

## 猪链球菌 7 型噬菌体裂解酶 Ly7917 催化域的裂菌活性

吉文汇<sup>1</sup> 孙亮<sup>2</sup> 黄庆庆<sup>1</sup> 王恒安<sup>1</sup> 严亚贤<sup>1</sup> 孙建和<sup>1\*</sup>

(1. 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)

(2. 甘肃农业大学动物医学院 甘肃 兰州 730070)

**摘要:**【目的】揭示链球菌噬菌体裂解酶 Ly7917 催化域 CHAP 的核心功能域, 为进一步改造裂解酶提供理论依据。【方法】通过表达纯化分别从 N 端截短的 Ly7917 及从 C 端截短的 LyCHAP 各蛋白, 基于平板裂解试验和浊度递减试验, 比较各截短蛋白之间的活性差异, 以及添加  $\text{Ca}^{2+}$  后各蛋白的活性变化。【结果】发现催化域蛋白 LyCHAP 与 Ly7917 全酶的活性差异不显著, LyCHAP 的 N 端序列对其活性影响较大, 不宜截短; 而 C 端依次截短后, 活性逐渐降低。C 端截短 20 个氨基酸的 LyCHAP<sub>1-130</sub>, 在添加 1 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  后活性最强。【结论】Ly7917 催化域 CHAP 的核心功能域为 1-130 aa, 推测其具有  $\text{Ca}^{2+}$  结合区域, 并发现 LyCHAP<sub>1-130</sub> 在  $\text{Ca}^{2+}$  参与下裂菌活性可媲美 Ly7917 全酶。预示着 LyCHAP<sub>1-130</sub> 可以替代全酶应用于之后的临床试验。

**关键词:** 猪链球菌, 噬菌体裂解酶, 催化结构域, 裂菌活性

## Catalytic domain of endolysin Ly7917 harbored in lysogenic phage of *Streptococcus suis* 7

JI Wen-Hui<sup>1</sup> SUN Liang<sup>2</sup> HUANG Qing-Qing<sup>1</sup> WANG Heng-An<sup>1</sup>  
YAN Ya-Xian<sup>1</sup> SUN Jian-He<sup>1\*</sup>

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

(2. School of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China)

**Abstract:** [Objective] We focused on finding out the active area of catalytic domain of endolysin Ly7917 against *Streptococcus suis*, consequently helpful for Ly7917 modification. [Methods] A group peptides truncated from N-terminal of Ly7917 or C-terminal of LyCHAP were expressed and compared with original Ly7917 and LyCHAP of the catalytic activity by plate lysis assay and turbidity decrease assay, even the situation with addition of  $\text{Ca}^{2+}$ . [Results] LyCHAP showed excellent catalytic activity

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (No. 31172381, 31372500, 31272580); Special Fund for Public Welfare Industry of Chinese Ministry of Agriculture (No. 201303041); The Basic Research Programs of Science and Technology Commission Foundation of Shanghai (No. 12JC1404700); The Key Project of Shanghai Municipal Agricultural Commission (No. 2014-3-1)

\*Corresponding author: E-mail: sunjhe@sjtu.edu.cn

Received: March 20, 2015; Accepted: October 21, 2015; Published online (www.cnki.net): November 06, 2015

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31172381, 31372500, 31272580); 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); 上海市科技兴农重点攻关项目(No. 2014-3-1)

\*通讯作者: E-mail: sunjhe@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2015-03-20; 接受日期: 2015-10-21; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-11-06

as well as the full-length Ly7917. Truncated Ly7917 from N-terminal showed no catalytic activity. With the assistance of  $\text{Ca}^{2+}$ , LyCHAP without 20 amino acids at C-terminal (LyCHAP<sub>1-130</sub>) could achieve the maximum catalytic effect even better than full-length LyCHAP. **[Conclusion]**  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent LyCHAP<sub>1-130</sub> could be the potential alternative of Ly7917 for further clinic trials.

**Keywords:** *Streptococcus suis*, Endolysin, Catalytic domain, Bacterial lysis

猪链球菌(*Streptococcus suis*, *S. suis*) 2 型、7 型等是临床常见的引起猪群发病、死亡的病原菌, 然而由于滥用抗生素等原因, 临床上耐药菌株不断出现, 猪链球菌病的治疗面临挑战<sup>[1]</sup>。噬菌体裂解酶具有裂菌效率高、裂菌谱广、不易产生抗性、易于批量生产等优势, 作为一种新型抗菌分子备受关注<sup>[2]</sup>。Ly7917 是猪链球菌 7 型溶原性噬菌体编码的裂解酶<sup>[3]</sup>, 全长含有 245 个氨基酸(aa), 由氨基端(N 端)的半胱氨酸-组氨酸依赖型氨肽酶(CHAP)催化结构域和羧基端(C 端)的 SH3b 结合结构域组成<sup>[4]</sup>, 研究发现该酶热稳定性好、裂菌谱广、裂菌活性强, 对 *S. suis* 2 型强毒株 HA9801 感染小鼠的保护率高, 具有开发应用潜力。

虽然 Ly7917 的裂菌活性已经确认, 但其裂菌机制及活性相关功能域尚不清楚。因此本文拟通过分段和截短表达 Ly7917 全酶和催化功能域 LyCHAP, 通过比较分段或截短后蛋白的活性, 确定 Ly7917 的核心功能域和活性片段。鉴于  $\text{Ca}^{2+}$  可以有效提高 Ly7917 的裂菌活性, 拟通过揭示 Ly7917 蛋白的  $\text{Ca}^{2+}$  结合区域, 为进一步改造裂解酶提供基础数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

表达质粒: pSJ2, 由 pET21a(+)改造构建, 携带氨苄青霉素(Amp<sup>+</sup>)抗性和 N 端 His<sub>6</sub> 纯化标签, 由中国科学院上海有机化学研究所周佳海研究员惠赠。

感受态细胞: Trans5 $\alpha$ 、BL21(DE3)均购自北京全式金生物技术有限公司。

细菌菌株: HA9801, 为 *S. suis* 2 型猪源强毒分离株, 本实验室保存。

LB 培养基(g/L): 氯化钠 10, 蛋白胨 10, 酵母

浸出粉 5。1  $\times$  10<sup>5</sup> Pa 灭菌 15 min, 冷却至室温并加入氨苄青霉素(Amp<sup>+</sup>)至终浓度 100 mg/L。酶类及其他试剂: *TransStart*<sup>®</sup> *FastPfu* DNA 聚合酶试剂盒, 购自北京全式金生物技术有限公司; 快速限制性内切酶 *Bam*H I、*Xho* I、T4 快速连接试剂盒(Thermo Fisher Scientific Inc.)、Omega 胶回收试剂盒, 购自上海前尘生物技术有限公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒, 购自碧云天生物技术有限公司。*Histrap* Fast flow 镍离子亲和纯化填料、DEAE Sepharose fast flow 弱阴离子交换纯化填料, GE 公司, 国药集团化学试剂有限公司代购。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 目的片段克隆及鉴定:** 裂解酶 Ly7917 的基因全长 738 bp, 编码 245 aa。经 Pfam 在线分析, Ly7917 由两个结构域构成, N 端 1-146 aa 为 CHAP 催化结构域, C 端 163-227 aa 为 SH3b 结合结构域。为了揭示 CHAP 的活性及活性区域, 按照图 1 所示, 从 CHAP 的 N 端及 C 端分别截短 CHAP 结构域, 通过与 Ly7917 全长及 LyCHAP 全长(1-150 aa)进行活性比较, 寻找活性中心。

通过分析, 选择从 Ly7917 的 N 端分别截短 16 aa (Ly7917<sub>17-245</sub>)、25 aa (Ly7917<sub>26-245</sub>)、52 aa (Ly7917<sub>53-245</sub>)、78 aa (Ly7917<sub>79-245</sub>); 从 LyCHAP 的 C 端分别截短 10 aa (LyCHAP<sub>1-140</sub>)、20 aa (LyCHAP<sub>1-130</sub>)、32 aa (LyCHAP<sub>1-118</sub>)、50 aa (LyCHAP<sub>1-100</sub>)。

根据相应序列设计引物(表 1), 使用 *TranStart*<sup>®</sup> *FastPfu* DNA 聚合酶试剂盒扩增裂解酶蛋白 Ly7917 全长及片段 Ly7917<sub>17-245</sub>、Ly7917<sub>26-245</sub>、Ly7917<sub>53-245</sub> 和 Ly7917<sub>79-245</sub>; 扩增催化结构域蛋白 LyCHAP 全长及片段 LyCHAP<sub>1-100</sub>、LyCHAP<sub>1-118</sub>、LyCHAP<sub>1-130</sub> 和 LyCHAP<sub>1-140</sub>。50  $\mu$ L PCR 反应体系组成: 1  $\mu$ L

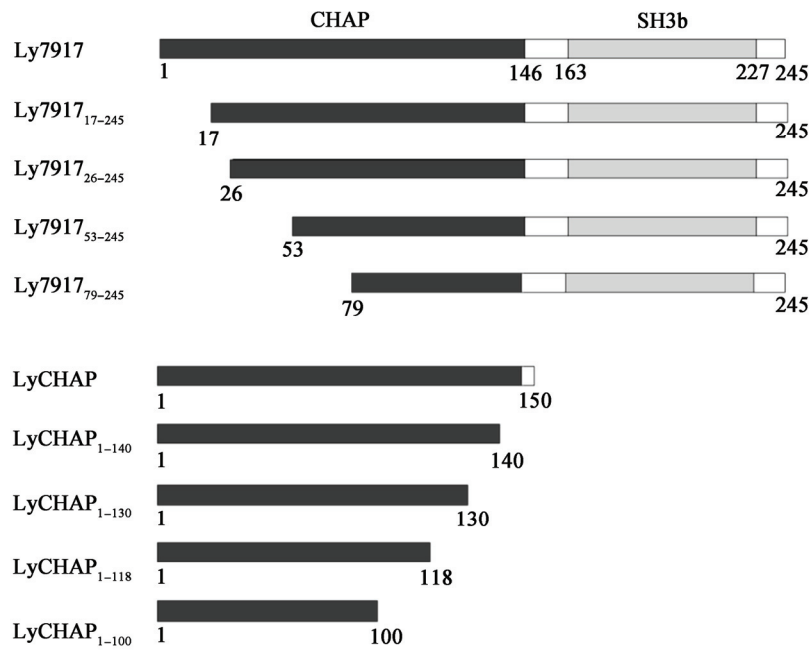


图 1 Ly7917 结构域分析及蛋白质截短方案

Figure 1 Domains prediction of Ly7917 and serial truncated peptides

注：结构域预测基于 <http://pfam.xfam.org/> 相关软件。

Note: Domains predicted at website <http://pfam.xfam.org/>.

表 1 PCR 扩增引物及检测引物  
Table 1 PCR primers for Ly7917 and truncated proteins

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'→3')	限制性酶切位点 Restriction enzyme
Ly7917 F	cgGGATCCatgacaacagtaaag	<i>Bam</i> H I
Ly7917 <sub>17-245</sub> F	cgGGATCCcgcggtgtctctgttgcaatg	<i>Bam</i> H I
Ly7917 <sub>26-245</sub> F	cgGGATCCtgctatgctttggccagttg	<i>Bam</i> H I
Ly7917 <sub>53-245</sub> F	cgGGATCCagtgggtgccactgtgatac	<i>Bam</i> H I
Ly7917 <sub>79-245</sub> F	cgGGATCCccacatctgggccattcaag	<i>Bam</i> H I
Ly7917 R	gCTCGAGttatttaaagtaacccaggc	<i>Xho</i> I
LyCHAP R	ccgCTCGAGtta*cggtccaggcgggtgatgt	<i>Xho</i> I
LyCHAP <sub>1-100</sub> R	CgCTCGAGtta*ataggggtgctgatg	<i>Xho</i> I
LyCHAP <sub>1-118</sub> R	ccgCTCGAGtta*ctccagaatggtcaatc	<i>Xho</i> I
LyCHAP <sub>1-130</sub> R	cgCTCGAGtta*gttgccggtagggtac	<i>Xho</i> I
LyCHAP <sub>1-140</sub> R	cgCTCGAGtta*ctgttgacggtagctag	<i>Xho</i> I
pSJ2 F	gtgagccgataacaattc	
pSJ2 R	agcttctttcgggctttg	

注：\*：下游引物引入终止密码子反向互补序列。

Note：\*：The reverse complementary sequences of a termination codon tta added in reverse primer.

*TranStart*<sup>®</sup> *FastPfu* DNA 聚合酶, 10  $\mu$ L 5 $\times$ *TranStart*<sup>®</sup> *FastPfu* Buffer, 5  $\mu$ L 2.5 mmol/L dNTPs, 2  $\mu$ L 10 mmol/L Ly7917 Forward Primer (F), 2  $\mu$ L 10 mmol/L Ly7917 Reverse Primer (R), 1  $\mu$ L phi7917 基因组, 29  $\mu$ L 双蒸水。PCR 体系反应条件为: 95  $^{\circ}$ C 2 min; 95  $^{\circ}$ C 20 s, 50  $^{\circ}$ C (最低引物  $T_m$  值-5  $^{\circ}$ C) 20 s, 72  $^{\circ}$ C 25 s, 共 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 5 min。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 胶回收试剂盒回收目的片段, 并将目的片段、pSJ2 载体分别用快切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I 于 37  $^{\circ}$ C 恒温酶切 30 min。双酶切产物用快速连接酶试剂盒于 22  $^{\circ}$ C 水浴条件下连接 30 min。将连接产物转化 100  $\mu$ L 全式金 Trans5 $\alpha$  感受态细胞, 涂布 Amp<sup>+</sup> LB 平板后, 置于 37  $^{\circ}$ C 恒温培养过夜。

从每个 LB 平板中挑取 3 个单克隆, 用载体引物 pSJ2F、pSJ2R 进行菌落 PCR 鉴定。扩增程序同上。对 PCR 鉴定阳性的菌液进行测序。

**1.2.2 蛋白诱导表达及活性初筛:** 从测序正确的菌液中提取质粒并转化感受态细胞 BL21(DE3), 挑取阳性单克隆菌落少量培养, 然后按 1% 转接到含 5 mL Amp<sup>+</sup> LB 液体培养基试管中, 37  $^{\circ}$ C、200 r/min 培养至  $OD_{600}=0.6$ , 加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 于 27  $^{\circ}$ C、120 r/min 培养 4 h 诱导蛋白表达。设 pSJ2-BL21 为空白对照, 未诱导的菌株为阴性对照。蛋白表达水平采用 SDS-PAGE (分离胶 12%, 浓缩胶 4%) 进行检测。

将表达每种蛋白的对应菌种转接入含 1 L Amp<sup>+</sup> LB 液体培养基的三角摇瓶中进行大量表达, 培养与诱导方法同上。收集菌体, 重悬于 30 mL Binding Buffer A (0.02 mol/L Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 0.3 mol/L NaCl, pH 7.4) 中, 采取冰浴-超声波裂解细胞。8 000 r/min 离心后收集上清液(蛋白粗提液), 并经 0.22  $\mu$ m 滤器(Millipore)过滤, 参照 Bustamante 等<sup>[5]</sup> 采用平板裂解法, 以 HA9801 为指示菌, 通过观察裂菌圈大小来确定蛋白粗提液的活性, 并以 pSJ2-BL21 诱导的粗提物为阴性对照, Ly7917 为阳性对照。对可以产生裂菌圈的表达蛋白进行进一步

蛋白纯化。没有产生裂菌圈的蛋白, 则视为无裂解能力。

**1.2.3 蛋白纯化及活性比较:** 按照产品说明书, 使用 Histrap fast flow 镍离子亲和层析技术纯化 His 标签融合蛋白, 并进一步采用 DEAE Sepharose fast flow 进行弱阴离子交换亲和层析纯化。用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定纯化蛋白浓度, 并将定量后的蛋白质溶液按照其蛋白质分子量大小调整到相同摩尔浓度后进行下一步的裂菌活性比较研究。

参照 Nelson 等<sup>[6]</sup>建立的 96 孔板-浊度递减法, 检测纯化蛋白的活性。用灭菌 PBS 将 HA9801 重悬至  $OD_{650}=0.6$ , 加入 96 孔板, 100  $\mu$ L/孔。将各种蛋白溶液作 2 倍稀释为 3 个梯度 2<sup>0</sup>、2<sup>1</sup>、2<sup>2</sup>, 加入到 96 孔板, 100  $\mu$ L/孔, 每个浓度设置 3 个重复孔。阴性对照只加入对应的缓冲液。37  $^{\circ}$ C 恒温孵育 15 min, 酶标仪测定  $OD_{650}$  的吸光度值(细菌浊度)。

为了揭示 Ca<sup>2+</sup>对裂解酶活性的影响, 按照上述方法, 先将蛋白溶液稀释后依次加入 96 孔板, 每个稀释度重复 6 孔, 其中 3 孔加入 1  $\mu$ L 1 mol/L CaCl<sub>2</sub> 溶液至终浓度为 1 mmol/L, 另 3 孔不加 CaCl<sub>2</sub>, 阴性对照为 PBS+Buffer A。37  $^{\circ}$ C 感作 15 min 后每孔加入 100  $\mu$ L HA9801 悬液, 再于 37  $^{\circ}$ C 放置 15 min 后读取  $OD_{650}$  吸光度值。分析 Ca<sup>2+</sup>对截短蛋白的酶活性的影响<sup>[7]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 Ly7917 截短片段的扩增、克隆与测序

设计的 10 个 Ly7917 全长或截短片段: Ly7917、Ly7917<sub>17-245</sub>、Ly7917<sub>26-245</sub>、Ly7917<sub>53-245</sub>、Ly7917<sub>79-245</sub>、LyCHAP、LyCHAP<sub>1-140</sub>、LyCHAP<sub>1-130</sub>、LyCHAP<sub>1-118</sub> 和 LyCHAP<sub>1-100</sub>, 经 PCR 成功扩增(图 2)后测序分析显示序列完全正确。

### 2.2 蛋白表达及活性初筛

构建了 10 个 Ly7917 全长或截短片段的重组质粒(表 2), 重组菌经诱导后呈可溶性表达。采用目标蛋白粗提物进行的平板裂解实验显示(图 3), Ly7917 和 LyCHAP 粗提物的裂菌圈非常明显, 直径均约

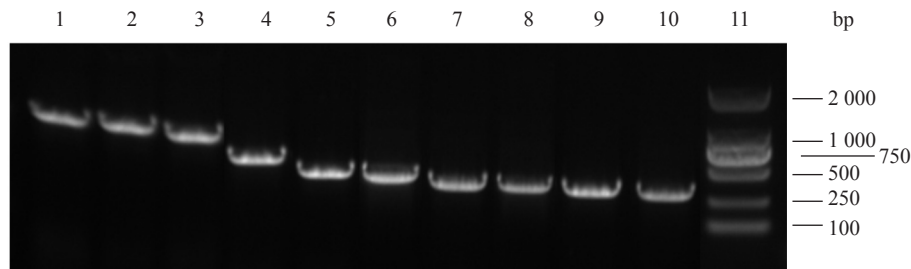


图 2 PCR 产物电泳图

Figure 2 Electrophoretogram of PCR products

Note: 1: Ly7917; 2: Ly7917<sub>17-245</sub>; 3: Ly7917<sub>26-245</sub>; 4: Ly7917<sub>53-245</sub>; 5: Ly7917<sub>79-245</sub>; 6: LyCHAP; 7: LyCHAP<sub>1-140</sub>; 8: LyCHAP<sub>1-130</sub>; 9: LyCHAP<sub>1-118</sub>; 10: LyCHAP<sub>1-100</sub>; 11: Marker 2000.

表 2 重组质粒及融合蛋白数据

Table 2 The detailed data of recombinant plasmid and fusion protein

蛋白名称 Protein name	核算序列长度 Nucleotide length (bp)	重组质粒名称 Recombinant plasmid	融合蛋白大小 Fusion protein (kD)	预测 pI 值* pI value
Ly7917	738	Ly7917-pSJ2	26.1+3.3	6.79
Ly7917 <sub>17-245</sub>	690	Ly7917 <sub>17-245</sub> -pSJ2	24.2+3.3	6.79
Ly7917 <sub>26-245</sub>	663	Ly7917 <sub>26-245</sub> -pSJ2	23.6+3.3	7.16
Ly7917 <sub>53-245</sub>	582	Ly7917 <sub>53-245</sub> -pSJ2	20.7+3.3	7.96
Ly7917 <sub>79-245</sub>	504	Ly7917 <sub>79-245</sub> -pSJ2	18.1+3.3	7.98
LyCHAP	453	LyCHAP-pSJ2	15.8+3.3	6.16
LyCHAP <sub>1-140</sub>	423	LyCHAP <sub>1-140</sub> -pSJ2	14.7+3.3	6.09
LyCHAP <sub>1-130</sub>	393	LyCHAP <sub>1-130</sub> -pSJ2	13.5+3.3	5.92
LyCHAP <sub>1-118</sub>	357	LyCHAP <sub>1-118</sub> -pSJ2	12.1+3.3	5.40
LyCHAP <sub>1-100</sub>	303	LyCHAP <sub>1-100</sub> -pSJ2	10.2+3.3	5.80

注: \*pI 值预测网站 [http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/), 融合蛋白是由目的蛋白与 pSJ2 载体蛋白(内含标签蛋白 His<sub>6</sub>)的 26 aa (3.3kD) 组成。

Note: \*pI values of each peptide were predicted on [http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/). Fusion proteins were consists of target protein and 26 aa (3.3kD) on plasmid.

为 13 mm 左右。LyCHAP<sub>1-140</sub>、LyCHAP<sub>1-130</sub>、LyCHAP<sub>1-118</sub>、LyCHAP<sub>1-100</sub> 粗提物形成的裂菌圈相对较小且依次减小, 裂菌圈直径介于 9–11 mm 之间, 其中, LyCHAP<sub>1-140</sub> 的裂菌圈直径为 11 mm, LyCHAP<sub>1-100</sub> 的为 9 mm。而 Ly7917<sub>17-245</sub>、Ly7917<sub>26-245</sub>、Ly7917<sub>53-245</sub> 和 Ly7917<sub>79-245</sub> 粗提物均未形成可见裂菌圈, 将视为无裂解活性。将 Ly7917、LyCHAP、LyCHAP<sub>1-140</sub>、LyCHAP<sub>1-130</sub>、LyCHAP<sub>1-118</sub> 和 LyCHAP<sub>1-100</sub> 进一步采用镍柱纯化, 并对

LyCHAP 进行离子交换层析纯化。

### 2.3 蛋白纯化及活性比较

经过 Ni-NTA 镍柱层析, 获得纯化的 Ly7917、LyCHAP、LyCHAP<sub>1-140</sub>、LyCHAP<sub>1-130</sub>、LyCHAP<sub>1-118</sub> 和 LyCHAP<sub>1-100</sub> 6 个蛋白, 均洗脱于含 200 mmol/L 咪唑的 Binding buffer A (200-A); LyCHAP 经镍柱纯化后, 进一步采用 DEAE 弱阴离子纯化, 洗脱于含 100 mmol/L NaCl 的 Binding buffer B (100-B) 中 (图 4)。将纯化后的各蛋白浓度均调整到 1.5 μmol/L,

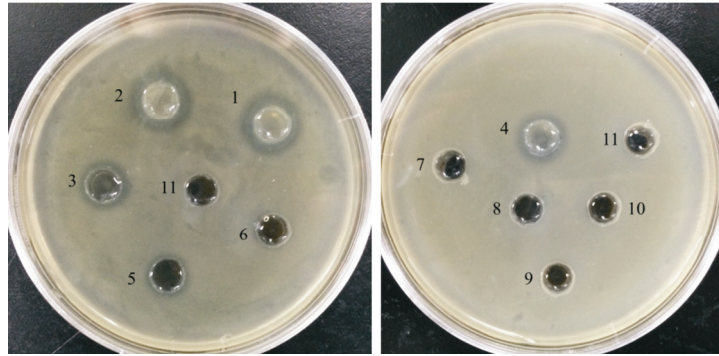


图 3 平板裂解试验

Figure 3 Plate lysis assay

注: 1: Ly7917; 2: LyCHAP; 3: LyCHAP<sub>1-140</sub>; 4: LyCHAP<sub>1-130</sub>; 5: LyCHAP<sub>1-118</sub>; 6: LyCHAP<sub>1-100</sub>; 7: Ly7917<sub>17-245</sub>; 8: Ly7917<sub>26-245</sub>; 9: Ly7917<sub>53-245</sub>; 10: Ly7917<sub>79-245</sub>; 11: 阴性对照(pSJ2-BL21). 琼脂打孔孔径为 8 mm, 以上各孔中加入的均为表达后的蛋白质粗提液.  
Note: 1: Ly7917; 2: LyCHAP; 3: LyCHAP<sub>1-140</sub>; 4: LyCHAP<sub>1-130</sub>; 5: LyCHAP<sub>1-118</sub>; 6: LyCHAP<sub>1-100</sub>; 7: Ly7917<sub>17-245</sub>; 8: Ly7917<sub>26-245</sub>; 9: Ly7917<sub>53-245</sub>; 10: Ly7917<sub>79-245</sub>; 11: Negative control (pSJ2-BL21). Crude extracts of each peptide were added into the wells with a diameter of 8 mm.

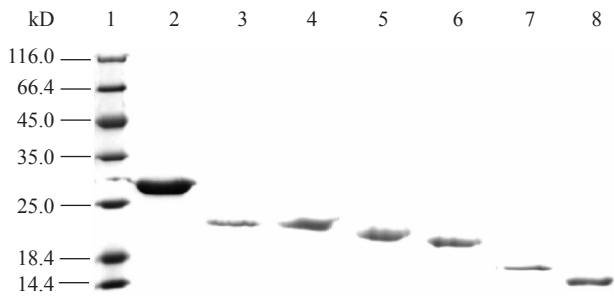


图 4 纯化蛋白 SDS-PAGE 图

Figure 4 SDS-PAGE of purified protein of Ly7917 and C-terminal truncated LyCHAP

注: 1: 蛋白 Marker; 2: Ly7917; 3: LyCHAP (离子纯化); 4: LyCHAP; 5: LyCHAP<sub>1-140</sub>; 6: LyCHAP<sub>1-130</sub>; 7: LyCHAP<sub>1-118</sub>; 8: LyCHAP<sub>1-100</sub>.

Note: 1: Protein marker; 2: Ly7917; 3: LyCHAP (DEAE); 4: LyCHAP; 5: LyCHAP<sub>1-140</sub>; 6: LyCHAP<sub>1-130</sub>; 7: LyCHAP<sub>1-118</sub>; 8: LyCHAP<sub>1-100</sub>.

进行活性测试, 比较各蛋白与细菌作用后的相对浊度(反应孔细菌浊度/阴性对照孔细菌浊度)大小。

结果显示(图 5), 用 200-A 洗脱液作 2<sup>2</sup> 稀释, 摩尔数相同的各蛋白中, Ly7917 全酶的活性最强, 其对应的相对细菌浊度最低, 约为 47%; 其次是 LyCHAP 约 50%。LyCHAP<sub>1-140</sub> 的活性较 LyCHAP 略低, 其对应的相对细菌浊度约 52%。LyCHAP 随

着 aa 数量的逐渐减少, 对应的细菌浊度比值也相应增高, 裂解活性随之降低。Ly7917<sub>1-118</sub> 与 LyCHAP<sub>1-100</sub> 的裂解活性均相对较低, 二者之间无显著差异。活性最低的 LyCHAP<sub>1-100</sub> 对应的相对细菌浊度较 LyCHAP 的高约 22%, 较 Ly7917 全酶的高约 25%。溶解于不同缓冲溶液的 LyCHAP 表现出明显的活性差异, 用 100-B 洗脱液作 2<sup>2</sup> 稀释的 LyCHAP 对应的相对细菌浊度低于用 200-A 洗脱液稀释的 LyCHAP 近 10%。

图 6 中, 未加 Ca<sup>2+</sup> 的 5 个蛋白在两个浓度梯度上, 所对应的相对细菌浊度大小依次为 LyCHAP<sub>1-100</sub> > LyCHAP<sub>1-118</sub> > LyCHAP<sub>1-130</sub> > LyCHAP<sub>1-140</sub> > LyCHAP, 与图 4 结果一致。2<sup>3</sup> 稀释度下各蛋白对应的相对细菌浊度均高于 2<sup>2</sup> 稀释度下对应的相对细菌浊度。添加 1 mmol/L Ca<sup>2+</sup> 后, LyCHAP<sub>1-100</sub>、LyCHAP<sub>1-118</sub>、LyCHAP<sub>1-130</sub> 所对应的相对细菌浊度大小依次为 LyCHAP<sub>1-100</sub> > LyCHAP<sub>1-118</sub> > LyCHAP<sub>1-130</sub>, 且各蛋白对应的相对细菌浊度明显比未添加 Ca<sup>2+</sup> 的低。LyCHAP<sub>1-140</sub> 对应的相对细菌浊度在添加 Ca<sup>2+</sup> 后并无明显降低, 而 LyCHAP 在添加 Ca<sup>2+</sup> 后相对细菌浊度较未添加组明显增高。

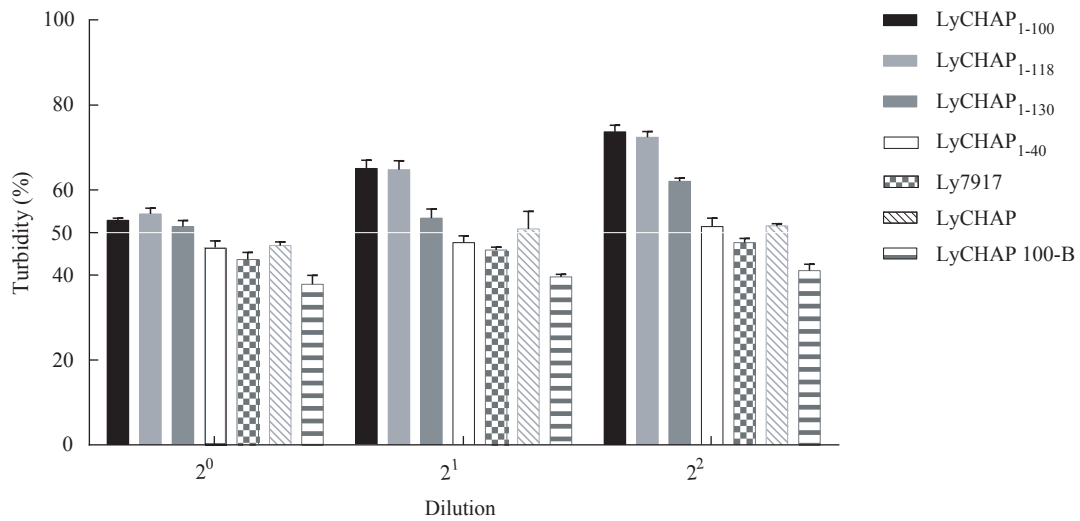


图5 蛋白质分段表达后相对活性比较

Figure 5 Catalytic activity analysis of partial and full length of Ly7917

注: 溶解于 200 mmol/L 咪唑的 Binding Buffer A (200-A)中的 Ly7917、LyCHAP、LyCHAP<sub>1-140</sub>、LyCHAP<sub>1-130</sub>、LyCHAP<sub>1-118</sub> 和 LyCHAP<sub>1-100</sub> 6 个蛋白没有特别标注出溶解溶液, 进一步离子纯化后的 LyCHAP 溶解于 100 mmol/L NaCl Binding Buffer B 中, 标注为 LyCHAP 100-B.

Note: Ly7917, LyCHAP, LyCHAP<sub>1-140</sub>, LyCHAP<sub>1-130</sub>, LyCHAP<sub>1-118</sub> and LyCHAP<sub>1-100</sub> were purified by Histrap fast flow resin and LyCHAP 100-B was purified by DEAE iron exchange resin.

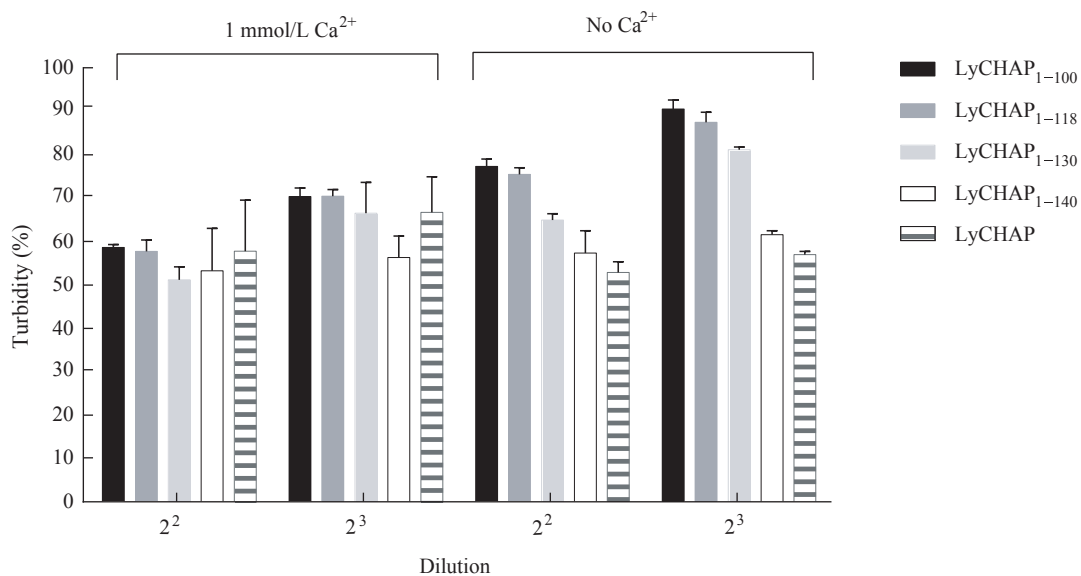


图6 Ca<sup>2+</sup>对含不同长度裂解结构域的 LyCHAP 蛋白活性影响

Figure 6 Effect of Ca<sup>2+</sup> on serial peptieds of LyCHAP



### 3 讨论

*S. suis* 7 型菌株溶原性噬菌体 phi7917 编码的裂解酶 Ly7917 的生物活性已在本实验室前期工作中得到证实。Ly7917 是一个热稳定性高、裂菌谱广、裂解活性强的新型裂解酶。CHAP 为 Ly7917 裂解酶的催化结构域, 决定着 Ly7917 的裂菌能力。本实验通过构建、表达 Ly7917 的 10 个截短或分段表达的蛋白并通过比较蛋白的裂菌活性, 定位了 CHAP 的活性区域。同时, 发现  $\text{Ca}^{2+}$  对 Ly7917 全酶的裂解活性具有明显的增强作用。

研究结果显示, LyCHAP 及其 4 个 C 端截短的蛋白 LyCHAP<sub>1-140</sub>, LyCHAP<sub>1-130</sub>, LyCHAP<sub>1-118</sub> 和 LyCHAP<sub>1-100</sub> 均有裂解活性。摩尔数相同条件下, 经镍柱纯化的蛋白裂解活性由高到低依次为 Ly7917 > LyCHAP > LyCHAP<sub>1-140</sub> > LyCHAP<sub>1-130</sub> > LyCHAP<sub>1-118</sub> > LyCHAP<sub>1-100</sub>。经离子交换纯化的 LyCHAP (100-B) 的裂解活性明显高于相同摩尔数的 LyCHAP (200-A)。究其原因, 可能是因为 LyCHAP 融合蛋白的等电点 pI 为 6.16, 100-B 溶液的 pH 值较 200-A 更高, 更适宜 LyCHAP 解离为离子态而更好地保持活性。Ly7917<sub>17-245</sub>、Ly7917<sub>26-245</sub>、Ly7917<sub>53-245</sub> 和 Ly7917<sub>79-245</sub> 4 个 N 端依次截短的蛋白质在平板裂解实验中均未表现出裂菌活性, 说明 N 端 1-16 aa 参与酶活性部位组成或其空间结构构成, 对整个 CHAP 裂解结构域的活性有很大的影响。

在添加  $\text{Ca}^{2+}$  后, LyCHAP<sub>1-100</sub>、LyCHAP<sub>1-118</sub> 和 LyCHAP<sub>1-130</sub> 对 HA9801 的裂解活性均有明显提高, 其活性强弱依次为 LyCHAP<sub>1-130</sub> > LyCHAP<sub>1-118</sub> > LyCHAP<sub>1-100</sub>, 与其未添加  $\text{Ca}^{2+}$  时的裂解活性强弱排序一致, 说明 Ly7917 的 1-100 aa 内存在  $\text{Ca}^{2+}$  结合位点。 $\text{Ca}^{2+}$  的添加对 LyCHAP<sub>1-140</sub> 的裂解活性未表现出明显的增强效果, 对 LyCHAP 的作用反而是抑制。从理论上分析应该是 LyCHAP 越完整,  $\text{Ca}^{2+}$  所体现出的促活性增强作用越明显。在  $\text{Ca}^{2+}$  存在的情况下, 各蛋白的裂解活性强弱顺序与未添加  $\text{Ca}^{2+}$  时的活性强弱顺序一致: LyCHAP > LyCHAP<sub>1-140</sub> > LyCHAP<sub>1-130</sub> > LyCHAP<sub>1-118</sub> > LyCHAP<sub>1-100</sub>。推测 LyCHAP 的 130-146 aa 之间的序列有可能会在  $\text{Ca}^{2+}$

存在的条件下使得  $\text{Ca}^{2+}$  与 LyCHAP 截短蛋白形成络合物或者复合物, 其本身就会使得反应孔内的浊度增高。其次, 形成复合物有可能会影响酶的裂解作用, 使裂解细菌能力减弱, 这将在今后的试验中进一步验证。此外, LyCHAP<sub>1-130</sub> 比相同摩尔浓度未添加  $\text{Ca}^{2+}$  的 LyCHAP 裂解能力还强。因此, 在添加 1 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  的条件下, 分子量更小的 LyCHAP<sub>1-130</sub> 代替 LyCHAP 甚至 Ly7917 应用于临床治疗, 会有更大的优势。

总之, Ly7917 的裂解能力略高于 LyCHAP。但是 LyCHAP 分子量小, 在表达纯化方面更有优势。在添加  $\text{Ca}^{2+}$  至终浓度为 1 mmol/L 条件下, LyCHAP<sub>1-130</sub> 活性显著增强且活性最高, 比相同摩尔浓度添加及未添加  $\text{Ca}^{2+}$  的 LyCHAP 裂解能力还强, 可媲美 Ly7917 全酶, 为裂解酶的进一步改造及临床应用奠定了理论基础。

### 参考文献

- [1] Meng XP, Shi YB, Ji WH, et al. Application of a bacteriophage lysin to disrupt biofilms formed by the animal pathogen *Streptococcus suis*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(23): 8272-8279
- [2] Fischetti VA. Bacteriophage endolysins: A novel anti-infective to control Gram-positive pathogens[J]. International Journal of Medical Microbiology, 2010, 300(6): 357-362
- [3] Tang F, Bossers A, Harders F, et al. Comparative genomic analysis of twelve *Streptococcus suis* (pro)phages[J]. Genomics, 2013, 101(6): 336-344
- [4] Huang QQ, Ji WH, Du B, et al. Mining and evaluating the high-effectiveness and broad-spectrum endolysin encoded by prophage harbored in *Streptococcus suis* serotype 7[J]. Microbiology China, 2015, 42(6): 1052-1059 (in Chinese)  
黄庆庆, 吉文汇, 杜斌, 等. 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[J]. 微生物学通报, 2015, 42(6): 1052-1059
- [5] Bustamante N, Rico-Lastres P, García E, et al. Thermal stability of Cpl-7 endolysin from the streptococcus pneumoniae bacteriophage Cp-7; cell wall-targeting of its CW\_7 motifs[J]. PLoS One, 2012, 7(10): e46654
- [6] 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 the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001, 98(7): 4107-4112
- [7] Gu JM, Feng YG, Feng X, et al. Structural and biochemical characterization reveals LysGH15 as an unprecedented "EF-Hand-Like" calcium-binding phage lysin[J]. PLoS Pathogens, 2014, 10(5): e1004109