



赵学慧, 芝吉, 曹青, 张浩浩, 何曾文, 邓静, 范子秋, 马永辉, 马金锐, 张坤中, 崇倩, 宋维丽, 薛惠文, 苟惠天. 单核细胞增生李斯特菌噬菌体裂解酶 Lys039 的活性分析及初步应用[J]. 中国农业大学学报, 2024, 29(9):112-121.

ZHAO Xuehui, ZHI Ji, CAO Qing, ZHANG Haohao, HE Zengwen, DENG Jing, FAN Ziqiu, MA Yonghui, MA Jinrui, ZHANG Kunzhong, CHONG Qian, SONG Weili, XUE Huiwen, GOU Huitian. Activity analysis and preliminary application of *Listeria monocytogenes* phage endolysin Lys039[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2024, 29(9):112-121.

DOI: 10.11841/j.issn.1007-4333.2024.09.10

单核细胞增生李斯特菌噬菌体裂解酶 Lys039 的 活性分析及初步应用

赵学慧¹ 芝吉¹ 曹青¹ 张浩浩¹ 何曾文¹ 邓静¹ 范子秋¹ 马永辉¹
马金锐¹ 张坤中¹ 崇倩¹ 宋维丽² 薛惠文¹ 苟惠天^{1*}

(1. 甘肃农业大学 动物医学院, 兰州 730070;

2. 临洮县龙门镇畜牧兽医站, 甘肃 定西 730500)

摘要 为探究单核细胞增生李斯特菌噬菌体裂解酶的特性及在食品基质中的初步应用, 从NCBI获取李斯特菌噬菌体裂解酶 *Lys039* 基因序列, 分析其生物信息学, 并在大肠杆菌中表达纯化, 研究其裂解活性、对生物被膜的影响以及在牛奶基质中的应用。结果表明: 1) 裂解酶 *Lys039* 由 341 个氨基酸组成, 分子质量为 36.4 ku, 等电点为 9.81, 其结构具有酰胺酶活性, 对本实验室 22 株单核细胞增生李斯特菌、2 株无害李斯特菌、1 株伊氏李斯特菌以及 1 株威氏李斯特菌具有裂解活性, 但是对葡萄球菌、枯草芽孢杆菌以及沙门菌没有显示出裂解活性。2) 随着 *Lys039* 浓度的升高, 裂解活性逐渐增强, 最适温度为 30 °C, 最适 pH 值为 6.0。3) *Lys039* 能显著清除单核细胞增生李斯特菌形成的生物被膜, 并且可以降低牛奶中单核细胞增生李斯特菌的细菌数量。综上, *Lys039* 温度耐受范围广、耐酸耐碱且裂解谱较宽, 可显著清除生物被膜以及初步应用效果良好。本研究为进一步防治及快速检测单核细胞增生李斯特菌提供理论基础。

关键词 裂解酶; 噬菌体; 单核细胞增生李斯特菌; *Lys039*

中图分类号 S852.612

文章编号 1007-4333(2024)09-0112-10

文献标志码 A

Activity analysis and preliminary application of *Listeria monocytogenes* phage endolysin Lys039

ZHAO Xuehui¹, ZHI Ji¹, CAO Qing¹, ZHANG Haohao¹, HE Zengwen¹, DENG Jing¹,
FAN Ziqiu¹, MA Yonghui¹, MA Jinrui¹, ZHANG Kunzhong¹, CHONG Qian¹,
SONG Weili², XUE Huiwen¹, GOU Huitian^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;

2. Longmen Town Animal Husbandry and Veterinary Station of Lintao Country, Dingxi 730500, China)

Abstract To investigate the properties of *Listeria monocytogenes* phage endolysin and initial application in food matrix, the gene sequence of *Listeria* bacteriophage endolysin *Lys039* was obtained from NCBI and subjected to bioinformatics analysis. The gene was then expressed and purified in *E. coli*, and its lytic activity, influence on biofilm, and application in milk matrix were investigated. The results showed that: 1) *Lys039*

收稿日期: 2023-12-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(32060822, 31960726); 2022年现代丝路寒旱农业科技支撑项目(GSLK-2022-17); 张家川揭榜挂帅项目(ZC-STK-2023A-030)

第一作者: 赵学慧(ORCID: 0009-0008-5486-7896), 硕士研究生, E-mail: 2926738983@qq.com

通讯作者: 苟惠天(ORCID: 0000-0002-5241-4673), 教授, 主要从事食源性疾病预防控制、动物性食品安全检测、人兽共患病的预警及综合防控等研究, E-mail: gouht@gsau.edu.cn

was composed of 341 amino acids, with a molecular weight of 36.4 ku and isoelectric point of 9.81. Its structure exhibited amidase activity and lyses the cell walls of 22 strains of *Listeria monocytogenes*, 2 strains of *Listeria innocua*, 1 strain of *Listeria ivanovii*, and 1 strain of *Listeria welshimeri* in our laboratory. However, it exhibit no lytic activity on *Staphylococci* spp, *Bacillus subtilis*, and *Salmonella* spp. 2) The lytic activity of Lys039 increased gradually with concentration enrichment, the optimum temperature was 30 °C and the optimal pH value was 6.0. 3) Lys039 can effectively clear the biofilm formed by *Listeria monocytogenes* and reduce the number of *Listeria monocytogenes* in milk. In conclusion, Lys039 has a wide range of temperature tolerance, acid and alkali resistance and wide lytic spectrum, which can significantly reduce biofilm and has good preliminary application. This study provides a theoretical basis for further prevention and rapid detection of *Listeria monocytogenes*.

Keywords endolysin; phage; *Listeria monocytogenes*; Lys039

单核细胞增生李斯特菌是食源性病原菌之一,也是人兽共患致病菌,可引起人类和动物的李斯特菌病。大多数李斯特菌病归因于3种血清型,分别为1/2a、1/2b和4b^[1]。分布广泛,主要见于土壤、腐烂的植物、青贮饲料以及水域等^[2],并且可在冰箱温度下生长繁殖,被称为“冰箱杀手”,是冷藏食品的主要隐患之一^[3]。人们通过食用污染的食品感染,对于新生儿、孕妇、老年人等免疫力低下的人群,可引起严重感染,导致脑膜炎等疾病的发生^[4]。李斯特菌在食品加工环境中能够存活数月甚至数年,部分归因于生物被膜的形成,生物被膜是附着在生物或非生物表面的微生物群落,由自身产生的细胞外聚合物包裹,该结构为细菌细胞提供保护作用^[5]。生物被膜的形成成为防治李斯特菌感染增加了难度。自抗生素问世以来,在防治细菌感染方面发挥了重大作用。然而,这些年由于抗生素的滥用,导致细菌耐药问题频发^[6]。因此,研究新型的抗菌方法及抗菌剂防治单核细胞增生李斯特菌感染极其重要。

噬菌体作为一种天然抗菌剂,能够特异性的裂解宿主细菌^[7]。一直以来,被认为具有防治细菌感染以及抑制生物被膜的能力,作为一种新的抗菌制剂,具有很大的优势^[8]。李斯特菌噬菌体能够特异性感染单核细胞增生李斯特菌。噬菌体LMP1和LMP7在10和30 °C条件下均能抑制单核细胞增生李斯特菌ATCC7644和ATCC19114的生长^[9]。但是,与细菌长时间接触,容易使得细菌产生噬菌体抗性;噬菌体在分离过程中不稳定;而且作为一种病毒,不适用于为化学定义的抗菌药物制定的法规^[10-11]。对于噬菌体,还有很多问题有待解决。

而噬菌体在细菌细胞内复制的后期会表达一种能够裂解细菌细胞壁的蛋白水解酶——噬菌体裂解酶。噬菌体裂解酶不仅安全、高效、无残留,

而且细菌对其不易产生抗性;其抗体不会削弱裂解酶的杀菌作用;裂解酶是非生命体,更容易成药,比起噬菌体更有发展潜力^[12]。生物被膜的形成,给临床疾病的治疗和医疗设备的消毒带来了很大的困难,并且对食品加工方面也造成了威胁。利用金黄色葡萄球菌噬菌体裂解酶E-LM12结合结构域CBD3的高度特异性,作为靶向剂应用到光动力抗菌疗法(aPDT)中,用于治疗浅表感染或术中感染的植入物和组织进行外科清创^[13]。因为革兰氏阴性菌有很厚的外膜,这限制了裂解酶的裂解能力,但可以添加外膜渗透剂(EDTA-2Na)或者对裂解酶其中的氨基酸进行突变后与抗菌肽融合,不仅发挥了裂解作用,而且还使抗菌能力提高了2~4个lg单位^[14-15]。裂解酶作为一种新型抗菌剂,具有潜在的应用前景。与其他裂解酶相比,单核细胞增生李斯特菌噬菌体裂解酶的研究大多集中在食品应用方面。3种抗菌剂(乳酸链球菌肽、月桂精氨酸乙酯、ε-聚赖氨酸)与裂解酶PlyP100分别单独或互相联合应用,对新鲜奶酪中单核细胞增生李斯特菌可以发挥有效的抑菌作用^[16]。裂解酶LysZ5在4 °C条件下,3 h就可以将豆浆中的单核细胞增生李斯特菌数量减少4 lg(CFU/mL)^[17]。无论是单独使用还是与其他制剂联合应用,都能够降低食品中单核细胞增生李斯特菌的数量,是一种有效的抑制剂。李斯特菌噬菌体裂解酶也能够抑制和清除形成的生物被膜,裂解酶293-Amidase和单核细胞增生李斯特菌在20 °C孵育5 d后,与对照组相比较,抑制率可达78%^[18]。而且研究还发现,从PlyP100处理后的奶酪中分离得到的李斯特菌,并没有对PlyP100产生耐药性^[19]。我国对于单核细胞增生李斯特菌噬菌体裂解酶的研究报道较少,尤其缺少对生物被膜

作用的相关研究。

因此,本研究旨在对单核细胞增生李斯特菌噬菌体裂解酶 Lys039 进行表达纯化,对其杀菌活性、对生物被膜的影响以及在牛奶基质中的初步应用进行研究,为进一步探究单核细胞增生李斯特菌防治及快速检测提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

本研究使用的菌株为单核细胞增生李斯特菌 A85-1-1,表达载体 pET-28a、裂解谱中所用李斯特菌菌株、沙门菌、白色葡萄球菌、柠檬色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌均为本实验室保存,感受态大肠杆菌 BL21 购自北京擎科生物科技有限公司。

1.2 材料与试剂

全基因及引物合成,由生工生物工程(上海)股份有限公司完成;卡那霉素、异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)、蛋白酶抑制剂(PMSF),北京索莱宝生化试剂有限公司;质粒小提试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司;蛋白分子质量 Marker,甘肃伟博鑫生物科技有限公司;BCA 蛋白定量试剂盒,碧云天生物技术有限公司。

1.3 裂解酶 Lys039 基因获取及生物信息学分析

通过美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)数据库获取李斯特菌噬菌体 LP-039(MN172529.2)的裂解酶基因序列,将该噬菌体编码的裂解酶命名为 Lys039。参考涂传灯等^[20]方法,利用在线工具 ExPasy-ProtParam Tool(<https://web.expasy.org/protparam/>)预测分子量、等电点、不稳定指数、脂肪指数等理化特性;利用 NCBI 数据库中的 Conserved Domain Search Service, CD Search(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)进行保守结构域功能分析;通过在线服务器 SWISS-MODEL,采用同源建模的方法预测裂解酶的三级结构(<https://swissmodel.expasy.org/interactive>)。

1.4 全基因合成与质粒载体 pET-28a-Lys039 的构建及鉴定

将裂解酶 Lys039 基因序列送生工生物工程(上海)股份有限公司合成,构建重组质粒 pET-28a-Lys039。将含有重组质粒 pET-28a-Lys039 的甘油菌,划线接种于含 Kan 的 LB 固体培养基上,37℃温

箱中过夜培养,挑取 4~5 个单克隆,分别接种于含 Kan 的 LB 液体培养基中,37℃,200 r/min 过夜培养,按照质粒小提试剂盒说明书提取质粒;将重组质粒转化至大肠杆菌感受态细胞 BL21 中。挑取单克隆鉴定是否转化成功,PCR 鉴定通用引物 T7: TAATACGACTCACTATAGGG, T7 ter: GCTA GTTATTGCTCAGCGG, PCR 扩增条件: 94℃预变性 5 min, 94℃变性 30 s, 55℃退火 30 s, 72℃延伸 1 min 40 s, 共 32 个循环; 72℃再延伸 10 min。

1.5 重组蛋白的诱导表达及检测

参考丁一峰等^[21]方法,略有改动。挑取阳性单克隆,接种于含 Kan 的液体培养基中,振荡培养至对数生长期($OD_{600}=0.6$)。按照 1:100 的比例扩大培养,当 OD_{600} 达到 0.6 时,冰浴 30 min,加入 0.1 mmol/L 的 IPTG, 16℃, 200 r/min 诱导 12 h。8 000 r/min, 离心收集菌体, PBS 洗 3 次, 将菌体重悬。超声破碎 30 min(220 W, 工作 3 s, 间歇 4 s), 4℃, 8 000 r/min 离心, 收集上清液, 用镍柱亲和层析纯化蛋白。通过聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析重组蛋白。同时利用 BCA 法测定蛋白浓度。用超滤管将缓冲液置换为 PBS 用于裂解谱之后的试验。

1.6 裂解酶 Lys039 在固体平板上裂解活性的测定

采用平板裂解法检测 Lys039 的裂解活性^[22]。将单核细胞增生李斯特菌 A85-1-1 培养至对数生长期($OD_{600}=0.6$), 涂布于固体培养基 BHI 上, 取 Lys039 纯化液 10 μ L 滴于平板中央(缓冲液 Elution buffer 作对照)。晾干后, 倒置于 37℃培养 8 h 观察是否有抑菌圈形成。

1.7 裂解酶 Lys039 的裂解谱分析

参考尹红梅等^[22]方法, 稍有改动。受试菌株为本实验室所保存的 22 株单核细胞增生李斯特菌、2 株无害李斯特菌、1 株伊氏李斯特菌、1 株威氏李斯特菌、1 株枯草芽孢杆菌、2 株葡萄球菌、3 株沙门菌, 总共 32 株菌株。菌液培养至对数生长期, 利用倾注平板法, 将菌液与适当温度的培养基混合, 平铺于平皿中, 待其凝固。取裂解酶 Lys039 10 μ L 滴在平皿中央, 缓冲液 Elution buffer 作对照。倒置于 37℃温箱中培养 8 h。观察并记录结果, 试验重复 3 次。

1.8 裂解酶 Lys039 杀菌活性的测定

1.8.1 不同浓度裂解酶 Lys039 的杀菌活性

参考 Yuan 等^[8]方法。将单核细胞增生李斯特菌 A85-1-1 培养至对数生长期, PBS 洗 3 次。4℃,

8 000 r/min, 离心 10 min, PBS 溶液重悬菌体。取 9 个 1.5 mL 离心管, 分别向其中加入 100 μ L 菌液, 与 100 μ L 裂解酶 Lys039 (终浓度分别为 50、100、200 和 400 μ g/mL) 混合, 37 $^{\circ}$ C, 180 r/min 孵育, 2 h 内每 20 min 取样, 稀释成不同梯度, 取 100 μ L 涂布于 BHI 固体培养基上, 37 $^{\circ}$ C 倒置培养 24 h 观察计数, 试验重复 3 次。

1.8.2 温度对裂解酶 Lys039 杀菌活性的影响

参考 Lu 等^[23]方法。400 μ g/mL 的裂解酶 Lys039 在不同温度 (20、30、37、42、50、60、70 和 80 $^{\circ}$ C) 处理 30 min, 待其温度降到室温。将培养到对数生长期的单核细胞增生李斯特菌 A85-1-1 用 PBS 洗 3 次, 重悬后与 Lys039 混合, 37 $^{\circ}$ C, 180 r/min 孵育 2 h, 将培养液稀释不同梯度, 涂布后 37 $^{\circ}$ C 倒置培养 24 h 计数, 试验重复 3 次。

1.8.3 pH 对裂解酶 Lys039 杀菌活性的影响

参考 Lu 等^[23]方法。培养细菌同上, PBS 重悬菌体, 分别取 1 mL 菌液加入到 1.5 mL 离心管中, 12 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 用不同 pH (3、4、5、6、7、8、9、10、11 和 12) 的 PBS 重悬菌体, 分别与 400 μ g/mL 的裂解酶 Lys039 混合, 振荡培养 2 h。涂布后 37 $^{\circ}$ C 倒置培养 24 h 计数, 试验重复 3 次。

1.9 裂解酶 Lys039 对单核细胞增生李斯特菌生物被膜的影响

采用结晶紫染色法测定生物被膜形成量^[24]。将单核细胞增生李斯特菌 A85-1-1 培养到对数生长期, 按 1:100 接种至 BHI 液体培养基中, 吸取 200 μ L 加入 96 孔板, 空白对照组加入 200 μ L BHI 培养基。分别培养 12、24、48 和 72 h 形成生物被膜, 弃去浮游菌, PBS 洗 3 次。加入 200 μ L 400 μ g/mL 的裂解酶 Lys039 作为试验组, 阴性对照组为同等体积的 PBS 缓冲液, 30 $^{\circ}$ C 孵育 2 h。用 PBS 洗 3 次, 甲醇固定 15 min, 弃去甲醇, 室温放置 15 min 使甲醇完全挥发, 然后加入 0.1% 的结晶紫溶液染色 30 min, 弃去染色液用 PBS 洗 3 次, 最后加入 200 μ L 95% 乙醇脱色 20 min, 测定其 OD₅₉₅ 分析裂解酶 Lys039 对单核细胞增生李斯特菌生物被膜的清除作用。每组做 3 个平行, 试验重复 3 次。

1.10 牛奶基质中裂解酶 Lys039 的裂解活性

本试验采用的样品为全脂超高温牛奶和脱脂超高温牛奶, 来评估裂解酶 Lys039 在牛奶基质中的裂解作用, 参考 Agún 等^[25]方法, 略有改动。将培养

至对数生长期的单核细胞增生李斯特菌 A85-1-1 用 PBS 洗 3 次重悬, 按照 1:100 加入牛奶中, 再加入 400 μ g/mL 的裂解酶 Lys039, 混合均匀, 不加裂解酶的缓冲液作为对照组。分别在 30 $^{\circ}$ C 静置孵育, 在 0.5、1、2、4、6、12 和 24 h 取样 100 μ L, 连续稀释至合适梯度, 涂布在 BHI 固体平板上, 37 $^{\circ}$ C 培养 24 h。每组做 3 个平行, 试验重复 3 次。

1.11 数据处理和统计分析

试验数据采用 Excel 2016、IBM SPSS Statistics 2022、Origin 2022 进行统计分析以及作图。 $*P<0.05$, 表示差异显著; $**P<0.01$ 、 $***P<0.001$ 均表示差异极显著; ns 表示差异不显著。

2 结果与分析

2.1 Lys039 生物信息学分析

利用 ExPasy-ProtParam Tool 预测到 Lys039 由 341 个氨基酸组成, 分子质量为 36.4 ku, 等电点为 9.81, 不稳定指数为 16.24, 说明该裂解酶稳定。亲水系数为 -0.740, 具有一定的亲水性。由保守结构域分析可知, Lys039 是典型的模块化结构。含有一个 N 端 Amidase_2 结构域 (PF01510), C 端是一个新的结合结构域 (CBD), Lys039 具有酰胺酶活性, 切割细菌细胞壁中 N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸之间的酰胺键, 从而发挥裂解作用。用 SWISS-MODEL 同源建模预测了三维结构 (图 1)。

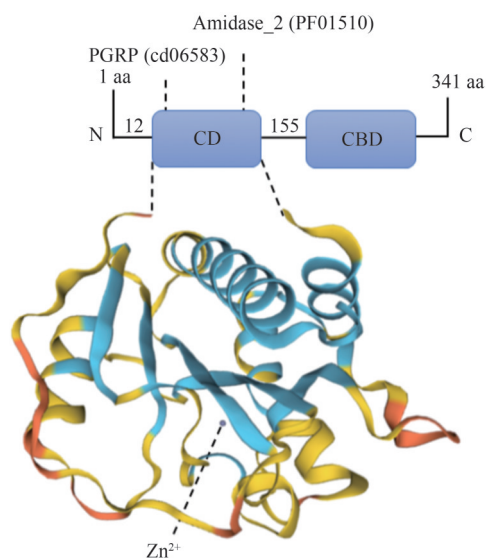
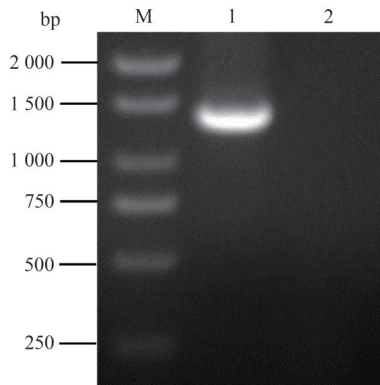


图 1 Lys039 三维结构预测

Fig. 1 Lys039 Three-dimensional structure prediction

2.2 阳性转化子的鉴定

以 BL21/pET-28a-Lys039 单克隆为模板,用引物 T7、T7 ter 对阳性转化子进行菌液 PCR 鉴定,结果如图 2 所示,片段大小正确。同时重组质粒测序结果表明,裂解酶基因已经成功转化至感受态大肠杆菌 BL21 中。



M: 2 000 DNA Marker; 1: 重组质粒扩增产物; 2: 阴性对照。
M: 2 000 DNA Marker; 1: Recombinant plasmid amplification product; 2: Negative control.

图2 重组质粒菌液PCR鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant palsmid bacteria by PCR

2.3 重组蛋白的表达纯化及检测

由图 3 可以看出,裂解酶 Lys039 表达菌株经 IPTG 诱导后,在破碎上清中约 40 ku 的位置出现目的条带,除去 pET-28a 载体本身携带的 His 标签分子量(约 4.5 ku),经亲和层析成功纯化出与理论大小(36.4 ku)相符的目的蛋白。

2.4 裂解酶 Lys039 平板裂解活性

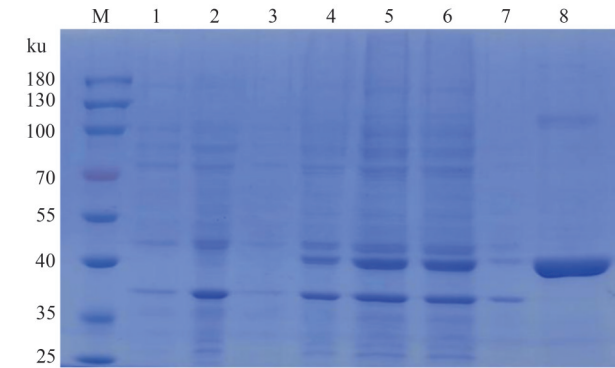
如图 4 所示,与对照组比较(Elution buffer),纯化的裂解酶 Lys039 在含有单核细胞增生李斯特菌菌株 A85-1-1 的 BHI 固体平板上形成裂解圈,表明 Lys039 有裂解作用。

2.5 裂解酶 Lys039 裂解谱分析

由表 1 可以看出,裂解酶 Lys039 可以裂解本实验室中 22 株单核细胞增生李斯特菌、2 株无害李斯特菌 4-49 和 6-99、1 株伊氏李斯特菌以及 1 株威氏李斯特菌 4-43。对于白色葡萄球菌、柠檬色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌以及革兰氏阴性菌沙门菌没有裂解作用。表明该裂解酶对李斯特菌属成员具有特异性。

2.6 裂解酶 Lys039 杀菌活性分析

利用活菌计数法测定裂解酶 Lys039 的杀菌活性。裂解酶 Lys039 具有剂量依赖性,在同一时间

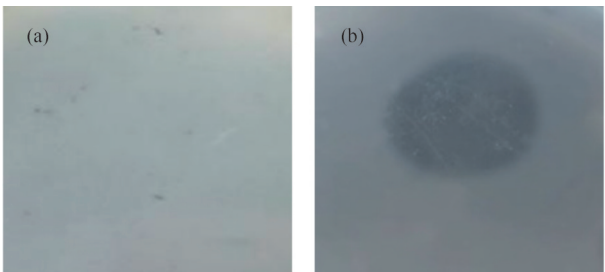


M: Marker; 1: 未诱导 pET-28a; 2: 诱导 pET-28a; 3: 未诱导 pET28-Lys039; 4: 破碎前全蛋白; 5: 破碎后全蛋白; 6: 上清; 7: 沉淀; 8: 纯化蛋白。

M: Marker; 1: Uninduced pET-28a; 2: Induced pET-28a; 3: Uninduced pET28a-Lys039; 4: Whole protein before fragmentation; 5: Whole protein after fragmentation; 6: Supernatant; 7: Precipitation; 8: Purified protein.

图3 重组蛋白 Lys039 SDS-PAGE 图

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of recombinant protein Lys039



(a)对照组(Elution buffer);(b)试验组(Lys039)。
(a) Control group (Elution buffer); (b) Experimental group (Lys039).

图4 平板裂解试验检测裂解酶 Lys039 裂解活性

Fig. 4 Plate cleavage test to detect the lytic activity of endolysin Lys039

下,高浓度的 Lys039 具有高杀菌活性。与未加裂解酶处理的对照组相比,400 $\mu\text{g/mL}$ 的 Lys039 与单核细胞增生李斯特菌 A85-1-1 作用 120 min 后,可使活菌数降低约 4.5 lg(CFU/mL)单位,在 50 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度下,依然具有杀菌活性,作用 120 min 后,活菌数可降低约 1.9 lg(CFU/mL)单位,表明 Lys039 具有较高的杀菌能力(图 5(a))。不同温度处理的 Lys039 与单核细胞增生李斯特菌 A85-1-1 作用 2 h 后,活菌数显著降低($P<0.01$),30 $^{\circ}\text{C}$ 表现出高活性,为最适温度,80 $^{\circ}\text{C}$ 处理后,仍然具有裂解活性,说明裂解酶 Lys039 具有较高的温度耐受性(图 5(b))。裂解酶 Lys039 在 pH 3~12 范围内活菌数显著降低,均表现出杀菌活性。pH 为 6.0 时,观察到

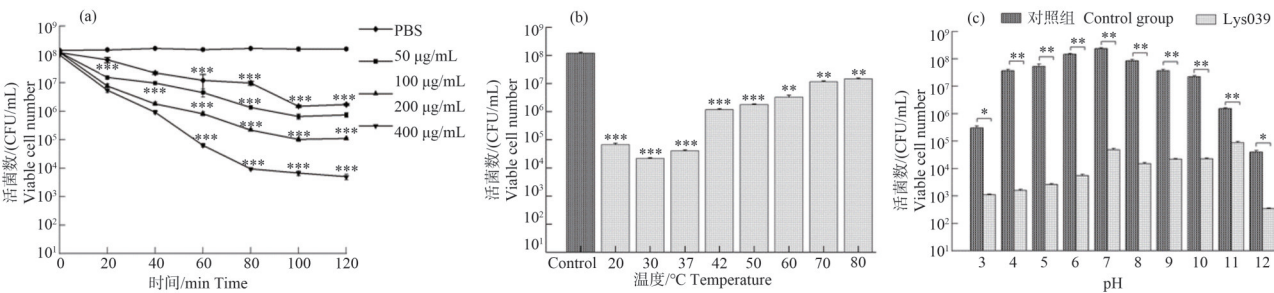
表 1 Lys039 对 32 株菌株裂解活性检测

Table 1 Detection of lytic activity of Lys039 against 32 strains

菌株 Strain	抑菌圈 Bacteriostatic circle	血清型 Serotype	菌株 Strain	抑菌圈 Bacteriostatic circle	血清型 Serotype
单核细胞增生李斯特菌 A77-1-2 <i>Listeria monocytogene</i> A77-1-2	+	1/2a	单核细胞增生李斯特菌 Li4 <i>Listeria monocytogene</i> Li4	+	1/2b
单核细胞增生李斯特菌 1-12-2-2 <i>Listeria monocytogene</i> 1-12-2-2	+	1/2c	单核细胞增生李斯特菌 Li5 <i>Listeria monocytogene</i> Li5	+	1/2a
单核细胞增生李斯特菌 A83-2-1 <i>Listeria monocytogene</i> A83-2-1	+	1/2c	单核细胞增生李斯特菌 Li6 <i>Listeria monocytogene</i> Li6	+	1/2a
单核细胞增生李斯特菌 D31-1 <i>Listeria monocytogene</i> D31-1	+	1/2a	单核细胞增生李斯特菌 ATCC 19112 <i>Listeria monocytogene</i> ATCC 19112	+	1/2c
单核细胞增生李斯特菌 5-90-1-2 <i>Listeria monocytogene</i> 5-90-1-2	+	1/2c	单核细胞增生李斯特菌 ATCC 19115 <i>Listeria monocytogene</i> ATCC 19115	+	4b
单核细胞增生李斯特菌 6-56-1-2 <i>Listeria monocytogene</i> 6-56-1-2	+	1/2c	单核细胞增生李斯特菌 CVCC 1598 <i>Listeria monocytogene</i> CVCC 1598	+	4b
单核细胞增生李斯特菌 D46-1-1 <i>Listeria monocytogene</i> D46-1-1	+	1/2a	单核细胞增生李斯特菌 CVCC 1597 <i>Listeria monocytogene</i> CVCC 1597	+	4b
单核细胞增生李斯特菌 66-3 <i>Listeria monocytogene</i> 66-3	+	1/2a	威氏李斯特菌 4-43 <i>Listeria welshimeri</i> 4-43	+	
单核细胞增生李斯特菌 150-1 <i>Listeria monocytogene</i> 150-1	+	1/2a	伊氏李斯特菌 <i>Listeria ivanovii</i>	+	
单核细胞增生李斯特菌 Li8 <i>Listeria monocytogene</i> Li8	+	1/2b	无害李斯特菌 4-49 <i>Listeria innocua</i> 4-49	+	
单核细胞增生李斯特菌 A78-2-2 <i>Listeria monocytogene</i> A78-2-2	+	1/2b	白色葡萄球菌 <i>White staphylococci</i>	—	
单核细胞增生李斯特菌 164-5 <i>Listeria monocytogene</i> 164-5	+	1/2a	柠檬色葡萄球菌 <i>Lemon staphylococci</i>	—	
单核细胞增生李斯特菌 C64-2 <i>Listeria monocytogene</i> C64-2	+	1/2c	枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	—	
单核细胞增生李斯特菌 C18-2-1 <i>Listeria monocytogene</i> C18-2-1	+	1/2c	伤寒沙门菌 12-2 <i>Salmonella typhi</i> 12-2	—	
单核细胞增生李斯特菌 A79-1 <i>Listeria monocytogene</i> A79-1	+	1/2c	鼠伤寒沙门菌 K49-2 <i>Salmonella typhimurium</i> K49-2	—	
无害李斯特菌 6-99 <i>Listeria innocua</i> 6-99	+		丙型副伤寒沙门菌 N17-1 <i>Salmonella paratyphi</i> C N17-1	—	

注：+：有；—：无

Note：+：Yes；—：None



(a)不同浓度Lys039杀菌活性;(b)温度稳定性;(c)pH稳定性。
(a) Bactericidal activity of different concentrations of Lys039; (b) Temperature stability; (c) pH stability.

图5 裂解酶Lys039杀菌活性最佳条件测定

Fig. 5 Determination of bactericidal activity of endolysin Lys039 under optimum conditions

相对较高的裂解活性,与对照组相比,活菌数减少了约 4.4 lg (CFU/mL) 单位,最适 pH 值为 6.0 (图 5(c))。

2.7 裂解酶Lys039对单核细胞增生李斯特菌生物被膜的影响

采用结晶紫染色法,通过测定 OD₅₉₅ 研究裂解酶 Lys039 对单核细胞增生李斯特菌 A85-1-1 生物被膜形成的抑制作用。如图 6 所示,与 PBS 处理的对照组比较,在不同时间段,裂解酶 Lys039 均能显著清除单核细胞增生李斯特菌 A85-1-1 形成的生物被膜($P<0.01$)。

2.8 牛奶基质中裂解酶Lys039的裂解活性

采用活菌计数法测定不同时间段裂解酶 Lys039 在全脂牛奶和脱脂牛奶中的裂解活性。与 PBS 处理的对照组相比,裂解酶 Lys039 能显著降低不同商业类型牛奶(全脂和脱脂)中的单核

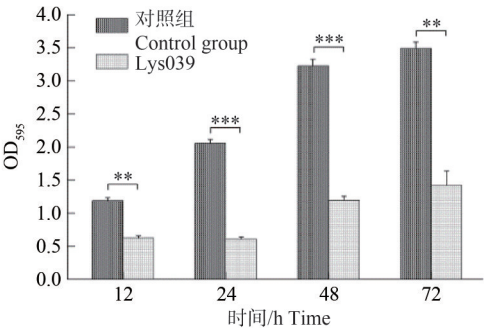
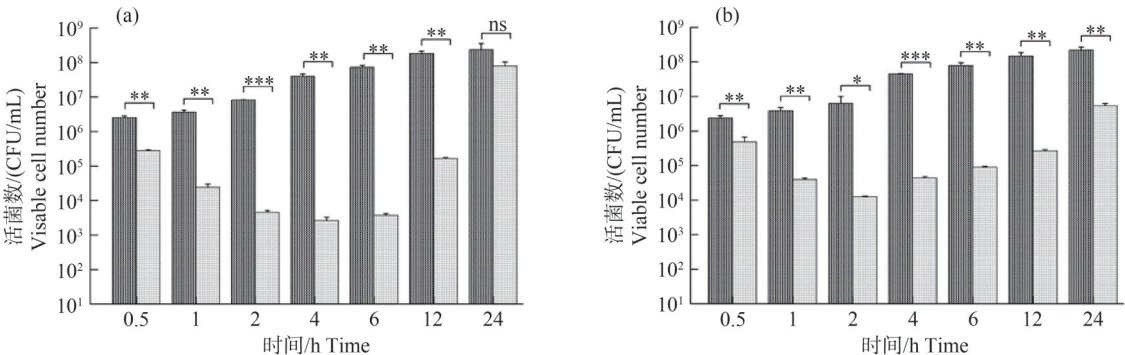


图6 裂解酶Lys039对单核细胞增生李斯特菌A85-1-1生物被膜的影响

Fig. 6 Effect of endolysin Lys039 on biofilm of *Listeria monocytogenes* A85-1-1

细胞增生李斯特菌数量。但在孵育 24 h 后观察到了细菌数量再生长的现象,全脂牛奶中 24 h 试验组细菌再生长的数量与对照组无显著性差异(图 7)。



(a)裂解酶Lys039在全脂牛奶中的裂解活性;(b)裂解酶Lys039在脱脂牛奶中的裂解活性。
(a) Lytic activity of endolysin Lys039 in whole milk; (b) Lytic activity of endolysin Lys039 in skim milk.

图7 裂解酶Lys039在牛奶中的活性

Fig. 7 Lytic activity of endolysin Lys039 in milk

3 讨 论

单核细胞增生李斯特菌是一种食源性致病菌,广泛分布于环境中。通过污染食品,危害人类健康以及畜牧业发展,对公共卫生以及食品工业造成重大影响。抗生素的频繁使用,导致耐药问题频发,甚至出现了超级耐药菌。有研究表明,李斯特菌对大多数抗微生物药物能够快速产生耐药性^[26]。已经从多种来源中分离得到多重耐药李斯特菌^[27-29]。噬菌体裂解酶作为潜在的抗菌剂候选,对防治李斯特菌感染具有重大研究意义。

通常,大多数革兰氏阳性菌噬菌体裂解酶结构分为N端催化结构域(CD)和C端结合结构域(CBD),CBD特异性识别并与细菌细胞壁上的受体结合,CD作用于肽聚糖中的化学键,一些裂解酶已经被发现有多CD或CBD^[30]。本研究在对裂解酶Lys039保守结构域分析发现,裂解酶Lys039含有一个N端Amidase_2结构域(PF01510)以及一个新的结合结构域。CD预测范围为12~155位氨基酸。可以根据在肽聚糖上裂解位点的不同,将裂解酶分为5种:N-乙酰基酰胺酶、N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸酰胺酶、N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶、内肽酶和转糖基酶^[31]。裂解酶Lys039属于N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸酰胺酶,为肽聚糖识别蛋白(PGRPs)超家族成员。PGRP是肽聚糖识别蛋白,该结构中有一裂缝,形成肽聚糖结合槽,其中有一个保守的Zn²⁺结合位点,裂解酶Lys039中His28、His137、Asp151参与Zn²⁺的结合。有研究发现,用丙氨酸或苯丙氨酸取代参与Zn²⁺配位的氨基酸残基(His26、Tyr51、His123和Cys13)后,酶活性完全丧失,表明Zn²⁺的结合残基有维持催化活性的作用^[32]。裂解酶Lys039通过80℃、强酸强碱处理后,仍然具有杀菌活性,表现出较强的裂解活性及耐酸耐碱能力,可能与Zn²⁺配位的氨基酸有关系。

噬菌体在细菌细胞复制结束后期产生穴蛋白(Holin)和裂解酶(Endolysin)。穴蛋白靶向作用于细胞膜,当holin聚集达到一定阈值,形成孔隙,为裂解酶开通一条通道。裂解酶作用细胞壁主要成分肽聚糖的化学键,使其断裂,完成裂解过程。由于革兰氏阳性菌细胞壁缺乏外膜屏障,从外部裂解相对容易^[33]。裂解酶Lys039的结合结构域特异性识别细胞壁结合位点,肽聚糖结合槽将底物固定在催

化的合适位置,肽聚糖裂解结构域CD切割李斯特菌细胞壁中N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸之间的酰胺键,肽聚糖结构遭到破坏,细菌细胞不能承受细胞内的渗透压破裂而亡,从而杀灭细菌^[32]。对裂解酶Lys039裂解谱进行分析,本研究发现Lys039对本实验室的22株单核细胞增生李斯特菌、2株无害李斯特菌4-49和6-99、1株伊氏李斯特菌以及1株威氏李斯特菌4-43都表现出了较强的裂解能力,这种相对较宽的裂解范围可能是因为PCD与Ami_2折叠在一起,增强了裂解活性。但同时又对白色葡萄球菌、柠檬色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌以及沙门菌没有裂解作用,可能是因为Lys039的结合结构域能够特异性识别李斯特菌属成员。

生物被膜中包裹细菌的胞外基质(EPS),主要成分为胞外多糖。噬菌体裂解酶能够通过降解胞外多糖,细菌生物被膜结构遭到破坏,使包裹的细菌暴露出来,从而发挥裂解作用^[34]。已经有很多研究表明,裂解酶能够清除细菌生物被膜^[35-36]。裂解酶Lys039对不同时间段形成的单核细胞增生李斯特菌生物被膜都有显著的清除作用。大多数李斯特菌病的爆发与牛奶及乳制品污染有关^[37]。本研究中裂解酶Lys039能显著降低全脂超高温牛奶和脱脂超高温牛奶中单核细胞增生李斯特菌的数量,但研究发现,在孵育24 h后,试验组的细菌数量有再生长的现象,这可能与超高温处理的牛奶成分的分子变化有关,这些变化降低了裂解酶的活性,从而促进细菌的再生长。与裂解酶Lys039在污染的脱脂牛奶相比较,在全脂牛奶中孵育24 h后试验组的细菌数量与对照组无显著差异,可能是由于牛奶中的脂肪干扰了裂解酶的活性^[25]。

目前,国内对于李斯特菌噬菌体裂解酶方面的研究报道相对较少。本研究表达纯化的裂解酶Lys039具有高杀菌活性、较高温度的耐受性以及耐酸耐碱的能力,并且可以有效减少单核细胞增生李斯特菌形成的生物被膜。可为以后检测和防治李斯特菌感染提供理论基础。

4 结 论

本研究表达纯化的裂解酶Lys039对李斯特菌表现出较好的裂解能力。具有较高的温度耐受性,酸碱度耐受范围广。该酶可以显著清除单核细胞增生李斯特菌形成的生物被膜,但详细机制还需进

一步研究。食品基质牛奶中的初步应用试验表明裂解酶在食品中应用的可行性,但本研究中只选择了牛奶作为试验对象,有一定的局限性,后续会选取不同的试验对象进行研究。为进一步揭示裂解酶Lys039的作用特性及应用于食品工业预防李斯特菌感染提供参考信息。

参考文献 Reference

- [1] Brown P, Kucerova Z, Gorski L, Chen Y, Ivanova M, Leekitcharoenphon P, Parsons C, Niedermeyer J, Jackson J, Kathariou S. Horizontal gene transfer and loss of serotype-specific genes in *Listeria monocytogenes* can lead to incorrect serotype designations with a commonly-employed molecular serotyping scheme[J]. *Microbiology Spectrum*, 2023, 11(1): e0274522
- [2] Walland J, Lauper J, Frey J, Imhof R, Stephan R, Seuberlich T, Oevermann A. *Listeria monocytogenes* infection in ruminants: Is there a link to the environment, food and human health? A review [J]. *Schweizer Archiv Fur Tierheilkunde*, 2015, 157(6): 319-328
- [3] Rogalla D, Bomar P A. *Listeria Monocytogenes* [M]. Treasure Island (FL) Ineligible Companies: StatPearls Publishing, 2023
- [4] Vázquez-Boland J A, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Domínguez-Bernal G, Goebel W, González-Zorn B, Wehland J, Kreft J. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants [J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2001, 14(3): 584-640
- [5] Janež N, Škrlić B, Sterniša M, Klančnik A, Sabotič J. The role of the *Listeria monocytogenes* surfactome in biofilm formation [J]. *Microbial Biotechnology*, 2021, 14(4): 1269-1281
- [6] Murray C J L, Ikuta K S, Sharara F, Swetschinski L, Aguilar G R, Gray A, Han C, Bisignano C, Rao P, Wool E. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: A systematic analysis[J]. *Lancet*, 2022, 399(10325): 629-655
- [7] Salmond G P C, Fineran P C. A century of the phage: Past, present and future[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2015, 13(12): 777-786
- [8] Yuan Y Y, Li X Y, Wang L L, Li G, Cong C, Li R H, Cui H J, Murtaza B, Xu Y P. The endolysin of the *Acinetobacter baumannii* phage vB_AbaP_D2 shows broad antibacterial activity[J]. *Microbial Biotechnology*, 2021, 14(2): 403-418
- [9] Lee S, Kim M G, Lee H S, Heo S, Kwon M, Kim G. Isolation and characterization of *Listeria phages* for control of growth of *Listeria monocytogenes* in milk[J]. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 2017, 37(2): 320-328
- [10] Lin D M, Koskella B, Lin H C. Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance [J]. *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics*, 2017, 8(3): 162-173
- [11] Łobocka M, Dąbrowska K, Górski A. Engineered bacteriophage therapeutics: Rationale, challenges and future [J]. *BioDrugs: Clinical Immunotherapeutics, Biopharmaceuticals and Gene Therapy*, 2021, 35(3): 255-280
- [12] Murray E, Draper L A, Ross R P, Hill C. The advantages and challenges of using endolysins in a clinical setting [J]. *Viruses*, 2021, 13(4): 680
- [13] Bispo M, Santos S B, Melo L D R, Azeredo J, van Dijl J M. Targeted antimicrobial photodynamic therapy of biofilm-embedded and intracellular staphylococci with a phage endolysin's cell binding domain[J]. *Microbiology Spectrum*, 2022, 10(1): e0146621
- [14] Nie T, Meng F Q, Lu F X, Bie X M, Zhao H Z, Sun J, Lu Z X, Lu Y J. An endolysin Salmicide-p1 from bacteriophage fmb-p1 against gram-negative bacteria[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2022, 133(3): 1597-1609
- [15] Hong H W, Kim Y D, Jang J, Kim M S, Song M, Myung H. Combination effect of engineered endolysin EC340 with antibiotics [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 821936
- [16] Takhar S R, Ibarra-Sánchez L A, Miller M J. Effect of antimicrobial treatments applied individually and in combination on the growth of *Listeria monocytogenes* in Queso Fresco at 3 different temperatures [J]. *JDS Communications*, 2022, 3(5): 307-311
- [17] Zhang H, Bao H D, Billington C, Hudson J A, Wang R. Isolation and lytic activity of the *Listeria* bacteriophage endolysin LysZ5 against *Listeria monocytogenes* in soya milk [J]. *Food Microbiology*, 2012, 31(1): 133-136
- [18] Pennone V, Sanz-Gaitero M, O'Connor P, Coffey A, Jordan K, van Raaij M J, McAuliffe O. Inhibition of *L. monocytogenes* biofilm formation by the amidase domain of the phage vB_LmoS₂₉₃ endolysin[J]. *Viruses*, 2019, 11(8): 722
- [19] Ibarra-Sánchez L A, Van Tassel M L, Miller M J. Antimicrobial behavior of phage endolysin PlyP100 and its synergy with nisin to control *Listeria monocytogenes* in Queso Fresco [J]. *Food Microbiology*, 2018, 72: 128-134
- [20] 涂传灯, 陈凯歌. 鱼源副乳房链球菌前噬菌体裂解酶 Sply828 的抗菌活性[J]. *微生物学通报*, 2022, 49(5): 1719-1730
- Tu C D, Chen K G. Antibacterial activity of a prophage lysin Sply828 from fish-derived *Streptococcus parauberis* [J]. *Microbiology China*, 2022, 49(5): 1719-1730 (in Chinese)
- [21] 丁一峰, 聂若男, 朱文娟, 王吉, 王佳, 王小红. 沙门菌噬菌体 T139 基因组分析及其裂解酶 LysT40 的异源表达和活性鉴定[J]. *华中农业大学学报*, 2021, 40(6): 176-185
- Ding Y F, Nie R N, Zhu W J, Wang J, Wang J, Wang X H. Genome analysis of *Salmonella* phage T139 and heterologous expression, activity characterization of its endolysin LysT40 [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2021, 40(6): 176-185 (in Chinese)
- [22] 尹红梅, 侯忠余, 王金丽, 唐俊妮. 普通变形杆菌噬菌体裂解酶 Lys66 的表达纯化及活性分析[J]. *食品工业科技*, 2024, 45(4): 109-115
- Yin H M, Hou Z Y, Wang J L, Tang J N. Expression, purification and activity analysis of *Proteus vulgaris* phage Lys66 [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2024, 45(4): 109-115 (in Chinese)
- [23] Lu Y F, Wang Y R, Wang J, Zhao Y, Zhong Q, Li G, Fu Z F, Lu S G. Phage endolysin LysP108 showed promising antibacterial potential against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2021, 11: 668430
- [24] 张玉凤, 程梦琨, 冀亚路, 蔡若鹏, 孙长江, 冯新, 雷连成, 顾敬敏, 韩文瑜. 裂解酶 LysGH15 对金黄色葡萄球菌体外生物被膜的影响[J]. *中国兽医学报*, 2018, 38(2): 293-300
- Zhang Y F, Cheng M J, Ji Y L, Cai R P, Sun C J, Feng X, Lei L C, Gu J M, Han W Y. Effect of lysin LysGH15 on *Staphylococcus aureus* biofilm in vitro [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2018, 38(2): 293-300 (in Chinese)
- [25] Agún S, Fernández L, Rodríguez A, García P. Deletion of the amidase domain of endolysin LysRODI enhances antistaphylococcal activity in milk and during fresh cheese production [J]. *Food Microbiology*, 2022,

- 107: 104067
- [26] Luque-Sastre L, Arroyo C, Fox E M, McMahon B J, Bai L, Li F Q, Fanning S. Antimicrobial resistance in *Listeria* species [J/OL]. *Microbiology Spectrum*, 2018, 6 (4). [2023-11-14]. DOI: 10.1128/microbiolspec.ARBA-10.1128/microbiolspec.0031-2017
- [27] Granier S A, Moubareck C, Colaneri C, Lemire A, Roussel S, Dao T T, Courvalin P, Brisabois A. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolates from food and the environment in France over a 10-year period [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(8): 2788-2790
- [28] Obaidat M M, AlShehabat I A. High multidrug resistance of *Listeria monocytogenes* and association with water sources in sheep and goat dairy flocks in Jordan[J]. *Preventive Veterinary Medicine*, 2023, 215: 105922
- [29] Escolar C, Gómez D, Del Carmen Rota García M, Conchello P, Herrera A. Antimicrobial resistance profiles of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* isolated from ready-to-eat products of animal origin in Spain[J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2017, 14(6): 357-363
- [30] Ho M K Y, Zhang P F, Chen X, Xia J, Leung S S Y. Bacteriophage endolysins against gram-positive bacteria, an overview on the clinical development and recent advances on the delivery and formulation strategies[J]. *Critical Reviews in Microbiology*, 2022, 48(3): 303-326
- [31] Pimentel M. Genetics of phage *Lysis*[J]. *Microbiology Spectrum*, 2014, 2(1): MGM2-MGM0017-2013
- [32] Sekiya H, Kamitori S, Nariya H, Matsunami R, Tamai E J. Structural and biochemical characterization of the *Clostridium perfringens*-specific Zn²⁺-dependent amidase endolysin, Psa, catalytic domain [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2021, 576: 66-72
- [33] Fischetti V A. Bacteriophage endolysins: A novel anti-infective to control Gram-positive pathogens[J]. *International Journal of Medical Microbiology: IJMM*, 2010, 300(6): 357-362
- [34] Shen Y, Köller T, Kreikemeyer B, Nelson D C. Rapid degradation of *Streptococcus pyogenes* biofilms by PlyC, a bacteriophage-encoded endolysin [J]. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2013, 68(8): 1818-1824
- [35] Poonacha N, Nair S, Desai S, Tuppad D, Hiremath D, Mohan T, Vipra A, Sharma U. Efficient killing of planktonic and biofilm-embedded coagulase-negative staphylococci by bactericidal protein P128 [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2017, 61(8): e00457-e00417
- [36] Wang Y, Sun J H, Lu C P. Purified recombinant phage lysin LySMP: An extensive spectrum of lytic activity for swine streptococci[J]. *Current Microbiology*, 2009, 58(6): 609-615
- [37] Kozak S M, Brown S R B, Bobak Y, D'Amico D J. Control of *Listeria monocytogenes* in whole milk using antimicrobials applied individually and in combination[J]. *Journal of Dairy Science*, 2018, 101(3): 1889-1900

责任编辑: 秦梅



第一作者简介: 赵学慧, 甘肃农业大学在读硕士研究生, 动物医学预防兽医学专业, 研究方向为兽医公共卫生。在校期间获得研究生学业一等奖学金、学业二等奖学金、兰州正大奖学金, 中国畜牧兽医学学会兽医食品卫生学分会第十七次学术交流会优秀报告三等奖。



通讯作者简介: 苟惠天, 农学博士, 甘肃农业大学动物医学院教授, 博士生导师。兼任国家奶牛疾病防治科技创新联盟理事、甘肃省食品安全标准评审专家、甘肃省食品安全风险评估专业委员会委员等。主要从事动物性食品安全监测, 食源性疾病、人兽共患病的预警及综合防控的教学和研究工作。主编、副主编教材专著3部, 以第一发明人申请国家专利6件, 获得甘肃省科技进步奖1项。主持各类科研项目8项, 完成12项; 发表各类学术论文50篇, 其中SCI论文20篇。