

# 高效广谱猪链球菌 7 型前噬菌体裂解酶的挖掘及活性研究

黄庆庆 吉文汇 杜斌 程玉强 孙建和\*

(上海交通大学农业与生物学院 上海市兽医生物技术重点实验室 上海 200240)

**摘要:**【目的】噬菌体具有防控耐药性病原菌的抗菌应用潜力,但是有些病原菌噬菌体的获得非常困难,研究发现大多数病原菌存在前噬菌体(Prophage),且由前噬菌体编码的裂解酶(Endolysin)具有良好的抗菌应用前景,本研究将挖掘猪链球菌前噬菌体及其编码的裂解酶。【方法】通过对 GenBank 中登录的数株猪链球菌前噬菌体裂解酶的基因信息分析,挖掘出一株猪链球菌 7 型菌株前噬菌体编码的裂解酶,研究其生物学活性。以猪链球菌 7 型菌株 7917 的基因组为模板,采用 PCR 技术扩增获得裂解酶基因 *ly7917*,将其克隆至质粒 pET28a(+)并转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  细胞,挑选基因序列正确的阳性克隆、抽提质粒、转化表达菌株大肠杆菌 BL21,经 IPTG 诱导可高效表达裂解酶 Ly7917。【结果】平板裂解试验结果显示 Ly7917 具有高效裂菌活性,能够裂解猪链球菌 2 型高致病力菌株 HA9801;浊度递减试验结果显示该裂解酶能够高效裂解猪链球菌 2 型、7 型、9 型和马链球菌兽疫亚种参考株、金黄色葡萄球菌(包括耐甲氧西林金黄色葡萄球菌)等多种革兰氏阳性菌。【结论】基于前噬菌体挖掘的裂解酶 Ly7917,具有高效广谱裂菌活性,为临床上利用裂解酶治疗耐药菌的混合感染提供了可能。

**关键词:** 前噬菌体, 裂解酶, 裂菌活性, 猪链球菌, 金黄色葡萄球菌

## Mining and evaluating the high-effectiveness and broad-spectrum endolysin encoded by prophage harbored in *Streptococcus suis* serotype 7

HUANG Qing-Qing JI Wen-Hui DU Bin CHENG Yu-Qiang SUN Jian-He\*

(Shanghai Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

**Abstract: [Objective]** In recent years, there has been an increasing worldwide prevalence of bacterial resistance to a wide range of antibiotics, resulting in a focus of research interest in bacteriophage. Unfortunately, *Streptococcus suis* (SS) bacteriophage is not easy to isolate, and the endolysin encoded

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31172381, 31372500); 国家公益性行业(农业)科研专项项目(No. 201303041); 上海市基础研究重点项目(No. 12JC1404700)

\*通讯作者: ☉: sunjhe@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2014-09-10; 接受日期: 2014-11-17; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-11-17

by phage has been examined as a potential agent for SS control. **[Methods]** In this study, based on the analysis of genomic information of several *Streptococcus suis* deposited in GenBank, we mined and analyzed one endolysin named Ly7917 encoded by a prophage harbored in *Streptococcus suis* serotype 7 (SS7) genome. The *ly7917* gene was amplified by PCR using bacterial genome purified from a SS7 strain 7917 as template and then inserted into the pET28a(+) plasmid. The recombinant plasmid pET28a(+)-*ly7917* was transformed into *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , the sequencing of positive colony showed 100% homology with the target gene. The recombinant plasmid was then transformed into *E. coli* BL21 and induced with IPTG for expression. **[Results]** The result of plate analysis showed that Ly7917 has highly activity and can lysis *Streptococcus suis* serotype 2 strain HA9801. In addition, bacterial turbidity test showed that *Streptococcus suis* serotype 7, serotype 9, most of serotype 2 strains, *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* strain, *Staphylococcus aureus* (including Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) were highly sensitive to Ly7917. **[Conclusion]** Effective and broad-spectrum characteristics of Ly7917 mined from prophage brings hope for mixed infection in clinical as an effective therapeutic.

**Keywords:** Prophage, Endolysin, Bacterial lysis, *Streptococcus suis*, *Staphylococcus aureus*

猪链球菌是一种人畜共患病原菌,可引起脑膜炎、败血症、关节炎、心内膜炎等疾病,严重的可致人死亡<sup>[1]</sup>。现已发现该菌荚膜抗原血清型有 35 种以上,大多数致病性血清型为 1-9 型和 14 型<sup>[2]</sup>,2 型为世界范围内流行的一个主要血清型,除 2 型菌株外,7 型菌株也是经常分离到的血清型之一。随着 7 型菌株的频繁发现<sup>[3-4]</sup>,对其防控研究也就显得非常必要。金黄色葡萄球菌也是一种人畜共患病原菌,多重耐药性及耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)呈全球性扩散、传播,严重威胁着人类健康。目前,临床上主要采用抗生素治疗细菌感染,但由于抗生素滥用等原因,近年来细菌耐药加剧。应用抗生素治疗耐药细菌感染已面临巨大挑战,研发高效、广谱抗菌药物具有理论和现实意义。

研究发现,噬菌体编码的裂解酶是治疗细菌感染的一种新型、具有潜力的抗菌物质。裂解酶是噬菌体感染细菌后期<sup>[5-6]</sup>合成的肽聚糖水解酶,通过降解宿主菌细胞壁,释放子代噬菌体,达到裂解宿主菌的目的。裂解酶具有较高的特异性,仅攻击特定细菌,并不影响人体正常菌群和细胞。因此,裂解酶作为潜在的抗感染药物具有重要的研究价值<sup>[7]</sup>。

目前国内外报道的大多数裂解酶均来源于裂解性噬菌体,其裂菌谱相对较窄<sup>[8-9]</sup>,而且较多病原

菌较难获得裂解性噬菌体,从而给裂解酶的研发带来一定的难度。研究发现大多数细菌的基因组中存在前噬菌体(Prophage)序列,且其中一般含有编码裂解酶的基因,这给研发裂解酶提供了新的策略和途径。尽管如此,由于不同结构组成的裂解酶其裂菌效率和裂菌谱差异很大,因此挖掘高效、广谱的裂解酶基因非常重要。研究发现具有酰胺酶催化域的裂解酶一般活性较高<sup>[10-12]</sup>,同时,具有 SH3b 结合域的裂解酶呈现相对较宽的裂解谱,甚至可以裂解不同种的细菌<sup>[13]</sup>。据此,本文基于 GenBank 中猪链球菌前噬菌体基因信息,通过挖掘、筛选,发现了一猪链球菌 7 型菌株编码的高效、广谱裂解酶 Ly7917<sup>[14]</sup>,Ly7917 的发现为临床上治疗多种革兰阳性菌的混合感染带来了希望。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

菌株与质粒:质粒 pET28a(+)由本实验室保存;猪链球菌 2 型菌株 *Streptococcus suis* 2-1 (即 SS2-1)、05-465、19-2(A)、5-2、ZY05719、HA9801、HA9802、HA05729-1、29、*S. suis* 2-H (即 SS2-H)、11-1、*S. suis* 2-4 (即 SS2-4)、006731,7 型菌株 *S. suis* 7 (即 SS7),9 型菌株 *S. suis* 9 (即 SS9),马链球菌兽疫亚种参考株 ATCC35246,沙门氏菌,枯草芽孢杆菌和大肠杆

菌由本实验室保存。耐甲氧西林金黄色葡萄球菌菌株 PNB49、DL44-2、SD2-17-1、DL57-3、DZ92、PNB5、PNB25、PN31、DL56-1 由上海兽医研究所提供。金黄色葡萄球菌菌株 ATCC25913 和 05P361、05Q132、05-L189、K185、B52 分别由上海市动物疫病预防控制中心和上海交通大学农业与生物学院食品科学实验室提供。猪链球菌 7 型菌株 7917 基因组 DNA 由南京农业大学惠赠。

主要的酶和试剂: 2×*Taq* Master mix 购于上海翊圣生物科技有限公司; *FastPfu* DNA Polymerase 购于北京全式金生物技术有限公司; 限制性核酸内切酶 *FastDigest EcoR* I、*FastDigest Hind* III 和 *Rapid DNA Ligation Kit* 购于 Thermo 公司; 质粒提取试剂盒和胶回收试剂盒购于 TIANGEN 公司。

## 1.2 裂解酶基因的挖掘

挖掘并筛选 GenBank 上登录的猪链球菌前噬菌体的裂解酶基因, 并在 [smart.embl-heidelberg.de/](http://smart.embl-heidelberg.de/) 网站上进行功能域的预测, 从而挖掘出潜在的高效广谱的裂解酶基因并进行深入研究。

## 1.3 裂解菌的培养

猪链球菌和沙门氏菌的培养: 菌液按 1% 转接于含 2% 胎牛血清的 THB 培养基中, 37 °C、150 r/min 培养 6–8 h 至菌液生长到  $OD_{600}$  达到 0.8–1.0。

金黄色葡萄球菌的培养: 菌液按 1% 转接于 BHI 培养基中, 37 °C、150 r/min 培养 2–4 h 至菌液生长到  $OD_{600}$  达到 0.8–1.0。

枯草芽孢杆菌和大肠杆菌的培养: 菌液按 1% 转接于 LB 培养基中, 37 °C、150 r/min 培养 2–4 h 至菌液生长到  $OD_{600}$  达到 0.8–1.0。

## 1.4 裂解酶基因的克隆

参照 GenBank 中猪链球菌 7917 菌株的基因组 DNA 序列(GenBank 登录号为 KC348601.1), 设计两条引物 F 和 R, 并在两条引物的 5'端分别插入限制性核酸内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切位点, 引物序列如下: F: 5'-ACCGAATTCATGACAACAGTAAATGAAGCA-3'; R: 5'-ACGAAGCTTTTATTAAAGTACCCCAGGC-3'。

PCR 反应体系: 引物 F (10 μmol/L) 2 μL, 引物 R (10 μmol/L) 2 μL, 猪链球菌 7917 菌株的基因组 DNA 1 μL, 5×*FastPfu* buffer 10 μL, 2.5 mmol/L dNTPs 5 μL, DNA Polymerase 1 μL, 去离子水 29 μL。PCR 反应条件: 95 °C 2 min; 95 °C 20 s, 60 °C 20 s, 72 °C 15 s, 30 个循环; 72 °C 5 min。反应结束后, 取 5 μL 产物采用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 并用胶回收试剂盒回收 PCR 产物。

## 1.5 重组表达质粒 pET28a(+)-Ly7917 的构建

采用常规方法构建重组表达质粒。双酶切体系: *FastDigest EcoR* I 1 μL、*FastDigest Hind* III 1 μL、10×*FastDigest green buffer* 3 μL、DNA or pET28a(+) 10 μL、去离子水 15 μL。37 °C 酶切 30 min。采用胶回收试剂盒回收产物, 保存在 -20 °C。连接体系: *Rapid ligation buffer* 2 μL、DNA 5 μL、pET28a(+) 1 μL、T4 DNA Ligase 1 μL、去离子水 1 μL, 22 °C 连接 30 min。反应结束后将连接产物转化至 *Escherichia coli* DH5α 感受态细胞、涂板、挑单克隆, 采用 PCR 和双酶切的方法鉴定 pET28a(+)-ly7917 重组阳性克隆, 并将筛选到的阳性克隆送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。将所测的序列用 DNAMAN 比对分析, 挑选与目的基因比对相似性达到 100% 的单克隆抽提质粒, 转化 *Escherichia coli* BL21 并保菌。

## 1.6 Ly7917 融合蛋白的表达

将冻存的菌种 pET28a(+)-ly7917-BL21 按 1:100 转接至卡那霉素抗性的 LB 液体培养基中, 37 °C、150 r/min 培养 12–14 h, 复苏菌种, 将复苏的菌种按 1:100 转接至 1 L 卡那霉素抗性的 LB 液体培养基中, 相同条件下培养 3–4 h 至菌液生长到  $OD_{600}$  达到 0.6, 加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 27 °C 诱导 4–6 h, 取 5 mL 菌液样品进行 SDS-PAGE 电泳检测。剩余菌液用 25 mL PBS 重悬后, 超声波破碎, 取上清获得 Ly7917 蛋白粗提液, 保存于 4 °C, 用于活性检测, 部分粗提液经 Ni 柱纯化后获得纯化蛋白, 用于活性单位和裂菌谱的测定。

## 1.7 融合蛋白的活性检测

采用平板裂解实验检测融合蛋白的活性。将 50 mL 培养至  $OD_{600}$  为 1.0 的猪链球菌 2 型菌株 HA9801 用 1 mL PBS 重悬后与 10 mL 0.7% 的 THB 上层琼脂混匀, 倒平板, 打孔, 共打 4 个孔, 编号为 A、B、C、D。A 孔加入 100  $\mu$ L Ly7917 蛋白粗提液, B、C、D 孔为对照, 每孔分别加入等量的青霉素、空载体粗提液和 PBS。37  $^{\circ}$ C 孵育至少 24 h 后, 观察有无裂菌圈。

## 1.8 裂菌活性单位的测定

采用浊度递减实验测定裂解酶 Ly7917 的活性单位。将培养到  $OD_{600}$  达到 1.0 的 HA9801 重悬至  $OD_{650}$  为 0.6<sup>[8]</sup> 制成细菌悬液, 将细菌悬液加入 96 孔板中, 每孔加 100  $\mu$ L, 随后每孔细菌悬液中加 100  $\mu$ L 倍比稀释的起始浓度为 3.27 g/L 的 Ly7917, 每组设置 3 个重复, 37  $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 测定细菌浊度下降百分数, 能够使细菌浊度下降 50% 的酶抗生菌的最高稀释度的倒数定义为该蛋白制剂的一个活性单位(Unit/mL)<sup>[8]</sup>。对照组每孔加入等量的 PBS 和 120 mmol/L 咪唑。

## 1.9 裂菌谱的测定

采用浊度递减实验检测 Ly7917 对不同菌株的裂解效率。链球菌 2 型菌株 *S. suis* 2-1 (即 SS2-1)、05-465、19-2(A)、5-2、ZY05719、HA9801、HA9802、HA05729-1、29、*S. suis* 2-H (即 SS2-H)、11-1、*S. suis* 2-4 (即 SS2-4)、00673, 7 型菌株 *S. suis* 7 (即 SS7), 9 型菌株 *S. suis* 9 (即 SS9), 马链球菌兽疫亚种参考株 ATCC35246, 沙门氏菌、枯草芽孢杆菌, 大肠杆菌和金黄色葡萄球菌菌株(PNB49、DL44-2、SD2-17-1、DL57-3、DZ92、PNB5、PNB25、PN31、DL56-1、05P361、05Q132、ATCC25913、05-L189、K185、B52)按 1.7 的方法培养和处理后分别加入 96 孔板, 然后每孔加入 100  $\mu$ L Ly7917 至终浓度为 1.635 g/L, 每组设置 3 个重复, 37  $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 计算细菌浊度下降百分数, 测定裂解酶 Ly7917 对不同菌株的裂解效率。

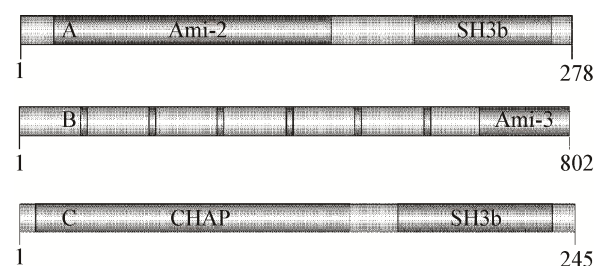


图 1 猪链球菌噬菌体裂解酶功能域预测

Figure 1 Functional domains prediction of *Streptococcus suis* phage lysins

## 2 结果与分析

### 2.1 裂解酶基因的挖掘

通过对国内外已发表的噬菌体编码裂解酶的结构和组成分析发现, 具有酰胺酶催化域的裂解酶一般活性较高<sup>[10-12]</sup>, 具有 SH3b 结合域的裂解酶呈现相对较宽的裂解谱<sup>[13]</sup>。据此, 从 GenBank 中筛选出具有代表性的猪链球菌前噬菌体裂解酶 A、B 和 C (图 1), 其中, 裂解酶 A<sup>[14]</sup> (GenBank 序列号: KC348600) 共有 278 个氨基酸残基, 功能域由两部分组成, 其中结合域为 SH3b; 裂解酶 B<sup>[15]</sup> (GenBank 序列号: EF563971) 共有 802 个氨基酸残基, 功能域由 7 部分组成, 结构比较复杂, 蛋白分子量较大; 裂解酶 C<sup>[14]</sup> (GenBank 序列号: KC348601.1) 即为 Ly7917, 由 246 个氨基酸残基组成, 功能域由两部分组成, 8-146 为 CHAP 催化域和 167-235 为 SH3b 结合域分子量为 27 kD。通过比较、分析和预试验, 最终筛选出 Ly7917 作为目标裂解酶, 并进行深入研究。

### 2.2 Ly7917 基因的克隆与序列分析

以猪链球菌 7 型菌株 7917 基因组为模板, 用引物 F、R 扩增 *ly7917* 基因, 电泳结果显示扩增出了一条大小约 750 bp 的产物, 与目的基因大小一致。

### 2.3 重组质粒 pET28a(+)-*ly7917* 的双酶切鉴定

从 *E. coli* DH5 $\alpha$  中抽提质粒 pET28a(+)-*ly7917*, 用 *Eco*R I 和 *Hind* III 进行双酶切鉴定, 结果显示大约在 750 bp 处有一条带, 大小与目的基因相符, 另一条带为载体(图 2)。

## 2.4 Ly7917 融合蛋白的诱导表达

取表达菌培养至  $OD_{600}$  达到 0.6 时加入诱导剂 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 27 °C 诱导 4–6 h, 进行 SDS-PAGE 电泳检测融合蛋白表达情况。结果显示, 诱导组在 30 kD 处有一条明显的蛋白条带, 未加诱导剂组和空载体组均未出现条带(图 3)。蛋白粗提液经 Ni 柱纯化后浓度约为 3.27 g/L, 1 L 表达菌可获得纯化蛋白 32.7 mg。

## 2.5 融合蛋白的活性检测

以猪链球菌 2 型高致病力菌株 HA9801 为裂解菌, 采用平板裂解实验检测 Ly7917 粗提液能否裂解 HA9801, 以青霉素作为对照。A 孔加入 100  $\mu$ L Ly7917 粗提液, B 孔加入等量的青霉素, C 孔和 D 孔分别加入空载体粗提液和 PBS。结果显示 A 孔能够形成透亮的裂菌圈, B 孔可以形成模糊可见的抑菌圈, C、D 均不能形成裂菌圈(图 4)。Ly7917 粗提液有活性, 能够裂解猪链球菌 2 型菌株 HA9801。

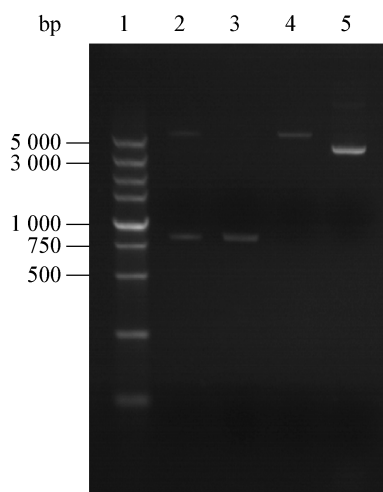


图 2 pET28a(+)-ly7917 重组质粒的双酶切图谱

Figure 2 pET28a(+)-ly7917 digested with *EcoR* I and *Hind* III

注: 1: DM5000 核酸 Marker; 2: *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切的 pET28a(+)-ly7917; 3: *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切的 ly7917; 4: *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切的 pET28a(+); 5: pET28a(+).

Note: 1: DM5000 DNA marker; 2: pET28a(+)-ly7917 digested with *EcoR* I and *Hind* III; 3: ly7917 digested with *EcoR* I and *Hind* III; 4: pET28a(+) digested with *EcoR* I and *Hind* III; 5: pET28a(+).

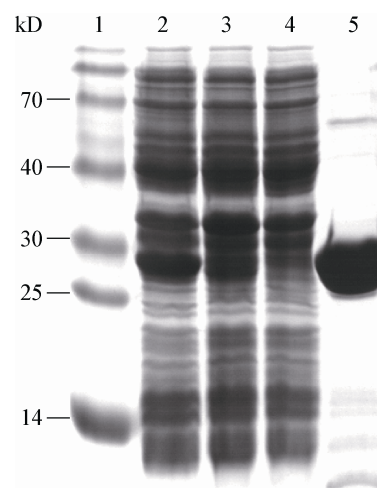


图 3 大肠杆菌重组表达 Ly7917 蛋白的 SDS-PAGE 分析  
Figure 3 SDS-PAGE analysis of *E. coli* expressed fusion protein Ly7917

注: 1: Blue Plus II protein marker; 2: IPTG 诱导组; 3: 未诱导组; 4: 诱导的 pET28a(+)空载体组; 5: 纯化后的 Ly7917.

Note: 1: Blue Plus II protein marker; 2: Induced with IPTG; 3: Uninduced with IPTG; 4: Empty vector pET28a(+) induced with IPTG; 5: Purified Ly7917.

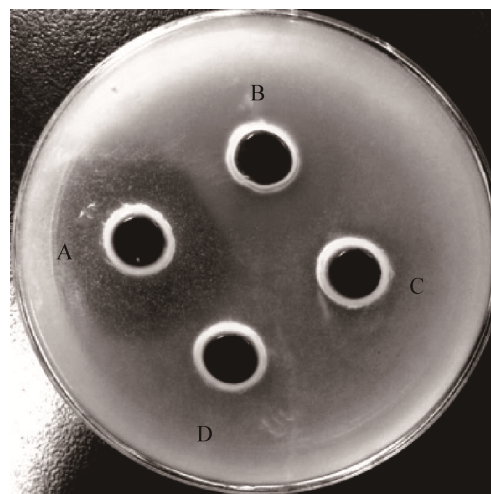


图 4 平板裂解实验检测 Ly7917 粗提液的裂解活性

Figure 4 Plate lysis assay for detecting lysis activity of crude Ly7917

注: A: 加入 100  $\mu$ L Ly7917 粗提液; B: 加入 100  $\mu$ L 青霉素; C: 加入 100  $\mu$ L 空载体粗提液; D: 加入 100  $\mu$ L PBS.

Note: A: Added 100  $\mu$ L crude Ly7917; B: Added 100  $\mu$ L penicillin; C: Added 100  $\mu$ L crude empty vector; D: Added 100  $\mu$ L PBS.



2.6 Ly7917 活性单位的测定

以 HA9801 为裂解菌, 采用浊度递减实验测定纯化蛋白 Ly7917 的活性单位。37 °C 孵育 30 min, 测定细菌浊度下降百分数, 能够使细菌浊度下降 50% 的蛋白制剂最高稀释度的倒数定义为该蛋白制剂的一个活性单位(Unit/mL)<sup>[8]</sup>。结果显示: 在 37 °C 条件下, 当原浓度为 3.27 g/L 的 Ly7917 稀释倍数为 1:2<sup>11</sup> 时, 37 °C 孵育 30 min 后能够使 HA9801 的浊度下降 50% (图 5)。因此, Ly7917 的活性为 2 048 Unit/mL, 626 Unit/mg, 每个活性单位所含的 Ly7917 重组蛋白的量为 1.60 μg。

2.7 裂菌谱

采用浊度递减实验测定 Ly7917 对猪链球菌 2

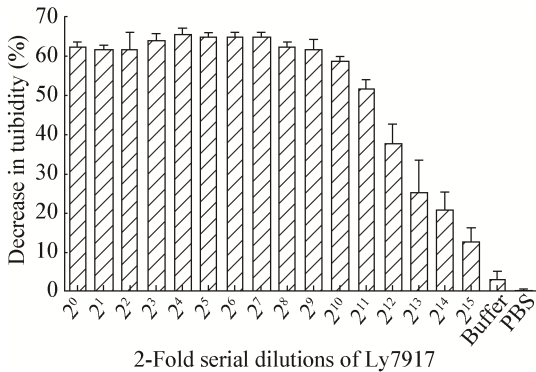


图 5 以 HA9801 为裂解菌 Ly7917 活性单位的测定  
Figure 5 Lysin activity of Ly7917 to HA9801

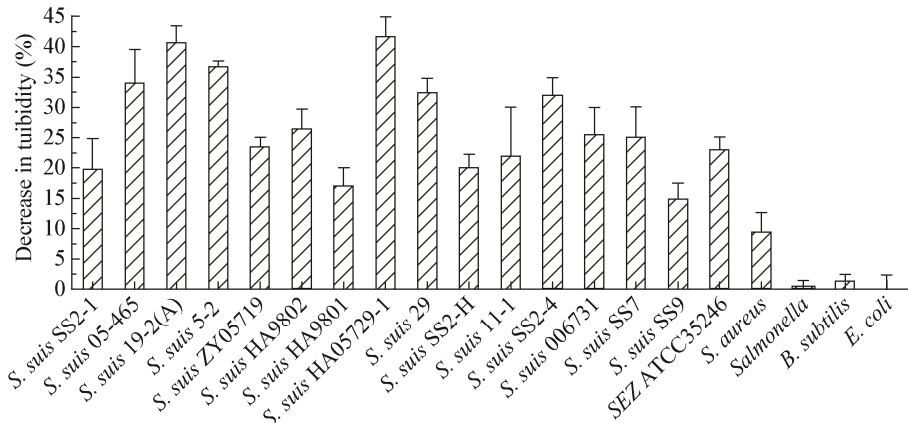


图 6 Ly7917 对不同菌株的裂解效率  
Figure 6 Range of activity of Ly7917 towards tested bacteria

型、7 型、9 型、马链球菌兽疫亚种参考株 ATCC35246、大肠杆菌、沙门氏菌、枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌的裂解效率。试验结果表明 Ly7917 对猪链球菌 2 型、7 型、9 型、马链球菌兽疫亚种参考株 ATCC35246 和金黄色葡萄球菌都具有裂解作用, 而且对大多数猪链球菌 2 型菌株较敏感, 裂解活性较高(图 6)。

3 讨论

噬菌体是一种感染原核细胞的病毒, 依据侵染细菌机制的不同, 可将噬菌体分为裂解性噬菌体和溶源性噬菌体。裂解性噬菌体通过吸附、侵入、增殖、组装和释放 5 个阶段杀死病原菌。溶源性噬菌体侵染宿主后, 将其基因组整合至宿主基因组上, 并随宿主基因组的复制而复制, 成为前噬菌体, 其在特定的条件下(如丝裂霉素 C 诱导等), 噬菌体 DNA 可与宿主菌 DNA 分离, 进入裂解循环, 裂解宿主菌。猪链球菌裂解性噬菌体分离比较困难, SMP 是目前国内分离到的唯一一种猪链球菌裂解性噬菌体<sup>[16]</sup>, 因此试图应用裂解性噬菌体防控耐药性猪链球菌存在难度。裂解酶是噬菌体感染细菌后期<sup>[5-6]</sup>合成的肽聚糖水解酶, 具有裂菌作用。相对于噬菌体而言裂解酶的裂菌谱更广, 例如 SMP 仅能够裂解 2 株猪链球菌 2 型株, 而其编码的裂解酶 LySMP 能够裂解 15 株猪链球菌 2 型菌株;

除此之外, LySMP 对猪链球菌 7 型和 9 型也具有裂解作用<sup>[7]</sup>, 提示噬菌体裂解酶具有广阔的开发应用前景。

目前国内外报道的大多数裂解酶均来源于裂解性噬菌体, 其裂菌谱相对较窄<sup>[8-9]</sup>, 而且较多病原菌较难获得裂解性噬菌体, 从而给裂解酶的研发带来一定的难度。研究发现大多数细菌的基因组中均存在前噬菌体(Prophage)序列, 且在其中一般含有编码裂解酶的基因, 这给研发裂解酶提供了新的策略和途径。因此, 本文基于 GenBank 中猪链球菌前噬菌体基因信息, 从一猪链球菌 7 型菌株中成功挖掘、筛选出一高效、广谱的裂解酶 Ly7917<sup>[14]</sup>。显然, 基于细菌基因组挖掘前噬菌体裂解酶技术的建立, 为临床上治疗多种革兰氏阳性菌的混合感染提供了可能。

Ly7917 的高效、广谱的裂菌特性归功于其功能域的组成: 它同时具备 CHAP 酰胺酶催化域和 SH3b 结合域。大多数噬菌体裂解酶具有“双结构域结构”的特点: 氨基端结构域具有催化活性, 能够特异性的切断肽聚糖中的化学键, 羧基端结构域可以与宿主菌细胞壁上的特异性底物结合<sup>[17-18]</sup>。裂解酶在裂解细菌时催化域主要作用于肽聚糖上的糖苷键和肽键, CHAP 催化域作用位点为肽侧链和交联桥之间的氨基或肽键连接, 肽聚糖酰胺连接在细菌种间往往是保守的<sup>[19]</sup>, 因此相应的裂解酶具有高效、广谱的裂菌特性, 如国外发现的裂解酶 PlySs2 对化脓性链球菌、MRSA、VISA 等多种革兰氏阳性致病菌都具有裂解作用<sup>[20]</sup>。

Ly7917 是继 PlySs2<sup>[20]</sup>之后, 国内首次筛选到的一株广谱高效的猪链球菌噬菌体裂解酶, Ly7917 对链球菌、葡萄球菌等革兰氏阳性菌的许多菌株都具有高效裂解活性。相比国内外报道的一些噬菌体裂解酶裂菌谱窄的缺点而言, 该裂解酶在裂菌谱上有了新的拓展。到目前为止, 国内外均没有关于用噬菌体裂解酶治疗体内多种细菌引起的混合感染的相关报道, 鉴于 Ly7917 在裂菌谱和杀菌效率上的大幅提升, 其将在临床抗菌治疗上具有重要的潜在

应用价值。

在治疗细菌感染时, 裂解酶比抗生素具有更好的特异性, 抗生素在抑制病原菌的同时也抑制了肠道菌群的正常繁殖, 并引起不良后遗症, 如腹泻和难辨梭状芽孢杆菌并发症等。相比之下, 裂解酶可特异性地杀死特定病原体, 而不影响其他正常菌群<sup>[6]</sup>, 但不足的是裂解酶的特异性限制了其在治疗混合感染时的应用。Ly7917 高效、广谱的裂菌特性为临床上关于用一种裂解酶治疗多种革兰氏阳性菌引起的混合感染的研究提供了强有力的素材。

最新研究表明, 流感大流行时化脓链球菌、肺炎球菌和耐甲氧西林金黄色葡萄球菌引起的二次感染死亡率达到 90%以上<sup>[21-24]</sup>。莫匹罗星和多链丝霉素是目前仅有的能够治疗黏膜上病原菌定殖的两种抗生素, 但是由于抗生素的滥用, 金黄色葡萄球菌对这两种抗生素均产生了耐药性<sup>[25]</sup>。虽然有些噬菌体裂解酶能够特异性地裂解肺炎球菌、链球菌或者金黄色葡萄球菌, 可为临床上利用噬菌体裂解酶治疗口腔和鼻黏膜上病原菌的定殖带来新的希望<sup>[8-9, 11, 26-28]</sup>, 但美中不足的是, 需要多种裂解酶混合用药才能够治疗多种病原菌的感染。而 Ly7917 对链球菌和葡萄球菌等多种菌株都具有裂解活性, 因此, 未来在流感大流行时也许可以尝试采用裂解酶作用于易感人群, 抑制致病性链球菌和葡萄球菌的增殖, 有效地减少这些细菌的继发感染<sup>[29]</sup>。

总之, 我们发现了一个高效、广谱的噬菌体裂解酶, 该裂解酶能够高效裂解猪链球菌 2 型、7 型、9 型、马链球菌兽疫亚种参考株、金黄色葡萄球菌(包括耐甲氧西林金黄色葡萄球菌)等多种革兰氏阳性病原菌。而且, 该裂解酶制备、纯化便捷、产量高、对环境条件的耐受能力强(将另文发表)。这些特性都为临床上利用裂解酶治疗混合感染带来了希望。

## 参考文献

- [1] Gottschalk M, Segura M. The pathogenesis of the meningitis caused by *Streptococcus suis*: the unresolved questions[J]. Veterinary Microbiology, 2000, 76(3): 259-272

- [2] Gottschalk M, Segura M, Xu J. *Streptococcus suis* infections in humans: the Chinese experience and the situation in North America[J]. Animal Health Research Reviews/Conference of Research Workers in Animal Diseases, 2007, 8(1): 29-45
- [3] MacLennan M, Foster G, Dick K, et al. *Streptococcus suis* serotypes 7, 8 and 14 from diseased pigs in Scotland[J]. The Veterinary Record, 1996, 139(17): 423-424
- [4] Aarestrup FM, Jorsal SE, Jensen NE. Serological characterization and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolates from diagnostic samples in Denmark during 1995 and 1996[J]. Veterinary Microbiology, 1998, 60(1): 59-66
- [5] O'Flaherty S, Ross RP, Coffey A. Bacteriophage and their lysins for elimination of infectious bacteria[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2009, 33(4): 801-819
- [6] Fischetti VA. Bacteriophage lysins as effective antibacterials[J]. Current Opinion in Microbiology, 2008, 11(5): 393-400
- [7] Wang Y, Sun JH, Lu CP. Purified recombinant phage lysin LySMP: an extensive spectrum of lytic activity for swine *Streptococci*[J]. Current Microbiology, 2009, 58(6): 609-615
- [8] Nelson D, Loomis L, Fischetti VA. Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A *Streptococci* by using a bacteriophage lytic enzyme[J]. Proceedings of National Academy of Science of the United States of America, 2001, 98(7): 4107-4112
- [9] Loeffler JM, Nelson D, Fischetti VA. Rapid killing of *Streptococcus pneumoniae* with a bacteriophage cell wall hydrolase[J]. Science, 2001, 294(5549): 2170-2172
- [10] Idelevich EA, von Eiff C, Friedrich AW, et al. *In vitro* activity against *Staphylococcus aureus* of a novel antimicrobial agent, PRF-119, a recombinant chimeric bacteriophage endolysin[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2011, 55(9): 4416-4419
- [11] Daniel A, Euler C, Collin M, et al. Synergism between a novel chimeric lysin and oxacillin protects against infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2010, 54(4): 1603-1612
- [12] Schmelcher M, Powell AM, Becker SC, et al. Chimeric phage lysins act synergistically with lysostaphin to kill mastitis-causing *Staphylococcus aureus* in murine mammary glands[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(7): 2297-2305
- [13] Becker SC, Foster-Frey J, Stodola AJ, et al. Differentially conserved *Staphylococcal* SH3b\_5 cell wall binding domains confer increased staphylolytic and streptolytic activity to a *Streptococcal* prophage endolysin domain[J]. Gene, 2009, 443(1/2): 32-41
- [14] Tang F, Bossers A, Harders F, et al. Comparative genomic analysis of twelve *Streptococcus suis* (pro)phages[J]. Genomics, 2013, 101(6): 336-344
- [15] Ju CX, Gu HW, Lu CP. Characterization and functional analysis of atl, a novel gene encoding autolysin in *Streptococcus suis*[J]. Journal of Bacteriology, 2012, 194(6): 1464-1473
- [16] Ma YL, Lu CP. Isolation and identification of a bacteriophage capable of infecting *Streptococcus suis* type 2 strains[J]. Veterinary Microbiology, 2008, 132(3/4): 340-347
- [17] Diaz E, Lopez R, Garcia JL. Chimeric phage-bacterial enzymes: a clue to the modular evolution of genes[J]. Proceedings of National Academy of Science of the United States of America, 1990, 87(20): 8125-8129
- [18] Garcia P, Garcia JL, Garcia E, et al. Modular organization of the lytic enzymes of *Streptococcus pneumoniae* and its bacteriophages[J]. Gene, 1990, 86(1): 81-88
- [19] Vollmer W, Blanot D, de Pedro MA. Peptidoglycan structure and architecture[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2008, 32(2): 149-167
- [20] Gilmer DB, Schmitz JE, Euler CW, et al. Novel bacteriophage lysin with broad lytic activity protects against mixed infection by *Streptococcus pyogenes* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2013, 57(6): 2743-2750
- [21] Morens DM, Taubenberger JK, Fauci AS. The persistent legacy of the 1918 influenza virus[J]. The New England Journal of Medicine, 2009, 361(3): 225-229
- [22] Brundage JF, Shanks GD. What really happened during the 1918 influenza pandemic? The importance of bacterial secondary infections[J]. The Journal of Infectious Diseases, 2007, 196(11): 2
- [23] Brundage JF, Shanks GD. Deaths from bacterial pneumonia during 1918-19 influenza pandemic[J]. Emerging Infectious Diseases, 2008, 14(8): 1193-1199
- [24] Hussell T, Wissinger E, Goulding J. Bacterial complications during pandemic influenza infection[J]. Future Microbiology, 2009, 4(3): 269-272
- [25] Hudson IR. The efficacy of intranasal mupirocin in the prevention of *Staphylococcal* infections: a review of recent experience[J]. The Journal of Hospital Infection, 1994, 27(2): 81-98
- [26] Cheng Q, Nelson D, Zhu S, et al. Removal of group B *Streptococci* colonizing the vagina and oropharynx of mice with a bacteriophage lytic enzyme[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2005, 49(1): 111-117
- [27] Rashel M, Uchiyama J, Ujihara T, et al. Efficient elimination of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* by cloned lysin derived from bacteriophage phi MR11[J]. The Journal of Infectious Diseases, 2007, 196(8): 1237-1247
- [28] Schuch R, Nelson D, Fischetti VA. A bacteriolytic agent that detects and kills *Bacillus anthracis*[J]. Nature, 2002, 418(6900): 884-889
- [29] McCullers JA, Karlstrom A, Iverson AR, et al. Novel strategy to prevent otitis media caused by colonizing *Streptococcus pneumoniae*[J]. PLoS Pathogens, 2007, 3(3): e28