论著

文章编号:1000-5404(2008)13-1268-04

铜绿假单胞菌噬菌体 PaP1 内溶素基因克隆、表达及活性分析

孙卫忠,胡晓梅,饶贤才,谭银玲,陈志谨,丛延广,胡福泉 (第三军医大学基础医学部微生物学教研室,重庆市微生物工程实验室,重庆 400038)

摘 要:目的 构建铜绿假单胞菌噬菌体内溶素重组原核表达载体,检测重组蛋白的酶学活性及抑菌活性。方法 利用重组技术将铜绿假单胞菌裂解性噬菌体 PaP1 内溶素基因构建到表达载体 pQE31 中,并在大肠杆菌 M15(pREP4)中诱导表达,通过非变性方法纯化重组融合蛋白,利用酶谱电泳、抑菌实验等技术检测酶学活性及抑菌活性。结果 酶谱电泳方法结果显示重组融合蛋白对铜绿假单胞菌细胞壁肽聚糖有降解作用,抑菌活性检测结果显示重组融合蛋白对金黄色葡萄球菌有一定的抑菌效果。结论 该研究从实验方面证实了噬菌体 PaP1 内溶素基因的生物学功能。

关键词:噬菌体;内溶素;基因表达;活性鉴定
中图法分类号:Q939.48;R378.991;R394-33 文献标识码:A

Cloning, expression and enzymatic assay of bacteriophage PaP1 endolysin against *Pseudomonas aeruginosa*

SUN Wei-zhong, HU Xiao-mei, RAO Xian-cai, TAN Yin-ling, CHEN Zhi-jin, CONG Yan-guang, HU Fu-quan (Department of Microbiology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct, express and purify recombinant endolysin of *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) bacteriophage PaP1, and detect its enzymatic activity and antibacterial activity. Methods The objective endolysin fragment of bacteriophage PaP1 was amplified from the genome, and then cloned into the expression vector pQE31. Then the fusion protein expressed in *E. coli* M15(pREP4) and purified under native conditions. The enzymatic activity was detected by zymography assay and its biological activity was detected by antibacterial activity assay. Results Enzymatic assay showed that the recombinant protein could cause the lysis of the purified *P. aeruginosa* peptidoglycan. Antibacterial activity assay showed that the recombinant protein inhibited the growth of *Staphylococcus aureus*. Conclusion The obtained phage endolysin exerts antibacterial activity to *P. aeruginosa*.

Key words: bacteriophage; endolysin; gene expression; enzymatic activity

噬菌体是细菌的一类病毒,而控制双链 DNA 噬菌体进出宿主细胞的物质是一类由噬菌体编码的蛋白,这类蛋白被称作内溶素或肽聚糖解聚酶(endolysin 或者 lysin)[1]。内溶素具有特异的破坏宿主细胞壁的功能,因而有可能成为某些致病细菌特别是某些耐药细菌潜在的抗感染药物。本室在前期工作中完成了铜绿假单胞菌裂解性噬菌体 PaP1 的部分基因组测序[2,3],对已经完成测序的基因组序列分析显示一内溶素同源基因,该基因编码的氨基酸序列与已知的铜绿假单胞菌噬菌体 phiCTX 编码的内溶素有较高的相似性[Identities = 98/186 (52%), Positives = 126/186 (67%)]。基于内溶素的研究背景,本实验对噬菌体 PaP1 内溶素基因进行克隆、表达,同时对表达的重组融合蛋白进行纯化及功能分析,以鉴定铜绿假单胞菌噬菌体 PaP1 内溶素是否也具有与 phiCTX 相同的功能。

1 材料与方法

1.1 主要菌株、噬菌体、质粒及试剂

铜绿假单胞菌 PA6、噬菌体 PaP1、大肠杆菌 JM109、大肠杆菌 M15 (pREP4)、金黄色葡萄球菌 (ATCC 25923)均由本实验室保存;溶壁微球菌(*micrococcus lysodeikticus*)购自广东微生物研究所菌种保藏中心;限制性内切酶 *Bam*HⅠ,*Sma*Ⅰ、T_4 DNA 连接酶,PCR 相关试剂(*Taq* 酶、dNTP、RNase)及克隆载体 pMD18-T 均购自大连宝生公司;表达载体 pQE31 购自德国 Qiagen 公司;鸡溶菌酶标准品购自美国 Amresco 公司;丙烯酰胺及

基金项目:国家自然科学基金(30300295)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30300295)
作者简介:孙卫忠,男,山东省禹城市人,博士,讲师,主要从事功能基因组方面的研究。电话:(023)68752239,E-mail:sun_weizhong05@126.com
通信作者:胡福泉,电话:(023)68752240
收稿日期:2007-10-17;修回日期:2008-01-12

N，N′-亚甲双丙烯酰胺为美国 Promega 公司产品。

1.2　主要仪器设备

高速台式冷冻离心机购自德国 Sigma 公司；PCR 仪器（PCR Sprint）购自英国 Hybaid 公司；蛋白质电泳仪、蛋白质纯化分离系统购自美国 Bio-Rad 公司。

1.3　内溶素基因的克隆与表达载体的构建

1.3.1　引物的设计与合成　　根据噬菌体 PaP1 内溶素基因序列设计引物，由上海生物工程公司合成。正向引物：5′-GGATCCGAGTATCAAAA ATG GCTCTAACTG-3′，反向引物：5′-CCCGGGAT TTA CTTGAAGGATTGATAGG-3′，在正反向引物端分别设计限制性内切酶 *Bam*H Ⅰ 与 *Sma* Ⅰ 的酶切位点（序列中下划线部分、加框部分分别为内溶素基因的起始密码子和终止密码子）。

1.3.2　PCR 反应　　以噬菌体 PaP1 基因组为模板，进行 PCR 扩增，首先，94 ℃ 预变性 4 min，然后进入循环，循环参数为：94 ℃ 变性 30 s，55 ℃ 复性 60 s，72 ℃ 延伸 90 s，共 30 个循环，末次循环自动延伸 10 min。取 5 μl 扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3.3　内溶素基因的克隆　　取 PCR 扩增产物 3 μl，按比例（2∶1）与克隆载体 pMD18-T（含有氨苄青霉素抗性基因）连接。连接反应液转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞，经含抗生素（氨苄青霉素 50 mg/L）的 LB 固体培养基筛选。提取阳性克隆的质粒 DNA，经限制性内切酶 *Bam* H Ⅰ 与 *Sma* Ⅰ 双酶切及 PCR 方法鉴定正确。

1.3.4　表达载体的构建　　将酶切片段与同样双酶切的 pQE31 表达载体连接，连接反应液转化至大肠杆菌 M15（pREP4）感受态细胞，经 LB 固体培养基筛选。提取阳性重组质粒 DNA。经双酶切、PCR 等鉴定正确后，阳性质粒送大连宝生公司测序。

1.4　融合蛋白的诱导表达及纯化

1.4.1　诱导表达　　挑取验证无误的阳性质粒转化宿主菌 M15（pREP4），接种于 10 ml 的 LB 液体培养基中（氨苄青霉素 50 mg/L，卡那霉素 25 mg/L），37 ℃ 过夜培养。取 5 ml 培养菌液，接种于 100 ml 的 LB 液体培养基中，继续培养 3 ~ 4 h。加入 IPTG（终浓度 0.5 mmol/L）诱导表达 10 h，并每隔 1 h 取 100 μl 菌液样品，SDS-PAGE 检测表达最适时期。

1.4.2　纯化　　在最适表达时期，将诱导表达的菌液 100 ml 8 000 × *g* 离心 5 min，加入 10 ml 裂解液（mmol/L，NaH_2PO_4 50，NaCl 300，咪唑 10；0.05% 吐温 20）和 10 μl 蛋白酶抑制剂 PMSF。超声破碎细菌，裂解产物 15 000 × *g* 离心 30 min，除去沉淀（以上所有纯化步骤均在 0 ~ 4℃ 条件下完成）。制备好的上清样品直接通过 Ni-NTA 层析介质，用清洗液（mmol/L，NaH_2PO_4 50，NaCl 300，咪唑 20）去除非特异结合的杂蛋白，最后用洗脱液（mmol/L，NaH_2PO_4 50，NaCl 300，咪唑 250）收集洗脱峰，12% SDS-PAGE 检测分析。纯化的融合蛋白经 Sephadex G75 分子筛脱盐后，冻干保存。

1.5　酶作用底物铜绿假单胞菌细胞壁肽聚糖的提取

实验操作方法采用已有方法并做适当改进[4]　挑取铜绿假单胞菌 PA6 菌株单菌落，接种于 10 ml 的 LB 液体培养基中 37℃ 过夜培养。将菌液接种于 100 ml 的 LB 液体培养基中继续培养至对数生长期［*D*（600）为 0.6 ~ 0.7］，然后接种于 2 L 发酵罐中继续培养 8 ~ 10 h。4 ℃ 条件下 8 000 × *g* 离心 15 min，收集细菌沉淀。用 100 ml，pH = 6.5 的磷酸缓冲液（mmol/L，磷酸钠 10，磷酸钾 2，NaCl 137，KCl 2.7）洗涤沉淀 2 次，然后用 100 ml 灭菌双蒸水（pH = 6.0）重悬沉淀，加入十二烷基硫酸钠（SDS）至终浓度 4%，沸水浴中处理 45 min。室温条件下 40 000 × *g* 离心 1 h，得到的沉淀用灭菌双蒸水反复洗涤除去 SDS。用灭菌双蒸水洗涤 2 次并用 10 ml 双蒸水重悬，加入胰蛋白酶（终浓度 200 μg/ml），在 37℃ 条件下消化 16 h 除去细胞壁上附着的脂蛋白。40 000 × *g* 室温高速离心 1 h，沉淀后用灭菌双蒸水洗涤 2 次最后冻干备用。

1.6　酶谱法鉴定重组蛋白活性

酶谱法是一种基于 SDS-PAGE 电泳后通过复性手段检测酶活性的方法[5]，其核心操作是将底物加入到电泳胶中，酶蛋白经电泳复性后作用于底物，底物肽聚糖经亚甲基蓝染色后背景呈天蓝色。如果底物被降解，则经过脱色后，在降解处形成透明圈或者透明带。操作方法简述如下：将所提取的铜绿假单胞菌细胞壁肽聚糖高压灭菌后按比例（0.2% ~ 0.4%）与 12% SDS-PAGE 充分混合制备电泳胶。样品（含鸡溶菌酶阳性对照）经上样、电泳完毕后，将电泳胶取下在灭菌双蒸水中浸泡 30 min，转移到复性缓冲液中（0.1% TritonX -100，10 mmol/L PBS，pH = 6.5）在 37℃ 条件下继续缓慢振荡培育 16 h。然后加入染色液（0.01% KOH，0.1% 亚甲基蓝）染色 2 h，最后用双蒸水脱色。

1.7　生长抑制检测（平板扩散法）[6]

分别取对数生长期的铜绿假单胞菌、大肠杆菌 JM109、金黄色葡萄球菌和溶壁微球菌 10 ml 菌液，5 000 × *g* 离心沉淀后称湿重。细菌沉淀用 pH 值 6.5 的磷酸缓冲液（mmol/L，磷酸钠 10，磷酸钾 2，NaCl 137，KCl 2.7）重悬（100 mg/ml）。将 1 ml 各种细菌悬浮液（约 1 mg/ml）分别与 10 ml 预融的 LB 琼脂固体培养基（1.5% 琼脂）混匀后注入培养皿中，待培养基凝固冷却后用灭菌打孔器在培养基上均匀打孔。每个孔中分别加入 20 μl 不同时期纯化的蛋白样品（10 mg/ml），同时设置等体积的小牛血清白蛋白（BSA，10 mg/ml）阴性对照和阳性对照鸡溶菌酶（HEWL，10 mg/ml），37 ℃ 培养过夜。

2　结果

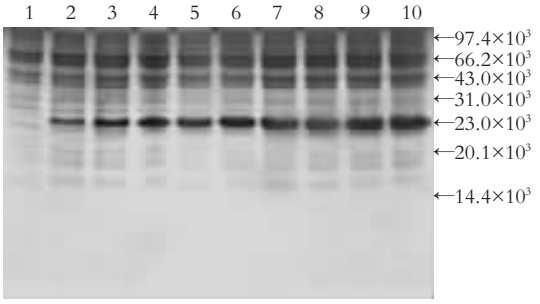
2.1　内溶素基因的克隆与表达载体的构建

对构建的内溶素重组克隆载体 pMD18-T 测序，发现目的基因编码的开放阅读框大小为 561 bp，序列与已测的序列完全一致。将目的片断插入表达载体 pQE31，得到的重组基因翻译区全长为 609 bp，共编码 202 个氨基酸残基，预测融合蛋白相对分子质量为 22.8×10^3，其中在 N-端含有 6 个连续的组氨酸残基的亲和标签。

2.2　内溶素的表达与纯化

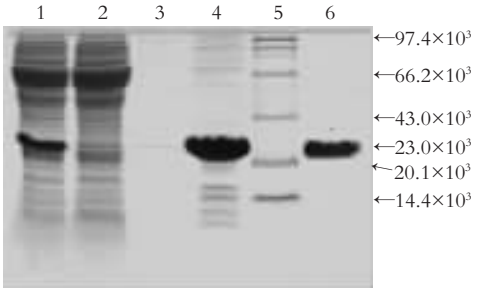
将 pQE31-ELYS/ M15（pREP4）重组工程菌经 IPTG（0.5 mmol/L）诱导后，分别收集不同诱导时间产物，SDS-PAGE 检测。结果显示，重组融合蛋白在诱导 6 h 后高水平表达（约占细胞总蛋白 20%），表达产物大小约 23×10^3，这与预测的大小基本一致（图 1）。表达产物经超声裂菌后分别收集上清和沉

淀，经 SDS 检测分析显示约 80% 的融合蛋白存在于上清中。上清经 Ni-NTA 亲和层析及分子筛脱盐后，收集不同浓度咪唑洗脱峰及 Sephadex G75 分子筛脱盐洗脱峰样品，SDS-PAGE 电泳检测显示为单一的目的蛋白带（图 2）。



1：阴性对照；2～10：重组质粒转化菌经 IPTG 诱导后 1～9 h 的产物

图 1 SDS-PAGE 检测经 IPTG 诱导的阳性重组子表达

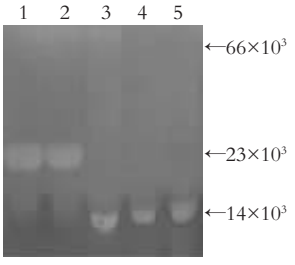


1：细菌超声裂解上清；2：镍离子柱亲和穿过峰；3，4：咪唑洗脱峰（浓度分别为 20、250 mmol/L）；5：蛋白质标准；6：分子筛 Sephadex G75 脱盐洗脱峰

图 2 SDS-PAGE 检测非变性方法纯化的各种样品

2.3 酶谱法检测酶活性

目的蛋白经 SDS-PAGE 电泳、亚甲基蓝染色、双蒸水脱色后，在 23×10^3 附近形成一透明带，同时在阳性对照（HEWL）处也发现类似的透明带，而阴性对照（BSA）无透明带。因此推断目的蛋白可以将铜绿假单胞菌细菌细胞壁肽聚糖层解离。根据同步处理的普通 SDS-PAGE 电泳检测，目的蛋白及阳性、阴性对照与酶谱法处理条件下的电泳迁移位置一致（图 3）。

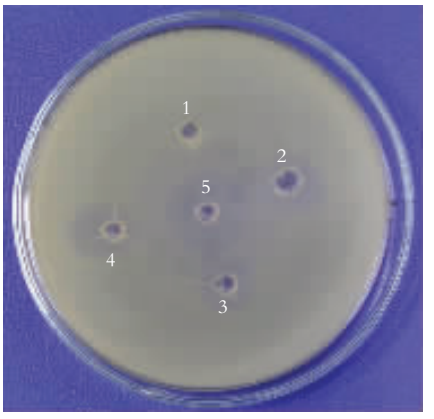


1，2：目的蛋白；3，4：HEWL 阳性对照；5：BSA 阴性对照

图 3 酶谱法检测重组蛋白活性

2.4 目的蛋白对多种细菌的生长抑制检测

将不同时间段分离得到的目的蛋白及对照样品分别处理 2 种革兰阳性细菌（金黄色葡萄球菌和溶壁微球菌）及 2 种革兰阴性细菌（铜绿假单胞菌和大肠杆菌 JM109）。结果显示，阴性对照（HEWL）只对革兰阳性细菌具有抑制作用，目的蛋白只对金黄色葡萄球菌具有抑制现象，阴性对照（BSA）对 4 种细菌均没有抑制现象。根据形成的抑菌圈大小可以看出：HEWL 对金黄色葡萄球菌的抑菌圈最明显，随着保存时间的延长，目的蛋白对金黄色葡萄球菌的抑制效果逐渐下降（图 4）。



1：BSA；2～4：纯化重组蛋白（保存时间分别为 1、4、12 周）；5：HEWL

图 4 纯化重组蛋白的抑菌效果

3 讨论

本实验构建的重组表达载体经 IPTG 诱导后，表达产物主要以可溶性状态存在，而以包含体形式存在较少。一般认为：包含体的产生主要是由于表达产物的不正确折叠所致，而影响包含体形成的因素主要有：细胞内伴侣蛋白和折叠酶的活性、细菌培养温度、目的蛋白的表达量、细胞内环境的 pH 值等。此外还有一个重要因素，蛋白质中某些氨基酸残基（尤其是半胱氨酸）的改变可能会显著改变蛋白质的整体构象，从而使其容易受细胞内折叠机制的影响而难以进行正确折叠。本实验构建的重组蛋白能够可溶性表达的原因可能是：在编码的蛋白质序列中只有一对半胱氨酸残基，如果目的蛋白正确折叠时形成的共价二硫键为分子内共价键，则二硫键对蛋白的正确折叠影响可能不大。另外，本实验得到的重组蛋白表达量占细菌蛋白总量的 20% 左右，宿主菌可能有足够的能力进行正确折叠也是重组融合蛋白可溶性表达的原因之一。

一般来说，每种噬菌体都具有宿主的专一性，而利用噬菌体编码的内溶素从菌体外界作用于细菌时，其作用的细菌种类较少，一般仅对宿主菌具有特异作用[1]。有几种因素可能与内溶素的专一性有关，一种因素是有些细菌的细胞壁具有独特的化学键，而这种化学键是内溶素的作用位点，另外一种因素是有的宿主菌细胞壁上含有内溶素识别及结合的特异位点或结构[7]。但也存在特例，比如解淀粉芽孢杆菌噬菌体的内溶素可以抑制铜绿假单胞菌的生长，其原因可能是铜绿假单胞菌的细胞壁外膜上含有内溶素特异结合的位点[8]。本研究对获得的铜绿假单胞菌噬菌体 PaP1 内溶素重组蛋白进行肽聚糖解聚和抑菌作用检测。结

果表明,尽管该重组蛋白对宿主菌的细胞壁肽聚糖提取物有明显的降解作用,并且对金黄色葡萄球菌的生长也有一定的抑制作用,但是,该重组蛋白的直接抑菌效果较弱,并且对其他革兰阳性细菌及革兰阴性细菌没有作用。一种推测是噬菌体 PaP1 仅在感染宿主菌时利用该内溶素破坏宿主细胞壁肽聚糖层,作用方式温和,不会引起宿主的瞬时死亡。另外一种可能是,铜绿假单胞菌为革兰阴性细菌,在细胞壁外侧还有一层外膜,细胞外膜作为屏障在空间上阻碍了内溶素作用于细胞壁肽聚糖层。因此采用从菌体外界直接将该内溶素重组蛋白作用于铜绿假单胞菌效果并不明显,而将宿主菌外膜除去可实现酶学活性。

根据报道,大部分噬菌体的内溶素由于缺少信号肽不能够穿透宿主细胞膜,通常需要噬菌体编码的一种穴蛋白(Holin)辅助才能够穿过宿主细胞膜,进入周间质进而作用于宿主细胞壁肽聚糖层[9,10]。对已测噬菌体 PaP1 部分基因组序列分析时未发现类似的穴蛋白基因或相似片段,推测该噬菌体的穴蛋白基因可能位于未测基因组序列上或者有其他基因调控内溶素的酶学活性,但这种推测还有待于噬菌体 PaP1 全基因组测序完成之后才能证实。另外,目前对内溶素的最适反应条件(比如离子浓度、pH 值等因素)尚未摸索成熟,还需在后续实验中进一步完善。

总之,本实验初步证明了噬菌体 PaP1 内溶素具有肽聚糖解聚功能和抑菌活性。根据研究结果,尽管目前该内溶素抑菌效果不明显,还不具有直接应用于抗微生物感染价值。但从分析来看,如果采用适当的手段去除革兰阴性细菌外膜或者发现介导该内溶素穿过宿主菌外膜的物质,则此类噬菌体内溶素将在抗感染方面具有深远的应用前景。

参考文献:

[1] Young R. Bacteriophage lysis: mechanism and regulation[J]. Microbiol Rev, 1992, 56(3): 430-481.
[2] 李 明, 申晓冬, 丛延广, 等. 难测序噬菌体基因组 PaP1 的大片段克隆及测序[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(6): 539-542.
[3] 李 明, 申晓冬, 周莹冰, 等. 铜绿假单胞菌噬菌体 PaP1 生物学特性的研究[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(9): 860-863.
[4] Clarke A J. Extent of peptidoglycan O acetylation in the tribe Proteeae [J]. J Bacteriol, 1993, 175(14): 4550-4553.
[5] Strating H, Clarke A J. Differentiation of bacterial autolysins by zymogram analysis[J]. Anal Biochem, 2001, 291(1): 149-154.
[6] Grinde B, Jolles J, Jolles P. Purification and characterization of two lysozymes from rainbow trout (Salmo gairdneri) [J]. Eur J Biochem, 1988, 173(2): 269-273.
[7] Borysowski J, Weber-Dabrowska B, Gorski A. Bacteriophage endolysins as a novel class of antibacterial agents[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2006, 231(4): 366-377.
[8] Morita M, Tanji Y, Orito Y, *et al*. Functional analysis of antibacterial activity of Bacillus amyloliquefaciens phage endolysin against Gram-negative bacteria[J]. FEBS Lett, 2001, 500(1-2): 56-59.
[9] Grundling A, Blasi U, Young R. Biochemical and genetic evidence for three transmembrane domains in the class I holin, lambda S[J]. J Biol Chem, 2000, 275 (2): 769-776.
[10] Ziedaite G, Daugelavicius R, Bamford J K, *et al*. The Holin protein of bacteriophage PRD1 forms a pore for small-molecule and endolysin translocation[J]. J Bacteriol, 2005, 187(15): 5397-5405.

(编辑 薛国文)

文章编号:1000-5404(2008)13-1271-01

个案与短篇

中医治疗急腹症 1 例

陈 义 (贵州省思南县民族中医院中医科,贵州 思南 565100)

1 临床资料

患者,女性,60 岁,2003 年 7 月 1 日入院,自述四肢酸软,腹胀 4 d,精神萎靡不振,便秘 3 d。查腹膨隆,腹软无压痛、反跳痛,肝脾未扪及,血常规及电解质检查正常,患 2 型糖尿病 7 年,查血糖 10.8 mmol/L,给予二甲双胍、优降糖、青霉素和氨苄青霉素针静滴,并予生脉注射液静滴。治疗 3 d 后,患者自觉症状无明显改善,复查血糖升为 12.6 mmol/L,并加用胰岛素静滴,口服生地、石斛、玉竹、北沙参等滋阴清热的中药,2 d 后血糖降为 8.8 mmol/L,但腹胀症状未改善,并感胸闷而喘、恶心呕吐,不思饮食,食后腹胀、腹痛更为明显,查血清胰淀粉酶 130 U/L,嘱其禁食,患者次日无明显好转,并感皮肤发痒,小便黄,查肝功能转氨酶升至 64 U,黄疸指数为 18 U,血糖又升为 11.8 mmol/L,诊断考虑为糖尿病并发胰腺炎。患者精神欠佳,口干苦,不饮水,腹胀腹痛,压之则甚,皮肤及小便黄,大便数日未解,舌红而干,苔黄腻而燥,脉弦数而沉,中医诊为黄疸和腹痛,病机为湿热内阻中焦,阳明腑气不通,故予三仁汤和承气汤及茵陈蒿汤加减,虑其久病脾胃之气必衰,故重用太子参 45 g 益气生津,以益脾使其攻下之中不忘扶正,处方如下:杏仁 12 g、

(下转 1278 页)

作者简介:陈 义,男,贵州省思南县人,土家族,副主任医师,主要从事肝病、青少年脱发等方面的研究。发表论文 10 余篇。电话:(0856)7222371

收稿日期:2008-05-14 修回日期:2008-06-05