



研究报告

KL2 型鲍曼不动杆菌噬菌体解聚酶克隆及抗菌活性分析

王灿¹ 高明明² 俞鑫婷² 刘艳楠³ 米志强^{*3}

1 安徽医科大学附属阜阳医院呼吸内科 安徽 阜阳 236000

2 解放军总医院第五医学中心呼吸与危重症医学科 北京 100071

3 军事科学院军事医学研究院微生物流行病学研究所 病原微生物生物安全国家重点实验室 北京 100071

摘要:【背景】噬菌体解聚酶是噬菌体在裂解细菌过程中产生的一种抗菌蛋白,关于鲍曼不动杆菌荚膜分型及常见型别噬菌体解聚酶的研究报道较少。【目的】以 KL2 型鲍曼不动杆菌为研究对象,从噬菌体 IME-AB2 中克隆解聚酶,在大肠杆菌中进行可溶性表达并研究其体外抗菌活性。【方法】应用二代测序及生物信息学方法鉴定鲍曼不动杆菌荚膜型,分析 IME-AB2 全基因组。应用分子克隆技术克隆 ORF76 假定的尾丝蛋白(Putative Tail Fiber)基因,构建重组表达载体 *pEASY-Blunt-E1-gp76*,在大肠杆菌 BL21(DE3)中诱导表达,通过 Ni-NTA 亲和层析纯化解聚酶,研究解聚酶体外抗菌活性。【结果】构建了 *pEASY-Blunt-E1-gp76* 解聚酶重组表达质粒,该重组质粒在大肠杆菌中得到可溶性表达;体外活性分析显示,该重组蛋白在体外能够对所有的 KL2 型鲍曼不动杆菌具有较好的抗菌活性,解聚酶联合人和狗的血清具有很好的杀菌活性。【结论】鉴定解聚酶并提高其抗菌谱具有重要意义,也是噬菌体及解聚酶用于治疗耐药菌研究领域急需解决的重要问题之一。

关键词: 鲍曼不动杆菌, 分型, 解聚酶, 血清

Cloning and antibacterial activity analysis of KL2 type *Acinetobacter baumannii* bacteriophage depolymeraseWANG Can¹ GAO Mingming² YU Xinting² LIU Yannan³ MI Zhiqiang^{*3}

1 Department of Respiratory Medicine, Fuyang Hospital Affiliated to Anhui Medical University, Fuyang, Anhui 236000, China

2 Department of Respiratory and Critical Care Diseases, the Fifth Medical Center, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100071, China

3 State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medicine, Academy of Military Sciences, Beijing 100071, China

Abstract: [Background] Bacteriophage depolymerase is a kind of antibacterial protein produced by bacteriophage in the process of bacterial lysis. There are few reports on the capsule typing and common types of *Acinetobacter baumannii* bacteriophage depolymerases. [Objective] The KL2 type *A. baumannii*

Foundation items: National Key Research and Development Program of China (2017YFF0108605); Scientific Research Project of Anhui Health Committee (AHWJ2021b057); Research Fund Project of Anhui Medical University (2020xkj060)

***Corresponding author:** E-mail: zhiqiangmi_ime@163.com

Received: 23-06-2021; **Accepted:** 04-08-2021; **Published online:** 23-08-2021

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFF0108605); 安徽省卫生健康委科研项目(AHWJ2021b057); 安徽医科大学校科研基金项目(2020xkj060)

***通信作者:** E-mail: zhiqiangmi_ime@163.com

收稿日期: 2021-06-23; **接受日期:** 2021-08-04; **网络首发日期:** 2021-08-23

was selected as the research object. The depolymerase was cloned from the phage IME-AB2, and soluble expression was carried out in *Escherichia coli*, and its activity *in vitro* was studied. **[Methods]** *A. baumannii* capsular typing was identified through next generation sequencing and bioinformatics analysis. The IME-AB2 whole genome was analyzed. The putative tail fiber gene of ORF76 was cloned. The recombinant expression vector *pEASY-Blunt-E1-gp76* was constructed and induced to express in *E. coli* BL21(DE3). The depolymerase was purified by Ni-NTA affinity chromatography and the gp76 antibacterial activity was studied *in vitro*. **[Results]** The recombinant plasmid of *pEASY-Blunt-E1-gp76* was successfully constructed and expressed in *E. coli*. *In vitro* activity analysis was showed that the recombinant protein had good antibacterial activity against all KL2 type *A. baumannii* *in vitro*, and the depolymerase combined with human or dog serum had good bactericidal activity. **[Conclusion]** It is of great significance to identify depolymerase and improve its antibacterial spectrum, and it is also one of the important problems to be solved urgently in the field of bacteriophage and depolymerase used in the treatment of drug-resistant bacteria.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, typing, depolymerase, serum

鲍曼不动杆菌是一种革兰氏阴性、严格需氧、非乳糖发酵、非运动性杆菌；通常存在于污水和医疗设备^[1]。鲍曼不动杆菌因其对干燥、消毒剂和主要抗菌药物抵抗能力较强而成为医院感染的重要病原菌；主要引起呼吸道感染、泌尿系统感染、继发性脑膜炎、手术部位感染、呼吸机相关性肺炎等^[2]。鲍曼不动杆菌对常用抗菌药物的耐药率有逐年增加趋势，引起临床医生和微生物研究者的特别关注。目前，从医院内病人体液中分离到的病原菌中，有相当一部分是耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌 (Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii*, CRAB)，即包括广耐药 (Extensively Drug-Resistant, XDR) 或泛耐药 (Pandrug-Resistant, PDR) 鲍曼不动杆菌^[3]。在全球一些地区，鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类抗菌药物耐药率超过 90%，由耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌引起的医院获得性肺炎 (Hospital-Acquired Pneumonia, HAP) 和血流感染 (Bloodstream Infections, BSI) 死亡率接近 60%^[4]。针对鲍曼不动杆菌感染的抗菌药物 (如多粘菌素、替加环素、氨基糖苷类)，由于其药代动力学特性和细菌耐药率的不断增加，抗菌药物已经不再是理想的治疗选择。在这种严峻的耐药情况下，研制鲍曼不动杆菌感染的替代方法尤为迫切。

噬菌体 (Bacteriophage, phage) 是一种天然的细

菌病毒，可感染并裂解细菌。近年来关于噬菌体对抗多重耐药菌感染的安全性和有效性得到了证实^[5]。然而，在大量的体内外研究中证明，使用完整的噬菌体治疗细菌感染可能并不理想，因为噬菌体作为一个完整的病毒很难标准化进行大规模生产和保存。此外，整个噬菌体基因组中可能含有一些功能未知的基因，这使得噬菌体治疗的长期安全性难以预测^[6-8]。自然分离的噬菌体具有高度专一宿主选择性，往往只能感染单一的细菌分离株，而不能感染同一种细菌的其他分离株。这种高度专一的宿主选择性使噬菌体的应用受到极大限制。通过大量的筛选或者一些其他措施能够在一定程度上提高噬菌体的感染谱，但这些常规手段费时费力，而且效果十分有限。因此，研究噬菌体抗菌蛋白在控制细菌感染中的作用越来越受到重视。一些鲍曼不动杆菌噬菌体能够在铺有细菌的双层平板上形成半透明的晕环^[9]。晕环被认为是噬菌体解聚酶活性的宏观表现，即噬菌体解聚酶作用于细菌表面荚膜多糖引起的。噬菌体解聚酶是噬菌体在裂解细菌的过程中产生的一种衍生酶类，其抗菌范围比噬菌体的宿主范围要广，但往往也局限于同属或同种细菌^[10-11]，噬菌体解聚酶的专一性是把双刃剑。噬菌体或解聚酶因其特异性较强，不仅可应用于细菌的分类，也给其应用带来很大优势。应用噬菌体或解聚酶作为抗菌

剂通常只作用某一种属内的部分菌株,而对其他共生菌无影响,这极大地提高了安全性和特异性,同时也降低了这种抗菌物质的应用范围。

鲍曼不动杆菌表面具有较厚的荚膜多糖(Capsular Polysaccharide, CPS),其产生的 CPS 具有高度的多样性,染色体荚膜基因位点多态性(K 位点或 KL 型)决定 CPS 结构高度多样性。截至目前,通过分析鲍曼不动杆菌基因组序列,已经鉴定了超过 140 个 KL 变异体^[12],依据已鉴定的荚膜多糖结构,有超过 40 个荚膜型被鉴定^[13-14]。本研究前期从医院污水中分离到一株鲍曼不动杆菌裂解性噬菌体(命名为 vB_AbaM-IME-AB2,以下简称 IME-AB2),并成功对该噬菌体生物学特性及全基因组序列进行分析;该噬菌体抗菌谱较窄,仅能裂解部分菌株,该噬菌体的噬菌斑周围可以形成透明晕环,而关于噬菌体形成透明晕环的相关抗菌蛋白基因未做进一步探讨^[9,15]。尽管大量文献表明该现象为噬菌体可能存在解聚酶基因引起,但缺乏有效的实验论证^[9]。本研究对该噬菌体宿主菌 AB2 及其余 57 株细菌进行高通量测序,并对测序结果进行比对分析,进而确定细菌荚膜型(Capsule Type, KL)。进一步对该噬菌体全基因组生物学信息分析发现,该噬菌体尾丝蛋白基因可能是编码解聚酶的基因。因此,本研究对该噬菌体尾丝蛋白基因进行克隆及表达,鉴定其是否具有抗菌活性。尽管国外报道的解聚酶联合人血清具有杀菌作用,但都仅限于几种荚膜型别。关于鲍曼不动杆菌具体荚膜分型方法及常见型解聚酶的研究未见明确报道,研究解聚酶及噬菌体的特异性为改造噬菌体及增加解聚酶抗菌谱提供理论支持,也为临床应对多重耐药性鲍曼不动杆菌的防治提供一种有效的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源

鲍曼不动杆菌及鲍曼不动杆菌噬菌体

IME-AB2 均来自军事科学院军事医学研究院微生物流行病学研究所未知病原分析实验室,实验研究内容征得北京微生物与流行病学研究所伦理委员会批准并同意。研究所用狗血清及健康人血清均来自解放军总医院第五医学中心全军采供血中心,并征得解放军总医院第五医学中心伦理委员会审批同意。

1.1.2 主要试剂和仪器及培养基

2×TransTaq® High Fidelity(HiFi) PCR SuperMix II (-dye)、pEASY 系列克隆载体用试剂盒 pEASY®-Blunt E1 Expression Kit、质粒提取试剂盒、Trans1-T1 感受态细胞和 BL21(DE3)感受态细胞,北京全式金生物技术有限公司;Q5 High-Fidelity DNA Polymerase 2×Master Mix,纽英伦生物技术(北京)有限公司;PCR 产物纯化试剂盒, AJ 公司;细菌 DNA 提取试剂盒, Roche 公司;默克密理博超滤离心管, Millipore 公司;透析袋,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;预装重力柱,生工生物工程(上海)股份有限公司;二代测序建库试剂盒 E7645 NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep Kit for Illumina®, NEB 公司。

二代测序仪, Illumina 公司;SGI4700 高性能计算机服务器,本实验室提供;CLC Genomics Workbench 12.0 高通量测序分析用软件, QIAGEN 公司。

LB 液体培养基^[15]和 LB 固体培养基^[15](用于病原菌的培养);磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffered Saline, PBS): 0.2 mol/L Na_2HPO_4 , 0.2 mol/L NaH_2PO_4 , pH 7.4。

1.2 方法

1.2.1 细菌培养及核酸提取

取 58 株鲍曼不动杆菌分别接种至 LB 平板上, 37 °C 恒温培养箱孵育过夜。挑取单一菌落于 5 mL LB 液体培养基, 37 °C、200 r/min 条件下振荡培养过夜,取 300 μL 菌液 1 000 r/min 离心 1 min,用相同体积磷酸盐缓冲液重悬, 4 °C 超声破壁(功率 20%, 超声 4 s, 间隔 2 s) 10 min, 加入 40 μL 蛋白

酶 K (终浓度 10 mmol/L), 70 °C 水浴孵育 15 min。然后按照细菌 DNA 提取试剂盒说明书提取细菌 DNA。

1.2.2 细菌测序及序列拼接

二代测序：取鲍曼不动杆菌 DNA 100 ng、4 °C 超声打断，加接头序列；根据 E7645 NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep Kit for Illumina®试剂盒说明书构建文库，通过本实验室 MiSeq 测序平台上机测序。测序下机数据由本实验室工作人员通

过高性能计算机服务器使用 Newbler 2.9 软件拼接序列，得到所有细菌 Contigs 和 Scaffold 片段。

1.2.3 细菌生物信息学分析及细菌分型

通过 NCBI 网站下载鲍曼不动杆菌特异性荚膜型基因簇(KL 型)，并制成 KL 型数据库(表 1)。以该数据库为参考序列，对已测序的 58 株细菌 Contigs 或 Scaffold 片段通过 CLC Genomics Workbench 12.0 软件进行 BLAST 比对，当比对序列相似度在 100%时，确定该细菌为特定的 KL 型。

表 1 80 种鲍曼不动杆菌特异性荚膜型基因簇 GenBank 登录号

Table 1 GenBank accession number of 80 *Acinetobacter baumannii* specific capsular gene clusters

荚膜型	登录号	荚膜型	登录号
KL type	Accession No.	KL type	Accession No.
KL1	HM590877/FJ172370/KC526901	KL2	KJ459911/JN968483
KL3	KF793926	KL4	JN409449
KL5	BK010760	KL6	KF130871
KL7	KC526894	KL8	KX712116
KL9	MK355479/MK355482/MK355481	KL10	KY434633
KL11	KF002790	KL12	JN107991
KL13	MF522810	KL14	KF030679
KL15	KC526900	KL16	MF522813
KL17	KC118541	KL18	MF522811
KL19	KU215659/KU165787	KL20	JQ684178
KL21	MG231275	KL22	KC526920/KC526915
KL23	MF522812	KL24	KX756650
KL25	BK008886	KL26	MK420047/MF522809
KL27	KT266827	KL28	MF522807
KL30	MN166189	KL32	KC526897/KT359615
KL33	MN166195/MK370018	KL35	KC526896
KL37	KX712115	KL39	JHDC01000016/JHPE01000018
KL40	KP100029	KL42	KC526903/MN166194
KL43	KC526905/MN166192	KL45	MN166190
KL46	MK609549	KL47	MN166193/KX661320
KL48	MN166191	KL49	KT359616
KL51	MN148384	KL52	KY434632/KC526899
KL53	MH190222	KL54	MG867726
KL55	MN148381	KL57	KY434631
KL58	KT359617	KL60	MN148382
KL63	KC526909/KX712117	KL73	MF362178
KL74	MN148383	KL77	MK370019
KL80	KC526914/KC526911	KL81	KC526916
KL82	KC526908	KL83	KC526898
KL84	KC526902	KL85	KC526913
KL88	KC526910	KL89	KC526919
KL90	KC526917/MK370020	KL91	KM402814
KL92	MN958100	KL93	BK010902
KL99	MN958101	KL102	MK399429/MK370021
KL106	MK399430	KL107	MK370022
KL108	MK370023	KL109	MK370024
KL110	MK370025	KL111	MK370026
KL112	MT152376/MK370027	KL113	MK370028
KL114	MK388214	KL116	MK399425
KL125	MH306195	KL127	MK399427

1.2.4 系统发育分析

噬菌体末端酶大亚基是一种保守的噬菌体蛋白。因此, 基于末端酶大亚基氨基酸序列构建噬菌体 IME-AB2 的系统发育树。从 NCBI 中下载与 IME-AB2 末端酶大亚基氨基酸序列相似性最高的 20 余种不同噬菌体, 通过 CLC Genomics Workbench 12.0 软件分别提取末端酶大亚基氨基酸序列, 使用 MEGA 6.0 软件制成基于末端酶大亚基氨基酸序列的系统发育树。

1.2.5 噬菌体解聚酶克隆及表达

(1) IME-AB2-ORF76 序列的扩增

鲍曼不动杆菌噬菌体 IME-AB2 解聚酶 Dp76 的扩增, 以 IME-AB2 噬菌体原液为模板, 设计引物: ORF76 in-F (5'-ATGACAAATCCAACACTTATTA-3') 和 ORF76 in-R (5'-CCCAAAAACCTTTCGGTATATT-3')。PCR 反应体系(50 μ L): 上、下游引物(10 μ mol/L)各 2.0 μ L, 噬菌体原液(噬菌体滴度 2×10^{11} PFU/mL) 1.0 μ L, RNase-Free ddH₂O 20.0 μ L, Q5 High-Fidelity DNA Polymerase 2 \times Master Mix 25.0 μ L。PCR 反应设置退火温度为 60 $^{\circ}$ C, 其余条件参照产品使用说明, 共进行 40 个循环。产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 然后按照 PCR 产物纯化试剂盒说明书回收目的片段。

(2) 表达载体的构建

按照 *pEASY*®-Blunt E1 Expression Kit 使用说明书取 *pEASY*®-Blunt E1 Expression Vector 1 μ L 与 PCR 产物 4 μ L 轻轻混合, 室温(20–37 $^{\circ}$ C)反应 5 min。反应结束后, 将上述混合物加入至 50 μ L Trans1-T1 感受态细胞中(在感受态细胞刚刚解冻时加入连接产物), 轻弹混匀, 冰浴 20–30 min, 42 $^{\circ}$ C 水浴热激 30 s, 立即置于冰上 2 min; 加入 250 μ L 平衡至室温的 LB 液体培养基, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 振荡培养 1 h。2 000 r/min 离心 1 min, 弃掉部分上清, 保留 100 μ L, 轻弹悬浮菌体, 取全部菌液均匀地涂在 LB 平板(含有 100 μ g/mL 氨苄西林)上, 置于 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。挑取单克隆菌落分别接种于 5 mL 含 100 μ g/mL 氨苄西林的 LB 液体培养

基中, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养至对数期(OD_{600} 为 0.8 左右), 用 T7 Promoter Primer (5'-TAATACGACTC ACTATAGGG-3')和目的基因反向引物鉴定阳性克隆, 或用目的基因正向引物和 T7 Terminator Primer (5'-CTAGTTATTGCTCAGCGGTG-3')鉴定阳性克隆, 对于鉴定成功的单克隆菌液继续培养过夜, 并参照质粒提取试剂盒说明书提取质粒。

(3) 重组蛋白的诱导表达

将构建好的重组质粒按照试剂盒说明书操作规范转化到感受态细胞 BL21(DE3)中, 再将 BL21 (DE3)置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱培养过夜, 随机挑取单菌落接种至含有氨苄西林(浓度 100 μ g/mL)的 5 mL LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 振荡培养至对数生长期(OD_{600} 为 0.8 左右); 向上述 5 mL 的培养基中加入 5 μ L 的 IPTG (终浓度为 1 mmol/L), 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 继续振荡培养 24 h, 同时对照组不加诱导剂; 取 1 mL 菌液加入新的离心管中, 12 000 r/min 离心 5 min, 去除上清, 用 1 mL 的磷酸盐缓冲液重悬管中沉淀; 将上一步的离心管置于冰水混合物上, 在超声破碎仪器上超声 15 min (功率 20%, 超声 5 s, 间隔 3 s)后, 12 000 r/min 离心 5 min, 取出上清储存于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱, 用于 SDS-PAGE 胶对蛋白分子量鉴定及蛋白活性检测。

1.2.6 解聚酶的纯化

重组质粒 *pEASY*-Blunt-E1-ORF76 转化至感受态细胞 BL21(DE3)后, 再将其置于 37 $^{\circ}$ C 温箱培养 24 h; 随机挑取单菌落, 接种至 5 mL 含有氨苄西林的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 振荡培养至对数期(OD_{600} 为 0.8 左右), 将 5 mL 的菌液加入 1 L 含有氨苄西林的 LB 液体培养基中, 继续培养至对数期(OD_{600} 为 0.8 左右); 在上述菌液中加入 1 mL 的 IPTG (终浓度为 1 mmol/L), 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 振荡培养 24 h; 将 1 L 的过夜培养菌分装置于离心桶内并配平, 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 15 min, 去除上清, 收集下层沉淀, 用 50 mL 的磷酸盐缓冲液重悬细菌沉淀; 将悬液置于冰水浴中超声(功率为 70%, 超声 5 s, 间隔 3 s) 60 min,

4 °C、12 000 r/min 离心 15 min 去沉淀, 收集上清; 将上清液通过 0.22 μm 的滤器过滤, 收集下层过滤液备用。参照 HisTrap HP 纯化柱使用说明对重组蛋白进行纯化, 具体步骤如下: 首先用 5 倍柱体积的去离子水清洗纯化柱, 然后以 1 mL/min 的流速, 用 10 倍柱体积的含 20 mmol/L 咪唑的上样缓冲液平衡纯化柱。样品以 0.5 mL/min 的流速于 4 °C 进行上样, 再用 5 倍柱体积的洗脱缓冲液进行线性梯度洗脱, 并收集洗脱液。根据目的蛋白的分子量, 以磷酸盐缓冲液为透析液, 将重组蛋白装入 70 kD 分子量的透析袋内透析 24 h, 最后采用 70 kD 规格超滤离心管对纯化蛋白进行脱盐以及浓缩, 浓缩后的蛋白采用 Bradford 法^[16]进行浓度测定。

1.2.7 噬菌体及解聚酶抗菌谱分析

用噬菌体 IME-AB2 和解聚酶 Dp76 进行点斑试验, 以确定 IME-AB2 的宿主特异性及解聚酶的抗菌特性^[17]。采用双层平板法, 分别对 58 株鲍曼不动杆菌铺双层平板, 自然风干, 在每个平板中点入 2 μL 噬菌体原液(2×10^{11} PFU/mL), 自然风干, 37 °C 恒温培养 8 h, 用相同体积的磷酸盐缓冲液点在平板周围作为对照组。8 h 后待细菌长满平板, 取 2 μL (0.6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 纯化的 Dp76 点至平板中央, 同样体积的磷酸盐缓冲液点在 Dp76 平板周围作为对照组, 常温条件继续孵育。根据噬菌体形成噬菌斑特性及解聚酶形成晕环的特性^[18]决定噬菌体及解聚酶的抗菌特性, 每次试验重复 3 次。

1.2.8 解聚酶联合血清杀菌实验

分别取 5 名正常成人捐献的静脉血 3 mL, 4 000 r/min 离心 15 min, 将离心所得 5 名志愿者的黄色血清混匀备用; 分别取 3 只实验动物中心饲养的狗静脉血 5 mL, 相同方式提取血清备用。取 10 μL 培养过夜的细菌 AB2 与 180 μL 人血清或狗血清混合, 加入 10 μL 纯化的 Dp76 (0.6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 或相同体积的磷酸盐缓冲液作为对照, 于 37 °C 恒温培养箱孵育 3 h。为了评估血清中补体的杀菌活性, 首先在 56 °C 下将人或狗血清灭活 30 min, 再取 10 μL 培养过夜的细菌 AB2 与 180 μL 灭活血清或未灭活血清混合, 加入 10 μL 纯化的 Dp76 或相同体积的磷酸盐缓冲液作为对照; 分别取上述 5 组混合物 100 μL 加入磷酸盐缓冲液, 振荡混匀, 按照 10 倍体积连续倍比稀释至 10^{-6} ; 分别取 100 μL 上述倍比稀释液均匀涂布在 LB 平板上, 置于 37 °C 恒温培养过夜; 待菌落长出合适大小后, 计算平板菌落个数; 每个平板菌落数在 50–200 个视为有效, 此过程实验重复 3 次, 收集实验数据统计分析。

2 结果与分析

2.1 鲍曼不动杆菌噬菌体形态特征及系统发育分析

IME-AB2 铺双层平板发现, 该噬菌体可以在噬菌斑周围形成透明的晕环(图 1A); 将 IME-AB2 通过氯化铯密度离心纯化后, 使用透射电子显微镜观察噬菌体 IME-AB2 的形状, 结果显示 IME-AB2 形似蝌蚪状, 具有正二十面体头部(直径

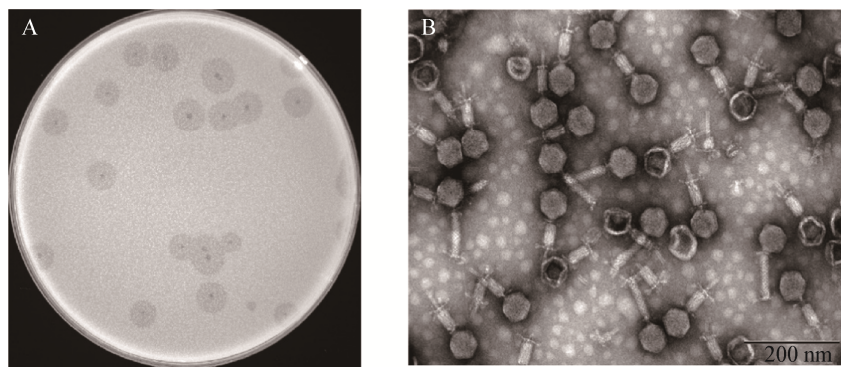


图 1 IME-AB2 噬菌斑特点(A)及噬菌体形态特征(B)

Figure 1 Plaque characteristics (A) and phage morphology (B) of IME-AB2

约 61 nm)和可收缩的短尾(长约 90 nm) (图 1B), 基于噬菌体末端酶大亚基系统发育分析发现 IME-AB2 噬菌体属于有尾噬菌体目(Caudovirales), 肌尾噬菌体科(Myoviridae), Obolenskivirus 病毒亚科。如图 2 所示, 有 5 个噬菌体与 IME-AB2 相似性最高, 聚集在同一分支, 分别是 *Acinetobacter* Phage AB1 (登录号为 NC_042028.1)、*Acinetobacter* Phage Abp2 (登录号为 NC_041998)、*Acinetobacter* Phage YMC-13-01-C62 (登录号为 NC_024785.1)、*Acinetobacter* Phage AP22 (登录号为 NC_017984.1)和 IME285 (登录号为 MH853786)。

2.2 细菌 KL 分型及噬菌体抗菌谱分析

经二代测序的 58 株鲍曼不动杆菌与已公布的

特异性鲍曼不动杆菌荚膜型基因簇序列比对发现, 该 58 株菌一共分为 7 个 KL 型, 其中 AB2 为 KL2 型, IME-AB2 噬菌体和解聚酶 Dp76 对 KL2 型菌株敏感性一致(表 2); 表 3 为宿主菌 AB2 药敏结果, AB2 对所列抗菌药物全部耐药。

2.3 解聚酶 Dp76 分子克隆及蛋白表达结果

IME-AB2 噬菌体解聚酶经 CLC Genomics Workbench 12.0 软件预测及电泳结果显示, ORF76 分子量大小约为 2 176 bp (图 3A), 参照 *pEASY®-Blunt E1 Expression Kit* 解聚酶表达试剂盒说明书, 构建出重组质粒(图 3B), 对含有重组质粒的 BL21(DE3)经 IPTG 诱导后通过 SDS-PAGE 法鉴定, 结果显示 Dp76 蛋白分子量大小约为 76.0 kD (图 3C)。

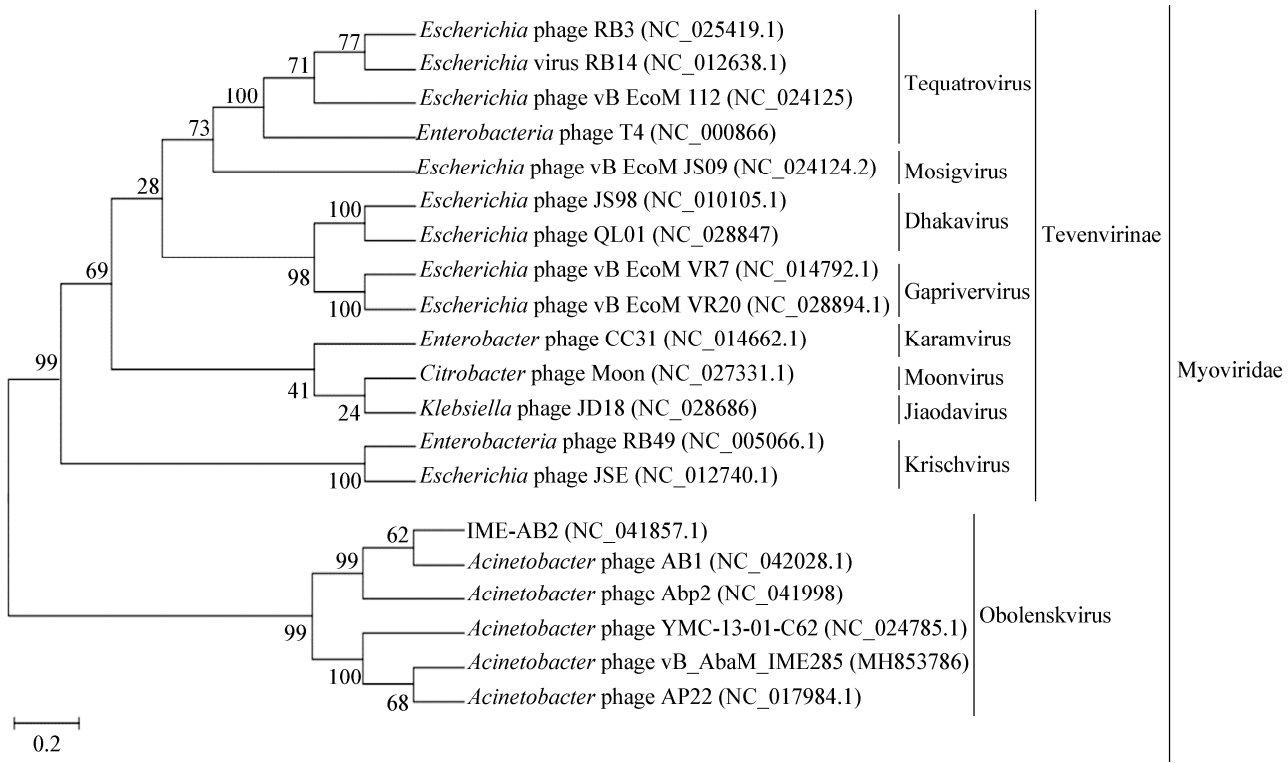


图 2 IME-AB2 系统发育树分析
Figure 2 Phylogenetics tree analysis of IME-AB2

注: 分支点上的数字代表可信度, 数值越接近 100, 可信度越强; 括号内代表 GenBank 序列登录号; 标尺越短代表亲缘关系越近。IME-AB2 属于奥博伦斯克病毒亚科
Note: The number at the branch is reliability, the closer the value is to 100, the stronger the reliability is; The serial number in the bracket is GenBank accession number; The scale plate is evolutionary distance, the shorter the ruler, the closer the kinship. The evolutionary relationship shows that IME-AB2 belongs to Obolenskivirus

表 2 用于 KL 分型的菌株及分型结果

Table 2 The list of strain used in KL type and their type result

型别	细菌编号	噬菌体敏感性 ^a	解聚酶敏感性 ^b
KL type	Bacterial No.	Sensitivity to phage ^a	Sensitivity to depolymerase ^b
2	2/4/5/220/1611/1613/1614/2035/2036/2037/2038/2039/2401	+	+
3	358/363/1704/1708/1707/1761/1793/1799/2093/2099/2114/	—	—
7	2116/2093/2099/2126/2529/2589/2712	—	—
9	1703	—	—
29	7/14/387/406	—	—
36	295/333	—	—
39	1612	—	—
	154/256/1762/2403/2586/2588/2632/2878/2879/2880/2881/	—	—
	2882/2883/2884/2885/2886/2887/2888/2890/		

注：^a：菌株对噬菌体敏感性；^b：菌株对解聚酶敏感性。—：不敏感；+：敏感
Note: ^a: Sensitivity of strain to phage; ^b: Sensitivity of strain to depolymerase. —: Nonsensitive; +: Sensitive

表 3 鲍曼不动杆菌 AB2 药敏结果

Table 3 Drug sensitivity data of *Acinetobacter baumannii* AB2

抗菌药物	最低抑菌浓度	敏感性	抗菌药物	最低抑菌浓度	敏感性
Antibiotics	MIC (μg/mL)	Sensitivity	Antibiotics	MIC (μg/mL)	Sensitivity
环丙沙星	≥4	R	氨苄西林	≥32	R
Ciprofloxacin			Ampicillin		
庆大霉素	≥16	R	氨苄西林舒巴坦	≥32	R
Gentamicin			Ampicillin sulbactam		
亚胺培南	≥16	R	氨曲南	≥64	R
Imipenem			Aztreonam		
美罗培南	≥16	R	哌拉西林/他唑巴坦钠	≥128	R
Meropenem			Piperacillin/Tazobactam		
哌拉西林	≥128	R	呋喃妥因	≥512	R
Piperacillin			Nitrofurantoin		
复方新诺明	≥320	R	头孢哌酮/舒巴坦钠	≥64	R
Cotrimoxazole			Cefoperazone/Sulbactam		
左氧氟沙星	≥8	R	头孢吡肟	≥64	R
Levofloxacin			Cefepime		
头孢他啶	≥64	R	头孢曲松	≥64	R
Ceftazidime			Ceftriaxone		
头孢呋辛酯	≥64	R	妥布霉素	≥16	R
Cefuroxime axetil			Tobramycin		
头孢呋辛钠	≥64	R	头孢替坦	≥64	R
Cefuroxime sodium			Cefotetan		

注：R：耐药
Note: R: Drug resistance

2.4 解聚酶 Dp76 的活性鉴定

将含有重组质粒 *pEASY-Blunt-E1-ORF76* 的 BL21(DE3)诱导表达后结果显示：将上清滴到铺有 AB2 的双层平板上，以磷酸盐缓冲液作为对照组，可清晰地观察到透明晕环(图 4)，而

且具有较好的解聚活性。经纯化后的解聚酶活性更强。取浓度为 0.6 μg/μL 的 Dp76 解聚酶 2 μL，点至铺有 AB2 培养的 LB 平板上，稀释至绝对量为 4.6875 ng 时的 Dp76 仍具有微弱的活性(图 4)。

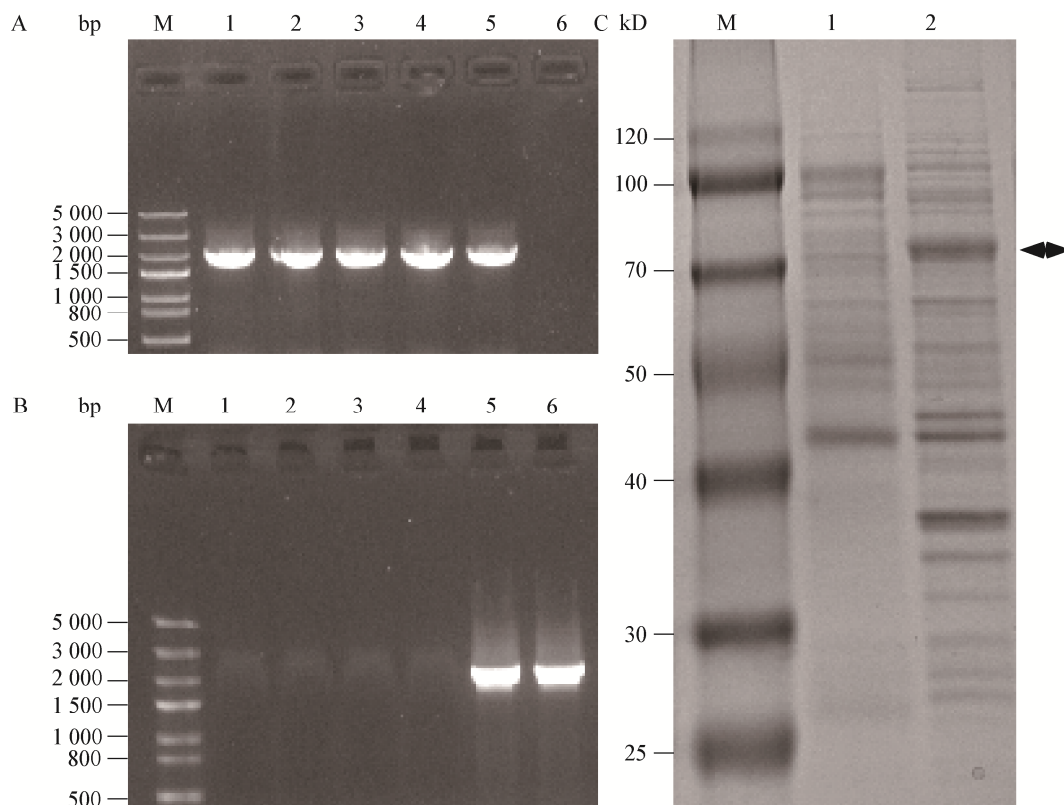


图3 解聚酶 IME-AB2-ORF76 基因克隆及表达结果

Figure 3 Cloning and expression of depolymerase IME-AB2-ORF76

注: A: PCR 扩增目的基因; 1-5: PCR 扩增产物; 6: 对照; M: DNA Marker. B: PCR 鉴定目的基因; 1-4: 未鉴定成功; 5-6: PCR 鉴定产物; M: DNA Marker. C: 解聚酶基因表达; M: 蛋白 Marker; 1: 含 E1 表达质粒的 BL21(DE3)破碎液上清(阴性对照); 2: 含重组质粒 *pEASY-Blunt-E1-ORF76* 的 BL21(DE3)细胞破碎液上清, 箭头所示为 Dp76

Note: A: Target gene amplification by PCR; 1-5: PCR products; 6: Control; M: DNA Marker. B: Identification target gene by PCR; 1-4: Not identified successfully; 5-6: PCR identification products; C: Gene expression of depolymerase; M: Protein Marker; 1: Cell extract of *E. coli* BL21(DE3) harboring E1 expression plasmid (negative control); 2: BL21(DE3) cell disruption supernatant containing recombinant plasmid *pEASY-Blunt-E1-ORF76*, the arrow in 2 was Dp76

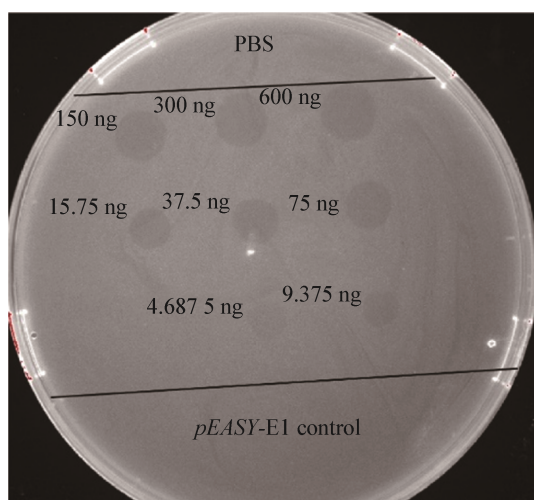


图4 解聚酶活性鉴定

Figure 4 Identification of depolymerase activity

2.5 解聚酶联合血清杀菌实验

经解聚酶 Dp76 处理后的 AB2 通过血清杀灭效果进行了评价, AB2 和 Dp76 混合后联合人或狗的血清分别孵育 3 h 后结果显示, 解聚酶联合血清治疗组细菌载量明显低于对照组和纯血清治疗组 ($P < 0.001$)。然而, 当解聚酶单独或者与灭活血清一起作用细菌时, 细菌数量几乎没有减少(图 5)。因此, 解聚酶可增强血清介导的杀菌活性。

3 讨论与结论

目前, 鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类抗菌药物的耐药率逐年上升, 而临床上在面对耐药性鲍曼不动杆菌感染时可供选择的抗菌药物十分有限。因此, 开发和建立新的抗菌药物、制剂或方法成为

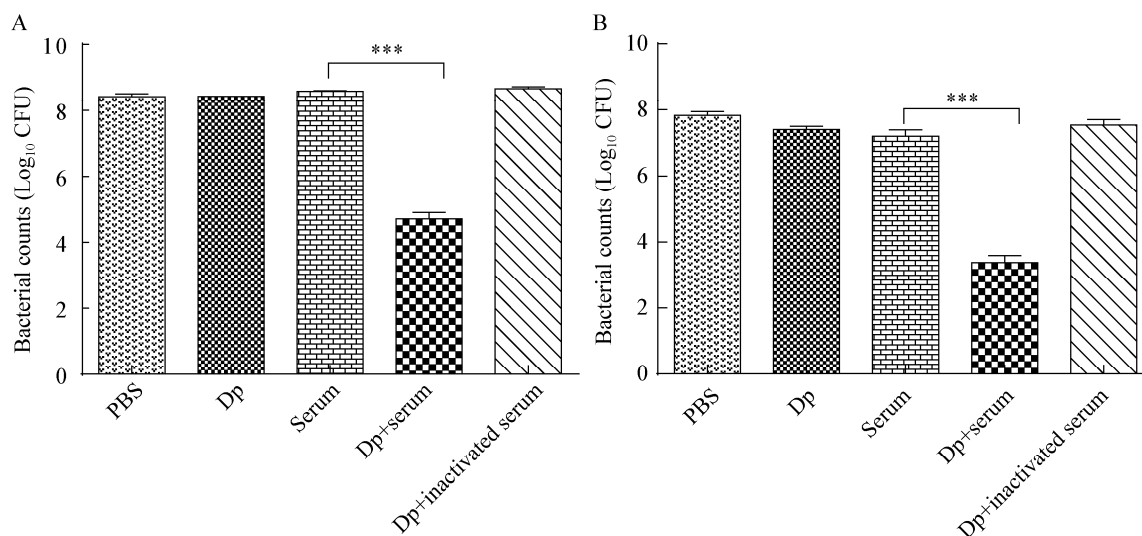


图5 解聚酶联合人血清、狗血清杀菌实验结果

Figure 5 Sterilization experimental results of depolymerase combined with human or dog serum

注：A：解聚酶联合人血清具有很好杀菌活性；B：解聚酶联合狗血清同样具有很好杀菌活性。 $P<0.001$

Note: A: Depolymerase combined with human serum had good bactericidal activity; B: Depolymerase combined with dog serum also had good bactericidal activity. $P<0.001$

全球抗感染领域关注的焦点。裂解性噬菌体和噬菌体衍生酶是控制多重耐药性鲍曼不动杆菌传播的可能途径之一；裂解性噬菌体是一类能感染、杀灭细菌的天然病毒。裂解性噬菌体对宿主菌的感染和裂解作用具有特异性，较少出现耐药问题，也不会造成机体的微生态失调。噬菌体在临床应用中的主要障碍在于用噬菌体作为完整的病毒粒子很难实现大规模标准化的生产和使用。如果噬菌体的衍生物能够被鉴定出来并能控制细菌感染，可能会大大减少多重耐药性鲍曼不动杆菌的感染。

对于革兰氏阳性细菌，噬菌体衍生蛋白内容素已被鉴定，并能够在体外和体内达到有效的抗菌作用^[19-20]；革兰氏阴性细菌细胞壁表面被厚厚的荚膜包围着，保护细菌不受肽聚糖降解酶的影响；因此，很少有内容素本身能够穿透细菌的细胞壁发挥抗菌作用。最近有研究报道，一些内容素具有广泛的抗革兰氏阴性细菌活性^[21]，尽管如此，大多数内容素被发现只有在外膜渗透剂存在的条件下才能提高抗菌活性^[22]；由噬菌体尾纤维

基因编码的解聚酶通过破坏细菌荚膜被发现具有抗细菌毒力的作用^[23]。近年来，许多研究已经证实，荚膜多糖是鲍曼不动杆菌噬菌体携带多糖解聚酶的主要受体^[24]。解聚酶是一种新型抗菌制剂^[24]。解聚酶可以将细菌荚膜“剃”干净，暴露其噬菌体结合受体位点，并进一步侵染细菌^[14]。噬菌体来源的荚膜解聚酶已被证明可以降低革兰氏阴性细菌的毒力，这些在大肠杆菌^[25]、肺炎克雷伯菌^[26-27]和鲍曼不动杆菌^[28]已经得到证实；荚膜解聚酶广泛存在于鲍曼不动杆菌噬菌体基因组中，是鲍曼不动杆菌特异性荚膜的主要酶源^[29]，具有解聚酶活性的噬菌体通常在噬菌斑的周围形成透明的晕环^[16]。本研究在 IME-AB2^[15]生物学性状及全基因组分析的基础上研究噬菌体抗菌蛋白，对 IME-AB2 进化分析发现该噬菌体属于 Obolenskivirus，而关于该病毒属的报道较少。将 IME-AB2 噬菌体中 ORF76 编码的氨基酸序列与 NCBI 中已提交的序列通过 BLASTp 比对发现，ORF76 编码的蛋白可能具有解聚酶活性；经分子克隆技术鉴定了 ORF76 编码的尾丝蛋白具有解聚

酶活性。IME-AB2 和解聚酶 Dp76 对 KL2 型鲍曼不动杆菌具有较好的抗菌活性, IME-AB2 噬菌体抗菌谱和解聚酶 Dp76 抗菌谱相同, 经诱导表达的解聚酶在体外能够形成较大的晕环, 经倍比稀释后仍具有较好的抗菌活性。

鲍曼不动杆菌是一种重要的机会致病菌, 常引起多种复杂感染, 包括伤口感染、软组织感染、腹腔感染和呼吸道感染^[30]。鲍曼不动杆菌能够在生物和非生物表面定殖并形成生物被膜^[31], 菌体表面具有较厚的荚膜多糖是促成慢性持久性感染和耐药性鲍曼不动杆菌形成的一个重要的因素。CPS 包围细菌细胞壁表面并保护它们免受外部威胁^[32]。荚膜多糖, 也称为 KL 型, 是细菌的主要毒力因子, 参与保护细菌免受一系列环境压力, 主要是针对宿主免疫^[33]。噬菌体对易感宿主细菌的吸附过程是由噬菌体受体结合蛋白与宿主细菌表面特异性受体之间的特异性相互作用决定的, 噬菌体表面结合蛋白及其独特的特性是多样的, 噬菌体为吸附和启动感染通常会利用自身表面的受体结合蛋白来识别特定的宿主细胞表面受体, 噬菌体表面结合蛋白通常存在于噬菌体的尾丝、尾刺、尾尖和基板等位置^[11], 噬菌体尾丝纤维的 C 末端果胶裂解酶结构域通常是噬菌体基因组之间唯一的差异, 果胶酸裂解酶结构域负责噬菌体解聚酶的活性并与特定鲍曼不动杆菌荚膜多糖结合^[34]。果胶裂解酶结构域的解聚酶蛋白特异性地识别细菌荚膜类型作为噬菌体吸附的配体, 这与细菌表面 CPS 的结构是分不开的。CPS 结构的高度多样性和可变性意味着不同种类的噬菌体解聚酶的存在, 噬菌体解聚酶可以特异性地识别和切割不同的 CPS^[34]。如肺炎克雷伯菌噬菌体 KP32 可以产生 2 种荚膜解聚酶, 分别对 K3 和 K21 荚膜血清型具有高度特异性, 而噬菌体 KP32 本身裂解谱也仅限于荚膜型 K3 和 K21 的菌株^[35]。大肠杆菌 K1-5 噬菌体具有 K1 和 K5 型 2 种解聚酶活性, 当然噬菌体本身对这 2 种荚膜型细菌均能够裂解^[36]。在对 K45 荚膜型鲍曼不动杆菌解聚酶功能分析的

研究中提到, vB_AbM_B9 对 K45 和 K30 荚膜型菌株能够特异性感染和裂解, 这种噬菌体编码一种荚膜解聚酶 B9gp69, 该解聚酶能够消化 K30 型和 K45 型 2 种类型鲍曼不动杆菌表面胞外多糖^[10]。本研究发现 IME-AB2 可以产生 1 种解聚酶 Dp76, 其与 IME-AB2 对细菌的敏感性是一致的。因此, 需要含有不同噬菌体和相应 CPS 识别蛋白的制剂, 以消除同一物种中不同荚膜类型的细菌^[12]。噬菌体的特异性决定了鲍曼不动杆菌分型的重要性。本研究通过二代测序的方式对 58 株鲍曼不动杆菌进行分型, 对所测鲍曼不动杆菌全序列进行拼接, 通过 BLAST 方式, 对所得序列和已公布特异性荚膜型序列基因簇进行比对, 确定荚膜型, 具有准确性高的特点, 本文仅针对 KL2 型鲍曼不动杆菌噬菌体和解聚酶进行分析。因此, 不断寻找具有不同 K-特异性的噬菌体是必要的。

解聚酶能剥离细菌表面的荚膜多糖, 使细菌对血清杀灭敏感^[25], 为确定 Dp76 是否能够在血清存在条件下具有较好的抗菌活性, 我们将鲍曼不动杆菌与血清及纯化的解聚酶混合, 分析酶预处理菌与血清作用细菌的抗菌作用, 与以往研究结果^[9]相似, 解聚酶可以联合人血清进行杀菌作用。解聚酶可以特异性地表达并结合到细菌表面的荚膜多糖上^[29], 它们可以消化鲍曼不动杆菌表面的荚膜多糖, 使细菌易受血清杀灭; 也就是说解聚酶体外抗菌的效果完全归因于血清中补体系统的作用^[26], 而关于血清补体具体成分在所有目前文献中未做进一步明确。在脓毒症小鼠模型中, 解聚酶在体内可以增强补体系统、中性粒细胞和巨噬细胞对细菌的杀灭作用^[9,11,37-38]。因此解聚酶可以增强血清补体对细菌的敏感性。血清中存在的血清蛋白质系统由血浆补体成分、可溶性补体调节蛋白、补体受体等 30 余种糖蛋白组成^[39], 是一个具有精密调控机制的蛋白质反应系统, 或多分子系统, 包括可溶性蛋白、膜结合性蛋白和补体受体, 因此称为补体系统^[39], 补体 C3(C3)^[40]和补体 C4(C4)^[40]在血清中的含量高于其他补体分子, 二者在完成补体系统的多种功能中具

有十分重要的作用,具体何种成分未有相关研究,这也是本研究后期研究血清联合解聚酶杀菌的重要内容。解聚酶可以联合狗血清进行杀菌作用,这可能是由于狗和人同为哺乳动物,狗血清中补体成分和人类血清成分类似,同样可以启动免疫杀菌作用。这也是后续研究的内容之一。即使有许多噬菌体解聚酶功能已被研究,与广谱杀菌抗菌药物不同的是,它们仍然只针对有限数量的细菌菌株,因此,鉴定新型解聚酶并评价其抗鲍曼不动杆菌感染的能力是非常必要的。

REFERENCES

- [1] Wong D, Nielsen TB, Bonomo RA, Pantapalangkoor P, Luna B, Spellberg B. Clinical and pathophysiological overview of *Acinetobacter* infections: a century of challenges[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2017, 30(1): 409-447
- [2] Ayobami O, Willrich N, Harder T, Okeke IN, Eckmanns T, Markwart R. The incidence and prevalence of hospital-acquired (carbapenem-resistant) *Acinetobacter baumannii* in Europe, Eastern Mediterranean and Africa: a systematic review and meta-analysis[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2019, 8(1): 1747-1759
- [3] Zeighami H, Valadkhani F, Shapouri R, Samadi E, Haghi F. Virulence characteristics of multidrug resistant biofilm forming *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care unit patients[J]. *BMC Infectious Diseases*, 2019, 19(1): 629
- [4] Esterly JS, Griffith M, Qi C, Malczynski M, Postelnick MJ, Scheetz MH. Impact of carbapenem resistance and receipt of active antimicrobial therapy on clinical outcomes of *Acinetobacter baumannii* bloodstream infections[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2011, 55(10): 4844-4849
- [5] Rai S, Kumar A. Bacteriophage therapeutics to confront multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*-a global health menace[J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2021: 1758-2229.12988
- [6] Nilsson AS. Phage therapy—constraints and possibilities[J]. *Uppsala Journal of Medical Sciences*, 2014, 119(2): 192-198
- [7] Chan BK, Abedon ST, Loc-Carrillo C. Phage cocktails and the future of phage therapy[J]. *Future Microbiology*, 2013, 8(6): 769-783
- [8] Yuan YY, Wang LL, Li XY, Tan DM, Cong C, Xu YP. Efficacy of a phage cocktail in controlling phage resistance development in multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*[J]. *Virus Research*, 2019, 272: 197734
- [9] Wang C, Li PY, Niu WK, Yuan X, Liu HY, Huang Y, An XP, Fan H, Zhangxiang LL, Mi LY, et al. Protective and therapeutic application of the depolymerase derived from a novel KN₁ genotype of *Klebsiella pneumoniae* bacteriophage in mice[J]. *Research in Microbiology*, 2019, 170(3): 156-164
- [10] Oliveira H, Costa AR, Ferreira A, Konstantinides N, Santos SB, Boon M, Noben JP, Lavigne R, Azeredo J. Functional analysis and antivirulence properties of a new depolymerase from a myovirus that infects *Acinetobacter baumannii* capsule K45[J]. *Journal of Virology*, 2019, 93(4). DOI: 10.1128/jvi.01163-18
- [11] Wang C, Li PY, Zhu Y, Huang Y, Gao MM, Yuan X, Niu WK, Liu HY, Fan H, Qin YH, et al. Identification of a novel *Acinetobacter baumannii* phage-derived depolymerase and its therapeutic application in mice[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 1407
- [12] Popova AV, Shneider MM, Arbatsky NP, Kasimova AA, Senchenkova SN, Shashkov AS, Dmitrenok AS, Chizhov AO, Mikhailova YV, Shagin DA, et al. Specific interaction of novel *Friunavirus* phages encoding tailspike depolymerases with corresponding *Acinetobacter baumannii* capsular types[J]. *Journal of Virology*, 2021. DOI:10.1128/jvi.01714-20
- [13] Kenyon JJ, Kasimova AA, Shneider MM, Shashkov AS, Arbatsky NP, Popova AV, Miroshnikov KA, Hall RM, Knirel YA. The KL24 gene cluster and a genomic island encoding a Wzy polymerase contribute genes needed for synthesis of the K24 capsular polysaccharide by the multiply antibiotic resistant *Acinetobacter baumannii* isolate RCH51[J]. *Microbiology*, 2017, 163(3): 355-363
- [14] Arbatsky NP, Shneider MM, Dmitrenok AS, Popova AV, Shagin DA, Shelenkov AA, Mikhailova YV, Edelstein MV, Knirel YA. Structure and gene cluster of the K125 capsular polysaccharide from *Acinetobacter baumannii* MAR13-1452[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 117: 1195-1199
- [15] Peng F, Mi ZQ, Huang Y, Yuan X, Niu WK, Wang YH, Hua YH, Fan HH, Bai CQ, Tong YG. Characterization, sequencing and comparative genomic analysis of vB_AbaM-IME-AB2, a novel lytic bacteriophage that infects multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates[J]. *BMC Microbiology*, 2014, 14(1): 181
- [16] Liu YN, Mi ZQ, Mi LY, Huang Y, Li PY, Liu HY, Yuan X, Niu WK, Jiang N, Bai CQ, et al. Identification and characterization of capsule depolymerase Dpo48 from *Acinetobacter baumannii* phage IME200[J]. *PeerJ*, 2019, 7: e6173
- [17] Chen YB, Guo GH, Sun EC, Song JY, Yang L, Zhu LL, Liang W, Hua L, Peng Z, Tang XB, et al. Isolation of a T7-like lytic *Pasteurella* bacteriophage vB_PmuP_PHB01 and its potential use in therapy against *Pasteurella multocida* infections[J]. *Viruses*, 2019, 11(1): 86
- [18] Chen YB, Sun EC, Song JY, Yang L, Wu B. Complete genome sequence of a novel T7-like bacteriophage from a *Pasteurella multocida* capsular type A isolate[J]. *Current Microbiology*, 2018, 75(5): 574-579
- [19] Chang Y, Kim M, Ryu S. Characterization of a novel endolysin LysSA11 and its utility as a potent biocontrol

- agent against *Staphylococcus aureus* on food and utensils[J]. Food Microbiology, 2017, 68: 112-120
- [20] Chang Y, Yoon H, Kang DH, Chang PS, Ryu S. Endolysin LysSA97 is synergistic with carvacrol in controlling *Staphylococcus aureus* in foods[J]. International Journal of Food Microbiology, 2017, 244: 19-26
- [21] Thummeepak R, Kitti T, Kunthalert D, Sitthisak S. Enhanced antibacterial activity of *Acinetobacter baumannii* bacteriophage ØABP-01 endolysin (LysABP-01) in combination with colistin[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 1402
- [22] Oliveira H, Vilas Boas D, Mesnage S, Kluskens LD, Lavigne R, Sillankorva S, Secundo F, Azeredo J. Structural and enzymatic characterization of ABgp46, a novel phage endolysin with broad anti-Gram-negative bacterial activity[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 208
- [23] Lin JC, Koh TH, Lee N, Fung CP, Chang FY, Tsai YK, Ip M, Siu LK. Genotypes and virulence in serotype K2 *Klebsiella pneumoniae* from liver abscess and non-infectious carriers in Hong Kong, Singapore and Taiwan[J]. Gut Pathogens, 2014, 6(1): 21
- [24] Popova AV, Shneider MM, Myakinina VP, Bannov VA, Edelstein MV, Rubalskii EO, Aleshkin AV, Fursova NK, Volozhantsev NV. Characterization of myophage AM24 infecting *Acinetobacter baumannii* of the K9 capsular type[J]. Archives of Virology, 2019, 164(5): 1493-1497
- [25] Lin H, Paff ML, Molineux IJ, Bull JJ. Therapeutic application of phage capsule depolymerases against K1, K5, and K30 capsulated *E. coli* in mice[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 2257
- [26] Lin TL, Hsieh PF, Huang YT, Lee WC, Tsai YT, Su PA, Pan YJ, Hsu CR, Wu MC, Wang JT. Isolation of a bacteriophage and its depolymerase specific for K1 capsule of *Klebsiella pneumoniae*: implication in typing and treatment[J]. The Journal of Infectious Diseases, 2014, 210(11): 1734-1744
- [27] Hsieh PF, Lin HH, Lin TL, Chen YY, Wang JT. Two T7-like bacteriophages, K5-2 and K5-4, each encodes two capsule depolymerases: isolation and functional characterization[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 4624
- [28] Liu YN, Leung SSY, Guo YT, Zhao LL, Jiang N, Mi LY, Li PY, Wang C, Qin YH, Mi ZQ, et al. The capsule depolymerase Dpo48 rescues *Galleria mellonella* and mice from *Acinetobacter baumannii* systemic infections[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 545
- [29] Oliveira H, Costa AR, Konstantinides N, Ferreira A, Akturk E, Sillankorva S, Nemecek A, Shneider M, Dötsch A, Azeredo J. Ability of phages to infect *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex species through acquisition of different pectate lyase depolymerase domains[J]. Environmental Microbiology, 2017, 19(12): 5060-5077
- [30] Shirmohammadlou N, Zeighami H, Haghi F, Kashefieh M. Resistance pattern and distribution of carbapenemase and antiseptic resistance genes among multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care unit patients[J]. Journal of Medical Microbiology, 2018, 67(10): 1467-1473
- [31] Thummeepak R, Kongthai P, Leungtongkam U, Sitthisak S. Distribution of virulence genes involved in biofilm formation in multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates[J]. International Microbiology: the Official Journal of the Spanish Society for Microbiology, 2016, 19(2): 121-129
- [32] Qi LH, Li H, Zhang CF, Liang BB, Li J, Wang LG, Du XY, Liu XL, Qiu SF, Song HB. Relationship between antibiotic resistance, biofilm formation, and biofilm-specific resistance in *Acinetobacter baumannii*[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 483
- [33] Taylor CM, Roberts IS. Capsular polysaccharides and their role in virulence[J]. Contributions to Microbiology, 2005, 12: 55-66
- [34] Knirel YA, Shneider MM, Popova AV, Kasimova AA, Senchenkova SN, Shashkov AS, Chizhov AO. Mechanisms of *Acinetobacter baumannii* capsular polysaccharide cleavage by phage depolymerases[J]. Biochemistry: Moscow, 2020, 85(5): 567-574
- [35] Majkowska-Skrobek G, Latka A, Berisio R, Squeglia F, Maciejewska B, Briers Y, Drulis-Kawa Z. Phage-borne depolymerases decrease *Klebsiella pneumoniae* resistance to innate defense mechanisms[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 2517
- [36] Leiman PG, Battisti AJ, Bowman VD, Stummeyer K, Mühlenhoff M, Gerardy-Schahn R, Scholl D, Molineux IJ. The structures of bacteriophages K1E and K1-5 explain processive degradation of polysaccharide capsules and evolution of new host specificities[J]. Journal of Molecular Biology, 2007, 371(3): 836-849
- [37] Oliveira H, Mendes A, Fraga AG, Ferreira A, Pimenta AI, Mil-Homens D, Fialho AM, Pedrosa J, Azeredo J. K2 capsule depolymerase is highly stable, is refractory to resistance, and protects larvae and mice from *Acinetobacter baumannii* sepsis[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2019, 85(17): e00934-19
- [38] Majkowska-Skrobek G, Łatka A, Berisio R, Maciejewska B, Squeglia F, Romano M, Lavigne R, Struve C, Drulis-Kawa Z. Capsule-targeting depolymerase, derived from *Klebsiella* KP36 phage, as a tool for the development of anti-virulent strategy[J]. Viruses, 2016, 8(12): 324
- [39] Plebani M, Banfi G, Bernardini S, Bondanini F, Conti L, Dorizzi R, Ferrara FE, Mancini R, Trenti T. Serum or plasma? An old question looking for new answers[J]. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 2020, 58(2): 178-187
- [40] Chen FF, Wang GK, Griffin JJ, Brenneman B, Banda NK, Holers VM, Backos DS, Wu LP, Moghimi SM, Simberg D. Complement proteins bind to nanoparticle protein corona and undergo dynamic exchange *in vivo*[J]. Nature Nanotechnology, 2017, 12(4): 387-393