

中文摘要

产气荚膜梭菌 S19 噬菌体的分离鉴定及其裂解酶 Lys19 的

结构与抗菌功能

产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*) 是一种革兰氏阳性厌氧菌, 可感染人和动物。菌体呈粗杆状, 边缘笔直。可在环境中广泛存在。繁殖温度范围广, 可分泌 20 多种已鉴定的毒素, 可引起多种疾病, 例如气性坏疽和食物中毒等。主要由 A 型产气荚膜梭菌导致, 严重威胁公共卫生安全。目前, 虽然气性坏疽的发病率低, 但是即使在很好的治疗条件下, 致死率仍然很高。如果不治疗, 气性坏疽的致死率可达 100%。随着抗菌药的逐渐发展, 滥用现象已经相当普遍, 并且日益恶化。由此引发产气荚膜梭菌对于很多的抗菌药都产生了耐药的情况, 最后导致防治困难甚至临床治疗失败的事件多有发生, 噬菌体及其裂解酶成为解决这一问题的重要策略。

噬菌体治疗虽然与传统抗生素相比具有很大优势, 但是也存在一些缺陷。例如药效持续时间短、易产生抗性菌等问题。噬菌体裂解酶可以作用于细胞壁的主要成分肽聚糖的化学键, 进而使化学键断开, 完成裂解过程, 噬菌体裂解酶是有效的治疗剂, 在治疗由抗生素耐药性病原体引起的感染方面具有巨大潜力。

本研究以 A 型产气荚膜梭菌 S19 为宿主菌, 在污水中分离得到了一株新的噬菌体, 根据标准命名法命名为 vB_CpeS_XBG01 (简称 XBG01)。首先, 通过扫描电镜确定了 XBG01 为长尾噬菌体。对 XBG01 的噬菌体基因组进行了测序和分析, 测序结果表明该噬菌体的全基因组长度为 58 822bp, G+C 含量为 34.52%, 基因组序列在数据库中没有其他噬菌体与之有同源性, 表明 XBG01 为新的噬菌体。预测了 92 个开放阅读框, 并对开放阅读框的功能进行了注释。

在对噬菌体 XBG01 的基因组序列进行生物信息学分析后, 鉴定筛选出裂解酶基因, 全长为 789bp, 并命名为 Lys19。将裂解酶 Lys19 的氨基酸序列上传至 NCBI 进行比对, 经比较全长在数据库中并没有已知裂解酶与其同源, 表明裂解酶 Lys19 为新的产气荚膜属裂解酶。在噬菌体 XBG01 中确定了裂解酶 Lys19

基因，成功构建了 pET-15b-Lys19 载体，并成功表达了裂解酶 Lys19。对裂解酶 Lys19 的生物学特性和体外杀菌活性进行研究，结果表明，裂解酶 Lys19 有较宽的裂解谱，不仅可以裂解产气荚膜梭菌，还可以裂解猪链球菌。稳定性结果表明，裂解酶 Lys19 有比较强的耐酸碱能力，在 pH 值 3.0-9.0 范围内有较好的杀菌活性；裂解酶 Lys19 不耐高温，在温度高于 55°C 时活性逐渐丧失；100-700mM 的 NaCl 对裂解酶 Lys19 的活性影响并不大，高浓度 NaCl 并不会影响 Lys19 的活性；100mM 的 EDTA 预处理之后并不影响裂解酶 Lys19 的活性。体外杀菌测定结果表明，终浓度为 100 μ g/mL 的 Lys19 与宿主菌培养 40min，可裂解大约 1 个 Lg 单位的活菌，对宿主菌具有良好的杀菌活性。对裂解酶 Lys19 作为生物防治剂的功效研究表明，使用裂解酶 Lys19 杀灭生菜上的产气荚膜梭菌，结果表明在 15min、30min、60min 内均可杀灭 1 个 Lg 单位的活菌，展现出广阔的应用前景。

最后，裂解酶 Lys19 的 3D 结构和关键活性位点通过生物信息学在线工具 Phyre² 进行了预测，采用一步法分别将预测的关键活性位点逐一突变为丙氨酸，然后比较各突变体蛋白(E146A、H81A、Y133A、E95A、E26A、L132A、H13A、R124A)与 Native Lys19 的杀菌活性，以此确认其关键活性位点。实验结果显示，E146A、H81A、E26A、H13A 突变体的杀菌活性较 Native Lys19 分别降低了超过 60%，说明 146E、81H、26E、13H 为 Lys19 发挥催化裂解活性的关键位点；构建、纯化表达截短体蛋白 Lys19A (5aa~175aa) 和 Lys19B (180aa~262aa)，体外杀菌结果显示，Lys19A 具有裂解活性，但失去了对猪链球菌的裂解活性，Lys19B 丧失裂解活性。然后构建表达纯化了融合蛋白 EGFP、Lys19A-EGFP 和 Lys19B-EGFP，并借助激光共聚焦显微镜进一步确认这些结构域的结合特性。实验结果显示，Lys19B-EGFP 具有结合活性，而 Lys19A-EGFP 没有结合活性。

综上所述，本研究分离了一个新的产气荚膜梭菌噬菌体，并分析其全基因组筛选得到了裂解酶 Lys19，该酶在作为抗菌制剂方面具有很好的前景，为新型高效抗菌制剂的研发奠定了坚实基础。

关键词：

产气荚膜梭菌，噬菌体，裂解酶，新型抗菌制剂

目 录

前 言	1
第一篇 文献综述	2
第 1 章 产气荚膜梭菌的研究进展	2
1.1 产气荚膜梭菌简介	2
1.2 产气荚膜梭菌主要毒素类型及危害	2
1.3 产气荚膜梭菌的致病性	3
1.4 产气荚膜梭菌耐药性现状	4
第 2 章 产气荚膜梭菌噬菌体及其裂解酶的研究进展	7
2.1 噬菌体概述	7
2.2 噬菌体裂解酶概述	8
2.3 产气荚膜梭菌噬菌体裂解酶的应用	9
2.4 展望	10
第二篇 研究内容	11
第 1 章 产气荚膜梭菌噬菌体的分离鉴定及其基因组测序分析	11
1.1 材料	11
1.2 方法	13
1.3 结果	17
1.4 讨论	30
1.5 小结	31
第 2 章 产气荚膜梭菌噬菌体重组裂解酶 Lys19 的原核表达及其体外	

活性测定.....	32
2.1 材料.....	32
2.2 方法.....	33
2.3 结果.....	37
2.4 讨论.....	46
2.5 小结.....	47
第3章 裂解酶 Lys19 的结构预测和功能解析以及各截短体蛋白的功能验证.....	48
3.1 材料.....	48
3.2 方法.....	50
3.3 结果.....	53
3.4 讨论.....	60
3.5 小结.....	61
结 论.....	62
参考文献.....	63
导师简介.....	71
作者简介.....	72
攻读硕士期间发表的学术论文及其他成果.....	73
致 谢.....	74

英文缩写词

英文缩写	英文全称	中文全称及注释
LB	Luria bertani medium	LB 培养基
MOI	Multiplicity of infection	感染复数
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
PFU	Plaque forming unit	噬斑形成单位
CFU	Colony-forming unit	菌落形成单位
OD	Optical density	吸光度
bp	Base pair	碱基对
PBS	Phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液
Amp	Ampicillin	氨苄霉素
CBD	Cell-wall binding domain	细胞壁结合结构域
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid	乙二胺四乙酸
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein	增强型绿色荧光蛋白
ORF	Open Reading Frame	开放阅读框
KD	Kilodalton	千道尔顿
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
BHI	Brain Heart Infusion Broth	脑心浸出液肉汤

前 言

产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*) 是一种革兰氏阳性厌氧菌, 可感染人和动物。虽属于厌氧菌, 但其仍然可以在有氧环境以及低浓度超氧化物的情况下生存, 传播范围广, 危害大^[1, 2], 能够产孢子, 有荚膜, 作为动物体内的病原菌, 能够产生荚膜是区别于其他梭菌的特点之一, 可引起肌肉坏死、气性坏疽和食物中毒。分泌 20 多种已鉴定的毒素, 毒素分型依赖于其携带 *cpa/plc*、*cpb*、*etx*、*iap/ibp/itx*、*cpe* 和 *netB* 基因, 这些基因分别编码 α 、 β 、 ϵ 、 ι 、CPE 和 NetB 六种毒素^[3]。CPA (α -毒素) 具有酶活性, 可降解细胞膜磷脂酰胆碱和鞘磷脂, 抑制中性粒细胞的成熟以及激活花生四烯酸代谢, 损害先天免疫反应; CPB (β -毒素) 被称为成孔毒素, 能够结合内皮细胞并通过释放 P 物质引起神经毒性症状等, 对人类和现代养殖业都造成了挑战。因此, 寻找一种效果好的新型抗菌药物迫在眉睫。噬菌体及其衍生的裂解酶是有效的治疗剂, 在治疗由抗生素耐药性病原体引起的感染方面具有巨大潜力。

目前, 有关于产气荚膜梭菌噬菌体裂解酶的研究报道较少。本研究分离得到了一株新的产气荚膜梭菌噬菌体, 在 NCBI 数据库中比对没有已知噬菌体与之有同源性。以 A 型产气荚膜梭菌 S19 为宿主菌, 分离得到产气荚膜梭菌噬菌体 vB_CpeS_XBG01。对其全基因组进行分析, 鉴定筛选出裂解酶基因并进行原核表达纯化, 得到裂解酶 Lys19, 经比较全长在数据库中没有已知裂解酶与其同源, 表明裂解酶 Lys19 是一个值得深入研究的产气荚膜属裂解酶的新成员。初步研究了其生物学特性和体外杀菌活性, 裂解谱结果显示 Lys19 裂解范围较广, 不仅可以裂解产气荚膜梭菌, 还可以裂解猪链球菌。然后预测了 Lys19 的 3D 结构和关键活性位点并进行定向突变, 以确认其关键活性位点; 随后进行了对该酶不同区域功能的预测和验证, 并推测了其结构的构成。

每一种细菌都具有与之对应丰富的噬菌体及其裂解酶, 每一株都会表现出各具特色的生物结构和功能, 不断丰富每一种细菌的噬菌体及其裂解酶库, 本研究可为细菌感染的噬菌体和裂解酶疗法提供多样性的储备与选择。

第一篇 文献综述

第 1 章 产气荚膜梭菌的研究进展

1.1 产气荚膜梭菌简介

产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*) 又名魏氏梭菌, 是一种重要的人畜共患革兰氏阳性厌氧菌, 虽属于厌氧菌, 但其仍然可以在有氧环境以及低浓度超氧化物的情况下生存, 传播范围广, 危害大^[1, 2]。菌体呈粗杆状, 边缘笔直, 两头钝圆, 菌端较齐, 没有鞭毛, 不能运动, 单个或者成对存在, 偶尔呈现短链排列, 能够产孢子, 有荚膜, 作为动物体内的病原菌, 能够产生荚膜是区别于其他梭菌的特点之一。可以在环境中传播, 可以在污水、土壤以及人和动物的消化道中广泛存在。繁殖温度范围广 (20°C-25°C), 生长最佳 pH 值为 6.5 至 7.5^[4, 5], 根据 AOAC 建议, 产气荚膜梭菌的培养、检测和计数在 TSC (胰蛋白糖亚硫酸盐环丝氨酸琼脂) 培养基上进行, 菌落呈现黑色, 通过革兰氏染色和在乳糖明胶培养基上通过检查其产气量和乳糖发酵能力和运动能力确认是否属于产气荚膜梭菌种属^[6]。产气荚膜梭菌存在于多种环境中, 包括土壤、污水和食物, 同时也是人类和动物患病或健康状态下胃肠道微生物群的重要组成部分。新一代测序技术揭示了 1991 年在高山冰川中发现的木乃伊, 其胃肠道存在产气荚膜梭菌^[7]。

1.2 产气荚膜梭菌主要毒素类型及危害

产气荚膜梭菌可分泌 20 多种已鉴定的毒素, 毒素分型依赖于其携带 *cpa/plc*、*cpb*、*etx*、*iap/ibp/itx*、*cpe* 和 *netB* 基因, 这些基因分别编码 α 、 β 、 ϵ 、 ι 、CPE 和 NetB 六种毒素^[3], 可以使用免疫学方法检测产气荚膜梭菌毒素。

CPA (α -毒素) 具有酶活性, 可降解细胞膜磷脂酰胆碱和鞘磷脂, 抑制中性粒细胞的成熟以及激活花生四烯酸代谢, 损害先天免疫反应, 导致气性坏疽^[8-10]。CPB (β -毒素) 被称为成孔毒素, 能够结合内皮细胞并通过释放 P 物质引起神经毒性症状, 引起坏死性小肠结肠炎^[9]。ETX (ϵ -毒素) 是绵羊出血性肠炎和肠

毒血症的主要病因。肠蛋白酶作用后更加活跃，导致肠道通透性增加，形成血管周围水肿和快速细胞水肿^[11-13]。ITX (ɪ-毒素) 被称为二元毒素，能够产生两种不同的蛋白质: Ia 和 Ib。Ib 蛋白与细胞表面受体结合后与 Ia 结合形成复合物，Ib 创建的膜通道使 Ia 能够进入细胞质，从而通过 ADP-核糖基化引起肌动蛋白细胞骨架解聚^[14]。CPE (肠毒素) 也是一种成孔毒素，能够与细胞表面的密蛋白受体结合。它能够形成六聚体复合物，导致钙流入，激活钙蛋白酶致细胞死亡。CPE 可导致食物中毒和非食源性腹泻^[13]。NetB (坏死性肠炎 B 样毒素) 在禽类坏死性肠炎中被发现，可导致毛孔形成^[15]。

产气荚膜梭菌可根据其分泌的主要致病性毒素的不同分为 A、B、C、D、E 五种类型，其中 A 型菌为危害较严重的毒素型菌，可导致人体或动物体组织气肿，还能引起肠毒血症及胃肠道传染性疾病，胃肠内的毒素被吸收进入机体并循环，从而损害其他内部器官，严重危害人与动物公共卫生安全及现代禽畜产业的发展。^[16, 17]。

1.3 产气荚膜梭菌的致病性

产气荚膜梭菌可引起肌肉坏死和气性坏疽等疾病^[18, 19]，主要由 A 型产气荚膜梭菌导致。如今，虽然气性坏疽的发病率低，但是，即使在抗生素治疗或高压氧治疗的特殊条件下，致死率仍然很高^[20]。如果不治疗，气性坏疽的致死率可达 100%^[21, 22]。气性坏疽是由孢子或营养细胞对创伤性伤口的毒性感染引起的，产气荚膜梭菌细胞的增殖导致受影响组织的严重坏死。临床症状主要有发烧、疼痛、水肿和进行性肌坏死等，进一步发展为败血症、中毒性休克，最后导致死亡^[23]。

A 型 Cp 易引发胃肠道综合征、食物中毒等，世界各地频繁发生食物中毒事件，促使人们对 A 型 Cp 在其中的作用展开更深入的探讨。只要禽肉产品受到 A 型 Cp 污染后未能经过彻底烹饪，或者被受潮、温度不当等储存条件影响，就极易导致食物中毒的发生。畜禽的 Cp 感染多以 CpA 为主，A 型 Cp 易引起鸡的坏死性肠炎 (Necrotic Enteritis, NE)^[24]，NE 对世界上很多国家的养殖业造成了严重的影响，随着我国养殖业的兴起，国人对于鸡肉的需求越来越大，而 NE 对肉鸡的饲养造成了不利影响，导致肉鸡的生长速度变慢，周期变长，

蛋鸡的产蛋量以及蛋的质量也同样受到影响^[25]。

B 型 Cp 常引起绵羊的痢疾，当毒素转移并被吸收到循环系统中时，会导致肠道病变和肠毒血症。绵羊痢疾的特点是坏死性出血性肠炎，很少出现在与 CPB 和 ETX 毒素作用相关的局灶性对称性坏死中^[26-28]。有学者推测 B 型 Cp 毒素可能与多发性硬化症（Multiple Sclerosis, MS）的发病机制有关，因为在 MS 患者中已发现 ETX 血清抗体^[29]。Ma 等人^[30]发现 MS 与产生 ETX 的产气荚膜梭菌菌株存在关联，它们在循环髓磷脂自身反应性淋巴细胞的背景下引发炎症性脱髓鞘。

C 型 Cp 可以导致哺乳动物和人类，特别是会导致新生儿出现坏死性肠炎和肠毒血症^[31, 32]。患有糖尿病和其他胰腺疾病的人中发现了罕见的 C 型 Cp 感染病例。C 型疾病有急性或半急性病程，死亡率极高^[33, 34]。动物通常会出现腹泻和腹痛等症状，有时也会出现神经损伤和猝死症状。病理上，该病以坏死性病变为特征，镜下病变特征为严重坏死性肠炎或小肠结肠炎引起的损害等^[35]。消化道外的病变表现为循环障碍，包括浆膜充血和出血、水肿和肺充血。

D 型 Cp 会导致绵羊、山羊和牛的肠毒血症和小肠结肠炎症。牛和羊感染肠毒血症后，主要表现为大脑和其他肠外器官受损，但现实中很少见到出现肠道病变的病例。山羊感染该毒素型会引发小肠结肠炎，该疾病的主要诱发因素是突然摄入富含高发酵碳水化合物的饲料^[19, 27]。

E 型 Cp 分离自患病动物的肠道内容物，这种毒素类型是健康生物和多种动物肠道微生物共同存在的成员，因此这些菌株的出现并不明确地伴有疾病症状^[19]。

F 型 Cp 能够在孢子形成时产生 α -毒素和 CPE。此前，这些菌株被归类为 A 型毒素。这些菌株会导致人类食物中毒和非食源性腹泻，以及抗生素相关性腹泻等^[36, 37]。

1.4 产气荚膜梭菌耐药性现状

产气荚膜梭菌会导致禽类的坏死性肠炎，尤其在 2-6 周龄的幼鸡中较为常见，发病率和死亡率较高，对全球畜牧业的发展造成严重危害^[38]。针对坏死性肠炎，杆菌肽等生长促进剂能发挥良好的治疗作用。然而随着抗菌药物的不断发展和

广泛使用，不合理甚至滥用的情况日益严重，由此引发产气荚膜梭菌对于很多的抗菌药都产生了耐药的情况，最后导致防治困难甚至临床治疗失败的事件多有发生。国内外很多国家目前都出现了对产气荚膜梭菌程度不同的耐药性，就目前的研究结果来看，产气荚膜梭菌已经对很多抗生素表现出抗药性，可能是因为这些药物被使用的时间和用量造成的。研究显示，加拿大和阿根廷等国家使用杆菌肽的频率很高，但是产气荚膜梭菌对杆菌肽的敏感性较低，耐药性很高^[39, 40]。在一些国家，并未使用杆菌肽的条件下，产气荚膜梭菌对杆菌肽的敏感性仍十分高^[40, 41]。另外，一项追踪研究表明，在农业部实施生长促进剂禁令后分离出来的产气荚膜梭菌菌株，对抗生素的敏感性却有所降低。研究人员认为，这大概是由于长期大量不合理使用抗生素所致^[42]。因此，可以得出结论，产气荚膜梭菌对抗菌药的敏感程度与长期不合理使用之间存在相关性。

近年来，我国发现的产气荚膜梭菌分离株耐药性表现出显著的区域差异，并且分离株的地区不同，对于同种药物的敏感性也存在着差异，蔡建平团队曾对大量鸡场内产气荚膜梭菌的耐药情况展开了调查研究，该团队采集了7省的样品，分离鉴定得到了214株产气荚膜梭菌。随后测定了这些菌株的药物敏感性，测定结果显示，四川省部分地区的分离菌株对所使用的药物均呈现出敏感状态；在广西省部分地区地区，分离菌株只对那西肽表现出敏感性。而其他地区的大部分分离的产气荚膜梭菌，则对杆菌肽和吉他霉素表现出耐药性，这或许与我国不同地区长期在养鸡业中使用这类抗生素有关^[43, 44]。

由于抗生素的耐药性的局限性，对于Cp感染的防控也常常采用其他的方法，例如疫苗和微生态制剂等，但是疫苗的研发周期长，需要较长时间的临床测试是否具有好的预防效果。同样的，中药也是新型的抗菌制剂的选择之一，但是中药复方的副作用依然没有明确，且中药的适口性不佳，制作成食品会很大程度的改变风味和色泽，因此也有一定的局限性^[45-47]。

噬菌体及其衍生的裂解酶是有效的治疗剂，在治疗由抗生素耐药性病原体引起的感染方面具有巨大潜力。噬菌体，也称为细菌病毒，是可以感染细菌并在细菌中复制的病毒。当裂解性噬菌体感染宿主细菌时，它们将基因组注入宿主细菌中，并利用宿主的生物合成机制复制并产生子代病毒颗粒。在裂解周期的最后阶段，会产生噬菌体内溶素来破坏细菌细胞壁并释放后代。裂解循环导

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/558032126113006141>