

金黄色葡萄球菌噬菌体 vB_Sau_P68 的基因组分析和裂解酶

于诗筠¹, 吕金晖¹, 文会淇², 张雅倩², 喻鑫婷³, 米志强^{*2}, 黄海龙^{*1}

1 吉林农业大学动物科学技术学院, 吉林 长春 130118

2 军事科学院军事医学研究院微生物流行病学研究所 病原微生物生物安全国家重点实验室, 北京 100071

3 安徽医科大学解放军 307 临床学院, 北京 100071

于诗筠, 吕金晖, 文会淇, 张雅倩, 喻鑫婷, 米志强, 黄海龙. 金黄色葡萄球菌噬菌体 vB_Sau_P68 的基因组分析和裂解酶[J]. 微生物学通报, 2022, 49(8): 3107-3119

Yu Shijun, Lyu Jinhui, Wen Huiqi, Zhang Yaqian, Yu Xinting, Mi Zhiqiang, Huang Hailong. Expression and sequence analysis of *Staphylococcus aureus* phage lysin[J]. Microbiology China, 2022, 49(8): 3107-3119

摘要:【背景】金黄色葡萄球菌是常见的人畜共患条件致病菌, 随着多耐药菌株分离率的增长, 研发与抗生素作用模式不同的抗菌剂迫在眉睫。【目的】分离高效且特异性强的金黄色葡萄球菌噬菌体, 对其进行功能注释, 并对其编码的裂解酶进行功能验证。【方法】通过对噬菌体全基因组序列进行分析找到裂解酶基因, 利用原核表达系统对其编码的 2 个裂解酶蛋白进行克隆, 用 SDS-PAGE 与蛋白免疫印迹法(Western blotting)鉴定目的蛋白是否表达, 并采用单斑法验证其裂解活性。【结果】本研究的噬菌体为一株新的金黄色葡萄球菌噬菌体, 命名为 vB_Sau_P68, 该基因组全长为 139 409 bp, GC 含量为 31.0%, 编码 220 个开放阅读框(open reading frame, ORF), 透射电镜观察具有正二十面体头部和收缩性尾部, 形态学分类属于肌尾噬菌体。该噬菌体编码 2 个裂解酶基因, 分别具有 CHAP 催化结构域与 SH3_5 结合结构域, SDS-PAGE 与 Western blotting 表明 Lys161 能够表达且有裂解活性, Lys163 则无法外源表达。对 Lys161 序列进行分析, 该裂解酶无信号肽, 无跨膜区域, 以无规则卷曲为主。【结论】本研究对一株新的金黄色葡萄球菌噬菌体编码的 2 个裂解酶基因进行了克隆表达, 结果提示 CHAP 催化结构域具有裂解活性, 而 SH3_5 结合结构域则不表达。这一结果可为裂解酶的机制探索及应用提供理论基础。

关键词: 全基因组分析; CHAP 结构域; SH3_5 结构域; 蛋白结构

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFC1602500, 2017YFF0108605); 国家自然科学基金(31900489, 81572045); 吉林省科技厅项目(20190301009NY)

Supported by: National Key Research and Development Program of China (2018YFC1602500, 2017YFF0108605); National Natural Science Foundation of China (31900489, 81572045); Project of Department of Science and Technology of Jilin Province (20190301009NY)

***Corresponding authors:** E-mail: MI Zhiqiang: zhiqiangmi_ime@163.com; HUANG Hailong: huanghail@163.com

Received: 2021-12-08; **Accepted:** 2022-02-02; **Published online:** 2022-03-11

Expression and sequence analysis of *Staphylococcus aureus* phage lysin

YU Shijun¹, LYU Jinhui¹, WEN Huiqi², ZHANG Yaqian², YU Xinting³, MI Zhiqiang^{*2}, HUANG Hailong^{*1}

1 College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, Jilin, China

2 State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

3 307 Clinical College, Anhui Medical University, Beijing 100071, China

Abstract: [Background] *Staphylococcus aureus* is a common zoonotic opportunistic pathogen. With the emergence of multidrug resistant strains, it is urgent to develop antimicrobial agents with different modes of action from antibiotics. [Objective] To isolate *S. aureus* phage and identify its functional lysin components as an effective specific antimicrobial agent. [Methods] The whole genome sequence of the phage was assembled and annotated for the mining of putative lysin encoding genes. Two putative lysin genes were respectively cloned into a prokaryotic expression vector. SDS-PAGE and Western blotting were employed to confirm the expression of the target proteins. We then verified the lytic activity by spotting the expression product on the host bacterial lawn. [Results] The isolated phage in this study could lyse its host bacterium and was named vB_Sau_P68. The phage genome was 139 409 bp with the GC content of 31.0% and encoded 220 open reading frames (ORFs). Under the transmission electron microscope, the phage appeared as an icosahedron with a contractile tail, which belonged to Myoviridae. Two putative lysin genes were annotated in the phage genome. ORF161 was predicted to encode lysin with a CHAP catalytic domain and ORF163 with a SH3_5 binding domain. The results of SDS-PAGE and Western blotting showed that Lys161 was expressed successfully and had lytic activity, while the expression of Lys163 was not be detected. The Lys161 sequence had no signal peptide or transmembrane region, and random coil was its major secondary structural element. [Conclusion] In this study, two lysin genes were cloned from a *Staphylococcus aureus* phage genome and expressed. The results suggested that the CHAP catalytic domain had lytic activity, while the SH3_5 binding domain was not expressed. The findings provide a theoretical basis for the exploration of the acting mechanism and application of lysin.

Keywords: whole genome analysis; CHAP domain; SH3_5 domain; protein structure

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, Sa)是人与动物中常见的条件致病菌,广泛分布于自然界中,在人体上多定殖于皮肤、阴道和胃肠道等部位,在犬、猫身上多定殖于口、鼻和会阴等处,可导致人与动物不同程度的感染,如皮肤和软组织感染、骨关节炎等,严重时可导致菌血症、坏死性肺炎及感染性心内膜

炎等^[1]。

目前,多耐药金黄色葡萄球菌的检出率越来越高,噬菌体作为潜在的替代疗法越来越受到重视,其能够特异性裂解宿主菌,不针对其他菌群,具有特异性。2017年, Eliava 噬菌体治疗中心曾应用几种葡萄球菌噬菌体制剂成功治疗了一种罕见的人常染色体隐性遗传病

(Netherton 综合征), 该病主要表现为皮肤干燥、皴裂, 全身覆盖着淡黄色薄膜, 手掌及足部角化过度伴有瘙痒, 应用噬菌体治疗 7 d 后皮肤状况显著改善, 淡黄色薄膜的厚度减小, 并且关节活动有所缓解, 再治疗 6 个月后该患者的 Netherton 综合征未复发且各项指标均正常^[2]。Schooley 等对一名 68 岁由鲍曼不动杆菌感染引起的坏死性胰腺炎患者应用噬菌体静脉注射 3 周后患者完全清醒, 肾功能也得到改善^[3]。2015 年, Nzakizwanayo 等的研究证明噬菌体可以减少导尿管上生物膜的形成, 预防导尿管阻塞引起的肾炎等临床并发症^[4]。然而考虑到噬菌体制剂的大量纯化及审批程序, 噬菌体的应用目前仍存在一定问题。裂解酶作为噬菌体中发挥裂解功能的蛋白之一, 成分单一、易于获得, 在 2001 年首次验证裂解酶能够预防小鼠上呼吸道内 A 组链球菌的定殖后, 2013 年裂解酶 SAL-1 的临床试验获得批准, 评估了其药理学及药效学的安全性, 直至 2017 年, 由 Microcos 公司开发出了第一个可用于人类皮肤金黄色葡萄球菌感染的裂解酶^[4-7]。

噬菌体发挥裂解功能的蛋白有 4 种: 病毒相关肽聚糖水解酶(virion-associated peptidoglycan hydrolases, VAGPHs)、解聚酶(depolymerases)、裂解酶(endolysin)和穿孔素(holin)^[8]。其中, 裂解酶能够裂解革兰氏阳性细菌细胞壁肽聚糖上的糖苷键或肽键, 因其作用位点不同主要分为以下 5 类: N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸酰胺酶、L-丙氨酸-D-谷氨酰胺内肽酶、交联桥内肽酶、N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶及 N-乙酰胞壁质酶(溶菌酶)^[9]。许多噬菌体裂解酶都具有“双结构域结构”的特点, 即 N-端具有靶向作用于细胞壁肽聚糖骨架或多肽链酰胺键的催化结构域, C-端具有与宿主细胞壁特异性结合的结合结构域, 但也有少数裂解酶存在多个催

化结构域^[10-12]。

本研究通过对一株金黄色葡萄球菌噬菌体全基因组序列进行分析, 对同一株噬菌体编码的 2 个分别为 CHAP 催化结构域和 SH3_5 结合结构域的裂解酶基因进行克隆表达, 并分析其抗菌活性, 以期裂解酶的应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

金黄色葡萄球菌菌株 Sa 68 分离自吉林农业大学动物医院病犬口鼻分泌物, 将口鼻拭子浸泡于 7.5% NaCl 肉汤液体培养基中 4-6 s, 随后于 37 °C、200 r/min 摇床培养至平台期(OD_{600} 约 1.0), 接种至科马嘉金黄色葡萄球菌显色培养基中, 37 °C 培养箱培养 18 h, 取红色或粉红色单克隆进行革兰氏染色镜检, 可见为紫色的阳性球菌, 随后将疑似为金黄色葡萄球菌的单克隆培养至平台期(OD_{600} 约 1.0)后, 参照细菌基因组 DNA 提取试剂盒的方法提取细菌基因组 DNA 并作为模板, 用 16S rRNA 基因通用引物进行扩增, 引物序列见表 1。PCR 反应体系(25 μL): 2×Taq Plus PCR Master Mix 12.5 μL, 16S rRNA_F 与 16S rRNA_R (10 μmol/L) 各 1 μL, 细菌 DNA 模板 2 μL, ddH₂O 8.5 μL。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 94 °C 1 min, 56 °C 1 min, 72 °C 2 min, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。将 PCR 产物送至吉林省库美生物科技有限公司测序, 将测序结果在 NCBI BLASTn 上比对, 鉴定为金黄色葡萄球菌(编号为 Sa 68), 将菌种保存于-80 °C 冰箱备用。

大肠杆菌 Trans1-T1 与 BL21(DE3)感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司, pCold I 质粒由军事医学研究院微生物流行病学研究所保存。

表 1 本实验所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称	引物序列	引物长度
Primer name	Primer sequence (5'→3')	Primer length (bp)
16S rRNA_F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	20
16S rRNA_R	GGTACCTTGTTACGACTT	19
ORF161_F	ATCGAAGGTAGGCATATGATGGCTAAGACGCAAGCAG	37
ORF161_R	GAGATTACCTATCTAGATTACACCATTCCCTTCAGGTTTTTTAC	43
ORF163_F	ATCGAAGGTAGGCATATGATGAGTGCTAGTGATGCTC	37
ORF163_R	GAGATTACCTATCTAGATTAAGTCTTGAATGTCCCCCAGGC	41
pCold_F_Primer	ACGCCATATCGCCGAAAGG	19
pCold_R_Primer	GGCAGGGATCTTAGATTCTG	20

1.2 主要试剂和仪器

核酸提取试剂盒, 罗氏诊断产品(上海)有限公司; 限制性内切酶 *Nde* I 与 *Xba* I, New England Biolabs 北京有限公司; 胶回收试剂盒, 凯杰生物工程(深圳)有限公司; 质粒小提试剂盒, 北京全式金生物技术有限公司; Western blotting ECL 化学发光法检测试剂盒、刃天青, 北京索莱宝生物技术有点公司。磷酸盐缓冲液: NaH_2PO_4 6 g/L, NaCl 17.55 g/L, pH 8.0; TEN 缓冲液: 10 mmol/L Tris-Cl, 1 mmol/L EDTA, 100 mmol/L NaCl。Qubit 2.0 荧光计, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; Ni-NTA 柱, 生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.3 噬菌体全基因组序列分析

噬菌体分离于吉林农业大学动物医院污水, 污水经 10 000 r/min 离心 10 min, 弃沉淀, 将上清经 0.22 μm 过滤后加入到 37 °C、200 r/min 摇床培养至对数期(OD_{600} 约 0.6)的宿主菌 Sa 68 中, 37 °C、200 r/min 培养至菌液澄清后, 10 000 r/min 离心 5 min, 取上清经 0.22 μm 过滤, 所得滤液即为噬菌体裂解液, 经 3 次单斑纯化后, 噬菌体原液于吉林农业大学动物医院 4 °C 冰箱保存备用, 随后寄往北京军事医学研究院微生物流行病学研究所保存并进行高通量测

序(Illumina MiSeq), 测序数据经 Spades 3.13.0 软件拼接后获得全基因组序列, 上传至 NCBI (登录号为 OL741057), 在 NCBI BLASTn 上与数据库比对进行同源性分析, 并对噬菌体注释开放阅读框(open reading frame, ORF)进行解读。

1.4 噬菌体纯化与电镜

采用蔗糖密度梯度离心法纯化噬菌体, 取 30 mL 噬菌体原液至超速离心管中, 随后向管底加入 10 mL 的 30%蔗糖溶液, 使用 Optima XE-100 Ultracentrifuge 超速离心机, 4 °C、20 000 r/min 离心 3 h 弃去上清液, 用 100 μL TEN 缓冲液重悬噬菌体沉淀, 随后用透射电子显微镜(TEM)观察噬菌体形态, 放大倍率为 60 000。

1.5 编码裂解酶基因预测

将注释为裂解酶基因的蛋白在 Pfam (<http://pfam.xfam.org/>)与 Inter Pro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>)网站上进行结构域预测。

1.6 噬菌体基因组的提取

将宿主菌于 37 °C、200 r/min 摇床培养至对数期(OD_{600} 约 0.6), 加入在本实验室保存于 4 °C 的噬菌体原液, 继续摇床培养至澄清, 上清液经 0.22 μm 滤膜过滤后, 参照核酸提取试剂盒说明书提取噬菌体基因组 DNA, 并于 -20 °C 保存备用。

1.7 质粒载体的选择与引物设计

选取 pCold I 质粒作为 ORF161 与 163 的载体, 酶切位点为 *Nde* I 与 *Xba* I, 设计特异性同源重组引物, 如表 1 所示, 由北京诺赛基因组研究中心有限公司合成。

1.8 目的片段的扩增

用同源重组引物对噬菌体 DNA 进行扩增, PCR 反应体系: 噬菌体基因组的 DNA 模板 2 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 2.5 μ L, ddH₂O 18 μ L, Q5 High-Fidelity 2 \times Master Mix 25 μ L。PCR 反应条件: 98 $^{\circ}$ C 30 s; 98 $^{\circ}$ C 10 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。取 5 μ L PCR 产物用 1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定目的条带。

1.9 裂解酶克隆与表达

将 PCR 产物参照凯杰胶回收试剂盒说明书纯化后, 连接至已酶切的 pCold I 载体, 随后转化至 Trans1-T1 感受态细胞内, 挑取 Trans1-T1 转化平板上的单克隆接种至 Amp 抗性(终浓度为 100 μ g/mL) LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 摇床培养过夜至平台期(OD_{600} 约 1.0), 用质粒小提试剂盒提取质粒, 分别以质粒载体的 pCold_F_Primer 为上游引物, 以 ORF161、163 目的基因 3'-端 的下游引物 ORF161_R 与 ORF163_R 对提取的质粒进行 PCR 鉴定, 提取的质粒送往北京诺赛基因组研究中心有限公司进行测序, 将插入片段序列正确的质粒转化至大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞后 37 $^{\circ}$ C 培养, 次日观察转化平板上是否有单克隆生长。

1.10 SDS-PAGE 与蛋白免疫印迹法(Western blotting)鉴定

分别对含有 ORF161 与 163 基因的表达载体进行小量诱导表达, 挑取大肠杆菌 BL21(DE3)转化平板上单克隆在 Amp 抗性(终浓度 100 μ g/mL)

液体 LB 培养基内, 于 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 摇床培养至对数期(OD_{600} 约 0.6)后, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG, 25 $^{\circ}$ C 诱导 15 h。4 $^{\circ}$ C、8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体沉淀, 用磷酸盐缓冲液重悬, 超声破碎(功率 30%、超声 2 s、间歇 3 s, 总时长 10 min)后用 SDS-PAGE 鉴定蛋白表达情况。

蛋白免疫印迹法根据 ECL 化学发光法检测试剂盒说明书操作, 略有改动, 具体实验步骤如下: 转膜: 将 PVDF 膜、蛋白胶和海绵经电转液浸泡后进行转膜(海绵-PVDF 膜-蛋白胶-海绵), 设置电泳仪参数 30 V、300 mA, 电泳 30 min 后取下 PVDF 膜, TBST 缓冲液洗涤 3 次; 封闭: 5%脱脂奶粉, 室温封闭 1 h, TBST 缓冲液洗涤 3 次; 一抗:鼠抗组氨酸标签(1:2 000), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 缓冲液洗涤 3 次; 二抗:羊抗鼠(1:10 000), 室温摇动孵育 1 h, TBST 缓冲液洗涤 3 次; 检测: 将 PVDF 膜浸泡在 ECL 发光液内 10 s 后, 放置在显影仪内显影。

1.11 裂解酶初步活性鉴定及纯化

使用单斑法初步检测蛋白活性, 将 5 μ L 破碎蛋白上清液 Lys161 与 Lys163 点在宿主菌双层平板上, 37 $^{\circ}$ C 培养箱培养, 观察有无抑菌圈产生。将确定有裂解活性的裂解酶进行纯化, 取大量诱导的菌液 4 $^{\circ}$ C、8 000 r/min 离心 10 min 获取菌体沉淀, 用磷酸盐缓冲液重悬后超声破碎(功率 75 W、超声 2 s、间歇 3 s, 总时长 10 min), 收集破碎蛋白上清液, 用 Ni-柱亲和层析法纯化蛋白, 经磷酸盐缓冲液透析后用 Qubit 2.0 荧光计测定蛋白浓度, 并于 -80 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.12 刃天青显色法检验纯化 Lys161 活性

根据文献[13]中的方法对裂解活性较弱的裂解酶检验杀菌活性, 方法略有改动, 具体实

验步骤为：将培养至对数期(OD_{600} 约 0.6)的 Sa 68 菌液 10 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清液, 用 PBS 缓冲液洗涤并重悬, 取 100 μ L 至 96 孔板中, 分为实验组与对照组, 每组 3 孔; 实验组内加入 100 μ L 纯化 Lys161 (终浓度为 125 μ g/mL), 同时向对照组内加入 100 μ L PBS 缓冲液, 37 $^{\circ}$ C 培养 2 h; 随后向各孔内加入 3 μ L 2% (质量体积分数)的刃天青, 37 $^{\circ}$ C 培养观察颜色变化。

1.13 裂解酶的蛋白结构预测

用 CLC Genomics WorkBench 12.0 软件对 Lys161 蛋白的氨基酸序列进行分析; 采用 Signal P4.1 服务器(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)对 Lys161 在线预测是否具有信号肽; 采用 TMHMM V2.0 服务器(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)对 Lys161 在线预测, 同时根据疏水性结果判断 Lys161 是否具有跨膜区域; 采用 PredictProtein 网站(<https://predictprotein.org/>)对 Lys161 在线预测其二级结构, 其 CHAP 催化结构域的三级结构使用 SWISS-MODEL 网站 (<https://swissmodel.expasy.org/>)进行同源建模。

2 结果与分析

2.1 噬菌体全基因组序列分析

该噬菌体 vB_Sau_P68 全长为 139 409 bp, GC 含量为 31.0%, RAST 注释结果显示噬菌体编码 220 个开放阅读框与 1 个 tRNA 基因。在所有 ORFs 中, 63 个开放阅读框与已知蛋白功能具有显著相似性, 其余 157 个开放阅读框被注释为功能未知蛋白(图 1)。

噬菌体全基因组序列经 NCBI BLASTn 比对, 与葡萄球菌噬菌体 *Staphylococcus* phage pSco-10 (KX011028.1)、*Staphylococcus* phage

Stab23 (LR215720.1)、*Staphylococcus* phage vB_Sau_S24 (KY794643.1)、*Staphylococcus* phage vB_Sau_Clo6 (KY794642.1)和 *Staphylococcus* phage Stab22 (LR215721.1)相似性较高, 均为 Herelleviridae 家族 Twortvirinae 亚科 Kayvirus 属, 虽然序列具有很高的相似性(表 2), 但利用 BRIG 软件对 5 株葡萄球菌噬菌体全基因组序列进行比对, 发现噬菌体序列依旧存在显著差异(图 2), 随后采用 MEGA 7.0 的 neighbor-joining 法对噬菌体末端酶大亚氨基酸序列构建系统进化树(图 3), 同样表明 vB_Sau_P68 为一株新的噬菌体。

2.2 噬菌体电镜

通过透射电镜观察, 噬菌体 vB_Sau_P68 形态上属于肌尾噬菌体(图 4), 具有典型的正二十面体头部结构和长收缩性尾部结构, 底板还延伸出一个旋钮状结构, 噬菌体头部直径为 (84 ± 1) nm, 尾部长度为 (195 ± 1) nm。

2.3 裂解酶基因预测

RAST 注释结果提示该噬菌体存在 2 个开放阅读框编码裂解酶基因, 即 ORF161 与 163 均被注释为 N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸酰胺酶, 而且 Pfam 与 Inter Pro 预测 ORF161 存在 CHAP 催化结构域, ORF163 存在 SH3_5 结合结构域。

2.4 目的片段的扩增与重组质粒的鉴定

ORF161 与 163 目的基因片段长度分别为 639 bp 与 633 bp, 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 目的条带大小与预测片段长度一致(图 5A)。用载体上游引物(pCold_F_Primer)与目的片段下游引物(ORF161_R 与 ORF163_R)进行 PCR 扩增验证, 确认插入片段位置正确(图 5B)。再将重组质粒测序获得的基因序列与 ORF161 或 163 参考序列基因组进行比对, 覆盖度为 100%, 表明无碱基缺失或突变。

表 2 与 vB_Sau_P68 噬菌体相似度较高的 5 条序列

Table 2 Phages with high similarity to vB_Sau_P68

Phages	Family	Coverage (%)	Identity (%)
<i>Staphylococcus</i> phage pSco-10	Herelleviridae	61	95.74
<i>Staphylococcus</i> phage Stab23	Herelleviridae	82	93.15
<i>Staphylococcus</i> phage vB_Sau_S24	Herelleviridae	81	95.48
<i>Staphylococcus</i> phage vB_Sau_Clo6	Herelleviridae	81	94.95
<i>Staphylococcus</i> phage Stab22	Herelleviridae	81	94.72

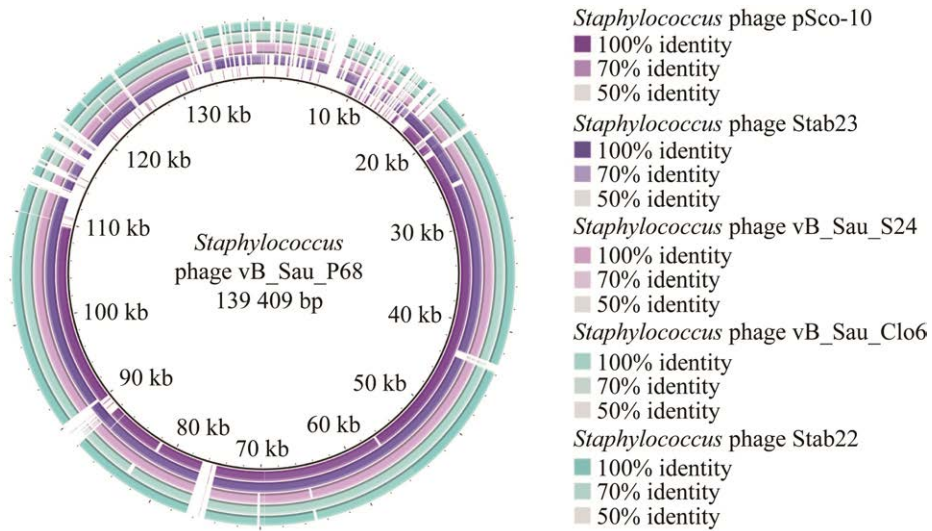


图 2 VB_SAU_P68 与 5 株葡萄球菌噬菌体全基因序列比对

Figure 2 Genome comparison of vB_Sau_P68 with 5 *Staphylococcus* phages.

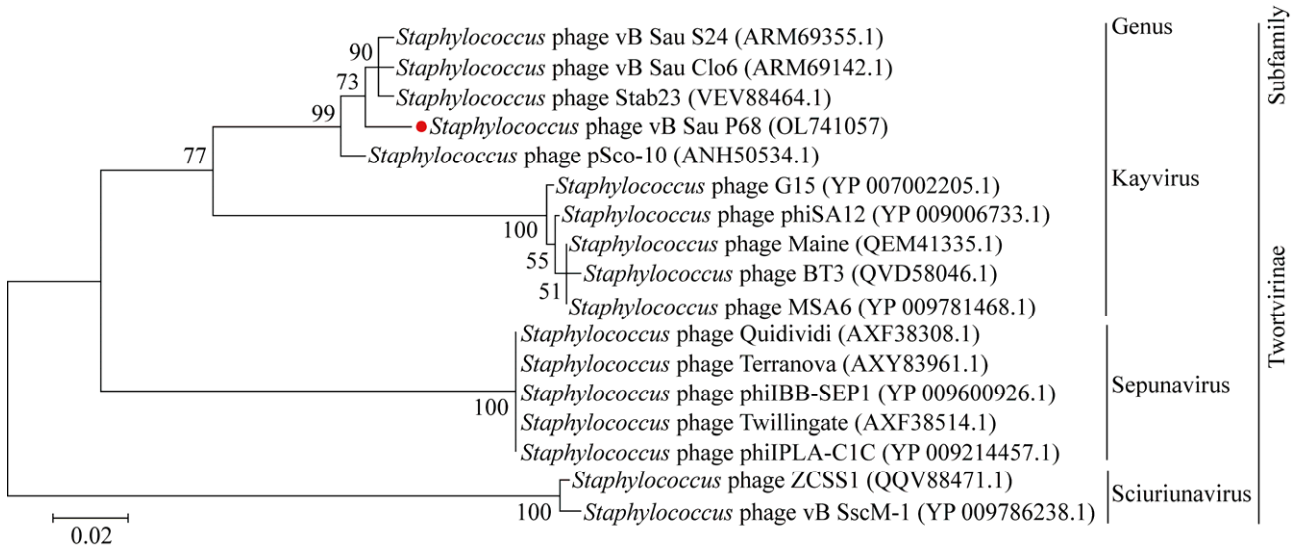


图 3 基于噬菌体末端酶大亚基氨基酸序列的系统发育树 分支数字代表可信度，标尺代表遗传距离

Figure 3 Phylogenetic tree based on the terminase large subunit amino acid sequences of phages. The branch numbers represent the confidence level, and the scale represents the genetic distance.

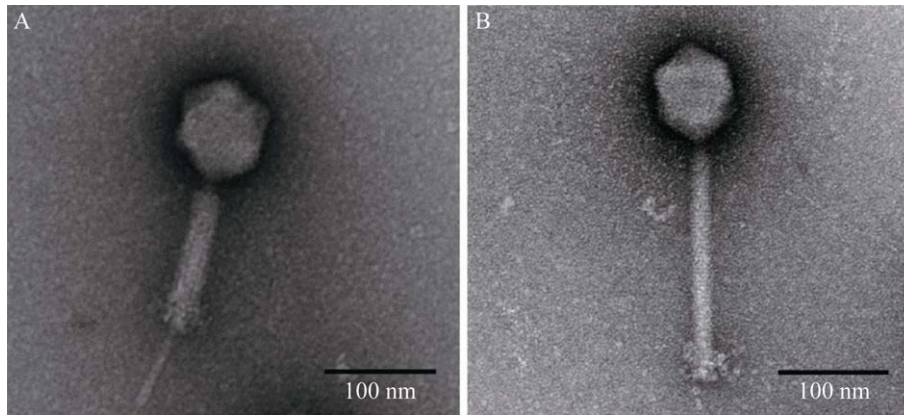


图 4 噬菌体 vB_Sau_P68 形态 A: 尾巴收缩时的噬菌体; B: 尾巴未收缩时的噬菌体
Figure 4 Morphology of vB_Sau_P68. A: Phage with contracted tail; B: Phage with uncontracted tail.

2.5 蛋白表达纯化与活性验证

如图 6A 所示, 蛋白粗提液经 SDS-PAGE 鉴定后, 与 pCold I 空载体对照组相比, 含有 CHAP 结构域的 Lys161 能够在上清液中检测到, 含有 SH3_5 结构域的 Lys163 则无特异性条带。如图 6B 所示, 根据 Western blotting 鉴定结果, 证明只有 CHAP 结构域的 Lys161 实现表达。取 5 μ L 蛋白粗提液 Lys161 与 Lys163 点在

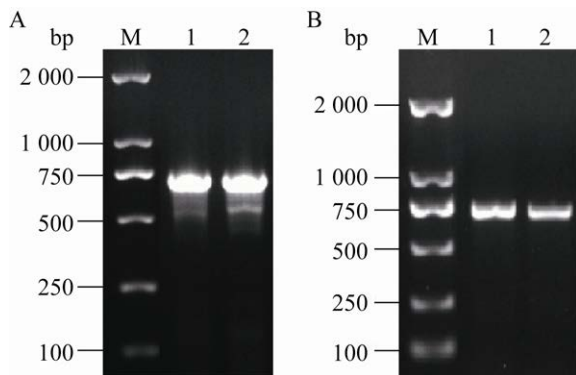


图 5 电泳鉴定图 A: 目的片段 PCR 产物鉴定; B: 重组质粒 PCR 产物鉴定。M: Marker; 1: Lys161; 2: Lys163
Figure 5 Electrophoresis identification. A: Target fragment PCR product identification; B: Identification of recombinant plasmid PCR products. M: Marker; 1: Lys161; 2: Lys163.

宿主菌双层平板上, 如图 6C 所示, Lys161 具有抑菌圈, Lys163 与 pCold I 对照则无活性。结合 SDS-PAGE 与 Western blotting 结果可知 Lys161 为具有裂解活性的可溶性蛋白, 利用 Ni-柱亲和和层析法对其纯化, 在含 250 mmol/L 咪唑的磷酸盐缓冲液内可收集到目的蛋白, 随后用不含咪唑的磷酸盐缓冲液透析(4 $^{\circ}$ C 透析 24 h, 每 8 h 换一次缓冲液), Qubit 2.0 荧光计测定蛋白浓度为 250 μ g/mL。

2.6 刃天青显色法观察 Lys161 裂解活性

刃天青溶液呈蓝色, 能够渗入到活细胞内, 将活细胞不可逆地还原为粉色。Sa 68 菌液加入 Lys161 孵育 2 h 后, 刃天青显色反应呈蓝紫色(图 7A), 而加入 PBS 缓冲液的细菌显色反应呈粉色(图 7B), 证明 Lys161 具有裂解活性。

2.7 裂解酶 Lys161 结构分析

Lys161 由 212 个氨基酸组成, 该裂解酶不含信号肽(图 8A), 一般认为 *S* 值大于 0.5 时存在信号肽, 根据跨膜蛋白预测及疏水性预测结果可知该裂解酶不存在跨膜蛋白(图 8B 和 8C)。其二级结构组成为: α -螺旋占 20.75%, β -折叠占 24.06%, 无规则卷曲占 55.19%, 是

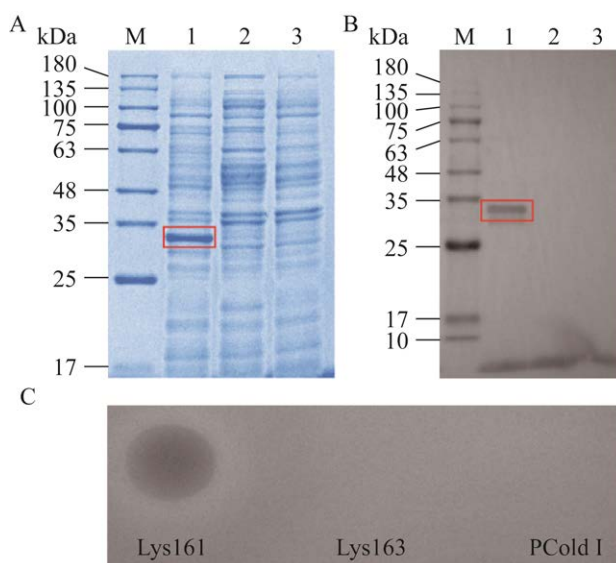


图 6 蛋白表达与活性鉴定 A: SDS-PAGE 鉴定; B: Western blotting 鉴定; C: 单斑法验证裂解活性。M: Marker; 1: Lys161 超声上清液; 2: Lys163 超声上清液; 3: pCold I 空载体对照

Figure 6 Protein expression and activity identification. A: SDS-PAGE; B: Western blotting; C: Single spot assay to verify lytic activity. M: Marker; 1: Lys161 ultrasound supernatant; 2: Lys163 ultrasound supernatant; 3: pCold I empty vector control.

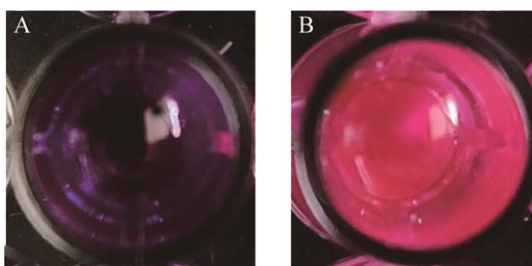


图 7 刃天青显色结果 A: 实验组; B: 对照组
Figure 7 Results of resazurin assay. A: Experiment; B: Control.

以无规则卷曲为主的亲水性可溶蛋白。Lys161 CHAP 催化结构域与 LysK 的 CHAP 催化结构域氨基酸序列相似性为 96.97%，有 5 个氨基酸的差异，其三级结构根据 LysK 的 CHAP 结构域 (登录号为 4CSH_A) 进行同源建模(图 9)。

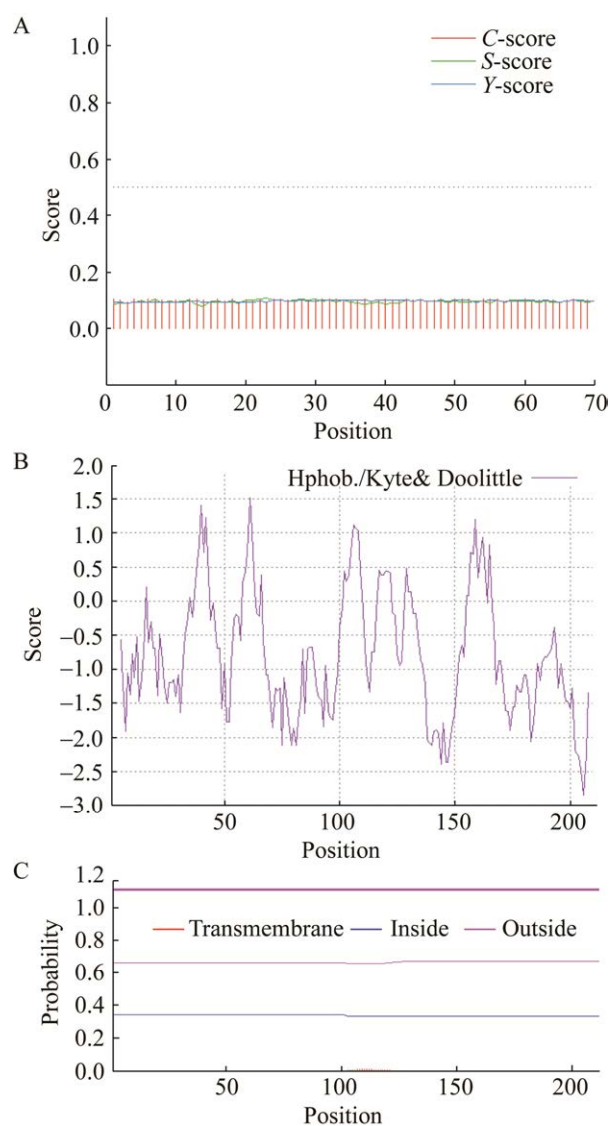


图 8 Lys161 裂解酶结构分析 A: 信号肽预测, C-值为剪切位点分值, S-值为信号肽分值, Y-值为综合剪切分值; B: 疏水性预测, 正值为疏水区, 负值为亲水区; C: 跨膜蛋白预测, transmembrane 为跨膜, inside 为膜内, outside 为膜外

Figure 8 Structure analysis of Lys161 lyase. A: Signal peptide prediction, C-score is the cleavage site score, S-score is the signal peptide score, Y-score is the comprehensive cleavage score; B: Hydrophobicity prediction, the positive value is the hydrophobic region, the negative value is the hydrophilic region; C: Prediction of transmembrane protein, inside is inside the membrane, outside is outside the membrane.



图9 Lys161 CHAP 结构域示意图

Figure 9 Schematic illustration of structure of CHAP domain in Lys161.

3 讨论与结论

β -内酰胺类、氨基糖苷类、喹诺酮类与大环内酯类等药物曾被认为是治疗金黄色葡萄球菌的有效抗生素,但近年来由于滥用、误用导致耐多药菌株分离率越来越高,严重威胁人类健康,抗菌药物耐药性已经成为重大公共卫生问题,研发与传统抗生素作用模式不同的抗菌药物迫在眉睫^[14-16]。由于耐多药细菌的出现,裂解酶作为替代抗菌剂逐渐受到重视。裂解酶在对抗抗生素耐药性革兰阳性病原菌方面显示出很大的潜力^[17]。

噬菌体裂解酶作为一种高效杀菌的抗菌剂,与噬菌体相比不易产生细菌抗性^[6],因为裂解酶成分单一,本质为一种蛋白质分子,只作用于细菌细胞壁肽聚糖上特定糖苷键,特异性较强,而不同种属细菌之间的细胞外结构也具有差异,因此裂解酶对其他共生菌群无影响^[18],可避免菌群失调。另外,在同一菌种内,裂解酶通常比噬菌体的裂解谱更广泛,这是由于噬菌体吸附的受体有多种,包括细菌表面多糖、外膜蛋白或者其他特殊结构如鞭毛、菌毛等,噬菌体在吸附过程中容易产生抗性突变使受体丢失,无法进行噬菌体的注入以及抗菌蛋白发挥裂解效果,从而产生噬菌体抗性,但细胞壁

肽聚糖是革兰氏阳性菌暴露在外的一层可直接被裂解酶水解的结构,通常不会有结构上的变化,所以相较于噬菌体,裂解酶往往具有更广泛的裂解谱,一些裂解酶可与EDTA联合杀灭革兰氏阴性菌^[19]。在动物体内实验中,裂解酶也表现出了良好的治疗干预,如ClyS与苯唑西林协同作用能够有效保护小鼠免受MRSA感染^[20],LysGH15与黄芩苷、芹菜素联合也可有效降低金黄色葡萄球菌 α -溶血素的产生,对金黄色葡萄球菌肺炎具有良好的治疗效果^[21-22]。

一般来说,裂解酶对细胞不具有毒性作用,目前,3种裂解酶SAL200、CF-301和P128已经应用于临床^[23],其中裂解酶SAL200在化学、血液学、尿液分析、生命体征和体格检查中均无显著变化,并且细菌在SAL200作用下连续传代30次也并未产生耐药突变体^[24]。此外,在兽医临床中,P128还可用于治疗犬脓皮病^[25],Trx-SA1与LysGH15可用于MRSA引起的乳房炎^[26-27]。一些嵌合裂解酶如ClyC-AH与PRF-119等也表现出更好的裂解活性^[26,28]。

根据以往报道,对同一裂解酶内不同结构域的研究都是以截短再表达的方式研究,将同一裂解酶内具有不同活性片段的结构域进行三维解析,发现在金黄色葡萄球菌噬菌体裂解酶内,主要发挥裂解活性的结构域为CHAP结构域,该片段与 Ca^{2+} 具有亲和性;其次为amidase 2结构域,该片段与 Zn^{2+} 具有亲和性,但在单独表达时通常不表现出裂解活性,与CHAP结构域一起表达后具有“1+1>2”的特点,而SH3_5结构域则具有结合活性^[29-31]。目前并无文献报道一个完整的金黄色葡萄球菌噬菌体裂解酶在序列上被插入其他噬菌体蛋白,而在本研究中,ORF161与ORF163中间插入了一段内切酶(HNH homing endonuclease),该内切酶在转录水平上是否能够发生自切割将两段编码裂解

酶基因的蛋白整合为一个完整裂解酶,还有待进一步探索。

本研究对一株新发现的金黄色葡萄球菌噬菌体全基因组序列进行分析,对其编码的2个裂解酶基因进行克隆表达,发现具有CHAP催化结构域的Lys161能够表达且具有裂解活性,而只含有SH3_5结合结构域的Lys163则无表达且无裂解活性。裂解酶Lys161属于内容素,在噬菌体中通常与穴蛋白协同作用,在穴蛋白靶向细胞膜的帮助下,裂解酶靶向细胞壁裂解细菌,所以与自溶素相比通常不存在信号肽及跨膜区域^[32]。总之,本研究利用生物信息学的方法对噬菌体及其编码的裂解酶序列进行分析,并且成功表达了具有裂解活性的裂解酶Lys161,为裂解酶机制的探索及应用提供了理论支持。

REFERENCES

- [1] Misić AM, Davis MF, Tyldsley AS, Hodkinson BP, Tolomeo P, Hu BF, Nachamkin I, Lautenbach E, Morris DO, Grice EA. The shared microbiota of humans and companion animals as evaluated from *Staphylococcus* carriage sites[J]. *Microbiome*, 2015, 3: 2
- [2] Zhvania P, Hoyle NS, Nadareishvili L, Nizharadze D, Kutateladze M. Phage therapy in a 16-year-old boy with netherton syndrome[J]. *Frontiers in Medicine*, 2017, 4: 94
- [3] Schooley RT, Biswas B, Gill JJ, Hernandez-Morales A, Lancaster J, Lessor L, Barr JJ, Reed SL, Rohwer F, Benler S, et al. Development and use of personalized bacteriophage-based therapeutic cocktails to treat a patient with a disseminated resistant *Acinetobacter baumannii* infection[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2017, 61(10): e00954-e00917
- [4] Nzakizwanayo J, Hanin A, Alves DR, McCutcheon B, Dedi C, Salvage J, Knox K, Stewart B, Metcalfe A, Clark J, et al. Bacteriophage can prevent encrustation and blockage of urinary catheters by *Proteus mirabilis*[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2015, 60(3): 1530-1536
- [5] Gondil VS, Harjai K, Chhibber S. Endolysins as emerging alternative therapeutic agents to counter drug-resistant infections[J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2020, 55(2): 105844
- [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]. *PNAS*, 2001, 98(7): 4107-4112
- [7] Totté J, Van Doorn MB, Pasmans SGMA. Successful treatment of chronic *Staphylococcus aureus*-related dermatoses with the topical endolysin staphfect SA.100: a report of 3 cases[J]. *Case Reports in Dermatology*, 2017, 9(2): 19-25
- [8] Fatma A, Maheswaran E, Oluwasegun ID, Samar R, Stephanie L, Tolulope JO, Fazal MK, Akomolafe A, Fazal A, Eduard T, et al. Phage-encoded endolysins[J]. *Antibiotics*, 2021, 10(2): 124
- [9] Rodríguez-Rubio L, Gerstmans H, Thorpe S, Mesnage S, Lavigne R, Briers Y. DUF3380 domain from a *Salmonella* phage endolysin shows potent N-acetylmuramidase activity[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82(16): 4975-4981
- [10] Navarre WW, Ton-That H, Faull KF, Schneewind O. Multiple enzymatic activities of the murein hydrolase from staphylococcal phage ϕ 11: identification of a d-alanyl-glycine endopeptidase activity[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(22): 15847-15856
- [11] 朱丹, 祝思路, 付玉荣, 伊正君. 噬菌体裂解酶作用机制及用于细菌感染治疗的研究进展[J]. *基础医学与临床*, 2018, 38(2): 241-245
Zhu D, Zhu SL, Fu YR, Yi ZJ. Mechanism and progress of the research on the treatment of bacterial infection with bacteriophage lysin[J]. *Basic & Clinical Medicine*, 2018, 38(2): 241-245 (in Chinese)
- [12] Gu JM, Lu R, Liu XH, Han WY, Lei LC, Gao Y, Zhao HL, Li Y, Diao YW. LysGH15B, the SH3b domain of staphylococcal phage endolysin LysGH15, retains high affinity to staphylococci[J]. *Current Microbiology*, 2011, 63(6): 538-542
- [13] Butaye P, Argudín MA, Smith TC. Livestock-associated MRSA and its current evolution[J]. *Current Clinical Microbiology Reports*, 2016, 3(1): 19-31
- [14] 杜丽娟. 分枝杆菌噬菌体 Guo1 LysA 的克隆表达及抗菌作用研究[D]. 重庆: 重庆医科大学硕士学位论文, 2018
Du LJ. Study on expression and antibacterial effect of *Mycobacterium* phage Guo1 LysA[D]. Chongqing: Master's Thesis of Chongqing Medical University, 2018 (in Chinese)
- [15] Ansari S, Jha RK, Mishra SK, Tiwari BR, Asaad AM. Recent advances in *Staphylococcus aureus* infection:

- focus on vaccine development[J]. *Infection and Drug Resistance*, 2019, 12: 1243-1255
- [16] Gajdács M. The continuing threat of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. *Antibiotics: Basel, Switzerland*, 2019, 8(2): 52
- [17] Fischetti VA. Bacteriophage lysins as effective antibacterials[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2008, 11(5): 393-400
- [18] Huang GT, Shen XD, Gong YL, Dong ZW, Zhao X, Shen W, Wang J, Hu FQ, Peng YZ. Antibacterial properties of *Acinetobacter baumannii* phage Abp1 endolysin (PlyAB1)[J]. *BMC Infectious Diseases*, 2014, 14: 681
- [19] Dong HL, Zhu CY, Chen JY, Ye X, Huang YP. Antibacterial activity of *Stenotrophomonas maltophilia* endolysin P28 against both Gram-positive and Gram-negative bacteria[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 1299
- [20] Daniel A, Euler C, Collin M, Chahales P, Gorelick KJ, Fischetti VA. 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
- [21] Xia FF, Li X, Wang B, Gong PJ, Xiao F, Yang M, Zhang L, Song J, Hu LY, Cheng MJ, et al. Combination therapy of LysGH15 and apigenin as a new strategy for treating pneumonia caused by *Staphylococcus aureus*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 82(1): 87-94
- [22] 胡丽媛. 金葡菌噬菌体裂解酶 LysGH15 关键位点的确定及其与黄芩苷联合治疗小鼠肺炎的研究[D]. 长春: 吉林大学硕士学位论文, 2017
- Hu LY. The key sites of *Staphylococcus aureus* phage lysin LysGH15 and the combination therapy of Lys GH15 and baicalin for treating pneumonia of mice[D]. Changchun: Master's Thesis of Jilin University, 2017 (in Chinese)
- [23] Álvarez A, Fernández L, Gutiérrez D, Iglesias B, Rodríguez A, García P. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospitals: latest trends and treatments based on bacteriophages[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2019, 57(12): e01006-e01019
- [24] Jun SY, Jang IJ, Yoon S, Jang K, Yu KS, Cho JY, Seong MW, Jung GM, Yoon SJ, Kang SH. Pharmacokinetics and tolerance of the phage endolysin-based candidate drug SAL200 after a single intravenous administration among healthy volunteers[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2017, 61(6): e02629-e02616
- [25] Junjappa RP, Desai SN, Roy P, Narasimhaswamy N, Raj JRM, Durgaiah M, Vipra A, Bhat UR, Satyanarayana SK, Shankara N, et al. Efficacy of anti-staphylococcal protein P128 for the treatment of canine pyoderma: potential applications[J]. *Veterinary Research Communications*, 2013, 37(3): 217-228
- [26] Fan JD, Zeng ZL, Mai KJ, Yang Y, Feng JQ, Bai Y, Sun BL, Xie QM, Tong YG, Ma JY. Preliminary treatment of bovine mastitis caused by *Staphylococcus aureus*, with trx-SA1, recombinant endolysin of *S. aureus* bacteriophage IME-SA1[J]. *Veterinary Microbiology*, 2016, 191: 65-71
- [27] 肖峰. 应用金黄色葡萄球菌噬菌体裂解酶 LysGH15 治疗乳房炎的实验研究[D]. 长春: 吉林大学硕士学位论文, 2015
- Xiao F. Experimental study of *Staphylococcus aureus* phage lysin LysGH15 in the treatment of mastitis[D]. Changchun: Master's Thesis of Jilin University, 2015
- [28] Idelevich EA, Von Eiff C, Friedrich AW, Iannelli D, Xia GQ, Peters G, Peschel A, Wanninger I, Becker K. *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
- [29] Yan JA, Yang RJ, Yu SH, Zhao W. The application of the lytic domain of endolysin from *Staphylococcus aureus* bacteriophage in milk[J]. *Journal of Dairy Science*, 2021, 104(3): 2641-2653
- [30] Sanz-Gaitero M, Keary R, Garcia-Doval C, Coffey A, Van Raaij MJ. Crystal structure of the lytic CHAP(K) domain of the endolysin LysK from *Staphylococcus aureus* bacteriophage K[J]. *Virology Journal*, 2014, 11: 133
- [31] Gu JM, Feng YG, Feng X, Sun CJ, Lei LC, Ding W, Niu FF, Jiao LY, Yang M, Li Y, 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
- [32] 张倩, 张湘莉兰, 孙耀强, 于会举, 张培生, 刘鸽, 屈勇刚, 童贻刚, 李岩. 奶牛乳房炎金黄色葡萄球菌裂解性噬菌体裂解酶 LysIMEP5 基因的克隆及序列分析[J]. *中国兽药杂志*, 2016, 50(10): 15-21
- Zhang Q, Zhang XLL, Sun YQ, Yu HJ, Zhang PS, Liu G, Qu YG, Tong YG, Li Y. Cloning and sequence analysis of bovine mastitis *Staphylococcus aureus* lytic bacteriophage lysin LysIMEP5 gene[J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2016, 50(10): 15-21 (in Chinese)