



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105287622 A

(43) 申请公布日 2016. 02. 03

(21) 申请号 201510697439. 9

A61P 31/04(2006. 01)

(22) 申请日 2015. 10. 23

(71) 申请人 陕西省微生物研究所

地址 710032 陕西省西安市西影路 8 号

申请人 中国科学院生物物理研究所

(72) 发明人 万一 陈畅 高磊 张玉英

乔新华 王琰

(74) 专利代理机构 西安智大知识产权代理事务

所 61215

代理人 刘国智

(51) Int. Cl.

A61K 33/00(2006. 01)

A61K 33/26(2006. 01)

A61K 45/00(2006. 01)

权利要求书1页 说明书7页 附图4页

(54) 发明名称

NO 累积降低铜绿假单胞菌侵袭力的方法、靶点及应用

(57) 摘要

本发明公开了 NO 累积降低铜绿假单胞菌侵袭力的方法、靶点及应用,是在铜绿假单胞菌的生存或培养环境中,通过外源 NO 供体或内源 NO 代谢阻断的方式达到 NO 累积,以降低铜绿假单胞菌的侵袭力因子绿脓菌素的产生。仅用微量的 NO 即可实现对铜绿假单胞菌 PCN 的显著抑制 (60  $\mu$  M SNP 处理, PCN 合成减少 82% ), 同时发现通过抑制 NO 代谢相关酶 -NO 还原酶也可实现对 PCN 合成的显著抑制 (PA01  $\Delta$  nor 突变株 PCN 降低 84% ), 具有高效的特点。本发明用 NO 供体, 或通过抑制铜绿假单胞菌 NO 代谢相关酶, 作为抗细菌感染类疾病的方式, 将不会像传统抗生素那样影响人体的正常微生物群体, 而人体正常微生物群体对人体健康有着非常重要的作用。

1. 一种降低铜绿假单胞菌侵袭力的方法,其特征在于,在铜绿假单胞菌的生存或培养环境中,通过外源 NO 供体或内源 NO 代谢调控的方式达到 NO 累积,以降低铜绿假单胞菌的侵袭力因子绿脓菌素的产生。

2. 如权利要求 1 所述的降低铜绿假单胞菌侵袭力的方法,其特征在于,所述的外源 NO 供体包括能够直接或间接向铜绿假单胞菌提供 NO 的化合物,外源 NO 供体存在于铜绿假单胞菌的生存或培养环境中。

3. 如权利要求 1 所述的降低铜绿假单胞菌侵袭力的方法,其特征在于,所述的内源 NO 代谢的调控包括对 NO 代谢相关酶的抑制、阻断或增强。

4. 如权利要求 1 或 3 所述的降低铜绿假单胞菌侵袭力的方法,其特征在于,所述的内源 NO 代谢阻断是向铜绿假单胞菌中克隆入能够与 NO 代谢相关酶重组并使其功能缺失的质粒或载体;或者采用 NO 代谢相关酶的抑制剂,使其酶活降低或丧失,达到 NO 在铜绿假单胞菌中的积累;或者采用基因重组或使用激动剂使有利于内源 NO 产生的酶的增强,达到 NO 在铜绿假单胞菌中的积累。

5. 一种能够促使铜绿假单胞菌侵袭力降低的的靶点,其特征在于,所述的靶点包括铜绿假单胞菌胞内与 NO 代谢相关的基因位点、与 NO 代谢相关的酶;

与 NO 代谢相关的基因位点、与 NO 代谢相关的酶被抑制或激活后能够达到 NO 累积,降低铜绿假单胞菌的侵袭力因子绿脓菌素的产生。

6. 在铜绿假单胞菌的生存或培养环境中通过外源 NO 供体或内源 NO 代谢阻断的方式达到 NO 累积,以降低铜绿假单胞菌的侵袭力因子绿脓菌素产生的应用。

7. NO 供体化合物在制备降低铜绿假单胞菌的侵袭力的药物中的应用。

8. 能够对铜绿假单胞菌 NO 代谢阻断的质粒、载体或化合物在制备降低铜绿假单胞菌的侵袭力的药物中的应用。

9. 如权利要求 8 所述的应用,其特征在于,所述的应用包括:

以 NO 代谢的拮抗、抑制或阻断的方式实现 NO 代谢阻断的化合物在制备降低铜绿假单胞菌的侵袭力的药物中的应用;

以 NO 代谢途径中关键因子为作用靶点或重组靶点的酶、载体或化合物在制备降低铜绿假单胞菌的侵袭力的药物中的应用。

10. 以铜绿假单胞菌的 NO 还原酶为作用靶点的药物或载体在制备降低铜绿假单胞菌的侵袭力的药物中的应用。

## NO 累积降低铜绿假单胞菌侵袭力的方法、靶点及应用

### 技术领域

[0001] 本发明属生物医药技术领域,涉及 NO 累积降低铜绿假单胞菌侵袭力的方法、靶点及应用。

### 背景技术

[0002] 铜绿假单胞菌 (PAO) 是一种非常重要的机会致病菌,被认为是医院感染性疾病三大致死菌之一。在人体免疫力低下的情况例如患有慢性疾病的人群,器官移植的病人或大面积烧伤的病人等等,它能引起各种不同的急性或是慢性感染甚至导致死亡,特别是敏感患者免疫系统和囊性纤维化 (CF):超过 80% 的 CF 患者死于这些感染。铜绿假单胞菌对大部分的抗生素 (头孢菌素、青霉素、氟喹诺酮类原料药和氨基糖甙类的抗生素) 都有强的抗药性。目前临床应用的抗生素其作用靶点仅限于蛋白合成、细胞壁、DNA 复制、细胞膜和叶酸辅酶等等,数量极为有限,而且存在严重的耐药性问题。细菌的侵袭力是其感染宿主并导致疾病的能力,而细菌的侵袭力取决于细菌所产生的毒性因子及其损伤宿主的作用机制。病原菌通过释放多种毒素类蛋白破坏宿主细胞的正常生理功能,甚至导致宿主细胞的死亡。近年来研究发现将细菌的侵袭力作为靶点来开发新型抗生素,可以通过抑制细菌致病性从而达到治疗细菌感染类疾病的目的,而且由于其对细菌的生长不产生影响,因此可以较少或者避免传统抗生素所引起的细菌耐药性问题的出现。

[0003] 绿脓菌素 (PCN) 是铜绿假单胞菌一种重要的侵袭力因子。PCN 是一种易穿透生物膜的蓝色吩嗪化合物,常见于 CF 患者感染铜绿假单胞菌的痰液中。最近动物模型实验结果显示,PCN 是铜绿假单胞菌侵染过程中的关键化合物,其所具有的毒力能显著的减少靶点所侵染组织器官中的细胞,同时 PCN 还能抑制呼吸道上皮细胞的纤毛蠕动,并增加胞内过氧化物产生。目前已经报道一些化合物能够不同程度抑制铜绿假单胞菌绿脓菌素的合成,如儿茶素 (2 ~ 4mM) 能够减少 50% PCN 的合成;丁子香酚 (50 ~ 400  $\mu$ m) 能够减少 56% PCN 的合成;云南白药 (2.5g/1) 能够减少 76.5% PCN 的合成。但这些化合物多存在用药量大、对 PCN 合成抑制效率不高的问题,并且其中很多本身就具有强的杀菌性,这样不仅会增加菌株的耐药性,而且会影响人体内正常菌群的生长,损害人体健康。

### 发明内容

[0004] 本发明解决的问题在于提供一种 NO 累积降低铜绿假单胞菌侵袭力的方法、靶点及应用,从“降低细菌侵袭力”角度出发,寻找到了的一种新的能有效抑制铜绿假单胞菌侵袭力因子的途径,相关药物靶点可应用于药物的制备。

[0005] 本发明是通过以下技术方案来实现:

[0006] 一种降低铜绿假单胞菌侵袭力的方法,在铜绿假单胞菌的生存或培养环境中,通过外源 NO 供体或内源 NO 代谢阻断的方式达到 NO 累积,以降低铜绿假单胞菌的侵袭力因子绿脓菌素的产生。

[0007] 所述的外源 NO 供体包括能够直接或间接向铜绿假单胞菌提供 NO 的化合物,外源

NO 供体存在于铜绿假单胞菌的生存或培养环境中。

[0008] 所述的内源 NO 代谢阻断的调控包括对 NO 代谢相关酶的抑制或、阻断或增强。

[0009] 其特征在于,所述的内源 NO 代谢阻断是向铜绿假单胞菌中克隆入能够与 NO 代谢相关酶重组并使其功能缺失的质粒或载体;或者采用 NO 代谢相关酶的抑制剂,使其酶活降低或丧失,达到 NO 在铜绿假单胞菌中的积累;或者采用基因重组或使用激动剂使有利于内源 NO 产生的酶的增强,达到 NO 在铜绿假单胞菌中的积累。

[0010] 一种能够促使铜绿假单胞菌侵袭力降低的靶点,所述的靶点包括铜绿假单胞菌胞内与 NO 代谢相关的基因位点、与 NO 代谢相关的酶;

[0011] 与 NO 代谢相关的基因位点、与 NO 代谢相关的酶被抑制或激活后能够达到 NO 累积,降低铜绿假单胞菌的侵袭力因子绿脓菌素的产生。

[0012] 在铜绿假单胞菌的生存或培养环境中通过外源 NO 供体或内源 NO 代谢阻断的方式达到 NO 累积,以降低铜绿假单胞菌的侵袭力因子绿脓菌素产生的应用。

[0013] NO 供体化合物在制备降低铜绿假单胞菌的侵袭力的药物中的应用。

[0014] 能够对铜绿假单胞菌 NO 代谢阻断的质粒、载体或化合物在制备降低铜绿假单胞菌的侵袭力的药物中的应用。

[0015] 所述的应用包括:

[0016] 以 NO 代谢的拮抗、抑制或阻断的方式实现 NO 代谢阻断的化合物在制备降低铜绿假单胞菌的侵袭力的药物中的应用;

[0017] 以 NO 代谢途径中关键酶分子为作用靶点或重组靶点的酶、载体或化合物在制备降低铜绿假单胞菌的侵袭力的药物中的应用。

[0018] 以铜绿假单胞菌的 NO 还原酶为作用靶点的药物或载体在制备降低铜绿假单胞菌的侵袭力的药物中的应用。

[0019] 与现有技术相比,本发明具有以下有益的技术效果:

[0020] 1) 本发明提供了利用 NO 累积降低铜绿假单胞菌侵袭力的方法、靶点及应用,利用外源的微量 NO 供体或内源的 NO 聚集有效抑制铜绿假单胞菌侵袭力因子的生物合成,其中仅用微量的 NO 即可实现对铜绿假单胞菌 PCN 的显著抑制(60  $\mu$ M SNP 处理,PCN 合成减少 82%),具有高效的特点;这为治疗铜绿假单胞菌感染提供了一种可能的新方法以及一系列药物靶点。

[0021] 2) 本发明中的 NO 下游代谢的关键酶 Nor 若被抑制将产生与外源 NO 供体相同抑制侵袭力的效果(缺失 Nor 的突变株相比野生株其 PCN 合成减少 84%),因此以 NO 为代表的 NO 代谢相关酶将是抑制 NO 累积,从而降低铜绿假单胞菌侵袭力的有效靶点,是一个有效的药物制备针对的靶点。

[0022] 3) 本发明涉及的 NO 供体,比如硝普钠(SNP)于 1929 年就开始用于临床,其本身就是一种传统的强效、速效血管扩张药,所以在安全性上没有问题。而且本发明进一步通过实验证实 SNP 与传统抗生素没有拮抗作用,鉴于其提供可促使 NO 累积从而降低铜绿假单胞菌侵袭力,扩展了 SNP 的应用,使其可以与抗生素联合用进行铜绿假单胞菌抑制药物的制备。

[0023] 4) 本发明从“抗细菌侵染力”角度出发寻找新型抗菌物质。NO 在其不抑菌、杀菌的前提下,可以抑制病原菌的侵染力,不会给细菌本身带来生存压力,可以较少或者避免耐药性的产生,因此利用 NO 累积进行抑制细菌感染类药物的制备,有助于解决临床上细菌耐

药性带来的难题。

[0024] 5) 本发明用 NO 供体, 或通过抑制铜绿假单胞菌 NO 代谢相关酶, 作为抗细菌感染类疾病的方式, 将不会像传统抗生素那样影响人体的正常微生物群体, 而人体正常微生物群体对人体健康有着非常重要的作用。

#### 附图说明

[0025] 图 1 为 NO 供体 SNP 对 PA01 生长和 PCN 合成的影响; (其中 A 为不同浓度 SNP 对 PA01 生长的影响; B 为不同浓度 SNP 对 PA01 产 PCN 的影响; C 为不同浓度 SNP 对 PA01 产 PCN 的影响趋势图)

[0026] 图 2 为 60  $\mu\text{M}$  SNP 对临床分离铜绿假单胞菌生长和 PCN 合成的影响; (A 为 60  $\mu\text{M}$  SNP 对临床分离铜绿假单胞菌生长的影响; B 为 60  $\mu\text{M}$  SNP 对临床分离铜绿假单胞菌 PCN 合成的影响)

[0027] 图 3 为 nor 基因敲除及 PCR 和抗性检测; (A 为 nor 基因的结构以及含有插入 Gm 抗性 nor 基因结构; B 为  $\Delta$  nor 菌株的 PCR 验证; C 为  $\Delta$  nor 菌株的抗性验证)

[0028] 图 4 为一氧化氮还原酶 Nor 对 PA01 和 PA515 生长的影响; (A 为 PA01 与其  $\Delta$  nor 突变株 PAN1 的生长差异; B 为 P515 与其  $\Delta$  nor 突变株 PAN515 的生长差异;)

[0029] 图 5 为一氧化氮还原酶 Nor 对 PA01 和 PA515 PCN 合成的影响。(A 为 PA01 与其  $\Delta$  nor 突变株 PAN1 的产 PCN 的差异; B 为 P515 与其  $\Delta$  nor 突变株 PAN515 的产 PCN 的差异, C 为提取的 PCN 比色比较)。

#### 具体实施方式

[0030] 下面结合具体的实施例对本发明做进一步的详细说明, 所述是对本发明的解释而不是限定。

[0031] 本发明提供一种降低铜绿假单胞菌侵袭力的方法, 在铜绿假单胞菌的生存或培养环境中, 通过外源 NO 供体或内源 NO 代谢调控的方式达到 NO 累积, 以降低铜绿假单胞菌的侵袭力因子绿脓菌素的产生。

[0032] 所述的外源 NO 供体包括能够直接或间接向铜绿假单胞菌提供 NO 的化合物, 外源 NO 供体存在于铜绿假单胞菌的生存或培养环境中。具体的, 本发明利用微量 NO 供体来抑制铜绿假单胞菌侵袭力因子之一的绿脓菌素 (PCN) 的生物合成, 能够在不杀死细菌的前提下降低细菌的侵袭力。

[0033] 所述的内源 NO 代谢的调控包括对 NO 代谢相关酶的抑制、阻断或增强。所述的内源 NO 代谢阻断是向铜绿假单胞菌中克隆入能够与 NO 代谢相关酶重组并使其功能缺失的质粒或载体; 或者采用 NO 代谢相关酶的抑制剂, 使其酶活降低或丧失, 达到 NO 在铜绿假单胞菌中的积累; 或者采用基因重组或使用激动剂使有利于内源 NO 产生的酶的增强, 达到 NO 在铜绿假单胞菌中的积累。具体的以与内源 NO 积累有关的 NO 还原酶 (Nor) 作为代表。通过构建缺失 Nor 的突变株研究了此靶点对 PCN 生物合成的影响。结果表明, 外源加入微量的 NO 供体或抑制作用靶点 Nor 均可以显著减少铜绿假单胞菌 PCN 的生物合成。

[0034] 本发明还提供能够促使铜绿假单胞菌侵袭力降低的的靶点, 所述的靶点包括铜绿假单胞菌胞内与 NO 代谢相关的基因位点、与 NO 代谢相关的酶;

[0035] 与 NO 代谢相关的基因位点、与 NO 代谢相关的酶被抑制或激活后能够达到 NO 累积,降低铜绿假单胞菌的侵袭力因子绿脓菌素的产生。

[0036] 基于上述表述,本发明提供在铜绿假单胞菌的生存或培养环境中通过外源 NO 供体或内源 NO 代谢阻断的方式达到 NO 累积,以降低铜绿假单胞菌的侵袭力因子绿脓菌素产生的应用。

[0037] 下面给出本发明的一些说明:

[0038] 1) 利用微量 NO 供体有效抑制铜绿假单胞菌侵袭力因子的生物合成

[0039] 所述的铜绿假单胞菌为一种条件致病菌,本发明涉及其模式菌株 PA01 及临床分离的铜绿假单胞菌株。

[0040] 所述的侵袭力因子为铜绿假单胞菌的次级代谢产物绿脓菌素,绿脓菌素属于吩嗪化合物,其分子式  $C_{13}H_{10}N_{20}$ 。

[0041] 外源微量的 NO 供体来抑制铜绿假单胞菌绿脓菌素 PCN 的生物合成。其中涉及的 NO 供体可以为硝普钠 SNP ( $Na_2Fe(CN)_5NO$ ),亚硝基谷胱甘肽 GSNO ( $C_{10}H_{16}N_4O_7S$ ) 等。

[0042] 2) 利用选择性抑制 NO 下游代谢靶点有效抑制铜绿假单胞菌侵袭力因子的生物合成

[0043] 所述的铜绿假单胞菌 NO 下游代谢的关键酶——NO 还原酶,此酶的作用是将胞内的 NO 转化为  $N_2O$ ,避免过量 NO 积累对细胞造成不利影响。

[0044] 所述的选择性抑制是本发明通过基因敲除手段构建了缺失 Nor 的突变菌株。

[0045] 实施例 1:通过平板培养确定 NO 供体 SNP 能够显著抑制铜绿假单胞菌 PCN 的生物合成

[0046] 本案例所用菌株为铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 模式菌株 PA01 (较为常见,从各保藏中心即可获得)。本菌为专性需氧菌,37℃培养普通细菌培养基(如 LB 培养基)20 ~ 24h。

[0047] 本案例通过加入不同浓度 SNP 的多组平板样品和一个空白平板样品来研究 NO 对菌体 PCN 合成的影响。其中各组样品 SNP 的终浓度分别为 20,40,60,80,100  $\mu M$ 。在 PA01 培养 22h 后,利用氯仿萃取平板中菌体产生的 PCN,浓缩,然后用盐酸显色,根据显色液在 520nm 处的光吸收值来确定菌体产 PCN 的水平。

[0048] 结果如图 1 所示,结果显示随着平板中 SNP 浓度的增大,铜绿假单胞菌 PCN 合成明显减少,在 20  $\mu M$  ~ 60  $\mu M$  浓度范围内的 PCN 减少趋势显著,当大于 60  $\mu M$  减少趋于平缓,可见 60  $\mu M$  是较为理想的浓度(图 1 中 C 所示)。

[0049] 实施实例 2:通过摇瓶培养确定 SNP 能够显著抑制铜绿假单胞菌 PCN 的生物合成且不会给菌体的生长带来压力

[0050] 实施依据:

[0051] 1) 菌体生长的检测:通过每 2 小时菌液在 600nm 处的光吸收值来确定菌体的生长情况。

[0052] 2) PCN 检测:利用氯仿萃取菌液中菌体产生的 PCN,浓缩,然后用盐酸显色,根据显色液在 520nm 处的光吸收值来确定菌体产 PCN 的水平。

[0053] 具体实施:

[0054] 本案例所用铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 模式菌株 PA01;临床菌株

分离自陕西省人民医院,分离方法如下:对有正常菌群存在的临床标本或采自环境中的标本接种选择性培养基如麦康凯琼脂培养基(MAC);对无正常菌群存在的临床标本如血液、脑脊液、穿刺液等接种普通或血琼脂培养基。该菌氧化酶阳性,能氧化分解葡萄糖和木糖,产酸不产气,但不分解乳糖和蔗糖。液化明胶、可分解尿素,还原硝酸盐为亚硝酸盐并产生氮气,吲哚阴性,不产生 $H_2S$ ,利用枸橼酸盐,精氨酸双水解酶阳性,综合以上生理生化特征确定分离得到的菌株为铜绿假单胞菌。

[0055] 本案例通过摇瓶培养确定 SNP 对 PA01 生长和 PCN 的生物合成的影响。设计加入不同浓度 SNP 的多组样品和一个空白样品来研究 NO 对菌体生长和 PCN 合成的影响。其中各组样品 SNP 的终浓度分别为 20, 60, 100, 140, 160 和 200  $\mu M$ 。摇瓶培养期间每隔 2h 进行取样,进行菌体生长检测和 PCN 检测。结果如图 1 中的 A、B 所示,当 NO 供体 SNP 浓度小于 100  $\mu M$  时,其对铜绿假单胞菌模式菌株 PA01 生长影响较小。在 20 ~ 100  $\mu M$  之间随着 SNP 浓度增大 PCN 合成显著减少,且在 60  $\mu M$  PCN 的减少量与菌体生长减少量的比值最大,这说明 60  $\mu M$  的 SNP 在对菌体生长影响较小的情况下,对 PCN 合成的抑制作用最为显著。

[0056] 最后对临床分离铜绿假单胞菌进行同样的实验,得到了相似的结果,证明与 NO 供体共培养对铜绿假单胞菌的 PCN 合成抑制具有普适性(如图 2,其中对生长的影响、对 PCN 合成的抑制分别如 A、B 所示)。

[0057] 实施实例 3:对 NO 还原酶(Nor)这一靶点进行抑制,构建缺失 Nor 的突变菌株

[0058] 实施原理:编码 Nor 基因的敲除:首先构建含有抗性插入片段 nor 基因的质粒,此时 nor 由于插入了抗性片段而无法表达。通过三亲株杂交将此重组质粒导入到 PA01 中,由于重组质粒和基因组上的 nor 基因含有相同的同源臂,通过同源重组使质粒上插入失活的 nor 基因置换了基因组上的 nor 基因,从而使 PA01 无法表达 nor 基因,也就无法合成 Nor,从而影响 NO 的正常代谢,实现 NO 累积。

[0059] 具体实施:首先构建 nor 两端的引物,然后通过 PCR 获得 nor 基因。然后通过 2 次酶切、连接构建了含有插入 Gm 抗性 nor 基因的重组质粒——nor-pexGm。

[0060] 得到目的片段 nor-pexGm 后,纯化后用不同的酶切后,与相应酶切处理的质粒 pEX18-Amp 或 pEX18-Tc 连接,转化大肠杆菌,用含 X-gal 和 AMP(50  $\mu g/ml$ ) 或 TET(15  $\mu g/ml$ ) 的 LB 平板筛选阳性克隆。酶切验证后(如图 3B 所示),再向重组质粒的 PCR 片段(norBC 中的部分片段,如图 3A)中克隆入来源于 pZ1918-LacZ 的 lacZ-GM 片段,转化大肠杆菌,用含有 GM(15  $\mu g/ml$ ) 的 LB 固体平板筛选并验证 lacZ-GM 片段插入方向,最终构建用于基因敲除的重组质粒(如图 3A,其中与 nor 基因相关的片段为:norBC-GM 片段)。

[0061] 重组质粒转入大肠杆菌后,质粒上的插入片段(norBC-GM 片段)和铜绿假单胞菌基因组上同源片段发生同源重组,需要三亲株杂交的方法。通过三亲株杂交种的协助质粒将此质粒带入到目的菌株 PA01 中。

[0062] 三亲株杂交过程如下:

[0063] 1. 将供体菌(含有重组质粒的大肠杆菌,15  $\mu l/ml$  的 GM)和介导菌(含有协助质粒 pRK2013 的大肠杆菌,50  $\mu g/ml$  的 KAN)分别在 25ml LB 培养基中 37 $^{\circ}C$ 、200rpm 震荡培养 14 小时,受体菌(铜绿假单胞菌)接种在 25ml 的 LB 培养基中,置于 42 $^{\circ}C$ 、200rpm 震荡培养 14 小时。

[0064] 2. 把菌体转入 50ml 无菌大离心管中,8000rpm 离心 3 分钟,弃上清后用 0.5ml PBS

洗涤一次并转到 1.5ml 小离心管中,称重后用 PBS 重悬菌体(浓度为 500  $\mu$ g/ml)。按 1:1:1 的比例在新离心管中混合上述三种菌悬液,轻轻将菌体吹打均匀。

[0065] 3. 取混合均匀的菌悬液 0.1ml 点在 LB 固体平板中央,同时,点 0.1ml 野生型铜绿假单胞菌菌悬液做阴性对照。平板放置 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中培养 8-12 小时。

[0066] 4. 用 1m PBS 重悬平板上菌体。适当稀释后涂布 100  $\mu$ l 于含有 GM(150  $\mu$ g/ml) 的 PIA 固体培养基上,倒置于恒温培养箱中 37 $^{\circ}$ C 培养 24 小时。同时,将野生型铜绿假单胞菌也涂布于一个平板做负性对照。

[0067] 在菌体内通过一定几率的同源重组获得含有缺失完整 nor 基因的突变菌株。通过 pcr 和抗性培养等一系列的筛选方式从中筛选出此突变株(如图 3 的 C 所示)。

[0068] 杂交株的确认实验及结果:

[0069] 一次重组成功的铜绿假单胞菌可在含有 GM 的 PIA 平板上生长,挑取阳性克隆在含有 10%蔗糖的 LB 平板上划线。二次重组的突变株用 TET 敏感性和 PCR 验证。结果显示已成功构建 PA01  $\Delta$  nor 菌株,命名为 PAN1。如图 3C 所示,其中 1 为带有 GM 抗性的平板,只有 PAN1 菌株在上面生长,2 为不含抗生素平板,野生 PA01 以及 PAN1 菌株均能生长。

[0070] 同样为了验证普适性,按照上述方法同时构建了一株缺失 nor 基因的临床菌株。

[0071] 实施实例 4:通过摇瓶培养  $\Delta$  nor 突变株与野生株确定当选择性抑制靶点 Nor 时能够显著抑制铜绿假单胞菌 PCN 的生物合成且不会给菌体的生长带来压力

[0072] 实施原理:NO 还原酶 Nor 的作用是将胞内的 NO 转化成 N<sub>2</sub>O,避免胞内 NO 的过量积累。所以  $\Delta$  nor 突变株会持续的积累内源 NO 从而产生一些生物效应。本发明通过比较铜绿假单胞菌  $\Delta$  nor 突变株与野生株生长及产 PCN 的情况来确定内源 NO 对其侵袭力因子 PCN 的影响。

[0073] 具体实施:同时对 PA01  $\Delta$  nor 突变株与野生株进行培养,在期间每 2h 取样进行生长和 PCN 检测分析,结果显示缺失 Nor 的突变株与野生株相比生长变化较小(生长降低 10%)但 PCN 合成显著减弱(PCN 降低 84%,检测结果图 4 所示)

[0074] 为了验证普适性,对一株临床菌 PA515 的  $\Delta$  nor 突变株与野生株做了同样的实验,得到类似的结果。这说明内源积累的 NO 在对铜绿假单胞菌生长影响较小的情况下,对 PCN 合成有显著的抑制作用(检测结果图 5 所示)。

[0075] 目前已有研究表明通过抑制 PCN 的合成能够降低铜绿假单胞菌的侵袭力。如 Gee W. Lau 等(Gee W. Lau et al 2004) 研究发现铜绿假单胞菌产 PCN 在其侵染小鼠过程中起到关键作用,此研究构建了三株 PCN 合成酶的突变株( $\Delta$  phzB1、 $\Delta$  phzM、 $\Delta$  phzS) 发现这些突变株产绿脓菌素能力均显著降低,其后续动物实验表明这些突变株感染小鼠肺部的菌体数量以及小鼠的致死率较野生菌均有显著降低。这些研究结果表明通过抑制 PCN 的合成能够降低铜绿假单胞菌的侵袭力,结合上述实施实例 NO 积累能显著减少铜绿假单胞菌 PCN 的合成的结论,说明 NO 累积能够有效降低铜绿假单胞菌侵袭力。

[0076] 因此本发明提供以下应用:

[0077] 在铜绿假单胞菌的生存或培养环境中通过外源 NO 供体或内源 NO 代谢阻断的方式达到 NO 累积,以降低铜绿假单胞菌的侵袭力因子绿脓菌素产生的应用。

[0078] NO 供体化合物在制备降低铜绿假单胞菌的侵袭力的药物中的应用。

[0079] 能够对铜绿假单胞菌 NO 代谢阻断的质粒、载体或化合物在制备降低铜绿假单胞



菌的侵袭力的药物中的应用。

[0080] 由于 NO 还原酶为实现 NO 累积的一种方式, 其他的方式也能够实现 NO 累积, 其对 PCN 生长的抑制和铜绿假单胞菌的侵袭力的降低应当具有一致性的结果。

[0081] 具体的所述的应用包括:

[0082] 以 NO 代谢的拮抗、抑制或阻断的方式实现 NO 代谢阻断的化合物在制备降低铜绿假单胞菌的侵袭力的药物中的应用;

[0083] 以 NO 代谢途径中关键因子为作用靶点或重组靶点的酶、载体或化合物在制备降低铜绿假单胞菌的侵袭力的药物中的应用。

[0084] 以铜绿假单胞菌的 NO 还原酶为作用靶点的药物或载体在制备降低铜绿假单胞菌的侵袭力的药物中的应用。

[0085] 以上给出的实施例是实现本发明较优的例子, 本发明不限于上述实施例。本领域的技术人员根据本发明技术方案的技术特征所做出的任何非本质的添加、替换, 均属于本发明的保护范围。

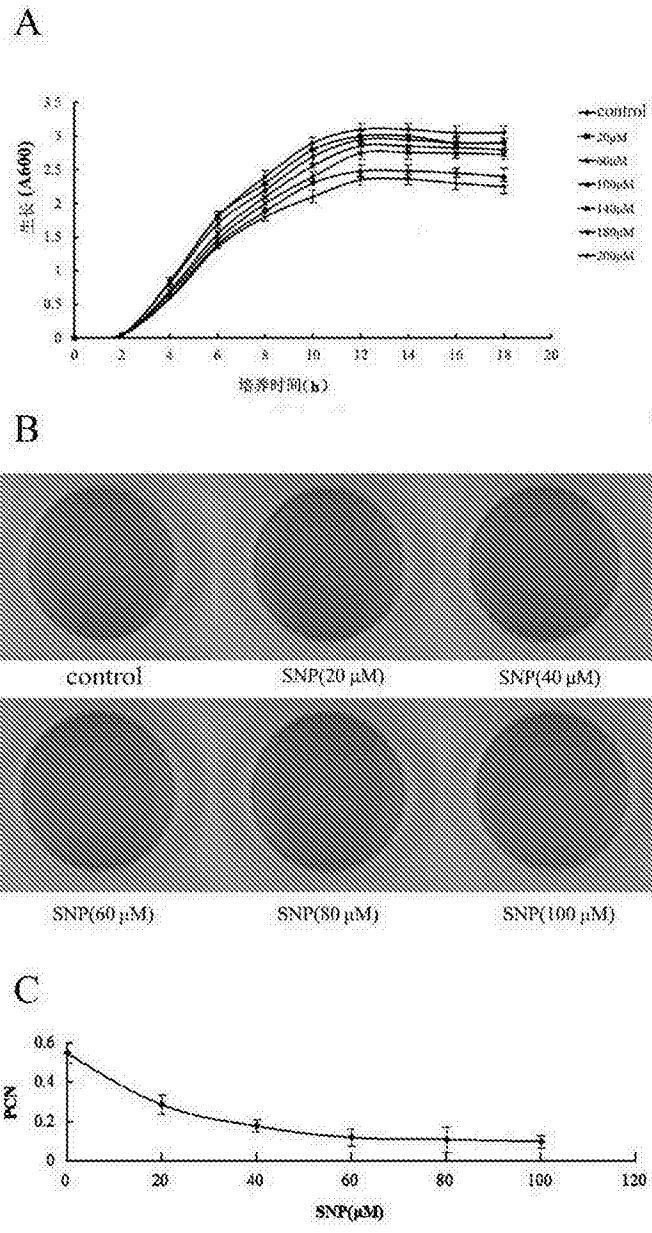


图 1

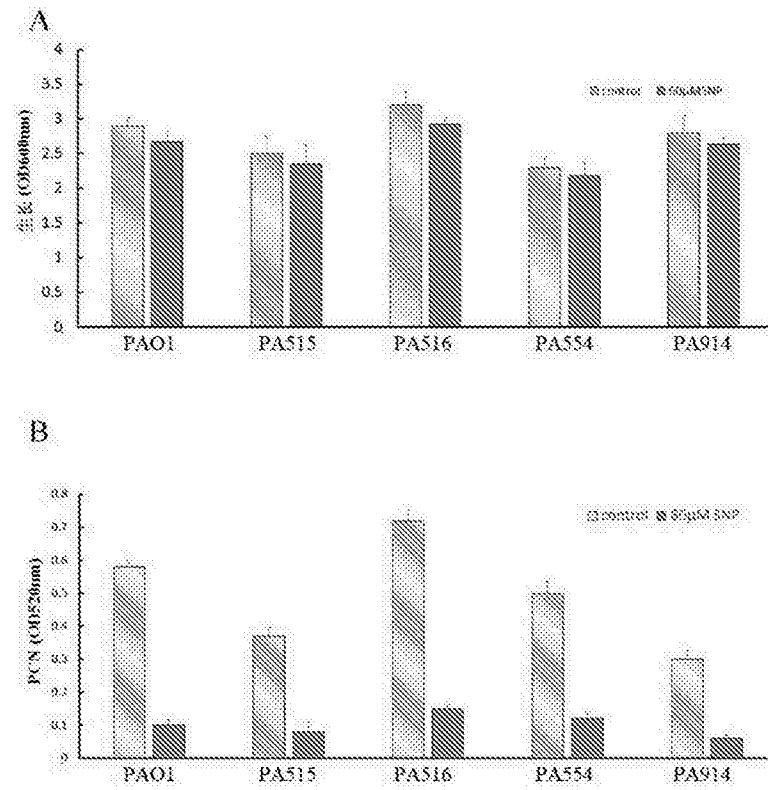


图 2

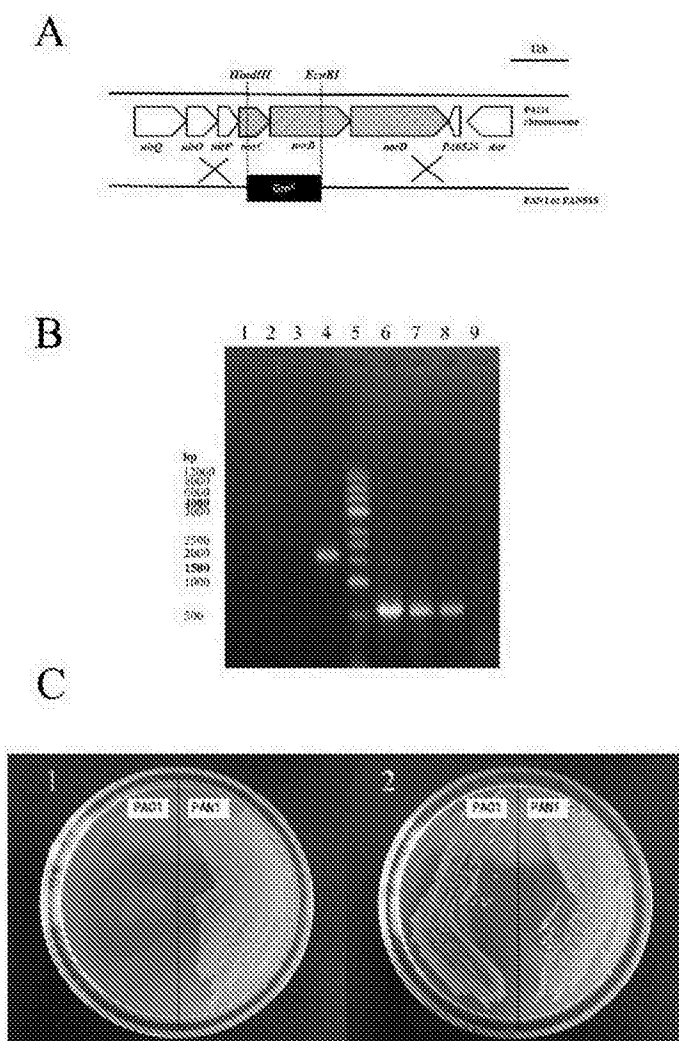
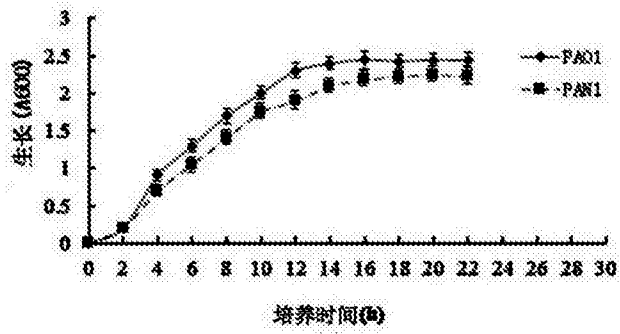


图 3

A



B

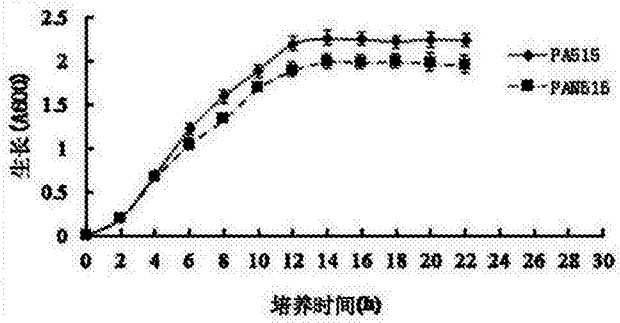
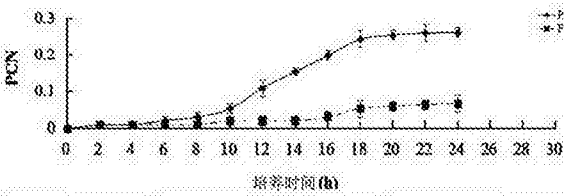
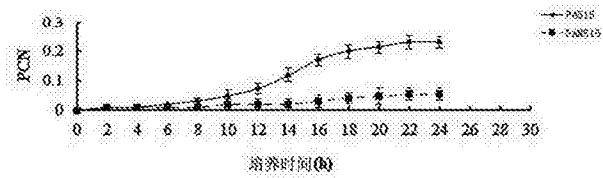


图 4

A



B



C

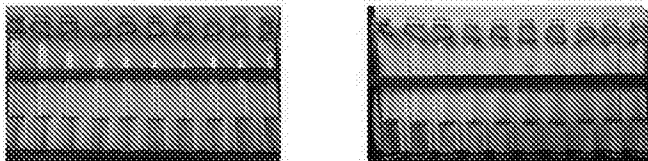


图 5