

分类号: 9832.61+1
研究生学号: 2013851008

单位代码: 10183
密 级: 公 开

吉 林 大 学

博 士 学 位 论 文

蔡若鹏

2019年12月



噬菌体 GH-K3 的生物学特性及其诱导肺炎克雷伯菌
产生噬菌体抗性的机制

Biological characteristics of phage GH-K3 and the
mechanism of inducing phage resistance
in *Klebsiella pneumoniae*

作者姓名：蔡若鹏

专业名称：预防兽医学

研究方向：兽医分子免疫学及病原微生物学

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：2019 年 12 月 3 日

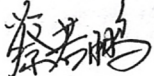
授予学位日期： 年 月 日

答辩委员会组成：

	姓 名	职 称	工作单位
主席	祁克宗	教 授	安徽农业大学
委员	扈荣良	研究员	军事医学科学院军事兽医研究所
	张西臣	教 授	吉林大学
	王新平	教 授	吉林大学
	于 录	研究员	吉林大学
	杨勇军	教 授	吉林大学
	卢士英	研究员	吉林大学

吉林大学博士学位论文原创性声明

本人郑重声明：所呈交学位论文，是本人在指导教师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

学位论文作者签名：

日期：2019年12月9日

本研究由“国家自然科学基金”
(No. 31502103 和 No. 31572553) 和国家重点研发计划
(2017YFD0501000) 资助

**This research was supported by the National Natural
Science Foundation (No. 31502103 and No. 31572553) and
National key research and development program
(2017YFD0501000) of China**

中文摘要

噬菌体 GH-K3 的生物学特性及其诱导肺炎克雷伯菌产生噬菌体抗性的机制

肺炎克雷伯菌作为一种重要的医院和社区获得性机会致病菌，通常会引发各种类型的感染，尤其是 K1 和 K2 血清型高毒力菌株给人类公共卫生事业和动物的健康养殖带来严重的威胁。由于抗生素的滥用，以产碳青霉烯酶和产超广谱 β -内酰胺酶为代表的多重耐药肺炎克雷伯菌菌株不断出现，特别是近年来产碳青霉烯酶高毒力菌株的出现，给肺炎克雷伯菌感染的治疗带来了更为严峻的挑战。

噬菌体疗法作为抗生素的替代或补充疗法，被视为多重耐药肺炎克雷伯菌感染的重要解决方案之一。然而，像很多其他细菌一样，肺炎克雷伯菌在被噬菌体裂解的过程中也会发生针对噬菌体的抗性突变，极大地限制了噬菌体治疗的应用。近年研究人员针对噬菌体对宿主细菌的识别以及细菌抵抗噬菌体侵染的机制已取得丰硕的研究成果，但关于肺炎克雷伯菌的相关研究却比较缺乏。本课题组之前的研究也发现，宿主细菌 *K. pneumoniae* K7 (K2 血清型) 在与噬菌体 GH-K3 互作的过程当中很容易产生噬菌体抗性突变菌株，但其发生的机理还尚不清楚。肺炎克雷伯菌的噬菌体抗性产生机制的揭示，对提高噬菌体对肺炎克雷伯菌感染的治疗效果具有重要的参考价值。因此，本研究旨在揭示噬菌体 GH-K3 诱导 *K. pneumoniae* K7 产生噬菌体抗性的机制。

本研究首先对噬菌体 GH-K3 的宿主谱、一步生长曲线等生物学特性进行了研究，并对该噬菌体的全基因组进行测序和生物信息学分析。结果表明，噬菌体 GH-K3 隶属于长尾噬菌体家族，爆发量为 291 PFU/细胞。该噬菌体的基因组长度为 49427 bp，总共含有 77 个开放阅读框 (Open Reading Frame, ORF)，与 13 种噬菌体具有高度的核苷酸序列相似性和紧密的进化关系。上述数据比较全面地揭示了噬菌体 GH-K3 的生物学特性，为后续该噬菌体诱导宿主细菌产生噬菌体抗性的研究奠定了良好的基础。

后续本研究对肺炎克雷伯菌的噬菌体抗性产生机制展开探索。研究表明，*K. pneumoniae* K7 在 GH-K3 的压力下所衍生的噬菌体抗性突变菌株几乎都拥有

粗糙的菌落形态。通过菌液离心试验、扫描电子显微镜观察以及噬菌体吸附试验证实以 *K. pneumoniae* K7R^R 为代表的菌落形态“粗糙型”突变菌株的多糖吸附受体发生缺失突变，这与过去的文献报道一致。另外，本研究还意外发现极少数突变菌株具有“大而光滑”的菌落形态，将其命名为 *K. pneumoniae* K7R^B。K7R^B 的噬菌体抗性与表面多糖无关，但可能与蛋白吸附受体的缺失有关，对于肺炎克雷伯菌来说，这是一种新型的噬菌体抗性产生方式。虽然肺炎克雷伯菌表面多糖对于 GH-K3 的募集具有主导作用，但是细菌表面蛋白受体可能才是该噬菌体侵染宿主的决定性因素。上述数据所揭示的肺炎克雷伯菌抵抗噬菌体侵染的过程仅限于噬菌体吸附阶段，进一步说明了该细菌拥有“多糖-蛋白”两级受体吸附模式的可能性。

为了阐明肺炎克雷伯菌对 GH-K3 的噬菌体抗性的产生机制，本研究针对 *K. pneumoniae* K7R^R 和 K7R^B 分别展开试验。阿尔新蓝染色的结果证实，K7R^R 的荚膜多糖（Capsular Polysaccharide, CPS）合成存在严重障碍。另外，银染的结果则表明该突变菌株的脂多糖（Lipopolysaccharide, LPS）组分未发生明显变化，从而确定 GH-K3 的初级吸附受体成分为 CPS 而不是 LPS。与 K7 相比，K7R^R 在全基因组水平上并未发生基因突变。液相色谱-串联质谱（Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry, LC-MS-MS）分析表明，该突变菌株中三种由荚膜多糖合成相关基因簇（Capsular Polysaccharide Synthesis, *cps*）编码的葡糖基转移酶（Glucosyltransferases）——GT-1、GT-2 和 *WcaJ* 的丰度剧烈下调。进一步研究发现，单独缺失 *GT-1*、*GT-2* 和 *wcaJ* 任意一个基因均导致细菌 CPS 合成障碍并伴随着 GH-K3 敏感性的丧失，表明这三种葡糖基转移酶均参与了维持细菌对噬菌体敏感性的过程。然而，拥有高分子量 CPS 残基 (> 250 kDa) 的 K7 ($\Delta GT-1$) 和 K7 ($\Delta wcaJ$) 仍然可以被一部分 GH-K3 吸附，表明 *GT-1* 或 *wcaJ* 的缺失可能使 CPS 残基保留了一定的噬菌体结合位点。因此，上述数据表明 K7R^R 的噬菌体抗性突变及其粗糙的菌落形态与三个葡糖基转移酶——GT-1、GT-2 和 *WcaJ* 表达抑制所导致的 CPS 合成障碍有关。

为了揭示 *K. pneumoniae* K7R^B 的噬菌体抗性产生机制，本研究分析了该突变菌株与 K7 之间的序列差异基因和差异表达蛋白。事实上，K7R^B 中 *ompC* 基因的第 711 位碱基“T”和第 712 位碱基“A”之间比野生型菌株少一个“G”，这是

该突变菌株唯一的基因突变位点。LC-MS-MS 分析则表明, 在 K7 与 K7R^B 之间的差异表达蛋白中, K7R^B 中的四个外膜蛋白——OmpC、OmpN、KPN_02430 和 OmpF 存在极为明显的表达抑制现象。基因回补试验表明, 只有过表达 *ompC* 的 K7R^B 可被 GH-K3 所裂解。相比之下, K7 中 *ompC* 的第 712 位碱基缺失可引发 OmpC 表达抑制, 从而导致该菌株对 GH-K3 的侵染产生抗性。这些试验均可证明 OmpC 是 GH-K3 的关键受体, 而 K7R^B 的噬菌体抗性为自身 *ompC* 基因突变所致。另外, 三株 K2 血清型肺炎克雷伯菌——*K. pneumoniae* KPP14、KPP27 和 KPP36 具有与 K7 接近的 OmpC 表达水平。除了第 255、342、344 和 348 个氨基酸位点以外, 四个菌株的 OmpC 序列完全一致。但是, GH-K3 对 KPP27 的成斑率很低, 而 KPP14 和 KPP36 完全不能被该噬菌体所侵染。然而, 当这三个菌株自身的 *ompC* 基因被来自 K7 的 *ompC* 基因替换之后, 它们对 GH-K3 的敏感性均显著提高, 表明来源于 K7 的 OmpC 是 GH-K3 最合适的二级吸附受体。

综上所述, 本研究不仅阐释了两种噬菌体抗性菌株——*K. pneumoniae* K7R^R 和 K7R^B 的产生机理而且证实了 GH-K3 对宿主菌的吸附存在“CPS-OmpC”的两级受体模式。因此, 本研究丰富了肺炎克雷伯菌噬菌体受体的认知, 对于后续其他细菌的噬菌体抗性产生机制研究具有借鉴意义。

关键词:

肺炎克雷伯菌; 噬菌体; 噬菌体抗性; 荚膜多糖 (CPS); 外膜蛋白

Abstract

Biological characteristics of phage GH-K3 and the mechanism of inducing phage resistance in *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae (*K. pneumoniae*) spp. are important nosocomial and community-acquired opportunistic pathogens, which cause various infections, especially highly virulent strains with K1 or K2 serotype that pose serious threats to public health and animal husbandry. Due to the abuse of antibiotics, multidrug-resistant (MDR) *K. pneumoniae* represented by carbapenemase-producing and extended spectrum β -lactamase (ESBL)-producing strains are constantly appearing, especially the emergence of carbapenem-resistant hypervirulent strains in recent years has brought a more severe challenge to the treatment of *K. pneumoniae* infection.

Bacteriophage has been recognized as an alternative or complementary therapy to antibiotics, which is considered as one of important solutions for MDR *K. pneumoniae* infection. However, like many other bacteria, phage resistance mutations can also occur during the cleavage of *K. pneumoniae* by phages, which greatly limit their therapeutic applications. In recent years, great achievements have been made in the studies of phage-host recognition and the mechanisms of phage resistance, but the related studies on *K. pneumoniae* were relatively lacking. Our previous studies also found that *K. pneumoniae* K7, a host strain of K2 serotype, was prone to produce phage-resistant mutant strains during the interaction with phage GH-K3, but the mechanism of its occurrence remains unclear. The clarification of the mechanism of phage resistance of *K. pneumoniae* is of great value in improving the therapeutic effect of phage on *K. pneumoniae* infection. Therefore, this study aims to reveal the mechanism by which phage GH-K3 induces phage resistance of *K. pneumoniae* K7.

The biological characteristics of phage GH-K3, such as host spectrum and one-step growth curve, were firstly revealed in this study, and then the whole genome of the phage was sequenced and analyzed. These results showed that GH-K3 belonged to the *Siphoviridae* family with a burst size of 291 PFU/cell. The phage comprised of 49,427 bp containing a total of 77 open reading frames (ORFs) and shared high

degree of nucleotide similarity and close evolutionary relationships with 13 other phages. The above data revealed the biological characteristics of phage GH-K3, and laid a solid foundation for the subsequent study of phage resistance in host bacteria.

The mechanism of phage resistance in *K. pneumoniae* was explored in the follow-up study. Our data showed that almost all the phage-resistant mutant strains derived from *K. pneumoniae* K7 under the pressure of GH-K3 had a rough-type colony morphology. A phage-adsorbing receptor mutation in the surface polysaccharides of a rough-type phage mutant strain represented by *K. pneumoniae* K7R^R was confirmed by centrifugation, scanning electron microscopy (SEM), and phage adsorption assay, which was consistent with previous literature reports. In addition, it was unexpectedly found that a very small number of mutant strains had a smooth-type colony morphology, and named as *K. pneumoniae* K7R^B. The bacteriophage resistance of K7R^B was independent of surface polysaccharides, but seemed to be associated with the loss of protein-adsorbed receptors, which was found to be a novel phage resistance production pattern for *K. pneumoniae*. Bacterial surface polysaccharides had a leading role in the recruitment of GH-K3, but surface protein receptors appeared to be the decisive factor for phage infection. The above data revealed that the processes of *K. pneumoniae* resistance to phage infection were limited to the phage adsorption phase, further illustrating the possibility of *K. pneumoniae* having a “polysaccharide-protein” two-stage receptor adsorption mode.

To elucidate the mechanism of phage resistance of *K. pneumoniae* to GH-K3, this study was conducted on *K. pneumoniae* K7R^R and K7R^B, respectively. The severe CPS synthesis defect in K7R^R has been confirmed by alcian blue staining. Additionally, it was verified by silver staining that the LPS components of the mutant strain did not change significantly, thereby determining that the primary phage adsorption receptor of GH-K3 was CPS instead of LPS. Compared to K7, K7R^R did not have a genetic mutation at the whole genome level. However, liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS-MS) analysis showed that the abundance of three glucosyltransferases, GT-1, GT-2 and WcaJ, encoded by the gene cluster of Capsular Polysaccharide Synthesis (*cps*) was dramatically down-regulated. Further studies found that deletion of any of *GT-1*, *GT-2* and *wcaJ* resulted in bacterial CPS synthesis defect accompanied by loss of GH-K3 sensitivity, indicating that all these three glucosyltransferases might be involved in maintenance of phage sensitivity.

However, in the presence of macromolecular CPS residues (>250 KDa), K7($\Delta GT-1$) and K7($\Delta wcaJ$) could still be bounded by GH-K3, though with a modest adsorption efficiency, suggesting that the CPS residues accumulated upon deletion of *GT-1* or *wcaJ* did retain phage binding sites. Thus, the above data indicated that the phage resistance mutation of K7R^R and its rough-type colony morphology were associated with CPS synthesis defect caused by expression inhibition of three glucosyltransferases, GT-1, GT-2 and WcaJ.

To reveal the phage resistance mechanism of *K. pneumoniae* K7R^B, differential genes and differentially expressed proteins between the mutant strain and K7 were analyzed in this study. In fact, *ompC* gene of K7R^B lacks one “G” between T711 and A712 compared with the wild type strain, which is the only genetic mutation site of the mutant strain. LC-MS-MS analysis showed that among differentially expressed proteins between K7 and K7R^B, four outer membrane proteins in K7R^B, OmpC, OmpN, KPN_02430 and OmpF, showed extremely significant expression inhibition. Gene complementation experiments showed that only K7R^B with *ompC* overexpression was cleaved by GH-K3. By contrast, deletion of *ompC*₇₁₂ in K7 triggered OmpC silencing, resulting in resistance to GH-K3. These assays proved that OmpC was the key adsorption receptor for GH-K3, and the phage resistance of K7R^B was caused by mutation of its own *ompC* gene. In addition, the OmpC expression levels of three other *K. pneumoniae* strains with K2 serotype, KPP14, KPP27 and KPP36, were close to that of K7. The OmpC sequences of the four strains were identical except for residues 255, 342, 344 and 348, but the efficiency of plating of KPP27 by GH-K3 was very low, and KPP14 and KPP36 could not be infected by this phage. However, these strains became more sensitive to GH-K3 after their native *ompC* being replaced by *ompC* of K7, suggesting that OmpC^{K7} was the most suitable secondary receptor for GH-K3.

In summary, this study not only revealed phage resistance mechanism of *K. pneumoniae* K7R^R and K7R^B, but also demonstrated the two-stage receptor mode of “CPS-OmpC” during the adsorption of GH-K3 to host cells. Therefore, this study

enriched the cognition of *Klebsiella* phage receptors, and it had certain reference significance for the subsequent studies of the phage resistance mechanisms of other bacteria.

Keywords:

Klebsiella pneumoniae; Bacteriophage; Phage resistance; Capsular polysaccharide (CPS); Outer membrane protein

目 录

前 言.....	1
第一篇 文献综述.....	3
第一章 肺炎克雷伯菌的危害及其噬菌体疗法的研究进展	3
1.1 肺炎克雷伯菌的概述.....	3
1.2 高毒力肺炎克雷伯菌的研究进展.....	3
1.3 多重耐药肺炎克雷伯菌的主要类型及耐药特点.....	6
1.4 高毒力耐药型肺炎克雷伯菌.....	10
1.5 抗生素治疗肺炎克雷伯菌感染的现状.....	11
1.6 噬菌体治疗肺炎克雷伯菌感染的概述.....	12
第二章 噬菌体吸附受体的研究进展	15
2.1 革兰阴性菌噬菌体吸附受体.....	16
2.2 革兰阳性菌噬菌体吸附受体.....	18
2.3 噬菌体的类别与受体类型的关系.....	18
第三章 细菌的噬菌体抗性突变产生机制的研究进展	21
3.1 噬菌体的吸附抑制.....	21
3.2 噬菌体的 DNA 注入阻滞	22
3.3 噬菌体的 DNA 复制障碍	23
3.4 流产感染系统.....	25
3.5 细菌的群体感应.....	26
3.6 宿主菌抵御噬菌体侵染的新机制.....	26
3.7 噬菌体逃避宿主免疫.....	29
第二篇 研究内容.....	31
第一章 噬菌体 GH-K3 的生物学特性及基因组分析	31
1.1 材料.....	32
1.2 方法.....	33
1.3 结果.....	36

1.4	讨论.....	51
1.5	小结.....	52
第二章	肺炎克雷伯菌噬菌体抗性突变菌株的分离及鉴定.....	53
2.1	材料.....	53
2.2	方法.....	54
2.3	结果.....	55
2.4	讨论.....	60
2.5	小结.....	61
第三章	粗糙型肺炎克雷伯噬菌体抗性突变菌株的产生机制.....	63
3.1	材料.....	63
3.2	方法.....	65
3.3	结果.....	76
3.4	讨论.....	84
3.5	小结.....	86
第四章	光滑型肺炎克雷伯噬菌体抗性突变菌株的产生机制.....	87
4.1	材料.....	87
4.2	方法.....	89
4.3	结果.....	100
4.4	讨论.....	114
4.5	小结.....	117
结 论.....		119
创新点.....		121
参考文献.....		123
导师简介.....		141
作者简介.....		143
攻读博士期间发表的学术论文及其他成果.....		145
致 谢.....		147

英文缩略词表

英文缩写	英文全称	中文全称
LB	Luria bertani medium	LB 培养基
PBS	Phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液
SM	Saline-Magnesium buffer	SM 缓冲液
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	肺炎克雷伯菌
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	大肠杆菌
OD	Optical density	吸光度
ORF	Open Reading Frame	开放阅读框
bp	Base pair	碱基对
KD	Kilodalton	千道尔顿
Amp	Ampicillin	氨苄青霉素
Kan	kanamycin	卡那霉素
Gm	Gentamicin	庆大霉素
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
qRT-PCR	Quantitative real-time polymerase chain reaction	实时定量 PCR
LC-MS-MS	Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry	液相色谱-串联质谱
SEM	Scanning electron microscope	扫描电子显微镜
TEM	Transmission electron microscope	透射电子显微镜
PVDF	Polyvinylidene fluoride	聚偏二氟乙烯（薄膜）
HRP	Horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
GT	Glucosyltransferase	葡糖基转移酶
Omp	Outer membrane protein	外膜蛋白
PFU	Plaque forming unit	噬斑形成单位
MOI	Multiplicity of infection	感染复数
TSP	Tail spike protein	尾针蛋白

前 言

肺炎克雷伯菌不但是全世界范围内排名第二的医院和社区获得性机会致病菌，还是一种典型的人兽共患病原菌。到目前为止，肺炎克雷伯菌涉及 79 种血清型，而具有高毒力的 K1 和 K2 血清型菌株在肺炎克雷伯菌流行株中占据绝对优势，主要引发机体出现肺炎、肝脓肿、泌尿系统疾病和菌血症等多种复杂感染的症状，不仅对人类公共卫生安全造成了严重威胁，而且对动物养殖业的发展带来了极为不利的影 响。更为严峻的是，种类极其繁多的产碳青霉烯酶（Carbapenemases）和产超广谱 β -内酰胺酶（Extended Spectrum β -lactamases, ESBLs）多重耐药肺炎克雷伯菌菌株，以及近年出现的产碳青霉烯酶高毒力菌株（Carbapenem-resistant Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*, CR-hvKP），已使当前能够有效治疗肺炎克雷伯菌感染的抗生素捉襟见肘。

由于细菌耐药问题的日益凸现，能够特异性裂解多重耐药菌株的噬菌体在世界范围内重新获得人们的重视。近年，我国医疗人员使用噬菌体与抗生素联合疗法成功治愈了两例多重耐药肺炎克雷伯菌引起的顽固性尿路感染。但是，使用噬菌体治疗细菌感染过程中经常会产生噬菌体抗性突变菌株，这些突变菌株极具造成临床二次感染的安全隐患。因此，为了降低细菌的噬菌体抗性突变率从而提高噬菌体的应用价值，探究细菌的噬菌体抗性产生机制是广大噬菌体研究人员几十年来最为重要的课题之一。

细菌的噬菌体抗性突变通常多发生于噬菌体吸附、核酸注入和复制阶段。据统计，宿主菌的吸附受体的改变所导致的噬菌体难以识别是细菌产生噬菌体抗性的主要方式。关于肺炎克雷伯菌的噬菌体吸附受体及其噬菌体抗性产生机制的研究开展得较早，上世纪七八十年代，研究人员相继证实 CPS 或者 LPS 成分均可作为肺炎克雷伯菌噬菌体的吸附受体，肺炎克雷伯菌缺失这些表面多糖会导致噬菌体抗性的产生。此后的三十多年中，随着生命科学领域相关高新技术的不断普及和应用，关于噬菌体对宿主细菌的识别以及细菌的噬菌体抗性产生机制的研究已经从简单的受体成分识别逐步向噬菌体与宿主细菌之间的基因调控、蛋白互作和结合位点的识别等更深层次的研究方向迈进，但是关于肺炎克雷伯菌的噬菌体

抗性产生机制的研究却长期以来止步不前。本课题组前期研究发现，噬菌体 GH-K3 在裂解宿主细菌 *K. pneumoniae* K7（K2 血清型，产荚膜）的过程中会产生许多具有菌落形态粗糙的噬菌体抗性突变菌株，这一现象可能与细菌表面多糖受体发生变化有关，但具体的作用机制仍需大量试验予以论证。

为了突破肺炎克雷伯菌抵抗噬菌体侵染机制的研究瓶颈，本论文首先研究了噬菌体 GH-K3 的生物学特性并结合该噬菌体全基因组序列信息进行了生物信息学分析。然后探究了由 K7 衍生的噬菌体 GH-K3 抗性突变菌株的主要特征并对该噬菌体的吸附受体类型进行了鉴定，进而阐明了该噬菌体的吸附受体的主要成分以及相应的调控方式，从而证实了噬菌体 GH-K3 对于肺炎克雷伯菌存在“多糖-外膜蛋白”两级受体吸附模式，打破了长期以来肺炎克雷伯菌噬菌体受体仅有宿主菌表面多糖的固有认知，为以后更加深入地研究噬菌体与肺炎克雷伯菌的互动方式以及探索其他细菌的噬菌体抗性产生机制提供了借鉴。

第一篇 文献综述

第一章 肺炎克雷伯菌的危害及其噬菌体疗法的研究进展

1.1 肺炎克雷伯菌的概述

肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 属于变形菌门, γ -变形菌纲, 肠杆菌目, 肠杆菌科, 克雷伯氏菌属, 是一种常见的革兰氏阴性短杆菌。多数肺炎克雷伯菌具有荚膜结构因而可形成灰白色大型黏液性菌落, 另外一些不具备荚膜的细菌可形成小型黄白色菌落, 是一种典型的人畜共患病原菌。该细菌在1882年由德国病理学家弗里德兰德 (Friedlander C. Uber) 首次发现, 因而旧称弗里德兰德氏杆菌。肺炎克雷伯菌在全球范围内的医院内感染率已升至第二位, 主要引发肺炎、肝脓肿、泌尿道症状和菌血症等感染, 甚至危及生命^[1]。此外, 该类细菌不但对人类公共卫生事业造成了巨大威胁, 而且易引发免疫力低下动物肺炎、乳腺炎、子宫炎等化脓性炎症, 甚至败血症, 从而严重影响动物养殖业的健康发展。

1.2 高毒力肺炎克雷伯菌的研究进展

1.2.1 肺炎克雷伯菌分型的概述

长期以来, 利用抗血清进行的免疫学相关试验是检测细菌血清型的基本手段。1978年, Palfreyman 等^[2]利用对流免疫电泳 (Counter-current Immunoelectrophoresis, CIE) 创立了肺炎克雷伯菌血清型的检测方法。但是随着新的肺炎克雷伯菌血清型不断出现, 这种传统的检测方法经常会产生一些假阳性或假阴性的结果, 给临床样本诊断或实验室检测带来了极大的困扰, 因此这套沿用数十年经典的肺炎克雷伯菌血清型鉴定方法已经逐步被一些新兴的基因诊断方法所取代。

由于具备分离 10 Kb 到 10 Mb 的 DNA 分子的能力, 脉冲场凝胶电泳 (Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE) 已成为细菌分型的主流方法之一。基于 PFGE 方法, Diancourt 等^[3]根据肺炎克雷伯菌 7 个位点的核苷酸序列 (*mdh*, *infB*, *tonB*, *gapA*, *phoE*, *pgi* 和 *rpoB*) 特征, 利用多位点序列分型技术 (Multilocus Sequence

Typing, MLST) 对其进行序列类型 (Sequence Types, STs) 分类, 具有密切相关序列类型的菌株被称为克隆复合物 (Clonal Complexes, CCs)。

鉴于肺炎克雷伯菌中荚膜多糖合成相关基因簇 (Capsular Polysaccharide Synthesis, *cps*) 的多样性, *cps* 基因簇序列已经应用于该细菌的血清型分型。2004 年, Brisse 等^[4]利用限制性片段长度多态性聚合酶链反应 (PCR-restriction Fragment Length Polymorphism, PCR-RFLP) 技术建立了一种新型的肺炎克雷伯菌分型方法。基于对 PCR 扩增后的 *cps* 基因簇 (~20 Kb) 酶切消化的结果, 该方法可快速对绝大多数肺炎克雷伯菌菌株进行精确分型。然而这种方法存在一定的局限性, 比如一些菌株 *cps* 区域的扩增比较困难。另外, 隶属于同一血清型的不同菌株有时可能会呈现出多种 RFLP 谱型, 甚至不同血清型的菌株可能会出现极其相似的谱型 (如 K22 和 K37)^[4], 从而给菌株分型带来误判。为了提高细菌分型的精确性并简化相关试验程序, 相关研究人员尝试使用 *cps* 基因簇的特异性位点序列作为肺炎克雷伯菌基因分型手段。例如, Fang 等^[5, 6]发现对位于 *cps* 基因簇的聚合酶基因 *wzy* 及其等位基因 *magA* 的序列分析可有效地应用于 K1 型肺炎克雷伯菌的快速鉴定。然而这种针对特异性序列的方法似乎只能应用于区分少数已知荚膜类型的菌株, 并且每种荚膜类型的菌株都需要特定的鉴定引物, 因此一旦面对肺炎克雷伯菌的混合感染, 这种鉴定方法就显得力不从心。鉴于 *wzy* 基因分型方法的缺点, Pan 等^[7]则另起炉灶, 通过对荚膜合成相关酪氨酸激酶编码基因 *wzc* 分析发现, 该基因在不同血清型的菌株中同时存在着保守序列和可变序列, 其中可变序列编码区 VR2 可成功地用于对不同血清型的菌株进行分型。这种基因分型方法的突出优势在于利用一对引物即可区分几乎所有血清型的肺炎克雷伯菌菌株。因此, *wzc* 基因分型方法是目前公开报道的最为简单的肺炎克雷伯菌分型方法。根据上述荚膜分类相关方法, 到目前为止相关学者已经鉴定出至少 79 种荚膜类型的肺炎克雷伯菌^[8, 9]。

1.2.2 高毒力肺炎克雷伯菌的特征及检测方法

肺炎克雷伯菌根据毒力特征可被分为经典型肺炎克雷伯菌 (Classic *K. pneumoniae*, cKP) 和高毒力肺炎克雷伯菌 (Hypervirulent *K. pneumoniae*, hvKP) 两大类群^[10]。与 cKP 主要见于医院内免疫力低下人群中的继发感染不同, hvKP 一般流行于社区内年轻健康的人群^[11]。然而, 我国作为 hvKP 感染高发地区之一,

hvKP 院内感染率在逐年攀升。Guo 等^[12]针对我国一家医院在 2013 年 1 月至 2015 年 10 月分离得到 369 株肺炎克雷伯菌的调查显示, 84 株被鉴定为 hvKP, 约占总数的 22.8%。根据全世界范围内的肺炎克雷伯菌血清型的调查结果, hvKP 多为 K1、K2、K5、K54 和 K57 型^[13, 14], 其中 K1 和 K2 型在 hvKP 中占据绝对比例^[12]。K1 型菌株主要序列分型上主要属于 ST23 型, 而 K2 型菌株的序列分型却十分复杂 (ST25、ST65、ST66、ST86、ST373、ST374、ST375、ST380 和 ST434 等)。可能是由于序列分型的差异, K1 型菌株主要诱发机体产生单一的肝脓肿的症状, 然而 K2 菌株却是多种感染症状的诱因^[12]。

目前已报道的 hvKP 在菌落形态上基本上都具有高黏液性特征, 因此它们又被称之为高黏液性肺炎克雷伯菌菌株 (hypermucoviscous *K. pneumoniae*, HMKP)。拉丝试验 (String Test) 是鉴定 HMKP 最为简单而且直观的方法, 即使用细菌接种环轻柔地挑取单菌落, 黏液丝长度大于 5 mm 即判定为高黏性表型^[15]。但是由于拉丝试验结果的可靠性比较有限, 因此阳性菌株是否为高毒力菌株仍需依靠其他试验手段 (如对毒力编码基因进行测序) 进一步地判断。

Aerobactin 作为一种柠檬酸盐-异羟肟酸铁载体, 一般只表达于 hvKP 菌株^[16], 因此对 Aerobactin 相关基因簇 *iucABCD* 以及 Aerobactin 转运蛋白编码基因 *iutA* 进行测序是判定 hvKP 的重要手段之一。这些基因通常位于毒力质粒上, 故而对毒力质粒进行直接测序也是判定 hvKP 较为常用的方法^[17, 18]。另外, 毒力质粒中所编码黏液表型的调节因子 A (Regulator of Mucoïd Phenotype A) 基因 *rmpA* 和 *rmpA2* 以及位于细菌基因组的荚膜合成调节 (Regulation of the Capsule Synthesis) 基因 A (*rcaA*) 和 B (*rcaB*) 亦是 hvKP 的典型特征^[19-21]。此外, 一些基因不但是 hvKP 的重要标识, 还是菌株所属血清型的“身份证明”。例如, 对荚膜相关基因 (Mucoviscosity-associated Gene A, *magA*) 进行测序可作为筛选 K1 型肺炎克雷伯菌菌株的重要判断标准^[15]。

1.2.3 高毒力肺炎克雷伯菌的分子致病机理

肺炎克雷伯菌的毒力因子主要包括荚膜多糖、脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS, 具有 O1-O9 等多个类型)、铁载体蛋白 (Siderophores) 和菌毛 (I 型或 III 型) 等^[22]。另外一些研究表明, 一些细菌外膜成分, 例如一些具有外排泵或铁转运功能的孔蛋白亦发挥着毒力因子的作用^[23, 24]。但是, 不同血清型肺炎克雷伯菌毒力

的差异似乎主要在于荚膜多糖的生成量，如作为hvKP的K1和K2型菌株表面一般都具有超荚膜（Hypercapsule）结构。

荚膜指细菌细胞壁外包裹的黏性物质，主要成分为多糖及蛋白质^[25]，本身几乎不具有毒力^[26]，但是作为肺炎克雷伯菌最重要的毒力因子其特征主要表现在如下几个方面：首先，细菌可通过荚膜形成的物理屏障抵御机体巨噬细胞的吞噬作用以及中性粒细胞、补体等介导调理吞噬和细胞杀伤效应^[27]。其次，荚膜通过远端结合诸如人 β 防御素（Human β -Defensins）和乳铁蛋白（Lactoferrin）等抗微生物肽以制止它们进一步与细菌外膜结合，从而对细菌形成保护作用^[28]。第三，荚膜通过阻断C3等补体成分与细菌外膜的相互作用，进而阻止补体介导的细菌裂解和调理作用^[29, 30]。第四，由于荚膜成分对NOD信号通路的激活作用及对LPS的屏障作用，极大地限制了细菌对免疫细胞的激活作用，因此产荚膜肺炎克雷伯菌在感染初期所诱导的TNF- α 、IL-6、IL-8以及活性氧（Reactive Oxygen Species, ROS）等炎症因子表达量十分有限，从而为该细菌广泛定植创造条件^[31]。第五，荚膜有时可以充当细菌的营养物质，有效地提高细菌的生存能力。因此，与其他烈性病原菌相比，肺炎克雷伯菌维持其在宿主体内维持毒力的方式更侧重免疫逃避而非攻击性，而荚膜多糖是其最为主要的毒力因子^[22]。另外，K1和K2血清型的肺炎克雷伯菌还具有独特的免疫逃避机制，即它们的荚膜多糖缺乏巨噬细胞识别细菌所必须的D-甘露糖- α -2,3-D-甘露糖或L-鼠李糖- α -2,3-L-鼠李糖的重复序列单元^[32]。因此，这两种血清型的菌株可进一步规避巨噬细胞的吞噬作用以及其他免疫细胞的杀伤作用，对医院和社区的公共卫生管理带来了严峻的考验。

1.3 多重耐药肺炎克雷伯菌的主要类型及耐药特点

由于人们对抗生素的过度依赖，细菌耐药性日益凸显，特别是近十多年来，“超级细菌”屡见不鲜，并且日益频繁的国际人员往来和物流运输极大地方便了这些耐药菌株在全世界范围内广泛传播^[33]。我国的“超级细菌”主要为革兰氏阴性菌，占临床出现比例75%以上，对临床感染治疗造成严重威胁。目前仅有替加环素、多黏菌素等屈指可数的抗生素针对广泛耐药（Extensive Drug Resistance, XDR）革兰氏阴性菌感染有一定的治疗效果，一旦这些细菌的耐药性进一步增强，我们依靠抗生素建立的防御阵地就有可能全线崩溃。

多重耐药 (Multidrug-Resistant, MDR) 肺炎克雷伯菌菌株主要为cKP, 现已被世界卫生组织 (World Health Organization, WHO)、美国疾病预防控制中心 (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) 和欧盟等政府及卫生组织认定为具有严重公共威胁的病原菌^[34]。因此, 关于多重耐药肺炎克雷伯菌的抗生素替代疗法的需求已迫在眉睫。

1.3.1 产酶型多重耐药肺炎克雷伯菌的概述

产酶型肺炎克雷伯多重耐药菌株主要包括两大类, 即产超广谱 β -内酰胺酶 (Extended Spectrum β -lactamases, ESBLs) 菌株和产碳青霉烯酶 (Carbapenemases) 菌株^[35]。由于缺乏有效的抗生素疗法, 医院内两类多重耐药肺炎克雷伯菌感染的发病率和死亡率明显高于非耐药细菌感染。2013年, CDC针对美国183家医院的调查结果显示, 产ESBL菌株引起的感染和产碳青霉烯酶引起的感染分别占医院内肺炎克雷伯菌感染率的23%和11%。其中前者导致导致1100例死亡, 而后者导致导致520例死亡^[36]。

1.3.2 产 ESBL 肺炎克雷伯菌的耐药特点

ESBL 通常由肠杆菌科细菌质粒所编码, 通过介导 β -内酰胺环的开环效应进而使头孢他啶、头孢噻肟和头孢曲松等超广谱 (第三代) 头孢菌素和一些单环内酰胺类抗生素 (例如氨曲南) 失活, 仅有头孢西丁和头孢替坦等头孢菌素及少量的碳青霉烯类抗生素的对产 ESBL 菌株的感染具有治疗效果^[37]。

1983 年, 世界首例产 ESBL 肺炎克雷伯菌临床感染病例在德国被报道, 该菌株对氧化亚氨基头孢菌素具有耐药性^[38]。5 年后, 美国也发现了北美首例产 ESBL 菌株^[39]。自第一种 ESBL 被命名为 SHV-2 以来, TEM, SHV, CTX-M 和 OXA 等型产 ESBL 肺炎克雷伯菌相继被发现, 目前这些菌株造成的临床感染病例已呈全球分布^[40, 41]。2001 年, 一项关于世界不同地区产 ESBL 肺炎克雷伯菌菌株的研究报告表明, 在美国约有 7.6%肺炎克雷伯临床分离菌株被证实为产 ESBL 菌株, 在加拿大这一比例为 4.9%, 欧洲为 23%, 亚太地区为 25%, 而拉丁美洲的形势最为严峻, 产 ESBL 菌株的比例约为 45%^[42]。

1.3.3 产碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌的耐药特点

碳青霉烯酶不但可水解碳青霉烯类（美罗培南、亚胺培南等）和其他类型的 β -内酰胺类抗生素，还能导致许多其他非 β -内酰胺抗生素（特别是氟喹诺酮类抗生素）的失活。各式各样的碳青霉烯类耐药肠杆菌（Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, CRE）的出现给抗生素的治疗带来了严峻的考验。

根据Ambler分子结构分类法，碳青霉烯酶主要包括A（高水平耐药）、B（易被乙二胺四乙酸（EDTA）抑制的高水平耐药）、D（低水平耐药）三类^[43]。其中A类和D类碳青霉烯酶活性的发挥须依赖丝氨酸活性位点。然而B类碳青霉烯酶活性的发挥则须 Zn^{2+} 的参与，因此被称为金属内酰胺酶（Metallo β -lactamases, MBLs）^[44]。

1.3.3.1 A类碳青霉烯酶

A类碳青霉烯酶主要包括NMC-A/IMI、SME、KPC和GES等多种类型^[45]。作为碳青霉烯类耐药肠杆菌的重要分支，耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌（Carbapenem-resistant *K. pneumoniae*, CR-KP）以产KPC型菌株最为常见，这些细菌一般仅对多黏菌素和替加环素等少数抗生素敏感^[41]。由于 bla_{KPC} 主要由质粒编码，因此极易造成细菌之间的基因水平转移。自1996年第一例KPC型产碳青霉烯酶的肺炎克雷伯菌在美国北卡罗来纳州被鉴定以来^[46]，已有22个KPC亚型被鉴别（KPC-1—KPC-22），其中KPC-2和KPC-3被研究的最为透彻^[47]。截至2013年的数据表明，产KPC肺炎克雷伯菌已在美国、中国（包括台湾地区）和南美洲大部分地区（巴西、阿根廷和哥伦比亚等）以及欧洲局部地区（意大利、波兰和希腊等）呈现较为严重的地方性传播^[48]。尤其是ST258型菌株（ bla_{KPC-2} 和 bla_{KPC-3} ）已呈全球范围广泛分布，而在我国的主要流行株却是ST11型（与ST258型菌株具有极高的序列相似性）^[49, 50]。另外，产GES肺炎克雷伯菌菌株近年来已在欧洲和南美洲等地区零星出现^[51, 52]，虽然目前还并不明确它们是否能造成像产KPC菌株那样的全球传播，但是仍需我们积极采取应对措施。

1.3.3.2 B类碳青霉烯酶

B类碳青霉烯酶由 bla_{IMP} 、 bla_{VIM} 、 bla_{GIM} 、 bla_{SIM} 和 bla_{KMH} 等基因簇编码，自20世纪90年代以来在肠杆菌科细菌中的检出率逐年攀升。在2007年之前，

我国、日本和澳大利亚等国的肺炎克雷伯菌菌株中的 B 类碳青霉烯酶以 IMP 为主,而意大利和希腊等欧洲国家则以 VIM 为主(主要是 VIM-1 和 VIM-4 型)^[53]。然而,2008 年 Yong 等^[54]在一位印度裔瑞典患者的体内首次发现一株携带 *bla*_{NDM-1} 基因的肺炎克雷伯菌菌株。该菌株可产生 NDM-1 型碳青霉烯酶,可耐受几乎所有 β -内酰胺类抗菌药物。这种碳青霉烯酶具有与传统 B 类碳青霉烯酶完全不同的序列,目前已发现至少 15 种 NDM 亚型。产 NDM 肺炎克雷伯菌菌株的地方性流行范围主要集中于印度、巴基斯坦和孟加拉国等国家,在其他地区呈现散发流行。虽然产 NDM 菌株的流行强度不及产 KPC 型肺炎克雷伯菌菌株,但是前者的全球化蔓延态势已经进一步凸显。在我国,产 NDM 不动杆菌属菌株的检出率远高于肠杆菌科菌株,但是近年来产 NDM-1 肺炎克雷伯菌菌株的检出率却逐年攀升^[55]。Chen 等^[56]对来源于不同质粒中保守的 NDM-1 编码区进行比较分析,发现这些序列均存在转座因子以及位于 NDM-1 编码区侧翼的反向重复元件,这可能说明一些肺炎克雷伯菌菌株可能通过水平转移的方式获得了 *bla*_{NDM-1} 基因。

1.3.3.3 D 类碳青霉烯酶

由于具有快速水解异恶唑青霉素(苯唑西林,氯唑西林和双氯西林等)的特性,因此 D 类碳青霉烯酶又被称为苯唑西林酶(Oxacillinases, OXAs)^[57]。在已发现 400 余种 OXA 家族基因中,仅有 OXA-23、OXA-48、OXA-51 和 OXA-58 等在肺炎克雷伯菌中被检出^[58]。虽然这些产 OXA 菌株总体耐药水平较低,但是 OXA-48 型对碳青霉烯类药物的水解能力依然不容小觑。OXA-48 型肺炎克雷伯菌菌株于 2003 年在土耳其被首次发现^[59],其后地中海沿岸国家陆续报道了该型菌株的存在^[60]。另外,该型菌株的地方性流行范围也见诸于印度等南亚国家。此外,作为 OXA-48 的变体菌株,OXA-370 菌株已造成巴西、智利等南美洲国家严重的医院内感染^[61]。因此,OXA-48 及其变体菌株的广泛传播亦引起了人们极大关注。

1.3.3 其他类型多重耐药肺炎克雷伯菌概述

除了产碳青霉烯酶以外,细菌外膜蛋白功能缺失以及主动外排系统功能亢进也是形成多重耐药肺炎克雷伯菌的主要诱因。作为革兰氏阴性菌的抵御外界环境

刺激和维持内环境稳态的重要的疏水屏障，外膜蛋白（Outer Membrane Protein, OMP）具有 β -桶状结构，通常以二聚体或三聚体的形式广泛地镶嵌在细菌外膜，以形成利于菌体营养摄取和新陈代谢的中央孔道^[62]。相关研究表明，这些外膜孔蛋白通常是抗生素的作用靶点，由于结构缺失或表达抑制等造成的外膜孔蛋白表达水平降低均可影响抗生素进入菌体发挥作用^[63]。对于肺炎克雷伯菌来说，外膜孔蛋白 OmpK35 和 OmpK36 的缺失突变是产生耐头孢菌素、碳青霉烯和氟喹诺酮等类抗生素的肺炎克雷伯菌菌株的公认原因之一^[64]。但有意思的是，这些外膜孔蛋白缺陷的耐药菌株通常伴有产 AmpC 酶的性状^[65]。这类 β -内酰胺酶包括 CMY-2、DHA-1 和 ACC-1 等多种类型，它们通过位于细菌基因组或质粒的 *ampC* 基因进行编码，可特异性降解头孢菌素抗生素，一些文献表达该酶的菌株归类为 Ambler C 类菌株^[66]。

细菌外排泵是指镶嵌于细胞膜利用质子交换等方式将进入菌体的抗生素排出的一类功能蛋白，这些蛋白的过度表达可极大抑制抗生素的杀菌效果。目前，在肺炎克雷伯菌中发现的外排泵系统主要包括：耐药结节细胞分化家族（Resistance-nodulation-division Family, RND）的 AcrAB-TolC 和 KexD 系统^[67]；主要易化子超家族（Major Facilitator Superfamily, MFS）的 KdeA^[68]、KpnGH^[69] 和 KmrA^[70] 系统以及小多重耐药家族（Small Multidrug Resistance Family, SMR）家族的 KpnEF 系统^[71]等。特别要指出的是，作为细菌最为常见的外排泵系统，AcrAB-TolC 的活性增强将导致耐替加环素菌株的产生^[72]，这是对广泛依赖替加环素的细菌感染治疗方法的严峻挑战。另外，尽管外排泵系统对不同抗生素的泵出具有一定的选择特异性，但是多种外排泵系统的在同一菌株上的共存促成了广谱耐药型肺炎克雷伯菌的产生。

1.4 高毒力耐药型肺炎克雷伯菌

过去的研究普遍认为 hvKP 的耐药率远低于 cKP^[73, 74]，但是近年来关于高毒力耐药型肺炎克雷伯菌的报道不断增多。例如，Zhan 等^[75]在 140 株产碳青霉烯酶的肺炎克雷伯菌中发现了 21 株 hvKP（15%）。为了探究产碳青霉烯酶的肺炎克雷伯菌毒力增强的原因，Gu 等^[76]针对 5 株 ST11 型高毒力耐药型肺炎克雷伯菌所携带的毒力质粒进行测序分析。结果表明，这些毒力质粒与 pLVPK 序列相

似型极高，可能说明产碳青霉烯酶的 cKP 通过获得外源毒力质粒的方式提高了自身的毒力。然而，一些携带毒力质粒的产 OXA-232 肺炎克雷伯菌虽然暂时并未表现出高毒力的性状^[77]，但是这些菌株仍然具有毒力增强的可能性。此外，不仅是产碳青霉烯酶菌株可以获得毒力质粒，另有报道证实高毒力菌株 ST23-K1 通过获得耐药质粒的方式成为了产碳青霉烯酶高毒力菌株（Carbapenem-resistant Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*, CR-hvKP）^[78]。

1.5 抗生素治疗肺炎克雷伯菌感染的现状

目前可有效对抗CR-KP感染的抗生素已捉襟见肘，仅有替加环素和多黏菌素等屈指可数的抗生素被认为对这类菌株有一定的治疗效果。然而，研究表明单独使用替加环素进行治疗时，该药在体内血药浓度偏低，无法达到体外那样理想的杀菌效果。更为严重的是，多项研究已经证实耐替加环素肺炎克雷伯菌菌株的存在^[72, 79]，因此利用该抗生素对抗CR-KP感染的治疗方案极有可能逐步被摒弃。多黏菌素虽然在体内有较高的血药浓度，但是近几年研究人员发现肺炎克雷伯菌可通过*crrB*基因突变和携带*mcr-1*质粒等方式获得对多黏菌素的耐药性^[80, 81]。另外，多黏菌素通常具有较强的肾毒性，长期使用势必给患者造成不可逆转的损伤。鉴于多黏菌素治疗所带来的副作用，Oliva等^[82]发现双碳青霉烯联合给药（厄他培南与高剂量的美罗培南）是治疗CR-KP感染的一个较为可行的方案，但是这种使用高剂量抗生素的治疗方案可能会诱导产生更为耐药的CR-KP。为了避免陷入无抗生素可用的绝境，相关研究人员在新型抗生素研发领域进行不断探索。近年，一种新型头孢菌素-内酰胺酶抑制剂组合，头孢他啶/阿维巴坦（Ceftazidime-avibactam）被美国食品和药物管理局（Food and Drug Administration, FDA）批准用于治疗复合型腹腔感染、并发尿路感染、医院获得性肺炎等细菌性疾病（www.fda.gov）。Yu等^[83]的研究发现头孢他啶/阿维巴坦对于CR-hvKP菌株，尤其是对产KPC-2的ST11型菌株具有良好的抑制效果，但是这种新型的抗生素组合的一个致命的弱点在于无法抑制产MBL菌株的生长。另外，无论是大剂量联合使用抗生素，还是依赖新型抗生素进行治疗都势必增加患者的治疗成本，因此以抗生素为主导的针对CR-KP的治疗方案可能前景比较暗淡。

1.6 噬菌体治疗肺炎克雷伯菌感染的概述

噬菌体是一类专一性的细菌病毒，根据其裂解细菌的能力，又分为温和型噬菌体和烈性噬菌体。虽然噬菌体在治疗细菌感染的应用已有近百年历史，但由于其宿主谱较窄，对于临床常见的细菌混合感染难以起到理想的治疗效果，随着广谱抗生素的出现，噬菌体的治疗作用逐渐被淡化^[84]。但是近年来随着抗生素的滥用，包括肺炎克雷伯菌在内的多重耐药菌株层出不穷，过去依靠抗生素建立起来的公共卫生防线已经岌岌可危。由于噬菌体不受细菌耐药性和自身生长环境的影响，对诸多“超级细菌”具有良好的杀灭效果，在这个抗生素防线即将崩溃的时代，噬菌体又重新得到人们的重视^[85-87]。

针对高毒力耐药型肺炎克雷伯菌的不断出现，越来越多的学者把目光投向宽宿主谱噬菌体的分离及噬菌体治疗。例如，在针对 123 株从英国及格鲁吉亚医院分离得到的克雷伯菌株中（包括多种多重耐药菌株），Karumidze 等^[88]分离得到的两株噬菌体——vB_Klp_3 和 vB_Klp_4 具有很宽的裂解谱，对来源于格鲁吉亚的菌株的裂解率为 26%，而对来源于英国的菌株的裂解率高达 76%。另外，Taha 等^[89]以来自糖尿病病人足部的肺炎克雷伯菌为宿主菌，分离得到一株宽裂解谱噬菌体 ZCKP1。该噬菌体可对 71%（15/21）的受试肺炎克雷伯菌和部分受试奇异变形杆菌（*Proteus mirabilis*）和大肠杆菌均有裂解效果。除了上述案例，另有很多宿主谱较宽的肺炎克雷伯菌噬菌体被陆续分离，为针对该菌的单一噬菌体疗法以及鸡尾酒疗法（Cocktail Therapy）的研究提供了更多的选择性。

目前，噬菌体控制肺炎克雷伯菌的感染已经取得了丰硕的理论研究成果。Cao 等^[90]研究发现，施用单剂量 2×10^9 PFU 的噬菌体 1513 可明显改善肺炎克雷伯菌引起的小鼠肺部病变，进而使其免于致死性肺炎。但是，这种单次给药的噬菌体疗法应在感染后尽早进行，通常感染发生的 3 h 以内使用噬菌体的治疗方可保证疗效，而延迟的噬菌体治疗往往会使治疗效果大打折扣^[91]。然而，Hung 等^[92]的研究却发现小鼠在感染肺炎克雷伯菌 24 h 后，噬菌体 ϕ NK5 仍然具有明显的保护效果，而且无论是通过灌胃途径还是通过腹腔注射途径给予该噬菌体都可以很大程度上抑制肝脓肿病变的发展。另外，对于由于烧伤等因素造成的失去皮肤、黏膜等物理屏障的患者来说，肺炎克雷伯菌造成的创面感染十分普遍，以往通常采用硝酸银和庆大霉素进行联合治疗。Kumari 等^[93]利用肺炎克雷伯菌 B5055

感染小鼠被烧伤的皮肤，对利用该菌的特异性噬菌体 Kpn5、硝酸银和庆大霉素的治疗效果进行了比较。结果显示虽然 0.5%硝酸银和 1000 mg/L 庆大霉素对烧伤感染的治疗效果值得肯定，但是两组小鼠的生存率仍然低于噬菌体治疗组的小鼠。因此，应用噬菌体治疗肺炎克雷伯菌引发的继发性感染以及相关噬菌体制剂的研发都是具有应用价值的医疗研究热点。此外，很多研究表明噬菌体可作为抗生素的辅助治疗剂，对于肺炎克雷伯菌噬菌体来说也不例外。Verma 等^[94]发现噬菌体 KPO1K2 与环丙沙星联合使用时，不但可以降低肺炎克雷伯菌 B5055 耐药菌株的突变率还可以抑制生物被膜的生成。另外，本实验室前期在噬菌体鸡尾酒治疗肺炎克雷伯菌的研究方面进行了大胆的尝试，发现噬菌体鸡尾酒对于该细菌引起的小鼠菌血症的治疗效果明显强于单一噬菌体疗法^[95]。综上，针对宽宿主谱噬菌体的分离、噬菌体与抗生素联合疗法以及噬菌体鸡尾酒等的研究为治疗肺炎克雷伯菌的临床感染奠定了扎实的基础。令人振奋的是，上海噬菌体与耐药研究所的朱同玉教授、郭晓奎教授和陈立光教授等噬菌体专家领衔的医疗团队使用噬菌体与抗生素联合疗法以及噬菌体鸡尾酒疗法，于 2018 年 8 月和 2019 年 7 月成功治愈了两位因多重耐药肺炎克雷伯菌而久患顽固性尿路感染患者（消息来源：<http://www.whb.cn/zhuzhan/yiliao/20180815/208449.html>）。这不仅是继 1958 年余瀆教授之后我国大陆地区仅有的噬菌体医疗案例，而且是首批通过我国医疗伦理委员会审批的噬菌体治疗案例。同时，这些治疗案例也标志着我国公众对于噬菌体疗法从茫然无知到逐渐认可的历史性转折，对抗生素替代疗法的研究与实践具有极其宝贵的参考价值。

第二章 噬菌体吸附受体的研究进展

噬菌体侵染细菌的过程分为吸附、注入、复制、转录翻译、组装和释放等阶段。其中吸附是其感染宿主细菌过程中的第一个步骤，即噬菌体通过自身的受体结合蛋白识别并结合细菌表面上的受体从而完成在菌体表面定位，为噬菌体DNA注入菌体提供条件^[96]。总而言之，噬菌体对宿主的成功吸附是其启动裂解细菌功能的前提，而噬菌体对细菌的吸附效率的差异通常是决定其宿主范围最为关键的因素。

噬菌体吸附细菌通常包括三个步骤：初始接触、可逆结合和不可逆结合（特异性结合）。第一步主要涉及由布朗运动等因素引起的噬菌体和宿主之间的随机碰撞。在可逆结合步骤中，噬菌体与细菌表面组分的结合存在不稳定性。研究认为，这种松散的结合方式有助于噬菌体贴近细胞表面，从而提高噬菌体识别细菌表面受体的效率^[97]。而在不可逆结合步骤中，噬菌体结合蛋白与细菌受体的特异性结合通常需要酶促切割介导，比如噬菌体解聚酶（Depolymerase）通过识别宿主表面多糖的糖苷键并随机水解以释放糖聚合物的重复单元（寡糖），同时牵引噬菌体颗粒逐渐靠近宿主细胞表面并最终与外膜受体结合^[98]。该步骤往往会触发噬菌体的形态变化（如肌尾噬菌体的尾部收缩），为后续将遗传物质注入宿主做准备。

自20世纪60-70年代以来，研究人员已经通过多种技术手段确认了大量的噬菌体吸附受体。然而，这些吸附受体绝大多数都是细菌多糖、蛋白质以及其他菌体表面附属结构等成分。随着分子生物学和生物结构学等研究领域的发展与应用，关于噬菌体受体的研究从过去模糊的成分认知到如今可以精确鉴定负责噬菌体与细菌结合的糖基或氨基酸位点。此外，加拿大阿尔伯塔大学的相关学者还建立了噬菌体受体数据库（Phage Receptor Database, PhReD）(<https://phred.herokuapp.com/>)，从而为后续噬菌体受体的相关研究提供有力的信息支持。

2.1 革兰阴性菌噬菌体吸附受体

2.1.1 细菌表面多糖作为噬菌体吸附受体

脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) 由脂质 A、核心多糖和 O-抗原 (O-多糖) 等成分构成, 一些革兰阴性菌噬菌体可与这些结构进行特异性结合。例如 ϕ A1122、 ϕ JA1 和 Pokrovskaya 等噬菌体的受体均为鼠疫耶尔森菌 (*Yersinia pestis*) 的核心多糖^[99, 100]。相当一部分噬菌体以 O-抗原作为吸附受体, 例如霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) 的噬菌体 VP4 等^[101]。作为菌落光滑 (S) 型细菌的专属结构, 与结构相对保守的核心多糖相比, O-抗原的糖基组成及排列顺序高度可变。因此以 O 抗原为吸附受体的噬菌体通常只能裂解 S 型细菌, 其宿主谱明显窄于粗糙 (R) 型细菌的噬菌体^[102]。然而, SP6 噬菌体作为一个特例, 可同时感染具有不同 O 抗原类型的沙门氏菌——*S. Typhimurium* 和 *S. Newport*, 并且对于不含 O-抗原的 *S. Typhimurium* 也有一定的感染能力。Tu 等^[103]通过冷冻电镜揭示 SP6 的两个 (Tail Spike Protein, TSP) 蛋白——gp46 和 gp47 可借助 gp37 为支点, 根据不同的宿主 O 抗原和外膜蛋白类型进行转向调节, 从而识别并侵染不同血清型的沙门氏菌。

类似于 LPS, 产荚膜细菌的噬菌体通过其受体结合蛋白的酶活性与宿主荚膜多糖实现可逆性的结合, 进而与宿主表面其他成分实现不可逆结合。除了肺炎克雷伯菌外, 诸如沙门氏菌、空肠弯曲菌 (*Campylobacter jejuni*) 等革兰氏阴性细菌, 都以各种荚膜结构, 如大荚膜、微荚膜、黏液层和糖萼等作为噬菌体的主要吸附受体。例如, 多种短尾和肌尾噬菌体可利用伤寒沙门氏菌 (*S. enterica* serovar Typhi) 的荚膜 Vi 抗原作为吸附受体^[104]。

2.1.2 细菌外膜蛋白作为噬菌体吸附受体

细菌外膜蛋白不但是菌体物质代谢的主要通道, 而且是噬菌体侵染宿主的重要途径。一般情况下以外膜蛋白作为吸附受体的噬菌体通常亦以细菌表面多糖作为初级吸附受体 (Primary Receptor), 因此这些外膜蛋白结构通常被定义为噬菌体的二级吸附受体 (Secondary Receptor)。通常情况下, 外膜蛋白 A (Outer Membrane Protein A, OmpA) 和外膜蛋白 C (OmpC) 的表达水平在革兰氏阴性菌全部外膜蛋白中占据绝对优势, 因此这两种蛋白逐渐演化成最为常见的噬菌体

受体。Marti 等^[105]证实鼠伤寒沙门氏菌 DT7155 (*Salmonella* Typhimurium DT7155) OmpC 是噬菌体 vB_SenM-S16 的二级受体。另外, 大肠杆菌 K-12 经过替换来自 DT7155 的 OmpC 可获得对该噬菌体的敏感性。此外, 志贺氏菌噬菌体 Sf6 (*Shigella* phage Sf6) 在水解脂多糖后, 通过与 OmpA 或 OmpC 感染宿主。并且, Sf6 更倾向与 OmpA 相结合^[106, 107]。此外, 一些表达水平较低的外膜蛋白, 如 OmpF、OmpT、OmpX、FhuA/TonB (负责铁离子转运)、BtuB (负责维生素 B₁₂ 的运输) 和 LamB (麦芽糖孔蛋白) 都有作为噬菌体受体的报道。

2.1.3 细菌特殊结构作为噬菌体吸附受体

细菌一些特殊的外部结构, 通常也可作为噬菌体的吸附受体, 如鞭毛、菌毛等。鞭毛是一种由基体、鞭毛钩和鞭毛丝等组成, 连接在细菌表面具有螺旋结构的丝状蛋白^[96]。这种负责菌体运动功能的特殊结构主要包括单端鞭毛、端生鞭毛和周鞭毛等类型。以鞭毛作为吸附受体的噬菌体多属于长尾病毒科或肌尾病毒科, 例如枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 噬菌体 PBS1、大肠杆菌噬菌体 Chi 和变形杆菌 (*Proteus vulgaris*) 噬菌体 PV22 等, 它们与鞭毛的吸附过程通常具有可逆性。Guerrero-Ferreira 等^[108]研究认为这种可逆吸附通常依赖噬菌体衣壳蛋白上的细丝结构 (Filament)。该团队通过冷冻电子显微镜 (Cryoelectron Microscopy, Cryo-EM) 观察发现, 噬菌体 ϕ CbK 和 ϕ Cb13 在完成与新月柄杆菌 (*Caulobacter crescentus*) 鞭毛的可逆吸附后, 可随着鞭毛的螺旋运动而沿着其表面移动, 直到它们与位于宿主两极的受体完成不可逆结合。这种噬菌体衣壳蛋白细丝结构介导的可逆吸附方式有利于含鞭毛细菌表面噬菌体的募集, 进而保证了噬菌体对宿主菌的侵染效率。

菌毛包括普通菌毛和性菌毛 (F 菌毛) 两种类型。作为一种可增强菌体定植能力的特殊结构, 普通菌毛在革兰氏阴性菌表面广泛存在, 很多噬菌体可依赖此结构对菌体进行吸附。相对于鞭毛而言, 以普通菌毛作为吸附受体的噬菌体种属分布十分广泛, 其中研究得比较透彻的就是以铜绿假单胞杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 的 IV 型菌毛为吸附受体的一类噬菌体^[109]。另外, 具有传递遗传物质功能的性菌毛虽然在细菌表面仅有少量的存在, 然而这种由 F 质粒编码菌毛也有大量作为噬菌体吸附受体的报道^[96, 110]。一般的研究都认为噬菌体一般只能吸附在性菌毛的尖端, 然而噬菌体与普通菌毛的结合方式却具有多样性。例如,

Daugelavicius 等^[111]发现噬菌体 $\phi 6$ 可与丁香假单胞菌 (*Pseudomonas syringae*) 菌毛的侧面结合。

2.2 革兰阳性菌噬菌体吸附受体

与革兰氏阴性菌噬菌体相比,革兰氏阳性菌噬菌体的研究进展较为缓慢^[112]。加之革兰氏阳性细菌具有复杂的细胞壁结构,所以目前已经鉴定出的革兰氏阳性菌噬菌体受体较为有限,大多数与细胞壁多糖 (Cell Wall Polysaccharides, CWPS)^[113]、肽聚糖 (Peptidoglycan) 或磷壁酸 (Lipoteichoic Acids, LTA) 结构相关,可引导噬菌体与之进行可逆结合。然而,一些噬菌体与革兰氏阳性菌进行可逆结合后,进而与另外一些表面成分,如枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 膜蛋白 YueB^[114],乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis*) 噬菌体感染蛋白 (Phage Infection Protein, PIP)^[115] 以及磷酸六糖基序 (Phosphohexasaccharide Motifs)^[116] 等进行不可逆结合。这种情况与上文所述革兰氏阴性菌由表面多糖和外膜蛋白组成的二级噬菌体受体识别模式比较类似,但是一些革兰氏阳性菌的噬菌体受体存在着一种特殊的现象,即细菌的噬菌体受体偶尔会向噬菌体抗性菌株上转移。例如, Tzipilevich 等^[117] 发现枯草芽孢杆菌存在着一种由膜囊泡 (Membrane Vesicle) 介导的噬菌体受体转移机制, 可让具有噬菌体抗性的菌株通过与敏感菌株共培养而获得受体,进而被噬菌体侵染。

2.3 噬菌体的类别与受体类型的关系

同一宿主菌往往能被多种噬菌体所裂解,而这些噬菌体对宿主菌的吸附过程通常需依赖不同的受体。Shin 等^[118] 研究发现鼠伤寒沙门氏菌 SL1344 (*S. Typhimurium* SL1344) 的 25 种噬菌体所识别的受体类型似乎与自身形态密切相关。比如以鞭毛 (11 种) 和 BtuB (7 种) 作为受体的噬菌体均属于长尾噬菌体科,而使用 LPS 的 O-抗原作为受体的噬菌体 (7 种) 却属于短尾噬菌体科。此外, Bertozzi Silva 等^[96] 通过对目前已知受体类型的噬菌体进行统计分析,进一步证实了 Shin 等人的观点。首先,该团队所统计的以革兰氏阴性菌为宿主的长尾噬菌体 (19 株) 均需细菌表面蛋白作为吸附受体。然而,以革兰氏阳性菌为宿主的长尾噬菌体 (25 株) 却表现出完全不同的受体依赖性。除一株噬菌体仅以蛋白作为吸附受体以外,其余全部噬菌体对宿主的吸附均需依赖多糖受体。另外,

以革兰氏阳性菌为宿主的肌尾噬菌体（3株）似乎仅与多糖受体结合。而在以革兰氏阴性细菌为宿主的肌尾噬菌体中，仅依赖多糖受体的噬菌体（11株）明显多于依赖蛋白受体的噬菌体（6株）。有意思的是，无论短尾噬菌体（17株）的宿主菌是革兰氏阳性菌还是革兰氏阴性菌，它们似乎都只依赖多糖受体对宿主菌进行吸附。

第三章 细菌的噬菌体抗性突变产生机制的研究进展

噬菌体裂解细菌的过程中，宿主菌通常通过多种方式产生噬菌体抗性突变，这种细菌抵抗噬菌体的侵染的过程多发生在噬菌体的吸附、核酸注入和复制阶段。这些抗性细菌可能会具有更强的耐药性和不确定的毒力。长期以来，这个问题一直阻碍着噬菌体制剂的发展和应用，近年来相关学者也针对这些机制展开了广泛的研究，细菌耐受噬菌体的机制纷繁复杂，一种菌株有时能够以几种不同方式抵御噬菌体的侵染。目前，虽然一些机制已经被阐明，但诸多机制之间的联系还不清晰，更无有效手段阻遏细菌的噬菌体抗性的产生。

3.1 噬菌体的吸附抑制

抑制噬菌体吸附是细菌抵御噬菌体侵染最常见的方式。受自身基因突变机制及外界环境因素的影响，细菌的受体的合成量或空间构象通常会发生改变，导致原本可裂解这些细菌的噬菌体变得难以吸附，从而产生针对噬菌体侵染的抵抗力。上一章提到很多噬菌体都可利用细菌表面多糖（脂多糖、荚膜多糖等）作为吸附受体，这些成分的缺失或合成抑制将严重影响噬菌体对宿主的吸附。例如，鼠疫耶尔森菌的核心多糖成分（Hep/Glc-Kdo/Ko）的缺失使得噬菌体 ϕ A1122彻底丧失了对该宿主菌的吸附能力^[99]。同样，霍乱弧菌（*Vibrio cholerae*）O抗原基因簇中 $manB$ 、 $wbeE$ 以及 $wbeU$ 突变也导致该噬菌体VP4丧失对宿主的吸附作用^[101]。另外，在多糖类噬菌体吸附受体合成基本正常的前提下，缺乏某种单一组分也有可能影响噬菌体对宿主的侵染。例如，空肠弯曲菌NCTC11168荚膜多糖中缺乏O-甲基化氨基磷酸酯（O-methyl Phosphoramidate, MeOPN）将极大地影响噬菌体F336对该细菌的吸附^[119]。此外，一些噬菌体二级受体（如细菌外膜蛋白）的改变同样会影响这些病毒粒子对宿主菌的侵染。Marti等^[105]将噬菌体vB_SenM-S16的宿主菌——沙门氏菌DT7155的 $ompC$ 进行基因敲除，发现噬菌体S16对 $ompC$ 缺失株的吸附及裂解能力明显弱于野生型菌株。该团队进一步研究发现，沙门氏菌DT7155一级受体和二级受体同时缺失将使其完全丧失对噬菌体S16的敏感性。

鞭毛和菌毛等细菌特殊结构发生改变亦会对噬菌体的侵染造成严重的影响。Shin等^[118]发现众多以鼠伤寒沙门氏菌SL1344为宿主菌的噬菌体中，以鞭毛蛋白

为吸附受体的噬菌体可分为F-I和F-II两种类型。当SL1344鞭毛蛋白FljB缺失后,并不影响两种类型噬菌体对其的侵染能力。但是,鞭毛蛋白FliC缺失的细菌却只对F-II型噬菌体具有敏感性。然而,两种类型的噬菌体都无法感染两种鞭毛蛋白同时缺失的细菌。这说明FljB和FliC两种鞭毛蛋白均为F-II型噬菌体的吸附受体,F-I型噬菌体只能与鞭毛蛋白FliC相结合。因此,对宿主鞭毛蛋白吸附特性的差异可作为噬菌体分类的一种重要依据。另外,农杆菌H13-3 (*Agrobacterium* sp. H13-3) 鞭毛蛋白由主要鞭毛蛋白FlaA,次级鞭毛蛋白FlaB、FlaD构成。研究表明FlaA缺失可明显降低噬菌体侵染量,FlaB缺失却使噬菌体侵染量增加,FlaD缺失并不影响噬菌体的侵染,但是三种蛋白同时缺失的细菌则表现出对噬菌体的抗性。此外,该菌的*motA*作为编码可促进菌体移动的鞭毛马达蛋白基因,当其缺失后该菌株丧失运动性并对噬菌体的抵抗力^[120]。

Kim等^[121]研究发现铜绿假单胞杆菌IV型菌毛编码基因*pilY1*、*pilB*和*pilA*的转座子插入突变将给噬菌体PA1 ϕ 的侵染造成致命影响。而大肠杆菌*TraA*基因缺失或者特定位点的点突变,可引起菌体表面F菌毛结构缺失,从而丧失对噬菌体f1的敏感性。

尽管宿主通过改变吸附受体可抵御绝大多数噬菌体侵染,但是仍有部分噬菌体通过变异自身的受体结合蛋白又可以重新恢复对宿主的侵染能力。因此,宿主菌针对噬菌体的DNA注入和复制阶段进化出种类繁多的抗噬菌体系统。

3.2 噬菌体的DNA注入阻滞

一些细菌可依赖自身溶原性噬菌体基因组编码的重复感染排除系统(Superinfection Exclusion, Sie)来阻滞外源噬菌体DNA注入。目前研究得最为透彻的Sie系统是大肠杆菌的Imm-Sp系统^[122]。该系统分别由*imm*和*sp*基因编码,当T4以及其它T-even属噬菌体开始向菌体注入DNA时,Imm负责改变内膜蛋白噬菌体注入位点的构象,而Sp负责使噬菌体所分泌的溶菌酶丧失活性,两个系统协同作用从而阻滞噬菌体DNA的注入过程。另外,研究人员在其他革兰氏阴性菌中发现许多类似的Sie系统,比如沙门氏菌溶原性噬菌体P22编码的SieA系统^[123]、大肠杆菌溶原性噬菌体mEp167编码的Cor系统^[124]、大肠杆菌溶

原性噬菌体 HK97 编码的 gp15 蛋白^[125]以及铜绿假单胞菌溶原性噬菌体的 c repressor 系统^[126]等。

与革兰氏阴性菌的 Sie 系统研究相比,革兰氏阳性菌相关研究虽然起步较晚,但是发展较快。例如,乳酸菌溶原性噬菌体 Tuc2009 所编码的 Sie₂₀₀₉ 系统干扰和抑制相关噬菌体 DNA 注入的机制已经被解析^[127]。另外, Bebeacua 等^[128]借助 X-Ray 技术,发现嗜热链球菌溶原性噬菌体 TP-J34 所编码的带有信号肽的脂蛋白(Lipoprotein, LTP)可直接与外源噬菌体尾部的卷尺蛋白(Tape Measure Protein, TMP)结合从而阻止其插入细胞质膜。除了溶原性噬菌体所携带的 Sie 系统以外,一些革兰氏阳性菌中还可以通过噬菌体感染蛋白的变异等方式抑制噬菌体注入 DNA。例如 Duerkop 等^[129]发现粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)噬菌体感染蛋白 PIP_{EF} 全部或部分缺失都将严重影响噬菌体遗传物质的注入。

3.3 噬菌体的 DNA 复制障碍

针对噬菌体将DNA注入后进行复制的阶段,宿主菌同样进化出针对阶段的抵抗机制,其中主要包括细菌的R-M(Restriction Modification)系统和CRISPR-Cas系统。R-M系统由限制性核酸内切酶(Rease)和甲基转移酶(MTase)两部分构成,当噬菌体DNA注入时,限制性内切酶特定位点分解DNA,并通过甲基转移酶对宿主自身DNA提供保护作用。Lee等^[130]研究发现,单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)可利用LmoJ2和LmoJ3两种R-M系统对自身提供保护,从而有效抵抗了噬菌体的侵染。如果直接删除*L. monocytogenes*限制性内切酶特异性位点,那么宿主菌将会获得抗噬菌体的特性。

近年来,一些新的 R-M 系统逐渐被发现,例如 BREX(Bacteriophage Exclusion)和 DISARM(Defence Island System associated with Restriction-Modification)系统,这两种系统在细菌和古细菌中广泛存在^[131, 132]。BREX 系统一般包括 6 个开放阅读框组成的基因盒,分别编码 RNA 结合蛋白,ATP 酶,DNA 甲基化酶,碱性磷酸酶, Lon 样蛋白酶以及一个功能未知的蛋白(图 1.1)。当枯草芽孢杆菌 BEST7003 (*Bacillus subtilis* BEST7003)基因组整合了来源于蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*) BREX 系统后, BEST7003 可广泛耐受烈性噬菌体和温和噬菌体的侵染。进一步研究表明, BREX 系统通过 DNA 甲基化酶指导细菌基因组中

非回文基序“TAGGAG”第5位碱基发生m6A甲基化。这种方式可在不影响宿主基因组稳定性的前提下有效阻止噬菌体DNA的复制。DISARM系统一般由五个基因组成，包括DNA甲基化酶，解旋酶，磷脂酶D (Phospholipase D, PLD)，DUF1998的编码基因以及一个功能未知的基因(图1.2)。除了PLD结构域编码基因外，其余四个基因对于噬菌体的防御都具有不可或缺的作用。研究表明，枯草芽孢杆菌BEST7003 (*B. subtilis* BEST7003) 在获得来自 (*Bacillus paralicheniformis* 9945a) DISARM系统后可以在一定程度上抵御phi3T、Nf和SPO1这三种噬菌体的侵染。与BREX系统类似，DISARM系统通过甲基化酶修饰宿主CCWGG (W = A或T) 基序作为自身DNA的标记，从而限制外源噬菌体DNA进入。

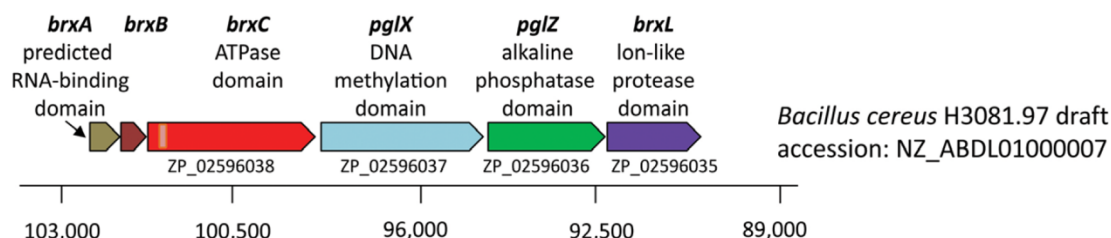


图 1.1 *B. cereus* H3081.97 BREX 基因座 (引自 Tamara Goldfarb, et al., 2018)

Fig 1.1 The BREX locus in *B. cereus* H3081.97

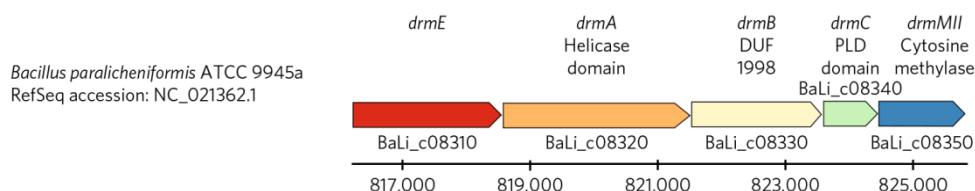


图 1.2 *B. paralicheniformis* ATCC 9945a DISARM 基因座 (引自 Gal Ofir, et al., 2018)

Fig 1.2 The DISARM locus of *B. paralicheniformis* ATCC 9945a

CRISPR-Cas系统由高度保守并具有回文结构的短序列 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, CRISPRs)、CRISPR相关的cas基因以及crRNA构成，作为一种针对外源DNA侵染的细菌免疫系统，该系统在约87%的古细菌和约45%细菌中广泛存在^[133]。根据cas基因的数量，CRISPR-Cas系统目前可分为5个型：I-V，以及16个亚型^[134]。具有CRISPR-Cas系统的细菌在遭遇噬菌体

侵染时, 可通过Cas蛋白识别噬菌体DNA中的前间隔序列临近基序 (Protospacer Adjacent Motif, PAM), 然后将其整合到CRISPR序列前导区的下游并生成新的间隔序列。随后, CRISPR-Cas系统根据间隔序列信息启动Cas-crRNA复合物的合成及组装。当同种噬菌体再次入侵时, 细菌通过Cas-crRNA复合物实现对噬菌体DNA靶向切割进而干扰其复制。目前, CRISPR-Cas系统协助细菌抵抗噬菌体侵染已经在很多研究中证实^[135, 136]。为了防止发酵过程中的噬菌体污染, CRISPR-Cas9系统已在工业微生物中得到应用^[137]。通常情况下, CRISPR-Cas系统这种借助RNA引导的对外源DNA的切割足以保护细菌免受噬菌体的侵染。然而, 当PAM位于噬菌体的晚期表达的基因中或当CRISPR基因簇中间隔序列存在错配时, 多型CRISPR-Cas系统均无法有效阻滞噬菌体DNA的复制。然而, 在这种情况下, Jiang等^[138]发现III型CRISPR-Cas系统可通过抑制噬菌体DNA转录来缓慢抑制噬菌体的进一步侵染。

3.4 流产感染系统

流产感染系统 (Abortive Infection Systems, Abi) 也是一种常见的细菌抵御噬菌体侵染的方式。这些细菌在被噬菌体侵染过程中利用Abi诱导自身过早凋亡从而阻碍噬菌体的增殖, 极大地降低了噬菌体的释放量。Rex系统是目前解析得最为完善的Abi系统之一, 最早发现于λ溶原性大肠杆菌^[139]。该系统通过RexA和RexB抵御噬菌体的侵染。噬菌体DNA复制等过程激活作为传感蛋白RexA, 成对的RexA有启动对膜锚定蛋白RexB的激活, 继而扰乱细胞膜电位, 导致宿主菌裂解。而毒素-抗毒素 (Toxin-antitoxin, TA) 系统当属细菌中相对比较常见的Abi系统^[140]。例如, 大肠杆菌TA系统的mazEF基因可编码mRNA核糖核酸内切酶, 当噬菌体DNA在菌体中复制时该酶能够导致宿主mRNA降解, 从而以诱导宿主菌凋亡的方式阻遏噬菌体的组装和释放^[141, 142]。与其他细菌种属相比, 乳球菌属 (*Lactococcus*) 细菌由于拥有大量abi基因从而被归为一类独特的Abi类群, 目前已发现至少23种与之相关的流产感染机制^[143]。这些流产感染机制分别在阻断噬菌体DNA复制、转录、表达和组装等过程中发挥着不同的作用。

3.5 细菌的群体感应

细菌的群体感应 (Quorum Sensing, QS) 是指生长达到一定密度细菌彼此之间通过分泌或接收信号分子, 进而调整自身外部结构以及分泌产物的一系列细菌群体效应, 是大量细菌适应外部生长环境变化的重要方式之一。目前的研究表明, 细菌的自发光效应、细菌素的分泌、生物被膜和荚膜的合成以及各种毒力因子的表达等都与QS密切相关, 而噬菌体对细菌的侵染也往往会受到QS的影响。由于许多细菌外部结构都是噬菌体的受体, 一旦这些结构因QS而发生改变, 宿主菌往往会表现出抗噬菌体的特性。例如, 沙门氏菌通过群体感应元件LsrR所介导产生的呋喃类信号分子来抑制其鞭毛组成蛋白的合成, 从而阻断相应噬菌体的吸附^[144]。另外, QS所介导合成的分泌产物则是干扰噬菌体侵染的另一个重要的因素。一般来说, 当培养基的细菌达到一定密度时, 细菌会通过群体感应产生生物膜, 使细菌更紧密地结合在一起, 掩蔽部分噬菌体受体, 导致噬菌体侵染效率的下降。此外, 这些生物膜中通常含有多种酶成分, 可直接导致噬菌体失去侵染细菌的能力^[145]。值得一提的是, 一些研究表明细菌的CRISPR-Cas系统^[146]、流产感染系统^[147]等通常与QS密切相关, 这些复杂细菌内部效应很可能会汇总成一个协同的力量, 共同抵御噬菌体的入侵。

3.6 宿主菌抵御噬菌体侵染的新机制

除了前文提到的系统, 以色列 Weizmann 研究所的 Rotem Sorek 教授带领其团队通过研究自于细菌、古细菌约 45000 个基因组中“防御岛”(Defense Islands, 即已被证实的防御基因簇)附近的基因群, 发现了 Thoeris、Hachiman、Shedu、Gabija、Septu、Lamassu、Zorya、Kiwa、Druantia 和 Wadjet (均以西方神话人物命名) 等排斥外源 DNA 的新型防御系统^[148]。除 Wadjet 系统只能排除外源质粒以外, 其他各系统都能辅助相应的细菌抵御噬菌体侵染。到目前为止, 这些系统的具体作用机制尚未完全解析, 因此它们与传统抗噬菌体系统区别和联系仍有待进一步探究。

3.6.1 Zorya 系统

Zorya 系统（以斯拉夫神话中的神灵命名）的识别源于对大肠杆菌防御基因簇 pfam15611 富集化的研究。Rotem Sorek 团队研究发现在 1663 个细菌样品中，约有 3% 检测到 Zorya 系统的存在，而在古细菌中并未发现该系统。目前发现的该系统主要分为两类，I 型 Zorya 系统包含 *zorABCD* 四个基因，编码长度约为 9kb；而 II 型 Zorya 系统由 *zorABE* 三个基因组成（图 1.3）。将来自大肠杆菌 E24377A (*E. coli* E24377A) 的 I 型 Zorya 操纵子克隆到大肠杆菌 MG1655 (*E. coli* MG1655) 中，该受体菌株对噬菌体 T7，SECphi27 和 λ -vir 的敏感性分别下降 10 至 10000 倍。而来自于大肠杆菌 ATCC8739 (*E. coli* ATCC8739) II 型 Zorya 系统可使大肠杆菌 MG1655 (*E. coli* MG1655) 抵御噬菌体 T7 和噬菌体 SECphi17 的感染。

Zorya 系统的 ZorA 和 ZorB 结构域分别与大肠杆菌内膜蛋白 MotA 和 MotB 具有明显的同源性。MotAB 复合物可形成质子通道，为鞭毛旋转提供能量，通过旋转将质子转移到细胞中^[149]。因此，该团队假设 Zorya 系统有可能采用类似于 MotAB 质子通道的方式实现噬菌体感染后膜电位的去极化。同时，ZorC，ZorD 和 ZorE 可能参与噬菌体活性的感知。如果噬菌体感染宿主后仍然具有活性，将可能引发 ZorAB 质子通道开放，导致膜去极化和细胞死亡。根据这一假设，Zorya 可能是一种有条件的流产感染系统。实际上，被噬菌体 T7 感染的含有 Zorya 系统的细菌的子代噬菌体的释放率不足 20%，而且这些被感染的细菌最终出现生长抑制效应，表明 Zorya 系统介导的噬菌体防御机制涉及被感染细菌的死亡或代谢抑制。

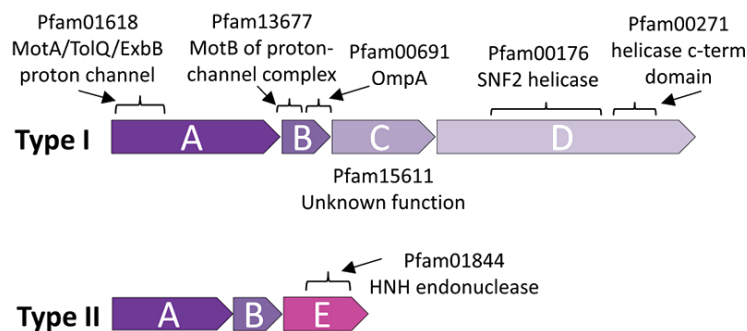


图 1.3 两种类型的 Zorya 系统的结构域（引自 Shany Doron, et al., 2018）

Fig 1.3 Domain organization of the two types of Zorya

3.6.2 Thoeris 系统

Thoeris（以埃及分娩和生育保护神命名）是一个基于芽孢杆菌 pfam08937 [Toll-白细胞介素受体（Toll-interleukin Receptor, TIR）结构域]富集而检测到的系统。该系统在测序样品中检出率约为 4%，并且在在细菌和古细菌中均有分布。Rotem Sorek 团队的研究证实枯草芽孢杆菌 BEST7003 (*Bacillus subtilis* BEST7003) 摄入来自解淀粉芽孢杆菌 Y2 (*Bacillus amyloliquefaciens* Y2) 或来自蜡状芽孢杆菌 MSX-D12 (*B. cereus* MSX-D12) 的 Thoeris 系统后均对肌尾噬菌体丧失敏感性。但由于受试的三个肌尾噬菌体彼此同源性极低，因此他们猜测这些噬菌体的特异性序列可能并不是触发 Thoeris 系统产生抗性的诱因，该系统很可能是针对肌尾噬菌体的一般生物学特征而赋予细菌抗性。

Thoeris 系统由 ThsA 和 ThsB 两部分组成。ThsA 通常包含烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（Nicotinamide Adenine Dinucleotide, NAD）结构域，一些 ThsA 具有多跨膜 N-末端结构域。然而，ThsB 包含一个或多个 TIR 结构域（图 1.4）。这可能是真核生物固有免疫系统起源于原核生物噬菌体防御系统的一种暗示。由于 TIR 结构域被证实具有酶促 NAD⁺水解酶活性^[150]，Rotem Sorek 团队针对解淀粉芽孢杆菌 Y2 (*B. subtilis* BEST7003) ThsB 蛋白 E99A 进行点突变，证实突变菌株的 Thoeris 系统失去对噬菌体的防御作用。此外，ThsA NAD⁺结合位点（可能 NAD⁺的解离）中的点突变，如蜡状芽孢杆菌系统 ThsA: N112A 以及解淀粉芽孢杆菌系统 ThsA: D100A/N115A, 均会导致 Thoeris 系统失去活性。这些结果表明 NAD⁺结合和水解是 Thoeris 系统发挥抗噬菌体活性的必要条件。

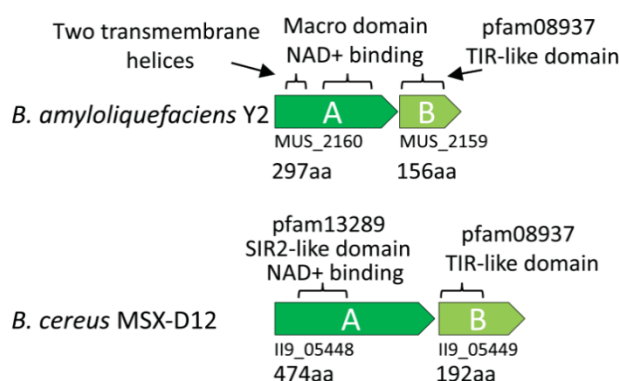


图 1.4 Thoeris 系统的结构域（引自 Shany Doron, et al., 2018）

Fig 1.4 Domain organization of Thoeris

3.6.3 Druantia 系统

Druantia 系统（以高卢神话中的神灵命名）拥有庞大规模的基因序列（约为 12 kb），主要用于编码未知功能结构域（DUF1998）、解旋酶以及与 ATP 利用相关的 Walker A/B 基序。根据该序列下游一组高度可变基因的排布规律，目前将该系统归类为三种类型。由于这些序列几乎完全不包含已知防御系统中的编码基因，因此 Druantia 系统可被归类为一种原核生物抵御噬菌体侵染的新模式。比如，将大肠杆菌(*E. coli* UMEA 4076-1)中的 I 型系统克隆到大肠杆菌 MG1655(*E. coli* MG1655)，使得工程菌株对所测试的 6 种噬菌体中的 4 种产生抗性。

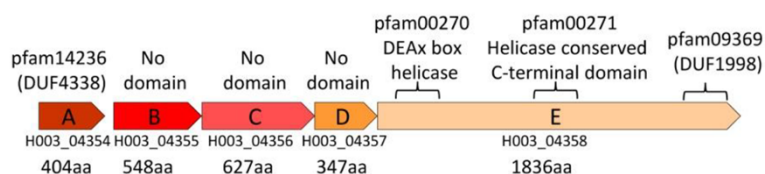


图 1.5 I 型 Druantia 系统的结构域（引自 Shany Doron, et al., 2018）

Fig 1.5 Domain organization of Druantia type I

3.7 噬菌体逃避宿主免疫

针对多种多样的细菌抵抗噬菌体侵染的机制，噬菌体也进化出一些免疫逃避手段。Liu 等^[151]发现作为博代氏杆菌 (*Bordetella*) 噬菌体 BPP-1 受体百日咳杆菌黏附素自转运蛋白 (Pertactin Autotransporter, Prn) 发生缺失不会完全阻滞其噬菌体的吸附，但是吸附效率会大大降低，说明该噬菌体在其主要吸附受体缺失的情况下，通过进化重新具备了部分吸附能力。为了对抗 R-M 系统，葡萄球菌噬菌体 K 在双链 DNA 基因组中丢失 Sau3A 位点(含有宿主限制性内切酶特异性位点 5'-GATC-3')，从而加强了对噬菌体的侵染效率。同理，噬菌体也发生针对 CRISPR-Cas 系统的突变，例如噬菌体 DNA 保守序列 PAM 发生突变后，宿主菌无法获得与噬菌体同型的间隔序列，从而使噬菌体有效地避开 CRISPR-Cas 系统的拦截^[135, 152]。此外，一些可以逃避 BREX 系统的噬菌体近年来也被发现。这意味着在与宿主协同进化中，噬菌体很可能通过水平基因转移形成了抗 BREX 机制，而这些变异基因可能是研究噬菌体遗传规律的新型手段。

第二篇 研究内容

第一章 噬菌体 GH-K3 的生物学特性及基因组分析

肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 主要引发肺炎、肝脓肿、泌尿系统疾病以及菌血症等多种复杂感染的症状^[1], 甚至危及生命。然而, 该细菌之所以能成为全世界范围内排名第二的医院和社区获得性机会致病菌主要原因: 一是以 K1 和 K2 血清型为主的高毒力肺炎克雷伯菌(Hypervirulent *K. pneumoniae*, hvKP) 感染率不断攀升^[12]; 二是以产碳青霉烯酶 (Carbapenemases) 和产超广谱 β -内酰胺酶 (Extended Spectrum β -lactamases, ESBLs) 为代表的多重耐药 (MDR) 肺炎克雷伯菌的广泛流行^[153, 154]; 三是近几年高毒力耐药型肺炎克雷伯菌的不断出现^[76]。正是以上三点原因使得以抗生素为主的肺炎克雷伯菌感染的治疗面临极其严峻的考验。

噬菌体发现以及噬菌体疗法的发展已有百余年的历史, 但是随着 20 世纪 70 年代广谱抗生素的普及, 噬菌体疗法逐渐被人们淡忘。然而随着抗生素耐药菌株的不断出现, 可用抗生素资源面临枯竭。由于寻找抗生素替代疗法或辅助疗法的迫切需求, 噬菌体疗法重新受到公众的关注^[84]。

此前本课题组从来自吉林省人民医院的一例临床样本中分离得到一株高毒力肺炎克雷伯菌, 命名为 *K. pneumoniae* K7, 该菌株具有“大而光滑”的菌落形态, 对小鼠的最小致死剂量 (Minimal Lethal Dose, MLD) 仅为 2.5×10^3 CFU。GH-K3 是以 *K. pneumoniae* K7 为宿主菌分离得到的噬菌体。此前曾使用含有该噬菌体“鸡尾酒”在 2 h 内将小鼠血液中的 *K. pneumoniae* K7 数量从 3.6×10^6 CFU/mL 降低到 3.6×10^1 CFU/mL, 表明噬菌体 GH-K3 在临床感染的快速诊断和治疗中具有一定应用潜力。

由于目前尚无针对噬菌体 GH-K3 的生物学特性及生物信息学的相关报道, 因此本章研究了该噬菌体的宿主谱、一步生长曲线等生物学特性, 并对该噬菌体进行了全基因组测序和分析。所得数据有利于我们全盘掌握噬菌体 GH-K3 的生物学特性及生物信息学特征, 为后续研究该噬菌体诱导肺炎克雷伯菌产生抗性的机制奠定基础。

1.1 材料

1.1.1 菌株和噬菌体

K. pneumoniae K7 分离自吉林省人民医院的一例临床样本, 已获得该菌株的全基因组信息 (GenBank Accession Number: NKQH00000000), 其他 71 株克雷伯菌菌株 (表 1.1) 均分离自吉林大学第一医院的临床样本, 所有菌株均由本实验室保藏, 以 LB 培养基在 37 °C 的条件下培养上述菌株。

噬菌体 GH-K3 分离自长春市某污水处理厂的水样, 现由本实验室保藏。

在本研究中, 沾染上述微生物的器具在使用完毕后均需高压蒸汽灭菌处理, 所产生的废料和残液由学校工作人员统一回收处理。

1.1.2 主要试剂及耗材

胰蛋白胨及酵母提取物 (OXOID 公司); 0.22 μm 一次性针头过滤器 (Merck Millipore 公司); PBS 粉剂 (北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司); DNase I、RNase A、氯化铯均为 Sigma-Aldrich 公司的产品; Viral DNA Kit (美国 Omega Bio-Tek 公司, 货号 D3892)。

LB 培养基的配制: 按照组分浓度: 1% (w/v) 胰蛋白胨, 0.5% (w/v) 酵母提取物, 1% (w/v) NaCl 进行液体 LB 培养基的配制。如需配制固体 LB 培养基, 则需加入 1.5% (w/v) 琼脂粉; 如需配制半固体 LB 培养基, 则需加入 0.7% (w/v) 琼脂粉。115 °C 高压灭菌 20 min, 置于 4 °C 保存备用。

SM 缓冲液: 将 5.8 g NaCl、0.2 g MgSO₄ 加入 50 mL 浓度为 Tris-HCl (1 M, pH 7.5) 中, 随后加入 2% 明胶, 再加入 800 mL 蒸馏水以充分溶解, 定容至 1.0 L。115 °C 高压灭菌 20 min, 置于 4 °C 保存备用。

其他试剂均为进口分装或国产分析纯。

1.1.3 主要仪器

立式自动压力蒸汽灭菌器 (至微 (厦门) 仪器有限公司); 超净工作台 (苏州安泰空气技术有限公司); 恒温培养箱 (上海一恒科学仪器有限公司); 恒温摇床 (上海智城分析仪器制造有限公司); 电热恒温水槽 (上海精宏实验设备有限公司); 低温高速离心机 (美国 Thermo Scientific 公司); BioPhotometer plus 核酸

蛋白测定仪（德国 Eppendorf 公司）；电子分析天平（岛津国际贸易（上海）有限公司）；pH 计（METTLER TOLEDO 公司）；透射电子显微镜（Hitachi 公司）；扫描电子显微镜（Hitachi 公司）；超高速离心机（日本 Hitachi 公司）；微量移液器（2.5 μL 、10 μL 、100 μL 、200 μL 、1000 μL ）（美国 Thermo Scientific 公司）；普通冰箱及-80 $^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱（海尔公司）。

1.2 方法

1.2.1 噬菌体 GH-K3 宿主谱的测定

本试验分别采用空斑试验和噬斑试验检测噬菌体 GH-K3 的宿主谱，并检测该噬菌体对不同细菌的噬斑生成效率^[155]。

1.2.1.1 空斑试验

将 100 μL 过夜培养的菌液均匀涂布在 LB 琼脂平板上，再将 5 μL 噬菌体悬浮液（ 10^{10} PFU/mL）滴加在琼脂表面并使液体充分吸收。经 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 6 h，观察平板有无空斑出现。

1.2.1.2 噬斑试验

使用倍比稀释的方法将纯化的噬菌体悬浮液的滴度调整至 10^5 PFU/mL。取 100 μL 该滴度的噬菌体悬浮液和 100 μL 过夜培养的菌液与融化的半固体培养基（温度为 60 $^{\circ}\text{C}$ 左右）充分混合，随后将上述混合液均匀地铺在 LB 琼脂平板（经 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1 h）表面。待平板表面的半固体培养基充分凝固后，将其移至 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱倒置培养 10 h，然后观察平板有无噬菌斑出现。

1.2.1.3 噬菌体感染效率（成斑率）的计算

将噬菌体 GH-K3 对 *K. pneumoniae* K7 的成斑率 (Efficiency of Plating, EOP) 设为参照，计算公式为：成斑率=受试菌株平均噬斑数量/K7 平均噬斑数量，该试验需进行三次生物学重复。

1.2.2 噬菌体 GH-K3 生长特性的测定

1.2.2.1 感染复数 (Multiplicity of Infection, MOI) 对噬菌体增殖的影响

将 *K. pneumoniae* K7 培养至对数生长期后转接至 11 个含新鲜的 LB 液体培养基的试管（终浓度为 2×10^7 CFU/mL）。然后分别以不同的 MOI：（噬菌体/细菌

= 0.00000001、0.0000001、0.000001、0.00001、0.0001、0.001、0.01、0.1、1、10 和 100)向上述试管加入噬菌体 GH-K3,并于恒温摇床震荡培养 10 h (37 °C, 180 r/min)。然后将培养液进行连续倍比稀释并立即使用双层琼脂平板法测定不同 MOI 对应的噬菌体滴度,该试验需进行三次生物学重复^[156]。

1.2.2.2 一步生长曲线测定

将 *K. pneumoniae* K7 培养至对数生长期后转接至新鲜的 LB 液体培养基(终浓度为 1×10^7 CFU/mL)并与噬菌体 GH-K3 混合(MOI=0.1)。将混合液置于恒温摇床震荡培养 10 min (37 °C, 180 r/min)以使噬菌体有充足时间对细菌进行吸附。然后将混合液离心 5 min (4 °C, $12,000 \times g$),并将沉淀重悬于 10 mL LB 液体培养基中。接下来将悬浮液置于恒温摇床震荡培养(37 °C, 180 r/min),在总时长为 120 min 的培养时间内,每隔 5 min 收集样品 300 μ L。将过滤后的样品进行连续倍比稀释并立即使用双层琼脂平板法测定不同时间对应的噬菌体滴度,该试验需进行三次生物学重复。

1.2.2.3 噬菌体爆发量(Burst Size)的计算

噬菌体爆发量是指每个被噬菌体感染的细菌所释放噬菌体的平均数量。计算公式为:爆发量=噬菌体最终数量/潜伏期被感染细胞数量^[157]。

1.2.3 噬菌体 GH-K3 稳定性的测定

1.2.3.1 pH 稳定性

取 14 个含 10 mL 的 LB 液体培养基的试管,将其 pH 值分别调节为 1-14,随后每个试管中均加入 100 μ L 噬菌体 GH-K3 悬浮液(10^{10} PFU/mL)。将这些试管移至 37 °C 恒温培养箱静置 1 h,然后将培养液进行连续倍比稀释并立即使用双层琼脂平板法测定不同 pH 值对噬菌体滴度的影响。

1.2.3.2 温度稳定性

取 7 份体积为 10 mL 的噬菌体 GH-K3 悬浮液(10^{10} PFU/mL)并将其置于试管中,将这些试管分别在 4 °C、5 °C、37 °C、50 °C、60 °C、70 °C 和 80 °C 的环境中静置 1 h,每隔 20 min 取 300 μ L 样品进行连续倍比稀释并立即使用双层琼脂平板法测定不同温度对噬菌体滴度的影响。

1.2.3.3 贮存稳定性

将 10 mL 已知滴度的噬菌体 GH-K3 悬浮液 (10^{10} PFU/mL) 在 4 °C 冰箱中静置一年后, 取 300 μ L 样品进行连续倍比稀释并立即使用双层琼脂平板法测定长时间贮存对噬菌体滴度的影响。

1.2.4 噬菌体 GH-K3 的浓缩和纯化

将 100 μ L 噬菌体 GH-K3 悬浮液 (10^{10} PFU/mL) 加入到 1 L *K. pneumoniae* K7 培养液中 ($OD_{600}=0.4$)。继续震荡培养 6 h 后, 将培养液离心 20 min (4 °C, $4,000 \times g$) 回收上清液。接下来将 DNase I 和 RNase A 添加到上清液 (终浓度均为 1 μ g/mL) 中并于室温下孵育 30 min。随后向上清液中加入 1 M NaCl, 将其冰浴 1 h 后加入聚乙二醇 8000 (PEG8000) (10% w/v)。将混合液冰浴过夜后, 离心 10 min (4 °C, $10,000 \times g$) 收集噬菌体颗粒并重悬于 2 mL SM 缓冲液中。最后通过氯化铯 (CsCl) 密度梯度离心 (4 °C, $35,000 \times g$, 3 h, CsCl 梯度: 1.32、1.45、1.50、1.70 g/mL) 纯化噬菌体浓缩液, 然后置于 4 °C 冰箱中保存。

1.2.5 TEM 观察噬菌体的形态

将纯化的噬菌体浓缩液滴加在铜网上, 2 min 后使用滤纸吸弃铜网表面过量的浓缩液并使用磷钨酸 (2% w/v) 对铜网进行负染色, 待铜网表面充分干燥后以透射电子显微镜 (TEM) 进行观察 (加速电压为 80 kV)。

1.2.6 肺炎克雷伯菌的血清型鉴定

Pan 等^[7]研究表明, 凭借通用引物 (F: 5'-3' GGGTTTTTATCGGGTTGTAC, R: 5'-3' TTCAGCTGGATTTGGTGG) 对 *wzc* 基因的可变序列编码区 CD1-VR2-CD2 进行 PCR 扩增并测序, 可用于肺炎克雷伯菌的血清型分型。为了鉴定对噬菌体 GH-K3 敏感的肺炎克雷伯菌的血清型, 本人委托生工生物工程(上海)股份有限公司进行上述引物的合成并将相应的菌液送往该公司进行测序, 然后将测得的 CD1-VR2-CD2 序列与文献公布的序列进行比对, 以判断菌株所对应的血清型。

1.2.7 噬菌体 GH-K3 的全基因组测序及分析

以 1.2.4 纯化的噬菌体 GH-K3 浓缩液为样本, 按照说明书使用 Viral DNA Kit 提取其基因组。经浓度和纯度检验合格后 (≥ 100 ng/ μ L, $OD_{260/280} \approx 1.8$, 总量 ≥ 2

μg), 利用 Illumina HiSeq 2500 测序平台对 GH-K3 基因组样品进行全基因组测序并使用 Roche Newbler v.2.8 软件进行序列组装^[158] (该部分研究内容由本课题组委托军事医学科学院微生物流行病研究所童贻刚研究员课题组完成)。通过 tRNAscan-SE^[159]和 RNAmmer^[160]软件分别对基因组序列中编码 tRNA 和 rRNA 的基因进行识别。使用 GeneMarkS 软件对基因组序列中的开放阅读框(Open reading frame, ORF)进行预测^[161]。利用 PSI-BLAST (阈值=0.005)方法, 根据美国国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 的非冗余蛋白质序列数据库 (Non-redundant Protein Sequence Database, nr) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 提供的信息对 GH-K3 基因组中 ORF 的功能进行注释分析^[162]。利用 CLC Main Workbench 软件 (版本 8.0.1) 生成该噬菌体基因功能模块的示意图。使用 Mauve 软件 (版本 2.3.1) 对 GH-K3 及其同源噬菌体基因组序列进行共线性分析^[163]。利用 MPI bioinformatics Toolkit (<https://toolkit.tuebingen.mpg.de/#/tools/hhpred>) 的 HHpred 模块在线分析噬菌体 GH-K3 相关蛋白结构域^[164]。通过 ClustalW 软件比对 GH-K3 及其同源噬菌体的相关基因序列, 并基于序列比对结果使用 PHYLIP 软件 (版本 3.697) 构建系统发育进化树^[165]。通过 Sequence Logo 方法进行相关氨基酸序列保守性在线分析 (默认参数, <http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>)

1.2.8 统计学分析

本研究中所涉及的统计学数据均通过 One-way Analysis of Variance (ANOVA) 或 Student's *t*-tests 进行处理。所有图表均由 GraphPad Prism 6 (美国 GraphPad Software 公司) 生成。误差棒表示标准误的平均值 (Standard Error of the Mean, SEM)。*, 即 $P < 0.05$, 数据存在显著差异; **, 即 $P < 0.01$, ***, 即 $P < 0.001$, 数据存在极显著差异。

1.3 结果

1.3.1 噬菌体 GH-K3 的宿主谱

在受试的 72 株克雷伯菌菌株中, 包括 *K. pneumoniae* K7 在内的 9 个菌株呈现空斑阳性。然而, 噬菌体 GH-K3 只能针对 *K. pneumoniae* K7、KP1、KPP6、

KPP7、KPP27 和 KPP41 的 6 个菌株形成噬菌斑，其中后 5 个菌株的成斑率远低于 K7（表 1.1）。

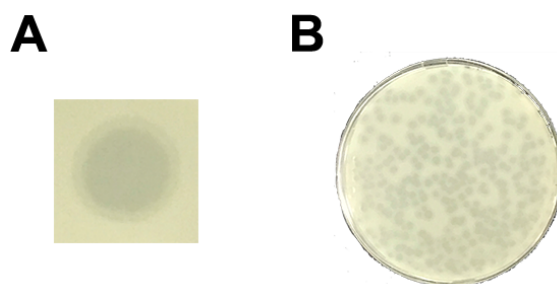


图 1.1 噬菌体 GH-K3 对 *K. pneumoniae* K7 的空斑试验及噬斑试验
 Fig 1.1 Spot assay and plaque assay of phage GH-K3 to *K. pneumoniae* K7

A: 空斑试验 B: 噬斑试验

A: Spot assay B: Plaque assay

表 1.1 噬菌体 GH-K3 的宿主谱

Table 1.1 The host range of phage GH-K3

Species	ID	Spot	Plaque (成斑率 (%))
<i>K. pneumoniae</i>	K7	+	+ (100 ± 6.14)
<i>K. pneumoniae</i>	KP1	+	+ (0.06 ± 0.02)
<i>K. pneumoniae</i>	KPP6	+	+ (1.02 ± 0.13)
<i>K. pneumoniae</i>	KPP7	+	+ (0.62 ± 0.24)
<i>K. pneumoniae</i>	KPP27	+	+ (0.67 ± 0.07)
<i>K. pneumoniae</i>	KPP41	+	+ (1.20 ± 0.11)
<i>K. pneumoniae</i>	KPP14	+	-
<i>K. pneumoniae</i>	KPP36	+	-
<i>K. pneumoniae</i>	KPP51	+	-
<i>K. pneumoniae</i>	KP2	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	KP3	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	KP4	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	KP5	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	KP6	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	KP7	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	KP8	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	KP9	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	KP10	-	-

续表 1.1

Species	ID	Spot	Plaque (成斑率 (%))
<i>K. pneumoniae</i>	KP11	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	KP12	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	KP13	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	KPP1	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	KPP2	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	KPP3	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	KPP4	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	KPP5	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	KPP8	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	KPP9	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	KPP10	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	KPP11	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	KPP12	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	KPP13	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	KPP15	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	KPP16	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	KPP17	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	KPP18	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	KPP19	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	KPP20	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	KPP21	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	KPP22	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	KPP23	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	KPP24	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	KPP25	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	KPP26	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	KPP28	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	KPP29	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	KPP30	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	KPP31	-	-

续表 1.1

Species	ID	Spot	Plaque (成斑率 (%))
<i>K. pneumoniae</i>	KPP32	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	KPP33	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	KPP34	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	KPP35	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	KPP37	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	KPP38	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	KPP39	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	KPP40	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	KPP42	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	KPP43	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	KPP44	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	KPP45	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	KPP46	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	KPP47	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	KPP48	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	KPP49	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	KPP50	-	-
<i>K. oxytoca</i>	KO1	-	-
<i>K. oxytoca</i>	KO2	-	-
<i>K. oxytoca</i>	KO3	-	-
<i>K. oxytoca</i>	KO4	-	-
<i>K. oxytoca</i>	KO5	-	-
<i>K. oxytoca</i>	KO6	-	-
<i>K. oxytoca</i>	KO7	-	-

+: GH-K3 can form spot or plaque; -: GH-K3 cannot form spot or plaque

1.3.2 噬菌体 GH-K3 敏感菌株的血清型

测序结果表明, *K. pneumoniae* K7、KP1、KPP6、KPP7、KPP14、KPP27、KPP36、KPP41、KPP51 的 CD1-VR2-CD2 序列均与 K2 血清型肺炎克雷伯菌标准株 *K. pneumoniae* Chedid 完全一致 (图 1.2), 说明对噬菌体 GH-K3 敏感的肺炎克雷伯菌均为 K2 血清型菌株。

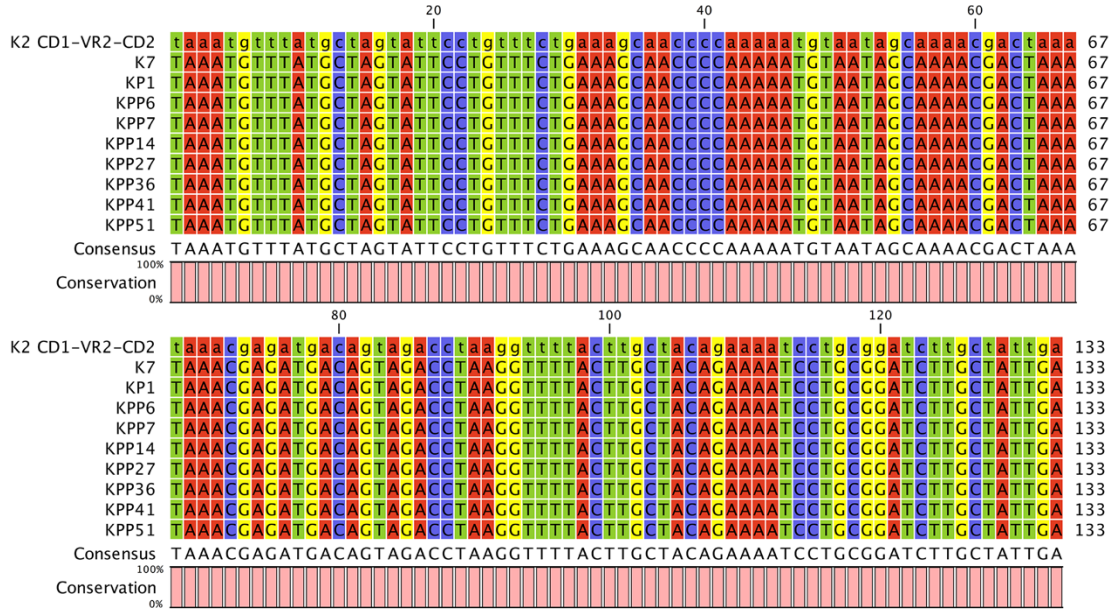


图 1.2 噬菌体 GH-K3 敏感型肺炎克雷伯菌的 CD1-VR2-CD2 序列比对

Fig 1.2 Sequence alignment of CD1-VR2-CD2 among GH-K3 sensitive strains

1.3.3 噬菌体 GH-K3 的生长特性

当 MOI 为 0.0000001 时, GH-K3 的噬菌体滴度最高, 滴度约为 2.9×10^{10} PFU/mL (图 1.3 A)。另外, GH-K3 的一步生长曲线显示该噬菌体的潜伏期约为 20 min, 在此之后数量迅速增加, 需要约 30 min 到达生长稳定期。经计算, 该噬菌体的爆发量约为 291 PFU/细胞 (图 1.3 B)。

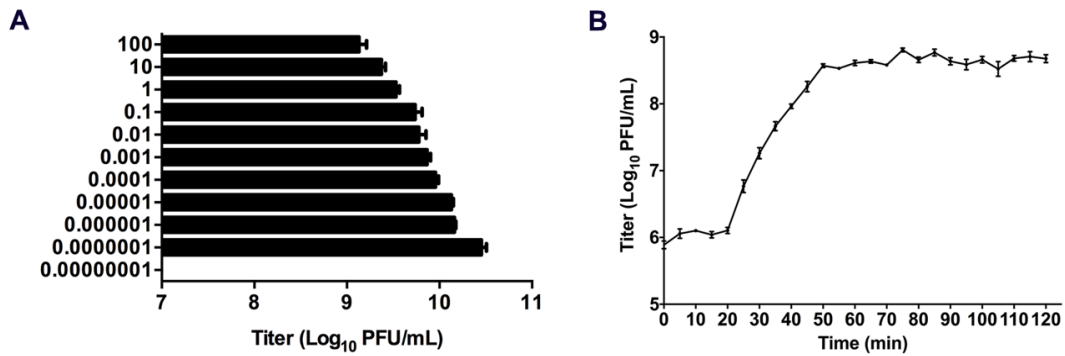


图 1.3 噬菌体 GH-K3 的生长特性

Fig 1.3 The growth characteristics of GH-K3

A: 不同 MOI 对应的 GH-K3 滴度 B: GH-K3 的一步生长曲线

A: Titers of GH-K3 under different MOI B: One-step growth curve of GH-K3

1.3.4 噬菌体 GH-K3 的稳定性

噬菌体 GH-K3 的活性在 pH 6-10 时相对稳定 (噬菌体存活率 >85%)。然而, 噬菌体的滴度在酸性 (pH 1-4) 或碱性 (pH 12-14) 条件下急剧下降 (图 1.4 A)。当温度在 4 °C 至 37 °C 之间时, GH-K3 的滴度可维持在 10^9 - 10^{10} PFU/mL。然而, 当温度 ≥ 50 °C 时, 噬菌体的活性明显降低 (图 1.4 B)。此外, 在 4 °C 环境中储存一年后, GH-K3 的滴度几乎没有变化 (图 1.4 C)。

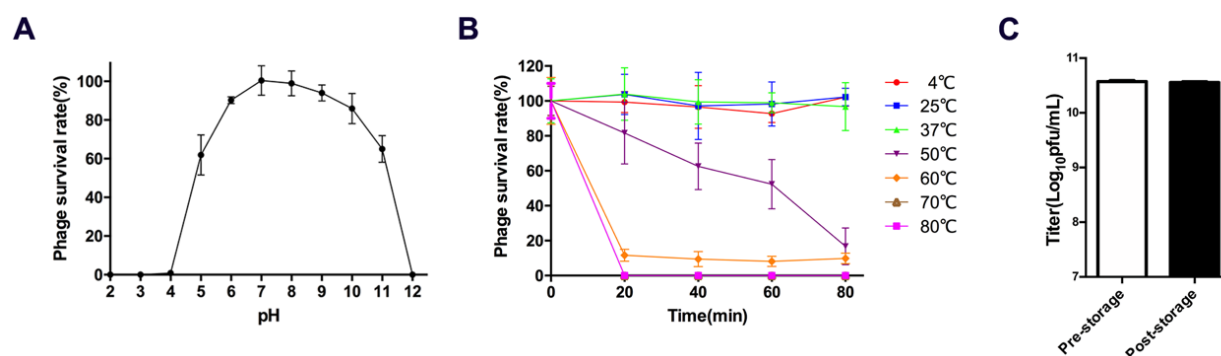


图 1.4 噬菌体 GH-K3 的稳定性

Fig 1.4 Stability tests of GH-K3

A: pH 稳定性 B: 热稳定性 C: 长期贮存稳定性

A: pH stability B: Thermal stability C: Long-term storage stability

1.3.5 噬菌体 GH-K3 的形态观察

透射电子显微镜观察结果显示, 噬菌体 GH-K3 的病毒颗粒由直径约 45 nm 的二十面体头部和长约 130 nm、宽约 5 nm 的非收缩尾部构成 (图 1.5), 表明 GH-K3 隶属于长尾噬菌体 (*Siphoviridae*) 家族。

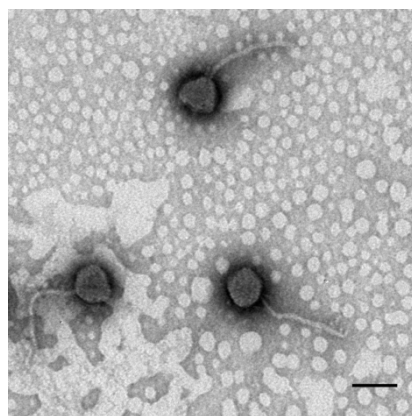


图 1.5 GH-K3 的透射电镜观察 (标尺代表 50 nm)

Fig 1.5 The observation of GH-K3 by TEM (scale bar represents 50 nm)

1.3.6 噬菌体 GH-K3 的基因组生物学信息学分析

噬菌体 GH-K3 的基因组测序覆盖率为 100%，平均测序深度为 2889.73。序列拼接结果表明，GH-K3 是核酸类型为双链 DNA(Double-strand DNA, ds DNA) 的噬菌体，其基因组序列长度为 49427 bp，编码密度为 95.94%，G+C 含量为 50.2%。该噬菌体基因组含有 77 个 ORF，每个 ORF 包含 37-1267 个密码子不等。其中 18 个为正向编码，而其他的 ORF 均为负向编码。在这些 ORF 的起始密码子中，ATG 占 93.5%，GTG 占 5.2%，TTG 占 1.3%。在终止密码子中，TAA 占 54.5%，TGA 占 28.6%，TAG 占 16.9%。

基于全基因组水平的 BLAST 分析表明，噬菌体 GH-K3 基因组与肠杆菌噬菌体 F20 (*Enterobacter phage F20*)^[166]以及 KP36^[167]、1513^[90]、KLPN1^[168]、KOX1^[169]、PKP126^[170]和 Sushi^[171]等 12 株克雷伯菌噬菌体的基因组具有高度同源性 (表 1.2)，据此 GH-K3 可被归类为“KP36 样病毒”属^[167]。

表 1.2 GH-K3 与同源噬菌体的基因组比较

Table 1.2 Global genome comparison of GH-K3 with homologous phages

	GH-K3	1513	KP36	NJS1	KLPN1	JY917	MezzoGao
Host strain type	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
GenBank number	MH844531.1	KP658157.1	JF501022.1	MH445453.1	KR262148.1	MG894052.1	MF612072.1
G+C content	50.2%	50.6%	50.7%	50.7%	50.5%	50.4%	51.0%
Genome size (bp)	49,427	49,462	49,797	49,292	49,037	37,655	49,807
Identity of GH-K3 BLASTN	100%	97%	96%	96%	95%	96%	96%
Query coverage of GH-K3	100%	91%	87%	87%	83%	69%	87%

表 1.2 (续)

Table 1.2 (Continued)

	GML-KpCol1	KPN N141	KOX1	PKP126	Sushi	vB_KpnS_Kp V522	F20
Host strain type	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>
GenBank number	MG552615.1	MF415412.1	KY780482.1	KR269719.1	KT001920.1	KX237515.1	JN672684.1
G+C content	51.0%	51.0%	51.2%	50.7%	50.8%	50.8%	47.9%
Genome size (bp)	50,249	49,090	50,526	50,934	48,754	51,099	51,543
Identity of GH-K3 BLASTN	95%	95%	84%	89%	97%	85%	84%
Query coverage of GH-K3	89%	89%	78%	86%	87%	79%	75%

噬菌体 GH-K3 与其 13 个同源噬菌体的基因组共线性分析结果表明, 这 14 个噬菌体存在着极其相似的基因模块排布顺序 (图 1.6)。

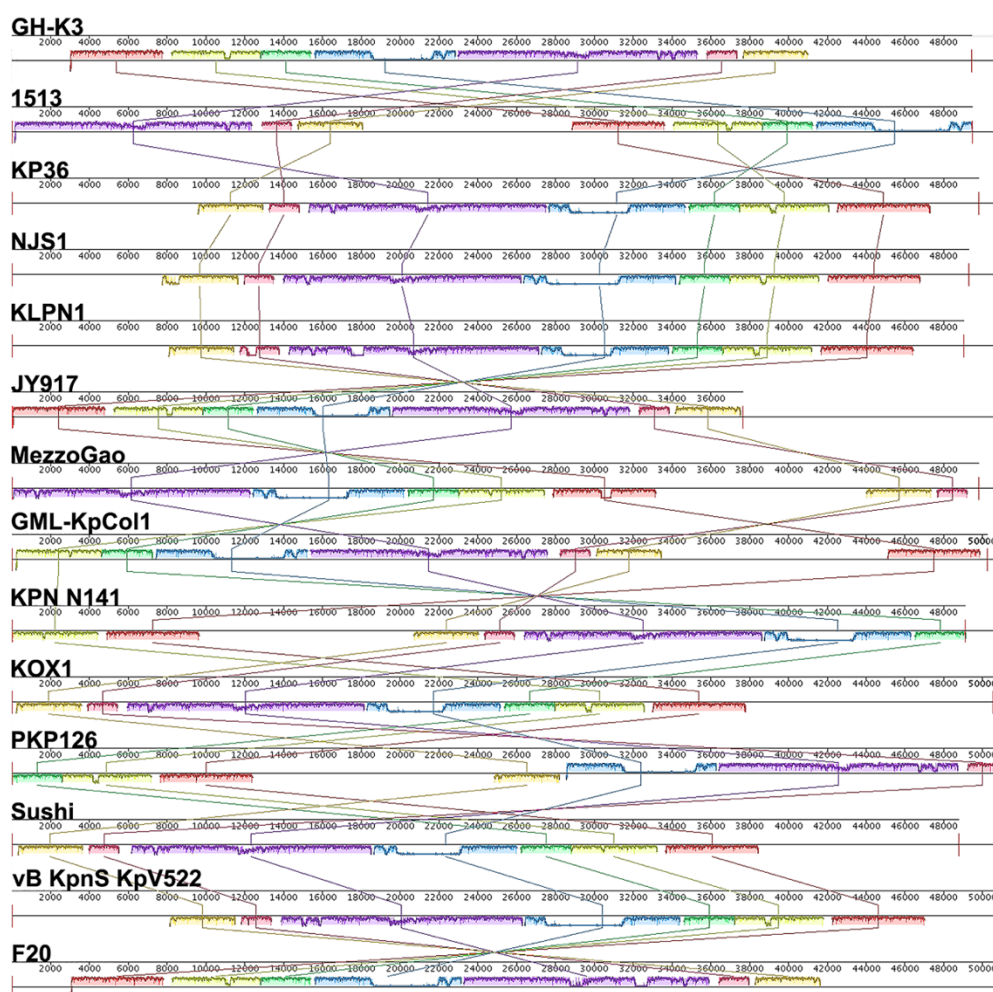


图 1.6 GH-K3 和同源噬菌体之间的基因组共线性分析

Fig 1.6 Multiple genome alignments among GH-K3 and homologous phages

选择沙门氏菌噬菌体 FSL SP126 (*Salmonella* phage FSL SP126) 作为外群, 基于末端酶大亚基 (Terminase Large Subunit) 基因的系统发育进化分析表明, GH-K3 与 KLPN1、KP36 和 1513 等多种克雷伯菌噬菌体具有密切的进化关系 (图 1.7)。

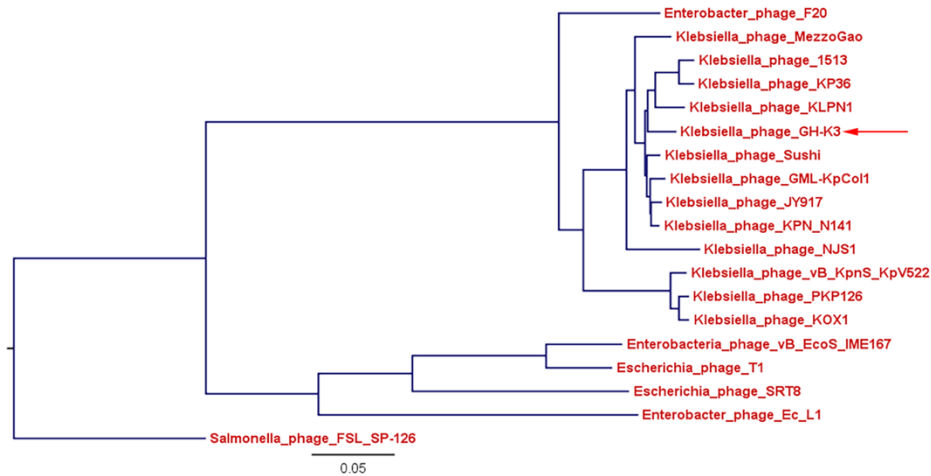


图 1.7 基于末端酶大亚基基因的系统发育进化分析

Fig 1.7 Phylogenetic analyses based on terminase large subunit genes

根据 NCBI 数据库的 PSI-BLAST 分析结果，噬菌体 GH-K3 的 31 个 ORF (40.3%) 编码具有已知功能的蛋白，这些 ORF 可被划分为核苷酸代谢和复制基因模块 (*gp8*、*gp12*、*gp17-gp19*、*gp23* 和 *gp25-gp31*)、DNA 包装基因模块 (*gp52* 和 *gp53*)、形态相关基因模块 (*gp33-gp42* 和 *gp49-gp51*) 和宿主裂解基因模块 (*gp14-gp16*) (图 1.8)。此外，在 GH-K3 的基因组中未检测到噬菌体溶源模块、抗生素抗性基因以及疑似毒力因子编码基因。

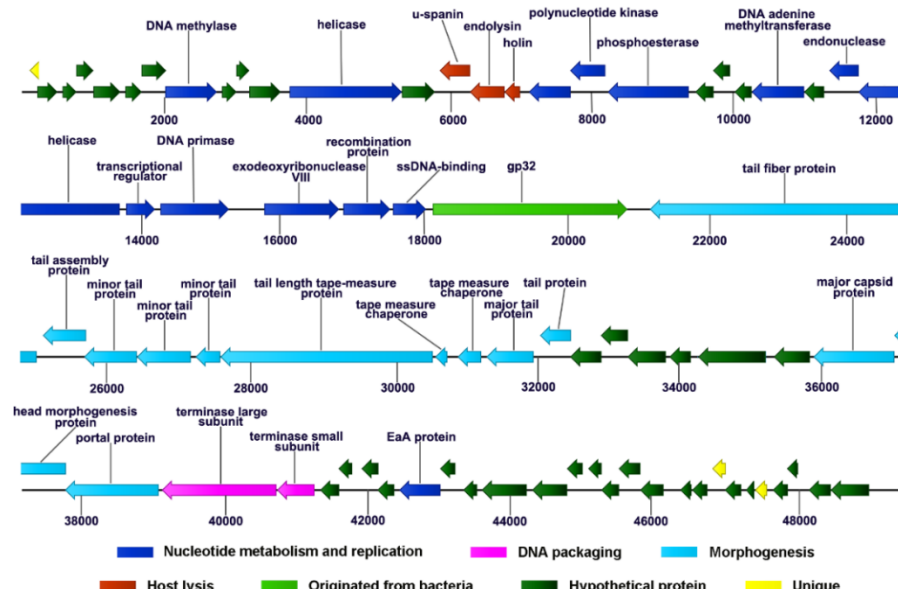


图 1.8 噬菌体 GH-K3 基因组示意图

Fig 1.8 Graphical representation of the phage GH-K3 genome

噬菌体 GH-K3 的 ORF 功能注释分析结果表明, 只有 gp1、gp70 和 gp73 三个较短的序列与 NCBI 公布的序列没有任何相似性, 在图 1.8 中它们被标记为“独特 (Unique)”基因模块。而绝大部分 ORF 都拥有序列相似性高于 90% 的同源氨基酸序列, 部分 ORF 甚至与其同源序列完全一致, 这说明该噬菌体 ORF 的注释结果具有较高的可靠性。然而, 氨基酸长度为 907 aa 被注释为假定尾丝蛋白 (Tail Fiber Protein) 的 gp32 却是一个特例, 与之最为相似的氨基酸序列为 *Klebsiella* phage KP36 gp50, 但是二者仅有 61% 的序列相似性, 相似序列覆盖率更是低至 38% (表 1.3), 基本都位于编码蛋白的 N-末端。虽然 GH-K3 gp32 的 N-末端序列与 NCBI 公布的其他序列也具有一定的相似性 (47-88%), 但是其第 351-907 氨基酸位点与公布的序列几乎没有相似性。

噬菌体 GH-K3 全基因组序列信息已上传至 GenBank (MH844531)。

表 1.3 GH-K3 基因组的 ORF 分析

Table 1.3 The ORF analysis of GH-K3 genome

ORF ^a	bp		Length (aa)	Protein size (kDa)	pI	Annotated function	Representative similarity to proteins in database	E value	Query cover	Identity (positives)	Accession no.
	Start	Stop									
1 [‡] -	102	236	44	4.943	7.10						
2 [†] +	215	496	93	10.489	4.69	hypothetical protein	[<i>Klebsiella</i> phage Sushi] [<i>Klebsiella</i> phage 1513]	6e-60 2e-59	100% 100%	98% (97%) 97% (97%)	YP_009196705.1 YP_009197849.1
3 [†] +	569	763	64	7.028	5.43	hypothetical protein	[<i>Klebsiella</i> phage Sushi] [<i>Klebsiella</i> phage KP36]	9e-37 2e-36	100% 100%	100% (100%) 98% (100%)	YP_009196704.1 YP_009226039.1
4 [†] +	760	999	79	8.593	6.27	hypothetical protein	[<i>Klebsiella</i> phage KP36] [<i>Klebsiella</i> phage 1513]	2e-51 5e-51	100% 100%	100% (100%) 99% (100%)	YP_009226038.1 YP_009197851.1
5 [†] +	999	1376	125	13.891	5.91	hypothetical protein	[<i>Klebsiella</i> phage KLPN1] [<i>Klebsiella</i> phage 1513]	1e-76 7e-76	100% 100%	96% (98%) 94% (98%)	YP_009195409.1 YP_009197852.1
6 [†] +	1449	1676	75	8.112	11.16	hypothetical protein	[<i>Klebsiella</i> phage Sushi] [<i>Klebsiella</i> phage PKP126]	1e-46 1e-46	100% 100%	99% (98%) 99% (98%)	YP_009196701.1 YP_009284885.1
7 [†] +	1673	2017	114	12.513	9.56	hypothetical protein	[<i>Klebsiella</i> phage vB_KpnS_KpV522] [<i>Klebsiella</i> phage KOX1]	3e-66 1e-62	99% 99%	87% (90%) 85% (87%)	AOZ65336.1 ARM70372.1
8 [§] +	2007	2726	239	27.439	7.66	putative cytosine DNA methylase	[<i>Klebsiella</i> phage KLPN1] [<i>Klebsiella</i> phage KPN N141]	2e-170 6e-170	96% 96%	99% (99%) 98% (100%)	YP_009195407.1 ASW27404.1
9 [†] +	2799	3002	67	7.538	9.69	hypothetical protein	[<i>Klebsiella</i> phage 1513] [<i>Klebsiella</i> phage KPN N141]	2e-38 3e-38	100% 100%	97% (100%) 96% (100%)	YP_009197855.1 ASW27403.1
10 [†] +	2999	3181	60	6.668	9.73	hypothetical protein	[<i>Klebsiella</i> phage KPN N141] [<i>Klebsiella</i> phage MezzoGao]	5e-33 5e-33	100% 100%	93% (98%) 93% (98%)	ASW27402.1 ASV44986.1
11 [†] +	3183	3620	145	15.886	9.34	hypothetical protein	[<i>Klebsiella</i> phage 1513] [<i>Klebsiella</i> phage KPN N141]	4e-101 5e-101	100% 100%	99% (100%) 99% (100%)	YP_009197857.1 ASW27401.1
12 [†] +	3746	5314	522	57.833	8.17	putative helicase	[<i>Klebsiella</i> phage 1513] [<i>Klebsiella</i> phage MezzoGao]	0.0 0.0	100% 100%	100% (100%) 99% (100%)	YP_009197858.1 ASV44984.1
13 [†] +	5318	5779	153	17.667	8.97	hypothetical protein	[<i>Klebsiella</i> phage Sushi] [<i>Klebsiella</i> phage PKP126]	1e-110 1e-109	100% 100%	99% (99%) 99% (98%)	YP_009196695.1 YP_009284880.1

表 1.3 (续)
Table 1.3 (Continued)

14 [†] -	5849	6274	141	14.808	9.63	putative u-spanin	[<i>Klebsiella</i> phage Sushi]	2e-96	100%	100% (100%)	YP_009196694.1
							[<i>Klebsiella</i> phage JY917]	7e-96	100%	99% (99%)	AVI03116.1
15 [†] -	6271	6753	160	17.972	9.68	putative endolysin	[<i>Klebsiella</i> phage 1513]	3e-115	100%	99% (100%)	YP_009197861.1
							[<i>Klebsiella</i> phage NJS1]	5e-115	100%	99% (100%)	AXF39406.1
16 [†] -	6755	6970	71	7.560	10.75	putative holin	[<i>Klebsiella</i> phage 1513]	1e-41	100%	100% (100%)	YP_009197862.1
							[<i>Klebsiella</i> phage MezzoGao]	3e-41	100%	99% (100%)	ASV44979.1
17 [†] -	7097	7678	193	21.914	5.95	putative nucleoside triphosphate hydrolase	[<i>Klebsiella</i> phage KP36]	8e-139	100%	98% (98%)	YP_009226026.1
							[<i>Klebsiella</i> phage KLPN1]	7e-138	100%	98% (98%)	YP_009195398.1
18 [†] -	7675	8163	162	18.366	5.9	putative polynucleotide kinase/phosphatase	[<i>Klebsiella</i> phage KP36]	5e-115	100%	99% (99%)	YP_009226025.1
							[<i>Klebsiella</i> phage Sushi]	4e-113	100%	98% (98%)	YP_009196690.1
19 [†] -	8201	9331	376	42.343	6.44	putative phosphoesterase	[<i>Klebsiella</i> phage Sushi]	0.0	100%	99% (100%)	YP_009196689.1
							[<i>Klebsiella</i> phage 1513]	0.0	100%	99% (100%)	YP_009197865.1
20 [†] -	9427	9678	83	9.598	9.9	hypothetical protein	[<i>Klebsiella</i> phage 1513]	4e-52	100%	98% (100%)	YP_009197866.1
							[<i>Klebsiella</i> phage Sushi]	2e-51	100%	96% (100%)	YP_009196688.1
21 [†] -	9675	9911	78	8.568	5.13	hypothetical protein	[<i>Klebsiella</i> phage Sushi]	4e-51	100%	100% (100%)	YP_009196687.1
							[<i>Klebsiella</i> phage 1513]	1e-50	100%	99% (100%)	YP_009197867.1
22 [†] -	9976	10212	78	9.142	4.43	hypothetical protein	[<i>Klebsiella</i> phage 1513]	7e-50	100%	100% (100%)	YP_009197868.1
							[<i>Klebsiella</i> phage KP36]	2e-49	100%	99% (100%)	YP_009226021.1
23 [†] -	10216	10947	243	27.738	6.28	putative DNA adenine methyltransferase	[<i>Klebsiella</i> phage 1513]	2e-178	100%	98% (98%)	YP_009197869.1
							[<i>Klebsiella</i> phage JY917]	9e-178	100%	98% (98%)	AVI03125.1
24 [†] -	10950	11228	92	9.994	8.51	hypothetical protein	[<i>Klebsiella</i> phage 1513]	6e-58	100%	98% (97%)	YP_009197870.1
							[<i>Klebsiella</i> phage KP36]	1e-57	100%	97% (96%)	YP_009226019.1
25 [§] -	11302	11709	135	15.128	9.06	putative endonuclease	[<i>Klebsiella</i> phage KP36]	2e-95	100%	99% (100%)	YP_009226018.1
							[<i>Klebsiella</i> phage Sushi]	8e-95	100%	99% (99%)	YP_009196683.1
											YP_009197872.1
26 [†] -	11709	13742	677	77.13	7.89	putative DNA helicase	[<i>Klebsiella</i> phage 1513]	0.0	100%	99% (99%)	YP_009196682.1
							[<i>Klebsiella</i> phage Sushi]	0.0	100%	99% (99%)	
27 [†] +	13834	14235	133	15.195	10.91	putative transcriptional regulator	[<i>Klebsiella</i> phage KLPN1]	5e-93	100%	100% (100%)	YP_009195388.1
							[<i>Klebsiella</i> phage 1513]	8e-93	100%	99% (100%)	YP_009197873.1
28 [§] +	14311	15270	319	36.047	5.94	putative DNA primase	[<i>Klebsiella</i> virus GML-KpCol1]	0.0	100%	98% (99%)	AUE22047.1
							[<i>Klebsiella</i> phage KPN N141]	0.0	100%	98% (99%)	ASW27462.1
29 [†] +	15766	16812	348	39.176	5.64	putative exodeoxyribonuclease VIII	[<i>Klebsiella</i> phage NJS1]	0.0	100%	100% (100%)	AXF39392.1
							[<i>Klebsiella</i> phage Sushi]	0.0	100%	99% (100%)	YP_009196679.1
30 [†] +	16872	17528	218	24.339	6.67	putative recombination protein	[<i>Klebsiella</i> phage MezzoGao]	7e-161	100%	100% (100%)	ASV44966.1
							[<i>Klebsiella</i> phage Sushi]	2e-160	100%	99% (100%)	YP_009196678.1
31 [†] +	17565	18029	154	17.686	5.85	putative ssDNA-binding protein	[<i>Klebsiella</i> phage NJS1]	3e-105	100%	96% (97%)	AXF39390.1
							[<i>Klebsiella</i> phage JY917]	6e-105	100%	96% (97%)	AVI03133.1
32 [†] +	18124	20847	907	98.563	5.56	putative tail fiber protein	[<i>Klebsiella</i> phage KP36]	6e-98	38%	61% (70%)	YP_009226011.1
							[<i>Klebsiella</i> phage JY917]	5e-94	22%	88% (92%)	AVI03134.1

表 1.3 (续)
Table 1.3 (Continued)

33 [†]	-	21164	24967	1267	138.784	5.15	putative tail fiber protein	[<i>Klebsiella</i> phage NJS1] [<i>Klebsiella</i> phage MezzoGao]	0.0 0.0	89% 86%	95% (96%) 95% (97%)	AXF39388.1 ASV44961.1
34 [†]	-	25055	25657	200	20.831	9.86	putative tail assembly protein	[<i>Klebsiella</i> phage JY917] [<i>Klebsiella</i> phage NJS1]	7e-141 7e-141	100% 100%	99% (100%) 99% (100%)	AVI03136.1 AXF39387.1
35 [†]	-	25632	26369	245	28.45	6.12	putative minor tail protein	[<i>Klebsiella</i> phage JY917] [<i>Klebsiella</i> phage NJS1]	0.0 0.0	100% 100%	100% (100%) 99% (99%)	AVI03137.1 AXF39386.1
36 [†]	-	26371	27123	250	27.507	8.24	putative minor tail protein	[<i>Klebsiella</i> phage MezzoGao] [<i>Klebsiella</i> phage NJS1]	0.0 0.0	100% 100%	100% (100%) 99% (100%)	ASV44958.1 AXF39385.1
37 [‡]	-	27193	27537	114	12.386	7.45	putative minor tail protein	[<i>Klebsiella</i> phage MezzoGao] [<i>Klebsiella</i> phage JY917]	3e-78 6e-77	100% 100%	99% (100%) 96% (99%)	ASV44957.1 AVI03139.1
38 [†]	-	27540	30509	989	106.957	9.12	putative tail length	[<i>Klebsiella</i> phage JY917]	0.0	100%	98% (99%)	AVI03140.1
39 [†]	-	30546	30713	55	6.476	5.41	tape-measure protein	[<i>Klebsiella</i> phage MezzoGao]	0.0	100%	99% (99%)	ASV44956.1
							putative tape measure chaperone	[<i>Klebsiella</i> phage 1513] [<i>Klebsiella</i> phage PKP126]	2e-31 3e-30	100% 100%	98% (100%) 93% (98%)	YP_009197813.1 YP_009284931.1
40 [†]	-	30860	31186	108	12.209	5.34	putative tape measure chaperone	[<i>Klebsiella</i> phage 1513] [<i>Klebsiella</i> phage KPN N141]	4e-75 1e-74	100% 100%	99% (100%) 98% (100%)	YP_009197814.1 ASW27488.1
41 [†]	-	31263	31919	218	23.969	5.51	putative major tail protein;	[<i>Klebsiella</i> phage NJS1] [<i>Klebsiella</i> phage 1513]	3e-162 6e-159	100% 100%	100% (100%) 98% (98%)	AXF39380.1 YP_009197815.1
42 [†]	-	32013	32444	143	16.016	8.82	putative tail protein	[<i>Klebsiella</i> phage Sushi] [<i>Klebsiella</i> virus GML-KpCol1]	2e-101 3e-99	100% 100%	99% (99%) 98% (98%)	YP_009196664.1 AUE22063.1
43 [†]	-	32434	32871	145	16.035	9.29	hypothetical protein	[<i>Klebsiella</i> phage KLPN1] [<i>Klebsiella</i> phage vB_KpnS_KpV522]	1e-103 1e-102	100% 100%	100% (100%) 99% (99%)	YP_009195372.1 AOZ65299.1
44 [†]	-	32864	33241	125	13.577	5.70	hypothetical protein	[<i>Klebsiella</i> phage Sushi] [<i>Klebsiella</i> phage MezzoGao] [<i>Klebsiella</i> phage PKP126]	1e-82 5e-82 1e-119	100% 100% 99%	99% (99%) 98% (98%) 95% (98%)	YP_009196662.1 ASV44950.1 YP_009284937.1
45 [†]	-	33238	33771	177	19.861	6.45	hypothetical protein	[<i>Klebsiella</i> phage vB_KpnS_KpV522]	2e-118	99%	94% (98%)	AOZ65297.1
46 [†]	-	33825	34121	98	11.246	7.46	hypothetical protein	[<i>Klebsiella</i> phage Sushi] [<i>Klebsiella</i> phage KLPN1]	1e-61 9e-60	100% 100%	97% (97%) 94% (95%)	YP_009196660.1 YP_009195369.1
47 [†]	-	34213	35172	319	35.304	5.61	hypothetical protein	[<i>Klebsiella</i> phage MezzoGao] [<i>Klebsiella</i> virus GML-KpCol1]	0.0 0.0	100% 100%	99% (100%) 99% (100%)	ASV44947.1 AUE22068.1
48 [†]	-	35285	35788	167	16.956	6.13	hypothetical protein	[<i>Klebsiella</i> phage JY917] [<i>Klebsiella</i> phage 1513]	2e-111 3e-111	99% 99%	97% (97%) 97% (98%)	AVI03150.1 YP_009197822.1
49 [†]	-	35840	36970	376	41.073	5.42	putative major capsid protein	[<i>Klebsiella</i> phage KP36] [<i>Klebsiella</i> phage 1513]	0.0 0.0	100% 100%	99% (100%) 99% (100%)	YP_009225994.1 YP_009197823.1
50 [†]	-	36970	37737	255	29.089	5.90	putative head morphogenesis protein	[<i>Klebsiella</i> phage KP36] [<i>Klebsiella</i> phage JY917]	0.0 0.0	100% 100%	99% (100%) 98% (99%)	YP_009225993.1 AVI03152.1
51 [†]	-	37727	39037	436	48.044	5.18	putative portal protein	[<i>Klebsiella</i> phage NJS1] [<i>Klebsiella</i> virus GML-KpCol1]	0.0 0.0	100% 100%	99% (100%) 99% (100%)	AXF39370.1 AUE22072.1
52 [†]	-	39083	40684	533	61.414	6.53	putative terminase large subunit	[<i>Klebsiella</i> virus GML-KpCol1] [<i>Klebsiella</i> phage MezzoGao]	0.0 0.0	100% 100%	99% (99%) 99% (99%)	AUE22073.1 ASV45019.1

表 1.3 (续)

Table 1.3 (Continued)

53 [†]	40694	41218	174	19.692	5.76	putative terminase small subunit	[<i>Klebsiella</i> phage MezzoGao] [<i>Klebsiella</i> phage Sushi]	6e-126 1e-125	100% 100%	99% (100%) 99% (99%)	ASV45018.1 YP_009196653.1
54 [†]	41298	41561	87	10.02	10.16	hypothetical protein	[<i>Klebsiella</i> phage vB_KpnS_KpV522] [<i>Klebsiella</i> virus GML-KpCol1]	6e-56 6e-56	100% 100%	95% (97%) 95% (97%)	AOZ65288.1 AUE22075.1
55 [†]	41555	41746	63	7.111	9.0	hypothetical protein	[<i>Klebsiella</i> phage KLPN1] [<i>Klebsiella</i> phage KPN N141]	2e-38 2e-38	100% 100%	98% (98%) 98% (98%)	YP_009195359.1 ASW27433.1
56 [†]	41878	42111	77	8.927	9.65	hypothetical protein	[<i>Klebsiella</i> phage KLPN1] [<i>Klebsiella</i> phage PKP126]	3e-49 1e-45	100% 100%	100% (100%) 88% (98%)	YP_009195358.1 YP_009284913.1
57 [†]	42099	42335	78	8.796	5.26	hypothetical protein	[<i>Klebsiella</i> virus GML-KpCol1] [<i>Klebsiella</i> phage KLPN1]	1e-47 5e-47	100% 100%	95% (97%) 94% (96%)	AUE22078.1 YP_009195357.1
58 [†]	42405	42980	191	21.765	6.25	putative EaA protein	[<i>Klebsiella</i> phage MezzoGao] [<i>Klebsiella</i> phage KPN N141]	2e-139 9e-138	100% 100%	99% (100%) 98% (98%)	ASV45013.1 AASW27430.1
59 [†]	42977	43189	70	7.617	4.50	hypothetical protein	[<i>Klebsiella</i> phage KPN N141] [<i>Klebsiella</i> phage 1513]	2e-42 3e-42	100% 100%	100% (100%) 99% (100%)	ASW27429.1 YP_009197833.1
60 [†]	43301	43492	63	7.115	8.62	hypothetical protein	[<i>Klebsiella</i> phage 1513] [<i>Klebsiella</i> phage Sushi]	2e-37 3e-37	100% 100%	100% (100%) 100% (100%)	YP_009197834.1 YP_009196722.1
61 [†]	43559	44188	209	23.345	6.11	hypothetical protein	[<i>Klebsiella</i> virus GML-KpCol1] [<i>Klebsiella</i> phage 1513]	2e-118 4e-113	100% 100%	81% (86%) 81% (84%)	AUE22082.1 YP_009197835.1
62 [†]	44264	44752	162	18.516	6.29	hypothetical protein	[<i>Klebsiella</i> phage NJS1] [<i>Klebsiella</i> phage Sushi]	6e-115 3e-114	100% 100%	98% (98%) 97% (98%)	AXF39360.1 YP_009196720.1
63 [†]	44752	44970	72	8.060	4.31	hypothetical protein	[<i>Klebsiella</i> phage Sushi] [<i>Klebsiella</i> phage NJS1]	1e-43 2e-43	100% 100%	100% (100%) 99% (100%)	YP_009196719.1 AXF39359.1
64 [†]	45050	45235	61	6.886	9.93	hypothetical protein	[<i>Klebsiella</i> phage KP36] [<i>Klebsiella</i> virus GML-KpCol1]	2e-36 8e-36	100% 100%	100% (100%) 98% (98%)	YP_009225979.1 AUE22085.1
65 [†]	45232	45477	81	9.292	5.03	hypothetical protein	[<i>Klebsiella</i> phage KPN N141] [<i>Klebsiella</i> phage PKP126]	8e-54 7e-47	100% 100%	99% (100%) 88% (91%)	ASW27423.1 YP_009284905.1
66 [†]	45477	45779	100	11.271	9.54	hypothetical protein	[<i>Klebsiella</i> phage KP36] [<i>Klebsiella</i> phage MezzoGao]	5e-66 5e-61	100% 100%	94% (98%) 89% (96%)	YP_009225977.1 ASV45005.1
67 [†]	45776	46102	108	12.282	9.21	hypothetical protein	[<i>Klebsiella</i> phage KPN N141] [<i>Klebsiella</i> phage 1513]	1e-73 4e-73	100% 100%	97% (99%) 97% (98%)	ASW27421.1 YP_009197841.1
68 [†]	46337	46492	51	5.564	4.81	hypothetical protein	[<i>Klebsiella</i> phage Sushi] [<i>Klebsiella</i> phage NJS1]	3e-28 3e-28	100% 100%	98% (100%) 98% (100%)	YP_009196714.1 AXF39356.1
69 [†]	46503	46715	70	8.065	5.48	hypothetical protein	[<i>Klebsiella</i> phage 1513] [<i>Klebsiella</i> phage Sushi]	1e-42 1e-42	100% 100%	97% (98%) 97% (98%)	YP_009197843.1 YP_009196713.1
70 [†]	46785	46973	62	7.261	4.48						
71 [†]	46961	47188	75	8.659	9.76	hypothetical protein	[<i>Klebsiella</i> phage MezzoGao] [<i>Klebsiella</i> phage NJS1]	7e-45 1e-44	96% 96%	94% (95%) 94% (95%)	ASV44999.1 AXF39354.1
72 [†]	47258	47371	37	4.711	10.73	hypothetical protein	[<i>Klebsiella</i> virus GML-KpCol1] [<i>Klebsiella</i> phage KPN N141]	6e-17 2e-16	100% 94%	95% (97%) 97% (97%)	AUE22095.1 ASW27415.1
73 [†]	47383	47550	55	6.423	9.81						
74 [†]	47632	47841	69	8.096	6.07	hypothetical protein	[<i>Klebsiella</i> phage MezzoGao] [<i>Klebsiella</i> phage KPN N141]	4e-42 5e-42	100% 100%	96% (97%) 96% (97%)	ASV44997.1 ASW27413.1
75 [†]	47831	47983	50	5.718	4.58	hypothetical protein	[<i>Klebsiella</i> phage KLPN1] [<i>Klebsiella</i> phage PKP126]	1e-28 2e-28	100% 100%	98% (100%) 98% (100%)	YP_009195343.1 YP_009284891.1
76 [†]	48136	48441	101	11.016	4.09	hypothetical protein	[<i>Klebsiella</i> phage 1513] [<i>Klebsiella</i> phage PKP126]	9e-62 9e-62	100% 100%	93% (97%) 92% (98%)	YP_009197847.1 YP_009284890.1
77 [†]	48444	48977	177	20.122	5.45	hypothetical protein	[<i>Klebsiella</i> phage PKP126] [<i>Klebsiella</i> phage KPN N141]	6e-116 1e-114	100% 100%	90% (96%) 90% (95%)	YP_009284889.1 ASW27410.1

^a †, AUG start codons; ‡, UUG start codons; §, GUG start codons. +, right orientation; -, left orientation.

1.3.7 GH-K3 gp32 的生物信息学分析

临近尾丝蛋白编码基因 3'端的 GH-K3 *gp32* 位于基因组中 18124 bp-20847 bp, 这段序列在基因组共线性分析图片中显示为“空白”。然而除了 GH-K3 之外, 每个同源噬菌体的基因组中尾丝蛋白编码基因 3'端附近均拥有长度约为 3000 bp 的“空白区域”(图 1.6), 进一步分析表明 KP36 *gp50*、JY917 *gp23*、KOX1 *gp23*、KLPN1 *gp43*、Sushi *gp24*、PKP126 *gp59*、MezzoGao *gp18*、NJS1 *gp42*、GML-KpCol1 *gp13*、vB_KpnS_KpV522 *gp45*、F20 *gp32*、KPN N141 *gp71* 和 1513 *gp71* 的编码区均位于这些“空白区域”, 意味着这些 GH-K3 *gp32* 与上述序列互为同源等位基因, 但是这些基因之间彼此的相似性极低, 系统发育进化分析也表明它们之间的进化关系相对较远(图 1.9)。另外, 这些等位基因序列的 G+C 含量约为 40%, 明显低于全基因组平均水平(G+C 含量约为 50%, 表 1.2)。上述分析结果可能表明 GH-K3 *gp32* 及其同源等位基因可能都是噬菌体在侵染宿主的过程中通过基因水平交换获得的外源基因, 而这些噬菌体获得这些基因的过程也可能处于各自的晚期进化阶段^[172]。

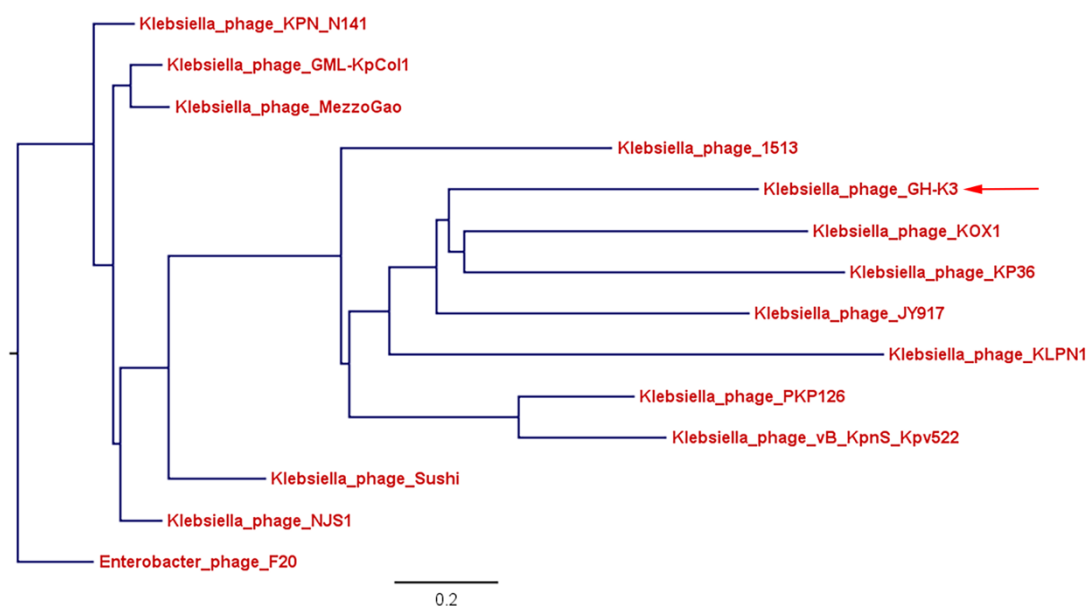


图 1.9 基于 GH-K3 *gp32* 等位基因的系统发育进化分析

Fig 1.9 Phylogenetic analyses based on alleles of GH-K3 *gp32*

GH-K3 gp32 与 KP36 gp50、JY917 gp23、KXO1 gp23、1513 gp71、KLPN1 gp43、Sushi gp24、PKP126 gp59、MezzoGao gp18、NJS1 gp42、GML-KpCol1 gp13、vB_KpnS_KpV522、F20 gp32 以及 KPN N141 gp71 之间氨基酸序列保守性分析结果表明,除了 N-末端以外, GH-K3 gp32 及其同源蛋白的氨基酸序列之间存在着极低的相似性(图 1.10)。

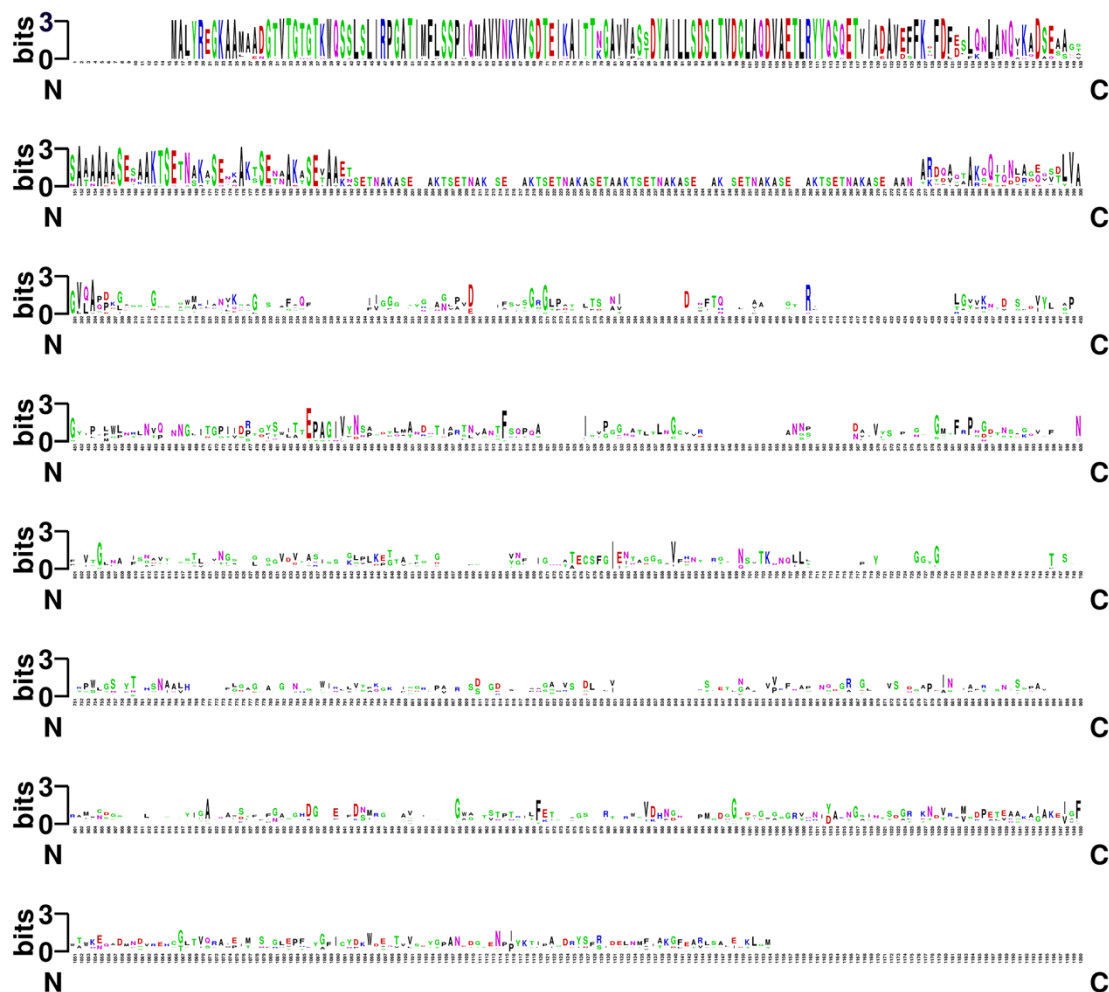


图 1.10 GH-K3 gp32 及其同源序列的保守性分析

Fig 1.10 Sequence conservation of GH-K3 gp32 in comparison with other homologous sequences

HHpred 分析结果表明 GH-K3 gp32 的第 183-565 位氨基酸和第 265-583 位氨基酸所形成的空间构象分别与尾针蛋白(Tail Spike Protein, TSP)结构域(PDB ID: 5W6S_A)和聚半乳糖醛酸酶(一种噬菌体解聚酶)结构域(PDB ID: 1BHE_A)

具有一定的结构相似性,这说明 gp32 可能是噬菌体 GH-K3 的受体结合蛋白。另外,来源于克雷伯菌噬菌体 KP36 的解聚酶 depoKP36 也与上述结构域具有一定的结构相似性(图 1.11),极大地增加了 gp32 具有解聚酶活性的可能性。

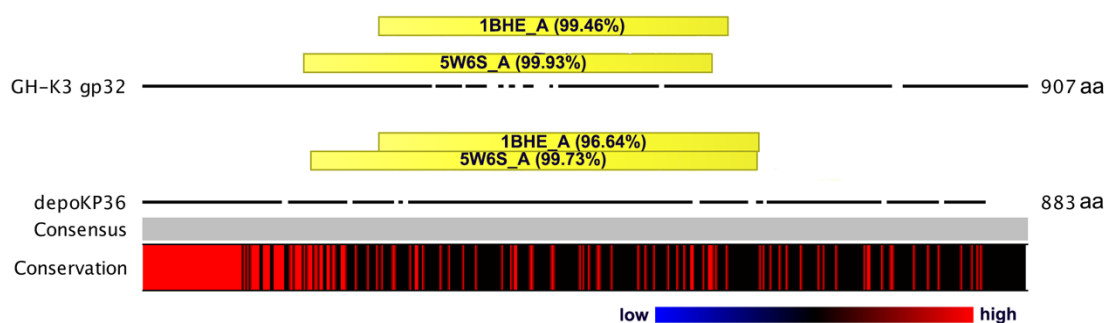


图 1.11 GH-K3 gp32 和 depoKP36 的序列比对和结构域分析

Fig 1.11 Sequence alignments and domain analyses of GH-K3 gp32 and depoKP36

1.4 讨论

高效的细菌裂解性能和良好的理化稳定性是噬菌体作为临床抗菌制剂的基础^[173],而对于噬菌体 GH-K3 而言这些生物学特性此前尚无人研究。针对 GH-K3 生物学特性研究的空白,本章的研究结果证实该噬菌体是一株可特异性裂解 K2 血清型肺炎克雷伯菌的噬菌体,爆发量可达 291 PFU/细胞。作为一种广泛流行的 hvKP, K2 血清型肺炎克雷伯菌造成的感染症状非常复杂^[12],抗生素疗法效果通常都不尽人意,而噬菌体 GH-K3 的特性会为 K2 型细菌感染的治疗带来新的希望。另外,研究发现噬菌体 GH-K3 可在 pH 6-10 和温度<50 °C 的环境中保持较为稳定的滴度。特别是该噬菌体在 4 °C 低温环境中可长期保持滴度稳定,因此该噬菌体具有作为抗生素替代或辅助制剂的应用潜力。

全基因组测序及分析的结果表明, GH-K3 是基因组长度为 49427 bp 的 ds DNA 噬菌体,共包含 77 个 ORF。该噬菌体在全基因组水平上与肠杆菌噬菌体 F20 以及包括 *Klebsiella* phage KP36 在内的 12 株克雷伯菌噬菌体的基因组具有高度的序列相似性。另外,该噬菌体中并未发现抗生素抗性基因^[174, 175]或疑似毒力因子编码基因^[176],因此 GH-K3 的遗传背景符合临床应用标准。

与其他的编码蛋白相比, gp32 却是对 GH-K3 具有特殊意义的编码蛋白,它紧邻尾丝蛋白的 C-末端,与同源蛋白相比其 N-末端相对保守,但是该蛋白的第

351-907氨基酸位点却几乎与NCBI数据库已公布的序列没有任何相似性。另外，GH-K3 gp32 及其 13 个同源蛋白的非 N-末端序列具有极高的多样性。噬菌体受体结合蛋白与宿主细菌受体的专一性结合需依赖其结合区的特异性结构，而 gp32 的序列则符合噬菌体受体结合蛋白结合区序列高度可变的特点^[177, 178]。HHpred 分析结果表明，GH-K3 gp32 及其同源蛋白都包含尾针蛋白（TSP）结构域。除了 1513 gp71 之外，这些蛋白似乎又都拥有解聚酶的结构域，其中 Sushi gp24、MezzoGao gp18、NJS1 gp42、GML-KpCol1 gp13、F20 gp32 和 KPN N141 gp71 均含有与肠杆菌噬菌体 K1F 的内切-N-乙酰神经氨酸酶（Endo-N-acetyl Neuraminidase）（PDB ID: 3GW6_B）构象相近的水解酶结构域，而特别要指出的是，KP36 gp50 (depoKP36) 的解聚酶的功能也已被文献证实^[167]，说明 GH-K3 gp32 可能也具有噬菌体解聚酶的活性。

综上所述，本章研究解析了噬菌体 GH-K3 的生物学特性以及基因组学相关属性，为后续该噬菌体相关的基础及应用研究奠定了基础。

1.5 小结

1.5.1 通过透射电子显微镜（TEM）对噬菌体 GH-K3 的形态进行了观察并获得了该噬菌体的宿主谱、一步生长曲线和噬菌体稳定性等生物学特性相关数据。

1.5.2 基因组测序及生物信息学分析结果表明，噬菌体 GH-K3 基因组序列长度为 49427 bp，包含 77 个 ORF，该噬菌体与 13 个噬菌体具有高度的同源性。

1.5.3 gp32 是噬菌体 GH-K3 中一个与众不同的编码蛋白，除了 N-末端以外，它的大部分序列与 NCBI 数据库已公布的序列没有任何相似性。

1.5.4 经 HHpred 分析结果表明，GH-K3 gp32 存在与尾针蛋白（Tail Spike Protein, TSP）结构域（PDB ID: 5W6S_A）和聚半乳糖醛酸酶（一种噬菌体解聚酶）结构域（PDB ID: 1BHE_A）类似的空间结构。

第二章 肺炎克雷伯菌噬菌体抗性突变菌株的分离及鉴定

与其他细菌类似，肺炎克雷伯菌在被噬菌体裂解的过程中，会产生针对噬菌体侵染的抗性突变。变异后的肺炎克雷伯菌因丧失对噬菌体的敏感性，不但限制了噬菌体疗法的应用，而且一旦这些菌株造成临床二次感染，后果将十分严重。近年研究人员针对细菌抵抗噬菌体侵染的机制展开了广泛的研究，他们发现细菌针对噬菌体吸附、注入、复制和组装等多个阶段都可以产生抗性突变，一些细菌甚至同时具有多种抵抗噬菌体侵染的方式，但关于肺炎克雷伯菌噬菌体抗性突变的产生机制的研究却十分少见。

本课题组前期研究表明，*K. pneumoniae* K7 在被 GH-K3 裂解的过程中会产生针对噬菌体的抗性突变，形成具有粗糙菌落形态的菌株，从而失去了对该噬菌体的敏感性^[95]，但其发生的机理还尚不清楚。为了研究该株肺炎克雷伯菌的噬菌体抗性产生机制，本章对 *K. pneumoniae* K7 在 GH-K3 压力下衍生的噬菌体抗性突变菌株进行了分离和鉴定，具体包括噬菌体抗性突变菌株的表观及微观的特征和生长特性的描述，以及 GH-K3 对这些突变菌株吸附效率的分析。过去的研究表明，很多细菌都拥有多种受体（表面多糖或蛋白成分等）以供不同噬菌体对其进行吸附，然而对于肺炎克雷伯菌来说，目前仅发现细菌表面多糖成分（CPS 和 LPS）可作为噬菌体的吸附受体^[179, 180]，因此，为了拓宽对肺炎克雷伯菌噬菌体受体的认知，本章对 *K. pneumoniae* K7 及其噬菌体抗性突变菌株的表面多糖和蛋白进行消化，并根据吸附试验的结果探讨了该噬菌体吸附受体类型，为了深入阐述肺炎克雷伯菌噬菌体抗性突变菌株的产生机制奠定基础。

2.1 材料

2.1.1 菌株及质粒载体

噬菌体 GH-K3 和 *K. pneumoniae* K7 的培养条件详见 1.1.1。

2.1.2 主要试剂及耗材

高碘酸盐和蛋白酶 K 均为 Sigma-Aldrich 公司的产品；其余试剂及耗材品牌详见 1.1.2。

2.1.3 主要仪器

仪器品牌详见 1.1.3。

2.2 方法

2.2.1 肺炎克雷伯菌生长曲线的测定

将肺炎克雷伯菌培养至对数生长期后转接至含新鲜的 LB 液体培养基的试管中(终浓度为 2×10^7 CFU/mL), 置于恒温摇床震荡培养 12 h (37 °C, 180 r/min)。每隔 1 h 使用 BioPhotometer plus 记录培养液在 600 nm 波长处的吸光值(OD_{600}), 最终通过上述时间收集的数据绘制菌株的生长曲线。

若测定 *K. pneumoniae* K7 在噬菌体 GH-K3 压力下的生长曲线, 则按照 $MOI=0.01$ 加入该噬菌体, 另设不添加噬菌体的 K7 培养液作为对照, 测定方法同上。

2.2.2 噬菌体 GH-K3 抗性突变菌株的分离

使用接菌环蘸取上述 10 h 培养液, 在 LB 琼脂平板上划线。培养 12 h 后, 用 10 μ L 枪头小心挑取一个粗糙的菌落, 置于 5 mL LB 液体培养基中培养 7 h, 将其命名为 “K7R^R” 并使用甘油法 (30% v/v) 保藏于 -80 °C 冰箱。另外, 使用同样的方法对一株具有光滑的菌落形态的抗性突变菌株进行保藏并将其命名为 “K7R^B”。

将上述菌液经倍比稀释后涂布 LB 琼脂平板, 12 h 后分别计算粗糙型菌落和光滑型菌落所占比例。

2.2.3 扫描电子显微镜样品观察肺炎克雷伯菌表面形态

将肺炎克雷伯菌培养至对数生长期($OD_{600}=0.4-0.6$), 然后用 PBS 洗涤三次。使用 4%戊二醛固定过夜后, 将菌株依次用不同浓度的乙醇 (20%、50%、70%、90%和 100%) 进行脱水, 随后置于盖玻片上冷冻干燥。最后, 通过扫描电子显微镜 (Scanning electron microscopy, SEM) 观察细菌表面形态。

2.2.4 噬菌体吸附试验

向 1 mL 处于对数生长末期的肺炎克雷伯菌培养液(浓度为 2×10^9 CFU/mL) 中加入 10 μ L 稀释的噬菌体 GH-K3 (1×10^7 PFU), 将混合液置于恒温摇床震荡培养 10 min (37 $^{\circ}$ C, 180 r/min) 以使噬菌体有充足时间对细菌进行吸附。然后将混合液离心 5 min (4 $^{\circ}$ C, $12,000 \times g$), 通过过滤器 (0.22 μ m) 过滤上清液, 最后将过滤后的样品进行连续倍比稀释并立即使用双层琼脂平板法测定上清液中残留的噬菌体滴度。噬菌体吸附效率=[(噬菌体初始滴度-上清液中的残留滴度)/初始滴度] $\times 100\%$ ^[181]。

2.2.5 噬菌体受体类型的鉴定

高碘酸盐 (Periodate, 化学式: IO_4^-) 和蛋白酶 K 分别对细菌表面多糖和蛋白成分具有破坏作用。

(1) 破坏细菌表面多糖成分

以乙酸钠溶液 (50 mM, pH 5.2) 为溶剂配制 100 mM 的 IO_4^- 溶液, 然后将该溶液以 1: 5 的体积比添加到肺炎克雷伯菌菌液中 (浓度为 2×10^9 CFU/mL), 然后置于 25 $^{\circ}$ C 的水浴锅中避光孵育 2 h。

(2) 破坏细菌表面多糖成分

将蛋白酶 K 溶液 (0.2 mg/mL) 以 1: 10 的体积比添加到肺炎克雷伯菌菌液中 (浓度为 2×10^9 CFU/mL), 然后置于 37 $^{\circ}$ C 的水浴锅中孵育 3 h。

使用 PBS 对经 IO_4^- 溶液或蛋白酶 K 处理的肺炎克雷伯菌洗涤 3 次, 然后立即进行噬菌体吸附试验。

结果判定: 若噬菌体对经 IO_4^- 处理菌株的吸附能力降低, 说明噬菌体以细菌表面多糖作为吸附受体; 若噬菌体对经蛋白酶 K 处理菌株的吸附能力降低, 说明噬菌体以细菌表面蛋白作为吸附受体^[99]。

2.2.6 统计学分析

参照 1.2.8 进行数据统计。

2.3 结果

2.3.1 肺炎克雷伯菌在噬菌体 GH-K3 压力下的生长特性

K. pneumoniae K7 在噬菌体 GH-K3 压力下的生长曲线分析表明, 该噬菌体可在 1.5 h 内有效抑制 K7 的生长, 抑制时间可维持 4 h 左右。然而, GH-K3 和 K7 混合培养液的 OD₆₀₀ 在 5 h 后开始升高, 说明噬菌体抗性突变菌株开始出现并迅速增殖 (图 2.1)。

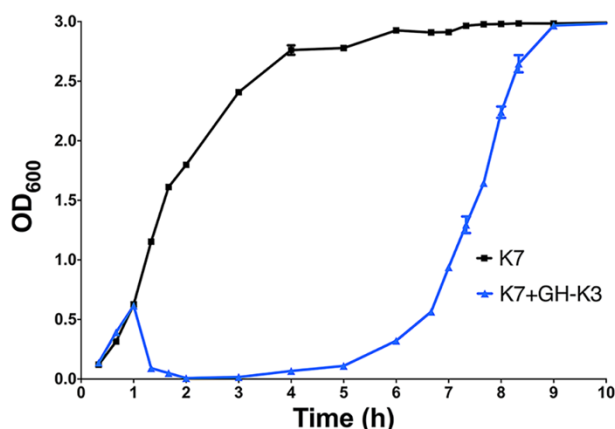


图 2.1 *K. pneumoniae* K7 在 GH-K3 压力下的生长曲线

Fig 2.1 Growth curves of *K. pneumoniae* K7 with GH-K3 treatment.

2.3.2 噬菌体抗性突变菌株的特征

将 *K. pneumoniae* K7 在噬菌体 GH-K3 的压力下培养 10 h 后, 通过平板划线法分离噬菌体抗性突变菌株。研究发现, 绝大多数突变菌株具有粗糙的菌落形态 (图 2.2 A), 本人挑取其中一个菌落扩大培养并保藏, 将其命名为 K7R^R。与 K7 菌液离心后所生成的“虚浮型”沉淀相比, K7R^R 的菌液在离心过程中形成“紧实型”沉淀 (图 2.2 C)。扫描电子显微镜 (SEM) 观察表明, K7R^R 表面缺少类似于 K7 的黏液层结构 (图 2.2 D), 表明该突变菌株表面多糖发生了缺失突变。然而, 我们意外发现另有极少数突变菌株基本上维持了 K7 光滑的菌落形态 (图 2.2 A), 这种菌株在所有的噬菌体抗性突变菌株中占比尚不到 1% (图 2.2 B), 本人亦挑取其中一个菌落扩大培养并保藏, 将其命名为 K7R^B。K7R^B 的菌液经离心后生成类似于 K7 的“虚浮型”沉淀 (图 2.2 C)。SEM 观察表明, 该突变菌株表面富含黏液层结构 (图 2.2 D), 说明 K7R^B 的表面多糖并未发生 K7R^R 那样明显的缺失突变。

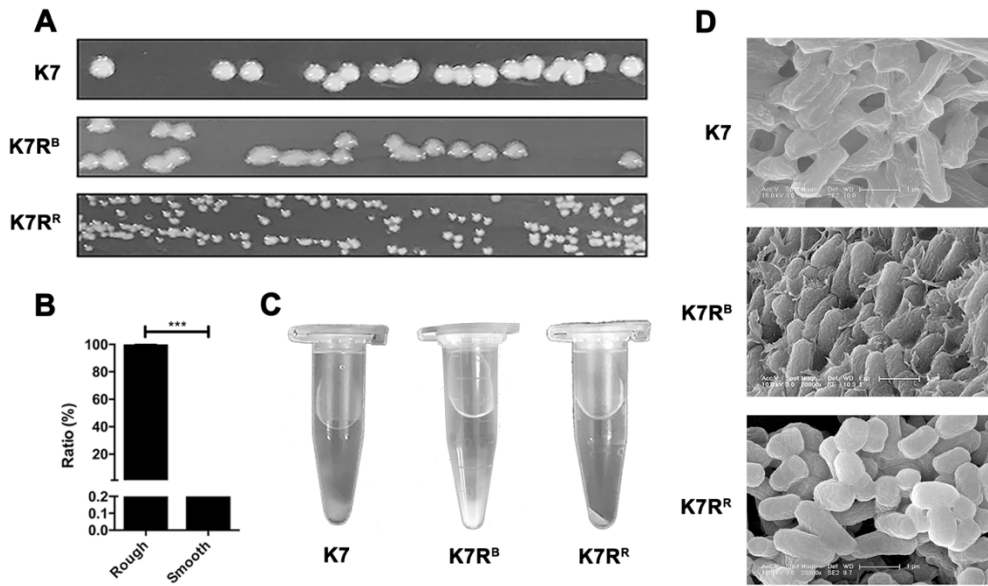


图 2.2 *K. pneumoniae* K7、K7R^B 和 K7R^R 的表现及微观特征

Fig 2.2 Apparent and microscopic characteristics of K7, K7R^B and K7R^R

A: K7、K7R^B 和 K7R^R 的菌落形态分析 B: 噬菌体抗性突变菌株的比例分析
 C: K7、K7R^B 和 K7R^R 的离心沉淀分析 D: K7、K7R^B 和 K7R^R 扫描电子显微镜图像
 A: Colony morphology of K7, K7R^B and K7R^R B: Proportion analysis of phage-resistant strains
 C: Centrifugation analysis of K7, K7R^B and K7R^R D: SEM images of K7, K7R^B and K7R^R

虽然 K7R^R 和 K7R^B 均无法被噬菌体 GH-K3 所裂解, 但是空斑试验则显示出二者截然不同的特征。与 K7R^R 空斑阴性的结果相比, GH-K3 可在 K7R^B 的菌苔上形成空斑 (图 2.3), 进一步说明了该突变菌株表面多糖的完整性可能并未受到噬菌体抗性突变的影响。

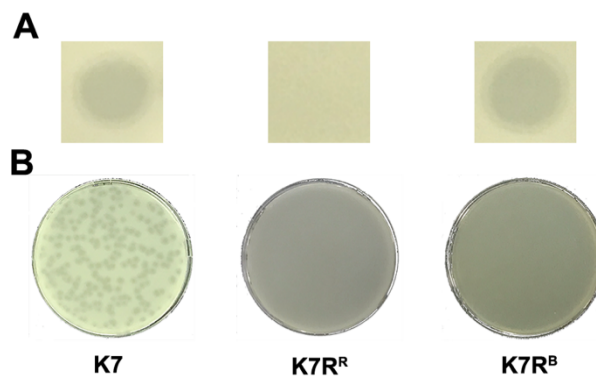


图 2.3 噬菌体抗性突变菌株的敏感性分析

Fig 2.3 Sensitivity of phage-resistant strains

A: 空斑试验 B: 噬斑试验
 A: Spot assay B: Plaque assay

2.3.3 噬菌体抗性突变菌株的生长特性

K. pneumoniae K7R^R、K7R^B 与 K7 的生长曲线比较结果显示，两种不同的噬菌体抗性突变菌株与野生株生长速率基本一致（图 2.4），说明针对噬菌体 GH-K3 的抗性突变并不会对菌株造成生长抑制。

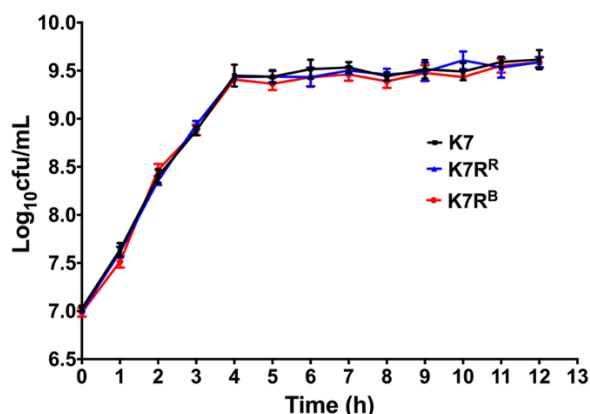


图 2.4 *K. pneumoniae* K7R^R、K7R^B 与 K7 的生长曲线的比较

Fig 2.4 Comparison of growth curves of *K. pneumoniae* K7R^R, K7R^B and K7

2.3.4 GH-K3 对噬菌体抗性突变菌株的吸附效率

与 *K. pneumoniae* K7 相比，噬菌体 GH-K3 对 K7R^R 的吸附能力急剧下降至 3.9%，大部分噬菌体在 10 min 之内无法吸附该突变菌株，即便将吸附时间延长到 1 h，吸附效率依然没有明显变化（8.9%），说明 K7R^R 的噬菌体抗性突变可能是表面多糖缺失导致的噬菌体吸附抑制。然而，GH-K3 对 K7R^B 吸附效率却几乎与 K7 相同（图 2.5）。

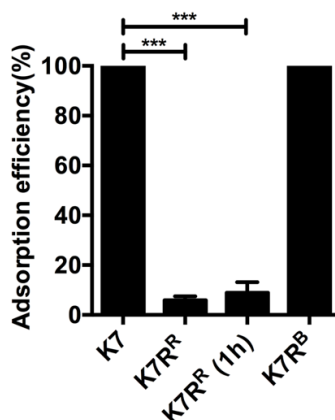


图 2.5 GH-K3 对肺炎克雷伯菌 K7、K7R^R 和 K7R^B 的吸附效率

Fig 2.5 Adsorption efficiencies of GH-K3 to *K. pneumoniae* K7, K7R^R, and K7R^B

2.3.5 噬菌体 GH-K3 吸附受体类型的鉴定

为了探究噬菌体 GH-K3 的吸附受体类型,本人使用高碘酸盐和蛋白酶 K 处理 K7 和 K7R^B。K7 和 K7R^B 经 IO₄⁻ 处理后,大部分噬菌体 GH-K3 在 10 min 之内无法吸附这两个菌株,说明细菌表面多糖对该噬菌体具有强大的募集作用,这与之前“肺炎克雷伯菌噬菌体吸附宿主需依赖细菌表面多糖受体”的观点相吻合。然而,随着吸附时间的延长,GH-K3 仍可逐渐吸附到经 IO₄⁻ 处理的 K7 表面,当吸附时间为 1 h 时,其吸附效率已升至 93.9%,并且对经 IO₄⁻ 处理的 K7 并不影响 GH-K3 的感染效率。说明细菌表面多糖的缺失仅是延缓了该噬菌体的吸附作用,并不对噬菌体的侵染具有决定性作用。另外,GH-K3 对 IO₄⁻ 处理的 K7R^B 的吸附效率并不随着吸附时间的延长而提高(9.5%)(图 2.6 A)。

蛋白酶 K 处理似乎并不影响噬菌体 GH-K3 对 K7 和 K7R^B 的吸附效率,但是严重影响该噬菌体对 K7 的侵染(图 2.6 B)。另外,该噬菌体对 IO₄⁻ 和蛋白酶 K 双重处理的 K7 和 K7R^B 的吸附效率(分别为 3.2%和 2.0%)显著低于仅用 IO₄⁻ 处理的菌株(分别为 12.0%和 10.7%)(图 2.6 A),说明一些细菌表面蛋白成分可能也是 GH-K3 的吸附受体,并且对于噬菌体的侵染具有决定性作用。

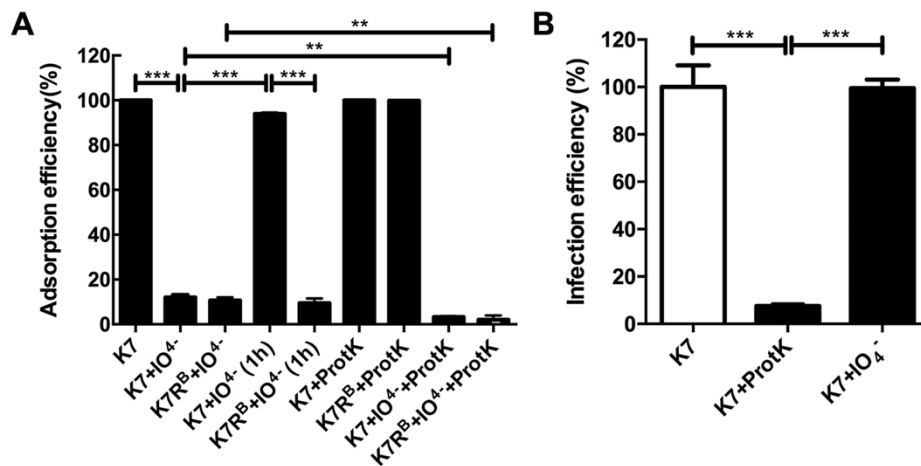


图 2.6 GH-K3 对经 IO₄⁻ 和蛋白酶 K 处理肺炎克雷伯菌的吸附效率和感染效率

Fig 2.6 Adsorption and infection efficiencies of GH-K3 to IO₄⁻ or ProK-treated

K. pneumoniae strains

A: GH-K3 的吸附效率 B: GH-K3 的感染效率

A: Adsorption efficiencies of GH-K3 B: Infection efficiencies of GH-K3

2.4 讨论

细菌的噬菌体抗性突变是限制噬菌体应用的重大障碍。本章研究表明 GH-K3 对宿主菌 *K. pneumoniae* K7 生长抑制作用仅能维持 5 h 左右, 随后菌落形态粗糙的噬菌体抗性菌株便开始大量产生, 进一步的研究则证实以 K7R^R 为代表“粗糙型”的突变菌株几乎不能被 GH-K3 所吸附。

肺炎克雷伯菌的 CPS 作为噬菌体吸附受体早在 20 世纪 70 年代即已被证实。Thurrow 等^[179]发现克雷伯氏菌噬菌体 KP11 通过识别和水解 β -D-葡糖基-(1-3)- β -D-葡糖醛酸键以及 α -D-半乳糖基-(1-3)- β -D-葡萄糖键 (β -D-glucosyl-(1-3)- β -D-glucuronic acid linkages) 来吸附宿主。此外, Tomas 等^[180]利用肺炎克雷伯氏菌噬菌体 FC3-2、FC3-3 和 FC3-6 诱导肺炎克雷伯菌 C3 产生抗性突变, 发现突变菌株均失去 O-抗原, 这说明除了荚膜多糖以外, 脂多糖成分亦可作为克雷伯菌噬菌体的表面受体。另外, 具有不同 K 抗原的 O1 血清型的肺炎克雷伯菌均对上述三个噬菌体均有敏感性, 这可能说明 O-抗原是三个噬菌体成功侵染宿主的决定因素。从此在相当长的一段时间里学界都认为这些细菌表面多糖成分是肺炎克雷伯菌噬菌体仅有的吸附受体, 而这种多糖缺失突变会阻滞噬菌体的吸附^[96]。

本章研究发现噬菌体 GH-K3 几乎失去了对 K7R^R 的吸附能力, 并且无法对 K7R^R 形成空斑, 说明 GH-K3 完全失去了对该突变菌株的识别能力。另外, K7R^R 表面的黏液层基本消失, 说明该突变菌株表面多糖中 CPS 发生缺失突变的可能性最大, 但是 LPS 是否也发生相应的改变还需要后续其他试验进行证实。另外, 本章研究意外发现极少数噬菌体抗性突变菌株 (K7R^B) 基本上维持了类似于 K7 的光滑的菌落形态及完整的黏液层结构, GH-K3 可对 K7R^B 形成空斑, 并且对该菌株吸附效率并未发生明显改变, 说明 GH-K3 仍具备对该突变菌株的识别能力。但即便如此, 该突变菌株完全不能被该噬菌体所裂解, 这个现象提示我们 K7R^B 可能通过一种新的方式获得了对 GH-K3 的抗性。

噬菌体吸附受体类型的鉴定结果表明, 细菌表面多糖作为噬菌体的吸附受体可在 10 min 内完成对 GH-K3 的募集, 而失去多糖的细菌对噬菌体的募集能力大打折扣, 说明细菌表面多糖的确是该噬菌体的吸附受体。另外, 该部分研究内容同时证实了 *K. pneumoniae* K7 表面蛋白吸附受体的存在, 但与多糖成分相比, 蛋

白成分对噬菌体的募集速率很低，所以这就解释了“蛋白酶 K 的处理并不影响 GH-K3 对 K7 以及 K7R^B 的吸附”的现象。然而，经 IO₄⁻处理的菌株只是可以延缓 GH-K3 的吸附和侵染过程而并未产生对噬菌体的抗性，说明细菌表面多糖受体的有无并不对该噬菌体的吸附起决定性作用，也进一步说明菌落形态粗糙的噬菌体抗性突变菌株 K7R^R 的产生不仅仅是表面多糖缺失那样简单，具体原因仍需要后续进一步的探索。然而，经 IO₄⁻处理的 K7R^B 似乎却几乎完全排斥 GH-K3 对其吸附，说明该噬菌体关键的吸附受体发生变异，而这一吸附受体很可能是细菌表面蛋白成分。同时，本章研究也证明 K7 经蛋白酶 K 的处理后，噬菌体 GH-K3 对其感染效率大幅度降低，说明肺炎克雷伯菌的表面蛋白成分对噬菌体的侵染具有决定作用。因此，K7R^B 的产生有可能是蛋白受体发生改变所致。

综上所述，本章的研究从噬菌体抗性突变菌株的表观及微观的特征以及吸附受体类型鉴定的角度确定了 K7R^R 和 K7R^B 均主要以吸附抑制的方式抵抗噬菌体 GH-K3 的侵染，并进一步推测了该噬菌体对于肺炎克雷伯菌的吸附具有“细菌多糖-蛋白”两级受体模式。然而，本章数据仅是揭开了噬菌体 GH-K3 抗性突变菌株的产生方式的冰山一角，其噬菌体抗性产生机制仍需后续进行深入研究。

2.5 小结

2.5.1 *K. pneumoniae* K7 在噬菌体 GH-K3 压力下衍生的噬菌体抗性突变菌株按照菌落形态可分为粗糙型和光滑型两种类型，它们的主要特征已经被解析。

2.5.2 通过噬菌体吸附试验对 *K. pneumoniae* K7 的噬菌体吸附受体类型进行了鉴定，发现 GH-K3 不只以细菌表面多糖作为吸附受体，细菌表面蛋白成分很可能也参与了噬菌体的吸附过程。

第三章 粗糙型肺炎克雷伯噬菌体抗性突变菌株的产生机制

细菌的噬菌体抗性突变产生于噬菌体侵染宿主过程中的不同阶段^[182]，其中吸附抑制是最常见的细菌抵御噬菌体侵染的方式^[183]。研究证实革兰氏阴性菌 LPS (O-抗原) 和 CPS (K-抗原) 可作为多种噬菌体的初级吸附受体^[99, 104, 119]。一旦 O-抗原或 K-抗原发生缺失，细菌菌落形态通常会明显变得粗糙，进而对噬菌体的吸附产生明显的抑制作用，甚至对噬菌体的侵染完全产生抗性^[184, 185]。上一章的研究已经证实 *K. pneumoniae* K7 在噬菌体 GH-K3 的压力下会产生噬菌体抗性突变，绝大多数突变菌株因表面多糖的丧失而使得菌落形态变得粗糙。早期的研究中，LPS 或 CPS 均有作为肺炎克雷伯菌吸附受体的报道^[179, 180]，但是我们仅从表观现象无法判定哪种多糖是 GH-K3 的吸附受体。

为了鉴定 GH-K3 的多糖吸附受体成分，本章分别提取了 *K. pneumoniae* K7 和 K7R^R 的 CPS 成分和 LPS 成分，使用阿尔新蓝染色、银染等方法对两株细菌中多糖差异进行分析。另外，一些研究表明细菌对噬菌体吸附抑制源于 LPS 或 CPS 合成蛋白的编码基因突变而导致的多糖合成阻滞^[184, 185]。上一章的研究也表明细菌表面多糖的缺失并不是产生噬菌体抗性突变的根本原因，从而假定 K7R^R 的多糖合成编码蛋白可能存在相似的缺失突变。因此本章对 K7R^R 进行全基因组测序以比较该突变菌株与 K7 的序列差异，并对两个菌株进行液相色谱-串联质谱 (Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry, LC-MS-MS) 分析，以寻找它们之间的差异表达蛋白。然后，通过基因缺失等多种试验方法，验证差异蛋白在维持细菌对噬菌体敏感性所起的作用，进而阐明 K7R^R 噬菌体抗性突变的产生机制。

3.1 材料

3.1.1 菌株和噬菌体及质粒载体

pCVD442 质粒载体、大肠杆菌 DH5α λpir 菌株和大肠杆菌 β2155 菌株由本实验室保藏；噬菌体 GH-K3 及其宿主细菌 *K. pneumoniae* K7 的培养条件详见 1.1.1。

3.1.2 主要试剂及耗材

Bacterial DNA Kit (D3350)、Bacterial RNA Kit (R6950)、普通质粒小提试剂盒和 DNA 凝胶回收试剂盒均为美国 Omega Bio-Tek 公司的产品; PrimeSTAR HS DNA Polymerase、DNA 连接试剂盒、DL5000 marker、4×SDS buffer、PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 和 SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) 聚合酶均为大连 TaKaRa 公司产品; 限制性内切酶 *Sma* I、FastAP 热敏感碱性磷酸酶和 Tango buffer 均为 Thermo Scientific 公司产品; 氨苄青霉素、卡那霉素 (Amresco 公司); 50×TAE、10×TBST、10×膜转移缓冲液均为北京索莱宝科技有限公司的产品; 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷和阿尔新蓝 8GX 溶液均为 Sigma-Aldrich 公司的产品; 苯酚溶液 (pH 6.6, Amresco 公司); PVDF 膜和 ECL 化学发光液均为 Merck Millipore 公司的产品; 脱脂奶粉 (美国 BD 公司); SERVAPOR®透析管 (MWCO 12-14 kDa, 德国 Serva 公司); HRP-conjugated goat anti-rabbit antibody (美国 Abcam 公司); 二氨基庚二酸 (TCI 公司); 0.2 mL 八联 PCR 管 (Axygen 公司)。

本章研究所使用的兔源多克隆抗体由金斯瑞生物科技有限公司制备, 滴度均达到 1: 128000, 抗原多肽序列见表 3.1。

表 3.1 抗原多肽序列

Table 3.1 Sequences of peptide antigens

Name	Start-end	Sequence
GT-1	185-198 aa	<u>C</u> IKDKHIEAGFFKST
GT-2	89-102 aa	RSRLREIKLNKKYDC <u>C</u>
WcaJ	317-330 aa	<u>C</u> ENDDKVIQATKNDI
DnaK	613-626 aa	<u>C</u> SADAQASNAKDDDDV

其余试剂及耗材品牌详见 1.1.2 和 2.1.2。

3.1.3 主要仪器

电转化仪 (美国 BIO-RAD 公司); Applied Biosystems®7500 实时荧光定量 PCR 系统 (美国 Thermo Scientific 公司); 其余仪器品牌详见 1.1.3 和 2.1.3。

3.2 方法

3.2.1 肺炎克雷伯菌表面多糖的提取及纯化

(1) 使用热酚法提取细菌表面多糖

取 1 mL 处于对数生长末期的肺炎克雷伯菌培养液(浓度为 2×10^9 CFU/mL), 离心 5 min (4°C , $12,000 \times g$) 并保留菌体沉淀, 将菌体沉淀重悬于 150 μL ddH₂O 并加入等体积的饱和酚水溶液 (pH 6.6), 再使用涡旋振荡器剧烈混合并室温静置 5min。为了抽提混合液中的多糖成分, 向混合液中加入 300 μL 氯仿并置于 65°C 的水浴锅中温育 20 min, 然后离心 10 min (4°C , $13,000 \times g$) 并收集上层水相中的粗制多糖成分。

(2) 粗制多糖的纯化

向粗制多糖溶液中加入三氯乙酸 (20% w/v) 以沉淀核酸和蛋白质, 然后离心 1 h (4°C , $16,000 \times g$) 并弃去沉淀。接下来, 向上清液中加入 3 体积的冷乙醇 (96% v/v) 并在 -20°C 下放置 24 h, 然后离心 1 h (4°C , $16,000 \times g$) 收集沉淀并重悬于去离子水中。

(3) CPS 组分和 LPS 组分的纯化

通过超速离心 20 h (4°C , $100,000 \times g$) 分离 CPS 组分及 LPS 组分, 使用 SERVAPOR 透析管分别对粗制 CPS 和 LPS 透析 24 h (4°C) 以进行纯化。最后, 使用冻干机将纯化的 CPS 和 LPS 冻干并称重。

3.2.2 *K. pneumoniae* K7R^R 的全基因组测序

将 *K. pneumoniae* K7R^R 在 LB 液体培养基中培养至对数生长末期 (浓度为 2×10^9 CFU/mL), 按照说明书使用 Bacterial DNA Kit 提取其基因组。经浓度和纯度检验合格后 (≥ 100 ng/ μL , $\text{OD}_{260/280} \approx 1.8$, 总量 ≥ 2 μg), 委托军事医学科学院微生物流行病学研究所童贻刚研究员课题组对该细菌进行全基因组测序、序列组装及注释分析。*K. pneumoniae* K7R^R 全基因组序列信息已上传至 GenBank (Accession Number: SKFI00000000)。

3.2.3 *K. pneumoniae* K7 和 K7R^R 的 LC-MS-MS 分析

将 *K. pneumoniae* K7 和 K7R^R 在 LB 液体培养基中培养至对数生长末期（浓度为 2×10^9 CFU/mL），使用 PBS 洗涤菌体三次并将菌液浓缩 10 倍。然后将浓缩菌液与 4×Protein SDS PAGE Loading Buffer 按照体积比 3: 1 进行混合并煮沸 10 min。接下来通过 12% SDS-PAGE 分离不同分子量大小菌体蛋白，随后将每个样品对应的胶条按照分子量大小切成八个凝胶条带并装入 EP 管中封存^[186]。每个样品均准备 4 个生物学重复。后续的 LC-MS-MS 上机前样品制备、测试及蛋白表达量差异分析由本课题组委托北京大学基础医学院刘小云研究员课题组进行。两个细菌之间蛋白表达量差异 ≥ 2 倍即判定为差异表达蛋白。热图（Heat-map）由 Heml 1.0 生成^[187]，并通过 STRING 进行 COG 分析将差异表达蛋白进行归类^[188]。

3.2.4 *GT-1*、*GT-2* 和 *wcaJ* 基因缺失菌株的构建

3.2.4.1 同源重组手臂基因扩增与产物回收

通过 Primer 5.0 软件，根据需要缺失的基因序列信息设计同源重组手臂基因引物，并委托吉林省库美生物科技有限公司合成，引物名称及序列见表 3.2。

表 3.2 同源重组手臂基因相关引物序列

Table 3.2 Primers for homologous recombination arms

Gene name	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
(<i>GT-1</i>)-5	GTCGACACATTGCAATTGTGCAAGTCGAAT TTATC	GAAGATATTCAAGATATAGATAGCATA CCATTTCCCTGTTG
(<i>GT-1</i>)-3	CTCAATTAATGACTCGGCCAATATCTGAAC	GTCGACGTTGTATATAATGCAGTTTCG CTAGATGGAC
(<i>GT-2</i>)-5	GTCGACGTTGTCAATATAGCGATAACGATCG TTACAG	GAGAACAGTTAGTAATAGCCAATGAC GAAGT
(<i>GT-2</i>)-3	CGATCAAATCAACATCATGTCCTGTTGAG	GTCGACAGAAATGTCAGTTAAATCGA TTGCGGTATC
(<i>wcaJ</i>)-5	GTCGACATACTCAATGCCGTTATGAACCATC TTC	TAAGATGCTGCTTAAGATAAGCATTGT GC
(<i>wcaJ</i>)-3	TTCAATCACTCATTTATAACAAGCATATCT GTCG	GTCGACGATGCCGATCTTCTGAATGTA GCATC

(1) 同源重组手臂基因的扩增

所有 PCR 反应体系均为：

<i>K. pneumoniae</i> K7 基因组	0.5 μ L
(<i>GT-1/GT-2/wcaJ</i>) -5 F/3 F	0.5 μ L
(<i>GT-1/GT-2/wcaJ</i>) -5 R/3 R	0.5 μ L
dNTP Mixture	5.0 μ L
5 \times PrimeSTAR Buffer	10.0 μ L
PrimeSTAR HS DNA Polymerase	0.5 μ L
ddH ₂ O	33.0 μ L
Total	50.0 μL

为了便于 PCR 产物的回收，上述反应体系做 4 个重复。

所有 PCR 反应程序均为：

95 $^{\circ}$ C	5 min	} 30 Cycles
94 $^{\circ}$ C	30 s	
60 $^{\circ}$ C	30 s	
72 $^{\circ}$ C	1 min	
72 $^{\circ}$ C	10 min	

(2)使用 1%琼脂糖凝胶电泳对位于目的基因上游和下游同源重组手臂基因的 PCR 产物进行检测,并按照说明书使用 DNA 凝胶回收试剂盒回收 PCR 产物。

3.2.4.2 Kan 抗性基因的扩增与产物回收

通过 Primer 5.0 软件,根据同源重组手臂基因序列及 Kan 抗性基因信息设计融合 PCR 引物,并委托吉林省库美生物科技有限公司合成,引物名称及序列见表 3.3。

表 3.3 卡那霉素抗性基因相关引物序列

Table 3.3 Primers for kanamycin resistance genes

Gene name	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
(GT-1)-Kan	CAACAGGAAATGGTATGCTATCTATATCTT	GTTCAGATATTGGCCGAGTCATTAAT
	GAATATCTTCCATATGAATATCCTCCTTAGT TCCTATTC	TGAGGAGCTGCTTCGAAGTTCCTA
(GT-2)-Kan	ACTTCGTCATTGGCTATTACTAACTGTTCT	CTCAACAGGACATGATGTTGATTTGA
	CCATATGAATATCCTCCTTAGTTCCTATTC	TCGGAGCTGCTTCGAAGTTCCTA
(wcaJ)-Kan	GCACAATGCTTATCTTAAGCAGCATCTTAC	CGACAGATATGCTTGTTTATAAATGA
	ATATGAATATCCTCCTTAGTTCCTATTC	GTGATTGAAGAGCTGCTTCGAAGTT CCTA

(1) Kan 抗性基因的扩增

所有 PCR 反应体系均为:

pKD4 质粒 (~10 ng/μL)	0.5 μL
(GT-1/GT-2/wcaJ) -Kan F	0.5 μL
(GT-1/GT-2/wcaJ) -Kan R	0.5 μL
dNTP Mixture	5.0 μL
5×PrimeSTAR Buffer	10.0 μL
PrimeSTAR HS DNA Polymerase	0.5 μL
ddH ₂ O	33.0 μL
Total	50.0 μL

为了便于 PCR 产物的回收, 上述反应体系做 4 个重复。

所有 PCR 反应程序均为:

95 °C	5 min	} 30 Cycles
94 °C	30 s	
57 °C	30 s	
72 °C	1 min	
72 °C	10 min	

(2) 使用 1%琼脂糖凝胶电泳对 Kan 抗性基因的 PCR 产物进行检测, 并按照说明书使用 DNA 凝胶回收试剂盒回收 PCR 产物。

3.2.4.3 基因缺失打靶片段的构建

(1) 融合 PCR 技术构建基因缺失打靶片段

所有 PCR 反应体系均为:

上游同源重组手臂基因 PCR 产物	5.0 μL
下游同源重组手臂基因 PCR 产物	5.0 μL
Kan 抗性基因的 PCR 产物	5.0 μL
(<i>GT-1/GT-2/wcaJ</i>) -5 F	0.5 μL
(<i>GT-1/GT-2/wcaJ</i>) -3 R	0.5 μL
dNTP Mixture	5.0 μL
5 \times PrimeSTAR Buffer	10.0 μL
PrimeSTAR HS DNA Polymerase	0.5 μL
ddH ₂ O	18.5 μL
<hr/>	
Total	50.0 μL

为了便于 PCR 产物的回收, 上述反应体系做 4 个重复。

所有 PCR 反应程序均为:

95 $^{\circ}\text{C}$	5 min	} 30 Cycles
94 $^{\circ}\text{C}$	30 s	
60 $^{\circ}\text{C}$	30 s	
72 $^{\circ}\text{C}$	3 min	
72 $^{\circ}\text{C}$	10 min	

(2) 使用 1%琼脂糖凝胶电泳对 *GT-1*、*GT-2* 和 *wcaJ* 打靶片段的 PCR 产物进行检测, 并按照说明书使用 DNA 凝胶回收试剂盒回收 PCR 产物。

3.2.4.4 基因缺失打靶质粒载体的构建

(1) 使用 *Sma* I 对 pCVD442 质粒载体进行单酶切, 反应体系如下:

pCVD442 (~100 ng/ μL)	10.0 μL
10 \times Tango buffer	5.0 μL
<i>Sma</i> I (10 U/ μL)	2.0 μL
ddH ₂ O	33.0 μL
<hr/>	
Total	50.0 μL

37 °C酶切 2-3 h 后,按照说明书使用 DNA 凝胶回收试剂盒对 pCVD442 质粒载体酶切产物进行回收,经 1%琼脂糖凝胶电泳检测和浓度测量后,贮存于-20 °C 冰箱备用。

(2) 去磷酸化反应

pCVD442 酶切产物	50.0 μL
FastAP (10 U/ μL)	3.0 μL
Total	53.0 μL

37 °C反应 45 min。

(3) 打靶片段的 PCR 产物与 pCVD442 质粒载体的连接

连接体系如下:

打靶片段的 PCR 回收产物 ($\sim 50 \text{ ng}/\mu\text{L}$)	4.5 μL
质粒载体酶切产物 ($\sim 50 \text{ ng}/\mu\text{L}$)	0.5 μL
Solution I	5.0 μL
Total	10.0 μL

10 μL 体系于 16 °C连接过夜。

(4) 电转化感受态细胞的制备:

取大肠杆菌 DH5 α λpir 或者 $\beta 2155$ 菌种,划线接种 LB 平板(不含抗生素),30 °C培养过夜。 $\beta 2155$ 菌株需在培养基中另添加 0.5 mM 的 DAP(二氨基庚二酸)。次日挑单克隆接种 2 mL 液体 LB 培养基(不含抗生素),30 °C培养过夜。第三日吸取 0.5 mL 过夜菌液加入 50 mL LB 液体 LB 培养基中,37 °C培养至 OD₆₀₀ 至 0.5。将培养液冰浴 15 min,离心 15 min (4 °C, 10,000 $\times g$) 弃上清。然后以 30 mL 冰冷的三蒸水洗涤细菌沉淀两次,再用 10 mL 冰冷的 10%甘油(三蒸水配制)洗涤一次,最后将离心后的细菌沉淀充分悬浮于 50 μL 10%甘油中,即得用于电转化试验的感受态细胞,分装并保存于-80 °C冰箱。

(5) 将(3)中过夜连接产物经异丙醇沉淀后,使用 70%乙醇洗涤并溶解于 5 μL 去离子水。通过电转化仪将其转入大肠杆菌 DH5 α λpir 感受态细胞,然后将转化菌液涂布 LB 琼脂平板(含 Amp 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Kan 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)并于 37 °C培养至单克隆形成。

(6) 使用 10 μL 枪头于超净工作台中小心挑取平板上单克隆, 接种到 5 mL 的 LB 液体培养基 (含 Amp 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Kan 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 然后置于恒温摇床中震荡培养 10-12 h (37 $^{\circ}\text{C}$, 180 r/min)。

(7) 按照说明书使用质粒小提试剂盒提取质粒 DNA 以获得重组打靶质粒载体。

(8) 将阳性重组质粒送往吉林省库美生物科技有限公司并使用 pCVD442 载体测序引物 (5'-3': ATTTGCAGACTACGGGCCTAAA) 进行测序, 将测序正确打靶质粒载体贮存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

3.2.4.5 打靶质粒载体供体菌株的构建

(1) 将重组打靶质粒载体通过电转化仪转入大肠杆菌 β 2155 菌株, 然后将转化菌液涂布 LB 琼脂平板 (含 Amp 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.5 mM DAP (二氨基庚二酸)) 并于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养至单克隆形成。

(2) 使用 10 μL 枪头于超净工作台中小心挑取平板上单克隆, 接种到 5 mL 的 LB 液体培养基 (含 Amp 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.5 mM DAP), 然后置于恒温摇床中震荡培养 10-12 h (37 $^{\circ}\text{C}$, 180 r/min), 即为供体菌株的菌液。

3.2.4.6 供体菌株和受体菌株的接合试验

(1) 取 500 μL 供体菌株的菌液与 500 μL 受体菌株 (*K. pneumoniae* K7) 的菌液混合进行接合实验。

(2) 取 100 μL 接合后菌液涂布 LB 琼脂平板 (含 Amp 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Kan 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 并于 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养至单克隆形成。

(3) 随机挑选 10 个单克隆, 依次用 10 μL 枪头挑入同一管 100 μL LB 液体培养基, 混合均匀后, 取 10 μL 接种 3 mL LB 培养基, 然后置于恒温摇床中震荡培养 10-12 h (30 $^{\circ}\text{C}$, 220 r/min)。然后取 100 μL 培养液涂布 LB 琼脂平板 (含 Kan 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 10% 蔗糖, 不含 NaCl), 置于 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养至单克隆形成。再随机挑选 100 个单克隆, 使用 10 μL 枪头依次分别点种含 Amp 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LB 琼脂平板和含 Kan 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LB 琼脂平板, 30 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养过夜。

(4) 随机挑选 1-2 个只在含 Kan 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LB 琼脂平板上生长的单克隆, 接种到 5 mL LB 液体培养基 (Kan 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 然后置于恒温摇床中震荡培养 10-12 h (30 $^{\circ}\text{C}$, 180 r/min)。

3.2.4.7 *GT-1*、*GT-2* 和 *wcaJ* 基因缺失菌株的鉴定

通过 Primer 5.0 软件，根据缺失基因序列及周边序列信息分别设计外侧鉴定引物和内侧鉴定引物，并委托吉林省库美生物科技有限公司合成，引物名称及序列见表 3.4。

表 3.4 基因缺失菌株鉴定引物序列

Table 3.4 Primers for identification of gene deletion strains

Gene name	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
(<i>GT-1</i>)-out	GGATGAACTTTGTTAAGATAACCAGATAA GTCCTTG	CTATGAGTATAAATGTGCTGTAGATGCAGGAA TAAG
(<i>GT-1</i>)-in	CAACATTTGAGTCAAGTGCTAACTGCTT	CAGAAATGTCAGTTAAATCGATTGCGGTATC
(<i>GT-2</i>)-out	GATATTACTATTGAGCATAGCGACAGCAA AAC	GTAGAGTTATTCATACTTCTAGAGATTATTATC TGATCCATCC
(<i>GT-2</i>)-in	CCATCGTAGATCGCTTGGAGTTCTT	CCAAAGGGATATGGCTACCAAGTCATATC
(<i>wcaJ</i>)-out	CTTGGTGAAGATATCTTTGGTAATGTCTGA TCA	GGATATCATTTCTTAAACTTAAGAACATAAGA GCTACAATATG
(<i>wcaJ</i>)-in	GAGGTCCTACAACGGACATCTGAC	CAGGTGCGTTATGGAATGGATGGA

(1) 外侧鉴定引物 PCR 反应

所有 PCR 反应体系均为：

菌液	0.5 μL
(<i>GT-1/GT-2/wcaJ</i>) -out F	0.5 μL
(<i>GT-1/GT-2/wcaJ</i>) -out R	0.5 μL
dNTP Mixture	5.0 μL
5×PrimeSTAR Buffer	10.0 μL
PrimeSTAR HS DNA Polymerase	0.5 μL
ddH ₂ O	33.0 μL
Total	50.0 μL

所有 PCR 反应程序均为：

95 °C	5 min	} 35 Cycles
94 °C	30 s	
60 °C	30 s	
72 °C	3 min	
72 °C	10 min	

使用 1%琼脂糖凝胶电泳对外侧鉴定引物的 PCR 产物进行检测。

(2) 内侧鉴定引物 PCR 反应

所有 PCR 反应体系均为：

菌液	0.5 μ L
(<i>GT-1/GT-2/wcaJ</i>) -in F	0.5 μ L
(<i>GT-1/GT-2/wcaJ</i>) -in R	0.5 μ L
dNTP Mixture	5.0 μ L
5 \times PrimeSTAR Buffer	10.0 μ L
PrimeSTAR HS DNA Polymerase	0.5 μ L
ddH ₂ O	33.0 μ L
Total	50.0 μ L

所有 PCR 反应程序均为：

95 $^{\circ}$ C	5 min	} 30 Cycles
94 $^{\circ}$ C	30 s	
60 $^{\circ}$ C	30 s	
72 $^{\circ}$ C	30 s	
72 $^{\circ}$ C	10 min	

使用 1%琼脂糖凝胶电泳对内侧鉴定引物的 PCR 产物进行检测。

(3) 将上述外侧鉴定引物的 PCR 产物送往吉林省库美生物科技有限公司，以外侧鉴定引物进行测序。如果 PCR 产物测序结果符合预期，则可判定对应的基因已经成功缺失。

(4) 使用甘油法 (30% v/v) 将符合鉴定预期的 *K. pneumoniae* K7 (Δ *GT-1*)、K7 (Δ *GT-2*) 和 K7 (Δ *wcaJ*) 菌株贮存于 -80 $^{\circ}$ C 超低温冰箱备用。

3.2.5 肺炎克雷伯菌的 qRT-PCR 分析

为了测定 *K. pneumoniae* K7R^R、K7 (Δ *GT-1*)、K7 (Δ *GT-2*) 和 K7 (Δ *wcaJ*) 中 *GT-1*、*GT-2*、*wcaJ* 的转录变化情况，通过 Primer 5.0 软件分别设计三个基因以及内参基因 16s rRNA 的 qRT-PCR 引物并委托吉林省库美生物科技有限公司合成，基因名称及引物序列见表 3.5。

表 3.5 qPCR 分析相关引物序列
Table 3.5 Primers for qPCR analysis

Gene name	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>GT-1</i>	GGTTTCGGTTCAGATATTGGC	GTATCTTTACGCTCATTATGCTCATG
<i>GT-1</i>	GTCGTTAGTACAAGCATTGGAAG	CAAATAGCACTTCGTCATTGGC
<i>wcaJ</i>	TTGGTCAGATGTCCGTTGTAG	ACCACGCCAACCATTAATTTG
16s rRNA	AGGCTAGAGTCTTGTAGAGGG	AGCGTCAGTCTTTGTCCAG

(1) 肺炎克雷伯菌总 RNA 的提取

将肺炎克雷伯菌培养至对数生长期 ($OD_{600}=0.6-0.8$), 随后将菌液离心 5 min ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $12,000 \times g$) 并用 PBS 洗涤菌体沉淀。按照说明书使用 Bacterial RNA Kit 提取细菌的总 RNA。提取的 RNA 经浓度和纯度检验合格后 ($OD_{260/280} = 1.8\sim 2.0$, $OD_{260/230} \geq 2.0$, $RIN \geq 6.5$, $23S: 16S \geq 1.0$, $\geq 2\text{ }\mu\text{g}$ in total [$\geq 100\text{ ng}/\mu\text{l}$]), 贮存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱备用。

(2) 肺炎克雷伯菌 cDNA 的获取

按照说明书使用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 对提取的细菌总 RNA ($<1\text{ }\mu\text{g}$) 进行反转录以获取 cDNA, 贮存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱备用。

(3) qRT-PCR 反应

使用 $200\text{ }\mu\text{L}$ 八联管按照表 3.6 所示的反应体系在冰盒上配制 PCR 反应液。每个样品设置 3 个生物学重复。

表 3.6 qRT-PCR 反应体系
Table 3.6 Reaction system of qRT-PCR

试剂	用量
菌株 cDNA ($<100\text{ ng}$)	2.0 μL
Negative control 反应时, 加入等体积 ddH ₂ O	
PCR Forward Primer ($10\text{ }\mu\text{M}$)	0.5 μL
PCR Reverse Primer ($10\text{ }\mu\text{M}$)	0.5 μL
SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)	12.5 μL
ddH ₂ O	9.5 μL
Total	25.0 μL

随后将八联管按照编号依次放入 Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR System, 按照“两步法”运行 qRT-PCR 反应程序。

qRT-PCR 反应程序:

	↓	
95°C	30 sec	
95°C	5 sec	}
60°C	30 sec	
95°C	15 sec	} 40 Cycles
60°C	15 sec	
95°C	20 min	

(4) qRT-PCR 数据分析

根据所得数据,应用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析细菌中 *GT-1*、*GT-2*、*wcaJ* 转录变化情况,具体算法为: 基因转录倍数变化 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$, $\Delta Ct = Ct(\text{目的基因}) - Ct(\text{内参基因}(16s\text{ rRNA}))$, $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{试验组}) - \Delta Ct(\text{对照组}(K7))$ 。

3.2.6 Western Blot 分析

使用 12% SDS-PAGE 分离待测蛋白样品,通过半干转膜仪将蛋白转移至 PVDF 膜(膜预先用甲醇浸泡 1 min,转膜时间 7 min)。随后将 PVDF 膜置于含有封闭液(5%脱脂奶粉)的平皿中并使用水平脱色摇床封闭 2 h (25 °C)。然后加入稀释至适当浓度后的一抗对膜进行孵育(37 °C 1 h 或 4 °C 过夜),用 TBST 洗涤三次(每次 5 min)。接下来使用二抗稀释液在 37 °C 孵育 PVDF 膜 1 h,用 TBST 进行三次洗涤(每次 10 min),最后通过化学发光进行显影。

3.2.7 统计学分析

参照 1.2.8 进行数据统计。

3.3 结果

3.3.1 *K. pneumoniae* K7R^R 的表面多糖分析

上一章已经证实噬菌体 GH-K3 主要以 *K. pneumoniae* K7 表面多糖成分作为初级吸附受体。本章阿尔新蓝染色结果表明, 与 *K. pneumoniae* K7 的高分子量 CPS 相比, K7R^R 中 CPS 残基的分子量主要在 70-250 KDa 之间, 部分 CPS 残基分子量已低至约 50 KDa (图 3.1 A), 说明该突变菌株中 CPS 的合成发生严重障碍。然而银染的结果表明, K7R^R 中 LPS 的含量虽然高于野生型菌株 K7, 但是组分却未发生明显的改变(图 3.1 B)。上述结果说明 *K. pneumoniae* K7 中 GH-K3 的初级吸附受体主要为 CPS。

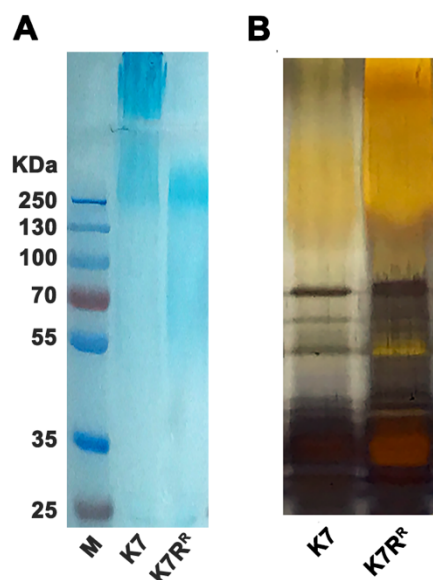


图 3.1 K7 与 K7R^R 的表面多糖分析

Fig 3.1 Surface polysaccharide analysis of K7 and K7R^R

A: K7 和 K7R^R 的 CPS 表型 B: K7 和 K7R^R 的 LPS 表型

A: CPS phenotypes of K7 and K7R^R B: LPS phenotypes of K7 and K7R^R

3.3.2 *K. pneumoniae* K7R^R 及经 IO₄⁻处理的 K7 子代菌株的特征

虽然 IO₄⁻可降解 *K. pneumoniae* K7 表面的多糖成分, 但是本章的结果显示经 IO₄⁻处理的 K7 菌株的子代却很快恢复了类似于 K7 虚浮的沉淀以及光滑的菌落形态。然而, K7R^R 在无 GH-K3 压力下产生的子代菌株仍呈现出稳定的“紧实型”沉淀形态及粗糙的菌落形态(图 3.2)。这些结果说明 K7R^R 表面 CPS 的合成可能受到抑制。

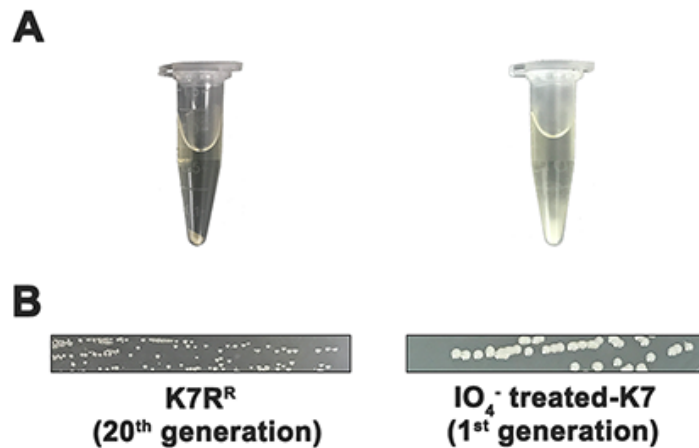


图 3.2 K7R^R 和经 IO₄⁻处理的 K7 子代菌株的特征

Fig 3.2 Characteristics of the progeny strains of K7R^R and IO₄⁻ treated-K7

A: 离心沉淀分析 B: 菌落形态分析

A: Centrifugation analysis B: Colony morphology

3.3.3 *K. pneumoniae* K7 与 K7R^R 的差异基因及差异表达蛋白分析

为了深入探究 *K. pneumoniae* K7R^R 的 CPS 合成抑制以及产生噬菌体抗性的原因, 本人对 K7R^R 与 K7 之间序列差异基因和差异表达蛋白进行分析。然而, BLAST 分析表明, K7R^R 在全基因组水平上并未发生基因突变。但是针对 K7 和 K7R^R 的~3100 个蛋白的 LC-MS-MS 分析表明, K7R^R 有 46 个蛋白的丰度与 K7 存在显著差异, 其中 16 个蛋白表达量上调, 30 个蛋白表达量下调 (图 3.3 A), 以 WcaJ 和两个未知蛋白表达量差异最为明显。作为一种荚膜异多糖生物合成 UDP-葡萄糖脂质载体转移酶 (Colanic Acid Biosynthesis UDP-glucose Lipid Carrier Transferase), WcaJ 主要存在于 K1、K2、K5、K14 和 K64 等血清型的肺炎克雷伯菌菌株中, 常作为血清型分类的重要依据^[40,41]。经 Pfam 家族分析, 两个未知蛋白分别隶属于 Glycos_transf_1 (PF00534) 和 Glyco_trans_1_4 (PF13692), 这说明它们与 WcaJ (Bac_transf (PF02397)) 类似都具有葡糖基转移酶 (Glucosyltransferases, GT) 的功能, 据此两个蛋白分别被命名为 GT-1 和 GT-2。GT-1、GT-2 和 WcaJ 在 K7R^R 中的表达量分别下调了~16.7 倍、~14.2 倍和~8.1 倍 (图 3.3 B)。Western Blot 结果则验证了 K7R^R 中这三种蛋白质的表达水平确实存在明显下降的情况。另外, qPCR 分析则发现该抗性突变菌株中 *GT-1*、*GT-2* 和 *wcaJ* 的转录水平亦出现显著下降 (图 3.3 C 和图 3.3 D)。

肺炎克雷伯菌 CPS 的合成需要多种糖基转移酶参与，而这些酶相关编码基因的通常位于 *cps* 基因簇，不同血清型菌株 *cps* 基因簇的序列组成具有一定差异^[7]。基因序列分析结果表明，*GT-1*、*GT-2* 和 *wcaJ* 均位于由 18 个 ORF (*galF* 和 *ugd* 之间) 组成的 K2 血清型 *cps* 基因簇中 (图 3.3 E)。除 *GT-1*，*GT-2* 和 *WcaJ* 外，K7R^R 的 *cps* 基因簇中其他 ORF 所编码的蛋白的表达水平并未出现显著性的变化 (图 3.3 B)。

K. pneumoniae K7R^R 中其他蛋白的表达量亦发生明显改变。例如，*WabH* 作为一种脂多糖核心生物合成糖基转移酶 (Lipopolysaccharide Core Biosynthesis Glycosyl Transferase)，在 K7R^R 中其表达量上调约 2.5 倍，这似乎与该突变菌株 LPS 合成量高于野生型菌株有一定关联。另外，细菌的 ATP 结合盒转运蛋白 (ATP-binding-cassette Transporters, ABC) 通过 ATP 水解来驱动相关酶促反应底物的摄取或分泌，以确保糖链聚合过程中的能量供应^[9]。与 K7 相比，K7R^R 中多种 ABC 蛋白表达水平出现显著性的变化，主要包括三种表达量下调的蛋白 (KPN_00622, *YrbF* 和 KPN_02289) 和两种表达量上调的蛋白 (*MsbA* 和 KPN_01617) (图 3.3 A)。

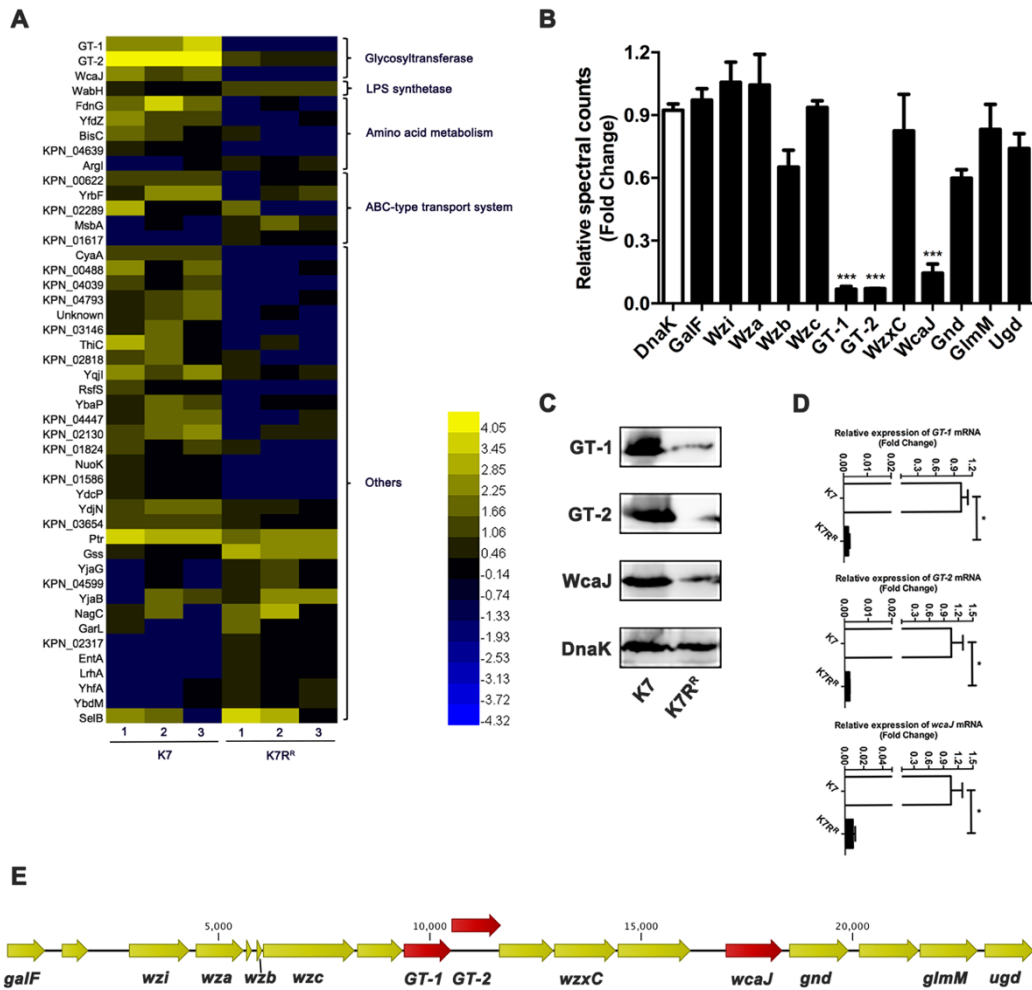


图 3.3 *K. pneumoniae* K7 和 K7R^R 的差异表达蛋白分析

Fig 3.3 Differentially expressed proteins between *K. pneumoniae* K7 and K7R^R

A: 肺炎克雷伯菌 K7 和 K7R^R 差异表达蛋白的热图分析

B: K7R^R 与 K7 的蛋白丰度变化分析

C: Western Blot 分析 K7 和 K7R^R 中 GT-1、GT-2 和 WcaJ 的表达水平

D: qPCR 分析 K7 和 K7R^R 中 *GT-1*、*GT-2* 和 *wcaJ* mRNA 转录水平

E: K7 的 *cps* 基因簇示意图

A: Heat-map analysis of differentially expressed proteins between K7 and K7R^R

B: Analysis of protein abundance changes of K7R^R and K7

C: Western Blot analysis of GT-1, GT-2 and WcaJ between K7 and K7R^R

D: qPCR analysis of *GT-1*, *GT-2* and *wcaJ* mRNA between K7 and K7R^R

E: Schematic of *cps* gene cluster of K7

3.3.4 *GT-1*、*GT-2* 和 *wcaJ* 基因缺失菌株的构建

为了进一步鉴定 *GT-1*、*GT-2* 和 *WcaJ* 这三个肺炎克雷伯菌的糖基转移酶对噬菌体敏感性的调控作用，本试验使用打靶质粒载体 pCVD442 对 *K. pneumoniae* K7 的 *GT-1*、*GT-2* 和 *wcaJ* 分别进行单基因缺失。如果 Kan 抗性基因成功替换了 *GT-1*、*GT-2* 或 *wcaJ* 基因，则三个基因外部鉴定引物的 PCR 产物长度应分别为 3064 bp、3229 bp 和 3137 bp。PCR 结果显示本人所筛选菌株中均有预期长度的特异性扩增产物(图 3.4 A、B 和 C)。使用外部鉴定引物的测序结果也显示，*GT-1*、*GT-2* 或 *wcaJ* 基因均被 Kan 抗性基因替代，并且测序结果完全符合预期设计。另外，使用三个基因内部鉴定引物可在未发生基因缺失的菌株中扩增得到长度分别为 363 bp、316 bp 和 208 bp 的特异性扩增产物，而在基因缺失菌株中则无特异产物扩增(图 3.4 D、E 和 F)。上述结果说明 *K. pneumoniae* K7 的 *GT-1*、*GT-2* 或 *wcaJ* 三个单基因缺失菌株——K7 ($\Delta GT-1$)、K7 ($\Delta GT-2$) 和 K7 ($\Delta wcaJ$) 均已成功构建。

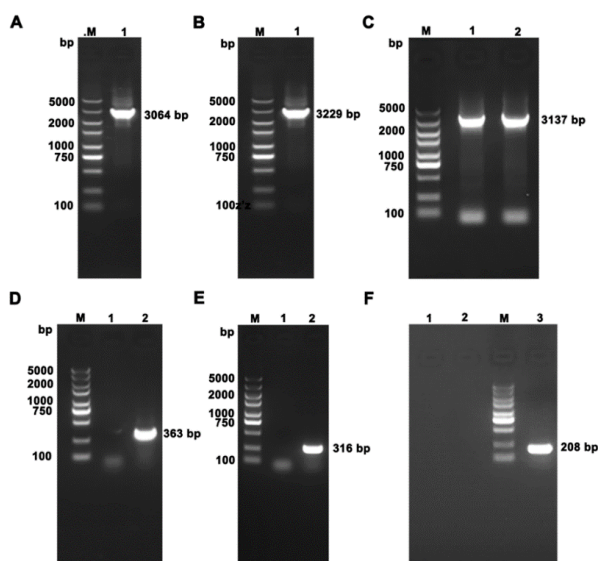


图 3.4 基因缺失菌株的 PCR 鉴定

Fig 3.4 The PCR identification of gene deletion strains

A、B、C: K7 ($\Delta GT-1$)、K7 ($\Delta GT-2$) 和 K7 ($\Delta wcaJ$) 外侧引物的 PCR 鉴定

D、E、F: K7 ($\Delta GT-1$)、K7 ($\Delta GT-2$) 和 K7 ($\Delta wcaJ$) 内侧引物的 PCR 鉴定

M: DL5000 marker

A, B, C: PCR identification of K7($\Delta GT-1$), K7($\Delta GT-2$) and K7($\Delta wcaJ$) using external primers

D, E, F: PCR identification of K7($\Delta GT-1$), K7($\Delta GT-2$) and K7($\Delta wcaJ$) using internal primers

M: DL5000 marker

3.3.5 *GT-1*、*GT-2* 和 *wcaJ* 基因缺失菌株的特征

K. pneumoniae K7 ($\Delta GT-1$)、K7 ($\Delta GT-2$) 和 K7 ($\Delta wcaJ$) 均呈现出一系列类似于 K7^R 的特征，即三个缺失突变菌株均呈现出粗糙的菌落形态，并且在离心过程中倾向于形成“紧实型”沉淀（图 3.5 A 和图 3.5 B）。通过扫描电子显微镜进一步观察发现，K7 表面黏液状的荚膜结构在三个菌株表面几近消失（图 3.5 C）。值得注意的是，与 K7 ($\Delta GT-1$) 和 K7 ($\Delta GT-2$) 的杆状形态不同，部分 K7 ($\Delta wcaJ$) 的形态类似于球菌，说明 *WcaJ* 的缺失可影响肺炎克雷伯菌的形态。

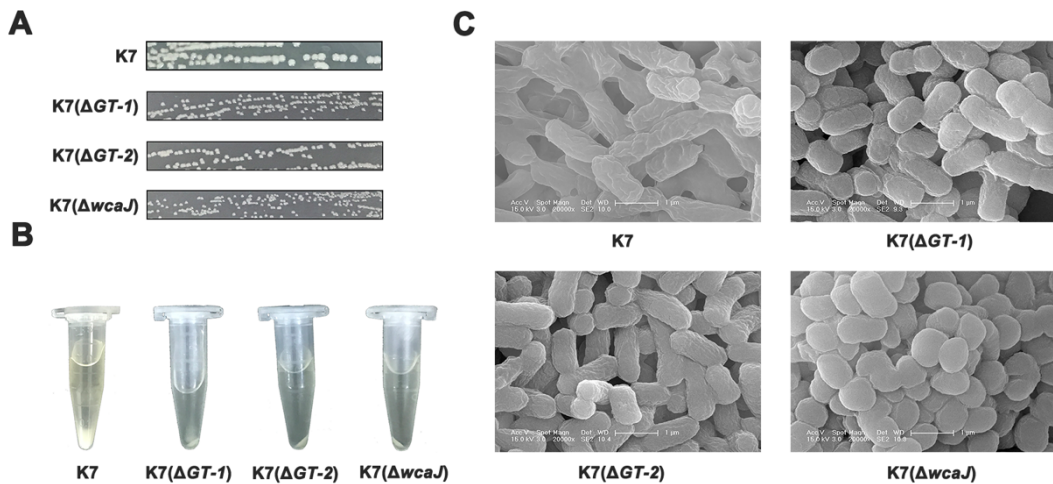


图 3.5 基因缺失菌株的表现及微观特征

Fig 3.5 Apparent and microscopic of characteristics of gene deletion strains

A: K7、K7 ($\Delta GT-1$)、K7 ($\Delta GT-2$) 和 K7 ($\Delta wcaJ$) 的菌落形态分析

B: K7、K7 ($\Delta GT-1$)、K7 ($\Delta GT-2$) 和 K7 ($\Delta wcaJ$) 的离心沉淀分析

C: K7、K7 ($\Delta GT-1$)、K7 ($\Delta GT-2$) 和 K7 ($\Delta wcaJ$) 扫描电子显微镜图像

A: Colony morphology of K7, K7($\Delta GT-1$), K7($\Delta GT-2$) and K7($\Delta wcaJ$)

B: Centrifugation analysis of K7, K7($\Delta GT-1$), K7($\Delta GT-2$) and K7($\Delta wcaJ$)

C: SEM images of K7, K7($\Delta GT-1$), K7($\Delta GT-2$) and K7($\Delta wcaJ$)

3.3.6 *GT-1*、*GT-2* 和 *wcaJ* 基因缺失菌株的表面多糖分析

通过阿尔新蓝染色，发现 K7 ($\Delta GT-1$) 和 K7 ($\Delta wcaJ$) 中 CPS 残基的分子量虽然高于 250 kDa，但远低于 K7 的 CPS 的分子量。而 K7 ($\Delta GT-2$) 中 CPS 残基的分子量分布与 K7^R 十分类似，同样检测到分子量约为 50 kDa 的 CPS 残基（图 3.6 A），表明与 K7 ($\Delta GT-1$) 和 K7 ($\Delta wcaJ$) 相比，K7 ($\Delta GT-2$) 中的 CPS 糖链组装过程可能进一步受阻。此外，三种糖基转移酶缺陷菌株中 LPS 均

呈现出与 K7R^R 一致的变化规律，即 LPS 组分没有发生改变，但是产量却高于 K7 (图 3.6 B)。

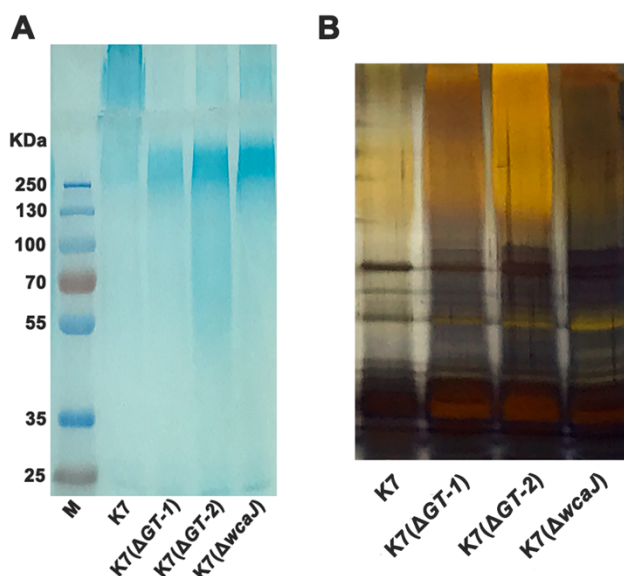


图 3.6 *K. pneumoniae* K7 ($\Delta GT-1$)、K7 ($\Delta GT-2$) 和 K7 ($\Delta wcaJ$) 的表面多糖分析

Fig 3.6 Surface polysaccharide analysis of *K. pneumoniae* K7($\Delta GT-1$), K7($\Delta GT-2$) and K7($\Delta wcaJ$)

A: K7、K7 ($\Delta GT-1$)、K7 ($\Delta GT-2$) 和 K7 ($\Delta wcaJ$) 的 CPS 表型

B: K7、K7 ($\Delta GT-1$)、K7 ($\Delta GT-2$) 和 K7 ($\Delta wcaJ$) 的 LPS 表型

A: CPS phenotypes of K7, K7($\Delta GT-1$), K7($\Delta GT-2$) and K7($\Delta wcaJ$)

B: LPS phenotypes of K7, K7($\Delta GT-1$), K7($\Delta GT-2$) and K7($\Delta wcaJ$)

3.3.7 *GT-1*、*GT-2* 和 *wcaJ* 基因缺失菌株的转录及表达分析

为了揭示 *GT-1*、*GT-2* 和 *WcaJ* 之间的调控关系，本人使用 Western Blot 和 qPCR 方法分析了 *K. pneumoniae* K7 ($\Delta GT-1$)、K7 ($\Delta GT-2$) 和 K7 ($\Delta wcaJ$) 菌株中三个糖基转移酶基因的转录及表达水平。结果表明，当 *GT-1* 缺失时，*wcaJ* 的转录量及表达量均出现明显的下调。而当 *wcaJ* 缺失时，*GT-2* 的转录水平及表达水平亦会受到严重影响。然而，*GT-2* 的缺失对 *GT-1* 和 *wcaJ* 的转录及表达并没有显著影响 (图 3.7 A 和图 3.7 B)，可能表明 *GT-2* 在糖链的组装过程中扮演着相对独立的角色。另外，K7 经 IO_4^- 处理后，*GT-1*、*GT-2* 和 *WcaJ* 的表达水平并未发生明显的变化 (图 3.7 C)，说明 IO_4^- 引起的表面多糖降解并不会对三种葡萄糖基转移酶的表达造成影响。

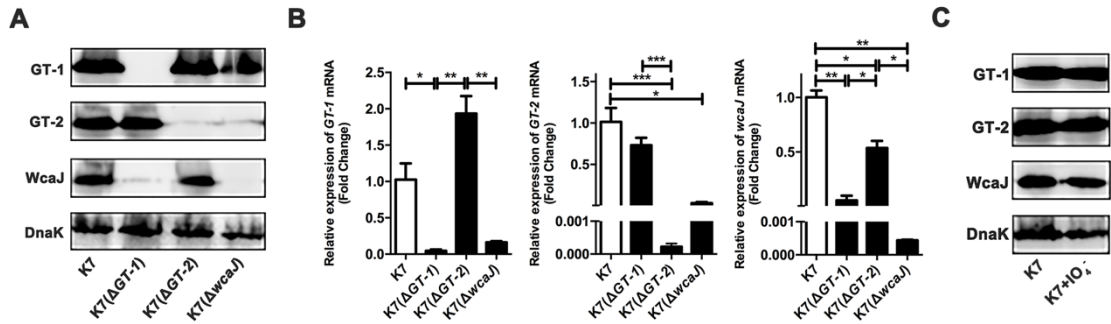


图 3.7 基因缺失菌株的 *GT-1*、*GT-2* 和 *wcaJ* 转录及表达分析

Fig 3.7 Transcription and expression analysis of *GT-1*, *GT-2* and *wcaJ* in gene deletion strains

- A: K7、K7 ($\Delta GT-1$)、K7 ($\Delta GT-2$) 和 K7 ($\Delta wcaJ$) 中 GT-1、GT-2 和 WcaJ 的表达水平
- B: K7、K7 ($\Delta GT-1$)、K7 ($\Delta GT-2$) 和 K7 ($\Delta wcaJ$) 中 *GT-1*、*GT-2* 和 *wcaJ* mRNA 转录水平
- C: K7 和经 IO_4^- 处理的 K7 中 GT-1、GT-2 和 WcaJ 的表达水平

A: Western Blot analysis of GT-1, GT-2 and WcaJ among K7, K7($\Delta GT-1$), K7($\Delta GT-2$) and K7($\Delta wcaJ$)

B: qPCR analysis of *GT-1*, *GT-2* and *wcaJ* mRNA among K7, K7($\Delta GT-1$), K7($\Delta GT-2$) and K7($\Delta wcaJ$)

C: Western Blot analysis of GT-1, GT-2 and WcaJ between K7 and IO_4^- treated-K7

3.3.8 *GT-1*、*GT-2* 和 *wcaJ* 基因缺失菌株对 GH-K3 的敏感性分析

研究表明, *K. pneumoniae* K7 ($\Delta GT-1$)、K7 ($\Delta GT-2$) 和 K7 ($\Delta wcaJ$) 均无法被噬菌体 GH-K3 所裂解, 但是该噬菌体可在 K7 ($\Delta GT-1$) 和 K7 ($\Delta wcaJ$) 的菌苔上形成模糊的空斑 (图 3.8 A)。尽管 10 min 之内, GH-K3 对 K7 ($\Delta GT-1$)、K7 ($\Delta GT-2$) 和 K7 ($\Delta wcaJ$) 的吸附效率 (分别为 21.1%, 5.5% 和 48.9%) 均显著低于 K7, 但是该噬菌体在吸附时间延长至 1 h 时, 对 K7($\Delta GT-1$) 和 K7($\Delta wcaJ$) 的吸附效率分别升至 47.8% 和 84.2%。然而延长同样的时间, GH-K3 对 K7($\Delta GT-2$) 的吸附效率仍并没有发生明显的变化——仅为 8.0% (图 3.8 B), 说明 GH-K3 仍可利用 K7 ($\Delta GT-1$) 和 K7 ($\Delta wcaJ$) 的大分子 CPS 残基对菌株进行识别和吸附。这似乎也印证一点, GH-K3 对菌株的吸附能力与细菌表面的多糖的分子量成正相关。

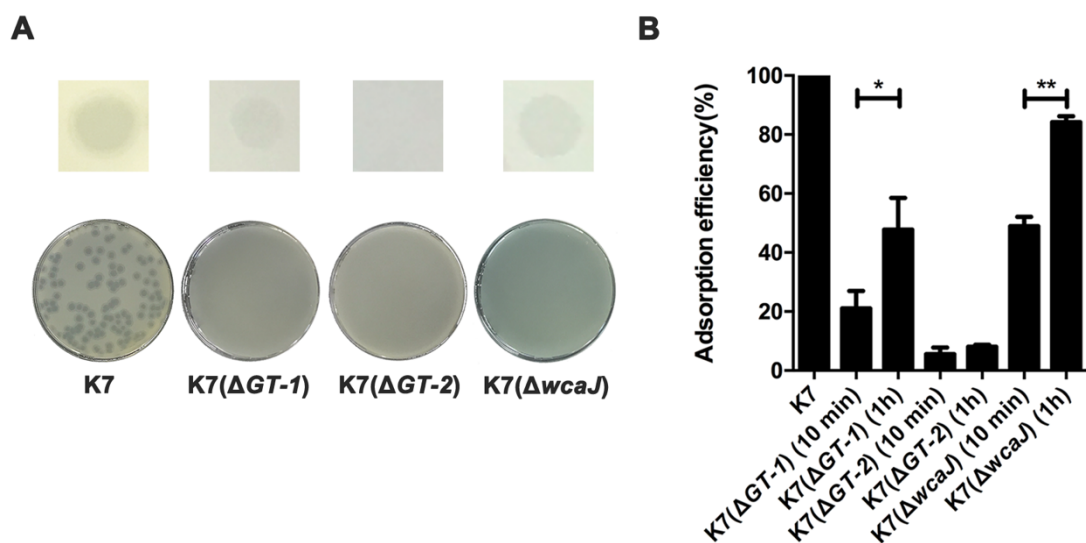


图 3.8 基因缺失菌株对 GH-K3 的敏感性

Fig 3.8 Sensitivity of gene deletion strains to GH-K3

A: K7、K7 (ΔGT-1)、K7 (ΔGT-2) 和 K7 (ΔwcaJ) 的空斑及噬斑试验

B: GH-K3 对 K7、K7 (ΔGT-1)、K7 (ΔGT-2) 和 K7 (ΔwcaJ) 的吸附效率

A: Spot and plaque forming assays of K7, K7(ΔGT-1), K7(ΔGT-2) and K7(ΔwcaJ)

B: Adsorption efficiencies of GH-K3 to K7, K7(ΔGT-1), K7(ΔGT-2) and K7(ΔwcaJ)

3.4 讨论

本章研究发现噬菌体抗性突变菌株 *K. pneumoniae* K7R^R 存在 CPS 缺失性状，而 LPS 的组分并没有明显的改变，说明 GH-K3 与之前 Thurow 等^[179]报道的一样，也以细菌表面的 CPS 作为吸附受体。过去的研究表明，菌落形态粗糙的噬菌体抗性突变菌株通常伴随着相关多糖合成蛋白表达抑制^[184, 185]，提示我们 K7R^R 中 CPS 合成相关蛋白的表达可能也受到抑制。据此本人以 CPS 合成相关蛋白为重点关注对象，对 K7 与 K7R^R 的差异表达蛋白展开了研究。LC-MS-MS 分析并结合 Western Blot 验证表明该菌株中三种葡糖基转移酶——GT-1、GT-2 和 WcaJ 的在 K7R^R 中均呈现明显的表达抑制。此外，将 K7 菌株的 *GT-1*、*GT-2* 和 *wcaJ* 分别进行缺失突变后，K7 (ΔGT-1)、K7 (ΔGT-2) 和 K7 (ΔwcaJ) 均呈现出 CPS 缺失性状并且完全不能被 GH-K3 所裂解。这些数据说明这三个葡糖基转移酶均与 CPS 合成有关，从而保障 GH-K3 对宿主的吸附能力。另外，经 IO₄⁻处理的 K7 传代后均可恢复 CPS 产生能力，然而 K7R^R 子代菌株却能维持稳定的荚膜缺失性状。进一步研究表明，经 IO₄⁻处理的 K7 中 GT-1、GT-2 和 WcaJ 的表达水平没有

像 K7R^R 那样明显改变, 说明这三个葡糖基转移酶可能通过补充细菌表面缺失的 CPS 来维持细菌荚膜性状的稳定遗传。此外, 为了进一步确定三种糖基转移酶的功能, 本研究还尝试将野生型基因 *GT-1*、*GT-2* 和 *wcaJ* 通过 pUC18K 质粒载体分别重新转入突变菌株 K7 ($\Delta GT-1$)、K7 ($\Delta GT-2$) 和 K7 ($\Delta wcaJ$)。然而, 重组质粒载体却不能在这些菌株中稳定维持。因此, 本课题组将继续寻找其他合适的过表达质粒载体来突破这一技术瓶颈。

过去的研究表明, 细菌表面多糖缺失或合成抑制所导致的噬菌体抗性突变, 其根源多在于相关多糖合成蛋白编码基因的突变^[184, 185]。然而, 与野生型菌株 K7 相比, 在 K7R^R 的全基因组中未检测到基因突变, 包括 *GT-1*、*GT-2* 和 *wcaJ*。因此, 我们推测 K7R^R 中三种葡糖基转移酶的转录和表达水平的下调可能与 DNA 甲基化等表观遗传修饰有关^[131]。

噬菌体 GH-K3 对拥有高分子量 CPS 残基 (>250 kDa) 的 K7 ($\Delta GT-1$) 和 K7 ($\Delta wcaJ$) 保留了一定的吸附能力并可以在两个菌株的菌苔上形成模糊的空斑。但是 K7 ($\Delta GT-2$) 与 K7R^R 一样具有很多分子量较低 CPS 残基并且 GH-K3 对其吸附效率也不能随着吸附时间的延长而提高。这些数据可能表明 GH-K3 对于高分子量的 CPS 残基仍然有一定的识别能力, 但却几乎无法识别 K7R^R 或 K7 ($\Delta GT-2$) 中的低分子量残基。

尽管 GH-K3 对 K7 ($\Delta GT-1$) 和 K7 ($\Delta wcaJ$) 具有一定的吸附能力, 但是该噬菌体却无法裂解这两个菌株。一方面的原因可能是 K7 ($\Delta GT-1$) 和 K7 ($\Delta wcaJ$) 大分子 CPS 残基与 K7 的 CPS 在聚合形态上有着本质的区别, 导致 GH-K3 与 K7 ($\Delta GT-1$) 和 K7 ($\Delta wcaJ$) 的识别方式有别于 K7, 进而影响该噬菌体进一步的侵染。另一方面, 除噬菌体受体缺失外, 对受体的掩蔽作用也是阻止噬菌体吸附的重要策略^[182]。然而, 在 K7R^R 以及葡糖基转移酶缺失菌株中, 都具有 CPS 含量的急剧下降并伴随 LPS 含量上升的现象。LC-MS-MS 分析也发现 K7R^R 中一种 LPS 合成酶——WabH 的表达量中度上调。因此, 本人猜测尽管 GH-K3 似乎能够吸附到大分子 CPS 残基上, 但它与宿主的进一步结合可能被由过量的 LPS 形成的物理屏障所阻断。相关文献曾证实 CPS 和 LPS 之间存在相互依赖和转换的关系^[189, 190]。在本章的研究中, 等量 (1.0×10^9 CFU) 的 K7 和 K7R^R 的细菌多糖总含量几乎相同 (166 μg vs. 168 μg), 表明 CPS 和 LPS 的合成似乎具有动态平

衡关系。另外,一些 ATP 结合盒转运蛋白表达量的改变可能意味着 K7 在产生噬菌体抗性突变以及表面多糖此消彼长的过程中,细菌内部的能量供应发生了重新调整。

综上所述,本章证实 *K. pneumoniae* K7R^R 噬菌体抗性主要源于三种葡糖基转移酶——GT-1、GT-2 和 WcaJ 表达抑制导致的 CPS 合成障碍。上一章的研究曾证实 K7 表面存在 GH-K3 侵染宿主所必需的蛋白吸附受体,但是由于蛋白受体成分尚未确认,所以本章研究尚无法确定 K7R^R、K7 ($\Delta GT-1$)、K7 ($\Delta GT-2$) 以及 K7 ($\Delta wcaJ$) 是否存在蛋白受体的突变。因此在后续的研究中,本人不但要致力于揭示 GH-K3 蛋白受体成分,同时也应注重该噬菌体多糖受体与蛋白受体之间的关联性的研究。

3.5 小结

3.5.1 通过阿尔新蓝染色及银染,证实噬菌体 GH-K3 的初级吸附受体为 CPS 成分。

3.5.2 与 *K. pneumoniae* K7 相比, K7R^R 中不存在序列差异基因,但是三种葡糖基转移酶——GT-1、GT-2 和 WcaJ 的表达水平却显著低于野生株。

3.5.3 基因缺失试验表明, GT-1、GT-2 和 WcaJ 均与 CPS 合成有关,同时说明 *K. pneumoniae* K7R^R 对噬菌体 GH-K3 的抗性主要源于 GT-1、GT-2 和 WcaJ 表达抑制导致的 CPS 合成障碍。

3.5.4 GT-1、GT-2 和 WcaJ 的表达水平与细菌荚膜性状稳定遗传密不可分,但是细菌经 IO4-处理并不能引起这三种葡糖基转移酶的表达水平下调。

3.5.5 虽然 *GT-1*、*GT-2* 和 *wcaJ* 的缺失均可导致 CPS 合成障碍,但是噬菌体 GH-K3 对于拥有高分子量的 CPS 残基的 K7 ($\Delta GT-1$) 和 K7 ($\Delta wcaJ$) 具有一定的识别能力,但是无法识别拥有低分子量的 CPS 残基 K7R^R 或 K7 ($\Delta GT-2$)。

第四章 光滑型肺炎克雷伯噬菌体抗性突变菌株的产生机制

时至今日,多种细菌的噬菌体抗性产生机制已经被阐明,很多细菌针对不同的噬菌体侵染阶段产生了不同的抵御噬菌体继续入侵的应对机制^[118, 182]。然而,在本研究之前相关学者仅发现肺炎克雷伯菌表面的 CPS 或 LPS 可作为噬菌体的吸附受体,而关于该细菌噬菌体抗性产生机制的报道似乎也仅与表面多糖缺失而影响噬菌体吸附有关。

上一章的研究本人证实了肺炎克雷伯菌的 CPS 成分可作为噬菌体 GH-K3 的初级吸附受体并且 CPS 的合成受三个葡糖基转移酶——GT-1、GT-2 和 WcaJ 所调控,以 *K. pneumoniae* K7R^R 为代表的菌落形态粗糙的噬菌体抗性突变菌株的出现与三个葡糖基转移酶的表达抑制密切相关。然而,在第二章的研究中,本人还发现极少数菌落形态光滑的噬菌体抗性突变菌株,试验已经证明这种突变虽然也发生在噬菌体吸附阶段,但是对突变菌株的表面多糖似乎并无影响,说明肺炎克雷伯菌可能还存在一种不为人知的噬菌体抗性产生机制。另外,本人研究发现肺炎克雷伯菌表面疑似存在噬菌体 GH-K3 的蛋白吸附受体。过去的研究证实一些革兰氏阴性菌的外膜蛋白成分可作为多种噬菌体的二级吸附受体^[105-107]。因此,本人怀疑以 K7R^B 为代表的菌落形态光滑的噬菌体抗性菌株产生的原因可能与细菌外膜蛋白的改变存在密切关系。

本章以 K7 和 K7R^B 中外膜蛋白相关编码基因及蛋白表达水平作为重点研究对象,通过全基因组测序以及 LC-MS-MS 分析,寻找并筛选两个菌株之间的可能与噬菌体受体相关的序列差异基因和差异表达蛋白。然后,通过基因过表达、基因缺失等多种试验方法,验证差异基因及差异蛋白在维持噬菌体受体的正常功能以及细菌对噬菌体敏感性所起的作用,进而阐明 K7R^B 噬菌体抗性突变的产生机制。

4.1 材料

4.1.1 菌株和噬菌体及质粒载体

大肠杆菌 DH5 α 和大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞为北京全式金生物技术有限公司的产品;pUC18K 质粒载体由天津科技大学生物工程学院郑宇教授惠

赠；pUC19 质粒载体、pET28a 质粒载体、pCVD442 质粒载体、大肠杆菌 DH5 α λ pir 菌株和大肠杆菌 β 2155 菌株由本实验室保藏；噬菌体 GH-K3、*K. pneumoniae* K7 及其他肺炎克雷伯菌的培养条件详见 1.1.1。

4.1.2 主要试剂及耗材

限制性内切酶 *Xba* I、*Hind* III、*Nde* I 和 *Xho* I 均为大连 TaKaRa 公司产品；弗氏佐剂、弗氏不完全佐剂均为 Sigma-Aldrich 公司的产品；硫酸庆大霉素（Amresco 公司）；PierceTM BCA Protein Assay Kit（美国 Thermo Scientific 公司）；超滤离心管（Merck Millipore 公司）。

本章研究所使用的兔源多克隆抗体由金斯瑞生物科技有限公司制备，滴度均达到 1: 128000，抗原多肽序列见表 4.1。

表 4.1 抗原多肽序列

Table 4.1 Sequences of peptide antigens

Name	Start-end	Sequence
OmpC-1	176-189 aa	GSVSGEGATNNGRGC
OmpC-2	342-355 aa	DNSFTRNAGISTDDC
OmpN	178-191 aa	GQNAQDINVGTTNRC
KPN_02430	183-196 aa	EGTNNGGKRKLAREC
OmpF	291-304 aa	CGKDLQSRAGFSGGD
DnaK	613-626 aa	CSADAQASNAKDDDV

Tris 缓冲液：按照终浓度为 20 mM Tris 和 200 mM NaCl 的比例进行配制，将溶液的 pH 值调整为 8.0 后定容至相应体积，过滤除杂后备用。

TTN 缓冲液：按照终浓度为 50 mM Tris 和 100 mM NaCl 的比例进行配制，按体积比加入 2% Triton X-100，将溶液的 pH 值调整为 8.0 后定容至相应体积，过滤除杂后备用。

8 M 尿素溶液：将尿素加入 Tris 缓冲液，使用磁力搅拌器加热并充分搅拌溶解，直至终浓度为 8 M，过滤除杂后备用。

蛋白折叠缓冲液：聚氧乙烯月桂醚为 Sigma-Aldrich 公司的产品，按 10% 体积比向 Tris 缓冲液加入甘油，再按 0.2% 体积比加入聚氧乙烯月桂醚，过滤除杂后备用^[191]。

其余试剂及耗材详见 1.1.2、2.1.2 和 3.1.2。

4.1.3 主要仪器

仪器品牌详见 1.1.3、2.1.3 和 3.1.3

4.1.4 实验动物

新西兰大耳兔（雄性，16 周龄）购自辽宁长生生物技术有限公司。

4.2 方法

4.2.1 *K. pneumoniae* K7R^B 的表面多糖提取及纯化

参照 3.2.1，进行 *K. pneumoniae* K7R^B 的表面多糖提取及纯化。

4.2.2 *K. pneumoniae* K7R^B 的全基因组测序

将 *K. pneumoniae* K7R^B 在 LB 液体培养基中培养至对数生长末期（浓度为 2×10^9 CFU/mL），按照说明书使用 Bacterial DNA Kit 提取其基因组。经浓度和纯度检验合格后（ ≥ 100 ng/ μ L，OD_{260/280} ≈ 1.8 ，总量 ≥ 2 μ g），委托军事医学科学院微生物流行病学研究所童贻刚研究员课题组对该细菌进行全基因测序、序列组装及注释分析。*K. pneumoniae* K7R^R 全基因组序列信息已上传至 GenBank（Accession Number: PKKQ00000000）。

4.2.3 *K. pneumoniae* K7 和 K7R^B 的 LC-MS-MS 分析

参照 3.2.3，进行 *K. pneumoniae* K7 和 K7R^B 的 LC-MS-MS 分析。

4.2.4 *ompC* 单碱基缺失菌株及基因缺失菌株的构建

4.2.4.1 *ompC*₂₄₁₋₁₀₉₇^{K7RB} 基因扩增与产物回收

为了造成 *K. pneumoniae* K7 中 *ompC* 基因第 712 位碱基缺失突变，本人来源于 K7R^B 中 *ompC* 基因第 241-1097 位碱基作为替换序列，通过 Primer 5.0 软件设计其引物，委托吉林省库美生物科技有限公司合成，引物名称及序列见表 4.2。

表 4.2 *ompC*₂₄₁₋₁₀₉₇^{K7RB} 同源重组手臂基因相关引物序列

Table 4.2 Primers for homologous recombination arm of *ompC*₂₄₁₋₁₀₉₇^{K7RB}

Gene name	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>ompC</i> ₂₄₁₋₁₀₉₇ ^{K7RB}	ATA <u>TCTAGAG</u> TTTCAGGCGAACAACTGA AAGCTC	ATA <u>TCTAGAT</u> TAGAACTGGTAAACC AGGCCAGTG

以 *K. pneumoniae* K7R^B 基因组为模板，使用上述引物进行 PCR 扩增，反应体系及重复次数与 3.2.4.1 (1) 完全一致。

PCR 反应程序：

95 °C	5 min	} 30 Cycles
94 °C	30 s	
62 °C	30 s	
72 °C	1 min	
72 °C	10 min	

使用 1%琼脂糖凝胶电泳对 *ompC*₂₄₁₋₁₀₉₇^{K7RB} 的 PCR 产物进行检测，并按照说明书使用 DNA 凝胶回收试剂盒回收 PCR 产物。

4.2.4.2 克隆质粒载体 pUC19-*ompC*₂₄₁₋₁₀₉₇^{K7RB} 的构建

(1)使用 *Xba* I 对 pUC19 质粒载体及 *ompC*₂₄₁₋₁₀₉₇^{K7RB} 的 PCR 回收产物进行单酶切，反应体系如下：

pUC19 (~100 ng/μL)	10 μL	
<i>ompC</i> ₂₄₁₋₁₀₉₇ ^{K7RB} 的 PCR 回收产物		43 μL
10×Tango buffer	5.0 μL	5.0 μL
<i>Xba</i> I (10 U/μL)	2.0 μL	2.0 μL
ddH ₂ O	33.0 μL	
Total	50.0 μL	50.0 μL

37 °C酶切 2-3 h 后，按照说明书使用 DNA 凝胶回收试剂盒对上述酶切产物进行回收，经 1%琼脂糖凝胶电泳检测和浓度测量后，贮存于 -20 °C冰箱备用。

(2)参照 3.2.4.4(2)-(3)，将 pUC19 酶切产物去磷酸化并与 *ompC*₂₄₁₋₁₀₉₇^{K7RB} 的 PCR 回收产物进行连接。

(3) 连接产物转化克隆菌株感受态细胞

使用热激转化法将连接产物转入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 具体步骤如下:

将从-80 °C 冰箱中取出的感受态细胞 (每管 100 μ L) 于冰上解冻, 将连接产物与感受态细胞轻轻混匀, 然后冰浴 30 min。随后在 42 °C 水浴锅中静置热激 90 s, 然后立即转入冰浴中, 冷却 5-10 min。接下来加入一定体积的液体培养基, 37 °C 条件下 180 rpm 培养 1 h 后, 取 100 μ L 菌液均匀涂布于含有抗性的固体平板表面, 37 °C 倒置培养 12-16 h 后观察有无单克隆菌落出现。

(4) 参照 3.2.4.4 (6) - (7), 进行重组菌株的培养 (筛选培养基中含 Amp 100 μ g/mL)、以及质粒的提取。提取的质粒需进行 PCR 鉴定, 鉴定引物为 pUC19 F: gtgctgcaaggcgattaagt, pUC19 R: gctcgtatgttgtggaattg, PCR 反应体系与完全一致。

PCR 反应程序:

95 °C	5 min	
94 °C	30 s	} 35 Cycles
60 °C	45 s	
72 °C	1 min	
72 °C	10 min	

(5) 将 PCR 鉴定结果阳性重组质粒送往吉林省库美生物科技有限公司进行测序, 将测序正确的 pUC19-*ompC*₂₄₁₋₁₀₉₇^{K7RB} 质粒载体贮存于-20 °C 冰箱备用。

4.2.4.3 *ompC* 同源重组手臂基因的扩增与产物回收

通过 Primer 5.0 软件, 根据 *K. pneumoniae* K7、KPP14、KPP27 和 KPP36 的 *ompC* 周边保守序列信息设计同源重组手臂基因引物, 并委托吉林省库美生物科技有限公司合成, 引物名称及序列见表 4.3。

表 4.3 *ompC* 同源重组手臂基因相关引物序列Table 4.3 Primers for homologous recombination arms of *ompC*

Gene name	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>ompC-5</i>	TATATA <u>TCTAGA</u> AGAAGCGGCTGATGTTG CC	CAGTCGGCTATTTTCATTGTGCTGC
<i>ompC-3</i>	GTTGCACTGGGCCTGGTTTACC	TATATA <u>TCTAGA</u> CGACACCAGATAG CGGGAGATC

以 *K. pneumoniae* KPP14/KPP27/KPP36 菌液为模板, 使用上述引物进行 PCR 扩增, 反应体系、重复次数以及反应程序与 3.2.4.1 完全一致。然后, 使用 1% 琼脂糖凝胶电泳对同源重组手臂基因 *ompC-5* 和 *ompC-3* 的 PCR 产物进行检测, 并按照说明书使用 DNA 凝胶回收试剂盒回收 PCR 产物。

4.2.4.4 *Gm* 抗性基因扩增与产物回收

通过 Primer 5.0 软件, 根据同源重组手臂基因序列及 *Gm* 抗性基因信息设计融合 PCR 引物, 并委托吉林省库美生物科技有限公司合成, 引物名称及序列见表 4.4。

表 4.4 庆大霉素抗性基因相关引物序列

Table 4.4 Primers for gentamicin resistance gene

Gene name	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>ompC-Gm</i>	GCAGCACAATGAAATAGCCGACTGAGAAA TGCTCGACTTC	GGTAAACCAGGCCAGTGCAACTTG TGACAATTTACCGAACAAC

以 pJQ200SK 质粒 (~10 ng/μL) 为模板, 使用上述引物进行 PCR 扩增, 反应体系、重复次数以及反应程序与 3.2.4.2 完全一致。然后, 使用 1% 琼脂糖凝胶电泳对 *Gm* 抗性基因的 PCR 产物进行检测, 并按照说明书使用 DNA 凝胶回收试剂盒回收 PCR 产物。

4.2.4.5 *ompC* 打靶片段的构建

(1) 融合 PCR 技术构建基因缺失打靶片段。按照 3.2.4.3 反应体系, 将 *ompC-5* 的 PCR 回收产物、*ompC-3* 的 PCR 回收产物以及 *Gm* 抗性基因的 PCR 回收产物混合, 使用引物 *ompC-5* F 和 *ompC-3* R 进行 PCR 扩增, 重复次数以及反应程序与 3.2.4.3 完全一致。然后, 使用 1% 琼脂糖凝胶电泳对 *ompC* 打靶片段的 PCR 产物进行检测, 并按照说明书使用 DNA 凝胶回收试剂盒回收 PCR 产物。

4.2.4.6 *ompC* 打靶质粒载体的构建

(1) 使用 *Xba* I 分别对 pCVD442 质粒载体、pUC19-*ompC*₂₄₁₋₁₀₉₇^{K7RB} 质粒载体以及 (*ompC*-5)-Gm-(*ompC*-3) 打靶片段进行单酶切, 反应体系与 3.2.4.4 (1) 一致。37 °C 酶切 2-3 h 后, pCVD442 质粒载体按照 3.2.4.4 (2) 所示的反应体系进行去磷酸化反应, 按照说明书使用 DNA 凝胶回收试剂盒对酶切产物进行回收, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测和浓度测量后, 贮存于 -20 °C 冰箱备用。

(2) 将 pCVD442 质粒载体的去磷酸化酶切产物分别与 *ompC*₂₄₁₋₁₀₉₇^{K7RB} 的酶切产物和 (*ompC*-5)-Gm-(*ompC*-3) 的酶切产物进行连接, 反应体系与 3.2.4.4 (3) 一致, 于 16 °C 连接过夜。

(3) 根据 3.2.4.4 (5) - (7) 将连接产物转化大肠杆菌 DH5α λpir, 并提取重组菌株中的质粒载体。将阳性重组质粒送往吉林省库美生物科技有限公司并使用 pCVD442 载体测序引物 (5'-3': ATTTGCAGACTACGGGCCTAAA) 进行测序。pCVD442 与 *ompC*₂₄₁₋₁₀₉₇^{K7RB} 连接得到的重组质粒载体经测序验证后可作为 *ompC*₇₁₂ 的打靶质粒载体, 命名为 pCVD442-*ompC*₇₁₂; pCVD442 与 *ompC*₂₄₁₋₁₀₉₇^{K7RB} 连接得到的重组质粒载体经测序验证后可作为 K7 中 *ompC*₇₁₂ 的打靶质粒载体, 命名为 pCVD442-Δ*ompC*₇₁₂。将测序正确的 pCVD442 与 (*ompC*-5)-Gm-(*ompC*-3) 重组质粒载体作为 KPP14、KPP27 和 KPP36 中 *ompC* 的打靶质粒载体, 命名为 pCVD442-Δ*ompC*, 贮存于 -20 °C 冰箱备用。

4.2.4.7 打靶质粒载体供体菌株的构建

参照 3.2.4.5, 将重组打靶质粒载体 pCVD442-Δ*ompC*₇₁₂ 和 pCVD442-Δ*ompC* 通过电转化仪转入大肠杆菌 β2155 菌株, 收获供体菌株的菌液。

4.2.4.8 供体菌株和受体菌株的接合试验

参照 3.2.4.6, 取 500 μL β2155/pCVD442-Δ*ompC*₇₁₂ 的菌液与 500 μL *K. pneumoniae* K7 的菌液混合进行接合试验 (筛选培养基中含 Kan 50 μg/mL); 另取 3 份 500 μL β2155/pCVD442-Δ*ompC* 的菌液分别与 500 μL *K. pneumoniae* KPP14、KPP27 和 KPP36 的菌液混合进行接合试验 (筛选培养基中含 Gm 50 μg/mL)。

4.2.4.9 *ompC* 单碱基缺失菌株及基因缺失菌株的鉴定

通过 Primer 5.0 软件，根据缺失基因序列及周边序列信息分别设计外侧鉴定引物和内侧鉴定引物，并委托吉林省库美生物科技有限公司合成，引物名称及序列见表 4.5。

表 4.5 *ompC* 单碱基缺失菌株及基因缺失菌株鉴定引物序列

Table 4.5 Primers for identification of single-base deletion and gene deletion strains

Gene name	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>ompC</i> _{712-out}	GATTCAGGTGCGGAAGCAGATGGTCG	GTCGTCGAGCAATGCCGCATC
<i>ompC-out</i>	GTCGCCAGCAGGACAATAACCATC	GCTTGCCTTCGCCGTTTCATC
<i>ompC-in</i>	GACTCGTCTGGCATTTCGCAG	CAACCAGACCGAAGAAATCAGAGTTAC

使用 PCR 及测序对疑似 K7($\Delta ompC_{712}$)、KPP14($\Delta ompC$)、KPP27($\Delta ompC$)和 KPP36($\Delta ompC$) 菌株进行鉴定，所有 PCR 反应体系、反应程序和测序方法均与 3.2.4.7 一致。最后使用甘油法 (30% v/v) 将符合鉴定预期的单碱基缺失菌株及基因缺失菌株贮存于 -80 °C 超低温冰箱备用。

4.2.5 外膜蛋白编码基因过表达菌株的构建

4.2.5.1 *ompC*、*ompN*、*KPN_02430* 和 *ompF* 基因扩增与产物回收

通过 Primer 5.0 软件，根据 *K. pneumoniae* K7 中 *ompC*、*ompN*、*KPN_02430* 和 *ompF* 的序列信息设计 PCR 引物，并委托吉林省库美生物科技有限公司合成，引物名称及序列见表 4.6，划线部分为 *Xba* I 或 *Hind* III 酶切位点。

表 4.6 外膜蛋白编码基因的 PCR 扩增引物序列

Table 4.6 Primers for PCR amplification of *omps*

Gene name	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>ompC</i> ^{K7}	GCTCTAGAAATGAAAGTTAAAGTACTGTCC	CCAAGCTTTTAGAACTGGTAAACCA
<i>ompN</i> ^{K7}	GCTCTAGAAATGAAAAGAAAAGTACTGGCC	CCAAGCTTTCAGAACTGGTAAACCAGG
<i>KPN_02430</i> ^{K7}	GCTCTAGAAATGAAAAGAAAAGTACTGGCACTC	CCAAGCTTTCAGAACTGATAGACCAGG
<i>ompF</i> ^{K7}	GCTCTAGAAATGATGAAGCGCAATAT	CCAAGCTTTTAGAACTGGTAAACGAT

以 *K. pneumoniae* K7 基因组为模板，使用上述引物进行 PCR 扩增，反应体系及重复次数与 3.2.4.1 (1) 完全一致。

PCR 反应程序:

95 °C	5 min	
94 °C	1 min	} 30 Cycles
55 °C	1 min	
72 °C	1 min	
72 °C	10 min	

使用 1%琼脂糖凝胶电泳对 *ompC*^{K7}、*ompN*^{K7}、*KPN_02430*^{K7} 和 *ompF*^{K7} 基因的 PCR 产物进行检测,并按照说明书使用 DNA 凝胶回收试剂盒回收 PCR 产物。

4.2.5.2 pUC18K 重组质粒载体的构建

(1)使用 *Xba* I 和 *Hind* III 分别对 *ompC*^{K7}、*ompN*^{K7}、*KPN_02430*^{K7} 和 *ompF*^{K7} 基因的 PCR 回收产物及 pUC18K 质粒载体进行双酶切,反应体系如下:

PCR 回收产物 (50 ng/μL)	4.0 μL	
pUC18K (50 ng/μL)		4.0 μL
<i>Xba</i> I (10 U/μL)	0.5 μL	0.5 μL
<i>Hind</i> III (10 U/μL)	0.5 μL	0.5 μL
M buffer	2.0 μL	2.0 μL
ddH ₂ O	13.0 μL	13.0 μL
Total	20.0 μL	20.0 μL

上述体系做 4 个重复,37 °C 酶切 2-3 h。然后,按照说明书的步骤使用 DNA 凝胶回收试剂盒对 *ompC*^{K7}、*ompN*^{K7}、*KPN_02430*^{K7} 和 *ompF*^{K7} 及 pUC18K 质粒载体酶切产物的进行回收,经 1%琼脂糖凝胶电泳检测和浓度测量后,贮存于-20 °C 冰箱备用。

(2)将 *ompC*^{K7}、*ompN*^{K7}、*KPN_02430*^{K7} 和 *ompF*^{K7} 酶切产物分别与 pUC18K 质粒载体酶切产物进行连接,连接体系与 3.2.4.4 (3) 完全一致,于 16 °C 连接过夜。

(3)参照 4.2.4.2 (3) 进行连接产物的转化,然后参照 3.2.4.4 (6) - (7),进行重组菌株的培养(筛选培养基中含 Kan 50 μg/mL)、以及质粒的提取。提取的质粒需进行双酶切鉴定,反应体系如下:

质粒 DNA (50 ng/ μ L)	2 μ L
<i>Xba</i> I (10 U/ μ L)	0.3 μ L
<i>Hind</i> III (10 U/ μ L)	0.3 μ L
M buffer	1.0 μ L
ddH ₂ O	6.4 μ L
Total	10.0 μ L

经 37 °C 酶切 2-3 h 后, 使用 1% 琼脂糖凝胶电泳对酶切产物进行检测。

(4) 将阳性重组质粒送往吉林省库美生物科技有限公司进行测序, 将测序正确的 pUC18K-*ompC*^{K7}、pUC18K-*ompN*^{K7}、pUC18K-*KPN_0243*^{K7} 和 pUC18K-*ompF*^{K7} 质粒载体贮存于 -20 °C 冰箱备用。

4.2.5.3 过表达菌株的构建

参照 3.2.4.4 (4), 制备 *K. pneumoniae* K7R^B 以及 KPP14 (Δ *ompC*)、KPP27 (Δ *ompC*) 和 KPP36 (Δ *ompC*) 的感受态细胞。通过电转化仪将 pUC18K-*ompC*^{K7}、pUC18K-*ompN*^{K7}、pUC18K-*KPN_0243*^{K7} 和 pUC18K-*ompF*^{K7} 分别转入 K7R^B, 再将 pUC18K-*ompC*^{K7} 依次转入 KPP14 (Δ *ompC*)、KPP27 (Δ *ompC*) 和 KPP36 (Δ *ompC*), 收获 K7R^BC-*ompC*^{K7}、K7R^BC-*ompN*^{K7}、K7R^BC-*KPN_0243*^{K7} 和 K7R^BC-*ompF*^{K7} 以及 KPP14 (Δ *ompC*) C-*ompC*^{K7}、KPP27 (Δ *ompC*) C-*ompC*^{K7} 和 KPP36 (Δ *ompC*) C-*ompC*^{K7} 的菌液。使用甘油法 (30% v/v) 将上述菌株贮存于 -80 °C 超低温冰箱备用。

4.2.6 外膜蛋白的原核表达和纯化

4.2.6.1 *ompC*、*ompN*、*KPN_02430* 和 *ompF* 基因扩增与产物回收

通过 Primer 5.0 软件, 根据 *K. pneumoniae* K7 中 *ompC*、*ompN*、*KPN_02430* 和 *ompF* 的序列信息设计 PCR 引物, 并委托吉林省库美生物科技有限公司合成, 引物名称及序列见表 4.7, 划线部分为 *Nde* I 或 *Xho* I 酶切位点。

表 4.7 外膜蛋白编码基因的 PCR 扩增引物序列

Table 4.7 Primers for PCR amplification of *omps*

Gene name	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>ompC</i>	CGCC <u>CATATG</u> ATGGAAATTTATAACAAAGAC	CCG <u>CTCGAG</u> TTAGAACTGGTAAACCA
<i>ompN</i>	CGCC <u>CATATG</u> ATGGAAATTTATAATAAAGACGGG	CCG <u>CTCGAG</u> TCAGAACTGGTAAACCAGG
<i>KPN_02430</i>	CGCC <u>CATATG</u> ATGGAAATCTATAACAAAAACGGT	CCG <u>CTCGAG</u> TCAGAACTGATAGACCAGG
<i>ompF</i>	CGCC <u>CATATG</u> ATGGCAGAAATCTATAACA	CCG <u>CTCGAG</u> TTAGAACTGGTAAACGA

以 *K. pneumoniae* K7 基因组为模板，使用上述引物进行 PCR 扩增，反应体系及重复次数与 3.2.4.1 (1) 完全一致。

PCR 反应程序：

95 °C	5 min	
94 °C	1 min	} 30 Cycles
55 °C	1 min	
72 °C	1 min	
72 °C	10 min	

使用 1%琼脂糖凝胶电泳对 *ompC*、*ompN*、*KPN_02430* 和 *ompF* 基因的 PCR 产物进行检测，并按照说明书使用 DNA 凝胶回收试剂盒回收 PCR 产物。

4.2.6.2 pET28a 重组质粒载体的构建

(1) 使用 *Nde* I 和 *Xho* I 分别对 *ompC*、*ompN*、*KPN_02430* 和 *ompF* 基因的 PCR 回收产物及 pET28a 质粒载体进行双酶切，反应体系如下：

PCR 回收产物 (50 ng/μL)	4.0 μL	
pET28a (50 ng/μL)		4.0 μL
<i>Nde</i> I (10 U/μL)	0.5 μL	0.5 μL
<i>Xho</i> I (10 U/μL)	0.5 μL	0.5 μL
H buffer	2.0 μL	2.0 μL
ddH ₂ O	13.0 μL	13.0 μL
Total	20.0 μL	20.0 μL

上述体系做 4 个重复，37 °C 酶切 2-3 h。然后，按照说明书使用 DNA 凝胶回收试剂盒对 *ompC*、*ompN*、*KPN_02430* 和 *ompF* 及 pET28a 质粒载体酶切产物的进行回收，经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测和浓度测量后，贮存于 -20 °C 冰箱备用。

(2) 将 *ompC*、*ompN*、*KPN_02430* 和 *ompF* 酶切产物分别与 pET28a 质粒载体酶切产物进行连接，连接体系与完全一致 3.2.4.4 (3)，于 16 °C 连接过夜。

(3) 参照 4.2.4.2 (3)，进行连接产物的转化，然后参照 3.2.4.4 (6) - (7)，进行重组菌株的培养（筛选培养基中含 Kan 50 µg/mL）、以及质粒的提取。提取的质粒需进行双酶切鉴定，反应体系如下：

质粒 DNA (50 ng/µL)	2.0 µL
<i>Nde</i> I (10 U/µL)	0.3 µL
<i>Xho</i> I (10 U/µL)	0.3 µL
H buffer	1.0 µL
ddH ₂ O	6.4 µL
Total	10.0 µL

经 37 °C 酶切 2-3 h 后，使用 1% 琼脂糖凝胶电泳对酶切产物进行检测。

(4) 将阳性重组质粒送往吉林省库美生物科技有限公司进行测序，将测序正确的 pET28a-*ompC*、pET28a-*ompN*、pET28a-*KPN_02430* 和 pET28a-*ompF* 质粒载体贮存于 -20 °C 冰箱备用。

4.2.6.3 外膜蛋白的诱导表达

(1) 使用热激转化法将 pET28a-*ompC*、pET28a-*ompN*、pET28a-*KPN_02430* 和 pET28a-*ompF* 转入大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞，具体步骤参照 4.2.4.2 (3)。

(2) 使用 10 µL 枪头于超净工作台中小心挑取平板上单克隆，接种到 5 mL 含有 Kan 抗性 (50 µg/mL) 的 LB 液体培养基中，然后置于恒温摇床中震荡培养 10-12 h (37 °C, 180 r/min)。

(3) 取 1 mL 过夜培养的菌液接种于 1 L 含有 Kan 抗性 (50 µg/mL) 的 LB 液体培养基中，然后置于恒温摇床中震荡培养 2-3 h (37 °C, 180 r/min) 至对数生长期 (OD₆₀₀ 0.6~1.0)。然后向培养液中加入异丙基-β-D-硫代半乳糖苷

(Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside, IPTG) 至终浓度为 1 mM, 然后继续置于恒温摇床中低温震荡培养 16 h (16 °C, 180 r/min)。

4.2.6.4 外膜蛋白的变性纯化及蛋白复性

(1) 将经诱导表达的菌液离心 10 min (4 °C, 6,000 \times g), 使用预冷的 Tris 缓冲液洗涤菌体 2-3 次, 然后用适量的蛋白纯化缓冲液悬浮菌体。悬起的菌液经冰浴后, 进行 30 min 超声破碎 (工作 5 s, 间歇 5 s, 全过程冰浴), 离心 15 min (4 °C, 13,000 \times g) 并保留包涵体沉淀 (Inclusion Bodies, IBs)。将经 TTN 缓冲液洗涤两次后 IB 置于 Tris-尿素缓冲液 (4 °C) 中 4 h, 同时温和搅拌使其充分溶解。

(2) 将上述样品小心加入平衡后的 Ni-NTA 亲和层析柱, 待上清液与 Ni 柱充分结合后, 收集流出液以待后续分析。依次使用含 20 mM 咪唑与含 50 mM 咪唑的洗涤缓冲液各 4 个柱体积, 洗涤 Ni 柱以去除杂蛋白。然后用 2 个柱体积含 500 mM 咪唑的洗脱液, 洗脱并收集纯化的 OmpC、OmpN、KPN_02430 和 OmpF 变性蛋白。然后将各个蛋白洗脱液离心 20 min (4 °C, 13,000 \times g) 并通过 0.22 μ m 过滤器回收上清液。接下来, 将上清液快速加入到 5 倍体积的蛋白折叠缓冲液中并在 4 °C 条件下温和搅拌 12 h。随后将溶液超速离心 90 min (4 °C, 35,000 \times g) 并回收上清液, 即复性后的 OmpC、OmpN、KPN_02430 和 OmpF 蛋白。

(3) 为了浓缩外膜蛋白, 将复性后的蛋白溶液加入超滤离心管 (事先用 8 M 尿素处理 30 min), 经超滤管水平离心 30 min (4 °C, 3,500 rpm) 收集蛋白浓缩液。为了置换掉外膜蛋白浓缩液中的咪唑成分, 向浓缩液中加入 Tris 缓冲液, 然后以上述同样的方法超滤离心 30 min。

(4) 使用 PierceTM BCA Protein Assay Kit 对纯化并超滤后的外膜蛋白进行浓度测定, 分装并保存于 -80 °C 冰箱。

4.2.7 外膜蛋白抗血清的制备和中和效果的检测

将 OmpC、OmpN、KPN_02430 和 OmpF 蛋白浓缩液稀释到 1 mg/mL, 用等体积的弗氏完全佐剂对蛋白稀释液进行乳化, 然后对新西兰大耳兔进行皮内多点免疫。随后, 每隔两周使用经弗氏不完全佐剂乳化的蛋白稀释液进行加强免疫, 直至抗体效价到达 1: 64000。加强免疫结束后 10 天, 对新西兰大耳兔静脉注射

戊巴比妥钠 (100 mg/kg) 使其安乐死。将收集的血液置于 37 °C 恒温培养箱中 1 h 后, 置 4 °C 冰箱中 10 h, 然后离心 10 min (4 °C, 3,000 rpm) 并回收血清, 进行特异性检测后, 分装并保存于 -80 °C 冰箱备用。

向处于对数生长末期的肺炎克雷伯菌培养液 (浓度为 2×10^9 CFU/mL) 等体积加入稀释 10 倍的外膜蛋白抗血清, 37 °C 孵育 3 h, 通过噬斑试验检测噬菌体 GH-K3 对经抗血清处理 K7 的感染效率, 该试验需进行三次生物学重复。

4.2.8 统计学分析

参照 1.2.8 进行数据统计。

4.3 结果

4.3.1 *K. pneumoniae* K7R^B 的表面多糖分析

阿尔新蓝染色以及银染的结果表明, *K. pneumoniae* K7R^B 中的 CPS 和 LPS 组分均与野生株 K7 无明显的差异 (图 4.1), 证明 K7R^B 中的噬菌体抗性的产生与表面 CPS 和 LPS 没有直接关系。

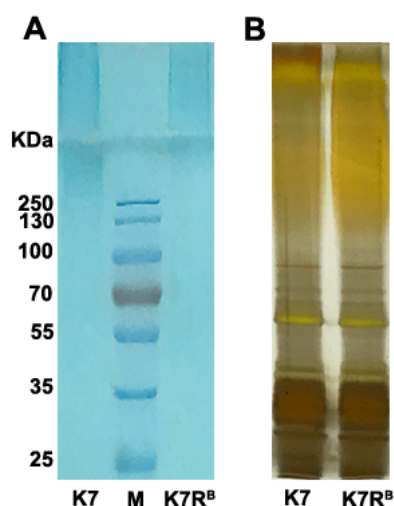


图 4.1 K7 与 K7R^B 的表面多糖分析

Fig 4.1 Surface polysaccharide analysis of K7 and K7R^B

A: K7 和 K7R^B 的 CPS 表型 B: K7 和 K7R^B 的 LPS 表型

A: CPS phenotypes of K7 and K7R^B B: LPS phenotypes of K7 and K7R^B

4.3.2 *K. pneumoniae* K7 与 K7R^B 的差异基因比对分析

K. pneumoniae K7R^B 经全基因组测序后，与 K7 的序列进行 BLAST 比对分析。结果表明，与 K7 相比，K7R^B 的 *ompC* 基因中的第 711 位碱基“T”和第 712 位碱基“A”之间缺少一个“G”，这是该菌株中唯一的基因突变位点，导致 *ompC* 基因的 ORF 分为 *ompC*-1 和 *ompC*-2 两个部分（图 4.2）。

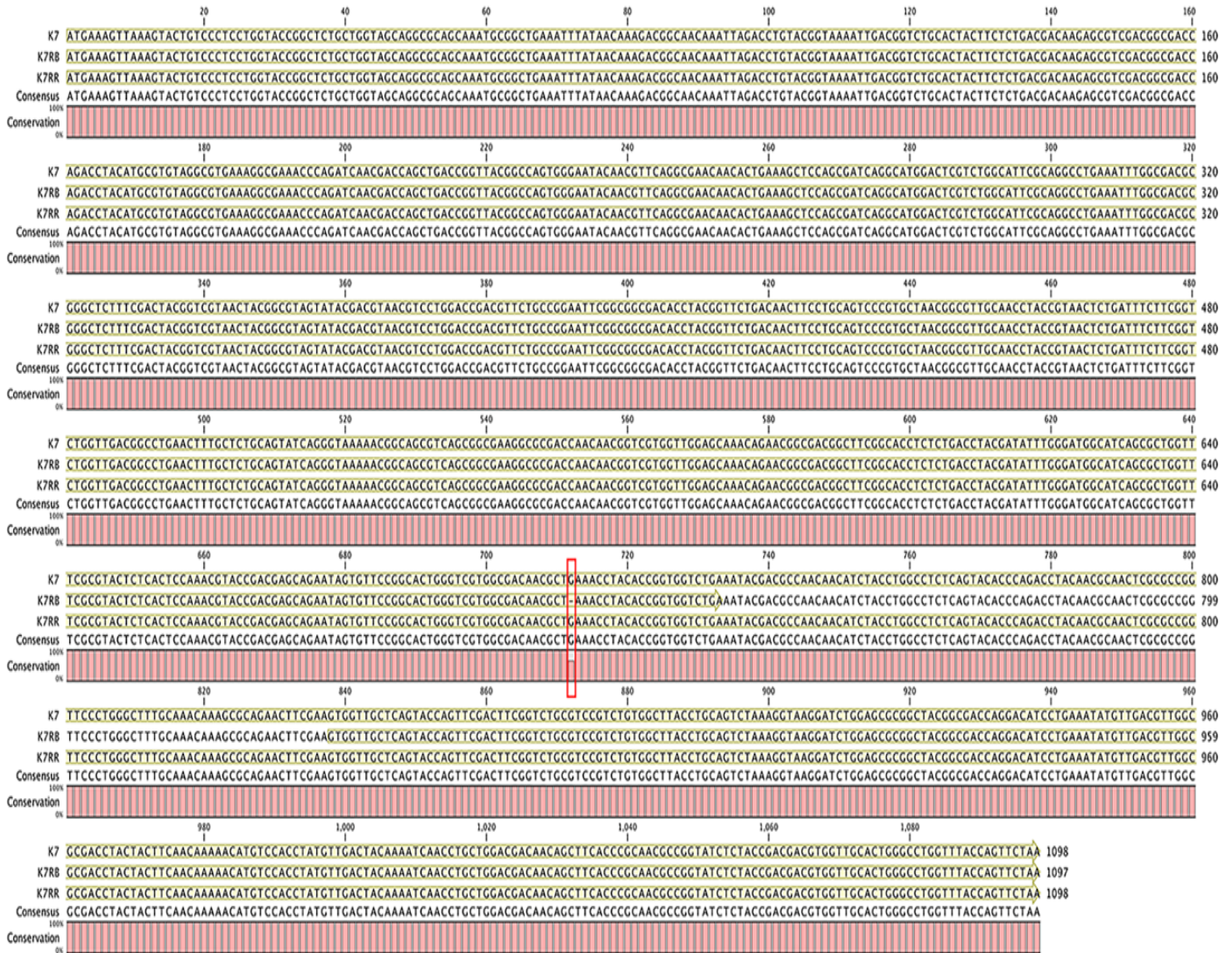


图 4.2 K7 与 K7R^B *ompC* 核酸序列比对分析

Fig 4.2 Nucleic acid sequence alignment of *ompC* between K7 and K7R^B

4.3.3 *K. pneumoniae* K7 与 K7R^B 的差异表达蛋白分析

本试验通过 LC-MS-MS 分析比较了 *K. pneumoniae* K7 和 K7R^B 之间~3100 种蛋白的丰度差异。与 K7 相比, K7R^B 中 60 种蛋白的丰度存在显著变化, 其中 13 种蛋白质表达量上调, 47 种蛋白表达量下调。差异表达蛋白主要分布于细菌的外膜蛋白、糖和氨基酸代谢相关蛋白、金属离子运输蛋白以及呼吸链相关蛋白等功能类别 (图 4.3 A)。

通过 SDS-PAGE 分析, K7R^B 中分子量为 35-40 KDa 蛋白质条带数量明显少于 K7 (图 4.3 B)。LC-MS-MS 分析则表明 K7R^B 中的一些外膜孔蛋白的丰度剧烈下调, 包括 OmpC (~9.7 倍)、OmpN (~133.2 倍)、KPN_02430 (~23.7 倍) 和 OmpF (~18.3 倍) (图 4.3 C 和图 4.3 D)。Western Blot 验证表明上述四种外膜蛋白的表达水平符合 LC-MS-MS 的分析结果(图 4.3 E), 说明 K7 中 OmpC、OmpN、KPN_02430 和 OmpF 可能是 GH-K3 的二级吸附受体, 一旦这些外膜蛋白发生缺失会导致细菌产生噬菌体抗性。另外, 从这些外膜蛋白编码基因的转录水平上来看, qPCR 数据表明 K7R^B 中 *ompN*、*KPN_02430* 和 *ompF* 出现极为明显的转录抑制。然而, 该突变菌株中 *ompC-1* 和 *ompC-2* 的转录水平却没发生显著的变化 (图 4.3 F), 表明 OmpC 的表达抑制可能与该蛋白的翻译过程有关。

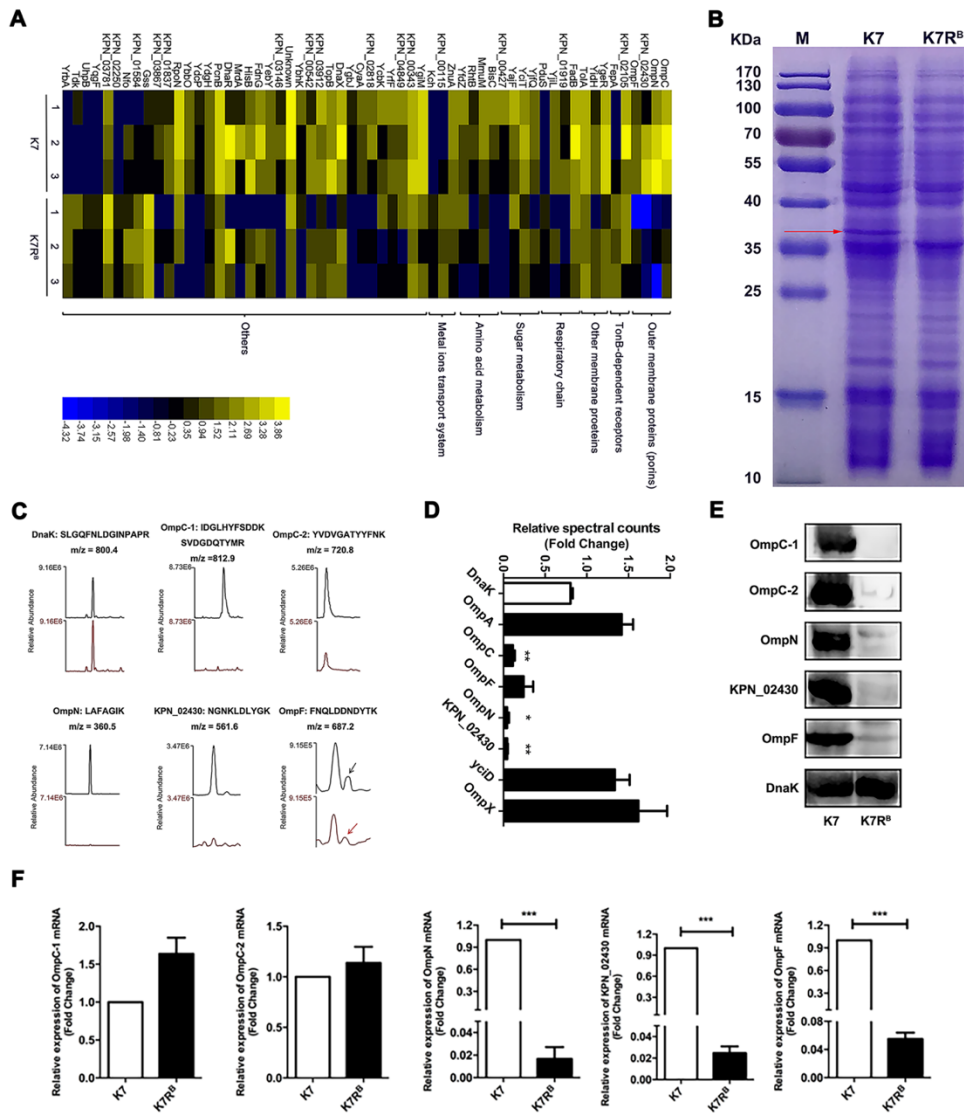


图 4.3 *K. pneumoniae* K7 和 K7R^B 的差异表达蛋白

Fig 4.3 Differentially expressed proteins between *K. pneumoniae* K7 and K7R^B

- A: K7 和 K7R^B 差异表达蛋白的热图分析
 - B: K7 和 K7R^B 的 SDS-PAGE 分析
 - C: 外膜蛋白质子化肽段提取离子色谱分析
 - D: K7R^B 与 K7 的蛋白丰度变化分析
 - E: Western Blot 分析 K7 和 K7R^B 中外膜蛋白的表达水平
 - F: qPCR 分析 K7 和 K7R^B 中外膜蛋白编码基因 mRNA 转录水平
- A: Heat-map analysis of differentially expressed proteins B: SDS-PAGE analysis of K7 and K7R^B
 C: Extracted ion chromatograms of protonated peptides D: Analysis of protein abundance changes
 E: Western Blot analysis of Omp between K7 and K7R^B F: qPCR analysis of *omp* mRNA between K7 and K7R^B

STRING分析表明OmpA处于OmpC、OmpN、KPN_02430和OmpF等外膜蛋白组成的蛋白互作网络中的中心位置(图4.4),说明OmpA虽然可能并不是GH-K3的吸附受体,但是该蛋白在维系外膜蛋白OmpC、OmpN、KPN_02430和OmpF互作关系中可能发挥着重要作用。

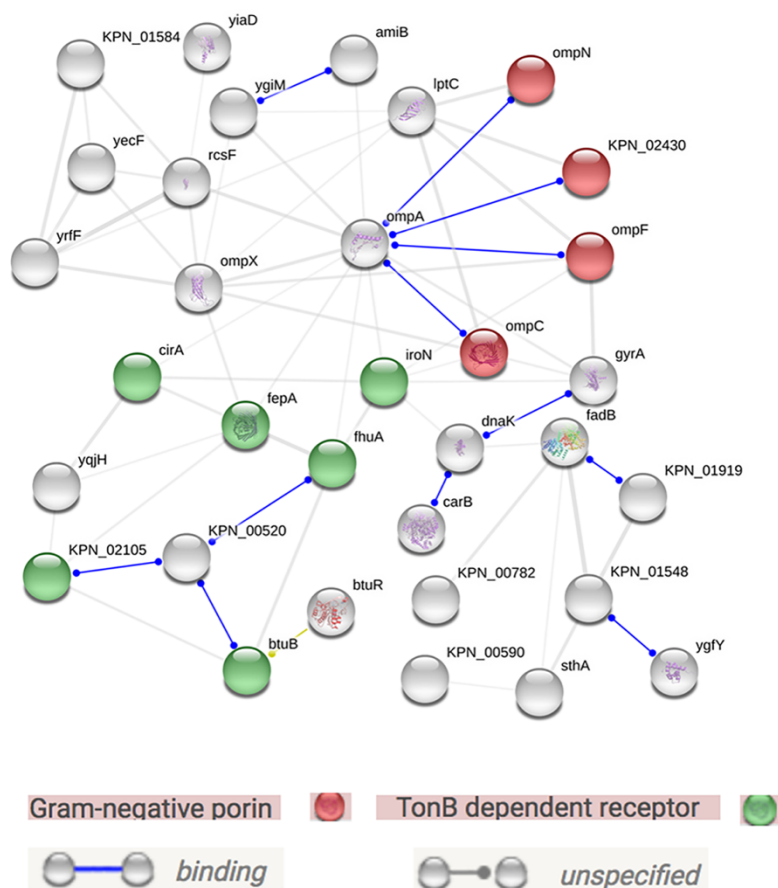


图 4.4 *K. pneumoniae* K7 和 K7R^B 的差异表达蛋白互作关系分析
 Fig 4.4 The interaction of differentially expressed proteins between *K. pneumoniae* K7 and K7R^B

4.3.4 *K. pneumoniae* K7R^B 的外膜蛋白过表达载体的构建

为了揭示 *K. pneumoniae* K7 的 OmpC、OmpN、KPN_02430 和 OmpF 是否具备 GH-K3 吸附受体的功能,本试验使用 pUC18K 质粒载体在 K7R^B 中过表达来自 K7 的 *ompC*、*ompN*、*KPN_02430* 和 *ompF* 基因。*Xba* I 和 *Hind* III 对重组质粒载体的双酶切结果(图 4.5)和测序结果均证实 pUC18K-*ompC*^{K7}(第 1、2 泳道)、pUC18K-*ompN*^{K7}(第 3、4 泳道)、pUC18K-*KPN_0243*^{K7}(第 5、6 泳道)和

pUC18K-omp^{K7} (第 7、8 泳道) 已成功构建, 在此基础上电转化 K7R^B 从而获得四种外膜蛋白的过表达菌株。

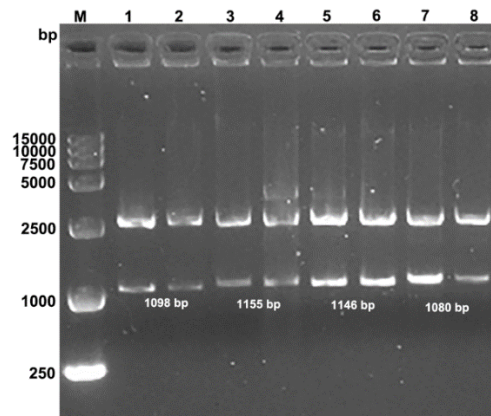


图 4.5 pUC18K-omp 的双酶切鉴定

Fig 4.5 Identification of pUC18K-omp by double digestion

4.3.5 外膜蛋白编码基因过表达菌株对 GH-K3 的敏感性分析

研究表明, OmpC、OmpN、KPN_02430 和 OmpF 均可通过 pUC18K 质粒载体在 K7R^B 中得到过表达(图 4.6 A)。通过噬斑试验, 本人发现尽管噬菌体 GH-K3 对 K7R^BC-omp^{C^{K7}} 形成的噬斑透亮程度弱于 K7, 但是足以证明这株携带 pUC18K-omp^{C^{K7}} 的 K7R^B 可被该噬菌体所裂解。然而, K7R^BC-omp^{N^{K7}}、K7R^BC-KPN_02430^{K7} 和 K7R^BC-omp^{F^{K7}} 仍然不能被 GH-K3 所侵染(图 4.6 B), 说明这四种外膜蛋白中似乎只有 OmpC 可作为 GH-K3 的外膜蛋白受体。

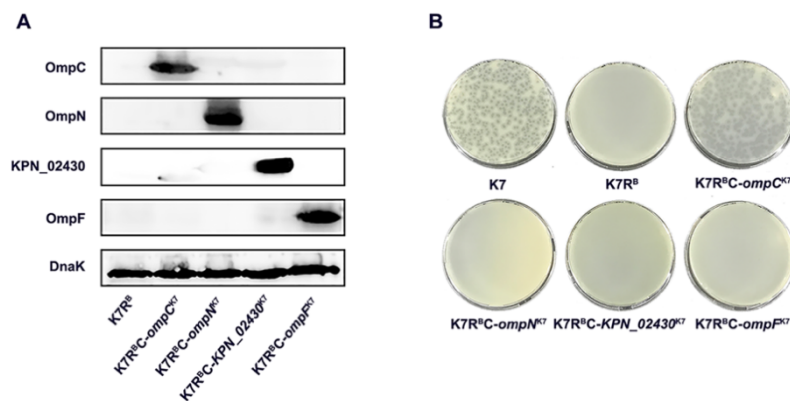


图 4.6 基因过表达菌株对 GH-K3 的敏感性

Fig 4.6 Sensitivity of gene overexpression strains to GH-K3

A: 过表达菌株中外膜蛋白的表达水平 B: GH-K3 对基因过表达菌株的噬斑试验

A: Western Blot analysis of Omp among gene overexpression strains

B: Plaque assays of GH-K3 to gene overexpression strains

4.3.6 外膜蛋白原核表达载体的构建

为了比较 OmpC、OmpN、KPN_02430 和 OmpF 抗血清孵育 K7 对 GH-K3 侵染的影响, 本试验使用 pET28a 质粒载体对四种外膜蛋白进行原核表达和变性纯化, 然后免疫新西兰大耳兔以获得相应的抗血清。Nde I 和 Xho I 对重组质粒载体的双酶切结果 (图 4.7) 和测序结果均证实 pET28a-ompC (第 1 泳道)、pET28a-ompN (第 2 泳道)、pET28a-KPN_02430 (第 3 泳道) 和 pET28a-ompF (第 4 泳道) 已成功构建。

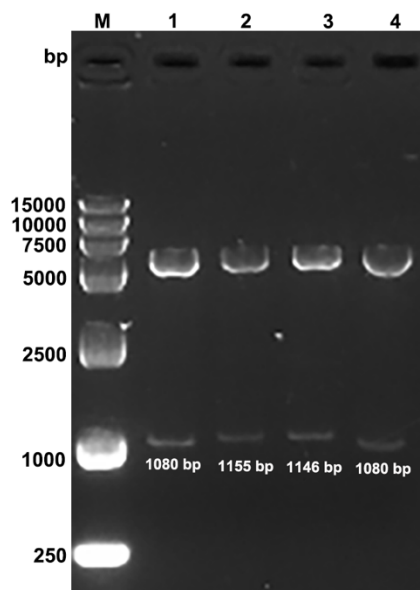


图 4.7 pET28a-omp 的双酶切鉴定

Fig 4.7 Identification of pET28a-omp by double digestion

4.3.7 外膜蛋白抗血清的中和作用分析

在上述基础上转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 菌株并对四种外膜蛋白进行变性纯化。SDS-PAGE 分析结果表明, 通过变性纯化及蛋白复性, 可以获得纯化的 OmpC、OmpN、KPN_02430 和 OmpF 蛋白 (图 4.8 A)。针对 *K. pneumoniae* K7 的 Western Blot 结果显示, 四种外膜蛋白的抗血清具有较强的特异性 (图 4.8 B)。统计结果表明, 该噬菌体对经 OmpN、KPN_02430 和 OmpF 抗血清孵育 K7 的感染效率几乎不发生变化, 但是 GH-K3 对经 OmpC 抗血清孵育 K7 的感染效率却下降 27.2% (图 4.8 C)。

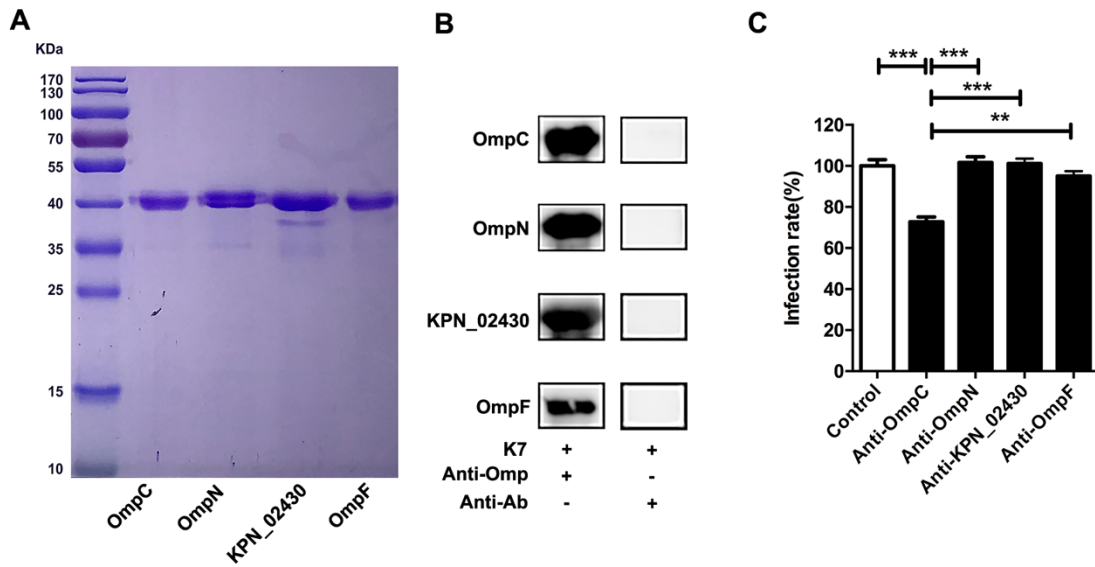


图 4.8 外膜蛋白抗血清对 GH-K3 侵染宿主的影响

Fig 4.8 Effect of anti-Omp sera on GH-K3 infection

A: 纯化后外膜蛋白的 SDS-PAGE 分析 B: Omp 抗血清特异性分析

C: 外膜蛋白抗血清对 GH-K3 感染 K7 的影响

A: SDS-PAGE analyses of purified Omps

B: Specificity of anti-Omp sera against *K. pneumoniae* K7

C: Effect of anti-Omp sera on the infection efficiencies of K7 by GH-K3.

4.3.8 *ompC* 单碱基缺失菌株的构建

为了进一步探究 *K. pneumoniae* K7R^B 的 *ompC* 单碱基 (G712) 缺失与其噬菌体抗性的关联, 本试验参照 K7R^B 的 *ompC* 序列, 借助打靶质粒载体 pCVD442 以序列替换的方式对 *K. pneumoniae* K7 的 *ompC* 基因的第 712 位碱基进行缺失突变。本人首先构建了打靶质粒载体 pCVD442- $\Delta ompC_{712}$ 并转化大肠杆菌 $\beta 2155$, 然后以供体菌株 $\beta 2155/pCVD442-\Delta ompC_{712}$ 与受体菌株 *K. pneumoniae* K7 进行接合试验, 10-12 h 后在含 Kan 50 $\mu g/mL$ 的 LB 琼脂平板上随机筛选 16 个单克隆菌落。以鉴定引物 *ompC*_{712-out} 对这些菌落进行 PCR 鉴定发现, 第 1、12 号克隆无特异性产物扩增, 这是由于打靶质粒载体已经通过同源重组整合到 K7 的基因组上, 整合的序列过长从而导致引物无法扩增, 而未发生基因整合的菌株则可扩增出长度为 4941 bp 的 PCR 产物 (图 4.9)。测序分析表明第 1、12 号菌株的 *ompC* 基因确实发生了 G712 缺失, 说明 *K. pneumoniae* K7 ($\Delta ompC_{712}$) 已成功构建。

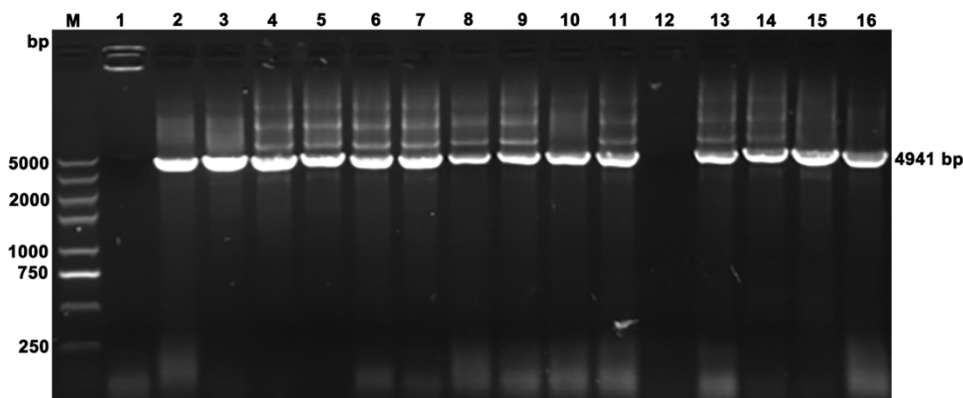


图 4.9 K7 ($\Delta ompC_{712}$) 的 PCR 鉴定

Fig 4.9 The PCR identification of K7($\Delta ompC_{712}$)

4.3.9 *ompC* 单碱基缺失菌株对 GH-K3 的敏感性分析

结果表明 K7 ($\Delta ompC_{712}$) 出现与 K7R^B 类似的 OmpC 表达抑制现象 (图 4.10 A), 噬斑试验也表明 K7 ($\Delta ompC_{712}$) 完全不能被 GH-K3 所侵染 (图 4.10 B)。

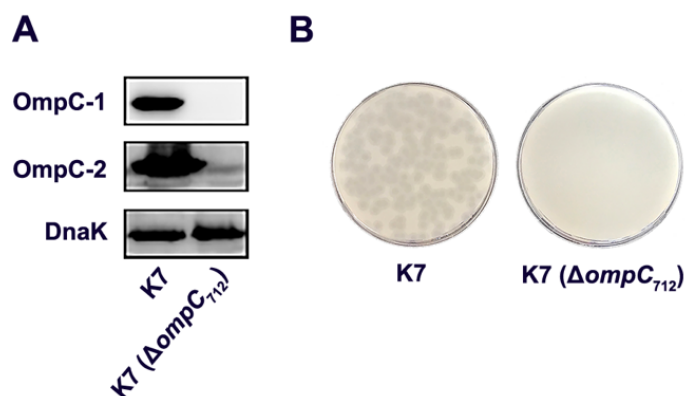


图 4.10 K7 ($\Delta ompC_{712}$) 对 GH-K3 的敏感性

Fig 4.10 Sensitivity of K7($\Delta ompC_{712}$) to GH-K3

A: Western Blot 分析 K7 ($\Delta ompC_{712}$) 中 OmpC 表达水平 B: K7 ($\Delta ompC_{712}$) 的噬斑试验
A: Western Blot analysis of OmpC of K7($\Delta ompC_{712}$) B: Plaque assays of K7($\Delta ompC_{712}$)

4.3.10 GH-K3 对 K7R^BC-*ompC*^{K7} 和 K7 ($\Delta ompC_{712}$) 的吸附效率

为了鉴定 OmpC 的噬菌体吸附特性, 本试验使用高碘酸盐和蛋白酶 K 分别对 K7R^BC-*ompC*^{K7} 和 K7 ($\Delta ompC_{712}$) 分别进行处理。研究表明, 10 min 之内, 噬菌体 GH-K3 对经 IO₄⁻处理的 K7 ($\Delta ompC_{712}$) 的吸附效率仅为 42.2%。但是同样时间内, 该噬菌体对经 IO₄⁻处理的 K7R^BC-*ompC*^{K7} 的吸附效率却为 87.7%, 这

一数值明显高于第二章中经 IO_4^- 处理的 K7。然而, 将吸附时间延长至 1 h, 噬菌体对经 IO_4^- 处理的 K7 ($\Delta ompC_{712}$) 的吸附效率并没有明显的变化, 这一现象与第二章中经 IO_4^- 处理的 K7R^B 非常相似。此外, K7R^BC-*ompC*^{K7} 经 IO_4^- 和蛋白酶 K 双重处理后, 其吸附效率降至 57.4%, 显著低于 IO_4^- 或蛋白酶 K 单处理的菌株, 但是仍显著高于同样经双重处理 K7 ($\Delta ompC_{712}$) 的噬菌体吸附效率 (34.6%) (图 4.11)。结合第二章的噬菌体吸附试验数据, 这些结果可证明 OmpC 对于噬菌体 GH-K3 吸附宿主具有关键作用。

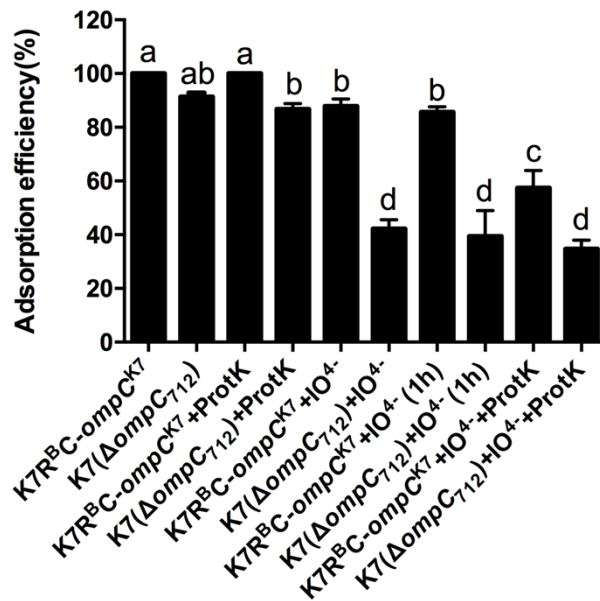


图 4.11 GH-K3 对 K7R^BC-*ompC*^{K7} 和 K7 ($\Delta ompC_{712}$) 的吸附效率

Fig 4.11 Adsorption efficiencies of GH-K3 to K7R^BC-*ompC*^{K7} and K7($\Delta ompC_{712}$)

4.3.11 其他 K2 血清型肺炎克雷伯菌与 K7 对 GH-K3 敏感性的差异分析

第一章的研究表明, 除了 *K. pneumoniae* K7 以外, KPP14、KPP27 和 KPP36 也都属于 K2 血清型肺炎克雷伯菌。虽然噬菌体 GH-K3 在 KPP14、KPP27 和 KPP36 的菌苔上都可形成空斑, 但是该噬菌体仅能裂解 KPP27 并形成小而模糊的噬斑 (图 4.12 A)。为了揭示 K7、KPP14、KPP27 和 KPP36 对 GH-K3 敏感性差异的成因, 本试验从四个菌株的 OmpC 表达水平差异和序列差异来展开研究。Western Blot 的结果表明, K7 和其他三个菌株中 OmpC 的表达水平没有明显差异 (图 4.12 B 和图 4.12 C)。BLAST 分析结果则表明, KPP14、KPP27 和 KPP36 中 OmpC 的氨基酸序列与 K7 相比具有极高的序列相似性, 但是三个菌株中第 255、342、

344 和 348 位氨基酸与 K7 存在差异：K7 中第 255 位氨基酸为 Ser，而其他三个菌株中相应位点均为 Thr；K7 中第 342、344 和 348 位氨基酸分别为 Asp、Ser 和 Asn，而 KPP14 和 KPP36 中相应位点则为 Glu、Asp 和 Lys（图 4.12 D），可能正是因为 KPP27 的 OmpC 的氨基酸序列与 K7 最为接近，所以该菌株对 GH-K3 具有一定的敏感性。通过 PyMOL 建模分析表明，在 K7 的 OmpC 中，除了 Ser255 位于三聚体侧面 β 折叠结构域以外，Asp342、Ser344 和 Asn348 均位于远离三聚体中心的胞外螺旋结构域（图 4.12 E），这种结构可能有利于噬菌体的受体结合蛋白与之直接接触。

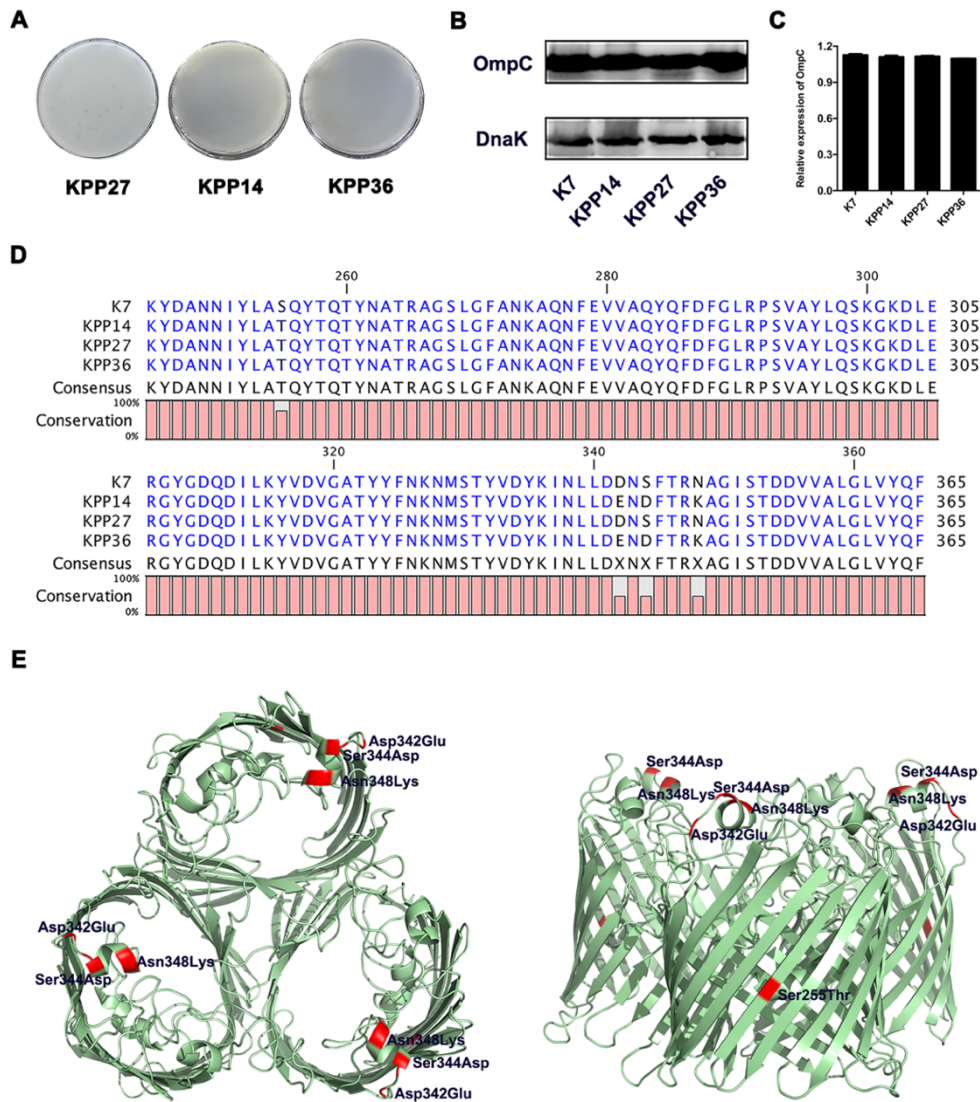


图 4.12 其他肺炎克雷伯菌与 K7 之间 OmpC 的差异

Fig 4.12 The differences of OmpC among K7 and other *K. pneumoniae* strains

A: KPP14、KPP27 和 KPP36 对 GH-K3 的敏感性

B: K7、KPP14、KPP27 和 KPP36 的 OmpC 表达水平

C: K7、KPP14、KPP27 和 KPP36 的 OmpC 表达分析

D: K7、KPP14、KPP27 和 KPP36 之间 OmpC 氨基酸序列比对

E: 具有差异位点标识的 OmpC 三聚体结构

A: Sensitivity of KPP14, KPP27, and KPP36 to GH-K3

B: Expression levels of OmpC in K7, KPP14, KPP27, and KPP36

C: OmpC expression analysis of K7, KPP14, KPP27 and KPP36

D: Amino acid sequence alignment of OmpC among K7, KPP14, KPP27, and KPP36

E: OmpC trimerization structure with residue replacements

4.3.12 *ompC* 基因替换菌株的构建

为了证实噬菌体 GH-K3 对不同菌株来源的 *OmpC* 识别的特异性, 本试验使用来自 K7 的 *OmpC* 替代 KPP14、KPP27 和 KPP36 自身的 *OmpC*。首先构建 KPP14、KPP27 和 KPP36 的 *ompC* 基因缺失菌株。如果 Gm 抗性基因成功替换了三个菌株的 *ompC* 基因, 则三个菌株外部鉴定引物的 PCR 产物长度应均为 2481 bp。PCR 结果显示本人所筛选菌株中均有预期长度的特异性扩增产物(图 4.13 A、B 和 C)。经测序表明, 这些菌株的 *ompC* 基因均被 Gm 抗性基因替代, 并且测序结果完全符合预期设计。另外, 内部鉴定引物 *ompC*-in 可在未发生缺失的 *ompC* 菌株中扩增得到长度为 206 bp 的特异性扩增产物, 而在 KPP14 基因缺失菌株(第 2、3 和 4 号克隆)、KPP27 基因缺失菌株(第 6、7 和 8 号克隆)以及 KPP36 基因缺失菌株(第 11 和 12 号克隆)中则无特异产物扩增(图 4.13 D)。上述结果说明 *K. pneumoniae* KPP14、KPP27 和 KPP36 的 *ompC* 基因缺失菌株——KPP14 ($\Delta ompC$)、KPP27 ($\Delta ompC$) 和 KPP36 ($\Delta ompC$) 均已成功构建。

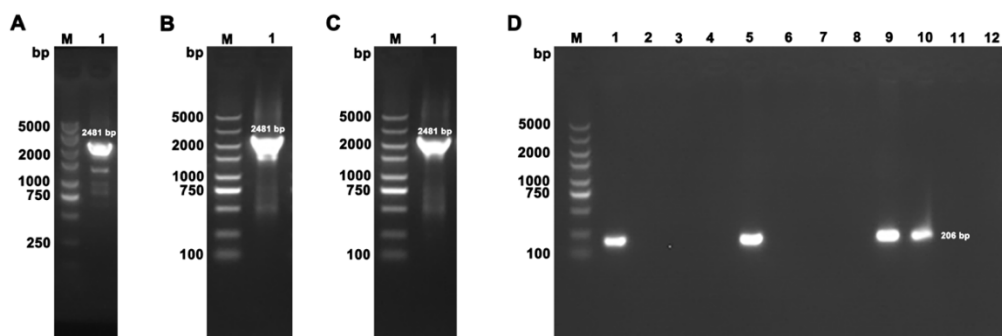


图 4.13 基因缺失菌株的 PCR 鉴定

Fig 4.13 The PCR identification of gene deleted mutant strains

A、B、C: KPP14 ($\Delta ompC$)、KPP27 ($\Delta ompC$) 和 KPP36 ($\Delta ompC$) 外侧引物的 PCR 鉴定
 D: 第 1-4, 5-8, 9-12 泳道分别为 KPP14 ($\Delta ompC$)、KPP27 ($\Delta ompC$) 和 KPP36 ($\Delta ompC$) 内侧引物的 PCR 鉴定结果 M: DL5000 marker

A, B, C: PCR identification of KPP14($\Delta ompC$), KPP27($\Delta ompC$) and KPP36($\Delta ompC$) using external primers

D: PCR identification of KPP14($\Delta ompC$), KPP27($\Delta ompC$) and KPP36($\Delta ompC$) by internal primers were presented in lanes 1-4, 5-8, and 9-12, respectively M: DL5000 marker

参照 4.2.4.4 (4) 进行电转化感受态细胞的制备, 随后将 pUC18K-*ompC*^{K7} 电转化 KPP14 ($\Delta ompC$)、KPP27 ($\Delta ompC$) 和 KPP36 ($\Delta ompC$), 从而获得 KPP14($\Delta ompC$)C-*ompC*^{K7}、KPP27($\Delta ompC$)C-*ompC*^{K7} 和 KPP36($\Delta ompC$)C-*ompC*^{K7} 的菌株。

4.3.13 *ompC* 基因替换菌株对 GH-K3 的敏感性分析

研究表明, KPP14 ($\Delta ompC$) *C-ompC*^{K7}、KPP27 ($\Delta ompC$) *C-ompC*^{K7} 和 KPP36 ($\Delta ompC$) *C-ompC*^{K7} 均可过表达来源于 K7 的 *ompC* 基因 (图 4.14 A 第 3、6、9 泳道)。无论是否经过 IO₄⁻ 处理, 三种过表达 *ompC*^{K7} 的菌株都比其野生型菌株更容易被 GH-K3 所吸附 (图 4.14 B)。此外, GH-K3 对 KPP27 ($\Delta ompC$) *C-ompC*^{K7} 的感染效率显著提高, 形成的噬斑 (图 4.14 C 4 号平板) 比野生型 KPP27 上形成的噬斑 (图 4.14 C 3 号平板) 更多而且更透亮。另外, GH-K3 还可以对 KPP14 ($\Delta ompC$) *C-ompC*^{K7} 和 KPP36 ($\Delta ompC$) *C-ompC*^{K7} 形成小而模糊的噬斑 (图 4.14 C 2 号和 6 号平板), 说明 KPP14、KPP27 和 KPP36 自身的 OmpC 被来源于 K7 的 OmpC 所替代后, 均不同程度地提高了对噬菌体 GH-K3 的敏感性。

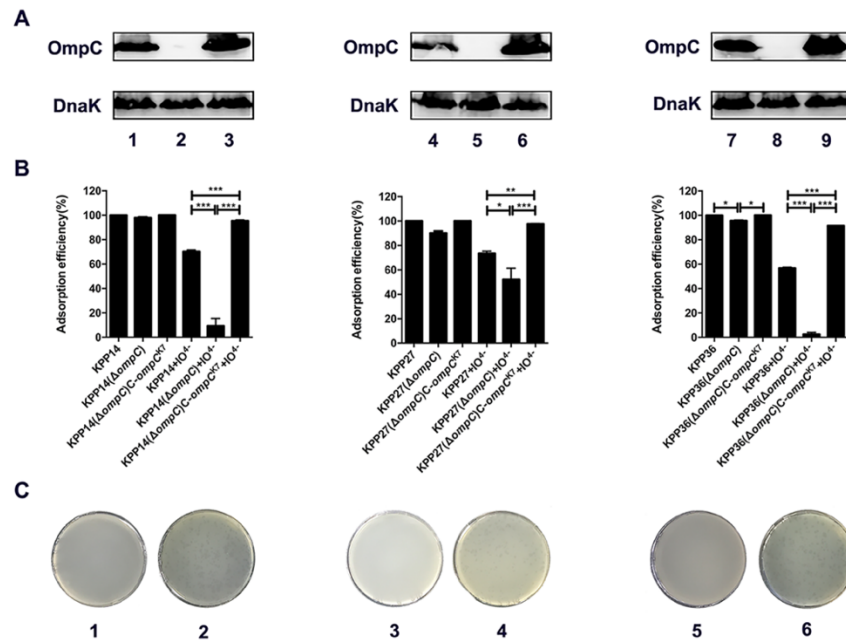


图 4.14 *ompC* 基因替换菌株对 GH-K3 的敏感性

Fig 4.14 Sensitivity of *ompC*-substituted strains to GH-K3

A: 不同肺炎克雷伯菌 OmpC 的表达水平 B: GH-K3 对不同肺炎克雷伯菌的吸附效率

C: GH-K3 对不同肺炎克雷伯菌的噬斑试验

A: Expression levels of OmpC in different *K. pneumoniae* strains

B: Adsorption efficiencies of GH-K3 binding to different *K. pneumoniae* strains

C: Plaque assays of GH-K3 to different *K. pneumoniae* strains

4.3.14 *GT-1*、*GT-2* 和 *wcaJ* 基因缺失菌株的 *OmpC* 表达分析

上一章研究发现, K7 中 *GT-1*、*GT-2* 和 *wcaJ* 任何一个基因发生缺失, 都会导致噬菌体 GH-K3 彻底失去对其的侵染能力。但是经本章 Western Blot 分析发现, *K. pneumoniae* K7 ($\Delta GT-1$)、K7 ($\Delta GT-2$) 和 K7 ($\Delta wcaJ$) 中 *OmpC* 的表达量与 K7 相比并无明显差异 (图 4.15), 说明由葡糖基转移酶表达抑制导致的噬菌体抗性突变与二级受体 *OmpC* 并无关联。

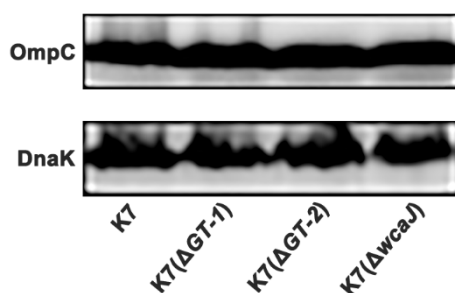


图 4.15 *GT-1*、*GT-2* 和 *wcaJ* 基因缺失菌株的 *OmpC* 表达分析

Fig 4.15 *OmpC* expression in *GT-1*, *GT-2* and *wcaJ* gene deletion strains

4.4 讨论

与 *K. pneumoniae* K7 相比, K7R^B 中 *ompC* 基因发生单碱基缺失突变, 另外四个细菌外膜孔蛋白——*OmpC*、*OmpN*、KPN_02430 和 *OmpF* 蛋白丰度均显著下调。由于细菌外膜孔蛋白通常作为多种噬菌体的吸附受体^[96], 因此 K7R^B 对噬菌体 GH-K3 的抗性可能与这些蛋白表达量的下调有关。为了验证 LC-MS-MS 数据, 本人在 K7R^B 中对 *ompC*、*ompN*、KPN_02430 和 *ompF* 四个基因分别进行过表达。然而, 只有 K7R^BC-*ompC*^{K7} 可被 GH-K3 所裂解, 表明 *OmpC* 对 GH-K3 感染起关键作用。此外, *OmpC* 过表达不会引起其他孔蛋白的上调, 这表明该蛋白似乎是 GH-K3 有效感染宿主的决定性因素。*OmpC* 已被鉴定为多种革兰氏阴性菌 (如大肠杆菌和沙门氏菌) 中的噬菌体吸附受体, 其基因突变将导致细菌产生噬菌体抗性^[105, 106]。在本章研究中, 单碱基缺失菌株 K7 ($\Delta ompC_{712}$) 显示出对 GH-K3 的抗性, 这进一步支持了 *OmpC* 是 GH-K3 侵染宿主的决定性因素的观点。此外, 针对 K7R^BC-*ompC*^{K7} 和 K7 ($\Delta ompC_{712}$) 的噬菌体吸附试验中, 充分体现了 *OmpC* 对于 GH-K3 吸附宿主所发挥的巨大作用, 因此, *OmpC* 是 GH-K3

识别并水解初级受体 CPS 后与之结合的二级吸附受体。通常情况下,用抗血清封闭细菌表面的噬菌体受体可以阻止对应噬菌体的吸附,从而使细菌免受这些病毒粒子的侵染^[192]。然而,GH-K3 对经 OmpC 抗血清孵育 K7 的感染效率仅下降 27.2%。造成这种现象可能的原因是:OmpC 在变性条件下纯化后,蛋白重折叠的所形成的构象与天然构象存在一定的误差,从而导致 OmpC 抗血清的受体封闭作用受到一定限制。

结合上一章 LC-MS-MS 分析数据,*K. pneumoniae* K7R^R 中 OmpC 的表达水平与 K7 相比几乎没有差异。而本章 LC-MS-MS 分析数据则表明,K7R^B 中 GT-1、GT-2 和 WcaJ 这三个葡糖基转移酶的蛋白丰度与 K7 相比也没有显著差异。经 Western Blot 分析,K7 中 *GT-1*、*GT-2* 和 *wcaJ* 任何一个基因发生缺失都不影响 OmpC 的表达量;同样,*ompC* 基因的表达抑制也不影响菌株表面多糖的组分。这些数据说明以 K7R^R 为代表的初级吸附受体突变的产生机理与 K7R^B 为代表的二级吸附受体突变的产生机理具有相对独立性。

OmpC 是革兰氏阴性菌表达丰度最高的外膜蛋白之一,在肺炎克雷伯菌中也被命名为 OmpK36^[193]。由于 K7R^B 的 *ompC* 发生单碱基缺失突变,该基因的 ORF 分为两部分——*ompC*₁₋₇₃₂ 和 *ompC*₈₃₇₋₁₀₉₇,极有可能会造成 *ompC* 的转录或翻译障碍。有意思的是,与 K7 相比,K7R^B 中 *ompC*₁₋₇₃₂ 和 *ompC*₈₃₇₋₁₀₉₇ 均未出现转录下调的情况,但是该突变菌株 OmpC-1 和 OmpC-2 的丰度却远低于野生型菌株,因此这种蛋白缺失现象可能源于蛋白翻译过程中的错误折叠。在革兰氏阴性细菌中,一些如大肠杆菌中的 Skp 这样的分子伴侣,可防止外膜蛋白在跨周质运输过程中聚集,有缺陷的翻译产物可能在折叠或运输到外膜的过程中受到严重阻碍^[62, 194]。另外,具有结构缺陷的 OmpC 可刺激菌体内部一系列应激反应,随后这种发生突变的孔蛋白被诸如 DegP、DegS 和 RseP 等蛋白酶降解^[195, 196]。

本章还研究了噬菌体 GH-K3 对其他 K2 型 *K. pneumoniae*——KPP14、KPP27 和 KPP36 中 OmpC 的识别能力。KPP14、KPP27 和 KPP36 与 K7 在 OmpC 表达丰度上具有高度的相似性,并且除了第 255、342、344 和 348 位氨基酸以外,三个菌株 OmpC 序列与 K7 完全一致,但是 KPP14、KPP27 和 KPP36 对 GH-K3 的敏感性却远低于 K7。然而,当使用来源于 K7 的 *ompC* 基因分别替换了 KPP14、KPP27 和 KPP36 中原有的 *ompC* 基因后,三个菌株对 GH-K3 的敏感性显著提高。

这些结果不但表明来源于 K7 的 OmpC 是 GH-K3 最合适的二级吸附受体，也说明 Ser255、Asp342、Ser344 和 Asn348 可能是 GH-K3 的关键结合位点。

OmpC 作为一种转铁蛋白结合蛋白 (Transferrin-binding Protein) [197]，它的缺失突变不仅使 K7R^B 完全不能被 GH-K3 所侵染，还使该细菌中诸如 FepA 和 KPN_02105 等一些铁摄取蛋白的丰度发生了显著性的变化。另外，K7R^B 中一些其他的能量营养代谢相关蛋白的丰度也发生了明显的改变，第二章的研究已经发现 K7R^B 的生长速率并不受外膜蛋白缺失的影响，说明这些蛋白丰度的变化可能是突变菌株重新迅速适应生长环境的一种方式。另外，本论文综述部分已经提到，肺炎克雷伯菌 OmpC 缺失突变可能导致菌株对多种抗生素产生耐药^[64]。本课题组正在进行的研究已经证实，K7R^B 对碳青霉烯类抗生素的耐药性略高于 K7。因此，虽然像 K7R^B 这种外膜蛋白缺陷的肺炎克雷伯菌噬菌体抗性突变菌株并不常见，但是它们作为多重耐药菌株的潜在来源，需要我们从公共卫生的角度加以重视。

综上所述，本章证实了 OmpC 作为二级吸附受体是噬菌体 GH-K3 侵染肺炎克雷伯菌的决定性因素，同时揭示了 K7R^B 的噬菌体抗性突变与 *ompC* 点缺失突变引起的 OmpC 缺失密切相关。另外，本人根据 GH-K3 与来源于 K7 的 OmpC 结合的倾向性判断，该外膜蛋白的 Asp342、Ser344 和 Asn348 可能是关键的噬菌体结合位点，但是 GH-K3 与 OmpC 结合位点之间的互作方式仍待进一步的探究。随着核磁共振技术 (Nuclear Magnetic Resonance, NMR)、X 射线衍射技术 (X-ray Diffraction, XRD) 和冷冻电镜技术 (Cryoelectron Microscopy, Cryo-EM) 等结构生物学研究方法的普及，一些噬菌体受体结合蛋白与宿主受体的结合机制，例如 T4 噬菌体与大肠杆菌 OmpC 的结合方式以及拥有双尾针蛋白的噬菌体 SP6 对不同血清型沙门氏菌的侵染方式都已经通过结构生物学方法得到了阐释^[103, 198]。因此，今后本课题组将尝试利用结构生物学方法对 GH-K3 与 OmpC 的结合位点进行三维结构解析以进一步阐明该噬菌体对宿主的识别方式以及宿主的噬菌体抗性产生机制。

4.5 小结

4.5.1 与 *K. pneumoniae* K7 相比, K7R^B 的 CPS 和 LPS 组分几乎未发生改变, 说明该细菌的噬菌体抗性突变性状与细菌表面多糖无关。

4.5.2 与 *K. pneumoniae* K7 相比, K7R^B 的 *ompC* 发生单碱基“G”缺失突变, 同时四个细菌外膜孔蛋白——OmpC、OmpN、KPN_02430 和 OmpF 蛋白丰度均显著低于野生株, 其中 OmpC 的表达抑制可能与该蛋白的翻译过程有关。

4.5.3 通过 *ompC*、*ompN*、*KPN_02430* 和 *ompF* 基因的过表达试验, 发现只有过表达 *ompC* 的 K7R^B 菌株可被噬菌体 GH-K3 所裂解, 说明 OmpC 可能是噬菌体 GH-K3 有效感染宿主的决定性因素。通过对 *ompC*₇₁₂ 进行单碱基缺失, 进一步说明了 OmpC 是 GH-K3 的二级吸附受体, 同时说明 K7R^B 对噬菌体 GH-K3 的抗性源于 *ompC* 的单碱基缺失突变。

4.5.4 *K. pneumoniae* KPP14、KPP27 和 KPP36 自身的 *ompC* 基因被来源于 K7 的 *ompC* 基因所替代后, 三个菌株均提高了对 GH-K3 的敏感性, 表明来源于 K7 的 OmpC 是该噬菌体最合适的二级吸附受体。

结 论

1. 作为一种可特异性裂解 K2 血清型肺炎克雷伯菌的长尾噬菌体, GH-K3 具有良好的理化稳定性。该噬菌体基因组序列长度为 49427 bp, 包含 77 个 ORF, 与 13 个噬菌体具有高度的同源性。

2. 噬菌体 GH-K3 对宿主菌的结合存在“CPS-OmpC”的两级吸附受体模式, 其中 CPS 是初级吸附受体, 外膜蛋白 OmpC 是二级吸附受体。

3. *K. pneumoniae* K7 在噬菌体 GH-K3 的压力下衍生的噬菌体抗性突变菌株中, 绝大部分是“粗糙型”突变菌株 K7R^R, 极少部分是“光滑型”突变菌株 K7R^B。

4. *K. pneumoniae* K7R^R 对噬菌体 GH-K3 的抗性主要源于三种葡糖基转移酶——GT-1、GT-2 和 WcaJ 表达抑制所导致的 CPS 合成障碍, 而 K7R^B 对 GH-K3 的抗性源于基因突变所造成的外膜蛋白 OmpC 的表达抑制。

创新点

1.在由 *K. pneumoniae* K7 衍生的噬菌体 GH-K3 抗性突变菌株中，除了绝大部分菌落形态粗糙的突变菌株以外，本研究首次发现菌落形态光滑的抗性突变菌株，并系统地描述了其主要特征。

2.本研究发现 *K. pneumoniae* K7 的 OmpC 对于噬菌体 GH-K3 的吸附具有决定性作用，该外膜蛋白可作为该噬菌体的二级吸附受体，突破了长期以来关于肺炎克雷伯菌噬菌体受体认知的局限性。

3.本研究首次证实噬菌体 GH-K3 的初级吸附受体 CPS 受三种葡糖基转移酶——GT-1、GT-2 和 WcaJ 的调控，三种蛋白表达抑制引起的 CPS 合成障碍是 *K. pneumoniae* K7R^R “粗糙型”突变性状的主要根源，而“光滑型”抗性突变菌株 K7R^B 对噬菌体 GH-K3 的抗性主要源于基因突变导致的外膜蛋白 OmpC 的表达抑制，为系统地阐明肺炎克雷伯菌抵抗噬菌体侵染的机制提供了首例较为清晰的案例。

参考文献

- [1] Podschun R and Ullmann U, *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors[J]. Clin Microbiol Rev, 1998, 11(4): 589-603.
- [2] Palfreyman J M, *Klebsiella* serotyping by counter-current immunoelectrophoresis[J]. J Hyg (Lond), 1978, 81(2): 219-225.
- [3] Diancourt L, Passet V, Verhoef J, *et al.*, Multilocus Sequence Typing of *Klebsiella pneumoniae* Nosocomial Isolates[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(8): 4178-4182.
- [4] Brisse S, Issenhuth-Jeanjean S, and Grimont P A, Molecular serotyping of *Klebsiella* species isolates by restriction of the amplified capsular antigen gene cluster[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(8): 3388-3398.
- [5] Fang C T, Lai S Y, Yi W C, *et al.*, *Klebsiella pneumoniae* genotype K1: an emerging pathogen that causes septic ocular or central nervous system complications from pyogenic liver abscess[J]. Clin Infect Dis, 2007, 45(3): 284-293.
- [6] Fang C T, Lai S Y, Yi W C, *et al.*, The function of *wzy_K1 (magA)*, the serotype K1 polymerase gene in *Klebsiella pneumoniae cps* gene cluster[J]. J Infect Dis, 2010, 201(8): 1268-1269.
- [7] Pan Y J, Lin T L, Chen Y H, *et al.*, Capsular types of *Klebsiella pneumoniae* revisited by *wzc* sequencing[J]. PLoS One, 2013, 8(12): e80670.
- [8] Hsu C R, Lin T L, Pan Y J, *et al.*, Isolation of a bacteriophage specific for a new capsular type of *Klebsiella pneumoniae* and characterization of its polysaccharide depolymerase[J]. PLoS One, 2013, 8(8): e70092.
- [9] Pan Y J, Lin T L, Chen C T, *et al.*, Genetic analysis of capsular polysaccharide synthesis gene clusters in 79 capsular types of *Klebsiella* spp[J]. Sci Rep, 2015, 5: 15573.
- [10] Prokesch B C, TeKippe M, Kim J, *et al.*, Primary osteomyelitis caused by hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*[J]. Lancet Infect Dis, 2016, 16(9): e190-e195.

- [11] Patel P K, Russo T A, and Karchmer A W, Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*[J]. Open Forum Infect Dis, 2014, 1(1): ofu028.
- [12] Guo Y, Wang S, Zhan L, *et al.*, Microbiological and Clinical Characteristics of Hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* Isolates Associated with Invasive Infections in China[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2017, 7(24).
- [13] Liu Y M, Li B B, Zhang Y Y, *et al.*, Clinical and molecular characteristics of emerging hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections in mainland China[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2014, 58(9): 5379-5385.
- [14] Solovieva E V, Myakinina V P, Kislichkina A A, *et al.*, Comparative genome analysis of novel Podoviruses lytic for hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* of K1, K2, and K57 capsular types[J]. Virus Res, 2018, 243: 10-18.
- [15] Fang C T, Chuang Y P, Shun C T, *et al.*, A novel virulence gene in *Klebsiella pneumoniae* strains causing primary liver abscess and septic metastatic complications[J]. J Exp Med, 2004, 199(5): 697-705.
- [16] Russo T A, Olson R, MacDonald U, *et al.*, Aerobactin, but Not Yersiniabactin, Salmochelin, or Enterobactin, Enables the Growth/Survival of Hypervirulent (Hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* *Ex Vivo* and *In Vivo* [J]. Infect Immun, 2015, 83(8): 3325-3333.
- [17] Chen Y T, Chang H Y, Lai Y C, *et al.*, Sequencing and analysis of the large virulence plasmid pLVPK of *Klebsiella pneumoniae* CG43[J]. Gene, 2004, 337: 189-198.
- [18] Tang H L, Chiang M K, Liou W J, *et al.*, Correlation between *Klebsiella pneumoniae* carrying pLVPK-derived loci and abscess formation[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2010, 29(6): 689-698.
- [19] Lai Y C, Peng H L, and Chang H Y, RmpA2, an activator of capsule biosynthesis in *Klebsiella pneumoniae* CG43, regulates K2 *cps* gene expression at the transcriptional level[J]. J Bacteriol, 2003, 185(3): 788-800.
- [20] Hsu C R, Lin T L, Chen Y C, *et al.*, The role of *Klebsiella pneumoniae* *rmpA* in capsular polysaccharide synthesis and virulence revisited[J]. Microbiology, 2011, 157(Pt 12): 3446-3457.
- [21] Su K, Zhou X, Luo M, *et al.*, Genome-wide identification of genes regulated by RcsA, RcsB, and RcsAB phosphorelay regulators in *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044[J]. Microb Pathog, 2018, 123: 36-41.

- [22] Paczosa M K and Meccas J, *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense[J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2016, 80(3): 629-661.
- [23] Bialek-Davenet S, Lavigne J P, Guyot K, *et al.*, Differential contribution of AcrAB and OqxAB efflux pumps to multidrug resistance and virulence in *Klebsiella pneumoniae*[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2015, 70(1): 81-88.
- [24] Chen J H, Siu L K, Fung C P, *et al.*, Contribution of outer membrane protein K36 to antimicrobial resistance and virulence in *Klebsiella pneumoniae*[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2010, 65(5): 986-990.
- [25] Madigan MT, Martinko JM, Bender KS, *et al.* *Brock Biology of Microorganisms*[M]. 14th ed, San Francisco: Benjamin Cummings, 2014.
- [26] Cano V, Moranta D, Llobet-Brossa E, *et al.*, *Klebsiella pneumoniae* triggers a cytotoxic effect on airway epithelial cells[J]. *BMC Microbiol*, 2009, 9: 156.
- [27] Domenico P, Salo R J, Cross A S, *et al.*, Polysaccharide capsule-mediated resistance to opsonophagocytosis in *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Infect Immun*, 1994, 62(10): 4495-4499.
- [28] Moranta D, Regueiro V, March C, *et al.*, *Klebsiella pneumoniae* Capsule Polysaccharide Impedes the Expression of β -Defensins by Airway Epithelial Cells[J]. *Infect Immun*, 2010, 78(3): 1135-1146.
- [29] Alvarez D, Merino S, Tomas J M, *et al.*, Capsular polysaccharide is a major complement resistance factor in lipopolysaccharide O side chain-deficient *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates[J]. *Infect Immun*, 2000, 68(2): 953-955.
- [30] Cortes G, Borrell N, de Astorza B, *et al.*, Molecular analysis of the contribution of the capsular polysaccharide and the lipopolysaccharide O side chain to the virulence of *Klebsiella pneumoniae* in a murine model of pneumonia[J]. *Infect Immun*, 2002, 70(5): 2583-2590.
- [31] Regueiro V, Moranta D, Frank C G, *et al.*, *Klebsiella pneumoniae* subverts the activation of inflammatory responses in a NOD1-dependent manner[J]. *Cell Microbiol*, 2011, 13(1): 135-153.
- [32] Corsaro M M, De Castro C, Naldi T, *et al.*, ¹H and ¹³C NMR characterization and secondary structure of the K2 polysaccharide of *Klebsiella pneumoniae* strain 52145[J]. *Carbohydr Res*, 2005, 340(13): 2212-2217.
- [33] Laxminarayan R, Duse A, Wattal C, *et al.*, Antibiotic resistance-the need for global solutions[J]. *Lancet Infect Dis*, 2013, 13(12): 1057-1098.

- [34] World Health Organization. Antimicrobial resistance: global report on surveillance [R]. Geneva: World Health Organization, 2014.
- [35] Chung P Y, The emerging problems of *Klebsiella pneumoniae* infections: carbapenem resistance and biofilm formation[J]. FEMS Microbiol Lett, 2016, 363(20).
- [36] Vital signs: carbapenem-resistant Enterobacteriaceae[J]. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2013, 62(9): 165-170.
- [37] Paterson D L and Bonomo R A, Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update[J]. Clin Microbiol Rev, 2005, 18(4): 657-686.
- [38] Knothe H, Shah P, Krcmery V, *et al.*, Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*[J]. Infection, 1983, 11(6): 315-317.
- [39] Jacoby G A, Medeiros A A, O'Brien T F, *et al.*, Broad-spectrum, transmissible beta-lactamases[J]. N Engl J Med, 1988, 319(11): 723-724.
- [40] Iredell J, Brown J, and Tagg K, Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae: mechanisms and clinical implications[J]. BMJ, 2016, 352: h6420.
- [41] Boyle D P and Zembower T R, Epidemiology and Management of Emerging Drug-Resistant Gram-Negative Bacteria: Extended-Spectrum beta-Lactamases and Beyond[J]. Urol Clin North Am, 2015, 42(4): 493-505.
- [42] Winokur P L, Canton R, Casellas J M, *et al.*, Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum beta-lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific region[J]. Clin Infect Dis, 2001, 32 Suppl 2: S94-103.
- [43] Queenan A M and Bush K, Carbapenemases: the versatile beta-lactamases[J]. Clin Microbiol Rev, 2007, 20(3): 440-458, table of contents.
- [44] Walsh T R, Toleman M A, Poirel L, *et al.*, Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm?[J]. Clin Microbiol Rev, 2005, 18(2): 306-325.
- [45] Jan W R and Niels H I, Class A carbapenemases[J]. J Antimicrob Chemother, 2007, 60(3): 470.
- [46] Yigit H, Queenan A M, Anderson G J, *et al.*, Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2001, 45(4): 1151-1161.

- [47] Wang D, Chen J, Yang L, *et al.*, Phenotypic and enzymatic comparative analysis of the KPC variants, KPC-2 and its recently discovered variant KPC-15[J]. PLoS One, 2014, 9(10): e111491.
- [48] Munoz-Price L S, Poirel L, Bonomo R A, *et al.*, Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases[J]. Lancet Infect Dis, 2013, 13(9): 785-796.
- [49] Pitout J D D, Nordmann P, and Poirel L, Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*, a Key Pathogen Set for Global Nosocomial Dominance[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2015, 59(10): 5873-5884.
- [50] Chen L, Mathema B, Chavda K D, *et al.*, Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: molecular and genetic decoding[J]. Trends Microbiol, 2014, 22(12): 686-696.
- [51] Tollentino F M, Polotto M, Nogueira M L, *et al.*, High prevalence of bla(CTX-M) extended spectrum beta-lactamase genes in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a tertiary care hospital: first report of bla(SHV-12), bla(SHV-31), bla(SHV-38), and bla(CTX-M-15) in Brazil[J]. Microb Drug Resist, 2011, 17(1): 7-16.
- [52] Monica S, Juha K, Hakanen A J, *et al.*, Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Finland: the first years (2008-11)[J]. J Antimicrob Chemother, 2012, 67(12): 2860-2864.
- [53] Nordmann P, Naas T, and Poirel L, Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae[J]. Emerging infectious diseases, 2011, 17(10): 1791-1798.
- [54] Yong D, Toleman M A, Giske C G, *et al.*, Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(12): 5046-5054.
- [55] Qin S, Fu Y, Zhang Q, *et al.*, High incidence and endemic spread of NDM-1-positive Enterobacteriaceae in Henan Province, China[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2014, 58(8): 4275-4282.
- [56] Chen Y T, Lin A C, Siu L K, *et al.*, Sequence of closely related plasmids encoding bla(NDM-1) in two unrelated *Klebsiella pneumoniae* isolates in Singapore[J]. PLoS One, 2012, 7(11): e48737.

- [57] Jeon J H, Lee J H, Lee J J, *et al.*, Structural basis for carbapenem-hydrolyzing mechanisms of carbapenemases conferring antibiotic resistance[J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(5): 9654-9692.
- [58] Evans B A and Amyes S G, OXA beta-lactamases[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2014, 27(2): 241-263.
- [59] Poirel L, Heritier C, Tolun V, *et al.*, Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48(1): 15-22.
- [60] Carrer A, Poirel L, Eraksoy H, *et al.*, Spread of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Istanbul, Turkey[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008, 52(8): 2950-2954.
- [61] Carrasco-Anabalón S, Conceicao Neto C O, D'Alincourt Carvalho-Assef A P, *et al.*, Introduction of NDM-1 and OXA-370 from Brazil into Chile in strains of *Klebsiella pneumoniae* isolated from a single patient[J]. *Int J Infect Dis*, 2019, 81: 28-30.
- [62] Schiffrin B, Calabrese A N, Devine P W A, *et al.*, Skp is a multivalent chaperone of outer-membrane proteins[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2016, 23(9): 786-793.
- [63] Pages J M, James C E, and Winterhalter M, The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2008, 6(12): 893-903.
- [64] Martinez-Martinez L, Extended-spectrum beta-lactamases and the permeability barrier[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2008, 14 Suppl 1: 82-89.
- [65] Shin S Y, Bae I K, Kim J, *et al.*, Resistance to carbapenems in sequence type 11 *Klebsiella pneumoniae* is related to DHA-1 and loss of OmpK35 and/or OmpK36[J]. *J Med Microbiol*, 2012, 61(Pt 2): 239-245.
- [66] Wyres K L and Holt K E, *Klebsiella pneumoniae* Population Genomics and Antimicrobial-Resistant Clones[J]. *Trends Microbiol*, 2016, 24(12): 944-956.
- [67] Padilla E, Llobet E, Domenech-Sanchez A, *et al.*, *Klebsiella pneumoniae* AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54(1): 177-183.

- [68] Ping Y, Ogawa W, Kuroda T, *et al.*, Gene cloning and characterization of KdeA, a multidrug efflux pump from *Klebsiella pneumoniae*[J]. Biol Pharm Bull, 2007, 30(10): 1962-1964.
- [69] Srinivasan V B, Singh B B, Priyadarshi N, *et al.*, Role of novel multidrug efflux pump involved in drug resistance in *Klebsiella pneumoniae*[J]. PLoS One, 2014, 9(5): e96288.
- [70] Ogawa W, Koterasawa M, Kuroda T, *et al.*, KmrA multidrug efflux pump from *Klebsiella pneumoniae*[J]. Biol Pharm Bull, 2006, 29(3): 550-553.
- [71] Srinivasan V B and Rajamohan G, KpnEF, a new member of the *Klebsiella pneumoniae* cell envelope stress response regulon, is an SMR-type efflux pump involved in broad-spectrum antimicrobial resistance[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2013, 57(9): 4449-4462.
- [72] Roy S, Datta S, Viswanathan R, *et al.*, Tigecycline susceptibility in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* causing neonatal septicaemia (2007-10) and role of an efflux pump in tigecycline non-susceptibility[J]. J Antimicrob Chemother, 2013, 68(5): 1036-1042.
- [73] Lin Y T, Jeng Y Y, Chen T L, *et al.*, Bacteremic community-acquired pneumonia due to *Klebsiella pneumoniae*: clinical and microbiological characteristics in Taiwan, 2001-2008[J]. BMC Infect Dis, 2010, 10: 307.
- [74] Zhang Y, Zhao C, Wang Q, *et al.*, High Prevalence of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* Infection in China: Geographic Distribution, Clinical Characteristics, and Antimicrobial Resistance[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2016, 60(10): 6115-6120.
- [75] Zhan L, Wang S, Guo Y, *et al.*, Outbreak by Hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* ST11 Isolates with Carbapenem Resistance in a Tertiary Hospital in China[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2017, 7(182).
- [76] Gu D, Dong N, Zheng Z, *et al.*, A fatal outbreak of ST11 carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese hospital: a molecular epidemiological study[J]. Lancet Infect Dis, 2018, 18(1): 37-46.
- [77] Shu L, Dong N, Lu J, *et al.*, Emergence of OXA-232 Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* That Carries a pLVPK-Like Virulence Plasmid among Elderly Patients in China[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2019, 63(3): e02246-02218.

- [78] Zhang R, Lin D, Chan E W-C, *et al.*, Emergence of Carbapenem-Resistant Serotype K1 Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* Strains in China[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015, 60(1): 709-711.
- [79] Yao H, Qin S, Chen S, *et al.*, Emergence of carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Lancet Infect Dis*, 2018, 18(1): 25.
- [80] Cheng Y-H, Lin T-L, Lin Y-T, *et al.*, Amino Acid Substitutions of CrrB Responsible for Resistance to Colistin through CrrC in *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2016, 60(6): 3709-3716.
- [81] Liu Y Y, Wang Y, Walsh T R, *et al.*, Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study[J]. *Lancet Infect Dis*, 2016, 16(2): 161-168.
- [82] Oliva A, Gizzi F, Mascellino M T, *et al.*, Bactericidal and synergistic activity of double-carbapenem regimen for infections caused by carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2016, 22(2): 147-153.
- [83] Yu F, Lv J, Niu S, *et al.*, In Vitro Activity of Ceftazidime-Avibactam against Carbapenem-Resistant and Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* Isolates[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2018, 62(8).
- [84] Nobrega F L, Costa A R, Kluskens L D, *et al.*, Revisiting phage therapy: new applications for old resources[J]. *Trends Microbiol*, 2015, 23(4): 185-191.
- [85] Jamal M, Andleeb S, Jalil F, *et al.*, Isolation, characterization and efficacy of phage MJ2 against biofilm forming multi-drug resistant *Enterobacter cloacae*[J]. *Folia Microbiol (Praha)*, 2018.
- [86] Vandamme E J, Phage therapy and phage control: to be revisited urgently!![J]. *J Chem Technol Biot*, 2014, 89(3): 329-333.
- [87] Jamal M, Bukhari S, Andleeb S, *et al.*, Bacteriophages: an overview of the control strategies against multiple bacterial infections in different fields[J]. *J Basic Microbiol*, 2019, 59(2): 123-133.
- [88] Karumidze N, Kusradze I, Rigvava S, *et al.*, Isolation and characterisation of lytic bacteriophages of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca*[J]. *Curr Microbiol*, 2013, 66(3): 251-258.

- [89] Taha O A, Connerton P L, Connerton I F, *et al.*, Bacteriophage ZCKP1: A Potential Treatment for *Klebsiella pneumoniae* Isolated From Diabetic Foot Patients[J]. *Front Microbiol*, 2018, 9(2127).
- [90] Cao F, Wang X, Wang L, *et al.*, Evaluation of the efficacy of a bacteriophage in the treatment of pneumonia induced by multidrug resistance *Klebsiella pneumoniae* in mice[J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 752930.
- [91] Chhibber S, Kaur S, and Kumari S, Therapeutic potential of bacteriophage in treating *Klebsiella pneumoniae* B5055-mediated lobar pneumonia in mice[J]. *J Med Microbiol*, 2008, 57(Pt 12): 1508-1513.
- [92] Hung C H, Kuo C F, Wang C H, *et al.*, Experimental phage therapy in treating *Klebsiella pneumoniae*-mediated liver abscesses and bacteremia in mice[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, 55(4): 1358-1365.
- [93] Kumari S, Harjai K, and Chhibber S, Bacteriophage versus antimicrobial agents for the treatment of murine burn wound infection caused by *Klebsiella pneumoniae* B5055[J]. *J Med Microbiol*, 2011, 60(Pt 2): 205-210.
- [94] Verma V, Harjai K, and Chhibber S, Restricting ciprofloxacin-induced resistant variant formation in biofilm of *Klebsiella pneumoniae* B5055 by complementary bacteriophage treatment[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2009, 64(6): 1212-1218.
- [95] Gu J, Liu X, Li Y, *et al.*, A method for generation phage cocktail with great therapeutic potential[J]. *PLoS One*, 2012, 7(3): e31698.
- [96] Bertozzi Silva J, Storms Z, and Sauvageau D, Host receptors for bacteriophage adsorption[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2016, 363(4).
- [97] Kokjohn TA, Miller RV. Gene transfer in the environment: transduction. In: Fry JC, Day MJ (eds). *Release of Genetically Engineered and Other Micro-Organisms* [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1992, 54–81.
- [98] Pires D P, Oliveira H, Melo L D, *et al.*, Bacteriophage-encoded depolymerases: their diversity and biotechnological applications[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, 100(5): 2141-2151.
- [99] Kiljunen S, Datta N, Dentovskaya S V, *et al.*, Identification of the lipopolysaccharide core of *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* as the receptor for bacteriophage phiA1122[J]. *J Bacteriol*, 2011, 193(18): 4963-4972.

- [100] Filippov A A, Sergueev K V, He Y, *et al.*, Bacteriophage-resistant mutants in *Yersinia pestis*: identification of phage receptors and attenuation for mice[J]. PLoS One, 2011, 6(9): e25486.
- [101] Xu J, Zhang J, Lu X, *et al.*, O antigen is the receptor of *Vibrio cholerae* serogroup O1 El Tor typing phage VP4[J]. J Bacteriol, 2013, 195(4): 798-806.
- [102] Rakhuba D V, Kolomiets E I, Dey E S, *et al.*, Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell[J]. Pol J Microbiol, 2010, 59(3): 145-155.
- [103] Tu J, Park T, Morado D R, *et al.*, Dual host specificity of phage SP6 is facilitated by tailspike rotation[J]. Virology, 2017, 507: 206-215.
- [104] Pickard D, Toribio A L, Petty N K, *et al.*, A conserved acetyl esterase domain targets diverse bacteriophages to the Vi capsular receptor of *Salmonella enterica* serovar Typhi[J]. J Bacteriol, 2010, 192(21): 5746-5754.
- [105] Marti R, Zurfluh K, Hagens S, *et al.*, Long tail fibres of the novel broad-host-range T-even bacteriophage S16 specifically recognize *Salmonella* OmpC[J]. Mol Microbiol, 2013, 87(4): 818-834.
- [106] Parent K N, Erb M L, Cardone G, *et al.*, OmpA and OmpC are critical host factors for bacteriophage Sf6 entry in *Shigella*[J]. Mol Microbiol, 2014, 92(1): 47-60.
- [107] Porcek N B and Parent K N, Key residues of *S. flexneri* OmpA mediate infection by bacteriophage Sf6[J]. J Mol Biol, 2015, 427(10): 1964-1976.
- [108] Guerrero-Ferreira R C, Viollier P H, Ely B, *et al.*, Alternative mechanism for bacteriophage adsorption to the motile bacterium *Caulobacter crescentus*[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(24): 9963-9968.
- [109] Bondy-Denomy J, Qian J, Westra E R, *et al.*, Prophages mediate defense against phage infection through diverse mechanisms[J]. ISME J, 2016, 10(12): 2854-2866.
- [110] Toropova K, Stockley P G, and Ranson N A, Visualising a viral RNA genome poised for release from its receptor complex[J]. J Mol Biol, 2011, 408(3): 408-419.
- [111] Daugelavicius R, Cvirkaitė V, Gaidelyte A, *et al.*, Penetration of enveloped double-stranded RNA bacteriophages phi13 and phi6 into *Pseudomonas syringae* cells[J]. J Virol, 2005, 79(8): 5017-5026.

- [112] Mahony J and van Sinderen D, Gram-positive phage-host interactions[J]. *Front Microbiol*, 2015, 6: 61.
- [113] Ainsworth S, Sadovskaya I, Vinogradov E, *et al.*, Differences in lactococcal cell wall polysaccharide structure are major determining factors in bacteriophage sensitivity[J]. *MBio*, 2014, 5(3): e00880-00814.
- [114] Vinga I, Baptista C, Auzat I, *et al.*, Role of bacteriophage SPP1 tail spike protein gp21 on host cell receptor binding and trigger of phage DNA ejection[J]. *Molecular Microbiology*, 2012, 83(2): 289-303.
- [115] Mooney D T, Jann M, and Geller B L, Subcellular location of phage infection protein (Pip) in *Lactococcus lactis*[J]. *Can J Microbiol*, 2006, 52(7): 664-672.
- [116] Bebeacua C, Tremblay D, Farenc C, *et al.*, Structure, adsorption to host, and infection mechanism of virulent lactococcal phage p2[J]. *J Virol*, 2013, 87(22): 12302-12312.
- [117] Tzipilevich E, Habusha M, and Ben-Yehuda S, Acquisition of Phage Sensitivity by Bacteria through Exchange of Phage Receptors[J]. *Cell*, 2017, 168(1-2): 186-199.e112.
- [118] Shin H, Lee J H, Kim H, *et al.*, Receptor diversity and host interaction of bacteriophages infecting *Salmonella enterica* serovar Typhimurium[J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e43392.
- [119] Sorensen M C, van Alphen L B, Harboe A, *et al.*, Bacteriophage F336 recognizes the capsular phosphoramidate modification of *Campylobacter jejuni* NCTC11168[J]. *J Bacteriol*, 2011, 193(23): 6742-6749.
- [120] Yen J Y, Broadway K M, and Scharf B E, Minimum requirements of flagellation and motility for infection of *Agrobacterium* sp. strain H13-3 by flagellotropic bacteriophage 7-7-1[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2012, 78(20): 7216-7222.
- [121] Kim S, Rahman M, Seol S Y, *et al.*, *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage PA10 requires type IV pili for infection and shows broad bactericidal and biofilm removal activities[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2012, 78(17): 6380-6385.
- [122] Lu M J, Stierhof Y D, and Henning U, Location and unusual membrane topology of the immunity protein of the *Escherichia coli* phage T4[J]. *J Virol*, 1993, 67(8): 4905-4913.

- [123] Hofer B, Ruge M, and Dreiseikelmann B, The superinfection exclusion gene (sieA) of bacteriophage P22: identification and overexpression of the gene and localization of the gene product[J]. *J Bacteriol*, 1995, 177(11): 3080-3086.
- [124] Arguijo-Hernandez E S, Hernandez-Sanchez J, Briones-Pena S J, *et al.*, Cor interacts with outer membrane proteins to exclude FhuA-dependent phages[J]. *Arch Virol*, 2018, 163(11): 2959-2969.
- [125] Cumby N, Edwards A M, Davidson A R, *et al.*, The bacteriophage HK97 gp15 moron element encodes a novel superinfection exclusion protein[J]. *J Bacteriol*, 2012, 194(18): 5012-5019.
- [126] Chung I Y, Bae H W, Jang H J, *et al.*, Superinfection exclusion reveals heteroimmunity between *Pseudomonas aeruginosa* temperate phages[J]. *J Microbiol*, 2014, 52(6): 515-520.
- [127] Mahony J, McGrath S, Fitzgerald G F, *et al.*, Identification and characterization of lactococcal-prophage-carried superinfection exclusion genes[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2008, 74(20): 6206-6215.
- [128] Bebeacua C, Lorenzo Fajardo J C, Blangy S, *et al.*, X-ray structure of a superinfection exclusion lipoprotein from phage TP-J34 and identification of the tape measure protein as its target[J]. *Mol Microbiol*, 2013, 89(1): 152-165.
- [129] Duerkop B A, Huo W, Bhardwaj P, *et al.*, Molecular Basis for Lytic Bacteriophage Resistance in Enterococci[J]. *MBio*, 2016, 7(4).
- [130] Lee S, Ward T J, Siletzky R M, *et al.*, Two novel type II restriction-modification systems occupying genomically equivalent locations on the chromosomes of *Listeria monocytogenes* strains[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2012, 78(8): 2623-2630.
- [131] Goldfarb T, Sberro H, Weinstock E, *et al.*, BREX is a novel phage resistance system widespread in microbial genomes[J]. *EMBO J*, 2015, 34(2): 169-183.
- [132] Ofir G, Melamed S, Sberro H, *et al.*, DISARM is a widespread bacterial defence system with broad anti-phage activities[J]. *Nat Microbiol*, 2018, 3(1): 90-98.
- [133] Grissa I, Vergnaud G, and Pourcel C, CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats[J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(Web Server issue): W52-57.

- [134] Makarova K S, Wolf Y I, Alkhnbashi O S, *et al.*, An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2015, 13(11): 722-736.
- [135] Deveau H, Barrangou R, Garneau J E, *et al.*, Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*[J]. *J Bacteriol*, 2008, 190(4): 1390-1400.
- [136] Medina-Aparicio L, Davila S, Rebollar-Flores J E, *et al.*, The CRISPR-Cas system in Enterobacteriaceae[J]. *Pathog Dis*, 2018, 76(1).
- [137] Baltz R H, Bacteriophage-resistant industrial fermentation strains: from the cradle to CRISPR/Cas9[J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2018, 45(11): 1003-1006.
- [138] Jiang W, Samai P, and Marraffini L A, Degradation of Phage Transcripts by CRISPR-Associated RNases Enables Type III CRISPR-Cas Immunity[J]. *Cell*, 2016, 164(4): 710-721.
- [139] Snyder L, Phage-exclusion enzymes: a bonanza of biochemical and cell biology reagents?[J]. *Mol Microbiol*, 1995, 15(3): 415-420.
- [140] Otsuka Y, Prokaryotic toxin-antitoxin systems: novel regulations of the toxins[J]. *Curr Genet*, 2016, 62(2): 379-382.
- [141] Engelberg-Kulka H, Hazan R, and Amitai S, mazEF: a chromosomal toxin-antitoxin module that triggers programmed cell death in bacteria[J]. *J Cell Sci*, 2005, 118(Pt 19): 4327-4332.
- [142] Alawneh A M, Qi D, Yonesaki T, *et al.*, An ADP-ribosyltransferase Alt of bacteriophage T4 negatively regulates the *Escherichia coli* MazF toxin of a toxin-antitoxin module[J]. *Mol Microbiol*, 2016, 99(1): 188-198.
- [143] Chopin M C, Chopin A, and Bidnenko E, Phage abortive infection in lactococci: variations on a theme[J]. *Curr Opin Microbiol*, 2005, 8(4): 473-479.
- [144] Choi J, Shin D, Kim M, *et al.*, LsrR-mediated quorum sensing controls invasiveness of *Salmonella typhimurium* by regulating SPI-1 and flagella genes[J]. *PLoS One*, 2012, 7(5): e37059.
- [145] Azeredo J and Sutherland I W, The use of phages for the removal of infectious biofilms[J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2008, 9(4): 261-266.

- [146] Hoyland-Kroghsbo N M, Munoz K A, and Bassler B L, Temperature, by Controlling Growth Rate, Regulates CRISPR-Cas Activity in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. MBio, 2018, 9(6).
- [147] Nigam A, Kumar S, and Engelberg-Kulka H, Quorum Sensing Extracellular Death Peptides Enhance the Endoribonucleolytic Activities of *Mycobacterium tuberculosis* MazF Toxins[J]. MBio, 2018, 9(3).
- [148] Doron S, Melamed S, Ofir G, *et al.*, Systematic discovery of antiphage defense systems in the microbial pangenome[J]. Science, 2018, 359(6379).
- [149] Hosking E R, Vogt C, Bakker E P, *et al.*, The *Escherichia coli* MotAB proton channel unplugged[J]. J Mol Biol, 2006, 364(5): 921-937.
- [150] Essuman K, Summers D W, Sasaki Y, *et al.*, The SARM1 Toll/Interleukin-1 Receptor Domain Possesses Intrinsic NAD(+) Cleavage Activity that Promotes Pathological Axonal Degeneration[J]. Neuron, 2017, 93(6): 1334-1343.e1335.
- [151] Liu M, Deora R, Doulatov S R, *et al.*, Reverse transcriptase-mediated tropism switching in *Bordetella* bacteriophage[J]. Science, 2002, 295(5562): 2091-2094.
- [152] Pawluk A, Bondy-Denomy J, Cheung V H, *et al.*, A new group of phage anti-CRISPR genes inhibits the type I-E CRISPR-Cas system of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. MBio, 2014, 5(2): e00896.
- [153] Robilotti E and Deresinski S, Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*[J]. F1000Prime Reports, 2014, 6: 80.
- [154] Humphries R M and Hemarajata P, Resistance to Ceftazidime-Avibactam in *Klebsiella pneumoniae* Due to Porin Mutations and the Increased Expression of KPC-3[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2017, 61(6).
- [155] Mirzaei M K and Nilsson A S, Correction: Isolation of phages for phage therapy: a comparison of spot tests and efficiency of plating analyses for determination of host range and efficacy[J]. PLoS One, 2015, 10(5): e0127606.
- [156] Gong P, Cheng M, Li X, *et al.*, Characterization of *Enterococcus faecium* bacteriophage IME-EFm5 and its endolysin LysEFm5[J]. Virology, 2016, 492: 11-20.
- [157] Gadagkar R and Gopinathan K P, Bacteriophage burst size during multiple infections[J]. J Biosci, 1980, 2(3): 253-259.

- [158] Margulies M, Egholm M, Altman W E, *et al.*, Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors[J]. *Nature*, 2005, 437(7057): 376-380.
- [159] Lowe T M and Eddy S R, tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence[J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(5): 955-964.
- [160] Lagesen K, Hallin P, Rodland E A, *et al.*, RNAmmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes[J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(9): 3100-3108.
- [161] Besemer J, Lomsadze A, and Borodovsky M, GeneMarkS: a self-training method for prediction of gene starts in microbial genomes. Implications for finding sequence motifs in regulatory regions[J]. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29(12): 2607-2618.
- [162] Altschul S F, Madden T L, Schaffer A A, *et al.*, Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs[J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(17): 3389-3402.
- [163] Darling A C, Mau B, Blattner F R, *et al.*, Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements[J]. *Genome Res*, 2004, 14(7): 1394-1403.
- [164] Alva V, Nam S Z, Soding J, *et al.*, The MPI bioinformatics Toolkit as an integrative platform for advanced protein sequence and structure analysis[J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(W1): W410-415.
- [165] Shimada M K and Nishida T, A modification of the PHYLIP program: A solution for the redundant cluster problem, and an implementation of an automatic bootstrapping on trees inferred from original data[J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2017, 109: 409-414.
- [166] Mishra C K, Choi T J, and Kang S C, Isolation and characterization of a bacteriophage F20 virulent to *Enterobacter aerogenes*[J]. *J Gen Virol*, 2012, 93(Pt 10): 2310-2314.
- [167] Majkowska-Skrobek G, Latka A, Berisio R, *et al.*, Capsule-Targeting Depolymerase, Derived from *Klebsiella* KP36 Phage, as a Tool for the Development of Anti-Virulent Strategy[J]. *Viruses*, 2016, 8(12).

- [168] Hoyles L, Murphy J, Neve H, *et al.*, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*-bacteriophage combination from the caecal effluent of a healthy woman[J]. PeerJ, 2015, 3: e1061.
- [169] Brown T L, Petrovski S, Hoyle D, *et al.*, Characterization and formulation into solid dosage forms of a novel bacteriophage lytic against *Klebsiella oxytoca*[J]. PLoS One, 2017, 12(8): e0183510.
- [170] Park E A, Kim Y T, Cho J H, *et al.*, Characterization and genome analysis of novel bacteriophages infecting the opportunistic human pathogens *Klebsiella oxytoca* and *K. pneumoniae*[J]. Arch Virol, 2016.
- [171] Nguyen D T, Lessor L E, Cahill J L, *et al.*, Complete Genome Sequence of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-Producing *K. pneumoniae* Siphophage Sushi[J]. Genome Announc, 2015, 3(5).
- [172] Bryan M J, Burroughs N J, Spence E M, *et al.*, Evidence for the intense exchange of MazG in marine cyanophages by horizontal gene transfer[J]. PLoS One, 2008, 3(4): e2048.
- [173] Jonczyk E, Klak M, Miedzybrodzki R, *et al.*, The influence of external factors on bacteriophages--review[J]. Folia Microbiol (Praha), 2011, 56(3): 191-200.
- [174] Brown-Jaque M, Calero-Caceres W, and Muniesa M, Transfer of antibiotic-resistance genes via phage-related mobile elements[J]. Plasmid, 2015, 79: 1-7.
- [175] Lekunberri I, Subirats J, Borrego C M, *et al.*, Exploring the contribution of bacteriophages to antibiotic resistance[J]. Environ Pollut, 2017, 220(Pt B): 981-984.
- [176] Penades J R, Chen J, Quiles-Puchalt N, *et al.*, Bacteriophage-mediated spread of bacterial virulence genes[J]. Curr Opin Microbiol, 2015, 23: 171-178.
- [177] Casjens S R and Molineux I J, Short noncontractile tail machines: adsorption and DNA delivery by podoviruses[J]. Adv Exp Med Biol, 2012, 726: 143-179.
- [178] Plattner M, Shneider M M, Arbatsky N P, *et al.*, Structure and Function of the Branched Receptor-Binding Complex of Bacteriophage CBA120[J]. J Mol Biol, 2019.
- [179] Thurow H, Niemann H, and Stirm S, Bacteriophage-borne enzymes in carbohydrate chemistry. Part I. On the glycanase activity associated with

- particles of *Klebsiella* bacteriophage No. 11[J]. Carbohydr Res, 1975, 41: 257-271.
- [180] Tomás J M, Benedí V J, and Jofre J T, Identification of the cell surface receptor for FC3-2, FC3-3 and FC3-6 bacteriophages from *Klebsiella pneumoniae*[J]. FEMS Microbio Lett, 1987, 41(3): 223-228.
- [181] Le S, He X, Tan Y, *et al.*, Mapping the tail fiber as the receptor binding protein responsible for differential host specificity of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages PaP1 and JG004[J]. PLoS One, 2013, 8(7): e68562.
- [182] Labrie S J, Samson J E, and Moineau S, Bacteriophage resistance mechanisms[J]. Nat Rev Microbiol, 2010, 8(5): 317-327.
- [183] Silva J B, Storms Z, and Sauvageau D, Host receptors for bacteriophage adsorption[J]. Fems Microbiology Letters, 2016, 363(4): fnw002.
- [184] Le S, Yao X, Lu S, *et al.*, Chromosomal DNA deletion confers phage resistance to *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Sci Rep, 2014, 4: 4738.
- [185] Li G, Shen M, Yang Y, *et al.*, Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to Phage PaP1 Predation via O-Antigen Polymerase Mutation[J]. Frontiers in microbiology, 2018, 9: 1170-1170.
- [186] Hu M, Liu Y, Yu K, *et al.*, Decreasing the amount of trypsin in in-gel digestion leads to diminished chemical noise and improved protein identifications[J]. J Proteomics, 2014, 109: 16-25.
- [187] Deng W, Wang Y, Liu Z, *et al.*, HemI: a toolkit for illustrating heatmaps[J]. PLoS One, 2014, 9(11): e111988.
- [188] Szklarczyk D, Morris J H, Cook H, *et al.*, The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible[J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(D1): D362-d368.
- [189] Ren G, Wang Z, Li Y, *et al.*, Effects of Lipopolysaccharide Core Sugar Deficiency on Colanic Acid Biosynthesis in *Escherichia coli*[J]. J Bacteriol, 2016, 198(11): 1576-1584.
- [190] Izquierdo L, Coderch N, Pique N, *et al.*, The *Klebsiella pneumoniae wabG* gene: role in biosynthesis of the core lipopolysaccharide and virulence[J]. J Bacteriol, 2003, 185(24): 7213-7221.
- [191] Kumar P D and Krishnaswamy S, Overexpression, refolding, and purification of the major immunodominant outer membrane porin OmpC from *Salmonella*

- typhi*: characterization of refolded OmpC[J]. *Protein Expr Purif*, 2005, 40(1): 126-133.
- [192] Li X, Koc C, Kuhner P, *et al.*, An essential role for the baseplate protein Gp45 in phage adsorption to *Staphylococcus aureus*[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 26455.
- [193] Dutzler R, Rummel G, Alberti S, *et al.*, Crystal structure and functional characterization of OmpK36, the osmoporin of *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Structure*, 1999, 7(4): 425-434.
- [194] Schiffrin B, Calabrese A N, Higgins A J, *et al.*, Effects of Periplasmic Chaperones and Membrane Thickness on BamA-Catalyzed Outer-Membrane Protein Folding[J]. *J Mol Biol*, 2017, 429(23): 3776-3792.
- [195] Merdanovic M, Clausen T, Kaiser M, *et al.*, Protein quality control in the bacterial periplasm[J]. *Annu Rev Microbiol*, 2011, 65: 149-168.
- [196] Rigel N W and Silhavy T J, Making a beta-barrel: assembly of outer membrane proteins in Gram-negative bacteria[J]. *Curr Opin Microbiol*, 2012, 15(2): 189-193.
- [197] Sandrini S, Masania R, Zia F, *et al.*, Role of porin proteins in acquisition of transferrin iron by enteropathogens[J]. *Microbiology*, 2013, 159(Pt 12): 2639-2650.
- [198] Bartual S G, Otero J M, Garcia-Doval C, *et al.*, Structure of the bacteriophage T4 long tail fiber receptor-binding tip[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(47): 20287-20292.

攻读博士期间发表的学术论文及其他成果

- [1] **Cai R**, Wu M, Zhang H, Zhang Y, Cheng M, Guo Z, Ji Y, Xi H, Wang X, Xue Y, Sun C, Feng X, Lei L, Tong Y, Liu X, Han W*, and Gu J*, A Smooth-Type, Phage-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Mutant Strain Reveals that OmpC Is Indispensable for Infection by Phage GH-K3[J]. Appl Environ Microbiol, 2018, 84(21).
- [2] **Cai R**, Wang G, Le S, Wu M, Cheng M, Guo Z, Ji Y, Xi H, Zhao C, Wang X, Xue Y, Wang Z, Zhang H, Fu Y, Sun C, Feng X, Lei L, Yang Y, Ur Rahman S, Liu X, Han W*, and Gu J*, Three Capsular Polysaccharide Synthesis-Related Glucosyltransferases, GT-1, GT-2 and WcaJ, Are Associated With Virulence and Phage Sensitivity of *Klebsiella pneumoniae*[J]. Front Microbiol, 2019, 10: 1189.
- [3] **Cai R**, Wang Z, Wang G, Zhang H, Cheng M, Guo Z, Ji Y, Xi H, Wang X, Xue Y, Ur Rahman S, Sun C, Feng X, Lei L, Tong Y, Han W, and Gu J*, Biological properties and genomics analysis of vB_KpnS_GH-K3, a *Klebsiella* phage with a putative depolymerase-like protein[J]. Virus Genes, 2019, 55(5): 696-706.
- [4] **蔡若鹏**, 顾敬敏, 韩文瑜*, 噬菌体解聚酶的分类与结构特征及其应用研究进展[J]. 中国兽医学报 (录用通知) .

致 谢

本人试验研究及论文撰写是在导师韩文瑜教授的悉心指导下完成的,在攻读博士学位期间,导师经常为我指点迷津,热忱鼓励,他以探索不止的敬业精神和严谨的治学态度,成为我今后的学习和工作中的楷模。为了本人博士学业的顺利完成,导师倾注了大量的心血和汗水,在此本人谨向他致以崇高的敬意和衷心的感谢!导师博闻强识的理论素养、高瞻远瞩的科研理念和宽广豁达的处世方式深深地感染着我并使我受益终生。

感谢我们微生物学与免疫学实验室的雷连成教授、杨勇军教授、冯新教授、顾敬敏副教授、李阳副教授、闫广谋副教授、孙长江讲师以及杜崇涛讲师等诸位老师为我们创造良好的试验条件和科研氛围。在此,我要特别感谢大师兄顾敬敏副教授。2015年9月,初来微免实验室的我对噬菌体的相关研究十分陌生,但在他帮助下,我得以在较短的时间内根据导师拟定的研究方向完成了对试验方案的设计。在此后四年多的时光中,顾师兄几乎每天都在关注我的试验进展,和我一起分析试验中遇到的问题并探讨解决方案,本人每一篇SCI论文的发表也都离不开师兄亲力亲为地点拨。顾师兄不仅以他渊博的学识,敏锐的学术洞察力,以及开阔敏捷的逻辑思维不断地“授我以渔”,成为我心中科研的典范,而且他“事业与家庭两不误”的人生理念将为我今后的人生道路打上深深的烙印。

此外,已从本实验室光荣毕业的宋军博士、张明亮博士、张蕾博士、刘洪涛博士、许会会博士、程梦璐博士、刘建方硕士、夏翡翠硕士、宫鹏娟硕士、胡丽媛硕士、张玉凤硕士、王艳梅硕士、曹原硕士和赵斌硕士以及还在实验室继续奋斗的朱日宁博士、王心舞师妹、冀亚路师弟、薛一冰师妹、袭恒豫师妹、王子晶师妹、张美娜师妹和张昊师妹等都为我的试验研究提供了大量无私的帮助和宝贵的建议,大家在“微免大家庭”中共同营造了和谐的科研氛围,在此本人深表感谢!另外,感谢我的舍友张竞博士对我学习和生活中的理解和关照!

感谢北京大学刘小云研究员以及吴梅博士为本研究质谱试验及其数据分析所提供的支持;感谢军事医学科学院童贻刚研究员为本研究细菌、噬菌体基因组测序及数据分析所提供的指导;感谢我的硕士导师——吉林农业大学王春风教授

及其团队在我攻读博士学位期间予以的鼓励与帮助。

感谢我的爱人杨天雪博士,与我相守十年,让我们从恋人变成了彼此的亲人!她用阳光之心为我驱散征途中的阴霾,让我拥有爱的铠甲而不惧怕挫折的锋芒。我相信今后无论走得多远身边都有她的身影,我们将继续坚守约定,共赏风景。最后感谢我的父母、岳父、岳母及其他亲友,为我负重前行,从而让我在“岁月静好”中完成博士学业!在这里衷心祈愿各位家人平安顺遂。

合上尾页,怀揣感恩,奔赴下一个彼岸,无论沿途一马平川还是荆棘遍地,我只顾风雨兼程。