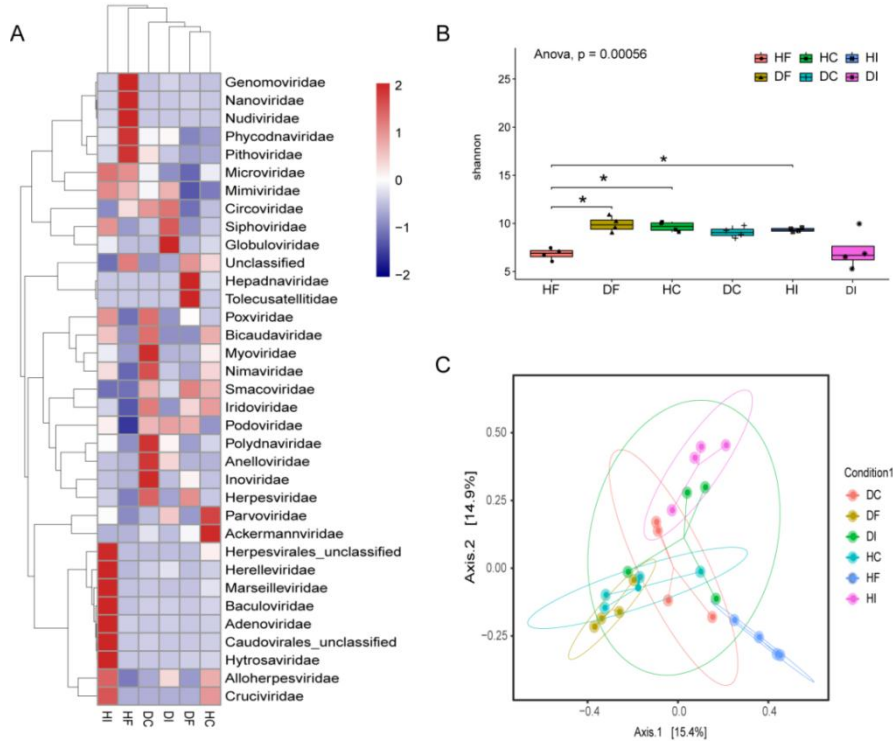


图 1.8 健康和腹泻仔猪肠道病毒分布和多样性比较分析

Fig 1.8 Comparative analysis of distribution and diversity of intestinal viruses in healthy and diarrhea piglets

(A) 健康和腹泻断奶仔猪肠道中前 35 种病毒相对丰度的差异；(B) 健康断奶仔猪和腹泻断奶仔猪之间病毒群落的丰富度和均匀性差异；(C) 健康断奶仔猪和腹泻断奶仔猪的病毒群落结构组成不同。

(A) Differences in the relative abundance of the top 35 viruses in the intestine of healthy and diarrheal weaning piglets; (B) The richness and evenness difference of the virus community between healthy and diarrheal weaning piglets; (C) The virus community structural composition is different between healthy and diarrheal weaning piglets.

### 1.3.8 断奶仔猪肠道病毒功能基因分析

#### 1.3.8.1 肠道病毒功能基因预测和分类

为探究仔猪肠道病毒基因组信息，对病毒 contigs 进行了基因预测，最终鉴定出 80,567 个病毒基因序列，将这些基因的蛋白序列与 UniProtKB/Swiss-Prot 数据库的病毒序列进行比对，筛选出 18,134 个功能基因，占比 22.51%。如图 1.9 所示，这些功能基因被分为 11 类，分别为 Biological\_process、Cellular\_component、Coding\_sequence\_diversity、

Complete\_proteome、Developmental\_stage、Disease、Domain、Ligand、Molecular\_function、PTM 和 Technical\_term。

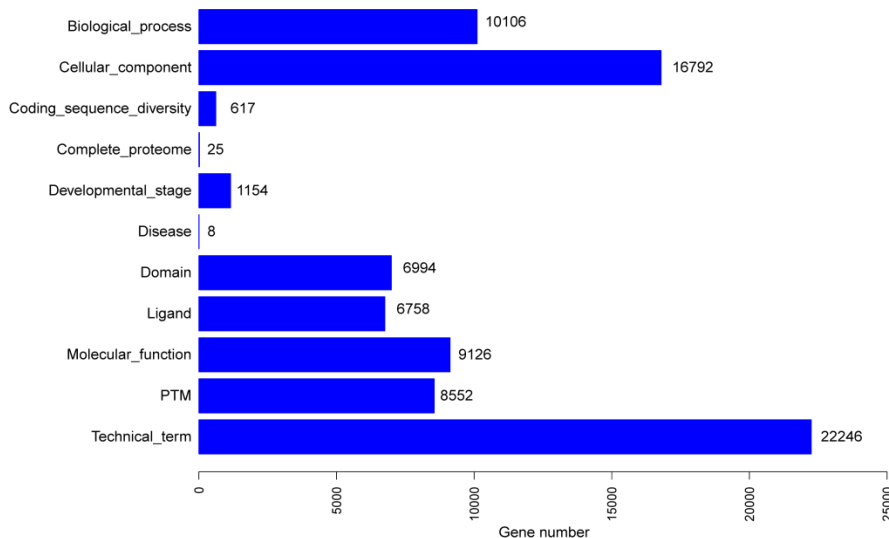


图 1.9 UniProtKB 类别统计

Fig 1.9 UniProtKB category statistics

### 1.3.8.2 肠道病毒功能基因主坐标分析

PCoA 分析显示健康仔猪回肠内容物、盲肠内容物和粪便样本分开聚集。相比之下，腹泻仔猪回肠内容物、盲肠内容物和粪便样本趋向聚集。表明健康仔猪回肠，盲肠和粪便样本病毒功能存在极大差异性，腹泻则导致仔猪各肠道病毒趋向于更相似的功能(图 1.10)。

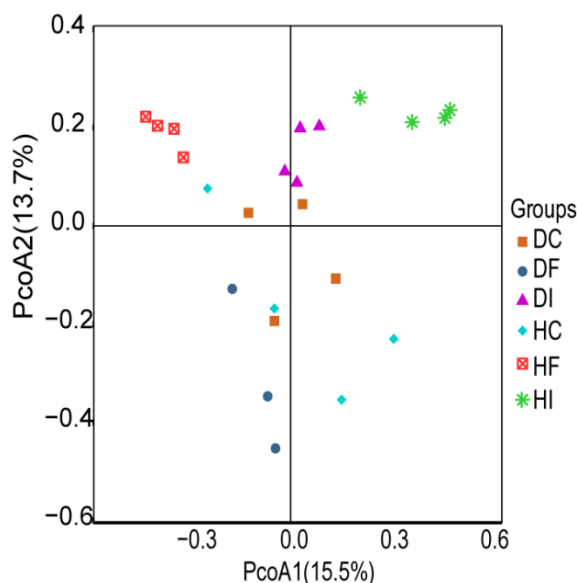


图 1.10 健康和腹泻断奶仔猪肠道病毒功能基因主坐标分析

Fig 1.10 Principal Co-ordinates Analysis of viral functional genes of healthy and diarrheal weaning piglet samples

### 1.3.8.3 肠道病毒 KEGG 功能基因鉴定及丰度分析

将鉴定的功能基因与 KEGG 数据库比对后鉴定出 34 种 KEGG 二级子功能基因，其中 15 个子功能基因在健康仔猪回肠，盲肠与粪便组之间存在显著丰度差异（图 1.11）。与健康仔猪样本相比，腹泻仔猪回肠、盲肠以及粪便中分别有 9 种、1 种和 8 种功能基因丰度发生显著性改变，例如腹泻导致仔猪粪便中 Global and overview maps、Nucleotide metabolism、Metabolism of cofactors and vitamins、Xenobiotics biodegradation and metabolism、Membrane transport、Cell motility 和 Immune disease 功能基因丰度显著上调（图 1.11）。

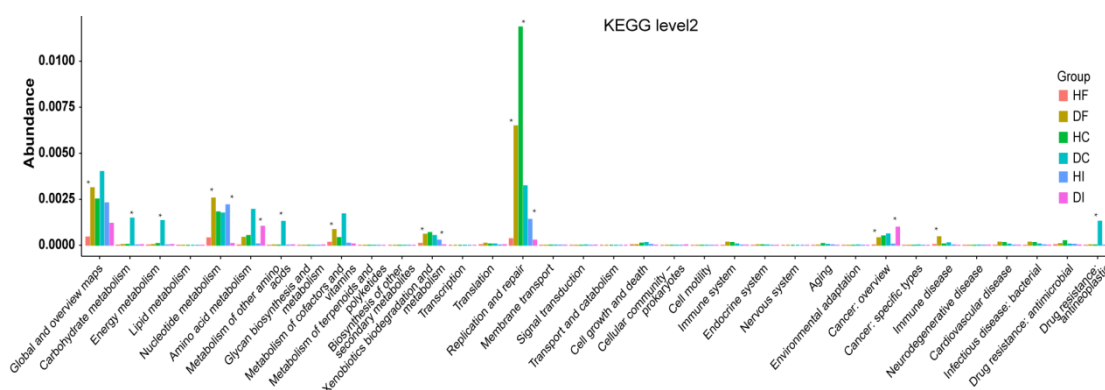


图 1.11 KEGG 基因 (Level 2) 相对丰度统计

Fig 1.11 Relative abundance statistics of KEGG gene (Level 2)

## 1.4 讨论

宏基因组测序的发展极大地扩展了人们对肠道微生物组在人类和动物健康和疾病中作用的理解。然而健康与腹泻断奶仔猪不同肠道部位中病毒群落结构和功能组成鲜为人知。由于引起断奶仔猪腹泻的因素复杂多样，在本研究中，首先通过粪便评分和肠道病理组织切片观察筛选腹泻仔猪。随后通过检测仔猪粪便中常见腹泻病毒 TGEV、PEDV 和 RV 抗原，从而排除了常见病毒感染导致腹泻的可能性。

通过对健康和腹泻断奶仔猪回肠（小肠）内容物，盲肠（大肠）内容物和新鲜粪便中的病毒 DNA 进行宏基因组测序与分析。令人惊讶的是，精选的断奶仔猪肠道病毒序列中高达 99.88% 与 Virus-VT 数据库中记录的已知病毒不匹配，这可能是由于与其他生态环境特征（土壤、水、人体肠道其他动物肠道等）相比，断奶仔猪肠道具有独特的环境特性所致<sup>[162]</sup>。本研究中鉴定的病毒 contigs 中，大多数病毒 contigs 分配给了由 *Caudovirales* 和

*Microviridae* 组成的噬菌体家族 (61.16%)。在人肠道以及其他许多生态系统中, 噬菌体群落同样由这两个噬菌体家族组成<sup>[163, 164]</sup>, 这再次证明了噬菌体在动物体内的普遍性和群落相似性。值得注意的是, 除噬菌体家族之外, 高达 27.43% 的病毒 contigs 分配给了 *Smacoviridae* 家族。据报道, *Smacoviridae* 是一个小 (~2.5Kb) CRESS-DNA (编码单链 (ss) DNA 的圆形 Rep) 病毒家族, 在包括人类在内的各种脊椎动物的粪便中普遍存在<sup>[165, 166]</sup>。César D éz-Villaseñor 等人<sup>[167]</sup>研究表明肠道产甲烷古菌是 *Smacoviridae* 病毒宿主的可靠候选者, 证明 *Smacoviridae* 是迄今为止已知感染原核生物的基因组最小的病毒。因此, *Smacoviridae* 病毒在猪肠道生态系统中的作用及其与疾病之间的关系值得进一步的研究。

出于实际原因, 粪便通常是研究肠道微生物群落的首选样本<sup>[168]</sup>。然而, 研究离散肠道位置的细菌提高了对复杂哺乳动物生态系统中共同进化的细菌伴侣进行推断的能力<sup>[1, 169]</sup>。先前的研究利用 16S rRNA 基因序列和细菌成员和功能的宏基因组分析揭示了小肠和大肠位置之间的巨大差异<sup>[147]</sup>。本研究表明, 健康仔猪的不同肠道样本 (回肠内容物、盲肠内容物和粪便) 中总病毒群落结构组成及其功能存在很大差异, 腹泻改变了仔猪肠道病毒群落多样性及分布模式, 这表明肠道病毒组与断奶仔猪腹泻有关。噬菌体是不同生态系统中细菌多样性和适应性的主要驱动因素<sup>[17, 170]</sup>。考虑到噬菌体丰度在断奶仔猪肠道病毒中的占比优势, 噬菌体可能在仔猪肠道原核病毒中起主导作用, 仔猪腹泻可能与肠道噬菌体群落有关。此外, 腹泻仔猪中噬菌体群落的变化可能通过捕食或寄生关系对细菌微生物组产生重大影响。因此, 有必要对健康和腹泻断奶仔猪肠道病毒中噬菌体群落组成及其与宿主之间的关系进行深入分析。

## 1.5 小结

**1.5.1** 成功对 24 份断奶仔猪肠道样本中病毒 DNA 进行宏基因组测序, 通过对序列的筛选和鉴定, 获得 50,756 个病毒序列。

**1.5.2** 断奶仔猪肠道病毒序列中, 约 99.88% 与 NCBI-NT 病毒数据库中的病毒序列不匹配, 表明了仔猪肠道病毒组序列的高度新颖性。

**1.5.3** 噬菌体是断奶仔猪肠道病毒的主要组分, 且主要由有尾噬菌体目 (*Caudovirales*) 和微小噬菌体科 (*Microviridae*) 组成。健康仔猪回肠、盲肠和粪便样本中病毒分布及病毒功能类型具有显著差异, 腹泻仔猪不同肠道样本中病毒分布模式及功能类型发生改变。





## 第2章 腹泻断奶仔猪肠道噬菌体群特异性改变及其与菌群相关性分析

噬菌体是细菌的寄生病毒，在维持地球上的微生物平衡方面发挥着至关重要的作用，已被公认为一种巨大的未开发资源。病毒宏基因组学研究已经揭示了人类肠道微生物群中重要的病毒成分。真核和原核病毒都是微生物群的一部分，属于原核病毒的噬菌体占主导地位<sup>[9, 10]</sup>。肠道噬菌体以两种状态存在：作为感染性裂解颗粒或整合在细菌染色体内的溶原性噬菌体元素。在没有疾病的情况下，肠道噬菌体种群在个体之间表现出显著的多样性并且在时间上是稳定的<sup>[164, 171]</sup>。然而，疾病状态下肠道噬菌体则发生特异性改变，并可能在肠道生理中发挥直接作用或通过捕食者与猎物的关系改变细菌微生物组<sup>[13, 15]</sup>。近年来，研究人员陆续揭示了肠道噬菌体群与人类炎症性肠病（IBD）、2型糖尿病甚至语言记忆之间的相关性<sup>[13-16]</sup>，表明肠道噬菌体在维持人体健康状态方面发挥着重要作用。然而，人们对断奶仔猪肠道噬菌体组成和分布了解有限，对腹泻状态下断奶仔猪肠道噬菌体的特异性改变及其与肠道菌群之间关系的了解更是少之又少。

上一章节研究表明噬菌体是断奶仔猪肠道主要病毒成分，在本章节中，通过对仔猪各肠道样本中的总DNA进行测序，综合病毒组数据，进一步分析健康和腹泻断奶仔猪肠道噬菌体群落差异及其与肠道菌群之间的关系。

### 2.1 材料

#### 2.1.1 主要试剂

琼脂糖、ALFA-SEQ 高级土壤 DNA 试剂盒（mCHIP 生物技术有限公司，广州，中国）、DNA 文库制备试剂盒(NEB Next® Ultra™，新英格兰生物实验室，马萨诸塞州，美国)

#### 2.1.2 主要仪器

荧光定量仪（Qubit 4.0，赛默飞世尔科技公司，沃尔瑟姆，美国）、超微量分光光度计（Nanodrop One，赛默飞世尔科技公司，沃尔瑟姆，美国）、Illumina Novaseq 6000 高通量测序仪、高通量核酸蛋白质分析系统（Qsep400，厚泽生物科技有限公司，杭州，中国）

## 2.2 方法

### 2.2.1 健康和腹泻断奶仔猪肠道测序样本的收集和处理

本研究中测序样本来自第 1 章节中采集的各断奶仔猪肠道样本。

### 2.2.2 总 DNA 提取

使用高级土壤 DNA 试剂盒，根据制造商的说明，提取每个样品的总 DNA。使用 1% 琼脂糖凝胶上测定 DNA 的完整性和纯度。DNA 的浓度和纯度通过使用荧光定量仪和超微量分光光度计测量。

### 2.2.3 文库制备和宏基因组测序

使用 DNA 文库制备试剂盒，根据其附带的说明书完成建库。文库质量在 Qubit 4.0 荧光定量仪和 Qsep 400 高通量核酸蛋白质分析系统上进行评估。最后，在 Illumina Novaseq 6000 高通量测序平台上对该文库进行测序，生成 150 bp 双末端读数。

### 2.2.4 原始数据质控、组装和非冗余基因集构建

使用软件 Trimmomatic (v.0.36)<sup>[149]</sup>对原始 reads 进行质量控制去除低质量序列。质控后的 clean reads 用 MEGAHIT (v.1.1.2)<sup>[152]</sup>组装序列，并将各样品未被利用上的 Reads 放在一起进行混合组装，以期发现样品中的低丰度物种信息。采用 MetaGeneMark (v.3.38)<sup>[157]</sup>来预测开放阅读框 (ORF)。采用 CD-HIT (v.4.7)<sup>[153]</sup>按同一性聚类的 95%，覆盖率 90% 去除冗余，选择最长的代表序列，得到非冗余的 gene catalogue (Unigenes)。

### 2.2.5 基因丰度计算及物种功能注释

使用 BMAP 软件 (<http://jgi.doe.gov/data-and-tools/bbtools/>) 将每个样本的 Clean Data 映射到 Unigenes，并获取每个样本中基因映射到的 reads 数样本。根据映射 read 数和基因长度，统计每个样本中每个基因的丰度信息。将非冗余基因集的 Unigenes 序列与 NCBI-NR 数据库比对进行物种注释，获得 Unigenes 的物种注释信息，并结合基因丰度表，获得各个分类层级的物种组成和丰度信息。另外，利用软件 metaphlan2<sup>[172]</sup>将 CleanReads 快速分类到物种上，作为基于 NR 数据库的物种注释方法的补充。

## 2.2.6 噬菌体-宿主预测

使用 CRISPR Recognition Tool (CRT)<sup>[173]</sup> 从 Refseq 数据库的细菌基因组中构建 CRISPR-Cas spacer 数据库, 然后使用 Blastn-short (v.2.9.0+) 与前述鉴定的病毒 contigs 比对, 满足  $e \leq 1e-10$ , 比对相似性  $\geq 95\%$ , spacer 的覆盖度达到 80% 的条件下取 best hit 作为噬菌体可能的宿主信息<sup>[79]</sup>, 统计宿主种属水平信息。由于目前已知的 spacer 序列有限, 因此只有一部分病毒 contigs 能预测出可能的宿主。

## 2.2.7 数据分析

本研究涉及的数据分析和可视化过程使用 R 软件 (v.3.6.3), Cytoscape 软件 (v.3.2.1) 和 Excel 2013 进行。使用 R 包 vegan 进行相关性计算和 Bray-curits 距离计算, 使用 R 包 ggplot2 绘制 PCoA 图, 柱形图, 箱线图和热图。使用 R 包 circlize 绘制圈图。使用 Excel 2013 绘制饼图和折线图。分别统计不同样本中 *Caudovirales* 和 *Microviridae* 对应的 contig 条数, 通过随机抽样的形式分别统计不同样本数量情况下的 contig 数量, 由 R 包 vegan 分别生成稀释曲线。使用 LEfSe 计算和可视化组间在丰度上有显著差异的病毒, LDA 最小值设置为 3<sup>[174]</sup>。噬菌体与细菌丰富度和多样性分析基于 spearman 相关系数绘制热图。样本中噬菌体 contigs 共线网络分析基于病毒丰度表, 分别对两个 *Caudovirales* 和 *Microviridae* 进行 contig 挑选, 统计样品的 contig 数量和共有 contig, 使用 Cytoscape 软件画图。基于噬菌体宿主预测结果信息, 使用 R 包 ggalluvial 绘制桑基图。使用 R 软件基础包进行统计分析, 差异星号对应的 p 值: \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ 。

## 2.2.8 数据可用性

这项研究中产生的所有原始序列数据都已存入基因组序列档案 (GSA) (<https://bigd.big.ac.cn/gsub/>) 中国科学院北京基因组研究所 BIG 数据中心, 登录号 CRA006589。

## 2.3 结果

### 2.3.1 断奶仔猪肠道 *Caudovirales* 和 *Microviridae* 病毒群相对丰度分析

对健康和腹泻仔猪样本中 *Caudovirales* 和 *Microviridae* 病毒群相对丰度进行分析, 结果显示无论是健康还是腹泻样本, *Microviridae* 病毒群相对丰度均显著高于 *Caudovirales* ( $P$

< 0.01) (图 2.1A)。健康仔猪的回肠、盲肠和粪便样本中的 *Caudovirales* 病毒群丰度依次降低, 盲肠和粪便样本之间存在显著差异 ( $P < 0.05$ ) (图 2.1B)。与健康仔猪相比, 腹泻仔猪粪便样本中的 *Caudovirales* 病毒群丰度显著增加 ( $P < 0.01$ ) (图 2.1A)。这些差异不太可能归因于健康和腹泻仔猪中样本数量或 unique 序列的不均匀, 因为腹泻仔猪样本中新噬菌体分类群的获取速度快于健康仔猪样本中新分类群的获取速度(图 2.1C)。相比之下, 腹泻仔猪样本中 *Microviridae* contigs 的丰度降低 (图 2.1A,B)。

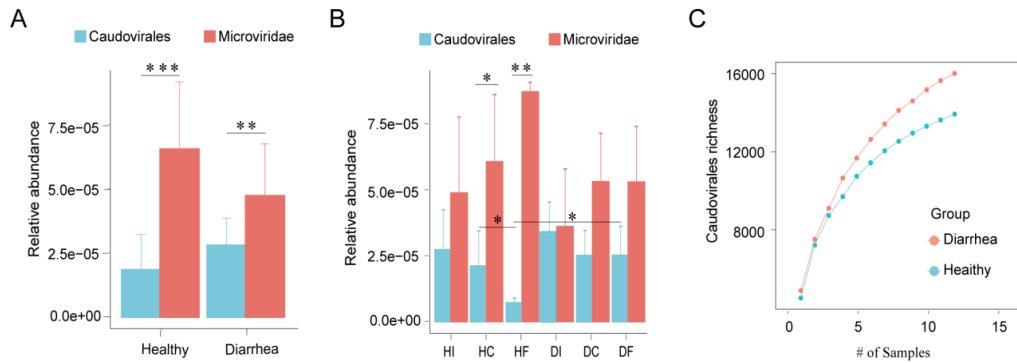


图 2.1 腹泻仔猪肠道中 *Caudovirales* 分类群的相对丰度增加。

Fig 2.1 Increased relative abundance of *Caudovirales* taxa in the intestine of piglets with diarrhea.

(A 和 B) 健康和腹泻仔猪样本中 *Microviridae* 和 *Caudovirales* 病毒分类群相对丰度的比较; (C) *Caudovirales* 丰富度随替换的子采样数量的增加的稀疏曲线。丰富度基于组装的 *Caudovirales* contigs。

(A and B) Comparison of the relative abundances of *Microviridae* and *Caudovirales* in healthy and diarrheal piglet samples; (C) Rarefaction curves of *Caudovirales* richness versus an increasing number of subsamplings with replacement. Richness based on assembled *Caudovirales* contigs.

### 2.3.2 断奶仔猪各肠道 *Caudovirales* (科水平) 相对丰度分析

对 *Caudovirales* 科水平的分类群丰度分析, 结果表明 *Herelleviridae*、*Myoviridae* 和 *Siphoviridae* 病毒群分别在健康仔猪回肠, 盲肠和粪便中发生富集。腹泻导致仔猪各肠道样本中优势噬菌体成分发生改变。具体而言, 腹泻仔猪回肠中 *Herelleviridae* 病毒群丰度减少, 而 *Myoviridae* 和 *Podoviridae* 病毒群分别在盲肠和粪便中富集 (图 2.2)。值得注意的是, 仅在健康仔猪盲肠样本中检测到 *Ackermannvirida* 病毒群, 但在腹泻仔猪各肠道样本中均检测

到 *Ackermannviridae* 病毒群 (图 2.2)。

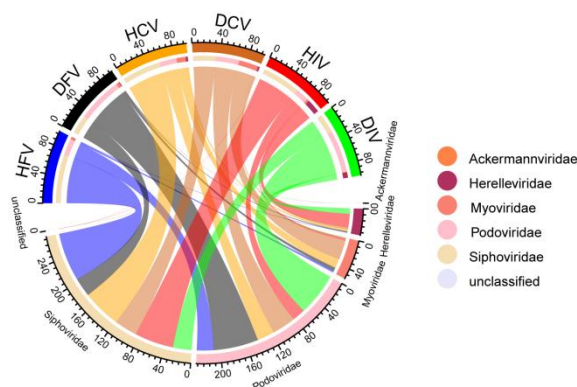


图 2.2 健康和腹泻仔猪不同肠道样本中 *Caudovirales* (科水平) 相对丰度分析

Fig 2.2 Analysis of relative abundance of *Caudovirales* (family level) in different intestinal samples of healthy and diarrhea piglets

### 2.3.3 断奶仔猪肠道噬菌体群落多样性分析

多样性分析表明健康和腹泻仔猪各肠道样本之间噬菌体分类群类型和富集性存在极大差异。在所有样本中都观察到大量的噬菌体 contigs, 但每个样本都具有特有的噬菌体 contigs (图 2.3A)。健康仔猪粪便样本噬菌体物种多样性显著低于回肠 ( $P < 0.05$ ) 和盲肠 ( $P < 0.05$ )。相比之下, 腹泻仔猪粪便样本噬菌体物种多样性显著升高 ( $P < 0.05$ ), 回肠 ( $P < 0.05$ ) 和盲肠 ( $P = 0.057$ ) 样本物种多样性降低 (图 2.3B)。此外, 主坐标分析显示健康仔猪不同肠道样本分开聚集, 但腹泻仔猪各肠道样本发生交叉聚集, 表明健康仔猪回肠、盲肠和直肠内容物中噬菌体群落显著不同, 腹泻仔猪导致这三个肠道部位噬菌体群落具有更高的相似性 (图 2.3C)。总之, 这些结果表明噬菌体群落在健康仔猪肠道中分布不均衡, 腹泻改变了噬菌体群落多样性和组成模式。

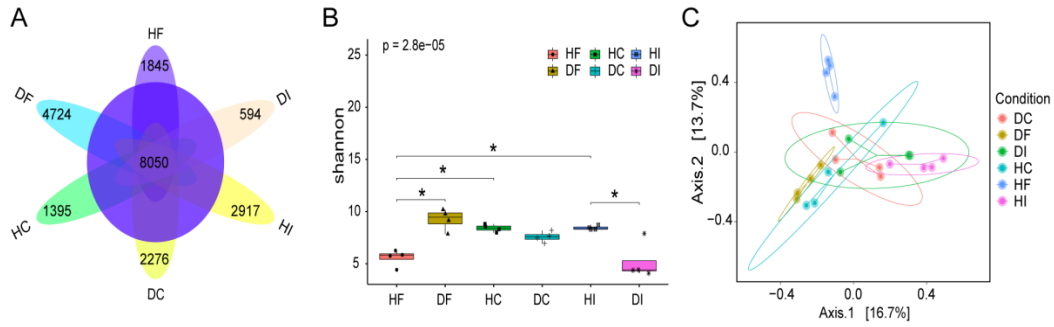


图 2.3 健康和腹泻仔猪肠道噬菌体多样性分析

Fig 2.3 Analysis of intestinal phages diversity in healthy and diarrhea piglets

(A) Venn 图显示不同肠道样本中噬菌体 contigs 数量；(B) Shannon 指数分析不同肠道样本中噬菌体多样性；(C) PCoA 分析不同肠道样本中噬菌体相似性。

(A) Venn diagram shows the number of phage contigs in different intestinal samples; (B) Shannon index analysis of phages diversity in different intestinal samples; (C) PCoA analysis of phages similarity in different intestinal samples.

当观察仔猪样本中 *Caudovirales* 及 *Microviridae* 噬菌体 contigs 在仔猪肠道中的存在情况时，发现健康仔猪回肠中 *Caudovirales* 和 *Microviridae* 共享和单个 contigs 数量最多，并在盲肠和粪便样本中依次减少（图 2.4A）。相比之下，腹泻仔猪回肠中 *Caudovirales* 和 *Microviridae* 共享和单个 contigs 数量最少，并在盲肠和粪便样本中依次增加（图 2.4B）。此外，腹泻仔猪回肠中 *Caudovirales* 和 *Microviridae* 单个 contigs 数量显著降低 ( $P < 0.05$ )（图 2.4C），粪便样本中 *Caudovirales* 和 *Microviridae* 单个 contigs 数量显著升高 ( $P < 0.001$ )（图 2.4D）。这再次表明噬菌体在健康仔猪不同肠道空间分配不均衡，随着仔猪从健康状态向腹泻状态的转变，噬菌体在肠道内的分布发生改变。

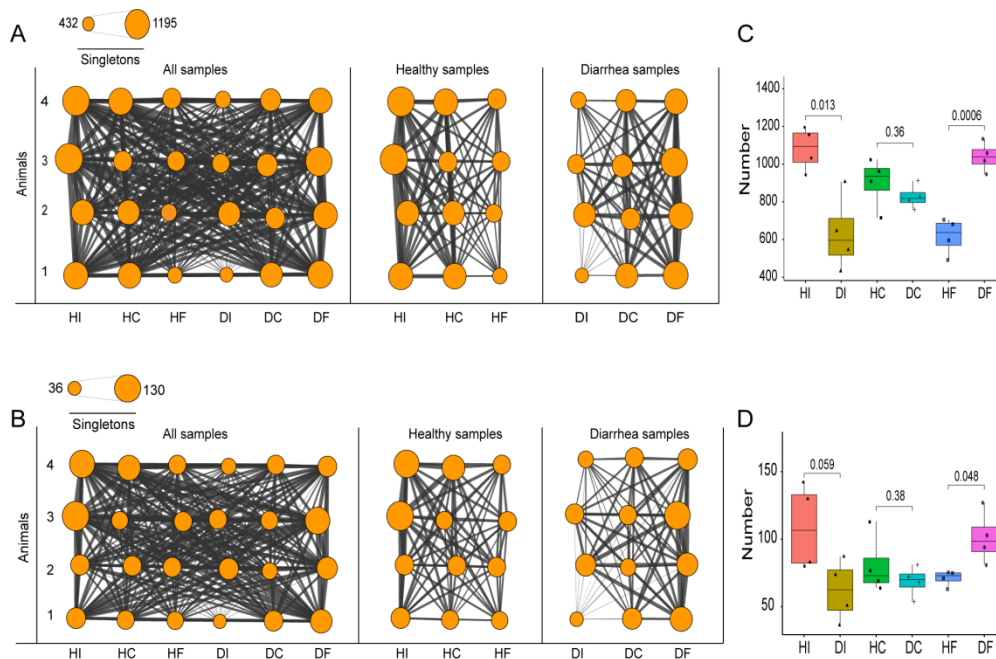


图 2.4 健康和腹泻肠道样本中噬菌体 contigs（共享和单个）关联分析

Fig 2.4 Connected analysis of phage contigs (shared and singleton) in healthy and diarrhea intestinal samples

### 2.3.4 断奶仔猪肠道细菌群落分布和多样性分析

为探索断奶仔猪肠道噬菌体群落与细菌群落相关。对仔猪肠道样本总 DNA 进行了宏基因组测序与分析。与肠道噬菌体群落相似，健康仔猪回肠、盲肠和粪便样本中细菌类群的富集具有很大差异，腹泻改变了各肠道样本中富集的细菌类群（图 2.5A）。此外，与肠道噬菌体群落相似，主成分分析显示健康仔猪回肠、盲肠和粪便样本分开聚集，而腹泻仔猪肠道样本发生聚集（图 2.5B）。但是，与噬菌体群落不同的是，健康仔猪粪便样本中细菌物种多样性显著高于回肠和盲肠样本（ $P < 0.05$ ），且回肠样本细菌物种多样性显著高于盲肠样本（ $P < 0.05$ ）。此外，与健康组样本相比，腹泻导致粪便样本物种多样性显著降低（ $P < 0.05$ ）（图 2.5C）。这些结果表明细菌群落在健康仔猪肠道中分布不均衡，腹泻导致肠道菌群与噬菌体病毒群发生了平行变化。



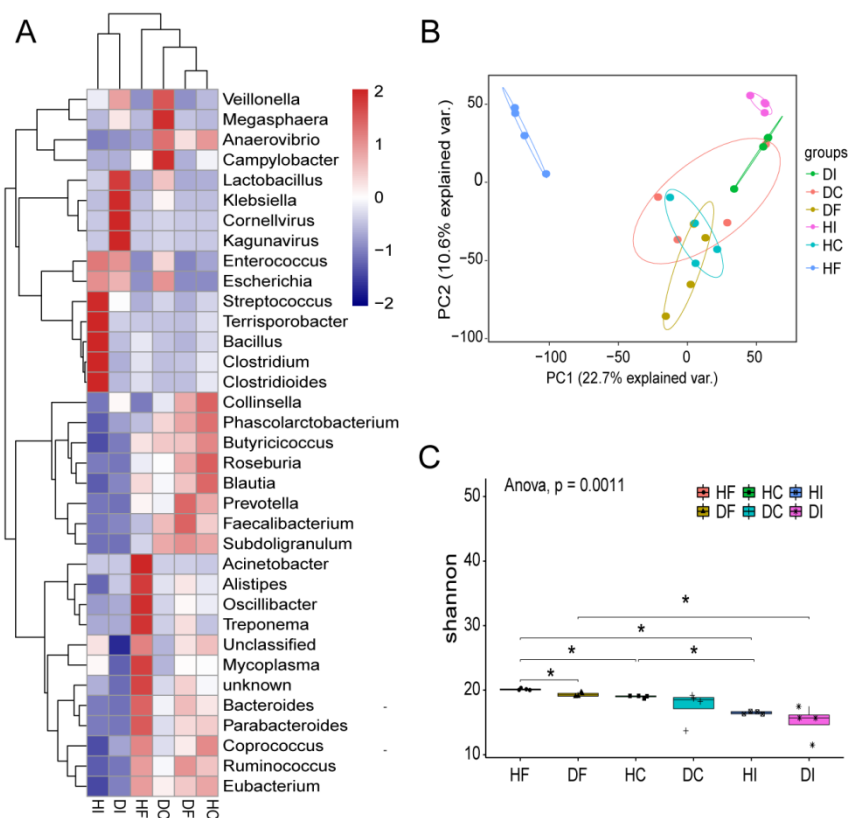


图 2.5 健康和腹泻仔猪肠道菌群多样性分析

Fig 2.5 Analysis of intestinal intestinal flora diversity in healthy and diarrhea piglets

(A) 健康和腹泻仔猪不同肠道样本中细菌（属）丰度的差异；(B) PCA 分析不同样本中的细菌群落相似性；(C) Shannon 指数分析不同样本中细菌多样性。

(A) Differences in the abundances of bacterial (genera) in the intestine of healthy and diarrheal piglets; (B) PCA analysis of bacterial community similarity in different samples; (C) Shannon index analysis of bacterial diversity in different samples.

### 2.3.5 断奶仔猪肠道噬菌体与细菌群落相关性分析

为表征仔猪肠道噬菌体与细菌群之间的关系，分别计算了噬菌体的丰富度和多样性与细菌的丰富度和多样性之间的 Spearman 相关系数。结果表明健康仔猪肠道 *Caudovirales* 丰富度多样性与菌群丰富度和多样性之间都存在显著负相关关系 ( $P < 0.05$ )。而在腹泻仔猪肠道中，*Caudovirales* 丰富度和多样性与菌群丰富度和多样性之间则表现为显著正相关关系 ( $P < 0.05$ ) (图 2.6A)。相比之下，健康和腹泻仔猪肠道中 *Microviridae* 与菌群之间存在类似反相关关系，但没有 *Caudovirales* 显著 (图 2.6B)。这表明腹泻改变了肠道噬菌体与菌群之间的相关性，这种改变主要与 *Caudovirales* 病毒类群有关。

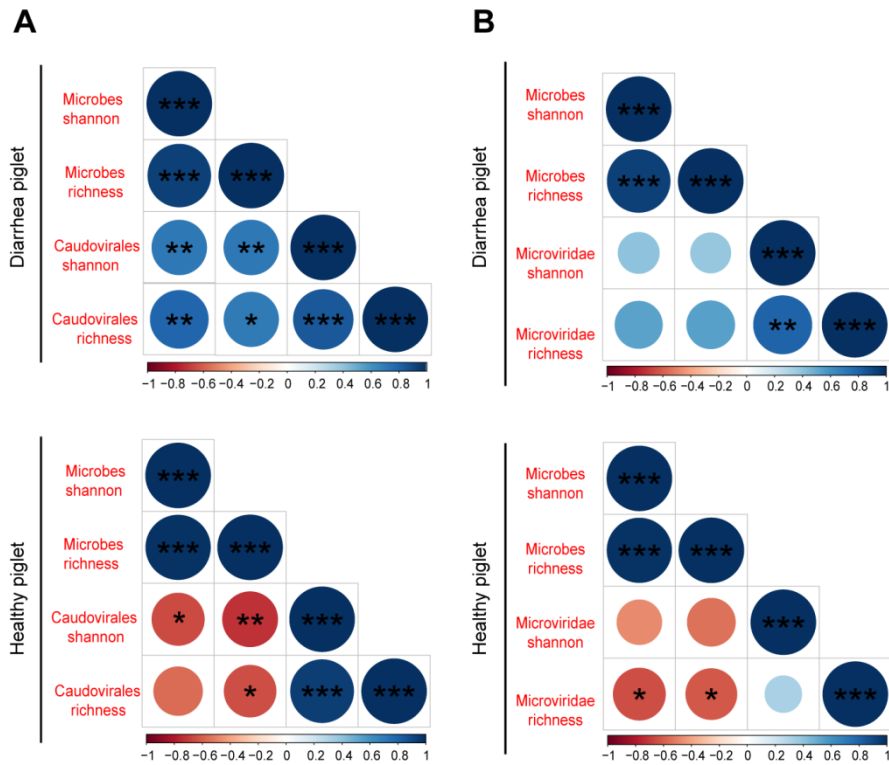


图 2.6 健康和腹泻仔猪肠道噬菌体与细菌群落 Spearman 相关性分析

Fig 2.6 Spearman correlation analysis of intestinal phages and bacterial community in healthy and diarrhea piglets

为进一步描述 *Caudovirales* 与菌群之间的关系，计算了 *Caudovirales* 类群（科水平）与细菌类群（科水平）之间的 Spearman 相关性。结果显示与总体多样性和丰富度相关性相似，健康和腹泻仔猪肠道中 *Caudovirales* 与多种细菌类群之间存在反相关关系（图 2.7）。其中具有显著性关系的细菌类群包括普雷沃氏菌科（*Prevotellaceae*）、乳酸杆菌科（*Lactobacillaceae*）、梭菌科（*Clostridiaceae*）、毛螺菌科（*Lachnospiraceae*）、瘤胃球菌科（*Ruminococcaceae*）、链球菌科（*Streptococcaceae*）、肠杆菌科（*Enterobacteriaceae*）以及拟杆菌科（*Bacteroidaceae*）。例如，在健康仔猪肠道样本中肌尾噬菌体科与普雷沃氏菌科呈负相关，与拟杆菌科呈正相关。与之相反的是，腹泻仔猪肠道中肌尾噬菌体科与普雷沃氏菌科呈正相关，与拟杆菌科呈负相关。这表明腹泻仔猪肠道噬菌体与细菌群落相关性的改变仅限于特定分类群。

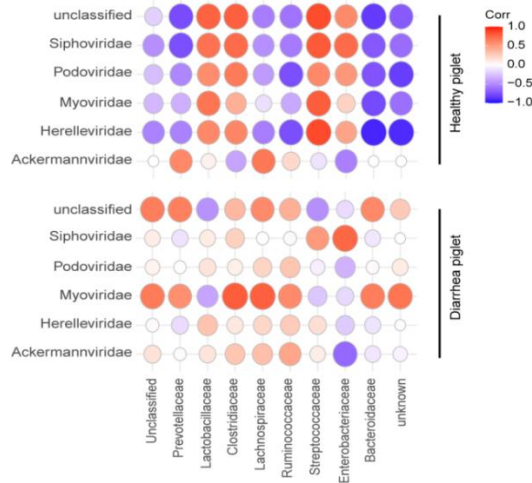


图 2.7 健康和腹泻仔猪肠道噬菌体与细菌在科水平的 Spearman 相关性分析

Fig 2.7 Spearman correlation analysis of intestinal phages and bacteria in healthy and diarrhea piglets at family level

### 2.3.6 仔猪肠道噬菌体群落 LEfSe 分析

LEfSe 分析鉴定了健康和腹泻仔猪样本中潜在的噬菌体生物标志物。如图 2.8 所示，属于 *Siphoviridae* 的红球菌属噬菌体 Sleepyhead 和属于 *Podoviridae* 的拟杆菌属噬菌体 crAss001 分别在健康仔猪回肠和盲肠中富集，而属于 *Siphoviridae* 的链球菌属噬菌体 M102 和梭菌属噬菌体 PhiS63 在粪便中富集（图 2.8A）。然而，腹泻仔猪粪便中拟杆菌属噬菌体 crAss001 发生富集（图 2.8B）。表明拟杆菌属噬菌体 crAss001 可能是腹泻断奶仔猪粪便中的潜在生物标志物。

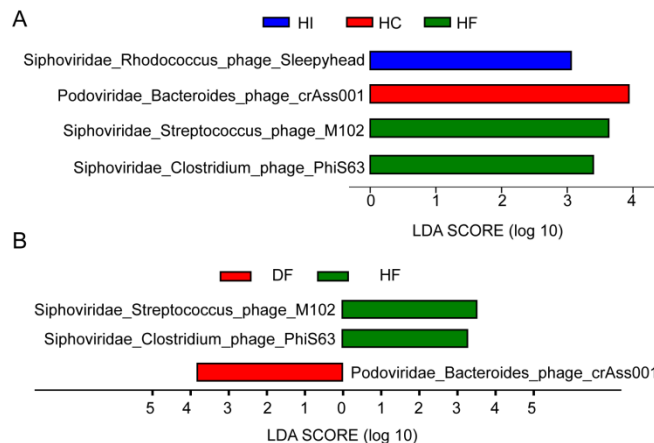


图 2.8 LEfSe 分析鉴定健康和腹泻仔猪病毒群生物标志物，LDA 评分 > 3.0。

Fig 2.8 Identification of biomarkers of healthy and diarrhea piglets using LEfSe analysis, and LDA scores > 3.0.

### 2.3.7 噬菌体-宿主预测分析

将鉴定病毒 contigs 与 RefSeq 数据库中细菌基因组构建的 CRISPR spacer 数据库进行匹配,分析和预测病毒的宿主谱。结果在 505 个噬菌体 contigs 和 111 个细菌属之间共获得 683 个匹配(图 2.9, 图 2.10A)。匹配的 111 个细菌属来自 10 个细菌门,其中大多数属于厚壁菌门(*Firmicutes*) (42.18%)、变形菌门(*Proteobacteria*) (29.75%) 和拟杆菌门(*Bacteroidetes*) (26.35%) 的成员,这些菌门同样是细菌群落中的主要菌门(图 2.9, 图 2.10B, 2.10C)。与三个主要菌门匹配的噬菌体在健康仔猪回肠,盲肠和粪便中丰度占比具有很大差异。具体而言,厚壁菌门噬菌体在健康仔猪回肠、盲肠和粪便中的占比分别为 85.96%、18.32% 和 47.04%;变形菌门噬菌体分别为 5.85%、9.90% 和 30.63%;而拟杆菌门噬菌体则分别为 7.71%、71.36% 和 15.16%。与健康仔猪肠道样本相比,腹泻导致仔猪各肠道样本中噬菌体丰度发生改变。例如,腹泻导致粪便样本中厚壁菌门噬菌体减少至 23.43%,变形菌门噬菌体减少至 21.09%,而拟杆菌门噬菌体增加至 54.62%。

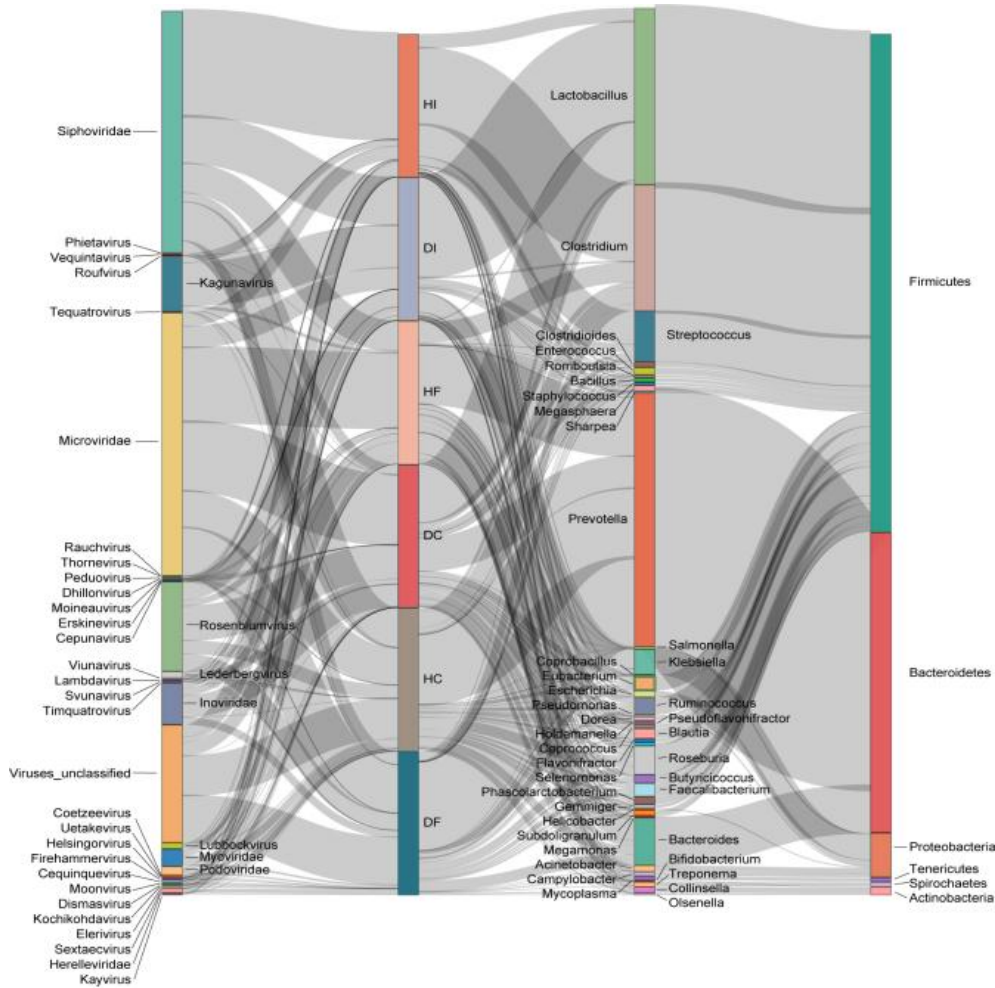


图 2.9 健康和腹泻仔猪样本中预测噬菌体-宿主关联性分析。从左至右，第一列显示了六种不同样本中与宿主相关的病毒群；第二列显示了六个采样点，即健康仔猪的回肠（HI）、盲肠（HC）和粪便（HF），以及腹泻仔猪的回肠、盲肠（DC）和粪便（DF）；第三列显示了细菌宿主在属水平的分布（筛选出丰度 > 1% 的属进行分析）；第四列显示了宿主细菌在门水平的分布。除第二列外，其他列不同部分的高度代表病毒和宿主的丰度。

Fig. 2.9 Predicted phages–host linkages analysis in healthy and diarrheal piglet samples. From left to right, the first column depicts the viral contigs linked to hosts in six different samples; The second column shows the six sampling sites, the ileum (HI), cecum (HC), and feces (HF), of healthy piglets and the ileum (DI), cecum (DC) and feces (DF) of diarrheal piglets; The third column shows the distribution of bacterial hosts at the genus level (genera with abundance >1 % were screened for analysis); The fourth column shows the distribution of bacterial hosts at the phylum level. Except for the second column, the heights of different parts of the other columns represent the abundances of viruses and hosts.

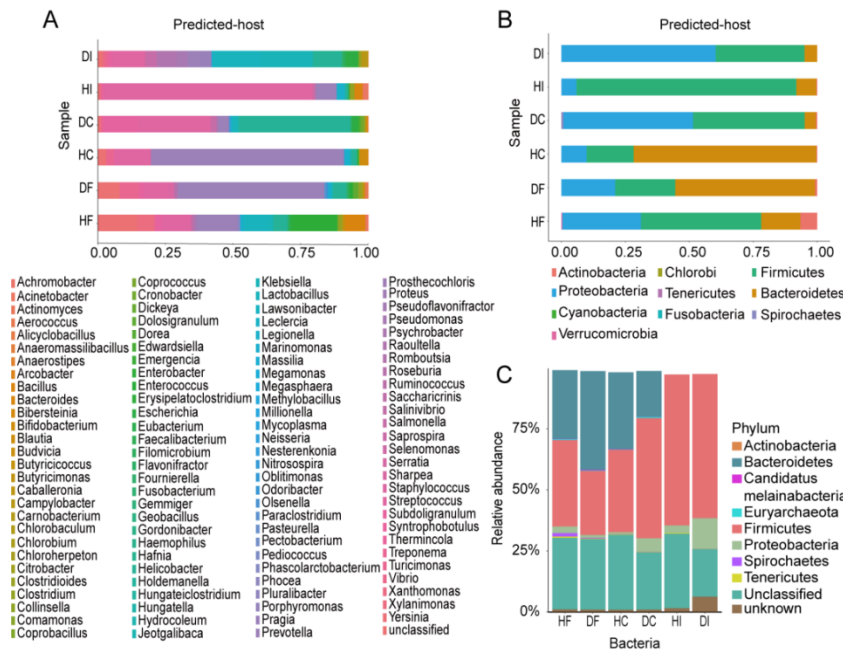


图 2.10 预测的病毒-宿主分析 (A) 预测的病毒宿主 (属水平) 及其相对丰度分布; (B) 预测的病毒宿主 (门水平) 及其相对丰度分布; (C) 宏基因组分析显示相对丰度最高的前 10 种细菌 (门水平)。

Fig. 2.10 Predicted virus–host analysis. (A) The relative abundance distribution of predicted viral hosts (genus level); (B) The relative abundance distribution of predicted viral hosts (phylum level); (C) Top 10 bacteria at the phylum level in relative abundance by metagenomic analysis.

### 2.3.8 不同肠道样本中预测的噬菌体丰度比较

在预测的噬菌体中，对相对丰度较高的噬菌体丰度进行比较分析，结果发现这些噬菌体对应的宿主主要是一些常见病原菌属，且相对丰度在不同肠道部位具有明显差异（图 2.11）。例如，与健康仔猪相比，腹泻仔猪回肠样本中沙门氏菌属（*Salmonella*），肺炎克雷伯氏菌属（*Klebsiella*）和乳酸杆菌属（*Lactobacillus*）噬菌体富集，而梭状芽孢杆菌属（*Clostridium*）和链球菌属（*Streptococcus*）噬菌体丰度减少。盲肠样本中弯曲杆菌属（*Campylobacter*）、大肠杆菌属（*Escherichia*）、肠球菌属（*Enterococcus*）、葡萄球菌属（*Staphylococcus*）和乳酸杆菌属（*Lactobacillus*）噬菌体富集，但是普雷沃氏菌属（*Prevotella*）和瘤胃球菌属（*Ruminococcus*）属噬菌体丰度减少。此外，在腹泻仔猪粪便中观察到普雷沃氏菌属噬菌体的富集。

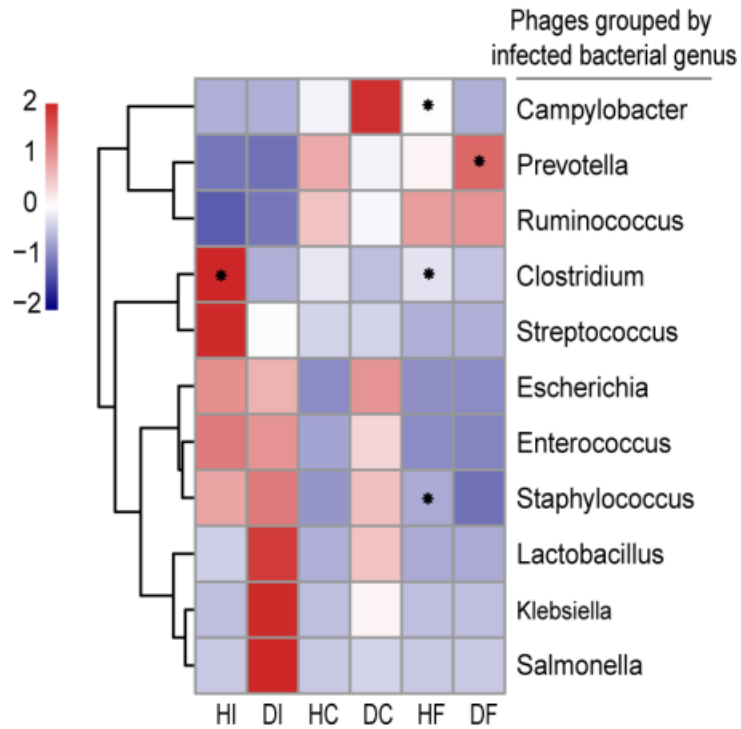


图 2.11 仔猪不同肠道样本中预测噬菌体相对丰度比较

Fig. 2.11 The relative abundance of predicted phages in different intestinal samples of piglets

为了解噬菌体 contigs 匹配的所有宿主菌在肠道细菌群落中的分布情况，计算了肠道菌群中这些噬菌体宿主菌在属水平上的相对丰度。结果表明，在仔猪肠道菌群中，相应的噬菌体宿主菌的相对丰度在仔猪不同肠道样本中发生了一致的变化（图 2.12）。这些结果表明仔猪肠道噬菌体随宿主菌的丰度的改变而改变，遵循典型的捕食者-猎物模式。

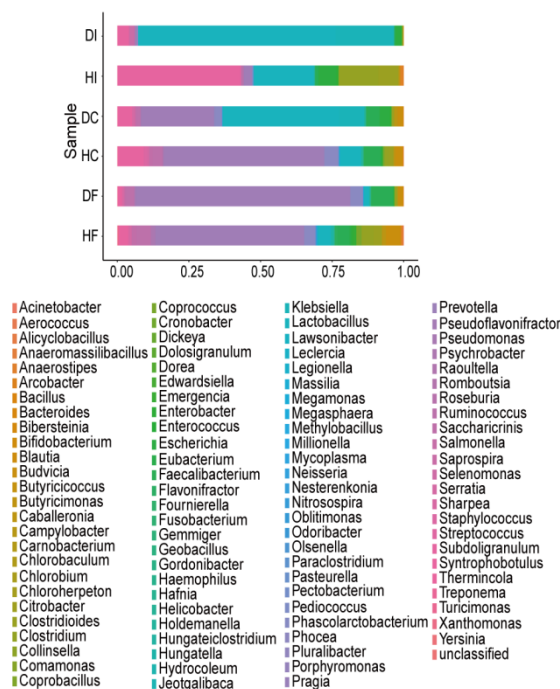


图 2.12 预测的病毒宿主在肠道菌群中的相对丰度

Fig. 2.12 The relative abundance of predicted virus hosts in intestinal flora

### 2.3.9 多价噬菌体分析

拥有多个宿主菌的噬菌体被称为多价噬菌体。通过对噬菌体匹配的宿主菌类别进行分析，结果显示在所有匹配的噬菌体 contigs 中，尽管 78% (394/505) 的噬菌体 contigs 仅对一个菌属或菌种特异性匹配。但近 22% (111/505) 的噬菌体 contigs 与两个或多个菌属 (37 个 contigs) 或菌种 (74 个 contigs) 相匹配 (图 2.13, 附表 S1)。

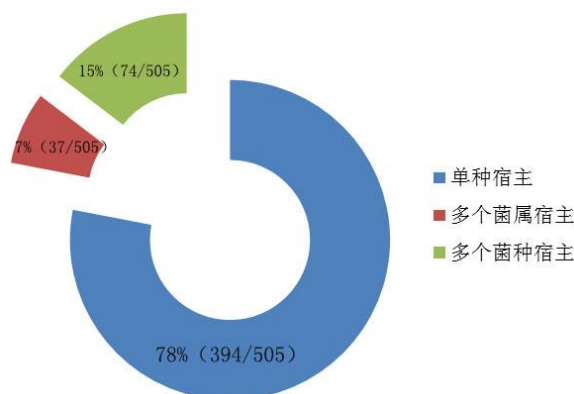


图 2.13 噬菌体-宿主预测分析

Fig. 2.13 Phage-host prediction analysis



对健康和腹泻仔猪肠道样本中多价噬菌体的多样性进行分析。结果表明，健康仔猪回肠、盲肠和粪便样品中多价噬菌体的多样性依次降低，回肠和粪便样品之间存在显著差异 ( $P < 0.05$ )。然而，与健康仔猪相比，腹泻仔猪粪便中多价噬菌体物种多样性显著更高 ( $P < 0.05$ ) (图 2.14)。具体而言，在健康仔猪粪便中，只有 3 个噬菌体 contigs 被鉴定为多价噬菌体，匹配的宿主细菌种类包括乳杆菌 (*Lactobacillus*)、土芽孢杆菌 (*Geobacillus*) 和片球菌 (*Pediococcus*)。然而，在腹泻粪便样本中被鉴定为多价噬菌体 contigs 数量增加到 26 个，匹配的宿主细菌种类包括弯曲杆菌 (*Campylobacter*)、链球菌 (*Streptococcus*)、葡萄球菌 (*Staphylococcus*)、肠球菌 (*Enterococcus*)、克雷伯氏菌 (*Klebsiella*)、沙门氏菌 (*Salmonella*)、土杆菌 (*Geobacillus*) 和硝基螺旋菌 (*Nitrospira*) (附表 S1)。

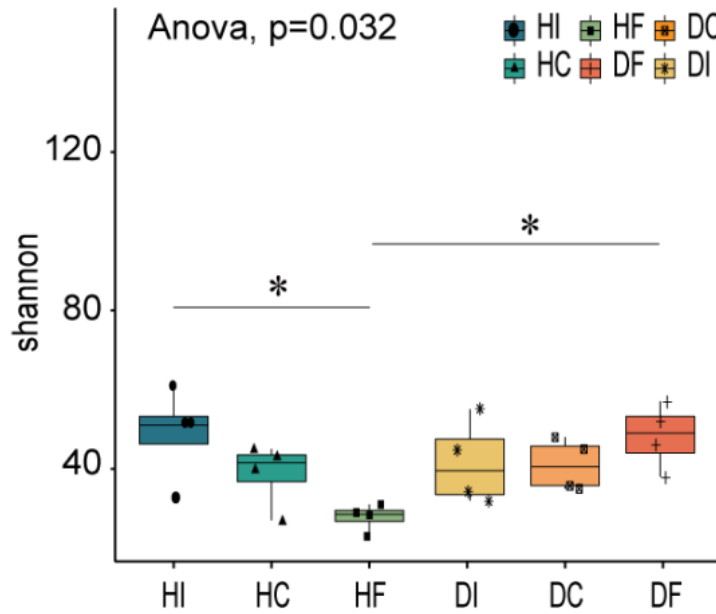


图 2.14 仔猪不同肠道样本中多价噬菌体的多样性分析

Fig. 2.14 Diversity analysis of polyvalent phages in different intestinal samples of piglets

## 2.4 讨论

本章节研究发现健康断奶仔猪回肠、盲肠和粪便样本中噬菌体群落组结构和物种多样性具有很大差异。腹泻导致 *Caudovirales* 家族的富集，并改变了病毒在肠道中的分布模式。噬菌体的生物学特性已被广泛审查<sup>[17, 175]</sup>，*Caudovirales* 噬菌体丰度的增加可能是由于共生微生物中原噬菌体的诱导，或者反映了从环境中获得的新病毒的引入，例如从食物或与其他家庭的接触中获得的病毒。噬菌体是不同生态系统中细菌多样性和适应性的主要驱动因

素<sup>[17, 170]</sup>。因此,腹泻仔猪中噬菌体群落的变化可能通过捕食关系对细菌群落产生重大影响。本研究中,仔猪的肠道细菌群落与噬菌体群落发生平行变化,腹泻同样改变了仔猪肠道细菌群落的分布模式和物种多样性。有趣的是,健康和腹泻仔猪肠道噬菌体群落的丰富性和多样性与细菌微生物群的丰富性与多样性呈显著负相关。其中噬菌体主要体现在 *Caudovirales* 家族,而细菌类群则包括普雷沃氏菌科、乳酸杆菌科、梭菌科、毛螺菌科、瘤胃球菌科、链球菌科、肠杆菌科以及拟杆菌科分类群。这些结果进一步揭示了健康仔猪肠道生态系统的复杂性,表明肠道噬菌体,尤其是 *Caudovirales* 家族噬菌体与断奶仔猪腹泻有关。

在哺乳动物肠道的复杂微生物群落中,捕食细菌和捕食者噬菌体之间存在着密切的关系<sup>[176, 177]</sup>。噬菌体取决于合适细菌宿主的存在,以维持不同环境中的繁殖<sup>[79, 178]</sup>。预测的噬菌体宿主和仔猪肠道中的优势细菌之间的高度一致性进一步证实了这一结果。从进化的角度来看,适应性更强的细菌在不利条件下将具有更高的生物量和更稳定的细胞内环境,为其相应的噬菌体提供更好的生存和繁殖条件<sup>[178, 179]</sup>和低丰度宿主细菌的条件下,噬菌体会找到并选择多种合适的宿主细菌进行感染,这也是肠道噬菌体与细菌共存的重要途径<sup>[180, 181]</sup>。

除了驱动菌群组成和多样性的变化外,噬菌体群落的变化还可能对细菌微生物组产生重要影响<sup>[17]</sup>。研究表明,噬菌体还可以驱动细菌群落之间遗传物质的水平转移,包括 ARGs<sup>[182]</sup>。广泛的噬菌体诱导、突变或从外部来源引入可以有效重组细菌适应性和抗性基因<sup>[183]</sup>。潜在噬菌体的激活可导致宿主细菌的裂解,并可能产生深远的生态后果。细菌裂解还可以释放蛋白质、脂质、核酸等物质,这些物质可以作为病原体相关的分子模式和抗原,触发炎症信号的级联反应,进而诱导细胞因子、细胞浸润和组织损伤。此外,肠道噬菌体变化的另一个潜在结果可能是噬菌体与哺乳动物宿主之间的直接相互作用,因为噬菌体可以诱导体液免疫反应和产生促炎细胞因子<sup>[184]</sup>。因此,探索噬菌体和菌群在猪肠道相关疾病发病机制中的关系可能是未来研究的重要领域。

尽管仔猪腹泻的原因复杂多样,但均与仔猪肠道微生物群紊乱有关<sup>[4, 185]</sup>。因此,仔猪腹泻的诊断和治疗需要新的思路和方法。由于腹泻仔猪肠道 *Caudovirales* 显著富集,并且该噬菌体分类群已被报道与人类多种疾病的发生有关,因此对肠道 *Caudovirales* 序列的鉴定可能成为诊断仔猪腹泻及其他疾病潜在手段。LEfSe 分析在腹泻仔猪粪便病毒中发现,属于短尾噬菌体科的拟杆菌属噬菌体 crAss001 富集。crAss 样噬菌体是人类肠道病毒组中

普遍存在且高度丰富的成员，可感染拟杆菌目共生细菌。这些病毒在人类肠道微生物组中表现出长期存在，并在某些个体中占主导地位<sup>[186]</sup>。然而，噬菌体-宿主预测结果表明腹泻仔猪粪便中感染普雷沃氏菌属噬菌体 contigs 显著富集，这表明肠道噬菌体组的变化与假定的细菌宿主的变化不一致，这种现象同样出现在人类肠道噬菌体中<sup>[16]</sup>。此外，已有研究表明腹泻仔猪粪便微生物中普雷沃氏菌富集，并可能成为潜在的诊断标志物<sup>[187]</sup>。因此，普雷沃氏菌属噬菌体同样可能成为一种诊断猪腹泻疾病的候选标志物，但这需要更大的腹泻仔猪粪便病毒样本量和更大的测序数据进一步筛选和验证。

由于粪便微生物群移植（FMT）成功地治疗了艰难梭菌引起的肠道感染，来自健康供体或明确细菌培养物的 FMT 得到了广泛认可<sup>[188]</sup>。本研究表明，仔猪不同肠道部位的病毒和细菌群落差异很大，因此粪便微生物群不能代表肠道微生物群，这可能是 FMT 治疗某些疾病效果不佳的原因。研究表明，粪便病毒移植（FVT）成功地治疗了艰难梭菌感染<sup>[189]</sup>。基于噬菌体在猪肠道病毒成分中的绝对优势，对发病仔猪进行 FVT 后，噬菌体可能通过恢复和调节肠道菌群达到有效治疗腹泻及其他疾病的目的。无论是 FMT 还是 FVT，都不可避免地会影响患者和动物的肠道微生物群，而肠道病毒和菌群之间有着密切的关系，因此需要更全面地了解肠道细菌、病毒及其与宿主的相互作用，以开发预防和治疗肠道疾病，特别是腹泻个性化方法。

## 2.5 小结

**2.5.1** 健康断奶仔猪回肠、盲肠和粪便样本中噬菌体群落组成及物种多样性具有显著差异，腹泻改变了不同肠道样本中噬菌体的物种多样性和群落结构。

**2.5.2** 健康和腹泻仔猪肠道 *Microviridae* 病毒群丰度显著高于 *Caudovirales*。与健康仔猪相比，腹泻仔猪样本中的 *Caudovirales* 病毒群丰度增加。此外，腹泻仔猪粪便中多价噬菌体物种多样性显著增加，且匹配的宿主细菌种类趋向于常见致病菌。

**2.5.3** 腹泻断奶仔猪肠道菌群与肠道噬菌体病毒群发生平行变化。健康和腹泻断奶仔猪肠道噬菌体丰富度和多样性与菌群丰富度和多样性呈显著反相关关系，且这种反相关关系仅限于特定分类群。

## 第3章 断奶仔猪肠道噬菌体介导 ARGs 转移的潜在途径和驱动要素

病原菌的抗微生物耐药性 (AMR) 已经成为严重的公共卫生问题<sup>[190]</sup>。尽管全球都在努力限制抗生素的使用, 但 AMR 经常发生在不同的环境中, 畜牧业是 ARGs 传播的潜在热点之一<sup>[191]</sup>。由于抗生素在养猪业中的广泛使用, 临床抗生素耐药性的出现和传播已经引起了全球的关注。更具体地说, 耐药病原体的快速出现将严重影响对细菌性感染的防治, 造成更大的经济损失, 并严重威胁人类健康。因此, 需要更好地了解 ARGs 来源和载体, 以减轻相关风险。

噬菌体和细菌之间的竞争对全球土壤抗生素耐药性的变化做出了重要贡献<sup>[170]</sup>。噬菌体作为水平基因转移的重要效应子, 可以通过基因转移将细菌基因组中的一些基因转移到噬菌体基因组中, 然后通过噬菌体遗传转化转移到其他细菌中, 这就很容易促进这些基因的传播和污染<sup>[17]</sup>。研究表明, 猪肠道是 ARGs 的丰富储库, MGE 是驱动细菌之间 ARGs 水平转移的重要因素<sup>[192, 193]</sup>。然而, 目前猪肠道微生物与 ARGs 和 MGE 基因之间关系的研究主要集中在细菌相关成分, 噬菌体相关 ARGs (噬菌体组来源 ARGs) 的研究很少<sup>[58]</sup>。宏基因组研究已经表明猪肠道生态系统支持噬菌体和细菌群落, 这两个分类群之间存在复杂的相互作用, 这可能驱动这两个群落之间的 ARGs 转导<sup>[116, 194]</sup>。此外, 研究表明炎症可以诱导原噬菌体并促进噬菌体的溶源化在活生物体内, 而仔猪腹泻往往伴随着肠道炎症<sup>[100, 195, 196]</sup>。因此, 断奶仔猪腹泻可能会通过肠道噬菌体与宿主菌之间的相互作用对 ARGs 产生影响。

在本章节中, 基于前期预测的噬菌体基因进行 ARGs 筛选, 对其在仔猪肠道中的相对丰度以及空间分布进行分析, 并基于肠道噬菌体和宿主之间的关系揭示肠道噬菌体介导 ARGs 转移的潜在途径和驱动因素。

### 3.1 材料

#### 3.1.1 实验菌株

大肠杆菌 BL21 感受态均由本实验室保存。

### 3.1.2 主要实验药品及试剂

氯化钠, 胰蛋白胨 (青岛海博), 酵母提取物 (青岛海博), LB 培养基 (青岛海博), Tris-base (青岛海博), 脲素, 琼脂粉 (青岛海博), IPTG (异丙基- $\beta$ -D-硫代吡喃半乳糖苷), 药敏片 (杭州微生物试剂有限公司), BCA 蛋白定量分析试剂盒 (ThermoFisher), SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (北京鼎国), SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒 (上海生工)。

### 3.1.3 主要实验仪器设备

台式高速低温离心机 (ThermoFisher), 恒温生化培养箱 (WMZK-0 型。上海市医用仪表厂), 37 °C 恒温摇床 (上海智诚), 蛋白凝胶电泳仪 (六一), 分光光度计 (Spectrum752, 上海光谱仪器有限公司), PCR 仪 (博日), pH 计 (MetterToledo) 微量移液枪 (Rainin), 酶标仪 (美国 BIO-RAD 公司), 电子分析天平 (FZ-1104, 上海分析仪器厂), -80 °C 超低温冰箱 (Forma700, 美国 ThermoFisherScientific 公司), 制冰机 ICE2 (意大利 Scotsman 公司)。

### 3.1.4 主要实验试剂配制

卡那霉素: 称取 0.5 g 氨苄青霉素钠粉末, 加入 ddH<sub>2</sub>O 定容至 10.0 mL, 配置浓度为 50 mg/mL, 用 0.22  $\mu$ m 滤器过滤, 分装于 EP 管。

IPTG: 称取 4.8 g 粉末, 加入 ddH<sub>2</sub>O 定容至 20.0 mL, 配置浓度为 1 mol/L, 用 0.22  $\mu$ m 滤器过滤, 分装于 EP 管。

Tris-NaCl 缓冲液: 以终浓度为 20 mM Tris 和 200 mM NaCl 的比例进行配置, 将 pH 调至 7.5。用 0.22  $\mu$ m 滤器过滤。

2.5M 咪唑: 称取 170.2g 咪唑粉末于 800.0 mL ddH<sub>2</sub>O 中, 充分搅拌溶解后, 用浓盐酸调至 pH 值= 8.0, 加入 ddH<sub>2</sub>O 定容至 1 L, 用 0.45  $\mu$ m 滤器过滤。

## 3.2 方法

### 3.2.1 噬菌体相关 ARGs 和 MGE 基因的筛选

基于 1.2.8 章节中预测的病毒基因, 通过使用 Diamond Blastp 软件 (v.2.9.0+) 将全部噬菌体基因的蛋白序列与 CARD (综合抗生素耐药数据库, <https://card.mcmaster.ca/>) 进行比对, 筛选  $e \leq 1e-4$  的最佳匹配结果, 注释 ARGs。此外, 噬菌体基因的蛋白质序列与 MGE

数据库 (<https://github.com/KatariinaParnanen/MobileGeneticElementDatabase/>)进行 Blastn 比对筛选出  $e < 1e-5$ , 覆盖率  $\geq 40\%$  的比对结果。同时使用 Diamond 软件 (v.0.9.32.133) 噬菌体基因的蛋白质序列与 NR 数据库进行比对, 以最佳分数筛选出  $e < 1e-5$ 、覆盖率  $\geq 40\%$  的比对结果。取两个数据库筛选结果的交集作为 MGE 基因的最终筛选结果。本研究中 MGE 被归为 7 类: 转座酶、整合酶、重组酶、分解酶、结合转座子、RteC (与四环素结合转座座相关) 和转座相关基因。

### 3.2.2 基因丰度分析与物种注释

基因丰度分析与物种功能注释参考章节 1.2.9。

### 3.2.3 噬菌体相关 ARGs 的载体构建

从确定含有噬菌体基因的噬菌体序列中选择 ARGs 进行体外表达和活性验证。由于在噬菌体 contigs1700 中鉴定出两个氨基糖苷类耐药基因, ANT(9)-Ia 和 ANT(6)-Ia, 选择其中一个 ARG 即 ANT(9)-Ia 进行体外活性验证。ANT(9)-Ia 基因序列见附表 S2。基因合成和质粒构建在生工生物工程(上海)股份有限公司进行, 使用载体为 pET-28a(+), 酶切位点为 *Bam*HI 和 *Xho*I。将公司合成的质粒利用热激法转化至 BL21 感受态细胞。步骤如下: (1) 取 2  $\mu$ L 质粒加入到 50  $\mu$ L 感受态细胞中, 冰浴 30 min, 热激 90 s, 再次冰浴 3-5 min。随后往其中加入 200  $\mu$ L LB 液体培养基, 在 37  $^{\circ}$ C 摇床以 180r/min 培养 1h。将其中 100  $\mu$ L 菌液均匀涂布于含有卡那霉素 (50  $\mu$ g/mL) 的 LB 固体培养基上, 将培养基平板倒置与 37  $^{\circ}$ C 温箱中培养 16 h。从 LB 固体培养基上挑取单菌落, 接种到含有卡那霉素 (50  $\mu$ g/mL) 的 LB 液体培养基中, 放置于 37  $^{\circ}$ C 摇床中以 180 r/min 培养 16 h。将培养的菌液送公司测序, 裂解酶基因序列正确即成功构建 pET-28a-ANT(9)-Ia-BL21 表达菌株, 菌液与 20% 甘油混合后保存于 -80  $^{\circ}$ C 冰箱。

### 3.2.4 ANT(9)-Ia 的诱导表达与药敏实验

取 50  $\mu$ L ANT(9)-Ia 表达菌株甘油菌接种于 5 mL 含有卡那霉素 (50  $\mu$ g/mL) 的 LB 液体培养基中, 在 37  $^{\circ}$ C 摇床以 180r/min 培养至对数生长期 ( $OD_{600} = 0.8$ )。将菌液进行冰浴降温后, 加入 IPTG 至终浓度为 1 mM, 置于 16  $^{\circ}$ C 低温摇床以 180 r/min 继续培养 18h 诱导基因表达。取 200  $\mu$ L 诱导后的菌液均匀涂布到 LB 固体培养基平板上, 对照组取 200  $\mu$ L BL21 培养菌液均匀涂布到 LB 固体培养基平板上, 随后将氨基糖苷类抗生素新霉素药敏片

分别贴到两个涂有菌液的培养基表面，置于 37 °C 温箱培养 16h，观察结果。

### 3.2.5 数据分析

本研究涉及的数据分析和可视化过程由 R 软件(v.3.6.3)、Cytoscape 软件(v.3.2.1) (<http://cytoscape.org>)、Excel 2013 和 CLC Main Workbench 第 8 版软件(CLC Bio-Qiagen, Aarhus, 丹麦)。相关性和 Bray–Curtis 距离使用 R 软件的 vegan 包计算。使用 R 软件的 ggplot2 绘制了 PCoA 图、柱状图和箱线图。使用 Excel 2013 绘制饼图。基因功能模块图的示意图是用 CLC Main Workbench 生成的。以随机抽样的形式计算不同样本中的 *Caudovirales* 病毒的数量, 并使用 R 软件的 vegan 包生成稀释曲线。基于噬菌体宿主预测结果, 使用 ggplot2 软件绘制了 Sankey 图。根据 ARGs 所在噬菌体群的丰度进行 Spearman 相关性分析 ( $cor > 0.8, P < 0.05$ ), 使用 R 软件的 igraph 绘制网络相关图。提取同时注释 ARGs 和 MGE 基因的噬菌体群, 计算不同物种中 ARGs 与 MGE 基因丰度, 用于 Spearman 相关性分析 ( $cor > 0.6, P < 0.05$ ), 并使用 Cytoscape 进行可视化。使用方差分析和 Wilcoxon 秩和检验的基本 R 软件包进行统计分析。使用 Mauve (v.2.3.1) 进行基因组共线性分析。\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ 。

## 3.3 结果

### 3.3.1 仔猪肠道噬菌体相关 ARGs 筛选

通过基因预测, 共获得 59,955 个噬菌体基因, 将这些基因与 CARD 数据库比对筛选 ARGs。结果共筛选出 112 个 ARGs (图 3.1, 附表 S3), 占比 0.1868% (112/59955), 这些 ARGs 来自于 91 个噬菌体 contigs。

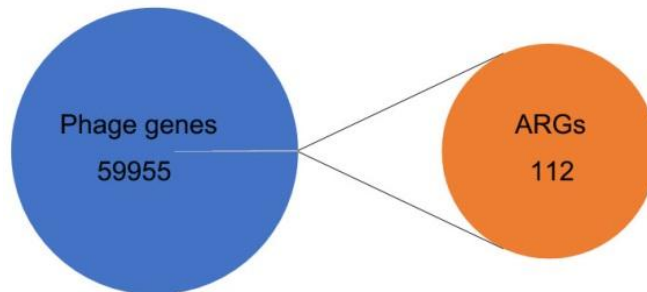


图 3.1 肠道噬菌体相关 ARGs 数量

Fig 3.1 Number of intestinal phage-related ARGs

### 3.3.2 仔猪不同肠道样本噬菌体相关 ARGs 的相对丰度

分别计算健康和腹泻仔猪不同肠道样本中噬菌体相关 ARGs 的相对丰度。结果显示腹泻仔猪肠道样本中噬菌体相关 ARGs 的丰度高于健康仔猪（图 3.2A）。值得注意的是，无论是健康还是腹泻仔猪，盲肠样本中 ARGs 的丰度显著高于回肠和粪便样本（ $P < 0.05$ ）。此外，与健康仔猪样本相比，腹泻仔猪粪便样本中噬菌体相关 ARGs 的丰度显著升高（ $P < 0.05$ ）（图 3.2B）。

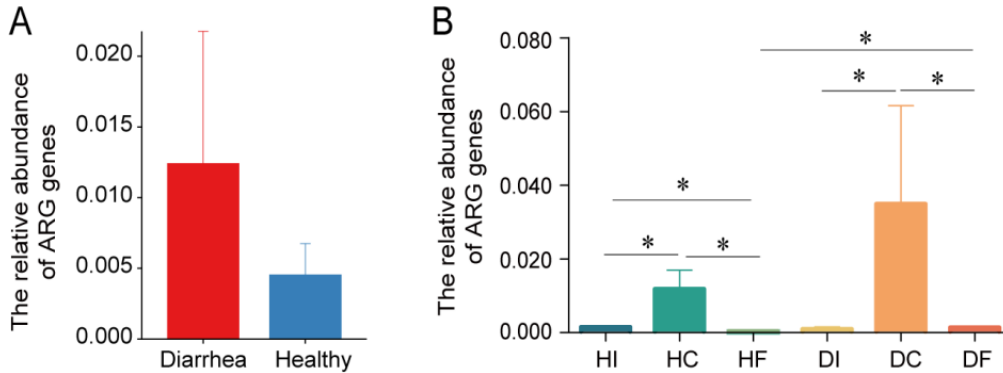


图 3.2 健康和腹泻仔猪不同肠道样本中噬菌体相关 ARGs 的相对丰度

Fig. 3.2 Relative abundance of phage-associated ARGs in different intestinal samples of healthy and diarrhea piglets

### 3.3.3 仔猪肠道噬菌体与 ARGs 相关性分析

根据 Spearman 相关性分析，11 个 ARGs 分别与 *Microviridae*、*Siphovirida*、*Podoviridae* 和 *Myoviridae* 呈显著正相关（图 3.3）。具体而言，*Siphovirida* 分别与大环内酯抗性基因 *mel*、林可酰胺抗性基因 *ErmB*、林可胺抗性基因 *lnuC*、氨基糖苷抗性基因 *ANT (9) -Ia* 和四环素抗性基因 *tetW* 呈显著正相关。*Podoviridae* 分别与碳青霉烯抗性基因 *SHV-159* 和大环内酯类抗性基因 *mphA* 呈显著正相关。而 *Myoviridae* 分别与大环内酯类抗性基因 *mphA* 显著正相关。此外，*Microviridae* 与截短侧耳素抗性基因 *lsaE*、糖肽抗性基因 *vanWG* 和氯霉素抗性基因 *catIII* 显著正相关。值得注意的是，在注释为 *Mimiviridae* 的病毒 contigs 中发现四环素抗性基因 *adeH* 同源物，并显示与噬菌体的显著正相关，这表明仔猪肠道 *Mimiviridae* 可能是 ARGs 的潜在储存库（图 3.3）。



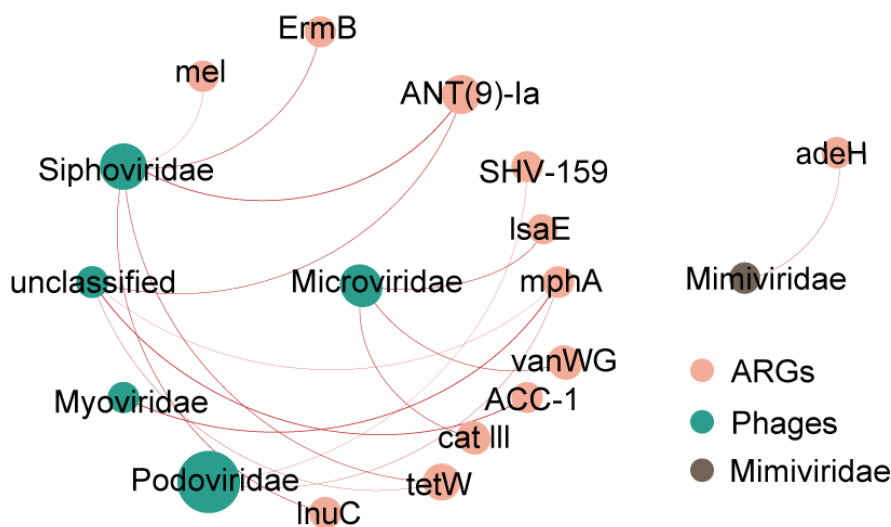


图 3.3 噬菌体（科水平）与 ARGs 相关性分析

Fig. 3.3 Correlation analysis between phages (family level) and ARGs

### 3.3.4 仔猪肠道噬菌体相关 MGE 基因筛选和丰度分析

通过对仔猪肠道噬菌体序列的比对和筛选，在 237 个噬菌体 contigs 中共发现 303 个 MEGs 同源基因。在本研究中，将这些 MGE 基因分为 7 类，即转座酶（Transposase）、重组酶（Recombinase）、整合酶（Integrase）、转座相关酶（Transposition-related）、解离酶（Resovase）、共轭转座子（Conjugative tranposon）和 RteC，其中转座酶基因数量和相对丰度最高，其次是重组酶和整合酶基因（图 3.4）。

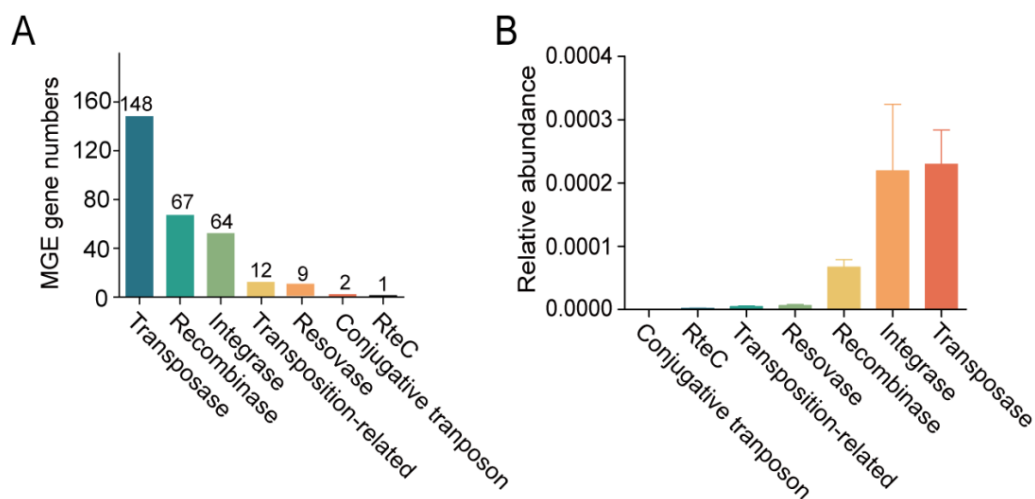


图 3.4 肠道噬菌体基因组中 MGE 基因数量和相对丰度

Fig. 3.4 Quantity and relative abundance of MGE genes from gut phage genomes

有趣的是，与噬菌体相关 ARGs 的分布特征一致，噬菌体相关的 MGEs 基因主要来自盲肠样本。健康和腹泻仔猪盲肠样本中噬菌体相关的 MGEs 基因丰度高于回肠和粪便样本。与健康样本相比，腹泻仔猪粪便样品中 MGEs 基因（转座酶、重组酶、整合酶、转座相关酶、解离酶和 RteC）的丰度显著高于健康仔猪（图 3.5）。

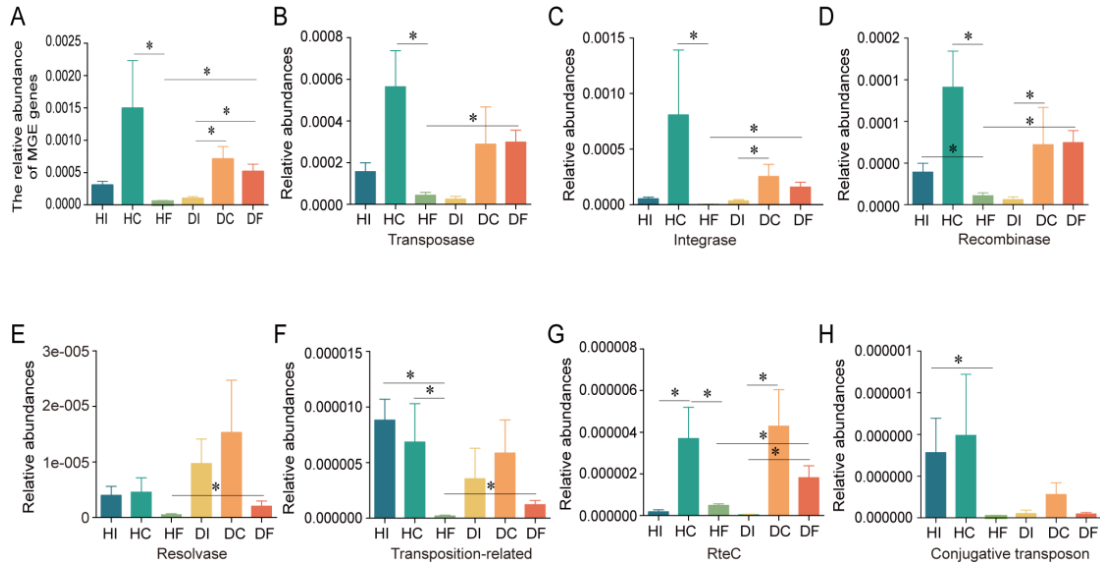


图 3.5 仔猪肠道噬菌体 MGE 基因相对丰度

Fig. 3.5 Relative abundance of MGE gene of intestinal phage in piglets

(A) 仔猪不同肠道样本中噬菌体相关 MGE 基因（总）相对丰度；健康和腹泻仔猪不同肠道样本中噬菌体基因组中转座酶 (B)、整合酶 (C)、重组酶 (D)、分解酶 (E)、转座相关 (F)、RteC (G) 和共轭转座子 (H) 的相对丰度。

(A)Relative abundance of phage-associated MGE genes (total) in different intestinal samples of piglets; Relative abundance of transposase (B), integrase (C), recombinase (D), resolvase (E), transposition-related (F), RteC (G), and conjugative transposon (H) from phage genomes in different gut samples of healthy and diarrheal piglets.

### 3.3.5 细菌宏基因组中整合酶基因的丰度分析

整合酶是噬菌体溶原整合的关键基因 (Johnson 等人, 2022)。对不同样本细菌宏基因组中整合酶基因相对丰度进行分析，结果表明腹泻仔猪粪便样本中细菌相关整合酶基因丰度显著低于健康仔猪 (图 3.6)。

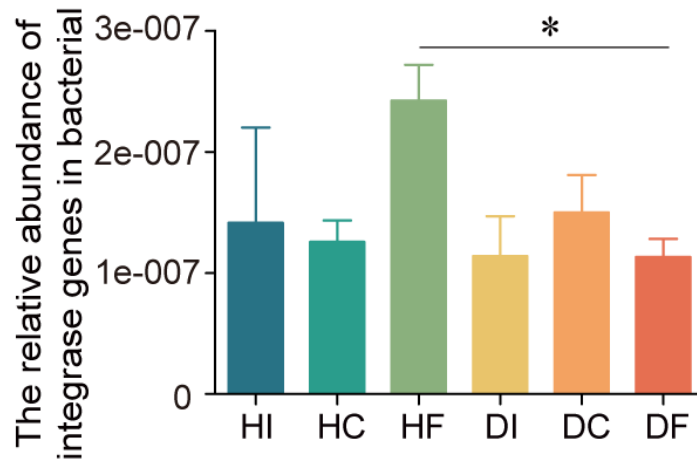


图 3.6 不同样本中细菌相关整合酶基因相对丰度

Fig. 3.6 Relative abundance of bacterial-related integrase genes in different samples

### 3.3.6 噬菌体 contigs 中 ARGs 和 MGE 基因的共现模式

通过对携带 ARGs 和 MGEs 基因的噬菌体 contigs 基因组进行分析, 发现共有 18 个噬菌体群同时携带 ARGs 和 MGEs 基因 (图 3.7A)。这些噬菌体序列分别来自健康仔猪的回肠样本 (5 个 contigs) 和盲肠样本 (4 个 contigs) 以及腹泻仔猪的回肠样本 (5 个 contigs) 和盲肠样本 (4 个 contigs)。为了确认这些肠道噬菌体同时编码 ARGs 和 MGE 基因, 随机选择了其中 5 个噬菌体 contigs 作为代表进行基因组可视化。结果显示在每个噬菌体 contigs 中同时存在多个 ARGs 或 MGEs 基因, 并表现出不同的共现组合模式 (图 3.7B)。例如, 在噬菌体 contig 1700 中, 同时出现三个重组酶基因 (其中两个是位点特异性重组酶) 和抗性基因 ANT (9) -Ia 和 ANT (6) -Ia。而位点特异性重组酶、IS3 家族转座酶和抗性基因 ANT (9) -Ia、Isa (E) 和 Inu (B) 共同出现在 contig 39656 基因组中。此外, 转座酶 TnpV 和四环素抗性基因 tet (O) 在 contig 21801 中同时出现。值得注意的是, contig 21801 被鉴定为多价噬菌体序列, 这可能会增加 ARGs 在更广泛宿主中传播的风险。除 contig 21801 以外, 未在其他多价噬菌体 contigs 中发现 ARGs, 但在其他多价噬菌体群中仍发现 MGE 基因 (图 3.7C)。

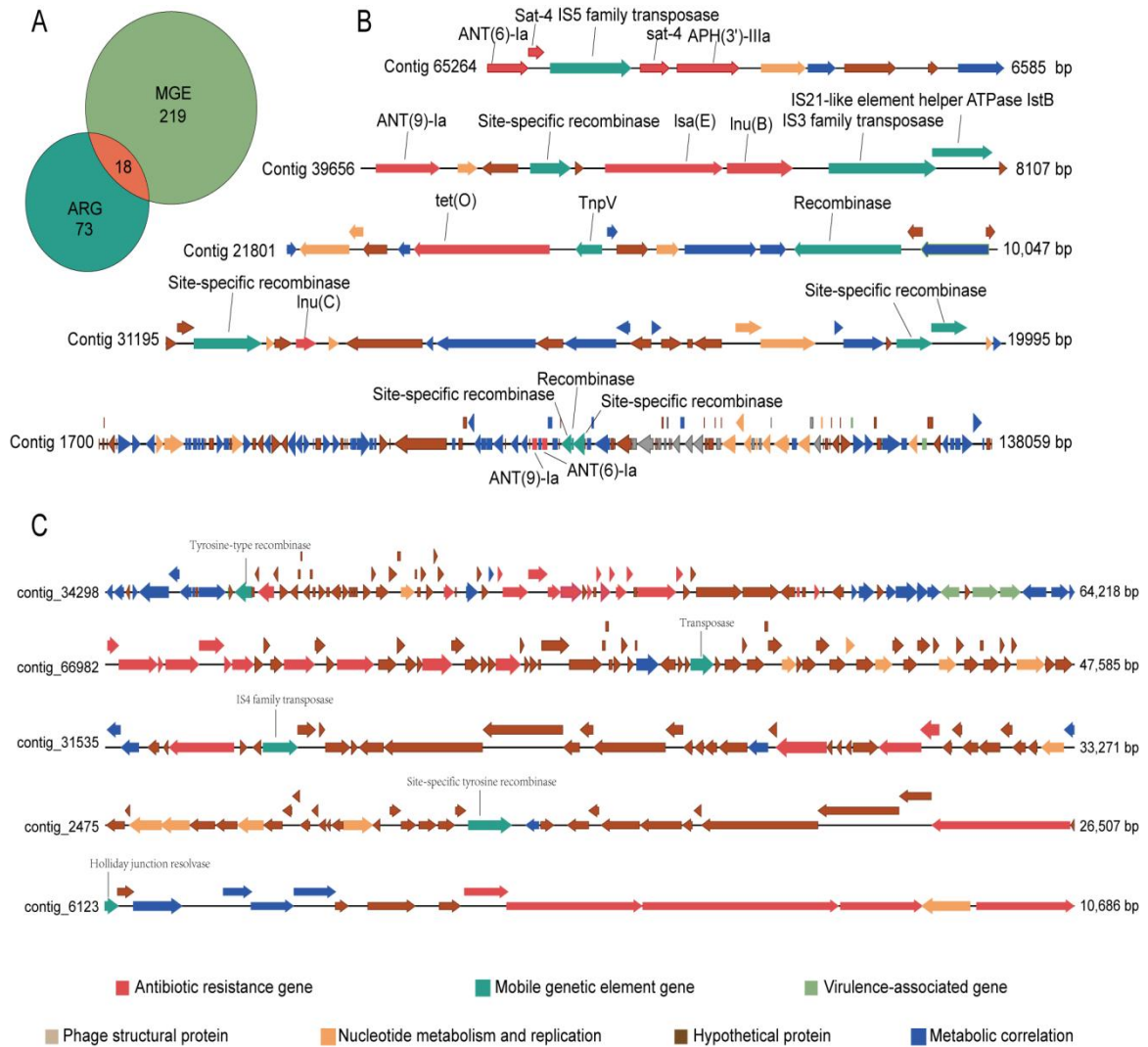


图 3.7 携带 ARGs 或 MGE 基因的噬菌体 contigs 的可视化

Fig. 3.7 Visualization of phage contigs carrying both ARGs and MGE genes

(A) Venn 图显示了编码 ARGs 或 MGE 基因的噬菌体群的数量；(B)携带 ARGs 和 MGE 基因的噬菌体 contigs 基因组图谱；(C) 多价噬菌体 contigs 的基因组图谱

(A) Venn diagram showing the number of phage contigs encoding genes for ARGs or MGE genes; (B) Genome map of phage contigs carrying both ARGs and MGE genes;(C) Genome map of polyvalent phage contigs

### 3.3.7 共现 ARGs 和 MGE 基因相关性分析

基于同时携带 MGE 基因和 ARGs 的噬菌体 contigs，计算了 ARGs 和 MGE 基因的相对丰度，并进行了 Spearman 相关分析。结果表明，ARGs 和 MGE 基因之间存在显著正相关（图 3.8）。具体而言，重组酶分别与抗性基因 ANT (6) -Ia、ANT (9) -Ia、InuB、InuC、

lsaE、tetO、tetW、aad(6) 和 SAT-4 显著正相关。转座酶分别与抗性基因 lnuB、lnuC、lsaE、APH(3')-IIIa、SAT-4、tetW、ANT(6)-Ia 和 lnuC 呈显著正相关。解离酶分别与抗性基因 tetO 和 tetW 呈显著正相关。此外，转座相关酶分别与抗性基因 ANT(6)-Ia、ANT(9)-Ia、lnuB、lsaE、tetO 和 tetW 显著正相关。这些结果表明，噬菌体相关 MGE 基因是 ARGs 谱的重要驱动因素。有趣的是，对 18 个同时携带 ARGs 和 MGE 基因的噬菌体 contigs 进行种类注释后，这些噬菌体 contigs 被分配给 6 个链球菌噬菌体，即 Streptococcus\_phage\_Javan630、Streptococcus\_phage\_phi-SC181、Streptococcus\_phage\_phi-SsUD.1、Streptococcus\_phae\_hiSC070807、Streptococcus\_ssatellite\_phage\_SJavan415 和 Streptococcus\_phage-phi-m46.1 (图 3.8)，表明仔猪肠道噬菌体中 ARGs 和 MGE 基因的共存可能与链球菌噬菌体及其宿主菌链球菌有关。

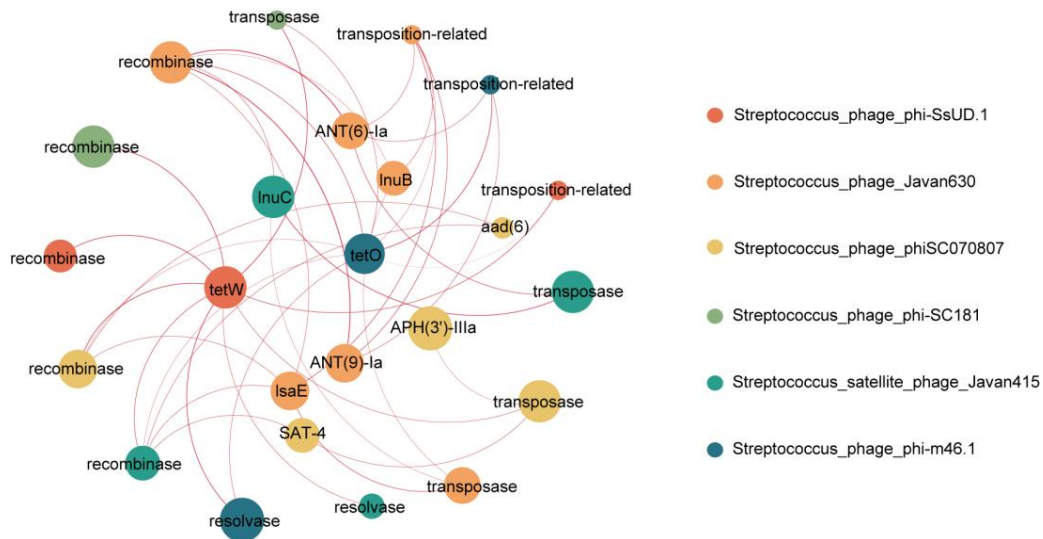


图 3.8 共现 ARGs 或 MGE 基因相关性分析

Fig. 3.8 Correlation analysis of co-existing ARGs or MGE genes

### 3.3.8 链球菌噬菌体基因组可视化

为了进一步验证 3.3.7 的分析结果，从 NCBI 核苷酸数据库中搜索这六种链球菌噬菌体的全基因组序列并进行可视化，正如所料，每个噬菌体基因组都携带 ARGs 和 MGE 基因。除噬菌体 Streptococcus\_ssatellite\_phage\_Javan415 仅携带一个 MGE（整合酶）和一个 ARG（lnuC）之外，其他五个链球菌噬菌体基因组均同时携带多个 ARGs 和 MGEs 基因。在这 6 个链球菌噬菌体基因组中总共发现了 12 个 ARGs 和 4 个 MGEs 基因，其中 7 个 ARGs [tetW、tetO、APH(3')-IIIa、sat-4、ANT(6)-Ia、ANT(9)-Ia 和 lnuC] 和所有 4 个 MGE 基因

(重组酶、整合酶、转座酶和 TnpV) 存在于同时携带 ARGs 和 MGE 基因的仔猪肠道噬菌体基因组中 (图 3.9)。

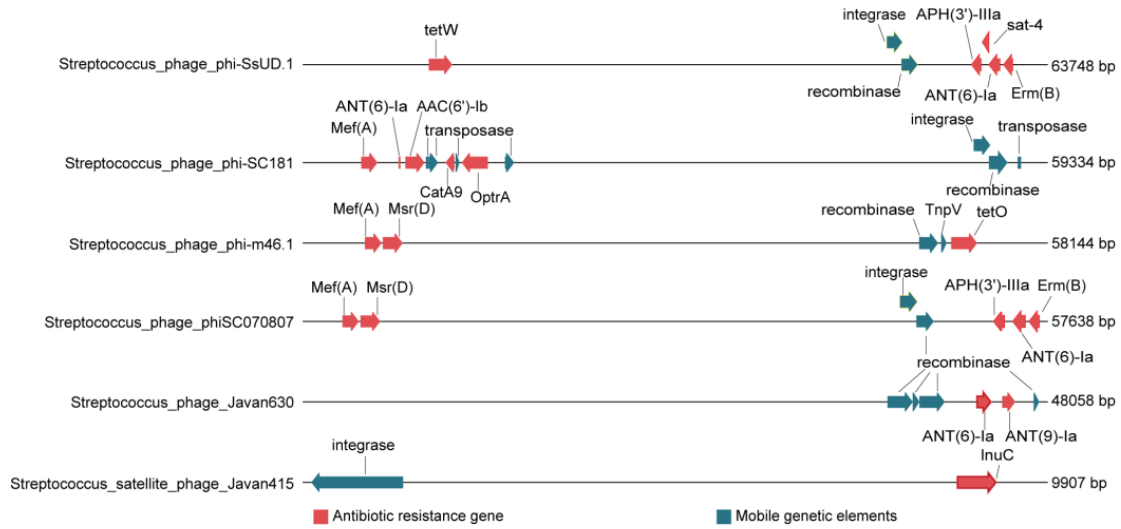


图 3.9 链球菌噬菌体基因组可视化 (仅显示 ARGs 和 MGE 基因)

Fig. 3.9 Visualization of streptococcal phage genomes (Only ARGs and MGE genes are displayed)

### 3.3.9 同时携带 ARGs 和 MGE 基因的肠道噬菌体 contigs 与匹配的链球菌噬菌体共线分析

将图 3.7B 中可视化 5 个代表性肠道噬菌体 contigs 与 6 个链球菌噬菌体序列进行共线分析, 结果显示可视化的 5 个肠道噬菌体 contigs 序列分别与 6 个链球菌噬菌体存在同源序列, 这进一步验证了 3.3.7 中的分析结果 (图 3.10)。

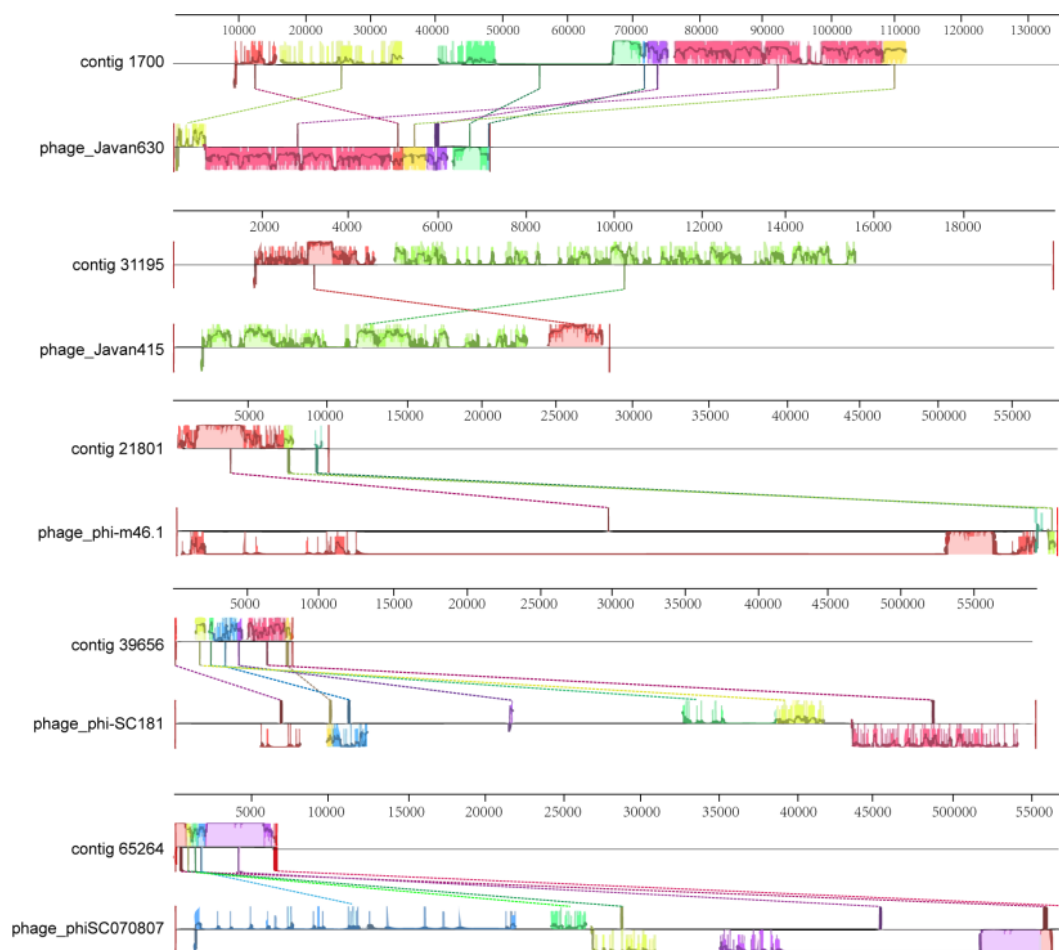


图 3.10 仔猪肠道噬菌体 contigs 与匹配的链球菌噬菌体基因组的共线性分析

Fig. 3.10 Collinearity analysis of piglet gut phage contigs with matched streptococcal phage genomes

### 3.3.10 携带 ARGs 和 MGE 基因的噬菌体 contigs 与公共库中细菌基因组序列之间共线性分析

为了验证编码 ARGs 和 MGE 基因的噬菌体 contigs 中的 ARGs 是否位于细菌移动元件上, 将 2 个代表性噬菌体 contigs 的核苷酸序列与 NCBI 核苷酸数据库进行了比对。结果表明, 2 个噬菌体 contigs 中编码 ARGs 的序列片段与包括链球菌在内的多种细菌中的质粒、ICEs 或转座子等多种细菌移动元件的序列表现出高度共线性(图 3.11)。例如, 在 contig 1700 中, 包括 2 个 ARGs [ANT(9)-Ia 和 ANT(6)-Ia] 在内的基因片段分别与粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)反式共轭物 T4 质粒 pJH-T4(KY290886.1)、棉子糖肠球菌(*Enterococcus raffinosus*) F162\_2 质粒 pF162\_2\_2 (CP072890.1)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) SA7112 质粒 pSA7112-2 (KX011077.1)、猪链球菌 (*Streptococcus suis*) ICE 元件 ICESsu14ND70

(MK211807.1)、腐生葡萄球菌 (*Staphylococcus saprophyticus*) GDY8P168P 质粒 pY8P168P msrA (CP065799.1)、猪丹毒丝菌 (*Erysipelothrix rhusiopathiae*) ICEEr0106 移动元件 (MG812141.1) 和海氏肠球菌 (*Enterococcus hirae*) 697 质粒 p697-a (CP091202.1) 的基因序列高度匹配 (覆盖率 > 99%, 同一性 > 98%)。这些结果表明, 猪肠道噬菌体的耐药组与公共数据库中细菌相关移动元件之间存在重叠, 进一步证明了猪肠道噬菌体是 ARGs 的重要储存库。

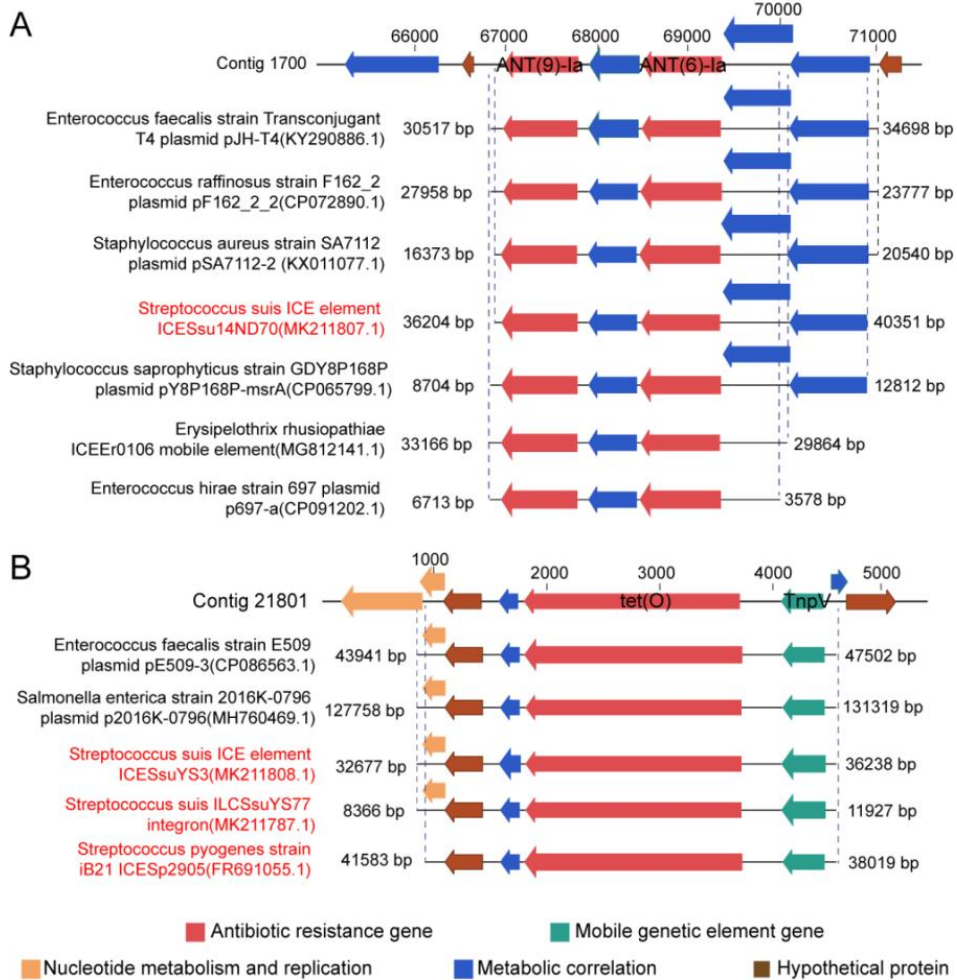


图 3.11 携带 ARGs 和 MGE 基因的噬菌体 contigs 与核苷酸数据库中细菌基因组序列之间共线性的简化描述

Fig. 3.11 Simplified description of collinearity between phage contigs carrying both ARGs and MGE genes and bacterial genome sequences in nucleotide databases

### 3.3.11 仔猪肠道噬菌体相关 ARG ANT(9)-Ia 的克隆和表达

为了证明断奶仔猪肠道噬菌体携带有功能性 ARGs, 从肠道噬菌体基因中选择一个



ARG 进行体外表达和活性测定。结果显示构建的 ANT(9)-Ia 表达菌株经诱导呈现可溶性表达，并在蛋白胶上显示出分子大小约为 34 kDa 的条带（图 3.12）。除去 PET-28a 载体本身携带的 His 标签分子量（约 4.5kDa），成功纯化出与 ANT(9)-Ia（29.73 kDa）分子量相一致的蛋白，表明 ANT(9)-Ia 表达菌株经诱导后 ANT(9)-Ia 蛋白成功表达。

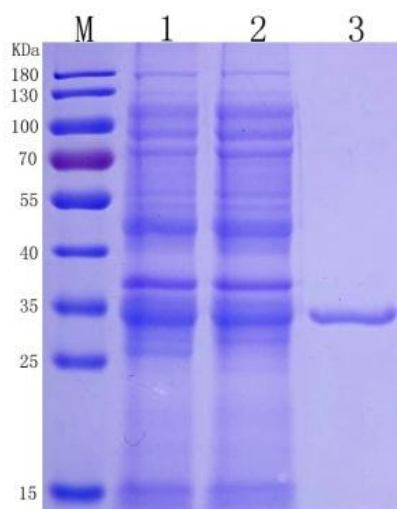


图 3.12 重组 ANT(9)-Ia 纯化的 SDS-PAGE 分析

Fig.3.12 SDS-PAGE analysis of the purity of recombinant ANT(9)-Ia

(M: marker; 1: 诱导表达的大肠杆菌 BL21; 2: 超声后的上清液; 3: 纯化的 ANT(9)-Ia)  
(M: marker; 1: expressed *E. coli* BL21; 2: supernatant after crushing; 3: purified ANT(9)-Ia)

### 3.3.12 ANT(9)-Ia 表达菌株的抗性验证

如图 3.13 所示，新霉素药敏片可在涂布有 BL21 菌液的固体培养基表面产生明显的抑菌环，相比之下，经 IPTG 诱导后的 ANT(9)-Ia-BL21 表达菌株在新霉素药敏片周围产生抗性菌株，这表明仔猪肠道噬菌体携带的 ARG 可使菌株出现耐药表型。

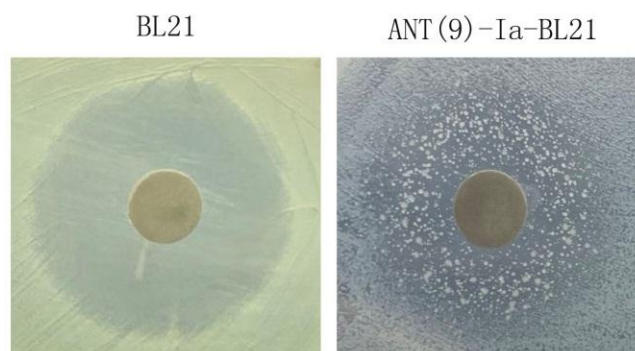


图 3.13 重组 ANT(9)-Ia 药物敏感性分析

Fig. 3.13 Drug sensitivity analysis of recombinant ANT(9)-Ia

### 3.4 讨论

如果 ARGs 由包括噬菌体在内的任何移动元件携带, 细菌种群之间 ARGs 水平转移的风险会大大增加<sup>[53]</sup>。Enault 等人<sup>[197]</sup>强调, 噬菌体基因组很少含有 ARGs, 并且可能高估了噬菌体基因组中 ARGs 的预测丰度, 他们从已知噬菌体基因组中的 121,506 个病毒蛋白中仅鉴定出 2 个 (0.0016%) 真正的 ARGs。在本研究中产生的 24 个病毒组中, 约 0.1868% (112/59955) 的读数被预测为 ARGs 序列。病毒组中 ARGs 的比例与其他研究地点检测到的 ARGs 水平相当。例如, 对于从土壤、动物粪便或海洋样品中制备的病毒组中被注释为 ARGs 的比例范围为 0.001% 至 0.440%<sup>[117, 197-199]</sup>。Johnson 等人<sup>[117]</sup>在猪粪便中的 141,701 个病毒基因中总共检测到 14 个 ARGs, 检测率为 0.010%。相比之下, 本研究中仔猪肠道噬菌体基因组中的 ARGs 检测率高出 18 倍 (0.1868%), 但这与 Johnson 等人的发现并不冲突。因为在本研究中, 绝大多数 (91.83%) 鉴定的噬菌体相关 ARGs 序列来自仔猪盲肠样本, 只有 3.41% 的 ARGs 序列是来自仔猪粪便样本, 粪便中 ARGs 的检出率约为 0.00637%, 这与 Johnson 等人的研究结果相似<sup>[117]</sup>。重要的是, 本研究表明猪肠道噬菌体相关 ARGs 转移至细菌基因组后可以迫使菌株产生耐药表型, 强调了猪肠道噬菌体在储存和转移 ARGs 的风险。此外, 本研究对病毒颗粒进行了纯化, 通过严格的方法提取了病毒核酸, 并使用多种数据库和新方法严格鉴定了病毒序列。这些过程减少了来自非病毒 DNA 源 ARGs 污染的可能性。

环境微生物群落中 MGE 的水平转移是细菌基因组进化和适应特定环境压力的重要机制, 其在环境 ARGs 谱中的驱动作用已引起广泛关注<sup>[192, 200]</sup>。尽管已有研究表明中国猪养殖场富含 MGEs, 但是猪肠道噬菌体基因组中相关 MGEs 的含量和类型仍不确定<sup>[201]</sup>。在这项研究中, 仔猪肠道噬菌体基因组中 MGE 基因的检测率约为 0.5054% (303/5995), 约为 ARGs 的 2.7 倍, 其中转座酶基因数量和相对丰度最高。这与之前的报道一致, 转座酶基因是猪肠道微生物组中最丰富的 MGE 基因, 可能在介导动物粪便和堆肥中不同门之间的 ARGs 转移中发挥关键作用<sup>[51, 202]</sup>。因此, 噬菌体相关转座酶基因可能是驱动噬菌体介导 ARGs 转移的重要因素。

MGE 基因和 ARGs 在细菌中的共存可能会加剧 ARGs 的维持和传播<sup>[52, 203]</sup>。作为细菌水平基因转移的重要载体, 噬菌体基因组中 ARGs 和 MGE 基因的共存也可能加剧 ARGs 的维持和传播。在本研究中, 约 19.78% (18/91) 的肠道噬菌体 contigs 同时携带 ARGs 和

MGE 基因, 并且这些 ARGs 与 MGE 基因之间存在显著正相关。重要的是, 多个 ARGs 或 MGE 基因在其中一些噬菌体 contigs 中共现, 这大大增加了宿主细菌获得 ARGs 的风险。Li 等人的一项研究表明, 猪肠道细菌群落中 ARGs 和 MGE 基因的共现与特定的系统发育分支有关, 属于肠杆菌科的病原体的共现性增加<sup>[193]</sup>。出乎意料的是, 本研究中携带 ARGs 和 MGE 基因的噬菌体 contigs 没有被分配给肠杆菌科噬菌体, 而是全部被分配给 6 种链球菌噬菌体, 而这 6 个链球菌噬菌体均以原噬菌体和卫星原噬菌体存在<sup>[204-207]</sup>。原噬菌体和卫星原噬菌体以结构化的方式广泛分布在链球菌中, 原噬菌体的跨物种传播并不罕见<sup>[205]</sup>。因此, 仔猪肠道噬菌体中 ARGs 和 MGE 基因的共存维持模式似乎不是随机选择的, 而是与特定的噬菌体宿主有关。由于本研究选择的实验仔猪均来自同一个猪场, 因此, 仔猪肠道噬菌体中 ARGs 和 MGE 基因的共存维持模式是否与饲养环境有关, 还有待进一步探索。值得注意的是, 在携带 ARGs 和 MGE 基因的噬菌体 contigs 中, 携带 ARGs 的基因片段在公共数据库中包括猪链球菌在内的多种细菌中的质粒、ICEs、转座子和基因岛序列表现出高度共线性。重要的是, 这些遗传元件负责捕获和传播 ARGs<sup>[57]</sup>, 这表明这些细菌中的 ARGs 可能由噬菌体介导转移, 链球菌噬菌体可能是 ARGs 的“中转站”。总之, 这些结果进一步强调了猪肠道噬菌体在 ARGs 维持和传播中的重要作用。

研究表明炎症可在体内诱导原噬菌体或诱导噬菌体基因组裂解<sup>[117]</sup>, 而仔猪腹泻通常伴有肠道炎症<sup>[195, 196]</sup>。在第一章节中(章节 1.3.1.2)可以观察到腹泻仔猪结肠组织中的严重病理损伤, 以及结肠粘膜下层的大量中性粒细胞浸润。与健康仔猪相比, 腹泻仔猪粪便中 *Caudovirales* 的丰度显著增加。本章研究表明细菌基因组中负责噬菌体基因组溶原整合的整合酶基因的丰度在腹泻仔猪的粪便中显著降低。因此, 腹泻仔猪粪便中 *Caudovirales* 的丰度增加很可能是由于宿主中的原噬菌体的诱导。通过诱导噬菌体及其随后感染新的细菌宿主, 噬菌体基因可以转移到细菌基因组中, 这已被证明在体外和体内发生<sup>[100, 208]</sup>。重要的是, 本研究表明, 多种 ARGs 与 *Caudovirales* (*Siphoviridae*、*Podoviridae* 和 *Myoviridae*) 表现出显著正相关, 腹泻还导致粪便中携带 ARGs 和 MGE 基因的噬菌体丰度的显著增加, 这将有助于将噬菌体基因组整合到细菌基因组中, 从而增加细菌群落中 ARGs 的转导概率。在营养缺乏和宿主细菌丰度低的情况下, 噬菌体将找到并选择多种适合感染的宿主细菌, 这是肠道噬菌体与细菌共存的重要方式<sup>[180, 181]</sup>。在本研究中, 腹泻仔猪粪便中多价噬菌体的多样性显著增加。具体而言, 来自健康小猪粪便的多价噬菌体仅与 3 个细菌属相匹配, 即乳杆菌属、土杆菌属和片球菌属, 它们都属于厚壁菌门。然而, 粪便腹泻中的多价噬菌

体匹配增加到 8 个细菌属, 即弯曲杆菌属、链球菌属、葡萄球菌属、肠球菌属、克雷伯菌属、沙门氏菌属、土芽孢杆菌属和硝基螺旋菌属, 属于厚壁菌门和变形杆菌属。重要的是, 其中大多数是潜在的临床致病菌, 如弯曲杆菌、链球菌、葡萄球菌、肠球菌、克雷伯菌和沙门菌, 而弯曲杆菌和沙门氏杆菌是导致腹泻的重要病原体<sup>[209, 210]</sup>。因此, 腹泻仔猪可能通过多价噬菌体促进 ARGs 在更广泛宿主中的分布, 并增加致病菌获得 ARGs 的风险。

鉴于噬菌体被认为是肠道 ARGs 的重要载体, 肠道噬菌体与细菌相互作用在介导细菌耐药性中的重要性可能被低估, 其对公共卫生的影响值得进一步研究。值得注意的是, 本研究在仔猪肠道 *Mimivirus* 基因组中发现了 ARG (*adeH*) 同源物, 并与携带 ARGs 的噬菌体相关。*Mimivirus* 是一种感染变形虫的巨型病毒, 并被发现与噬病毒体相关<sup>[211]</sup>。*Mimivirus* 和噬病毒体的基因组是含有真核、病毒、细菌和/或古生物基因的嵌合体, 噬病毒体是 *Mimivirus* 移动群的一部分。*Mimivirus* 和噬病毒体通过序列转移、将噬病毒体 DNA 整合到巨型病毒 DNA 中以及 *Mimivirus* 对噬病毒体的防御机制而彼此强烈相互作用<sup>[212]</sup>。因此, 猪肠道中的 *Mimivirus* 可能是 ARGs 的潜在储库和载体。

## 3.5 小结

**3.5.1** 断奶仔猪肠道噬菌体是 ARGs 的重要储存库, 噬菌体相关 MGE 基因是影响 ARGs 维持和转移的重要驱动因素。

**3.5.2** 断奶仔猪肠道 *Caudovirales* 分类群与多种 ARGs 显著相关, 而腹泻导致 *Caudovirales* 分类群以及噬菌体相关 ARGs 和 MGE 基因丰度的显著升高, 这增加了噬菌体介导的 ARGs 在细菌群落中传播的风险。

**3.5.3** 断奶仔猪肠道多价噬菌体基因组中检测到 ARGs 和 MGE 基因, 由于腹泻导致粪便中多价噬菌体多样性的增加, 且匹配的宿主细菌种类趋向于常见致病菌, 这极大增加了肠道噬菌体介导的 ARGs 在更广泛细菌群落 (尤其是常见致病菌) 中传播的风险。

**3.5.4** 断奶仔猪肠道噬菌体组中 ARGs 和 MGE 基因的共现与链球菌噬菌体及其宿主菌有关。



## 第4章 断奶仔猪肠道噬菌体组猪链球菌裂解酶预测基因序列的重组表达与体外裂解活性测定

猪链球菌是一种人畜共患病原体,作为正常微生物群的一部分,猪链球菌常常无症状定居在猪的上呼吸道。然而,当猪链球菌穿透粘膜屏障并进入血液、关节和中枢神经系统时,它可能会导致疾病的发生,如菌血症、心内膜炎、关节炎、肺炎,甚至猝死<sup>[119]</sup>。由猪链球菌感染引起的链球菌性猪病是全球猪养殖业死亡和经济损失的主要原因。由于缺乏有效的疫苗来预防这种疾病,促使全世界广泛使用抗生素。随后引起抗生素耐药性的出现,并在全球蔓延。新抗生素候选物的减少加上抗生素耐药性的增加使得开发替代性抗菌剂成为必要。噬菌体及其编码的裂解酶被提出来填充这种抗菌空隙。由于链球菌烈性噬菌体的分离难度大,研究人员把目光投在具有链球菌杀菌活性的裂解酶上。在过去的20年里,关于链球菌裂解酶的发现、结构/功能、工程、免疫原性、毒性/安全性和动物模型中的功效的研究不断扩展。鉴于耐药猪链球菌临床分离株不断出现,尽管这些裂解酶对一些猪链球菌表现出一定的杀菌活性,但是这些裂解酶的杀菌谱难以覆盖全部菌株,裂解活性也需要进一步提高。因此需要挖掘和筛选更多新的猪链球菌裂解酶,从而提高裂解酶作为猪链球菌抗菌制剂的应用价值。

对仔猪肠道病毒组的分析表明仔猪肠道病毒组可能代表了一个尚未开发的生物制剂基因库,且被鉴定的多价噬菌体 contigs 匹配到多种链球菌。因此,这些噬菌体极有可能编码序列新颖且具有宽裂解酶谱的猪链球菌裂解酶。基于此,在本章节中,从仔猪肠道来源的多价噬菌体序列中筛选出1个预测为链球菌噬菌体裂解酶基因,将裂解酶序列进行合成后,进行载体构建与蛋白表达,并对裂解酶的体外杀菌活性及生物膜清除能力进行了测定。

### 4.1 材料

#### 4.1.1 实验菌株

本研究使用的25株猪链球菌和2株无乳链球菌均由本实验室保存,3株马链球菌马亚种和2株马链球菌兽疫亚种由山东畜牧兽医职业学院董建宝教授惠赠,所有菌株见表4.2。

#### 4.1.2 主要实验药品及试剂

氯化钠, 胰蛋白胨 (青岛海博), 酵母提取物 (青岛海博), BHI 培养基 (青岛海博), LB 培养基 (青岛海博), Tris-base (青岛海博), 脲素, 琼脂粉 (青岛海博), 卡那霉素, IPTG (异丙基- $\beta$ -D-硫代吡喃半乳糖苷), 大肠杆菌 BL21 感受态细胞, 药敏片 (杭州微生物试剂有限公司), 浓盐酸, 氢氧化钠, 结晶紫, 甲醇, 乙醇, 戊二醛 (上海生工), 0.22  $\mu\text{m}$  滤器 (德国 Millipore 公司), BCA 蛋白定量分析试剂盒 (ThermoFisher), 革兰氏染色试剂盒 (青岛海博), 12 孔板和 96 孔微量滴定板 (美国 Costar 公司), PageRuler 蛋白 Marker (ThermoFisher), SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (北京鼎国), 细菌基因组 DNA 提取试剂盒 (北京天根), SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒 (上海生工)。

#### 4.1.3 主要实验仪器设备

分光光度计 (Spectrum752, 上海光谱仪器有限公司), PCR 仪 (博日), pH 计 (MetterToledo), 核酸蛋白测定仪 (德国 eppendorf 公司), 振荡器 (其林贝尔), 微量移液枪 (Rainin), 酶标仪 (美国 BIO-RAD 公司), 显微镜 (奥林巴斯), 电子分析天平 (FZ-1104, 上海分析仪器厂),  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  超低温冰箱 (Forma700, 美国 ThermoFisherScientific 公司), 制冰机 ICE2 (意大利 Scotsman 公司), 扫描电子显微镜 (SEM) (德国日立 S-3400N)。

#### 4.1.4 主要实验试剂配制

卡那霉素: 称取 0.5 g 卡那霉素粉末, 加入 ddH<sub>2</sub>O 定容至 10.0 mL, 配置浓度为 50 mg/mL, 用 0.22  $\mu\text{m}$  滤器过滤, 分装于 EP 管。

BHI 固体培养基: 称取 3.85 g BHI 粉末和 1.5 g 琼脂粉于 100.0 mL ddH<sub>2</sub>O 中, 置于锥形瓶中  $115\text{ }^{\circ}\text{C}$  高压 30 min, 冷却至  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$  左右, 混合均匀后倒平板。

BHI 液体培养基: 称取 3.85 g BHI 粉末于 100.0 mL ddH<sub>2</sub>O 中, 分装于试管,  $115\text{ }^{\circ}\text{C}$  高压 30 min。

LB 固体培养基: 称取 1 g 胰蛋白胨粉末, 1 g 氯化钠粉末, 0.5 g 酵母提取物粉末和 1.5 g 琼脂粉于 100.0 mL dd H<sub>2</sub>O 中, 置于锥形瓶中  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  高压 20 min, 冷却至  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$  左右, 加入终浓度为 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的卡那霉素, 混合均匀后倒平板。

LB 液体培养基: 称取 1 g 胰蛋白胨粉末, 1 g 氯化钠粉末, 0.5 g 酵母提取物粉末于 100.0 mL ddH<sub>2</sub>O 中, 分装于试管,  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  高压 20 min。

PBS 缓冲液: 称取 8.0 g NaCl、3.58 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O、0.27 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.2 g KCl, 加

入 ddH<sub>2</sub>O 定容至 1.0 L, 121 °C 高压 20 min。

**IPITG:** 称取 4.8 g 粉末, 加入 ddH<sub>2</sub>O 定容至 20.0 mL, 配置浓度为 1 mol/L, 用 0.22 μm 滤器过滤, 分装于 EP 管。

**Tris-NaCl 缓冲液:** 以终浓度为 20 mM Tris 和 200 mM NaCl 的比例进行配置, 将 pH 调至 7.5。用 0.22 μm 滤器过滤。

**2.5M 咪唑:** 称取 170.2 g 咪唑粉末于 800.0 mL ddH<sub>2</sub>O 中, 充分搅拌溶解后, 用浓盐酸调至 pH 值 = 8.0, 加入 ddH<sub>2</sub>O 定容至 1 L, 用 0.45 μm 滤器过滤。

## 4.2 方法

### 4.2.1 猪链球菌鉴定

将 25 株猪链球菌分别在 BHI 固体培养基平板上划线, 置于 37 °C 温箱中培养 20 h。挑取平板上的单菌落接种于新鲜 BHI 液体培养基中, 放置 37 °C 摇床以 180 r/min 培养 20 h。使用革兰氏染色试剂对菌液进行染色, 显微镜下观察菌株形态。此外, 利用细菌基因组提取试剂盒提取各菌株 DNA 并送至公司测序, 测序结果通过 NCBI-Blastn 进行比对分析。

### 4.2.2 猪链球菌的药敏鉴定

利用纸片扩散法测定猪链球菌的药物敏感性。将猪链球菌培养至对数生长期 ( $OD_{600} = 0.8$ ), 菌液均匀涂布在 BHI 固体培养基平板上。然后将药敏纸片紧贴到培养基表面, 平板置于 37 °C 温箱中培养 20 h 后, 测量抑菌环的直径, 试验重复三次, 最终结果取三次数值平均值。耐药性评价标准依据美国临床实验室标准全国委员会 (NCCLS) 标准。

### 4.2.3 链球菌裂解酶基因筛选和序列分析

基于肠道病毒基因预测结果筛选噬菌体裂解酶 (Endolysin/Lysin) 基因。为从仔猪肠道病毒组中获得序列新颖且广泛裂解谱的链球菌噬菌体裂解酶基因序列, 基于章节 2.3 噬菌体-宿主预测结果, 筛选出匹配的宿主中包含链球菌的多价噬菌体 contigs 序列, 通过 RAST 软件 (v.2.0) (<https://rast.nmpdr.org/rast.cgi>) 将这些噬菌体序列中基因进行预测和注释, 根据注释结果筛选获得假定的链球菌裂解酶基因序列。将筛选的裂解酶氨基酸序列在 NCBI 数据进行比对, 初步筛选出序列新颖的裂解酶。使用 CLC Main Workbench version 7.7.3 软件进行裂解酶基因序列比较分析。



#### 4.2.4 裂解酶基因合成和表达载体的构建

基因合成和质粒构建在生工生物工程(上海)股份有限公司进行,使用载体为 pET-28a(+),酶切位点为 *Bam*HI 和 *Xho*I。将公司合成的质粒利用热激法转化至 BL21 感受态细胞。步骤如下:(1)取 2  $\mu$ L 质粒加入到 50  $\mu$ L 感受态细胞中,冰浴 30 min,热激 90 s,再次冰浴 3-5 min。随后往其中加入 200  $\mu$ L LB 液体培养基,在 37  $^{\circ}$ C 摇床以 180 r/min 培养 1 h。将其中 100  $\mu$ L 菌液均匀涂布于含有卡那霉素(50  $\mu$ g/mL)的 LB 固体培养基上,将培养基平板倒置与 37  $^{\circ}$ C 温箱中培养 16 h。从 LB 固体培养基上挑取单菌落,接种到含有卡那霉素(50  $\mu$ g/mL)的 LB 液体培养基中,放置于 37  $^{\circ}$ C 摇床中以 180 r/min 培养 16 h。将培养的菌液送公司测序,裂解酶基因序列正确即成功构建 pET-28a-Lys33795-BL21 表达菌株,菌液与 20% 甘油混合后保存于-80  $^{\circ}$ C 冰箱。

#### 4.2.5 裂解酶的表达

取 50  $\mu$ L 裂解酶表达菌株甘油菌接种于 5 mL 含有卡那霉素(50  $\mu$ g/mL)的 LB 液体培养基中,在 37  $^{\circ}$ C 摇床以 180 r/min 培养 16 h。然后全部转接至 500 mL 含有卡那霉素(50  $\mu$ g/mL)的新鲜 LB 液体培养基中,37  $^{\circ}$ C 摇床中以 180 r/min 培养对数生长期( $OD_{600} = 0.8$ )。将菌液进行冰浴降温后,加入 IPTG 至终浓度为 1 mM,置于 16  $^{\circ}$ C 低温摇床以 180 r/min 继续培养 18 h 诱导蛋白。取 1.0 mL 菌液作为诱导后全菌样本。将剩余菌液在 4  $^{\circ}$ C, 8,000  $\times g$  条件下离心 30 min 进行集菌,弃掉上清,最终用 40.0 mL Tris-NaCl 缓冲液重悬菌体。

#### 4.2.6 裂解酶蛋白纯化与浓缩

蛋白纯化步骤如下:

- (1) 将重悬的菌液放入玻璃烧杯中置于冰上,使用超声破碎仪破碎菌体;
- (2) 将超声后的菌液于 4  $^{\circ}$ C 离心机 10,000  $\times g$  离心 20 min,收集上清,留取 1 mL 作为蛋白上清样本;
- (3) 使用 0.22  $\mu$ m 滤器过滤上清,加至镍柱中进行蛋白挂柱,舍弃流出液;
- (4) 用 Tris-NaCl 缓冲液将 2.5M 咪唑分别稀释成 20 mM (50 mL)、50 mM (50 mL) 和 500 mM (50 mL) 咪唑。随后依次往镍柱中加入 20 mM (50 mL) 和 50 mM (50 mL) 咪唑洗脱杂蛋白,最后加入 50.0 mL 500 mM 咪唑洗脱目的蛋白,留取前 20 mL 流出液,即目的蛋白洗脱液;

蛋白浓缩步骤如下:

用 0.22  $\mu\text{m}$  滤器过滤纯化后的目的蛋白洗脱液, 于 4  $^{\circ}\text{C}$  离心机 3,500  $\times g$  水平离心至管中液体剩余 2 mL 左右, 舍弃滤液, 往超滤管中加入过滤后的 Tris-NaCl 缓冲液, 继续离心。反复操作 3 次后, 将超滤管中蛋白液体取出, 使用蛋白定量分析试剂盒测定蛋白浓度, 最终将蛋白浓度稀释到 2 mg/mL 后分装至 EP 管中, 经液氮速冻后放至 -80  $^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。

#### 4.2.7 裂解酶在固体平板上的裂解活性测定

将猪链球菌 SC498 培养至对数生长期 ( $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0.8$ ), 将菌液均匀地涂布在固体 BHI 培养基平板上, 取 10.0  $\mu\text{L}$  纯化后的裂解酶 Lys33795 (终浓度为 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 滴在固体培养基上, 另外在培养基上滴加 10.0  $\mu\text{L}$  体积的 500 mM 洗脱液和 10.0  $\mu\text{L}$  空载体菌株的洗脱液作为对照。待平板晾干后, 放置 37  $^{\circ}\text{C}$  温箱中培养 16 h, 观察现象。

#### 4.2.8 裂解酶 Lys33795 在液体培养基中的裂解活性测定

挑取猪链球菌 SC498 的单菌落转接到 5 mL 新鲜 BHI 液体培养基中, 于 37  $^{\circ}\text{C}$  摇床中 (180 r/min) 培养至对数生长期 ( $\text{OD}_{600} = 0.8$ ), 菌液使用 4  $^{\circ}\text{C}$  离心机 8,000  $\times g$  离心 2 min, 无菌 PBS 缓冲液反复重悬洗涤三次。最终使用 5 mL 无菌 PBS 重悬菌液并等量分装到 5 个透明玻璃管中。在其中 4 个重悬菌液中分别加入终浓度为 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的裂解酶 Lys33795, 剩余 1 管加入等体积无菌 PBS 缓冲液作为对照。震荡混匀后, 将各管混合物放入 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴锅中培养。观察裂解酶 Lys33795 对猪链球菌的裂解情况。

#### 4.2.9 裂解酶 Lys33795 对猪链球菌 SC498 体外杀菌活性

将猪链球菌 SC498 在 4 mL 新鲜 BHI 液体培养基中培养至对数生长期 ( $\text{OD}_{600} = 0.8$ ), 使用 4  $^{\circ}\text{C}$  离心机 8,000  $\times g$  离心 2 min, 无菌 PBS 缓冲液洗涤 3 次。最终使用 4 mL 无菌 PBS 重悬菌液并等量分装到 4 个 1.5 mL 无菌 EP 管中。在其中 3 个重悬菌液中分别加入终浓度为 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的裂解酶 Lys33795, 剩余 1 管加入等体积无菌 PBS 缓冲液作为对照。震荡混匀后, 将各管混合物放入 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴锅中孵育培养 1 h。期间每 10 min 取样一次, 通过倍比稀释法测定各管菌落数。本实验重复三次。

#### 4.2.10 诱导细菌产生针对裂解酶 Lys33795 抗性的分析

选取猪链球菌 SC498 作为指示菌株。菌液 SC498 培养至对数生长期 ( $\text{OD}_{600} = 0.8$ ) 后均匀涂布到 BHI 固体培养基, 将裂解酶 Lys33795 进行连续 2 倍稀释, 取 10.0  $\mu\text{L}$  不同浓度

裂解酶蛋白，分别滴在涂布有猪链球菌的固体培养基上，置于 37 ℃ 温箱中培养 16 h。在抑菌圈边缘挑取单菌落接种于新鲜 BHI 液体培养基中培养，以上操作重复循环 7 代。随后在第 7 代的基础上再连续作用 5 代，检测每一代的菌株对裂解酶 Lys33795 的敏感性。检测方法同 4.2.9，其中裂解酶 Lys33795 终浓度为 100 µg/mL，作用时间为 1 h。

#### 4.2.11 裂解酶 Lys33795 的 pH 值和温度稳定性测定

**pH 稳定性测定：**将菌株 SC498 新鲜 BHI 液体培养基中培养至对数生长期( $OD_{600} = 0.8$ )，使用 4 ℃ 离心机  $8,000 \times g$  离心 2 min，无菌 PBS 缓冲液洗涤 3 次。使用浓盐酸和氢氧化钠将 PBS 缓冲液的 pH 值分别调至为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0，并进行高压灭菌。随后使用高压的缓冲液将蛋白 Lys33795 浓度稀释至 100 µg/mL。将菌液与不同 pH 值的蛋白等体积充分混匀，置于 37 ℃ 水浴锅中孵育 1 h，利用倍比稀释法进行菌落数测定。作为对照，在相同条件下用缓冲液处理后测量活菌数。实验一式三份进行。

**温度稳定性测定：**使用无菌 PBS 缓冲液重悬菌液，反复洗涤 3 次。然后与 Lys33795（终浓度为 100 µg/mL）混合，分别放置于 4 ℃、25 ℃、37 ℃、45 ℃ 和 50 ℃ 水浴锅中孵育 1 h，利用倍比稀释法进行菌落数测定。作为对照，在相同条件下用 PBS 缓冲液处理后测量活菌数。实验进行三次重复。

#### 4.2.12 裂解酶 Lys33795 裂解谱测定

使用空斑法测定裂解酶 Lys33795 的裂解谱。分别将 25 株猪链球菌、3 株马链球菌马亚种、2 株马链球菌兽疫亚种、2 株无乳链球菌培养至对数生长期 ( $OD_{600} = 0.8$ )。分别取 200 µL 菌液均匀涂布在 BHI 固体培养基表面，然后往培养基上滴 10 µL 终浓度为 20 µg/mL 的裂解酶 Lys33795，晾干后，将培养基放置 37 ℃ 温箱培养 16 h，观察空斑形成情况。

#### 4.2.13 链球菌生物膜形成能力的测定

使用 96 孔板法测定链球菌形成生物膜的能力。简言之，将各链球菌（见表 4.2）单菌落接种到 5 mL 新鲜 BHI 培养基中，并在 37 ℃ 摇床中培养 16 h。将培养物以 1:100 的比例转移到新鲜 BHI 液体培养基中进行稀释，并将 200 µL（约  $10^6$  CFU/mL）稀释菌液添加到无菌 96 孔板中，每株菌设置 3 个孔作为三次重复。此外，三个仅含有 BHI 培养基的孔用作阴性对照。将 96 孔板在 37 ℃ 温箱中培养 72 h 后，对孔中生物膜进行处理和测定，步骤如下：

- (1) 去除孔内未附着的细胞，并用无菌 PBS 洗涤孔 3 次；
- (2) 每孔用 200  $\mu$ L 甲醇固定生物膜上的细菌 30 min，然后清空孔内混合物并在室温下干燥 2min；
- (3) 每孔用 200  $\mu$ L 1% (wt/vol) 结晶紫染色剂染色 30 min，用无菌 PBS 洗涤 3 次，并在室温下干燥；
- (4) 每孔用 33% 醋酸浸泡 10 min 后，使用酶标仪测定 OD<sub>630nm</sub>。

链球菌生物膜的形成能力可分为四个级别：强 ( $4 \times OD_c \leq OD$ )、中等 ( $2 \times OD_c < OD \leq 4 \times OD_c$ ) 和弱 ( $OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$ )，或未有生物膜形成 ( $OD \leq OD_c$ )。OD<sub>c</sub> 是阴性对照 (BHI 组) 中获得的 OD<sub>630nm</sub> 测量截止值。

#### 4.2.14 结晶紫染色法测定裂解酶 Lys33795 对链球菌生物膜的清除能力

从既能被 Lys33795 裂解又能生成强生物膜的猪链球菌、马链球菌马亚种、马链球菌兽疫亚种以及无乳链球菌中各选一株菌来测定裂解酶 Lys33795 对链球菌生物膜的清除能力。除此之外，从不能被裂解酶裂解但能生成强生物膜的猪链球菌中选取一株菌测定 Lys33795 对生物膜的清除能力。首先，按照 4.2.13 方法进行菌株的生物膜培养，去除孔内未附着的细胞，并用无菌 PBS 洗涤孔 3 次后，往孔中加入终浓度为 200  $\mu$ g/mL 的裂解酶 Lys33795，对照组加入等体积的无菌 PBS，每组设置 3 个孔作为 3 次重复。将培养板放置 37  $^{\circ}$ C 温箱中培养 1h 后，按照 4.2.13 方法处理各组生物膜，最终酶标仪测定各组样品的 OD<sub>630nm</sub> 值。

#### 4.2.15 扫描电子显微镜 (SEM) 测定裂解酶 Lys33795 对链球菌生物膜的清除能力

猪链球菌 SC57、马链球菌马亚种 Seq17 以及马链球菌兽疫亚种 Seq13 用于确定裂解酶对生物膜的清除能力。参考 4.2.13 方法，12 孔细胞培养板被用于培养链球菌生物膜。简言之，在培养板的每个孔底部提前放置直径为 14 mm 的细胞爬片，向培养板各孔中分别加入 3 mL 菌液稀释液。将 12 孔细胞培养板在 37  $^{\circ}$ C 温箱中静置培养 72 h，然后用无菌 PBS 洗涤孔三次以去除非粘附细胞。各菌株形成的生物被膜分别使用终浓度为 200  $\mu$ g/mL 的 Lys33795 和 PBS 处理 1h。弃去孔中液体，无菌 PBS 洗涤孔三次。用 2.5% 戊二醛固定各孔中的生物膜，然后用不同浓度 (20%、50%、70%、90% 和 100%) 的乙醇脱水，待爬片完全干燥后，使用扫描电子显微镜观察。

### 4.3 结果

#### 4.3.1 猪链球菌的鉴定

猪链球菌在镜下观察为紫色,圆形或卵圆形,多数呈链状排列,链的长短不一(图 4.1)。经 BLAST 比对分析各菌株 16S rRNA 序列进一步对菌株进行了确定。例如,猪链球菌 SC198 的 16S rRNA 序列与 GenBank 数据库公布的一株猪链球菌 16S rRNA 序列(登录号: AF009505.1)的覆盖率(Query Cover)为 94%,同一性(Identity%)为 97.84%。



图 4.1 猪链球菌的革兰氏染色镜检

Fig.4.1 Gram staining microscopic examination of *Streptococcus suis*

#### 4.3.2 猪链球菌的药物敏感性测定

对本研究中 25 株猪链球菌进行抗生素敏感性测定,结果表明所有猪链球菌菌株均表现出了多重耐药性,主要对红霉素(大环内酯类)、四环素(四环素类)、头孢他啶(头孢菌素类)以及多粘菌素 B(多肽类)抗生素产生耐药性。

表 4.1 猪链球菌的抗生素敏感性测定

Table 4.1 Determination of antibiotic sensitivity of *Streptococcus suis*

	<sup>1</sup> 红 霉 素	<sup>2</sup> 青 霉 素	<sup>3</sup> 四 环 素	<sup>4</sup> 链 霉 素	<sup>5</sup> 环 丙 沙 星	<sup>5</sup> 恩 诺 沙 星	<sup>6</sup> 头 孢 他 啶	<sup>7</sup> 氟 苯 尼 考	<sup>8</sup> 多 黏 菌 素 B	<sup>9</sup> 磺 胺 异 恶 唑
SC457	R	S	R	S	S	S	R	S	R	S
SC128	R	S	R	S	R	R	R	S	R	S
SC442	R	S	S	S	S	S	R	S	R	R
SC4502	R	S	R	S	S	S	R	S	R	S

续表 4.1 猪链球菌的抗生素敏感性测定

Continued Table 4.1 Determination of antibiotic sensitivity of *Streptococcus suis*

	<sup>1</sup> 红 霉 素	<sup>2</sup> 青 霉 素	<sup>3</sup> 四 环 素	<sup>4</sup> 链 霉 素	<sup>5</sup> 环 丙 沙 星	<sup>5</sup> 恩 诺 沙 星	<sup>6</sup> 头 孢 他 啶	<sup>7</sup> 氟 苯 尼 考	<sup>8</sup> 多 黏 菌 素 B	<sup>9</sup> 磺 胺 恶 唑
SC489	R	S	R	S	S	S	R	S	R	S
SC143	R	S	R	S	S	S	R	S	R	S
SC198	R	S	R	S	S	S	R	S	R	S
SC295	R	S	R	S	S	S	R	S	R	S
SC1483	R	S	R	S	S	S	R	S	R	S
SC57	R	S	R	S	S	S	R	S	R	S
SC498	R	S	S	S	S	R	R	S	R	S
SC483	R	S	R	S	S	S	R	S	R	S
SC174	R	S	R	S	S	S	R	S	R	S
SC198	R	S	R	S	S	S	R	S	R	S
SC140	R	S	R	S	S	S	R	S	R	S
SC295	R	S	R	S	S	S	R	S	R	S
SC19	R	S	R	S	S	S	R	S	R	S
SC230	R	S	R	S	S	S	R	S	R	S
SC147	R	S	R	S	S	S	R	S	R	S
SC19	R	S	R	S	S	S	R	S	R	S
1-302	S	S	R	S	R	S	R	S	R	S
242	R	S	R	S	R	R	R	S	R	S
SP	R	S	R	S	S	S	R	S	R	S
90gi	S	S	R	S	R	S	R	S	R	S
LSM	R	S	R	S	S	S	R	S	R	S

注：R:耐药；S:敏感；I:介于耐药和敏感之间；

抗生素类别：<sup>1</sup>大环内酯类；<sup>2</sup>β内酰胺类；<sup>3</sup>四环素类；<sup>4</sup>氨基糖苷类；<sup>5</sup>喹诺酮类；<sup>6</sup>头孢菌素类；<sup>7</sup>酰胺类；<sup>8</sup>多肽类；<sup>9</sup>磺胺类。

### 4.3.3 链球菌裂解酶基因鉴定与筛选

通过筛选，从 80,567 个肠道病毒基因中检测到 75 个噬菌体裂解酶基因，占比约 0.09%

(75/80567) (图 4.2)。为获得进一步获得序列新颖且具有广泛裂解谱猪链球菌裂解酶，从被鉴定为多价噬菌体且宿主预测中包含链球菌的噬菌体 contigs 中获得 4 个裂解酶基因(基因序列见附表 S4)，这四个裂解酶基因分别来自 contig33795、contig8387、contig29887 和 contig15143，分别命名为 Lys33795、Lys8387、Lys29887 和 Lys15143。

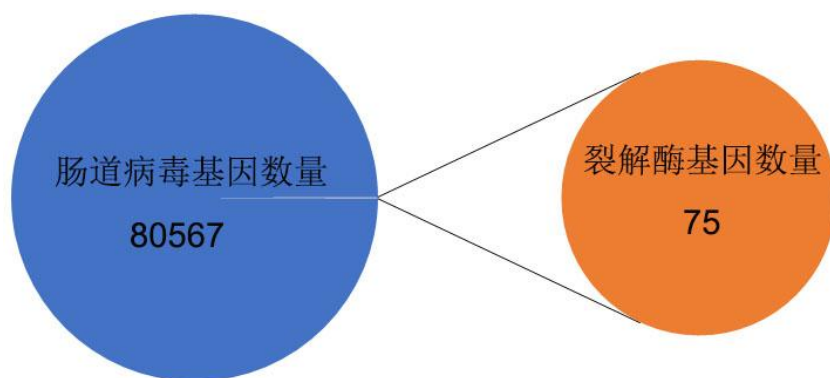


图 4.2 裂解酶基因筛选

Fig.4.2 Lysin genes screening

#### 4.3.4 链球菌裂解酶基因序列的同源性分析

将筛选的 4 个链球菌裂解酶氨基酸序列与 NCBI 数据库进行比对，结果表明 4 个裂解酶均仅与已报道肺炎链球菌噬菌体裂解酶 Cpl-1 (登录号: NP\_044837.1) 具有同源性 (表 4.2)。但这 4 个裂解酶序列与 Cpl-1 覆盖率和同一性较低，表明这 4 个裂解酶都属于序列新颖的猪链球菌裂解酶。此外，氨基酸比对结果显示，在 4 个肠道噬菌体链球菌裂解酶中，裂解酶 Lys8387、Lys29887 和 Lys15143 氨基酸序列相似性较高，而裂解酶 Lys33795 氨基酸序列与其他其他裂解酶具有极大差异 (图 4.3)。因此，本研究选择 Lys33795 进行进一步的体外表达和活性研究。

表 4.2 链球菌裂解酶与 Cpl-1 同源性分析

Table 4.2 Homology Analysis of Streptococcus Lysin and Cpl-1

链球菌裂解酶	与 Cpl-1 序列覆盖率 (%)	与 Cpl-1 序列同一性 (%)
Lys33795	56	52.24
Lys8387	66	58.88
Lys29887	56	57.87
Lys15143	57	56.72

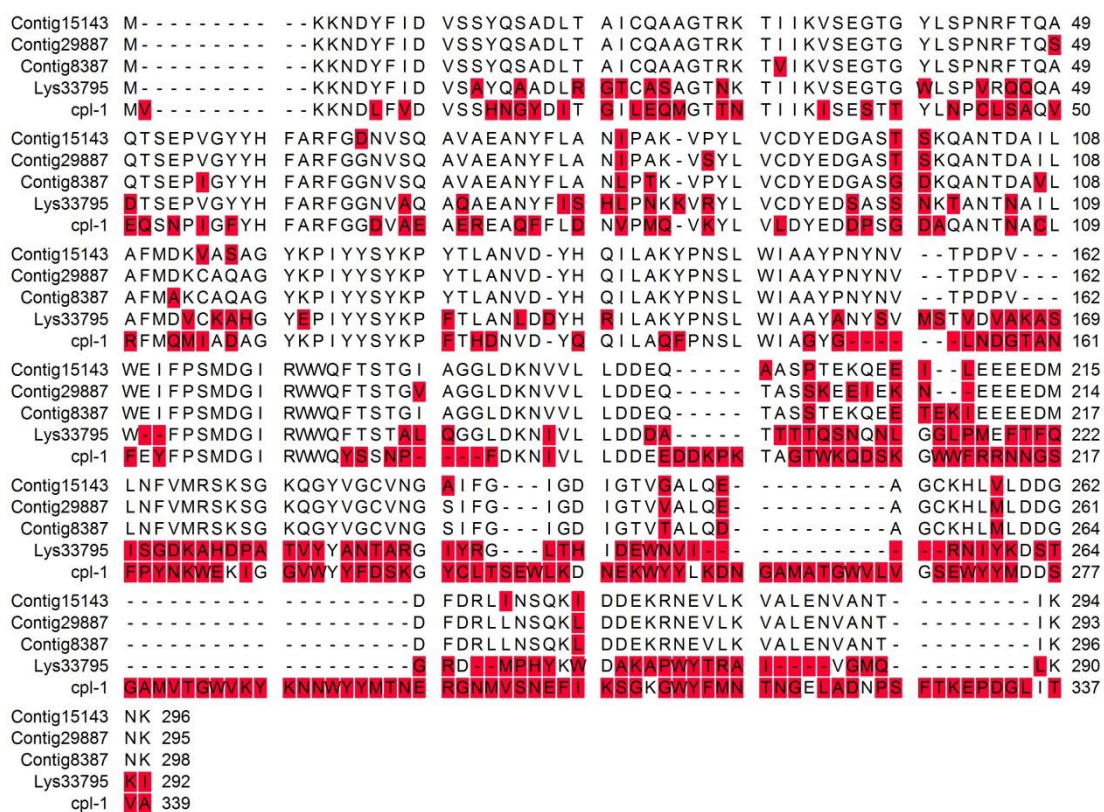


图 4.3 四个链球菌裂解酶与 Cpl-1 氨基酸序列比对分析。标红部分代表不同氨基酸残基。

Fig.4.3 Comparative analysis of amino acid sequences of 4 streptococcal lysins and Cpl-1. The red portion represents different amino acid residues.

### 4.3.5 裂解酶 Lys33795 的表达与纯化

裂解酶 Lys33795 表达菌株经诱导呈现可溶性表达，并在蛋白胶上显示出分子大小约为 38kDa 的条带（图 4.4），除去 PET-28a 载体本身携带的 His 标签分子量（约 4.5 kDa），成功纯化出与裂解酶 Lys33795（33.22 kDa）分子量相一致的蛋白。



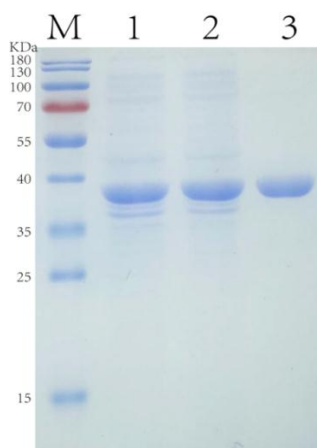


图 4.4 重组 Lys33795 纯化的 SDS-PAGE 分析

Fig.4.4 SDS-PAGE analysis of the purity of recombinant Lys33795

(M: marker; 1: 诱导表达的大肠杆菌 BL21; 2: 超声后的上清液; 3: 纯化的 Lys33795)

(M: marker; 1: expressed *E. coli* BL21; 2: supernatant after crushing; 3: purified Lys33795)

#### 4.3.6 裂解酶 Lys33795 在平板上的裂解活性

纯化的裂解酶 Lys33795 (终浓度为 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 可在涂布有猪链球菌 SC498 的 BHI 固体培养基上形成透亮明显的抑菌环 (图 4.5), 而空载体和洗脱液均未形成抑菌环, 表明 Lys33795 对猪链球菌 SC498 具有裂解活性。

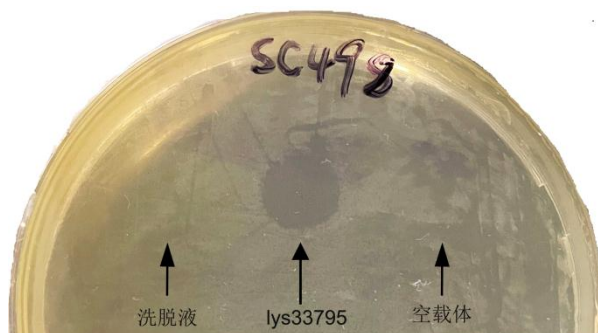


图 4.5 裂解酶 Lys33795 的抑菌斑

Fig.4.5 The antibacterial ring of lysin Lys33795

#### 4.3.7 Lys33795 在液体环境中的裂解活性

如图 4.6 所示, 裂解酶 Lys33795 与猪链球菌共 5 min 后, 不同浓度的 Lys33795 使得处于生长状态下的猪链球菌菌液浑浊度降低, 并且随着 Lys33795 浓度的升高, 菌液澄清度越高, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 Lys33795 与菌液孵育 5 min 即可使菌液完全澄清, 表明 Lys33795 对猪链球菌具有良好的杀菌活性。

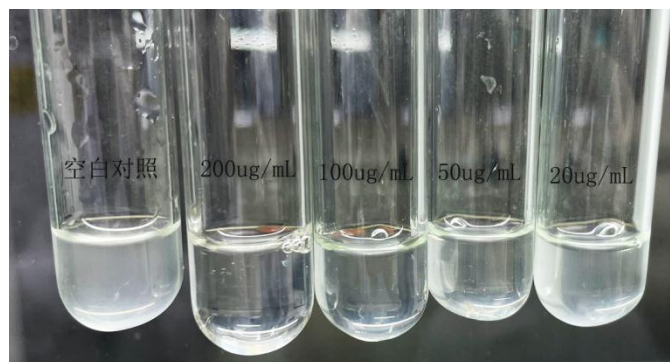


图 4.6 不同浓度裂解酶 Lys33795 在液体中对链球菌裂解活性的观察

Fig.4.6 The observation of lysin Lys33795 with different concentrations on the activity of *Streptococcus suis* in liquid

#### 4.3.8 裂解酶 Lys33795 对猪链球菌 SC498 的体外杀菌作用

与 PBS 处理组相比, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  及以上浓度的 Lys33795 与猪链球菌 SC498 作用 10min 后, 可显著降低菌落数 ( $P < 0.001$ )。50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 Lys33795 可在作用 10min 后杀死约 1.5 个 Log 的活菌量, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 Lys33795 可在作用 10 min 后杀死约 2 个 Log 的活菌量。随着作用时间的延长, 裂解酶处理组的活菌量逐渐下降。50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 Lys33795 可在作用 60 min 后杀死约 2 个 Log 的活菌量, 而 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 Lys33795 可在作用 60 min 后杀死约 3 个 Log 的活菌量 (图 4.7)。这些结果表明裂解酶 Lys33795 对猪链球菌具有高效的杀菌效率, 其杀菌效率随浓度的升高和时间的延长而升高。

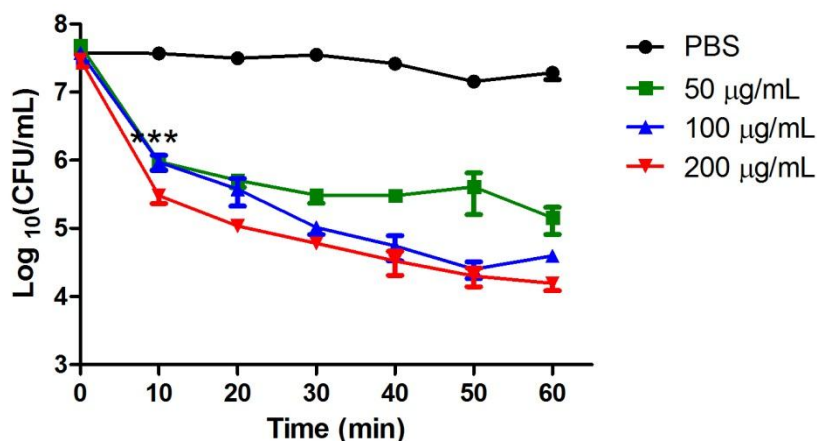


图 4.7 裂解酶 Lys33795 对猪链球菌 SC498 的体外杀菌活性。\*\*\*,  $P < 0.001$ 。

Fig4.7 Bactericidal activity of Lys33795 against *Streptococcus suis* SC498 in vitro. \*\*\*,  $P < 0.001$ .

### 4.3.9 猪链球菌对裂解酶 Lys33795 的抗性测定

如图 4.8 所示，在猪链球菌 SC498 连续传代 12 代之后，裂解酶 Lys33795 对每一代菌株的杀菌效率没有降低，这表明在 12 代内，猪链球菌不会对裂解酶 Lys33795 产生抗性。

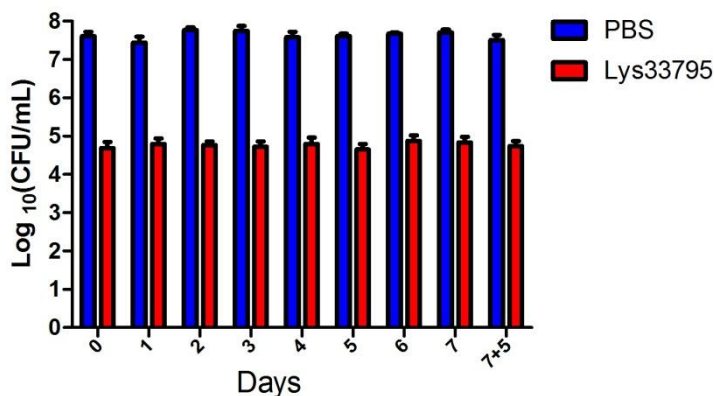


图 4.8 链球菌 SC498 对裂解酶 Lys33795 的抗性测定

Fig4.8 Determination of resistance of *Streptococcus suis* SC498 to Lys33795

### 4.3.10 裂解酶 Lys33795 的 pH 稳定性和温度稳定性

pH 稳定性测定结果表明，裂解酶 Lys33795 在较宽的 pH 范围 (pH 值=3 ~ 10) 内均表现出裂解活性，但 Lys33795 在酸性 (pH 值=3 ~ 6) 条件下的裂解活性强于其中性或碱性 (pH 值=7 ~ 10) 条件下的裂解活性 (图 4.9A)。此外，在 4℃ ~ 45℃ 的温度范围内，裂解酶 Lys33795 具有稳定的裂解活性 (图 4.9B)。这些结果表明裂解酶 Lys33795 具有较强的耐酸碱耐能力以及耐高温能力。

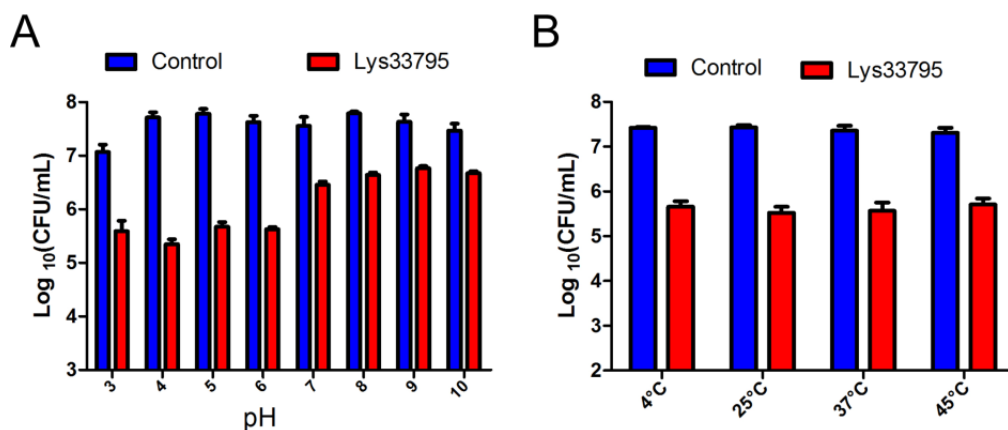


图 4.9 Lys33795 的 pH 稳定性和温度稳定性

Fig4.9 pH stability and temperature stability of Lys33795

### 4.3.11 Lys33795 裂解谱的测定

通过空斑法测定裂解酶 Lys3379 的裂解谱。如表 4.3 所示, 裂解酶 Lys33795 对猪链球菌的裂解率约为 60.00% (15/25)。除此之外, Lys33795 对马链球菌马亚种、马链球菌兽疫亚种和无乳链球菌表现出裂解活性, 裂解率分别约为 66.67% (2/3)、100% (2/2) 和 100% (2/2)。这些结果表明裂解酶 Lys33795 具有广泛的裂解谱。

表 4.3 裂解酶 Lys33795 的裂解谱

表 4.3 The lytic spectrum of lysin Lys33795

菌株	抑菌斑	菌株	抑菌斑
<sup>1</sup> SC457	+	<sup>1</sup> SC295	-
<sup>1</sup> SC128	+	<sup>1</sup> SC19	-
<sup>1</sup> SC442	+	<sup>1</sup> SC230	-
<sup>1</sup> SC4502	+	<sup>1</sup> SC147	-
<sup>1</sup> SC489	+	<sup>1</sup> 1-302	+
<sup>1</sup> SC143	+	<sup>1</sup> LSM	+
<sup>1</sup> SC149	+	<sup>1</sup> 242	+
<sup>1</sup> SC295	+	<sup>1</sup> SP	-
<sup>1</sup> SC1483	+	<sup>1</sup> 90gi	-
<sup>1</sup> SC57	+	<sup>2</sup> Seq4	+
<sup>1</sup> SC498	+	<sup>2</sup> Seq13	+
<sup>1</sup> SC483	-	<sup>3</sup> Seq17	+
<sup>1</sup> SC174	-	<sup>3</sup> E2B9	+
<sup>1</sup> SC198	-	<sup>3</sup> 3518	-
<sup>1</sup> SC140	-	<sup>4</sup> Pn-1	+
<sup>1</sup> SC19	+	<sup>4</sup> 9894	+

注: + 有; - 无;

菌株种类: <sup>1</sup>猪链球菌; <sup>2</sup>马链球菌兽疫亚种; <sup>3</sup>马链球菌马亚种; <sup>4</sup>无乳链球菌。

### 4.3.12 链球菌生物膜生成能力测定

如图 4.10 所示, 不同种链球菌的生物膜形成能力具有明显差异。绝大多数猪链球菌形成弱生物膜或不生成生物膜, 1 株猪链球菌 (SC442) 生成中等生物膜, 仅两株猪链球菌 (SCC57 和 SCC198) 生成强生物膜。相比之下, 所有马链球菌均可生成强生物膜, 其中马链球菌马亚种 (Seq17、E2B9 和 3518) 生成的生物膜强度高于马链球菌兽疫亚种 (Seq4 和 Seq13)。此外, 2 株无乳链球菌均形成弱生物膜。

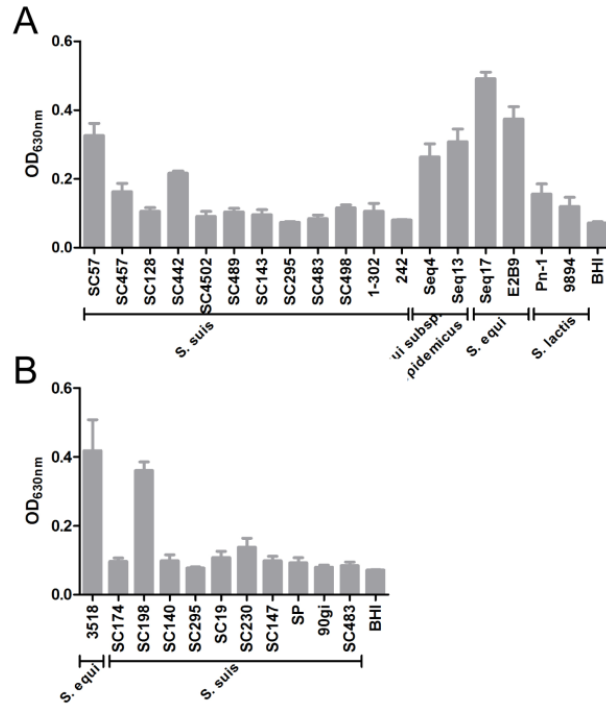


图 4.10 链球菌生物膜形成能力测定

Fig 4.10 Determination of biofilm forming ability of *Streptococcus*

(A) 可被 Lys33795 裂解的链球菌生物膜测定；(B) 不能被 Lys33795 裂解的链球菌生物膜测定。

(A) Determination of biofilm of *Streptococcus* that can be lysed by Lys33795; (B) Determination of biofilm of *Streptococcus* that cannot be lysed by Lys33795.

### 4.3.13 裂解酶 Lys33795 对链球菌生物膜的清除能力测定

依据 4.3.11 结果，选取可生成强生物膜的猪链球菌 SC198（不能被 Lys33795 裂解）和 SC57、马链球菌兽疫亚种 Seq13 和马链球菌马亚种 Seq17 测定 Lys33795 对链球菌生物膜的清除能力。结果表明 Lys33795 可以显著降低链球菌 SC57、马链球菌兽疫亚种 Seq13 和马链球菌马亚种 Seq17 的生物膜量，但不能降低猪链球菌 SC198 生成的生物膜量(图 4.11)。这个结果表明，裂解酶 Lys33795 可显著清除可裂解范围内链球菌形成的生物膜，但无法清除抗性菌株形成的生物膜。

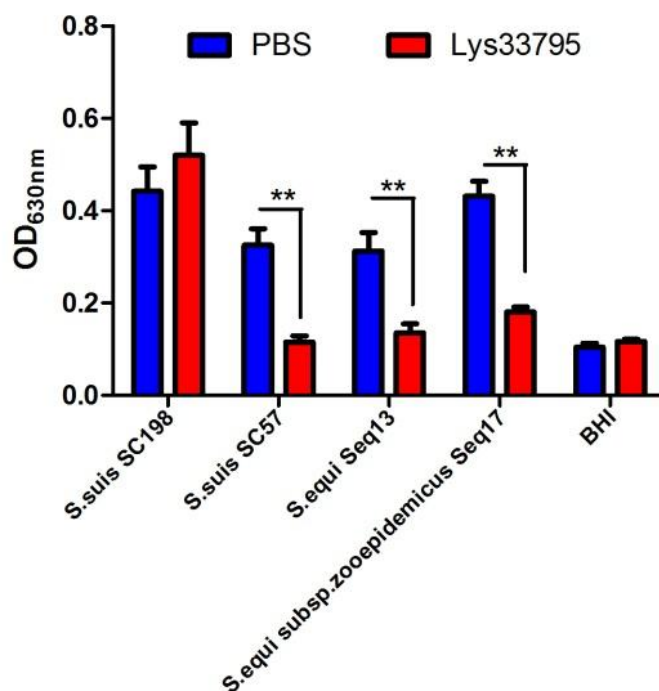


图 4.11 裂解酶 Lys 33795 对链球菌生物膜的清除能力测定

Fig 4.11 Determination of the scavenging ability of lysin Lys33795 to streptococcus biofilm

#### 4.3.14 SEM 观察裂解酶 Lys 33795 对链球菌生物膜的清除作用

在 SEM 图片中，观察到猪链球菌 SC57、马链球菌马亚种 Seq17 和马链球菌兽疫亚种 Seq13 经过 72 h 培养过后，PBS 处理组均可在爬片上生成紧密且厚实的生物膜，其中马链球菌马亚种 Seq17 生物膜形成能力最强（图 4.12）。相比之下，裂解酶 Lys33785 处理组绝大多数生物膜被清除，与结晶紫染色法结果一致，进一步证明了裂解酶 Lys33785 对链球菌生物膜的清除能力。

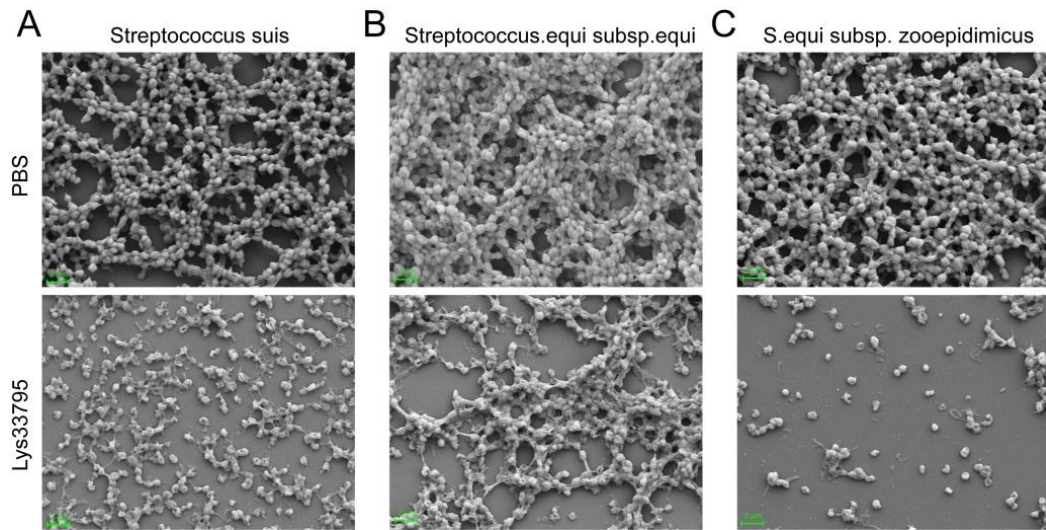


图 4.12 SEM 观察生物被膜

Fig4.12 The biofilm observed by SEM

(A) 猪链球菌 SC57; (B) 马链球菌马亚种 Seq17; (C) 马链球菌兽疫亚种 Seq13。

(A) *Streptococcus suis* SC57; (B) *Streptococcus equi subsp. equi* Seq17; (C) *Streptococcus equi subsp. zoonosis* Seq13.

#### 4.4 讨论

基于猪链球菌耐药性对全球范围的威胁，迫切需要开发新型抗菌药物的策略。在这种情况下，噬菌体和噬菌体衍生的裂解酶被认为是有前途的替代药物，这归因于它们不同的作用机制<sup>[213]</sup>。另人棘手的是，猪链球菌烈性噬菌体的分离难度非常大，目前，仅有一株烈性猪链球菌噬菌体被分离和表征<sup>[214]</sup>。因此，研究人员把目标集中到了噬菌体编码的裂解酶上。作为蛋白质治疗实体，噬菌体裂解酶代表了一种在直接接触时靶向细菌肽聚糖键的酶生物。裂解酶可以高效地破坏细菌细胞壁，而不管细菌细胞的存活情况如何，即浮游形式或附着形式，以及它们的抗生素敏感性特征<sup>[143]</sup>。

本研究基于仔猪肠道病毒组中鉴定的多价噬菌体序列，筛选出一个的猪链球菌裂解酶 Lys33795，其仅与已报道肺炎链球菌裂解酶 Cpl-1 显示出同源性，且两者仅有 56% 的覆盖率和 52.24% 的同一性，这表明了 Lys33795 在序列上新颖性。Cpl-1 生物学特性已被广泛研究，该裂解酶对口腔链球菌菌和肺炎链球菌具有裂解活性<sup>[215]</sup>。相比之下，Lys33795 表现出广泛的裂解谱，不仅对猪链球菌有裂解活性，而且靶向马链球菌马亚种、马链球菌兽疫亚种以及无乳链球菌表现出杀菌活性。Lys33795 对测定的猪链球菌的裂解率达到了 60.00%

(15/25), 根据之前研究对这些猪链球菌血清型的鉴定<sup>[216]</sup>, 本研究中 Lys33795 可裂解猪链球菌血清型覆盖 2 型、3 型、7 型、9 型、10 型和 27 型。据报道, 猪链球菌主要致病血清型包括 1 型、2 型、7 型和 9 型<sup>[217]</sup>。由于本实验室目前没有 1 型猪链球菌菌株, 因此 Lys33795 是否对 1 型猪链球菌有裂解酶活性需要更多菌株和试验进一步验证。除了具有广泛的裂解谱之外, Lys33795 对多重耐药猪链球菌表现出高效的杀菌活性, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 Lys33795 可在作用 10min 后杀死约 1.5 个 Log 的活菌量, 且杀菌活性的增强依赖于蛋白浓度的升高和作用时间的延长。此外, Lys33795 表现出耐强酸碱性和耐高温性, 且不易诱导菌株抗性的产生。这些特性均有助于 Lys33795 作为抗击多重耐药猪链球菌感染的临床药物。

在本研究中, 观察到绝大多数链球菌不形成或只形成弱生物膜, 仅有 3 株猪链球菌形成较强生物膜。而所有马链球菌可生成较强的生物膜, 生物膜的形成增加了细菌对抗生素的耐受性和耐药性<sup>[127]</sup>。因此, 马链球菌耐药性的增强可能与生物膜的形成有着重要关系。一般来说, 成熟的生物膜比年轻的生物膜更耐抗生素<sup>[127]</sup>。然而, 裂解酶 Lys33795 可以显著清除猪链球菌及马链球菌培养 72h 形成的成熟生物膜。裂解酶作用于细菌细胞壁, 不影响生物膜内的基质, 细菌是生物被膜的主要部分, 一旦生物被膜中的细菌被裂解, 生物被膜的完整性被破坏并最终被清除<sup>[218]</sup>。因此, 裂解酶对生物被膜的清除范围可能与其裂解谱保持一致。本研究结果证明了这一点, 与 PBS 处理组相比, 裂解酶 Lys33795 处理组细菌的数量明显的减少(图 4.11)。然而, Lys33795 对抗性菌株形成的生物膜无影响(图 4.10)。

多项研究证明了裂解酶在体内对猪链球菌抗感染治疗效果<sup>[140]</sup>其中裂解酶 Ply5218 减轻了链球菌引起的仔猪临床症状, 并显著降低了细菌负荷和细胞因子 IL-6 的水平, 表明了裂解酶在治疗仔猪链球菌感染中有效性<sup>[219]</sup>。对于裂解酶 Lys33795 需要建立动物多种猪链球菌动物模型去进一步验证其在体内的治疗效果。此外, Lys33795 对马链球菌和无乳链球菌具有杀菌活性, 而无乳链球菌是全球引起临床和亚临床乳腺炎的一种重要病原体, 马链球菌则主要引起马腺疫病<sup>[220, 221]</sup>。因此, Lys33795 可能同时成为治疗链球菌乳腺炎以及马腺疫的一个潜在药物, 但这都需要更多的实验去评估真正的治疗效果。

总之, 本研究发现了一种新的猪链球菌裂解酶 Lys33795, 实验结果表明, Lys33795 可能是一种潜在的有效抗链球菌药物。随着病毒宏基因组测序的发展和普及, 研究人员可能从病毒组中挖掘出更多潜在的噬菌体裂解酶或其他类型的抗菌蛋白, 这将极大的推进新型抗菌药物的研发。



## 4.5 小结

**4.5.1** 基于断奶仔猪肠道噬菌体组，筛选出 4 个序列新颖的链球菌噬菌体裂解酶基因，并成功完成裂解酶 Lys33795 的载体构建与蛋白表达。

**4.5.2** 裂解酶 Lys33795 具有广泛的裂解谱，不仅对多种血清型猪链球菌裂解活性，而且可以靶向裂解无乳链球菌、马链球菌兽疫亚种以及马链球菌马亚种。

**4.5.3** 裂解酶 Lys33795 对多重耐药猪链球菌表现出高效的杀菌活性，且不易诱导菌株抗性的产生。此外，Lys33795 可在较宽 pH 值（pH 值 = 3 ~ 10）和温度（4 ~ 45 ℃）范围内保持杀菌活性。

**4.5.4** 裂解酶 Lys33795 可以显著清除猪链球菌及马链球菌形成的成熟生物膜。以上特性均有助于 Lys33795 成为应对多重耐药猪链球菌感染药物的后备临床药物。

## 结 论

1. 噬菌体是断奶仔猪肠道病毒的主要组分, 主要由有尾噬菌体目(*Caudovirales*)和微小噬菌体科(*Microviridae*)组成, 且在健康断奶仔猪肠道中分布不均衡。

2. 仔猪断奶后腹泻与肠道噬菌体紊乱有关, 噬菌体在维持仔猪肠道生态健康方面扮演着重要角色。

3. 腹泻断奶仔猪肠道菌群与肠道噬菌体病毒群发生的平行变化与特定噬菌体和细菌分类群有关。

4. 断奶仔猪肠道噬菌体是 ARGs 的重要储存库, 携带具有耐药性能的真正 ARGs。噬菌体相关 MGE 基因是 ARGs 的重要驱动因素。腹泻增加了断奶仔猪肠道噬菌体介导的 ARGs 在细菌群落中传播的风险。

5. 断奶仔猪肠道病毒组具有高度新颖性, 基于肠道噬菌体组来源新型链球菌裂解酶的发现提示猪肠道噬菌体组是一个尚未开发的裂解酶基因库, 在临床新型抗菌药物发掘和治疗应用方面具有巨大的潜力。



## 参考文献

- [1] Gresse R, Chaucheyras-Durand F, Fleury M A, et al. Gut Microbiota Dysbiosis in Postweaning Piglets: Understanding the Keys to Health [J]. Trends in microbiology, 2017, 25(10): 851-873.
- [2] Lalles J P, Bosi P, Smidt H, et al. Nutritional management of gut health in pigs around weaning [J]. P Nutr Soc, 2007, 66(2): 260-268.
- [3] Yang Q L, Huang X Y, Zhao S G, et al. Structure and Function of the Fecal Microbiota in Diarrheic Neonatal Piglets [J]. Frontiers in microbiology, 2017, 8.
- [4] Zhou X H, Liu Y H, Xia X, et al. Intestinal accumulation of microbiota-produced succinate caused by loss of microRNAs leads to diarrhea in weanling piglets [J]. Gut Microbes, 2022, 14(1).
- [5] Xiao L, Estelle J, Kiilerich P, et al. A reference gene catalogue of the pig gut microbiome [J]. Nature microbiology, 2016, 1(12).
- [6] Pang X Y, Hua X G, Yang Q, et al. Inter-species transplantation of gut microbiota from human to pigs [J]. Isme Journal, 2007, 1(2): 156-162.
- [7] Albernaz-Goncalves R, Antillon G O, Hotzel M J. Linking Animal Welfare and Antibiotic Use in Pig Farming-A Review [J]. Animals-Basel, 2022, 12(2).
- [8] Hu Y F, Gao G F, Zhu B L. The antibiotic resistome: gene flow in environments, animals and human beings [J]. Front Med-Prc, 2017, 11(2): 161-168.
- [9] Martinez-Garcia M, Santos F, Moreno-Paz M, et al. Unveiling viral-host interactions within the 'microbial dark matter' [J]. Nature communications, 2014, 5.
- [10] Minot S, Sinha R, Chen J, et al. The human gut virome: Inter-individual variation and dynamic response to diet [J]. Genome Res, 2011, 21(10): 1616-1625.
- [11] Feiner R, Argov T, Rabinovich L, et al. A new perspective on lysogeny: prophages as active regulatory switches of bacteria [J]. Nature Reviews Microbiology, 2015, 13(10): 641-650.
- [12] Juhas M, van der Meer J R, Gaillard M, et al. Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution [J]. Fems Microbiol Rev, 2009, 33(2): 376-393.

- [13] Norman J M, Handley S A, Baldrige M T, et al. Disease-Specific Alterations in the Enteric Virome in Inflammatory Bowel Disease [J]. *Cell*, 2015, 160(3): 447-460.
- [14] Mayneris-Perxachs J, Castells-Nobau A, Arnoriaga-Rodriguez M, et al. Caudovirales bacteriophages are associated with improved executive function and memory in flies, mice, and humans [J]. *Cell host & microbe*, 2022, 30(3): 340.
- [15] Marbouty M, Thierry A, Millot G A, et al. MetaHiC phage-bacteria infection network reveals active cycling phages of the healthy human gut [J]. *Elife*, 2021, 10.
- [16] Ma Y F, You X Y, Mai G Q, et al. A human gut phage catalog correlates the gut phageome with type 2 diabetes [J]. *Microbiome*, 2018, 6.
- [17] Brussow H, Canchaya C, Hardt W D. Phages and the evolution of bacterial pathogens: From genomic rearrangements to lysogenic conversion [J]. *Microbiol Mol Biol R*, 2004, 68(3): 560.
- [18] D'Costa V M, King C E, Kalan L, et al. Antibiotic resistance is ancient [J]. *Nature*, 2011, 477(7365): 457-461.
- [19] Waschulin V, Borsetto C, James R, et al. Biosynthetic potential of uncultured Antarctic soil bacteria revealed through long-read metagenomic sequencing [J]. *Isme Journal*, 2022, 16(1): 101-111.
- [20] de Castro A P, Fernandes G D, Franco O L. Insights into novel antimicrobial compounds and antibiotic resistance genes from soil metagenomes [J]. *Frontiers in microbiology*, 2014, 5.
- [21] Campbell J M, Crenshaw J D, Polo J. The biological stress of early weaned piglets [J]. *J Anim Sci Biotechno*, 2013, 4.
- [22] Brown D C, Maxwell C V, Erf G F, et al. The influence of different management systems and age on intestinal morphology, immune cell numbers and mucin production from goblet cells in post-weaning pigs [J]. *Vet Immunol Immunop*, 2006, 111(3-4): 187-198.
- [23] Heo J M, Opapeju F O, Pluske J R, et al. Gastrointestinal health and function in weaned pigs: a review of feeding strategies to control post-weaning diarrhoea without using in-feed antimicrobial compounds [J]. *J Anim Physiol an N*, 2013, 97(2): 207-237.
- [24] Bomba L, Minuti A, Moisa S J, et al. Gut response induced by weaning in piglet features

- marked changes in immune and inflammatory response [J]. *Funct Integr Genomic*, 2014, 14(4): 657-671.
- [25] Saladrigas-Garcia M, Duran M, D'Angelo M, et al. An insight into the commercial piglet's microbial gut colonization: from birth towards weaning [J]. *Anim Microbiome*, 2022, 4(1).
- [26] Starke I C, Pieper R, Neumann K, et al. The impact of high dietary zinc oxide on the development of the intestinal microbiota in weaned piglets [J]. *Fems Microbiol Ecol*, 2014, 87(2): 416-427.
- [27] Fang D, Xu T Q, Sun J Y, et al. Nicotinamide Mononucleotide Ameliorates Sleep Deprivation-Induced Gut Microbiota Dysbiosis and Restores Colonization Resistance against Intestinal Infections [J]. *Adv Sci*, 2023.
- [28] Kamada N, Seo S U, Chen G Y, et al. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease [J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13(5): 321-335.
- [29] Bian G R, Ma S Q, Zhu Z G, et al. Age, introduction of solid feed and weaning are more important determinants of gut bacterial succession in piglets than breed and nursing mother as revealed by a reciprocal cross-fostering model [J]. *Environ Microbiol*, 2016, 18(5): 1566-1577.
- [30] Rist V T S, Weiss E, Eklund M, et al. Impact of dietary protein on microbiota composition and activity in the gastrointestinal tract of piglets in relation to gut health: a review [J]. *Animal*, 2013, 7(7): 1067-1078.
- [31] Konstantinov S R, Awati A A, Williams B A, et al. Post-natal development of the porcine microbiota composition and activities [J]. *Environ Microbiol*, 2006, 8(7): 1191-1199.
- [32] Tran T H T, Everaert N, Bindelle J. Review on the effects of potential prebiotics on controlling intestinal enteropathogens *Salmonella* and *Escherichia coli* in pig production [J]. *J Anim Physiol an N*, 2018, 102(1): 17-32.
- [33] Iwu C J, Iweriebor B C, Obi L C, et al. Occurrence of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in two commercial swine farms in the Eastern Cape Province, South Africa [J]. *Comp Immunol Microb*, 2016, 44(48-53).
- [34] Zhou D, Zhu Y H, Zhang W, et al. Oral administration of a select mixture of *Bacillus* probiotics generates Tr1 cells in weaned F4ab/acR(-) pigs challenged with an F4(+)

- EPEC/EPEC strain [J]. *Vet Res*, 2015, 46.
- [35] Chen X, Xu J M, Ren E D, et al. Co-occurrence of early gut colonization in neonatal piglets with microbiota in the maternal and surrounding delivery environments [J]. *Anaerobe*, 2018, 49(30-40).
- [36] Frese S A, Parker K, Calvert C C, et al. Diet shapes the gut microbiome of pigs during nursing and weaning [J]. *Microbiome*, 2015, 3.
- [37] Dou S, Gadonna-Widehem P, Rome V, et al. Characterisation of Early-Life Fecal Microbiota in Susceptible and Healthy Pigs to Post-Weaning Diarrhoea [J]. *PloS one*, 2017, 12(1).
- [38] Scharek L, Guth J, Reiter K, et al. Influence of a probiotic *Enterococcus faecium* strain on development of the immune system of sows and piglets [J]. *Vet Immunol Immunop*, 2005, 105(1-2): 151-161.
- [39] Taras D, Vahjen W, Macha M, et al. Performance, diarrhea incidence, and occurrence of *Escherichia coli* virulence genes during long-term administration of a probiotic *Enterococcus faecium* strain to sows and piglets [J]. *J Anim Sci*, 2006, 84(3): 608-617.
- [40] Poulsen A S R, de Jonge N, Nielsen J L, et al. Impact of *Bacillus* spp. spores and gentamicin on the gastrointestinal microbiota of suckling and newly weaned piglets [J]. *PloS one*, 2018, 13(11).
- [41] Byrgesen N, Madsen J G, Larsen C, et al. The Effect of Feeding Liquid or Dry Creep Feed on Growth Performance, Feed Disappearance, Enzyme Activity and Number of Eaters in Suckling Piglets [J]. *Animals-Basel*, 2021, 11(11).
- [42] Pluske J R, Turpin D L, Kim J C. Gastrointestinal tract (gut) health in the young pig [J]. *Anim Nutr*, 2018, 4(2): 187-196.
- [43] Kim J H, Heo K N, Odle J, et al. Liquid diets accelerate the growth of early-weaned pigs and the effects are maintained to market weight [J]. *J Anim Sci*, 2001, 79(2): 427-434.
- [44] Canchaya C, Fournous G, Chibani-Chennoufi S, et al. Phage as agents of lateral gene transfer [J]. *Current opinion in microbiology*, 2003, 6(4): 417-424.
- [45] Mulder I E, Schmidt B, Lewis M, et al. Restricting Microbial Exposure in Early Life Negates the Immune Benefits Associated with Gut Colonization in Environments of High

- Microbial Diversity [J]. PloS one, 2011, 6(12).
- [46] McCracken B A, Spurlock M E, Roos M A, et al. Weaning anorexia may contribute to local inflammation in the piglet small intestine [J]. J Nutr, 1999, 129(3): 613-619.
- [47] Dubreuil J D. Enterotoxigenic *Escherichia coli* and probiotics in swine: what the bleep do we know? [J]. Biosci Microb Food H, 2017, 36(3): 75-90.
- [48] Upadhaya S D, Kim I H. Maintenance of gut microbiome stability for optimum intestinal health in pigs - a review [J]. J Anim Sci Biotechno, 2022, 13(1).
- [49] Qian X, Gu J, Sun W, et al. Diversity, abundance, and persistence of antibiotic resistance genes in various types of animal manure following industrial composting [J]. J Hazard Mater, 2018, 344(716-722).
- [50] Wang C L, Li P, Yan Q L, et al. Characterization of the Pig Gut Microbiome and Antibiotic Resistome in Industrialized Feedlots in China [J]. Msystems, 2019, 4(6).
- [51] Li L L, Xiao Y W, Olsen R H, et al. Short- and long-read metagenomics insight into the genetic contexts an hosts of mobile antibiotic resistome in Chinese swine farms [J]. Sci Total Environ, 2022, 827.
- [52] Yang Y W, Xing S C, Chen Y X, et al. Profiles of bacteria/phage-mediated ARGs in pig farm wastewater treatment plants in China: Association with mobile genetic elements, bacterial communities and environmental factors [J]. J Hazard Mater, 2021, 404.
- [53] Martinez J L, Coque T M, Baquero F. What is a resistance gene? Ranking risk in resistomes [J]. Nature Reviews Microbiology, 2015, 13(2): 116-123.
- [54] Cox G, Wright G D. Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions [J]. International Journal Of Medical Microbiology, 2013, 303(6-7): 287-292.
- [55] Gardner B, Betson M, Rosel A C, et al. Mapping the evidence of the effects of environmental factors on the prevalence of antibiotic resistance in the non-built environment: Protocol for a systematic evidence map [J]. Environ Int, 2023, 171.
- [56] Emamalipour M, Seidi K, Vahed S Z, et al. Horizontal Gene Transfer: From Evolutionary Flexibility to Disease Progression [J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8.
- [57] Brown-Jaque M, Calero-Caceres W, Muniesa M. Transfer of antibiotic-resistance genes via phage-related mobile elements [J]. Plasmid, 2015, 79(1-7).



- [58] Hu Y F, Yang X, Li J, et al. The Bacterial Mobile Resistome Transfer Network Connecting the Animal and Human Microbiomes [J]. *Applied and environmental microbiology*, 2016, 82(22): 6672-6681.
- [59] Brigulla M, Wackernagel W. Molecular aspects of gene transfer and foreign DNA acquisition in prokaryotes with regard to safety issues [J]. *Appl Microbiol Biot*, 2010, 86(4): 1027-1041.
- [60] Duesberg C B, Malhotra-Kumar S, Goossens H, et al. Interspecies Recombination Occurs Frequently in Quinolone Resistance-Determining Regions of Clinical Isolates of *Streptococcus pyogenes* [J]. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2008, 52(11): 4191-4193.
- [61] Casjens S. Prophages and bacterial genomics: what have we learned so far? [J]. *Molecular microbiology*, 2003, 49(2): 277-300.
- [62] Oliver A, Coque T M, Alonso D, et al. CTX-M-10 linked to a phage-related element is widely disseminated among Enterobacteriaceae in a Spanish hospital [J]. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2005, 49(4): 1567-1571.
- [63] Banks D J, Porcella S F, Barbian K D, et al. Structure and distribution of an unusual chimeric genetic element encoding macrolide resistance in phylogenetically diverse clones of group A *Streptococcus* [J]. *Journal Of Infectious Diseases*, 2003, 188(12): 1898-1908.
- [64] Wyres K L, van Tonder A, Lambertsen L M, et al. Evidence of antimicrobial resistance-conferring genetic elements among pneumococci isolated prior to 1974 [J]. *BMC genomics*, 2013, 14.
- [65] Maslanova I, Doskar J, Varga M, et al. Bacteriophages of *Staphylococcus aureus* efficiently package various bacterial genes and mobile genetic elements including SCCmec with different frequencies [J]. *Env Microbiol Rep*, 2013, 5(1): 66-73.
- [66] Smillie C S, Smith M B, Friedman J, et al. Ecology drives a global network of gene exchange connecting the human microbiome [J]. *Nature*, 2011, 480(7376): 241-244.
- [67] Rodriguez-Mozaz S, Chamorro S, Marti E, et al. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river [J]. *Water Res*, 2015, 69(234-242).

- [68] Korzeniewska E, Korzeniewska A, Harnisz M. Antibiotic resistant *Escherichia coli* in hospital and municipal sewage and their emission to the environment [J]. *Ecotox Environ Safe*, 2013, 91(96-102).
- [69] Winokur P L, Vonstein D L, Hoffman L J, et al. Evidence for transfer of CMY-2 AmpC beta-lactamase plasmids between *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from food animals and humans [J]. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2001, 45(10): 2716-2722.
- [70] Moubareck C, Bourgeois N, Courvalin P, et al. Multiple antibiotic resistance gene transfer from animal to human enterococci in the digestive tract of gnotobiotic mice [J]. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2003, 47(9): 2993-2996.
- [71] Davies J, Davies D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance [J]. *Microbiol Mol Biol R*, 2010, 74(3): 417.
- [72] Antimicrobial resistance: Implications for the food system. An expert report, funded by the IFT Foundation [J]. *Compr Rev Food Sci F*, 2006, 5(3): 71-137.
- [73] Hu Y F, Liu F, Lin I Y C, et al. Dissemination of the mcr-1 colistin resistance gene [J]. *Lancet Infectious Diseases*, 2016, 16(2): 146-147.
- [74] Handelsman J. Metagenomics: Application of genomics to uncultured microorganisms (vol 68, pg 669, 2004) [J]. *Microbiol Mol Biol R*, 2005, 69(1): 195-195.
- [75] Baker B J, Banfield J F. Microbial communities in acid mine drainage [J]. *Fems Microbiol Ecol*, 2003, 44(2): 139-152.
- [76] Yooseph S, Sutton G, Rusch D B, et al. The Sorcerer II Global Ocean Sampling expedition: Expanding the universe of protein families [J]. *Plos Biol*, 2007, 5(3): 432-466.
- [77] Aggarwala V, Liang G X, Bushman F D. Viral communities of the human gut: metagenomic analysis of composition and dynamics [J]. *Mobile DNA-Uk*, 2017, 8.
- [78] Norman J M, Handley S A, Virgin H W. Kingdom-Agnostic Metagenomics and the Importance of Complete Characterization of Enteric Microbial Communities [J]. *Gastroenterology*, 2014, 146(6): 1459-1469.
- [79] Paez-Espino D, Eloie-Fadrosch E A, Pavlopoulos G A, et al. Uncovering Earth's virome [J]. *Nature*, 2016, 536(7617): 425.
- [80] Manrique P, Bolduc B, Walk S T, et al. Healthy human gut phageome [J]. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America, 2016, 113(37): 10400-10405.
- [81] Kim M S, Park E J, Roh S W, et al. Diversity and Abundance of Single-Stranded DNA Viruses in Human Feces [J]. *Applied and environmental microbiology*, 2011, 77(22): 8062-8070.
- [82] Shkoporov A N, Clooney A G, Sutton T D S, et al. The Human Gut Virome Is Highly Diverse, Stable, and Individual Specific [J]. *Cell host & microbe*, 2019, 26(4): 527.
- [83] Stern A, Mick E, Tirosh I, et al. CRISPR targeting reveals a reservoir of common phages associated with the human gut microbiome [J]. *Genome Res*, 2012, 22(10): 1985-1994.
- [84] Gregory A C, Zablocki O, Zayed A A, et al. The Gut Virome Database Reveals Age-Dependent Patterns of Virome Diversity in the Human Gut [J]. *Cell host & microbe*, 2020, 28(5): 724.
- [85] Moreno-Gallego J L, Chou S P, Di Rienzi S C, et al. Virome Diversity Correlates with Intestinal Microbiome Diversity in Adult Monozygotic Twins [J]. *Cell host & microbe*, 2019, 25(2): 261.
- [86] Bushman F, Liang G X. Assembly of the virome in newborn human infants [J]. *Curr Opin Virol*, 2021, 48(17-22).
- [87] Ferretti P, Pasolli E, Tett A, et al. Mother-to-Infant Microbial Transmission from Different Body Sites Shapes the Developing Infant Gut Microbiome [J]. *Cell host & microbe*, 2018, 24(1): 133.
- [88] Pannaraj P S, Ly M, Cerini C, et al. Shared and Distinct Features of Human Milk and Infant Stool Viromes [J]. *Frontiers in microbiology*, 2018, 9.
- [89] Mirzaei M K, Khan M A A, Ghosh P, et al. Bacteriophages Isolated from Stunted Children Can Regulate Gut Bacterial Communities in an Age-Specific Manner [J]. *Cell host & microbe*, 2020, 27(2): 199.
- [90] Hsu C L, Duan Y, Fouts D E, et al. Intestinal virome and therapeutic potential of bacteriophages in liver disease [J]. *J Hepatol*, 2021, 75(6): 1465-1475.
- [91] Wetzel K S, Aull H G, Zack K M, et al. Protein-Mediated and RNA-Based Origins of Replication of Extrachromosomal Mycobacterial Prophages [J]. *mBio*, 2020, 11(2).

- [92] Loh B, Kuhn A, Leptihn S. The fascinating biology behind phage display: filamentous phage assembly [J]. *Molecular microbiology*, 2019, 111(5): 1132-1138.
- [93] Kirsch J M, Brzozowski R S, Faith D, et al. Bacteriophage-Bacteria Interactions in the Gut: From Invertebrates to Mammals [J]. *Annu Rev Virol*, 2021, 8(95-113).
- [94] Sinha A, Li Y, Mirzaei M K, et al. Transplantation of bacteriophages from ulcerative colitis patients shifts the gut bacteriome and exacerbates the severity of DSS colitis [J]. *Microbiome*, 2022, 10(1).
- [95] Chatterjee A, Willett J L E, Dunny G M, et al. Phage infection and sub-lethal antibiotic exposure mediate *Enterococcus faecalis* type VII secretion system dependent inhibition of bystander bacteria [J]. *PLoS genetics*, 2021, 17(1).
- [96] Hsu B B, Gibson T E, Yeliseyev V, et al. Dynamic Modulation of the Gut Microbiota and Metabolome by Bacteriophages in a Mouse Model [J]. *Cell host & microbe*, 2019, 25(6): 803.
- [97] Cornuault J K, Petit M A, Mariadassou M, et al. Phages infecting *Faecalibacterium prausnitzii* belong to novel viral genera that help to decipher intestinal viromes [J]. *Microbiome*, 2018, 6.
- [98] Coughlan S, Das A, O'Herlihy E, et al. The gut virome in Irritable Bowel Syndrome differs from that of controls [J]. *Gut Microbes*, 2021, 13(1).
- [99] Clooney A G, Sutton T D S, Shkoporov A N, et al. Whole-Virome Analysis Sheds Light on Viral Dark Matter in Inflammatory Bowel Disease [J]. *Cell host & microbe*, 2019, 26(6): 764.
- [100] Diard M, Bakkeren E, Cornuault J K, et al. Inflammation boosts bacteriophage transfer between *Salmonella* spp. [J]. *Science*, 2017, 355(6330): 1211-1215.
- [101] Tiamani K, Luo S Q, Schulz S, et al. The role of virome in the gastrointestinal tract and beyond [J]. *Fems Microbiol Rev*, 2022, 46(6).
- [102] Kim S, Rigatto K, Gazzana M B, et al. Altered Gut Microbiome Profile in Patients With Pulmonary Arterial Hypertension [J]. *Hypertension*, 2020, 75(4): 1063-1071.
- [103] Padhi P, Worth C, Zenitsky G, et al. Mechanistic Insights Into Gut Microbiome Dysbiosis-Mediated Neuroimmune Dysregulation and Protein Misfolding and Clearance in

- the Pathogenesis of Chronic Neurodegenerative Disorders [J]. *Front Neurosci-Switz*, 2022, 16.
- [104] Lang S, Demir M, Martin A, et al. Intestinal Virome Signature Associated With Severity of Nonalcoholic Fatty Liver Disease [J]. *Gastroenterology*, 2020, 159(5): 1839-1852.
- [105] Cinek O, Kramna L, Lin J, et al. Imbalance of bacteriome profiles within the Finnish Diabetes Prediction and Prevention study: Parallel use of 16S profiling and virome sequencing in stool samples from children with islet autoimmunity and matched controls [J]. *Pediatr Diabetes*, 2017, 18(7): 588-598.
- [106] Mara P, Vik D, Pachiadaki M G, et al. Viral elements and their potential influence on microbial processes along the permanently stratified Cariaco Basin redoxcline [J]. *Isme Journal*, 2020, 14(12): 3079-3092.
- [107] Chevallereau A, Pons B J, van Houte S, et al. Interactions between bacterial and phage communities in natural environments [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2022, 20(1): 49-62.
- [108] Gyles C L. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview [J]. *J Anim Sci*, 2007, 85(E45-E62).
- [109] Spencer L, Olawuni B, Singh P. Gut Virome: Role and Distribution in Health and Gastrointestinal Diseases [J]. *Front Cell Infect Mi*, 2022, 12.
- [110] Colomer-Lluch M, Jofre J, Muniesa M. Antibiotic Resistance Genes in the Bacteriophage DNA Fraction of Environmental Samples [J]. *PloS one*, 2011, 6(3).
- [111] Modi S R, Lee H H, Spina C S, et al. Antibiotic treatment expands the resistance reservoir and ecological network of the phage metagenome [J]. *Nature*, 2013, 499(7457): 219.
- [112] Van Belleghem J D, Clement F, Merabishvili M, et al. Pro- and anti-inflammatory responses of peripheral blood mononuclear cells induced by *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* phages [J]. *Scientific reports*, 2017, 7.
- [113] Gogokhia L, Buhrke K, Bell R, et al. Expansion of Bacteriophages Is Linked to Aggravated Intestinal Inflammation and Colitis [J]. *Cell host & microbe*, 2019, 25(2): 285.
- [114] Miedzybrodzki R, Switala-Jelen K, Fortuna W, et al. Bacteriophage preparation inhibition of reactive oxygen species generation by endotoxin-stimulated polymorphonuclear

- leukocytes [J]. *Virus Res*, 2008, 131(2): 233-242.
- [115] McCort M, MacKenzie E, Pursell K, et al. Bacterial infections in lung transplantation [J]. *J Thorac Dis*, 2021, 13(11): 6654-6672.
- [116] Allen H K, Looft T, Bayles D O, et al. Antibiotics in Feed Induce Prophages in Swine Fecal Microbiomes [J]. *mBio*, 2011, 2(6).
- [117] Johnson T A, Looft T, Severin A J, et al. The In-Feed Antibiotic Carbadox Induces Phage Gene Transcription in the Swine Gut Microbiome [J]. *mBio*, 2017, 8(4).
- [118] Tao S Y, Zou H C, Li J J, et al. Landscapes of Enteric Virome Signatures in Early-Weaned Piglets [J]. *Microbiol Spectr*, 2022.
- [119] Segura M, Calzas C, Grenier D, et al. Initial steps of the pathogenesis of the infection caused by *Streptococcus suis*: fighting against nonspecific defenses [J]. *Febs Lett*, 2016, 590(21): 3772-3799.
- [120] Votsch D, Willenborg M, Weldearegay Y B, et al. *Streptococcus suis* - The "Two Faces" of a Pathobiont in the Porcine Respiratory Tract [J]. *Frontiers in microbiology*, 2018, 9.
- [121] Palmieri C, Varaldo P E, Facinelli B. *Streptococcus suis*, an emerging drug-resistant animal and human pathogen [J]. *Frontiers in microbiology*, 2011, 2.
- [122] Huang J H, Liang Y, Guo D W, et al. Comparative Genomic Analysis of the ICESa2603 Family ICEs and Spread of erm(B)- and tet(O)-Carrying Transferable 89K-Subtype ICEs in Swine and Bovine Isolates in China [J]. *Frontiers in microbiology*, 2016, 7.
- [123] Libante V, Nombre Y, Coluzzi C, et al. Chromosomal Conjugative and Mobilizable Elements in *Streptococcus suis*: Major Actors in the Spreading of Antimicrobial Resistance and Bacteriocin Synthesis Genes [J]. *Pathogens*, 2020, 9(1).
- [124] Uruen C, Chopo-Escuin G, Tommassen J, et al. Biofilms as Promoters of Bacterial Antibiotic Resistance and Tolerance [J]. *Antibiotics-Basel*, 2021, 10(1).
- [125] Chuzeville S, Auger J P, Dumesnil A, et al. Serotype-specific role of antigen I/II in the initial steps of the pathogenesis of the infection caused by *Streptococcus suis* [J]. *Vet Res*, 2017, 48.
- [126] Tanabe S I, Bonifait L, Fittipaldi N, et al. Pleiotropic effects of polysaccharide capsule loss on selected biological properties of *Streptococcus suis* [J]. *Canadian Journal Of Veterinary*

- Research-*Revue Canadienne De Recherche Veterinaire*, 2010, 74(1): 65-70.
- [127] Munoz-Egea M C, Garcia-Pedrazuela M, Mahillo-Fernandez I, et al. Effect of Antibiotics and Antibiofilm Agents in the Ultrastructure and Development of Biofilms Developed by Nonpigmented Rapidly Growing Mycobacteria [J]. *Microb Drug Resist*, 2016, 22(1): 1-6.
- [128] Guo D W, Wang L P, Lu C P. In Vitro Biofilm Forming Potential Of *Streptococcus Suis* Isolated From Human And Swine In China [J]. *Braz J Microbiol*, 2012, 43(3): 993-1004.
- [129] Lewis K. Persister cells, dormancy and infectious disease [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2007, 5(1): 48-56.
- [130] Walters M C, Roe F, Bugnicourt A, et al. Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin [J]. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2003, 47(1): 317-323.
- [131] Doroshenko N, Tseng B S, Howlin R P, et al. Extracellular DNA Impedes the Transport of Vancomycin in *Staphylococcus epidermidis* Biofilms Preexposed to Subinhibitory Concentrations of Vancomycin [J]. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2014, 58(12): 7273-7282.
- [132] Ma F, Yi L, Yu N W, et al. *Streptococcus suis* Serotype 2 Biofilms Inhibit the Formation of Neutrophil Extracellular Traps [J]. *Front Cell Infect Mi*, 2017, 7.
- [133] Hannan S, Ready D, Jasni A S, et al. Transfer of antibiotic resistance by transformation with eDNA within oral biofilms [J]. *FEMS immunology and medical microbiology*, 2010, 59(3): 345-349.
- [134] Uruen C, Garcia C, Fraile L, et al. How *Streptococcus suis* escapes antibiotic treatments [J]. *Vet Res*, 2022, 53(1).
- [135] Hoa N T, Chieu T T B, Nghia H D T, et al. The antimicrobial resistance patterns and associated determinants in *Streptococcus suis* isolated from humans in southern Vietnam, 1997-2008 [J]. *Bmc Infect Dis*, 2011, 11.
- [136] Segura M. *Streptococcus suis* vaccines: candidate antigens and progress [J]. *Expert Rev Vaccines*, 2015, 14(12): 1587-1608.
- [137] Stoffels L, Taunt H N, Charalambous B, et al. Synthesis of bacteriophage lytic proteins

- against *Streptococcus pneumoniae* in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Plant Biotechnol J*, 2017, 15(9): 1130-1140.
- [138] Hermoso J A, Garcia J L, Garcia P. Taking aim on bacterial pathogens: from phage therapy to enzybiotics [J]. *Current opinion in microbiology*, 2007, 10(5): 461-472.
- [139] Schmelcher M, Donovan D M, Loessner M J. Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials [J]. *Future microbiology*, 2012, 7(10): 1147-1171.
- [140] Linden S B, Alreja A B, Nelson D C. Application of bacteriophage-derived endolysins to combat streptococcal disease: current State and perspectives [J]. *Curr Opin Biotech*, 2021, 68(213-220).
- [141] Schmelcher M, Powell A M, Camp M J, et al. Synergistic streptococcal phage lambda SA2 and B30 endolysins kill streptococci in cow milk and in a mouse model of mastitis [J]. *Appl Microbiol Biot*, 2015, 99(20): 8475-8486.
- [142] Hoopes J T, Stark C J, Kim H A, et al. Use of a Bacteriophage Lysin, PlyC, as an Enzyme Disinfectant against *Streptococcus equi* [J]. *Applied and environmental microbiology*, 2009, 75(5): 1388-1394.
- [143] Sharma U, Vipra A, Channabasappa S. Phage-derived lysins as potential agents for eradicating biofilms and persisters [J]. *Drug Discov Today*, 2018, 23(4): 848-856.
- [144] Meng X P, Shi Y B, Ji W H, et al. Application of a Bacteriophage Lysin To Disrupt Biofilms Formed by the Animal Pathogen *Streptococcus suis* [J]. *Applied and environmental microbiology*, 2011, 77(23): 8272-8279.
- [145] Domenech M, Garcia E, Moscoso M. In Vitro Destruction of *Streptococcus pneumoniae* Biofilms with Bacterial and Phage Peptidoglycan Hydrolases [J]. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2011, 55(9): 4144-4148.
- [146] Shen Y, Koller T, Kreikemeyer B, et al. Rapid degradation of *Streptococcus pyogenes* biofilms by PlyC, a bacteriophage-encoded endolysin [J]. *J Antimicrob Chemoth*, 2013, 68(8): 1818-1824.
- [147] Looft T, Allen H K, Cantarel B L, et al. Bacteria, phages and pigs: the effects of in-feed antibiotics on the microbiome at different gut locations [J]. *Isme Journal*, 2014, 8(8): 1566-1576.



- [148] Wei H Y, Huang S, Yao T, et al. Detection of viruses in abalone tissue using metagenomics technology [J]. *Aquac Res*, 2018, 49(8): 2704-2713.
- [149] Bolger A M, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data [J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(15): 2114-2120.
- [150] Li R Q, Li Y R, Kristiansen K, et al. SOAP: short oligonucleotide alignment program [J]. *Bioinformatics*, 2008, 24(5): 713-714.
- [151] Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform [J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(14): 1754-1760.
- [152] Li D H, Luo R B, Liu C M, et al. MEGAHIT v1.0: A fast and scalable metagenome assembler driven by advanced methodologies and community practices [J]. *Methods*, 2016, 102(3-11).
- [153] Li W Z, Godzik A. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences [J]. *Bioinformatics*, 2006, 22(13): 1658-1659.
- [154] Shi M, Lin X D, Tian J H, et al. Redefining the invertebrate RNA virosphere [J]. *Nature*, 2016, 540(7634): 539.
- [155] Zhao G Y, Wu G, Lim E S, et al. VirusSeeker, a computational pipeline for virus discovery and virome composition analysis [J]. *Virology*, 2017, 503(21-30).
- [156] Skewes-Cox P, Sharpton T J, Pollard K S, et al. Profile Hidden Markov Models for the Detection of Viruses within Metagenomic Sequence Data [J]. *PloS one*, 2014, 9(8).
- [157] Zhu W H, Lomsadze A, Borodovsky M. Ab initio gene identification in metagenomic sequences [J]. *Nucleic acids research*, 2010, 38(12).
- [158] Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation [J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(14): 2068-2069.
- [159] El-Gebali S, Mistry J, Bateman A, et al. The Pfam protein families database in 2019 [J]. *Nucleic acids research*, 2019, 47(D1): D427-D432.
- [160] Hulo C, de Castro E, Masson P, et al. ViralZone: a knowledge resource to understand virus diversity [J]. *Nucleic acids research*, 2011, 39(D576-D582).
- [161] Kanehisa M, Sato Y, Morishima K. BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG Tools for Functional Characterization of Genome and Metagenome Sequences [J]. *Journal of*

- molecular biology, 2016, 428(4): 726-731.
- [162] Dhal B, Thatoi H N, Das N N, et al. Chemical and microbial remediation of hexavalent chromium from contaminated soil and mining/metallurgical solid waste: A review [J]. *J Hazard Mater*, 2013, 250(272-291).
- [163] Breitbart M, Hewson I, Felts B, et al. Metagenomic analyses of an uncultured viral community from human feces [J]. *Journal of bacteriology*, 2003, 185(20): 6220-6223.
- [164] Reyes A, Haynes M, Hanson N, et al. Viruses in the faecal microbiota of monozygotic twins and their mothers [J]. *Nature*, 2010, 466(7304): 334-U381.
- [165] Varsani A, Krupovic M. Smacoviridae: a new family of animal-associated single-stranded DNA viruses (vol 163, pg 2005, 2018) [J]. *Arch Virol*, 2018, 163(11): 3213-3214.
- [166] Anindita P D, Sasaki M, Gonzalez G, et al. Discovery and genetic characterization of diverse smacoviruses in Zambian non-human primates (vol 9, 5045, 2019) [J]. *Scientific reports*, 2019, 9.
- [167] Diez-Villasenor C, Rodriguez-Valera F. CRISPR analysis suggests that small circular single-stranded DNA smacoviruses infect Archaea instead of humans [J]. *Nature communications*, 2019, 10.
- [168] Suchodolski J S, Ruaux C G, Steiner J M, et al. Assessment of the qualitative variation in bacterial microflora among compartments of the intestinal tract of dogs by use of a molecular fingerprinting technique [J]. *American journal of veterinary research*, 2005, 66(9): 1556-1562.
- [169] Rhoades N S, Hendrickson S M, Prongay K, et al. Growth faltering regardless of chronic diarrhea is associated with mucosal immune dysfunction and microbial dysbiosis in the gut lumen [J]. *Mucosal Immunol*, 2021, 14(5): 1113-1126.
- [170] Huang D, Yu P F, Ye M, et al. Enhanced mutualistic symbiosis between soil phages and bacteria with elevated chromium-induced environmental stress [J]. *Microbiome*, 2021, 9(1):
- [171] Minot S, Bryson A, Chehoud C, et al. Rapid evolution of the human gut virome [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(30): 12450-12455.
- [172] Truong D T, Franzosa E A, Tickle T L, et al. MetaPhlan2 for enhanced metagenomic

- taxonomic profiling [J]. *Nat Methods*, 2015, 12(10): 902-903.
- [173] Bland C, Ramsey T L, Sabree F, et al. CRISPR Recognition Tool (CRT): a tool for automatic detection of clustered regularly interspaced palindromic repeats [J]. *Bmc Bioinformatics*, 2007, 8.
- [174] Segata N, Izard J, Waldron L, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation [J]. *Genome Biol*, 2011, 12(6).
- [175] Fortier L C, Sekulovic O. Importance of prophages to evolution and virulence of bacterial pathogens [J]. *Virulence*, 2013, 4(5): 354-365.
- [176] Doron S, Melamed S, Ofir G, et al. Systematic discovery of antiphage defense systems in the microbial pangenome [J]. *Science*, 2018, 359(6379).
- [177] Lourenco M, Chaffringeon L, Lamy-Besnier Q, et al. The Spatial Heterogeneity of the Gut Limits Predation and Fosters Coexistence of Bacteria and Bacteriophages [J]. *Cell host & microbe*, 2020, 28(3): 390.
- [178] Shapiro O H, Kushmaro A, Brenner A. Bacteriophage predation regulates microbial abundance and diversity in a full-scale bioreactor treating industrial wastewater [J]. *Isme Journal*, 2010, 4(3): 327-336.
- [179] Heilmann S, Sneppen K, Krishna S. Coexistence of phage and bacteria on the boundary of self-organized refuges [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(31): 12828-12833.
- [180] De Sordi L, Khanna V, Debarbieux L. The Gut Microbiota Facilitates Drifts in the Genetic Diversity and Infectivity of Bacterial Viruses [J]. *Cell host & microbe*, 2017, 22(6): 801.
- [181] Yu P F, Mathieu J, Yang Y, et al. Suppression of Enteric Bacteria by Bacteriophages: Importance of Phage Polyvalence in the Presence of Soil Bacteria [J]. *Environ Sci Technol*, 2017, 51(9): 5270-5278.
- [182] Monaci P, Urbanelli L, Fontana L. Phage as gene delivery vectors [J]. *Curr Opin Mol Ther*, 2001, 3(2): 159-169.
- [183] Hu J, Ye H, Wang S L, et al. Prophage Activation in the Intestine: Insights Into Functions and Possible Applications [J]. *Frontiers in microbiology*, 2021, 12.
- [184] Chechushkov A, Kozlova Y, Baykov I, et al. Influence of Caudovirales Phages on Humoral

- Immunity in Mice [J]. *Viruses-Basel*, 2021, 13(7).
- [185] Koh H W, Kim M S, Lee J S, et al. Changes in the Swine Gut Microbiota in Response to Porcine Epidemic Diarrhea Infection [J]. *Microbes Environ*, 2015, 30(3): 284-287.
- [186] Shkoporov A N, Khokhlova E V, Stephens N, et al. Long-term persistence of crAss-like phage crAss001 is associated with phase variation in *Bacteroides intestinalis* [J]. *Bmc Biol*, 2021, 19(1).
- [187] Sun J, Du L, Li X L, et al. Identification of the core bacteria in rectums of diarrheic and non-diarrheic piglets [J]. *Scientific reports*, 2019, 9.
- [188] van Nood E, Vriee A, Nieuwdorp M, et al. Duodenal Infusion of Donor Feces for Recurrent *Clostridium difficile* [J]. *New Engl J Med*, 2013, 368(5): 407-415.
- [189] Ott S J, Waetzig G H, Rehman A, et al. Efficacy of Sterile Fecal Filtrate Transfer for Treating Patients With *Clostridium difficile* Infection [J]. *Gastroenterology*, 2017, 152(4): 799.
- [190] Samreen, Ahmad I, Malak H A, et al. Environmental antimicrobial resistance and its drivers: a potential threat to public health [J]. *J Glob Antimicrob Re*, 2021, 27(101-111).
- [191] Li N, Liu C, Zhang Z G, et al. Research and Technological Advances Regarding the Study of the Spread of Antimicrobial Resistance Genes and Antimicrobial-Resistant Bacteria Related to Animal Husbandry [J]. *Int J Env Res Pub He*, 2019, 16(24).
- [192] Dokland T. Molecular Piracy: Redirection of Bacteriophage Capsid Assembly by Mobile Genetic Elements [J]. *Viruses-Basel*, 2019, 11(11).
- [193] Li X J, Rensing C, Vestergaard G, et al. Metagenomic evidence for co-occurrence of antibiotic, biocide and metal resistance genes in pigs [J]. *Environ Int*, 2022, 158.
- [194] Shkoporov A N, Turkington C J, Hill C. Mutualistic interplay between bacteriophages and bacteria in the human gut [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2022.
- [195] Kim K, Song M, Liu Y H, et al. Enterotoxigenic *Escherichia coli* infection of weaned pigs: Intestinal challenges and nutritional intervention to enhance disease resistance [J]. *Front Immunol*, 2022, 13.
- [196] Xia B, Zhong R Q, Wu W D, et al. Mucin O-glycan-microbiota axis orchestrates gut homeostasis in a diarrheal pig model [J]. *Microbiome*, 2022, 10(1).

- [197] Enault F, Briet A, Bouteille L, et al. Phages rarely encode antibiotic resistance genes: a cautionary tale for virome analyses [J]. *Isme Journal*, 2017, 11(1): 237-247.
- [198] Balcazar J L. Bacteriophages as Vehicles for Antibiotic Resistance Genes in the Environment [J]. *PLoS pathogens*, 2014, 10(7).
- [199] Calero-Caceres W, Balcazar J L. Antibiotic resistance genes in bacteriophages from diverse marine habitats [J]. *Sci Total Environ*, 2019, 654(452-455).
- [200] Piotrowska M, Popowska M. Insight into the mobilome of *Aeromonas* strains [J]. *Frontiers in microbiology*, 2015, 6.
- [201] Zhang Y, Cheng D M, Xie J, et al. Impacts of farmland application of antibiotic-contaminated manures on the occurrence of antibiotic residues and antibiotic resistance genes in soil: A meta-analysis study [J]. *Chemosphere*, 2022, 300.
- [202] Qiu T L, Huo L H, Guo Y J, et al. Metagenomic assembly reveals hosts and mobility of common antibiotic resistome in animal manure and commercial compost [J]. *Environ Microbiome*, 2022, 17(1).
- [203] Maurya A P, Rajkumari J, Pandey P. Enrichment of antibiotic resistance genes (ARGs) in polyaromatic hydrocarbon-contaminated soils: a major challenge for environmental health [J]. *Environ Sci Pollut R*, 2021, 28(10): 12178-12189.
- [204] Brenciani A, Bacciaglia A, Vignaroli C, et al. Phi m46.1, the Main *Streptococcus pyogenes* Element Carrying *mef(A)* and *tet(O)* Genes [J]. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2010, 54(1): 221-229.
- [205] Javan R R, Ramos-Sevillano E, Akter A, et al. Prophages and satellite prophages are widespread in *Streptococcus* and may play a role in pneumococcal pathogenesis [J]. *Nature communications*, 2019, 10.
- [206] Palmieri C, Princivalli M S, Brenciani A, et al. Different Genetic Elements Carrying the *tet(W)* Gene in Two Human Clinical Isolates of *Streptococcus suis* [J]. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2011, 55(2): 631-636.
- [207] Shang Y H, Li D X, Hao W B, et al. A prophage and two ICESa2603-family integrative and conjugative elements (ICEs) carrying *optrA* in *Streptococcus suis* [J]. *J Antimicrob Chemoth*, 2019, 74(10): 2876-2879.

- [208] Bearson B L, Allen H K, Brunelle B W, et al. The agricultural antibiotic carbadox induces phage-mediated gene transfer in *Salmonella* [J]. *Frontiers in microbiology*, 2014, 5(
- [209] Amankwah F K D, Gbedema S Y, Boakye Y D, et al. Antimicrobial Potential of Extract from a *Pseudomonas aeruginosa* Isolate [J]. *Scientifica*, 2022, 2022.
- [210] Kotloff K L. Bacterial diarrhoea [J]. *Curr Opin Pediatr*, 2022, 34(2): 147-155.
- [211] Azevedo B L D, Junior J P A, Ullmann L S, et al. The Discovery of a New Mimivirus Isolate in Association with Virophage-Transposon Elements in Brazil Highlights the Main Genomic and Evolutionary Features of This Tripartite System [J]. *Viruses-Basel*, 2022, 14(2).
- [212] Colson P, Ominami Y, Hisada A, et al. Giant mimiviruses escape many canonical criteria of the virus definition [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2019, 25(2): 147-154.
- [213] Ghosh C, Sarkar P, Issa R, et al. Alternatives to Conventional Antibiotics in the Era of Antimicrobial Resistance [J]. *Trends in microbiology*, 2019, 27(4): 323-338.
- [214] Ma Y L, Lu C P. Isolation and identification of a bacteriophage capable of infecting *Streptococcus suis* type 2 strains [J]. *Veterinary microbiology*, 2008, 132(3-4): 340-347.
- [215] Loeffler J M, Djurkovic S, Fischetti V A. Phage lytic enzyme Cpl-1 as a novel antimicrobial for pneumococcal bacteremia [J]. *Infect Immun*, 2003, 71(11): 6199-6204.
- [216] Wang Z J, Liu X, Shi Z X, et al. A novel lysin Ply1228 provides efficient protection against *Streptococcus suis* type 2 infection in a murine bacteremia model [J]. *Veterinary microbiology*, 2022, 268.
- [217] Gottschalk M, Xu J G, Calzas C, et al. *Streptococcus suis*: a new emerging or an old neglected zoonotic pathogen? [J]. *Future microbiology*, 2010, 5(3): 371-391.
- [218] Cerca N, Jefferson K K, Oliveira R, et al. Comparative antibody-mediated phagocytosis of *Staphylococcus epidermidis* cells grown in a biofilm or in the planktonic state [J]. *Infect Immun*, 2006, 74(8): 4849-4855.
- [219] Wang Z F, Ma J J, Wang J, et al. Application of the Phage Lysin Ply5218 in the Treatment of *Streptococcus suis* Infection in Piglets [J]. *Viruses-Basel*, 2019, 11(8).
- [220] Smith J C S, Moroni P, Santisteban C G, et al. Distribution of *Lactococcus* spp. in New York State dairy farms and the association of somatic cell count resolution and

bacteriological cure in clinical mastitis samples [J]. *Journal of dairy science*, 2020, 103(2): 1785-1794.

- [221] Waller A S, Jolley K A. Getting a grip on strangles: Recent progress towards improved diagnostics and vaccines [J]. *Vet J*, 2007, 173(3): 492-501.

## 附录

附表 S1 噬菌体-宿主预测分析

Attached list S1 Phage-host prediction analysis

#Contig_id	Predicted _host
DC1 contig_13921	Prosthecochloris Prosthecochloris_sp._ZM_2
DC1 contig_14856	Escherichia Escherichia_coli
DC1 contig_15551	Prevotella Prevotella_sp._P5-126
DC1 contig_18782	Proteus Proteus_mirabilis
DC1 contig_22503	Nesterenkonia Nesterenkonia_sp._M8;Escherichia Escherichia_coli
DC1 contig_27447	Streptococcus Streptococcus_suis;Streptococcus Streptococcus_pseudopneumoniae Klebsiella Klebsiella_oxytoca;Klebsiella Klebsiella_pneumoniae;Citrobacter  Citrobacter_rodentium;Enterobacter Enterobacter_roggenkampii;Neisseria  DC1 contig_31535 Neisseria_lactamica;Klebsiella Klebsiella_variicola;Neisseria Neisseria_meningitidis
DC1 contig_32789	Escherichia Escherichia_coli
DC1 contig_33026	Fusobacterium Fusobacterium_naviforme
DC1 contig_33621	Escherichia Escherichia_coli
DC1 contig_35348	Enterococcus Enterococcus_faecalis
DC1 contig_35639	Filomicrobium Filomicrobium_insigne
DC1 contig_3659	Enterobacter Enterobacter_hormaechei;Escherichia Escherichia_coli
DC1 contig_3854	Gemmiger Gemmiger_sp._An50
DC1 contig_39009	Klebsiella Klebsiella_pneumoniae
DC1 contig_39439	Streptococcus Streptococcus_oralis
DC1 contig_40918	Xylanimonas Xylanimonas_cellulosilytica
DC1 contig_42402	Prevotella Prevotella_sp._P5-125
DC1 contig_4427	Saprospira Saprospira_grandis Klebsiella Klebsiella_pneumoniae;Nesterenkonia Nesterenkonia_sp._M8;Enterobacter  DC1 contig_44778 Enterobacter_hormaechei;Escherichia Escherichia_coli
DC1 contig_48217	Escherichia Escherichia_albertii
DC1 contig_49771	Butyricimonas Butyricimonas_synergistica
DC1 contig_52112	Vibrio Vibrio_parahaemolyticus
DC1 contig_57595	Chlorobaculum Chlorobaculum_tepidum
DC1 contig_58169	Salmonella Salmonella_enterica
DC1 contig_60098	Proteus Proteus_mirabilis;Proteus Proteus_hauseri;Yersinia Yersinia_kristensenii
DC1 contig_60173	unclassified Clostridiales_bacterium_SYSU_GA17129
DC1 contig_63993	Escherichia Escherichia_albertii;Klebsiella Klebsiella_pneumoniae;Citrobacter  Citrobacter_koseri
DC1 contig_64122	Salmonella Salmonella_enterica



DC1 contig_64332	Nesterenkonia Nesterenkonia_sp._M8
DC1 contig_66554	Escherichia Escherichia_coli
DC1 contig_67170	Prevotella Prevotella_copri
DC2 contig_10890	Prevotella Prevotella_scopos
DC2 contig_11615	Prevotella Prevotella_intermedia
DC2 contig_11623	Prevotella Prevotella_sp._P2-180
DC2 contig_16849	Gordonibacter Gordonibacter_pamelaeae
DC2 contig_37348	Anaerostipes Anaerostipes_sp._992a
DC2 contig_42965	Actinomyces Actinomyces_sp._ICM39
DC3 contig_1332	Prevotella Prevotella_copri
DC3 contig_13342	Prevotella Prevotella_sp._P4-51
DC3 contig_14640	Clostridium Clostridium_oryzae
DC3 contig_2001	Roseburia Roseburia_inulinivorans
DC3 contig_46503	Lactobacillus Lactobacillus_delbrueckii
DC3 contig_47184	Campylobacter Campylobacter_jejuni;Campylobacter Campylobacter_coli
DC3 contig_47322	Lactobacillus Lactobacillus_johnsonii
DC3 contig_48865	Faecalibacterium Faecalibacterium_prausnitzii
DC3 contig_49416	Lactobacillus Lactobacillus_johnsonii;Lactobacillus Lactobacillus_gasseri
DC3 contig_56166	Clostridium Clostridium_disporicum
DC3 contig_57091	Faecalibacterium Faecalibacterium_sp._AF28-13AC
DC3 contig_73844	Lactobacillus Lactobacillus_reuteri
DC4 contig_10296	Faecalibacterium Faecalibacterium_prausnitzii;Faecalibacterium  Faecalibacterium_sp._AF28-13AC
DC4 contig_12500	Prevotella Prevotella_sp._P5-125
DC4 contig_14145	unclassified Erysipelotrichaceae_bacterium_GAM147
DC4 contig_14847	Campylobacter Campylobacter_jejuni;Campylobacter Campylobacter_coli
DC4 contig_21454	Lactobacillus Lactobacillus_reuteri
DC4 contig_2168	Hydrocoleum Hydrocoleum_sp._CS-953
DC4 contig_22871	Faecalibacterium Faecalibacterium_prausnitzii
DC4 contig_23299	Faecalibacterium Faecalibacterium_prausnitzii
DC4 contig_23696	Faecalibacterium Faecalibacterium_sp._AF28-13AC
DC4 contig_25257	Campylobacter Campylobacter_jejuni;Campylobacter Campylobacter_coli
DC4 contig_26298	Campylobacter Campylobacter_jejuni
DC4 contig_28482	Campylobacter Campylobacter_coli
DC4 contig_29647	Lactobacillus Lactobacillus_reuteri
DC4 contig_30935	Holdemanella Holdemanella_biformis
DC4 contig_33203	Faecalibacterium Faecalibacterium_sp._AF28-13AC
DC4 contig_36695	Faecalibacterium Faecalibacterium_prausnitzii
DC4 contig_41278	Faecalibacterium Faecalibacterium_sp._AF28-13AC;Faecalibacterium  Faecalibacterium_prausnitzii
DC4 contig_42595	Faecalibacterium Faecalibacterium_prausnitzii
DC4 contig_47293	Campylobacter Campylobacter_jejuni
DC4 contig_49719	Lactobacillus Lactobacillus_reuteri

DC4 contig_56055	Lactobacillus Lactobacillus_reuteri
DC4 contig_58306	unclassified Firmicutes_bacterium_AM41-11
DC4 contig_688	Campylobacter Campylobacter_jejuni
DC4 contig_720	Campylobacter Campylobacter_fetus
DC4 contig_8241	Faecalibacterium Faecalibacterium_prausnitzii
DF1 contig_10640	Prevotella Prevotella_copri
DF1 contig_10986	Campylobacter Campylobacter_coli
DF1 contig_17076	Campylobacter Campylobacter_jejuni;Campylobacter Campylobacter_coli
DF1 contig_1709	Staphylococcus Staphylococcus_intermedius
DF1 contig_196	Lactobacillus Lactobacillus_delbrueckii
DF1 contig_22208	Campylobacter Campylobacter_jejuni;Campylobacter Campylobacter_coli
DF1 contig_22805	Campylobacter Campylobacter_jejuni;Campylobacter Campylobacter_coli
DF1 contig_22849	Lactobacillus Lactobacillus_delbrueckii
DF1 contig_28257	Ruminococcus Ruminococcus_sp._AF25-19
DF1 contig_2883	Staphylococcus Staphylococcus_felis
DF1 contig_30029	Campylobacter Campylobacter_jejuni;Campylobacter Campylobacter_coli
DF1 contig_36182	Campylobacter Campylobacter_coli
DF1 contig_40290	Campylobacter Campylobacter_jejuni;Campylobacter Campylobacter_coli; Campylobacter Campylobacter_sp._P0138
DF1 contig_44444	Campylobacter Campylobacter_jejuni;Campylobacter Campylobacter_coli
DF1 contig_46316	Gordonibacter Gordonibacter_pamelaeae
DF1 contig_48744	ErysipelatoClostridium [Clostridium]_innocuum
DF1 contig_51415	Campylobacter Campylobacter_coli
DF1 contig_52239	Campylobacter Campylobacter_jejuni;Campylobacter Campylobacter_coli
DF1 contig_54136	Streptococcus Streptococcus_anginosus;Streptococcus Streptococcus_intermedius
DF1 contig_56723	Staphylococcus Staphylococcus_gallinarum
DF1 contig_60454	Campylobacter Campylobacter_jejuni;Campylobacter Campylobacter_coli
DF1 contig_6084	Campylobacter Campylobacter_jejuni;Campylobacter Campylobacter_coli
DF1 contig_63339	Campylobacter Campylobacter_jejuni;Campylobacter Campylobacter_coli
DF1 contig_66831	Campylobacter Campylobacter_jejuni;Campylobacter Campylobacter_coli
DF1 contig_7001	Ruminococcus Ruminococcus_bicirculans
DF1 contig_70514	Bacteroides Bacteroides_sp._HMSC068A09
DF1 contig_71080	Psychrobacter Psychrobacter_sp._SHUES1
DF1 contig_75022	Campylobacter Campylobacter_fetus
DF1 contig_966	Campylobacter Campylobacter_jejuni;Campylobacter Campylobacter_sp._112
DF2 contig_11980	Butyricoccus Butyricoccus_porcorum
DF2 contig_15358	Aerococcus Aerococcus_urinaeequi
DF2 contig_15420	Aerococcus Aerococcus_urinaeequi
DF2 contig_15612	Dolosigranulum Dolosigranulum_pigrum
DF2 contig_16525	Staphylococcus Staphylococcus_xylosus
DF2 contig_21633	Staphylococcus Staphylococcus_equorum
DF2 contig_22141	Aerococcus Aerococcus_urinaeequi
DF2 contig_22837	Jeotgalibaca Jeotgalibaca_dankookensis

DF2 contig_24527	Campylobacter Campylobacter_sp._107
DF2 contig_25559	Anaeromassilibacillus Anaeromassilibacillus_senegalensis
DF2 contig_25638	Staphylococcus Staphylococcus_warneri
DF2 contig_37738	Ruminococcus Ruminococcus_sp._AF17-22AC
DF2 contig_38992	Faecalibacterium Faecalibacterium_prausnitzii
DF2 contig_40656	Campylobacter Campylobacter_jejuni;Campylobacter Campylobacter_coli
DF2 contig_43362	Campylobacter Campylobacter_jejuni;Campylobacter Campylobacter_coli
DF2 contig_43527	Clostridium Clostridium_algidicarnis
DF2 contig_43792	Campylobacter Campylobacter_jejuni;Campylobacter Campylobacter_coli
DF2 contig_51	Psychrobacter Psychrobacter_sp._P11G5
DF2 contig_5204	Staphylococcus Staphylococcus_warneri;Staphylococcus Staphylococcus_epidermidis
DF2 contig_54525	unclassified [Eubacterium]_rectale
DF2 contig_57325	Staphylococcus Staphylococcus_carnosus;Staphylococcus Staphylococcus_felis
DF2 contig_60080	Hungatei Clostridium Hungatei Clostridium_sp._N2K1
DF2 contig_66762	Aerococcus Aerococcus_urinaeequi
DF2 contig_67338	Staphylococcus Staphylococcus_carnosus
DF2 contig_67467	Campylobacter Campylobacter_jejuni;Campylobacter Campylobacter_coli
DF2 contig_67886	Campylobacter Campylobacter_jejuni;Campylobacter Campylobacter_coli
DF2 contig_69431	Geobacillus Geobacillus_thermoleovorans;Geobacillus Geobacillus_sp._C56-T3;Geobacillus Geobacillus_sp._FW23;Geobacillus Geobacillus_kaustophilus
DF2 contig_69670	Legionella Legionella_pneumophila
DF3 contig_10438	Faecalibacterium Faecalibacterium_prausnitzii
DF3 contig_17473	Streptococcus Streptococcus_massiliensis;Streptococcus Streptococcus_sp._HMSC066E07
DF3 contig_19755	Klebsiella Klebsiella_pneumoniae;Salmonella Salmonella_enterica
DF3 contig_21859	unclassified Burkholderiales_bacterium_1_1_47
DF3 contig_26316	Megamonas Megamonas_funiformis
DF3 contig_26982	Salmonella Salmonella_enterica
DF3 contig_27452	Butyricoccus Butyricoccus_porcorum
DF3 contig_2768	Prevotella Prevotella_sp._P5-126
DF3 contig_3996	Streptococcus Streptococcus_anginosus
DF3 contig_50352	Aerococcus Aerococcus_urinaeequi
DF3 contig_51958	Jeotgalibaca Jeotgalibaca_dankookensis
DF3 contig_57635	unclassified Burkholderiales_bacterium
DF3 contig_58638	Clostridium Clostridium_perfringens
DF3 contig_59243	unclassified Clostridiales_bacterium_AF36-10
DF3 contig_72230	Nitrosospira Nitrosospira_multiformis;Nitrosospira Nitrosospira_sp._Nsp6;Nitrosospira Nitrosospira_sp._Nsp5
DF3 contig_77933	Psychrobacter Psychrobacter_glacincola
DF3 contig_78942	unclassified Comamonadaceae_bacterium_NML03-0146
DF3 contig_79394	Faecalibacterium Faecalibacterium_prausnitzii

DF3 contig_80017	Prevotella Prevotella_sp._P5-126
DF3 contig_83236	Helicobacter Helicobacter_pullorum
DF4 contig_13881	Lawsonibacter Lawsonibacter_asaccharolyticus
DF4 contig_18106	Chlorobium Chlorobium_sp._N1
DF4 contig_2658	Prevotella Prevotella_copri
DF4 contig_30855	Coprococcus Coprococcus_catus
DF4 contig_31081	Streptococcus Streptococcus_anginosus;Enterococcus Enterococcus_timonensis
DF4 contig_33942	Porphyromonas Porphyromonas_gingivalis
DF4 contig_37019	Prevotella Prevotella_sp._P5-126
DF4 contig_54716	Campylobacter Campylobacter_jejuni;Campylobacter Campylobacter_coli
DF4 contig_54792	Prevotella Prevotella_copri
DF4 contig_57111	Ruminococcus Ruminococcus_bromii
DF4 contig_65533	Ruminococcus Ruminococcus_sp._AM28-13
DI1 contig_1124	Klebsiella Klebsiella_pneumoniae
DI1 contig_1721	Lactobacillus Lactobacillus_delbrueckii
DI1 contig_2765	Klebsiella Klebsiella_quasivariicola
DI1 contig_2979	Cronobacter Cronobacter_sakazakii;Cronobacter Cronobacter_dublinensis; Salmonella Salmonella_enterica
DI1 contig_3131	Pseudomonas Pseudomonas_stutzeri
DI1 contig_3258	Klebsiella Klebsiella_variicola;Klebsiella Klebsiella_pneumoniae
DI1 contig_3434	Salmonella Salmonella_enterica
DI1 contig_4127	Klebsiella Klebsiella_variicola;Klebsiella Klebsiella_michiganensis
DI1 contig_4597	Lactobacillus Lactobacillus_reuteri;Lactobacillus Lactobacillus_salivarius
DI1 contig_4639	Escherichia Escherichia_coli
DI1 contig_4739	Klebsiella Klebsiella_pneumoniae
DI1 contig_4991	Klebsiella Klebsiella_quasipneumoniae
DI1 contig_5148	Streptococcus Streptococcus_suis
DI1 contig_519	Leclercia Leclercia_adecarboxylata;Escherichia Escherichia_albertii;Escherichia  Escherichia_coli;Massilia Massilia_namucunensis
DI1 contig_5268	Klebsiella Klebsiella_variicola
DI1 contig_5303	Klebsiella Klebsiella_pneumoniae
DI1 contig_5504	Klebsiella Klebsiella_pneumoniae;Klebsiella Klebsiella_variicola;Klebsiella  Klebsiella_oxytoca;Pectobacterium Pectobacterium_aquaticum;Dickeya Dickeya_z eae
DI1 contig_5576	Raoultella Raoultella_sp._T31
DI1 contig_6022	Klebsiella Klebsiella_pneumoniae
DI1 contig_6123	Salmonella Salmonella_enterica;Cronobacter Cronobacter_dublinensis;Serratia  Serratia_marcescens;Hafnia Hafnia_alvei;Acinetobacter  Acinetobacter_sp._WCHAc060033;Pluralibacter Pluralibacter_gergoviae;Yersinia  Yersinia_frederiksenii;Cronobacter Cronobacter_sakazakii
DI1 contig_6227	Klebsiella Klebsiella_pneumoniae
DI1 contig_6672	Dickeya Dickeya_sp._Secpp_1600
DI1 contig_6674	Edwardsiella Edwardsiella_tarda

DI1 contig_6845	Klebsiella Klebsiella_oxytoca
DI1 contig_6953	Klebsiella Klebsiella_pneumoniae;Pluralibacter Pluralibacter_gergoviae;Klebsiella Klebsiella_variicola
DI1 contig_7014	Escherichia Escherichia_coli;Nesterenkonia Nesterenkonia_sp._M8
DI1 contig_763	Klebsiella Klebsiella_pneumoniae
DI1 contig_7750	Klebsiella Klebsiella_variicola
DI1 contig_7794	Lactobacillus Lactobacillus_reuteri
DI1 contig_79	Klebsiella Klebsiella_pneumoniae;Escherichia Escherichia_coli;Klebsiella Klebsiella_quasipneumoniae;Klebsiella Klebsiella_variicola
DI1 contig_8190	Klebsiella Klebsiella_oxytoca
DI1 contig_8314	Klebsiella Klebsiella_pneumoniae
DI1 contig_8324	Klebsiella Klebsiella_pneumoniae;Klebsiella Klebsiella_variicola;Escherichia Escherichia_coli
DI1 contig_8330	Salmonella Salmonella_enterica
DI1 contig_8484	Helicobacter Helicobacter_sp._10-6591
DI1 contig_8625	Klebsiella Klebsiella_michiganensis;Klebsiella Klebsiella_variicola
DI1 contig_8626	Klebsiella Klebsiella_pneumoniae;Salmonella Salmonella_enterica
DI1 contig_8705	Streptococcus Streptococcus_suis
DI1 contig_889	Citrobacter Citrobacter_rodentium
DI1 contig_908	Klebsiella Klebsiella_pneumoniae
DI1 contig_9428	Helicobacter Helicobacter_sp._10-6591
DI1 contig_9431	Citrobacter Citrobacter_koseri
DI2 contig_14690	Clostridium Clostridium_vincentii
DI2 contig_16540	Streptococcus Streptococcus_macedonicus;Streptococcus Streptococcus_oralis
DI2 contig_1700	Ruminococcus Ruminococcus_bicirculans
DI2 contig_17921	SaliniVibrio SaliniVibrio_proteolyticus
DI2 contig_18456	Lactobacillus Lactobacillus_delbrueckii;Lactobacillus Lactobacillus_equicursoris
DI2 contig_18859	Prevotella Prevotella_copri
DI2 contig_19553	Streptococcus Streptococcus_galloyticus
DI2 contig_2028	Streptococcus Streptococcus_hyointestinalis
DI2 contig_21016	Lactobacillus Lactobacillus_delbrueckii
DI2 contig_21801	Coprobacillus Coprobacillus_sp._AF34-1BH;Ruminococcus Ruminococcus_sp._OM06-36AC;unclassified [Eubacterium]_rectale
DI2 contig_26852	Odoribacter Odoribacter_splanchnicus;Bacteroides Bacteroides_sp._HMSC068A09 Streptococcus Streptococcus_suis;Streptococcus Streptococcus_sp._FDAARGOS_256;
DI2 contig_2839	Streptococcus Streptococcus_cristatus;Streptococcus Streptococcus_oralis
DI2 contig_28644	Streptococcus Streptococcus_infantarius
DI2 contig_29046	unclassified [Eubacterium]_rectale
DI2 contig_29151	Lactobacillus Lactobacillus_johnsonii
DI2 contig_29712	Bifidobacterium Bifidobacterium_thermophilum;Bifidobacterium Bifidobacterium_thermacidophilum

DI2 contig_30093	Helicobacter Helicobacter_sp._TUL
DI2 contig_30501	Prevotella Prevotella_intermedia
DI2 contig_31626	Prevotella Prevotella_copri
DI2 contig_32032	Lactobacillus Lactobacillus_johnsonii
DI2 contig_32434	Lactobacillus Lactobacillus_brevis;Streptococcus Streptococcus_galloyticus; Enterococcus Enterococcus_cecorum;Clostridium Clostridium_sp._AF32-12BH
DI2 contig_32644	Campylobacter Campylobacter_lanienae
DI2 contig_332	Streptococcus Streptococcus_suis Xanthomonas Xanthomonas_cucurbitae;Xanthomonas Xanthomonas_dyei;Xantho monas
DI2 contig_34298	Xanthomonas_melonis
DI2 contig_34323	Treponema Treponema_pedis
DI2 contig_34830	Lactobacillus Lactobacillus_delbrueckii
DI2 contig_35932	Streptococcus Streptococcus_galloyticus;Streptococcus Streptococcus_lutetiensis
DI2 contig_3724	Lactobacillus Lactobacillus_delbrueckii
DI2 contig_3746	Campylobacter Campylobacter_jejuni;Campylobacter Campylobacter_coli Streptococcus Streptococcus_anginosus;Streptococcus Streptococcus_sp._HMSC3 6C04;
DI2 contig_38551	Streptococcus Streptococcus_sp._HMSC057E02
DI2 contig_38771	Achromobacter Achromobacter_denitrificans
DI2 contig_43503	Helicobacter Helicobacter_pullorum
DI2 contig_44141	Streptococcus Streptococcus_suis
DI2 contig_44835	Lactobacillus Lactobacillus_reuteri
DI2 contig_45701	Bacillus Bacillus_cereus
DI2 contig_45851	Lactobacillus Lactobacillus_johnsonii
DI2 contig_47037	Lactobacillus Lactobacillus_reuteri
DI2 contig_47492	Faecalibacterium Faecalibacterium_prausnitzii
DI2 contig_49378	Escherichia Escherichia_coli
DI2 contig_50158	Lactobacillus Lactobacillus_mucosae
DI2 contig_50754	Klebsiella Klebsiella_pneumoniae;Klebsiella Klebsiella_quasivariicola;Raoultella  Raoultella_ornithinolytica
DI2 contig_53345	Faecalibacterium Faecalibacterium_prausnitzii
DI2 contig_53623	Salmonella Salmonella_enterica
DI2 contig_75	Salmonella Salmonella_enterica
DI2 contig_7757	Lactobacillus Lactobacillus_reuteri
DI2 contig_8072	Lactobacillus Lactobacillus_johnsonii
DI2 contig_8746	Lactobacillus Lactobacillus_reuteri
DI2 contig_8796	Bibersteinia Bibersteinia_trehalosi
DI3 contig_10975	Lactobacillus Lactobacillus_reuteri;Lactobacillus Lactobacillus_oris Streptococcus Streptococcus_lutetiensis;Streptococcus Streptococcus_pasteurianus
DI3 contig_11678	; Streptococcus Streptococcus_galloyticus

DI3 contig_1238	Flavonifractor Flavonifractor_plautii;Clostridium Clostridium_sp._ATCC_BAA-442; unclassified Clostridiales_bacterium_VE202-03
DI3 contig_1363	Lactobacillus Lactobacillus_reuteri
DI3 contig_14477	Lactobacillus Lactobacillus_delbrueckii
DI3 contig_17615	Prevotella Prevotella_sp._P5-126
DI3 contig_1792	Lactobacillus Lactobacillus_fermentum
DI3 contig_1850	Lactobacillus Lactobacillus_gasseri
DI3 contig_19186	Lactobacillus Lactobacillus_johnsonii
DI3 contig_20740	Streptococcus Streptococcus_lutetiensis
DI3 contig_21099	Lactobacillus Lactobacillus_parafarraginis;Lactobacillus Lactobacillus_reuteri
DI3 contig_22317	Lactobacillus Lactobacillus_johnsonii
DI3 contig_23553	Prosthecochloris Prosthecochloris_sp._ZM_2
DI3 contig_24513	Streptococcus Streptococcus_suis;Streptococcus Streptococcus_macedonicus
DI3 contig_24652	Lactobacillus Lactobacillus_reuteri;Lactobacillus Lactobacillus_salivarius
DI3 contig_2475	Lactobacillus Lactobacillus_reuteri;Streptococcus Streptococcus_iniae
DI3 contig_25246	Olsenella Olsenella_sp._AF16-14LB;Olsenella Olsenella_sp._AF15-43LB;Olsenella Olsenella_sp._AM30-3LB
DI3 contig_25349	Lactobacillus Lactobacillus_johnsonii
DI3 contig_2714	Lactobacillus Lactobacillus_johnsonii
DI3 contig_27486	Lactobacillus Lactobacillus_salivarius
DI3 contig_28757	Legionella Legionella_pneumophila
DI3 contig_29446	Lactobacillus Lactobacillus_johnsonii;Lactobacillus Lactobacillus_sp._UMNPBX19
DI3 contig_30700	Faecalibacterium Faecalibacterium_prausnitzii;Faecalibacterium Faecalibacterium_sp._OM04-11BH
DI3 contig_30740	Helicobacter Helicobacter_equorum
DI3 contig_31124	Lactobacillus Lactobacillus_reuteri
DI3 contig_3155	Lactobacillus Lactobacillus_fermentum;Lactobacillus Lactobacillus_reuteri
DI3 contig_31708	Lactobacillus Lactobacillus_reuteri
DI3 contig_32364	Streptococcus Streptococcus_equinus
DI3 contig_5016	Prevotella Prevotella_copri
DI3 contig_6446	Lactobacillus Lactobacillus_taiwanensis;Lactobacillus Lactobacillus_johnsonii
DI3 contig_6658	Staphylococcus Staphylococcus_pseudintermedius
DI3 contig_8387	Streptococcus Streptococcus_anginosus;Streptococcus Streptococcus_sp._HMSC36C04; Streptococcus Streptococcus_thermophilus;Streptococcus Streptococcus_sp._HMSC057E02
DI3 contig_8700	Streptococcus Streptococcus_suis
DI3 contig_9330	Lactobacillus Lactobacillus_mucosae
DI3 contig_9335	Campylobacter Campylobacter_jejuni
DI3 contig_9912	Lactobacillus Lactobacillus_delbrueckii
DI4 contig_10018	Caballeronia Caballeronia_humi
DI4 contig_12504	Streptococcus Streptococcus_agalactiae;Staphylococcus Staphylococcus_sciuri

DI4 contig_17260	Clostridium Clostridium_sp._ATCC_BAA-442;Flavonifractor Flavonifractor_plautii
DI4 contig_19028	Helicobacter Helicobacter_equorum
DI4 contig_20848	Faecalibacterium Faecalibacterium_prausnitzii
DI4 contig_23667	Streptococcus Streptococcus_agalactiae;Streptococcus Streptococcus_equinus
DI4 contig_24661	Helicobacter Helicobacter_sp._10-6591
DI4 contig_251	Helicobacter Helicobacter_equorum
DI4 contig_3733	Legionella Legionella_pneumophila
DI4 contig_3784	Pasteurella Pasteurella_multocida
DI4 contig_4672	Salmonella Salmonella_enterica
DI4 contig_6704	Campylobacter Campylobacter_lanienae;Campylobacter Campylobacter_sp._P162;Campylobacter Campylobacter_sp._NCTC_13003;Campylobacter Campylobacter_sp._RM8970;Campylobacter Campylobacter_sp._P0227;Campylobacter Campylobacter_sp._P157;Campylobacter Campylobacter_sp._P0138;Campylobacter Campylobacter_sp._P0140;Campylobacter Campylobacter_sp._P0124;Campylobacter Campylobacter_sp._P0103
HC1 contig_32663	Odoribacter Odoribacter_sp._OF09-27XD
HC1 contig_41758	Prevotella Prevotella_copri
HC1 contig_46447	Pectobacterium Pectobacterium_carotovorum
HC1 contig_48096	Hungatella Hungatella_hathewayi;Olsenella Olsenella_sp._KH3B4
HC1 contig_49206	Arcobacter Arcobacter_canalis
HC1 contig_56554	Phascolarctobacterium Phascolarctobacterium_succinatutens
HC1 contig_58352	Xanthomonas Xanthomonas_campestris
HC1 contig_65366	Lactobacillus Lactobacillus_delbrueckii
HC1 contig_66982	Faecalibacterium Faecalibacterium_prausnitzii;Lawsonibacter Lawsonibacter_asaccharolyticus;Faecalibacterium Faecalibacterium_sp._An192
HC2 contig_18489	Prevotella Prevotella_copri
HC2 contig_24405	Helicobacter Helicobacter_equorum;Helicobacter Helicobacter_sp._10-6591
HC2 contig_2574	Streptococcus Streptococcus_equinus
HC2 contig_35635	Faecalibacterium Faecalibacterium_prausnitzii
HC2 contig_36708	Prevotella Prevotella_copri
HC2 contig_37096	Faecalibacterium Faecalibacterium_prausnitzii
HC2 contig_37295	Faecalibacterium Faecalibacterium_prausnitzii
HC2 contig_47591	Butyricicoccus Butyricicoccus_sp._AM27-36
HC2 contig_60908	Streptococcus Streptococcus_hyointestinalis
HC2 contig_65922	Faecalibacterium Faecalibacterium_prausnitzii;Xylanimonas Xylanimonas_cellulolytica
HC2 contig_69380	Blautia Blautia_sp._AM16-16B;Blautia Blautia_sp._AM46-3MH;Blautia Blautia_sp._AM22-22LB;Blautia Blautia_sp._AM46-5
HC2 contig_72237	Roseburia Roseburia_sp._AM59-24XD;Clostridium Clostridium_sp._OM07-10AC
HC2 contig_72564	Prevotella Prevotella_copri
HC2 contig_76941	Butyricicoccus Butyricicoccus_sp._AM27-36



HC3 contig_11257	Streptococcus Streptococcus_macedonicus
HC3 contig_23434	Budvicia Budvicia_aquatica
HC3 contig_26625	unclassified Clostridia_bacterium_UC5.1-2F7;Phocea Phocea_massiliensis
HC3 contig_29768	Prevotella Prevotella_pallens
HC3 contig_45168	Prevotella Prevotella_bryantii
HC3 contig_4855	Clostridium Clostridium_sp._C8
HC3 contig_49227	Faecalibacterium Faecalibacterium_prausnitzii
HC3 contig_5958	Porphyromonas Porphyromonas_gulae
HC3 contig_7463	Prevotella Prevotella_stercorea
HC4 contig_101545	Prevotella Prevotella_sp._P4-65
HC4 contig_108834	unclassified Ruminococcaceae_bacterium_TF06-43
HC4 contig_14102	Thermincola Thermincola_potens
HC4 contig_1950	HungateiClostridium HungateiClostridium_saccincola
HC4 contig_20614	Prevotella Prevotella_sp._TF12-30;Prevotella Prevotella_copri
HC4 contig_24751	Millionella Millionella_massiliensis
HC4 contig_29259	Enterobacter Enterobacter_kobei
HC4 contig_4329	Faecalibacterium Faecalibacterium_prausnitzii
HC4 contig_55452	Clostridium Clostridium_sporogenes
HC4 contig_5612	Xanthomonas Xanthomonas_oryzae
HC4 contig_65712	Clostridium Clostridium_sp._AF32-12BH
HC4 contig_6691	Sharpea Sharpea_azabuensis
HC4 contig_67240	Oblitimonas Oblitimonas_alkaliphila
HC4 contig_74451	Emergencia Emergencia_timonensis
HC4 contig_80050	Coprobacillus Coprobacillus_sp._AF17-11AC
HC4 contig_80461	Faecalibacterium Faecalibacterium_prausnitzii
HF1 contig_1722	Clostridium Clostridium_bornimense
HF1 contig_9754	unclassified Clostridiales_bacterium_VE202-01
HF2 contig_10107	Faecalibacterium Faecalibacterium_prausnitzii
HF2 contig_19173	Streptococcus Streptococcus_thermophilus
HF2 contig_31123	Streptococcus Streptococcus_pyogenes
	Lactobacillus Lactobacillus_paracasei;Lactobacillus Lactobacillus_curvatus;Lactobacillus
	Lactobacillus_sp._143-6;Lactobacillus Lactobacillus_rhamnosus;Lactobacillus
	Lactobacillus_delbrueckii;Lactobacillus Lactobacillus_parafarraginis;Lactobacillus
HF2 contig_31320	Lactobacillus_sp._257-1;Lactobacillus Lactobacillus_coryniformis;Lactobacillus
	Lactobacillus_sp._187-3;Lactobacillus Lactobacillus_concavus;Pediococcus
	Pediococcus_inopinatus;Lactobacillus Lactobacillus_pentosus;Lactobacillus
	Lactobacillus_fermentum;Lactobacillus Lactobacillus_sakei;Lactobacillus
	Lactobacillus_sp._247-4;Lactobacillus Lactobacillus_fuchuensis;Lactobacillus
	Lactobacillus_sp._47-3;Lactobacillus Lactobacillus_bifermentans
HF3 contig_1200	Geobacillus Geobacillus_stearothermophilus

HF3 contig_1304	Legionella Legionella_pneumophila
HF3 contig_21521	Geobacillus Geobacillus_thermoleovorans;Geobacillus Geobacillus_kaustophilus; Geobacillus Geobacillus_sp._FW23
HF3 contig_22561	Megamonas Megamonas_funiformis
HF3 contig_30052	Marinomonas Marinomonas_sp._DSL-35
HF3 contig_32931	Subdoligranulum Subdoligranulum_sp._APC924/74
HF3 contig_34858	Bacillus Bacillus_cereus
HF3 contig_36470	unclassified Opitutaceae_bacterium_TSB47
HF3 contig_5596	unclassified Clostridiales_bacterium_VE202-01
HF3 contig_6602	Chlorobium Chlorobium_ferrooxidans
HF4 contig_12104	Carnobacterium Carnobacterium_viridans
HF4 contig_19953	Streptococcus Streptococcus_agalactiae
HF4 contig_32494	Lactobacillus Lactobacillus_taiwanensis;Lactobacillus Lactobacillus_johnsonii
HF4 contig_4348	Acinetobacter Acinetobacter_sp._SWAC5
HI1 contig_16537	Clostridium Clostridium_sp._C8
HI1 contig_17096	ParaClostridium ParaClostridium_bifermentans
HI1 contig_20354	Butyricoccus Butyricoccus_sp._AM27-36
HI1 contig_23689	Clostridium Clostridium_tepidum
HI1 contig_26506	Clostridium Clostridium_perfringens
HI1 contig_269	unclassified Burkholderiales_bacterium_YL45;Turicimonas Turicimonas_muris
HI1 contig_31829	Streptococcus Streptococcus_macedonicus
HI1 contig_33606	Lactobacillus Lactobacillus_salivarius Streptococcus Streptococcus_hyointestinalis;Streptococcus Streptococcus_macedoni cus;
HI1 contig_33795	Streptococcus Streptococcus_thermophilus;Streptococcus Streptococcus_equinus
HI1 contig_40777	unclassified Firmicutes_bacterium_OM04-13BH
HI1 contig_43069	Roseburia Roseburia_hominis
HI1 contig_53936	Prevotella Prevotella_sp._P5-126
HI1 contig_5588	Clostridium Clostridium_perfringens
HI1 contig_56358	Clostridium Clostridium_perfringens
HI1 contig_57586	Faecalibacterium Faecalibacterium_prausnitzii
HI1 contig_61753	Romboutsia Romboutsia_timonensis
HI1 contig_62768	Campylobacter Campylobacter_lanienae
HI1 contig_64646	Clostridium Clostridium_sartagoforme
HI1 contig_6507	Helicobacter Helicobacter_sp._10-6591
HI1 contig_7010	Streptococcus Streptococcus_macedonicus;Streptococcus Streptococcus_lutetiensis; Streptococcus Streptococcus_equinus
HI1 contig_72556	Clostridium Clostridium_sp._OM02-18AC
HI1 contig_76091	Enterobacter Enterobacter_roggenkampii;Enterobacter Enterobacter_cloacae
HI1 contig_82142	Clostridium Clostridium_perfringens
HI1 contig_84711	Subdoligranulum Subdoligranulum_sp._APC924/74
HI2 contig_13642	Clostridium Clostridium_sp._DSM_8431
HI2 contig_24199	Bacillus Bacillus_cereus

HI2 contig_31258	Faecalibacterium Faecalibacterium_sp._OM04-11BH
HI2 contig_4859	Bacillus Bacillus_cereus;Bacillus Bacillus_anthraxis
HI2 contig_50409	Prevotella Prevotella_copri
HI2 contig_52038	Fournierella Fournierella_massiliensis
HI2 contig_55191	Butyricoccus Butyricoccus_sp._AM27-36
HI2 contig_59086	unclassified Burkholderiales_bacterium_YL45;Turicimonas Turicimonas_muris
HI2 contig_60482	Blautia Blautia_sp._OM06-15AC
HI2 contig_63383	Salmonella Salmonella_enterica
HI2 contig_64257	Bacillus Bacillus_paralicheniformis;Bacillus Bacillus_thuringiensis
HI2 contig_72866	Syntrophobotulus Syntrophobotulus_glycolicus
HI2 contig_85751	Salmonella Salmonella_enterica
HI2 contig_87153	Haemophilus Haemophilus_haemolyticus
HI2 contig_88633	Clostridium Clostridium_sporogenes
HI2 contig_93610	Prevotella Prevotella_copri
HI2 contig_95055	Faecalibacterium Faecalibacterium_prausnitzii
HI3 contig_100368	ErysipelatoClostridium [Clostridium]_cocleatum
HI3 contig_100773	Streptococcus Streptococcus_lutetiensis
HI3 contig_108339	ErysipelatoClostridium [Clostridium]_spiroforme
HI3 contig_109494	Clostridioides Clostridioides_difficile
HI3 contig_113067	Clostridium Clostridium_perfringens
HI3 contig_114041	Clostridium Clostridium_sp._AF15-41
HI3 contig_114886	Gemmiger Gemmiger_sp._An87
HI3 contig_117029	Clostridium Clostridium_sp._AF32-12BH
HI3 contig_122337	Streptococcus Streptococcus_equinus;Streptococcus Streptococcus_macedonicus; Streptococcus Streptococcus_gallolyticus
HI3 contig_123096	Klebsiella Klebsiella_pneumoniae;Salmonella Salmonella_enterica;Escherichia  Escherichia_coli;Pseudomonas Pseudomonas_aeruginosa;Pragia Pragia_fontium
HI3 contig_123457	ErysipelatoClostridium [Clostridium]_spiroforme
HI3 contig_123692	Faecalibacterium Faecalibacterium_prausnitzii
HI3 contig_123827	Enterobacter Enterobacter_sp._EGD-HP1
HI3 contig_124046	Bifidobacterium Bifidobacterium_tissieri
HI3 contig_14978	Nitrosospira Nitrosospira_sp._Nsp5;Nitrosospira Nitrosospira_multiformis
HI3 contig_16573	Coprobacillus Coprobacillus_sp._AF36-10BH
HI3 contig_20097	Streptococcus Streptococcus_salivarius;Streptococcus Streptococcus_sp._HMSC078 H03; Streptococcus Streptococcus_sp._449_SSPC
HI3 contig_29580	Treponema Treponema_lecithinolyticum
HI3 contig_29887	Streptococcus Streptococcus_agalactiae;Streptococcus Streptococcus_oralis;Strepto coccus  Streptococcus_macedonicus;Acinetobacter Acinetobacter_junii
HI3 contig_3339	Prevotella Prevotella_copri
HI3 contig_37847	Megasphaera Megasphaera_sp._An286
HI3 contig_40253	Prosthecochloris Prosthecochloris_sp._ZM

HI3 contig_41645	Prevotella Prevotella_sp._P4-51
HI3 contig_43520	Campylobacter Campylobacter_jejuni;Campylobacter Campylobacter_coli;Campylobacter  Campylobacter_sp._BCW_6872
HI3 contig_47074	Clostridium Clostridium_perfringens
HI3 contig_47275	Campylobacter Campylobacter_jejuni
HI3 contig_50294	unclassified Bathymodiolus_thermophilus_thioautotrophic_gill_symbiont
HI3 contig_51460	Methylobacillus Methylobacillus_flagellatus
HI3 contig_52613	Campylobacter Campylobacter_coli
HI3 contig_5440	Subdoligranulum Subdoligranulum_sp._APC924/74
HI3 contig_57557	Alicyclobacillus Alicyclobacillus_macrosporangioides
HI3 contig_59285	unclassified [Eubacterium]_siraeum
HI3 contig_60324	Escherichia Escherichia_albertii
HI3 contig_61025	Helicobacter Helicobacter_pullorum
HI3 contig_61229	Enterobacter Enterobacter_kobei
HI3 contig_61500	Clostridioides Clostridioides_difficile
HI3 contig_77345	Faecalibacterium Faecalibacterium_prausnitzii
HI3 contig_77592	Holdemanella Holdemanella_biformis
HI3 contig_7760	Eubacterium [Eubacterium]_eligens
HI3 contig_77940	Flavonifractor Flavonifractor_plautii;Clostridium Clostridium_sp._ATCC_BAA-44 2
HI3 contig_77988	Campylobacter Campylobacter_lanienae
HI3 contig_8124	Salmonella Salmonella_enterica
HI3 contig_96075	Clostridium Clostridium_jeddahense
HI3 contig_9982	Prevotella Prevotella_copri
HI4 contig_102995	unclassified Erysipelotrichaceae_bacterium_OH741_COT-311
HI4 contig_104939	Blautia Blautia_sp._AF22-5LB
HI4 contig_107660	unclassified Erysipelotrichaceae_bacterium_GAM147
HI4 contig_10979	Collinsella Collinsella_intestinalis
HI4 contig_112262	Klebsiella Klebsiella_pneumoniae;Escherichia Escherichia_coli
HI4 contig_113819	unclassified Burkholderiales_bacterium
HI4 contig_114474	Pseudoflavonifractor Pseudoflavonifractor_capillosus
HI4 contig_115121	Saccharicrinis Saccharicrinis_fermentans
HI4 contig_115329	Faecalibacterium Faecalibacterium_prausnitzii
HI4 contig_15143	Streptococcus Streptococcus_oralis;Streptococcus Streptococcus_equinus;Streptococcus  Streptococcus_lutetiensis;Streptococcus Streptococcus_salivarius;Streptococcus  Streptococcus_sp._HMSC066E07
HI4 contig_15665	Roseburia Roseburia_inulinivorans
HI4 contig_16108	Dorea Dorea_sp._AM13-35
HI4 contig_17220	Prevotella Prevotella_copri
HI4 contig_17571	Prevotella Prevotella_copri
HI4 contig_19105	Comamonas Comamonas_kerstersi

HI4 contig_19234	unclassified Bathymodiolus_thermophilus_thioautotrophic_gill_symbiont
HI4 contig_1930	ErysipelatoClostridium [Clostridium]_cocleatum
HI4 contig_19741	unclassified Ruminococcaceae_bacterium_TF06-43
HI4 contig_26559	Bifidobacterium Bifidobacterium_breve
HI4 contig_26664	Helicobacter Helicobacter_equorum
HI4 contig_27016	Faecalibacterium Faecalibacterium_prausnitzii
HI4 contig_28460	Selenomonas Selenomonas_ruminantium
HI4 contig_34239	Streptococcus Streptococcus_hyointestinalis
HI4 contig_36242	Prevotella Prevotella_copri
HI4 contig_39247	Klebsiella Klebsiella_pneumoniae
HI4 contig_39392	Flavonifractor Flavonifractor_plautii
HI4 contig_39473	ErysipelatoClostridium [Clostridium]_cocleatum
HI4 contig_43335	unclassified Bathymodiolus_thermophilus_thioautotrophic_gill_symbiont
HI4 contig_45752	Escherichia Escherichia_coli
HI4 contig_50516	Mycoplasma Mycoplasma_ovipneumoniae
HI4 contig_51416	Holdemanella Holdemanella_biformis
HI4 contig_54504	unclassified Bathymodiolus_thermophilus_thioautotrophic_gill_symbiont
HI4 contig_55422	Chloroherpeton Chloroherpeton_thalassium
HI4 contig_57176	Prevotella Prevotella_copri
HI4 contig_57988	Clostridium Clostridium_sp._1_1_41A1FAA
HI4 contig_6104	Olsenella Olsenella_sp._HMSC062G07
HI4 contig_61535	Megasphaera Megasphaera_stantonii
HI4 contig_64974	Streptococcus Streptococcus_lutetiensis
HI4 contig_66374	Streptococcus Streptococcus_equinus
HI4 contig_66699	Lactobacillus Lactobacillus_delbrueckii
HI4 contig_68337	unclassified Burkholderiales_bacterium_YL45;Turicimonas Turicimonas_muris
HI4 contig_72974	Streptococcus Streptococcus_thermophilus
HI4 contig_73756	Helicobacter Helicobacter_sp._TUL
HI4 contig_79005	Streptococcus Streptococcus_lutetiensis;Streptococcus Streptococcus_infantarius
HI4 contig_79564	Bifidobacterium Bifidobacterium_asteroides
HI4 contig_82813	Faecalibacterium Faecalibacterium_prausnitzii
HI4 contig_82818	Clostridium Clostridium_sp._AF32-12BH;Dorea Dorea_sp._OM07-5;Eubacterium Eubacterium_ventriosum;Ruminococcus Ruminococcus_sp._OM06-36AC;unclassified Firmicutes_bacterium_AM43-11BH;Roseburia Roseburia_inulinivorans
HI4 contig_83714	Bifidobacterium Bifidobacterium_pseudocatenuatum
HI4 contig_87136	Prevotella Prevotella_sp._P5-126
HI4 contig_87235	Campylobacter Campylobacter_jejuni
HI4 contig_90127	Escherichia Escherichia_coli

附表2 ANT(9)-Ia 基因序列  
Attached list 2 ANT (9) - Ia gene sequence

碱基序列	氨基酸序列
Ttgagtatagatttaagtaacaaaaaattccgaaagaagcaattc	MSIDLSNKKIPKEAIQALKTIAELLDNMLI
aagcattaaaaactatagcgggaactacttgataatgtaattggg	GVYLYGSAVMGGLRMNSDVDILVITNQLS
gtgtattgtatggctcggcagtaatgggtggttacgtatgaatagc	SEKTRRNLNRLMLISGKIGNIKDMRPLEV
gatgtagatatttggtaataacaatcaagtttatctgaaaaact	TVINQKDIVPWHFPPKYEFMYGEWLREQF
cgaaggaaacttacaaataggttaatgcttatatctgggaaaatag	EKGEIPESTYDPDLAILLAQLRKNSINLLGP
gaaacataaaagatatgagcgctctgaagttacggtcataaatca	KATEVIEPVPMTDIRKAIKESLPGLIASING
aaaggatattgcccctggcattccccccaaatagaatttatgta	DERNVILTARMWLTASTGEIRSKDLAAE
tggcagtggtgctaagagagcagttgaaaaggagaaattcctg	WAIPQLPDEHATLLNKAREAYLGECVDK
agtcgacttatgatccggatttagcaataacttttagcacaactaaga	WEGMESEVAELVNHMKKSISSLNIQLPF
aaaaatagtattaaccttttgggaccaaggcaacagaagtaattg	RIV
agcctgtgccaatgacagatattcgaagcaattaagaatcgtt	
gcccgggtgatagctagcattaacggtagcgaacgcaatgtgat	
ttaacttttagccagaatgtggctgacagcatctactggtgaaattc	
gctcaaaagatctggcagctgaatgggcgataacctcaattaccg	
atgagcatgctactttactcaaaaagcgagagaggctatttagg	
agagtgtgtgacaagtgggaaggaaatgaaatctgaggtggctg	
aactgtaatcatatgaaaaagtctatagagtcttccctaatatcc	
aattacctttcgaatagttaa	



附表 S3 仔猪肠道噬菌体 contigs 中检测到的 ARGs  
Attached list S3 ARGs detected in the piglets intestinal phage contigs

Query	Best_Hit_ARO	Resistance Mechanism	AMR Gene Family
EFANCA ML_13600	YojI	antibiotic efflux	ATP-binding cassette (ABC) antibiotic efflux pump
EFANCA ML_47869	vanWG	antibiotic target alteration	glycopeptide resistance gene cluster; vanW
EFANCA ML_41141	lnuC	antibiotic inactivation	lincosamide nucleotidyltransferase (LNU)
EFANCA ML_62693	SAT-4	antibiotic inactivation	streptothricin acetyltransferase (SAT)
EFANCA ML_39107	adeH	antibiotic efflux	resistance-nodulation-cell division (RND) antibiotic efflux pump
EFANCA ML_74619	ANT(6)-Ia	antibiotic inactivation	ANT(6)
EFANCA ML_77882	tetW	antibiotic target protection	tetracycline-resistant ribosomal protection protein
EFANCA ML_79812	tetW	antibiotic target protection	tetracycline-resistant ribosomal protection protein
EFANCA ML_36185	tetW	antibiotic target protection	tetracycline-resistant ribosomal protection protein
EFANCA ML_54443	catIII	antibiotic inactivation	chloramphenicol acetyltransferase (CAT)
EFANCA ML_43761	ACC-1	antibiotic inactivation	ACC beta-lactamase
EFANCA ML_60121	APH(3')-IIIa	antibiotic inactivation	APH(3')
EFANCA ML_75792	tetO	antibiotic target protection	tetracycline-resistant ribosomal protection protein
EFANCA ML_26063	APH(3')-IIIa	antibiotic inactivation	APH(3')
EFANCA ML_27225	vanTG	antibiotic target alteration	glycopeptide resistance gene cluster; vanT
EFANCA ML_62509	tetO	antibiotic target protection	tetracycline-resistant ribosomal protection protein
EFANCA ML_69443	aadA11	antibiotic inactivation	ANT(3")
EFANCA ML_52058	mel	antibiotic efflux	ATP-binding cassette (ABC) antibiotic efflux pump
EFANCA ML_50987	bmr	antibiotic efflux	major facilitator superfamily (MFS) antibiotic efflux pump
EFANCA	lnuC	antibiotic	lincosamide nucleotidyltransferase



ML_57069		inactivation	(LNU)
EFANCA	APH(3')-IIIa	antibiotic	APH(3')
ML_62694		inactivation	
EFANCA	APH(3')-IIIa	antibiotic	APH(3')
ML_48163		inactivation	
EFANCA	ANT(6)-Ia	antibiotic	ANT(6)
ML_78523		inactivation	
EFANCA	vanWG	antibiotic target	glycopeptide resistance gene
ML_71694		alteration	cluster; vanW
EFANCA	ANT(6)-Ia	antibiotic	ANT(6)
ML_38520		inactivation	
EFANCA	vanWG	antibiotic target	glycopeptide resistance gene
ML_66972		alteration	cluster; vanW
EFANCA	tetO	antibiotic target	tetracycline-resistant ribosomal
ML_39120		protection	protection protein
EFANCA	mphA	antibiotic	macrolide phosphotransferase
ML_21925		inactivation	(MPH)
EFANCA	tetM	antibiotic target	tetracycline-resistant ribosomal
ML_80024		protection	protection protein
EFANCA	lsaE	antibiotic efflux	ATP-binding cassette (ABC)
ML_61983			antibiotic efflux pump
EFANCA	tetW	antibiotic target	tetracycline-resistant ribosomal
ML_72765		protection	protection protein
EFANCA	ANT(9)-Ia	antibiotic	ANT(9)
ML_74617		inactivation	
EFANCA	APH(3')-IIIa	antibiotic	APH(3')
ML_17401		inactivation	
EFANCA	tetO	antibiotic target	tetracycline-resistant ribosomal
ML_64583		protection	protection protein
EFANCA	ErmB	antibiotic target	Erm 23S ribosomal RNA
ML_31744		alteration	methyltransferase
EFANCA	SAT-4	antibiotic	streptothricin acetyltransferase
ML_62691		inactivation	(SAT)
EFANCA	tet(W/N/W)	antibiotic target	tetracycline-resistant ribosomal
ML_60123		protection	protection protein
EFANCA	lnuC	antibiotic	lincosamide nucleotidyltransferase
ML_74896		inactivation	(LNU)
EFANCA	SAT-4	antibiotic	streptothricin acetyltransferase
ML_48162		inactivation	(SAT)
EFANCA	AAC(6')-Ie-APH(2'')-Ia	antibiotic	AAC(6'); APH(2'')
ML_41134		inactivation	
EFANCA	lnuC	antibiotic	lincosamide nucleotidyltransferase
ML_68375		inactivation	(LNU)

EFANCA ML_29676	APH(3')-IIIa	antibiotic inactivation	APH(3')
EFANCA ML_50590	ErmG	antibiotic target alteration	Erm 23S ribosomal RNA methyltransferase
EFANCA ML_71370	lnuC	antibiotic inactivation	lincosamide nucleotidyltransferase (LNU)
EFANCA ML_75669	vanWG	antibiotic target alteration	glycopeptide resistance gene cluster; vanW
EFANCA ML_62690	aad(6)	antibiotic inactivation	ANT(6)
EFANCA ML_54715	MexB	antibiotic efflux	resistance-nodulation-cell division (RND) antibiotic efflux pump
EFANCA ML_62461	APH(2'')-If	antibiotic inactivation	APH(2'')
EFANCA ML_69608	ErmB	antibiotic target alteration	Erm 23S ribosomal RNA methyltransferase
EFANCA ML_64620	tetW	antibiotic target protection	tetracycline-resistant ribosomal protection protein
EFANCA ML_56172	aad(6)	antibiotic inactivation	ANT(6)
EFANCA ML_26429	IMP-15	antibiotic inactivation	IMP beta-lactamase
EFANCA ML_13575	aad(6)	antibiotic inactivation	ANT(6)
EFANCA ML_67216	SAT-4	antibiotic inactivation	streptothricin acetyltransferase (SAT)
EFANCA ML_15553	bmr	antibiotic efflux	major facilitator superfamily (MFS) antibiotic efflux pump
EFANCA ML_55743	adeH	antibiotic efflux	resistance-nodulation-cell division (RND) antibiotic efflux pump
EFANCA ML_40933	ANT(9)-Ia	antibiotic inactivation	ANT(9)
EFANCA ML_64582	tet(40)	antibiotic efflux	major facilitator superfamily (MFS) antibiotic efflux pump
EFANCA ML_04978	APH(3')-IIIa	antibiotic inactivation	APH(3')
EFANCA ML_59769	Staphylococcus mupA conferring resistance to mupirocin	antibiotic target alteration	antibiotic resistant isoleucyl-tRNA synthetase (ileS)
EFANCA ML_62587	tetA(P)	antibiotic efflux	major facilitator superfamily (MFS) antibiotic efflux pump
EFANCA ML_38334	mphA	antibiotic inactivation	macrolide phosphotransferase (MPH)

EFANCA ML_09699	APH(3')-IIIa	antibiotic inactivation	APH(3')
EFANCA ML_53841	lnuC	antibiotic inactivation	lincosamide nucleotidyltransferase (LNU)
EFANCA ML_03276	ANT(6)-Ia	antibiotic inactivation	ANT(6)
EFANCA ML_03321	SHV-159	antibiotic inactivation	SHV beta-lactamase
EFANCA ML_20451	catIII	antibiotic inactivation	chloramphenicol acetyltransferase (CAT)
EFANCA ML_50483	mel	antibiotic efflux	ATP-binding cassette (ABC) antibiotic efflux pump
EFANCA ML_47485	vanWG	antibiotic target alteration	glycopeptide resistance gene cluster; vanW
EFANCA ML_63030	Staphylococcus mupB conferring resistance to mupirocin	antibiotic target alteration	antibiotic resistant isoleucyl-tRNA synthetase (ileS)
EFANCA ML_03830	oleI	antibiotic inactivation	ole glycosyltransferase
EFANCA ML_41680	Mrx	antibiotic inactivation	macrolide phosphotransferase (MPH)
EFANCA ML_12934	tet(40)	antibiotic efflux	major facilitator superfamily (MFS) antibiotic efflux pump
EFANCA ML_56207	vanSI	antibiotic target alteration	vanS; glycopeptide resistance gene cluster
EFANCA ML_58113	vanWG	antibiotic target alteration	glycopeptide resistance gene cluster; vanW
EFANCA ML_76164	ErmB	antibiotic target alteration	Erm 23S ribosomal RNA methyltransferase
EFANCA ML_61979	ANT(9)-Ia	antibiotic inactivation	ANT(9)
EFANCA ML_61984	lnuB	antibiotic inactivation	lincosamide nucleotidyltransferase (LNU)
EFANCA ML_67217	aad(6)	antibiotic inactivation	ANT(6)
EFANCA ML_10134	bmr	antibiotic efflux	major facilitator superfamily (MFS) antibiotic efflux pump
EFANCA ML_56067	APH(3')-IIIa	antibiotic inactivation	APH(3')
EFANCA ML_80022	tet(L)	antibiotic efflux	major facilitator superfamily (MFS) antibiotic efflux pump
EFANCA ML_08392	ceoB	antibiotic efflux	resistance-nodulation-cell division (RND) antibiotic efflux pump

EFANCA ML_29479	TaeA	antibiotic efflux	ATP-binding cassette (ABC) antibiotic efflux pump
EFANCA ML_69669	catIII	antibiotic inactivation	chloramphenicol acetyltransferase (CAT)
EFANCA ML_36356	APH(3')-IIIa	antibiotic inactivation	APH(3')
EFANCA ML_79432	catIII	antibiotic inactivation	chloramphenicol acetyltransferase (CAT)
EFANCA ML_76006	APH(3')-IIIa	antibiotic inactivation	APH(3')
EFANCA ML_27993	LpeB	antibiotic efflux	resistance-nodulation-cell division (RND) antibiotic efflux pump
EFANCA ML_80023	tet(L)	antibiotic efflux	major facilitator superfamily (MFS) antibiotic efflux pump
EFANCA ML_55170	oleI	antibiotic inactivation	ole glycosyltransferase
EFANCA ML_26880	vanWG	antibiotic target alteration	glycopeptide resistance gene cluster; vanW
EFANCA ML_53229	MexB	antibiotic efflux	resistance-nodulation-cell division (RND) antibiotic efflux pump
EFANCA ML_15615	Laribacter hongkongensis ampC beta-lactamase	antibiotic inactivation	ampC-type beta-lactamase
EFANCA ML_52120	lnuC	antibiotic inactivation	lincosamide nucleotidyltransferase (LNU)
EFANCA ML_41675	mdtG	antibiotic efflux	major facilitator superfamily (MFS) antibiotic efflux pump
EFANCA ML_26203	lnuG	antibiotic inactivation	lincosamide nucleotidyltransferase (LNU)
EFANCA ML_25517	catIII	antibiotic inactivation	chloramphenicol acetyltransferase (CAT)
EFANCA ML_09734	OXA-58	antibiotic inactivation	OXA beta-lactamase
EFANCA ML_56361	ErmB	antibiotic target alteration	Erm 23S ribosomal RNA methyltransferase
EFANCA ML_49722	AAC(6')-Ie-APH(2'')-Ia	antibiotic inactivation	AAC(6'); APH(2'')
EFANCA ML_41607	vanWG	antibiotic target alteration	glycopeptide resistance gene cluster; vanW
EFANCA ML_64488	ErmB	antibiotic target alteration	Erm 23S ribosomal RNA methyltransferase
EFANCA ML_04599	lsaE	antibiotic efflux	ATP-binding cassette (ABC) antibiotic efflux pump
EFANCA	catIII	antibiotic	chloramphenicol acetyltransferase

ML_34100		inactivation	(CAT)
EFANCA	Laribacter hongkongensis	antibiotic	ampC-type beta-lactamase
ML_66685	ampC beta-lactamase	inactivation	
EFANCA	IMP-22	antibiotic	IMP beta-lactamase
ML_41686		inactivation	
EFANCA	catIII	antibiotic	chloramphenicol acetyltransferase
ML_01264		inactivation	(CAT)
EFANCA	SAT-4	antibiotic	streptothricin acetyltransferase
ML_56171		inactivation	(SAT)
EFANCA	VEB-3	antibiotic	VEB beta-lactamase
ML_04000		inactivation	
EFANCA	lnuC	antibiotic	lincosamide nucleotidyltransferase
ML_30135		inactivation	(LNU)
EFANCA	ErmG	antibiotic target	Erm 23S ribosomal RNA
ML_30235		alteration	methyltransferase

附表 S4 链球菌裂解酶基因序列

Attached list S4 Streptococcus lysin genes sequence

裂解酶	碱基序列	氨基酸序列
Lys33795	atgaagaaaacgattattttattgatgtatcggcttatcaagcagcgg acttgcgaggaactgtgcgtctgctggtacaaaataagacgattatca aagtaagcgaaggaacaggctggctatccccagtcgccaacaac aagcagacaccagtgagcctgtaggttactaccacttgcacgtttg gtggcaatgtcgtcgaagcacaagctgaagcgaactactttatcagc cacttgccaacaaaaaagtgcgctatctggtctgtgactacgagga cagcgcaagtagcaataaacagccaacacaaaacgctatcttggc gtttatggatgtttgaaggcgcacgtgctacgacgtctactacag ctataagccgtttacactggctaactctggacgattaccaccgcatact agccaagtatcctaacagccttggattgctgcttatccaattacag cgtcatgtcaacagttgacgtggcaaaagcagctggttccgtcca tgagcggatccgctggtggcaattcacctcaaccgctttacaaggc ggactagacaagaacattgtttattagacgatgacgcaacaactact acacaatcaaacaaaatttaggaggactaccatggaattcacatt caaatctctggcgacaaagcacagacctgcaacagtattacg ccaatagcgacgtggtattatcgaggggtgactcatattgatgaat ggatgttattagaacatttataaagactcaactgctcagacatgc cacactataagtgggacgctaaggcgccttggtatactcgtgctattg taggtatgcaattgaagaaaattga	MKKNDFIDVSAAYQAAD LRGTCASAGTNKTIKVSE GTGWLSPVRQQQADTSEP VGYHFFARFGGNVAQAQ AEANYFISHLPNKKVRYL VCDYEDSASSNKTANTNA ILAFMDVCKAHGYEPIYY SYKPFTLANLDDYHRILA KYPNSLWIAAYANYSVMS TVDVAKASWFPMSMDGIR WWQFTSTALQGGDKNI VLLDDDATTTTQSNQNLG GLPMEFTFQISDKAHDP ATVYYANTARGIYRGLTHI DEWNVIRNIYKDESTGRD MPHYKWDKAPWYTRAI VGMQLKKI
Lys8387	atgaaaagaatgactattttattgatgtcgtcttatcaatccgcaga ttgacagctatatgccaagctgctggaacacgtaagacggttatca aagttagcaggggacaggttatcttcccctaactgittactcaagc gcaaacagcagccatcggttaccactcgcctgttgggtggca atgtcagccaagcagtagccgaagcgaactatttttgctaacttac caactaaagtgccttacctgtctgctgattatgagggcgtagtggtg ataagcaagccaatcagtagcagtgtagctttatggctaagtgcg cccaagctggctataaactctattatagctataaacatacacgtag ccaatgttgattatcaccaaatcctagctaaatacccaaacagcttgc ggattgctgcctacaactataacgtcacaccaccagttgggagattt tcccaagcatggacggcatccgctggtggcaattcacatcaactggt attgctggaggcctgataaaaatgttgtgtgctagatgacgagcaa acagcgtcatcaacagaaaaacaagaagaaccgaaaaaatcga ggaggaagaagatatgttaaatttgaatgcgttctaatacaggaaa acaaggctatgttggtgtgtcaacggcttattttggaattggagac atcggtacggtagacacctgcaagacgcaggttgcacaacacctaa tgctagacgatggcgattttgaccgcttgcctaattcacaagaactga tgatgagaaacgtaacgaagtgtcaagtagcgttgaagaactg gctaatacaatcaaaaataataa	MKKNDFIDVSSYQSADL TAICQAAGTRKTVIKVSE GTGYLSPNRFTAQTSEPI GYYHFFARFGGNVSQAVAE ANYFLANPTKVPYLVCYD EDGASGDKQANTDAVLA FMAKCAQAGYKPIIYYSY KPYTLAVDYHQIAKYPNS LWIAAYPNYNVTPDPVWE IFPSMDGIRWQFTSTGIAG GLDKNVLLDDEQTASSTE KQEETEKIEEEDMLNFV MRSKSGKQGYVGCVNGS IFGIGDIGTVTALQDAGCK HLMLDDGDFDRLLSQK LDDEKRNEVLKVALENVA NTIKNK

Lys29887	<p>atgaaaaagaatgactattttattgatgtcgtcttatcaatccgcaga          cttaacggcgatttgtcaagctgctggaacacgtaaacgattattaa          agtcagcgaaggcacgggctacttatcgcctaatacggttcacgcaat          cgcaaaccagtgaacccgctggctattaccactttgccggtttggc          ggtaatgtcagccaagcggtagcagaagcgaactatTTTTGGCTAAT          atccctgctaaagtctacacctcgtatgtgactatgaagacggcgct          agcacgtcaaaaagccaatacagccattttggcggttcaggacaa          atgcgcacaagctggttacaagccaatctattacagctacaagcctt          acacgctagcgaatggtgatcatcaaatcctagcaaaatcccaaac          agtctgtgattgcttacctactataatgtgacccccgaccccgttt          gggaatcttcccctcaatggatattcgtggtggcagttactccac          ggggggtgctggcggttagataaaaatggtgtattgctagatgacga          gcaaacagcgtcatcaaaagaagaattgaaaaaacgaggagg          aagaagatatgtgaatTTGTaatgcgtcaaatcaggtaacaag          gtacgtaggctgtgcaatggtctatTTTTGGAATCGGAGACATCGG          aacagtgggtgcttgaagaagcgggtgtaaacatctaattgctag          acgatggcgatttcgaccgttcttaattcaaaaacttgatgatga          gaaacgtaacgaagtgtaaaagttgcgcttgaaacgtggctaac          accatcaaaaataataa</p>	<p>MKKN DYFIDVSSYQSADL          TAICQAAGTRKTIK VSEG          TGYLSPNRFTQSQTSEPV          GYYHFARFGGNVSQAVAE          ANYFLANIPAKVSYLVCD          YEDGASTSKQANTDAILA          FMDKCAQAYKPIYYSYKP          YTLANVDYHQILAKYPNS          LWIAAYPNYNVTPDPVWE          IFPSDGRWWQFTSTGVAG          GLDKNVLLDDEQTASSKE          EIEKNEEEEDMLNFVMRS          KSGKQGYVGCVNGSIFGI          GDIGTVVALQEAGCKHL          MLDDGDFRLLNSQKLD          DEKRNEVLKVALENVANT          IKNK</p>
Lys15143	<p>atgaaaaggattattttatcgacgtgctgcagctctgcagattaacag          ctatttccaagctgcaggcacacgtaagacgattattaaagtgagc          gaaggaacaggttatctttcgccaatcgttttacacaagcacaact          agcgagcctgttgatactaccactttgctcgttttggtgacaatgtca          gtcaagcggtagcagaagcgaattatttctggcaaatattcccgca          aaagtccatacctcgtatgtgatgaggacggcgctagcacgtcaa          aacaggtaatacagatgccattttggcattatggataaggtggcga          gcgctggttacaagcctctattatagctacaagcccacgctggcaaa          tgttgattatcaccaaatcctagcaaaatcccaaacgtctgtggatt          gcagcttatcaaaatacaacgtaacccagaccagtttgggaaat          ctccaagtagtgacggcattcgtggtggcagttcactcaacgg          ggattgctggcggcctgataaaaatggtgtattactagatgacgagc          aagcagcgtcaccacagaaaaacaagaagaatttttagaggagg          aagaagatatgttaattcgtaatgcgtcaaatcaggtaacaag          gctatgttggtgtgtcaatggtgccatttttgaatcggggatatcgg          tacagtgggagcttgaagaagcaggtgtaaacatctagtgttag          atgatggcgattttgaccgctgatcaactcaaaaagattgatgatg          agaaacgtaatgaagtgttaaagttgcacttgaaaatgtcctaaca          caatcaaaaataataa</p>	<p>MKKDYFIDVSSSADLTAIC          QAAGTRKTIK VSEG TGY          LSPNRFTQAQTSEPV GYY          HFARFGDNVSQAVAE ANY          FLANIPAKVPYLVCDYED          GASTSKQANTDAILAFMD          KVASAGYKPYYSYKPYTL          ANVDYHQILAKYNSLWIA          AYPNYNVTPDPVWEIFPS          MDGIRWWQFTSTGIAGGL          DKNVLLDDEQAASPT          KQEEILEEEEDMLNFVMR          SKSGKQGYVGCVNGAIFG          IGDIGTVGALQEAGCKHL          VLDDGDFRDLINSQKIDD          EKRNEVLKVALENVANTI          KNK</p>