2025, 65(10): 4431-4443
CSTR: 32112.14.j.AMS.20250170
DOI: 10.13343/j.cnki.wsxb.20250170

微生物学报
Acta Microbiologica Sinica
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn

Research Article 研究报告

溶藻弧菌噬菌体裂解酶 lysV208 的重组表达和溶菌活性

倪金荣[1#]，叶莹莹[1#]，马英[1]，蔡鸿娇[1]，谭红连[2]，童桂香[2]，韦信贤[2]，房文红[3]，翁齐彪[4]，林茂[1*]

1 集美大学 水产学院，鳗鲡现代产业技术教育部工程研究中心，福建 厦门
2 广西水产科学研究院，广西水产遗传育种与健康养殖重点实验室，广西 南宁
3 中国水产科学研究院东海水产研究所，上海
4 福建省鳗鱼养殖与加工重点实验室，福建 福州

倪金荣, 叶莹莹, 马英, 蔡鸿娇, 谭红连, 童桂香, 韦信贤, 房文红, 翁齐彪, 林茂. 溶藻弧菌噬菌体裂解酶 lysV208 的重组表达和溶菌活性[J]. 微生物学报, 2025, 65(10): 4431-4443.
NI Jinrong, YE Yingying, MA Ying, CAI Hongjiao, TAN Honglian, TONG Guixiang, WEI Xinxian, FANG Wenhong, WENG Qibiao, LIN Mao. Recombinant expression and activity analysis of the lyase lysV208 from a phage of *Vibrio alginolyticus*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(10): 4431-4443.

摘　要：【目的】挖掘并开发高活性、高稳定性且可异源重组表达的噬菌体源裂解酶，确定其最优作用条件。【方法】采用浊度法验证重组表达裂解酶的溶菌活性及其最适作用条件。【结果】对溶藻弧菌噬菌体 phiV208 全基因组进行注释和蛋白预测，结果显示 ORF30 编码的蛋白具备裂解酶功能，将其命名为 lysV208。lysV208 可在大肠杆菌 BL21(DE3)中可溶性高效表达，经 0.25 mmol/L IPTG 诱导 16 h 后，纯化浓度达 204 μg/mL。与 0.5 mmol/L EDTA 协同作用时，其溶菌活性(浊度降低率)可从 24.2% 大幅提高至 68.0%。酶学特征研究表明，lysV208 的最适作用温度为 45 ℃ (溶菌活性 75.6%)，在水生动物乃至陆生动物常见的细菌性疾病流行温度范围(25−37 ℃)内，也具有较高溶菌活性(52.8%−71.9%)。lysV208 的最适作用 pH 为 7.0，在弱碱性条件(pH 7.0−9.0)下可保持较高的溶菌活性(44.0%−63.2%)，显示出对海淡水养殖环境的适应性。此外，二价金属离子(Zn^{2+}、Mg^{2+}、Mn^{2+}、Fe^{2+})在 0.1−1.0 mmol/L 浓度范围内对 lysV208 的溶菌活性有一定促进作用，但高浓度(10.0 mmol/L)离子会极显著抑制酶活性($P<0.01$)。裂解谱检测表明，重组酶 lysV208

资助项目：广西壮族自治区重点研发计划(桂科AB23026030)；福建省自然科学基金(2023J01143)；福建省社会科学基金(FJ2024B185)；泉州市科技计划(2022N044)
This work was supported by the Key Research and Development Program of Guangxi Zhuang Autonomous Region (GUIKE AB23026030), the Natural Science Foundation of Fujian Province (2023J01143), the Social Science Foundation of Fujian Province (FJ2024B185), and the Quanzhou Science and Technology Project (2022N044).
[#]These authors contributed equally to this work.
*Corresponding author. E-mail: linmao@jmu.edu.cn
Received: 2025-03-03; Accepted: 2025-06-25; Published online: 2025-08-11

不仅能高效裂解源噬菌体的宿主菌 V208，还对非宿主菌株表现出广谱溶菌能力，对溶藻弧菌 V039、创伤弧菌 H1、副溶血弧菌 GH32、哈维氏弧菌 TY13 和 G1 菌株的溶菌活性分别达到了 59.7%、68.9%、65.8%、38.0% 和 65.6%。【结论】重组裂解酶 lysV208 具有显著且稳定的体外溶菌活性，其裂解谱比源噬菌体 phiV208 更广。该酶在病原菌感染的生物防控领域，以及噬菌体-裂解酶协同制剂的开发中具有良好的应用前景。

关键词：溶藻弧菌；噬菌体；裂解酶；重组表达；溶菌

Recombinant expression and activity analysis of the lyase lysV208 from a phage of *Vibrio alginolyticus*

NI Jinrong[1#], YE Yingying[1#], MA Ying[1], CAI Hongjiao[1], TAN Honglian[2], TONG Guixiang[2], WEI Xinxian[2], FANG Wenhong[3], WENG Qibiao[4], LIN Mao[1*]

1 Engineering Research Center of the Modern Technology for Eel Industry, Ministry of Education, Fisheries College of Jimei University, Xiamen, Fujian, China

2 Key Laboratory of Aquaculture Genetic Breeding and Healthy Aquaculture of Guangxi, Guangxi Academy of Fishery Sciences, Nanning, Guangxi, China

3 East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai, China

4 Key Laboratory of Eel Aquaculture and Processing of Fujian Province, Fuzhou, Fujian, China

Abstract: [Objective] To identify and develop a phage-derived lyase that can be heterologously expressed with high activity and stability and determine its optimal working conditions. **[Methods]** We employed the turbidity reduction assay to evaluate the bacteriolytic activity and identify the optimal parameters. **[Results]** Genome annotation and protein prediction of the *Vibrio alginolyticus* phage phiV208 showed that ORF30 encoded a lyase, named lysV208. This enzyme demonstrated soluble expression in *Escherichia coli* BL21(DE3), reaching a purified concentration of 204 μg/mL after 16 h induction with 0.25 mmol/L IPTG. Its bacteriolytic activity (turbidity reduction rate) increased from 24.2% to 68.0% in the presence of 0.5 mmol/L EDTA. Enzymatic characterization revealed that lysV208 exhibited the maximum bacteriolytic activity (75.6%) at 45 ℃ while maintaining high activity (52.8%–71.9%) within the temperature range of 25–37 ℃, which is typical for bacterial disease outbreaks in aquatic and terrestrial animals. The enzyme showed the maximum activity at pH 7.0 and retained substantial bacteriolytic activity (44.0%–63.2%) under alkalescence conditions (pH 7.0–9.0), demonstrating adaptability to marine and freshwater aquaculture environments. Divalent metal ions including Zn^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}, and Fe^{2+} at 0.1–1.0 mmol/L moderately enhanced the bacteriolytic activity of lysV208, whereas those at 10.0 mmol/L reduced the activity (P<0.01). In addition, lysV208 displayed broad-spectrum lytic effects, showing the bacteriolytic activity of 59.7% against *V. alginolyticus* V039, 68.9% against *Vibrio vulnificus* H1, 65.8% against *Vibrio parahaemolyticus* GH32, and 38.0% and 65.6% against *Vibrio harveyi* TY13 and G1, respectively. **[Conclusion]** The recombinant lyase lysV208 demonstrates robust and stable *in vitro* bacteriolytic activity and a broader spectrum than its source phage. These findings highlight its potential for the control of bacterial infections and the development of phage-lyase synergistic agents.

Keywords: *Vibrio alginolyticus*; phage; lyase; recombinant expression; bacteriolysis

溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)是一种革兰氏阴性、人兽共患的机会致病菌，可引发水生动物的局部或全身感染[1]。在传统水产养殖中，抗生素治疗是控制溶藻弧菌病的主要手段。然而，近年来耐药菌及多重耐药现象的扩散导致抗生素疗效显著下降。这一现状促使噬菌体疗法成为新的研究热点。噬菌体疗法可精准靶向耐药菌，但受宿主特异性限制，其菌株覆盖率不足，制约了实际应用。针对这一瓶颈，噬菌体衍生的裂解酶受到关注。裂解酶(lyase)，又称内溶素(lysin)，是由噬菌体基因组编码、在裂解宿主菌前表达的一种细胞壁肽聚糖水解酶[2]。与源噬菌体相比，裂解酶具有更广的裂解谱和更低的抗性诱导风险[3]。与小分子抗生素相比，裂解酶通过靶向肽聚糖保守结构域，能够精准识别并作用于特定病原体。目前，国际上抗菌剂的审批程序仍以化学药物开发为核心，导致噬菌体疗法的临床应用受阻。相比之下，噬菌体衍生品如裂解酶作为生物治疗蛋白，可参考抗菌药物的审批流程和管理模式，更易获得批准[4]。

现有的裂解酶研究多集中于革兰氏阳性细菌的噬菌体。这类裂解酶结构上一般含有 2 个结构域，即一个决定酶催化活性的 C 端催化域(catalytic domain, CD)和一个决定细胞壁结合位点的 N 端结合域(cell wall binding domain, CBD)，二者之间由一个小片段连接[5]。部分裂解酶无结合域，仅有催化域，甚至拥有 2 个或 3 个不同的催化域[6]。

革兰氏阴性细菌的噬菌体裂解酶研究较少。其宿主菌的细胞壁结构更为复杂，外膜的存在使裂解酶难以直接接触细胞壁中的肽聚糖层，从而限制了裂解酶的作用效率，需要采用额外方法克服这一问题[7]。革兰氏阴性细菌噬菌体裂解酶多为单域结构，催化域本身具有足够能力直接作用于肽聚糖，通常缺乏细胞壁结合域。大多仅含 N 端催化域，分子量较小，能有效穿透外膜并作用于靶点[8]。在前期研究中，本实验室分离获得 1 株溶藻弧菌 V208 的噬菌体 phiV208[9]。基因组测序(GenBank 登录号为 MT227924)和蛋白功能注释结果表明，ORF30 编码一种单结构域胞壁酸酶，靶向肽聚糖层且缺乏结合域，符合革兰氏阴性菌噬菌体单域裂解酶的典型特征[10-11]。此外，该酶无信号肽及跨膜区，推测可通过胞内可溶性表达避免宿主自溶[12]，从而提高重组蛋白产量。

为克服革兰氏阴性菌外膜的低渗透性，外源性应用裂解酶仍需一定方法辅助。Bai 等[13]报道可使用螯合剂(如 EDTA)和有机酸，或改造裂解酶序列来增加其活性。例如，严孝金等[14]在噬菌体裂解酶 Lysp3 的 C 端添加 3–12 个疏水性氨基酸，生成 5 种不同的疏水性修饰裂解酶，有效增强了体外溶菌能力。基于上述策略，本研究对噬菌体 phiV208 的裂解酶基因 lysV208 进行生物信息学预测、克隆、表达和纯化，通过浊度法系统评估其溶菌活性，进一步优化 EDTA 联用浓度、反应温度、pH 及离子强度等关键参数，以期为新型噬菌体抗菌制剂的开发提供理论基础和数据参考。

1 材料与方法

1.1 菌株和主要试剂

溶藻弧菌 V208 及其噬菌体 phiV208，以及其他测试菌株均由本实验室分离、鉴定和保藏。测试菌株包括溶藻弧菌 V039、V214、TY05、TY12；副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*) TY10、TY17、TY18、VP11、GH32、Vp2、 Vp3；哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*) TY13、G1，创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*) H1；塔氏弧菌(*Vibrio tubiashii*) TY45；嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*) A009、A015、B11；鳗鲡爱德华氏菌(*Edwardsiella anguillarum*) B79；解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) TY27；无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*) SA503 和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) YY05 等。

大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3)，南京诺唯赞生物科技股份有限公司；琼脂糖购自 Biowest 公司；质粒 pET-28a(+)、*Bam*H I、*Xho* I、15% 电泳预制胶和 True Color 双色预染蛋白 marker，生工生物工程(上海)股份有限公司；盐酸卡那霉素(Kana)、作为阳性对照的溶菌酶(20 000 U/mg)，北京索莱宝科技有限公司；蛋白定量试剂盒(BCA 法)，亚科因(武汉)生物技术有限公司。

1.2 裂解酶 lysV208 的序列分析

利用前期实验室已测序的噬菌体 phiV208 的全基因组，通过分析注释信息推测 ORF30 可能具有裂解酶活性，将其命名为 lysV208。使用 SnapGene 软件对裂解酶碱基序列进行翻译并分析其编码蛋白的分子量、氨基酸组成及信号肽等理化性质。在 NCBI 数据库(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/)比对结果中下载与本研究的裂解酶氨基酸序列有同源性的蛋白序列，利用 MEGA 中 ClustalW 分析进行序列比对，将所形成的比对文件继续选择 MEGA 软件 Phylogeny 中 Test neighbor 方法绘制系统发育树。通过 NCBI 上的在线工分析工具 CD-search (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi)预测裂解酶的保守结构。

1.3 裂解酶 lysV208 的异源表达

以噬菌体 phiV208 基因组中的开放阅读框 ORF30 为模板，设计一对引物 lysV208-F1 (5′-CGC-GGATCC-ATGTTCTACAAATCATT-3′)和 lysV208-R1 (5′-CCG-CTCGAG-TCATGAAGCGTCCT-3′)，两者分别在末端加上了 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点。PCR 扩增，用 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定片段大小。PCR 反应体系(50 μL)：2×Accurate *Taq* Master Mix (AG11009) 25 μL，上、下游引物(10 μmol/L)各 2 μL，DNA 模板 2 μL，ddH_2O 19 μL。PCR 反应条件：94 ℃预变性 5 min；94 ℃变性 1 min，55 ℃退火 1 min，72 ℃延伸 2 min，35 个循环；72 ℃终延伸 10 min。扩增产物与质粒 pET-28a(+)双酶切后，采用 T4 DNA 连接酶连接，连接产物转化入 BL21(DE3)感受态细胞中，获得重组表达菌株 BL21-pET-lysV208，以 20% 甘油作为保护剂冻存于−80 ℃。

将保存的甘油管冻存株 BL21-pET-lysV208 划线复苏于 LB 平板，37 ℃恒温箱培养 12 h 后，在平板上随机挑取单菌落，接种到 10 mL LB 肉汤(含 50 μg/mL Kana)中，37 ℃、180 r/min 培养 12 h 后，取 1 mL 菌液接种到 100 mL LB 肉汤(含 50 μg/mL Kana)中，继续培养至 OD_{600}=0.6 左右时，加入异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)至终浓度 0.25 mmol/L，16 ℃、180 r/min 继续培养 24 h。培养结束后收集菌体，取诱导表达后的菌液 10 mL，4 ℃、10 000 r/min 离心 5 min，弃上清，沉淀用 1 mL 预冷的 PBS (10 mmol/L)重悬，重悬液在冰浴中超声波破碎菌体(90 W，破碎 1 s、停 3 s，共 5 min)，10 000 r/min 离心 5 min 得到含裂解酶的上清液(后续实验均以同浓度 PBS 进行稀释操作)。

1.4 裂解酶 lysV208 的溶菌活性测定

溶藻弧菌 V208 30 ℃、180 r/min 培养过夜，按 1% 体积分数接种至 100 mL LB 液体培养基中，在相同条件下取培养 0、1−16、18、24 h 的菌液测定 OD_{600} 值，绘制菌株生长曲线。

参考王伟宇等[15]的浊度法测定蛋白表达产物的溶菌活性，采用 200 μL 反应体系(100 μL 菌悬液+100 μL 测试活性的样品)，其中菌悬液为培养至对数生长期的菌液，8 000 r/min 离心 2 min，并以 PBS 缓冲液重悬沉淀稀释至 OD_{600}=2.0±0.1

(非特指皆采用此重悬液)。设置重组菌破碎上清液、PBS 缓冲液(pH 7.4)阴性对照和溶菌酶(20 000 U/mg)阳性对照 3 个实验组，另设空白对照组(200 μL 菌悬液)，每组 3 个平行。25 ℃下反应 2 h 后测 OD_{600} 值，计算浊度降低率，如公式(1)所示。

$$浊度降低率=(空白对照组OD_{600}值-实验组OD_{600}值)/空白对照组OD_{600}值\times100\% \quad (1)$$

1.5 裂解酶 lysV208 的纯化与浓度测定

破碎后的上清液经 0.22 μm 的滤膜过滤，通过 HisPur™ Ni-NTA Spin Columns 镍柱纯化蛋白，使用 Amicon Ultra-15 离心过滤器(10-kDa MWCO, UFC9010)进行缓冲液置换以除盐，得到纯化后的目的蛋白 lysV208，于−80 ℃保存。用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析纯化后的裂解酶 lysV208。使用蛋白定量试剂盒(BCA 法)测定蛋白浓度。

1.6 裂解酶 lysV208 的最佳作用条件

参考上述 200 μL 反应体系和溶菌活性检测方法，测试裂解酶在不同条件下的作用。在探究 lysV208 与 EDTA 联用效果的实验中，体系中的 100 μL 测试样品设置为 lysV208 (终浓度 51 μg/mL)或 PBS 缓冲液与不同浓度的 EDTA (终浓度分别为 0、0.5、1.25、2.5、5、10 mmol/L)的混合液。在研究重组酶对处于迟缓期、对数期及稳定期细菌的溶菌活性时，根据溶藻弧菌 V208 的生长曲线分别取培养 3、12、24 h (对应这 3 个生长阶段)的菌液，8 000 r/min 离心 2 min 后重悬，取 100 μL 菌悬液添加 100 μL lysV208 (51 μg/mL)与 EDTA (0.5 mmol/L)的混合液，进行溶菌活性检测。

在上述确定的最佳条件下进一步确定 lysV208 的最适作用浓度，取 100 μL 的菌悬液加 100 μL lysV208 (终浓度分别为 0、8.5、17、35、51、68、85、102 μg/mL)与 EDTA (0.5 mmol/L)的混合液进行反应，以终浓度 0 μg/mL 组作为对照。在最适作用浓度下，将反应体系的作用温度设置为不同的梯度(10−45 ℃)，分别反应 2 h 后测定 OD_{600} 的变化，确定酶的最适作用温度。进一步将反应体系用不同 pH 的 PBS 缓冲液调节到不同 pH (3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0)下反应 2 h 后检测 OD_{600} 的变化，确定酶的最适反应 pH。为进一步分析金属离子(Zn^{2+}、Ca^{2+}、Mg^{2+}、Mn^{2+}、Fe^{2+})对 lysV208 活性的影响，在 100 μL 测试样品中除了 lysV208 (51 μg/mL)和 EDTA (0.5 mmol/L)，还添加了 $ZnCl_2$、$CaCl_2$、$MgCl_2$、$MnCl_2$ 或 $FeSO_4$ (终浓度设置 0.1、1、10 mmol/L 3 个梯度)，待反应结束测 OD_{600}。以上所有实验组别均设置 3 个平行。

1.7 裂解酶 lysV208 的裂解谱检测

噬菌体 phiV208 的裂解谱检测采用点斑法[16]，将 10 μL 噬菌体梯度稀释液均匀点在上层含宿主菌的双层平板上，培养 12 h 后观察是否有噬菌斑出现。裂解酶 lysV208 的裂解谱检测采用 1.6 节的方法，处理测试菌液得到 OD_{600}=2.0±0.1 的重悬液，在 96 孔板中依次加入 100 μL 测试菌株的菌悬液，以及 100 μL 裂解酶(51 μg/mL)与 EDTA (0.5 mmol/L)的混合液，设不添加 lysV208 (以 PBS 代替)的组别为对照，将反应体系置于 30 ℃恒温条件下孵育 2 h，随后使用酶标仪测定 OD_{600} 并计算溶菌活性。

2 结果与分析

2.1 裂解酶 lysV208 的序列分析与预测

将噬菌体 phiV208 的裂解酶基因 *lysV208* 序列(GenBank 登录号为 QIW88961.1)导入 SnapGene 软件中，翻译成氨基酸序列后进行理化性质分析。lysV208 基因序列全长 516 bp，编码 171 个氨基酸，理论分子量大小约为 19.2 kDa。软件预测结果显示，其不含有信号肽序列。系统发育树分析表明，lysV208 与弧菌噬菌体 PVA1 的裂解酶基因高度同源(图 1)，处于同一分支上，与双方噬菌体全基因比对结果一致，两者遗传距离相近。CD-search 预测结果显示，

裂解酶 lysV208 在 2−170 个氨基酸之间有 ZliS (COG3926)溶菌酶家族结构域；在 1−94 个氨基酸之间有 N-乙酰胞壁酸酶(cd13926)结构域；在 6−94 个氨基酸之间有 Glyco_hydro_108 结构域，该结构域的描述也是 N-乙酰胞壁酸酶家族(pfam05838) (表 1)。这三者均为裂解酶的催化域，未预测出相关结合域。

2.2 裂解酶 lysV208 的克隆、表达、鉴定与纯化

以噬菌体 phiV208 基因组为模板，以 lysV208-F1 和 lysV208-R1 为引物进行 PCR 扩增。PCR 产物凝胶电泳在 500 bp 左右处出现条带，符合序列长度 516 bp 的预期(图 2)。通过双酶切将目的片段连接到 pET-28a(+)质粒上，将重组质粒转至 BL21(DE3)感受态细胞中，测序无误后以 IPTG 诱导裂解酶 lysV208 的大量低温可溶性表达。

生长曲线显示(图 3)，溶藻弧菌 V208 在液体培养的 0−3 h 处于迟缓期，4−12 h 处于对数生长期，13 h 之后进入稳定期。细菌浓度与光密度值(OD_{600})成正比，当细菌结构完整时光密度

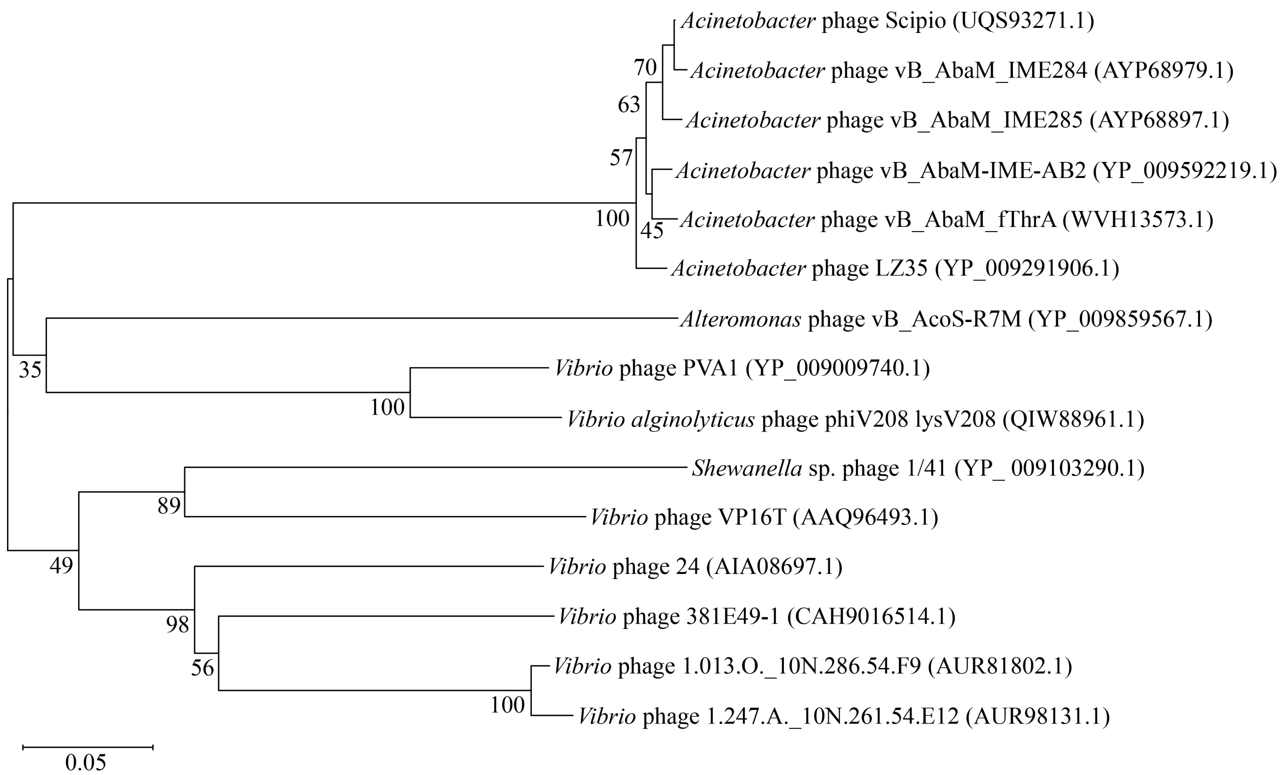

图1 噬菌体phiV208基于裂解酶lysV208构建的系统发育树

Figure 1 Phylogenetic tree of phage phiV208 based on the lyase lysV208.

表1 裂解酶lysV208结构域的预测

Table 1 Conserved domain prediction for lyase lysV208

Name	Accession	Description	Interval	*E*-value
ZliS	COG3926	Lysozyme family protein	2−170	8.53×10^{-42}
GH108	cd13926	N-acetylmuramidase domain of the glycosyl hydrolase 108 family	1−94	4.52×10^{-29}
Glyco_hydro_108	pfam05838	This family acts as a lysozyme (N-acetylmuramidase)	6−94	1.44×10^{-24}

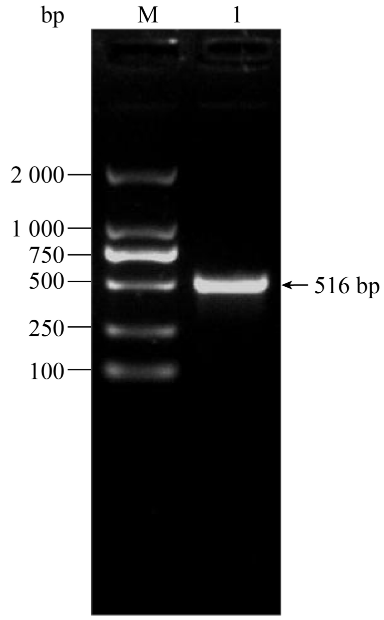

图2 lysV208基因PCR扩增产物的电泳图。泳道M：DNA分子量标准；泳道1：*lysV208*。

Figure 2 The PCR amplification products of *lysV208*. Lane M: DNA marker; Lane 1: *lysV208*.

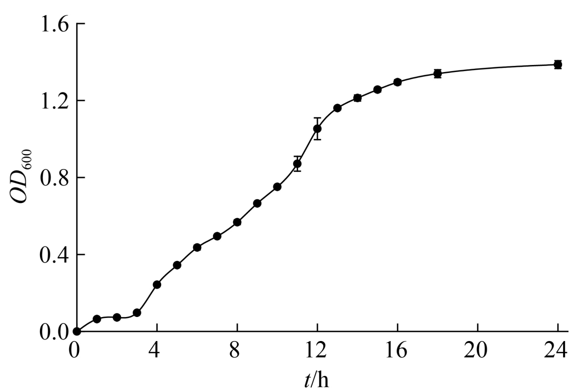

图3 溶藻弧菌V208的生长曲线

Figure 3 The growth curve of *Vibrio alginolyticus* V208.

值较高；当细菌被裂解后则显著下降。重组表达菌株超声波破碎后的上清液即可使溶藻弧菌V208 浊度下降 44.8% (图 4)，表明重组裂解酶获得了可溶性表达。进一步纯化后的裂解酶 lysV208 在 SDS-PAGE 图中于 20 kDa 处呈现单一清晰条带，与预测分子量一致(图 5)，BCA 试

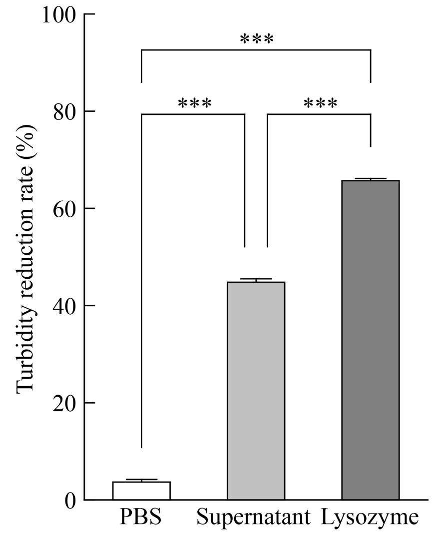

图4 重组表达菌超声破碎上清液和参照溶菌酶对溶藻弧菌V208的溶菌活性

Figure 4 Bacteriolytic activity of the sonicated lysate supernatant from recombinant bacteria and the control lysozyme against *Vibrio alginolyticus* strain V208. *** indicates extremely significant differences between groups (P<0.001).

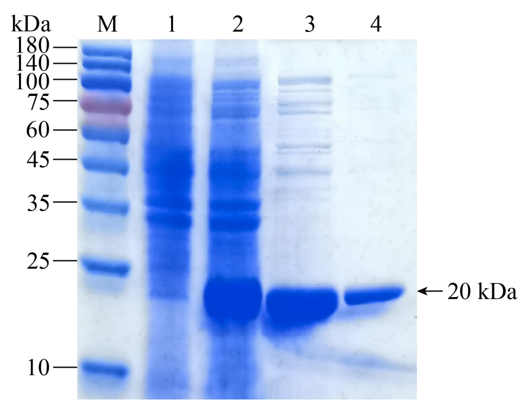

图5 重组裂解酶lysV208纯化前后的电泳图。泳道M：蛋白分子量标准；泳道1：BL21-pET28a(+)；泳道2：未纯化的上清液；泳道3–4：镍柱第1、2次洗脱液。

Figure 5 SDS-PAGE analysis of recombinant lyase lysV208 before and after purification. Lane M: Protein marker; Lane 1: BL21-pET28a(+); Lane 2: Unpurified supernatant; Lanes 3–4: First and second eluates from the nickel column.

剂盒测定纯化的蛋白浓度为 204 μg/mL。

2.3 裂解酶 lysV208 的最佳作用条件

在 EDTA 协同作用体系中，浓度范围 0.5−10 mmol/L 的 EDTA 均显著提升了 lysV208 对溶藻弧菌的溶菌活性(58.6%−68.0%)，其中联用 0.5 mmol/L EDTA 时的溶菌活性最高(68.0%)，较无 EDTA 组(24.2%)提高了 2.8 倍(图 6A)。

进一步分析对不同生长时期溶藻弧菌的溶菌效率(图 6B)，结果显示 lysV208 对溶藻弧菌对数生长期菌体的溶菌活性为 61.7%，而对稳定期菌体的活性降至 10.3%，表明裂解酶的作用效能与细菌生长阶段密切相关，试验结果也提示裂解酶早期介入对细菌的控制效果更好。

浓度梯度实验表明(图 6C)，裂解酶 lysV208 的溶菌活性随其浓度提高而显著提升。然而，在浓度为 51−102 μg/mL 区间增速趋缓，该区间溶菌活性仅提高 9.2%，提示酶浓度继续增加对活性提升的增益有限。

温度适应性实验表明(图 6D)，lysV208 的最佳作用温度为 45 ℃，此时溶菌活性为 75.6%，而在水生动物乃至陆生动物常见的细菌性疾病流行温度(25−37 ℃)范围内，lysV208 也具备较高溶菌活性(52.8%−71.9%)。

pH 稳定性实验揭示(图 6E)，lysV208 在 pH 7.0 时裂解能力最强(63.2%)。酸性条件下酶活大幅下降，弱碱性条件下(pH 7.0−9.0)可保持较高的溶菌活性(44.0%−63.2%)，这可能和它来源于海洋弧菌噬菌体有关，同时也表明它适用于淡水(pH 7.0 左右)和海水养殖环境(pH 7.8−8.4)。

二价金属离子(Zn^{2+}、Fe^{2+}、Mg^{2+}、Mn^{2+}、Ca^{2+})干扰实验显示(图 6F)，低浓度(0.1−1.0 mmol/L)离子对 lysV208 酶的溶菌活性有促进作用，尤其是 Mg^{2+} (0.1−1.0 mmol/L)显著促进 lysV208 酶的溶菌活性($P<0.05$)。然而，高浓度(10 mmol/L)的上述离子均极显著抑制酶活性($P<0.001$)。

总体来看，lysV208 (51 μg/mL)联合 EDTA (0.5 mmol/L)在 25−37 ℃、pH 7.0−8.0 及低离子强度(<1 mmol/L)的条件下可实现较高的溶菌效率，这些特性为水产病原菌防控提供了适宜的应用条件。

2.4 裂解酶 lysV208 的裂解谱

针对所有测试菌株，噬菌体 phiV208 只能特异性裂解溶藻弧菌 V208。相比之下，重组裂解酶 lysV208 (51 μg/mL lysV208+0.5 mmol/L EDTA)不仅能高效裂解源噬菌体的宿主菌 V208，还对非宿主菌株表现出广谱溶菌能力。对溶藻弧菌 V208、溶藻弧菌 V039、创伤弧菌 H1、副溶血弧菌 GH32、哈维氏弧菌 TY13 和 G1 的溶菌活性显著，浊度降低率分别达到了 64.4%、59.7%、68.9%、65.8%、38.0% 和 65.6% (图 7)。相比之下，对革兰氏阳性菌(如金黄色葡萄球菌 YY05 和无乳链球菌 SA503)的溶菌活性较低(<10.0%)，但对解淀粉芽孢杆菌 TY27 表现出一定的溶菌活性(10.5%)。实验结果表明相对于源噬菌体，重组表达的裂解酶 lysV208 具有更宽的裂解谱。

3 讨论与结论

噬菌体裂解酶通过特异性降解宿主细胞壁的肽聚糖层，在噬菌体复制周期末期触发宿主细胞的裂解(自内裂解)，进而释放子代病毒颗粒。研究表明在宿主菌胞内噬菌体裂解酶的作用需要噬菌体穿孔素(holin)的协同参与，穿孔素可在细胞膜上制造小孔使裂解酶能顺利通过并降解肽聚糖[17]。在重组表达菌中，裂解酶 lysV208 虽在胞内可溶性表达，但该酶无信号肽区域，且缺乏噬菌体穿孔素的协同，因此难以穿过细胞膜作用于肽聚糖靶点，从而导致自溶困难。本研究构建的工程菌在培养和诱导表达过程中菌密度较大，未发现自溶现象，同时也收获了较高的 lysV208 表达量。研究报道指出，裂解酶作为外源抗菌剂使用时通常需要利用外膜通透剂影响细菌外膜屏障，协助裂解酶接近肽聚糖作用靶点，从而实现高效降解(自外裂解)[18]。Oliveira 等[19]利用柠檬酸和苹果酸与噬

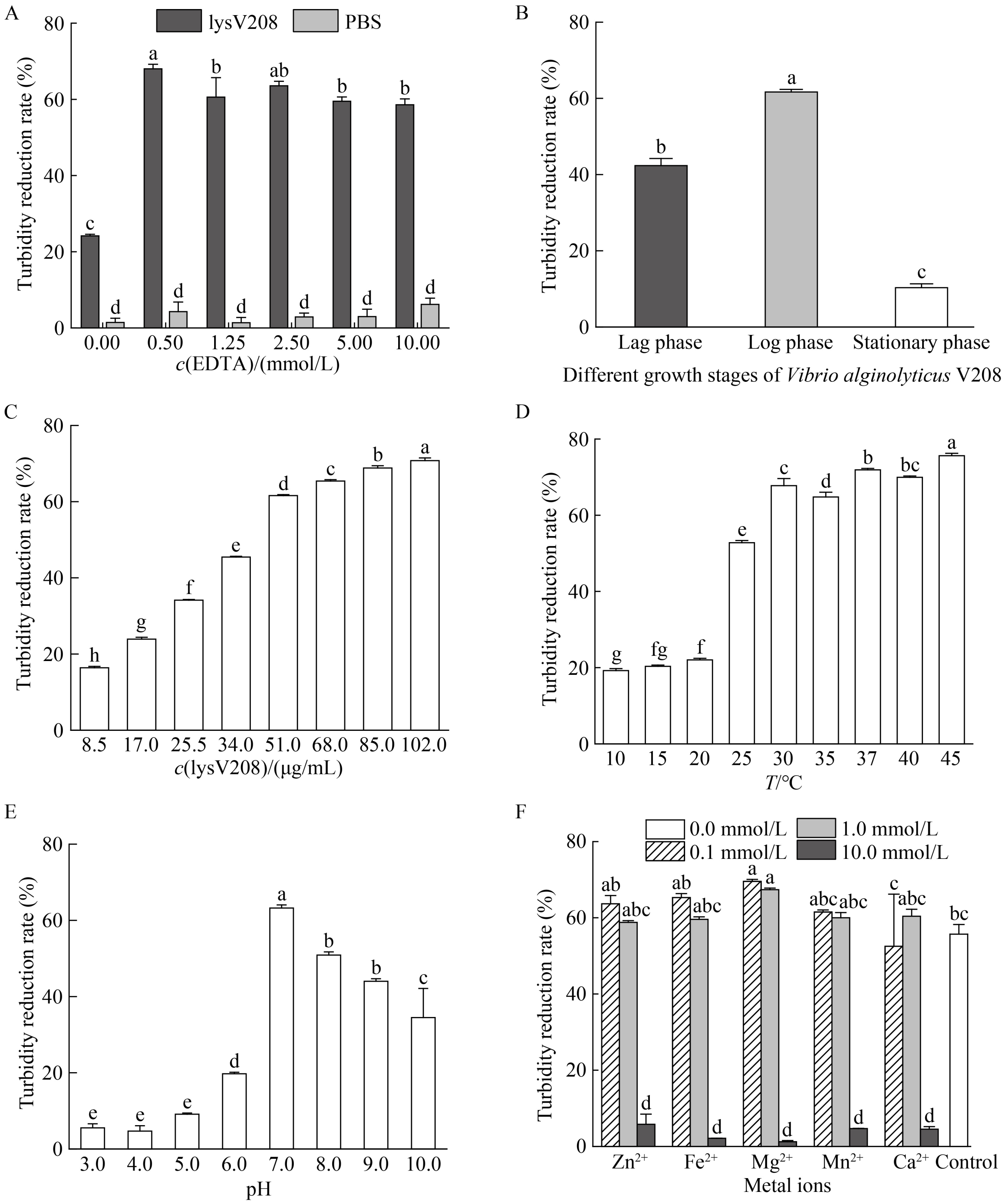

图6 重组酶lysV208溶菌活性的影响因素。A：EDTA终浓度；B：宿主不同生长时期；C：lysV208终浓度；D：温度；E：pH；F：金属离子终浓度。不同小写字母表示不同组间差异显著(P<0.05)。

Figure 6 Factors affecting the bacteriolytic activity of the recombinase lysV208. A: Final concentration of EDTA; B: Different growth phases of the host; C: Final concentration of lysV208; D: Temperature; E: pH; F: Final concentration of metal ions. Different lowercase letters denote significant differences between groups (P<0.05).

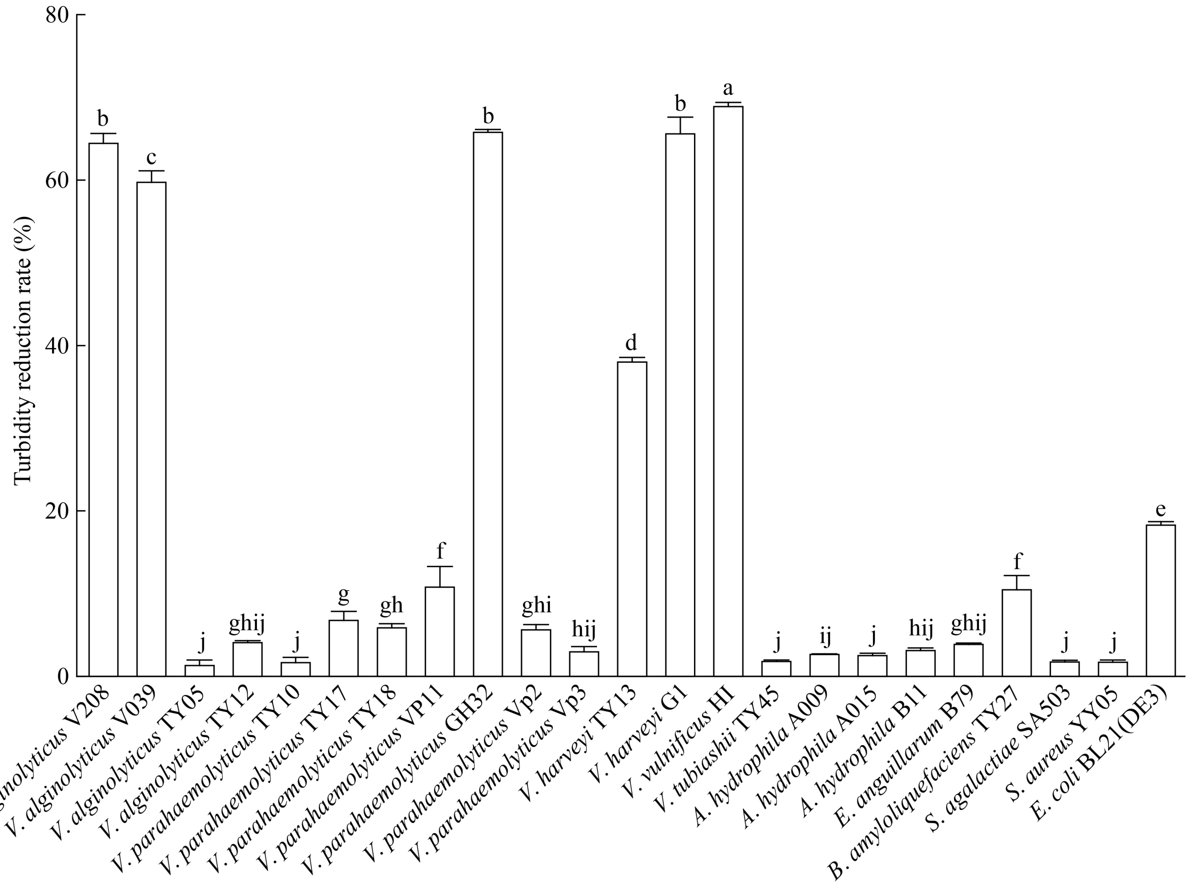

图7　重组裂解酶lysV208对不同细菌的裂解谱分析

Figure 7　The bacteriolytic activity of the recombinase lysV208 against different bacteria. Different lowercase letters denote significant differences between groups (P<0.05).

菌体 phi68 编码的 Lys68 共同作用 2 h，可使细菌载量降低 3–5 个对数级。Jiang 等[20]在研究中发现，沙门氏菌(*Salmonella*)噬菌体 SLMP1 编码的 LysSP1 在 5 mmol/L EDTA 辅助下还可裂解革兰氏阳性的李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)。本研究中，0.5 mmol/L EDTA 的联用(图 6A)可将裂解酶 lysV208 对溶藻弧菌 V208 的溶菌活性从 24.2% 大幅提高至 68.0%，同时对工程菌 BL21(DE3)也能产生 18.3% 的胞外溶菌活性(图 7)。蔡幸哲等[21]的研究报道中，裂解酶 LysLorf22 同样以 BL21 作为表达工程菌时未引发菌株自溶，但在自外裂解实验中经氯仿处理破坏细菌膜结构后则具有 68% 的溶菌活性。

外源性应用裂解酶时，除了可以联用螯合剂(如 EDTA)和有机酸等克服革兰氏阴性菌外膜的低渗透性外，还可以通过改造裂解酶序列来增加其外膜渗透能力。严孝金等[14]在噬菌体裂解酶 Lysp3 的 C 端添加 3–12 个疏水性氨基酸，生成了 5 种不同的疏水性修饰裂解酶，这种结构修饰有效增强了体外溶菌能力。Briers 等[22]早期设计的外膜穿透内溶素(artilysins)，是将 holin 和一段多肽融合到裂解酶中，通过功能融合的方式协同破坏外膜结构并激活内溶素的肽聚糖水解活性。该团队[23]后续研发的融合型裂解酶 Art-175 (含 SMAP-29 肽与 KZ144 内溶素)可同时靶向铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)及其多重耐药菌株的胞外聚合物和肽聚糖层，显著缩短作用时间，增强溶菌能力。这些研究

启示我们，裂解酶 lysV208 也可以通过序列改造使其摆脱对外膜通透剂的依赖。毕竟在复杂的应用环境中外膜通透剂的使用有一定限制，或者受环境因素影响不一定能达到最佳的协同作用条件。

裂解酶活性受宿主生理状态及环境因素影响，本研究主要在体外进行，尚未充分评估该裂解酶在实际水产养殖环境中的应用效果。与畜牧业中可直接将部分裂解酶作为饲料添加剂应用的方式不同(如噬菌体裂解酶 TSPphg 和 MMPphg[24])，水产养殖环境中的复杂因素(如水质波动、水体交换以及养殖生物的免疫反应等)可能影响裂解酶性能，其实际应用效果需进一步验证。然而，lysV208 的杀菌效率与细菌的生长阶段显著相关，该酶对对数生长期细菌的溶菌能力较稳定期提升 51.4%，这一现象与副乳房链球菌(*Streptococcus parauberis*)裂解酶 Sply828 的作用规律一致[25]，表明细菌细胞壁稳定性及组分的动态变化极大地影响酶活性[26-27]。此外，lysV208 的酶活性呈现一定的金属离子浓度依赖性。0.1−1.0 mmol/L 二价金属离子可促进其溶菌作用，在 10.0 mmol/L 的浓度下则完全失活，类似效应在 LysWL59、LysWL60 及 λSA2 等裂解酶中也有出现[28-29]。

天然噬菌体依赖外膜蛋白[30]、脂多糖[31]或鞭毛[32]等特异性受体识别宿主，导致抗菌范围受限。例如，副溶血弧菌噬菌体 VPs20 仅能裂解单一菌株，但其编码的裂解酶 Lys69 具有更广泛的裂解谱，可作用于 5 株副溶血性弧菌、3 株鳗弧菌(*Vibrio anguillarum*)，但仍局限于特定菌属[33]。相比之下，重组裂解酶 lysV208 通过靶向肽聚糖层的保守结构域，突破源噬菌体的宿主受体限制，展现出跨物种溶菌能力。其可有效裂解溶藻弧菌、创伤弧菌、哈维氏弧菌及大肠杆菌等多种革兰氏阴性菌，展现出更广谱的抗菌潜力。综上所述，相较于源噬菌体 phiV208 的窄谱特性，该重组酶通过靶向保守结构实现跨物种溶菌，为开发新型抗菌制剂提供了重要策略。

作者贡献声明

倪金荣：数据分析、撰写文章；叶莹莹：课题执行、撰写文章；马英：软件程序分析；蔡鸿娇：软件程序分析、监督管理；谭红连：提供资源、论文审阅；童桂香：项目管理、监督管理；韦信贤：监督管理、论文审阅；房文红：方法论、论文审阅；翁齐彪：提供资源、论文审阅；林茂：提出概念，获取基金、项目管理和论文审阅。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

[1] QIN YQ, REN XY, ZHANG YK, JU HY, LIU J, XIE J, ALTAF MM, DIAO XP. Distribution characteristics of antibiotic resistance genes and microbial diversity in the inshore aquaculture area of Wenchang, Hainan, China[J]. Science of The Total Environment, 2024, 914: 169695.

[2] SCHMELCHER M, DONOVAN DM, LOESSNER MJ. Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials[J]. Future Microbiology, 2012, 7(10): 1147-1171.

[3] GUPTA R, PRASAD Y. P-27/HP endolysin as antibacterial agent for antibiotic resistant *Staphylococcus aureus* of human infections[J]. Current Microbiology, 2011, 63(1): 39-45.

[4] COOPER CJ, KHAN MIRZAEI M, NILSSON AS. Adapting drug approval pathways for bacteriophage-based therapeutics[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 1209.

[5] 杨航, 余军平, 危宏平. 裂解酶治疗的研究进展与应用前景[J]. 微生物学通报, 2015, 42(1): 178-184.
YANG H, YU JP, WEI HP. Research progress in lysin therapy[J]. Microbiology China, 2015, 42(1): 178-184 (in Chinese).

[6] YANG H, WANG DB, DONG QH, ZHANG ZP, CUI ZQ, DENG JY, YU JP, ZHANG XN, WEI HP. Existence of separate domains in lysin PlyG for recognizing *Bacillus anthracis* spores and vegetative cells[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2012, 56(10): 5031-5039.

[7] RAHMAN MU, WANG WX, SUN QQ, SHAH JA, LI C, SUN YM, LI YR, ZHANG BL, CHEN W, WANG SW.

Endolysin, a promising solution against antimicrobial resistance[J]. Antibiotics, 2021, 10(11): 1277.
[8] GHOSE C, EULER CW. Gram-negative bacterial lysins[J]. Antibiotics, 2020, 9(2): 74.
[9] 付汉清. 对虾养殖源弧菌噬菌体的分离、鉴定及其全基因组学研究[D]. 厦门: 集美大学, 2018.
FU HQ. Isolation, identification and genome-wide research of *Vibrio phages* from shrimp farm[D]. Xiamen: Jimei University, 2018 (in Chinese).
[10] BRIERS Y, VOLCKAERT G, CORNELISSEN A, LAGAERT S, MICHIELS CW, HERTVELDT K, LAVIGNE R. Muralytic activity and modular structure of the endolysins of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages φKZ and EL[J]. Molecular Microbiology, 2007, 65(5): 1334-1344.
[11] POHANE AA, JAIN V. Insights into the regulation of bacteriophage endolysin: multiple means to the same end[J]. Microbiology, 2015, 161(12): 2269-2276.
[12] SHANNON R, RADFORD DR, BALAMURUGAN S. Impacts of food matrix on bacteriophage and endolysin antimicrobial efficacy and performance[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2020, 60(10): 1631-1640.
[13] BAI J, YANG E, CHANG PS, RYU S. Preparation and characterization of endolysin-containing liposomes and evaluation of their antimicrobial activities against Gram-negative bacteria[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2019, 128: 40-48.
[14] 严孝金, 李锋, 秦立廷, 李倩倩, 韩翠晓, 冯舵, 王笑梅, 高伟. 传染性法氏囊病病毒VP5蛋白跨膜区的敲除及可溶性原核表达研究[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(17): 10461-10463.
YAN XJ, LI F, QIN LT, LI QQ, HAN CX, FENG D, WANG XM, GAO W. Knockout of IBDV VP5 protein transmembrane region and the soluble prokaryotic expression research[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2011, 39(17): 10461-10463 (in Chinese).
[15] 王伟宇, 林洪, 王静雪. 副溶血弧菌噬菌体qdvp001重组内溶素诱导表达以及理化性质初步研究[J]. 食品工业科技, 2016, 37(16): 205-209.
WANG WY, LIN H, WANG JX. Characterization of recombinant endolysin from *Vibrio* parahaemolytics-infecting bacteriophage qdvp001[J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(16): 205-209 (in Chinese).
[16] YE YY, TONG GX, CHEN GH, HUANG LX, HUANG LQ, JIANG XL, WEI XX, LIN M. The characterization and genome analysis of a novel phage phiA034 targeting multiple species of *Aeromonas*[J]. Virus Research, 2023, 336: 199193.
[17] 史东灵, 解天慧, 石慧. 噬菌体EC-p9和SM-p2内溶酶及穿孔素的特性及联合抑菌作用[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(24): 7-12.
SHI DL, XIE TH, SHI H. Characteristics and combined bacteriostasis of endolysin and holin in phage EC-p9 and SM-p2[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(24): 7-12 (in Chinese).
[18] ZHANG PF, ZENG P, LAI CKC, IP M, TO KKW, ZUO Z, XIA J, LEUNG SSY. Synergism of colistin and globular endolysins against multidrug-resistant Gram-negative bacteria[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 278: 134670.
[19] OLIVEIRA H, THIAGARAJAN V, WALMAGH M, SILLANKORVA S, LAVIGNE R, NEVES-PETERSEN MT, KLUSKENS LD, AZEREDO J. 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.
[20] JIANG YH, XU DQ, WANG LZ, QU M, LI FL, TAN ZJ, YAO L. Characterization of a broad-spectrum endolysin LysSP1 encoded by a *Salmonella* bacteriophage[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2021, 105(13): 5461-5470.
[21] 蔡幸哲, 彭林, 刘珂芮, 刘书亮, 李诚, 刘爱平. 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.
CAI XZ, PENG L, LIU KR, LIU SL, LI C, LIU AP. Preparation and activity analysis of endolysin LysLorf22 derived from *Salmonella* bacteriophage[J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2020, 36(1): 212-218 (in Chinese).
[22] BRIERS Y, WALMAGH M, van PUYENBROECK V, CORNELISSEN A, CENENS W, AERTSEN A, OLIVEIRA H, AZEREDO J, VERWEEN G, PIRNAY JP, MILLER S, VOLCKAERT G, LAVIGNE R. Engineered endolysin-based “Artilysins” to combat multidrug-resistant Gram-negative pathogens[J]. mBio, 2014, 5(4): e01379-14.
[23] BRIERS Y, WALMAGH M, GRYMONPREZ B, BIEBL M, PIRNAY JP, DEFRAINE V, MICHIELS J, CENENS W, AERTSEN A, MILLER S, LAVIGNE R. Art-175 is a highly efficient antibacterial against multidrug-resistant strains and persisters of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2014, 58(7): 3774-3784.
[24] 张关令. 复合裂解酶的制备及其在肉鸡饲养中的应用效果评价[D]. 昆明: 昆明理工大学, 2020.
ZHANG GL. Preparation of compound lysin and evaluation of its application in broiler breeding[D]. Kunming: Kunming University of Science and Technology, 2020 (in Chinese).
[25] 涂传灯, 陈凯歌. 鱼源副乳房链球菌前噬菌体裂解酶Sply828的抗菌活性[J]. 微生物学通报, 2022, 49(5): 1719-1730.
TU CD, CHEN KG. Antibacterial activity of a prophage lysin Sply828 from fish-derived *Streptococcus parauberis*[J]. Microbiology China, 2022, 49(5): 1719-1730 (in Chinese).
[26] PRITCHARD DG, DONG SL, BAKER JR, ENGLER JA. The bifunctional peptidoglycan lysin of *Streptococcus agalactiae* bacteriophage B30[J].

Microbiology, 2004, 150(Pt 7): 2079-2087.
[27] OECHSLIN F, DARASPE J, GIDDEY M, MOREILLON P, RESCH G. *In vitro* characterization of PlySK1249, a novel phage lysin, and assessment of its antibacterial activity in a mouse model of *Streptococcus agalactiae* bacteremia[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2013, 57(12): 6276-6283.
[28] 王玉平. 噬菌体裂解酶LysWL59和LysWL60的制备、特性分析及应用[D]. 雅安: 四川农业大学, 2020.
WANG YP. Preparation, characterization and application of endolysins LysWL59 and LysWL60[D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2020 (in Chinese).
[29] SCHMELCHER M, POWELL AM, CAMP MJ, POHL CS, DONOVAN DM. Synergistic streptococcal phage λSA2 and B30 endolysins kill streptococci in cow milk and in a mouse model of mastitis[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(20): 8475-8486.
[30] ZHANG Z, YU F, ZOU YQ, QIU Y, WU AP, JIANG TJ, PENG YS. Phage protein receptors have multiple interaction partners and high expressions[J]. Bioinformatics, 2020, 36(10): 2975-2979.
[31] FILIPPOV AA, SERGUEEV KV, HE YX, HUANG XZ, GNADE BT, MUELLER AJ, FERNANDEZ-PRADA CM, NIKOLICH MP. Bacteriophage-resistant mutants in *Yersinia pestis*: identification of phage receptors and attenuation for mice[J]. PLoS One, 2011, 6(9): e25486.
[32] McCUTCHEON JG, PETERS DL, DENNIS JJ. Identification and characterization of type IV pili as the cellular receptor of broad host range *Stenotrophomonas maltophilia* bacteriophages DLP1 and DLP2[J]. Viruses, 2018, 10(6): 338.
[33] 刘森. 副溶血弧菌噬菌体的分离鉴定及其裂解酶的表达[D]. 大连: 大连理工大学, 2023.
LIU S. Isolation and identification of phage from *Vibrio parahaemolyticus* and expression of endolysin[D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2023 (in Chinese).