



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112301021 B

(45) 授权公告日 2022. 11. 18

(21) 申请号 202011196934.9

A61P 31/04 (2006.01)

(22) 申请日 2020.10.30

A61K 38/16 (2006.01)

C12R 1/19 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 112301021 A

(56) 对比文件

AU 2006201041 A1, 2006.04.06

CN 108410884 A, 2018.08.17

(43) 申请公布日 2021.02.02

Jarmila Farkasovska等. The Lysis

(73) 专利权人 西南大学

地址 400715 重庆市北碚区天生路2号

System of the Streptomyces aureofaciens

(72) 发明人 石慧 解天慧

Phage 11/6.《Current Microbiology》.2008,第

57卷

(74) 专利代理机构 北京汇泽知识产权代理有限

公司 11228

杨曦等. 大肠杆菌0157 Stx噬菌体裂解酶的克隆表达及活性分析.《上海交通大学学报(农业科学版)》.2012,第30卷(第04期),25-30.

专利代理师 武君

解天慧等. 大肠杆菌0157:H7噬菌体EC-p9的内溶酶和穿孔素的特性预测及克隆表达.《食品与发酵工业》.2020,第47卷(第9期),

(51) Int. Cl.

C12N 9/24 (2006.01)

C07K 14/01 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

A61K 38/47 (2006.01)

审查员 冯娟

权利要求书1页 说明书7页

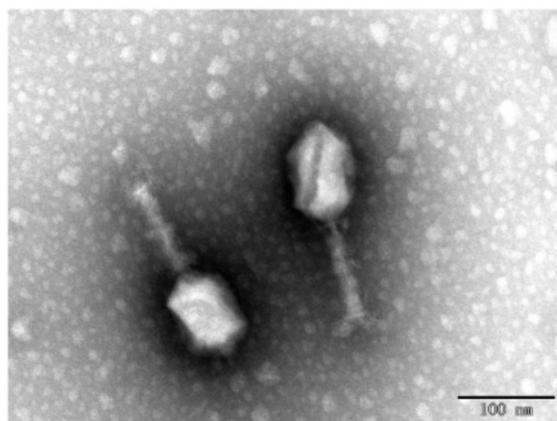
序列表5页 附图3页

(54) 发明名称

一种抗大肠杆菌噬菌体表达的内溶酶和穿孔素组合物及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明提供了一种抗大肠杆菌噬菌体表达的内溶酶和穿孔素组合物及其制备方法和应用,属于生物工程技术领域。所述内溶酶的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示,所述穿孔素的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示。本发明的噬菌体表达的内溶酶Lys 9和穿孔素Hol 9,具有广谱的杀菌活性,对多种革兰氏阳性和革兰氏阴性菌都具有较好的抑菌效果,对大肠杆菌具有明显的杀伤作用,且内溶酶Lys 9具有一个N端酶活结构域,能裂解β-1,4-糖苷键,穿孔素Hol 9具有一个保守的结构域,能破坏细胞,并传递信息来控制细胞的裂解时间,可用于制备预防、抑制或治疗细胞感染的药物中,在医疗和食品安全领域具有推广应用价值。



CN 112301021 B

1. 一种抗大肠杆菌噬菌体表达的内溶酶和穿孔素组合物,其特征在于,所述内溶酶的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示,所述穿孔素的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示,所述内溶酶的结构域由酰胺酶催化结构域和肽聚糖结合结构域组成。

2. 根据权利要求1所述抗大肠杆菌噬菌体表达的内溶酶和穿孔素组合物,其特征在于,编码所述内溶酶的核苷酸序列如SEQ ID NO:3所示,编码所述穿孔素的核苷酸序列如SEQ ID NO:4所示。

3. 根据权利要求2所述抗大肠杆菌噬菌体表达的内溶酶和穿孔素组合物,其特征在于,表达所述内溶酶和穿孔素组合物的细胞为原核细胞或真核细胞。

4. 一种表达载体,其特征在于,所述表达载体包含权利要求2所述的核苷酸序列。

5. 权利要求1至权利要求3任一所述抗大肠杆菌噬菌体表达的内溶酶和穿孔素组合物在制备用于预防、抑制或治疗细胞感染的药物中的应用。

## 一种抗大肠杆菌噬菌体表达的内溶酶和穿孔素组合物及其制备方法及应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物工程技术领域,具体涉及一种抗大肠杆菌噬菌体表达的内溶酶和穿孔素组合物及其制备方法和应用。

### 背景技术

[0002] 大肠杆菌0157:H7是肠出血性大肠杆菌中最典型的一种食源性病原菌,能产生志贺毒素引起腹泻、出血性结肠炎、溶血性尿毒综合症等疾病,甚至有可能导致死亡。但用抗生素控制大肠杆菌0157:H7存在争议,因为抗生素可能导致志贺毒素被大量释放。临床研究表明,抗生素治疗确实会增加溶血性尿毒综合症发展的风险。此外,抗生素的滥用导致细菌耐药性的大量出现,耐药性大肠杆菌0157已经增加。

[0003] 近几年,噬菌体作为一种新型的抑菌剂开始得到大量的研究。但噬菌体作为活体病毒,不易保存且不容易被人们接受。而具有抑菌作用的内溶酶和穿孔素能很好的解决这些问题。穿孔素和内溶酶在噬菌体裂解细菌中发挥着重要的作用,“穿孔素-内溶酶”裂解体系是dsDNA噬菌体的经典的裂解系统。内溶酶是一种有dsDNA噬菌体编码的肽聚糖水解酶,降解细菌的肽聚糖,导致细菌死亡。内溶酶具有高效,裂解谱宽,不易产生耐药性等优点,已经应用于医疗,食品安全,病原菌检测等各个方面。穿孔素是一种含有跨膜结构的疏水蛋白。在噬菌体裂解细菌过程中,通过在细胞膜上形成孔径,协助内溶酶与肽聚糖接触。但现有噬菌体内溶酶和穿孔素的种类很少。

### 发明内容

[0004] 有鉴于此,本发明的目的在于提供一种抗大肠杆菌噬菌体表达的内溶酶和穿孔素组合物及其制备方法和应用。

[0005] 经研究,本发明采用以下技术方案:

[0006] 1、一种抗大肠杆菌噬菌体表达的内溶酶和穿孔素组合物,所述内溶酶的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示,所述穿孔素的氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示,所述内溶酶的结构域由酰胺酶催化结构域和肽聚糖结合结构域组成。

[0007] 优选的,所述穿孔素具有一个跨膜结构和一个单独的结构域。

[0008] 优选的,编码所述内溶酶的的核苷酸序列如SEQ ID NO:3所示,编码所述穿孔素的的核苷酸序列如SEQ ID NO:4所示。

[0009] 优选的,表达所述内溶酶和穿孔素组合物的细胞为原核细胞或真核细胞。

[0010] 优选的,所述噬菌体为抗大肠杆菌噬菌体。

[0011] 更优选的,所述大肠杆菌为肠出血性大肠杆菌,即大肠杆菌0157:H7。其中,将抗大肠杆菌噬菌体,抗大肠杆菌噬菌体表达的内溶酶和穿孔素分别命名为EC-p 9,Lys 9和Hol 9。

[0012] 2、一种表达载体,所述表达载体包含如SEQ ID NO:3所示和SEQ ID NO:4所示的核

昔酸序列。

[0013] 3、上述抗大肠杆菌噬菌体表达的内溶酶和穿孔素组合物的制备方法,包括以下步骤:

[0014] 1) 向污水中加入大肠杆菌,培养后收集上清液,将上清液点斑于双层琼脂平板上,纯化后得到单一斑块,向单一斑块中加入缓冲液,搅拌后静置,收集液体,离心后加入大肠杆菌菌液中,培养,离心取上清液,富集得到噬菌体;

[0015] 2) 用试剂盒提取噬菌体DNA,以噬菌体DNA为模板,以内溶酶引物或穿孔素引物进行PCR扩增,95℃变性,55℃退火,72℃延伸,30个循环,72℃终延伸,得到内溶酶或穿孔素的基因片段;

[0016] 3) 将得到的内溶酶或穿孔素基因片段连接至pEasy-Blunt E1载体进行平端克隆;通过蓝白筛选、菌液PCR扩增和测序,获得pEASY-内溶酶或pEASY-穿孔素重组载体;将重组载体转化至大肠杆菌E.coli BL21 (DE3)感受态细胞中,并涂布于含有氨苄青霉素的TSA平板上,37℃下培养;将阳性克隆菌株接种至氨苄青霉素的LB培养基中,于37℃,震荡培养过夜;将过夜培养的阳性克隆菌株以1:100的稀释比例接种到LB培养基中,37℃,震荡培养;内溶酶或穿孔素重组表达采用异丙基硫代-β-D-半乳糖苷(IPTG)进行诱导,在37℃孵育后离心,通过Tris-NaCl缓冲液重悬沉淀后,在冰浴条件下超声破菌;将超声产物离心,上清液过滤,将蛋白纯化,得到内溶酶表达的融合蛋白,其氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示,得到穿孔素表达的融合蛋白,其氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示。

[0017] 优选的,所述制得的内溶酶Lys 9的分子量为28.46kDa,穿孔素Hol 9的分子量为24.97kDa。

[0018] 优选的,所述内溶酶引物的核苷酸序列包括如SEQ ID NO:5所示和SEQ ID NO:6所示。

[0019] 优选的,所述穿孔素引物的核苷酸序列包括如SEQ ID NO:7所示和SEQ ID NO:8所示。

[0020] 优选的,包括用试剂盒提取噬菌体DNA,以噬菌体DNA为模板,以十聚体寡核苷酸引物进行PCR扩增,94℃变性,34℃复性,72℃延伸,45个循环,72℃延伸,以PCR产物条带少且亮的引物再次扩增,PCR产物进行胶回收,胶回收产物进行TA克隆,测序,用NCBI进行相似性比对,得到所述内溶酶引物和所述穿孔素引物的核苷酸序列。

[0021] 优选的,所述十聚体寡核苷酸引物的核苷酸序列为如SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16所示的任一种。

[0022] 4、上述抗大肠杆菌噬菌体表达的内溶酶和穿孔素组合物在制备用于预防、抑制或治疗细胞感染的药物中的应用。

[0023] 本发明的有益效果在于:

[0024] 1) 本发明的抗大肠杆菌噬菌体表达的内溶酶Lys 9和穿孔素Hol 9组合物,具有广谱的杀菌活性,对多种革兰氏阳性和革兰氏阴性菌都具有较好的抑菌效果,对大肠杆菌具有明显的杀伤作用,且内溶酶Lys 9具有两个保守的结构域,其中一个为N端酶活结构域,属于Muraidase家族,能裂解β-1,4-糖苷键,是N-乙酰胞壁酸酶,另一个为肽聚糖结合域,属于PG\_binding\_1家族,穿孔素Hol 9具有一个保守的结构域,属于Bacteriophage T holin家

族,能破坏细胞,并传递信息来控制细胞的裂解时间,内溶酶Lys 9和穿孔素Ho1 9组合之后,其杀菌能力明显增强;

[0025] 2) 本发明的抗大肠杆菌噬菌体表达的内溶酶Lys 9和穿孔素Ho1 9组合物的制备方法,操作简单,成本低,且制得的内溶酶Lys 9和穿孔素Ho1 9组合物可用于制备预防、抑制或治疗细胞感染的药物中,在医疗和食品安全领域具有推广应用价值。

### 附图说明

[0026] 图1为噬菌体EC-p 9的透射电镜图;

[0027] 图2为内溶酶Lys 9和穿孔素Ho1 9基因的凝胶电泳图;

[0028] 图3为内溶酶Lys 9(A)和穿孔素Ho1 9(B)的结构域分析结果图;

[0029] 图4为内溶酶Lys 9(A)和穿孔素Ho1 9(B)的跨膜结构分析结果图;

[0030] 图5为内溶酶Lys 9蛋白表达的SDS-PAGE分析结果图;其中,M为marker,1为菌体,2为超声破菌后的上清液,3为超声破菌后的沉淀,4为上清的穿过峰,5为缓冲液洗脱峰,6-9分别为浓度为20,50,200,500mmol/L的咪唑洗脱的洗脱液;

[0031] 图6为穿孔素Ho1 9蛋白表达的SDS-PAGE分析结果图;其中:M为marker,1为上清液,2为穿过峰,3为洗脱液,4-7分别为浓度为20,50,200,500mmol/L的咪唑洗脱的洗脱液;

[0032] 图7为内溶酶Lys 9和穿孔素Ho1 9表达对BL21的毒害作用分析结果图;

[0033] 图8为内溶酶Lys 9和穿孔素Ho1 9的杀菌能力分析结果图。

### 具体实施方式

[0034] 下面结合本发明实施例,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0035] 实施例1

[0036] 大肠杆菌噬菌体的制备和分离纯化

[0037] 污水样本取自重庆市的河里,将水样离心后加入终浓度为1.25mmol/L的CaCl<sub>2</sub>,取上清液用滤纸过滤后,用0.22μm滤膜过滤到无菌容器中,加入2×LB和大肠杆菌0157:H7;

[0038] 在37℃条件下振荡培养过夜,将过夜后的液体离心,上清液用无滤膜过滤后,与大肠杆菌0157:H7菌液和含0.7%的琼脂的TSB混合后倒入TSA板,37℃培养,进行噬菌体分离;

[0039] 纯化噬菌体斑块,直至平板上呈现单一的斑块形态;向平板中加入3mL SM缓冲液(100mM NaCl,8mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O,50mM Tris-HCl,pH=7.5),收集液体和顶层琼脂,9000×g离心15min;

[0040] 向上清液加入处于对数期的大肠杆菌0157:H7菌液,于37℃,120rpm培养至液体完全澄清,利用PEG-8000过夜富集噬菌体颗粒,20000×g氯化铯密度梯度离心1h,得到纯化的噬菌体EC-p 9,纯化后的噬菌体EC-p 9在4℃下保存于SM缓冲液中。

[0041] 将实施例1中纯化后的噬菌体进行透射电镜分析,结果如图1所示。

[0042] 从图1中分析可知,噬菌体EC-p 9为肌尾科噬菌体,头部64.31nm,尾部112.71nm。

[0043] 实施例2

[0044] 噬菌体EC-p 9的鉴定,内溶酶Lys 9和穿孔素Ho1 9基因的获取

[0045] 用试剂盒提取噬菌体DNA,以噬菌体DNA为模板,用十聚体寡核苷酸序列SEQ ID NO:5~SEQ ID NO:12所示的随机引物(10-mer RAPD)进行PCR扩增,94℃预变性4min;94℃变性1min,34℃复性1min,72℃延伸2min,45个循环,72℃延伸10min;

[0046] 依据扩增结果,选择PCR产物条带少且亮的引物再次扩增,PCR产物进行胶回收,胶回收产物进行TA克隆,测序;

[0047] 用NCBI进行相似性比对,来确定噬菌体的种类;

[0048] 根据相识度最高的噬菌体来确定内溶酶和穿孔素引物;

[0049] 以噬菌体EC-p 9的DNA为模板,内溶酶核苷酸序列SEQ ID NO:5所示为正向引物和内溶酶核苷酸序列SEQ ID NO:6所示为反向引物或者穿孔素核苷酸序列SEQ ID NO:7所示为正向引物和穿孔素核苷酸序列SEQ ID NO:8所示为反向引物进行PCR扩增,95℃预变性10min,95℃变性30s,55℃退火30s,72℃延伸1min,30个循环,72℃终延伸10min。利用核酸电泳检测PCR产物。将PCR产物送往生工测序。

[0050] 本实施例中所用引物的序列表如表1所示;

[0051] 表1引物序列表

名称	核苷酸序号	核苷酸序列表
十聚体寡核苷酸随机引物	SEQ ID NO:9	5'-ACGGCCGACC-3'
	SEQ ID NO:10	5'-GCTGGGCCGA-3'
	SEQ ID NO:11	5'-GCCCCGAGCGG-3'
	SEQ ID NO:12	5'-TGCGCGCGGG-3'
	SEQ ID NO:13	5'-AGCGGGCCAA-3'
	SEQ ID NO:14	5'-CCGGGCAAGC-3'
	SEQ ID NO:15	5'-AGGAAGGTGC-3'
	SEQ ID NO:16	5'-CGAACGGCGG-3'
内溶酶正向引物	SEQ ID NO:5	5'-ATGGCCATTCTAAAAC-3'
内溶酶反向引物	SEQ ID NO:6	5'-TTAACAGAACTCTTGTA-3'
穿孔素正向引物	SEQ ID NO:7	5'-ATGGCAGCACCTGAAT-3'
穿孔素反向引物	SEQ ID NO:8	5'-TTATTTAGCCCTTCCTAA-3'

[0053] 采用BLAST对预测基因与已知的基因和蛋白序列进行比较;分别利用ExPASy ProtParamtool、SOPMA和TMHMM Server v.2.0对内溶酶和穿孔素的理化特征、二级结构和跨膜结构进行测定。

[0054] 结果显示,噬菌体EC-p 9的tRNA基因与大肠杆菌噬菌体PE37相识度最高为81.20%。根据Escherichia phage PE37内溶酶和穿孔素的核苷酸序列得到内溶酶Lys 9和穿孔素Ho1 9引物,从而获得,噬菌体EC-p9的内溶酶Lys 9的核苷酸序列SEQ ID NO:3和穿孔素Ho1 9的核苷酸序列SEQ ID NO:4。

[0055] 将内溶酶Lys 9和穿孔素Ho1 9进行凝胶电泳分析,结果如图2所示。

[0056] 图2中,1对应内溶酶Lys 9核苷酸序列的长度,2对应穿孔素Ho1 9的核苷酸序列的

长度。从图2中分析可知,内溶酶Lys 9核苷酸序列的长度为649bp左右,穿孔素Hol 9的核苷酸序列的长度为785bp左右,内溶酶Lys 9核苷酸和穿孔素的Hol 9核苷酸的分子量大小分别为28.46kDa和24.97kDa。

[0057] 将内溶酶Lys 9和穿孔素Hol 9的结构域进行分析,结果如图3所示。

[0058] 图3中,A表示内溶酶Lys 9,B表示穿孔素Hol 9。从图3中分析可知,内溶酶Lys 9具有两个保守的结构域,其中一个为N端酶活结构域,属于Muraidase家族,能裂解 $\beta$ -1,4-糖苷键,是N-乙酰胞壁酸酶;另一个为肽聚糖结合域,属于PG\_binding\_1家族;穿孔素Hol 9含有一个保守的结构域,属于Bacteriophage T holin家族,能破坏细胞,并传递信息来控制细胞的裂解时间。

[0059] 将内溶酶Lys 9和穿孔素Hol 9的跨膜结构进行分析,结果如图4所示。

[0060] 图4中,A表示内溶酶Lys 9,B表示穿孔素Hol 9。从图4中分析可知,内溶酶Lys 9没有跨膜结构,穿孔素Hol 9在27-46位氨基酸形成一个跨膜结构。

[0061] 实施例3

[0062] 内溶酶Lys 9的克隆、表达和纯化

[0063] 将实施例2得到的内溶酶Lys 9基因片段连接至pEasy-Blunt E1载体进行平端克隆;通过蓝白筛选、菌液PCR扩增和测序,获得pEASY-Lys 9重组载体;将获得的重组载体转化至大肠杆菌E.coli BL21 (DE3)感受态细胞中,并涂布于含有100ng/mL氨苄青霉素的TSA平板上,37°C下培养16小时;将阳性克隆菌株接种至含有100ng/mL氨苄青霉素的LB液体培养基中,与37°C,200rpm震荡培养过夜;将过夜培养的阳性克隆菌株以1:100的稀释比例接种到500mL的LB液体培养基中(100ng/mL氨苄青霉素),37°C,200rpm震荡培养至OD<sub>600</sub>达到0.6;

[0064] 内溶酶Lys 9表达对大肠杆菌BL21 (DE3)的毒害作用,加入终浓度为1mmol/L的IPTG,在37°C,200rpm的条件下震荡培养,在诱导过程中每隔(20min)取菌液样品,用分光光度计测定菌液在600nm波长处的吸光值,共测定2h,结果如图7所示;

[0065] 内溶酶Lys 9重组表达采用1mM的异丙基硫代- $\beta$ -D-半乳糖苷(IPTG)进行诱导,在37°C孵育5h后离心(8000 $\times$ g,10min,4°C),通100mL Tris-NaCl缓冲液(50mM Tris-HCl,500mM NaCl,pH=7.5)重悬沉淀后,在冰浴条件下超声破菌;

[0066] 将超声产物在4°C、13000rpm的条件下离心1h,上清液用0.45 $\mu$ m的滤膜过滤,随后采用镍离子柱进行蛋白纯化,用Tris-NaCl缓冲液平衡后,分别用20mM、50mM的咪唑洗脱杂蛋白,用200mM、500mM的咪唑洗脱,得到内溶酶Lys 9表达的融合蛋白,其氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。

[0067] 将纯化后的内溶酶Lys 9表达的融合蛋白进行SDS-PAGE分析,结果如图5所示。

[0068] 从图5中分析可知,纯化后内溶酶Lys 9表达的融合蛋白在SDS-PAGE上,在35kDa和25kDa中间以单条带形式迁移。

[0069] 实施例4

[0070] 穿孔素Hol 9的克隆、表达和纯化

[0071] 将实施例2得到的穿孔素Hol 9基因片段连接至pEasy-Blunt E1载体进行平端克隆;通过蓝白筛选、菌液PCR扩增和测序,获得pEASY-Hol 9重组载体;将获得的重组载体转化至大肠杆菌E.coli BL21 (DE3)感受态细胞中,并涂布于含有100ng/mL氨苄青霉素的TSA

平板上,37℃下培养16小时;将阳性克隆菌株接种至含有100ng/mL氨苄青霉素的LB液体培养基中,于37℃,200rpm震荡培养过夜;将过夜培养的阳性克隆菌株以1:100的稀释比例接种到500mL的LB液体培养基中(100ng/mL氨苄青霉素),37℃,200rpm震荡培养至OD<sub>600</sub>达到0.6;

[0072] 穿孔素Ho1 9表达对大肠杆菌BL21 (DE3) 的毒害作用,加入终浓度为1mmol/L的IPTG,在37℃,200rpm的条件下震荡培养,在诱导过程中每隔(20min)取菌液样品,用分光光度计测定菌液在600nm波长处的吸光值,共测定2h,结果如图7所示;

[0073] 穿孔素Ho1 9表达采用1mM IPTG进行诱导,在37℃孵育20min后离心(8000×g,10min,4℃),用100mL Tris-NaCl缓冲液(50mM Tris-HCl,500mM NaCl,pH=7.5)重悬沉淀后,在冰浴条件下超声破菌;

[0074] 将超声产物在4℃、13000rpm的条件下离心1h,上清液用0.45μm的滤膜过滤,随后采用镍离子柱进行蛋白纯化,用Tris-NaCl缓冲液平衡后,分别用20mM、50mM的咪唑洗脱杂蛋白,用200mM、500mM的咪唑洗脱,得到穿孔素Ho1 9表达的融合蛋白,其氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示。

[0075] 将纯化后的穿孔素Ho1 9表达的融合蛋白进行SDS-PAGE分析,结果如图6所示。

[0076] 从图6中分析可知,纯化后的穿孔素Ho1 9表达的融合蛋白在SDS-PAGE上,在26kDa和20kDa中间,以单条带形式迁移。

[0077] 内溶酶Lys 9和穿孔素Ho1 9表达对大肠杆菌BL21 (DE3) 的毒害作用,如图7所示。从图7中分析可知,pEASY-Lys 9的表达没有抑制BL21 (DE3) 的生长,而pEASY-Ho1 9的表达抑制了BL21 (DE3) 的生长,并且在诱导20min细菌的浓度最大;之后随着诱导时间的延长,菌液浓度逐渐降低。

[0078] 实施例5

[0079] 内溶酶Lys 9和穿孔素Ho1 9融合蛋白的抑菌谱和MIC值的测定

[0080] 以大肠杆菌,沙门氏菌和单增李斯特菌为指示菌,采用平板裂解实验检测内溶酶Lys 9和穿孔素Ho1 9融合蛋白的抑菌谱;

[0081] 指示菌在37℃,120rpm过夜培养后,稀释到10<sup>8</sup>CFU/mL,取200μL菌液与含0.7%的琼脂的TSB混合,倒入TSA板上,自然晾干,分别滴加10μL适当浓度的内溶酶Lys 9和穿孔素Ho1 9融合蛋白,在37℃培养,形成半透明的斑点则表示有裂解性;

[0082] 将过夜培养后的菌液稀释到10<sup>6</sup>CFU/mL,取4.5mL菌与0.5mL梯度稀释内溶酶Lys 9和穿孔素Ho1 9融合蛋白分别混匀,在37℃,120rpm过夜培养。内溶酶Lys 9和穿孔素Ho19融合蛋白的抑菌活性如表2所示。

[0083] 表2内溶酶Lys 9和穿孔素Ho1 9融合蛋白的抑菌活性

检测菌株	内溶酶 Lys 9		穿孔 Hol 9	
	裂解性	MIC	裂解性	MIC
[0084] 大肠杆菌	+	2.5 mg/mL	+	1.4 mg/mL
沙门氏菌	+	2.5 mg/mL	+	1.4 mg/mL
单增李斯特菌	+	0.25 mg/mL	+	2.8 mg/mL

[0085] 注:+:裂解性;-:不裂解。

[0086] 由表2中的抑菌结果分析可知,重组内溶酶Lys 9和和穿孔素Ho1 9均具有广谱的杀菌活性,对多种革兰氏阳性和革兰氏阴性菌都具有较好的抑菌效果,其中对革兰氏阳性细菌的抑菌效果比革兰氏阴性细菌的抑菌效果好。

[0087] 实施例6

[0088] 内溶酶Lys 9和和穿孔素Ho1 9的杀菌能力

[0089] 选择大肠杆菌为底物,对重组内溶酶Lys 9、穿孔素Ho1 9及其组合物的杀菌能力进行检测分析。将过夜培养的大肠杆菌用Tris-NaCl缓冲液洗涤重悬,并调节OD<sub>600</sub>至到0.8-1.0左右;取450μL菌液分别加入50μL终浓度为2MIC的内溶酶Lys 9或穿孔素Ho1 9,在37°C培养1h后测定菌落数;取450μL菌液加入50μL内溶酶Lys 9和穿孔素Ho1 9的组合物(终浓度为MIC,即分别为2.5mg/mL和1.4mg/mL),在37°C培养1h后测定菌落数。结果如图8所示。

[0090] 从图8中分析可知,在1h后,单独使用内溶酶Lys 9或穿孔素Ho1 9处理的大肠杆菌菌液的菌落数显著下降;且内溶酶Lys 9和穿孔素Ho1 9的组合物对大肠杆菌的杀灭作用显著高于单独使用的内溶酶Lys 9或穿孔素Ho1 9。

[0091] 当然,以上仅为本发明的优选实施例而已,并不用于限制本发明,尽管参照前述实施例对本发明进行了详细的说明,对于本领域的技术人员来说,其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分技术特征进行等同替换。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

[0001]	序列表																			
[0002]	<110> 西南大学																			
[0003]	<120> 一种抗大肠杆菌噬菌体表达的内溶酶和穿孔素组合物及其制备方法和应用																			
[0004]	<160> 16																			
[0005]	<210> 1																			
[0006]	<211> 260																			
[0007]	<212> PRT																			
[0008]	<213> 人工序列																			
[0009]	<400> 1																			
[0010]	Met	Ala	Ile	Leu	Lys	Pro	Asp	Gly	Arg	Ser	Glu	Trp	Ser	Arg	Leu	Ser	Gly	Pro	His	Lys
[0011]	1			5						10					15					20
[0012]	Ile	Gly	Phe	Ser	Leu	Thr	Ala	Asp	Gly	Ile	Phe	Gly	Lys	Ala	Thr	Glu	Asn	Ala	Val	Lys
[0013]				25						30					35					40
[0014]	Ser	Val	Gln	Ala	Gly	Ala	Gly	Leu	Val	Ile	Asp	Gly	Ile	Ala	Gly	Pro	Lys	Thr	Phe	Tyr
[0015]				45						50					55					60
[0016]	Ala	Ile	Arg	Asn	Ala	Gly	Asp	Ala	His	Gln	Glu	His	Leu	Thr	Glu	Ala	Asp	Leu	Val	Asp
[0017]				65						70					75					80
[0018]	Ala	Ala	Arg	Glu	Leu	Gly	Val	Glu	Leu	Ala	Ser	Met	Lys	Ala	Val	Asn	Gln	Val	Gln	Ser
[0019]				85						90					95					100
[0020]	Arg	Gly	Thr	Gly	Phe	Thr	Lys	Thr	Gly	Lys	Ile	Lys	Thr	Leu	Phe	Glu	Arg	His	Ile	Met
[0021]				105						110					115					120
[0022]	Tyr	Lys	Lys	Val	Thr	Ala	Lys	Phe	Gly	Gln	Ala	Arg	Ala	Asn	Ala	Leu	Tyr	Gln	Leu	Tyr
[0023]				125						130					135					140
[0024]	Pro	Thr	Leu	Val	Asn	Pro	Asn	Ser	Gly	Gly	Tyr	Ile	Gly	Gly	Asp	Ala	Glu	Leu	Glu	Arg
[0025]				145						150					155					160
[0026]	Leu	Gln	Gly	Ala	Ile	Ala	Leu	Asp	Glu	Asp	Cys	Ala	Tyr	Gln	Ser	Ala	Ser	Tyr	Gly	Leu
[0027]				165						170					175					180
[0028]	Phe	His	Ile	Met	Gly	Phe	Asn	Cys	Gln	Ile	Cys	Gly	Tyr	Thr	Asn	Ala	Lys	Glu	Met	Phe
[0029]				185						190					195					200
[0030]	Thr	Asp	Phe	Leu	Thr	Gly	Glu	Arg	Ala	His	Leu	Leu	Ala	Phe	Val	Lys	Phe	Ile	Met	Lys
[0031]				205						210					215					220
[0032]	Met	Pro	Ile	Cys	Gly	Lys	Pro	Arg	Thr	Lys	Ile	Gly	Pro	Ser	Leu	Leu	Val	Ser	Thr	Met
[0033]				225						230					235					240
[0034]	Val	Leu	His	Met	Arg	Lys	Thr	Ser	Met	Ile	Leu	Asn	Trp	Arg	Gln	His	Thr	Ile	Phe	Pro
[0035]				245						250					255					260
[0036]	<210> 2																			
[0037]	<211> 216																			
[0038]	<212> PRT																			
[0039]	<213> 人工序列																			
[0040]	<400> 2																			
[0041]	Met	Ala	Ala	Pro	Arg	Ile	Pro	Ser	Leu	Phe	Leu	Leu	Gly	Val	Leu	Asp	Arg	Leu	Phe	Lys
[0042]	1			5						10					15					20

[0043]	Asp Asn Ala Thr Gly Lys Val Leu Ala Ser Arg Val Ala Val Val Ile Leu Leu Phe Met			
[0044]		25	30	35 40
[0045]	Met Ala Ile Val Trp Tyr Arg Gly Asp Ser Phe Phe Glu Tyr Tyr Lys Gln Ser Lys Tyr			
[0046]		45	50	55 60
[0047]	Glu Thr Tyr Ser Glu Ile Ile Glu Lys Glu Arg Asn Ala Arg Phe Glu Ser Val Ala Leu			
[0048]		65	70	75 80
[0049]	Glu Gln Leu Gln Ile Val His Ile Ser Ser Glu Ala Asp Phe Ser Ala Val Tyr Ser Phe			
[0050]		85	90	95 100
[0051]	Arg Pro Lys Asn Leu Asn Tyr Phe Val Asp Ile Ile Ala Tyr Glu Gly Lys Leu Pro Ser			
[0052]		105	110	115 120
[0053]	Thr Ile Ser Glu Lys Ser Leu Gly Gly Tyr Pro Val Asp Lys Thr Met Asp Glu Tyr Ala			
[0054]		125	130	135 140
[0055]	Val His Leu Asn Gly Arg His Tyr Tyr Ser Asn Ser Lys Phe Ala Phe Leu Pro Thr Lys			
[0056]		145	150	155 160
[0057]	Lys Pro Thr Pro Glu Ile Asn Tyr Met Tyr Ser Cys Pro Tyr Phe Asn Leu Asp Asn Ile			
[0058]		165	170	175 180
[0059]	Tyr Ala Gly Thr Ile Thr Met Tyr Trp Tyr Arg Asn Asp His Ile Ser Asn Asp Arg Leu			
[0060]		185	190	195 200
[0061]	Glu Ser Ile Cys Ala Gln Ala Ala Arg Ile Leu Gly Arg Ala Ile Lys			
[0062]		205	210	215 216
[0063]	<210> 3			
[0064]	<211> 785			
[0065]	<212> RNA			
[0066]	<213> 人工序列			
[0067]	<400> 3			
[0068]	ATGCCATTC TAAAACCGGA CGGGCGCTCT GAGTGGTCGC GCCTCAGTGG 50			
[0069]	ACCTCACAAA ATCGGTTTCT CTCTACAGC CGATGGCATA TTTGGTAAGG 100			
[0070]	CAACAGAGAA TGCTGTCAA TCCGTTCAAG CAGGTGCTGG ATTGGTTATT 150			
[0071]	GATGGTATTG CTGGGCCAAA GACCTTCTAT GCTATCCGCA ACGCTGGAGA 200			
[0072]	CGCTCATCAG GAACATCTGA CCGAAGCGGA CTTGGTTGAC GCAGCACGTG 250			
[0073]	AACTTGGTGT TGAGCTGGCC AGTATGAAAG CTGTGAATCA GGTACAATCC 300			
[0074]	CGTGGCACGG GTTTTACCAA AACTGGCAAG ATCAAACTC TGTTTGAGCG 350			
[0075]	CCACATCATG TACAAAAAGG TGACGGCAA ATTCGGCAA GCAAGAGCCA 400			
[0076]	ATGCTCTGTA CCAACTCTAC CCAACATTGG TTAACCCAA TTCTGGTGGG 450			
[0077]	TATATCGGCG GAGACGCGGA GTTGGAAACGC CTTCAAGGTG CAATCGCCCT 500			
[0078]	TGACGAGGAC TGCCTTACC AGAGTGCTTC CTACGGCCTA TTCCACATCA 550			
[0079]	TGGGGTTCAA CTGCCAAATC TGTGGCTATA CAAATGCCAA AGAGATGTTC 600			
[0080]	ACTGATTTCC TGA CTGGTGA ACGCGCTCAC CTTCTGGCAT TTGTCAAGTT 650			
[0081]	CATCATGAAG ATGCCAATAT GTGGAAAGCC CTGAAGAACA AAAATTGGGC 700			
[0082]	CGAGTTTGCT CGTCAGTACA ATGGTCTGCT ATATGCGAAA AACCAGTATG 750			
[0083]	ATACTAACT GCGGCAGCA TACAATATTT CCTAA 785			
[0084]	<210> 4			
[0085]	<211> 649			

- [0086] <212> RNA  
[0087] <213> 人工序列  
[0088] <400> 4  
[0089] ATGGCAGCAC CTAGAATCCC TTCGCTCTGA TTTCTGTTGG GTGTTCTAGA 50  
[0090] TCGCTTGTTT AAAGATAACG CTACCGGGAA GGTTCCTGCT TCCCGAGTAG 100  
[0091] CTGTCGTAAT TCTTTTATTT ATGATGGCGA TTGTTTGTA TAGGGGAGAT 150  
[0092] AGTTTCTTTG AGTACTATAA GCAATCAAAG TATGAAACAT ACAGTGAAAT 200  
[0093] TATTGAAAAG GAAAGAAATG CACGCTTTGA ATCTGTCGCC CTGGAACAAC 250  
[0094] TCCAGATAGT TCATATATCA TCTGAGGCAG ACTTTAGTGC GGTGTATTCT 300  
[0095] TTCCGCCCTA AAAACTTAAA CTATTTTGTT GATATTATAG CATAACGAAG 350  
[0096] AAAATTACCT TCAACAATAA GCGAAAAATC ACTTGGAGGA TATCCTGTTG 400  
[0097] ATAAAACTAT GGATGAATAT GCAGTTCATT TAAATGGACG TCATTATTAT 450  
[0098] TCCAAC TCA AATTTGCTTT TTTACCAACT AAAAAGCCTA CTCCCGAAAT 500  
[0099] AAATTACATG TACAGTTGTC CATATTTCAA TTTGGATAAT ATCTATGCTG 550  
[0100] GAACAATAAC TATGACTGG TATAGAAATG ATCACATAAG TAATGACCGC 600  
[0101] CTTGAATCAA TATGTGCTCA GCGGCCAGA ATATTAGGAA GGGCTATAA 649  
[0102] <210> 5  
[0103] <211> 16  
[0104] <212> RNA  
[0105] <213> 人工序列  
[0106] <400> 5  
[0107] ATGGCCATTC TAAAAC 16  
[0108] <210> 6  
[0109] <211> 18  
[0110] <212> RNA  
[0111] <213> 人工序列  
[0112] <400> 6  
[0113] TTAACAGAAA CTCTTGTA 18  
[0114] <210> 7  
[0115] <211> 16  
[0116] <212> RNA  
[0117] <213> 人工序列  
[0118] <400> 7  
[0119] ATGGCAGCAC CTGAAT 16  
[0120] <210> 8  
[0121] <211> 18  
[0122] <212> RNA  
[0123] <213> 人工序列  
[0124] <400> 8  
[0125] TTATTTAGCC CTCCTAA 18  
[0126] <210> 9  
[0127] <211> 10  
[0128] <212> RNA

- [0129] <213> 人工序列  
[0130] <400> 9  
[0131] ACGGCCGACC 10  
[0132] <210> 10  
[0133] <211> 10  
[0134] <212> RNA  
[0135] <213> 人工序列  
[0136] <400> 10  
[0137] GCTGGGCCGA 10  
[0138] <210> 11  
[0139] <211> 10  
[0140] <212> RNA  
[0141] <213> 人工序列  
[0142] <400> 11  
[0143] GCCCGAGCGG 10  
[0144] <210> 12  
[0145] <211> 10  
[0146] <212> RNA  
[0147] <213> 人工序列  
[0148] <400> 12  
[0149] TGCGGCGGG 10  
[0150] <210> 13  
[0151] <211> 10  
[0152] <212> RNA  
[0153] <213> 人工序列  
[0154] <400> 13  
[0155] AGCGGGCCAA 10  
[0156] <210> 14  
[0157] <211> 10  
[0158] <212> RNA  
[0159] <213> 人工序列  
[0160] <400> 14  
[0161] CCGGGCAAGC 10  
[0162] <210> 15  
[0163] <211> 10  
[0164] <212> RNA  
[0165] <213> 人工序列  
[0166] <400> 15  
[0167] AGGAAGGTGC 10  
[0168] <210> 16  
[0169] <211> 10  
[0170] <212> RNA  
[0171] <213> 人工序列

[0172] <400> 16

[0173] CGAACGGCGG 10

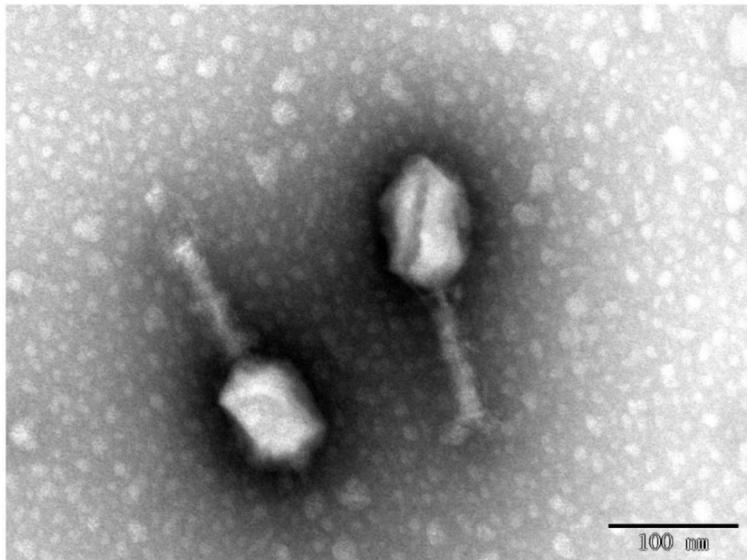


图1

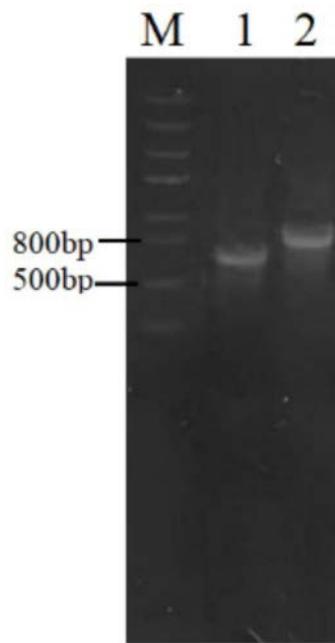


图2

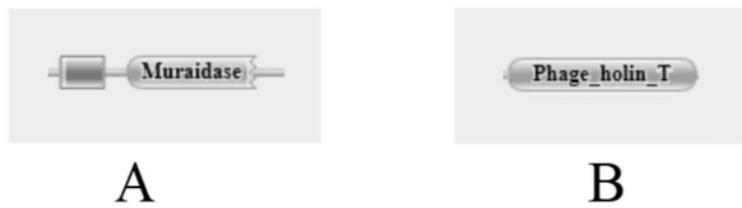


图3

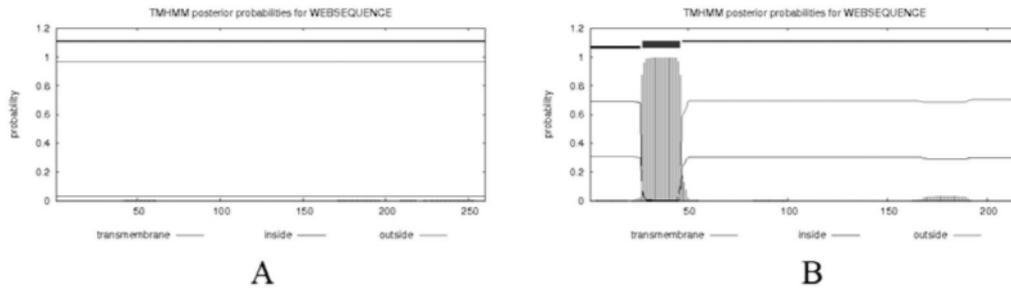


图4

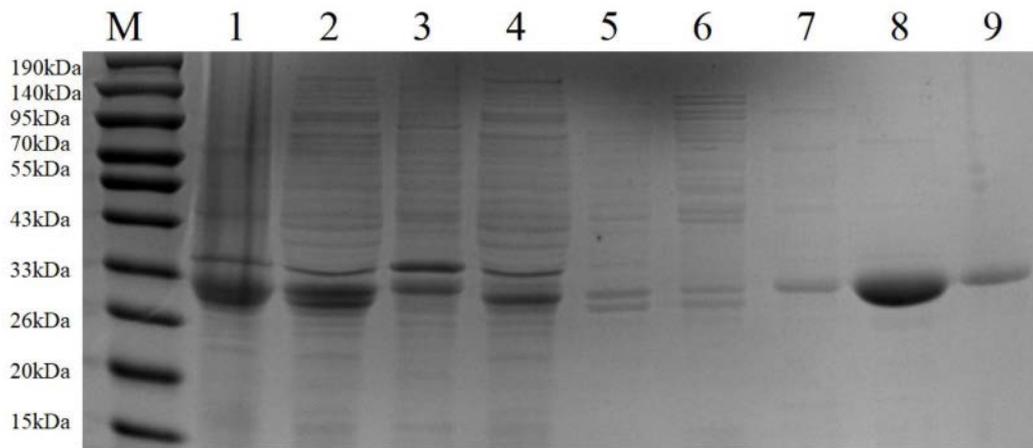


图5

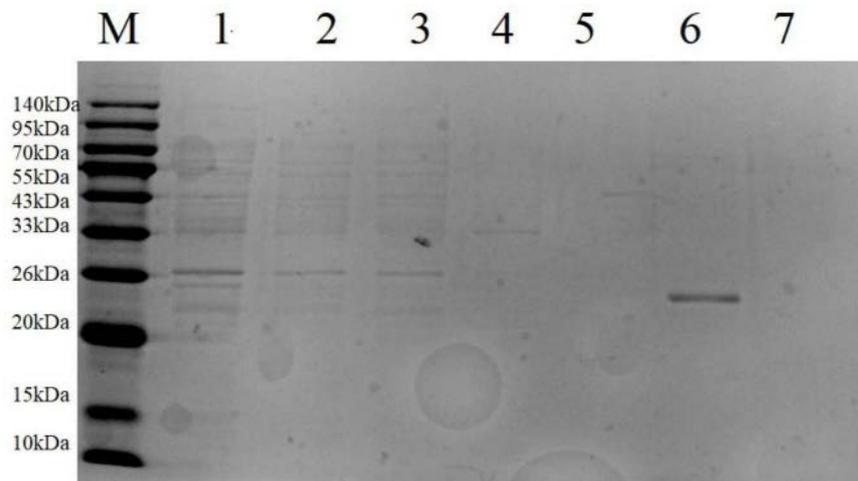


图6

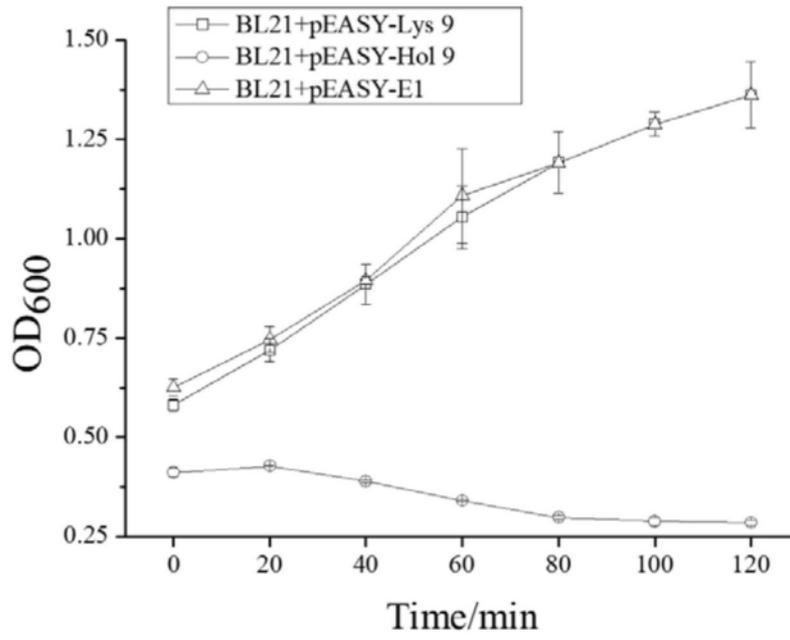


图7

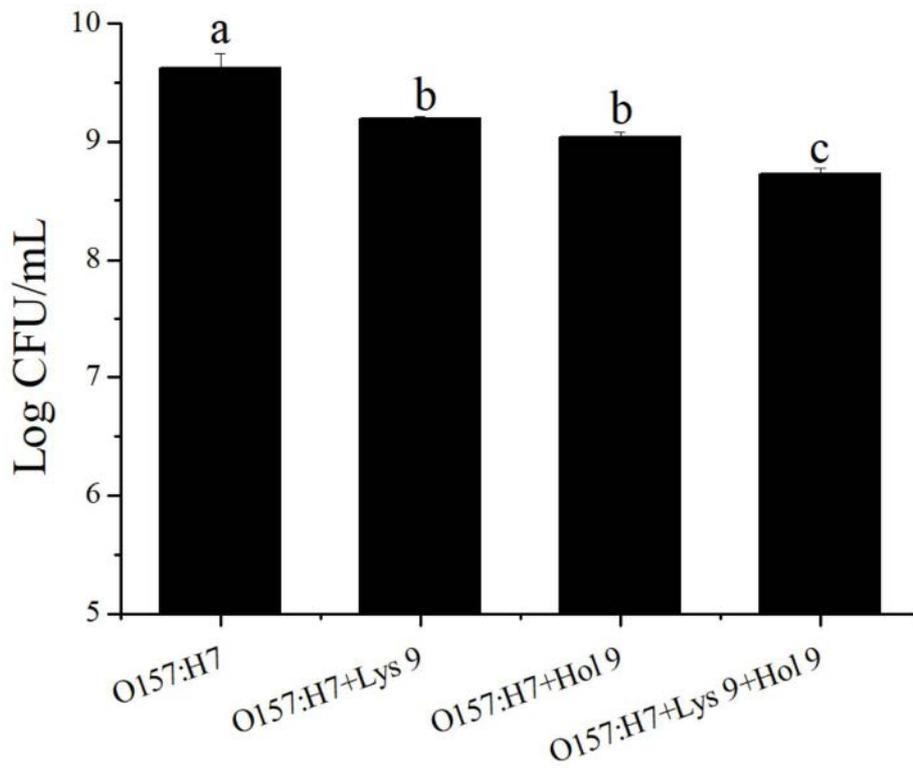


图8