文章编号:1000-5404(2011)23-2463-03

论著

摩氏摩根菌噬菌体 MmP1 内溶素重组蛋白活性的初步鉴定

朱晓艳[1,2],胡福泉[1],谭银玲[1] (400038 重庆,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[1];610083 成都,成都军区总医院全军中心实验室[2])

[摘要] **目的** 初步鉴定摩氏摩根菌噬菌体 MmP1 内溶素基因重组蛋白的生物学活性。**方法** 提取摩氏摩根菌细胞肽聚糖成分,采用酶谱电泳法、扩散法检测重组融合蛋白对细胞壁肽聚糖层的降解活性;采用纸片法检测重组蛋白对金黄色葡萄球的抑菌作用;测定重组蛋白与抗生素的协同抑菌作用。**结果** 成功提取了摩氏摩根菌细胞壁肽聚糖,酶谱法、扩散法结果表明重组蛋白对摩氏摩根菌肽聚糖具有降解作用,纸片法结果表明重组蛋白可抑制金黄色葡萄球菌的生长;当与新青霉素Ⅱ、氨苄青霉素(Amp)、羧苄青霉素(Car)3 种抗生素共同作用时有协同抑菌作用,3 种抗生素的 MIC 值分别由 1.56、1.56、3.125 μg/ml 降为 0.39、0.78、0.195 μg/ml。**结论** 重组融合蛋白可降解肽聚糖、抑制金黄色葡萄球菌生长活性,且与抗生素协同作用时可降低抗生素 MIC 值。

[关键词] 噬菌体;内溶素;摩氏摩根菌;细胞壁肽聚糖;抑菌活性
[中图法分类号] Q510.3; Q939.48; Q939.92 [文献标志码] A

Identification of endolysin encoded by bacteriophage MmP1 against *Morganella morganii*

Zhu Xiaoyan[1,2], Hu Fuquan[1], Tan Yingling[1] ([1]Department of Microbiology, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]Laboratory Center of Medical Research, General Hospital of Chengdu Military Command, Chengdu, Sichuan Province, 610083, China)

[**Abstract**] Objective To identify the biological activity of recombinant endolysin encoded by bacteriophage MmP1 against *Morganella morganii*. Methods The peptidoglycan of *Morganella morganii* was extracted. Enzymatic activity of the recombinant endolysin was detected by zymography assay and gel diffusion assay, respectively. The inhibitory activity of recombinant protein against *S. aureus* culture was detected by paper disk method. The synergistic effect of recombinant protein and antibiotics was determined by MIC. Results Zymography assay and gel diffusion assay showed that *Morganella morganii* peptidoglycan can be hydrolyzed by the recombinant endolysin. MmP1 endolysin could inhibit growth of *S. aureus*. The synergistic effect was observed when MmP1 endolysin was combined with antibiotics including AmpⅡ, Amp and Car, and the MIC of AmpⅡ, Amp and Car reduced from 0.39 μg/ml, 0.78 μg/ml and 0.195 μg/ml to 1.56 μg/ml, 1.56 μg/ml and 3.125 μg/ml, respectively. Conclusion The recombinant endolysin can hydrolyze *Morganella morganii* peptidoglycan, inhibit growth of *S. aureus*, and enhance bacteriostasis activity of antibiotics.

[**Key words**] bacteriophage; endolysin; *Morganella morganii*; peptidoglycan; antibacterial activity

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30770093). Corresponding author: Tan Yinling, Tel: 86-23-68771933, E-mail: tanyinling2002@yahoo.com.cn

摩氏摩根菌是革兰阴性菌,属肠杆菌科,存在于环境中以及人类、爬行动物和哺乳动物的肠道内,可引起多种疾病及感染。噬菌体作为细菌的病毒,在自然界中广泛存在,是生物圈中数量最多的生命形式。据研究报道,控制双链 DNA 噬菌体进出宿主菌的是被称作内溶素(endolysin)的一种酶蛋白,其作用的底物是细菌细胞壁肽聚糖层。噬菌体感染宿主菌后,通过合成大量的内溶素瞬时裂解宿主菌细胞壁肽聚糖层,从而释放子代噬菌体[1-4]。无论革兰阴性或者阳性菌的细胞壁都含有肽聚糖结构,因此近年来利用噬菌体内溶素进行抗细菌性感染治疗的研究越来越多。

在前期工作中我们完成了对摩氏摩根菌噬菌体 MmP1 全基因组测序(GenBank 登录号 No. EU652770),并成功克隆表达了其基因组 ORF12 编码的内溶素重组蛋白[5-6]。本实验提取摩氏摩根菌细胞壁肽聚糖成分,采用酶谱电泳法、扩散法即纸片法检测重组融合蛋白对细胞壁肽聚糖层的降解活性和对革兰阳性菌、革兰阴性菌的抑菌作用,并检测重组蛋白与抗生素的协同抑菌作用。

[基金项目] 国家自然科学基金(30770093)
[通信作者] 谭银玲,电话:(023)68771933,E-mail:tanyinling2002@yahoo.com.cn

1 材料与方法

1.1 主要菌株、噬菌体及试剂

摩氏摩根菌噬菌体 MmP1、大肠杆菌 JM109、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌均由本实验室保存，胰蛋白胨、酵母粉购自英国 Oxoid，琼脂粉购自成都天泰，NaCl 购自重庆化学试剂厂。

1.2 主要仪器设备

蛋白质电泳仪购自美国 Bio-Rad 公司，超净工作台购自美国 Nuaire，37 ℃恒温 CO_2 孵箱购自美国 THERMO FORMA 公司。

1.3 摩氏摩根菌细胞壁肽聚糖成分的提取

挑取摩氏摩根菌菌株单菌落，接种于 10 ml 的 LB 液体培养基中 37 ℃培养过夜；将菌液接种于 1 000 ml 的 LB 液体培养基中培养 6 h 左右；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（磷酸钠 10 mmol/L，磷酸钾 2 mmol/L，氯化钠 137 mmol/L，氯化钾 2.7 mmol/L）洗涤沉淀 2 次；用 100 ml 灭菌双蒸水（pH = 6.0）重悬沉淀，加入 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 10 ml 灭菌双蒸水重悬沉淀，加入 0.5% 的胰蛋白酶，在 37 ℃条件下消化 16 h 除去细胞壁上附着的脂蛋白；40 000 × *g* 离心 1 h，沉淀用灭菌双蒸水洗涤 2 次后冻干备用[7]。

1.4 酶谱法检测肽聚糖降解活性

将提取的摩氏摩根菌细胞壁肽聚糖高压灭菌后按比例（0.2% ~0.5%）与 12% SDS-PAGE 充分混合制备电泳胶。取阴性对照牛血清白蛋白 BSA、目的蛋白和阳性对照鸡溶菌酶跑电泳，浓度均为 10 mg/ml。样品经上样、电泳完毕后，将电泳胶在灭菌水中浸泡 30 min，再在复性缓冲液中（0.1% Triton X-100，10 mmol/L PBS，pH = 6.5）37 ℃条件下继续培育 16 h 后，用染色液（0.01% KOH，0.1% 亚甲基蓝）染色 2 h，双蒸水脱色[6]。

1.5 扩散法检测肽聚糖降解活性

将提取的摩氏摩根菌细胞肽聚糖作为内溶素的底物，与聚丙烯酰胺混合，然后将得到的重组蛋白（10 mg/ml）加入到预先处理好的孔中，37 ℃条件下培育 16 h，加入亚甲基蓝对肽聚糖进行染色。根据亚甲基蓝染色的原理，底物肽聚糖经染色后会成蓝绿色。因此，如果底物肽聚糖被降解，则脱色后则会变透明。

按照蛋白电泳制胶方案配制 12% 积层胶，将制备好的凝胶取下，置于玻板上，用灭菌打孔器在胶上均匀打孔；每个孔中分别加入 15 μl 待检测蛋白样品（10 mg/ml），放入湿盒中密闭，37 ℃ 条件下培育 16 h；加入亚甲基蓝染色液染色 2 h，最后用双蒸水脱色至透明条带出现。

1.6 纸片法检测重组蛋白对细菌的生长抑制活性

分别取对数生长期的金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、摩氏摩根菌各 1 ml，5 000 × *g* 离心沉淀后，用 100 μl 新鲜 LB 溶液重悬后涂板，然后在平板中央放上高压灭菌的药敏试纸片，分别滴加等体积（15 μl）的目标蛋白（20 mg/ml），阴性对照（BSA，20 mg/ml），阳性对照溶菌酶（20 mg/ml），37 ℃培养过夜。

1.7 重组蛋白体的最低抑菌浓度（MIC）测定

采用微量倍比稀释法在 96 孔培养板中测定内溶素的 MIC。重组内溶素的稀释：根据纸片法检测重组蛋白对细菌的生长抑制活性结果，我们确定了重组蛋白的 11 个浓度范围：2、1、0.5、0.25、0.125、0.062 5、0.031 2、0.015 6、0.007 8、0.003 9、0.001 95 mg/ml。将检测菌液稀释至菌浓度为：5×10^5 CFU/ml，取系列倍比稀释的重组内溶素各 10 μl，分别加入 90 μl 稀释好的待测菌，设 MHB 肉汤及稀释的待测菌对照孔，混匀后置 37 ℃培养 24 h 后观察结果，并采用酶标仪以肉汤空白对照孔调零，采用酶标仪测定各测试孔 *D*（490）值。MIC 的判定：测试孔 *D*（490）值与空白对照孔 *D*（490）最低重组内溶素浓度为其对该测试菌的 MIC。

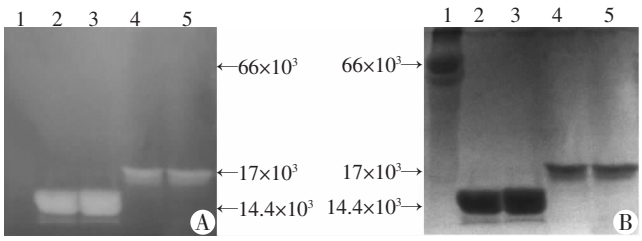
1.8 重组蛋白与抗生素的协同抑菌作用检测

采用微量倍比稀释法在 96 孔培养板中测定 3 种抗生素新青霉素Ⅱ、氨苄青霉素（Amp）、羧苄青霉素（Car）在内溶素的协同作用下 MIC 的改变。抗生素的稀释：新青霉素Ⅱ：100、50、25、12.5、6.25、3.125、1.562、0.781、0.39、0.195、0.097 5 μg/ml；氨苄青霉素：200、100、50、25、12.5、6.25、3.125、1.562、0.781、0.39、0.195 μg/ml；羧苄青霉素：200、100、50、25、12.5、6.25、3.125、1.562、0.781、0.39、0.195 μg/ml。将检测菌液稀释至菌浓度为 5×10^5 CFU/ml，取系列倍比稀释的抗生素各 10 μl，分别加入 90 μl 稀释好的待测菌，设 MHB 肉汤及稀释的待测菌对照孔，混匀后置 37 ℃培养 24 h 后观察结果，并采用酶标仪以肉汤空白对照孔调零，采用酶标仪测定各测试孔 *D*（490）值。将适量的重组蛋白加入金黄色葡萄球菌中，使其达到最低抑菌浓度，混匀后置 37 ℃培养 16 h，再次用微量倍比稀释法测定 3 种抗生素对金黄色葡萄球菌株的 MIC。

2 结果

2.1 酶谱法检测重组蛋白的肽聚糖降解活性

经考马斯亮蓝 R-250 对蛋白质进行染色的结果显示，在 17×10^3、14.4×10^3 及 66×10^3 处出现不同的蛋白条带，根据相对分子质量大小应分别为 MmP1 内溶素重组蛋白、阳性对照鸡溶菌酶及阴性对照 BSA。而这同一块胶经亚甲基蓝对肽聚糖进行染色后的结果显示，在 MmP1 内溶素重组蛋白和阳性对照鸡溶菌酶处出现透明条带，而在阴性对照 BSA 处则未出现透明条带（图 1）。



A：亚甲基蓝染色；B：考马斯亮蓝染色

1：阴性对照 BSA（10 mg/ml）；2 ~3：目的蛋白（10 mg/ml）；4 ~5：阳性对照鸡溶（10 mg/ml）菌酶

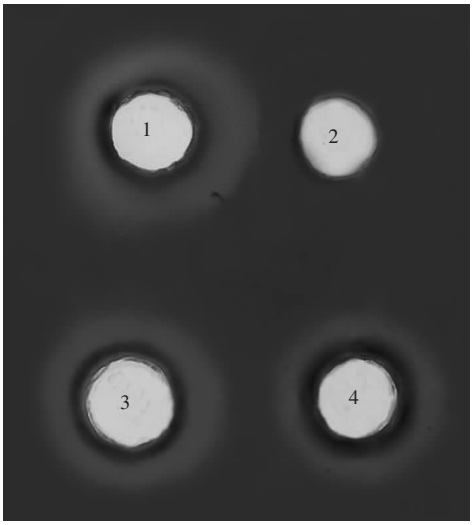
图 1 SDS-PAGE 电泳检测重组蛋白肽聚糖解聚活性

2.2 扩散法检测肽聚糖降解活性

从图 2 可知，重组 MmP1 内溶素可以将底物肽聚糖降解形成透明圈，且对底物肽聚糖的降解作用比较彻底；阳性对照鸡溶菌酶同样可以降解底物肽聚糖，而阴性对照 BSA 则无明显降解作用。

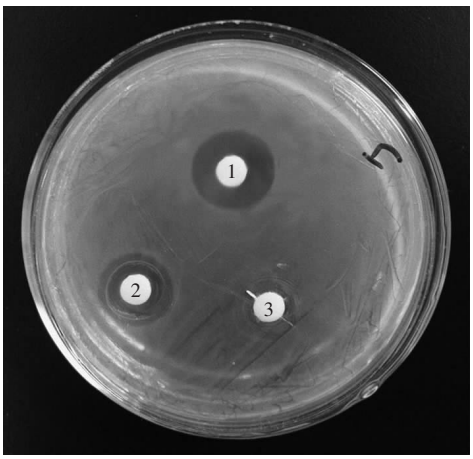
2.3 纸片法检测重组蛋白对细菌的生长抑制活性

结果显示目的蛋白只对金黄色葡萄球菌具有显著抑制现象，而对铜绿假单胞菌和摩氏摩根菌的抑制现象不明显。见图 3。



1:阳性对照鸡溶菌酶(10 mg/ml);2:阴性对照 BSA(10 mg/ml);3、4:MmP1 内溶素重组蛋白(10 mg/ml)

图2 SDS-PAGE 电泳扩散法检测重组蛋白对摩氏摩根菌肽聚糖解聚活性



1:阳性对照鸡溶菌酶(20 mg/ml);2:重组蛋白(20 mg/ml);3:BSA(20 mg/ml)

图3 平板扩散法检测重组蛋白对金黄色葡萄球菌的抑菌活性

2.4 重组蛋白的最低抑菌浓度及协同抑菌活性

通过微量倍比稀释法,我们首先测得 MmP1 内溶素重组蛋白对金黄色葡萄球菌的最低抑菌浓度为 0.39 μg/ml,进一步测定了3种抗生素(新青霉素Ⅱ、Amp、Car)与具有最低抑菌浓度的重组蛋白联合使用前后的 MIC 改变情况。新青霉素Ⅱ、Amp、Car 3种抗生素的 MIC 值分别为 1.56、1.56、3.125 μg/ml;加入重组蛋白后的 MIC 值分别为 0.39、0.78、0.195 μg/ml。

3 讨论

本实验中将提取的摩氏摩根菌细胞壁肽聚糖作为内溶素的底物,与聚丙烯酰胺混合,然后将得到的重组蛋白(10 mg/ml)加入到预先处理好的孔中,37 ℃条件下培育 16 h,加入亚甲基蓝对肽聚糖进行染色。根据亚甲基蓝染色的原理,底物肽聚糖经染色后会成蓝绿色。因此,如果底物肽聚糖被降解,则脱色后会变透明。重组 MmP1 内溶素可以将底物肽聚糖降解形成透明圈,且对底物肽聚糖的降解作用比较彻底;阳性对照鸡溶菌酶同样可以降解底物肽聚糖,而阴性对照 BSA 则无明显降解作用。

酶谱法是将酶学方法和电泳方法结合在一起[8],将底物肽聚糖混合在凝胶中,借助电场力的作用推动变性的酶蛋白向一极移动,电泳完毕,通过复性使酶复性而将所在位置的肽聚糖降解;因此通过亚甲基蓝对肽聚糖进行染色后,如果酶蛋白将肽聚糖降解,则在酶蛋白所处的位置会出现透明条带。而酶蛋白本身所处的迁移位置可通过考马斯亮蓝染色来确定。酶谱法与扩散法实验结果表明重组蛋白对肽聚糖有明显的降解作用,且重组蛋白与抗生素共同作用时可以显著降低抗生素 MIC 值。抑菌实验结果表明重组蛋白对金黄色葡萄球菌生长抑制作用明显,但将内溶素基因产物直接用于活菌治疗目前并不可行,在以后的研究中这一问题尚待解决[9-12]。

参考文献:

[1] Cho Y K, Kook H, Woo Y J, *et al*. Morganella morganii pericarditis in a child with X-linked agammaglobulinemia[J]. Pediatr Int, 2010, 52(3): 489-491.

[2] Dupuis M E, Moineau S. Genome organization and characterization of the virulent lactococcal phage 1358 and its similarities to Listeria phages[J]. Appl Environ Microbiol, 2010, 76(5): 1623-1632.

[3] Wittmann J, Gartemann K H, Eichenlaub R, *et al*. Genomic and molecular analysis of phage CMP1 from Clavibacter michiganensis subspecies michiganensis[J]. Bacteriophage, 2011, 1(1): 6-14.

[4] Mounir K, El-Koraichi A, Ragala A, *et al*. Unusual cause of infant severe community-acquired pneumonia: Morganella morganii[J]. Ann Fr Anesth Reanim, 2010, 29(6): 498.

[5] 谭银玲, 李明, 黄建军, 等. 噬菌体基因组 PaP1 的鸟枪法测序及其生物信息学分析[J]. 中华烧伤杂志, 2006, 22(2): 96-100.

[6] 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.

[7] Clarke A J. Extent of peptidoglycan O acetylation in the tribe Proteeae[J]. J Bacteriol, 1993, 175(14): 4550-4553.

[8] 孙卫忠, 胡晓梅, 饶贤才, 等. 铜绿假单胞菌噬菌体 PaP1 内溶素基因克隆、表达及活性分析[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(13): 1268-1271.

[9] Deresinski S. Bacteriophage therapy: exploiting smaller fleas[J]. Clin Infect Dis, 2009, 48(8): 1096-1101.

[10] 贾鸣, 胡晓梅, 孙卫忠, 等. 噬菌体 PaP3 多糖解聚酶对铜绿假单胞菌生物膜的作用研究[J]. 免疫学杂志, 2008, 24(2): 184-187.

[11] 申晓冬, 张克斌, 李明, 等. 推定铜绿假单胞菌噬菌体 PaP3 末端酶小亚单位的 DNA 结合能力检测[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(5): 379-382.

[12] 孙卫忠, 胡晓梅, 饶贤才, 等. 通过生物信息学技术预测铜绿假单胞菌噬菌体内溶素的作用机制[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(9): 787-790.

(**收稿**:2011-05-20;**修回**:2011-06-30)

(编辑 栾 嘉)