



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20160023

类志贺邻单胞菌噬菌体 Φ P4-7 裂解酶 Gp2 的表达及活性测定

何 洋, 荆兆元, 杨洪江

(工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津市工业微生物重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘 要: 多重耐药菌株的出现给临床治疗带来了困难, 噬菌体编码的裂解酶能够杀死病原菌, 是潜在的重要杀菌因子. 本实验采用 PCR 技术, 扩增类志贺邻单胞菌 (*Plesiomonas shigelloides*) 噬菌体 Φ P4-7 裂解酶 gp2 基因并克隆至质粒 pQE30 上进行表达, 重组蛋白采用 Ni-NTA 亲和层析法进行纯化. 重组裂解酶 Gp2 最适反应 pH 为 9; 裂解酶 40 °C 保温 15 min, 酶活剩余 56.4%. 底物专一性实验结果显示, 该裂解酶能够高效裂解 5 种革兰氏阴性菌, 即铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*)、摩氏摩根菌 (*Morganella morganii*)、弗氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter freundii*), 以及 3 种革兰氏阳性菌, 即金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、枯草芽胞杆菌 (*Bacillus subtilis*)、地衣芽胞杆菌 (*Bacillus licheniformis*). 杀菌实验结果表明, 裂解酶 Gp2 可与 EDTA、LAB-35 以及 SDS 配合使用, 进一步提高该酶对铜绿假单胞菌和枯草芽胞杆菌的杀菌活性. 裂解酶 Gp2 具有高效广谱裂菌活性, 具有潜在的应用价值.

关键词: 噬菌体裂解酶; 类志贺邻单胞菌噬菌体 Φ P4-7; 蛋白表达; 杀菌活性

中图分类号: Q786

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2017)03-0016-07

Characterization and Activity Determination of Gp2 Endolysin from *Plesiomonas shigelloides* Phage Φ P4-7

HE Yang, JING Zhaoyuan, YANG Hongjiang

(Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: The emergence of multi-drug resistant pathogens has brought difficulties to clinical treatments. The endolysin encoded phage could lyse pathogenic microorganisms, and as an important bactericidal agent, it is a potential alternative to antibiotics. In this study, gp2 gene of *Plesiomonas shigelloides* phage Φ P4-7 was amplified and cloned into pQE30 plasmid. The recombinant protein was purified by Ni-NTA agarose resin. The optimal acidity of recombinant endolysin was pH 9. After treatment at 40 °C for 15 min, it retained approximately 56.4% of its lytic activity. The GP2 endolysin could cleave 5 G⁻ strains (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Morganella morganii*, *Citrobacter freundii*) and 3 G⁺ strains (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*). In combination with EDTA, LAB35, or SDS, respectively, Gp2 displayed synergetic antimicrobial activities to both *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis*. Our results indicate that Gp2 endolysin is effective in killing some pathogens and might be used as an antibacterial agent.

Key words: phage endolysin; *Plesiomonas shigelloides* phage Φ P4-7; expression of protein; antibacterial activity

全世界范围内, 控制多重耐药性菌株的感染是临床面临的难题之一^[1-2]. 鲍曼不动杆菌 (*Acinetobacter*

baumannii)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 和肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 等病

收稿日期: 2016-01-19; 修回日期: 2016-05-31

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31370205, 30970114)

作者简介: 何 洋 (1989—), 男, 天津人, 博士研究生; 通信作者: 杨洪江, 教授, hongjiangyang@tust.edu.cn

原微生物所引起的高发病率和死亡率,给社会医疗保障系统带来了沉重的负担. 抗生素治疗对于多重耐药菌株感染收效甚微,亟需研发对环境和人类健康无害的抗菌素替代产品.

噬菌体编码的裂解酶能够破坏细菌的细胞壁,具有效率高、特异性强和作用快的特点,并且产生耐受的可能性极低,使裂解酶有望成为新型杀菌因子^[3-5]. 典型的革兰氏阳性菌噬菌体编码的裂解酶,一般具有2种结构域,即位于N端的催化中心结构域(enzymatic catalytic domain, ECD)和位于C端的细胞结合结构域(cell binding domain, CBD). 典型的革兰氏阴性菌噬菌体编码的裂解酶,其结构只包含1个ECD,没有CBD. 革兰氏阳性菌噬菌体裂解酶具有CBD,与细胞壁碎片结合而被封闭,限制了其催化功能的持续发挥;而革兰氏阴性菌噬菌体裂解酶不含CBD,不会被细胞壁碎片封闭,有利于裂解酶催化功能的持续发挥. 革兰氏阳性菌噬菌体裂解酶可直接作用于阳性菌细胞壁,破坏肽聚糖成分杀死细菌. 此类裂解酶的相关研究比较深入,在医药、食品、水产养殖、畜牧养殖、发酵以及能源等多个领域有着广泛的应用前景^[4,6]. 革兰氏阴性菌细胞壁肽聚糖层被磷脂外膜包被,阻止了裂解酶的直接作用,导致了相关噬菌体裂解酶的研究较少^[7-8]. 革兰氏阴性菌噬菌体裂解酶的种类与数量巨大,有关研究仍处于初步阶段,其丰富的裂解酶基因资源亟待挖掘.

本实验通过原位分离法,以从鱼类肠道分离的类志贺邻单胞菌(*Plesiomonas shigelloides*)噬菌体ΦP4-7^[11]的基因组DNA作为模板扩增裂解酶基因,克隆到大肠杆菌(*E. coli*)表达载体pQE30中,经过酶切验证以及测序结果证实pQE30-gp2构建成功,并在*E. coli* M15中获得了表达. 在体外抑菌实验中,发现裂解酶Gp2作为抑菌制剂的潜力,并且发现裂解酶与表面活性剂或乙二胺四乙酸(EDTA)联用能够提高裂解酶的杀菌活性.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

大肠杆菌(*E. coli*) M15/pREP4以及质粒pQE30由南开大学生命科学学院惠赠. 类志贺邻单胞菌(*Plesiomonas shigelloides*) P4-7以及类志贺邻单胞菌噬菌体ΦP4-7为本实验室从环境中分离^[11]. 铜绿假

单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) PAK、粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)^[11]、鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)、摩氏摩根菌(*Morganella morganii*)^[11]、弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*)^[11]、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)、蕈状芽胞杆菌(*Bacillus mycoides*)以及地衣芽胞杆菌(*Bacillus licheniformis*)为本实验室保存.

1.1.2 酶、载体、引物和主要试剂

Taq酶、dNTP、限制酶、连接反应试剂盒、DL5000 DNA Marker、预混型低相对分子质量标准蛋白,大连宝生物有限公司; Ni-NTA亲和层析琼脂糖,七海复泰生物科技有限公司; 胶回收试剂盒,北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司; 其他所有化学试剂均为进口或国产分析纯试剂.

1.1.3 培养基

LB培养基(g/L): 酵母浸粉5, 蛋白胨10, NaCl 5.

LB固体培养基(g/L): 酵母浸粉5, 胰蛋白胨10, NaCl 5, 琼脂15.

1.2 方法

1.2.1 引物的设计与合成

根据本研究室已测序的类志贺邻单胞菌噬菌体编码的裂解酶基因gp2(GenBank登录号为KU521519)设计引物,上、下游分别引入Kpn I和Hind III酶切位点. gp2F: 5'-CGGGGTACCATGCA ACCATCGCGAGCGTG-3'; gp2R: 5'-CCCAAGCTT CTGGCGGCGGTGGATTTTTG-3'. 引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成.

1.2.2 噬菌体ΦP4-7裂解酶基因gp2的克隆以及表达载体的构建

提取噬菌体ΦP4-7的基因组DNA,以基因组DNA作为模版,通过上游引物gp2F和下游引物gp2R扩增裂解酶基因gp2,1.2%琼脂糖电泳回收774 bp大小的片段,与Kpn I和Hind III双酶切的pQE30载体连接,直接转化*E. coli* M15. 重组子通过BamH I和Hind III酶切验证,并将正确的重组子测序.

1.2.3 裂解酶的表达与纯化

将重组菌接种到含氨苄青霉素(100 μg/mL)和卡那霉素(25 μg/mL)的LB培养液中,37℃振荡过夜培养;次日,按1:100比例转接至100 mL LB培养基中,37℃振荡培养至 $A_{600} = 0.6$ 时,加入IPTG至终浓度0.5 mmol/L,16℃诱导16 h. 收集菌体,按照1 g湿菌体加入5 mL裂菌缓冲液(20 mmol/L Tris-

HCl, 250 mmol/L NaCl, 1 mmol/L PMSF, pH 7.4) 的比例重悬菌体, 超声波破碎细胞. 4 °C、10 000 g 离心 10 min, 收集上清液, 并将上清液经 0.22 μm 滤膜过滤. 将过滤的上清液与 500 μL Ni-NTA 亲和层析琼脂糖充分混合, 离心后收集亲和层析琼脂糖, 并用洗杂缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, 250 mmol/L NaCl, pH 7.4) 洗涤填料 2 ~ 3 次. 最后用洗脱缓冲液 (100 mmol/L 咪唑, 20 mmol/L Tris-HCl, 250 mmol/L NaCl, pH 7.4) 充分洗涤填料并收集上清液. 上清液在 4 °C 条件下透析以除去咪唑.

1.2.4 铜绿假单胞菌的预处理

将过夜的铜绿假单胞菌 PAK 转接于新鲜的 LB 液体培养基中, 37 °C 振荡培养至 $A_{600} = 0.6$ 时, 收集全部细胞并重悬于 10 mL 被氯仿饱和的 Tris 缓冲液 (50 mmol/L, pH 7.7) 中, 室温下轻柔振荡 30 min, 4 °C、4 000 g 离心 15 min, 弃上清液收集细胞. 细胞通过 10 mmol/L 的磷酸盐缓冲液 (pH 7.2) 重悬, 4 000 g、4 °C 离心 15 min, 再用 10 mmol/L 的磷酸盐缓冲液 (pH 7.2) 将细胞重悬至 $A_{600} = 0.6 \sim 1.0$.

1.2.5 裂解酶的活性测定

裂解酶 Gp2 的肽聚糖水解活性通过铜绿假单胞菌 PAK 的去除外膜细胞作为反应底物计算. 裂解酶活性的测定方法如下:

梯度稀释的裂解酶 30 μL 加入到 270 μL 铜绿假单胞菌 PAK 的去除外膜细胞中, 共设 3 个平行. 在室温下, 裂解酶 Gp2 的活性通过 A_{600} 的减小速率计算, 数据用 BIO-TEK Synergy4 酶标仪测量并记录. 裂解酶活性基于酶的浓度以及裂解速率为基础, 并根据 Briers 等^[9]描述的标准化方法计算.

1.2.6 裂解酶的酶学性质分析

所有实验组均在室温条件反应 2 h, 通过 BIO-TEK Synergy4 酶标仪每 3 min 测定 1 次 A_{600} , 并按照 1.2.5 节描述的方法计算酶活力.

热稳定性: 将裂解酶分别置于 4 ~ 100 °C 的温度下, 保温 15 min. 保温过的裂解酶在室温条件下复性 20 min. 以 1.2.4 节的方法制备的铜绿假单胞菌 PAK 的去除外膜细胞至 pH 7 的 0.05 mol/L PBS 缓冲液中, 并将细胞的 A_{600} 控制在 0.6 ~ 0.8. 将不同温度保温过的裂解酶加入到细胞中, 使裂解酶的终质量浓度控制在 1 μg/mL.

最适反应 pH: 以 1.2.4 节的方法制备铜绿假单胞菌 PAK 的去除外膜细胞, 所有细胞分别重悬至 pH 4 ~ 11 的缓冲液中, 并将 A_{600} 控制在 0.6 ~ 0.8. 将裂解酶与不同 pH 的细胞悬液混合, 使裂解酶的终质量

浓度控制在 1 μg/mL, 重悬于对应 pH 缓冲液的细胞作为阴性对照.

底物专一性: 以 1.2.4 节的方法制备铜绿假单胞菌、大肠杆菌、粘质沙雷氏菌、鲍曼不动杆菌、摩氏摩根菌、弗氏柠檬酸杆菌的去除外膜细胞. 4 株革兰氏阳性菌 (金黄色葡萄球菌、枯草芽胞杆菌、蕈状芽胞杆菌、地衣芽胞杆菌) 并不需要氯仿处理, 只通过 pH 7 的 0.05 mol/L PBS 缓冲液洗涤并重悬即可. 将所有种类细胞的 A_{600} 控制在 0.6 ~ 0.8. 将纯化好的裂解酶加入到细胞中, 裂解酶的终质量浓度为 1 μg/mL.

1.2.7 裂解酶与外膜透化物联用的抗菌活性分析

将待测菌株的过夜培养物转接于新鲜的 LB 液体培养基中, 接种量为 3%. 37 °C 振荡培养至 $A_{600} = 0.6$ 时, 收集所有细胞, 用 0.05 mol/L 的 PBS (pH 7.2) 缓冲液洗涤并重悬细胞, 将菌液的 A_{600} 调整至 0.8 ~ 1.0.

将裂解酶 (终质量浓度为 25 μg/mL) 与金属离子螯合剂 (EDTA 的终浓度为 0.5 mmol/L, SDS (十二烷基硫酸钠) 和 LAB-35 (月桂酰胺丙基甜菜碱) 的终质量浓度为 4 μg/mL) 加入到 240 μL 的菌液中, 阴性对照为 PBS 缓冲液与菌液混合, 37 °C 保温 1 h 后, 将混合物进行梯度稀释, 稀释液涂布于 LB 平板上, 37 °C 倒置培养 16 h. 通过菌落计数计算保温后反应体系中的生物量. 裂解酶的抗菌活性按照式 (1) 计算. 每个实验组以及对对照组至少设置 3 个平行.

$$\text{抗菌活性} = \frac{N_0 - N_i}{N_0} \quad (1)$$

式中: N_0 代表阴性对照保温 1 h 后的生物量; N_i 表示实验组保温 1 h 后的生物量.

2 结果与分析

2.1 裂解酶 gp2 基因的生物信息学分析

裂解酶 gp2 基因全长 429 bp, 编码 142 个氨基酸, 预测的相对分子质量为 15 368. 通过 Isoelectric Point Calculator 软件计算出裂解酶 Gp2 的等电点为 9.25.

裂解酶 Gp2 编码的氨基酸序列通过在线软件 Standard Protein BLAST 和 Protein Data Bank 进行同源性比对, 确定裂解酶的保守区域. 通过比对发现裂解酶 Gp2 具有 Endolysin-autolysin 结构域 (Accession cd00737, E-value 2.27e-62). Endolysin-autolysin 结构域与糖苷水解酶 24 (glycoside hydrolase 24, GH24) 家族、λ噬菌体溶菌酶都属于溶菌酶类超级家族. 该超

级家族所有成员都能够催化肽聚糖的 N-乙酰葡萄糖胺与 N-乙酰胞壁酸之间的 β-1,4-糖苷键水解.

通过在线多重比对软件 CLUSTAL Ω 对裂解酶 Gp2 进行多重比对. 类志贺邻单胞菌噬菌体裂解酶 Gp2 与多种革兰氏阳性、阴性菌的噬菌体裂解酶有较高的同源性(图 1). 相对于革兰氏阳性菌的噬菌体裂解酶,裂解酶 Gp2 仅包含 1 个 ECD,并不包含 CBD. 因此,裂解酶 Gp2 只与革兰氏阳性菌噬菌体裂解酶的 ECD 具有同源性. 通过 Protein Data Bank 数

据库的同源比对发现该裂解酶具有 Glu-8aa-Asp/Cys-5aa-Thr 的催化活性中心^[10]. 在已经解析完全的大肠杆菌噬菌体 P21 的溶菌酶 R²¹ (Protein Data Bank ID: 3 HDE) 中,其催化活性中心位于 Glu³⁵、Asp⁴⁴、Thr⁵⁰; 在裂解酶 Gp2 的催化活性中心位于 Glu¹⁵、Cys²⁴、Thr³⁰.

为进一步了解裂解酶的催化以及抗菌活性,将裂解酶 Gp2 在大肠杆菌中进行了初步表达以及活性测定.

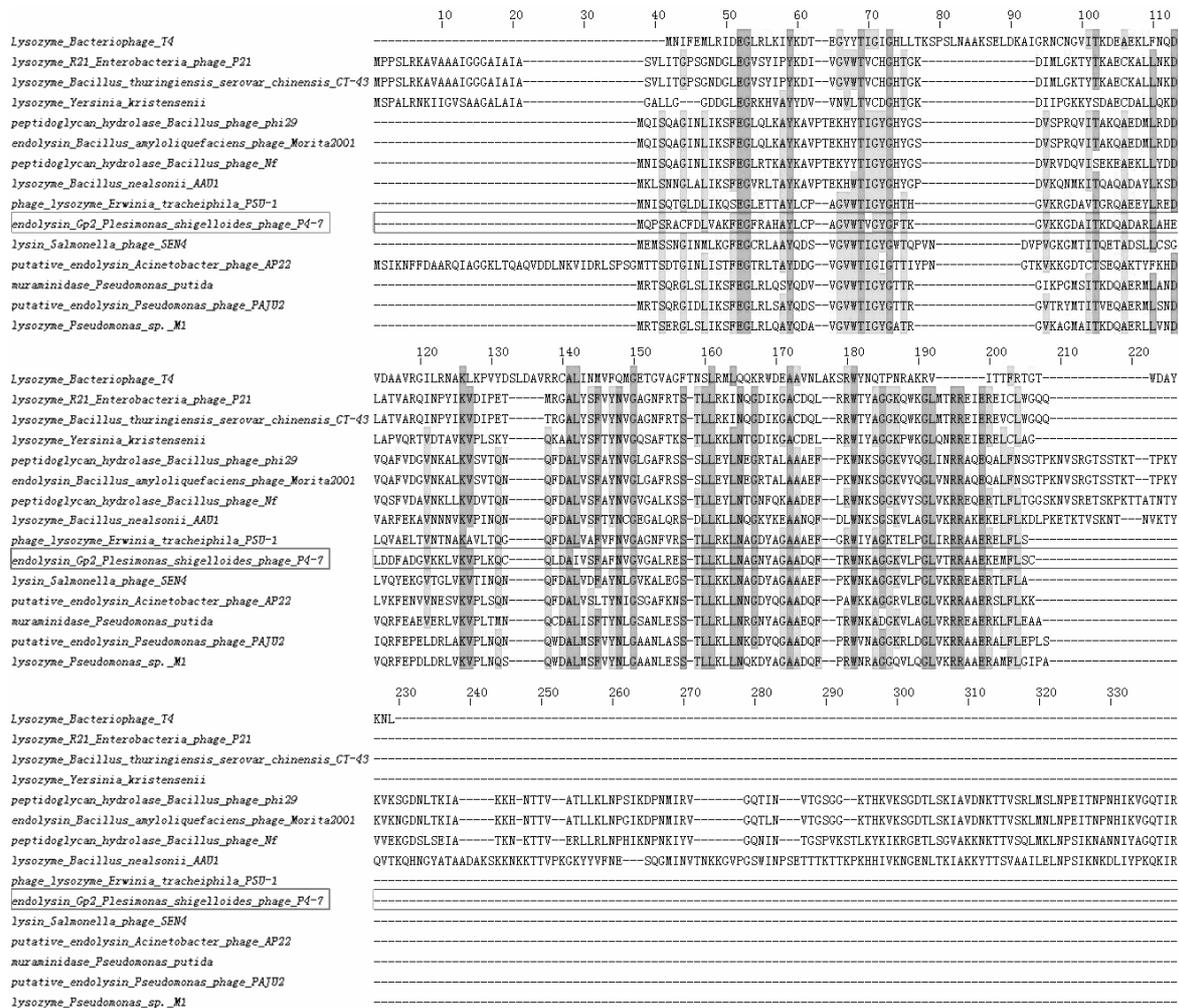


图 1 裂解酶 Gp2 的多重比对分析
Fig. 1 Multiple alignment analysis of endolysin Gp2

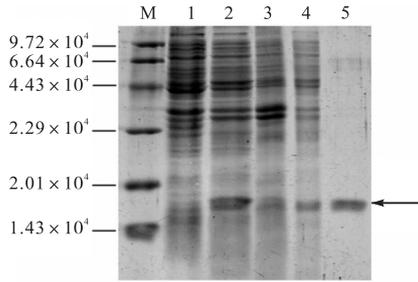
2.2 裂解酶基因 gp2 原核表达载体的构建和表达

在 37 °C 诱导重组裂解酶 Gp2 时,发现诱导后的生物量比诱导前的少 30%, 并且蛋白表达量较低,重组裂解酶蛋白 Gp2 可能对大肠杆菌表达系统有一定毒性. 上清液以及沉淀中都有相对分子质量为 1.8 × 10⁴ 的目的蛋白条带(图 2), 说明裂解酶 Gp2 为部分可溶,纯化的裂解酶蛋白的纯度能够达到 95% 以上.

2.3 重组裂解酶 Gp2 的活性分析

收集对数期中期的铜绿假单胞菌 PAK 细胞,通过氯仿处理除去细胞表面的外膜,得到去除外膜的铜绿假单胞菌细胞. 以该细胞作为反应底物,测定裂解酶 Gp2 的活性,结果如图 3 所示. 裂解酶 Gp2 可以在 1 μg/mL 的条件下高效降解去除外膜的铜绿假单胞菌 PAK 细胞,当反应进行 1 h 左右时,50% 的铜绿

假单胞菌 PAK 的去除外膜细胞被降解.



M. 蛋白 marker; 1. 未诱导; 2. IPTG 诱导; 3. 超声破碎后沉淀; 4. 超声破碎后的上清液; 5. 纯化后的 Gp2

图2 大肠杆菌表达重组裂解酶蛋白 Gp2 的 SDS-PAGE 电泳分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the recombinant endolysin protein Gp2 in *E. coli*

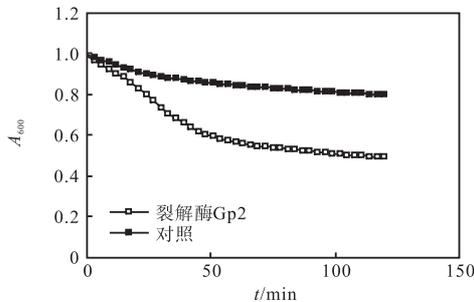


图3 裂解酶 Gp2 的活性

Fig. 3 Activity analysis of Gp2 endolysin

2.4 重组裂解酶 Gp2 的酶学性质分析

2.4.1 热稳定性

裂解酶 Gp2 的热稳定性通过各个温度条件下裂解酶剩余的酶活性来表示, 结果如图 4 所示.

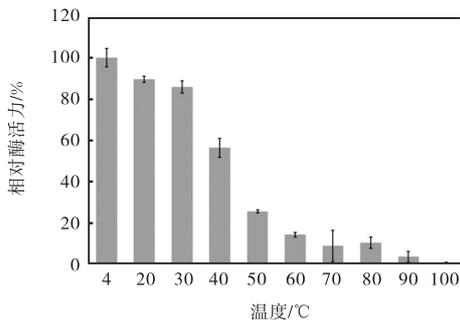


图4 裂解酶 Gp2 的热稳定性

Fig. 4 Thermal stability of endolysin Gp2

20 °C 和 30 °C 处理后, 裂解酶活性几乎没有下降, 至少能够保持 90% 左右; 40 °C 处理后, 裂解酶活性能够保持 56.4%. 随着温度的提高, 裂解酶的活性急剧下降. 在 60 °C 时, 裂解酶的活性能够保持 14.6%; 100 °C 处理后, 裂解酶的活性几乎检测不到.

2.4.2 最适反应 pH

不同反应 pH 对裂解酶 Gp2 活性的影响如图 5 所示. 在 pH = 4、5、6、7 的条件下, 裂解酶 Gp2 的酶活力基本保持在 20% ~ 30% 左右; 当 pH 提高至 8 时, 裂解酶的活性开始提高至 38.4%; 当 pH 进一步提高至 9 时, 裂解酶的活性开始提高至 100%; 当 pH 提高至 10、11 时, 裂解酶的酶活力开始下降至 84.7% 和 73.2%. 综上所述, 裂解酶 Gp2 的最佳反应 pH 为 9, 并且该酶是一种碱性肽聚糖水解酶.

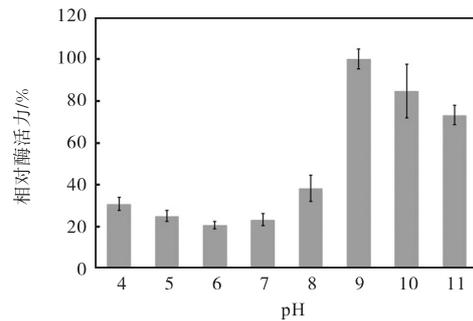


图5 不同反应 pH 对裂解酶 Gp2 活性的影响

Fig. 5 Effect of different optimal pH on endolysin Gp2

2.4.3 底物专一性

裂解酶 Gp2 对于不同微生物的裂解活性如图 6 所示.

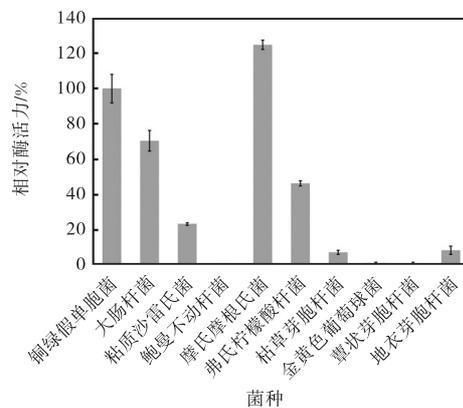


图6 裂解酶 Gp2 对于不同微生物的裂解活性

Fig. 6 Lytic activity of endolysin Gp2 for different microorganisms

除鲍曼不动杆菌以外, 裂解酶 Gp2 可明显裂解 5 株革兰氏阴性菌的去除外膜细胞; 相对于铜绿假单胞菌 (100%), 裂解酶 Gp2 裂解 4 株革兰氏阴性菌的相对活性分别为大肠杆菌 70.5%、粘质沙雷氏菌 23.4%、摩氏摩根氏菌 124.73%、弗氏柠檬酸杆菌 46.37%. 然而, 裂解酶 Gp2 不仅可以水解革兰氏阴性菌的肽聚糖, 还可以水解部分革兰氏阳性菌的肽聚

糖. 相对于铜绿假单胞菌(100%),裂解酶 Gp2 裂解金黄色葡萄球菌、枯草芽胞杆菌和地衣芽胞杆菌的活性分别为 7.4%、1.2% 和 8.6%.

2.5 裂解酶 Gp2 的协同抗菌活性

裂解酶 Gp2 与外膜透化物联用对铜绿假单胞菌和枯草芽胞杆菌的体外抗菌效果如图 7 所示.

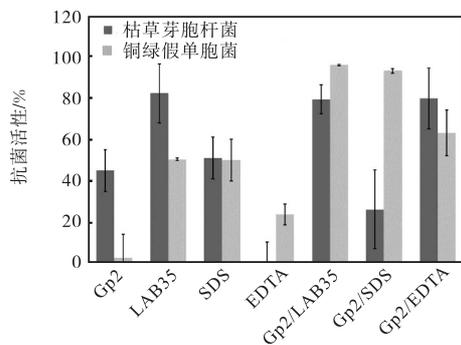


图 7 裂解酶 Gp2 与外膜透化物联用对铜绿假单胞菌和枯草芽胞杆菌的体外抗菌效果

Fig. 7 Antibacterial rate of Gp2 endolysins in vitro combined with outer membrane permeabilizers against *P. aeruginosa* and *B. subtilis*

在缺乏外膜透化物存在时,因革兰氏阴性菌外膜的存在,铜绿假单胞菌对裂解酶 Gp2 不敏感.当金属离子螯合剂(乙二胺四乙酸,EDTA)以及表面活性剂(十二烷基硫酸钠,SDS;月桂酰胺丙基甜菜碱,LAB-35)存在时,提高了裂解酶 Gp2 的抗菌活性.所以,LAB-35 与裂解酶 Gp2 联用对铜绿假单胞菌的抗菌活性最高.

当裂解酶 Gp2 单独使用时,可以一定程度地杀死枯草芽胞杆菌.当 SDS 与 LAB-35 单独存在时,对枯草芽胞杆菌具有一定的抗菌活性;裂解酶 Gp2 分别与表面活性剂 SDS、LAB-35 联用时,并没有进一步提高裂解酶对枯草芽胞杆菌的抗菌活性.当 EDTA 存在时,裂解酶 Gp2 的抗菌活性可以提高至 79.7%.所以,EDTA 与裂解酶 Gp2 连用对枯草芽胞杆菌的抗菌活性最高.

3 讨论

噬菌体编码的裂解酶能够降解细菌细胞壁上的肽聚糖,具有效率高、特异性强和作用快的特点,并且产生耐受的可能性极低,使裂解酶有望成为新型杀菌因子.本实验中,克隆、表达了类志贺邻单胞菌噬菌体裂解酶 Gp2,并且初步研究了其酶学性质以及抗菌活性.类志贺邻单胞菌噬菌体国际上报道较少,本

研究室首次采用原位分离法,从鱼类肠道中分离到一株类志贺邻单胞菌噬菌体 ΦP4-7^[11],并进行了基因组测序.从噬菌体 ΦP4-7 基因组数据中挖掘到一个编码了裂解酶基因 *gp2*.

通过多重比对发现,裂解酶 Gp2 与裂解酶 R²¹ 相比,Gp2 蛋白 N 端缺乏 SAR (signal-anchor-release) 结构域. SAR 结构域是一种亚稳定的跨膜结构域,使得表达的裂解酶 R²¹ 嵌入在磷脂双分子层上,并封闭其催化活性.当噬菌体 P21 进入裂解周期后期时,宿主菌细胞膜结构被 holin 蛋白破坏,R²¹ 蛋白从细胞膜上脱离,并且位于 N 端的多肽重新折叠,使得裂解酶活性恢复,并催化肽聚糖水解,导致细胞彻底裂解,释放子代噬菌体^[12].相对于缺乏 SAR 结构域的裂解酶 Gp2 而言,在裂解酶表达时,具有活性的蛋白很容易渗漏到周质空间并水解原核蛋白表达载体的肽聚糖层,最终导致部分细胞裂解.所以,当裂解酶 GP2 在大肠杆菌中外源表达时,*E. coli* M15/pREP4 的生物量会随着蛋白表达时间的延长而降低.

在类似的研究中发现:与 T4 裂解酶(T4 lysozyme)及其结构类似的水解酶,其最适反应 pH 一般为 6.0~6.5^[12-13],并且在较为极端 pH(9~11)的条件下,酶活力几乎检测不到;而裂解酶 Gp2 在 pH 为 4~11 的范围内,酶活性至少可保持 20% 以上,说明该酶具有较宽的工作 pH 范围,为将来噬菌体裂解酶应用创造了良好条件.

裂解酶 Gp2 的底物特异性不受种属特异性的影响,可裂解 5 株革兰氏阴性菌以及 3 株革兰氏阳性菌.裂解酶 Gp2 裂解革兰氏阳性菌的原因可能有 3 个:首先,通过结构域预测,裂解酶 Gp2 属于溶菌酶类超级家族,该家族成员都可水解肽聚糖的 N-乙酰葡萄糖胺与 N-乙酰胞壁酸之间的 β-1,4-糖苷键^[14],并且该化学键是革兰氏阴性、阳性菌都具有的化学键,所以裂解酶 Gp2 可以裂解革兰氏阳性菌.其次,通过多重比对发现,裂解酶 Gp2 与芽胞杆菌噬菌体裂解酶 ECD 以及大肠杆菌的 T4 噬菌体裂解酶都具有很高的同源性.大肠杆菌的 T4 噬菌体编码的裂解酶可以直接将革兰氏阳性菌的细胞壁水解^[15],这揭示了裂解酶 Gp2 裂解革兰氏阳性菌的原因.最后,革兰氏阴性菌的肽聚糖结构单一^[16],所以噬菌体裂解酶 Gp2 能够降解多种去除外膜的革兰氏阴性菌细胞;而革兰氏阳性菌肽聚糖的结构多样性程度高且致密^[16],所以噬菌体裂解酶 Gp2 虽可以降解革兰氏阳性菌,但活性并不是很高.

本实验表达了一个高效、工作 pH 范围广的噬菌体裂解酶,该裂解酶能够高效裂解多种革兰氏阳性和阴性细菌。而且,该裂解酶制备、纯化便捷,对环境条件的耐受能力较强。这些特性都为临床上利用裂解酶治疗多重耐药菌株感染带来了希望。

参考文献:

- [1] Coelho J M, Turton J F, Kaufmann M E, et al. Occurrence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clones at multiple hospitals in London and Southeast England[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2006, 44(10): 3623–3627.
- [2] Falagas M E, Rafailidis P I, Kofteridis D, et al. Risk factors of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infections: A matched case control study[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2007, 60(5): 1124–1130.
- [3] Hawkey P M. The growing burden of antimicrobial resistance[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2008, 62(5): 1–9.
- [4] Fischetti V A, Nelson D, Schuch R. Reinventing phage therapy: Are the parts greater than the sum?[J]. *Nature Biotechnology*, 2006, 24(12): 1508–1511.
- [5] Ackermann H W. 5500 Phages examined in the electron microscope[J]. *Archives of Virology*, 2007, 152(2): 227–243.
- [6] Fischetti V A. Bacteriophage endolysins: A novel anti-infective to control Gram-positive pathogens[J]. *International Journal of Medical Microbiology*, 2010, 300(6): 357–362.
- [7] Borysowski J, Weber-Dąbrowska B, Górski A. Bacteriophage endolysins as a novel class of antibacterial agents [J]. *Experimental Biology and Medicine*, 2006, 231(4): 366–377.
- [8] Callewaert L, Walmagh M, Michiels C W, et al. Food applications of bacterial cell wall hydrolases[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2011, 22(2): 164–171.
- [9] Briers Y, Lavigne R, Volckaert G, et al. A standardized approach for accurate quantification of murein hydrolase activity in high-throughput assays[J]. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 2007, 70(3): 531–533.
- [10] Sun Q, Kutty G F, Arockiasamy A, et al. Regulation of a muralytic enzyme by dynamic membrane topology[J]. *Nature Structural and Molecular Biology*, 2009, 16(11): 1192–1194.
- [11] He Y, Yang H. The gastrointestinal phage communities of the cultivated freshwater fishes[J]. *Fems Microbiology Letters*, 2015, 362(5): fnu027.
- [12] Lavigne R, Briers Y, Hertveldt K, et al. Identification and characterization of a highly thermostable bacteriophage lysozyme[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2004, 61(21): 2753–2759.
- [13] Hawkes R, Grutter M G, Schellman J. Thermodynamic stability and point mutations of bacteriophage T4 lysozyme[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 1984, 175(2): 195–212.
- [14] Wohlkonig A, Huet J, Looze Y, et al. Structural relationships in the lysozyme superfamily: Significant evidence for glycoside hydrolase signature motifs[J]. *Plos One*, 2010, 5(11): e15388.
- [15] Vries J, Harms K, Broer I, et al. The bacteriolytic activity in transgenic potatoes expressing a chimeric T4 lysozyme gene and the effect of T4 lysozyme on soil and phytopathogenic bacteria[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 1999, 22(2): 280–286.
- [16] Schleifer K H, Kandler O. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications[J]. *Bacteriological Reviews*, 1972, 36(4): 407–477.

责任编辑: 郎婧