

蔡幸哲, 彭林, 刘珂芮, 等. 沙门氏菌噬菌体裂解酶 *LysLorf22* 的制备及溶菌活性分析[J]. 江苏农业学报, 2020, 36(1): 212-218.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2020.01.030

沙门氏菌噬菌体裂解酶 *LysLorf22* 的制备及溶菌活性分析

蔡幸哲, 彭林, 刘珂芮, 刘书亮, 李诚, 刘爱平
(四川农业大学食品学院, 四川雅安 625014)

摘要: 根据沙门氏菌噬菌体 Lumpael 的全基因组序列, 预测该噬菌体裂解酶基因并对其进行生物信息学分析; 优化其在大肠杆菌表达系统中的表达, 并分析噬菌体裂解酶 *LysLorf22* 与外膜渗透剂最优组合的溶菌效果。结果表明, 裂解酶 *LysLorf22* 的相对分子质量为 1.76×10^4 , 等电点为 9.14, 其较优表达条件为: 表达菌株 *Escherichia coli* BL21, 37 °C 诱导 4 h。 *LysLorf22* 裂解谱较宽, 最佳工作浓度为 375 nmol/L, 在 30 min 内可使氯仿处理的 *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 菌悬液 OD_{600} 下降 0.72; 375 nmol/L 的 *LysLorf22* 与 0.5 mmol/L 乙二胺四乙酸二钠联用对 *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 溶菌效果最佳, 在 2 h 内可使活菌数从 1.62×10^9 CFU/ml 下降至 4.31×10^8 CFU/ml。

关键词: 沙门氏菌; 噬菌体; 裂解酶; 外膜渗透剂

中图分类号: TS207.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2020)01-0212-07

Preparation and activity analysis of endolysin *LysLorf22* derived from *Salmonella* bacteriophage

CAI Xing-zhe, PENG Lin, LIU Ke-rui, LIU Shu-liang, LI Cheng, LIU Ai-ping
(College of Food Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

Abstract: In this study, the gene encoding endolysin was predicted and analyzed by bioinformatic software based on the genomic sequence of *Salmonella* bacteriophage Lumpael. Besides, the expression of *LysLorf22* in *Escherichia coli* expression system was optimized, and the bactericidal effect of *LysLorf22* combined with outer membrane permeabilizing agents was analyzed. The results showed that the molecular weight of *LysLorf22* was 1.76×10^4 , and the isoelectric point was 9.14. The optimal expression condition of *LysLorf22* was using expression strain *Escherichia coli* BL21, induced at 37 °C for four hours. *LysLorf22* had a broad lytic spectrum, and its optimal working concentration was 375 nmol/L, in which the OD_{600} of chloroform-treated *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 could be reduced by 0.72 in 30 minutes. The combination of 375 nmol/L *LysLorf22* and 0.5 mmol/L disodium ethylenediamine tetraacetate showed the best lytic effect on *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, which reduced the viable cells from 1.62×10^9 CFU/ml to 4.31×10^8 CFU/ml in two hours.

Key words: *Salmonella*; bacteriophage; endolysin; outer membrane permeabilizing agent

沙门氏菌是一种常见的人兽共患病原菌, 主要通

过蛋、肉等禽类产品感染人类^[1]。人感染沙门氏菌后多出现剧烈头痛、发热、急性胃肠炎、呕吐等症状^[2-3]。在世界各国各类细菌性食物中毒中, 沙门氏菌食物中毒占比较高。抗生素在沙门氏菌的预防和治疗中发挥着重要作用, 近年来, 由于抗生素的滥用, 细菌耐药性不断增强, 沙门氏菌多重耐药菌株也不断出现。2017年 CHINET 中国细菌耐药监测结果显示, 沙门氏

收稿日期: 2019-06-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(31801629); 四川农业大学大学生创新训练计划项目(201910626138)

作者简介: 蔡幸哲(1998-), 女, 浙江乐清人, 本科生, 主要从事食品微生物研究。(E-mail) 908301008@qq.com

通讯作者: 刘爱平, (E-mail) aipliu@outlook.com

菌属细菌超过 50%对氨苄西林产生耐药性,伤寒沙门氏菌和副伤寒沙门氏菌对环丙沙星和氯霉素的耐药力较高^[4-6]。沙门氏菌感染的控制面临极大挑战,亟待找到一种新型杀菌剂代替抗生素。

噬菌体在自然界中分布广泛,1958年 Jacob 等发现噬菌体编码的一类蛋白质具有裂解细菌的作用,将其纯化后命名为裂解酶^[7]。噬菌体裂解酶作为杀菌剂具有高效、特异性较强的优点,并且作为一种蛋白质,其理化性质易于研究,便于对其进行改造优化和工业化生产^[8]。但裂解酶的作用效果会受到酶浓度、环境温度、pH 和其他离子的影响,因此应用时还需要掌握裂解酶的最适剂量和最佳作用时间,并控制作用条件^[9-10]。与抗生素相比,细菌更难对裂解酶产生抗性,这可能是由于裂解酶的作用位点高度保守,变异几率小^[11]。裂解酶结构一般包括结合功能域和催化功能域,研究发现一种裂解酶可能含有 1 个或多个催化域,这也可能是细菌难以对裂解酶产生抗性的原因之一^[12]。

噬菌体裂解酶能降解细菌细胞壁的肽聚糖。革兰氏阴性菌肽聚糖层较薄,但其肽聚糖层外有较厚的外膜保护,裂解酶难以直接自外裂解细菌^[13]。目前关于沙门氏菌噬菌体裂解酶的研究较少。因此探究革兰氏阴性菌噬菌体裂解酶的生物学特性,将其与外膜渗透剂(Outer membrane permeabilizing agents, OMP)联用或者对裂解酶进行修饰以提高其裂解效果是当前研究的主要方向^[14]。本研究根据沙门氏菌噬菌体 Lumpael 的基因组公开序列,利用生物信息学软件分析该噬菌体裂解酶,优化 *LysLorf22* 基因密码子及其在大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)表达系统中的表达,并分析裂解酶 *LysLorf22* 与 OMP 最优组合对沙门氏菌的溶菌效果,为其在食品、农产品安全中的应用提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 试验菌种 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC、*Escherichia coli* ATCC 25922、*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 购自美国 ATCC, *Escherichia coli* BL21、*Escherichia coli* DH5 α 购自德国 Novagen 公司,其它菌株由华中农业大学王小红教授和四川农业大学微生物实验室惠赠。

1.1.2 主要试剂 LB 肉汤、XLD 培养基购自青岛

高科园海博生物技术有限公司, Triton X-100 购自北京吉美生物技术有限公司,柠檬酸(Citric acid, CA)、苹果酸(Malic acid, MA)购自上海瑞永生物科技有限公司,3-color Pre-Stained Protein Ladder High Range PM5100 购自台湾 SMOBIO 公司。

1.1.3 主要仪器及设备 JY 92-IIN 超声波细胞粉碎仪,宁波新芝生物科技股份有限公司生产;Varioskan Flash 酶标仪、ST 16R 冷冻离心机,美国 Thermo Fisher Scientific 公司生产;Gel Doc XR+凝胶成像系统、Chem DocTM XRS+成像系统,美国 Bio-Rad 公司生产。

1.2 试验方法

1.2.1 裂解酶基因 *LysLorf22* 的生物信息学分析

从沙门氏菌噬菌体 Lumpael 的全基因组序列(GenBank 登录号:MK125141.1)查找其裂解酶基因 *LysLorf22* 的开放阅读框,对核苷酸序列进行翻译。利用 ExPASy Bioinformatics Resource Portal(<http://us.expasy.org/tools/protparam.html>)对裂解酶 *LysLorf22* 的相对分子质量和等电点进行分析,利用 NCBI BLAST 工具对 *LysLorf22* 的氨基酸序列进行同源性比对,利用 PRABI 网站的 SOPMA 程序(<https://npsa-prabi.ibcp.fr>)对 *LysLorf22* 的二级结构进行预测,采用 NCBI Conserved Domain Database 和 InterProScan(<http://www.ebi.ac.uk/interpro/scan.html>)对 *LysLorf22* 的模块化结构进行预测,利用 SignalP 5.1 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>)分析 *LysLorf22* 的信号肽序列,利用 TMHMM Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)分析 *LysLorf22* 跨膜结构域。

1.2.2 裂解酶 *LysLorf22* 的表达

1.2.2.1 重组载体 pET-28b-*LysLorf22* 的构建 对裂解酶基因 *LysLorf22* 进行密码子优化(适于 *E. coli* 表达系统),由生工生物工程(上海)股份有限公司合成 *LysLorf22* 基因(序列 3'端加 6 x His 标签)。按照合成序列,设计特异性引物并在其 5' 和 3' 端分别引入 *Nco* I 和 *Xho* I 酶切位点。以 *LysLorf22* 基因为模板,扩增并纯化 PCR 产物。分别对 PCR 产物和载体 pET-28b 进行 *Nco* I、*Xho* I 双酶切,16 $^{\circ}$ C 连接酶切产物,转化至 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,挑克隆子测序验证获得重组质粒 pET-28b-*LysLorf22*。

1.2.2.2 裂解酶 *LysLorf22* 的表达条件优化 为优化裂解酶 *LysLorf22* 的表达,用不同的表达菌株和

温度进行试验。首先,将重组质粒分别转化表达菌株 *E. coli* BL21 和 *E. coli* C41,并将相应转化子的单菌落接种于 5 ml 含 50 $\mu\text{g/ml}$ 卡那霉素(Kanamycin)的 LB 培养基(LBK)中 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。将过夜培养物接种至 5 ml 新鲜 LBK,当 OD_{600} 值约 0.6 时,将其进一步接种于 100 ml LBK。当培养物的 OD_{600} 值达到约 1.0 时,加入终浓度 0.25 mmol/L 异丙基 β -D-1-硫代半乳糖吡喃糖苷(Isopropyl β -D-Thiogalactoside, IPTG),分别在 16 $^{\circ}\text{C}$ 诱导 12 h, 30 $^{\circ}\text{C}$ 诱导 4 h 或 37 $^{\circ}\text{C}$ 诱导 4 h 进行裂解酶的表达。诱导表达结束后,以 7 000 r/min 离心 15 min 收获菌体沉淀。以磷酸盐缓冲液(PBS; 50 mmol/L NaH_2PO_4 , 300 mmol/L NaCl, pH 7.5)洗涤沉淀 2 次,将沉淀重悬于 40 ml PBS,并使用冰浴在低于 10 $^{\circ}\text{C}$ 的温度下超声破碎细胞(105 W 30 min, 开 2 s, 停 2 s),收集上清液(超声处理后的天然蛋白质提取物, NPE)和变性蛋白质提取物(超声处理后沉淀物溶解在 8 mol/L 尿素中, DPE),取同等体积样品用于 SDS-PAGE 分析^[15]。

1.2.2.3 裂解酶 *LysLorf22* 的表达与纯化 确认裂解酶 *LysLorf22* 的较优表达条件后,将其在 3 L 培养基中诱导表达。收集 NPE,按照 Liu 等^[16]方法以 Ni^{2+} -IDA 柱(杭州 NeuroPeptide 生物科学与技术公司产品)纯化裂解酶 *LysLorf22*,并进行 SDS-PAGE 和 Western blot 分析。

1.2.3 裂解酶 *LysLorf22* 的裂解谱分析 参考 Mikoulskaia 等^[17]的报道,通过浊度法分析裂解酶 *LysLorf22* 的裂解谱。将受试菌种接种于 130 ml LB 肉汤液体培养基中,其中革兰氏阴性菌在培养至对数生长期后加入 5% (体积分数)的氯仿处理 20 min 以除去其外膜,以 8 000 r/min 离心 15 min,经无菌水多次洗涤后离心收集菌体。将沉淀用 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(含 0.1% Triton X-100, pH 8.2)重悬,调节 OD_{600} 至 0.8~1.0,向 200 μl 细菌重悬液中加入 50 μl 裂解酶,于室温下作用 30 min 后检测 OD_{600} ,以相同体积 Tris-HCl 缓冲液(含 0.1% Triton X-100)替代裂解酶 *LysLorf22* 作为对照。所有试验重复 3 次,根据裂解率得出裂解酶的裂解谱。裂解率 = [(试验组 OD_{600} 的减小量 - 空白组 OD_{600} 的减小量) / 菌液初始 OD_{600}] $\times 100\%$ 。革兰氏阳性菌无需用氯仿处理,直接离心收集菌体。

1.2.4 裂解酶 *LysLorf22* 最佳作用浓度 参考 Geng

等^[18]的方法,以裂解效果较好的 *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 作为靶标菌进行裂解酶 *LysLorf22* 最佳作用浓度试验。按照方法 1.2.3 制得经氯仿处理后的细菌重悬液,将 50 μl 不同浓度的 *LysLorf22* 加入到 200 μl 细菌重悬液中(*LysLorf22* 终浓度分别为 0.4 nmol/L、2.0 nmol/L、10.0 nmol/L、50.0 nmol/L、250.0 nmol/L、375.0 nmol/L 和 500.0 nmol/L),在室温下每隔 1 min 检测 OD_{600} ,共监测 30 min。以相同体积 Tris-HCl 缓冲液(含 0.1% Triton X-100)替代裂解酶 *LysLorf22* 作为对照,所有试验重复 3 次。

1.2.5 裂解酶 *LysLorf22* 与 OMP 联用的溶菌活性分析

1.2.5.1 最佳 OMP 及其作用浓度的测定 参考李萌^[13]的方法,通过浊度法确定最佳 OMP(EDTA、CA 和 MA)及其最适浓度。将 *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 接种于 120 ml LB 肉汤液体培养基中,培养至对数生长期后以 8 000 r/min 离心 15 min,经无菌水多次洗涤后离心收集菌体。细菌沉淀用 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(不含 0.1% Triton X-100, pH 8.2)重悬至 OD_{600} 为 0.8~1.0。将 25 μl *LysLorf22* (终浓度为最佳作用浓度)、25 μl OMP(EDTA 终浓度为 0.10 mmol/L、0.25 mmol/L、0.50 mmol/L、1.00 mmol/L、5.00 mmol/L、10.00 mmol/L、20.00 mmol/L 和 25.00 mmol/L, CA、MA 终浓度为 0.1 mmol/L、0.5 mmol/L、1.0 mmol/L、5.0 mmol/L、10.0 mmol/L、20.0 mmol/L 和 25.0 mmol/L)和 200 μl 细菌重悬液混匀,在室温下静置^[19-21],每隔 30 min 检测 OD_{600} ,共监测 2 h。设置对照,重复 3 次。

1.2.5.2 最优联用组合的溶菌计数 按照方法 1.2.5.1 的方法收集细菌沉淀并重悬至 OD_{600} 为 0.8~1.0。将 100 μl *LysLorf22* (终浓度为最佳作用浓度)、100 μl OMP(方法 1.2.5.1 确定的最佳联用 OMP 及其最适浓度)和 800 μl 细菌重悬液混匀,在 25 $^{\circ}\text{C}$ 静置 2 h,取 100 μl 混合液梯度稀释后在 XLD 培养基上进行菌落计数。设置对照,重复 3 次。

2 结果与分析

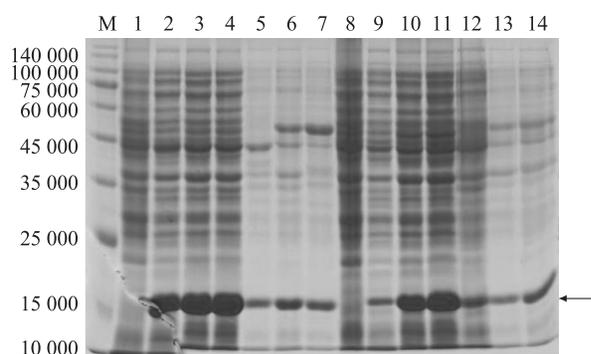
2.1 裂解酶基因 *LysLorf22* 的生物信息学分析

根据沙门氏菌噬菌体 Lumpael 的基因组序列信息可知其 ORF22 编码长度为 159 个氨基酸的裂解酶(命名为裂解酶 *LysLorf22*)。 *LysLorf22* 的相对分

子质量为 1.76×10^4 , 等电点为 9.14。 *LysLorf22* 与 *Escherichia* sp. 噬菌体 Skarpretter、 *Klebsiella* sp. 噬菌体 vB_KpnS_IME279 以及 *Enterobacter bugandensis* 和 *Rhodobacter sphaeroides* 的溶菌酶氨基酸序列相似度为 81%~85%。二级结构预测结果表明, *LysLorf22* 主要由 α 螺旋、无规则卷曲、 β 折叠和延伸链结构组成, 比例分别为 43.40%、41.51%、6.92% 和 8.18%。 *LysLorf22* 是 8~154 位氨基酸与噬菌体 λ 溶菌酶结构域保守的球状蛋白质酶。 *LysLorf22* 不含信号肽序列, 也不存在跨膜区域。

2.2 裂解酶 *LysLorf22* 的表达

构建重组质粒 pET-28b-*LysLorf22*, 尝试不同表达菌株和表达温度组合优化裂解酶 *LysLorf22* 的表达。如图 1 所示, 2 种表达菌株经过诱导后均表达相对分子质量约 1.70×10^4 的蛋白质条带, 且条带大小符合裂解酶 *LysLorf22* 的预测相对分子质量。由目的蛋白质条带深浅可知, 较优的表达条件为: 表达菌株 *E. coli* BL21, 37 °C 诱导 4 h。经过大量表达和纯化, 获得了较高纯度的 *LysLorf22* (图 2)。



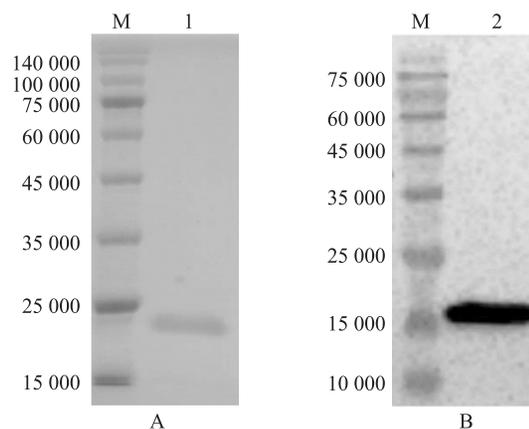
M: 蛋白质 Marker; 1: 空白对照, 菌株 *E. coli* BL21 未诱导表达; 2: 菌株 *E. coli* BL21, 16 °C 表达上清; 3: 菌株 *E. coli* BL21, 30 °C 表达上清; 4: 菌株 *E. coli* BL21, 37 °C 表达上清; 5: 菌株 *E. coli* BL21, 16 °C 离心沉淀; 6: 菌株 *E. coli* BL21, 30 °C 离心沉淀; 7: 菌株 *E. coli* BL21, 37 °C 离心沉淀; 8: 空白对照, 菌株 *E. coli* C41 未诱导表达; 9: 菌株 *E. coli* C41, 16 °C 表达上清; 10: 菌株 *E. coli* C41, 30 °C 表达上清; 11: 菌株 *E. coli* C41, 37 °C 表达上清; 12: 菌株 *E. coli* C41, 16 °C 离心沉淀; 13: 菌株 *E. coli* C41, 30 °C 离心沉淀; 14: 菌株 *E. coli* C41, 37 °C 离心沉淀。

图 1 表达的裂解酶 *LysLorf22* SDS-PAGE 分析

Fig.1 SDS-PAGE analysis of endolysin *LysLorf22*

2.3 裂解酶 *LysLorf22* 的裂解谱

噬菌体裂解酶具有一定的特异性, 但是相对于噬菌体, 裂解酶的作用又具有一定的广谱性^[22-24]。



M: 蛋白质 Marker; 1, 2: *LysLorf22*。

图 2 纯化后 *LysLorf22* 的 SDS-PAGE (A) 和 Western blot (B) 分析

Fig.2 SDS-PAGE (A) and Western blot (B) analysis of purified *LysLorf22*

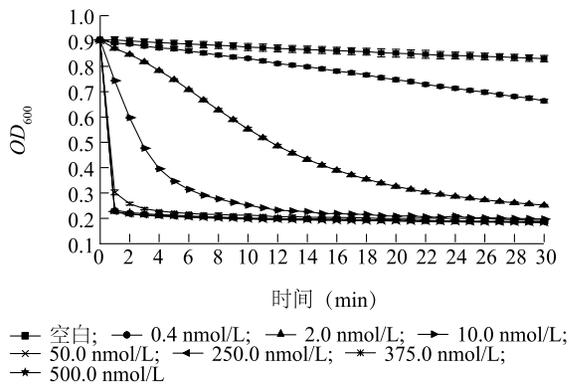
将 19 株菌株用于检测 *LysLorf22* 的裂解谱, 结果见表 1。 *LysLorf22* 基本不能裂解革兰氏阳性菌 *Listeria monocytogenes* EGDe 和 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, 但其对受试的经氯仿处理的 17 株革兰氏阴性菌均表现出裂解活性, 宿主谱较宽。受试的 12 株沙门氏菌中, *LysLorf22* 对 *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 的裂解率最高, 为 79%, 故选择 *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 为后续试验靶标菌。虽然 *LysLorf22* 来源于沙门氏菌噬菌体, 但是它对 *E. coli* DH5 α 的裂解率最高 (83%), 对 *Salmonella enteritidis* ATCC13076 的裂解率次之 (79%), 这可能是由于 *LysLorf22* 与 *Escherichia* sp. 噬菌体 Skarpretter 具有较高的同源性。 *LysLorf22* 对氯仿预处理的表达菌株 *E. coli* BL21 具有较强裂解能力, 在 *LysLorf22* 制备过程中, 由于 *E. coli* BL21 未经氯仿处理且菌株所处环境缺乏 OMP, 故几乎未观察到表达菌株 *E. coli* BL21 发酵液变澄清。

2.4 裂解酶 *LysLorf22* 最佳作用浓度

LysLorf22 的最佳作用浓度检测结果如图 3 所示。 *LysLorf22* 浓度为 2 nmol/L 时即对经氯仿处理的宿主菌表现出明显的裂解效果。裂解酶浓度为 250 nmol/L、375 nmol/L 和 500 nmol/L 时裂解效果比较接近。当 *LysLorf22* 终浓度为 375 nmol/L, 与宿主菌作用 30 min 时, OD_{600} 下降最多, 为 0.72, 说明噬菌体裂解酶裂解细菌具有高效性, 这与之前的研究结果^[25]一致。

表1 裂解酶 *LysLorf22* 的裂解谱Table 1 Lysis spectrum of endolysin *LysLorf22*

菌株	裂解率 (%)	菌株	裂解率 (%)
<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028	48±1.03	<i>Salmonella</i> Enteritidis 10978	43±0.66
<i>Salmonella</i> Dublin 3710	50±0.14	<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 13311	44±0.95
<i>Salmonella</i> Dublin 3723	50±0.44	<i>Salmonella</i> Typhimurium ST-8	47±0.27
<i>Salmonella</i> Anatum ATCC 9270	65±0.24	<i>Escherichia coli</i> BL21	68±0.45
<i>Salmonella</i> Choleraesuls ATCC 10708	53±7.50	<i>Escherichia coli</i> DH5 α	83±0.58
<i>Salmonella</i> Paratyphi B CMCC 50094	44±0.58	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	69±0.67
<i>Salmonella</i> Pullorum CVCC 534	37±1.82	<i>Escherichia coli</i> O ₈	63±0.93
<i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076	79±0.20	<i>Listeria monocytogenes</i> EGDe	-3±1.18
<i>Salmonella</i> Enteritidis 10984	43±0.32	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-1±1.61
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	61±0.80		

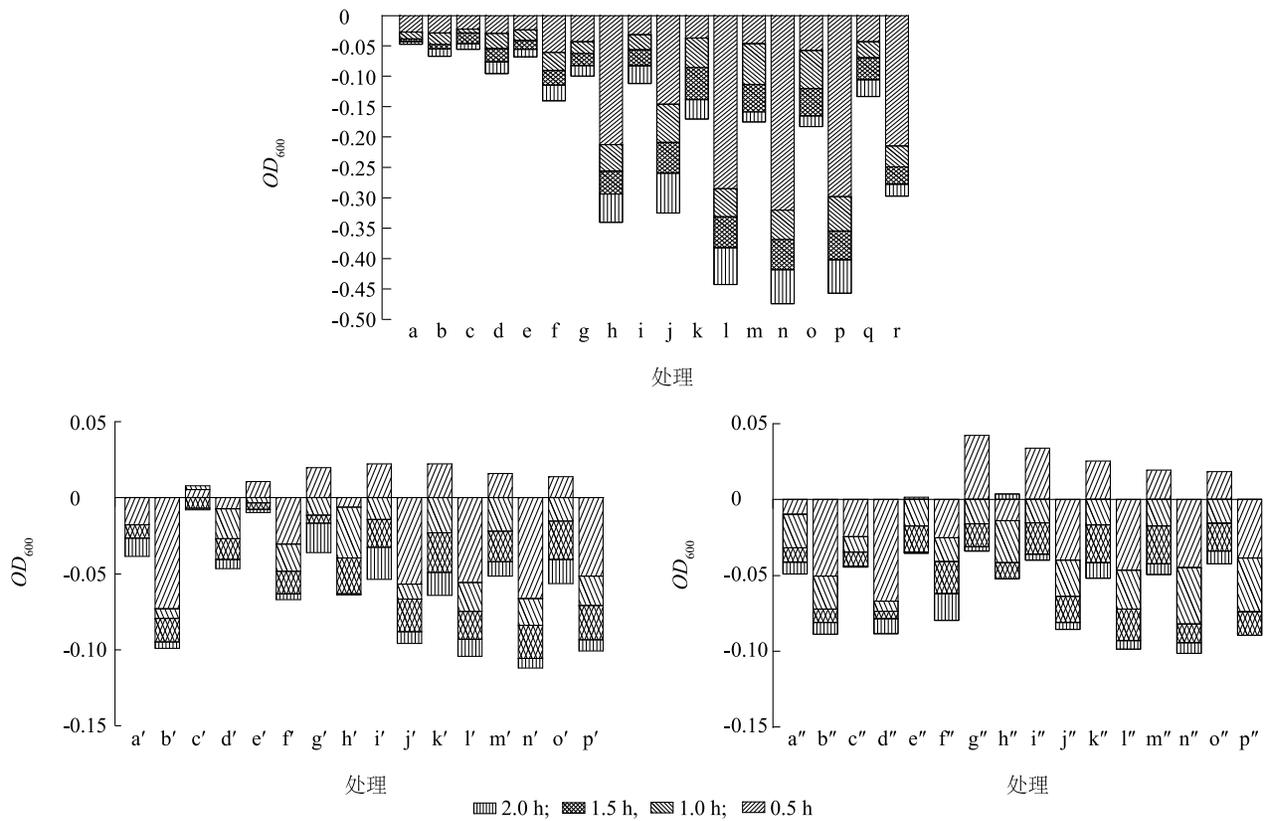
图3 裂解酶 *LysLorf22* 最适浓度Fig.3 Optimum concentration of endolysin *LysLorf22*

2.5 裂解酶 *LysLorf22* 与 OMP 联用的溶菌活性

革兰氏阴性菌由于肽聚糖外膜的保护作用,裂解酶不能直接自外裂解细菌,需要 OMP 协助裂解酶穿透外膜发挥作用。本研究将 *LysLorf22* (375 nmol/L) 与不同浓度的 EDTA、CA 和 MA 联用,通过浊度法探究裂解效果,结果如图 4 所示。裂解酶 *LysLorf22* 单独作用于活菌时,2 h 仅使 OD_{600} 下降 0.06,几乎没有裂解效果,与 Oliveira 等^[26] 的报道一致。EDTA (终浓度为 0.10 mmol/L、0.25 mmol/L、0.50 mmol/L、1.00 mmol/L、5.00 mmol/L、10.00 mmol/L、20.00 mmol/L 和 25.00 mmol/L) 单独作用于活菌时有一定的抑菌效果,在 EDTA 作用浓度为 0.50

mmol/L 时,2 h 使 OD_{600} 下降 0.18。*LysLorf22* 与 0.1~25.0 mmol/L 的 EDTA 联用时能有效裂解宿主菌,当 EDTA 浓度为 0.5 mmol/L 时,2 h 内 OD_{600} 下降最多,为 0.47,且在最初 30 min 内作用效果最明显, OD_{600} 下降 0.32。CA 和 MA (终浓度为 0.1 mmol/L、0.5 mmol/L、1.0 mmol/L、5.0 mmol/L、10.0 mmol/L、20.0 mmol/L、25.0 mmol/L) 单独作用于活菌时,抑菌效果不明显;不同浓度 CA 和 MA (0.1~25.0 mmol/L) 与 *LysLorf22* 联用时的裂解效果优于单独使用 CA 和 MA,但均弱于 EDTA 与 *LysLorf22* 联用效果。

按照上述最优裂解组合,使用 XLD 培养基对其杀菌效果进行计数,结果如表 2 所示。*LysLorf22* (375 nmol/L) 单独作用于 *Salmonella* Enteritidis ATCC13076 时没有裂解效果。EDTA (0.5 mmol/L) 单独作用时效果较小,2 h 内使细菌数量从 1.62×10^9 CFU/ml 下降至 1.14×10^9 CFU/ml,而 *LysLorf22* (375 nmol/L) 与 EDTA (0.5 mmol/L) 联用 2 h 能使细菌数量下降至 4.31×10^8 CFU/ml,杀菌效率为 73.40%。从裂解酶工作浓度和杀菌效果看,*LysLorf22* 与 OMP 联用的活性明显优于 Lim 等^[27] 的报道。目前已有将溶菌酶与 EDTA 联用应用于食品生产的报道,如 Marianna 等^[28] 将溶菌酶、乳酸链球菌素和 EDTA 联合应用于肉饼杀菌,发现有明显的抑制活菌总数和乳酸菌生长的作用。



a; Tris-HCl; b; *LysLorf22*+Tris-HCl; c; Tris-HCl+25.00 mmol/L EDTA; d; *LysLorf22*+25.00 mmol/L EDTA; e; Tris-HCl+20.00 mmol/L EDTA; f; *LysLorf22*+20.00 mmol/L EDTA; g; Tris-HCl+10.00 mmol/L EDTA; h; *LysLorf22*+10.00 mmol/L EDTA; i; Tris-HCl+5.00 mmol/L EDTA; j; *LysLorf22*+5.00 mmol/L EDTA; k; Tris-HCl+1.00 mmol/L EDTA; l; *LysLorf22*+1.00 mmol/L EDTA; m; Tris-HCl+0.50 mmol/L EDTA; n; *LysLorf22*+0.50 mmol/L EDTA; o; Tris-HCl+0.25 mmol/L EDTA; p; *LysLorf22*+0.25 mmol/L EDTA; q; Tris-HCl+0.10 mmol/L EDTA; r; *LysLorf22*+0.10 mmol/L EDTA。 a'; Tris-HCl; b'; *LysLorf22*+Tris-HCl; c'; Tris-HCl+25.00 mmol/L CA; d'; *LysLorf22*+25.00 mmol/L CA; e'; Tris-HCl+20.00 mmol/L CA; f'; *LysLorf22*+20.00 mmol/L CA; g'; Tris-HCl+10.00 mmol/L CA; h'; *LysLorf22*+10.00 mmol/L CA; i'; Tris-HCl+5.00 mmol/L CA; j'; *LysLorf22*+5.00 mmol/L CA; k'; Tris-HCl+1.00 mmol/L CA; l'; *LysLorf22*+1.00 mmol/L CA; m'; Tris-HCl+0.50 mmol/L CA; n'; *LysLorf22*+0.50 mmol/L CA; o'; Tris-HCl+0.10 mmol/L CA; p'; *LysLorf22*+0.10 mmol/L CA。 a''; Tris-HCl; b''; *LysLorf22*+Tris-HCl; c''; Tris-HCl+25.00 mmol/L MA; d''; *LysLorf22*+25.00 mmol/L MA; e''; Tris-HCl+20.00 mmol/L MA; f''; *LysLorf22*+20.00 mmol/L MA; g''; Tris-HCl+10.00 mmol/L MA; h''; *LysLorf22*+10.00 mmol/L MA; i''; Tris-HCl+5.00 mmol/L MA; j''; *LysLorf22*+5.00 mmol/L MA; k''; Tris-HCl+1.00 mmol/L MA; l''; *LysLorf22*+1.00 mmol/L MA; m''; Tris-HCl+0.50 mmol/L MA; n''; *LysLorf22*+0.50 mmol/L MA; o''; Tris-HCl+0.10 mmol/L MA; p''; *LysLorf22*+0.10 mmol/L MA。

图 4 不同浓度 EDTA (A)、CA (B)、MA (C) 与 *LysLorf22* 联用对 *Salmonella Enteritidis* ATCC13076 的溶菌效果

Fig.4 The bactericidal effect of combination of EDTA (A), CA (B), MA (C) at different concentrations and *LysLorf22* on *Salmonella Enteritidis* ATCC13076

表 2 *LysLorf22* 与外膜渗透剂最优裂解组合的溶菌效果

Table 2 Bactericidal effect of optimal lytic combination of *LysLorf22* and outer membrane permeabilizing agents

时间 (h)	活菌数 (CFU/ml)		
	<i>LysLorf22</i> +EDTA	EDTA+Tris-HCl	<i>LysLorf22</i> +Tris-HCl
0	$(1.62 \pm 0.13) \times 10^9$	$(1.62 \pm 0.13) \times 10^9$	$(1.62 \pm 0.13) \times 10^9$
2	$(4.31 \pm 1.00) \times 10^8$	$(1.14 \pm 0.04) \times 10^9$	$(1.54 \pm 0.21) \times 10^9$

3 结论

本研究基于生物信息学分析,选取 pET 表达系统对裂解酶 *LysLorf22* 的表达条件进行优化,经诱导表达获得相对分子质量为 1.76×10^4 的裂解酶 *LysLorf22*。该酶具有高效性和较强的特异性,与外膜渗透剂联用时表现出一定程度的溶菌活性,其中 *LysLorf22* 与 EDTA 联用对沙门氏菌的杀灭效果最佳,

具有较好的控制食品中沙门氏菌污染的潜力。由于 *LysLorf22* 对本试验中的两株革兰氏阳性菌没有明显的裂解效果,可在与 EDTA 联用的基础上再与革兰氏阳性菌噬菌体裂解酶、抗生素联用,配置成混合制剂,提高其杀菌广度。混合制剂可减少每种成分的用量,并降低细菌产生抗性的几率^[29-30]。

参考文献:

- [1] 包红朵,张辉,王冉. 宽噬菌谱肠炎沙门氏菌噬菌体的生物学特性[J]. 江苏农业学报, 2011, 27(5): 1117-1121.
- [2] 包红朵,周艳,张鹏禹,等. 沙门氏菌裂解性噬菌体的分离鉴定及其生物学特性[J]. 食品科学, 2015, 36(5): 131-136.
- [3] 王晶钰,董睿,王利勤,等. 市售鲜鸡蛋中沙门氏菌的分离鉴定及毒力岛基因检测[J]. 食品科学, 2012, 33(16): 154-158.
- [4] 朱冬梅,彭珍,刘书亮,等. 肉鸡屠宰加工过程中沙门氏菌的污染情况及其耐药性分析[J]. 食品科学, 2014, 35(17): 214-219.
- [5] 胡付品,郭燕,朱德妹,等. 2017年 CHINET 中国细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2018, 18(3): 241-251.
- [6] 冯彩峰,林居纯,张飞,等. 食品动物源沙门氏菌血清型及对 β -内酰胺类耐药性调查[J]. 食品科学, 2015, 36(7): 101-104.
- [7] JACOB F, FUERST C R. The mechanism of lysis by phage studied with defective lysogenic bacteria[J]. Microbiology, 1958, 18(2): 518-526.
- [8] 渠坤丽,徐永平,李振,等. 提高噬菌体裂解酶抗菌活性的研究进展[J]. 微生物学杂志, 2017, 37(1): 88-93.
- [9] 许东勤. 沙门氏菌噬菌体 SLMP1 裂解酶的重组表达及噬菌体在水产品中的应用研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2018.
- [10] 严晶,胡申才. 噬菌体裂解酶的应用概况[J]. 湖北农业科学, 2019, 58(10): 5-8.
- [11] 夏翡翡. 噬菌体裂解酶 *LysGH15* 与芹菜素联合应用治疗金黄色葡萄球菌肺炎的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2016.
- [12] 张辉,周艳,包红朵,等. 噬菌体裂解酶结构域重构及其裂解功能分析[J]. 华北农学报, 2017, 32(6): 134-138.
- [13] 李萌. 宽裂解谱沙门氏菌噬菌体的基因组学分析及其重组内溶素抑菌活性研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014.
- [14] 朱丹,祝思路,付玉荣,等. 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.
- [15] 杨曦. 大肠杆菌 O157 Stx 噬菌体裂解酶的原核表达及活性研究[D]. 上海: 上海交通大学, 2012.
- [16] LIU A, XIONG Q, SHEN L, et al. A sandwich-type ELISA for the detection of *Listeria monocytogenes* using the well-oriented single chain Fv antibody fragment[J]. Food Control, 2017, 79: 156-161.
- [17] MIKOULINSKAIA G V, ODINOKOVA I V, ZIMIN A A, et al. Identification and characterization of the metal ion-dependent l-alanyl-d-glutamate peptidase encoded by bacteriophage T5 [J]. Febs Journal, 2009, 276(24): 7329-7342.
- [18] GENG P, HU Y, ZHOU G, et al. Characterization of three autolysins with activity against cereulide-producing *Bacillus* isolates in food matrices [J]. International Journal of Food Microbiology, 2017, 241: 291-297.
- [19] LEGOTSKY S A, VLASOVA K Y, PRIYMA A D, et al. Peptidoglycan degrading activity of the broad-range *Salmonella* bacteriophage S-394 recombinant endolysin [J]. Biochimie, 2014, 107: 293-299.
- [20] SCHMELCHER M, POWELL A M, CAMP M J, et al. Synergistic streptococcal phage λ SA2 and B30 endolysins kill streptococci in cow milk and in a mouse model of mastitis [J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2015, 99(20): 1-12.
- [21] BRIERS Y, LAVIGNE R, VOLCKAERT G, et al. A standardized approach for accurate quantification of murein hydrolase activity in high-throughput assays [J]. Journal of Biochemical Biophysical Methods, 2007, 70: 531-533.
- [22] HONG J, KIM K P, HEU S, et al. Identification of host receptor and receptor-binding module of a newly sequenced T5-like phage EPS7 [J]. FEMS Microbiology Letters, 2008, 289(2): 202-209.
- [23] ZIMMER M, VUKOV N, SCHERER S, et al. The murein hydrolase of the bacteriophage ϕ 3626 dual lysis system is active against all tested *Clostridium perfringens* strains [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(11): 5311-5317.
- [24] YOONG P, SCHUCH R, NELSON D, et al. Identification of a broadly active phage lytic enzyme with lethal activity against antibiotic-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* [J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186(14): 4408-4412.
- [25] SCHUCH R, NELSON D, FISCHETTI V A. A bacteriolytic agent that detects and kills *Bacillus anthracis* [J]. Nature, 2002, 418(6900): 884-889.
- [26] OLIVEIRA H, THIAGARAJAN V, WALMAGH M, et al. A thermostable salmonella phage endolysin, lys68, with broad bactericidal properties against gram-negative pathogens in presence of weak acids [J]. PLoS ONE, 2014, 9(10): e108376.
- [27] LIM J A, SHIN H, KANG D H, et al. Characterization of endolysin from a *Salmonella typhimurium*-infecting bacteriophage SPN1S [J]. Research in Microbiology, 2012, 163(3): 233-241.
- [28] MARIANNA M, ANNALISA L, MILENA S, et al. Use of lysozyme, nisin, and EDTA combined treatments for maintaining quality of packed ostrich patties [J]. Journal of Food Science, 2010, 75(3): 178-186.
- [29] TANJI Y, SHIMADA T, YOICHI M, et al. Toward rational control of *Escherichia coli* O157:H7 by a phage cocktail [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004, 64(2): 270-274.
- [30] TANJI Y, SHIMADA T, FUKUDOMI H, et al. Therapeutic use of phage cocktail for controlling *Escherichia coli* O157:H7 in gastrointestinal tract of mice [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2005, 100(3): 280-287.

(责任编辑:张震林)