

分类号: S852.61+1  
研究生学号: 2020854011

单位代码: 10183  
密 级: 公开



# 吉 林 大 学

## 硕 士 学 位 论 文

(专业学位)

裂解酶 LysLF1 的生物学特性及其抗链球菌的效果评价  
Biological characteristics of LysLF1 and its effect against  
*Streptococcus*

作者姓名: 黄春正  
类 别: 兽医硕士  
领域(方向): 分子病原细菌学  
指导教师: 顾敬敏 教授  
培养单位: 动物医学学院

2023 年 6 月

裂解酶 LysLF1 的生物学特性及其抗链球菌的效果  
Biological characteristics of LysLF1 and its effect  
against *Streptococcus*

作者姓名：黄春正

领域（方向）：兽医

指导教师：顾敬敏 教授

类别：兽医硕士

答辩日期：2023年6月1日

本研究由国家自然科学基金（**32072824、32222083、  
U19A2038**）和国家重点研发计划（**2021YFA0911201**）资  
助

**This research was supported by the National Natural  
Science Foundation of China (32072824, 32222083,  
U19A2038) and the National Key Research and  
Development Program of China (2021YFA0911201)**

## 中文摘要

### 裂解酶 LysLF1 的生物学特性及其抗链球菌的效果评价

链球菌 (*Streptococcus spp*) 是一类危害严重的人畜共患病原菌。目前, 抗生素仍是治疗链球菌感染的首选药物, 如:  $\beta$ -内酰胺类 (以青霉素为代表)、大环内酯类、氟喹诺酮类抗生素等。但世界各地包括中国、东南亚、北欧和美洲等多个国家和地区均有链球菌耐药表型和耐药基因 (*mefA*、*ermB*、*TetM* 等) 的报道。再加上新候选抗生素的减少迫使人们研发新型抗菌制剂。裂解酶是一种由噬菌体编码的水解酶, 可特异性切割细菌细胞壁肽聚糖上不同的化学键, 破坏细胞壁完整性, 使细菌在渗透压的作用下发生崩解。该类酶可以在体外表达, 具有易于获取、易于改造、起效快、安全、不易使细菌产生抗性的特点。另外, 链球菌细胞壁肽聚糖中含有相似交联桥结构, 这使得链球菌噬菌体裂解酶较其它种属裂解酶相比天然具有更宽的裂解谱, 可裂解属内多种链球菌。因此, 裂解酶有望成为抗链球菌感染的新型抗菌制剂。

在本研究中, 以马链球菌属临床分离株 3518 为宿主菌, 在其全基因组序列中挖掘到一个具有良好裂解活性的前噬菌体裂解酶, 将其命名为 LysLF1。将 LysLF1 的氨基酸序列上传至生物信息学在线分析网站 NCBI, 进行同源比对分析。分析结果表明, LysLF1 与其它已被研究过功能的链球菌裂解酶的同源性最高为 21.88%, 表明 LysLF1 为一个新的链球菌属裂解酶; 基本生物学特性测定结果表明, LysLF1 具有较宽的宿主范围, 可裂解受试菌株中的马链球菌、猪链球菌和解没食子酸链球菌, 细菌减少比率在 30%~99%; pH 稳定性测定结果表明, LysLF1 具有较强的耐酸碱能力, 在 4~8 pH 范围内保持良好的杀菌活性可裂解约 70%~99% 的活菌; 温度稳定性结果表明, LysLF1 对温度较为敏感, 温度高于 40°C 时其活性完全丧失; NaCl 稳定性结果显示, 高浓度 NaCl 会影响 LysLF1 活性, 使用 200 mM NaCl, 会使其杀菌量减少  $1.24 \times 10^8$  CFU/mL; EDTA 稳定性结果显示, 金属离子是该酶发挥活性所非必须的。体外裂解实验结果进一步表明, LysLF1 具有良好的杀菌活性。100  $\mu$ g/mL 的 LysLF1 可使活菌数下降约 2 个 Lg 单位 (起始菌量为  $10^8$  CFU/mL), 杀死约 99% 的活菌。以上结果表明, LysLF1 具

有良好的应用前景。

随后, 通过生物信息学在线分析工具 Phyre<sup>2</sup> 预测了 LysLF1 各结构域的 3D 结构和关键催化作用位点, 并使用一步法将预测的关键催化位点逐一突变为丙氨酸, 通过比较各突变体蛋白 (N11A、C26A、H91A、G108A、G158A、D241A、D276A、D337A) 与 Native LysLF1 的杀菌活性, 确定其关键催化位点。实验结果表明, C26A、G108A 的杀菌活性较 Native LysLF1 相比, 分别下降了 81.99%, 61.61%。从而确定了 C26 和 G108 是 LysLF1 发挥裂解活性的关键氨基酸作用位点; 通过构建截短体蛋白 (LysLF1A(1~170 aa)、LysLF1B(1~360 aa)、LysLF1C(330~445 aa)) 采用体外杀菌活性实验确定各结构域的裂解活性; 结果表明, LysLF1A(1~170 aa)、LysLF1B(1~360 aa) 具有裂解活性, LysLF1C(330~445 aa) 不具有裂解活性; 通过构建融合蛋白 (LysLF1A-EGFP、LysLF1B-EGFP、EGFP-LysLF1C), 使用激光共聚焦显微镜确定各结构域的结合活性。结果表明, LysLF1B-EGFP、EGFP-LysLF1C 具有结合活性, LysLF1A-EGFP 不具有结合活性。从而确定了 LysLF1 的结构形式为双催化域和一个结合域, 发挥结合活性的结构域与 SH3 相似, GH25 结构域也与结合有关, 发挥催化活性的关键结构域与 CHAP 相似。以上结果, 为日后 LysLF1 的人工设计与改造奠定了基础。

最后, 通过使用宿主菌马链球菌临床分离株 3518 建立小鼠肺炎感染模型, 使用不同浓度的 LysLF1 治疗小鼠, 评价 LysLF1 的体内抗菌效果。结果显示, 200  $\mu\text{g}/\text{只}$  和 400  $\mu\text{g}/\text{只}$  剂量的 LysLF1 均有提高小鼠存活率和减慢小鼠死亡的效果。200  $\mu\text{g}/\text{只}$  剂量的 LysLF1 可保护 37.5% 的小鼠免受死亡, 400  $\mu\text{g}/\text{只}$  剂量的 LysLF1 可使小鼠存活率提高到 75%。小鼠肺部细菌载量检测结果表明, 400  $\mu\text{g}/\text{只}$  剂量的 LysLF1 对菌株 3518 有清除作用。肺部病理组织学切片结果显示, 与未治疗组相比, 400  $\mu\text{g}/\text{只}$  剂量的 LysLF1 可缓解小鼠肺部病理组织学损伤。在 12 h 和 48 h 的肺间质厚度、肺泡内出血、炎性细胞浸润等情况均有所减轻。

综上所述, 本研究发现并成功获得一个具有良好体内外抗菌活性的新链球菌噬菌体裂解酶, 该酶在治疗链球菌感染中具有良好的应用潜力, 为丰富链球菌细菌裂解酶酶库和新型抗菌制剂的研发奠定基础。

#### 关键词:

链球菌裂解酶, 新型抗菌制剂, 结构域, 小鼠肺炎模型

## Abstract

### **Biological characteristics of LysLF1 and its effect against**

#### ***Streptococcus***

The disease caused by *Streptococcus spp* is a serious zoonosis which distributes widely in the world. Antibiotics including  $\beta$ -lactam (represented by penicillin), macrolide and quinolone were effective drug for the therapy for *streptococcal* infection. However, there have been reports of *Streptococcus* resistant phenotype and genotype (*mefA*, *ermB*, *TetM*, etc.) in China and worldwide. In addition, the reduction of new candidate antibiotics has forced people to develop new antibacterial agents. Endolysins are hydrolytic enzymes which are encoded by phage, specifically cleave the specific bonds on peptidoglycan of bacterial cell wall, destroy the integrity of cell wall, and make bacteria disintegrate under the osmotic pressure. It can be expressed *in vitro* and has various features, such as easily accessible, facilely modified, quick effect, safety, and low resistance to bacteria. In addition, there are the similar cross-bridge in *Streptococcal* peptidoglycan which allows *Streptococcal* endolysins have a wider host spectrum than other species endolysins in nature, and can lyse a variety of *Streptococci* species. Therefore, endolysin is expected to become a new antimicrobial alternatives against *Streptococcal* infections.

In this study, the clinical isolate 3518 of *Streptococcus equi* was used as the host bacteria, and a prophage endolysin with good antimicrobial activity was found in its whole genome sequence, which was named LysLF1. Uploaded the amino acid sequence of LysLF1 to the bioinformatics online analysis website NCBI for comparing the homology. The results of analysis indicated that LysLF1 had the highest homology of 21.88% with other *Streptococcal* endolysins that had been studied. LysLF1 is a new *Streptococcus* endolysin. The results of biological characteristics indicated that LysLF1 had a wide host range and could lyse *Streptococcus equi*, *Streptococcus suis*, and *Streptococcus gallolyticus* in the tested strains, with a bacterial reduction rate of 30%

to 99%.The pH stability test results showed that LysLF1 has strong acid and alkali resistance, and maintained good antimicrobial activity within the pH range of 4~8, which can cleave about 70% to 99% of live bacteria; The temperature stability results indicated that LysLF1 was more sensitive to temperature, and its activity is completely lost when the temperature was above 40 °C; The stability results of NaCl showed that high concentrations of NaCl would affect the activity of LysLF1, and the use of 200 mM NaCl would reduce its antimicrobial activity by  $1.24 \times 10^8$  CFU/mL; The stability results of EDTA showed that metal ions were not necessary for the enzyme to exert its activity. The results of *in vitro* lysis experiments further indicated that LysLF1 had good antimicrobial activity.

Subsequently, the 3D structure and key catalytic sites of each domain of LysLF1 were predicted using the bioinformatics online analysis tool Phyre<sup>2</sup>, and the predicted key catalytic sites were mutated into alanine using a one-step method. By comparing the antimicrobial activity of various mutant proteins (N11A, C26A, H91A, G108A, G158A, D241A, D276A, D337A) with Native LysLF1, their key catalytic sites were determined. The experimental results showed that the antimicrobial activity of C26A and G108A decreased by 81.99% and 61.61% compared to Native LysLF1, respectively. Thus, it was determined that C26 and G108 are key amino acid action sites for LysLF1 to exert proteolytic activity; By constructing truncated proteins (LysLF1A (1~170 aa), LysLF1B (1~360 aa), and LysLF1C (330~445 aa)), the proteolytic activity of each domain was determined through *in vitro* antimicrobial experiments; The results showed that LysLF1A (1~170 aa) and LysLF1B (1~360 aa) exhibited proteolytic activity, while LysLF1C (330~445 aa) did not exhibit proteolytic activity; By constructing fusion proteins (LysLF1A-EGFP, LysLF1B-EGFP, EGFP-LysLF1C), the binding activity of each structural domain was determined using LSCM . The results showed that LysLF1B-EGFP and EGFP-LysLF1C had binding activity, while LysLF1A-EGFP did not. Thus, the structure type of LysLF1 was determined to be a dual-enzymatically active domain (EAD) and a cell wall-binding domain(CBD). The domain that exerts binding activity was similar to SH3, and the GH25 domain was also related to binding. The key domain that exerted catalytic activity was similar to CHAP. The above results have laid the

foundation for the artificial design and transformation of LysLF1 in the future.

Finally, a mice pneumonia infection model was established using the host *Streptococcus equi* clinical isolate 3518. Different concentrations of LysLF1 were used to treat mice and evaluated the *in vivo* antibacterial effect of LysLF1. The results showed that 200  $\mu\text{g}/\text{mice}$  and 400  $\mu\text{g}/\text{mice}$  LysLF1 had the effect of improving mice survival rate and slowing their death. 200  $\mu\text{g}/\text{mice}$  LysLF1 could protect 37.5% of mice from death, 400  $\mu\text{g}/\text{mice}$  LysLF1 could increase the survival rate of mice to 75%. The bacterial load results in the mice lungs showed that 400  $\mu\text{g}/\text{mice}$  LysLF1 had a scavenging effect on isolate 3518. The results of lung histopathological showed that compared to the untreated group, 400  $\mu\text{g}/\text{mice}$  LysLF1 could alleviate pathological and histological damage to the lungs. The pulmonary interstitial thickness, alveolar hemorrhage, and inflammatory cell infiltration were reduced at 12 and 48 hours.

In summary, this study found and successfully obtained a novel *Streptococcal* endolysin with good antimicrobial activity *in vitro* and *vivo*. LysLF1 has good application potential in the treatment of *Streptococcal* infections, laying the foundation for enriching the *Streptococcal* endolysin library and developing new antibacterial agents.

**Keywords:**

*Streptococcal* endolysins; novel antimicrobial agents; domain; mice pneumonia model



# 目 录

前言.....	1
第一篇 文献综述 .....	3
第 1 章 链球菌的研究进展.....	3
1.1 链球菌的概述及危害.....	3
1.2 链球菌的分类方法.....	4
1.3 致病性链球菌的毒力因子.....	5
1.4 致病性链球菌感染的治疗现状.....	6
第 2 章 链球菌抗菌制剂的研究进展 .....	7
2.1 噬菌体及其裂解酶的概述.....	8
2.2 链球菌抗菌制剂的研究概况.....	9
2.3 展望.....	11
第二篇 研究内容 .....	13
第 1 章 裂解酶 LysLF1 的表达及其基本生物学特性.....	13
1.1 材料.....	13
1.2 方法.....	15
1.3 结果.....	21
1.4 讨论.....	31
1.5 小结.....	33
第 2 章 裂解酶 LysLF1 的结构预测与功能解析.....	34
2.1 材料.....	34
2.2 方法.....	36
2.3 结果.....	40
2.4 讨论.....	47
2.5 小结.....	49
第 3 章 裂解酶 LysLF1 在动物感染模型中的抗菌效果评价.....	50
3.1 材料.....	50
3.2 方法.....	51
3.3 结果.....	52
3.4 讨论.....	54
3.5 小结.....	55
结论.....	56
参考文献.....	57

## 英文缩写词

英文缩写	英文全称	中文全称及注释
BHI	Brain Heart Infusion Broth	脑心浸出液肉汤
bp	Base pair	碱基对
CBD	Cell-wall binding domain	细胞壁结合结构域
CFU	Colony-forming unit	菌落形成单位
CLSM	Confocal laser scanning microscope	激光扫描共聚焦显微镜
CPS	capsular polysaccharides	荚膜多糖
EAD	Enzymatically active domain	酶活性结构域
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid	乙二胺四乙酸
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein	增强型绿色荧光蛋白
IPTG	Isopropyl $\beta$ -D-Thiogalactoside	异丙基硫代半乳糖苷
Kan	kanamycin	卡那霉素
KD	Kilodalton	千道尔顿
LB	LB Broth	LB 肉汤
ORF	Open Reading Frame	开放阅读框
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
PBS	Phosphate Buffered Saline	磷酸盐缓冲溶液
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
PGHs	phage-encoded peptidoglycan hydrolases	噬菌体编码的肽聚糖水解酶
Tris-HCl	Tris-HCl	三羟甲基氨基甲烷 - 盐酸缓冲溶液

## 前 言

链球菌 (*Streptococcus spp*) 是一类危害严重的革兰氏阳性球菌, 其宿主范围广泛, 可感染人、猪、马、牛、鸡等多种动物。该类菌定殖于皮肤、口腔、鼻黏膜、生殖道、呼吸道等与外界直接接触的表面或粘膜。可引起人类咽炎、肺炎、阴道炎、败血症、奶牛乳腺炎、猪脑膜炎、马腺疫等多种临床症状。在人类健康、兽医临床及畜牧业生产中扮演重要角色。目前, 防治链球菌感染的策略仍是预防为主, 兼用抗生素治疗。近年来, 由于抗生素的不合理使用, 大多数的临床分离株的抗生素敏感性降低, 甚至出现多重耐药菌株和超级细菌。另外, 抗生素的毒副作用 (损伤机体系统)、过敏反应以及对机体正常菌群的影响等危害迫使人们寻找代替抗生素的新型抗菌制剂。噬菌体裂解酶是一类来源于噬菌体的肽聚糖水解酶 (phage-encoded peptidoglycan hydrolases PGHs)。该类酶通过与细菌细胞壁肽聚糖的化学键作用来发挥催化活性。相较于抗生素具有特异性强、很难产生抗性、抗菌效率高等特点。另外, 裂解酶作为一种蛋白质, 安全有效、易于人工合成修饰改造、研发成本低。凭借以上优势, 裂解酶逐渐走进人们的视线, 挖掘它作为新型抗菌制剂的潜力, 使其尽早应用于临床来抗菌。

链球菌的细胞壁肽聚糖具有相似的交联桥结构, 这使得链球菌噬菌体裂解酶相较于其它种属裂解酶有着更宽的裂解范围与应用潜力。目前, 约有 25 个链球菌属裂解酶被报道。这些报道主要针对酶学性质、结构以及抗菌活性进行研究, 很少有体内的研究, 更缺乏相应的临床数据。本研究从一株马链球菌临床分离株 3518 的全基因组中获取到一个前噬菌体裂解酶, 将其命名未 LysLF1。LysLF1 的氨基酸序列虽与 GH25 家族溶菌酶以及链球菌噬菌体 LF2 编码的裂解酶同源性较高, 但是并没有研究这两个蛋白功能的报道。与已研究过体内外抗菌活性的其它链球菌属裂解酶 (PlySs2、Ply7971、Ply30、Ply5218、LysSMP、Ply1228、PlySs9) 相比, LysLF1 的同源性低于 21.88%。表明 LysLF1 为一个具有研究价值的链球菌属裂解酶新成员。首先对其进行宿主范围、杀菌活性、稳定性等基本生物学特性分析; 随后预测并验证了该酶各区域的功能, 推测其结构组成。并通过定点突变技术找到酶的关键氨基酸作用位点。最后通过建立小鼠肺炎感染模型, 测定肺部细菌载量、肺部病理组织学变化等指标评估其体内抗感染效果。

本研究为后续酶的人工设计改造以及应用于临床治疗奠定基础。

## 第一篇 文献综述

### 第1章 链球菌的研究进展

#### 1.1 链球菌的概述及危害

链球菌 (*Streptococcus spp*) 是革兰氏阳性需氧或兼性厌氧球菌, 无鞭毛、无芽孢、有些具有荚膜。在普通光学显微镜下观察呈球形或椭圆形, 对营养要求复杂, 需补充血清、葡萄糖等营养物质, 在液体培养基中成链状生长、固体培养基中成单、成双生长<sup>[1]</sup>。目前已发现的链球菌种类超过 60 种<sup>[2]</sup>, 大多数为人类和多种动物机体内的正常菌群, 存在于消化道、呼吸道等与外界直接接触的表面或粘膜, 少部分可引起疾病, 如乳房链球菌 (*S. uberis*)<sup>[3]</sup>、猪链球菌 (*S. suis*)<sup>[4]</sup>、马链球菌 (*S. equi*)<sup>[5]</sup>、肺炎链球菌引起 (*S. pneumoniae*) 等<sup>[6]</sup>被称为致病性链球菌。

致病性链球菌的危害极大, 大多数为人畜共患病原菌。如无乳链球菌 (*S. agalactiae*) 不仅感染奶牛引起牛乳腺炎也能感染人类<sup>[7, 8]</sup>, 尤其是孕妇并在其分娩的过程中垂直传播给新生儿<sup>[9]</sup>。在全球范围内, 发病率最高的为 ST17 株<sup>[10]</sup>, 该类菌感染新生儿分为早发型和迟发型, 早发型在新生儿生命初期的 72 小时内发病, 表现为呼吸道疾病、败血症和脑膜炎等; 迟发型在生命初期的第 4 到 90 天内发病, 该阶段的发病与新生儿和环境接触有关, 出现败血症、脑膜炎、泌尿道感染、骨关节炎、呼吸系统疾病和蜂窝组织炎等症状, 甚至死亡。存活的新生儿也有发生智力障碍、脑畸形、脑积水等神经系统疾病后遗症的可能性<sup>[7, 11, 12]</sup>。

猪链球菌 (*S. suis*) 的宿主范围广泛, 可感染人、猪、羊、马、禽 (鸟、鸭、鸡) 等动物。根据该类菌荚膜多糖 (CPS) 的抗原性不同可分为 29 种血清型, 其中血清 2 型在猪链球菌和人类感染中最为普遍, 血清 4、5、9、14、16、21、24 和 31 型有病例报道<sup>[13-17]</sup>。该类菌感染引起的猪链球菌病是造成全球养猪业死亡率 (4~12 周龄仔猪) 较高和经济损失的主要原因。据估计, 各地区和农场的发病率大不相同, 在 5%~20% 之间。大约 70% 的感染到达神经系统表现为脑膜炎, 最终使机体死亡<sup>[18]</sup>; 马链球菌 (*S. equi*) 是一种条件性致病菌, 包括马链球菌兽疫亚种 (*Streptococcus equi subsp. zooepidemicus, SEZ*)、马亚种 (*Streptococcus equi subsp. equi, SEE*)、类马亚种 (*Streptococcus equi subsp. ruminatorum, SER*)<sup>[19]</sup>。兽

疫亚种与马亚种的同源性很高,但在流行病学上有着显著的差异,马亚种具有宿主特异性,只感染马属动物,引起一种传染性很强且危害严重的急性接触性疾病即马腺疫,而兽疫亚种能导致其他家畜如牛,绵羊,山羊,猪,狗和猫感染且容易发生变异<sup>[20, 21]</sup>。近年来,国内外均有马链球菌感染人类的报道,2006年从一位患有艾滋病的法国男性的脑脊液中分离出马链球菌,患者最终因多脏器功能衰竭死于脓毒症<sup>[22]</sup>。在我国也有疑似马链球菌引起人类筋膜炎的报道<sup>[23]</sup>。

## 1.2 链球菌的分类方法

### 1.2.1 兰氏分群法

链球菌属的抗原结构比较复杂,核蛋白抗原(P抗原)为属特异性抗原;多糖抗原(C抗原)为群特异性抗原;蛋白质抗原(表面抗原)为型特异性抗原,与菌体毒力和免疫力有关。Rebecca Lancefield在20世纪30年代提出的基于与细胞壁相关的碳水化合物的抗原反应(C抗原)来对链球菌种类分类,至今仍被经典使用<sup>[24]</sup>。后面科学家们在这种方法的基础上进行改进和细化,链球菌被分为从A到W组群<sup>[25]</sup>。其中A组链球菌(GAS)、C组链球菌(GCS)和G组链球菌(GGS)分别在其细胞壁碳水化合物抗原的低聚糖侧链上携带N-乙酰葡萄糖胺侧链、N-乙酰半乳糖胺和鼠李糖<sup>[26]</sup>。

GAS的代表性菌株酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)具有宿主特异性,是对人类最致病的链球菌类型,会引起咽炎、丹毒及其它侵袭性疾病,如软组织感染、风湿热、肾小球肾炎、链球菌中毒性休克综合征(STSS)等<sup>[27-29]</sup>。GAS在全球引起的人类咽炎感染每年达6亿例,其中有50多万人死亡<sup>[29]</sup>。如前所述的无乳链球菌(*S. agalactiae*)是GBS的代表性菌株。停乳链球菌似马亚种(*Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis*)是由GCS和GGS共同组成的一个链球菌亚种,该亚种与化脓性链球菌的相似性很高,高达72%,所以它们拥有很多共同的独立决定因子,如链激酶、抗吞噬M蛋白、链球菌溶血素O或S等<sup>[30]</sup>。

兰氏分群并不能区分所有的链球菌属内各种群细菌,如乳导管灌注乳房链球菌(*S. uberis*)、鱼链球菌(*S. iniae*)、肺炎链球菌(*S. pneumoniae*)、草绿色链球菌(*Viridans streptococci*)等因为缺少兰氏分群抗原被归为非兰氏类型链球菌<sup>[31]</sup>。

## 1.2.2 溶菌现象分类法

根据链球菌在血琼脂培养基中有不同的溶血特性将链球菌分为 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 型<sup>[32]</sup>。 $\alpha$ 型溶血性链球菌（Streptococcal Alpha-hemolysins）多为条件性致病菌，会在菌落周围形成不透明溶血环<sup>[33]</sup>； $\beta$ 型溶血性链球菌（Streptococcal beta-hemolysins）的致病性强，会观察到完全透明的无色溶菌环，这也是 GAS 和 GBS 的一个标志性表型特征<sup>[34]</sup>。虽然二者在血琼脂平板上的菌落表型相似，但是它们的分子基础是完全不同的<sup>[34]</sup>。而 $\gamma$ 型溶血性链球菌（Streptococcal Gamma-hemolysins）即不溶血性链球菌，无致病性不产生溶血素也就不会观察到溶菌环。

除以上两种分类方法外，还需通过生化反应、药敏试验、需氧性等实验对链球菌进行全面细致分类。

## 1.3 致病性链球菌的毒力因子

链球菌定殖并能引起侵袭性疾病的适应性通常受控于控制细菌过程的调节系统，例如宿主组织的粘附和侵袭以及对宿主免疫应答的抗性<sup>[35]</sup>。黏附素（HvgA、BspA, BspC 等）、毒素（链霉素、链球菌溶血素 O、S）、免疫结合蛋白（Protein G、MIG、MAG、ZAG 等）、纤连蛋白结合蛋白（FnbA、SzM/SeM、FOG 等）等参与链球菌在机体组织中的传播和干扰宿主的免疫应答<sup>[36]</sup>。*S. suis* 的毒力因子猪链球菌腺苷合成酶（Ssads）通过合成腺苷来抑制粒细胞（PMN）活性来对抗宿主免疫系统<sup>[37]</sup>。一些具有荚膜（CPS）的链球菌，如 *S. pneumoniae*、*S. agalactiae* 具有较高的侵袭能力，该类菌可通过 CPS 与抑制性唾液酸结合免疫球蛋白样凝集素（Siglecs）并促进自身的传播<sup>[38]</sup>。*S. pneumoniae* 还可通过抑制调理性吞噬细胞作用，防止定植过程中粘液滞留<sup>[35]</sup>。

在感染过程中，细菌会遇到不同的环境和宿主因素。细菌调控系统通常通过调控特定的基因表达来感知和响应环境信号。这些系统可以分为四个主要组，包括群体感应系统，独立调节因子，调节 RNA 和双组分调节系统（TCS）<sup>[39]</sup>。其中 TCS 与链球菌的毒力密切相关，有研究表明 TCS 突变株通过抑制细菌代谢来降低细菌的毒力<sup>[40]</sup>。随着基因组测序技术的发展，已在多种链球菌属的细菌内发现 TCS。在化脓性链球菌中，有 11 至 13 个这样的系统，在肺炎链球菌中存在 13 个系统，在无乳链球菌中已经报道了多达 20 个 TCS，在猪链球菌中，通过比较基

基因组分析预测了 15 个 TCS<sup>[41]</sup>。

## 1.4 致病性链球菌感染的治疗现状

链球菌感染的临床治疗需要及时诊断和及早开始适当的抗生素治疗。青霉素和其他  $\beta$ -内酰胺类药物是链球菌感染普遍易感性的标准治疗方法<sup>[42]</sup>。在青霉素过敏患者中，可选用大环内酯类药物、头孢菌素（即头孢唑林）治疗感染<sup>[43]</sup>。然而，临床上已报告过多次大环内酯类药物治疗失败的案例<sup>[44]</sup>。林可酰胺类抗生素（如克林霉素）能有效治疗严重侵袭性感染，它是通过抑制内毒素的产生和细菌蛋白质的合成来发挥作用的<sup>[45]</sup>。然而，使用克林霉素作为单一疗法因诱导细菌耐药也会导致治疗失败，已在对红霉素有抗药性的侵入性感染菌株中检出 *erm* 甲基化酶基因的存在<sup>[46]</sup>。

在我国，2019 年的一项研究对 39 株肺炎链球菌新生儿分离株进行耐药基因和药物敏感性测试，其中四环素耐药基因的检出率达 89.7%，大环内酯类药物耐药基因的检出率高达 100.0%，药物敏感性测试与耐药基因检出结果相对，它们对大环内酯类药物（红霉素、阿奇霉素）、青霉素、四环素耐药率均较高，高达 89.0% 以上<sup>[47]</sup>。2021 年的一项研究对我国新疆北部马属动物感染链球菌的耐药性和耐药基因分布进行调查，调查结果表明这些分离株的青霉素耐药率达到 72.4%，对其它抗生素（四环素、强力霉素、头孢他啶）的耐药率也均达到了 50% 以上，*bla<sub>TEM</sub>* 耐药基因的检出率也达到了 66.7%<sup>[48]</sup>。随着细菌耐药性的逐渐加重以及越来越多的超级细菌的出现对人类和兽类感染性疾病防控和临床治疗带来重大挑战。因此，需要开发出能够代替抗生素治疗的新型抗菌药物。

综上所述，细菌耐药性的逐渐加重以及超级细菌的出现，在威胁人类健康的同时，也为人类和兽类感染性疾病防控和临床治疗带来重大挑战。另一方面细菌的进化使得开发新型抗生素的选择越来越少，开发抗生素的成本变高，迫使药行业放弃抗生素，转而开发能够代替抗生素治疗且更安全有效成本低新型抗菌药物。



## 第2章 链球菌抗菌制剂的研究进展

如前所述,链球菌感染会引起咽炎、肺炎、乳腺炎、肺炎等疾病,不仅威胁人类健康,还对农业和养殖业造成很大危害。抗生素耐药性的上升迫使采用新的方法来治疗细菌性疾病。噬菌体是一种病毒,可以感染细菌、螺旋体、真菌等微生物<sup>[49]</sup>。根据噬菌体与宿主菌的关系将其分为两大类,即溶原性噬菌体和裂解性噬菌体<sup>[50]</sup>。溶原性噬菌体感染细菌后,会将自身遗传物质整合到宿主细菌的染色体中,随着宿主细菌的繁殖而相传,不会裂解宿主细菌,这个过程称为溶原周期,当外界环境开始变化,溶原菌就会启动裂解周期,这个过程主要是阻遏蛋白在调控<sup>[51]</sup>。而裂解性噬菌体,侵入细胞后即利用宿主细菌系统来完成子代噬菌体的复制增殖最后杀死目标菌释放病毒颗粒<sup>[52]</sup>。通过两类噬菌体的生活周期,我们可以看出溶原噬菌体的可用价值不高,所以通常使用烈性噬菌体治疗感染。烈性噬菌体作为抗菌制剂具有特异性强、不易产生抗性和耐药性、给药次数少、研发成本低、周期短等特点。但噬菌体作为抗菌制剂也有一些不能忽视的缺点,例如噬菌体作为一种病毒可能会给机体带来潜在的安全问题,而且体内实验表明,噬菌体在生物体内代谢很快。

噬菌体裂解酶(Bacteriophage lysins)是噬菌体在感染宿主细菌后期表达的一类蛋白酶,又称裂解酶、溶胞壁酶、内容素。该类酶表现出比亲本噬菌体更高效的裂解活性和更宽的宿主谱。鉴于革兰氏阳性菌无外膜(OM)保护的结构的特点,裂解酶可在体外自外向内的裂解细菌,这为裂解酶成为抗菌制剂提供了可能。噬菌体裂解酶通过作用于细菌细胞壁上的聚糖骨架、多肽链之间的酰胺键或直接作用于肽聚糖来发挥酶活性从而清除病原体。噬菌体裂解酶靶向的细胞壁糖基是细菌存活所必须的成分,所以与抗生素相比,细菌很难对噬菌体裂解酶产生抗性;除此之外,裂解酶作为一种蛋白易于获取、可批量生产、对正常菌群无影响;杀菌不依赖于细菌生长,作用迅速;除在烈性噬菌体的基因组中获取裂解酶基因序列外,还可以在细菌基因组中挖掘出前噬菌体裂解酶,这为一些难以分离出烈性噬菌体的细菌治疗提供一种新途径;基于裂解酶模块化结构,还可以通过基因工程的手段对其进行设计、改造和修饰来提高其裂解效率和拓宽宿主谱。基于以上优势,裂解酶在防控链球菌感染方面可能比噬菌体具有更广泛的应用前景,可作为新型抗菌制剂的研发方向。

## 2.1 噬菌体及其裂解酶的概述

### 2.1.1 噬菌体裂解酶的作用机制

噬菌体裂解酶通过裂解宿主细菌细胞壁肽聚糖(PG)层在渗透压的作用下杀灭细菌。根据其作用位点不同可分为三大类,作用于 N-乙酰葡萄糖胺(N-Acetylglucosamine, NAG)与 N-乙酰胞壁酸(N-Acetylmuramic Acid, NAMA)间交替糖苷键的称为糖苷酶(glycosidase);作用于聚糖链与肽链相连的酰胺键的称为酰胺酶(amidase);作用于肽链或肽桥的称为肽酶(peptidase)<sup>[53, 54]</sup>。溶菌酶,如裂解性糖基转移酶和 N-乙酰胞壁质酶断裂从 NAMA 到 NAG 的  $\beta$ -1,4 糖苷键(The N-Acetylmuramoyl- $\beta$ -1,4-N-Acetylglucosamine),不同的是裂解性糖基转移酶发生催化反应并不依赖于水分子,会在 NAMA 形成一个分子内糖苷键,而 N-乙酰胞壁质酶属于水解酶会利用水分子催化裂解糖苷;N-乙酰氨基葡萄糖苷酶水解从 NAG 到 NAMA 的  $\beta$ -1,4 糖苷键(The N-acetylglucosaminyl- $\beta$ -1,4-N-acetylmuramine)<sup>[55]</sup>。

来源于假单胞菌噬菌体 phiKZ 的裂解酶 Gp144 已被证实发挥裂解性糖基转移酶活性,其中 Glu115 和 Glu178 是其发挥活性的关键氨基酸作用位点<sup>[56, 57]</sup>;来源于链球菌的噬菌体裂解酶 PlyC 的糖苷水解酶(PlyC<sub>GyH</sub>)催化结构域,已被证实发挥 N-乙酰氨基葡萄糖苷酶活性<sup>[58]</sup>。裂解酶 PlyL<sup>[59]</sup>、PlyG<sup>[55]</sup>、XlyA<sup>[60]</sup>、LysGH15<sup>[61]</sup>、PlyPSA<sup>[62]</sup>、CD27L<sup>[63]</sup>均具有锌离子依赖性的酰胺酶活性;来源于李斯特菌噬菌体 A500 的裂解酶 Ply500 的第 1~154 位氨基酸发挥内肽酶活性<sup>[64]</sup>。一些具有半胱氨酸、组氨酸依赖性酰胺水解酶/肽酶(CHAP)结构域的裂解酶可发挥酰胺酶或/和肽酶活性,如耐甲氧西林金黄色葡萄球菌噬菌体裂解酶 PlyGRCS 可发挥 N-乙酰胞壁氨酰-L-丙氨酸酰胺酶活性和 D-丙氨酰-甘氨酰内肽酶的水解活性<sup>[65]</sup>;从化脓性链球菌 MGAS315 中挖掘的前噬菌体裂解酶 PlyPy 的 CHAP 结构域具有 D-丙氨酰-L-丙氨酸内肽酶活性<sup>[66]</sup>。

### 2.1.2 革兰氏阳性菌噬菌体裂解酶的结构特征

大多数的革兰氏阳性菌裂解酶的结构呈模块化,具有两个结构域,分别是位

于 N 端发挥催化裂解活性的催化结构域 (enzymatically active domain, EAD) 和 C 端发挥识别和结合活性的结合结构域 (cell-wall binding domain, CBD)。两个结构域中间由一段柔性短肽连接, 蛋白质的分子量一般在 25~40 kDa<sup>[67]</sup>。少部分是由两到三个催化结构域连接到一个单一的结合结构域上。如 GBS 链球菌裂解酶 B30, 它的第 6~107 位氨基酸构成 CHAP 结构域、145~344 位氨基酸构成中央乙酰酰胺酶 (Acm) 结构域、354~443 位氨基酸为一个假定的细胞壁结合结构域 (SH3b)<sup>[68]</sup>。除此之外, 还有一些特殊的结构形式, 结构最为复杂的是 GAS 链球菌裂解酶 PlyC。该酶是由 1 个 PlyCA (50 KDa) 亚基和 8 个 PlyCB (8 KDa) 亚基组成的环状多聚体, 这两个亚基由同一个操纵子上的两个基因转录而来。PlyCA 亚基具有 GyH 和 CHAP 两个不同的催化结构域, 两个结构域间由螺旋对接结构域连接, 各结构域间协同作用来切割细菌细胞壁肽聚糖上不同类型的化学键。8 个 PlyCB 亚基以对称环的形式发挥识别和结合细菌细胞壁的作用<sup>[58, 69, 70]</sup>。

## 2.2 链球菌抗菌制剂的研究概况

### 2.2.1 链球菌噬菌体裂解酶研究进展

目前, 全球共有 20 多个链球菌噬菌体裂解酶被报道<sup>[71-73]</sup>。研究最全面透彻裂解效率最高的为 PlyC, 该酶可裂解 GAS、GCS、GES 链球菌<sup>[74]</sup>, 是首个被证明在体内具有治疗效果的裂解酶, 在 1 分钟内可杀死 7~8 个 Lg 单位的活菌, 在 PlyCB 亚基的介导下还可穿过哺乳动物细胞膜清除胞内化脓性链球菌<sup>[70]</sup>。最新研究表明, PlyC 具有免疫原性, 只诱导正常的免疫反应, 没有引起超敏反应, 这初步证明其作为抗菌制剂的安全性; 来源于化脓性链球菌菌株 MGAS315 的前噬菌体裂解酶 Plypy 具有很宽的裂解谱, 可裂解 GAS、GBS、GCS、GES、乳房链球菌 (*Streptococcus uberis*) 以及戈登链球菌 (*Streptococcus gordonii*), 使用 0.25 mg/只或 0.5 mg/只剂量的蛋白可以显著降低小鼠的死亡率<sup>[66]</sup>; PlyGBS、B30、PlySK1249 等裂解酶均是从前噬菌体上挖掘得到, 其中 PlyGBS、B30 是从 *S. agalactiae* 中挖掘而来, 具有 99% 的氨基酸序列同源性, 使用 0.5 mg/只剂量的蛋白用于治疗小鼠阴道和上呼吸道感染, 菌落数分别减少了 3、2 个 Lg 单位<sup>[75, 76]</sup>。PlySK1249 是从 GCS 停乳链球菌类马亚种 (*Streptococcus dysgalactiae subsp.*

*Equisimili*, SDSE) 中挖掘得到, 使用 1 mg/只剂量的蛋白可以保护小鼠免受 *S. agalactiae* 感染<sup>[77]</sup>; 裂解酶 Ply1228 是从 12 型 *S. suis* 临床分离株 SC183 中挖掘得到的前噬菌体裂解酶, 该酶可裂解 8 个血清型的猪链球菌, 在体外 10 min 内可杀死 4 个 Lg 单位的活菌, 使用 0.2 mg/只的剂量可有效清除血液和各脏器的菌载量, 缓解病理组织学变化和炎症因子水平<sup>[72]</sup>。裂解酶 Lys0859 是从 *S. suis* SS0859 菌株中挖掘的前噬菌体裂解酶, 该酶的宿主范围广泛, 不仅可以裂解链球菌还可裂解葡萄球菌细菌以及类丹毒菌 (*E. rhusiopathiae*) 而且有着广泛的贮存稳定性, 在 -100 °C 下储存 20 天可保留 80% 的活性。-80 °C 可稳定存在 7 个月、在 4 °C 条件下可稳定存在 30 天、50 °C 条件下可稳定存在 30 min、60 °C 下处理 5 min 仍可保留 70% 的活性。在牛奶中也可发挥它的杀菌活性, 有着很好的应用前景<sup>[78]</sup>。

综上所述, 链球菌噬菌体裂解酶可裂解多种细菌, 相较其它菌属噬菌体裂解酶的抗菌谱更广, 这是由于大多数的链球菌细胞壁肽聚糖含有相同的交联桥结构。而且引起链球菌属疾病的病原微生物通常只有一种, 感染部位通常在皮肤、口鼻咽、肺、阴道等与外界直接接触的外表面或粘膜。基于以上特点, 链球菌噬菌体裂解酶作为抗菌制剂在药代动力学、药效、疗效以及免疫反应等方面较其它抗菌制剂有着显著优势和前景<sup>[71]</sup>。但是大多数链球菌属噬菌体裂解酶的热稳定性和抗菌活性并不是很好。因此, 需要挖掘出更多性质稳定、体内外抗菌活性高、裂解谱更广的链球菌属噬菌体裂解酶, 为裂解酶早日应用于临床治疗提供丰富的来源与理论基础。

### 2.2.2 链球菌噬菌体裂解酶的应用概况

链球菌噬菌体裂解酶在治疗人类疾病、动物感染、食品安全、检测等领域均有应用。对于它的应用最早可追溯到 1997 年, Bernstein 团队与美国新视野检测公司 (NHD, Columbia, MD, USA) 合作利用 GCS 噬菌体裂解酶制作胶体金试纸条来检测 GAS 临床样品, 该方法的检测时间为 5 min<sup>[79]</sup>。2009 年, Hoopes JT 团队, 将裂解酶 PlyC 制造成消毒剂应用于 *Streptococcus equi* 引起的马腺疫的马厩和仓房的灭菌消毒。这是首款蛋白质类消毒剂, 使用 1 μg 的蛋白就能在 10 min 内杀灭 8 个 Lg 单位的 *Streptococcus equi*, 其活性是普通消毒剂 Virkon-S 的 1, 000 倍<sup>[80]</sup>。从血清 9 型 *S. suis* 菌株中挖掘的前噬菌体裂解酶 Ply5218 已应用于 *S.*

*suis* 引起的仔猪感染, 连续三次注射 50  $\mu\text{g}$  剂量的蛋白可有效缓解仔猪症状、降低菌载量以及促炎因子水平<sup>[81]</sup>。

随着现代科学与技术的发展, 多学科领域交叉合作研发出多种新型抗菌剂。将裂解酶与化学材料相结合来治疗耐药细菌感染已经成为科学研究的一个极具潜力的新方向。2021 年的一项研究, 将人工合成的嵌合裂解酶 ClyR (该裂解酶的 EAD 来源于 PlyC, CBD 来源于 PlySs2) 与无定形磷酸钙 (ACP) 负载在纳米材料羧甲基壳聚糖 (CMC) 偶合成 CMC-ClyR-ACP 纳米凝胶来防治龋齿等口腔疾病<sup>[82]</sup>。

### 2.2.3 其它新型抗菌制剂的应该概况

除噬菌体及其抗菌蛋白裂解酶外, 抗体、免疫调节剂、抗菌肽、益生菌等都是有效代替抗生素的新型抗菌制剂。链球菌属的新型抗菌制剂大部分都应用于防治口腔疾病, 如在 2014 年 Laleman 团队发表的一篇综述中表明益生菌可减少变形链球菌 (*S. mutans*) 的数量治疗人类龋齿<sup>[83]</sup>; 在 2021 年 Otreba 团队发表的综述中阐述了蜂毒有抗 *Streptococcus mutans* 感染治疗口腔细菌感染的潜力<sup>[84]</sup>; 在 2022 年, 来自湖南师范大学和南开大学的科研工作者合作开发出一种可以防治由 *S. mutans* 生物膜引起的龋齿并对 pH 和脂质双敏感的新型抗菌肽 pHly-1。pHly-1 在大鼠模型中表现出比常规药物 CHX 更好的治疗效果且对周围菌群和组织没有损害<sup>[85]</sup>。此外, 也有应用于 GBS 引起疾病的新型抗菌制剂, 如在 2021 年 Torres 团队的研究表明, 从大蒜中提取的大蒜素具有抗 *S. agalactiae* 感染的活性, 是一个有潜力的治疗 GBS 感染的新型制剂<sup>[86]</sup>。

## 2.3 展望

在后抗生素时代的大背景下, 抗生素疗法仍然是治疗细菌性疾病的首选方法, 但是它的研发速度远赶不上多重耐药菌株的出现。为防止日后无药可治的情况发生, 对新型抗菌制剂的研发变得尤为重要。生物学信息知识的积累与分子生物学技术的发展使研究人员对噬菌体裂解酶的了解更加深入, 该类蛋白不易产生抗性、不影响正常菌群、作用迅速、抗菌效果好效率高、来源丰富、易于改造。极具成

为下一代抗菌制剂的潜力。目前,已有噬菌体裂解酶上市或处于临床试验阶段,但像抗生素一样真正应用于临床还需要一段时间。主要的困难在于:1)覆盖面不广,很难应用于胞内寄生菌以及革兰氏阴性菌;2)存在潜在的安全问题,是否有潜在的毒性(如被裂解的细菌碎片进入血液可能引发炎症因子风暴导致感染性休克或脏器衰竭)以及与机体免疫系统间的相互作用,都缺乏有力充分的数据支持;3)缺少合适的给药方式和递送系统;4)作为蛋白不易保存、半衰期短;5)缺少高效筛选平台。科研人员已有新的策略解决上述问题,如使用EDTA、柠檬酸等物理化学的方法增加外膜通透性、利用蛋白质工程方法将阴性菌裂解酶与细胞穿膜肽或者尾丝蛋白融合表达帮助裂解酶穿过外膜结构;开发可重组EAD、CBD、linker、细胞穿膜小肽的嵌合裂解酶的高通量筛选平台等。虽然已经提出了多种解决困境的策略,但是在实际操作中反馈的效果往往达不到预期,裂解酶真正的大规模应用还需要不断思考与探索。

## 第二篇 研究内容

### 第1章 裂解酶 LysLF1 的表达及其基本生物学特性

链球菌 (*Streptococcus spp.*) 是一类可感染人类和多种动物的革兰氏阳性球菌。该类细菌导致的相关系统性感染具有高发病率和死亡率, 主要表现为咽炎、肺炎、乳腺炎、脑膜炎、坏死性筋膜炎、脓毒症等临床症状。不仅对人类健康产生威胁, 还给农业生产及水产养殖业造成经济损失。目前, 抗生素疗法仍是治疗链球菌属疾病的首选方案, 但由于抗生素的不合理使用, 已在全球各地区的人类和动物中分离出的链球菌中检出耐药表型, 这迫使科研人员开始寻找代替抗生素的新型抗菌制剂。噬菌体裂解酶凭借其天然的杀菌效果和裂解机制, 极具成为新一代抗菌制剂的潜力。此外, *Streptococcus spp.* 特殊的临床特点 (感染部位在与外界相通的表面或粘膜; 单一菌株引起感染, 一般不会共感染) 和结构特征 (细胞壁肽聚糖含有相同的交联桥结构), 这使得 *Streptococcus spp.* 噬菌体裂解酶更有希望成为新一代抗 *Streptococcus spp.* 感染的酶生物制剂。

本研究对一株马链球菌临床分离株 3518 进行全基因组测序, 比较分析后从中筛选得到一个具有杀菌活性的前噬菌体裂解酶, 命名为 LysLF1。对其进行载体构建和原核表达, 测定其基本生物学特性及体外杀菌活性。初步评价该噬菌体裂解酶作为链球菌属抗菌制剂的效果。

#### 1.1 材料

##### 1.1.1 菌株

30 株马链球菌及 3 株解没食子酸链球菌由山东畜牧兽医职业学院董建宝老师馈赠, 分离自某地患病驴样本; 13 株猪链球菌、1 株金黄色葡萄球菌、1 株大肠杆菌及所用质粒 pET-28a 由本实验室保藏。所有链球菌及金黄色葡萄球菌使用 BHI 培养基培养, 大肠杆菌及 pET-28a 菌液使用 LB 培养基培养。培养温度均为 37 °C。

### 1.1.2 主要试剂及仪器

一次性无菌接种环 (BKMMAM), 一次性塑料无菌涂布棒 (BKMMAM), 一次性无菌细菌培养皿 (NEST), BHI 培养基 (青岛海博), 胰蛋白胨 (OXOID), 酵母提取物 (OXOID), NaCl (北京化工), 琼脂粉 (Gentihold), 革兰氏染色剂 (青岛海博), Extaq mix (TaKaRa), PrimeSTAR HS Mix (TaKaRa), DL2000、DL5000 DNA Marker (TaKaRa), 琼脂糖 (Bioweste), 琼脂糖凝胶试剂盒 (上海生工), 质粒小提试剂盒 (TIANGEN), 硫酸卡那霉素 (Solarbio), IPTG (Solarbio), 0.22  $\mu\text{m}$  一次性过滤器 (Merck Millipore), 0.8  $\mu\text{m}$  过滤器 (津腾), PBS 干粉 (biosharp), 10 kDa 超滤离心管 (pall), PageRuler (thermo), 5 $\times$ SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (Beyotime), BCA 蛋白定量试剂盒 (Thermo Fisher), *Xho* I 和 *Bam*H I (TaKaRa)。

高压灭菌锅 (上海申安), 普通光学显微镜 (奥林巴斯), 恒温培养摇床 (智诚), 恒温培养箱 (一恒), PCR 仪 (博日), 电子分析天平 (上海岛津), 核酸电泳仪 (北京六一), 超净工作台 (苏净安泰), 旋涡混合器 (海门其林贝尔), 微量移液器 (Thermo), 超声波细胞粉碎机 (宁波新芝), pH 测定仪 (Mettler Toledo), 酶标仪 (Thermo) 台式冷冻离心机 (Thermo), 核酸电泳仪蛋白电泳仪 (天能), 低温恒温水浴锅 (EYELA)。

### 1.1.3 主要试剂的配置

**LB 培养基:** 按照每 100 mL 加入胰蛋白胨 1 g, 酵母提取物 0.5 g, NaCl 1 g 的比例进行液体 LB 培养基的配制。固体培养基需在液体培养基的基础上加入琼脂粉 1.5% (w/v), 用双蒸水充分搅拌溶解。121  $^{\circ}\text{C}$  高压灭菌 20 min。

**BHI 培养基:** 按照每 100 mL 加入 BHI 粉末 3.85g 进行液体培养基的配置, 固体培养基在液体培养基的基础上添加琼脂粉 1.5% (w/v), 用双蒸水充分搅拌溶解。115  $^{\circ}\text{C}$  高压灭菌 30 min。

**PBS 缓冲液:** 将 PBS 磷酸盐缓冲液干粉加到容器中, 加入双蒸水充分搅拌溶解, 调节 pH 值至 7.4 并定容至 2.0 L。121 $^{\circ}\text{C}$  高压灭菌 20 min。

**硫酸卡那霉素:** 称取硫酸卡那霉素粉末 0.05 g 定容至 10.0 mL 双蒸水中, 在超净台内用 0.22  $\mu\text{m}$  一次性无菌过滤器过滤, 分装于 1.5 mL EP 管中, 保存浓度为 100 mg/mL, 保存温度为 -20  $^{\circ}\text{C}$ 。



IPTG: 称取 IPTG 粉末 2.4 g 定容至 10.0 mL 双蒸水中, 在超净台内用 0.22 $\mu$ m 一次性无菌过滤器过滤, 分装于 1.5 mL EP 管中, 保存浓度为 1 mol/L, 保存温度为-20 $^{\circ}$ C。

1 M Tris-NaCl 缓冲液: 添加 1 M Tris Base 20.0 mL 和 5 M NaCl 40.0 mL 至适量双蒸水中, 用浓盐酸调 pH 定容至 1.0 L 双蒸水中。用 0.8  $\mu$ m 滤器过滤, 常温储存。

2.5 M 咪唑: 称取咪唑粉末 212.75 g, 充分搅拌溶解于适量双蒸水中, 用浓盐酸调 pH = 8.0, 定容至 1.0 L, 用 0.8  $\mu$ m 滤器过滤, 常温储存。

### 1.1.4 引物

表 1.1 相关引物序列

Table 1.1 Primers

Gene name	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>16S rRNA</i>	GTGCTTGCACTTCTGACGTTAGC	TGAGCCGTGGGCTTTCACAT
<i>LysLF1</i>	CGGGATCCATGGCTACATATCAG GAATATAAAAGTC	CGCTCGAGTTATACTTGTGTT GCATTAGAT

## 1.2 方法

### 1.2.1 链球菌菌种的分离鉴定及其药物敏感型评价

#### 1.2.1.1 链球菌菌种的分离鉴定

使用一次性接种环蘸取少量菌液在 BHI 固体培养基上三区划线后倒放在 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养 20 h。然后挑取单个菌落接种于含有 1 mL BHI 液体的 1.5 mL 无菌 EP 管中。在 37  $^{\circ}$ C 180 rpm 条件下培养, 待细菌长起后使用革兰氏染色法在普通光学显微镜下鉴定菌落形态。

使用煮沸法粗提鉴定正确菌液的基因组, 具体操作如下: 4  $^{\circ}$ C (8,000 $\times$ g; 5 min) 离心菌体, 用等量 PBS 重悬菌体 3 次后, 最后使用 100  $\mu$ L PBS 重悬菌体沸水浴 10 min, 再次离心, 使用 1 mL 注射器小心吸取上清液用 0.22  $\mu$ m 滤器过滤后作为模板, 扩增 16S rRNA 基因。扩增体系如表 1.2, 扩增程序为 94  $^{\circ}$ C 预变

性 5 min, 94 °C 变性 45 s, 55 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 60 s, 72 °C 终延伸 10 min, 16 °C 终止, 共经历 30 个循环。

将 PCR 产物进行琼脂糖核酸电泳, 条带大小正确的产物送至生工生物工程(长春)有限公司测序, 将返回来的碱基序列上传至 NCBI 数据库, 比对分析后最终确定菌株种类。

表 1.2 16S rRNA 基因 PCR 扩增体系

Table 1.2 The PCR amplification system of 16S rRNA gene

Component	Volume (μL)
模板	1.0
27F	1.0
1492R	1.0
Extaq mix (2 ×)	25.0
ddH <sub>2</sub> O	22.0

### 1.2.1.2 链球菌药物敏感型评价

采用纸片扩散法评价各菌株对 17 种抗生素药物的敏感性, 具体操作如下, 使用镊子将各种药敏片间隔贴在已均匀涂布着菌液的 BHI 固体培养基上。37 °C 倒置培养 20 h 后, 测量各抑菌环的直径。评判标准参考美国 NCCLS, 具体见表 1.3<sup>[87, 88]</sup>。

表 1.3 抗生素耐药/敏感临界范围

Table 1.3 The critical range of antibiotic resistance/sensitivity

抗生素	评判标准 (mm)
环丙沙星 (CIP)	16-20
氨苄西林 (AMP)	19-25
庆大霉素 (GM)	13-14
四环素 (TE)	19-22
头孢他啶 (CAZ)	15-17
诺氟沙星 (NOR)	13-16
卡那霉素 (K)	14-17

续表 1.3 抗生素耐药/敏感临界范围

Continued Table 1.3 The critical range of antibiotic resistance/sensitivity

抗生素	评判标准
红霉素 (E)	16-20
氨苄西林 (AM)	19-25
青霉素 (P)	20-27
阿莫西林 (AMX)	20-27
头孢曲松 (CTR)	14-16
恩诺沙星 (ENR)	16-20
磺胺异恶唑 (SIZ)	13-16
多粘菌素 B (PB)	8-11
多西环素 (DOX)	13-15
链霉素 (S)	12-14

## 1.2.2 裂解酶的挖掘与氨基酸同源性分析

将马链球菌临床分离株 3518 送至生工生物进行基因组测序，测序平台为 Illumina HiSeq 和 PacBioRll。使用 PhiSpy 软件预测该菌株的溶原噬菌体的可能区域。将这个区域内的基因序列与 NCBI 数据库和 PHAST 数据库内已知的裂解酶序列进行比对分析寻找可能的前噬菌体裂解酶。使用 DNAMAN 软件比对裂解酶与其它链球菌属裂解酶的氨基酸同源性，随后对预测结果进行活性验证。

## 1.2.3 裂解酶 LysLF1 原核表达载体的构建及其蛋白表达纯化

### 1.2.3.1 pET-28a-LysLF1 载体的构建

(1) 目的基因的扩增：以分离株 3518 基因组为模板，用引物 LysLF1-F 和 LysLF1-R 对目的基因 LysLF1 进行 PCR 扩增，使用 1% 琼脂糖凝胶在 100 V 的条件下核酸电泳 40 min 后回收目的条带。PCR 反应程序为：94 °C 预变性 10 min, 94 °C 变性 35 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 72 °C 终延伸 10 min。其中变

性、退火、延伸三个步骤经历 30 个循环。PCR 反应体系见表 1.4。

表 1.4 LysLF1 的 PCR 反应体系

Table 1.4 The reaction system of PCR of LysLF1

Component	Volume ( $\mu\text{L}$ )
模板	1.0
LysLF1-F	1.0
LysLF1-R	1.0
2 $\times$ PrimeSTAR HS Mix	25.0
ddH <sub>2</sub> O	22.0

(2) 目的片段的连接与转化：将回收的 LysLF1 基因和 pET-28a 质粒用 *Bam*H I 酶和 *Xho* I 酶在 37 °C 条件下，双酶切过夜后核酸电泳鉴定酶切产物，使用普通 DNA 产物回收试剂盒回收酶切产物并用双蒸水洗脱后测定浓度，-20 °C 保存。双酶切反应体系见表 1.5：

表 1.5 双酶切反应体系

Table 1.5 Reaction of enzyme digestion system.

Component	Quantity
LysLF1/pET28a 质粒	2.0 $\mu\text{g}$
10 $\times$ K buffer	5 $\mu\text{L}$
<i>Bam</i> H I	2.5 $\mu\text{L}$
<i>Xho</i> I	2.5 $\mu\text{L}$
ddH <sub>2</sub> O	补齐
Total volume	50.0 $\mu\text{L}$

按表 1.6 的连接体系将 LysLF1 和 pET-28a 质粒酶切后的回收产物置于 16 °C 低温水浴锅中连接 7~8 小时，然后采用热激法将连接产物全部转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态中，最后将菌液全部涂布在含有 1% Kan<sup>+</sup> 抗性的 LB 固体培养基中，37 °C 培养 12 h。

表 1.6 连接反应体系

Component	Quantity ( $\mu\text{L}$ )
LysLF1+pET28a	8.5
LysLF1: pET28a	3:1 (摩尔比)
10×T4 DNA Ligase Buffer	1
T4 DNA Ligase	0.5
Total volume	10

(3) 阳性克隆的鉴定及转化：使用与扩增 LysLF1 相同的 PCR 程序和反应体系筛选阳性克隆子，将阳性克隆子送至测序公司测序，用 DNAMAN 软件对返回的测序结果与 LysLF1 碱基序列比对，用质粒 DNA 小提试剂盒（生工）提取序列正确的 DH5 $\alpha$  菌株的质粒，将质粒转化至 BL21 感受态细胞中。将构建成功的克隆菌株和表达菌株用 30% 的甘油保藏至 -80 °C 冰箱中。

### 1.2.3.2 pET-28a-LysLF1 的原核表达与蛋白纯化

(1) pET-28a-LysLF1 的原核表达：取保藏的菌株转接至含有 1% Kan<sup>+</sup> 抗性的 LB 液体培养基中，待菌液培养至 OD<sub>600nm</sub>=0.6 时，加入 1% IPTG 于 16 °C，180 r/min 低温诱导表达 16 h。4 °C (8,000×g; 10 min) 离心收集菌体后用 Tris-NaCl (pH=7.5) 缓冲溶液重悬菌体。

(2) pET-28a-LysLF1 蛋白的纯化：将重悬后的菌体经冰浴超声 (180 w, 超声 2 s, 间歇 2 s) 破碎直至液体变得澄清透明。4 °C (12,000 × g; 10 min) 离心收集上清液，采用镍柱亲和层析法纯化蛋白。具体操作步骤如下：首先使用 500 mM 咪唑洗脱镍柱，随后使用 Tris-NaCl (pH=7.5) 缓冲溶液平衡镍柱，将收集的上清液挂柱 2 次，依次使用 20 mM、50 mM、500 mM 的咪唑洗脱杂蛋白和目的蛋白。每一步均使用等量柱体积的相应溶液处理 4 次，每种溶液加入镍柱前均需通过 0.8  $\mu\text{m}$  的滤器过滤。将收集的目的蛋白用 0.22  $\mu\text{m}$  滤器过滤到 10 kDa 超滤离心管中，4 °C (3, 500×g) 水平离心浓缩以及去除咪唑。

(3) 蛋白浓度的测定：用 BCA 蛋白定量试剂盒对浓缩后蛋白进行浓度测定，具体操作步骤可见说明书。使用 Tris-NaCl (pH=7.5) 缓冲溶液将蛋白稀释到合适

储存浓度后置于液氮罐中速冻，立即储存于-80 °C备用。

## 1.2.4 裂解酶 LysLF1 的基本生物学特性的测定

### 1.2.4.1 裂解酶 LysLF1 的活性验证

(1) 裂解酶 LysLF1 在平板上的裂解活性：将 3518 菌株培养至对数生长期 ( $OD_{600nm}=0.6\sim 0.8$ ) 后把菌液均匀涂布到 BHI 固体培养基上，各取 10  $\mu$ L 超声后上清液及纯化后的蛋白 (200  $\mu$ g) 滴到平板上，待液体晾干后倒置于 37 °C 温箱中培养过夜，通过观察是否有抑菌环出现，来判断其在平板上的裂解活性。

(2) 裂解酶 LysLF1 在液体中的裂解活性：为进一步验证裂解活性，使用不同终浓度的 LysLF1 (0、25、50、100、150  $\mu$ g/mL) 与培养至对数生长期的 3518 菌株 ( $OD_{600nm}=0.6\sim 0.8$ ) 在 37 °C 下孵育 1 h 后，通过观察菌液的浑浊度，来判断其在液体培养基中的裂解活性。

(3) 裂解酶 LysLF1 对宿主菌 3518 及标准株 ATCC35246 的体外杀菌活性：将菌株 3518 和标准株 ATCC35246 培养至对数生长期 ( $OD_{600nm}=0.6\sim 0.8$ )，使用无菌 Tris-NaCl (pH=7.5) 缓冲液重悬菌体 3 次后，加入终浓度为 100  $\mu$ g/mL 的 LysLF1 分别与分离株 3518 和 ATCC35246 在 37 °C 下共孵育 4 h，使用倍比稀释的方法每 1 h 测一次菌落数变化。阴性对照组添加等量 Tris-NaCl (pH=7.5) 缓冲液。

### 1.2.4.2 裂解酶 LysLF1 宿主范围的测定

选取 48 株链球菌、1 株金黄色葡萄球菌 (ATCC29213) 和 1 株大肠杆菌 (ATCC25922) 测定 LysLF1 的裂解谱。将上述菌株培养至对数生长期 ( $OD_{600nm}=0.6\sim 0.8$ )，把菌液均匀涂布到 BHI 固体培养基上，取 10  $\mu$ L 纯化后的蛋白 (200  $\mu$ g) 滴到平板上，待液体晾干后倒置于 37 °C 温箱中培养过夜，通过观察是否有抑菌环出现，初步确定宿主范围；

取 1 mL 上述培养到对数生长期 ( $OD_{600nm}=0.6\sim 0.8$ ) 的菌液，使用无菌 Tris-NaCl (pH=7.5) 缓冲液重悬菌体后加入终浓度为 100  $\mu$ g/mL 的蛋白在 37 °C 下共孵育 1 h，通过倍比稀释的方法测定各组前后菌落数的变化。

### 1.2.4.3 裂解酶 LysLF1 的稳定性的测定

(1) pH 对裂解酶的裂解活性的影响

将 Tris-NaCl 缓冲溶液用浓盐酸和 NaOH 将 pH 调至 4~8 共 5 个梯度, 将培养到对数生长期 ( $OD_{600nm}=0.6\sim0.8$ ) 的 3518 菌株用不同 pH 的 Tris-NaCl 缓冲溶液重悬后加入终浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 LysLF1, 对照组加入等量的 Tris-NaCl (pH=7.5)。在 37  $^{\circ}\text{C}$  下共孵育 1 h, 比较孵育前后各组菌落数变化。

#### (2) 温度对裂解酶 LysLF1 裂解活性的影响

将培养到对数生长期 ( $OD_{600nm}=0.6\sim0.8$ ) 的 3518 菌液无菌 Tris-NaCl (pH=7.5) 缓冲液重悬 3 次后加入终浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 LysLF1, 分别在 4  $^{\circ}\text{C}$ 、25  $^{\circ}\text{C}$ 、37  $^{\circ}\text{C}$ 、40  $^{\circ}\text{C}$  的条件下共孵育 1 h, 比较孵育前后各组菌落数变化。

#### (3) NaCl 对裂解酶 LysLF1 裂解活性的影响

将培养到对数生长期 ( $OD_{600nm}=0.6\sim0.8$ ) 的 3518 菌液用 Tris-NaCl (pH=7.5) 缓冲液重悬后分别加入 0、0.1mM、0.5 mM、1 mM、10mM、50 mM、100 mM、200 mM 的 NaCl 和终浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 LysLF1, 37  $^{\circ}\text{C}$  共孵育 1 h, 比较孵育前后各组菌落数变化。

#### (4) EDTA 对裂解酶 LysLF1 裂解活性的影响

使用终浓度为 100 mM 的 EDTA 预处理 LysLF1, 与用 Tris-NaCl (pH=7.5) 缓冲液处理过的 3518 ( $OD_{600nm}=0.6\sim0.8$ ) 菌悬液在 37  $^{\circ}\text{C}$  共孵育 1 h, 比较孵育前后各组菌落数变化。来判断裂解酶发挥活性是否需要金属离子参与。

## 1.3 结果

### 1.3.1 链球菌的分离鉴定

链球菌在 BHI 固体平板上生长出白色或无色、半透明、圆形, 中间凸起的菌落 (如图 1.1 A 所示), 挑起单菌落转接到 BHI 液体培养基中, 待菌落长起后进行革兰氏染色鉴定并在显微镜下进行观察 (如图 1.1 B 所示), 镜下可见长短不一的链状阳性球菌。为进一步确定菌种, 提取各菌液的基因组采用 PCR 的方法扩增其 16S rRNA 基因, 核酸电泳结果显示在 1540 bp 左右出现条带 (如图 1.1 C 所示), 条带大小符合预期, 将 PCR 产物送到生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 将测序结果在 NCBI 数据库中 BLAST 分析比对碱基序列, 结果表明菌株均为链球菌, 具体种属见表 1.7。

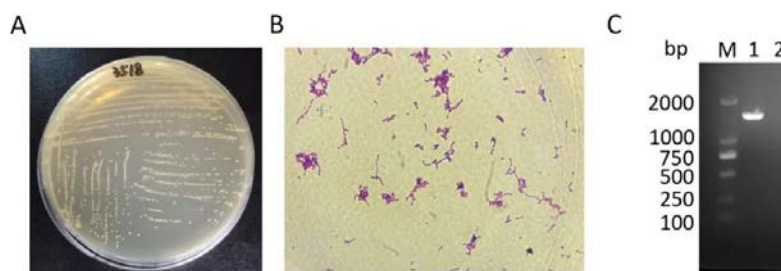


图 1.1 链球菌鉴定

A: 链球菌在平板上的细菌形态; B: 革兰氏染色显微镜 (100×) 下细菌形态;  
 C: 16S rRNA 鉴定 (M: DL2,000 DNA marker; 1: 细菌 16s rRNA 基因扩增; 2: 阴性对照)

Fig. 1.1 Identification of *Streptococcus spp.*

A: Morphology of *Streptococcus spp.* on plate B: Gram stain microscopic bacterial morphology (100×) C: 16S rRNA identification (M: DL2,000 DNA marker; 1: The 16S rRNA gene amplification of strain; 2: Negative control)

### 1.3.2 链球菌药物敏感性评价

选取的 26 株链球菌对抗生素的敏感性结果如表 1.8, 在选取的 17 种常见抗生素中, 对头孢他啶 (CAZ) 和磺胺异恶唑 (SIZ) 耐药的菌株较多, 分别有 17 株菌对 CAZ 耐药, 16 株菌对 SIZ 耐药。菌株 Seq-2、Seq-8、Seq-10、Seq-11、XY-2021、90J1、202、1C50、BTE1、21EB 敏感的抗生素在 1~4 种, 为多重耐药菌株。

表 1.8 链球菌对抗生素药物敏感性评价

Table 1.8 Evaluation of the susceptibility of *Streptococcus spp.* to antibiotics

R:耐药; S:敏感; I:中度敏感

菌株名称	环丙沙星 CIP	庆大霉素 GM	四环素 TE	头孢他啶 CAZ	诺氟沙星 NOR	卡那霉素 K	链霉素 S	红霉素 E	氨苄西林 AM	青霉素 P	阿莫西林 AMX	头孢曲松 CTR	恩诺沙星 ENR	磺胺异恶唑 SIZ	多粘菌素 BPB	多西环素 DOX
3518	I	R	S	R	S	S	R	S	R	I	R	R	S	S	R	S
35246	S	R	R	R	S	R	R	I	R	R	R	S	S	R	R	S
Seq-2	I	R	I	R	R	R	R	I	S	R	R	R	S	R	I	R



续表 1.8 链球菌对抗生素药物敏感性评价

Continued Table 1.8 Evaluation of the susceptibility of *Streptococcus spp.* to antibiotics

菌株名称	环丙沙星 CIP	庆大霉素 GM	四环素 TE	头孢他啶 CAZ	诺氟沙星 NOR	卡那霉素 K	链霉素 S	红霉素 E	氨苄西林 AM	青霉素 P	阿莫西林 AMX	头孢曲松 CTR	恩诺沙星 ENR	磺胺恶唑 SIZ	多粘菌素 BPB	多西环素 DOX
Seq-6	S	S	S	R	S	S	I	R	R	R	R	R	S	S	S	S
Seq-8	I	R	S	R	R	R	R	I	S	I	I	R	R	R	R	S
Seq-10	I	S	R	R	S	R	I	R	R	R	R	R	I	R	S	R
Seq-11	I	R	I	R	R	R	R	R	I	I	I	R	S	R	I	S
Seq-12	S	S	S	R	R	I	S	I	R	I	I	S	S	S	I	S
Seq-13	I	R	R	S	S	R	R	I	R	R	R	S	S	R	S	S
Seq-15	S	S	S	S	R	S	I	R	S	I	S	S	S	S	S	S
SZ-2	S	S	S	R	S	S	S	S	S	I	S	R	R	R	S	S
SZ-3	S	S	R	R	S	S	S	R	I	I	I	R	I	R	S	S
SZ-4	S	S	I	R	S	S	S	S	S	S	R	S	I	R	S	S
XY2021	R	S	R	R	I	I	I	R	R	R	R	R	I	R	S	R
YC-1	S	S	I	S	R	S	S	S	S	R	S	R	I	S	S	S
90J-1	I	R	S	R	I	R	R	I	I	I	R	R	I	R	R	R
202	R	R	S	R	S	R	R	I	I	R	R	R	I	R	I	S
1C80	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	I	S
O283	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	R	I	R	S	S
11709	S	R	R	R	S	S	S	I	I	S	S	S	I	S	S	S
SP	I	R	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S	I	I	S	S
1C50	R	R	S	I	R	R	I	S	R	R	R	I	R	R	I	S
BTE1	I	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	I	S	R	I	I
21EB	I	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R
F	I	S	I	S	S	S	S	I	S	R	R	S	S	I	S	S
TMSS2	I	R	R	S	R	R	R	R	S	R	S	S	S	I	S	S

### 1.3.3 裂解酶 LysLF1 同源性分析

通过比对分析马链球菌临床分离株 3518 的前噬菌体可能区域，挖掘得到疑似编码裂解酶的序列，将该段序列编码的蛋白命名为 LysLF1。将 LysLF1 的碱基序列上传至 NCBI 进行 BLASTP，发现该蛋白的氨基酸序列与 GH25 家族溶菌酶以及链球菌噬菌体 LF2 编码的裂解酶同源性较高，但是并没有研究这两个蛋白的功能。与已研究过体内外抗菌活性的其它链球菌属裂解酶 (plySs2、ply7971、

ply30、ply5218、LysSMP、Ply1228、plySs9) 相比, LysLF1 的同源性低于 21.88%。  
表明 LysLF1 为一个新的噬菌体裂解酶。

### Identity=21.88%



图 1.2 裂解酶 LysLF1 的同源性分析

Fig. 1.2 The identity analysis of LysLF1

### 1.3.4 裂解酶 LysLF1 的表达与纯化

使用 LysLF1 特异性引物成功扩增出约 1335 bp 的片段, 对表达载体进行双酶切和测序鉴定均表明成功构建 pET-28a-LysLF1 原核表达载体(如图 1.3 所示)。

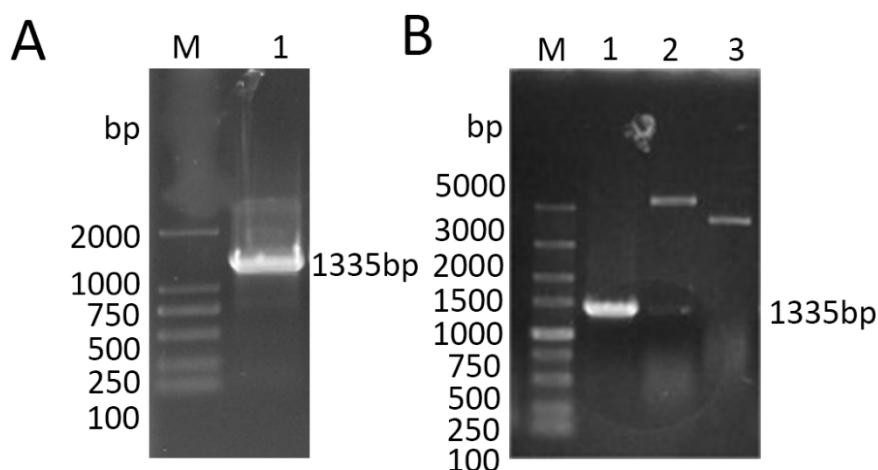


图 1.3 LysLF1 基因扩增和 pET-28a-LysLF1 载体的鉴定

Fig. 1.3 Gene amplification of LysLF1 and identification of pET-28a-LysLF1 vector

A:PCR 扩增 (M: DL2,000 DNA marker; 1: LysLF1 基因扩增) B:双酶切鉴定 (M: DL5,000 DNA marker; 1: LysLF1 基因扩增; 2: pET-28a- LysLF1 双酶切产物; 3: pET-28a 质粒)

A: PCR amplification (M: DL2,000 DNA marker; 1: Gene amplification of LysLF1) B: Double enzyme digestion identification (M: DL5,000 DNA marker; 1: 1: Gene amplification of LysLF1; 2: Double enzyme digestion fragments of pET-28a-LysLF1; 3: pET-28a plasmid)

大肠杆菌 BL21 表达菌株经 16 °C 低温诱导 18 h 后呈现可溶性表达, 在 56 kDa 处可观察到与 LysLF1 预期分子量相一致的条带(如图 1.4 所示)。500 mM 的咪唑缓冲溶液洗脱出的流出液无杂蛋白, 表明在体外成功制备出 LysLF1 重组蛋白。

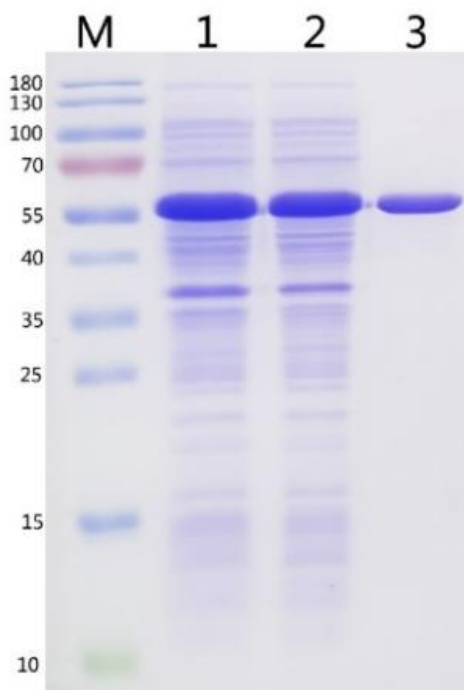


图 1.4 裂解酶 LysLF1 的表达与纯化

Fig 1.4 The expression and purification of lysin LysLF1

(M: 180 kDa marker; 1: 诱导后大肠杆菌 BL21 全菌; 2: 超声破碎后上清液; 3: 500 mM 咪唑流出液)

(M: 180 kDa protein marker ; 1: Expressed *E. coli* BL21; 2: Supernatant after ultrasonic crushing ; 3: 500 mM imidazole effluent)

### 1.3.5 裂解酶 LysLF1 的活性验证

200  $\mu\text{g}$  纯化后的蛋白可在 BHI 固体平板上显示出抑菌环, 表明 LysLF1 具有活性。比浊法结果显示, 在 BHI 液体培养培养基中与不加裂解酶的对照组相比, LysLF1 的终浓度越高, 菌液就越澄清。说明 LysLF1 具有良好的裂解活性 (如图 1.5 所示)。

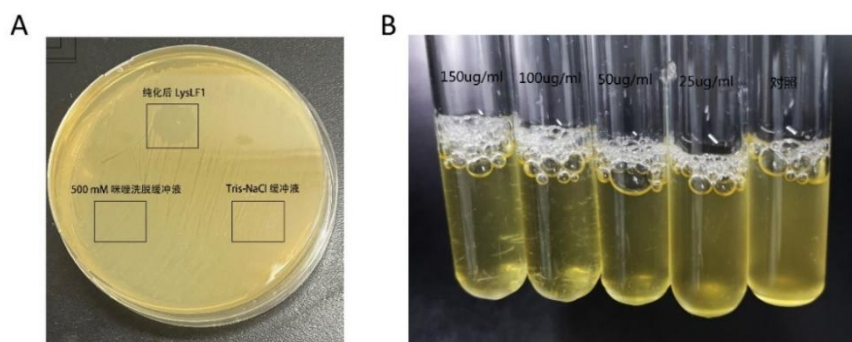


图 1.5 A: 裂解酶 LysLF1 在平板上的裂解活性; B: 裂解酶 LysLF1 在液体培养基中的裂解活性

Fig. 1.5 A: The lytic activity of LysLF1 on BHI plate; B: The lytic activity of LysLF1 in broth

选取 *S. equi* 标准株 ATCC32546 及宿主菌临床分离株 3518 与 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  LysLF1 在 37  $^{\circ}\text{C}$  共孵育 4 h, 每间隔 1 h 测定一次菌落数变化来判断裂解酶 LysLF1 的体外杀菌活性。结果显示 (如图 1.6 所示), LysLF1 的体外裂解进程较慢, 作用 4 h 后可裂解约 2 个 Lg 单位的活菌。对分离株 3518 和标准株 ATCC35246 均有良好的抗菌活性。

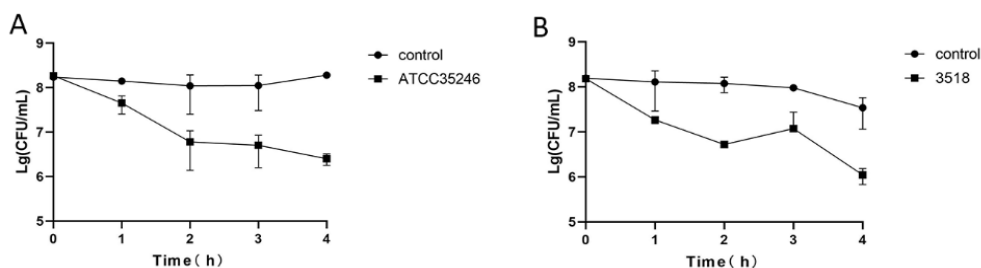


图 1.6 裂解酶 LysLF1 的体外杀菌活性

Fig 1.6 The antimicrobial activity of LysLF1 in vitro

A. LysLF1 对 ATCC32546 的体外杀菌活性 B. LysLF1 对 3518 的体外杀菌裂解活性

A. The antimicrobial activity of LysLF1 to ATCC32546 B. The antimicrobial activity of LysLF1 to 3518

通过观察裂解酶 LysLF1 (200  $\mu\text{g}$ ) 在 BHI 固体平板上抑菌圈的形成情况来判断 LysLF1 的裂解范围。随后选取 25 株分离株与 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 LysLF1 共孵育比较前后具体的菌落数差异。结果显示, LysLF1 可裂解大部分链球菌, 可裂解 29 株 *S. equi* (29/30), 4 株 *S. suis* (4/13), 1 株 *S. gallolyticus* (1/3), 不裂解 *S. aureus*

及 *E. coli* (见表 1.9)。100 µg/mL 的蛋白的活菌减少比率在 30%~99%之间。

表 1.9 LysLF1 的裂解范围

Table 1.9 Host range of LysLF1

细菌名称	空斑形成情况	细菌名称	空斑形成情况	细菌名称	空斑形成情况
Name of bacteria	Situation of Spot formation	Name of bacteria	Situation of Spot formation	Name of bacteria	Situation of Spot formation
3518 <sup>1</sup>	+	Squi-5 <sup>1</sup>	+	SC181 <sup>2</sup>	+
35246 <sup>1</sup>	+	Squi-6 <sup>1</sup>	+	SC183 <sup>2</sup>	+
21E8 <sup>1</sup>	+	Squi-7 <sup>1</sup>	+	SC225 <sup>2</sup>	+
E289 <sup>1</sup>	+	Squi-8 <sup>1</sup>	+	SS42 <sup>2</sup>	+
O19D <sup>1</sup>	+	Squi-9 <sup>1</sup>	+	wc11SS7 <sup>2</sup>	-
BTE1 <sup>1</sup>	+	Squi-10 <sup>1</sup>	+	242 <sup>2</sup>	+
90gi <sup>1</sup>	-	Squi-11 <sup>1</sup>	+	SP <sup>3</sup>	+
Squi-1 <sup>1</sup>	+	Squi-12 <sup>1</sup>	+	TMSSS2 <sup>3</sup>	-
Squi-2 <sup>1</sup>	+	Squi-13 <sup>1</sup>	+	6F18 <sup>3</sup>	-
Squi-3 <sup>1</sup>	+	202 <sup>2</sup>	-	ATCC29213 <sup>4</sup>	-
Squi-4 <sup>1</sup>	+	203 <sup>2</sup>	-	ATCC25922 <sup>5</sup>	-
1C80 <sup>1</sup>	+	1C50 <sup>1</sup>	+	0283 <sup>1</sup>	+
1D09 <sup>1</sup>	+	SZ4 <sup>1</sup>	+	YG-1 <sup>1</sup>	+
F <sup>1</sup>	+	SZ3 <sup>1</sup>	+	SZ2 <sup>1</sup>	+
XY2021 <sup>1</sup>	+	CPD35 <sup>2</sup>	-	CPD40 <sup>2</sup>	-
CPD17 <sup>2</sup>	-	CPD28 <sup>2</sup>	-	CPD41 <sup>2</sup>	-

1: 马链球菌; 2: 猪链球菌; 3: 解没子酸链球菌; 4: 金黄色葡萄球菌; 5: 大肠

杆菌

+: 有空斑形成; -: 无空斑形成

1: *S. equi*; 2: *S. suis*; 3: *S. gallolyticus*; 4: *S. aureus*; 5: *E. coli*

+: LysLF1 can form spot; -: LysLF1 cannot form spot

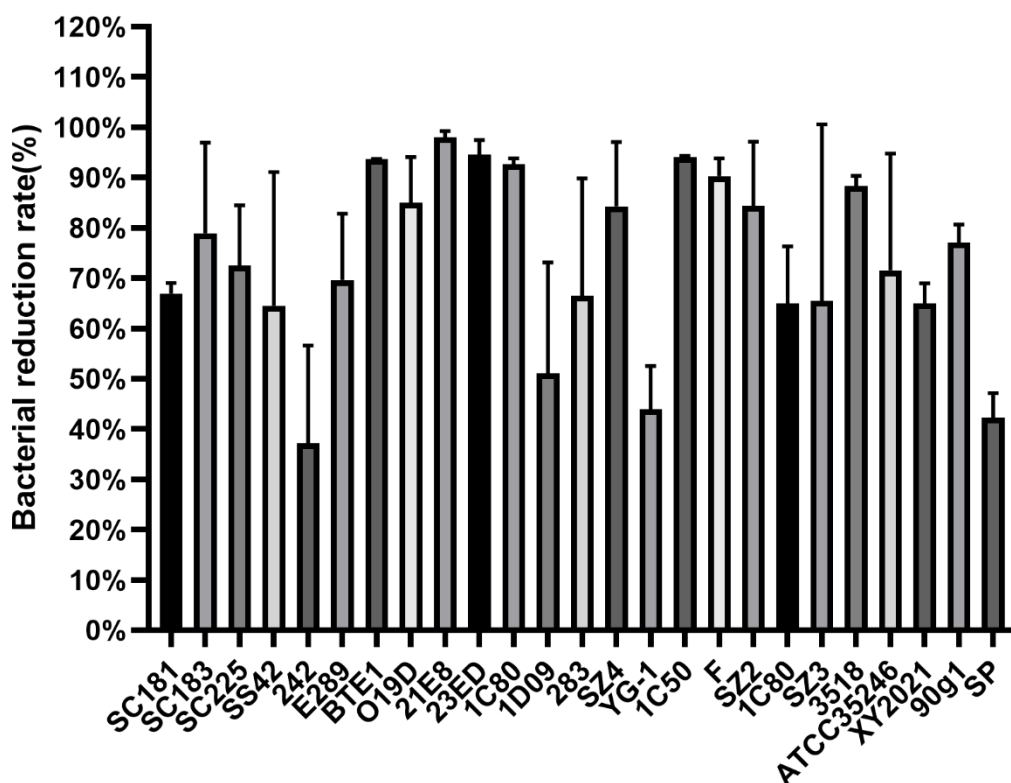


图 1.7 LysLF1 的裂解范围

Fig 1.7 Host range of LysLF1

以上结果表明 LysLF1 具有广泛的裂解范围以及良好的裂解活性。

### 1.3.6 裂解酶 LysLF1 的稳定性测定

pH 稳定性实验结果显示,裂解酶 LysLF1 具有较强的耐酸碱能力,在 4~8 pH 范围内表现出良好的杀菌活性。作用 1 h 可杀灭约 73.93~99.41%的活菌(图 1.8 A)。温度稳定性实验结果显示,该酶对温度较为敏感,不耐高温,在温度高于 40 °C 时,其活性完全丧失。在 4 °C 和 25 °C 的环境中的裂解进程和效率相似,90 min 内可杀死约 1.5 个 Lg 单位的活菌(起始菌量为  $10^8$  CFU/mL)。另外在 37 °C 中的裂解进程较快,60 min 即可杀灭约 1.3 个 Lg 单位的活菌。该酶的最适温度为 37 °C(图 1.8 B)。

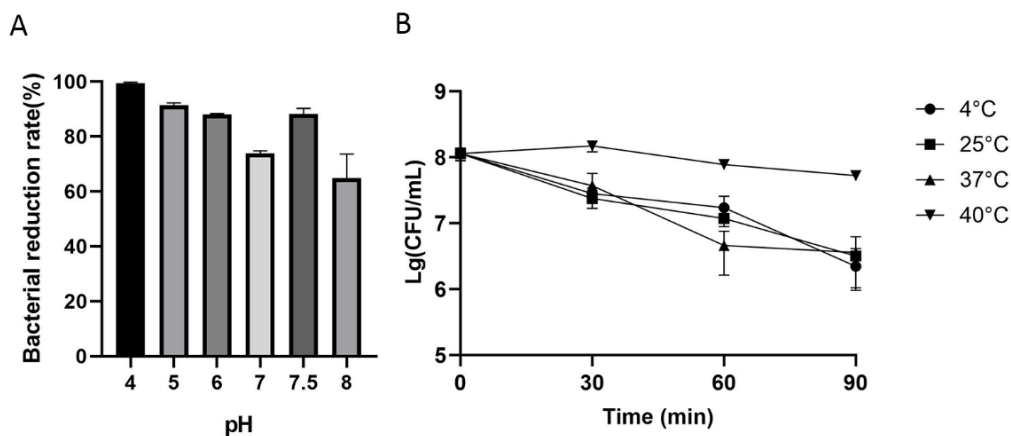


图 1.8 LysLF1 的 pH 及温度稳定性

A. LysLF1 的 pH 稳定性 B. LysLF1 的温度稳定性

Fig 1.8 pH and temperature stability of LysLF1

A. The pH stability of LysLF1 B. The temperature stability of LysLF1

使用不同浓度的 NaCl 处理 LysLF1 比较作用 1 h 前后菌落数的差值来判断盐离子对 LysLF1 裂解活性的影响，结果表明 0.1~10 mM 的 NaCl 对 LysLF1 裂解活性的影响并不大，100 mM、200 mM 的 NaCl 会使 LysLF1 的杀菌量分别减少  $9.6 \times 10^7$  CFU/mL 和  $1.24 \times 10^8$  CFU/mL (图 1.9 A)。表明高浓度 NaCl 会影响 LysLF1 的活性。

使用终浓度为 100 mM 的 EDTA 预处理 LysLF1 (100  $\mu$ g/mL) 后，比较其与 LysLF1 在 90 min 内的杀菌量变化，结果表明，EDTA 减慢了 LysLF1 的杀菌进程，但并不影响最终的杀菌效果。表明金属离子是 LysLF1 发挥活性所非必须的 (图 1.9 B)。



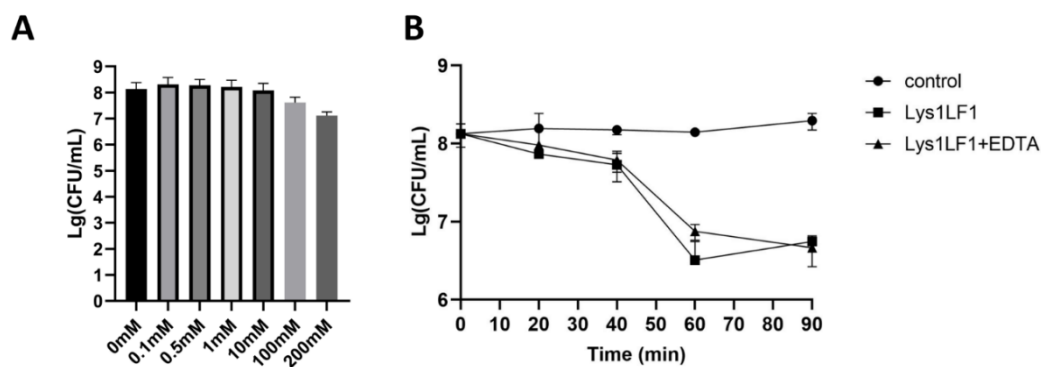


图 1.9 LysLF1 的 NaCl 及 EDTA 稳定性

A. LysLF1 的 NaCl 稳定性 B. LysLF1 的 EDTA 稳定性

Fig 1.9 NaCl and EDTA stability of LysLF1

A. The NaCl stability of LysLF1 B. The EDTA stability of LysLF1

## 1.4 讨论

链球菌是一类危害严重的病原体，不仅威胁人类健康，在农业生产和养殖业中也扮演着重要角色。在畜牧业中，无乳链球菌、停乳链球菌是引起奶牛乳腺炎的主要病原菌；猪链球菌是引起猪脑膜炎、心内膜炎的主要病原菌；马链球菌是感染马属动物、猪并引起马腺疫、子宫炎、肺炎的主要病原菌。目前，抗生素治疗仍是抗链球菌感染的首选药物。临床上首选  $\beta$ -内酰胺类抗生素（以青霉素为代表）来治疗链球菌属疾病，但是一部分人群对  $\beta$ -内酰胺类药物过敏，因此采用大环内酯类抗生素来代替青霉素疗法或者与  $\beta$ -内酰胺类药物联合使用以治疗社区获得性肺炎等严重侵入性感染。在兽医临床上，主要使用疫苗如活疫苗、灭活疫苗、基因工程疫苗来保护动物免受链球菌毒株的感染。但是疫苗的研发成本高、保护作用有限、免疫效果不确定。此外，已在全球多种临床分离株的遗传物质中检出耐药基因，如 *erm*、*mef*、*TetM* 等。其中 *erm* 基因的存在可能会使菌株具有交叉耐药性。链球菌抗生素耐药性的日益严重和药物残留问题迫使人们寻找新型抗菌制剂。噬菌体及其裂解酶以其天然的优势成为替代抗生素的新型抗菌制剂。由于链球菌细胞壁肽聚糖的特殊结构，使得链球菌属噬菌体裂解酶相较于其它种属裂解酶有着更宽的裂解谱，应用潜力更广。目前已发现的链球菌属噬菌体裂解酶约 20 多个，数量有限，所以急需挖掘新的链球菌属噬菌体裂解酶并对其性质

进行评价, 为这种新型抗菌制剂早日走向临床奠定基础。

在本章中, 所选取的 26 株链球菌, 出现 10 株多重耐药菌株, 其中对对  $\beta$ -内酰胺类抗生素头孢他啶 (CAZ) 和磺胺类抗菌药物磺胺异恶唑 (SIZ) 的耐药最为严重。随后, 在马链球菌临床分离株 3518 的全基因中发现一个具有良好裂解活性的前噬菌体裂解酶 LysLF1。该裂解酶与已报道的研究过其功能的链球菌属裂解酶的氨基酸序列同源性较低, 仅为 21.88%。而与其序列相似性较高的 GH25 家族溶菌酶以及链球菌噬菌体 LF2 编码的裂解酶的功能并没有被报道。因此, 裂解酶 LysLF1 是一个具有研究潜力的新型链球菌抗菌制剂。

成功制备裂解酶 LysLF1, 该酶的碱基序列长度为 1335 bp, 体外重组蛋白为可溶性表达, 蛋白大小约为 56 kDa 与预期大小相一致。LysLF1 的裂解范围较广, 可裂解受试菌株中的马链球菌、猪链球菌、解没食子酸链球菌。裂解谱与猪链球菌裂解酶 Ply30 相似 (同时可裂解马链球菌和猪链球菌)<sup>[89]</sup>。该酶的裂解活性较好使用 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的蛋白可杀死约 90% 的活菌。但是裂解进程较为缓慢 4 h 可杀灭 2~3 个 Lg 单位起始菌量为  $10^8 \text{CFU}/\text{mL}$  的活菌。此外, LysLF1 耐酸碱、不耐高温。在 4~8 pH 范围内稳定存在, 在酸性环境下裂解活性较强, 1 h 内可杀死约 99% 的活菌。而 pH 值为 8 时, 活菌减少率为 64.95%。当温度为 40  $^{\circ}\text{C}$  时酶的活性就会丧失。这与裂解酶 Ly7917 的耐高温能力相似, 该酶在温度为 42  $^{\circ}\text{C}$  时活性丧失, pH 稳定性却相反, Ly7917 在 pH 值为 4.5 时会丧失, pH 值升高活性随之增强<sup>[90]</sup>。裂解酶作为抗菌制剂时, 一般会添加金属离子及盐离子以提高其活性产生从而产生更好地治疗效果, 但大多数其它链球菌属裂解酶如 Cpl-1<sup>[91]</sup>、PAL<sup>[92]</sup>、Cpl-7<sup>[93]</sup>、EJ-1<sup>[94]</sup> 并没有研究 NaCl、EDTA 对酶活性的影响。本章研究中使用 NaCl 和 EDTA 来处理 LysLF1, 100 mM、200 mM NaCl 会使 LysLF1 的杀菌量减少, 而 0.2、0.5 mM 的 NaCl 会使粪肠球菌噬菌体裂解酶 Lys22 的活性分别下降 30% 和 90%<sup>[95]</sup>。

综上所述, LysLF1 是一个具有较广裂解范围、良好抗菌活性的链球菌属噬菌体裂解酶新成员。此外该酶较强的耐酸性质可用来治疗子宫炎、阴道炎。但该酶作为新型抗菌制剂走向临床, 仍需进一步研究, 可以向 LysLF1 中添加有机酸如柠檬酸或者与抗生素联合使用来提高其抗菌活性、拓宽其宿主谱、增高靶向性。

## 1.5 小结

- 1.5.1 成功获取 26 株马链球菌的耐药性数据。
- 1.5.2 成功从马链球菌临床分离株中, 挖掘到一个可溶性表达的新的链球菌属噬菌体裂解酶。
- 1.5.3 裂解酶 LysLF1 具有较宽的宿主范围、良好的体外杀菌活性、较强的耐酸碱能力。

## 第2章 裂解酶 LysLF1 的结构预测与功能解析

革兰氏阳性菌噬菌体裂解酶的结构一般呈模块化。典型的结构形式为双结构域，即 N 端含有一个催化裂解结构域（EAD），C 端含有一个细胞壁结合结构域（CBD）。也有一些特殊的结构形式存在，即 N 端和 C 端都含有 EAD, CBD 位于两者之间或同时含有三个 EAD（如酰胺酶、内肽酶、糖苷酶结构域）。裂解酶的结构形式决定酶的裂解范围和裂解活性。因此本章通过生物信息学在线分析工具预测 LysLF1 各结构域的 3D 结构以及可能的催化作用位点。随后，通过构建截短体蛋白和融合蛋白来验证各截短片的功能。最后，通过一步法定向突变找到 LysLF1 的关键氨基酸作用位点。以上为日后人工改造裂解酶奠定理论基础与数据支撑。

### 2.1 材料

#### 2.1.1 主要试剂及仪器

Hochest No.33342 荧光染料（Sigma）、无缝克隆试剂盒（Beyotime）、无水乙醇、激光共聚焦显微镜（日本，东京，Olympus FV 3000），其余试剂和仪器见 1.1.2.

#### 2.1.2 引物

表 2.1 引物序列

Table 2.1 Primers

Name	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>LysLF1A</i>	CGCGGATCCATGGCTACATATCA GGAAT	CCGCTCGAGTTAAGTAGCGG TTAAGTCT
<i>LysLF1B</i>	CGCGGATCCGGAGTAGCAGGTG GTTT	CCGCTCGAGTTATACTTGTGT TGCATTA
<i>LysLF1C</i>	CGCGGATCCATGGCTACATATCA GGAAT	CCGCTCGAGTTAGCTTTGTG GTTTGTCA
<i>C26A</i>	GTAGCCATCCCAAGCTTGCGCA CCAAGCGATCC	GGATCGCTTGGTGCGCAAGC TTGGGATGGCTAC

续表 2.1 引物序列

Continued Table 2.1 Primers

Name	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>H91A</i>	CACTATCAAAAATAGCCACAGC GCTATACGGTGTAACACCTG	CAGGTGTTACACCGTATAGC GCTGTGGCTATTTTTGATAGT G
<i>G108A</i>	CTCCACCCTGGTTTTGAGCTAAA AACCATCCGTAT	ATACGGATGGTTTTTAGCTCA AAACCAGGGTGGAG
<i>N110A</i>	GTTTGCTCCACCCTGGGCTTGAC CTAAAACCATCCGTAT	ATACGGATGGTTTTTAGGTCA AGCCCAGGGTGGAGCAAAC
<i>D158A</i>	GCTTGTTGATAAGCTGATACAGC AATAAAATAATCGCCTTTATTTAG TCCT	AGGACTAAATAAAGGCGATT ATTTTATTGCTGTATCAGCTT ATCAACAAGC
<i>D1241A</i>	GCACTTGCAGAGTCTTCATAAGC AATGACTAAGTAAGAGACTT	AAGTCTCTTACTTAGTCATTG CTTATGAAGACTCTGCAAGT GC
<i>D337A</i>	CTGCTAATAATACAATATTTTTAG CTAAACCACCTGCTACTCCTAC	GTAGGAGTAGCAGGTGGTTT AGCTAAAATATTGTATTATT AGCAG
<i>D276A</i>	TCAATATTATTAAGCGTAAATGGT TTAGCGCTGTAATAAACAGGCTT ATATCCAGC	GCTGGATATAAGCCTGTTTAT TACAGCGCTAAACCATTAC GCTTAATAATATTGA
<i>LysLF1- CBD</i>	CGAGCTCGCAGATGATAGTAGC AAAGTGGAT	CCCTCGAGTTATACTTGTGTT GCATTAGATAAATACTTATCT TCGA
<i>BamH I - EGFP-Sac I</i>	CGGGATCCAGAACCCCGTGAG CAAGG	CGAGCTCTTTGTACAGCTCG TCCATGCC

续表 2.1 引物序列

Continued Table 2.1 Primers

Name	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>EGFP</i>	CGCGGATCCGTGAGCAAGGGCG AG	CCGCTCGAGCTACTTGTACA GCTCGTC
<i>LysLF1A-EGFP-P1</i>	CGCGGATCCATGGCTACATATCAG	
<i>LysLF1A-EGFP-P2</i>	CTCGCCCTTGCTCACAGAACCCCCAGTAGCGGTTAAGT	
<i>LysLF1A-EGFP-P3</i>	GACTTAACCGCTACTGGGGGTTCTGTGAGCAAGGGCGAG	
<i>LysLF1B-EGFP-P1</i>	CGCGGATCCATGGCTACATATCAG	
<i>LysLF1B-EGFP-P2</i>	CTCGCCCTTGCTCACAGAACCCCCGCTTTGTGGTTTGTCAAT	
<i>LysLF1B-EGFP-P3</i>	ATTGACAAACCACAAAGCGGGGGTTCTGTGAGCAAGGGCGAG	
<i>P4</i>	CCGCTCGAGCTACTTGTACAGCTCGTC	

## 2.2 方法

### 2.2.1 裂解酶 LysLF1 的 3D 结构预测和关键氨基酸作用位点分析

#### 2.2.1.1 LysLF1 结构域 3D 结构及功能预测

将 LysLF1 的各截短片段氨基酸序列上传至在线网站 Phyre<sup>2</sup> (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) 对其序列进行分析、预测二级结构、分析功能域、同源建模法建立 3D 结构、预测关键氨基酸作用位点。

#### 2.2.1.2 LysLF1 的关键氨基酸作用位点的确定

基于预测的 3D 结构和氨基酸序列分析来判断 LysLF1 发挥裂解活性的关键

作用位点。运用一步法将各个位点定向突变为丙氨酸后测定各突变体蛋白的杀菌活性。突变体引物见表 2.1。

(1) 突变体载体的构建及原核表达与纯化：以 pET-28a-LysLF1-C26A (突变位点 C26) 为例。使用 pET-28a-LysLF1 BL21 质粒为模板，使用特异性引物 C26A-F 和引物 C26A-R 进行 PCR。PCR 反应程序为：95 °C 预变性 5 min, 95 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 68 °C 延伸 8 min, 68 °C 终延伸 10 min。其中变性、退火、延伸三个步骤经历 15 个循环。PCR 反应体系见表 2.2。基因扩增后加入 1  $\mu$ L 的 *DpnI*，在 37 °C 水浴锅中消化模板 6 h。后续载体构建与突变体蛋白纯化步骤均与 1.2.3 相同。

(2) 突变体活性测定与 1.2.4.2 中裂解谱测定方法相同。

表 2.2 LysLF1 突变体的 PCR 反应体系

Table 2.2 The reaction system of PCR of LysLF1 mutants

Component	Volume ( $\mu$ L)
模板	1.0
F	0.5
R	0.5
dNTPs	2.5
KOD-Plus	0.5
10 $\times$ KOD buffer	2.5
MgSO <sub>4</sub>	1
ddH <sub>2</sub> O	16.5

## 2.2.2 LysLF1 各截短体蛋白的功能验证

### 2.2.2.1 截短体蛋白杀菌活性的验证

(1) 截短体蛋白载体的构建、原核表达与蛋白纯化

以 pET-28a-LysLF1A 为例，使用试剂盒按照说明书操作提取 LysLF1-pET-28a-BL21 表达菌株的质粒。以该质粒为模板 LysLF1A-F 和 LysLF1A-R 为引物扩增 LysLF1A 基因，PCR 体系与 1.2.1.3 相同，反应程序除延伸步骤按照每 500 bp 延伸 30 s 外，其余均同 1.2.1.3。后续载体构建与蛋白纯化步骤均与 1.2.3 相同。

利用以上方法构建的 3 个表达载体为 pET-28a-LysLF1A、LysLF1B、LysLF1C (图 2.1)。

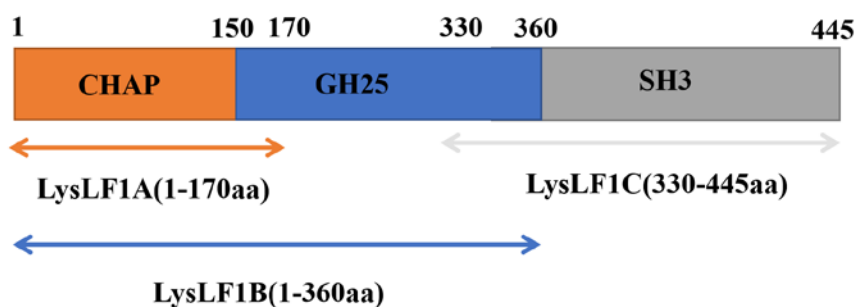


图 2.1 LysLF1 截短体蛋白示意图

Fig 2.1 The schematic of LysLF1 protein-truncating variant (PTV)

## (2) 平板裂解活性及液体杀菌活性验证

取 10  $\mu\text{L}$  纯化后的截短体蛋白 LysLF1A、LysLF1B、LysLF1C 与 LysLF1 (200  $\mu\text{g}$ ) 滴加在涂布着 3518 的平板上, 37  $^{\circ}\text{C}$  培养过夜观察抑菌环形成情况。然后使用 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的蛋白与培养至对数生长期的 3518 ( $\text{OD}_{600\text{nm}}=0.6\sim 0.8$ ) 在 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴锅中孵育 90 min, 每 30 min 测定一次菌落数来比较各截短体蛋白在液体中的杀菌活性。未添加蛋白加入等量缓冲溶液的为阴性对照组, 加入终浓度相同的 LysLF1 的为阳性对照组。

### 2.2.2.2 截短体蛋白结合活性的验证

#### (1) 融合蛋白的表达与纯化

使用无缝克隆法构建 pET-28a-EGFP-LysLF1C 融合蛋白的原核表达载体。具体操作如下: 以 pET-28a-LysLF1 质粒为模板, 使用 Lys1-CBD 的上下游引物扩增 LysLF1C 基因, *Bam*HI-EGFP-*Sac*I 的上下游引物扩增 EGFP 基因, 使用无缝克隆试剂盒, 将 LysLF1C 基因、EGFP 基因、用 *Bam*HI 和 *Xho*I 酶切过的载体 pET-28a 以及 2 $\times$ Seamless Cloning Mix 混合, 然后在 50  $^{\circ}\text{C}$  下孵育 15 分钟转化至克隆菌株 DH5 $\alpha$  中。

使用传统的同源重组法构建 pET-28a-LysLF1A/B-EGFP 融合蛋白, 具体操作如下: 共经历三轮 PCR, 使用 DNA 产物胶回收试剂盒回收第一轮及第三轮的 PCR 扩增产物。反应体系见表 2.3 和表 2.4。程序见图 2.2。使用 *Bam*HI、*Xho*I 酶切第三轮的 PCR 扩增产物及 pET-28a 载体。使用引物 EGFP-F 及 EGFP-R 构建 pET-28a-EGFP 的原核表达载体, 程序体系同 1.2.3。



pET-28a-LysLF1A/B-EGFP、pET-28a-EGFP-LysLF1C 及 pET-28a-EGFP 后续原核表达载体的后续构建与蛋白纯化方法步骤均与 1.2.3 相同。

表 2.3 LysLF1A/B-EGFP 融合基因的 PCR 反应体系

Table 2.3 The reaction system of PCR of Fusion gene LysLF1A/B-EGFP

第一轮 PCR		第一轮 PCR	
Component	Volume( $\mu\text{L}$ )	Component	Volume( $\mu\text{L}$ )
LysLF1A/B BL21 菌液	5	EGFP BL21 菌液	5
LysLF1A/B P1	1	LysLF1A/B P3	1
LysLF1A/B P2	1	P4	1
2 $\times$ Prime STAR HS	25	2 $\times$ Prime STAR HS	25
Mix		Mix	
ddH <sub>2</sub> O	18	ddH <sub>2</sub> O	18

续表 2.3 LysLF1A/B-EGFP 融合基因的 PCR 反应体系

Continued Table 2.3 The reaction system of PCR of Fusion gene LysLF1A/B-EGFP

第二轮 PCR		第三轮 PCR	
Component	Volume ( $\mu\text{L}$ )	Component	Volume ( $\mu\text{L}$ )
LysLF1A/B (一轮回收产物)	5	第二轮产物	8
EGFP (一轮回收产物)	5	2 $\times$ PrimeSTAR HS Mix	25
2 $\times$ PrimeSTAR HS Mix	25	LysLF1A/B P1	1
ddH <sub>2</sub> O	15	LysLF1A/B P4	1
		ddH <sub>2</sub> O	18

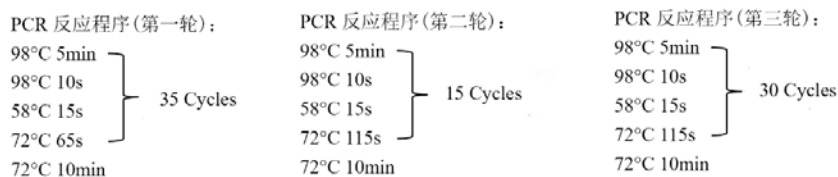


图 2.2 LysLF1A/B-EGFP 融合基因的 PCR 反应程序

Fig 2.2 The PCR program of LysLF1A/B-EGFP fusion gene

## (2) 激光共聚焦显微镜观察 LysLF1 的结合活性

用缓冲溶液处理处于对数生长期的菌液 3518 后,向其中加入 5  $\mu\text{L}$  Hoechst No.33342 荧光染料置于 37  $^{\circ}\text{C}$  温箱中共孵育 10 min。随后在 4  $^{\circ}\text{C}$  (8,000 $\times$ g ;5 min) 离心,并用 PBS 洗涤 5 次以除去未结合的染料,然后向菌体沉淀中加入终浓度为 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的融合蛋白 (EGFP、LysLF1A-EGFP、LysLF1B-EGFP、EGFP-LysLF1C),体系为 100  $\mu\text{L}$ 。再次置于 37  $^{\circ}\text{C}$  温箱中共孵育 1 h。随后 4  $^{\circ}\text{C}$  (8,000  $\times$ g ;5 min) 离心,并用 PBS 洗涤 5 次以除去未结合的荧光蛋白,然后将细菌菌体用 100  $\mu\text{L}$  PBS 重悬。在激光共聚焦显微镜 (LSCM) 下观察各融合蛋白的结合活性。观察前需处理玻片,具体操作步骤为:3% 冰醋酸浸泡玻片 30 min, ddH<sub>2</sub>O 冲洗至无味后再用无水乙醇浸泡 30 min, 擦镜纸擦干后即可使用。

## 2.3 结果

### 2.3.1 裂解酶 LysLF1 3D 结构预测和关键氨基酸作用位点的确定

(1) 各截短片段的功能预测:将 LysLF1 的氨基酸序列上传至 NCBI 进行 BLASTP 分析,结果表明就整体而言 LysLF1 属于 GH25 家族。其中 LysLF1 的 150 aa~350 aa 是一个保守的 GH25 细胞壁酰胺酶结构域,该片段可能发挥水解细胞壁酰胺键的作用。LysLF1A (1~170 aa) 的氨基酸序列 BLASTP 结果未见保守结构域,但与 *Streptococcus pyogenes* UTMEM-1 (WP\_038433339.1) 的 CHAP 结构域的同源性为 100%,置信度最高,因此推测 LysLF1A 可能是一个 CHAP 结构域,与催化作用有关。LysLF1C (330~445 aa) 的氨基酸序列 BLASTP 结果也未见保守结构域,但与 *Streptococcus pyogenes* UTMEM-1 (EQL80511.1) 的 SH3 结构域的同源性为 99.12%,置信度最高,因此推测 LysLF1C 可能为该酶的 CBD (图 2.1)。

(2) 各截短片段的 3D 结构与关键氨基酸作用位点的预测:将 LysLF1A 的氨基酸序列上传至在线蛋白质结构预测软件 Phyre<sup>2</sup>,结果表明 LysLF1A 与金黄色葡萄球菌噬菌体裂解酶 LysGH15 的 CHAP 片段 (PDB: c4olkB) 最为接近,覆盖率为 66%,置信度为 98.4%,同一性为 25%,可信度高。结构预测结果表明 LysLF1A 有 2 个  $\alpha$  螺旋和 4 个  $\beta$  折叠,3D 结构见图 2.3 A。软件分析结果显示

C26、G108、H91、N110 可能是发挥催化结构的位点。此外，在 LysLF1A 中发现与 LysGH15 的 CHAP 片段相似的凹槽结构即 D17、D19、S21、G23、D28。在 LysGH15 的 CHAP 结构域中该凹槽结构（D45、D47、Y49、H51 以及 D56）可以与  $Ca^{2+}$  结合，其附近的 C54 和 H117 是 CHAP 结构域的催化中心（图2.3 B）。因此推断 LysLF1 的 C26 和 H91 极有可能是该酶发挥裂解活性的关键氨基酸作用位点（图 2.3 A,C）。

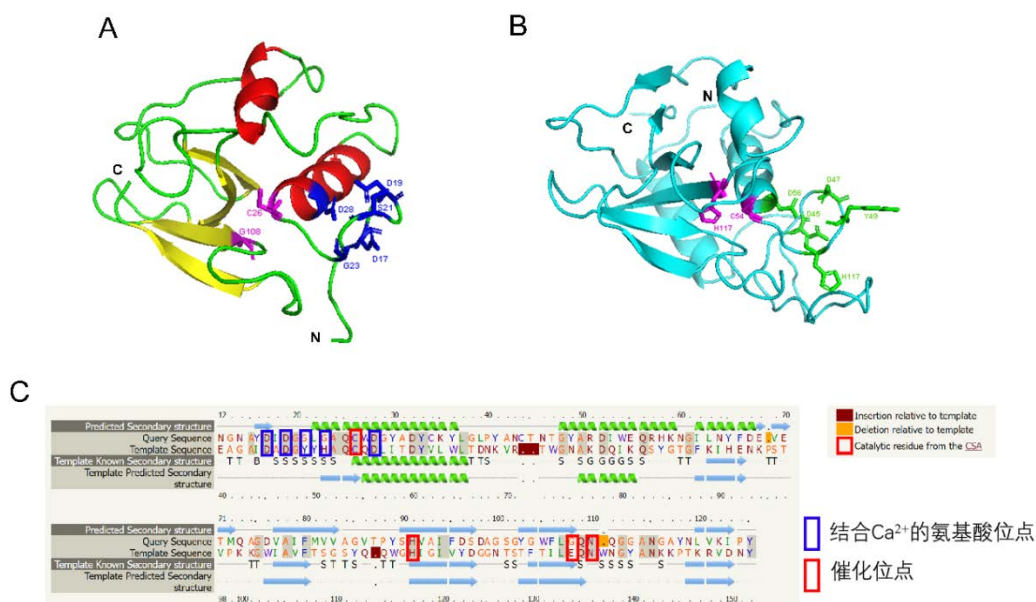


图 2.3 LysLF1A 3D 结构及关键氨基酸作用位点的预测

A: LysLF1A 3D 结构 粉色: 关键催化位点; 蓝色:  $Ca^{2+}$ 结合位点 B: LysGH15-CHAP 3D 结构 粉色: 关键催化位点; 绿色:  $Ca^{2+}$ 结合位点 C: LysLF1A 与 LysGH15-CHAP 结构域的序列比对 Query sequence: LysLF1A Template sequence:

LysGH15-CHAP 结构域; 绿色:  $\alpha$ 螺旋; 蓝色:  $\beta$ 折叠

Fig 2.3 Prediction of LysLF1A 3D structure and key amino acid action sites

A: The 3D structure of LysLF1A Pink: The key catalytic residue; Blue: The calcium-binding sites B: The 3D structure of LysGH15-CHAP domain Pink: The key catalytic residue; Green: The calcium-binding sites C: The alignment of LysLF1A with the CHAP domains of LysGH15 Query sequence: LysLF1A; Template sequence: LysGH15-CHAP domain Green:  $\alpha$ -helices; blue:  $\beta$ -strands

BLAST 结果显示 LysLF1 (150 aa~350 aa) 可能是发挥酰胺酶活性的 EAD, 将该段序列上传至 Phyre<sup>2</sup>, 分析结果表明其与结构数据库中链球菌噬菌体裂解酶

Cpl-1 (PDB: d2j8ga2) 的部分结构最接近, 覆盖率为 94%, 置信度为 100%, 同一性为 56%, 可信度较高。结构预测结构表明 LysLF1 (150 aa~350 aa) 的二级结构有 7 个  $\alpha$  螺旋和 8 个  $\beta$  折叠, 3D 结构见图 2.4 A, 软件分析结果显示 D158、D241、D276、D337 可能是发挥催化结构的位点 (图 2.4 B)。



图 2.4 LysLF1 (150 aa~350 aa) 3D 结构及关键氨基酸作用位点的预测

Query sequence: LysLF1 (150 aa~350 aa); Template sequence: Cpl-1 部分序列;  
绿色: $\alpha$  螺旋; 蓝色: $\beta$  折叠

Fig 2.4 Prediction of LysLF1 (150 aa~350 aa) 3D structure and key amino acid action sites

Query sequence: LysLF1 (150 aa~350 aa); Template sequence: Cpl-1 partial sequence

Green:  $\alpha$ -helices; blue:  $\beta$ -strands

BLAST 结果显示 LysLF1C 可能是发挥结合作用的 CBD, 将该段序列上传至 Phyre<sup>2</sup>, 分析结果表明其与结构数据库中苏云金芽孢杆菌 BT9727\_4915 结构域的溶液核磁共振结构最接近, 并预测了其三维结构, 覆盖率为 41%, 置信度为 91.5%, 同一性为 26% (图 2.5)。

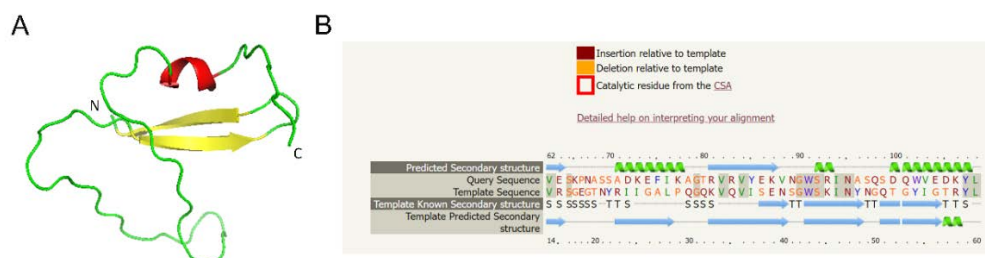


图 2.5 LysLF1C 的 3D 结构及序列比对

Fig 2.5 LysLF1C 的 3D structure and sequence alignment of LysLF1C

(3) 关键氨基酸作用位点的确定: 选取上述预测的 8 个氨基酸作用位点,

采用一步法将各个位点突变为丙氨酸,将上述突变体的 BL21 菌液送至公司测序,返回的测序结果与各突变体序列相同。并成功纯化出 N11A、C26A、H91A、G108A、D158A、D276A、D337A、D241A 突变体蛋白。通过比较终浓度相同的 Native LysLF1 和各突变体蛋白 (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 在 37 $^{\circ}\text{C}$  下作用 1h 的前后菌量变化来判断体外杀菌活性从而确定关键氨基酸作用位点。结果显示, C26A 突变体蛋白的杀菌活性较 Native LysLF1 下降 81.99%, G108A 突变体蛋白的杀菌活性较 Native LysLF1 下降 61.61%, 其它突变体蛋白的杀菌活性无显著变化, 表明 C26、G108 为 LysLF1 发挥催化裂解活性的关键位点。(如图 2.6 所示)。

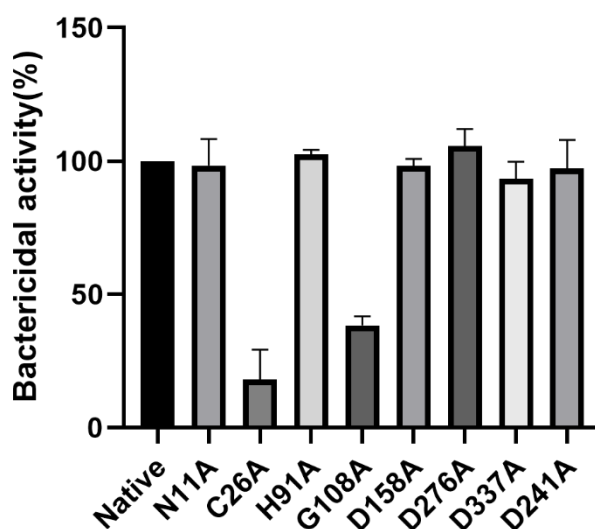


图 2.6 突变体蛋白的杀菌活性

Fig 2.6 Bactericidal activity of LysLF1 mutants

## 2.3.2 LysLF1 截短体蛋白的功能验证

### 2.3.2.1 LysLF1 截短体蛋白裂解活性的测定

#### (1) LysLF1 截短体蛋白的原核表达与纯化

2.3.1 的分析结果显示, LysLF1 的 1~170 aa 和 150~360 aa 可能是该酶的 EAD, 可能分别表现为半胱氨酸、组氨酸依赖性的酰胺水解酶或肽酶活性 (CHAP), 胞壁酰胺酶活性 (GH25\_muramidase domain)。LysLF1 的 330~445 aa 可能是该酶的 CBD, 与结合识别相关 (SH3)。将 LysLF1 (1~170 aa)、LysLF1 (330~445 aa) 命名为 LysLF1A、LysLF1C。我们尝试表达 LysLF1 (150~360 aa), 但并没有纯

化出该截短体蛋白。所以构建了 LysLF1 (1~360 aa), 将其命名为 LysLF1B (如图 2.1 所示)。

PCR 结果显示, 在 510 bp、1080 bp、346 bp 处可见与预期大小相一致的条带 (如图 2.7 A 所示), 后续碱基测序结果与已知序列相一致, 表明成功构建 LysLF1A、LysLF1B、LysLF1C 的原核表达载体。SDS-PAGE 结果显示, 在约 19 kDa、40 kDa、13 kDa 处可见与预测分子量相一致的条带, 表明成功纯化出 LysLF1A、LysLF1B、LysLF1C 截短体蛋白 (如图 2.7 B 所示)。

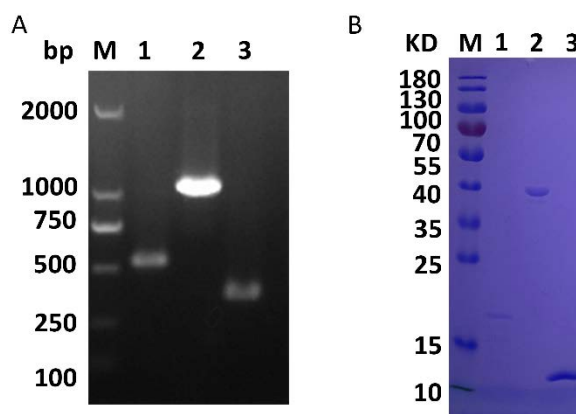


图 2.7 LysLF1 截短体蛋白的原核表达与纯化

Fig 2.7 Prokaryotic expression and purification of LysLF1 truncations

A: PCR 扩增 (M: DL 2000 marker; 1: LysLF1A 基因扩增; 2: LysLF1B 基因扩增; 3: LysLF1C 基因扩增) B: 蛋白纯化 (M: Marker; 1: 纯化的 LysLF1A; 2: 纯化的 LysLF1B; 3: 纯化的 LysLF1C)

A: PCR amplification (M: DL 2000 marker; 1: LysLF1A gene amplification; 2: LysLF1B gene amplification; 3: LysLF1C gene amplification) B: Protein purification (M: marker; 1: purified LysLF1A; 2: purified LysLF1B; 3: purified LysLF1C)

## (2) LysLF1 截短体蛋白裂解活性测定

平板裂解实验表明, LysLF1A、LysLF1B 可在涂布着 3518 的平板上生成抑菌环, 未见 LysLF1C 形成抑菌环 (如图 2.8 所示)。

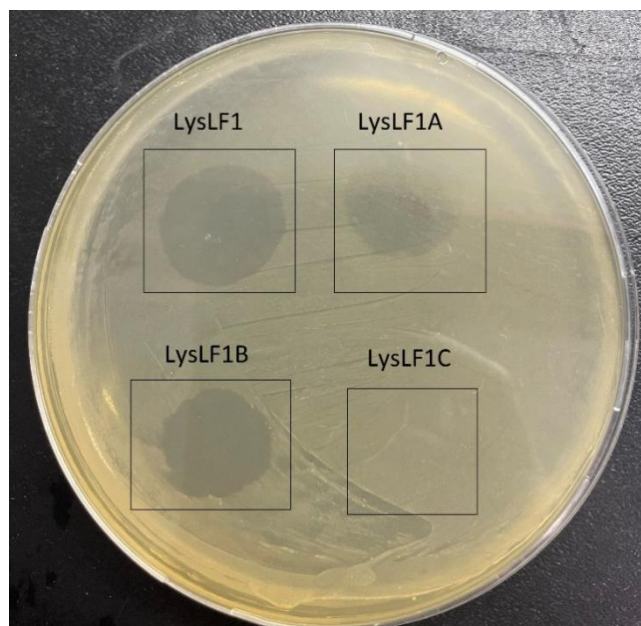


图 2.8 LysLF1 截短体蛋白的平板裂解活性

Fig 2.8 The lystic activity of LysLF1 truncations on BHI plate

根据平板裂解活性的结果，通过比较 LysLF1A、LysLF1B 与 LysLF1 在 90 min 内的菌落数变化来测定 LysLF1A、LysLF1B 的体外杀菌活性，只添加 Tris-NaCl (pH=7.5) 缓冲溶液的为对照组。结果表明，各截短体蛋白活性具有与全酶相似的裂解活性，在 37 °C、90 min 的条件下，可使菌落数下降 1 个 Lg 单位。LysLF1A 的裂解进程要比 LysLF1 和 LysLF1B 快，30 min 即可达到将活菌从 8 次方降至 7 次方的效果（如图 2.9 所示）。

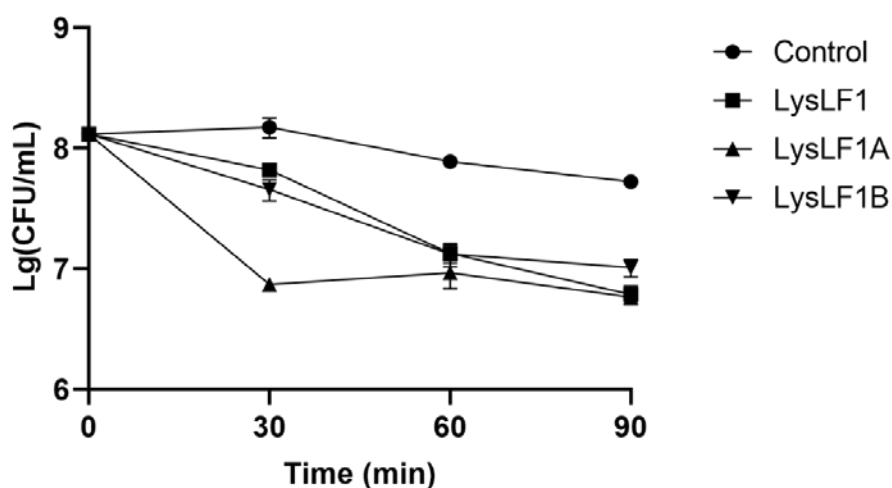


图 2.9 LysLF1 截短体蛋白的液体杀菌活性

Fig 2.9 The lystic activity of LysLF1 truncations in vitro

### 2.3.2.2 LysLF1 截短体蛋白结合活性的测定

#### (1) LysLF1 融合蛋白的原核表达与纯化

将 LysLF1A、LysLF1B、LysLF1C 基因与 EGFP 基因串联表达，中间由 9 个碱基组成的 Linker 连接。构建 pET28-EGFP 原核表达载体作为对照。PCR 结果显示，在 771 bp、1290 bp、1860 bp、1126 bp 处可见与预期大小相一致的条带（如图 2.10 A 所示），后续碱基测序结果与已知序列相一致，表明成功构建 pET-28a-EGFP、pET-28a-LysLF1A-EGFP、pET-28a-LysLF1B-EGFP、pET-28a-EGFP-LysLF1C 的原核表达载体。SDS-PAGE 结果显示，在约 27 kDa、42 kDa、67 kDa、40 kDa 处可见与预测分子量相一致的条带，表明成功纯化出 EGFP、LysLF1A-EGFP、LysLF1B-EGFP、LysLF1C-EGFP 融合蛋白（如图 2.10 B 所示）。

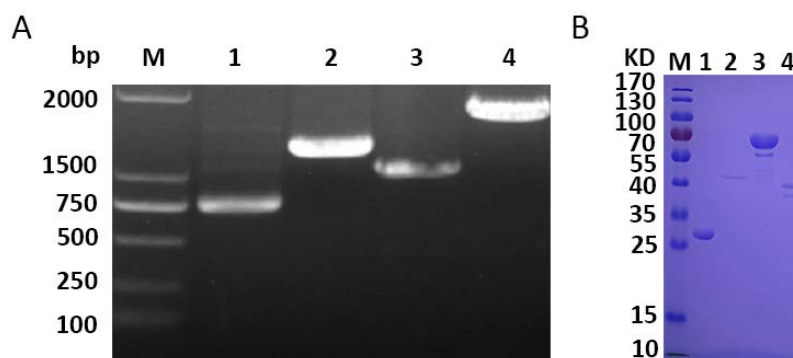


图 2.10 LysLF1 融合蛋白的原核表达与纯化

Fig 2.10 Prokaryotic expression and purification of LysLF1 fusion protein

A: PCR 扩增 (M: DL 2000 marker; 1: EGFP 基因扩增; 2: LysLF1A-EGFP 基因扩增; 3: EGFP-LysLF1C; 4: LysLF1B-EGFP 基因扩增) B: 蛋白纯化 (M: Marker; 1: 纯化的 EGFP; 2: 纯化的 LysLF1A-EGFP; 3: 纯化的 LysLF1B-EGFP; 4: 纯化的 EGFP-LysLF1C)

A: PCR amplification (M: DL 2000 marker; 1: EGFP gene amplification; 2: LysLF1A-EGFP gene amplification; 3: EGFP-LysLF1C gene amplification; 4: LysLF1B-EGFP) B: Protein purification (M: marker; 1: purified EGFP; 2: purified LysLF1A-EGFP; 3: purified LysLF1B-EGFP; purified EGFP LysLF1C)

#### (2) LysLF1 融合蛋白结合活性的测定

通过在激光共聚焦显微镜下观察融合蛋白 LysLF1A-EGFP、LysLF1B-EGFP、EGFP-LysLF1C 与宿主菌 3518 的结合情况，来判断各截短区域的结合活性。添



加 EGFP 蛋白作为对照。结果显示, LysLF1B、LysLF1C 具有与 3518 菌株结合的能力、LysLF1A 则不能与宿主菌结合(如图 2.11 所示)。

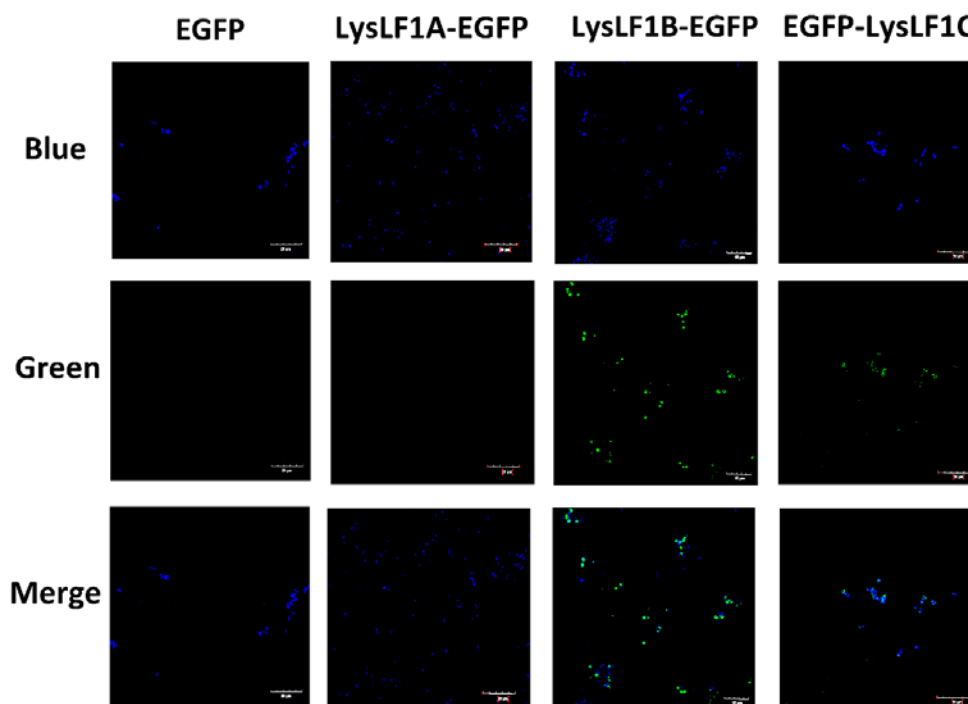


图 2.11 LysLF1 各融合蛋白与菌株 3518 的结合情况

(Blue: 405nm 波长下的蓝色激发光; Green: 488nm 波长下的绿色激发光; Merge: Blue 和 Green 的合并显示各融合蛋白以及 EGFP 与菌株 3518 的共定位情况)

Fig.2.11 Binding of LysLF1 fusion proteins to host strain 3518

(Blue: Localization at 405 nm; Green: Localization at 488 nm; Merge of Blue and Green showed the colocalization of each fusion protein and EGFP with host strain 3518)

## 2.4 讨论

在上一章的研究中, 我们通过对一株马链球菌临床分离株 3518 进行全基因组测序, 并利用生物信息学在线软件分析该宿主的噬菌体整合酶等相关基因的存在, 在体外成功获得一个新的链球菌噬菌体裂解酶 LysLF1。基本生物学特性结果显示, 该酶具有较宽的宿主谱和良好的体外杀菌活性及耐酸碱能力。但它不耐高温, 裂解进程和效率与其它裂解酶如金黄色葡萄球菌属噬菌体裂解酶 LysGH15<sup>[96]</sup>、

LysK<sup>[97]</sup>、同种属噬菌体裂解酶 PlyC<sup>[98]</sup>、Ply1228<sup>[72]</sup>都有所差异。基于革兰氏阳性菌裂解酶的模块化结构,可以使用不同裂解酶的结构域,来人工设计替换以及改造裂解酶(嵌合裂解酶)从而提高裂解酶的裂解效率和拓宽裂解谱。如嵌合裂解酶 ClyS,就是由 Twort 的裂解酶(PlyTW)的 N 端内肽酶结构域(CHAP)<sup>[99]</sup>和 phiNM3 裂解酶的非 SH3b 样(CWT)<sup>[100]</sup>细胞壁结合结构域组合而成。改造后可有效抗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)、万古霉素中度耐药性的金黄色葡萄球菌(VISA)以及甲氧西林敏感的金黄色葡萄球菌(MSSA)等多种金黄色葡萄球菌感染<sup>[101]</sup>。又如嵌合裂解酶 Cpl711,该酶是由肺炎链球菌裂解酶 Cpl-7 的催化结构域(GH-25 家族的糖基水解酶)和 Cpl-1 的胆碱结合结构域(CW\_binding\_1),中间由一个 Cpl-1 的 linker(Cpl-1)连接而成<sup>[102]</sup>。该嵌合裂解酶表现出比其亲本裂解酶更高效的杀菌活性以及更广泛的宿主范围。

在本章研究中,对裂解酶 LysLF1 的结构和功能进行预测及解析。预测结果表明,相较于其它裂解酶,LysLF1 可能有特殊的结构形式即 2+1 类型(由 2 个 N 端的 EAD 和 1 个 C 端的 CBD 组成)。分别是位于 N 端的 CHAP 结构域(LysLF1A, 1~170 aa)、GH25\_muramidase 结构域(150~350 aa)和位于 C 端的 SH3 结构域(LysLF1C, 330~445 aa)。该结构形式与猪链球菌裂解酶 LySMP(N 端含有发挥内肽酶和糖苷酶活性的 EAD, C 端含有与 Cpl-7 相似的 CBD)<sup>[103]</sup>、无乳链球菌裂解酶 B30(N 端含有相似的 CHAP 结构域和糖苷酶结构域, C 端有推定的 SH3b 结构域)<sup>[76]</sup>以及大多数葡萄球菌裂解酶均相似<sup>[104]</sup>。而大多数的噬菌体裂解酶是由一个 EAD 和一个 CBD 组成。各截短体蛋白的体外杀菌实验结果显示,LysLF1A、LysLF1B 具有裂解活性,LysLF1C 无裂解活性。而且 LysLF1A 表现出与全长 LysLF1 相似的裂解活性,但是裂解进程较 LysLF1 快。说明与 CHAP 相似的结构域是发挥催化裂解活性的关键结构域。各截短体与 EGFP 串联的融合蛋白与宿主菌 3518 的结合实验结果显示,LysLF1B、LysLF1C 具有结合活性,LysLF1A 无结合活性。说明与 SH3 结构域相似的结构域是发挥结合活性的关键结构域,GH25\_muramidase 结构域也与细胞壁的结合有关。所以说,LysLF1 是由位于氨基端的 2 个酶催化裂解结构域和位于羧基端的一个细胞壁结合结构域组成。另外,该酶的第 26 位氨基酸半胱氨酸(C26)以及第 108 位氨基酸甘氨酸(G108)是发挥催化活性的关键作用位点。这两个位点均在推定的 CHAP 结构域上,这表

明 LysLF1A 是 LysLF1 发挥活性所必不可少的区域。大多数具有相似 CHAP 结构域的裂解酶如金黄色葡萄球菌裂解酶 LysGH15、粪肠球菌噬菌体裂解酶 LysIME-EF1 是凹槽结构附近的 Cys-His 位点来发挥活性。而在本研究中将相似的 His 位点 (H91) 突变后并未见裂解活性发挥变化。

综上所述,通过对裂解酶 LysLF1 各区域的功能预测及验证,为后续该酶的人工分子改造与嵌合提供理论基础与来源,同时也扩充了裂解酶库。

## 2.5 小结

**2.5.1** 分析并预测裂解酶 LysLF1 不同区域的二级结构以及三维结构。

**2.5.2** 确定裂解酶 LysLF1 发挥结合活性的结构域与 SH3 相似 (LysLF1C, 330~445 aa), GH25\_muramidase 结构域也与结合有关;发挥催化活性的关键结构域与 CHAP (LysLF1A, 1~170 aa) 相似。

**2.5.3** 确定 C26 和 G108 是裂解酶 LysLF1 发挥裂解活性的关键氨基酸作用位点。

## 第3章 裂解酶 LysLF1 在动物感染模型中的抗菌效果评价

在链球菌 (*Streptococcus spp*) 中马链球菌是兽医临床中常见的病原微生物, 感染该类菌的患病动物常表现为肺炎、脑膜炎、败血症、子宫内膜炎等临床症状<sup>[105]</sup>。实验动物中小鼠和兔子最易感。在前面两章的研究中, 我们发现了一个新的链球菌属噬菌体裂解酶 LysLF1, 基本生物学特性实验结果表明, 该酶具有较宽的裂解谱, 较强的耐酸碱能力以及良好的体外杀菌活性。并通过生物学在线分析平台预测了各截短片段的 3D 结构与功能, 通过一步法定点突变找到了其关键氨基酸作用位点, 说明 LysLF1 具有作为新型抗菌制剂的潜力。

在本章中, 我们将通过建立小鼠肺炎感染模型, 进一步评价 LysLF1 的体内抗感染效果。通过小鼠存活率实验、病理组织学变化、肺部细菌载量变化全面评价该裂解酶体内治疗的效果和安全性, 为后续应用于临床提供更多数据支撑。

### 3.1 材料

#### 3.1.1 主要试剂和仪器

剪刀、镊子、研磨珠、浓硫酸、4% 甲醛 (北京化工)、异氟烷 (北京中生瑞泰)、研磨仪。

其他试剂和仪器参考 1.1.2。

#### 3.1.2 主要试剂的配制

4% 甲醛: 将 40% 的甲醛溶液用 ddH<sub>2</sub>O 稀释 10 倍后分装于 4 mL 离心管中, 备用。

其他试剂参考 1.1.3。

#### 3.1.3 实验菌株和实验动物

实验菌株为溶原宿主菌 3518, 来源与培养处理方法参考 1.1; 实验动物为 SPF 级雌性 BALB/c 小鼠, 6-8 周龄 (18-20g), 购自辽宁长生生物技术有限公司。

## 3.2 方法

### 3.2.1 小鼠肺炎模型的建立

将马链球菌临床分离株 3518 培养至对数生长期( $OD_{600nm}=0.7$  左右),用 PBS 缓冲溶液,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $10,000\times g$ ,  $5\text{ min}$ ), 重复洗菌 3 次。小鼠随机分成 4 组, 每组 8 只, 使用异氟烷麻醉小鼠, 然后滴鼻攻菌, 攻菌剂量为  $5\times 10^7\text{ CFU/只}$ 、 $5\times 10^6\text{ CFU/只}$ 、 $5\times 10^5\text{ CFU/只}$ 、对照组滴入 PBS 缓冲溶液。待小鼠自然吸入, 苏醒后观察七日内小鼠存活情况, 以确定最佳攻菌剂量。

### 3.2.2 裂解酶 LysLF1 对小鼠治疗效果的评价

#### 3.2.2.1 裂解酶 LysLF1 最适治疗剂量的确定

将小鼠随机分组, 每组 8 只, 采用滴鼻的方式将最佳攻菌剂量的马链球菌临床分离株 3518 菌液滴入小鼠体内, 攻菌后 0.5 h, 分别使用  $100\text{ }\mu\text{g/只}$ 、 $200\text{ }\mu\text{g/只}$ 、 $400\text{ }\mu\text{g/只}$ 剂量的 LysLF1 治疗小鼠。对照组只滴加  $400\text{ }\mu\text{g/只}$ 剂量 LysLF1 治疗小鼠, 不做攻菌处理。记录小鼠 7 日内的存活情况, 以确定最佳治疗剂量。

#### 3.2.2.2 肺部菌载量的测定

将小鼠随机分为 2 组, 每组 30 只小鼠, 治疗组在攻菌后 0.5 h 滴鼻最佳治疗剂量的蛋白; 对照组滴鼻等量无菌 PBS。分别在治疗后 12 h、24 h、30 h、36 h、48 h、72 h、84 h 从对照组和治疗组中随机选取 3 只小鼠取出肺部组织, 向肺部组织中加入无菌 PBS 和研磨珠进行研磨后采用倍比稀释法测定样品中的细菌载量。在采取肺部组织之前对小鼠实施安乐死处理。

#### 3.2.2.3 肺部组织的病理学分析

使用高压灭菌的剪刀和镊子解剖小鼠肺脏, 分别取出一小部分攻菌后 12 h 和 48 h 的正常组、PBS 组和治疗组的肺部组织, 立即放于 4% 多聚甲醛溶液中固定。随后通过 HE 染色法分析肺部病理组织学变化。

### 3.2.3 统计学分析

本研究所有图片均由 GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, 美国)生成。误差棒表示平均值的标准偏差。P 值  $<0.05$  被认为具有统计学意义。NS  $P>0.05$ ; \*  $P<0.05$ ; \*\*  $P<0.01$ ; \*\*\* $P<0.001$ 。误差棒代表平均值的标准误差。数据分析

使 One-way Analysis of Variance (ANOVA) 或 Student's t-tests 进行处理。

### 3.3 结果

#### 3.3.1 最适攻菌剂量的确定

使用  $5 \times 10^5$  CFU/只滴鼻攻入 3518 菌株时 7 天内未见小鼠死亡, 但可见小鼠行动缓慢、被毛炸起等临床表现。使用  $5 \times 10^6$  CFU/只滴鼻攻菌 4 天内小鼠全部死亡, 可见小鼠行动缓慢、抱团、不爱采食采水等临床表现。使用  $5 \times 10^7$  CFU/只滴鼻攻菌时 1 天内即可引起 75% 的小鼠死亡, 攻菌 1 天后观察存活的小鼠已出现嗜睡、活动困难、垂死等严重的临床症状。因此, 菌株 3518 的最小致死剂量(MLD) 为  $5 \times 10^6$  CFU/只。以  $2 \times$ MLD 作为最适攻菌剂量, 即  $1 \times 10^7$  CFU/mice。

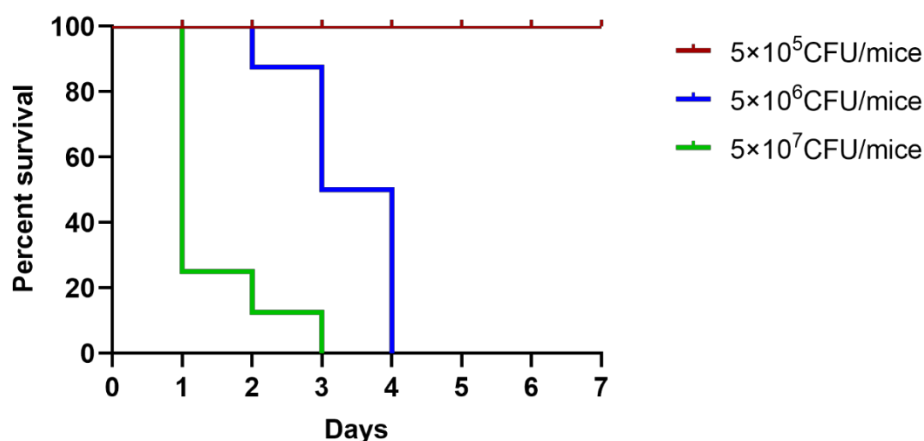


图 3.1 菌株 3518 的最适攻菌剂量

Fig 3.1 The optimum dose of strain 3518

#### 3.3.2 裂解酶 LysLF1 对小鼠治疗效果的评价

##### 3.3.2.1 裂解酶 LysLF1 最佳治疗剂量的测定

通过比较未治疗组(滴入等量 PBS 缓冲溶液)与治疗组(100  $\mu$ g/只、200  $\mu$ g/只、400  $\mu$ g/只 LysLF1)小鼠 7 日内的存活情况来确定裂解酶 LysLF1 用于治疗由菌株 3518 ( $1 \times 10^7$  CFU/只)引起肺炎的最佳治疗剂量。结果表明, 未治疗组小鼠在 4 日内全部死亡。100  $\mu$ g/只剂量的 LysLF1 对小鼠无保护作用, 200  $\mu$ g/只, 400  $\mu$ g/只剂量的 LysLF1 可延缓小鼠死亡时间、提高小鼠的存活率。单次使用

400  $\mu\text{g}$  /只剂量的 LysLF1 滴鼻小鼠，并没有对小鼠存活率产生影响（control 组）（图 3.2）。因此，400  $\mu\text{g}$ /只为最佳治疗剂量。

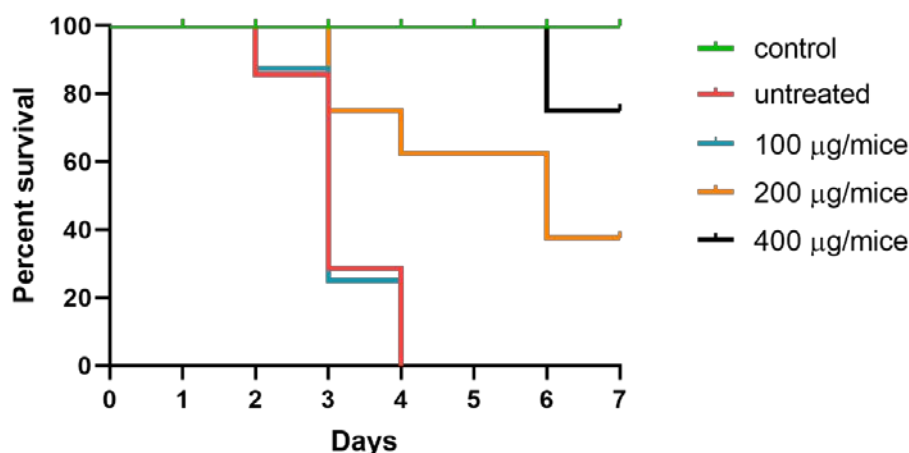


图 3.2 LysLF1 的最佳治疗剂量

Fig 3.2 The optimal therapeutic dose of LysLF1

### 3.3.2.2 感染小鼠肺部组织载菌量的测定

如图 3.3 所示，在滴入 3518 菌株 12 小时后，对照组小鼠肺部菌载量约为  $4.5 \times 10^4$  CFU/mg，而治疗组小鼠肺部菌载量约为 115 CFU/mg。感染 24 h 后，对照组小鼠肺部菌载量约为  $3.3 \times 10^4$  CFU/mg，对照组肺部菌载量约为 343 CFU/mg。在攻菌 24 h 后，治疗组肺部菌载量随着时间的推移而持续上升，但始终都比未治疗组的细菌载量要低。说明 400  $\mu\text{g}$ /只的 LysLF1 对菌株 3518 有清除作用，可延缓细菌在小鼠肺内的增殖。

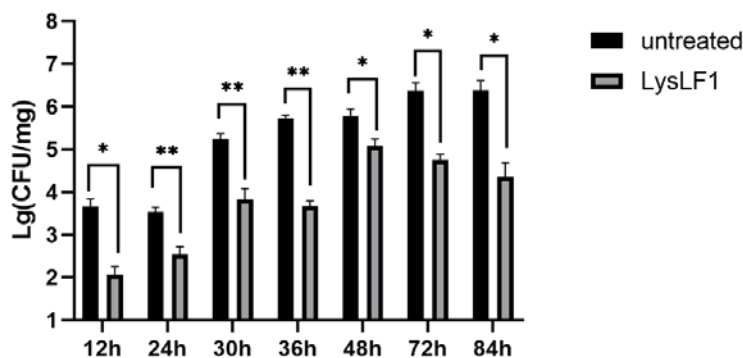


图 3.3 肺部细菌载量检测

Fig 3.3 Bacteria load in lungs sample

### 3.3.2.3 感染小鼠肺部病理组织学评估

如图 3.4 所示, 12 h、48 h 组未经治疗组的肺泡结构的正常形态被破坏、肺间质增厚、肺泡内出血并伴有炎性细胞浸润, 且随着时间的推移而逐渐加重。12 h、48 h 治疗组(400  $\mu\text{g}/\text{只}$ )的肺部病理组织变化相较而言有所缓解, 其在攻菌后 12 h 的形态要优于攻菌后 48 h, 12 h 时仍接近正常肺部组织结构。

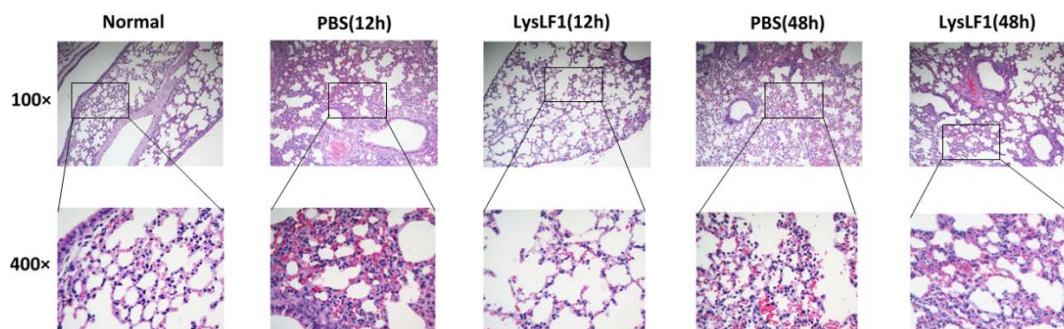


图 3.4 BALB/c 小鼠肺部病理组织学分析

Fig 3.4 Pathological analysis of lung tissue in BALB/c mice

## 3.4 讨论

链球菌的宿主范围广泛, 所带来的危害也不容小觑。严重危害人类健康、农业生产以及畜牧业发展。该种属细菌能造成肺炎、乳腺炎、脑膜炎等临床症状。在兽医临床上, 马链球菌是造成马腺疫以及猪链球菌病的一种病原菌。在实验动物中该类菌对小鼠和兔子最易感。另外, 随着在越来越多的链球菌的临床分离株中, 检出耐药基因以及发现多重耐药菌株甚至超级细菌表型, 实际的临床治疗中急需新的抗菌制剂来解决这种局面。虽然现已发现链球菌噬菌体裂解酶的数量有 20 多种, 但是真正在体内研究其抗菌效果的却很少。

在本章研究中, 对裂解酶 LysLF1 治疗由马链球菌临床分离株 3518 引起的小鼠肺炎效果进行评价。分别使用 100  $\mu\text{g}/\text{只}$ 、200  $\mu\text{g}/\text{只}$ 、400  $\mu\text{g}/\text{只}$ 剂量的 LysLF1 对小鼠进行治疗, 结果表明, 使用的治疗剂量越高, 对小鼠的保护作用越好。这与猪链球菌裂解酶 Ply1228<sup>[106]</sup>以及肺炎链球菌裂解酶 Cpl-1<sup>[107]</sup>相一致。与 LysLF1 不同的是 Cpl-1 评价了其在大鼠内的治疗效果。另外, 单独滴入 400  $\mu\text{g}/\text{只}$ 剂量的 LysLF1 不会对小鼠的生命造成威胁。因此, 使用 LysLF1 治疗小鼠



是安全可靠的。LysLF1 在体内有着良好的抗菌效果，可延缓小鼠的死亡进程，降低小鼠的死亡率。使用 400  $\mu\text{g}$ /只剂量的 LysLF1 在滴鼻攻菌 0.5 h 后治疗小鼠可使 75% 的小鼠免受死亡、延缓细菌在小鼠肺部的增殖有效缓解肺部病理损伤。LysLF1 与无乳链球菌前噬菌体裂解酶 PlyGBS, B30、猪链球菌前噬菌体裂解酶 Ply30 以及停乳链球菌裂解酶 PlySK1249 相比有着较好的体内抗菌效果<sup>[75-77]</sup>。这些裂解酶的最佳治疗剂量分别为 0.5 mg/只、0.5 mg/只、1 mg/只、2 mg/只。

综上所述，通过裂解酶 LysLF1 在小鼠肺炎模型中抗菌活性的研究，证明该酶在体内用着良好的抗菌效果，可以作为抗链球菌感染的新型酶类生物制剂。后续研究可以将该酶与抗生素、抗菌肽、细菌素、中草药提取物联合使用来提高该酶的体内治疗效果。在提高体内抗菌效果后，可尝试在多种模型动物中如兔子、牛、猪、马中进行抗菌效果评价，为后续该酶应用于兽医临床甚至治疗人类疾病做准备。

## 3.5 小结

**3.5.1** 成功建立小鼠肺炎模型

**3.5.2** 200  $\mu\text{g}$ /只、400  $\mu\text{g}$ /只剂量的 LysLF1 可以提高小鼠的存活率，减缓小鼠死亡的进程。

**3.5.3** 400  $\mu\text{g}$ /只剂量的 LysLF1 对菌株 3518 有清除作用以及改善病理组织学损伤。

## 结 论

1、从马链球菌临床分离株 3518 中发现一个新的前噬菌体裂解酶 LysLF1，该酶与其它链球菌属细菌裂解酶的同源性低于 21.88%，并通过原核表达获得了具有裂解活性的裂解酶。

2、裂解酶 LysLF1 具有良好的体外杀菌活性、较宽的宿主范围以及较强的耐酸碱能力。

3、裂解酶 LysLF1 的结构形式由两个催化裂解结构域和一个细胞壁结合结构域组成，其中一个发挥半胱氨酸、组氨酸依赖性的酰胺水解酶或肽酶活性(CHAP)，另一个发挥酰胺酶活性(GH25\_muramidase domain)，LysLF1C (SH3) 是该酶的细胞壁结合结构域。

4、成功预测截短区域 LysLF1A、LysLF1 (150~350aa)、LysLF1C 的二级结构以及 3D 模型，C26、G108 是该酶发挥活性的关键氨基酸作用位点。

5、成功建立小鼠肺炎感染模型，LysLF1 在体内仍表现出良好的抗菌活性。400  $\mu\text{g}$ /只剂量的 LysLF1 能够显著提高小鼠的存活率，减缓小鼠的死亡进程和清除细菌，减轻肺部病理组织损伤。

## 参考文献

- [1] GARCIA-CURIEL L, DEL ROCIO LOPEZ-CUELLAR M, RODRIGUEZ-HERNANDEZ A I, et al. Toward understanding the signals of bacteriocin production by *Streptococcus* spp. and their importance in current applications [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2021, 37(1): 15.
- [2] PONTIGO F, MORAGA M, FLORES S V. Molecular phylogeny and a taxonomic proposal for the genus *Streptococcus* [J]. *Genet Mol Res*, 2015, 14(3): 10905-18.
- [3] MCDONALD T J, MCDONALD J S. Streptococci isolated from bovine intramammary infections [J]. *Am J Vet Res*, 1976, 37(4): 377-81.
- [4] MANCINI F, ADAMO F, CRETINI R, et al. A fatal case of streptococcal toxic shock syndrome caused by *Streptococcus suis* carrying tet (40) and tet (O/W/32/O), Italy [J]. *J Infect Chemother*, 2016, 22(11): 774-6.
- [5] TIMONEY J F. The pathogenic equine streptococci [J]. *Vet Res*, 2004, 35(4): 397-409.
- [6] WEISER J N, FERREIRA D M, PATON J C. *Streptococcus pneumoniae*: transmission, colonization and invasion [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2018, 16(6): 355-67.
- [7] Puopolo KM, Lynfield R, Cummings JJ; American Academy of Pediatrics, Committee on Fetus and Newborn, Committee on Infectious Diseases. Management of Infants at Risk for Group B Streptococcal Disease. *Pediatrics*. 2019;144(2):e20191881 [J]. *Pediatrics*, 2019, 144(4).
- [8] COBO-ANGEL C, JARAMILLO-JARAMILLO A S, LASSO-ROJAS L M, et al. *Streptococcus agalactiae* is not always an obligate intramammary pathogen: Molecular epidemiology of GBS from milk, feces and environment in Colombian dairy herds [J]. *PLoS One*, 2018, 13(12): e0208990.
- [9] KENZEL S, HENNEKE P. The innate immune system and its relevance to neonatal sepsis [J]. *Curr Opin Infect Dis*, 2006, 19(3): 264-70.
- [10] LANNES-COSTA P S, BARAUNAR A, RAMOS J N, et al. Comparative genomic analysis and identification of pathogenicity islands of hypervirulent ST-17

- Streptococcus agalactiae Brazilian strain [J]. Infect Genet Evol, 2020, 80: 104195.
- [11] FURFARO L L, CHANG B J, PAYNE M S. Perinatal Streptococcus agalactiae Epidemiology and Surveillance Targets [J]. Clin Microbiol Rev, 2018, 31(4).
- [12] VERANI J R, MCGEE L, SCHRAG S J, et al. Prevention of perinatal group B streptococcal disease--revised guidelines from CDC, 2010 [J]. MMWR Recomm Rep, 2010, 59(RR-10): 1-36.
- [13] SEGURA M. Streptococcus suis Research: Progress and Challenges [J]. Pathogens, 2020, 9(9).
- [14] OKURA M, OSAKI M, NOMOTO R, et al. Current Taxonomical Situation of Streptococcus suis [J]. Pathogens, 2016, 5(3).
- [15] DUTKIEWICZ J, ZAJAC V, SROKA J, et al. Streptococcus suis: a re-emerging pathogen associated with occupational exposure to pigs or pork products. Part II - Pathogenesis [J]. Ann Agric Environ Med, 2018, 25(1): 186-203.
- [16] KERDSIN A, HATRONJIT R, GOTTSCHALK M, et al. Emergence of Streptococcus suis serotype 9 infection in humans [J]. J Microbiol Immunol Infect, 2017, 50(4): 545-6.
- [17] HATRONJIT R, KERDSIN A, GOTTSCHALK M, et al. First human case report of sepsis due to infection with Streptococcus suis serotype 31 in Thailand [J]. BMC Infect Dis, 2015, 15: 392.
- [18] URUEN C, GARCIA C, FRAILE L, et al. How Streptococcus suis escapes antibiotic treatments [J]. Vet Res, 2022, 53(1): 91.
- [19] BLUM S, ELAD D, ZUKIN N, et al. Outbreak of Streptococcus equi subsp. zooepidemicus infections in cats [J]. Vet Microbiol, 2010, 144(1-2): 236-9.
- [20] PISONI G, ZADOKS R N, VIMERCATI C, et al. Epidemiological investigation of Streptococcus equi subspecies zooepidemicus involved in clinical mastitis in dairy goats [J]. J Dairy Sci, 2009, 92(3): 943-51.
- [21] PRIESTNALL S, ERLES K. Streptococcus zooepidemicus: an emerging canine pathogen [J]. Vet J, 2011, 188(2): 142-8.
- [22] MARCHANDIN H, JUMAS-BILAK E, BOUMZEBRA A, et al. Fatal Streptococcus equi subsp. ruminantium infection in a man [J]. Emerg Infect Dis,

- 2007, 13(12): 1964-6.
- [23] 白小贤, 王虎军. 临床药师参与 1 例疑似马链球菌引起筋膜炎患者的治疗实践 [J]. 中国临床药学杂志, 2017, 26(04): 269-72.
- [24] LANCEFIELD R C, FREIMER E H. Type-specific polysaccharide antigens of group B streptococci [J]. J Hyg (Lond), 1966, 64(2): 191-203.
- [25] KAWAMURA Y, HOU X G, SULTANA F, et al. Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus* [J]. Int J Syst Bacteriol, 1995, 45(2): 406-8.
- [26] CARROLL K C. Biographical Feature: Rebecca Lancefield, Ph.D [J]. J Clin Microbiol, 2019, 57(8).
- [27] BROUWER S, BARNETT T C, RIVERA-HERNANDEZ T, et al. *Streptococcus pyogenes* adhesion and colonization [J]. FEBS Lett, 2016, 590(21): 3739-57.
- [28] CARAPETIS J R, STEER A C, MULHOLLAND E K, et al. The global burden of group A streptococcal diseases [J]. Lancet Infect Dis, 2005, 5(11): 685-94.
- [29] SIMS SANYAHUMBI A, COLQUHOUN S, WYBER R, et al. Global Disease Burden of Group A *Streptococcus* [M]//FERRETTI J J, STEVENS D L, FISCHETTI V A. *Streptococcus pyogenes: Basic Biology to Clinical Manifestations*. Oklahoma City (OK). 2016.
- [30] SHIMOMURA Y, OKUMURA K, MURAYAMA S Y, et al. Complete genome sequencing and analysis of a Lancefield group G *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* strain causing streptococcal toxic shock syndrome (STSS) [J]. BMC Genomics, 2011, 12: 17.
- [31] HAENNI M, LUPO A, MADEC J Y. Antimicrobial Resistance in *Streptococcus* spp [J]. Microbiol Spectr, 2018, 6(2).
- [32] 武岳. 母乳中乳酸菌的分离鉴定研究及 *Streptococcus* 新种的鉴定 [D]; 内蒙古农业大学, 2021.
- [33] APELGREN L D, DAJANI A S. Purification of a streptococcal bacteriocin (viridin B) and its separation from alpha-hemolysin [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1979, 15(3): 436-9.

- [34] NIZET V. Streptococcal beta-hemolysins: genetics and role in disease pathogenesis [J]. Trends Microbiol, 2002, 10(12): 575-80.
- [35] LANNES-COSTA P S, DE OLIVEIRA J S S, DA SILVA SANTOS G, et al. A current review of pathogenicity determinants of Streptococcus sp [J]. J Appl Microbiol, 2021, 131(4): 1600-20.
- [36] TURNER C E, BUBBA L, EFSTRATIOU A. Pathogenicity Factors in Group C and G Streptococci [J]. Microbiol Spectr, 2019, 7(3).
- [37] LIU P, PIAN Y, LI X, et al. Streptococcus suis adenosine synthase functions as an effector in evasion of PMN-mediated innate immunity [J]. J Infect Dis, 2014, 210(1): 35-45.
- [38] CARLIN A F, CHANG Y C, ARESCHOUG T, et al. Group B Streptococcus suppression of phagocyte functions by protein-mediated engagement of human Siglec-5 [J]. J Exp Med, 2009, 206(8): 1691-9.
- [39] GOMEZ-MEJIA A, GAMEZ G, HAMMERSCHMIDT S. Streptococcus pneumoniae two-component regulatory systems: The interplay of the pneumococcus with its environment [J]. Int J Med Microbiol, 2018, 308(6): 722-37.
- [40] 徐娟. 猪链球菌 2 型双组分信号转导系统 NisKR 和 BceRS 对毒力调控的研究 [D]; 华中农业大学, 2014.
- [41] PATENGE N, FIEDLER T, KREIKEMEYER B. Common regulators of virulence in streptococci [J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2013, 368: 111-53.
- [42] Prevention of Group B Streptococcal Early-Onset Disease in Newborns: ACOG Committee Opinion, Number 797 [J]. Obstet Gynecol, 2020, 135(2): e51-e72.
- [43] Prevention of Early-onset Neonatal Group B Streptococcal Disease: Green-top Guideline No. 36 [J]. BJOG, 2017, 124(12): e280-e305.
- [44] //FERRETTI J J, STEVENS D L, FISCHETTI V A. Streptococcus pyogenes: Basic Biology to Clinical Manifestations. Oklahoma City (OK). 2016.
- [45] WALKER M J, BARNETT T C, MCARTHUR J D, et al. Disease manifestations and pathogenic mechanisms of Group A Streptococcus [J]. Clin Microbiol Rev, 2014, 27(2): 264-301.

- [46] CHOCHUA S, METCALF B J, LI Z, et al. Population and Whole Genome Sequence Based Characterization of Invasive Group A Streptococci Recovered in the United States during 2015 [J]. *mBio*, 2017, 8(5).
- [47] 张巧丽, 吕一枝, 王珊珊,等. 肺炎链球菌分离株的耐药性与毒力基因研究 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2017, 27(23): 5288-91.
- [48] 孙丹岚. 金银花和连翘对北疆地区马链球菌分离株耐药性和毒力基因的影响 [D]; 新疆农业大学, 2021.
- [49] 王静, 王劲, 孙运峰,等. 治疗性噬菌体制剂的研究进展 [J]. *食品与药品*, 2011, 13(09): 366-70.
- [50] 噬菌体可分为哪两类? [J]. *发酵科技通讯*, 2012, 41(01): 29.
- [51] HOWARD-VARONA C, HARGREAVES K R, ABEDON S T, et al. Lysogeny in nature: mechanisms, impact and ecology of temperate phages [J]. *ISME J*, 2017, 11(7): 1511-20.
- [52] CHEVALLEREAU A, PONS B J, VAN HOUTE S, et al. Interactions between bacterial and phage communities in natural environments [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2022, 20(1): 49-62.
- [53] 吴瑕, 龚国利, 查健. 基于细菌裂解酶的功能性生物材料及其应用 [J]. *生物加工过程*, 2020, 18(01): 81-7.
- [54] 周彪, 甄向凯, 欧阳松应. 噬菌体裂解酶应用研究进展 [J]. *微生物学通报*, 2021, 48(09): 3330-40.
- [55] LOVE M J, ABEYSEKERA G S, MUSCROFT-TAYLOR A C, et al. On the catalytic mechanism of bacteriophage endolysins: Opportunities for engineering [J]. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*, 2020, 1868(1): 140302.
- [56] NELSON D C, SCHMELCHER M, RODRIGUEZ-RUBIO L, et al. Endolysins as antimicrobials [J]. *Adv Virus Res*, 2012, 83: 299-365.
- [57] CHERTKOV O V, ARMEEV G A, UPOROV I V, et al. Dual Active Site in the Endolytic Transglycosylase gp144 of Bacteriophage phiKZ [J]. *Acta Naturae*, 2017, 9(1): 81-7.
- [58] MCGOWAN S, BUCKLE A M, MITCHELL M S, et al. X-ray crystal structure of the streptococcal specific phage lysin PlyC [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012,

- 109(31): 12752-7.
- [59] LOW L Y, YANG C, PEREGO M, et al. Structure and lytic activity of a *Bacillus anthracis* prophage endolysin [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(42): 35433-9.
- [60] LOW L Y, YANG C, PEREGO M, et al. Role of net charge on catalytic domain and influence of cell wall binding domain on bactericidal activity, specificity, and host range of phage lysins [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(39): 34391-403.
- [61] GU J, FENG Y, FENG X, et al. Structural and biochemical characterization reveals LysGH15 as an unprecedented "EF-hand-like" calcium-binding phage lysin [J]. *PLoS Pathog*, 2014, 10(5): e1004109.
- [62] KORNDORFER I P, DANZER J, SCHMELCHER M, et al. The crystal structure of the bacteriophage PSA endolysin reveals a unique fold responsible for specific recognition of *Listeria* cell walls [J]. *J Mol Biol*, 2006, 364(4): 678-89.
- [63] DUNNE M, LEICHT S, KRICHEL B, et al. Crystal Structure of the CTP1L Endolysin Reveals How Its Activity Is Regulated by a Secondary Translation Product [J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(10): 4882-93.
- [64] KORNDORFER I P, KANITZ A, DANZER J, et al. Structural analysis of the L-alanoyl-D-glutamate endopeptidase domain of *Listeria* bacteriophage endolysin Ply500 reveals a new member of the LAS peptidase family [J]. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2008, 64(Pt 6): 644-50.
- [65] LINDEN S B, ZHANG H, HESELPOTH R D, et al. Biochemical and biophysical characterization of PlyGRCS, a bacteriophage endolysin active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99(2): 741-52.
- [66] LOOD R, RAZ A, MOLINA H, et al. A highly active and negatively charged *Streptococcus pyogenes* lysin with a rare D-alanyl-L-alanine endopeptidase activity protects mice against streptococcal bacteremia [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014, 58(6): 3073-84.
- [67] FISCHETTI V A. Bacteriophage endolysins: a novel anti-infective to control Gram-positive pathogens [J]. *Int J Med Microbiol*, 2010, 300(6): 357-62.
- [68] BAKER J R, LIU C, DONG S, et al. Endopeptidase and glycosidase activities of



- the bacteriophage B30 lysin [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72(10): 6825-8.
- [69] NELSON D, SCHUCH R, CHAHALES P, et al. PlyC: a multimeric bacteriophage lysin [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(28): 10765-70.
- [70] SHEN Y, BARROS M, VENNEMANN T, et al. A bacteriophage endolysin that eliminates intracellular streptococci [J]. *Elife*, 2016, 5.
- [71] LINDEN S B, ALREJA A B, NELSON D C. Application of bacteriophage-derived endolysins to combat streptococcal disease: current state and perspectives [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2021, 68: 213-20.
- [72] WANG Z, LIU X, SHI Z, et al. A novel lysin Ply1228 provides efficient protection against *Streptococcus suis* type 2 infection in a murine bacteremia model [J]. *Vet Microbiol*, 2022, 268: 109425.
- [73] XIAO Y, CHEN R, LI M, et al. The effectiveness of extended binding affinity of prophage lysin PlyARI against *Streptococcus suis* infection [J]. *Arch Microbiol*, 2021, 203(8): 5163-72.
- [74] NELSON D, LOOMIS L, FISCHETTI V A. Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(7): 4107-12.
- [75] 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]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49(1): 111-7.
- [76] PRITCHARD D G, DONG S, BAKER J R, et al. The bifunctional peptidoglycan lysin of *Streptococcus agalactiae* bacteriophage B30 [J]. *Microbiology (Reading)*, 2004, 150(Pt 7): 2079-87.
- [77] OECHSLIN F, DARASPE J, GIDDEY M, et al. In vitro characterization of PlySK1249, a novel phage lysin, and assessment of its antibacterial activity in a mouse model of *Streptococcus agalactiae* bacteremia [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 57(12): 6276-83.
- [78] LI X X, ZHANG F Q, WANG S, et al. *Streptococcus suis* prophage lysin as a new strategy for combating streptococci-induced mastitis and *Streptococcus suis* infection [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2023, 78(3): 747-56.

- [79] DAVID B. METHOD FOR EXPOSING GROUP A STREPTOCOCCAL ANTIGENS AND AN IMPROVED DIAGNOSTIC TEST FOR THE IDENTIFICATION OF GROUP A STREPTOCOCCI. 1987-.
- [80] HOOPEES J T, STARK C J, KIM H A, et al. Use of a bacteriophage lysin, PlyC, as an enzyme disinfectant against *Streptococcus equi* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75(5): 1388-94.
- [81] WANG Z, MA J, WANG J, et al. Application of the Phage Lysin Ply5218 in the Treatment of *Streptococcus suis* Infection in Piglets [J]. *Viruses*, 2019, 11(8).
- [82] ZHU Y, YAN J, MUJTABA B M, et al. The dual anti-caries effect of carboxymethyl chitosan nanogel loaded with chimeric lysin ClyR and amorphous calcium phosphate [J]. *Eur J Oral Sci*, 2021, 129(3): e12784.
- [83] LALEMAN I, DETAILLEUR V, SLOT D E, et al. Probiotics reduce mutans streptococci counts in humans: a systematic review and meta-analysis [J]. *Clin Oral Investig*, 2014, 18(6): 1539-52.
- [84] OTREBA M, MAREK L, TYCZYNSKA N, et al. Bee Venom, Honey, and Royal Jelly in the Treatment of Bacterial Infections of the Oral Cavity: A Review [J]. *Life (Basel)*, 2021, 11(12).
- [85] ZHANG P, WU S, LI J, et al. Dual-sensitive antibacterial peptide nanoparticles prevent dental caries [J]. *Theranostics*, 2022, 12(10): 4818-33.
- [86] TORRES K A M, LIMA S, TORRES L M B, et al. Garlic: An Alternative Treatment for Group B *Streptococcus* [J]. *Microbiol Spectr*, 2021, 9(3): e0017021.
- [87] 王冰艺, 马弘财, 邹明昊,等. 牦牛源链球菌的分离鉴定及耐药性分析 [J]. *中国畜牧兽医*, 2023, 50(02): 745-53.
- [88] 张瑞华, 高善颂, 庞天津,等. 狐狸源停乳链球菌类马亚种的分离鉴定和耐药性分析 [J]. *中国兽医杂志*, 2022, 58(12): 31-5.
- [89] TANG F, LI D, WANG H, et al. Prophage lysin Ply30 protects mice from *Streptococcus suis* and *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* infections [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2015, 81(21): 7377-84.
- [90] JI W, HUANG Q, SUN L, et al. A novel endolysin disrupts *Streptococcus suis* with high efficiency [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2015, 362(24): fmv205.

- [91] LOEFFLER J M, DJURKOVIC S, FISCHETTI V A. Phage lytic enzyme Cpl-1 as a novel antimicrobial for pneumococcal bacteremia [J]. *Infect Immun*, 2003, 71(11): 6199-204.
- [92] LEVY H L, SARKISSIAN C N, SCRIVER C R. Phenylalanine ammonia lyase (PAL): From discovery to enzyme substitution therapy for phenylketonuria [J]. *Mol Genet Metab*, 2018, 124(4): 223-9.
- [93] DIEZ-MARTINEZ R, DE PAZ H D, BUSTAMANTE N, et al. Improving the lethal effect of cpl-7, a pneumococcal phage lysozyme with broad bactericidal activity, by inverting the net charge of its cell wall-binding module [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 57(11): 5355-65.
- [94] DIAZ E, LOPEZ R, GARCIA J L. EJ-1, a temperate bacteriophage of *Streptococcus pneumoniae* with a Myoviridae morphotype [J]. *J Bacteriol*, 1992, 174(17): 5516-25.
- [95] 胡南南. 粪肠球菌噬菌体裂解酶 Lys22 的制备及其相关生物学特性测定 [D]; 吉林大学, 2022.
- [96] GU J, XU W, LEI L, et al. LysGH15, a novel bacteriophage lysin, protects a murine bacteremia model efficiently against lethal methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection [J]. *J Clin Microbiol*, 2011, 49(1): 111-7.
- [97] FILATOVA L Y, BECKER S C, DONOVAN D M, et al. LysK, the enzyme lysing *Staphylococcus aureus* cells: specific kinetic features and approaches towards stabilization [J]. *Biochimie*, 2010, 92(5): 507-13.
- [98] HESELPOTH R D, NELSON D C. A new screening method for the directed evolution of thermostable bacteriolytic enzymes [J]. *J Vis Exp*, 2012, (69).
- [99] BECKER S C, SWIFT S, KOROBOVA O, et al. Lytic activity of the staphylolytic Twort phage endolysin CHAP domain is enhanced by the SH3b cell wall binding domain [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2015, 362(1): 1-8.
- [100] NEPAL R, HOUTAK G, SHAGHAYEGH G, et al. Prophages encoding human immune evasion cluster genes are enriched in *Staphylococcus aureus* isolated from chronic rhinosinusitis patients with nasal polyps [J]. *Microb Genom*, 2021, 7(12).
- [101] 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]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54(4): 1603-12.
- [102] DIEZ-MARTINEZ R, DE PAZ H D, GARCIA-FERNANDEZ E, et al. A novel chimeric phage lysin with high in vitro and in vivo bactericidal activity against *Streptococcus pneumoniae* [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2015, 70(6): 1763-73.
- [103] WANG Y, SUN J H, LU C P. Purified recombinant phage lysin LySMP: an extensive spectrum of lytic activity for swine streptococci [J]. *Curr Microbiol*, 2009, 58(6): 609-15.
- [104] YOKOI K J, KAWAHIGASHI N, UCHIDA M, et al. The two-component cell lysis genes *holWMY* and *lysWMY* of the *Staphylococcus warneri* M phage *varphiWMY*: cloning, sequencing, expression, and mutational analysis in *Escherichia coli* [J]. *Gene*, 2005, 351: 97-108.
- [105] 魏述亮, 邱家章, 张恒彬. 猪链球菌病研究进展 [J]. *山东畜牧兽医*, 2023, 44(01): 86-9.
- [106] 链球菌噬菌体裂解酶 Ply1228 的抗菌活性研究 [J]. 2021.
- [107] ENTENZA J M, LOEFFLER J M, GRANDGIRARD D, et al. Therapeutic effects of bacteriophage Cpl-1 lysin against *Streptococcus pneumoniae* endocarditis in rats [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49(11): 4789-92.