

网络出版时间: 2025-06-30 15:21:51 网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.r.20250629.2053.002>

耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌荚膜特异性 解聚酶克隆表达及其相关功能研究

闫涛^{1,2}, 汪娜³, 王秋妍¹, 马成成¹, 滕宣¹, 余可雪¹, 葛宏华³, 刘周^{1,2}

(¹ 安徽医科大学第二附属医院检验科, 合肥 230601; ² 安徽省胸科医院临床检验中心, 合肥 230022;

³ 安徽大学物质科学与信息技术研究院健康科学与技术研究所, 合肥 230601)

摘要 目的 构建 K64 型荚膜特异性解聚酶重组蛋白 Dep44, 探讨其在对抗耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌 (CRKP) 感染中的应用效力。方法 分离表达解聚酶的噬菌体 (vB_Kpn_HF1013, GenBank: PP803128), 分析其基因序列, 筛选具有解聚酶活性的候选蛋白, 构建重组蛋白 Dep44 并验证其解聚酶活性。通过滴板法验证 Dep44 重组蛋白的敏感谱, 通过生物膜清除及血清杀菌实验评估 Dep44 抗菌活性。结果 噬菌体 vB_Kpn_HF1013 尾刺蛋白具有解聚酶活性, 能特异性裂解 K64 型 CRKP 荚膜。生物膜清除实验结果显示: 与对照组比较 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 与 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 剂量的 Dep44 重组蛋白均可有效破坏细菌生物膜。血清杀菌实验结果显示: Dep44 重组蛋白具有协同血清杀菌能力, 但这种作用需要依赖补体系统的存在, Dep44 本身不具备直接杀菌活性。结论 Dep44 重组蛋白能够特异性裂解 K64 型 CRKP 荚膜, 具备破坏生物膜及协同血清杀菌能力, 有望应用于 K64 型 CRKP 相关感染的控制及医疗器械表面生物膜的清除。

关键词 解聚酶; 噬菌体; 耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌; 荚膜; 生物膜; 重组蛋白

中图分类号 Q 939.48

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)07-1251-07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.07.013

耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌 (carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, CRKP) 对大部分临床常用抗菌药物具有耐药性, 给临床治疗带来巨大挑战^[1]。一项研究^[2]发现, 中国某地区 CRKP 血流感染患者的病死率从 2014 年的 38.0% 上升至 2019 年

上半年时的 74.0%, 提示患者病死率呈上升趋势。另有研究^[3]发现, 在老年患者中, CRKP 血流感染患者的病死率高达 48.3%, 显著高于敏感菌感染患者病死率 (5.8%)。CRKP 表面荚膜能够影响细菌耐药性与毒力, 与其致病性密切相关^[4]。K64 荚膜型是目前中国流行范围最广的 CRKP 类型, 已成为主要的公共卫生威胁之一^[5]。

噬菌体解聚酶能够特异性识别并降解细菌表面的荚膜多糖结构, 使细菌失去荚膜的保护而暴露于环境之中, 有助于噬菌体实现侵袭与增殖^[6-7]。相较于完整的噬菌体制剂, 解聚酶更不易诱导细菌产生抗性, 且研究^[8]表明, 解聚酶重组蛋白不易产生

2025-03-07 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金 (编号: 2408085MH233); 感染性疾病安徽省重点实验室资助课题 (编号: AHIDL-2412R); 安徽医科大学校基金资助项目 (编号: 2022xkj172)

作者简介: 闫涛, 女, 硕士研究生;

刘周, 男, 主任技师, 硕士生导师, 通信作者, E-mail: li-zhou0112@ahmu.edu.cn

staining of the ovaries showed that there were no significant differences in follicles at all levels, but the development was poor, the number of primordial follicles decreased, and the number of corpus luteum increased. Compared with the NS group, the serum P in the AM and AH groups decreased (all $P < 0.01$), and serum E2 in AM and AH groups decreased (all $P < 0.05$). **Conclusion** Pioglitazone affects HPOA by regulating pituitary function directly. However, the effect of acarbose on HPOA may be mediated through the gut-brain axis, and has no direct correlation with the ovarian structure.

Key words hypothalamic-pituitary-ovarian axis; acarbose; pioglitazone; rat; sex hormone; ovarian hormone

Fund programs Natural Science Research Project of Anhui Educational Committee (No. 2022AH051141); Doctoral Scientific Research Foundation of the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University (No. BSKY-2019002)

Corresponding author Deng Datong, E-mail: 13855134251@163.com

毒副作用,有望应用于抗感染治疗。因此,该研究旨在构建 K64 型 CRKP 荚膜特异性解聚酶重组蛋白,探究其相关功能,为基于解聚酶的治疗策略提供科学研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源 本研究所用的肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*, KPN) 及血清均来自于安徽医科大学第二附属医院检验科常规保存的样本,已征得安徽医科大学第二附属医院伦理委员会批准(批准号: KYLL20240067)。所有菌株均通过 Microflex LT 质谱仪进行鉴定。

1.1.2 主要试剂与仪器 病毒基因组 RNA/DNA 提取试剂盒[货号: 9766, 宝日医生物技术(北京)有限公司]; FastPure Gel DNA Extraction Mini Kit(货号: DC301-01, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司); 硫酸卡那霉素(货号: K8020, 北京索莱宝科技有限公司); KOD One™ PCR Master Mix[货号: KMM-201, 东洋纺(上海)生物科技有限公司]; 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(货号: ST098, 上海碧云天生物技术有限公司); LB 肉汤培养基及 DNA 分子量标准 Marker[货号: A507002-0250、B500353-0500, 生工生物工程(上海)股份有限公司]; T4 连接酶、FastDigest Nde I、FastDigest Xho I(货号: EL0011、FD0584、FD0694, 美国赛默飞世尔科技公司)。聚合酶链式反应仪(型号: QuantStudio™ 5, 美国赛默飞世尔科技公司); 生物安全柜(型号: HFsafe1200LC, 香港力康生物医疗科技控股有限公司); 低温超高压细胞破碎机(型号: JN-02C, 广州聚能生物科技有限公司); 电泳仪(型号: DYY-6C, 北京六一生物科技有限公司); CO₂ 培养箱(型号: HF 151, 香港力康生物医疗科技控股有限公司); 凝胶成像仪(型号: Tanon 1600, 上海天能生命科学有限公司); Microflex LT 质谱仪(型号: Microflex LT MALDI-TOF, 德国布鲁克公司)。

1.2 方法

1.2.1 细菌荚膜血清型检测 利用煮沸法获得细菌 DNA, 再使用 wzi 分型引物(正向: 5'-GTGC-CGCGAGCGCTTTCTATCTTGCTATTCC-3'; 反向: 5'-GAGAGCCACTGGTTCCAGAATTACCGC-3') 扩增菌株的 DNA。聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)产物由生工生物工程(上海)股份有限公司测序鉴定, 并通过在线平台(<https://bigsdb. Pas->

[teur.fr/klebsiella/](https://bigsdb. Pas-teur.fr/klebsiella/)) 分析测序结果, 鉴定 wzi 型和相应的荚膜血清型^[9]。

1.2.2 噬菌体 DNA 提取与测序分析 从医院污水中分离得到噬菌体液 vB_Kpn_HF1013 (GenBank: PP803128), 其宿主菌为 *K. pneumoniae* 1013 (K64 型 CRKP)。噬菌体液保存于实验室 4 °C 冰箱中; 细菌悬液中加入终浓度为 20% 的丙三醇, 保存于 -80 °C 冰箱中。在噬菌体悬液中加入终浓度 0.5 mol/L 的 NaCl 和 10% (w/v) 的聚乙二醇-8000 颠倒混匀后于 4 °C 冰箱中静置过夜。次日 14 000 r/min 离心 15 min, 收集噬菌体沉淀。参照病毒 RNA/DNA 提取试剂盒提供的实验方法提取噬菌体基因。使用 Illumina NovaSeq 平台对噬菌体基因组进行测序, 测序结果通过 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 预测开放阅读框(open reading frame, ORF)。依据噬菌体基因组信息筛选可能具有解聚酶活性的蛋白。

1.2.3 噬菌体解聚酶基因克隆 以 vB_Kpn_HF1013 的 DNA 为模板扩增目的基因(ORF44)。由于目标基因内部存在 Nde I 酶切位点, 因此选择重叠延伸 PCR 的方式进行克隆。引物如下: ORF44_F (5'-C CAATTCATATGACCATATCAAACGCCGAG-CCTGGGTCCG-3'); ORF44_1_R (5'-CACTATTA-ACGTACGGAGTACGACAGAATATATCAAAGTCATCC-3'); ORF44_2_F (5'-CGTACTCCGTACGTTAATAGT-GCTTACTCAGCATGGAAGCCG-3'); ORF44_R (5'-GGCCTCGAGTTACAGATATCCGAATGAAGGCTGGT-TATCGGAG-3')。使用 ORF44_F 和 ORF44_1_R 进行 PCR 扩增, 获得产物 ORF44-1; 使用 ORF44_2_F 和 ORF44_R 进行 PCR 扩增, 获得产物 ORF44-2。将 ORF44-1 和 ORF44-2 按照 1:2 或 2:1 的比例混合后, 以 ORF44_F 和 ORF44_R 作为引物进行 PCR 扩增, 获得 ORF44 全长序列。利用琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物的分子量及纯度, 回收 PCR 产物。

1.2.4 噬菌体解聚酶表达载体构建 回收的 PCR 产物用 Nde I 和 Xho I 进行酶切, 再使用 T4 连接酶将目的基因片段与 pET28a 质粒载体进行连接, 获得包含目的片段的重组质粒。将重组质粒转化入 DH5α 感受态细胞中, 并利用卡那霉素抗性平板分离成功转化的细菌。从平板上挑取单克隆菌株, 进行菌落 PCR 扩增, 并利用琼脂糖凝胶电泳验证菌株中是否包含目的基因。确认含有目的基因的菌株后, 将样本送至通用生物(安徽)股份有限公司进行测序验证, 若样本序列与目的基因序列一致, 则回收

样本质粒。

1.2.5 噬菌体解聚酶重组蛋白诱导表达 将构建好的表达质粒转化至感受态细胞 BL21 中,并涂布于含卡那霉素的 LB 固体平板,37 ℃ 培养过夜。挑取单个菌落接种于含卡那霉素的 LB 培养基中,37 ℃、220 r/min 振荡培养至菌液 600 nm 处吸光度达到 0.8~1.2 时,加入终浓度为 0.2 mmol/L 的异丙基-β-D-硫代半乳糖苷,继续培养 24 h。4 000 r/min、4 ℃ 离心 20 min 收集菌液沉淀,并使用低温超高压细胞破碎机破碎菌体,破碎产物 13 000 r/min、4 ℃ 离心 30 min,收集上清液用于蛋白纯化。

1.2.6 噬菌体解聚酶重组蛋白纯化 通过镍柱亲和层析纯化蛋白。将样本加入镍柱后,使用 Washing Buffer(20 mmol/L Tris-HCl,500 mmol/L NaCl,pH 8.0,20 mmol/L 咪唑)清洗 5 次镍柱,洗脱与镍柱结合能力差的杂蛋白。使用 Elution Buffer(20 mmol/L Tris-HCl,500 mmol/L NaCl,pH 8.0,200 mmol/L 咪唑)洗脱目的蛋白,用灭菌 EP 管收集洗脱液,并利用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis,SDS-PAGE)验证目的蛋白纯化情况。将不同剂量的 Dep44 蛋白(0.125~1.000 μg)滴加于涂布 *K. pneumoniae* 1013 菌悬液的 LB 固体平板上,同时滴加 10 μL 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline,PBS)及 vB_Kpn_HF1013(1×10^9 PFU/mL)用作对照,验证 Dep44 重组蛋白是否具有荚膜降解活性。目的蛋白的分子量大小为 86.4 ku,因此选择 50 ku 规格的超滤离心管对蛋白进行浓缩,最终获得纯化且浓缩的重组蛋白,并将其命名为 Dep44。

1.2.7 Dep44 解聚酶活性及敏感谱测定 用噬菌体 vB_Kpn_HF1013 与解聚酶 Dep44 进行滴板试验,以确定 Dep44 是否具有解聚酶活性以及其宿主范围是否与 vB_Kpn_HF1013 一致。将对数生长期的待测菌悬液均匀涂布于 LB 固体平板上,待菌液自然风干后,分别滴加 5 μL 的噬菌体 vB_Kpn_HF1013 悬液(1×10^9 PFU/mL)或 Dep44(200 μg/mL),置于 37 ℃ 恒温箱中过夜培养。通过观察平板上是否形成半透明晕圈评估解聚酶对目标菌株的作用效果。实验重复 3 次,记录实验结果。

1.2.8 Dep44 生物膜清除作用 为评估 Dep44 对细菌生物膜的破坏能力,将 *K. pneumoniae* 1013 菌悬液(1×10^6 CFU/mL)加至 96 孔板及 12 孔板中,并于 37 ℃ 温箱中静置孵育 48 h 以形成生物膜。随后,弃去细菌悬液,在每个孔中加入不同剂量的

Dep44(2、10 μg/mL),对照组加入等量的 PBS,继续孵育 4 h。用结晶紫染色法对生物膜进行染色,使用酶标仪在 570 nm 波长下测定吸光度,以评估不同浓度的 Dep44 对生物膜的破坏效果。利用吖啶橙染色液对生物膜进行荧光染色,通过荧光显微镜观察染色结果,以进一步佐证结晶紫染色的实验结果。每组实验重复 3 次。

1.2.9 Dep44 联合血清杀菌实验 为评估 Dep44 与血清的协同杀菌能力,从临床收集 8 例健康男性和 8 例健康女性的血清,并将其混合作为细菌培养体系的一部分。部分血清于 56 ℃ 水浴处理 30 min 以灭活补体。将对数生长期的 *K. pneumoniae* 1013 菌悬液稀释至 1×10^5 CFU/mL,取 25 μL 菌液分别与 75 μL PBS、血清或热灭活血清混合。向解聚酶处理组加入终浓度为 10 μg/mL 的 Dep44,其余组则加入等量的 PBS。混合后于 37 ℃ 孵育 3 h,通过测定细菌存活数评估 Dep44 是否具有协同血清杀菌作用。每组实验重复 3 次。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism 9.5.0 及 SPSS27.0 软件对数据进行统计分析。数据符合正态分布,两组定量数据均数比较采用 *t* 检验。单一变量影响下的不同组间均数差异比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 噬菌体基因组分析与解聚酶三维结构预测 噬菌体全基因组测序结果显示,噬菌体 vB_Kpn_HF1013 为环状 DNA 病毒,序列长度为 48 964 bp,根据蛋白注释结果推测尾刺蛋白(ORF44)可能具有解聚酶活性(图 1A)。依据尾刺蛋白序列预测其三维结构,结果显示,噬菌体尾刺蛋白包含 3 个可辨别的结构域: N 端结构域、中央 β 螺旋结构域和 C 端结构域(图 1B),与目前已解析的解聚酶结构高度相似。

2.2 Dep44 分子克隆及蛋白表达结果 将噬菌体尾刺蛋白基因在大肠杆菌中进行表达,通过对表达载体前后端序列测序分析及菌落 PCR 检测,证实载体中存在目的基因,且其基因序列与目标序列一致(图 2A、2B)。将纯化后的重组蛋白做 SDS-PAGE 分析,结果显示其分子量约为 86.0 ku,与预期分子量大小一致(图 2C)。将 Dep44 蛋白(0.125~1.000 μg)滴加于涂布 *K. pneumoniae* 1013 菌悬液的平板上,可以观察到滴板处出现半透明晕圈,证明重组蛋白具有解聚酶活性(图 2D)。

2.3 Dep44 重组蛋白敏感谱测定 本研究共收集了 8 株 K64 型 CRKP 和其他 6 种荚膜型菌株, 共计 21 株细菌样本。通过滴板法实验发现, Dep44 只在涂布 K64 型 CRKP 菌悬液的平板上形成半透明晕

圈, 其宿主范围与噬菌体 vB_Kpn_HF1013 的宿主范围一致, 表明 Dep44 对 K64 型 CRKP 具有高度特异的荚膜清除能力。见表 1。

2.4 Dep44 生物膜清除实验 通过结晶紫及吡啶

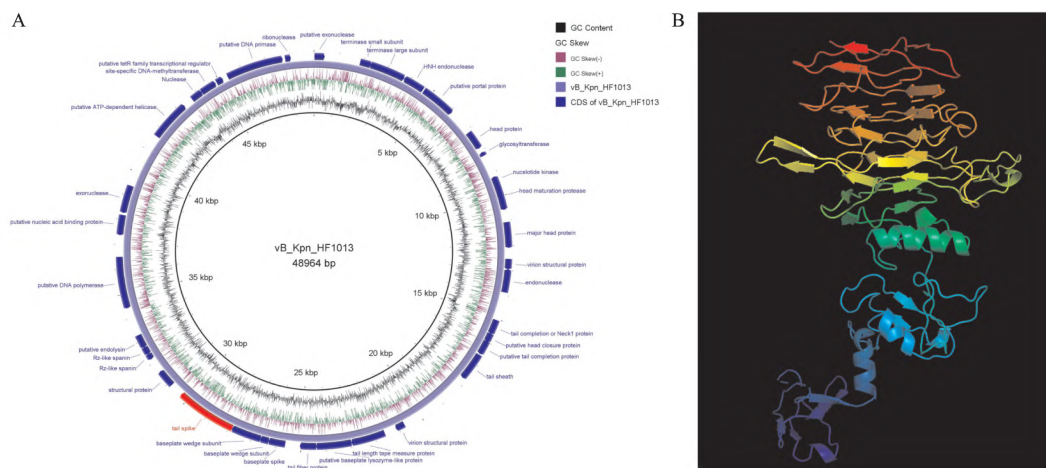


图 1 噬菌体基因组注释及解聚酶三维结构预测结果

Fig. 1 Phage genome annotation and three-dimensional structure prediction results of depolymerase

A: Phage genome annotation map; B: Three-dimensional structure prediction of depolymerase, where the red region represents the C-terminus of the protein and the blue region represents the N-terminus of the protein.

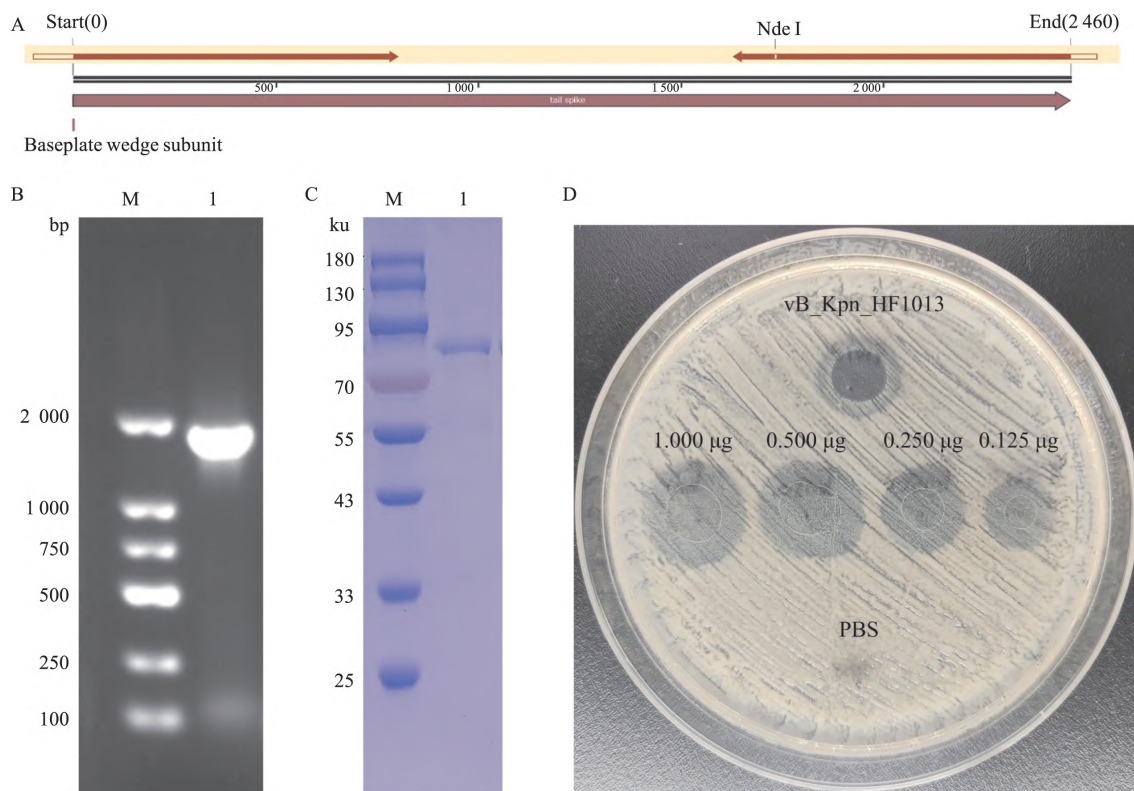


图 2 表达载体构建、重组蛋白纯化及活性鉴定

Fig. 2 Expression vector construction, recombinant protein purification and activity identification

A: Results of sequencing comparison between the front and back ends of expression vector; B: Results of colony PCR agarose gel electrophoresis (M: Marker, 1: PCR product); C: Results of SDS-PAGE analysis of recombinant protein (M: Marker, 1: protein purification product); D: Spot assay results of different concentrations of Dep44 (0.125 – 1.000 µg), PBS and vB_Kpn_HF1013 were used as controls.

橙染色法对 Dep44 的生物膜清除效果进行评估。结果表明,无论是 2 $\mu\text{g/mL}$ 还是 10 $\mu\text{g/mL}$ 剂量的 Dep44,均能够有效破坏细菌生物膜,具有剂量依赖性。见图 3。

2.5 Dep44 联合血清杀菌实验 联合解聚酶和血清处理组的细菌载量显著低于血清处理组 ($P < 0.0001$)。然而,当解聚酶单独作用或与热灭活血清共同作用于细菌时,细菌数量几乎无变化。这一结果

证明,Dep44 在血清中的抗菌活性依赖于血清中活性补体的存在,联合使用可以显著增强血清的杀菌效果,但 Dep44 本身并不具备杀菌活性。见图 4。

3 讨论

KPN 是一种兼性厌氧的革兰阴性菌,广泛存在于环境中,是引发严重社区和医院感染的主要病原体之一^[10]。由于抗生素的不规范使用,KPN 耐药率

表 1 vB_Kpn_HF1013 及 Dep44 敏感谱
Tab.1 Host range of vB_Kpn_HF1013 and Dep44

Capsular type	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strains	vB_Kpn_HF1013	Dep44
K1	KP4760 ,KP3530 ,KP4372	-	-
K2	KP0165 ,KP5409 ,KP7283	-	-
K16	KP0429	-	-
K19	KP9057 ,KP5380	-	-
K64	<i>K. pneumoniae</i> 1013 ,KP1136 ,KP0519 ,KP1062 ,KP8777 ,KP1797 ,KP1872 ,KP8699	+	+
K47	KP1109 ,KP1017 ,KP9398	-	-
K38	KP8696	-	-

- : no lysis; + : showed plaques or halos.

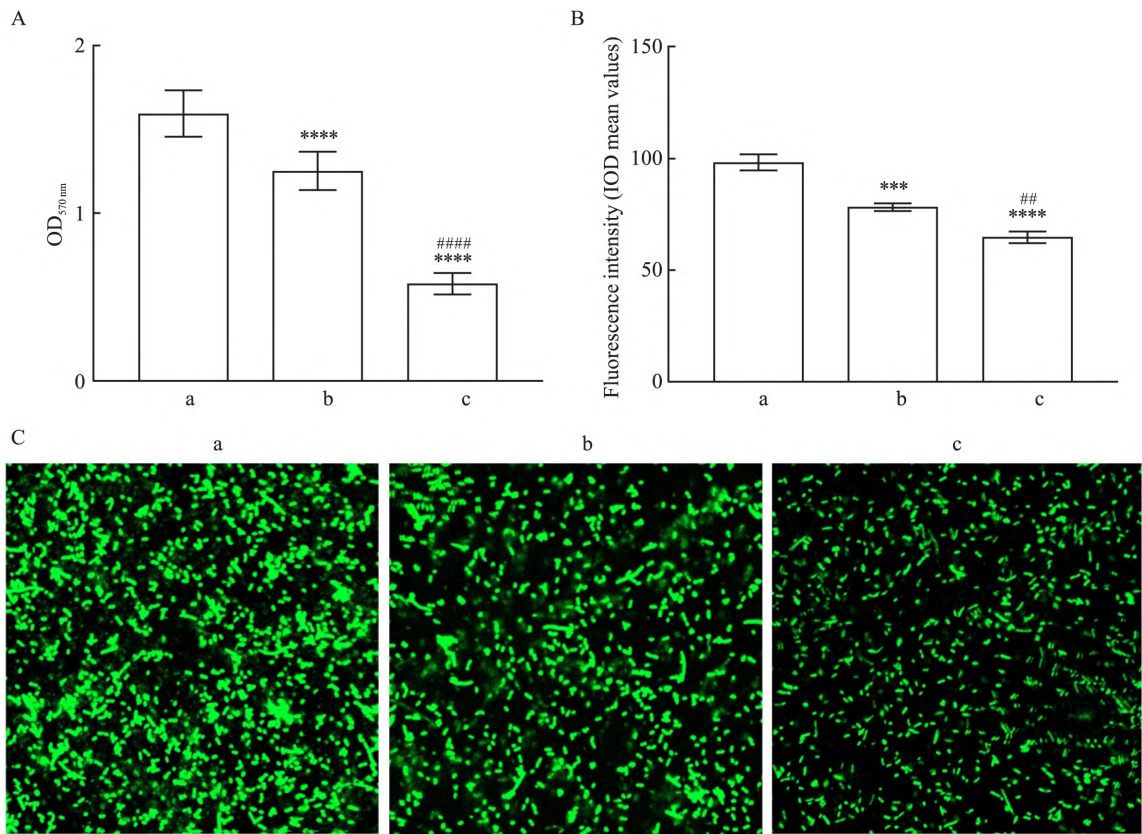


图 3 Dep44 生物膜清除作用

Fig.3 Dep44 biofilm disrupting effects

A: Comparison of crystal violet staining results; B: Comparison of average acridine orange fluorescence intensity; C: Acridine orange staining results at $\times 20$; a: Control group; b: 2 $\mu\text{g/mL}$ Dep44 group; c: 10 $\mu\text{g/mL}$ Dep44 group; *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ vs Control group; ## $P < 0.01$, #### $P < 0.0001$ vs 2 $\mu\text{g/mL}$ Dep44 group.

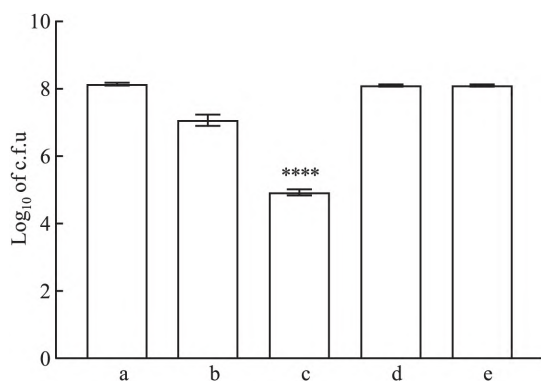


图4 解聚酶联合血清杀菌作用

Fig. 4 Bactericidal effect of depolymerase combined with serum

a: PBS group; b: Serum group; c: Serum + 10 µg/mL Dep44 group; d: 10 µg/mL Dep44 group; e: heat-inactivated serum + 10 µg/mL Dep44 group; **** $P < 0.0001$ vs Serum group.

逐渐提高,甚至出现对碳青霉烯类抗生素耐药的突变体,导致临床抗菌药物选择受限。CRKP 在全世界范围内的流行给临床治疗带来巨大挑战,已成为严重的公共卫生问题。近年来,研究^[11-12]表明,K64 型 CRKP 还可以通过获得携带毒力基因的质粒进化成碳青霉烯耐药的高毒力 KPN,这一变化使得 CRKP 感染的治疗变得更加困难。因此,开发针对 CRKP 的新型治疗手段尤为紧迫。

噬菌体解聚酶能够降解细菌的荚膜多糖结构,协助噬菌体附着并侵袭宿主细菌,实现裂解作用。已有研究^[8]表明,解聚酶荚膜降解功能可应用于细菌荚膜分型鉴定、生物膜清除及辅助抗感染治疗之中,开发解聚酶不仅有助于进一步理解其生物活性,也为解聚酶鸡尾酒疗法的应用提供了研究基础,有望扩大其作用范围并提升其治疗效果。因此,本研究旨在通过构建噬菌体解聚酶重组蛋白 Dep44,探索其针对 K64 型 CRKP 的抗菌效力,以期为临床治疗 CRKP 感染提供新的治疗思路。

本研究对噬菌体 vB_Kpn_HF1013 的尾刺蛋白进行分子克隆,构建解聚酶重组蛋白 Dep44。通过重组蛋白活性分析、生物膜清除及协同血清杀菌实验,评估该重组蛋白功能与应用潜力。结果发现,Dep44 具有 K64 型荚膜特异性,有望应用于 K64 型 CRKP 相关感染的精准治疗。细菌生物膜能够限制抗菌药物的渗透,同时还能帮助细菌逃避宿主免疫杀伤,容易导致受感染患者发生慢性和复发性感染^[13-14]。因此,控制细菌生物膜形成在感染的预防和治疗中尤为关键。本研究结果显示,Dep44 能够有效破坏 CRKP 生物膜,提示该解聚酶有望应用于

医疗器械表面生物膜清除以及生物膜相关性感染治疗之中。此外,通过血清联合杀菌实验发现,当 Dep44 与血清共同作用于 CRKP 时,能显著增强血清的杀菌效果,而当血清中的补体被灭活后,这种协同作用消失。这表明 Dep44 的杀菌效果依赖于补体系统的存在,联合使用可以显著提高血清杀菌效果。

综上所述,Dep44 可特异性降解 K64 型 CRKP 荚膜,在感染控制中展现出良好应用前景,未来可通过基因工程优化其结构,拓宽宿主谱并增强活性,为临床抗感染治疗提供新策略。

参考文献

- [1] Li S, Feng X, Li M, et al. *In vivo* adaptive antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae* during antibiotic therapy [J]. *Front Microbiol*, 2023, 14: 1159912. doi: 10.3389/fmicb.2023.1159912.
- [2] Li Y, Li J, Hu T, et al. Five-year change of prevalence and risk factors for infection and mortality of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection in a tertiary hospital in North China [J]. *Antimicrob Resist Infect Control*, 2020, 9(1): 79. doi: 10.1186/s13756-020-00728-3.
- [3] Chen Y, Chen Y, Liu P, et al. Risk factors and mortality for elderly patients with bloodstream infection of carbapenem resistance *Klebsiella pneumoniae*: a 10-year longitudinal study [J]. *BMC Geriatr*, 2022, 22(1): 573. doi: 10.1186/s12877-022-03275-1.
- [4] Pei N, Li Y, Liu C, et al. Large-scale genomic epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* identified clone divergence with hypervirulent plus antimicrobial-resistant characteristics causing within-ward strain transmissions [J]. *Microbiol Spectr*, 2022, 10(2): e0269821. doi: 10.1128/spectrum.02698-21.
- [5] Chu W, Hang X, Li X, et al. Bloodstream infections in patients with rectal colonization by carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: a prospective cohort study [J]. *Infect Drug Resist*, 2022, 15: 6051-63. doi: 10.2147/IDR.S383688.
- [6] Zhao D, Tang M, Ma Z, et al. Synergy of bacteriophage depolymerase with host immunity rescues sepsis mice infected with hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* of capsule type K2 [J]. *Virulence*, 2024, 15(1): 2415945. doi: 10.1080/21505594.2024.2415945.
- [7] Kim S H, Lee H, Park M K. Isolation, characterization, and application of a novel, lytic phage vB_SalA_KFSST3 with depolymerase for the control of *salmonella* and its biofilm on cantaloupe under cold temperature [J]. *Food Res Int*, 2023, 172: 113062. doi: 10.1016/j.foodres.2023.113062.
- [8] Wang H, Liu Y, Bai C, et al. Translating bacteriophage-derived depolymerases into antibacterial therapeutics: challenges and prospects [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2024, 14(1): 155-69. doi: 10.1016/j.apsb.2023.08.017.

- [9] Brisse S, Passet V, Haugaard A B, et al. Wzi gene sequencing, a rapid method for determination of capsular type for *Klebsiella* strains[J]. *J Clin Microbiol*, 2013, 51(12): 4073–8. doi: 10.1128/JCM.01924–13.
- [10] 隋成宇, 王家桢, 张之珺, 等. 6株肺炎克雷伯菌的耐药性及致病性分析[J]. *安徽医科大学学报*, 2024, 59(1): 71–6. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000–1492.2024.01.012.
- [10] Sui C Y, Wang J Z, Zhang Z J, et al. Analysis of drug resistance and pathogenicity of six strains of *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2024, 59(1): 71–6. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000–1492.2024.01.012.
- [11] Li L, Li S, Wei X, et al. Infection with carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: clinical, virulence and molecular epidemiological characteristics [J]. *Antimicrob Resist Infect Control*, 2023, 12(1): 124. doi: 10.1186/s13756–023–01331–y.
- [12] Liu L, Lou N, Liang Q, et al. Chasing the landscape for intrahospital transmission and evolution of hypervirulent carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Sci Bull (Beijing)*, 2023, 68(23): 3027–47. doi: 10.1016/j.scib.2023.10.038.
- [13] Sionov R V, Steinberg D. Targeting the holy triangle of quorum sensing, biofilm formation, and antibiotic resistance in pathogenic bacteria [J]. *Microorganisms*, 2022, 10(6): 1239. doi: 10.3390/microorganisms10061239.
- [14] Ge M, Jiang F, Lin H. Nanocatalytic medicine enabled next-generation therapeutics for bacterial infections [J]. *Mater Today Bio*, 2024, 29: 101255. doi: 10.1016/j.mtbio.2024.101255.

Cloning, expression, and functional analysis of capsule – specific depolymerase targeting carbapenem – resistant *Klebsiella pneumoniae*

Yan Tao^{1,2}, Wang Na³, Wang Qiuyan¹, Ma Chengcheng¹, Teng Xuan¹,
Yu Kexue¹, Ge Honghua³, Liu Zhou^{1,2}

(¹Dept of Clinical Laboratory, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601;

²Dept of Clinical Laboratory Center, Anhui Chest Hospital, Hefei 230022; ³Institute of Health Sciences and Technology, Institutes of Physical and Information Technology, Anhui University, Hefei 230601)

Abstract Objective To construct the K64 capsule depolymerase recombinant protein, Dep44, and investigate its potential application against carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKP) infections. **Methods** The depolymerase-encoding phage vB_Kpn_HF1013 (GenBank: PP803128) was isolated and genomically analyzed to screen for candidate depolymerases. The recombinant protein Dep44 was constructed and functionally verified for depolymerase activity. Dep44 sensitive range was validated and Dep44 antimicrobial activity was assessed by biofilm disruption and serum sterilization assays. **Results** The tail spike protein of phage vB_Kpn_HF1013 exhibited depolymerase activity and recombinant protein Dep44 specifically degraded K64 CRKP capsule. Biofilm eradication assays demonstrated that recombinant Dep44 at both 2 µg/mL and 10 µg/mL significantly disrupted bacterial biofilms relative to the control. Serum bactericidal assays showed that Dep44 exhibited synergistic activity with serum, dependent on the complement system, as Dep44 alone lacked bactericidal properties. **Conclusion** Dep44 effectively targets and degrades K64 CRKP capsule, disrupts biofilms, and enhances serum bactericidal activity, highlighting its potential for managing K64 CRKP infections and clearing biofilms from medical devices.

Key words depolymerase; phage; carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*; capsule; biofilm; recombinant protein

Fund programs Natural Science Foundation of Anhui Province (No. 2408085MH233); Project of Anhui Province Key Laboratory of Infectious Diseases, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University (No. AHIDL-2412R); Scientific Research Project of Anhui Medical University (No. 2022xkj172)

Corresponding author Liu Zhou, E-mail: liuzhou0112@ahmu.edu.cn