

沈元朝, 李悦, 孙利厂, 等. 噬菌体裂解酶的钝顶螺旋藻表达方法建立及功能评价[J]. 江苏农业学报, 2025, 41(8): 1638-1646.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2025.08.020

噬菌体裂解酶的钝顶螺旋藻表达方法建立及功能评价

沈元朝, 李悦, 孙利厂, 王冉

(江苏省农业科学院农产品质量安全与营养研究所, 江苏 南京 210014)

摘要: 噬菌体裂解酶因具有高效、安全的杀菌特性成为潜在的抗菌药物, 受到研究者的广泛关注。基于本研究团队前期分离得到的 1 株具有较宽宿主谱且呈烈性的金黄色葡萄球菌噬菌体 vB_SauH_JAAS17, 本研究首先通过大肠杆菌原核表达系统成功对噬菌体 vB_SauH_JAAS17 的 2 种裂解酶——裂解酶 A (*LysinA*) 和裂解酶 B (*LysinB*) 进行表达分析, 证明裂解酶编码基因能在原核表达系统中成功表达和制备, 并且将所表达的裂解酶合用时具有广谱杀菌活性。在此基础上, 本研究开发了一种基于钝顶螺旋藻表达系统的噬菌体裂解酶的新表达方法。结果显示, 在 500 ng/ μ L 质粒、1% 聚乙二醇 8000 (PEG 8000) 冰浴诱导 30 min 的转化条件下, *LysinA* 和 *LysinB* 的表达水平最高, 分别为 10.44 mg/mL、10.04 mg/mL。当联合使用的 2 种噬菌体裂解酶的质量浓度为 2.0 mg/mL 时, 其裂解水平与噬菌体 vB_SauH_JAAS17 所产裂解酶不存在显著差异, 且无明显细胞毒性。

关键词: 噬菌体裂解酶; 钝顶螺旋藻; 表达方法; 功能评价

中图分类号: S188+.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2025)08-1638-09

Establishment of the *Spirulina platensis* expression method for bacteriophage lysins and functional evaluation

SHEN Yuanzhao, LI Yue, SUN Lichang, WANG Ran

(Institute of Food Safety and Nutrition, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: Bacteriophage lysins have emerged as promising antibacterial agents due to their efficient and safe bactericidal properties, attracting widespread attention. In the early stage of this study, a virulent *Staphylococcus aureus* phage, vB_SauH_JAAS17, with a broad host range was isolated. Based on this, the lysins named *LysinA* and *LysinB* encoded by vB_SauH_JAAS17 were successfully expressed using an *Escherichia coli* prokaryotic expression system, demonstrating both the feasibility of heterologous expression and the broad-spectrum antibacterial activity of the lysins. Furthermore, a novel expression strategy was developed using *Spirulina platensis* as the host. The results showed that the expression levels of *LysinA* and *LysinB* reached their highest values at 10.44 mg/mL and 10.04 mg/mL under transformation conditions of 500 ng/ μ L plasmid and 1% polyethylene glycol 8000 (PEG 8000) ice bath induction for 30 min. When the mass concentration of the two combined phage lysins was 2.0 mg/mL, their lytic activity showed no significant difference compared to the lysin produced by phage vB_SauH_JAAS17, and no obvious cytotoxicity was observed.

Key words: bacteriophage lysin; *Spirulina platensis*; expression method; functional evaluation

噬菌体 (Bacteriophage) 是一种侵染细菌的病毒, 广泛分布于土壤、水源、动物消化道中^[1-2]。噬菌体数量庞大, 种类丰富, 总量远超细菌^[3]。当前, 细

收稿日期: 2025-02-26

基金项目: 江苏省卓越博士后计划项目 (2023ZB375); 江苏省农业科技自主创新基金项目 [CX(22)2017]

作者简介: 沈元朝 (1994-), 男, 江苏南京人, 博士, 助理研究员, 主要从事噬菌体相关生物学技术开发工作。(E-mail) silenceyz525@163.com

通讯作者: 孙利厂, (E-mail) sunlc@jaas.ac.cn; 王冉, (E-mail) ranwang@jaas.ac.cn

菌的耐药性不断增加^[4-5],抗生素作为传统的细菌性疾病控制手段,其应用正面临巨大挑战^[6-7]。作为细菌的天敌和天然抗菌剂,噬菌体在对抗难以用抗生素治疗的细菌感染时具有很大潜力^[8]。但是,由于噬菌体在应用过程中可能产生细菌抵抗现象,并且作为活细菌病毒应用后,可能造成环境安全等问题,因此一直制约着相关产品的广泛应用^[9-10]。

噬菌体裂解酶(Bacteriophage lysin)是由噬菌体编码、表达的一种可高效消化细菌细胞壁的高特异性酶^[11],具有很好的安全性、稳定性,并具有杀菌快、在体内的半衰期短、不易残留的优势,可用于研发抗菌药^[12-15]。然而,噬菌体裂解酶无法大规模生产是制约其产业化的关键因素。常见的裂解酶外源表达系统主要有大肠杆菌系统、毕赤酵母系统等,毕赤酵母菌的安全性虽然较高,但是蛋白质的分泌效率较低(特别是分泌大分子量蛋白质),且传代不稳定,难以实现长期大批量表达^[16-17]。大肠杆菌表达载体虽然具有成本低、繁殖快和操作简便等优点,但是由于其具有表达背景要求较高、产内毒素且蛋白质容易降解、不能用于表达制备阴性菌的裂解酶等不足,从而限制了裂解酶的大规模产业化发展^[18]。

钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis*)是一种可食用且具备医用价值的丝状多细胞原核藻类,由于其具有不含内毒素、不形成胞内包涵体等优势,因此被认为具有作为外源蛋白质表达系统的潜力^[19-20]。张海生等^[21]成功将含有绿色荧光蛋白序列的表达载体转化至钝顶螺旋藻中,实现了绿色荧光蛋白在钝顶螺旋藻中的表达;郑晓欢^[22]研究发现,表皮生长因子 hEGF 也能够螺旋藻中表达。本研究拟以金黄色葡萄球菌噬菌体 vB_SauH_JAAS17 的裂解酶作为研究对象,以植物表达质粒 pYPQ203 作为表达载体,通过聚乙二醇 8000 (PEG 8000)转化的方式,建立一种钝顶螺旋藻高效表达噬菌体裂解酶的方法,以期裂解酶的高效制备提供一种新思路。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis*,编号为 FACHB-314)购自中国科学院淡水藻种库;植物表达载体 pYPQ203 购自北京星石生物科技有限公司;DH5 α

感受态细胞、Rosetta-gami 2(DE3) pLysS 感受态细胞均购自上海唯地生物技术有限公司;螺旋藻液体培养基(SP)、脑心浸出液肉汤(BHI)培养基、LB 培养基均购自北京酷来博科技有限公司;聚乙二醇 8000 (PEG 8000)购自生工生物工程(上海)股份有限公司;噬菌体 DNA 提取试剂盒购自加拿大 Norgen Biotek 公司;小鼠成纤维细胞株(L929)、小鼠主动脉内皮细胞株(MAEC)均购自北纳生物科技有限公司;金黄色葡萄球菌 E622 等均由笔者所在实验室保藏;金黄色葡萄球菌噬菌体 vB_SauH_JAAS17 由笔者所在实验室分离纯化并保藏。

1.2 试验方法

1.2.1 钝顶螺旋藻培养与生长曲线的测定 取 5 mL 处于对数生长末期的钝顶螺旋藻培养液,加入新鲜配制的 100 mL 螺旋藻液体培养基中,于光照培养箱中静置培养。设定如下培养条件:光照度为 2 600 lx,相对湿度为 72%,光/暗周期为 12 h/12 h,培养温度为 28 $^{\circ}$ C。每 24 h 通过紫外可见分光光度计测定钝顶螺旋藻在 560 nm 处的吸光度(OD_{560}),绘制钝顶螺旋藻的生长曲线。

1.2.2 噬菌体裂解酶基因的验证 取 100 μ L 处于对数生长期(OD_{600} = 0.6)的金黄色葡萄球菌 E622,加入等体积的噬菌体 vB_SauH_JAAS17 (1×10^8 PFU/mL),于 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。将细菌-噬菌体混合液加入新鲜的 BHI 液体培养基中,在 37 $^{\circ}$ C 摇床中于 180 r/min 振荡培养过夜。取全部噬菌体培养液,在 5 000 g、4 $^{\circ}$ C 条件下离心 30 min。将上清液用 0.22 μ m 过滤器过滤后,在 35 000 g、12 $^{\circ}$ C 条件下离心 2 h。弃去上清液,沉淀用 1 \times 磷酸盐(PBS)缓冲液重悬。用噬菌体 DNA 提取试剂盒提取噬菌体的基因组 DNA,并将其送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行全基因组测序与拼接,再将拼接结果提交至美国国家生物技术信息中心(NCBI)数据库中进行比对,对噬菌体 vB_SauH_JAAS17 的裂解酶基因位点进行预测。

1.2.3 噬菌体裂解酶原核表达及裂解活力的验证

首先,针对 2 个预测到的裂解酶基因位点(分别命名为 *LysinA*、*LysinB*)设计引物(分别命名为 A-F/R、B-F/R,表 1),采用无缝克隆方法将 2 个裂解酶基因插入带有组氨酸标签(His-tag)的 pET-28a(+)原核表达质粒中。随后,将连接产物转化至 Rosetta-gami 2(DE3) pLysS 感受态细胞,将转化的感受态细

胞涂布至含有卡那霉素、氯霉素的 LB 培养基上进行培养过夜,再挑取多个单克隆进行测序验证。将含有测序正确的裂解酶原核表达质粒(分别命名为 pET+*LysinA*、pET+*LysinB*)的阳性克隆接种至含卡那霉素、氯霉素抗性的 LB 液体培养基中,待 $OD_{600} = 0.6$ 时,加入终浓度为 0.01 mmol/L 的异丙基硫代半乳糖苷(Isopropyl β -D-thiogalactoside, IPTG) 进行诱导表达过夜。收集菌液沉淀,经镍-氮三乙酸(Ni-NTA)柱纯化融合 His-tag 的重组 *LysinA*、*LysinB* 蛋白。将蛋白质进行超滤纯化浓缩后,通过二喹啉甲酸(BCA)蛋白质浓度测定法测得蛋白质质量浓度,用蛋白质印迹(Western blot)方法进行蛋白质相对分子量的验证。最后,验证不同质量浓度 *LysinA*、*LysinB* 蛋白对噬菌体 vB_SauH_JAAS17 宿主菌的裂解能力。具体方法如下:将裂解酶的质量浓度稀释为 0.2 mg/mL 、 0.5 mg/mL 、 1.0 mg/mL 和 2.0 mg/mL ,将 $100 \mu\text{L}$ 不同质量浓度的裂解酶与 $100 \mu\text{L}$ $OD_{600} = 0.6$ 的宿主菌 E622 溶液转入 1.5 mL 离心管中,于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 150 r/min 摇床中孵育培养,2 h 内每 20 min 取样 1 次。稀释成不同梯度后,各取 $100 \mu\text{L}$ 涂布于脑心浸出液肉汤(BHI)固体培养基上,于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 细菌培养箱中进行过夜培养,对每块平板上的菌落形成单位(CFU)进行计数,试验重复 3 次。

表 1 用于构建原核表达裂解酶质粒的引物序列

Table 1 Primer sequences for construction of the prokaryotic expression plasmid encoding lysins

引物	引物序列(5'→3')	扩增片段长度(bp)
A-F	gacagcaaatgggtcgcggaATGAGTGCTAGTGATGCTCAATTCC	630
A-R	cgacggagctcgaattcggaCTATTTGAATACTCCCCAGGCAA	
B-F	gacagcaaatgggtcgcggaATGGCTAAGACTCAAGCAGAAATAAA	804
B-R	cgacggagctcgaattcggaTTATTTACCCGTGTGCCAAGC	
pET-F	TCCGAATTCGAGCTCCGTC	5 369
pET-R	TCCGCGACCCATTGCTG	

引物序列中小写字母代表同源臂。

1.2.4 噬菌体裂解酶钝顶螺旋藻表达质粒的构建

首先,以带有 His-tag 的重组 *LysinA*、*LysinB* 蛋白的基因序列为模板,以 pYPQ203 植物表达质粒为载体,基于 *Asc* I、*Spe* I 酶切位点,通过限制性酶切法分别将重组 *LysinA*、*LysinB* 蛋白的基因序列插入 pYPQ203 植物表达质粒中。随后,将连接产物转化至 DH5 α 感受态细胞中,再将转化的感受态细胞涂布至具有卡那霉素抗性的 LB 培养基上进行培养过

夜,挑取多个单克隆进行测序验证。将序列正确的裂解酶植物表达质粒(分别命名为 pY+*LysinA*、pY+*LysinB*)接种至 20 mL 具有卡那霉素抗性的 LB 液体培养基中培养至对数末期,用质粒小提试剂盒提取得到高质量浓度的 pY+*LysinA*、pY+*LysinB* 质粒,所用引物序列见表 2。

表 2 用于构建钝顶螺旋藻中裂解酶表达质粒的引物序列

Table 2 Primer sequences for construction of the *Spirulina platensis* expression plasmid encoding lysins

引物	引物序列(5'→3')	扩增片段长度(bp)
AscI-A	agaggatcccctcgaggcgcgcATGGGCAGCAGCCATCATC	630
SpeI-A	ggcggcgcctctagaactagtCTATTTGAATACTCCCCAGGCAA	630
AscI-B	agaggatcccctcgaggcgcgcATGGGCAGCAGCCATCATC	804
SpeI-B	ggcggcgcctctagaactagtTTATTTACCCGTGTGCCAAGC	804

引物序列中小写字母代表同源臂。

1.2.5 噬菌体裂解酶质粒转化钝顶螺旋藻方法的建立

为了探究噬菌体裂解酶植物表达质粒转化钝顶螺旋藻的最优方法,本研究以对数生长期的钝顶螺旋藻为研究对象,设置不同转化条件(PEG 8000 含量和质粒转化量)。首先,取 1 mL 对数生长期($OD_{560} = 0.6$)的钝顶螺旋藻培养液,在 5000 g 、 $12 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下离心 5 min 后弃去上层液,加入 1 mL 含有 2 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA)的新鲜 SP 液体培养基重悬沉淀,孵育过夜以抑制螺旋藻胞内、胞外核酸酶活性^[4]。将 EDTA 处理后的钝顶螺旋藻离心后弃去上层液,加入 1 mL SP 液体培养基重悬沉淀。随后,在 100 W 条件下超声 2 s 以破碎原生质体,并迅速将处理后的培养液置于冰上孵育。在预先制备的终含量为 0.1% 、 0.2% 、 0.5% 、 1.0% 的 PEG 8000 溶液(用 $0.22 \mu\text{m}$ 过滤器过滤除菌后冰浴)中加入最终质量浓度分别为 $50 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 、 $100 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 、 $250 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 、 $500 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 的 pY+*LysinA*、pY+*LysinB* 质粒,在室温下涡旋混匀 15 s,随后静置 5 min。将 PEG 8000 和质粒混合物加入对数生长期的钝顶螺旋藻培养液中,轻弹管壁以混匀,将培养液于冰上静置 30 min,再于 $42 \text{ }^\circ\text{C}$ 热激 1 min 后转冰浴 5 min。在进行质粒转化后的钝顶螺旋藻培养液中添加 10 mL SP 液体培养基,随后将培养液于光照培养箱中静置培养 48 h。最后,将钝顶螺旋藻培养液在 5000 g 、 $12 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下离心 5 min,弃去上层液体后,加入 1 mL SP 液体培养基重悬沉淀。取 $100 \mu\text{L}$ 重悬液涂布至

含有 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 潮霉素 B 的 SP 固体平板上,置于光照培养箱中静置培养至出现单克隆藻株,挑取藻株进行扩大培养。

1.2.6 钝顶螺旋藻表达裂解酶的裂解活力验证

将成功转化裂解酶表达质粒的钝顶螺旋藻培养至对数生长末期,取 100 mL 钝顶螺旋藻培养液置于冰上,用 300 W 超声破碎 15 min 后剧烈振荡 15 s,在 10 000 g 、12 $^{\circ}\text{C}$ 条件下离心 10 min。在上清液中加入脱氧核糖核酸酶 I (*Dnase I*)、核糖核酸酶 A (*Rnase A*) 酶,于冰上消化 10 min,将所有上清液过 Ni-NTA 柱以纯化融合 His-tag 的重组 *LysinA*、*LysinB* 蛋白,在 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液中透析 12 h,超滤浓缩后于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。将裂解酶稀释为 0.2 mg/mL、0.5 mg/mL、1.0 mg/mL 和 2.0 mg/mL 的质量浓度后,将不同质量浓度的裂解酶与培养至 $OD_{600}=0.6$ 的噬菌体宿主菌共同孵育后转入 96 孔板中,分别在 1 h、3 h、6 h、12 h 和 24 h 时测量各孔的 OD_{600} 值。

1.2.7 钝顶螺旋藻表达裂解酶的裂解谱验证

将 2 mg/mL *LysinA*+*LysinB* 混合裂解酶制剂分别与 7 株噬菌体宿主菌共同点样至 BHI 固体平板上,并观察裂解酶的裂解谱。具体方法如下:将宿主菌通过 BHI 液体培养基扩大培养至 $OD_{600}=0.6$,取 10 μL 宿主菌培养液与 10 μL 裂解酶液进行快速混匀,将混合液滴加在预先划好分区的 BHI 固体平板上。将平板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 细菌培养箱中进行正置培养,待液滴完全干燥后转为倒置培养过夜,观察点样处的细菌生长情况。

1.2.8 钝顶螺旋藻表达裂解酶的细胞毒性验证

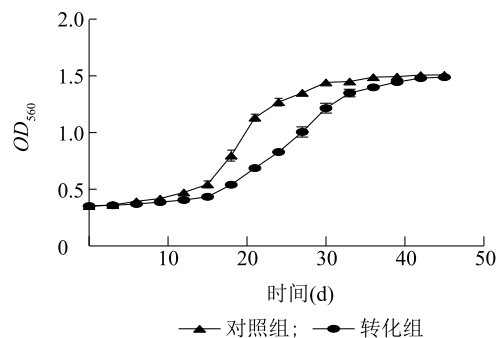
本研究选用小鼠成纤维细胞株 (L929)、小鼠主动脉内皮细胞株 (MAEC) 为材料,通过细胞活性检测法 (CCK-8) 测定不同质量浓度钝顶螺旋藻表达裂解酶的细胞毒性。具体方法如下:首先,将处于对数生长期的 L929、MAEC 细胞消化后用 5 mL 新鲜配制的含 10% 胎牛血清的高糖 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基 (DMEM) 重悬,立即将细胞悬液加入新的 96 孔细胞培养板中,每孔 100 μL 。将 *LysinA*、*LysinB* 和 *LysinA*+*LysinB* 混合裂解酶的测试质量浓度设置为高、中、低 3 个梯度 (2.0 mg/mL、1.0 mg/mL、0.5 mg/mL),即分别在对应的孔中加入 0.4 mg、0.2 mg 和 0.1 mg 裂解酶,随后加入 10% 胎牛血清高糖 DMEM 完全培养基将每孔液体体积补至 200 μL 。分别在 1 h、3 h、12 h 和 24 h 时通过 CCK-8 测定裂解酶对 L929、MAEC 的

细胞毒性。

2 结果与分析

2.1 钝顶螺旋藻的一步生长曲线

以未转化含有裂解酶编码基因质粒的钝顶螺旋藻为对照组进行培养试验,培养一定时间后的生长曲线显示,对照组在培养 15 d 左右进入对数生长期,在培养 30 d 左右进入稳定期;用含裂解酶编码基因质粒转化的钝顶螺旋藻的对数生长期出现时间推迟至培养后 18 d 左右,且在对数生长期间的生长速率低于对照组;用含裂解酶编码基因质粒转化的钝顶螺旋藻在培养至 42 d 时进入稳定期,此时 2 组间的 OD_{560} 不存在显著差异 (图 1)。



OD_{560} : 钝顶螺旋藻在 560 nm 处的吸光度。

图 1 钝顶螺旋藻的一步生长曲线

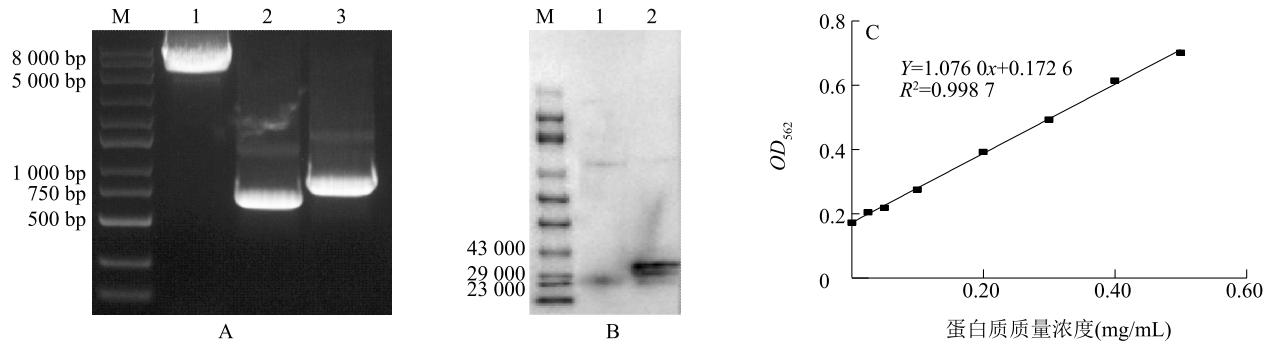
Fig.1 One-step growth curve of *Spirulina platensis*

2.2 噬菌体裂解酶的原核表达

对金黄色葡萄球菌噬菌体 vB_SauH_JAAS17 全基因组测序结果进行比对发现,该噬菌体基因组全长为 138 626 bp,与 *Staphylococcus virus* APTC_SA_2、Sa83、SAM2 等噬菌体的同源性均在 99% 以上。以上述噬菌体为模板,对 vB_SauH_JAAS17 进行注释发现,该噬菌体存在 2 个裂解酶编码基因 *LysinA*、*LysinB*,分别位于基因组上第 28 004~28 633 位和第 29 564~30 367 位。将 *LysinA*、*LysinB* 转入 pET-28a (+) 原核表达质粒中进行原核表达验证。PCR 结果显示,引物线性化处理, pET-28a (+) 质粒、*LysinA* 和 *LysinB* 的核酸电泳条带大小正确。对回收后进行同源重组并转化感受态细胞后获得的阳性克隆进行 PCR 验证,发现核酸电泳条带大小正确。Sanger 测序结果表明,*LysinA*、*LysinB* 序列在 pET-28a (+) 质粒中的插入位点正确且无突变 (图 2A)。将 pET+*LysinA*、pET+*LysinB* 质粒进行原核表达后进行蛋白质纯化,

Western blot 结果显示,原核表达得到的 *LysinA*、*LysinB* 的相对分子量符合预期,分别为26 600、33 200(图 2B)。用 BCA 蛋白质质量浓度测定试剂盒测得裂解酶

质量浓度定量标准曲线(图 2C),推算得到 *LysinA*、*LysinB* 的原核表达水平分别为 1.95 mg/mL、2.23 mg/mL。



A: 双酶切验证结果,其中 M 对应 marker,1 对应 pET-28a(+) 无缝克隆线性化结果,2 对应裂解酶 A(*LysinA*) 无缝克隆线性化结果,3 对应裂解酶 B(*LysinB*) 无缝克隆线性化结果;B: 裂解酶的蛋白质印迹结果,其中 M 对应 marker,1 对应 *LysinA* 的结果,2 对应 *LysinB* 的结果;C: 原核表达裂解酶的二喹啉甲酸(BCA) 蛋白质质量浓度测定标准曲线,图中数据均为溶液进行 10 倍稀释后的测定结果。

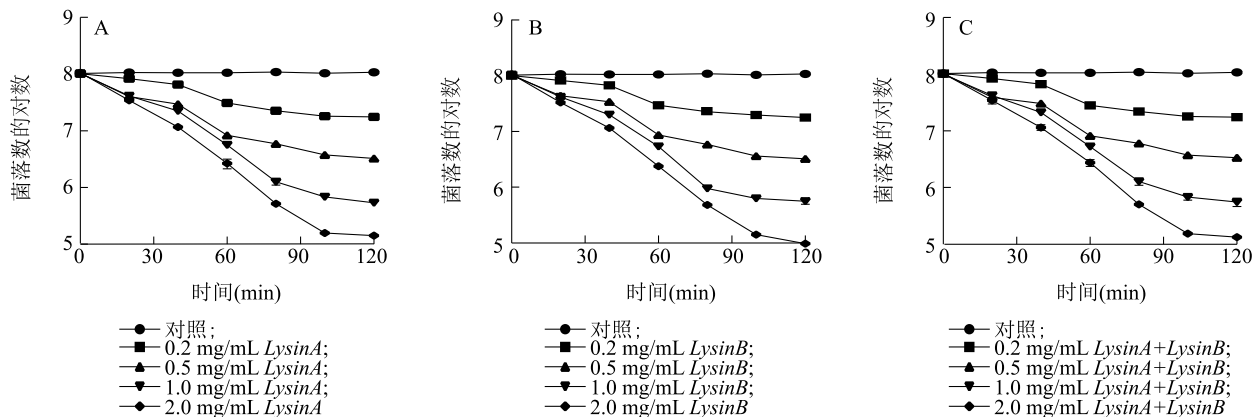
图 2 噬菌体裂解酶的原核表达结果

Fig.2 Prokaryotic expression of bacteriophage lysins

2.3 原核表达噬菌体裂解酶的裂解活力验证

将原核表达的噬菌体裂解酶 *LysinA*、*LysinB* 或 *LysinA*+*LysinB* 组合剂(将相同质量浓度的 *LysinA* 与 *LysinB* 混合,视为组合剂,下同)稀释至不同质量浓度梯度,以金黄色葡萄球菌 E622 为试验对象,以噬菌体 vB_SauH_JAAS17 为对照,研究原核表达裂解酶的裂解活力。结果表明,裂解酶 *LysinA*、*LysinB* 具有剂量和处理时间依赖性,在同一处理时间下,高剂

量处理组对宿主菌具有更高的裂解活性。与未加裂解酶的空白对照相比,*LysinA*、*LysinB* 与 *LysinA*+*LysinB* 组合剂在 0.2 mg/mL 质量浓度下处理 20 min 即可反映其裂解活性,当处理 60 min 及更长时间时,对宿主菌的裂解速率放缓。在所有试验组中,裂解酶的裂解活性在质量浓度为 2.0 mg/mL 时达到最高值,且 *LysinA*、*LysinB* 处理与 *LysinA*+*LysinB* 组合剂处理间不存在显著差异(图 3)。



A: 裂解酶 A(*LysinA*) 裂解活性曲线;B: 裂解酶 B(*LysinB*) 裂解活性曲线;C: *LysinA*+*LysinB* 裂解活性曲线。

图 3 原核表达噬菌体裂解酶裂解活力的验证

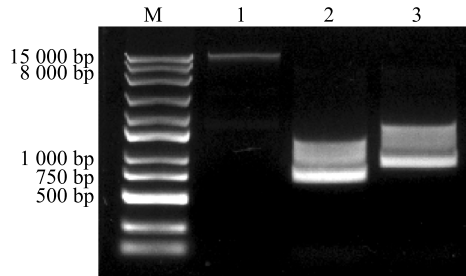
Fig.3 Validation of lytic activity of prokaryotically expressed phage lysins

2.4 钝顶螺旋藻表达噬菌体裂解酶体系的构建

将 *LysinA*、*LysinB* 通过酶切方式构入 pYPQ203 植物表达质粒中进行表达验证。核酸电泳结果显

示,经双酶切后,pYPQ203 质粒、*LysinA*、*LysinB* 的核酸电泳条带大小正确。在进行条带回收后,连接并转化感受态细胞,对获得的阳性克隆进行 PCR 验

证,结果显示核酸电泳条带大小正确。Sanger 测序结果表明,*LysinA*、*LysinB* 序列在 pYPQ203 质粒中的插入位点正确且无突变(图 4)。



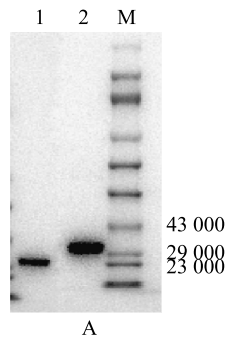
M: marker; 1: pYPQ203 质粒的酶切线性化结果; 2: 裂解酶 A (*LysinA*) DNA 序列的酶切线性化结果; 3: 裂解酶 B (*LysinB*) DNA 序列的酶切线性化结果。

图 4 钝顶螺旋藻表达噬菌体裂解酶质粒的构建

Fig.4 Plasmid construction for the expression of lysins by *Spirulina platensis*

将 pY+*LysinA*、pY+*LysinB* 质粒参照方法 1.2.5 稀释至不同质量浓度后,与不同含量的 PEG 8000

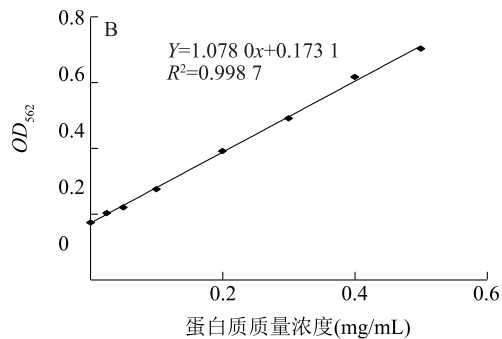
共同孵育并转化对数生长期的钝顶螺旋藻。筛选结果表明,用 0.1%、0.2% PEG 8000 介导转化的钝顶螺旋藻均未长成阳性克隆;用 0.5% PEG 8000 介导转化 500 ng/μL 质粒时,在培养后 7 d 可见 1 个单克隆,但挑取单个克隆加入液体抗性培养基中进行扩大培养失败;用 1.0% PEG 8000 介导转化 250 ng/μL、500 ng/μL 质粒时,在培养后 4 d 可见少量单克隆,挑取单个克隆加入液体抗性培养基中进行扩大培养后提取蛋白质进行验证。Western blot 结果显示,用 1.0% PEG 8000 介导转化 250 ng/μL、500 ng/μL 质粒时,钝顶螺旋藻中表达得到的 *LysinA*、*LysinB* 的相对分子量符合预期,与原核表达结果无显著差异(图 5A)。用 BCA 蛋白质量浓度测定试剂盒测得裂解酶质量浓度定量标准曲线(图 5B),推算得到在质粒转化质量浓度为 250 ng/μL、500 ng/μL 时 *LysinA* 的蛋白质表达质量浓度分别为 10.13 mg/mL、10.44 mg/mL;在质粒转化质量浓度为 250 ng/μL、500 ng/μL 时 *LysinB* 的蛋白质表达质量浓度分别为 10.02 mg/mL、10.04 mg/mL,差异均不显著。



A: 裂解酶蛋白电泳结果,其中 1 对应钝顶螺旋藻表达裂解酶 A (*LysinA*) 的结果,2 对应钝顶螺旋藻表达裂解酶 B (*LysinB*) 的结果,M 对应 marker; B: 钝顶螺旋藻表达裂解酶的二喹啉甲酸 (BCA) 蛋白质量浓度测定标准曲线。

图 5 噬菌体裂解酶的钝顶螺旋藻表达结果

Fig.5 *Spirulina platensis* expression of bacteriophage lysins

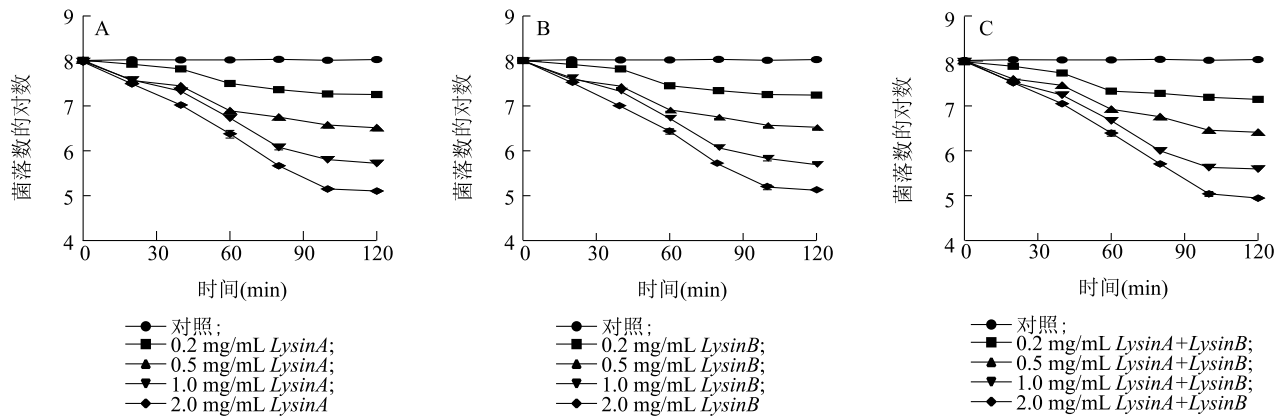


2.5 钝顶螺旋藻表达噬菌体裂解酶的裂解活力验证

将用钝顶螺旋藻表达的噬菌体 *LysinA*、*LysinB* 或 *LysinA*+*LysinB* 组合剂稀释至不同质量浓度梯度,以金黄色葡萄球菌 E622 为裂解对象,以噬菌体 vB_SauH_JAAS17 为对照,研究原核表达裂解酶的裂解活力。图 6 显示,与原核表达处理相比,用钝顶螺旋藻表达的裂解酶对宿主菌 E622 的裂解能力在整个观察期间均无显著差异。

2.6 钝顶螺旋藻表达裂解酶的裂解谱验证

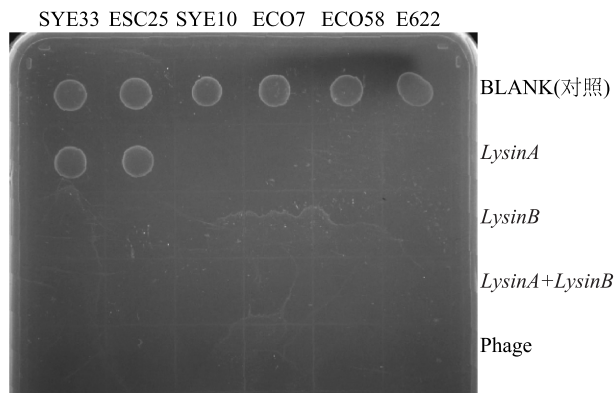
当用钝顶螺旋藻表达的噬菌体裂解酶 *LysinA*、*LysinB* 处理或 *LysinA*+*LysinB* 组合处理的质量浓度为 2.0 mg/mL 时,以本课题组保藏的 6 株噬菌体 vB_SauH_JAAS17 宿主菌为试验对象,研究用钝顶螺旋藻表达的裂解酶的裂解谱。图 7 显示,所有宿主菌均可被 *LysinB* 和 *LysinA*+*LysinB* 组合剂裂解,而 ESC25、SYE33 不能单独被 *LysinA* 裂解。



A: 钝顶螺旋藻表达 *LysinA* 裂解活力验证; B: 钝顶螺旋藻表达 *LysinB* 裂解活力验证; C: 钝顶螺旋藻表达 *LysinA+LysinB* 裂解活力验证。 *LysinA*: 裂解酶 A; *LysinB*: 裂解酶 B。

图 6 钝顶螺旋藻表达噬菌体裂解酶的裂解活力验证

Fig.6 Validation of lytic activity of *Spirulina platensis* expressed phage lysins



SYE33、ESC25、SYE10、ECO7、ECO58、E622: 噬菌体 vB_SauH_JAAS17 的宿主菌; *LysinA*: 裂解酶 A; *LysinB*: 裂解酶 B; Phage: 噬菌体。

图 7 钝顶螺旋藻表达噬菌体裂解酶的裂解谱验证

Fig.7 Lysis spectrum verification of *Spirulina platensis* expressed phage lysins

2.7 钝顶螺旋藻表达裂解酶的细胞毒性验证

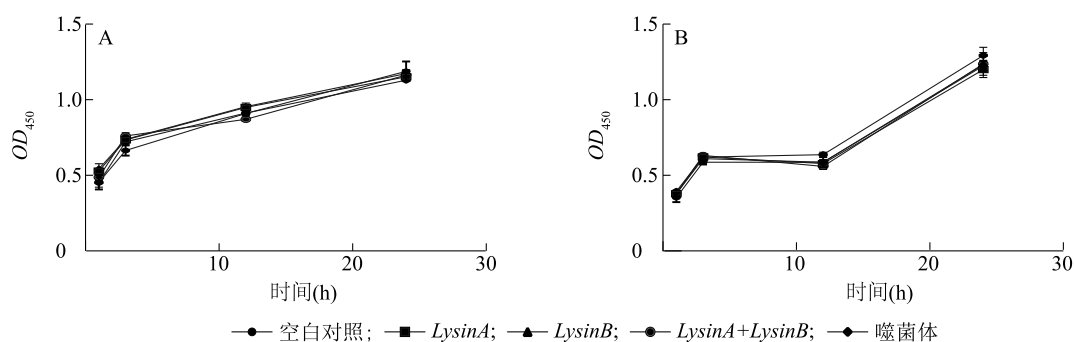
分析 CCK-8 细胞毒性试验结果可知, 高质量浓度的 *LysinB* 处理组和 *LysinA+LysinB* 组合处理组在处理时间为 1 h 时对 L929、MAEC 的毒性略高于空白对照, 但差异不显著。在其余时间点, 高质量浓度的 *LysinB* 处理组和 *LysinA+LysinB* 组合处理组与空白对照相比, 未显示出明显的细胞毒性(图 8)。

3 讨论

噬菌体裂解酶被认为是一类有前景的抗菌药

物。然而, 现有的噬菌体裂解酶表达体系主要基于毕赤酵母、大肠杆菌等, 无法满足裂解酶临床转化所需的产量大、生物安全性好和成本效益高等要求。钝顶螺旋藻表达系统是一种较新开发的原核藻类表达系统, 具有生物安全性好、成本效益高和表达稳定等优势, 理论上适用于裂解酶的表达。然而, 用钝顶螺旋藻表达裂解酶的相关研究目前仍是空白。因此, 本研究旨在开发一种用钝顶螺旋藻表达裂解酶的方法, 为裂解酶的高效表达提供一种新的思路。

目前, 钝顶螺旋藻转化方法主要包括电转化法、超声转化法和 PEG 转化法等, 其中电转化法效率较高, 但要求电压、电流及脉冲时长等参数精确, 且操作复杂, 此外电转化法的单次转化量较少, 藻细胞死亡率高, 因此不适合用于大批量转化; 超声转化法的效率低^[23-24], 也不适合进行深入研究。本研究以 PEG 转化法作为研究内容, 旨在探究不同含量 PEG 8000 和质粒对转化效率的影响。结果表明, 用 1% PEG 8000 转化 500 ng/ μ L 质粒时的转化效率最高, 该结果与前人的研究结果^[25] 较为一致。用含有裂解酶基因的质粒转化钝顶螺旋藻后, 钝顶螺旋藻在对数生长期的增长速率放缓, 可能是由外源蛋白质的表达及抗生素的施加造成的压力引起的。经验证, 用原核表达、钝顶螺旋藻表达的裂解酶在裂解宿主菌方面的表现并无显著差异, 说明钝顶螺旋藻表达系统对裂解酶的关键构象和生物学活性等没有明显影响。尽管大肠杆菌具有增殖快、培养条件易控制等优势, 但是大肠杆菌表达系统需要借助异丙基-



A:钝顶螺旋藻表达裂解酶对小鼠成纤维细胞株(L929)的毒性的验证结果;B:钝顶螺旋藻表达裂解酶对小鼠主动脉内皮细胞株(MAEC)的毒性的验证结果。LysinA:裂解酶A;LysinB:裂解酶B。

图8 钝顶螺旋藻表达噬菌体裂解酶的细胞毒性验证

Fig.8 Cytotoxicity verification of *Spirulina platensis* expressed phage lysins

β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)或乳糖等进行诱导表达,对培养时间、培养温度和诱导表达剂使用量等因素要求严格。此外,大肠杆菌作为革兰氏阴性菌,其含有的内毒素等有害物质需要经过复杂的前处理才能去除,否则可能影响所表达的蛋白质的纯度和安全。钝顶螺旋藻表达系统不依赖于外源诱导表达剂,尽管前期生长缓慢,但进入对数期后即可实现持续性、高水平的外源蛋白质表达(等体积下钝顶螺旋藻表达裂解酶的水平约为大肠杆菌原核表达水平的5倍)。另外,钝顶螺旋藻作为一种可食用的天然藻类,不含内毒素等有害物质,避免了复杂的前处理步骤。在与小鼠成纤维细胞、小鼠主动脉内皮细胞的共培养过程中,钝顶螺旋藻表达的裂解酶对这2种细胞均未产生明显的毒性作用,这一结果可能预示,钝顶螺旋藻表达的裂解酶能够通过口服、静脉注射等给药方式用于宿主菌感染后的治疗过程,充分说明钝顶螺旋藻表达系统的优越性。

综上所述,本研究建立了一种钝顶螺旋藻表达噬菌体裂解酶的方法,填补了钝顶螺旋藻表达裂解酶研究的空白,为裂解酶表达提供了一种新思路。本研究方法表达的噬菌体裂解酶产量高,2种裂解酶联用时对宿主菌的裂解活性较强,无明显细胞毒性,是一种具有潜在临床转化价值的抗菌药物。

参考文献:

[1] DE PAEPE M, LECLERC M, TINSLEY C R, et al. Bacteriophages: an underestimated role in human and animal health? [J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2014, 4: 39.

[2] CLOKIE M R J, MILLARD A D, LETAROV A V, et al. Phages

in nature[J]. *Bacteriophage*, 2011, 1(1): 31-45.

[3] KOONIN E V. The wonder world of microbial viruses[J]. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 2010, 8(10): 1097-1099.

[4] UPADHAYAY A, LING J J, PAL D, et al. Resistance-proof antimicrobial drug discovery to combat global antimicrobial resistance threat[J]. *Drug Resistance Updates*, 2023, 66: 100890.

[5] LE GUERN R, STABLER S, GOSSET P, et al. Colonization resistance against multi-drug-resistant bacteria: a narrative review [J]. *Journal of Hospital Infection*, 2021, 118: 48-58.

[6] CRUNKHORN S. Predicting novel antibacterial agents[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2020, 19(4): 238.

[7] BURKI T K. Development of new antibacterial agents: a sense of urgency needed [J]. *The Lancet. Respiratory Medicine*, 2021, 9(6): e54.

[8] HITCHCOCK N M, DEVEQUI GOMES NUNES D, SHIACH J, et al. Current clinical landscape and global potential of bacteriophage therapy[J]. *Viruses*, 2023, 15(4): 1020.

[9] SCHMALSTIG A A, FREIDY S, HANAFIN P O, et al. Reapproaching old treatments; considerations for PK/PD studies on phage therapy for bacterial respiratory infections [J]. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 2021, 109(6): 1443-1456.

[10] DANIS-WLODARCZYK K, DABROWSKA K, ABEDON S T. Phage therapy: the pharmacology of antibacterial viruses[J]. *Current Issues in Molecular Biology*, 2021, 40: 81-164.

[11] 方圆子,王 琰,孙建和. 噬菌体裂解酶:现状与未来[J]. *微生物学通报*, 2009, 36(12): 1888-1893.

[12] GU J M, XI H Y, CHENG M J, et al. Phage-derived lysins as therapeutic agents against multidrug-resistant *Enterococcus faecalis* [J]. *Future Microbiology*, 2018, 13: 275-278.

[13] ZHANG Y F, CHENG M J, ZHANG H, et al. Antibacterial effects of phage lysin LysGH15 on planktonic cells and biofilms of diverse *Staphylococci* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(15): e00886-18.

[14] 郭浩然,许青彦,周 洋,等. 噬菌体的分布广泛性以及口服安

- 全性[J]. 中国食品学报,2021,21(2):349-357.
- [15] CHENG M J, ZHANG Y F, LI X W, et al. Endolysin LysEF-P10 shows potential as an alternative treatment strategy for multidrug-resistant *Enterococcus faecalis* infections [J]. Scientific Reports, 2017,7(1):10164.
- [16] 艾聪聪, 龚国利, 项 伟, 等. 毕赤酵母表达系统发展现状及其优化策略[J]. 未来食品科学,2022,2(3):60-72.
- [17] 武 婕, 张晓雪, 余河水, 等. 毕赤酵母工程菌高密度发酵研究与进展[J]. 中国生物工程杂志,2016,36(1):108-114.
- [18] 高绪娜, 李金敏, 邵庆武, 等. 噬菌体裂解酶在大肠杆菌中的重组表达研究进展[J]. 畜牧产业,2024(2):62-66.
- [19] KAWATA Y, YANO S, KOJIMA H, et al. Transformation of *Spirulina platensis* strain C1 (*Arthrospira* sp. PCC9438) with Tn5 transposase-transposon DNA-cation liposome complex[J]. Marine Biotechnology,2004,6(4):355-363.
- [20] 王 芬, 叶 霁, 曹媛媛, 等. 钝顶螺旋藻表达载体 p215 t-spp 的构建及转化[J]. 激光生物学报,2009,18(1):12-16.
- [21] 张海生, 叶 霁, 唐欣昀, 等. 绿色荧光蛋白 *gfp* 基因在钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis*) A9 藻株中的表达[J]. 激光生物学报,2008,17(1):59.
- [22] 郑晓欢. 人表皮生长因子 hEGF 在螺旋藻中的表达研究[D]. 厦门:厦门大学,2009.
- [23] 王高歌, 茅云翔, 张宝红, 等. 电转化法转化钝顶螺旋藻转化条件的研究[J]. 高技术通讯,2002,12(10):91-95.
- [24] 柯珍恋. 钝顶螺旋藻转化与表达系统的建立[D]. 厦门:厦门大学,2001.
- [25] 唐欣昀. 钝顶螺旋藻表达载体的构建及转化研究[D]. 合肥:安徽农业大学,2008.

(责任编辑:徐 艳)