

巨型噬菌体的研究进展

何博¹, 姜昕宇¹, 廖江林^{1,2}, 卢曙光^{1*}, 乐率^{1*}

1 陆军军医大学 基础医学院, 微生物学教研室, 重庆市微生物工程重点实验室, 重庆

2 陆军军医大学 第一附属医院(重庆西南医院) 心血管内科, 重庆

何博, 姜昕宇, 廖江林, 卢曙光, 乐率. 巨型噬菌体的研究进展[J]. 微生物学报, 2025, 65(3): 1017-1032.

HE Bo, JIANG Xinyu, LIAO Jianglin, LU Shuguang, LE Shuai. Research progress in jumbo phages[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(3): 1017-1032.

摘要: 在后抗生素时代, 噬菌体疗法是对抗耐药菌的重要候选武器。噬菌体具有丰富的多样性, 其中的巨型噬菌体是一类基因组大于 200 kb 的噬菌体。由于其基因组容量大, 功能基因类型丰富且排布分散。巨型噬菌体在生物学机制上具有许多特性, 如拥有超大的噬菌体颗粒、独特的复制周期和结构(如核状区室、内体和长波浪卷曲尾丝)等。本文旨在对巨型噬菌体及其研究进展进行综述, 重点剖析其生物学特点、基因组与进化、特殊的复制机制与结构, 并探讨其在抗耐药菌感染、环境治理、水产养殖和生物防治等领域的应用潜力, 为巨型噬菌体的相关研究和应用提供参与与启示。

关键词: 巨型噬菌体; 基因组与进化; 核状区室; 噬菌体治疗; 应用进展

Research progress in jumbo phages

HE Bo¹, JIANG Xinyu¹, LIAO Jianglin^{1,2}, LU Shuguang^{1*}, LE Shuai^{1*}

1 Key Laboratory of Microbial Engineering under the Educational Committee in Chongqing, Department of Microbiology, College of Basic Medical Sciences, Army Medical University, Chongqing, China

2 Department of Cardiovascular Medicine, the Southwest Hospital of Army Medical University, Chongqing, China

Abstract: In the post-antibiotic era, phage therapy becomes a candidate for treating drug-resistant bacteria. Phages are diverse, and jumbo phages are a class of phages with genomes longer than 200 kb. Their large genomes carry abundant functional genes with scattered distribution. Jumbo phages have a variety of unique biological characteristics, such as oversized phage particles, unique

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFA0911200)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFA0911200).

*Corresponding authors. E-mail: LU Shuguang: lugs@tmmu.edu.cn; LE Shuai: leshuai2004@tmmu.edu.cn

Received: 2024-10-01; Accepted: 2024-11-01; Published online: 2024-12-31

replication cycles, and unique structures such as the nucleus-like compartment, the “inner body”, and the long-wavy curly tail fiber. This paper reviews the research progress in jumbo phages, focusing on their biological characteristics, genomes, evolution, and special replication mechanisms and structures. Furthermore, this review explores the application potential of jumbo phages in the treatment of drug-resistant bacterial infection, environmental management, aquaculture, and biocontrol, aiming to provide reference and implications for the research and application of jumbo phages.

Keywords: jumbo phages; genome and evolution; nucleus-like compartment; phage therapy; application progress

随着抗生素的广泛使用,致病细菌的耐药性进化不断加速,耐药菌感染已成为当前临床治疗的一大挑战^[1-3]。2022年的报告指出,全球耐药菌感染在2019年导致495万人死亡,成为导致人类死亡的第二大杀手^[2]。噬菌体(bacteriophage, phage)是一种能够特异性感染并裂解细菌的病毒,自20世纪初被发现以来就用于治疗细菌感染性疾病^[4]。噬菌体疗法已成为人类对抗耐药菌感染的重要候选方案^[4],近年来备受关注^[5]。噬菌体在自然界中分布广泛,种类繁多^[6]。在目前已发现的噬菌体中,基因组最小仅5 kb左右,最大可达852 kb^[7],噬菌体基因组大小的中位数为50 kb^[6,8]。

巨型噬菌体(jumbo phage)是基因组大小在200 kb以上的一类噬菌体^[9],当巨型噬菌体基因组超过500 kb时,可被称为巨大噬菌体(megaphage),也有研究者将巨大噬菌体称为大型噬菌体(huge phage)^[10]。由于含有较大的基因组,巨型噬菌体不仅拥有更加丰富的基因型,还具备更大的病毒粒子以装载较大的核酸分子^[11]。自20世纪70年代第一株巨型噬菌体被发现以来^[12-15],越来越多的巨型噬菌体被分离和鉴定。然而,相较于基因组小、结构简单、易于分离、便于遗传操作的普通噬菌体(基因组大小不到200 kb),巨型噬菌体因其较大的基因组和噬菌体粒子(phage virion),其分离鉴定和深

入研究相对困难^[16]。随着高通量测序技术、宏基因组学以及大片段DNA(deoxyribonucleic acid)操纵技术的发展,近年来人们对噬菌体的生物学特性及其基因组的了解逐渐深入,对巨型噬菌体的研究也取得了许多重要进展^[10,16-17]。不同来源和不同大小的巨型噬菌体不断被分离、鉴定出来^[10],对巨型噬菌体基因型丰富的基因组进行系统性深入分析,补充并完善了噬菌体的功能基因库和进化分类^[18]。同时,许多巨型噬菌体在感染细菌过程中所形成的特殊结构也被发现和解析^[17]。

巨型噬菌体较大的基因组赋予了其更大的潜力和更广阔的应用前景。其基因组结构(genome organization)、基因组中涵盖的基因类型等也展现出与普通噬菌体明显的区别。因此,研究巨型噬菌体有助于更好地理解噬菌体的生物学与进化。巨型噬菌体基因组中含有丰富的基因元件,这为噬菌体与宿主之间的相互作用研究提供了丰富的素材。对巨型噬菌体独特生物学特性的解析也将深化我们对噬菌体的认识。此外,巨型噬菌体在抗耐药菌感染、环境治理、食品安全和农牧业等领域展现出巨大的应用潜力,有望为相关难题的解决提供新的思路 and 方案。

1 巨型噬菌体的分离鉴定

巨型噬菌体的发现比普通噬菌体晚半个多

世纪, 其分离困难的主要原因在于其病毒粒子较大(平均头部直径约 100 nm, 尾长约 200 nm), 这阻碍了噬菌斑的形成, 且可能在过滤去除细菌时被滤膜阻留^[19]。其次, 巨型噬菌体的基因组核酸分子超过 200 kb, 在提取纯化时极易发生片段化, 导致完整的基因组不易被检测到^[20]。20 世纪 70 年代左右, 基因组大小约 498 kb 的巨型芽胞杆菌(*Bacillus megaterium*)噬菌体 G^[14-15]和基因组大小约 280 kb 的铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)噬菌体 ΦKZ^[12-13]首次被发现并分离鉴定, 它们均拥有较大的病毒颗粒, 其中噬菌体 G 的头部直径可达到 180 nm (图 1)。然而, 在近半个世纪的时间里(截至 2017 年), 仅有 93 株基因组大于 200 kb 的巨型噬菌体被报道^[19]。

近年来, 通过改进巨型噬菌体的分离、培养方法, 如过滤时使用较大孔径的滤芯、采用更低琼脂糖浓度的半固体培养基等, 以及借助迅速发展的宏基因组学技术、高通量测序技术、第三代测序技术、大片段 DNA 操纵技术等, 巨型噬菌体的发现和分离鉴定进入了加速阶段, 大量不同细菌的巨型噬菌体被发现并报道。2020 年, Al-Shayeb 等^[10]对来自多个生态系统的

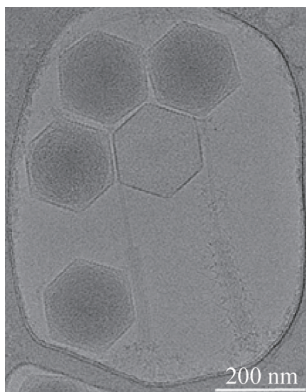


图1 巨型噬菌体G的透射电镜形态^[14]

Figure 1 Transmission electron microscope (TEM) morphology of jumbo phage G^[14].

DNA 样本进行了测序分析, 成功识别出数百个长度超过 200 kb 的噬菌体基因组, 包括一个长度为 735 kb 的噬菌体基因组。目前, 已知的巨型噬菌体中基因组最大的是从人类肠道微生物组中检测到的 HugePhage1, 其基因组长度达到 852 kb^[7]。随着越来越多巨型噬菌体被成功分离、鉴定^[21-33], 巨型噬菌体库正在不断扩展和补充。截至 2024 年 9 月, GenBank 数据库中公布的巨型噬菌体序列数量已达近 800 个, 其中大多数噬菌体的基因组集中在 200–300 kb 范围内, 且有 57 株噬菌体是不可培养的(其基因组是从宏基因组测序拼接而来, 并未获取对应的噬菌体颗粒)(图 2)。

目前已分离鉴定的巨型噬菌体中大多数以革兰氏阴性菌(Gram-negative)为宿主菌, 如假单胞菌(*Pseudomonas*)和柄杆菌(*Caulobacter*)等, 也有少部分巨型噬菌体的宿主菌为革兰氏阳性菌(Gram-positive), 如金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)等^[17]。从理论上讲, 巨型噬菌体在地球生态系统和各种细菌宿主中广泛存在, 每一种细菌都可能有自己的巨型噬菌体。因此, 未来将有更多种属细菌的巨型噬菌体被分离和鉴定。巨型噬菌体的挖掘为深入探究噬菌体的多样性

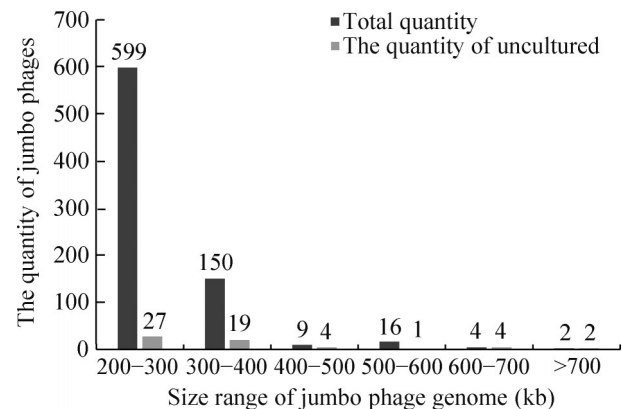


图2 巨型噬菌体基因组大小及数量分布

Figure 2 Genome size and number distribution of jumbo phages.

与进化机制提供了宝贵资源,也为后续研究巨型噬菌体的基因组组织、病毒粒子结构、子代复制机制、与宿主的相互作用关系以及进化等方面的研究奠定了基础。此外,未来应尝试分离更多能裂解病原菌(包括耐药菌)的巨型噬菌体,以推动其在抗菌感染噬菌体制剂的研发与制备中的应用,为临床抗病原菌感染治疗提供新的途径。

2 巨型噬菌体的基因组与进化

巨型噬菌体的基因组不仅容量更大,而且在基因排布方式、基因功能的复杂性以及生物学策略的多样性等方面展现出显著特点。深入探究巨型噬菌体的基因组特征,有助于更全面地理解噬菌体这一生命形式的生存机制及进化历程,进而揭示其如何在自然选择中演化出如此庞大的基因组,以及这些额外基因如何赋予它们相较于普通噬菌体更为多样的生存策略和更强的环境适应能力。不同物种基因组中功能

基因的组织形式各具特色,原核细菌的功能基因倾向于成簇化排列^[34],而真核生物的功能基因通常分散在基因组中。普通噬菌体的基因组通常展现出模块化的结构特点,功能基因成簇化排列^[35]。相比之下,巨型噬菌体的基因组中,功能基因却像真核生物一样分散在基因组中,或仅形成较小的基因亚簇^[36-37]。例如,巨型噬菌体 Φ KZ 的基因组是一个长度为 280 334 bp 的带有末端冗余、低 G+C 含量的双链 DNA 分子,基因组图谱显示其功能基因的排布比较分散(图 3)。

巨型噬菌体拥有更大的基因组意味着其拥有数量更多、种类更加多样的基因,从而可赋予其在 DNA 复制、转录、翻译和核苷酸代谢等多个生命过程中更高的自主性。对多种巨型噬菌体的测序分析发现其基因组中除了必需的早、中、晚期基因外,还包含大量的 RNA 聚合酶(RNA polymerase, RNAP)基因、转运 RNA(transfer RNA, tRNA)合成酶基因、tRNA 修饰酶

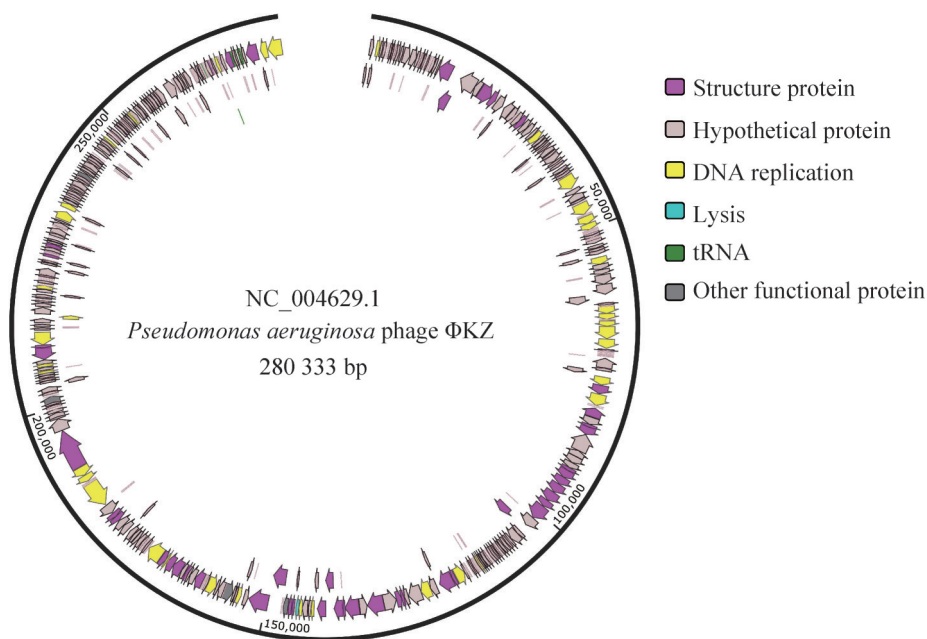


图3 巨型噬菌体 Φ KZ的基因组图谱

Figure 3 Genomic map of the jumbo phage Φ KZ.

基因、翻译起始元件、编码延伸因子以及核糖体蛋白等多种功能 DNA 序列^[10,18]。同时, 巨型噬菌体更加丰富的基因型也赋予了它们更加多样的表型结构。截至目前, 已发现仅在巨型噬菌体中存在的多种特殊结构, 包括在噬菌体 0305Φ8-26 上特有的长波浪形卷曲尾丝蛋白 (long, wavy, curly tail fibers)^[38-41], 以及在铜绿假单胞菌 ΦKZ 样噬菌体衣壳中发现的卷绕在基因组 DNA 上的噬菌体“内体” (inner body) 蛋白^[42-45]。2023 年, Prichard 等^[46]对最新定义的 Chimalliviridae (其马利病毒科)进行了基因组序列系统性分析, 该病毒科的噬菌体会在感染宿主菌过程中形成一个类似细胞核的复制区室 (nucleus-like replication compartment), 其核心组成为 ChmA 蛋白, 具有此特征的噬菌体被称为成核噬菌体 (nucleus-forming phage); 分析研究表明, 能够编码 ChmA 蛋白的噬菌体共享 72 个保守基因, 这些基因分散于 7 个基因簇中。

目前对已测序的巨型噬菌体基因组进行的功能注释尚不完善, 部分 DNA 序列的功能尚未明确, 还存在大量编码未知功能蛋白的基因。例如, 其马利病毒科的典型成员 ΦKZ 噬菌体基因组中未知蛋白基因约占其基因总数的 75%^[36]。为了深化对巨型噬菌体基因组的认识和理解, 今后需要进一步解析这些未知序列的功能, 这将有望揭示巨型噬菌体基因组中更多潜在的功能和机制, 从而为相关领域的研究提供新的视角和动力。

通过全基因组序列比对, 构建了宿主为大肠杆菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯氏菌等的部分巨型噬菌体的发育树, 结果显示拥有相同种属宿主菌且基因组大小相近的巨型噬菌体在发育关系上更为接近 (图 4)。随着巨型噬菌体基因组数据库的持续扩展, 可以利用比较基因组学和蛋白组学分析技术, 深入探索巨型噬菌体基因组的广泛多样性与复杂进化历程^[10,18-19,47]。

此外, 这些研究还进一步揭示了巨型噬菌体在抵抗 CRISPR-Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats-Cas) 等宿主防御系统方面的潜在能力^[48], 为理解噬菌体和宿主菌之间的相互作用与进化策略提供了新的视角。

3 巨型噬菌体的复制机制及相关特殊结构

与普通噬菌体一样, 巨型噬菌体为了成功复制, 必须精确调控宿主菌的基因表达^[19]。在感染宿主菌后, 噬菌体需迅速接管其生命活动, 以避免细菌的抗噬菌体防御系统, 并“劫持”细菌的所有胞内资源为己所用^[19]。目前, 虽已有众多研究揭示了噬菌体调节宿主菌以完成自身复制的多种机制^[49], 但对于巨型噬菌体的复制机制仍缺乏深入了解。此外, 相较于普通噬菌体, 巨型噬菌体展现出了更多不依赖于宿主菌的自主生命活动, 其基因组通常编码用于 mRNA 转录的 RNAP 和用于蛋白质翻译的 tRNA 等^[17]。以 ΦKZ 噬菌体为例, 它并不依赖宿主细胞的 RNAP 进行转录, 而是通过注入自身病毒颗粒所携带的 RNAP 来进行早期基因的转录^[50-53]。随后, ΦKZ 还会额外表达其 RNAP, 以支持后期的基因表达过程^[17]。然而, 并非所有巨型噬菌体都编码 RNAP, 有些仍依赖于宿主细胞的转录机制进行基因表达^[17], 这表明巨型噬菌体的复制过程具有多样性和复杂性。Gerovac 等^[54]通过整合生化、遗传和结构分析等多种研究方法, 在 ΦKZ 噬菌体中鉴定出一种丰富且保守的噬菌体因子 ΦKZ014, 该因子通过特异性结合 5S 核糖体 RNA 靶向宿主细胞的大核糖体亚基。ΦKZ014 不仅迅速促进噬菌体的复制, 还是感染后最早表达的 ΦKZ 蛋白之一, 且在整个翻译周期中 ΦKZ014 都与核糖体紧密结合, 从而确保噬菌体复制的高效进行^[54]。尽管

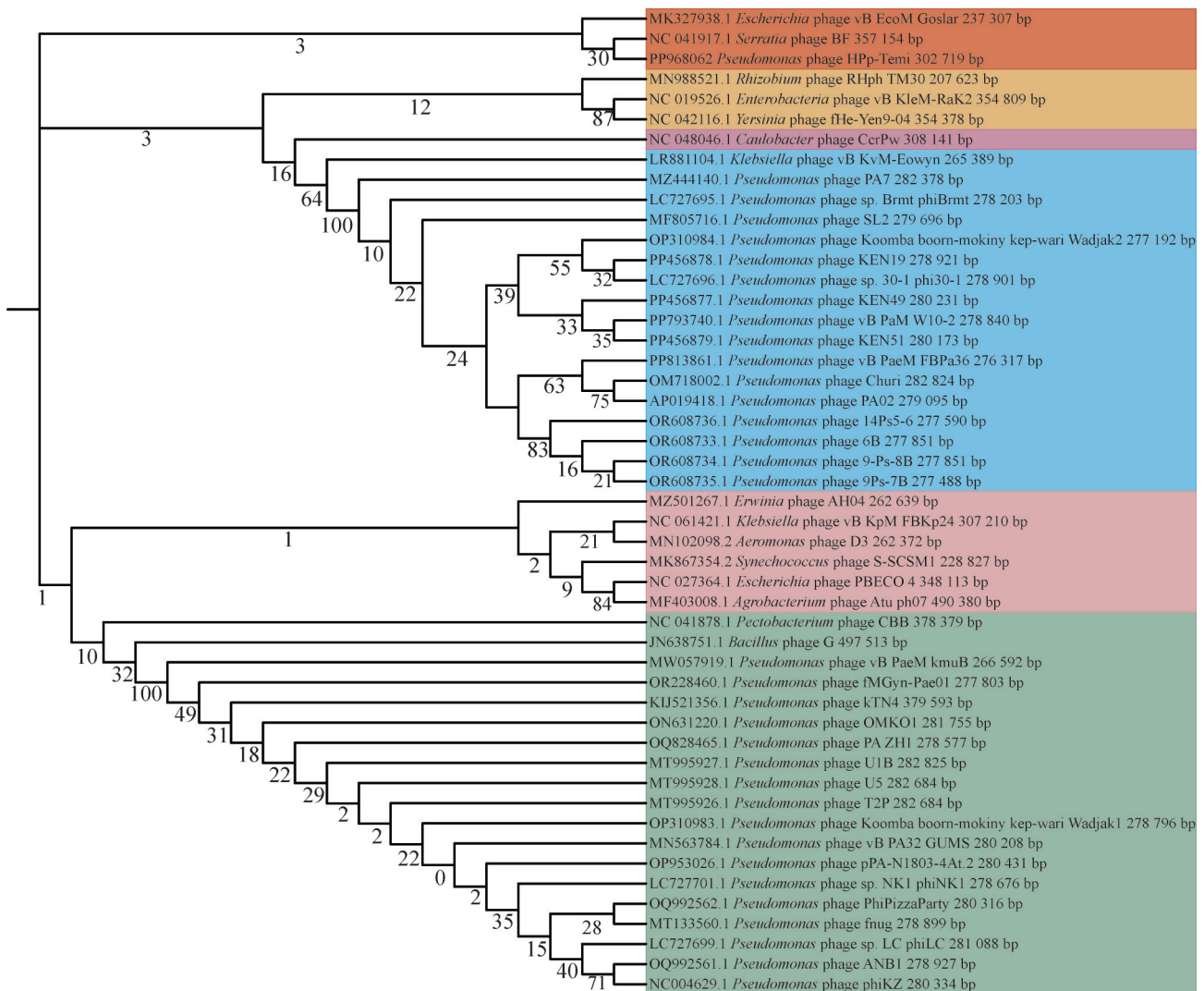


图4 巨型噬菌体的发育树

Figure 4 Phylogenetic tree of jumbo phages.

ΦKZ 是研究相对清楚的巨型噬菌体, 但对于巨型噬菌体复制机制的认识和理解仍需要更多、更深入的探索。

随着不同来源的巨型噬菌体被不断分离、鉴定与研究, 其丰富多样的生物学特性正逐步被揭示和解析。在目前已发现的巨型噬菌体中, 一些特殊的生物学特性引起了广泛关注。首先是巨型噬菌体在复制过程中可在宿主菌内部形成类似“细胞核”的核状区室, 这一独特结构对于理解噬菌体在感染细菌过程中的复制机制

具有重要意义^[17]。此外, 巨型噬菌体中还发现了一些其他特有结构, 如长波浪形卷曲尾丝和卷绕在噬菌体基因组 DNA 上的内体(inner body), 这些特有结构不仅丰富了我们对于巨型噬菌体的认识, 也为进一步探索其复制机制提供了重要线索^[17-19]。

3.1 巨型噬菌体的核状区室

噬菌体基因组在感染初期易受细菌防御系统的攻击, 而某些巨型噬菌体会组装一个基于蛋白质的核状区室来保护复制中的噬菌体 DNA。

2017年, Joe Pogliano 团队在研究噬菌体 201Φ2-1 感染细菌的过程中, 观察到一个核状 (nucleus-like) 结构的组装^[55-56]。使用荧光显微镜和冷冻电子断层扫描技术, 研究者发现该核状结构为噬菌体在宿主细菌中组装的一个蛋白质区室, 可将噬菌体 DNA 包裹起来^[56]。在后续研究中, 发现包括巨型噬菌体标准株 ΦKZ 在内的许多噬菌体都能在感染宿主菌过程中建立一个类似的核状区室^[56]。通过对这些噬菌体的基因组进行系统性测序和分析, 确定了成核噬菌体的保守基因, 并将这一类噬菌体作为一个新科命名为奇马利病毒科 (*Chimalliviridae*)^[46]。这类噬菌体均能在早期基因表达程序启动后, 形成一个蛋白质样的核状区室, 将噬菌体基因组 DNA 与宿主细胞质隔离开来, 进行基因组复制并继续其生命周期的其余部分, 最后裂解细菌释放子代噬菌体 (图 5)。这个核状区室的外壳主要由 ChmA 蛋白组成, 该蛋白在感染早期表达并自组装^[57]。在核状区室内, 由噬菌体编码的 RNAPs 进行转录, 而噬菌体编码的 DNA 聚合

酶则负责噬菌体基因组的复制^[57]。核状区室的外壳包含狭窄的孔道, 允许特定的细菌和噬菌体蛋白进入, 噬菌体 mRNA 也可通过孔道进入细菌细胞质, 并依赖宿主菌的翻译机制进行噬菌体蛋白的翻译^[57]。翻译好的噬菌体蛋白, 在宿主菌细胞质中组装成子代噬菌体的前衣壳 (图 5)。随后, 在噬菌体微管蛋白同系物 PhuZ 的协助下, 噬菌体基因组 DNA 包装到前衣壳中^[58-61]。然而, 这个辅助装配过程并非所有成核巨型噬菌体复制所必需^[17]。研究者还通过冷冻电镜观察到成核巨型噬菌体 ΦPA3 的核状区室结构被自组装的 2D 晶格包围^[62]。Enustun 等^[63]研究发现, 一种保守的噬菌体核状区室相关蛋白 ChmC 在噬菌体生命活动中起着重要作用, 它可能协助噬菌体 mRNA 通过核状结构, 从而确保后续病毒衣壳蛋白的翻译和组装。此项研究为成核噬菌体复制机制的解析提供了新的知识和重要线索。

核状区室结构不仅帮助成核巨型噬菌体完成复制, 还为噬菌体基因组提供了有效保护,

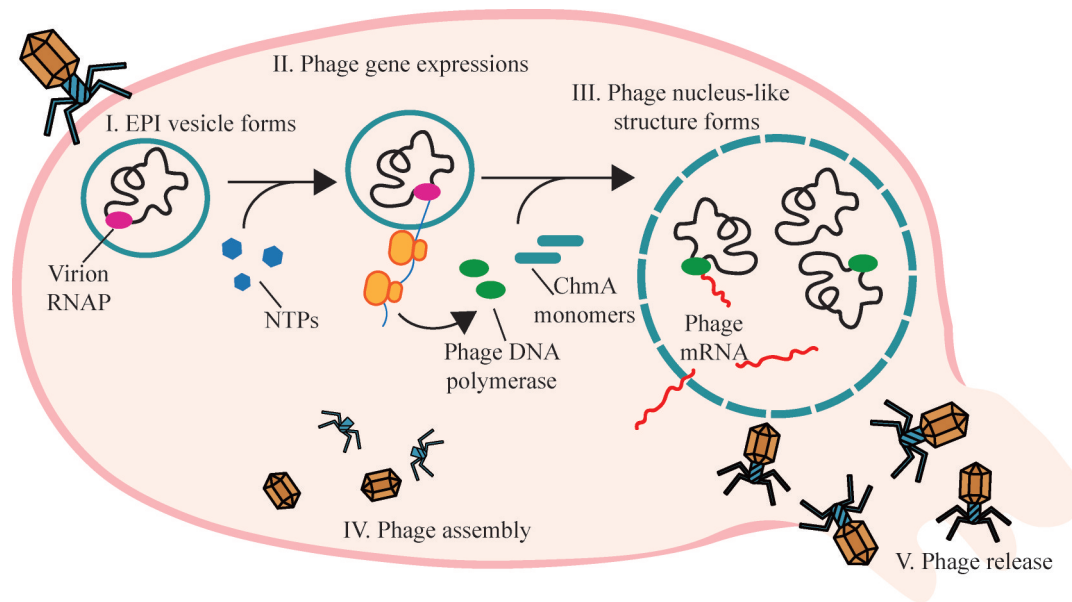


图5 成核巨型噬菌体感染宿主细菌过程示意图

Figure 5 Schematic diagram of the infection process of host bacteria by nucleus-forming jumbo phages.

使其免受靶向 DNA 的细菌防御系统的攻击(图 6)^[64]。例如, Bondy-Denomy 等^[65]在寻找能够抵抗细菌 CRISPR-Cas 防御系统的噬菌体过程中, 发现巨型噬菌体 Φ KZ 可通过构建核状区室将其基因组 DNA 与宿主菌的防御性核酸酶分离, 从而实现对许多靶向噬菌体 DNA 的防御机制的抵抗。其能抵抗的防御系统包括 Cas3、Cas9、Cas12a 等 CRISPR-Cas 系统的几种亚型以及限制性核酸内切酶 *HsdRMS* 和 *EcoR I* (图 6)^[66]。在噬菌体的整个感染过程中, Cas 蛋白和限制性内切酶都无法进入包裹噬菌体 DNA 的核状区室结构, 但通过将 *EcoR I* 与区室内部蛋白 ORF152 进行融合表达, 可使限制性内切酶进入核状区室, 从而靶向切割噬菌体 DNA 并保护宿主细胞(图 6)^[66]。此外, 成核噬菌体的 mRNA 会从核状区室结构中导出到宿主细胞质进行蛋白质翻译, 该研究发现 Φ KZ 噬菌体对靶向 RNA 的 Cas13a (type VI-A CRISPR-Cas 酶)敏感, 并利

用 Cas13a 成功实现了对 Φ KZ 噬菌体基因组的编辑(图 6)^[67]。Fineran 团队在沙雷氏菌(*Serratia*)成核巨型噬菌体 PCH45 中也发现了类似现象, 该噬菌体可逃避靶向 DNA 的 I 型 CRISPR-Cas 系统, 但对 III 型基于 RNA 的系统免疫敏感^[68]。2022 年, 该团队进一步研究证明 III 型系统通过识别噬菌体 mRNA 来激活依赖环三腺苷的辅助核酸酶 NucC, 被活化的 NucC 可降解细菌染色体, 从而触发细菌死亡, 同时破坏噬菌体的复制和成熟, 最终通过中止感染(abortive infection)实现对细菌群体的保护^[69]。Birkholz 等^[70]研究还表明, 成核巨型噬菌体 Φ PA3 和 Φ KZ 在共感染同一宿主菌时存在竞争。当 2 种噬菌体感染同一个细胞时, 可组装形成杂合的噬菌体核状区室结构^[71], 而 Φ PA3 基因组编码的内含子核酸内切酶 Gp210 可进入该杂合核状结构并切割 Φ KZ 基因组上的 *gp178* 基因, 从而干扰 Φ KZ 噬菌体的复制^[70]。

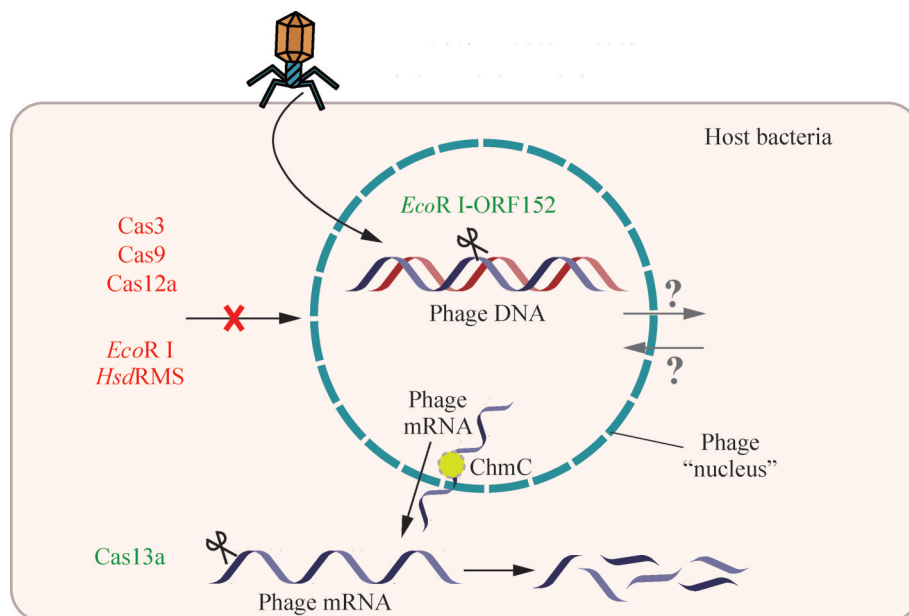


图6 成核巨型噬菌体对宿主防御系统的抵抗机制示意图

Figure 6 Schematic diagram of the resistance mechanisms of nucleus-forming jumbo phages to host defense systems.

以上研究表明, 这些核状区室可能最初是作为对抗细菌免疫系统的保护机制而演化出来的^[72]。真核细胞的病毒在复制过程中也会形成类似的区室结构^[73]。目前, 对噬菌体核状区室结构和功能的解析工作仍面临诸多挑战^[57,72,74-78], 对这些机制的深入研究, 不仅能为生命系统的进化理论增添新知, 更有望为开发新型抗菌疗法提供重要的科学支撑和实践指导。

3.2 巨型噬菌体复制相关的其他特殊结构

巨型噬菌体在复制过程中, 除了可形成核状区室外, 还拥有其他起重要作用的特殊结构, 如噬菌体内体、长波浪卷曲尾丝和膜囊泡等, 它们不仅有助于噬菌体基因组的包装, 还参与了宿主菌的识别以及其他关键过程^[19]。早在1984年, Krylov 等就在破裂的 Φ KZ 噬菌体病毒颗粒中观察到其衣壳蛋白内部包含一个独特的圆柱形结构, 并将其命名为“inner body”(内体)^[42]。这一结构宽约 24 nm、长约 105 nm, 呈现出类似弹簧的外观, 在噬菌体颗粒吸附到细菌后, 该结构会消失, 可能与基因组 DNA 一起被注射到宿主菌中^[42-43,79]。内体是 Φ KZ 样噬菌体的一个保守且必要的组成部分^[80-81]。研究表明, Φ KZ 噬菌体的内体由 6 种噬菌体蛋白(Gp89、Gp90、Gp93、Gp95、Gp97 和 Gp162)构成, 每种蛋白在噬菌体衣壳中都有多个拷贝^[45,82]。其中的 4 种蛋白(Gp90、Gp93、Gp95 和 Gp97)与噬菌体基因组 DNA 一起被注入到宿主菌中, 并在感染早期随 DNA 一起移动^[83-84]。目前, 内体在噬菌体感染细菌过程中的功能机制仍不清楚, 推测其可能具有多功能性, 不仅与 DNA 包装和注入有关, 还可能在噬菌体复制过程的其他方面发挥作用^[45]。在最近的一项研究中, Yakunina 等^[44]利用活细胞荧光显微镜成

像技术(live fluorescent microscopy)对宿主细胞内与荧光蛋白融合的“inner body”蛋白进行追踪定位, 发现蛋白质 Gp97 和 Gp162 在噬菌体头部成熟期间被纳入新的噬菌体头部, 而蛋白质 Gp90、Gp93 和 Gp95 可能在 DNA 包装前不久才被整合到噬菌体中。这一发现揭示了“inner body”蛋白在噬菌体生命周期中的动态变化过程。

除了内体, 巨型噬菌体的另一个特殊结构是在噬菌体 0305 Φ 8-36^[38-39] 和 vB_BpuM_BpSp^[40-41]中发现的长波浪卷曲尾丝。通过透射电子显微镜可以观察到 3 根卷曲的波浪状尾丝围绕在噬菌体基板附近(图 7)。噬菌体 vB_BpuM_BpSp 的卷尾纤维很长且具有潜在的柔韧性, 这可能使其能够快速识别细菌表面的受体分子, 从而提高感染宿主菌的几率^[41]。

此外, 成核噬菌体在感染宿主菌时还会形成早期噬菌体感染(early phage infection, EPI)囊泡(图 5), 该 EPI 囊泡将注入的噬菌体基因组核酸以膜结合的方式包裹起来以启动感染^[72]。研

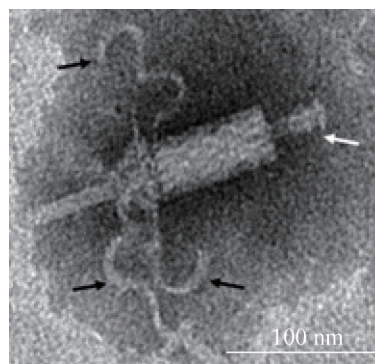


图7 噬菌体 vB_BpuM_BpSp 分离的尾部亚结构^[41]。黑色箭头表示卷曲的尾纤维, 白色箭头表示尾部和衣壳之间连接的接头。

Figure 7 Separated tail substructure of phage vB_BpuM_BpSp^[41]. The black arrow represents the curled tail fiber, and the white arrow represents the joint connecting the tail and the capsid.

究者推测, EPI 囊泡是在噬菌体注入核酸过程中从宿主菌细胞膜获取的, 且囊泡中的 DNA 可进行 RNA 转录, 但 EPI 囊泡形成的具体机制尚未被解析^[72]。这些早期感染功能很可能是由某些蛋白所介导的, 且这些蛋白很可能被包装进噬菌体衣壳, 并随噬菌体基因组 DNA 一起注入宿主菌中^[45,50,72]。噬菌体感染早期的膜结合中间体 EPI 囊泡的发现, 也解答了成核噬菌体如何在蛋白质核状区室形成之前保护其基因组免受宿主靶向 DNA 的防御系统攻击的问题^[85]。对这些特殊结构进行深入研究, 将有助于更全面地理解巨型噬菌体的复制机制, 为将来的科学研究和应用提供坚实的基础。

4 巨型噬菌体的应用

巨型噬菌体因其宿主谱广、复制周期独特、杀菌活性强等特性, 在抗病原菌感染、环境治理、水产养殖和生物防治等多个方面展现出良好的应用前景^[21,26,33,86-88]。例如, 2011 年, Monson 等^[89]鉴定了一株 Φ KZ-like 的巨型噬菌体 Φ PA3, 其基因组大小约为 309 kb, Φ PA3 具有广泛的宿主范围, 能够感染许多铜绿假单胞菌临床分离株和实验室菌株, 包括 PAK、PA14 以及 PAO1。2016 年, 研究人员使用一组包含 55 种不同来源的铜绿假单胞菌临床分离株, 验证了包括数种 Φ KZ-like 巨型噬菌体在内的不同组合噬菌体的裂解效果, 期望制备出针对铜绿假单胞菌的高效噬菌体制剂, 为临床抗感染治疗提供新的治疗策略。2020 年, Decewicz 等^[22]首次从污水中分离出可裂解条件致病菌苍白杆菌属 (*Ochrobactrum*) 的噬菌体 vB_OspM_OC 和 vB_OspP_OH, 其中 vB_OspM_OC 为基因组大小超过 277 kb 的巨型噬菌体。2022 年, Zhang 等^[91]从污水中分离出一种可裂解多种金黄色葡萄球菌株 (*Staphylococcus aureus*) 的新型巨型噬菌

体 vB_StaM_SA1, 该噬菌体可用于污水治理和作为抗感染治疗的候选噬菌体制剂。同年, Rai 等^[32]成功从临床样本和医院污水等多种环境中分离出 17 种具有不同活性和裂解效率的噬菌体, 其中包含 3 株巨型噬菌体, 对多株多重耐药铜绿假单胞菌均具有裂解能力, 且能有效抑制其生物被膜的形成, 因此可作为噬菌体治疗的候选药物。近年来, 越来越多的针对多重耐药菌感染的新型巨型噬菌体被分离鉴定出来^[23,25,92-93], 这为耐药菌的抗感染治疗提供了更多潜在的噬菌体候选者。

在环境治理方面, 巨型噬菌体同样展现出应用价值。比如, 2023 年 Hu 等^[24]成功从医院废水中分离并表征了 Φ Kp5130 和 Φ Kp9438 两种针对肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 的巨型噬菌体, 这 2 种噬菌体在环境中表现出较高的稳定性, 并对临床抗生素耐药性的肺炎克雷伯菌展现出强烈的裂解活性; 该研究表明, 采用巨型噬菌体混合物处理医院废水, 能显著减少肺炎克雷伯菌的数量。在水产养殖领域, 副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 诱发的急性肝胰腺坏死病 (acute hepatopancreatic necrosis disease, AHPND) 频繁暴发, 导致全球水产养殖业遭受重大损失, 巨型噬菌体疗法展现出作为替代抗生素方案以有效遏制病原菌污染的应用价值^[94]。2023 年, Thammatinna 等^[94]从 98 个海水样品中对潜在噬菌体进行了高通量筛选, 其中 2 株基因组大小约 239 kb 的成核巨型噬菌体 Eric 和 Ariel 对弧菌具有广泛的宿主谱, 可有效治理水产养殖中的弧菌污染。此外, 2018 年 Jacquemot 等^[95]从珊瑚礁中分离出几种新型溶珊瑚弧菌 (*Vibrio coralliilyticus*) 噬菌体, 其中包括一株基因组大小为 303 kb 的巨型噬菌体 BONAISHI, 其对几种溶珊瑚弧菌的致病菌株具有显著的裂解作用, 表明使用巨型噬菌体进行

生物防治是治理珊瑚中病原菌感染的一个有效方法。

随着对巨型噬菌体生物学特性的认识逐渐深化, 以及噬菌体分离鉴定技术、高通量测序技术和各种组学技术的不断发展和完善, 未来有望从医院环境和临床样本中分离出更多具有潜在应用价值的巨型噬菌体, 为基础研究和临床抗感染治疗提供更丰富、有良好应用价值的噬菌体资源。

5 总结与展望

近年来, 巨型噬菌体的发现与研究日益增多, 使我们对其生物学特性及基因组有了更为深入的了解。一些独特的生物学构造, 如核状区室、内体和长波浪卷曲尾丝等, 在不同巨型噬菌体的复制过程中被发现, 极大地丰富了我们对于噬菌体生物学多样性的认知。巨型噬菌体的基因组堪称遗传信息的宝库, 其中蕴含的丰富基因资源为探索生命科学的奥秘, 包括噬菌体多样性、基因组的进化等, 提供了更多可能性, 展现出巨大的研究潜力。尽管如此, 目前仍存在大量未被阐明的巨型噬菌体生物学机制, 如噬菌体如何精密调控宿主菌、其反防御系统的运作原理以及基因组中大量未知功能蛋白的分子特性等。未来相关研究将深化我们对巨型噬菌体与宿主菌相互作用的理解, 并为开发新型抗菌药物和治疗策略开辟新途径。

噬菌体疗法在解决耐药菌感染方面具有巨大潜力, 但仍面临许多挑战, 其中之一是细菌对抗噬菌体的防御系统^[96-97]。因此, 巨型噬菌体成为了一个理想的选择, 它们能在复制时构建起保护自身基因组的核状区室, 并在感染期间展现出对细菌防御系统(特别是那些攻击 DNA 的防御系统)的广泛抵抗力, 从而有效应对这一挑战^[98]。此外, 巨型噬菌体还被报道携带额外

的基因, 负责宿主溶解、基因组 DNA 复制和转录以及核苷酸代谢等, 从而减少对宿主菌的依赖, 并拥有比普通噬菌体更广泛的宿主谱^[18-19]。这些特点使巨型噬菌体成为噬菌体疗法中更为理想的选择。巨型噬菌体因其基因组大、容量大等特点, 在抗病原菌感染等领域具有更大的潜力和应用前景, 有望被研制成高效、广谱的噬菌体制剂, 服务于临床抗病原菌感染治疗^[98]。

尽管巨型噬菌体在抗病原菌感染等领域已展现出较大潜力, 但当前研究仍面临诸多限制和挑战。由于巨型噬菌体的研究起步较晚, 已分离的巨型噬菌体种类相对较少, 且基因组注释尚不完善, 机制解析仍停留在实验室研究阶段。这使得我们对巨型噬菌体的认识仍然有限, 无法充分发挥其潜在的应用价值。对于已分离出的巨型噬菌体, 其表征尚不全面。大量的 DNA 序列和假定蛋白编码基因的功能仍然未知, 这些编码不明功能的噬菌体蛋白是否存在潜在危害, 目前尚无法准确预测。这种不确定性不仅限制了巨型噬菌体在临床应用中的安全性评估, 也阻碍了其作为治疗制剂的进一步开发和利用。在技术层面, 操纵较常规噬菌体基因组更大的巨型噬菌体基因组仍存在瓶颈, 这限制了对巨型噬菌体的利用和改造。目前尚未见关于巨型噬菌体设计改造的报道, 但巨型噬菌体的基因组容量较大, 其基因组的删减和扩展都具有更大的改造空间。随着技术的深度融合与持续创新, 巨型噬菌体基因组改造的瓶颈有望被打破, 从而释放出更大的应用潜力。

因此, 为了解决当前面临的挑战并充分发挥巨型噬菌体的潜力, 需要进一步研究和探索新的技术手段, 继续深入研究和解析巨型噬菌体的生物学特性、基因组结构、功能机制及其在抗感染治疗中的应用前景。通过不断完善基因组注释、拓展巨型噬菌体的种类、解析生物

学机制和突破技术瓶颈，有望为耐药菌的临床抗感染治疗研制更加有效、安全的噬菌体制剂，推动噬菌体治疗的发展。

作者贡献声明

何博：文章撰写，绘制图 5、图 6，引用图 1、图 7；姜昕宇：文章审阅；廖江林：生物信息学统计分析，绘制图 3、图 4；卢曙光：文章审核与修改，整理相关数据并绘制图 2；乐率：综述选题及确定文章主旨和结构，文章修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] ZHANG C, FU XH, LIU YQ, ZHAO H, WANG GQ. Burden of infectious diseases and bacterial antimicrobial resistance in China: a systematic analysis for the global burden of disease study 2019[J]. *The Lancet Regional Health Western Pacific*, 2023, 43: 100972.
- [2] COLLABORATORS AR. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis[J]. *Lancet*, 2022, 399(10325): 629-655.
- [3] GBD 2019 Antimicrobial Resistance Collaborators. Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019[J]. *Lancet*, 2022, 400(10369): 2221-2248.
- [4] HATFULL GF, DEDRICK RM, SCHOOLEY RT. Phage therapy for antibiotic-resistant bacterial infections[J]. *Annual Review of Medicine*, 2022, 73: 197-211.
- [5] REARDON S. Phage therapy gets revitalized[J]. *Nature*, 2014, 510(7503): 15-16.
- [6] DION MB, OECHSLIN F, MOINEAU S. Phage diversity, genomics and phylogeny[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2020, 18(3): 125-138.
- [7] ZHAO LY, SHI Y, LAU HCH, LIU WX, LUO GW, WANG GP, LIU CG, PAN YS, ZHOU QM, DING YQ, SUNG JJY, YU J. Uncovering 1058 novel human enteric DNA viruses through deep long-read third-generation sequencing and their clinical impact[J]. *Gastroenterology*, 2022, 163(3): 699-711.
- [8] HENDRIX RW. Bacteriophage genomics[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2003, 6(5): 506-511.
- [9] DEVOTO AE, SANTINI JM, OLM MR, ANANTHARAMAN K, MUNK P, TUNG J, ARCHIE EA, TURNBAUGH PJ, SEED KD, BLEKHMEN R, AARESTRUP FM, THOMAS BC, BANFIELD JF. Megaphages infect *Prevotella* and variants are widespread in gut microbiomes[J]. *Nature Microbiology*, 2019, 4(4): 693-700.
- [10] AL-SHAYEB B, SACHDEVA R, CHEN LX, WARD F, MUNK P, DEVOTO A, CASTELLE CJ, OLM MR, BOUMA-GREGSON K, AMANO Y, HE C, MÉHEUST R, BROOKS B, THOMAS A, LAVY A, MATHEUS-CARNEVALI P, SUN C, GOLTSMAN DSA, BORTON MA, SHARRAR A, et al. Clades of huge phages from across Earth's ecosystems[J]. *Nature*, 2020, 578(7795): 425-431.
- [11] HENDRIX RW. Jumbo bacteriophages[M]//*Current Topics in Microbiology and Immunology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2009: 229-240.
- [12] KRYLOV VN, SMIRNOVA TA, REBENTISH BA, MINENKOVA IB. Structure of PhiKZ bacteriophage particles[J]. *Voprosy Virusologii*, 1978, 5: 568-571.
- [13] KRYLOV VN, ZHAZYKOV IZ. *Pseudomonas* bacteriophage phiKZ: possible model for studying the genetic control of morphogenesis[J]. *Genetika*, 1978, 14(4): 678-685.
- [14] GONZÁLEZ B, MONROE L, LI KP, YAN R, WRIGHT E, WALTER T, KIHARA D, WEINTRAUB ST, THOMAS JA, SERWER P, JIANG W. Phage G structure at 6.1 Å resolution, condensed DNA, and host identity revision to a *Lysinibacillus*[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2020, 432(14): 4139-4153.
- [15] DONELLI G, DORE E, FRONTALI C, GRANDOLFO ME. Structure and physico-chemical properties of bacteriophage G. III. A homogeneous DNA of molecular weight 5×10^8 [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1975, 94(4): 555-565.
- [16] SERWER P, HAYES SJ, THOMAS JA, HARDIES SC. Propagating the missing bacteriophages: a large bacteriophage in a new class[J]. *Virology Journal*, 2007, 4: 21.
- [17] HARDING KR, KYTE N, FINERAN PC. Jumbo phages[J]. *Current Biology*, 2023, 33(14): R750-R751.
- [18] M IYER L, ANANTHARAMAN V, KRISHNAN A, BURROUGHS AM, ARAVIND L. Jumbo phages: a comparative genomic overview of core functions and adaptations for biological conflicts[J]. *Viruses*, 2021, 13(1): 63.
- [19] YUAN YH, GAO MY. Jumbo bacteriophages: an overview[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 403.
- [20] SHKOPOROV AN, HILL C. Bacteriophages of the human gut: the "known unknown" of the microbiome[J]. *Cell Host & Microbe*, 2019, 25(2): 195-209.
- [21] ALEXIYUK P, BOGOYAVLENSKIY A, ALEXIYUK M, AKANOVA K, MOLDAKHANOV Y, BEREZIN V. Isolation and characterization of jumbo coliphage vB_EcoM_Lh1B as a promising therapeutic agent against chicken colibacillosis[J]. *Microorganisms*, 2023, 11(6): 1524.
- [22] DECEWICZ P, GOLEC P, SZYM CZAK M, RADLINSKA M, DZIEWIT L. Identification and characterization of the first virulent phages, including a

- novel jumbo virus, infecting *Ochrobactrum* spp. [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(6): 2096.
- [23] HOU YT, WU ZH, REN L, CHEN Y, ZHANG YA, ZHOU Y. Characterization and application of a lytic jumbo phage ZPAH34 against multidrug-resistant *Aeromonas hydrophila*[J]. Frontiers in Microbiology, 2023, 14: 1178876.
- [24] HU M, XING B, YANG MH, HAN R, PAN HZ, GUO H, LIU Z, HUANG T, DU K, JIANG SY, ZHANG Q, LU WJ, HUANG X, ZHOU CZ, LI JH, SONG WC, DENG ZQ, XIAO MF. Characterization of a novel genus of jumbo phages and their application in wastewater treatment[J]. iScience, 2023, 26(6): 106947.
- [25] JO D, KIM H, LEE Y, KIM J, RYU S. Characterization and genomic study of EJP2, a novel jumbo phage targeting antimicrobial resistant *Escherichia coli*[J]. Frontiers in Microbiology, 2023, 14: 1194435.
- [26] KANAIZUKA A, SASAKI R, MIYASHITA S, ANDO S, ITO K, FUKUHARA T, TAKAHASHI H. Isolation of *Burkholderia* jumbo phages and their utilization as biocontrol agents to suppress rice seedling rot disease[J]. Journal of General Plant Pathology, 2023, 89(1): 24-34.
- [27] KAWATO Y, ISTIQOMAH I, GAAFAR AY, HANAOKA M, ISHIMARU K, YASUIKE M, NISHIKI I, NAKAMURA Y, FUJIWARA A, NAKAI T. A novel jumbo *Tenacibaculum maritimum* lytic phage with head-fiber-like appendages[J]. Archives of Virology, 2020, 165(2): 303-311.
- [28] KWON J, KIM SG, KIM HJ, GIRI SS, KIM SW, LEE SB, PARK SC. Isolation and characterization of *Salmonella* jumbo-phage pSal-SNUABM-04[J]. Viruses, 2020, 13(1): 27.
- [29] MARQUIONI V, ROSSI FPN, MENDONÇA DC, MARTINS LF, BEHLAU F, SETUBAL JC, da SILVA AM, NOVO-MANSUR MTM. Isolation and characterization of vB_XciM_LucasX, a new jumbo phage that infects *Xanthomonas citri* and *Xanthomonas fuscans*[J]. PLoS One, 2022, 17(4): e0266891.
- [30] MOROZOVA V, BABKIN I, KOZLOVA Y, TIKUNOV A, USHAKOVA T, BARDASHEVA A, FEDORETS V, ZHIRAKOVSKAYA E, TIKUNOVA N. Isolation, characterization and genomic analysis of a novel jumbo phage, AerS₂₆₆, that infects *Aeromonas salmonicida*[J]. Microorganisms, 2023, 11(11): 2649.
- [31] NAKNAEN A, SUTTINUN O, SURACHAT K, KHAN E, POMWISED R. A novel jumbo phage PhiMa05 inhibits harmful *Microcystis* sp.[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 660351.
- [32] RAI P, SHETTY SS, PRABELL S, KUNTAR A, PINTO D, KUMAR BK, DIVYASHREE M, RAJ JRM, PREMANATH R, DEEKSHIT VK, KARUNASAGAR I, KARUNASAGAR I. Characterisation of broad-spectrum phiKZ-like jumbo phage and its utilisation in controlling multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates[J]. Microbial Pathogenesis, 2022, 172: 105767.
- [33] SASAKI R, MIYASHITA S, ANDO S, ITO K, FUKUHARA T, TAKAHASHI H. Isolation and characterization of a novel jumbo phage from leaf litter compost and its suppressive effect on rice seedling rot diseases[J]. Viruses, 2021, 13(4): 591.
- [34] OVERBEEK R, FONSTEIN M, D' SOUZA M, PUSCH GD, MALTSEV N. The use of gene clusters to infer functional coupling[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999, 96(6): 2896-2901.
- [35] PETROV VM, NOLAN JM, BERTRAND C, LEVY D, DESPLATS C, KRISCH HM, KARAM JD. Plasticity of the gene functions for DNA replication in the T4-like phages[J]. Journal of Molecular Biology, 2006, 361(1): 46-68.
- [36] MESYANZHINOV VV, ROBBEN J, GRYPONPREZ B, KOSTYUCHENKO VA, BOURKALTSEVA MV, SYKILINDA NN, KRYLOV VN, VOLCKAERT G. The genome of bacteriophage phiKZ of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Journal of Molecular Biology, 2002, 317(1): 1-19.
- [37] SKURNIK M, HYYTIÄINEN HJ, HAPPONEN LJ, KILJUNEN S, DATTA N, MATTINEN L, WILLIAMSON K, KRISTO P, SZELIGA M, KALINMÄNTTÄRI L, AHOLA-IIVARINEN E, KALKKINEN N, BUTCHER SJ. Characterization of the genome, proteome, and structure of yersiniophage φR1-37[J]. Journal of Virology, 2012, 86(23): 12625-12642.
- [38] HARDIES SC, THOMAS JA, SERWER P. Comparative genomics of *Bacillus thuringiensis* phage 0305phi8-36: defining patterns of descent in a novel ancient phage lineage[J]. Virology Journal, 2007, 4: 97.
- [39] THOMAS JA, HARDIES SC, ROLANDO M, HAYES SJ, LIEMAN KR, CARROLL CA, WEINTRAUB ST, SERWER P. Complete genomic sequence and mass spectrometric analysis of highly diverse, atypical *Bacillus thuringiensis* phage 0305phi8-36[J]. Virology, 2007, 368(2): 405-421.
- [40] YUAN YH, GAO MY. Proteomic analysis of a novel *Bacillus* jumbo phage revealing glycoside hydrolase as structural component[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 745.
- [41] YUAN YH, GAO MY. Characteristics and complete genome analysis of a novel jumbo phage infecting pathogenic *Bacillus pumilus* causing ginger rhizome rot disease[J]. Archives of Virology, 2016, 161(12): 3597-3600.
- [42] KRYLOV VN, SMIRNOVA TA, MINENKOVA IB, PLOTNIKOVA TG, ZHAZIKOV IZ, KHRENOVA EA. *Pseudomonas* bacteriophage contains an inner body in its capsid[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1984, 30(6): 758-762.
- [43] WU WM, THOMAS JA, CHENG NQ, BLACK LW, STEVEN AC. Bubblegrams reveal the inner body of bacteriophage φKZ[J]. Science, 2012, 335(6065): 182.
- [44] NICHIPORENKO A, ANTONOVA D, KURDYUMOVA I, KHODORKOVSKII M, YAKUNINA MV. Assembly of phiKZ bacteriophage inner body during infection[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2024, 693: 149372.
- [45] THOMAS JA, WEINTRAUB ST, WU WM, WINKLER DC, CHENG NQ, STEVEN AC, BLACK LW. Extensive

- proteolysis of head and inner body proteins by a morphogenetic protease in the giant *Pseudomonas aeruginosa* phage ϕ KZ[J]. *Molecular Microbiology*, 2012, 84(2): 324-339.
- [46] PRICHARD A, LEE JN, LAUGHLIN TG, LEE A, THOMAS KP, SY AE, SPENCER T, ASAVAVIMOL A, CAFFERATA A, CAMERON M, CHIU N, DAVYDOV D, DESAI I, DIAZ G, GUERCA M, HEARST K, HUANG LY, JACOBS E, JOHNSON A, KAHN S, et al. Identifying the core genome of the nucleus-forming bacteriophage family and characterization of *Erwinia* phage RAY[J]. *Cell Reports*, 2023, 42(5): 112432.
- [47] JANG HB, FAGUTAO FF, NHO SW, PARK SB, CHA IS, YU JE, LEE JS, IM SP, AOKI T, JUNG TS. Phylogenomic network and comparative genomics reveal a diverged member of the Φ KZ-related group, marine vibrio phage Φ JM-2012[J]. *Journal of Virology*, 2013, 87(23): 12866-12878.
- [48] MAGAR S, KOLTE V, SHARMA G, GOVINDARAJAN S. Exploring pangenomic diversity and CRISPR-Cas evasion potential in jumbo phages: a comparative genomics study[J]. *Microbiology Spectrum*, 2024, 12(10): e0420023.
- [49] LE S, WEI LL, WANG J, TIAN F, YANG Q, ZHAO JR, ZHONG ZJ, LIU JZ, HE XS, ZHONG Q, LU SG, LIANG HH. Bacteriophage protein DapI regulates evasion of antiphage immunity and *Pseudomonas aeruginosa* virulence impacting phage therapy in mice[J]. *Nature Microbiology*, 2024, 9(7): 1828-1841.
- [50] CEYSSENS PJ, MINAKHIN L, van den BOSSCHE A, YAKUNINA M, KLIMUK E, BLASDEL B, de SMET J, NOBEN JP, BLÄSI U, SEVERINOV K, LAVIGNE R. Development of giant bacteriophage ϕ KZ is independent of the host transcription apparatus[J]. *Journal of Virology*, 2014, 88(18): 10501-10510.
- [51] YAKUNINA M, ARTAMONOVA T, BORUKHOV S, MAKAROVA KS, SEVERINOV K, MINAKHIN L. A non-canonical multisubunit RNA polymerase encoded by a giant bacteriophage[J]. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43(21): 10411-10420.
- [52] OREKHOVA M, KORESHOVA A, ARTAMONOVA T, KHODORKOVSKII M, YAKUNINA M. The study of the ϕ KZ phage non-canonical non-virion RNA polymerase[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2019, 511(4): 759-764.
- [53] SOKOLOVA ML, MISOVETC I, SEVERINOV KV. Multisubunit RNA polymerases of jumbo bacteriophages[J]. *Viruses*, 2020, 12(10): 1064.
- [54] GEROVAC M, CHIHARA K, WICKE L, BÖTTCHER B, LAVIGNE R, VOGEL J. Phage proteins target and co-opt host ribosomes immediately upon infection[J]. *Nature Microbiology*, 2024, 9(3): 787-800.
- [55] THOMAS JA, ROLANDO MR, CARROLL CA, SHEN PS, BELNAP DM, WEINTRAUB ST, SERWER P, HARDIES SC. Characterization of *Pseudomonas chlororaphis* myovirus 201varphi2-1 via genomic sequencing, mass spectrometry, and electron microscopy[J]. *Virology*, 2008, 376(2): 330-338.
- [56] CHAIKEERATISAK V, NGUYEN K, KHANNA K, BRILOT AF, ERB ML, COKER JKC, VAVILINA A, NEWTON GL, BUSCHAUER R, POGLIANO K, VILLA E, AGARD DA, POGLIANO J. Assembly of a nucleus-like structure during viral replication in bacteria[J]. *Science*, 2017, 355(6321): 194-197.
- [57] LAUGHLIN TG, DEEP A, PRICHARD AM, SEITZ C, GU YJ, ENUSTUN E, SUSLOV S, KHANNA K, BIRKHOLZ EA, ARMBRUSTER E, McCAMMON JA, AMARO RE, POGLIANO J, CORBETT KD, VILLA E. Architecture and self-assembly of the jumbo bacteriophage nuclear shell[J]. *Nature*, 2022, 608(7922): 429-435.
- [58] KRAEMER JA, ERB ML, WADDLING CA, MONTABANA EA, ZEHR EA, WANG H, NGUYEN K, PHAM DSL, AGARD DA, POGLIANO J. A phage tubulin assembles dynamic filaments by an atypical mechanism to center viral DNA within the host cell[J]. *Cell*, 2012, 149(7): 1488-1499.
- [59] ZEHR EA, KRAEMER JA, ERB ML, COKER JKC, MONTABANA EA, POGLIANO J, AGARD DA. The structure and assembly mechanism of a novel three-stranded tubulin filament that centers phage DNA[J]. *Structure*, 2014, 22(4): 539-548.
- [60] CHAIKEERATISAK V, BIRKHOLZ EA, POGLIANO J. The phage nucleus and PhuZ spindle: defining features of the subcellular organization and speciation of nucleus-forming jumbo phages[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 641317.
- [61] CHAIKEERATISAK V, KHANNA K, NGUYEN KT, SUGIE J, EGAN ME, ERB ML, VAVILINA A, NONEJUIE P, NIEWEGLAWSKA E, POGLIANO K, AGARD DA, VILLA E, POGLIANO J. Viral capsid trafficking along treadmilling tubulin filaments in bacteria[J]. *Cell*, 2019, 177(7): 1771-1780.e12.
- [62] NIEWEGLAWSKA ES, BRILOT AF, MÉNDEZ-MORAN M, KOKONTIS C, BAEK M, LI JR, CHENG YF, BAKER D, BONDY-DENOMY J, AGARD DA. The ϕ PA3 phage nucleus is enclosed by a self-assembling 2D crystalline lattice[J]. *Nature Communications*, 2023, 14: 927.
- [63] ENUSTUN E, ARMBRUSTER EG, LEE JN, ZHANG ST, YEE BA, MALUKHINA K, GU YJ, DEEP A, NARITOMI JT, LIANG QS, AIGNER S, ADLER BA, CRESS BF, DOUDNA JA, CHAIKEERATISAK V, CLEVELAND DW, GHASSEMIAN M, BINTU B, YEO GW, POGLIANO J, et al. A phage nucleus-associated RNA-binding protein is required for jumbo phage infection[J]. *Nucleic Acids Research*, 2024, 52(8): 4440-4455.
- [64] MODELL AE, SIRIWARDENA SU, CHOUDHARY A. A jumbo phage forms a nucleus-like compartment to evade bacterial defense systems[J]. *Biochemistry*, 2020, 59(20): 1869-1870.
- [65] BONDY-DENOMY J, PAWLUK A, MAXWELL KL, DAVIDSON AR. Bacteriophage genes that inactivate the CRISPR/Cas bacterial immune system[J]. *Nature*, 2013, 493(7432): 429-432.
- [66] MENDOZA SD, NIEWEGLAWSKA ES, GOVINDARAJAN S, LEON LM, BERRY JD, TIWARI

- A, CHAIKEERATISAK V, POGLIANO J, AGARD DA, BONDY-DENOMY J. A bacteriophage nucleus-like compartment shields DNA from CRISPR nucleases[J]. *Nature*, 2020, 577(7789): 244-248.
- [67] GUAN JW, OROMÍ-BOSCH A, MENDOZA SD, KARAMBELKAR S, BERRY JD, BONDY-DENOMY J. Bacteriophage genome engineering with CRISPR-Cas13a[J]. *Nature Microbiology*, 2022, 7(12): 1956-1966.
- [68] MALONE LM, WARRING SL, JACKSON SA, WARNECKE C, GARDNER PP, GUMY LF, FINERAN PC. A jumbo phage that forms a nucleus-like structure evades CRISPR-Cas DNA targeting but is vulnerable to type III RNA-based immunity[J]. *Nature Microbiology*, 2020, 5(1): 48-55.
- [69] MAYO-MUÑOZ D, SMITH LM, GARCIA-DOVAL C, MALONE LM, HARDING KR, JACKSON SA, HAMPTON HG, FAGERLUND RD, GUMY LF, FINERAN PC. Type III CRISPR-Cas provides resistance against nucleus-forming jumbo phages *via* abortive infection[J]. *Molecular Cell*, 2022, 82(23): 4471-4486.e9.
- [70] BIRKHOLZ EA, MORGAN CJ, LAUGHLIN TG, LAURK, PRICHARD A, RANGARAJAN S, MEZA GN, LEE JN, ARMBRUSTER E, SUSLOV S, POGLIANO K, MEYER JR, VILLA E, CORBETT KD, POGLIANO J. An intron endonuclease facilitates interference competition between coinfecting viruses[J]. *Science*, 2024, 385(6704): 105-112.
- [71] CHAIKEERATISAK V, BIRKHOLZ EA, PRICHARD AM, EGAN ME, MYLVARA A, NONEJUIE P, NGUYEN KT, SUGIE J, MEYER JR, POGLIANO J. Viral speciation through subcellular genetic isolation and virogenesis incompatibility[J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 342.
- [72] ARMBRUSTER EG, LEE J, HUTCHINGS J, VANDERWAL AR, ENUSTUN E, ADLER BA, AINDOW A, DEEP A, RODRIGUEZ ZK, MORGAN CJ, GHASSEMIAN M, CHARLES E, CRESS BF, SAVAGE DF, DOUDNA JA, POGLIANO K, CORBETT KD, VILLA E, POGLIANO J. Sequential membrane- and protein-bound organelles compartmentalize genomes during phage infection[J]. *bioRxiv*, 2023. DOI: 10.1101/2023.09.20.558163.
- [73] KNIPE DM, PRICHARD A, SHARMA S, POGLIANO J. Replication compartments of eukaryotic and bacterial DNA viruses: common themes between different domains of host cells[J]. *Annual Review of Virology*, 2022, 9(1): 307-327.
- [74] CHAIKEERATISAK V, NGUYEN K, EGAN ME, ERB ML, VAVILINA A, POGLIANO J. The phage nucleus and tubulin spindle are conserved among large *Pseudomonas* phages[J]. *Cell Reports*, 2017, 20(7): 1563-1571.
- [75] BIRKHOLZ EA, LAUGHLIN TG, ARMBRUSTER E, SUSLOV S, LEE JN, WITTMANN J, CORBETT KD, VILLA E, POGLIANO J. A cytoskeletal vortex drives phage nucleus rotation during jumbo phage replication in *E. coli*[J]. *Cell Reports*, 2022, 40(7): 111179.
- [76] CHAIKEERATISAK V, KHANNA K, NGUYEN KT, EGAN ME, ENUSTUN E, ARMBRUSTER E, LEE JN, POGLIANO K, VILLA E, POGLIANO J. Subcellular organization of viral particles during maturation of nucleus-forming jumbo phage[J]. *Science Advances*, 2022, 8(18): eabj9670.
- [77] ENUSTUN E, DEEP A, GU YJ, NGUYEN KT, CHAIKEERATISAK V, ARMBRUSTER E, GHASSEMIAN M, VILLA E, POGLIANO J, CORBETT KD. Identification of the bacteriophage nucleus protein interaction network[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2023, 30(11): 1653-1662.
- [78] MORGAN CJ, ENUSTUN E, ARMBRUSTER EG, BIRKHOLZ EA, PRICHARD A, FORMAN T, AINDOW A, WANNASRICHAN W, PETERS S, INLOW K, SHEPHERD IL, RAZAVILAR A, CHAIKEERATISAK V, ADLER BA, CRESS BF, DOUDNA JA, POGLIANO K, VILLA E, CORBETT KD, POGLIANO J. An essential and highly selective protein import pathway encoded by nucleus-forming phage[J]. *bioRxiv*, 2024. DOI: 2024.03.21.585822.
- [79] FOKINE A, KOSTYUCHENKO VA, EFIMOV AV, KUROCHKINA LP, SYKILINDA NN, ROBBEN J, VOLCKAERT G, HOENGER A, CHIPMAN PR, BATTISTI AJ, ROSSMANN MG, MESYANZHINOV VV. A three-dimensional cryo-electron microscopy structure of the bacteriophage phiKZ head[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2005, 352(1): 117-124.
- [80] KRYLOV VN, DELA CRUZ DM, HERTVELDT K, ACKERMANN HW. “φKZ-like viruses”, a proposed new genus of myovirus bacteriophages[J]. *Archives of Virology*, 2007, 152(10): 1955-1959.
- [81] SOKOLOVA OS, SHABUROVA OV, PECHNIKOVA EV, SHAYTAN AK, KRYLOV SV, KISELEV NA, KRYLOV VN. Genome packaging in EL and Lin68, two giant phiKZ-like bacteriophages of *P. aeruginosa*[J]. *Virology*, 2014, 468: 472-478.
- [82] THOMAS JA, BLACK LW. Mutational analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* myovirus KZ morphogenetic protease gp175[J]. *Journal of Virology*, 2013, 87(15): 8713-8725.
- [83] FOSSATI A, MOZUMDAR D, KOKONTIS C, MÉNDEZ-MORAN M, NIEWEGLAWSKA E, PELIN A, LI YP, GUO B, KROGAN NJ, AGARD DA, BONDY-DENOMY J, SWANEY DL. Next-generation proteomics for quantitative Jumbophage-bacteria interaction mapping[J]. *Nature Communications*, 2023, 14(1): 5156.
- [84] LI YP, GUAN J, HAREENDRANATH S, CRAWFORD E, AGARD D, MAKAROVA K, KOONIN E, BONDY-DENOMY J. A family of novel immune systems targets early infection of nucleus-forming jumbo phages[J]. *bioRxiv*, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1101/2022.09.17.508391>.
- [85] RODRIGUEZ ZK, LAUGHLIN TG, VANDERWAL A, AINDOW A, RAZAVILAR A, PRICHARD AM, LEE JN, ARMBRUSTER E, POGLIANO J, VILLA E. Investigating the early stages of infection of nucleus-forming jumbo phage[J]. *Biophysical Journal*, 2023, 122(3): 414a.
- [86] ATTAI H, BOON M, PHILLIPS K, NOBEN JP, LAVIGNE R, BROWN PJB. Larger than life: isolation and genomic characterization of a jumbo phage that

- infects the bacterial plant pathogen, *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1861.
- [87] THANKI AM, BROWN N, MILLARD AD, CLOKIE MRJ. Genomic characterization of jumbo *Salmonella* phages that effectively target United Kingdom pig-associated *Salmonella* serotypes[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1491.
- [88] KRYLOV V. Bacteriophages of *Pseudomonas aeruginosa*: long-term prospects for use in phage therapy[J]. *Advances in Virus Research*, 2014, 88: 227-278.
- [89] MONSON R, FOULDS I, FOWERAKER J, WELCH M, SALMOND GPC. The *Pseudomonas aeruginosa* generalized transducing phage phiPA3 is a new member of the phiKZ-like group of 'jumbo' phages, and infects model laboratory strains and clinical isolates from cystic fibrosis patients[J]. *Microbiology*, 2011, 157(Pt 3): 859-867.
- [90] PLETENEVA EA, SHABUROVA OV, BURKALTSEVA MV, KRYLOV SV, KAPLAN AM, CHESNOKOVA EN, POLYGACH OA, VOROSHILOVA NN, MIKHAILOVA NA, ZVEREV VV, KRYLOV VN. Novel approach to composition of, bacteriophage mixtures for antibacterial therapy[J]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii*, 2016, 5: 3-11.
- [91] ZHANG BY, SUN HZ, ZHAO FY, WANG Q, PAN Q, TONG YG, REN HY. Characterization and genomic analysis of a novel jumbo bacteriophage vB_StaM_SA1 infecting *Staphylococcus aureus* with two lysins[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 856473.
- [92] GÜEMES AGC, GHATBALE P, BLANC AN, MORGAN CJ, GARCIA A, LEONARD J, HUANG LN, KOVALICK G, PROOST M, CHIU M, KUO PT, OH J, KARTHIKEYAN S, KNIGHT R, POGLIANO J, SCHOOLEY RT, PRIDE DT. Jumbo phages are active against extensively drug-resistant eyedrop-associated *Pseudomonas aeruginosa* infections[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2023, 67(12): e0065423.
- [93] IMAM M, ALRASHID B, PATEL F, DOWAH ASA, BROWN N, MILLARD A, CLOKIE MRJ, GALYOV EE. vB_PaeM_MIJ3, a novel jumbo phage infecting *Pseudomonas aeruginosa*, possesses unusual genomic features[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 2772.
- [94] THAMMATINNA K, SINPRASERTPORN A, NAKNAEN A, SAMERNATE T, NUANPIROM J, CHANWONG P, SOMBOONWIWAT K, POGLIANO J, SATHAPONDECHA P, THAWONSUWAN J, NONEJUIE P, CHAIKEERATISAK V. Nucleus-forming vibriophage cocktail reduces shrimp mortality in the presence of pathogenic bacteria[J]. *Scientific Reports*, 2023, 13(1): 17844.
- [95] JACQUEMOT L, BETTAREL Y, MONJOL J, CORRE E, HALARY S, DESNUES C, BOUVIER T, FERRIER-PAGÈS C, BAUDOUX AC. Therapeutic potential of a new jumbo phage that infects *Vibrio coralliilyticus*, a widespread coral pathogen[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2501.
- [96] SMITH WPJ, WUCHER BR, NADELL CD, FOSTER KR. Bacterial defences: mechanisms, evolution and antimicrobial resistance[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2023, 21(8): 519-534.
- [97] KORTRIGHT KE, CHAN BK, KOFF JL, TURNER PE. Phage therapy: a renewed approach to combat antibiotic-resistant bacteria[J]. *Cell Host & Microbe*, 2019, 25(2): 219-232.
- [98] GUAN JW, BONDY-DENOMY J. Intracellular organization by jumbo bacteriophages[J]. *Journal of Bacteriology*, 2020, 203(2): e00362-20.