

食品工业科技

SCIENCE AND TECHNOLOGY OF FOOD INDUSTRY

- 荷兰《文摘与引文数据库》(Scopus)
- 瑞典开放存取期刊目录 DOAJ
- 美国《化学文摘》CA
- 英国《食品科技文摘》FSTA
- 日本科学技术振兴机构数据库JST
- 世界期刊影响力指数(WJCI)报告
- 食品科学与工程领域高质量科技期刊分级目录第一方阵T1
- 北大核心期刊
- 中国精品科技期刊
- 中国科技核心期刊CSTPCD
- 中国核心学术期刊RCCSE
- 中国农林核心期刊A
- 中国生物医学Sino Med

半月刊 ISSN 1002-0306 CN 11-1759/TS

邮发代号: 2-399

普通变形杆菌噬菌体裂解酶Lys66的表达纯化及活性分析

尹红梅, 侯忠余, 王金丽, 唐俊妮

Expression, Purification and Activity Analysis of *Proteus vulgaris* Phage Lys66

YIN Hongmei, HOU Zhongyu, WANG Jinli, and TANG Junni

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023040128>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

尹红梅, 侯忠余, 王金丽, 等. 普通变形杆菌噬菌体裂解酶 Lys66 的表达纯化及活性分析 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(4): 109–115.
doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023040128

YIN Hongmei, HOU Zhongyu, WANG Jinli, et al. Expression, Purification and Activity Analysis of *Proteus vulgaris* Phage Lys66[J].
Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(4): 109–115. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023040128

· 生物工程 ·

普通变形杆菌噬菌体裂解酶 Lys66 的表达 纯化及活性分析

尹红梅¹, 侯忠余², 王金丽¹, 唐俊妮^{1,2,*}

(1. 西南民族大学食品科学与技术学院, 四川成都 610041;

2. 青藏高原动物遗传资源保护与利用教育部重点实验室, 四川成都 610041)

摘要:目的: 对一株新型普通变形杆菌噬菌体中的裂解酶 Lys66 进行基因克隆、蛋白表达纯化及活性分析。方法: 将噬菌体全基因序列在 Genbank 数据库中进行对比, 挖掘出裂解酶基因序列, 并对其克隆, 进一步在大肠杆菌中表达蛋白并纯化, 探究其抑菌效果。结果: 通过比对挖掘出与裂解酶相似度较高的基因序列, 大小为 393 bp; 利用 ExPASy Bioinformatics Resource Portal 预测裂解酶的分子质量为 15.20 kDa, 等电点为 9.40, 由 130 个氨基酸组成, 将优化的合成基因构建到载体 pET-32a 中, 得到重组质粒 pET-32a-lys66, 并将重组质粒转入大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞后诱导其表达, 经纯化验证后, 获得 1.86 mg/mL 的重组裂解酶 Lys66 蛋白。裂解酶 Lys66 在平板上的抑菌圈直径为 19.30 mm; 对 15 株受试菌株中的 13 株经氯仿处理的革兰氏阴性菌均表现出裂解活性, 宿主谱较广。Lys66 (1.89 mg/mL) 与乙二胺四乙酸 (1 mmol/L) 联用, 2 h 后 OD_{600 nm} 下降 0.61, 抑菌效果较好。结论: 本研究重组表达的裂解酶 Lys66 具有良好的抑菌效果, 可作为一种潜在的抗菌剂。

关键词: 变形杆菌, 噬菌体裂解酶, 抗菌剂, 食品安全

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2024)04-0109-07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023040128



本文网刊:

Expression, Purification and Activity Analysis of *Proteus vulgaris* Phage Lys66

YIN Hongmei¹, HOU Zhongyu², WANG Jinli¹, TANG Junni^{1,2,*}

(1. College of Food Sciences and Technology, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China;

2. Institute of Qinghai-Tibetan Plateau & Key Laboratory of Qinghai-Tibetan Plateau, Animal Genetic Resource Reservation and Utilization of Ministry of Education, Chengdu 610041, China)

Abstract: Objective: The gene cloning, protein expression, purification and activity analysis of a new type of *Proteus vulgaris* bacteriophage lyase Lys66 were performed. Methods: The whole gene sequence of bacteriophage was compared in the Genbank database. The gene sequence of lysase was excavated and cloned. The protein was expressed in *Escherichia coli* and was further purified to explore its antibacterial effect. Results: A gene sequence with high similarity to lyase was discovered through comparison, with a size of 393 bp. By using ExPASy Bioinformatics Resource Portal, the lyase was predicted that its molecular weight was 15.20 kDa, the isoelectric point was 9.40, and it was composed of 130 amino acids. The whole optimized synthetic gene was constructed onto vector pET-32a to obtain the recombinant plasmid pET-32a-Lys66. The recombinant plasmid was transferred into competent cells of *E. coli* BL21 (DE3) to induce its expression. After purification and validation, 1.86 mg/mL Lys66 protein was obtained. The diameter of the bacteriostatic ring of Lys66 lyase on the plate was 19.30 mm. Thirteen Gram-negative bacteria out of 15 tested strains treated with chloroform showed lytic

收稿日期: 2023-04-17

基金项目: “十三五”国家重点研发计划重点专项 (2018YFD0500500); 西南民族大学中央高校基本科研业务费专项 (2020NTD04)。

作者简介: 尹红梅 (1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品加工与安全, E-mail: 2292750661@qq.com。

* 通信作者: 唐俊妮 (1971-), 博士, 教授, 研究方向: 食品安全与食品微生物, E-mail: 392783291@qq.com。

activity, with a wide host spectrum. When Lys66 (1.89 mg/mL) was used in combination with ethylene diamine tetraacetic acid (1 mmol/L), the $OD_{600\text{ nm}}$ decreased by 0.61 after 2 h, indicating a good antibacterial effect. Conclusion: The recombinant lysase Lys66 expressed in this study had good antibacterial effects and could be used as a potential antibacterial agent.

Key words: *Proteus*; bacteriophage lyase; antibacterial agents; food safety

普通变形杆菌(*Proteus vulgaris*)属肠杆菌科,变形杆菌属,是一种常见的革兰氏阴性杆菌,广泛存在于自然界^[1],主要存在于水、土壤和天然肥料以及食品中,是人体肠道常见菌群之一^[2-3]。变形杆菌属,特别是奇异变形杆菌和普通变形杆菌,是尿路感染^[2]的主要病原菌之一。近年来,有研究发现变形杆菌除了可引起尿路感染外,还可引发多种人类疾病,如胃肠炎^[4]、上消化道疾病^[5]、肝胆疾病^[6]尤其与克罗恩病的关联特别强^[7],给医疗带来巨大压力。有研究显示在 1129 件直接入口食品中检出变形杆菌 117 株,检出率为 10.36%,可见其很容易污染食品^[8]。此外,变形杆菌通常与食物变质有关,食用受污染的食物(尤其是肉类和蔬菜)时也可引起食源性疾病^[9]。在人口众多的发展中国家,变形杆菌属仍然是导致食物中毒的主要细菌。近年来,中国报道的与变形杆菌相关的食物中毒病例也越来越多^[10-13]。而且,多重耐药(multi drug resistance, MDR)和广泛耐药(extensively drug resistant, XDR)细菌菌株的迅速传播严重限制了抗生素的使用^[14-15],故急需寻找新的抗生素替代物。

噬菌体是一类专门寄生在细菌中的病毒,故又称细菌病毒,最初在 1916 年,由加拿大医学细菌学家 Félix d'Hérel 分离得到^[16]。使用噬菌体疗法防治病原菌是一种新的策略,被认为是食品工业等不同领域病原体控制剂的理想替代品,美国 FDA 早在 2006 年已批准单核细胞增生李斯特菌特异性噬菌体作为新型食品防腐剂(ListShield™)^[17]。噬菌体虽然是天然无害的生物防治剂,但随着研究的深入,人们发现细菌与噬菌体都在不断进化。由此,细菌也会对噬菌体产生一定抗性,导致噬菌体的抑菌效果并不理想。与噬菌体相比,噬菌体溶酶在用作治疗药物方面具有许多优势,包括高效杀菌^[17]、更宽的宿主谱^[18]、易于靶向的药物递送和低细菌耐药性^[19]。裂解酶是噬菌体编码的肽聚糖水解酶,这些酶独立于噬菌体病毒粒子与相关的编码穿孔素(holin)蛋白一起积聚在宿主细胞内^[20-21],要解决细菌的噬菌体抗性,裂解酶是较为优异的解决之策。

迄今为止,已经鉴定、表征和测试了许多裂解酶对一系列致病菌的功效。Lu 等^[22]研究发现一种广谱噬菌体内溶素,其可以有效杀灭产气荚膜梭菌。Senevirathne 等^[23]的研究表明,噬菌体裂解酶对水曲霉菌(一种肺炎克雷伯菌多重耐药分离株)有很好的裂解作用。Shen 等^[18]克隆表达了可以有效杀灭大肠杆菌 O157:H7 的噬菌体裂解酶,在温度(4.0~95.0 °C)

和 pH(5.0~11.0)下表现出较高的酶活性稳定性,此外,它还揭示了对革兰氏阴性病原体(如大肠杆菌、沙门氏菌和铜绿假单胞菌)的广泛抗菌活性。王玉平^[24]的研究结果表明,两种沙门氏菌有强裂解能力的噬菌体裂解酶应用到食品中对莴苣的杀菌效果最好,其次是鸭肠,对哈密瓜、猪肉和脱脂奶粉中沙门氏菌的杀菌效果均较差。王栗萍^[25]发现粪肠球菌噬菌体裂解酶具有广谱抑菌作用,能有效清除金黄色葡萄球菌和粪肠球菌的生物被膜,在治疗 SD 大鼠腹腔感染中表现出良好效果,且对 SD 大鼠治疗后的肠道菌群多样性几乎未产生不利影响。可见,噬菌体裂解酶是一种具有应用前景的新型抗菌剂,但目前暂无普通变形杆菌噬菌体裂解酶的相关报道。本研究对一株新的普通变形杆菌噬菌体中的裂解酶进行基因克隆、蛋白表达及纯化,并探究裂解酶的抑菌活性,旨在为其在食品、农产品加工领域中的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

变形杆菌 来源于牦牛屠宰场,分离后经 16S rRNA 测序鉴定,一株新的裂解变形杆菌的短尾噬菌体 PV66 本实验室提供(已经过纯化鉴定及全基因组测序),市售牛肉;胰蛋白胨、酵母粉、琼脂 英国 Oxoid 公司;异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)、TMB 显色试剂盒、BL21(DE3)感受态细胞、Western Blot 一抗(His 鼠抗)、Western Blot 二抗(羊抗鼠)、蛋白定量试剂盒 上海生工生物有限公司;氨苄青霉素 上海源叶生物有限公司;咪唑(Imidazole)、甘氨酸、尿素(Urea)、丙烯酰胺、甲叉丙烯酰胺、四甲基乙二胺(TMED)、十二烷基硫酸钠(SDS)、过硫酸胺(AP) 美国 Oxoid Limited 公司;十二烷基肌氨酸钠(SKL) 擎科梓熙生物技术有限公司;镍柱(Ni-NTA) 上海昂科生物科技有限公司;聚乙二醇(PEG 20000)、EDTA、考马斯亮蓝、冰醋酸 天津市致远化学试剂有限公司;

SW-CJ-2FD 超净工作台、电子天平、恒温培养箱 苏净集团苏州安泰空气技术有限公司;HZQ-X160 恒温振荡培养箱 苏州培英实验设备有限公司;TGL-16K 医用离心机 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;MLS-3020 高压蒸汽灭菌锅、DW-86L390 超低温冰箱 日本三洋公司;AKHL-III-24 艾柯纯水机 成都康宁实验专用纯水设备厂;UV-6100 分光光度计、318cf 酶标仪 上海美普达仪器有限公司;SCIENTZ-III 超声波细胞破碎仪 宁

波新芝生物科技股份有限公司; UniversalHood II 型凝胶成像仪 天津津立仪器设备科技发展有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 裂解酶基因的比对 将经测序装配好的全部基因组上传至国际生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)所提供的局部相似性比对工具(Basic Local Alignment Search Tool, BLAST)(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)中进行比对, 以确定与裂解酶具有高相似性基因序列。

1.2.2 裂解酶基因生物信息分析 利用 ExPASy Bioinformatics Resource Portal(<http://us.expasy.org/tools/protparam.html>)研究裂解酶的分子质量、等电点和氨基酸组成等物理特性。

1.2.3 裂解酶基因的合成与重组质粒的构建 将测序得到的全基因组序列在数据库 NCBI 比对得到的与其他裂解酶高度相似的基因片段进行分析, 添加 6 个 His 标签后采用全基因合成的方式将裂解酶基因亚克隆到载体 pET-32a 上, 基因合成由生工生物工程(上海)股份有限公司完成, 获得重组质粒 pET-32a-Lys66, 用 XbaI 与 XhoI 进行双酶切, 胶回收双酶切产物进行验证。

1.2.4 蛋白的表达 将重组质粒 pET-32a-Lys66 转移到大肠杆菌 BL21(DE3)的感受态细胞中^[22], 在 42 °C 下热击后均匀地涂布在含有 50 μg/mL 氨苄青霉素的平板上, 并在 37 °C 下恒温培养。挑取单克隆菌落, 在 37 °C 下, 在含有氨苄青霉素的液体培养基中培养。当 OD_{600 nm} 值达到 0.6 时, 加入 0.5 mmol/L 诱导剂 IPTG 继续培养, 分别在 20 °C 孵育过夜、37 °C 孵育 6 h。无诱导剂的为阴性对照。以 4000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液并收集菌体, 用缓冲溶液 A 悬浮。通过超声波破碎机完全溶解。离心收集上清液和沉淀物, 用缓冲液 B 溶解沉淀物, 分别制备上清液和沉淀蛋白样品, 并准备上胶检测。确定再表达的条件: 在含有 50 μg/mL 氨苄青霉素的培养基中培养细菌溶液, 当 OD_{600 nm} 值达到 0.6 时, 加入 0.5 mmol/L 诱导剂 IPTG, 在 20 °C 下培养过夜以进行大量表达, 并通过离心收集细胞菌体。

1.2.5 重组蛋白的纯化 用缓冲液 C(8 mol/L Urea, 50 mmol/L Tris, 300 mmol/L NaCl, 0.1% Triton X-100, pH8.0)溶解细胞菌体, 超声破碎后, 离心收集上清粗蛋白; 取 5 mL Ni-NTA, 用 5 倍于柱床体积的 Binding buffer(8 mol/L Urea, 50 mmol/L Tris, 300 mmol/L NaCl, pH8.0)洗涤平衡柱; 将粗蛋白用平衡柱填料孵育 1 h, 收集流出物; 用 Binding buffer 冲洗平衡柱; 用 Washing buffer(8 mol/L Urea, 50 mmol/L Tris, 300 mmol/L NaCl, 20/50 mmol/L Imidazole, pH8.0)缓冲液洗涤柱子, 收集流出物; 用 Elution buffer(8 mol/L Urea, 50 mmol/L Tris,

300 mmol/L NaCl, 500 mmol/L Imidazole, pH8.0)缓冲液洗脱, 收集流出物; 将流出物分别处理, 取样, 制备 SDS-PAGE 检测。将纯化后的组分 5 透析到蛋白保存缓冲液(50 mmol/L Tris, 300 mmol/L NaCl, 0.1% SKL, pH7.4)中, 透析后用 PEG 20000 浓缩, 0.45 μm 膜过滤, 分装 1 mL/管, -80 °C。

1.2.6 目的蛋白的检测 将纯化后的目的蛋白用 SDS-PAGE 检测和 Western Blot 验证。具体方法为: SDS-PAGE 检测: 对蛋白样品进行处理, 制样, 12% 分离胶(30% 制胶液 4 mL, 1.5 mol/L Tris-HCl 2.5 mL, 10% SDS 100 μL, 10% APS 100 μL, 10% TEMD 10 μL, ddH₂O 3.3 mL), 5% 浓缩胶(30% 制胶液 0.83 mL, 1 mol Tris-HCl 0.625 mL, 10% SDS 50 μL, 10% APS 75 μL, 10% TEMD 7.5 μL, ddH₂O 3.42 mL), 进行 SDS-PAGE 电泳, 检测分子量。

Western Blot 验证: 对蛋白样品进行处理, 制样。浓缩胶 5%, 分离胶 12%。一抗为鼠抗 His 标签, 二抗为羊抗鼠, 采用 TMB 显色, 使用标签抗体进行验证。

1.2.7 重组蛋白质量浓度的测定 采用非干扰型蛋白定量试剂盒 Cat. No.C503071 对纯化好的蛋白质量浓度进行测定^[26]。以吸光度为纵坐标, 对应牛血清白蛋白量为横坐标, 用 Microsoft Excel 软件绘制蛋白标准曲线, 获得标准曲线公式; 将测得的待定量蛋白质样品溶液吸光度代入标准曲线公式中, 计算出所对应的蛋白质样品质量浓度。

1.2.8 裂解酶溶菌活性分析 采用平板裂解实验检测裂解酶的活性^[26], 将菌株 66 培养至对数生长期, 与 6 mL 融化的 0.75% 琼脂 LB 培养基混合, 冷却后打孔。加入上述纯化的裂解酶 Lys66, 并设 0.5 mmol/L EDTA 为阴性对照。37 °C 培养 8 h 后观察是否有抑菌圈并记录。

1.2.9 裂解酶 Lys66 的裂解谱分析 参考文献 [27] 的方法, 通过浊度法分析裂解酶 Lys66 的裂解谱。将受试菌种接种于 100 mL LB 肉汤液体培养基中, 其中革兰氏阴性菌在培养至对数生长期后加入 5% (V/V) 的氯仿处理 20 min 以除去其外膜, 以 8000 r/min 离心 15 min, 经无菌水多次洗涤后离心收集菌体。将沉淀用 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(含 0.1% TritonX-100, pH8.2)重悬, 调节 OD_{600 nm} 至 0.8~1.0, 向 200 μL 细菌重悬液中加入 50 μL 裂解酶, 于室温下作用 30 min 后检测 OD_{600 nm}, 以相同体积 Tris-HCl 缓冲液(含 0.1% Triton X-100)替代裂解酶 Lys66 作为对照。所有试验重复 3 次, 根据裂解率得出裂解酶的裂解谱。裂解率=[(试验组 OD_{600 nm} 的减小量-空白组 OD_{600 nm} 的减小量)/菌液初始 OD_{600 nm}] \times 100。

1.2.10 裂解酶 Lys66 与 EDTA 联用的溶菌活性分析 参考文献 [28] 的方法, 通过浊度法确定最佳

EDTA 及其最适浓度。将菌株 66 接种于 100 mL LB 肉汤液体培养基中, 培养至对数生长期后以 8000 r/min 离心 15 min, 经无菌水多次洗涤后离心收集菌体。细菌沉淀用 Tris-HCl 缓冲液(不含 0.1% Triton X-100, pH8.2)重悬至 OD_{600 nm} 为 0.8~1.0。按表 1 中的用量加入 Lys66、不同浓度 EDTA 和 200 μL 细菌重悬液混匀, 在室温下静置, 每隔 30 min 检测 OD_{600 nm}, 共监测 2 h, 重复 3 次。与对照组(组别 a)相比, 试验组(组别 b~组别 r)OD₆₀₀ 值下降的越多,

说明溶菌活性越好。

1.3 数据处理

采用 Excel 2016 进行原始数据的整理、用 SPSS 2019 进行方差分析、Origin 2018 进行图形绘制。

2 结果与分析

2.1 裂解酶基因的挖掘

将测序组装后的全基因组序列上传到 NCBI 进行比对, 找到与裂解酶相似度较高的基因序列如图 1 所示, Lys66 基因序列片段大小为 393 bp。序列已上传至国际生物技术信息中心数据库中, 登陆号为: OR195071。

2.2 裂解酶的生物信息分析

利用 ExPASy Bioinformatics Resource Portal 预测裂解酶的分子质量为 15.20 kDa, 等电点为 9.40, 由 130 个氨基酸组成, 不稳定指数是 44.61, 说明该蛋白质不稳定, 亲水系数为-0.591, 表明该蛋白具有一定的亲水性, 为利于蛋白纯化, 在末端加上 6 个 His 标签。由图 2 可知, Lys66 与 Proteus phage Vb PmiP-P59 和 Proteus phage Privateer 所产的裂解酶具有同源性(53%), 但 Lys66 处于单独分支, 说明 Lys66 是一种新型裂解酶。

2.3 全基因合成与质粒载体 pET-32α-lys66 的构建

采用全基因合成法构建重组质粒 pET-32α-lys66, 并亚克隆到表达载体 pET-32α 中。为了清楚地观察目标条带, 重组质粒用 XbaI 和 XhoI 酶切。结果表明, 酶切产物包括载体条带(约 5600 bp)和目的基因条带(450 bp 左右)(图 3)。同时, 重组质粒的测序结果表明, 裂解酶基因已正确插入到 pET-32α 表达载体上, 表明重组质粒 pET-32α-lys66 构建成功。

表 1 裂解酶 Lys66 与 EDTA 用量(μL)
Table 1 Dosage of lysase Lys66 and EDTA (μL)

组别	Lys66 (1.89 mg/mL)	EDTA	Tris-HCl (50.00 mmol/L)
a	0.00	0.00(0 mmol/L EDTA)	50.00
b	25.00	0.00(0 mmol/L EDTA)	25.00
c	0.00	25.00(25 mmol/L EDTA)	25.00
d	25.00	25.00(25 mmol/L EDTA)	0.00
e	0.00	25.00(20 mmol/L EDTA)	25.00
f	25.00	25.00(20 mmol/L EDTA)	0.00
g	0.00	25.00(10 mmol/L EDTA)	25.00
h	25.00	25.00(10 mmol/L EDTA)	0.00
i	0.00	25.00(5 mmol/L EDTA)	25.00
j	25.00	25.00(5 mmol/L EDTA)	0.00
k	0.00	25.00(1 mmol/L EDTA)	25.00
l	25.00	25.00(1 mmol/L EDTA)	0.00
m	0.00	25.00(0.5 mmol/L EDTA)	25.00
i	25.00	25.00(0.5 mmol/L EDTA)	0.00
o	0.00	25.00(0.25 mmol/L EDTA)	25.00
p	25.00	25.00(0.25 mmol/L EDTA)	0.00
q	0.00	25.00(0.10 mmol/L EDTA)	25.00
r	25.00	25.00(0.10 mmol/L EDTA)	0.00

TTAAATAAGTTCAAAATGTGGCATGTCAAGTTTCTTGTATAAATCCAACCATCCACTTTA
TTAGACCATGTACCACCCCTAATTGGAATATCTAATTCCTCAGAAAGCTTTAAACATAG
CAATAGCCATTTTTTCAAACCTAGCTCTATCTTTCCAATCAATTGGATAAGGAACCATATC
AATAGCATTACCAAGTTATATGTTTTGAGTTTCATAGTCCATGAAACACCTTTATTAACATATT
CCCTTTGCTTTTCAATAGTTCCTTATACCCCTCTGTTATGGTTATATCAAATGGCATGTATTCA
AATGCTTTCAATACAACCTTTTGTAACTTTTCATTAAACAGAGGATAACCTTTCTTTCCAG
TGTTACTTAGTTTTACGTTAGACAT

图 1 裂解酶基因序列

Fig.1 Sequence of Lyase gene

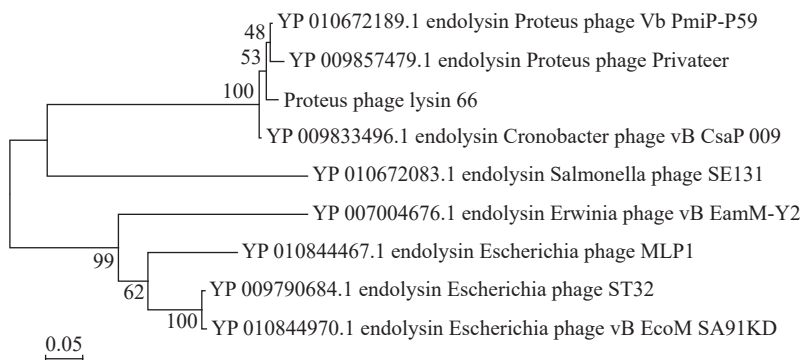


图 2 Lys66 氨基酸序列系统发育比较

Fig.2 Amino acid phylogenetic comparison of the endolysin Lys66

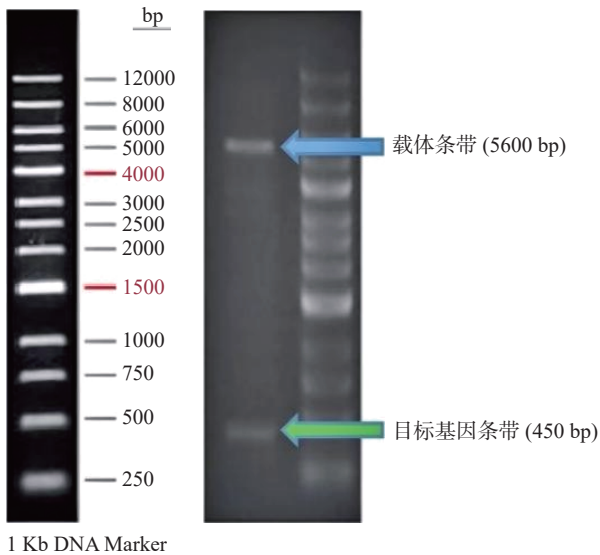


图 3 重组质粒酶切图

Fig.3 Restriction diagram of recombinant plasmid

2.4 确定重组蛋白的最佳诱导条件

将重组质粒 pET-32 α -lys66 转化大肠杆菌 BL21 (DE3)感受态细胞后,用 IPTG 诱导表达,探讨不同条件下的表达效果。裂解酶融合蛋白的预测分子量为 15.20 kDa。从图 4 可以看出, BL21(DE3)表达的蛋白大小与预期值一致。目的蛋白主要存在于破碎上清中,目的蛋白在破碎上清液中的亮度与诱导后基本相同,表明为可溶性蛋白。目的蛋白在 37 °C 上清过夜诱导浓度下表达较高,选择 37 °C 过夜诱导为最佳条件。

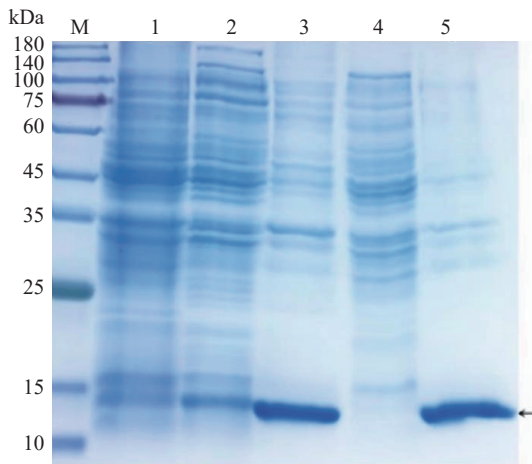


图 4 融合蛋白表达小试 SDS-PAGE 分析结果

Fig.4 SDS-PAGE analysis of fusion protein expression test

注:泳道 M: Protein Marker;泳道 1: 诱导前总蛋白;泳道 2: 20 °C 沉淀;泳道 3: 20 °C 上清;泳道 4: 37 °C 沉淀;泳道 5: 37 °C 上清。

2.5 重组蛋白的纯化及检测

确定最佳诱导条件后,将 BL21(DE3)大肠杆菌扩大培养以获得大量粗蛋白,经过镍柱亲和和层析纯化, SDS-PAGE 电泳分析发现 500 mmol/L Imidazole 洗脱组分中可以获得较纯且量较多的目的蛋白(图 5)。

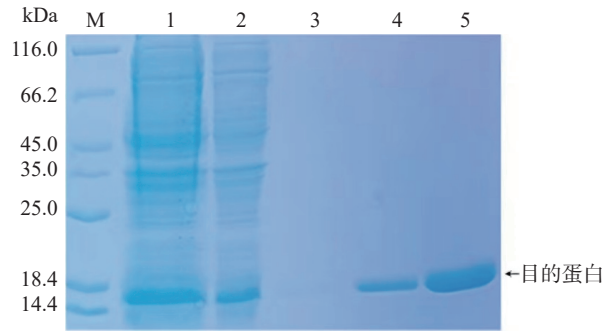


图 5 纯化融合蛋白镍柱亲和层析的 SDS-PAGE 分析

Fig.5 SDS-PAGE analysis of purified fusion protein nickel affinity chromatography

注:泳道 M: Protein marker;泳道 1: 上样;泳道 2: 流出;泳道 3: 20 mmol/L Imidazole 洗脱组分;泳道 4: 50 mmol/L Imidazole 洗脱组分;泳道 5: 500 mmol/L Imidazole 洗脱组分。

2.6 融合目的蛋白的验证

纯化后融合蛋白 SDS-PAGE 电泳在理论分子量附近出现明显条带(图 6A),初步判断融合蛋白纯化成功。为进一步确定纯化蛋白为目的蛋白,采用 TMB 显色试剂盒按 Western Blot 方法显色检测。结果表明,相应位置有明显条带(图 6B),表明该蛋白为目的蛋白。

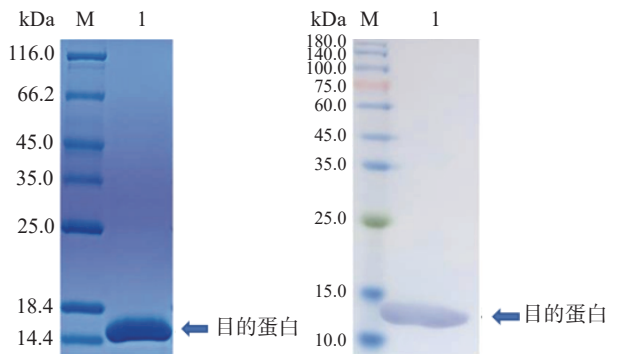


图 6 最终纯化蛋白 SDS-PAGE 分析图(A)和最终纯化蛋白 Western Blot 分析图(B)

Fig.6 SDS-PAGE analysis of final purified protein (A) and Western Blot analysis of final purified protein (B)

注:泳道 M: Protein marker;泳道 1: 融合目的蛋白。

2.7 蛋白浓度的测定

将纯化得到的裂解酶 Lys66 蛋白透析浓缩后,用蛋白定量试剂盒提供的方法建立蛋白标准曲线,得到标曲回归方程为 $y=0.0171x+0.0435$, $R^2=0.9948$ 。在蛋白标准曲线下用分光光度计测定蛋白 Lys66 浓度为 1.86 mg/mL。

2.8 裂解酶溶菌活性

通过平板裂解实验检测表达蛋白的裂解活性发现,与对照组相比,使用了裂解酶后,平板上出现直径约 19.30 mm 较清晰抑菌圈(图 7)。说明裂解酶可以裂解普通变形杆菌 66,具有良好的溶菌活性。

2.9 裂解酶 Lys66 的裂解谱分析

裂解酶相对噬菌体的作用具有特异性又有广谱

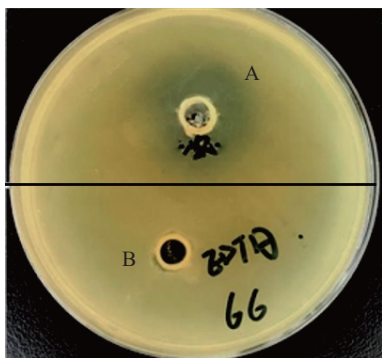


图7 平板裂解实验检测表达蛋白的裂解活性

Fig.7 Plate cleavage test to detect the cleavage activity of the expressed proteins

注: A: 实验组: 裂解酶 PV66; B: 阴性对照组: EDTA。

性,用 15 株菌株对 Lys66 进行裂解图谱测试,结果见表 2。Lys66 在很大程度上不能裂解革兰氏阳性菌 *Staphylococcus aureus* ATCC43300 和 *Enterococcus faecalis*,但对所有 13 株氯仿处理的革兰氏阴性菌均表现出裂解活性,宿主谱较广。在供试的 10 株普通变形杆菌中,Lys66 对 *Proteus vulgaris* 66 的裂解率最高,为 82%,因此选择 *Proteus vulgaris* 66 作为后续试验的目标菌。虽然 Lys66 来源于普通变形杆菌噬菌体,但是它对 *Escherichia coli* O157 (19%)、*Cronobacter* spp.(5%)也表现出一定的裂解能力,这可能是由于 Lys66 与 *Escherichia coli*、*Cronobacter* spp.噬菌体裂解酶具有一定的同源性。Lys66 对氯仿预处理的表达菌株 *Proteus vulgaris* 66 具有较强裂解能力(82%),说明 Lys66 对普通变形杆菌的污染有较好的清除能力。

表 2 裂解酶 Lys66 的裂解谱
Table 2 Lysis spectrum of endolysin Lys66

菌株	裂解率(%)	菌株	裂解率(%)
<i>Proteus vulgaris</i> 2	57.00±0.08	<i>Proteus vulgaris</i> 65	75.00±0.02
<i>Proteus vulgaris</i> 7	66.00±0.06	<i>Proteus vulgaris</i> 66	82.00±0.02
<i>Proteus vulgaris</i> 8	65.00±0.04	<i>Salmonella</i> .sp H9812	1.00±0.05
<i>Proteus vulgaris</i> 12	61.00±0.01	<i>Cronobacter</i> spp	5.00±0.04
<i>Proteus vulgaris</i> 22	71.00±0.04	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC43300	-12.00±0.08
<i>Proteus vulgaris</i> 23	74.00±0.03	<i>Enterococcus faecalis</i>	-3.00±0.02
<i>Proteus vulgaris</i> 29	39.00±0.11	<i>Escherichia coli</i> O157	19.00±0.14
<i>Proteus vulgaris</i> 45	69.00±0.03		

2.10 裂解酶 Lys66 与 EDTA 联用的溶菌活性分析

由于肽聚糖外膜的保护作用,裂解酶不能直接从外膜裂解革兰氏阴性菌,需要膜渗透剂来协助裂解酶穿透外膜^[29]。在本研究中,将 Lys66(1.89 mg/mL)与不同浓度的 EDTA 结合,用浊度法探讨裂解效果。结果显示如图 8 所示,当 Lys66 单独应用于活菌时(组别 b),2 h 后 OD_{600 nm} 仅下降了 0.06,几乎没有裂解效果,不同浓度的 EDTA 对活菌单独处理有一定的抑制作用,且当 EDTA 浓度为 0.50 mmol/L 时达到最高(组别 m),2 h 后 OD_{600 nm} 下降了 0.29,

当 Lys66 与 EDTA 结合使用时,可有效裂解宿主细菌,当 EDTA 浓度为 1 mmol/L 时 Lys66 的溶菌活性最好(组别 l),2 h 后 OD_{600 nm} 下降了 0.61,且前 30 min 内效果最明显,OD_{600 nm} 下降了 0.38。

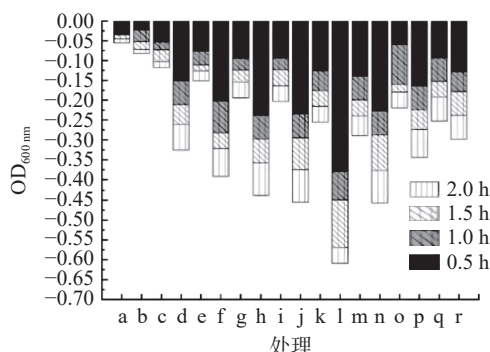


图 8 不同浓度 EDTA 与 Lys66 联用对 *Proteus vulgaris* 66 的溶菌效果

Fig.8 Lytic effect of different concentrations of EDTA and Lys66 on *proteus vulgaris*
注:不同组别剂量详见表 1。

3 结论

本实验将噬菌体全基因组测序获得的基因在 Genbank 数据库中 BLAST 比对,得到一段 393 bp 与其他噬菌体裂解酶基因相似的基因序列,翻译后,通过在线软件预测显示,该蛋白分子量为 15.20 kDa,等电点为 9.40,由 130 个氨基酸组成。将优化的基因通过合成构建到载体 pET-32α 中,得到重组质粒 pET-32α-lys66,将重组质粒转入大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞后,培养,诱导表达,收集菌体,纯化蛋白,最后通过 SDS-PAGE 以及 Western Blot 对蛋白进行验证,获得 1.86 mg/mL 的重组裂解酶 Lys66 蛋白。裂解酶 Lys66 在平板上有直径约为 19.30 mm 清晰的抑菌圈,对 15 株受试菌株中 13 株氯仿处理的革兰氏阴性菌均表现出裂解活性,宿主谱较广。Lys66 (1.89 mg/mL) 与 EDTA(1 mmol/L)联用时,2 h 后 OD_{600 nm} 下降 0.61。以上结果表明 Lys66 具有良好的抑菌效果,是一种潜在的抗菌剂。

本研究成功表达纯化出普通变形杆菌噬菌体裂解酶 Lys66,并对其溶菌活性进行初步探究,为裂解酶在食品、医药等领域的开发与应用提供了理论依据。但裂解酶本身对革兰氏阴性菌的溶菌活性并不明显,且未将其应用到实际食品中,未来可通过与其他抗菌剂^[30]或基因工程^[31]的方式提高裂解酶在革兰氏阴性菌中杀菌效力,并将裂解酶应用到食品中,进一步探究其在食品中杀菌活性。

参考文献

[1] MOHR K I. History of antibiotics research[J]. *Curr Top Microbiol Immunol* 2016, 398: 237-272.
[2] SCHAFFER J N, PEARSON M M. *Proteus mirabilis* and urinary tract infections[J]. *Microbiology Spectrum*, 2015, 3(5): 3-5.
[3] YANG R, XU G Y, WANG X Y, et al. Establishment and application of a dual taq man real-time PCR method for and *Proteus*

- vulgaris* [J]. *Polish Journal of Microbiology*, 2020, 69(3): 293–300.
- [4] HAMILTON A L, KAMM M A, NG S C, et al. *Proteus* spp. as putative gastrointestinal pathogens [J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2018, 31(3): 10–1128.
- [5] MULLER H E. Occurrence and pathogenic role of *Morganella-Proteus-Providencia* group bacteria in human feces [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1986, 23(2): 404–405.
- [6] SEGAL R, POGORELIUK I, DAN M, et al. Gastric microbiota in elderly patients fed via nasogastric tubes for prolonged periods [J]. *Journal of Hospital Infection*, 2006, 63(1): 79–83.
- [7] MISRA V, MISRA S P, SINGH P A, et al. Significance of cytomorphological and microbiological examination of bile collected by endoscopic cannulation of the papilla of Vater [J]. *Indian J Pathol Microbiol*, 2009, 52(3): 328–331.
- [8] 封会茹, 董晓根, 余红, 等. 直接入口食品中变形杆菌污染状况调查 [J]. *现代预防医学*, 2010, 37(7): 1250–1251, 1256. [FENG Huiru, DONG Xiaogen, YU Hong, et al. Study on contamination of proteus in directly edible food [J]. *Modern Preventive Medicine*, 2010, 37(7): 1250–1251, 1256.]
- [9] LI Chang'an, GUO Caihong, YANG Tingyu, et al. Whole-genome analysis of bla_{NDM}-bearing *Proteus mirabilis* isolates and mcr-1-positive *Escherichia coli* isolates carrying bla_{NDM} from the same fresh vegetables in China [J]. *Foods*, 2023, 12(3): 492.
- [10] 吴存凤, 廖晓伟. 一起变形杆菌食物中毒的调查报告 [J]. *上海预防医学*, 2013, 25(3): 130–131, 142.
- [11] 潘长太, 刘明明, 豆爱琴. 一起奇异变形杆菌食物中毒的调查分析 [J]. *中国医药指南*, 2012, 10(26): 378–379.
- [12] 米涵, 宗勇南. 一起奇异变形杆菌引起食物中毒的调查报告 [J]. *中国初级卫生保健*, 2014, 28(1): 88–89.
- [13] 朱蕾. 一起奇异变形杆菌食物中毒的流行病学调查 [J]. *江苏预防医学*, 2017, 28(2): 212–213.
- [14] BLAIR J M A, WEBBER M A, BAYLAY A J, et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2015, 13(1): 42–51.
- [15] LIVERMORE D M, ON B O T B, BLASER M, et al. Discovery research: the scientific challenge of finding new antibiotics [J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2011, 66(9): 1941–1944.
- [16] SALMOND G P C, FINERAN P C. A century of the phage: Past, present and future [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2015, 13(12): 777–786.
- [17] LOVE M J, BHANDARI D, DOBSON R C J, et al. Potential for bacteriophage endolysins to supplement or replace antibiotics in food production and clinical care [J]. *Antibiotics*, 2018, 7(1): 17.
- [18] SHEN K S, SHU M, TANG M X, et al. Molecular cloning, expression and characterization of a bacteriophage JN01 endolysin and its antibacterial activity against *E. coli* O157: H7 [J]. *LWT*, 2022, 165: 113705.
- [19] ABDELRAHMAN F, GANGAKHEDKAR R, NAIR G, et al. Pseudomonas phage ZCPS1 endolysin as a potential therapeutic agent [J]. *Viruses*, 2023, 15(2): 520.
- [20] ABEDON S T. Ecology and evolutionary biology of hindering phage therapy: The phage tolerance vs. phage resistance of bacterial biofilms [J]. *Antibiotics*, 2023, 12(2): 245.
- [21] CHANG Y. Bacteriophage-derived endolysins applied as potent biocontrol agents to enhance food safety [J]. *Microorganisms*, 2020, 8(5): 724–724.
- [22] LU R, LIU B H, WU L T, et al. A broad-spectrum phage endolysin (LysCP28) able to remove biofilms and inactivate clostridium perfringens strains [J]. *Foods*, 2023, 12(2): 411–411.
- [23] SENEVIRATHNE A, LEE J, DE ZOYSA M, et al. Genome characterization of bacteriophage KPP-1, a novel member in the subfamily *vequintavirinae*, and use of its endolysin for the lysis of multidrug-resistant *klebsiella variicola* *in vitro* [J]. *Microorganisms*, 2023, 11(1): 207–207.
- [24] 王玉平. 噬菌体裂解酶 LysWL59 和 LysWL60 的制备、特性分析及应用 [D]. 成都: 四川农业大学, 2020. [WANG Y P. Preparation, characterization and application of endolysins LysWL59 and LysWL60 [D]. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2020.]
- [25] 王粟萍. 粪肠球菌噬菌体裂解酶、穿孔素基因克隆表达及应用 [D]. 昆明: 昆明理工大学, 2022. [WANG S P. Cloning, expression and application of *Enterococcus faecalis* phage lyase gene [D]. Kunming: Kunming University of Science and Technology, 2022.]
- [26] 陶程琳, 姚澜, 王少辉, 等. 沙门菌噬菌体溶菌酶 Lys-SHWT1 的制备及抑菌活性分析 [J]. *中国动物传染病学报*, 2021, 29(3): 10–15. [TAO C L, YAO L, WANG S H, et al. Preparation and antibacterial analysis of *Salmonella* bacteriophage lysozyme LysSHWT1 [J]. *Chinese Journal of Animal Infectious Diseases*, 2021, 29(3): 10–15.]
- [27] SCHMELCHE R M, POWELL A M, CAMP M J, et al. Synergistic streptococcal phage ASA2 and B30 endolysins kill streptococci in cow milk and in a mouse model of mastitis [J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2015, 99(20): 1–12.
- [28] JIANG Y H, XU D Q, WANG L Z, et al. Characterization of a broad-spectrum endolysin LysSP1 encoded by a *Salmonella* bacteriophage [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2021, 105(13): 5461–5470.
- [29] OLIVEIRA H, AZEREDO J, LAVIGNE R, et al. Bacteriophage endolysins as a response to emerging foodborne pathogens [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2012, 28(2): 103–115.
- [30] 王瑜欣, 李静, 付开来, 等. 噬菌体裂解酶 Lysin1902 原核表达及其与 ϵ -聚赖氨酸联用效果评价 [J]. *微生物学报*, 2023, 63(2): 834–844. [WANG Y X, LI J, FU K L, et al. Phage endolysin Lysin1902: Prokaryotic expression and evaluation of its bactericidal activity combined with ϵ -poly-lysine [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(2): 834–844.]
- [31] BRIERS Y, WALMAGH M, VAN P V, et al. Engineered endolysin-based "artilysins" to combat multidrug-resistant gram-negative pathogens [J]. *mBio*, 2014, 5(4): e1314–e1379.