

中文摘要

裂解酶 LysLF1 的生物学特性及其抗链球菌的效果评价

链球菌 (*Streptococcus spp*) 是一类危害严重的人畜共患病原菌。目前, 抗生素仍是治疗链球菌感染的首选药物, 如: β -内酰胺类 (以青霉素为代表)、大环内酯类、氟喹诺酮类抗生素等。但世界各地包括中国、东南亚、北欧和美洲等多个国家和地区均有链球菌耐药表型和耐药基因 (*mefA*、*ermB*、*TetM* 等) 的报道。再加上新候选抗生素的减少迫使人们研发新型抗菌制剂。裂解酶是一种由噬菌体编码的水解酶, 可特异性切割细菌细胞壁肽聚糖上不同的化学键, 破坏细胞壁完整性, 使细菌在渗透压的作用下发生崩解。该类酶可以在体外表达, 具有易于获取、易于改造、起效快、安全、不易使细菌产生抗性的特点。另外, 链球菌细胞壁肽聚糖中含有相似交联桥结构, 这使得链球菌噬菌体裂解酶较其它种属裂解酶相比天然具有更宽的裂解谱, 可裂解属内多种链球菌。因此, 裂解酶有望成为抗链球菌感染的新型抗菌制剂。

在本研究中, 以马链球菌属临床分离株 3518 为宿主菌, 在其全基因组序列中挖掘到一个具有良好裂解活性的前噬菌体裂解酶, 将其命名为 LysLF1。将 LysLF1 的氨基酸序列上传至生物信息学在线分析网站 NCBI, 进行同源性比对分析。分析结果表明, LysLF1 与其它已被研究过功能的链球菌裂解酶的同源性最高为 21.88%, 表明 LysLF1 为一个新的链球菌属裂解酶; 基本生物学特性测定结果表明, LysLF1 具有较宽的宿主范围, 可裂解受试菌株中的马链球菌、猪链球菌和解没食子酸链球菌, 细菌减少比率在 30%~99%; pH 稳定性测定结果表明, LysLF1 具有较强的耐酸碱能力, 在 4~8 pH 范围内保持良好的杀菌活性可裂解约 70%~99% 的活菌; 温度稳定性结果表明, LysLF1 对温度较为敏感, 温度高于 40°C 时其活性完全丧失; NaCl 稳定性结果显示, 高浓度 NaCl 会影响 LysLF1 活性, 使用 200 mM NaCl, 会使其杀菌量减少 1.24×10^8 CFU/mL; EDTA 稳定性结果显示, 金属离子是该酶发挥活性所非必须的。体外裂解实验结果进一步表明, LysLF1 具有良好的杀菌活性。100 μ g/mL 的 LysLF1 可使活菌数下降约 2 个 Lg 单位 (起始菌量为 10^8 CFU/mL), 杀死约 99% 的活菌。以上结果表明, LysLF1 具

有良好的应用前景。

随后，通过生物信息学在线分析工具 Phyre² 预测了 LysLF1 各结构域的 3D 结构和关键催化作用位点，并使用一步法将预测的关键催化位点逐一突变为丙氨酸，通过比较各突变体蛋白（N11A、C26A、H91A、G108A、G158A、D241A、D276A、D337A）与 Native LysLF1 的杀菌活性，确定其关键催化位点。实验结果表明，C26A、G108A 的杀菌活性较 Native LysLF1 相比，分别下降了 81.99%，61.61%。从而确定了 C26 和 G108 是 LysLF1 发挥裂解活性的关键氨基酸作用位点；通过构建截短体蛋白（LysLF1A(1~170 aa)、LysLF1B(1~360 aa)、LysLF1C(330~445 aa)）采用体外杀菌活性实验确定各结构域的裂解活性；结果表明，LysLF1A(1~170 aa)、LysLF1B(1~360 aa) 具有裂解活性，LysLF1C(330~445 aa) 不具有裂解活性；通过构建融合蛋白（LysLF1A-EGFP、LysLF1B-EGFP、EGFP-LysLF1C），使用激光共聚焦显微镜确定各结构域的结合活性。结果表明，LysLF1B-EGFP、EGFP-LysLF1C 具有结合活性，LysLF1A-EGFP 不具有结合活性。从而确定了 LysLF1 的结构形式为双催化域和一个结合域，发挥结合活性的结构域与 SH3 相似，GH25 结构域也与结合有关，发挥催化活性的关键结构域与 CHAP 相似。以上结果，为日后 LysLF1 的人工设计与改造奠定了基础。

最后，通过使用宿主菌马链球菌临床分离株 3518 建立小鼠肺炎感染模型，使用不同浓度的 LysLF1 治疗小鼠，评价 LysLF1 的体内抗菌效果。结果显示，200 $\mu\text{g}/\text{只}$ 和 400 $\mu\text{g}/\text{只}$ 剂量的 LysLF1 均有提高小鼠存活率和减慢小鼠死亡的效果。200 $\mu\text{g}/\text{只}$ 剂量的 LysLF1 可保护 37.5% 的小鼠免受死亡，400 $\mu\text{g}/\text{只}$ 剂量的 LysLF1 可使小鼠存活率提高到 75%。小鼠肺部细菌载量检测结果表明，400 $\mu\text{g}/\text{只}$ 剂量的 LysLF1 对菌株 3518 有清除作用。肺部病理组织学切片结果显示，与未治疗组相比，400 $\mu\text{g}/\text{只}$ 剂量的 LysLF1 可缓解小鼠肺部病理组织学损伤。在 12 h 和 48 h 的肺间质厚度、肺泡内出血、炎性细胞浸润等情况均有所减轻。

综上所述，本研究发现并成功获得一个具有良好体内外抗菌活性的新链球菌噬菌体裂解酶，该酶在治疗链球菌感染中具有良好的应用潜力，为丰富链球菌细菌裂解酶酶库和新型抗菌制剂的研发奠定基础。

关键词：

链球菌裂解酶，新型抗菌制剂，结构域，小鼠肺炎模型

Abstract

Biological characteristics of LysLF1 and its effect against *Streptococcus*

The disease caused by *Streptococcus spp* is a serious zoonosis which distributes widely in the world. Antibiotics including β -lactam (represented by penicillin), macrolide and quinolone were effective drug for the therapy for *streptococcal* infection. However, there have been reports of *Streptococcus* resistant phenotype and genotype (*mefA*, *ermB*, *TetM*, etc.) in China and worldwide. In addition, the reduction of new candidate antibiotics has forced people to develop new antibacterial agents. Endolysins are hydrolytic enzymes which are encoded by phage, specifically cleave the specific bonds on peptidoglycan of bacterial cell wall, destroy the integrity of cell wall, and make bacteria disintegrate under the osmotic pressure. It can be expressed *in vitro* and has various features, such as easily accessible, facilely modified, quick effect, safety, and low resistance to bacteria. In addition, there are the similar cross-bridge in *Streptococcal* peptidoglycan which allows *Streptococcal* endolysins have a wider host spectrum than other species endolysins in nature, and can lyse a variety of *Streptococci* species. Therefore, endolysin is expected to become a new antimicrobial alternatives against *Streptococcal* infections.

In this study, the clinical isolate 3518 of *Streptococcus equi* was used as the host bacteria, and a prophage endolysin with good antimicrobial activity was found in its whole genome sequence, which was named LysLF1. Uploaded the amino acid sequence of LysLF1 to the bioinformatics online analysis website NCBI for comparing the homology. The results of analysis indicated that LysLF1 had the highest homology of 21.88% with other *Streptococcal* endolysins that had been studied. LysLF1 is a new *Streptococcus* endolysin. The results of biological characteristics indicated that LysLF1 had a wide host range and could lyse *Streptococcus equi*, *Streptococcus suis*, and *Streptococcus gallolyticus* in the tested strains, with a bacterial reduction rate of 30%

to 99%. The pH stability test results showed that LysLF1 has strong acid and alkali resistance, and maintained good antimicrobial activity within the pH range of 4~8, which can cleave about 70% to 99% of live bacteria; The temperature stability results indicated that LysLF1 was more sensitive to temperature, and its activity is completely lost when the temperature was above 40 °C; The stability results of NaCl showed that high concentrations of NaCl would affect the activity of LysLF1, and the use of 200 mM NaCl would reduce its antimicrobial activity by 1.24×10^8 CFU/mL; The stability results of EDTA showed that metal ions were not necessary for the enzyme to exert its activity. The results of *in vitro* lysis experiments further indicated that LysLF1 had good antimicrobial activity.

Subsequently, the 3D structure and key catalytic sites of each domain of LysLF1 were predicted using the bioinformatics online analysis tool Phyre², and the predicted key catalytic sites were mutated into alanine using a one-step method. By comparing the antimicrobial activity of various mutant proteins (N11A, C26A, H91A, G108A, G158A, D241A, D276A, D337A) with Native LysLF1, their key catalytic sites were determined. The experimental results showed that the antimicrobial activity of C26A and G108A decreased by 81.99% and 61.61% compared to Native LysLF1, respectively. Thus, it was determined that C26 and G108 are key amino acid action sites for LysLF1 to exert proteolytic activity; By constructing truncated proteins (LysLF1A (1~170 aa), LysLF1B (1~360 aa), and LysLF1C (330~445 aa)), the proteolytic activity of each domain was determined through *in vitro* antimicrobial experiments; The results showed that LysLF1A (1~170 aa) and LysLF1B (1~360 aa) exhibited proteolytic activity, while LysLF1C (330~445 aa) did not exhibit proteolytic activity; By constructing fusion proteins (LysLF1A-EGFP, LysLF1B-EGFP, EGFP-LysLF1C), the binding activity of each structural domain was determined using LSCM. The results showed that LysLF1B-EGFP and EGFP-LysLF1C had binding activity, while LysLF1A-EGFP did not. Thus, the structure type of LysLF1 was determined to be a dual-enzymatically active domain (EAD) and a cell wall-binding domain (CBD). The domain that exerts binding activity was similar to SH3, and the GH25 domain was also related to binding. The key domain that exerted catalytic activity was similar to CHAP. The above results have laid the

foundation for the artificial design and transformation of LysLF1 in the future.

Finally, a mice pneumonia infection model was established using the host *Streptococcus equi* clinical isolate 3518. Different concentrations of LysLF1 were used to treat mice and evaluated the *in vivo* antibacterial effect of LysLF1. The results showed that 200 µg/mice and 400 µg/mice LysLF1 had the effect of improving mice survival rate and slowing their death. 200 µg/mice LysLF1 could protect 37.5% of mice from death, 400 µg/mice LysLF1 could increase the survival rate of mice to 75%. The bacterial load results in the mice lungs showed that 400 µg/mice LysLF1 had a scavenging effect on isolate 3518. The results of lung histopathological showed that compared to the untreated group, 400 µg/mice LysLF1 could alleviate pathological and histological damage to the lungs. The pulmonary interstitial thickness, alveolar hemorrhage, and inflammatory cell infiltration were reduced at 12 and 48 hours.

In summary, this study found and successfully obtained a novel *Streptococcal* endolysin with good antimicrobial activity *in vitro* and *in vivo*. LysLF1 has good application potential in the treatment of *Streptococcal* infections, laying the foundation for enriching the *Streptococcal* endolysin library and developing new antibacterial agents.

Keywords:

Streptococcal endolysins; novel antimicrobial agents; domain; mice pneumonia model

关于学位论文使用授权的声明

本人完全了解吉林大学有关保留、使用学位论文的规定，同意吉林大学保留或向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅；本人授权吉林大学可以将本学位论文的全部或部分内 容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文和汇编本学位论文。

（保密论文在解密后应遵守此规定）

论文级别： 硕士 博士

学科专业： 兽医

论文题目： 裂解酶 LysLF1 的生物学特性及其抗链球菌的效果评价

作者签名： 黄春正

指导教师签名： 顾敬敏

2023 年 6 月 1 日

目 录

前 言	1
第一篇 文献综述	3
第 1 章 链球菌的研究进展	3
1.1 链球菌的概述及危害	3
1.2 链球菌的分类方法	4
1.3 致病性链球菌的毒力因子	5
1.4 致病性链球菌感染的治疗现状	6
第 2 章 链球菌抗菌制剂的研究进展	7
2.1 噬菌体及其裂解酶的概述	8
2.2 链球菌抗菌制剂的研究概况	9
2.3 展望	11
第二篇 研究内容	13
第 1 章 裂解酶 LysLF1 的表达及其基本生物学特性	13
1.1 材料	13
1.2 方法	15
1.3 结果	21
1.4 讨论	31
1.5 小结	33
第 2 章 裂解酶 LysLF1 的结构预测与功能解析	34
2.1 材料	34
2.2 方法	36
2.3 结果	40
2.4 讨论	47
2.5 小结	49
第 3 章 裂解酶 LysLF1 在动物感染模型中的抗菌效果评价	50
3.1 材料	50

3.2 方法.....	51
3.3 结果.....	52
3.4 讨论.....	54
3.5 小结.....	55
结 论	56
参考文献	57
导师简介	67
作者简介	68
攻读硕士期间发表的学术论文及其他成果	69
致 谢	70

英文缩写词

英文缩写	英文全称	中文全称及注释
BHI	Brain Heart Infusion Broth	脑心浸出液肉汤
bp	Base pair	碱基对
CBD	Cell-wall binding domain	细胞壁结合结构域
CFU	Colony-forming unit	菌落形成单位
CLSM	Confocal laser scanning microscope	激光扫描共聚焦显微镜
CPS	capsular polysaccharides	荚膜多糖
EAD	Enzymatically active domain	酶活性结构域
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid	乙二胺四乙酸
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein	增强型绿色荧光蛋白
IPTG	Isopropyl β -D-Thiogalactoside	异丙基硫代半乳糖苷
Kan	kanamycin	卡那霉素
KD	Kilodalton	千道尔顿
LB	LB Broth	LB 肉汤
ORF	Open Reading Frame	开放阅读框
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
PBS	Phosphate Buffered Saline	磷酸盐缓冲溶液
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
PGHs	phage-encoded peptidoglycan hydrolases	噬菌体编码的肽聚糖水解酶
Tris-HCl	Tris-HCl	三羟甲基氨基甲烷 - 盐酸缓冲溶液

前 言

链球菌 (*Streptococcus spp*) 是一类危害严重的革兰氏阳性球菌, 其宿主范围广泛, 可感染人、猪、马、牛、鸡等多种动物。该类菌定殖于皮肤、口腔、鼻黏膜、生殖道、呼吸道等与外界直接接触的表面或粘膜。可引起人类咽炎、肺炎、阴道炎、败血症、奶牛乳腺炎、猪脑膜炎、马腺疫等多种临床症状。在人类健康、兽医临床及畜牧业生产中扮演重要角色。目前, 防治链球菌感染的策略仍是预防为主, 兼用抗生素治疗。近年来, 由于抗生素的不合理使用, 大多数的临床分离株的抗生素敏感性降低, 甚至出现多重耐药菌株和超级细菌。另外, 抗生素的毒副作用 (损伤机体系统)、过敏反应以及对机体正常菌群的影响等危害迫使人们寻找代替抗生素的新型抗菌制剂。噬菌体裂解酶是一类来源于噬菌体的肽聚糖水解酶 (phage-encoded peptidoglycan hydrolases PGHs)。该类酶通过与细菌细胞壁肽聚糖的化学键作用来发挥催化活性。相较于抗生素具有特异性强、很难产生抗性、抗菌效率高等特点。另外, 裂解酶作为一种蛋白质, 安全有效、易于人工合成修饰改造、研发成本低。凭借以上优势, 裂解酶逐渐走进人们的视线, 挖掘它作为新型抗菌制剂的潜力, 使其尽早应用于临床来抗菌。

链球菌的细胞壁肽聚糖具有相似的交联桥结构, 这使得链球菌噬菌体裂解酶相较于其它种属裂解酶有着更宽的裂解范围与应用潜力。目前, 约有 25 个链球菌属裂解酶被报道。这些报道主要针对酶学性质、结构以及抗菌活性进行研究, 很少有体内的研究, 更缺乏相应的临床数据。本研究从一株马链球菌临床分离株 3518 的全基因组中获取到一个前噬菌体裂解酶, 将其命名未 LysLF1。LysLF1 的氨基酸序列虽与 GH25 家族溶菌酶以及链球菌噬菌体 LF2 编码的裂解酶同源性较高, 但是并没有研究这两个蛋白功能的报道。与已研究过体内外抗菌活性的其它链球菌属裂解酶 (PlySs2、Ply7971、Ply30、Ply5218、LysSMP、Ply1228、PlySs9) 相比, LysLF1 的同源性低于 21.88%。表明 LysLF1 为一个具有研究价值的链球菌属裂解酶新成员。首先对其进行宿主范围、杀菌活性、稳定性等基本生物学特性分析; 随后预测并验证了该酶各区域的功能, 推测其结构组成。并通过定点突变技术找到酶的关键氨基酸作用位点。最后通过建立小鼠肺炎感染模型, 测定肺部细菌载量、肺部病理组织学变化等指标评估其体内抗感染效果。

本研究为后续酶的人工设计改造以及应用于临床治疗奠定基础。

第一篇 文献综述

第1章 链球菌的研究进展

1.1 链球菌的概述及危害

链球菌 (*Streptococcus spp*) 是革兰氏阳性需氧或兼性厌氧球菌, 无鞭毛、无芽孢、有些具有荚膜。在普通光学显微镜下观察呈球形或椭圆形, 对营养要求复杂, 需补充血清、葡萄糖等营养物质, 在液体培养基中成链状生长、固体培养基中成单、成双生长^[1]。目前已发现的链球菌种类超过 60 种^[2], 大多数为人类和多种动物机体内的正常菌群, 存在于消化道、呼吸道等与外界直接接触的表面或粘膜, 少部分可引起疾病, 如乳房链球菌 (*S. uberis*)^[3]、猪链球菌 (*S. suis*)^[4]、马链球菌 (*S. equi*)^[5]、肺炎链球菌引起 (*S. pneumoniae*) 等^[6]被称为致病性链球菌。

致病性链球菌的危害极大, 大多数为人畜共患病原菌。如无乳链球菌 (*S. agalactiae*) 不仅感染奶牛引起牛乳腺炎也能感染人类^[7, 8], 尤其是孕妇并在其分娩的过程中垂直传播给新生儿^[9]。在全球范围内, 发病率最高的为 ST17 株^[10], 该类菌感染新生儿分为早发型和迟发型, 早发型在新生儿生命初期的 72 小时内发病, 表现为呼吸道疾病、败血症和脑膜炎等; 迟发型在生命初期的第 4 到 90 天内发病, 该阶段的发病与新生儿和环境接触有关, 出现败血症、脑膜炎、泌尿道感染、骨关节炎、呼吸系统疾病和蜂窝组织炎等症状, 甚至死亡。存活的新生儿也有发生智力障碍、脑畸形、脑积水等神经系统疾病后遗症的可能性^[7, 11, 12]。

猪链球菌 (*S. suis*) 的宿主范围广泛, 可感染人、猪、羊、马、禽 (鸟、鸭、鸡) 等动物。根据该类菌荚膜多糖 (CPS) 的抗原性不同可分为 29 种血清型, 其中血清 2 型在猪链球菌和人类感染中最为普遍, 血清 4、5、9、14、16、21、24 和 31 型有病例报道^[13-17]。该类菌感染引起的猪链球菌病是造成全球养猪业死亡率 (4~12 周龄仔猪) 较高和经济损失的主要原因。据估计, 各地区和农场的发病率大不相同, 在 5%~20% 之间。大约 70% 的感染到达神经系统表现为脑膜炎, 最终使机体死亡^[18]; 马链球菌 (*S. equi*) 是一种条件性致病菌, 包括马链球菌兽疫亚种 (*Streptococcus equi subsp. zooepidemicus, SEZ*)、马亚种 (*Streptococcus equi subsp. equi, SEE*)、类马亚种 (*Streptococcus equi subsp. ruminatorum, SER*)^[19]。兽

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/898140032070006042>