



# 噬菌体裂解酶 Lysin1902 原核表达及其与 $\epsilon$ -聚赖氨酸联用效果评价

王瑜欣<sup>1</sup>, 李静<sup>1</sup>, 付开来<sup>1</sup>, 吴珮榕<sup>1</sup>, 陈鑫茹<sup>1</sup>, 薛峰<sup>1</sup>, 汤芳<sup>1\*</sup>, 戴建君<sup>1,2</sup>

1 南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095

2 中国药科大学生命科学与技术学院, 江苏 南京 210009

王瑜欣, 李静, 付开来, 吴珮榕, 陈鑫茹, 薛峰, 汤芳, 戴建君. 噬菌体裂解酶 Lysin1902 原核表达及其与  $\epsilon$ -聚赖氨酸联用效果评价[J]. 微生物学报, 2023, 63(2): 834-844.

WANG Yuxin, LI Jing, FU Kailai, WU Peirong, CHEN Xinru, XUE Feng, TANG Fang, DAI Jianjun. Phage endolysin Lysin1902: prokaryotic expression and evaluation of its bactericidal activity combined with  $\epsilon$ -poly-lysine[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(2): 834-844.

**摘要:** 【目的】研究裂解酶 Lysin1902 与  $\epsilon$ -聚赖氨酸( $\epsilon$ -PL)对大肠杆菌 O157:H7 的协同抗菌作用。【方法】通过 Mega 构建进化树、使用在线工具等分析大肠杆菌噬菌体裂解酶 Lysin1902 氨基酸序列组成和结构等; 原核表达并纯化 Lysin1902; 通过平板裂解实验检测 Lysin1902 对大肠杆菌 O157:H7 灭活菌株的裂解活性; 用 96 孔板法检测 Lysin1902 或  $\epsilon$ -PL 的活菌裂解能力; 棋盘法验证 Lysin1902 和  $\epsilon$ -PL 联用效果。【结果】体外成功表达并纯化了 Lysin1902。Lysin1902 对大肠杆菌 O157:H7 灭活菌株具有裂解活性, 但不能有效裂解活的大肠杆菌。噬菌体裂解酶与  $\epsilon$ -PL 联用结果表明, 加入 Lysin1902 后,  $\epsilon$ -PL 能够完全控制大肠杆菌 O157:H7 增殖的使用浓度由 0.7 mg/mL 降低到 0.1 mg/mL。【结论】体外原核表达并纯化 Lysin1902, 其单独使用对活的大肠杆菌 O157:H7 无裂解活性, 但与  $\epsilon$ -PL 联用可显著提高  $\epsilon$ -PL 对大肠杆菌 O157:H7 的裂解能力。

**关键词:** 裂解酶 Lysin1902;  $\epsilon$ -聚赖氨酸; 联用; 大肠杆菌 O157:H7

资助项目: 国家自然科学基金(32172858)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32172858).

\*Corresponding author. Tel/Fax: +86-25-84396517, E-mail: tfalice@126.com

Received: 2022-07-01; Accepted: 2022-08-30; Published online: 2022-09-02

# Phage endolysin Lysin1902: prokaryotic expression and evaluation of its bactericidal activity combined with $\epsilon$ -poly-lysine

WANG Yuxin<sup>1</sup>, LI Jing<sup>1</sup>, FU Kailai<sup>1</sup>, WU Peirong<sup>1</sup>, CHEN Xinru<sup>1</sup>, XUE Feng<sup>1</sup>, TANG Fang<sup>1\*</sup>, DAI Jianjun<sup>1,2</sup>

1 College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China

2 School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, Jiangsu, China

**Abstract: [Objective]** To investigate the antibacterial effect of the phage endolysin Lysin1902 combined with  $\epsilon$ -poly-lysine ( $\epsilon$ -PL) on *Escherichia coli* O157:H7. **[Methods]** We employed Mega to construct the phylogenetic tree and used online tools to analyze the amino acid sequence of Lysin1902. After prokaryotic expression, Lysin1902 was purified. We then detected the lytic activity of Lysin1902 against autoclaved *E. coli* O157:H7 by plate lysis assay and detected the lysis activity of Lysin1902 or  $\epsilon$ -PL on live *E. coli* O157:H7 in 96-well plates. Further, we adopted checkerboard assay to measure the bactericidal activity of Lysin1902 combined with  $\epsilon$ -PL. **[Results]** We successfully expressed and purified Lysin1902. Lysin1902 showed lytic activity against autoclaved *E. coli* O157:H7 but cannot effectively lyse live *E. coli* strains. After the addition of Lysin1902, the concentration of  $\epsilon$ -PL that could completely control the proliferation of *E. coli* O157:H7 decreased from 0.7 mg/mL to 0.1 mg/mL. **[Conclusion]** Lysin1902 was successfully expressed and purified. Lysin1902 alone has no lytic activity against *E. coli* O157:H7, while the combined use of Lysin1902 with  $\epsilon$ -PL significantly increased the lytic activity of  $\epsilon$ -PL against *E. coli* O157:H7.

**Keywords:** Lysin1902;  $\epsilon$ -poly-lysine; combined use; *Escherichia coli* O157:H7

大肠杆菌 O157:H7 作为一种危害严重的食源性人兽共患病原菌,时刻威胁人类生命健康安全<sup>[1]</sup>。大肠杆菌 O157:H7 在全世界范围内主要传播来源是家禽、牲畜及其肉制品<sup>[2]</sup>,能够引起多种人类疾病,如轻度腹泻、出血性结肠炎、溶血尿毒症综合征和血栓性血小板减少性紫癜等<sup>[3]</sup>。研究发现,世界各地已经从动物和肉类中分离出大肠杆菌 O157:H7 多重耐药菌<sup>[4-5]</sup>。同时,食源性病原菌产生抗生素耐药性可能会增加食物链对人类的风险<sup>[6]</sup>。此外,有时抗生素治疗大肠杆菌 O157:H7 感染也会增加志贺毒素等衍生毒素的释放和溶血性尿毒综合征(HUS)风险<sup>[7]</sup>。因此,

有必要开发新型替代方法以预防和治疗大肠杆菌 O157:H7 感染。

作为能够杀灭细菌的病毒,噬菌体天然、可自我复制、低毒等优点再次引起人类的重视<sup>[8]</sup>。然而,噬菌体的专一性使其宿主谱受到限制,大大降低了其应用价值。噬菌体裂解酶通过水解细胞壁中的肽聚糖层,引起细菌裂解,导致子代噬菌体从宿主菌内释放<sup>[9]</sup>。相比于噬菌体,裂解酶应用的最大优点就在于其不受噬菌体宿主谱限制,能够大幅提高其应用范围。已有研究表明,通过原核表达系统可以得到具有裂解活性的噬菌体裂解酶<sup>[10-11]</sup>。然而,受限于包括大肠杆菌在

内的革兰阴性菌细菌外膜保护,外源性应用噬菌体裂解酶的活性被限制<sup>[12]</sup>。目前,除了通过大量研究以发现能够穿过细菌外膜的天然噬菌体裂解酶以外,研究人员还通过改造噬菌体裂解酶等手段来解决裂解酶穿过细菌外膜的问题<sup>[13-14]</sup>。但是,这会大幅增加研究成本,而且通过改造后的裂解酶也会增加未知风险。通过噬菌体裂解酶与现有抗菌剂联用具有解决相关问题的潜力。 $\epsilon$ -聚赖氨酸( $\epsilon$ -poly-lysine,  $\epsilon$ -PL)是一种广谱的抗菌剂<sup>[15]</sup>,由于其优异的抗菌活性,良好的水溶性,高安全性和可生物降解性, $\epsilon$ -PL已广泛应用于食品和制药行业<sup>[16]</sup>。尽管如此,研究降低 $\epsilon$ -PL使用浓度仍然值得肯定,这是基于 $\epsilon$ -PL的高价格和高浓度使用时会产生苦味。 $\epsilon$ -PL主要通过诱导微生物细胞的膜损伤发挥抗菌活性<sup>[17]</sup>,这与噬菌体裂解酶产生互补性。因此,噬菌体裂解酶和 $\epsilon$ -PL的联用将有益于更好地对抗大肠杆菌 O157:H7。

实验室前期分离获得高效裂解大肠杆菌 O157:H7 的噬菌体 PNJ1902,属于长尾噬菌体科 T5 类噬菌体<sup>[18]</sup>。为了检测噬菌体 PNJ1902 裂解酶 Lysin1902 的种类及其与 $\epsilon$ -PL 联用的抑菌活性,本试验通过分析裂解酶序列特征,原核表达裂解酶蛋白,并测定其抑菌活性,以期新型抗菌制剂的开发提供参考。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 菌株、噬菌体和生长条件

本研究使用的噬菌体为鸡粪中分离得到的烈性噬菌体 PNJ1902 (本实验室分离保存)<sup>[18]</sup>。宿主菌为大肠杆菌 O157:H7 EDL933 (本实验室保存)。感受态大肠杆菌 DH5 $\alpha$  和感受态大肠杆菌 BL21(DE3)购自北京擎科生物科技有限公司。表达载体 pET28a(+)购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司。Luria-Bertani (LB)液体培养基、LB 固体培养基(2%琼脂,质量体积分数)和半固体培养

基(0.5%琼脂,质量体积分数)用于实验中大肠杆菌 O157:H7 和噬菌体 PNJ1902 的培养。细菌培养温度为 37  $^{\circ}$ C,噬菌体培养温度为 30  $^{\circ}$ C。

### 1.2 引物与试剂

$\epsilon$ -PL 购自上海麦克林生化有限公司。限制性内切酶 QuickCut<sup>TM</sup> BamH I、QuickCut<sup>TM</sup> Xho I 和 T4 DNA Ligation Kit 购自宝生物工程(大连)有限公司。PCR 产物回收试剂盒购自湖南艾科瑞生物工程有限公司。质粒提取试剂盒和胶回收试剂盒购自南京诺唯赞生物科技有限公司。His-Ni 蛋白纯化柱购自美国 GE 公司。蛋白和 DNA Marker 购自宝生物工程(大连)有限公司。引物由北京擎科生物科技有限公司合成,引物序列: Lysin1902-F 5'-CGGGATCCATGAGTTTAAATTTGGTAAAAATAGCG-3', Lysin1902-R 5'-CCCTCGAGAAGACTAGTTCGACATGACC-3'。序列中下划线表示酶切位点(BamH I和 Xho I)。

### 1.3 Lysin1902 蛋白序列分析

通过 NCBI 数据库对 Lysin1902 氨基酸序列进行同源性比对;使用 MEGA 7.0 创建噬菌体裂解酶系统发育树;利用在线工具分析氨基酸序列分子量等电点等(<https://web.expasy.org/protparam/>);通过 TMHMM-2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>)分析裂解酶蛋白跨膜结构域;裂解酶疏水性分析通过在线工具完成(<https://web.expasy.org/protscale/>);使用 SignalP-5.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-5.0>)预测信号肽序列;在线预测裂解酶结构域(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>);裂解酶二级结构预测通过在线工具 Psipred (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>)完成;裂解酶三级结构预测通过在线工具 Swissmodel (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>)完成。

### 1.4 基因的克隆及重组表达质粒的构建

以噬菌体 PNJ1902 基因组为模板,通过 PCR

扩增 *lysin1902* 基因。PCR 扩增条件: 95 °C 3 min; 95 °C 15 s, 60 °C 15 s, 72 °C 30 s, 共 30 个循环; 72 °C 5 min。胶回收 PCR 产物。对 *lysin1902* 基因 PCR 产物和表达载体 pET28a(+) 共同使用 *Bam*H I 和 *Xho* I 进行双酶切并回收相应产物。连接目的片段和表达载体以构建重组表达质粒 pET28a-*lysin1902*。将重组质粒转入大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞。测序正确后提取重组质粒并转入大肠杆菌 BL21(DE3) 感受态细胞。得到表达 Lysin1902 蛋白的工程菌 pET28a-*lysin1902*/BL21。

### 1.5 重组蛋白 Lysin1902 的 SDS-PAGE

取 1 mL 过夜培养菌液加入含有 100  $\mu$ g/mL 卡那霉素 LB 液体培养基中培养至  $OD_{600}$  为 0.6。之后加入 1 mL 浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 进行重组蛋白诱导表达。对细菌裂解液上清和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳以分析重组蛋白。同时检测纯化后 Lysin1902 浓度。

### 1.6 Lysin1902 对细菌的裂解活性检测

实验检测了 Lysin1902 对包括大肠杆菌 O157:H7 EDL933 在内的共 23 株菌株的裂解活性。为测定 Lysin1902 对灭活细菌的裂解活性, 实验参照之前方法进行, 并进行相应改动<sup>[13]</sup>。简言之, 取 5  $\mu$ L 浓度为 1 mg/mL 的纯化蛋白样品点斑至 0.1% (质量体积分数) 琼脂糖上, 该琼脂糖中嵌入了 50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5 的高压灭菌菌株(细菌浓度约为  $10^7$  CFU/mL)。以 50% 1 mol/L 咪唑洗脱缓冲液作为阴性对照。在 37 °C 下孵育 24 h 后观察点斑区域透明度以了解蛋白酶对细菌壁裂解活性。

### 1.7 Lysin1902 或 $\epsilon$ -PL 抗菌活性检测

采用微孔稀释法测定 Lysin1902 或  $\epsilon$ -PL 对大肠杆菌 O157:H7 的抑菌活性。取 1  $\mu$ L 对数生长期( $10^8$  CFU/mL) 大肠杆菌 O157:H7 培养液与 189  $\mu$ L LB 液体培养基混合, 并添加到聚苯乙烯 96 孔板孔中。取 10  $\mu$ L 不同浓度的 Lysin1902 或

$\epsilon$ -PL 储备溶液添加至细菌溶液中, 以获得 0、0.000 01、0.000 1、0.001、0.01、0.1、1 mg/mL Lysin1902 和 0、0.1、0.3、0.5、0.7 mg/mL  $\epsilon$ -PL。阳性对照组为含有细菌培养物的培养基, 阴性对照为不含有细菌培养物的培养基。在 37 °C 下孵育 12 h 后测定每孔  $OD_{600}$  值。

同时, 实验检测 Lysin1902 对其他活的 22 株菌株裂解活性。方法同上, 区别在于猪链球菌 (*Streptococcus suis*) 使用 Todd Hewitt Broth (THB) 培养基进行培养。

### 1.8 Lysin1902 与 $\epsilon$ -PL 联用棋盘实验

参照之前的方法进行实验<sup>[19]</sup>。将 Lysin1902 和  $\epsilon$ -PL 储备溶液添加到无菌 LB 液体培养基中, 分别获得 0、0.2、0.4、0.6、0.8 mg/mL Lysin1902 和 0、0.2、0.6、1、1.4 mg/mL  $\epsilon$ -PL。之后, 各取 100  $\mu$ L 含有不同浓度的两种抗菌剂 LB 溶液等分加入 96 孔微量测定板中混匀。每孔加入 1  $\mu$ L 对数生长期的大肠杆菌 O157:H7 培养物(最终细胞浓度约为  $10^5$  CFU/mL), 并在 37 °C 下孵育 12 h。之后, 计算两种抗菌剂的抑制浓度分数(FIC)的总和( $\Sigma$ FIC=FICA+FICB)。协同作用定义为  $\Sigma$ FIC $\leq$ 0.5, 加性定义为  $0.5<\Sigma$ FIC $<$ 1.0, 无差异定义为  $1.0\leq\Sigma$ FIC $\leq$ 4.0, 拮抗作用定义为  $\Sigma$ FIC $>$ 4.0。

### 1.9 Lysin1902 与 $\epsilon$ -PL 联用细菌裂解效果动态监测

方法同 1.8。各取 100  $\mu$ L 0.4 mg/mL 的 Lysin1902 和 0.2 mg/mL 的  $\epsilon$ -PL LB 溶液等分加入 96 孔微量测定板中混匀。实验组每孔加入 1  $\mu$ L 对数生长期的大肠杆菌 O157:H7 培养物(最终细胞浓度约为  $10^5$  CFU/mL), 并在 37 °C 下孵育 12 h。每 1 h 检测各孔浓度, 使用  $OD_{600}$  表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 Lysin1902 蛋白序列分析

通过进化树分析, 结果显示 Lysin1902 蛋白

氨基酸序列与 T5 类噬菌体大肠杆菌噬菌体 vB\_EcoS\_AKFV33 的亲缘性最高(氨基酸序列同源性为 100%) (图 1)。蛋白分子量等电点分析结果显示, Lysin1902 蛋白共有 137 个氨基酸, 理论 pI 为 7.91, 在大肠杆菌中半衰期 >10 h, 属于结构相对稳定蛋白(表 1); 蛋白质跨膜结构域预测结果显示, Lysin1902 蛋白无跨膜结构域; 蛋白疏水性分析结果显示 Lysin1902 蛋白疏水性最

大值是 1.122, 最小值是 -2.289; 信号肽序列预测结果显示, Lysin1902 蛋白无信号肽序列; 蛋白质结构域分析结果显示, Lysin1902 蛋白有 5 个活性位点和 3 个 Zn 离子结合位点; 蛋白质二级结构预测结果显示, Lysin1902 蛋白主要含有 6 个  $\alpha$ -螺旋(共 49 个氨基酸)和 3 个  $\beta$ -折叠(共 3 个氨基酸), 其他为无规则卷曲(共 85 个氨基酸); Lysin1902 蛋白三级结构预测结果见图 2。

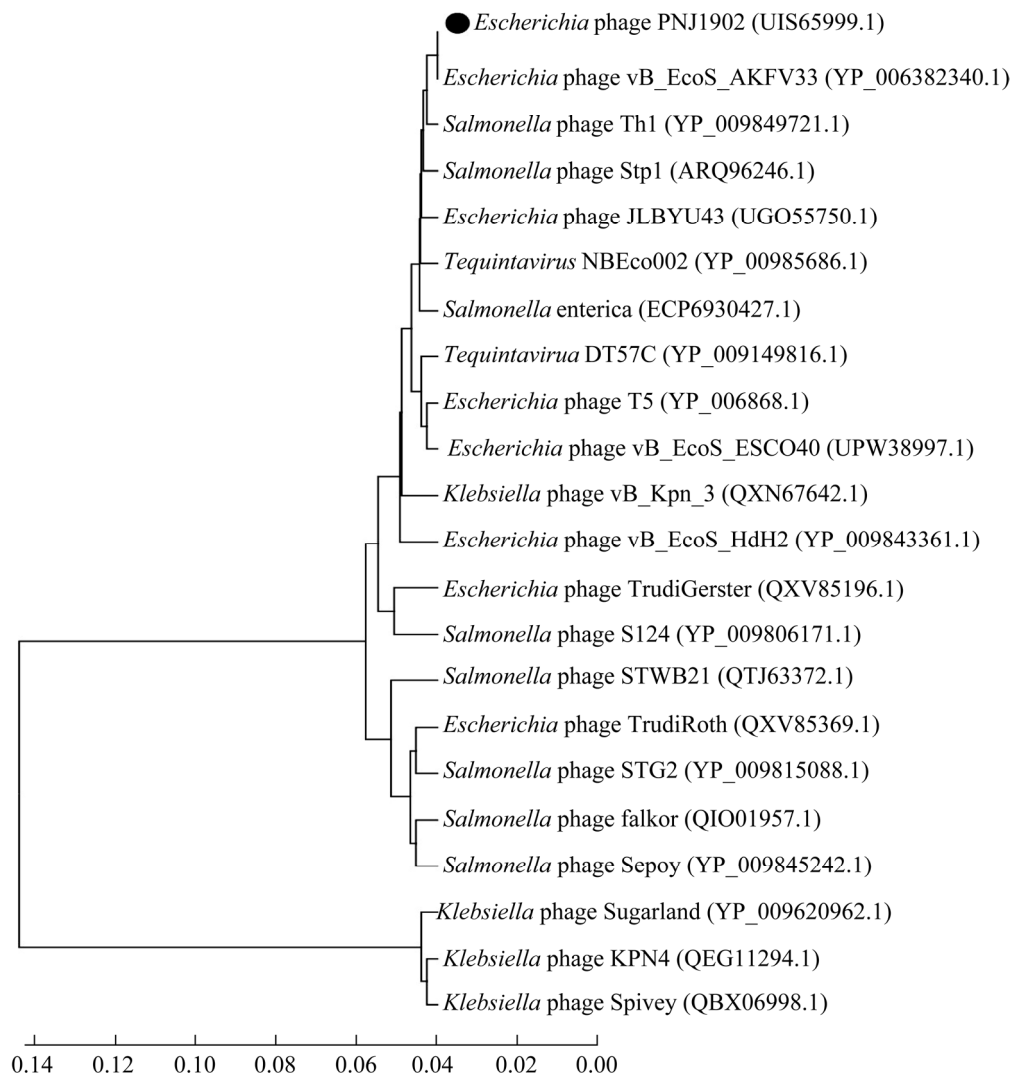


图 1 Lysin1902 蛋白氨基酸序列进化分析

Figure 1 Phylogenetic tree based on Lysin1902 amino acid sequence of phage PNJ1902. Black dot: *Escherichia* phage PNJ1902; Numbers in brackets represent GenBank sequence ID; Ruler: Genetic distance.

表 1 Lysin1902 蛋白分子量等电点分析

Table 1 Molecular weight isoelectric point analysis of Lysin1902 protein

Item	Results
Number of amino acids	137
Molecular of weight	15 264.23
Theoretical of pI	7.91
Total number of negatively charged residues (Asp+Glu)	18
Total number of positively charged residues (Arg+Lys)	19
Estimation of half-life	N-terminal is Met; 30 h (mammalian reticulocytes, <i>in vitro</i> ); >20 h (yeast, <i>in vivo</i> ); >10 h ( <i>E. coli</i> , <i>in vivo</i> )
Instability index	The instability index (II) is 35.78 and it is stable

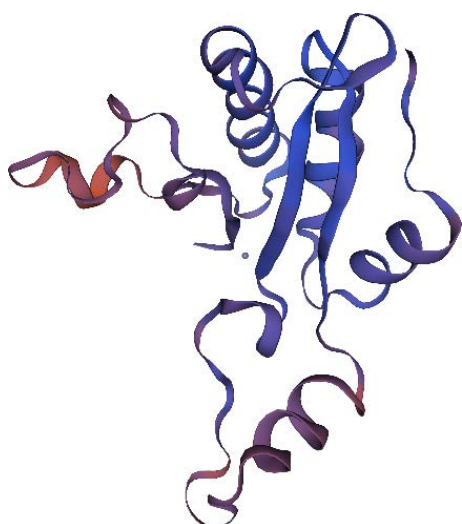


图 2 Lysin1902 蛋白预测三级结构

Figure 2 The predicted structure of Lysin1902.

## 2.2 *lysin1902* 基因的克隆及重组表达质粒的构建

通过 PCR 扩增噬菌体 *lysin1902* 基因。测序正确后,将 *lysin1902* 基因连接到 pET28a(+)载体上,构建重组表达质粒 pET28a-*lysin1902*, PCR 及双酶切鉴定结果如图 3 所示。目的条带与预期片段大小相同。

## 2.3 重组蛋白 Lysin1902 的 SDS-PAGE 鉴定

通过 IPTG 诱导表达 Lysin1902 蛋白,超声破碎离心后,通过 SDS-PAGE 电泳检测沉淀和上清中蛋白表达情况。结果显示, Lysin1902 蛋白主要在上清中表达。条带大约在 20 kDa 处出现目的条带,与预期蛋白大小一致(图 4)。

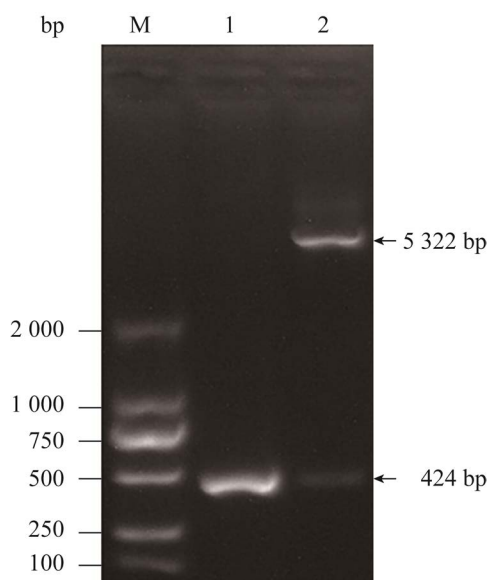
图 3 重组质粒 pET28a-*lysin1902* 的 PCR 及双酶切鉴定

Figure 3 PCR and double digestion identification of the recombinant plasmid pET28a-*lysin1902* M: Nucleic acid relative molecular mass standard (2 000 bp). 1: PCR identification of pET28a-*lysin1902*; 2: Identification of pET28a-*lysin1902* double enzyme digestion (*Bam*H I and *Xho* I).

利用微量紫外分光光度计对纯化的 Lysin1902 蛋白质量浓度进行测定, Lysin1902 蛋白溶液的质量浓度为 2.68 g/L。

## 2.4 Lysin1902 裂解谱测定

实验通过检测 22 株灭活菌株或活性菌株以明确 Lysin1902 裂解谱。实验结果如表 2 所示, Lysin1902 对所有检测的活菌株无显著裂解活性,

但对检测的 6 株大肠杆菌 O157:H7、大肠杆菌 41 YDH (O141)、CVCC195 (O8:K87)和 CVCC196 (O8:K87, K88ac)灭活菌株具有裂解活性。

## 2.5 Lysin1902 裂解大肠杆菌 O157:H7 灭活菌株活性检测

为了检测 Lysin1902 是否还保留大肠杆菌 O157:H7 EDL933 裂解活性, 通过点斑灭活菌株进行检测。实验结果如图 5 所示, Lysin1902 保留了裂解大肠杆菌 O157:H7 的活性。

## 2.6 Lysin1902 或 $\epsilon$ -PL 的抗菌活性检测

实验评估了 Lysin1902 或  $\epsilon$ -PL 对大肠杆菌 O157:H7 的抗菌活性。如图 6A 所示, Lysin1902 即使达到 1 mg/mL 无法显著抑制大肠杆菌 O157:H7。阳性对照和其他 endolysin 蛋白处理组  $OD_{600}$  值均接近 1.1。 $\epsilon$ -PL 的使用浓度达到 0.7 mg/mL 时基本抑制大肠杆菌 O157:H7 的生长(图 6B)。

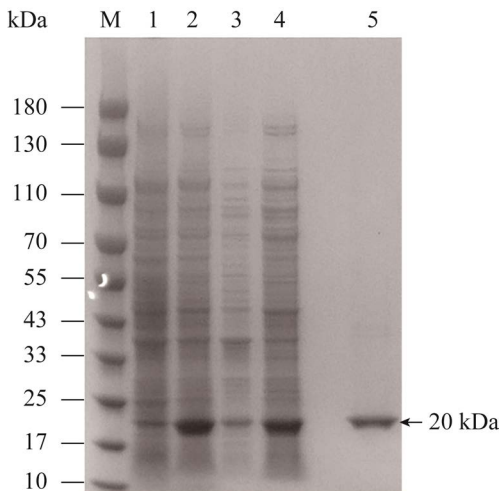


图 4 SDS-PAGE 检测 Lysin1902 蛋白在大肠杆菌 BL21 中的表达

Figure 4 Detection of Lysin1902 protein expression in *E. coli* BL21 by SDS-PAGE. M: Protein relative molecular mass standard (180 kDa). 1: Uninduced whole bacteria of pET28a-*lysin1902*/BL21; 2: IPTG-induced whole bacteria of pET28a-*lysin1902*/BL21; 3: IPTG induced bacterial precipitate of pET28a-*lysin1902*/BL21; 4: Bacterial supernatant after pET28a-*lysin1902*/BL21 IPTG induction; 5: Purified Lysin1902 protein.

表 2 Lysin1902 对 22 株菌株裂解能力检测

Table 2 Detection of Lysin1902 on the lysis ability of 22 strains

Strain	Serotype	Inactivated strain	Active strain
EHEC1	O157:H7	+	-
EHEC8	O157:H7	+	-
EHEC15	O157:H7	+	-
EHEC25	O157:H7	+	-
EHEC26	O157:H7	+	-
EHEC30	O157:H7	+	-
<i>E. coli</i> 14 (YDH)	O101	-	-
<i>E. coli</i> 41 (YDH)	O141	+	-
<i>E. coli</i> 72 (YDH)	O149	-	-
<i>E. coli</i> 175 (YDH)	O101	-	-
<i>E. coli</i> 202 (YDH)	O141	-	-
<i>E. coli</i> 514 (YDH)	O111	-	-
<i>E. coli</i> 554 (YDH)	O111	-	-
CVCC192	O149:K91, K88ac	-	-
CVCC195	O8:K87	+	-
CVCC196	O8:K87, K88ac	+	-
<i>Salmonella</i> 11 (LYX)	Unknown	-	-
<i>Salmonella</i> 123 (XGS)	Unknown	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 15-4	Unknown	-	-
<i>S. aureus</i> 15-9	Unknown	-	-
<i>S. suis</i> 7002	2	-	-
<i>S. suis</i> 40	9	-	-

+ indicates that Lysin1902 has lytic activity against the strains; - indicates that Lysin1902 does not have lytic activity against the strains.

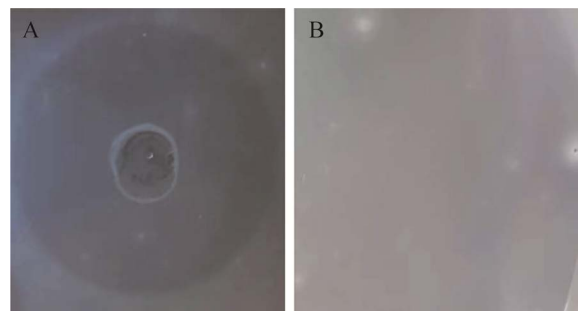


图 5 Lysin1902 裂解大肠杆菌 O157:H7 灭活菌株活性检测

Figure 5 Activity detection of Lysin1902 split *E. coli* O157:H7 inactivated strain. A: Experimental group. B: Negative control group.

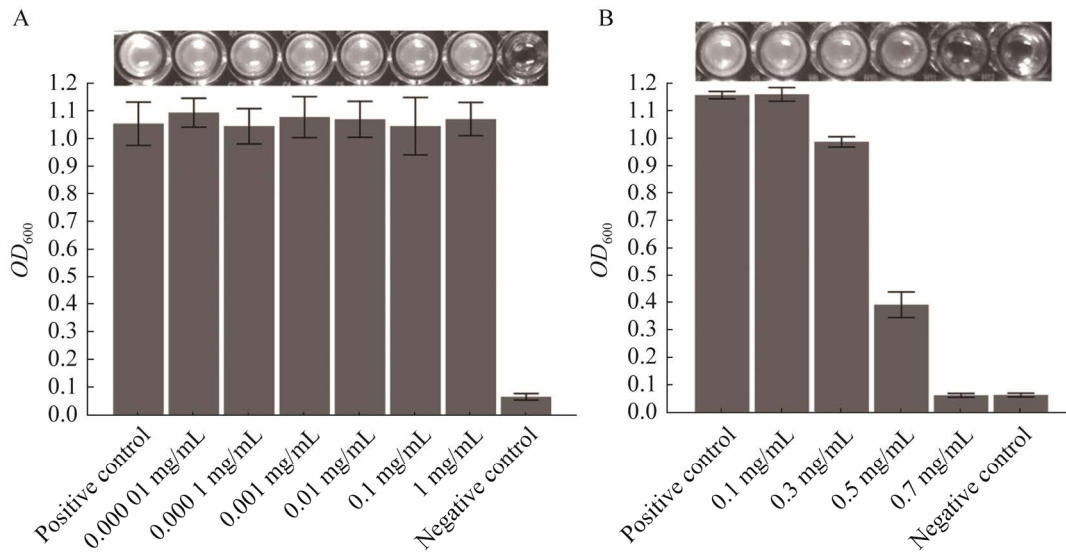


图 6 Lysin1902 和  $\epsilon$ -PL 抗大肠杆菌 O157:H7 活菌能力检测

Figure 6 Detection of the ability of Lysin1902 and  $\epsilon$ -PL to resist *Escherichia coli* O157:H7 viable bacteria. A: Analysis of the ability of Lysin1902 to resist *E. coli* O157:H7 viable bacteria. B: Analysis of the ability of  $\epsilon$ -PL to resist *E. coli* O157:H7 viable bacteria. The error bar indicated mean $\pm$ SD.

## 2.7 Lysin1902 与 $\epsilon$ -PL 联用效果评价

通过棋盘法检测 Lysin1902 与  $\epsilon$ -PL 联用的效果。结果显示, 当  $\epsilon$ -PL 的浓度达到 0.3 mg/mL 时, 其开始具有控制大肠杆菌 O157:H7 数量的能力, 浓度达到 0.7 mg/mL 时, 其能够完全控制大肠杆菌

O157:H7 增殖。但当加入 0.2 mg/mL 的 Lysin1902 后,  $\epsilon$ -PL 能够完全控制大肠杆菌 O157:H7 增殖的使用浓度降低到 0.1 mg/mL (图 7A)。细菌  $OD_{600}$  值也验证了相同的结果(图 7B)。 $\Sigma$ FIC=0.3, 实验结果表明两种抗菌剂之间具有强协同作用。

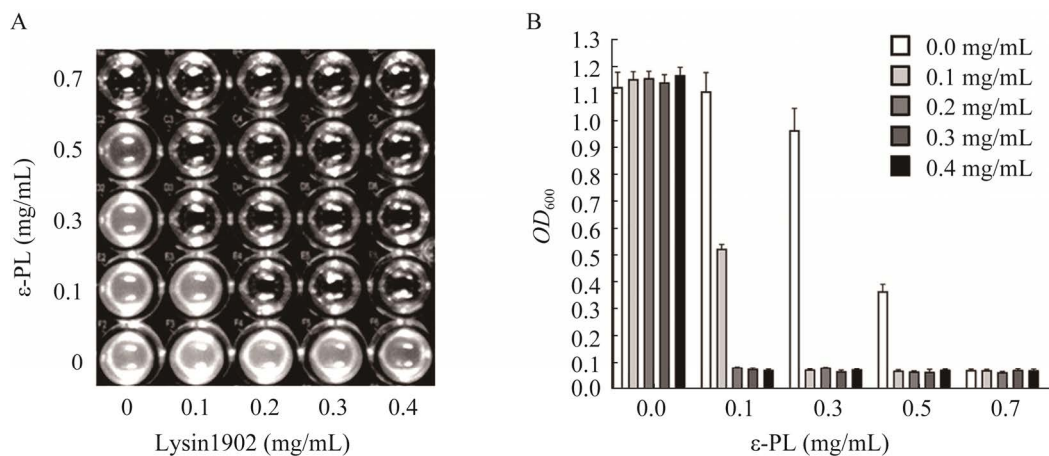


图 7 棋盘分析 Lysin1902 与  $\epsilon$ -PL 联用效果

Figure 7 Checkerboard analysis of the combined effect of Lysin1902 and  $\epsilon$ -PL. A: Detection of the combined effect of Lysin1902 and  $\epsilon$ -PL by 96-well plate. B:  $OD_{600}$  value of wells. The error bar indicated mean $\pm$ SD.



### 3 讨论

大肠杆菌 O157:H7 作为一种能够产生志贺毒素的病原菌,广泛存在于食品、食品加工厂和养殖环境等,时刻威胁食品安全和人类健康。抗生素的滥用会导致大肠杆菌 O157:H7 耐药性的产生,同时诱导细菌志贺毒素产出增加,加剧宿主病情<sup>[5,7]</sup>。噬菌体裂解酶是一种可以由内而外裂解细菌的小分子蛋白。相比于噬菌体,其应用的优势在于更宽的宿主谱以杀灭病原菌。同时,噬菌体裂解酶不会诱导大肠杆菌 O157:H7 志贺毒素产生的增加。这表明通过噬菌体裂解酶防控大肠杆菌 O157:H7 具有巨大潜在价值。目前,已有大量报道关于噬菌体裂解酶应用于防控大肠杆菌 O157:H7 的研究<sup>[20-22]</sup>。然而,细菌外膜的存在导致噬菌体裂解酶不能有效到达相应部位发挥作用。通过裂解酶人工改造虽然是一种行之有效的方法以弥补这一缺陷,然而,这无疑会增加研发成本,并且人工改造蛋白应用需要更多的安全评估。通过噬菌体裂解酶与  $\epsilon$ -PL 等抗菌剂的联用可以有效解决相关问题,但目前鲜有研究。

本研究成功表达了噬菌体 PNJ1902 裂解酶 Lysin1902。虽然 Lysin1902 蛋白氨基酸序列与 T5 类噬菌体大肠杆菌噬菌体 vB\_EcoS\_AKFV33 氨基酸序列同源性为 100%,但其裂解酶未见表达。研究发现该蛋白存在一个 Zn 离子、137 个氨基酸、稳定性高、无跨膜结构域且无信号肽序列。该酶与 T5 类噬菌体大肠杆菌噬菌体 vB\_EcoS\_AKFV33 具有较高亲缘性,属于 T5 类噬菌体裂解酶家族<sup>[23]</sup>。

为确定原核表达 Lysin1902 裂解活性,本研究从 Lysin1902 裂解大肠杆菌 O157:H7 灭活菌株和活菌株两个方面进行验证。实验结果显示, Lysin1902 可以有效裂解灭活后的大肠杆菌(图

5A),但不能有效裂解活的大肠杆菌(图 6A)。实验结果表明,通过原核表达的 Lysin1902 具有裂解细菌活性,但该蛋白不能穿越细菌外膜。同时,本研究也检测了 Lysin1902 对其他灭活菌株和活性菌株的裂解活性。实验结果显示, Lysin1902 对 22 种活性菌株均未显示出裂解活性,同时对 *Salmonella* 和 *S. aureus* 等非大肠杆菌灭活菌株无裂解活性。但是, Lysin1902 对选择的 6 种大肠杆菌 O157:H7 灭活菌株均表现出裂解活性,同时也裂解灭活大肠杆菌 O8 和 O141 等血清型。上述研究结果表明, Lysin1902 具有广泛裂解大肠杆菌 O157:H7 等血清型的潜力,但其需要其他抗菌剂协助其穿过细菌外膜。前期杨曦等<sup>[24]</sup>已经得到了天然能够裂解活性大肠杆菌 O157:H7 的噬菌体裂解酶 LysEC1,该酶也显示出了对不同血清型大肠杆菌的裂解活性。但是,与 LysEC1 类似裂解酶非常难于得到,多数裂解酶类似于 Lysin1902,其本身难于穿过细菌外膜。拓宽 Lysin1902 这类裂解酶的应用价值具有很大意义。

$\epsilon$ -PL 作为食品工业具有高应用价值的抗菌剂,在本研究中检测了其大肠杆菌 O157:H7 杀灭能力。实验结果显示,加入 0.2 mg/mL 的 Lysin1902 后,  $\epsilon$ -PL 能够完全控制大肠杆菌 O157:H7 增殖的使用浓度由 0.7 mg/mL 降低到 0.1 mg/mL。由 0.2 mg/mL Lysin1902 和 0.1 mg/mL  $\epsilon$ -PL 组合计算得到清除大肠杆菌 O157:H7 能力的  $\Sigma$ FIC=0.3<0.5(图 7)。同时,这种组合可有效抑制大肠杆菌 O157:H7 至少 12 h(图 8)。这与 Ning 等<sup>[19]</sup>研究结果相似。其研究发现,添加 60 U/mL 噬菌体裂解酶 Lysqdv001 后,  $\epsilon$ -PL 完全控制副溶血性弧菌的使用浓度由 0.8 mg/mL 降低到 0.2 mg/mL。有研究发现,大肠杆菌 O157:H7 细胞中的活性氧(ROS)<sup>3</sup>水平与  $\epsilon$ -PL 浓度呈正相关<sup>[15]</sup>。此外,添加抗氧化剂 N-乙酰半

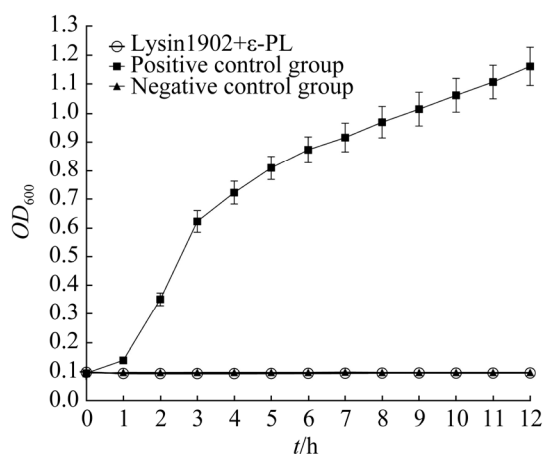


图8 Lysin1902与 $\epsilon$ -PL联用对大肠杆菌O157:H7抑制效果监测

Figure 8 Monitoring of the inhibitory effect of Lysin1902 combined with  $\epsilon$ -PL on *E. coli* O157:H7. The error bar indicated mean $\pm$ SD.

胱氨酸后, 大肠杆菌 O157:H7 的死亡率降低。同时, 在  $\epsilon$ -PL 处理后, 大肠杆菌 O157:H7 氧化应激基因 *sodA* 和 *oxyR* 的表达水平分别上调 4 倍和 16 倍, 而毒力基因 *eaeA* 和 *espA* 下调。DNA 损伤反应(SOS 反应) 5 个调节子基因 *recA* 和 *lexA* 的表达也受到  $\epsilon$ -PL 的影响<sup>[15]</sup>。研究表明,  $\epsilon$ -PL 对大肠杆菌 O157:H7 的抗菌机制可能归因于对膜完整性的干扰、ROS 的氧化应激以及对各种基因表达的影响。本研究目的是评估 Lysin1902 和  $\epsilon$ -PL 的联合作用, 研究结果也表明了两者的组合具有高效的协同杀菌作用。推测这是通过  $\epsilon$ -PL 破坏大肠杆菌 O157:H7 外膜后, Lysin1902 和  $\epsilon$ -PL 共同杀灭细菌实现的。研究结果充分证明, 噬菌体裂解酶与  $\epsilon$ -PL 联合作用于病原菌具有高效、成本低廉、安全等优点, 其真正应用价值值得更深一步研究。

## 参考文献

- [1] PULIGUNDLA P, LIM S. Biocontrol approaches against *Escherichia coli* O157: H7 in foods[J]. Foods: Basel, Switzerland, 2022, 11(5): 756.
- [2] LI YK, CHEN H, SHU M, ZHONG C, BI Y, YANG HH, WU GP. Isolation, characterization and application of an alkaline resistant virulent bacteriophage JN01 against *Escherichia coli* O157: H7 in milk and beef[J]. LWT, 2021, 144: 111266.
- [3] O'FLYNN G, ROSS RP, FITZGERALD GF, COFFEY A. Evaluation of a cocktail of three bacteriophages for biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(6): 3417-3424.
- [4] VIDOVIC S, TSOI S, MEDIHALA P, LIU J, WYLIE JL, LEVETT PN, KORBER DR. Molecular and antimicrobial susceptibility analyses distinguish clinical from bovine *Escherichia coli* O157 strains[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2013, 51(7): 2082-2088.
- [5] YANG X, WU YN, LIU Q, SUN H, LUO M, XIONG YW, MATUSSEK A, HU B, BAI XN. Genomic characteristics of Stx2e-producing *Escherichia coli* strains derived from humans, animals, and meats[J]. Pathogens: Basel, Switzerland, 2021, 10(12): 1551.
- [6] UM MM, BARRAUD O, KEROUREDAN M, GASCHET M, STALDER T, OSWALD E, DAGOT C, PLOY MC, BRUGERE H, BIBBAL D. Comparison of the incidence of pathogenic and antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains in adult cattle and veal calf slaughterhouse effluents highlighted different risks for public health[J]. Water Research, 2016, 88: 30-38.
- [7] MODY RK, GRIFFIN PM. Editorial commentary: Increasing evidence that certain antibiotics should be avoided for shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections: More data needed[J]. Clinical Infectious Diseases, 2016, 62(10): 1259-1261.
- [8] COLAVECCHIO A, GOODRIDGE LD. Phage therapy approaches to reducing pathogen persistence and transmission in animal production environments: opportunities and challenges[J]. Microbiology Spectrum, 2017, 5(3). DOI: 10.1128/microbiolspec.PFS-10.1128/microbiolspec0017-2017.
- [9] GONDIL VS, HARJAI K, CHHIBBER S. Endolysins as emerging alternative therapeutic agents to counter drug-resistant infections[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2020, 55(2): 105844.
- [10] WANG WY, LI MZ, LIN H, WANG JX, MAO XZ. The *Vibrio parahaemolyticus*-infecting bacteriophage qdvp001: Genome sequence and endolysin with a modular structure[J]. Archives of Virology, 2016, 161(10): 2645-2652.

- [11] 解天慧, 石慧. 大肠杆菌 O157 : H7 噬菌体 EC-p9 的内溶酶和穿孔素的特性预测及克隆表达[J]. 食品与发酵工业, 2021(9): 107-113.  
XIE TH, SHI H. Characteristics prediction and expression of endolysin and holin from *E. coli* O157 : H7 phage EC-p9[J]. Food and Fermentation Industries, 2021(9): 107-113 (in Chinese).
- [12] 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-e01314.
- [13] HESELPOTH RD, EULER CW, SCHUCH R, FISCHETTI VA. Lysocins: bioengineered antimicrobials that deliver lysins across the outer membrane of gram-negative bacteria[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2019, 63(6): e00342-e00319.
- [14] YAN GM, LIU JF, MA Q, ZHU RN, GUO ZM, GAO CC, WANG S, YU L, GU JM, HU DL, HAN WY, DU R, YANG JL, LEI LC. The N-terminal and central domain of colicin A enables phage lysin to lyse *Escherichia coli* extracellularly[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2017, 110(12): 1627-1635.
- [15] YE RS, XU HY, WAN CX, PENG SS, WANG LJ, XU H, AGUILAR ZP, XIONG YH, ZENG ZL, WEI H. Antibacterial activity and mechanism of action of  $\epsilon$ -poly-l-lysine[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2013, 439(1): 148-153.
- [16] WANG DH, WANG HM, WU JP, HOU YX, SUN JR, YUAN JF, GU SB. Biotechnological production and application of epsilon-poly-L-lysine ( $\epsilon$ -PL): Biosynthesis and its metabolic regulation[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2022, 38(7): 123.
- [17] JIAO WX, LIU X, CHEN QM, DU YM, LI YY, YUE FL, DONG XQ, FU MR. *Epsilon*-poly-l-lysine ( $\epsilon$ -PL) exhibits antifungal activity *in vivo* and *in vitro* against *Botrytis cinerea* and mechanism involved[J]. Postharvest Biology and Technology, 2020, 168: 111270.
- [18] WANG YX, SUBEDI D, LI J, WU JL, REN JL, XUE F, DAI JJ, BARR JJ, TANG F. Phage cocktail targeting STEC O157: H7 has comparable efficacy and superior recovery compared with enrofloxacin in an enteric murine model[J]. Microbiology Spectrum, 2022, 10(3): e0023222.
- [19] NING HQ, LIN H, WANG JX. Synergistic effects of endolysin Lysqdv001 and  $\epsilon$ -poly-lysine in controlling *Vibrio parahaemolyticus* and its biofilms[J]. International Journal of Food Microbiology, 2021, 343: 109112.
- [20] MICHAEL L, DAVID C, SALIM I, CRAIG B, CI DR. The structure and function of modular *Escherichia coli* O157: H7 bacteriophage FTBEc1 endolysin, LysT84: Defining a new endolysin catalytic subfamily[J]. The Biochemical Journal, 2021, 479(2): 207-223.
- [21] LOVE MICHAEL J, DAVID C, MANNERS SARAH H, ABEYSEKERA GAYAN S, CRAIG B, DOBSON RENWICK CJ. The molecular basis for *Escherichia coli* O157: H7 phage FAHEc1 endolysin function and protein engineering to increase thermal stability[J]. Viruses, 2021, 13(6): 1101.
- [22] PARK DW, PARK JH. Characterization of endolysin LysECP26 derived from rV5-like phage vB\_EcoM-ECP26 for inactivation of *Escherichia coli* O157: H7[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2020, 30(10): 1552-1558.
- [23] PROKHOROV DA, MIKOULINSKAIA GV, MOLOCHKOV NV, UVERSKY VN, KUTYSHENKO VP. High-resolution NMR structure of a  $Zn^{2+}$ -containing form of the bacteriophage T5 l-alanyl-d-glutamate peptidase[J]. RSC Advances, 2015, 5(51): 41041-41049.
- [24] 杨曦, 吉文汇, 曹冬梅, 孙建和, 严亚贤. 大肠杆菌 O157 Stx 噬菌体裂解酶的克隆表达及活性分析[J]. 上海交通大学学报: 农业科学版, 2012(4): 25-30.  
YANG X, JI WH, CAO DM, SUN JH, YAN YX. Expression and antibacterial activity of stx phage endolysin of *Escherichia coli* O157[J]. Journal of Shanghai Jiao Tong University: Agricultural Science, 2012(4): 25-30 (in Chinese).