



金黄色葡萄球菌噬菌体 GH15
及其裂解酶三维结构与分子作用机制研究
The Researches of *Staphylococcus aureus* Phage GH15
and Three-Dimensional Structure, Mechanism of its Lysin

作者姓名：顾敬敏
专业名称：预防兽医学
研究方向：分子免疫学及病原微生物
指导教师：韩文瑜 教授
学位类别：农学博士
培养单位：动物医学学院
论文答辩日期：2014 年 06 月 07 日
授予学位日期： 年 月 日
答辩委员会主席：周 锐 教授
论文评阅人：

本研究由以下项目资助

国家自然科学基金--重点项目（项目编号：31130072）

This work was supported by the National Natural
Science Foundation of China
(Key Program, No. 31130072)

未经本论文作者的书面授权，依法收存和保管本论文学术版本、电子版本的任何单位和个人，均不得对本论文的全部或部分内容进行任何形式的复制、修改、发行、出租、改编等有碍作者著作权的商业性使用（但纯学术性使用不在此限）。否则，应承担侵权的法律责任。

吉林大学博士学位论文原创性声明

本人郑重声明：所呈交学位论文，是本人在指导教师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

学位论文作者签名：

日期：2014年6月11日

中文摘要

金黄色葡萄球菌噬菌体 GH15 及其裂解酶三维结构与分子作用机制研究

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 是人畜共患的一种重要病原菌，可引起多种局部和全身性的感染疾病。耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA) 的出现给这些感染性疾病的临床治疗带来了极大的困难。噬菌体 (bacteriophage) 是一种可以感染细菌的病毒，它利用细菌内的细胞器合成自身所需的生物分子，在感染后期通过自身编码裂解酶所起的水解作用破坏细胞壁，从而杀死细菌释放子代噬菌体颗粒。由于噬菌体与其裂解酶具有快速杀灭特定病原菌的能力，使得二者在治疗耐药菌感染方面表现出极大的应用潜力。本研究拟以金黄色葡萄球菌的噬菌体及其裂解酶作为研究对象，探索噬菌体裂解酶作为治疗制剂的潜力及其裂解作用的分子机制。

首先在医学临床分离到多株 MRSA 菌株，然后以分离到的 MRSA 菌株为宿主菌对噬菌体进行了分离、纯化和筛选，最终得到了一株具有广谱、高效裂解活性的烈性噬菌体，命名为 GH15。对噬菌体 GH15 的全基因组进行了序列测定，结果表明该噬菌体全长为 139.8 Kb，共具有 214 个开放式阅读框 (ORF)，G+C% 为 30.23%。比对分析表明 GH15 与其它金葡萄球菌噬菌体 (K、G1、A5W、ISP 和 Sb-1) 同源性较近。但是，在 GH15 基因组中不存在内含子，而同源性较近的这几个噬菌体分别在不同的基因中含有若干个内含子。内含子相关基因的比对和分析表明有内含子噬菌体和无内含子噬菌体的相关基因在内含子插入位点处具有明显的差异。相关的内含子基因序列与数据库中的任何基因都不具有同源性，因此可以推测这些内含子起源于噬菌体，而非其宿主菌或者其它来源，也就是说 GH15 很有可能在其它噬菌体基础上发生了内含子的丢失。通过 SDS-PAGE 和质谱分析共鉴定出 GH15 的 10 个结构蛋白，主要为组成衣壳和尾部的相关蛋白。

进一步对基因组序列进行分析确定了 GH15 的裂解酶基因 (*LysGH15*)，并对其裂解酶 *LysGH15* 进行了表达和纯化。*LysGH15* 对 MRSA 表现出高效的裂解活性，其最佳作用温度为 37°C、最佳作用 pH 值为 7.0；*LysGH15* 表现出比噬菌体 GH15 更宽的裂解谱，可以裂解所有被检的 24 株 MRSA。通过使小鼠感染 MRSA 制作了小鼠菌血症模型，对该模型进行治疗的实验中发现 50 μg 的 *LysGH15* 即可以有效地治疗处于菌血症状态的小鼠。通过对小鼠血液和脾脏中菌含量进行持续的检测，表明 *LysGH15* 可以使菌血症小鼠血液和脾脏内的菌

量快速的下降，显示出很强的清除感染细菌的能力，同时还可以降低小鼠体内 IL-6、IL-4 和 INF- γ 的 mRNA 水平。

为了揭示 LysGH15 裂解金葡萄的作用机制，本研究拟对 LysGH15 蛋白的三维结构进行解析。但是，小角散射和二级结构预测分析表明全长 LysGH15 是由两个很长的 linker 连接三个近似球形的活性区域组成，表现出很大的摆动性，无法进行蛋白结晶。因此，分别对 LysGH15 的三个活性片段（CHAP、amidase-2、SH3b）进行了表达和结构解析。通过结晶条件的初筛和优化最终获得了 CHAP 片段和 amidase-2 片段的高质量晶体，并分别通过硒代和泡重原子的方法解析了这两个片段的三维结构。依据 CHAP 片段结构进行的位点突变、原子发射光谱分析（ICP-AES）、等温滴定量热法（ITC），thermal shift，圆二色谱分析（CD）和活性实验表明：CHAP 可以通过 5 个氨基酸残基结合一个 Ca^{2+} ，其中 D45、D47 和 D56 的侧链在结合 Ca^{2+} 中起关键作用； Ca^{2+} 的丢失不会影响 CHAP 的二级结构，但是对其热稳定性具有轻微影响，它与 CHAP 的解离平衡常数为 27 μM ； Ca^{2+} 在 CHAP 的裂解活性中起关键的调节作用，一旦丢失，将使 CHAP 失活；C54-H117-E134-N136 四联体为 CHAP 的活性中心，其中 C54 的巯基起主要的攻击作用。通过 amidase-2 的结构可以看到 H214、H324 和 C332 三个氨基酸残基的侧链可以结合一个 Zn^{2+} ，另外通过序列和结构的比对确定了与活性有关的氨基酸位点为 E282 和 T330，并通过突变后的活性实验进行了进一步的验证。由于无法获得 SH3b 片段的晶体，所以采用了核磁共振技术对该片段进行了结构解析。首先表达了 ^{15}N 和 ^{13}C 单标和双标的 SH3b 蛋白，通过核磁共振技术获得了二维谱数据，通过计算、分析和优化最终获得了 SH3b 在溶液状态下的三维结构。核磁滴定与突变实验鉴定了 SH3b 与底物多肽“AGGGGG”相互作用的界面和关键氨基酸位点。

在全长 LysGH15 蛋白水平对结构相关研究得出的结论进行了验证：将 LysGH15 上的 C54 突变为丝氨酸，结果 LysGH15 完全失活，结合 Ca^{2+} 关键位点的突变也会对全长 LysGH15 的活性产生同样的影响，表明 CHAP 片段在全长的裂解活性中起关键作用；将全长 LysGH15 中的 E282 突变为丙氨酸，结果 LysGH15 的活性无明显的变化，表明 amidase-2 在全长的活性中所起的作用很小；将 LysGH15 中 SH3b 结合相关的位点进行突变，结果可以显著影响全长的活性，表明 SH3b 的结合活性在全长活性中起很大作用。综上，CHAP 的水解活性与 SH3b 的结合活性共同促成了 LysGH15 的高效裂解活性。

关键词：

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌，烈性噬菌体，内含子，裂解酶，三维结构

Abstract

The Researches of *Staphylococcus aureus* Phage GH15 and Three-Dimensional Structure, Mechanism of its Lysin

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) is an important zoonotic pathogen that can cause a variety of local and systemic infections. Treatment of these infections has become ever more difficult due to the emergence of multidrug-resistant strains, especially methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA). Lytic bacteriophages are viruses that infect bacteria, hijack their machinery, replicate intracellularly and are finally released by host cell lysis. The phage lysin is synthesized at the end of the phage lytic life cycle to lyse the host cell. Phage and lysin are highly efficient in lysing bacteria. Thus, they might be an alternative treatment strategy for infections caused by antibiotic-resistant strains.

In this study, the staphylococci phage and its lysin were studied. First, a lot of MRSA strains have been isolated from clinical and were used as host bacteria to isolate and screen lytic phages. Finally, one phage, named GH15, was obtained and it showed broad-spectrum and high-efficient lytic activity to *S. aureus*. The genome of phage GH15 has been sequenced. It indicated that the phage GH15 genome is a 139.8 Kb contiguous sequence of linear, double-stranded DNA, with an overall G+C content of 30.23%, and encodes a predicted 214 ORFs. Analysis revealed that GH15 is closely related to G1, ISP, A5W, Sb-1, and K. Interestingly, all the introns present in the homologous phages listed above are absent in GH15. A comparison of the intron-related genes demonstrated a clear distinction in the location of the insertion site between intron-containing and intron-free alleles. The introns which existed in the lysin gene and polymerase gene of most class III phages do not share homology with any gene in other phages or bacterial genomes. The unique nature of these introns may support the speculation that these introns originated in the phages and there were intron-loss events in GH15. By SDS-PAGE and mass spectrometry, ten structural proteins were identified and most of them are capsid- or tail-related proteins.

LysGH15, the lysin of GH15, was identified in the genome by sequence analysis and was expressed by using *E. coli*. LysGH15 displayed broad spectrum and high-efficient lytic activity to *S. aureus*. The optional temperation and pH of LysGH15 are 37°C and 7.0 respectively. The

bacteremia mouse model was used to detect the bactericidal activity of LysGH15. It indicated that a single intraperitoneal injection of LysGH15 (50 µg) administered 1 h after MRSA injections at double minimum lethal dose, was sufficient to protect mice. Administration of LysGH15 significantly reduced the number of bacteria in spleen and blood compared with those in untreated mice. At the same time, LysGH15 reduced the levels of IL-6, IL-4, and IFN- γ mRNA in spleen cells.

In order to reveal the mechanism of LysGH15, the three-dimensional structure of LysGH15 would be resolved. However, SAXS and secondary structure prediction of LysGH15 indicated that three spherical domains are linked by two long linkers and the LysGH15 shows high flexible. So the protein crystal of LysGH15 could not be obtained. Since, the structures of three domains of LysGH15 (CHAP, amidase-2 and SH3b) were resolved respectively. High-quality crystals of single CHAP domain and amidase-2 domain were obtained by screening and optimization of crystallization conditions. The structures of single CHAP domain and amidase-2 domain were resolved by using Se-SAD and I-SAD respectively. Structure-guided mutagenesis, ICP-AES, ITC, CD, thermal shift, and lytic activity of the CHAP domain indicated that: residues D45, D47, Y49, H51, and D56 coordinate a central Ca^{2+} ion and the side chains of D45, D47, and D56 play essential role in binding the calcium; the CD spectroscopy showed that the presence/absence of Ca^{2+} does not affect the secondary structures of the LysGH15 CHAP domain, the fluorescence-based thermal shift assays indicated that Ca^{2+} has a slight contribution to the protein thermostability, the ITC demonstrated that the equilibrium dissociation constant of the LysGH15 CHAP domain for Ca^{2+} is approximately 27 μM ; the calcium ion plays an important role as a switch that modulates the CHAP domain between the active and inactive states; C54-H117-E134-N136 is the activity site, the $-SH$ of C54 plays important role in attacking function. The structure of amidase-2 indicated that there is a zinc ion coordinated by H214, H324 and C332. Structure-guided mutagenesis of the amidase-2 domain revealed that both the zinc ion and E282 are required in catalysis and enable us to propose a catalytic mechanism. Due to that the crystal of SH3b could not be obtained, the structure of SH3b domain was resolved by using NMR. The NMR titration identified the interface and key residues of SH3b domain interacted with peptide “AGGGGG”.

Additionally, the C54S mutation or D45A/D47A/D56A in LysGH15 induced the lytic activity loss of LysGH15 which indicated that the CHAP domain plays an important role in the activity of

LysGH15. However, the E282A mutation or mutation of the zinc-binding residues (H214A, H324A, or C332A) does not affect the lytic activity of full-length LysGH15. The bactericidal activity of LysGH15 was reduced when the key residues (identified by NMR titration) in SH3b domain were mutated to alanine. Thus, both the binding activity of the SH3b domain and the catalytic activity of the CHAP contribute to the high-efficient lytic activity of LysGH15.

Key Words:

methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), lytic phage, intron, endolysin (lysin), three-dimensional structure

目 录

前 言.....	1
第一篇 文献综述	3
第一章 噬菌体作为治疗应用的研究概述	3
1.1 噬菌体概述	4
1.2 作为治疗和检测应用的噬菌体	5
1.3 噬菌体的制备	6
1.4 噬菌体的“鸡尾酒”疗法	7
1.5 噬菌体疗法的应用	9
第二章 噬菌体裂解酶的研究进展	21
2.1 噬菌体裂解酶概述	21
2.2 裂解酶的结构组成	22
2.3 裂解酶的三维结构	23
2.4 细菌对裂解酶产生抗性的可能	24
2.5 裂解酶的特异性	25
2.6 裂解酶应用的安全性	26
2.7 裂解酶应用的潜在风险	26
2.8 裂解酶与抗生素的协同作用	27
2.9 裂解酶的应用	28
2.10 展望	32
第二篇 研究内容	33
第一章 耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌及其噬菌体的分离鉴定	33
1.1 材料	33
1.2 方法	35
1.3 结果	37
1.4 讨论	43

1.5 小结.....	44
第二章 噬菌体 GH15 全基因组序列测定和分析	45
2.1 材料.....	45
2.2 方法.....	46
2.3 结果.....	48
2.4 讨论.....	61
2.5 小结.....	63
第三章 裂解酶 LysGH15 的原核表达及体内外抑菌活性	65
3.1 材料.....	65
3.2 方法.....	67
3.3 结果.....	69
3.4 讨论.....	75
3.5 小结.....	76
第四章 裂解酶 LysGH15 三维结构解析	77
4.1 材料.....	78
4.2 方法.....	79
4.3 结果.....	85
4.4 讨论.....	103
4.5 小结.....	104
第五章 裂解酶 LysGH15 作用机制研究	105
5.1 材料.....	105
5.2 方法.....	106
5.3 结果.....	110
5.4 讨论.....	126
5.5 小结.....	128
结 论.....	129
创 新 点.....	131

参考文献.....	133
导师简介.....	153
作者简介.....	155
发表的学术论文	157
致 谢.....	159

英文缩写词表

英文缩写	英文全称	中文全称及注释
MRSA	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌
MSSA	Methicillin-sensitive <i>Staphylococcus aureus</i>	甲氧西林敏感的金黄色葡萄球菌
VRSA	Vancomycin-resistant <i>S. aureus</i>	耐万古霉素的金黄色葡萄球菌
CA-MRSA	Community-associated MRSA	社区获得性 MRSA
ICP-AES	Inductively coupled plasma atomic emission spectrometry	原子发射光谱分析
AUC	Analytical ultracentrifugation	分析超速离心
NMR	Nuclear magnetic resonance	核磁共振
SEC	Size-exclusion chromatography	分子筛层析
SAD	Single-wavelength anomalous dispersion	单波长反常散射
RMSD	Root-mean-square deviation	根均方差
Ni-NTA	Nickel-nitrilotriacetic acid	镍-氮川三乙酸
TEV	Tobacco etch virus	烟草蚀纹病毒
SSRF	Shanghai Synchrotron Radiation Facility	上海同步辐射光源所
K_D	Equilibrium dissociation constants	平衡解离常数
ITC	Isothermal titration calorimetry	等温滴定量热法
CD	Circular dichroism	圆二色谱
PFU	Plaque-forming unit	噬斑形成单位
MLD	Minimum lethal dose	最小致死剂量
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	甘油醛-3-磷酸脱氢酶
dGTP	2'-deoxyguanosine-5'-triphosphate trisodium salt	脱氧鸟苷三磷酸三钠
DTT	DL-Dithiothreitol	二硫苏糖醇
dCTP	Deoxycytidine triphosphate	三磷酸脱氧胞苷
MOI	Multiplicity of infection	感染复数
SAXS	Small-angle x-ray scattering	X-射线小角散射
GFP	Green fluorescent protein	绿色荧光蛋白
TCA	Trichloroacetic acid	三氯乙酸
CSP	Chemical shift perturbation	显著化学位移扰动
PTA	Phosphotungstic acid	磷钨酸

前　　言

金黄色葡萄球菌是一种普遍存在的病原细菌，可以引起皮肤脓肿、伤口感染、心内膜炎、骨髓炎、肺炎、以及中毒性休克综合征等多种局部和全身性感染疾病。随着抗生素的大量使用和滥用，金黄色葡萄球菌对抗生素的耐药性逐渐增强，使得该菌引起感染的治疗变得越来越困难，尤其是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的出现，引起了医学界的广泛关注。目前，对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌最有效的抗生素是万古霉素，但是，现在在临幊上已经分离到对万古霉素不敏感的金黄色葡萄球菌。因此，迫切需要研发新型药物，以控制耐药性金黄色葡萄球菌引起的感染。

噬菌体是一种细菌病毒，可以通过尾丝蛋白或其他吸附相关的蛋白与宿主菌特异性的结合，然后将遗传物质注入到宿主菌内；首先阻断和接管宿主菌的所有代谢活动，并利用宿主菌的原料合成自身的基因组及结构蛋白；在噬菌体颗粒组装完成之后会合成裂解酶，从宿主菌内部将其细胞壁水解，最终使细菌发生崩解，释放出子代的噬菌体颗粒，然后开始下一轮的感染周期。噬菌体在发现早期就被作为一种治疗细菌感染的药物进行研究，随着抗生素疗法的不断发展，噬菌体疗法逐渐在西方退出历史舞台，但是在原苏联和东欧一些国家却一直在应用噬菌体疗法。近些年，随着耐药菌株的不断出现，抗生素治疗的效果越来越差，因此，噬菌体疗法又重新受到了广大研究人员的重视。据分析在地球上约有 10^{31} 数量的噬菌体，种类大约有 10^6 ，是一个非常丰富的基因库，因此，噬菌体又是一个很好的遗传学研究对象。另外，在噬菌体疗法研究中延伸出了一个新的方向，即噬菌体裂解酶作为治疗制剂的研究。裂解酶由噬菌体基因组编码、在噬菌体感染细菌的后期表达，可以水解细菌的细胞壁，从而引起细菌的死亡。已有研究表明来自噬菌体的裂解酶可以高效的杀灭细菌，在细菌外部与之相作用时，表现为更快速的裂解活性。近几年，噬菌体和裂解酶作为治疗制剂的研究越来越多。与抗生素相比，二者最大的特点是：特异性，不影响正常菌群；与抗生素作用机制不同，对耐药菌株同样有效；高效性，可以快速的杀灭特定病原菌。而裂解酶与噬菌体相比，又表现出几个优势：裂解酶是蛋白质，更易于被接受；裂解酶的作用更快，接触后就可以裂解细菌使之死亡，不需要增殖；裂解酶比其来源噬菌体的裂解谱更宽；细菌对裂解酶更不易产生抗性。

目前，国外关于金黄色葡萄球菌噬菌体的研究已有报道，包括金葡菌特异性噬菌体基因组的测定和分析、利用噬菌体治疗金葡菌引起感染的研究、以及利用裂解酶治疗金葡菌感染的研究。鉴于噬菌体及其裂解酶特异性的原因，二者都具有地域性的特点，在一个地区分离

到的噬菌体及其裂解酶仅对该地域流行的病原菌起作用，对其它地域流行的病原菌没有作用。而国内关于金黄色葡萄球菌噬菌体的研究极少，其裂解酶的研究更是空白。

因此，本论文以临床分离到的 MRSA 菌株为宿主菌，对其烈性噬菌体进行了分离和筛选，并对其基因组进行了遗传学分析，尤其对其裂解酶的抑菌活性进行了深入研究。鉴于国内外还没有报道金黄色葡萄球菌噬菌体裂解酶的三维结构，其作用机制尚不清楚，为了填补这块空白，本论文对表达的裂解酶进行了三维结构解析，确定了其高效裂解活性的作用机制，为其它具有序列同源性的裂解酶提供结构参考依据。

第一篇 文献综述

第一章 噬菌体作为治疗应用的研究概述

现代医学的一个重大贡献就是控制了细菌的感染，大大的延长了人们的寿命。细菌感染的有效控制使临床手术、移植和化疗等相关医学治疗措施变得切实可行。这主要归功于抗生素的发现和使用，其作用机理主要是通过干扰细菌的功能/生长过程，从而杀灭或者抑制细菌的生长^[1]。抗生素可以按照抗菌活性的特异性分为宽谱和窄谱，即使是窄谱的抗生素往往也可以对 G+、G-细菌中的一种细菌具有抑菌活性。由于一些宽谱抗生素的非特异性抗菌活性，使临幊上已不再需要鉴定细菌的种类，而是可以直接使用宽谱抗生素进行治疗。但是，抗生素并不是完美的，宽谱的抗生素同时存在着副作用，可以破坏人体内正常的菌群从而导致严重的腹泻。另外，抗生素面临的最大挑战是耐药菌株的快速出现，这使抗生素的治疗效果大打折扣。自 1928 年弗莱明发现青霉素并应用于临幊，在不到二十年的时间，人们就发现了对青霉素具有抗性的耐药菌株。另外，在临幊、个人不恰当或过量使用抗生素，以及在养殖业和渔业普遍的滥用抗生素，这些都加速了耐药菌株的出现。因此，一旦使用了一种新的抗生素，在短短的 3 到 30 年内就可以快速的出现其相应的耐药菌株^[2]。

现如今，已经进入了后抗生素时代，在欧洲和美国每年因多重耐药细菌感染引起的死亡人数高达上万，为了抵御细菌快速进化的防御系统，研究人员正在努力研发新的抗菌药物。在去年的五月份，欧洲成立了公私合作的机构，名为 NewDrugs vs BadBugs，将科研和工业联合起来，共同研发对抗耐药细菌的新型药物；同样在去年 7 月份，美国通过立法鼓励药物公司增加抗菌药物的研发和生产力度^[3]。但是这些努力很可能达不到预期的推动效果，相关专家指出，大多数医药公司仅向抗生素研发中投入很少的人力、财力和物力，而且新的政府规划中，对其提供的激励措施也不足。结果导致这些药物生产商在原地踏步，依然依靠旧的、低回报率的高通量筛选方法。在 1983-1992 期间，美国食品和药物监管局共批准了 30 种新抗生素；后面 10 年，批准的抗生素数量降到了 17 种；而在过去的这 10 年，仅有 7 种新抗微生物药物进入市场^[3]。Coates 等^[4]的调查表明，在将来的 50 年里如果想要控制眼下如此多而严重的耐药细菌，就必须研发至少 20 种新型的抗生素。但是，即便在新抗生素的研发上投入更多的经济支持，这个目标也是不可能完成的。所以他認為探寻抗生素辅助药物或者其替代品更加切实可行。在这种观点的推动下，一些研究人员重新开始审视比高通量筛选方法更为久远的研究领域，实际上该领域在抗生素发现之前就已经盛行一时了，那就是一个世纪之前发现的细菌天敌：噬菌体。

1.1 噬菌体概述

噬菌体是可以感染、杀灭细菌的病毒^[5]。跟其它病毒一样，噬菌体感染细菌也是从识别并结合细菌表面受体开始，接着进行细菌内自我复制。90%的噬菌体有尾部，并具有二十面体头部^[6]。噬菌体通过尾丝蛋白或其他吸附相关的蛋白与宿主菌特异性的结合，然后将遗传物质注入到宿主菌内部，首先阻断、接管宿主菌的所有代谢活动，并利用宿主菌的原件合成自身的基因组和结构蛋白，在噬菌体颗粒组装完成之后会合成一种裂解酶，从宿主菌内部将细胞壁水解，最终细菌发生崩解，释放出子代的噬菌体颗粒，然后开始下一轮的感染周期。依据噬菌体的生活周期，这种裂解可以在感染后短期内发生（裂解周期），也可能经过很长的一段时间，在其它因素刺激的情况下发生（溶源周期）^[7]。

噬菌体的发现距今已有一个世纪之久，分别于 1915 年和 1917 年由英国微生物学家 Frederick Twort（弗雷德里克·特沃特）和法国-加拿大双国籍的微生物学家 Felix d'Herelle（菲利克斯·德赫雷尔）首次发现，并由 d'Herelle 命名为 phage，意为细菌的食用者、嗜好者^[3]。他在发现之初就对噬菌体疗法进行了尝试，应用该疗法治愈了畜禽的一些细菌感染性疾病，甚至通过自己、家人和同事口服噬菌体来证明其安全性。在 1917 年到 1930 年，d'Herelle 利用噬菌体疗法治愈了全球范围的多种细菌感染疾病，例如东南亚爆发的鼠疫和法国流行的痢疾。这种噬菌体疗法比弗莱明发现青霉素早了将近 10 年，他的成功在一段时间内广泛的激起了人们对噬菌体疗法的研究热潮。D'Herelle 最优秀的学生叫 George Eliava，是一名格鲁吉亚医生。在二十世纪 20 年代早期，Eliava 与 d'Herelle 一起在巴黎工作，转而回到格鲁吉亚首都第比利斯，建立了专门致力于噬菌体疗法的机构——Eliava 研究所。在 Eliava 研究所最辉煌的时候，每周能够为苏联军队生产两顿的噬菌体产品。目前该研究所依然存在，并且拥有八个不同的研究单位，以及全世界最丰富的噬菌体库。另外，在 1920-1940 年成立了像 Eli Lilly 这样的一些生产商品化噬菌体制剂的公司。目前，在世界许多地区仍然将噬菌体疗法作为细菌感染治疗的第一选择。在前苏联的一些国家，噬菌体疗法经常是细菌感染疾病的经典治疗方法。另外，在波兰的索波特有一个噬菌体疗法中心，在那里噬菌体被专门用来治疗慢性细菌感染性疾病，而抗生素疗法对这些慢性感染基本上是没有作用的。

但是在西方国家，随着抗生素的发展，噬菌体逐渐退出了历史的舞台。由于青霉素和相关抗生素的易获得、宽抑菌谱、易携带、易保存等优势，使美国和西欧的研究人员和临床工作者将噬菌体疗法视作费力、过时的疗法。在 20 世纪 40 年代噬菌体被 Max Delbrück 等作为研究遗传学的工具之后，进而重新得到了研究人员的重视。20 世纪 40、50 年代，美国噬菌体协会由 Delbrück 倡导组成，为噬菌体的研究做出了极大的贡献。在 1969 年，鉴于发现

了病毒的遗传学构成和复制机制，次年的诺贝尔生理医学奖颁给了 Max Delbrück, Alfred D. Hershey 和 Salvador E. Luria 三个人。随着研究的发展和深入，由于具有了严格的定量方法、观察方法和研究方法，噬菌体的研究逐渐走向了科学化。

近几年，随着细菌耐药性的不断严重，西方一些权威的研究机构和业内的专业人士开始重新审视噬菌体疗法。一些公司已经对天然的噬菌体展开了研究，就像 Eliava，他们筛选出最适合应对顽固性细菌感染的噬菌体株，然后将噬菌体混合使用从而达到最佳的治疗效果。总部设在弗吉尼亚州的 AmpliPhi 生物科学中心，已经在伦敦完成了一个包含 24 人的临床研究，他们利用噬菌体疗法成功治愈了绿脓杆菌感染引起的成人中耳炎病例^[8]；瑞士食品行业巨头雀巢集团正在孟加拉国测试利用噬菌体治疗大肠杆菌引起的儿童腹泻。

剑桥大学麻省理工学院的合成生物学家 Timothy Lu 这样说到，“现在已经进入噬菌体复兴的时代，人们正在试图按照自己的意图改造和利用噬菌体，使之为人类造福”。

1.2 作为治疗和检测应用的噬菌体

发展噬菌体疗法的第一步就是分离、筛选安全有效的噬菌体。噬菌体一般分离自含量丰富的环境中，如土壤和污水。噬菌体作为细菌的天然寄生生物，已有证据显示，二者是共同进化的^[9]。因此，即使细菌经过突变对原来的噬菌体产生了抗性，随之，针对突变细菌的特异性噬菌体就会相应的出现^[10]。所选择的噬菌体必须能够：成功的结合到细菌的表面受体上；将遗传物质导入宿主菌；合成自身的子代噬菌体颗粒；将细菌裂解。这个过程被称为是“裂解性周期”。一般情况下，一个裂解周期大约需要 15-60 分钟，能够产生 100-200 个子代噬菌体^[11]。噬菌体治疗过程中，如果在体内存在有足够数量的宿主菌，噬菌体的浓度会呈指数形式的快速增长。

噬菌体选择最重要的一点就是宿主范围。限制宿主范围的主要因素有：噬菌体不能识别并结合到宿主菌的表面受体；不能将 DNA 注入宿主菌体内；噬菌体 DNA 被宿主菌蛋白切割；噬菌体 DNA 不能阻止菌体的自身合成、无法有效合成自身所需物质^[12]。然而，窄的宿主范围也是有益的，这样可以避免像抗生素一样引起的破坏人肠道正常菌群的副作用。而特异性太强的不足就在于，必须通过筛选才能确定针对感染菌株最有效的噬菌体。为了解决这一不足，就需要分离广谱的噬菌体或通过分子生物学的方法改造噬菌体。另外，还可以将多种噬菌体以鸡尾酒的形式混合使用，这在多种细菌同时感染的情况下尤其有效。这就可以选择针对引起某种疾病的普遍病原菌的噬菌体混合使用，或者首先确定是引起感染的细菌，然后选择相应的噬菌体混合使用。不同的噬菌体可以特异性的针对不同的细菌受体，当其中一个细菌受体发生突变时，还有针对其它受体的敏感噬菌体存在，除非所选噬菌体识别的所有

细菌受体均发生突变，才可能有抗性细菌残留，但那样的几率很低，在这个意义上，噬菌体鸡尾酒可以用来减少细菌抗性的发生。

另外两个选择噬菌体的重要标准是具有稳定的裂解性生活周期（即烈性噬菌体）、不存在编码毒力因子和溶原相关的基因。烈性噬菌体遵循裂解性生命周期，在感染的末期使细菌裂解，从而释放子代噬菌体颗粒。相比，温和噬菌体有可能通过感染立即裂解宿主菌释放子代，也有可能将 DNA 整合到宿主菌的核酸或者质粒上，然后以“前噬菌体”的形式伴随细菌的分裂传给后代，直至受到一定的刺激才可以重新进入裂解性生命周期。处于溶原状态的细菌不会被噬菌体杀灭，反而可以对其他相关的噬菌体的感染产生抗性^[13]。温和噬菌体还可以通过溶源化，向宿主菌传递毒力因子，也可以从宿主菌处获得毒力因子并向另外的细菌传播。温和噬菌体有一些烈性噬菌体所没有的特征性基因，例如抑制基因、操控序列和整合基因。经过测序可以得到初步确定。

研究表明有些噬菌体在尾部存在可以水解细菌生物被膜的酶（多糖解聚酶或者聚糖酶）^[14]，这些噬菌体能够使噬菌体感染处于生物被膜深层的细菌，从而增强对生物被膜的降解和对内部细菌的裂解，因此应用性更强^[15]。

1.3 噬菌体的制备

噬菌体一般是从环境或者生物样品中获得，例如土壤、河水、污水和粪便。可以将一种或多种菌株同时加入到一份或者多份样品的混合液中共同培养，这样具有高效、省时、省力的优点。如果相应的噬菌体在样品中存在，则细菌就会被噬菌体裂解并释放出子代噬菌体颗粒。然后将裂解液进行离心和过滤以除去大颗粒和细胞碎片，即得到噬菌体增殖液（分离步骤）。然后对裂解液的噬菌体进行平板法纯化，从而获得单一的噬菌体（纯化步骤）。噬菌体的增殖，可以通过液体或者固体培养基进行，如果用固体培养基，需要用无菌水或者培养基将噬菌体浸泡出来（增殖步骤）。早期，使用的噬菌体制备液仅仅是经过过滤的裂解液，其中还含有内毒素和外毒素^[16]。但是之前涉及到噬菌体疗法动物实验的文献也未曾有因为内毒素而引起副作用的报道。现在关于生物制品安全的法规都要求噬菌体制剂在进一步的加工前（如喷雾干燥、冷冻干燥、雾化等），需进行严格的去除细菌内毒素操作。内毒素是革兰氏阴性细菌的细胞壁的脂多糖成分。脂质部分与毒性有关，而多糖成分则可以激发免疫反应^[17]。目前，有很多可以除去噬菌体制剂中内毒素的商品化产品。而对于大规模的样品制备的话，则可以进行离子交换或者凝胶过滤色谱法除去内毒素（除内毒素步骤）^[18]。另外，还可以用有机溶剂，如辛基或叔丁醇等，对噬菌体进行透析和纯化，该方法已被申请专利（Patent Application 2010/0227376）。

在实验室的条件下，噬菌体增殖和纯化的方法通常费时、费力，而商品化的噬菌体制剂则要求在大规模生产过程中要使用最优的生产步骤。目前，减弱活病毒疫苗的生产工艺已经发展到商业化阶段，具有严格的操作规程^[19]。噬菌体规模化生产所需工艺大多都与病毒疫苗生产很相似，因此可以借鉴^[20]。具体的噬菌体生产过程的改进可以在专利中看到：Bujanover 建议噬菌体与宿主菌孵育过程中用半固体培养基代替液体培养基。然后重复进行稀释—离心—抽提上清，最终使提取液中噬菌体的浓度至少在 10^{10} PFU/mL。Lenherr 和 Bartsch 已经建立了全自动的纯化过程，也申请了专利。

总之，从野外环境的样品一直到无内毒素的噬菌体产品，都可以用建立好的生物技术手段完成。

1.4 噬菌体的“鸡尾酒”疗法

地球上噬菌体的数量是庞大的，大约有 10^{31} 个噬菌体存在，组成了一个巨大、活跃的基因库^[21]。鉴于如此庞大的数量，很容易就可以分离到像大肠杆菌 O157: H7、沙门氏菌、空肠杆菌、绿脓杆菌和金黄色葡萄球菌等主要病原性细菌的特异性噬菌体。这些噬菌体的宿主范围差异性很大，有的很窄（只针对某一型的细菌），有的却较宽（裂解某一种甚至以上的细菌）^[22]。不同的噬菌体侵染细菌的机制是不同的，因此，可以通过研究噬菌体蛋白与细菌的相互作用来找到新的药物靶点，从而设计新的抑菌小分子。并且，噬菌体感染细菌的机制与抗生素和其它小分子抑菌成分的作用机制是完全不同的^[23]。通常会认为噬菌体疗法杀菌的体现是噬菌体导致的细菌裂解，但是实际上远在细菌崩解之前细菌就已经因为噬菌体的感染而发生了基因水平的死亡（噬菌体基因组接管了细菌的代谢系统）。经过几十亿年的进化，噬菌体可以在敏感菌株的细胞质内产生各种抑菌成分。例如，金葡菌噬菌体可以产生一个 23kDa 的蛋白，它可以结合到金葡菌 RNA 聚合酶 σA 亚基，通过阻断细胞的转录功能从而抑制细菌的生长^[24]。

噬菌体及其鸡尾酒用于临床医学的优势主要有^[25]：噬菌体与抗生素的抑菌机制不同，细菌产生的对抗生素的抗性不会影响噬菌体的抑菌作用；不会破坏正常的菌群，类似于窄谱的化学抗菌制剂；噬菌体种类多、数量大，并且很容易分离、定性；多数噬菌体对宿主菌以外的生命体不具有毒性作用；合适的剂型及合理的使用噬菌体可以治疗细菌引起的感染，完全可以作为抑菌制剂来使用。

噬菌体疗法可以按照所用噬菌体种类的多少分类：单噬菌体疗法仅仅使用一种噬菌体；而多噬菌体疗法是多种噬菌体同时混合使用，也叫“鸡尾酒”（cocktail）疗法^[26]。单噬菌体疗法一般用于噬菌体疗法的实验模型建立，比如在一个存在噬菌体敏感菌株的特定环境中，

或者临幊上针对病原菌严格筛选的噬菌体。因为只有一种噬菌体需要被纯化，这种疗法实施起来比较简单，但是考虑到噬菌体的裂解谱较窄、机体对噬菌体的免疫反应（中和抗体的产生），相对来说治疗的应用性不强。所选的噬菌体一般是在噬菌体库中获得，之前一般经过一定的研究，生物学特性了解清楚，但是需要注意的是在体外具有很强抑菌活性的噬菌体，在体内不一定有效^[27]。所以，用于商业化治疗或者生物防治的噬菌体一般来说必须是宿主范围很宽的单一噬菌体或者噬菌体鸡尾酒^[28]。

噬菌体可以杀死特定的病原菌，同时不会破坏正常的菌群，这非常符合现代抗菌药物的要求，并且也是其最具吸引力的特点^[29]。这就要求在实施治疗之前必须鉴定病原菌对哪些噬菌体敏感，这就提高了该疗法的成本^[30]。虽然现在鉴定某些病原菌的种类很方便，但是噬菌体并不是可以对一种细菌有效，甚至有些特异性强的噬菌体都不能完全裂解某一种细菌的某一个型^[22]。而抗生素却可以对多种细菌都具有抑制活性。基于这个原因，噬菌体抑菌活性的“窄谱性”是制约噬菌体疗法发展和用于医学治疗的关键所在。所以在 21 世纪初利用噬菌体鸡尾酒的研究开始增加。但这并不是说单个噬菌体疗法不可行，而是可以通过其他的策略使噬菌体疗法得到更好的提高。而噬菌体鸡尾酒就是其中的策略之一。根据应用噬菌体鸡尾酒的目的可以将其分为两种：一种是为了拓宽噬菌体制剂的可用范围；另一种是为了预防在治疗过程中可能产生的噬菌体抗性菌株。这两个策略都可以增强噬菌体疗法在医学和商业上的可应用性，同时也可增强噬菌体疗法对细菌感染的疗效。

有些研究推荐了一些改进噬菌体鸡尾酒疗法的方法。其中 Kelly 等，基于对金黄色葡萄球菌噬菌体 K 的研究提出了一系列的方法去解决噬菌体抗性菌株出现的问题，利用富集噬菌体 K 的突变体从而对抗金葡菌的突变株^[31]。他们将 29 株金葡菌的噬菌体抗性机制进行了鉴定^[12]，发现 24 株属于限制性修饰机制，3 株属于吸附抑制机制，另外两个菌株的抗性机制尚未确定。6 株源于噬菌体 K 的最具潜力的突变噬菌体组成了一个鸡尾酒，并测定了其裂解谱，表现出很强的应用潜力。Han 等通过分离原始菌株和噬菌体抗性突变菌株的噬菌体，然后组成噬菌体鸡尾酒^[32]。在攻致死剂量的肺炎克雷伯菌 1h 后，只需一次腹腔注射噬菌体鸡尾酒就可以得到 100% 的保护率，如果提高剂量的话，即使在攻菌后 3h 使用，同样可以达到这样的效果，而对照组的保护率为 0%。

可以用更多的分子生物学方法确定噬菌体作用于细菌的受体位点。Filippov 通过位点定向突变和反式互补方法鉴定了鼠疫耶尔森菌上九个噬菌体的结合位点^[33]。其中有六个受体可以被八株噬菌体识别，都位于脂多糖的核心部分，因此，将这几个噬菌体联合应用可以组成一个具有很好疗效的噬菌体鸡尾酒。小鼠实验表明，由这些噬菌体处理耶尔森菌后产生的突变菌株的毒力减弱了很多，其最小致死剂量提高了 50%，并且被抗性菌株感染的小鼠可

以存活很久。

将多株噬菌体混合为“鸡尾酒”一起使用可以增加噬菌体疗法的应用潜力，并且理论上来说明鸡尾酒中包含的噬菌体种类越多其应用潜力就越大，越符合医学和商业化的要求。但是，如果包含过多的噬菌体的话，就会大大影响非目标菌株，不过这种影响相对经典的抗生素来说还是小很多。另外，包含的噬菌体太多就会大大提高生产和加工的成本。

目前，推出了很多个性化医学，因此产生了很多基于组学的诊断，从而使这种个性化疗法推向临床^[34, 35]。原则上就是可以利用组学方法确定分离自病人的病原细菌，然后为病人量身制作针对这种病原的噬菌体鸡尾酒。但是由于缺乏对噬菌体与宿主菌相互作用的信息，只能建议某些噬菌体可能有效。因此可以利用基于噬菌体对细菌进行鉴定的方法。这就要求必须有一个健全的噬菌体库，或者有快速的鉴定方法，才可以在短时间内将个性化的噬菌体制剂制作好、进行实施^[36]。

也可以针对同一种、或者同一型的细菌建立多个鸡尾酒，每个鸡尾酒可以不含有交叉的宿主菌。只要确定感染细菌的种类，可以同时使用几个针对这种细菌的鸡尾酒进行治疗。也可以先不进行敏感性测定，先按照最可能的感染菌型进行噬菌体治疗，同时测定鸡尾酒库中对感染菌株具有裂解活性的个体，如果开始的治疗无效，则可以按照敏感性测定的结果进行个性化噬菌体鸡尾酒疗法的制定。当然，这会使生产和分销的成本增大。

前苏联格鲁吉亚共和国采用噬菌体疗法是根据以往的经验^[37]，引起不同感染的病原菌是不同的，根据不同的感染种类制定不同的噬菌体鸡尾酒。如：针对外伤的，一般以大肠杆菌、绿脓杆菌、链球菌、金葡菌和变形菌为主，将针对这些病原菌的噬菌体混合到一起，就叫做“Pyophage”；另外，还有针对肠道感染的“Intestiphage”，包含针对一般情况下引起肠道感染的病原菌的噬菌体组成的鸡尾酒。可以对这种噬菌体进行调整，比如增加一种针对目前流行菌株的噬菌体。除了增加新的噬菌体种类，还可以根据噬菌体抗性菌株出现情况调整已有的噬菌体。总之，噬菌体鸡尾酒疗法可以依具体情况具体调整、灵活应用。

1.5 噬菌体疗法的应用

作为有效的抑菌制剂，噬菌体已经应用到了医疗、食品防控和检测、畜牧养殖和水产养殖等各个方面：

1.5.1 噬菌体疗法在水产养殖中的应用

细菌性疾病是大规模水产养殖业的一个主要问题，养殖的鱼和贝类，就像其它动物和人一样，时刻面临着微生物攻击的威胁。虽然化学药物在治疗和预防细菌性感染方面是快速且有效的方法，但是化药的频繁使用已经造成了多重耐药性细菌的出现。日本已经批准了 25

种可以用于渔业的药物，因此应用化学药物引起的问题在日本更为严重。当然，疫苗是预防感染性疾病的理想办法，但是商业化的疫苗想要用于水产养殖业还有许多限制。另外，一些生物防控的研究，例如应用益生菌来防控鱼相关病原的研究也有个别报道^[38]，然而，就像用于人类的益生菌相似，这种方法在因果关系的科学论证方面却面对着很大的困难。噬菌体疗法可以有很好的科学论证，在幸存的鱼体内噬菌体的数量明显的增加，这是由于噬菌体感染和裂解了宿主细菌的结果，因此噬菌体疗法的成功可以确定是依赖于噬菌体所起的对细菌的杀灭作用。许多其他的生物防控措施都不能用科学论证来说明其作用机制，这使得噬菌体疗法可以从中脱颖而出。作为特异性病原的杀手，噬菌体是控制水产养殖业细菌感染疾病很有吸引力的治疗制剂。许多鱼相关病原菌的噬菌体已经被分离获得，其中包括感染迟钝爱德华氏菌，嗜水气单胞菌和耶尔森氏菌等病原菌的噬菌体。

格氏乳球菌曾经对日本石首鱼的养殖业造成了重大的经济损失，首次爆发是在 1974 年。Nakai^[39]等测定了腹腔和口服噬菌体对实验性感染格氏乳球菌的幼石首鱼的保护作用。腹腔攻菌后，再腹腔注射噬菌体可以达到 100% 的保护率，而非治疗组存活率仅为 10%。即使当攻菌后的第 24h 再给予噬菌体进行治疗，仍然具有 50% 的保护率。当对石首鱼实施肛门插管攻菌时，饲喂噬菌体浸泡的食物也具有很好的保护效果。在非治疗组的鱼脾脏可以持续的（72h 或更长时间）检测到格氏乳球菌的存在；而在治疗组的鱼体内只能检测到极少的菌量，并且应用噬菌体 48h 之后，鱼体内的细菌就降低到可检测水平以下。在体内实验中死亡的鱼体内分离的格氏乳球菌对噬菌体依然敏感，在重复饲喂噬菌体浸泡的饲料的鱼的血清中也没有检测到针对噬菌体的中和性抗体。

Pseudomonas plecoglossicida 是感染香鱼的机会性病原菌，其毒性很强，LD₅₀ 为 10^{1.2} CFU/fish。口服噬菌体浸泡过的饲料可以有效的保护被 *P. plecoglossicida* 感染的香鱼^[40]。非治疗组中在攻菌后的 7 d 开始出现死亡，在 2 周时死亡率达到 65%，而治疗组的香鱼可以存活的更久，并且最终的死亡率仅为 22.5%，并且在攻菌后 1h 或者 24h 饲喂噬菌体浸泡的饲料都可以达到显著的保护效果。这些结果表明口服噬菌体就可以有效的杀灭鱼内脏和消化道中的细菌，这意味着，即使在全身性感染的阶段，噬菌体仍然是非常有效的。在治疗组死亡的香鱼体内分离到的 *P. plecoglossicida* 对噬菌体仍然敏感。当在体外将噬菌体与 *P. plecoglossicida* 长期相互作用时，也会产生相应的抗性菌株，但是这种突变菌株的毒力很弱；而在治疗后死亡的鱼体内却检测不到抗性菌株的存在，治疗后存活的鱼血清中也未发现噬菌体的中和抗体。当实验空间扩大到一个鱼塘时，在相对自然的环境中利用噬菌体浸泡过的饲料进行正常饲喂，可以使香鱼的死亡减少三分之一。

毛细弧菌、副溶血性弧菌、霍乱弧菌和创伤弧菌这些细菌不但可以感染鱼养殖厂还可以

引起人的严重感染。Shivu^[41]在水产养殖厂的孵化池中分离到多株针对毛细弧菌的噬菌体，所有的噬菌体都不感染其它类型的弧菌，其中 6 株具有很宽的裂解谱，表现出很大的应用潜力。Vinod 在虾养殖塘中分离到一株噬菌体，可以裂解 15 株毛细弧菌。感染毛细弧菌的幼虾不进行治疗的话存活率仅为 25%，而使用噬菌体进行治疗的水塘中幼虾的存活率高达 80%，显著地减少了水塘中毛细弧菌的数量。抗生素治疗水塘中的毛细弧菌在 48h 内得到了明显的下降（幼虾存活率达到 40%），但之后由于细菌的增殖，又达到了 10^6 CFU/ml；而噬菌体处理的鱼塘在 17d 内都检测不到细菌的存在，使幼虾的存活率升高到 86%。这项研究表明噬菌体在虾养殖场中作为毛细弧菌的生物控制工具具有很好的前景。

这些应用噬菌体控制鱼和虾感染病原细菌的研究表明噬菌体疗法在水产养殖业大有用途。当养殖大量的鱼时，饲喂给药的方式是最切实可行的。噬菌体对酸性条件的敏感性不会制约其在无胃鱼养殖业的应用，因为在无胃鱼没有胃，其肠道内 pH 值是略偏碱性的。对于有些通过皮肤和鳃开始感染鱼的细菌性疾病，就可以用药浴的方式给药。

1.5.2 噬菌体疗法在畜牧业的应用

细菌耐药性问题不仅危及到了人类的健康，同时给养殖业带来了严重的损失。研究者也在努力寻求应对措施，目前，欧盟已经明令禁止在动物养殖业使用亚治疗剂量抗生素。在动物养殖业，噬菌体疗法同样很有潜力可以辅助或者替代抗生素。在噬菌体发现之初，d'Herelle 就开展了利用噬菌体治疗沙门氏菌引起的鸡伤寒。同样也是随着抗生素的大量发现，噬菌体疗法在畜牧业逐渐退出舞台。随着耐药菌株的出现，同时由于噬菌体可以很有效的杀灭包括耐万古霉素的肠球菌和耐甲氧西林金葡菌等多重耐药菌株，越来越多的研究者开始重新尝试利用噬菌体再次为畜牧养殖业服务。

奶牛

Smith 和 Huggins 于 1982 年^[42]在小鼠的治疗实验中发现，一次性使用噬菌体 R 就可以预防大肠杆菌引发的败血症，与一次或多次应用抗生素的效果相当。之后他们又于 1983 年和 1987 年开始应用噬菌体分别治疗新生牛犊、猪和羔羊的产肠毒素大肠杆菌感染^[43, 44]。他们的研究表明口服噬菌体，再加上在圈舍喷洒噬菌体，可以有效的降低由感染 ETEC（产肠毒素大肠杆菌）引起牛犊腹泻的严重程度，减少死亡率。1998 年 Smith 及其同事 Barrow^[45]又利用噬菌体 R 对模拟初乳感染大肠杆菌引起的牛犊败血症进行了治疗，虽然感染后 8h 进行噬菌体治疗并没有阻止感染的发生，但是却可以有效的控制疾病的严重程度、减少死亡率。

显性和隐性乳房炎是主要的奶牛疾病之一，在世界范围内广泛分布。目前主要的治疗措施是多次经过乳头向被感染的乳房内注射抗生素。金葡菌是引起奶牛乳房炎的主要病原之一，由于其低治愈率、强耐药性及在牛群中持续隐性感染，给临床的治疗带来了很多的麻烦、

造成了巨大的经济损失^[46]。另外，这些强耐药的金葡菌很容易从动物传播给人，所以引起了广泛关注^[47]。虽然在小鼠模型中^[48]，噬菌体疗法可以很有效的治疗 MRSA 的感染，但是在 2006 年一项用噬菌体治疗奶牛乳房炎的研究结果却不是很乐观^[49]。实验中一共用了 24 只荷斯坦奶牛，并且都患有金葡菌引起的隐性乳房炎感染，将奶牛分做两组，一组每天灌乳注射噬菌体 K (10^{11} PFU)，另一组每天灌乳注射生理盐水作对照，持续治疗 5d，结果显示治疗组的治愈率为 16.7%，对照组治愈率为 0%，但是在统计学上没有显著的差异性。治疗组和对照组乳汁内金葡菌的数量没有发生明显的差异，分离到的金葡菌仍然对 K 噬菌体敏感，也就是说治疗失败的原因不是产生了噬菌体抗性菌株，而很可能是由于：注入乳腺的大部分噬菌体被乳汁中存在的酶降解；乳汁蛋白阻碍了噬菌体对宿主菌的结合；噬菌体被乳汁中的蛋白聚合沉淀了^[50]。鉴于这些可能，噬菌体疗法在治疗奶牛乳房炎的可行性还需要进一步的研究。

畜禽

大肠杆菌病在畜禽生产中也是一个很严重的问题，可以引起高的死亡率和产品污染。感染之初细菌定植在呼吸道中引起气囊炎，很快就可以转化为败血症，最后导致很高的死亡率。1998 年，Barrow 等人^[45]在噬菌体疗法的研究中发现，可以感染 K1 大肠杆菌的噬菌体 R 在预防和治疗大肠杆菌引起的鸡败血症和脑膜炎模型中具有良好的效果。O2 血清型的大肠杆菌通常导致鸡的气囊炎和败血症。2002 年，Huff 及其同事^[51]开展了利用噬菌体疗法预防和治疗这种血清型的大肠杆菌引起的鸡病研究，表明噬菌体可以用于鸡大肠杆菌病的预防，在预防中噬菌体的剂量对于疗效起关键作用。

一般来说，大肠杆菌最常引起鸡的呼吸道感染。因此，Huff 等人^[52]开展了噬菌体喷洒进行预防和控制的研究，表现出显著的防控能力。2003 年 Huff 等人^[53]继续对噬菌体的治疗效果进行了评价，结果显示喷雾使用噬菌体没有表现出治疗效果，而肌肉注射显示出了治疗效果，对于处于大肠杆菌引起的败血症状态的鸡，肌肉注射的治疗效果要优于喷雾。Huff^[54]还发现肌肉注射使用噬菌体与低剂量的恩诺沙星联合应用，可以显著提高对大肠杆菌引起的鸡病的治疗效果。

隐性感染沙门氏菌的家禽广泛存在，造成了圈舍的高污染率，很容易引起人的沙门氏菌病。其中伤寒沙门氏菌和肠炎沙门氏菌的毒力很强，对年幼和老龄的鸡是很大的威胁。多重耐药沙门氏菌的出现，严重的影响了家禽、其它食用动物和人类的健康。1958 年 Taylor 和 Silliker 利用宽谱的沙门氏菌噬菌体和血清型特异性噬菌体处理了被鸡白痢沙门氏菌和鼠伤寒沙门氏菌污染的孵化蛋，使其孵化率从 < 45% 提高到了 > 70%。2007 年 Atterbury^[55]对 3 株宽谱噬菌体治疗屠宰前肉鸡沙门氏菌病的能力进行了评价，该研究表明在屠宰前使用高剂

量的噬菌体来降低肠炎沙门氏菌和鼠伤寒沙门氏菌的含量是有效的。虽然使用高剂量噬菌体产生抗性菌株的几率进一步加大，但是可以应用混合噬菌体来予以改善。

空肠弯曲杆菌病主要由空肠弯曲杆菌引起，是在发展中国家普遍存在的食源性细菌。空肠弯曲杆菌主要定植在健康家禽、猪和牛的肠道内，可以引起肠炎。屠宰的肉鸡体内携带大量的空肠弯曲杆菌，屠宰后的胴体极易污染该菌，且每只胴体约有 10^5 CFU 的菌量^[56]，污染的家禽肉带来了严重的公共健康风险。定量风险评估显示如果家禽肉携带的空肠弯曲杆菌的量下降 2 个 log 单位，人感染空肠弯曲杆菌的事件就可以显著降低^[57]。首次应用噬菌体疗法预防和治疗肉鸡空肠弯曲杆菌病的研究是 2005 年由 Wagenaar 团队进行的^[58]。预防实验的结果显示噬菌体可以延缓细菌的定植，但是不能完全阻止。治疗实验结果显示使用噬菌体治疗后，鸡体内的空肠弯曲杆菌数量很快降低了 3 个 log 单位。这些表明说明在屠宰前几天应用噬菌体可以大大降低人群患空肠弯曲杆菌病的风险。为了降低抗性菌株产生的风险，可以利用不同的噬菌体轮流对屠宰前的家禽进行处理。

猪

随着对怀孕母猪实施菌毛疫苗之后，仔猪的 ETEC 感染的噬菌体疗法就被忽略了。但是断奶仔猪的 ETEC 感染仍然是猪养殖业的一个主要的问题。再加上耐药性 ETEC 的广泛出现，人们开始重新重视噬菌体疗法。2007 年 Jamalludeen 等人^[59]分离到了针对 O149 型 ETEC 的多株噬菌体，O149 是世界范围流行的猪 ETEC 菌株。对分离到的噬菌体 GJ-GJ7 单独或者混合应用以预防和治疗感染 O149: H10 型 ETEC 断奶仔猪的能力进行了研究。预防和治疗实验中均显著降低了仔猪腹泻的症状，减少了排泄物中 ETEC 的含量，降低了体重下降的水平。另外，还表明抗酸剂可以有效的保护噬菌体抵抗胃内的低 pH 环境。

早期，Smith 和 Huggins 对两个噬菌体混合使用控制 ETEC 菌株 P433(O20:K101:987P+) 感染引起的新生仔猪腹泻的效果进行研究^[43]。噬菌体 P433/1，以细菌上 K101 抗原为受体，可以裂解 P433 菌株，另一个噬菌体 P433/2，可以裂解 K101 阴性的 P433 突变菌株（对噬菌体 P433/1 具有抗性）。两个噬菌体在体外都表现出很强的裂解活性。在体内实验中，治疗组没有发生仔猪死亡的情况，发生的腹泻比较温和，持续了 7-13h。粪便中 P433 的菌量从治疗时的 10^8 CFU/g 经过 5 h 降低到了 10^5 CFU/g，粪便中噬菌体 P433/1 在整个实验都保持在 10^6 PFU/g，甚至更高。噬菌体 P433/1 的抗性突变菌株在几个治疗的仔猪中被检测到，但是数量比 P433 菌株少很多，并且不会引起仔猪的腹泻。

综上，目前噬菌体疗法在牛、家禽和猪主要有两方面应用：1.降低因动物病原感染对动物健康和农产品的影响；2.通过减少动物携带的人兽共患病原菌的分布和量从而控制病原体通过食品和其它途径向人类传播。虽然在不同的方面的应用目的不同，但大致可以分为两类：

预防和治疗。想成功的达到这两个目的需要遵循一套共同的条件。其中最重要的条件是对感染的流行病学及发病机制、病原的多样性、噬菌体对如此多样的病原的控制能力必须了解的非常清楚。尽管早期已经有成功的案例，但是在其它动物疾病的噬菌体治疗方面却没有进一步的研究。这主要是由于管理制度逐渐完善、新疫苗不断研发以及抗菌药物的预防性应用，同时也反映出噬菌体疗法具有一些限制。除了病原的流行病学知识，其它的限制条件还有：宽谱噬菌体的缺乏、噬菌体在流体环境中的效率、在感染和发病的关键点及时的使用噬菌体、以及切合实际、经济的给药方式。

1.5.3 噬菌体疗法在食品安全的应用

在过去的二十年里，对噬菌体的研究大多集中到了其生物学特性的研究，这些研究使人们更加深入的了解了这个有趣生物，以及它们可能的用途。食源性疾病的爆发使许多国家都遭受了很大的代价，最近的评估表明每年美国因食源性疾病造成的经济损失约 510-777 亿美元^[60]；加拿大约 13.3 亿美元。一般来说噬菌体的宿主特异性能够达到种属特异性，有些甚至具有型特异性。这种特异性可以使人们放心的利用噬菌体对付特定的病原菌。因此，近来多报道利用噬菌体用于食品加工中，以来控制食品加工过程中的细菌污染，即所谓的“生物控制”^[61]。最近作为食品储存添加剂使用的噬菌体制剂得到了美国食品药物管理局的批准，给研究人员全面展开对天然的细菌杀手进行应用的研究注入了动力。

利用噬菌体控制食物中人兽共患病原菌

目前有些食品加工厂已经开始利用噬菌体控制整个加工过程中人兽共患病原体的传播。在屠宰前用噬菌体处理兽皮，以减少大肠杆菌 O157:H7 和沙门氏菌进入食物链的几率，已经获得了美国食品与药物局的批准 (<http://omnilytics.com/news>)。噬菌体也可以减少食品加工前后人兽共患病原菌的数量^[62-65]。如果想显著减少空肠弯曲杆菌、沙门氏菌等在冷藏温度不繁殖的细菌，就必须应用较高 MOI 的噬菌体量（增加噬菌体接触到细菌的几率）通过一过性裂解作用来实现。单核细胞增生李斯特氏菌在冷藏温度下同样可以繁殖，使用高剂量的噬菌体也可以有效的控制食物中该菌的量^[66]，并且美国食品安全局最近已批准可以在即食性肉和家禽食品应用商品化的噬菌体制剂来控制李氏杆菌 (<http://www.cfsan.fda.gov/~lrd/fr060818.html>)。

在液体环境下，借助液体的流动和扩散可以增加噬菌体遇到敏感宿主菌的几率。当噬菌体应用食品时，将面临两个问题。首先，大多数食物是固体的；其次，由于有高的卫生标准，一般食品污染细菌的浓度很低^[61]。所以就必须使用高剂量（约 10^8 PFU）的噬菌体以确保足够快的接触到目的菌株，并将其感染。否则，由于相遇的几率太低，少量的噬菌体是不能接触到少量细菌的。如果噬菌体的量达到了标准，可以覆盖食物的绝大多数的表面，所污染的

细菌的浓度就不是限制因素了。现有的实验也证实了这种观点。在 24°C 的 LB 培养基中，将沙门氏菌噬菌体 P7 与其宿主在不同比例的条件下孵育 2 h，然后对残留的细菌进行计数^[67]。结果表明被 P7 杀灭的沙门氏菌的数量与开始时沙门氏菌的浓度无关，当噬菌体量达到 5×10^8 PFU/ml，几乎所有的敏感菌都被杀灭了。将细菌最低浓度作为噬菌体生物控制成功与否的一个先决条件是不被接受的^[68]。利用噬菌体防治肉表面腐败菌的研究结果表明，当宿主菌的数量低至每平方厘米 45 个 CFU 的量时，噬菌体仍然可以很有效的控制该腐败菌。

利用噬菌体控制植物源性食品中的病原菌

评价噬菌体清除植物性食物中的病原性细菌和控制植物疾病的能力的研究已经开展了很多。并且应用噬菌体控制养殖的蘑菇、西红柿和苹果的细菌性斑点病和火疫的研究都取得了很好的成果^[62]。其中分别针对野油菜黄单胞菌和丁香假单胞菌的两个噬菌体的混合制剂已经得到了美国环境保护局的商业化生产许可，该产品将用于西红柿和辣椒的细菌性斑点病的防治^[69]。但是由于许多不可控的环境因素，例如温度、阳光暴晒、适度、喷洒不均匀及快速的失活等，限制了噬菌体在田间的应用。不过在大棚中，这些问题就可以得到解决。另外还可以调整噬菌体制剂的剂型从而降低因阳光暴晒和雨水冲刷导致的噬菌体失活和流失^[70]。有研究将李斯特氏菌的噬菌体鸡尾酒单独或者和乳酸链球菌素联合应用于哈密瓜和苹果片，以降低细菌含量^[71]。当单独应用噬菌体鸡尾酒时，可以使哈密瓜的细菌含量降低 2 到 4.6 个 log 单位，当与乳酸链球菌素联合应用时还观察到了协同效应。而在苹果片上的应用表明噬菌体的活性降低了，出现了噬菌体的衰减。分析其可能的原因是噬菌体对低的 pH 值敏感，另外可能由于苹果源的噬菌体抑制成分的存在造成的^[72]。还有研究表明针对李氏杆菌的噬菌体 P100 和 A511 可以在 6°C 条件下使白菜和生菜上李氏杆菌的数量降低了 4 个 log 单位，并且可以将储存期延长到 6 d 之久^[72]。

利用噬菌体控制动物源性食品中的病原菌

将噬菌体应用于各种动物性来源食品的生物防控以及肉食性动物病原细菌防控的研究都得到了令人鼓舞的成果。用于肉食性动物可以减少生产加工过程中细菌污染的几率。风险评估模型表明用于屠宰的动物棚圈的粪便中病原细菌数量降低 1 或者 2 个 log 单位，消费者受影响的风险就可以分别降低 45% 和 75%^[73]。有研究将李氏杆菌噬菌体 P100 应用于软奶酪中李氏杆菌的控制，首先人为的在加工过程中污染李氏杆菌，然后评价噬菌体控制污染的效果^[66]。研究表明使用高剂量噬菌体的条件下，检测不到李氏杆菌的存在。另有研究表明 P100 和 A511 李斯特菌噬菌体加入到巧克力牛奶和莫扎里拉奶酪后，在 6°C 储存 6 d，可以使样品中李斯特氏菌的数量快速的下降，低至可以检测到的水平之下；用于热狗，火鸡切片肉，熏鲑鱼和海鲜，也可以使人工污染的李氏杆菌下降 5 个 log 单位^[72]。

利用噬菌体控制食品中的腐生菌

噬菌体被广泛的认为可以有效的抑制饮料和食物中腐生菌的增殖，从而延长这些食品的上架时间。烈性噬菌体 SA-C12 在啤酒中非常稳定，可以有效的控制商品化啤酒中存在的 56 株短乳杆菌^[74]。另外，绿脓杆菌特异性的噬菌体可以使冷藏的鲜牛肉原料的销售货架寿命从 1.6 d 延长到 2.9 d。虽然另一则类似的研究的结果不太乐观，其主要原因可能是因为所用噬菌体的宿主谱太窄，不能够感染引起腐烂的细菌^[75]。有项研究评价了乳酸链球菌特异性噬菌体控制其宿主增殖、延长猪肉销售时间的效果，结果表明在 2°C 和 6°C 时该噬菌体都可以在两天内降低细菌的数量，但是 2 d 之后噬菌体敏感细菌和抗性细菌都表现出了增长的态势^[76]。尽管如此，噬菌体处理的猪肉的销售时间延长到了 8 d，而对照组的销售寿命仅有 4 d。

利用噬菌体进行食品表面消毒和控制生物被膜

生物被膜的形成在食品加工厂是一个很重要的问题，一旦形成就可以作为传播源长期的向外排菌、污染食物和环境，引起食物的变质、传播疾病^[77]。生物被膜对各种抗菌药物和消毒剂都具有很强的抵抗力，一旦形成就很难清除。目前有研究已经将噬菌体用于表面的消毒以及各种病原菌形成的生物被膜的清除^[78]。结果表明，单独应用噬菌体可以使生物被膜中的细菌下降 3 个 log 单位，并且噬菌体对季铵化合物具有抗性，同时使用时不会失活，二者同时应用时可以使吸附到表面的李斯特菌降低 5 个 log 单位。另一项研究表明，噬菌体 P100 可以用于控制李斯特氏菌在不锈钢表面形成的生物被膜，平均可以减少 5.29 log CFU/cm²。其它用于控制大肠杆菌 O157:H7、粪肠球菌、绿脓杆菌、空肠弯曲杆菌和表皮葡萄球菌生物被膜的研究也都获得了理想的的结果。

1.5.4 利用噬菌体检测病原细菌

在食品加工厂和食品检验机构，对食品或者食品加工环境中的病原细菌进行检测和鉴定的方法必须要快速和敏感。但是一般快速的方法都缺乏敏感性，并且需要一个很长的富集步骤，费时、费力。噬菌体仅仅感染特定的细菌，这使它们成为了一种检测病原菌的理想工具。噬菌体在自然界数量庞大，可以针对特定的病原分离到相应的噬菌体，因此可以建立专门针对某一病原的特异性噬菌体检测方法。整个感染过程，从特异性的识别开始，最终到细菌的裂解和子代噬菌体的释放结束，总共需要 1-2 h，因此可以发展快速的检测方法。并且可以基于噬菌体的整个感染过程或者某一个阶段来建立各种检测方法。

培养法

利用噬菌体鉴定和检测细菌最经典的技术是噬菌体分型。这个方法是将特异性噬菌体与待检细菌在半固体培养基中共同培养，然后观察细菌是否被裂解。如果细菌对噬菌体敏感，

将发生裂解，就会形成透明的空斑。如果用液体培养的话，相对于不加噬菌体的培养液的浊度就会下降。肉眼观察或者利用分光光度计就可以对结果进行鉴定。利用自动浊度计和数码相机就可以进行高通量的检测^[79]。几乎所有在流行病学中很重要的病原菌的特异性噬菌体都已经收入到噬菌体库中。这个方法即特异又简单。不过此方法需要待检细菌的量比较大，其中的细菌分离和扩增步骤也费时、费力。

基于噬菌体与宿主菌形成的复合物

噬菌体感染细菌的最初阶段是噬菌体尾部的蛋白特异性的结合到宿主细菌的表面受体上。由于该结合具有多价的特性（高亲和力），所以形成的复合物既特异又非常牢固。利用这一点就可以利用噬菌体捕捉细菌，或者将噬菌体染色作为指示。因此，噬菌体本身或它们的传感受体可用于作为生物识别元件的生物传感器。这与抗原抗体的方法很相似。将荧光标记的噬菌体与待检细菌的培养液混合后，一旦噬菌体吸附到细菌的表面就可以用流式细胞术或者改进的直接外荧光过滤器技术来检测^[80]。将噬菌体固定在固体表面就可以利用噬菌体对宿主菌特异性的吸附能力来捕获宿主菌。当宿主细胞结合到噬菌体之后，就可以利用各种光学、电化学或 MEMS（微机电系统）设备进行实时监测。为了简化生物吸附检测的过程，可以利用噬菌体受体代替噬菌体作为捕捉工具。噬菌体受体对细菌表面存在的特异性区域具有高亲和力的识别活性。基因工程获得的噬菌体尾丝蛋白可以像抗体一样执行捕捉和鉴定细菌的功能；另外噬菌体编码的裂解酶的结合区也可以用来特异性的捕获细菌^[81]。这些蛋白都可以高亲和力的与细菌细胞壁上的特异性受体相结合。

指示性噬菌体

噬菌体感染细菌的第二个阶段涉及到噬菌体遗传物质注入到宿主细菌的内部。当噬菌体的核酸物质进入宿主细胞后，噬菌体将立即接管细菌全部的代谢系统。可以通过遗传物质修饰来改造噬菌体使其携带报告基因（如生物发光基因），噬菌体感染细菌后将表达报告基因，通过仪器就可以很容易的检测到^[82]。

将噬菌体介导的裂解作为待检病原存在的指示

噬菌体感染细菌的最后阶段将伴随着细菌的裂解和子代噬菌体的释放。该裂解事件可以通过监控细胞内容物（如细胞内部的分子或者子代的噬菌体）的释放被检测到。三磷酸腺苷（ATP）在细胞内部分布广泛，可以作为噬菌体介导的细胞裂解的检测信号。ATP 存在于所有的活细胞内，并且含量很高，可以通过 ATP 生物发光的方法很容易检测到。荧光素-荧光素酶反应释放的光强度与 ATP 的含量是成一定比例的，因此可以通过这个反应确定样品中被特异性噬菌体裂解的细菌的数量。检测在噬菌体与待测样品共同的培养液中子代噬菌体的释放量，这在快速、特异的检测食物和环境中的细菌方面具有很好的应用前景。一般来说，

每种噬菌体在特定的条件下感染细菌的释放量是恒定的，只要噬菌体的量足够多，就可以将待检样品中所有的敏感细菌裂解，同时释放子代噬菌体，而释放的子代噬菌体的数量就与起初样品中存在的细菌量成一定比例。噬菌体的数量可以通过噬斑实验或者通过检测特定的噬菌体蛋白/核酸序列来确定。这种方法主要有四个步骤：1. 噬菌体吸附并感染宿主菌；2. 将样品中多余的噬菌体破坏掉或者除去；3. 噬菌体原件的合成、组装和子代噬菌体颗粒的释放；4. 释放的噬菌体数量的测定。

1.5.5 噬菌体疗法在人医临床的应用

当噬菌体作为治疗制剂应用时，对机体来说是一种外来的生物体，很可能会与机体的免疫系统产生相互作用、激发机体的免疫反应。但是面临这一问题的抗菌制剂，不仅仅只有噬菌体。一些被批准使用的蛋白质药物同样具有激发免疫反应的能力，另外，化学性抗生素也是通过裂解细菌达到治疗的目的，也会引起细菌细胞碎片、内毒素的释放。目前的研究表明，当噬菌体颗粒进入动物、人机体后，经过较短的时间就可以被内皮网状系统清除干净。但是，不同的给药途径，会使噬菌体颗粒的免疫原性发生很大的变化（血液 vs 体表）。比如 Carmody 等^[83]的研究表明通过腹腔注射噬菌体同样可以对肺部细菌感染具有一定的治疗效果，这充分说明一些噬菌体可以很容易穿过不同的体腔，并且不会激起针对噬菌体的免疫反应。Merril 等^[84]通过“驯化”获得了可以在机体内长期存在的噬菌体，它们的免疫原性明显的低于父辈噬菌体，这说明一些噬菌体可以逃过机体的免疫反应。最近有噬菌体疗法的临床实验表明在不同的机体体腔内存在的噬菌体都不会通过免疫反应的激起而影响疾病的状态。目前，有些噬菌体产品已经通过了监管标准，有些被美国食品药物监管会划分为安全制剂的类别，另外一些已经在美国环境保护局注册、或被美国农业部批准使用。

目前，第一次关于应用噬菌体治疗病人的安全性实验是在 2005 年由 Bruttin 和 Brussow 进行的^[85]。在应用安慰剂，低/高剂量噬菌体的组间整体状态没有明显的差异，口服噬菌体的志愿者的粪便中检出了噬菌体，表明噬菌体可以通过胃肠系统。有趣的是，T4 噬菌体在粪便中出现却没有降低粪便中大肠杆菌的数量，尽管只测定了大肠杆菌的数量，但这也足以表明噬菌体没有影响志愿者的正常菌群。这整个实验过程中，志愿者血液内谷丙转氨酶和谷草转氨酶的水平均未发生变化。另外，也没有针对噬菌体的免疫反应发生，表明噬菌体的口服应用是安全的。另外，Rhoads^[86]对一个噬菌体“鸡尾酒”WPP-201（其中含有八株针对金葡萄、绿脓杆菌和大肠杆菌的裂解性噬菌体）进行了临床一期安全性实验，主要是评价噬菌体治疗的安全性，而没有设定实验去评价噬菌体治疗的效果，结果表明对这些下肢静脉溃疡的病人没有丝毫的安全性风险。Delacoste 首次应用雾化的噬菌体“鸡尾酒”成功的治愈了患有顽固性咳嗽的病人^[87]。紧接着 Hoeflmayr^[88]将噬菌体“鸡尾酒”与其它抗菌制剂一起进行了雾化，

内毒素被有意的留在了噬菌体制剂中，这样可以充分刺激病人的免疫系统，如此，治愈慢性支气管炎病人的成功率高达 90%。2009 年 Merabishvili^[89]对 BFC-1 噬菌体“鸡尾酒”的治疗效果进行了评价，该鸡尾酒中含有针对绿脓杆菌和金葡菌的三个噬菌体，将鸡尾酒用注射器连接微型喷雾器喷洒到病人的烧伤伤口上，所有的患者都未出现因噬菌体治疗而引起的副反应。Wright 等^[8]利用噬菌体鸡尾酒 Biophage-PA（包含 6 个针对绿脓杆菌的噬菌体）对患有绿脓杆菌引起的慢性中耳炎患者进行了治疗。治疗组在炎症、溃疡、息肉、造粒、渗出液的类型和气味方面都得到了很大的改善，而使用安慰剂的患者却没有出现明显的改善。最重要的是，整个实验过程没有发生与噬菌体相关的副反应。目前相关的三期临床实验正在进行中。

总之，目前口服和局部使用噬菌体疗法的实验表明噬菌体疗法在人体使用是安全的。在目前一期和二期临床实验以及之前的研究都表明噬菌体疗法是非常有效的。另外值得一提的是从 20 世纪 20 年代开始，在东欧，尤其是俄国、波兰和格鲁吉亚等国家，噬菌体疗法得到了持续的应用和深入的研究。建立了多个噬菌体疗法的研究中心，包括在波兰城市弗罗茨瓦夫的 Hirsfeld 免疫学与实验疗法研究中心和位于格鲁吉亚城市第比利斯的 Eliava 研究中心。在格鲁吉亚，噬菌体疗法是普遍被人们接受的，并在现在的治疗过程中被广泛应用。在格鲁吉亚和俄国，有商业化的噬菌体制剂，其中包括噬菌体“鸡尾酒”制剂，作为非处方药出售给公众。

第二章 噬菌体裂解酶的研究进展

在噬菌体研究的基础上延伸出一个新的研究方向，即利用噬菌体感染细菌过程中编码的裂解酶，从而可以不再依赖活的噬菌体本身。既然裂解酶可以水解细胞壁肽聚糖，那么它们在细菌外部使用就可以更加高效的裂解革兰氏阳性菌。每两天地球上就有一半的细菌被噬菌体杀死，这是一个周而复始的巨大工程。这样的话，不管细菌感染来势如何凶，总会有噬菌体及其裂解酶可以将其杀灭。现在，科学家只需找到这些噬菌体、确定其裂解酶，然后就可以对症下药。

相比噬菌体，利用裂解酶治疗细菌性感染疾病具有很多优势。首先，噬菌体杀灭细菌的主要因素就是噬菌体存在编码裂解酶的基因，在侵染细菌时可以表达裂解酶。噬菌体裂解酶像噬菌体一样仅攻击细菌，而不影响动物细胞，并具有较高的特异性，因此该酶不影响无害或有益的人体寄生菌。其次，裂解酶只是一种蛋白质，而噬菌体是一种病毒，相对来说应用裂解酶进行治疗更容易被人们所接受。此外，裂解酶的宿主谱比噬菌体的宿主谱广（一种裂解酶可以裂解同种不同型的细菌，少数的还能裂解异种细菌），因为裂解酶与细菌作用，不存在类似噬菌体的吸附阶段、自我复制、繁殖，而是直接作用于细菌胞壁进行溶菌。同时，裂解酶对细菌的杀伤作用所需时间极短，为接触“一过式”杀菌方式。细菌如果想要逃避裂解酶的作用，就必须调整其细胞壁的结构成分，但是这种情况发生的几率是极低的，因此细菌很难产生对裂解酶的抗性，这是应用裂解酶最主要的优势。裂解酶还能够进行原核和真核表达，能够大量的生产，且工艺已经非常成熟。因此，诸多方面都显示出噬菌体裂解酶可以应用于细菌感染的治疗，并且优势非常明显。

2.1 噬菌体裂解酶概述

噬菌体裂解酶是由噬菌体感染细菌的后期由噬菌体基因组编码合成的一种细胞壁水解酶，可以选择性、快速的杀灭特定的革兰氏阳性细菌^[90]。肽聚糖作为革兰氏阳性菌细胞壁的重要组成部分，对维持细菌内部的正常渗透压起着至关重要的作用^[91-93]，如果肽聚糖遭到破坏可以直接导致细菌的渗透性损伤和细菌崩解。经过数百万年的进化，噬菌体裂解酶已经成为一类高效的细菌肽聚糖水解酶。在生理状态下，噬菌体裂解酶是在噬菌体感染细菌的特定时期产生的，通常是在 holin 蛋白表达之后，通过 holin 对细胞膜的穿孔作用^[94]，从而使裂解酶透过细胞膜到达细胞壁的肽聚糖，从而发挥水解作用，导致细菌破裂、释放子代噬菌体颗粒^[95]。当噬菌体裂解酶在细菌外部与之接触时就可以高效的水解肽聚糖，进而杀灭细菌，因此，由噬菌体编码的裂解酶可以作为一类新型的抗菌制剂，将裂解酶应用于临床感染

疾病的治疗领域将是一个重要的进展^[96]。通常情况下，裂解酶具有种/属特异性，比如金黄色葡萄球菌噬菌体的裂解酶只对金黄色葡萄球菌具有水解活性，因此可以在不影响正常菌群的前提下，提供针对性的治疗策略，并且可以降低细菌产生裂解酶抗性的风险^[97]。不过，有极少数裂解酶可以对一种以上的革兰氏阳性菌或者对革兰氏阳性和阴性菌都有活性^[98, 99]。

噬菌体裂解酶与细菌自身的 *autolysin* 以及 *exolysin* 具有相似的结构和功能^[100]，并且与一小类哺乳动物的肽聚糖识别蛋白密切相关^[101]。但是细菌的 *autolysin* 主要是参与细菌生长和二分裂过程中对细胞壁的调控^[102]，而细菌的 *exolysin* 则是由细菌分泌到外部、主要用于杀灭其它种类细菌的水解酶。*Exolysin* 中最典型的例子是 *Staphylococcus simulans* 产生的 *lysostaphin*，它对 *Staphylococcus aureus* 具有裂解作用，而对其它细菌无害^[103]。

由于近些年细菌耐药性问题的日益严重，越来越多的研究人员将噬菌体的裂解酶看做一种非常有潜力的细菌感染治疗制剂^[104]。Fischetti 及其同事杜撰了“enzybiotics”一词，来阐明其蛋白质的本质及抑菌活性的特征^[105]。噬菌体裂解酶可以对细菌产生“一过性裂解”作用，而这种作用于噬菌体结构蛋白中的尾部水解蛋白发挥的裂解作用是不同的，后者是噬菌体通过尾部蛋白作用将自身遗传物质注入到细菌体内而在细胞壁上打孔，从而对细菌造成损伤而发生的裂解作用^[106-108]。阳性菌的细胞壁肽聚糖外面没有阴性菌所具有的外膜蛋白的保护，所以通常情况下，裂解酶的应用限制于革兰氏阳性菌。不过最近有研究报道了可以破坏阴性菌外膜蛋白的多肽，这为裂解酶应用于阴性菌感染的治疗提供了很好的契机。

裂解酶已经在败血症、心内膜炎、咽炎、肺炎、脑膜炎、粘膜及皮肤感染等动物模型中进行了治疗性研究^[38-45]。作为一种新型的抗微生物制剂，裂解酶具有与小分子抗生素药物不同的几个特点：(1) 具有高度的特异性，大多数具有种属特异性，这主要是由于不同细菌细胞壁上的肽聚糖成分有差异；(2) 具有快速、高效的特点，一旦裂解酶与肽聚糖上的底物接触，就可以在极短的时间内将处于静态或生长状态的细菌杀灭；(3) 可以有效的治疗生物被膜引起的心内膜炎等感染；(4) 可以与针对细胞壁起作用的抗生素发挥协同作用；(5) 可以使抗性菌株恢复对抗生素的敏感性。作为一种分子，裂解酶属于蛋白质，因此具有免疫原性。但是至今为止，体内和体外实验均表明裂解酶产生的抗体不具有对裂解酶裂解活性的中和作用^[109]。为了检测噬菌体裂解酶的安全性和药代动力学，后续需要进一步的实验研究。

2.2 裂解酶的结构组成

针对革兰氏阳性和革兰氏阴性菌的裂解酶通常表现出不同的结构组成，这反映出这两大类细菌细胞壁成分的差异。通常情况下，针对革兰氏阳性菌的噬菌体裂解酶表现为模块儿结

构，由两种以上的活性域组成，一般是大于 25 kDa 的蛋白质分子（抗生素大小一般为 0.3-1.6 kDa）^[110]。典型的阳性菌裂解酶具有两种功能的活性域：具有与底物结合作用的活性域和水解底物的活性域。一般来说，裂解酶的 N 端为水解活性域，可以特异性的破坏肽聚糖的化学键，根据裂解酶可以水解的化学键可以将其分为几类^[111]：N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶和裂解性转糖基酶，二者可以水解糖链中 N-乙酰胞壁酸-β-1,4-N-乙酰葡糖胺之间的化学键；N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶，特异性水解糖链中 N-乙酰葡糖胺-β-1,4-N-乙酰胞壁酸之间的化学键；N-乙酰基-L-丙氨酸酰胺酶，特异性水解糖链和多肽链之间的酰胺键；内肽酶，水解肽聚糖的四肽侧链的化学键。裂解酶的 C 端结合区可以特异性的结合肽聚糖上的相应配体，包括磷壁酸或者中性多糖等^[112]。在裂解之后，裂解酶的结合区依然可以牢固的结合在细胞壁碎片上，这很可能不利于噬菌体的扩散和再次发挥活性。目前，关于李氏杆菌噬菌体裂解酶特异性结合配体的研究报道较多。而相比之下，革兰氏阴性菌的外膜可以避免其肽聚糖直接暴露在外面，也就限制了裂解酶在阴性细菌外部的水解作用。这或许可以解释为什么水解阴性菌的裂解酶大多数情况下只有一个水解活性区域，而没有结合区，大小也只有 15-20 kDa。当然，也有特殊情况，比如两个来自绿脓杆菌噬菌体（KZ144 和 EL188）的裂解酶就具有 N 端结合活性域和 C 端水解活性域的模块结构。KZ144 的 N 端结合活性域不但对绿脓杆菌细胞壁的肽聚糖具有高亲和力的结合作用，同时可以结合其它革兰氏阴性菌的细胞壁成分^[113]。另外，针对革兰氏阳性菌的裂解酶也不单是只具有两个活性域的模块结构，有的具有三个活性域^[114]。比如针对金葡菌的裂解酶大多就具有两个 N 端水解活性域和一个 C 端结合活性域^[115]；链球菌噬菌体 λSA2 的裂解酶则是中间为结合活性域，两端为水解活性域^[116]；另外，肺炎链球菌的噬菌体裂解酶的结合活性域包含 18 个重复的由 20 个氨基酸组成的基序，可以特异的结合细胞壁上包含胆碱的磷壁酸^[117]。目前为止，绝大多数噬菌体的裂解酶均是由一个基因编码生成的，只有 A 型链球菌噬菌体 C1 的噬菌体 PlyC 是由两个基因编码生成的，包括 PlyCA 和 PlyCB^[118]。一个 PlyC 分子由八个 PlyCB 组合成的结合活性域和一个 PlyCA 催化活性域组成。

2.3 裂解酶的三维结构

尽管有些噬菌体裂解酶的单一活性域的三维结构已经得到了解析，但是目前为止只有两个整体模块结构的裂解酶成功获得了结晶^[117]。第一个已经报道的具有完整模块结构裂解酶的结构是肺炎球菌噬菌体裂解酶 Cpl-1，它包含 N 端的胞壁质酶和 C 端的结合活性域，其中 C 端结合活性域由 6 个连续串联的重复序列组成的两个独立的结构域组成，水解域和结合域共同构成了一个发卡结构^[119]。Cpl-1 的两个结构域在结合之前进行相互作用，结合活性域使

裂解酶可以以正确的方向结合底物，类似的合作机制也存在于其它需要依赖结合区才能发挥完全活性的裂解酶^[120]。第二个获得结晶的完整模块裂解酶 PlyPSA 来自于李氏杆菌噬菌体 PSA，是依赖于锌离子的酰胺酶^[121]。PlyPSA 的结合域形成了比较有趣的折叠方式，形成了没有显著序列相关性的内部结构重复。

就像 Cpl-1 和 PlyPSA 晶体结构中显示的那样，具有模块结构的裂解酶的不同活性域之间由短、但柔性很大的 linker 连接，这种内部具有的柔性，使得全长裂解酶的结晶变得非常困难。正是由于这个原因，目前为止报道的关于噬菌体裂解酶的结构大多数都是裂解酶单个结构域的晶体结构。尽管艰难梭菌裂解酶 CD27L 依赖锌离子的催化域与 PlyPSA 仅有 30% 的序列同源性，但是他们却表现出非常相似的结构^[120]，这与之前提到的 PlyPSA 结合域的内部结构重复很相似，都是裂解酶趋同进化的例子。除了 PlyPSA 和 CD27L 以外，其它几个裂解酶同样通过晶体结构揭示了其裂解活性依赖于二价金属离子的特性^[122]，其它一些具有锌离子结合保守位点存在的裂解酶应该具有类似的性质^[123]。噬菌体裂解酶的催化域可以依据折叠情况分为几类，其中许多已经结晶的糖苷酶属于糖基水解酶类的 24 和 25 家族 (GH24, GH25)^[101, 117]。虽然 X-射线晶体学方法是目前确定蛋白质结构的金标准和最常用的方法，但是同样有一些研究通过其它的方法对裂解酶的结构进行了解析或者预测，其中包括核磁共振技术^[124]、同源建模、以及其它生物物理学方法^[125]。

2.4 细菌对裂解酶产生抗性的可能

鉴于细菌对抗生素产生抗性的速度非常快，因此迫切需要研发难以使细菌产生抗性的全新抑菌制剂。过去几十年 MRSA 等超级耐药菌株呈持续性增长模式，分布越来越广泛，使之从院内病原菌转变为了社区获得性感染的主要病原菌^[126]。广谱抗生素（青霉素和四环素）的过量使用，同时给目的病原菌和共生微生物产生了选择压力，这加速了耐药基因在细菌中的分布^[114]。在这方面，具有种属特异性的裂解酶表现出优于传统广谱抗生素的特点。此外，噬菌体与它们的宿主菌进行了长期的共同进化，而裂解酶结合和水解的对象又是细菌细胞壁上高度保守、不可改变的成分，这些确保了噬菌体的存在，也使得细菌无法形成对裂解酶的抗性^[127]。至今没有裂解酶抗性突变菌株的报道，这很可能是由于发生了相应突变的菌株根本无法正常存活。肺炎链球菌的裂解酶结合底物是细胞壁上的胆碱^[128]，化脓性链球菌的裂解酶结合底物是细胞壁上的 polryrhamnose^[110]，炭疽芽孢杆菌的裂解酶结合底物是细胞壁的中性多糖^[112]，这些裂解酶的结合底物都是细菌生存所必需得。当裂解酶在细菌外部进行水解作用时，肽聚糖的外部特征同样限制了产生对裂解酶抗性的可能，而多数针对抗生素的典型抗性机制都产生于细菌细胞内部。细菌对抗生素的内部抗性机制包括：降低膜通透性、细

胞内部成分的主动外排和通过细胞质的酶使抗生素失活^[104]。这些抗性机制根本不会影响裂解酶对细菌的裂解作用，这是裂解酶的一大优势。

目前为止，还没有细菌产生针对裂解酶抗性机制的研究报道^[96]。另外，对金葡菌、肺炎双球菌和蜡样芽孢杆菌应用亚最小抑制浓度的裂解酶时，也不会产生对裂解酶表现抗性的突变菌株。在实验中，将噬菌体裂解酶滴到长有金葡菌菌苔的平板上，然后在空斑的边缘处挑取单菌落继续培养后再次涂平板滴裂解酶，如此重复操作 40 个循环，即便如此，仍然没有抗性菌株出现^[112]。在另一项研究中，体外使 MRSA 菌株暴露于递增浓度梯度的特异性裂解酶 ClyS 或者莫匹罗星，结果 8 d 之后产生了具有低水平莫匹罗星抗性的突变菌株，而没有发现对裂解酶具有抗性的突变株^[109]。尽管链球菌和炭疽芽孢杆菌可以分泌表达较厚的多糖荚膜，而金葡菌和链球菌可以形成防御性的生物被膜，但是这些都不能阻碍裂解酶发挥其裂解活性^[105, 112]。

尽管这些研究结果非常鼓舞人心，但是我们必须注意到有些关于细菌产生针对非噬菌体源的一些肽聚糖水解酶的抗性。有报道称细菌可以通过细胞壁的二次修饰从而产生对人溶菌酶的抗性，比如肽聚糖的 O-乙酰化和 N-去乙酰化以及磷壁酸的 D-丙氨酰化^[102, 129]。类似的还有关于金葡菌产生对细菌溶菌酶抗性的报道^[130]。多数情况下，这种抗性是由于五个甘氨酸交联桥被修饰而形成的（比如减少到仅有 1 个甘氨酸残基或者掺入一个丝氨酸残基^[131]），而这个五甘交联桥是溶葡萄球菌酶的底物^[103]，并且被认为是金葡菌肽聚糖最易发生变化的位置^[132]。另一种理论上存在的对噬菌体裂解酶能够产生抗性的机制是通过细胞壁的修饰产生空间位阻，从而造成结合配体或者水解位点的伪装和隐藏。不过幸运的是，至今还没有通过类似机制对噬菌体裂解酶产生抗性的报道出现^[104]。现有的研究数据还不能够为“噬菌体裂解酶对细菌抗性机制易感性有多强”这个问题提供明确的答案。

2.5 裂解酶的特异性

通常情况下，裂解酶只对其来源噬菌体的宿主菌种类具有杀菌活性，比如来自于链球菌噬菌体的裂解酶只能够杀灭链球菌^[133]，而来自于金葡菌噬菌体的裂解酶只能杀灭金葡菌^[134]。相比其来源噬菌体来说，裂解酶可能会具有更宽的裂解谱。与抗生素相比，裂解酶只会杀灭特定的病原菌，而对其它的正常菌群不会产生影响。裂解酶在体外对具有剂量依赖抗生素敏感性和强耐药性的革兰氏阳性菌，如：炭疽芽孢杆菌和蜡样芽孢杆菌^[112]、难辨梭状芽孢杆菌^[135]、产气荚膜梭菌^[136]、粪肠球菌和屎肠球菌^[137]、单核增生李斯特杆菌^[138]、金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌^[134]、无乳链球菌^[139]、肺炎链球菌^[133]、以及化脓性链球菌^[105]等，都表现出很强的杀灭活性。其中一个具有高度特异性的裂解酶是嵌合裂解酶 ClyS，它

只能裂解金葡菌，包括 MRSA 和 VRSA^[134]。

尽管没有经过实验证实，不过通过预测，ClyS 应该是一个可以特异性水解金葡菌甘氨酸交联桥的内肽酶。ClyS 包含一个来自于 Twort 噬菌体裂解酶的 CHAP 活性域，该活性域在序列和预测的结构上与 LysK 和 phi11 噬菌体裂解酶具有相似性。LysK 和噬菌体 phi11 裂解酶中的 CHAP 活性域都是水解金葡菌四肽侧链和五个甘氨酸交联桥之间的化学键的活性^[140]。同样也有个别的裂解酶可以表现出很宽的裂解活性，比如来自肠球菌噬菌体的裂解酶 PlyV12，不仅可以杀灭肠球菌，同时可以杀灭包括无乳链球菌和化脓性链球菌^[137]。

科研人员也对具有宽谱裂解活性裂解酶的结合特性进行了研究。Loessner 等人的研究表明裂解酶与其在细胞壁上结合配体的结合力可以达到 $K_a=3\sim6\times10^8$ ，这与抗体的高亲和力很接近，表明该裂解酶是一种“一次性”的酶，很难从结合配体和水解位点处脱离下来。这种对细菌细胞壁上配体如此高的亲和力使裂解酶可以很快的结合目的菌株。裂解酶可以有效的裂解处于对数期和稳定期的细菌，因此可以被应用于全身性治疗和粘膜表面治疗。许多研究表明裂解酶从结合底物到水解底物所需的时间是极短的。比如纳克剂量的 PlyC 可以在几分钟内使 10^7 的化脓性链球菌菌液降低 6 个 log 单位^[105]。类似的还有关于裂解酶裂解炭疽芽孢杆菌^[112]、粪肠球菌和屎肠球菌^[137]、金葡菌^[134]和无乳链球菌的报道^[139]。除了化学消毒以外（如漂白消毒），在生物源杀菌物质中，裂解酶的杀菌效果可以说是最快的。

2.6 裂解酶应用的安全性

从安全方面考虑，噬菌体裂解酶的高特异性是其最有益的特性。尤其在食品安全和医疗应用方面，这些裂解酶可以在不影响正常菌群的前提下杀灭特定的病原菌，这使得它们与传统的抗生素和化学防腐药物相比表现出极大的优越性。不过将裂解酶对人体或者动物进行全身性治疗时，主要的担忧则是细菌裂解后大量促炎细胞碎片的产生，包括磷壁酸、脂磷壁酸和肽聚糖，这些成分很可能引起脓毒性休克和多器官功能衰竭等严重的机体反应^[141]。Entenza 等人的研究发现对小鼠持续的静脉注射 Cpl-1 可以增加促炎细胞因子的浓度^[142]；但是 Witzenrath 及其同事的研究则表明，相比不进行治疗的动物，每间隔 12 h 应用一次裂解酶 Cpl-1 可以有效的降低动物细胞因子的浓度^[143]。两项研究所得结果的差异或许可以解释为持续应用高剂量的 Cpl-1 可以造成细菌细胞壁碎片的大量释放，从而导致高水平的促炎性因子^[144]。另外，由于裂解酶属于蛋白质，所以不具有腐蚀性，并且可以被生物降解^[114]。

2.7 裂解酶应用的潜在风险

裂解酶疗法的一个担忧是在裂解酶应用过程中可能会产生中和性抗体，这会阻碍裂解酶的后续使用。抗生素都是一些不具有免疫原性的小分子，而噬菌体裂解酶是蛋白质，当进行

粘膜使用或者全身应用时可以引起机体发生免疫反应，产生抗体。这些抗体很可能导致裂解酶活性的中和。已有报道特异性裂解炭疽杆菌、金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌和化脓性链球菌的裂解酶的兔高免血清被制作出来被用来验证上述的观点。在每个研究中，都会产生针对相应裂解酶的抗体，但是在体外实验中这些抗体不会阻碍裂解酶活性的发挥^[105, 109, 112, 134, 145, 146]。在体内实验中同样表现出这样的特性，Jado 等人^[147]的研究表明在应用 Cpl-1 和 Pal 治疗过程中，可以促使小鼠产生针对裂解酶的抗体，但是当再次使用时不会影响小鼠的正常恢复能力，也没有过敏反应等副作用的产生。其它几项关于不同裂解酶与病原菌的研究同样表明可以引起机体产生针对裂解酶的抗体^[144]，但是裂解酶再次使用时不会引起动物产生副反应或者过敏反应，并且抗体不会阻碍裂解酶活性的发挥^[146, 147]。这些结果可能是由于裂解酶对细胞壁的亲和力要大于 IgG 与裂解酶的亲和力^[138, 148]，裂解酶杀灭细菌的速度快于裂解酶引起机体产生免疫反应的速度^[144, 147]。总体来说，现有的研究表明裂解酶确实可以使机体产生抗体，但是所产生的抗体不是中和抗体，裂解酶可以在体内被重复使用，并且不会产生不良反应或者失效的情况。

有研究表明当 Cpl-1 被静脉注射全身使用时，其半衰期约为 20 min，与其它一些蛋白的情况相似^[145]。因此，如果在治疗过程中想要使裂解酶达到足够的全身性浓度，需要重复给药、或者通过静脉注射^[144]。另外，也可以通过对裂解酶进行修饰，从而达到延长其半衰期，已经有相关的研究进行了尝试。前期的研究已经表明生物分子的聚乙二醇化可以降低机体系统对分子的清除^[149-151]。但是，近期的研究表明半胱氨酸特异的聚乙二醇化 Cpl-1 的抗菌活性消失了，表明这种方法可能不适合这类模块组成的裂解酶^[149]。相比之下，通过 C 端半胱氨酸残基形成的二聚化 Cpl-1 不但增强了裂解酶对肺炎双球菌的特异性杀灭活性，同时使血浆中裂解酶的清除率下降了 10 倍。这种天然的二聚化已经应用到几个噬菌体裂解酶上，另外这种策略或许对其它模块结构的裂解酶也具有作用^[150]。

2.8 裂解酶与抗生素的协同作用

所谓协同作用是指，两种抗微生物制剂同时使用时，可以降低单独使用时的剂量、增加治疗的效果，同时可以通过作用于不同的靶位从而有效降低抗性产生的作用。协同作用可以在不同噬菌体裂解酶之间或者在噬菌体裂解酶与其它抗微生物制剂之间存在。可以作用于肽聚糖不同位点的两个裂解酶可以同时在三维空间中的不同位置破坏肽聚糖，从而使肽聚糖造成更有效的损害。另外也可能是一种化学键被一个裂解酶水解后，可以使第二个裂解酶更有效的作用于它的底物，从而使底物快速的降解^[154, 155]。肺炎球菌噬菌体裂解酶 Cpl-1 与 Pal 是两个噬菌体裂解酶之间具有协同作用的典型例子^[151]，另外金葡菌噬菌体裂解酶 LysK 与

溶葡萄球菌酶之间也存在协同作用^[140]。这两个例子全部是在体外用经典的棋盘法检测到的。在 Cpl-1 和 Pal 测定协同作用时还用到了体内实验, 利用肺炎球菌建立的小鼠菌血症模型^[48]。链球菌和金葡菌噬菌体裂解酶的嵌合体 λ SA2-E-Lyo-SH3b 和 λ SA2-E-LysK-SH3b^[115]与溶葡萄球菌酶在体外和小鼠乳房炎模型中均表现出协同作用^[154]。Cpl-1 与青霉素和庆大霉素同时使用时也都表现出协同作用^[152]; 金葡菌噬菌体裂解酶 MV-L 与糖肽类抗生素同时使用时, 对万古霉素中度耐药的金葡菌表现出了协同的杀灭作用^[146]; 另外, 前面提到的嵌合型金葡菌噬菌体裂解酶 ClyS 与苯唑西林同时应用时, 可以有效治疗 MRSA 引起的小鼠败血症模型^[134]; 金葡菌噬菌体裂解酶 LysH5 与乳酸链球菌素共同使用表现出协同作用, 可以有效降低牛奶中金葡菌的数量^[153], 另外 LysH5 与金葡菌噬菌体裂解酶 HydH5 也表现出协同作用^[158]。

2.9 裂解酶的应用

2.9.1 在医学方面的应用

自从发现了噬菌体裂解酶自外裂解的现象, 这种酶就成为了治疗人和动物细菌性感染的候选治疗药物。但是只有当经典的抗生素面临细菌多重耐药性问题时, 研究人员才开始将焦点放在这些裂解酶上, 并开始进行将这些酶作为传统药物的辅助品或替代品用于医学的研究。

链球菌的防控

其中研究最多的是利用裂解酶控制链球菌的感染。作为一个 20 世纪 60 年代晚期的研究生, Fischetti 发现可以利用一种分离自噬菌体的裂解酶杀灭 C 型链球菌。裂解酶是由噬菌体产生的, 在裂解细胞壁的过程中发挥着重要作用, 它可以水解细胞壁肽聚糖的多肽键将细胞壁破裂, 使子代的噬菌体颗粒从宿主菌的胞内释放到外部环境。他将这种酶进行了纯化, 发现该酶可以在细菌细胞壁上打孔, 从而使细胞壁崩解、导致细菌死亡, 并且具有特异性^[154]。三十年以后, Fischetti 重新开始他博士期间的工作, 利用之前的裂解酶治疗小鼠脓毒性咽喉炎。在口服该裂解酶 2h 后, 细菌完全消失了^[105]。此后, Fischetti 又获得了针对包括粪肠球菌、MRSA 和炭疽杆菌在内的多种病原菌的噬菌体裂解酶。至今为止, Fischetti 只是在小鼠模型上对裂解酶的效果进行了测定。不过位于纽约杨克斯的 ContraFect 公司, 已经批准生产了 Fischetti 的 9 个裂解酶, 并且聘请了他及洛克菲勒大学的其他研究人员作为科学顾问, 今年 Fischetti 有望开展首例临床实验^[3]。

2001 年, Nelson^[105]报道了利用链球菌噬菌体裂解酶 PlyC 预防和治疗有 A 型链球菌引起的小鼠上呼吸道感染的研究。提前应用该裂解酶可以使小鼠的感染率从 70% 降到 30%。当小鼠感染链球菌时使用 500 U 的 PlyC 就可以在 2 h 内使菌量降低到检测水平以下。接着

这个研究团队陆续进行了一系列的研究：使用 Pal 裂解酶后 5 h 就完全清除了肺咽部定植的肺炎链球菌，并且没有对正常菌群造成任何影响^[133]；以及使用 PlyGBS 使阴道和咽喉定植的 B 型链球菌的数量得到了显著的下降^[139]。他们发现裂解酶不单单可以降低粘膜上细菌的数量，同时还可以有效的治疗全身性细菌感染疾病。当小鼠静脉注射肺炎链球菌时，1 h 后使用一次 2 mg 剂量的 Cpl-1 裂解酶就使血液内的菌含量从 4.7 log CFU/mL 下降到检测不到的水平，使小鼠的存活率达到 100%，而非治疗的对照组的存活率仅为 20%^[145]。Cpl-1 和 Pal 都可以有效保护链球菌引起的小鼠菌血症，当二者单独使用时有效的治疗剂量是 200 μg，而当联合应用时每种裂解酶仅需 2.5 μg，这表明二者在体内表现出了协同效应^[147]。近期还有关于 Cpl-1 的研究：连续输入裂解酶液治疗肺炎链球菌引起的小鼠心内膜炎，可以显著的降低主动脉瓣和血液中的细菌含量^[142]；应用 Cpl-1 能够有效的预防流感后继发的中耳炎；脑池内注射或腹腔注射 Cpl-1 能够有效的治疗链球菌引起的脑膜炎^[155]；利用 Cpl-1 能够成功的治疗肺炎链球菌引起的肺炎^[143]。最新的研究中，首先利用鼻腔感染链球菌，在 24 h 后造成严重的肺炎时进行治疗，腹腔注射裂解酶可以使患严重肺炎的小鼠得到 100% 的保护率，而使用阿莫西林治疗组存活率仅为 86%。这些结果都表明裂解酶有能力治愈建立的链球菌感染模型^[144]。

炭疽杆菌的防控

除了裂解酶治愈链球菌感染的研究外，PlyG 裂解酶在小鼠模型中对作为生物战剂的炭疽杆菌也表现出显著的杀灭活性。腹腔注射炭疽杆菌，对照组使用缓冲液进行处理，结果 2 h 后小鼠就出现了死亡，而利用 PlyG 治疗组的小鼠存活率达到 70~80%^[156]。另有一个炭疽杆菌裂解酶 PlyPH，在 pH 4~10.5 的范围内都表现出很好的抑菌活性，对腹腔注射炭疽杆菌的濒死小鼠的保护率可以达到 40%^[157]。

金葡萄的防控

在过去的 5 年里，也有许多关于利用裂解酶控制金葡萄感染的研究。2007 年有一篇报道利用源自噬菌体 ΦMR11 的裂解酶 MV-L 有效的清除了小鼠鼻腔感染的 MRSA 菌株。当该裂解酶分别在感染 MRSA 后的 0、30、60 min 时腹腔应用，其对小鼠的保护率分别为 100%，100% 和 60%^[146]。另外，嵌合型裂解酶 ClyS 同样可以显著地减少小鼠鼻腔感染 MRSA 的数量，可以比莫匹罗星更有效的清除皮肤感染的 MRSA，单独使用或者与苯唑西林联合应用都可以有效的保护菌血症状态的小鼠^[109]。具有同样显著治疗效果的还有 LysK^[155]，LysGH15 和 P-27/HP^[158]。

同时，在印度的 GangaGen 医疗公司也在开展相关的方向他们将截短的噬菌体裂解酶与小分子共同使用对抗金葡萄。该公司已经获得了一个镶嵌蛋白 P128，它可以杀灭各种葡萄

球菌，其中包括分离于人志愿者鼻腔的菌株^[159]。值得注意的是，GangaGen 和 ContraFect 的蛋白产品的审批肯定不会遇到像他们的来源者噬菌体那样的困难。Fischetti 很自信这些基于噬菌体的疗法最终肯定会在不久的将来应用于临床。

2.9.2 裂解酶在食品安全方面的应用

凭借裂解酶的抑菌能力，就可以将噬菌体裂解酶作为抗菌制剂来增强食品的安全性。裂解酶可以事先纯化好然后直接加到食品中或对动物等进行饲喂，另外，也可以直接使用分泌表达裂解酶的表达菌株，如乳酸乳球菌。裂解酶同样可以应用于控制植物细菌的生长。研究表明来源于 Ealh 噬菌体的裂解酶可以用于清除感染未成熟梨的火疫病原菌，可以延缓或抑制该病原菌引起的梨的软化和坏死等症状^[160]。

许多研究都表明噬菌体裂解酶及其它噬菌体相关的水解酶在对食品相关病原的控制和检测方面都具有很大的应用潜力。裂解酶的优势是对特定病原的高度特异性，不会像以往的广谱抗微生物药物那样影响食品及人体中正常存在的细菌。Obeso 的研究表明噬菌体裂解酶 LysH5 可以在 4 h 内将巴氏消毒奶中的金葡萄清除到检测水平以下^[161]，并且该裂解酶与乳酸链球菌素表现出协同作用^[153]。另外，链球菌裂解酶 B30^[162]、Ply700^[162]、链球菌与金葡萄的嵌合裂解酶 λSA2E-Lyso-SH3b 和 λSA2E-LysK-SH3b^[164]、酪酸梭菌噬菌体 ΦCTP1 的裂解酶^[135]都在牛奶及其它奶制品中显示出很强的抑菌活性。非常有意思的是三个李氏杆菌噬菌体裂解酶 Ply118、Ply511 和 PlysP35 对高温表现出很强的抵抗力，尤其是 PlysP35 在 90°C 放置 30 min 仍然保持裂解活性。这些热稳定的噬菌体裂解酶可以用于一些需要经过热处理的食品，如巴氏消毒的奶制品^[123]。Ply118、Ply511 和 Ply500 在生菜等食品中可以作为抗李氏杆菌制剂，储存六天后可以将单核李氏杆菌降低 2.4 个 log 单位的菌量（Guenther 等人的研究，数据尚未发表）。一些裂解酶还可以用于固体食物表面的消毒，比如可以将水果浸泡在表达欧文氏菌噬菌体裂解酶的大肠杆菌的裂解液中，使欧文氏菌的增殖得到抑制^[160]。另一种利用噬菌体裂解酶控制食源性病原菌的策略是使用可以在发酵过程中表达和分泌裂解酶的乳酸乳球菌来控制病原菌。

2.9.3 裂解酶在检测方面的应用

应用高特异性的噬菌体裂解酶的结合区（CBD）作为细菌检测的方法也得到了广泛的研究。Kretzer^[81]的研究表明利用 CBD 包被的磁珠对食物中、自然和人工污染的单核增生李氏杆菌的检出率达到 90% 以上。这种方法在敏感性和快速性方面明显优于标准的平板法，并且这些方法也可以用于蜡样芽孢杆菌和产气荚膜梭菌等其它细菌的检测。也有报道将该方法与可以定量且高度敏感的实时定量 PCR 方法结合使用^[163]。另外，将 CBD 与荧光标记 marker（如 GFP、CFP 和 dsRed）融合表达，不仅可以指示其结合特性，并且可以特异性的

检测和区分目标菌株。有报道将八种不同的李氏杆菌噬菌体裂解酶的 CBDs（分别可以特异性的结合不同血清型的李氏杆菌）与不同的荧光标记蛋白相结合，建立了可以通过显微镜检测和区分不同血清型的李氏杆菌^[148]。以 CBD 为基础的检测方法还应用到了炭疽杆菌的检测中，研究发现 PlyG 裂解酶 C 端的十个氨基酸的小肽就具有结合炭疽杆菌的活性，并且该结合具有特异性，可以与荧光纳米晶体共同使用进行检测^[164, 165]。

2.9.4 裂解酶在农业方面的应用

裂解酶还可以通过转基因植物进行表达，从而防控植物病原细菌的感染。Düring 团队将 T4 裂菌酶转入到土豆中，这种土豆具有抗软腐欧文氏菌的能力。裂菌酶可以在这种转基因植物中蓄积，当细菌通过果胶酶破坏了植物细胞时，裂菌酶就可以杀灭接触到的病原细菌，从而防止进一步感染的发生。另有一种独特的想法，不是主张植物的自我防护，而是利用植物生产用于人和畜禽医疗使用的裂解酶蛋白，该方法成本低、并且可以大规模生产。Oey 及其同事^[166]利用烟草叶绿体植物对肺炎链球菌噬菌体裂解酶 Cpl-1 和 Pal 以及 B 型链球菌噬菌体裂解酶 PlyGBS 进行了表达，表达量可以达到植物全部可溶蛋白的 70% 以上，前景非常可观。

在动物养殖业可以使用噬菌体相关的水解酶来预防和治疗细菌性疾病，从而大大降低病原菌传播到食品中的风险。牛的乳腺炎是广泛存在于奶牛中的疾病，单单在美国就引起将近 20 亿美元的损失^[167]。当下，抗生素疗法的治疗效果很差，再加上细菌耐药性的增加，因此迫切需要新型的抗微生物制剂。金葡菌是引起奶牛乳腺炎最广泛的病原菌，所以溶葡萄球菌酶作为首个相关水解酶在奶牛乳腺炎的治疗和防控中得到了深入的研究。研究表明将溶葡萄球菌酶注射到乳头管可以有效的杀死乳腺内感染的金葡菌，在小鼠模型和奶牛中都获得了很好的疗效^[168, 169]。另外，产裂解酶的转基因小鼠^[170]和奶牛^[171]都可以使动物具有抵抗引起乳腺炎的金葡菌。研究表明将溶葡萄球菌酶和嵌合噬菌体裂解酶 λSA2E-LysK-SH3b 联合应用可以在体外以及在奶牛乳腺炎的小鼠模型中有效的杀灭金葡菌，并且具有协同作用^[172]。从这些研究结果可以看出，裂解酶对奶牛乳腺炎的治疗效果明显优于噬菌体和抗生素，因此其应用潜力更大。

Hoopes^[173]的研究显示了噬菌体裂解酶的另一种应用，他们评价了 PlyC 作为消毒剂清除马厩表面和设备上的马疫链球菌的能力。结果表明该裂解酶对马疫链球菌的清除能力比传统的消毒剂强 1000 倍。

2.9.5 裂解酶在其它方面的应用

目前应用噬菌体相关水解酶清除细菌生物被膜的研究也逐渐增多。根据 NIH（美国国立卫生研究院）的报道，人类的细菌性感染大约有 80% 的病例与生物被膜有关^[114]，同时生物

被膜也是食品生产和加工及其它相关行业的重要问题^[174]。生物被膜高水平的耐药性使其很难被清除，但是最近许多研究都表明噬菌体裂解酶可以成功清除掉生物被膜。相关的研究有：利用金葡萄噬菌体裂解酶 Φ11^[175]和 SAP-2^[176]清除了金葡萄形成的生物被膜；Cpl-1 和 LytA 联合应用可以破坏肺炎链球菌、口腔链球菌和 *pseudopneumoniae* 链球菌形成的生物被膜^[177]；LySMP 单独使用以及与抗生素联合使用都可以破坏猪链球菌的生物被膜^[178]；PlyLM 与蛋白酶配合使用可以破坏单核增生李氏杆菌形成的单层生物被膜[Simmons 等，数据未报道]。

另外噬菌体裂解酶可以用于革兰氏阳性细菌的核酸和蛋白提取^[179]；可以使细菌形成菌影，作为疫苗使用^[180]；利用噬菌体裂解酶的 CBD（结合区）在乳酸乳球菌表面展示异源蛋白，发展活疫苗^[181]；发展自动诱导的大肠杆菌裂解系统，便于重组蛋白的释放^[182]。

2.10 展望

过去五年中，关于新噬菌体裂解酶被发现、深入研究的报道和这些裂解酶在医疗、食品安全、农业、生物技术等方面应用的研究都越来越多。伴随着多重耐药超级细菌给人们带来日益严重的威胁，研发包括噬菌体裂解酶在内的新型抗微生物制剂的热潮在近期还将持续。从医学角度看，噬菌体裂解酶在局部应用治疗方面很有优势，可以避免或者降低全身应用可能具有的风险，如针对裂解酶本身或者细菌相关抗原引起的促炎性因子的释放等严重的免疫反应。不过，近期涉及动物模型的一些研究都得出了积极、可喜的成果，提示我们裂解酶也可以在长期全身使用疗法中替代或辅助抗生素来使用。目前的一些制度对噬菌体裂解酶作为食品添加剂进行使用具有妨碍作用，不过，美国食品安全监督局已经批准了李氏杆菌噬菌体在一些食品中作为添加剂来使用，这或许可以为将来改变对噬菌体裂解酶在食品中应用的相关限制规定的改变提供原推动力。特别是在食品行业，不同的抗菌物质之间的协同效应可以用来对抗某些产品的食源性致病菌，而备选的抗菌物质较多、并且食品处理的流程也较长，因此噬菌体裂解酶很有可能作为其中的一员或者一个环节来使用。测序技术的飞速发展可以使有效活性域的鉴定更加快捷、使相关的成本更低，另外，植物和酵母表达系统同样可以为裂解酶的生产降低大量的成本。全球约有 10^{31} 个噬菌体，种类也多达 10^6 种，因此理论上也就存在一个取之不尽用之不竭的具有裂解活性结构域的储存库，这可以为病原菌的检测和控制提供强有力的工具^[104]。

第二篇 研究内容

第一章 耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌及其噬菌体的分离鉴定

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 是人畜共患的一种重要病原菌，可以引起皮肤溃疡、伤口感染、心内膜炎、骨髓炎、肺炎和中毒性休克综合症等各种感染性疾病^[169, 170]。凡对抗生素甲氧西林、头孢拉定和苯唑西林具有耐药性或 *mecA* 基因为阳性的金黄色葡萄球菌被称为耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌 (methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA)，该菌的发现引起了全球的轰动。1961 年英国首次报道 MRSA 后，各国相继出现了它的报道。目前，MRSA 是医院和社区常见的致病菌，伴有高发病率和死亡率。在我国，MRSA 的检出率逐年增高，已经成为了主要的院内感染病原。MRSA 是一种致病力和耐药性极强的病原菌，在院内散播可导致局部病房或病区的暴发流行，需引起人们的高度重视并采取及时有效的措施遏制其蔓延。MRSA 近年来给临床治疗带来了极大的困难，尤其是 MRSA 引起的医源传播和社区性传播成为了严峻的问题^[183-186]。目前，万古霉素是治疗 MRSA 感染最有效的药物，但是有些 MRSA 菌株已经表现出了对万古霉素的抗性 (vancomycin-resistant *S. aureus*, VRSA)，这引起了医学界的广泛关注^[178-180]。因此，现在迫切需要一种新型的、可以直接杀灭这一病原菌的治疗性药物^[187, 188]。如前面综述所述，噬菌体及其裂解酶作为一种新型的杀菌药物已经成为一个重要的研究方向。本章节对临床流行的 MRSA 及其噬菌体进行了分离和研究。

首先从人医临床采集了多份病料，对金黄色葡萄球菌进行分离、纯化和耐药性的鉴定，其中 MRSA 菌株的比例极高。以分离到的 MRSA 菌株作为指示菌，对其烈性噬菌体进行了分离和纯化，并从中筛选出了对 MRSA 具有广谱、高效裂解活性的噬菌体 GH15。本章节还对 GH15 的一般生物学特性进行了研究，确定其遗传物质为双链的线性 DNA，属于有尾噬菌体目、肌尾噬菌体科。

1.1 材料

1.1.1 主要试剂

核酸 marker (Takara); SDS、Tris、Glycine (Amresco); 琼脂 (BD); 琼脂糖 (上海); Peptone、Yeast Extract (Oxoid); Brian Heart Infusion (BHI); 常规药敏纸片 (英国 OXOID); 生化反应管(杭州天和); 快速革兰氏染色试剂盒; 病毒核酸提取试剂盒(Axygen); PEG-8000 (Sigma); 一次性滤器 (Millipore, 0.22 μm pore size); CsCl、磷钨酸 (Amresco); 透射

电子显微镜 (JEOL JEM-1200EX II, Japan Electronics and Optics Laboratory, Tokyo, Japan); *DNase I*、*RNase A*、*Mung Bean Nuclease* (Takara) 等。

1.1.2 主要菌株

金黄色葡萄球菌分离株 (本实验室分离、保存); 金黄色葡萄球菌 ATCC25923、ATCC26003、USA300, 大肠杆菌 ATCC25922 (购自 ATCC); 金黄色葡萄球菌 CVCC2261, 链球菌 CVCC606, 沙门氏菌 CVCC541 (购自中国兽医药品监察所); 枯草芽孢杆菌 EA751, 肺炎克雷伯菌 43816 (本室保存)。

1.1.3 引物

mecAF: AAA CTA CGG TAA CAT TGA TCG CAA C

mecAR: CTT GTA CCC AAT TTT GAT CCA TTT G

16SrRNAF: CGA AAG CCT GAC GGA GCA AC

16SrRNAR: AAC CTT GCG GTC GTA CTC CC

1.1.4 主要仪器

PCR 仪 (Biometra T3000); 恒温水浴锅 (上海一恒, DK-80); 卧式电泳仪 (北京六一, DYY-6C); 超洁净操作台 C1109B、立式恒温摇床 1102C、卧式恒温摇床 (上海志诚); 凝胶成像系统 (天能, 1600); 小型台式离心机 pico17、小型低温离心机 pico22、台式低温离心机 Legend RT+ (Thermo); 显微镜; 制冰机 ICE2 (Scotsman); 立式电泳仪 (BioRed, Mini4); 分光光度计 Nanodrop-2000 (Thermo); -80°C 冰箱 (Thermo) 等。

1.1.5 试剂配制

PBS 缓冲液

137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 50 mM Na₂HPO₄, 10 mM KH₂PO₄, pH 值 7.4。

SM 缓冲液

100 mM NaCl, 8 mM MgSO₄, 50 mM Tris-HCl, pH 值 7.5。

培养基

(1) 液体 LB 培养基: Tryptone (10 g), Yeast Extract (5 g), NaCl (10 g), 定容至 1L 后 120°C 高压蒸汽灭菌 20 min。

(2) 固体 LB/BHI 培养基: 在液体 LB/BHI 基础上加入 Agar (15% M/V)。

(3) 半固体 LB/BHI 培养基: 在液体 LB/BHI 基础上加入 Agar (7% M/V)。

1.1.6 样品采集

病料采集

病料取自吉林大学第一附属医院检验科。

污水采集

采自长春市污水处理系统：天嘉水晶城污水排放口、208 医院污水排放口、南湖公园污水排放口等处。

1.2 方法

1.2.1 金黄色葡萄球菌的分离与鉴定

病料中菌株的分离与纯化

将采集的病料浸于少量无菌生理盐水中，在无菌超净台中用接种棒挑取上述浸泡液 1~2 环，划线接种于 BHI 平板上，37°C 恒温箱中培养 18~24h。利用革兰氏染色试剂盒对长出的菌落进行染色和显微镜观察，对革兰氏染色为阳性球菌的菌落进行再次平板划线纯化，直至长出的菌落大小和形态均一。对分离的细菌进行生化反应特性检测，从而初步确定分离菌株的种类。

金葡萄 16SrRNA 和 mecA 耐药基因的 PCR 鉴定

将待检菌株的菌液进行金葡萄 16SrRNA 和 mecA 耐药基因的 PCR 鉴定。PCR 反应条件：95°C 预变性 10 min；94°C 变性 45 s，51°C 退火 50 s，72°C 延伸 1 min，30 个循环；72°C 总延伸 10 min，最后 4°C 保存。PCR 反应体系：10×PCR buffer 2.5 μL，dNTP (2.5 mM) 2 μL，rTaq (1U/μL) 1 μL，16SrRNA 上游引物 (25 μM) 1 μL，16SrRNA 下游引物 (25 μM) 1 μL，菌液模板 1 μL，ddH₂O 16.5 μL。PCR 完成后将扩增产物进行琼脂糖核酸凝胶电泳，观测条带的大小。

药敏实验

取 16SrRNA PCR 鉴定为阳性的菌株，接种于液体 BHI 培养基中 37°C 震荡培养 18~24 h。取菌液 120 mL 滴于 BHI 平板上，用无菌涂菌棒涂抹均匀，待干燥后用镊子无菌夹取药敏纸片贴于涂有菌液的平板上，轻按一下，每板贴六个，做三个重复，37°C 恒温箱倒置培养 18 h 左右。用游标卡尺测定抑菌环直径，取三组的平均值，耐药性评价标准见表 1.1。

表 1.1 对抗生素耐药/敏感的临界范围（临床医学评价标准）

Table 1.1 The critical range of resistance or sensitivity to antibiotic (clinical evaluation)

抗生素	criteria) 临界范围 (mm)
头孢唑啉	14~18
红霉素	16~20
头孢哌肟	14~18
头孢西丁	21~21
左旋氧氟沙星	14~16
利奈唑胺	15~16
青霉素 G	14~14
利福平	17~19
头孢呋辛	14~23
复方新诺明	10~16
头孢噻肟	14~23
四环素	19~22
替考拉宁	11~13
哌拉西林	17~21
万古霉素	16~16

1.2.2 噬菌体的分离、纯化与生物学特性研究

采集污水样品，以 MRSA 菌株（W3275）为宿主菌，对其烈性噬菌体进行分离和纯化，并对其生物学特性进行测定。

污水样品的处理

在长春市的污水排放和处理系统多点采取污水样品。利用多层纱布对所采的污水样品进行初步过滤，然后将滤液置于 4°C 进行 $10,000 \times g$ 离心 15 min，用 0.22 μm 孔径的一次性滤器对上清液进行过滤，将滤过液放于 4°C 备用。

噬菌体扩增与检测

将 W3275 菌株接种于 BHI 液体培养基试管中，37°C 震荡培养至对数生长期，将菌液与处理的污水样品同时加入液体 BHI 培养基中，继续 37°C 震荡培养过夜。然后对培养液于 4°C 进行 $10,000 \times g$ 离心 15 min，用 0.22 μm 孔径的一次性滤器对上清液进行过滤，滤液即为噬菌体增殖液。利用空斑实验检测增殖液中是否有裂解 W3275 的噬菌体：将新鲜的 W3275 菌液均匀涂布于 BHI 固体培养基平板上，晾干后将噬菌体增殖液滴于平板上，静置 10 min，待增殖液完全被培养基吸收，将平板倒置放于 37°C 恒温箱中培养过夜。次日观察滴增殖液处是否形成了透明的空斑。

噬菌体的纯化

利用双层平板法对分离到的噬菌体进行纯化：将噬菌体增殖液用 BHI 液体培养基进行倍比稀释，将每个稀释梯度的噬菌体液与 W3275 菌液同时加入 BHI 半固体培养基中（45°C~50°C），充分混匀后倒于 BHI 固体培养基平板上，静置 30 min，待凝固后倒置于

37°C 恒温箱中培养过夜；在双层平板上用 10 μL 枪头挑取单个的噬菌斑浸泡于 BHI 培养基中，并放于 4°C 静置 6 h，然后将噬菌体浸泡液进行倍比稀释，重复双层平板操作。如此重复三次以上，直至所形成形状和大小均一的噬菌斑。将纯化的噬菌体与甘油（30%）混合均匀后放于-80°C 冻存、备用。

生长特性测定

最佳感染复数（MOI）测定：将培养至对数生长期的 W3275 调至菌液浓度为 1×10^7 cfu/mL，然后按照噬菌体/细菌比例为 0.0001、0.001、0.01、0.1、1、10 和 100 将噬菌体与 W3275 进行混匀，转接到 BHI 培养基中，在 37°C 振荡培养 8 h，将培养液在 4°C 进行 10,000 × g 离心 15 min，用 0.22 μm 孔径的一次性滤器对上清液进行过滤得到噬菌体增殖液，利用双层平板法对噬菌体增殖液进行滴度测定，获得最高滴度的噬菌体/细菌比例即为最佳 MOI。

一步生长曲线测定：将培养至对数生长期的 W3275 与噬菌体按照最佳 MOI 的比例混匀，在 4°C 放置 15 min，然后 4°C 进行 10,000 × g 离心 15 min，用新鲜 BHI 液体培养基将沉淀悬起，将悬液置于 37°C 振荡培养，每隔 5 min 取一次样品测定噬菌体的滴度，从而绘制出噬菌体感染 W3275 的一步生长曲线。

透射电子显微镜观察

将纯化的噬菌体利用 20% (w/v) 的 PEG-8000、2.5 M 的 NaCl 对噬菌体增殖液中的噬菌体进行沉淀，10,000 × g 离心 15 min 后弃掉上清，用少量 SM 缓冲液将噬菌体沉淀悬起，得到噬菌体的浓缩液。利用 CsCl 密度梯度离心^[48]，将样品滴于铜片上进行磷钨酸染色(PTA, 2% w/v)，放置于透射电子显微镜中于加速电压为 80 kV 条件下进行观察，并拍摄图片。

遗传物质类型鉴定

利用病毒基因组小量提取试剂盒对纯化的噬菌体浓缩液进行基因组提取，操作严格按照说明书进行。分别用 DNase I (20 U/μg), RNase A (5 U/μg) 和 Mung Bean Nuclease (20 U/μg) 对提取的噬菌体基因组在 37°C 水浴锅中进行消化，将消化产物进行琼脂糖凝胶核酸电泳检测。

1.3 结果

1.3.1 金黄色葡萄球菌的分离与鉴定

病料中金黄色葡萄球菌的分离与初步鉴定

通过固体平板划线培养对分离到的菌株进行了纯化（图 1.1）。对分离到的可疑菌株进行了革兰氏染色、显微镜镜检和生化反应实验，初步确定了所分离菌株中有 27 株为金黄色葡萄球菌。将分离到的金黄色葡萄球菌菌株与甘油（30%）进行混匀，保存于-80°C 备用，另

外进行了冻干处理（保护剂为脱脂奶粉）。



图 1.1 金黄色葡萄球菌的分离与纯化

Fig 1.1 The isolation and purification of *S. aureus*

金黄色葡萄球菌 16SrRNA 和 mecA 耐药基因的 PCR 鉴定

对初步鉴定的金黄色葡萄球菌进行 16SrRNA 的 PCR 鉴定（图 1.2），分离到的 27 株金黄色葡萄球菌菌株均扩增出了 528 bp 的特异性目的条带，都表现为 16SrRNA 的 PCR 阳性，证实这些菌株为金黄色葡萄球菌。另外，对这些菌株进行了 mecA 基因的 PCR 鉴定，表明有 24 株金黄色葡萄球菌可以扩增出 313 bp 的特异性目的条带，表明这些菌株含有 mecA 基因、为 mecA 耐药基因型阳性的 MRSA。

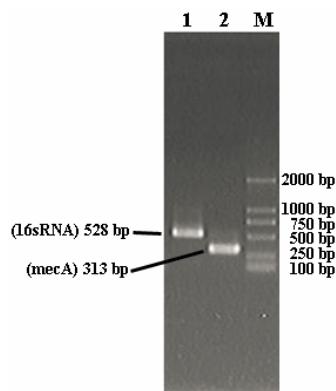


图 1.2 金黄色葡萄球菌 16SrRNA 和 mecA 基因的 PCR 鉴定

Fig 1.2 The PCR identification of the staphylococci 16SrRNA and mecA genes

药敏实验

对鉴定为金黄色葡萄球菌的菌株进行药敏实验（图 1.3），发现 24 株对头孢西丁表现为抗性（见表 1.2），与 mecA 的 PCR 检测结果一致，表明这些菌株为表型阳性 MRSA。另外发现所有的金葡菌均对替考拉宁和万古霉素敏感，且大多数的菌株对利奈唑胺和复方新诺明

也敏感。



图 1.3 药敏实验

Fig 1.3 Antimicrobial susceptibility test

表 1.2 金黄色葡萄球菌对抗生素的耐药性评价

Table 1.2 The evaluation of the *S. aureus* antibiotic-resistance

β -内酰胺酶	头孢唑啉	红霉素	头孢吡肟	头孢西丁	左旋氧氟沙星	利奈唑胺	青霉素G	利福平	头孢呋辛	复方新诺明	头孢噻肟	四环素	替考拉宁	哌拉西林	万古霉素
YB57	+	R	R	R	R	S	R	S	R	S	R	R	S	R	S
R89	+	R	R	R	R	S	R	S	R	S	R	R	S	R	S
W25	+	R	R	R	R	S	R	S	R	S	R	R	S	R	S
R81	+	R	R	R	R	S	R	S	R	S	R	R	S	R	S
R3659	+	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R	S	R	S
R3680	+	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R	S	R	S
R3784	+	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R	S	R	S
R75	+	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R	S	R	S
W4552	+	R	R	R	R	S	R	S	R	S	R	R	S	R	S
R5886	+	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R	S	R	S
R6199	+	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S
R6246	+	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R	S	S	S
R6186	+	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R	S	R	S
R6012	+	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R	S	R	S
R6040	+	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R	S	R	S
R6491	+	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R	S	R	S
R6994	+	R	R	R	R	I	S	R	S	R	R	R	S	R	S
R23	+	R	R	R	R	R	S	R	R	R	I	R	S	R	S
R3790	+	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	S	S
R208	+	R	R	R	R	R	S	R	I	R	R	S	R	S	S
R238	+	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	S	R	S	S
W11	+	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	S	R
R196	+	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	S	R	S	S
W4727	+	S	R	S	S	R	S	R	S	S	R	I	S	I	S
W4661	+	S	R	S	S	R	S	S	R	S	S	S	I	I	S
R6199	+	S	R	R	S	R	R	R	R	I	S	R	S	I	S
W3275	+	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R	S	R	S

R: 表现为耐药; S: 表现为敏感; I: 介于耐药敏感之间。

1.3.2 噬菌体的分离、纯化和生物学特性研究

选取 W3275 为指示菌株，对烈性噬菌体进行了分离和纯化，并从中筛选广谱、高效裂解活性的噬菌体。

噬菌体的分离

以 W3275 为指示菌株在污水样品中分离到了 59 株噬菌体，对 W3275 均表现为空斑实验阳性（见图 1.4）。

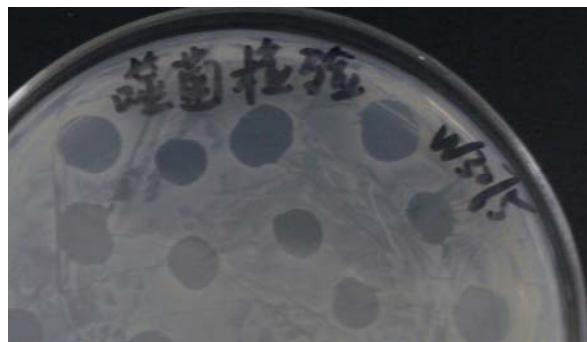


图 1.4 噬菌体感染 W3275 的空斑检测实验

Fig 1.4 Spot tests of phage infecting W3275

噬菌体的纯化

利用双层平板法对分离到的噬菌体进行纯化（见图 1.5）。经过三轮以上的纯化后，每份噬菌体都获得了噬菌体斑大小和形态均一的单克隆。



图 1.5 双层平板法纯化噬菌体

Fig 1.5 The purification of phage using double-layer agar plate method

噬菌体宿主谱的测定

以临幊上分离到的 27 株金黄色葡萄球菌、本实验室保存的、以及 ATCC 购买的标准菌

株为指示菌，对纯化的噬菌体进行裂解谱测定，确定了每株噬菌体的宿主范围（见图 1.6）。所检测的噬菌体均对金葡菌以外的细菌不具有裂解活性，表现出特异性。其中 15 号噬菌体的宿主谱最宽，可以裂解 25 株金黄色葡萄球菌，其中 15 株为 MRSA 菌株，将该噬菌体命名为 GH15，作为后续实验的研究对象。

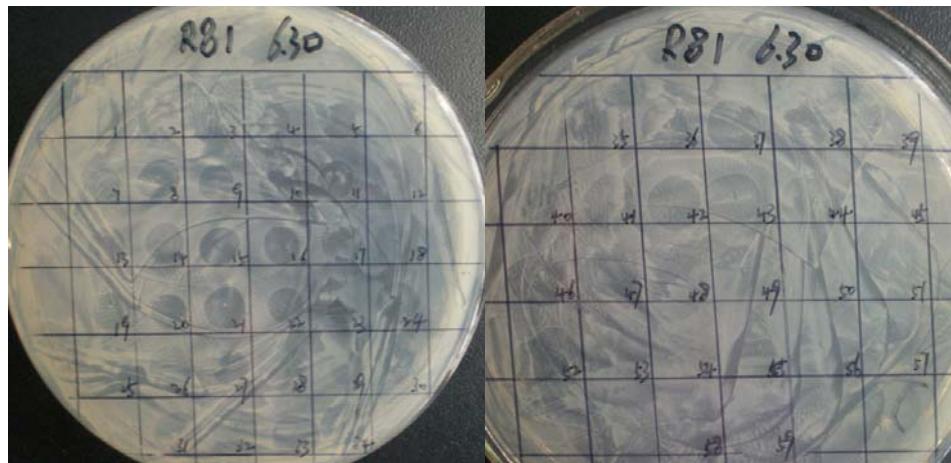


图 1.6 噬菌体宿主谱测定

Fig 1.6 The detection of the phage host range

噬菌体 GH15 最佳 MOI 与一步生长曲线

通过实验确定了 GH15 感染 W3275 的最佳 MOI 为 0.001，使该噬菌体获得最有效的繁殖（见图 1.7），滴度可以达到 2.7×10^{10} pfu/mL。

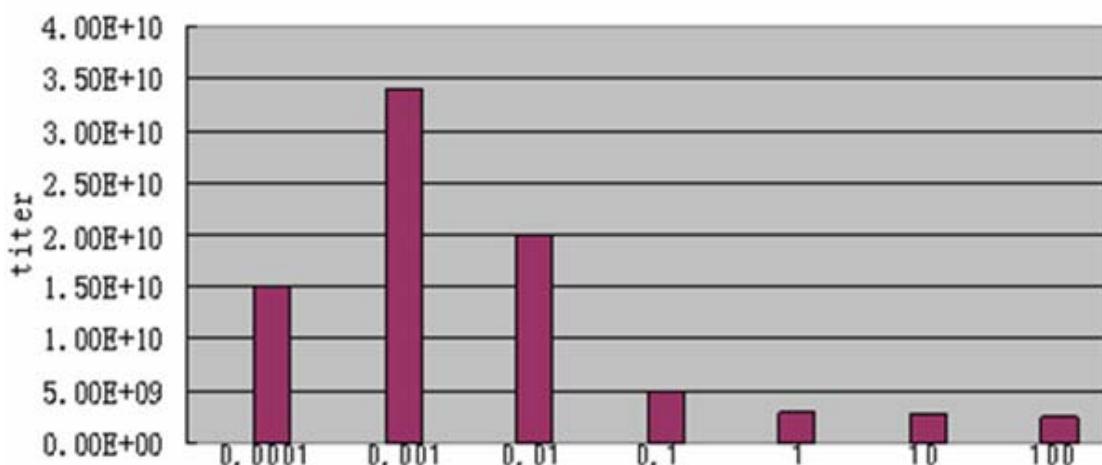


图 1.7 GH15 最佳 MOI 测定

Fig 1.7 The detection of the optional MOI of GH15

在 MOI 为 0.001 的条件下，测定了 GH15 感染 W3275 的一步生长曲线（见图 1.8）。由图可以看出，该一步生长曲线呈波浪式上升趋势，潜伏期为 25 min，一个裂解周期大约为 15-20 min。

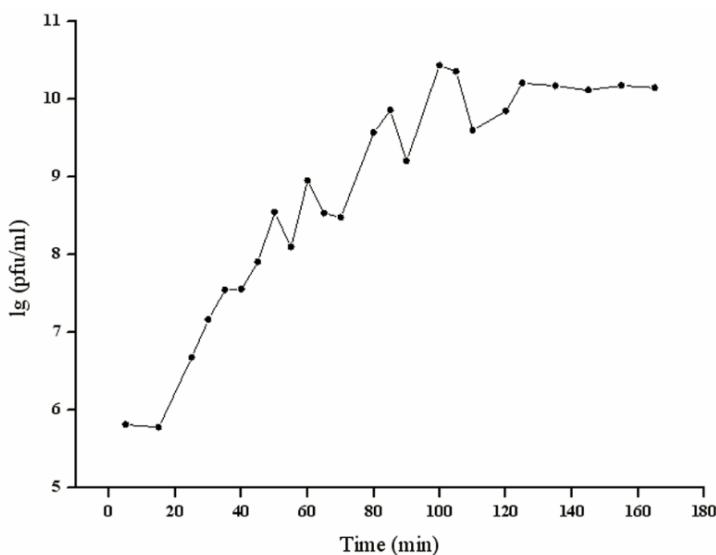


图 1.8 GH15 的一步生长曲线

Fig 1.8 One-step growth curve of phage GH15

噬菌体 GH15 透射电子显微镜观察

对 GH15 进行了透射电子显微镜观察（见图 1.9）。发现该噬菌体有可以收缩的尾巴，依据形态表明 GH15 属于有尾噬菌体目、肌尾噬菌体科。GH15 由头部衣壳、颈部、尾板和尾鞘组成。其中头部衣壳的直径为 65 ± 3 nm，尾部底板直径为 60 nm，尾部主干长度约 125 ± 2 nm。

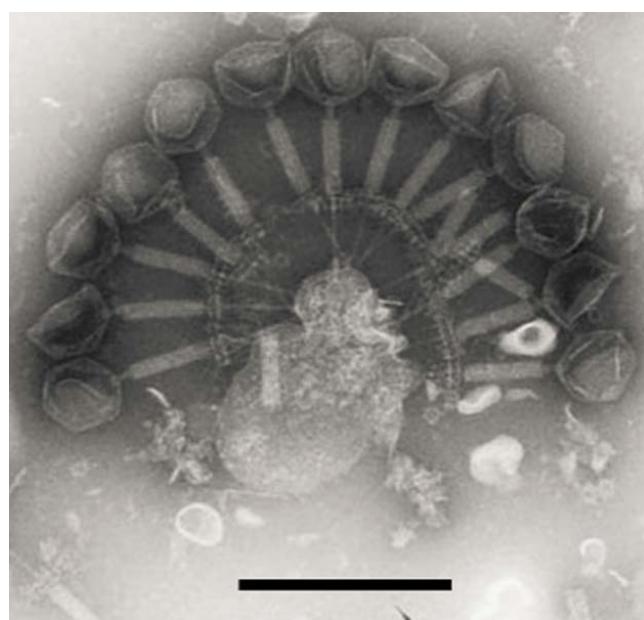


图 1.9 GH15 在透射电子显微镜下的形态

Fig 1.9 The transmission electron micrographs of GH15 (the bar represents 200 nm)

噬菌体 GH15 遗传物质类型的鉴定

利用病毒基因组小量提取试剂盒对纯化的噬菌体 GH15 浓缩液进行基因组的提取（三

份), 并测定了 GH15 基因组对 *DNase I*(20 U/ μ g), *RNase A* (5 U/ μ g) 和 *Mung Bean Nuclease* (20 U/ μ g) 的敏感性, 结果表明 GH15 基因组仅对 DNase I 敏感说明该基因组为 DNA, 而对 *Mung Bean Nuclease* 不敏感, 说明该基因组为双链 DNA (见图 1.10)。

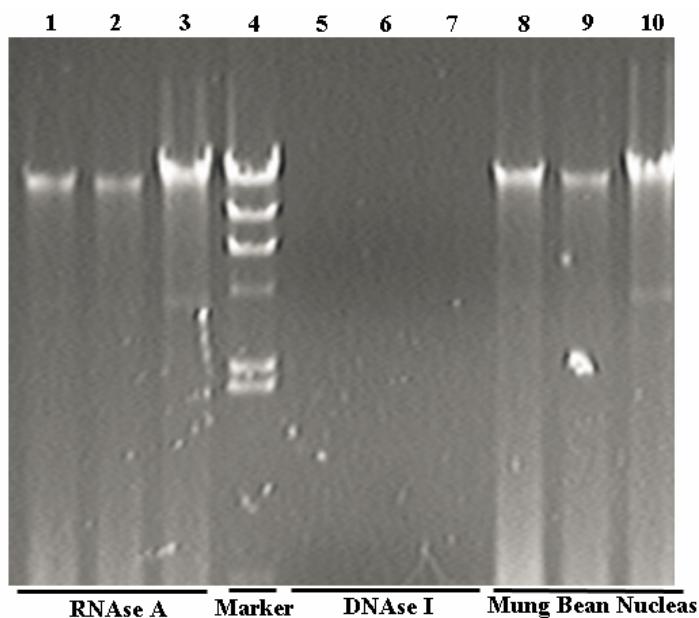


图 1.10 GH15 基因组类型鉴定

Fig 1.10 The identification of the GH15 genome type

1.4 讨论

作为以细菌为寄生宿主的病毒, 噬菌体的最大特点就是其感染能力的特异性, 多数噬菌体的宿主谱具有种属特异性, 有少数噬菌体甚至具有型特异性^[117]。噬菌体分布非常广泛, 只要有细菌的地方就会有相应的噬菌体存在。而不同的地域流行的病原菌株具有很大差异, 因此, 不同地域分布的噬菌体是不同的。虽然国外已有很多金黄色葡萄球菌噬菌体的报道, 但是我国国内关于金黄色葡萄球菌噬菌体的研究极少, 且研究的非常浅显。因此我们迫切需要加大力度对该领域进行研究, 以期获得具有自主知识产权的国内流行菌株的噬菌体。

本章节首先在人医临床对金黄色葡萄球菌进行了分离, 然后以特异性引物对其进行了进一步的验证。从 *mecA* 基因的 PCR 检测和药敏实验来看, 分离到的金黄色葡萄球菌中大部分属于 MRSA 菌株, 对大多数抗生素都具有极强的耐药性, 仅对少数几种抗生素敏感。

污水中存在大量的细菌, 因此其中的噬菌体含量也是极其丰富的。以分离到的 MRSA 作为指示菌株, 在污水样品中对 MRSA 具有裂解活性的烈性噬菌体进行了分离。利用倍比稀释之后的噬菌体液, 进行双层平板法实验, 可以将单个的噬菌体进行分离和扩增, 类似于

细菌的划线分离。大多数噬菌体的特异性非常窄，具有种属特异性，或者型特异性。极少有发现跨种属噬菌体的报道，通常所说的广谱噬菌体，是相对于具有型特异性的窄谱噬菌体而言的。作为抑菌制剂来研究的噬菌体应该对 MRSA 具有广谱和高效的抑菌活性^[97]。因此，本章节对分离、纯化到的噬菌体进行了裂解谱的测定，其中 GH15 对金黄色葡萄球菌表现出了最宽的裂解谱，尤其是对大多数检测的 MRSA 菌株具有裂解活性。其中一株 MRSA 菌株 USA300 购自 ATCC，是美国最为流行的 CA-MRSA 菌株，GH15 对其表现出高效的裂解活性，这说明 GH15 不但可以裂解本地的流行菌株，同时对大洋对面国家流行的菌株也具有裂解活性，显示出巨大的研究价值和应用潜力。之前实验室在 ATCC 购买到一株 K 噬菌体，其宿主菌也是金葡菌，是目前研究最多的金葡菌噬菌体，但是 GH15 的宿主谱远远宽于 K 噬菌体的裂解谱。究其原因，可能是二者分离的来源不同，GH15 是在长春本地分离的，所检测菌株大多也是当地的流行株。

鉴于 GH15 的广谱裂解活性，后续的研究将以该噬菌体作为研究对象。通过 GH15 一步生长曲线的测定，表明该噬菌体具有很短的潜伏期，繁殖力很强，并且最佳的感染复数很低，这些对作为抑菌制剂来开发是非常有利的。最重要的是 GH15 不会发生溶源化，并且长期与宿主菌相互作用也不会使宿主菌产生抗性。通过透射电子显微镜观察发现 GH15 为典型的肌尾噬菌体，在形态上与已经公布的金黄色葡萄球菌噬菌体 K 和 812 很像。对 GH15 的遗传物质进行了初步的鉴定，确定其为线性双链 DNA，这个特点与已经公布的其它金葡菌噬菌体也是一致的。

为了进一步探明 GH15 与目前已经公布的其它金黄色葡萄球菌噬菌体之间的异同，需要对其基因组进行序列测定和分析。因此，在下一章节将对 GH15 的全基因组序列进行了测定，并将其基因组序列与数据库中已公布的噬菌体基因组进行比对和分析，在基因水平揭示 GH15 与其它噬菌体的差异。

1.5 小结

- 1.5.1 成功在医院临床分离到 24 株 MRSA。
- 1.5.2 以分离到的 MRSA 作为指示菌株分离到了裂解性噬菌体，并从中筛选到了具有广谱、高效裂解活性的噬菌体，命名为 GH15。
- 1.5.3 GH15 为肌尾噬菌体，其基因组为双链、线性 DNA；潜伏期短，最佳感染复数很小；且不会发生溶源化，很有潜力作为抑菌制剂进行研究。

第二章 噬菌体 GH15 全基因组序列测定和分析

噬菌体是数量巨大且种类极为丰富的生物物种。噬菌体的溶源性感染周期被认为是推动噬菌体与其宿主菌共同进化的主要动力^[189]。噬菌体不仅在细菌的生态系统中起关键的作用，并且还有助于细菌适应新的环境，另外还与细菌致病性毒力因子的传播有关^[190]。因此研究噬菌体的基因组和遗传特性，在遗传学中是很重要的一一个方向。

近几年，已报道了多株金黄色葡萄球菌噬菌体基因组的研究。Tony Kwan 等^[190]发表的文章提出按照基因组的大小、基因图谱的组成和核酸及蛋白序列的比较分析，可以将金黄色葡萄球菌噬菌体分成三个类型。其中 K、A5W、ISP、Sb-1、G1 和 Twort 这几个金黄色葡萄球菌的肌尾噬菌体属于 III 型，它们具有大的基因组 (>125 kbp)^[190]。

在上一章节中的研究结果表明噬菌体 GH15 对临幊上分离到的 MRSA 菌株以及标准菌株具有特异、高效和广谱的裂解活性，显示出极大的研究价值和应用潜力。为了进一步深入认识 GH15，本章节将对 GH15 的基因组和蛋白组成进行研究，从而在基因和蛋白水平加深对 GH15 的认识，也为后续实验奠定基础。

2.1 材料

2.1.1 主要试剂

PEG-8000(Sigma); 一次性滤器(Millipore, 0.22 μm pore size); CsCl、磷钨酸(Amresco); 透射电子显微镜(JEOL JEM-1200EX II, Japan Electronics and Optics Laboratory, Tokyo, Japan); RevertAid™ M-MuLV 反转录酶、oligo(dT)₁₈(MBI Fermentas, Canada); SDS、Tris、Glycine(Amresco); 琼脂(BD); 琼脂糖(上海); 10 kDa 的 Slide-A-Lyzer 透析袋(Pierce Biotechnology, Rockford, IL); Peptone、Yeast Extract(Oxoid); 核酸 marker、蛋白质 marker(Takara)等。

2.1.2 主要噬菌体株和菌株

噬菌体 GH15(本实验室分离，详见第一章); 金黄色葡萄球菌分离株 W3275(本实验室分离，详见第一章)。

2.1.3 引物

ORF71P-F: ATG GCT AAG ACT CAA GCA GAA

ORF71P-R: CTA TTT GAA TAC TCC CCA GGC AA

ORF82P-F: AAG AAC TAA TTA AGA TAG CAC AAG A

ORF82P-R: TTC ATC AAA GTA GAA TTG TTT ATT T

ORF100P-F: ATG GCA TCA GAA GCT AAA CAA ACC G

ORF100P-R: TTA AGT ACG TGC TTT GTC ACT TGC T

ORF122P-F: ATG AGA TTA AGA ATT AAG AAC TTA T

ORF122P-R: CTA TTT TCC TAA GTC TTT TAT TTC A

ORF135P-F: TAT GGA AAA TGG ATT GAG TTA

ORF135P-R: TGT TTC ACA TTC AAT AAC AGA

ORF141P-F: ATG AAA GTA TTA ATC TTA TTT GA

ORF141P-R: TTA AAT TTC TTG ATA AAT ATG TT

2.1.4 主要仪器

PCR 仪 (Biometra T3000); 恒温水浴锅 (上海一恒, DK-80); 卧式电泳仪 (北京六一, DYY-6C); 超洁净操作台 C1109B、立式恒温摇床 1102C、卧式恒温摇床 (上海志诚); 凝胶成像系统 (天能, 1600); 小型台式离心机 pico17、小型冷冻离心机 pico22、台式冷冻离心机 Legend RT+ (Thermo); 质谱仪 (ESI-MS/MS); 立式电泳仪 (BioRed, Mini4); 分光光度计 Nanodrop-2000 (Thermo); 制冰机 ICE2 (Scotsman); 病毒基因组提取试剂盒 (Axygen) 等。

2.1.5 试剂配制

PBS 缓冲液

137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 50 mM Na₂HPO₄, 10 mM KH₂PO₄, pH 值 7.4。

SM 缓冲液

100 mM NaCl, 8 mM MgSO₄, 50 mM Tris-HCl, pH 值 7.5。

培养基

(1) 液体 LB 培养基: Tryptone (10 g), Yeast Extract (5 g), NaCl (10 g), 定容至 1 L 后 120°C 高压蒸汽灭菌 20 min。

(2) 固体 LB 培养基: 在液体 LB 基础上加入的 Agar (15% M/V)。

2.2 方法

2.2.1 噬菌体 GH15 的扩增、浓缩与纯化

将 MRSA 菌株 W3275 培养至 OD₆₀₀ 为 0.2, 然后将噬菌体 GH15 按照 MOI 为 0.1 (phage/cell) 的比例加入培养的菌液中, 然后继续培养, 直至菌液彻底澄清, 即得到噬菌体 GH15 增殖液。将噬菌体增殖液于 4°C 10,000 × g 离心 15 min, 然后将上清液通过 0.22-μm 孔径的一次性滤器进行过滤。通过 PEG-8000 与 NaCl 将过滤的噬菌体增殖液中的噬菌体进

行沉淀， $10,000 \times g$ 离心 15 min，弃掉上清，用少量 SM 缓冲液将噬菌体沉淀悬起。通过 CsCl 密度梯度离心对浓缩的噬菌体 GH15 进行纯化，利用 10 kDa 的透析袋在 SM 缓冲液中进行透析，即得到纯化的噬菌体颗粒。通过磷钨酸负染（2% [wt/vol]），利用透射电子显微镜对浓缩前、后的噬菌体 GH15 样品进行观察。

2.2.2 噬菌体 GH15 核酸的提取与序列测定

噬菌体 GH15 进行基因组的提取：向噬菌体样品中加入蛋白酶 K ($50 \mu\text{g/mL}$) 以及 SDS (0.5%)，快速混匀后在 65°C 放置 1 h；待冷却后用苯酚、酚氯仿和氯仿各抽提一次；在 4°C 于缓冲液（10 mM Tris·HCl，pH 值 8.0，1 mM EDTA）中进行透析。

将提取的基因组进行电泳分析，然后将 GH15 的基因组分别处理为包含 500 bp、2 kb 和 6 kb 的基因文库；利用 Illumina Genome Analyzer 测序技术对噬菌体 GH15 进行高通量 Solexa paired-end 测序^[191]；利用 SOAPdenovo 软件对基因组进行拼接处理^[192]。该部分的测序内容由华大基因公司的北京基因组研究所（BGI）进行。

2.2.3 噬菌体 GH15 的序列分析和比对

对噬菌体 GH15 的基因组进行分析。利用 BLAST^[193]和 GeneMarkS^[183]对噬菌体 GH15 的开放式阅读框（ORFs）进行初步确定；分别通过 tRNAscan-SE^[194] 和 RNAmmer^[195]确定编码 tRNA 和 rRNA 的基因；将 GH15 的基因序列和氨基酸序列利用 National Center for Biotechnology Information network service 中的 BLASTN 和 BLASTP 在线软件进行比对分析^[196]；GH15 基因组的圆形图谱用 CGView^[197]进行制作；全长基因组的比对分析通过 BLASTN Artemis Comparison Tool^[198]进行。

2.2.4 内含子的鉴定

依据之前的报道^[199]对噬菌体感染细菌的总 RNA 进行提取，并进行 RT-PCR 分析：将 MRSA 菌株 W3275 培养至对数生长期后，以 MOI 为 0.1 的比例加入噬菌体，之后继续培养 10 min，然后收集 W3275，提取其 RNA；应用 RevertAidTM M-MuLV 反转录酶和 oligo (dT)₁₈ 对提取的 RNA 进行反转录实验；分别以提取的 RNA、反转录获得的 cDNA 和 GH15 基因组为模板扩增相关的基因，对 PCR 扩增产物进行电泳分析。PCR 反应条件： $94^\circ\text{C} 45\text{ s}$, $48^\circ\text{C} 45\text{ s}$, $68^\circ\text{C} 2.5\text{ min}$ ，进行 35 个循环，最后 68°C 延伸 10 min。

2.2.5 噬菌体 GH15 结构蛋白的鉴定

对噬菌体 GH15 的结构蛋白进行 SDS-PAGE 和质谱分析^[190]：将纯化并浓缩好的噬菌体 GH15 样品与上样 buffer 进行混匀，煮沸 8 min，然后在配制好的 12% SDS-PAGE 凝胶上样、电泳；将跑完的凝胶进行考马斯亮蓝 R250 染色，然后将单一的条带用刀切下，进行胰蛋白酶消化^[200]；利用电喷雾-串联质谱法对消化的肽段进行分析^[201]，将得到的肽谱与基因数据

库和 GH15 基因组进行 BLASTP 分析，以确定每个条带对应的基因及其功能。

2.3 结果

2.3.1 噬菌体 GH15 的扩增与浓缩

通过将噬菌体 GH15 感染 MRSA 菌株 W3275，对 GH15 进行了初步扩增（图 2.1 左），然后通过 PEG-8000 沉淀法，将 GH15 的扩增液进行浓缩。用透射电子显微镜对浓缩前后的噬菌体进行观察，表明 GH15 得到了浓缩（图 2.1 右）。

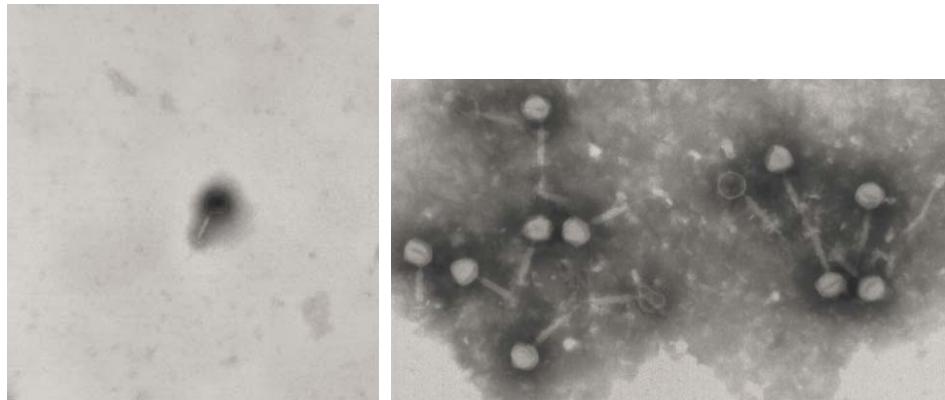


图 2.1 GH15 的扩增与浓缩

Fig 2.1 The amplification and concentration of GH15

（左图为 GH15 扩增液；右图为 GH15 浓缩液）

(left, the amplification sample of GH15; right, the concentration sample of GH15)

2.3.2 噬菌体 GH15 核酸的提取

对噬菌体 GH15 进行纯化之后，对其基因组进行提取（见图 2.2），利用分光光度计 Nanodrop-2000 测定了所提 DNA 的浓度为 10 ng/ μ L。取总量 7 μ g DNA 样品送至华大基因，对 DNA 序列成功进行了测定，拼接完成后将 DNA 序列提交至 NCBI 的 GenBank 数据库中，获得编号为 JQ686190。

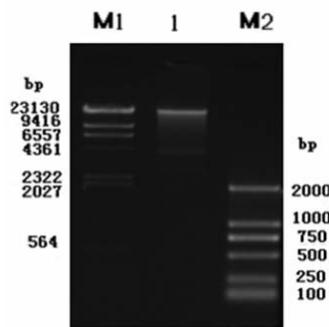


图 2.2 GH15 基因组提取

Fig 2.2 The extraction of GH15 genome

2.3.3 噬菌体 GH15 基因组的分析

通过测序和拼接得到了 GH15 的 DNA 序列（图 2.3），为线性双链 DNA、长度为 139,806-bp；G+C% 为 30.23%；共具有 214 个 ORFs，全部基因的编码率为 89.37%，平均每个开放式阅读框长度为 653 bp，其中编码的蛋白长度超过 100 个氨基酸的 ORFs 有 129 个（60.28%）；所有的 ORFs 中有 196（91.6%）个起始密码子为 AUG，10 个（4.7%）起始密码子为 UUG，8 个（3.7%）起始密码子为 GUG。

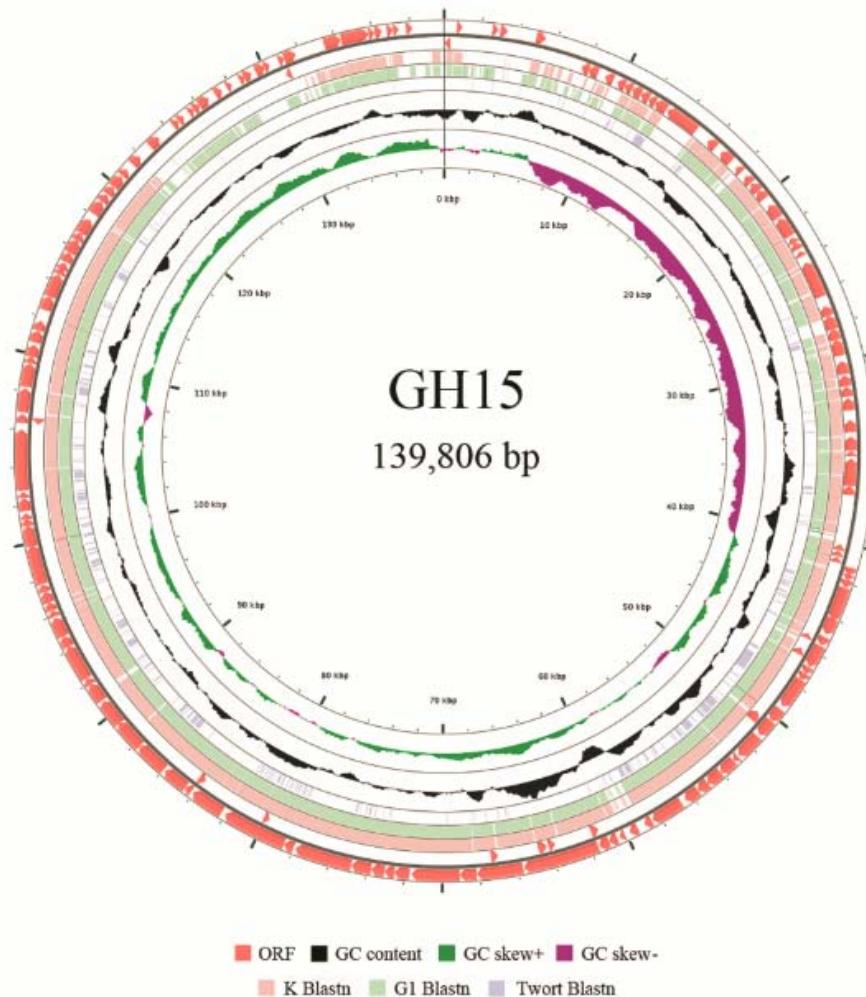


图 2.3 GH15 基因图谱

Fig 2.3 The genetic and physical organization of the GH15 genome

按照基因编码的方向可以将全长 GH15 基因组分为两个部分：长的一部分包含 150 个 ORFs，编码方向朝向一个方向；短的一部分包含剩下的 ORFs，编码方向朝向另外一个方向，所在位置为从 6.5 kb 到 41 kb 处 (ORFs 17-78)。

将所有编码的蛋白与 NCBI 数据库中蛋白序列进行比对分析，对每个蛋白的功能和名称进行了预测，见表 2.1：

表 2.1 GH15 基因组中开放式阅读框的分析

Table 2.1 General features of the putative ORFs from GH15 with the best matches in the

database

ORF ^a	Bp		Protein size (kDa)	pI	Representative similarity to proteins in database	E value	Identity (positives)	Accession no.
	Start	Stop						
1 [†] -	20	358	13.500	4.39	<i>Staphylococcus</i> phage G1	ORF128	4e-53	95% (99%)
2 [†] +	671	979	11.811	4.59	<i>Staphylococcus</i> phage G1	ORF145	5e-51	95% (97%)
3 [†] +	1185	1472	11.035	5.65	<i>Staphylococcus</i> phage G1	ORF159	8e-42	93% (94%)
4 [†] +	1522	1713	7.674	9.56	<i>Staphylococcus</i> phage G1	ORF221	7e-28	98% (100%)
5 [†] +	2231	2389	6.055	10.39	<i>Staphylococcus</i> phage Twort	ORF253	0.017	53% (74%)
6 [†] +	2556	2879	12.393	4.90	<i>Staphylococcus</i> phage G1	ORF135	3e-54	98% (99%)
7 [†] +	2979	3359	14.649	4.68	Hypothetical protein			
8 [†] +	3851	4072	8.469	4.07	Hypothetical protein			
9 [†] +	4153	4290	5.485	4.34	Hypothetical protein			
10 [†] +	4361	4525	6.421	4.77	Hypothetical protein			
11 [†] +	4616	4852	9.057	3.99	<i>Staphylococcus</i> phage A5W	ORF194	8e-34	92% (99%)
12 [†] +	4932	5402	17.897	3.45	<i>Staphylococcus</i> phage G1	ORF092	2e-80	98% (99%)
13 [†] +	5473	5736	10.372	4.05	Hypothetical protein			
14 [†] +	5740	5913	6.629	4.85	<i>Staphylococcus</i> phage G1	ORF234	6e-22	95% (98%)
15 [†] +	5913	6182	10.116	5.01	<i>Staphylococcus</i> phage G1	ORF166	9e-32	80% (87%)
16 [†] +	6258	6446	7.512	4.96	<i>Staphylococcus</i> phage G1	ORF226	1e-23	97% (98%)
17 [†] -	6756	7046	11.545	4.28	Hypothetical protein			
18 [†] -	7136	7384	9.994	4.60	<i>Staphylococcus</i> phage G1	ORF184	2e-31	86% (91%)
19 [†] -	7398	7643	9.628	4.33	Hypothetical protein			
20 [†] -	7656	8066	16.760	6.09	<i>Staphylococcus</i> phage G1	ORF109	1e-50	73% (88%)
21 [†] -	8066	8581	20.033	4.19	<i>Staphylococcus</i> phage G1	ORF103	1e-22	81% (92%)
22 [†] -	8613	8867	10.231	3.88	<i>Staphylococcus</i> phage G1	ORF103	3e-18	92% (96%)
23 [†] -	8867	9058	7.884	9.74	<i>Staphylococcus</i> phage G1	ORF224	3e-26	94% (98%)
24 [†] -	9055	9453	14.982	9.54	<i>Staphylococcus</i> phage A5W		1e-51	79% (88%)
					hypothetical membrane protein MbpA			ACB88998
25 [†] -	9533	9787	9.675	5.22	Hypothetical protein			
26 [†] -	9787	10248	18.240	4.77	Hypothetical protein			
27 [†] -	10248	10682	16.960	4.15	<i>Staphylococcus</i> phage K	ORF2	6e-68	89% (95%)
28 [†] -	10696	11238	21.527	9.23	<i>Staphylococcus</i> phage G1	ORF073	4e-94	94% (98%)
29 [†] -	11250	11738	19.367	9.30	<i>Staphylococcus</i> phage K	ORF4	5e-84	91% (96%)
30 [†] -	11751	12155	16.436	5.46	<i>Staphylococcus</i> phage K	ORF5	1e-55	88% (96%)
31 [†] -	12158	12859	27.517	4.90	<i>Staphylococcus</i> phage K	ORF6	5e-122	91% (96%)
					putative protein phosphatase			YP_024437
32 [†] -	12952	14802	68.955	5.45	<i>Staphylococcus</i> epidermidis RP62A		9e-148	54% (67%)
					lipase/acylhydrolase domain-containing protein			YP_189214
33 [†] -	15704	16252	22.002	4.39	<i>Staphylococcus</i> phage K	ORF8	2e-87	96% (99%)
34 [†] -	16256	16474	8.424	4.28	<i>Staphylococcus</i> phage G1	ORF201	4e-33	99% (100%)
35 [†] -	16475	16561	3.282	4.15	<i>Staphylococcus</i> phage G1	ORF218	4e-20	100% (100%)
36 [†] -	16659	17396	28.683	6.77	<i>Staphylococcus</i> phage K	ORF9	2e-135	99% (99%)
37 [†] -	17459	17563	4.105	4.59	<i>Staphylococcus</i> phage G1	ORF437	4e-10	100% (100%)
38 [†] -	17575	17814	9.433	4.52	<i>Staphylococcus</i> phage G1	ORF180	2e-31	84% (92%)
39 [†] -	17816	18205	14.755	4.66	<i>Staphylococcus</i> phage K	ORF10	1e-38	61% (82%)
40 [†] -	18299	18472	6.818	5.06	<i>Staphylococcus</i> phage G1	ORF245	7e-25	96% (98%)
41 [†] -	18513	18995	19.030	4.56	<i>Staphylococcus</i> phage K	ORF11	2e-78	89% (96%)
								YP_024442
42 [†] -	19045	19587	20.450	4.74	<i>Staphylococcus</i> phage K	ORF11	9e-94	97% (99%)
43 [†] -	19587	20117	20.499	3.98	<i>Staphylococcus</i> phage K	ORF13	2e-91	95% (98%)
44 [†] -	20120	20284	6.284	9.54	<i>Staphylococcus</i> phage A5W		1e-19	93% (94%)
					hypothetical membrane protein MbpP			ACB89017
45 [†] -	20287	20565	10.897	5.08	<i>Staphylococcus</i> phage A5W		1e-21	91% (95%)
					hypothetical membrane protein MbpR			ACB89018
46 [†] -	20565	21410	31.808	9.31	<i>Staphylococcus</i> phage K	ORF14	5e-151	93% (96%)
47 [†] -	21472	22551	40.899	4.92	<i>Staphylococcus</i> phage G1	ORF024	0.0	95% (98%)
					ATPase-like protein			YP_241071
48 [†] -	22704	22919	8.507	4.16	<i>Staphylococcus</i> phage G1	ORF134	2e-29	89% (96%)
								YP_241072

49 [†] -	23023	23439	15.992	4.98	<i>Staphylococcus</i> phage K ORF16	3e-74	99% (100%)	YP_024447
50 [†] -	23572	23874	11.303	4.67	<i>Enterococcus</i> phage phiFL3A ArpR DNA binding protein	6e-23	51% (78%)	YP_0033475
51 [†] -	23874	24062	7.320	4.11	<i>Staphylococcus</i> phage G1 ORF228	5e-25	95% (97%)	YP_241075
52 [†] -	24106	24267	6.401	4.54	<i>Staphylococcus</i> phage G1 ORF259	7e-20	92% (96%)	YP_241076
53 [†] -	24268	26319	79.842	6.67	<i>Staphylococcus</i> phage K ORF18	0.0	93% (96%)	YP_024449
54 [†] -	26399	26662	10.258	5.37	<i>Staphylococcus</i> phage G1 ORF172	1e-39	95% (98%)	YP_241079
55 [‡] -	26679	26852	6.585	8.71	<i>Staphylococcus</i> phage A5W ORF039	3e-22	95% (100%)	ACB89030
56 [†] -	26859	27437	21.45	8.74	<i>Staphylococcus</i> phage K ORF19	5e-93	95% (99%)	YP_024450
57 [†] -	27430	28185	29.376	9.68	<i>Staphylococcus</i> phage Twort ORF052 HNH endonuclease I-TwoI	4e-12	42% (58%)	YP_238598
58 [†] -	28190	28780	22.320	4.47	<i>Staphylococcus</i> phage K ORF20	3e-96	86% (95%)	YP_024451
59 [†] -	28806	29699	34.578	5.12	<i>Staphylococcus</i> phage K ORF21 putative DNA ligase	5e-132	78% (91%)	YP_024452
60 [†] -	29703	29927	8.151	8.64	Hypothetical protein			
61 [†] -	29995	30735	28.547	5.11	<i>Staphylococcus</i> phage K ORF22 putative PhoH-related protein	3e-142	98% (100%)	YP_024453
62 [†] -	30787	31401	23.133	4.01	<i>Staphylococcus</i> phage K ORF23	5e-86	80% (89%)	YP_024454
63 [†] -	31417	31842	15.79	7.17	<i>Staphylococcus</i> phage K ORF24 putative ribonuclease	1e-73	99% (100%)	YP_024455
64 [†] -	31832	32023	7.472	5.79	<i>Staphylococcus</i> phage G1 ORF222	2e-28	100% (100%)	YP_241086
65 [†] -	32046	32657	23.397	3.87	<i>Staphylococcus</i> phage K ORF25	5e-107	99% (100%)	YP_024456
66 [†] -	32677	32907	8.831	8.38	<i>Enterococcus</i> phage phiEF24C putative transcriptional regulator	5e-10	50% (68%)	YP_0015043
67 [†] -	32910	33137	9.225	9.97	<i>Staphylococcus</i> phage G1 ORF190	1e-34	100% (100%)	YP_241089
68 [†] -	33246	33938	24.903	4.87	<i>Staphylococcus</i> hominis SK119 putative transglycosylase IsaA	5e-21	35% (48%)	ZP_0406014
69 [†] -	34135	34929	29.295	8.84	<i>Staphylococcus</i> phage A5W hypothetical membrane protein MbpS	2e-133	88% (96%)	ACB89042
70 [†] -	34929	35237	12.172	8.88	<i>Staphylococcus</i> phage K ORF29	1e-49	8% (99%)	YP_024460
71 [†] -	35351	36838	54.762	9.51	<i>Staphylococcus</i> phage K ORF30/ORF32 putative lysin	0.0	99% (99%)	YP_024461
72 [†] -	36838	37341	18.144	3.92	<i>Staphylococcus</i> phage K ORF33 putative holin	4e-87	95% (98%)	YP_024463
73 [†] -	37426	37611	7.065	4.94	<i>Staphylococcus</i> phage G1 ORF233	1e-25	100% (100%)	YP_241098
74 [†] -	39154	39372	8.678	9.03	<i>Staphylococcus</i> phage G1 ORF200	1e-34	100% (100%)	YP_241099
75 [†] -	39853	40062	7.761	5.75	<i>Staphylococcus</i> phage G1 ORF207	8e-19	70% (77%)	YP_241100
76 [‡] -	40075	40407	12.522	5.19	<i>Staphylococcus</i> phage G1 ORF209	2e-53	99% (99%)	YP_241101
77 [‡] -	40420	40746	13.074	5.64	<i>Staphylococcus</i> phage A5W hypothetical membrane protein MbpC	2e-53	98% (98%)	ACB89047
78 [†] -	40779	41045	10.093	8.74	<i>Staphylococcus</i> phage G1 ORF169	1e-27	98% (100%)	YP_241102
79 [†] +	41306	41572	10.363	6.74	<i>Staphylococcus</i> phage A5W hypothetical membrane protein MbpD	2e-34	97% (97%)	ACB89048
80 [†] +	41691	41828	5.434	9.20	<i>Staphylococcus</i> phage G1 ORF161	3e-19	100% (100%)	YP_241104
81 [‡] +	41825	42235	15.698	4.28	<i>Staphylococcus</i> phage G1 ORF133	8e-71	99% (99%)	YP_241105
82 [†] +	42250	44067	70.255	6.69	<i>Listeria</i> phage A511 gp74 putative terminase large subunit	0.0	63% (79%)	YP_0014684
83 [†] +	44060	44881	30.568	5.03	<i>Staphylococcus</i> phage K ORF36	1e-150	98% (99%)	YP_024466
84 [†] +	44952	45041	3.400	8.61	<i>Staphylococcus</i> phage G1 ORF235	5e-19	100% (100%)	YP_240894
85 [†] +	45038	45517	18.539	4.73	<i>Staphylococcus</i> phage K ORF37	2e-85	99% (100%)	YP_024467
86 [‡] +	45559	46788	45.087	3.98	<i>Staphylococcus</i> phage A5W hypothetical membrane protein MbpF	9e-147	86% (89%)	ACB89054
87 [†] +	46873	47214	12.825	9.27	<i>Staphylococcus</i> phage A5W hypothetical membrane protein MbpE	8e-56	99% (100%)	ACB89055
88 [‡] +	47232	47603	14.525	6.38	<i>Staphylococcus</i> phage K ORF40 putative portal protein	3e-64	99% (100%)	YP_024470
89 [‡] +	47607	49298	64.082	6.42	<i>Staphylococcus</i> phage K ORF41 putative portal protein	0.0	99% (99%)	YP_024471
90 [‡] +	49491	50264	28.641	4.81	<i>Enterococcus</i> phage phiEF24C putative prohead protease	3e-57	48% (66%)	YP_0015041
91 [†] +	50283	51242	36.176	4.22	<i>Staphylococcus</i> phage G1 ORF029	2e-145	97% (99%)	YP_240902
92 [†] +	51358	52794	51.211	4.95	<i>Staphylococcus</i> phage K ORF44 putative capsid protein	0.0	99% (100%)	YP_024474
93 [†] +	52841	53137	11.229	9.46	<i>Staphylococcus</i> phage G1 ORF151	6e-32	95% (99%)	YP_240904
94 [†] +	53150	54058	34.160	5.05	<i>Staphylococcus</i> phage K ORF45	2e-177	100% (100%)	YP_024475
95 [†] +	54072	54950	33.715	5.62	<i>Staphylococcus</i> phage K ORF46	2e-170	99% (100%)	YP_024476

96 [†] +	54950	55570	23.745	10.39	<i>Staphylococcus</i> phage K ORF47		8e-116	99% (100%)	YP_024477
97 [†] +	55589	56425	31.749	4.56	<i>Staphylococcus</i> phage K ORF48		2e-159	99% (100%)	YP_024478
98 [†] +	56427	56642	8.279	8.45	<i>Staphylococcus</i> phage G1 ORF202		7e-35	100% (100%)	YP_240909
99 [†] +	56669	58432	64.444	4.74	<i>Staphylococcus</i> phage K ORF49	putative major tail sheath protein	0.0	99% (99%)	YP_024479
100 [†] +	58505	58933	15.924	5.42	<i>Staphylococcus</i> phage 812 capsid protein		4e-78	100% (100%)	ABL87118
101 [†] +	59017	59181	6.691	10.02	<i>Staphylococcus</i> phage Twort ORF245		3e-11	69% (83%)	YP_238558
102 [†] +	59201	59311	4.279	10.38	<i>Staphylococcus</i> phage G1 ORF239		9e-12	100% (100%)	YP_240912
103 [†] +	59354	59806	17.807	9.78	<i>Staphylococcus</i> phage K ORF51		3e-43	57% (75%)	YP_024481
104 [†] +	60084	60395	12.237	5.99	<i>Staphylococcus</i> phage K ORF52		4e-51	99% (100%)	YP_024482
105 [†] +	60527	60985	18.108	4.58	<i>Staphylococcus</i> phage K ORF53		4e-82	99% (100%)	YP_024483
106 [†] +	61029	61565	20.920	4.05	<i>Enterococcus</i> phage phiEF24C putative RNA polymerase		1e-07	33% (64%)	YP_0015041
107 [†] +	61618	65676	143.893	9.16	<i>Enterococcus</i> phage phiEF24C putative tail lysin		2e-07	28% (45%)	YP_0015041
108 [§] +	65749	68181	91.515	6.55	<i>Enterococcus</i> phage phiEF24C putative tail lysin		3e-100	37% (56%)	YP_0015041
109 [†] +	68195	69082	34.592	4.31	<i>Staphylococcus</i> phage K ORF57		2e-166	99% (100%)	YP_024487
110 [†] +	69082	71628	96.036	4.72	<i>Staphylococcus</i> phage K ORF58	putative glycerophosphoryl diester phosphodiesterase	0.0	99% (99%)	YP_024488
111 [†] +	71735	72526	29.343	8.20	<i>Staphylococcus</i> phage K ORF59		7e-151	100% (100%)	YP_024489
112 [†] +	72526	73050	19.952	4.31	<i>Staphylococcus</i> phage G1 ORF078		3e-95	100% (100%)	YP_240925
113 [†] +	73050	73754	26.597	4.52	<i>Staphylococcus</i> phage K ORF61	putative baseplate protein	4e-134	99% (100%)	YP_024491
114 [†] +	73769	74815	39.178	4.63	<i>Listeria</i> phage A511 gp103 putative tail protein		2e-110	56% (74%)	YP_0014684
115 [§] +	74836	77895	116.315	4.77	<i>Staphylococcus</i> phage K ORF63		0.0	99% (99%)	YP_024493
116 [†] +	78006	78527	19.239	5.25	<i>Staphylococcus</i> phage K ORF64		5e-96	100% (100%)	YP_024494
117 [†] +	78548	82006	129.241	4.93	<i>Enterococcus</i> phage phiEF24C putative adsorption associated tail protein		0.0	52% (72%)	YP_0015041
118 [†] +	82055	82213	6.207	8.40	<i>Staphylococcus</i> phage G1 ORF262		3e-20	100% (100%)	YP_240931
119 [†] +	82214	84043	69.032	5.74	<i>Staphylococcus</i> phage K ORF66		0.0	97% (98%)	YP_024496
120 [†] +	84155	84526	14.453	4.70	<i>Staphylococcus</i> phage K ORF67		2e-62	98% (98%)	YP_024497
121 [†] +	84533	85909	50.567	6.25	<i>Staphylococcus</i> phage K ORF68		0.0	99% (99%)	YP_024498
122 [†] +	86001	87749	67.258	5.83	<i>Staphylococcus</i> phage K ORF69	putative helicase	0.0	99% (100%)	YP_024499
123 [†] +	87761	89374	63.186	8.11	<i>Staphylococcus</i> phage K ORF70	putative Rep protein	0.0	99% (99%)	YP_024500
124 [†] +	89406	90809	53.020	5.25	<i>Staphylococcus</i> phage K ORF71	putative helicase	0.0	100% (100%)	YP_024501
125 [†] +	90888	91913	39.265	4.93	<i>Staphylococcus</i> phage K ORF72	putative exonuclease	1e-172	86% (92%)	YP_024502
126 [†] +	91913	92290	14.897	5.14	<i>Staphylococcus</i> phage K ORF73		2e-66	99% (100%)	YP_024503
127 [†] +	92290	94209	73.456	5.07	<i>Staphylococcus</i> phage K ORF74	putative exonuclease	0.0	99% (100%)	YP_024504
128 [†] +	94209	94805	23.236	6.63	<i>Staphylococcus</i> phage K ORF75		2e-110	98% (99%)	YP_024505
129 [†] +	94820	95887	40.939	8.37	<i>Staphylococcus</i> phage K ORF76	putative primase	0.0	100% (100%)	YP_024506
130 [†] +	95953	96291	12.963	4.04	<i>Staphylococcus</i> phage G1 ORF127		6e-56	100% (100%)	YP_240943
131 [†] +	96291	96743	17.041	4.72	<i>Staphylococcus</i> phage G1 ORF098		2e-77	98% (99%)	YP_240944
132 [‡] -	96882	97007	4.405	9.28	Hypothetical protein				
133 [§] +	97009	97338	12.898	5.01	<i>Enterococcus</i> phage phiEF24C putative resolvase		2e-05	37% (60%)	YP_0015041
134 [†] +	97356	97748	14.750	9.79	<i>Staphylococcus</i> phage K ORF79	putative NrdI protein	8e-68	98% (99%)	YP_024509
135 [†] +	97763	99877	80.217	5.53	<i>Staphylococcus</i> phage K ORF80	putative ribonucleotide reductase large subunit	0.0	99% (99%)	YP_024510
136 [†] +	99891	100940	40.445	4.56	<i>Staphylococcus</i> phage K ORF81	putative ribonucleotide reductase minor subunit	0.0	100% (100%)	YP_024511
137 [†] +	100958	101287	12.371	4.46	<i>Staphylococcus</i> phage K ORF82		1e-54	97% (98%)	YP_024512

138 [†] +	101337	101591	9.516	4.38	<i>Staphylococcus</i> phage K ORF83 thioredoxin-like protein	1e-40	99% (100%)	YP_024513
139 [†] +	101799	102395	23.599	6.51	<i>Staphylococcus</i> phage K ORF84	6e-109	99% (99%)	YP_024514
140 [†] +	102405	102710	11.928	5.87	<i>Staphylococcus</i> phage K ORF85 putative integration host factor	2e-51	100% (100%)	YP_024515
141 [†] +	102786	106004	124.646	5.32	<i>Staphylococcus</i> phage K ORF86/ORF88/ORF90 putative DNA polymerase	0.0	99% (99%)	YP_024516
142 [§] +	106074	106316	9.055	4.02	<i>Staphylococcus</i> phage G1 ORF181	5e-37	98% (99%)	YP_240959
143 [†] +	106333	106815	18.018	5.46	<i>Staphylococcus</i> phage K ORF91	1e-89	99% (100%)	YP_024519
144 [†] +	106902	108179	47.189	4.51	<i>Staphylococcus</i> phage K ORF92	0.0	96% (98%)	YP_024520
145 [†] +	108239	109495	46.762	5.19	<i>Staphylococcus</i> phage K ORF93 putative DNA repair protein	0.0	99% (99%)	YP_024521
146 [†] +	109499	109852	13.378	5.02	<i>Staphylococcus</i> phage G1 ORF121	1e-61	100% (100%)	YP_240963
147 [†] +	109839	110501	26.609	5.20	<i>Staphylococcus</i> phage K ORF94 putative sigma factor	2e-122	100% (100%)	YP_024522
148 [†] +	110629	111361	23.169	4.53	<i>Enterococcus</i> phage phiEF24C putative Ig-like protein	2e-16	34% (58%)	YP_0015041
149 [‡] +	111283	111795	17.864	4.20	<i>Staphylococcus</i> phage K ORF96 putative major tail protein	2e-88	99% (99%)	YP_024524
150 [†] +	111810	112037	7.829	4.35	<i>Staphylococcus</i> phage K ORF96 putative major tail protein	4e-09	52% (70%)	YP_024524
151 [†] +	112132	112392	10.273	5.71	<i>Staphylococcus</i> phage G1 ORF174	4e-42	99% (100%)	YP_240968
152 [†] +	112396	113151	29.146	4.36	<i>Staphylococcus</i> phage K ORF97	5e-136	96% (98%)	YP_024525
153 [†] +	113144	114394	47.605	5.80	<i>Listeria</i> phage A511 gp148 putative DNA repair exonuclease	8e-78	42% (63%)	YP_0014685
154 [†] +	114408	114776	13.991	5.74	<i>Staphylococcus</i> phage A5W membrane protein MbpG	5e-63	100% (100%)	ACB89126
155 [†] +	114922	115074	5.712	5.69	<i>Staphylococcus</i> phage K ORF100	7e-21	98% (100%)	YP_024528
156 [†] +	115138	115674	20.762	7.32	<i>Staphylococcus</i> phage G1 ORF075	3e-98	98% (99%)	YP_240973
157 [†] +	115733	116434	27.381	9.57	<i>Staphylococcus</i> phage K ORF101	2e-135	99% (100%)	YP_024529
158 [§] +	116733	116858	4.974	11.53	<i>Staphylococcus</i> phage K ORF102	3e-15	100% (100%)	YP_024530
159 [†] +	116858	117721	32.285	5.37	<i>Staphylococcus</i> phage G1 ORF036	4e-158	98% (99%)	YP_240976
160 [†] +	118093	118824	28.350	5.17	<i>Staphylococcus</i> phage K ORF103	6e-136	100% (100%)	YP_024531
161 [†] +	118842	119300	17.849	4.69	<i>Staphylococcus</i> phage G1 ORF094	4e-82	99% (100%)	YP_240978
162 [†] +	119365	119808	17.536	6.19	<i>Staphylococcus</i> phage K ORF105	1e-76	99% (100%)	YP_024533
163 [†] +	119825	120529	27.444	4.51	<i>Staphylococcus</i> phage K ORF106	1e-114	93% (97%)	YP_024534
164 [†] +	120591	120989	15.428	9.17	<i>Staphylococcus</i> phage A5W hypothetical membrane protein MbpH	6e-70	99% (100%)	ACB89136
165 [†] +	121136	121378	9.337	8.45	<i>Staphylococcus</i> phage G1 ORF182	5e-35	93% (98%)	YP_240982
166 [†] +	121383	121940	21.688	9.49	<i>Staphylococcus</i> phage K ORF108	4e-67	89% (98%)	YP_024536
167 [†] +	121976	122152	6.988	4.51	<i>Staphylococcus</i> phage G1 ORF240	9e-25	100% (100%)	YP_240984
168 [§] +	122163	122393	8.440	7.32	Hypothetical protein			
169 [†] +	122407	122619	8.091	8.45	Hypothetical protein			
170 [†] +	122700	123344	25.194	5.63	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit	0.70	33% (49%)	CAD11990
171 [†] +	123360	123608	9.038	4.49	Hypothetical protein			
172 [†] +	123789	124085	11.497	8.31	<i>Staphylococcus</i> phage G1 ORF152	2e-44	92% (95%)	YP_240987
173 [†] +	124124	124315	7.506	8.65	<i>Staphylococcus</i> phage A5W	6e-25	94% (98%)	ACB89144
174 [†] +	124328	124696	14.145	4.01	hypothetical membrane protein MbpK			
175 [†] +	124709	125056	12.989	4.45	<i>Staphylococcus</i> phage G1 ORF119	1e-52	81% (94%)	YP_240989
176 [†] +	125056	125334	10.197	4.04	<i>Staphylococcus</i> phage G1 ORF124	2e-58	98% (99%)	YP_240990
177 [†] +	125404	125709	12.162	9.23	<i>Staphylococcus</i> phage G1 ORF240	7e-42	97% (98%)	ACB89147
178 [†] +	125724	126074	13.681	9.93	hypothetical membrane protein MbpI			
179 [†] +	126074	126676	23.382	9.77	<i>Staphylococcus</i> phage G1 ORF065	3e-50	97% (99%)	YP_240992
180 [†] +	126690	126869	7.249	7.10	<i>Staphylococcus</i> phage G1 ORF237	5e-58	98% (98%)	YP_240993
181 [§] +	127095	127505	15.361	4.41	<i>Staphylococcus</i> phage A5W	2e-111	97% (100%)	YP_240994
182 [†] +	127507	127800	11.572	3.85	hypothetical membrane protein MbpM			
183 [†] +	127817	128104	10.470	9.22	<i>Staphylococcus</i> phage A5W ORF160	1e-21	80% (95%)	YP_240995
184 [†] +	128115	128228	4.465	4.69	hypothetical membrane protein MbpL			
185 [†] +	128272	128490	8.294	9.55	<i>Staphylococcus</i> phage A5W	4e-34	58% (77%)	ACB89152
					hypothetical membrane protein MbpP			
					<i>Staphylococcus</i> phage G1 ORF362	7e-10	97% (100%)	ACB89153
					<i>Staphylococcus</i> phage G1 ORF170	1e-24	83% (90%)	ACB89154
								YP_241000
								YP_241001

186 [†] +	128566	128871	11.737	4.40	Hypothetical protein				
187 [†] +	128871	129278	15.693	8.75	Hypothetical protein				
188 [†] +	129289	129525	9.158	8.93	Hypothetical protein				
189 [†] +	129522	130049	20.679	6.17	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> TW20 phage protein	3e-66	75% (86%)	CDI49957	
190 [†] +	130127	130216	3.427	9.86	Hypothetical protein				
191 [†] +	130222	130341	4.634	9.52	Hypothetical protein				
192 [†] +	130387	130566	6.407	10.03	<i>Staphylococcus</i> phage G1	ORF236	4e-22	98% (100%)	YP_241002
193 [†] +	130581	130844	10.292	4.60	<i>Staphylococcus</i> phage G1	ORF171	1e-37	91% (95%)	YP_241003
194 [†] +	130847	131164	12.122	4.85	<i>Staphylococcus</i> phage G1	ORF137	3e-42	84% (90%)	YP_241004
195 [†] +	131165	131818	24.968	5.60	<i>Staphylococcus</i> phage G1	ORF055	9e-39	48% (64%)	YP_241006
196 [†] +	131896	132099	7.698	5.68	Hypothetical protein				
197 [†] +	132115	132273	5.778	6.21	<i>Staphylococcus</i> phage A5W		2e-11	71% (90%)	ACB89160
					hypothetical membrane protein MbpN				
198 [†] +	132289	132513	8.500	7.94	Hypothetical protein				
199 [†] +	132526	132726	7.600	5.04	<i>Staphylococcus</i> phage G1	ORF211	2e-31	100% (100%)	YP_241008
200 [†] +	132727	133017	11.133	9.26	<i>Staphylococcus</i> phage A5W		4e-40	89% (93%)	ACB89162
					hypothetical membrane protein MbpO				
201 [†] +	133110	133403	11.413	6.39	<i>Staphylococcus</i> phage K	ORF109	7e-33	75% (85%)	YP_024537
202 [†] +	133400	134308	34.895	5.10	<i>Staphylococcus</i> phage K	ORF110	1e-138	84% (90%)	YP_024538
					putative ribose-phosphate pyrophosphokinase				
203 [†] +	134326	135795	56.127	5.25	<i>Staphylococcus</i> phage K	ORF111	0.0	98% (99%)	YP_024539
					nicotinamide phosphoribosyl transferase				
204 [†] +	135874	136119	9.872	8.80	<i>Staphylococcus</i> phage G1	ORF178	4e-37	93% (99%)	YP_241013
205 [†] +	136139	136531	15.477	5.13	<i>Staphylococcus</i> phage G1	ORF113	1e-64	96% (98%)	YP_241014
206 [†] +	136533	136730	7.939	4.37	<i>Staphylococcus</i> phage G1	ORF194	4e-25	85% (85%)	YP_241015
207 [†] +	136796	137107	11.550	6.36	<i>Staphylococcus</i> phage G1	ORF142	7e-50	98% (99%)	YP_241016
208 [†] +	137113	137412	11.654	9.59	<i>Staphylococcus</i> phage K	ORF114	8e-44	92% (94%)	YP_024542
209 [†] +	137412	137651	9.866	9.49	Hypothetical protein				
210 [§] +	137653	137802	6.009	4.83	Hypothetical protein				
211 [†] +	137799	138134	12.947	4.93	<i>Staphylococcus</i> phage G1	ORF131	3e-46	83% (91%)	YP_241018
212 [†] +	138134	138352	8.612	3.93	Hypothetical protein				
213 [†] +	138390	138665	10.515	4.65	Hypothetical protein				
214 [†] +	138727	138894	6.519	4.06	<i>Staphylococcus</i> phage G1	ORF225	4e-22	96% (100%)	YP_241020

^a †, AUG start codons; ‡, UUG start codons; §, GUG start codons. +, right orientation; -, left orientation.

由表中可以看到, GH15 所编码的蛋白只有 65 个 (30.4%) 与数据库中已知功能的蛋白序列具有同源性, 因此可能发挥类似的功能; 另外有 124 个 (57.9%) 与数据库中不知功能的蛋白具有序列同源性; 其余 25 个基因产物 (11.7%) 没有发现具有同源性的蛋白序列存在。

当噬菌体的基因按照行使功能的类型观察其分布时, 这些基因并不是随机、无需排布的, 而是可以分为几个模块: 核酸的代谢和复制模块、裂解模块、结构组成模块。值得一提的是并没有发现溶原相关的模块存在。在这几个模块中, 裂解模块最小, 仅包含两个相邻的 ORFs (ORFs 71 和 72)。核酸代谢模块包括分开的两个部分 (ORFs 31-68 和 ORFs 122-153), 比对分析表明在该模块中有几个与自身 DNA 复制有关的 ORFs, 包括 DNA ligase (ORF 59), RNase H (ORF 63), helicase (ORFs 122 和 124), primase (ORF 129), polymerase (ORF 141) 和 DNA binding 蛋白 (ORFs 50 和 145)。另外该模块还包含编码 exonucleases (ORFs 125, 127 和 153), integration host factor (ORF 140), 以及一些 DNA 成熟所需要的酶 (ORFs 134-136)。GH15 的 ORF106 与粪肠球菌噬菌体 phiEF24C 的 RNA 聚合酶表现出 30% 的序列同源性, 有趣的是这个 ORF 位于结构模块中 (ORFs 82-117)。另外, GH15 存在一个可以编

码 σ 因子的基因，即 ORF147，所编码的蛋白大小为 26.6 kDa。该因子很可能是调控 RNA 聚合酶来识别噬菌体启动子区域，然后调节噬菌体基因的表达，同时抑制宿主菌基因的表达^[202]。ORF47 和 ORF61 分别可以表达 40.9 kDa 和 28.5 kDa 的 ATP 酶，它们存在于核酸代谢模块。鉴于这个模块含有如此丰富的核酸代谢相关基因，GH15 应该可以依赖自身的工具完成自身核酸的代谢与合成，而无需依赖宿主菌。这或许可以解释为何 GH15 可以表现出宽的宿主谱。

噬菌体在金黄色葡萄球菌毒力因子的传播中扮演重要的角色^[203]。BLASTP 分析表明 GH15 的一部分 ORF32（124bp 到终止子，共 493 个氨基酸残基）与金葡萄脂肪酶/乙酰水解酶的蛋白序列具有 54% 的同源性，并且这部分基因序列的 G+C% 为 32.66%，与金葡萄的非常接近^[204]，因此，这段基因很可能是来自于金黄色葡萄球菌。之前有报道称脂肪酶/乙酰水解酶是一个潜在的毒力因子，并且可能与金葡萄的溶原转换有关^[205]。同时，这个 ORF 与噬菌体 HKU10-03 的尾丝蛋白具有 45% 的同源性，所以 GH15 的 ORF32 的真实功能还需进一步的验证。

分析表明 GH15 的 ORF57 与金葡萄噬菌体 Twort (ORF52)、K (ORF31)、G1 (ORF84) 以及沙门氏菌噬菌体 PVP-SE1、大肠杆菌噬菌体 rv5 和粪肠球菌噬菌体 SAP6 的核酸内切酶 HNH 蛋白具有同源性。因此可以推测 GH15 的 ORF52 很可能也是编码 HNH 核酸内切酶。有趣的是 GH15 的 ORF57 是一个独立、完整的基因，而与其同源的 Twort K/G1 相应序列都是被编码核糖核苷酸还原酶大亚基和裂解酶的基因分割为了两个基因。另外，GH15 的 ORF57 的最后 28 个氨基酸与 K ORF20 中的一段具有 82% 的同源性，而 K 噬菌体 ORF20 的另一段与 GH15 的 ORF58 同样具有同源性，由此可见这些噬菌体发生了基因的重排。

2.3.4 序列分析、比对

对 GH15 的全长基因组与 NCBI Genbank 数据库中的基因进行比对和分析，表明其与噬菌体 K、Sb-1、A5W、ISP 和 G1 的基因组具有较高的同源性（图 2.4 和 2.5）。从 K、Sb-1、A5W、ISP 和 G1 到 GH15 的基因组的 G+C% 表现为依次降低（从 30.60% 到 30.23%），而基因组的大小则相反，长度从 K 噬菌体的 127,395 bp 一直到 GH15 的 139,806 bp（表 2.2）。由图 2.5 可以看出，在 A5W、ISP、G1 和 GH15 的基因组尾部的两个大的片段在 Sb-1 和 K 基因组中是缺失的，这表明在这几个噬菌体的基因组中发生了大片段基因的插入或缺失。从这 6 个噬菌体基因组的同源性的变化、G+C% 变化和基因组大小的变化趋势可以得出推论：从噬菌体 K 到 Sb-2、A5W、ISP、G1，再到 GH15，在进化上具有密切的关系，这些噬菌体组成了“K-like”家族。另外，虽然 Twort 噬菌体基因组的 G+C% 为 30.26%，与 GH15 的 G+C% 最接近，但是 Twort 噬菌体在基因序列水平与 GH15 基因组的覆盖率和同源性仅为 46% 和

87%。不过，Lavigne 的报道曾提出理论：二者基因的同源性达到 40%以上，则可以认为属于同一家族^[206]。鉴于此，Twort 噬菌体应该也属于“K-like”家族。

Tony Kwan 及其同事^[190]曾提出一个金黄色葡萄球菌噬菌体依照基因组大小进行分类的方法： <20 kbp 的成员属于 I 类； ≈ 40 kbp 的成员属于 II 类； >125 kbp 的成员属于 III 类。依据这一分类方法，再加上与其它金黄色葡萄球菌 III 类噬菌体具有较高的同源性，可以确定 GH15 是金黄色葡萄球菌 III 类噬菌体的一个新成员。目前为止，所发现的 III 类噬菌体均为肌尾噬菌体，该类噬菌体与其它金黄色葡萄球菌噬菌体表现出很低的同源性。之前还曾报道过一个金黄色葡萄球菌噬菌体^[207]，名为 812，相关文献的限制性酶切分析表明该噬菌体基因组大小约为 146.5 kbp，并且它也是一个肌尾噬菌体，该噬菌体已经测定的一些基因片段与 III 类噬菌体表现出很高的同源性。虽然 812 的全基因组还未测定，但是鉴于已知的这些信息，它应该也属于 III 类噬菌体。

虽然 GH15 与其它金黄色葡萄球菌的 III 类噬菌体之间在基因整体水平表现出很高的同源性，但是相比较还是可以看出在 GH15 基因组上发生了大量的基因插入事件。上面已经提到在 GH15 尾部上的两个大的基因片段在 K, Sb-1 和 Twort 基因组中是完全缺失的，而它们在 G1, ISP 和 A5W 基因组中也仅有部分存在。这两个大基因片段分别位于 1,050~4,919 bp 和 121,787~132,491 bp, G+C% 分别为 28.4% 和 28.48%，显著低于 GH15 全基因组的平均 G+C% 水平，它们应该属于基因的嵌合体（morons）^[208]。这表明在这些噬菌体之间曾经发生过嵌合体形式的大规模基因交换或者转移。

表 2.2 GH15 及其同源噬菌体基因组的比较分析

Table 2.2 A global genome comparison of GH15 and homologous phages

	GH15	Twort	G1	ISP	A5W	Sb-1	K
G+C content	30.23%	30.26%	30.39%	30.42%	30.47%	30.48%	30.60%
Genome size (bp)	139,806	130,706	138,715	138,339	137,083	127,188	127,395
Identity of GH15 BLASTN	100%	87%	97%	97%	97%	97%	97%
Query coverage of GH15 BLASTN	100%	46%	92%	92%	92%	84%	85%

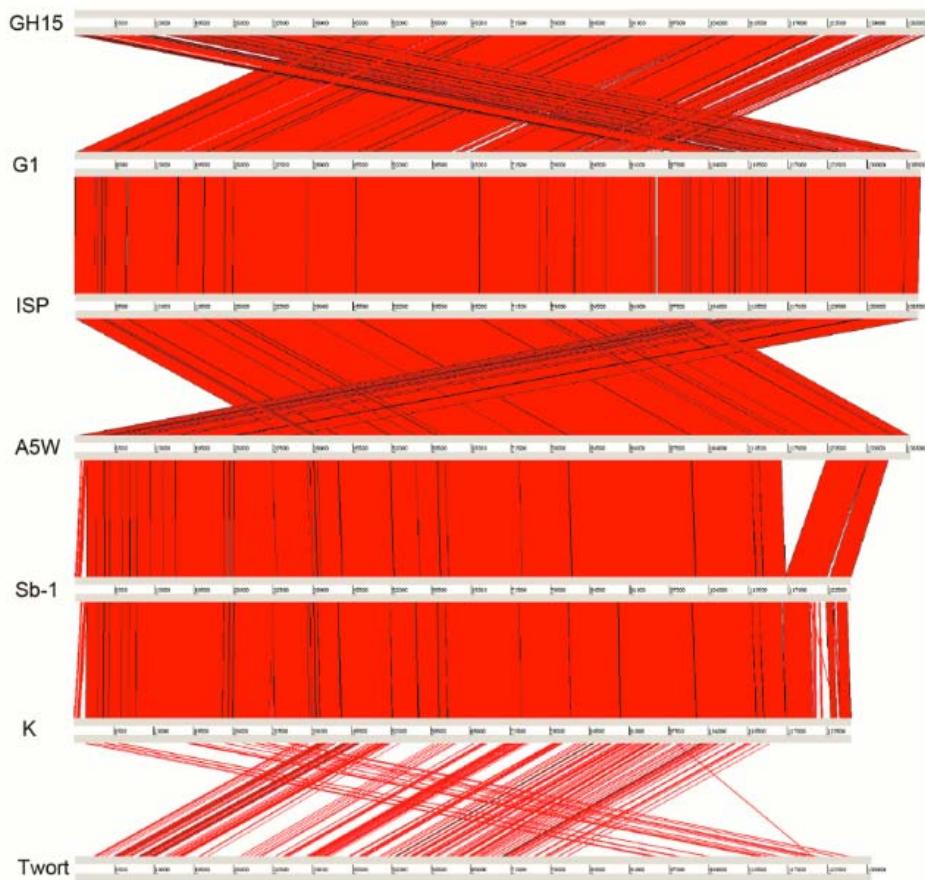


图 2.4 GH15 与其同源噬菌体 ORFs 的比对分析

Fig 2.4 A comparison of the genomic locations of homologous ORFs

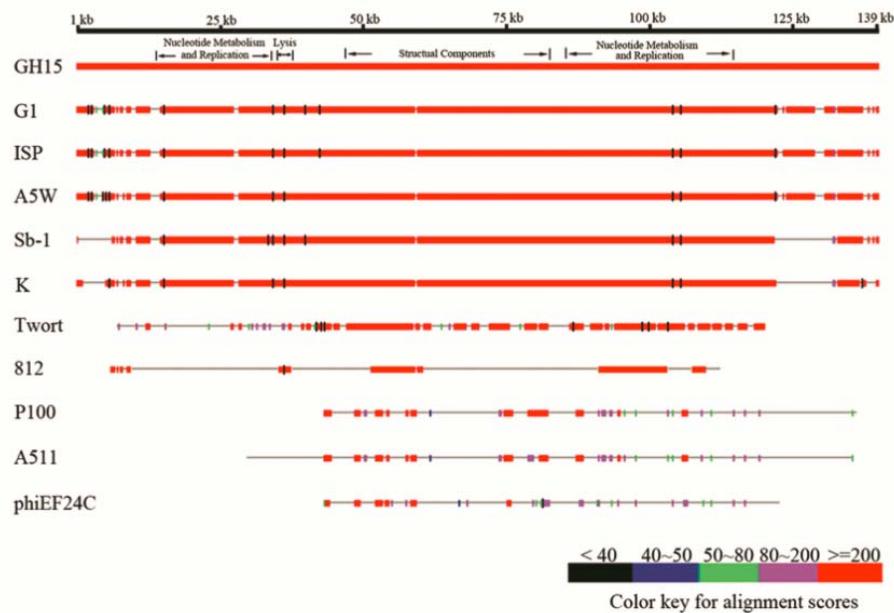


图 2.5 GH15 与其它同源噬菌体序列的比对分析

Fig 2.5 A pairwise nucleotide sequence comparison of GH15 with other phages

2.3.5 内含子鉴定

之前的报道表明其它金黄色葡萄球菌 III 型噬菌体有些基因上具有内含子，但是对 GH15 的所有 ORFs 进行的比对和分析却未发现该噬菌体存在有内含子。GH15 上与其它噬菌体内含子相关的基因的对应 ORFs 分别是 ORF71、ORF82、ORF100、ORF122、ORF135 和 ORF141。为了进一步的验证相关基因 intron 的有无，对这些相关基因进行了 RT-PCR 分析。将噬菌体 GH15 感染 W3275 10 min 后的总 RNA 进行提取，反转录为 cDNA，以其为模板，利用这些内含子相关的 ORFs 的引物进行基因扩增。另外分别以提取的总 RNA 和 GH15 的 DNA 为模板对这些相关 ORFs 进行扩增，然后比较扩增片段的大小。如图 2.6 所见，结果表明对于每一个内含子相关基因，以 cDNA 和 DNA 为模板扩增出的片段的大小都是一致的，说明这些基因中都没有内含子的存在。而以 RNA 为模板不能扩增出条带，说明 RNA 中没有污染 DNA。



图 2.6 内含子的鉴定

Fig 2.6 Identification of the introns absence/presence

(1 淘道为 marker；2、5、8、11、14 和 17 淘道以 GH15 的 DNA 为模板；3、6、9、12、15 和 18 淘道以 GH15 总 RNA 的反转录产物为模板；4、7、10、13、16 和 19 淘道以 GH15 的总 RNA 为模板)

(Lane 1, molecular mass marker, with sizes given on the left; lane 2, 5, 8, 11, 14 and 17, PCR product obtained by using primers on GH15 phage DNA respectively; lane 3, 6, 9, 12, 15 and 18, RT-PCR product obtained by using primers on RNA isolated from GH15-infected cells 10-min after infection respectively; lane 4, 7, 10, 13, 16 and 19, PCR product obtained by using primers with RNA isolated from GH15-infected cells 10-min after infection respectively)

尽管如此，GH15 的相关基因与其它 III 型噬菌体中与内含子有关的基因表现出极高的同源性，但是在内含子插入位点附近却表现出明显的基因序列差异。图 2.7 是对内含子插入位点前后的 20bp 片段进行比对的结果。由于无法确定核糖核苷酸还原酶第一个内含子的正确插入位点，因此没有对该内含子周围的基因进行比对分析。

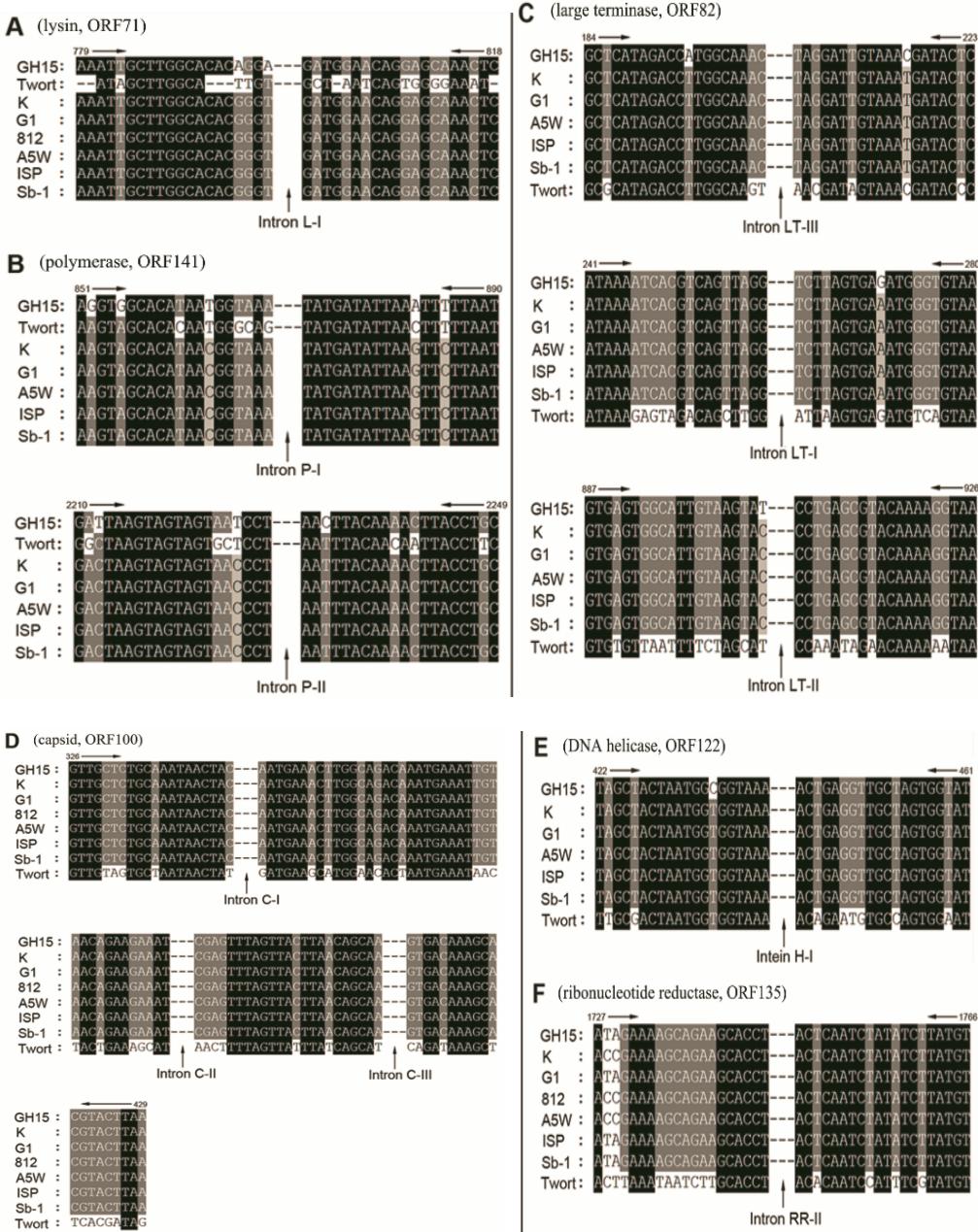


图 2.7 内含子插入位点附近基因序列的比对分析

Fig 2.7 The nucleotide sequence alignment of the region surrounding the splice site of introns
之前报道 Twort 的末端酶大亚基的基因存在两个 introns，但是本研究将其与 GH15 的相关基因进行比对分析之后发现 Twort 的这个基因还存在另外一个 intron，见图 2.8。

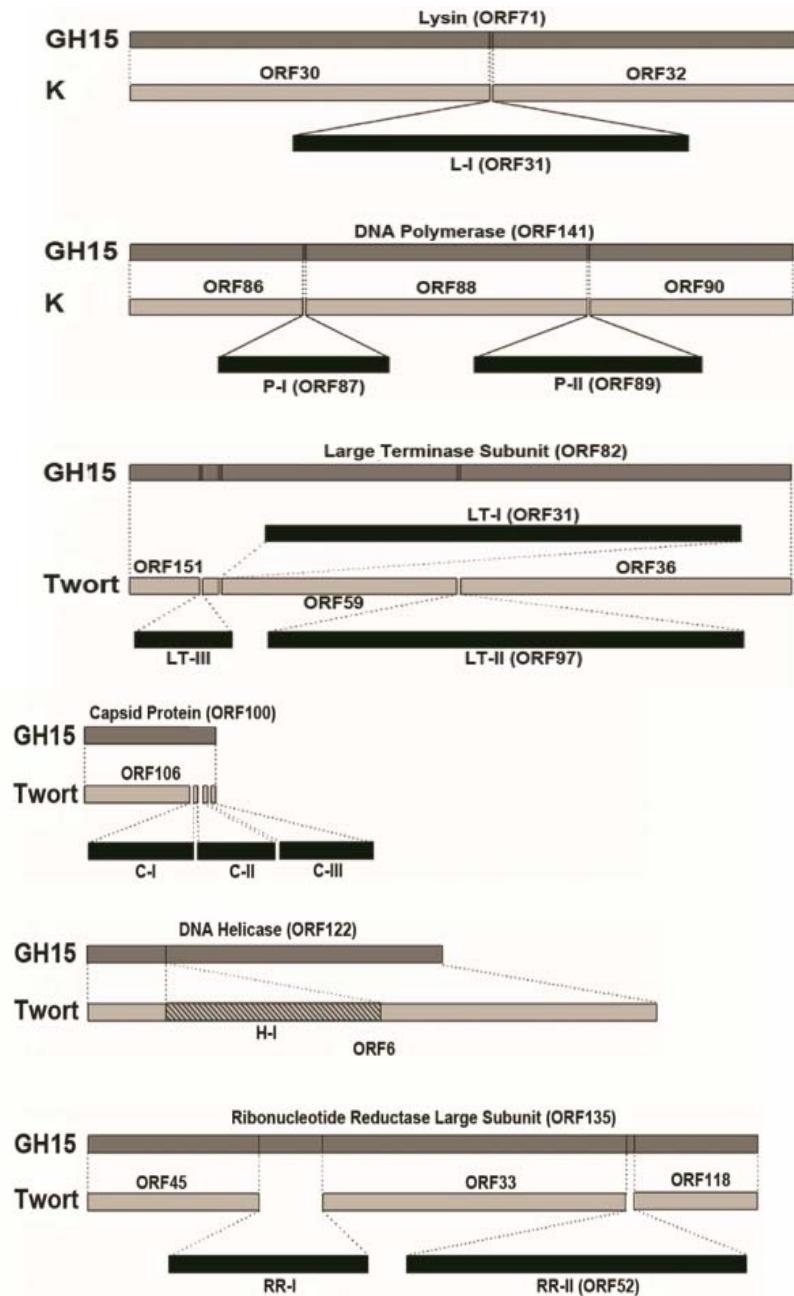


图 2.8 GH15 与 K/Twort 噬菌体内含子相关基因的比对

Fig 2.8 A schematic representation of several related genes of the phage GH15 and K/Twort
with introns and inteins

(The introns and inteins are indicated above or below the denoted ORFs in dark and lightly shaded gray boxes, respectively)

2.3.6 噬菌体 GH15 结构蛋白的鉴定

为了进一步确定 GH15 的结构蛋白组成情况，对其结构蛋白进行了 SDS-PAGE 和质谱分析。对其结构蛋白进行电泳之后，通过考马斯亮蓝染色在凝胶上出现了 13 条相对独立的条带（见图 2.9），将这些条带切下，然后将样品进行了质谱分析，最终鉴定出了 10 个结构

相关蛋白。其中第 6 个条带，也就是最粗的条带为组成衣壳的主要蛋白，对应基因为 ORF92；第 12 个条带也是组成衣壳的蛋白，对应基因为 ORF100；第 1、4、7、11 和 13 这五个条带都是组成尾部的蛋白，其中条带 1 对应 ORF117，编码吸附相关的尾部蛋白，条带 4 对应 ORF99，编码主要的尾鞘蛋白，条带 7 对应 ORF114，与李氏杆菌 A511 噬菌体编码尾部蛋白的 gp103 具有 56% 的同源性，条带 11 对应 ORF149，条带 13 对应 ORF150；另外值得一提的是条带 3 也对应 ORF99，这可能是进行修饰了的尾鞘蛋白；条带 2 对应 ORF110；条带 5 对应 ORF89，编码尾部出孔蛋白；条带 9 对应 ORF148，与粪肠球菌噬菌体 phiEF24C 的 Ig-like 蛋白表现出 34% 的同源性。除了 ORF148-150，其余的结构蛋白都位于 GH15 基因组的结构组成模块中。

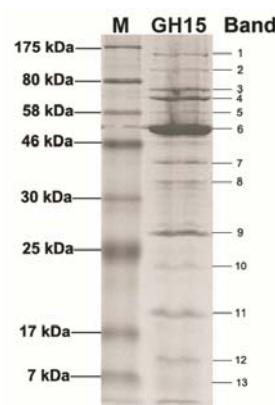


图 2.9 GH15 结构蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig 2.9 SDS-PAGE electrophoresis of GH15 structural proteins

2.4 讨论

本章节对 GH15 的全基因组序列进行了测定，其 G+C% 为 30.23%，比其宿主菌金黄色葡萄球菌的 G+C%（32.9%）低^[204]。G+C% 的差异可能会导致噬菌体在感染其宿主菌时无法高效利用宿主菌的密码子^[209]。不过 GH15 在两个区域内存在编码 4 个 tRNA 的基因，第一个区域为 14.8-15.7 kb，在 ORF32 和 ORF33 之间存在一个编码 Met-tRNA 的基因；第二个区域为 39.1-37.6 kb，在 ORF73 到 ORF74 之间存在可以编码 Asp-tRNA、Phe-tRNA 和 pseudo-tRNA 的基因。这些 tRNA 的存在可以弥补噬菌体与宿主菌之间 G+C% 差异带来的障碍^[210]。第二个编码 tRNA 的区域存在于结构模块中，其位置的分布不会是偶然发生的，这或许可以使 GH15 更有效的转录基因序列、增加复制的几率^[210]。

大多来自 III 型噬菌体的裂解酶和聚合酶基因中都存在内含子^[202]，另外 Twort 在其它三个基因中同样存在内含子^[190]。尽管该家族其它噬菌体的内含子相关基因与 GH15 的相应基因均表现出很高的同源性 (>95%)，但是 GH15 不存在任何内含子。表明 GH15 具有独特的

遗传特性，同时也显示出该家族成员的多样性。

I类内含子可以在 RNA 或者多肽的水平进行自动剪切^[211]，而噬菌体携带的 I型内含子通常存在于编码蛋白的基因中^[212]。一般来说，具有较大基因组的噬菌体都会存在内含子^[202]。已有研究表明噬菌体 K 和 Twort 基因组中存在 I型内含子^[190]。噬菌体 K、Sb-1、A5W、ISP、G1 和 812 的裂解酶及其 DNA 聚合酶基因中分别存在一个和两个内含子。而在 Twort 编码核糖核酸还原酶（之前报道存在 2 个内含子^[213]，本研究分析表明它含有第三个内含子）、衣壳蛋白（含有 3 个内含子）^[199]和末端酶大亚基（含有 2 个内含子）^[190]的基因中也存在内含子。这些内含子中通常存在编码 HNH 家族核酸内切酶的基因，有利于内含子的移动和归巢^[214]。这类 HNH 核酸内切酶负责将内含子放入正确的位置，从而完成归巢^[211]，一旦这些特异的插入位点发生了序列变化，可以直接导致内含子自剪切和插入的失败^[215]。该研究对有无内含子噬菌体相关基因进行的比对可以反映出这些内含子归巢和自剪切关键的序列特征^[211]。

分析还发现在金葡萄 III 型噬菌体的裂解酶和 DNA 聚合酶中存在的内含子与数据库中任何的基因都不具有同源性。这些内含子的特有性或许可以说明它们本身就存在于这些噬菌体当中，而 GH15 之所以没有这些内含子，是因为它发生了内含子的丢失。另外 Darnell 和 Doolittle^[216]曾提出进化和选择的压力会导致内含子的丢失，这与本研究的推论是相一致的。我们不难发现，通过内含子插入位点周围序列的比较可以看出内含子的丢失是非常精确的，另外，大多内含子相关的基因都是高表达水平的基因。这些特征都印证了之前的一个理论：大多数内含子的丢失是通过基因与相应的 cDNA 发生了同源重组^[217]。

有报道称基因组可以通过非同源重组的方法进行增长，比如可以通过“moron”的获得，而 morons 与其插入位点前后的基因往往表现出较大的 G+C% 差异^[208]。前面提到的 GH15 含有的两个较大的差异片段具有 morons 的特征，它们很可能是 GH15 在 Sb-1 和 K 的基础上获得形成的。

已知金黄色葡萄球菌可以编码 Sau3A1 等限制性调控系统的酶，包括 *Sau3A1*、*BamHI*、*PvuI* 和 *DpnI*，它们可以识别 5'-GATC-3'；另外还可以编码一种可以识别 5'-GGNCC-3' 序列的核酸内切酶^[202]。有趣的是 GH15 基因组中完全不具有 5'-GATC-3' 和 5'-GGNCC-3'（5'-GGTCC-3'，5'-GGGCC-3'，5'-GGACC-3' 和 5'-GGCCC3'）这些特征序列。因此，GH15 可以有效的逃避宿主菌对外来基因的防御机制，这与 GH15 的宽宿主谱是密切相关的。

另外，虽然粪肠球菌噬菌体 phiEF24C-P2 及李氏杆菌噬菌体 P100 和 A511^[206]与 GH15 的宿主菌不是同种细菌，但 GH15 的一些蛋白也与这几个噬菌体的相应蛋白具有同源性，并且这些蛋白主要分布于核酸代谢和复制模块：末端酶大亚基（ORF82）、RNA 聚合酶（ORF106）、解旋酶（ORF122）、转录调节子（ORF123）、核酸外切酶（ORF125）、DNA

修复外切酶（ORF127）、引物酶（ORF129）、解离酶（ORF133）和 DNA 聚合酶（ORF141）。所有这些蛋白都是噬菌体存活所必须的，属于噬菌体的“核心蛋白”^[189]。这些同源性蛋白的存在表明 GH15 与这三个噬菌体具有相关性，它们很有可能是由相同的祖先进化而来的。

2.5 小结

- 2.5.1 噬菌体 GH15 的基因组与其它的金黄色葡萄球菌 III 型噬菌体的基因组具有高度的同源性，它们之间存在密切的遗传和进化关系。
- 2.5.2 与 GH15 具有同源性的噬菌体在基因组中具有内含子，但 GH15 所有可能编码蛋白的基因中均不存在内含子，表现出独特的遗传特性。分析表明，GH15 很可能发生了内含子的丢失。
- 2.5.3 在 GH15 和其它同源噬菌体之间存在许多嵌合体，表明他们之间发生了大片段的基因转移。
- 2.5.4 GH15 编码“核心蛋白”的基因与粪肠球菌噬菌体 phiEF24C-P2 和李氏杆菌噬菌体 P100 和 A511 的相关基因具有同源性，显示出它们之间的相关性。

第三章 裂解酶 LysGH15 的原核表达及体内外抑菌活性

噬菌体 GH15 具有很宽的裂解谱，表现出极大的应用潜力。虽然它不能感染哺乳动物细胞，但 GH15 是活的病毒，是很难通过审批、进入临床应用的，这就限制了噬菌体 GH15 的进一步应用。不过噬菌体可以裂解细菌主要是依靠其感染末期产生的裂解酶，而裂解酶属于蛋白质，相比活噬菌体而言，裂解酶具有更强的应用性，也更容易被人们接受。

噬菌体裂解酶是由噬菌体基因组编码，在感染细菌的末期表达，用于裂解宿主菌的水解酶^[161]。裂解酶属于直接破坏细菌细胞壁上肽聚糖的水解酶类。之前已经报道来自噬菌体的裂解酶，对细菌表现出有效的裂解活性，尤其在细菌外部应用时，可以不受细胞膜的限制作用，对细菌表现出更有效的裂解活性^[218]。作为潜在的抑菌制剂，裂解酶具有以下几个优点：1，它的作用方式与传统的抗生素不同，具有抗生素抗性的菌株，对裂解酶仍然敏感；2，具有特异性，不会影响机体的正常菌群；3，鉴于肽聚糖是阳性菌细胞壁的重要组成成分，一旦突变很难存活，因此细菌无法产生对裂解酶的抗性^[97]。

前期，国外已经报道了金葡菌噬菌体的裂解酶，包括：LysK，ClyS，MV-L，LysWMY 和 ΦH5，但是只有 MV-L 和 ClyS 进行了体内治疗实验^[134, 161]。在前两个章节，研究结果表明 GH15 对临幊上分离的金黄色葡萄球菌表现出广谱的裂解活性和独特的遗传特性。为了进一步检测其裂解酶的应用潜力，本章节对 GH15 的裂解酶 LysGH15 进行了表达，并通过体内、外抑菌活性的研究探明其作为抑菌制剂的潜力。

3.1 材料

3.1.1 主要试剂

ExTaq、dNTP、*XhoI*、*BamHI* (Takara)；Ni-NTA (Qiagen)；SDS、Tris、Glycine、IPTG (Amresco)；Ampicillin(国药集团化学试剂有限公司)；琼脂(BD)；琼脂糖(上海)；Peptone、Yeast Extract (Oxoid)；Imidazole (Apolo)；Thrombin 酶 (Sigma)；Superdex-200 (GE)；超滤管 (Millipore)；质粒小提试剂盒、胶回收试剂盒 (Axygen)；引物 (上海生工)；核酸 marker、蛋白质 marker (Takara)；TRIZOL Reagent (Invitrogen, Milan, Italy)；RevertAidTM M-MuLV Reverse Transcriptase (MBI Fermentas, Canada) 和 oligo (dT)₁₈；QuantiTect SYBR Green PCR kit (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada) 等。

3.1.2 主要载体与菌株

pET15b (实验室保存)；大肠杆菌 BL21_Codon Plus 感受态细胞 (实验室制备)、大肠杆菌 DH5α感受态细胞 (天根生化)；金黄色葡萄球菌分离株 (本实验室分离，详见第一章)；

金黄色葡萄球菌 ATCC25923、ATCC26003，大肠杆菌 ATCC25922（购自 ATCC）；金黄色葡萄球菌 CVCC2261，链球菌 CVCC606，沙门氏菌 CVCC541（购自中国兽医药品监察所）；枯草芽孢杆菌 EA751，肺炎克雷伯菌 43816（本室保存）。

3.1.3 引物

lysF: CCG CTC GAG ATG GCT AAG ACT CAA GCA GAA
lysR: CGG GAT CCC TAT TTG AAT ACT CCC CAG GCA A
GAPDH_fw: TTC ACC ACC ATG GAG AAG GC
GAPDH_rv: GGC ATG GAC TGT GGT CAT GA
IL-6_fw: AAA GAG TTG TGC AAT GGC AAT T
IL-6_rv: CAG TTT GGT AGC ATC CAT CAT
IL-4_fw: AAT GTA CCA GGA GCC ATA TCC AC
IL-4_rv: TCA CTC TCT GTG GTG TTC TTC GT
INF- γ _fw: AGC GGC TGA CTG AAC TCA GAT TGT AG
INF- γ _rv: GTC ACA GTT TTC AGC TGT ATA GGG

3.1.4 主要仪器

PCR 仪 (BioRed, gradient-96)；恒温水浴锅（上海一恒，DK-80）；卧式电泳仪（北京六一，DYY-6C）；超洁净操作台 C1109B、立式恒温摇床 1102C、卧式恒温摇床（上海志诚）；超声破碎仪 JY92-IIIN（宁波新芝）；立式电泳仪（BioRed, Mini4）；凝胶成像系统（天能，1600）；小型台式离心机 pico17、小型低温离心机 pico22、台式低温离心机 Legend RT+（Thermo）；分光光度计 Nanodrop-2000（Thermo）；制冰机 ICE2（Scotsman）；蛋白质纯化仪 Purifier10（GE）；RT-PCR 仪（ABI 7500）等。

3.1.5 试剂配制

PBS 缓冲液

137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 50 mM Na₂HPO₄, 10 mM KH₂PO₄, pH 值 7.4。

分子筛缓冲液

20 mM Tris-HCl (pH 值 7.5), 500 mM NaCl。

培养基

(1) 液体 LB 培养基：Tryptone (10 g), Yeast Extract (5 g), NaCl (10 g), 定容至 1 L 后 120°C 高压蒸汽灭菌 20 min。

(2) 固体 LB/BHI 培养基：在液体 LB/BHI 基础上加入 Agar (15% M/V)。

3.2 方法

3.2.1 LysGH15 的表达与纯化

LysGH15 表达菌株的构建

(1) 利用引物 lysF 和 lysR 对 *LysGH15* 基因进行 PCR 扩增, 反应体系: 5 μL 的 2 mM dNTP; 5 μL 的 10× KOD buffer; 2.5 μL 的 200 mM MgSO₄; 1 μL 的模板; 上下游引物 (20 mM) 各 1 μL; 1 μL 的 KOD 酶; 33.5 μL 的去离子水。反应条件: 95°C 5 min; 95°C 45 s, 60°C 45 s, 68°C 2 min, 30 个循环; 68°C 10 min; 4°C 保存。电泳后利用切胶回收试剂盒对目的条带进行回收;

(2) 对载体 pET-15b 和基因片段 *LysGH15* 进行 *XhoI* 和 *BamHI* 限制性酶切处理, 电泳后对载体和片段进行切胶回收;

(3) 利用 T4 连接酶对处理好的载体与基因片段进行 16°C 连接, 并将连接产物转化到 DH5α 感受态细胞中;

(4) 对构建好的克隆菌株进行 PCR 鉴定, 并进一步进行测序分析, 检验正确后提取表达载体;

(5) 将构建好的表达载体 pET-15b-LysGH15 转入 BL21 (Codon Plus) 感受态细胞中。

LysGH15 的表达与纯化

于 37°C 将构建好的表达菌株在 LB 培养基中培养至对数生长初期 (OD₆₀₀ 约 0.6), 在 4°C 冷库中将菌液冷却, 之后加入 IPTG (终浓度为 1 mM) 并放入 25°C 摆床进行诱导和表达。

利用 Ni-NTA 对蛋白进行亲和层析纯化。a: 将诱导好的表达菌株通过离心集菌, 用适量的 PBS 缓冲液悬起; b: 将菌悬液冰浴、超声破碎、离心, 取上清; c: 将上清样品过 Ni 柱, 先用含 20 mM 咪唑的 PBS 与含 50 mM 咪唑的 PBS 缓冲液各 50 mL 分别洗杂蛋白, 然后用含 500 mM 咪唑的 PBS 洗脱目的蛋白。

3.2.2 LysGH15 最佳作用条件

最佳作用 pH 值

取等量、纯化的 LysGH15 蛋白换为不同 pH 值的 buffer (将 50 mM 醋酸钠缓冲液调至 pH 值 4.0-6.0, 将 PBS 缓冲液调至 pH 值 7.0-9.0), 然后将不同 pH 值缓冲液条件下的 LysGH15 与等量的 MRSA 菌株 W3275 (将 OD₆₀₀ 调至 1.2 左右) 进行充分混匀, 放置于 37°C 水浴锅中, 30 min 后测定反应液的 OD₆₀₀ 值, 该值下降的越多说明在该条件下 LysGH15 的裂解活性越强, 将表现为最高活性缓冲液的 pH 值条件定义为最佳作用 pH 值。

最佳作用温度

将 MRSA 菌株 W3275 培养至对数生长期，用 PBS 缓冲液洗涤后悬起，并将 OD₆₀₀ 调至 1.2 左右。处于最佳作用 pH 值缓冲液条件的等量 LysGH15 与处理好的 W3275 快速混匀，放置于不同温度的水浴锅中孵育 30 min，结束后测定 OD₆₀₀ 的数值，活性最高一组的温度定为最佳作用温度。

3.2.3 LysGH15 体外抑菌活性测定

LysGH15 在平板上形成抑菌环的能力

在超净工作台中将对数生长期的 W3275 用涂布器均匀的涂抹于固体 BHI 培养基平板上，晾干后用无菌的枪头宽口端在平板上打孔，将纯化的 LysGH15 (40 μg/mL) 滴于孔中，另外将蛋白的洗脱液和空载体菌株的洗脱产物滴于另外两个孔中作为对照，将平板正放置于 37°C 恒温箱中培养过夜，次日观察抑菌环的形成情况。

LysGH15 对生长状态的 MRSA 抑菌作用测定

将 W3275 于 BHI 液体培养基中培养至对数生长期 (OD₆₀₀ 约 0.8)，然后将 LysGH15 加入三管菌液中继续培养 (终浓度分别为 10 μg/mL, 40 μg/mL 和 100 μg/mL)，作为对照，另外两组分别加入热灭火的 LysGH15 (100 μg/mL) 与新鲜的 BHI 培养基，然后将菌液继续放入 37°C 恒温摇床中培养，观察菌液的生长情况。

LysGH15 裂解谱及裂解活性的测定

将 53 株金黄色葡萄球菌 (24 株 MRSA, 29 株 MSSA) 及大肠杆菌 ATCC25922、链球菌 CVCC606、沙门氏菌 CVCC54、枯草芽孢杆菌 EA751 和肺炎克雷伯菌 43816 分别进行培养，至对数生长期后用 PBS 缓冲液进行洗涤，将菌液的浓度调至 OD₆₀₀ 为 1.2。利用倍比稀释法测定初始状态时溶液内的菌量，然后将纯化的 LysGH15 分别加入到每个菌液中，终浓度为 40 μg/mL，放入 37°C 水浴锅中静置 30 min，再次测定溶液中的剩余菌量，最后计算出溶液中加入 LysGH15 前后细菌的减少量。

3.2.4 LysGH15 体内裂解活性测定

该部分实验所用小鼠均为雌性 BALB/c 小鼠，体重 20~22 g (8 到 12 周龄)，购自吉林大学基础部，每组设置 5 只。所用菌株为 MRSA 菌株 YB57。

小鼠感染 MRSA 菌血症模型的建立

将 YB57 培养至对数生长期，用 PBS 洗涤后备用。设置 6 组小鼠，分别对其中 5 个组别的每只小鼠的一侧腹腔注射 YB57 菌液 7×10^6 , 7×10^7 , 7×10^8 , 7×10^9 和 7×10^{10} cfu 的菌量，剩余 1 组注射蛋白缓冲液作为对照，每个组别设置两个重复。对这些小鼠进行观察，每日记录小鼠的存活状态，将 7 日内全部死亡的组别的细菌剂量定为最小致死剂量 (MLD)。

LysGH15 对小鼠菌血症最小治疗剂量 (MPD) 的测定

确定了 YB57 菌株对 BALB/c 小鼠的 MLD 之后，以 $2\times$ MLD 的剂量对小鼠进行腹腔一侧攻菌，隔一定时间测定小鼠血液内细菌的含量。当小鼠血液内的菌量达到 10^5 cfu/mL 之后，在小鼠腹腔的另一侧注射 LysGH15 进行治疗。LysGH15 的量设定 5 个组别，分别是：0 μg , 5 μg , 10 μg , 50 μg 和 100 μg 。将 100 μg 的 LysGH15 进行加热失活，对小鼠进行治疗，另外设一组健康小鼠注射过量的 LysGH15 (200 μg)。每个组别设置三个重复，然后观测每组小鼠每日的死亡数量和存活数量，30 d 后确定每组的存活率。最后存活率为 100% 的治疗剂量确定为 LysGH15 的 MPD。

在 LysGH15 的 MPD 剂量治疗的情况下，动态的检测小鼠血液内（检测 120 h）和脾脏内（检测 24h）的菌量变化情况。小鼠血液的样品：无菌条件下在尾静脉采集，倍比稀释后测定菌含量；脾脏样品：在无菌条件下解剖小鼠后取出脾脏，研磨之后倍比稀释，测定菌含量。

LysGH15 治疗小鼠菌血症过程中炎性因子 IL-6、IL-4 和 INF- γ 转录水平测定

另外对取出的脾脏提取总 RNA，通过 real-time PCR 测定其 IL-6、IL-4 和 INF- γ 的 mRNA 水平。利用 TRIZOL 法提取脾脏的总 RNA；利用反转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA；然后以 cDNA 为模板进行 real-time PCR；对数据进行分析。Real-time PCR 的组成：反应浓度为 500 nM 的引物，1 μL 的 cDNA， $2\times$ QuantiTect SYBR green PCR mastermix，加水至 25 μL 。反应条件：95°C 变性 10 min, 95°C 变性 15 s, 60°C 退火 45 s，进行 45 个循环。每个反应重复两次。

将 GAPDH 作为参照内参，对结构进行溶解曲线分析。将相对于 GAPDH 的 fold increase/decrease 量表示目的基因的转录水平。每个样品扩增的平均值利用循环阈值 (Ct) 的方法测定；将目的基因的 Ct 值与 GAPDH 的 Ct 值的差值 (DCt) 对目的基因的表达量进行相对定量；脾脏中 mRNA 量的大小用 2^{-DCt} 表示。

3.3 结果

3.3.1 LysGH15 的表达与纯化

通过 PCR、酶切和测序鉴定（图 3.1），确定成功构建了表达载体 pET15b-LysGH15 以及表达菌株。

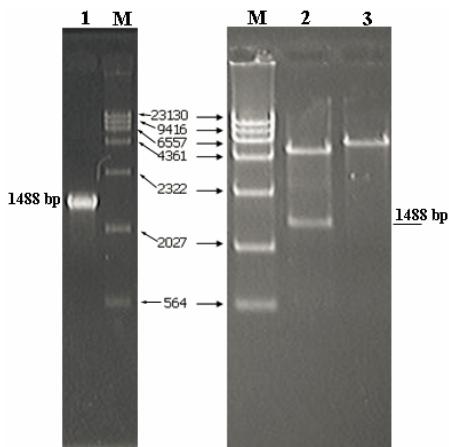


图 3.1 裂解酶 *LysGH15* 基因的扩增与表达载体鉴定

Fig 3.1 Amplification and expression vectors identification of *LysGH15* gene

(1: *LysGH15* 基因扩增; M: marker; 2: pET15b-*LysGH15* 载体双酶切鉴定; 3: 载体的单酶切鉴定)

(1: *LysGH15* amplification; M: marker; 2: vector digestion with two enzymes; 3: vector digestion with one enzyme)

对构建好的表达菌株进行 25°C 低温诱导和表达，结果表明该蛋白为可溶表达。通过 Ni-NTA 亲和层析的方法纯化得到了 *LysGH15* 蛋白（图 3.2），测定蛋白浓度之后，-80°C 保存备用。

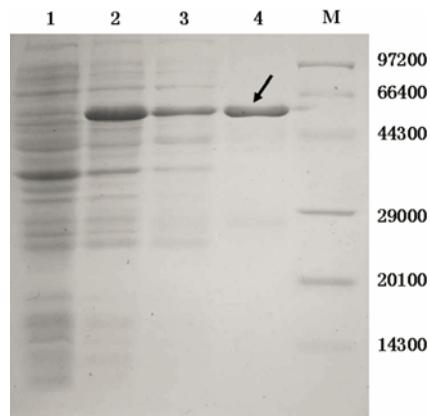


图 3.2 *LysGH15* 的表达与纯化

Fig 3.2 The expression and purification of *LysGH15*

(1: 未诱导表达菌株超声悬液; 2: 诱导表达菌株超声悬液; 3: 诱导表达菌株超声上清; 4: 纯化的 *LysGH15*; M: marker)

(1: uninduced *E. coli* cells; 2: *E. coli* induced with IPTG; 3: supernatant of the induced cells after crushing; 4: the purified *LysGH15* fraction; M: molecular mass marker.)

3.3.2 LysGH15 最佳作用条件测定

温度梯度实验表明 LysGH15 在 15~40°C 条件下都表现出明显的裂解活性，当温度为 37°C 左右时其表现为最强的裂解活性（图 3.3）。pH 值梯度实验表明 LysGH15 在 pH 值为 5.0~8.0 范围时，表现出显著的裂解活性，当 pH 值为 6.0~7.0 时活性最高。因此，后续活性实验的条件采用 37°C 和 PBS 缓冲体系（pH 值 7.3）。

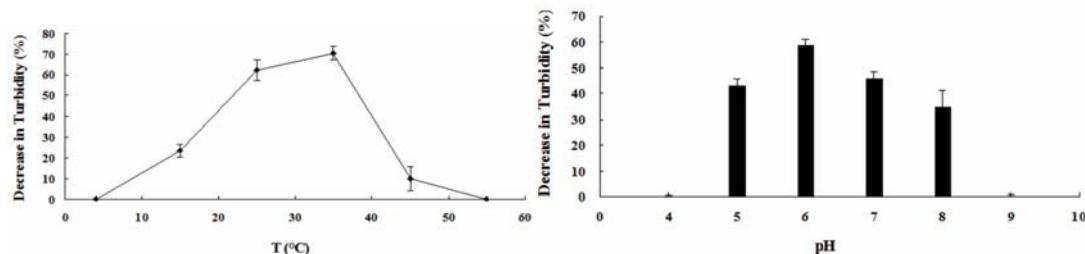


图 3.3 LysGH15 最佳作用温度与最佳作用 pH 值

Fig 3.3 The optional functional temperature and pH of LysGH15

(Percent reduction in the turbidity of a MRSA W3275 suspension after treatment with 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ lysin for 30 min. left: the pH profile of LysGH15 activity; right: temperature profile of lysin activity)

3.3.3 LysGH15 体外裂解活性测定

LysGH15 在平板上形成抑菌环的能力

实验表明 LysGH15 (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 在 37°C 条件下可以在涂布有 MRSA 菌株的固体 BHI 培养基平板上形成明显的抑菌环（图 3.4）。说明纯化的 LysGH15 对金黄色葡萄球菌具有显著的抑菌活性。但是抑菌环直径不大，考虑到有两方面的原因：1，LysGH15 的分子量为 54 kDa，在固体培养基中不容易扩散；2，在干燥的无液体环境下，LysGH15 不能发挥原有的抑菌活性。



图 3.4 LysGH15 在平板上表现的抑菌活性

Fig 3.4 The bactericidal activity of LysGH15 on the plate

LysGH15 对对数生长期 MRSA 的裂解作用

实验表明当 LysGH15 工作浓度为 40 $\mu\text{g/mL}$ 和 100 $\mu\text{g/mL}$ 时, 可以使对数生长期状态下持续培养的 MRSA 完全裂解 (如图 3.5)。低浓度的 LysGH15 (10 $\mu\text{g/mL}$) 加入初始时可以使菌液滴度在一定程度上降低, 但是随着培养的继续, 菌液恢复浑浊。而热灭活的 LysGH15 (100 $\mu\text{g/mL}$) 完全不表现出对菌液生长的抑制活性。

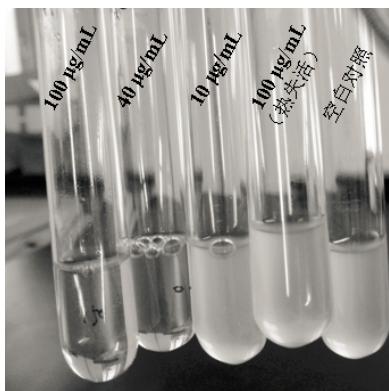


图 3.5 LysGH15 对生长期 MRSA 的抑菌活性

Fig 3.5 The bactericidal activity of LysGH15 to log-phase MRSA

LysGH15 裂解谱及裂解活性的测定

裂解活性实验表明 LysGH15 对金黄色葡萄球菌表现出特异性的裂解活性, 对大肠杆菌、链球菌、沙门氏菌、枯草芽孢杆菌和肺炎克雷伯菌不具有抑菌活性。LysGH15 可以有效的裂解全部的 24 株 MRSA 菌株、18 株 (18/29) MSSA 菌株 (图 3.6)。对 MRSA 菌株表现出一定的偏嗜性, 可以使 MRSA 菌株的 \log 值平均下降 5.4 ± 1.1 , 而 MSSA 菌株的 \log 值仅降低 3.9 ± 2.8 。

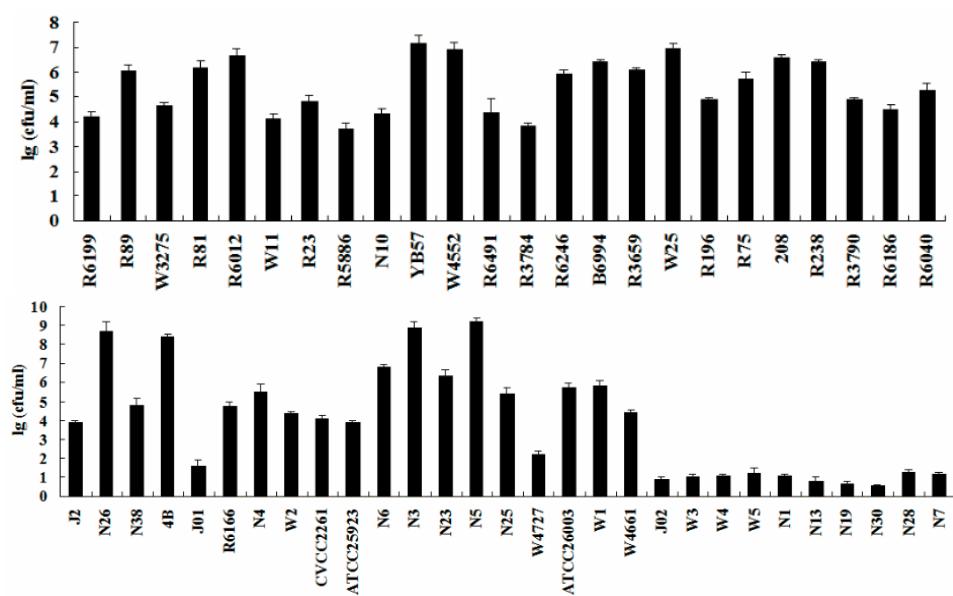


图 3.6 LysGH15 对 MRSA (上) 和 MSSA (下) 的抑菌谱

Fig 3.6 The lytic spectrum of LysGH15 to MRSA (up) and MSSA (down)

(LysGH15 使用的终浓度为 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 作用 30 min, 图中黑色柱表示使用 LysGH15 前后菌量的差值)

(LysGH15 exerted specific killing of *S. aureus*. Log-phase cultures of different bacteria were exposed to LysGH15 [finally concentration, 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$] for 30 min.)

3.3.4 LysGH15 体内裂解活性测定

小鼠感染 MRSA 菌血症模型的建立

实验表明当对小鼠腹腔注射 7×10^9 和 7×10^{10} cfu 菌量的 YB57 时, 7 日内可以使小鼠的死亡率达到 100%, 而注射 7×10^8 cfu 菌量时 7 日内的死亡率为 60%, 因此确定 YB57 的最小致死剂量为 7×10^9 cfu。后续实验对小鼠的腹腔攻菌量定为 $2 \times$ MLD。

LysGH15 对小鼠菌血症最小治疗剂量的测定

对小鼠腹腔攻菌 $2 \times$ MLD, 1h 后采集小鼠尾静脉血样, 发现血液内的菌量已达到 5.4×10^5 cfu/mL, 表明此时的小鼠已经达到全身感染、处于菌血症状态, 并且在 3 d 后全部死亡。因此, 治疗实验在攻菌 1h 后进行。在治疗实验中, 当腹腔注射 LysGH15 的量为 10 μg 时, 对小鼠的保护率可以达到 40%, 而当治疗剂量为 $\geq 50 \mu\text{g}$ 时保护率可以达到 100% (图 3.7)。热失活的 LysGH15 (100 μg) 未表现出任何的保护作用。对健康小鼠腹腔注射 200 μg 的 LysGH15, 小鼠未表现出不适症状。

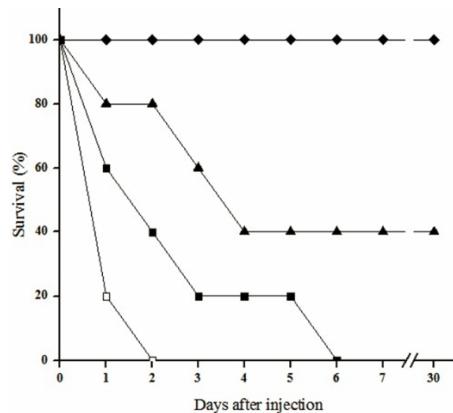


图 3.7 LysGH15 对感染 YB57 处于菌血症状态小鼠的治疗

Fig 3.7 Rescue of mice from lethal MRSA YB57 infection by LysGH15

(◆: 治疗剂量为 50 μg ; ▲: 治疗剂量为 10 μg ; ■: 治疗剂量为 5 μg ; □: 注射 buffer, 作为对照)

Mice were inoculated i.p. with $2 \times$ MLD YB57. One hour later, 50 μg (black diamond), 10 μg (black triangles), or 5 μg of lysin (black squares) were injected into the mouse peritoneal cavity. Control mice (white squares) were treated with elution buffer under the same conditions.

在 LysGH15 的 MPD 剂量治疗的情况下, 对小鼠血液内菌量进行的动态检测表明治疗后的 2 h, 小鼠血液中的菌含量降到了 10^3 cfu/mL, 相比未治疗组的小鼠下降了 4 个 log 单位(图 3.8)。对小鼠脾脏内菌量的检测表明治疗后 5 h, 治疗组脾脏内的菌量相比为治疗组下降了 3 个 log 单位, 到 24 h 基本检测不到细菌的存在。

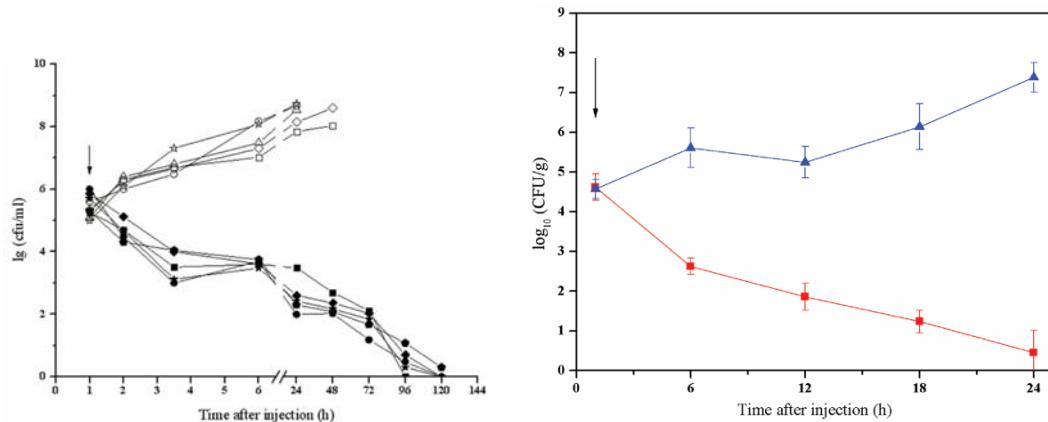


图 3.8 LysGH15 对菌血症小鼠体内 MRSA 的清除能力

Fig 3.8 The colony count of blood and spleen samples at regular intervals

左图: LysGH15 对血液内细菌的清除 (黑色标示为治疗组的不同小鼠血液内细菌含量变化, 白色标示为不治疗组的不同小鼠血液内菌含量变化); 右图: LysGH15 对脾脏内细菌的清除 (■标示为治疗组小鼠脾脏内菌量变化, ▲标示为不治疗组小鼠脾脏内均量变化)。

Left: At the indicated times, bacterial counts (cfu/mL) in five mice either treated with 50 μ g of LysGH15 (black symbols) or buffer (white symbols) were determined from peripheral blood samples (10 μ L) taken from the caudal vein. Every line of black or white symbols represents the bacterial counts of a single mouse treated with lysin or buffer. Right: The quantity of bacteria (\log_{10} CFU/g) was measured by colony count in the spleens of mice with YB57 infection (1.4×10^{10} CFU/mouse) treated with 50 μ g LysGH15 (■) or elution buffer (▲) at indicated times.

LysGH15 治疗小鼠菌血症过程中炎性因子 IL-6、IL-4 和 INF- γ 转录水平测定

提取脾脏的总 RNA, 对 IL-6、IL-4 和 INF- γ 的 mRNA 水平进行了 real-time PCR 测定(图 3.9)。向健康小鼠腹腔注射 50 μ g 的 LysGH15 组别, 与未处理的小鼠相比, 没有检测到 IL-6、IL-4 和 INF- γ 的 mRNA 水平有明显的变化; 攻菌未治疗组小鼠体内的 IL-6、IL-4 和 INF- γ 的 mRNA 水平呈持续升高趋势, 到 24 h IL-6 的水平升高了 8 倍, IL-4 升高了 2 倍, INF- γ 升高了 5 倍; 攻菌后治疗组小鼠体内 IL-6、IL-4 和 INF- γ 的 mRNA 水平开始呈升高趋势, 12 h 时可以达到最高值, 之后呈下降趋势, 到 24 h 均恢复到正常水平。

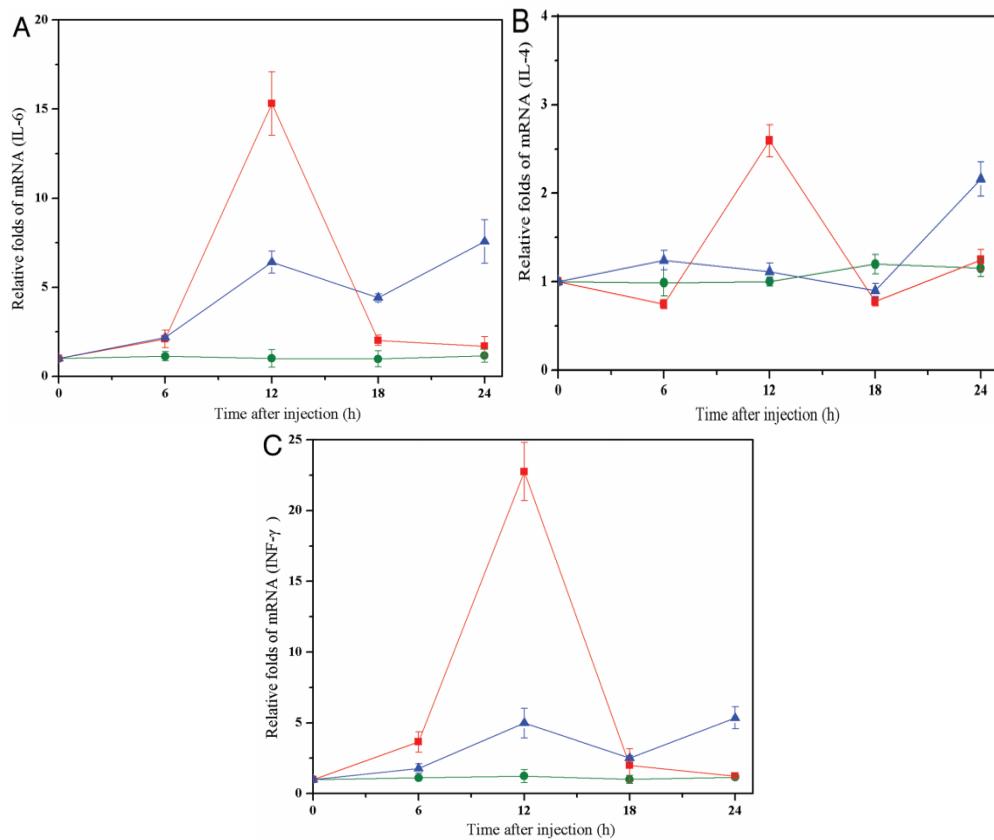


图 3.9 利用 LysGH15 (50 μg/小鼠) 治疗时脾内 IL-6、IL-4、IFN-γ mRNA 水平测定

Fig 3.9 The IL-6, IL-4 , and IFN-γ mRNA levels in the spleen tissues of mice

●：50 μg/mouse 治疗组；▲：攻菌但不治疗组；■：正常小鼠。内参为 GAPDH。

The mRNA levels in the spleen tissues of mice were analyzed by real-time RT-PCR within 24 h after i.p. injection of mice (3 mice/group) with LysGH15 alone (50 μg/mouse) (●), YB57 alone (2× MLD per mouse) (▲), or YB57 (2× MLD per mouse) and LysGH15 (50 μg/mouse) concurrently (■).

3.4 讨论

限制噬菌体宿主谱的因素有多种，主要包括：噬菌体对细菌的识别和结合，这主要是通过尾丝蛋白等识别细菌上配体的成分决定；噬菌体基因组进入细菌后逃避细菌相关防御系统的能力；噬菌体接管细菌、利用细菌成分合成自身组成成分的能力；裂解酶破坏细菌细胞壁释放子代噬菌体颗粒的能力。因此，通常来说，由于少了几方面的限制因素，裂解酶的裂解谱要宽于其来源噬菌体的宿主谱。本实验中，LysGH15 即表现出比噬菌体 GH15 更宽的裂解谱，尤其对所测定的所有 MRSA 菌株具有高效和均一的裂解活性。

通常来说，裂解酶的 C 端结合区可以特异性的结合到细菌细胞壁的底物成分上（通常为多糖类物质^[127]），其结合能力在很大程度上可以影响裂解酶的裂解活性^[175]。因此，鉴于

GH15 对 MRSA 和 MSSA 裂解活性的巨大差异，二者细胞壁上与 LysGH15 相结合的底物成分很可能具有数量或者结构上的差异，MRSA 与 LysGH15 的亲和力应该强于 MSSA 对 LysGH15 的亲和力。LysGH15 的裂解活性对金黄色葡萄球菌具有高度的特异性，不裂解其它类型的细菌，因此不会影响机体的正常菌群，在控制金黄色葡萄球菌感染方面表现出很大的优势。

MRSA 的感染可以增加细胞因子 IL-6、IL-4 和 INF- γ 的 mRNA 水平，表明炎症反应非常严重^[219]。在这一点上，本研究的结果与之前的报道是相符的^[220]。在治疗初期，炎性因子的 mRNA 水平升高很多，这与 LysGH15 对细菌的快速裂解相一致，很可能是由于 LysGH15 对小鼠体内细菌的快速裂解，造成了大量细胞内容物（外毒素）的释放，从而导致炎性因子水平的升高^[221]。金黄色葡萄球菌释放的肽聚糖、脂磷壁酸和外毒素均可以引起这些炎性因子水平的升高^[222]。在治疗后期这三个细胞因子水平的快速回落则是由于机体内免疫系统的清除作用而引起的。与之相比，非治疗组小鼠体内炎性因子 mRNA 水平呈持续升高趋势，直至死亡。另外，与正常的小鼠相比，单独向健康小鼠体内注射 LysGH15 没有引起这些炎性因子 mRNA 水平的变化。

综上，LysGH15 对金葡菌，尤其对 MRSA 具有广谱、高效的裂解活性，表现出巨大的应用潜力。那么 LysGH15 是如何发挥高效抑菌活性的？其作用机制如何？目前为止，国内外尚无金黄色葡萄球菌噬菌体裂解酶作用机制的研究。虽然其他细菌噬菌体裂解酶的作用机制已有报道，但由于 LysGH15 的氨基酸序列与之差异太大，无法进行参考。目前研究蛋白质作用机制最成熟的方法是解析其三维结构。因此，为了阐明 LysGH15 的分子作用机制，也为了填补金葡菌噬菌体裂解酶三维结构这块空白，在下一章节将对 LysGH15 的三维结构进行解析。

3.5 小结

- 3.5.1 成功表达了具有杀菌活性的 LysGH15，其最佳作用 pH 值为 7.0、最佳作用温度为 37°C。
- 3.5.2 LysGH15 表现出比噬菌体 GH15 宽的裂解谱和更加高效的裂解活性，尤其对 MRSA 菌株的杀菌活性非常强。
- 3.5.3 一次性应用 50 μg 的 LysGH15 即可以有效的保护菌血症状态的小鼠，使体内的菌量得到快速的下降，同时有效缓解感染引起的炎性因子水平的升高。

第四章 裂解酶 LysGH15 三维结构解析

生物大分子的直径通常来说是几个 nm 到几百个 nm, 蛋白质分子即属于生物大分子的范畴。目前还不存在一种工具可以用来直接的观测蛋白质分子中原子与原子基团的空间分布, 因此, 结构生物学研究人员开发了多种方法来间接的研究生物大分子的三维结构。目前为止, 研究蛋白质三维结构的方法主要包括: X-射线晶体学 (X-ray crystallography)、核磁共振技术 (nuclear magnetic resonance, NMR)、冷冻电子显微镜法 (cryoelectron microscopy, Cryo-EM)、小角散射 (small angle X-ray scattering, SAXS)、中子衍射 (neutron diffraction, ND) 以及原子力显微镜 (atomic force microscopy, ATM) 等。其中, 蛋白质晶体的 X-射线衍射技术是研究蛋白质分子三维结构最常用的手段之一。所有这些方法均有各自的优缺点和适合的研究范围, 不同的研究对象需要结合实际情况采用不同的方法。比如 NMR 比较适合研究分子量小、在溶液中极其稳定、不易结晶的蛋白质(一般为 10-20 kDa) 以及蛋白质与其它分子相互作用位点的确证; 而冷冻电子显微镜则比较适合研究大分子量蛋白质 (通常大于 400 kDa)、完整的病毒、甚至亚细胞器的结构。因此需要具体情况具体分析, 结合不同的方法来互补进行。

大多数噬菌体裂解酶的蛋白结构已有报道, 其裂解细菌的分子作用机制也已基本清楚。然而金黄色葡萄球菌噬菌体裂解酶的蛋白结构目前尚无报道, 且与其它种属噬菌体裂解酶的氨基酸序列差异太大, 无法进行参考。前面的序列分析表明 LysGH15 与已公布的其它金黄色葡萄球菌噬菌体裂解酶具有较高的序列同源性, 因此该裂解酶具有典型性。另外, LysGH15 对金黄色葡萄球菌 (尤其是 MRSA) 表现出很强的裂解活性和宽的裂解谱, 因此, 解析其三维结构并阐明其作用机制非常具有意义, 同时也可以为其它金黄色葡萄球菌噬菌体裂解酶的结构解析提供重要的参考和依据。

最初本研究拟对全长 LysGH15 的蛋白质三维结构进行解析, 但是始终无法获得蛋白晶体。通过 SAXS 分析, 获得了 LysGH15 在溶液状态下的表面结构模型, 发现它由两个 linkers 连接三个相对独立的球状结构组成, 整体呈“V”字形, 柔性很大, 这样的蛋白质获得蛋白晶体的几率是极低的。因此, 后续根据 LysGH15 三个活性片段各自的蛋白特性分别选择了蛋白质的 X-射线晶体学和核磁共振技术对它们的三维结构进行了解析, 为进一步的分子作用机制研究提供结构基础。

4.1 材料

4.1.1 主要试剂

KOD-plus DNA 聚合酶(日本 Toyobo 公司); *NdeI*、*XhoI*、*DpnI*、*SspI*(NEB); T4 DNA Polymerase(Novagen); dCTP、dGTP(Promega); Ni-NTA(Qiagen); EDTA、Urea、SDS、Tris、Glycine、IPTG(Amresco); 核酸 marker、蛋白质 marker(Takara); Ampicillin、Kanamycin(国药集团化学试剂有限公司); 琼脂(BD); 琼脂糖(上海); Peptone、Yeast Extract(Oxoid); Imidazole(Apolo); Superdex-200(GE); Se-Methionine(百灵威); TEV 酶(本实验室制备, 表达质粒由美国佐治亚大学提供); 超滤管(Millipore); 蛋白结晶筛选试剂盒 Wizard I、II、III、IV(Emerald), Screen、Screen 2、PEG、PEG 2、Index(Hampton); 晶体优化相关试剂(Hamptonresearch 公司、Sigma、博亚捷晶公司); 质粒小提试剂盒、胶回收试剂盒(Omega); 多肽“AGGGGG”和引物(上海生工); ammonium chloride(¹⁵N, 99%)和 D-Glucose(U-¹³C6, 99%)均购自 Cambridge Isotope Laboratories, Inc.。

4.1.2 主要载体与菌株

pET-26b; LIC 专用载体 pMCSG7(美国阿公那国家实验室提供); 大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞、大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞(天根生化)。

4.1.3 引物

lysGH15_fw: GGG AAT TCC ATA TGG CTA AGA CTC AAG CAG AA

lysGH15_rev: CCG CTC GAG TTT GAA TAC TCC CCA GGC AA

CHAP_fw: TAC TTC CAA TCC AAT GCT ATG GCT AAG ACT CAA GCA GAA

CHAP_rev: TTA TCC ACT TCC AAT GTT ATG CTT TTA CAG GTA TCT CAA T

Amidase-2_fw: TAC TTC CAA TCC AAT GCT GCA GGA ACT ACT GTT AAA AAA

Amidase-2_rev: TTA TCC ACT TCC AAT GTT ACT TTT TCC AAG AGC CTG TTA C

SH3b_fw: TAC TTC CAA TCC AAT GCT AAA AAC TAC ATG GAT AAA GGA

SH3b_rev: TTA TCC ACT TCC AAT GTT ACT ATT TGA ATA CTC CCC AGG C

4.1.4 主要仪器

PCR 仪器(BioRed, gradient-96); 恒温水浴锅(上海一恒, DK-80); 卧式电泳仪(北京六一, DYY-6C); 超洁净操作台 C1109B、立式恒温摇床 1102C(上海志诚); 卧式恒温摇床 innova44(Eppendorf); 超声破碎仪 JY92-IIN(宁波新芝); 立式电泳仪(BioRed, Mini4); 凝胶成像系统(天能, 1600); 小型台式离心机 pico17、小型冷冻离心机 pico22、台式冷冻离心机 Legend RT+(Thermo); 分光光度计 Nanodrop2000(Thermo); 倒置光学显微镜

SMZ1500 (Nikon); 立式高速冷冻离心机 CR22GII、大容量冷冻离心机 CR7 (Hitachi); 纯水仪 AcademicQ (Millipore); 制冰机 ICE2 (Scotsman); 高压蒸汽灭菌器 MLS-3780 (Sanyo); 蛋白质纯化仪 Purifier10 (GE); X-射线衍射仪 MicroMax CCD007 (Rigaku); 分析超速离心机 ProteomeLab XL-I-2 (Backman); 蛋白质结晶机器人 Mosquito (TTP Lab Tech); 600 MHz NMR spectrometer (Agilent DD2); ICP-AES (Varian, VISTA-MPX); 分析超速离心机 (Beckman XL-I) 等。

4.1.5 试剂配制

PBS 缓冲液

137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 50 mM Na₂HPO₄, 10 mM KH₂PO₄, pH 值 7.4。

分子筛缓冲液

- (1) LysGH15: 20 mM Tris-HCl (pH 值 7.5), 500 mM NaCl;
- (2) CHAP 和 amidase-2: 20 mM Tris-HCl (pH 值 7.5), 150 mM NaCl;
- (3) SH3b: 40 mM Na₃PO₄, 50 mM NaCl, pH 值 6.5。

培养基

- (1) 普通 M9 培养基: NH₄Cl (1 g), Na₂HPO₄.H₂O (12.8 g), NaCl (0.5 g), KH₂PO₄ (3 g), 定容至 1L 后 120°C 高压蒸汽灭菌 20 min。
- (2) ¹⁵N 和/或 ¹³C 标记用 M9 培养基: 将普通 M9 培养基中的 NH₄Cl 替换为 ¹⁵N 标记的 NH₄Cl, 加入灭菌的 MgSO₄ (1 mM) 和无菌滤膜过滤的 ¹³C 标记葡萄糖 (0.2% M/V)。
- (3) 硒代用 M9 培养基: 在普通 M9 培养基中加入过滤除菌的葡萄糖 (0.2% M/V) 和硒代甲硫氨酸 (25 mg/mL), 以及灭菌的 MgSO₄ (1 mM)。

4.2 方法

4.2.1 全长 LysGH15 蛋白结晶条件的筛选与分析

由于在上一章节表达的具有 N 端 His 标签的 LysGH15 有降解现象, 稳定性达不到结晶的条件, 因此首先构建了具有 C 端 His 的 LysGH15, 稳定性得到了改善; 然后对其结晶条件进行初步的筛选和分析。

LysGH15 的表达与纯化

- (1) 利用引物 lysGH15_fw 和 lysGH15_rev 对 LysGH15 基因进行 PCR 扩增, 反应体系: dNTP (2 mM) 5 μL; 10× KOD buffer 5 μL; MgSO₄ (200 mM) 2.5 μL; 模板 1 μL; 上、下游引物 (20 mM) 各 1 μL; KOD 酶 1 μL; 去离子水 33.5 μL。反应条件: 95°C 5 min; 95°C 45 s, 60°C 45 s, 68°C 2 min, 30 个循环; 68°C 10 min; 4°C 保存。电泳后利用切胶

回收试剂盒对目的条带进行回收；

- (2) 对表达载体 pET-26b 和基因片段 *LysGH15* 进行 *NdeI* 和 *XhoI* 的限制性酶切处理，电泳后对目的条带进行切胶回收；
- (3) 对处理好的载体与基因片段进行连接，并转化到 DH5 α 感受态细胞中；
- (4) 对构建好的菌株进行 PCR 鉴定，并进一步进行测序分析；
- (5) 将鉴定正确的表达载体 pET-26b-*LysGH15* 转入 BL21 (DE3) 感受态细胞，然后进行蛋白的诱导 (IPTG 终浓度为 0.2 mM) 和表达；
- (6) 利用 Ni-NTA 对蛋白进行亲和层析纯化：含 20 mM 咪唑与含 50 mM 咪唑的 buffer 分别洗杂蛋白 50 mL，含 500 mM 咪唑的 buffer 洗脱目的蛋白 15 mL；
- (7) 将纯化的 LysGH15 进行浓缩和换 buffer，然后利用分子筛层析获得性质均一的 LysGH15 样品，浓缩后测定蛋白浓度，-80°C 保存备用。

结晶条件的筛选

结晶条件的筛选采用悬滴气相扩散法。将纯化好的 LysGH15 调至浓度为 30 mg/mL、20 mg/mL 和 10 mg/mL，利用 mosquito 晶体筛选机器人进行加样，取 0.2 μ L 的 LysGH15 样品和 0.2 μ L 的结晶筛选池液在薄膜上进行混合，贴到加有 100 μ L 对应池液的 96 孔晶体筛选板上，形成蒸汽扩散的微环境。将处理好的晶体筛选板静置在 16°C 恒温室内，等待晶体的生成。

LysGH15 的 SAXS 分析

将 LysGH15 的浓度调至 9 mg/mL、5 mg/mL 和 2.5 mg/mL，溶解 buffer 为 20 mM Tris，500 mM NaCl，5% Glycerin，pH 值 7.5。样品寄送到美国洛伦兹伯克利国家实验室，利用 SIBYLS 光束进行 SAXS 数据收集。对三个浓度的蛋白在 10°C 条件下进行 0.5 s，1 s 和 6 s 测定。在 0.01 到 0.3 \AA -1 范围内对 Q 值 ($Q = 4\pi\sin\theta/\lambda$, 2θ 为散射角) 进行散射强度 $I(Q)$ 测定。将每个样品的检测值进行平均，并减去 buffer 的底色值，从而得到散射曲线。然后对不同浓度所得到的多条曲线进行分析和平均，产生平均的散射曲线。应用 Guinier plot analysis 中的 PRIMUS 软件对最初的 R_g 值进行分析^[223]。利用 GNOM 程序对 $P(r)$ 分布函数进行计算^[224]。通过在网站 <http://www.if.sc.usp.br/~saxs/saxsmow.html> 分析分布函数 $P(r)$ 直接获得被测样品中蛋白的分子量^[225]。应用 GASBOR 对 $P(r)$ 分布曲线进行分析，获得低分辨率的分子模型。

4.2.2 CHAP 片段的结构解析

单独对 CHAP 片段进行了构建，获得了性质稳定的 CHAP 蛋白，并筛选和优化该片段结晶的条件，由于 CHAP 片段序列与 PDB 数据库中已有结构的同源性太低 (< 30 %)，因

此为了获得相位，对 CHAP 进行了硒代与结晶，最后通过晶体的 X 射线衍射对其三维结构进行了解析。

CHAP 片段的表达与纯化

(1) 利用引物 CHAP_fw 和 CHAP_rv 对 *CHAP* 基因进行 PCR 扩增，反应体系：dNTP (2 mM) 5 μL; 10× KOD buffer 5 μL; MgSO₄ (200 mM) 2.5 μL; 模板 1 μL; 上、下游引物 (20 mM) 各 1 μL; KOD 酶 1 μL; 去离子水 33.5 μL。反应条件：95°C 5 min; 95°C 45 s, 60°C 45 s, 68°C 1 min, 30 个循环；68°C 10 min; 4°C 保存。电泳后利用切胶回收试剂盒对目的条带进行回收；

(2) 对表达载体 pMCSG7 的 LIC 线性化处理：1 μL *SspI* 酶；200 ng 载体；4 μL 10× buffer；1 μL dGTP (100 mM)；2 μL DTT (100 mM)，加去离子水至 40 μL。对基因片段 *CHAP* 进行 LIC 处理：200 ng PCR 反应产物；4 μL 10× buffer；1 μL dCTP (100 mM)；2 μL DTT；1 μL T4 酶，加去离子水至 40 μL。混匀后 37°C 作用过夜，将反应产物进行电泳，回收目的片段；

(3) 对处理好的载体与基因片段进行连接：将 1 μL LIC 处理的 pMCSG7 载体和 4 μL LIC 处理的 *CHAP* 基因片段混匀，置于室温反应 30 min。然后将连接产物转化到 DH5α 感受态细胞中；

(4) 对构建好的菌株进行 PCR 鉴定，并进一步进行测序分析；

(5) 将鉴定正确的表达载体 pMCSG7-CHAP 转入 BL21 (DE3) 感受态细胞，然后进行蛋白的诱导 (IPTG 终浓度为 0.2 mM) 和表达；

(6) 利用 Ni-NTA 对蛋白进行亲和层析纯化：含 20 mM 咪唑与含 50 mM 咪唑的 buffer 分别洗杂蛋白 50 mL，含 500 mM 咪唑的 buffer 洗脱目的蛋白 15 mL，将纯化的 CHAP 进行浓缩和换 buffer 除去咪唑，加入 TEV 酶，在 16°C 酶切过夜，然后过二次 Ni 柱、收集流穿液；

(7) 对切去标签的 CHAP 蛋白进行浓缩，然后利用分子筛层析获得性质均一的蛋白样品，浓缩后测定蛋白浓度，-80°C 保存备用。

CHAP 片段的 AUC 分析

将 CHAP 蛋白样品的 OD₂₈₀ 调至 0.75，buffer 为 20 mM Tris 和 150 mM NaCl (pH 值为 7.5)。取该样品及相应的 buffer 400 μL 分别加入石英杯的两个加样槽中，用 An-60 Ti 转子进行分析超速离心，在 20°C 262,000 ×g 转速下收集样品的 280 nm 吸收值。将收取的数据利用 SEDFIT 软件进行处理和分析。

CHAP 片段结晶条件的筛选

结晶条件的筛选采用悬滴气相扩散法。方法同 LysGH15 蛋白晶体的筛选。

CHAP 片段结晶条件的优化

利用 Grid Screen 方法对初筛结晶的条件进行优化。同时梯度式的设置二个成分的浓度（一般对 pH 值和沉淀剂的浓度进行梯度配制），固定其它的成分，在二维矩阵中对结晶条件进行优化，同时将蛋白调至不同的浓度，从而优化出最适的蛋白晶体。

CHAP 片段 native 晶体的数据收集与分析

将优化好的蛋白晶体快速利用液氮进行冻存，并保存于液氮中。在上海 BL17U1 线站利用 ADSC Q315 CCD 探测器在 100 K 条件下对冷冻晶体进行 X-射线衍射，调节晶体的位置以及与光源的距离，以获得最佳的衍射数据。利用 χ^2 DF 软件确定正确的空间群，借助 HKL2000 软件对原始数据进行指数确认、集成和规整。

硒代- (Se-) CHAP 片段的纯化与结晶

将含有质粒 pMCSG7-CHAP 的表达菌株接种到 5 mL 试管中，然后转接到 300 mL M9 培养基中，培养至对数生长期后，取 50 mL 转入 500 mL M9 培养基中加入 $MgSO_4$ 和葡萄糖，37°C 培养到对数生长期后加入硒代甲硫氨酸（50 $\mu g/mL$ ），再培养 1 h 后放置于 4°C 冷藏室内冷却，然后加入 IPTG，在 16°C 进行诱导。

蛋白的纯化与 native CHAP 纯化操作一致。Se-CHAP 蛋白的最佳结晶条件在 native CHAP 蛋白优化的结晶条件基础上进一步进行 Grid Screen 优化。

Se-CHAP 晶体的数据收集与结构解析

Se-CHAP 数据的收集与 native 晶体一致。通过 Se-SAD 方法对收集的数据进行处理，利用 Se 的信号确定晶体的相位，从而解析 Se-CHAP 的结构，将 native CHAP 的数据利用分子置换法从而获得 CHAP 的 native 三维结构。

4.2.3 amidase-2 片段的结构解析

单独对 amidase-2 片段进行了构建，获得了性质稳定的 amidase-2 蛋白，并筛选和优化该片段结晶的条件，该片段序列与 PDB 数据库中已有结构的同源性低（< 30 %），因此通过将 amidase-2 晶体浸泡重原子的方法获得了空间相位，从而解析了其三维结构。

amidase-2 的表达与纯化

该部分操作与 CHAP 片段的表达与纯化相似：

- (1) 利用引物 amidase-2_fw 和 amidase-2_rv 对 *amidase-2* 基因进行 PCR 扩增，反应体系和反应条件与 CHAP 的一样。电泳后利用切胶回收试剂盒对目的条带进行回收；
- (2) 对 *amidase-2* 基因进行 LIC 处理（操作见 *CHAP* 基因）；
- (3) 对线性化处理好的载体 pMCSG7 与 *amidase-2* 基因片段进行连接，然后将连接产

物转化到 DH5 α 感受态细胞中；

- (4) 对构建好的菌株进行 PCR 鉴定，并进行测序分析；
- (5) 将鉴定正确的表达载体 pMCSG7-amidase-2 转入 BL21 (DE3) 感受态细胞，然后进行蛋白的诱导 (IPTG 终浓度为 0.2 mM) 和表达；
- (6) 利用 Ni-NTA 对蛋白进行亲和层析纯化：含 20 mM 咪唑与含 50 mM 咪唑的 buffer 分别洗杂蛋白，含 500 mM 咪唑的 buffer 洗脱目的蛋白，将纯化的 amidase-2 进行浓缩和换 buffer，加入 TEV 酶，在 16°C 酶切过夜，然后过二次 Ni 柱、收集流穿液；
- (7) 对切去标签的 amidase-2 蛋白进行浓缩，然后利用分子筛层析获得性质均一的蛋白样品，浓缩后测定蛋白浓度，-80°C 保存备用。

amidase-2 的 AUC 分析

将 amidase-2 蛋白样品的 OD₂₈₀ 调至 0.75，buffer 为 20 mM Tris 和 150 mM NaCl (pH 值为 7.5)。取该样品及相应的 buffer 400 μ L 分别加入石英杯的两个加样槽中，用 An-60 Ti 转子进行离心，在 20°C 262,000 $\times g$ 转速下收集样品的 280 nm 吸收值。将收取的数据利用 SEDFIT 软件进行处理和分析。

amidase-2 结晶条件的筛选

结晶条件的筛选采用悬滴气相扩散法。将纯化好的 amidase-2 蛋白调至浓度为 25 mg/mL、18 mg/mL 和 10 mg/mL，利用 mosquito 晶体筛选机器人进行加样，取 0.2 μ L 的蛋白样品和 0.2 μ L 的结晶筛选池液在薄膜上进行混合，贴到加有 100 μ L 对应池液的 96 孔晶体筛选板上，形成蒸汽扩散的微环境。将处理好的晶体筛选板静置在 16°C 恒温室内，等待蛋白晶体的生成。

amidase-2 结晶条件的优化

利用 Grid Screen 方法对初筛结晶的条件进行优化。同时梯度式的设置二个成分的浓度（一般对 pH 值和沉淀剂的浓度拉梯度配制），固定其它的条件，在二维矩阵中对结晶条件进行优化，同时将蛋白调至不同的浓度，从而优化出最适生长 amidase-2 蛋白晶体的条件。将 native 的 amidase-2 晶体浸泡于含有 10 mM KI 的池液中，浸泡 10 min 后取出冻存。

amidase-2 的 native 和泡 KI 晶体的数据收集、分析与结构解析

将优化好的蛋白晶体快速利用液氮进行冻存，并保存于液氮中。在美国洛伦兹伯克利国家实验室 BL5.0.1 线站在 100 K 条件下对冷冻晶体进行 X-射线衍射，调节晶体的位置以及与光源的距离，以获得最佳的衍射数据。利用 X²DF 软件确定正确的空间群，借助 HKL2000 软件对原始数据进行指数确认、集成和规整。通过 I-SAD 方法对收集的泡 KI 的晶体数据进行处理，利用 I 的信号确定相位，从而解析了泡 KI 的 amidase-2 结构，将 native 的 amidase-2

数据利用分子置换法获得 amidase-2 的 native 三维结构。

4.2.4 SH3b 片段的结构解析

对 SH3b 片段进行了构建和表达，由于该片段在液体状态无法获得晶体。因此，该部分实验通过核磁共振方法对 SH3b 片段的结构进行了解析。

SH3b 片段的表达与纯化

(1) 利用引物 SH3b_fw 和 SH3b_rv 对 *SH3b* 基因进行 PCR 扩增，PCR 反应体系和反应条件与 CHAP 的反应条件相似。电泳后利用切胶回收试剂盒对目的条带进行回收；

(2) 对 *SH3b* 基因进行 LIC 处理（操作见 *CHAP* 基因的处理）；

(3) 对线性化处理好的载体 pMCSG7 与 *SH3b* 基因片段进行连接，然后将连接产物转化到 DH5 α 感受态细胞中；

(4) 对构建好的菌株进行 PCR 鉴定，并进一步进行测序分析；

(5) 将鉴定正确的表达载体 pMCSG7-SH3b 转入 BL21 (DE3) 感受态细胞，在 ^{15}N 和/或 ^{13}C 标记用的 M9 培养基中进行蛋白的诱导 (IPTG 终浓度为 0.2 mM) 和表达；

(6) 利用 Ni-NTA 对蛋白进行亲和层析纯化：含 20 mM 咪唑与含 50 mM 咪唑的 buffer 分别洗杂蛋白，含 500 mM 咪唑的 buffer 洗脱目的蛋白，将纯化的 SH3b 进行浓缩和换 buffer，加入 TEV 酶，在 16°C 酶切过夜，然后过二次 Ni 柱、收集流穿液；

(7) 对切去标签的 SH3b 蛋白进行浓缩，然后利用分子筛层析获得性质均一的蛋白样品，浓缩后测定蛋白浓度，-80°C 保存备用。

SH3b 片段的 AUC 分析

将 SH3b 蛋白样品的 OD₂₈₀ 调至 0.75，buffer 为 40 mM Na₃PO₄, 50 mM NaCl, pH 值 6.5。取该样品及相应的 buffer 400 μL 分别加入石英杯的两个加样槽中，用 An-60 Ti 转子进行离心，在 262,000 × g 转速下收集样品在 280 nm 的吸收值。将收取的数据利用 SEDFIT 软件进行处理和分析。

^{15}N 标记 SH3b 的初步 NMR 分析

将 ^{15}N 标记的 SH3b 每隔 4 d 在 Agilent DD2 600MHz NMR 测定仪上 (Z-gradient triple-resonance cryoprobe) 以 298 K 条件测定一次 ^1H 谱^[226]，之后测定一个 2D ^1H - ^{15}N HSQC (20 min)，通过获得的图谱确定 SH3b 是否适合核磁共振的数据收集。

^{15}N 与 ^{13}C 标记 SH3b 的 NMR 数据收集

在 ^{15}N 和 ^{13}C 双标记的 SH3b 蛋白样品中添加内标 DSS (0.01%)。解析结构所需要收集的数据包括（实验时间以 1 mM 左右的蛋白浓度计算）：

—维 ^1H 谱 (Presat 或 3919 压制水峰)

2D ^1H - ^{15}N HSQC 实验时间 ~20 min
2D ^1H - ^{13}C HSQC (脂肪区) 实验时间 ~20 min
2D ^1H - ^{13}C HSQC (芳香区) 实验时间 ~10 min
3D ^1H - ^{13}C NOESY-HSQC (脂肪区) 实验时间 1.5~2 d
3D ^1H - ^{13}C NOESY-HSQC (芳香区) 实验时间 1 d
3D ^1H - ^{15}N NOESY-HSQC 实验时间 1.5~2 d
3D HNCACB 实验时间 1 d
3D CBCA(CO)NH 实验时间 1 d
3D HNCA 实验时间 6 h
3D HN(CA)CO 实验时间 1~2 d
3D HBHA(CO)NH 实验时间 1 d
3D HBHANH 实验时间 1 d
3D CCH-TOCSY 实验时间 1~2 d
3D HCCH-TOCSY 实验时间 1~2 d

SH3b 片段的结构解析

所有的数据均用 NMRPipe^[227]和 NMRViewJ^[228]进行处理。质子的化学位移参考内部的 DSS 信息，而 ^{15}N 和 ^{13}C 化学位移可以直接应用。利用 CYANA 程序进行初步计算从而获得 SH3b 的结构^[229]，然后应用 CNS 程序^[230]通过手动分配以及利用 SANE 程序^[231]通过半自动的 NOE 分配对结构进行 refine，在结构 refine 中要纳入应用 TALOS-N^[232]确定的主要二面角约束力和依据常规的二级结构模式获得的氢键约束力。在 100 个初始 SH3b 结构中选取 50 个能量最低的结构应用 CNS 和 RECOORDScript^[233]进行加水 refine，然后选择 20 个能量最低的结构通过整合表示 SH3b 的最终结构。结构的质量应用 MOLMOL^[234] 和 PROCHECK-NMR^[235]进行分析。

4.3 结果

4.3.1 LysGH15 结晶条件的筛选与分析

LysGH15 的表达与纯化

成功构建了表达载体 pET-26b-LysGH15，并通过 PCR 和测序进行了确证，将该表达载体转化到表达菌株 BL21 (DE3) 中。对带 C 端 His 的 LysGH15 进行诱导和表达，确定为可溶性表达（见图 4.1）。

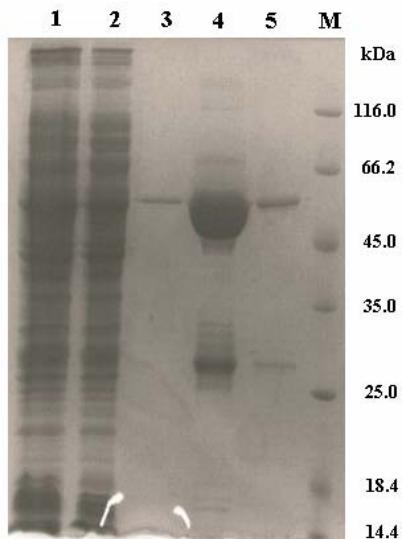


图 4.1 含 C 端 His 标签的 LysGH15 的表达与纯化

Fig 4.1 The expression and purification of LysGH15 with C-His

(1: 诱导表达细菌超声悬液; 2: 诱导表达菌的超声上清; 3: 50 mM 咪唑洗脱液; 4: 500 mM 咪唑洗脱液; 5: 洗脱后的填料; M: marker)

(1: the whole induced bacteria; 2: the supernatant of the induced bacteria; 3: the elution sample using 50 mM imidazole; 4: the elution sample using 500 mM imidazole; 5: the base after eluted using 500 mM imidazole; M: marker)

将纯化的 LysGH15 进行浓缩（所用浓缩管的限流孔径为 30 kDa），然后将 buffer 换为分子筛 buffer，将浓缩的 LysGH15 进行分子筛层析。由图 4.2 中可以看到只有一个 LysGH15 主峰出现，峰形较好、性质均一，收取蛋白峰样品。

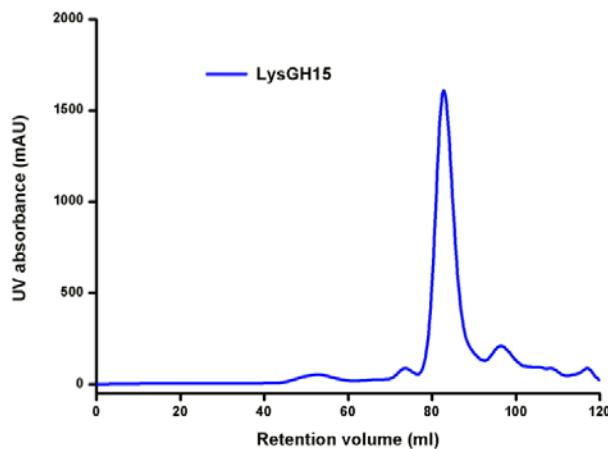


图 4.2 LysGH15 的分子筛层析

Fig 4.2 SEC of the full-length LysGH15

对收集的样品进行 SDS-PAGE 检验（图 4.3），表明收集的 LysGH15 纯度良好。

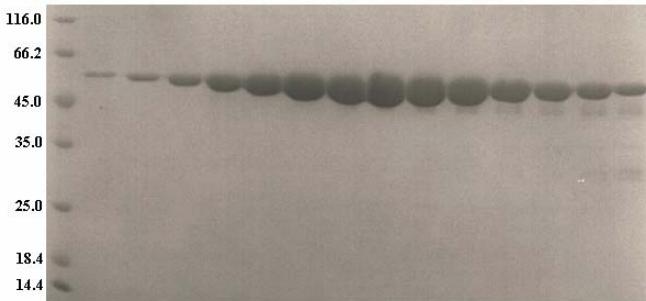


图 4.3 分子筛收集样品的 SDS-PAGE 分析

Fig 4.3 The SDS-PAGE analysis of samples collected during SEC

将收集的 LysGH15 除去后面三管后进行浓缩，测定蛋白浓度，放于-80°C 保存、备用。

结晶条件的筛选

利用悬滴气相扩散法对 LysGH15 (30 mg/mL、20 mg/mL 和 10 mg/mL) 的结晶条件进行了初步筛选。但是经过长时间的观察都没有发现晶体长出。为了分析 LysGH15 不结晶的原因，下一步对其在溶液中的表面构象进行了 SAXS 分析。

LysGH15 的 SAXS 分析

在美国洛伦兹伯克利国家实验室收集了 LysGH15 的 SAXS 数据之后，对该数据进行了分析。并获得了 LysGH15 在溶液中的表面构象。

由图 4.4 中可以看出，LysGH15 在溶液中呈 V 字型，可以清晰的看到三个相互独立的球形 domains 由两个长的 linkers 串联起来，表现出很大的柔性。理论上来说，这种形态的蛋白无法获得晶体。因此后续将对三个 domains 分别进行结构解析。

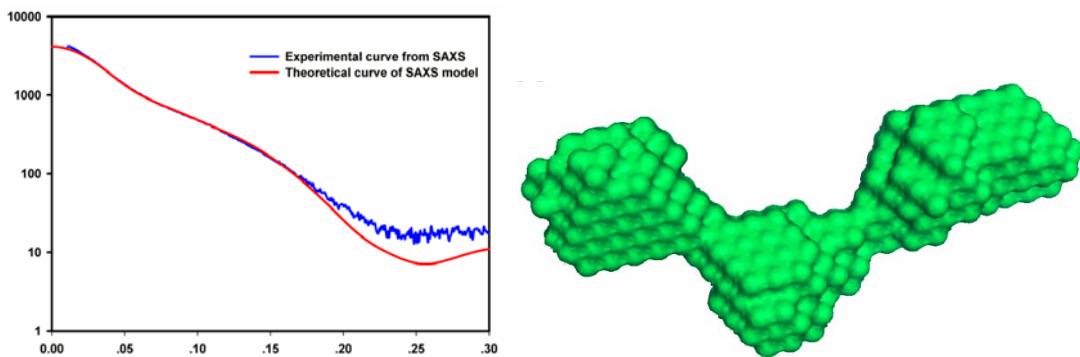


图 4.4 LysGH15 的 SAXS 分析

Fig 4.4 The SAXS analysis of C-His-LysGH15

(左图：理论曲线与实验曲线拟合；右图：C-His-LysGH15 在溶液状态下的表面构象)

(Left: the fitting curve of theoretical and experimental curves; right: the model of LysGH15)

4.3.2 CHAP 片段的结构解析

成功的表达了性质稳定的 CHAP (1-165 aa, 见图 4.5) 片段，并筛选和优化到了该片段结晶的条件，然后通过 Se-CHAP 的结晶与数据收集、分析获得了晶体相位，成功解析了 CHAP 片段的三维结构。

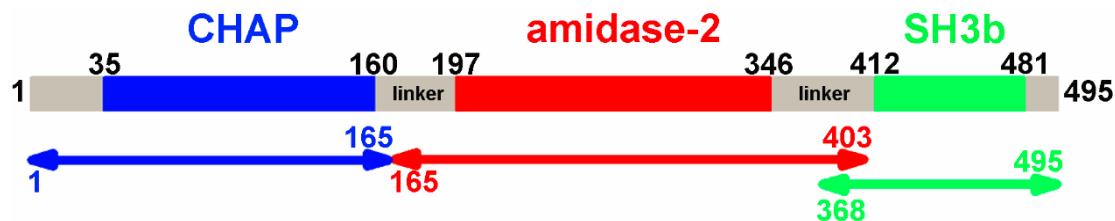


图 4.5 LysGH15 的结构示意图

Fig 4.5 Domain organization of LysGH15

CHAP 片段的表达与纯化

利用 PCR 对 *CHAP* 基因进行了扩增，成功构建了 pMCSG7-CHAP 表达载体，并转入了 BL21 表达菌株。通过诱导表达和纯化获得了不含标签的 CHAP 蛋白（图 4.6）。

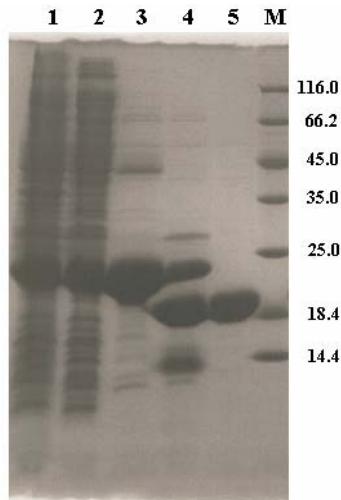


图 4.6 CHAP 片段的表达与纯化

Fig 4.6 The expression and purification of LysGH15 CHAP domain

(1: 诱导表达细菌超声悬液; 2: 诱导表达菌的超声上清; 3: 500 mM 咪唑洗脱蛋白液; 4: 对纯化的蛋白进行 TEV 酶切的产物; 5: 过二次镍柱后得到的无标签 CHAP 蛋白; M: marker)

(1: the whole induced bacteria; 2: the supernatant of the induced bacteria; 3: the elution sample using 500 mM imidazole; 4: the sample of CHAP cut by TEV; 5: the CHAP domain without His tag; M: marker)

然后将 CHAP 蛋白进行分子筛层析，由图 4.7 中可以看出只有 CHAP 蛋白的主峰出现，

出峰位置表明该分子约 18 kDa。

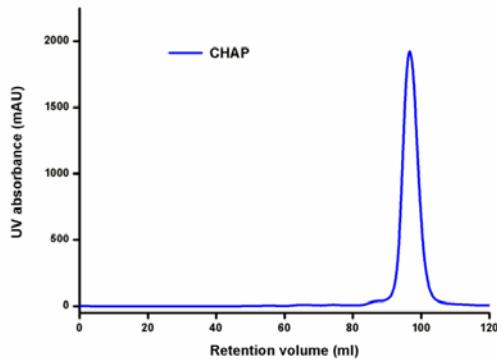


图 4.7 CHAP 片段的分子筛层析

Fig 4.7 SEC of the CHAP domain

SDS-PAGE (图 4.8) 表明收集的蛋白样品纯度很好，浓缩后测定蛋白浓度，-80°C 保存备用。

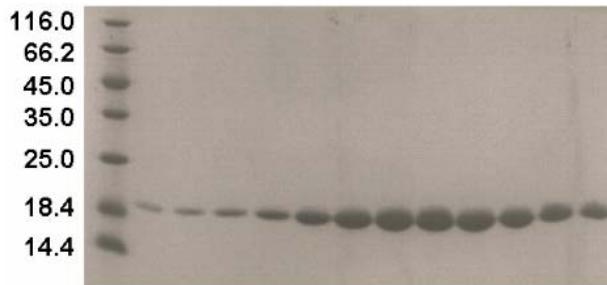


图 4.8 CHAP 片段过分子筛收集样品的 SDS-PAGE 分析

Fig 4.8 The SDS-PAGE analysis of samples collected during SEC of the CHAP domain

CHAP 片段的 AUC 分析

CHAP 片段的分析超离结果表明 (图 4.9)，该片段在 buffer 为 20 mM Tris 和 150 mM NaCl (pH 值为 7.5) 条件下为单体形式，分子量大小约为 18 kDa，与分子筛的结果一致。

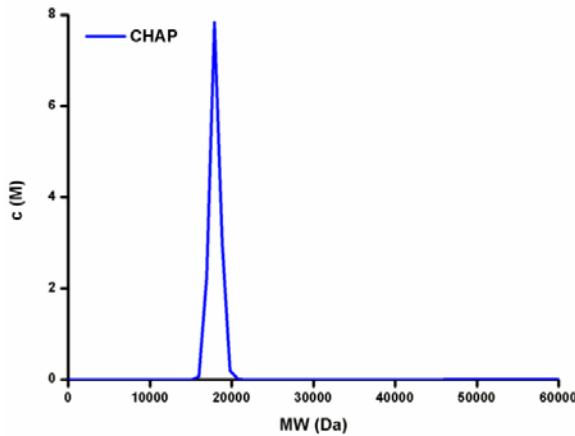


图 4.9 CHAP 片段的分析超速离心

Fig 4.9 AUC of the CHAP domain

CHAP 片段结晶条件的筛选

通过悬滴气相扩散法对 CHAP 片段的结晶条件进行的初步筛选，该蛋白在 16°C 恒温室内放置 2 周可以长出小的六棱柱状晶体(见图 4.10)，池液条件为：0.1 M Bis-Tris-propane，pH 值 7.0 和 3.5 M 甲酸钠，蛋白浓度为 10~20 mg/mL。但是晶体个体太小，很难用 loop 捞起，需要进行进一步的结晶条件优化。

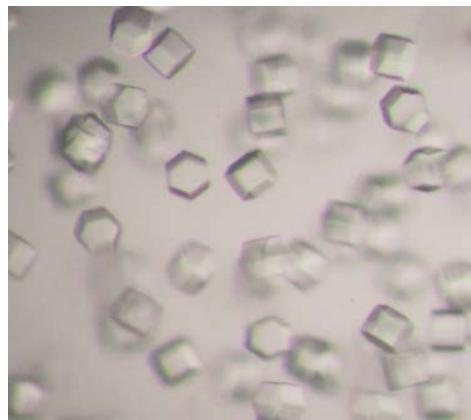


图 4.10 初筛的 CHAP 片段蛋白晶体

Fig 4.10 The preliminary screening crystal of the native CHAP domain

CHAP 片段结晶条件的优化

利用 Grid Screen 方法，对初筛的结晶条件中 Bis-Tris-propane 的 pH 值和甲酸钠的浓度设置梯度，并且将蛋白浓度设定梯度，结果发现 CHAP 蛋白结晶的最佳条件为 0.1 M Bis-Tris-propane，pH 值 7.5 和 3.8 M 甲酸钠，蛋白浓度为 10~15 mg/mL，所需时间为 2 周。在该条件下长出的晶体大小适中（图 4.11），优于初筛时的晶体状态，将优化好的蛋白晶体快速利用液氮进行冻存，并保存于液氮中。

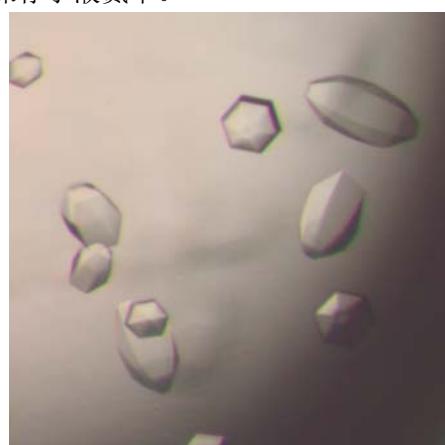


图 4.11 优化的 CHAP 片段蛋白晶体

Fig 4.11 The optimization crystal of the native CHAP domain

CHAP 片段 native 晶体的数据收集与分析

将冻存的晶体在生物物理研究所的 CCD 进行了初步测试,该晶体的衍射分辨率可以达到 3 Å。把晶体运送到上海光源所,用 BL17U1 线站的 ADSC Q315 CCD 探测器在 100 K 条件下对冷冻晶体进行 X-射线衍射,发现该晶体分辨率能达到 2.7 Å,为单晶,收取了 310 张衍射图(图 4.12)。利用 X²DF 软件确定其空间群为 $P6_222$,并通过 HKL2000 软件对原始数据进行分析。但是由于无法通过分子置换的方法解析结构,所以通过这套数据无法解析 CHAP 的结构。



图 4.12 CHAP 片段晶体的 X-射线衍射

Fig 4.12 The diffraction of the crystal of native CHAP domain

Se-CHAP 蛋白的结晶、数据收集与结构解析

通过硒代实验,获得了含有 Se 代甲硫氨酸的 CHAP 蛋白。由于 CHAP 序列中只有两个甲硫氨酸,所以预期 Se-CHAP 与 native CHAP 蛋白的性质应该很相似,所以参考 native CHAP 结晶条件同样获得了 Se-CHAP 的晶体(图 4.13)。在上海光源的同步辐射收取了 Se-CHAP 晶体的数据。利用硒的单波长反常散射信号(Se-SAD),解析了 Se-CHAP 的结构。

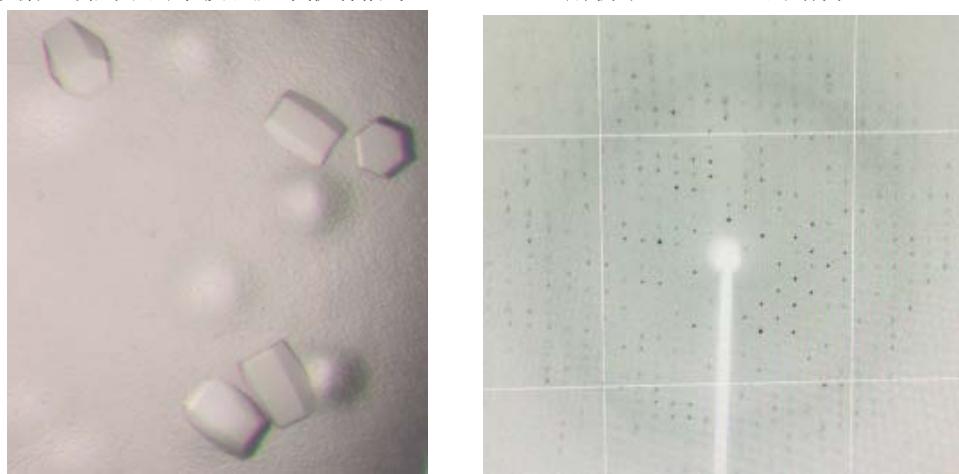


图 4.13 Se-CHAP 片段的蛋白晶体(左图)及其衍射(右图)

Fig 4.13 The crystal of Se-CHAP domain and its diffraction in X-ray

CHAP 片段三维结构的解析和优化

利用分子置换法获得了 native CHAP 蛋白的结构，通过精细的优化，使该结构各方面的参数都达到了良好的标准 ($R_{\text{work}} = 17.37\%$, $R_{\text{free}} = 20.39\%$)，见表 4.1。将该结构提交到 PDB，获得的 PDB 收录号为 4OLK。

表 4.1 CHAP 蛋白晶体的 X-射线衍射数据收集以及 refine 处理

Table 4.1 Data collection and refinement statistics of the CHAP crystal

Parameter	CHAP (Se-Met)	CHAP (Native)
PDB ID		4OLK
X-ray source	SSRF	SSRF
Crystal to detector distance (mm)	330	380
Number of images	360	310
Oscillation width (°)	0.5	0.5
Wavelength (Å)	0.98	0.98
Space group	$P6_{\text{2}}22$	$P6_{\text{2}}22$
a, c (Å)	113.40, 177.92	113.32, 178.50
Mosaicity (°)	0.47	0.45
No. of protein molecules/ASU	2	2
No. of phasing sites (selenium) /ASU	4	
No. of phasing sites (iodide) /ASU		
Resolution range (Å)	50.00-2.80 (2.90-2.80)	50.00-2.80 (2.90-2.80)
Rsym (%) cif	13.4 (49.9)	9.3 (40.4)
Mean I/ σ (I) cif	44 (11)	37.70 (11.91)
Completeness (%) cif	100 (100)	99.7 (100)
Redundancy	11.0 (10.9)	18 (18.6)
Refinement		
Resolution (Å)		47.85-2.69
No. of reflections		18004
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}} (\%)$		17.37/20.39
No. of atoms		2804
No. of protein atoms		2627
No. of ligand atoms		21
No. of waters		156
Wilson B (Å ²)		41.45
Mean B (Å ²)		—
R.M.S. deviations		
Bond lengths (Å)		0.011
Bond angles (°)		0.838
Ramachandran analysis		
Favored region (%)		96.92
Allowed region (%)		3.08
Outliers (%)		0.00

The numbers in parentheses represent values for the highest resolution shell.

每个不对称单元由两个分子的 CHAP 组成，中间由一个分子的 Bis-Tris-propane 介导形成二聚，在溶液状态下不具有这种现象。每一个 CHAP 分子的结构包含 1~164 范围的氨基酸，由 3 个 α -螺旋，6 个 β -折叠和一个 Ca^{2+} 组成(如图 4.14, 左)。 Ca^{2+} 的存在同时利用 ICP-AES 进行了确证。对结构进行优化后确定结合 Ca^{2+} 的位点由 $\alpha2$ 及其后面的 loop 组成，该位点由 5 个氨基酸结合一个钙离子，分别为：D45、D47、Y49、H51 和 D56，这五个位点与 Ca^{2+} 之间的距离分别为 2.36 Å、2.37 Å、2.13 Å、2.32 Å 和 2.27 Å。由 CHAP 的表面结构可以看

到一个明显的沟槽结构（图 4.14，右），而 Ca^{2+} 则埋于沟槽的上面。

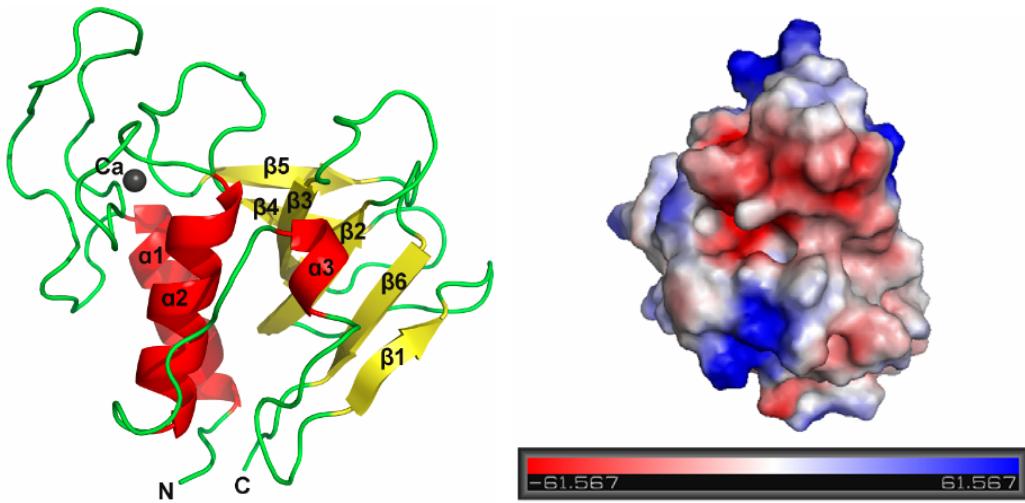


图 4.14 CHAP 片段的三维结构（左图）及其表面电荷分布（右图）

Fig 4.14 The 3D structure of the CHAP domain (left) and its surface charge distribution (right)

4.3.3 amidase-2 片段的结构解析

获得了性质稳定的 amidase-2 片段（见图 4.5），通过结晶条件的筛选和优化得到了该蛋白的最佳结晶条件，将 amidase-2 的蛋白晶体浸泡重原子，收取数据获得了晶体的相位，成功解析了其三维结构。

amidase-2 的表达与纯化

成功构建了 pMCSG7-amidase-2 表达菌株，通过诱导表达和纯化获得了可溶表达、性质稳定的 amidase-2 蛋白（图 4.15）。

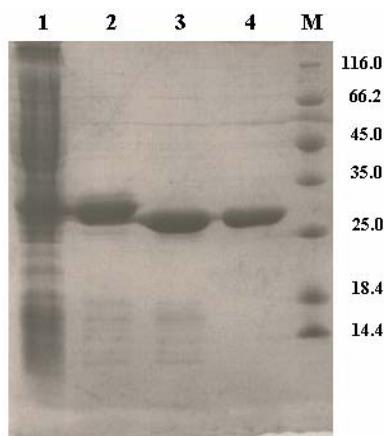


图 4.15 amidase-2 片段的表达与纯化

Fig 4.15 The expression and purification of LysGH15 amidase-2 domain

(1: 诱导表达菌的超声上清; 2: 500 mM 咪唑洗脱液; 3: 对纯化的蛋白进行 TEV 酶切的产物; 4: 过二次镍柱后得到的无标签 amidase-2 蛋白; M: marker)

(1: the supernatant of the induced bacteria; 2: the elution sample using 500 mM imidazole; 3: the sample of CHAP cut by TEV; 4: the CHAP domain without His tag; M: marker)

将纯化的 amidase-2 蛋白进行浓缩、过分子筛，只出现了一个主峰（图 4.16），且出峰位置表明其大小约为 28 kDa。

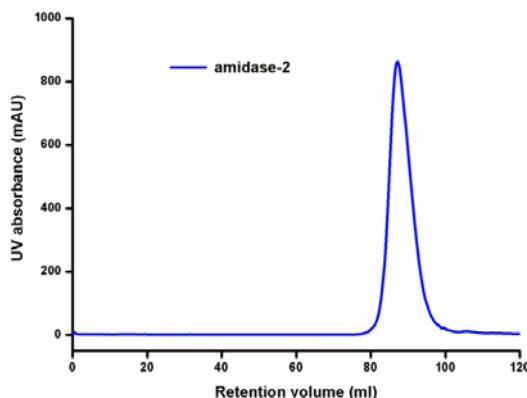


图 4.16 amidase-2 片段的分子筛层析

Fig 4.16 SEC of the amidase-2 domain

将主峰的样品收集，进行 SDS-PAGE 分析，图 4.17 表明样品的纯度良好，分子大小约为 28 kDa。将收集的蛋白样品进行浓缩，测定浓度后，-80°C 冻存。

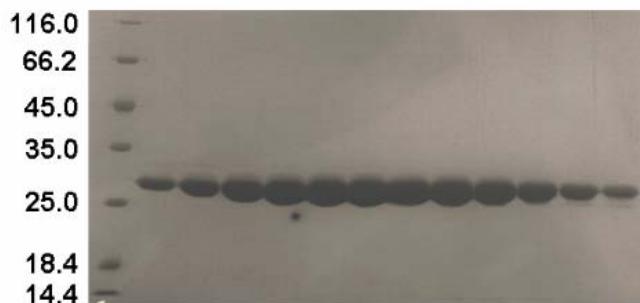


图 4.17 amidase-2 片段过分子筛收集样品的 SDS-PAGE 分析

Fig 4.17 The SDS-PAGE analysis of samples collected during SEC of the amidase-2 domain

amidase-2 的 AUC 分析

将纯化的 amidase-2 蛋白的 OD₂₈₀ 调至 0.75 进行分析超离（图 4.18），表明在 buffer: 20 mM Tris 和 150 mM NaCl (pH 值为 7.5) 条件下 amidase-2 为单体形式存在。

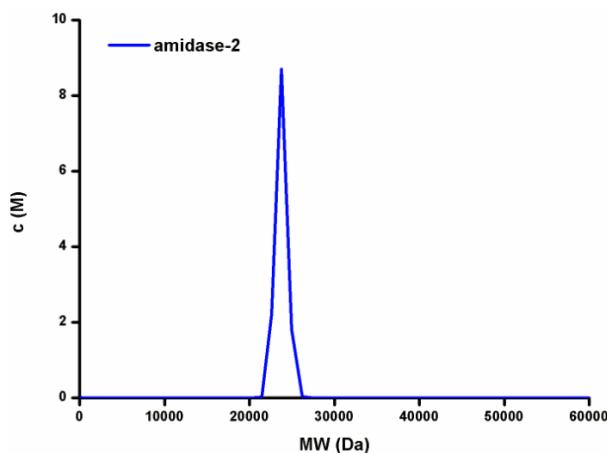


图 4.18 amidase-2 片段的分析超速离心分析

Fig 4.18 AUC analysis of the amidase-2 domain

amidase-2 结晶条件的筛选

利用悬滴气相扩散法对 amidase-2 片段的结晶条件进行初步筛选，该蛋白在 16°C 恒温室内放置 1 周可以长出晶体(图 4.19)，池液条件为：0.1 M Tris-HCl, pH 值 8.5, 0.2 M Li₂SO₄, 30% (wt/vol) PEG 4,000。结晶条件仍需进行进一步的优化。

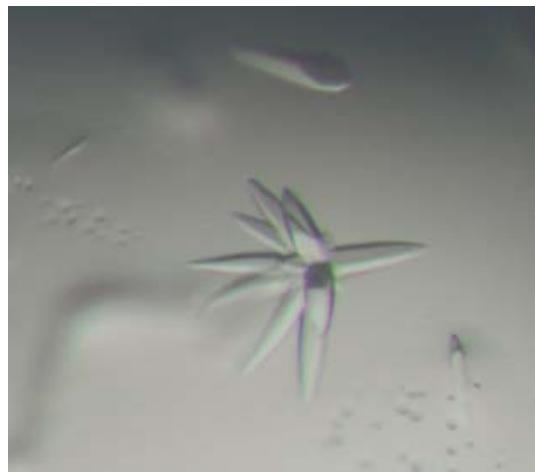


图 4.19 初筛的 amidase-2 片段蛋白晶体

Fig 4.19 The preliminary screening crystal of the native amidase-2 domain

amidase-2 结晶条件的优化

利用 Grid Screen 方法对初筛结晶的条件进一步优化。将结晶条件的 pH 值和沉淀剂 PEG 的种类 (PEG-3000, PEG-4000, PEG-5000) 及浓度进行梯度设置。发现最佳的结晶条件为：0.1 M Tris-HCl, pH 值 9.0, 0.2 M Li₂SO₄, 30% (wt/vol) PEG 3,000。另外进行了 additive 的筛选，发现当加入 0.1 M xylitol 时可以进一步改善和加速 amidase-2 的晶体生成(图 4.20)。

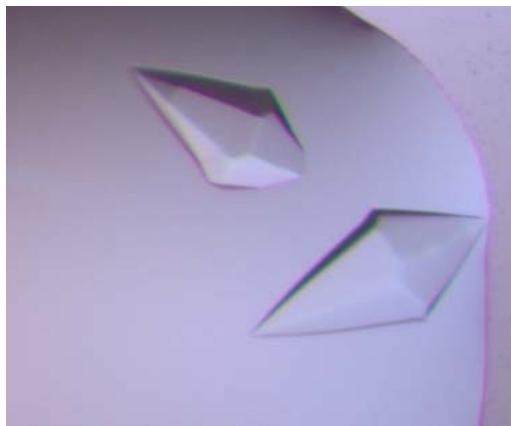


图 4.20 优化的 amidase-2 片段蛋白晶体

Fig 4.20 The optimization crystal of the native amidase-2 domain

amidase-2 的 native 和泡 KI 晶体的数据收集、分析与结构解析

将优化好的 amidase-2 蛋白晶体在含有 10 mM KI 的池液中浸泡 5 min，快速利用液氮进行冻存，并保存于液氮中。在美国洛伦兹伯克利国家实验室 BL5.0.1 线站收集 native 和浸泡 KI 的 amidase-2 晶体的数据（图 4.21），分辨率可以达到 2.3 Å。通过 I-SAD 方法对收集的泡 KI 的数据进行处理，利用 I 的信号确定了相位，从而解析了泡 KI 的 amidase-2 结构，将 native 的 amidase-2 数据利用分子置换法获得了 amidase-2 的 native 三维结构。将该结构提交到 PDB，获得 PDB 号为 4OLS。

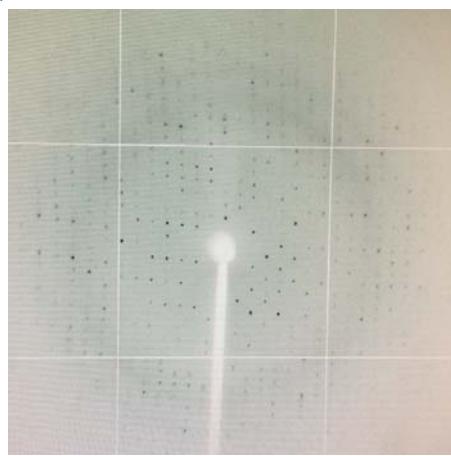


图 4.21 amidase-2 片段晶体的 X-射线衍射

Fig 4.21 The diffraction of the crystal of amidase-2 domain

对 native 的 amidase-2 蛋白的结构进行优化，使该结构各方面的参数都达到了良好的标准 ($R_{work} = 15.76\%$, $R_{free} = 16.08\%$)，见表 4.2。每个不对称单元由 4 个 amidase-2 分子的组成。每一个 amidase-2 分子由 8 个 α -螺旋，5 个 β -折叠和一个 Zn^{2+} 组成（见图 4.22）。 Zn^{2+} 的存在同时利用 ICP-AES 进行了确证。对结构进行优化后确定结合 Zn^{2+} 的位点有 3 个，分别为：H214, H324 和 C332。在结构的表面有一明显的沟槽结构， Zn^{2+} 存在于沟槽中央，

暴露于外面。

表 4.2 amidase-2 蛋白晶体的 X-射线衍射数据收集以及 refine 处理

Table 4.2 Data collection and refinement statistics of the amidase-2 crystal

Parameter	amidase-2 (Iodide)	amidase-2 (Native)
PDB ID		4OLS
X-ray source	APS	SSRF
Crystal to detector distance (mm)	320	340
Number of images	180	570
Oscillation width (°)	1	0.5
Wavelength (Å)	0.97	0.98
Space group	$P6_3$	$P6_3$
a, c (Å)	135.93, 106.79	135.40, 107.07
Mosaicity (°)	0.46	0.62
No. of protein molecules/ASU	4	4
No. of phasing sites (selenium) /ASU		
No. of phasing sites (iodide) /ASU	4	
Resolution range (Å)	50.00-2.20 (2.28-2.10)	50.00-2.10 (2.18-2.10)
Rsym (%) cif	13.7 (46.1)	7.7 (37.4)
Mean I/σ(I) cif	21.37 (4.09)	41.07 (8.7)
Completeness (%) cif	99.0 (91.5)	96.9 (77.4)
Redundancy	9.1 (4.6)	16.1 (11.1)
Refinement		
Resolution (Å)		39.57-2.27
No. of reflections		48572
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$ (%)		15.76/16.08
No. of atoms		6563
No. of protein atoms		5904
No. of ligand atoms		19
No. of waters		640
Wilson B (Å ²)		26.50
Mean B (Å ²)		37.05
R.M.S. deviations		
Bond lengths (Å)		0.009
Bond angles (°)		1.13
Ramachandran analysis		
Favored region (%)		97.00
Allowed region (%)		3.00
Outliers (%)		0.00

The numbers in parentheses represent values for the highest resolution shell.

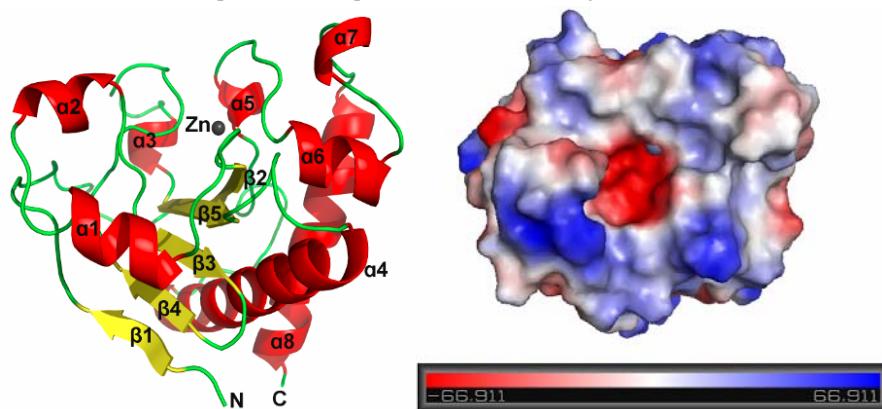


图 4.22 Amidase-2 片段的三维结构（左图）及其表面电荷分布（右图）

Fig 4.22 The amidase-2 3D structure and surface charge distribution

4.3.4 SH3b 片段的结构解析

由于无法获得 SH3b 片段的晶体。因此，该部分实验通过 NMR 方法对 SH3b 片段（见图 4.5）的结构进行了解析，并通过滴定实验确定了该片段与底物相互作用的界面。

SH3b 片段的表达与纯化

成功构建了含有 pMCSG7-SH3b 的表达菌株，利用 ^{15}N 和/或 ^{13}C 标记的 M9 培养基，获得了 native、 ^{15}N 和/或 ^{13}C 标记的 SH3b 蛋白（图 4.23），蛋白稳定性良好。

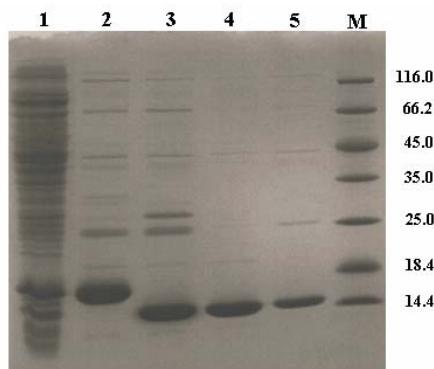


图 4.23 SH3b 片段的表达与纯化。

Fig 4.23 The expression and purification of LysGH15 SH3b domain

(1: 诱导表达菌的超声上清; 2: 500 mM 咪唑洗脱液; 3: 对纯化的蛋白进行 TEV 酶切的产物; 4 和 5: 过二次镍柱后得到的无标签 SH3b 蛋白; M: marker)

(1: the supernatant of the induced bacteria; 2: the elution sample using 500mM imidazole; 3: the sample of CHAP cut by TEV; 4 and 5: the CHAP domain without His tag; M: marker)

将纯化的 SH3b 蛋白进行分子筛层析（图 4.24），由峰形可以看出 SH3b 性质均一，为单体形式存在，大小约 15 kDa。

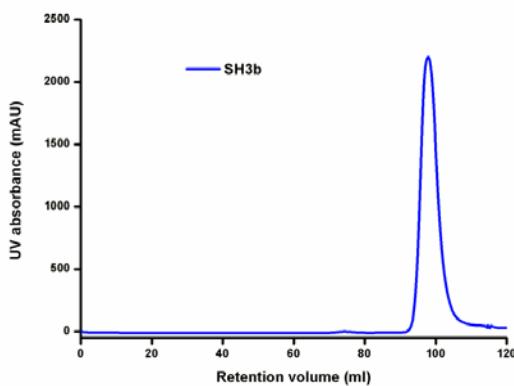


图 4.24 SH3b 片段的分子筛层析

Fig 4.24 SEC of the SH3b domain

将分子筛的主峰收集样品，进行 SDS-PAGE 分析，由图 4.25 可以看出，收集的 SH3b 蛋白样品，纯度良好。

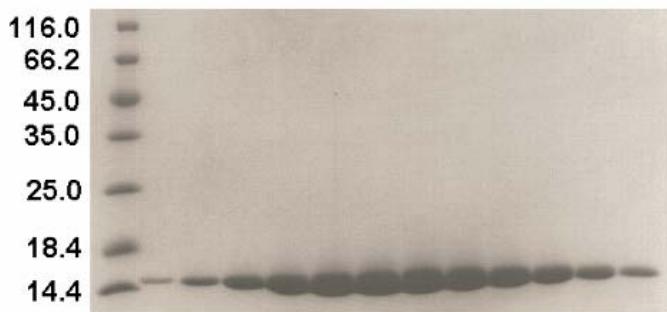


图 4.25 SH3b 片段过分子筛收集样品的 SDS-PAGE 分析

Fig 4.25 The SDS-PAGE analysis of samples collected during SEC of the SH3b domain

SH3b 片段的 AUC 分析

如图 4.26, 分析超离结果表明 SH3b 在 buffer(40 mM Na₃PO₄, 50 mM NaCl, pH 值 6.5) 中呈单体形式存在, 大小与分子筛和 SDS-PAGE 的结果一致。

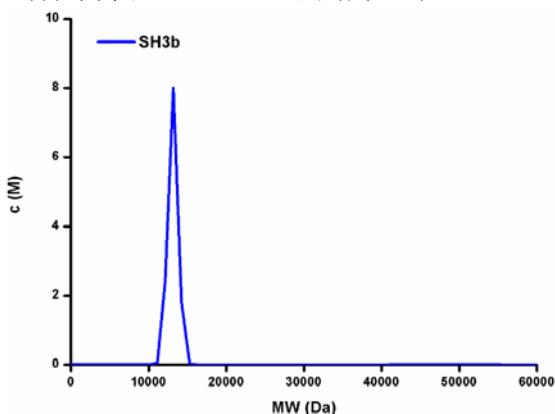


图 4.26 SH3b 片段的分析超速离心分析

Fig 4.26 AUC analysis of the SH3b domain

native 和 ¹⁵N 标记 SH3b 的初步 NMR 分析

为了验证 SH3b 是否符合做 NMR 的条件, 对 native SH3b 进行了一维 ¹H 谱测定, 结果表明各峰值分散良好, 非常适合 NMR。然后每隔 4d 测定一次 ¹H 谱, 结果表明峰形非常稳定, 基本没有明显的变化 (图 4.27), 说明 SH3b 性质稳定, 可以进行下一步实验。

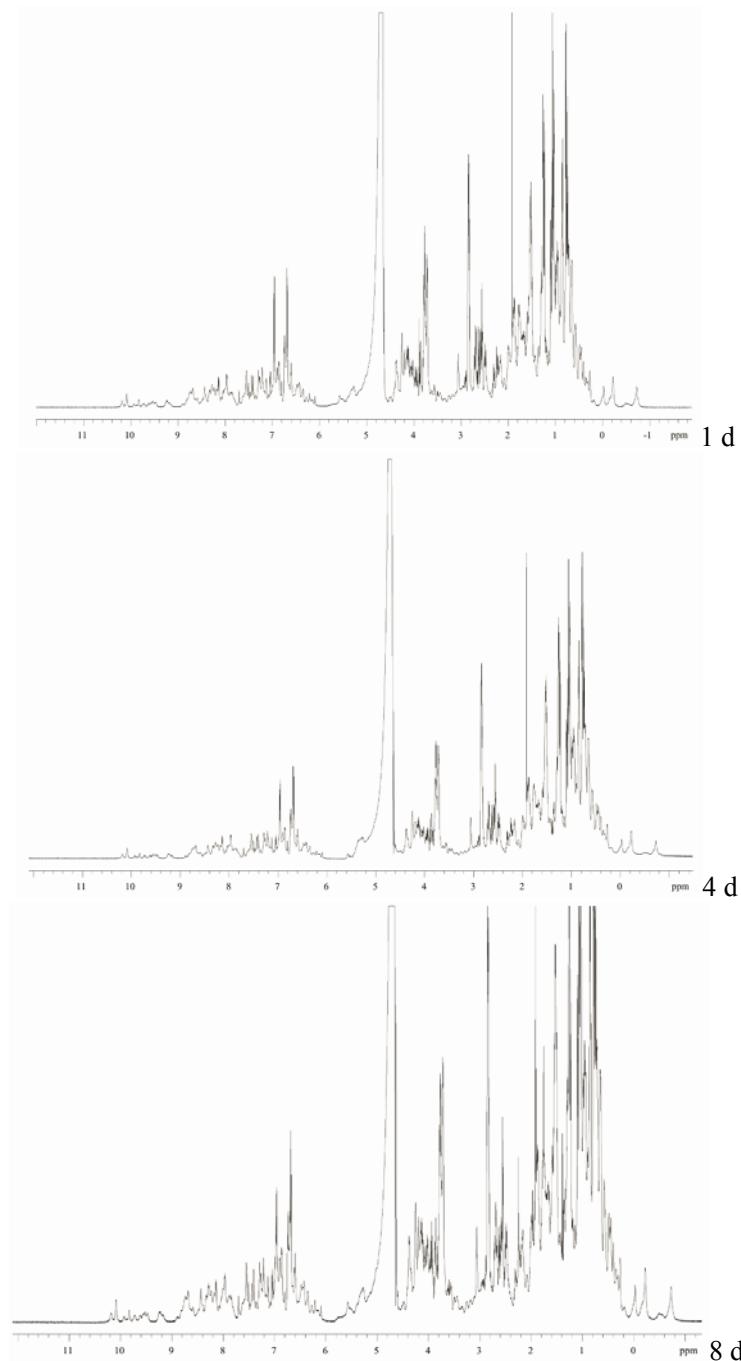


图 4.27 SH3b 样品不同时间的一维 ^1H 谱测定比较

Fig 4.27 The one-dimensional ^1H spectrum of SH3b

对 ^{15}N 标记的 SH3b 进行了二维 ^1H - ^{15}N HSQC 测定($\sim 20\text{min}$), 得到了 SH3b 的二维谱, 见图 4.28, 每个氨基酸位点的图谱分布良好, 符合进一步 NMR 数据收集的要求。

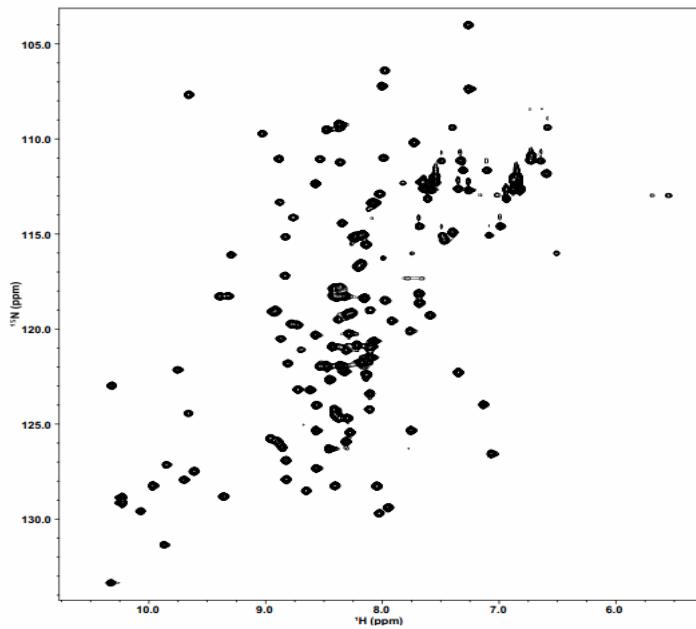


图 4.28 SH3b 的二维谱测定

Fig 4.28 The two-dimensional spectrum of SH3b

^{15}N 与 ^{13}C 标记 SH3b 的 NMR 数据收集

按照前面叙述的方法，对 ^{15}N 和 ^{13}C 双标记的 SH3b 蛋白样品进行了全面的数据收集，期间每隔一周换一次蛋白样品，以防止蛋白样品发生大的变化、保证所收集数据的质量（图 4.29）。

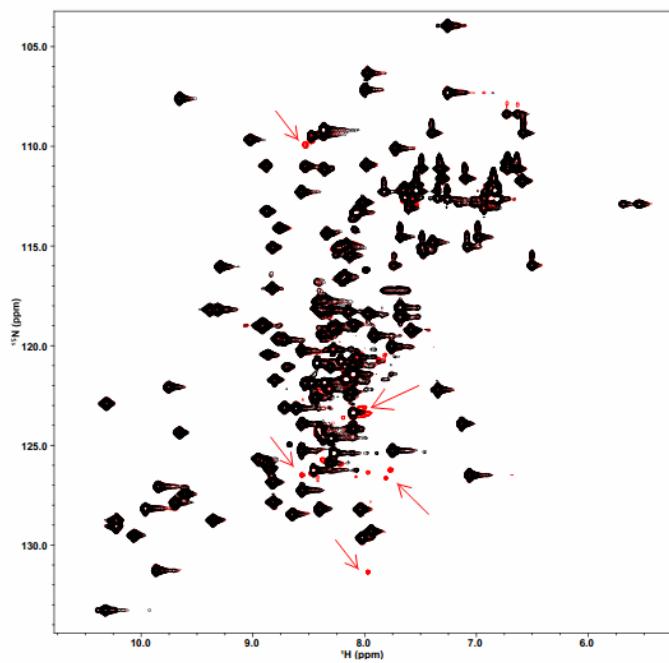


图 4.29 SH3b 样品质量的监测

Fig 4.29 The quality monitoring of SH3b sample

通过数据的整理和分析，成功指认了每个图谱点对应的氨基酸位点，见图 4.30。

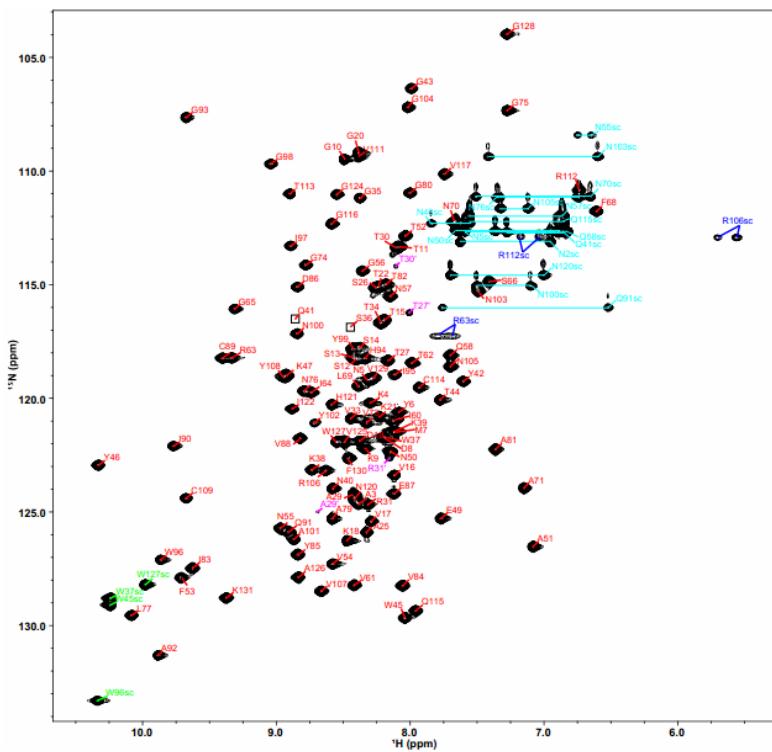


表 4.3 20 个表现最低能量的 SH3b 结构的信息统计

Table 4.3 The experimental restraints and structural statistics for the 20 lowest energy structures of the SH3b domain.

PDB ID	2MK5
BMRB ID	19752
Distance restraints	
Intraresidue	1257
Sequential	807
Medium	284
Long-range	1096
Ambiguous	1297
Total	4741
Hydrogen bond restraints	82
Dihedral angle restraints	
	84
	84
Total	168
Violations	
Max. distance restraint violation (Å)	0.156
Max. dihedral angle restraint violation (°)	4.19
RMSD from the experimental restraints	
Distance restraints (Å)	0.0026 ± 0.0005
Dihedral angle restraints (°)	0.50 ± 0.07
RMSD from the ideal geometry	
Bond lengths (Å)	0.0106 ± 0.0002
Bond angles (°)	1.10 ± 0.03
Improper (°)	1.53 ± 0.08
RMSD from the mean structure (Å)	
Backbone heavy atoms	
All residues*	0.50 ± 0.05
Regular secondary structure**	0.37 ± 0.04
All heavy atoms	
All residues	0.84 ± 0.05
Regular secondary structure	0.71 ± 0.06
PROCHECK statistics (%)	
Most favored regions	92.8
Additional allowed regions	5.5
Generously allowed regions	0.2
Disallowed regions	1.5

*Residues 400-495 are included in the analysis.

**Regular secondary structure regions include residues 402-403, 409-418, 424-428, 439-441, 446-455, 457-464, 470-480, 485-490, and 493-494.

4.4 讨论

到目前为止，关于噬菌体裂解酶体内外活性的研究已有报道，涉及到各个菌属，其中包括金黄色葡萄球菌噬菌体的裂解酶，如 LysK、ClyS、MV-L、LysWMY 和 ΦH5 等。但是至今为止，还未见金黄色葡萄球菌噬菌体裂解酶三维结构的报道。为了填补这块儿空白，也为了揭示 LysGH15 分子作用机制，本章节对其进行了解析。

最初，本研究拟对 LysGH15 全长裂解酶的结构进行解析。虽然获得了全长 LysGH15 蛋白，并且通过在 C 端加 His 标签增强了其稳定性，但是始终无法获得全长 LysGH15 的晶体。

通过 SAXS 分析，获得了全长 LysGH15 在溶液中的表面结构模型，呈“V”字形，由两个长的 linkers 连接三个相对独立排布的近似球形的活性片段组成，具有很大的摆动性，这可以解释为何无法获得 LysGH15 的蛋白晶体。另外，LysK 的研究表明其单独的 CHAP 就具有抑菌活性^[236]，并且已有文献报道单独的 SH3b 片段就具有结合活性^[109]。因此，本研究分别对其三个活性片段进行了结构解析。

由于 LysGH15 的 CHAP 和 amidase-2 两个活性片段与 PDB 数据库中已有的蛋白序列同源性均小于 30%，无法通过简单的分子置换的方法对其结构进行解析。因此，对于 CHAP 片段进行了 Se-CHAP 的表达、结晶和数据收集，并且利用 Se 的反常散射信号解析了其结构。另外，虽然之前的序列分析表明 amidase-2 可以结合一个 Zn^{2+} ，并且在获得的 native 数据中也的确检测到了反常散射信号，但是却无法解析其结构，该现象在之前的报道中也有叙述，具体原因尚不清楚^[237]。因此，对于 amidase-2，利用的是将 native 晶体浸泡重原子的方法，通过 I 的反常散射信号解析了其结构。这两个结构的解析可以为后续具有序列同源性的其它蛋白结构的解析提供 model，可以通过简单的分子置换就可以对结构进行解析。虽然 SH3b 片段与已报道的 ALE-1 的结合区具有 47% 的同源性，足以利用分子置换法进行结构解析，但是 SH3b 始终无法获得蛋白晶体。通过稳定性测定和 NMR 预实验表明 SH3b 片段稳定性很好，适合进行 NMR 实验，因此本章节利用 NMR 方法对其进行了解析，获得了溶液状态下 SH3b 的三维结构，更接近于其天然状态下的结构。

通过该章节的研究，获得了第一例金葡萄噬菌体裂解酶的三维结构，填补了该研究的空白，为其同源蛋白三维结构的解析提供了结构模型，也为后续 LysGH15 分子作用机制的研究提供了重要的结构参考依据。

4.5 小结

- 4.5.1 通过 SAXS 分析获得了 LysGH15 溶液状态下分子表面结构的模型，全长的 LysGH15 摆动性太强，无法获得其蛋白晶体。
- 4.5.2 利用蛋白质晶体衍射和 Se-SAD 方法成功解析了 LysGH15 的 CHAP 片段蛋白质三维结构，该蛋白由 3 个 α -螺旋和 6 个 β -折叠组成，通过 5 个氨基酸位点结合了一个 Ca^{2+} ，该位点位于沟槽结构的旁边并被埋在蛋白的内部。
- 4.5.3 利用蛋白质晶体衍射和 I-SAD 方法成功解析了 LysGH15 的 amidase-2 片段蛋白质三维结构，该结构由 8 个 α -螺旋和 5 个 β -折叠组成，通过三个氨基酸位点结合了一个 Zn^{2+} ，它处于沟槽的中央位置并暴露于表面。
- 4.5.4 利用 NMR 技术成功解析了 SH3b 溶液状态下的三维结构，该片段由 9 个 β 折叠组成。

第五章 裂解酶 LysGH15 作用机制研究

在上一章节，分别利用蛋白质的 X-射线晶体学和 NMR 技术对 LysGH15 的三个活性域进行了三维结构的解析，这为揭示 LysGH15 的作用机制奠定了结构基础。单从结构只能看到蛋白质分子和基团在三维空间中的排列，无法获知具体行使功能和作用的分子和基团。通过对 LysGH15 三个活性域三维结构的观察产生了几点疑问：这三个片段的结构与之前公布的同源蛋白的结构有何异同？在 CHAP 片段中行使功能的关键氨基酸位点有哪些？ Ca^{2+} 是否与 CHAP 活性的发挥有关？ Zn^{2+} 是否与 amidase-2 片段发挥活性有关，其关键的位点有哪些？哪些位点和界面在 SH3b 发挥结合活性中起关键作用？以及这三个片段分别在 LysGH15 发挥高效活性中起多大的作用？

为了回答这几个问题，本章节对 LysGH15 的这三个片段的结构与数据库中已有的结构进行了比对分析；利用位点突变和活性测定确定了 CHAP 和 amidase-2 发挥活性的关键位点；通过 thermal shift、CD、ITC 确定了 Ca^{2+} 对 CHAP 片段生物物理特性的影响，以及二者的亲和力；通过 NMR 滴定实验和突变分析确定了 SH3b 片段中与结合功能有关的关键氨基酸位点；最后通过定点突变，确定了三个片段在 LysGH15 活性的发挥中分别所起的作用。

通过该章节的研究阐明了 LysGH15 的分子作用机制。这不仅填补了金葡萄噬菌体裂解酶作用机制的空白，也为同源裂解酶作用机理的阐明提供参考依据，更丰富了噬菌体裂解酶作用方式多样化的知识。

5.1 材料

5.1.1 主要试剂

KOD-plus DNA 聚合酶（日本 Toyobo 公司）；Ni-NTA（Qiagen）；EDTA、Urea、SDS、Tris、Glycine、IPTG（Amresco）；Ampicillin、Kanamycin（国药集团化学试剂有限公司）；琼脂（BD）；琼脂糖（上海）；Peptone、Yeast Extract（Oxoid）；Imidazole（Apolo）；Superdex-200（GE）；TEV 酶（本实验室制备，表达质粒由美国佐治亚大学提供）；核酸 marker、蛋白质 marker（Takara）；超滤管（Millipore）；质粒小提试剂盒、胶回收试剂盒（Omega）；引物（上海生工）；SYPRO Orange dye（Invitrogen）等。

5.1.2 主要载体与菌株

pET-28a、pET15b（实验室保存）；大肠杆菌 BL21（DE3）感受态细胞、大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞（d 根生化）；CA-MRSA 菌株 USA300-TCH1516（ATCC）；YB57（本实验室

分离)。

5.1.3 引物

LysGH15B-SalI: ACG CGT CGA CAG GTG GAA CTC CCT GAC AAG

LysGH15B-EcoRI: CGG AAT TCT GGA AAA AGA ACC AAT ACG

GFP-SalI: ACG CGT CGA CGG GGG TTC TGT GAG CAA GGG CGA GGA G

GFP-HindIII: CCC AAG CTT GTA CAG CTC GTC CA

LysGH15B-XhoI: CCG CTC GAG TGG AAA AAG AAC CAA TAC G

GFP-BamHI: CGG GAT CCC TAC TTG TAC AGC TCG TCC A

5.1.4 主要仪器

PCR 仪器 (BioRed, gradient-96); 恒温水浴锅 (上海一恒, DK-80); 高压蒸汽灭菌器 MLS-3780 (Sanyo); 卧式电泳仪 (北京六一, DYY-6C); 600 MHz NMR spectrometer (Agilent DD2); 立式电泳仪 (BioRed, Mini4); 凝胶成像系统 (d 能, 1600); 分光光度计 Nanodrop-2000 (Thermo); 超洁净操作台 C1109B、立式恒温摇床 1102C (上海志诚); real-time PCR machine (CFX96, Bio-Rad); 卧式恒温摇床 innova44 (Eppendorf); 超声破碎仪 JY92-IIN (宁波新芝); ICP-AES (Varian, VISTA-MPX); 台式冷冻离心机 Legend RT+、小型冷冻离心机 pico22、小型台式离心机 pico17 (Thermo); 立式高速冷冻离心机 CR22GII、大容量冷冻离心机 CR7 (Hitachi); ITC-200 microcalorimete (GE Healthcare); 纯水仪 AcademicQ (Millipore); 制冰机 ICE2 (Scotsman); 蛋白质纯化仪 Purifier10 (GE); Chirascan CD Spectrometer (Applied Photophysics) 等。

5.1.5 试剂配制

PBS 缓冲液

137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 50 mM Na₂HPO₄, 10 mM KH₂PO₄, pH 值 7.4。

分子筛缓冲液

- (1) LysGH15: 20 mM Tris-HCl (pH 值 7.5), 500 mM NaCl;
- (2) CHAP 和 amidase-2: 20 mM Tris-HCl (pH 值 7.5), 150 mM NaCl;
- (3) SH3b: 40 mM Na₃PO₄, 50 mM NaCl, pH 值 6.5;

5.2 方法

5.2.1 LysGH15 各片段的活性测定

序列比对和预测分析表明, LysGH15 的 CHAP 和 amidase-2 片段为水解 domains, 应该具有水解细胞壁化学键的活性; 而其 SH3b 为结合 domain, 应该具有结合活性。

CHAP 片段和 amidase-2 片段裂解活性测定

将 MRSA 菌株 USA300 培养至对数生长期，用 PBS 进行三次重复清洗，然后将 OD₆₀₀ 调至 1.0 左右作为裂解活性测定的底物，将蛋白与之混匀后作用 120 min，实时记录样品 OD₆₀₀ 的变化。

参考文献的方法制备 USA300 的细胞壁碎片^[232]：将对数生长期的 USA300 进行离心收集菌体，加入 4% (w/v) SDS 煮沸 60 min，然后利用去离子水洗涤三次，加入胰蛋白酶 (0.5 mg/mL) 在 37°C 孵育过夜，然后用去离子水进行洗涤，加入三氯乙酸 (TCA, 10%) 孵育 5 h 消化磷壁酸。将处理好的细胞碎片用 PBS 悬起，将其 OD₅₇₈ 调至 0.6 左右，备用。将待测蛋白与处理好的细胞壁孵育 60 min，实时记录样品 OD₅₇₈ 的变化情况。

SH3b 片段结合活性测定

SH3b 与 GFP 串联表达：

(1) 利用引物 SH3b-SalI 和 SH3b-EcoRI 对 *LysGH15B* 基因进行 PCR 扩增，用 GFP-SalI 和 GFP-HindIII 扩增 *GFP* 基因。反应体系：dNTP (2 mM) 5 μL; 10× KOD buffer 5 μL;

MgSO₄ (200 mM) 2.5 μL; 模板 1 μL; 上下游引物 (20 mM) 各 1 μL; KOD 酶 1 μL; 去离子水 33.5 μL。反应条件：95°C 5 min; 95°C 45 s, 60°C 45 s, 68°C 2 min, 30 个循环；68°C 10 min; 4°C 保存。电泳后利用切胶回收试剂盒对目的条带进行回收；

(2) 对载体 pET-28a 和基因片段 *LysGH15B* 和 *GFP* 进行限制性酶切处理，电泳后对目的条带进行切胶回收；

(3) 对处理好的载体与基因片段进行连接，并转化到 DH5α 感受态细胞中；

(4) 对构建好的菌株进行 PCR 鉴定，并进一步测序分析；

(5) 以构建好的 pET-28a-LysGH15B-GFP 为模板，以引物 LysGH15B-XhoI 和 GFP-BamHI 对 *LysGH15B-GFP* 进行 PCR 扩增，将扩增的产物进行限制性酶切处理，电泳后回收目的片段，并与同样处理的 pET-15b 进行连接和鉴定；

(6) 将鉴定正确的表达载体 pET-15b-LysGH15B-GFP 转入 BL21 (DE3) 感受态细胞，然后进行蛋白的诱导 (IPTG 终浓度为 0.2 mM) 和表达；

(7) 利用 Ni-NTA 对蛋白进行亲和层析纯化：含 20 mM 咪唑与含 50 mM 咪唑的 buffer 分别洗杂蛋白，含 500 mM 咪唑的 buffer 洗脱目的蛋白；

(8) 将纯化的 LysGH15B-GFP 进行浓缩和换 buffer，然后利用分子筛层析获得性质均一的蛋白样品，浓缩后测定蛋白浓度，-80°C 保存备用。

融合蛋白 LysGH15B-GFP 结合活性的测定：

将对数生长期的 YB57 菌株用 PBS 进行洗涤，然后于 37°C 利用 Hoechst No. 33342 荧

光染料进行染色（20 $\mu\text{mol/L}$ ）10 min，用 PBS 对染色的细菌进行五次洗涤，然后将纯化的 LysGH15B-GFP 与处理好的细菌进行 15 min 孵育，之后用 PBS 洗涤五次，最后用 100 μL PBS 悬起用激光共聚焦显微镜进行观察。用 GFP 做同样的处理，作为对照。

5.2.2 CHAP 片段活性关键氨基酸位点测定

CHAP 片段与同源蛋白的结构比对和分析

利用 CLUSTAL W (<http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html>) 在线软件对 CHAP 片段的氨基酸序列与数据库中的蛋白进行比对分析，并运用 ESPript (<http://escript.ibcp.fr/ESPript/ESPript/index.php>) 软件作图；在 Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/family/PF05257>) 和 MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk/index.shtml>) 蛋白序列数据库中将 CHAP 片段的序列与同一家族的其它蛋白的序列进行比对分析；利用 DALI 在线软件对 CHAP 片段的结构与数据库中的结构进行比对分析，找出具有较高结构同源性的蛋白，并用 PyMOL 软件进行作图；利用 ConSurf server (<http://consurftest.tau.ac.il/>) 对 CHAP 片段的结构和序列进行保守性分析，并用 PyMOL 软件进行作图。

活性中心 Cys-His-Glu-Asn 四联体与 Ca^{2+} 对 CHAP 片段活性的影响

运用一步突变法将 CHAP 片段的相应氨基酸位点进行突变、表达和纯化。然后将不同位点突变的 CHAP 片段进行细胞碎片水解活性和对细菌裂解活性的测定。对 Ca^{2+} 结合位点突变的 CHAP 蛋白进行 ICP-AES，以测定突变体蛋白结合 Ca^{2+} 的能力。

Ca^{2+} 与 CHAP 片段亲和力测定

首先对 CHAP 片段进行 EDTA 处理，除掉其结合的 Ca^{2+} ，利用透析的方法将多余的 EDTA 除去，然后浓缩、过分子筛，备用。

利用 ITC-200 microcalorimeter 在 16°C 对 Ca^{2+} 与 CHAP 片段的亲和力进行了测定。 Ca^{2+} 与 CHAP 片段蛋白均用相同的 buffer 溶解（20 mM Tris，pH 值 7.5，200 mM NaCl），用 600 μM CaCl_2 滴定 50 μM 不含 Ca^{2+} 的 CHAP 片段。另外，用相同浓度的 Ca^{2+} 滴定相同的 buffer，作为空白对照。对收集的数据利用 MicroCal Origin 进行分析。

Ca^{2+} 对 CHAP 片段二级结构的影响

利用 Chirascan CD Spectrometer 对含有、拿掉 Ca^{2+} 的 CHAP 蛋白的 CD 谱进行测定和分析。CHAP 蛋白均溶于相同的 buffer 中（20 mM Tris，pH 值 7.5，200 mM NaCl），并且浓度均调整为 0.15 mg/mL。于 20°C 在 0.1-cm 长度的比色皿中对蛋白的 CD 谱进行扫描，波长范围为 200~260 nm，每隔 1 nm 进行一次扫描。

Ca^{2+} 对 CHAP 片段热稳定性的影响

利用 thermal shift 实验测定 Ca^{2+} 对 CHAP 蛋白热稳定性的影响。将含有和不含有 Ca^{2+}

的 CHAP 蛋白调至浓度为 0.2 mg/mL, buffer 为 20 mM Tris (pH 值 7.5), 200 mM NaCl, SYPRO Orange 荧光染料进行 1000 倍稀释。利用 real-time PCR 对温度变化过程中的荧光信号的变化进行测定, 荧光信号强度为 450~490/560~580 nm 波长下的激发强度/释放强度, 温度梯度设置为 20~95°C, 以 0.5°C 为一个梯度, 每个梯度测定 15 s。对测定的数据进行分析, 确定每个蛋白的溶解曲线。

5.2.3 amidase-2 片段活性关键氨基酸位点测定

amidase-2 片段与同源蛋白的结构比对和分析

利用 CLUSTAL W (<http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html>) 在线软件对 amidase-2 片段的氨基酸序列与数据库中的蛋白进行比对分析, 并运用 ESPript (<http://escript.ibcp.fr/ESPript/ESPript/index.php>) 软件作图; 利用 DALI 在线软件对 amidase-2 片段的结构与数据库中的结构进行比对分析, 找出具有较高结构同源性的蛋白, 并用 PyMOL 软件进行作图; 利用 ConSurf server (<http://consurftest.tau.ac.il/>) 对 amidase-2 片段的结构和序列进行保守性分析, 并用 PyMOL 软件进行作图。

活性中心 E282、T330 和 Zn²⁺对 amidase-2 片段活性的影响

运用一步突变法将 amidase-2 片段的相应氨基酸位点进行突变、表达和纯化。然后将不同位点突变的 amidase-2 片段进行细胞碎片水解活性的测定。对 Zn²⁺结合位点突变的 amidase-2 蛋白进行 ICP-AES 以测定突变体蛋白结合 Zn²⁺的能力。

5.2.4 SH3b 片段活性关键氨基酸位点的测定

SH3b 片段与同源蛋白的结构比对和分析

利用 CLUSTAL W (<http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html>) 在线软件对 SH3b 片段的氨基酸序列与数据库中的蛋白进行比对分析, 并运用 ESPript (<http://escript.ibcp.fr/ESPript/ESPript/index.php>) 软件作图; 利用 DALI 在线软件对 SH3b 片段的结构与数据库中的结构进行比对分析, 找出具有较高结构同源性的蛋白, 并用 PyMOL 软件进行作图; 利用 ConSurf server (<http://consurftest.tau.ac.il/>) 对 SH3b 片段的结构和序列进行保守性分析, 并用 PyMOL^[238]软件进行作图。

SH3b 与底物多肽“AGGGGG”的 NMR 滴定分析

将 ¹⁵N 标记的 SH3b 与多肽段“AGGGGG”进行 NMR 滴定分析。将多肽段用 NMR buffer 进行溶解, 配成 100 mM 的储液; 将 ¹⁵N 标记的 SH3b 的浓度调至 0.5 mM, 然后与多肽分别以 1: 0、1: 0.1、1: 0.2、1: 0.8、1: 1.5、1: 3、1: 5、1: 7 和 1: 10 的比例 (mol 比) 进行混合, 逐个对样品进行 ¹H-¹⁵N HSQC 测定, 对测定的结构进行分析, 并利用公式:

$$CSP = \sqrt{(\delta_{HN})^2 + (\frac{\delta_N}{6})^2}$$

对显著化学位移扰动 (CSPs) 进行计算, 其中 δ_{HN} 和 δ_N 分别代表 $^1\text{H}_N$ 和 ^{15}N 的化学扰动值。

然后利用公式:

$$CSP = \frac{CSP_{\max}}{2} \left[(1+r+K_D \left(\frac{1}{C_{pro}} + \frac{r}{C_{lig}} \right)) - \sqrt{(1+r+K_D \left(\frac{1}{C_{pro}} + \frac{r}{C_{lig}} \right))^2 - 4r} \right]$$

对平衡解离常数 (K_D) 进行计算, 其中 CSP_{\max} 表示理论饱和状态下的 CSP, r 表示蛋白与多肽的摩尔比, C_{pro} 表示初始溶液中蛋白的浓度, C_{lig} 表示多肽储液的浓度。

5.2.5 各活性片段关键氨基酸位点对 LysGH15 裂解活性的影响

将 MRSA 菌株 USA300 培养至对数生长期, 用 PBS 进行三次重复清洗, 然后将 OD_{600} 调至 1.0 左右, 作为裂解活性测定的底物, 将蛋白与之混匀后作用 120 min, 实时记录样品 OD_{600} 的变化。

CHAP 片段关键位点对 LysGH15 裂解活性的影响

将 CHAP 活性相关的关键氨基酸位点和 Ca^{2+} 结合位点在 LysGH15 上进行定点突变, 并进行表达和纯化, 然后测定每个突变体对 USA300 的裂解活性。将 native 的 LysGH15 作为对照。

amidase-2 片段关键位点对 LysGH15 裂解活性的影响

将 amidase-2 的活性相关的关键氨基酸位点和 Zn^{2+} 结合位点在 LysGH15 上进行定点突变, 并进行表达和纯化, 然后测定每个突变体对 USA300 的裂解活性。将 native 的 LysGH15 作用对照。

SH3b 片段关键位点对 LysGH15 裂解活性的影响

将滴定实验测得的 SH3b 与多肽“AGGGGG”相互作用的氨基酸位点在 LysGH15 上进行定点突变, 并进行表达和纯化, 然后测定每个突变体对 USA300 的裂解活性。将 native 的 LysGH15 作用对照。

5.3 结果

5.3.1 LysGH15 及其各片段活性的测定

对 LysGH15 的 CHAP 和 amidase-2 的抑菌活性以及 SH3b 的结合活性进行测定。

CHAP 片段和 amidase-2 片段裂解活性测定

全长的 LysGH15 在浓度 0.25 μM 时就可以表现出高效的裂解活性, 而单独的 CHAP 片段在浓度 50 μM 时才表现出明显的裂解活性, 单独的 amidase-2 片段不表现出任何裂解活性, 但是当 amidase-2 (50 μM) 与 CHAP (50 μM) 混合到一起时可以表现出大于单独

CHAP 片段表现出的裂解活性（见图 5.1）。

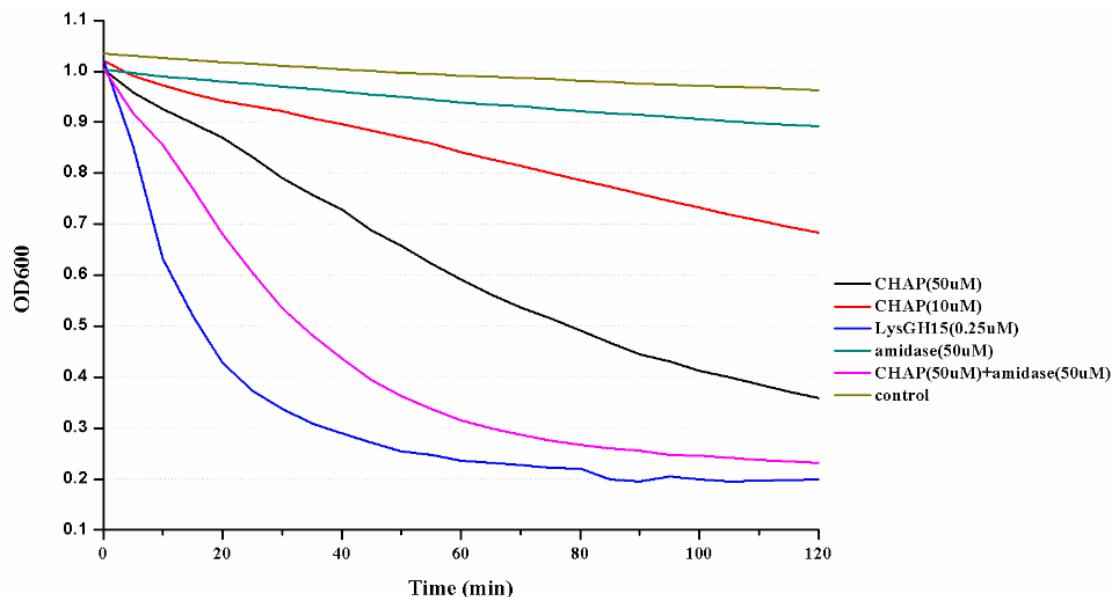


图 5.1 LysGH15 各活性片段抑菌活性

Fig 5.1 The bactericidal of different LysGH15 domain

SH3b 片段结合活性测定

LysGH15B 与 GFP 融合表达：

将 LysGH15 的 SH3b 片段（400~483 aa）与 GFP 进行了串联表达，中间由 1 个 linker 连接（见图 5.2），表达菌株经过诱导之后呈翠绿色，成功表达了 LysGH15B-GFP，并对其进行纯化（图 5.3）。

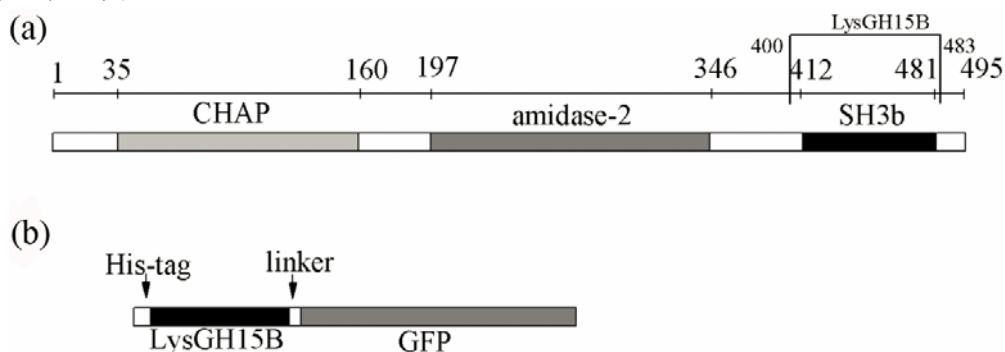


图 5.2 蛋白结构示意图

Fig 5.2 The schematic of proteins

(a: LysGH15 的结构示意图； b: LysGH15 的 SH3b 片段与 GFP 串连表达示意图)

(a: Schematic of LysGH15 and its three domains. LysGH15B (residues 400 to 483) is part of the fusion protein LysGH15B-GFP; b: Schematic of LysGH15B-GFP)

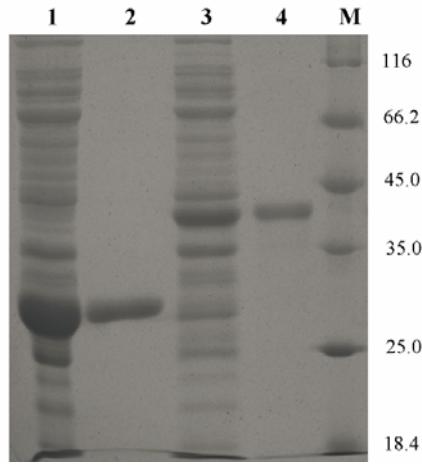


图 5.3 LysGH15B-GFP 与 GFP 的表达与纯化

Fig 5.3 Protein profiles of LysGH15B-GFP and GFP

(1: GFP 诱导表达菌株的超生上清; 2: 纯化的 GFP; 3: LysGH15B-GFP 诱导表达菌株的超声上清; 4: 纯化的 LysGH15B-GFP; M: marker)

(Lane 1: *E. coli* BL21 cells induced with IPTG; Lane 2: the purified GFP fraction; Lane 3: *E. coli* BL21 cells induced with IPTG; Lane 4: the purified LysGH15B-GFP fraction; Lane M: the molecular mass marker)

蛋白 LysGH15B-GFP 结合活性的测定:

通过激光共聚焦显微镜观察发现 LysGH15B-GFP 可以特异性的结合金黄色葡萄球菌，同时可以激发绿色荧光（图 5.4）。

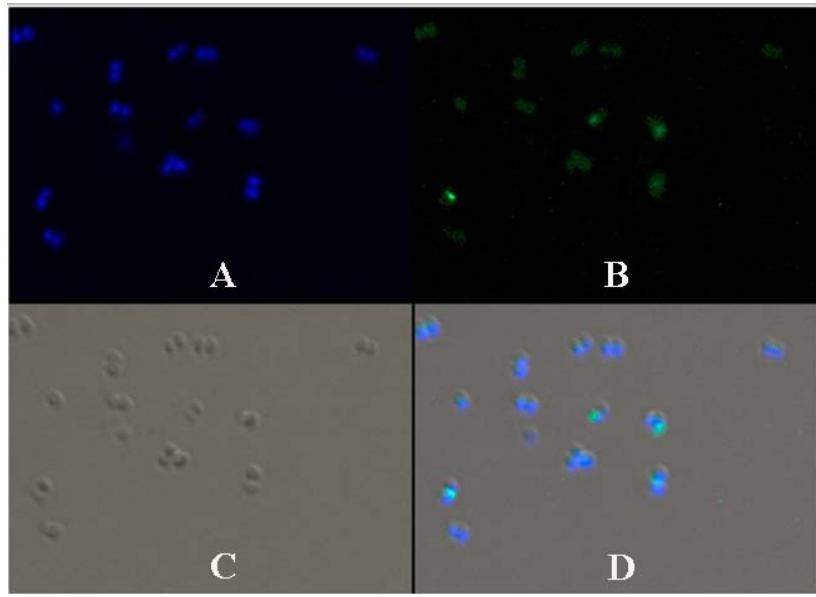


图 5.4 融合蛋白 LysGH15B-GFP 对 MRSA 菌株 YB57 的结合

Fig 5.4 Localization of LysGH15B-GFP on YB57

(先将 YB57 用荧光染料 Hoechst 33342 染色，然后与融合蛋白 LysGH15B-GFP 孵育，之后进行激光共聚焦显微镜观察。A: 405 nm 波长下用荧光染料染色的细菌；B: 488 nm 波长下 GFP 激发绿色荧光；C: 白色光；D: A、B 和 C 重合)

YB57 was processed using Hoechst 33342, and then, it was incubated with LysGH15B-GFP.

A: Localization at 405 nm wavelength (blue fluorescence, emitted by Hoechst No. 33342 fluorescent dye); B: Localization at 488 nm wavelength (green fluorescence, emitted by GFP); C: Image of ordinary ray (normal light); D: Overlay of the pictures shown in (A), (B), and (C).

5.3.2 CHAP 片段关键氨基酸位点测定

CHAP 片段与同源蛋白序列与结构的比对和分析

序列比对表明 LysGH15 的 CHAP 片段与 plyTW、LytN、PlyC_CHAP、E_amidase、E_Gsp 和 L_amidase 具有一定的序列同源性，尤其 C54、H117、E134 和 N136 组成的四联体表现的非常保守（图 5.5）。另外，plyTW 和 LytN 与 LysGH15 的 CHAP 片段的 Ca^{2+} 结合位点的关键氨基酸位点表现出同源性。

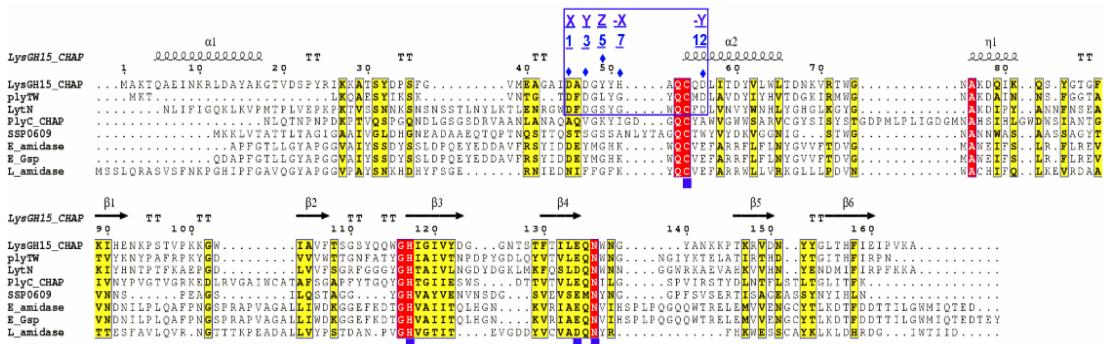


图 5.5 LysGH15 的 CHAP 片段的序列与其它同源序列之间的比对分析

Fig 5.5 Sequence alignment of LysGH15 CHAP domain and homologous proteins

(Ca^{2+} 结合位点的 12 个氨基酸残基用蓝色方框标示, Cys-His-Glu-Asn 四联体用蓝色方框标示, 结合 Ca^{2+} 的五个位点用蓝色菱形表示)

(The 12-residue calcium-binding site is indicated by a blue box. The Cys-His-Glu-Asn quartet and the calcium-binding residues are indicated by filled blue squares and filled blue diamonds, respectively)

利用 ConSurf server 软件分析了 LysGH15 的 CHAP 片段的序列保守性，结合 PyMOL 程序，得到了结合序列保守性的 CHAP 片段的表面结构图，可以看到 CHAP 表面组成沟槽结构的氨基酸的保守性很大（图 5.6）。因此，很可能是行使水解活性的位置。

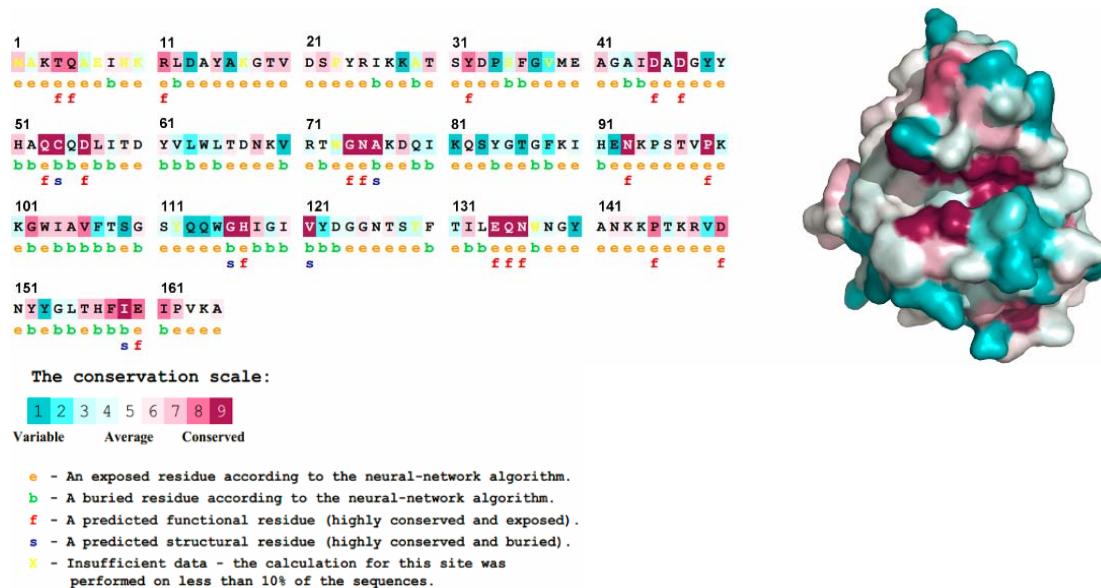


图 5.6 CHAP 片段的序列中保守氨基酸位点分析（左图）及其结构表面沟槽结构（右图）

Fig 5.6 Alignment of sequence (left) and surface rendering of the groove (right)

DALI 分析表明 CHAP 片段与 PlyC_CHAP、SSP0609、E_amidase、E_Gsp 和 L_amidase 等具有一定的结构同源性，其中与 PlyC_CHAP 的 RMSD 最低为 2.32（见表 5.1）。

表 5.1 利用 DaliLite 软件对 LysGH15 的 CHAP 结构与数据库中的同源结构进行比对

Table 5.1 Structural comparison of each individual domain with structurally homologous proteins using the DaliLite server.

Homologous proteins	DALI score	RMS deviation	Number of aligned C _α atoms	Total residues (range)	PDB ID
<i>Streptococcus</i> phage C1 endolysin PlyC (PlyC_CHAP)	11.4	2.32	121	155 (310~464)	4F88
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> CHAP domain (SSP0609)	6.2	2.83	93	115 (41~155)	2K3A
<i>Staphylococcus aureus</i> staphyloxanthin biosynthesis protein	7.7	3.04	95	113 (1~113)	2LRJ
<i>Escherichia coli</i> glutathionylspermidine synthetase/amidase (E_amidase)	8.4	2.66	110	193 (10~202)	2IO8
<i>Escherichia coli</i> K-12 glutathionylspermidine synthetase/amidase (E_Gsp)	8.2	2.71	110	190 (8~197)	3A2Z
<i>Leishmania</i> trypanothione synthetase-amidase (L_amidase)	8.4	2.61	101	182 (2~183)	2VPS

利用 PyMOL 软件对 LysGH15 的 CHAP 片段与同源蛋白的结构进行比较，结果发现虽然大体上它们的结构相似，尤其保守的四联体位点吻合的很好，但是只有 LysGH15 的 CHAP 具有 Ca²⁺结合位点（见图 5.7）。

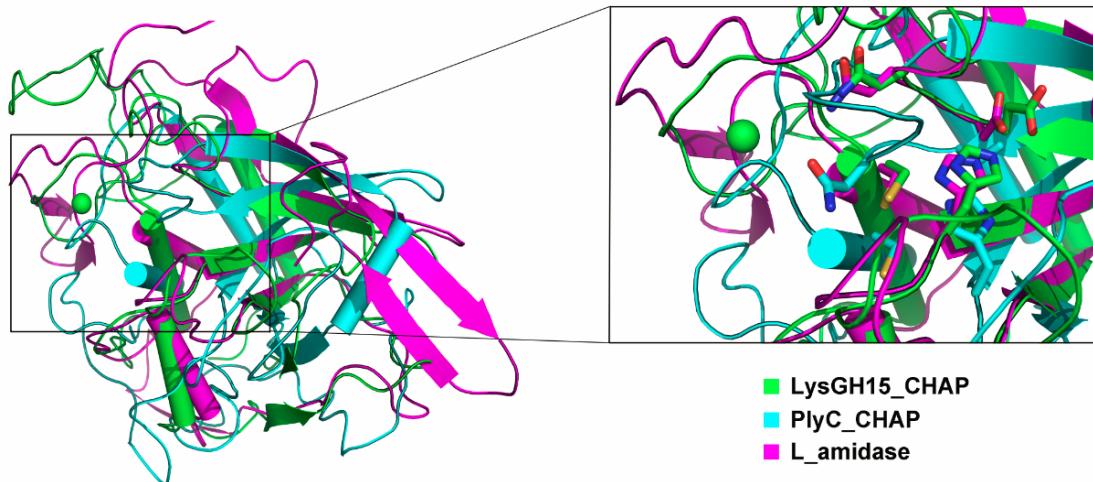


图 5.7 LysGH15 CHAP 片段与同源蛋白结构比对

Fig 5.7 Structural comparison of the LysGH15 CHAP domain with homologous proteins

(α -螺旋用圆柱表示, β -折叠用箭头表示, Ca^{2+} 用球形表示)

(Helices are shown as cylinders, strands are shown as arrows, and zinc ions are shown as spheres)

在 Pfam 数据库中的 PF05257 家族中, 有 6.56% (366/5579) 的成员与 LysGH15 的 CHAP 片段序列的四联体位点和 Ca^{2+} 结合位点具有较高的同源性; 在 MEROPS 数据库中的 C51 家族中, 有 36.04% (71/197) 的成员与 LysGH15 的 CHAP 片段序列的四联体位点和 Ca^{2+} 结合位点具有较高的同源性。这些同源的蛋白很有可能与 LysGH15 的 CHAP 片段一样都可以结合 Ca^{2+} 。

活性中心 Cys-His-Glu-Asn 四联体与 Ca^{2+} 对 CHAP 片段活性的影响

由图 5.8 中可以看到 Ca^{2+} 紧邻 Cys-His-Glu-Asn 四联体中的 C54。

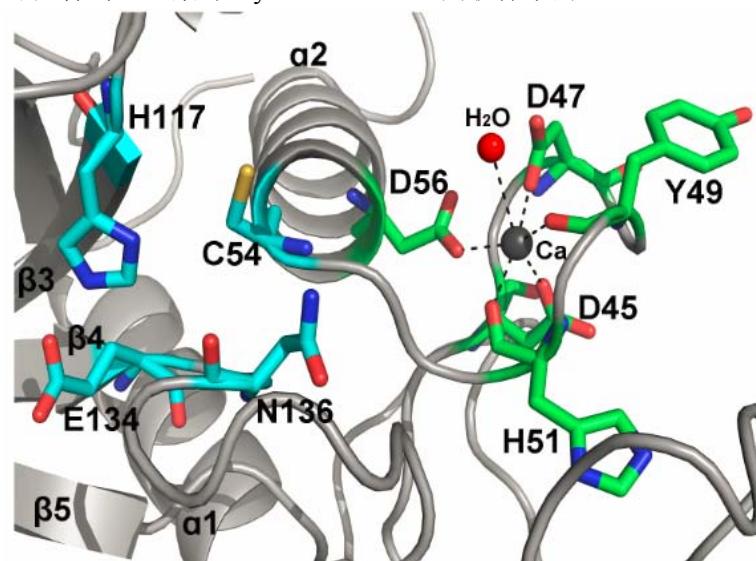


图 5.8 Cys-His-Glu-Asn 四联体（青色）与 Ca^{2+} 结合位点（绿色）

Fig 5.8 A detailed view of the catalytic site (cyan) and the calcium-binding site (green)

利用 EDTA (1 mM) 对 CHAP 片段进行处理，然后通过透析除去 EDTA，然后对处理的 CHAP 进行细胞壁水解实验，发现其活性完全消失。然后对 EDTA 处理的 CHAP 蛋白中加入不同的金属离子，发现只有当补加 Ca^{2+} 时，其活性才可以恢复（图 5.9）。表明 Ca^{2+} 在 CHAP 的活性中起决定性作用。

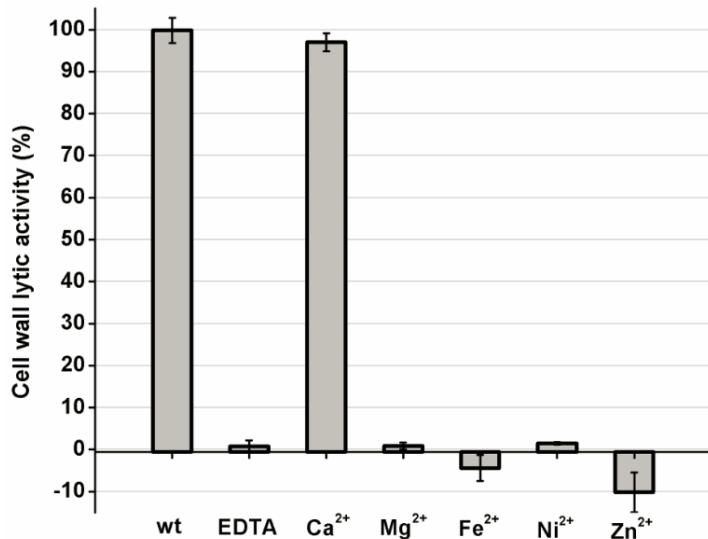


图 5.9 LysGH15 的 CHAP 片段的细胞壁水解活性

Fig 5.9 Cell wall lytic activity of the LysGH15 CHAP domain

(除 wt 的 CHAP 片段为 native 蛋白, 其它的组均为 EDTA 处理过的 CHAP 蛋白 [5 μM]，然后添加不同的金属离子 [5 μM]，过量的 EDTA 利用透析的方法除去)

(The effects of different ions [5 μM] on the lytic activity of the EDTA-inactivated CHAP [5 μM] domain [excess EDTA was removed by dialysis])

运用一步突变法将结合 Ca^{2+} 的五个氨基酸位点分别突变为丙氨酸，进行抑菌活性和细胞壁水解活性测定（图 5.10）。结果表明：突变体 D45A、D47A 和 D56A 的活性全部丧失，而突变体 Y49A 和 H51A 活性仅下降了很小的一部分（< 20%）。另外，ICP-AES 检测结果表明突变体 D45A、D47A 和 D56A 中没有 Ca^{2+} 信号，而 Y49A 和 H51A 仍然含有 Ca^{2+} 。表明 D45、D47 和 D56 是结合 Ca^{2+} 的关键位点（表 5.2）。表明正是该 Ca^{2+} 位点在发挥维持 CHAP 裂解活性的作用。

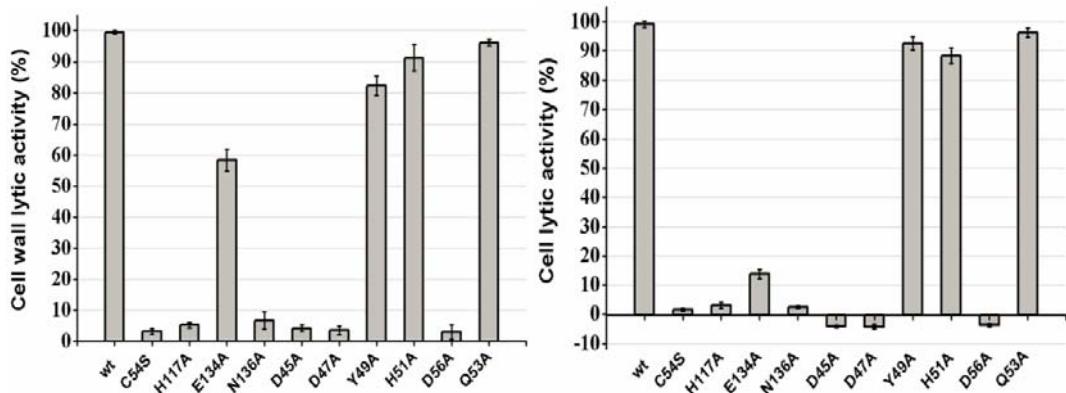


图 5.10 不同的 CHAP 片段突变体对其细胞壁和细菌裂解活性的影响

Fig 5.10 The lytic activity of the CHAP domain containing different mutations

(所有 CHAP 片段的浓度分别为 $50 \mu\text{M}$ [USA300 菌株] 和 $5 \mu\text{M}$ [USA300 细胞壁])

(The concentrations of the proteins used in this study are $50 \mu\text{M}$ [live USA300 cells] and $5 \mu\text{M}$ [cell wall])

表 5.2 LysGH15 的 CHAP 片段上 Ca^{2+} 结合位点的分析

Table 5.2 Ca^{2+} -oxygen ligands in the LysGH15 CHAP domain

	Residue	Atom	Distance (\AA)	Key residues for Ca^{2+} binding ^a
X (1)	D45	OD1	2.36	●
Y (3)	D47	OD1	2.37	●
Z (5)	Y49	O	2.13	○
-X (7)	H51	O	2.32	○
-Y (12)	D56	OD2	2.27	●
Average (\AA)			2.29	
(Second molecule)			(2.27)	
B-factor of Ca^{2+} (\AA)			47.41	
(Second molecule)			(48.51)	

^a ●: indicates the key residue for calcium binding in the LysGH15 CHAP domain; ○: indicates nonessential residues for calcium binding in the LysGH15 CHAP domain.

将 CHAP 的四联体逐一突变为丙氨酸，对突变体进行活性测定表明：只有 E134A 残留有一部分水解活性，其它三个突变体的活性基本消失（图 5.10）。表明这三个位点在活性的发挥中起重要作用。另外，将 C54 突变为 S54 后发现 C54S 突变体活性也完全消失。

CHAP 与 Ca^{2+} 亲和力测定

利用 ITC 实验，将 Ca^{2+} 对 CHAP 蛋白（已经去掉 Ca^{2+} ）进行滴定（图 5.11）。当 Ca^{2+} 浓度为 $600 \mu\text{M}$ 、CHAP 蛋白浓度为 $50 \mu\text{M}$ 时可以获得较好的滴定效果，对数据进行处理、获得拟合曲线，计算表明二者结合比例约为 1:1，平衡解离常数为 $27 \mu\text{M}$ 。

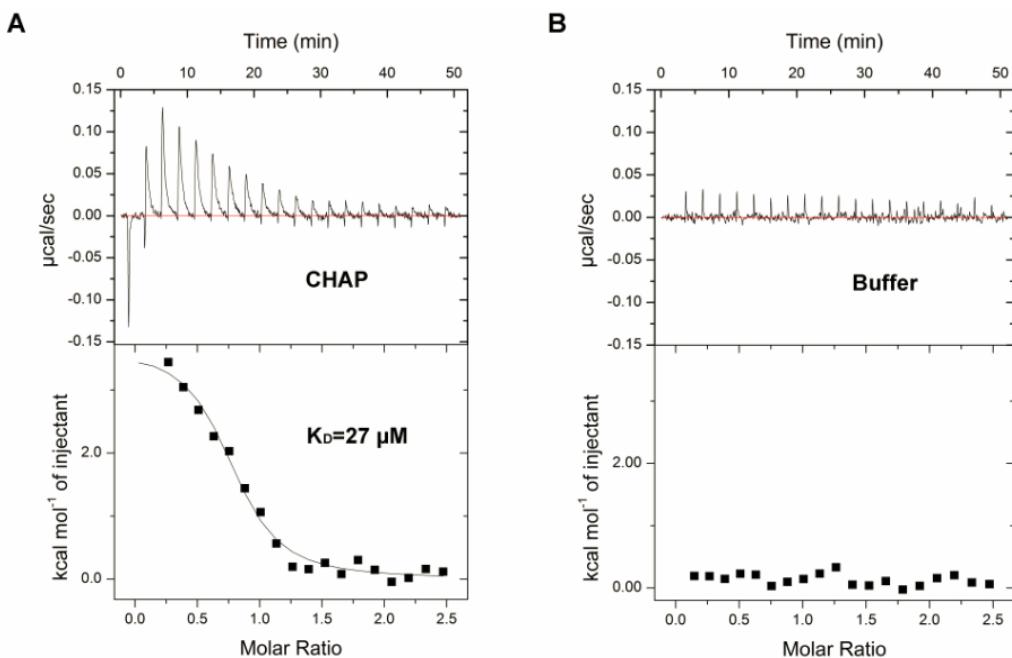


图 5.11 Ca^{2+} 对 CHAP 片段的 ITC 滴定实验

Fig 5.11 The equilibrium dissociation constant of the CHAP domain in the presence of calcium ions
(A: 600 μM Ca^{2+} 滴定 50 μM CHAP 蛋白; B: 600 μM Ca^{2+} 滴定 buffer, 作为对照)
(A) 600 μM CaCl_2 was stepwise injected into 50 μM the CHAP protein samples. (B) 600
 μM CaCl_2 was injected into the buffer as control.

Ca^{2+} 对 CHAP 片段二级结构的影响

利用 CD 实验对结合 Ca^{2+} 和不结合 Ca^{2+} 的 CHAP 片段进行二级结构的测定, 如图 5.12, 结果表明二者的二级结构没有明显的差别, 表明 Ca^{2+} 不影响 CHAP 的二级结构组成。

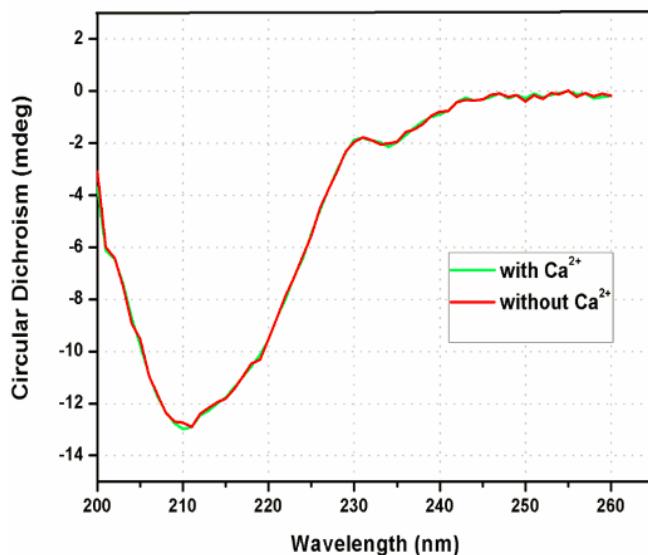


图 5.12 结合 Ca^{2+} 与不结合 Ca^{2+} 的 CHAP 蛋白二级结构测定

Fig 5.12 Circular dichroism spectroscopy of the CHAP domain with/without Ca^{2+}

Ca²⁺对 CHAP 片段热稳定性的影响

通过 thermal shift 实验测定了结合 Ca²⁺与不结合 Ca²⁺的 CHAP 蛋白的溶解曲线（图 5.13），二者仅表现出 2°C 的偏移，表明 Ca²⁺对 CHAP 的热稳定性具有轻微的增强作用。

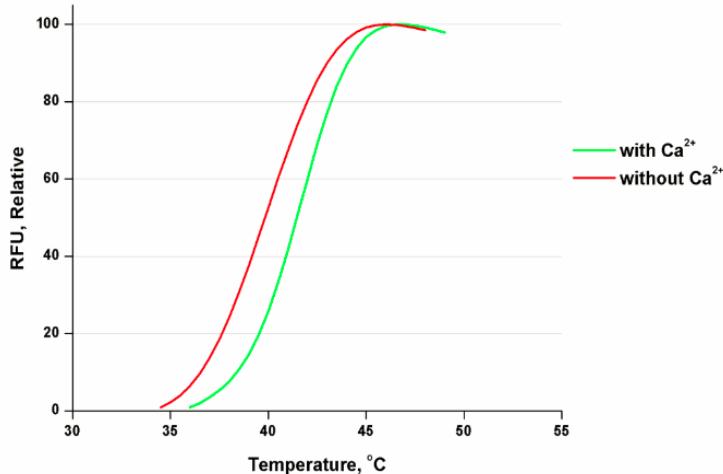


图 5.13 结合 Ca²⁺与不结合 Ca²⁺的 CHAP 蛋白溶解曲线测定

Fig 5.13 The thermal shift assays of the CHAP domain with/without Ca²⁺

5.3.3 amidase-2 片段关键氨基酸位点测定

amidase-2 片段与同源蛋白的结构比对和分析

序列比对分析（图 5.14）表明 LysGH15 的 amidase-2 片段与 plyTW、plyL、plyG、xlyA、AmiE、AmpD 和 AmiD 表现出一定的序列同源性，尤其是 Zn²⁺和 E282 表现出很大的保守性。

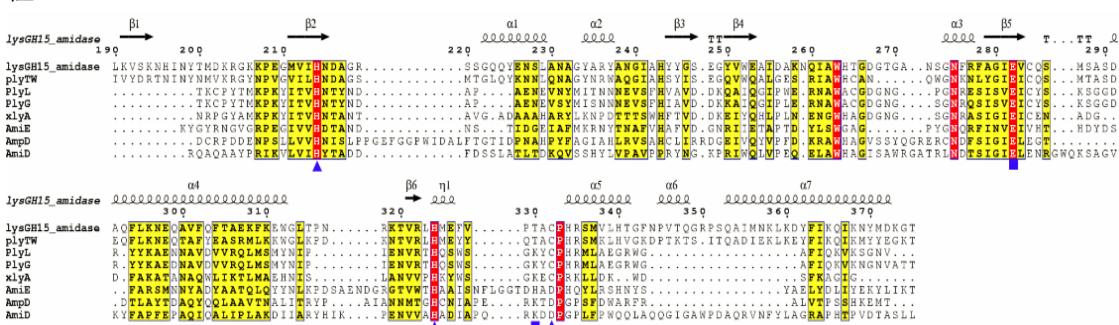


图 5.14 LysGH15 的 amidase-2 片段的序列与其它同源序列之间的比对分析

Fig 5.14 Sequence alignment of LysGH15 amidase-2 domain and homologous proteins

(Zn²⁺结合位点的 3 个氨基酸残基用蓝色三角标示，活性位点用蓝色方框标示)

(The zinc-binding residues of this domain are indicated by filled blue triangles, and the

catalytic residues are indicated by filled blue squares)

DALI 比对表明 LysGH15 的 amidase-2 与 PlyL、PlyG、xlyA、AmiE、AmiE、AmpD 和 AmiD 表现出结构同源性（表 5.3）。其中 amidase-2 与 PlyL 结构比对的 RMSD 为 1.62，

具有最高的结构相似性。利用 PyMOL 软件对 LysGH15 的 amidase-2 与 PlyL、PlyG 和 xlyA 进行了结构的比较，表明他们的结构大致相似，尤其 Zn²⁺结合位点与 E282 的空间位置吻合度高（图 5.15）。

表 5.3 利用 DaliLite 软件对 amidase-2 与同源结构进行比对分析

Table 5.3 Structural comparison of each individual domain with structurally homologous proteins using the DaliLite server

Homologous proteins	DALI score	RMS deviation	Number of aligned C α atoms	Total residues (range)	PDB ID
<i>Bacillus anthracis</i> prophage endolysin PlyL	21.2	1.62	146	157 (1~157)	1YB0
<i>Bacillus</i> phage gamma amidase PlyG	19.5	1.76	146	165 (165)	2L47
<i>Bacillus subtilis</i> amidase xlyA	19.4	1.63	133	154 (1~154)	3HMB
<i>Staphylococcus epidermidis</i> autolysin AmiE	17.7	2.24	154	207 (7~213)	3LAT
<i>Citrobacter freundii</i> amidase AmpD	12.7	2.42	132	179 (1~179)	2Y2B
<i>Escherichia coli</i> K-12 amidase AmiD	8.5	3.93	155	257 (5~261)	2WKX

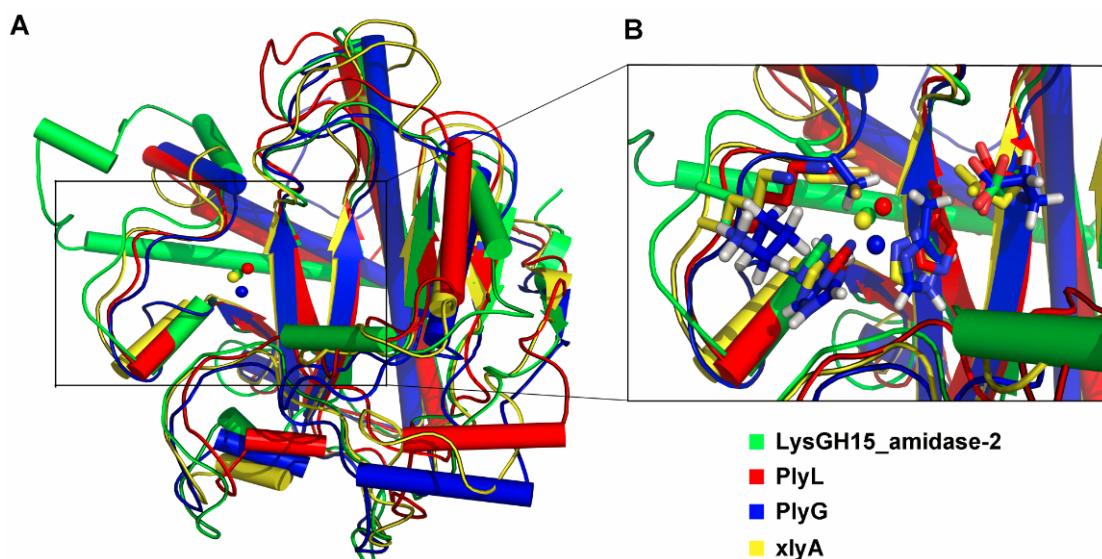


图 5.15 LysGH15 amidase-2 片段与同源蛋白的结构比对

Fig 5.15 Structural comparison of the amidase-2 domain with homologous proteins

(α -螺旋用圆柱表示, β -折叠用箭头表示, Zn²⁺用球形表示)

(Helices are shown as cylinders, strands are shown as arrows, and zinc ions are shown as spheres)

利用 ConSurf server 软件分析显示出 amidase-2 序列中氨基酸的保守性，通过 PyMOL 作图表明 Zn²⁺结合位点和组成沟槽结构的主要氨基酸位点具有很高的保守性（图 5.16）。

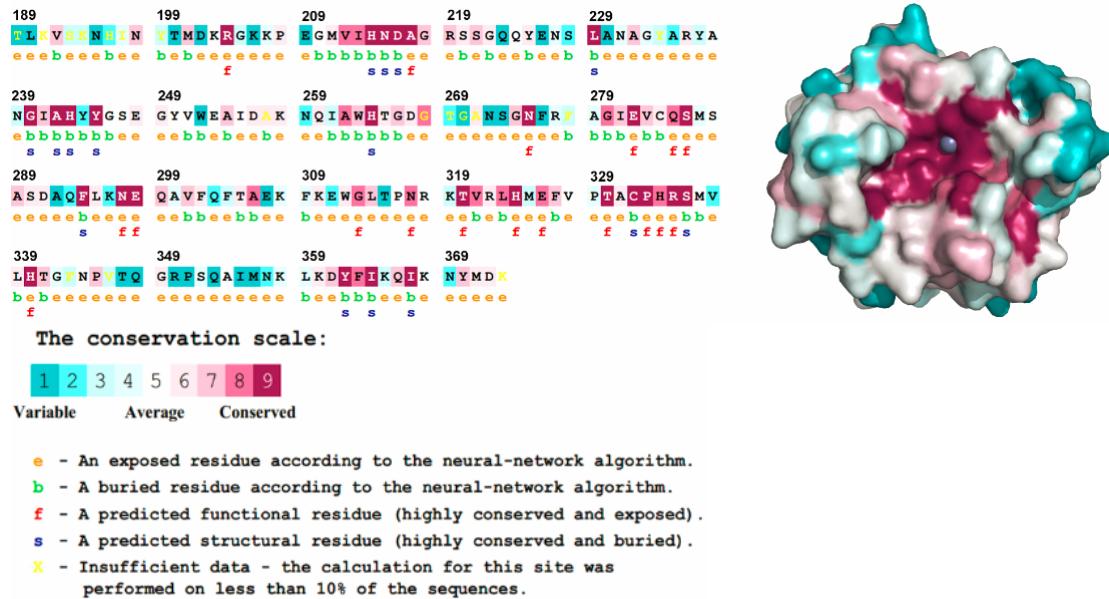


图 5.16 Amidase-2 片段的序列中保守氨基酸位点分析（左图）及其结构表面沟槽结构（右图）

Fig 5.16 Alignment of sequence and surface rendering of the groove

活性中心 E282、T330 与 Zn²⁺对 amidase-2 片段活性的影响

由图 5.17 中可以看出 Zn²⁺与 E282 和 T330 正好组成了 amidase-2 沟槽的中心。

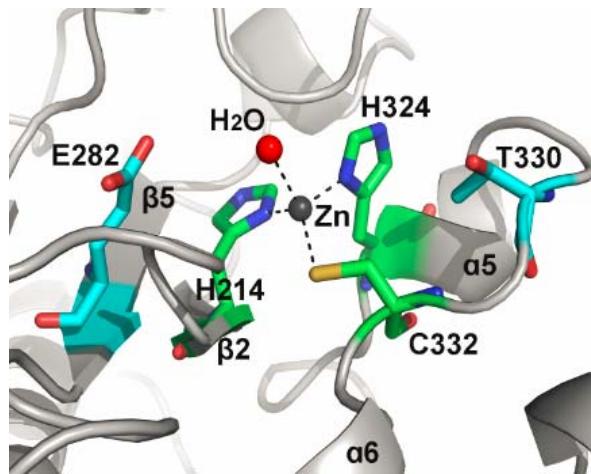


图 5.17 活性位点（青色）与 Zn²⁺结合位点（绿色）在 amidase-2 蛋白结构中的分布

Fig 5.17 A detailed view of the activity site (cyan) and the zinc site (green) in the amidase-2 domain

由于 amidase-2 单独存在不表现出水解活性，但是对 CHAP 表现出活性的增强作用。所以分析 amidase-2 突变体活性时，即测定 amidase-2 对 CHAP 活性的增强作用。见图 5.18，突变分析表明：突变体 H214A、H324A、C332A 和 E282A 的活性完全消失，而 T330A 保留了相对于 native amidase-2 一半的活性。

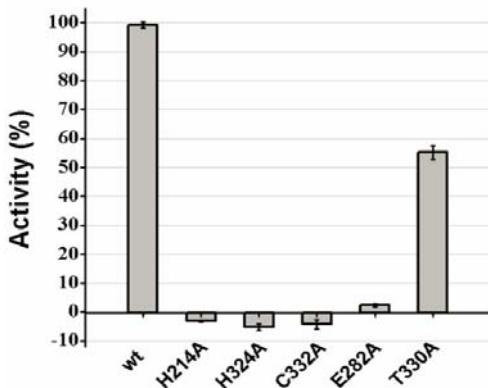


图 5.18 不同的 amidase-2 突变体 (50 μM) 对 CHAP (50 μM) 活性的增强能力测定

Fig 5.18 The ability of the amidase-2 domain (50 μM) containing different mutations to enhance the lytic activity of the CHAP domain (50 μM)

5.3.4 SH3b 片段关键氨基酸位点测定

SH3b 片段与同源蛋白的结构比对和分析

如图 5.19, 序列分析表明 LysGH15 的 SH3b 片段与 ALE-1 的结合区表现出很高的序列同源性 (47%)。ConSurf server 分析显示了 SH3b 片段氨基酸的保守性分布, 结合 PyMOL 得到了 SH3b 结合氨基酸位点保守性的表面结构图, 表明其沟槽出的位点显示出高的保守性 (图 5.20)。同样, DALI 在线分析表明 SH3b 与 ALE-1 的结合区具有很高的结构同源性, 二者的 RMSD 仅为 1.56 (表 5.4)。由图 5-21 同样可以看出二者的相似性。

LysGH15_SH3b 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480 490
S T P A T R P V T G S W K N Q Y G T I K P R N A C F V N G N Q F I V R I G S P P L N A P V G C N D P A C A R I V D E V C I Q O G H W T G Y N A I N G R V Y P V R T C G V P P N H I P G V A W C V F X
ALE-1 D Y K D D D D K V R Y K R N K I G T D Y K S A S F I A N D I I T R L I G P P R S M D S G V E R R G L T I K I D E V N K Q D G H V W V G Y N E N S G R R V I D P V R T N H E S T G E L G P . L W G D I X

图 5.19 LysGH15 的 amidase-2 片段的序列与其它同源序列之间的比对分析

Fig 5.19 Sequence alignment of LysGH15 amidase-2 domain and homologous proteins

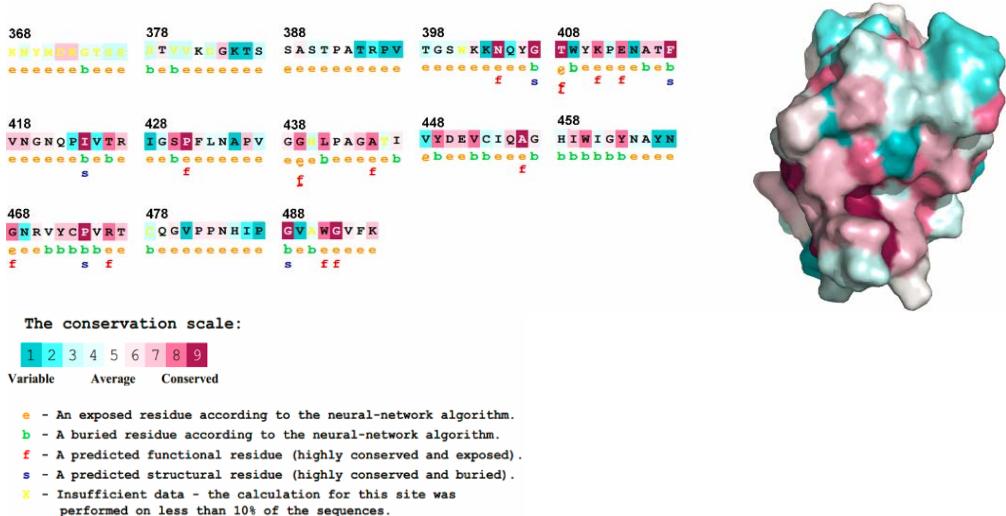


图 5.20 SH3b 片段的序列中保守氨基酸位点分析 (左图) 及结构表面沟槽结构 (右图)

Fig 5.20 Alignment of sequence and surface rendering of the groove

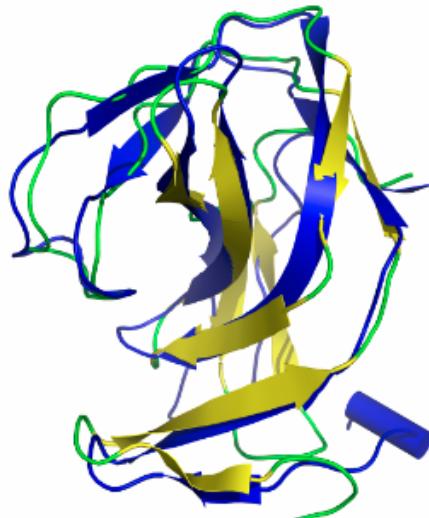


图 5.21 LysGH15 SH3b 片段（黄色）与 ALE-1 结合区（蓝色）结构的比对

Fig 5.21 Structural comparison of the SH3b domain (yellow) with the binding domain (blue) of ALE-1

表 5.4 利用 Dali 软件对 LysGH15 SH3b 与同源蛋白结构的比对分析

Table 5.4 Structural comparison of each individual domain with structurally homologous proteins using the DaliLite server

Homologous proteins	DALI score	RMS deviation	Number of aligned C α atoms	Total residues (range)	PDB ID
<i>Staphylococcus capitis</i> EPK1 peptidylglycan hydrolase ALE-1	13.1	1.56	91	98 (264~362)	1R77

SH3b 与底物多肽“AGGGGG”的 NMR 滴定分析

通过对 SH3b 与多肽“AGGGGG”的滴定数据进行分析，得到了各个位点位移情况的二维图谱(图 5.22)。由图 5.23 可以看到每个氨基酸位点发生偏移的程度，通过计算表明 SH3b 与多肽的结合力为 3 mM 左右，说明二者的结合力非常弱(图 5.24)。其中发生较大位移的氨基酸位点有：N404、Y406、G407、T408、S430、L433、I454 和 A456。这些位点主要集中在 SH3b 的沟槽结构上(图 5.25)。

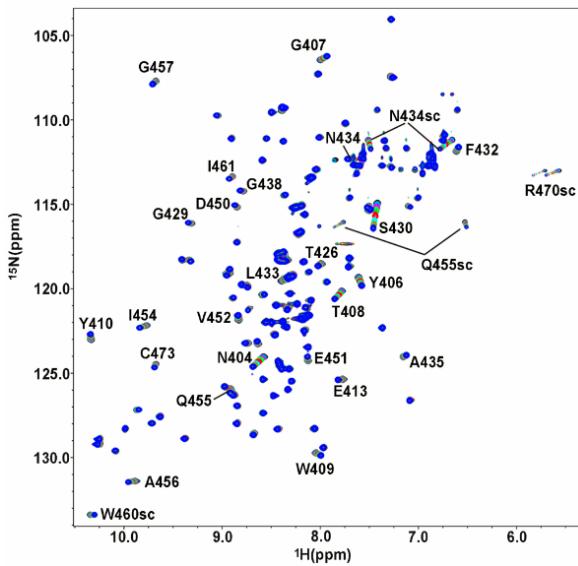


图 5.22 SH3b 与多肽“AGGGGG”滴定的 ^1H - ^{15}N HSQC 谱测定

Fig 5.22 ^1H - ^{15}N HSQC spectra of the titration of the SH3b domain with the peptide “AGGGGG”

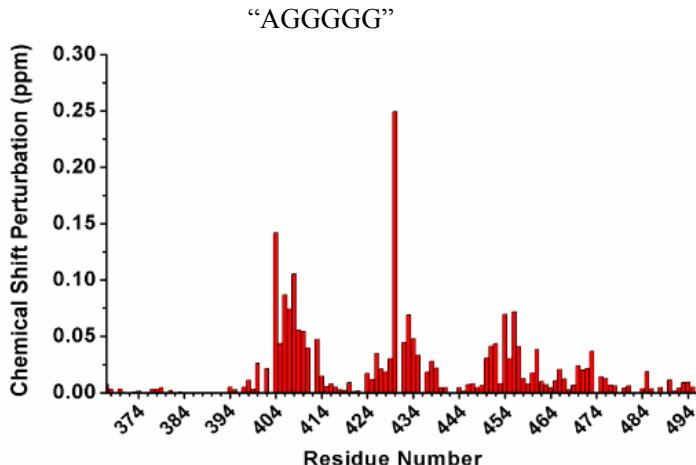


图 5.23 滴定实验中每个氨基酸位点发生偏移的程度

Fig 5.23 Chemical shift perturbations in the peptide “AGGGGG” titration

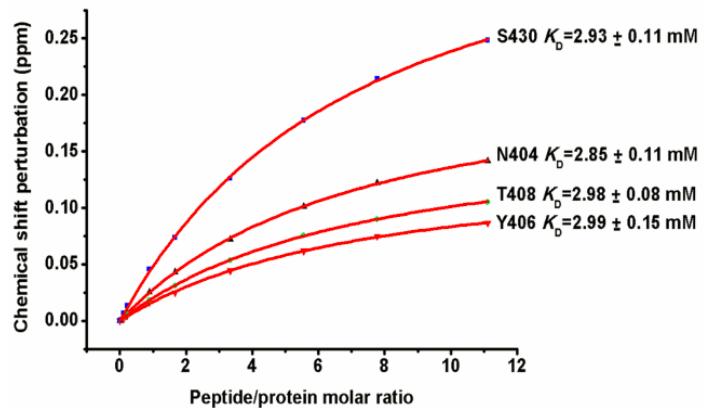


图 5.24 多肽“AGGGGG”与 SH3b 滴定的平衡解离常数测定

Fig 5.24 K_D values for binding of the SH3b domain to “AGGGGG”

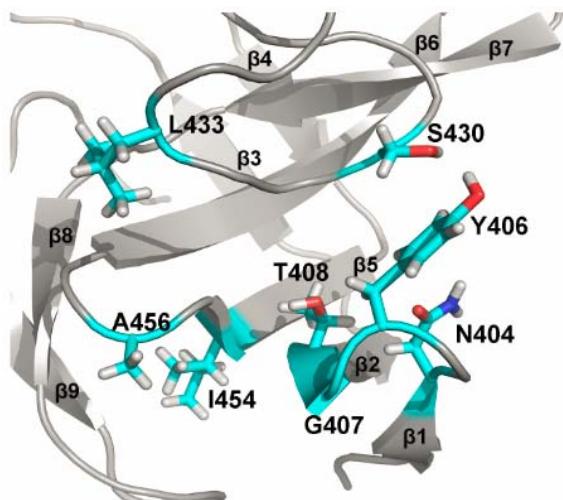


图 5.25 SH3b 与多肽“AGGGGG”相互作用的氨基酸位点

Fig 5.25 A detailed view of the residues in the SH3b domain that interact with the “AGGGGG”

5.3.5 各活性片段关键氨基酸位点对 LysGH15 裂解活性的影响

将 CHAP 上的 C54 与 Ca^{2+} 的关键结合位点在 LysGH15 上分别进行定点突变。见表 5.4，活性实验表明：与 native 的 LysGH15 活性相比，C54S-LysGH15、D45A-LysGH15、D47A-LysGH15 和 D56A-LysGH15 突变体的活性完全消失，与单独 CHAP 片段突变分析的结果一致。表明 CHAP 在 LysGH15 中起关键的水解作用，C54 和 Ca^{2+} 也是 LysGH15 发挥功能的关键位点。

将 amidase-2 上的 E282 和 Zn^{2+} 结合位点在 LysGH15 上进行定点突变。活性实验表明：E282A-LysGH15、H214A-LysGH15、H324A-LysGH15 和 C332A-LysGH15 突变体与 native 的 LysGH15 的活性均无明显的变化。表明 amidase-2 在 LysGH15 的活性中所起的作用很微弱。

将滴定实验测得的 SH3b 与多肽“AGGGGG”相互作用的氨基酸位点在 LysGH15 上进行定点突变，活性实验结果表明：突变体 N404A-LysGH15、Y406A-LysGH15、(N404A+Y406A)-LysGH15、G407A-LysGH15、T408A-LysGH15、(G407A+T408 A)-LysGH15、L433A-LysGH15 和 I454A-LysGH15 相对于 native 的 LysGH15 的活性都有了显著的降低，表明这些位点都在 LysGH15 发挥活性中起关键作用。虽然 S430 在滴定中表现的偏移最大，但是 S430A-LysGH15 基本上保持了原活性。

表 5.4 不同 LysGH15 突变体抑菌能力测定

Table 5.4 The bactericidal activity of the different constructs

	The velocity of the decrease in OD ₆₀₀ (OD/min)
Control	5.9×10 ⁻⁴
LysGH15 (0.25 μM)	69.0×10 ⁻⁴
C54S-LysGH15 (0.25 μM)	5.9×10 ⁻⁴
E282A-LysGH15 (0.25 μM)	66.4×10 ⁻⁴
D45A-LysGH15 (0.25 μM)	5.5×10 ⁻⁴
D47A-LysGH15 (0.25 μM)	5.4×10 ⁻⁴
Y49A-LysGH15 (0.25 μM)	65.0×10 ⁻⁴
H51A-LysGH15 (0.25 μM)	67.0×10 ⁻⁴
D56A-LysGH15 (0.25 μM)	5.7×10 ⁻⁴
H214A-LysGH15 (0.25 μM)	63.0×10 ⁻⁴
H324A-LysGH15 (0.25 μM)	63.5×10 ⁻⁴
C332A-LysGH15 (0.25 μM)	65.0×10 ⁻⁴
N404A-LysGH15 (0.25 μM)	21.7×10 ⁻⁴
Y406A-LysGH15 (0.25 μM)	30.5×10 ⁻⁴
(N404A+Y406A)-LysGH15 (0.25 μM)	23.3×10 ⁻⁴
G407A-LysGH15 (0.25 μM)	35.5×10 ⁻⁴
T408A-LysGH15 (0.25 μM)	12.8×10 ⁻⁴
(G407A+ T408 A)-LysGH15 (0.25 μM)	11.3×10 ⁻⁴
S430A-LysGH15 (0.25 μM)	62.3×10 ⁻⁴
L433A-LysGH15 (0.25 μM)	49.3×10 ⁻⁴
(S430A + L433A)-LysGH15 (0.25 μM)	44.6×10 ⁻⁴
I454A-LysGH15 (0.25 μM)	42.4×10 ⁻⁴

The initial OD₆₀₀ value of the bacteria was approximately 1.0. Different proteins were added into the bacteria solution, and the OD₆₀₀ was kinetically measured for 120 min.

5.4 讨论

上一章节成功解析了 LysGH15 三个活性片段的三维结构，这是世界上首例金黄色葡萄球菌噬菌体裂解酶的三维结构。本章节的研究表明 LysGH15 与其 CHAP 片段的活性均依赖于 Ca²⁺，Ca²⁺所在的位置紧邻 CHAP 片段的四联体活性中心。目前为止，LysGH15 是首个报道的具有 Ca²⁺结合位点的裂解酶。前期已有关于裂解酶的活性依赖于 Ca²⁺的报道，如 LysK，以及噬菌体 phi11、B30 和 Ply700 的裂解酶^[239]，但 LysGH15 是首次通过结构解析确定了这个 Ca²⁺结合位点，并且通过多种实验确证了其所起的关键作用。由此可以推测，与 LysGH15 具有序列同源性，尤其活性中心和 Ca²⁺结合位点的氨基酸序列相对应、同时活性又依赖于 Ca²⁺的这些蛋白，很可能也具有结合 Ca²⁺的特性。

据报道，具有 helix-loop-helix Ca²⁺结合基序的蛋白被称为 EF-hand 蛋白，其中结合 Ca²⁺的 loop 通常为 12 个氨基酸的长度^[240]。而“EF-hand-like”蛋白的 Ca²⁺结合位点的特点包括：

(1)结合 Ca²⁺的 loop 的长度不是 12 个氨基酸；和/或 (ii) loop 前后的二级结构不全是 helix。

虽然 LysGH15 CHAP 片段结合 Ca^{2+} 的 loop 长度为 12 个氨基酸，但是该 loop 的两端仅有一个 helix 结构，而另一侧为很长的 loop 结构，因此它属于“EF-hand like”蛋白。LysGH15 是第一个来自噬菌体裂解酶的“EF-hand like”蛋白。

就像 thermolysin-like 蛋白酶一样，LysGH15 与其 CHAP 片段的 Ca^{2+} 就像开关一样调控着裂解活性的有无^[241]。氨基酸位点 D45、D47 和 D56 是通过其侧链结合 Ca^{2+} ，而 Y49 和 H51 则是通过主链结合 Ca^{2+} ，因此，当 Y49 和 H51 突变为丙氨酸时，CHAP 依然可以结合 Ca^{2+} ，而当 D45、D47 和 D56 突变为丙氨酸时其 Ca^{2+} 结合活性就丧失了。鉴于 Ca^{2+} 紧挨着四联体活性中心，尤其紧邻 C54，所以 Ca^{2+} 可能通过两种方式调控蛋白的活性：(1) 直接参与催化反应；(2) 通过调控 C54 的空间位置来调控蛋白的活性。但是 Ca^{2+} 与 C54 之间的距离为 9 Å，所以二者之间不会存在直接的相互作用，而 thermal shift 表明 Ca^{2+} 确实对 CHAP 的热稳定性具有贡献，即对 CHAP 的结构有一定的影响。突变体 C54S 和 C54A 的活性都消失了，而 Cys 与 Ser 之间的区别仅仅在于其侧链的-SH 变为了-OH，说明 C54 的-SH 在活性的发挥中起关键的进攻作用。这与之前大肠杆菌 GSP 合成酶的研究结果是一致的^[242]。因此， Ca^{2+} 很可能是通过调控 C54，使之处于正确的空间方位，从而调控蛋白活性。

Pfam 数据库中的 PF05257 家族 (<http://pfam.sanger.ac.uk/family/PF05257>) 与 MEROPS 数据库中的 C51 家族 (<http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/famsum?family=c51>) 分别有 6.56% (366/5579) 和 36.04% (71/197) 的成员与 LysGH15 的 CHAP 片段序列具有较高的同源性，尤其是四联体和 Ca^{2+} 结合的关键氨基酸位点，因此，这些蛋白很有可能与 LysGH15 的 CHAP 片段同样具有 Ca^{2+} 结合活性，并且其活性受 Ca^{2+} 的调控。

已有文章报道金葡萄噬菌体 Φ11 的裂解酶^[175]、链球菌噬菌体 λSA2 裂解酶的 N-acetylglucosaminidase^[116, 243] 和 LysK^[236] 的 amidase 片段均不表现裂解活性。同样，LysGH15 的 amidase-2 片段单独存在时也不具有裂解活性。但是本研究还发现 LysGH15 的 amidase-2 并不是完全沉默的，它可以增强 CHAP 片段的裂解活性。Amidase-2 片段很可能是与 CHAP 片段切割不同的细胞壁化学键，而相比 CHAP 片段，amidase-2 所切割的化学键不是致命的；或者只有当 CHAP 完成了切割活性、排除空间位阻之后，amidase-2 才可以发挥活性，因此，不表现为裂解活性。相关的文献已报道 LysK 的 amidase-2 和 CHAP 片段分别切割金葡萄细胞壁的 N-acetylmuramoyl-L-alanine 和 D-alanine 与 glycine 之间的化学键^[244]。而 LysGH15 与 LysK 的氨基酸序列同源性高达 99% 以上，因此，LysGH15 的 CHAP 与 amidase-2 很可能也切割这两个化学键（本实验室其它同学正在开展先关的研究）。当这两个

化学键同时被切断时可以使细胞壁形成大的孔洞，从而加速细菌的裂解^[245]。

AmiD 与其底物复合物的结构已得到解析，其作用机制已经明了^[246]。AmiD 的 E104 与 Zn²⁺共同发挥作用活化结合于 Zn²⁺的水分子，从而发起对 amide 化学键的亲核攻击，而其 K159 所起的作用是稳定攻击形成的四面体。LysGH15 amidase-2 片段与 AmiD 表现出很大的结构相似性，且其 E282 和 T330 分别对应 AmiD 的 E104 和 K159，因此，很可能通过相似的方式发挥裂解活性，同时突变体的活性测定也支持这一推论。之前有报道称细菌和真核细胞的 amidase 存在一个唯一保守的氨基酸位点，即 asparagine^[237]。但是通过比对分析，发现 LysGH15 的 amidase-2 片段同样具有与之对应的保守氨基酸（N275），因此可以说病毒、细菌和真核细胞的 amidase 都存在 asparagine 这一保守氨基酸位点。

SH3b 与 GFP 的融合蛋白不仅具有 GFP 激发荧光的特性，同时表现出对金黄色葡萄球菌的特异性结合能力，因此很有潜力作用一种检测工具。鉴于 SH3b 与 ALE-1 的结合区之间的高度序列同源性和结构同源性，而已有报道称 ALE-1 结合区的底物为金葡菌细胞壁上五肽交联桥的 GGGGG，因此本研究合成了多肽段 AGGGGG，并进行了滴定实验和突变分析，确定了 SH3b 发挥结合作用的关键氨基酸位点，并且这些位点突变为丙氨酸后确实显著影响了全长 LysGH15 的裂解活性。虽然 SH3b 不具有裂解活性，但是鉴于单独的 CHAP 与 LysGH15 的裂解活性相差近百倍，而 amidase-2 对 LysGH15 的裂解活性又影响甚微，所以 SH3b 的结合作用对 LysGH15 高效裂解活性的发挥起着至关重要的作用。通过 SH3b 的结合作用可以增强其相连的 CHAP 片段与细胞壁接触的机会^[247]，从而大大提高了整体的裂解活性。

5.5 小结

- 5.5.1 LysGH15 的三个活性片段单独存在时：CHAP 表现出较全长蛋白弱的裂解活性；amidase-2 片段不具有裂解活性，但是 amidase-2 片段可以增强 CHAP 片段的活性；SH3b 具有特异性结合金黄色葡萄球菌的活性。
- 5.5.2 LysGH15 以及其 CHAP 片段的裂解活性均依赖于 Ca²⁺的存在，另外四联体对其活性的发挥也是至关重要的，CHAP 片段在 LysGH15 的活性中起关键的裂解作用；
- 5.5.3 amidase-2 片段发挥活性的关键位点是 E282 和 Zn²⁺，该片段在 LysGH15 的裂解活性中所起的作用很微弱；
- 5.5.4 鉴定了 SH3b 与多肽 AGGGGG 相互作用的界面及关键的氨基酸位点，该片段在 LysGH15 的裂解活性中起重要作用。

结 论

1. 成功分离到对 MRSA 具有广谱、高效裂解活性的噬菌体——GH15。
2. GH15 表现出独特的遗传学特性，在基因组中不含有其它同源噬菌体所具有的内含子。
3. LysGH15 对金黄色葡萄球菌，尤其是对 MRSA 表现出很强的裂解活性，50 μg 的 LysGH15 即可以有效治疗处于菌血症状态的小鼠，表现出巨大的应用潜力。
4. 成功解析了 LysGH15 所有三个活性片段的三维结构。
5. CHAP 片段的活性中心为 C54-H117-E134-N136 四联体，其中 C54 的巯基起关键的进攻作用，活性中心边缘存在一个 Ca²⁺结合位点，该位点表现出调控 CHAP 片段活性有/无的开关作用。
6. Amidase-2 片段的活性中心存在一个 Zn²⁺结合位点，与空间相邻的 E282 和 T330 共同发挥水解作用。
7. 通过 NMR 和滴定实验确证了 SH3b 的三维结构以及其与底物多肽相互作用的关键氨基酸位点，SH3b 片段在全长 LysGH15 裂解活性中起重要作用。

创 新 点

1. 率先分离到了不含内含子的金黄色葡萄球菌噬菌体——GH15，丰富了噬菌体的遗传学内容，也为噬菌体的遗传学研究提供了重要的素材。
2. 成功解析了金黄色葡萄球菌噬菌体裂解酶的三维结构，为其同源蛋白的结构研究提供了重要的结构模型，同时也丰富了蛋白质的三维结构数据库。
3. 率先验证了具有 Ca^{2+} 结合位点的噬菌体裂解酶——LysGH15，该 Ca^{2+} 对 LysGH15 及其同源裂解酶的裂解活性起重要的调控作用，展示了裂解酶作用方式的多样化。
4. 率先揭示了金黄色葡萄球菌噬菌体裂解酶 LysGH15 裂解作用的分子机制，为同源裂解酶的相关研究提供了重要的参考依据。

参考文献

- [1] Hoe, S., et al., Respirable bacteriophages for the treatment of bacterial lung infections. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv*, 2013. **26**(6): p. 317-35.
- [2] Palumbi, S.R., Humans as the world's greatest evolutionary force. *Science*, 2001. **293**(5536): p. 1786-90.
- [3] Gravitz, L., Turning a new phage. *Nat Med*, 2012. **18**(9): p. 1318-20.
- [4] Coates, A.R., G. Halls, and Y. Hu, Novel classes of antibiotics or more of the same? *Br J Pharmacol*, 2011. **163**(1): p. 184-94.
- [5] Parisien, A., et al., Novel alternatives to antibiotics: bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases, and antimicrobial peptides. *J Appl Microbiol*, 2008. **104**(1): p. 1-13.
- [6] Chan, B.K., S.T. Abedon, and C. Loc-Carrillo, Phage cocktails and the future of phage therapy. *Future Microbiol*, 2013. **8**(6): p. 769-83.
- [7] Matsuzaki, S., et al., Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases. *J Infect Chemother*, 2005. **11**(5): p. 211-9.
- [8] Wright, A., et al., A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; a preliminary report of efficacy. *Clin Otolaryngol*, 2009. **34**(4): p. 349-57.
- [9] Buckling, A. and P.B. Rainey, Antagonistic coevolution between a bacterium and a bacteriophage. *Proc Biol Sci*, 2002. **269**(1494): p. 931-6.
- [10] Thiel, K., Old dogma, new tricks--21st Century phage therapy. *Nat Biotechnol*, 2004. **22**(1): p. 31-6.
- [11] Bade, E.G., Asymmetric transcription of bacteriophage Mu-1. *J Virol*, 1972. **10**(6): p. 1205-7.
- [12] Labrie, S.J., J.E. Samson, and S. Moineau, Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat Rev Microbiol*, 2010. **8**(5): p. 317-27.
- [13] Oppenheim, A.B., et al., Switches in bacteriophage lambda development. *Annu Rev Genet*, 2005. **39**: p. 409-29.
- [14] Glonti, T., N. Chanishvili, and P.W. Taylor, Bacteriophage-derived enzyme that depolymerizes the alginic acid capsule associated with cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Appl Microbiol*, 2010. **108**(2): p. 695-702.

- [15] Alemayehu, D., et al., Bacteriophages phiMR299-2 and phiNH-4 can eliminate *Pseudomonas aeruginosa* in the murine lung and on cystic fibrosis lung airway cells. *MBio*, 2012. **3**(2): p. e00029-12.
- [16] Skurnik, M., M. Pajunen, and S. Kiljunen, Biotechnological challenges of phage therapy. *Biotechnol Lett*, 2007. **29**(7): p. 995-1003.
- [17] Boratynski, J., et al., Preparation of endotoxin-free bacteriophages. *Cell Mol Biol Lett*, 2004. **9**(2): p. 253-9.
- [18] Wilson, M.J., et al., Removal of tightly bound endotoxin from biological products. *J Biotechnol*, 2001. **88**(1): p. 67-75.
- [19] Ulmer, J.B., U. Valley, and R. Rappuoli, Vaccine manufacturing: challenges and solutions. *Nat Biotechnol*, 2006. **24**(11): p. 1377-83.
- [20] Gill, J.J. and P. Hyman, Phage choice, isolation, and preparation for phage therapy. *Curr Pharm Biotechnol*, 2010. **11**(1): p. 2-14.
- [21] Hendrix, R.W., et al., Evolutionary relationships among diverse bacteriophages and prophages: all the world's a phage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(5): p. 2192-7.
- [22] Hyman, P. and S.T. Abedon, Bacteriophage host range and bacterial resistance. *Adv Appl Microbiol*, 2010. **70**: p. 217-48.
- [23] Miedzybrodzki, R., et al., Clinical aspects of phage therapy. *Adv Virus Res*, 2012. **83**: p. 73-121.
- [24] Osmundson, J., et al., Promoter-specific transcription inhibition in *Staphylococcus aureus* by a phage protein. *Cell*, 2012. **151**(5): p. 1005-16.
- [25] Loc-Carrillo, C. and S.T. Abedon, Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage*, 2011. **1**(2): p. 111-114.
- [26] Chan, B.K. and S.T. Abedon, Phage therapy pharmacology phage cocktails. *Adv Appl Microbiol*, 2012. **78**: p. 1-23.
- [27] Maura, D., et al., Virulent bacteriophages can target O104:H4 enteroaggregative *Escherichia coli* in the mouse intestine. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012. **56**(12): p. 6235-42.
- [28] Abedon, S.T., Kinetics of phage-mediated biocontrol of bacteria. *Foodborne Pathog Dis*, 2009. **6**(7): p. 807-15.
- [29] Abedon, S.T. and C. Thomas-Abedon, Phage therapy pharmacology. *Curr Pharm Biotechnol*, 2010. **11**(1): p. 28-47.

- [30] Rea, M.C., et al., Effect of broad- and narrow-spectrum antimicrobials on Clostridium difficile and microbial diversity in a model of the distal colon. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108 Suppl 1**: p. 4639-44.
- [31] Kelly, D., et al., Development of a broad-host-range phage cocktail for biocontrol. Bioeng Bugs, 2011. **2**(1): p. 31-7.
- [32] Gu, J., et al., A method for generation phage cocktail with great therapeutic potential. PLoS One, 2012. **7**(3): p. e31698.
- [33] Filippov, A.A., et al., Bacteriophage-resistant mutants in Yersinia pestis: identification of phage receptors and attenuation for mice. PLoS One, 2011. **6**(9): p. e25486.
- [34] Manolio, T.A. and E.D. Green, Genomics reaches the clinic: from basic discoveries to clinical impact. Cell, 2011. **147**(1): p. 14-6.
- [35] Gosalbes, M.J., et al., Metagenomics of human microbiome: beyond 16s rDNA. Clin Microbiol Infect, 2012. **18 Suppl 4**: p. 47-9.
- [36] Pirnay, J.P., et al., The phage therapy paradigm: pret-a-porter or sur-mesure? Pharm Res, 2011. **28**(4): p. 934-7.
- [37] Abedon, S.T., et al., Phage treatment of human infections. Bacteriophage, 2011. **1**(2): p. 66-85.
- [38] Verschueren, L., et al., Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. Microbiol Mol Biol Rev, 2000. **64**(4): p. 655-71.
- [39] Nakai, T., et al., Protective effects of bacteriophage on experimental *Lactococcus garvieae* infection in yellowtail. Dis Aquat Organ, 1999. **37**(1): p. 33-41.
- [40] Park, S.C., et al., Isolation of bacteriophages specific to a fish pathogen, *Pseudomonas plecoglossicida*, as a candidate for disease control. Appl Environ Microbiol, 2000. **66**(4): p. 1416-22.
- [41] Shrivastava, M.M., et al., Molecular characterization of *Vibrio harveyi* bacteriophages isolated from aquaculture environments along the coast of India. Environ Microbiol, 2007. **9**(2): p. 322-31.
- [42] Smith, H.W. and M.B. Huggins, Successful treatment of experimental *Escherichia coli* infections in mice using phage: its general superiority over antibiotics. J Gen Microbiol, 1982. **128**(2): p. 307-18.
- [43] Smith, H.W. and M.B. Huggins, Effectiveness of phages in treating experimental *Escherichia*

- coli diarrhoea in calves, piglets and lambs. J Gen Microbiol, 1983. **129**(8): p. 2659-75.
- [44] Smith, H.W., M.B. Huggins, and K.M. Shaw, The control of experimental Escherichia coli diarrhoea in calves by means of bacteriophages. J Gen Microbiol, 1987. **133**(5): p. 1111-26.
- [45] Barrow, P., M. Lovell, and A. Berchieri, Jr., Use of lytic bacteriophage for control of experimental Escherichia coli septicemia and meningitis in chickens and calves. Clin Diagn Lab Immunol, 1998. **5**(3): p. 294-8.
- [46] Makovec, J.A. and P.L. Ruegg, Antimicrobial resistance of bacteria isolated from dairy cow milk samples submitted for bacterial culture: 8,905 samples (1994-2001). J Am Vet Med Assoc, 2003. **222**(11): p. 1582-9.
- [47] Lee, J.H., Methicillin (Oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. Appl Environ Microbiol, 2003. **69**(11): p. 6489-94.
- [48] Matsuzaki, S., et al., Experimental protection of mice against lethal *Staphylococcus aureus* infection by novel bacteriophage phi MR11. J Infect Dis, 2003. **187**(4): p. 613-24.
- [49] Gill, J.J., et al., Efficacy and pharmacokinetics of bacteriophage therapy in treatment of subclinical *Staphylococcus aureus* mastitis in lactating dairy cattle. Antimicrob Agents Chemother, 2006. **50**(9): p. 2912-8.
- [50] Gill, J.J., et al., Bovine whey proteins inhibit the interaction of *Staphylococcus aureus* and bacteriophage K. J Appl Microbiol, 2006. **101**(2): p. 377-86.
- [51] Huff, W.E., et al., Prevention of *Escherichia coli* respiratory infection in broiler chickens with bacteriophage (SPR02). Poult Sci, 2002. **81**(4): p. 437-41.
- [52] Huff, W.E., et al., Prevention of *Escherichia coli* infection in broiler chickens with a bacteriophage aerosol spray. Poult Sci, 2002. **81**(10): p. 1486-91.
- [53] Huff, W.E., et al., Evaluation of aerosol spray and intramuscular injection of bacteriophage to treat an *Escherichia coli* respiratory infection. Poult Sci, 2003. **82**(7): p. 1108-12.
- [54] Huff, W.E., et al., Therapeutic efficacy of bacteriophage and Baytril (enrofloxacin) individually and in combination to treat colibacillosis in broilers. Poult Sci, 2004. **83**(12): p. 1944-7.
- [55] Atterbury, R.J., et al., Bacteriophage therapy to reduce salmonella colonization of broiler chickens. Appl Environ Microbiol, 2007. **73**(14): p. 4543-9.
- [56] Jorgensen, F., et al., Prevalence and numbers of *Salmonella* and *Campylobacter* spp. on raw,

- whole chickens in relation to sampling methods. *Int J Food Microbiol*, 2002. **76**(1-2): p. 151-64.
- [57] Rosenquist, H., et al., Quantitative risk assessment of human campylobacteriosis associated with thermophilic *Campylobacter* species in chickens. *Int J Food Microbiol*, 2003. **83**(1): p. 87-103.
- [58] Wagenaar, J.A., et al., Phage therapy reduces *Campylobacter jejuni* colonization in broilers. *Vet Microbiol*, 2005. **109**(3-4): p. 275-83.
- [59] Jamalludeen, N., et al., Isolation and characterization of nine bacteriophages that lyse O149 enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Vet Microbiol*, 2007. **124**(1-2): p. 47-57.
- [60] Scharff, R.L., Economic burden from health losses due to foodborne illness in the United States. *J Food Prot*, 2012. **75**(1): p. 123-31.
- [61] Hagens, S. and M.J. Loessner, Bacteriophage for biocontrol of foodborne pathogens: calculations and considerations. *Curr Pharm Biotechnol*, 2010. **11**(1): p. 58-68.
- [62] Greer, G.G., Bacteriophage control of foodborne bacteria. *J Food Prot*, 2005. **68**(5): p. 1102-11.
- [63] Higgins, J.P., et al., Use of a specific bacteriophage treatment to reduce *Salmonella* in poultry products. *Poult Sci*, 2005. **84**(7): p. 1141-5.
- [64] Hudson, J.A., et al., Bacteriophages as biocontrol agents in food. *J Food Prot*, 2005. **68**(2): p. 426-37.
- [65] Hagens, S. and M.J. Loessner, Application of bacteriophages for detection and control of foodborne pathogens. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007. **76**(3): p. 513-9.
- [66] Carlton, R.M., et al., Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2005. **43**(3): p. 301-12.
- [67] Bigwood, T., J.A. Hudson, and C. Billington, Influence of host and bacteriophage concentrations on the inactivation of food-borne pathogenic bacteria by two phages. *FEMS Microbiol Lett*, 2009. **291**(1): p. 59-64.
- [68] Kasman, L.M., et al., Overcoming the phage replication threshold: a mathematical model with implications for phage therapy. *J Virol*, 2002. **76**(11): p. 5557-64.
- [69] Maura, D. and L. Debarbieux, Bacteriophages as twenty-first century antibacterial tools for food and medicine. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011. **90**(3): p. 851-9.

- [70] Balogh, B., et al., Phage therapy for plant disease control. *Curr Pharm Biotechnol*, 2010. **11**(1): p. 48-57.
- [71] Leverenz, B., et al., Optimizing concentration and timing of a phage spray application to reduce *Listeria monocytogenes* on honeydew melon tissue. *J Food Prot*, 2004. **67**(8): p. 1682-6.
- [72] Guenther, S., et al., Virulent bacteriophage for efficient biocontrol of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *Appl Environ Microbiol*, 2009. **75**(1): p. 93-100.
- [73] Havelaar, A.H., et al., Effectiveness and efficiency of controlling *Campylobacter* on broiler chicken meat. *Risk Anal*, 2007. **27**(4): p. 831-44.
- [74] Deasy, T., et al., Isolation of a virulent *Lactobacillus brevis* phage and its application in the control of beer spoilage. *J Food Prot*, 2011. **74**(12): p. 2157-61.
- [75] Greer, G.G. and B.D. Dilts, Inability of a bacteriophage pool to control beef spoilage. *Int J Food Microbiol*, 1990. **10**(3-4): p. 331-42.
- [76] Greer, G.G. and B.D. Dilts, Control of *Brochothrix thermosphacta* spoilage of pork adipose tissue using bacteriophages. *J Food Prot*, 2002. **65**(5): p. 861-3.
- [77] Di Bonaventura, G., et al., Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity. *J Appl Microbiol*, 2008. **104**(6): p. 1552-61.
- [78] Roy, B., et al., Biological inactivation of adhering *Listeria monocytogenes* by listeriaphages and a quaternary ammonium compound. *Appl Environ Microbiol*, 1993. **59**(9): p. 2914-7.
- [79] Anany, H., et al., Biocontrol of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in meat by using phages immobilized on modified cellulose membranes. *Appl Environ Microbiol*, 2011. **77**(18): p. 6379-87.
- [80] Lee, S.H., et al., Isolation, characterization of bacteriophages specific to *Microlunatus phosphovorus* and their application for rapid host detection. *Lett Appl Microbiol*, 2006. **42**(3): p. 259-64.
- [81] Kretzer, J.W., et al., Use of high-affinity cell wall-binding domains of bacteriophage endolysins for immobilization and separation of bacterial cells. *Appl Environ Microbiol*, 2007. **73**(6): p. 1992-2000.
- [82] Schofield, D.A. and C. Westwater, Phage-mediated bioluminescent detection of *Bacillus anthracis*. *J Appl Microbiol*, 2009. **107**(5): p. 1468-78.

- [83] Carmody, L.A., et al., Efficacy of bacteriophage therapy in a model of *Burkholderia cenocepacia* pulmonary infection. *J Infect Dis*, 2010. **201**(2): p. 264-71.
- [84] Merril, C.R., et al., Long-circulating bacteriophage as antibacterial agents. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(8): p. 3188-92.
- [85] Bruttin, A. and H. Brussow, Human volunteers receiving *Escherichia coli* phage T4 orally: a safety test of phage therapy. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005. **49**(7): p. 2874-8.
- [86] Rhoads, D.D., et al., Bacteriophage therapy of venous leg ulcers in humans: results of a phase I safety trial. *J Wound Care*, 2009. **18**(6): p. 237-8, 240-3.
- [87] Delacoste, P., [Considerations on the treatment of common respiratory diseases by means of bacteriophages]. *Rev Med Suisse Romande*, 1959. **79**: p. 552-63.
- [88] Hoeflmayr, J. and R. Fried, [On the problem of sensitization during the therapeutic use of phage suspensions]. *Arzneimittelforschung*, 1960. **10**: p. 996-7.
- [89] Merabishvili, M., et al., Quality-controlled small-scale production of a well-defined bacteriophage cocktail for use in human clinical trials. *PLoS One*, 2009. **4**(3): p. e4944.
- [90] Fischetti, V.A., Bacteriophage lysins as effective antibacterials. *Curr Opin Microbiol*, 2008. **11**(5): p. 393-400.
- [91] Whatmore, A.M. and R.H. Reed, Determination of turgor pressure in *Bacillus subtilis*: a possible role for K⁺ in turgor regulation. *J Gen Microbiol*, 1990. **136**(12): p. 2521-6.
- [92] Doyle, R.J. and R.E. Marquis, Elastic, flexible peptidoglycan and bacterial cell wall properties. *Trends Microbiol*, 1994. **2**(2): p. 57-60.
- [93] Arnoldi, M., et al., Bacterial turgor pressure can be measured by atomic force microscopy. *Phys Rev E Stat Phys Plasmas Fluids Relat Interdiscip Topics*, 2000. **62**(1 Pt B): p. 1034-44.
- [94] Wang, I.N., J. Deaton, and R. Young, Sizing the holin lesion with an endolysin-beta-galactosidase fusion. *J Bacteriol*, 2003. **185**(3): p. 779-87.
- [95] Wang, I.N., D.L. Smith, and R. Young, Holins: the protein clocks of bacteriophage infections. *Annu Rev Microbiol*, 2000. **54**: p. 799-825.
- [96] Pastagia, M., et al., Lysins: the arrival of pathogen-directed anti-infectives. *J Med Microbiol*, 2013. **62**(Pt 10): p. 1506-16.
- [97] Borysowski, J., B. Weber-Dabrowska, and A. Gorski, Bacteriophage endolysins as a novel class of antibacterial agents. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2006. **231**(4): p. 366-77.
- [98] Morita, M., et al., Functional analysis of antibacterial activity of *Bacillus amyloliquefaciens*

- phage endolysin against Gram-negative bacteria. *FEBS Lett*, 2001. **500**(1-2): p. 56-9.
- [99] Lai, M.J., et al., Antibacterial activity of *Acinetobacter baumannii* phage varphiAB2 endolysin (LysAB2) against both gram-positive and gram-negative bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011. **90**(2): p. 529-39.
- [100] Lopez, R., et al., The pneumococcal cell wall degrading enzymes: a modular design to create new lysins? *Microb Drug Resist*, 1997. **3**(2): p. 199-211.
- [101] Low, L.Y., et al., Role of net charge on catalytic domain and influence of cell wall binding domain on bactericidal activity, specificity, and host range of phage lysins. *J Biol Chem*, 2011. **286**(39): p. 34391-403.
- [102] Vollmer, W., et al., Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiol Rev*, 2008. **32**(2): p. 259-86.
- [103] Schindler, C.A. and V.T. Schuhardt, Lysostaphin: A New Bacteriolytic Agent for the *Staphylococcus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1964. **51**: p. 414-21.
- [104] Schmelcher, M., D.M. Donovan, and M.J. Loessner, Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials. *Future Microbiol*, 2012. **7**(10): p. 1147-71.
- [105] Nelson, D., L. Loomis, and V.A. Fischetti, Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(7): p. 4107-12.
- [106] Kanamaru, S., et al., Control of bacteriophage T4 tail lysozyme activity during the infection process. *J Mol Biol*, 2005. **346**(4): p. 1013-20.
- [107] Moak, M. and I.J. Molineux, Peptidoglycan hydrolytic activities associated with bacteriophage virions. *Mol Microbiol*, 2004. **51**(4): p. 1169-83.
- [108] Lavigne, R., et al., Identification and characterization of a highly thermostable bacteriophage lysozyme. *Cell Mol Life Sci*, 2004. **61**(21): p. 2753-9.
- [109] Pastagia, M., et al., A novel chimeric lysin shows superiority to mupirocin for skin decolonization of methicillin-resistant and -sensitive *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011. **55**(2): p. 738-44.
- [110] Fischetti, V.A., D. Nelson, and R. Schuch, Reinventing phage therapy: are the parts greater than the sum? *Nat Biotechnol*, 2006. **24**(12): p. 1508-11.
- [111] Vollmer, W. and U. Bertsche, Murein (peptidoglycan) structure, architecture and biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta*, 2008. **1778**(9): p. 1714-34.

- [112] Schuch, R., D. Nelson, and V.A. Fischetti, A bacteriolytic agent that detects and kills *Bacillus anthracis*. *Nature*, 2002. **418**(6900): p. 884-9.
- [113] Briers, Y., et al., The high-affinity peptidoglycan binding domain of *Pseudomonas* phage endolysin KZ144. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009. **383**(2): p. 187-91.
- [114] Nelson, D.C., et al., Endolysins as antimicrobials. *Adv Virus Res*, 2012. **83**: p. 299-365.
- [115] Becker, S.C., et al., Differentially conserved staphylococcal SH3b_5 cell wall binding domains confer increased staphylolytic and streptolytic activity to a streptococcal prophage endolysin domain. *Gene*, 2009. **443**(1-2): p. 32-41.
- [116] Pritchard, D.G., et al., LambdaSa1 and LambdaSa2 prophage lysins of *Streptococcus agalactiae*. *Appl Environ Microbiol*, 2007. **73**(22): p. 7150-4.
- [117] Hermoso, J.A., J.L. Garcia, and P. Garcia, Taking aim on bacterial pathogens: from phage therapy to enzybiotics. *Curr Opin Microbiol*, 2007. **10**(5): p. 461-72.
- [118] Nelson, D., et al., PlyC: a multimeric bacteriophage lysin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(28): p. 10765-70.
- [119] Hermoso, J.A., et al., Structural basis for selective recognition of pneumococcal cell wall by modular endolysin from phage Cp-1. *Structure*, 2003. **11**(10): p. 1239-49.
- [120] Mayer, M.J., et al., Structure-based modification of a *Clostridium difficile*-targeting endolysin affects activity and host range. *J Bacteriol*, 2011. **193**(19): p. 5477-86.
- [121] Korndorfer, I.P., et al., The crystal structure of the bacteriophage PSA endolysin reveals a unique fold responsible for specific recognition of *Listeria* cell walls. *J Mol Biol*, 2006. **364**(4): p. 678-89.
- [122] Korndorfer, I.P., et al., Structural analysis of the L-alanoyl-D-glutamate endopeptidase domain of *Listeria* bacteriophage endolysin Ply500 reveals a new member of the LAS peptidase family. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2008. **64**(Pt 6): p. 644-50.
- [123] Schmelcher, M., F. Waldherr, and M.J. Loessner, *Listeria* bacteriophage peptidoglycan hydrolases feature high thermostability and reveal increased activity after divalent metal cation substitution. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012. **93**(2): p. 633-43.
- [124] Kashyap, M., et al., (1)H, (1)(3)C and (1)(5)N NMR assignments of inactive form of P1 endolysin Lyz. *Biomol NMR Assign*, 2012. **6**(1): p. 87-9.
- [125] Bustamante, N., et al., Cpl-7, a lysozyme encoded by a pneumococcal bacteriophage with a novel cell wall-binding motif. *J Biol Chem*, 2010. **285**(43): p. 33184-96.

- [126] Borysowski, J., et al., Potential of bacteriophages and their lysins in the treatment of MRSA: current status and future perspectives. *BioDrugs*, 2011. **25**(6): p. 347-55.
- [127] Fischetti, V.A., Bacteriophage lytic enzymes: novel anti-infectives. *Trends Microbiol*, 2005. **13**(10): p. 491-6.
- [128] Yother, J., et al., Generation and properties of a *Streptococcus pneumoniae* mutant which does not require choline or analogs for growth. *J Bacteriol*, 1998. **180**(8): p. 2093-101.
- [129] Guariglia-Oropeza, V. and J.D. Helmann, *Bacillus subtilis* sigma(V) confers lysozyme resistance by activation of two cell wall modification pathways, peptidoglycan O-acetylation and D-alanylation of teichoic acids. *J Bacteriol*, 2011. **193**(22): p. 6223-32.
- [130] Grundling, A., D.M. Missiakas, and O. Schneewind, *Staphylococcus aureus* mutants with increased lysostaphin resistance. *J Bacteriol*, 2006. **188**(17): p. 6286-97.
- [131] DeHart, H.P., et al., The lysostaphin endopeptidase resistance gene (epr) specifies modification of peptidoglycan cross bridges in *Staphylococcus simulans* and *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol*, 1995. **61**(4): p. 1475-9.
- [132] Schleifer, K.H. and O. Kandler, Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol Rev*, 1972. **36**(4): p. 407-77.
- [133] Loeffler, J.M., D. Nelson, and V.A. Fischetti, Rapid killing of *Streptococcus pneumoniae* with a bacteriophage cell wall hydrolase. *Science*, 2001. **294**(5549): p. 2170-2.
- [134] Daniel, A., et al., Synergism between a novel chimeric lysin and oxacillin protects against infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010. **54**(4): p. 1603-12.
- [135] Mayer, M.J., A. Narbad, and M.J. Gasson, Molecular characterization of a *Clostridium difficile* bacteriophage and its cloned biologically active endolysin. *J Bacteriol*, 2008. **190**(20): p. 6734-40.
- [136] Schmitz, J.E., et al., Lytic enzyme discovery through multigenomic sequence analysis in *Clostridium perfringens*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011. **89**(6): p. 1783-95.
- [137] Yoong, P., et al., Identification of a broadly active phage lytic enzyme with lethal activity against antibiotic-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *J Bacteriol*, 2004. **186**(14): p. 4808-12.
- [138] Loessner, M.J., et al., C-terminal domains of *Listeria monocytogenes* bacteriophage murein hydrolases determine specific recognition and high-affinity binding to bacterial cell wall

- carbohydrates. Mol Microbiol, 2002. **44**(2): p. 335-49.
- [139] Cheng, Q., et al., Removal of group B streptococci colonizing the vagina and oropharynx of mice with a bacteriophage lytic enzyme. Antimicrob Agents Chemother, 2005. **49**(1): p. 111-7.
- [140] Becker, S.C., J. Foster-Frey, and D.M. Donovan, The phage K lytic enzyme LysK and lysostaphin act synergistically to kill MRSA. FEMS Microbiol Lett, 2008. **287**(2): p. 185-91.
- [141] Nau, R. and H. Eiffert, Modulation of release of proinflammatory bacterial compounds by antibacterials: potential impact on course of inflammation and outcome in sepsis and meningitis. Clin Microbiol Rev, 2002. **15**(1): p. 95-110.
- [142] Entenza, J.M., et al., Therapeutic effects of bacteriophage Cpl-1 lysis against *Streptococcus pneumoniae* endocarditis in rats. Antimicrob Agents Chemother, 2005. **49**(11): p. 4789-92.
- [143] Witzenrath, M., et al., Systemic use of the endolysin Cpl-1 rescues mice with fatal pneumococcal pneumonia. Crit Care Med, 2009. **37**(2): p. 642-9.
- [144] Fischetti, V.A., Bacteriophage endolysins: a novel anti-infective to control Gram-positive pathogens. Int J Med Microbiol, 2010. **300**(6): p. 357-62.
- [145] Loeffler, J.M., S. Djurkovic, and V.A. Fischetti, Phage lytic enzyme Cpl-1 as a novel antimicrobial for pneumococcal bacteraemia. Infect Immun, 2003. **71**(11): p. 6199-204.
- [146] Rashel, M., et al., Efficient elimination of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* by cloned lysis derived from bacteriophage phi MR11. J Infect Dis, 2007. **196**(8): p. 1237-47.
- [147] Jado, I., et al., Phage lytic enzymes as therapy for antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* infection in a murine sepsis model. J Antimicrob Chemother, 2003. **52**(6): p. 967-73.
- [148] Schmelcher, M., et al., Rapid multiplex detection and differentiation of *Listeria* cells by use of fluorescent phage endolysin cell wall binding domains. Appl Environ Microbiol, 2010. **76**(17): p. 5745-56.
- [149] Resch, G., P. Moreillon, and V.A. Fischetti, PEGylating a bacteriophage endolysin inhibits its bactericidal activity. AMB Express, 2011. **1**: p. 29.
- [150] Resch, G., P. Moreillon, and V.A. Fischetti, A stable phage lysis (Cpl-1) dimer with increased antipneumococcal activity and decreased plasma clearance. Int J Antimicrob Agents, 2011. **38**(6): p. 516-21.
- [151] Loeffler, J.M. and V.A. Fischetti, Synergistic lethal effect of a combination of phage lytic

- enzymes with different activities on penicillin-sensitive and -resistant *Streptococcus pneumoniae* strains. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003. **47**(1): p. 375-7.
- [152] Djurkovic, S., J.M. Loeffler, and V.A. Fischetti, Synergistic killing of *Streptococcus pneumoniae* with the bacteriophage lytic enzyme Cpl-1 and penicillin or gentamicin depends on the level of penicillin resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005. **49**(3): p. 1225-8.
- [153] Garcia, P., et al., Synergy between the phage endolysin LysH5 and nisin to kill *Staphylococcus aureus* in pasteurized milk. *Int J Food Microbiol*, 2010. **141**(3): p. 151-5.
- [154] Fischetti, V.A., E.C. Gotschlich, and A.W. Bernheimer, Purification and physical properties of group C streptococcal phage-associated lysin. *J Exp Med*, 1971. **133**(5): p. 1105-17.
- [155] Grandgirard, D., et al., Phage lytic enzyme Cpl-1 for antibacterial therapy in experimental pneumococcal meningitis. *J Infect Dis*, 2008. **197**(11): p. 1519-22.
- [156] Kikkawa, H.S., et al., Characterization of the catalytic activity of the gamma-phage lysin, PlyG, specific for *Bacillus anthracis*. *FEMS Microbiol Lett*, 2008. **286**(2): p. 236-40.
- [157] Yoong, P., et al., PlyPH, a bacteriolytic enzyme with a broad pH range of activity and lytic action against *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol*, 2006. **188**(7): p. 2711-4.
- [158] Gupta, R. and Y. Prasad, P-27/HP endolysin as antibacterial agent for antibiotic resistant *Staphylococcus aureus* of human infections. *Curr Microbiol*, 2011. **63**(1): p. 39-45.
- [159] Vipra, A.A., et al., Antistaphylococcal activity of bacteriophage derived chimeric protein P128. *BMC Microbiol*, 2012. **12**: p. 41.
- [160] Kim, W.S., H. Salm, and K. Geider, Expression of bacteriophage phiEa1h lysozyme in *Escherichia coli* and its activity in growth inhibition of *Erwinia amylovora*. *Microbiology*, 2004. **150**(Pt 8): p. 2707-14.
- [161] Obeso, J.M., et al., Lytic activity of the recombinant staphylococcal bacteriophage PhiH5 endolysin active against *Staphylococcus aureus* in milk. *Int J Food Microbiol*, 2008. **128**(2): p. 212-8.
- [162] Celia, L.K., D. Nelson, and D.E. Kerr, Characterization of a bacteriophage lysin (Ply700) from *Streptococcus uberis*. *Vet Microbiol*, 2008. **130**(1-2): p. 107-17.
- [163] Walcher, G., et al., Evaluation of paramagnetic beads coated with recombinant *Listeria* phage endolysin-derived cell-wall-binding domain proteins for separation of *Listeria monocytogenes* from raw milk in combination with culture-based and real-time polymerase chain reaction-based quantification. *Foodborne Pathog Dis*, 2010. **7**(9): p. 1019-24.

- [164] Fujinami, Y., et al., Sensitive detection of *Bacillus anthracis* using a binding protein originating from gamma-phage. *Microbiol Immunol*, 2007. **51**(2): p. 163-9.
- [165] Sainathrao, S., K.V. Mohan, and C. Atreya, Gamma-phage lysin PlyG sequence-based synthetic peptides coupled with Qdot-nanocrystals are useful for developing detection methods for *Bacillus anthracis* by using its surrogates, *B. anthracis*-Sterne and *B. cereus*-4342. *BMC Biotechnol*, 2009. **9**: p. 67.
- [166] Oey, M., et al., Plastid production of protein antibiotics against pneumonia via a new strategy for high-level expression of antimicrobial proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(16): p. 6579-84.
- [167] Sordillo, L.M. and K.L. Streicher, Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2002. **7**(2): p. 135-46.
- [168] Bramley, A.J. and R. Foster, Effects of lysostaphin on *Staphylococcus aureus* infections of the mouse mammary gland. *Res Vet Sci*, 1990. **49**(1): p. 120-1.
- [169] Oldham, E.R. and M.J. Daley, Lysostaphin: use of a recombinant bactericidal enzyme as a mastitis therapeutic. *J Dairy Sci*, 1991. **74**(12): p. 4175-82.
- [170] Kerr, D.E., et al., Lysostaphin expression in mammary glands confers protection against staphylococcal infection in transgenic mice. *Nat Biotechnol*, 2001. **19**(1): p. 66-70.
- [171] Wall, R.J., et al., Genetically enhanced cows resist intramammary *Staphylococcus aureus* infection. *Nat Biotechnol*, 2005. **23**(4): p. 445-51.
- [172] Schmelcher, M., et al., Chimeric phage lysins act synergistically with lysostaphin to kill mastitis-causing *Staphylococcus aureus* in murine mammary glands. *Appl Environ Microbiol*, 2012. **78**(7): p. 2297-305.
- [173] Hoopes, J.T., et al., Use of a bacteriophage lysin, PlyC, as an enzyme disinfectant against *Streptococcus equi*. *Appl Environ Microbiol*, 2009. **75**(5): p. 1388-94.
- [174] Van Houdt, R. and C.W. Michiels, Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *J Appl Microbiol*, 2010. **109**(4): p. 1117-31.
- [175] Sass, P. and G. Bierbaum, Lytic activity of recombinant bacteriophage phi11 and phi12 endolysins on whole cells and biofilms of *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol*, 2007. **73**(1): p. 347-52.
- [176] Son, J.S., et al., Antibacterial and biofilm removal activity of a podoviridae *Staphylococcus aureus* bacteriophage SAP-2 and a derived recombinant cell-wall-degrading enzyme. *Appl*

Microbiol Biotechnol, 2010. **86**(5): p. 1439-49.

- [177] Domenech, M., E. Garcia, and M. Moscoso, In vitro destruction of *Streptococcus pneumoniae* biofilms with bacterial and phage peptidoglycan hydrolases. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011. **55**(9): p. 4144-8.
- [178] Meng, X., et al., Application of a bacteriophage lysin to disrupt biofilms formed by the animal pathogen *Streptococcus suis*. *Appl Environ Microbiol*, 2011. **77**(23): p. 8272-9.
- [179] Loessner, M.J., A. Schneider, and S. Scherer, A new procedure for efficient recovery of DNA, RNA, and proteins from *Listeria* cells by rapid lysis with a recombinant bacteriophage endolysin. *Appl Environ Microbiol*, 1995. **61**(3): p. 1150-2.
- [180] Panthel, K., et al., Generation of *Helicobacter pylori* ghosts by PhiX protein E-mediated inactivation and their evaluation as vaccine candidates. *Infect Immun*, 2003. **71**(1): p. 109-16.
- [181] Hu, S., et al., Characterization of a novel LysM domain from *Lactobacillus fermentum* bacteriophage endolysin and its use as an anchor to display heterologous proteins on the surfaces of lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 2010. **76**(8): p. 2410-8.
- [182] Zhang, X., et al., An auto-inducible *Escherichia coli* lysis system controlled by magnesium. *J Microbiol Methods*, 2009. **79**(2): p. 199-204.
- [183] Hashimoto, H., [Drug resistance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Japan until 1993]. *Jpn J Antibiot*, 1994. **47**(6): p. 575-84.
- [184] Miller, L.G., et al., Necrotizing fasciitis caused by community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Los Angeles. *N Engl J Med*, 2005. **352**(14): p. 1445-53.
- [185] Mylotte, J.M., C. McDermott, and J.A. Spooner, Prospective study of 114 consecutive episodes of *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Rev Infect Dis*, 1987. **9**(5): p. 891-907.
- [186] Tenover, F.C., et al., Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate from a patient in Pennsylvania. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004. **48**(1): p. 275-80.
- [187] Brumfitt, W. and J. Hamilton-Miller, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *N Engl J Med*, 1989. **320**(18): p. 1188-96.
- [188] Enright, M.C., The evolution of a resistant pathogen--the case of MRSA. *Curr Opin Pharmacol*, 2003. **3**(5): p. 474-9.
- [189] Krupovic, M., et al., Genomics of bacterial and archaeal viruses: dynamics within the prokaryotic virosphere. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2011. **75**(4): p. 610-35.

- [190] Kwan, T., et al., The complete genomes and proteomes of 27 *Staphylococcus aureus* bacteriophages. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(14): p. 5174-9.
- [191] Li, R., et al., The sequence and de novo assembly of the giant panda genome. Nature, 2010. **463**(7279): p. 311-7.
- [192] Li, R., et al., De novo assembly of human genomes with massively parallel short read sequencing. Genome Res, 2010. **20**(2): p. 265-72.
- [193] Altschul, S.F., et al., Basic local alignment search tool. J Mol Biol, 1990. **215**(3): p. 403-10.
- [194] Lowe, T.M. and S.R. Eddy, tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. Nucleic Acids Res, 1997. **25**(5): p. 955-64.
- [195] Lagesen, K., et al., RNAmmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(9): p. 3100-8.
- [196] Altschul, S.F., et al., Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res, 1997. **25**(17): p. 3389-402.
- [197] Grant, J.R. and P. Stothard, The CGView Server: a comparative genomics tool for circular genomes. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(Web Server issue): p. W181-4.
- [198] Carver, T., et al., Artemis and ACT: viewing, annotating and comparing sequences stored in a relational database. Bioinformatics, 2008. **24**(23): p. 2672-6.
- [199] Landthaler, M. and D.A. Shub, Unexpected abundance of self-splicing introns in the genome of bacteriophage Twort: introns in multiple genes, a single gene with three introns, and exon skipping by group I ribozymes. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(12): p. 7005-10.
- [200] Shevchenko, A., et al., A strategy for identifying gel-separated proteins in sequence databases by MS alone. Biochem Soc Trans, 1996. **24**(3): p. 893-6.
- [201] Lavigne, R., et al., The structural proteome of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage phiKMV. Microbiology, 2006. **152**(Pt 2): p. 529-34.
- [202] O'Flaherty, S., et al., Genome of staphylococcal phage K: a new lineage of Myoviridae infecting gram-positive bacteria with a low G+C content. J Bacteriol, 2004. **186**(9): p. 2862-71.
- [203] Goerke, C., et al., Diversity of prophages in dominant *Staphylococcus aureus* clonal lineages. J Bacteriol, 2009. **191**(11): p. 3462-8.
- [204] Kuroda, M., et al., Whole genome sequencing of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet, 2001. **357**(9264): p. 1225-40.

- [205] Gill, S.R., et al., Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. *J Bacteriol*, 2005. **187**(7): p. 2426-38.
- [206] Lavigne, R., et al., Classification of Myoviridae bacteriophages using protein sequence similarity. *BMC Microbiol*, 2009. **9**: p. 224.
- [207] Pantucek, R., et al., The polyvalent staphylococcal phage phi 812: its host-range mutants and related phages. *Virology*, 1998. **246**(2): p. 241-52.
- [208] Hendrix, R.W., Bacteriophage genomics. *Curr Opin Microbiol*, 2003. **6**(5): p. 506-11.
- [209] Rocha, E.P. and A. Danchin, Base composition bias might result from competition for metabolic resources. *Trends Genet*, 2002. **18**(6): p. 291-4.
- [210] Bailly-Bechet, M., M. Vergassola, and E. Rocha, Causes for the intriguing presence of tRNAs in phages. *Genome Res*, 2007. **17**(10): p. 1486-95.
- [211] Foley, S., A. Bruttin, and H. Brussow, Widespread distribution of a group I intron and its three deletion derivatives in the lysin gene of *Streptococcus thermophilus* bacteriophages. *J Virol*, 2000. **74**(2): p. 611-8.
- [212] Edgell, D.R., M. Belfort, and D.A. Shub, Barriers to intron promiscuity in bacteria. *J Bacteriol*, 2000. **182**(19): p. 5281-9.
- [213] Landthaler, M., et al., Two self-splicing group I introns in the ribonucleotide reductase large subunit gene of *Staphylococcus aureus* phage Twort. *Nucleic Acids Res*, 2002. **30**(9): p. 1935-43.
- [214] Shub, D.A., H. Goodrich-Blair, and S.R. Eddy, Amino acid sequence motif of group I intron endonucleases is conserved in open reading frames of group II introns. *Trends Biochem Sci*, 1994. **19**(10): p. 402-4.
- [215] Haugen, P., D.M. Simon, and D. Bhattacharya, The natural history of group I introns. *Trends Genet*, 2005. **21**(2): p. 111-9.
- [216] Darnell, J.E. and W.F. Doolittle, Speculations on the early course of evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986. **83**(5): p. 1271-5.
- [217] Coulombe-Huntington, J. and J. Majewski, Characterization of intron loss events in mammals. *Genome Res*, 2007. **17**(1): p. 23-32.
- [218] Loessner, M.J., Bacteriophage endolysins--current state of research and applications. *Curr*

Opin Microbiol, 2005. **8**(4): p. 480-7.

- [219] Thijs, L.G., A.B. Groeneveld, and C.E. Hack, Multiple organ failure in septic shock. Curr Top Microbiol Immunol, 1996. **216**: p. 209-37.
- [220] Tsao, S.M., C.C. Hsu, and M.C. Yin, Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in diabetic mice enhanced inflammation and coagulation. J Med Microbiol, 2006. **55**(Pt 4): p. 379-85.
- [221] Larkin, E.A., et al., *Staphylococcus aureus*: the toxic presence of a pathogen extraordinaire. Curr Med Chem, 2009. **16**(30): p. 4003-19.
- [222] Matsui, K., M. Wirottesangthong, and A. Nishikawa, Peptidoglycan from *Staphylococcus aureus* induces IL-4 production from murine spleen cells via an IL-18-dependent mechanism. Int Arch Allergy Immunol, 2008. **146**(3): p. 262-6.
- [223] Konarev, P.V., et al., PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. Journal of Applied Crystallography, 2003. **36**(5): p. 1277-1282.
- [224] Svergun, D., Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. Journal of Applied Crystallography, 1992. **25**(4): p. 495-503.
- [225] Fischer, H., et al., Determination of the molecular weight of proteins in solution from a single small-angle X-ray scattering measurement on a relative scale. Journal of Applied Crystallography, 2010. **43**(1): p. 101-109.
- [226] Gong, W., et al., Structural insight into recognition of methylated histone tails by retinoblastoma-binding protein 1. J Biol Chem, 2012. **287**(11): p. 8531-40.
- [227] Delaglio, F., et al., NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. J Biomol NMR, 1995. **6**(3): p. 277-93.
- [228] Johnson, B.A., Using NMRView to visualize and analyze the NMR spectra of macromolecules. Methods Mol Biol, 2004. **278**: p. 313-52.
- [229] Herrmann, T., P. Guntert, and K. Wuthrich, Protein NMR structure determination with automated NOE assignment using the new software CANDID and the torsion angle dynamics algorithm DYANA. Journal of Molecular Biology, 2002. **319**(1): p. 209-27.
- [230] Brunger, A.T., et al., Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 1998. **54**(Pt 5): p. 905-21.
- [231] Duggan, B.M., et al., SANE (Structure Assisted NOE Evaluation): an automated

- model-based approach for NOE assignment. *J Biomol NMR*, 2001. **19**(4): p. 321-9.
- [232] Shen, Y. and A. Bax, Protein backbone and sidechain torsion angles predicted from NMR chemical shifts using artificial neural networks. *J Biomol NMR*, 2013. **56**(3): p. 227-41.
- [233] Nederveen, A.J., et al., RECOORD: a recalculated coordinate database of 500+ proteins from the PDB using restraints from the BioMagResBank. *Proteins*, 2005. **59**(4): p. 662-72.
- [234] Koradi, R., M. Billeter, and K. Wuthrich, MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *J Mol Graph*, 1996. **14**(1): p. 51-5, 29-32.
- [235] Laskowski, R.A., et al., AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *J Biomol NMR*, 1996. **8**(4): p. 477-86.
- [236] Horgan, M., et al., Phage lysin LysK can be truncated to its CHAP domain and retain lytic activity against live antibiotic-resistant staphylococci. *Appl Environ Microbiol*, 2009. **75**(3): p. 872-4.
- [237] Zoll, S., et al., Structural basis of cell wall cleavage by a staphylococcal autolysin. *PLoS Pathog*, 2010. **6**(3): p. e1000807.
- [238] Delano, W., PyMOL. Schrodinger, Inc., New York, NY., 2002: p. <http://www.pymol.org>
- [239] Fenton, M., et al., Characterization of the staphylococcal bacteriophage lysin CHAP(K). *J Appl Microbiol*, 2011. **111**(4): p. 1025-35.
- [240] Zhou, Y., et al., Prediction of EF-hand calcium-binding proteins and analysis of bacterial EF-hand proteins. *Proteins*, 2006. **65**(3): p. 643-55.
- [241] Eijsink, V.G., B.W. Matthews, and G. Vriend, The role of calcium ions in the stability and instability of a thermolysin-like protease. *Protein Sci*, 2011. **20**(8): p. 1346-55.
- [242] Pai, C.H., et al., Dual binding sites for translocation catalysis by Escherichia coli glutathionylspermidine synthetase. *EMBO J*, 2006. **25**(24): p. 5970-82.
- [243] Donovan, D.M. and J. Foster-Frey, LambdaSa2 prophage endolysin requires Cpl-7-binding domains and amidase-5 domain for antimicrobial lysis of streptococci. *FEMS Microbiol Lett*, 2008. **287**(1): p. 22-33.
- [244] Becker, S.C., et al., LysK CHAP endopeptidase domain is required for lysis of live staphylococcal cells. *FEMS Microbiol Lett*, 2009. **294**(1): p. 52-60.
- [245] McGowan, S., et al., X-ray crystal structure of the streptococcal specific phage lysin PlyC. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(31): p. 12752-7.
- [246] Kerff, F., et al., Specific structural features of the N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase

- AmiD from Escherichia coli and mechanistic implications for enzymes of this family. *J Mol Biol*, 2010. **397**(1): p. 249-59.
- [247] McLaughlin, S., et al., PIP(2) and proteins: interactions, organization, and information flow. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 2002. **31**: p. 151-75.

导师简介

韩文瑜，男，汉族，1955年3月出生，河北阜城人，中共党员，博士，教授，博士生导师。现任吉林大学校长助理、农学部学部长（副省级待遇），享受国务院特殊津贴。国家重点学科——预防兽医学学科带头人，长期从事兽医微生物学与免疫学的教学科研工作。主编、副主编《现代动物免疫学》、《现代分子病原细菌学》、《病原细菌检验技术》、《动物疫病学》、《动物生物制品手册》等专著教材多部；主持完成国家自然科学基金课题等10余项，发表论文近200篇；获吉林省科技进步一等奖2项，军队科技进步奖等十五项，获发明专利6项。致力于病原微生物快速诊断、分子细菌学、分子免疫学的研究，在细菌快速诊断、细菌耐药性及其克服、基因工程抗菌肽、噬菌体及其裂解酶、人兽共患病研究方面形成明显的科研特色和优势。长期从事高等教育管理工作，在教学科研管理上具有较高造诣，发表教学研究论文多篇，获军队级教学成果二等奖两项，是吉林省第四届教学名师，吉林省第三批高级专家。任国务院学位委员会第六届学科评议组成员，教育部动物医学教学指导委员会副主任，全国兽医微生物专业委员会副主任委员、全国动物防疫专家委员会委员、农业部兽药评审委员会委员、中国畜牧兽医学会常务理事、吉林省人兽共患病学会理事长、吉林省微生物学会副理事长、全国农业高等教育研究会副理事长、吉林省动物防疫专家委员会委员、吉林省学位评定委员会委员、吉林省高教学会常务理事，长春市科协常务理事、长春市第十四届人大代表。

联系地址：吉林省长春市西安大路5333号，吉林大学动物医学学院，微生物与免疫学实验室

邮政编码：130062

作者简介

顾敬敏，男，汉，博士研究生，1986 年 4 月出生，河北省邢台市人。2008 年毕业于河北北方学院动物医学专业，获学士学位；2008 年 9 月至 2010 年 6 月在吉林大学动物医学学院预防兽医学专业，攻读兽医微生物学与免疫学方向的硕士学位；2010 年 9 月至 2014 年 6 月在吉林大学动物医学学院预防兽医学专业，攻读分子免疫学及病原微生物方向的博士学位。主要从事 MRSA 菌株及其噬菌体的分离、鉴定与噬菌体裂解酶作用机制的研究。完成博士论文《金黄色葡萄球菌噬菌体 GH15 及其裂解酶三维结构与分子作用机制研究》的研究工作。攻读博士学位期间参加国家自然科学基金重点项目 1 项（项目号为：31130072），以第一作者 SCI 研究论文 6 篇、非 SCI 国际论文 1 篇。

联系地址：吉林省长春市西安大路 5333 号，吉林大学动物医学学院，微生物与免疫实验室

邮政编码：130062

发表的学术论文

1. **Gu J**, Xu W, Lei L, Huang J, Feng X, Sun C, Du C, Zuo J, Li Y, Du T, Li L, Han W*. LysGH15, a novel bacteriophage lysin, protects a murine bacteremia model efficiently against lethal methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection[J]. *J Clin Microbiol.* 2011 Jan;49(1):111-7.
2. **Gu J**, Zuo J, Lei L, Zhao H, Sun C, Feng X, Du C, Li X, Yang Y, Han W*. LysGH15 reduces the inflammation caused by lethal methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in mice[J]. *Bioeng Bugs.* 2011 Mar-Apr;2(2):96-9.
3. **Gu J**, Lu R, Liu X, Han W*, Lei L, Gao Y, Zhao H, Li Y, Diao Y. LysGH15B, the SH3b domain of staphylococcal phage endolysin LysGH15, retains high affinity to staphylococci[J]. *Curr Microbiol.* 2011 Dec;63(6):538-42.
4. **Gu J**, Liu X, Li Y, Han W*, Lei L, Yang Y, Zhao H, Gao Y, Song J, Lu R, Sun C, Feng X. A Method for Generation Phage Cocktail with Great Therapeutic Potential[J]. *PLoS One.* 2012;7(3):e31698.
5. **Gu J**, Liu X, Lu R, Li Y, Song J, Lei L, Sun C, Feng X, Du C, Yu H, Yang Y, Han W*. Complete Genome Sequence of *Staphylococcus aureus* Bacteriophage GH15[J]. *J Virol.* 2012 Aug;86(16):8914-5.
6. **Gu J**, Liu X, Yang M, Li Y, Sun C, Lu R, Song J, Zhang Q, Lei L, Feng X, Du C, Yu H, Yang Y, Han W*. Genomic characterization of lytic *Staphylococcus aureus* phage GH15: providing new clues to intron shift in phages[J]. *J Gen Virol.* 2013 Apr;94(Pt 4):906-15.
7. **Gu J**, Feng Y, Feng X, Sun C, Lei L, Ding W, Niu F, Jiao L, Yang M, Li Y, Liu X, Song J, Cui Z, Han D, Du C, Yang Y, Ouyang S, Liu Z, and Han W*. Structural and biochemical characterization reveals LysGH15 as an unprecedented “EF-hand-like” calcium-binding phage lysin [J]. *Plos Pathogens.* 2014 May 15;10(5):e1004109.

致 谢

在此论文完成之际，谨向我的导师——韩文瑜教授致以崇高的敬意和衷心的感谢！本论文是在导师的悉心指导和亲切关怀下完成的。导师渊博的专业知识，高瞻远瞩的科研眼光、认真踏实的工作作风、严谨细致的科学态度、实事求是的学术作风以及为人师表的风范，使我受益匪浅，都是我学习和追求的目标。非常感谢导师这几年来在学习、生活中对我的关心和教导！谨向导师致以我最衷心的感谢和敬意！

衷心感谢本实验室雷连成教授，他活跃的创新思维，丰富的科研经验及严于律己的工作态度使我深深领会了要成为一名真正学者应有的素质，并将对我今后的工作和学习产生深刻的影响。

衷心感谢杨勇军教授、冯新副教授、孙长江老师、杜崇涛老师在本人课题研究过程中给予的悉心指导和帮助！

衷心感谢中科院生物物理研究所刘志杰研究员和中国科学院青岛生物能源与过程研究所冯银刚研究员在蛋白质结构研究中给予的指导和帮助，二位老师在蛋白质结构生物学方面渊博的知识使我受益匪浅！感谢中科院生物物理研究所平台的张媛媛老师、李建辉老师、于晓霞老师对我实验进行中给予的帮助！

特别感谢丁壮教授、张西辰教授对我学习上的支持与帮助！感谢人兽共患病研究所王芯蕊老师、张媛媛老师、杨丽老师在实验中给予的帮助和指导！感谢研究生张明军老师、王开宇老师、郝永亮老师在我三年学习期间给予的支持和帮助。感谢畜牧兽医学院各位领导、各位老师对我的培养以及在我学习期间给予的支持和帮助！

感谢吉林大学第一附属医院的续薇教授和王晶老师在临床病料采集方面给予的帮助！

衷心感谢实验室所有的成员在生活和学习中给予的帮助和支持。实验室团结互助和乐观向上的精神帮助我顺利度过博士的学习生活，在此表示诚挚的谢意！

最后，衷心感谢我的家人一直以来给予的大力支持和理解，你们是我最坚强的后盾和力量的源泉，一直为我提供最温暖的动力！