(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119875972 A
(43)申请公布日 2025.04.25

(21)申请号 202510007125.5

(22)申请日 2018.12.04

(30)优先权数据
62/594,943 2017.12.05 US

(62)分案原申请数据
201880088486.5 2018.12.04

(71)申请人 比奥普来克斯有限公司
地址 美国

(72)发明人 蒂莫西·W·斯塔兹尔
托德·D·图尔纳
拉维·S·V·斯塔兹尔

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227
专利代理师 张福誉 陈九洲

(51)Int.Cl.
C12N 1/21(2006.01)
A61K 45/06(2006.01)
A61K 35/74(2015.01)
A61K 9/00(2006.01)
A61P 31/04(2006.01)
A61K 35/741(2015.01)
C12N 15/31(2006.01)
C12N 15/113(2010.01)
C12R 1/445(2006.01)

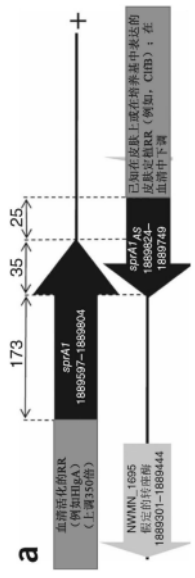
权利要求书10页 说明书142页
序列表（电子公布） 附图35页

(54)发明名称

预防微生物感染的方法和组合物

(57)摘要

本发明涉及预防微生物感染的方法和组合物,提供了用于持久地影响受试者中的微生物生态系统(微生物组)从而预防感染并减少微生物感染的复发的方法和组合物。在一些实施例中,提供了用于产生和使用具有预防多种微生物感染潜能的经过分子修饰的细菌菌株的组合物和方法。



CN 119875972 A

1.一种合成微生物,其包括重组核苷酸,所述重组核苷酸包括

至少一种杀灭开关分子修饰,所述杀灭开关分子修饰包括

第一细胞死亡基因,所述第一细胞死亡基因与

包括诱导型第一启动子的第一调节区可操作地结合,其中

响应于暴露于血液、血清或血浆,所述第一诱导型启动子显示出所述重组核苷酸的条件性高水平基因表达,基础生产力增加至少三倍。

2.根据权利要求1所述的合成微生物,其中所述合成微生物进一步包括

至少一种第二分子修饰(表达钳),所述第二分子修饰包括

对所述第一细胞死亡基因具有特异性的抗毒素基因,其中所述抗毒素基因与

包括第二启动子的第二调节区可操作地结合,所述第二启动子在真皮或粘膜定植时或在完全培养基中具有活性(组成性),但在暴露于血液、血清或血浆至少30分钟后并未被诱导、被诱导低于1.5倍或被抑制。

3.根据权利要求1或2所述的方法,其中所述合成微生物衍生自具有与不良微生物相同的属和种的目标微生物。

4.根据权利要求1或2所述的合成微生物,其中所述第一启动子在暴露于血液、血清或血浆后至少30分钟、60分钟、90分钟、120分钟、180分钟、240分钟、300分钟或至少360分钟内被上调了至少5倍、至少10倍、至少20倍、至少50倍或至少100倍。

5.根据权利要求1或2所述的合成微生物,其中在不存在血液、血清或血浆的情况下,所述第一启动子未被诱导、被诱导低于1.5倍或被抑制。

6.根据权利要求2所述的合成微生物,其中所述第二调节区包括第二启动子,所述第二启动子在真皮或粘膜定植时或在TSB培养基中具有活性,但在选自由以下组成的组的时间段后暴露于血液、血清或血浆时被抑制至少2倍:至少30分钟、60分钟、90分钟、120分钟、180分钟、240分钟、300分钟和至少360分钟。

7.根据权利要求1到6中任一项所述的合成微生物,其中所述合成微生物的可测量的平均细胞死亡发生在所述第一启动子的诱导之后的至少预设时间段内。

8.根据权利要求7所述的合成微生物,其中所述可测量的平均细胞死亡发生在暴露于血液、血清或血浆后的选自由以下组成的组的至少预设时间段内:至少1分钟、5分钟、15分钟、30分钟、60分钟、90分钟、120分钟、180分钟、240分钟、300分钟或360分钟。

9.根据权利要求8所述的合成微生物,其中在所述预设时间段后,所述可测量的平均细胞死亡为至少50%cfu、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少99%、至少99.5%、至少99.8%或至少99.9%cfu计数减少。

10.根据权利要求1到9中任一项所述的合成微生物,其中所述杀灭开关分子修饰在所述受试者的全身性病状下减少或阻止所述合成微生物的感染性生长。

11.根据权利要求1或2所述的合成微生物,其中所述至少一种分子修饰被整合到所述合成微生物的染色体上。

12.根据权利要求3所述的合成微生物,其中所述目标微生物对至少一种抗微生物剂敏感。

13.根据权利要求12所述的合成微生物,其中所述目标微生物选自细菌、真菌或原生动物目标微生物。

14.根据权利要求13所述的方法,其中所述目标微生物是能够在真皮和/或粘膜生态位定植的细菌物种,并且是选自由以下组成的组的属中的成员:不动杆菌属、棒状杆菌属、丙酸杆菌属(Cutibacterium)、葡萄球菌属、链球菌属、丙酸杆菌属(Propionibacterium)和假单胞菌属。

15.根据权利要求14所述的合成微生物,其中合成微生物衍生自金黄色葡萄球菌菌株。

16.根据权利要求15所述的合成微生物,其中所述细胞死亡基因选自由以下组成的组:sprA1、sprA2、kpn1、sma1、sprG、relF、rsaE、yoeB、mazF、yefM或溶葡萄球菌素毒素基因。

17.根据权利要求16所述的合成微生物,其中所述细胞死亡基因包括选自由以下组成的组的核苷酸序列:SEQ ID NO:122、124、125、126、127、128、274、275、284、286、288、290、315和317,或基本上相同的核苷酸序列。

18.根据权利要求16或17所述的合成微生物,其中所述诱导型第一启动子包括或衍生自选自由以下组成的组的基因:isdA(铁调节表面决定簇蛋白A)、isdB(铁调节表面决定簇蛋白B)、isdG(血红素降解型单加氧酶)、hlgA(γ-溶血素成分A)、hlgA1(γ-溶血素)、hlgA2(γ-溶血素)、hlgB(γ-溶血素成分B)、hrtAB(血红素调节型转运蛋白)、sbnC(luc C家族铁载体生物合成蛋白)、sbnD、sbnI、sbnE(lucA/lucC家族铁载体生物合成蛋白)、isdI、lrgA(胞壁质水解酶调节子A)、lrgB(胞壁质水解酶调节子B)、ear(Ear蛋白)、fhuA(铁色素转运ATP-结合蛋白fhuA)、fhuB(铁色素转运渗透酶)、hlb(磷脂酶C)、血红素ABC转运蛋白2基因、血红素ABC转运蛋白基因、isd ORF3、sbnF、丙氨酸脱氢酶基因、二氨基庚二酸脱羧酶基因、铁ABC转运蛋白基因、苏氨酸脱水酶基因、铁载体ABC转运蛋白基因、SAM dep Metrans基因、HarA、splF(丝氨酸蛋白酶SplF)、splD(丝氨酸蛋白酶SplD)、dps(一般应激蛋白20U)、SAUSA300_2617(假定的钴ABC转运蛋白、ATP结合蛋白)、SAUSA300_2268(钠/胆汁酸同向转运体家族蛋白)、SAUSA300_2616(钴家族转运蛋白)、srtB(分拣酶B)、sbnA(可能的铁载体生物合成蛋白sbnA)、sbnB、sbnG、leuA(2-异丙基苹果酸合酶氨基酸生物合成酶)、sstA(铁转运膜蛋白)、sirA(铁ABC转运蛋白底物结合蛋白)、isdA(血红素转运蛋白)和spa(葡萄球菌蛋白A)。

19.根据权利要求18所述的合成微生物,其中所述第一启动子包括选自由以下组成的组的核苷酸序列:SEQ ID NO:114、115、119、120、121、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162和163,或其基本上相同的核苷酸序列。

20.根据权利要求15到19中任一项所述的合成微生物,其中所述抗毒素基因编码能够与所述第一细胞死亡基因的至少一部分杂交的反义RNA序列。

21.根据权利要求20所述的合成微生物,其中所述抗毒素基因分别选自由以下组成的组:sprA1抗毒素基因、sprA2抗毒素基因、sprG抗毒素基因或sprF、holin抗毒素基因、187-lysK抗毒素基因、yefM抗毒素基因、溶葡萄球菌素抗毒素基因或mazE抗毒素基因、kpn1抗毒素基因、sma1抗毒素基因、relF抗毒素基因、rsaE抗毒素基因或yoeB抗毒素基因。

22.根据权利要求21所述的合成微生物,其中所述抗毒素基因包括选自由以下组成的组的核苷酸序列:SEQ ID NO:273、306、307、308、309、310、311、312、314、319或322,或基本上相同的核苷酸序列。

23.根据权利要求21或22所述的合成微生物,其中所述第二启动子包括或衍生自选自

由以下组成的组的基因:clfB(聚集因子B)、sceD(自溶素,胞外蛋白D)、walKR(毒力调节子)、atlA(主要自溶素)、oatA(O-乙酰基转移酶A);磷酸核糖基甘氨酰胺甲酰基转移酶基因、磷酸核糖基氨基咪唑合成酶基因、酰胺基磷酸核糖基转移酶基因、磷酸核糖基甲酰基甘氨酰胺合酶基因、磷酸核糖基甲酰基甘氨酰胺合酶基因、磷酸核糖基氨基咪唑-琥珀酰胺基因、海藻糖渗透酶IIC基因、DeoR家族转录调节基因、磷酸果糖激酶基因、PTS果糖转运蛋白亚基IIC基因、半乳糖-6-磷酸异构酶基因、NarZ、NarH、NarT、烷基氢过氧化物酶基因、假设蛋白基因、DeoR反式因子基因、溶血磷脂酶基因、蛋白质分解伴侣基因、烷基氢过氧化物酶基因、磷酸果糖激酶基因、gyrB、sigB和rho。

24.根据权利要求23所述的合成微生物,其中所述第二启动子是P_{clfB}(聚集因子B),并且包括SEQ ID NO:117、118、129或130的核苷酸序列,或其基本上相同的核苷酸序列。

25.根据权利要求1到24中任一项所述的合成微生物,其进一步包括选自由以下组成的组的分子修饰:毒力阻断分子修饰和纳米工厂分子修饰。

26.根据权利要求25所述的合成微生物,其中所述毒力阻断分子修饰阻止来自所述不良微生物的遗传物质的水平基因转移。

27.根据权利要求25所述的合成微生物,其中所述纳米工厂分子修饰包括基因的插入、基因的敲除或基因的遗传修饰,所述基因编码选自由以下组成的组的产物:酶、氨基酸、代谢中间体和小分子。

28.一种组合物,其包括有效量的根据权利要求1到27中任一项所述的合成微生物和药学上可接受的载剂、稀释剂、润肤剂、粘合剂、赋形剂、润滑剂、甜味剂、调味剂、润湿剂、防腐剂、缓冲剂或吸收剂或其组合。

29.根据权利要求28所述的药物组合物,其进一步包括营养素、益生元、共生体和/或益生菌物种。

30.一种单剂量单位,其包括根据权利要求28或29所述的组合物。

31.根据权利要求30所述的单剂量单位,其包括至少10^5、至少10^6、至少10^7、至少10^8、至少10^9、至少10^{10}CFU或至少10^{11}的合成菌株或和药学上可接受的载剂。

32.根据权利要求31所述的剂量单位,其被配制用于局部施用。

33.根据权利要求1到27中任一项所述的合成微生物或根据权利要求28或29所述的组合物,其用于制造用于消除和预防受试者中不良微生物的复发的药物。

34.一种用于消除和预防容纳微生物组的受试者中不良微生物的复发的方法,所述方法包括:

a.对所述宿主微生物组进行去定植;以及

b.通过向所述受试者施用包括至少一种赋予非天然属性的元件的合成微生物来持久地替换所述不良微生物,其中所述合成微生物能够持久地整合到所述宿主微生物组中,并在所述宿主微生物中占据与所述不良微生物相同的生态位。

35.根据权利要求34所述的方法,其中在所述受试者的至少一个部位上进行去定植,从而从所述至少一个部位基本上减少或消除所述不良微生物的可检测存在。

36.根据权利要求35所述的方法,其中通过包括表型方法和/或基因型方法的方法来确定所述不良微生物的可检测存在,任选地其中所述表型方法选自由以下组成的组:生物化学反应、血清学反应、对抗微生物剂的敏感性、对噬菌体的敏感性、对细菌素的敏感性和/或

细胞蛋白的特性,并且任选地

其中所述基因型方法选自由以下组成的组:杂交、质粒图谱、质粒多态性分析、限制性酶消化、通过脉冲场凝胶电泳(PFGE)进行的反应和分离、核糖分型、聚合酶链反应(PCR)及其变体、连接酶链反应(LCR)和基于转录的扩增系统(TAS)。

37.根据权利要求35所述的方法,其中所述生态位是真皮或粘膜环境,其允许所述不良微生物在所述至少一个部位处稳定定植。

38.根据权利要求37所述的方法,其中在施用步骤之后至少两周、至少四周、至少六周、至少八周、至少十周、至少12周、至少16周、至少26周、至少30周、至少36周、至少42周或至少52周的时间段内,通过所述至少一个部位处的所述合成微生物的可检测存在来确定持久整合至所述宿主微生物组的能力。

39.根据权利要求38所述的方法,其中在施用步骤之后至少两周、至少四周、至少六周、至少八周、至少十周、至少12周、至少16周、至少26周、至少30周、至少36周、至少42周或至少52周的时间段内,通过不存在所述至少一个部位处的所述不良微生物的可检测存在来确定持久替换所述不良微生物的能力。

40.根据权利要求39所述的方法,其中在施用步骤之后,通过所述至少一个部位处不存在所述不良微生物与所述合成微生物的共定植来确定占据相同生态位的能力,

任选地,其中在施用步骤之后至少一周、至少两周、至少四周、至少六周、至少八周、至少十周、至少12周、至少16周、至少26周、至少30周、至少36周、至少42周或至少52周确定不存在共定植。

41.根据权利要求34所述的方法,其中所述至少一种赋予非天然属性的元件持久地掺入到所述合成微生物中。

42.根据权利要求41所述的方法,其中将所述至少一种赋予非天然属性的元件经由所述合成微生物持久地掺入到所述宿主微生物组中。

43.根据权利要求42所述的方法,其中所述至少一种赋予非天然属性的元件选自由以下组成的组:杀灭开关分子修饰、毒力阻断分子修饰、代谢修饰和纳米工厂分子修饰。

44.根据权利要求43所述的方法,其中将所述分子修饰整合到所述合成微生物的染色体上。

45.根据权利要求43所述的方法,其中所述合成微生物包括阻止来自所述不良微生物的遗传物质的水平基因转移的毒力阻断分子修饰。

46.根据权利要求43所述的方法,其中所述合成微生物包括在所述受试者的全身性病状下减少或阻止所述合成微生物的感染性生长的杀灭开关分子修饰。

47.根据权利要求43所述的方法,其中所述合成微生物衍生自具有与所述不良微生物相同的属和种的目标微生物。

48.根据权利要求43所述的方法,其中所述合成微生物衍生自具有与所述去定植的宿主微生物组生物整合的能力的目标微生物。

49.根据权利要求43所述的方法,其中所述合成微生物衍生自从所述宿主微生物组分离的目标微生物。

50.根据权利要求48或49所述的方法,其中所述目标微生物对至少一种抗微生物剂敏感。

51.根据权利要求50所述的方法,其中所述目标微生物选自细菌、真菌或原生动物目标微生物。

52.根据权利要求51所述的方法,其中所述目标微生物是能够在真皮和/或粘膜生态位定植的细菌物种,并且是选自由以下组成的组的属中的成员:不动杆菌属、棒状杆菌属、丙酸杆菌属、葡萄球菌属、链球菌属、丙酸杆菌属和假单胞菌属。

53.根据权利要求52所述的方法,其中所述目标微生物选自由以下组成的组:约氏不动杆菌(Acinetobacter johnsonii)、鲍曼不动杆菌(Acinetobacter baumannii)、金黄色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)、表皮葡萄球菌(Staphylococcus epidermidis)、路邓葡萄球菌(Staphylococcus lugdunensis)、沃氏葡萄球菌(Staphylococcus warneri)、腐生葡萄球菌(Staphylococcus saprophyticus)、痤疮棒状杆菌(Corynebacterium acnes)、纹带棒状杆菌(Corynebacterium striatum)、白喉棒状杆菌(Corynebacterium diphtheriae)、极小棒状杆菌(Corynebacterium minutissimum)、痤疮丙酸杆菌(Cutibacterium acnes)、痤疮丙酸杆菌(Propionibacterium acnes)、颗粒丙酸杆菌(Propionibacterium granulosum)、酿脓链球菌(Streptococcus pyogenes)、金黄色葡萄球菌、无乳链球菌(Streptococcus agalactiae)、缓症链球菌(Streptococcus mitis)、绿色链球菌(Streptococcus viridans)、肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae)、咽峡炎链球菌(Streptococcus anginosis)、星座链球菌(Steptococcus constellatus)、中间链球菌(Streptococcus intermedius)、无乳链球菌(Streptococcus agalactiae)、铜绿假单胞菌(Pseudomonas aeruginosa)、栖稻假单胞菌(Pseudomonas oryzihabitans)、施氏假单胞菌(Pseudomonas stutzeri)、恶臭假单胞菌(Pseudomonas putida)和荧光假单胞菌(Pseudomonas fluorescens),任选地其中目标菌株是金黄色葡萄球菌502a菌株或RN4220菌株。

54.根据权利要求46所述的方法,其中所述合成微生物杀灭开关分子修饰包括可操作地连接至包括第一诱导型启动子的第一调节区的第一细胞死亡基因。

55.根据权利要求54所述的方法,其中通过与所述受试者的至少一个部位处的正常生理(生态位)状况相比,微生物环境中的状态改变来激活(诱导)所述第一启动子。

56.根据权利要求55所述的方法,其中所述合成微生物的可测量的平均细胞死亡发生在所述第一启动子的诱导之后的至少预设时间段内。

57.根据权利要求56所述的方法,其中在状态改变后,所述可测量的平均细胞死亡发生在选自由以下组成的组的至少预设时间段内:至少1分钟、5分钟、15分钟、30分钟、60分钟、90分钟、120分钟、180分钟、240分钟、300分钟或360分钟。

58.根据权利要求57所述的方法,其中在所述预设时间段后,所述可测量的平均细胞死亡为至少50%cfu、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少99%、至少99.5%、至少99.8%或至少99.9%cfu计数减少。

59.根据权利要求55所述的方法,其中所述状态改变选自以下中的一个或多个:pH、温度、渗透压、重量渗透摩尔浓度、氧气水平、营养素浓度、血液浓度、血浆浓度、血清浓度、金属浓度、螯合金属浓度、一种或多种免疫因子的组成或浓度变化、矿物质浓度和电解质浓度。

60.根据权利要求59所述的方法,其中所述状态改变是与所述受试者的至少一个部位

处的正常生理(生态位)状况相比的血液、血清或血浆的浓度更高和/或组成改变。

61.根据权利要求60所述的方法,其中所述第一启动子是血液、血清、血浆和/或血红素响应性启动子。

62.根据权利要求55到61中任一项所述的方法,其中在所述状态改变后,所述第一启动子在选自由以下组成的组的时间段内被上调至少1.5倍、至少3倍、至少5倍、至少10倍、至少20倍、至少50倍或至少100倍:至少30分钟、60分钟、90分钟、120分钟、180分钟、240分钟、300分钟和至少360分钟。

63.根据权利要求62所述的方法,其中在不存在所述状态改变的情况下,所述第一启动子未被诱导、被诱导低于1.5倍或被抑制。

64.根据权利要求63所述的方法,其中在存在血清或血液的情况下,所述第一启动子在一段时间内被诱导至少1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍或至少6倍。

65.根据权利要求64所述的方法,其中在所述至少一个部位处,在所述正常生理(生态位)状况下,所述第一启动子未被诱导、被诱导低于1.5倍或被抑制。

66.根据权利要求64所述的方法,其中在不存在血液、血清、血浆或血红素的情况下,所述第一启动子未被诱导、被诱导低于1.5倍或被抑制。

67.根据权利要求54到66中任一项所述的方法,其中所述合成微生物衍生自作为金黄色葡萄球菌菌株的目标微生物,并且其中所述第一启动子衍生自选自由以下组成的组的基因:isdA(铁调节表面决定簇蛋白A)、isdB(铁调节表面决定簇蛋白B)、isdG(血红素降解型单加氧酶)、hlgA(γ-溶血素成分A)、hlgA1(γ-溶血素)、hlgA2(γ-溶血素)、hlgB(γ-溶血素成分B)、hrtAB(血红素调节型转运蛋白)、sbnC(luc C家族铁载体生物合成蛋白)、sbnD、sbnI、sbnE(lucA/lucC家族铁载体生物合成蛋白)、isdI、lrgA(胞壁质水解酶调节子A)、lrgB(胞壁质水解酶调节子B)、ear(Ear蛋白)、fhuA(铁色素转运ATP-结合蛋白fhuA)、fhuB(铁色素转运渗透酶)、hlb(磷脂酶C)、血红素ABC转运蛋白2基因、血红素ABC转运蛋白基因、isd ORF3、sbnF、丙氨酸脱氢酶基因、二氨基庚二酸脱羧酶基因、铁ABC转运蛋白基因、苏氨酸脱水酶基因、铁载体ABC转运蛋白基因、SAM dep Metrans基因、HarA、splF(丝氨酸蛋白酶SplF)、splD(丝氨酸蛋白酶SplD)、dps(一般应激蛋白20U)、SAUSA300_2617(假定的钴ABC转运蛋白、ATP结合蛋白)、SAUSA300_2268(钠/胆汁酸同向转运体家族蛋白)、SAUSA300_2616(钴家族转运蛋白)、srtB(分拣酶B)、sbnA(可能的铁载体生物合成蛋白sbnA)、sbnB、sbnG、leuA(2-异丙基苹果酸合酶氨基酸生物合成酶)、sstA(铁转运膜蛋白)、sirA(铁ABC转运蛋白底物结合蛋白)、isdA(血红素转运蛋白)和spa(葡萄球菌蛋白A)。

68.根据权利要求67所述的方法,其中所述第一启动子衍生自或包括选自由以下组成的组的核苷酸序列:SEQ ID NO:114、115、119、120、121、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162和163,或其基本上相同的核苷酸序列。

69.根据权利要求54到68中任一项所述的方法,其中所述不良微生物是金黄色葡萄球菌菌株,并且其中所述可检测存在是通过包括以下的方法测量的:从所述受试者的至少一个部位处获得样品、使显色琼脂与所述样品接触、孵育所述接触的琼脂以及在预定时间段后计数细菌物种的阳性cfu。

70.根据权利要求54到69中任一项所述的方法,其中所述细胞死亡基因选自毒素基因,

所述毒素基因选自由以下组成的组:sprA1、sprA2、kpn1、sma1、sprG、relF、rsaE、yoeB、mazF、yefM和溶葡萄球菌素毒素基因。

71.根据权利要求70所述的方法,其中所述细胞死亡基因包括选自由以下组成的组的核苷酸序列:SEQ ID NO:122、124、125、126、127、128、274、275、284、286、288、290、315和317,或基本上相同的核苷酸序列。

72.根据权利要求54到71中任一项所述的方法,其中所述合成微生物进一步包括表达钳分子修饰,所述表达钳分子修饰包括对所述第一细胞死亡基因具有特异性的抗毒素基因,其中所述抗毒素基因与包括第二启动子的第二调节区可操作地连接,所述第二启动子在真皮或粘膜定植时或在TSB培养基中具有活性,但在选自由以下组成的组的时间段后暴露于血液、血清或血浆时被抑制至少2倍:至少30分钟、60分钟、90分钟、120分钟、180分钟、240分钟、300分钟和至少360分钟。

73.根据权利要求72所述的方法,其中所述抗毒素基因编码能够与所述第一细胞死亡基因的至少一部分杂交的反义RNA序列。

74.根据权利要求73所述的方法,其中所述抗毒素基因分别选自由以下组成的组:sprA1抗毒素基因、sprA2抗毒素基因、sprG抗毒素基因或sprF、holin抗毒素基因、187-lysK抗毒素基因、yefM抗毒素基因、溶葡萄球菌素抗毒素基因或mazE抗毒素基因、kpn1抗毒素基因、sma1抗毒素基因、relF抗毒素基因、rsaE抗毒素基因或yoeB抗毒素基因。

75.根据权利要求74所述的方法,其中所述抗毒素基因包括选自由以下组成的组的核苷酸序列:SEQ ID NO:273、306、307、308、309、310、311、312、314、319或322,或基本上相同的核苷酸序列。

76.根据权利要求72到75中任一项所述的方法,其中所述第二启动子衍生自选自由以下组成的组的基因:clfB(聚集因子B)、sceD(自溶素,胞外蛋白D)、walKR(毒力调节子)、atlA(主要自溶素)、oatA(O-乙酰基转移酶A);磷酸核糖基甘氨酰胺甲酰基转移酶基因、磷酸核糖基氨基咪唑合成酶基因、酰胺基磷酸核糖基转移酶基因、磷酸核糖基甲酰基甘氨酰胺合酶基因、磷酸核糖基甲酰基甘氨酰胺合酶基因、磷酸核糖基氨基咪唑-琥珀酰胺基因、海藻糖渗透酶IIC基因、DeoR家族转录调节基因、磷酸果糖激酶基因、PTS果糖转运蛋白亚基IIC基因、半乳糖-6-磷酸异构酶基因、NarZ、NarH、NarT、烷基氢过氧化物酶基因、假设蛋白基因、DeoR反式因子基因、溶血磷脂酶基因、蛋白质分解伴侣基因、烷基氢过氧化物酶基因、磷酸果糖激酶基因、gyrB、sigB和rho。

77.根据权利要求76所述的方法,其中所述第二启动子是P_{clfB}(聚集因子B),并且包括SEQ ID NO:117、118、129或130的核苷酸序列,或其基本上相同的核苷酸序列。

78.根据权利要求43到77中任一项所述的方法,其中所述去定植步骤包括向所述受试者的所述至少一个部位局部施用去定植剂,从而减少或消除来自所述至少一个部位的所述不良微生物的存在。

79.根据权利要求78所述的方法,其中所述去定植步骤包括局部施用所述去定植剂,其中并未同时施用全身性抗微生物剂。

80.根据权利要求78或79所述的方法,其中在第一次局部施用所述去定植剂的一周、两周、三周、一个月、两个月、三个月、六个月或一年内不施用全身性抗微生物剂。

81.根据权利要求40到42中任一项所述的方法,其中所述去定植剂选自由以下组成的

组:消毒剂、杀菌剂、防腐剂、收敛剂和抗微生物剂。

82.根据权利要求81所述的方法,其中所述去定植剂选自由以下组成的组:醇类(乙醇、异丙醇)、醛类(戊二醛、甲醛、甲醛释放剂(羟甲基甲硫脲＝甲醛硫脲、牛磺罗定、六胺、登妥因)、邻苯二甲醛)、酰苯胺类(三氯卡班＝TCC＝3,4,4'-三氯均二苯脲)、双胍类(氯己定、阿来西定、聚合双胍类(MW>3,000g/mol的聚六亚甲基双胍,vantocil)、双脒剂(普罗帕脒、羟乙磺酸丙氧苯脒、二盐酸丙氧苯脒、双溴丙脒、羟乙磺酸双溴丙脒)、酚类(硫双氯酚、对氯间二甲苯酚、氯二甲酚、六氯酚)、双酚类(三氯生、六氯酚)、氯二甲酚(PCMX)、季铵化合物(西曲溴铵、苯扎氯铵、西吡氯铵)、银化合物(磺胺嘧啶银、硝酸银)、过氧化物(过氧化氢、过乙酸、过氧化苯甲酰)、碘化合物(聚维酮-碘、泊洛沙姆-碘、碘)、释氯剂(次氯酸钠、次氯酸、二氧化氯、二氯异氰尿酸钠、氯胺-T)、铜化合物(氧化铜)、异维A酸、硫化合物、植物提取物(白千层属(茶树油)、越橘属(例如,A型原花青素)、腊肠树、岗松、苦楝、文定果、葡萄、Terminalia avicennioides Guill&Perr、Phylantus discoideus muel.Muel-Arg、丁香罗勒、金边红桑、Hypericum pruinatum Boiss.&Bal、Hypericum olimpicum L.和Hypericum sabrum L、北美金缕梅(金缕梅)、丁香油、桉属、迷迭香属(迷迭香)、百里香属(百里香)、牛至属(牛至)、香茅属、樟属、老鹳草属、薰衣草属)、氨基酮戊酸和局部抗生素化合物(细菌素;莫匹罗星、杆菌肽、新霉素、多粘菌素B、庆大霉素)。

83.根据权利要求81或82所述的方法,其中所述抗微生物剂选自由以下组成的组:万古霉素、头孢唑林、头孢霉素、头孢氨苄、利奈唑胺、达托霉素、克林霉素、林可霉素、莫匹罗星、杆菌肽、新霉素、多粘菌素B、庆大霉素、普卢利沙星、尤利沙星、非达霉素、盐酸米诺环素、甲硝唑、甲硝唑、磺胺甲噁唑、氨苄西林、甲氧苄啶、氧氟沙星、诺氟沙星、替硝唑、诺氟沙星、奥硝唑、左氧氟沙星、萘啶酸、头孢曲松、阿奇霉素、头孢克肟、头孢曲松、头孢氨苄、头孢曲松、利福昔明、环丙沙星、诺氟沙星、氧氟沙星、左氧氟沙星、加替沙星、吉米沙星、普鲁利沙星、尤利沙星、莫西沙星、制霉菌素、两性霉素B、氟胞嘧啶、酮康唑、泊沙康唑、克霉唑、伏立康唑、灰黄霉素、硝酸咪康唑和氟康唑。

84.根据权利要求78到83中任一项所述的方法,其中所述去定植包括在替换步骤之前局部施用所述去定植剂至少一次、两次、三次、四次、五次或六次或更多次。

85.根据权利要求84所述的方法,其中所述去定植步骤包括以0.5小时到48小时之间的间隔向所述受试者的至少一个宿主部位施用所述去定植剂一次到六次或更多次或两次到四次,并且其中在最终的去定植步骤之后进行所述替换步骤。

86.根据权利要求85所述的方法,其中所述替换步骤包括向所述受试者的所述至少一个宿主部位初始局部施用组合物,所述组合物包括至少10^5、至少10^6、至少10^7、至少10^8、至少10^9、至少10^{10}CFU或至少10^{11}的合成菌株和药学上可接受的载剂。

87.根据权利要求86所述的方法,其中在所述去定植步骤的12小时、24小时、36小时、2天、3天、4天、5天、6天或7天内执行初始替换步骤。

88.根据权利要求86或87所述的方法,其中在最终的去定植步骤之后,以不超过每两周一次到六个月一次的间隔重复所述替换步骤。

89.根据权利要求86或87所述的方法,其中以不超过每两周一次到六个月一次的间隔重复所述去定植步骤和所述替换步骤。

90.根据权利要求86到89中任一项所述的方法,其中所述替换包括向所述至少一个部

位施用所述合成微生物至少一次、两次、三次、四次、五次、六次、七次、八次、九次或十次。

91.根据权利要求90所述的方法,其中所述替换包括每月向所述至少一个部位施用所述合成微生物不超过一次、不超过两次、不超过三次或不超过四次。

92.根据权利要求43到91中任一项所述的方法,其进一步包括

促进所述合成微生物在所述受试者中的定植。

93.根据权利要求92所述的方法,其中促进所述合成微生物在所述受试者中的定植包括向所述受试者施用促进剂,任选地,其中所述促进剂是营养素、益生元、共生体、稳定剂、保湿剂和/或益生菌物种。

94.根据权利要求93所述的方法,其中所述促进包括在初始的去定植步骤之后向所述受试者施用10^6到10^{10}cfu或10^7到10^9cfu的益生菌物种。

95.根据权利要求93所述的方法,其中所述营养素选自氯化钠、氯化锂、甘油磷酸钠、苯乙醇、甘露醇、胰蛋白、肽和酵母提取物。

96.根据权利要求93所述的方法,其中所述益生元选自由以下组成的组:短链脂肪酸(乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸、戊酸、异戊酸)、甘油、来自农业副产物的果胶衍生的寡糖、低聚果糖(例如,菊粉样益生元)、低聚半乳糖(例如,棉子糖)、琥珀酸、乳酸和甘露寡糖。

97.根据权利要求93所述的方法,其中所述益生菌选自由以下组成的组:短双歧杆菌(Bifidobacterium breve)、两歧双歧杆菌(Bifidobacterium bifidum)、乳酸双歧杆菌(Bifidobacterium lactis)、婴儿双歧杆菌(Bifidobacteriuminfantis)、短双歧杆菌、长双歧杆菌(Bifidobacterium longum)、罗伊氏乳杆菌(Lactobacillus reuteri)、副干酪乳杆菌(Lactobacillus paracasei)、植物乳杆菌(Lactobacillus plantarum)、约氏乳杆菌(Lactobacillus johnsonii)、鼠李糖乳杆菌(Lactobacillus rhamnosus)、嗜酸乳杆菌(Lactobacillus acidophilus)、唾液乳杆菌(Lactobacillus salivarius)、干酪乳杆菌(Lactobacillus casei)、植物乳杆菌、乳酸乳球菌(Lactococcus lactis)、嗜热链球菌(Streptococcus thermophiles)和粪肠球菌(Enterococcus fecalis)。

98.根据权利要求93所述的方法,其中所述共生体选自由以下组成的组:约氏不动杆菌、鲍曼不动杆菌、金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、路邓葡萄球菌、沃氏葡萄球菌、腐生葡萄球菌、痤疮棒状杆菌、纹带棒状杆菌、白喉棒状杆菌、极小棒状杆菌、痤疮丙酸杆菌、痤疮丙酸杆菌、颗粒丙酸杆菌、酿脓链球菌、金黄色葡萄球菌、无乳链球菌、缓症链球菌、绿色链球菌、肺炎链球菌、咽峡炎链球菌、星座链球菌、中间链球菌、无乳链球菌、铜绿假单胞菌、栖稻假单胞菌、施氏假单胞菌、恶臭假单胞菌和荧光假单胞菌。

99.根据权利要求43到98中任一项所述的方法,其中所述不良微生物是抗微生物剂抗性微生物。

100.根据权利要求99所述的方法,其中所述抗微生物剂抗性微生物是抗生素抗性细菌。

101.根据权利要求99所述的方法,其中所述抗生素抗性细菌是革兰氏阳性细菌物种,其选自由以下组成的组:链球菌属、丙酸杆菌属和葡萄球菌属。

102.根据权利要求101所述的方法,其中所述链球菌属选自由以下组成的组:肺炎链球菌、变形链球菌(Steptococcus mutans)、远缘链球菌(Streptococcus sobrinus)、酿脓链球菌和无乳链球菌。

103.根据权利要求101所述的方法,其中所述丙酸杆菌属选自由以下组成的组:痤疮丙酸杆菌痤疮亚种(Cutibacterium acnes subsp.acnes)、痤疮丙酸杆菌defendens亚种(Cutibacterium acnes subsp.defendens)和痤疮丙酸杆菌细长亚种(Cutibacterium acnes subsp.elongatum)。

104.根据权利要求101所述的方法,其中所述葡萄球菌属选自由以下组成的组:金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌和腐生葡萄球菌。

105.根据权利要求104所述的方法,其中所述不良微生物是耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌(MRSA)菌株,所述菌株含有葡萄球菌染色体盒(I-III型SCCmec),其编码一个(I型SCCmec)或多个抗生素抗性基因(II型和III型SCCmec)和/或产生毒素。

106.根据权利要求105所述的方法,其中所述毒素选自由以下组成的组:潘顿-华伦特白蛋白结合素(PVL)毒素、中毒性休克综合征毒素-1(TSST-1)、葡萄球菌α-溶血素毒素、葡萄球菌β-溶血素毒素、葡萄球菌γ-溶血素毒素、葡萄球菌δ-溶血素毒素、肠毒素A、肠毒素B、肠毒素C、肠毒素D、肠毒素E和凝固酶毒素。

107.根据权利要求43到106中任一项所述的方法,其中所述受试者在所述施用步骤之后至少两周、至少四周、至少六周、至少八周、至少十周、至少12周、至少16周、至少24周、至少30周、至少36周、至少42周或至少52周并未表现出所述不良微生物的复发,如通过在所述至少一个部位处擦拭所述受试者所证明。

108.一种试剂盒,其在至少一个容器中包括根据权利要求1到27中任一项所述的合成微生物、根据权利要求28或29中任一项所述的组合物或根据权利要求30到32中任一项所述的单剂量,以及任选的包括去定植剂的至少第二个容器、一张说明书、包括促进剂的至少第三个容器和/或施药器。

预防微生物感染的方法和组合物

[0001] 本申请是申请日为2018年12月4日、申请号为201880088486.5、发明名称为“预防微生物感染的方法和组合物”的中国专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请作为PCT国际专利申请于2018年12月4日提交,并要求2017年12月5日提交的美国临时申请第62/594,943号的优先权,所述美国临时申请通过引用整体并入本文。

[0004] 序列表

[0005] 本申请包含电子格式的序列表,所述序列表作为创建于2018年12月3日的标题为“Sequence-Listing”的文件,并且所述文件大小为128,065千字节(KB)。txt文件“Sequence-Listing”的内容通过引用并入本文。

技术领域

[0006] 提供了用于持久地影响受试者中的微生物生态系统(微生物组)从而通过去定植和用合成微生物进行持久替换来抵抗感染并减少不良微生物的感染复发的方法和组合物。提供了合成微生物,所述合成微生物可以在真皮或粘膜条件下持久地替换不良微生物,并且含有旨在增强安全性的分子修饰(例如,当暴露于全身性病状时通过自我破坏、通过减少获取毒力或抗生素抗性基因的可能性和/或通过在受试者的生态系统部位产生期望的产物来增强安全性)。

背景技术

[0007] 与卫生保健或社区相关的感染通常是由克服患者防御能力的定植微生物导致的。抗生素使用不当可能会导致微生物组管理不当。微生物组管理不当的一个关键的意外后果是抗生素抗性微生物的出现。

[0008] 每个人都拥有数十万亿微生物,所述微生物可能由10,000种不同的物种、类型和菌株组成。这些“共生”生物既存在于外部部位(例如真皮),也存在于内部部位(例如胃肠道),并且对于人类的生存是必需的。“定植”是通过与环境的持续互动而自动发生的。

[0009] 微生物的发酵构成了“生物群系”,其是一种动态的、结构化的生物系统,在许多情况下以及在许多方面对健康至关重要。生物组结构是由宿主、环境和生物群系组成部分之间广泛的组合网络创建的。人类微生物组是一个生态系统。所述生态系统具有动态但持久的结构—其是“可复原的”并且具有“健康”的正常基本状态。

[0010] 然而,在一些情况下,微生物组可能被病原微生物入侵并占据。这种“定植”可能成为“感染”的先兆。对微生物组的这种破坏可能导致严重的甚至威胁生命的疾病。

[0011] 生物群系管理不当的一个意想不到的后果是“抗生素抗性”的出现。当抗生素和防腐剂不能完全消除目标微生物时,就会发生这种情况。少数对这些材料表现出抗性的幸存者随后优先生长(“重新定植”)回到一个已经清除了竞争生物的开放环境(或空置的“生态位”)中。然后,幸存生物控制了整个空间,这通常对其后代保持抵抗力。如果暴露于新的杀灭剂中,所述幸存生物也会趋向于产生抗性。这些微生物仅几代之久就可以对许多或所有

已知的抗生素产生抗性,从而成为当今著名的“超级细菌”,并在此过程中造成巨大的全球健康新问题。

[0012] 被称为“复发”的现象是产生抗生素抗性的过程的核心。尽管存在治疗病原性感染的方法,但实际上不存在预防复发的方法。

[0013] 细菌感染是正在出现的“超级细菌”现象的本因。抗生素的过度使用和滥用已导致许多致病菌的菌株对越来越多的抗生素疗法产生抵抗力,从而造成了巨大的全球公共卫生问题。随着每种新的抗生素变种被用于治疗这些超级细菌,选择抗性菌株的必然过程重新开始,并且病原体的抗性变体也迅速发展。不幸的是,今天细菌形成抵抗力的速度比开发新抗生素更快。

[0014] 除了培养抗生素抗性并经常在接受者中引起不良健康影响外,抗生素治疗还具有破坏整个微生物组(包含有益细菌和有害细菌)的不期望的作用。这通常会产生新的问题,例如在治疗后将微生物组开放给不定病原体定植。

[0015] 然而,细菌具有较少的适应不同资源的余地,因为这些要求在分子水平上更基础,并且在基因组中固有地定义。这使微生物组生态学的行为更像是一个“理想”的系统,从而导致完全相同的菌株竞争者之一被排除在生态位之外。

[0016] 定植在人体中的生物群落被称为微生物组。通常将微生物组根据地理学进行细分(即皮肤微生物组与胃肠道微生物组)或根据系统学进行细分(即细菌微生物组与真菌或原生微生物组),以用于分析。

[0017] 抗生素是拯救生命的药物,但是其也可能改变微生物组、使微生物组失衡和破坏微生物组。微生物组是体内和皮肤上、肠道、口腔或呼吸道以及泌尿道中自然存在的细菌群落。健康的微生物组有助于防止感染。抗生素破坏了微生物组,从而消除了“有益”细菌和“有害”细菌。耐药细菌(例如MRSA、CRE和艰难梭菌)可以利用这种干扰并繁殖。由于抗性细菌的这种过度生长,身体已为感染做好了准备。一旦受试者被抗性细菌定植,则抗性细菌就可以轻松地传播给其它人。参见“抗生素抗性(AR)解决方案计划:微生物组、CDC微生物组情况说明书2016(Antibiotic Resistance(AR)Solutions Initiative:Microbiome,CDC Microbiome Fact Sheet 2016)”.www.cdc.gov/drugresistance/solutions-initiative/innovations-to-slow-AR.html.

[0018] 根据疾病控制中心(CDC)的数据,对美国的主要抗性威胁包含淋病奈瑟氏球菌(Neisseria gonorrhoeae)、多重耐药性不动杆菌属(Acinetobacter)、耐药性弯曲杆菌属(Campylobacter)、耐氟康唑的念珠菌属(Candida)、耐万古霉素的肠球菌属(Enterococcus)(VRE)、多重耐药性铜绿假单胞菌(Pseudomonas Aeruginosa)、耐药性非伤寒沙门氏菌(non-typhoidal Salmonella)、耐药性伤寒沙门氏菌血清型(Salmonella serotype typhi)、耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)(MRSA)、耐药性肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae)、耐药性结核病、耐万古霉素的金黄色葡萄球菌、耐红霉素的A组链球菌属(Streptococcus)和耐克林霉素的B组链球菌属。参见“抗生素/抗微生物抗性(AR/AMR)”,https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest_threats.html.

[0019] 淋病奈瑟氏球菌引起淋病,这是一种性传播疾病,可导致尿道、子宫颈、咽部或直肠的分泌物和炎症。每年大约有820,000例淋病感染。其中,约有246,000例耐药性淋病感

染:188,600例四环素抗性、11,489例对头孢克肟的敏感性降低、3,280例对头孢曲松的敏感性降低以及约2,460例对阿奇霉素的敏感性降低。

[0020] 不动杆菌属是革兰氏阴性细菌的一种,其是重症患者中肺炎或血液感染的原因。这些细菌中的许多细菌已经变得对抗生素具有很强的抵抗力。每年约有12,000例不动杆菌属感染,包含约7,300例多重抗性不动杆菌属感染和500例死亡。

[0021] 念珠菌病是由念珠菌属的酵母引起的真菌感染。有超过20多种念珠菌酵母可导致人类感染,其中最常见的是白色念珠菌。念珠菌酵母通常生活在皮肤和粘膜上而不会引起感染。然而,这些微生物的过度生长或入侵会导致症状发展。念珠菌病的症状因感染的身体部位而异。念珠菌属是美国与卫生保健相关的第四大常见血液感染原因。在一些医院中,念珠菌属是最常见的原因。这些感染往往发生在患病最重的患者中。每年约有46,000例念珠菌属感染,包含约3,400例耐氟康唑的念珠菌属感染和220例死亡。

[0022] 金黄色葡萄球菌是在皮肤上发现的常见类型的细菌。在医疗手术中,当患者需要导管或呼吸机或进行外科手术时,金黄色葡萄球菌会进入体内并引起感染。耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌(MRSA)引起一系列疾病,从皮肤和伤口感染到肺炎和血液感染,所述感染可能导致败血症和死亡。葡萄球菌(包含MRSA)是与卫生保健相关的感染的最常见原因之一。每年约有80,461例严重MRSA感染,并且每年约有11,285例MRSA导致的死亡。当金黄色葡萄球菌对万古霉素耐药时,几乎没有可用的治疗方法,因为迄今为止确定的耐万古霉素的金黄色葡萄球菌也对甲氧西林和其它种类的抗生素耐药。自2002年以来,在4个州至少有13例耐万古霉素的金黄色葡萄球菌。

[0023] 肺炎链球菌(S.pneumoniae或pneumococcus)是美国细菌性肺炎和脑膜炎的主要原因。其也是引起血流感染以及耳和鼻窦感染的主要原因。每年约有1,200,000例耐药性感染,约有19,000例额外住院和7,000例死亡。

[0024] A组链球菌(GAS)引起许多疾病,包含咽炎(链球菌性咽喉炎)、链球菌中毒性休克综合征、坏死性筋膜炎(“肉食性”疾病)、猩红热、风湿热和皮肤感染(如脓疱病)。A组链球菌是坏死性筋膜炎(“肉食性”疾病)的主要原因。同年约有1-260万例链球菌性咽喉炎感染,包含每年约1300例耐药性A组链球菌属感染,以及约160例死亡。

[0025] B组链球菌(GBS)是一种细菌,其可以在各个年龄段的人群中引起严重疾病,范围从血流感染(败血症)和肺炎到脑膜炎和皮肤感染。B组链球菌是新生儿严重微生物感染的主要原因。2011年,约有27,000例严重的GBS病例,包含约7,600例耐药性B组链球菌属感染和约440例死亡。

[0026] 预防耐药性微生物在定植个体中的感染和传播的现有技术方法包含筛查和分离耐药性微生物、对所述耐药性微生物进行去定植和/或用药物敏感性微生物进行重新定植。

[0027] 仅采用抑制(去定植)的现有技术方法(如使用抗生素和抗微生物剂)经常失败,因为其经受高复发率。当单独使用时,去定植常常不足以有效地防止耐药性微生物的复发和/或传播。

[0028] 在引起与卫生保健有关的感染的病原微生物中,耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌(MRSA)由于其毒力和疾病谱、多重耐药性特性以及在卫生保健机构中的流行性而被优先考虑。MRSA是呼吸机相关性肺炎和手术部位感染的最常见原因,也是中央导管相关血流感染的第二个最常见的原因。

[0029] 已经显示,涉及对新住院患者进行MRSA筛查并分离携带MRSA的患者(不论是否进行去定植)的策略在减少传播方面有些有效。然而,这种类型的治疗相当昂贵,需要额外的居住设施,并带有特殊的收容和卫生程序。

[0030] 单独的去定植已被用于医院患者中,以试图减少金黄色葡萄球菌携带者的传播并预防疾病。去定植可能涉及抗生素和/或防腐剂的多日治疗方案,例如,鼻内莫匹罗星和氯己定沐浴。通用的去定植是一些医院采用的一种方法,在所述方法中,所有重症监护病房(ICU)的住院患者每天都要用氯己定和鼻内莫匹罗星清洗,但自从广泛使用以来,美国的MRSA感染率并未发生明显变化。此外,微生物在反复接触后可能对氯己定和莫匹罗星产生抗性。

[0031] 单独使用时,去定植可能不会持久,因为空置的生态位可能会被病原微生物或耐药性微生物重新定植。

[0032] 例如,Shinefield等人(1963,《美国儿童疾病杂志(Amer J Dis Child)》105,1963年6月,第146-154页)观察到新生婴儿通过与携带者接触而被定植了具有52/52a/80/81噬菌体复合物的金黄色葡萄球菌菌株,之后婴儿及其家人经常患病。Shinefield还观察到,对婴儿使用杀菌剂或抗微生物剂的控制措施导致菌群异常的定植,所述菌群主要由高度耐药的凝固酶阴性葡萄球菌和革兰氏阴性菌(如假单胞菌和变形杆菌)组成。Shinefield试图通过经鼻和/或脐带接种,用葡萄球菌菌株502a来对新生儿进行人工定植,从而解决这个问题。502a是低毒力的金黄色葡萄球菌的凝固酶阳性菌株,其易受青霉素影响,并且无法诱导产生β-内酰胺酶。结果表明,其它葡萄球菌的存在会干扰502a的获得。6个月至一年后,定植的持久性至多为35%。

[0033] Boris M.等人(“细菌干扰:预防复发的家族性葡萄球菌疾病(Bacterial Interference:Protection Against Recurrent Intrafamilial Staphylococcal Disease)”《美国儿童疾病杂志》115(1968):521-29)故意在出生后的头几个小时内用金黄色葡萄球菌502a对约4000个婴儿进行定植(鼻孔和脐带残端)。观察到婴儿几乎完全免受80/81感染(在接种后1年内监测婴儿)。尽管有5-15%的婴儿出现了微小的治疗性小囊泡,但在治疗后的前3天会自行消退。与安慰剂(盐水)n=63相比,现有的去定植将502a的持久性提高了5倍。复发性疖病的对照研究表明,在80%的患者中,使用全身性抗生素+鼻腔抗微生物剂进行去定植然后应用502a减少了疾病。

[0034] 用药物敏感性菌株进行重新定植可能是不安全的,因为药物敏感性菌株仍可能引起全身性感染。

[0035] Shinefield等人(1973,《微生物免疫(Microbiol Immunol)》,第1卷,541-547)报道了使用细菌置换(包含去定植)治疗患有复发性疖病的患者。用抗生素疗法(包含全身性抗生素以及鼻腔粘膜使用抗微生物霜)治疗了慢性葡萄球菌携带者。在最初的研究中,31名患者仅接受了抗生素疗法,并且原始菌株的复发率达到74%。18名患者先接受了抗生素疗法,随后进行了502a接种,并且原始菌株的复发率为27%。一项针对587名患者的更大研究导致12个月后原始菌株复发率为21%。然而,糖尿病、湿疹或粉刺患者的复发率很高。在11名患者中发现了与502a相关的疾病。

[0036] Aly等人(1974《传染病学杂志(J Infect Dis)》129(6)第720-724页)研究了金黄色葡萄球菌携带者中的细菌干扰。用抗生素和抗菌皂治疗携带者,并用菌株502a攻击。具体

地说,去定植方法涉及口服双氯西林8天;鼻内使用新孢霉素8天,以及三氯均二苯脲(trichlorocabanilide)。据发现,需要充分的去定植才能取得良好摄入。第7天的摄入为100%,但在第23天的摄入则降至60%到80%。经过良好去定植的受试者在23周时的持久性数据为73%,而部分去定植的受试者的持久性数据仅为17%。第3天在5/12个受试者中发现了共定植,第10天在2/12个受试者中发现了共定植,并且第35天和第70天在1/12个受试者中发现了共定植。

[0037] 去定植后用相同属但不同物种的微生物进行重新定植可能是不持久的,因为空置的生态位无法被不同物种充分填充。

[0038] 转让给西达斯西奈医学中心(Cedars-Sinai Medical Center)的WO2009117310A2(George Liu)公开了用于使用去定植/重新定植方法治疗和预防耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌和对甲氧西林敏感的金黄色葡萄球菌(MSSA)的方法。在一个实例中,用抗生素治疗小鼠以根除现有菌群(包含MRSA),并用相同属但不同物种的细菌(如表皮葡萄球菌)对新清除的表面积进行定植。并未提供有关复发的具体数据。

[0039] 施用益生菌以治疗病原微生物感染的尝试可能是无效的,并且可能不是持久的,因为益生菌可能不会永久地定植于受试者。

[0040] 转让给Bovine保健品公司的美国专利第6,660,262号(Randy McKinney)公开了用于治疗动物的微生物感染的广谱抗微生物组合物,所述广谱抗微生物组合物包括某些矿物质、维生素、钴氨基酸、海藻和乳杆菌物种。在牛和马中进行了田间试验,但未鉴定出传染性细菌菌株或其它传染原。

[0041] 转让给Ganeden生物技术公司的美国专利第6,905,692号(Sean Farmer)公开了用于应用到哺乳动物的皮肤或粘膜以抑制某些细菌、酵母、真菌和病毒的局部用组合物,所述局部用组合物含有益生型芽孢杆菌细菌、孢子和细胞外产物的某些组合。提供了媒剂(如鸸鹋油)形式的包括凝结芽孢杆菌(Bacillus coagulens)孢子或芽孢杆菌物种培养上清液和林氏假单胞菌(Pseudomonas lindbergii)培养上清液的组合物。所述公开指出,由于益生菌不会永久地定植在宿主中,因此需要定期摄取或应用益生菌,以使任何促进健康的特性持续存在。

[0042] 转让给Ganeden生物技术公司的美国专利第6,461,607号(Sean Farmer)公开了用于控制哺乳动物中的胃肠道病原体的产乳酸菌,优选地,凝结芽孢杆菌菌株。公开了用于对具有抗生素抗性的益生型产乳酸菌菌株进行选择性育种和分离的方法。公开了用于使用包括抗生素抗性产乳酸菌和抗生素的组合物治疗感染的方法。

[0043] 转让给Seres Therapeutics的美国专利第8,906,668号提供了两种或更多种不同操作分类单位(OTU)的细菌的细胞毒性二元组合,以持久地排除致病细菌。通过比较生物之间的序列(例如,至少在高变区中共享16S核糖体RNA基因的至少95%序列同一性的序列)来确定OTU。

[0044] 仅采用替换原始病原微生物(重新定植)的现有技术方法容易受到新微生物的定植率的影响。如果重新定植处理不正确,则该过程可能会失败。有效的重新定植很关键,但不足以单独使用以防止复发。

[0045] 涉及原始病原微生物的抑制(去定植)和用新微生物替换(重新定植)的现有技术方法可能取决于具体方法而导致病原微生物的可变复发。

[0046] 与其针对共生的病原微生物或耐药性微生物发动无用的战争,一种更好的方法可能是管理微生物组:积极促进“有益细菌”及其支持系统的动力学,同时有选择地抑制特定病原性生物的复发。需要安全持久地预防和减少不良微生物(如剧毒的病原微生物和/或耐药性微生物)感染的复发的改进方法。

发明内容

[0047] 提供了用于安全持久地影响受试者中的微生物生态系统(微生物组)从而执行多种功能的方法和组合物,例如,所述功能包含降低被不良微生物(如剧毒的病原微生物和/或耐药性微生物)感染的风险。

[0048] 本文提供了预防或降低受试者中不良微生物的定植、感染、定植复发或病原性感染复发的风险的方法,所述方法包括:对受试者的至少一个部位上的不良微生物进行去定植,从而从所述部位减少或消除所述不良微生物的存在;通过向所述受试者的至少一个部位施用合成微生物来持久地替换所述不良微生物,其中所述合成微生物可以通过占据先前被所述不良微生物占据的生态位而持久地与宿主微生物组整合;以及任选地促进所述合成微生物在所述受试者内的定植。

[0049] 本公开提供了一种用于消除和预防容纳微生物组的受试者中不良微生物的复发的方法,所述方法包括(a)对所述宿主微生物组进行去定植;(b)通过向所述受试者施用包括至少一种赋予非天然属性的元件的合成微生物来持久地替换所述不良微生物,其中所述合成微生物能够持久地整合到所述宿主微生物组中,并在所述宿主微生物中占据与所述不良微生物相同的生态位。

[0050] 在一些实施例中,在所述受试者的至少一个部位上进行去定植,从而从所述至少一个部位基本上减少或消除所述不良微生物的可检测存在。

[0051] 在一些实施例中,通过包括表型方法和/或基因型方法的方法来确定不良微生物或合成微生物的可检测存在,任选地,其中所述表型方法选自由以下组成的组:生物化学反应、血清学反应、对抗微生物剂的敏感性、对噬菌体的敏感性、对细菌素的敏感性和/或细胞蛋白的特性。在一些实施例中,所述基因型方法选自杂交技术、质粒图谱、质粒多态性分析、限制性酶消化、通过脉冲场凝胶电泳(PFGE)进行的反应和分离、核糖分型、聚合酶链反应(PCR)及其变体、连接酶链反应(LCR)和基于转录的扩增系统(TAS)。

[0052] 在一些实施例中,所述生态位是真皮或粘膜环境,其允许所述不良微生物在所述受试者的至少一个部位处稳定定植。

[0053] 在一些实施例中,在施用步骤之后至少两周、至少四周、至少六周、至少八周、至少十周、至少12周、至少16周、至少26周、至少30周、至少36周、至少42周或至少52周的时间段内,通过所述至少一个部位处的所述合成微生物的可检测存在来确定持久整合至所述宿主微生物组的能力。

[0054] 在一些实施例中,在施用步骤之后至少两周、至少四周、至少六周、至少八周、至少十周、至少12周、至少16周、至少26周、至少30周、至少36周、至少42周或至少52周的时间段内,通过不存在所述至少一个部位处的所述不良微生物的可检测存在来确定持久替换所述不良生物的能力。

[0055] 在一些实施例中,在施用步骤之后,通过所述至少一个部位处不存在所述不良微

生物与所述合成微生物的共定植来确定占据相同生态位的能力。在一个实施例中,在施用步骤之后至少两周、至少四周、至少六周、至少八周、至少十周、至少12周、至少16周、至少26周、至少30周、至少36周、至少42周或至少52周确定不存在共定植。

[0056] 在一些实施例中,所述合成微生物包括至少一种赋予非天然属性的元件,所述元件被持久地掺入到所述合成微生物中。在一些实施例中,将所述至少一种赋予非天然属性的元件经由所述合成微生物持久地掺入到所述宿主微生物组中。

[0057] 在一些实施例中,所述至少一种赋予非天然属性的元件是杀灭开关分子修饰、毒力阻断分子修饰或纳米工厂分子修饰。在一些实施例中,所述合成微生物包括整合到所述合成微生物的染色体中的分子修饰。在一些实施例中,所述合成微生物包括毒力阻断分子修饰,所述毒力阻断分子修饰阻止来自所述不良微生物的遗传物质的水平基因转移。

[0058] 在一些实施例中,在状态改变后,所述合成微生物的可测量的平均细胞死亡发生在第一启动子的诱导之后的至少预设时间段内。在一些实施例中,在状态改变后,所述可测量的平均细胞死亡发生在选自由以下组成的组的至少预设时间段内:至少1分钟、5分钟、15分钟、30分钟、60分钟、90分钟、120分钟、180分钟、240分钟、300分钟或360分钟。在一些实施例中,在预设时间段后,所述可测量的平均细胞死亡为至少50%cfu、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少99%、至少99.5%、至少99.8%或至少99.9%cfu计数减少。在一些实施例中,所述状态改变选自以下中的一个或多个:pH、温度、渗透压、重量渗透摩尔浓度、氧气水平、营养素浓度、血液浓度、血浆浓度、血清浓度、金属浓度、螯合金属浓度、组成变化或一种或多种免疫因子的浓度、矿物质浓度和电解质浓度。在一些实施例中,所述状态改变是与所述受试者的至少一个部位处的正常生理(生态位)状况相比的血液、血清或血浆的更高浓度和/或所述血液、血清或血浆的组成改变。

[0059] 在一些实施例中,所述不良微生物是金黄色葡萄球菌菌株,并且其中所述可检测存在是通过包括以下的方法测量的:从所述受试者的至少一个部位处获得样品、使显色琼脂与所述样品接触、孵育所述接触的琼脂以及在预定时间段后计数细菌物种的阳性cfu。

[0060] 在一些实施例中,提供了一种包括去定植步骤的方法,所述去定植步骤包括向所述受试者的至少一个部位局部施用去定植剂,从而从所述至少一个部位减少或消除所述不良微生物的存在。

[0061] 在一些实施例中,所述去定植步骤包括局部施用去定植剂,其中并未同时施用全身性抗微生物剂。在一些实施例中,在第一次局部施用所述去定植剂或施用所述合成微生物之前、同时和/或之后一周、两周、三周、一个月、两个月、三个月、六个月或一年内,并未施用全身性抗微生物剂。在一些实施例中,所述去定植剂选自由以下组成的组:消毒剂、杀菌剂、防腐剂、收敛剂和抗微生物剂。在一些实施例中,所述去定植剂选自由以下组成的组:醇类(乙醇、异丙醇)、醛类(戊二醛、甲醛、甲醛释放剂(羟甲基甲硫脲=甲醛硫脲、牛磺罗定、六胺、登妥因)、邻苯二甲醛)、酰苯胺类(三氯卡班=TCC=3,4,4'-三氯均二苯脲)、双胍类(氯己定、阿来西定、聚合双胍类(MW>3,000g/mol的聚六亚甲基双胍,vantocil)、双脒剂(普罗帕脒、羟乙磺酸丙氧苯脒、二盐酸丙氧苯脒、双溴丙脒、羟乙磺酸双溴丙脒)、酚类(硫双氯酚、对氯间二甲苯酚、氯二甲酚、六氯酚)、双酚类(三氯生、六氯酚)、氯二甲酚(PCMX)、季铵化合物(西曲溴铵、苯扎氯铵、西吡氯铵)、银化合物(磺胺嘧啶银、硝酸银)、过氧化物(过氧化氢、过乙酸、过氧化苯甲酰)、碘化合物(聚维酮-碘、泊洛沙姆-碘、碘)、释氯剂(次氯酸钠、

次氯酸、二氧化氯、二氯异氰尿酸钠、氯胺-T)、铜化合物(氧化铜)、异维A酸、硫化合物、植物提取物(白千层属(茶树油)、越橘属(例如,A型原花青素)、腊肠树、岗松、苦楝、文定果、葡萄、Terminalia avicennioides Guill&Perr、Phylantus discoideus muel.Muel-Arg、丁香罗勒、金边红桑、Hypericum pruinatum Boiss.&Bal、Hypericum olimpicum L.和Hypericum sabrum L、北美金缕梅(金缕梅)、丁香油、桉属、迷迭香属(迷迭香)、百里香属(百里香)、牛至属(牛至)、香茅属、樟属、老鹳草属、薰衣草属)、氨基酮戊酸和局部抗生素化合物(细菌素;莫匹罗星、杆菌肽、新霉素、多粘菌素B、庆大霉素)。

[0062] 在一些实施例中,所述抗微生物剂选自由以下组成的组:万古霉素、头孢唑林、头孢霉素、头孢氨苄、利奈唑胺、达托霉素、克林霉素、林可霉素、莫匹罗星、杆菌肽、新霉素、多粘菌素B、庆大霉素、普卢利沙星、尤利沙星、非达霉素、盐酸米诺环素、甲硝唑、甲硝唑、磺胺甲噁唑、氨苄西林、甲氧苄啶、氧氟沙星、诺氟沙星、替硝唑、诺氟沙星、奥硝唑、左氧氟沙星、萘啶酸、头孢曲松、阿奇霉素、头孢克肟、头孢曲松、头孢氨苄、头孢曲松、利福昔明、环丙沙星、诺氟沙星、氧氟沙星、左氧氟沙星、加替沙星、吉米沙星、普鲁利沙星、尤利沙星、莫西沙星、制霉菌素、两性霉素B、氟胞嘧啶、酮康唑、泊沙康唑、克霉唑、伏立康唑、灰黄霉素、硝酸咪康唑和氟康唑。

[0063] 在一些实施例中,所述去定植包括在替换步骤之前局部施用所述去定植剂至少一次、两次、三次、四次、五次或六次或更多次。在一些实施例中,所述去定植步骤包括以0.5小时到48小时之间的间隔向所述受试者的至少一个宿主部位施用一次到六次或更多次或两次到四次去定植剂,并且其中在最终的去定植步骤之后进行所述替换步骤。

[0064] 在一些实施例中,提供了一种方法,所述方法包括对不良微生物进行去定植并用合成微生物替换,所述方法包括向所述受试者的至少一个宿主部位局部施用组合物,所述组合物包括至少10^5、至少10^6、至少10^7、至少10^8、至少10^9、至少10^{10}或至少10^{11}CFU的合成菌株和药学上可接受的载剂。在一些实施例中,在去定植步骤的12小时、24小时、36小时、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天或10天之内或0.5-10天、1-7天或2到5天之间执行初始的替换步骤。在一些实施例中,在最终的去定植步骤之后,以不超过每两周一次到六个月一次的间隔重复所述替换步骤。在一些实施例中,以不超过每两周一次到六个月一次或三周一次到三个月一次的间隔重复所述去定植步骤和替换步骤。在一些实施例中,所述替换包括向所述至少一个部位施用至少一次、两次、三次、四次、五次、六次、七次、八次、九次或十次所述合成微生物。在一些实施例中,所述替换包括每月向所述至少一个部位施用不超过一次、不超过两次、不超过三次或不超过四次所述合成微生物。

[0065] 在一些实施例中,对所述不良微生物进行去定植并用合成微生物替换的方法进一步包括促进所述合成微生物在所述受试者中的定植。在一些实施例中,促进所述合成微生物在所述受试者中的定植包括向所述受试者施用促进剂,任选地,其中所述促进剂是营养素、益生元、共生体、稳定剂、保湿剂和/或益生菌物种。在一些实施例中,所述促进包括在初始的去定植步骤之后向所述受试者施用10^5到10^{10}cfu、10^6到10^9cfu或10^7到10^8cfu的益生菌物种。

[0066] 在一些实施例中,所述营养素选自氯化钠、氯化锂、甘油磷酸钠、苯乙醇、甘露醇、胰蛋白、肽和酵母提取物。在一些实施例中,所述益生元选自由以下组成的组:短链脂肪酸(乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸、戊酸、异戊酸)、甘油、来自农业副产物的果胶衍生的寡糖、低聚

果糖(例如,菊粉样益生元)、低聚半乳糖(例如,棉子糖)、琥珀酸、乳酸和甘露寡糖。

[0067] 在一些实施例中,所述益生菌选自由以下组成的组:短双歧杆菌(Bifidobacterium breve)、两歧双歧杆菌(Bifidobacterium bifidum)、乳酸双歧杆菌(Bifidobacterium lactis)、婴儿双歧杆菌(Bifidobacteriuminfantis)、短双歧杆菌、长双歧杆菌(Bifidobacterium longum)、罗伊氏乳杆菌(Lactobacillus reuteri)、副干酪乳杆菌(Lactobacillus paracasei)、植物乳杆菌(Lactobacillus plantarum)、约氏乳杆菌(Lactobacillus johnsonii)、鼠李糖乳杆菌(Lactobacillus rhamnosus)、嗜酸乳杆菌(Lactobacillus acidophilus)、唾液乳杆菌(Lactobacillus salivarius)、干酪乳杆菌(Lactobacillus casei)、植物乳杆菌、乳酸乳球菌(Lactococcus lactis)、嗜热链球菌(Streptococcus thermophiles)和粪肠球菌(Enterococcus fecalis)。

[0068] 在一些实施例中,所述共生体选自由以下组成的组:约氏不动杆菌(Acinetobacter johnsonii)、鲍曼不动杆菌(Acinetobacter baumannii)、金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、路邓葡萄球菌(Staphylococcus lugdunensis)、沃氏葡萄球菌(Staphylococcus warneri)、腐生葡萄球菌(Staphylococcus saprophyticus)、痤疮棒状杆菌(Corynebacterium acnes)、纹带棒状杆菌(Corynebacterium striatum)、白喉棒状杆菌(Corynebacterium diphtheriae)、极小棒状杆菌(Corynebacterium minutissimum)、痤疮丙酸杆菌(Cutibacterium acnes)、痤疮丙酸杆菌(Propionibacterium acnes)、颗粒丙酸杆菌(Propionibacterium granulosum)、酿脓链球菌(Streptococcus pyogenes)、金黄色葡萄球菌、无乳链球菌(Streptococcus agalactiae)、缓症链球菌(Streptococcus mitis)、绿色链球菌(Streptococcus viridans)、肺炎链球菌、咽峡炎链球菌(Streptococcus anginosis)、星座链球菌(Steptococcus constellatus)、中间链球菌(Streptococcus intermedius)、无乳链球菌、铜绿假单胞菌、栖稻假单胞菌(Pseudomonas oryzihabitans)、施氏假单胞菌(Pseudomonas stutzeri)、恶臭假单胞菌(Pseudomonas putida)和荧光假单胞菌(Pseudomonas fluorescens)。

[0069] 在一些实施例中,所述不良微生物是抗微生物剂抗性微生物。在一些实施例中,所述抗微生物剂抗性微生物是抗生素抗性细菌。在一些实施例中,所述抗生素抗性细菌是革兰氏阳性细菌物种,其选自由以下组成的组:链球菌属(Streptococcus spp)、丙酸杆菌属(Cutibacterium spp)和葡萄球菌属(Staphylococcus spp)。在一些实施例中,所述链球菌选自由以下组成的组:肺炎链球菌、变形链球菌(Steptococcus mutans)、远缘链球菌(Streptococcus sobrinus)、酿脓链球菌和无乳链球菌。在一些实施例中,所述丙酸杆菌选自由以下组成的组:痤疮丙酸杆菌痤疮亚种(Cutibacterium acnes subsp.acnes)、痤疮丙酸杆菌defendens亚种(Cutibacterium acnes subsp.defendens)和痤疮丙酸杆菌细长亚种(Cutibacterium acnes subsp.elongatum)。在一些实施例中,所述葡萄球菌选自由以下组成的组:金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌和腐生葡萄球菌。在一些实施例中,所述不良微生物是含有葡萄球菌染色体盒(I-III型SCCmec)的耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌(MRSA)菌株,所述盒对一个抗生素抗性基因(I型SCCmec)或多个抗生素抗性基因(II型和III型SCCmec)进行编码和/或产生毒素。在一些实施例中,所述毒素选自由以下组成的组:潘顿-华伦特白蛋白结合素(PVL)毒素、中毒性休克综合征毒素-1(TSST-1)、葡萄球菌α-溶血素毒素、葡萄球菌β-溶血素毒素、葡萄球菌γ-溶血素毒素、葡萄球菌δ-溶血素毒素、肠毒素A、肠

毒素B、肠毒素C、肠毒素D、肠毒素E和凝固酶毒素。

[0070] 在一些实施例中,用根据本公开所述的方法治疗的受试者在所述施用步骤之后至少两周、至少四周、至少六周、至少八周、至少十周、至少12周、至少16周、至少24周、至少26周、至少30周、至少36周、至少42周或至少52周内并未表现出所述不良微生物的复发或定植,如通过在所述至少一个部位处擦拭所述受试者所证明的那样。

[0071] 本公开提供了用于一种持久地替换受试者中的不良微生物的合成微生物。所述合成微生物包括旨在通过降低全身性感染风险来增强安全性的分子修饰。在一个实施例中,所述分子修饰响应于血液、血清或血浆而导致合成微生物的生长或细胞死亡显著减少。可以在用于预防或减少受试者中不良微生物的真皮或粘膜定植或重新定植的复发的方法和组合物中使用所述合成微生物。

[0072] 本公开提供了一种用于组合物和方法的合成微生物,所述组合物和方法用于治疗或预防由受试者中的不良微生物引起的定植或重新定植、全身性感染、菌血症或心内膜炎、降低所述定植或重新定植、全身性感染、菌血症或心内膜炎的风险或降低所述定植或重新定植、全身性感染、菌血症或心内膜炎的可能性。

[0073] 本公开提供了一种包括重组核苷酸的合成微生物,所述重组核苷酸包括至少一个杀灭开关分子修饰,所述杀灭开关分子修饰包括第一细胞死亡基因,所述第一细胞死亡基因与包括诱导型第一启动子的第一调节区可操作地结合,其中响应于暴露于血液、血清或血浆,所述第一诱导型启动子显示出所述重组核苷酸的条件性高水平基因表达,基础生产力增加至少三倍。在一些实施例中,所述诱导型第一启动子展示出一种基因、包括所述基因、衍生自所述基因或选自所述基因,在暴露于血液、血清或血浆后至少30分钟、60分钟、90分钟、120分钟、180分钟、240分钟、300分钟或至少360分钟内,所述基因显示出至少5倍、至少10倍、至少20倍、至少50倍或至少100倍的上调。

[0074] 在一些实施例中,所述合成微生物包括杀灭开关分子修饰,所述杀灭开关分子修饰包括可操作地连接至包括诱导型第一启动子的第一调节区的第一细胞死亡基因,其中所述第一启动子通过与所述受试者的至少一个部位处的正常生理环境(生态位)状况对比的微生物环境的状态改变而被激活(诱导)。

[0075] 在一些实施例中,所述合成微生物进一步包括表达钳分子修饰,所述表达钳分子修饰包括对所述第一细胞死亡基因或其产物具有特异性的抗毒素基因,其中所述抗毒素基因与包括第二启动子的第二调节区可操作地结合,所述第二启动子在真皮或粘膜定植时或在完全培养基中具有组成性或活性,但在暴露于血液、血清或血浆至少30分钟后并未被诱导、被诱导低于1.5倍或被抑制。在一些实施例中,所述第二启动子在真皮或粘膜定植时或在TSB培养基中具有活性,但在至少30分钟、60分钟、90分钟、120分钟、180分钟、240分钟、300分钟或至少360分钟的时间段后暴露于血液、血清或血浆时被抑制至少2倍。

[0076] 在一些实施例中,在暴露于血液、血清或血浆后至少1分钟、5分钟、15分钟、30分钟、60分钟、90分钟、120分钟、180分钟、240分钟、300分钟或360分钟内,所述合成微生物表现出具有至少50%cfu减少的可测量的平均细胞死亡。在一些实施例中,在暴露于血液、血清或血浆后至少1分钟、5分钟、15分钟、30分钟、60分钟、90分钟、120分钟、180分钟、240分钟、300分钟或360分钟内,所述合成微生物表现出的可测量的平均细胞死亡为至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少99%、至少99.5%、至少99.8%或至少99.9%cfu计数减

少。

[0077] 在一些实施例中,所述合成微生物包括在受试者的全身性病状下减少或阻止所述合成微生物的感染性生长的杀灭开关分子修饰。

[0078] 在一些实例中,所述合成微生物包括整合到所述合成微生物的染色体中的至少一种分子修饰。

[0079] 在一些实施例中,所述合成微生物衍生自具有与不良微生物相同的属和种的目标微生物。在一些实施例中,所述目标微生物对至少一种抗微生物剂敏感。在一些实施例中,所述目标微生物选自细菌、真菌或原生动物目标微生物。在某些实施例中,所述目标微生物能够在真皮和/或粘膜生态位定植。

[0080] 在一些实施例中,所述目标微生物具有与去定植的宿主微生物组一起进行生物整合的能力。在一些实施例中,所述合成微生物衍生自从所述宿主微生物组中分离的目标微生物。在一些实施例中,所述目标微生物选自细菌、真菌或原生动物目标微生物。

[0081] 在一些实施例中,所述目标微生物是选自由以下组成的组的属中的成员:不动杆菌属、棒状杆菌属、丙酸杆菌属(Cutibacterium)、葡萄球菌属、链球菌属、丙酸杆菌属(Propionibacterium)和假单胞菌属。

[0082] 在一些实施例中,所述目标微生物是能够在真皮和/或粘膜生态位定植的细菌物种,并且是选自由以下组成的组的属中的成员:不动杆菌属、棒状杆菌属、丙酸杆菌属、葡萄球菌属、链球菌属、丙酸杆菌属和假单胞菌属。在一些实施例中,所述目标微生物选自由以下组成的组:约氏不动杆菌、鲍曼不动杆菌、金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、路邓葡萄球菌、沃氏葡萄球菌、腐生葡萄球菌、痤疮棒状杆菌、纹带棒状杆菌、白喉棒状杆菌、极小棒状杆菌、痤疮丙酸杆菌、痤疮丙酸杆菌、颗粒丙酸杆菌、酿脓链球菌、金黄色葡萄球菌、无乳链球菌、缓症链球菌、绿色链球菌、肺炎链球菌、咽峡炎链球菌、星座链球菌、中间链球菌、无乳链球菌、铜绿假单胞菌、栖稻假单胞菌、施氏假单胞菌、恶臭假单胞菌和荧光假单胞菌。在特定的实施例中,提供了衍生自金黄色葡萄球菌菌株的合成微生物。在一些实施例中,靶菌株是金黄色葡萄球菌502a菌株或RN4220菌株。

[0083] 在一些实施例中,所述合成微生物包括杀灭开关分子修饰,所述杀灭开关分子修饰包括选自由以下组成的组的细胞死亡基因:sprA1、sprA2、kpn1、sma1、sprG、relF、rsaE、yoeB、mazF、yefM或溶葡萄球菌素毒素基因。在一些实施例中,所述细胞死亡基因包括选自由以下组成的组的核苷酸序列:SEQ ID NO:122、124、125、126、127、128、274、275、284、286、288、290、315和317,或基本上相同的核苷酸序列。

[0084] 在一些实施例中,所述诱导型第一启动子是血液、血清和/或血浆响应性启动子。在一些实施例中,在暴露于人血、血清或血浆后,所述第一启动子在选自由以下组成的组的时间段内被上调至少1.5倍、至少3倍、至少5倍、至少10倍、至少20倍、至少50倍或至少100倍:至少30分钟、60分钟、90分钟、120分钟、180分钟、240分钟、300分钟和至少360分钟。在一些实施例中,在不存在状态改变的情况下,所述第一启动子未被诱导、被诱导低于1.5倍或被抑制。在一些实施例中,在存在血清、血液或血浆的情况下,所述第一启动子在一段时间内被诱导至少1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍或至少6倍。在一些实施例中,在所述至少一个部位处,在所述正常生理(生态位)状况下,所述第一启动子未被诱导、被诱导低于1.5倍或被抑制。

[0085] 在一些实施例中,所述诱导型第一启动子包括或衍生自选自由以下组成的组的基因:isdA(铁调节表面决定簇蛋白A)、isdB(铁调节表面决定簇蛋白B)、isdG(血红素降解型单加氧酶)、hlgA(γ-溶血素成分A)、hlgA1(γ-溶血素)、hlgA2(γ-溶血素)、hlgB(γ-溶血素成分B)、hrtAB(血红素调节型转运蛋白)、sbnC(luc C家族铁载体生物合成蛋白)、sbnD、sbnI、sbnE(lucA/lucC家族铁载体生物合成蛋白)、isdI、lrgA(胞壁质水解酶调节子A)、lrgB(胞壁质水解酶调节子B)、ear(Ear蛋白)、fhuA(铁色素转运ATP-结合蛋白fhuA)、fhuB(铁色素转运渗透酶)、hlb(磷脂酶C)、血红素ABC转运蛋白2基因、血红素ABC转运蛋白基因、isd ORF3、sbnF、丙氨酸脱氢酶基因、二氨基庚二酸脱羧酶基因、铁ABC转运蛋白基因、苏氨酸脱水酶基因、铁载体ABC转运蛋白基因、SAM dep Metrans基因、HarA、splF(丝氨酸蛋白酶SplF)、splD(丝氨酸蛋白酶SplD)、dps(一般应激蛋白20U)、SAUSA300_2617(假定的钴ABC转运蛋白、ATP结合蛋白)、SAUSA300_2268(钠/胆汁酸同向转运体家族蛋白)、SAUSA300_2616(钴家族转运蛋白)、srtB(分拣酶B)、sbnA(可能的铁载体生物合成蛋白sbnA)、sbnB、sbnG、leuA(2-异丙基苹果酸合酶氨基酸生物合成酶)、sstA(铁转运膜蛋白)、sirA(铁ABC转运蛋白底物结合蛋白)、isdA(血红素转运蛋白)和spa(葡萄球菌蛋白A)。在一些实施例中,所述诱导型第一启动子包括选自由以下组成的组的核苷酸序列:SEQ ID NO:114、115、119、120、121、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162和163,或其基本上相同的核苷酸序列。

[0086] 在一些实施例中,所述合成微生物包括表达钳分子修饰,所述表达钳分子修饰包括与抗毒素基因可操作地结合的第二启动子,所述抗毒素基因对能够与第一细胞死亡基因的至少一部分杂交的反义RNA序列进行编码。在一些实施例中,所述抗毒素基因对能够与第一细胞死亡基因的至少一部分杂交的反义RNA序列进行编码。在一些实施例中,所述抗毒素基因分别选自由以下组成的组:sprA1抗毒素基因、sprA2抗毒素基因、sprG抗毒素基因或sprF、holin抗毒素基因、187-lysK抗毒素基因、yefM抗毒素基因、溶葡萄球菌素抗毒素基因或mazE抗毒素基因、kpn1抗毒素基因、sma1抗毒素基因、relF抗毒素基因、rsaE抗毒素基因或yoeB抗毒素基因。在一些实施例中,所述抗毒素基因包括选自由以下组成的组的核苷酸序列:SEQ ID NO:273、306、307、308、309、310、311、312、314、319或322,或基本上相同的核苷酸序列。

[0087] 在一些实施例中,所述第二启动子包括或衍生自选自由以下组成的组的基因:clfB(聚集因子B)、sceD(自溶素,胞外蛋白D)、walKR(毒力调节子)、atlA(主要自溶素)、oatA(O-乙酰基转移酶A);磷酸核糖基甘氨酰胺甲酰基转移酶基因、磷酸核糖基氨基咪唑合成酶基因、酰胺基磷酸核糖基转移酶基因、磷酸核糖基甲酰基甘氨酰胺合酶基因、磷酸核糖基甲酰基甘氨酰胺合酶基因、磷酸核糖基氨基咪唑-琥珀酰胺基因、海藻糖渗透酶IIC基因、DeoR家族转录调节基因、磷酸果糖激酶基因、PTS果糖转运蛋白亚基IIC基因、半乳糖-6-磷酸异构酶基因、NarZ、NarH、NarT、烷基氢过氧化物酶基因、假设蛋白基因、DeoR反式因子基因、溶血磷脂酶基因、蛋白质分解伴侣基因、烷基氢过氧化物酶基因、磷酸果糖激酶基因、gyrB、sigB和rho。在一些实施例中,所述第二启动子是P_{clfB}(聚集因子B),其包括SEQ ID NO:117、118、129或130的核苷酸序列,或其基本上相同的核苷酸序列。

[0088] 在一些实施例中,所述合成微生物包括毒力阻断分子修饰和/或纳米工厂分子修

饰。在一些实施例中,所述毒力阻断分子修饰阻止来自所述不良微生物的遗传物质的水平基因转移。

[0089] 在一些实施例中,所述纳米工厂分子修饰包括基因的插入、基因的敲除或基因的遗传修饰,所述基因对选自由以下组成的组的产物进行编码:酶、氨基酸、代谢中间体和小分子。

[0090] 本公开提供了一种组合物,其包括有效量的根据本公开所述的合成微生物和药学上可接受的载剂、稀释剂、润肤剂、粘合剂、赋形剂、润滑剂、甜味剂、调味剂、润湿剂、防腐剂、缓冲剂或吸收剂或其组合。在一些实施例中,所述组合物进一步包括促进剂。在一些实施例中,所述促进剂选自营素、益生元、共生体和/或益生菌物种。

[0091] 本公开提供了一种包括本公开的组合物或合成微生物的单剂量单位。在一些实施例中,所述单剂量单位包括至少约10^5、至少10^6、至少10^7、至少10^8、至少10^9、至少10^{10}CFU或至少10^{11}的合成菌株或和药学上可接受的载剂。在一些实施例中,所述单剂量单位被配制成用于局部施用。在一些实施例中,所述单剂量单位被配制成用于真皮或粘膜施用。

[0092] 本公开提供了用于制造药物的根据本公开所述的合成微生物、组合物,所述药物用于消除、预防或减少受试者中不良微生物复发的风险的方法中。

[0093] 本公开提供了一种用于预防或减少受试者中不良微生物的真皮或粘膜定植或重新定植的复发的试剂盒,所述试剂盒包括至少一个容器,所述容器包括本公开的合成微生物、组合物或单剂量,以及任选的一个或多个另外的组分,所述另外的组分选自包括去定植剂的第二个容器、一张说明书、包括促进剂的至少第三个容器和/或施药器。

附图说明

[0094] 图1示出了插入到金黄色葡萄球菌(例如,BioPlx-01)中以产生合成微生物BioPlx菌株的代表性分子修饰的图。包括所述分子修饰的盒包括杀灭开关和表达钳,所述表达钳包含被克隆以驱动SprA1反义(抗毒素)RNA表达的表达钳(例如,ClfB)启动子,其中所述盒通过杀灭开关被掺入同一表达模块中,所述杀灭开关包括与SprA1毒素基因可操作地结合的血清响应性启动子(例如,P_{hlgA})。在这个菌株中,血清/血液暴露会激活毒素(例如,最多350倍或更多)但不激活抗毒素,而TSB中或皮肤上的生长会激活抗毒素但不激活毒素。

[0095] 图2示出了穿梭载体PCN51,其用于将基因克隆到大肠杆菌-金黄色葡萄球菌直通菌株(IM08B)中,从而将所述载体转染到BioPlx-01中以进行评估。

[0096] 图3A、图3B和图3C示出了具有用于由菌株BioPlx-01重组构建合成的金黄色葡萄球菌的引物序列的表4A。

[0097] 图4A、图4B、图4C和图4D示出了具有用于由菌株BioPlx-01进行合成的金黄色葡萄球菌的CRISPR构建的引物序列的表4B。

[0098] 图5A示出了pKOR1整合型质粒的遗传图谱,其描绘了repF(pE194ts的复制基因)、secY570(secY的N端570个核苷酸,包含核糖体结合位点)、cat(氯霉素乙酰基转移酶)、attP(页面λ的附着位点)、ori(-)(ColE1质粒的复制起点)和bla(b-内酰胺酶)。(+)或(-)表示革兰氏阳性细菌(+)或革兰氏阴性(-)细菌的功能。Pxyl/tetO启动子和所述启动子的转录方向由箭头指示。

[0099] 图5B示出了pIMAY整合型质粒的遗传图谱。(登录号JQ62198)。

[0100] 图6示出了通过与人血清一起孵育在甲氧西林敏感性金黄色葡萄球菌菌株BioPlx-01中对HlgA(γ溶血素)启动子候选者进行的倍数诱导。将表达针对管家基因(gyrB)进行归一化,并将其与液体TSB培养基中对数生长的细胞中的表达进行比较。

[0101] 图7示出了通过与人血清一起孵育在甲氧西林敏感性金黄色葡萄球菌菌株BioPlx-01中对SstA(铁转运)启动子候选者进行的倍数诱导。将表达针对管家基因(GyrB)进行归一化,并将其与液体TSB培养基中对数生长的细胞中的表达进行比较。

[0102] 图8示出了在金黄色葡萄球菌502a基因组(GenBank:CP007454.1)中介于1,102,100与1,102,700bp之间鉴定的CRISPR gRNA靶位点基因间区域。

[0103] 图9示出了用于查找用于CRISPR方法中的假定gRNA的CRISPRScan的代表性屏幕快照。

[0104] 图10示出了用于通过CRISPR进行整合的盒和pCasSA载体的布局。Cap1A是控制gRNA转录的组成型启动子。Target seq是靶标序列,例如,具有10个可能的剪切靶标(1.1、1.2等)。sgRNA是单链向导RNA(提供结构性组分)。Xba1和Xho1是两个限制性位点,用于将HA添加到pCasSA载体中。HA是同源臂,可用作同源性定向修复的模板(通常为200-1000bp)。P_{rpsL}-mCherry是控制“最优的”mCherry的组成型启动子。P_{rpsL}-Cas9是控制Cas9蛋白表达的组成型启动子。

[0105] 图11示出了用于本公开的载体。A是用于使用pCN51通过荧光筛查启动子的载体。B是用于通过细胞死亡基因筛查启动子的载体。C是用于使用CRISPR进行染色体整合的载体。D是用于使用同源重组进行染色体整合的载体。左和右(或上游和下游)HA:靶基因座的同源臂,CRISPR靶向:向基因座的RNA导引,mCherry:荧光报道蛋白,Cas9蛋白:CRISPR核酸内切酶,kanR:卡那霉素抗性,oriT:转移起点(用于整合)以及sma1:代表性杀灭基因(限制性核酸内切酶)。

[0106] 图12A、图12B和图12C示出了pIMAY整合型质粒的核苷酸序列(SEQ ID NO:131)。(登录号JQ62198)。

[0107] 图13A示出了在血清中1分钟、15分钟和45分钟时,启动子候选者isdA、isdB、hlgA2、hrtAB、isdG、sbnE、lrgA、lrgB、fhuA、fhuB、ear、hlb、splF、splD、dps和SAUSA300_2617的活性,以及qPCR使基因表达相对于培养基发生的倍数变化。

[0108] 图13B示出了在血液中1分钟、15分钟和45分钟时,启动子候选者isdA、isdB、hlgA2、hrtAB、isdG、sbnE、lrgA、lrgB、fhuA、fhuB、ear、hlb、splF、splD、dps和SAUSA300_2617的活性,以及qPCR使基因表达相对于培养基发生的倍数变化。

[0109] 图13C示出了通过qPCR与TSB相比,在T＝90分钟时启动子候选者hlgB、ear、fnb、splF、splD、clfA、CH52_360、CH52_305、CH52_1670、hlb、lrgB、lrgA、emp、fhuA、fhuB、isdI、isdA、srtB、isdG、sbnE、sbnA、sbnC和isdB在血清中的基因表达。

[0110] 图14示出了对合成微生物pTK1细胞的细胞生长的诱导型抑制,所述细胞包括已被转化为金黄色葡萄球菌RN4220细胞的pCN51质粒(pTK1)上的镉启动子后的细胞死亡毒素基因(sprA1)。诱导后2小时读取OD(630nm)。在没有镉的情况下以及在存在500nM和1uM镉的情况下,野生型4220细胞均显示出良好的细胞生长。在没有镉的情况下,pTK1-1和pTK1-2细胞显示出良好的生长,但是在诱导后2小时,在存在500nM和1uM镉的情况下,细胞生长被显著抑制。

[0111] 图15A示出了p174(pRAB11_Ptet-sprA1)的质粒图谱,含有Ptet-sprA盒的质粒区域的放大图。

[0112] 图15B示出了呈天然环状形式的p174(pRAB11_Ptet-sprA1)完整质粒。

[0113] 图15C示出了在6小时处的合成微生物金黄色葡萄球菌502a p174细胞的平板稀释的照片,所述细胞包括已被转化为金黄色葡萄球菌502a细胞的pRAB11-2质粒(p174)上的脱水四环素启动子后的细胞死亡毒素基因(sprA1)。p174质粒含有缺失的spra1反义(Das)。在6小时诱导后示出了BHI chlor10上的未经诱导的502a p174(tet-spra1Das)细胞(左侧)和经诱导的所述细胞(右侧)在10e-5处的平板稀释。左侧板(未经诱导的)在10e-5处无法计数,但在10e-6处计数约720个菌落。右边的经诱导的板在10e-5处产生16个菌落。诱导后6小时,经诱导的细胞的存活百分比为0.22%。

[0114] 图16示出了衍生自金黄色葡萄球菌502a的四个合成菌株的诱导前的细胞生长和诱导后的细胞生长,所述菌株具有基于质粒的诱导型表达系统,所述表达系统包括四个不同的细胞死亡基因候选者sprA1、187-lysK、Holin和sprG。所述候选细胞死亡基因已被克隆到pRAB11质粒上的四环素诱导型启动子之后,并被转化为金黄色葡萄球菌502a细胞。在诱导经AtC诱导的(+)菌株(以虚线(------)表示)和未经诱导的(-)菌株(以实线(_____)表示)后,在T=0、30、60、120和240分钟处获取BP_068(502a pRAB11-Ptet-sprA1)、BP_069(502apRAB11-Ptet-187lysK)、BP_070(502a pRAB11-Ptet-holin)和BP_071(502apRAB11-Ptet-sprG1)的计算出的OD600读数,并将其与BHI培养基中的BP_001(502a wt)进行比较。经诱导的(+)菌株BP_068(sprA1)、BP_069(187lysK)和BP_070(holin)中的每一个菌株均表现出(i)诱导前良好的细胞生长和(ii)诱导后对细胞生长的显著抑制。BP_068(+)在诱导后的每个时间点T=30、T=60、T=60、T=120和T=240处均表现出对细胞生长的最佳抑制作用,因此选择了sprA1基因对金黄色葡萄球菌502a中的杀灭开关进行初步的进一步发育。

[0115] 图17所示的条形图示出了与BHI培养基中的BP_001(502a wt)相比,未经诱导的(-)菌株和经脱水四环素诱导的(+)菌株BP_068(502apRAB11-Ptet-sprA1)、BP_069(502apRAB11-Ptet-187lysK)、BP_070(502apRAB11-Ptet-holin)和BP_071(502a pRAB11-Ptet-sprG1)在T=0(灰色)与240分钟(黑色)之间的菌落形成单位(cfu)/mL的差异。经诱导的(+)菌株BP_068(sprA1)、BP_069(187lysK)和BP_070(holin)中的每一个菌株均表现出(i)诱导前良好的细胞生长和(ii)诱导后对细胞生长的显著抑制。BP_068在诱导后的240分钟处表现出对细胞生长的最佳抑制作用,因此选择了sprA1基因对金黄色葡萄球菌502a中的杀灭开关进行初步的进一步发育。

[0116] 图18示出了金黄色葡萄球菌菌株BP_001、BP_055和BP_076的经诱导的(+)亚培养物和未经诱导的(-)亚培养物的GFP表达倍数变化。

[0117] 图19示出了菌株BP_076(SA502a,ΔsprA1::Ptet-GFP)的基因组图谱。

[0118] 图20示出了被构建用于在金黄色葡萄球菌中进行基因组整合的质粒的图谱。

[0119] 图21示出了金黄色葡萄球菌502a基因组中的PsbnA-sprA1杀灭开关的图谱。血清和血液响应性启动子PisdB与sprA1毒素细胞死亡基因可操作地连接。

[0120] 图22示出了杀灭开关配置的图,所述杀灭开关配置使用与sprA1毒素细胞死亡基因可操作地连接的血清和血液响应性启动子PisdB以及包括与sprA AS可操作地连接的第二启动子clfB的表达钳来防止毒素在不存在血液或血清的情况下泄漏表达。所述杀灭开关

被掺入金黄色葡萄球菌502a基因组中。

[0121] 图23示出了与TSB相比,三种菌株暴露于人血清时的生长曲线:502a—金黄色葡萄球菌野生型,金黄色葡萄球菌BP_011—502aΔsprA1-sprA1(AS)以及金黄色葡萄球菌BP_084—502aΔPsprA::PsbnA,其中所述杀灭开关被整合到金黄色葡萄球菌502a的基因组中。虚线表示在血清中生长的菌株,而实线则表示在TSB中生长的菌株。180分钟后,与血清中的野生型和复杂培养基中的杀灭开关相比,具有整合的杀灭开关的菌株BP_084所显示出的生长曲线显著降低。暴露于人血清3小时后,与TSB中相同的BP_084细胞相比,金黄色葡萄球菌BP_084(502aΔPsprA::PsbnA)细胞表现出98.84%的可测量的平均细胞死亡。

具体实施方式

[0122] 本公开基于被称为“细菌替换”或“生态位排除”的原理,在所述远离中,一种微生物替换并排除了另一种微生物。在生态学领域,竞争性排除或高斯定律指出,争夺完全相同资源的两个物种无法稳定地共存。这是由于以下事实:一个竞争者将比另一个竞争者拥有一些轻微的优势,从长远来看这会导致较小竞争者的灭绝。在高阶生物中,这通常会导致较小竞争者适应稍有不同的生态位。

[0123] 提供了用于持久地管理受试者的微生物组的方法和组合物。在实施例中,所述微生物组是真皮和/或粘膜微生物组(Exobiome)。尽管存在治疗由病原微生物引起的感染的方法,但实际上不存在防止复发的方法。

[0124] 传染原—金黄色葡萄球菌(MSSA和MRSA)

[0125] 自二十世纪初以来被分类为所有致病生物中最致命的一种,在美国医院中,每年约有500,000名患者感染葡萄球菌感染,这主要是由金黄色葡萄球菌引起的。在美国,每年多达50,000例死亡与金黄色葡萄球菌感染有关。金黄色葡萄球菌存在于40-44%的健康人类的皮肤上或鼻孔内。金黄色葡萄球菌有时也出现在口腔、胃肠道、泌尿生殖道和上呼吸道中。一些研究表明更高的定植率。例如,Eriksen等人认为,存在更高比例的暂时或间歇性携带者,从而增加了患病率,所述患病率有时会大于75%。

[0126] 金黄色葡萄球菌502a WT**BioPlx-01WT®**和其它替换和阻断性菌株

[0127] 在实例1中采用了被称为BioPlx-01WT®的金黄色葡萄球菌502a WT菌株,其是一种天然的“野生型”生物,已知所述菌株具有相对非传染性,并且没有已知的副作用。在BioPlx临床研究中,已显示所述菌株在此预期应用中非常有效(占据并阻断所需的微生物生态位以防止MRSA复发)。

[0128] 本发明的方法通过用“阻断性”生物—在本研究中为BioPlx01-WT金黄色葡萄球菌502a WT菌株持久地替换(通常具有毒性和抗生素抗性)定植型不良金黄色葡萄球菌菌株来预防感染。针对BioPlx开发的任何其它病原体替换生物,预计将以类似的方式应用这一现象。

[0129] 本文提供了其它替换菌株,如合成菌株,所述替换菌株完全能够定植在正确制备的皮肤和粘膜表面上,并占据该细菌物种所使用的生态位,从而阻断其它变体重新定植所述生态位。

[0130] 存在大量金黄色葡萄球菌变体(截至9/2017为10,000+基因组),以及与这一物种相关的广泛的遗传盒和毒力因子。

[0131] 耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌(MRSA)是指这种常见的人类共生细菌和有时是致病菌的一类抗生素抗性变体。其与野生型菌株(MSSA—敏感性金黄色葡萄球菌)的不同之处在于,其携带的mecA盒可以允许MRSA菌株产生替换的青霉素结合蛋白(PBP2A),从而使所述菌株对大多数β-内酰胺和许多其它一线抗生素具有抗性。

[0132] 耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌(MRSA)和剧毒的甲氧西林敏感性金黄色葡萄球菌(vMSSA)是金黄色葡萄球菌的有毒的侵入性变体,其定居在许多人类中,并且可进一步引起浅表软组织感染和严重的全身性感染。MRSA或vMSSA的定植通常是主动葡萄球菌感染的必要先兆。感染是由细菌在皮肤或粘膜上的集落所引起的,所述细菌穿透外部免疫屏障并通过伤口、切口、针刺或皮肤上的其它缺口侵入组织或血流。这可能导致菌血症和其它全身性感染,死亡率很高。

[0133] 本公开使用金黄色葡萄球菌的一般被动菌株来替换MRSA或vMSSA并将其从真皮/粘膜微生物组的通常位置中排除。众所周知,BioPlx使用的野生型干扰性金黄色葡萄球菌在引起全身性疾病方面表现不佳,但是,无论变异水平或入侵程度如何,实际上任何微生物都可以通过自然接种或偶然接种而成为“偶然病原体”。在金黄色葡萄球菌的情况下尤其如此。

[0134] 由BioPlx开发的去定植和BioPlx01菌株施用方法使本文提供的菌株具有巨大的数值和位置竞争优势。与对剧毒的MRSA菌株进行的简单杀菌破坏作用相比,这种方法的后果提供了更长的MRSA去定植作用。早期研究表明,使用BioPlx产品对BioPlx01 MRSA进行的去定植/重新定植过程的总排除效果大于6个月,而先前的文献显示,在仅使用标准的去定植方法的情况下,金黄色葡萄球菌鼻腔定植在第4周时的复发率为45%,而在第12周时复发率为60%。

[0135] 适应症的概述

[0136] 在医院和社区卫生机构中,金黄色葡萄球菌感染都是严重的问题。耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌(MRSA)与其它金黄色葡萄球菌菌株在遗传上有所不同,其遗传因素赋予了对通常用于治疗金黄色葡萄球菌感染的抗生素甲氧西林和其它(通常为β-内酰胺)抗生素的抗性。MRSA菌株携带mecA表达盒,所述表达盒使MRSA菌株产生替换的青霉素结合蛋白(PBP2A),而正是这种突变赋予了抗性。由于这种抗性,MRSA难以治疗,这使其在许多情况下成为威胁生命的问题。在医院或其它类型的医疗机构中,MRSA经常被感染(医院相关[HA])。这些感染通常在进行侵入性手术(如手术、静脉内导管插入、插管或人工关节放置)时发生。社区相关(CA)型MRSA通常是通过皮肤接触传播的,并且最初的症状往往是皮肤上的大疖。

[0137] 使用BioPlx菌株的BioPlx方法不是治疗侵入性MRSA疾病的方法,因此在侵入性疾病状态期间无意将其应用于患者。BioPlx方法的益处可以在以下患者组中得到证明:1)具有患侵入性疾病的高风险,2)由于这种增加的风险显示出显著的临床益处而具有较高的发病率和死亡率,并且对于预防侵入性金黄色葡萄球菌疾病没有其它有效的选项。这些特征定义了疾病控制中心自2005年以来一直跟踪的有关MRSA子集的患者群体,根据2014年ABC监测数据,这些患者已经历了侵入性MRSA疾病—72,444例。

[0138] 与人体内部相比,金黄色葡萄球菌以定植状态驻留的人皮肤和粘膜层的表面具有非常不同的所需营养素水平以及不同的环境质量。众所周知,为了使细菌成功入侵,细菌必须能够在定植状态和侵入状态之间调整其需求和反应。这是通过细菌检测这些环境之间的

变化并打开或关闭某些基因盒从而允许产生更适应新侵入状态的蛋白质来实现的。

[0139] BioPlx方法(并且具体地说,BioPlx01菌株)通过重新排列分子指令从而导致这些特定盒中一个或多个盒的操纵子中的生物死亡来利用这一要求。这产生了定植型金黄色葡萄球菌的“保持株”,其不能在所引入的患者中引起疾病,但是也不允许通常可能定居在人群中的其它循环性金黄色葡萄球菌菌株定植在所述患者中。这是通过竞争性排除的生态前提发生的。

[0140] 当前针对MRSA定植的患者的“护理标准”是不一致的。对于具有复发性疾病高风险的患者,没有关于葡萄球菌定植的管理指南。IDSA的《成人和儿童MRSA感染治疗临床实践指南》(2011)仅针对具有社区获得性皮肤和软组织反复感染的患者的去定植手术提供C-III级(最低—无数据,专家意见)支持,而并未提及去定植在预防侵入性MRSA疾病中的作用。一些医院已经对所有入院患者进行了广泛的筛查和隔离计划,但是由于(包含)疗效的持续性差和平均住院患者的基线风险较低(即加州大学欧文分校的MRSA爆发),该方法并未显示出效果。因此,其它医院已减少了对仅接受ICU和心胸外科手术治疗的患者的关注。已显示这一策略可减少MRSA临床分离株以及来自任何病原体的血液感染。然而,这些是旨在降低近期内MRSA感染的风险的短期情景策略。

[0141] 对于美国和世界其它地方,MRSA疾病和定植都是复杂的流行病学问题。从无症状定植到侵入性疾病状态,MRSA的表现范围很广,从而赋予系统高死亡率和高成本。显然,经历过侵入性疾病的MRSA患者在医学上是截然不同的。这些患者的死亡率高于任何其它MRSA亚群。这些患者具有较高的治疗失败率。与其它组患者相比,这些患者发生另一种侵入性MRSA事件的风险要高得多。这使得所述组成为BioPlx方法应针对的适当孤儿组,并且所述适当孤儿组将从所述方法的使用中受益。

[0142] 可以得出结论,去定植在持久清除MRSA定植方面很大程度上无效,并会导致高复发率。已经发现,只有去定植与主动重新定植相结合才能提供从一种生物(变体)到另一种生物的长期转化。

[0143] 作为临床上独特的疾病的复发性侵入性MRSA

[0144] 另一种适应症是“预防复发性侵入性MRSA”。已经经历过侵入性MRSA感染的患者对随后的侵入性MRSA感染的敏感性大大提高。本文提供的BioPlx技术的工作原理是占据微生物组中的生态位,所述生态位通常可能被剧毒形式的MRSA占据。

[0145] 侵入性MRSA引起的全身性感染:

[0146] SA(包含变体MRSA)可以以无害的方式共存于全人类中至少40%的人类的皮肤和粘膜表面上,因此细菌本身不能描述疾病;相反,所述细菌的临床表现是确定的。

[0147] 定义和监测所述病状的整个国家和国际主管部门都同意,侵入性MRSA感染是与由所述细菌引起的其它病状不同的单独的独特疾病。

[0148] 任何类型的金黄色葡萄球菌的简单定植不应被视为疾病状态。实际上,具有适合金黄色葡萄球菌居住的皮肤和粘膜生物群系营养和环境特征的人,必须将一些此类生态位占据者作为其微生物菌群的一部分,以实现其生物群系的稳定平衡“静止状态”。任何方法的目标都是用产品菌株(在这种情况下为经修饰后无法在人体内以侵入状态生存的抗生素敏感性金黄色葡萄球菌)持久地替换高危患者的MRSA菌株。

[0149] 为了产生侵入性传染病,MRSA必须放弃其被动共生状态,并突破真皮/粘膜屏障,

进入皮下间质(间质液)或循环系统(血液、血清、血浆)区域。这种“状态改变”通过新的生物行为和与宿主的关系引发了新的疾病状态。

[0150] 金黄色葡萄球菌菌血症(SAB)是该类型感染的重要实例,其发生率范围为每年20到50例/100,000人口(范围为每年64,600到161,500例)。这些患者中有10%到30%的患者将死于SAB。侵入性全身性MRSA菌血症的死亡率约为20%。相比之下,死亡人数要多于AIDS、结核病和病毒性肝炎的总和。

[0151] 对于CDC-US关于侵入性MRSA疾病的美国全国病例估计(2014),最新报告为72,444例。每年患所述疾病的患者人数少于200,000,并且这可能允许指定孤儿药。MRSA可以在三个不同的水平上影响患者:1)定植、2)浅表感染—皮肤和软组织以及3)全身性侵入性感染。

[0152] 1)定植。金黄色葡萄球菌是一种正常的共生生物,其永久定居在约三分之一的人口中,而短暂定居发生在另外约三分之一的人口中。所述微生物的MRSA变体占据微生物组的生态位,并在美国大约2%的人口中定居(取决于位置和占据而高度变异)。MRSA定植会直接在免疫/防御系统外层上建立潜在的传染性生物的常设库,这对患者构成了持续的风险。

[0153] 2)浅表感染—皮肤和软组织感染。在两种主要的疾病状态类别中,与皮肤相关的MRSA或皮肤和软组织感染是最常见的。其通常以可能使人感到疼痛和灼热的肿胀、脓或流液、疖开始,有时还会伴有发烧。如果不加以治疗,这些疖可能会变成脓肿,需要进行外科手术才能引流。对于局限在皮肤上的MRSA,脓肿的手术引流可能是唯一必要的治疗方法,并且不建议使用抗生素。皮肤和软组织感染可通过手术排干疖来进行治疗,仅在绝对必要时才施用抗生素进行治疗。

[0154] 3)全身性侵入性感染。MRSA菌血症(侵入性MRSA)是一种全身性MRSA感染,其被定义为通常在无菌部位(包含血液、脑脊液、关节液、骨骼、下呼吸道和其它体液)中存在MRSA。与仅局限于皮肤的MRSA感染相比,MRSA菌血症的预后要差得多,有20%的病例导致死亡。所述病状的预后、感染部位和临床症状的差异使其在临床上不同于皮肤和软组织感染MRSA感染。MRSA菌血症会导致皮肤和软组织感染中未见的多种并发症,包含感染性心内膜炎、败血性关节炎和骨髓炎。对于侵入性MRSA,在美国推荐使用达托霉素和万古霉素进行治疗。万古霉素起作用相对较慢,并且无法穿透某些组织。已经证明达托霉素是有效的,但是除了万古霉素在MRSA中引起达托霉素抗性的问题外,达托霉素在治疗紧急时的不敏感性也是一个问题。侵入性MRSA的临床症状和治疗方法的差异为侵入性MRSA作为不同于MRSA皮肤和软组织感染的临床独特病状提供了明确的证据。

[0155] BioPlx技术通过防止在已被定植的人(包含已经经历过侵入性MRSA感染的人)和已经进行了去定植手术的人中再次发生侵入性MRSA感染而起作用。作为一种去定植/重新定植微生物学方法,当患者患有全身性MRSA感染时,BioPlx技术将不会被用来“治疗”所述患者。将在清除全身性MRSA感染(以及全身去定植)之后应用所述BioPlx技术。

[0156] 医学术语的既定原理是,疾病或病状不简单地与病原体同义。在当前情况下,MRSA介导的全身菌血症(或侵入性全身性疾病的其它名称)与可能由MRSA或其它金黄色葡萄球菌菌株引起或与其相关的其它浅表皮肤和粘膜状况明确不同。侵入性全身性MRSA介导的疾病具有明显不同的诊断、病理、治疗和预后特征。

[0157] 值得注意的是,基于BioPlx01菌株的作用机制,与治疗侵入性MRSA本身相反,可以防止患者随后发生全身性MRSA感染。因此,“预防复发性全身性MRSA感染”将是对BioPlx01

菌株的适应症的最准确描述。

[0158] 患有侵入性MRSA感染的患者的目标群体已被成功清除生物(通常通过标准抗生素干预(例如万古霉素)),但仍具有MRSA重新定植、复发的高风险(发生率)以及相关的MRSA全身性再感染的风险增加。

[0159] 国际和美国对疾病名称的公认:

[0160] 疾病控制与预防中心(CDC)对这种疾病提出了明确的定义,因为该中心自2005年以来一直在美国积极监测这种病状。该机构通过新兴感染计划(EIP)利用主动细菌核心监视系统进行这种监测。在这种情况下,通过MRSA从通常无菌的身体部位分离来定义案例。通常无菌部位包含血液、脑脊液、胸膜液、心包液、腹膜液、关节/滑液、骨骼、体内部位(淋巴结、脑、心脏、肝脏、脾脏、玻璃体液、肾脏、胰腺或卵巢)或其它通常无菌的部位。

[0161] CDC还创建了国家医疗安全网络(NHSN),作为对美国16,000多家医疗机构的跟踪系统,以提供数据来指导预防工作。医疗保险服务中心(CMS)和其它付款人使用此数据来确定对医疗机构绩效的财务激励。该系统出于流行病学目的跟踪MRSA血流感染作为侵入性疾病的标志物。

[0162] 在ICD9和ICD10系统中,还通过一组病状来对MRSA介导的侵入性疾病状态进行编码,每个病状都具有针对病原体MRSA的自身数字代码。例如,归因于MRSA的败血症编码为A41.02,归因于MRSA的肺炎编码为J15.212。这进一步举例说明了以下差异表征:由于相同的病因而导致的侵入性MRSA疾病与浅表皮肤和软组织疾病并列—代码L03.114(左上肢实例),其后继代码B95.6 MRSA作为引起其它地方分类的疾病的原因,所述代码附加在各种其它感染代码上,以指示MRSA是造成疾病状况的原因。

[0163] 欧盟的一个分支机构欧洲疾病控制中心(ECDC)还通过与NHSN类似的定义监测侵入性金黄色葡萄球菌分离株,并跟踪耐甲氧西林的百分比,但报告要求并未得出欧盟对年度总病例的估计。

[0164] 区别地,与全身性病状不同,简单的MRSA定植本身通常不被视为疾病。然而,定植被认为是大多数侵入性疾病的先决条件,(例如)研究表明,鼻部金黄色葡萄球菌分离株通常与随后引起临床感染的菌株相同,这证明了这一点。这种持续的定植状态反映了该细菌在皮肤和粘膜表面的生态稳定性。

[0165] 该定植状态记录在ICD10系统Z22.322中的Z子标题下,所述子标题保留给影响健康状况和与保健服务联系的因素,但不适用于疾病或伤害本身。

[0166] 目标孤儿疾病群体:

[0167] BioPlx非复发方法靶向的孤儿疾病群体是先前被MRSA侵入性感染(全身性感染)的人群(已知为敏感人群),以及继续遭受MRSA持续定植的人群。美国疾病预防控制中心(CDC)监视美国所有侵入性MRSA感染病例。多个研究人员已描述了这一医学上独特的群体—已经遭受一种定义的侵入性MRSA感染事件的患者。由于他们表现出的敏感性和持续的定植性,所述群体患有威胁生命的侵入性疾病的风险增加。

[0168] 在一些实施例中,提供了一种用于预防重新定植或预防由MRSA引起的全身性侵入性菌血症的复发的方法,所述方法包括通过以下方法预防首要必备的MRSA定植(或预防所述MRSA定植的复发):

[0169] 1)从黏膜和真皮微生物组中对MRSA进行去定植,以及

[0170] 2)用合成的金黄色葡萄球菌(例如,BioPlx01菌株)对这些微生物组进行重新定植。所述方法通过细菌干扰的作用通过目标真皮/粘膜微生物组生态系统内的生态位动力学而有效,这是因为合成的金黄色葡萄球菌(例如,BioPlx01菌株)起着占据特定生态位的作用,并因此占据/阻止了MRSA的重新定植(阻止复发)。本文提供的原理研究的证据已清楚证明了所述方法的有效性。

[0171] SA作为正常微生物组的一部分存在,占总人口的40%以上。MSSA的定植状态很常见。MRSA变异在美国人口中约占1-2%,但在某些地区或人口统计中,这一水平可能远远更高。据认为,MRSA具有在金黄色葡萄球菌敏感人群中的任何人中定居的能力。金黄色葡萄球菌最常生活在皮肤表面上和前鼻前庭中,但在一些个体的深口咽部和胃肠道中以及正常阴道菌群中也可能发现少量金黄色葡萄球菌。

[0172] 在被定植的个体中,金黄色葡萄球菌通常仍然是仅占据生态位而不引起疾病的非侵入性共生细菌。但是,在一部分被定植的个体中,所述细菌既可能适时地引起疾病,也可能由于某些特定变异特征而导致侵入可能性增加,从而引起疾病。

[0173] 大约23%的持续性MRSA携带者在被鉴定为携带者后的一年内发生了不连续的MRSA感染。

[0174] 许多金黄色葡萄球菌变体已经获得了编码毒力蛋白产物的遗传盒,其允许此类菌株更有效地侵入表皮或粘膜组织层,并随后开始深部或全身性感染。在定植或感染中,mecA盒的存在限制了这些患者的治疗选择,并且许多研究已证明,与MSSA相比,在细菌血症、血管内感染和肺炎中,与MRSA相关的死亡率增加。

[0175] 由于不可能预先确定被MRSA定植的个体最终是否会发展出侵入性疾病,因此,鉴定并治疗具有充分文献记载的侵入性MRSA疾病风险增加的整个患者群体尤其重要。

[0176] MRSA介导的侵入性疾病统计数据:

[0177] 在1961年英国科学家鉴定了MRSA,并且在1968年记录了第一例美国临床病例。在随后的25年中,MRSA在很大程度上被认为是地方医院的问题,并且发病率呈上升趋势,但是从1990年代中期到后期开始,发现与社区相关的MRSA发病率增加,主要表现在浅表皮肤和软组织感染中。医学界最关注的是由MRSA引起的侵入性感染的增加。在整个1990年代,侵入性MRSA疾病的发病率呈上升趋势,并在2005年达到顶峰。

[0178] CDC通过NHSN以及也从2005年开始的“新兴感染计划—主动细菌核心”监视系统跟踪侵入性MRSA疾病的发病率。与2005年相比,2015年的数据表明,侵入性MRSA疾病的总发病率几乎降低了50%,发病率从37.56降低到18.8。发病率的降低在很大程度上归因于在医院中为应对这种公共卫生危机而采取的昂贵且费力的感染控制干预措施,因为大部分收益是在与卫生保健有关的病例中看到的,而不是与社区有关的病例。尽管在过去十年中取得了进步,但侵入性MRSA感染仍然是公共卫生领域的首要任务。这些感染可能很难治疗,并且在接受适当治疗的患者中,近25%的患者表现出治疗失败。预测哪些卫生保健经验丰富的患者具有侵入性MRSA的风险是一个具有挑战性的问题。已经阐明了如MRSA定植、存在慢性开放性伤口以及存在侵入性器械等危险因素。

[0179] 仅这些特征的存在不能预测哪个患者最终将显示出侵入性疾病。然而,对于患者患侵入性MRSA感染,最可预测的风险因素之一是先前曾发生过侵入性MRSA感染。在主动细菌核心监测(ABC)的2004-2005年数据中,注意到在回顾性数据评估的18个月中,几乎13%

的侵入性病例继续发展出第二次侵入性MRSA感染。对2011日历年的EIP-ABC数据进行的另一项调查发现,这些患者中有8%的患间隔者至少30天被一种以上的侵入性MRSA感染。复发性侵入性MRSA感染的长期风险肯定仍然更高,因为这些估计将错过研究期间段之前这些患者中的早期感染,以及在结束日期之后发生的晚期感染。自从Huang和Platt(2003)发现29%的具有已知MRSA定植或感染的住院患者在18个月内继续发生第二次MRSA感染(通常是严重的)后,靶向该组人群以防止侵入性疾病状态的复发可以预防大约17,500例后续的侵入性MRSA感染(使用最新的CDC数据)。

[0180] 侵入性MRSA以及MRSA的皮肤和软组织感染均由相同的病原体引起。然而,孤儿的称号是根据药物和疾病的并列来授予的。MRSA是病原体,而不是疾病状态。然而,其可能导致感染,并且正在治疗这些不同类型的传染病。与MRSA仅限于皮肤或仅以MRSA定植相比,侵入性MRSA的预后要严重得多,而且其临床表现不同。美国人口中约40%的人口被金黄色葡萄球菌定植,通常在鼻子或皮肤上发现。通常,不存在被视为"疾病状态"的感染迹象。然而,全身性MRSA感染将表现为高烧、发冷、头晕、胸痛、患处肿胀、头痛、皮疹、咳嗽和其它全身性症状。这两种情况的处理方式有所不同,其中通常通过切开并引流通常与皮肤和软组织感染有关的疖来治疗皮肤和软组织感染。仅当全身性疾病或严重疾病的迹象扩散到多个部位时才使用抗生素和去定植方法。

[0181] 侵入性MRSA的发病率每年为20到50例/100,000人。[6a]当前美国人口为326,199,002(2017年11月2日从www.census.gov/popclock访问),这意味着美国每年保守地有163,100例侵入性MRSA感染病例,低于FDA孤儿指定的200,000名患者标准。搜索了患病率报道的其它来源,以确认已计算出该患者群体的最保守估计。Hassoun等人在2014年报告了美国72,444例侵入性MRSA发病率,从2005年的111,261例下降。[7a]基于此发病率并假设人口将继续减少,可以假设163,029名侵入性MRSA患者的患病率在美国2017年是一个非常保守的估计。根据美国疾病预防控制中心(CDC)的数据,2011年有超过80,000例侵入性MRSA感染和11,285例相关死亡。

[0182] 为了解决这一问题,本发明人已经开发了BioPlx01菌株,其是不能引起疾病但可以驻留在MRSA可能占据的微生物组生态位中的金黄色葡萄球菌的分子改变的菌株。BioPlx01菌株缺乏侵入性的原因是,操纵子在与血液或血浆接触后会打开,从而触发生物的死亡。在施用BioPlx01菌株之前,已对MRSA检测呈阳性并经历全身性症状的患者将进行全身去定植,从而使所述菌株能够占据MRSA先前曾在该患者微生物组中占据的位置。通过防止MRSA的强毒株占据生态位,这些强毒株无法定植,并随后侵入无菌组织部位。BioPlx01菌株能够预防全身性MRSA反复感染。

[0183] 在一个实施例中,提供了一种用于在患有囊性纤维化的患者中治疗金黄色葡萄球菌肺部感染的方法。

[0184] 在一个实施例中,提供了一种用于治疗侵入性细菌血症的方法。使用CDC(疾病控制和预防中心)采用的标准,通过从通常无菌的身体部位分离出细菌即可指示出侵入性细菌血症。这些身体部位可能包含血液、CSF、关节液、骨骼样品、下呼吸道样品和其它无菌体液。这种情况与简单细菌定植以及细菌介导的皮肤和软组织感染有关,但有明显区别。公认的是,在大多数情况下,定植状态是侵入性疾病的先决条件。

[0185] MRSA和v-MSSA介导的侵入性(全身性)细菌感染

[0186] 在金黄色葡萄球菌的介导下,MRSA侵入性细菌感染也可通常被称为或在文献中被称为:MRSA菌血症或败血症、全身性MRSA感染、MRSA血流感染、入性MRSA感染。特定的MRSA诱导的全身性病状范围从骨髓炎、败血性关节炎、肺炎、心内膜炎、菌血症、中毒性休克综合征到败血性休克。通过持久地干扰不良菌株的定植机制而在高危人群中预防或减少侵入性MRSA疾病复发的方法的开发将在预防侵入性MRSA感染通常所需的病状方面取得重大进展,并将降低这些患者遭受随后的MRSA侵入性感染的可能性。

[0187] 本公开的一个目的是评估BioPlx-01 WT材料在活跃健康的成年医务工作者中预防MRSA复发的能力。该群体的MRSA感染风险尤其高,并且在任何人口中,其MRSA定植率最高。成功地证明针对该群组的保护作用将验证BioPlx-01WT在所有具有风险的人中有效预防MRSA复发的功效。

[0188] “复发”仅表示“细菌再次出现”。复发对于疾病的发展和控制至关重要。随着病原体的复发,病原体会一次又一次地出现,并且每次经历一个生存周期时,所述病原体都会“学着”对所见过的抗生素越来越有抵抗力。没有这种复发的话,病原体一旦消失,就会消失,仅此而已。如果没有复发,就不会存在向抗生素抗性发展的压力。

[0189] 在各个实施例中,可以用一种或多种病原微生物定植受试者。在某些实施例中,不良微生物是耐药性病原微生物。耐药性病原微生物可以选自淋病奈瑟氏球菌、耐氟康唑的念珠菌属、MRSA、耐药性肺炎链球菌、耐药性结核病、耐万古霉素的金黄色葡萄球菌、耐红霉素的A组链球菌属和耐克林霉素的B组链球菌属。https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest_threats.html.

[0190] 在一个实施例中,不良微生物可以是耐药的病原性金黄色葡萄球菌。

[0191] 葡萄球菌属是最丰富的皮肤定植细菌属,并且是医院感染和社区相关的皮肤感染的最重要原因。金黄色葡萄球菌物种可能引起暴发性感染,而其它葡萄球菌物种引起的感染大多是亚急性的。定植通常是感染的先决条件。Otto 2010,《皮肤病学专家评论(Expert Rev Dermatol)》2010年4月;5(2):183-195。然而,并非所有侵入性金黄色葡萄球菌感染之前都会检测到相同菌株的定植。不相关的部分可以通过“直接接种”或“直接伤口接种”理论来解释,如在第二次携带者的手术过程中发生的事件,或在首次定居监测之后的时间内,所有这些患者的金黄色葡萄球菌菌株在定植或侵入性菌株定植中的不完全检测。

[0192] SA是常见的人类共生生物,其在30%到50%(美国)的人口中存在(定植),通常没有症状。尽管人类的家畜、牲畜和螨虫可以作为辅助库,但人类无症状携带的金黄色葡萄球菌是主要的天然库。

[0193] 存在许多不同的金黄色葡萄球菌菌株,其中许多还可以充当严重的病原体。金黄色葡萄球菌感染的症状可能多种多样,从无症状到轻微症状,从皮肤和软组织感染到威胁生命的侵入性全身疾病(如血管内感染、肺炎、败血症性关节炎、心内膜炎、骨髓炎、异物感染、败血症、中毒休克和心内膜炎)。传统上认为,鼻前粘膜是用于检测金黄色葡萄球菌对健康携带者定植的最常见部位。一些部位可能无症状地被定植,所述部位包含鼻孔、喉咙、腋窝、会阴、腹股沟区和直肠。

[0194] MRSA分离株曾经主要限于医院、其它卫生保健环境以及经常使用这些设施的患者。然而,自1990年代中期以来,在缺乏暴露于卫生保健系统的风险因素的人群中,报告的MRSA感染人数激增。MRSA感染率的增加与新型MRSA克隆的识别有关,这种克隆被称为社区

相关型MRSA(CA-MRSA)。CA-MRSA菌株不同于较旧的与卫生保健相关的MRSA菌株;二者感染不同类型的患者、二者引起不同的临床综合、二者的抗菌剂敏感性模式不同、二者在社区的健康人群中迅速传播并且经常在医疗环境中引起感染。David、Michael等人,2010,《临床微生物学综述(Clin Microbiol Rev)》23(3):616-687。

[0195] 尚未知为什么复发性CA-MRSA皮肤和软组织感染是常见的。复发发生的机制尚不清楚。可能的情况包含持续无症状的CA-MRSA携带引起的再感染、从环境MRSA获得后的再感染或在与人或动物的密切接触中获得新型MRSA之后的再感染。由MSSA引起的皮肤和软组织感染也会复发,但发生频率低于由MRSA引起的感染。

[0196] 在恒定的抗生素压力下,许多金黄色葡萄球菌变体已发展出抗生素抗性。如今,金黄色葡萄球菌对青霉素的耐药性实际上已普遍存在,并且普通的β-内酰胺耐药性和相关的多种抗生素(甲氧西林)耐药性现已广泛传播,从而产生了一类重要的新型抗生素抗性“超级细菌”。

[0197] 致病性金黄色葡萄球菌可以是耐药性金黄色葡萄球菌,如MRSA或耐万古霉素的菌株(如VISA或VRSA)。可替换地,致病性金黄色葡萄球菌可以是剧毒的甲氧西林敏感性金黄色葡萄球菌(v-MSSA)。v-MSSA是威胁生命的侵入性感染的高毒力原因。MRSA和v-MSSA很流行,并且人为代价很高。

[0198] MRSA已经成为世界范围内医院、诊所、监狱、军营、甚至体育馆和健康俱乐部中的严重的公共卫生问题。MRSA是医院获得性感染的常见原因(每年50万美国患者),并且越来越多地成为社区获得性感染的重要原因。对于全身侵入性疾病—20%的病例会导致死亡。MRSA是新型抗生素抗性“超级细菌”中最重要的一种。尽管存在治疗金黄色葡萄球菌感染的方法,但实际上不存在预防复发的方法。在31%到45%的受试者中发现MRSA皮肤感染的复发。

[0199] 防止复发的一种努力包含去定植。防止复发的第一个(也是目前唯一的)广泛实践的步骤是去定植。不幸的是,简单的去定植在防止复发方面效果很差。医生最初可以使用局部用化学品(例如氯己定)或抗生素治疗微生物定植或感染(例如MRSA或v-MSSA定植/感染)。在许多情况下,用抗生素治疗可以“临床上”消除疾病。防腐剂和收敛剂可用于去定植(即,抑制),所述防腐剂和收敛剂包含茶树油和氯己定。用于抑制的抗生素包含用于鼻部去定植的局部用抗生素,如莫匹罗星。最常用于MRSA的全身性抗生素包含万古霉素、第一代抗生素,如头孢唑林、头孢霉素或头孢氨苄;以及新一代抗生素,如利奈唑胺或达托霉素。在不太严重的MRSA病例中,可以使用克林霉素或林可霉素。尽管如此,仅通过这种去定植,MRSA和v-MSSA病原体通常会在近1/2的时间内复发或重新生长。这种水平的表现自然导致人们对简单的去定植在预防复发方面的功效持怀疑态度。

[0200] 临床医生通常向患有耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌(MRSA)引起的反复皮肤感染的患者开具局部、鼻内或全身性抗微生物药剂,以努力消除葡萄球菌属携带者状态。一些药物可以暂时中断葡萄球菌属的运输,但是没有一种药物可以有效预防MRSA引起的皮肤感染。Creech等人《北美传染病诊所(Infect Dis Clin North Am.)》2015年9月;29(3):429-464。

[0201] 在文献和本发明人的手中,均发现去定植的质量与观察到的复发率相关,但是简单的去定植很少导致持久的、成功的结果。

[0202] 本公开提供了致力于通过有效且持久地修饰微生物组而防止复发的方法和组合物。

[0203] 已经开发了用于预防或减少病原性微生物感染的复发的方法,所述方法包括抑制微生物感染或定植。

[0204] 提供了一种减少受试者中病原性感染的复发或减少不良微生物定植的方法,所述方法包括:在所述受试者的至少一个部位上对所述不良微生物进行去定植,从而显著减少或消除所述部位的所述不良微生物的存在;以及通过向所述受试者施用具有与所述不良微生物相同的属和种的合成的第二微生物来替换所述不良微生物。

[0205] 预防复发的方法和组合物包含通过用专门设计的合成微生物(或“有益细菌”)填充病原体所占据的生物群系生态位来替换病原微生物。通过占据相同的生物群系生态位,“有益细菌”将病原体挤出,从而阻止病原体重新定植或移入(或移回)其首选的生态社区。确保填充同一生物群系生态位的一种方法是通过设计一种具有与病原微生物相同的属和种的合成微生物。

[0206] 预防复发的方法和组合物包含通过重建关键的营养、化学或共生环境来促进或支持合成微生物(“有益细菌”),所述环境进一步促进优选的生物并抑制病原体的重新定植。例如,共生簇可以提供另外的的分层防御,以防止病原体移回其旧的生态位—这可以帮助防止复发。

[0207] BioPlx方法通过包含微生物学、系统和计算生物学在内的最先进的方法/技术;环境相互作用(集群和信号传导);专有生物(经选择和改良);以及变体和菌株替换策略来实现。

[0208] 本文提供了替换微生物,其包含(1)“BioPlx01-WT®变体”—一种具有确定的无毒力和被动定植历史的金黄色葡萄球菌502a野生型微生物,其已被分离、验证并准备用于使用该菌株簇的田间试验,如实例1所述;(2)“BioPlx01-KO®工程变体”,一种合成的金黄色葡萄球菌菌株,其可通过敲除特定的毒力基因来增强安全性;(3)“BioPlx01-KS®工程变体”,一种合成的金黄色葡萄球菌菌株,其嵌入分子程序化的细胞死亡触发器,以防止侵入性毒力。在一些实施例中,合成微生物纯粹充当病原菌株的替换物,而没有“新”感染或定植。

[0209] 已经开发了充分表征的金黄色葡萄球菌培养物(菌株和变体)的广泛的专有文库,其用于替换生物来源;用于耐久性和竞争性分析;用于基因型/表型的比较分析;用于毒力基因组/转录组的聚类建模;并用于信号传导基因组/转录组的聚类建模。

[0210] 正在开发可控制的共生生物文库,以与BioPlx01-KS®变体一起进行潜在变体簇共同施用。

[0211] 还正在开发用于计算微生物学的方法,所述方法包含机器学习;复杂的动态微生物系统的建模;基因组/转录组/蛋白质组(表型)的关系;毒力因子遗传学和启动子;对弹性和随时间/条件发生的变化进行建模;n维生态位形成关系;和高维聚类关系。

[0212] 本文的模型抗复发方法的中心是“非共定植”原理,意味着仅一个物种以及所述物种的一种变体可以随时占据相关的皮肤或粘膜生物群系生态位。这个简单且可测试的现象背后是许多更深层次的生成原理,这些原理共同构成了新兴的微生物组学。尽管可以广泛

推广,但本节中对非共定植的讨论专门针对金黄色葡萄球菌定植。

[0213] 非共定植

[0214] 非共定植(也被称为“细菌替换”)的原理指出,在任何给定时间,一个物种的仅一种变体/菌株可以占据生物群系内的任何给定生态位。

[0215] 非共定植的中心经验现象代表一种综合效果:可以在复杂系统中发现的大量力相互作用的结果,并且直到今天才被很好地表征和数学化。

[0216] 人类生物群系中对物种水平特定的细菌生态位是本技术的基础。如果对生物学的生态位占据没有特异性,则不可能实现有意的菌株交换,正如实验证明的细菌替换现象一样。

[0217] 对于用于预防病原性定植或感染复发的本发明方法的持久性而言,非共定植的期望是重要的。变体到变体的非共定植已在文献中通过菌株/变体替换进行了实验证明(例如,1963年Shinefield等人的金黄色葡萄球菌80/81到502a的转化),并且在当前的临床研究中得到了证实,如实例1所示。

[0218] 物种间持续的生态位占据存在怀疑,因为仔细阅读文献表明耐久性低,并且体内证据很少。短暂的占据可能会发生,但不被认为是重要的结果,因为只关注持久性结果。

[0219] 物种间替换的持久性失败证明了特定的生态位填充需要“紧密变体”替换。这很重要,因为只有持久的生物群系才能显示有效的非复发技术/产品所需的功能特性(如弹性)。

[0220] 在变体到变体替换(如在本公开中关于MRSA抗复发材料所见的替换)的情况下,尚未从文献中鉴定出证据表明所述替换是否需要“生物群系破坏性事件”(如通过抗菌剂、抗生素等意外或有意地进行去定植)或是否可以通过“缓慢的竞争性替换”(一种生物为了资源、增长等而与另一种生物竞争)而发生所述替换。然而,在绝大多数人类皮肤生物群系中,只有一种菌株“完全”地定植于人类,这表明发生了缓慢的竞争性替换。进一步地,抗MRSA非定植方法的成功率为55%,这表明“生物群系破坏性事件”也可以诱导持久的生物群系变化。这两种现象都是非共定植的表现。

[0221] 非共定植自然发生,例如,在大多数情况下,在单个生物群系中仅检测到一种金黄色葡萄球菌变体(超过95%的情况,其中的平衡可能是由“短暂状况”引起的)。

[0222] 在指定和评估非共定植的持久性(功效)时,有必要认识到三种不同的结果等级:(1)短期—紧随重新定植后、(2)早期稳定期—排出过量生物之后以及(3)长期—建立稳定的“新”生物群系之后。

[0223] 在短期(紧随重新定植后)中,去定植的生物群系由在重新定植过程中“过量”应用的生物主导—产生了一种偶然的和暂时的结合(像涂抹花生酱一样)。在此期间内的测试只能确认已经发生了生物群系应用。持续时间=几天,随后替换过量的生物。

[0224] 在早期稳定期(排出过量生物之后)中,生物群系本身正在重新建立其平衡状态,但表面上看起来是替换生物而不是先前存在的病原体。对这一结果的信心主要是由于新生物与去定植后存活的病原体的比率差距悬殊(约上百万比一)。期望这将成为具有高耐久性水平的稳定定植。在此期间的测试将确认已消除了MRSA或vMSSA,并且已重新定植了替换菌株。持续时间=数周至数月。

[0225] 在长期(建立稳定的“新”生物群系之后)中,不仅将证明生物占据或“占领”生态位的能力,而且还将证明其“保持”该生态位的能力。在一些实施例中,所述阶段用于评估替换

菌株或合成微生物对抗当前一代的新生物群系入侵者(如USA300)的竞争力。这个问题是指“新的”替换生物随着时间的推移与缓慢的竞争性替换物竞争的能力,以及随着时间推移可能对生物群系造成破坏的外力(如抗生素或防腐剂的暴露或频繁暴露于病原体)—尤其是当菌株对此干扰物差异敏感时。

[0226] 表征微生物变体的非共定植现象、变体对变体的生态位占领是重要的,并且已经开发出的经验证据表明该现象在真皮生物群系生态系统中存在并且是强大力量。

[0227] “竞争性排除”法是指仅一种生物主导一个生态位的情况。

[0228] 理解该现象的一个历史性错误是假设这是一个二进制系统,概念上由一个或两个变体驱动。实际上,在任何时候,随着时间的流逝,环境中可能存在大量不同的微生物,例如各种金黄色葡萄球菌菌株。

[0229] 可以得出结论,如果没有非共定植现象,则实际上所有“具有葡萄球菌能力的”生物群系本质上都是多种变体的高度可变的混合异源“汤”。表1列出了各种可能性。

[0230] 表1.金黄色葡萄球菌(SA)的生态位兼容性和预期结果

[0231]

病例	生态位兼容性	竞争性排除	预期结果
1)	一个金黄色葡萄球菌生态位	+	一种变体主导（除了过渡）
2)	一个金黄色葡萄球菌生态位	-	总是有大量的变体（汤）
3)	多个金黄色葡萄球菌生态位	+	任何较小的变体数量=离散生态位的数量
4)	多个金黄色葡萄球菌生态位	-	总是有大量的变体（汤）

[0232]

[0233] 在表1中,可以消除案例2和案例4,因为共定植发生在5%以下(文献中),并且即使在这些案例中,观察到的绝大多数共定植实例也仅涉及一种其它生物。在少数可能与生态位与替换生物的足迹不完整或不重叠有关的情况下(少于5%),案例3可以被视为可能的。

[0234] 从文献中没有直接的证据表明观察到的一种变体对另一种变体的替换(例如MRSA的获得)是由生物群系破坏性事件引起的还是由缓慢的竞争性替换引起的。然而,从经验上很清楚,一次仅一种菌株趋向于定植任何单个生物群系(完全地)。给定生物群系内在生物地理上明显不同且遥远的部位往往具有相同的变体,并且这在没有任何可观察到的全身去定植和替换过程的情况下发生,这表明发生了规则驱动的竞争性替换过程。对竞争性替换的观察是非共定植原理的另一种表现。

[0235] 在替换变体并未完全填充生态位的假设情况下,可能存在弱化共定植的趋势。在这些情况下,可以使用变体簇用替换物“填充缝隙”,以使共定植有利于合成的替换微生物而非原始病原体。尽管这可能涉及使用不同的替换微生物,但这不是复发—这是进一步阻断复发。

[0236] 非共定植的当前证据

[0237] 一项大型研究调查了从英格兰牛津郡健康患者身上采集的3,197份阳性金黄色葡萄球菌样品中的共定植的发生率,之后进行了长达两年的纵向调查;在鼻孔样品中具有多株金黄色葡萄球菌的点流行率为3.4%到5.8%。Votintseva等人,2014《临床微生物学杂志(J Clin Microbiol)》,52(4):1192-1200。在近两年中几乎每两个月提交一次拭子的金黄

色葡萄球菌携带者中,有11%的人有短暂的共同运输。该研究使用了有效的水疗分型方案,所述方案许使用敏感程序查找甚至低比例的共定植菌株。该数据集的解释表明,金黄色葡萄球菌定植是一个动态过程,随着时间的推移,多个金黄色葡萄球菌菌株争夺存在于同一生态位中的可能性较低。一个简单的计算可以确定,观察到的结果不仅仅是独立地占领了一个非特定的生态位。在这种情况下,对1000名患者进行了筛查,发现360名患者为金黄色葡萄球菌阳性。在非特定生态位的情况下,预计将出现.36x.36或13%(130人)的共定植;然而,在所述主要点上,360名携带者中仅有3.9%(14人)实际上被共定植,这表明了微生物组生态位对金黄色葡萄球菌的菌株特异性。

[0238] 可以在任何事件时间点用金黄色葡萄球菌的两种不同菌株短暂定植一小部分金黄色葡萄球菌携带者。如上所述,Votintseva等人研究了MSSA和MRSA内的所有变体,并指出该现象的点发生率在3.4%到5.8%的范围内。仅研究MRSA和MSSA混合物的论文(只会发现mecA位点不同的物种)的点发生率可预测地更低,为2.3%。如果共定植是一个稳定的状态,则几乎所有样品中都将含有金黄色葡萄球菌物种的混合物。这并未被观察到。

[0239] 另一项研究研究了680名正在接受任何类型的住院治疗的患者。当时,国家卫生局对所有入院患者进行了MRSA筛查。Dall'Antonia,M.等人,2005,《医院感染杂志(J Hospital Infect)》61,62-67。在此评估过程中,对方案进行了完善,以发现MSSA患者、MRSA患者以及共定植了MRSA和MSSA的患者。在115名患者中仅发现MSSA(16.9%),在56名患者中仅发现MRSA(8.2%)并且在4名患者中发现了共定植(0.58%),这再次证明了微生物组中针对金黄色葡萄球菌的菌株专属生态位的观点。其支持一种金黄色葡萄球菌菌株可以阻止另一种金黄色葡萄球菌菌株的建立的理念。结果表明,如空假设所预测的那样,共定植的携带者的百分率较低,这表明先前占领居住的金黄色葡萄球菌菌株针对一种金黄色葡萄球菌菌株的定植具有显著的保护作用。统计学著性为$p<0.01$。计算出MSSA定植对MRSA定植的保护作用为78%(CI:29-99%)。

[0240] 进一步的研究在美沙酮诊所中观察了由HIV感染的IV吸毒者组成的群体中非一致的金黄色葡萄球菌分离株。存在121个基线阳性金黄色葡萄球菌样品,其中4个样品在PFGE评估的3个菌落中显示出明显的不一致。然而,对这4个样品的重新评估显示,这4个样品中有2个样品在第二次评估时是一致的。重新评估18个最初发现是一致的样品后,未发现不一致。因此,发现该群体的1.7-3.3%在单个时间点发生了共定植。Cespedes C.等人,《传染病学杂志》2005;191:444-52。

[0241] 去定植/重新定植研究的历史证据也显示了非共定植的证据。这一原理先前已在1960年代和1970年代著名的80/81至502a“细菌干扰”研究和临床应用中得到了部分证明。在1960年代和1970年代的早期细菌干扰论文中显示了共定植的缺失,这些论文也清楚地证明了在调节共定植方面的“竞争性排除”。没有观察到作为常驻菌株的80/81和作为供体菌株的502A的混合培养物,这通过实验证明了非共定植是微生物组的一种稳定情况。(Shinefield等人,1963;Shinefield等人,1966;Shinefield等人,1973;Aly等人,1974;Boris等人,1964;Light等人,1967;Fine等人,1967)。

[0242] 在不存在“非等价”和“竞争性排除”的情况下,微生物组生态位将始终被相同细菌物种的多种菌株填充。如果从未见过,实质上从鼻孔中分离出纯净的金黄色葡萄球菌菌株培养物将是罕见的事件。在这种状态下的种群动态将产生金黄色葡萄球菌的许多变体的异

质“汤”,这是由环境的偶然或随机暴露所决定的。宿主曾经接触过的任何菌株都将有同等机会在所述空间定居,而不会与任何其它菌株变体竞争或干扰(多克隆定植)。这个经验结果的缺失表明“竞争性排除”。

[0243] 然而,排除原则并没有严格到一旦生态位被占据,其它变体就无法篡夺其位置。这些观察结果证明了一个排除原则,该原则是有力的,但其允许外部物种通过短暂共享所述生态位来挑战占领物种,同时对所述空间中的主导地位进行最终竞争。在一些情况下,“新”菌株战胜了先前的常驻菌株,并建立了新的优势常驻菌株。在其它情况下,闯入者被拒,常驻菌株排斥了替换尝试并重新确立了独占优势。在这两种情况下,共定植的状态都是短暂且不稳定的;出现频率低。

[0244] 微生物系统

[0245] 提供了在受试者中持久并安全地预防病原微生物感染复发的方法和组合物,所述方法包括:抑制病原微生物;用能够占据相同生态位的合成微生物进行替换以持久地排除所述病原微生物;以及促进合成微生物持久地驻留在所述生态位内。如上所述,所述方法被称为BioPlx®方法。在一些实施例中,发现受试者在抑制步骤之前被病原微生物定植。

[0246] 为了成功地在微生物组内工作从而以产生持久保护结果的方式促进所需生物的定植,需要知道微生物组的“规则”:如以下各节中更详细地讨论的。

[0247] 已经开发了一种非共定植模型以提供背景并建立目标产物的特征。本发明技术的基本原理在于微生物学范例(生物组/生态系统/生态位),以及具有某些持久特征和可验证特征的微生物组。关键的可发现指标取决于文献中的共定植统计数据,通过对去定植、测试和其它相关条件的详细说明对所述文献进行了修改,随后对实例1的临床研究进行了直接观察。

[0248] 受试者中的皮肤微生物组是实体,是持久的可识别事物。超过10,000种不同物种的微生物组成了皮肤微生物组。皮肤生物群系是一种生态系统,其可以被定义为一个系统或一组相互连接的元件,由生物的群落与其环境相互作用而形成。皮肤微生物组生态系统具有“健康”或“正常”的基本状态。生物群系可以是“健康的”或“病态的”(生态失调),并且可能被病原性生物入侵—换句话说,微生物组可能会被“有害细菌”(如MRSA)入侵,其也可能被不良生物或变体感染或污染(生态失调)。生态失调是用于体内或体内微生物失衡或适应不良(如受损的微生物群)的术语。

[0249] 皮肤微生物组具有由宿主和生物群系所有组成部分之间广泛的组合网络创建的结构。微生物组或生物群系是一个动态结构的复杂系统,并且是一个“弹性复原”生态系统。

[0250] 皮肤微生物组具有动态但持久的结构—例如,即使在大量细胞死亡的情况下(例如洗涤,使用乙醇、洗手液等),其也是“可复原的”,生物群系以相似的形式再生。

[0251] 复原力

[0252] 人类微生物组具有复原能力,这意味着轻度的扰动往往会朝着先前建立的物种混合物和浓度的基线重新校正。然而,由于急性的外部破坏性事件(即抗微生物药物或防腐剂的应用)或由于缓慢的竞争性替换,每个生态位的成员都可以成功地挑战其在稳定混合物中的位置。

[0253] 在生态学中,复原力是生态系统通过抵抗破坏并快速恢复而对摄动或干扰做出反应的能力。复原力是指生态系统的稳定性以及承受干扰和恢复自身的能力。

[0254] 在文献中,复原力的主要数学定义基于动力学系统理论,并且更具体地说,基于吸引子和吸引域。人类微生物组以多种方式运作,如多域复杂系统。其会改变状态或域,但随后复原力会稳定该状态。Martin,S.等人,2011,在以下文献中:Deffuant G.、Gilbert N.(编辑)“复杂系统的生存力和复原力(Viability and Resilience of Complex Systems)”《了解复杂系统(Understanding Complex Systems)》施普林格出版社(Springer),柏林,海德堡,第15-36页。

[0255] 微生物组以多种方式操作,如多吸引子的复杂系统—其可以改变吸引子的状态或域,但随后与所述吸引子相关的复原力会稳定该状态。

[0256] 生态复原力被定义为系统在经历变化时吸收干扰并重新组织从而仍然保持基本相同的功能、结构、特性和反馈的能力。Mitra,C.等人,2015,“基于生态复原力的复杂系统中多稳定性的综合量化(An integrative quantifier of multistability in complex systems based on ecological resilience)”,《自然(Nature)》,《科学报告(Scient.Rep.)》,5,1-12。

[0257] “竞争性排除原则”规定完全竞争者不存在。“不平等公理”指出,现实世界中没有任何两个事物或过程是完全相等的。Hardin,1960,《科学(Science)》,第131卷,1292-1297,第1292页。根据Hardin的“不平等公理”和竞争性排除原则,长期持久性只能通过近似变体的替换来实现,但就物种替换而言是不可能的。例如,MRSA和MSSA可以短暂地共定植—如同金黄色葡萄球菌的任何其它变体可以以短暂方式共定植一样。参见Dall’Antonia,M.等人,2005,《医院感染杂志》61,62-67,其公开了一项针对680位患者进行任何类型住院治疗并对所有入院患者进行MRSA筛查的研究。在此评估过程中,对方案进行了完善,以发现MSSA患者、MRSA患者以及共定植了MRSA和MSSA的患者。在115名患者中仅发现MSSA(16.9%),在56名患者中仅发现MRSA(8.2%)并且在4名患者中发现了共定植(0.58%),这再次证明了微生物组中针对金黄色葡萄球菌的菌株专属生态位的观点。其支持一种金黄色葡萄球菌菌株可以阻止另一种金黄色葡萄球菌菌株的建立的理念。

[0258] 复原力可能会导致复发(一种观察到的自然现象),因为现有的(受MRSA污染的)生物群系试图自我保护。

[0259] 然而,如本文提供的方法和组合物所显示的,复原力也可以防止MRSA复发。通过抑制定植在受试者体内的病原微生物,如MRSA(“有害细菌”),并用相同物种的安全合成微生物(“有益细菌”)替换,已确定“有益细菌”可持久地防止“有害细菌”的复发(防止MRSA再次入侵)。

[0260] 在金黄色葡萄球菌携带者中观察到产生持久的持续替换的复原力的历史实例,并用菌株502a替换。Aly等人(1974《传染病学杂志》129(6)第720-724页)研究了金黄色葡萄球菌携带者中的细菌干扰。用抗生素和抗菌皂治疗携带者,并用金黄色葡萄球菌菌株502a攻击。据发现,需要充分的去定植才能获得502a的良好定植。第7天的摄入为100%,但在第23天的摄入则降至60%到80%。经过良好去定植的受试者在23周时的持久性数据为73%。因此,只有通过紧密变体的替换才能获得长期的持久性。共生菌群(正常菌群、原生微生物群)可以帮助重新定植动力学,但其不能满足严格的持久性要求。发明人设计了一种用于获得将被“替换”或“排除”的生物或病原体(相同物种)的“被动”形式的方法。

[0261] 已经提出了在没有严重扰动的情况下的成年人微生物生态系统中的相对稳定性,

并且人类社区的长期稳定性并不是通过惯性来维持的,而是通过动态系统内的恢复力的作用来维持的。Relman,D.A.,2012,《营养学评论(Nutr Rev.)》,70(增刊1):S2-S9)。

[0262] 功能性复原力是微生物群落的固有属性,并且已经提出响应于环境变化的状态改变可能是驱动微生物群落的功能性复原力的关键机制。Song等人,2015,《微生物学前沿(Frontiers in Microbiology)》,6,1298。为了寻求适用于所有微生物群落的整合概念,Song等人比较了工程化复原力和生态复原力,并通过以下论证协调二者:复原力是复杂的自适应系统的固有属性,这些系统在受到干扰后会恢复其系统级功能以及与环境的相互作用,而不是其内生状态。

[0263] 因此,生物群系生态系统具有动态的但“稳定的弹塑性平衡”,一旦受到干扰,生物群系就“尝试”恢复平衡。在任何给定时刻,生物群系生态系统都具有平衡的“基本状态”。甚至大量细胞死亡(例如洗涤,使用乙醇、洗手液等)后,通常也会观察到生物群系以相似的形式再生。

[0264] 微生物组生态系统具有由结构以及内部和外部相互作用定义的“生态位”。任何生物群系结构的一个“事实”或“原理”是:如关系结构所定义/允许的,不同的生物在生物群系中占据不同的“生态位”。生态学中的“生态位”是物种在其环境中具有的作用和地位;物种如何满足其对食物和住所的需求、如何生存以及如何繁殖。一个物种的生态位包含其与环境中生物和非生物因素的所有相互作用。生物群系“生态位”具有特定的环境因素和条件,包含例如pH、温度、渗透压、重量渗透摩尔浓度、氧气水平、营养素浓度、血液浓度、血浆浓度、血清浓度和电解质浓度。

[0265] 如关系结构所定义/允许的,不同的生物在生物群系中占据不同的“生态位”。生态位是生物群系生态系统的持久特征。每个生态位都有边界条件;虚拟的形状或反映该形状的“足迹”,其将在“哈金森生态位(Hutchinsonian niche)”的上下文中进行讨论。

[0266] 哈金森氏生态位是n维超体积,其中维度是环境条件和资源,其定义个体或物种践行“其”生活方式(更具体地说,其种群持续)的要求。“超体积”定义了生物可利用(并由生物专门使用)的资源(例如,光、营养素、结构等)的多维空间,并且和“除考虑中的物种以外的所有物种都被视为坐标系的一部分。”

[0267] 生态位是单个物种占据的生态空间中的非常特定的部分。在不存在两个物种在所有方面都相同(即,Hardin的“不平等公理”)和竞争性排除原则的前提下,一些资源或适应性维度将为每个物种提供特定的生态位。

[0268] 生态位是排他的。每种生物都与相似的生物竞争所述生态位,并且成功的生物填补所述生态位。两种生物不会/不能填充相同的生态位,因为随着时间的推移,一种生物会与另一种生物竞争。因此,两种生物在同一生物群系中并存的时间越长,则意味着它们不会占据相同的生态位。

[0269] 一旦生态位空置,其它生物就可以填补该位置。这是因为一个物种不具有与另一个物种相同的足迹,因此一个物种无法填充与另一个物种相同的生态位。成功的替换需要使用相同的生物(例如,相同物种或紧密变体)来填充或持久地替换生态位。已经认识到,部分竞争以短暂定植/感染的形式存在并且是可观察到的现象。

[0270] 单个生态位的部分竞争可能发生。一种生物可以通过部分竞争来“缩小”另一种生物的“生态位宽度”。表皮葡萄球菌与金黄色葡萄球菌可能就是这种情况。表皮葡萄球菌是

一种共生细菌,当以足够高的浓度使用时,其会分泌一种能够分解预先形成的金黄色葡萄球菌生物膜的丝氨酸蛋白酶。Sugimoto等人,《细菌学杂志(J Bacteriol)》,195(8)1645-1655。然而,在作为毒性表型表达的载体的生物(由于在部位处施用而暂时大量超负荷)与作为缩小或胜过病原体的生态位的持久居民的生物之间存在重要区别。

[0271] 物种间共定植是与持久填充和阻断生态位的能力不同的现象。例如,Shu等人(2013)证明甘油与痤疮丙酸杆菌(C.acnes)发酵形成短链脂肪酸(SCFA),所述痤疮丙酸杆菌是一种皮肤共生细菌,其可以抑制USA300(最普遍的社区获得性耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌(CA-MRSA))的生长。Shu证明了痤疮丙酸杆菌在厌氧条件下产生的SCFA在高浓度下会抑制金黄色葡萄球菌的生长。Shu等人,2013《公共科学图书馆·综合(PLoS ONE)》8(2):e55380。然而,这些细菌和痤疮丙酸杆菌的这种发酵能力已经存在于正常人的皮肤生物群系中,而并未有效地消除或减轻金黄色葡萄球菌的致病性。没有任何理由相信这些底物的超生理应用将达到减少金黄色葡萄球菌定植或疾病发生率的目的。

[0272] 去定植/重新定植

[0273] 提供了一种预防或减少受试者中不良微生物的病原性感染的复发的方法,所述方法包括以下步骤:(i)在所述受试者的至少一个部位上对所述不良微生物进行抑制(去定植),从而减少或消除所述部位的所述不良微生物的存在;以及(ii)通过在所述至少一个部位处向所述受试者施用具有与所述不良微生物相同的属和种的合成的第二微生物来替换所述不良微生物。任选地,所述方法进一步包括(iii)促进所述合成微生物的定植,例如,在施用部位处。

[0274] 在一些实施例中,所述不良微生物是病原微生物,并且术语抑制(S)是指在所述受试者的一个或多个、两个或更多个、三个或更多个、四个或更多个部位处抑制、减少或消除所述病原微生物的过程。例如,所述不良微生物可以经受鼻部、粘膜和/或真皮去定植方案。

[0275] 术语“替换”(R)是指用良性、药物敏感性和/或不能在受试者中引起全身性或病原性感染的合成微生物替换病原微生物。替换微生物可以是与病原微生物相同物种的经过分子修饰的合成微生物。合成微生物可以是与病原微生物相同物种的不同菌株的经过分子修饰的微生物,使得合成微生物能够定植在受试者的部位上,但是不能引起受试者的全身性感染。通过填充病原微生物的空置生态位,合成微生物能够消除病原微生物在受试者中的重新定植,从而减少或消除病原性感染的复发。

[0276] 术语促进(P)是指例如通过采用益生元和生物群系管理(例如通过采用生物群系调节器)来促进受试者中的替换合成微生物,从而促进和支持包括所述合成微生物的新生物群系的方法和组合物。

[0277] 这些方法广泛地定义了平台技术(SRP),并开发了专门设计的方案以解决特定的医疗病状(例如MRSA)。如果正确选择了S、R和P的过程—打开特定的生物群系生态位,然后填充并维持所述生态位—将创建一个能够抵抗病原性定植的“持久的”持续生物群系。

[0278] 提供了一种减少受试者中病原微生物全身性感染的复发或机会的方法,所述方法包括:抑制受试者上的病原微生物,从而显著减少或消除所述病原微生物的可检测存在;通过向受试者施用合成微生物来替换所述病原微生物,其中所述合成微生物能够占据与所述病原微生物相同的生态位,如通过以下所证明的:(1)所述合成微生物具有与所述病原微生物相同的遗传背景或属和种;和/或(2)所述合成微生物在替换后至少60天对所述受试者表

现出持久的可检测存在。所述方法可以包含促进所述合成微生物在所述受试者的至少一个部位上的定植。在一些情况下,可能发现受试者已经被病原微生物定植。

[0279] 通常,在受试者全身性感染病原微生物之前,病原微生物先定植在受试者中。例如,相当大比例的金黄色葡萄球菌菌血症病例似乎是内源性的,因为其可能起源于鼻粘膜的菌落。例如,在一项金黄色葡萄球菌菌血症的多中心研究中,在219名患者中有180名患者(82.2%)的血液分离株与前鼻孔的血液分离株相同。在第二项研究中,在1278名经金黄色葡萄球菌鼻腔定植的患者中,有14名患者随后发生了金黄色葡萄球菌菌血症。在这14名患者中的12名患者(86%)中,从鼻孔获得的分离株与1天到14个月后从血液获得的分离株在克隆上相同。参见von Eiff等人,2001,《新英格兰医学期刊(NEJM)》,第344卷,第1号,11-16。另一项研究表明,与非携带者相比,鼻孔携带者发生金黄色葡萄球菌菌血症的相对风险增加了数倍,报道了侵入性分离株与先前发现的定植菌株之间的匹配度为80%。Wertheim等人,《柳叶刀(Lancet)》2004;364:703-705。

[0280] 在一些实施例中,发现受试者在全身性感染之前被微生物的致病菌株定植。在其它实施例中,受试者可能已经被病原微生物的医院(医院获得性)菌株或社区获得性菌株定植或感染。

[0281] 所述病原微生物可以是野生型微生物,和/或可以定植或可检测地存在于受试者的至少一个部位中的病原微生物。所述部位可以是受试者的真皮或粘膜部位。一个或多个定植部位可以包含皮肤和软组织,包含但不限于鼻孔、喉咙、会阴、腹股沟区、阴道、鼻腔、腹股沟、直肠周围区域、手指间、额头、咽部、腋窝、手部、胸部、腹部、头部和/或脚趾间。

[0282] 所述病原微生物可以是耐药微生物。疾病控制中心(CDC)最近发布了一份报告,概述了对美国的18种耐药性威胁,参见www.cdc.gov/drugresistance/biggest_threats.在一些实施例中,所述不良微生物选自淋病奈瑟氏球菌、耐氟康唑的念珠菌属、耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌(MRSA)、耐万古霉素的金黄色葡萄球菌、耐药性肺炎链球菌和耐药性结核病、耐红霉素的A组链球菌属和耐克林霉素的B组链球菌属。

[0283] 在一些实施例中,所述病原微生物是MRSA。

[0284] 合成微生物(a)必须能够填充受试者至少一个部位中的生态位,以便在抑制后持久地排除不良微生物;(b)必须具有至少一种分子修饰,所述分子修饰包括可操作地连接至包括第一启动子的第一调节区的第一细胞死亡基因,所述第一启动子通过与受试者的至少一个部位中的正常生理状况相比的环境状态的改变而被激活(诱导)。

[0285] 合成微生物可以与不良微生物属于相同的属和种,以便增强填充生态位并持久地排除受试者的至少一个部位中的不良微生物的能力。

[0286] 在一些实施例中,本公开提供了一种合成微生物,所述合成微生物并非病原体并且无法成为偶然的病原体,因为其不具有在状态改变时(例如,在暴露于血液或血清时)感染受试者的能力。所述合成微生物包括至少一种分子修饰,所述分子修饰包括可操作地连接至包括第一启动子的第一调节区的第一细胞死亡基因,所述第一启动子通过与受试者的至少一个部位中的正常生理状况相比的环境状态的改变而被激活(诱导)。例如,如果受试者中的部位是真皮或粘膜部位,则暴露于血液或血清是状态的改变,其导致合成微生物的细胞死亡。例如,合成微生物的平均细胞死亡可能发生在状态改变后的6小时、5小时、4小时、2小时、90分钟、60分钟、45分钟、30分钟、20分钟、15分钟、10分钟、5分钟、2分钟或1分钟

内。状态改变可以是以下条件中一种或多种相对于受试者的至少一个部位处的条件的改变:pH、温度、渗透压、重量渗透摩尔浓度、氧气水平、营养素浓度、血液浓度、血浆浓度、血清浓度和电解质浓度。在一些实施例中,所述状态改变是与受试者的至少一个部位处的正常生理状况相比的血液、血清或血浆的更高浓度。

[0287] 在一个实施例中,所述病原微生物是MRSA。MRSA是金黄色葡萄球菌的一个变体亚组。MRSA菌株通常包含mecA盒,所述盒允许产生替换的青霉素结合蛋白,从而使所述菌株对大多数β-内酰胺和其它一线抗生素的治疗具有抗性。金黄色葡萄球菌整体(包含MRSA)作为正常微生物组的一部分存在,约占总人口的30%。作为微生物组的一部分,金黄色葡萄球菌最常生活在皮肤表面上和前鼻前庭中,但在一些个体的深口咽部和胃肠道中以及作为正常阴道菌群的一部分也可能发现少量金黄色葡萄球菌。

[0288] 在绝大多数个体中,金黄色葡萄球菌仍然是仅占据生态位而不引起疾病的非侵入性共生细菌。定植状态远比侵入性疾病的状态更普遍——一些研究人员估计该比率约为1000比一。Laupland等人,《传染病学杂志》(2008)198:336。然而,在一部分被定居的个体中,由于获得了编码毒力蛋白产物的基因盒,这种细菌既可能适时地引起疾病,也可能由于侵入的趋势增加而引起疾病,所述基因盒使这种菌株更有效地侵入表皮或粘膜组织层,从而引发深层感染。在上述两种情况下,mecA盒的存在限制了这些患者的治疗选择,并且许多研究已证明,与MSSA相比,在细菌血症、血管内感染和肺炎中,与MRSA相关的死亡率增加。

[0289] 定义

[0290] 除非上下文另外清楚地指明,否则单数形式“一个/种(a/an)”和“所述(the)”旨在也包含复数形式。

[0291] 术语“和/或”指代并涵盖相关列出项中的一个或多个的任何和所有可能的组合。

[0292] 术语“包括(comprises)”和/或“包括(comprising)”在本说明书中使用时指定所陈述的特征、整数、步骤、操作、元件和/或组分的存在,但不排除存在或添加一个或多个其它特征、整数、步骤、操作、元件、组分和/或其组。除非另外规定,否则说明书中所使用的包含技术术语和科学术语的所有术语都具有与本公开所属领域的普通技术人员通常所理解的含义相同的含义。在术语冲突的情况下,以本说明书为准。

[0293] 术语“病原体”或“病原微生物”是指能够引起疾病的微生物。病原微生物可能定植在受试者的部位,并随后可能引起受试者的全身性感染。病原微生物可能已经进化出突破通常限制其它微生物的细胞和解剖障碍的遗传能力。病原体可能会固有地对细胞造成破坏,以强有力地获得新的独特生态位,从而使所述病原体与其它微生物的竞争减少,并提供了新的营养素。Falkow,Stanley,1998《新发传染病杂志(Emerging Infectious Diseases)》,第4卷,第3号,495-497。病原微生物可以是耐药微生物。

[0294] 术语“剧毒的”或“毒力”用于描述微生物引起疾病的能力。

[0295] 术语“共生的”是指一种共生形式,其中一种生物从另一种生物获得食物或其它益处而不会对其产生影响。共生细菌通常是正常菌群的一部分。

[0296] 术语“抑制”或“去定植”是指通过各种方式基本上减少或消除原始的不期望的病原微生物(通常被称为“去定植”)。基本上减少是指通过本领域已知的任何方式使不良微生物减少原始定植的大于90%、95%、98%、99%或大于99.9%。

[0297] 术语“替换”是指通过引入新的微生物(通常被称为“重新定植”)来替换原始的病

原微生物,所述新微生物“挤出”并占据原始微生物通常会占据的生态位,并且因此可以防止原始的不良微生物返回微生物组生态系统(通常被称为“干扰”和“非共定植”)。

[0298] 术语“持久替换(durably replace/replacement)”或“持久排除(durably exclude/exclusion)”是指在将新的微生物引入受试者后至少30天、60天、84天、120天、168天或180天的时间段内,例如通过擦拭受试者而检测到的新合成微生物的存在。在一些实施例中,“持久替换”或“持久排除”是指在将新的合成微生物引入受试者后至少30天、60天、84天、120天、168天或180天的时间段内不存在原始的病原微生物,例如,在至少两个连续的多个采样周期内通过擦拭对象来检测到的不存在。

[0299] 术语“促进(promote或promoting)”是指例如在受试者中增强新生物的定植和存活的活动或方法。例如,在受试者中促进合成细菌的定植可以包含施用营养素、益生元和/或益生菌物种。

[0300] 如本文所使用的,术语“预防(prevention/prevent/preventing/prophylaxis)”是指在疾病状态或病状的临床表现发作之前开始的作用过程(如施用本公开的化合物或药物组合物),以预防或减少所述疾病状态或病状的这种临床表现。这种预防和抑制不一定是绝对有用的。

[0301] 如本文所使用的,术语“治疗(treatment、treat和和treating)”是指在疾病状态或病状的临床表现发作之后开始的作用过程(如施用化合物或药物组合物),以消除或减少所述疾病状态或病状的这种临床表现。这种治疗不一定是绝对有用的。

[0302] 如本文所使用的,术语“需要治疗”是指护理人员做出的判断认为患者需要治疗或将从治疗中受益。该判断是基于护理人员专业知识范围内的多种因素做出的,但包含以下认知:由于一种可通过本发明的方法、化合物或药物组合物治疗的病状,患者生病或将要生病。

[0303] 如本文所使用的,术语“需要预防”是指护理人员做出的判断认为患者需要预防或将从预防中受益。该判断是基于护理人员专业知识范围内的多种因素做出的,但包含以下认知:由于一种可通过本发明的方法、化合物或药物组合物预防的病状,患者将要生病或可能生病。

[0304] 如本文所使用的,术语“个体”、“受试者”或“患者”是指任何动物,包含鸟类或哺乳动物,如小鼠、挪威大鼠、棉鼠、沙鼠、鱼、仓鼠、其它啮齿动物、兔子、狗、猫、猪、牛、绵羊、山羊、马或灵长类动物和人类。该术语可以指定男性或女性或两者,或者排除男性或女性。在一方面,所述患者是成年人。在另一方面,所述患者是非新生儿人类婴儿。在另一方面,所述患者是人类小孩、儿童或青少年。在一些实施例中,发现所述受试者在全身性感染之前被微生物的致病菌株定植,或者所述受试者可能已经被病原微生物的医院(医院获得性)菌株或社区获得性菌株所定植或感染。

[0305] 术语“新生儿”是指出生后头28天的婴儿。术语“非新生儿”是指28天以上的动物。

[0306] 如本文所使用的,术语“有效量”是指能够单独使用或作为药物组合物的一部分的试剂的量,其能够对疾病状态或病状的任何症状、方面或特征具有任何可检测的积极作用。这种效果不一定是绝对有益的。

[0307] 术语“可测量的平均细胞死亡”是指在引入状态改变后的预定时间段内确定的微生物与在限定条件下不存在状态改变的相同微生物相比的存活百分比的倒数。可以通过定

量活微生物细胞的任何已知方法来确定存活百分比。例如,可以通过以下步骤来计算存活百分比:计数经培养的合成微生物细胞的cfus/mL,并在预定时间段内计数未经诱导的合成微生物细胞的cfus/mL,然后将经诱导的cfus/mL除以未经诱导的cfus/mL x 100=x%存活百分比。可测量的平均细胞死亡可以通过下式来确定:100%-x%存活百分比=y%可测量的平均细胞死亡。例如,其中存活百分比是5%,可测量的平均细胞死亡是100%-5%=95%。可以采用任何用于计数经培养的活微生物细胞的方法来计算存活百分比,包含cfu、OD600、流式细胞术或其它已知的技术。同样,可以将经诱导的合成菌株与暴露于相同条件下相同时间段的野生型目标微生物进行比较,使用类似的计算方法来确定"存活率",其中100%-存活率=z%"活细胞的减少"。

[0308] 如本文所使用的,术语"包含"在范围上是非限制性的,使得除了列出的元件之外,还可以考虑其它元件;该术语在任何情况下都可以理解为"包含但不限于"。

[0309] 术语"动物"是指动物界的定义。

[0310] 当提及核苷酸或其片段时,术语"基本同一性"或"基本上相同"表示当通过适当的核苷酸插入或缺失与另一种核苷酸(或其互补链)最佳对齐时,核苷酸序列同一性为核苷酸碱基的至少约95%,并且更优选地,至少约96%、97%、98%或99%,如通过如FASTA、BLAST或Gap等任何众所周知的序列同一性算法所测量,如以下所讨论的。在某些情况下,与参考核苷酸分子具有实质同一性的核苷酸分子可以编码具有与参考核苷酸分子编码的多肽相同或基本相似的氨基酸序列的多肽。

[0311] 当提及核苷酸或氨基酸序列时,术语"衍生自"是指分别具有至少50%的连续参考核苷酸或氨基酸序列的经修饰的序列,其中所述经修饰的序列使合成微生物与启动子、细胞死亡基因、抗毒素基因、毒力阻断或纳米工厂等遗传元件的参考序列表现出相似的期望属性,包含响应于状态改变而上调或下调;或表达毒素、抗毒素或纳米工厂产物的能力;或基本相似的序列;转录反义RNA抗毒素的能力;或防止或减少遗传物质从不良微生物中水平基因转移的能力。关于核苷酸序列的术语"衍生自"还包含已针对特定微生物进行密码子优化以表达与参考核苷酸序列编码的氨基酸序列基本相似的氨基酸序列的经修饰的序列。当提及微生物时,术语"衍生自"是指经过分子修饰以获得合成微生物的目标微生物。

[0312] 当应用于多肽时,术语"基本相似性"或"基本相似"是指当如通过使用默认空位权重的程序GAP或BESTFIT最佳对齐时,两个肽或蛋白质序列共享至少95%的序列同一性,甚至更优选地至少98%或99%的序列同一性。优选地,不相同的残基位置因保守性氨基酸取代而不同。

[0313] "保守氨基酸取代"是指其中一个氨基酸残基被具有侧链(R基团)的另一个氨基酸残基取代,所述侧链具有类似的化学性质(电荷或疏水性)。通常,保守氨基酸取代不会实质上改变例如毒素或抗毒素蛋白的功能特性。具有类似化学性质的侧链的氨基酸基团的实例包含(1)脂肪族侧链:甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸;(2)脂肪族-羟基侧链:丝氨酸和苏氨酸;(3)含酰胺的侧链:天冬酰胺和谷氨酰胺;(4)芳香族侧链:苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸;(5)碱性侧链:赖氨酸、精氨酸和组氨酸;(6)酸性侧链:天冬氨酸和谷氨酸并且(7)含硫侧链是半胱氨酸和蛋氨酸。优选的保守氨基酸取代基是:缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸、苯丙氨酸-酪氨酸、赖氨酸-精氨酸、丙氨酸-缬氨酸、谷氨酸-天冬氨酸和天冬酰胺-谷氨酰胺。

[0314] 可以使用使用默认的或推荐的参数的FASTA来比较多肽序列,所述FASTA为6.1版GCG中的程序。FASTA(例如,FASTA2和FASTA3)提供了询问序列与搜索序列之间的最佳重叠区域的对齐和序列一致性百分比(参见例如,Pearson,W.R.,《分子生物学方法(Methods Mol Biol)》132:185-219(2000),其通过引用并入本文)。当比较本公开的序列与含有大量来自不同生物的序列的数据库时,另一个优选的算法是使用默认参数的计算机程序BLAST,尤其是BLASTP或TBLASTN。参见例如,Altschul等人,《分子生物学杂志(J Mol Biol)》215:403-410(1990)以及Altschul等人,《核酸研究(Nucleic Acids Res)》25:3389-402(1997)。

[0315] 除非另有说明,否则本文提供的核苷酸序列以5'-3'方向表示。

[0316] 意图赋予所有代词其最广泛的含义。除非另有说明,否则女性代词涵盖男性,男性代词涵盖女性,单数代词涵盖复数,并且复数代词涵盖单数。

[0317] 术语“全身施用”是指进入循环系统使得整个身体都受到影响的施用途径。全身施用可通过肠内施用(通过胃肠道吸收,例如口服施用)或肠胃外施用(例如,注射、输注或植入)进行。

[0318] 术语“局部施用”是指施用于身体的局部区域或身体部位的表面,而与作用的位置无关。局部施用的典型部位包含皮肤或粘膜上的部位。在一些实施例中,局部施用途径包含药物或组合物的肠内施用。

[0319] 术语“不良微生物”是指可以作为病原微生物、耐药性微生物、抗生素抗性微生物、引起刺激的微生物、引起异味的微生物的微生物和/或可以是包括不良毒力因子的微生物。

[0320] 术语“合成微生物”是指通过任何方式修饰以包含至少一种赋予非天然属性的元件的分离的微生物。例如,合成微生物可以被工程化为包含分子修饰,所述分子修饰包括遗传材料的添加、缺失和/或修饰以结合非天然属性。在一些实施例中,合成微生物不是营养缺陷型生物。

[0321] 术语微生物的“可检测存在”是指通过本领域已知的任何方法在微生物属、种和/或菌株的样品中确认的阳性检测。确认可以是通过熟练从业人员和/或通过重复该方法得到的阳性测试解释。

[0322] 如本文所使用的,术语“微生物组(microbiome或microbiomic)”或“微生物群(microbiota)”是指微生物生态系统。这些生态系统是在所有动植物中以及所有动植物上发现的共生、共栖和病原微生物群落。

[0323] 如本文所使用的,术语“微生物”是指仅在显微镜的帮助下才能看到的生物,并且通常仅由单个细胞组成。微生物包含细菌、原生动物和真菌。

[0324] 如本文所使用的,术语“生态位”和“生态位状况”是指特定微生物物种所需的环境和营养要求的生态阵列。对物种生态位的值的定义限定了特定生物群系中该物种可以物理占据的位置,并限定了可能的微生物竞争者。

[0325] 如本文所使用的,术语“定植”是指微生物在体表(例如,真皮或粘膜表面)上持续可检测的存在而不会引起个体疾病。

[0326] 如本文所使用的,术语“共定植”是指同一微生物物种内的两种或多种菌株或变体同时在受试者位点上的生态位定植。例如,术语“共定植”可以指两种或多种菌株或变体同时且非暂时地占据相同生态位。术语“非暂时地”是指在至少间隔两周从受试者获得的多个样品中,在两个或更多个时间后续点上随时间对受试者的部位处的菌株或变体进行阳性鉴

定。

[0327] 如本文所使用的,术语“细菌替换”或“非共定植”是指一种原理,即一个物种的仅一种变体/菌株可以在任何给定时间占据生物群系内的任何给定生态位。

[0328] 如本文所使用的,术语“杀灭开关”或“KS”是指合成微生物的有意分子修饰,所述分子修饰包括细胞死亡基因,所述细胞死亡基因与包括诱导型启动子、遗传元件或盒的调节区可操作地连接,其中在杀灭开关中诱导的细胞死亡基因表达响应于特定的状态改变(如微生物的环境条件的改变)而引起微生物的细胞死亡、生长的停止或无法复制微生物。

[0329] 例如,在包括杀灭开关的合成微生物中,诱导型第一启动子可通过血液、血清、血浆和/或血红素的存在而被激活,其中可操作地结合的细胞死亡基因的上调和转录/表达导致微生物的细胞死亡或微生物的停滞生长,从而提高了合成微生物的安全性。

[0330] 术语“细胞死亡基因”是指这样的基因,当被诱导时,其导致细胞进入一种状态,在该状态中,所述基因停止细胞繁殖、充分改变细胞的调节机制以永久性破坏细胞活力、诱导衰老或诱导细胞遗传或蛋白质组学系统发生致命变化。例如,细胞死亡基因可以是编码毒素蛋白或毒素肽的毒素基因。

[0331] 术语“抗毒素基因”是指编码对细胞死亡基因具有特异性的抗毒素RNA反义分子或抗毒素蛋白或另一种抗毒素分子的基因或由其编码的产物

[0332] 术语“毒力阻断”或“v-block”是指微生物的分子修饰,其导致生物从其它菌株或物种接受外来DNA的能力降低,从而有效地导致所述生物获得外源毒力或抗生素抗性基因的能力降低。

[0333] 如本文所使用的,术语“纳米工厂”是指微生物的分子修饰,所述分子修饰导致产生产物—产生有益效果的这些修饰的初级蛋白质、多肽、氨基酸或核酸或次级产物。

[0334] 如本文所使用的,术语“毒素蛋白”或“毒素肽”是指在合成微生物内部产生的有效量的物质,其对微生物造成有害作用而对其定植的受试者没有有害作用。

[0335] 如本文所使用的,术语“分子修饰”或“分子工程改造的”是指使用本领域已知的任何基因编辑方法对微生物基因进行的有意修饰,包含但不限于如下文所述的重组DNA技术、NgAgo、mini-Cas9、CRISPR-Cpf1、CRISPR-C2c2、Target-AID、Lambda Red、整合、重组酶或使用本领域已知的噬菌体技术。可以以化学方法或通过使用分子生物学技术对DNA进行测序和操纵,例如以将一个或多个元件(例如,调节区、启动子、毒素基因、抗毒素基因或其它结构域)排列成合适的构型,或引入密码子、删除密码子、优化密码子、产生半胱氨酸残基、修饰、添加或删除氨基酸等。分子修饰可以包含:例如使用质粒、基因插入、基因敲除来切除或去除不期望的基因;通过增加或减少碱基对以破坏编码框架而移码;外源沉默,例如通过使用可嵌入编码例如RNA反义抗毒素的DNA中的诱导型启动子或组成型启动子;产生CRISPR-cas9或其它编辑蛋白以使用例如与诱导型启动子或组成型启动子连接的向导RNA或限制性修饰/甲基化系统(例如,用于识别并破坏传入的毒力基因)来消化例如传入的毒力基因,从而增加对水平基因转移的抵抗力。通过将修饰插入合成微生物的基因组中,可以持久地将分子修饰(例如杀灭开关、表达钳和/或v-block)掺入到合成微生物中。

[0336] 合成微生物可以进一步包括另外的分子修饰(例如,纳米工厂),可以将其直接掺入细菌基因组或质粒中,以调整例如纳米工厂生产的作用持续时间,并且范围可以从短期(对于细菌物种使用非复制性质粒)到中期(对于不具有成瘾依赖性的情况使用复制性质

粒)到长期(直接进行细菌基因组操作)。

[0337] 分子修饰可以赋予期望被持久地掺入宿主微生物组中的非天然属性、可以为微生物组中的生物或宿主微生物组整体提供增强的安全性或功能性、可以提供增强的安全性特征,包含杀灭开关(s)或其它控制功能。在一些实施例中,如此嵌入的安全属性可以响应于微生物或宿主微生物组整体的状态或状况的改变。

[0338] 可以以一个或多个、两个或更多个、五个或更多个、10个或更多个、30个或更多个或100个或更多个拷贝将分子修饰掺入合成微生物中,或以不超过一个、不超过三个、不超过五个、不超过10个、不超过30个或不超过100个拷贝将分子修饰掺入合成微生物中。

[0339] 如本文所使用的,术语“复发”是指经过去定植的微生物对同一生态位进行重新定植。

[0340] 术语“药学上可接受的”是指在合理的医学判断范围内,适合于与人类和动物的组织接触使用而不会产生过度的毒性、刺激性、过敏反应或其它问题或并发症的、与合理的益处/风险比相称的化合物、载剂、赋形剂、组合物和/或剂型。

[0341] 术语“药学上可接受的载剂”是指被治疗的受试者在生理上可接受的载剂,同时保留了与其一起施用的合成微生物的完整性和期望特性。示例性的药学上可接受的载剂包含生理盐水或磷酸盐缓冲盐水。本文提供了其它生理上可接受的载剂及其调配物,或者所述其它生理上可接受的载剂及其调配物是本领域技术人员已知的并且在例如在以下文献中进行描述:《雷明顿药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)》,(第20版),编辑:A.R.Gennaro,2000,利平科特·威廉斯·威尔金斯出版公司(Lippincott Williams& Wilkins),宾夕法尼亚州费城。

[0342] 本文所使用的数字范围旨在包含该范围内含有的每个数字和数字的子集,无论是否具体公开。进一步地,这些数值范围应被解释为对涉及该范围内的任何数字或数字子集的权利要求提供支持。例如,公开内容从1到10应被解释为支持2到8、3到7、5到6、1到9、3.6到4.6、3.5到9.9等范围。

[0343] 本文所引用的所有专利、专利出版物和经同行评审的出版物(即,“参考文献”)通过引用明确并入本文,其程度如同每个单独的参考文献被专门地且单独地指示为通过引用并入。在本公开与所并入参考文献之间发生冲突的情况下,以本公开为准。

[0344] 除非另外定义,否则本文中使用的全部技术术语和科学术语都具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的含义相同的含义。如本文所使用的,当用于提及具体所列举的数值时,术语“约”意指数值可以与所列举的值相差不超过1%。例如,如本文所使用的,表述“约100”包含99和101以及介于两者之间的所有值(例如,99.1、99.2、99.3、99.4等)。

[0345] 尽管在本公开的实践或测试中可以使用类似于或等同于本文所述的方法和材料的任何方法和材料,但现在描述了优选的方法和材料。

[0346] 载体和目标微生物

[0347] 本文还描述了包括多核苷酸分子的载体,以及用这种载体转化的靶细胞。本文所述的多核苷酸分子可以与载体结合,所述载体包含用于所关注的繁殖宿主的选择标志物和复制起点。对靶细胞进行基因工程改造以包含这些载体,从而转录RNA并表达多肽。本文的载体包含可操作地连接至合适的转录性或翻译性调节序列(如用于微生物靶细胞的调节序

列)的多核苷酸分子。调节序列的实例包含转录启动子、操纵子或增强子、mRNA核糖体结合位点以及控制转录和翻译的适当序列。当本文的调节序列功能性地涉及例如编码细胞死亡基因的多核苷酸时,本文所述的核苷酸序列可操作地连接。

[0348] 典型的媒介物包含质粒、穿梭载体、杆状病毒、灭活的腺病毒等。在本文所述的某些实例中,载体可以是本文所述的经修饰的pIMAY、pIMAYz或pKOR整合型质粒。

[0349] 目标微生物可以选自能够在去定植之后持久地替换特定的不良微生物的任何微生物。目标微生物可以是野生型微生物,其随后被工程改造以通过本文所述的方法增强安全性。目标微生物可以选自细菌、真菌或原生动物目标微生物。目标微生物可以是能够在受试者中定植真皮和/或粘膜生态位的菌株。目标微生物可以是野生型微生物或可以进行另外的分子修饰的合成微生物。目标微生物可以选自选自由以下组成的组的属:不动杆菌属、棒状杆菌属、丙酸杆菌属(Cutibacterium)、葡萄球菌属、链球菌属、丙酸杆菌属(Propionibacterium)和假单胞菌属。目标微生物选自由以下组成的组:约氏不动杆菌、鲍曼不动杆菌、金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、路邓葡萄球菌、沃氏葡萄球菌、腐生葡萄球菌、痤疮棒状杆菌、纹带棒状杆菌、白喉棒状杆菌、极小棒状杆菌、痤疮丙酸杆菌、痤疮丙酸杆菌、颗粒丙酸杆菌、大肠杆菌(Escherichia coli)、酿脓链球菌、金黄色葡萄球菌、无乳链球菌、缓症链球菌、绿色链球菌、肺炎链球菌、咽峡炎链球菌、星座链球菌、中间链球菌、无乳链球菌、变形链球菌(Streptococcus mutans)、铜绿假单胞菌、栖稻假单胞菌、施氏假单胞菌、恶臭假单胞菌和荧光假单胞菌。

[0350] 目标微生物可以与不良微生物属于相同的属和种,但属于不同的菌株。例如,不良微生物可以是抗生素抗性金黄色葡萄球菌菌株,如MRSA菌株。抗生素抗性金黄色葡萄球菌菌株可以是致病菌株,其可能与皮肤感染、粘膜感染、菌血症和/或心内膜炎有关。当不良微生物是金黄色葡萄球菌菌株(例如,MRSA)时,目标微生物可以是例如病原性较低的菌株,所述病原性较低的菌株可以是分离的菌株,如金黄色葡萄球菌靶细胞(如RN4220或502a菌株)等。可替换地,靶细胞可以与不良微生物属于相同的菌株。在另一个实例中,不良微生物是大肠杆菌菌株,例如尿路致病性大肠杆菌1型菌株或p-纤维化菌株,例如涉及尿路感染、菌血症和/或心内膜炎的菌株。在另一个实例中,不良菌株是痤疮丙酸杆菌菌株,例如涉及寻常痤疮、菌血症和/或心内膜炎的菌株。在另一个实例中,不良微生物是变形链球菌菌株,例如,涉及变形链球菌心内膜炎、龋齿的菌株。

[0351] 模型抗生素敏感性目标微生物

[0352] 目标微生物可以是与不良微生物相同物种的抗生素敏感性微生物。在一个实施例中,不良微生物是MRSA菌株,并且替换的目标微生物是对抗生素敏感的金黄色葡萄球菌菌株。对抗生素敏感的微生物可以是金黄色葡萄球菌菌株502a(“502a”)。502a是一种凝固酶阳性、对青霉素敏感的、非青霉素酶产生型葡萄球菌属,其通常被噬菌体7、47、53、54和77溶解。血清学类型(b)ci。502a表现出不同寻常的椎间盘抗生素敏感性模式,因为除四环素外,该菌株对低浓度的大多数抗生素敏感;耐受5μg四环素,但对10μg四环素敏感。在一些实施例中,502a菌株可以作为金黄色葡萄球菌Aureus亚种Aureus Rosenbach ATCC®27217™商购。

[0353] 不幸的是,即使是对抗微生物剂敏感的目标微生物也可能引起全身性感染。因此,如本文所提供,对目标微生物进行分子修饰以掺入调节序列(包含例如用于表达细胞死亡

基因、v-block或纳米工厂的诱导型第一启动子),从而增强安全性并降低如本文所述的病原性感染的可能性。

[0354] 目标微生物和/或合成微生物包括(i)在对不良微生物进行去定植并向受试者施用目标微生物或合成微生物之后,持久地定植受试者中的生态位的能力,以及(ii)在施用步骤之后至少两周、至少四周、至少六周、至少八周、至少十周、至少12周、至少16周、至少24周、至少26周、至少30周、至少36周、至少42周或至少52周的时间段内防止受试者中不良微生物的复发的能力。

[0355] 选择用于MRSA的目标微生物

[0356] 如本文所述,可以通过对目标微生物进行去定植并用假定的目标微生物替换来进行目标微生物的选择。例如,不期望的耐甲氧西林金的黄色葡萄球菌(MRSA)是全球范围内侵入性细菌感染数量不成比例的原因。金黄色葡萄球菌的定植状态被认为是大多数侵入性感染的必要前提。然而,已经研究了使用标准防腐剂方案进行去定植作为减少MRSA定植和感染的方法,结果不一。在本文提供的一个实例中,通过使用不同的金黄色葡萄球菌菌株作为候选的目标微生物进行有意的重新定植,对不良微生物MRSA进行的新型去定植方法的可行性和持久性,旨在与标准的去定植相比,效果持续时间延长。实例1公开了一项研究,其中共筛查了765名健康志愿者的金黄色葡萄球菌定植。筛查人群的整体MRSA率为8.5%。53名MRSA定植个体的队列参加了一项对照研究,即使用金黄色葡萄球菌502a WT菌株BioPlx-01进行的去定植/重新定植治疗与仅进行标准去定植的对照组。监测MRSA从定居状态消失的持续时间以及有意的MSSA重新定植的持续性,持续6个月。对于MRSA去定植方案的功效部分,对照组(n=15)在第4周的时间点显示出60%的MRSA复发。使用BioPlx-01WT方案的测试组(n=34)在第8周主要终点处显示出0%的MRSA复发,并且直到第26周仍未显示MRSA复发的证据。相反,这些参与者表现出令人惊讶的MSSA定植持续性,这可能表明金黄色葡萄球菌502a BioPlx-01WT菌株产品持续定植了26周。另外,在去定植/重新定植治疗中使用的磷酸盐缓冲盐水组合物中的BioPlx-01WT成分在单独的55名参与者的队列中并未显示出皮肤刺激的迹象。因此,靶菌株金黄色葡萄球菌502a BioPlx-01WT的去定植/重新定植方案提供了比标准去定植更长的MRSA菌株去定植持久性,并且未观察到负面的皮肤效应。

[0357] 用于确定微生物的可检测存在的方法

[0358] 可以采用本领域已知的任何方法来确定微生物属、种和菌株的可检测存在。方法的概述可在Aguilera-Arreola MG中找到。“细菌感染研究的鉴定和分型方法:简要回顾和以分枝杆菌属为研究案例(Identification and Typing Methods for the Study of Bacterial Infections:a Brief Review and Mycobacterial as Case of Study.)”《临床微生物学档案(Arch Clin Microbiol.)》2015,7:1,其通过引用并入本文。

[0359] 可以通过表型方法和/或基因型方法来确定细菌的属、种和/或菌株的可检测存在。表型方法可以包含生物化学反应、血清学反应、对抗微生物剂的敏感性、对噬菌体的敏感性、对细菌素的敏感性和/或细胞蛋白的特性。生物化学反应的一个实例是细胞外酶的检测。例如,葡萄球菌属产生许多不同的细胞外酶,包含DNAase、蛋白酶和脂肪酶。Gould、Simon等人,2009,“通过检测来自两个欧洲研究组的金黄色葡萄球菌和MRSA的临床分离株中的脂解活性来对新型生色底物进行评估(The evaluation of novel chromogenic substrates fro detection of lipolytic activity in clinical isolates of

Staphylococcus aureus and MRSAfrom two European study groups)”《FEMS微生物学快报(FEMS Microbiol Let)》297;10-16。生色底物可用于检测细胞外酶。例如,可以使用CHROMager™MRSA生色培养基(CHROMagar,法国巴黎)来分离和区分耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌(MRSA),包含低水平MRSA。从例如鼻部、会阴、喉咙获得样品,通过可能的富集步骤获得直肠样品。如果琼脂板已被冷藏,则在接种前应将其温热至室温。将样品划线到板上,然后在有氧条件下于37℃下孵育18-24小时。读取菌落的外观,其中MRSA菌落呈玫瑰色至淡紫色,甲氧西林敏感性金黄色葡萄球菌(MSSA)菌落被抑制,而其它细菌则呈蓝色、无色或受抑制的菌落。另外,要明确鉴定为MRSA,还需要最终鉴定为金黄色葡萄球菌。例如,可以使用CHROMagar™金黄色葡萄球菌生色培养基,其中金黄色葡萄球菌呈淡紫色,腐生葡萄球菌呈绿松石蓝,大肠杆菌、白色念珠菌和粪肠球菌被抑制。为了检测B组链球菌属(GBS)(无乳链球菌),可以使用CHROMagar™StrepB板,其中无乳链球菌(B组)呈淡紫色,肠球菌和粪肠球菌呈钢蓝色,乳杆菌属、明串珠菌属和乳球菌属呈浅粉红色,而其它微生物为蓝色、无色或受抑制。为了检测各种念珠菌,可以使用CHROMager™念珠菌属生色培养基。念珠菌属物种涉及浅表口咽部感染和泌尿生殖道感染。尽管白色念珠菌仍是主要的物种,但由于新的抗真菌剂有效地对抗白色念珠菌,如热带念珠菌(C.tropicalis)、克鲁斯念珠菌(C.krusai)或格拉布勒他念珠菌(C.glabrata)等其它类型也有所增加。对皮肤、痰、尿液、阴道标本样品进行取样和直接划线,直接划线或铺展在平板上,然后在有氧条件下于30-37℃下孵育48小时,并读取平板上的菌落外观,其中白色念珠菌为绿色,热带念珠菌为金属蓝色,克鲁斯念珠菌为粉红色并且模糊,乳酒念珠菌(C.kefyr)和格拉布勒他念珠菌为淡紫色棕色,而其它物种为白色至淡紫色。

[0360] 用于属和物种鉴定的基因型方法可以包含杂交、质粒图谱、质粒多态性分析、限制性酶消化、通过脉冲场凝胶电泳(PFGE)进行的反应和分离、核糖分型、聚合酶链反应(PCR)及其变体、连接酶链反应(LCR)、基于转录的扩增系统(TAS)或本文所述的任何方法。

[0361] 可以例如通过使用提供针对革兰氏阴性细菌DNA序列的注释的Galileo™抗微生物抗性(AMR)检测软件(Arc Bio LLC,加州门罗帕克和马萨诸塞州剑桥市)来进行微生物的鉴定。

[0362] 微生物分型方法可以选自包含以下的基因型方法:多基因座序列分型(MLST),其依赖于几个管家基因的PCR扩增以产生等位基因图谱;PCR-基因外回文重复序列元件(rep-PCR),其涉及PCR对基因组中的重复序列进行扩增并比较条带模式;AP-PCR,其是使用任意引物的聚合酶链反应;扩增片段长度多态性(AFLP),其涉及基因组DNA的酶限制性消化、限制性片段的结合和选择性扩增;DNA限制性片段(RFLP)的多态性,其涉及基因组DNA消化或带有限制性酶的扩增子,所述限制性酶产生短的限制性片段;随机扩增多态性DNA(RAPD),其使用通过任意核苷酸序列的单个引物对基因组DNA随机片段进行PCR扩增而得到的标志物DNA片段;多基因座串联重复序列分析(MLVA),其涉及对基因座VTR进行PCR扩增、可视化多态性以创建等位基因图谱;或脉冲场凝胶电泳(PFGE),其涉及宏观限制性片段的比较。PFGE电泳方法能够分离长度大于50kb且最高可达10Mb的片段,这是常规电泳无法实现的,常规电泳只能分离100bp到50kb的片段。PFGE的这种能力归因于其多向性特征,所述多向性特征可连续改变电场的方向,从而允许重新定向DNA分子的方向,因此除了此事件外,这些分子还可以通过琼脂糖凝胶迁移,施加的电脉冲具有不同的持续时间,从而促进了分子的

重新定向和不同大小的碎片的分离。一种PFGE装置可以是轮廓固定的均匀电场(CHEF,BioRad)。脉冲场凝胶电泳(PFGE)被认为是MRSA分型的金标准技术,因为其具有很高的辨别力,但其过程复杂且耗时。spa基因编码金黄色葡萄球菌蛋白A的细胞壁成分,并表现出多态性。基于序列的spa分型可以用作快速测试屏幕。Narukawa等人2009《日本东北大学实验医学杂志(Tohoku J Exp Med)》2009,218,207-213。

[0363] 本文提供了用于抑制和去除不良微生物(去定植)并用新的合成微生物进行替换的方法和组合物,以便用新微生物持久地置换和替换微生物生态系统中的不良微生物,从而防止原始的不良微生物的复发(本文中被称为生态位或生态干扰)。

[0364] 在一些实施例中,提供了在受试者中预防不良微生物的定植、防止不良微生物的感染、降低不良微生物的定植复发或降低不良微生物的病原性感染复发的方法,所述方法包括去定植和施用包括分子修饰的合成菌株,相对于野生型靶菌株,所述分子修饰降低了合成微生物对受试者引起疾病的能力,其中所述微生物选自由以下组成的组:约氏不动杆菌、鲍曼不动杆菌、金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、路邓葡萄球菌、沃氏葡萄球菌、腐生葡萄球菌、痤疮棒状杆菌、纹带棒状杆菌、白喉棒状杆菌、极小棒状杆菌、痤疮丙酸杆菌、痤疮丙酸杆菌、颗粒丙酸杆菌、酿脓链球菌、金黄色葡萄球菌、无乳链球菌、缓症链球菌、绿色链球菌、肺炎链球菌、咽峡炎链球菌、星座链球菌、中间链球菌、无乳链球菌、铜绿假单胞菌、栖稻假单胞菌、施氏假单胞菌、恶臭假单胞菌和荧光假单胞菌。

[0365] 在一些实施例中,提供了一种防止受试者中的病原微生物在受试者中传播或防止所述病原微生物的定植或感染复发的方法,所述方法包括抑制所述受试者中的所述病原微生物,并通过向所述受试者局部施用包括相同物种、不同菌株的良性微生物的组合物来替换所述病原微生物。所述方法可以进一步包括促进所述良性微生物的定植。在一些实施例中,所述良性微生物是具有至少一种分子修饰的合成微生物,所述分子修饰包括可操作地连接至包括第一启动子的第一调节区的第一细胞死亡基因,其中所述第一启动子在人血清或血液的存在下被激活。在一些实施例中,所述第一启动子在人类受试者的真皮或粘膜定植期间不被激活。

[0366] 在一些实施例中,提供了防止受试者中的耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌(MRSA)在受试者中传播或防止所述耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌的定植或感染复发的方法,所述方法包括抑制所述受试者中的所述MRSA,并通过向所述受试者局部施用相同物种、不同菌株的甲氧西林敏感性金黄色葡萄球菌(MSSA)来替换所述MRSA。所述方法可以进一步包括促进MSSA在所述受试者中的定植。

[0367] 提供了一种防止受试者中的不良微生物在受试者中传播或防止所述不良微生物的定植或感染复发的方法,所述方法包括抑制所述受试者中的所述不良微生物,并通过向所述受试者施用相同物种、不同菌株的第二微生物来替换所述不良微生物。所述方法可以进一步包括促进所述第二微生物的定植。在一些实施例中,所述不良微生物是耐药性病原微生物。在一些实施例中,所述第二微生物是药物敏感性微生物。在一些实施例中,所述第二微生物是合成微生物。

[0368] 抑制/去定植

[0369] 可以通过直接向受试者的皮肤或粘膜局部施用消毒剂、防腐剂或杀菌组合物(例如,通过用消毒剂、防腐剂或杀菌组合物喷洒、浸入或涂覆患处,任选地,患处和邻近区域,

或大于受试者外表面区域或粘膜表面区域的25％、50％、75％或大于90％)来抑制不良微生物。在一些实施例中,使患处或其它表面区域风干或在温和的热量下用空气干燥器干燥,或在给受试者穿衣或着装之前使其暴露于紫外线或阳光下。在一实施例中,抑制包括用紫外线辐射使受患处(以及任选地,受试者的一个或多个相邻或远侧区域)暴露。在各个实施例中,可以使用任何常用的消毒剂、防腐剂或杀菌组合物。在一个实施例中,使用了包括氯己定或其药学上可接受的盐的消毒剂。

[0370] 在一些实施例中,所述杀菌剂、防腐剂、收敛剂和/或抗菌剂选自由以下组成的组:醇类(乙醇、异丙醇)、醛类(戊二醛、甲醛、甲醛释放剂(羟甲基甲硫脲＝甲醛硫脲、牛磺罗定、六胺、登妥因)、邻苯二甲醛)、酰苯胺类(三氯卡班＝TCC＝3,4,4'-三氯均二苯脲)、双胍类(氯己定、阿来西定、聚合双胍类(MW>3,000g/mol的聚六亚甲基双胍,vantocil)、双脒剂(普罗帕脒、羟乙磺酸丙氧苯脒、二盐酸丙氧苯脒、双溴丙脒、羟乙磺酸双溴丙脒)、酚类(硫双氯酚、对氯间二甲苯酚、氯二甲酚、六氯酚)、双酚类(三氯生、六氯酚)、季铵化合物(西曲溴铵、苯扎氯铵、西吡氯铵)、银化合物(磺胺嘧啶银、硝酸银)、过氧化物(过氧化氢、过乙酸)、碘化合物(聚维酮-碘、泊洛沙姆-碘、碘)、释氯剂(次氯酸钠、次氯酸、二氧化氯、二氯异氰尿酸钠、氯胺-T)、铜化合物(氧化铜)、植物提取物(白千层属(茶树油)、腊肠树、岗松、苦楝、文定果、葡萄、Terminalia avicennioides Guill&Perr、Phylantus discoideus muel.Muel-Arg、丁香罗勒、金边红桑、Hypericum pruinatum Boiss.&Bal、Hypericum olimpicum L.和Hypericum sabrum L、北美金缕梅(金缕梅)、桉属、迷迭香属(迷迭香)、百里香属(百里香)、牛至属(牛至)、香茅属(柠檬草)、樟属、老鹳草属、薰衣草属)和局部抗生素化合物(细菌素;莫匹罗星、杆菌肽、新霉素、多粘菌素B、庆大霉素)。

[0371] 还可以通过使用光敏剂代替例如局部抗生素或除了局部抗生素之外还使用光敏剂,来对不良微生物进行抑制。例如,Peng Zhang等人("使用光敏剂代替抗生素杀死MRSA",《GEN新闻要闻(GEN News Highlights)》,2018年8月20日;48373)开发了一种使用光来活化氧气的技术,所述活性氧可抑制微生物的生长。如染料分子等光敏剂在光照下会变得兴奋。光敏剂将氧气转化为杀死微生物(如MRSA)的活性氧物种。为了浓缩光敏剂以提高功效,Zhang等人开发了水分散性混合型光敏剂,其包括用两亲聚合物修饰的贵金属纳米颗粒以捕获分子光敏剂。可以将混合型光敏剂以喷雾剂、洗剂或乳膏的形式施用于例如受试者的皮肤表面或伤口上,然后用红色或蓝色光照射以减少微生物的生长。

[0372] 去定植组合物可以呈局部溶液、洗剂或软膏剂形式,所述形式包括消毒剂、杀生物剂光敏剂或防腐剂化合物和一种或多种药学上可接受的载剂或赋形剂。在一个特定的实例中,使用了一种气雾剂消毒喷雾剂,其包括呈药学上可接受的载剂形式的葡萄糖酸氯己定(0.4％)、甘油(10％),所述载剂任选地含有染料以标记喷雾剂的覆盖范围。在一个实施例中,抑制步骤包括向一个或多个患处(以及任选地,一个或多个周围区域)施用美国专利第4,548,807号和/或第4,716,032号中公开的喷雾消毒剂,所述美国专利中的每一个均通过引用整体并入本文。消毒喷雾剂可以商购获得,例如,康涅狄格州布鲁克林的Deep Valley Farm,Inc.公司的Fight Bac®。其它消毒剂材料可以包含氯己定或其盐(如葡萄糖酸氯己定、醋酸氯己定和其它双胍类)、乙醇、SD醇、异丙醇、对氯邻苄基苯酚、邻苯酚、季铵化合物(如正烷基/二甲基乙基苄基氯化铵/正烷基二甲基苄基氯化铵、苯扎氯铵、西曲溴铵、甲基苄索氯铵、苄索氯铵、西他氯铵、西吡氯铵、多法氯铵)、杜灭芬、过氧化物和高锰酸盐(如过

氧化氢溶液、高锰酸钾溶液、过氧化苯甲酰)、抗菌染料(如原黄素半硫酸盐、三苯甲烷、亮绿、结晶紫、龙胆紫)、喹诺酮衍生物(如羟基喹啉硫酸盐、羟基喹啉硫酸钾、氯喹那多、地喹氯铵、二碘羟基喹啉)、蒲洛氏(Burow's)溶液(醋酸铝水溶液)、漂白液、碘溶液、溴化物溶液。各种通常公认的安全(GRAS)材料可用于消毒剂或杀菌组合物中,包含甘油和甘油酯,例如但不限于可食用的脂肪形成型脂肪酸的甘油单酯和甘油二酯、甘油单酯和甘油二酯的二乙酰酒石酸酯、三乙酸甘油酯、acettooleins、乙酰硬脂酸甘油酯、乳酸棕榈酸甘油酯、乳酰油酸甘油酯和正羟基硬脂精(oxystearins)。

[0373] 执行抑制步骤(或去定植)可以包括在1到10天的时间内每天施用1-3次;例如,在第一天、第二天、第三天、第四天、第五天、第六天、第七天、第八天、第九天、第十天、第十一天、第十二天、第十三天或十四天。在其它实施例中,抑制步骤可以两次、三次、四次、五次或六次施用,每次施用间隔为6到48小时、8到40小时、18到36小时或约20到28小时。在具体实施例中,抑制步骤连续一到五天或三到四天每天施用一次。在一些实施例中,抑制步骤不包含全身施用抗微生物剂。在一些实施例中,抑制步骤不包含全身施用抗生素、抗病毒剂或抗真菌剂。在其它实施例中,抑制步骤包含全身施用抗微生物剂。在一些实施例中,抑制步骤可以包含全身施用一种或多种抗生素、抗病毒剂或抗真菌剂。

[0374] 替换

[0375] 提供了其中用合成微生物持久地替换不良微生物的方法。合成微生物具有填充与病原微生物相同的生态位的能力和/或可以与病原微生物属于相同物种、不同菌株。通过使用相同物种、不同菌株(或甚至相同菌株),可以用良性合成微生物填充或持久地替换病原微生物的环境生态位。

[0376] 合成微生物

[0377] 在一些实施例中,不期望的病原微生物被合成微生物替换。在一些实施例中,例如,替换菌株可以是合成微生物,所述合成微生物是与不良微生物或病原微生物相同物种的经过分子修饰的菌株,或者是与不良微生物或病原微生物相同的菌株。

[0378] 在一些实施例中,提供了包括"杀灭开关"的合成微生物,其在暴露于血液或血清时显示出快速和完全的细胞死亡,但是在其它环境中显示出正常的代谢和定植功能。在一些实施例中,合成微生物包括稳定且不可移动的杀灭开关基因。最小杀灭开关(KS)组分包含:含有操纵子、启动子和翻译信号的调节区(RR),所述调节区响应于血液或血清暴露而被强烈激活;表达有毒蛋白质或RNA的杀灭开关基因;以及转录终止。KS的染色体整合是优选的。染色体基因座可以位于转录失活区域中,例如,介于丝氨酰tRNA合成酶和氨基酸转运蛋白之间的基因间区域(IR)。此处的插入不会影响侧翼基因的转录(Lei等人,2012)。优选地,IR中不存在已知的sRNA。可以选择任何其它惰性基因座。

[0379] 包括杀灭开关的合成微生物

[0380] 在特定的实施例中,病原微生物是耐抗微生物剂的微生物,并且替换微生物是与病原微生物相同物种的合成微生物。合成微生物可以是经过分子修饰的抗生素敏感性微生物。

[0381] 合成微生物可以包括一个或多个、两个或更多个或三个或更多个分子修饰,所述分子修饰包括可操作地连接至包括诱导型第一启动子的第一调节区的第一细胞死亡基因。任选地,合成微生物进一步包括第二细胞死亡基因,所述第二细胞死亡基因与包括第一启

动子的第一调节区或包括诱导型第二启动子的第二调节区可操作地连接。通过与所述受试者的至少一个部位处的正常生理状况相比,微生物环境中的状态改变来激活(诱导)第一启动子和任选的第二启动子。例如,状态改变可以选自以下中的一个或多个改变:pH、温度、渗透压、重量渗透摩尔浓度、氧气水平、营养素浓度、血液浓度、血浆浓度、血清浓度和电解质浓度。在一些实施例中,所述状态改变是与受试者的至少一个部位处的正常生理状况相比的血液、血清或血浆的更高浓度。

[0382] 在一个具体的实施例中,病原微生物是MRSA,并且替换微生物是合成微生物,所述合成微生物是经过分子修饰的金黄色葡萄球菌凝固酶阳性菌株。如本文所述,合成微生物可以是经过分子修饰的金黄色葡萄球菌502a。

[0383] 使用活的金黄色葡萄球菌作为治疗平台引起了安全问题,因为如果该病原体进入循环系统,则会引起严重的疾病。在一个实施例中,对合成微生物进行分子工程改造以包括“杀灭开关”(KS)和诱导型启动子,所述诱导型启动子在暴露于全血或血清时诱导快速的细菌死亡。杀灭开关可以由编码以下3个主要组分的DNA组成:i)“控制区”,其含有被血液或血清强烈激活的启动子和其它调节序列;ii)有毒的RNA或多肽,其表达由所述控制区驱动以及;iii)转录终止子。可以在一个易于改变的位点处将由这些元件组成的盒整合到金黄色葡萄球菌染色体中,而不会不利地影响细菌的功能。

[0384] 令人期望的是,最小化或避免控制区的基础表达或“泄漏”表达。例如,如果在暴露于血液或血清之前大量产生mRNA,则该菌株在制造期间或在皮肤定植期间可能会变弱,并且可能积累绕过或逃避KS的突变。为了解决这个问题,筛查候选者以发现在血清中被强烈诱导但在体外标准生长培养基中具有非常低或不可检测的mRNA表达的的候选者。尽管做出这种努力,仍可以观察到一些泄露表达,可以通过进一步包括iv)“表达钳”来控制所述泄露表达,以防止不合时宜的毒素产生。

[0385] 合成微生物的重组方法

[0386] 提供了一种包括重组核苷酸的合成微生物,所述重组核苷酸包括至少一种分子修饰(例如,杀灭开关),所述分子修饰包括(i)细胞死亡基因,其与(ii)包括第一诱导型启动子的第一调节区可操作地结合,所述第一诱导型启动子通过合成微生物环境中的状态改变而被诱导。合成微生物可以进一步包括至少一种第二分子修饰(表达钳),所述第二分子修饰包括(iii)对所述第一细胞死亡基因具有特异性的抗毒素基因,其中所述抗毒素基因与(iv)包括第二启动子的第二调节区可操作地结合,所述第二启动子在真皮或粘膜定植时或在培养基中具有活性(例如,组成性),并且优选地通过合成微生物环境状态的改变而被下调。

[0387] 在一些实施例中,提供了一种合成微生物,其包括至少一种分子修饰(例如,杀灭开关),所述分子修饰包括可操作地连接至包括第一启动子的第一调节区的第一细胞死亡基因,其中所述第一启动子通过与所述受试者至少一个部位处的正常生理状况相比的微生物环境的状态改变而被激活(诱导),任选地,其中所述合成微生物的细胞死亡发生在状态改变后的30分钟、60分钟、90分钟、120分钟、180分钟、360分钟或240分钟内。所述状态改变可以选自以下中的一个或多个情况:pH、温度、渗透压、重量渗透摩尔浓度、氧气水平、营养素浓度、血液浓度、血浆浓度、血清浓度、血红素浓度、汗液浓度、皮脂浓度、金属浓度、螯合金属浓度、组成变化或一种或多种免疫因子的浓度、矿物质浓度和电解质浓度。在一些实施

例中,所述状态改变是与受试者的至少一个部位处的正常生理状况相比的血液、血清或血浆的更高浓度。

[0388] 诱导型启动子

[0389] 提供了一种包括重组核苷酸的合成微生物,所述重组核苷酸包括至少一种分子修饰(例如,杀灭开关),所述分子修饰包括(i)细胞死亡基因,其与(ii)包括第一诱导型启动子的第一调节区可操作地结合,响应于暴露于血液、血清或血浆,所述第一诱导型启动子显示出所述重组核苷酸的条件性高水平基因表达,基础生产力增加至少两倍、至少三倍、至少10倍、至少20被、至少50被、至少100倍。

[0390] 一段时间后(例如,15分钟后、30分钟后、45分钟后、90分钟后、120分钟后、180分钟后、240分钟后、360分钟后或介于这之间的任何时间点后),当暴露于增加浓度的血液、血清、血浆或血红素时,可激活(诱导)所述诱导型第一启动子,从而使得与在不存在血液、血清、血浆或血红素的情况下(非诱导的)转录和/或表达相比,转录和/或表达增加至少5倍、至少10倍、至少20倍、至少50倍、至少100倍、至少300倍或至少600倍。

[0391] 可以通过以下方法选择血液或血清诱导型第一启动子:选择目标微生物;在目标微生物中选择一个或多个第一启动子候选基因;在培养基中生长所述微生物;在t=0分钟处,将血清或血液添加到培养基中;在t=n分钟(n=1-240分钟或更长、15-180分钟或30-120分钟)处获得样品;对样品进行RNA测序;并比较候选第一启动子基因暴露于血液或血清后的t=0分钟和t=n分钟时获得的样品中的候选第一启动子的RNA测序读数。可替换地,在没有血液或血清的培养基中,针对候选第一启动子,可以将在暴露于血液或血清之后t=n分钟之后获得的样品与t=n分钟处的样品进行比较。候选第一启动子可以选自这样的启动子:当与t=0时靶细胞中的候选启动子比较时,或与在没有血清或血液的培养基中t=n时靶细胞中的候选启动子比较时,所述启动子在血液或血清中在t=n分钟处的靶细胞生长后通过RNA测序表现出大于约10倍、大于约20倍、大于约50倍、大于约100倍或大于约500倍的上调。

[0392] 如通过RNA测序所确定的,与t=0相比,金黄色葡萄球菌502a中的几个血清响应性启动子候选基因在暴露于血清中30分钟后被上调20倍以上,所述启动子候选基因包含isdB基因CH52_00245(479倍)、sbnB基因CH52_05135(158倍)、isdC基因CH52_00235(93倍)、sbnA基因CH52_05140(88倍)、srtB基因CH52_00215(73倍)、sbnE基因CH52_05120(70倍)、sbnD基因CH52_05125(66倍)、isdI基因CH52_00210(65倍)、血红素ABC转运蛋白2基因CH52_00225(65倍)、sbnC基因CH52_05130(63倍)、血红素ABC转运蛋白基因CH52_00230(60倍)、isd ORF3基因CH52_00220(51倍)、sbnF基因CH52_05115(43倍)、丙氨酸脱氢酶基因CH52_11875(43倍)、HarA基因CH52_10455(43倍)、sbnG基因CH52_05110(42倍)、二氨基庚二酸脱羧酶基因CH52_05105(32倍)、铁ABC转运蛋白基因CH52_05145(31倍)、苏氨酸脱水酶基因CH52_11880(24倍)和isdA基因CH52_00240(21倍)。

[0393] 如通过RNAseq所确定的,与30分钟下的TSB相比,发现目标微生物金黄色葡萄球菌502a中的几个血清响应性启动子候选基因在暴露于血清中30分钟后被上调了20倍以上,所述启动子候选基因包含isdB基因CH52_00245(471倍)、isdC基因CH52_00235(56倍)、isdI基因CH52_00210(53倍)、sbnD基因CH52_05125(52倍)、sbnC基因CH52_05130(51倍)、sbnE基因CH52_05120(50倍)、srtB基因CH52_00215(47倍)、sbnB基因CH52_05135(44倍)、sbnF基因

CH52_05115(44倍)、血红素ABC转运蛋白2基因CH52_00225(43倍)、isdA基因CH52_00240(40倍)、血红素ABC转运蛋白基因CH52_00230(40倍)、sbnA基因CH52_05140(37倍)、isd ORF3基因CH52_00220(35倍)、sbnG基因CH52_05110(34倍)、HarA基因CH52_10455(28倍)、二氨基庚二酸脱羧酶基因CH52_05105(25倍)、sbnI基因CH52_05100(22倍)和丙氨酸脱氢酶基因CH52_11875(20倍)。与暴露于TSB中30分钟相比,铁ABC转运蛋白基因CH52_05145在暴露于血清中30分钟后被上调(19倍)。与暴露于TSB中30分钟相比,苏氨酸脱水酶基因CH52_11880在暴露于血清中30分钟后被上调(14倍)。

[0394] 如通过RNAseq所确定的,与t=0相比,目标微生物金黄色葡萄球菌502a中的几个血清响应性启动子候选基因在暴露于血清中90分钟后被上调了50倍以上,所述启动子候选基因包含isdB基因CH52_00245(2052倍)、sbnB基因CH52_05135(310倍)、丙氨酸脱氢酶基因CH52_11875(304倍)、sbnE基因CH52_05120(190倍)、sbnD基因CH52_05125(187倍)、isdC基因CH52_00235(173倍)、sbnC基因CH52_05130(162倍)、sbnA基因CH52_05140(143倍)、srtB基因CH52_00215(143倍)、sbnG基因CH52_05110(133倍)、sbnF基因CH52_05115(129倍)、血红素ABC转运蛋白基因CH52_00230(125倍)、血红素ABC转运蛋白2基因CH52_00225(117倍)、isdI基因CH52_00210(115倍)、HarA基因CH52_10455(114倍)、二氨基庚二酸脱羧酶基因CH52_05105(102倍)、sbnI基因CH52_05100(101倍)、isd ORF3基因CH52_00220(97倍)、SAM dep Metrans基因CH52_04385(75倍)。与t=0相比,铁ABC转运蛋白基因CH52_05145(44倍)、isdA基因CH52_00240(44倍)和铁载体ABC转运蛋白基因CH52_05150(33倍)在暴露于血清中90分钟后也被上调。

[0395] 如通过RNA测序所确定的,与90分钟下的TSB中的生长相比,发现目标微生物金黄色葡萄球菌502a中的几个血清响应性启动子候选基因在暴露于血清后90分钟后被上调了50倍以上,所述启动子候选基因包含isdB基因CH52_00245(1240倍)、sbnD基因CH52_05125(224倍)、血红素ABC转运蛋白基因CH52_00230(196倍)、sbnE基因CH52_05120(171倍)、srtB基因CH52_00215(170倍)、isdC基因CH52_00235(149倍)、sbnC基因CH52_05130(147倍)、二氨基庚二酸脱羧酶基因CH52_05105(141倍)、血红素ABC转运蛋白2基因CH52_00225(135倍)、sbnB基因CH52_05135(130倍)、sbnF基因CH52_05115(127倍)、bnG基因CH52_05110(120倍)、isd ORF3基因CH52_00220(119倍)、isdI基因CH52_00210(118倍)、HarA基因CH52_10455(117倍)、isdA基因CH52_00240(115倍)、sbnA基因CH52_05140(93倍)和sbnI基因CH52_05100(89倍)。与t=90分钟下的TSB相比,铁ABC转运蛋白基因CH52_05145(47倍)、铁载体ABC转运蛋白基因CH52_05150(37倍)和SAM dep Metrans基因CH52_04385(25倍)在暴露于血清中90分钟后也被上调。

[0396] 用于金黄色葡萄球菌合成微生物的血液或血清诱导型第一启动子基因可以选自或衍生自选自以下的基因:isdA(铁调节表面决定簇蛋白A)、isdB(铁调节表面决定簇蛋白B)、isdG(血红素降解型单加氧酶)、hlgA(γ-溶血素成分A)、hlgA1(γ-溶血素)、hlgA2(γ-溶血素)、hlgB(γ-溶血素成分B)、hrtAB(血红素调节型转运蛋白)、sbnC(luc C家族铁载体生物合成蛋白)、sbnE(lucA/lucC家族铁载体生物合成蛋白)、lrgA(胞壁质水解酶调节子A)、lrgB(胞壁质水解酶调节子B)、ear(Ear蛋白)、fhuA(铁色素转运ATP-结合蛋白fhuA)、fhuB(铁色素转运渗透酶)、hlb(磷脂酶C)、splF(丝氨酸蛋白酶SplF)、splD(丝氨酸蛋白酶SplD)、dps(一般应激蛋白20U)、SAUSA300_2617(假定的钴ABC转运蛋白、ATP结合蛋白)、

SAUSA300_2268(钠/胆汁酸向转运体家族蛋白)、SAUSA300_2616(钴家族转运蛋白)、srtB(分拣酶B)、sbnA(可能的铁载体生物合成蛋白sbnA)、leuA(2-异丙基苹果酸合酶氨基酸生物合成酶)、sstA(铁转运膜蛋白)、sirA(铁ABC转运蛋白底物结合蛋白)、IsdA(血红素转运蛋白)和Spa(葡萄球菌蛋白A)、HlgA(γ溶血素)、leuA(氨基酸生物合成酶)、sstA(铁转运蛋白)、sirA(铁转运)、spa(蛋白A)或IsdA(血红素转运蛋白)或基本上相同的基因。第一启动子基因也可以选自由以下组成的组:SAUSA300_0119(鸟氨酸环脱氨酶家族蛋白)、lrgA(胞壁质水解酶转运蛋白)和bioA(腺苷甲硫氨酸-8-氨基-7-氧代壬酸氨基转移酶)或基本上相同的基因。

[0397] 用于金黄色葡萄球菌合成微生物的血液或血清诱导型第一启动子基因可以选自或衍生自选自以下的基因:isdB基因CH52_00245、sbnD基因CH52_05125、血红素ABC转运蛋白基因CH52_00230、sbnE基因CH52_05120、srtB基因CH52_00215、isdC基因CH52_00235、sbnC基因CH52_05130、二氨基庚二酸脱羧酶基因CH52_05105、血红素ABC转运蛋白2基因CH52_00225、sbnB基因CH52_05135、sbnF基因CH52_05115、bnG基因CH52_05110、isd ORF3基因CH52_00220、isdI基因CH52_00210、HarA基因CH52_10455、isdA基因CH52_00240、sbnA基因CH52_05140和sbnI基因CH52_05100、铁ABC转运蛋白基因CH52_05145、铁载体ABC转运蛋白基因CH52_05150和SAM dep Metrans基因CH52_04385。

[0398] 用于金黄色葡萄球菌合成微生物的血液或血清诱导型第一启动子基因可以衍生自或包括选自114、115、119、120、121、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162和163的核苷酸序列,或基本上相同的序列。

[0399] 在一个实施例中,合成微生物是经过分子修饰的金黄色葡萄球菌502a。表2中示出了用于实时PCR探针设计的每个调节区后面的操纵子中第一个ORF的原始序列(从起始密码子到终止密码子)。

[0400] 表2.金黄色葡萄球菌菌株502a,用于实时PCR探针设计的每个调节区后面的操纵子中第一个ORF的原始序列。

[0401]

金黄色葡萄球菌菌株 502a，502a 的 *spa* ORF	ATGACTTTACAAATACATACAGGGGGTATTAATTT GAAAAAGAAAAACATTTATTCAATTCGTAAACTAGGTGTAGGTATTGCAT CTGTAACTTTAGGTACATTACTTATATCTGGTGGCGTAACACCTGCTGCA AATGCTGCGCAACACGATGAAGCTCAACAAAATGCTTTTTATCAAGTGTT AAATATGCCTAACTTAAACGCTGATCAACGTAATGGTTTTATCCAAAGCC TTAAAGATGATCCAAGCCAAAGTGCTAACGTTTTAGGTGAAGCTCAAAAA CTTAATGACTCTCAAGCTCCAAAAGCTGATGCGCAACAAAATAACTTCAA CAAAGATCAACAAAGCGCCTTCTATGAAATCTTGAACATGCCTAACTTAA ACGAAGCGCAACGTAACGGCTTCATTCAAAGTCTTAAAGACGACCCAAGC CAAAGCACTAATGTTTTAGGTGAAGCTAAAAAATTAAACGAATCTCAAGC ACCGAAAGCTGATAACAATTTCAACAAAGAACAACAAAATGCTTTCTATG AAATCTTGAATATGCCTAACTTAAACGAAGAACAACGCAATGGTTTCATC CAAAGCTTAAAAGATGACCCAAGCCAAAGTGCTAACCTATTGTCAGAAGC TAAAAAGTTAAATGAATCTCAAGCACCGAAAGCGGATAACAAATTCAACA AAGAACAACAAAATGCTTTCTATGAAATCTTACATTTACCTAACTTAAAC GAAGAACAACGCAATGGTTTCATCCAAAGCTTAAAAGATGACCCAAGCCA AAGCGCTAACCTTTTAGCAGAAGCTAAAAAGCTAAATGATGCACAAGCAC CAAAAGCTGACAACAAATTCAACAAAGAACAACAAAATGCTTTCTATGAA ATTTTACATTTACCTAACTTAACTGAAGAACAACGTAACGGCTTCATCCA AAGCCTTAAAGACGATCCTTCAGTGAGCAAAGAAATTTTAGCAGAAGCTA AAAAGCTAAACGATGCTCAAGCACCAAAAGAGGAAGACAACAAAAAACCT GGTAAAGAAGACGGCAACAAGCCTGGTAAAGAAGACAACAAAAAACCTGG TAAAGAAGACGGCAACAAGCCTGGTAAAGAAGACAACAACAAACCTGGCA AAGAAGACGGCAACAAGCCTGGTAAAGAAGACAACAACAAGCCTGGTAAA GAAGACGGCAACAAGCCTGGTAAAGAAGACGGCAACAAACCTGGTAAAGA AGACGGCAACGGAGTACATGTCGTTAAACCTGGTGATACAGTAAATGACA TTGCAAAAGCAAACGGCACTACTGCTGACAAAATTGCTGCAGATAACAAA TTAGCTGATAAAAACATGATCAAACCTGGTCAAGAACTTGTTGTTGATAA GAAGCAACCAGCAAACCATGCAGATGCTAACAAAGCTCAAGCATTACCAG AAACTGGTGAAGAAAATCCATTCATCGGTACAACTGTATTTGGTGGATTA TCATTAGCCTTAGGTGCAGCGTTATTAGCTGGACGTCGTCGCGAACTATA A SEQ ID NO: 1

[0402]

金黄色葡萄球菌菌株 502a，502a 的 *sirA* ORF	ATGAATAAAGTAATTAAAATGC TTGTTGTTACGCTTGCTTTCCTACTTGTTTTAGCAGGATGTAGTGGGAAT TCAAATAAACAATCATCTGATAACAAAGATAAGGAAACAACTTCAATTAA ACATGCAATGGGTACAACTGAAATTAAAGGGAAACCAAAGCGTGTTGTTA CGCTATATCAAGGTGCCACTGACGTCGCTGTATCTTTAGGTGTTAAACCT GTAGGTGCTGTAGAATCATGGACACAAAAACCGAAATTCGAATACATAAA AAATGATTTAAAAGATACTAAGATTGTAGGTCAAGAACCTGCACCTAACT TAGAGGAAATCTCTAAATTAAAACCGGACTTAATTGTCGCGTCAAAAGTT AGAAATGAAAAAGTTTACGATCAATTATCTAAAATCGCACCAACAGTTTC TACTGATACAGTTTTCAAATTCAAAGATACAACTAAGTTAATGGGGAAAG CTTTAGGGAAAGAAAAAGAAGCTGAAGATTTACTTAAAAAGTACGATGAT AAAGTAGCTGCATTCCAAAAAGATGCAAAAGCAAAGTATAAAGATGCATG GCCATTGAAAGCTTCAGTTGTTAACTTCCGTGCTGATCATACAAGAATTT ATGCTGGTGGATATGCTGGTGAAATCTTAAATGATTTAGGATTCAAACGT AATAAAGACTTACAAAAACAAGTTGATAATGGTAAAGATATTATCCAACT TACATCTAAAGAAAGCATTCCATTAATGAACGCTGATCATATTTTTGTAG TAAAATCAGATCCAAATGCGAAAGATGCTGCATTAGTTAAAAAGACTGAA AGCGAATGGACTTCAAGTAAAGAGTGGAAAAATTTAGACGCAGTTAAAAA CAACCAAGTATCTGATGATTTAGATGAAATCACTTGGAACTTAGCTGGCG GATATAAATCTTCATTAAAACTTATTGACGATTTATATGAAAAGTTAAAT ATTGAAAAACAATCAAAATAA SEQ ID NO: 2
金黄色葡萄球菌菌株 502a，502a 的 *sstA*	ATGATAATGATTATCATTAATTTAA AGGGAGAAAAATTTGTAATGAAGTATTTATTAAAGGGAAATATTTTGCTT CTATTACTAATATTGTTGACAATTATTTCGTTGTTCATAGGTGTGAGTGA ACTATCAATTAAAGATTTACTACATTTAACTGAATCACAGCGGAATATTT TATTCTCAAGCCGAATACCAAGGACGATGAGTATTTTAATTGCTGGAAGT TCGTTGGCTTTAGCAGGCTTGATAATGCAACAAATGATGCAAAATAAGTT TGTTAGTCCGACTACAGCTGGAACGATGGAATGGGCTAAACTAGGTATTT TAATTGCTTTATTGTTCTTTCCAACCGGTCATATTTTATTAAAACTAGTA TTTGCTGTTATTTGCAGTATTTGCGGTACGTTTTTATTTGTTAAAATCAT TGATTTTATAAAAGTGAAAGATGTCATTTTTGTACCGCTTTTAGGAATTA TGATGGGTGGGATTGTTGCAAGTTTCACAACCTTCATCTCATTGCGCACG AATGCTGTTCAAAGCATTGGTAACTGGCTTAACGGGAACTTTGCCATTAT CACAAGTGGACGCTATGAAATTTTATATTTAAGTATTCCTCTTTTAGCAT TGACATATCTTTTTGCTAATCATTTCACGATTGTAGGAATGGGTAAAGAC TTTACTAATAATTTAGGTTTGAGTTACGAAAAATTAATTAACATCGCATT GTTTATTACTGCAACTATTACAGCATTGGTAGTGGTGACTGTTGGAACAT TACCGTTCTTAGGACTAGTAATACCAAATATTATTTCAATTTATCGAGGT GATCATTTGAAAAATGCTATCCCTCATACGATGATGTTAGGTGCCATCTT TGTATTATTTTCTGATATAGTTGGCAGAATTGTTGTTTATCCATATGAAA TAAATATTGGTTTAACAATAGGTGTATTTGGAACAATCATTTTCCTTATC TTGCTTATGAAAGGTAGGAAAAATTATGCGCAACAATAA SEQ ID NO: 3

	金黄色葡萄球菌菌株 502a，502a 的 *hlgA* ORF	ATGAACT TAAAATTAAATAGAAAGAAAGTGATTTCTATGATTAAAAATAAAATATTA ACAGCAACTTTAGCAGTTGGTTTAATAGCCCCTTTAGCCAATCCATTTAT AGAAATTTCTAAAGCAGAAAATAAGATAGAAGATATCGGTCAAGGTGCAG AAATCATCAAAAGAACACAAGACATTACTAGCAAACGATTAGCTATAACT CAAAACATTCAATTTGATTTTGTAAAAGATAAAAAATATAACAAAGATGC CCTAGTTGTTAAGATGCAAGGCTTCATCAGCTCTAGAACAACATATTCAG ACTTAAAAAAATATCCATATATTAAAAGAATGATATGGCCATTTCAATAT AATATCAGTTTGAAAACGAAAGACTCTAATGTTGATTTAATCAATTATCT TCCTAAAAATAAAATTGATTCAGCAGATGTTAGTCAGAAATTAGGCTATA ATATCGGCGGAAACTTCCAATCAGCGCCATCAATCGGAGGCAGTGGCTCA TTCAACTACTCTAAAACAATTAGTTATAATCAAAAAAACTATGTTACTGA AGTAGAAAGTCAGAACTCTAAAGGTGTTAAATGGGGAGTGAAAGCAAATT CATTTGTTACACCGAATGGTCAAGTATCTGCATATGATCAATACTTATTT GCACAAGACCCAACTGGTCCAGCAGCAAGAGACTATTTCGTCCCAGATAA TCAATTACCTCCTTTAATTCAAAGTGGCTTTAATCCATCATTTATTACAA CATTGTCACACGAAAGAGGTAAAGGTGATAAAAGCGAGTTTGAAATCACT TACGGCAGAAACATGGATGCTACATATGCTTACGTGACAAGACATCGTTT AGCCGTTGATAGAAAACATGATGCTTTTAAAAACCGAAACGTTACAGTTA AATATGAAGTGAACTGGAAAACACATGAAGTAAAAATTAAAAGCATCACA CCTAAGTAA SEQ ID NO: 4
[0403]	金黄色葡萄球菌菌株 502a，502a 的 *isdA* ORF	ATGACAAAACATTATTTAAACAGTAAGTATCAATC AGAACAACGTTCATCAGCTATGAAAAAGATTACAATGGGTACAGCATCTA TCATTTTAGGTTCCCTTGTATACATAGGCGCAGACAGCCAACAAGTCAAT GCGGCAACAGAAGCTACGAACGCAACTAATAATCAAAGCACACAAGTTTC TCAAGCAACATCACAACCAATTAATTTCCAAGTGCAAAAAGATGGCTCTT CAGAGAAGTCACACATGGATGACTATATGCAACACCCTGGTAAAGTAATT AAACAAAATAATAAATATTATTTCCAAACCGTGTTAAACAATGCATCATT CTGGAAAGAATACAAATTTTACAATGCAAACAATCAAGAATTAGCAACAA CTGTTGTTAACGATAATAAAAAAGCGGATACTAGAACAATCAATGTTGCA GTTGAACCTGGATATAAGAGCTTAACTACTAAAGTACATATTGTCGTGCC ACAAATTAATTACAATCATAGATATACTACGCATTTGGAATTTGAAAAAG CAATTCCTACATTAGCTGACGCAGCAAAACCAAACAATGTTAAACCGGTT CAACCAAAACCAGCTCAACCTAAAACACCTACTGAGCAAACTAAACCAGT TCAACCTAAAGTTGAAAAAGTTAAACCTACTGTAACTACAACAAGCAAAG TTGAAGACAATCACTCTACTAAAGTTGTAAGTACTGACACAACAAAAGAT CAAACTAAAACACAAACTGCTCATACAGTTAAAACAGCACAAACTGCTCA AGAACAAAATAAAGTTCAAACACCTGTTAAAGATGTTGCAACAGCGAAAT CTGAAAGCAACAATCAAGCTGTAAGTGATAATAAATCACAACAAACTAAC AAAGTTACAAAACATAACGAAACGCCTAAACAAGCATCTAAAGCTAAAGA ATTACCAAAAACTGGTTTAACTTCAGTTGATAACTTTATTAGCACAGTTG CCTTCGCAACACTTGCCCTTTTAGGTTCATTATCTTTATTACTTTTCAAA AGAAAAGAATCTAAATAA SEQ ID NO: 5

[0404]

金黄色葡萄球菌菌株 502a，502a 的 *leuA*	ATGAGTAGTCATATTCAAATTTTTGATACGACACTAAGAGACGGTGAACA AACACCAGGAGTGAATTTTACTTTTGATGAACGCTTGCGTATTGCATTGC AATTAGAAAAATGGGGTGTAGATGTTATTGAAGCTGGATTTCCTGCTTCA AGTACAGGTAGCTTTAAATCTGTTCAAGCAATTGCACAAACATTAACAAC AACGGCTGTATGTGGTTTAGCTAGATGTAAAAAATCTGACATCGATGCTG TATATGAAGCAACAAAAGATGCAGCGAAGCCGGTCGTGCATGTTTTTATA GCAACATCACCTATTCATCTTGAACATAAACTTAAAATGTCTCAAGAAGA CGTTTTAGCATCTATTAAAGAACATGTCACATACGCGAAACAATTATTTG ACGTTGTTCAATTTTCACCTGAAGATGCAACGCGTACTGAATTACCATTC TTAGTGAAATGTGTACAAACTGCCGTTGACGCTGGAGCTACAGTTATTAA TATTCCTGATACAGTCGGCTACAGTTACCATGATGAATATGCACATATTT TCAAAACCTTAACAGAATCTGTAACATCTTCAAATGAAATTATTTATAGT GCTCATTGCCATGACGATTTAGGAATGGCTGTTTCAAATAGTTTAGCTGC AATTGAAGGCGGTGCGAGACGAATTGAAGGCACTGTAAATGGTATTGGTG AACGAGCAGGTAATGCAGCACTTGAAGAAGTCGCGCTTGCACTATACGTT CGAAATGATCATTATGGTGCTCAAACTGCCCTTAATCTCGAAGAAACTAA AAAAACATCGGATTTAATTTCAAGATATGCAGGTATTCGAGTGCCTAGAA ATAAAGCAATTGTTGGCCAAAATGCATTTAGTCATGAATCAGGTATTCAC CAAGATGGCGTATTAAAACATCGTGAAACATATGAAATTATGACACCTCA ACTTGTTGGTGTAAGCACGACTGAACTTCCATTAGGAAAATTATCTGGTA AACACGCCTTCTCAGAGAAGTTAAAAGCATTAGGTTATAACATTGATAAA GAAGCGCAAATAGATTTATTTAAACAATTCAAGACCATTGCGGACAAAAA GAAATCTGTTTCAGATAGAGATATTCATGCGATTATTCAAGGTTCTGAGC ATGAGCATCAAGCACTTTATAAATTGGAAACACTACAACTACAATATGTC TCTAGCGGCCTTCAAAGTGCTGTTGTTGTTGTTAAAGATAAAGAGGGTCA TATTTACCAGGATTCAAGTATTGGTACTGGTTCAATCGTAGCAATTTACA ATGCAGTTGATCGTATTTTCCAGAAAGAAACAGAATTAATTGATTATCGT ATTAATTCTGTCACTGAAGGTACTGATGCCCAAGCAGAAGTACATGTAAA TTTATTGATTGAAGGTAAGACTGTCAATGGCTTTGGTATTGATCATGATA TTTTACAAGCCTCTTGTAAAGCATACGTAGAAGCACATGCTAAATTTGCA GCTGAAAATGTTGAGAAGGTAGGTAAT SEQ ID NO: 6

[0405] 如下文所述,合成微生物可以包含防止细胞死亡基因表达的表达钳分子修饰,其中所述表达钳包括对细胞死亡基因具有特异性的抗毒素基因,所述抗毒素基因与第二启动子可操作地结合,所述第二启动子在真皮或粘膜定植时或在TSB培养基中具有活性,并且优选地在血液、血清或血浆中被下调,例如,所述第二启动子可以包括clfB基因(聚集因子B),例如表3所示。

[0406] 表3.用于实时PCR探针设计的其它序列

[0407]

502a 的 *clfB* ORF（用于驱动“表达钳”的抗毒素）	ATGAAAAAAAGAATTGATTATTTGTCGAATAAGCAGAATAAGTATTCGAT TAGACGTTTTACAGTAGGTACCACATCAGTAATAGTAGGGGCAACTATAC TATTTGGGATAGGCAATCATCAAGCACAAGCTTCAGAACAATCGAACGAT ACAACGCAATCTTCGAAAAATAATGCAAGTGCAGATTCCGAAAAAAACAA TATGATAGAAACACCTCAATTAAATACAACGGCTAATGATACATCTGATA TTAGTGCAAACACAAACAGTGCGAATGTAGATAGCACAACAAAACCAATG TCTACACAAACGAGCAATACCACTACAACAGAGCCAGCTTCAACAAATGA AACACCTCAACCGACGGCAATTAAAAATCAAGCAACTGCTGCAAAAATGC AAGATCAAACTGTTCCTCAAGAAGCAAATTCTCAAGTAGATAATAAAACA ACGAATGATGCTAATAGCATAGCAACAAACAGTGAGCTTAAAAATTCTCA AACATTAGATTTACCACAATCATCACCACAAACGATTTCCAATGCGCAAG GAACTAGTAAACCAAGTGTTAGAACGAGAGCTGTACGTAGTTTAGCTGTT GCTGAACCGGTAGTAAATGCTGCTGATGCTAAAGGTACAAATGTAAATGA TAAAGTTACGGCAAGTAATTTCAAGTTAGAAAAGACTACATTTGACCCTA ATCAAAGTGGTAACACATTTATGGCGGCAAATTTTACAGTGACAGATAAA GTGAAATCAGGGGATTATTTTACAGCGAAGTTACCAGATAGTTTAACTGG TAATGGAGACGTGGATTATTCTAATTCAAATAATACGATGCCAATTGCAG ACATTAAAAGTACGAATGGCGATGTTGTAGCTAAAGCAACATATGATATC TTGACTAAGACGTATACATTTGTCTTTACAGATTATGTAAATAATAAAGA AAATATTAACGGACAATTTTCATTACCTTTATTTACAGACCGAGCAAAGG CACCTAAATCAGGAACATATGATGCGAATATTAATATTGCGGATGAAATG TTTAATAATAAAATTACTTATAACTATAGTTCGCCAATTGCAGGAATTGA TAAACCAAATGGCGCGAACATTTCTTCTCAAATTATTGGTGTAGATACAG CTTCAGGTCAAAACACATACAAGCAAACAGTATTTGTTAACCCTAAGCAA CGAGTTTTAGGTAATACGTGGGTGTATATTAAAGGCTACCAAGATAAAAT CGAAGAAAGTAGCGGTAAAGTAAGTGCTACAGATACAAAACTGAGAATTT TTGAAGTGAATGATACATCTAAATTATCAGATAGCTACTATGCAGATCCA AATGACTCTAACCTTAAAGAAGTAACAGACCAATTTAAAAATAGAATCTA TTATGAGCATCCAAATGTAGCTAGTATTAAATTTGGTGATATTACTAAAA CATATGTAGTATTAGTAGAAGGGCATTACGACAATACAGGTAAGAACTTA AAAACTCAGGTTATTCAAGAAAATGTTGATCCTGTAACAAATAGAGACTA CAGTATTTTCGGTTGGAATAATGAGAATGTTGTACGTTATGGTGGTGGAA GTGCTGATGGTGATTCAGCAGTAAATCCGAAAGACCCAACTCCAGGGCCG CCGGTTGACCCAGAACCAAGTCCAGACCCAGAACCAGAACCAACGCCAGA TCCAGAACCAAGTCCAGACCCAGAACCGGAACCAAGCCCAGACCCGGATC CGGATTCGGATTCAGACAGTGACTCAGGCTCAGACAGCGACTCAGGTTCA GATAGCGACTCAGAATCAGATAGCGATTCGGATTCAGACAGTGATTCAGA TTCAGACAGCGACTCAGAATCAGATAGCGATTCAGAATCAGATAGCGACT CAGATTCAGATAGCGATTCAGATTCAGATAGCGATTCAGAATCAGATAGC GATTCGGATTCAGACAGTGATTCAGATTCAGACAGCGACTCAGAATCAGA TAGCGACTCAGAATCAGATAGTGAGTCAGATTCAGACAGTGACTCGGACT CAGACAGTGATTCAGACTCAGATAGCGATTCAGACTCAGATAGCGATTCA GACTCAGACAGCGATTCAGATTCAGACAGCGACTCAGAATCAGACAGCGA CTCAGACTCAGATAGCGACTCAGACTCAGACAGCGACTCAGATTCAGATA GCGATTCAGACTCAGACAGCGACTCAGACTCAGACAGCGACTCAGACTCA GATAGCGATTCAGACTCAGACAGCGACTCAGATTCAGATAGCGATTCGGA CTCAGACAGCGATTCAGATTCAGACAGCGACTCAGACTCGGATAGCGATT CAGATTCAGACAGCGACTCAGACTCGGATAGCGACTCGGATTCAGATAGT GACTCCGATTCAAGAGTTACACCACCAAATAATGAACAGAAAGCACCATC AAATCCTAAAGGTGAAGTAAACCATTCTAATAAGGTATCAAAACAACACA AAACTGATGCTTTACCAGAAACAGGAGATAAGAGCGAAAACACAAATGCA ACTTTATTTGGTGCAATGATGGCATTATTAGGATCATTACTATTGTTTAG AAAACGCAAGCAAGATCATAAAGAAAAAGCGTAAATACTTTTTTAGGCCG AATACATTTGTATTCGGTTTTTTTGTTGAAAATGATTTTAAAGTGAATTG SEQ ID NO: 7

[0408]

502a 的 *gyrA* ORF（内部管家基因）	ATGGCTGAATTACCTCAATCAAGAATAAATGAACGAAATATTACCAGTGA AATGCGTGAATCATTTTTAGATTATGCGATGAGTGTTATCGTTGCTCGTG CATTGCCAGATGTTCGTGACGGTTTAAAACCAGTACATCGTCGTATACTA TATGGATTAAATGAACAAGGTATGACACCGGATAAATCATATAAAAAATC AGCACGTATCGTTGGTGACGTAATGGGTAAATATCACCCTCATGGTGACT CATCTATTTATGAAGCAATGGTACGTATGGCTCAAGATTTCAGTTATCGT TATCCGCTTGTTGATGGCCAAGGTAACTTTGGTTCAATGGATGGAGATGG CGCAGCAGCAATGCGTTATACTGAAGCGCGTATGACTAAAATCACACTTG AACTGTTACGTGATATTAATAAAGATACAATAGATTTTATCGATAACTAT GATGGTAATGAAAGAGAGCCGTCAGTCTTACCTGCTCGATTCCCTAACTT GTTAGCCAATGGAGCATCAGGTATAGCGGTAGGTATGGCAACGAATATTC CACCACATAACTTAACAGAATTAATCAATGGTGTACTTAGCTTAAGTAAG AACCCTGATATTTCAATTGCTGAGTTAATGGAGGATATTGAAGGTCCTGA TTTCCCAACTGCTGGACTTATTTTAGGTAAGAGTGGTATTAGACGTGCAT ATGAAACAGGTCGTGGTTCAATTCAAATGCGTTCTCGTGCAGTTATTGAA GAACGTGGAGGCGGACGTCAACGTATTGTTGTCACTGAAATTCCTTTCCA AGTGAATAAGGCTCGTATGATTGAAAAAATTGCAGAGCTCGTTCGTGACA AGAAAATTGACGGTATCACTGATTTACGTGATGAAACAAGTTTACGTACT GGTGTGCGTGTCGTTATTGATGTGCGTAAGGATGCAAATGCTAGTGTCAT TTTAAATAACTTATACAAACAAACACCTCTTCAAACATCATTTGGTGTGA ATATGATTGCACTTGTAAATGGTAGACCGAAGCTTATTAATTTAAAAGAA GCGTTGGTACATTATTTAGAGCATCAAAAGACAGTTGTTAGAAGACGTAC GCAATACAACTTACGTAAAGCTAAAGATCGTGCCCACATTTTAGAAGGAT TACGTATCGCACTTGACCATATCGATGAAATTATTTCAACGATTCGTGAG TCAGATACAGATAAAGTTGCAATGGAAAGCTTGCAACAACGCTTCAAACT TTCTGAAAAACAAGCTCAAGCTATTTTAGACATGCGTTTAAGACGTCTAA CAGGTTTAGAGAGAGACAAAATTGAAGCTGAATATAATGAGTTATTAAAT TATATTAGTGAATTAGAAACAATCTTAGCTGATGAAGAAGTATTACTACA ATTAGTTAGAGATGAATTAACAGAAATTCGAGATCGTTTCGGTGATGATC GTCGTACTGAAATCCAATTAGGTGGATTTGAAGATTTAGAAGATGAAGAT CTCATTCCAGAAGAACAAATTGTAATTACACTAAGCCATAATAACTACAT TAAACGTTTGCCGGTATCTACATATCGTGCTCAAAACCGTGGTGGTCGTG GTGTTCAAGGTATGAATACATTGGAAGAAGATTTTGTCAGTCAATTGGTA ACTTTAAGTACACATGACCATGTATTGTTCTTTACTAACAAAGGTCGTGT ATACAAACTTAAAGGTTATGAAGTGCCTGAGTTATCAAGACAGTCTAAAG GTATTCCTGTAGTGAATGCTATTGAACTTGAAAATGATGAAGTCATTAGT ACAATGATTGCTGTTAAAGACCTTGAAAGTGAAGACAACTTCTTAGTGTT TGCAACTAAACGTGGTGTCGTTAAACGTTCAGCATTAAGTAACTTCTCAA GAATAAATAGAAATGGTAAGATTGCGATTTCGTTCAGAGAAGATGATGAG TTAATTGCAGTTCGCTTAACAAGTGGTCAAGAAGATATCTTGATTGGTAC ATCACATGCATCATTAATTCGATTCCCTGAATCAACATTACGTCCTTTAG GCCGTACAGCAACGGGTGTGAAAGGTATTACACTTCGTGAAGGTGACGAA GTTGTAGGGCTTGATGTAGCTCATGCAAACAGTGTTGATGAAGTATTAGT AGTTACTGAAAATGGTTATGGTAAACGTACGCCAGTTAATGACTATCGTT TATCAAATCGTGGTGGTAAAGGTATTAAAACAGCTACGATTACTGAGCGT AATGGTAATGTTGTATGTATCACTACAGTAACTGGTGAAGAAGATTTAAT GATTGTTACTAATGCAGGTGTCATTATTCGACTAGATGTTGCAGATATTT CTCAAAATGGTCGTGCAGCACAAGGTGTTCGCTTAATTCGCTTAGGTGAT GATCAATTTGTTTCAACGGTTGCTAAAGTAAAAGAAGATGCAGAAGATGA AACGAATGAAGATGAGCAATCTACTTCAACTGTATCTGAAGATGGTACTG AACAACAACGTGAAGCGGTTGTAAATGATGAAACACCAGGAAATGCAATT CATACTGAAGTGATTGATTCAGAAGAAAATGATGAAGATGGACGTATTGA AGTAAGACAAGATTTCATGGATCGTGTTGAAGAAGATATACAACAATCAT CAGATGAAGATGAAGAATAATAA SEQ ID NO: 8

[0409] 在重组方法中用于制备合成微生物经过分子修饰的金黄色葡萄球菌502a的另外的寡核苷酸示于图3A、图3B和图3C中示出的表4A中，并且启动子序列如下所示。

[0410] 细胞死亡基因

[0411] 如本文所述，合成微生物可以含有杀灭开关分子修饰，所述分子修饰包括与诱导型第一启动子可操作地结合的细胞死亡基因。细胞死亡基因可以选自在预定时间段内(优选地，在诱导的15分钟、30分钟、60分钟、90分钟、120分钟、240分钟或360分钟内)过度表达导致细胞死亡或合成微生物的生长显著减少的任何基因。

[0412] 在其它情况下已经开发了细胞死亡基因、毒素基因或杀灭开关基因。

[0413] 转让给Synlogic,Inc.的WO 2016/210373(Jonathan Kotula等人的)公开了一种重组细菌细胞,其是针对生物安全性而被工程改造的营养缺陷型生物,例如,所述重组细菌细胞包括基于抑制的杀灭开关基因,所述杀灭开关基因基因包括毒素诱导型启动子、抗毒素诱导型启动子和阿拉伯糖诱导型启动子,并依赖诱导剂(例如,阿拉伯糖)的存在来保持细胞存活。

[0414] Bielinski的US 8,975,061公开了用于生物防范以防止微生物在环境中的无意和/或不受控制的扩散的毒素和抗毒素基因的调节。

[0415] Gerdes的WO 1999/058652公开了基于细胞毒素的生物遏制和杀灭系统,包含大肠杆菌relBE基因座和在革兰氏阴性和革兰氏阳性细菌和古细菌中发现的类似系统。

[0416] Gabant的US20150050253公开了微生物的受控生长和控制其它外源重组或其它微生物的生长/扩散。

[0417] Falb的WO 2017/023818和WO 2016/210384公开了经工程改造以治疗涉及丙酸酯代谢的病症的细菌。

[0418] Falb的US20160333326公开了经工程改造以治疗与高氨血症有关的疾病的细菌。

[0419] Garry的US 9101597公开了免疫保护性原代间充质干细胞和方法,并且描述了一种促凋亡的杀灭开关,以用于间充质干细胞。

[0420] Falb的US20160206666公开了经工程改造以治疗得益于减少的肠炎和/或收紧的肠粘膜屏障的疾病的细菌。

[0421] 在一些实施例中,提供了合成微生物,其包括以下中的一种或多种:SprA1(金黄色葡萄球菌)、Sma1(粘质沙雷氏菌)、RelF(大肠杆菌)、KpnI(肺炎克氏杆菌)和/或RsaE(金黄色葡萄球菌)毒素基因。

[0422] 在本公开中,与先前鉴定的最佳控制区组合测试了多种细胞死亡毒素基因:i)在细胞膜上形成孔从而损害细胞膜功能的30个氨基酸肽(PepA1);ii)快速消化细菌染色体的限制性酶(Kpn1或其它);iii)小RNA(RsaE),其通过抑制2种基本基因的翻译而损害中枢生化代谢;iv)衍生自粘质沙雷氏菌的限制性核酸内切酶(Sma1);以及v)来源于大肠杆菌的毒素基因(RelF)。一些毒素比其它毒素更有效,并且控制区诱导强度和毒素效力的理想组合可能会导致菌株在基线时是健康的,而在循环系统中迅速死亡。

[0423] 在Felden,B和Sayed,N的WO 2013/050590中描述了sprA1(金黄色葡萄球菌)毒素基因(编码PepA1肽),所述专利公开了PepA1作为抗微生物剂的用途,但着重于使用所述肽作为纯化的外源性治疗药物以输送到体内。

[0424] 在Gerdes的EP 20090168998中描述了relF(大肠杆菌)毒素基因,所述专利公开了出于生物遏制目的的杀灭开关,并着重于围绕革兰氏阴性细菌的杀灭。

[0425] 在Hyde和Roderick的US 8852916中描述了relF毒素基因,所述专利公开了触发微生物细胞死亡(程序性细胞死亡)的机制。主要应用是将RelF用于环境生物遏制。

[0426] 在Amodei的US 8682619中描述了relF,所述专利预言地公开了RelF以调节细菌种群的生长。

[0427] 合成微生物可以通过插入杀灭开关分子修饰而衍生自金黄色葡萄球菌目标微生物,所述杀灭开关分子修饰包括调节区,所述调节区包括与细胞死亡基因可操作地连接的

诱导型启动子,所述细胞死亡基因可以是毒素基因。

[0428] 细胞死亡基因可以选自或衍生自sprA1基因(编码在细胞膜上形成孔的肽毒素)、sprA2基因、sprG基因、sma1基因(限制性核酸内切酶)、kpn1基因(快速消化细菌染色体的限制性酶)、rsaE基因(通过抑制2个基本基因的翻译而损害中枢代谢的小RNA)、relF基因(大肠杆菌)、yoeB基因、mazF基因、yefM基因或溶葡萄球菌素毒素基因。合成的金黄色葡萄球菌可以包含杀灭开关分子修饰,所述杀灭开关分子修饰包括细胞死亡基因,所述细胞死亡基因具有选自SEQ ID NO:122、124、125、126、127、128、274、275、284、286、288、290、315或317的核苷酸序列,或基本上相同的核苷酸序列。

[0429] 在一个具体的实施例中,提供了具有分子修饰的合成的金黄色葡萄球菌,所述分子修饰包括与细胞死亡基因可操作地结合的血液或血清诱导型第一启动子,所述细胞死亡基因包括或衍生自SprA1基因。

[0430] 多个杀灭开关

[0431] 一种KS可能足以使合成微生物具备期望的特性,但一个以上的KS可通过以下方式进一步增强菌株:i)大大降低使KS失活的突变的速率;以及ii)通过一种以上的途径杀死细胞,这可能导致更快的细胞死亡(一种增强产物的功能)。细胞死亡基因可以包括如下所示的启动子下游的一个或多个DNA序列(7)。碱基对编号对应于pCN51载体的位置。

[0432] 1.限制性位点PstI和EcoRI之间的sprA1基因序列如下所示。通过DNA 2.0(Atum)合成所述序列并将其连接到载体中,所述载体可以被转化到大肠杆菌细胞中进行复制。将sprA1基因在PstI和EcoRI位点处进行限制性切割,并通过凝胶电泳分离。限制性位点之间的完整序列,可能的起始位点和终止位点为斜体。

[0433]
```
                                    PstI
                                    CTGCAGGG TACCGCAGAG AGGAGGTGTA
6101 TAAGGTGATG CTTATTTTCG TTCACATCAT AGCACCAGTC ATCAGTGGCT
6151 GTGCCATTGC GTTTTTTTCT TATTGGCTAA GTAGACGCAA TACAAAATAG
6201 GTGACATATA GCCGCACCAA TAAAAATCCC CTCACTACCG CAAATAGTGA
6251 GGGGATTGGT GTATAAGTAA ATACTTATTT TCGTTGTGGA TCCTTGACTG
6301 AATTC SEQ ID NO: 122
     EcoRI
```

[0434] 2.ClfB启动子下的调节RNA sprA1sprA1$_{AS}$(sprA1sprA1反义)的DNA序列(反向克隆到sprA1基因后面,包含反义调节RNA)。该DNA序列产生非编码的反义调节RNA,其通过在血清和/或血液的环境因素之外调节sprA1的翻译而充当抗毒素。以下是sprA1sprA1$_{AS}$的DNA序列。

[0435] EcoRI

[0436] GAATTCAGTCAAGGATCCACAACGAAAATAAGTATTTACTTATACACCAATCCCCTCACTATT

[0437] TGCGGTAGTGAGGGGATTTTTATTGGTGCGGCTATATGTCACCTATTTTGTATTGCGTCTACT

[0438] TAGCCAATAAGAAAAAAACGCAATGGCACAGCCACTGATGACTGGTGCTATGATGTGAACGAAAATAAGCATCACCTTATACACCTCCTCTCTGCGGTACCCTGCAG SEQ ID NO:123

[0439] PstI

[0440] 3.限制性位点PstI和EcoRI之间的SmaI DNA序列。通过DNA 2.0(Atum)合成序列并将其连接到载体中,所述载体可以被转化到大肠杆菌细胞中进行复制。将SmaI基因在PstI

和EcoRI位点处进行限制性切割,并通过凝胶电泳分离。限制性位点之间的完整序列,起始位点和终止位点为斜体。

[0441]
```
                                                    C TGCAGATGAG
5751 CAGGGATGAC CAACTCTTTA CACTTTGGGG AAAGCTTAAC GATCGTCAGA
5801 AGGATAATTT TCTAAAATGG ATGAAAGCTT TTGATGTAGA GAAAACTTAC
5851 CAAAAAACAA GTGGGGATAT TTTCAATGAT GATTTTTTCG ATATATTTGG
5901 TGATAGATTA ATTACTCATC ATTTCAGTAG CACGCAAGCT TTAACAAAAA
5951 CTTTATTCGA ACATGCTTTT AATGACTCCT TAAATGAATC TGGAGTTATA
6001 TCCTCTCTTG CGGAAAGTAG AACAAACCCT GGGCATGACA TAACAATCGA
6051 TAGCATAAAG GTTGCTTTAA AAACAGAAGC AGCTAAAAAT ATTAGCAAAT
6101 CATATATTCA TGTAAGTAAG TGGATGGAGT TAGGCAAGGG GGAGTGGATT
6151 CTAGAATTAT TATTAGAACG GTTTTTAGAG CATCTAGAGA ATTATGAACG
6201 TATTTTCACA CTCAGATATT TTAAAATATC CGAGTATAAA TTTAGCTACC
6251 AGCTTGTAGA AATACCCAAG AGTCTTTTGT TGGAAGCAAA AAATGCGAAA
6301 TTAGAAATAA TGTCGGGAAG CAAACAAAGC CCTAAGCCCG GCTATGGATA
6351 TGTGTTAGAT GAAAATGAAA ATAAGAAGTT TTCTCTATAC TTTGATGGTG
6401 GTGCCGAGAG AAAACTTCAA ATAAAACATT TAAATTTAGA ACATTGCATT
6451 GTTCATGGAG TTTGGGATTT TATTCTACCG CCGCCTTAAG AATTC SEQ ID NO:
124
```

[0442] 4.限制性位点PstI和EcoRI之间的rsaE DNA序列。通过DNA 2.0(Atum)合成序列并将其连接到载体中,所述载体可以被转化到大肠杆菌细胞中进行复制。将RsaE小型调节RNA(sRNA)在PstI和EcoRI位点处进行限制性切割,并通过凝胶电泳分离。其含有一个5'插入,并且成熟的RNA从粗体GAAATTAA处开始加工,并且直到ACG之后的Ts延伸结束。

[0443]
```
                                    CTGCAGAT GGTAGAGATA GCATGTTATA
6101 TTATGAACAT GAAATTAATC ACATAACAAA CATACCCCTT TGTTTGAAGT
6151 GAAAAATTTC TCCCATCCCC TTTGTTTAGC GTCGTGTATT CAGACACGAC
6201 GTTTTTTTGA ATTC SEQ ID NO: 125
```

[0444] 5.可以将变体用于RsaE sRNA,其可以更高地表达sRNA,其可以更有效地工作。该变体将从5'端的GAAATTAA开始。

[0445]
```
6110 GAAATTAATC ACATAACAAA CATACCCCTT TGTTTGAAGT
6151 GAAAAATTTC TCCCATCCCC TTTGTTTAGC GTCGTGTATT CAGACACGAC
6201 GTTTTTTTGA ATTC SEQ ID NO: 126
```

[0446] 6.relF(大肠杆菌)DNA序列。将测试并克隆这个潜在的杀灭基因。

[0447] ATGAAGCAGC AAAAGGCGAT GTTAATCGCC CTGATCGTCA TCTGTTTAAC CGTCATAGTG

[0448] ACGGCACTGG TAACGAGGAA AGACCTCTGC GAGGTACGAA TCCGAACCGG CCAGACGGAG GTCGCTGTCT TCACAGCTTA CGAACCTGAG GAGTAA SEQ ID NO:127

[0449] 7.将测试并克隆KpnI(来自肺炎克氏杆菌的限制性酶)DNA序列。

atggatgtctttgataaagtttatagtgatgataatagttatgaccaaaaaactgtaagtcagcgtattgaagccct

atttcttaataaccttggcaaagttgtaactcgtcagcaaatcattagggcggcaactgatccaaaaacagggaaacaac

cagaaaattggcatcagagactttcagaactacgaactgataaaggatatactattttatcctggcgggatatgaaggtt

ttagctccgcaagagtatataatgccacacgcaacaagacgcccaaaggcagcaaagcgtgtattaccgacaaaagaaac

[0450] ctgggaacaggttttggatagagctaattactcttgcgagtggcaggaagatggtcaacactgtgggttagttgaaggtg

atattgatcctataggggggaggcacggtcaaactaacaccagaccatatgacacctcattcaatagatcccgcaactgat

gtaaatgatcctaaaatgtggcaagcattgtgtggacgtcatcaagttatgaaaaaaaattattgggattcaaataatgg

gaaaataaatgtcattggtatattgcagtcagtaaatgagaaacaaaagaatgatgctttagagtttcttttgaattatt

atggattgaaaaga**taa** SEQ ID NO: 128

[0451] 本文提供了一种合成的金黄色葡萄球菌502a,其包括至少一种分子修饰(杀灭开关),所述分子修饰包括可操作地连接至包括第一启动子的第一调节区的第一细胞死亡基因,任选地,其中所述第一细胞死亡基因包括选自SEQ ID NO:122、124、125、126、127、128、274、275、284、286、288、290、315和317的核苷酸序列,或基本上相同的核苷酸序列

[0452] 尽管已经针对其它目的描述了杀灭开关(KS),但是本发明的KS具有独特的特征:i)其对暴露于血液或血清作出反应;ii)其是内源性调节的,这意味着不需要添加或去除小分子即可激活或调节KS(并非营养缺陷型生物);以及iii)控制区/毒素的有用组合,以及多个此类盒的有用组合,可用于实现优异的性能。

[0453] 表达钳

[0454] 提供了一种包括杀灭开关分子修饰的合成微生物,所述杀灭开关分子修饰包括(i)细胞死亡基因,其与(ii)包括第一诱导型启动子的第一调节区可操作地结合,所述第一诱导型启动子通过暴露于血液或血清而被诱导。为了使合成微生物在受试者中持久地占据真皮或粘膜生态位,在不存在血液或血清的情况下,杀灭开关优选地应沉默(不表达)。

[0455] 为了避免细胞死亡基因的“泄漏表达”,合成微生物可以进一步包括至少一种第二分子修饰(表达钳),所述第二分子修饰包括(iii)对所述第一细胞死亡基因具有特异性的抗毒素基因,其中所述抗毒素基因与(iv)包括第二启动子的第二调节区可操作地结合,所述第二启动子在真皮或粘膜定植时或在培养基(例如,TSB)中具有活性(例如,组成性),并且优选地通过暴露于血液、血清或血浆液而被下调。

[0456] 理想地,KS菌株中基因表达(当细胞未暴露于血液或血清时观察到的表达,例如,在TSB(胰蛋白酶大豆肉汤)中时观察到的表达)的基础水平应非常低,因为在与血清接触前会产生毒素会过早地杀死或削弱菌株。即使是中等程度的细胞健康损害也是不可接受的,因为:1)KS中的逃逸突变会累积(KS不稳定性)—必须避免的已知现象,和/或;2)菌株在初步试验中观察到的天然功效可能会降低或丧失。为了理解泄漏表达是否存在问题,在选择最佳控制区以驱动KS时,测量并仔细考虑了基线表达的绝对水平和血清中的倍数变化。

[0457] 意识到渗漏表达并不能解决问题,并且现实是,在不存在特异性诱导的情况下,即使广泛使用的“严格控制”的变位启动子(如P_{CUP1}和P_{Gal7}和P_{Tet}-on/off变体)也会产生可测量的mRNA转录。在一些实施例中,使用“表达钳”,其中KS盒不仅含有驱动毒素表达的血清响应性控制区,而且还在金黄色葡萄球菌启动子(P_{clfB}等)的控制下编码“翻译阻断”RNA,所述启动子通常在皮肤定植期间在金黄色葡萄球菌中有很强的活性,并在血液中下调。

[0458] 将克隆clfB基因启动子(P_{clfB})以驱动sprA1sprA1$_{AS}$ RNA的表达,并将盒整合到与用于由血清响应性启动子(例如,P_{isdB}、P_{hlgA}等)表达sprA1毒素的表达模块相同的表达模块中。在这个菌株中,血清/血液暴露会激活毒素(例如,最多350倍或更多)但不激活抗毒素,而TSB中或皮肤上的生长会激活抗毒素但不激活毒素。合成菌株的示例性分子修饰的代表图在图1中示出。

[0459] 合成微生物的替换方法:KO方法

[0460] 在合成微生物中产生杀灭开关样表型的替换性方法是破坏("敲除")一个或多个在血液中存活和/或感染器官所需的基因,但这些基因是对于培养基中的生长或皮肤上的生长是不需要的(或不重要的)。在一些实施例中,表5所示的6个基因中的一个或多个基因或两个或更多个基因可用于KO方法。

[0461] 表5:用于基因敲除以产生弱毒菌株的候选者:

[0462]

参考	诱变的类型	在血液中存活或感染器官所需的基因	报告的基因功能
Benton 等人(2004 年)对金黄色葡萄球菌完整毒力所需的基因进行的大规模鉴定。《细菌学杂志(J. bact.)》186(24): 8478-8489。DOI 10.1128/JB.186.24.8478–8489.2004	转座子插入	PycA; AspB; GabP。这些转座子的突变导致体内器官感染率下降多达 1000 倍	PycA: 丙酮酸羧化酶
			AspB: 天冬氨酸转氨酶
			GabP: γ-氨基丁酸渗透酶
Valentino 等人(2014 年)。有助于金黄色葡萄球菌在脓肿和感染相关型生态中的适应性的基因。mBio5(5):e01729-14.doi:10.1128/mBio.01729-14	转座子插入	在血液中体外存活所必需的基因,但 BHI 液体或琼脂中的生长不需要这些基因: - SAOUHSC_01216 - SAOUHSC_00686 - SAOUHSC_00378	SAOUHSC_01216: 琥珀酰 CoA-合成酶亚基 b。
			SAOUHSC_00686: 未知的假设蛋白
			SAOUHSC_00378: 未知的假设蛋白

[0463] 在一个实施例中,提供了一种合成微生物,其包括使用等位交换用未经修饰的或表达固定的KS替换表5中的一个或多个基因。这可以进一步提高血液中合成微生物的死亡率。可替换地,通过具有一个KO和一个KS,可以减弱集成两个KS的需要。在另外的实施例中,合成微生物可以包括多于一个具有协同作用的KO的组合。

[0464] 杀灭开关调节区

[0465] 提供了一种包括杀灭开关的合成微生物。如本文所述,杀灭开关包括可操作地连接至包括诱导型启动子的调节区(RR)的细胞死亡基因。

[0466] 合成微生物的开发涉及鉴定并表征最佳调节区(RR),以便驱动杀灭开关基因;选择了血清响应性基因座的列表;鉴定了RR;意见验证了血清激活反应,并研究了基础表达。

[0467] 识别并表征最佳调节区以驱动杀灭开关候选者。

[0468] KS菌株构建的这一重要阶段涉及鉴定响应于人血清和/或全肝素化血液而强烈上调的基因。鉴定基因后,鉴定并注释含有启动子和其它上游元件的RR。在一种方法中,可以使用文献中已知的金黄色葡萄球菌中任何已知的血清和血液响应性基因。

[0469] RR包含响应于刺激而激活(或抑制)mRNA转录所需的上游调节序列。基序包含"向上"元件、-35和-10共有元件、核糖体结合位点("shine-dalgarno序列")和"操纵基因"序列,这些元件结合强烈影响转录的蛋白质因子。实际上,对于真细菌而言,利用起始密码子

上游200bp的DNA序列区域通常足以捕获所有这些元件。然而，优选地有意地鉴定这些序列以确保它们被包含。

[0470] 表6示出了通过暴露于人血或血清而强烈上调的六个金黄色葡萄球菌基因。

[0471] 表6：鉴定候选RR和血清或血液诱导型启动子以驱动杀灭开关组分从而驱动毒素。

[0472]

基因	功能	第一作者，年份	血清或血液的倍数变化	暴露于血液或血清的时间	研究中使用的SA菌株	注释
spa	葡萄球菌属蛋白A；Ig结合；单顺反子基因	Malachowa 2011	约45倍	90分钟	USA300和mu50	Wang 2004预测了单顺反子基因的结构。该结构的实验证据和计算证据均存在
sir	Sir ABC；铁转运	Malachowa 2011和Wang 2004	血清中为81倍；血液中为68倍（sirA；操纵子中的第一个ORF）	30分钟到120分钟	USA300和mu50	在最早的时间点感应高。实验的操纵子结构和预测的操纵子结构相匹配
sst	SstABCD操纵子；铁转运	Malachowa 2011和Wang 2004	血清中为25倍；血液中为15倍；	30分钟到120分钟	USA300和mu50	在最早的时间点感应高。实验的操纵子结构和预测的操纵子结构相匹配
γ溶血素 *hlgA*	rbc裂解	Malachowa 2011；	约350倍（图4B）	90分钟	USA300	Cooney 1993表征的操纵子结构
sai-1（seg 7个表面蛋白）。也被称为 *isdA*	29 kd细胞表面蛋白；血红素转运蛋白；	Wiltshire 2001	血清中为50倍；血液中为24倍。来自同一操纵子的IsdB在血清中上调240倍，在血液中上调140倍	16小时（O/N电镀试验）	8325-4	血清琼脂和溶液相试验，独立的pubs。Wiltshire 2001和Malachowa 2011，血清足以诱导，
leuA	苹果酸盐2-异丙酸合酶	Malachowa 2011	在TSB中下调6倍；在血清中上调15倍；在血液中的上调12倍	30分钟到120分钟	USA300	在TSB中下调但在血清中呈倍数上调的有吸引力的b/c可能是不够的

[0473]

SAUSA300_0119	鸟氨酸环脱氨酶家族蛋白	Malachowa 2011	在血清中 50 倍上调，在血液中为 27 倍；与 TSB 中的时间 0 相比，TSB 中没有上调	30 分钟到 120 分钟	USA300	与上述不同的基因类别，并且在 TSB 中似乎也受到严格的调节
lrgA	胞壁质水解酶转运蛋白	Malachowa 2011	在 TSB 中下调 3.3 倍；在血清中上调 12 倍；在血液中的上调 17 倍	30 分钟到 120 分钟	USA300	有吸引力的 b/c 在 TSB 中被下调
bioA	腺苷甲硫氨酸-8-氨基-7-氧壬酸氨基转移酶	Malachowa 2011	在血清中上调 107 倍；在血液中上调 56 倍；在 TSB 中没有调节	30 分钟到 120 分钟	USA300	有吸引力的 b/c 非常强烈的上调和鲜为人知的代谢基因

[0474] 每个操纵子中的完整基因和菌株BioPlx-01的侧翼序列均从Genbank获得,并根据文献和已知的基序识别算法进行注释。已经通过已发表的实验和预测工具的组合对转录终止子进行了鉴定。

[0475] 研究了血清响应性启动子在TSB(或类似的培养基)中的表达的其它文献证据。例如,在Ythier等人,2012,《分子与细胞蛋白质组学(Molecular&Cellular Proteomics)》,11:1123-1139,2012中公开了spa基因和isdA基因。在Dale等人,2004《细菌学杂志》186(24)8356-8362中公开了sirA基因。在Morrissey等人2000年公开了sst基因。在Flack等人2014,《美国国家科学院院刊(PNAS)》E2037-E2045中公开了hlgA基因。www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1322125111。在Lei等人2015,《毒力(Virulence)》6:1,75-84中公开了leuA基因。

[0476] 由于这些数据来自许多不同的菌株和实验系统,因此可以通过使用实时PCR进行定量基因表达测量,从而评估整个集合在单个标准化测定系统中的表达。重要的是,基因表达(当细胞未暴露于血液或血清时观察到的表达,例如,在TSB中观察到的表达)的基础“泄漏”水平应非常低,因为在与血清接触前产生毒素会过早地杀死/削弱BioPlx-XX菌株(包括杀灭开关的合成微生物)。即使是中等程度的细胞健康损害也是不可接受的,因为:1)KS中的逃逸突变会累积(KS不稳定性)—必须避免的已知现象,和/或2)观察到的BioPlx-01的天然功效可能会降低或丧失。因此,在选择最佳RR以驱动KS时,可以测量并仔细考虑基线表达的绝对水平和血清中的倍数变化。要注意的是,leuA在TSB中被下调(6倍)并在血清中被上调(15倍),这使其RR成为控制KS表达的特别受关注的候选者。

[0477] 在一些实施例中,具有杀灭开关的合成微生物可以进一步包括“表达钳”,其中KS盒不仅含有驱动毒素表达的血清响应性RR,而且还在启动子的控制下编码“翻译阻断”RNA抗毒素,所述启动子通常在定植期间在皮肤或鼻粘膜上具有活性。杀灭开关可以编码能够抑制细胞死亡毒素基因的负面影响的抗毒素。

[0478] 在一些实施例中,合成微生物是具有包括杀灭开关的分子修饰的金黄色葡萄球菌,所述分子修饰进一步包括“表达夹”,其中KS盒不仅含有驱动毒素表达的血清响应性RR,

而且还在金黄色葡萄球菌启动子(P_{clfB}等)的控制下编码“翻译阻断”RNA抗毒素,所述启动子通常在定植期间在皮肤上具有活性,例如,如表7所示。

[0479] 从表6中列出的启动子加上实时PCR数据,可以选择具有低基础表达与对血清/血液的高响应的最佳组合的两个或更多个RR来驱动KS表达。如本文所述,可以将这些RR与3个不同的KS基因配对,从而产生一组用于测试的KS候选菌株。所述组将包含“表达钳”候选者,如下所述。

[0480] 当KS菌株位于皮肤或鼻腔上皮上时,表达钳阻断毒素表达

[0481] 合成微生物可以包括表达钳。表7中示出了参与人鼻孔的金黄色葡萄球菌定植的基因,所述基因可以用作表达钳中的第二启动子,当所述菌株定植在皮肤或粘膜环境中时,所述表达钳进一步包括抗毒素基因以阻断泄漏的毒素表达。所述第二启动子可以是组成型启动子,如管家基因。所述第二启动子或可以优选地在存在血液或血清的情况下被下调。

[0482] 表7.参与人鼻孔的金黄色葡萄球菌定植的基因

[0483]

基因	已知或假定的作用	参考	注释
clfB（聚集因子 B）（ClfB）	粘附性	Wertheim HF、Walsh 2008；以及 Burian 2010	体内比 Gyr 高 10 倍；与 gyr 在体外的表达相同。在啮齿动物模型和人类中的表达对于鼻腔定植也很重要。其在体外以指数期表达。基因在人血清中被下调了 3 倍（Malachowa 2011）
自溶素（*sceD*）（外蛋白 D）	溶菌糖基转移酶	Stapleton MR、Horsburgh MJ 2007	在体外以指数期表达
walKR（毒力调节子）	至关重要的主要毒力调节子	Burian 2010	在零处和 1 年处的体内表达与 *gyrA* 相当
atlA（主要自溶素）	主要自溶素；双功能肽聚糖水解酶	Burian 2010	与 walKR 具有相似的特征，但表达更高（比 *gyr* 高 5 倍）
oatA（O-乙酰基转移酶 A）	肽聚糖的 O-乙酰化；使金黄色葡萄球菌细胞对溶菌酶具有抗性	Burian 2010	类似于 WalKR

[0484] 在一些实施例中,提供一种具有分子修饰的合成微生物,所述分子修饰包括杀灭开关,并且进一步包括表达钳,所述表达钳包括由第二启动子驱动的抗毒素基因,所述第二启动子通常在定植期间在皮肤或鼻粘膜上具有活性,任选地,其中所述第二启动子选自表7所示的基因,所述基因选自或衍生自聚集因子B(clfB)、自溶素(sceD;外蛋白D)、walKR(毒力调节子)、atlA(主要自溶素)和oatA(O-乙酰基转移酶A)。可替换地,组成型第二启动子可以选自或衍生自管家基因,例如gyrB、sigB或rho,任选地,其中所述第二启动子包括SEQ ID NO:324、325或326各自的核苷酸序列,或基本上相同的序列。

[0485] 用于表达钳的第二启动子可以选自在目标微生物中鉴定的基因,所述基因已被识别为在暴露于血液或血清时被下调。

[0486] 用于表达钳分子修饰的第二启动子应该是组成型启动子,其优选地在一段时间后(例如,15分钟后、30分钟后、45分钟后、90分钟后、120分钟后、180分钟后、240分钟后、360分钟后或介于这之间的任何时间点后)当暴露于血液或血清时被下调,从而使得与在不存在

血液或血清的情况下的转录和/或表达相比,细胞死亡基因的转录和/或表达降低至少2倍、3倍、4倍、5倍或至少10倍。

[0487] 可以通过以下方法选择第二启动子:选择目标微生物;在目标微生物中选择一个或多个第二启动子候选基因;在培养基中生长所述微生物;在t=0分钟处,将血清或血液添加到培养基中;在t=n分钟(n=1-240分钟或更长、15-180分钟或30-120分钟)处获得样品;对样品进行RNA测序;并比较候选第一启动子基因暴露于血液或血清后的t=0分钟和t=n分钟时获得的样品中的候选第一启动子的RNA测序读数。可替换地,在没有血液或血清的培养基中,针对候选第二启动子,可以将在暴露于血液或血清之后t=n分钟之后获得的样品与t=n分钟处的样品进行比较。候选第二启动子可以选自这样的启动子:当与t=0时靶细胞中的候选启动子比较时,或与在没有血清或血液的培养基中t=n时靶细胞中的候选启动子比较时,所述启动子在血液或血清中在t=n分钟处的靶细胞生长后通过RNA测序表现出下调。

[0488] 第二启动子可以选自或衍生自本文鉴定的启动子候选基因,所述启动子候选基因可能用于金黄色葡萄球菌502a的表达钳中,如通过RNA测序所确定,与t=0相比,发现所述启动子候选基因在暴露于血清中30分钟后至少被下调了2倍,所述启动子候选基因包含磷酸核糖基甘氨酰胺甲酰基转移酶基因CH52_00525(-4.30倍)、磷酸核糖基氨基咪唑合成酶基因CH52_00530(-4.27倍)、酰胺基磷酸核糖基转移酶基因CH52_00535(-4.13倍)、磷酸核糖基-甲酰基甘氨酰胺合酶基因CH52_00540(-4.04倍)、磷酸核糖基甲酰基甘氨酰胺合酶基因CH52_00545(-3.49倍)、磷酸核糖基氨基咪唑-琥珀酰胺基因CH52_00555(-3.34倍)、海藻糖渗透酶IIC基因CH52_03480(-3.33倍)、DeoR家族转录调节基因CH52_02275(-2.55倍)、磷酸果糖激酶基因CH52_02270(-2.46倍)和PTS果糖转运蛋白亚基IIC基因CH52_02265(-2.04倍)。

[0489] 第二启动子可以选自或衍生自磷酸核糖基甘氨酰胺甲酰基转移酶基因CH52_00525、海藻糖渗透酶IIC基因CH52_03480、DeoR家族转录调节基因CH52_02275、磷酸果糖激酶基因CH52_02270或PTS果糖转运蛋白亚基IIC基因CH52_02265。

[0490] 第二启动子可以是P_{clfB}(聚集因子B)基因;任选地,其中所述第二启动子包括SEQ ID NO:7、117、118、129或130的核苷酸序列,或基本上相同的序列。

[0491] 在一个特定的实例中,KS构建体之一(sprA1)配备有表达钳,所述表达钳包括由聚集因子B(clfB)启动子驱动的抗毒素($sprA1_{AS}$)。该启动子是驱动钳位的一种选择,因为其在TSB中以及在鼻腔/皮肤定植期间强烈表达(比丰富的管家基因gyrA高10倍)(Burian 2010)。这分别与产物的制造和使用直接相关。聚集因子B(clfB)启动子在血液中也被下调了3倍(Malachowa 2011),这有利于钳位无活性。可能不需要在血液中完全无活性,因为在血液中如此强烈地激活了血清响应性启动子的驱动。

[0492] 聚集因子B(clfB)启动子在人类鼻部定植期间也至少在12个月内稳定表达,并且在啮齿动物和体外定植模型中也得到了鉴定(Burian 2010)。

[0493] 在表达钳的一个实例中,在确认TSB中的强表达以及在血液或血清中较低的表达水平(实时PCR)后,选择clfB作为组成型启动子以用于表达钳中,从而确定其在靶菌株金黄色葡萄球菌502a中的特性。克隆clfB调节区以驱动sprA1反义(抗毒素)RNA(参见表3,第一个条目)的表达,并将盒整合到与用于由血清响应性启动子表达sprA1毒素基因的表达穿梭

载体相同的表达穿梭载体中。令人期望的是,血清/血液暴露可以强烈地激活毒素而不激活抗毒素,而TSB或皮肤/鼻腔上皮暴露可以激活抗毒素而不激活毒素。这个概念可以应用于下表3中的其它KS基因。使用钳位的另一种可能性是限制性酶KpnI(毒素)方法,其抗毒素可能是RNA适体,所述RNA适体最近被开发为该酶的强效抑制剂(Mondragon,2015),作为赋予所述适体代谢稳定性的一种手段。

[0494] 意识到渗漏表达并不能解决问题,并且现实是,在不存在特异性诱导的情况下,即使广泛使用的"严格控制"的变位启动子(如P_{CUP1}和P_{Gal7}和P_{Tet}-on/off变体)也会产生可测量的mRNA转录。

[0495] 表达钳包括与抗毒素基因可操作地连接的第二启动子。例如,为了有效果,抗毒素基因对杀灭开关中的细胞死亡毒素基因具有特异性。在正常的生理状况下,表达钳可防止细胞死亡基因的泄漏表达。当暴露于血液或血清中时,与抗毒素可操作地连接的第二启动子被下调,从而表达细胞死亡基因。

[0496] 合成微生物可以含有表达钳,所述表达钳包括对沉默细胞死亡基因具有特异性的抗毒素基因。抗毒素可以选自或衍生自本领域已知的对杀灭开关分子修饰中的细胞死亡基因具有特异性的任何抗毒素。抗毒素基因可以编码对细胞死亡基因具有特异性的反义RNA或对细胞死亡基因具有特异性的抗毒素蛋白。

[0497] 抗毒素基因可以是sprA1抗毒素基因或sprA1(AS)。sprA1抗毒素基因可以包括TATAATTGAGATAACGAAAATAAGTATTTACTTATACACCAATCCC CTCACTATTTGCGGTAGTGAGGGGATTT(SEQ ID NO:311)的核苷酸序列或基本上相同的序列,或CCCCTCACTACCGCAAATAGTGAGGGGATTGGTGTA TAAGTAAATACTTATTTTCGTTGT(SEQ ID NO:273)的核苷酸序列或基本上相同的序列。

[0498] 抗毒素基因可以是sprA2抗毒素或sprA2(AS),并且可以包括TATAATTAATTACATAATAAATTGAACATCTAAATACACCAAATCCCCTCACT ACTGCCATAGTGAGGGGATTTATT(SEQ ID NO:306)的核苷酸序列或基本上相同的序列;或TATAATTAATTACATAATAAATTGAACATCTAAATACACCAAATCCCCTCACTACTGCCATAGTGAGGGGATTTATTTAGGTGTTGGTTA(SEQ ID NO:312)的核苷酸序列或基本上相同的序列。

[0499] 抗毒素基因可以是sprG抗毒素基因(也被称为sprF),并且可以包括(5'-3')ATATATAGAAAAAGGGCAACATGCGCAAACATGTTACCCTAATGAGCCCGT TAAAAAGACGGTGGCTATTTTAGATTAAAGATTAAATTAATAACCATTTAAC CATCGAAACCAGCCAAAGTTAGCGATGGTTATTTTTT(SEQ ID NO:307)的核苷酸序列或基本上相同的序列。Pinel-Marie、Marie-Laure、Régine Brielle和Brice Felden。"在反义调节下,编码双重毒性肽的金黄色葡萄球菌RNA不平等地靶向宿主细胞和细菌竞争对手(Dual toxic-peptide-coding Staphylococcus aureus RNAunder antisense regulation targets host cells and bacterial rivals unequally.)"《细胞报告(Cell reports)》7.2(2014):424-435。

[0500] 抗毒素基因可以是对沉默yoeB毒素基因具有特异性的yefM抗毒素基因。yefM抗毒素基因可以包括MIITSPTEARKDFYQLLKNVNNNHEPIYISGNNAE NNAVIIGLEDWKSIQETIYLESTGTMDKVREREKDNSGTTNIDDIDWDNL(SEQ ID NO:314)的核苷酸序列或基本上相同的核苷酸。

[0501] 抗毒素基因可以是对溶葡萄球菌素毒素基因具有特异性的溶葡萄球菌素抗毒素基因。溶葡萄球菌素抗毒素可以包括TATAATTGAGATATGTTCATGTGT TATTTACTTATACACCAATCCCCTCACTATTTGCGGTAGTGAGGGGATTTTT(SEQ ID NO:319)的核苷酸序列或基本上相同的核苷

酸序列。

[0502] 抗毒素基因可以是靶向mazF的mazE抗毒素基因。mazE毒素基因可以包括ATGTTATCTTTTAGTCAAAATAGAAGTCATAGCTTAGAACAATCTTTAAAAGAAGGATATTCACAAATGGCTGATTTAAATCTCTCCCTAGCGAACGAAGCTTTTCCGATAGAGTGTGAAGCATGCGATTGCAACGAAACATATTTATCTTCTAATTC(SEQ ID NO:322)的核苷酸序列或基本上相同的序列。

[0503] 可替换地,可以如下设计抗毒素基因。在金黄色葡萄球菌中,存在两种主要的用于基因沉默的方法。在一种类型的基因沉默中,以sprA1为例,反义RNA与目标基因的5'UTR结合,从而阻断基因的翻译并导致mRNA的过早降解。基因沉默的另一种类型用于不具有定位在终止密码子附近的转录终止子的基因。可以通过与目标基因3'端互补(约3-10个碱基)的反义RNA来控制这些基因的翻译。反义RNA将结合覆盖编码最后一对密码子的序列并产生双链RNA的mRNA转录本,然后靶向所述双链RNA以进行RNaseIII降解。

[0504] 由于金黄色葡萄球菌中存在RNA沉默的许多实例(这些实例已被证实具有控制其靶基因的能力),因此这些区域和序列可以用作设计毒素/抗毒素盒的基础。这种方法只需要DNA序列的微小变化即可。

[0505] 在本公开中,可以将细胞死亡基因的抗毒素设计为涉及与靶基因的5'UTR的反义结合。可以将毒素基因插入PepA1阅读框中,并将内源性sprA1反义中的12bp换成与朝向异源毒素基因开始处的12bp同源的序列。

[0506] 在一个实例中,插入到sprA1位置中的Holin可以由反义RNA片段控制,所述反义RNA片段由(粗体的12bp Holin靶向序列)= TATA ATTGAGAT **AGTTTCATTAGC**TATTTACTTATACACCAATCCCCTCACTATTTGCGGTAGT

[0507] GA GGGGATTTTT(SEQ ID NO: 308)编码。

[0508] 在另一个实例中,插入到sprA1位置中的187-lysK可以由反义RNA片段控制,所述反义RNA片段由(粗体的12bp 187-lysK靶向序列)=TATAATTGAGAT **TTTAGGCAGTGC** TATTTACTTATACACCAA TCCCCTCA CTATTTGCGGT

[0509] AGTGAGGGGATTTTT(SEQ ID NO: 309)编码。

[0510] 对细胞死亡基因具有特异性的抗毒素可以涉及与毒素基因的3'UTR的反义结合。所述方法涉及在金黄色葡萄球菌的基因组中将异源毒素插入sprG的位置,并在最终的终止密码子之前添加另外的赖氨酸密码子(AAA)。编码区的最后6个碱基(AAAAAA)加上终止密码子(TAA)与内源性sprF抗毒素的3'区重叠。当sprF RNA的转录速率比异源性毒素基因高2.5倍时,其将与毒素转录本的3'UTR区形成双链体,从而开始RNaseIII的降解并阻止功能性肽的形成。由于两种异源性毒素的3'端以相同的方式被操纵,以与sprF序列重叠(在TAA终止密码子前面添加AAA密码子)—这也与内源性sprG的3'端相同,因此所有这三个毒素基因的抗毒素序列都将保持相同。例如,sprG抗毒素基因(sprF)可以包括核苷酸序列ATATATAGAAAAAGGGCAACATGCGCAAACATGTTACCCTAATGAGCCCGTTAAAAAGACGGTGGCTATTTTAGATTAAAGATTAAATTAATAACCATTTAACCATCGAAACCAGCCAAAGTTAGCGATGGTTATTTTTT(SEQ ID NO:310)。

[0511] 抗毒素基因可以包括选自SEQ ID NO:273、306、307、308、309、310、311、312、314、319或322中的任一个的核苷酸序列,或其基本上相同的序列。

[0512] 抗毒素基因可以编码或可以不编码抗毒素肽。其中合成微生物衍生自金黄色葡萄

球菌菌株,抗毒素肽可以对细胞死亡基因编码的毒素肽具有特异性。例如,当毒素基因是yoeB毒素基因(例如,编码包括SEQ ID NO:316的氨基酸序列的毒素肽)时,抗毒素基因可以编码yefM抗毒素蛋白,所述yefM抗毒素蛋白包括MIITSPTEARKDFYQLLKNVNNNHEPIYISGNNAENNA VIIGLEDWKSIQETIYLESTGTMDKVREREKDNSGTTNIDDIDWDNL(SEQ ID NO:314)的氨基酸序列或基本相似的序列。作为另一个实例,其中抗毒素基因是mazF毒素基因(例如,编码包括SEQ ID NO:321的氨基酸序列的毒素肽),抗毒素基因可以是mazE抗毒素基因(例如,编码包括MLSFSQNRSHSLEQSLKEGYSQMADLNLSLANEAFPIECEACDCNETYLSSNS TNE(SEQ ID NO:323)的氨基酸序列或基本相似的序列的抗毒素蛋白)。

[0513] 选择三个特别受关注的KS候选基因,因为其以3种不同的方式引起细胞死亡。在一些实施例中,合成微生物包括sprA1、kpnI或rsaE中的一个或多个、两个或更多个或每一个,以达到早期数据指示的最大死亡率。sprA1的作用机制是通过成孔肽的表达使质膜完整性/功能丧失。kpnI的作用机制涉及用限制性酶破坏金黄色葡萄球菌基因组。rsaE的作用机制涉及中枢代谢受损,包含TCA循环和四氢叶酸生物合成。

[0514] 在一些实施例中,合成微生物包括调节区,所述调节区包括可操作地连接至细胞死亡基因的第一启动子,其中所述细胞死亡基因编码毒素肽或蛋白质,并且其中所述第一启动子在暴露于血液或血清时被上调。细胞死亡基因可以是sprA1基因。sprA1编码毒素肽PepA1,如以下文献所述:Sayed等人,2012《生物化学杂志(JBC)》第287卷,第52号,第43454-43463页,2012年12月21日。PepA1通过膜透化作用诱导细胞死亡。PepA1具有氨基酸序列:MLIFVHIIAPVISGCAIAFFSYWLSRRNTK SEQ ID NO:104。相关的抗微生物肽包含MMLIFVHIIAPVISGCAIAFFSYWLSRRNTK(SEQ ID NO:105)、AIAFFSYWLSRRNTK(SEQ ID NO:106)、IAFFSYWLSRRNTK(SEQ ID NO:107)、AFFSYWLSRRNTK(SEQ ID NO:108)、FFSYWLSRRNTK(SEQ ID NO:109)、FSYWLSRRNTK(SEQ ID NO:110)、SYWLSRRNTK(SEQ ID NO:111)或YWLSRRNTK(SEQ ID NO:112),如WO 2013/050590中所述,其通过引用并入本文。细胞死亡基因可以是sprA2基因。sprA2基因可以编码毒素MFNLLINIMTSALSGCLVAFFAHWLRTRNNKKGDK(SEQ ID NO:305)。细胞死亡基因可以是金黄色葡萄球菌yoeB基因,其可以编码yoeB毒素,所述yoeB毒素具有MSNYTVKIKNSAKSDLRKIKHSYLKKSFLEIVETLKND PYKITQSFEKLEPKYLERYSRRINHQHRVVYTVDDRNKEVLILSAWSHYD(SEQ ID NO:316)的氨基酸序列或基本相似的序列。细胞死亡基因可以是模仿葡萄球菌基因,其可以编码金属肽酶毒素基因,所述金属肽酶毒素基因具有MTHEHSAQWLNNYKKGYGYGPYPLGINGGMHYGVDFFMNIGTPVKAISSGKIVEAGWSNYGGGNQIGLIENDGVHRQWYMHLSKYNVKVGDYVKAGQIIGWSGSTGYSTAPHLHFQRMVNSFSNSTAQDPMPFLKSAGYGKAGGTVTPTPNTGWKTNKYGTLYKSESASFTPNTDIITRTTGPFRSMPQSGVLKAGQTIHYDEVMKQDGHVWVGYTGNSGQRIYLPVRTWNKSTNTLGVLWGTIK(SEQ ID NO:318)的氨基酸序列或基本相似的序列。细胞死亡基因可以是mazF毒素基因,其可以编码mazF毒素,所述mazF毒素包括MIRRGDVYLADLSPVQGSEQGGVRPVVIIQNDTGNKYSPTVIVAAITGRINKA KIPTHVEIEKKKYKLDKDSVILLEQIRTLDKKRLKEKLTYLSDDKMKEVDNAL MISLGLNAVAHQKN(SEQ ID NO:321)的氨基酸序列或基本相似的序列。

[0515] 细胞死亡基因可以编码毒素肽或蛋白,所述毒素肽或蛋白包括SEQ ID NO:104、105、106、107、108、109、110、111、112、285、287、289、291、305、316、318或321的氨基酸序列,或基本相似的氨基酸序列。优选地,在不存在血液或血清的情况下,第一启动子是沉默的、不活跃的或最低活跃的。

[0516] PepA1是有毒的成孔肽,其通过改变基本的细胞膜功能而引起金黄色葡萄球菌死亡。PepA1的天然作用是未知的,但据推测是通过杀死受环境状况不利影响的细胞而对金黄色葡萄球菌种群/培养物提供有利帮助。通过过表达该基因,在存在血清的情况下发生快速且完全的细胞死亡。值得注意的是,sprA1 mRNA翻译由被称为sprA11(SprA1反义)的反义RNA抑制。如WO 2013/050590中所述,顺式编码的$SprAl_{AS}$ RNA在体内反式操作,以下调sprA1编码的肽表达,所述专利通过引用并入本文。实际上,反义RNA可以是使"渗漏"毒性最小化的方便的保护剂。其将由定植期间在人皮肤和鼻腔上皮上的金黄色葡萄球菌中表达的启动子驱动。sprA1的优点包含表达具有已知结构和活性的小肽。

[0517] 在一个特定的实施例中,提供了一种合成微生物,其包括可操作地连接至包括血液和/或血清诱导型第一启动子的第一调节区的第一细胞死亡基因sprA1,所述第一启动子包括SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、114、115、119、120、121、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162或163中任一个的核苷酸序列。在血液或血清中孵育15分钟、30分钟、45分钟、60分钟、90分钟、120分钟、180分钟或240分钟后,第一启动子可能被上调了5倍以上、10倍以上、50倍以上、100倍以上、300倍以上或600倍以上。在血清中孵育90分钟后,第一启动子可能被上调了5倍以上,并且可以选自fhuA、fhuB、isdI、isdA、srtB、isdG、sbnE、sbnA、sbnC和isdB。在血清中孵育90分钟后,第一启动子可能被上调了100倍以上,并且可以选自isdA、srtB、isdG、sbnE、sbnA、sbnC和isdB。

[0518] 细胞死亡基因可以编码抗微生物肽,所述抗微生物肽包括SEQ ID NO:104、105、106、107、108、109、110、111、112、285、287、289、291、305、316、318或321的氨基酸序列或其基本相似的氨基酸序列。

[0519] 细胞死亡基因可以选自任何已知的葡萄球菌毒素基因。细胞死亡基因可以选自sprA1毒素基因、sprA2毒素基因、187-lysK毒素基因、holin毒素基因、sprG毒素基因、yoeB毒素基因、溶葡萄球菌素毒素基因、金属肽酶毒素基因或mazF毒素基因,或基本上相同的毒素基因。毒素基因可以包括SEQ ID NO:274、275、284、286、288、290、304、315、317或320的核苷酸序列,或其基本上相同的核苷酸序列。

[0520] 细胞死亡基因可以是编码抗微生物肽PepA1的sprA1。在一些实施例中,合成微生物进一步包括可操作地连接至包括第二启动子的第二调节区的抗毒素基因SprA1-AS,所述第二启动子包括clfB的核苷酸序列,所述clfB的核苷酸序列包括SEQ ID NO:7、117、118、129或130的核苷酸序列,或基本上相同的序列。

[0521] 在一些实施例中,合成微生物包括限制性酶KpnI(肺炎克氏杆菌)基因。KpnI保护细菌基因组免受外来DNA的入侵。(例如)6-bp识别限制性酶KpnI的高水平表达将有效地切割金黄色葡萄球菌基因组。在一些实施例中,通过(例如)调节密码子使用,将表达载体(如下)设计成缺乏切割识别位点。6个碱基的识别序列每4096bp发生一次,从而将2.8MB的金黄色葡萄球菌基因组切割成约684个片段。KpnI具有快速活性的优势。在一些实施例中,可以通过将RNA适体表达为如上文针对sprA1所述的钳位来处理"泄漏"表达问题。

[0522] 在一些实施例中,合成微生物包括rsaE基因。rsaE基因是一个小RNA(93nt),其通过靶向编码THF生物合成途径和柠檬酸循环酶的管家mRNA的翻译起始,来抑制2种不同的代谢途径;高水平的表达是有毒的。通过过度表达RseE,由于对基本管家酶的抑制而导致生长

障碍。这是通过与核糖体结合位点和起始密码子区域中的Opp3A和OppB mRNA结合从而阻止翻译而发生的。这两个基因都编码ABC肽转运系统的组分,并影响细胞中基本的氮/氨基酸的供应,从而直接或间接损害中枢生化代谢。优点包含严重的生长抑制(比空载体对照大10,000倍)和有效的多功能性,因为单个sRNA会削弱多个基本生化途径的表达。Geissman等人2009和Bohn等人2010《关于RsaE天然功能的报告(report on the natural function of RsaE)》。

[0523] 创建一组用于在金黄色葡萄球菌中表达的血清活化的杀灭开关(KS)质粒候选者,其中将血清响应性RR亚克隆到金黄色葡萄球菌穿梭载体中;将细胞死亡基因插入RR的下游,并进行测序;测试泄漏表达抑制子"表达钳"的可行性;并且完成并评估候选菌株,以选择表现出快速且完全的死亡以及良好的基线生存能力的一个或多个主要候选菌株。

[0524] 最佳杀灭开关候选者的染色体整合对于长期稳定表达是重要的。另外,进行了菌株的死亡率范围和稳定性的比较。单独插入多达3个最佳杀灭开关盒,并以两种菌株的3个组合形式插入,总共插入6个菌株。插入的完成可能需要在大肠杆菌中进行多步克隆以构建构建体。例如,可以使用大肠杆菌菌株DC10B。DC10B是仅DCM-的大肠杆菌菌株(BEI产品编号NR-49804)。这是产生可轻易转染到大多数金黄色葡萄球菌菌株中的DNA的一种方法。为此,获得稳定的整合体,并在反向选择过程中切下质粒载体。确定并表征了血清诱导的细胞死亡的速率和程度,并确定了所有6个菌株的遗传稳定性。对优选的KS候选菌株进行了非人类功能测试,包含体内菌株死亡的功能测试;以及定植皮肤椎间盘的功能测试。

[0525] 在一些实施例中,提供了一种用于由BioPlx-01制备合成的金黄色葡萄球菌菌株的方法,所述方法包括(1)在大肠杆菌中规模产生穿梭载体pCN51;(2)在Cd-诱导型启动子P_{cad}之下将细胞死亡基因克隆到大肠杆菌中的pCN51中;(3)用血清响应性启动子替换P_{cad},并任选地插入表达夹;(4)通过对KS盒进行测序来验证构建体;(5)电穿孔进入金黄色葡萄球菌RN4220,并在红霉素板上选择转化株(此菌株为限制性-,并产生正确的甲基化模式以在BioPlx-01中存活);(6)由RN4220制备质粒并进行限制性消化以确认鉴定;(7)将质粒电穿孔到BioPlx-01中,并在红霉素板上选择;以及(8)分离菌株。以这种方式产生的菌株可用于性能测试和血清实验。所述方法在本文中进一步详细描述。

[0526] 在一些实施例中,提供了一种用于对来自BioPlx-01的合成金黄色葡萄球菌菌株进行性能测试的方法,所述方法包括(1)在TSB加抗生素中生长,作为对质粒的选择性压力;(2)将生长与WT BioPlx-01的生长进行比较,任选地产生一条生长曲线;(3a)对于Cd-启动子变体,将细胞清洗并转移至Cd-培养基(对照是BioPlx-01,其含有无细胞死亡基因的空载体)-或-(3b)对于KS变体,将细胞清洗并转移至血清(对照是WT BioPlx-01,其含有无细胞死亡基因的空载体);以及(4)使用$OD_{630\ nm}$用酶标仪监测生长情况,任选地延长时间以监测逃逸突变体。对于全血测试,所述方法仅在优选的候选者上执行,并使用TSA上的菌落形成单位(CFU)作为死亡读出。如果在暴露于血液的携带杀灭开关的菌株上形成菌落,则应对质粒进行测序以检查突变。如果存在逃逸突变体,则将质粒穿梭到大肠杆菌中并测序整个质粒。

[0527] 用于产生在金黄色葡萄球菌(SA)中表达的血清活化的杀灭开关(KS)质粒候选者的方法

[0528] 提供了用于评估细胞死亡诱导的方法,所述方法包括合成微生物的重组构建,所

述重组构建包括将基因克隆到大肠杆菌-SA穿梭载体中并将所述载体转染到BioPlx-01中以进行评估。

[0529] 步骤1:请求穿梭载体PCN51

[0530] 获得市售的穿梭载体,如PCN51(可通过BEI获得)是一个很好的选择,因为其含有:i)镉诱导型启动子,所述镉诱导型启动子可用于阳性对照菌株以证明毒素被表达并具有功能;ii)适用于所有结构的通用转录终止子(TT);以及iii)成熟的大肠杆菌和金黄色葡萄球菌复制子。可商购的穿梭载体pCN51(BEI目录号NR-46149)的示意图在图2中示出。表8示出了pCN51穿梭质粒的遗传元件。

[0531] 表8.pCN51穿梭载体的元件

[0532]

穿梭质粒 pCN51（BEI 目录号 NR-46149）	
元件	目的
pT181cop-WT repC	SA 复制机制
ermC	红霉素抗性
Amp	β-内酰胺酶；在大肠杆菌中赋予对氨苄西林的抗药性
ColE1 Ori	大肠杆菌的复制起点
Pcad-cadC	镉诱导型启动子
MCS（黑匣子）	多克隆位点；用于克隆 KS 的独特位点。
TT	blaZ 转录终止子

[0533] 发育中使用的启动子序列(7)如下所示,leuA、hlgA和镉启动子中的碱基对编号对应于pCN51载体位置。

[0534] 1.从基因组BioPlx-01(502a)DNA扩增的限制性位点SphI与PstI之间的leuA启动子(P_{leuA})序列(带下划线)。

[0535]
```
                                          SphI
                                          GCATGCGAAA CAGATTATCT
5501 ATTCAAAGTT AATTGTAAGA AAATTTAAAA TATTTGTTGA CATACTAAAG
5551 CAGATATAGT AAATTAAATT TATCAAATTT TTAGACAATT CTAACTATTA
5601 AAGTGATATA TACCATTCAC GGAAGGAGTA TAATAAAATG CTTAATCAAT
5651 ATACTGAACA TCAACCGACA ACTTCAAATA TTATTATTTT ATTATACTCT
5701 TTAGGACTCG AACGTTAGTA AATATTTACT AAACGCTTTA AGTCCTATTT
5751 CTGTTTGAAT GGGACTTGTA AACGTCCCAA TAATATTGGG ACGTTTTTTT
5801 ATGTTTTATC TTTCAATTAC TTATTTTTAT TACTATAAAA CATGATTAAT
5851 CATTAAAATT TACGGGGGAA TTTACTCTGC AG SEQ ID NO:114
                                  Pst1
```

[0536] 2.从基因组BioPlx-01(502a)DNA扩增的限制性位点SphI与PstI之间的hlgA启动子(P_{hlgA})序列。

[0537]
```
                                        SphI
                                          GCATGC AAACTATTGC
5501 GAAATCCATT CCTCTTCCAC TACAAGCACC ATAATTAAAC AACAATTCAA
5551 TAGAATAAGA CTTGCAAAAC ATAGTTATGT CGCTATATAA ACGCCTGCGA
5601 CCAATAAATC TTTTAAACAT AACATAATGC AAAAACATCA TTTAACAATG
5651 CTAAAAATGT CTCTTCAATA CATGTTGATA GTAATTAACT TTTAACGAAC
5701 AGTTAATTCG AAAACGCTTA CAAATGGATT ATTATATATA TGAACTTAAA
5751 ATTAAATAGA AAGAAAGTGA TTTCTCTGCA G SEQ ID NO: 115
                                  PstI
```

[0538]

[0539] 3.限制性位点SphI与PstI之间的镉启动子(P_{cad})序列。该启动子用于对照,并且是来自BEI Resources(https://www.beiresources.org/)的原始pCN51载体的一部分。

```
                                                  SphI
                                                  GCATGCGCAC TTATTCAAGT
        5501 GTATTTTTTA ATAAATTATT TTACTTATTG AAATGTATTA TTTTCTAATG
        5551 TCATACCCTG GTCAAAACCG TTCGTTTTTG AGACTAGAAT TTTATGCCCT
        5601 ACTTACTTCT TTTATTTTCA TTCAAATATT TGCTTGCATG ATGAGTCGAA
        5651 AATGGTTATA ATACACTCAA ATAAATATTT GAATGAAGAT GGGATGATAA
        5701 TATGAAAAAG AAAGATACTT GTGAAATTTT TTGTTATGAC GAAGAAAAGG
[0540]  5751 TTAATCGAAT ACAAGGGGAT TTACAAACAG TTGATATTTC TGGTGTTAGC
        5801 CAAATTTTAA AGGCTATTGC CGATGAAAAT AGAGCAAAAA TTACTTACGC
        5851 TCTGTGTCAG GATGAAGAGT TGTGTGTTTG TGATATAGCA AATATCTTAG
        5901 GTGTTACGAT AGCAAATGCA TCTCATCATT TACGTACGCT TTATAAGCAA
        5951 GGGGTGGTCA ACTTTAGAAA AGAAGGAAAA CTAGCTTTAT ATTCTTTAGG
        6001 TGATGAACAT ATCAGGCAGA TAATGATGAT CGCCCTAGCA CATAAGAAAG
        6051 AAGTGAAGGT CAATGTCTGA ACCTGCAG SEQ ID NO: 116
                                    PstI
```

[0541] 4.用于驱动反义调节RNA$sprA1_{AS}$的clfB启动子(P_{clfB})。其是带有EcoRI位点和BamHI位点的正向序列。将该序列反向,以驱动$sprA1_{AS}$潜在地充当钳位,从而在不存在血液的情况下保持sprAI基因的调节。带下划线的分别代表EcoRI位点和BamHI位点。

[0542] EcoRI

[0543] GAATTCAGGTGATGAAAAATTTAGAACTTCTAAGTTTTTGAAAAGTAAAAAATTTGTAATAGTGTAAAAATAGTATATTGATTTTTGCTAGTTAACAGAAAATTTTAAGTTATATAAATAGGAAGAAAACAAATTTTACGTAATTTTTTTCGAAAAGCAATTGATATAATTCTTATTTCATTATACAATTTAGACTAATCTAGAAATTGAAATGGAGTAATATTTGGATCCSEQ ID NO:117

[0544] 克隆到pCN51载体中的P_{clfB},其中EcoRI和BamHI反向。

[0545] BamHI

[0546] GGATCCAAATATTACTCCATTTCAATTTCTAGATTAGTCTAAATTGTATAATGAAATAAGAATTATATCAATTGCTTTTCGAAAAAAATTACGTAAAATTTGTTTTCTTCCTATTTATATAACTTAAAATTTTCTGTTAACTAGCAAAAATCAATATACTATTTTTACACTATTACAAATTTTTTACTTTTCAAAAACTTAGAAGTTCTAAATTTTTCATCACCTGAATTC

[0547] SEQ ID NO:118

[0548] 5.在NCBI 502a完整基因组中发现的sirA启动子(P_{sirA})。该序列取自sirA起始密码子上游的300个碱基对,如下划线所示。

[0549] ttagaaagatttacttttatatatgaagagactggattaaatacttttattgacgtaaaaattcacttttgaaccgttcaatatcttgccgattttatataacagctacaaataaaatataacagtttgattttacagcctcggtaaatcgtcttgacaaacaaaaattttgtgctatcacaacatttgcaacgtcttaacaagtcatctataaacatttctaaatatttaacattacttatgcgtcatttattgctaaaattattgtattaaaatatacatagaattgatgggatatcATG SEQ ID NO:119

[0550] 6.在NCBI 502a完整基因组中发现的sstA启动子(P_{sstA})。该序列取自sstA起始密码子上游的300个碱基对,如下划线所示。

[0551] acgaaaaattaattaacatcgcattgtttattactgcaactattacagcattggtagtggtgactgtt

ggaacattaccgttcttaggactagtaataccaaatattatttcaatttatcgaggtgatcatttgaaaaatgcta tccctcatacgatgatgttaggtgccatctttgtattattttctgatatagttggcagaattgttgtttatccata tgaaataaatattggtttaacaataggtgtatttggaacaatcattttccttatcttgcttatgaaaggtaggaaa aattATG SEQ ID NO:120

[0552] 7.isdA启动子(P_{isdA})。该序列取自来自NCBI 502a完整基因组的SstA起始位点上游的300个碱基对,如下划线所示。

[0553] CTATCTGCGGCATTTGCAGAATTACTGAATGTCGCGATGATGATAATTAACGCTAAAATCGTTGTATT AAAAACTTTTAAAATATTTTTCAAAACATAATCCTCCTTTTTATGATTGCTTTTAAGTCTTTAGTAAAATCATAAA TAATAATGATTATCATTGTCAATATTTATTTTATAATCAATTTATTATTGTTATACGGAAATAGATGTGCTAGTAT AATTGATAACCATTATCAATTGCAATGGTTAATCATCTCATATAACAACACATAATTTGTATCCTTAGGAGGAAAA CAACATG SEQ ID NO:121.

[0554] 在一些实施例中,提供了包括分子修饰的质粒、载体或合成微生物,所述分子修饰包括可操作地连接至诱导型血液或血清响应性第一启动子的细胞死亡基因,所述第一启动子包括选自由以下组成的组的核苷酸序列:SEQ ID NO:114、115、119、120、121、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162和163,或基本上相同的核苷酸序列。在一些实施例中,分子修饰进一步包括表达钳,所述表达钳包括与第二启动子可操作地连接的抗毒素基因,所述第二启动子包括选自SEQ ID NO:7、117、118、129或130的核苷酸序列。

[0555] 步骤2:将最佳的两种血清响应性RR克隆到穿梭载体(大肠杆菌宿主)中

[0556] 将候选的血清响应性RR克隆到穿梭载体(大肠杆菌宿主)中包括:(a)对来自BioPlx-01基因组DNA(gDNA)的最佳的两种优选血清响应性RR进行PCR扩增;(b)用pCN51中的这些RR片段替换镉诱导型启动子,从而创建两个新质粒(RR1和RR2);以及(3)选择大肠杆菌DH10B(或DH5α)中的克隆并对插入进行测序。

[0557] 下列KS基因获自金黄色葡萄球菌gDNA或通过从头合成获得:(i)sprA1/$sprA1_{AS}$:合成的;(ii)RsaE:金黄色葡萄球菌基因组DNA。以及(iii)KpnI:合成的。对于从gDNA扩增的基因,PCR引物与相关的限制性酶一起用于克隆。对于合成基因,克隆位点将被包含在合成中,并且在构建过程中将去除任何不期望的位点。例如,将从kpn1盒中去除KpnI位点,以防止自动消化。在质粒RR1和RR2中将KS基因插入血清响应性RR的下游,从而生成下面列出的所有构建体。在pCN51中将KS基因插入Cd-诱导型启动子的下游,从而创建阳性对照构建体。参见本文提供的可用于这些步骤的另外的相关序列和引物序列,例如,表2、3和4。对所有构建体的启动子和插入序列进行测序,以确保突变未在构建过程中积累

[0558] 待产生的质粒构建体的列表如下所示。除了2、4、8和11外,所有其它基因都将被转染到金黄色葡萄球菌中。

[0559] 1.Cd-诱导型启动子—sprA1

[0560] 2.Cd-诱导型启动子—反向取向sprA1

[0561] 3.血清响应性RR1—sprA1

[0562] 4.血清响应性RR1—反向取向sprA1

[0563] 5.血清响应性RR1—sprA1+P_{clfB}-$sprA1_{AS}$

[0564] 6.血清响应性RR2—sprA1

[0565] 7.血清响应性RR1—rsaE

[0566] 8.血清响应性RR1—rsaE-反向取向

[0567] 9.血清响应性RR2—rsaE

[0568] 10.血清响应性RR1—kpnI

[0569] 11.血清响应性RR1—kpnI反向取向

[0570] 12.血清响应性RR2—kpnI

[0571] 在该过程中正在产生反向取向的构建体,因为如果细胞死亡基因即使在生长培养基中也具有一定的基础毒性,则可能无法获得正向取向的构建体。除非易于以并排方式获得反向取向的构建体,否则这种负面结果不是结论性的。

[0572] 步骤3:将质粒转染到中间体金黄色葡萄球菌RN4220中(以获得正确的DNA甲基化模式)。无需转染反向取向的构建体;但是pCN51空载体的转染操作如下:

[0573] A.电穿孔进入RN4220中;

[0574] B.在含有红霉素的平板上选择转化株;以及

[0575] C.用限制性消化分离并确认质粒ID。

[0576] 步骤4:转染到BioPlx-01中

[0577] A.将来自步骤3C的电穿孔质粒插入感受态BioPlx-01中;

[0578] B.通过红霉素抗性选择转化株;以及

[0579] C.用限制性消化分离并确认质粒ID;保存9株菌种。

[0580] 步骤5:响应于血清和血液暴露,测试KS表达以及死亡程度和死亡率

[0581] A.在血液/血清暴露前后通过实时PCR对杀灭基因的表达进行定性测试。这将:i)确认菌株的构造;ii)将毒素产生的发作与死亡的发作相关联,并且iii)在KS的背景下确定启动子"渗漏性";

[0582] B.与TSB相比,血清/血液中的细胞死亡诱导曲线(CFU的杀灭程度和动力学);以及

[0583] C.含有空载体的BioPlx-01与带有KS质粒的BioPlx-01的简单生长速率比较。

[0584] 步骤6:测量KS突变的速率

[0585] 计数通过连续传代在几百代中在血清或血琼脂平板上和/或在含有液体培养基的血清中生长的菌落。确定突变率是否可以接受。据报道,KS基因的一个拷贝的功能性KS丢失率为10^{-6},而来自两个不同启动子的相同或不同的KS基因的两个拷贝的KS丢失率则低至10^{-10}(Knudsen 1995;《关于实际突变率测定结果的报告(reporting on actual mutation rate assay measurements)》)。

[0586] 步骤7:分析和解释

[0587] 最好的一种或多种KS菌株是这样的菌株:具有不受影响的生长速率(和定植潜力);并且响应于血液和/或血清而表现出快速且完全的死亡;并且具有稳定的分子修饰。

[0588] 步骤8:确定是否需要插入多个KS盒

[0589] 如果认为一种KS的分子稳定性不足,则将9种候选者列表中的第二种和不同的功能性KS(如果存在另一种功能性KS)添加到质粒中,并重新测试杀灭和稳定性。在Knudsen 1995和理论计算的基础上,预期KS稳定性将显著改善。

[0590] 用于长期稳定表达的最佳杀灭开关的染色体整合方法

[0591] 在已知可以耐受插入而不会显著改变细胞生物学的预先选择的位置处,将最佳的

一个或多个血清/血液响应性KS构建体精确地整合到染色体中。

[0592] 步骤1:获得用于金黄色葡萄球菌的整合载体。

[0593] 在仔细考虑最佳整合载体之后,可以使用质粒pKOR1或pIMAY,因为二者提供了选择整合位点的能力,从而避免了其它方法可能出现的对基因组生物学关键区域的干扰。两种载体都具有方便的反向选择(secY)手段,以便在整合KS后可以从基因组中切除质粒主链及其标志物。pKOR1的遗传图谱示于图5A中,并且特征描述于Bae等人2006《质粒(Plasmid)》55,第58-63页中,并在表9中进行了简要描述。pKOR的一个优势是能够克隆插入物而不受特定限制性酶的限制。

[0594] 表9.pKOR整合型质粒中的元件的目的

[0595]

整合型质粒 pKOR	
元件	目的
AmpR	β-内酰胺酶；在大肠杆菌（而非金黄色葡萄球菌）中赋予对氨苄西林的抗性
Ori (-)	大肠杆菌复制起点
Attp1 和 2	用 DNA 插入物的 AttB 元件进行的重组
CcdB	大肠杆菌回旋酶抑制剂蛋白；通过该蛋白抑制含有非重组质粒的细胞的生长
Cat-和 Cat +	分别用于革兰氏阴性细菌和革兰氏阳性细菌的耐氯霉素的基因
SecY570	570 nt，编码 secY 的基本 N 端；其反义由 ATc 诱导型 pxyl/tetO 启动子表达；在 Atc 存在下的生长表明质粒主链已经丢失
RepF	金黄色葡萄球菌的复制基因

[0596] pIMAY的遗传图谱示于图5B中,来自Monk,IR等人,《微生物学(mBio)》2012;doi:10.1128/mBio.00277-11。图12A、图12B和图12C示出了pIMAY整合型质粒的核苷酸序列(SEQ ID NO:131)。(登录号JQ62198)。大肠杆菌/葡萄球菌温度敏感性质粒pIMAYz包括低拷贝数的大肠杆菌复制起点(p15A)、共轭转移起点(oriT)、pBluescript多克隆位点(MCS)和来自pIMC的高度表达的cat基因(Phelp-cat)。革兰氏阳性细菌的温度敏感性复制子(repBCAD)和脱水四环素诱导型反义secY区域(anti-secY)可以分别从pVE6007和pKOR1扩增。列出的限制性位点是唯一的。引物(IM151/152)在pIMAY的MCS外部结合,并用于筛查大肠杆菌中的克隆(扩增283bp,无克隆的插入物)并确定葡萄球菌中是否存在复制质粒。pIMAYz的优点是体积更小、蓝白色筛查和较低的非容许温度,据报道这些优点可以避免整合过程中可能发生的突变。因此,可以在合同销售公司通过从头基因合成来制备质粒。

[0597] 步骤2.检查BioPlx-01中的可选标志物。

[0598] BioPlx-01对氨苄西林(50μg/mL和100μg/mL)、氯霉素(10μg/mL)和红霉素敏感(Drury 1965)。在一个实施例中,在整合过程期间,使用氯霉素(cat+)基因在氯霉素平板上选择转化株。

[0599] 步骤3.产生待整合的DNA片段。

[0600] 在穿梭载体pTK1中制备一个质粒,所述质粒含有串联的以下元件:[aTTB2]-\[1Kb的待替换的靶区域上游的序列]-[KS盒-AmpR]-[1kb的靶区域下游的序列]ATTB1,根据Bae等人(2006)的修改。使用限制性酶将片段从所述质粒中剔除并分离出来。实际上,“KS盒”可能是KS的一或两个拷贝,有待基因稳定性测试的结果。

[0601] 步骤4. 将一个或多个KS盒插入pKOR质粒。

[0602] 将步骤3的片段与质粒PKOR1进行体外重组,然后将重组混合物转染到DH5α中,并使用限制性图谱验证构建,通过标准筛查方法在大肠杆菌中获得期望的质粒构建体。

[0603] 步骤5.在BioPlx-01中获得含KS菌株的整合型质粒

[0604] 将质粒电穿孔到RN4220中;从转染的RN4220中分离质粒DNA,并将所述DNA电穿孔到BioPlx-01中,并在含有氯霉素(10μg/mL)的TSA板上选择转化株。

[0605] 步骤6.质粒整合至染色体。

[0606] 将菌株转移至非容许温度(43℃)以促进质粒整合至靶位点,并在氯霉素平板上选择菌落(10μg/mL)。

[0607] 步骤7.反向选择以驱逐质粒主链

[0608] 将来自步骤6的菌落分离物在容许温度(30℃)下生长以便于质粒切除,并在2μg/mL和3μg/mL的脱水四环素(aTc)琼脂上平板接种,以获得其中靶基因已整合且质粒已被切除和丢失的菌落(反向选择步骤)。在含有≥2μg/mL aTc的平板上生长的任何菌落都不包含质粒,因为质粒主链含有致命的aTc抑制型SecY反义基因。

[0609] 步骤8.确认整合的等位基因序列

[0610] 从KS菌株中分离基因组DNA,并通过PCR(和PCR扩增子的测序)确认敲入盒和侧翼结构。

[0611] 步骤9.检查血清诱导的细胞死亡

[0612] 一旦确认,则通过首先在TSB中生长细胞,然后将细胞转移至人血或血清中并在TSA中通过CFU平板测定法确定死亡率(10天)来进行细胞死亡率测定。

[0613] 步骤10.验证KS mRNA的表达

[0614] 确认靶基因在血液、血清和TSB中的表达变化。

[0615] 步骤11.制备冷冻的库

[0616] 可以用通过这些方法产生的合成微生物BioPlx-XX进行动物研究。可以进行体内功能性研究以测试杀灭开关菌株的功能。可能的研究包含小鼠研究,以显示wt BioPlx-01菌株与KS菌株的静脉内或腹膜内注射的致病性差异。还可以进行体外皮肤定植测试。另外的测试可能包含在小鼠中:执行BioPlx-01与BioPlx-XX的LD_{50}测试。作为另一个实例,在大鼠或其它动物中:执行BioPlx-01与BioPlx-XX的定植测试。

[0617] CRISPR-Cas诱导的同源性定向修复,用于直接插入最佳杀灭开关候选者以进行长期稳定表达

[0618] 在一些实施例中,提供了一种用于由BioPlx-01制备合成的金黄色葡萄球菌菌株的方法,所述方法包括使用CRISPR-Cas诱导的同源性定向修复来直接插入最佳KS候选者以进行长期稳定表达。在一些实施例中,提供了一种用于由BioPlx-01制备合成的金黄色葡萄球菌菌株的方法,所述方法包括(1)获得感受态细胞;(2)设计并测试CRISPR向导RNA(gRNA)序列并同时测试pCasSA;(3)使用由组成型报道分子控制的荧光报道分子设计并测试同源依赖性修复模板;(4)用荧光报道分子检查KS启动子;(5)将KS插入BioPlx-01中并验证其掺入;以及(6)测试功效和寿命。任选地,在BioPlx-01基因组内的其它位置处插入另外的KS盒。

[0619] 图10示出了用于通过CRISPR进行整合的盒和pCasSA载体的布局。Pcap1A是控制gRNA转录的组成型启动子。Target seq是靶标序列,例如,具有10个可能的剪切靶标(1.1、

1.2等)。gRNA是单链向导RNA(提供结构性组分)。Xba1和Xho1是两个限制性位点,用于将homology arms(HA)添加到pCasSA载体中。HA是同源臂,可用作同源性定向修复的模板(200-1000bp)。P_{rpsL}-mCherry是控制“最佳”mCherry的组成型启动子。P_{rpsL}-Cas9是控制Cas9蛋白表达的组成型启动子。

[0620] 图11示出了本公开中用于各种用途的载体。A是用于使用pCN51通过荧光筛查启动子的载体。B是用于通过细胞死亡基因筛查启动子的载体。C是用于使用CRISPR进行染色体整合的载体。D是用于使用同源重组进行染色体整合的载体。左和右HA:靶基因座的同源臂,CRISPR靶向:向基因座的RNA导引,mCherry:荧光报道蛋白,Cas9蛋白:CRISPR核酸内切酶,kanR:卡那霉素抗性,oriT:转移起点(用于整合)以及Sma1:代表性杀灭基因(限制性核酸内切酶)。

[0621] 施用和组合物

[0622] 在一些实施例中,提供了包括合成微生物和赋形剂或载剂的组合物。可以在适当的载剂基质内以适合于其特定的免疫原性或生物学或免疫学反应特性的任何方法(包含口服、静脉内、颊、鼻、粘膜、真皮或其它方法)施用所述组合物。在一个实施例中,提供了用于局部施用于受试者的真皮部位和/或粘膜部位的组合物。另一个特定的实施例涉及口服施用本公开的组合物。

[0623] 在一些实施例中,替换步骤包括在至少一个宿主受试者部位以及任选的受试者中的邻近区域处将合成菌株局部施用至真皮或粘膜,所述施用不超过一次、不超过两次或不超过三次。施用可以包含最初将包括至少10^6、至少10^7、至少10^8、至少10^9或至少10^{10}CFU的合成菌株和药学上可接受的载剂的组合物局部施用至受试者的至少一个宿主部位。可以在最终抑制步骤的12小时、24小时、36小时、48小时、72小时、4天、5天、6天、7天、8天或9天内执行初始替换步骤。

[0624] 可以至少一次(例如,每月一到30次、一到20次、一到十次、一到六次、一到五次、一到四次、一到三次或一到两次、或每月不超过一次、两次、三次、4次、5次、6次、每月8次、10次或不超过每月12次)将包括合成微生物的组合物施用于受试者的至少一个部位以及任选的邻近部位处的真皮和/或粘膜。组合物的后续施用可以在例如第一次施用后的一到30天、二到20天、三到15天或四到10天的时间段之后发生。

[0625] 通过施用包括选自营养素、益生元、稳定剂、保湿剂和/或益生菌物种的促进剂的组合物,可以促进合成微生物在受试者中的定植。所述促进剂可以以单独的促进剂组合物的形式施用于受试者,或者可以添加至微生物组合物中。

[0626] 在一些实施例中,所述促进剂可以是营养素,例如,选自氯化钠、氯化锂、甘油磷酸钠、苯乙醇、甘露醇、胰蛋白胨和酵母提取物。在一些实施例中,所述益生元选自由以下组成的组:短链脂肪酸(乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸、戊酸、异戊酸)、甘油、来自农业副产物的果胶衍生的寡糖、低聚果糖(例如,菊粉样益生元)、低聚半乳糖(例如,棉子糖)、琥珀酸、乳酸和甘露寡糖。

[0627] 在一些实施例中,所述促进剂可以是益生菌。所述益生菌可以是本领域已知的任何益生菌。益生菌是向宿主提供健康益处的活的微生物。在本文提供的方法中,益生菌可以局部施用于真皮和粘膜微生物组,和/或益生菌可以口服施用以向受试者提供真皮和粘膜的健康益处。已显示乳杆菌属的几种菌株具有全身性抗炎作用。研究表明,某些罗伊氏乳杆

菌菌株会诱导系统性抗炎细胞因子,如白介素(IL)-10。来自罗伊氏乳杆菌的可溶性因子抑制促炎细胞因子的产生。在皮肤模型中,已显示副干酪乳杆菌菌株可抑制中性炎症(Kober等人,2015,《国际女性皮肤病学杂志(Int J Women's Dermatol)》1(2015)85-89)。在人类真皮成纤维细胞和无毛小鼠模型中,已显示植物乳杆菌可抑制UVB诱导的基质金属蛋白酶1(MMP-1)的表达,从而保留人类成纤维细胞中的前胶原表达。在无毛小鼠组织学样品中口服施用植物乳杆菌显示,植物乳杆菌抑制了真皮组织中的MMP-13、MMP-2和MMP-9表达。

[0628] 临床上,还显示出益生菌的局部施用可改变皮肤的屏障功能,继而增加皮肤的抗微生物特性。当局部施用嗜热链球菌时,已显示其可改变皮肤的屏障功能,并继而增加皮肤的抗微生物特性。当局部使用嗜热链球菌时,已显示其在体外和体内均可增加神经酰胺的产生。神经酰胺会吸收皮肤中的水分,并且某些神经酰胺鞘脂(如植物鞘氨醇(PS))对痤疮丙酸杆菌表现出直接的抗微生物活性。Kober等人,2015,《国际女性皮肤病学杂志》1(2015)85-89。

[0629] 益生菌局部制剂的两项临床试验评估了其对痤疮的作用。与安慰剂相比,将粪肠球菌洗剂持续8周应用于面部可导致发炎性病变减少50%。在植物乳杆菌局部提取物的临床研究中,痤疮的数量、大小以及相关的红斑减少。Kober等人,2015,《国际女性皮肤病学杂志》1(2015)85-89。

[0630] 局部益生菌的临床试验已经评估了其对粘膜系统的作用。在一项研究中,通过鼻喷雾剂施用唾液链球菌以预防急性中耳炎(AOM)。如果鼻咽成功定植,则对降低AOM有明显作用。Marchisio等人(2015).《欧洲临床微生物学和传染病学杂志(Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.)》34,2377-2383。在另一项试验中,对患有分泌性中耳炎的儿童喷洒血液链球菌(S.sanguinis)和鼠李糖乳杆菌可减少中耳积液。Skovbjerg等人(2008).《儿童微生物学档案(Arch.Dis.Child.)》94,92-98。

[0631] 益生菌可以是局部益生菌或口服益生菌。益生菌可以例如是与不良微生物不同的属和种,或者与不良微生物具有相同的属但种不同。益生菌物种可以是与目标微生物属于不同的属和种。益生菌可以被修饰成包括杀灭开关分子修饰或可以不被修饰。益生菌可以选自乳杆菌、双歧杆菌、链球菌或肠球菌。益生菌可以选自短双歧杆菌、两歧双歧杆菌、乳酸双歧杆菌、婴儿双歧杆菌、短双歧杆菌、长双歧杆菌、罗伊氏乳杆菌、副干酪乳杆菌、植物乳杆菌、约氏乳杆菌、鼠李糖乳杆菌、嗜酸乳杆菌、唾液乳杆菌、干酪乳杆菌、植物乳杆菌、乳酸乳球菌、嗜热链球菌、唾液链球菌或粪肠球菌。

[0632] 促进剂可以包含蛋白质稳定剂,如在通过引用并入的美国专利第5,525,336中所公开的蛋白质稳定剂,所述蛋白质稳定剂包含在组合物中。非限制性实例包含甘油、海藻糖、乙二胺四乙酸、半胱氨酸、环糊精(如α-、β-或γ-环糊精)或其衍生物(如2-羟丙基β-环糊精)以及蛋白酶抑制剂(如亮抑酶肽、胃酶抑素、抗蛋白酶和血清胱抑素)。

[0633] 促进剂可以包含保湿剂。保湿剂的非限制性实例包含甘油、山梨糖醇、2-吡咯烷酮-5-羧酸钠、可溶性胶原和邻苯二甲酸二丁酯。

[0634] 组合物

[0635] 提供了包括合成微生物和药学上可接受的载剂、稀释剂、润肤剂、粘合剂、赋形剂、润滑剂、甜味剂、调味剂、缓冲剂、增稠剂、润湿剂或吸收剂的组合物。

[0636] 用于配制组合物的药学上可接受的稀释剂或载体选自由以下组成的组:水、盐水、

磷酸盐缓冲盐水或溶剂。溶剂可以选自例如乙醇、甲苯、异丙醇、正丁醇、蓖麻油、乙二醇单乙醚、二乙二醇单丁醚、二乙二醇单乙醚、二甲基亚砜、二甲基甲酰胺和四氢呋喃。载剂或稀释剂可以进一步包括一种或多种表面活性剂,如:i)阴离子表面活性剂,如脂肪酸的金属盐或链烷醇胺盐,例如月桂酸钠和油酸三乙醇胺;烷基苯砜,例如十二烷基苯磺酸三乙醇胺盐;烷基硫酸盐,例如月桂基硫酸钠;烷基醚硫酸盐,例如月桂基醚硫酸钠(2到8个EO);磺基琥珀酸盐,例如二辛基磺基琥珀酸钠;单甘油酯硫酸盐,例如单硬脂酸甘油酯单硫酸钠;异硫代硫酸盐,例如异硫代硫酸钠;甲基牛磺酸盐,例如Igepon T;酰基肌氨酸盐,例如肉豆蔻基肌氨酸钠;酰基肽,例如Maypons和Lamepons;酰基乳酸盐、聚烷氧基化醚乙醇酸盐,例如十三烷醇聚醚-7羧酸;磷酸盐,例如二月桂基磷酸钠;阳离子表面活性剂,如胺盐,例如沙巴明盐酸盐;季铵盐,例如Quaternium 5、Quaternium 31和Quaternium 18;两性表面活性剂,如咪唑化合物,例如Miranol;N-烷基氨基酸,例如椰油酰胺丙酸钠和天冬酰胺衍生物;甜菜碱,例如椰油酰胺基丙基甜菜碱;非离子表面活性剂,如脂肪酸链烷醇酰胺,例如油性乙醇酰胺;酯或多元醇,例如Span;聚甘油酯,例如用脂肪酸和一个或几个OH基团酯化的聚甘油酯;聚烷氧基化衍生物,例如聚氧:聚氧乙烯硬脂酸酯;醚,例如聚氧乙烯月桂基醚;酯醚,例如Tween;胺氧化物,例如椰子和十二烷基二甲基胺氧化物。在一些实施例中,包含一种以上的表面活性剂或溶剂。

[0637] 组合物可以包含有助于稳定pH的缓冲剂组分。在一些实施例中,pH介于4.5-8.5之间。例如,pH值可以约为4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9或8.0,包含介于这之间的任何值。在一些实施例中,pH为5.0到8.0、6.0到7.5、6.8到7.4或约7.0。缓冲剂的非限制性实例可以包含ACES、乙酸盐、ADA、氢氧化铵、AMP(2-氨基-2-甲基-1-丙醇)、AMPD(2-氨基-2-甲基-1,3-丙二醇)、AMPSO、BES、BICINE、bis-tris、BIS-TRIS丙烷、硼酸盐、CABS、卡可酸盐、CAPS、CAPSO、碳酸盐(pK1)、碳酸盐(pK2)、CHES、柠檬酸盐(pK1)、柠檬酸盐(pK2)、柠檬酸盐(pK3)、DIPSO、EPPS、HEPPS、乙醇胺、甲酸盐、甘氨酸(pK1)、甘氨酸(pK2)、双甘氨肽(pK1)、双甘氨肽(pK2)、HEPBS、HEPES、HEPPSO、组氨酸、肼、咪唑、苹果酸盐(pK1)、苹果酸盐(pK2)、马来酸盐(pK1)、马来酸盐(pK2)、MES、甲胺、MOBS、MOPS、MOPSO、磷酸盐(pK1)、磷酸盐(pK2)、磷酸盐(pK3)、哌嗪(pK1)、哌嗪(pK2)、哌啶、PIPES、POPSO、丙酸盐、吡啶、焦磷酸盐、琥珀酸盐(pK1)、琥珀酸盐(pK2)、TABS、TAPS、TAPSO、牛磺酸(AES)、TES、三甲基甘氨酸、三乙醇胺(TEA)和三羟甲基氨基甲烷(tris)。赋形剂可以包含乳糖、甘露糖醇、山梨糖醇、微晶纤维素、蔗糖、柠檬酸钠、磷酸二钙、磷酸盐缓冲剂或任何其它性质相似的成分(单独或以其合适的组合形式呈现)。

[0638] 微生物组合物可以包含:粘合剂,例如黄蓍胶、阿拉伯胶、甲基纤维素、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、淀粉或任何其它性质相似的成分(单独或以其合适的组合形式呈现);选自由以下组成的组的赋形剂:琼脂、碳酸钙、碳酸钠、硅酸盐、藻酸、玉米淀粉、马铃薯木薯淀粉、凝胶或任何其它性质相似的成分(单独或以其合适的组合形式呈现);选自由以下组成的组的润滑剂:硬脂酸镁、硬脂酸钙、滑石粉、固体聚乙二醇、月桂基硫酸钠或任何其它性质相似的成分(单独);选自由以下组成的组的助流剂:胶态二氧化硅或任何其它性质相似的成分(单独或以其合适的组合形式呈现);选自由以下组成的组的稳定剂:如甘露醇、蔗糖、海藻糖、甘氨酸、精氨酸、葡聚糖或其组合;选自由以下组成的组的添味剂或调味剂:薄荷、水杨

酸甲酯、橙味调味剂、香草调味剂或任何其它药学上可接受的添味剂或调味剂(单独或以其合适的组合形式呈现);选自由以下组成的组的湿润剂:乙酰醇、单硬脂酸甘油酯或任何其它药学上可接受的湿润剂(单独或以其合适的组合形式呈现);选自由以下组成的组的吸收剂:高岭土、膨润土或任何其它药学上可接受的吸收剂(单独或以其合适的组合形式呈现);选自由以下组成的组的阻滞剂:蜡、石蜡或任何其它药学上可接受的阻滞剂(单独或以其合适的组合形式呈现)。

[0639] 微生物组合物可以包括一种或多种润肤剂。润肤剂的非限制性实例包含硬脂醇、单蓖麻油酸甘油酯、单硬脂酸甘油酯、丙烷-1,2-二醇、丁烷-1,3-二醇、貂油、鲸蜡醇、异硬脂酸异丙酯、硬脂酸、棕榈酸异丁酯、异鲸蜡醇硬脂酸酯、油醇、月桂酸异丙酯、月桂酸己基酯、油酸癸酯、十八烷-2-醇、异鲸蜡醇、鲸蜡醇棕榈酸酯、二甲基聚硅氧烷、癸二酸二正丁酯、肉豆蔻酸异丙酯、棕榈酸异丙酯、硬脂酸异丙酯、硬脂酸丁酯、聚乙二醇、三甘醇、羊毛脂、芝麻油、椰子油、花生油、蓖麻油、乙酰化羊毛脂醇、石油、矿物油、肉豆蔻酸丁酯、异硬脂酸、棕榈酸、亚油酸异丙酯、月桂酸乳酸酯、肉豆蔻酸乳酸酯、油酸癸酯、肉豆蔻酸肉豆蔻脂。

[0640] 微生物组合物可以包含增稠剂,例如,其中增稠剂可以选自羟乙基纤维素(例如Natrosol)、淀粉、树胶(如阿拉伯树胶、高岭土或其它粘土)、水合硅酸铝、气相二氧化硅、羧乙烯基聚合物、羧甲基纤维素钠或其它纤维素衍生物、乙二醇单硬脂酸酯和藻酸钠。微生物组合物可以包含保存剂、防腐剂、颜料或着色剂、香料、掩蔽剂和载剂,如水和低级烷基、醇,如在通过引用并入的美国专利第5,525,336中所公开的保存剂、防腐剂、颜料或着色剂、香料、掩蔽剂和载剂,所述保存剂、防腐剂、颜料或着色剂、香料、掩蔽剂和载剂包含在组合物中。

[0641] 用于局部施用的微生物组合物可以以液体、溶液、悬浮液、乳膏、洗剂、软膏、凝胶或固体形式(如散剂、片剂或锭剂的形式)提供,以在施用前立即悬浮。局部使用的组合物也可以以硬胶囊或软明胶胶囊的形式提供,其中将良性微生物和/或合成微生物与水或油介质(例如花生油、液体石蜡或橄榄油)混合。可以使用在片剂和胶囊剂下的上述成分,以常规方式使用例如混合器、流化床设备、冻干或喷雾干燥设备将其溶解来制备散剂和颗粒剂。干燥的微生物组合物可以直接施用或可以悬浮在载剂中。当组合物呈散剂形式时,所述散剂可在载剂中包含白垩、滑石粉、富勒土、胶态二氧化硅、聚丙烯酸钠、四烷基和/或三烷基芳基铵蒙脱石和经化学改性的硅酸铝镁。当组合物呈散剂形式时,所述散剂可以包含白垩、滑石粉、富勒土、胶态二氧化硅、聚丙烯酸钠、四烷基和/或三烷基芳基铵蒙脱石和经化学改性的硅酸铝

[0642] 当存放在冷冻、冷藏或优选在室温下时,微生物组合物可能在至少一个月、两个月、三个月、六个月、12个月、18个月或24个月内表现出少于30%、20%、10%或5%cfu的稳定的CFU损失。

[0643] 试剂盒

[0644] 任何上述组合物或合成微生物可以试剂盒的形式提供。在一些实施例中,试剂盒包括容纳活细菌的容器或容纳冻干活细菌的容器。试剂盒可以包含第二容器,所述第二容器包含培养基。试剂盒还可以包含一种或多种去定植剂。试剂盒还可以包含用于施用组合物的说明书。在某些实施例中,提供了用于将细菌菌株与组合物的其它组分混合的说明书。在一些实施例中,试剂盒进一步包含将微生物组合物施用于受试者的施药器。

[0645] 剂量

[0646] 在某些实施例中,提供了一种用于局部施用的组合物,所述组合物为溶液组合物,或用于重构为溶液组合物。在一个实施例中,组合物可以包含水溶液(如磷酸盐缓冲盐水(PBS))中约1x 10^5到1x 10^{12}cfu/ml、1x 10^6到1x 10^{10}cfu/ml或1.2x 10^7到1.2x 10^9CFU/mL的合成微生物。较低剂量可用于受试者的初步刺激性研究。

[0647] 优选地,在执行初始的施用步骤后至少2周、3周、4周、6周、10周、15周、22周、26周、30周或52周后,受试者并未表现出不良微生物的复发,如通过在至少一个部位处擦拭受试者所证明的那样。

[0648] 纳米工厂

[0649] 在一些实施例中,提供了在微生物组的位点产生期望物质的方法(纳米工厂)。提供了可以包括纳米工厂分子修饰的合成微生物。术语"纳米工厂"是指目标微生物的分子修饰,所述分子修饰导致产生产物—产生有益效果的初级产物(如蛋白质、酶、多肽、氨基酸或核酸)或次级产物(如小分子)。产物可以从合成微生物中分泌出来,或者可以呈包涵体的形式。这种纳米工厂细菌菌株具有向宿主受试者提供广泛的持久益处的潜力,所述广泛的持久益处包含:(i)获得宿主先前缺乏的细胞产物和酶;以及(ii)获得微生物制造的小分子、多肽或蛋白质药物的递送系统,以实现多种治疗和预防益处。当如本文所述将这种纳米工厂细菌菌株持久地整合到生物群系中时,与直接产物应用相比,这种纳米工厂细菌菌株将提供有用的持久的替换性稳态产物生产。

[0650] 本文提供了用合成细菌菌株替换不良微生物现有定植的方法和合成微生物,所述合成细菌菌株包括用于生产或消费初级产物或次级产物的纳米工厂分子修饰,其中目标微生物可以是约氏不动杆菌、鲍曼不动杆菌、金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、路邓葡萄球菌、沃氏葡萄球菌、腐生葡萄球菌、痤疮棒状杆菌、纹带棒状杆菌、白喉棒状杆菌、极小棒状杆菌、痤疮丙酸杆菌、痤疮丙酸杆菌、颗粒丙酸杆菌、酿脓链球菌、金黄色葡萄球菌、无乳链球菌、缓症链球菌、绿色链球菌、肺炎链球菌、咽峡炎链球菌、星座链球菌、中间链球菌、无乳链球菌、铜绿假单胞菌、栖稻假单胞菌、施氏假单胞菌、恶臭假单胞菌和荧光假单胞菌、弯曲乳杆菌(Lactobacillus crispatus)、加氏乳杆菌(Lactobacillus gasseri)、詹氏乳杆菌(Lactobacillus jensenii)和惰性乳杆菌(Lactobacillus iners)的菌株。

[0651] 合成微生物中的纳米工厂分子修饰可用于协助其宿主受试者,即,患有某些原发性(合成代谢或分解代谢)或继发性代谢途径缺乏或由于一些小分子或大分子(如酶)过量或不足而引起的其它疾病的患者。纳米工厂分子修饰可以编码酶、氨基酸、代谢中间体或小分子。纳米工厂分子修饰可以赋予宿主微生物组新的生产(合成)功能或代谢功能,如内源性合成或代谢特定化合物的能力,或合成酶或其它活性分子以在外源性微生物组内进行操作的能力。

[0652] 微生物将在差异性调节的、诱导型或组成性调节的启动子的控制下携带选自生物合成基因、生物合成基因簇或编码一种或多种酶的一个或多个基因的纳米工厂。包括纳米工厂的合成微生物将作为单一药剂或与第二、第三或第四合成微生物组合被施用到人体的至少一个部位(真皮、粘膜或其它部位),所述第二、第三或第四合成微生物有助于第一合成微生物恢复宿主受试者上或宿主受试者中的功能丧失。

[0653] 在一个实例中,包括纳米工厂的合成微生物可用于通过产生细胞间活性因子来恢

复功能,例如,通过小肠中分泌的重组酶在外分泌型胰腺功能不全的患者中补充消化酶。胰腺是重要的器官,其在消化中起关键作用。外分泌型胰腺功能能不全(EPI)是由于胰腺长期受损而引起的,其导致小肠中主要消化脂肪和碳水化合物的典型消化酶减少或不存在。这些酶的损失会导致广泛的症状,并取决于EPI的严重程度。近端小肠(十二指肠)中小肠的pH水平低于远端区域的pH水平。环境的这种变化导致微生物生态位的占据是pH依赖性的。这种pH依赖性对于十二指肠共生细菌是自然选择的,所述十二指肠共生细菌可以进行分子修饰以成为合成微生物,从而将自身固有地定位在胃肠道的所述区域。胃以及小肠的上三分之二含有耐酸的乳杆菌属和链球菌属(Hao,Wl、Lee YK.“胃肠道微生物群:综述(Microflora of the gastrointestinal tract:a review)”《分子生物学方法(Methods Mol.Biol.)》2004,268,491-502),并且可能是从健康供体中分离出来的。通过敲入具有分泌性信号传导序列的重组脂肪酶、淀粉酶和/或蛋白酶,合成微生物对十二指肠的定植可以恢复EPI患者的消化功能。

[0654] 在纳米工厂的另一个实例中,包括纳米工厂的合成微生物可用于通过产生细胞内活性因子来恢复功能。例如,通过消除胃肠道中的苯丙氨酸来保护患有苯丙酮尿症(PKU)的受试者。苯丙氨酸是人体必需的氨基酸,这意味着人体无法产生它,而必须通过营养来获取它。一旦进入体内,苯丙氨酸的分解是通过一种蛋白质苯丙氨酸羟化酶(PAH)进行的。被称为苯丙酮尿症(PKU)的遗传性遗传病症是由编码PAH的基因的突变引起的,所述突变导致体内苯丙氨酸的积累。避免这种积累的最常见方法之一是避免食用富含苯丙氨酸的食物。可替换地,可以将已被分子修饰以在细胞内降解苯丙氨酸的合成微生物引入胃肠道中。这种合成微生物构成了PAH纳米工厂,从而在苯丙氨酸有机会通过进入患有PKU的宿主体内之前分解苯丙氨酸。

[0655] 在纳米工厂的另一个实例中,合成细菌可以衍生自皮肤微生物群的靶共生细菌,所述皮肤微生物群可以包括纳米工厂分子修饰。靶共生皮肤或粘膜细菌可以是例如葡萄球菌、链球菌或丙酸杆菌。例如,表皮葡萄球菌可以是目标微生物,因为其存在于多种真皮或粘膜环境类型中。考虑到合成的表皮葡萄球菌在不同环境中的持久能力,对合成的表皮葡萄球菌进行工程改造将有助于开发和优化多种递送技术和位置。

[0656] 在一个实例中,合成的表皮葡萄球菌菌株可以包括纳米工厂分子修饰以针对患有男性性腺功能减退症的男性产生睾丸激素。睾丸激素的生产可以通过以下方式完成:(i)引入整个甾醇生物合成途径,以及产生睾丸激素所必需的其它酶,或(ii)引入部分甾醇生物合成途径,并在携带的介质(如farnysel、角鲨烯、胆固醇等)中具有必需的前体分子,以便睾丸激素可以在合成细菌中组装。在另一个实例中,合成的表皮葡萄球菌菌株可以包括用于生产烟碱的纳米工厂分子修饰;该合成菌株可用作透皮疗法,以帮助戒烟。该合成菌株可以包含分子修饰以包含在茄科植物家族中发现的一种或多种生物合成途径,并且任选地进一步包含用于增强前体分子(即,天冬氨酸、鸟氨酸等)的内在途径的分子修饰。

[0657] 在纳米工厂的另外的实例中,合成的表皮葡萄球菌菌株可以包括用于产生东莨菪碱的纳米工厂分子修饰。目前,东莨菪碱通过缓释透皮贴剂递送,用于治疗晕动病和术后预防。该菌株将需要携带茄科植物家族中发现的生物合成途径,并可能增强前体分子的内在途径。

[0658] 作为另一个实例,合成的表皮葡萄球菌菌株可以包括用于产生辣椒素以减轻疱疹

后神经痛、牛皮癣或其它皮肤相关病症引起的疼痛的纳米工厂分子修饰。

[0659] 在另一个实例中,目标微生物是变形链球菌菌株,其可以具有杀灭开关、V-block或纳米工厂分子修饰中的一个或多个。龋齿和牙菌斑是世界范围内最常见的疾病,并且由微生物和食物残渣的混合物引起。在存在可发酵碳水化合物(例如,蔗糖和果糖)的情况下,特定类型的产酸细菌(尤其是变形链球菌)定植在牙齿表面,并对硬齿结构造成损害。龋齿和牙菌斑是世界范围内最常见的疾病,并且由微生物和食物残渣的混合物引起。在存在可发酵碳水化合物(例如,蔗糖和果糖)的情况下,特定类型的产酸细菌(尤其是变形链球菌)定植在牙齿表面,并对硬齿结构造成损害。Forrsten等人,《营养素(Nutrients)》,2010Mar;2(3):290-298。在一些实施例中,目标微生物是变形链球菌,其具有用于在存在蔗糖、果糖或其它可发酵碳水化合物的情况下减少酸产生的KS和/或纳米工厂敲除。

[0660] 用于解决皮肤病学和美容用途的合成微生物中的纳米工厂分子修饰的另外的实例包含:(i)表皮葡萄球菌中的透明质酸产生,其用于特应性皮炎或皮肤干燥;(ii)表皮葡萄球菌中的α-羟基酸产生,其用于减少细纹和皱纹以及不规则的色素沉着;(iii)痤疮丙酸杆菌中的水杨酸产生,其用于减少痤疮;(iv)表皮葡萄球菌中的熊果苷产生(熊果苷及其代谢产物对苯二酚通过抑制黑色素而起到皮肤增白剂的作用);(v)表皮葡萄球菌中的曲酸(由米曲霉等几种真菌产生),其用于减轻皮肤色素沉着;(vi)表皮葡萄球菌的类视黄醇产生,其用于减少细纹和皱纹;(vii)表皮葡萄球菌中的L-抗坏血酸(维生素C)产生,其用于刺激皮肤的胶原蛋白和抗氧化作用;(viii)表皮葡萄球菌中的铜肽(GHK-Cu)产生,其用于刺激胶原蛋白和弹性蛋白的产生并减少疤痕的形成;(ix)表皮葡萄球菌中的α硫辛酸产生,去用于对皮肤产生有益的抗氧化作用;以及(x)表皮葡萄球菌中的二甲基氨基乙醇的产生,其用于减少细纹和皱纹。

[0661] 痤疮丙酸杆菌是生活在皮肤上的优势细菌,并且与健康的皮肤和各种疾病均有关。这是可利用现代分子生物学技术增强和加强的另一种生物和生态位。研究表明,健康皮肤和长满粉刺的皮肤中痤疮丙酸杆菌的水平相似。Dréno,B.等人“痤疮丙酸杆菌(痤疮丙酸杆菌)和寻常型痤疮:简要了解最新更新(Cutibacterium acnes(Propionibacterium acnes)and acne vulgaris:a brief look at the latest updates)”《欧洲皮肤病学和性病学会杂志(Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology)》32(2018):5-14。这表明,仅降低人皮肤上存活的痤疮丙酸杆菌的数量将无助于减轻疾病或症状。相反,可以改变痤疮丙酸杆菌的其它菌株或真皮和皮下微生物组的其它成员,以减轻某些痤疮丙酸杆菌菌株用来引起疾病的机制。已显示与痤疮严重程度增加有最大关联的分离株也已显示产生更多的丙酸和丁酸。Beylot,C.等人“痤疮丙酸杆菌:其在痤疮发病机理中的作用的更新(Propionibacterium acnes:an update on its role in the pathogenesis of acne)”《欧洲皮肤病学和性病学会杂志》28.3(2014):271-278。

[0662] 纳米工厂分子修饰的另一个实例包含痤疮丙酸杆菌的另一种菌株,其被修饰以增加对短链脂肪酸(如丙酸和丁酸)的嗜好,从而从强菌株中去除炎性化学分泌物,从而使所述菌株毒性较小。富含碳的脂肪酸可用于诱导异源途径,并可用作维生素合成的前体或对居住于该位置的皮肤或微生物组有益的其它有机化合物。

[0663] 在另一个实例中,在表皮葡萄球菌中,已显示脂磷壁酸通过诱导miR-143来帮助减轻痤疮丙酸杆菌(即,痤疮丙酸杆菌)的炎症反应。Xia,Xiaoli等人“葡萄球菌属LTA诱导的

miR-143抑制痤疮丙酸杆菌介导的皮肤炎症反应(Staphylococcal LTA-induced miR-143inhibits Propionibacterium acnes-mediated inflammatory response in skin)”《皮肤病学研究杂志(Journal of Investigative Dermatology)》136.3(2016):621-630。可以使用合成的微生物,所述合成的微生物包括产生脂磷壁酸的纳米工厂分子修饰,所述脂磷壁酸通过诱导miR-143来抑制痤疮丙酸杆菌诱导的炎症。可以使用纳米工厂来调节寻常痤疮部位的表皮葡萄球菌的炎症反应,以治疗痤疮丙酸杆菌诱导的炎症。该途径只是有用的产物的一个实例,所述产物可以由短链脂肪酸制成,所述短链脂肪酸单独放置时会引起炎症和皮肤刺激。

[0664] 在另一个实例中,炎症和温度升高是由痤疮丙酸杆菌引起的疾病所涉及的因素,二者可以用作在工程化的菌株中诱导先前沉默的异源途径的信号。温度升高(表明密封的毛孔并发展为局部疾病状态)可能会在强毒株或另一种共生微生物中诱导非免疫刺激性脂肪酶(或其它酶)的转录和翻译,所述非免疫刺激性脂肪酶(或其它酶)能够将皮脂降解至重新开放堵塞的毛孔的程度,从而使该位置恢复其正常的生长条件。

[0665] 在另外的实例中,可以对合成的乳杆菌(如弯曲乳杆菌、加氏乳杆菌、詹氏乳杆菌或惰性乳杆菌—它们是女性阴道穹隆中常见的优势物种)进行工程改造,使其包括纳米工厂分子修饰,所述纳米工厂分子修饰在绝经后妇女的阴道穹隆中产生雌二醇。

[0666] 本文提供了用合成细菌菌株替换不良微生物现有定植的方法和合成微生物,所述合成细菌菌株包括用于生产或消费初级产物或次级产物的纳米工厂分子修饰,所述初级产物或次级产物例如选自酶、尼古丁、天冬氨酸、鸟氨酸、丙酸、丁酸、透明质酸、α-羟基酸、L-抗坏血酸、铜肽、α-硫辛酸、水杨酸、熊果苷、曲酸、东莨菪碱、辣椒素、类视黄醇、二甲基氨基乙醇、脂蛋白酸、睾丸激素、雌二醇和孕酮。

[0667] 合成细菌菌株的持久整合可根据期望的适应症进行调整,所述合成细菌菌株能够通过对其基因组进行纳米工厂化分子修饰或合成添加而产生在吸收后对微生物组整合位点或宿主中远处位点的宿主有益的物质、材料、产物或多种产物。根据合成核苷酸的变化是直接被掺入细菌基因组中还是将被引入质粒中,纳米工厂生产的作用持续时间的范围可以从短期(对于细菌物种使用非复制性质粒)到中期(对于不具有成瘾依赖性的情况使用复制性质粒)到长期(直接进行细菌基因组操作)。

[0668] 毒力阻断

[0669] 在一些实施例中,提供了用合成细菌菌株替换现有定植的方法,所述合成细菌菌株无法接受不期望的毒力或抗生素抗性基因的遗传转移。提供了可以包括“毒力阻断剂”或“V-block”的合成微生物。术语“毒力阻断”或“V-block”是指微生物的分子修饰,其导致生物从其它菌株或物种接受外来DNA的能力降低,从而有效地导致所述生物获得外源毒力或抗生素抗性基因的能力降低。

[0670] 本文提供了用包括V-block分子修饰的合成细菌菌株替换不良微生物现有定植的方法,所述合成细菌菌株无法接受不期望的毒力或抗生素抗性基因的遗传转移,其中目标微生物可以是约氏不动杆菌、鲍曼不动杆菌、金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、路邓葡萄球菌、沃氏葡萄球菌、腐生葡萄球菌、痤疮棒状杆菌、纹带棒状杆菌、白喉棒状杆菌、极小棒状杆菌、痤疮丙酸杆菌、痤疮丙酸杆菌、颗粒丙酸杆菌、酿脓链球菌、金黄色葡萄球菌、无乳链球菌、缓症链球菌、绿色链球菌、肺炎链球菌、咽峡炎链球菌、星座链球菌、中间链球菌、无乳

链球菌、铜绿假单胞菌、栖稻假单胞菌、施氏假单胞菌、恶臭假单胞菌和荧光假单胞菌的菌株。

[0671] 关于传染病的主要担忧之一通常被称为“水平基因转移”,其中潜在的细菌病原体获得外源毒力蛋白基因或抗微生物抗性基因。所述获得可能是由于这些基因从本地微生物组环境中的其它细菌菌株或物种转移而产生的。由于在引起疾病之前侵入性细菌病原体通常最初是皮肤或粘膜表面上的定植细菌微生物组的一部分,因此能够使这些定植菌株不能接受外源细菌DNA进入细菌基因组将具有很大的实际意义。在持久整合的合成细菌菌株中完成此过程的过程称为“毒力阻断”。

[0672] 这种“毒力阻断”操纵的菌株将能够在去定植事件后被整合到微生物组中,并且然后通过竞争性排除过程,在特定的生态位中保留一段时间作为优势菌株,而不会重新获得不期望的毒力或耐抗生素特性。在微生物组内对潜在病原体进行的这种构想将产生稳定的微生物组,所述稳定的微生物组无法以水平转移的方式获得毒力或抗微生物抗性基因,从而使微生物组的整体更坚固并且转化潜力降低。

[0673] V-block是可用于合成微生物中以抑制来自不良微生物的毒力或水平基因转移的分子修饰。可以通过以下方式在目标微生物中产生V-block分子修饰:(i)基因敲除(切除或去除)一种或多种已知的毒力基因;(ii)将毒力区移码(添加或减去碱基对以“打破”编码框架);(iii)使用诱导型启动子或组成型启动子(嵌入DNA基因组中,但在RNA中起作用)对毒力区进行外源沉默—例如抗毒素策略、使用可能与诱导型启动子或组成型启动子连接的向导RNA生产CRISPR-CAS9或其它编辑蛋白,以消化传入的毒力基因;或(iv)通过限制性修饰(RM)(如甲基化系统)转变生物的“先天免疫系统”以按分子类别识别和破坏传入的毒力基因。可以采用这些方法中的任何一种,以便增加对水平基因转移的抗性。用于构建V-block的基因编辑方法可以包含NgAgo、mini-Cas9、CRISPR-Cpf1、CRISPR-C2c2、Target-AID、Lambda Red、整合、重组酶或使用噬菌体。毒力阻断可以与合成微生物中的组成型启动子可操作地连接。毒力阻断分子修饰可能会阻止来自剧毒微生物的遗传物质的水平基因转移。

[0674] 赋予对金黄色葡萄球菌(SA)菌株的抗生素抗性的基因盒可以在特定位点处被整合到受体细胞的基因组中。可以在细胞基因组中删除或更改所述位点,从而使着陆位点不再可用于传入的DNA序列。事实证明,这不会干扰SA的生长能力,并且会使生物获得抗性盒的可能性大大降低

[0675] V-block分子修饰可引起毒力因子、抗性基因座或盒、毒素或产毒功能或生物整合微生物的其它不期望的属性的去除或中和。

[0676] 用于与金黄色葡萄球菌中的已知毒力因子或抗生素抗性基因一致的序列的Cas9识别系统形式的毒力阻断可用于保护金黄色葡萄球菌活生物治疗性产品的菌株免于获得另外的毒力因子和对抗生素类别的抗性,从而使其与最初批准和生产的产品一样安全。

[0677] CRISPR是用于原核细胞的天然适应性免疫系统,其随着时间的过去已经进化以帮助防御噬菌体攻击。该系统使用与噬菌体DNA(或任何目标DNA)序列互补的短DNA序列来靶向传入的DNA,并在将链掺入活细胞的基因组之前对其进行消化。

[0678] 可以对同一技术进行改造以靶向DNA序列,所述DNA序列对细菌细胞无威胁,但一旦获得,则会使该生物引起疾病并在先前不宜居住的环境中持续存在。通过将Cas-9酶整合到基因组中,或利用内源性Cas-9(如果可用的话),有可能将靶向抗生素抗性基因的组成性

表达的指导RNA引入基因组中。如果通过水平基因转移或其它方式将靶向序列引入细胞,则传入的DNA将被切割,并且无法整合到基因组中或产生功能性肽。如果基因在CRISPR-Cas系统靶向之前已被整合到基因组中,则经过工程改造的CRISPR-Cas系统将在基因组中找到所述基因并在目标位置处切割序列,从而产生无法存活的细胞并阻止抗生素抗性盒的扩散。

[0679] CRISPR系统也可以用于靶向RNA序列,从而沉默基因表达。不同于靶向抗生素抗性基因或毒力基因的DNA序列的识别序列,识别序列可以被设计成靶向mRNA。如果Cas9和靶向向导RNA在接收abxR或毒力基因的细胞中组成性表达,则经过工程改造的CRISPR系统将阻止翻译,从而阻碍蛋白质的形成以及细胞使用靶向基因的能力。

[0680] 可用于靶向毒力基因或抗生素抗性基因的表达的原核生物中的基因沉默的另一种方法是设计并组成性地表达靶向mRNA转录本的调节性RNA,通常在RBS处。这些将被整合到基因组中并从基因组中组成性表达以产生合成生物。调节性RNA是短序列(>100bp),并且与abxR或毒力基因的mRNA转录本的5'非翻译区(UTR)互补。短序列的组成性表达不应对生物造成新的代谢负担,并且将导致阻断靶向mRNA转化为蛋白质的结果。如果通过水平基因转移获得了经过工程改造的RNA,那么其将充分阻断细胞利用靶向抗生素抗性基因的能力。

[0681] DNA甲基化在原核生物和真核生物中发挥许多重要作用。DNA甲基化的一个特征使细胞能够将其自身的DNA与外来的DNA区分开。这使得编辑和研究许多野生型菌株非常困难,因为生物的甲基化酶系统将转化的质粒DNA识别为外来的,并在将所述质粒DNA转录或整合之前将其咀嚼。在甲基化模式非常相似的生物之间可能发生水平基因转移,因为传入的DNA看起来与受体自身的DNA非常相似,并且不会被消化。由于负责在特定序列中添加甲基的机制和基因,以及寻找和切割甲基化不正确的DNA的机制和基因,在许多细菌菌株中都是已知的,因此有可能创建一种能够具有独特甲基化模式的合成生物。这将使所有传入的DNA对于合成生物而言看起来都是外来的,并在该生物可以获得新特点之前被消化。这将使毒力基因或抗生素抗性基因水平基因转移到合成生物中不存在问题。

[0682] 以合成微生物中一个或多个细菌基因组盒插入位点的分子破坏形式存在的V-Block可使合成微生物无法从共栖生物群系的常驻细菌物种中获得抗生素类抗性基因。此类操作还将阻止获得可能增加整个肠壁侵入性事件的可能性的毒力基因。赋予对金黄色葡萄球菌(SA)菌株的抗生素抗性的基因盒可以在特定位点处被整合到受体细胞的基因组中。可以在细胞基因组中删除或更改所述位点,从而使着陆位点不再可用于传入的DNA序列。只要显示V-block不会干扰合成微生物的生长能力,并且会使生物获得抗性盒的可能性大大降低。

[0683] 实例

[0684] 实例1.实地研究—使用良性微生物的排他性生态位:

[0685] 临床研究—抑制和替换

[0686] 设计了一项临床研究,以鉴定MRSA阳性受试者、抑制MRSA菌株、通过施用Bioplx-01(即,MSSA 502a)来替换MRSA并定期重新测试受试者的MRSA的复发。研究人群主要来自Meerut地区的医务人员和医科学生。没有症状的受试者被纳入研究。

[0687] 这是一项"原理验证"研究,使用的材料和方法在很大程度上未得到改进—大于55%未复发率的任何结果都将被视为这些方法潜在效力的指标。80%或更高的未复发率的任何结果将被视为该方法当前技术实力的有力指标。

[0688] 研究目的和主要终点:

[0689] 1)确定无症状的金黄色葡萄球菌和MRSA在普通人群中的发生率—Meerut,UP(印度北部)—并使参与者有资格进行本研究的进一步阶段;

[0690] 2)确定经过BioPlx去定植的参与者的MRSA复发率;

[0691] 3)确定经过BioPlx01-WT重新定植的参与者的MRSA复发率;

[0692] 4)确定BioPlx01-WT在预防MRSA复发方面的持久性(至8和12周);

[0693] 5)可接受的研究复发水平=40%,目标复发水平=20%。

[0694] 将研究结果与来自同行评审来源的已发表的复发率进行比较评估,平均复发率为45%,未复发率为55%。

[0695] 进行了潜在参与者的鉴别和招募,对所有参与者进行了注册和测试:n=765。患者是来自以下地区的医务人员和医科学生:Meerut大学医学院—LLRM医学院(MUMC医院)、Harish Chandra医院、Murti医院、Silver Cross医院、JP医院以及Lokpriya医院、Dhanvantri医院、Jaswantrai医院。所有参与者均签署了书面披露、知情同意书和签署文件。

[0696] 所有765名潜在参与者都由实验室人员擦拭(鼻腔)。由实验室人员将所有拭子平板接种在金黄色葡萄球菌和MRSA的科玛嘉(chromagar)平板上。将所有板在37℃下孵育24小时,由研究主管亲自读取并评分。在读取时获取所有板的照片,并标记结果。

[0697] 金黄色葡萄球菌鼻拭子阳性(MSSA和MRSA)的受试者总共为162或21.18%,仅在鼻拭子预期发生率的低端。仅MSSA(非MRSA)参与者的人数为97或12.68%。

[0698] MRSA阳性参与者的人数为65或总测试人群的8.50%。

[0699] 研究主管选择了MRSA阳性参与者(n=65)进行功效研究。研究主管选择了金黄色葡萄球菌阳性参与者进行刺激性研究。

[0700] 使用PBS中的BioPlx01-WT(10^8)进行功效研究。

[0701] 关于12周的持续时间和对该过程的承诺,建议确认的MRSA阳性参与者(n=65)。研究持续时间延长至6个月。功效研究的受试者如表10所示。

[0702] 表10.功效研究

[0703]

鉴定出MRSA阳性	n=65
MRSA阳性,用于治疗组-Decol/Recol	n=34
MRSA阳性,用于阴性对照-仅Decol	n=15
MRSA因研究而丢失(抗生素的使用/退出)	n=04
MRSA阳性,未使用	n=12

[0704] 去定植/重新定植过程

[0705] 去定植。

[0706] 首先对参与者执行完全的去定植。以下是在关键地点消除MRSA的确认。根据“去定植方案”章节,用氯己定进行全身去定植,用莫匹罗星进行鼻部去定植,并用李施德林原始杀菌剂漱口。在完成去定植程序的疗程(五天)后,将进行确认MRSA测试以验证关键区域中不存在MRSA,并且将进行金黄色葡萄球菌测试以收集有关定植后的金黄色葡萄球菌水平的信息。参与者经历了为期五天的去定植过程,所述去定植过程由研究人员进行管理和观察。真皮去定植由研究人员进行,并且包含(1)全身喷洒施用氯己定(4%),(2)用莫匹洛星

(2%)进行鼻部(黏膜)去定植,以及(3)通过施用李施德林进行喉部(黏膜)去定植,每天一次,共5天。参与者经历了为期五天的去定植过程,所述去定植过程由BioPlx私人有限公司的人员进行管理和观察。

[0707] 真皮-氯己定

[0708] 鼻部(黏膜)-莫匹洛星

[0709] 喉部(黏膜)-李施德林

[0710] 参与者经历了一个全身氯己定浴,其使皮肤和头发完全去定植。的确,氯己定具有残留的抗生素活性,只要存在皮肤外层,所述抗生素活性就可以持续。五天的等待时间可确保皮肤的外层脱落,并确保当重新定植受试者时,BioPlx-01不会在此过程中被杀死。

[0711] 鼻部去定植。为了使鼻子和喉咙去定植,参与者必须使用为期五天的莫匹罗星抗生素疗程。这使鼻孔(鼻子)完全去定植。

[0712] 喉部去定植。为了使喉部去定植,参与者必须每天用原始李施德林漱口30秒。这使喉咙完全去定植。

[0713] 成功的去定植的特征在于,鼻子、喉咙和腋窝(腋下)的MRSA结果为阴性。成功进行去定植后,仅需在下游时间点进行鼻部跟踪测试。鼻子或喉咙中的MRSA阳性需要第二轮完整的去定植程序。在去定植之前,该类别的患者不会进入下一阶段的研究。腋窝中的MRSA阳性不需要第二轮完整的去定植,并且可以进入下一阶段的研究。现在,所有下游MRSA测试中都必须包含腋窝位点。

[0714] 每个研究组(1、2、3)的去定植后的资格测试N-T-H-A—金黄色葡萄球菌和MRSA。由Garg实验室工作人员获取拭子。由Gard实验室人员将所有拭子平板接种在金黄色葡萄球菌和MRSA的科玛嘉平板上。将所有平板在Garg博士的实验室中孵育24小时。所有板均由Garg博士亲自读取并评分。在读取时获取所有板的照片,并用Garg博士的结果标记。所有数据均由BioPlx私人有限公司以纸质和数字形式记录。所有数字数据都被传输到BioPlx私人有限公司,以备案并输入记录系统。此程序用于功效研究的所有步骤。

[0715] 如下所述,通过施用磷酸盐缓冲液(PBS)中的1.2x 10^8cfu/mL Bioplx-01进行重新定植,每天约15mL,连续两天,按以下时间表进行:

[0716] 连续两天进行1.2x10^8重新定植和QC测试;

[0717] POST 1.2x10^8重新定植测试—一天;

[0718] POST 1.2x 10^8重新定植测试—一周;以及

[0719] 每周观察—第2周及其后。

[0720] 针对每个研究组(1、2、3)进行去定植后的资格测试N-T-H-A—金黄色葡萄球菌和MRSA。

[0721] 每周观察包含由实验人员获取的受试者的拭子。采样的解剖部位包含鼻孔、喉咙、腋窝、手。

[0722] 由实验室人员将所有拭子平板接种在金黄色葡萄球菌和MRSA的科玛嘉(chromagar)平板上。将所有平板在37℃下孵育24小时。所有板均由研究主管亲自读取并评分。在读取时获取所有板的照片,并用结果进行标记。

[0723] 阴性对照。去定植后的阴性对照n=15;ID编号:0021、0022、0060、0512、0704、0724、0731、0218、0234、0239、0249、0302、0327、0037、0221。去定植后的MRSA复发n=15:初

始的阴性对照运行(第4周工作表—非定植后平均第6周)包含MRSA阳性n＝08;MRSA阴性n＝07,从而导致复发率＝53％。最终的阴性对照运行(工作表第12周—非定植后平均第16周)导致MRSA阳性n＝09;MRSA阴性n＝06,复发率＝60％。

[0724] 治疗组1、2、3。去定植/重新定植(8^10细胞浓度):34.将去定植/重新定植分为三组用于研究:第1组:PBS中的BioPlx01-WT(10^8)n＝10;ID编号:0015、0086、0146、0147、0149、0155、0178、0625、0657、0667。第2组:PBS中的BioPlx01-WT(10^8)n＝10;ID编号:0063、0075、0124、0138、0172、0325、0444、0478、0483、0538;以及第3组:PBS中的BioPlx01-WT(10^8)n＝14ID编号:0064、0112、0158、0232、0336、0488、0497、0498、0499、0552、0574、0692、0725、0735。

[0725] 去定植/重新定植后的MRSA复发:0;第1组＝0;第2组＝0;第3组＝0。去定植后MRSA阴性的持续时间:18周＝16例:0复发;以及17周＝18例:0复发。

[0726] 可检测的重新定植性能

[0727] 测试了功效研究中的受试者的金黄色葡萄球菌阳性结果,以使用青霉素酶盘检测替换物BioPlx 01WT的存在。结果示于表11中。

[0728] 表11.金黄色葡萄球菌阳性(NvTvHvA)

[0729]

SA阳性	定植后的天数/周数;+/总体
97.1％(第1组和第2组和第3组)	第01天;33/34
91.2％(第1组和第2组和第3组)	第01周;31/34
100％(第1组和第2组和第3组)	第02周;34/34
97.1％(第1组和第2组和第3组)	第03周;33/34
91.2％(第1组和第2组和第3组)	第04周;31/34
100％(第1组和第2组和第3组)	第05周;34/34
88.2％(第1组和第2组和第3组)	第06周;30/34
79.5％(第1组和第2组和第3组)	第08周;27/34
67.7％(第1组和第2组和第3组)	第10周;23/34
85.3％(第1组和第2组和第3组)	第12周;29/34
100％(第1组和第2组和第3组)	第14周;20/20

[0730] 研究持续时间延长至六个月。在研究结束时,金黄色葡萄球菌阳性率为100％,这使用BioPlx产品对BioPlx-01 MRSA进行的去定植/重新定植过程的总排除效果大于26个月,而先前的文献显示,在仅使用标准的去定植方法的情况下,金黄色葡萄球菌鼻腔定植在第4周时的复发率为45％,而在第12周时复发率为60％。

[0731] 刺激性研究

[0732] 如上所述,由研究指导者(Garg博士)选择MRSA阳性参与者进行功效研究。研究主管选择了金黄色葡萄球菌阳性参与者进行刺激性研究。MRSA患者需要花费大量精力进行筛查,因此尝试保留这些患者以进行研究的主要功效评估。非MRSA阳性定植率约占所有筛查参与者的33％-66％,因此有更多的供应。因为MRSA是金黄色葡萄球菌的抗生素抗性菌株,所以在金黄色葡萄球菌阳性参与者中进行刺激性测试等同于在MRSA阳性参与者中进行刺激性测试。

[0733] 对55名金黄色葡萄球菌阳性受试者进行了刺激性研究,方法是向右前臂局部施用

施用约5mL的BioPlx-01(502a)(1.2x 10^7CFU/mL,于PBS中)。左臂用作阴性对照。研究人员在应用后第1天、第4天和第7天观察前臂并拍照,以检查是否发红或有脓疱。在刺激性研究期间未进行抑制步骤。未观察到刺激或不良事件。

[0734] 培养条件

[0735] 功效研究使用溶于水中的PBS(Fisher)BP2944100磷酸盐缓冲盐水片剂形式的BioPlx-01(1.2x 10^8CFU/mL)来提供100mM磷酸盐缓冲液、2.7mM KCl和137mM NaCl(pH 7.4,在25℃下)。

[0736] 如下制备母液。将BioPlx-01菌株以四条纹方式划线到胰蛋白酶大豆琼脂(TSA)板上。在37℃下20小时后,将新鲜的细胞团用于无菌接种无菌胰蛋白酶大豆肉汤(TSB)瓶。将该培养物在37℃下以250rpm搅拌孵育18小时。将无菌的50%甘油添加到培养物中,使其最终含量为5%(v/v),然后将批次等分到无菌的50mL聚丙烯螺帽管中。将等分试样在-20℃下冷冻。为了进行质量控制,将一等份的试样解冻,通过剧烈振荡混合使其完全重悬并稀释,通过在37℃的脑心浸液(BHI)琼脂平板上孵育18小时来确定每mL的菌落形成单位(CFU)。由稀释校正的菌落计数计算CFU值。以这种方式生产的一批浓缩的BioPlx-01母液含有8x 10^9CFU/mL的BioPlx-01。通过在HiChrom葡萄球菌生色指示剂培养基上于37℃下孵育18小时来确认菌株的表型身份,所述菌株仅产生预期的绿色菌落。当在MRSA生色指示剂板上孵育时,该材料不产生菌落。

[0737] 用于功效研究的工作储备液的制备1.2x 10^8CFU/mL

[0738] 将完整的BioPlx-01储备液的10mL等分试样以8x 10^9CFU/mL完全融化,然后振荡整整1分钟以混合。将8.5mL的该溶液添加到275mL无菌(室温)PBS中,从而产生2.4x 10^8CFU/mL的储备液。通过倒置将其充分混合,并在4℃下保存直至使用。如功效研究中所使用的,为了提供PBS基质1.2x 10^8工作溶液-BioPlx-01,将一小瓶“2.4x 10^8CFU/mL”溶液通过剧烈颠倒进行混合,并将200mL的所述溶液添加到200mL PBS中以产生“1.2x 10^8CFU/mL工作溶液-BioPlx-01”。后一种溶液是在功效研究中应用于受试者的材料。将瓶盖紧,通过摇晃混合,并在4℃下保存直至使用。

[0739] 实例2.选择一个或多个诱导型启动子

[0740] 在这个实例中,评估了启动子候选者。通过与人全血和血清一起孵育,评估了MSSA菌株BioPlx-01中6个启动子候选者的倍数诱导和基础表达。将表达针对管家基因(gyrB)进行归一化,并将其与在液态胰蛋白酶大豆肉汤(TSB)培养基中对数生长的细胞中的表达进行比较。

[0741] 将BioPlx-01生长至对数中期(2OD/mL),然后大量洗涤并转移至新鲜收集的来自供体TK的血清和肝素化血液中。

[0742] 将样品以125rpm在缓慢搅拌的通风烧瓶中孵育;并在37℃下在15分钟、45分钟或75分钟处取出样品进行RNA分离。洗涤收集的细菌,并使用Qiagen Allprep试剂盒提取RNA,洗脱并冷冻RNA。由RNA制备编码DNA(cDNA),并在ABI 7500Fast仪器中通过实时PCR(Taqman)评估靶基因的表达。

[0743] 通过对在普通cDNA样品上运行的标准曲线进行插值来确定相对RNA水平以用于表达钳策略(P_{clfB}),所述普通cDNA样品被连续稀释并用特异于由5个假定的血清响应性启动子(P_{hlgA}、P_{leuA}、P_{sstA}、P_{sirA}、P_{isdA})和一个候选基因探针驱动的ORF的引物/探针进行测试,所述

候选基因在定植过程中在皮肤上的金黄色葡萄球菌中上调,但在血液中未报告上调。

[0744] 将所有基因的表达相对于在金黄色葡萄球菌中广泛用于此目的的管家基因gyrB(回旋酶亚基)进行归一化。通过rt PCR确定Ct。Ct、PCR的阈值循环,是在给定荧光下的循环数;基因(mRNA)数量越高,Ct越低。

[0745] 使用单个供体的血清的初步结果示于表12中。

[0746] 表12.血清暴露对BioPlx-01中KS启动子候选者的活化和TSB中基础表达水平的影响

[0747]

基因	通过实时 PCR 的血清处理的样品中的表达的倍数诱导增加	基础表达 TSB 中的 LeuA/GyrB 比率
hlgA（γ 溶血素）	30	0.19
leuA（AA 生物合成酶）	7.7	0.75
sstA（铁转运）	12.8	0.33
sirA（铁转运）	1.2	0.95
isdA（血红素转运蛋白）	1.7	0.59
clfB（聚集因子 B）	1.3	0.78

[0748] 在人血清中诱导启动子候选者P_{hlgA}的时间过程示于图6中,所述图示出了TSB中的hlgA/gyrB比率为0.19,有利于用于杀灭开关构建体。“no RT”:将75分钟时间点RNA制成的cDNA稀释到与所有其它样品稀释度相同的反应液中;如果RNA制备中没有gDNA,则应看不到任何信号。人血清中sstA的时间过程示于图7中,所述图示出了TSB中的sst/gyrB比率为0.33。选择P_{hlgA}和P_{sstA}作为首选候选者以进行进一步评估。TSB中的hlgA水平仅为管家基因gyrB的1/5或更低,因此该启动子成为主要候选者。

[0749] 使用来自两个供体的血清和全血重复该实验以分析总RNA,不同之处在于用DNaseI处理cDNA以去除污染的基因组DNA。具体地说,按照试剂盒方案,用turbo DNAse试剂盒处理RNA样品,所述试剂盒方案用Dnase进行处理并使其失活。使用DNAse的“无逆转录”对照(无RT对照)处于bkg/基线水平,因此可以接受。

[0750] 然后将处理过的RNA用于产生cDNA(并且再次运行无RT对照)。通过技术三次试验,Taqman对cDNA进行分析(从hlgA和sstA开始)。结果示于表13中。

[0751] 表13.启动子选择—血清和血液暴露对BioPlx-01中KS启动子候选者的活化和TSB中基础表达水平的影响。

[0752]

启动子	15 分钟处的倍数诱导			“泄露”表达	75 分钟内血清诱导>3 倍?
	血清（供体 1）	血清（供体 2）	血液（供体 2）	Target/GyrB（TSB）	
ISDA	83	15	4.1	0.002、0.022	是
SSTA	9	6.7	0.3	0.16、0.333	是
LEUA	1393	1601	990	0.0013、0.000017	是
HLGA	27	6	35	0.23、0.26	是
SIRA	5.5	2.6	0.08	0.25、1.1	否

[0753] 基于表13中所示的数据,消除了P_{isdA}、P_{sstA}、P_{sirA}。由于显著的基础表达而消除了P_{sstA},并且其在全血中未被诱导。由于显著的基础表达和在血清中的低幅度诱导,也消除了P_{sirA},并且其在全血中未被诱导,并且表现出不持续的诱导。

[0754] 基于该实验,选择P_{leuA}作为一个优选的启动子,因为其在血清中表现出非常高的上调,在TSB中表现出非常低的基础表达,并且在定植期间没有上调。可以使用表达钳,但是当使用P_{leuA}作为启动子时,表达钳可以是任选的。在Malachawa 2011(微阵列)和本实例中,P_{leuA}还表现出通过血液或血清暴露的强烈激活。leuA是九个基因的操纵子的一部分:ilvDBHC、leuABCD、ilvA。当与游离链氨基酸(亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸)结合时,被称为Cody的因子会结合RR从而抑制转录,因此,当游离氨基酸水平高于阈值时,启动子是沉默的。在使用MRSA的猪离体鼻内定植试验中,包含leu的氨基酸生物合成操纵子未被上调,并且作者提出,在定居过程中存在足够数量的氨基酸以防止这些途径的上调(Tulinski等人,2014)。

[0755] 基因leuA在血液和血清中被非常强烈地激活并且具有低的基础表达,因此进一步的理解是重要的。leuA在九个基因的操纵子中的两个盒中的第二个盒内。驱动其的调节区可能直接在ilvD上游或leuA上游。一种理解的方法是测试和比较两种变体。

[0756] ilvDBHC-leuABCD-ilvA

[0757] 选择P_{hlgA}作为另一个优选的启动子,因为其在血清和血液中表现出高度上调,并且在鼻定植过程中表现出下调。P_{hlg}的一个缺点是TSB中的基础表达。这可以通过包含用于hlgA的表达钳来解决。肽HlgA是一种可裂解宿主红细胞和白细胞的分泌型成孔毒素的亚基。HlgA(S类)与HlgB(F类)缔合,从而在同时产生γ-溶血素和白血球素的菌株中形成AB毒素(HlgA和LukF-PV也可以形成复合物)。

[0758] 通过群体感应agr的活化,TSB中的HlgA操纵子的转录被上调,但是血清中的agr被下调而hlgA被上调,因此hlgA的上调独立于血清中的agr途径。在一篇论文中,定居过程中的溶血素与TSB相比下调了5.7倍,具体地说,用MRSA ST398定植的猪鼻部外植体;参见Tulinski等人2014。然而,在这些实验中,在定植过程中未见hlgA表达的证据。调节子sarT抑制溶血素操纵子的转录,并且如果P_{hlgA}用于驱动KS(例如通过从定植启动子中过度表达sarT),则所述调节子可能是有用的"表达钳"。

[0759] 在另一个实施例中,合成微生物包括至少一种分子修饰,所述分子修饰包括可操作地连接至第一调节区的第一细胞死亡基因,所述第一调节区包括被血清或血液激活但在人皮肤、粘膜或TSB中表达很少或不表达的多个启动子。hlgA在皮肤上的较低表达具有更大的确定性,因为其在定植过程中被下调。leuA在TSB中的较低表达具有更大的确定性。

[0760] 实例3.选择一个或多个死亡基因

[0761] 在该实例中,评估细胞死亡基因候选者以制备具有至少一种分子修饰的合成微生物,所述分子修饰包括可操作地连接至包括第一诱导型启动子的第一调节区的第一细胞死亡基因。死亡基因的相对效力未知。由于泄漏表达,看起来最好的死亡基因不一定是最有效的基因。作用机制的多样性可能导致两个或更多个死亡基因组合的协同杀灭作用。候选死亡基因包含:SprA1:膜破裂;sma1:基因组破坏;和rsaE:阻断中枢代谢。死亡基因的各种组合示于表14中。创建了这些质粒并对其进行了测序,以测试P_{leuA}和P_{hlgA}驱动的KS变异体。

[0762] 表14.死亡基因KS构建体

[0763]

菌株编号	质粒名称	启动子	杀灭基因（PCD）	目的	注释
1	pTK1	镉诱导型	*SprA1*	+对照显示*sprA1*SprA1是功能性杀灭基因	用镉处理的TSB中的细胞应迅速死亡
1A	pTK2	镉诱导型	*sprA1*SprA1反向	阴性对照	用镉处理的TSB中的细胞不应迅速死亡
2	pTK3	LeuA	*sprA1*SprA1	KS	转移至血清或血液的细胞应迅速死亡
3	pTK4	LeuA	*sprA1*SprA1反向	比#2更容易获得质粒	将插入频率与#2进行比较
4	pTK5	LeuA	*sprA1*SprA1 + CLFB:: *sprA1*SprA1 as	KS	#2的表达钳变体
5	pTK6	HlgA	*sprA1*SprA1	KS	可能不健康甚至无法获得的基础表达
6	pTK7	HlgA	SprA1 + CLFB::SprA1 as	KS	可能比#5更健康
7	pTK8	镉诱导型	*sma1*限制性酶	+对照	用镉处理的TSB中的细胞应迅速死亡
8	pTK9	HlgA	*sma1*限制性酶	KS	使用反义制成的表达钳
9	pTK10	LeuA	*sma1*限制性酶	KS	使用反义制成的表达钳
10	pTK11	镉诱导型	*rsaE* sRNA	+对照	用镉处理的TSB中的细胞应迅速死亡
11	pTK12	HlgA	*rsaE* sRNA	KS	使用反义制成的表达钳
12	pTK13	LeuA	*rsaE* sRNA	KS	表达钳不存在，但可以使用反义制成

[0764] 死亡基因可以商购获得(Atum)，载体也可以商购获得(BEI)。获得单个死亡基因的结果后，构建包括两个死亡基因的组合。根据表14制备合成质粒、载体和合成微生物。

[0765] 产生包括细胞死亡基因的合成菌株的步骤如下。

[0766] 1.在大肠杆菌中规模产生穿梭载体pCN51。

[0767] 2.将死亡基因克隆到大肠杆菌中的pCN51中(在Cd-诱导型P_{cad}下)。

[0768] 3.用血清响应性启动子替换P_{cad}；并在适用的地方插入表达夹。

[0769] 4.通过对KS盒进行测序来验证构建体。

[0770] 5.电穿孔进入金黄色葡萄球菌RN4220，并在红霉素板上选择转化株(此菌株为限制性-，并产生正确的甲基化模式以在BioPlx-01中存活)。RN4220是用作中间体的金黄色葡萄球菌菌株；限制性-，甲基化+；BEI产品编号NR-45946。

[0771] 6.由RN4220制备质粒并进行限制性消化以确认ID。

[0772] 7.将质粒电穿孔到BioPlx-01中，并在红霉素板上选择。

[0773] 8.准备用于血清实验的合成微生物菌株。

[0774] 测试具有至少一种分子修饰的合成微生物菌株的步骤如下,所述分子修饰包括可操作地连接至包括第一启动子的第一调节区的第一细胞死亡基因。

[0775] 1.在TSB加抗生素中生长,作为对质粒的选择性压力。

[0776] 2.生长与WT Bioplx-01相比如何?制备生长曲线。

[0777] 3.Cd-启动子变体:洗涤细胞并将其转移至Cd培养基(对照是WT Bioplx-01,其包含无死亡基因的空载体)。

[0778] 4.KS变体:洗涤细胞并将其转移至血清(对照是WT Bioplx-01,其包含无死亡基因的空载体)。

[0779] 5.使用$OD_{630\ nm}$用酶标仪监测生长情况(延长的时间,监测逃逸突变体的出现)。

[0780] 6.对于全血测试,仅对获胜的候选者执行并且在TSB琼脂上使用CFU作为死亡读数。

[0781] 7.如果存在明显的逃避突变体,则将质粒穿梭到大肠杆菌中并测序整个质粒。

[0782] 质粒可以由市售产品制备。在一个实施例中,pCN51(6430bp)是用于修饰的商业质粒。pCN51是大肠杆菌SA穿梭载体,其中ampR用于大肠杆菌选择,而ermC用于金黄色葡萄球菌选择。pCN51是基于pT181的低拷贝滚环质粒,含有镉诱导型启动子和BLA终止子。BEI产品编号NR-46149。KS变体的组合可以在一个质粒中。可以在穿梭载体质粒的MCS中插入一个以上的KS。

[0783] 1.从Atum/DNA2.0订购3种编码3个杀灭基因的构建体,其中限制性套件策略性地放置在每个基因的末端以进行定向克隆。

[0784] 2.pCN51穿梭载体(BEI NR-46149)、RN4220金黄色葡萄球菌(BEI NR-45946)和DC10B大肠杆菌(BEI NR-49804)购自BEI Resources。

[0785] 3.订购表15中所示的DNA寡核苷酸用于:i)来自BioPlx-01gDNA的RR的PCR扩增,其中末端带有限制性酶以进行定向克隆,以及;ii)KS构建体的DNA测序。

[0786] 表15:用于测序KS构建体的寡核苷酸

[0787]

寡核苷酸名称	序列(5'至3')	目的
TKO1	gatgcGCATGCGAAACAGATTATCTATTC (SEQ ID NO: 9)	用 Sph1 进行 P_{leuA} PCR 扩增(上游 pr)
TKO2	gatgcGCATGCCAGATTATCTATTCAAAG (SEQ ID NO: 10)	用 Sph1 进行 P_{leuA} PCR 扩增(上游 pr 替换物)
TKO3	catgatCTGCAGAGTAAATTCCCCCGTAAATT (SEQ ID NO: 11)	用 Pst1 进行 P_{leuA} PCR 扩增(下游 pr)
TKO4	cacgtgatCTGCAGAGTAAATTCCCCCGTAAA (SEQ ID NO: 12)	用 Pst1 进行 P_{leuA} PCR 扩增(下游 pr 替换物)
TKO5	gactacGAATTC AGGTGATGAA AAATTTAGAA (SEQ ID NO: 13)	用 EcoRI 扩增 P_{clfB} 的上游引物
TKO6	gactacGAATTCTGATGAA AAATTTAGAACTT (SEQ ID NO: 14)	TKO5 的备份
TKO7	cttagctGGATCCAAATATTACTCCATTTCAA (SEQ ID NO: 15)	用 BamHI 扩增 P_{clfB} 的下游引物
TKO8	cttagctGGATCCAAATATTACTCCATTTCAATTTC (SEQ ID NO: 16)	TKO7 的备份

[0788]

TKO9	gatgcGCATGC TCACAAACTA TTGCGAAATC (SEQ ID NO: 17)	用于扩增 P_{hlgA} 的上游引物；含有 Sph1
TKO10	gatgcGCATGC AAACTA TTGCGAAATC CATTC (SEQ ID NO: 18)	TKO9 的备份
TKO11	catgatCTGCAG ATATATAATAATCCATTTGT (SEQ ID NO: 19)	用于扩增 P_{hlgA} 的下游引物；含有 PstI
TKO12	catgatCTGCAGATATATAATAATCCATTTGTAAGCG (SEQ ID NO: 20)	TKO11 的备份
TKO13	GTGTTACGATAGCAAATGCA (SEQ ID NO: 21)	用于对含有 P_{cad} 的构建体进行测序的第一正义引物
TKO14	TTATTGGCTAAGTAGACGCA (SEQ ID NO: 22)	第二正义测序引物大约在 *sprA1* 基因中间退火
TKO15	CACATGTTCTTTCCTGCGTT (SEQ ID NO: 23)	在血清响应性 P_{leuA} 和 P_{hlgA} 上游退火的引物。在 pCN51 载体中 Sph1 位点上游约 75 nt 处退火
TKO16	ACGCGGCCTTTTTACGGTTC (SEQ ID NO: 24)	TKO15 的备份
TKO17	GAATGGGACTTGTAAACGTC (SEQ ID NO: 25)	在 P_{leuA} 下游三分之一处附近退火的引物，因为其是相当大的片段并且 TKO15 可能无法完全阅读
TKO18	GAATGGGACTTGTAAACG (SEQ ID NO: 26)	TKO17 的备份
TKO19	ATAAACGCCTGCGACCAATA (SEQ ID NO: 27)	在 P_{hlgA} 三分之一附近进行退火的引物，因为其是相当大的片段并且 TKO15 可能无法完全阅读
TKO20	GCGACCAATAAATCTTTTAA (SEQ ID NO: 28)	TKO19 的备份

[0789] 克隆

[0790] 所有凝胶电泳琼脂糖凝胶均是按照制造商的说明添加的1X TAE缓冲液中的1.0-2.0％琼脂糖和Midori green(Nippon Genetics Europe GmbH)。

[0791] 实例3A.构造pTK1和pTK2

[0792] 1.如下制备微量制备(miniprep)数量的pCN51和sprA1、sma1和rsaE质粒

[0793] A.将菌株在LB+羧苄青霉素(100μg/mL)平板上划线,然后在37℃下孵育15-18小时。

[0794] B.用每种单个菌落接种LB+羧苄青霉素(100μg/mL)液体,并在37℃下搅拌(240rpm)孵育15-18小时。

[0795] C.按照制造商的说明,使用Qiagen旋转微量制备试剂盒,为每种菌株准备5X复制微量制备物,用30μL洗脱每个色谱柱中的DNA,然后将复制质粒制备物汇集在一起(在-20℃下冷冻DNA)。

[0796] 2.消化、连接、平板接种

[0797] 2.1.用PstI和EcoRI切割pCN51以线性化(37℃,30分钟)。预期大小为～6400bp(来自多克隆位点(MCS)的35bp片段丢失/在凝胶上不可见)。

[0798] 2.2.用Kpn1和BamHI切割pCN51质粒以线性化(37℃,30分钟)。预期大小为6400bp(来自MCS的35bp片段丢失)。

[0799] 2.3.用Pst1和EcoRI切割来自DNA2.0的sprA1质粒以释放期望的233bp sprA1插入物。

[0800] 2.4.用Kpn1和BamHI切割来自DNA2.0的sprA1质粒以释放期望的233bp sprA1插入物。

[0801] 2.5.在DNA消化过程中,倒入1.5%琼脂糖凝胶进行电泳。

[0802] 2.6.将8μL的6X加载染料添加到所有4个反应中以及1kb加DNA大小梯中(3μL,于30μL中)。

[0803] 2.7.在100V下运行凝胶1.5小时。

[0804] 2.8.用干净的剃须刀剃掉上文提到的所关注的带。

[0805] 2.9.将切片用来自Qiagen凝胶提取试剂盒(56℃)的3体积的QG缓冲液融化,偶尔涡旋。

[0806] 2.10.分离配对的载体,并一起插入一根色谱柱中,然后将材料洗脱到30μl的Qiagen洗脱缓冲液中。

[0807] A.Pst1+EcoRI插入物加上pCN51 Pst1/EcoRI载体。

[0808] B.Kpn1+BamHI插入物加上pCN51 Kpn1/BamHI。

[0809] 2.11在聚苯乙烯泡沫塑料盒中的500mL RT水中加入一些冰,以进行水浴;加入适量的冰以达到16℃。

[0810] 2.12.加入3.4μL的10X T4 DNA连接酶缓冲液并混合。加入1μL的T4DNA连接酶(来自NEB的4×10^5U/mL储备液)并在16℃下孵育2小时。

[0811] 2.13.将电穿孔单元设置为1500V/200ohms/25μF。

[0812] 2.14.解冻2小瓶DH5α大肠杆菌,然后将40μL的每个小瓶分别放入2个Eppendorf管中。在冰上冷却2个电穿孔比色皿。

[0813] 2.15.将1μL未稀释的连接液添加到40μL融化的DH5α大肠杆菌中,然后转移至冰冷的1mm间隙电穿孔比色皿中。

[0814] 2.16.准备好:在1mL移液器中的1mL SOC培养基、无菌1mL吸头和2个无菌14mL培养管

[0815] 2.17.将细胞电穿孔(首先是连接A),然后尽快将1mL SOC加到比色皿中,上下吸移6倍,然后将整个体积转移到新的14mL培养管中以进行恢复。重复此过程进行连接B的电穿孔。将两个恢复的样品置于37℃的振荡水浴中,持续1小时。

[0816] 2.18.在细胞恢复的同时,将2个LB+羧苄青霉素(100μg/mL)琼脂板倒置,将二者的盖稍稍倒在37℃的培养箱中(未加湿)

[0817] 2.19.恢复1小时后,相应地移出并标记LB+羧苄青霉素(1050μg/mL)琼脂平板,然后从水浴中移出14mL管。

[0818] 2.20.使用无菌玻璃珠,将150μL每种1mL恢复混合物铺在板上。

[0819] 2.21.将板在37℃的培养箱中放置16-18小时。

[0820] 2.22.记录

[0821] 连接A(P_{cad}::sprA1正向)和

[0822] 连接B(P_{cad}::sprA1反向)的菌落计数。

[0823] 3.筛查阳性:

[0824] 3.1.选择6个菌落进行筛查

[0825] 3.2.将6个连接A的菌落和6个连接B的菌落分别接种到14mL培养管中的3mL液体LB+羧苄青霉素(1050μg/mL)中。

[0826] 3.3.在37℃下振荡16小时。

[0827] 3.4.按照制造商的说明使用Qiagen旋转微量试剂盒分离质粒DNA,并将DNA洗脱到40μL洗脱缓冲液中。

[0828] 3.5.用以下消化5μL的12个质粒DNA中每一个质粒DNA:

[0829] A.PST1加上ECOR1

[0830] B.Kpn1+BamHI

[0831] C.单独的Xmn1

[0832] 如果Pst1+EcoRI,则混合7个反应。将5μL DNA溶液添加到15μL消化混合物中,并在37℃下孵育2小时。对Kpn1+BamHI和Xmn1消化进行相同的操作。

[0833] 与预期的凝胶模式比较:pTK1消化的正确模式:i)EcoRI和PstI;ii)Kpn1和BamHI;iii)Xmn1。pTK2消化的正确模式:i)EcoRI和PstI;ii)Kpn1和BamHI;iii)Xmn1。

[0834] 实例3B.制备pTK3(P_{leuA}::sprA1)和pTK6(P_{hlgA}::sprA1)和pTK4(P_{leuA}::sprA1反向)

[0835] 1.使用Qiagen“All prep”试剂盒从BioPlx-01的对数期培养物中提取gDNA。

[0836] 2.用pph1和Pst1消化pTK1 SprA1,以剔除镉诱导型启动子(P_{cad})。

[0837] 3.使用上游含有Sph1限制性序列且下游含有Pst-1限制序列的PCR引物,对来自Bioplx-01gDNA的leuA调节区(P_{leuA})进行PCR扩增。(下面的TKO1和TKO3序列;或备份TKO2+TKO4)。如前所述,通过凝胶电泳验证限制性内切。

[0838] PCR混合物:

[0839] 1.0μL来自BioPlx-01 50 ng/μL的gDNA

[0840] 25.0μL去离子水

[0841] 10.0μL 5X HF缓冲液

[0842] 5.0μL 2mM dTNP混合物

[0843] 4.0μL引物TKO1(5 pmol/μL储备液)

[0844] 4.0μL TKO3(5 pmol/μL储备液)

[0845] 1.0μL酚醛聚合酶NEB

[0846] ——————————

[0847] 50.0μL总计

[0848] 循环:

[0849] 98℃,持续2分钟

[0850] 20个循环:98℃,15秒--64℃,30秒--72℃,1分钟

[0851] 15个循环:98℃,持续15秒--55℃,持续30秒--72℃,持续1分钟

[0852] 保持:4℃,无限期

[0853] 4.使用上游含有Sph1限制性序列且下游含有Pst-1限制序列的PCR引物,对来自Bioplx-01 gDNA的hlgA调节区(P_{hlgA})进行PCR扩增。(TKO9和TKO11或备用集TKO10或TKO12)。除引物的身份外,PCR条件与上文针对P_{leuA}的条件相同。

[0854] 5.使用Qiagen PCR净化试剂盒,净化PCR反应并洗脱到43μL洗脱缓冲液中

[0855] 6.用Sph1和Pst1切割步骤3中的P_{leuA} PCR产物和步骤4中的P_{hlgA} PCR产物。为此添加5μL的10X CutSmart(NEB)和1μL的Sph1和Pst1,并在在37℃下孵育2小时。

[0856] 7.用Sph1/Pst1消化pTK1。

[0857] 8.在1.5%琼脂糖凝胶上分馏pTK1 Sph/Pst消化物以及Sph/Ps消化的P_{leuA}和P_{hlgA},并用干净的剃须刀切下~6000pTK1主链以及P_{leuA}(390bp)和P_{hlgA}(253bp)片段。

[0858] 9.将pTK1主链切片分为两部分,一半与LeuA切片结合,另一半与HlgA切片结合。使用Qiagen凝胶提取试剂盒一起融化并一起分离。将每个切片洗脱到30uL EB中。

[0859] 10.加入3.4μL的10X T4 DNA连接酶缓冲液和1μL的T4 DNA连接酶,并在16℃下孵育至少1小时。

[0860] 11.按照第2.13-2.22节中的步骤进行电穿孔、恢复和菌落平板接种。

[0861] 12.两个连接旨在产生正向的P_{leuA}::sprA1(pTK3)和正向的P_{hlgA}::sprA1 wt(pTK6)。

[0862] 实例3C.制备pTK4(与pTK3同时进行步骤)

[0863] 1.使用gDNA分离试剂盒从BioPlx-01的对数期培养物中提取gDNA。

[0864] 2.用Sph1和Pst1消化pTK2(正义sprA1),以剔除P_{cad}(有关消化条件,请参见上文)。

[0865] 3.将上文的Sph1/Pst1消化的P_{leuA}片段插入Sph1/Pst1消化的pTK2中,以生成反向的P_{leuA}::sprA1 wt(pTK4)。凝胶提取、连接和电穿孔过程的详细信息与上文第2节克隆相同。

[0866] 筛查pTK3、pTK4和pTK6:

[0867] 3.1.每种连接选择6个菌落进行筛查

[0868] 3.2.将6个pTK3的菌落和6个pTK4的菌落和6个pTK6的菌落分别接种到14mL培养管中的3mL LB+羧苄青霉素(100μg/mL)中。

[0869] 3.3.搅拌孵育16小时(37℃,240rpm)。

[0870] 3.4.使用微型制备试剂盒分离质粒DNA,并用40μL洗脱缓冲液洗脱DNA。

[0871] 3.5.如下消化5μL的18个质粒DNA中的每一个质粒DNA(准备足够的消化反应混合物以进行20个反应,从而解决移液错误):

[0872] A.Sph1加上Pst1

[0873] B.Xmn1。

[0874] 将5μL DNA添加到15μL消化反应混合物中,并在37℃下孵育2小时

[0875] 3.6.用凝胶电泳验证消化,与

[0876] pTK3、pTK4和pTK6的预期凝胶模式进行比较。

[0877] 制备pTK5和pTK7

[0878] 1.使用上文制备的BioPlx-01的gDNA。

[0879] 2.使用上游具有EcoRI限制性序列且下游具有BamHI限制性序列的引物,对来自BioPlx-01基因组DNA的clfB RR(P_{clfB})进行PCR扩增(引物:TK05和TK07)

[0880] PCR混合物(50μL总体积)

[0881] 1.0μL来自BioPlx-01 50ng/μL的gDNA

[0882] 25.0μL去离子水

[0883] 10.0μL 5X HF缓冲液(NEB)

[0884] 5.0μL 2mM dTNP混合物

[0885] 4.0μL引物TK05(5pmol/μL储备液)

[0886] 4.0μL TK07(5pmol/μL储备液)

[0887] 1.0μL酚醛聚合酶(NEB)

[0888] 循环:

[0889] 98℃,持续2分钟

[0890] 20个循环:98℃,15秒--64℃,30秒--72℃,1分钟

[0891] 15个循环:98℃,持续15秒--55℃,持续30秒--72℃,持续1分钟

[0892] 保持:4℃,无限期

[0893] 3.如前所述,使用5μL的PCR反应进行凝胶电泳。

[0894] 4.使用PCR净化试剂盒,净化PCR反应并用30μL洗脱缓冲液进行洗脱。

[0895] 5.用BamH1和EcoR1消化P_{clfB} PCR产物,并将其插入EcoR1/BamH1消化的pTK3主链中,以生成pTK5。该质粒将含有由P_{leuA}调节的sprA1和由P_{clfB}调节的$sprA1_{AS}$。使用相同的P_{clfB}片段,将其插入EcoR1/BamH1消化的pTK6中以生成pTK7。该质粒将含有由P_{hlgA}调节的sprA1和由P_{clfB}SprA1调节的$sprA1_{AS}$。凝胶提取、连接和电穿孔过程的详细信息与上文第2节克隆相同。

[0896] 筛查pTK5和pTK7

[0897] 3.1将6个连接pTK5的菌落和6个连接pTK7的菌落分别接种到14mL培养管中的3mL LB+羧苄青霉素(100μg/mL)中。

[0898] 3.3搅拌孵育16小时(37℃,240rpm)

[0899] 3.3使用微型制备试剂盒分离质粒DNA,并将DNA洗脱到40μL洗脱缓冲液中。

[0900] 3.5用以下消化5μL的12个质粒DNA中每一个质粒DNA:

[0901] A.BamHI+EcoRI

[0902] B.单独的Xmn1

[0903] 按照制造商的建议,用BamHI/EcoRI和Xmn1制备消化反应混合物。

[0904] 将5μL质粒溶液添加到15μL消化反应混合物中,并在37℃下孵育2小时。如前所述,通过凝胶电泳验证消化。

[0905] 实例3D.构建pTK8、pTK9和pTK10(分别为P_{cad}-sma1、P_{hlgA}-sma1和P_{leuA}-sma1)。

[0906] sma1基因是从DNA2.0处订购的,其上游具有Pst1限制性位点且下游具有EcoR1限制性位点,以便插入以下中:

[0907] • pCN51,其用于制备P_{cad}::smaI,从而产生pTK8

[0908] • 已用Pst1/EcoR1从中去除了sprA1的pTK6,其用于制备P_{hlgA}-sma1,从而产生pTK9

[0909] • 已用Pst1/EcoR1从中去除了sprA1的pTK3,其用于制备P_{leuA}-sma1,从而产生pTK10

[0910] 1.用Pst1和EcoR1 bysprA1消化pCN51、pTK6和pTK3。各自在37℃下孵育2小时。

[0911] 2.通过用Pst1和EcoR1消化含有该基因的有序质粒(在37℃下,2小时)来生成sma1片段。用凝胶电泳验证消化(预期的片段大小为757bp)。

[0912] 3.按照步骤2.5到2.22进行凝胶提取、连接、电穿孔、恢复和抗生素选择。

[0913] 筛查pTK8、pTK9和pTK10

[0914] 3.1将6个连接pTK8的菌落和6个连接pTK9的菌落和6个连接pTK10的菌落分别接种到14mL培养管中的3mL LB+羧苄青霉素(100μg/mL)中。

[0915] 3.3搅拌孵育16小时(37℃,240rpm)

[0916] 3.3使用微型制备试剂盒分离质粒DNA,并将DNA洗脱到40μL的洗脱缓冲液中

[0917] 3.5用以下消化5μL的12个质粒DNA中每一个质粒DNA:

[0918] A.Pst1和EcoRI

[0919] B.Sph1和Xcm1

[0920] C.单独的Xmn1

[0921] 遵循先前描述的限制性反应和凝胶电泳程序。

[0922] 实例3E.制备pTK11、pTK12和pTK13(分别为P_{cad}-rsaE、P_{hlgA}-rsaE和P_{leuA}-rsaE)。

[0923] rsaE基因是从DNA2.0处订购的,其具有上游的Pst1限制性位点和下游的EcoR1限制性位点,以便插入以下质粒中:

[0924] • pCN51,其用于制备P_{cad}-rsaE,从而产生pTK11

[0925] • 已用Pst1/EcoR1限制性内切从中去除了sprA1的pTK6,其用于制备P_{hlgA}-rsaE,从而产生pTK12

[0926] • 已用Pst1/EcoR1限制性内切从中去除了sprA1SprA1的pTK3,其用于制备P_{leuA}-rsaE,从而产生pTK13

[0927] 1.如先前章节中所述,用Pst1和EcoRI sprA1消化pCN51、pTK6和pTK3。

[0928] 2.按照制造商的建议,消化含有rsaE Pst1和EcoR1的有序DNA。

[0929] 用凝胶电泳验证消化(rsaE片段应为142bp)。

[0930] 3.按照步骤2.5到2.22进行凝胶分离、连接、电穿孔、恢复和抗生素选择。

[0931] 实例4.使用DNA2.0制备插入物的sprA1钳构建体和无钳构建体的产生:

[0932] 此处将pCN51用作载体主链,因为其具有镉诱导型启动子(P_{cad})、Bla终止子、对大肠杆菌的氨苄青霉素抗性和对金黄色葡萄球菌的红霉素抗性。在Drutz1965中,显示502a对2μg/mL的红霉素敏感。

[0933] 质粒pTK1:阳性对照盒证明sprA1在被诱导时引起死亡。

[0934] 1.从DNA2.0订购以下插入物。用Pst1和EcoR1限制性酶将其从有序载体中切出,并插入Pst1/EcoR1消化的pCN51中。本质上,其只是开放阅读框,并在下游具有用于捕获sprA1的侧翼,如Sayed等人2012所述,除了使用P_{cad}特征代替了aTc启动子(P_{tet})。该序列已在pDRAW中进行了验证,以确保策略可以正常工作。

[0935] CTGCAG*ggtaccg*cagagaggaggtgtataaggtg
ATGCTTATTTTCGTTCACATCATAGCACCAGTCATCAGTGGCTGTGC
CATTGCGTTTTTTTCTTATTGGCTAAGTAGACGCAATACAAAA*TAG*GTGA
CATATAGCCGCACCAATAAAAATCCCCTCACTACCGCAAATAGTGAGGGG
ATTGGTGTataagtaaatacttattttcgttgt
ggatccttgact*GAATTC* SEQ ID NO: 122

[0936] 所得质粒:pTKXXX

[0937] 带下划线的大写字母:起始密码子

[0938] 斜体:终止密码子

[0939] 粗体:PstI位点上游

[0940] 大写粗体斜体:EcoRI位点

[0941] 小写粗体斜体:KpnI位点

[0942] 铁锈色:shine-delgarno(SprA1天然使用)

[0943] 小写的下划线:BamHI位点

[0944] 产生pTK2:在pTK1中反向插入

[0945] 1.用Kpn1和BamHI切出pTK1的插入物,并将其插入到Kpn1和BamHI消化的pCN51中。这产生了毒素基因的反义方向,并且无论是否用镉诱导,毒素都不应被表达。产物为pTK2。

[0946] PTK3和PTK4:P_{hlgA}调节sprA1毒素,以证明当sprA1由血清或血液诱导时,其引起细胞死亡(分别为正向和反向构建体)。

[0947] 存在$sprA1_{AS}$,但是仅具有其天然启动子,因此表达钳应该是无活性的—并且如果P_{hlgA}是渗漏的,则可能由于不存在表达钳而出现一些细胞毒性。

[0948] pTK3:

[0949] 1.用Sph1和Pst1消化pTK1(正义sprA1),以剔除P_{cad}。

[0950] 2.使用含有上游Sph1限制性位点和Pst1下游限制性位点的PCR引物,对来自菌株502a的hlgA调节区(P_{hlgA})进行PCR扩增。(引物:TKO1和TKO2)

[0951] 3.用Sph1和Pst1切割P_{hlgA} PCR产物,并将其插入经Sph1/Pst1消化的pTK1中,以生成的正向P_{hlgA}::sprA1 wt,从而生成pTK3。

[0952] 1 TTGCGAAATC CATTCCTCTT CCACTACAAG CACCATAATT AAACAACAAT

[0953] AACGCTTTAG GTAAGGAGAA GGTGATGTTC GTGGTATTAA TTTGTTGTTA

[0954] 51 TCAATAGAAT AAGACTTGCA AAACATAGTT ATGTCGCTAT ATAAACGCCT

[0955] AGTTATCTTA TTCTGAACGT TTTGTATCAA TACAGCGATA TATTTGCGGA

[0956] 101 GCGACCAATAAATCTTTTAA ACATAACATA ATGCAAAAAC ATCATTTAAC

[0957] CGCTGGTTAT TTAGAAAATT TGTATTGTAT TACGTTTTTG TAGTAAATTG

[0958] 151 AATGCTAAAA ATGTCTCTTC AATACATGTT GATAGTAATT AACTTTTAAC

[0959] TTACGATTTT TACAGAGAAG TTATGTACAA CTATCATTAA TTGAAAATTG

[0960] 201 GAACAGTTAATTCGAAAACGCTTACAAATGGATTATTATATAT SEQ ID NO:327

[0961] CTTGTCAATT AAGCTTTTGC GAATGTTTAC CTAATAATATATA SEQ ID NO:328

[0962] TKO1:5'-gatgcGCATGCTTGC GAAATC CATTCCTCTT-3'(含有SphI)

[0963] SEQ ID NO:329

[0964] TKO2:5'-catgatCTGCAGATATATAATAATCCATTTGTAAGCG-3'(含有PstI)SEQ ID NO:20

[0965] pTK4:

[0966] 1.用Sph1和Pst1消化pTK2(反义sprA1),以剔除镉启动子。

[0967] 2.插入相同的经Sph1/Pst1消化的P_{hlgA} PCR产物。这提供了反相SprA1。

[0968] pTK5:pTK3的表达钳,使用P_{clfB}驱动$SprA1_{AS}$

[0969] 1.使用引物对来自502a gDNA的P_{clfB}进行PCR扩增,以产生上游EcoR1限制性位点

和BamHI下游限制性位点。

[0970] 2.用EcoR1和BamHI消化pTK3,并插入经EcoR1/BamHI消化的P_{clfB}。

[0971] 所得质粒被称为pTK5,并将含有受血清响应性P_{hlgA}(上调的)调节的SprA1正义和受血清响应性P_{clfB}(下调的)调节的$sprA1_{AS}$ SprA1。

[0972] 以下序列是P_{clfB}(紧接在TTG起始密码子上游的219个核苷酸)。

[0973] 1AGGTGATGAAAAATTTAGAA CTTCTAAGTT TTTGAAAAGT AAAAAATTTG

[0974] TCCACTACTT TTTAAATCTT GAAGATTCAAAAACTTTTCA TTTTTTAAAC

[0975] 51TAATAGTGTA AAAATAGTAT ATTGATTTTT GCTAGTTAAC AGAAAATTTT

[0976] ATTATCACAT TTTTATCATA TAACTAAAAACGATCAATTG TCTTTTAAAA

[0977] 101AAGTTATATAAATAGGAAGAAAACAAATTT TACGTAATTT TTTTCGAAAA

[0978] TTCAATATAT TTATCCTTCT TTTGTTTAAA ATGCATTAAA AAAAGCTTTT

[0979] 151GCAATTGATA TAATTCTTAT TTCATTATAC AATTTAGACT AATCTAGAAA

[0980] CGTTAACTAT ATTAAGAATAAAGTAATATG TTAAATCTGATTAGATCTTT

[0981] 201TTGAAATGGAGTAATATTT SEQ ID NO:129

[0982] AACTTTACCTCATTATAAA SEQ ID NO:130

[0983] 引物:5'--gactacGAATTC AGGTGATGAAAAATTTAGAA-3'SEQ ID NO:13引物:5'cttagctGGATCCAAATATTACTCCATTTCAA-3'SEQ ID NO:15

[0984] PepA1(SAnewman)

[0985] MQGFKEKHQELKKALCQIGLMRSISEVKQLNIASEQ ID NO:113

[0986] pTK6血清响应性启动子2--SprA1

[0987] 在这个构建体中,响应性启动子2是P_{leuA}。

[0988] 1.用Sph1和Pst1消化pTK1(含有正义sprA1),以剔除P_{cad}。

[0989] 2.使用含有上游Sph1限制性位点和下游Pst1限制性位点的PCR引物(引物:TKO5和TKO6)对来自金黄色葡萄球菌502a gDNA的P_{leuA}进行PCR扩增。

[0990] 3.用Sph1和Pst1消化P_{leuA} PCR产物,并将其插入经Sph1/Pst1消化的pTK1中,以生成的正向P_{leuA}::SprA1 wt,从而生成pTK6。

[0991] 在金黄色葡萄球菌中,ilvleu操纵子由ilvDBHC-leuABCD-ilvA(9个基因)组成。其是BCAA生物合成操纵子。

[0992] 实例5.电感受态DC10B的制备

[0993] 通过收获对数期细胞并在无菌去离子水中充分洗涤细胞以降低电导率并使细胞进入用于电穿孔过程的适当渗透状态来制备电感受态细菌。

[0994] 1.从新鲜划线的无抗生素平板中,用每种菌株接种250mL LB培养基,并搅拌孵育(37℃,240rpm)。

[0995] 2.在收获细胞之前,打开离心机并将转子充分冷却至4℃。在收获细胞之前,将1L无菌过滤的10%甘油放在冰上。

[0996] 3.通过OD_{630}监测生长,并且当细胞为1.0OD_{630}单位/mL时,立即将烧瓶放在湿冰上10分钟。从这一点出发,培养物必须保持冰冷。将每个250mL培养物倒入冷却的500mL无菌离心瓶中。

[0997] 4.离心(15分钟,3500rpm,4℃)。倒出上清液并吸出任何残留的肉汤。

[0998] 5.将250mL无菌的10％甘油添加到每个离心瓶中,并通过上下移液使细胞完全悬浮。

[0999] 6.再重复4和5两次。

[1000] 7.倒出上清液,并通过上下移液将细胞悬浮于2mL的10％甘油中。

[1001] 8.为了冷冻,将100μL的培养物等分到湿冰上的微量离心管中。用完所有培养物后,将试管移至干冰/乙醇浴中,持续10分钟。冷冻培养物后,将细胞转移至-80℃的冰箱中进行保存。

[1002] 为了确认细胞的效率—用1μL的pUC19(10pM)转化细胞。

[1003] 大肠杆菌的电穿孔条件为1500V、25μF、200欧姆。使用来自DH5α的1μL质粒微量制备物,并将其电穿孔到50μL电感受态DC10B中。

[1004] 1.将电感受态大肠杆菌在冰上解冻,并在冰冷的0.1cm间隙电穿孔比色皿中,将1μl的质粒添加到50μl细胞中。

[1005] 2.如上所述进行电穿孔并立即添加恢复培养基(1mL,SOC培养基)。

[1006] 3.在37℃下以250rpm搅拌1小时,然后将100μL平板接种到LB+100μg/mL羧苄青霉素上。将平板在37℃下孵育16小时。

[1007] 实例6.SA转化

[1008] 转化技术改编自Chen,W.等人2017,“通过使用工程化的CRISPR/Cas9系统对金黄色葡萄球菌进行快速高效的基因组编辑(Rapid and Efficient Genome Editing in Staphylococcus aureus by Using an Engineered CRISPR/Cas9 System)”《美国化学协会期刊(J Am Chem Soc)》139,3790-3795。现有材料:含50μg/ml卡那霉素的LB琼脂平板;用于筛查12个克隆的PCR测序引物;带有卡那霉素的TSB肉汤,用于细菌生长的无菌试管;用于进行菌落PCR的PCR试剂(500μl的预混液)和PCR级H_2O。

[1009] 将10μL的Golden Gate assembly产品转化为100μL大肠杆菌DH10B感受态细胞。在含有50μg/mL卡那霉素的LB琼脂平板上选择成功的菌落。通过PCR或测序证实了pCasSA-NN_spacer质粒的构建成功。

[1010] 实例7.从大肠杆菌DH10B中纯化质粒以确认序列

[1011] 1.插入物的DNA测序

[1012] 引物TKO13至TKO20被不同地用于测序这13个质粒的插入物。表15中指出了用于每个质粒的引物。杀灭基因插入物获自DNA2.0。对P_{leuA}启动子和P_{hlgA}启动子进行了PCR扩增,以评估这些片段的任何可能的聚合酶错误。

[1013] 2.序列的组装和确认

[1014] 2.1.检查原始色谱图,并且仅选择高质量区域(非常高的信噪比和良好的峰分离)用于组装过程。

[1015] 2.2.识别并去除连续引物的序列读数的重叠区域;独特的读数在Microsoft Word中以文本的颜色编码从头到尾串在一起。

[1016] 2.3.Clustal W用于产生理论序列与实际序列的序列比对。通过手动检查色谱图可以确认任何差异。

[1017] 实例8.电感受态BioPlx-01和RN4220的制备

[1018] 通过收获对数期细胞并在无菌去离子水中充分洗涤细胞以降低电导率并使细胞

进入用于电穿孔过程的适当渗透状态来制备电感受态细菌。

[1019] 现有材料:

[1020] 1.500mL橙色盖的V型底康宁离心瓶

[1021] 2.50mL Falcon管

[1022] 3.1.5mL无菌微量离心管

[1023] 4.用于A630测量的96孔板

[1024] 5.10和25mL无菌移液管和所有尺寸的无菌移液管吸头

[1025] 6.TSB肉汤(总共需要600mL)

[1026] 7.在收获细胞之前在湿冰上的1L无菌500mM蔗糖

[1027] 方案

[1028] 1.从新鲜划线的无抗生素平板中,用每种菌株接种250mL TSB培养基,并搅拌孵育(37℃,250rpm)。

[1029] 2.在收获细胞之前,打开离心机并将转子充分冷却至4℃。在收获细胞之前,将1L的10%甘油放在冰上。

[1030] 3.通过OD_{630}监测生长,并且当细胞为1.00D_{630}单位/mL时,立即将烧瓶放在湿冰上15分钟。从这一点出发,培养物必须保持冰冷。将每个250ml培养物倒入冷却的500ml无菌离心瓶中。

[1031] 4.以2900rpm离心15分钟。倒出上清液并吸出任何残留的肉汤。

[1032] 5.将250ml的10%甘油添加到每个离心瓶中,并通过上下移液使细胞完全悬浮。

[1033] 6.以2900rpm离心15分钟。倒出上清液,无需抽吸。将细胞完全悬浮在250ml甘油中,然后重新离心。

[1034] 7.倒出上清液,并通过上下移液将细胞悬浮于残留的甘油中。

[1035] 8.为了冷冻,将100微升的培养物加入到湿冰上的微量离心管中。用完所有培养物后,将试管移至干冰/乙醇浴中,持续10分钟。冷冻培养物后,将其转移至-80℃的冰箱中。

[1036] 实例9.设计和测试CRISPR gRNA序列并同时测试pCasSA

[1037] 在该实例中,从Addgene(Addgene质粒仓库,马萨诸塞州剑桥市)获得了对金黄色葡萄球菌(pCasSA)有效的CRISPR-Cas系统,从先前的实验中鉴定了待靶向的基因间区域,并且最后,设计和测试了靶向基因间区域的gRNA。

[1038] 1.从Addgene订购的经验证的CRISPR组分如表16所示。

[1039] 表16.CRISPR质粒

[1040]

ID	质粒	基因/插入物	载体类型
42876	pCas9	tracr/Cas9	细菌性表达，CRISPR；大肠杆菌
42875	pCRISPR	CRISPR-BsaI	细菌性表达，CRISPR；大肠杆菌
65770	BPK2101	CRISPR-Cas9	金黄色葡萄球菌 Cas9 和 sgRNA 的细菌性表达质粒（需要在间隔子中克隆到 BsaI 位点中）：T7-humanSaCas9-NLS-3xFLAG-T7-BsaIcassette-Sa-sgRNA
98211	pCasSA	CRISPR-Cas9	Sa 特异性 CRISPR

[1041] 2.选择CRISPR gRNA靶位点。找到目标位置,该位置应位于基因间区域中,以免破坏生存力。目前,在502a基因组GenBank:CP007454.1中已鉴定出一个这样的区域,其介于1,102,100与1,102,700bp之间,如图8所示。该区域与先前在重组方法中鉴定的区域对齐。

[1042] 3.选择区域后,使用CRISPRScan(http://www.crisprscan.org/)Moreno-Mateos等人,2012,《自然—方法学(Nature Methods)》12,982-988,找到假定的gRNA,如图9所示;注意,可用的序列都是大写的。

[1043] 4.使用BLAST(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&PROG_DEF=blastn&BLAST_PROG_DEF=megaBlast&BLAST_SPEC=MicrobialGenomes_1280&DB_GROUP=AllMG)或直接搜索序列(APE或类似序列)检查可能的脱靶结合。注意:标记为非规范的gRNA通常具有单个错配的碱基对,这些碱基对可能仍会起作用,但可能会导致另外的脱靶效应

[1044] 5.修改并排序寡核苷酸,如表4B、图4A、图4B、图4C和图4D所示。寡核苷酸的名称按以下格式显示=寡核苷酸编号,BPC(BioPlx CRISPR),靶标编号,方向(FOR或REV),然后是靶标序列。

[1045] 6.按照如下所示的方案,将CRISPR靶向序列中的每一个序列添加到pCasSA质粒中,改编自Chen,W.等人2017.“通过使用工程化的CRISPR/Cas9系统对金黄色葡萄球菌进行快速高效的基因组编辑”《美国化学协会期刊》139,3790-3795。

[1046] a.寡核苷酸设计

[1047] 在金黄色葡萄球菌的靶基因中的NGG(间隔子中不包含NGG)之前选择一个20bp的间隔序列(最佳GC比率为40%~60%)。按以下形式合成两个寡核苷酸(如上所述):

[1048] 注意:FOR引物应在靶序列中紧邻NGG的上游。

[1049] 5’-GAAANNNNNNNNNNNNNNNNNNN-3’

[1050] 3’-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNCAAA-5’

[1051] b.磷酸化

[1052] 制备如表17所示的磷酸化混合物。

[1053] 表17.酸化混合物

[1054]

2μl	寡核苷酸I(50μM)
2μl	寡核苷酸II(50μM)
5μl	10x T4 DNA连接酶缓冲液(NEB)
1μl	T4多核苷酸激酶(Takara)
40μl	ddH2O
50μl	总计

[1055] 在37℃下孵育1小时。

[1056] c.退火

[1057] 将2.5μl的1M NaCl添加到磷酸化的寡核苷酸对中。在95℃下孵育3分钟,然后缓慢冷却至室温(使用热循环仪)。(可替换地,使用加热块,将加热块从加热器中取出,并使其自然冷却2小时。)使用ddH2O将退火的寡核苷酸稀释20次。

[1058] d.载体消化

[1059] 用BsaI(NEB)消化1-2ug的pCas9,如表18所示。

[1060] 表18.载体消化混合物

[1061]

x ul(1-2ug)	pCas9
1ul	BsaI(NEB)

5ul	10x NEB缓冲液
0.5ul	100X BSA
y ul(至50ul)	ddH_2O
50ul	总计

[1062] 凝胶纯化消化的pCas9(对于成功克隆非常重要)。

[1063] e.连接

[1064] 制备如表19中所示的连接混合物。

[1065] 表19.连接混合物

[1066]

1ul(可能更多)	凝胶纯化,BsaI消化的Cas9
2ul	稀释的寡核苷酸
2ul	10x T4连接酶缓冲液
1ul	T4连接酶
x ul(至20ul)	ddH_2O
20ul	总计

[1067] 在室温下孵育2小时,或O/N为16C。

[1068] 转化为大肠杆菌细胞(DH5a、DH10B或DC10B)

[1069] f.选择质粒摄取

[1070] 通过用卡那霉素(50ug/mL)将细胞平板接种在LB-琼脂板上来选择质粒摄取。注意:pCasSA质粒会使大肠杆菌在30℃下非常缓慢地生长,可能需要将平板孵育24-36小时才能看到菌落。

[1071] 一旦菌落可见,便选择一些菌落使其与卡那霉素(50ug/mL)一起在LB肉汤中液体生长。保留液体培养物的等分试样,以便日后生长。

[1072] 在冷冻管中,通过倒置将50%无菌甘油添加到液体培养混合物中,然后置于-80℃下长期保存。

[1073] 使用Qiagen试剂盒提取质粒,规范保存在-20℃下。

[1074] 7.通过PCR和/或测序来确认包含

[1075] a.PCR检测

[1076] 使用21BPC FOR(SEQ ID NO:63)和22BPC REV(SEQ ID NO:64)在上文步骤6中生成的模板上进行测试。

[1077] 对构建体进行PCR。在未切割的pCasSA载体中,PCR产物约为275bp(阳性对照=完整的pCasSA载体)。使用消化的pCasSA载体进行PCR不应产生任何产物(阴性对照=Bsa1消化的pCasSA载体)。

[1078] 应测试消化产物的一小部分以确保100%的功效。可以通过PCR或凝胶电泳直接在消化的质粒上进行测试。用gRNA序列在pCasSA载体上进行PCR将产生~278bp的扩增子。注意:与完整的pCasSA载体相比,它们没有明显的不同。因此,Bsa1消化率必须为100%。

[1079] b.测序方法

[1080] 准备上文产生的PCR产物用于测序。按照制造商的方案使用旋转柱净化试剂盒净化PCR反应。

[1081] 使用NanoDrop测量纯化的PCR产物的浓度。

[1082] 将样品与正向引物或反向引物(分别为21BPC FOR和22BPC REV)混合,以用Quintara Biosciences进行测序。

[1083] PCR产物为5ng/ul并且引物为5pmol/ul(5uM)。应将来自完整pCasSA载体的PCR产物与其它产物一起测序,以提供基线。

[1084] 8.测试CRISPR-Cas的功效/靶向

[1085] 引入具有插入的gRNA序列的任何质粒应在靶向的CRISPR位点引起双链断裂。另外,缺乏用于同源指导修复(HDR)的同源序列将引起双链断裂诱导的致死性。因此,用靶向的质粒转化靶向质粒应导致对应于CRISPR靶向功效的死亡率。

[1086] 将10个中的每一个(假定所有靶向组合均起作用)转化为电感受态RN4220金黄色葡萄球菌细胞的单独等分试样。

[1087] 在这种情况下,靶标1、4和6-10应在RN4220细胞中显示出活性(序列足够相似以允许CRISPR gRNA结合)。

[1088] 实例10.使用由组成型启动子控制的荧光报告子设计并测试同源依赖性修复模板和功效

[1089] a.同源臂被设计成具有不同的长度(200、300和400bp),对应于上文鉴定的~600bp的基因间区域。为了证明生存力,在组成型启动子(rspL)的控制下插入荧光报告基因(例如,mCherry)。启动子和报告子的侧翼将带有限制性位点(Not1和Xma1)以允许转基因交换。当前的设计含有单个终止密码子。任选地,可以添加另外的终止密码子。通过ATUM(以前被称为DNA2.0)设计并订购构建体。使用Xho1和Xba1限制性位点将整个序列(同源臂+启动子+mCherry)放入pCasSA载体中。

[1090] b.检查mCherry的掺入/表达

[1091] 一旦完整的pCasSA-XX-XXX载体被组装并转化成金黄色葡萄球菌菌株,则验证:1)mCherry表达,和2)mCherry序列的基因组掺入。目前有一些可行的方法来检查这些。注意:mCherry表达应在维持质粒的细菌以及成功并入质粒的细菌中发生。为了区分这些,质粒必须被固化(去除),除非在PCR可以区分两者的情况下。

[1092] 对于质粒固化(带有repF盒):

[1093] 如前所述,在30℃下用抗生素生长液体培养物;

[1094] 在新鲜的TSB(无抗生素)中将3-5ul的该培养物稀释1000倍;

[1095] 置于42-43℃下直至明显生长(例如,过夜)。

[1096] 在有或没有氯霉素的TSA平板上划线液体培养物,并在37℃下生长。

[1097] 培养物应在37℃的-氯平板上生长,而不应在+氯平板上生长,如果这样的话,质粒已被去除

[1098] 对于荧光显微镜:

[1099] mCherry荧光团被~587nm的光激发并发射~610nm。

[1100] 对于PCR:

[1101] 跨越插入区域的PCR以确认掺入。设计用于扩增的引物:横跨插入区(41/42和43/44)。测试是否存在mCherry(51/45)。验证基因组DNA(TKO 1/3)的存在。混合和匹配的插入引物和mCherry引物也可用于测试mCherry的掺入。

[1102] 还可以通过蛋白质印迹分析来确认掺入。

[1103] 采用蛋白质印迹设备:凝胶盒和iBlot转移系统。采用本领域已知的一级抗mCherry抗体、二级比色抗体、预制凝胶(或凝胶浇铸设备和试剂)、iBlot转移试剂盒、蛋白酶抑制剂、蛋白质提取液(例如,RIPA)、蛋白质标志物(梯)和缓冲液(TBS、tween等)。

[1104] 实例11.用荧光报告子分析KS启动子

[1105] 荧光报告子在重组方法中鉴定的启动子(PleuA、PhlgA等)的控制下。这种组合可以测试所选启动子的功效,并得出可衡量的(阳性)结果。优选地,将mCherry置于基于pCN51主链的构建体中。.该组合用于测试多个可能的问题:

[1106] 如果含有质粒的细胞暴露于血液/血清,则应表达mCherry。这可以通过荧光显微镜(Ex 587nm,Em 610nm)或通过mCherry蛋白的蛋白质印迹来进行验证。

[1107] 如果mCherry蛋白是在“正常”条件下产生的(无血液/血清活化),则启动子是“渗漏的”。泄漏激活可以解释获得具有某些启动子(即P_{leuA})的KS质粒的一些问题,因为即使KS表达水平较低也可能导致生存力丧失。

[1108] 由特异性引物引起的上调的速率和一致性是什么?

[1109] 实时(荧光显微镜)或通过时程采样(蛋白质印迹)观察细胞,以观察暴露于血液和/或血清时荧光产生的速率。

[1110] 实例12.将KS插入BioPlx-01中、验证掺入、测试功效和寿命

[1111] 使用每个序列侧翼的Not1和Xma1限制性位点将所选择的KS插入pCasSA载体中。使用添加Xma1限制性位点的引物BP-40扩增pTK。将KS插入到金黄色葡萄球菌502a细胞中,并验证基因组掺入。将掺入的细胞从质粒中固化,并在暴露于血液/血清时测试其KS活性。然后如本文所述传代被称为“BioPlx-XX”的KS细胞以分析寿命和生存力。

[1112] 实例13.确认/表征血清诱导的细胞死亡的速率和程度。

[1113] 使具有KS的KS细胞BioPlx-XX与TSB中的BioPlx-01(金黄色葡萄球菌502a WT)并排生长,然后洗涤并转移至新鲜的人血清中。转移后不久,KS菌株将“死亡”,而WT菌株将在血清中开始生长。

[1114] 实例14.评估KS菌株BioPlx-XX的稳定性

[1115] 进行该实验以证明BioPlx-XX中的KS在体外繁殖期间在表型和基因型上是稳定的。

[1116] 表型稳定性(在这种案例中,为KS性能)将通过确定传代X、Y和Z代的菌株后血清中的细胞死亡速率来评估,其中X是在菌株生产中产生足以治疗200名患者的单个临床批次的材料所经历的翻倍数量,而Y和Z是进行多达41次总培养翻倍后经历的世代数。目标是每位患者4x 10^9个细胞X 200个患者=8x10^{11}个总细胞。

[1117] 每位患者4x 10^9细胞的剂量X 200个患者=8x 10^{11}个总细胞。

[1118] 1.用单个大菌落的BioPlx-01和第二个5mL的BioPlx-02(两者均已从冷冻的主细胞库中划线)接种5mL TSB。(大约密度为0.05A630/mL)。

[1119] 2.使2个菌株生长至每mL 1.6个A630单位(在Biotek读板器中进行监测;5次翻倍)。这是~指数中期。(请记住,仪器的线性范围介于0.1与0.9之间—必须将TSB中的样品稀释才能保持在此线性范围内)。保留有关增长率的详细说明。为了进行此计算,假设大约4个A630单位/mL=8x 10^9CFU/mL。总共获得8x 10^{11}CFU所需要的饱和培养物体积=(8x 10^{11}CFU/8x 10^9CFU/mL)=100mL

[1120] 3.使用来自(2)的促酵剂培养物将每种的100mL“最终”培养物接种至每mL 0.05个A630单位的密度。将1.6mL促酵剂添加到98.4mL TSB中。

[1121] 4.使两种菌株在37℃/250rpm下生长。监测密度,直到达到A630为3.2。(6次翻倍)。创建每种菌株的新培养物—以0.05A630单位/mL启动100mL(这是“第2轮”)。将烧瓶返回到250rpm/37℃的振荡器中。

[1122] 5.对于每种菌株,将来自步骤4的1mL体积的细胞收获到50mL PBS中。

[1123] 5A.所描述的部件。速冻第二批1mL培养物,并置于-80℃下进行稍后的基因测试(参见下文的基因型稳定性)。

[1124] 6.以2900rpm离心15分钟。

[1125] 7.吸出上清液并涡旋细胞沉淀物以重悬。

[1126] 8.将体积再次加至PBS中的50mL,并如步骤6中进行收获。

[1127] 9.将每种菌株(BioPlx-01,BioPlx-02)的沉淀物重悬于各自预热的新鲜人血清20ml中。

[1128] 10.以250rpm/37℃振荡,监测生长。预期的结果是BioPlx-01生长,而BioPlx-02(KS)不生长。收集足够的数据点,以便可以从半对数图中计算出每个点的斜率并进行比率分配。该比率将衡量KS性能。杀灭率(KR)=血清中BioPlx-01生长的斜率/血清中BioPlx-02生长的斜率。此KR衡量TSB中实现的KS性能(总共11次翻倍)。

[1129] 11.将监测来自步骤4A的“第2轮”培养物,直至达到A630为3.2(6次翻倍)。使用此将“第3轮”培养物接种至0.05A630/mL,然后使用第2轮饱和培养物执行步骤5-10。KR衡量KS性能(总共17次翻倍)。

[1130] 12.将监测来自步骤11的“第3轮”培养物,直至达到A630为3.2(6次翻倍),然后再次分裂回0.05A630/mL。这种生长至3.2然后分裂为0.05的过程如下进行4次:第3轮:23次翻倍;第4轮:29次翻倍;第5轮:35次翻倍;第6轮:41次翻倍。按照步骤5-10。KR衡量41次翻倍的KS性能。

[1131] 绘制KR作为培养物翻倍#的函数。

[1132] 基因型稳定性:

[1133] 1.从每个时间点11、17和41次翻倍中找到BioPlx-02细胞的样品,参见步骤5A。

[1134] 2.进行NextGen测序以确定该样品的序列同质性。单分子测序可用于确定在给定时间点在细胞群中发生的突变的百分比。

[1135] 实例15.通过荧光筛查候选的血清和血液响应性启动子以检测上调

[1136] 概述。在该实施例中,测试了潜在的金黄色葡萄球菌启动子在血液和/或血清中的活性。基于暴露于血液或血清后基因表达的上调,从文献中选择候选启动子。然后将这些启动子克隆到报告分子绿色荧光蛋白(GFP)的上游,所述绿色荧光蛋白在启动子被激活时发出荧光。在几个生长步骤后,将含有该启动子-GFP盒的金黄色葡萄球菌细胞暴露于血液或血清中,并通过荧光显微镜观察GFP的活性。该筛查的结果示出了几种在血液和/或血清中具有不同程度活性的启动子,所述启动子可用于调节分子修饰(如杀灭开关、毒力阻断或纳米工厂)。

[1137] 在实例1中,使用金黄色葡萄球菌的非致病性菌株(表示为502a),以从人的皮肤微生物组中排除耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌(MRSA)。尽管502a的应用在该试验中没有显示

出任何不良副作用,但设计了杀灭开关作为另外的安全措施。本文公开的杀灭开关分子修饰可以被掺入目标微生物(如金黄色葡萄球菌502a或RN4220细胞)中,并且在暴露于血液或血清时将通过减慢细胞生长或促进细胞死亡来抑制细胞生长。因此,将减少或消除患者全身性感染的可能性。杀灭开关包括两个关键元件:杀灭基因,用于减慢或停止细胞生长;以及血液或血清响应性启动子,用于控制杀灭基因的表达。在该实施例中,测试了候选金黄色葡萄球菌启动子在血液或血清中的活性增加。表20示出了来自金黄色葡萄球菌菌株502a基因组(NCBI CP007454.1)的候选启动子序列,包含上游约300bp并包含起始密码子。

[1138] 表20.候选启动子序列

[1139]

基因/描述	核苷酸序列
leuA	Atttttagacaattctaactattaaagtgatatataccattcacggaaggagtataataaaatgcttaatcaatatactgaacatcaaccgacaacttcaaatattattattttattatactctttaggactcgaacgttagtaaatatttactaaacgctttaagtcctatttctgtttgaatgggacttgtaaacgtcccaatatattgggacgtttttttatgttttatctttcaattacttatttttattactataaaacatgattaatcattaaaatttacgggggaatttactatg（SEQ ID NO: 132）
hlgA2	Acttcaaattttcacaaactattgcgaaatccattcctcttccactacaagcaccataattaaacaacaattcaatagaataagacttgcaaaacatagttatgtcgctatataaacgcctgcgaccaataaatcttttaaacataacataatgcaaaaacatcatttaacaatgctaaaaatgtctcttcaatacatgttgatagtaattaacttttaacgaacagttaattcgaaaacgcttacaaatggattattatatatatgaacttaaaattaaatagaaagaaagtgatttctatg（SEQ ID NO: 133）
hrtAB	Gttcatattgagttcatatttcaaccttatactgacgctaaagaagaaatagggagaagtgaatcgatatg （SEQ ID NO: 134）

[1140]

hlb	Ttcaggctatcaataatgctttgaaatcagcctgtagagtcaataatataccaattattacatcgcacgcattaagacac（SEQ ID NO: 135）
sbnC	Actcattgttcttatttactagcaaaaggtgtatctatacattacatttctaaaagattaggtcataaaaatatagcaat （SEQ ID NO: 136）
isdI	Aactacatccgtgtattcgcatttgttagaagaaaaatttaatgaagaggacaaaaaaacaactaaaattttagaaagta（SEQ ID NO: 137）
isdG	Tgtaatttagggacccattagggactccaaacccaataaatactgttgttacaaggtttctatg（SEQ ID NO: 138）
sbnE	Gaatacttcaaggattaacatatagtgcattgattcaaagtgtcatgtttgttgtcgtgaatgcgtgtcatcaacaacttaaaggcacatttgttggaacgacgaacagtatgttagttgttggtcaaattattggcagtcttagtggcgctgccattacaagttatactacaccagctactacgtttatcgttatgggcgtagtatttgcagtaagtagtttatttttaatttgttcaaccatcactaatcaaatcaacgatcacacattaatgaaattatgggagttgaaacaaaaaagtg（SEQ ID NO: 139）
lrgA	Atgaaaaacgattgaatcccacttattttatacgtattcatcgttcatatattattaacacgaaacacattaaagaagtgcaacaatggtttaactacacttatatggtaatattgacaaatggtgtcaagatgcaagttggacgttcatttatgaaagattttaaagcgtcgataggattacttttaacagtaatccttttttttatgcattttacctatgatattttgtatttcggactaaaaatcacgcaaatcgaagtgagccatctatactttagttaaatcaaacgtaggaggcaatg（SEQ ID NO: 140）
lrgB	Gtttagtattattatttgtattattatgtactggtgctgttaagttaggcgaagtcgaaaaagtaggaacgacactaacaaataacattggcttactcttcgtaccagccggtatctcagttgttaactctttaggtgtcattagccaagcaccatttttaatcattggactaataatcgtctcaacaatactattacttatttgtactggctatgtcacacaaattattatgaaagttacttcgagatctaaaggtgacaaagtcacaaaaaagatcaaaatagaggaggcacaagctcatg（SEQ ID NO: 141）
hlgB	Aagatcctagagattatttcgttccagacagtgagttacctcctcttgtacaaagtggatttaacccttcatttatcgccacagtatctcatgaaaaaggttcaagcgatacaagcgaatttgaaattacttacggaagaaacatggatgtcactcatgccattaaaagatcaacgcattatggcaacagttatttagacggacatagagtccataatgcattcgtaaatagaaactatactgttaaatacgaggtcaattggaagactcatgaaatcaaggtgaaaggacagaattgatatg（SEQ ID NO: 142）
fhuB	Tcaaaatgtaacaatgatcagaggcatatgtttaattattgctatgattctagcaggtattgcagttgctatcgctggacaagttgcatttgtaggtttgatggtacctcatatagcaagatttttaattggaactgattatgctaaaattctaccattaacagccttgttaggtgggatactcgtgcttgttgccgatgtgatagcacgatatttaggagaagcgcctgttggtgcaatcatttcatttatcggtgttccttacttttttatattttagttaaaaaaggaggacgctcaatatg（SEQ ID NO: 143）
splF	Gttcacctatattaaatagtaagcgagaagcaattggtgttatgtatgctagtgataaaccaacaggtgaaagtacaaggtcatttgctgtttatttctctcctgaaattaagaaatttattgcagataatttagataaataaatcatccatccatacattgataaatgatttttagaaattaacaacaaaatcaacaatttttaaacatctctgtgattctatttattcgaaatgatttaaaaaataaaacttcaaaaacctaaccttatatttatacgaatacttagaggagcacaaaaatg（SEQ ID NO: 144）
SAUSA300_2268	Gatgatgtatgtttcgaatttatcaattaacatgtgaggacctcccgaggaatacatggcattaaatacacgtttaatatttataaaggtgacttaattttgttcaagttgattttaccacgctttttttctttattcactaagacttttgaatgaagtttaaaataattgtttatcagtgataaaatatttgcaataagaagagaatggctaaataatcttaattttcagaaaagtaattgtaaccttactggtcttatggtaatatttttcaatattatcgacgaggatgtgttaacaatg（SEQ ID NO: 145）
SAUSA300_2616	Ctatcattataatgagataatgtcatttttaattgagctaaacagacagggaaagacgattattatgattacgcatgatatgcatttattgtctgagtatagttcaagaacagttgtattatcaaaaggacaagtcgttgctgataccacgccagtattgatattaaatgataaaaaaatctgtgagattgcatcattgagacaaacatcgctatttgaaatggccgaatatatagggattagcgagccacagaaattagtacaattatttattaaccatgataggaaggtgagacgccaatg（SEQ ID NO: 146）
SAUSA300_2617	Caggcctattttctaggaaatcgatgatttatttaatatcggtcaaattattgcgaatattatttgctgggcacttattgcaccaacattagatattttgatttataacgaaccggctaacaaggtttatacacaaggtgttatctctgcagtattaaatattatttcagttggtattattgggacaatattattaaaagcatatgcttcatctcaaataaaaaaaggtagtttacgtaaagaataatcattttgttgaatcagatatgtaaatgaatgtagaaaggtaatgatatatcatg（SEQ ID NO: 147）

[1141]

isdA	CTATCTGCGGCATTTGCAGAATTACTGAATGTCGCGATGATGATAATTAACGCTAA AATCGTTGTATTAAAAACTTTTAAAATATTTTTCAAAACATAATCCTCCTTTTTATG ATTGCTTTTAAGTCTTTAGTAAAATCATAAATAATAATGATTATCATTGTCAATATTT ATTTTATAATCAATTTATTATTGTTATACGGAAATAGATGTGCTAGTATAATTGATAA CCATTATCAATTGCAATGGTTAATCATCTCATATAACAACACATAATTTGTATCCTT AGGAGGAAAACAACATG （SEQ ID NO: 148）
isdB	CTTCAGTTGATAACTTTATTAGCACAGTTGCCTTCGCAACACTTGCCCTTTTAGGT TCATTATCTTTATTACTTTTCAAAAGAAAAGAATCTAAATAAATCATCGTCACACT CATAACTTAATATATTTTTTATTTTAAATTTTATTTAACCTATGTCATAGATATTTCAT AATCTATAACATAGGTTATTTTTTTATAAAATAATGTTGCAATTAACTACCATTTCA ATGTACAATACAAGTAATCAATTGATAATGATTATCAGTTGATAATATACAATTAGG AGTTGTTTCTACAACATG （SEQ ID NO: 149）
fhuA/C	Ctttcttgcagatgaataaataaatggtatgagcacacatacttaaatagaagtccacggacaagtttttgaactatgaagacttatctg tgggcgtttttttatttttataaaagtaatatacaagacatgacaaatcgagctatccaatttaaaaagtaatgttagtcaataagattgaaaa atgttataatgatgttcatgataatcattatcaattgggatgcctttgaaaattgataatttaaaaatagaaattatttttttataaacagaaag aattttattgaaagtagggaaattatg （SEQ ID NO: 150）
ear	Tgacacctgctaattcaaacattatttgagacattcttttcaaattaattataaatttttacctatagactagtttgatatttatctacatctcaa aattctcatcaacaatctttcacatccaacatttttactttagtttttataattcaaaacaacaaaacgatgttaaaaaattattctatttttttagt taatagatagttaatacatttttgatatttagttaattgttctttttaaaaaaatattattatattttcattgtaaacgtttacaatataaaaaaagg agcaattaaaatg （SEQ ID NO: 151）
fnb	Tgtacaggcgataattatgaaacacttagtatattgttttaaattagataatgatgaatttaatttgaaaaataagtataaaaaatacaagc cttgtgtgacaagggtttatgatgacttgaatacaatttataggtatatttcaaataataaaattatcaattaacataaaattaatgacaatct taacttttcattaactcgctttttttgtattgcttttaaaaaccgaacaatatagacttgcatttattaagtttaaaaaaattaatgaattttgcatt taaagggagatattatagtg （SEQ ID NO: 152）
splD	Attttaaattttgatgcatacattgaacccgggaattcaggatcaccagttctaaattctaacaatgaggtcataggtgtggtgtatggc ggtattggaaaaattggttctgaatataatggtgccgtatactttacgcctcaaatcaaagattttattcaaaagcacattgaacaataaa caaatttaaatatacaccatgagcatgtgttcaataattttaatgaaaaacatcggtcgaatataacataaaaaaacgtctatatcaaaag catcatgaataaacagaggagcacaaaaatg （SEQ ID NO: 153）
dps	Ataatagaaatagaatgtggaaaacaacatggcaccaaccaaatgattatgaaaaatcgttctttttagatgataatgcgaaagtaaa acttactgattgataaaacatacttgctaattgataatggatatactagatgatgaattaaaatttagacatttaaaaagcggaacacctta catttagattagaataattataaaaaagagagtaaaaacactttacagattagaatcattatatataataattaatataaacaagcaaga cgtagacaattttaaggagtgtattaaatatg （SEQ ID NO: 154）
CH52_00360	GAATTCTTTATAGCGCGTGCAATCACACCACAAGATAAAAGATTAAAAAGTGAC AAAGCATTTATTGCATTTTTAGAAGAAACCTTCGATCAGTTCTTACCATTTTATTC TGCATAAATAACTTTGTTTAAATAATAGAGCACGTAATCACATCCATGATTTCGTG CTCTTTTTTCTTAATATTAAATCGAACGTTCAACATAATAATTCATACTTTTAAAAA AATTAAAATAAATTTAGGTTGACCTAAACATTTTATTAGGTTATTATATTGTCCATA AGAAGTAGAGGTGAGTCAAA（SEQ ID NO: 155）
CH52_00305	CATAATCCCCCTCCTTAAATTTGTTCATATAAGATTATGATATCTTAGATTGCATAA AAAGACTAGGTTTAATAAAATTAAAATGTGACAAATTAACGACAAGAGAAAATG TCAATTTTGTGACACAAATAACATTTAATTTATTGCTATAATGTATATGTTAGAAAA TTTTAATAAGTAGAATCATGCATCTAAAAGAGATTAATATTTAAGCTTCAAATTTG AGTAAACGTGGATTACATAATTATCCCAATAAAAAAATCATTACGATTAAGTTCTT TTTATGTCGTCCACATACAATAC（SEQ ID NO: 156）

[1142]

CH52_01670	CATTTTATATTCCCTCCGTAAAATATAAAGTTTTCTTAACTAGTTTATAATAATTTTA ATTTGTAGTCAAAAAGACTTTGTAATAATGCGTTCAGTTAATTATAACTTACTTAT ACCTTAATATAAACAACTTAAACCCTTTTTATTATTTTTAATAACTCTAAAGTACAA CTCTAATCCGCTCTCTTTAAAAATATAAATGATAATAAGTGCACATAATTTCTCAAT GGATTTTATGAATTTAAAATATGTTATCATTTCACTAGGACATTTGTAATATGGTAT GATGCTATTTATGATTTT（SEQ ID NO: 157）
srtB	CATAAAAATCCTCTTTTATTAACGACGTTTCTTCAGTCATCACTAAACCAGTTGTT GTACCGTTTTAGATTCGATTTCGTTGACTTTGACAAATTAAGTAAATTAGCATTGG ACCACCGACAATCATTAAAATAGCATTGGCTGGAATTTCTAAAGGAGGCTGTATC ACTCGTCCTAATAAATCAGCCACTAACAATAGCCATGCACCAATAACTGTAGAAA ACGGAATAAGTACTCTGTAATTGCCCCCAACTAGCTTTCTAACCACATGTGGCAC AATAATACCTAAAAAGGCTAGTTGT（SEQ ID NO: 158）
sbnA	CAAAAGCGCTTCCTCCTCAAATTTAAAATTCTATAATATTGTGTGTTACCTAATTG ATAATGATTCTCACTATCAAGTAATTAGGATTATATTTTTTATGCATTTATATGTCAA ATAATTATAAGTTGCATGTAAATCATAAATATTTTATTGACTTAGGAAAAAATTTAA TTCATACTAAATCGTGATAATGATTCTCATTGTCATACATCACGAAGGAGGCTAAT TAGTCAATGAATAAAGTAATTAAAATGCTTGTTGTTACGCTTGCTTTCCTACTTGT TTTAGCAGGATGTAGTGGGA（SEQ ID NO: 159）
clfA	CATTTTATTCCCTCTTTTTAAAAAGTCATTTTATATTAACTATATACCCTTTAAAGAT ATATTTAATCTCTGTTAATGGAATTATACACTAAAATTGCATTATAGCAATTAATTT GTATCGATATTTTATTATCCACAATAATACTTTACTAACAAACATTTTATTTATTGCT ATTTTAAGAATTACAAACGACAACGTACGATTTGATTGCAAACATTTTTTATTATT AATATGAACTCTACCTAATGTAATCCTAGCTTTAAATCATATTTTTTCAAAAGCAG ATGTGTAATTTATGGTAC（SEQ ID NO: 160）
emp 同源	CATCTGTTATTTCTCCTTTATATAGACTCAATATTATAACCAATATAATTTCCCTGTT ATATTCACTAACAGCATTATATACCAGAATTTTCAGTATAATAATTAACTTGAAGTA AACGTTGTCTTAACATTTTTATTGTTTTTCAGCTTAAAATTAATTATTGATATTGAT AGTTAAGCATAATAATTTTTTCGTAATATAAAGTGAAAAAAGTAATAGTCCACAC CTGTTTAGAATGTGGACTATACTAGATTGCATCATTGAAATGATGACTTTGATATTA TTTATTGCTAGTTTAAAAT（SEQ ID NO: 161）
rsaC	CACGCTGTGTTTTAATGAAGTAAGATGAATTGATGTTGATGCAACCTAAAATATT GGTATCTCCAATATTTTAGGCTACACATCAACATAACAAAGTCGAAGGCTAATAG TCCCATATCGTGCGTTAAATATATATTACCCTCCTATTAATATATATACCGTTCCCGA TCGCACGATATGGTGGTATTAGAACTTCTCTTTGAACGAAAGAGAAAAGCTAGA ACTTATGCAGTTTTAATTAAACTGTAAACATTTGTCACTCTTTAAATCAAAGAGTA AAGTT（SEQ ID NO: 162）
hlgA1	Aacaatttgtattttacaaacattaattaaaaataaaagcaagacattcgtgcaatcggttaccttaaattgtttacaactgtcaacaatac caaggttttattaactatatttctcacaaaattagcttttagcattccaaacaaaaaaggttaaattgaacggaattatggcatttttaacttа attgtaaaaaagttgataatggtcaattgttaatgaacagttaattataataacgtccaaaatatattattatttaattaagttaaataaaatta tagaaagaaagtgaaacttatg（SEQ ID NO: 163）

[1143] 最初,从报道金黄色葡萄球菌细胞与血液或血清一起培养时基因表达变化的文献中选择21个启动子候选者。Malachowa N.等人(2011).“人血中金黄色葡萄球菌基因表达的整体变化(Global changes in Staphylococcus aureus gene expression in human blood)”《公共科学图书馆期刊》6:e1861710.1371/journal.pone.0018617中描述了以下基因:isdA、isdB、isdG、isdI、sbnC、sbnE、fhuA、fhuB、SAUSA300_2268、SAUSA300_2616、SAUSA300_2617、hlgB、lrgA、lrgB、ear、splD和splF。Palazzolo-Ballance A.M.等人(2008).“中性粒细胞杀微生物剂在社区相关的耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌中诱导病原体存活反应(Neutrophil microbicides induce a pathogen survival response in community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus)”《免疫学杂志(JImmunol)》180(1):500-509中描述了以下基因:fnb、hlb、hlgB、isdA、isdB、isdG、fhuA、fhuB、dps。最后,Stauff D.L.等人,(2007).“血红素感测所需的金黄色葡萄球菌HssR-HssS

两组分系统的信号传导和DNA结合活性(Signaling and DNA-binding activities of the Staphylococcus aureus HssR-HssS two-component system required for heme sensing)”《生物化学杂志》9月7日;282(36):26111-21中描述了hrtAB。为了捕获这些基因的所有相关调节元件,选择了每个基因的起始密码子上游的300个碱基对作为启动子区域。然后将每个启动子区域克隆到绿色荧光蛋白(GFP)的上游,以观察培养基、血液和血清中的启动子活性。将启动子克隆到GFPmut2(GFP变体)的前面,这样当启动子被激活时,GFP被转录并翻译为荧光蛋白。高荧光与高启动子活性相关。

[1144] 材料和方法

[1145] 克隆。对于选自文献的每种血液或血清响应性基因,选择紧邻起始密码子上游的300个碱基序列对作为启动子区域。从金黄色葡萄球菌502a基因组中扩增出启动子,并使用Gibson组装(GA)或限制性酶(RE)消化将其克隆到GFP的前面。对于Gibson组装,使用与载体主链同源的引物扩增启动子。在下表中,与启动子匹配的引物序列为大写,而与载体主链同源的引物序列为小写。对于限制性酶消化,使用具有SphI或PstI限制性位点的引物扩增启动子。在下表中,含有限制性位点的引物序列为粗体。使用PCR扩增载体主链,质粒pCN56(BEI Resources),以进行Gibson组装,或简单地用限制性酶消化以进行限制性酶克隆。注意,从未成功用GFP克隆dps启动子。多次尝试后,dps-GFP盒被丢弃。用于筛查的最终质粒盒是:pCN56-启动子-GFP。用于扩增启动子的引物示于表21中。用于扩增载体主链的引物示于表22中。

[1146] 表21.用于扩增启动子的引物

[1147]

启动子	克隆方法	正向引物（BPC#：序列）	反向引物（BPC#：序列）
isdA	RE	366:TATAT**GCATGC**CTATCTGCGGCATTTGCAG（SEQ ID NO: 164）	367:GATAC**CTGCAG**GTTGTTTTCCTCCTAAGGATA（SEQ ID NO: 165）
isdB	RE	368:GATGC**GCATGC**CTTCAGTTGATAACTTTATTA（SEQ ID NO: 166）	369:GATGC**CTGCAG**GTTGTAGAAACAACTCCTAAT（SEQ ID NO: 167）
isdI	RE	379:GATAC**GCATGC**TTACTCGTAGCAGTTTTTTGT（SEQ ID NO: 168）	380:GATAG**CTGCAG**GGGCAATCACTCCTCTATTTT（SEQ ID NO: 169）
isdG	RE	377:GATGC**GCATGC**AAACACAAGATAATTGAATTT（SEQ ID NO: 170）	378:GATGC**CTGCAG**AATTATCCTCTTTTCTGTTTAA（SEQ ID NO: 171）
sbnC	RE	381:GAATC**GCATGC**CTTTATTAAAGCTGACAAAGTCGTA（SEQ ID NO: 172）	382:GAAATC**CTGCAG**TGTTCAGACACCTCGCATTC（SEQ ID NO: 173）
sbnE	GA	305:taactgactaggcggccgcGAATACTTCAAGGATTAACATATAGTGCATTG（SEQ ID NO: 174）	306:ccagtgaaaagttcttctcctttactcatTTTTTTGTTTCAACTCCCATAATTTCATTAATG（SEQ ID NO: 175）
lrgA	GA	307:taactgactaggcggccgcATGAAAAACGATTGAATCCCACTTATTTTATACG（SEQ ID NO: 176）	308:ccagtgaaaagttcttctcctttactcatTGCCTCCTACGTTTGATTTAACTAAAG（SEQ ID NO: 177）
lrgB	GA	309:taactgactaggcggccgcGTTTAGTATTATTATTTGTATTATTATGTACTGGTGCTG（SEQ ID NO: 178）	310:ccagtgaaaagttcttctcctttactcatGAGCTTGTGCCTCCTCTATTTTG（SEQ ID NO: 179）
hlgB	GA	311:taactgactaggcggccgcAAGATCCTAGAGATTATTTCGTTCCAG（SEQ ID NO: 180）	312:ccagtgaaaagttcttctcctttactcatATCAATTCTGTCCTTTCACCTTGATTTC（SEQ ID NO: 181）
fhuA	GA	313:taactgactaggcggccgcCTTTCTTGCAGATGAATAAATAAATGGTATGAGC（SEQ ID NO: 182）	314:ccagtgaaaagttcttctcctttactcatAATTTCCCTACTTTCAATAAAATTCTTTCTG（SEQ ID NO: 183）

[1148]

fhuB	GA	315:taactgactaggcggccgcTCAAAATGTAACAATGATCAGAGGC（SEQ ID NO: 184）	316:ccagtgaaaagttcttctcctttactcatATTGAGCGTCCTCCTTTTTTAACTAAATATAAAAAG（SEQ ID NO: 185）
ear	GA	317:taactgactaggcggccgcTGACACCTGCTAATTCAAACATTATTTG（SEQ ID NO: 186）	318:ccagtgaaaagttcttctcctttactcatTTTAATTGCTCCTTTTTTTATATTGTAAACGTTTAC（SEQ ID NO: 187）
fnb	GA	319:taactgactaggcggccgcTGTACAGGCGATAATTATGAAACACTTAG（SEQ ID NO: 188）	320:ccagtgaaaagttcttctcctttactcatTATAATATCTCCCTTTAAATGCAAAATTCATTAATTTTTTTAAAC（SEQ ID NO: 189）
hlb	GA	321:taactgactaggcggccgcTTCAGGCTATCAATAATGCTTTGAAATC（SEQ ID NO: 190）	322:ccagtgaaaagttcttctcctttactcatAGAAACCTTGTAACAACAGTATTTATTGGG（SEQ ID NO: 191）
splF	GA	323:taactgactaggcggccgcGTTCACCTATATTAAATAGTAAGCGAGAAGC（SEQ ID NO: 192）	324:ccagtgaaaagttcttctcctttactcatTTTTGTGCTCCTCTAAGTATTCGTATAAATATAAGG（SEQ ID NO: 193）
splD	GA	325:taactgactaggcggccgcATTTTAAATTTTGATGCATACATTGAACCCGG（SEQ ID NO: 194）	326:ccagtgaaaagttcttctcctttactcatTTTTGTGCTCCTCTGTTTATTCATGATGC（SEQ ID NO: 195）
dps	GA	327:taactgactaggcggccgcATAATAGAAATAGAATGTGGAAAACAACATGGC（SEQ ID NO: 196）	328:ccagtgaaaagttcttctcctttactcatATTTAATACACTCCTTAAAATTGTCTACGTC（SEQ ID NO: 197）
SAUSA 300_2268	GA	329:taactgactaggcggccgcGATGATGTATGTTTCGAATTTATCAATTAACATGTG（SEQ ID NO: 198）	330:ccagtgaaaagttcttctcctttactcatTGTTAACACATCCTCGTCGATAATATTG（SEQ ID NO: 199）
SAUSA 300_2616	GA	331:taactgactaggcggccgcCTATCATTATAATGAGATAATGTCATTTTTAATTGAGC（SEQ ID NO: 200）	332:ccagtgaaaagttcttctcctttactcatTGGCGTCTCACCTTCCTATC（SEQ ID NO: 201）
SAUSA 300_2617	GA	333:taactgactaggcggccgcCAGGCCTATTTTCTAGGAAATCGATG（SEQ ID NO: 202）	334:ccagtgaaaagttcttctcctttactcatGATATATCATTACCTTTCTACATTCATTTACATATC（SEQ ID NO: 203）
hlgA2	GA	201:cgttaactaattaatttaagaaggagatatacatACTTCAAATTTTCACAAACTATTGCG（SEQ ID NO: 204）	185:ccagtgaaaagttcttctcctttactcatAGAAATCACTTTCTTTCTATTTAATTTTAAGTTCATATATA（SEQ ID NO: 205）
hrtAB	GA	205:cgttaactaattaatttaagaaggagatatacatGTTCATATTGAGTTCATATTTCAACC（SEQ ID NO: 206）	188:ccagtgaaaagttcttctcctttactcatATCGATTCACTTCTCCCTATTTCTTC（SEQ ID NO: 207）

[1149] 表22.用于扩增载体主链的引物

[1150]

质粒	克隆方法	正向引物	反向引物
pCN 56	GA（hlgA2、hrtAB）	197:ATGAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCACTGG（SEQ ID NO: 208）	198:ATGTATATCTCCTTCTTAAATTAATTAGTTAACGAATTCG（SEQ ID NO: 209）
pCN 56	GA（所有其它启动子）	197:ATGAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCACTGG（SEQ ID NO: 210）	265:gcggccgcctagtcagttaACTCAAAGGCGGTAATACGG（SEQ ID NO: 211）

[1151] 血液和血清样品。对于血液样本,将4-8ml人血抽入肝素化试管中并冷冻。对于血清样品,将4-8ml人血抽入非肝素化试管中,在室温下静置15-30分钟直至完全凝结,然后以3,000rpm离心15分钟。小心地除去血清上清液,将其转移到新试管中并冷冻。

[1152] 细胞系的构建。使用电穿孔用pCN56-启动子-GFP质粒转化RN4220金黄色葡萄球菌细胞。将每种细胞系的甘油储备液保存为用于随后的血液/血清诱导测定的起始材料。用于筛查的最终细胞系是:RN4220+pCN56-启动子-GFP。

[1153] 血液和血清诱导。对于每个细胞系,用一小勺甘油储备液接种1-3ml含10μg/ml红霉素的胰蛋白酶大豆肉汤(TSB)培养基。将培养物在37℃下以240rpm振荡过夜生长。早晨,测量培养物的光密度(OD),并用该培养物接种1ml新鲜的TSB+红霉素,至OD为0.1。将所述0.1OD的培养物在37℃下以240rpm振荡生长2-3小时,直至OD达到1-2。然后,用培养物接种500μl新鲜融化的血液、血清或TSB(三者均带有红霉素),至OD为0.1。将这三种培养物在37℃下以240rpm振荡生长1.5-2小时。将10μl的每种培养物滴到显微镜载玻片上,盖上盖玻片,并用用荧光显微镜观察。

[1154] 显微镜。用iPhone通过荧光显微镜的目镜拍摄图像。

[1155] 结果和结论。读取在培养基(阴性对照)、血液或血清中培养的每种金黄色葡萄球菌RN4220+pCN56-启动子-GFP细胞系的荧光图像,并对荧光水平进行评分,如表23所总结的。

[1156] 表23.TSB、血液或血清中的相对启动子GFP的荧光水平

[1157]

	荧光水平		
启动子	TSB 培养基	血液	血清
isdA	高	高	高
isdB	高	(无样品)	高
isdI	低	高	高
isdG	非常低	高	高
sbnC	非常低	中等	中等
sbnE	非常低	低	低
lrgA	非常低	低	低
lrgB	非常低	低	无
hlgB	非常低/无	中等	中等
fhuA	高	高	高
fhuB	非常低	低	低
ear	高	高	高
fnb	中等	中等	中等
hlb	非常低/无	中等	中等
splF	非常低/无	低	低
splD	非常低/无	非常低/无	非常低/无
SAUSA 300_2268	低	高	中等
SAUSA 300_2616	非常低/无	低	低
SAUSA 300_2617	非常低/无	低	低
hlgA2	低	高	中等
hrtAB	非常低/无	中等	中等

[1158] 用于杀灭开关的启动子需要两个基本特性。首先,当细胞暴露于血液或血清中时,

启动子必须开启或被上调。此屏幕清楚地显示了在血液或血清存在下的启动子活性谱;一些启动子在血液或血清中非常活跃,而其它启动子则不那么活跃。根据活性机制,不同的杀灭基因可能需要具有不同活性水平的启动子。例如,极其致命的杀灭基因(而非有毒的杀灭基因)可能需要强度非常低的启动子。随着各种杀灭基因被测试,有可能返回到该启动子列表并合理地构建杀灭开关。

[1159] 第二个要求是,当细胞不暴露于血液或血清时,候选启动子必须具有很少活性或没有活性。由于502a的主要目的是在暴露于MRSA之前在皮肤上定植,因此至关重要的是,细胞可以在其预期的位置正常生长,并且杀灭开关活性不会干扰该功能。此屏幕中最理想的杀灭开关候选启动子在TSB中表现出非常低的活性,在血液或血清中表现出中等/高活性,所述杀灭开关候选启动子包含isdG、sbnC、sbnE、hlgB、hlb、SAUSA300_2268、hlgA2和hrtAB。然而,isdI、lrgA、lrgB、fhuB、splF、dps、SAUSA300_2616、SAUSA300_2617也可能是有用的候选启动子,用于进一步评估。此屏幕显示,几个候选启动子(isdA、isdB、fhuA、ear和fnb)在暴露于血液和血清之前是活跃的,因此从潜在的杀灭开关启动子列表中优先考虑了这些启动子。

[1160] 如在Malachowa N,2011和Palazzolo-Ballance AM,2008中所述,从文献中选择了另外的候选启动子用于进一步筛查,所述另外的候选启动子包含lukG、lukH、chs、efb、icaB、SAUSA300_1059、SAUSA300_0370、aur和SAUSA300_0169。

[1161] 实例16.用于血液和血清响应性启动子的基因组表达的qRT PCR

[1162] 在该实施例中,对文献中发现的对血液和/或血清具有响应性的20种内源性金黄色葡萄球菌基因进行qRT PCR。使用屏幕帮助鉴定候选的血液和/或血清响应性启动子,所述启动子用于构建包括细胞死亡基因的杀灭开关分子修饰。简要地说,使502a细胞在TSB培养基、血液或血清中生长,并在各个时间点提取RNA。另外,测试了几种金黄色葡萄球菌基因,预计所述基因在血液或血清中无反应。这些基因被视为第二启动子的候选者,所述第二启动子与特异于细胞死亡基因的抗毒素可操作地连接。结果示出了一些在血液或血清中上调的基因和几个在血液或血清中稳定的基因。

[1163] 生长程序。如下进行生长实验。用一小勺感受态细胞接种502a细胞的4ml过夜培养物。早晨,用50ml过夜培养物接种125ml一次性无菌摇瓶,使光密度(OD)为0.1。将细胞生长至OD为2(几个小时)。在OD 2处,对于T=0的RNA样品,除去500ul。将3×7ml的剩余细胞转移至一式三份的50ml锥形管中。将试管旋转,倒出上清液,用PBS洗涤,再次旋转,除去上清液,并将细胞重悬于7ml的TSB、血清或血液中。将试管置于37℃下,以240rpm振荡。暴露于血清或血液后,在T=1(立即对试管取样且在37℃下不振荡)、T=15和T=45分钟时收集另外的RNA样品。用于TSB和血清培养物的RNA采样方法由以下组成:将500ul转移到1.5ml试管中,以13,200rpm离心1分钟,倒出上清液,并加入100ul的RNALater。除了抽吸上清液并加入200ul的RNALater外,血液培养物的采样是相同的。所有样品均在-20℃下保存,直至进一步处理(保存10个月)。

[1164] qPCR样品处理和数据分析。进行RNA提取和cDNA合成。将保存在RNALater中的冷冻RNA沉淀物在PBS中洗涤一次,使用Ambion RiboPure细菌试剂盒提取,并以2x 25ul洗脱。使用Ambion Turbo DNase试剂盒对RNA样品进行DNased处理。将将最终浓度低于50ng/ul的样品用乙醇沉淀,以浓缩DNA。将10ul DNased RNA用于Applied Biosystems高容量cDNA反转

录试剂盒。用Applied Biosystems PowerUp SYBR Green Master Mix进行qPCR(带有1ul cDNA的10ul反应)。对样品进行探测以寻找基因表达随时间和在不同培养基中的变化,并使用ΔΔCt方法将所述变化相对于管家基因gyrB进行归一化。从每个RNA样品的基因转录本的Ct值中减去gyrB转录本的Ct(循环至阈值)值。然后将这些ΔCt值相对于初始时间点进行归一化。表24示出了用于对候选的血清和/或血液响应性基因进行qRT PCR筛查的引物。

[1165] 表24.用于对候选的血清和/或血液响应性基因进行qRT PCR筛查的引物

[1166]

基因	qRT PCR 引物（BPC#-序列）	
	正向	反向
gyrB	BPC802-TTGGTACAGGAATCGGTGGC（SEQ ID NO: 212）	BPC803-TCCATCCACATCGGCATCAG（SEQ ID NO: 213）
isdA	BPC114-GCAACAGAAGCTACGAACGC（SEQ ID NO: 214）	BPC115-AGAGCCATCTTTTTGCACTTGG（SEQ ID NO: 215）

[1167]

isdB	BPC116-GCAACAATTTTATCATTATGCCAGC（SEQ ID NO: 216）	BPC117-TGGCAACTTTTTGTCACCTTCA（SEQ ID NO: 217）
isdI	BPC764-ACCGAGGATACAGACGAAGTT（SEQ ID NO: 218）	BPC765-TGCTGTCCATCGTCATCACTT（SEQ ID NO: 219）
isdG	BPC120-AACCAATCCGTAAAAGCTTGC（SEQ ID NO: 220）	BPC121-AGGCTTTGATGGCATGTTTG（SEQ ID NO: 221）
sbnC	BPC768-AGGGAAGGGTGTCTAAGCAAC（SEQ ID NO: 222）	BPC769-TCAGTCCTTCTTCAACGCGA（SEQ ID NO: 223）
sbnE	BPC124-ATTCGCTTTAGCCGCAATGG（SEQ ID NO: 224）	BPC125-GCAACTTGTAGCGCATCGTC（SEQ ID NO: 225）
lrgA	BPC126-GATACCGGCTGGTACGAAGAG（SEQ ID NO: 226）	BPC127-TGGTGCTGTTAAGTTAGGCGA（SEQ ID NO: 227）
lrgB	BPC128-ACAAAGACAGGCACAACTGC（SEQ ID NO: 228）	BPC129-GGTGTAGCACCAGCCAAAGA（SEQ ID NO: 229）
hlgB	BPC760-TGGTTGGGGACCTTATGGAAG（SEQ ID NO: 230）	BPC761-GGCATTTGGTGTTGCGCTAT（SEQ ID NO: 231）
fhuA	BPC132-CACGTTGTCTTTGACCACCAC（SEQ ID NO: 232）	BPC133-TGGGCAATGGAAGTTACAGGA（SEQ ID NO: 233）
fhuB	BPC134-CAATACCTGCTGGAACCCCA（SEQ ID NO: 234）	BPC135-GGGTCCGCATATTGCCAAAC（SEQ ID NO: 235）
ear	BPC136-CCACTTGTCAGATCTGCTCCT（SEQ ID NO: 236）	BPC137-GGTTTGGTTACAGATGGACAAACA（SEQ ID NO: 237）
fnb	BPC772-CGCAGTGAGCGACCATACA（SEQ ID NO: 238）	BPC773-TTGGTCCTTGTGCTTGACCA（SEQ ID NO: 239）
hlb	BPC140-CTACGCCACCATCTTCAGCA（SEQ ID NO: 240）	BPC141-ACACCTGTACTCGGTCGTTC（SEQ ID NO: 241）
splF	BPC142-TGCAATTATTCAGCCTGGTAGC（SEQ ID NO: 242）	BPC143-CCTGATGGCTTATTACCGGCAT（SEQ ID NO: 243）
splD	BPC144-AGTGACATCTGATGCGGTTG（SEQ ID NO: 244）	BPC145-AACACCAATTGCTTCTCGCTT（SEQ ID NO: 245）

[1168]

dps	BPC146-AGCGGTAGGAGGAAACCCTG（SEQ ID NO:246）	BPC147-GTTCTGCAGAGTAACCTTTCGC（SEQ ID NO: 247）
srtB	BPC846-TGAGCGAGAACATCGACGTAA（SEQ ID NO: 248）	BPC847-CCGACATGGTGCCCGTATAA（SEQ ID NO: 249）
emp	BPC854-TCGCGTGAATGTAGCAACAAA（SEQ ID NO: 250）	BPC855-ACTTCTGGGCCTTTAGCAACA（SEQ ID NO: 251）
sbnA	BPC858-CCTGGAGGCAGCATGAAAGA（SEQ ID NO: 252）	BPC859-CATTGCCAACGCAATGCCTA（SEQ ID NO: 253）
CH52_360	BPC834-TTCAACTCGAACGCTGACGA（SEQ ID NO: 254）	BPC835-TTGCACCCATTGTTGCACCT（SEQ ID NO: 255）
CH52_305	BPC838-TTCCTGGAGCAGTACCACCA（SEQ ID NO: 256）	BPC839-CAGCGCAATCGCTGTTAAACTA（SEQ ID NO: 257）
CH521670	BPC842-GCGATTATGGGACCAAACGG（SEQ ID NO: 258）	BPC843-ACTTCATAGCTTGGGTGTCCC（SEQ ID NO: 259）
clfA	BPC850-TCCAGCACAACAGGAAACGA（SEQ ID NO: 260）	BPC851-TAGCTTCACCAGTTACCGGC（SEQ ID NO: 261）
SAUSA300_2268	BPC778-GCTTCTACAGCTTTGCCGAT（SEQ ID NO: 262）	BPC779-GATTTGGTGCTTACTGCCACC（SEQ ID NO: 263）
SAUSA300_2616	BPC774-ACAAGCGCAACAAGCAAGAG（SEQ ID NO: 264）	BPC775-TGCGTTTGATACCTTTAACACGG（SEQ ID NO: 265）
SAUSA300_2617	BPC152-GGGCTGAAAAAGTTGGCATGA（SEQ ID NO:266）	BPC153-ACGCGTTGTTTTTGACCTCC（SEQ ID NO: 267）
hlgA2	BPC179-TGATTTCTGCACCTTGACCGA（SEQ ID NO: 268）	BPC180-AGCCCCTTTAGCCAATCCAT（SEQ ID NO: 269）
hrtAB	BPC713-ACACAACAACAACGTGATGAGC（SEQ ID NO: 270）	BPC714-TAACGGTGCTTGCTCTGCTT（SEQ ID NO: 271）

[1169] qPCR结果示于图13A和图13B中,所述图示出了在血液和/或血清中被上调的几个基因。图13A示出了在血清中1分钟、15分钟和45分钟时,启动子候选者isdA、isdB、hlgA2、hrtAB、isdG、sbnE、lrgA、lrgB、fhuA、fhuB、ear、hlb、splF、splD、dps和SAUSA300_2617,以及基因表达相对于培养基发生的倍数变化。如表25所示,此筛查中优选的血清响应性启动子候选者包含hlgA2、hrtAB、isdA、isdB、isdG、sbnE、ear和splD,因为在45分钟后暴露于血清时,其基因表达至少增加9倍、对血清的反应稍有延迟,并且在T＝1分钟时未显著上调。

[1170] 表25.通过qPCR优选的血清响应性基因的启动子候选者

[1171]

上调的基因	T＝45分钟时血清中的倍数变化
hlgA2	9
hrtAB	209
isdA	15

isdB	172
isdG	42
sbnE	30
ear	10
splD	9

[1172] 图13B示出了在血清中1分钟、15分钟和45分钟时,启动子候选者isdA、isdB、hlgA2、hrtAB、isdG、sbnE、lrgA、lrgB、fhuA、fhuB、ear、hlb、splF、splD、dps和SAUSA300_2617暴露于血液时的候选启动子活性,以及qPCR使基因表达相对于培养基发生的倍数变化。优选的启动子候选者在1分钟时表现出稍微延迟的基因表达反应,但是在15和45分钟时间点被显著上调至少30倍。通过qPCR优选的血液响应性基因的启动子候选者包含isdA、isdB、isdG、sbnE和SAUSA300_2617,如表26所示。

[1173] 表26.通过qPCR优选的血液响应性基因的启动子候选者

[1174]

上调的基因	T＝45时血液中的倍数变化
isdA	77
isdB	66
isdG	69
sbnE	33
SAUSA300_2617	150

[1175] 用于血清响应性启动子的基因组表达的另一种qRT PCR

[1176] 在该实施例中,还进行qRT PCR以筛查文献中发现的对血液和/或血清具有响应性的另外的金黄色葡萄球菌基因。简要地说,使502a细胞在TSB培养基或血清中生长,并在各个时间点提取RNA。结果示出了几个在血清中高度上调的基因。本质上,实验方案与上述实例相似,不同之处在于将RNA样品在转化为cDNA之前进行了归一化,并在T＝90分钟时收集了样品。

[1177] 生长程序。如下进行所述生长实验。将502a甘油储备液浸入新鲜的细菌平板上并生长过夜。将来自平板的3-5个单菌落接种到BHI培养基的4ml培养物中,并在37℃下以240rpm振荡生长过夜。早晨,将培养物在5ml新鲜BHI培养基中稀释至光密度(OD)为0.05。将细胞在37℃下以150rpm振荡生长数小时,至OD约为1。此时,在T＝0的时间点收集RNA样品(将1ml转移到1.5ml微量离心管中,以16,000rpm离心1分钟,弃去上清液,将细胞重悬于1ml无菌PBS中,以16,000rpm离心1分钟,吸出上清液,将细胞重悬浮于200ul RNALater中,并在-20℃下保存)。在10ml新鲜BHI培养基或融化的人血清的3个重复的肝素化试管中,将剩余的培养物稀释至OD为0.05,并在37℃下以150rpm振荡孵育。在T＝90分钟和T＝180分钟时收集另外的RNA样品。对于这些后来的样品,将一个10ml试管以3,000rpm离心10分钟,倾倒上清液,将细胞重悬于1ml PBS中,转移到1.5ml微量离心管中,以16,000rpm离心1分钟,吸出上清液,将细胞重悬于200ul RNALater中,并在-20℃下保存。

[1178] qPCR样品处理和数据分析。如下进行RNA提取和cDNA合成。将保存在RNALater中的冷冻RNA沉淀物在PBS中洗涤一次,使用Ambion RiboPure细菌试剂盒提取,并以2x 50ul洗脱。使用Ambion Turbo DNase试剂盒对RNA样品进行DNased处理。将将最终浓度低于50ng/ul的样品用乙醇沉淀,以浓缩DNA。将500ng DNased RNA用于Applied Biosystems高容量

cDNA反转录试剂盒。用Applied Biosystems PowerUp SYBR Green Master Mix进行qPCR(带有1ul cDNA的10ul反应)。

[1179] 对样品进行探测以寻找基因表达随时间和在不同培养基中的变化,并使用ΔΔCt方法将所述变化相对于管家基因gyrB、sigB、rho或三者的平均值进行归一化。从每个RNA样品的基因转录本的Ct值中减去管家基因转录本的Ct(循环至阈值)值。然后将这些ΔCt值相对于初始时间点进行归一化。将TSB和血清中90分钟时的基因表达相对于T=0时的值进行归一化。

[1180] 结果示于图13C中,所述图示出了通过qPCR与TSB相比,在T=90分钟时启动子候选者hlgB、ear、fnb、splF、splD、clfA、CH52_360、CH52_305、CH52_1670、hlb、lrgB、lrgA、emp、fhuA、fhuB、isdI、isdA、srtB、isdG、sbnE、sbnA、sbnC和isdB在血清中的基因表达。图13C显示血清中被上调了5倍以上的基因包含fhuA、fhuB、isdI、isdA、srtB、isdG、sbnE、sbnA、sbnC和isdB。图13C显示在血清中孵育90分钟后,几个基因被上调了100倍以上,所述基因包含isdA、srtB、isdG、sbnE、sbnA、sbnC和isdB。具体地说,isd、sbn和fhu家族中的基因在不同程度上被上调。此处调查的所有基因在TSB中从T=0分钟到T=90分钟均具有稳定的表达。该实验中的几个基因在血清中显示出高度上调,而其它基因在血清中显示出稳定的表达。这两个特性都可以在构造杀灭开关时有用。例如,可以用将在血清和/或血液中上调的启动子来控制细胞死亡基因,并且可以用将在血清中下调或保持稳定的启动子来控制对细胞死亡基因具有特异性的抗毒素基因。

[1181] 实例17.使用基于质粒的诱导系统将Spra1作为候选细胞死亡基因毒素

[1182] 在该实施例中,使用两种不同的基于质粒的诱导系统在两个金黄色葡萄球菌菌株中评估候选细胞死亡基因sprA1。

[1183] 实例17A.使用镉诱导型启动子对作为金黄色葡萄球菌细胞(RN4220)细胞生长抑制剂的sprA1进行了初步测试。将spra1毒素基因克隆到pCN51(pTK1)中的镉启动子后面。pCN51载体是含有镉诱导型启动子的低拷贝质粒。

[1184] 该版本的spra1含有调节spra1的反义序列。镉启动子下游的sprA1-sprA1AS的完整序列如下所示。该构建体被称为pTK1。

[1185] pTK1:sprA1-sprA1AS:sprA1毒素基因和核糖体结合位点,以及抗毒素基因(pTK1或p001)。将pTK1用于使用镉启动子的实验。

[1186] CGCAGAGAGGAGGTGTATAAGGTGATGCTTATTTTCGTTCACATCATA

[1187] GCACCAGTCATCAGTGGCTGTGCCATTGCGTTTTTTTCTTATTGGCTAA

[1188] GTAGACGCAATACAAAATAGGTGACATATAGCCGCACCAATAAAAATC

[1189] CCCTCACTACCGCAAATAGTGAGGGGATTGGTGTATAAGTAAATACTTATTTTCGTTGT(SEQ ID NO:272)

[1190] 核糖体结合位点区域

[1191] sprA1毒素基因

[1192] sprA1抗毒素基因

[1193] CCCCTCACTACCGCAAATAGTGAGGGGATTGGTGTATAAGTAAATACTT ATTTTCGTTGT(SEQ ID NO:273)sprA1抗毒素基因

[1194] 镉是有毒的化合物,因此第一步是找到亚抑制浓度,其中如果sprA1对RN4220的生

长具有负面影响,则镉对生长的最小影响足以看到明显的Δ。将RN4220在TSB培养基中生长过夜,并稀释至0.5OD,然后分成八个14ml培养管,每个培养管中均装有3ml稀释的RN4220细胞。将四种浓度的镉接种到4个试管中,每个试管都没有镉对照。最终镉浓度为10nM、100nM、1uM和10uM。在30℃,240RPM振荡下于2小时和22小时的生长处评估结果(数据未示出)。22小时后,10uM镉表现出最大的负面影响。使用金黄色葡萄球菌RN4220细胞,使用10nM、100nM和1uM镉,一式两份地重复测定镉的最小亚抑制浓度的实验。2小时后,镉测试的细胞生长结果显示出高达1uM的良好耐受性(数据未示出)。

[1195] 接下来,使用由pCN54转化的RN4220细胞测试500nM和1uM的镉,所述pCN54具有镉诱导型启动子,用作另外的对照。将RN4220细胞稀释至0.5OD(630nm),并等分到4个培养管中,每个试管3ml。在两个试管中接种500nM和1uM的镉。将含有pCN54的RN4220细胞稀释至0.5OD(630nm),并等分到4个培养管中,每个试管3ml。在两个试管中接种500nM和1uM的镉。所有pCN54的生长均含有红霉素10作为抗生素选择。在30℃下生长2小时后,测量了OD(630nm)。结果显示在500nM和1uM的镉下具有良好的耐受性。(数据未示出)。得出的结论是,除了10uM浓度过高而无法看到单独的镉效果与诱导的毒素之间的差异外,4220细胞在测试水平下均表现出良好的镉耐受性。

[1196] 接下来的实验包含pCN51质粒(pTK1)上的镉启动子后面的毒素(sprA1),所述质粒已被转化为RN4220细胞。用2个pTK1克隆选集和RN4220细胞(wt)测试了500nM和1uM的浓度。将wt RN4220细胞的过夜培养物和RN4220细胞中的pTK1的两个克隆稀释至0.5OD。将野生型(WT)RN4220细胞按3ml/管分为3个培养管。用500nM和1uM的镉接种两个试管,并在诱导2小时后读取OD。将每个pTK1克隆按3ml/管分为3个培养管(总共6个管)。用500nm和1uM诱导每个pTK1克隆,其中一个作为对照。诱导2小时后读取OD。结果示于表27和图14中。

[1197] 图14示出了对合成微生物pTK1细胞的细胞生长的诱导型抑制,所述细胞包括已被转化为金黄色葡萄球菌RN4220细胞的pCN51质粒(pTK1)上的镉启动子后的细胞死亡毒素基因(sprA1)。诱导后2小时读取OD(630nm),如表27所示。在没有镉的情况下以及在存在500nM和1uM镉的情况下,野生型4220细胞均显示出良好的细胞生长。在没有镉的情况下,pTK1-1和pTK1-2细胞显示出良好的生长,但是在诱导后2小时,在存在500nM和1uM镉的情况下,细胞生长被显著抑制。

[1198] 表27.诱导后2小时金黄色葡萄球菌RN4220细胞的光密度(630nm)

[1199]

细胞	2小时后的OD(630nm)
WT4220Cad-	3.0
WT 4220Cad+500nM	2.9
WT 4220Cad+1uM	2.9
ptK1-1Cad-	2.6
pTK1-1Cad+500nM	0.19
pTK1-1Cad+1uM	0.25
ptK1-2Cad-	2.4
pTK1-2Cad+500nM	0.16
pTK1-2Cad+1uM	0.22

[1200] 再现实验,并且每个样品在诱导后2小时显示出相似的OD(630nm)结果(数据未示

出)。总之,对wt Rn4220细胞进行了镉耐受性测试,而500nM-1uM的镉对RN4220细胞显示出最小的阴性反应。该实施例表明,当用镉诱导时,pTK1的诱导显示出对细胞生长的抑制。

[1201] 实例17B.使用脱水四环素(ATc)诱导型启动子:pRAB11(其为含有四环素诱导型启动子的高拷贝质粒),将候选细胞死亡基因SprA1评估为金黄色葡萄球菌细胞(502a)的细胞生长抑制剂。将两个版本的sprA1毒素克隆到pRAB11-2中的tet启动子的后面。测试的克隆是含有缺失的spra1反义(Das)的p174质粒和含有缺失的spra1反义加上缺失的RBS位点的p175质粒。p174(pRAB11_Ptet-sprA1)的质粒图谱示于图15A和图15B中。图15A示出了含有Ptet-sprA盒的质粒区域的放大图。图15B示出了呈天然环状形式的p174完整质粒。

[1202] p174和p175中采用的序列如下所示。p174和p175均在使用四环素启动子的实验中使用

[1203] p174 sprA1:sprA1毒素基因和核糖体结合位点(p174):CGCAGAGAGGAGGTGTATAAG GTGATGCTTATTTTCGTTCACATCATAGCA CCAGTCATCAGTGGCTGTGCCATTGCGTTTTTTTCTTATTGGCTA AGTAGAC GCAATACAAAATAGGTGACATATAGCCGCACCAATAAAAAT(SEQ ID NO:274)

[1204] p175 sprA1(ATG):从起始密码子开始的sprA1毒素基因(去除核糖体结合位点)(p175):ATGCTTATTTTCGTTCACATCATAGCACCAGTCATCAGTGG CTGTGCCATTGCGTTTTTTTCTTATTG GCTAAGTAGACGCAATACAAAATAG GTGACATATAGCCGCACCAATAAAAAT(SEQ ID NO:275)

[1205] 细胞生长具体地说,使502a细胞中pRAB11载体上的tet诱导型基因在BHI中生长过夜。p174 pRAB11-pro-tet-spra1Das显示出5.4的OD。The p175pRAB11-pro-tet-spra1Das(ATG)显示出6.2的OD。将所有5个过夜培养物均在1ml最终(14ml试管)BHI-chlor10(502a wt,仅BHI)中稀释至0.5OD。将每种细胞系分为2个试管,分别用于未经诱导和经诱导的脱水四环素(ATc)-总共10。

[1206] 诱导。文献显示在100ng/ml ATc下诱导是有效的,因此在这些实验中选择该浓度进行诱导。诱导每组一支试管,最终浓度为100ng/ml。将乙醇中的1mg/ml ATc储备液在EtOH中稀释至100ug/ml。将一微升添加到适当的试管中,最终浓度为100ng/ml。

[1207] 分别在2小时、4小时和6小时获取630nm处的OD。以1/10稀释度读取2和4小时的OD,而6小时OD在1/100稀释度下读取,以确保读数保持在线性范围内。

[1208] 将502a(未经诱导的和经诱导的)试管和p174(pRAB11-pro-tet-spra1Das)试管连续稀释至10e-5和10e-6,以便分别稀释接种到BHI和BHI-chlor10上。

[1209] OD的结果示于表28和29中,而板比较图示于图15C中。

[1210] 表28.诱导生长曲线的计算表。

[1211]

样品名称	O/N OD	ul O/N 培养物	BHI	试管编号	条件
502a wt	4.7	106	1 ml	2	未经诱导的和经诱导的
502a p174 pRAB11-ptet-sp a1Das	5.4	93	1 ml	2	未经诱导的和经诱导的
502a p175 pRAB11-ptet-spa1Das(ATG)	6.2	81	1 ml	2	未经诱导的和经诱导的

[1212] 表29.502a pRAB11 tet诱导实验

[1213]

	时间点（小时）的 OD_{630} 读数			
样品名称	0.0	2.0	4.0	6.0
502a wt	0.5	4.8	8.0	14
502a wt + 100 ng ATc	0.5	4.4	7.1	11
502a p174 pRAB11-ptet-spa1Das	0.5	4.5	7.7	13
502a p174 pRAB11-ptet-spa1Das + 100 ng ATc	0.5	0.7	0.3	0
502a p175 pRAB11-ptet-spa1Das(ATG)	0.5	4.3	7.7	7
502a p175 pRAB11-ptet-spa1Das(ATG) + 100ng ATc	0.5	3.8	8.1	13

[1214] 图15C示出了在6小时诱导后未经诱导的502a p174(tet-spra1Das)(左侧)和经诱导的502a p174(tet-spra1Das)(右侧)在10e-5处的平板稀释。左侧板＝BHI chlor10上以10e-5稀释的未经诱导的p174(tet-spra1Das)。右侧板是BHI chlor10上10e-5下的经诱导的p174(tet-spra1Das)。这两个平板都是来自6小时的诱导后时间点的样品。左侧板(未经诱导的)在10e-5处无法计数,但在10e-6处计数约720个菌落。右边的经诱导的板在10e-5处产生16个菌落,如表30所示。

[1215] 表30.6小时诱导后,经诱导的金黄色葡萄球菌502a p174(tet-spra1Das)细胞的存活百分比

[1216]

条件	菌落	可数的稀释度	0.1 ml 平板接种的计算	CFU's/ml
未经诱导的	720	10e-6	(720*10e6)/0.1	7.2* 10e9
经诱导的	16	10e-5	(16*10e5)/0.1	1.6* 10e7

[1217] 如表30所示,计算诱导后6小时的经诱导细胞的存活百分比为1.6*10e7/7.2*10e9＝.00222x 100＝0.222％。与未经诱导的细胞相比,6小时诱导后,经诱导的金黄色葡萄球菌502a p174(tet-spra1Das)细胞的存活百分比仅为0.222％。因此,与未经诱导的细胞相比,金黄色葡萄球菌502a p174细胞在诱导后6小时表现出100％-0.222％＝99.78％的可测量平均细胞死亡。

[1218] 总之,在诱导后至多6小时,用100ng/ml ATc进行的诱导显示出对p174在502a细胞中生长的良好抑制作用,小于1％、小于0.5％或小于0.25％。具体地说,与未经诱导样品和502a野生型相比,在6小时结束时CFU计数显示出的存活率仅为0.22％。用spra1的缺失的RBS位点诱导p175对照对长达6小时的生长没有负面影响。总之,当用ATc诱导时,p174的诱导显示出对细胞生长的抑制。然而,与502a野生型细胞相比,当用ATc诱导时,缺乏RBS的p175对照的诱导对生长没有抑制作用。

[1219] 实例18.各种毒素基因的基于502a诱导型质粒的表达

[1220] 该实施例示出了可用于金黄色葡萄球菌502a中的杀灭开关的各种候选细胞死亡毒素基因的有效性。该实验使用基于质粒的诱导型毒素表达。pRAB11是金黄色葡萄球菌中的高拷贝质粒,通过添加100ng/mL AtC(脱水四环素)来抑制Ptet启动子,从而实现高转录速率。pRAB11描述于以下文献中:Helle、Leonie等人“用于改善金黄色葡萄球菌中依赖Tet阻遏物的逐步基因诱导或沉默的载体(Vectors for improved Tet repressor-dependent

gradual gene induction or silencing in Staphylococcus aureus)”《微生物学(Microbiology)》157.12(2011):3314-3323。选择了四个候选细胞死亡毒素基因进行评估:sprA1、187-lysK、Holin和sprG。

[1221] sprA1(PepA1)。已显示在金黄色葡萄球菌菌株中发现的基因srpA1可编码小的膜毒素PepA1。Sayed、Nour等人“来自毒素-抗毒素模块的金黄色葡萄球菌凋亡样膜肽的功能和结构见解(Functional and Structural Insights of AStaphylococcus Aureus Apoptotic-like Membrane Peptide from a Toxin-Antitoxin Module)”《生物化学杂志(Journal of Biological Chemistry)》,第287卷,第52号,2012,第43454-43463页,doi:10.1074/jbc.m112.402693。Sayed等人描述了sprA1基因如何编码被称为PepA1的毒素蛋白,所述蛋白定位在细菌膜上并导致细胞死亡。这是金黄色葡萄球菌中I型毒素抗毒素系统的一部分,并且已在其基因组中进化保存。

[1222] 187-lysK。这是来自金黄色葡萄球菌噬菌体K的工程化的噬菌体溶素蛋白。Horgan、Marianne等人“噬菌体溶素LysK可被截短至其CHAP结构域,并保留针对活的耐抗生素葡萄球菌的裂解活性(Phage lysin LysK can be truncated to its CHAP domain and retain lytic activity against live antibiotic-resistant staphylococci)”《应用与环境微生物学(Applied and environmental microbiology)》75.3(2009):872-874。O’Flaherty等人设计并截短了该肽,并确定其对于许多金黄色葡萄球菌菌株仍具有裂解活性。O’Flaherty,S.等人“重组噬菌体溶素LysK具有针对临床相关葡萄球菌(包含耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌)的广泛裂解活性(The recombinant phage lysin LysK has a broad spectrum of lytic activity against clinically relevant staphylococci, including methicillin-resistant Staphylococcus aureus)”《细菌学杂志(Journal of bacteriology)》187.20(2005):7161-7164。

[1223] holin。在此实验中测试的holin毒素是许多靶向金黄色葡萄球菌的裂解噬菌体的基因组的一部分。已经显示,当从质粒表达载体诱导时,通过在细胞膜上形成损伤,可以破坏大肠杆菌中的细胞生长。Song,Jun等人《普通病毒学杂志(Journal of General Virology)》97.5(2016):1272-1281。

[1224] sprG。被称为sprG的编码区是金黄色葡萄球菌中另一种I型毒素抗毒素系统的一部分。在sprG的同一阅读框中编码了两种肽,并且已显示两种肽均可在被诱导时引起细胞死亡。Pinel-Marie等人《细胞报告》7.2(2014):424-435。

[1225] 材料。如下所示制备了各种合成菌株,还采用了502a wt。菌株包含:

[1226] -BP_068(502a pRAB11-Ptet-sprA1)

[1227] -BP_069(502a pRAB11-Ptet-187lysK)

[1228] -BP_070(502a pRAB11-Ptet-holin)

[1229] -BP_071(502a pRAB11-Ptet-sprG1)

[1230] -BP_001(502a wt)。

[1231] 在该实施例中使用的生长培养基包含BHI肉汤培养基(37g/L)(Alpha Biosciences)、BHI琼脂平板、BHI氯霉素(10μg/mL(Teknova))琼脂平板和BHI Chlor(10μg/mL(Teknova))+AtC(100ng/mL(Alfa Aesar))琼脂平板。下表31示出了用于构建质粒的寡核苷酸序列的列表。

[1232] 表31.用于构建质粒的寡核苷酸列表及其序列

[1233]

寡核苷酸名称	DNA 序列（5'- 3'）
BPC_670	GCTCAGATCTGTTAACGGTACCATCATACTC（SEQ ID NO: 276）
BPC_671	CACTGGCCGTCGTTTTACAAC（SEQ ID NO: 277）
BPC_672	gagtatgatggtaccgttaacagatctgagcCGCAGAGAGGAGGTGTATAAGGTG （ SEQ ID NO:278）
BPC_674	gagtatgatggtaccgttaacagatctgagcATGGTGGCATTACTGAAATCTTTAGAAAG（SEQ ID NO: 279）
BPC_675	gagtatgatggtaccgttaacagatctgagcATGGCACTGCCTAAAACGGG （ SEQ ID NO:280）
BPC_676	gagtatgatggtaccgttaacagatctgagcATGGCTAATGAAACTAAACAACCTAAAGTT（SEQ ID NO: 281）
BPC_677	gttgtaaaacgacggccagtgCCCGGGCTCAGCTATTATCA（SEQ ID NO:282）
BPC_678	gttgtaaaacgacggccagtgGCGGCCGCCCATGCATGC（SEQ ID NO:283）

[1234] 表32示出了毒素基因的DNA序列和氨基酸序列。在此实验中测试了sprA1、187-lysK、holin和sprG。毒素基因sprG具有两个阅读框,两个阅读框均已显示在金黄色葡萄球菌中具有毒素活性。较短的序列以粗体显示。

[1235] 表32.毒素的DNA和氨基酸序列

[1236]

毒素	DNA 序列	蛋白序列
sprA1	ATGCTTATTTTCGTTCACATCATAGCA CCAGTCATCAGTGGCTGTGCCATTGC GTTTTTTTCTTATTGGCTAAGTAGAC GCAATACAAAATAG（SEQ ID NO: 284）	LIFVHIIAPVISGCAIAFFSYWLSRRNTK （SEQ ID NO: 285）
187-lysK	Atggcactgcctaaaacgggtaaaccaacggcaaaacag gtggttgactgggcaatcaatttaatcggcagtggtgtcgat gttgatggttattatggtcggcaatgttgggatttacctaacta tatttttaatagatactggaactttaagacaccaggcaacgc aagagatatggcatggtatagatatcctgaagggtttaaagt gtttagaaacacttctgattttgtccctaaaccaggtgatata gcagtgtggacaggtggtaattacaattggaacacttgggg acacactggtattgttgtaggtccatcaactaaaagttacttttt atagtgtagatcagaattggaataactctaactcttacgttgg tagtcctgcagcaaagataaaacatagttatttggtgtaact cattttgttagacccgcatacaaagcagaaccgaaacctac accaccactggacagtacaccggcaactagaccagttaca ggttcttggaaaaagaaccagtacggaacttggtataaacc ggaaaatgcaacatttgtcaatggtaaccaacctatagtaac tagaataggttctccattcttaaatgctccagtaggcggtaac ttaccggcaggggctacaattgtatatgacgaagtttgtatc caagcaggtcacatttggataggttataatgcttacaacggt aacagagtatattgccctgttagaacttgtcaaggtgttccac ctaatcaaatacctggcgttgcctggggagtattcaaa （SEQ ID NO: 286）	MALPKTGKPTAKQVVDWAINLIGSGVDV DGYYGRQCWDLPNYIFNRYWNFKTPGNA RDMAWYRYPEGFKVFRNTSDFVPKPGDIA VWTGGNYNWNTWGHTGIVVGPSTKSYF YSVDQNWNNSNSYVGSPAAKIKHSYFGV THFVRPAYKAEPKPTPPLDSTPATRPVTGS WKKNQYGTWYKPENATFVNGNQPIVTRI GSPFLNAPVGGNLPAGATIVYDEVCIQAG HIWIGYNAYNGNRVYCPVRTCQGVPPNQI PGVAWGVFK （SEQ ID NO: 287）
Holin	Atggctaatgaaactaaacaacctaaagttgttggaggaat aaactttagcacaagaactaagagtaaaacattttgggtagc aattatatcagcagtagcagtatttgctaatcaaattacaggt gcttttggtttagactactcagctcaaattgagcaaggtgtaa atatcataggttctatactaacattattagcaggtttaggtatta ttgttgataataatactaaaggtcttaaagatagtgatattgttc aaacagattatataaaacctcgtgatagtaaagaccctaatg aatttgttcaatggcaagcaaatgcaaacacagctagcactt tcgaattagacaactatgaaaacaatgcagaacctgataca gatgatagtgatgaagtacctgctattgaagatgaaattgat ggcggttcagcaccttctcaagatgaagaagataccgagg aacacggtaaagtatttgcagaggaggaagttaagtag （SEQ ID NO: 288）	MANETKQPKVVGGINFSTRTKSKTFWVAI ISAVAVFANQITGAFGLDYSAQIEQGVNIIG SILTLLAGLGIIVDNNTKGLKDSDIVQTDYI KPRDSKDPNEFVQWQANANTASTFELDN YENNAEPDTDDSDEVPAIEDEIDGGSAPSQ DEEDTEEHGKVFAEEEVK （SEQ ID NO:289）
sprG	ATGGTGGCATTACTGAAATCTTTAGA AAGGAGACGCCTA**ATGATTACAATT AGTACCATGTTGCAGTTTGGTTTA TTCCTTATTGCATTGATAGGTCTAG TAATCAAGCTTATTGAATTAAGCAA TAAAAAATAA**	MVALLKSLERRRL**MITISTMLQFGLFLIA LIGLVIKLIELSNKK** （SEQ ID NO: 291）

[1237]

	（SEQ ID NO: 290）	
sprA2	ATGTTCAATTTATTAATTAACATCATG ACTTCAGCTTTAAGCGGCTGTCTTGT TGCGTTTTTTGCACATTGGTTACGAA CGCGCAACAATAAAAAAGGTGACAA ATAA （SEQ ID NO: 304）	MFNLLINIMTSALSGCLVAFFAHWLRTRN NKKGDK （SEQ ID NO: 305）

[1238] 方法

[1239] 如下进行质粒构建。

[1240] 1)使用空载体作为模板,使用引物BPC_670和BPC_671对pRAB11主链进行PCR扩增。

[1241] 2)从合成的质粒DNA(Genscript)中对毒素基因进行PCR扩增。这允许设计与靶基

因下游的质粒主链结合的引物,从而无需为每个基因的两端设计和订购独特的引物。

[1242] 3)引物对

[1243] a)sprA-BPC_672/BPC_677

[1244] b)187-lysK-BPC_675/BPC_678

[1245] c)Holin-BPC_676/BPC_678

[1246] d)sprG-BPC_674/BPC_678

[1247] 4)运行PCR产物以检查正确的大小,用DpnI(NEB)消化模板DNA,并使用Zymo离心柱净化反应。

[1248] 5)使用Gibson Assembly组装净化的PCR产物,并使用制造商方案(NEB)将其转化为电感受态IM08B大肠杆菌细胞。

[1249] 6)验证质粒上的启动子和毒素的正确序列。

[1250] 7)将经序列验证的质粒转化为电感受态金黄色葡萄球菌。

[1251] 如下进行生长实验。

[1252] 1)在5mL BHI肉汤培养基中开始每种菌株的过夜培养。向菌株BP_068-BP_071的培养基中添加10ug/mL氯霉素。

[1253] 2)将过夜培养物以1:100稀释到新鲜的BHI中。向菌株BP_068-BP_071的培养基中添加10ug/mL氯霉素。在37℃下以250rpm振荡孵育2小时。将每种菌株的板划线,并在37℃下孵育过夜,以确认培养物良好。

[1254] 3)取2小时培养物的OD600读数并将培养物稀释至OD为0.05

[1255] a)每种菌株都获得(4)5mL带BHI肉汤的试管

[1256] b)下表示出了记录的OD读数,以及用于将新鲜培养物接种至OD为0.05的每种培养物的计算量。

[1257] 表33

[1258] 表33.起始OD_{600}读数

[1259]

菌株	OD600	uL接种物	计算得起始OD
BP_068	2.1	119	0.0499
BP_069	1.7	147	0.0498
BP_070	2.0	125	0.05
BP_071	1.8	139	0.05
BP_001	1.7	147	0.0498

[1260] 4)保存每种培养物的100uL样品用于稀释平板接种。(3个板/培养物)

[1261] 5)在37℃下孵育培养物,直至OD达到0.5。对于每种菌株,将150ng/mL脱水四环素(AtC)加入2个试管中,并用+标记,以表明它们已接受诱导剂(降压剂)。继续使细胞再生长4小时,如下所述进行取样。

[1262] 6)在T=30分钟、60分钟、120分钟和240分钟处获取OD600读数。在下表中记录值

[1263] a)在T=0、60分钟和240分钟处进行稀释平板接种,并在以下平板(BHI、BHI Chlor10、BHI Chlor10+AtC 0.1)上平板接种正确的稀释度

[1264] 如下进行Cfu调查。

[1265] 1)在存在毒素基因的情况下,从含有质粒的菌株中鉴定出生长着菌落的BHI

(Chlor 10,AtC 0.1)琼脂平板。来自T240的板将是最好的。

[1266] 2)如果可能的话,每种菌株选择8个菌落。将菌落贴到新的BHI(Chlor 10,AtC 1)琼脂平板上,并进行金黄色葡萄球菌裂解程序。使用5uL裂解反应作为模板,通过HF聚合酶(如Q5/Phusion)使用引物DR_215/DR_216进行菌落PCR。

[1267] a)产生良好条带的反应,进行DpnI消化1小时,并柱纯化PCR反应。使用引物DR_215/DR_216发送经纯化的产物进行测序。

[1268] 诱导后在T=0、30、60、120和240分钟处取计算的OD600读数。T0之后的所有值均为2个试管的平均值。结果示于表34和图16中。+表示接受AtC的培养物,而-表示未接受任何另外的因素的培养物。图16示出了计算的OD600值与时间的关系。虚线代表在T=0处接受了150ng/mL AtC的培养物。图16显示,编码PepA1毒素蛋白的sprA基因在诱导后生长4小时后在活的502a金黄色葡萄球菌细胞中显示出最大的减少。

[1269] 具体地说,图16示出了衍生自金黄色葡萄球菌502a的四个合成菌株的诱导前的细胞生长和诱导后的细胞生长,所述菌株具有基于质粒的诱导型表达系统,所述表达系统包括四个不同的细胞死亡基因候选者sprA1、187-lysK、Holin和sprG。所述候选细胞死亡基因已被克隆到pRAB11质粒上的四环素诱导型启动子之后,并被转化为金黄色葡萄球菌502a细胞。在诱导经AtC诱导的(+)菌株(以虚线(------)表示)和未经诱导的(-)菌株(以实线(_____)表示)后,在T=0、30、60、120和240分钟处获取BP_068(502a pRAB11-Ptet-sprA1)、BP_069(502a pRAB11-Ptet-187lysK)、BP_070(502a pRAB11-Ptet-holin)和BP_071(502apRAB11-Ptet-sprG1)的计算出的OD600读数,并将其与BHI培养基中的BP_001(502a wt)进行比较。经诱导的(+)菌株BP_068(sprA1)、BP_069(187lysK)和BP_070(holin)中的每一个菌株均表现出(i)诱导前良好的细胞生长和(ii)诱导后对细胞生长的显著抑制。BP_068(+)在诱导后的每个时间点T=30、T=60、T=60、T=120和T=240处均表现出对细胞生长的最佳抑制作用,因此选择了sprA1基因对金黄色葡萄球菌502a中的杀灭开关进行初步的进一步发育。

[1270] 表34.诱导后在T=0、30、60、120和240分钟处计算的OD600,如图16所示

[1271]

	平均 OD600 读数				
菌株+/-, 经诱导的	T0	T30 分钟	T60 分钟	T120 分钟	T240 分钟
68+	1.05	0.05	0	0	0
68-	1.05	1.45	2.05	3.4	5.7
69+	1	0.15	0	0.1	0
69-	0.95	1.25	1.75	2.8	5.5
70+	1	0.8	0.7	0.5	0.4
70-	0.9	1.3	1.8	2.9	5.6
71+	1	1.1	1.4	2.1	5.2
71-	1	1.5	2	3.1	5.8
502a+	1.1	1.15	1.45	2.1	3.7
502 -	1.15	1.45	2.15	3.5	5.4

[1272] 下表35和图17示出了根据稀释的液体培养物样品的平板计数计算出的菌落形成单位。图17示出了显示T=0分钟(灰色)与240分钟(黑色)之间的菌落形成单位/mL的差异的柱状图。

[1273] 表35.根据稀释的液体培养物样品的平板计数计算出的CFU。

[1274]

	AtC	T0（cfu/mL）	T240（cfu/mL）
68	68+	2.85E+09	7.50E+01
	68-	3.12E+09	7.75E+09
69	69+	8.75E+09	6.30E+03
	69-	1.40E+09	1.10E+09
70	70+	5.25E+09	4.75E+04
	70-	6.05E+09	1.41E+11
71	71+	3.00E+09	1.04E+11
	71-	1.34E+09	2.69E+11
502	502a+	1.29E+09	2.07E+11
	502a-	1.45E+09	2.62E+11

[1275] 该实例研究了当在复杂的富集培养基中生长时,多种毒素基因在可操作地连接至诱导型启动子时在破坏细胞生存力方面的有效性。使用基于质粒的诱导型表达系统测试了两种天然葡萄球菌毒素sprA和sprG,一种是被称为187lysK的嵌合噬菌体毒素,而另一种是噬菌体holin毒素。编码PepA1毒素蛋白的sprA1基因在诱导后生长4小时后在活的502a金黄色葡萄球菌细胞中显示出最大的减少。选择sprA1基因用于金黄色葡萄球菌502a中的杀灭开关的初步进一步发育。

[1276] 实例19.来自基因组的GFP在菌株BP_076中的诱导表达(502aΔsprA1::P_{tet}-gfp)

[1277] 概述。在该实例中,通过定量性聚合酶链反应(qPCR)证实了金黄色葡萄球菌502a变异株(BP_076)基因组中的绿色荧光蛋白(GFP)的表达。将gfp基因与四环素诱导型启动子(P_{tet})和四环素阻遏蛋白基因(tetR)一起整合到基因组中。通过自杀质粒pIMAYz将P_{tet}-gfp表达系统引入基因组中,从而允许重组基因的可控表达。野生型菌株(BP_001)用作阴性对照,而携带具有相同P_{tet}-gfp表达系统的高拷贝质粒的菌株用作阳性对照。由于脱水四环素(aTc)的毒性低于四环素,因此使用脱水四环素在100ng/mL下诱导表达。

[1278] 总结的结果。当将t＝0分钟时BP_055和BP_076的样品与BP_001的样品进行比较时,qPCR数据显示诱导前GFP的表达较弱(表明P_{tet}渗漏);然而,诱导后的表达倍数变化仍然很明显。在基于质粒的gfp和整合的gfp之间看到了不同的表达模式。整合的gfp在整个测定过程中显示出持续的表达增加,而基于质粒的gfp在30分钟时显示出高度上调,而在90分钟时则几乎没有表达。BP_076和BP_055之间的表达差异是由于每种菌株中每个细胞的tetR拷贝数所致。BP_076每个细胞有一个拷贝,而BP_055有300-500个拷贝,这取决于每个细胞中质粒的数量。到测定结束时,BP_055培养物中存在的大量总TetR蛋白,其明显超过了用于诱导的aTc的量,这导致gfp表达受到抑制。

[1279] 细菌菌株和材料。

[1280] 菌株

[1281] BP_001(金黄色葡萄球菌502a)

[1282] BP_055(SA502a、p229_pRAB11-Ptet-GFP)

[1283] BP_076(SA 502a、ΔsprA1::Ptet-GFP)

[1284] 采用了脑心浸液肉汤(BHI)培养基、,BHI+氯霉素(10μg/mL)琼脂平板、脱水四环素(aTc)。

[1285] 样品是RNA(1mL培养物):t＝0、30和90分钟。

[1286] 方法—菌株构建

[1287] 1.为了在金黄色葡萄球菌的基因组中进行修饰,必须首先将所需的遗传元件添加

到能够进行这些修饰的质粒中。

[1288] 2.质粒主链是大肠杆菌-金黄色葡萄球菌穿梭载体(被称为pIMAYz),并且具有氯霉素抗性、低拷贝大肠杆菌复制起点、低拷贝温度敏感性金黄色葡萄球菌复制起点(允许在30℃下复制,但无法在37℃下复制)、受Ptet启动子控制的secY毒素以及用于在整合入金黄色葡萄球菌期间进行蓝/白筛查的lacZ基因。

[1289] 3.使用线性PCR产物构建质粒,使用Gibson Assembly将所示产物组装成环状构建体

[1290] a.使用引物DR_022/DR_023对pIMAYz载体的主链进行PCR扩增,以使其线性化,从而用于下游组装。必须按照制造商的说明,用DpnI(NEB)对背景模板DNA进行酶消化,然后再进一步使用。

[1291] b.使用引物DR_255/DR_241以pRAB11质粒为模板对tetR-Ptet-GFP区域进行PCR扩增。

[1292] c.使用引物DR_256/DR_257和DR_240/DR_236对金黄色葡萄球菌502a基因组的1kb区域进行PCR扩增。这些将被用作同源臂,以靶向用于整合到金黄色葡萄球菌基因组中的区域。

[1293] d.然后按照制造商的说明,用Gibson Assembly Master Mix(NEB)将这些线性片段组装成环状质粒,并转化为IM08B细胞。

[1294] 4.一旦可以确认新质粒DNA的序列,则开始50mL培养以获得足够的量,以便通过电穿孔转化成金黄色葡萄球菌502a。

[1295] 5.通过同源重组整合到金黄色葡萄球菌中

[1296] a.使用介于1微克与5微克之间的质粒DNA电穿孔进入金黄色葡萄球菌。在37℃下恢复1小时,然后在BHI+10ug/mL氯霉素和100ug/mL x-Gal上平板接种,并在37℃下孵育过夜。

[1297] b.第二天,挑取多个蓝色菌落,并在室温下开始5mL BHI肉汤培养,并使其在旋转振荡单元中生长12-20小时。

[1298] c.在BHI+1ug/mL脱水四环素(AtC)和100ug/mL X-gal上进行连续稀释(通常为10^{-4}-10^{-6})并平板接种。在37℃下孵育过夜。

[1299] d.第二天,通过将菌落贴到BHI、BHI+1ug/mL脱水四环素(AtC)和100ug/mL X-gal以及BHI+10ug/mL氯霉素和100ug/mL x-Gal琼脂板上来挑取并筛查白色菌落,从而确认对氯的敏感性和对AtC的耐受性。

[1300] e.应该用引物DR_237/DR_238通过PCR筛查显示出期望表型的菌落。获取了新基因的菌落应该产生4.4kb的条带,而恢复为野生型的菌落应该具有2.86kb的条带。应该对几个阳性克隆进行测序以验证正确的序列,并挑取一种经序列验证的克隆用于下游实验。

[1301] 细胞生长程序

[1302] 1.在BHI肉汤培养基(5mL)中开始每种菌株的过夜培养,并搅拌(37℃,240rpm)孵育。将氯霉素(最终浓度为10μg/mL)添加到BP_055的培养基中。

[1303] 2.测量过夜培养物的光密度(OD)并记录。

[1304] 在630nm处测量培养物的光密度(OD),新鲜培养基用作空白。将过夜培养物的OD表示为初始OD。如表36所示,转移到5mL新鲜培养基中的接种物使OD降低至0.05,因此新培养

物将在接种后两小时进入指数生长期。

[1305] 表36.P_001、BP_055和BP_076培养物的OD

[1306]

菌株	初始OD	5mL的接种物[μL]	2小时的OD
BP_001	8.2	30.5	1.01
BP_055	9.1	27.5	0.88
BP_076	8.7	28.7	1.01

[1307] 3.每次培养在2×14mL培养管中的新鲜BHI(5mL)中将过夜培养物稀释至0.050D;再次向BP_055培养物中添加氯霉素。

[1308] 4.搅拌孵育(37℃,240rpm),直至OD达到0.5-1(“2小时培养物”)。

[1309] 5.取出t=0分钟时RNA样品的1mL培养物,并将其转移至1.5mL微管中。旋转样品(16,000×g,1分钟,室温),吸出上清液,将沉淀物重悬于200μLRNAlater中。使样品在室温(RT)下孵育几分钟,然后在-20℃下保存。

[1310] 6.对于每种菌株,将aTc(4μL,100μg/mL)加入第一个14mL培养管中。对于每种菌株,4μL 100%乙醇加入第二个试管中作为诱导对照(将aTc溶解在100%乙醇中)。

[1311] 7.搅拌(37℃,240rpm)孵育培养物,直至其它采样时间点。

[1312] 8.在t=30和90分钟处重复RNA采样,在t=90分钟处测量OD。

[1313] qPCR样品处理和数据分析

[1314] 根据上述实例中的方案,使用Ambion RiboPure细菌试剂盒从保存在RNALater中的冷冻细胞沉淀物中提取RNA。将gfp表达水平相对于管家基因gyrB进行归一化,并使用ΔΔCt方法进行定量,参见表37中的引物序列。

[1315] 表37:qPCR引物的序列

[1316]

靶标	数据库编号	序列
gyrB	BP 802	5'-TTGGTACAGGAATCGGTGGC (SEQ ID NO: 212)
gyrB	BP 803	5'-TCCATCCACATCGGCATCAG (SEQ ID NO: 213)
gfp	BP 195	5'-CTGTCCACACAATCTGCCCT (SEQ ID NO: 292)
gfp	BP 196	5'-TGCCATGTGTAATCCCAGCA (SEQ ID NO: 293)

[1317] 用于质粒和菌株构建的引物序列示于表38中。

[1318] 表38.用于质粒和菌株构建的引物

[1319]

引物名称	ssDNA 序列（5'-3'）
DR_022	Caagcttatcgataccgtcgacctc （SEQ ID NO: 294）
DR_023	Gggatccactagttctagagcgg （SEQ ID NO: 295）
DR_237	GCAACTGGTACATCACAATTGGTACTCTCAC （SEQ ID NO: 296）
DR_238	GACCACGCATACCTATCTATAAACGGACAATG （SEQ ID NO: 297）
DR_255	GTCCAATTAGATGGCATGTAACTGGGCAGTGTCTTAAAAAATCG （SEQ ID NO: 298）
DR_241	CAGGCCAATTTGGCATAGAGCCGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACG （SEQ ID NO: 299）
DR_256	GTTACATGCCATCTAATTGGACAAATTCTATGAGAGTAGATTTTG （SEQ ID NO: 300）
DR_257	GCCAAATCGCTTTCGTGTATACGATTCCCAGTC （SEQ ID NO: 301）
DR_240	GGCTCTATGCCAAATTGGCCTGATGAGTTC （SEQ ID NO: 302）
DR_236	gctctagaactagtggatcccGGCGATTTTATTGTGACAAGAGACTGAAGAGC （SEQ ID NO: 303）

[1320] 图19示出了菌株BP_076(SA 502a,ΔsprA1::Ptet-GFP)的基因组图谱。

[1321] 图20示出了被构建用于在金黄色葡萄球菌中进行基因组整合的质粒的图谱。

[1322] 结果。携带P_{tet}-gfp系统的两种菌株的t＝0样品在诱导前均显示了一些GFP表达，表2示出了三种研究菌株在t＝0时的Ct值。野生型菌株BP_001扩增曲线在30个循环后超过阈值(0.4),这可能归因于某种形式的非特异性扩增或引物二聚体形成。

[1323] 表39示出了野生型菌株BP_001在表达诱导之前的阈值循环(Ct)值,示出了基于质粒的P_{tet}-gfp BP_055携带菌株和经P_{tet}-gfp基因修饰的菌株BP_076。将阈值设置为0.4。

[1324] 表39.BP_001、BP_055和BP_076在诱导之前的阈值循环(Ct)值

[1325]

菌株	BP_001	BP_055	BP_076
Ct值	33.65±0.61	22.99±0.06	23.09±0.10

[1326] 通过将每种菌株各自的实验时间点(t＝30分钟、90分钟)相对于对照时间点(t＝0)进行归一化,在ΔΔCt计算中考虑了GFP的基础表达水平。通过qPCR确定的GFP的表达水平显示在下文的图18中。图18示出了金黄色葡萄球菌菌株BP_001、BP_055和BP_076的经诱导的(+)亚培养物和未经诱导的(-)亚培养物的GFP表达倍数变化。在基于质粒的gfp和整合的gfp之间看到了不同的表达模式。整合的gfp在整个测定过程中显示出持续的表达增加,而基于质粒的gfp在30分钟时显示出高度上调,而在90分钟时则几乎没有表达所有三种菌株的经诱导的亚培养物(+)和未经诱导的亚培养物(-)对aTc和P_{tet}-gfp表达系统的存在显示出表达诱导依赖性。如预期的那样,BP_001在整个实验中均未表达。在整个实验中,BP_076中的GFP表达增加,这表明金黄色葡萄球菌502a基因组中的表达。针对BP_055确定的表达模式可归因于不理想的实验设计;然而,其确实实现了作为诱导的阳性对照的目的。BP_055在质粒pRAB11(一种高拷贝质粒)上携带P_{tet}-gfp表达系统。每个质粒都有两个TetR蛋白结合位点,所述位点在aTc不存在的情况下抑制GFP的表达。在诱导的30分钟内,大量的质粒乘以细胞计数就产生了大约1300倍的GFP表达上调,这确认了aTc在测定过程中呈活性形

式。人们可能希望GFP的表达水平在90分钟时甚至更高,但数据显示几乎没有表达(与t=0时相比,上调了大约7倍)。鉴于在t=90分钟时培养物中存在的TetR蛋白的总数,这并不奇怪。aTc的量不足以在90分钟的时间点抑制TetR的阻遏,从而导致几乎没有表达。通过对四环素诱导的GFP表达进行的qPCR分析,证实了金黄色葡萄球菌502a的经过分子修饰的菌株的基因表达。

[1327] 实例20.通过RNA seq筛查候选的血清响应性启动子以检测上调

[1328] 在该实验中,当相对于TSB在血清中生长时,对502a金黄色葡萄球菌变异株BP_001WT进行了RNA测序,以便获得对进入循环系统后微生物内发生的转录变化的整体理解。RNA测序是对从实验室生长培养基和人血清中收集的样品进行的。

[1329] 如下进行在有或没有人血清的TSB中的培养(生长测定)。在含有5%羊血的胰蛋白酶大豆肉汤(TSB)琼脂板上,从低温储备液中提取出金黄色葡萄球菌502a细胞,并生长过夜(37℃)。第二天,使用五个单菌落在14mL培养管中接种5mL TSB,并在搅拌(37℃,240rpm)下生长过夜。第二天早晨,将50mL的TSB转移至250mL烧瓶中,并加热至37℃。测量过夜培养物的OD_{600}(OD_{600}=6.0),并用于将温热的TSB接种(416μL)至OD_{600}为0.05。该培养物生长了大约两小时(37℃,100rpm),并达到1.24的OD_{600}。在此期间,将50mL人血清等分试样置于37℃的恒温箱中解冻,并加热新鲜的TSB。使用血清移液管,将15mL培养物转移至15mL Falcon管中并离心(室温,2000×g,10分钟)。倒出上清液,将沉淀物重悬于无菌PBS(15mL)中并离心(室温,2000×g,10分钟)。倒出来自洗涤步骤的上清液,并将沉淀物重悬于无菌PBS(7.5mL)中,从而使接种物的OD_{600}翻倍至2.48。使用PBS悬浮液以OD_{600}为0.05(每10mL培养基202μL)接种TSB和血清培养物样品。

[1330] 如下进行RNA测序样品的制备。

[1331] t=0分钟的样品(3×)在洗涤之前分别是原始的50mL促酵剂培养物的1mL。在指定的时间点,将培养管从培养箱中取出,置于冰水浴中5分钟,然后离心(4℃,2000×g,10分钟)。倒出上清液,将沉淀物重悬于1mL冰冷的无菌PBS中,并转移至微管中。将悬浮液离心(4℃,6000×g,3分钟),吸出上清液,并将沉淀物重悬于RNAlater中。将RNAlater悬浮液保存在-20℃下。

[1332] 将样品从-20℃的冰箱中取出以进行RNA提取,并在室温下解冻。沉淀细胞(室温,16000×g,1分钟),吸出上清液,然后用PBS洗涤细胞—洗涤有助于去除血清中的残留物。为了洗涤细胞,将沉淀物重悬于PBS中并离心(室温,16000×g,1分钟),弃去上清液。按照制造商的说明,使用英杰公司(Invitrogen)的RiboPure细菌试剂盒提取RNA。然后将提取的RNA进行DNase I处理,并用乙醇沉淀。根据测序公司的要求,将样品在干冰上以乙醇颗粒的形式发送。

[1333] 使用用于细菌的Ribo-Zero rRNA去除试剂盒(Illumina)从总RNA样品中耗尽核糖体RNA分子。在Shimadzu MultiNA微芯片电泳系统上分析RNA样品的质量,然后使用超声(4个脉冲,30秒,4℃)将样品破碎。将衔接子连接到分子的3'末端,以使第一链cDNA可以用M-MLV逆转录酶合成。纯化cDNA,并将5'Illumina TruSeq衔接子连接至反义cDNA的3'末端。然后使用高保真聚合酶通过PCR扩增cDNA,扩增后的浓度为10-20ng/μL。然后根据其所代表的生长条件对cDNA样品进行条形码处理,使用Agencourt AMPure XP试剂盒(Beckman Coulter Genomics)进行纯化,并通过毛细管电泳进行分析。然后合并cDNA,该合并池覆盖

200到500bp的分子。

[1334] 对于Illumina NextSeq,按照Illumina的说明设计用于PCR扩增的引物以进行TruSeq测序。使用75bp的读取长度在Illumina NextSeq 500系统上对cDNA进行测序。使用SARTools通过DESeq2分析基因的差异表达。

[1335] 通过RNA测序上调的基因的结果显示在表40中;t=暴露于人血清后以分钟为单位的时间。

[1336] 表40.金黄色葡萄球菌502a WT中的基因在暴露于人血清后通过RNAseq被上调

[1337]

基因		t=30 血清与t=0	t=30 血清与t=30 TSB	t=90 血清与t=0	t=90 血清与t=90 TSB
基因名称	基因编号	倍数变化	倍数变化	倍数变化	倍数变化
isdB	CH52_00245	479.653	471.648	2052.474	1240.112
sbnB	CH52_05135	158.756	44.41	310.08	130.622
isdC	CH52_00235	93.006	56.211	173.376	149.117
sbnA	CH52_05140	88.832	37.808	143.558	93.474
srtB	CH52_00215	73.135	47.421	143.059	170.578
sbnE	CH52_05120	70.475	50.083	190.255	171.279
sbnD	CH52_05125	66.84	52.434	187.025	224.017
isdI	CH52_00210	65.951	53.426	115.302	118.724
血红素 ABC 转运蛋白 2	CH52_00225	65.024	43.415	117.603	135.956
sbnC	CH52_05130	63.092	51.306	162.927	147.385
血红素 ABC 转运蛋白	CH52_00230	60.967	40.137	125.227	196.142
isd ORF3	CH52_00220	51.262	35.978	97.439	119.584
sbnF	CH52_05115	43.997	44.31	129.516	127.889
丙氨酸脱氢酶	CH52_11875	43.589	20.237	304.444	NA
HarA	CH52_10455	43.215	28.041	114.425	117.787
sbnG	CH52_05110	42.446	34.095	133.373	120.433
二氨基庚二酸脱羧酶	CH52_05105	32.541	25.864	102.838	141.629
铁 ABC 转运蛋白	CH52_05145	31.417	19.576	44.885	47.226
苏氨酸脱水酶	CH52_11880	24.559	20.237	NA	NA
isdA	CH52_00240	21.471	40.712	44.477	115.432
铁载体 ABC 转运蛋白	CH52_05150	NA	NA	33.201	37.267
sbnI	CH52_05100	NA	22.602	101.548	89.778
SAM dep Metrans	CH52_04385	NA	NA	75.292	25.847

[1338] 通过RNA测序,发现与t=0相比或在TSB中与t=30相比,几个基因在t=30分钟处暴露于人血清后被上调20倍以上,所述基因包含isdB、sbnB、isdC、sbnA、srtB、sbnE、sbnD、isdI、血红素ABC转运蛋白2、血红素ABC转运蛋白2、血红素ABC转运蛋白、isd ORF3、sbnF、丙氨酸脱氢酶、HarA、sbnG、二氨基庚二酸脱羧酶、铁ABC转运蛋白、苏氨酸脱水酶、isdA和sbnI。

[1339] 通过RNA测序,与t=0相比或在TSB中与t=30相比,几个基因在t=30分钟处暴露于人血清后被上调50倍以上,所述基因包含isdB、sbnB、isdC、sbnA、srtB、sbnE、sbnD、isdI、血红素ABC转运蛋白2、血红素ABC转运蛋白2、血红素ABC转运蛋白、isd ORF3。通过RNA测序,与t=0相比或在TSB中与t=30相比,在t=30分钟处暴露于人血清后被上调100倍以上的基

因包含isdB和sbnB,

[1340] 通过RNA测序,与t=0相比或在TSB中与t=90相比,几个基因在t=90分钟处暴露于人血清后被上调100倍以上,所述基因包含isdB、sbnB、isdC、sbnA、srtB、sbnE、sbnD、isdI、血红素ABC转运蛋白2、血红素ABC转运蛋白2、血红素ABC转运蛋白、isd ORF3、sbnF、丙氨酸脱氢酶、HarA、sbnG、二氨基庚二酸脱羧酶、isdA。

[1341] 当暴露于血清时,金黄色葡萄球菌502a中优选的上调基因包含isdB基因CH52_00245、srtB基因CH52_00215、血红素ABC转运蛋白2基因CH52_00215和HarA基因CH52_00215。

[1342] 如表41和表42所示,通过RNA测序发现几个金黄色葡萄球菌502aWT基因在暴露于人血清时被下调。

[1343] 表41.金黄色葡萄球菌502a WT中的基因在30分钟处暴露于人血清后通过RNAseq被下调

[1344]

基因名称	基因编号	t = 30 血清与 t = 0	t =30 血清与 t = 30 TSB
		倍数变化	倍数变化
磷酸核糖基甘氨酰胺甲酰基转移酶	CH52_00525	-4.307	-2.001
磷酸核糖基氨基咪唑合成酶	CH52_00530	-4.271	-2.063
酰胺基磷酸核糖基转移酶	CH52_00535	-4.131	-2.117
磷酸核糖基甲酰基甘氨酰胺合酶	CH52_00540	-4.046	-2.244
磷酸核糖基甲酰基甘氨酰胺合酶	CH52_00545	-3.498	-2.215
磷酸核糖基氨基咪唑-琥珀酰胺	CH52_00555	-3.345	-2.134
海藻糖渗透酶 IIC	CH52_03480	-3.338	-2.401
DeoR 家族转录调节子	CH52_02275	-2.55	-2.171
磷酸果糖激酶	CH52_02270	-2.464	-1.984
PTS 果糖转运蛋白亚基 IIC	CH52_02265	-2.042	-1.806
半乳糖-6-磷酸异构酶	CH52_07975	NA	-2.137

[1345] 表42.金黄色葡萄球菌502a WT中的基因在90分钟处暴露于人血清后通过RNAseq被下调

[1346]

基因名称	基因编号	t = 90 血清与 t = 0	t = 90 血清与 t = 90 TSB
		倍数变化	倍数变化
NarZ	CH52_07000	-5.012	-3.989
磷酸核糖基甘氨酰胺甲酰基转移酶	CH52_00525	-3.737	-1.680
海藻糖渗透酶 IIC	CH52_03480	-3.279	-4.381
NarH	CH52_07005	-3.265	NA
烷基氢过氧化物酶	CH52_06615	-3.211	-3.573
NarT	CH52_07045	-3.108	-3.680
假设蛋白	CH52_04875	-2.911	-3.396
DeoR 反式因子	CH52_02275	-2.245	-3.322
PTS 果糖转运蛋白亚基 IIC	CH52_02265	-2.211	-4.474
溶血磷脂酶	CH52_02680	-1.837	-3.000
蛋白质分解伴侣	CH52_01005	-0.009	-2.989
烷基氢过氧化物酶	CH52_06615	NA	-3.573
磷酸果糖激酶	CH52_02270	NA	-3.878

[1347] 与t=0或TSB中相比,金黄色葡萄球菌502a中的几个基因在血清中t=30或t=90

分钟后,至少被下调了2倍,所述基因包含磷酸核糖基甘氨酰胺甲酰基转移酶基因CH52_00525、海藻糖渗透酶IIC基因CH52_03480、DeoR转录调节基因CH52_02275、磷酸果糖激酶基因CH52_02270和PTS果糖转运蛋白亚基IIC基因CH52_02265。

[1348] 实例21.杀灭开关构建

[1349] 对于该实验,设计并构建了血清响应性杀灭开关盒,以便制备无法在血清或血液中生长的金黄色葡萄球菌(SA)502a菌株。基于SA中的内源性sprA1毒素抗毒素系统构建此盒。这是一种I型T/AT系统,其中毒素是被反义RNA翻译抑制的小膜孔蛋白肽(PepA1)。反义RNA与覆盖RBS并阻止其结合单链mRNA和合成蛋白质的能力的sprA1的5'UTR结合。

[1350] 该杀灭开关的设计将驱动PepA1毒素从其内源性系统表达的启动子区域改变为在人血清中培养生物时高度上调的启动子区域。用来自SA502a的sbnA启动子制备该构建体。对于该杀灭开关,反义RNA的启动子区域并未改变,但其它版本的杀灭开关仍在进行中,该区域也将改变为启动子,所述启动子在正常复杂培养基中的生长过程中被高度上调,但在生物在血液或血清中生长时被高度抑制或下调。这应该使其在血液或血清条件下更容易克服对sprA1的抗毒素抑制作用。

[1351] 为了测试杀灭开关的功能,通过在复合培养基、胰蛋白酶大豆肉汤(TSB)中取在指数早期生长的培养物并将生长培养基改变为人血清来诱导PepA1毒素的表达。监测OD,对板进行连续稀释,并对CFU进行计数,以监测培养物中的活细胞数量,并将其与在相同条件下生长的野生型SA502a进行比较。图21示出了金黄色葡萄球菌502a基因组中的PsbnA-sprA1杀灭开关的图谱。

[1352] 下文示出了用于质粒构建的方法、寡核苷酸、使用同源重组在金黄色葡萄球菌502a基因组中进行改变的方案以及杀灭测定。

[1353] 菌株

[1354] 502a-金黄色葡萄球菌野生型

[1355] BP_011-502aΔsprA1-sprA1(AS)

[1356] BP_084-502aΔPsprA::PsbnA

[1357] 在该实验中,BP_011的sprA1毒素基因和sprA1抗毒素区域都被敲除,因为据认为,通过将杀灭开关整合到该位点中比直接整合到野生型502a中更容易"治愈"KO。这是因为用于整合(即同源重组)的系统依赖于插入的基因与染色体靶标之间的同源性片段来决定整合的位置,并且据认为,如果基因组中存在内源性sprA1毒素/抗毒素,则其可能会干扰整合。BP_011菌株是杀灭开关菌株BP_084的亲本。在该实验中包含了BP-011菌株作为对照。

[1358] 质粒构建

[1359] 1)对来自SA502a基因组的同源区进行PCR扩增

[1360] a.上游同源臂-DR_233/DR_296

[1361] b.下游同源臂-DR_280/DR_236

[1362] 2)对来自IDT的合成线性DNA片段中的PsbnA-sprA1进行PCR扩增

[1363] a.PsbnA-sprA1-DR_297/DR_228

[1364] 3)对pIMAYz主链载体进行PCR扩增

[1365] a.DR_022/DR_023

[1366] 4)按照制造商的说明,使用Qiagen试剂盒凝胶纯化所有片段

[1367] 5)按照制造商的说明,将线性DNA片段组装成环状质粒,并转化为电感受态IM08B大肠杆菌细胞

[1368] 6)进行菌落PCR,以筛查菌落中完全组装的质粒

[1369] a.DR_117/DR_228(1571bp片段)

[1370] 7)挑取多个阳性菌落,将培养物生长过夜并测序质粒,以确认新组装的质粒中没有突变

[1371] 8)将经序列确认的质粒转化为电感受态SA502a,并遵循使用同源重组在SA基因组中进行编辑的方案

[1372] 9)通过PCR筛查最终菌落,用于与引物对DR_303/DR_304整合

[1373] a.如果观察到正确的条带大小,则发送PCR产物进行序列确认。

[1374] 表43.用于质粒构建的寡核苷酸序列

[1375]

引物名称	5'-3' DNA 序列
DR_233	cgacggtatcgataagcttgGCCACTGGCGTCAAATACTGTAATGAAGAATG (SEQ ID NO: 330)
DR_296	CATCTAATTGGACAAATTCTATGAGAGTAGATTTTGTTAATTTAAG (SEQ ID NO: 331)
DR_280	GTAGACGCAATACAAAATAGGTGACATATAGCCGCACC (SEQ ID NO: 332)
DR_236	gctctagaactagtggatcccGGCGATTTTATTGTGACAAGAGACTGAAGAGC (SEQ ID NO: 333)
DR_297	CATAGAATTTGTCCAATTAGATGTCCCACTACATCCTGCTAAAACAAGTAGG AAAGC (SEQ ID NO: 334)
DR_228	CTATTTTGTATTGCGTCTACTTAGCCAATAAG (SEQ ID NO: 335)
DR_022	Caagcttatcgataccgtcgacctc (SEQ ID NO: 336)
DR_023	Gggatccactagttctagagcgg (SEQ ID NO: 337)
DR_303	CAAGCCACCAAAGCACGTGCCTATTTGCC (SEQ ID NO: 338)
DR_304	CAGTGAAATAGATAGATTGGTTGAAAAACAATCTTCAAAAGTCGGACG (SEQ ID NO: 339)

[1376] 下文示出了用于使用同源重组在金黄色葡萄球菌502a基因组中进行改变的方案。

[1377] 材料

[1378] • BHI琼脂(氯霉素10ug/mL)(X-Gal 100ug/mL)

[1379] • BHI琼脂(AnhydroTet 1ug/mL)(X-Gal 100ug/mL)

[1380] • BHI琼脂

[1381] • BHI肉汤

[1382] • 在初级和次级重组事件后筛查菌落的引物

[1383] 方案

[1384] 1.准备一个高度浓缩的pIMAYz整合质粒。将约25mL过夜培养物离心成(4)2倍体积的微量制备方案。如果需要的话,可以通过2根色谱柱将其纯化,并进行操作以使DNA的产量最大化。应当合并洗脱液,并使用Zymo浓缩仪进行浓缩以使浓度最大化。

[1385] 2.使用实验室优化的电穿孔方案,使用多达5uL的上文浓缩质粒转化502a。

[1386] 3.在摇床中于30℃下恢复细胞,持续1小时

[1387] 4.将整个恢复混合物置于3-4BHI(Chlor 10,X-Gal 100)琼脂平板之间。在30℃下孵育1个平板,然后在37℃下过夜孵育其余的平板(确保培养箱温度为37℃或更高)

[1388] 5.使用引物DR_116/DR_117筛查平板上的蓝色菌落以确认环状质粒的存在。引物位于pIMAYz中的多个克隆位点的侧翼,并且对于30℃平板,将产生大小与同源臂的大小加所整合的任何区域的大小相同的条带。37℃平板不应产生任何条带。

[1389] 6.应使用在同源臂外结合的引物,筛查37℃平板上的蓝色菌落,以检测整合质粒进入基因组的情况。每个引物应与DR_116或DR_117配对。这将确认质粒被整合到基因组中的正确位置。

[1390] 7.如果在37℃平板上没有菌落产生条带(表明质粒已被整合),则可以将在30℃平板上显示质粒带的菌落稀释并平板接种在BHI琼脂(Chlor 10,X-Gal100)上并在37℃下孵育。重复步骤5-6,重新筛查新菌落以进行整合。

[1391] 8.如果PCR显示整合的质粒,则挑取几个菌落,如果可能的话,选择已整合了每种方式的克隆。在室温摇床中的5mL BHI肉汤中生长过夜(~16小时)。

[1392] 9.稀释至10^-5和10^-6,并在BHI琼脂(AnhydroTet 1ug/mL,X-Gal 100ug/mL)上平板接种50uL。将平板在37℃下孵育过夜。

[1393] 10.将白色菌落贴到BHI琼脂(Chlor 10uG/mL,X-Gal 100)、BHI琼脂(AnhydroTet 1ug/mL,X-Gal 100ug/mL)、BHI琼脂上,以筛查对脱水四环素的抗性和对氯霉素的敏感性。应当从BHI琼脂平板上挑取具有两种表型的菌落,并筛查所述菌落用于敲除或敲入。用于筛查最终基因型的引物中的至少一个引物应在用作同源臂的区域外结合。

[1394] 11.从几个阳性克隆的贴板上划线板,使用在同源臂外结合的引物进行HF PCR,然后进行测序。将平板在37℃下孵育过夜。

[1395] 12.从敲除的平板上挑取至少3个菌落,并进行菌落PCR以确定基因型。如果PCR均为阳性,则使用该板创建菌株原种并分配新的菌株编号。

[1396] 用于对金黄色葡萄球菌502a基因组中的合成PsbnA-sprA1杀灭开关进行初步评估的杀灭测定如下所示。

[1397] 杀灭测定

[1398] 1)开始待测菌株和野生型对照菌株的5mL TSB培养,并在以250RPM回转振荡的培养箱中于37℃下过夜生长

[1399] 2)第二天,在新鲜的TSB培养基中进行1:100稀释,并使培养物生长2小时。

[1400] 3)获取OD600的读数并记录值。计算接种5mL培养物至OD为0.05所需的细胞培养物的体积。将计算体积的新培养物接种到预热的培养基(TSB/血清)

[1401] 4)在37℃下继续生长培养物。进行连续稀释,并将几种细胞稀释液平板接种在BHI或TSB琼脂平板上。将板在37℃下孵育过夜,并在菌落出现后(>16小时)计数每个板上的菌落。

[1402] 使用金黄色葡萄球菌502a基因组中的PsbnA-sprA1杀灭开关的初步结果显示,在正常生长条件下,在TSB中,KS的生长曲线与野生型的生长曲线之间没有差异,如同所期望的那样。记录的菌落计数示于表44和图23中。

[1403] 表44.当暴露于人血清时180分钟后记录的菌落计数

[1404]

菌株		记录的菌落计数			
	t=分钟	t=0 分钟	t=45 分钟	t=90 分钟	t=180 分钟
BP_011	TSB	188*10^4	409*10^4	30*10^6	68*10^7
	血清	560*10^3	76 * 10^4	63*10^5	5*10^7
502a	TSB		305*10^4	199*10^5	89*10^6
	血清		305*10^4	35*10^5	6*10^7
BP_084	TSB	220*10^4	75*10^5	77*10^5	135*10^6
	血清	62*10^4	180*10^4	34*10^5	157*10^4

[1405] 如表44和图23所示,在暴露于人血清三小时后,具有掺入基因组的杀灭开关的金黄色葡萄球菌KS菌株BP_084的菌落计数比野生型菌株的菌落计数少约1000。

[1406] 通过用计数的菌落数*稀释因数*20(为考虑每次稀释平板接种50uL)得出的计算的cfu/ml如表45所示。

[1407] 表45.人血清和TSB中的计算的cfu/mL

[1408]

菌株		计算得 CFU/mL			
	t=分钟	0	45	90	180
BP_011	TSB	37600000	81800000	600000000	13600000000
	血清	11200000	15200000	126000000	1000000000
502a	TSB		61000000	398000000	1780000000
	血清		61000000	70000000	1200000000
BP_084	TSB	44000000	150000000	154000000	2700000000
	血清	12400000	36000000	68000000	31400000

[1409] 使用表45中的数据,将杀灭开关菌株的cfu/mL与野生型502a进行比较。血清诱导后3小时后,带有整合的杀灭开关金黄色葡萄球菌KS菌株BP_084(502aΔPsprA::PsbnA)的菌株显示出2.61%的存活率,与血清中的野生型相比,所述存活率对应存活细胞减少97.39%。

[1410] 同样如表45所示,在暴露于人血清三小时后,具有掺入基因组的杀灭开关的金黄色葡萄球菌KS菌株BP_084表现出的存活百分比为BP_084(血清)/BP_084(TSB)*100=1.16%存活百分比。因此,当暴露于人血清中时,与TSB中相同的BP_084细胞相比,诱导后3小时的金黄色葡萄球菌KS菌株BP_084(502aΔPsprA::PsbnA)细胞表现出100%-1.16%=98.84%的可测量平均细胞死亡。

[1411] 包括掺入基因组的杀灭开关分子修饰的合成微生物BP_084在正常条件下显示出期望的生长特性,但是当暴露于人血清时细胞生长明显减少。

[1412] 实例22.使用表达钳的杀灭开关构建

[1413] 使用表达钳的杀灭开关构建将如下执行。在先前的实例中,鉴定了某些基因,当暴露于人血清和血液时,这些基因在金黄色葡萄球菌中被上调或下调。例如,选择isdB作为被显著上调的启动子,即血液和血清响应性启动子。同样,选择clfB作为表达钳中使用的第二启动子,所述第二启动子在不存在血清或血液的情况下具有活性但在存在血清或血液的情况下被下调。

[1414] 在先前的实例中,鉴定了金黄色葡萄球菌中的内源性毒素,当被显著上调时,所述内源性毒素杀死细胞。例如,选择sprA1毒素作为细胞死亡基因。

[1415] 通过使用拼接PCR和Gibson组装,构建操纵子,所述操纵子使用负责上调金黄色葡萄球菌中的血清/血液基因的启动子区域来驱动sprA1毒素的表达,并使用负责下调金黄色

葡萄球菌中的血清/血液基因的启动子区域来驱动sprA1$_{AS}$的表达。图22示出了杀灭开关配置的动画,所述杀灭开关配置使用与sprA1细胞死亡基因可操作地连接的血清和血液响应性启动子isdB以及与sprAAS可操作地连接的第二启动子clfB的来防止毒素在不存在血液或血清的情况下泄漏表达。使用先前实例中描述的相同技术,通过同源重组将该盒整合到金黄色葡萄球菌502a基因组中的天然sprA1位置中。

[1416] 为了证实实用性,将使用合成的金黄色葡萄球菌502a进行杀灭测定实验,以确定在各种培养条件下和在不存在和存在血液或血清的情况下进行的真皮测定中杀灭开关的功能性。合成的金黄色葡萄球菌502a在真皮或粘膜条件下表现出良好的生长,但是当暴露于血液或血清时,其将表现出显著减少的生长或细胞死亡。考虑到定植的合成金黄色葡萄球菌502a将因此被安全地施用于受试者,因为其将无法在全身性病状下存活或繁殖。还考虑到合成的金黄色葡萄球菌502a将能够持久地占据通过金黄色葡萄球菌菌株(如MRSA)的去定植而产生的宿主微生物组中的空置生态位。

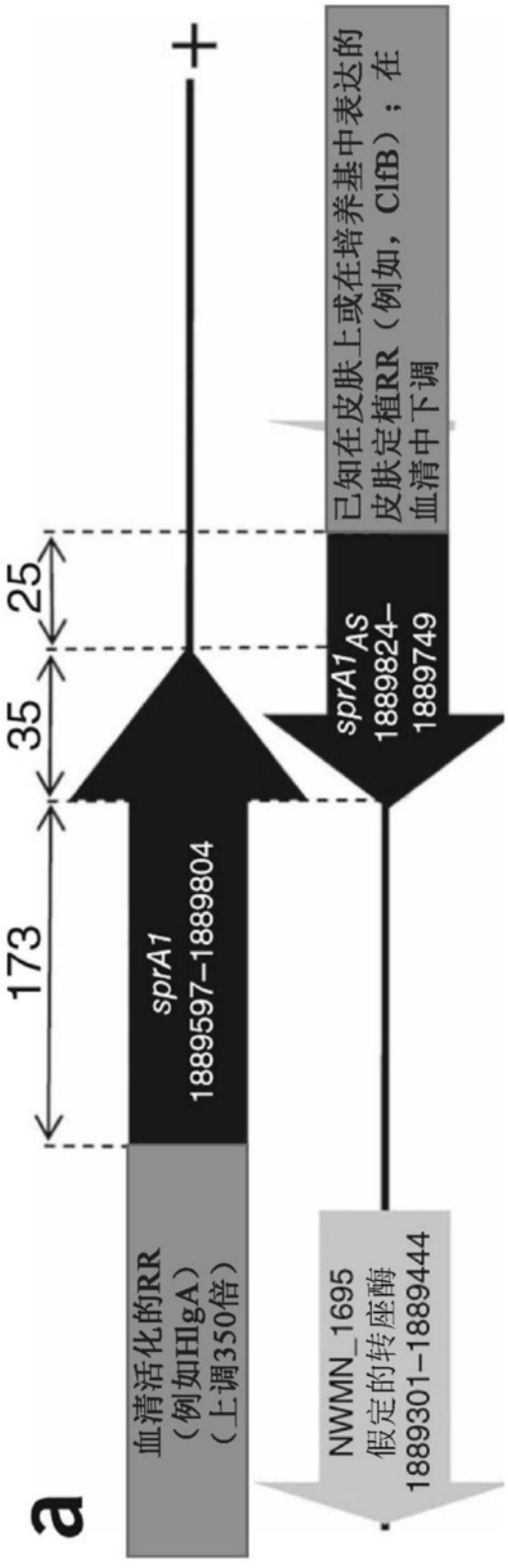

a
+
血清活化的RR
（例如HIgA）
（上调350倍）
sprA1
1889597–1889804
NWMN_1695
假定的转座酶
1889301–1889444
sprA1AS
1889824–
1889749
已知在皮肤上或在培养基中表达的
皮肤定植RR（例如，ClfB）；在
血清中下调
173
35
25

图1

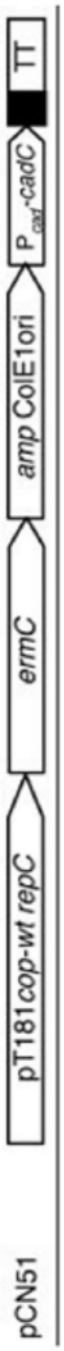


图2

表4A. 重组引物

SEQ ID NO:	名称	序列	描述
9	TKO1	GATGCGCATGCGAAACAGATTATCTATTC	用Sph1进行LeuA PCR扩增（上游pr）
10	TKO2	GATGCGCATGCCAGATTATCTATTCAAAG	用Sph1进行LeuA PCR扩增（上游pr替换物）
11	TKO3	CATGATCTGCAGAGTAAATTCCCCCGTAAATT	用Pst1进行LeuA PCR扩增（下游pr）
12	TKO4	CACGTGATCTGCAGAGTAAATTCCCCCGTAAA	用Pst1进行LeuA PCR扩增（下游pr替换物）
13	TKO5	GACTACGAATTCAGGTGATGAAAAATTTAGAA	用EcoRI扩增ClfB启动子的上游引物
14	TKO6	GACTACGAATTCTGATGAAAAATTTAGAACTT	TKO5的备份
15	TKO7	CTTAGCTGGATCCAAATATTACTCCATTTCAA	用BamHI扩增ClfB启动子的下游引物
16	TKO8	CTTAGCTGGATCCAAATATTACTCCATTTCAATTTC	TKO7的备份
17	TKO9	GATGCGCATGCTCACAAACTATTGCGAAATC	扩增HLGA RR的上游引物：含有Sph1
18	TKO10	GATGCGCATGCAAACTATTGCGAAATCCATTC	TKO9的备份
19	TKO11	CATGATCTGCAGATATATAATAATCCATTTGT	扩增HLGA RR的下游引物：含有PstI
20	TKO12	CATGATCTGCAGATATATAATAATCCATTTGTAAGCG	TKO11的备份
21	TKO13	GTGTTACGATAGCAAATGCA	用于对含有pCAD启动子的构建体进行测序的第一正义引物

图3A

表4A. 重组引物（续）

SEQ ID NO:	名称	序列	描述
22	TKO14	TTATTGGCTAAGTAGACGCA	第二正义测序引物大约在SprA1基因中间退火
23	TKO15	CACATGTTCTTTCCTGCGTT	在LEUA和HLGA的血清响应性RR上游退火的引物。在pCN51载体中Sph1位点上游约75 nt处退火
24	TKO16	ACGCGGCCTTTTTACGGTTC	备份以防TKO15产生低质量的读取
25	TKO17	GAATGGGACTTGTAAACGTC	在LEUA启动子/RR下游三分之一处附近退火的引物
26	TKO18	GAATGGGACTTGTAAACG	TKO17的备份
27	TKO19	ATAAACGCCTGCGACCAATA	在HLGA启动子/RR下游三分之一处附近退火的引物
28	TKO20	GCGACCAATAAATCTTTTAA	TKO19的备份，以防止其产生低质量的读取
29	TKO21	TTGAATAGATAATCTGTTTCGCATGCAGCGGCCGCCAGCT	具有leuA启动子同源R的pTK1载体
30	TKO22	AATTTACGGGGGGAATTTACTCTGCAGGGTACCGCAGAGAG	具有leuA启动子同源F的pTK1载体
31	TKO23	AGCTGGCGGCCGCTGCATGCGAAACAGATTATCTATTCAAAGTTAATTG	具有pTK1同源F的leuA插入物
32	TKO24	CTCTCTGCGGTACCCTGCAGAGTAAATTCCCCCGTAAATTTTAATG	具有pTK1同源R的leuA插入物
33	TKO25	CATTAAAATTTACGGGGGAATTTACTCTGCAGATGAGCAGGGATGA	具有leuA启动子同源F的pTK9载体

图3B

表4A. 重组引物（续）

SEQ ID NO:	名称	序列	描述
34	TKO26	CAATTAACTTTGAATAGATAATCTGTTTCGCATGCAGCGGCCGCCAGCT	具有leuA启动子同源R的pTK9载体
35	TKO27	CATTAAAATTTACGGGGGGAATTTACTCTGCAGATGGTAGAGATAGC	具有leuA启动子同源F的pTK12载体
36	TKO28	GCTATCTCTACCATCTGCAGAGTAAATTCCCCCGTAAATTTTTAATG	具有pTK12同源R的leuA插入物
37	TKO29	gcaatccatcttgttcaatcatTATAACCCTCTTTAATTTTGGTTATATG	具有kanR同源的pTK载体R（去除ermR）
38	TKO30	ccttcttgacgagttcttcgaGTTAAGGGATGCATAAACTGCA	具有kanR同源的pTK载体F（去除ermR）
39	TKO31	CATATAACCAAATTAAAGAGGGTTATAatgattgaacaagatggattgc	具有pTK同源的pCASSA kanR F（添加kanR）
40	TKO32	TGCAGTTTATGCATCCCTTAACtcagaagaactcgtcaagaagg	具有pTK同源的pCASSA kanR R（添加kanR）
41	TKO33	GAATGGGACTTGTAAACGTCCC	leuA菌落筛查PCR F
42	TKO34	GGGACGTTTACAAGTCCCATTC	leuA菌落筛查PCR R

图3C

表4B. CRISPR引物

SEQ ID NO:	BPC编号	名称	序列	目的
43	1	BPC - T1.1 - FOR	gaaaGGAGTAATATCGATGGAGTA	pCasSA的gRNA插入
44	2	BPC - T1.1 - REV	caaaTACTCCATCGATATTACTCC	pCasSA的gRNA插入
45	3	BPC - T1.2 - FOR	gaaaGGAGAGGATGATTATAA	pCasSA的gRNA插入
46	4	BPC - T1.2 - REV	caaaTTATAATCATCATCCTCTCC	pCasSA的gRNA插入
47	5	BPC - T1.3 - FOR	gaaaGGGAGAGGATGATTATA	pCasSA的gRNA插入
48	6	BPC - T1.3 - REV	caaaTATAATCATCATCCTCTCCC	pCasSA的gRNA插入
49	7	BPC - T1.4 - FOR	gaaaGGGTCTAATGTTATTGCTTA	pCasSA的gRNA插入
50	8	BPC - T1.4 - REV	caaaTAAGCAATAACATTAGACCC	pCasSA的gRNA插入
51	9	BPC - T1.5 - FOR	gaaaGGAGAGGATGATTATA	pCasSA的gRNA插入
52	10	BPC - T1.5 - REV	caaaTATAATCATCATCCTCTCC	pCasSA的gRNA插入
53	11	BPC - T1.6 - FOR	gaaaGGTAGTATGAGTAATATCGA	pCasSA的gRNA插入
54	12	BPC - T1.6 - REV	caaaTCGATATTACTCATACTACC	pCasSA的gRNA插入
55	13	BPC - T1.7 - FOR	gaaaGGAATTATATAAATATAAAG	pCasSA的gRNA插入
56	14	BPC - T1.7 - REV	caaaCTTTATATTTATATAATTCC	pCasSA的gRNA插入
57	15	BPC - T1.8 - FOR	gaaaGGCTACCTCCATATTTTCTA	pCasSA的gRNA插入
58	16	BPC - T1.8 - REV	caaaTAGAAAATATGGAGGTAGCC	pCasSA的gRNA插入

图4A

表4B. CRISPR引物（续）

SEQ ID NO:	BPC 编号	名称	序列	目的
59	17	BPC - T1.9 - FOR	gaaaGGATAGAACTGTATTAGACT	pCasSA的gRNA插入
60	18	BPC - T1.9 - REV	caaaAGTCTAATACAGTTCTATCC	pCasSA的gRNA插入
61	19	BPC - T1.10 - FOR	gaaaGGTGTCTAATGTTATTGCTT	pCasSA的gRNA插入
62	20	BPC - T1.10 - REV	caaaAAGCAATAACATTAGACACC	pCasSA的gRNA插入
63	21	BPC - gRNA - FOR	TGTTCTTTCCTGCGTTGTCG	用于将gRNA插入到pCasSA载体中的测序引物
64	22	BPC - gRNA - REV	TCGCATTGACGTTAATACCTACAT	用于将gRNA插入到pCasSA载体中的测序引物
65	23	BPC - T1.1.2 - REV	aaacTACTCCATCGATATTACTCC	gRNA的正确反向引物
66	24	BPC - T1.2.2 - REV	aaacTTATAATCATCATCCTCTCC	gRNA的正确反向引物
67	25	BPC - T1.3.2 - REV	aaacTATAATCATCATCCTCTCCC	gRNA的正确反向引物
68	26	BPC - T1.4.2 - REV	aaacTAAGCAATAACATTAGACCC	gRNA的正确反向引物
69	27	BPC - T1.5.2 - REV	aaacTATAATCATCATCCTCTCC	gRNA的正确反向引物
70	28	BPC - T1.6.2 - REV	aaacTCGATATTACTCATACTACC	gRNA的正确反向引物
71	29	BPC - T1.7.2 - REV	aaacCTTTATATTTATATAATTCC	gRNA的正确反向引物
72	30	BPC - T1.8.2 - REV	aaacTAGAAAATATGGAGGTAGCC	gRNA的正确反向引物

图4B

表4B. CRISPR引物（续）

SEQ ID NO:	BPC 编号	名称	序列	目的
73	31	BPC - T1.9.2 - REV	aaacAGTCTAATACAGTTCTATCC	gRNA的正确反向引物
74	32	BPC - T1.10.2 - REV	aaacAAGCAATAACATTAGACACC	gRNA的正确反向引物
75	33	BPC - pCN51-1 - FOR	TTTGCTGGCCTTTTGCTCAC	检查pCN51中的插入的引物
76	34	BPC - pCN51-1 - REV	TGCTTTTTCGATTGATGAACACCT	检查pCN51中的插入的引物
77	35	BPC - pCN51-2 - FOR	CGGCCTTTTTACGGTTCCTG	检查pCN51中的插入的引物
78	36	BPC - pCN51-2 - REV	ACGTTGCTTTTTCGATTGATGAAC	检查pCN51中的插入的引物
79	37	BPC - mChr-1 - FOR	**cacgtgat**CTGCAGTCACATGGTGAGCAAGGGC	具有Pst1的mCherry mRNA
80	38	BPC - mChr-1 - REV	**gactac**GAATTCAAAACTGATTTCGTTGACCCG	具有EcoR1的mCherry mRNA
81	39	BPC - mChr-2 - REV	cttagctGGATCCAAAACTGATTTCGTTGACCCG	具有BamH1的mCherry mRNA，可替换 #39
82	40	BPC - pCN51-hdr - REV	cttagctCCCGGGTGCTTTTTCGATTGATGAACACCT	具有Xma1的34BPC-REV，使用TKO15来添加同源臂
83	41	BPC - 2a - FOR	CGCCAAACGTTTCGTCAGTT	502a目标1基因组掺入检查
84	42	BPC - 2a - REV	TTCAAGCGTGACAAAGCAGC	502a目标1基因组掺入检查
85	43	BPC - 2a - FOR	TGCGCAATGGCCAAAAAGAT	502a目标1基因组掺入检查
86	44	BPC - 2a - REV	CGTGCTAACATCCGCTTCAA	502a目标1基因组掺入检查

图4C

表4B. CRISPR引物（续）

SEQ ID	BPC编号	名称	序列	目的
87	45	BPC - mChr-1 - REV	**AAAACTGATTTCGTTGACCCG**	mCherry
88	46	BPC - mChr-1 - FOR	**cacgtgat**CTGCAGTCACATGGTTTCTAAAGGT	具有Pst1的mCherry（pJ204中的密码子最优序列：300995）
89	47	BPC - pJ204-1 - FOR	ACGTTGCTTTTTCGATTGATGA	检查pJ204中的HA之间的插入
90	48	BPC - pJ204-1 - REV	TCCCCATGCGAGAGTAGGG	检查pJ204中的HA之间的插入
91	49	BPC - pJ204-2 - FOR	GAATATTTAAGGGCGCCTGTCAC	检查pJ204中的HA之间的插入
92	50	BPC - pJ204-2 - REV	TATGGGGTGTCGCCCTTT	检查pJ204中的HA之间的插入
93	51	BPC - mChr-1 - FOR	**TCACATGGTTTCTAAAGGT**	mCherry（pJ204中的密码子最优序列：300995）
94	52	BP - repF-1 - F	CATGCCTGCAGAACGGATTG	检查repF的去除
95	53	BP - repF-1 - R	GCGCGGGAATATGATGCTAA	检查repF的去除
96	54	BP - repF-2 - F	AGGTGACTGATGGCTGGTTG	检查repF的去除
97	55	BP - repF-2 - R	TATGTCTTTTGCGCAGTCGG	检查repF的去除
98	56	BP - srtA - F	gaaaCAAACAAATATGCTGCCACT	来自Dong等人的srtA CRISPR靶向
99	57	BP - srtA - R	aaacAGTGGCAGCATATTTGTTTG	srtA CRISPR靶向
100	58	BP - hla - F	gaaaGCTTCCAATATCTGTAGTAC	来自Dong等人的hla CRISPR靶向
101	59	BP - hla - R	aaacGTACTACAGATATTGGAAGC	hla CRISPR靶向
102	60	BP - coa - F	gaaaGCCATTTTTAAATCTGTACG	来自Dong等人的coa CRISPR靶向
103	61	BP - coa - R	aaacCGTACAGATTTAAAAATGGC	coa CRISPR靶向

图4D

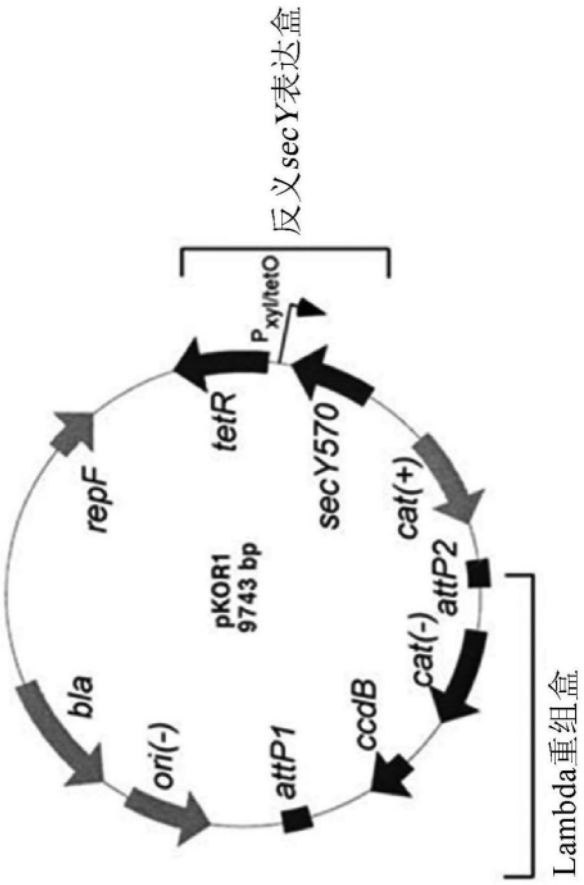

反义secY表达盒
P xyl/tetO
tetR
secY570
cat(+)
attP2
cat(-)
ccdB
attP1
ori(-)
bla
repF
pKOR1
9743 bp
Lambda重组盒

图5A

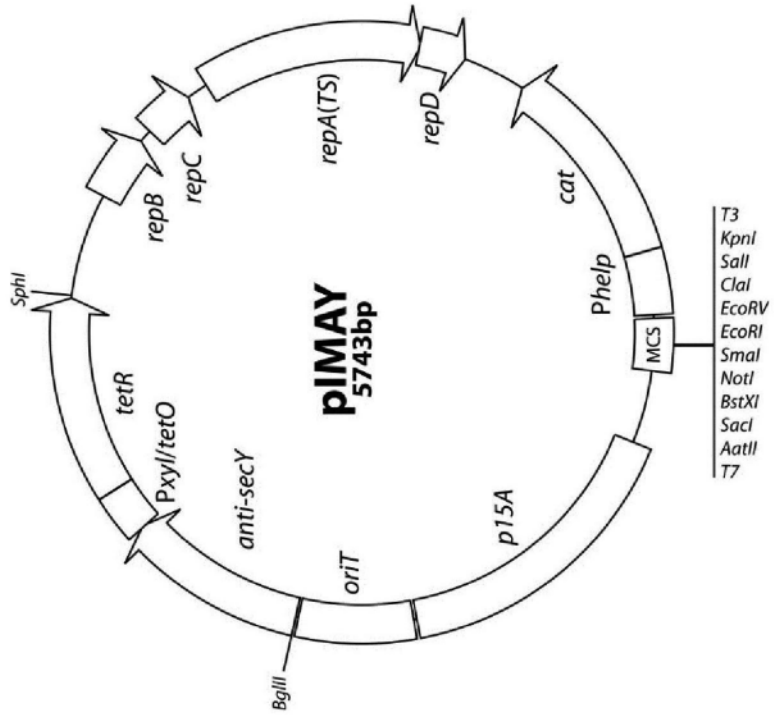

pIMAY
5743bp
repA(TS)
repD
cat
Phelp
MCS
T3
KpnI
SalI
ClaI
EcoRV
EcoRI
SmaI
NotI
BstXI
SacI
AatII
T7
p15A
oriT
anti-secY
Pxyl/tetO
tetR
repB
repC
SphI
BglII

图5B

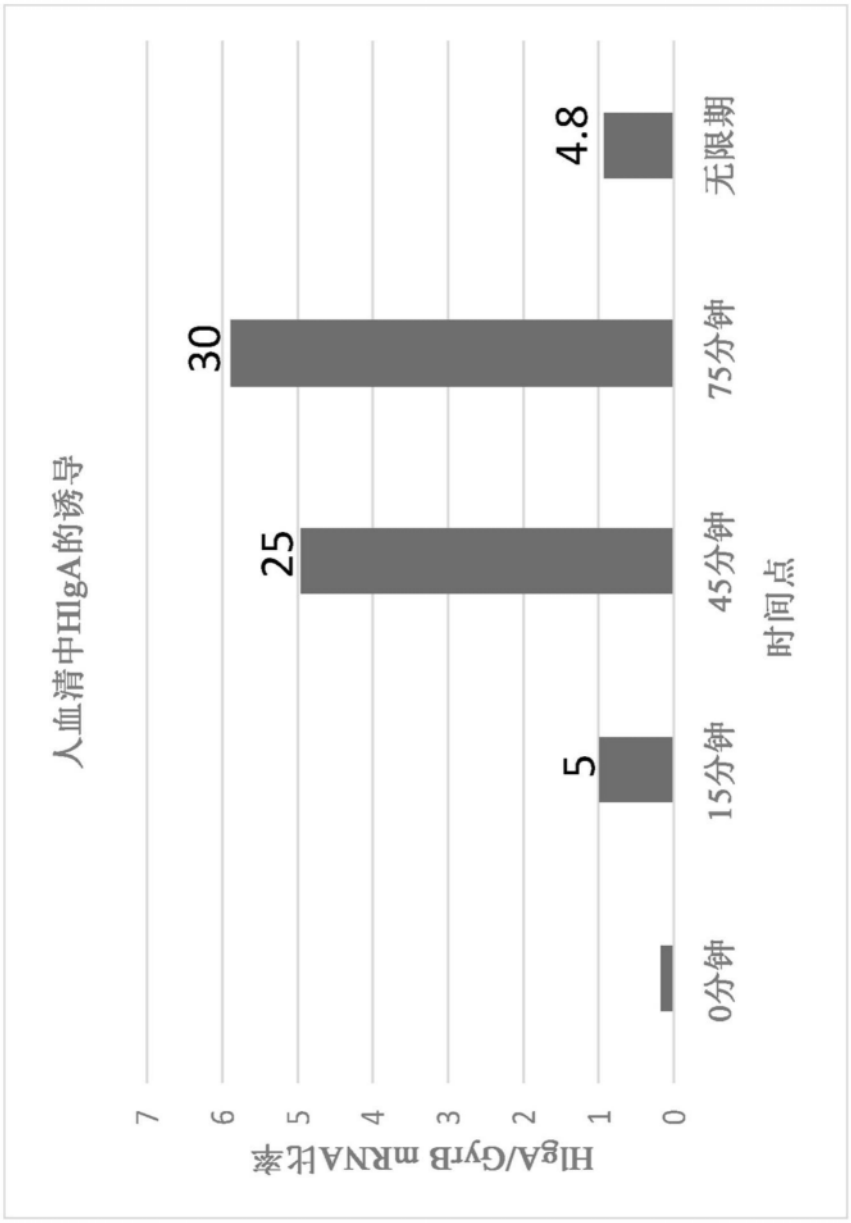

人血清中HIgA的诱导
HIgA/GyrB mRNA比率
0
1
2
3
4
5
6
7
0分钟
15分钟
45分钟
75分钟
无限期
时间点
5
25
30
4.8

图6

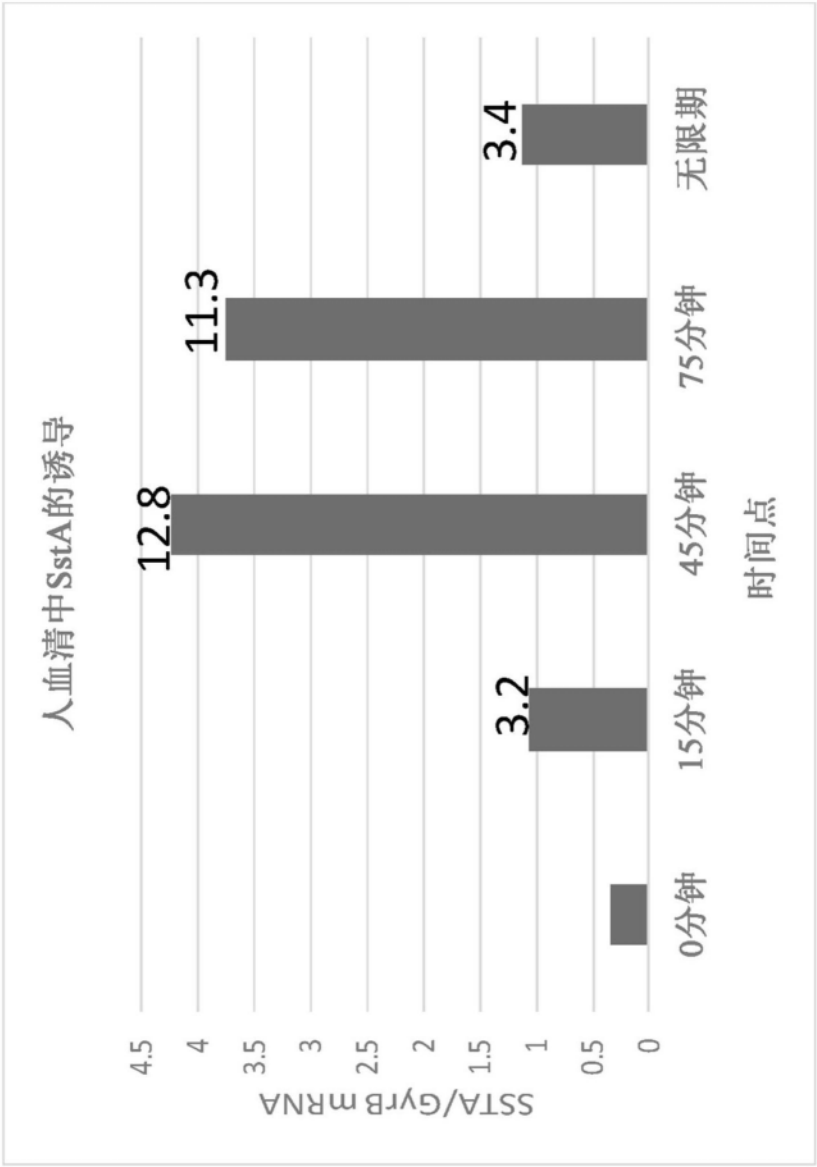

人血清中SstA的诱导
SSTA/GyrB mRNA
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
12.8
11.3
3.2
3.4
0分钟
15分钟
45分钟
75分钟
无限期
时间点

图7

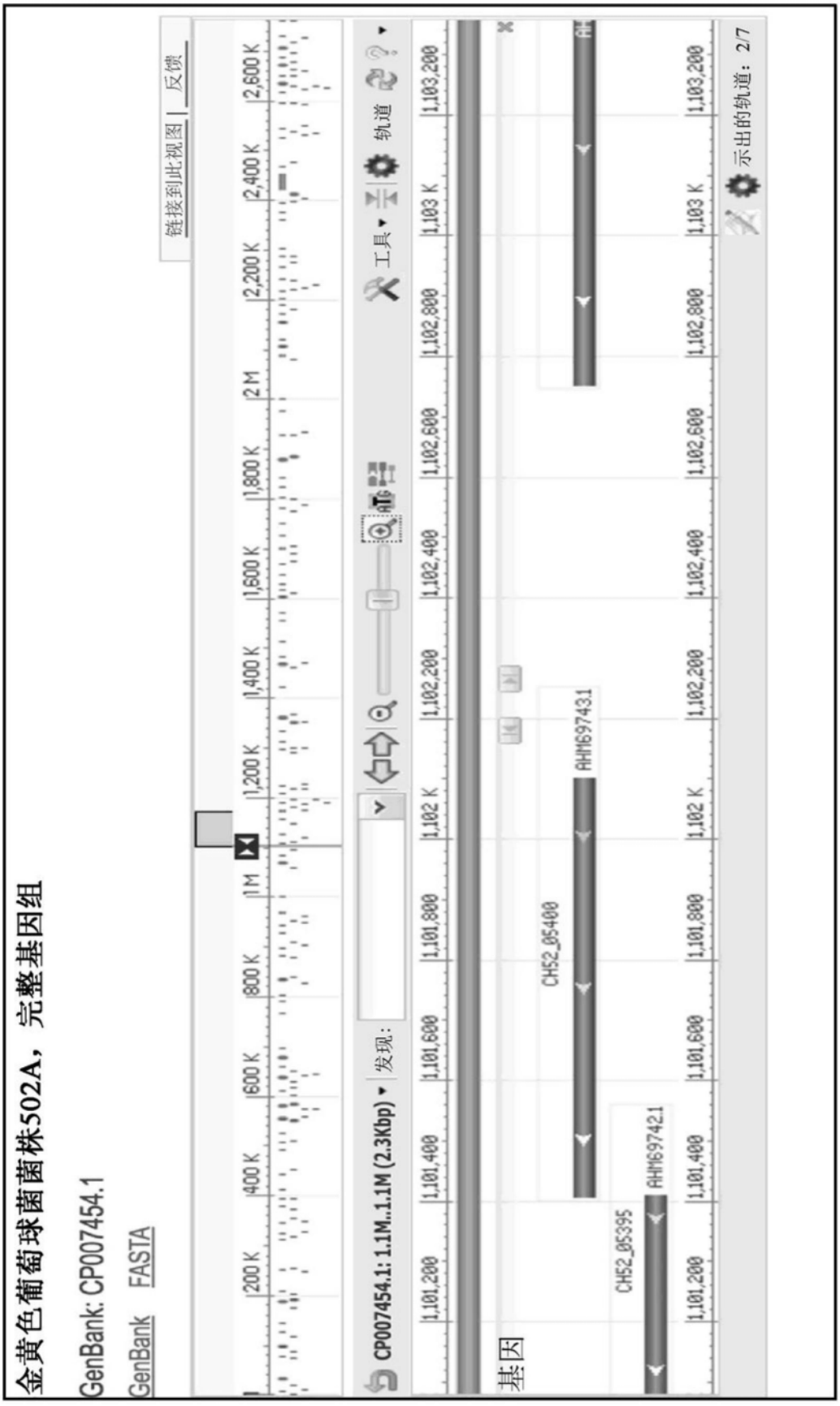

金黄色葡萄球菌菌株502A，完整基因组
GenBank: CP007454.1
GenBank FASTA
链接到此视图 | 反馈
CP007454.1: 1.1M..1.1M (2.3Kbp)
发现:
工具
轨道
示出的轨道：2/7
基因
CHS2_05400
AHM69743.1
CHS2_05395
AHM697421

图8

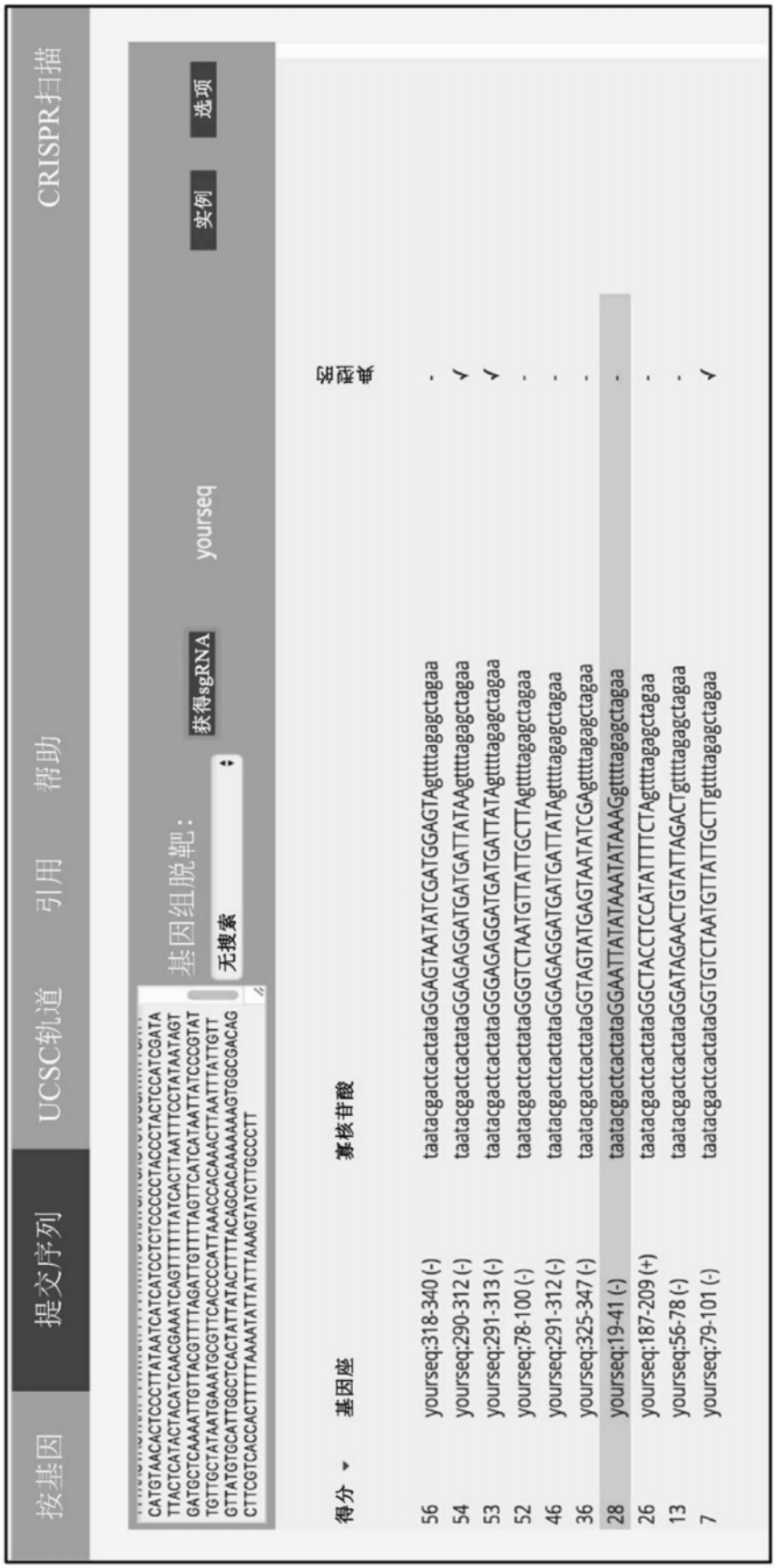

CRISPR扫描
选项
实例
yourseq
获得sgRNA
基因组脱靶：
无搜索
CATGTAACACTCCCTTATAATCATCCTCTCCCCCTACCCTACTCCATCGATA
TTACTCATACTACATCAACGAAATCAGTTTTTTATCACTTAATTTCCTATAATAGT
GATGCTCAAAATTGTTACGTTTTAGATTGTTTTAGTTCATCATAATTATCCCGTAT
TGTTGCTATAATGAAATGCGTTCACCCCATTAAACCACAAACTTAATTTATTGTT
GTTATGTGCATTGGCTCACTATTATACTTTTACAGCACAAAAAAAGTGGCGACAG
CTTCGTCACCACTTTTTAAAATATTATTTAAAGTATCTTGCCCTT
得分
基因座
寡核苷酸
事件型的
56 yourseq:318-340 (-) taatacgactcactataGGAGTAATATCGATGGAGTAgttttagagctagaa -
54 yourseq:290-312 (-) taatacgactcactataGGAGAGGATGATGATTATAAGttttagagctagaa ✓
53 yourseq:291-313 (-) taatacgactcactataGGGAGAGGATGATGATTATAGttttagagctagaa ✓
52 yourseq:78-100 (-) taatacgactcactataGGGTCTAATGTTATTGCTTAgttttagagctagaa -
46 yourseq:291-312 (-) taatacgactcactataGGAGAGGATGATGATTATAGttttagagctagaa -
36 yourseq:325-347 (-) taatacgactcactataGGTAGTATGAGTAATATCGAgttttagagctagaa -
28 yourseq:19-41 (-) taatacgactcactataGGAATTATATAAATATAAAGgttttagagctagaa -
26 yourseq:187-209 (+) taatacgactcactataGGCTACCTCCATATTTTCTAgttttagagctagaa -
13 yourseq:56-78 (-) taatacgactcactataGGATAGAACTGTATTAGACTgttttagagctagaa -
7 yourseq:79-101 (-) taatacgactcactataGGTGTCTAATGTTATTGCTTgttttagagctagaa ✓

图9

用于通过CRISPR进行整合的盒
pCasSA载体的布局
cap1A
目标序列
sgRNA
Xba1
HA
rpsL- mCherry
HA
Xho1
rpsL- Cas9
目标序列
=目标序列，当前正在处理10种可能的切割目标（1.1、1.2等）
HA
=用作同源直接修复模板的同源臂（200、300或400 bp）
rpsL- mCherry
=控制“优化的” mCherry的组成型启动子
rpsL- Cas9
=控制Cas9蛋白表达的组成型启动子
sgRNA
=单链向导RNA（提供结构性组分）
cap1A
=控制sgRNA转录的组成型启动子
Xba1
Xho1
=用于将HA添加至pCasSA载体的限制性位点

图10

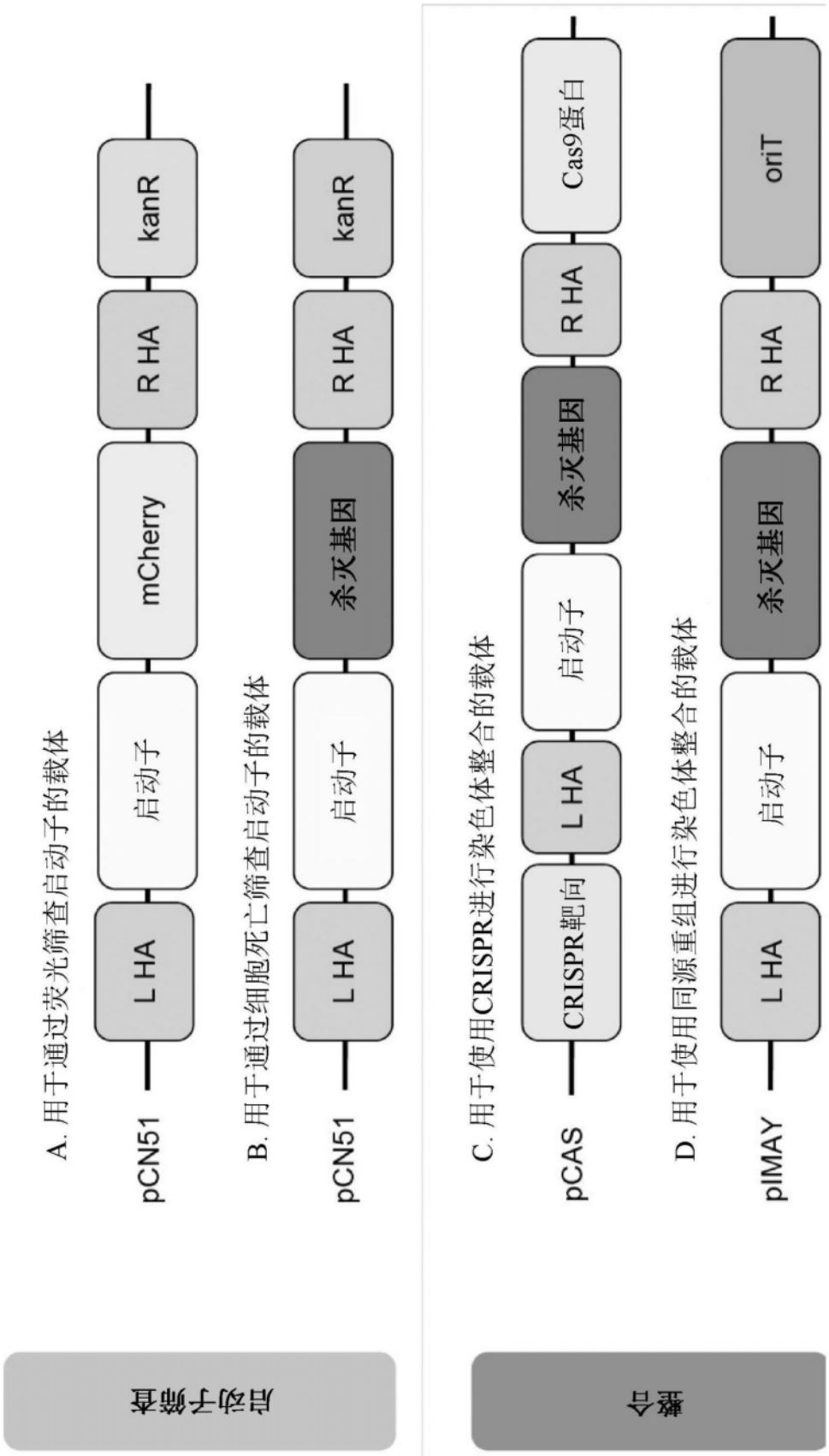

A. 用于通过荧光筛查启动子的载体
pCN51
L HA
启动子
mCherry
R HA
kanR
B. 用于通过细胞死亡筛查启动子的载体
pCN51
L HA
启动子
杀灭基因
R HA
kanR
启动子筛查
C. 用于使用CRISPR进行染色体整合的载体
pCAS
CRISPR靶向
L HA
启动子
杀灭基因
R HA
Cas9蛋白
D. 用于使用同源重组进行染色体整合的载体
pIMAY
L HA
启动子
杀灭基因
R HA
oriT
整合

图11

```
   1 gcatgcgttt tagcgtttat ttcgtttagt tatcggcata atcgttaaaa caggcgttat
  61 cgtagcgtaa aagcccttga gcgtagcgtg gctttgcagc gaagatgttg tctgttagat
 121 tatgaaagcc gatgactgaa tgaaataata agcgcagcgc ccttctattt cggttggagg
 181 aggctcaagg gagtatgagg gaatgaaatt ccctcatggg tttgatttta aaaattgctt
 241 gcaattttgc cgagcggtag cgctggaaaa ttttgaaaa aaatttggaa tttggaaaaa
 301 aatgggggga aaggaagcga atttgcttc cgtactacga ccccccatta agtgccgagt
 361 gccaattttt gtgccaaaaa cgctctatcc caactggctc aagggtttaa ggggttttc
 421 aatcgccaac gaatcgccaa cgttttcgcc aacgttttt ataaatctat atttaagtag
 481 ctttattgtt gttttatga ttacaaagtg atacactaac tttataaaat tatttgattg
 541 gagttttta aatggtgatt tcagaatcga aaaaaagagt tatgatttct ctgacaaaag
 601 agcaagataa aaaattaaca gatatggcga aacaaaaagg tttttcaaaa tctgcggttg
 661 cggcgttagc tatagaagaa tatgcaagaa aggaatcaga acaaaaaaaa taagcgaaag
 721 ctcgcgtttt tagaaggata cgagttttcg ctacttgttt ttgataaggt aattatatca
 781 tggctattaa aaatactaaa gctagaaatt ttggatttct attatatcct gactcaattc
 841 ctaatgattg gaaagaaaaa ttagagagtt tgggcgtatc tatggctgtc agtcctttac
 901 acgatatgga cgaaaaaaaa gataaagata catggaataa tagtaatatt atacaaaatg
 961 gaaagcacta taaaaaacca cactatcacg ttatatatat tgcacgaaat cctgtaacaa
1021 tagaaagcgt taggaacaag attaagcgaa aattgtggaa tagttcagtt gctcatgttg
1081 agatacttga ttatatcaaa ggttcatatg aatatttgac tcatgaatca aaggacgcta
1141 ttgctaagaa taaacatata tacgacaaaa aagatatttt gaacattaat gattttgata
1201 ttgaccgcta tataacactt gatgaaagcc aaaaaagaga attgaagaat ttactttag
1261 atatagtgga tgactataat ttggtaaata caaaagattt aatggctttt attcgcctta
1321 ggggagcgga gtttggaatt ttaaatacga atgatgtaaa agatattgtt tcaacaaact
1381 ctagcgcctt tagattatgg tttgagggca attatcagtg tggatataga gcaagttatg
1441 caaaggttct tgatgctgaa acgggggaaa taaaatgaca aacaaagaaa aagagttatt
1501 tgctgaaaat gaggaattaa aaaaagaaat taaggactta aaagagcgta ttgaaagata
1561 cagagaaatg gaagttgaat taagtacaac aatagattta ttgagaggag ggattattga
1621 ataaataaaa gccccctgac gaaagtcgaa ggggttttt atttggttt gatgttgcga
1681 ttaatagcaa tacattctat aatagaaggt atggaggatg ttatataatg agacagaatt
1741 atgatgatca tatgtcaact aacggggcag gttagtgaca ttagaaaacc gactgtaaaa
1801 agtacagtcg gcattatctc atattataaa agccagtcat taggcctatc tgacaattcc
1861 tgaatagagt tcataaacaa tcctgcatga taaccatcac aaacagaatg atgtacctgt
1921 aaagatagcg gtaaatatat tgaattacct ttattaatga atttcctgc tgtaataatg
1981 ggtagaaggt aattactatt attattgata tttaagttaa acccagtaaa tgaagtccat
2041 ggaataatag aaagagaaaa agcatttcca ggtataggtg ttttgggaaa caatttcccc
2101 gaaccattat attctctac atcagaaagg tataaatcat aaaactcttt gaagtcattc
2161 tttacaggag tccaaatacc agagaatgtt ttagatacac catcaaaaat tgtataaagt
2221 ggctctaact tatcccaata acctaactct ccgtcgctat tgtaaccagt tctaaaagct
2281 gtatttgagt ttatcaccct tgtcactaag aaaataaatg cagggtaaaa tttatatcct
2341 tcttgtttta tgtttcggta taaaacacta atatcaattt ctgtggttat actaaaagtc
```

(SEQ ID NO: 131 续)

图12A

```
2401 gtttgttggt tcaaataatg attaaatatc tcttttctct tccaattgtc taaatcaatt
2461 ttattaaagt tcatgggttt cactctcctt ctacattttt taacctaata atgccaaata
2521 ccgtttgcca cccctctctt tgataattat aatattggcg aaattcgctt ctaaagatga
2581 aacgcaatat tatatgcttg ctttatcggc cgtatgtgat tataccagcc ccctcactac
2641 atgtcaagaa taaactgcca aagcataatg ggataattaa ccctcactaa agggaacaaa
2701 agctgggtac cgggcccccc ctcgaggtcg acggtatcga taagcttgat atcgaattcc
2761 tgcagcccgg gggatccact agttctagag cggccgccac cgcggtggag ctccaattcg
2821 ccctatagtg agtcgtatta cgacgtccca gggcttcccg gtatcaacag ggacaccagg
2881 atttatttat tctgcgaagt gatcttccgt cacaggtatt tattcggcgc aaagtgcgtc
2941 gggtgatgct gccaacttac tgatttagtg tatgatggtg tttttgaggt gctccagtgg
3001 cttctgtttc tatcagctgt ccctcctgtt cagctactga cgggggtggtg cgtaacggca
3061 aaagcaccgc cggacatcag cgctagcgga gtgtatactg gcttactatg ttggcactga
3121 tgagggtgtc agtgaagtgc ttcatgtggc aggagaaaaa aggctgcacc ggtgcgtcag
3181 cagaatatgt gatacaggat atattccgct tcctcgctca ctgactcgct acgctcggtc
3241 gttcgactgc ggcgagcgga aatggcttac gaacgggggcg gagatttcct ggaagatgcc
3301 aggaagatac ttaacaggga agtgagaggg ccgcggcaaa gccgttttc cataggctcc
3361 gccccctga caagcatcac gaaatctgac gctcaaatca gtggtggcga aacccgacag
3421 gactataaag ataccaggcg tttcccctg gcggctccct cgtgcgctct cctgttcctg
3481 cctttcggtt taccggtgtc attccgcttg tatggccgcg tttgtctcat tccacgcctg
3541 acactcagtt ccgggtaggc agttcgctcc aagctggact gtatgcacga acccccgtt
3601 cagtccgacc gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccc ggaaagacat
3661 gcaaaagcac cactggcagc agccactggt aattgattta gaggagttag tcttgaagtc
3721 atgcgccggt taaggctaaa ctgaaaggac aagtttttggt gactgcgctc ctccaagcca
3781 gttacctcgg ttcaaagagt tggtagctca gagaaccttc gaaaaaccgc cctgcaaggc
3841 ggttttttcg tttcagagc aagagattac gcgcagacca aaacgatctc aagaagatca
3901 tcttattaat cagataaaat atttctagat ttcagtgcaa tttatctctt caaatgtagc
3961 acctgaagtc agccccatac gatataagtt gtaattctcc gccgcttgcc ctcatctgtt
4021 acgccggcgg tagccggcca gcctcgcaga gcaggattcc cgttgagcac cgccaggtgc
4081 gaataaggga cagtgaagaa ggaacacccg ctcgcgggtg ggcctactto acctatcctg
4141 cccggctgac gccgttggat acaccaagga aagtctacac gaaccctttg gcaaaatcct
4201 gtatatcgtg cgaaaaagga tggatatacc gaaaaaatcg ctataatgac cccgaagcag
4261 ggttatgcag cggaaaagcg ctgcttccct gctgttttgt ggaatatcta ccgactggaa
4321 acaggcaaat gcaggaaatt actgaactga ggggacaggc gagaggagat cttgatctaa
4381 tgattcaaac ccttgtgaac ttctttagaa caaaagaggt tcgtaacaag atttcttcca
4441 cactagcaat gttagtaatt tttaaaatag ggacttatat accagctcca ggagtaaatc
4501 ctgcagcttt tgataatccc caaggttctc aaggtgccac tgagttatta aatacttttg
4561 gtggcggagc cttgaaacga ttttctattt ttgcaatggg tattgtaccc tacatcactg
4621 catcaatcgt aatgcaatta ttacaaatgg atattgtccc taaattctca gaatgggcaa
4681 aacaaggtga agtaggtaga agaaagttaa ataacgttac tcgttattta gcaatttctt
4741 tagcatttat ccaatctata ggtatggcat tccaatttaa taattatctc aaaggtgcgc
```

（SEQ ID NO：131 续）

图12B

```
4801 tgattatcaa tcagtcaatt atgagttatt tattaatagc actagttttg acagcaggaa
4861 ctgctttctt aatatggctt ggtgatcaaa tcactcagtt cggtgttggt aatggtattt
4921 ctattatcat attcccatca agcttatttt aattatactc tatcaatgat agagtgtcaa
4981 tatttttttt agtttttcat gaactcgagg ggatccaaat aaaaaactag tttgacaaat
5041 aactctatca atgatagagt gtcaacaaaa aggaggaatt aatgatgtct agattagata
5101 aaagtaaagt gattaacagc gcattagagc tgcttaatga ggtcggaatc gaaggtttaa
5161 caacccgtaa actcgcccag aagctaggtg tagagcagcc tacattgtat tggcatgtaa
5221 aaaataagcg ggctttgctc gacgccttag ccattgagat gttagatagg caccatactc
5281 acttttgccc tttagaaggg gaaagctggc aagatttttt acgtaataac gctaaaagtt
5341 ttagatgtgc tttactaagt catcgcgatg gagcaaaagt acatttaggt acacggccta
5401 cagaaaaaca gtatgaaact ctcgaaaatc aattagcctt tttatgccaa caaggttttt
5461 cactagagaa tgcattatat gcactcagcg ctgtgggggca ttttacttta ggttgcgtat
5521 tggaagatca agagcatcaa gtcgctaaag aagaaagggga aacacctact actgatagta
5581 tgccgccatt attacgacaa gctatcgaat tatttgatca ccaaggtgca gagccagcct
5641 tcttattcgg ccttgaattg atcatatgcg gattagaaaa acaacttaaa tgtgaaagtg
5701 ggtcttaaaa gcagcataac ctttttccgt gatggtaact tca
```

(SEQ ID NO: 131 续)

图12C

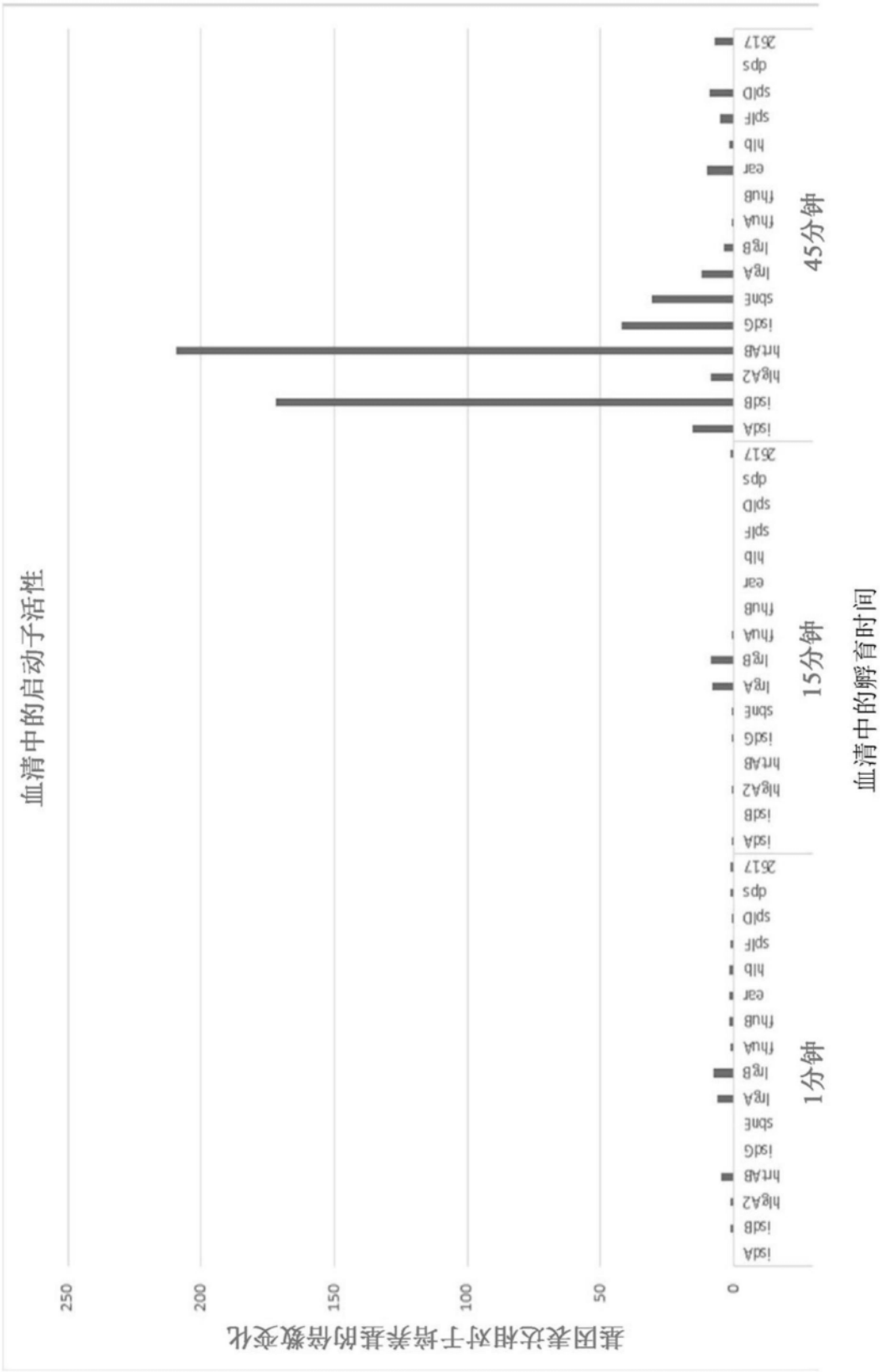

基因表达相对于培养基的倍数变化
250
200
150
100
50
0
血清中的启动子活性
血清中的孵育时间
1分钟
15分钟
45分钟
isdA
isdB
higA2
hrtAB
isdG
sbnE
irgA
irgB
fhuA
fhuB
ear
hlb
spID
dps
2617

图13A

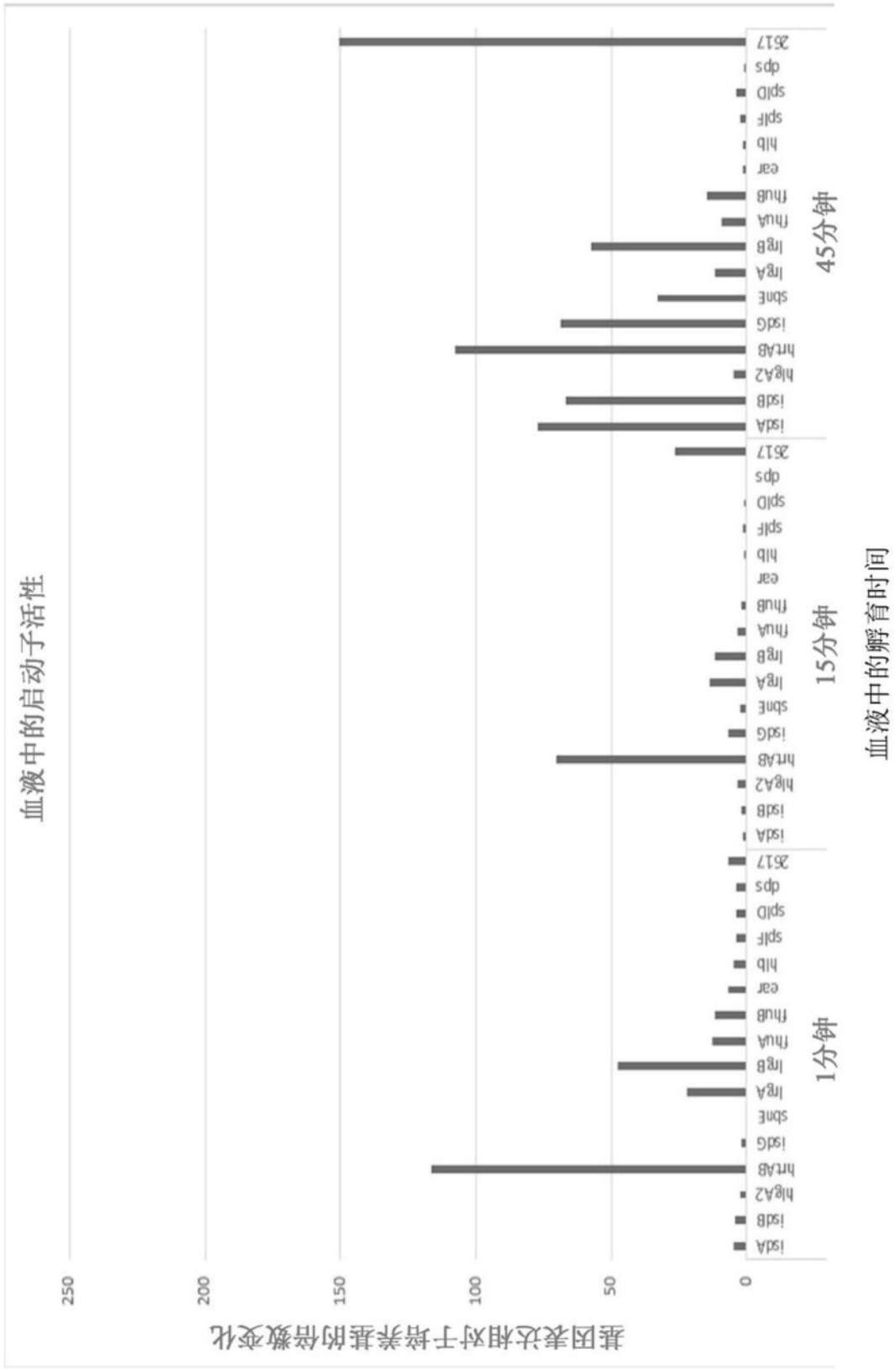

血液中的启动子活性
基因表达相对于培养基的倍数变化
250
200
150
100
50
0
血液中的孵育时间
1分钟
15分钟
45分钟
isdA
isdB
hlgA2
hrtAB
isdG
sbnE
IrgA
IrgB
fhuA
fhuB
ear
hlb
spID
dps
2617

图13B


T=90分钟时血清中的基因表达
与T=0时相比的表达倍数变化
2500
2000
1500
1000
500
0
1935
681
477
429
195
143
137
用于培养的基因和培养基
血清 TSB
higB
ear
fnb
splF
splD
clfA
CH52_360
CH52_305
CH52_1670
hlb
lrgB
lrgA
emp
fhuA
fhuB
isdI
isdA
srtB
isdG
sbnE
sbnA
sbnC
isdB

图13C

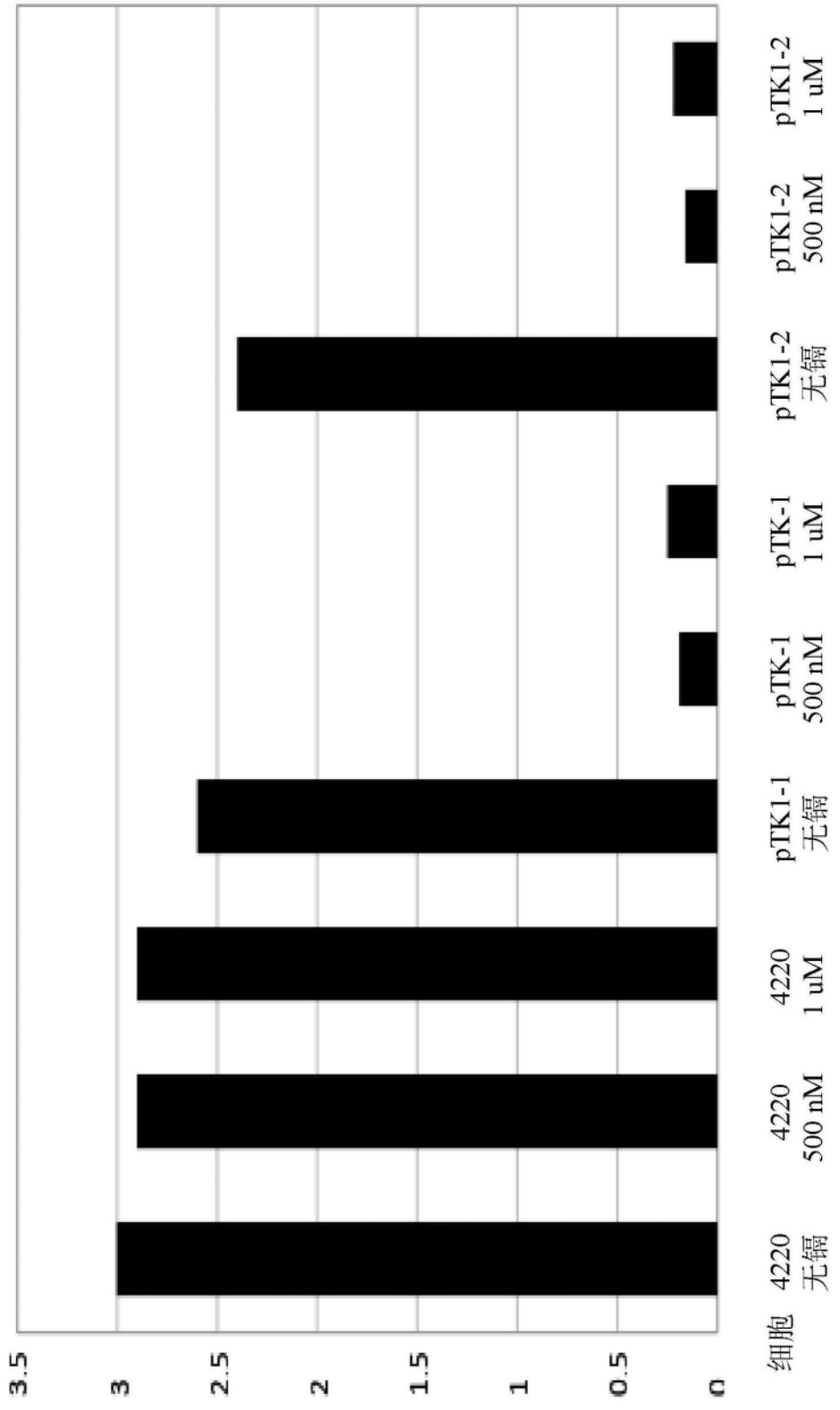

3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
细胞
4220 无镉
4220 500 nM
4220 1 uM
pTK1-1 无镉
pTK-1 500 nM
pTK-1 1 uM
pTK1-2 无镉
pTK1-2 500 nM
pTK1-2 1 uM

图14

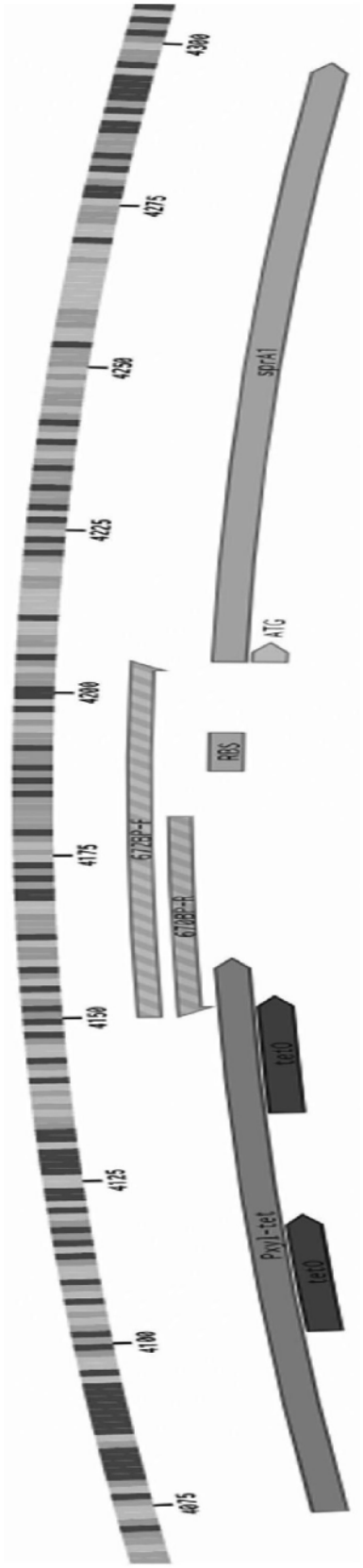

4300
4275
4250
4225
4200
4175
4150
4125
4100
4075
SpcA1
ATG
RBS
6728BP-F
6728BP-R
Pvul-tet
tetO
tetO

图15A

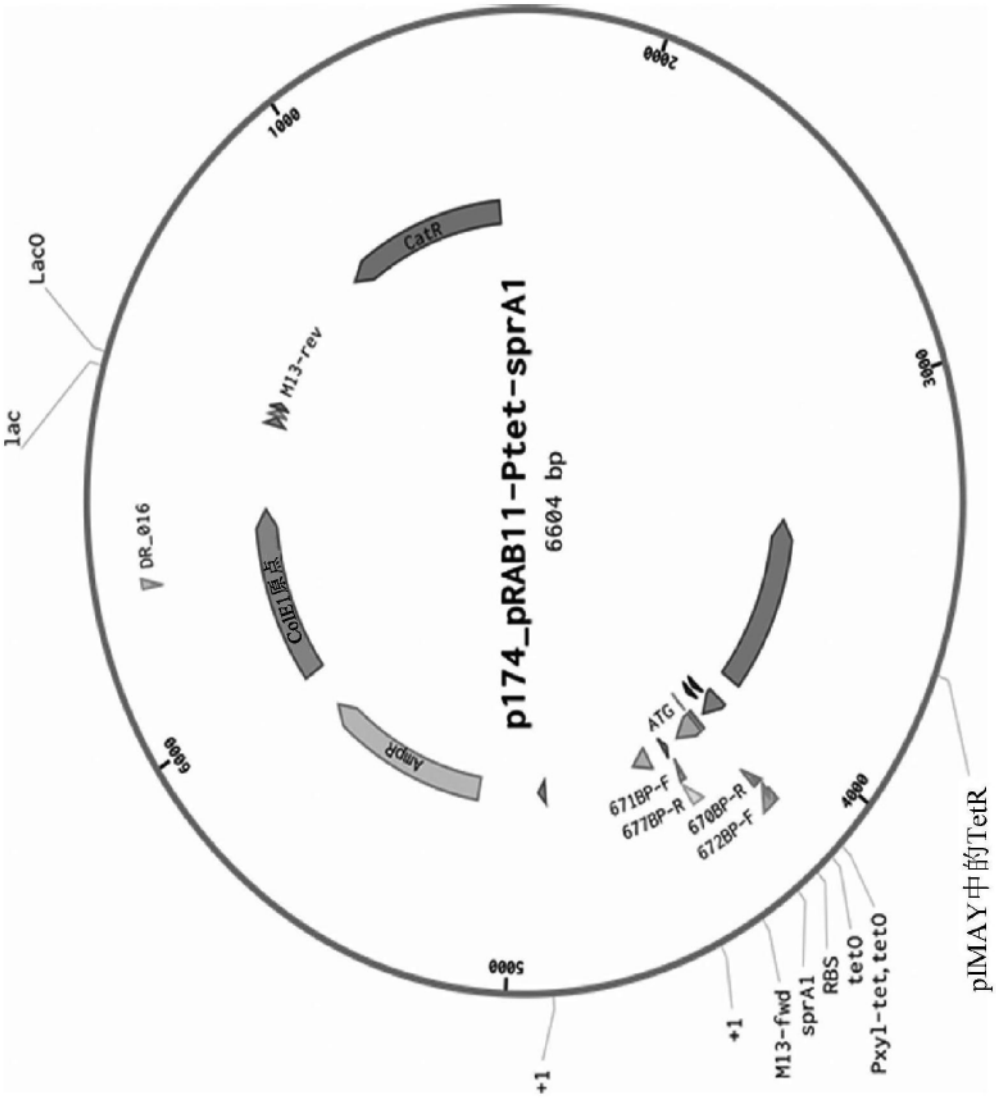

p174_pRAB11-Ptet-sprA1
6604 bp
1000
2000
3000
4000
5000
6000
CatR
M13-rev
LacO
lac
DR_016
ColE1 原点
AmpR
ATG
671BP-F
677BP-R
670BP-R
672BP-F
+1
M13-fwd
sprA1
RBS
tetO
Pxyl-tet, tetO
+1
pIMAY中的TetR

图15B

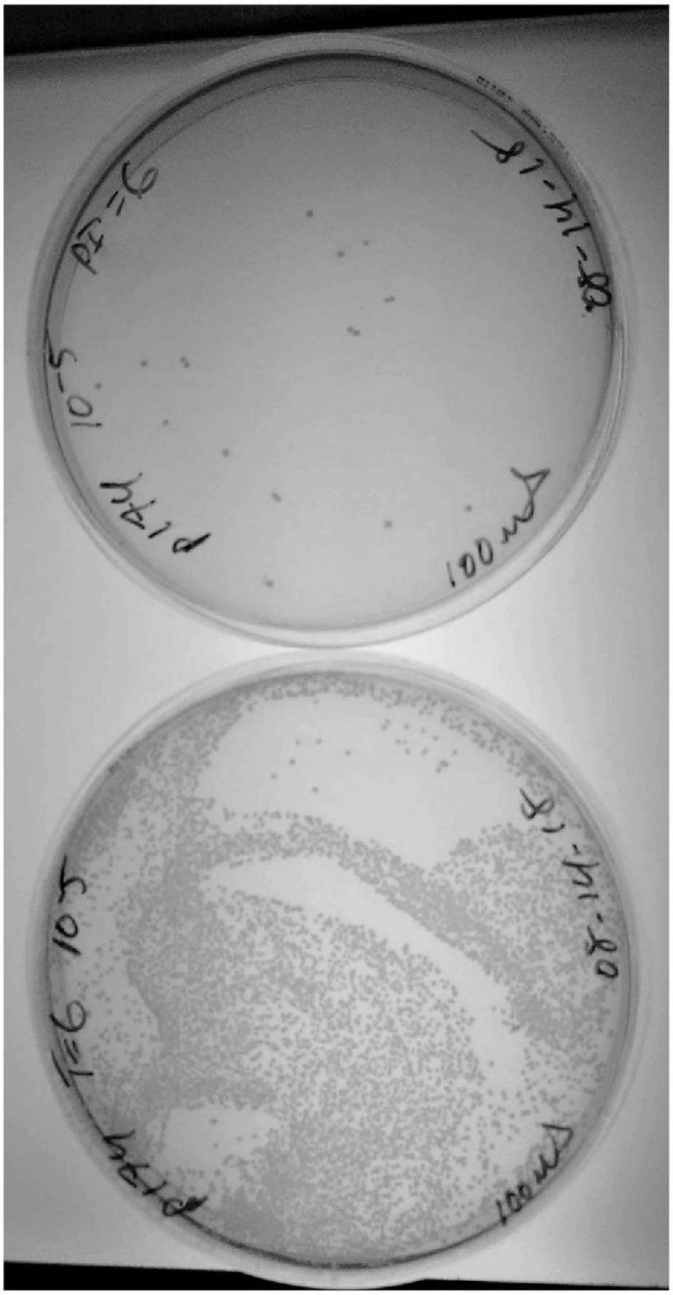


图15C

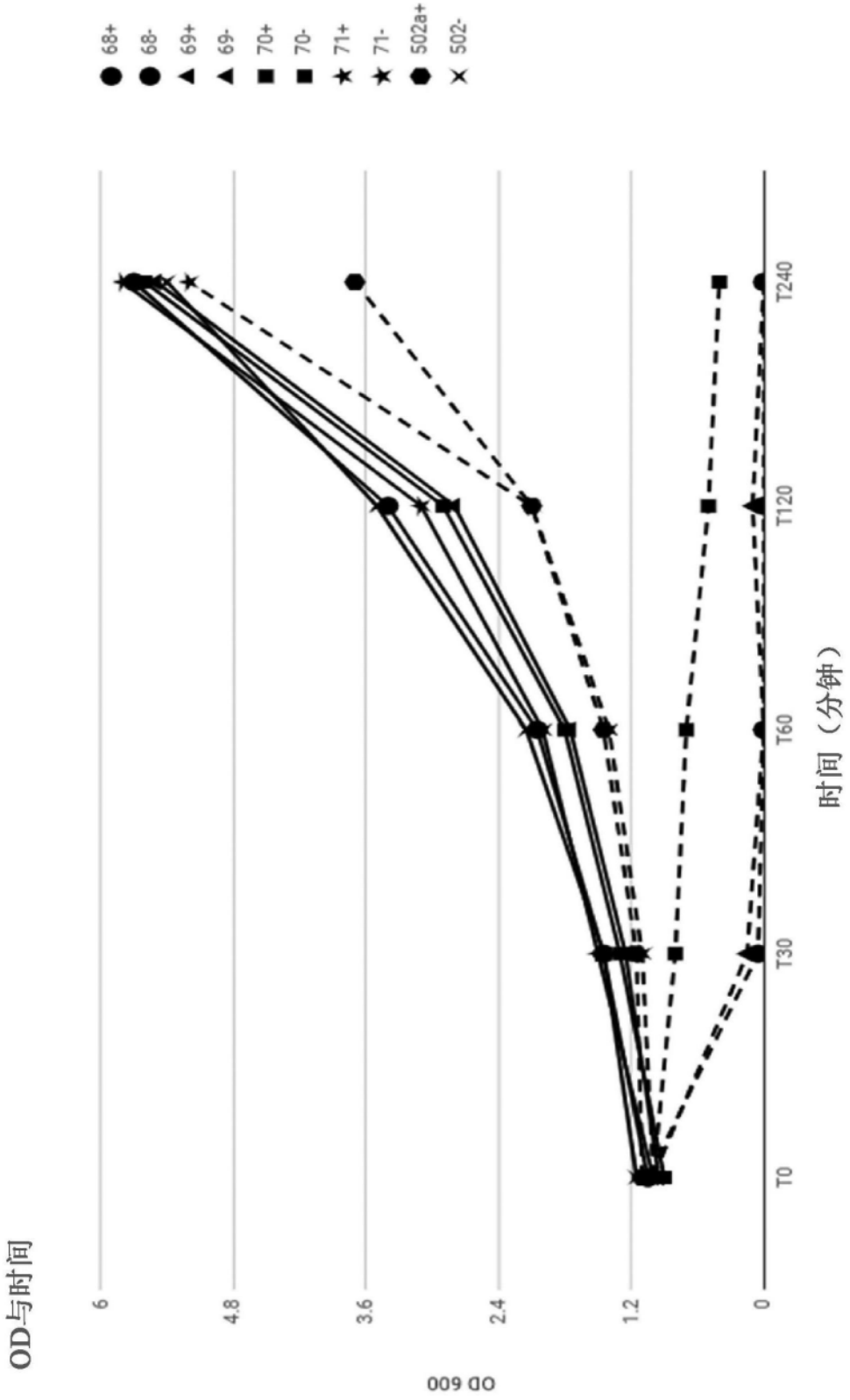

68+
68-
69+
69-
70+
70-
71+
71-
502a+
502-
OD与时间
OD 600
6
4.8
3.6
2.4
1.2
0
T0
T30
T60
T120
T240
时间（分钟）

图16

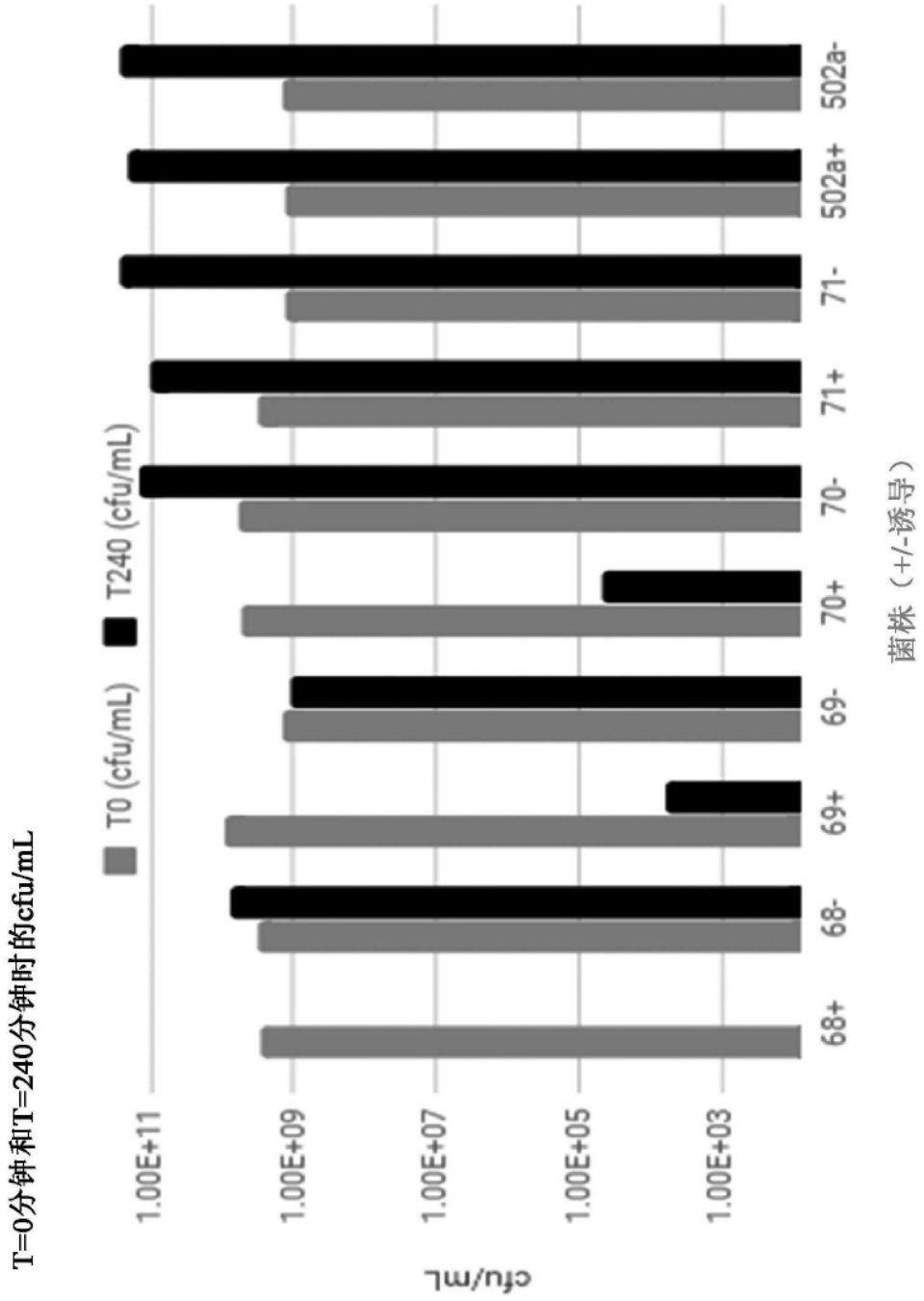

T=0分钟和T=240分钟时的cfu/mL
T0 (cfu/mL)
T240 (cfu/mL)
1.00E+11
1.00E+09
1.00E+07
1.00E+05
1.00E+03
cfu/mL
68+
68-
69+
69-
70+
70-
71+
71-
502a+
502a-
菌株（+/-诱导）

图17

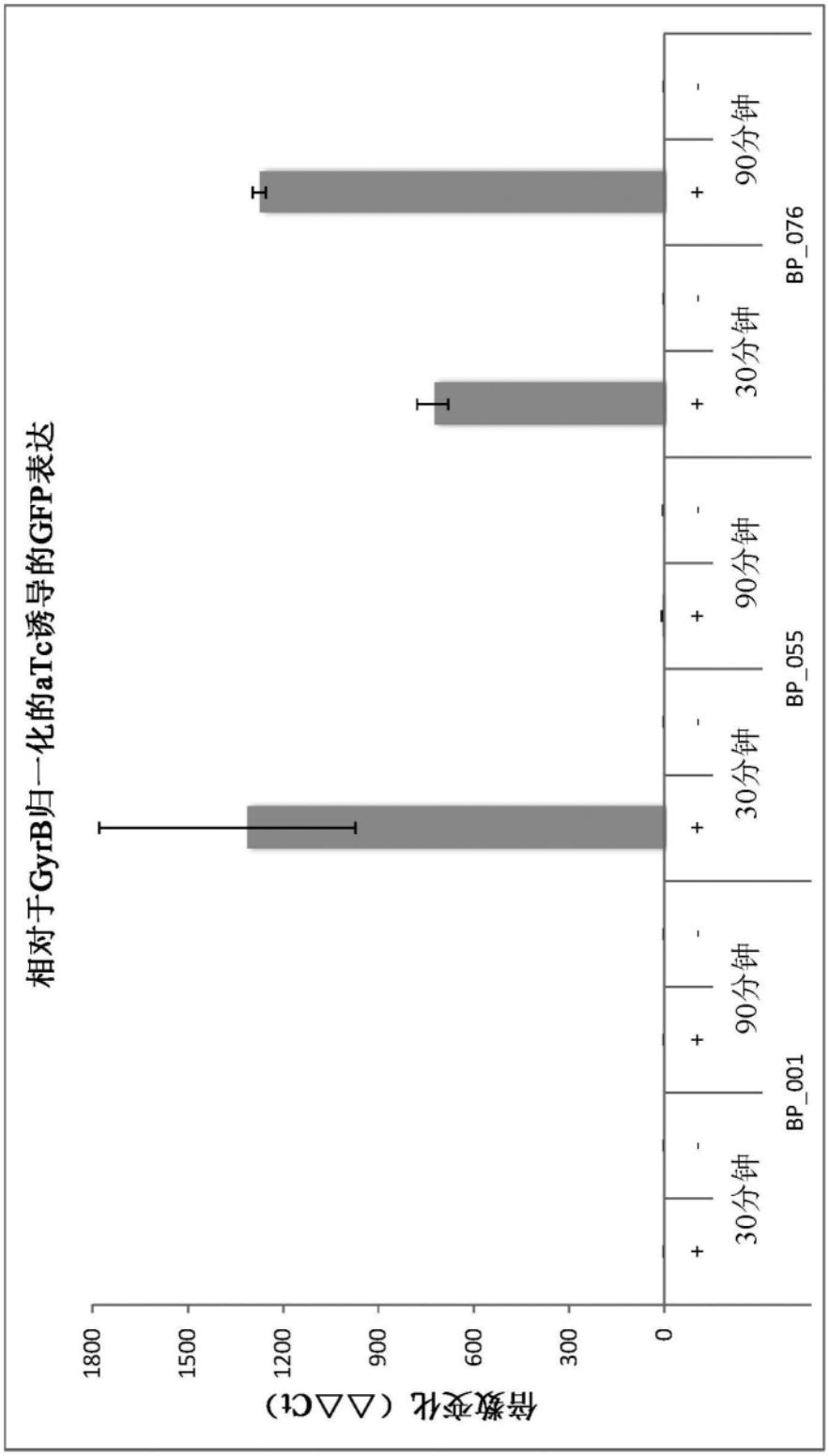

相对于GyrB归一化的aTc诱导的GFP表达
倍数变化（ΔΔCt）
1800
1500
1200
900
600
300
0
30分钟
90分钟
BP_001
BP_055
BP_076
+
-

图18

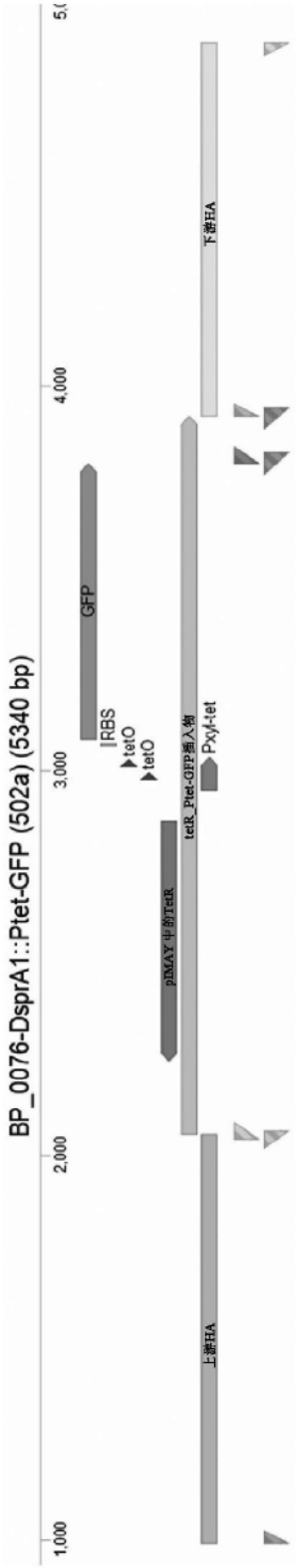

BP_0076-DsprA1::Ptet-GFP (502a) (5340 bp)
1,000
2,000
3,000
4,000
GFP
RBS
tetO
tetO
pMAY中的TetR
tetR_Ptet-GFP插入物
PxyA-tet
下游HA
上游HA

图19

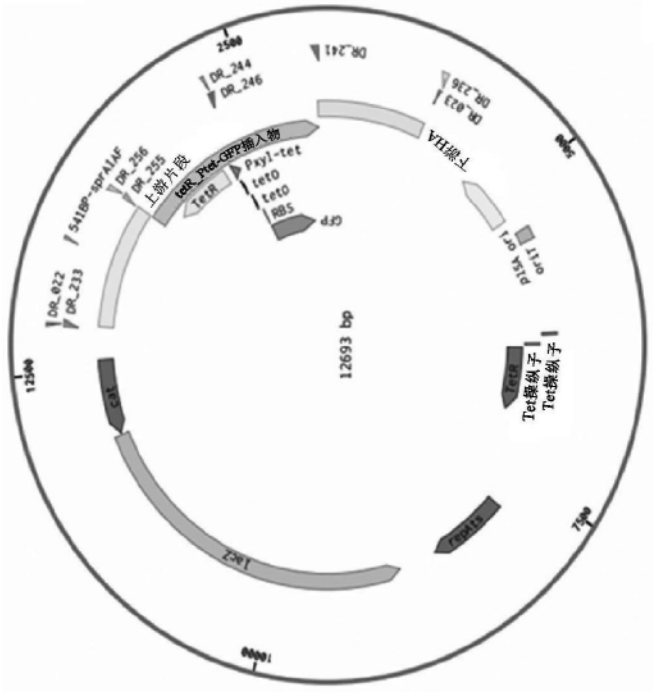

2500
DR_244
DR_246
DR_241
DR_233
DR_236
VH操纵
5418P-sprA1AF
DR_256
DR_255
上游片段
tetR_Ptet-GFP插入物
Pxyl-tet
tetO
tetO
RBS
gfp
tetR
P15A ori
ori1
DR_022
DR_233
12693 bp
12500
Cat1
Tet操纵子
Tet操纵子
repA
repB1
7500
10000

图20

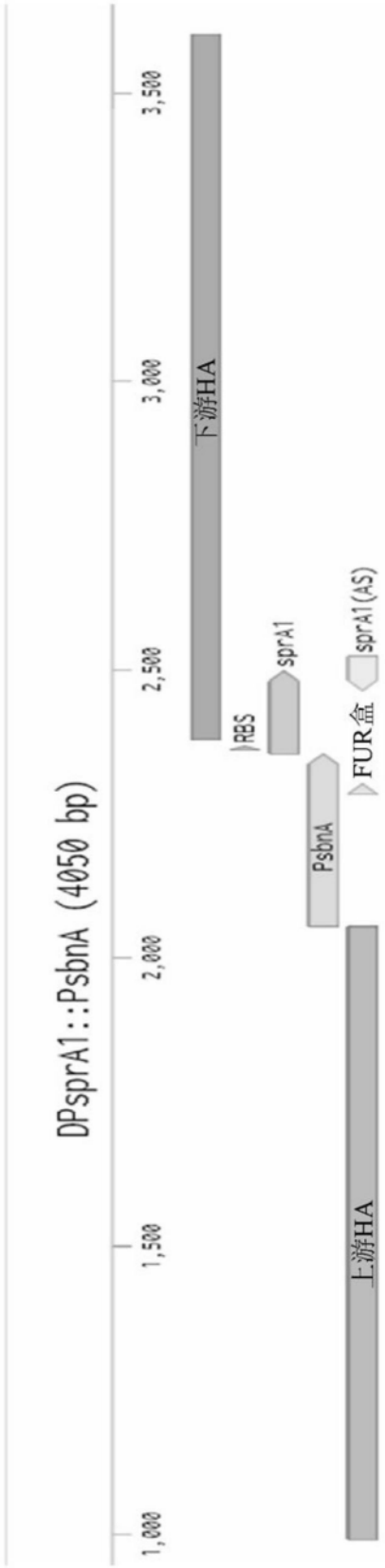

DPsprA1::PsbnA (4050 bp)
1,000
1,500
2,000
2,500
3,000
3,500
上游HA
PsbnA
RBS
sprA1
FUR盒
sprA1(AS)
下游HA

图21

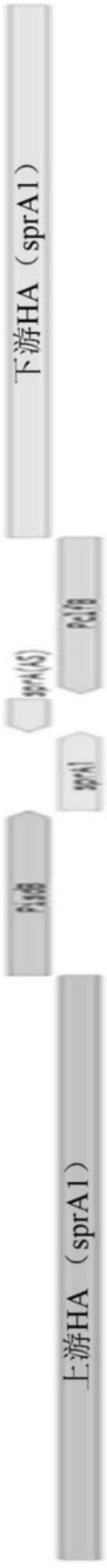


图22

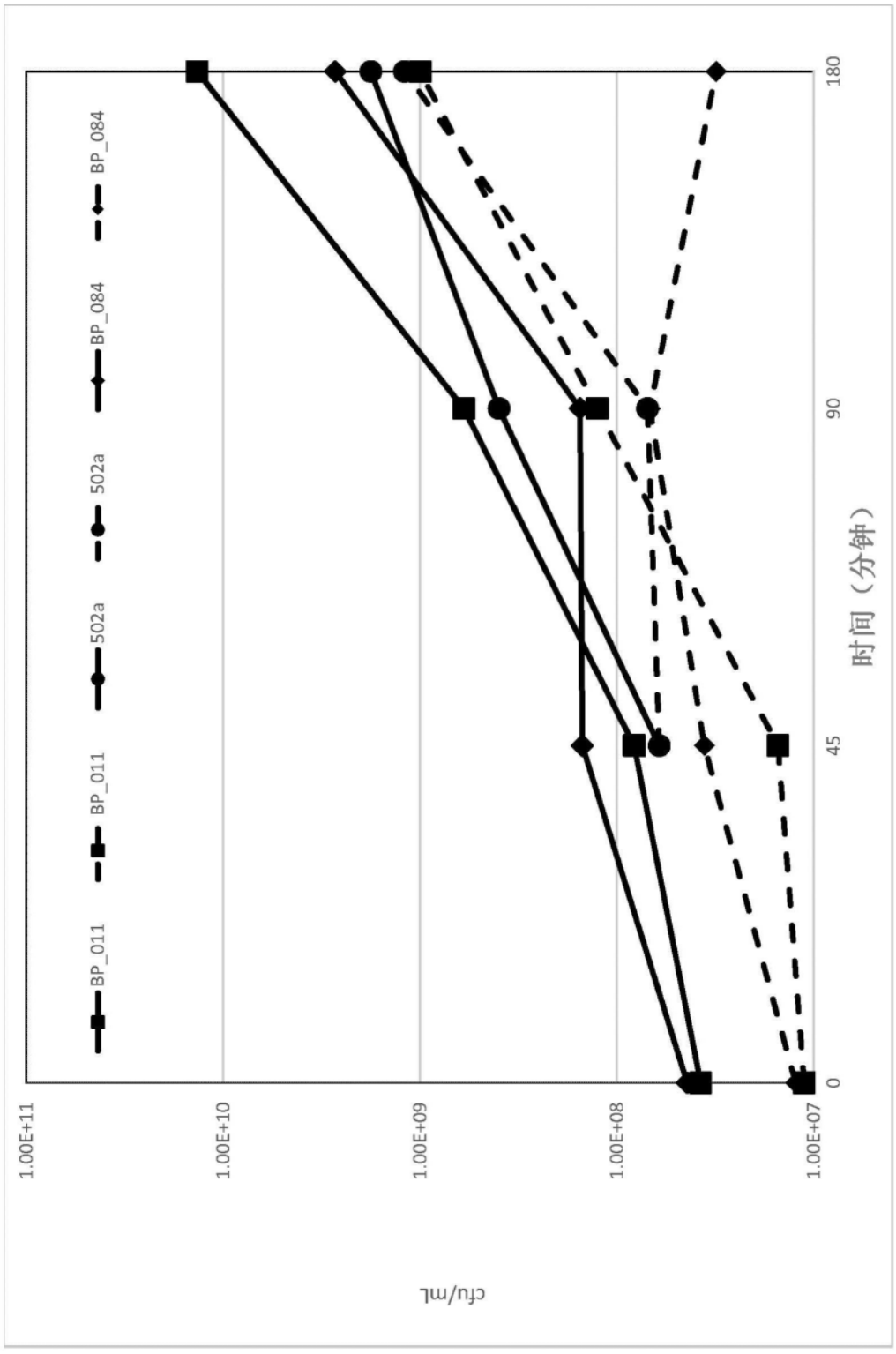

BP_084
BP_084
502a
502a
BP_011
BP_011
1.00E+11
1.00E+10
1.00E+09
1.00E+08
1.00E+07
cfu/mL
0
45
90
180
时间（分钟）

图23