

DOI:10.13350/j.cjpb.230911

• 论著 •

鲍曼不动杆菌噬菌体 ZZ1 受体结合蛋白 gp12 的克隆表达及 ZZ1 RBP 受体性质鉴定*

王小亭^{1,2}, 张向前², 张改², 王书伟², 李振江², 陈松建², 刘肖², 李亚辉², 王山梅³, 靳静^{2**}

(1. 惠州市第二妇幼保健院新生儿疾病筛查中心, 广东惠州 516001;

2. 河南省医学高等专科学校病原生物学与免疫学教研室; 3. 河南省人民医院检验科)

【摘要】 目的 为进一步了解噬菌体与宿主菌之间的相互作用机制,对鲍曼不动杆菌噬菌体 ZZ1 短尾丝蛋白 gp12 进行克隆表达并对 ZZ1 RBP 吸附受体进行鉴定。方法 原核表达噬菌体 ZZ1 受体结合蛋白 gp12,根据分子质量、抗原性以及 ZZ1 吸附竞争干扰的功能等对表达的重组受体结合蛋白 gp12 进行鉴定。分别用细菌膜蛋白提取试剂盒和细菌脂多糖提取试剂盒提取鲍曼不动杆菌表面 OMP 和 LPS,采用 ELISA 的方法对噬菌体 ZZ1 作用受体性质进行鉴定。分别用蛋白酶 K 和高碘酸盐对 AB09V 菌进行处理以破坏细菌表面的蛋白质和 LPS,观察噬菌体 ZZ1 对两种方法处理 AB09V 菌的吸附效率。结果 PCR 扩增 ZZ1gp12 基因后,成功诱导表达了含 6×His 标签的 ZZ1 重组受体结合蛋白 gp12,SDS-PAGE 显示所表达蛋白的相对分子质量约为 55 ku;使用 0.5 mmol/L IPTG 诱导 4h,蛋白表达基本趋于稳定;Western blot 显示纯化蛋白可分别被 his 标签抗体和小鼠抗 ZZ1 多克隆抗体识别;竞争吸附试验显示,在 ZZ1 重组 gp12 蛋白存在的情况下,ZZ1 对鲍曼不动杆菌 AB09V 的吸附效率与对照组的 63.5% 相比下降 42.4%;当 ZZ1 重组 gp37 蛋白和 ZZ1 重组 gp12 蛋白均存在的情况下,ZZ1 对鲍曼不动杆菌 AB09V 的吸附率下降 55.8%。ELISA 和进一步验证试验显示 ZZ1 重组受体结合蛋白均吸附宿主菌 AB09V 菌表面的 LPS。结论 成功表达了噬菌体 ZZ1 重组受体结合蛋白 gp12,ZZ1 重组 gp37 蛋白和 ZZ1 重组 gp12 蛋白均吸附宿主菌 AB09V 表面的 LPS。

【关键词】 鲍曼不动杆菌;噬菌体;噬菌体受体结合蛋白;尾丝蛋白

【中图分类号】 R378

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2023)09-1053-05

[Journal of Pathogen Biology. 2023 Sep;18(9):1053-1057, 1064.]

Cloning, expression of *Acinetobacter baumannii* phage ZZ1 receptor binding protein gp12 and identification of ZZ1 RBP receptors

WANG Xiaoting^{1,2}, ZHANG Xiangqian², ZHANG Gai², WANG Shuwei², LI Zhenjiang², CHEN Songjian², LIUXiao², LI Yahui², WANG Shanmei³, JIN Jing² (1. Huizhou Second Maternal and Child Health Hospital Neonatal Screening Center, Huizhou 516001, Guangdong, China; 2. Department of Pathogen Biology and Immunology, Henan Medical College; 3. Laboratory Department of Henan Provincial People's Hospital)***

【Abstract】 **Objective** In order to further understand the interaction mechanism between bacteriophages and host bacteria, the clonal expression of the *Acinetobacter baumannii* bacteriophage ZZ1 short tail fiber protein gp12 was performed and the ZZ1 RBP adsorption receptor was identified. **Methods** Prokaryotic expression of bacteriophage ZZ1 recombinant receptorbinding protein gp12, and it was identified from molecular mass, antigenicity and function of ZZ1 adsorption competition interference. OMP and LPS on the surface of *A. baumannii* were extracted respectively by Bacterial Membrane Protein Extraction Kit and Bacterial Lipopolysaccharide Extraction Kit, and then identified host receptors for bacteriophage ZZ1 adsorption using ELISA. We handled AB09V bacteria with proteinase K and periodate to destroy the protein and LPS on the bacterial surface, and observed the adsorption efficiency of the phage ZZ1 on the AB09V bacteria treated by the two methods. **Results** After PCR amplified the ZZ1gp12 gene, the ZZ1 recombinant receptorbinding protein gp12 containing the 6 His tag was successfully induced. SDS-PAGE showed that the relative molecular mass of the expressed protein was about 55 ku. The expression of protein induced at 37 °C with 0.5 mmol/L isopropyl beta-d-thiogalactoside (IPTG) concentration for 4 hours were basically stable. Western blot showed that the purified protein can be recog-

* **【基金项目】** 河南省医学科技攻关计划联合共建项目 (No. LHGJ20210169); 河南省科技厅科技发展计划项目 (No. 222102310449, No. 202102310098); 河南省高等学校重点科研项目 (No. 23B310012)。

** **【通讯作者】** 靳静, E-mail: jing77772006@126.com

【作者简介】 王小亭 (1988-), 女, 河南濮阳人, 硕士研究生, 主要从事病原生物学方面的研究。E-mail: 1265795663@qq.com
王小亭和张向前为共同第一作者。

nized by anti-Histag antibody and mouse anti ZZ1 polyclonal antibody, respectively; The competitive adsorption test showed that the adsorption efficiency of ZZ1 against *Acinetobacter baumannii* AB09V decreased by 42.4% compared with 63.5% in the control group in the presence of recombinant ZZ1gp12 protein; When both ZZ1 recombinant gp37 protein and ZZ1 recombinant gp12 protein were present, the adsorption rate decreased by 55.8%. ELISA and further validation assays showed that both ZZ1 recombinant receptor-binding proteins adsorbed LPS on the surface of the host bacterium AB09V. **Conclusion** The recombinant receptor-binding protein gp12 of the bacteriophage ZZ1 was successfully expressed. Both ZZ1 recombinant gp37 protein and ZZ1 recombinant gp12 protein adsorbed LPS on the surface of host bacteria AB09V.

【Key words】 *Acinetobacter baumannii*; phage; phage receptor-binding protein; tail fiber protein

噬菌体(bacteriophage, phage)是可以感染细菌、真菌、放线菌或者螺旋体等微生物的病毒,因为有些可以使宿主菌裂解,所以称之为噬菌体^[1-3]。近年来,随着抗生素的广泛使用和滥用,细菌的耐药趋势日益严峻^[4-6]。而噬菌体自然资源丰富、制备工艺简单、研发周期短,因此被认为是替代抗生素杀灭耐药菌的一种有效工具^[7-12]。T4噬菌体呈蝌蚪形,由一个头部和一个可以伸缩的尾部构成,属肌尾型噬菌体^[13]。T4噬菌体的头部呈长形二十面体对称,由蛋白质外壳结构包裹基因组DNA组成。其尾部组成结构复杂,由尾鞘、尾鞘包裹的中空尾管、六边形的基板和尾丝构成。在基板上附着有两种尾丝,6个长尾丝(long tail fibers, LTFs)和6个短尾丝(short tail fibers, STFs)又称为尾钉,为T4噬菌体感染吸附宿主菌的重要结构^[14]。T4噬菌体的短尾丝由gp12蛋白三聚体组成。长尾丝由gp34、gp35、gp36、gp37 4种蛋白组成,其中gp37也是三聚体结构。组成尾丝的gp34、gp37和gp12共同拥有一些同源基序,尤其是gp37和gp12的C-末端区域同源,可能与两者都能结合脂多糖有关^[13, 15-17]。前期研究证明噬菌体ZZ1也是一株T4-like噬菌体,并克隆表达了噬菌体ZZ1重组gp37蛋白。本实验将对噬菌体ZZ1重组gp12蛋白进行克隆表达,并对两种重组受体结合蛋白(RBP, receptor-binding protein)的受体性质进行鉴定,为噬菌体与细菌之间的相互作用研究奠定基础。

材料与方法

1 材料

1.1 菌株、噬菌体和质粒 鲍曼不动杆菌AB09V为本实验室保存;噬菌体ZZ1由本实验室分离;质粒PQE80L、DH5 α 、BL21购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.2 试剂 限制性内切酶Hind III、Bam I、Kpn I, Taq DNA聚合酶, dNTP, 10 \times buffer和DL5000 Marker均购自日本Takara公司;质粒提取试剂盒,胶回收试剂盒和DNA清洗试剂盒购自美国AXYGEN公司;Tris, SDS-PAGE凝胶配制试剂盒和SDS-

PAGE蛋白上样缓冲液为中国Beyotime产品;琼脂糖购自法国BIOWEST公司;Glycine和IPTG为中国Solarbio公司产品;脱脂奶粉,His标签抗体,DAB辣根过氧化物酶显色试剂盒, Ni-NTA, PMSF蛋白酶抑制剂和丽春红染色液购自中国BestBio公司;山羊抗小鼠IgG购自康为世纪公司;预染蛋白Marker(prestained protein Markers)为美国Thermo产品;BCA蛋白分析试剂盒(BCA protein kit)购自西安赫特生物科技有限公司;Amp购自河北远征药业有限公司;小牛血清购自中国BIOSHARP公司;多粘菌素B(PMB)为生工生物工程(上海)股份有限公司产品;鼠抗ZZ1多克隆抗体由本室制备并保存;营养肉汤,琼脂粉,营养琼脂和营养肉汤均购自上海泽叶生物科技有限公司。

2 方法

2.1 噬菌体ZZ1受体结合蛋白基因ZZ1gp12的克隆和表达 针对预测的噬菌体ZZ1gp12基因设计引物,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。ZZ1gp12-L: 5'-CGCGGATCCGCGATGGCTGAGACTCCATTAAAT-3'; ZZ1gp12-R: 5'-CGGGGTACCCCCTTAAGCCACCTTAATAAT-3'。以ZZ1基因组DNA为模板PCR扩增ZZ1gp12基因。PCR体系: template 4 μ L, dNTP 8 μ L, Taq enzyme 0.8 μ L, 上游引物 1.5 μ L, 下游引物 1.5 μ L, 10 \times buffer 10 μ L, 补足ddH₂O至100 μ L。PCR反应程序: 94 $^{\circ}$ C预变性5 min, 94 $^{\circ}$ C变性30 s, 52 $^{\circ}$ C退火40 s, 72 $^{\circ}$ C延伸3 min, 35个循环, 72 $^{\circ}$ C延伸5 min, 4 $^{\circ}$ C保存。对扩增产物以及质粒PQE80L进行双酶切,用T4连接酶将酶切目的片段连接,构建受体结合蛋白的重组质粒PQE80L-ZZ1gp12。将重组质粒转化入大肠埃希菌DH5 α 内。收集阳性克隆菌,提取质粒进行双酶切鉴定和测序验证。将验证正确的重组质粒导入表达菌株BL21中, IPTG诱导表达目的蛋白, SDS-PAGE和Western blot分析目的蛋白表达情况。

2.2 噬菌体ZZ1重组受体结合蛋白的纯化及鉴定 用镍柱纯化ZZ1重组受体结合蛋白。通过Western blot观察重组蛋白与噬菌体ZZ1中和抗体的结合作

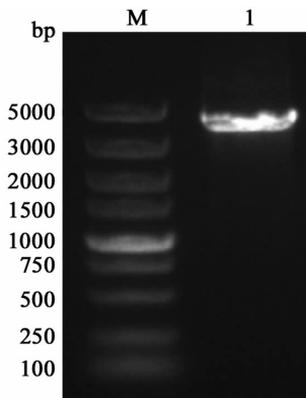
用,评价重组受体结合蛋白的反应原性。将鲍曼不动杆菌 AB09V 与纯化的噬菌体 ZZ1 重组 gp12 蛋白共孵育,再通过吸附干扰试验观察 ZZ1 重组 gp12 蛋白对 ZZ1 吸附鲍曼不动杆菌 AB09V 的竞争干扰作用。

2.3 ZZ1 重组受体结合蛋白受体性质的鉴定 用细菌外膜蛋白提取试剂盒和细菌脂多糖提取试剂盒分别提取鲍曼不动杆菌 AB09V 的外膜蛋白(Outer Membrane Protein, OMP)和脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)。分别以提取的 OMP 和 LPS 为包被抗原,以 6 × his 标签单抗为一抗进行 ELISA,判断两种重组受体结合蛋白的受体性质。分别用蛋白酶 K 和高碘酸盐对鲍曼不动杆菌 AB09V 菌进行处理,以破坏细菌表面的蛋白质和 LPS,测定噬菌体 ZZ1 对两种方法处理的 AB09V 菌的吸附效率,进一步验证两种重组受体结合蛋白对提取纯化的两种受体的吸附作用,以及与噬菌体 ZZ1 吸附细菌表面受体作用的一致性。

结果

1 目的基因 PCR 扩增

PCR 扩增 ZZ1gp12 基因,扩增产物约为 1 500 bp(图 1),与预期相符。



M DNA 标志物 1 ZZ1gp12 PCR 产物
图 1 ZZ1gp12 基因 PCR 产物 1%琼脂糖凝胶电泳分析
M DNA marker 1 ZZ1gp12 PCR product

Fig. 1 ZZ1gp12 PCR product

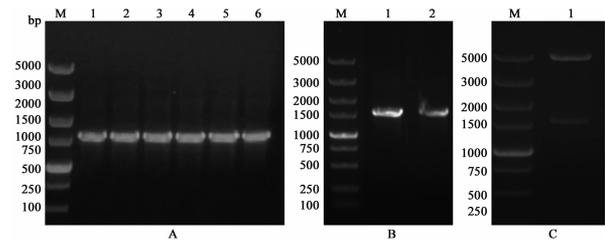
2 重组质粒的鉴定

分别提取感受态 DH5a 阳性克隆菌质粒、ZZ1 DNA,以及转化 PQE80L-ZZ1gp12 基因阳性克隆菌株质粒进行 PCR,扩增产物大小均为 1 500 bp(图 2A、2B);对重组质粒进行双酶切,得到目的基因片段和线性化质粒片段(图 2C)。对重组质粒测序,结果与预测基因序列完全一致。

3 ZZ1 重组 gp12 蛋白的诱导表达及可溶性分析

鉴定正确的阳性表达菌株经终浓度为 0.5 mmol/L IPTG 诱导 4 h,SDS-PAGE 电泳分析表达蛋白的分子质量为 55 ku(图 3A),与理论值一致。为了优化蛋

白最佳诱导时间,重组菌分别用 IPTG 诱导 0、1、2、4、6、8、10 h,SDS-PAGE 检测 ZZ1gp12 重组受体结合蛋白表达情况,结果如图 3B。可见在 IPTG 诱导 4 h 蛋白表达基本趋于稳定。阳性表达菌株经终浓度为 0.5 mmol/L IPTG 37 °C 诱导过夜,收集菌体,超声破碎后分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE 分析,结果如图 3C,ZZ1 重组 gp12 蛋白主要存在于上清中,即可溶性表达较多。

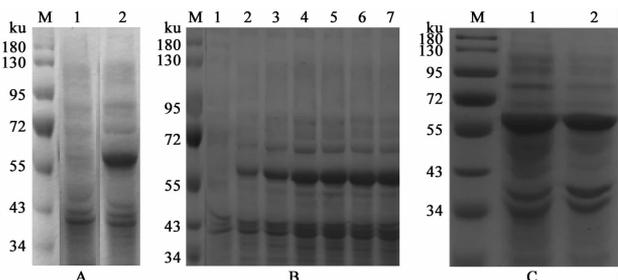


A DH5a 阳性克隆质粒和 ZZ1 DNAPCR 扩增 M DNA 标志物 1 ZZ1 DNAPCR 产物 2~6 DH5a 阳性克隆质粒 PCR 产物
B 重组质粒 PCR 鉴定 M DNA 标志物 1、2 重组质粒 PCR 产物
C 重组质粒双酶切鉴定 M DNA 标志物 1 重组质粒双酶切

图 2 重组质粒 PCR 及双酶切鉴定

A PCR amplification using *E. coli* DH5a Competent Cells and ZZ1 DNA as templates M DNAMarker 1 ZZ1 DNA PCR product 2-6 *E. coli* DH5a Competent Cells PCR product B PCR amplification using recombinant plasmid as templates M DNAMarker 1, 2 Recombinant plasmids PCR product C Enzyme digestion identification of recombinant plasmid M DNAMarker 1 Double enzyme digestion of recombinant plasmid

Fig. 2 Identification results of recombinant plasmids



A 重组菌表达蛋白的 SDS-PAGE 分析 M 蛋白分子质量标准 1 重组菌 IPTG 未诱导 2 重组菌 IPTG 诱导 4h B 不同诱导时间表达蛋白的 SDS-PAGE 分析 M 蛋白分子质量标准 1~7 依次为 IPTG 诱导 0、1、2、4、6、8、10h C IPTG 37 °C 诱导重组菌表达蛋白的 SDS-PAGE 分析 M 蛋白分子质量标准 1 IPTG 诱导重组菌超声破碎上清 2 IPTG 诱导重组菌超声破碎沉淀

图 3 ZZ1 重组 gp12 蛋白的诱导表达与可溶性分析

A SDS-PAGE analysis of recombinant bacterial expressed protein M Protein Marker 1 Recombinant *E. coli* BL21(DE3) un-induced cell 2 IPTG induction for 4 hours B SDS-PAGE analysis of protein expressed at different induction times M Protein Marker 1-7 Induction of IPTG for 1, 2, 3, 4, 5, 6, and 7 hours in sequence C SDS-PAGE analysis of recombinant bacterial protein expression induced by IPTG at 37 °C M Protein Marker 1 IPTG induced 4-hour lytic supernatant at 37 °C 2 IPTG induced 4-hour cleavage precipitation at 37 °C

Fig. 3 Induced expression and solubility analysis of ZZ1 recombinant gp12 protein

4 ZZ1 重组 gp12 蛋白纯化及鉴定

大量诱导 ZZ1 重组受体结合蛋白的表达。收集菌体,超声破碎后取上清,采用镍柱纯化 ZZ1 重组 gp12 蛋白,结果显示该蛋白可被 200 mmol/L 咪唑洗脱缓冲液洗脱。将洗脱蛋白纯化后进行 Western blot,该蛋白可被 his 标签抗体和小鼠抗 ZZ1 多克隆抗体识别,反应条带均位于 55 ku 处(图 4),表明纯化的重组蛋白仍具有反应原性。

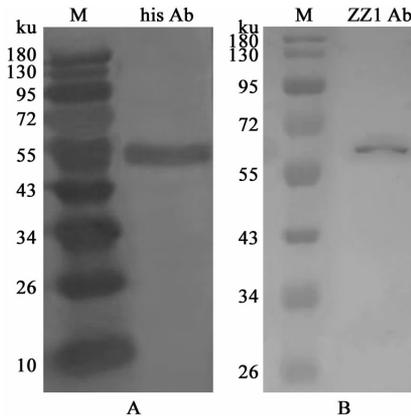


图 4 重组蛋白的 Western blot 分析
Fig. 4 The result of Western blot

5 ZZ1 重组 gp12 受体结合蛋白与 ZZ1 竞争性吸附 AB09V 试验

竞争吸附试验显示,在 ZZ1 重组 gp12 蛋白存在的情况下,ZZ1 对鲍曼不动杆菌 AB09V 的吸附率下降 42.4%;当 ZZ1 重组 gp37 蛋白和 ZZ1 重组 gp12 蛋白均存在的情况下,ZZ1 对鲍曼不动杆菌 AB09V 的吸附率下降 55.8%(图 5)。

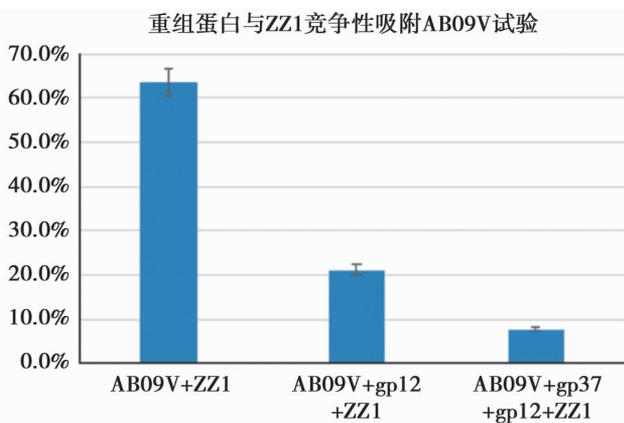
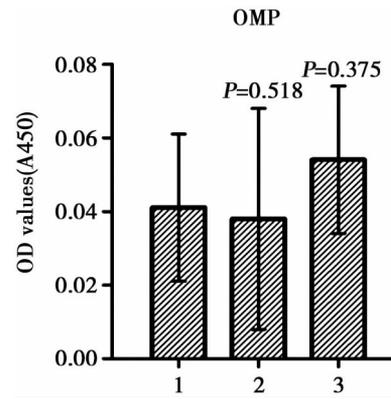


图 5 ZZ1 重组 gp12 蛋白与 ZZ1 竞争吸附 AB09V 试验
Fig. 5 ZZ1 recombinant gp12 protein competitively adsorbs AB09V with ZZ1

6 ZZ1 重组受体结合蛋白受体性质的鉴定

6.1 AB09V 膜蛋白含量 按照细菌膜蛋白提取试剂盒说明书中的方法提取鲍曼不动杆菌 AB09V 膜蛋白,用 BCA 法(绘制蛋白含量标准曲线)进行蛋白定量。提取 AB09V 的 OMP 蛋白含量为 2.74 mg/mL。

6.2 ZZ1 重组蛋白与 AB09V 菌 OMP 和 LPS 作用的 ELISA 检测 鲍曼不动杆菌 AB09V 菌膜蛋白与 ZZ1 重组 gp37 蛋白和 ZZ1 重组 gp12 蛋白作用的 A₄₅₀ 值分别为 0.038±0.03 和 0.054±0.03,与对照组 A₄₅₀ 值 0.041±0.02 比较差异均无统计学意义(均 P>0.05),说明 ZZ1 重组 gp37 和 gp12 蛋白均不与鲍曼不动杆菌 AB09V 表面 OMP 结合(图 6)。

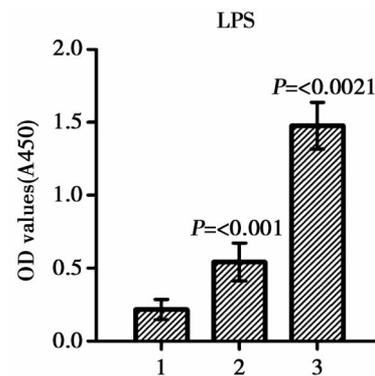


1 对照孔 2 ZZ1 重组 gp37 蛋白孔 3 ZZ1 重组 gp12 蛋白孔
图 6 ZZ1 重组 gp37 蛋白和 ZZ1 重组 gp12 蛋白与 AB09V 菌 OMP 作用的 ELISA 检测

1 Control 2 OMP-coated plates with ZZ1 recombinant gp37 protein action group 3 OMP-coated plates with ZZ1 recombinant gp12 protein action group

Fig. 6 ELISA results of ZZ1 recombinant gp37 and gp12 protein with AB09V strain OMP

鲍曼不动杆菌 AB09V 菌脂多糖与 ZZ1 重组 gp37 蛋白、ZZ1 重组 gp12 蛋白作用后的 A₄₅₀ 值分别为 0.542±0.09 和 1.477±0.09,与对照组 A₄₅₀ 值 0.216±0.07 比较差异均有统计学意义(均 P<0.01)。说明 ZZ1 重组 gp37 蛋白和 ZZ1 重组 gp12 蛋白均能与鲍曼不动杆菌 AB09V 表面 LPS 结合(图 7)。



1 对照孔 2 LPS 与 ZZ1 重组 gp37 蛋白作用孔 3 LPS 与 ZZ1 重组 gp12 蛋白作用孔

图 7 ZZ1 重组 gp37 和 gp12 蛋白与 AB09V 菌 LPS 作用的 ELISA 检测

1 Control 2 LPS-coated plate with ZZ1 recombinant gp37 protein action group 3 LPS-coated plate with ZZ1 recombinant gp12 protein action group

Fig. 7 ELISA results of ZZ1 recombinant gp37 and gp12 protein with AB09V strain LPS

6.3 蛋白酶 K 对 ZZ1 吸附的影响 图 8 显示,ZZ1 对经蛋白酶 K 破坏 OMP 后的鲍曼不动杆菌 AB09V 的吸附率与未处理 AB09V 比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。表明 ZZ1 的受体可能不是蛋白类受体。

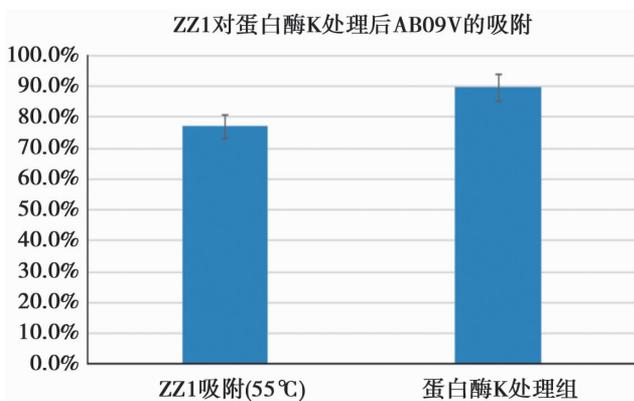


图 8 蛋白酶 K 对噬菌体 ZZ1 吸附的影响
Fig. 8 The effect of proteinase K on adsorption of phage ZZ1

6.4 高碘酸钾对 ZZ1 吸附的影响 ZZ1 对经高碘酸钾作用后的 AB09V 菌的吸附率与对照相比下降 75% (图 9)。表明鲍曼不动杆菌 AB09V 表面的脂多糖是噬菌体 ZZ1 的受体。

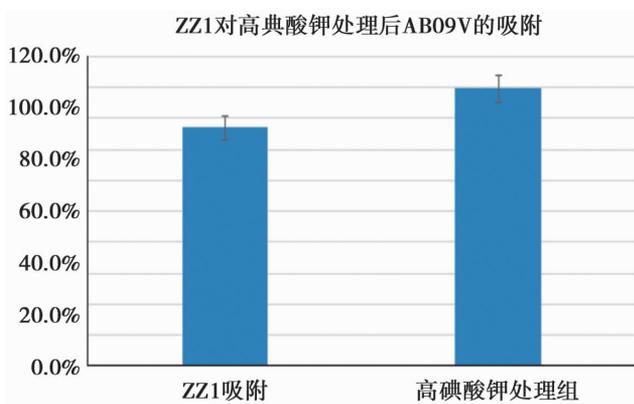


图 9 高碘酸钾对 ZZ1 吸附的影响
Fig. 9 The effect of potassium periodate on adsorption of phage ZZ1

讨论

T4 噬菌体是 T4-like 噬菌体家族中的代表,也是研究最为深入的一株噬菌体^[18]。研究发现,位于 T4 基板上的长尾丝末端的 gp37 以及组成短尾丝的 gp12 是参与 T4 双受体识别的关键结构,可特异性吸附结合大肠埃希菌表面的噬菌体受体^[19]。其中,位于长尾丝末端的 gp37 蛋白先与大肠埃希菌表面的 LPS 发生可逆的作用,当 3 个或更多的长尾丝末端 gp37 蛋白与 LPS 发生作用后,位于基板上的 6 个短尾丝蛋白 gp12 才能发生构象变化,并与大肠埃希菌外膜上的 LPS 发生不可逆的结合,从而完成吸附过程^[20-23]。前期研究发现,不动杆菌属噬菌体 ZZ1 属于 T4-like 噬菌体家

族成员之一。电镜观察噬菌体 ZZ1 与噬菌体 T4 有着相似的形态,尾部也有 6 个长尾丝和 6 个短尾丝(或称为尾钉)^[24-25]。利用生物信息学的方法预测到的噬菌体 ZZ1gp12 和 ZZ1gp37 基因与 T4 噬菌体 gp12 和 gp37 基因在核酸序列上的同源性分别为 57% 和 49%,在氨基酸序列上的相似性分别为 42% 和 18%;预测到的噬菌体 ZZ1gp12 和 gp37 基因在核酸序列上的同源性为 32%,在氨基酸序列上的相似性仅为 14%。

为探索噬菌体 ZZ1 吸附鲍曼不动杆菌 AB09V 表面的受体性质,本研究克隆表达了鲍曼不动杆菌噬菌体 ZZ1 的两种预测的受体结合蛋白,并通过 ELISA 检测了两种重组蛋白 gp12 和 gp37 分别与提取纯化的 AB09V 外膜 OMP 和 LPS 的相互作用。结果显示,鲍曼不动杆菌 AB09V 菌脂多糖均能与 ZZ1 的两种重组受体结合蛋白 gp12 和 gp37 结合,而鲍曼不动杆菌 OMP 不与 gp12 和 gp37 结合。比较 ELISA 检测的 A 值,位于长尾丝末端的 gp37 与 LPS 的作用弱于短尾丝 gp12。究其原因可能为长尾丝与 LPS 的作用常常是可逆的,而短尾丝与 LPS 的作用是不可逆的。另外,也可能与 gp37 在折叠成高级结构过程中缺乏“分子伴侣”gp38 而无法有效折叠成高级结构有关。这与噬菌体 T4 相一致,需要进一步验证。为进一步在 AB09V 菌的完整细胞表面验证上述的试验结果,本研究通过噬菌体 ZZ1 吸附 AB09V 菌的试验观察了完整噬菌体 ZZ1 病毒颗粒分别与位于 AB09V 外膜上的 LPS 和 OMP 的作用。结果显示,当 AB09V 外膜表面的 OMP 被蛋白酶 K 破坏后,噬菌体 ZZ1 对此菌的吸附率与未处理 AB09V 菌比较无显著变化,也就是说破坏 OMP 后并未影响 ZZ1 对鲍曼不动杆菌 AB09V 的吸附,即 ZZ1 并不与 OMP 作用;而 55℃ 吸附对照反而较蛋白酶 K 处理组的吸附率高,可能是当细菌处于 55℃ 时其活性受到影响,从而影响了 ZZ1 的吸附;ZZ1 对蛋白酶 K 作用后的鲍曼不动杆菌 AB09V 的吸附较好,可能与 AB09V 外膜有一层多肽类物质有关,蛋白酶 K 破坏 AB09V 表面多肽类物质后使 ZZ1 更易于吸附到 AB09V 表面,尚需进一步实验来验证。然而,当 AB09V 外膜表面的 LPS 被高碘酸盐破坏后,噬菌体 ZZ1 吸附率大幅度下降,进一步验证重组表达的两种 ZZ1 的受体结合蛋白 gp12 和 gp37 的吸附受体均为 LPS。

【参考文献】

- [1] Alomari MMM, Dec M, Urban-Chmiel R. Bacteriophages as an alternative method for control of zoonotic and foodborne pathogens[J]. Viruses, 2021, 13(12):2348.

- [10] 侯娇,温浩,王明坤,等. 多房棘球蚴感染小鼠脾脏巨噬细胞亚群及其极化表型的变化[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2021,39(6):771-778.
- [11] Mosser DM,Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation[J]. Nat Rev Immunol,2008,8(12):958-969.
- [12] Murray PJ,Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets[J]. Nat Rev Immunol,2011,11(11):723-737.
- [13] Johnsen J. Pathogenesis in immune thrombocytopenia: New insights[J]. Hematology Am Soc Hematol Educ Program,2012,2012:306-312.
- [14] Roelvelde DM,Koenders MI. The role of the Th17 cytokines IL-17 and IL-22 in rheumatoid arthritis pathogenesis and developments in cytokine immunotherapy[J]. Cytokine,2015,74(1):101-107.
- [15] 焦汇楠. 免疫性血小板减少症患者外周血 CD4 + CD25 + CD127lowTreg 细胞与炎症因子、趋化因子的相关性研究[J]. 数理医药学杂志,2022,35(4):481-483.
- [16] Hou X,Shi Y,Kang X,et al. *Echinococcus granulosus*: The establishment of the metacestode in the liver is associated with control of the CD4(+) T-cell-mediated immune response in patients with cystic echinococcosis and a mouse model[J]. Front Cell Infect Microbiol,2022,12:983119.
- [17] Li B,Liu YM,Yan Y,et al. Effect of different types of macrophages on hepatic fibrosis in *Echinococcus granulosus* mice[J]. Biomed Pharmacother,2019,117:109178.
- 【收稿日期】 2023-04-23 【修回日期】 2023-07-13
-
- (上接 1057 页)
- [2] Gorski A,Midzybrodzki R,Wgrzyn G,et al. Phage therapy: Current status and perspectives[J]. Med Res Rev,2020,40(1):459-463.
- [3] 舒飞鸿,王达利,黄广涛. 不同给药途径在噬菌体治疗中的研究进展[J]. 重庆医学,2022,51(21):3743-3749.
- [4] 陈小慧. 杀死耐药细菌用上天然武器[N]. 深圳商报,2023-01-18(A03).
- [5] 岳昌武. 抗生素开发现状及策略[J]. 延安大学学报:医学科学版,2021,19(1):7.
- [6] Zhu Y,Huang WE,Yang Q. Clinical perspective of antimicrobial resistance in bacteria[J]. Infect Drug Res,2022,15:735-746.
- [7] 刘成程,胡小芳,冯友军. 细菌耐药:生化机制与应对策略[J]. 生物技术通报,2022,38(9):13.
- [8] 金凤. 噬菌体疗法:精准打击土传病原菌[N]. 科技日报,2023-02-09(006).
- [9] 梁冰纯,赵文鹏,韩博,等. 噬菌体治疗动物细菌感染性疾病的研究进展[J]. 中国兽医杂志,2023,59(1):107-110.
- [10] Ling H,Lou X,Luo Q,et al. Recent advances in bacteriophage-based therapeutics: Insight into the post-antibiotic era[J]. Acta Pharmaceutica Sinica B,2022,12(12):4348-4364.
- [11] Gordillo Altamirano FL,Barr JJ. Phage therapy in the postantibiotic era[J]. Clin Microbiol Rev,2019,32(2):e00066-18.
- [12] Hatfull GF,Dedrick RM,Schooley RT. Phage therapy for antibiotic-resistant bacterial infections[J]. Ann Rev Med,2022,73:197-211.
- [13] Lan M,Yap,Michael G,et al. Structure and function of bacteriophage T4[J]. Fut Microbiol. 2014;9(12):1319-1327.
- [14] Leiman PG,Arisaka F,van Raaij MJ,et al. Morphogenesis of the T4 tail and tail fibers[J]. Virol J,2010,7(1):355.
- [15] Miller ES,Elizabeth K,Gisela M,et al. Bacteriophage T4 genome [J]. Microbiol Mol Biol Rev,2003,67(1):199-201.
- [16] King J. Using T4 genetics and Laemmli's development of high-resolution SDS gel electrophoresis to reveal structural protein interactions controlling protein folding and phage self-assembly[J]. J Biol Chem,2022,298(10):102463.
- [17] Bartual SG,Otero JM,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.
- [18] Zhang K,Li X,Wang Z,et al. Systemic expression, purification, and initial structural characterization of bacteriophage T4 proteins without known structure homologs[J]. Front Microbiol,2021,12:674415.
- [19] Rakhuba DV,Kolomiets EI,Dey ES,et al. Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell[J]. Polish J Microbiol,2010,59(3):145-155.
- [20] Suga A,Kawaguchi M,Yonesaki T,et al. Manipulating interactions between T4 phage long tail fibers and *Escherichia coli* receptors[J]. Appl Environ Microbiol,2021,87(13):e0042321.
- [21] Hyman P,van Raaij M. Bacteriophage T4 long tail fiber domains [J]. Biophysical Rev,2018,10(2):463-471.
- [22] 李凡,于振兴,张明,等. 噬菌体受体结合蛋白及其宿主谱扩展的相关研究进展[J/OL]. 食品科学:1-14[2023-02-21].
- [23] 叶玲玲,钟佑宏,王鹏,等. 肌尾噬菌体科 T4 类噬菌体的研究进展[J]. 中国病原生物学杂志,2019,14(5):606-609.
- [24] Jin J,Li ZJ,Wang SW,et al. Isolation and characterization of ZZ1, a novel lytic phage that infects *Acinetobacter baumannii* clinical isolates[J]. BMC Microbiol,2012,12(1):1-8.
- [25] Jing J,Li ZJ,Wang SW,et al. Genome organisation of the *Acinetobacter* lytic phage ZZ1 and comparison with other T4-like *Acinetobacter* phages[J]. BMC Genomics,2014,15(1):1-14.
- 【收稿日期】 2023-03-15 【修回日期】 2023-06-02