

## 沙门氏菌噬菌体 SM-p2 内溶酶及穿孔素的生物信息学分析和克隆表达

戚 斌, 解天慧, 石 慧\*

(西南大学食品科学学院 重庆 400715)

**摘要** 沙门氏菌是常见的危害公共安全的食源性致病菌。内溶酶和穿孔素作为新型生物抑菌剂,是噬菌体编码的具有细菌裂解作用的功能蛋白。本文利用十聚寡核苷酸引物和 PCR 技术对噬菌体 SM-p2 的 DNA 进行随机扩增并确定穿孔素基因 *Hol 2* 和内溶酶基因 *Lys 2*;使用生物学信息软件分析预测 *Lys 2* 和 *Hol 2* 的特性;利用大肠杆菌原核表达系统对 *Lys 2* 和 *Hol 2* 进行克隆表达。结果表明:噬菌体 SM-p2 是一种具有“穿孔素-内溶酶”裂解体系的双链 DNA 烈性噬菌体。经生物信息学分析发现,*Hol 2* 是一种仅有一个跨膜结构的 III 型穿孔素,*Lys 2* 是一种没有跨膜结构肽聚糖水解酶。利用大肠杆菌表达系统成功表达了 *Lys 2* 和 *Hol 2*,然而,穿孔素能直接裂解细菌细胞内膜,对感受态表达细胞产生毒害作用,导致 *Hol 2* 表达量较少。最终获得质量浓度为 5.419 mg/mL 的内溶酶 *Lys 2* 和 2.191 mg/mL 的穿孔素 *Hol 2*。本研究成功表达了沙门氏菌噬菌体 SM-p2 的内溶酶和穿孔素,为 SM-p2 的抑菌研究奠定了分子基础。

**关键词** 噬菌体; 基因克隆; 内溶酶; 穿孔素

文章编号 1009-7848(2022)08-0032-08 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2022.08.004

沙门氏菌是一种常见的食源性致病菌,人们在食用受污染的肉类、牛奶和鸡蛋时可能感染沙门氏菌,导致呕吐、腹泻、发烧、头痛,甚至死亡<sup>[1]</sup>。2019 年,欧洲确诊了近 88 000 例人类沙门氏菌病例。在美国,沙门氏菌每年导致大约 135 万人感染、26 500 人住院和 420 人死亡。在中国,80%~90%的食源性细菌中毒事件是由沙门氏菌引起的<sup>[2-3]</sup>。为了避免沙门氏菌对食品安全造成严重的影响,人们采取积极的措施来预防和控制。例如,使用有机酸、水蒸气等传统的方法来杀灭食品表面的沙门氏菌,然而,这样会改变食品的感官特性,而且还有可能在食品上造成有毒、有害物质的残留<sup>[4]</sup>。利用抗生素来杀灭沙门氏菌容易造成耐药菌的出现,对沙门氏菌的控制造成极大的挑战<sup>[5]</sup>。寻找新型的抗菌物质已刻不容缓。

近些年来,由于噬菌体具有无毒,特异性高,裂解性强和抗耐药性等优良特点,已作为一种新型的生物抑菌剂被大量研究<sup>[6-7]</sup>。目前噬菌体已开

始应用于清除食品中致病菌,然而,在噬菌体制剂的研发中存在一些缺陷或不足,如作为活体病毒,噬菌体常常不被人们接受以及一些噬菌体对于耐药基因的传播等<sup>[8]</sup>。内溶酶和穿孔素不仅保留了噬菌体的抑菌作用,而且细菌还很难对内溶酶和穿孔素产生抗性,可很好地解决噬菌体制剂存在的不足和缺陷。

内溶酶和穿孔素是一种存在于 dsDNA 噬菌体中,对细菌具有裂解活性的蛋白<sup>[9]</sup>。内溶酶和穿孔素可直接裂解细菌细胞壁或细胞膜<sup>[10]</sup>。内溶酶能够降解细菌的肽聚糖,使细菌裂解死亡;穿孔素能在细菌质膜上形成小孔,协助内溶酶降解肽聚糖。无毒、高效抑菌、不易产生耐药性等特点,使内溶酶和穿孔素开始应用于食品安全和医药等各个方面<sup>[11-12]</sup>。

本研究利用十聚体寡核苷酸随机引物对前期分离的一株烈性沙门氏菌噬菌体 SM-p2 的 DNA 进行随机扩增并鉴定,利用鉴定结果设计内溶酶 *Lys 2* 与穿孔素 *Hol 2* 的引物并确定它们的基因。通过生物信息学分析预测该噬菌体内溶酶结构和特征,最后通过基因克隆表达得到内溶酶 *Lys 2* 和穿孔素 *Hol 2*。

收稿日期: 2021-08-02

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(32072322)

作者简介: 戚斌(1997—),男,硕士生

通信作者: 石慧 E-mail: swuhui2017@163.com

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

SM-p2 为烈性噬菌体,保存于本实验室;pEASY-Blunt E1 大肠杆菌表达试剂盒、感受态大肠杆菌 Trans1-T1、BL21 (DE3)、胶回收试剂盒、

Ni-IDA 填料,北京全式金生物有限公司;T 载体 PCR 产物克隆试剂盒,上海生工生物工程股份有限公司。RNase A、DNaseI、乙二胺四乙酸(EDTA)、蛋白酶 K,索莱宝生物技术有限公司;其它试剂均为国产分析纯级。本试验所用引物见表 1。

表 1 本试验所用引物序列

Table 1 Primers sequence in this research

名称		引物序列(5'→3')	来源
十聚体寡核苷酸随机引物	287	CGAACGGCGG	[13]
	208	ACGGCCGACC	[13]
	275	CCGGGCAAGC	[13]
	272	AGCGGGCCAA	[13]
	270	TGCGCGCGGG	[13]
	241	GCCCGAGCGG	[13]
	228	GCTGGGCCGA	[13]
	277	AGGAAGGTGC	[13]
	Lys 2-R		TTAACAGAACTCTTGTA
Lys 2-F		ATGGCCATTCTAAACTCC	本实验室
Hol 2-F		GTGGAAAAGTTTATAC	本实验室
Hol 2-R		TCATATTGATCTACCTCC	本实验室

### 1.2 仪器与设备

电子天平,Sartorius 公司;2720 Thermal CyclerPCR 仪,AppliedBiosystems 公司;DYY-8C 电泳仪,北京六一生物科技有限公司;JY88-IIN 超声细胞粉碎仪,宁波新芝生物科技有限公司;011005 酶标仪,Biotek 公司;Bio-rad ChemiDoc XRS+019900 化学发光凝胶成像分析系统,Biorad 公司;DK-8D 水浴锅,上海齐欣科学仪器有限公司;UV-1600 紫外-可见分光光度仪,北京普析通用仪器有限责任公司;5810R 冷冻高速离心机,Eppendorf 公司;MX-F 微型涡旋混合仪,上海泸西分析仪器有限公司。

### 1.3 方法

1.3.1 噬菌体 SM-p2 DNA 的提取 噬菌体悬浮液首先用 RNase A (5 μg/mL) 和 DNaseI (2 U/mL) 在 37 °C 下处理 30 min, 然后在 80 °C 下孵育 15 min 使 DNase I 失活。纯化的噬菌体被蛋白酶 K (50 μg/mL) 于 56 °C 下处理 1 h, 辅以 SDS (0.5%) 和 EDTA (20 mmol/L)。加入等体积的苯酚/氯仿/异戊醇 (25:24:1), 混合并在 4 °C 下以 12 000×g 离心 20 min。转移上清液并与等体积的异丙醇混合并

保持在 -20 °C 过夜。离心后,用冰冷的 75% 乙醇洗涤沉淀 3 次。最后,将颗粒风干,溶解在 50 μL TE 缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl; 1 mmol/L EDTA, pH 8) 中并储存在 -20 °C。

1.3.2 噬菌体 SM-p2DNA 的随机扩增 以噬菌体 SM-p2 的 DNA 为模板,用引物 287、277、275、272、270、241、228 和 208 进行 PCR 扩增。PCR 扩增体系:Taq 聚合酶 (5 U/μL) 0.25 μL、10xPCR 缓冲液 2.5 μL、dNTPs (2.5mmol/L) 2.5 μL、ddH<sub>2</sub>O 17.5 μL、模板 DNA 0.5 μL、MgCl<sub>2</sub> 1.3 μL、上下游引物各 1 μL。PCR 扩增条件:94 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 30 s, 34 °C 复性 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 共 30 个循环。选择第 1 次扩增结果中又少又亮的条带进行再扩增,将第 2 次扩增的 PCR 产物回收后进行 TA 克隆并测序。测得的序列在 NCBI 上进行相似性比对 (Blastn)。

1.3.3 噬菌体 SM-p2 内容酶 (Lys 2) 和穿孔素 (Hol 2) 基因的确定 将上述随机二次扩增 PCR 产物的核酸序列在 NCBI 上进行相似性比对,选取 Blast 比对结果中同源率最高的噬菌体的内容酶和穿孔素基因设计引物。获得 4 条引物,即 Hol

2的上下游引物(*Lys 2*的上下游引物),以SM-p2的DNA为模板,结合*Hol 2*的上游引物和*Hol 2*下游引物(*Lys 2*上游引物引物和*Lys 2*的下游引物)进行PCR扩增。PCR扩增体系:Taq聚合酶(5 U/ $\mu\text{L}$ )0.3  $\mu\text{L}$ 、10xPCR缓冲液5  $\mu\text{L}$ 、dNTPs (2.5 mmol/L) 1  $\mu\text{L}$ 、ddH<sub>2</sub>O 35.2  $\mu\text{L}$ 、模板DNA 0.5  $\mu\text{L}$ 、MgCl<sub>2</sub> 4  $\mu\text{L}$ 、上下游引物各2  $\mu\text{L}$ 。PCR扩增条件:94  $^{\circ}\text{C}$ 预变性4 min;94  $^{\circ}\text{C}$ 变性30s,50  $^{\circ}\text{C}$ 复性30 s,72  $^{\circ}\text{C}$ 延伸1 min,共30个循环;最后72  $^{\circ}\text{C}$ 延伸5 min。

1.3.4 *Lys 2*与*Hol 2*的生物学信息分析 分别利用SOPMA、ExPASy ProtParamtool、TMHMM Server v. 2.0和Pfam数据库对SM-p2内溶酶和穿孔素的二级结构、理化特征、跨膜结构和结构域进行预测。利用PyMOL内溶酶和穿孔素的二级结构进行可视化。

1.3.5 重组质粒的构建与转化 将内溶酶*Lys 2*或穿孔素*Hol 2*基因片段与载体质粒pEasy-Blunt E1以物质的量比7:1的比例加入离心管中,在室温下反应8 min后,将试管置于冰上冷却。加连接产物于刚解冻好的50  $\mu\text{L}$  Trans1-T1感受态细胞中,在含有卡那霉素的抗性平板上进行筛选,以T7 promoter primer和目的基因的下游引物进行菌落PCR挑选阳性菌,将阳性菌提取质粒后送至测序公司测序。将测序正确的重组质粒转化到BL21(DE3)感受态大肠杆菌。

1.3.6 *Lys 2*与*Hol 2*的诱导表达与纯化 将含有pEASY-*Lys 2*、pEASY-*Hol 2*重组质粒的大肠感受态细胞接种到含有卡那霉素抗性(0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的LB肉汤培养基,200 r/min、37  $^{\circ}\text{C}$ 培养至OD<sub>600nm</sub>在0.5左右。分别加入终浓度为0.1、0.5、1、2、5 mmol/L的异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)诱导。在200 r/min、37  $^{\circ}\text{C}$ 的条件下诱导表达5 h。取诱导后的菌液6 000 r/min离心10 min,收集细菌沉淀;将沉淀重悬于100 mL无菌的PBS缓冲液中,冰浴下超声破碎,待溶液变得澄清后,10 000 r/min离心1 h,收集上清;使用0.45  $\mu\text{m}$ 的滤膜过滤得上清液。利用镍亲和柱纯化过滤后的上清,将过滤后的上清液加入柱子,上清液自然流出并收集穿透液。再用25 mL Tris-NaCl缓冲液清洗柱子并收集洗涤液后,使用浓度分别为20 mmol/L和50 mmol/L的

咪唑洗脱杂蛋白,收集洗脱液。再分别用200 mmol/L和500 mmol/L咪唑对目的蛋白进行洗脱。取36  $\mu\text{L}$ 纯化好的目标蛋白洗脱液与4  $\mu\text{L}$  4x SDS-PAGE上样缓冲液混和,用水浴锅在100  $^{\circ}\text{C}$ 下水浴3~5 min充分混匀,得蛋白凝胶电泳上样液,进行蛋白凝胶电泳。NanoDrop紫外分光光度计用于检测蛋白浓度。

1.3.7 *Hol 2*表达对BL21(DE3)的生长的毒害作用 分别挑取含有pEASY-*Hol 2*、pEASY-*Lys 2*和pEASY-Blunt E1重组质粒和空质粒的到10 mL含卡那霉素的LB肉汤培养基中37  $^{\circ}\text{C}$ 培养至OD<sub>600nm</sub>在0.4~0.6后,最终在200 r/min,37  $^{\circ}\text{C}$ 条件下加入终浓度为1 mmol/L的IPTG诱导培养2 h。定期检测菌液浊度,时间间隔为20 min,以描述大肠杆菌BL21(DE3)的生长趋势。

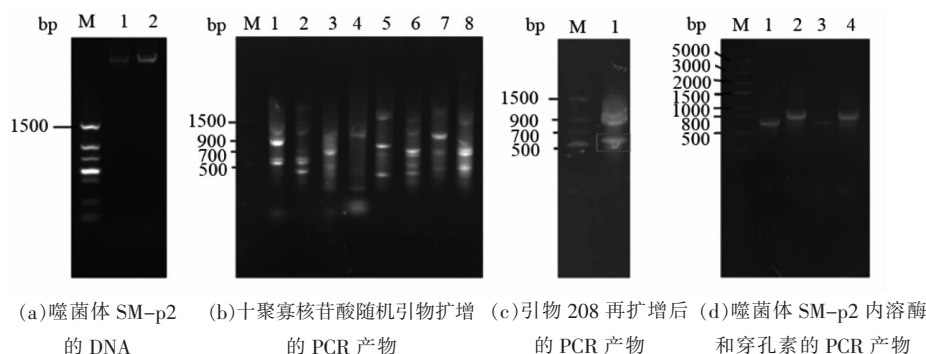
## 2 结果与分析

### 2.1 噬菌体SM-p2DNA的随机扩增及*Lys 2*与*Hol 2*基因的确

如图1b所示,噬菌体SM-p2 DNA的随机扩增产物具有多样性,引物208在泳道1中的PCR产物条带少且亮,选择泳道1中的PCR产物进行再扩增。最终回收到一段700~800 bp的DNA片段(图1c)。将回收的这段DNA测序,再进行Blastn比对。Blast比对结果显示,沙门氏菌噬菌体Sepoy的核苷酸还原酶与随机扩增的SM-p2 DNA片段同源率最高,为72.12%。根据沙门氏菌噬菌体Sepoy内溶酶和穿孔素的DNA序列设计引物。将设计好的引物,以SM-p2的DNA为模板进行PCR。所图1d所示,得到SM-p2内溶酶*Lys 2*的基因片段,大小在800 bp左右;得到SM-p2穿孔素*Hol 2*的基因片段,大小在700 bp左右。

### 2.2 *Lys 2*和*Hol 2*的生物学信息分析

2.2.1 噬菌体SM-p2内溶酶和穿孔素的二级结构 如图2所示,*Lys 2*和*Hol 2*的主要二级结构都为 $\alpha$ -螺旋,分别占氨基酸总数的56.06%和41.64%;*Lys 2*和*Hol 2*中第2丰富的结构是无规则卷曲,分别占氨基酸总数的29.17%和39.35%。在2种蛋白的二级结构中均未发现 $\beta$ -折叠。延长链和 $\beta$ -转角在*Lys 2*和*Hol 2*占氨基酸总数含量较少。由于*Lys 2*和*Hol 2*的二级结构



注:M 为 marker;图 a 中,泳道 1 和 2 为噬菌体 SM-p2 的 DNA;图 b 中,泳道 1~8 分别为引物 208、228、241、270、272、275、277 和 287 的产物;图 d 中,泳道 3 和 4 分别 *Hol 2* 和 *Lys 2* 的基因片段。

图 1 *Lys 2* 与 *Hol 2* 基因的 PCR 扩增

Fig.1 PCR amplification of gene of *Lys 2* and *Hol 2*

中很少有层状结构,且主要二级结构为  $\alpha$ -螺旋结构,因此可以推断 *Lys 2* 和 *Hol 2* 具有稳定的结构<sup>[14]</sup>。

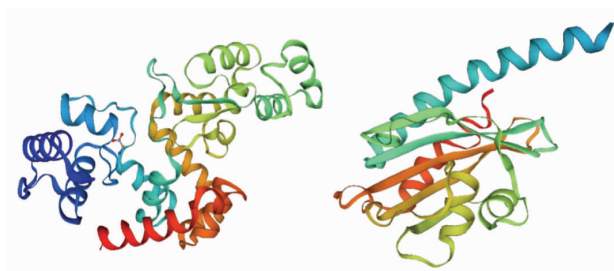
2.2.2 *Lys 2* 与 *Hol 2* 的特性预测 一般来说,不

稳定系数小于 40 表示蛋白质是稳定的<sup>[15]</sup>。如表 2 所示,*Lys 2* 和 *Hol 2* 的分子质量分别是 24.51 ku 和 28.66 ku,且不稳定系数都低于 40。

表 2 *Lys 2* 和 *Hol 2* 的理化性质

Table 2 The physicochemical properties of *Lys 2* and *Hol 2*

	<i>Hol 2</i>	<i>Lys 2</i>
基因大小/bp	641	784
分子质量/ku	24.51	28.66
不稳定系数	37.83	20.79
亲水系数	-0.054	-0.31
氨基酸数/个	216	264
带正电荷的残基/个	23	31
带负电荷的残基/个	23	26
等电点	6.79	8.87



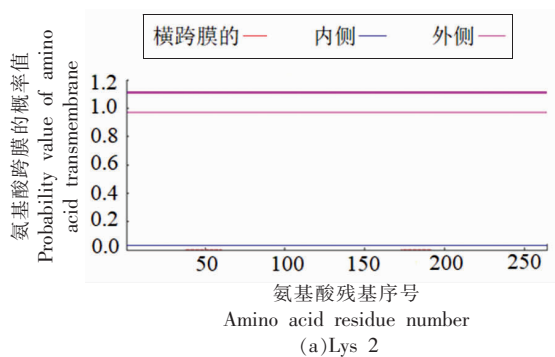
(a)内溶酶(*Lys 2*) (b)穿孔素(*Hol 2*)

图 2 *Lys 2* 和 *Hol 2* 二级结构的可视化

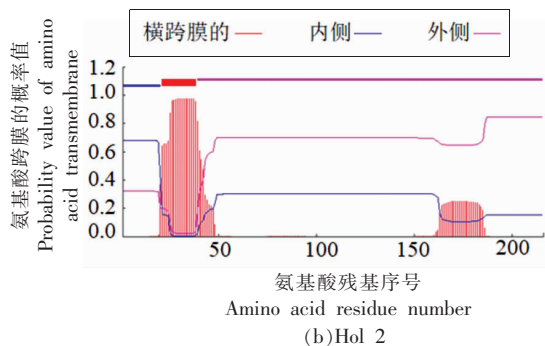
Fig.2 Visualization of secondary structure of *Lys 2* and *Hol 2*

2.2.3 *Lys 2* 与 *Hol 2* 的跨膜结构预测 对噬菌体 SM-p2 内溶酶和穿孔素的跨膜结构进行预测

(图 3) 结果显示,穿孔素 *Hol 2* 在 N 端在 21~38 位氨基酸形成一个跨膜结构,39~150 位氨基酸处



(a)*Lys 2*



(b)*Hol 2*

图 3 内溶酶 *Lys 2* 的跨膜结构(a)和穿孔素 *Hol 2* 的跨膜结构(b)

Fig.3 The transmembrane structure of endolysin *Lys 2* (a) and holin *Hol 2* (b)

于胞外,1~27位氨基酸处于胞内;内溶酶 Lys 2 在 150~200 之间由于螺旋程度较低最终并未形成跨膜结构。

**2.2.4 Lys 2 与 Hol 2 的结构域预测** 如图 4a 所示,噬菌体 SM-p2 的内溶酶 Lys 2 由两个结构域构成,一个结合结构域(CBD)和一个催化结构域(EDA),CBD 的主要位点是肽聚糖,EDA 起裂解细菌的作用,其本质属于 *N*-乙酰胞壁酸酶,能裂解  $\beta$ -1,4-糖苷键。如图 4b 所示噬菌体 SM-p2 的穿孔素 Hol 2,含有一个保守结构域,其主要作用是进行信息调节和破坏细菌细胞。

### 2.3 重组质粒的构建

构建重组表达质粒 pEASY-Lys 2 和 pESAY-Hol 2 来表达 Lys 2 与 Hol 2 功能蛋白。结果如图 5 所示,菌落 PCR 产物在泳道 1 和泳道 2 有明显的条带,大小分别为 700 bp 和 800 bp 左右,这与 *Hol 2* 和 *Lys 2* 基因大小一致,表明目的基因成功插入到了质粒中,重组质粒构建成功。

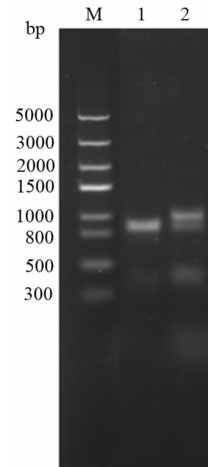
### 2.4 Lys 2 与 Hol 2 的诱导表达与纯化

向含 pEASY-Lys 2、pEASY-Hol 2 的菌液和含空载体 pEASY 的菌液中加入 IPTG 诱导表达的蛋白以及纯化后的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳分析,结果显示,0.1,0.5,1,2,5 mmol/L 的 IPTG 均能诱导蛋白表达,其中 Lys 2 在 1 mmol/L 和 2 mmol/L 的浓度下表达量最高,在 26 ku 到 33 ku 左右出现明显条带(图 6a);在 0.1~5 mmol/L 的 IPTG 浓度范围内,加入的 IPTG 浓度对 Hol 2 的



图 4 内溶酶 Lys 2(a)和穿孔素 Hol 2(b)的结构域

Fig.4 Endolysin Lys 2 (a) and holin Hol 2 (b) structure domain

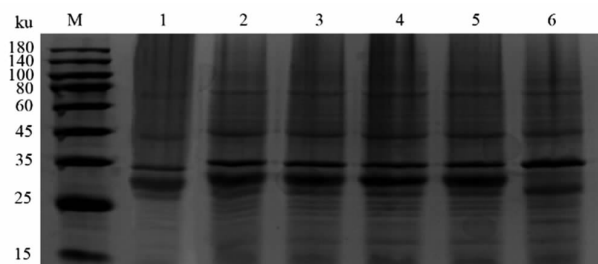


注:M 为 marker;泳道 1 和 2 分别为含 pEASY-Hol 2 和 pEASY-Lys 2 菌落的 PCR 产物。

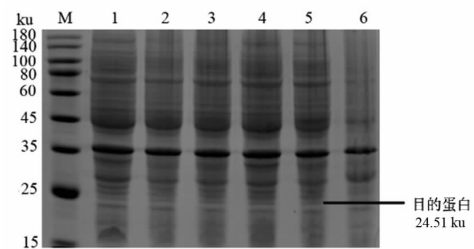
图 5 菌落 PCR 产物

Fig.5 PCR products of colony

诱导表达无明显影响,都能在 20 ku 到 25 ku 附近出现明显条带。作为阴性对照的质粒空载蛋白在相应位置并未出现明显的条带,表明 Lys 2 与 Hol 2 在大肠杆菌原核表达系统中的成功表达(图 6b)。



(a) Lys 2



(b) Hol 2

注:M 为 marker;图 a 和 b 中,1~5 分别代表浓度为 0.1,0.5,1,2,5 mmol/L 的 IPTG 诱导,6 为不含内溶酶的空质粒。

图 6 不同浓度 IPTG 诱导内溶酶 Lys 2(a)和穿孔素 Hol 2(b)表达

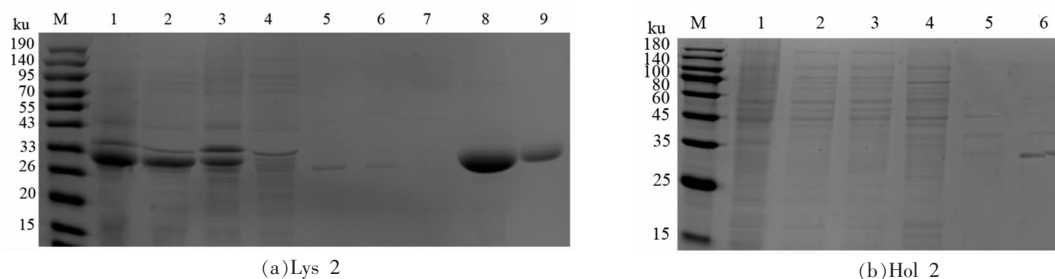
Fig.6 Different concentrations of IPTG induce expression of Lys 2 (a) and Hol 2 (b)

如图 7,SDS-PAGE 电泳图所示,Lys 2 能够在镍亲和柱中被 200 mmol/L 咪唑大量洗脱并纯

化(图 7a,泳道 8),Hol 2 能够在镍亲和柱中被 500 mmol/L 咪唑大量洗脱并纯化(图 7b,泳道 6),

且只在与目标蛋白分子质量大小一致的位置出现唯一清晰的条带。经检测,Lys 2 和 Hol 2 的质量

浓度分别为 5.419 mg/mL 和 2.191 mg/mL。



注:M 为 marker; 图 a 中,1. 菌体,2. 超声破菌后的上样液,3. 超声破菌后的沉淀,4. 上清液的穿过峰,5. 缓冲液洗脱峰,6-9 分别为浓度为 20,50,200,500 mmol/L 的咪唑洗脱液; 图 b 中,1. 上清液,2. 穿过峰,3. 洗脱液,4~7 分别为 20,50,200,500 mmol/L 的咪唑洗脱液。

图 7 内容酶 Lys 2(a)和穿孔素 Hol 2(b)的纯化

Fig.7 Purification of Lys 2 (a) and Hol 2 (b)

## 2.5 Hol 2 表达对 BL21(DE3)的生长的毒害作用

穿孔素具有直接裂解细菌细胞内膜的功能,可能对表达细菌产生毒害。如图 8 所示,随着时间的增加,BL21(DE3) + pEASY-Blunt E1(对照组)的菌液 OD<sub>600nm</sub> 值显著高于 BL21(DE3) + pEASY-Hol 2 的菌液 OD<sub>600nm</sub> 值,说明穿孔素 Hol 2 的表达抑制了细菌的生长。Hol 2 的表达虽能够抑制细菌的生长,但不能降低菌液的浓度,并在表达 80 min 后菌液浓度趋于稳定,说明 Hol 2 在加入 IPTG 诱导表达的后的第 80 分钟表达量趋于稳定,故 Hol 2 的最佳表达时间为 80 min。此外,BL21(DE3) + pEASY-Lys 2 在不同时间菌液 OD<sub>600nm</sub> 值与对照组无显著性差异,说明内容酶 Lys 2 的表达不会抑制细菌的生长。

## 3 结论

噬菌体编码的、有抑菌作用的内容酶和穿孔素,可作为一种新型抑菌剂控制食品中的病原菌。本研究对筛选的 SM-p2 噬菌体进行了初步的鉴定,结果表明,噬菌体 SM-p2 的 DNA 片段与沙门氏菌噬菌体 Sepoy 的同源率最高为 72.12%。生物信息公共数据库显示,沙门氏菌噬菌体 Sepoy 是一种含双链 DNA 的肌尾科噬菌体。因此,SM-p2 可能也是一种双链 DNA 噬菌体。内容酶和穿孔素一般存在于双链 DNA 噬菌体的尾刺上可以破坏细菌细胞壁,使噬菌体的 DNA 注入宿主细菌,对

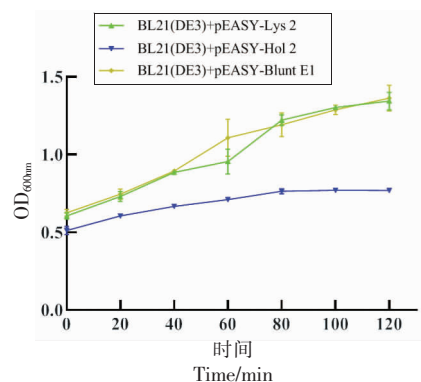


图 8 内容酶和穿孔素表达对大肠杆菌 BL21(DE3)生长的抑制作用

Fig.8 Inhibition of expression of endolysin and holin on growth of BL21 (DE3)

细菌具有很强的裂解活性,如 T4 噬菌体<sup>[16]</sup>。

双链 DNA 噬菌体的内容酶是一种高效的革兰氏阳性裂解酶,它具有无毒、高特异性、不易产生细菌耐药性等特点<sup>[17]</sup>。内容酶具有模块化结构域,一般由细胞壁识别结构域(CBD)和催化结构域(EDA)两部分组成,CBD 能够识别细菌,EDA 能够裂解细菌死亡<sup>[18]</sup>。内容酶的结构域决定了能够裂解的宿主范围,一般既有 CBD 又有 EDA 的内容酶宿主范围小,仅有一个球状催化结构域的内容酶能裂解多种细菌,甚至是革兰氏阴性细菌<sup>[19]</sup>。也有研究表明,有的内容酶不止一个 CBD 或 EDA<sup>[20-21]</sup>。跨膜结构对于穿孔素传递信息和控制细菌裂解时间具有重要的意义<sup>[22]</sup>。Lys 2 的生物信息学显示,Lys 2 具有典型的内容酶结构,即由

一个 CBD 和一个 EDA 组成,既可以识别具有特定结构的细菌又能对结合到细菌造成裂解。Hol 2 有一个跨膜结构,用于传递信息和裂解细胞膜。

本研究利用原核表达系统成功表达了 Lys 2 和 Hol 2, IPTG 诱导 Lys 2 和 Hol 2 表达的最佳浓度为 1 mmol/L, 在此浓度下诱导表达和纯化最终获得 5.419 mg/mL 的内溶酶溶液。穿孔素 Hol2 在未诱导之前少量表达,虽抑制了 BL21(DE3) 的生长,但并不能降低菌液浓度,在用 IPTG 诱导表达 80 min 后菌液浓度不在变化,因此穿孔素 Hol 2 的最佳表达时间是 80 min,纯化后的穿孔素 Hol 2 质量浓度为 2.191 mg/mL。

### 参 考 文 献

- [1] World Health Organisation. *Salmonella* (non-typhoidal)[DB/OL]. (2018-02-20)[2021-04-06]. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal)).
- [2] SCALLAN E, HOEKSTRA R M, ANGULO F J, et al. Foodborne illness acquired in the United States - Major pathogens[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2011, 17(1): 7-15.
- [3] LI K T, YE S Y, ALALI W Q, et al. Antimicrobial susceptibility, virulence gene and pulsed-field gel electrophoresis profiles of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium recovered from retail raw chickens, China[J]. *Food Control*, 2017, 72(Part A): 36-42.
- [4] SPRICIGO DA, BARDINA C, CORTÉS P, et al. Use of a bacteriophage cocktail to control *Salmonella* in food and the food industry[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2013, 165(2): 169-174.
- [5] GANGATHRAPRABHU B, KANNAN S, SANTHANAM G, et al. A review on the origin of multidrug-resistant *Salmonella* and perspective of tailored *phoP* gene towards avirulence [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2020, 147: 104352.
- [6] LI J J, LI Y M, DING Y F, et al. Characterization of a novel *Siphoviridae Salmonella* bacteriophage T156 and its microencapsulation application in food matrix[J]. *Food Research International*, 2021, 140: 110004.
- [7] LASAGABASTER A, JIMÉNEZ E, LEHNHERR T, et al. Bacteriophage biocontrol to fight *Listeria* outbreaks in seafood[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2020, 145: 111682.
- [8] 闫广谋. 大肠杆菌噬菌体裂解酶突变体与融合蛋白 Colicin-Lysep3 的构建及菌外裂解活性的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2019.
- [9] YAN G M. Study on construction and exogenous lytic mechanism of bacteriophage lysin mutants of *E. coli* and Colicin-Lysep3 fusion protein[D]. Changchun: Jilin University, 2019.
- [9] 朱召芹. 噬菌体裂解系统及其相关蛋白的研究进展 [J]. *中国预防医学杂志*, 2004, 5(6): 495-497.
- [10] ZHU Z Q. Research progress of phage lysis system and related proteins[J]. *Chinese Preventive Medicine*, 2004, 5(6): 495-497.
- [10] WHATMORE A M, REED R H. Determination of turgor pressure in *Bacillus subtilis*: A possible role for K<sup>+</sup> in turgor regulation [J]. *Microbiology* 1990, 136(12): 2521-2526.
- [11] HE Y, SHI Y L, LIU M L, et al. Nonlytic recombinant phage tail fiber protein for specific recognition of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90(24): 14462-14468.
- [12] GONDIL V S, 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.
- [13] MAHENTHIRALINGAM E, CAMPBELL M E, FOSTER J, et al. Random amplified polymorphic DNA typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from patients with cystic fibrosis[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1996, 34(5): 1129-1135.
- [14] WILKINS M R, GASTEIGER E, BAIROCH A, et al. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server [J]. *Methods in Molecular Biology*, 1998, 112: 531-552.
- [15] WON G, HAJAM I A, LEE J H. Improved lysis efficiency and immunogenicity of *Salmonella* ghosts mediated by co-expression of l phage holin-endolysin and  $\Phi$ X174 gene E[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 45139.
- [16] NOBREGA F L, VLOT M, DE JONGE P A, et al. Targeting mechanisms of tailed bacteriophages[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2018, 16(12): 760-773.
- [17] RODRIGUEZ -RUBIO L, MARTINEZ B, RODRIGUEZ A, et al. The phage lytic proteins from

- the *Staphylococcus aureus* bacteriophage vB\_SauS-phiIPLA88 display multiple active catalytic domains and do not trigger staphylococcal resistance[J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e64671.
- [18] LAI W C B, CHEN X, HO M K Y, et al. Bacteriophage-derived endolysins to target gram-negative bacteria [J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2020, 589: 119833.
- [19] SANTOS S B, COSTA A R, CARVALHO C, et al. Exploiting bacteriophage proteomes: The hidden biotechnological potential[J]. *Trends in Biotechnology*, 2018, 36(9): 966-984.
- [20] OECHSLIN F, DARASPE J, GIDDEY M, et al. *In vitro* characterization of PlySK1249, a novel phage Lysin, and assessment of its antibacterial activity in a mouse model of *Streptococcus agalactiae* bacteremia[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 57(12): 6276-6283.
- [21] BECKER S C, FOSTER-FREY J, DONOVAN D M. The phage K lytic enzyme LysK and lysostaphin act synergistically to kill MRSA[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2008, 287(2): 185-191.
- [22] 陈杰. 水稻细菌性褐条病菌噬菌体 AP1 新穿孔素-裂解素双组分裂解系统的鉴定和功能研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2019.
- CHEN J. Research on identification and function of a new type of holin-endolysin lysis system in *Acidovorax oryzae* phage AP1[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2019.

### Bioinformatics Analysis and Cloning Expression of Endolysin and Holin in *Salmonella* Phage SM-p2

Qi Bin, Xie Tianhui, Shi Hui\*

(College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400715)

**Abstract** *Salmonella* is common food-borne pathogen which could endanger public safety. Endolysin and holin, as new type of biological antibacterial agent, are functional proteins encoded by phages which can lyse bacteria. In this study, deca oligonucleotide primers and PCR technology were used to preliminarily identify phage SM-p2 and were used to determine genes of *Hol 2* and *Lys 2*. Bioinformatics was used to predict the structural and physiological properties of these two proteins. *E. coli* expression system was used to express *Lys 2* and *Hol 2*. The results showed that the bacteriophage SM-p2 was a dsDNA virulent bacteriophage with a 'holin-endolysin' lysis system. Bioinformatics analysis showed that *Hol 2* was a type III holin with only one transmembrane structure and *Lys 2* was a peptidoglycan hydrolase without transmembrane structure. Both *Lys 2* and *Hol 2* could be successfully expressed by the *E. coli* expression system, but holins could directly disrupt bacterial inner membrane and had a toxic effect on competent expressing cells, resulting in less expression of *Hol 2* in *E. coli* BL21 (DE3). Finally, *Lys 2* and *Hol 2* were obtained at the concentration of 5.419 mg/mL and 2.191 mg/mL, respectively. In this study, the gene of endolysin and holin of *Salmonella* phage SM-p2 were identified and successfully expressed, which laid a molecular foundation for antibacterial research of SM-p2.

**Keywords** bacteriophage; gene cloning; endolysin; holin