

基于 CRISPR/Cas9 技术构建鲍曼不动杆菌 *lpxC* 缺失株及其表型研究

孙宗偶¹, 张友文^{1,2}, 李海滨¹, 王秀坤^{1,2}, 于洁¹, 解晋茹¹, 庞蓬勃¹,
胡辛欣^{1,2}, 聂彤颖^{1,2}, 卢曦^{1,2}, 庞晶^{1,2}, 侯磊³, 杨信怡^{1,2}, 李聪然^{1,2},
孙琅^{1,2*}, 游雪甫^{1,2*}

1. 中国医学科学院、北京协和医学院医药生物技术研究所, 抗感染药物研究北京市重点实验室, 北京 100050;
2. 中国医学科学院病原微生物菌(毒)种保藏中心药用微生物相关菌(毒)种保藏分中心, 北京 100050;
3. 中国医学科学院、北京协和医学院医药生物技术研究所实验动物中心, 北京 100050)

摘要: 脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS) 是革兰阴性菌细胞膜外膜重要组成成分, 与多数革兰阴性菌不同, 鲍曼不动杆菌在 LPS 缺失后仍可存活并获得对多黏菌素的耐药性。有关 LPS 缺失鲍曼不动杆菌的研究多是对多黏菌素诱导产生的 LPS 缺失株, 背景复杂且不稳定。为深入研究 LPS 缺失介导的多黏菌素耐药鲍曼不动杆菌, 本研究通过双质粒 CRISPR/Cas9 系统敲除鲍曼不动杆菌 ATCC 19606 的 *lpxC* 基因, 构建稳定且背景清晰的 LPS 缺失株, 并对缺失株的形态、生长速率、抗生素的敏感性、毒力、膜通透性和膜电势进行分析。动物实验经中国医学科学院、北京协和医学院医药生物技术研究所实验动物管理与动物福利委员会批准 (批准号: IMB-20240119D₉)。结果显示, 鲍曼不动杆菌 ATCC 19606 的 *lpxC* 基因被成功敲除, *lpxC* 缺失后菌株失去外膜 LPS, 形态由杆状变为球状, 细菌生长速率变慢, 膜通透性升高, 膜电势降低, 对 β -内酰胺类、喹诺酮类、氨基糖苷类、大环内酯类、糖肽类抗生素的敏感性增强, 并且体内毒力大幅下降。 *lpxC* 缺失引起鲍曼不动杆菌的膜稳态、适应性发生明显改变, 了解 LPS 缺失介导的多黏菌素耐药鲍曼不动杆菌的特征变化有利于探究鲍曼不动杆菌耐药机制、寻找治疗新策略。

关键词: 鲍曼不动杆菌; 基因编辑; CRISPR/Cas9 系统; *lpxC* 基因; 多黏菌素; 耐药; 脂多糖

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)05-1286-09

Construction and characterization of *lpxC* deletion strain based on CRISPR/Cas9 in *Acinetobacter baumannii*

SUN Zong-ti¹, ZHANG You-wen^{1,2}, LI Hai-bin¹, WANG Xiu-kun^{1,2}, YU Jie¹, XIE Jin-ru¹,
PANG Peng-bo¹, HU Xin-xin^{1,2}, NIE Tong-ying^{1,2}, LU Xi^{1,2}, PANG Jing^{1,2}, HOU Lei³,
YANG Xin-yi^{1,2}, LI Cong-ran^{1,2}, SUN Lang^{1,2*}, YOU Xue-fu^{1,2*}

1. Beijing Key Laboratory of Antimicrobial Agents, Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China;
2. Division for Medicinal Microorganisms Related Strains, CAMS Collection Center of Pathogenic Microorganisms, Beijing 100050, China;
3. Experimental Animal Center, Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: Lipopolysaccharides (LPS) are major outer membrane components of Gram-negative bacteria.

收稿日期: 2024-01-16; 修回日期: 2024-02-21.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (32141003, 82104249); 科技部国家科技资源共享服务平台“国家病原微生物资源库”项目 (NPRC-32); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程 (2022-I2M-2-002).

*通讯作者 Tel: 86-10-67061033, E-mail: sunlang@imb.pumc.edu.cn;

Tel: 86-10-67010489, E-mail: xuefuyou@imb.pumc.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0044

Unlike most Gram-negative bacteria, *Acinetobacter baumannii* can still survive and acquire polymyxin resistance after complete loss of LPS. Previous studies of LPS-deficient *Acinetobacter baumannii* mostly focused on LPS-deficient strains induced by polymyxin, whose background was complex and unstable. To investigate LPS loss-mediated polymyxin resistant-*Acinetobacter baumannii*, this study constructed a stable and clear background LPS-deficient strain by knocking out *lpxC* gene in *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 with CRISPR/Cas9, and then studied the phenotypic changes of the *lpxC*-deficient strain including morphology, growth rate, antibiotic susceptibility, virulence, membrane permeability, and membrane potential. Animal experiments were approved by the Animal Care and Welfare Committee Institute of Medicinal Biotechnology, CAMS and PUMC (approval number: IMB-20240119D₉). The results indicated that the *lpxC* gene of *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 was successfully knocked out. After losing the *lpxC*, the strain underwent the morphological change from rod-shaped to spherical. Furthermore, it leads to reduced growth rate, enhanced membrane permeability, decreased membrane potential, lower virulence, and increased antibiotic susceptibility to β -lactams, quinolones, aminoglycosides, macrolides, glycopeptides. The *lpxC* deletion results in significant changes in membrane homeostasis and adaptability of *Acinetobacter baumannii*. Understanding the phenotypic changes of colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* mediated by LPS loss is useful for exploring the resistance mechanism of *Acinetobacter baumannii* and developing new therapeutic strategies.

Key words: *Acinetobacter baumannii*; gene editing; CRISPR/Cas9 system; *lpxC* gene; polymyxin; resistance; lipopolysaccharide

鲍曼不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*, *A. baumannii*) 是临床一种常见的革兰阴性条件致病菌, 2021年 CHINET 统计数据 displays 鲍曼不动杆菌占据主要临床分离菌株前五位, 常对临床上大多抗生素耐药, 亟需针对鲍曼不动杆菌耐药机制的研究^[1]。脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 是革兰阴性菌细菌细胞壁外膜的重要组成部分, 是大多数革兰阴性细菌生存所不可或缺的部分。LPS 分子由脂质 A、核心多糖、O-抗原三部分组成, LPS 生物合成过程中的第一阶段 Kdo₂-lipidA 九种基因 (*lpxA*、*lpxC*、*lpxD*、*lpxH*、*lpxB*、*lpxK*、*KdtA*、*lpxL* 和 *lpxM*) 参与反应, 其中 *lpxC* 基因表达的去乙酰化酶 (UDP-3-O-acyl-N-acetylglucosamine deacetylase, LpxC) 对脂质 A 的合成起到关键作用^[2]。鲍曼不动杆菌 *lpxC* 基因突变引起外膜 LPS 缺失对多黏菌素类药物高度耐药^[3]。CRISPR/Cas9 系统是目前最热门分子生物学技术之一, 能够简洁、高效、无痕地实现基因编辑, 提高对细菌基因功能研究的准确性。

本研究通过 CRISPR/Cas9 基因编辑技术对鲍曼不动杆菌的 *lpxC* 基因全敲除, 研究 *lpxC* 基因缺失介导多黏菌素耐药的鲍曼不动杆菌的表型特征, 为进一步探讨细菌耐药机制、发现新型药物靶点提供了基础, 也为临床治疗细菌耐药提供参考材料。

材料与方法

质粒与菌株 鲍曼不动杆菌 ATCC 19606 用于构建 *lpxC* 缺失株, 来自中国医学科学院病原微生物菌(毒)种保藏中心药用微生物相关菌(毒)种保藏分中

心。质粒 pCasAb-apr (# 121998, 用于表达 Cas9 蛋白和重组酶 RecAb 系统)、质粒 pSGAb-km (# 121999, 用于构建 sgRNA 和同源重组模板) 均购于 Addgene 公司。

动物 ICR 小鼠外观健康, 体重 18~22 g, 雌、雄各半, 由北京华阜康生物科技股份有限公司供应, 许可证号: SCXK (京) 2019-0008。饲养于中国医学科学院医药生物研究所动物房, 实验动物使用许可证号: SYXK (京) 2017-0023。

试剂与培养基 多黏菌素 B (polymyxin B, PMB, LOT#86378)、安普霉素 (apramycin, APR, LOT# 26867)、双(1,3-二巴比妥酸)-三次甲基氧烯洛尔 [bis-(1, 3-dibutylbarbituric acid)-trimethine oxonol, DiBAC₄(3), LOT#287430] 购于美国 MedChemExpress (MCE) 公司; 黏菌素 (colistin, CST, 批号: 130327-200906)、头孢他啶 (ceftazidime, 批号: 130484-201806)、头孢哌酮 (cefoperazone, 批号: 130420-201105)、头孢呋辛 (cefuroxim, 批号: 130493-201105)、美罗培南 (meropenem, 批号: 130506-202004)、氨曲南 (aztreonam, 批号: 130507-201303)、舒巴坦 (sulbactam, 批号: 130430-201007)、阿奇霉素 (azithromycin, 批号: 130352-201007)、阿米卡星 (amikacin, 批号: 30335-200204)、左氧氟沙星 (levofloxacin, 批号: 130455-202108)、万古霉素 (vancomycin, 批号: 130360-201302)、四环素 (tetracycline, 批号: 130306-201419) 购于中国食品药品检定研究院; 替加环素 (tigecycline, 批号: 1511130122) 购于正大天晴; 达托霉素 (daptomycin, 国药准字: J20100001) 购于海南斯达制药有限公司; 卡那霉素 (kanamycin, KAN,

LOT#HC0113A0020)、溴化乙锭 (ethidium bromide, EB, LOT#G107BA0010)、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside, IPTG, LOT# I621BA0019) 购于生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 购于赛默飞世尔科技公司; Gibson 组装试剂、T4 DNA 连接酶、T4 多聚核苷酸激酶、限制性内切酶 (*Bsa*I-HFv2、*Eco*I-HF、*Not*I-HF) 购于美国 New England Biolabs (NEB) 公司。

CRISPR/Cas9 基因编辑技术敲除 *lpxC* 基因 本研究参考季泉江课题组的方法^[4], 在此基础上, 重新设计并构建携带 *lpxC* 基因 sgRNA 和同源重组模板的 pSGAb-km 质粒, CRISPR/Cas9 基因编辑原理见图 1。利用 CRISPOR 网站 (<http://crispor.tefor.net/>) 设计针对 *lpxC* 的 spacer 序列, 选择 PAM 位点 (5'-NGG-3') 的前 20 bp 设计 3 对寡链核苷酸 spacer-*lpxC* spacer-F/R 序列, 通过 Gloden Gate 无缝克隆将 *lpxC* spacer-F/R 连接到经 *Bsa*I 酶切过的 pSGAb-km 质粒中。质粒转化到 *E. coli* DH5 α 后, 通过 50 μ g·mL⁻¹ 卡那霉素抗性平板筛选阳性克隆, 以 *lpxC* spacer-F/M13R 为 PCR 引物, 经菌落 PCR 和桑格测序验证后获得携带 *lpxC* 基因 sgRNA 的 pSGAb-*lpxC* spacer-km 质粒。接着通过限制性内切酶 *Not*I-HF、*Eco*RI-HF 将 pSGAb-*lpxC* spacer-km 质粒线性化, 以 *lpxC* 基因上下游约 500 bp 的同源臂 *lpxC*-up 和 *lpxC*-down 为同源重组模板, 采用 Gibson 组装的方式设计带有 overlap 的引物对 *lpxC*-up F/R、*lpxC*-down F/R, 以细菌基因组为模板通过 PCR 获得 *lpxC*-up、

lpxC-down, 经 Gibson 组装将上下游同源臂无缝连接到线性化的 pSGAb-*lpxC* spacer-km 质粒中, 经转化、卡那霉素抗性筛选、PCR、测序验证后获得携带 *lpxC* 基因 sgRNA 和同源重组模板的 pSGAb-*lpxC* spacer-HR-km 质粒。所有的引物序列见表 1。将 pCasAb-apr 质粒电转到鲍曼不杆菌 ATCC 19606 中, 以 pCasAb-apr 上携带的安普霉素抗性基因 (ApmR) 为模板设计引物对 ApmR-F/R (表 1), 通过 PCR 验证、测序获得并保存带有 pCasAb-apr 质粒的菌株, 通过 IPTG 诱导表达 2 h 后, 制备成感受态细胞。取 400 ng 构建好的 pSGAb-*lpxC* spacer-HR-km 质粒加到携带 pCasAb-apr 质粒的鲍曼不杆菌 ATCC 19606 的感受态细胞中进行电转化。电击完成后, 加入 1 mL BHI 液体培养基并置于 37 °C 摇床 100 r·min⁻¹ 震荡复苏 16 h。取 100 μ L 菌液涂布在含有 20 μ g·mL⁻¹ 多黏菌素 B 的 BHI 固体培养基平板上培养 16~20 h 筛选阳性克隆。在 *lpxC* 基因上下游同源臂设计引物对 *lpxC*-CF/CR (表 1) 进行 PCR。产物通过琼脂糖凝胶电泳检测并送样测序, 验证目的基因敲除结果。通过含有 5% 蔗糖的 BHI 固体培养平板去除 *lpxC* 缺失菌株中基因编辑的质粒, 挑选菌落通过 PCR 验证质粒去除结果, 以 ApmR-F/R 引物验证 pCasAb-apr 质粒, 以 pSG-F/R 引物验证 pSGAb-km 质粒, 引物见表 1。

LPS 的提取与鉴定 在已知质量的 15 mL 离心管中加入 12 mL 预冷的 PBS (pH 7.2), 刮取平板上的菌苔到 PBS 中混匀, 控制菌液 OD₆₀₀ 为 0.6 左右。4 °C 下重

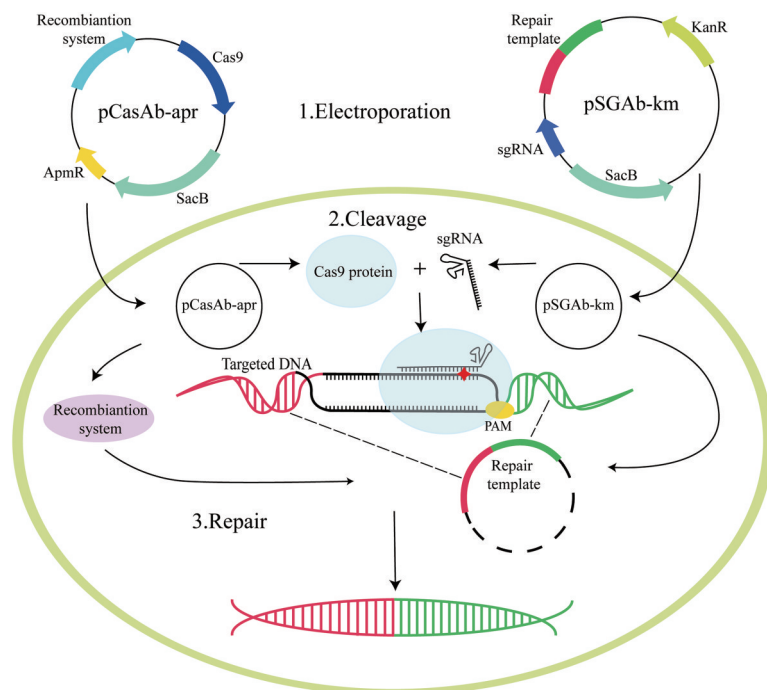


Figure 1 Principles of gene knockout using CRISPR/Cas9

Table 1 Primers for gene knockout used in the study

Primer	Sequence
ApmR-F	CCGTTGATCGTGCTATGA
ApmR-R	TGAGTAAACTGGTCTGACA
<i>lpxC</i> -CF	GTGGTTACGCAATGATGG
<i>lpxC</i> -CR	ATGAGCCYYGAGATAGTGTT
<i>lpxC</i> spacer1-F	tagtTGCAATTGGCGTAGATGATA
<i>lpxC</i> spacer1-R	aaacTATCATCTACGCCAATTGCA
<i>lpxC</i> spacer2-F	tagtGTTTGTGTATGAAGTCAGTG
<i>lpxC</i> spacer2-R	aaacCACTGACTTCATACACAAAC
<i>lpxC</i> spacer3-F	tagtTAGGAGCATCTTGTTCACGC
<i>lpxC</i> spacer3-R	aaacGCGTGAACAAGATGCTCCTA
M13R	CAGGAAACAGCTATGAC
<i>lpxC</i> up-F	CCGAGTCGGTGCTTTTTTGTATATCGAATTC
	TGGGAAAGCGTGTTAAT
<i>lpxC</i> up-R	CCAAATAAAGACAATGACGCTTGTAACTTC
	TTTTTTAAAACCG
<i>lpxC</i> down-F	AAAAAGAAGTTACAAAGCGTCATTGTCTTT
	ATTTGGCTATGTTATAATG
<i>lpxC</i> down-R	CTCCACCGCGTGGCGGCCGAACACATAA
	AAACAGGAAACCT
pSG-F	GATGTTTCATCGTTCATGTCTC
pSG-R	TCTGTGGATAACCGTATTACC

复离心两次 (2 500 ×g, 10 min) 获得菌体沉淀, 按沉淀重量的 10 倍加入裂解液, 利用超声波细胞破碎仪进行破碎 (破碎 3 s, 间歇 3 s, 40% 功率, 共 10 min)。离心取上清, 加入蛋白酶 K (终浓度为 0.1 mg·mL⁻¹), 60 °C 孵育 60 min 后离心, 取带有 LPS 的上清。将提取的 LPS 样品进行 SDS-PAGE 电泳, 140 V 电压下运行 55 min, 通过考马斯亮蓝染色。

细菌膜电势、膜通透性比较分析 将过夜培养的菌液调整到 0.5 MCF 左右, 取 10 μL 稀释后的菌液加入到 200 μL Dulbecco's 磷酸缓冲液 (Dulbecco's phosphate-buffered saline, DBS) 缓冲液中, 加入染料 DiBAC₄(3)、EB、PI, 终浓度分别为 10、10、5 μg·mL⁻¹。将样品在 25 °C 下孵育 30 min, 然后通过 BD Accuri C6 Flow Cytometer 流式细胞仪检测, 采用 488 nm 作为激发光, 检测器分别在 >630 nm、575 nm 的波长测量 PI 荧光、EB 荧光反映膜通透性, 525 nm 处测量 DiBAC₄(3) 荧光反映膜电势。

扫描电镜和透射电镜 取过夜培养的菌液, 离心去上清后用 0.2 mol·L⁻¹ PBS 重复洗涤离心两次, 再将菌体转移到 1.5 mL 离心管中, 沿管壁加入 1 mL 2.5% 戊二醛缓慢加入, 轻轻吹打悬浮 1 min 后离心成团, 2 500 ×g 离心 5 min, 加满戊二醛后, 4 °C 冰箱避光过夜 (> 12 h), 送样品到中科百测公司通过扫描电镜、透射电镜观察菌株外貌形态。

药敏分析 VITEK2-compact 全自动细菌药敏分析系统通过革兰阴性细菌药敏卡片 (VITEK2 AST-GN13) 检测鲍曼不动杆菌 ATCC 19606 野生型 (wild

type)、敲除株 ($\Delta lpxC$) 的药敏。同时根据 CLSI 标准, 通过肉汤微稀释法测定菌株对多黏菌素 B、黏菌素、卡那霉素、安普霉素、头孢他啶、头孢哌酮、头孢呋辛、美罗培南、氨曲南、舒巴坦、阿奇霉素、阿米卡星、左氧氟沙星、万古霉素、四环素、替加环素、达托霉素的敏感性, 药物浓度范围为 0.125~256 μg·mL⁻¹, 接种菌液浓度约 5×10⁵ CFU·mL⁻¹, 置于 37 °C 培养 16~20 h, 肉眼观察无细菌生长的最低药物浓度为最低抑菌浓度。

生长速率测定 取过夜培养至饱和的菌液, 按照 1:1 000 稀释, 通过 BIOSCREEN 全自动生长曲线分析仪, 37 °C 连续震荡培养菌株 48 h, 每 4 min 检测 OD₆₀₀ 的数值以得到菌株的生长曲线, 使用 GraphPad Prism 10 对生长曲线数据进行双因素方差分析, 采用 Bonferroni 事后多重检验, 当 $P < 0.05$ 时, 有统计学意义。

小鼠全身感染^[5,6] 小鼠按体重随机分组, 每组 10 只, 雌雄各半。实验菌液用 5% 高活性干酵母稀释成, 每只小鼠腹腔注入约 2×10⁶ CFU 的菌液 (*A. baumannii* ATCC 19606 1.6×10⁶ CFU, *A. baumannii* ATCC 19606 $\Delta lpxC$ 2.1×10⁶ CFU), 观察并记录 7 天内各组动物死亡数, 使用 Fisher 精确检验进行统计分析; 应用 Prism 软件 Kaplan-Meier 的乘积极限法创建生存曲线, 并使用对数秩检验 (log-rank) 比较生存曲线, 当 $P < 0.05$ 时认为两组具有显著性差异。

结果

1 鲍曼不动杆菌 ATCC 19606 在 *lpxC* 基因全敲除后存活并未检测到 LPS

已有报道称, 鲍曼不动杆菌 ATCC 19606 在 *lpxC* 基因缺失仍能存活, 为验证 *lpxC* 基因是否敲除成功, 本研究进行了 PCR 电泳分析。电泳结果显示, 野生株 PCR 产物的长度在 1 500~2 000 bp 之间, 而敲除株的 DNA 产物长度在 1 000~1 500 bp 之间 (图 2A)。测序结果进一步证实, 敲除株的产物是约为 1 397 bp 的 DNA 序列, 缺失了 903 bp 的碱基对应 *lpxC* 基因 (图 2B), 与预期结果一致, 表明 *lpxC* 基因敲除成功。由于 *lpxC* 基因是 LPS 合成的关键基因, 为了能更直观地反映出鲍曼不动杆菌 *lpxC* 基因与 LPS 的相关性, 本研究提取了野生株与敲除株的 LPS 进行 SDS-PAGE 电泳检测, 结果显示, 野生株在 17~20 kDa 的位置出现 LPS 的相应条带, 而敲除株未出现, 进一步证明了基因敲除后鲍曼不动杆菌 LPS 缺失 (图 3)。

2 鲍曼不动杆菌 ATCC 19606 在 *lpxC* 基因敲除后, 无法维持短杆状结构

为了观察 *lpxC* 基因敲除对鲍曼不动杆菌外貌的影响, 本研究分别通过扫描电镜与透射电镜观察鲍曼

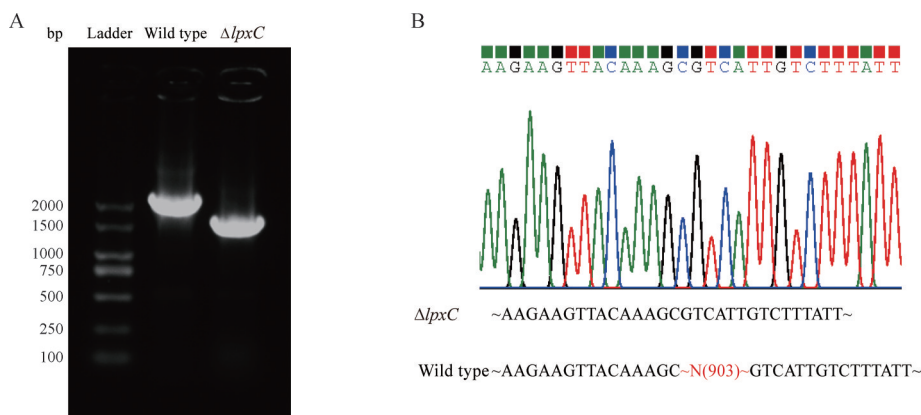


Figure 2 The results of *lpxC* knockout in *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606. PCR (A) and Sanger sequencing results (B) of *A. baumannii* ATCC 19606 before and after *lpxC* knockout

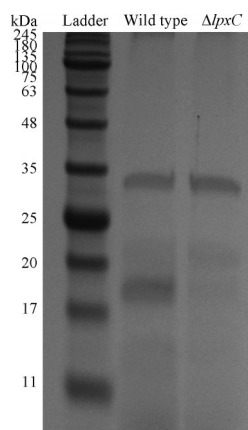


Figure 3 Identification of lipopolysaccharides (LPS) with Coomassie blue staining

不动杆菌形貌的变化。在扫描电镜下,野生型菌株整体分布均匀,单个细菌外观致密、粗糙,形状规则两端钝圆,呈现球杆状,无鞭毛结构,细菌之间界限清晰,无黏连发生(图4A~C)。相比之下,敲除株的单个细菌整体外观呈现球形或椭圆形,表面附着一些球形或长条形分泌物,分泌物呈现网络状,整体上细菌之间以类葡萄簇状排列,并且部分菌之间有粘连发生,菌与菌的界限较为模糊(图4D~F)。

在透射电镜下,本研究对细菌外膜结构上的变化有了更清晰的发现,野生株单个细菌切面形状规则,细胞壁颜色较深,菌与菌之间分界清晰(图4G~I)。在敲除株中,细菌很少呈单个存在,分泌物由外膜延伸而出,胞质分布不均匀,增殖过程不在中间位置内陷分裂,不呈现典型的均匀二分裂状态,在成簇的细胞中,细菌之间的界限变得透明,夹在中间的细菌形状不规则(图4J~L)。

3 *lpxC*基因敲除后细菌的膜通透性增高,膜电势降低

本研究通过流式细胞术对100 000个经过染色细

菌进行检测,分别在525、575和>630 nm波长下检测DiBAC₄(3)、EB和PI染料的荧光强度,以评估细菌的膜通透性和膜电势。DiBAC₄(3)是一种亲脂性阴离子荧光染料,在细胞膜电势较高的情况下,DiBAC₄(3)不能轻易穿过完整的细胞膜,因此荧光强度较低。但当膜电势降低时会增加染料的亲和力,从而导致荧光值的增加。EB、PI是两种核酸染料,在细胞膜完整的情况下会阻止这些染料的进入,当膜受损、通透性增加时,EB和PI能够进入到细胞内与核酸结合发出荧光。流式细胞术的结果显示,敲除株在各个波长下显示出比野生株更高的荧光强度,这表明鲍曼不动杆菌*lpxC*基因敲除后,膜电势降低(图5A),膜通透性增加(图5B、C)。

4 *lpxC*基因敲除后细菌对大多抗生素更敏感

VITEK2-compact全自动细菌药敏分析显示,在*lpxC*基因敲除后,除甲氧苄啶/磺胺甲恶唑外,鲍曼不动杆菌对各类抗生素的敏感性均有所提高,包括氨基糖苷类、第三代头孢类和喹诺酮类(表2)。

肉汤微稀释法的结果显示,敲除*lpxC*基因后的鲍曼不动杆菌表现出对多黏菌素的高度耐药性,但对β-内酰胺类(头孢他啶、头孢哌酮、头孢呋辛、舒巴坦、氨曲南、美罗培南)、喹诺酮类(左氧氟沙星)、氨基糖苷类(阿米卡星)、大环内酯类(阿奇霉素)、肽类(万古霉素、达托霉素)、四环素类(四环素、替加环素)多种抗生素更加敏感(表3)。

5 *lpxC*基因敲除后细菌的生长速率降低,毒力极大减弱

生长曲线的分析结果表明,*lpxC*基因敲除株的生长速率明显低于野生型。野生型菌株在大约12 h就达到了平台期,而与之相比,*lpxC*敲除株约晚12 h才进入平台期(图6A)。这说明*lpxC*基因的敲除严重影响鲍曼不动杆菌的生长动力学,导致生长过程的延迟。

小鼠腹腔感染大约 2×10^6 CFU的菌液后,连续观

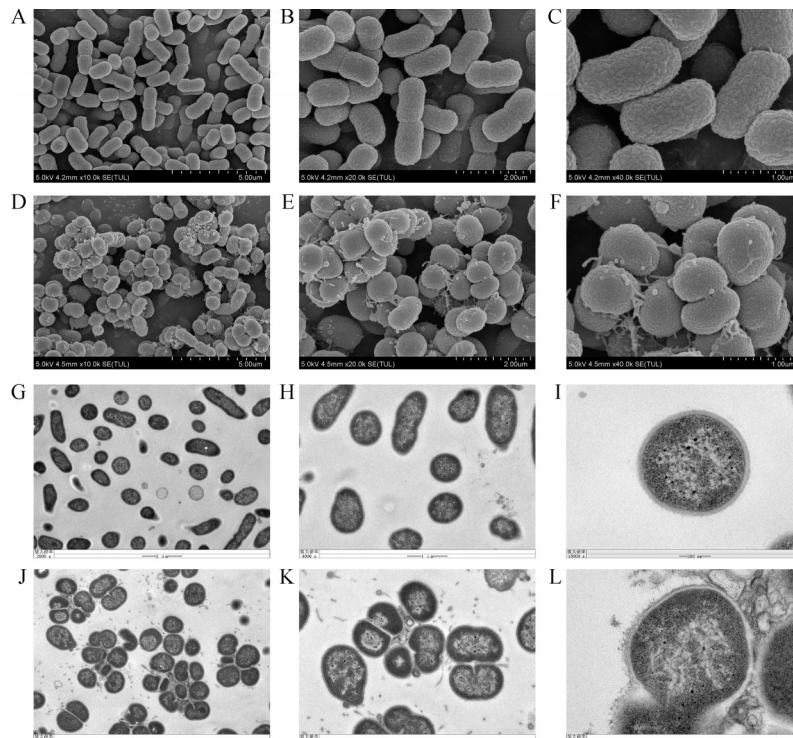


Figure 4 Morphological changes of *A. baumannii* ATCC 19606 before and after *lpxC* deletion. Scanning electron micrographs of *A. baumannii* ATCC 19606 (A–C) and *lpxC* deletion strain (D–F) at magnifications of 10.0 k, 20.0 k and 40.0 k amounting to 5.0, 2.0, and 1.0 μm , respectively. Transmission electron micrographs of *A. baumannii* ATCC 19606 (G–I) and *lpxC* deletion strain (J–L) at magnifications of 2 k, 4 k and 15 k amounting to 2.0, 1.0, and 200.0 nm, respectively

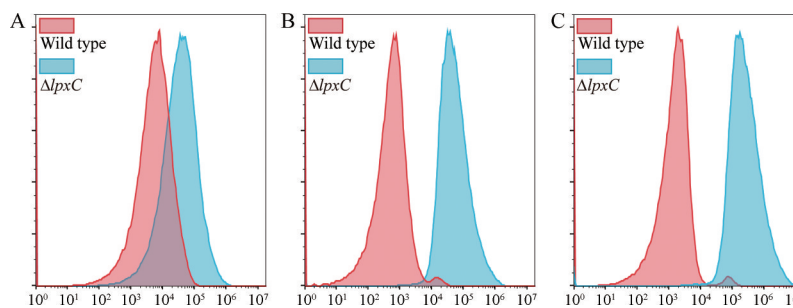


Figure 5 Alterations in membrane permeability and membrane potential of *A. baumannii* ATCC 19606 before and after *lpxC* deletion using DiBAC₄(3)/EB/PI staining. DiBAC₄(3) staining (A) revealed membrane potential decreased, EB staining (B), and PI staining (C) revealed membrane permeability increased after *lpxC* knockout

Table 2 Minimum inhibitory concentration (MIC) determination of *A. baumannii* against antibiotics with VITEK2-compact

Antibiotics	MIC/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	
	Wild type	$\Delta lpxC$
Ampicillin/Sulbactam	≤ 2	≤ 2
Cefazolin	≥ 64	≥ 64
Ceftazidime	8	≤ 1
Ceftriaxone	16	≤ 1
Cefepime	8	≤ 1
Imipenem	≤ 1	≤ 1
Gentamicin	4	≤ 1
Tobramycin	≤ 1	≤ 1
Ciprofloxacin	2	≤ 0.25
Levofloxacin	1	≤ 0.25
Trimethoprim/Sulfamethoxazole	≥ 320	≥ 320

察 7 天。结果显示, *A. baumannii* ATCC 19606 (wild type) 组小鼠死亡率为 90%, *A. baumannii* ATCC 19606 基因敲除 ($\Delta lpxC$) 组小鼠死亡率为 0% (图 6B)。应用 Fisher 精确检验进行统计分析比较显示, 两组小鼠死亡率具有极显著性差异 ($P < 0.01$)。应用 Prism 软件 Kaplan-Meier 的乘积极限法创建生存曲线, 并使用对数秩检验 (log-rank) 比较显示, 两组小鼠的生存曲线具有极显著性差异 ($P < 0.01$)。

讨论

鲍曼不动杆菌作为临床上最常见的致病菌之一,

Table 3 The antibiotic susceptibility of *A. baumannii* ATCC19606 with and without *lpxC*

Antibiotics	MIC/ $\mu\text{g mL}^{-1}$	
	Wild type	$\Delta lpxC$
Colistin	0.5	> 128
Polymyxin B	0.5	> 128
Apramycin	128	8
Kanamycin	64	2
Cefoperazone	64	16
Ceftazidime	2	0.125
Cefuroxim	64	0.5
Meropenem	0.5	< 0.125
Aztreonam	16	2
Sulbactam	1	< 0.125
Azithromycin	32	< 0.125
Amikacin	8	< 0.125
Levofloxacin	0.25	< 0.125
Vancomycin	> 256	< 0.125
Tetracycline	2	0.125
Tigecycline	1	< 0.125
Daptomycin	> 256	2

它的耐药率、感染率、分离率常年占据高位^[1]。由于该菌能够长时间存活于物体表面,因此在重症监护病房常引发呼吸机相关性肺炎,而在治疗过程中,它对常用的抗菌药物极易发生耐药^[7]。自2004年起,陆续在澳大利亚、马来西亚的临床中分离出对多黏菌素类药物高度耐药的鲍曼不动杆菌^[3,8]。这个现象为研究者敲响警钟,迫切需要深入研究鲍曼不动杆菌的耐药机制。

LPS 缺失是鲍曼不动杆菌对多黏菌素耐药的机制之一。Moffatt 等^[3]最早发现 LPS 缺失的鲍曼不动杆菌,并首次报道了临床分离得到的 LPS 缺失株 B0707-070。后续经临床分离得到的 LPS 缺失株鲜有报道,目前 LPS 缺失鲍曼不动杆菌的研究多是通过多黏菌素体外诱导而来。考虑到诱导突变可能引发其他未知基因的突变^[9],背景复杂且不稳定,本研究通过 CRISPR/Cas9 技术成功构建了 *lpxC* 基因全敲除菌。不同于鲍曼不动杆菌一般基因的敲除, *lpxC* 基因的敲除会改变抗生素的敏感性,导致 CRISPR/Cas9 系统质粒自带的抗性不能作为有效的筛选条件。考虑到鲍曼不动杆菌在 LPS 缺失后获得对多黏菌素的高度耐药性,本研究最

终采用多黏菌素 B 作为筛选条件,成功获得 *lpxC* 敲除株^[10]。

革兰阴性菌细胞膜外膜的磷脂 (phospholipids, PL) 和 LPS 成分维持着动态平衡,细菌可以通过调控 LPS 的动态变化适应不同的环境并提高对药物的耐受性,而一旦平衡被破坏将会对细菌产生致命威胁^[11,12]。鲍曼不动杆菌是目前发现失去 LPS 后仍能存活的 3 种细菌之一,鲍曼不动杆菌失去 LPS 后仍存在外膜,转录组学结果显示 LPS 的缺失造成磷脂转运体系 *mIaBCD* 和脂蛋白转运体系 *IoIBDE* 基因的转录水平显著上调,说明脂质在 LPS 缺失的菌株中扮演了关键调控作用^[13]。有文献报道,细菌外膜 LPS 缺失会导致内侧的 PL 翻转到外层,PL 弥补了外膜 LPS,但同时破坏细菌细胞壁的刚性结构和渗透性^[14],造成细胞膜通透性增加,疏水性物质更易进入细胞,疏水性物质的增加以及带有负电荷 LPS 的减少进一步造成膜电势降低^[15],这与本研究的结果一致。从电镜结果可以看出失去 LPS 的鲍曼不动杆菌失去了原有的杆状形态,变成了球状。细菌形态的改变说明细菌的细胞骨架成分发生了明显的改变,有文献报道长链肽聚糖的合成对 LPS 缺失鲍曼不动杆菌的生存至关重要,当青霉素结合蛋白 1A (penicillin binding protein 1A, PBP1A) 蛋白高表达时,鲍曼不动杆菌在失去 LPS 后无法存活,因为 PBP1A 可能对长链肽聚糖的合成具有抑制作用^[16]。在 LPS 缺失鲍曼不动杆菌中,聚 β -1,6-*N*-乙酰葡萄糖胺 (poly- β -1,6-*N*-acetylglucosamin, PNAG) 的合成与转运相关的 *pgaABCD* 基因转录水平明显增加^[17],说明细胞壁的肽聚糖的合成途径可能在维持 LPS 缺失鲍曼不动杆菌细胞膜稳定性中发挥着关键作用。至于细胞骨架成分究竟发生了怎样的变化还需进一步的研究。以上结果反映出 LPS 在维持细菌形态、细菌渗透压、膜电势起至关重要作用^[16]。*lpxC* 基因全敲除后,鲍曼不动杆菌对多黏菌素的敏感性明显下降。LPS 是多黏菌素的关键作用靶点,目前多黏菌素的作用机制仍然不明确,研究者认可度比较高的一种模型是多黏菌素二氨基丁酸残基

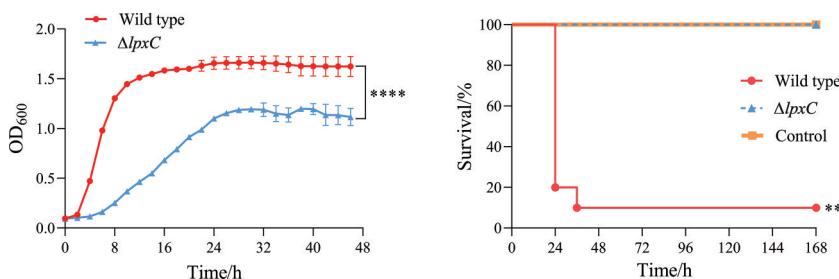


Figure 6 Growth curves of *A. baumannii* ATCC19606 before and after *lpxC* deletion (A), and survival curves of ICR mice following intraperitoneal infection with 2×10^6 CFU of the *A. baumannii* ATCC 19606 before and after *lpxC* deletion (B). $n = 10$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$

携带的正电荷与脂质 A 磷酸基团携带的负电荷产生静电作用, 导致 LPS 之间的二价阳离子被取代, 多黏菌素的疏水性结构进一步破坏细胞外膜的稳定性^[18,19]。当鲍曼不动杆菌失去 LPS 后, 外膜负电荷减少, 多黏菌素失去作用靶点 LPS, 导致多黏菌素敏感性下降。除多黏菌素外, 鲍曼不动杆菌对大多数的抗生素敏感性是上升的, 这可能与 *lpxC* 基因失活后, 菌株的膜通透性增加有关^[20]。

LPS 是革兰阴性菌的标志, 也是鲍曼不动杆菌毒力的主要来源之一。鲍曼不动杆菌可以通过修饰 LPS 的结构从而获得对多种抗生素的耐药性、逃避宿主免疫反应, 在宿主体内大量繁殖造成败血症甚至感染性休克^[21-23]。与野生株相比, LPS 缺失株在感染宿主中的生长速率、毒力显著下降的同时^[10,24], 更难产生生物膜、表面运动减弱、对多种消毒剂的敏感性增加限制了临床环境中的传播, 这可能是临床上鲜有报道 LPS 缺失株感染的原因^[25]。

此外, 针对 *lpxC* 为抗菌靶点是当前抗生素研究的热门方向, 尤其是 LpxC 抑制剂作为针对革兰阴性细菌的潜在治疗分子已被广泛研究^[26]。LpxC 抑制剂与铁螯合剂或硝酸镓的组合对鲍曼不动杆菌表现出协同活性, 与单独使用的化合物相比, 细菌数量显著减少^[27]。LpxC 抑制剂单独使用虽然不会对鲍曼不动杆菌产生很高的抗菌活性, 但是它会增加细菌对其他抗生素的敏感性^[20]。因此, 采用 LpxC 抑制剂联用已有抗生素治疗鲍曼不动杆菌引起的感染不仅可以提高疗效, 还能降低耐药发生率, 为未来的治疗策略开辟新的方向。

总之, 本研究通过 CRISPR/Cas9 系统成功构建了鲍曼不动杆菌 ATCC 19606 的 *lpxC* 全基因敲除株, 比较了表型上的变化, 为后续研究鲍曼不动杆菌独特的 LPS 缺失的膜结构、LPS 缺失后菌株膜组分、相关代偿性通路变化, 以及发现潜在药物靶点提供了物质条件。

作者贡献: 孙宗侗负责完成基因敲除、LPS 提取鉴定、药敏分析、测定膜通透性和膜电势、测定生长速率、整理数据及撰写文章; 孙琅指导研究思路、撰写及审阅文章; 游雪甫指导研究思路及审阅文章; 王秀坤负责完成动物实验及撰写文章; 张友文和李海滨指导实验操作与研究思路; 于洁和解晋茹指导实验操作; 杨信怡、李聪然、胡欣欣、聂彤颖、卢曦、庞晶和庞蓬勃指导研究思路; 侯磊负责动物饲养。

利益冲突: 本文作者声明无任何利益冲突。

References

- [1] Hu FP, Guo Y, Zhu DM, et al. CHINET surveillance of antimicrobial resistance among the bacterial isolates in 2021 [J].
- [2] Wang X, Quinn PJ. Lipopolysaccharide: biosynthetic pathway and structure modification [J]. *Prog Lipid Res*, 2010, 49: 97-107.
- [3] Moffatt JH, Harper M, Harrison P, et al. Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54: 4971-4977.
- [4] Wang Y, Wang Z, Chen Y, et al. A highly efficient CRISPR-Cas9-based genome engineering platform in *Acinetobacter baumannii* to understand the H₂O₂-sensing mechanism of OxyR [J]. *Cell Chem Biol*, 2019, 26: 1732-1742.e5.
- [5] Andes D, Van Ogtrop ML, Peng J, et al. *In vivo* pharmacodynamics of a new oxazolidinone (linezolid) [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, 46: 3484-3489.
- [6] Sreenivas K, Amarnath PV, Mallik A, et al. *In vitro* and *in vivo* antibacterial evaluation of DRF 8417, a new oxazolidinone [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2007, 60: 159-161.
- [7] Zhou H, Zhou JY, Yu YS. The interpretation of Chinese expert consensus for the diagnosis, treatment, prevention and control of *Acinetobacter Baumannii* infection [J]. *Chin J Evid Base Med (中国循证医学杂志)*, 2016, 16: 26-29.
- [8] Lean SS, Suhaili Z, Ismail S, et al. Prevalence and genetic characterization of carbapenem- and polymyxin-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from a Tertiary Hospital in Terengganu, Malaysia [J]. *ISRN Microbiol*, 2014, 2014: 953417.
- [9] Eisenreich W, Rudel T, Heesemann J, et al. Link between antibiotic persistence and antibiotic resistance in bacterial pathogens [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2022, 12: 900848.
- [10] Bojkovic J, Richie DL, Six DA, et al. Characterization of an *Acinetobacter baumannii lptD* deletion strain: permeability defects and response to inhibition of lipopolysaccharide and fatty acid biosynthesis [J]. *J Bacteriol*, 2015, 198: 731-741.
- [11] Klein G, Wiczorek A, Szuster M, et al. Checkpoints that regulate balanced biosynthesis of lipopolysaccharide and its essentiality in *Escherichia coli* [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 23: 189.
- [12] Klein G, Raina S. Regulated assembly of LPS, its structural alterations and cellular response to LPS defects [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20: 356.
- [13] Boll JM, Crofts AA, Peters K, et al. A penicillin-binding protein inhibits selection of colistin-resistant, lipooligosaccharide-deficient *Acinetobacter baumannii* [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113: E6228-E6237.
- [14] Guest RL, Rutherford ST, Silhavy TJ. Border control: regulating LPS biogenesis [J]. *Trends Microbiol*, 2021, 29: 334-345.
- [15] Alegun O, Pandeya A, Cui J, et al. Donnan potential across the outer membrane of Gram-negative bacteria and its effect on the permeability of antibiotics [J]. *Antibiotics (Basel)*, 2021, 10: 701.
- [16] Simpson BW, Niecekarz M, Pinedo V, et al. *Acinetobacter baumannii* can survive with an outer membrane lacking

- lipooligosaccharide due to structural support from elongasome peptidoglycan synthesis [J]. *mBio*, 2021, 12: e0309921.
- [17] Henry R, Vithanage N, Harrison P, et al. Colistin-resistant, lipopolysaccharide-deficient *Acinetobacter baumannii* responds to lipopolysaccharide loss through increased expression of genes involved in the synthesis and transport of lipoproteins, phospholipids, and poly- β -1,6-*N*-acetylglucosamine [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, 56: 59-69.
- [18] Qiao H, You XF, Li CR. Advances on mechanisms of action and resistance of polymyxins [J]. *Chin J Antibiot (中国抗生素杂志)*, 2019, 44: 770-777.
- [19] Velkov T, Roberts KD, Nation RL, et al. Pharmacology of polymyxins: new insights into an 'old' class of antibiotics [J]. *Future Microbiol*, 2013, 8: 711-724.
- [20] García-Quintanilla M, Caro-Vega JM, Pulido MR, et al. Inhibition of LpxC increases antibiotic susceptibility in *Acinetobacter baumannii* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2016, 60: 5076-5079.
- [21] Lee CR, Lee JH, Park M, et al. Biology of *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, antibiotic resistance mechanisms, and prospective treatment options [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017, 7: 55.
- [22] Harding CM, Hennon SW, Feldman MF. Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2018, 16: 91-102.
- [23] Wong D, Nielsen TB, Bonomo RA, et al. Clinical and pathophysiological overview of *Acinetobacter* infections: a century of challenges [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2017, 30: 409-447.
- [24] Snitkin ES, Zelazny AM, Gupta J, et al. Genomic insights into the fate of colistin resistance and *Acinetobacter baumannii* during patient treatment [J]. *Genome Res*, 2013, 23: 1155-1162.
- [25] Carretero-Ledesma M, García-Quintanilla M, Martín-Peña R, et al. Phenotypic changes associated with colistin resistance due to lipopolysaccharide loss in *Acinetobacter baumannii* [J]. *Virulence*, 2018, 9: 930-942.
- [26] Niu Z, Lei P, Wang Y, et al. Small molecule LpxC inhibitors against Gram-negative bacteria: advances and future perspectives [J]. *Eur J Med Chem*, 2023, 253: 115326.
- [27] Vinuesa V, Cruces R, Nonnoi F, et al. Inhibition of LpxC increases the activity of iron chelators and gallium nitrate in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* [J]. *Antibiotics (Basel)*, 2021, 10: 609.