

噬菌体 P1 侵染大肠杆菌 Nissle 1917 (EcN) 机理研究

于晏瓔, 周贤轩* (合肥工业大学食品科学与工程学院, 安徽合肥 230009)

摘要 [目的]找出噬菌体侵染大肠杆菌的位点。[方法]选择血清型为 O6:K5:H1 的大肠杆菌 Nissle 1917 (EcN) 作为试验菌株。通过 λ -RED 系统, 突变其 K 抗原和 O 抗原合成基因, 通过检测 P1 转导至这一系列突变株的转导效率来确定 P1 的侵染位点。[结果]双突变株 EcN Δ *kfiA* Δ *waaG*::Cm 具有最高的转导效率。*kfiA* 基因突变导致了 K 抗原缺失, *waaG* 基因突变导致了 LPS 核心寡糖中第 2 位庚糖 (HepII) 的暴露, 使得 P1 更容易接触到 HepII, 从而侵染细菌。[结论]研究认为 Hep II 很可能就是噬菌体 P1 的识别位点。

关键词 噬菌体 P1; Nissle 1917; K 抗原; O 抗原

中图分类号 Q939.9 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)19-0111-03

Study on the Mechanism of Phage P1 Infecting *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN)

YU Yan-ying, ZHOU Xian-xuan (School of Food Science and Engineering, Hefei University of Technology, Hefei, Anhui 230009)

Abstract [Objective] To find out the infection site of *Escherichia coli* infected by bacteriophage. [Method] We selected *E. coli* Nissle 1917 (EcN), serotype O6:K5:H1 as the experimental strain. The K antigen and O antigen synthesis genes were mutated by λ -RED system, and the infection sites of P1 were determined by detecting the transduction efficiency of P1 to these mutants. [Result] The double mutant EcN Δ *kfiA* Δ *waaG*::Cm had the highest transduction efficiency. The mutation of *kfiA* gene led to the deletion of K antigen. The mutation of *waaG* gene led to the exposure of second heptanes (Hep II) in LPS core oligosaccharides, which made it easier for P1 to contact with Hep II and to infect bacteria. [Conclusion] Hep II may be the recognition site of phage P1.

Key words Bacteriophage P1; Nissle 1917; K antigen; O antigen

噬菌体 P1 是一种溶源噬菌体, 可以侵染大肠杆菌和一些其他的革兰氏阴性菌。噬菌体 P1 之所以引起研究者兴趣, 是因为它可以捕捉宿主的基因组 DNA 包装在蛋白质衣壳里面作为自己的基因, 从而产生新一代的噬菌体。新的噬菌体在侵染其他的细菌后, 可将捕捉到的 DNA 整合到新宿主的基因组上^[1], 这一过程被称为转导。目前, P1 作为转导工具被广泛应用于基因工程中。P1 属于肌病毒科, 基因组约有 93 kb, 被包围在一个二十面体的头部里面^[2-3]。在病毒粒子中, 它以线性双链 DNA 分子的形式存在。它的尾部是由 6 个尾纤维组成的收缩尾^[4-5]。在侵染细菌时, 噬菌体颗粒利用尾部纤维吸附在细菌表面, 并与细菌表面的受体特异性结合。接下来, 尾鞘收缩, 将线性 DNA 注入宿主细胞。在 DNA 被注入后, 宿主 DNA 重组机制或病毒 DNA 表达重组酶, 将末端冗余序列重组, 以环化噬菌体基因组。P1 可能会进入溶源状态, 也可能会立即进入裂解阶段^[5]。

P1 是在革兰氏阴性菌中被普遍应用的转导工具。P1 能够包装供体菌的基因组 DNA 形成子代的噬菌体。由于噬菌体基因组的高突变性, 导致部分的子代噬菌体成为缺陷噬菌体, 在侵染受体菌时, 不能裂解宿主细胞, 而是通过同源重组的方式整合到宿主基因组上。虽然 P1 作为转导工具具有方便、快速、高效等优点, 但是它的使用范围有诸多限制: ①对于一些细胞表面覆盖荚膜多糖的细菌, P1 不能侵染^[6]; ②对于一些细胞表面表达 O 抗原的细菌, P1 也不能侵染; ③P1 的侵染位点被认为位于细胞表面的脂多糖 (LPS) 的核心上, 但是具体是位于哪一位的糖基上, 至今还未被发现。

笔者以大肠杆菌 Nissle 1917 (EcN) 为试验菌株。EcN 血清型为 O6:K5:H1, 其表达 K5 荚膜多糖, 覆盖在细胞表面^[7]。此外, EcN 还表达 O6 抗原。该研究通过 λ -RED 系统^[8] 突变其 K 抗原合成基因来检测 K 抗原是否影响 P1 侵染 EcN, 并逐个突变 LPS 合成基因, 通过检测转导效率的方式来确定 P1 的侵染位点。

1 材料与方法

1.1 材料 试验所用试剂均购于生工生物工程(上海)股份有限公司; 引物由通用生物系统(安徽)有限公司合成。大肠杆菌培养所需的抗生素为氨苄青霉素 (100 μ g/mL)、卡那霉素 (50 μ g/mL) 和氯霉素 (25 μ g/mL)。噬菌体 P1 由笔者所在实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 基因敲除。采用 λ -RED 同源重组系统对 EcN 进行基因敲除。首先, 利用带有待敲除基因两端的 39 bp 同源臂的引物对, 以质粒 pKD4/pKD3 为模板, PCR 扩增带有 FRT 位点的抗性片段。接下来, 将该 PCR 产物纯化, 并电击转化至 EcN/pKD46 电击感受态细胞中, 涂布于相应的抗性平板, 30 $^{\circ}$ C 隔夜培养。抗性平板上筛选出的单克隆菌株用菌落 PCR 进行验证, 以选择出阳性克隆。

1.2.2 P1 裂解液制备。P1 裂解液在大肠杆菌 ZK126 中制备。首先将隔夜活化的菌液以 1% 的比例转接至新鲜的 3 mL LB 培养基中, 同时添加 10 mmol/L MgCl₂、5 mmol/L CaCl₂ 和 0.1% 葡萄糖, 置于 37 $^{\circ}$ C、220 r/min 的摇床中, 培养至对数中期。接下来向供体菌中加入 100 μ L 噬菌体 P1, 37 $^{\circ}$ C 培养 3 h, 直至培养基中有细胞残渣出现, 且菌液浓度不再升高后, 向裂解液中加入 100 μ L 氯仿, 振荡混匀 10 min, 12 000 r/min 离心 2 min, 去除细胞碎片, 把上清吸出, 存于 -4 $^{\circ}$ C 备用。

1.2.3 噬菌体 P1 转导。首先, 用噬菌体 P1 侵染受体菌, 制

基金项目 国家自然科学基金项目 (31670120)。

作者简介 于晏瓔 (1991—), 男, 内蒙古赤峰人, 硕士研究生, 研究方向: 微生物代谢与调控。* 通讯作者, 教授, 博士, 从事微生物与酶工程研究。

收稿日期 2018-04-13

备包装有受体菌 ZK126 Δ recA::Kan 基因组 DNA 的裂解液。该方法与制备 P1 裂解液步骤相同。其次,收集 2 mL 受体菌隔夜培养的菌液,13 000 r/min 离心 2 min,收集菌体,并加入 1 mL 含有 10 mmol/L MgSO₄、5 mmol/L CaCl₂ 的 LB 培养基,重悬细胞。接下来,将包装了 ZK126 Δ recA::Kan 基因组 DNA 的噬菌体 P1 与受体菌混合,37 °C 静止培养 30 min 后,加入 200 μ L 1 mol/L 的柠檬酸钠和 1 mL 无抗 LB 培养基,置 37 °C、200 r/min 的摇床中复苏 1 h。复苏后,6 000 r/min 离心 5 min,收集菌体,加入 100 μ L 含有 0.01 mol/L 柠檬酸钠的 LB 液体培养基重悬细胞,涂布到卡那霉素抗性平板上,过夜培养。过夜培养的单克隆由菌落 PCR 检测以选择出阳性克隆。被选择的阳性克隆转接到含 10 mmol/L 柠檬酸钠的 50 μ g/mL 卡那霉素抗性平板上划线传代 2 次后,可保存菌种。

1.2.4 ¹H NMR 样品制备。首先,将隔夜培养的活化菌液转接至 6 L M9 培养基中,37 °C 培养 20 h。收集菌液上清,用 DEAE 凝胶柱纯化 K 抗原。将纯化好的 K 抗原样品冻干,用 0.5 mL D₂O 溶解。重复冻干、D₂O 溶解 2 次。用 0.5 mL D₂O 溶解冻干的样品,加入对苯二甲酸二钠 5 μ L (共 71 μ g) 溶液作为内参,充分混匀。样品制备好后,将待测样品装入核磁管中,送至合肥工业大学分析测试中心检测。使用 Agilent VNMRs 600MHz 核磁共振仪检测,光谱数据用 MestReNova 软件处理谱图。

2 结果与分析

2.1 ZK126 Δ recA::Kan 基因敲除结果 该试验选择 ZK126 Δ recA::Kan 作为噬菌体 P1 供体菌。首先,采用 λ -RED 同源重组系统敲除 ZK126 的 recA 基因。以带有卡那霉素抗性基因的 pKD4 为模板扩增敲除片段,电击转化至 ZK126/pKD46 电击感受态细胞中。转化后,挑取卡那霉素平板上的单克隆菌株进行菌落 PCR 检测。泳道 1 为 ZK126 野生型菌株,目的条带大小为 1 700 bp;泳道 2 为 ZK126 Δ recA::Kan 阳性克隆,目的条带大小分别为 1 200 bp 和 930 bp。由图 1 可知,结果与预期相符,说明 ZK126 的 recA 基因被成功敲除。

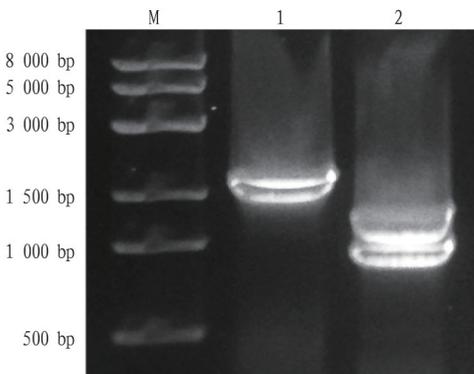


图1 ZK126 Δ recA::Kan 菌落 PCR

Fig.1 ZK126 Δ recA::Kan colony PCR

2.2 kfiA 基因敲除及 K 抗原含量检测 EcN 的 K 抗原多糖主要由 kps 基因座负责合成和转运。其中 kps 基因座分为 3 个区,负责合成的 2 区(kfiABCD)以及转运的 1 区(kpsFE-

DUCS)和 3 区(kpsMT)^[9]。在负责合成的 2 区基因中,kfiA 表达的蛋白催化葡萄糖醛酸和乙酰氨基葡萄糖的聚合,是合成荚膜多糖的必需基因。因此选择对 kfiA 基因进行敲除,构建了 EcN Δ kfiA::Kan 菌株,并通过辅助质粒 pCP20 表达翻转酶将其卡那霉素抗性基因去除。

¹H NMR 是近年来发展的一种快捷、准确地检测 K5 荚膜多糖的方法^[10]。为了验证 kfiA 基因突变株是否能够表达 K 抗原,通过¹H NMR 的方法检测野生型和突变株的 K 抗原(K5 多糖)含量。K5 荚膜多糖的组成单位是[(- \rightarrow 4) β -D-葡萄糖酸(GlcA)(1 \rightarrow 4)N-乙酰- α -D-葡萄糖(GlcNAc)(1 \rightarrow)]_n重复二糖单元,该二糖在¹H NMR 共有 6 个特征峰。其中,位于 2.0 ppm 处的峰,是由乙酰氨基葡萄糖的甲基氢所出的峰,是 K5 荚膜多糖最主要的特征峰。由图 2 可知,EcN 野生型菌株的 6 个 K5 多糖特征峰均明显出峰,且在图上标出。而 EcN Δ kfiA 菌株没有 K5 多糖的特征峰,说明 EcN Δ kfiA 菌株不表达 K5 多糖。

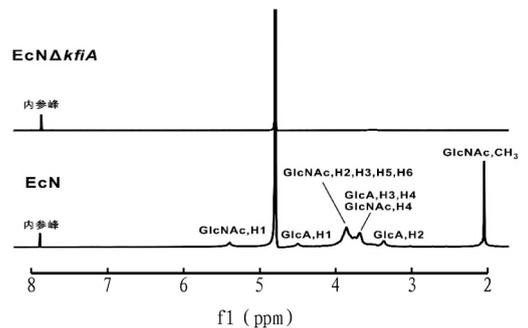


图2 ¹H NMR 检测 K 抗原含量

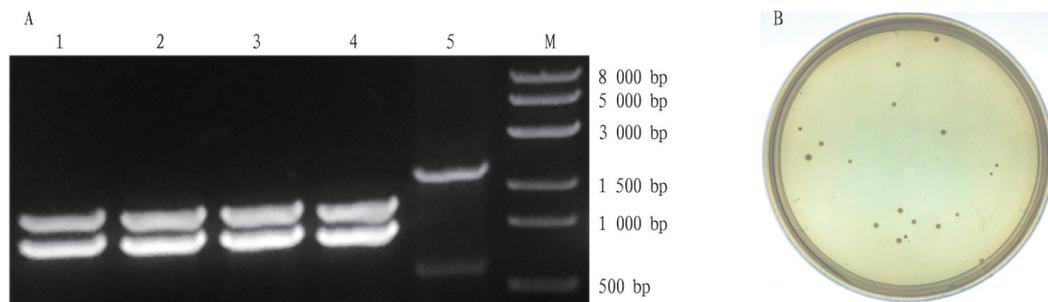
Fig.2 Detection of K antigen content by ¹H NMR

2.3 K 抗原对 P1 侵染 EcN 的影响 通过检测 P1 在侵染某种细菌时是否能够产生噬菌斑,可以直接地观察到 P1 是否能够裂解该种细菌。用从 ZK126 制备的 P1 裂解液同时侵染 EcN 和 EcN Δ kfiA,检测 P1 是否能够裂解 EcN 和 EcN Δ kfiA。结果显示,P1 在 EcN 和 EcN Δ kfiA 菌株中均不能产生噬菌斑,说明 P1 没有将这 2 种菌裂解(结果没有展示)。EcN Δ kfiA 菌株是 kfiA 基因突变株,不能产生 K5 多糖,说明 K5 多糖不是影响 P1 裂解 EcN 的决定性因素。

为了进一步验证 P1 能否侵染 EcN,将 EcN 作为 P1 受体菌进行转导试验。经比对,大肠杆菌 ZK126 的 recA 基因上下游 100 kb 的 DNA 片段与 EcN 的同源性较高,因此将 ZK126 Δ recA::Kan 作为供体菌,用 P1 包装其基因组,转导至 EcN,将得到的阳性克隆进行菌落 PCR 检测。由图 3 可知,电泳条带大小为 1 200 bp 和 930 bp,与预期相同,P1 成功将 Δ recA::Kan 片段转导至 EcN 中。

2.4 O 抗原对 P1 侵染 EcN 的影响 由上述结果可知,P1 可以侵染 EcN 但是不能将其裂解,产生噬菌斑。因此又突变它的 O 抗原基因以及逐个突变其 LPS 的糖基转移酶基因,以探究 O 抗原是否是影响 P1 裂解 EcN 的决定性因素,并寻找 P1 的识别位点。

采用 λ -RED 同源重组系统敲除了 LPS 的表面聚合物连



注:A. 菌落 PCR 检测转导结果;B. 抗性平板筛选的转导的阳性克隆

Note: A. Colony PCR detection and transduction results; B. Transgenic positive clones screened by resistant plates

图 3 P1 转导 ZK126 Δ recA::Kan 至 EcN

Fig. 3 P1 transduction of ZK126 Δ recA::Kan to EcN

接酶基因(*waaL*)、Hep II α -1,3-糖基转移酶基因(*waaG*)、Glc I α -1,3-糖基转移酶基因(*waaO*)以及 UDP-glucose 差向异构酶基因(*galE*)^[11],并且构建了 *kfiA* 与 *waaG*, *kfiA* 与 *waaO* 的双基因突变株。为了检测 O 抗原是否是影响 P1 裂解 EcN 的决定性因素,用 P1 来侵染这 6 株 O 抗原的突变株。结果显示,P1 仍然不能裂解这一系列的菌株。

2.5 转导效率检测 据报道,噬菌体侵染细菌的位点很可能位于细菌 LPS 的核心寡糖上。不同的 O 抗原基因突变株使得细菌 LPS 暴露出的寡糖单元也随之不同。用 P1 转导 ZK126 Δ recA::Kan 至构建的 O 抗原基因突变株中,通过计算转导效率来确定 P1 的侵染位点。

由图 4 可知,EcN Δ *kfiA* Δ *waaG*::Cm 的转导效率最高,EcN Δ *kfiA* 的效率第 2,EcN Δ *kfiA* Δ *waaO*::Cm 的效率第 3。其余的突变株和 EcN 野生型作为受体菌的转导效率基本一致。*kfiA* 基因突变株转导效率明显高于野生型,说明包裹在细菌周围的 K5 荚膜多糖影响 P1 感染细菌。*waaO* 和 *waaG* 单基因突变株会导致 LPS 核心寡糖在不同的糖单元处中断。*waaO* 突变株会暴露出 Glc I,而 *waaG* 突变株会暴露出 Hep II。单基因突变株对于转导效率几乎没有影响,但是在此基础上,再将 *kfiA* 基因突变,发现噬菌体 P1 的侵染效率有明显的提升。尤其 EcN Δ *kfiA* Δ *waaG*::Cm 菌株,转导效率最高,明显高于 EcN Δ *kfiA* Δ *waaO*::Cm 和 EcN Δ *kfiA* 菌株。由此得出结论:噬菌体 P1 侵染 EcN 的识别位点是位于 LPS 核心寡糖的第 2 位庚糖上(Hep II)。

3 讨论

该研究主要通过构建一系列的 K 抗原和 O 抗原基因突变菌株来探究 P1 不能裂解 EcN 的原因,并且寻找 P1 侵染 EcN 的识别位点。用从 ZK126 菌株制备的 P1 裂解液来侵染构建的一系列基因突变株,发现结果与 P1 侵染 EcN 野生型菌株一致,均不能产生噬菌斑,这说明了 K 抗原和 O 抗原均不是 P1 不能裂解 EcN 的原因。

据文献报道,P1 的识别位点很可能位于 LPS 的核心寡糖上。不同的 O 抗原基因突变株会导致 LPS 核心寡糖的提前中断,暴露出不同的寡糖单元。用 P1 转导 ZK126 Δ recA::Kan 至构建的 O 抗原基因突变株中,通过计算转导效率来确定 P1 的侵染位点。结果显示,EcN Δ *kfiA* Δ *waaG*::Cm 的转导

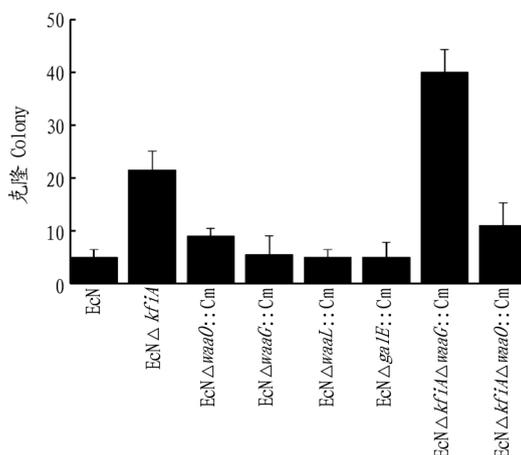


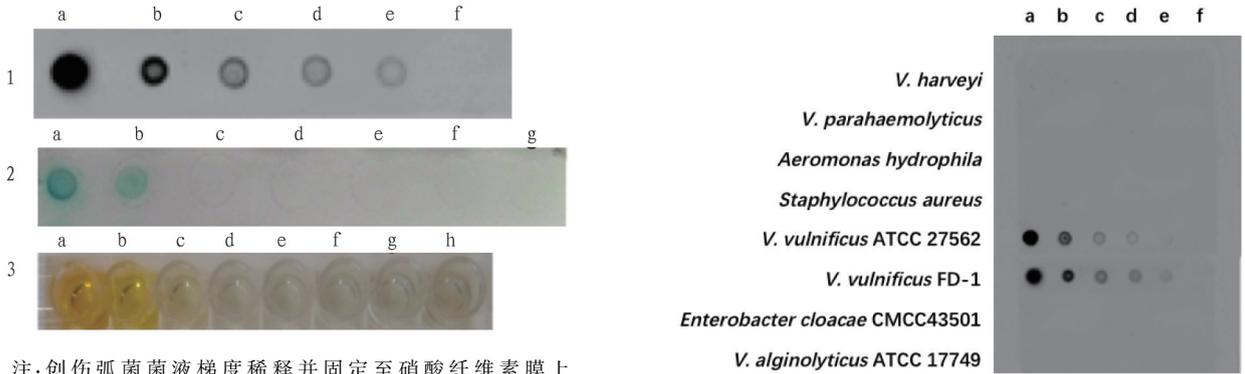
图 4 P1 转导 *recA*::Kan 至 EcN O 抗原突变株结果

Fig. 4 Results of P1 transduction of *recA*::Kan to EcN O antigen mutants

效率最高,EcN Δ *kfiA* 的效率第 2,EcN Δ *kfiA* Δ *waaO*::Cm 的效率第 3。其余的突变株和 EcN 野生型作为受体菌的转导效率基本一致。*kfiA* 基因突变株的转导效率均有明显提升,说明覆盖在 EcN 表面的 K5 荚膜多糖会影响 P1 侵染的效率。在将 K5 荚膜多糖去除后,P1 能够更好地与位于 K5 荚膜多糖内、位于细胞表面的噬菌体识别受体接触,由此导致了转导效率的提升。此外,EcN Δ *kfiA* Δ *waaG*::Cm 的转导效率明显高于其他 2 株 *kfiA* 基因突变株,说明 *waaG* 基因突变株使得 Hep II 暴露了出来,而 Hep II 就是噬菌体 P1 识别的侵染位点,因此会导致转导效率的升高。因此认为:Hep II 就是噬菌体 P1 识别的侵染位点。该研究寻找到了可能的 P1 识别位点,为 P1 的后续改造和应用奠定了理论基础。

参考文献

- [1] SINGER M, BAKER T A, SCHNITZLER G, et al. A collection of strains containing genetically linked alternating antibiotic resistance elements for genetic mapping of *Escherichia coli* [J]. *Microbiological reviews*, 1989, 53 (1): 1-24.
- [2] IIDA S, ARBER W. Multiple physical differences in the genome structure of functionally related bacteriophages P1 and P7 [J]. *Molecular & general genetics*, 1979, 173(3): 249-261.
- [3] YUN T, VAPNEK D. Electron microscopic analysis of bacteriophages P1, P1Cm, and P7: Determination of genome sizes, sequence homology, and location of antibiotic-resistance determinants [J]. *Virology*, 1977, 77(1): 376-385.



注:创伤弧菌菌液梯度稀释并固定至硝酸纤维素膜上(5 μL /孔),以创伤弧菌单克隆抗体作为一抗,分别以化学发光试剂 ECL 和 TMB 作为显色剂。第 1 行为 ECL 显色剂:a~e. 分别为 $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^5$ CFU/mL 10 倍梯度稀释创伤弧菌菌液;f 为空白对照。第 2 行为 TMB 显色剂:a~f. 分别为 $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^4$ CFU/mL 10 倍梯度稀释创伤弧菌菌液;g 为空白对照。第 3 行:ELISA 分别包被从加入 1:4 000 比例稀释的创伤弧菌单克隆抗体作为一抗,a~g. 分别为 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^2$ CFU/mL 10 倍梯度稀释创伤弧菌菌液(100 μL /孔),h 为空白对照

Note:Sensitivity of *V. vulnificus* serial dilutions were spotted onto the NCM (5 μL /spot) and conducted dot blot using MAb as the primary antibody. Chemiluminescent reagents ECL and TMB were used as colorants respectively. Row 1, ECL as a colorant; a. 1×10^9 CFU/mL, b. 1×10^8 CFU/mL, c. 1×10^7 CFU/mL, d. 1×10^6 CFU/mL, e. 1×10^5 CFU/mL, f. blank. Row 2, TMB as a colorant; a. 1×10^8 CFU/mL, b. 1×10^7 CFU/mL, c. 1×10^6 CFU/mL, d. 1×10^5 CFU/mL, e. 1×10^4 CFU/mL, f. 1×10^3 CFU/mL, g. blank. Row 3: The ELISA plate was coated with serial dilutions (from 1×10^8 to 1×10^2 CFU/mL, 100 μL /spot) of *V. harveyi*, and 1:4 000 dilutions of MAb was used as the primary antibody. a. 1×10^8 CFU/mL, b. 1×10^7 CFU/mL, c. 1×10^6 CFU/mL, d. 1×10^5 CFU/mL, e. 1×10^4 CFU/mL, f. 1×10^3 CFU/mL, g. 1×10^2 CFU/mL, h. blank

图 2 几种创伤弧菌单克隆抗体检测法灵敏度比较

Fig. 2 Comparison of the sensitivity of the detection methods of monoclonal antibodies in *V. vulnificus*

殊的设备和一定的技能,无法在基层养殖单位进行现场检测,而 LAMP 法虽然不需要特殊设备,但对操作环境要求较高,且易产生假阳性。胶体金免疫层析试纸条虽然操作简便,但灵敏度最高只能达 1×10^5 CFU/mL,无法用于病害的日常监测。

注:a~e. 分别为细菌浓度为 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^5$ CFU/mL 10 倍梯度稀释菌液固定的样品;f 为空白对照

Note:a~e. Bacterial concentration with 10-fold dilution; $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^5$ CFU/mL;f. Blank

图 3 创伤弧菌改良斑点杂交法灵敏度检测

Fig. 3 Sensitivity detection of the modified speckle hybridization method of *V. vulnificus*

本研究基于传统斑点杂交技术,以灵敏性更好的 ECL 替代 TMB 底物显色液,实现了创伤弧菌高灵敏度检测,与之前报道的传统斑点杂交法相比灵敏度提高了 100 倍,比 ELISA 法提高了 1 000 倍,而且反应时间大幅度缩短,孵育时间从 8 h 缩短至 2 h,可以用于创伤弧菌的现场快速检测。

参考文献

- [1] HENG S P, LETCHUMANAN V, DENG C Y, et al. *Vibrio vulnificus*: An environmental and clinical burden[J]. Front Microbiol, 2017, 8: 1-25.
- [2] HORSEMAN M A, SURANI S. A comprehensive review of *Vibrio vulnificus*: An important cause of severe sepsis and skin and soft-tissue infection [J]. Int J Infect Dis, 2011, 15(3): 157-166.
- [3] BAKER-AUSTIN C, GORE A, OLIVER J D, et al. Rapid *in situ* detection of virulent *Vibrio vulnificus* strains in raw oyster matrices using real-time PCR[J]. Environ Microbiol, 2010, 2(1): 76-80.
- [4] CHATZIDAKI-LIVANIS M, HUBBARD M A, GORDON K, et al. Genetic distinctions among clinical and environmental strains of *Vibrio vulnificus* [J]. Appl Environ Microbiol, 2006, 72(9): 6136-6141.
- [5] HAN F F, WANG F, GE B L. Detecting potentially virulent *Vibrio vulnificus* strains in raw oysters by quantitative loop-mediated isothermal amplification[J]. Appl Environ Microbiol, 2011, 77(8): 2589-2595.
- [6] LI H, XIAO J F, ZHOU Y, et al. Sensitivity improvement of rapid *Vibrio harveyi* detection with an enhanced chemiluminescent-based dot blot [J]. Lett Appl Microbiol, 2017, 65(3): 206-212.
- [7] 李强, 黄华, 张显昱, 等. 鲷爱德华菌单克隆抗体的制备及其在黄颡鱼“红头病”研究中的应用[J]. 大连海洋大学学报, 2014, 29(4): 323-328.
- [8] 陈艳, 付萍. 创伤弧菌检测方法的研究进展[J]. 国外医学(卫生学分册), 2008, 35(2): 91-96.
- [8] DATSENKO K A, WANNER B L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(12): 6640-6645.
- [9] YAN H H, BAO F F, ZHAO L P, et al. Cyclic AMP (cAMP) receptor protein-cAMP complex regulates heparosan production in *Escherichia coli* strain nissle 1917 [J]. Applied and environmental microbiology, 2015, 81(22): 7687-7696.
- [10] WANG Z Y, ZHANG Z Q, MCCALLUM S A, et al. Nuclear magnetic resonance quantification for monitoring heparosan K5 capsular polysaccharide production [J]. Analytical biochemistry, 2010, 398(2): 275-277.
- [11] WHITFIELD C, TRENT M S. Biosynthesis and export of bacterial lipopolysaccharides [J]. Annu Rev Biochem, 2014, 83: 99-128.

(上接第 113 页)

- [4] YARMOLINSKY M B, STERNBERG N. Bacteriophage P1 [J]. Viruses, 1988, 1936(3938): 1322.
- [5] LIU J, CHEN C Y, SHIOMI D, et al. Visualization of bacteriophage P1 infection by cryo-electron tomography of tiny *Escherichia coli* [J]. Virology, 2011, 417(2): 304-311.
- [6] SCHOLL D, ADHYA S, MERRILL C. *Escherichia coli* K1's capsule is a barrier to bacteriophage T7 [J]. Applied and environmental microbiology, 2005, 71(8): 4872-4874.
- [7] WHITFIELD C. Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in *Escherichia coli* [J]. Annual review of biochemistry, 2006, 75(1): 39-68.