

## 纹带棒杆菌 SpaD 多克隆抗体的制备及其对纹带棒杆菌强产膜株生物膜形成能力的抑制作用

郭玢欣<sup>1</sup>, 温娟<sup>1</sup>, 刘慧<sup>1</sup>, 王俊瑞<sup>2,3</sup>

(1. 内蒙古医科大学第一临床医学院检验科, 内蒙古 呼和浩特 010050; 2. 内蒙古医科大学附属医院检验科, 内蒙古 呼和浩特 010050; 3. 内蒙古自治区临床病原微生物重点实验室, 内蒙古 呼和浩特 010050)

**[摘要]** **目的:** 制备纹带棒杆菌 (*C. striatum*) 生物膜形成相关蛋白菌毛组装蛋白 D (SpaD) 多克隆抗体, 分析其抑制 *C. striatum* 强产膜株生物膜形成的作用和潜在应用价值。**方法:** 选取 2011—2021 年内蒙古医科大学附属医院住院患者临床标本中分离的 117 株 *C. striatum* 为研究对象。采用结晶紫染色法检测各菌株生物膜形成能力, 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 法检测 SpaD 编码基因 *spaD* 在 *C. striatum* 强产膜株中的分布。将 *C. striatum* 强产膜株分为对照组和蛋白酶 K 组, 采用结晶紫染色法检测蛋白酶对 *C. striatum* 强产膜株生物膜形成能力的抑制作用。蛋白重组技术构建 *C. striatum* SpaD 重组蛋白, 实验分为对照组和 5 及 10 mg·L<sup>-1</sup> SpaD 重组蛋白组, 采用结晶紫染色法检测 SpaD 重组蛋白对 *C. striatum* 强产膜株生物膜形成能力的抑制作用。并通过动物免疫获得兔抗 SpaD 多克隆抗体实验分为对照组和 1:400、1:200 及 1:100 SpaD 多克隆抗体组, 采用结晶紫染色法检测 SpaD 多克隆抗体对 *C. striatum* 强产膜临床株生物膜形成能力的抑制作用。**结果:** 结晶紫染色法检测, 强产膜株、中等产膜株和弱产膜株占比分别为 47.9% (56/117)、29.0% (34/117) 及 23.1% (27/117)。RT-qPCR 法, 所有强产膜株均携带 *spaD* 基因。与对照组比较, 5 和 10 mg·L<sup>-1</sup> SpaD 重组蛋白组 13 株强产膜菌生物膜形成能力均明显降低 ( $P < 0.05$ )。与对照组比较, 1:100 和 1:200 倍数稀释 SpaD 兔多克隆抗体组中分别有 61.5% (8/13) 及 7.7% (1/13) 的强产膜菌株生物膜形成能力明显降低 ( $P < 0.05$ )。**结论:** *spaD* 基因在 *C. striatum* 强产膜株中呈高表达状态。SpaD 多克隆抗体可明显抑制 *C. striatum* 强产膜株生物膜形成, 其抑制效应呈浓度依赖性。SpaD 可作为防治 *C. striatum* 产膜株感染的新靶点。

**[关键词]** 纹带棒杆菌; 生物膜; 纹带棒杆菌毒力; 菌毛组装蛋白 D; 多克隆抗体

**[中图分类号]** R378.1 **[文献标志码]** A

## Preparation of SpaD polyclonal antibody against *Corynebacterium striatum* and its inhibitory effect on biofilm formation ability of *Corynebacterium striatum* strains with strong biofilm production abilities

GUO Binxin<sup>1</sup>, WEN Juan<sup>1</sup>, LIU Hui<sup>1</sup>, WANG Junrui<sup>2,3</sup>

(1. Department of Laboratory Medicine, First School of Clinical Medicine, Inner Mongolia Medical

[收稿日期] 2024-10-24 [录用日期] 2024-12-19

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (82260416); 内蒙古自治区科技厅科技计划项目 (2022YFSH0072)

[作者简介] 郭玢欣 (2000—), 女, 内蒙古自治区巴彦淖尔市人, 在读硕士研究生, 主要从事病原微生物致病和耐药机制方面的研究。

[通信作者] 王俊瑞, 主任医师, 硕士研究生导师 (E-mail: wangjunrui123@yeah.net)

© 《吉林大学学报(医学版)》编辑部, 开放获取遵循 CC BY-NC-ND 协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

University, Hohhot 010050, China; 2. Department of Laboratory Medicine, Affiliated Hospital, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010050, China; 3. Key Laboratory of Clinical Pathogenic Microorganisms of Inner Mongolia Autonomous Region, Hohhot 010050, China)

**ABSTRACT Objective:** To prepare the polyclonal antibody against pilus assembly protein (SpaD), a biofilm formation related protein of *Corynebacterium striatum* (*C. striatum*), and to evaluate its inhibitory effect on biofilm formation by strong biofilm-producing strains of *C. striatum* along with its potential application value. **Methods:** A total of 117 strains of *C. striatum* isolated from clinical specimens of hospitalized patients at Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University from 2011 to 2021 were selected as the study subjects. The biofilm formation ability of each strain was detected by crystal violet staining assay. Real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) method was used to examine the distribution of SpaD protein encoding gene *spaD* in strong biofilm-producing strains of *C. striatum*. The strong biofilm-producing strains of *C. striatum* were divided into control group, and proteinase K group, and crystal violet staining method was used to detect the inhibitory effect of proteinase K on the biofilm formation abilities of the strong biofilm-producing strains of *C. striatum*. The recombinant SpaD protein was constructed using protein recombination technology and was divided into control group and 5 and 10 mg·L<sup>-1</sup> SpaD recombinant protein groups, and crystal violet staining method was used to detect the inhibitory effect of SpaD recombinant protein. The rabbit anti-SpaD polyclonal antibodies were subsequently obtained through animal immunization, the experiment was divided into control group and 1:400, 1:200, and 1:100 SpaD polyclonal antibody groups, the inhibitory effect of SpaD polyclonal antibodies on biofilm and crystal violet staining method was used to detect abilities of strong biofilm-producing strains of *C. striatum*. **Results:** The Crystal violet staining results revealed that strong, moderate, and weak biofilm-producing strains accounted for 47.9% (56/117), 29.0% (34/117), and 23.1% (27/117), respectively. The RT-qPCR results showed that all the strong biofilm-producing strains carried the *spaD* gene. Compared with control group, the biofilm formation abilities of 13 strong biofilm-producing *C. striatum* strains in both 5 and 10 mg·L<sup>-1</sup> SpaD recombinant protein groups were significantly decreased ( $P < 0.05$ ). Compared with control group, the biofilm formation abilities in 61.5% (8/13) and 7.7% (1/13) of strong biofilm-producing *C. striatum* strains in 1:100 and 1:200 SpaD polyclonal antibody groups were decreased, respectively ( $P < 0.05$ ). **Conclusions:** The *spaD* gene is highly expressed in strong biofilm-producing clinical strains of *C. striatum*. Anti-SpaD polyclonal antibodies significantly inhibits biofilm formation in these clinical isolates, demonstrating an inhibitory effect as a manner of concentration-dependent. SpaD can be a promising novel target for therapeutic intervention against biofilm-producing *C. striatum* infections.

**KEYWORDS** *Corynebacterium striatum*; Biofilm formation; Virulence of *Corynebacterium striatum*; Pilus assembly protein D; Polyclonal antibodies

纹带棒杆菌 (*Corynebacterium striatum*, *C. striatum*) 是近年发现可引起多种类型感染性疾病的一种新兴细菌性病原体, 可广泛定植于人体鼻咽部和皮肤黏膜表面<sup>[1]</sup>。*C. striatum* 感染的易感因素包括免疫功能低下或缺乏、广谱抗生素暴露或使用侵入性医疗器械等<sup>[2-4]</sup>。*C. striatum* 临床分离株具有较强传播能力和多药耐药特点, 通常仅对万古霉素和利奈唑胺敏感<sup>[5-6]</sup>。*C. striatum* 常与其他常见细菌性病原共存或共感染<sup>[7]</sup>, 使其防治变得更加困

难<sup>[8]</sup>。研发抗 *C. striatum* 感染的新型药物变得尤为紧迫。研究<sup>[9]</sup>显示: 生物膜形成是 *C. striatum* 的重要致病因素, 其与 *C. striatum* 所致医院内感染和传播密切相关。SOUZA 等<sup>[10]</sup> 研究发现: 产生生物膜的 *C. striatum* 克隆株更容易定植于物体表面, 而造成其在医院环境内的广泛传播。ALIBI 等<sup>[11]</sup> 研究发现: 22 株 *C. striatum* 均可在非生物表面 (如聚苯乙烯、玻璃、硅胶和聚氯乙烯等) 形成生物膜, 对秀丽隐杆线虫具有明显毒性, 其毒力发挥可

能与菌株携带菌毛编码基因——分选酶介导的菌毛组装蛋白DEF编码基因(sortase-mediated pilus assembly DEF, *spaDEF*)有关。*C. striatum*临床株携带*spaDEF*基因的比例较高<sup>[12]</sup>,特别是强产膜菌株。上述研究结果均提示:*spaDEF*在介导*C. striatum*黏附、生物膜形成和感染过程中发挥重要作用,或可研发为防控*C. striatum*感染的潜在作用靶点。本研究通过分子克隆技术和动物免疫制备分选酶介导的菌毛组装蛋白D(sortase-mediated pilus assembly D, SpaD)重组蛋白及兔抗多克隆抗体,分析其对*C. striatum*强产膜临床株生物膜形成能力的抑制作用,为研发基于SpaD位点的抗感染靶向药物提供新的思路和数据支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验菌株

收集2011—2021年内蒙古医科大学附属医院住院患者不同感染部位分离的117株*C. striatum*,样本来源于脓液、伤口分泌物、支气管肺泡灌洗液、全血和尿液等。临床分离菌株常规在-80℃冷冻保存。本研究所有菌株均分离自临床住院患者常规送检标本,未额外进行标本采集和菌株分离。本研究经内蒙古医科大学伦理委员会批准(批理审批号:KD202202033)。

### 1.2 实验动物、主要试剂和仪器

免疫用新西兰大白兔2只,购自北京昌扬西山养殖场(实验动物生产许可证号:SCXK〔京〕2021-0008)。胰蛋白胨大豆肉汤培养基粉(tryptic soy broth, TSB)购自英国OXOID公司,哥伦比亚血平板购自天津金章公司,2×Taq PCR预混液(含染料)和蛋白酶K购自北京天根生化科技有限公司,低相对分子质量蛋白质Marker(相对分子质量14 400~97 400)购自上海升正生物技术有限公司,山羊抗兔IgG-HRP购自美国Jackson ImmunoResearch公司。基因扩增仪(型号:A300)购自杭州朗基科学仪器有限公司,多功能酶标仪(型号:SUNRISE)购自瑞士Tecan公司,恒温培养振荡器(型号:ZWY-200D)购自上海智城分析仪器制造有限公司,CO<sub>2</sub>培养箱(型号:371)购自美国Thermo Fisher公司,基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪(型号:EXS3000)购自重庆元汇吉生物技术股份有限公司。

### 1.3 菌种鉴定

从-80℃冰箱中取出待测菌株,室温下解冻

复苏,采用四区划线法接种于血琼脂平板上,于37℃、5% CO<sub>2</sub>条件下培养24~48 h。采用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪对单克隆培养物进行复核鉴定,使用Zybio EXS 2600 (V1.0.0.0)版本数据库进行谱图比对。

### 1.4 结晶紫染色法检测*C. striatum*生物膜形成能力

使用一次性接种环挑取单个菌落于5~6 mL TSB培养基中,置于35℃恒温摇床培养至对数生长期,于酶标仪600 nm波长下测量细菌浊度至吸光度(A)值=1.0。使用无菌生理盐水配置0.5麦氏单位菌悬液,用TSB培养基稀释100倍后,吸取200 μL稀释好的菌液于96孔细胞培养板内,设置空白对照孔(TSB培养基中不加菌液),每个样本设置3个重复孔。置于37℃培养箱孵育24 h。将96孔细胞培养板中的液体全部吸出弃去,加入200 μL磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)(pH 7.2)重复洗板3次,静置10~20 min后晾干。每孔加入200 μL 99%甲醇,静置15 min固定生物膜。弃去甲醇,待96孔细胞培养板再次晾干,加入200 μL 2%结晶紫染液染色5~10 min。弃去染液,每孔加入200 μL PBS缓冲液洗去未结合的结晶紫,重复洗板3次后室温放置晾干。每孔加入160 μL 33%冰醋酸,静置10 min以溶解生物膜。使用酶标仪于620 nm处检测各孔A值,以不加入菌液的空白孔A值为Ac。菌株生物膜形成能力判别标准:不产膜(A≤Ac),弱产膜(Ac<A≤2Ac),中产膜(2Ac<A≤4Ac),强产膜(A>4Ac)。

### 1.5 结晶紫染色法检测蛋白酶K对强产膜菌株生物膜形成能力的膜抑制作用

从“1.4”结果中筛选13株生物膜形成能力最强的*C. striatum*临床分离株,评估蛋白酶K对其生物膜的抑制作用。实验流程参考WEN等<sup>[13]</sup>的方法。按照“1.4”步骤进行生物膜形成实验,各菌液于96孔细胞培养板孵育24 h后,使用PBS缓冲液轻柔洗板3次,加入20 mg·L<sup>-1</sup>蛋白酶K,每孔200 μL,37℃继续孵育2 h。对照组各孔加入不含蛋白酶K的等量细菌悬液,调零孔加入200 μL TSB培养基。PBS缓冲液清洗孔板3次后,进行结晶紫染色,检测各孔A值,以A值代表各组菌株生物膜形成能力,A值降低代表生物膜受到抑制,计算生物膜抑制率。生物膜抑制率=(对照孔A值-实验孔A值)/(对照孔A值-调零孔

A 值)  $\times 100\%$  [14]。

### 1.6 实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR) 法检测强产膜菌株中 *spaD* 基因表达情况

以 56 株强产膜 *C. striatum* 为模板, 以 *spaD* 正反向引物进行扩增反应。分别挑取单个菌落于 40  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O 中, 于 100  $^{\circ}\text{C}$  下加热 8 min 进行 DNA 粗提取。*spaD* 引物 [13] 由北京中美泰和公司合成。反应体系: 正、反向引物各 0.5  $\mu\text{L}$ , 引物信息见表 1。2 $\times$  Taq PCR Mix (with dye) 10  $\mu\text{L}$ , 模板 5  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 4  $\mu\text{L}$ 。反应条件: 94  $^{\circ}\text{C}$ 、5 min, 94  $^{\circ}\text{C}$ 、10 s, 56  $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 共 35 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$ 、5 min。对扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测, 以相对分子质量 2 000 标准作为参照, 以目标条带出现判定为菌株表达目标基因。

表 1 *spaD* 基因 PCR 引物序列  
Tab. 1 PCR primer sequences of *spaD* gene

Gene	Primer	Sequence(5'-3')	Size(bp)
<i>spaD</i>	<i>spaD</i> -F	TCGGTGTTCCTTCGGGTATGC	267
	<i>spaD</i> -R	CCTGGAAGGGTGATTGGAC	

### 1.7 SpaD 重组蛋白和多克隆抗体制备及鉴定

1.7.1 SpaD 重组蛋白制备与鉴定 SpaD 重组蛋白制备以 *C. striatum* 临床株 (CS-1, 强产膜株) 基因序列 (GenBank 编号: SAMN35779365 CS-1) 为参考序列, 检索 SpaD 蛋白 (36~266 氨基酸) 编码基因片段序列, 委托北京华大蛋白质研发中心有限公司合成。合成的基因片段分别包含上游 *EcoR* I 限制性内切酶位点和下游 *Xho* I 限制性内切酶位点。*SpaD* 基因片段和表达质粒载体 (pET30a) 经内切酶处理后, 采用 T4 DNA 连接酶连接。连接产物转化至 BL21-Codon Plus (DE3) 感受态细胞。其中, 表达质粒载体 pET30a 中在目的基因 N 端和 C 端均含有组氨酸 (Histidine, His) 标签。N 端标签序列: CACCATCATCATCATCAT; C 端标签序列: CACCACCACCACCACCAC。通过蛋白小量表达和大量表达实验观察目的蛋白表达情况。蛋白小量表达: 从转化平板上挑取单克隆菌株接种于含相应抗性的 1.5 mL LB 液体培养基, 并于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、200  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  条件下振荡培养至 A (620) 值为 0.6~0.8。加入 0.5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷 (isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside, IPTG) 诱导 2 h。诱导后的菌液经离心处理后, 用

10  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris-HCl (pH 8.0) 溶液重悬沉淀, 加入等体积 2 $\times$  loading buffer 溶液, 100  $^{\circ}\text{C}$  加热 5 min 后进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 检测分析。蛋白大量表达: 将菌液培养至 A (620) 值为 0.6~0.8 后加入 IPTG (0.5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 于 37  $^{\circ}\text{C}$  下诱导 4 h, 离心后用 20~30 mL 10  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris-HCl (pH 8.0) 溶液将菌体沉淀吹散, 进行超声破碎离心处理。取 100  $\mu\text{L}$  超声后的菌悬液, 12 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 10 min。取 50  $\mu\text{L}$  上清至新 EP 管, 所得沉淀用 50  $\mu\text{L}$  10  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris-HCl (pH 8.0) 重悬, SDS-PAGE 检测超声后全菌、上清和沉淀中蛋白表达情况。收集上清样本电泳胶条中符合预期相对分子质量条带蛋白, 采用镍柱亲和纯化方法分离带有 His 标签的 SpaD 蛋白。使用 10  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris-HCl (pH 8.0) 溶液平衡镍柱, 将样品稀释后上样, 分别用含 15、60 和 300  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  咪唑的 10  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris-HCl 溶液从亲和镍柱上洗脱目的蛋白, 并采用 SDS-PAGE 方法检测蛋白纯化效果。切下带有目的蛋白条带的胶块, 将样品消化、酶解后, 采用液相色谱-串联质谱联用技术 (liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS) 对目的蛋白进行鉴定。通过 Mascot 软件对所得序列进行检索和分析以鉴定目标蛋白 SpaD。

1.7.2 SpaD 多克隆抗体制备与鉴定 对新西兰大白兔进行免疫, 免疫前于兔耳静脉取阴性血清 1~2 mL。取 400  $\mu\text{g}$  纯化的 SpaD 重组蛋白, 用生理盐水稀释至 200~500  $\mu\text{L}$ , 加入等体积弗氏佐剂混匀。采用免疫原背部皮下注射对兔进行初次免疫。免疫后, 每隔 2 周进行 1 次加强免疫, 共进行 3 次加强免疫。于末次免疫 1 周后经兔颈动脉收集 35 mL SpaD 多克隆抗体阳性血清。采用 HiTrap rProtein A FF 亲和层析柱进行抗体纯化。

### 1.8 ELISA 法检测 SpaD 多克隆抗体效价

使用碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液 (pH=9.6) 将抗原 (SpaD 重组蛋白) 稀释至 2  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  后, 加入 96 孔细胞培养板, 每孔 100  $\mu\text{L}$ , 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜后弃去包被液。用吐温-20 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline with Tween<sup>®</sup>-20, PBST) 洗涤 2 次, 每孔加入 200  $\mu\text{L}$  1% BSA 封闭液, 37  $^{\circ}\text{C}$  封闭 2 h。PBST 缓冲液洗涤 1 次, 将待测血清从 1:200 开始进行 2 倍梯度稀释 (阴性对照孔加入 1:200 阴性血清,

空白对照孔加入PBS缓冲液),每孔100  $\mu\text{L}$ ,37  $^{\circ}\text{C}$  孵育1 h后用PBST缓冲液洗涤3次。每孔加入100  $\mu\text{L}$  HRP标记山羊抗兔IgG二抗(1:20 000),37  $^{\circ}\text{C}$  孵育1 h,洗涤3次后每孔加入100  $\mu\text{L}$  TMB显色液显色5~15 min。每孔加入50  $\mu\text{L}$  2 mol $\cdot\text{L}^{-1}$  硫酸以终止反应。使用酶标仪在450 nm(检测波长)和630 nm(参比波长)下测定各孔A值,抗体效价为1/2最大A值所对应的稀释倍数。

### 1.9 结晶紫染色法检测 SpaD 重组蛋白和多克隆抗体对强产膜 *C. striatum* 临床株生物膜形成能力的抑制作用

1.9.1 SpaD重组蛋白对生物膜形成能力的抑制作用 挑取 *C. striatum* 单菌落于5~6 mL TSB培养基中,于35  $^{\circ}\text{C}$  振荡器上过夜孵育至对数生长期。96孔细胞培养板中分别加入5和10 mg $\cdot\text{L}^{-1}$  SpaD重组蛋白,设为5及10 mg $\cdot\text{L}^{-1}$  SpaD重组蛋白组,37  $^{\circ}\text{C}$  下孵育30 min后,弃去液体,PBS缓冲液洗孔3次以除去未结合的蛋白。配置0.5麦氏单位的细菌溶液(10<sup>8</sup> CFU $\cdot\text{mL}^{-1}$ ),稀释100倍至10<sup>6</sup> CFU $\cdot\text{mL}^{-1}$ ,每孔加入200  $\mu\text{L}$  混匀稀释后的细菌悬液。设置对照孔为不含SpaD蛋白的细菌悬液,调零孔为不含菌液的TSB培养基。37  $^{\circ}\text{C}$  孵育24 h后按照“1.4”步骤进行生物膜形成能力检测。使用酶标仪在波长620 nm处检测各孔A值,计算各孔生物膜抑制率。

1.9.2 SpaD多克隆抗体对生物膜形成能力的抑制作用 按照“1.4”所述方法配置细菌悬液,将稀释后的菌液加入96孔细胞培养板,每孔200  $\mu\text{L}$ 。分别加入1:400、1:200和1:100稀释的SpaD多克隆抗体,分别作为1:400、1:200和1:100

SpaD多克隆抗体组。设置对照孔为不含SpaD抗体的细菌悬液,调零孔为不含菌液的TSB培养基。每组实验平行设置3个复孔。使用酶标仪在波长620 nm处检测各孔A值,计算各孔生物膜抑制率。

### 1.10 统计学分析

采用GraphPad Prism 9.5.1统计软件进行统计学分析。*C. striatum*各菌株处理后A值、生物膜抑制率和SpaD抗体效价均符合正态分布,以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间样本均数比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用独立样本 $t$ 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 *C. striatum* 临床株生物膜形成能力

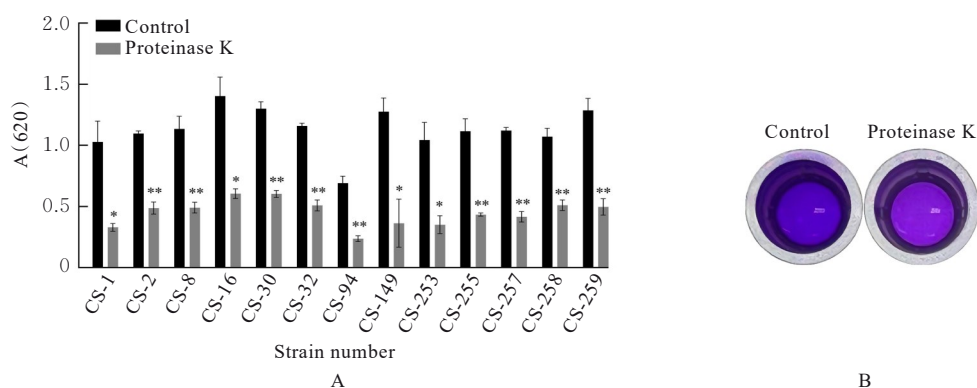
117株 *C. striatum* 均能在聚苯乙烯表面形成生物被膜,菌株间产膜能力存在差异。其中,强产膜株有56株,占比47.9%;中等产膜株有34株,占比29.0%;弱产膜株有27株,占比23.1%。

### 2.2 蛋白酶K对 *C. striatum* 生物膜形成能力的抑制作用

在筛选出的13株最强产膜菌株中,经蛋白酶K(20 mg $\cdot\text{L}^{-1}$ )处理后, *C. striatum* 强产膜株的生物膜形成能力均受到抑制。与对照组比较,蛋白酶组K各菌株A值明显降低( $P<0.05$ )。各菌株生物膜抑制率达52%~72%,抑制效果存在菌株异质性。见图1A。与对照组比较,蛋白酶K处理组生物膜结晶紫染色明显变浅。见图1B。

### 2.3 SpaD基因在 *C. striatum* 临床株中的分布

RT-qPCR法检测结果显示:56株(100%) *C. striatum* 强产膜株均携带 *spaD* 基因。



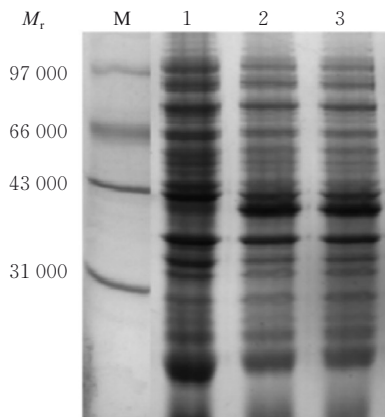
A: Histogram(\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$  compared with control group); B: Morphology of *C. striatum* (Crystal violet).

图1 *C. striatum* 生物膜形成能力

Fig. 1 Biofilm-forming abilities of *C. striatum*

### 2.4 SpaD 重组蛋白的克隆表达、纯化和鉴定

经测序验证, 编码 *SpaD* 基因片段成功克隆到 pET-30a 中。重组表达载体 pET-30a-*SpaD* 转化大肠杆菌感受态后可高效表达。见图 2 和 3。纯化后的重组蛋白经 LC-MS/MS 法鉴定, 证实为 *SpaD* 蛋白。纯化蛋白与数据库中 *SpaD* 蛋白高度一致, 蛋白得分为 9 700, 多肽的蛋白覆盖率为 44%。根据目标蛋白编码基因序列进行测算, 预期相对分子质量为 31 000。实验所得纯化蛋白相对分子质量与预期相对分子质量略有偏差, 可能与蛋白表达过程中发生蛋白修饰有关。见图 4 和表 1。



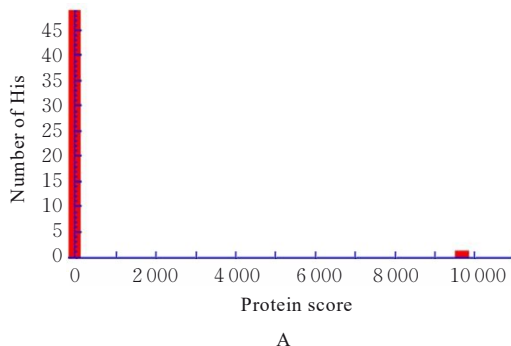
M: Marker; Lane 1: Control group; Lane 2, 3: IPTG-induced group.

图 2 SpaD 重组蛋白小量表达 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 2 SDS-PAGE electrophoregram of small-scale expression of *SpaD* recombinant protein

### 2.5 SpaD 多克隆抗体效价

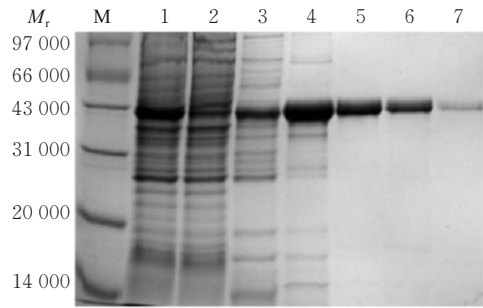
*SpaD* 重组蛋白免疫新西兰大白兔后, 成功获得 *SpaD* 多克隆抗体。经纯化后对抗体进行效价检测, 在双波长 (450 和 630 nm) 条件下检测 A 值, 抗体效价达到 1 : 102 400。见图 5。



A: Histogram of mascot score; B: Protein sequence alignment analysis (Matched peptides were shown in red bold).

图 4 SpaD 重组蛋白质谱鉴定结果

Fig. 4 Identification results of *SpaD* recombinant protein detected by mass spectrometry



M: Marker; Lane 1: Primary protein sample; Lane 2: Flow-through fraction; Lane 3: 15 mmol·L<sup>-1</sup> imidazole eluate; Lane 4: 60 mmol·L<sup>-1</sup> imidazole eluate; Lane 5-7: 300 mmol·L<sup>-1</sup> imidazole eluate.

图 3 SpaD 重组蛋白大量表达纯化后 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 3 SDS-PAGE electrophoregram of large-scale expression of *SpaD* recombinant protein after purification

### 2.6 SpaD 重组蛋白和多克隆抗体对各菌株生物膜形成能力的抑制作用

经 *SpaD* 重组蛋白处理 30 min 后, 与对照组比较, 5 和 10 mg·L<sup>-1</sup> *SpaD* 重组蛋白组中 13 株强产膜菌株生物膜形成能力均明显降低 ( $P < 0.05$ )。见图 6A。5 mg·L<sup>-1</sup> *SpaD* 重组蛋白组各菌株生物膜抑制率为 57%~80%, 10 mg·L<sup>-1</sup> *SpaD* 重组蛋白组各菌株生物膜抑制率为 62%~83%。*SpaD* 重组蛋白对不同菌株生物膜的抑制效应存在差异。与对照组比较, 5 和 10 mg·L<sup>-1</sup> *SpaD* 重组蛋白组生物膜结晶紫染色变浅。与 5 mg·L<sup>-1</sup> *SpaD* 重组蛋白组比较, 10 mg·L<sup>-1</sup> *SpaD* 重组蛋白组结晶紫染色更浅。见图 6B。

1 : 400、1 : 200 和 1 : 100 *SpaD* 多克隆抗体组对 13 株 *C. striatum* 菌株的生物膜抑制率为 7.3%~74.9%, 各菌株生物膜抑制程度间存在差异。与对

```

1 VEKNSLTIRS VTVAAVAGLS LGIAAPGATA VAQDSAIKKK QPAQPCNIDF
51 TRKGSLLTFK KEGAESSERA TGEKNTWVPG TPLSDVTFKI TRLMFDLEKQ
101 DWTKPPKTA A DVEDTDKIDE TRQVTTTDEG KAEFTDLDLG IYVVEEKAP
151 DGIVTGAPFI VSIPWVHKAS DANNYDVAAY PKNTETKVDK TVKDADKNIQ
201 DEYTYTINAD APTVGDGKEL TAFRFEDELD ERLDPQKVTH VKAGEIELVD
251 GDYEVKTPAE NNNKLVWTLT AQLGKLVTPG AKMSLTPEVK RRAVGDKTEL
301 KNHADVIFNN PNTGNEVVK TNEVVTYHKK LKVVKDGEE KGVLEKGAEP
351 QLYQCSAAE LGGPLTVNG TDKVTTGNDG TFTIDGLHVT DFEKNKDVAP
401 ATKKFLKET KAPAGYAKLD KPVEINFTRA EIGHTGEGDD APTLVADVEN
451 VKQDTKLPN TGGMGVILLA AIGAAIWAAG ANFARRGAEN
    
```

B

表1 SpaD重组蛋白性质和可信度

Tab. 1 Characteristics and confidences of SpaD recombinant protein

Protein	Molecular weight	Isoelectric point	Score	Number of matching sequence	Protein sequence coverage( $\eta/\%$ )
SpaD	52 593	5.54	9 700	36 (35)	44

对照组比较, 1:100 SpaD多克隆抗体组中有61.5% (8/13) 菌株生物膜形成能力明显降低 ( $P<0.05$ ), 1:200 SpaD多克隆抗体组中有7.7% (1/13) 菌株生物膜形成能力明显降低 ( $P<0.05$ )。对照组与1:400 SpaD多克隆抗体组各菌株生物膜形成能力比较差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。见图7A。与对照组比较, 1:400、1:200和1:100 SpaD多克隆抗体组生物膜结晶紫染色变浅, 1:100 SpaD

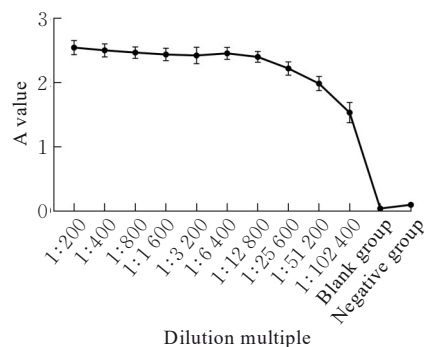
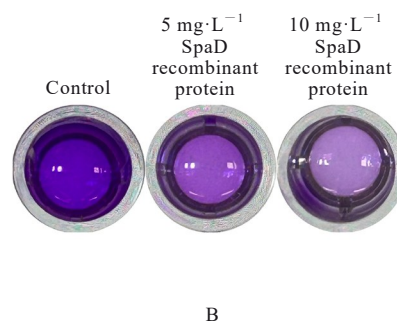
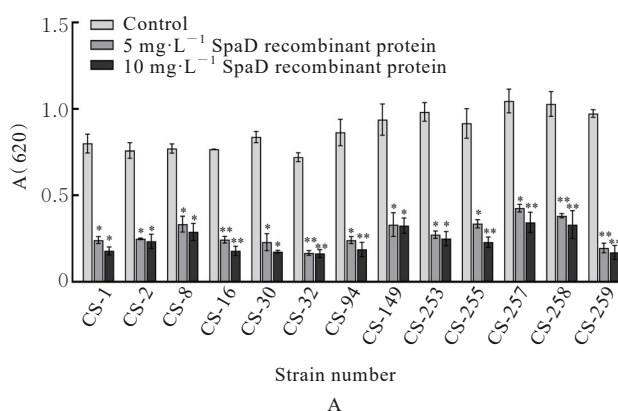


图5 兔抗SpaD多克隆抗体效价

Fig. 5 Titers of rabbit anti-SpaD polyclonal antibody

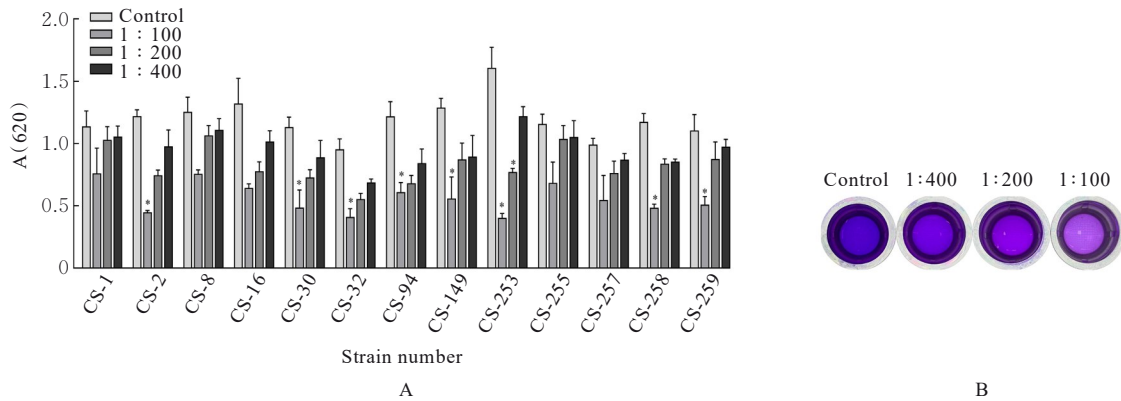
多克隆抗体组的菌株染色最浅, 生物膜形成能力最低。CS-1菌株处理前和1:400、1:200及1:100倍数稀释后SpaD多克隆抗体组生物膜结晶紫染色结果见图7B。

A: Histogram (\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  compared with control group); B: Morphology of *C. striatum* (Crystal violet).图6 SpaD重组蛋白对各组*C. striatum*强产膜菌株生物膜形成能力的抑制作用Fig. 6 Inhibitory effect of SpaD recombinant protein on biofilm-forming ability of strong biofilm-producing strains of *C. striatum* in various groups

### 3 讨论

近年, 关于*C. striatum*感染报道的数量呈明显增加趋势, 国内报道大多数以下呼吸道感染为主, 且分离菌株普遍呈现多重耐药特性<sup>[13, 15]</sup>。目前针对多重耐药*C. striatum*感染治疗的有效药物有限, 仅万古霉素和利奈唑胺仍保持高敏感性<sup>[16-17]</sup>, 且耐药株常表现出更强的生物膜形成能力, 给临床抗感染治疗带来巨大挑战。研究<sup>[18]</sup>显示:*C. striatum*可对常用消毒剂产生耐受性; 与游离态菌株比较, 生物膜态菌株耐受性更强, 这一特征有助于*C. striatum*产膜株在医院环境中长期存在和人际传播, 凸显了加强产膜株感染防控的重要意义。

目前关于*C. striatum*致病性的研究多聚焦于其生物膜形成能力, 因其与院内传播和致病性有密切关联。但关于*C. striatum*生物膜的防治策略研究较为匮乏。研究<sup>[19-21]</sup>显示: 细胞外基质是介导细菌生物膜形成的重要因素, 为维持细菌的完整性和存活提供有力支持。现有针对细菌细胞外基质成分的生物膜降解方法主要靶向其主要成分: 胞外多糖 (extracellular polymeric substances, EPS)、胞外DNA (extracellular DNA, eDNA) 和胞外蛋白质<sup>[22]</sup>。本课题组前期研究<sup>[13]</sup>报道了细胞外基质降解剂 (蛋白酶K、分散素B和DNase I) 对多重耐药*C. striatum*分离株具有明显的生物膜降解活性,



A: Histogram (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  compared with control group); B: Morphology of *C. striatum* (Crystal violet).

图7 兔抗 SpaD 多克隆抗体对各组 *C. striatum* 强产膜株生物膜形成能力的抑制作用

Fig. 7 Inhibitory effects of rabbit anti-SpaD polyclonal antibody on biofilm-forming abilities of strong biofilm-producing strains of *C. striatum* in various groups

以蛋白酶抑制剂活性最强,提示某些菌体蛋白或分泌蛋白在介导 *C. striatum* 生物膜形成中发挥重要作用。本研究进一步选择 *C. striatum* 强产膜株为研究对象,观察蛋白酶K对其生物膜形成能力的影响。结果显示:蛋白酶K可明显抑制 *C. striatum* 强产膜株生物膜形成,提示 *C. striatum* 某些胞外蛋白在介导其生物膜形成中起关键作用。

在 *C. striatum* 生物膜形成机制研究中,菌毛编码相关基因的分布及其与黏附和生物膜形成相关的报道<sup>[11-12]</sup>较多。菌毛是棒杆菌属细菌的一个重要毒力因子,可介导菌体与有生命或无生命物体表面之间发生黏附和定植。SpaA型菌毛最早在白喉棒状杆菌中被发现,其结构特征为三聚体结构,分别由主干(SpaA)、基底部(SpaB)和顶端(SpaC)构成。SpaA型菌毛可与人咽上皮细胞发生有效结合。此外,白喉棒杆菌还可携带另外两种菌毛,即SpaD型和SpaH型,二者缺失同样会降低白喉棒杆菌与人呼吸道上皮细胞之间的黏附能力<sup>[23]</sup>。本研究表明:所有强产膜菌株均携带 *spaD* 基因,这与 QIU 等<sup>[24]</sup>报道的临床株 *spaD/spaE* 基因高检出率(98%)相符。然而,关于 *spaD* 基因在 *C. striatum* 中的确切作用仍有待阐明。

本研究采用蛋白重组技术构建 SpaD 重组蛋白并制备兔抗 SpaD 多克隆抗体,检测二者对 *C. striatum* 生物膜形成能力的抑制作用,结果显示:5和10 mg·L<sup>-1</sup> SpaD 重组蛋白均可明显抑制强产膜株的生物膜形成能力,提示 SpaD 是 *C. striatum* 产膜株与无生命介质发生黏附的重要靶点。本研究也观察到 SpaD 多克隆抗体对 *C. striatum* 生物膜形

成能力的抑制作用,但生物膜抑制作用呈现明显的菌株间差异。类似的结果也被报道存在于白喉棒杆菌中<sup>[23]</sup>,针对 SpaB 和 SpaC 的多克隆抗体可明显减弱白喉棒杆菌与人上皮细胞之间的黏附。细菌生物膜形成是一个多因素参与的复杂调控过程,*C. striatum* 生物膜形成同样受 SpaD 之外其他因素的影响。SpaD 与其他因素如何协同调控 *C. striatum* 生物膜形成及其机制有待进一步探讨。

综上所述,鉴于 *spaD* 基因在 *C. striatum* 临床株中的广泛分布以及本研究发现的 SpaD 多克隆抗体对 *C. striatum* 强产膜株生物膜形成能力的抑制作用,SpaD 蛋白具有研发为一种抗 *C. striatum* 感染有效靶点的潜力,特别对于强产膜株所致慢性感染。SpaD 蛋白介导 *C. striatum* 与宿主细胞黏附、侵袭和致病性产生的具体机制仍需要进一步探讨。

#### 利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

#### 作者贡献声明:

郭玢欣和温娟参与实验实施及论文撰写,刘慧参与数据分析,王俊瑞参与实验设计和论文审阅。

#### [参考文献]

- [1] QIN L, SAKAI Y, BAO R, et al. Characteristics of multidrug-resistant *Corynebacterium spp.* isolated from blood cultures of hospitalized patients in Japan[J]. *Jpn J Infect Dis*, 2017, 70(2): 152-157.
- [2] SILVA-SANTANA G, SILVA C M F, OLIVELLA J G B, et al. Worldwide survey of *Corynebacterium striatum* increasingly associated with human invasive infections,

- nosocomial outbreak, and antimicrobial multidrug-resistance, 1976-2020 [J]. *Arch Microbiol*, 2021, 203(5): 1863-1880.
- [3] VERROKEN A, BAURAING C, DEPLANO A, et al. Epidemiological investigation of a nosocomial outbreak of multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* at one Belgian university hospital [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2014, 20(1): 44-50.
- [4] WANG J R, WANG Y Y, DU X L, et al. Rapid transmission of multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* among susceptible patients in a tertiary hospital in China [J]. *J Infect Dev Ctries*, 2016, 10(12): 1299-1305.
- [5] SUH J W, JU Y, LEE C K, et al. Molecular epidemiology and clinical significance of *Corynebacterium striatum* isolated from clinical specimens [J]. *Infect Drug Resist*, 2019, 12: 161-171.
- [6] BAIO P V, MOTA H F, FREITAS A D, et al. Clonal multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* within a nosocomial environment, Rio de Janeiro, Brazil [J]. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2013, 108(1): 23-29.
- [7] 王艳艳, 张健, 吕莹莹, 等. 内蒙古地区纹带棒杆菌临床分离株的耐药性及协同溶血活性 [J]. *国际流行病学传染病学杂志*, 2021(5): 368-373.
- [8] WANG X, ZHOU H, DU P, et al. Genomic epidemiology of *Corynebacterium striatum* from three regions of China: an emerging national nosocomial epidemic [J]. *J Hosp Infect*, 2021, 110: 67-75.
- [9] RAMOS J N, SOUZA C, FARIA Y V, et al. Bloodstream and catheter-related infections due to different clones of multidrug-resistant and biofilm producer *Corynebacterium striatum* [J]. *BMC Infect Dis*, 2019, 19(1): 672.
- [10] SOUZA C D, FARIA Y V, SANT'ANNA L D E O, et al. Biofilm production by multiresistant *Corynebacterium striatum* associated with nosocomial outbreak [J]. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2015, 110(2): 242-248.
- [11] ALIBI S, RAMOS-VIVAS J, SELMA W, et al. Virulence of clinically relevant multidrug resistant *Corynebacterium striatum* strains and their ability to adhere to human epithelial cells and inert surfaces [J]. *Microb Pathog*, 2021, 155: 104887.
- [12] SANGAL V, MARRS E C L, NELSON A, et al. Phylogenomic analyses of multidrug resistant *Corynebacterium striatum* strains isolated from patients in a tertiary care hospital in the UK [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2024, 43(7): 1495-1501.
- [13] WEN J, WANG Z H, DU X L, et al. Antibiofilm effects of extracellular matrix degradative agents on the biofilm of different strains of multi-drug resistant *Corynebacterium striatum* [J]. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 2022, 21(1): 53.
- [14] MIRZAEI B, BABAEI R, HAGHSHENAS M R, et al. PIA and rSesC mixture arisen antibodies could inhibit the biofilm-formation in *Staphylococcus aureus* [J]. *Rep Biochem Mol Biol*, 2021, 10(1): 1-12.
- [15] WANG X B, ZHOU H J, CHEN D K, et al. Whole-genome sequencing reveals a prolonged and persistent intrahospital transmission of *Corynebacterium striatum*, an emerging multidrug-resistant pathogen [J]. *J Clin Microbiol*, 2019, 57(9): e00683-19.
- [16] 杨佩红, 徐修礼, 周柯, 等. 纹带棒杆菌的临床分布及耐药性分析 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2017, 27(15): 3415-3418, 3426.
- [17] 王俊瑞, 杜小莉, 崔晶花, 等. 住院患者分离纹带棒杆菌耐药性及同源性分析 [J]. *中华医学杂志*, 2014, 94(32): 2501-2505.
- [18] SOUZA C, MOTA H F, FARIA Y V, et al. Resistance to antiseptics and disinfectants of planktonic and biofilm-associated forms of *Corynebacterium striatum* [J]. *Microb Drug Resist*, 2020, 26(12): 1546-1558.
- [19] BRESLAWEK A P, WANG S C, LI C, et al. Anionic amino acids support hydrolysis of poly- $\beta$ -(1,6)-N-acetylglucosamine exopolysaccharides by the biofilm dispersing glycosidase Dispersin B [J]. *J Biol Chem*, 2021, 296: 100203.
- [20] BRANDA S S, CHU F, KEARNS D B, et al. A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix [J]. *Mol Microbiol*, 2006, 59(4): 1229-1238.
- [21] KARYGIANNI L, REN Z, KOO H, et al. Biofilm matrixome: extracellular components in structured microbial communities [J]. *Trends Microbiol*, 2020, 28(8): 668-681.
- [22] FLEMMING H C, VAN HULLEBUSCH E D, NEU T R, et al. The biofilm matrix: multitasking in a shared space [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2023, 21(2): 70-86.
- [23] MANDLIK A, SWIERCZYNSKI A, DAS A, et al. *Corynebacterium diphtheriae* employs specific minor pilins to target human pharyngeal epithelial cells [J]. *Mol Microbiol*, 2007, 64(1): 111-124.
- [24] QIU J H, SHI Y L, ZHAO F, et al. The pan-genomic analysis of *Corynebacterium striatum* revealed its genetic characteristics as an emerging multidrug-resistant pathogen [J]. *Evol Bioinform Online*, 2023, 19: 11769343231191481.