



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116855486 A

(43) 申请公布日 2023. 10. 10

(21) 申请号 202310898216.3

C12N 15/60 (2006.01)

(22) 申请日 2023.07.21

A61K 38/51 (2006.01)

(71) 申请人 临沂大学

A61P 31/04 (2006.01)

地址 276000 山东省临沂市兰山区工业大道北段西侧

C12R 1/19 (2006.01)

(72) 发明人 牛建蕊 张兴林 马俊飞 李兴帅
于鲁敏 赵玉仲 杨祥朋

(74) 专利代理机构 北京慕达星云知识产权代理
事务所(特殊普通合伙)
11465

专利代理师 齐宝玲

(51) Int. Cl.

C12N 9/88 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

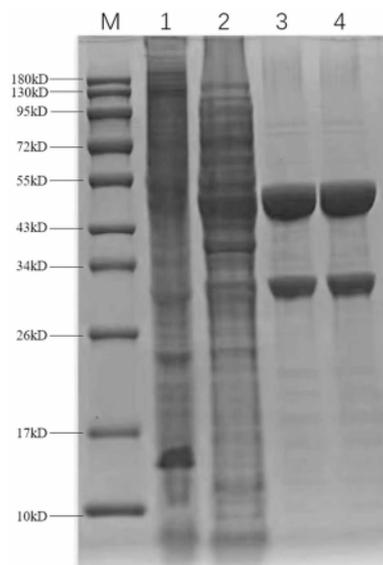
权利要求书1页 说明书8页
序列表(电子公布) 附图3页

(54) 发明名称

一种链球菌前噬菌体裂解酶lys1644及应用

(57) 摘要

本发明公开了一种链球菌前噬菌体裂解酶lys1644及应用,属于链球菌相关疾病防治技术领域,裂解酶lys1644的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示,该裂解酶的编码基因可以制备成重组载体或工程菌,为裂解酶lys1644的进一步应用提供了基础;该裂解酶对于停乳链球菌、金黄色葡萄球菌或表皮葡萄球菌具有抗菌活性,为奶牛乳腺炎和其他细菌性感染的预防和治疗提供了理论基础。



1. 一种链球菌前噬菌体裂解酶lys1644,其特征在於,所述裂解酶lys1644的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示。

2. 根据权利要求1所述的一种链球菌前噬菌体裂解酶lys1644,其特征在於,所述链球菌前噬菌体裂解酶lys1644的结构域包括N端Glucosaminidase裂解结构域、中间的CHAP裂解结构域和C端的SH3-5结合结构域。

3. 根据权利要求2所述的一种链球菌前噬菌体裂解酶lys1644,其特征在於,N端Glucosaminidase裂解结构域为第2位到第145位氨基酸,中间的CHAP裂解结构域为第163位到第296位氨基酸,C端的SH3-5结构域为第322位到第390位氨基酸。

4. 权利要求1-3任一所述的链球菌前噬菌体裂解酶lys1644在制备裂解停乳链球菌、金黄色葡萄球菌或表皮葡萄球菌的相关药物中的应用。

5. 权利要求1-3任一所述的链球菌前噬菌体裂解酶lys1644在制备治疗奶牛乳腺炎的抗菌剂中的应用。

6. 一种药物,其特征在於,包括链球菌前噬菌体裂解酶lys1644,所述裂解酶lys1644的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示,链球菌前噬菌体裂解酶lys1644的使用浓度为50 μ g/mL。

7. 权利要求1-3任一所述的链球菌前噬菌体裂解酶lys1644在制备裂解停乳链球菌、金黄色葡萄球菌或表皮葡萄球菌的生物材料中的应用,所述生物材料包括重组表达载体和重组工程菌;所述重组表达载体由表达载体和SEQ ID NO.2序列重组而成;所述重组工程菌是向宿主大肠杆菌中转化所述的重组表达载体而成。

一种链球菌前噬菌体裂解酶lys1644及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及链球菌相关疾病防治技术领域,更具体地说是涉及一种链球菌前噬菌体裂解酶lys1644及应用。

背景技术

[0002] 链球菌属(streptococcus)细菌属于革兰氏阳性菌,广泛分布于自然界、人及动物的粪便及健康人的鼻咽部,其中包括了种类繁多的致病菌。人类的致病菌包括肺炎链球菌、化脓链球菌和粪链球菌等,这些链球菌可以导致败血症、关节炎、脑膜炎、心内膜炎、脑炎、风湿热、猩红热等临床疾病;感染牛的停乳链球菌、无乳链球菌和乳房链球菌可导致奶牛乳腺炎等症状;猪链球菌可导致猪的人类的脑膜炎、败血症、肺炎等;马链球菌感染可致马匹出现马腺疫,致人类伤口感染和菌血症等。链球菌病给人类健康造成了极大的危害,给畜牧养殖业造成了巨大的损失。抗生素的出现,使链球菌感染得到了一定的控制。但随着抗生素在人类医学和畜牧养殖行业的不规范使用,使其耐药性逐渐变强,由此出现的多重耐药菌已没有可用的抗生素治疗,因此,迫切需要研发新一类的抗菌药物或抗菌剂用于链球菌感染的防控。

[0003] 噬菌体是一种能够感染细菌、古菌等原核微生物的病毒,其可通过“穿孔素-裂解酶”二元系统快速裂解细菌,因此噬菌体及其衍生的裂解酶可作为抗生素的替代抗菌剂。噬菌体的裂解谱一般较窄,且由于细菌可以快速进化出表面受体的抗性,使得其应用受限。而由噬菌体衍生的裂解酶具有相对广泛的裂解谱,可作为一种高效安全的天然抗菌剂,用于耐药病原细菌的防控。

[0004] 噬菌体裂解酶用作抗菌剂可以特异性地快速杀灭宿主细菌,裂解酶作用于细菌表面的肽聚糖,由于肽聚糖是细胞壁的关键成分,其种内保守性很高,因此裂解酶表现出更为广谱的裂解活性,也决定了细菌对裂解酶更难产生抗性;同时,将裂解酶用于治疗病原细菌感染的动物时,宿主动物会针对其产生抗体,但裂解酶的活性中心一般不是暴露于表面的抗原表位,因此针对裂解酶的抗体不会削弱其裂解杀菌作用;而且,裂解酶与其它抗菌剂如抗生素联用具有协同抗菌效应,不仅能够拓宽裂解谱,且能够更有效地发挥抗菌活性,降低细菌产生抗性的概率。

[0005] 针对奶牛乳腺炎相关的多种链球菌感染和其它链球菌如猪链球菌、马链球菌、肺炎链球菌和化脓链球菌等引起的疾病,目前尚未研发出广谱有效的链球菌噬菌体裂解酶,并将其应用于链球菌感染的防控。

[0006] 因此,如何提供一种针对链球菌的光谱的链球菌噬菌体裂解酶是本领域技术人员亟需解决的问题。

发明内容

[0007] 有鉴于此,本发明提供了一种链球菌前噬菌体裂解酶lys1644,该裂解酶对于与奶牛乳腺炎相关的停乳链球菌及金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌具有抗菌活性,为奶牛乳腺

炎和细菌性感染的预防和治疗提供了理论基础。

[0008] 为了实现上述目的,本发明采用如下技术方案:

一种链球菌前噬菌体裂解酶lys1644,所述裂解酶lys1644的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示。

[0009] 优选地,所述链球菌前噬菌体裂解酶lys1644的结构域包括N端Glucosaminidase裂解结构域、中间的CHAP裂解结构域和C端的SH3-5结合结构域。

[0010] 优选地,N端Glucosaminidase裂解结构域为第2位到第145位氨基酸,中间的CHAP裂解结构域为第163位到第296位氨基酸,C端的SH3-5结构域为第322位到第390位氨基酸。

[0011] 作为与上述技术方案相同的发明构思,本发明还请求保护所述的链球菌前噬菌体裂解酶lys1644在制备裂解停乳链球菌、金黄色葡萄球菌或表皮葡萄球菌的相关药物中的应用。

[0012] 作为与上述技术方案相同的发明构思,本发明还请求保护链球菌前噬菌体裂解酶lys1644在制备治疗奶牛乳腺炎和其他细菌性感染的抗菌剂中的应用。

[0013] 作为与上述技术方案相同的发明构思,本发明还请求保护编码SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的基因在制备裂解停乳链球菌、金黄色葡萄球菌或表皮葡萄球菌的相关药物中的应用。

[0014] 优选地,所述基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示。

[0015] 作为与上述技术方案相同的发明构思,本发明还请求保护一种用于扩增上述链球菌前噬菌体裂解酶lys1644的编码基因的特异性引物,这lys1644-F和lys1644-R,分别如SEQ ID NO.3~SEQ ID NO.4所示。

[0016] 一种药物,包括链球菌前噬菌体裂解酶lys1644,所述裂解酶lys1644的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示,链球菌前噬菌体裂解酶lys1644的使用浓度为50 μ g/mL。

[0017] 作为与上述技术方案相同的发明构思,本发明还请求保护链球菌前噬菌体裂解酶lys1644在制备裂解停乳链球菌、金黄色葡萄球菌或表皮葡萄球菌的生物材料中的应用,所述生物材料包括重组表达载体和重组工程菌;所述重组表达载体由表达载体和如SEQ ID NO.2所示的编码基因重组而成;所述重组工程菌是向宿主大肠杆菌中转化所述的重组表达载体而成。

[0018] 本发明还提供了一种链球菌前噬菌体裂解酶lys1644的制备方法,具体步骤如下:

(1) 以停乳链球菌SD24基因组为模板,扩增前噬菌体裂解酶lys1644的核苷酸序列;

(2) 将步骤(1)得到的核苷酸序列克隆至表达载体中,得到重组表达载体;

(3) 将步骤(2)得到的重组表达载体转化入大肠杆菌感受态细胞,得到重组工程菌;

(4) 利用重组工程菌诱导表达裂解酶lys1644;

(5) 提取纯化步骤(4)得到的裂解酶lys1644。

[0019] 优选地,裂解酶lys1644核苷酸序列克隆过程中采用的酶切方法为Bam HI和Kpn I双酶切。

[0020] 优选地,所述表达载体为pEC,C端有6xHis标签;具有T7 lac启动子,采用Ni⁺亲和层析纯化。该载体也可选择其它适于在大肠杆菌中表达外源基因的载体,如pET系列、pGEX

系列、pMAL系列或pBAD系列等。

[0021] 优选地,所述工程菌为大肠杆菌BL21 (DE3),也可以为大肠杆菌Rosseta等表达宿主菌。

[0022] 优选地,诱导表达所用的诱导剂为IPTG,诱导浓度为0.5mmol/L,诱导时间为16 h。

[0023] 优选地,所述工程菌的培养温度为37℃,诱导表达温度为25℃。

[0024] 经由上述的技术方案可知,与现有技术相比,本发明从停乳链球菌SD24基因组中克隆得到该前噬菌体裂解酶lys1644,采用原核表达方式,诱导表达出可溶的裂解酶。该裂解酶lys1644对停乳链球菌、金黄色葡萄球菌或表皮葡萄球菌具有广谱的抑菌效果,为预防和治疗上述细菌感染的疾病奠定了基础。本发明可以获得大量具有明确酶活性与理化特性的产品,产品生产成本低、产物活性强,可满足推广应用的生产需求。

附图说明

[0025] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明的实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据提供的附图获得其他的附图。

[0026] 图1附图为裂解酶蛋白lys1644原核表达和纯化的SDS-PAGE结果图;其中,M是标准蛋白质分子量标记物;1为转化空载体的工程菌株全蛋白;2为转化重组表达质粒的重组工程菌株全蛋白;3,4为裂解酶蛋白lys1644的纯化结果;

图2附图为裂解酶lys1644蛋白序列结构示意图;其中,Glucosaminidase是第1个裂解结构域,CHAP是第二个裂解结构域,SH3-5为结合结构域;

图3附图为AlphaFold预测的链球菌前噬菌体裂解酶lys644立体结构图示;

图4附图为不同浓度的裂解酶lys1644对停乳链球菌的体外抑菌效果图;

图5附图为裂解酶lys1644的pH稳定性检测结果图;

图6附图为裂解酶lys1644的温度稳定性结果图。

具体实施方式

[0027] 下面将结合本发明实施例中的附图,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。

[0028] 实施例1 基因组序列扩增和回收

对奶牛乳腺炎奶样分离出的停乳链球菌SD24进行全基因组测序,通过生信分析对基因组中前噬菌体基因组进行定位,并于前噬菌体中检索出裂解酶lys1644的全长核苷酸序列。

[0029] 使用引物对lys1644-F/R扩增如Seq ID NO.2所示的核苷酸序列。

[0030] 上游引物lys1644-F:5'-aggagatataccatgggatccatgaccttttttagataacat-3',如SEQ ID NO.3所示。

[0031] 下游引物lys1644-R:5'-aaaatacaggttttcggtaccatttaatttaccctaaagac-3',如

SEQ ID NO.4所示。

[0032] 引物序列中包含表达载体连接位点处的同源臂片段，下划线部分即为同源片段。

[0033] 反应体系如表1所示。

[0034] 表1 PCR扩增体系

2×Phanta Mix Master Buffer	25μL
模板 DNA	1μL
lys1644-F	2μL
lys1644-R	2μL
ddH ₂ O	20μL

反应条件：

95 °C	预变性	3min	} 30 个循环
95	变性	15s	
60 °C	退火	15s	
72 °C	延伸	90s	
72 °C	总延伸	10min	

扩增完成后，以1%琼脂糖凝胶电泳检车PCR扩增产物，使用诺唯赞割胶回收试剂盒回收PCR扩增的目的片段。

[0035] 实施例2重组表达质粒的连接和转化感受态细胞

1) 将表达载体进行双酶切，酶切体系如表2所示。

[0036] 表2 酶切体系

pEC 质粒	10μL
Bam HI	1μL
Kpn I	1μL
10×M Buffer	2μL
ddH ₂ O	6μL

[0037] 酶切过程为：37°C，水浴4h，酶切体系经1%琼脂糖凝胶电泳验证，胶回收，得到带有粘性末端的载体。

[0038] 根据目的基因PCR胶回收产物和酶切之后的质粒浓度，确定20μL一步克隆连接体系，如表3所示。

[0039] 表3 连接体系

目的基因	2 μ L
质粒酶切产物	2 μ L
5 \times CE II Buffer	4 μ L
ddH ₂ O	12 μ L

[0040] 2) 将表3中的连接体系混合,在37 $^{\circ}$ C,连接30min。将10 μ L连接产物加入100 μ L大肠杆菌DH5 α 感受态细胞中,轻轻混匀,于冰上放置30min。随后于42 $^{\circ}$ C热激90s后,迅速置于冰上2min。加入890 μ L LB培养基,37 $^{\circ}$ C振荡培养1h。5000rpm离心5min后,弃去900 μ L上清液,使用剩余100 μ L重悬菌液,并将其均匀涂布在含有Kan(终浓度50 μ g/mL)的固体LB培养基上,于37 $^{\circ}$ C培养箱倒置过夜培养。

[0041] 3) 挑取Kan平板上的单个菌落,接种到含有Kan的LB液体培养基中进行培养,得到菌悬液后,通过PCR鉴定阳性菌液,同时将PCR鉴定体系送至上海生工生物股份有限公司进行测序,将测序结果与目的基因序列进行比对。测序正确的重组DH5 α 菌株过夜培养后,使用诺唯赞质粒提取试剂盒提取重组质粒。

[0042] 4) 取10 μ L重组质粒加入100 μ L大肠杆菌BL21感受态细胞中,混匀后于冰上放置30min。随后于42 $^{\circ}$ C热激90s后,迅速置于冰上2min。加入890 μ L LB培养基,37 $^{\circ}$ C振荡培养1h。取100 μ L菌液均匀涂布在含有Kan(终浓度50 μ g/mL)的固体LB培养基上,于37 $^{\circ}$ C培养箱倒置过夜培养。

[0043] 实施例3 裂解酶蛋白lys1644的原核表达和纯化

挑取Kan平板上的单个菌落,接种到含有Kan的LB液体培养基中进行培养,得到菌悬液后,通过PCR鉴定阳性菌液。将阳性菌液转接到LB液体培养基中,37 $^{\circ}$ C振荡培养至OD₆₀₀约0.6-0.8后,加入终浓度为0.5mmol/L的IPTG,25 $^{\circ}$ C振荡过夜诱导表达。使用转入空质粒的表达工程菌作为阴性对照。重组工程菌扩大培养后进行诱导表达后,使用超声破碎对菌体进行裂解。12000rpm,4 $^{\circ}$ C离心10min后,去取上清液进行SDS-PAGE电泳分析。结果如图1所示,与空质粒工程菌(泳道1)相比,重组工程菌在45KDa和30KDa处出现较粗的条带(泳道2)。

[0044] 菌体用50mM咪唑洗液重悬,经超声破碎裂解后,取上清液,使用Ni⁺亲和层析柱对裂解酶蛋白进行纯化。用平衡液平衡层析柱2-3次,然后将上清液多次上柱使目标蛋白与亲和层析Ni⁺填料充分结合,用50mM咪唑洗涤6次,洗去杂蛋白。然后使用200mM咪唑对目的蛋白进行洗脱,蛋白纯化的结果如图1泳道3、4所示。纯化后的裂解酶蛋白lys1644的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示,编码基因如SEQ ID NO.2所示。

[0045] MTFLDNIKQGCLDGWAKYKILPSLTAAQAILESGWGKHAPHNALFGIKADSSWAGKSFNTKTQEEYQP
GVMTDIVDRFRAYDSWTDSIFDHGKFLNDNPRYQAVVGETDYKKACHAIKDAGYATASGYAELLIQLIEENDLQKW
DDEAIGGKEKQMISSQCREVIEFFINLANAGMGVDKDNFAGWQCADVPCYAAKHWFVGLWGNALDLLSAAAAGW
EVHRMPTDANPRAGAFFVQSVYPYHQFGHTGIVIEDSDGYTMRITIEQNIDGNADALYVGAPARFNTRDFTGVIGWFY
PPYQGDVAVTQTVSTEPQTSDTIVETPKSGTFTLDVAEINIRRWPSLASEVVGSYKQGDVTGFDSEGYANGYYWISY
VGGSGKRNLAIGQTDKDGNRISLWGKLN,如SEQ ID NO.1所示。

[0046] atgacctttt tagataacat taagcaaggc tgcttagacg gttgggctaa atacaaaata

ttgccatcct tgaccgcagc acaagcaatc ttagagagcg ggtggggtaa acatgcaccg cacaacgctc
 tgtttgaat taaggcagat agctcttggg caggcaagtc atttaacact aaaactcagg aggagtatca
 gccaggggtt atgactgaca tagtagatag gtttagagct tatgacagct ggactgacag tatttttgat
 cacggcaaat ttttaaacga taatccacgg tatcaggctg ttgttgggta gactgactat aaaaaagctt
 gtcacgctat caaggacgca ggttatgcca cggcaagtgg gtacgcggag ttgcttatcc aactaatcga
 ggaaaatgac ctacaaaaat gggatgacga agctatcggg gaaaaggaga agcaaatgat tagttctcaa
 tgtcgagaag ttattgaatt tttataaat ttggcaaatg ctggtatggg tgttgataaa gataattttg
 cgggctggca atgtgcagat gtgccttgtt atgcagcaaa gacttggtt ggggtggacc tttggggcaa
 tgcgattgat ttgctagata gcgctgctgc cgctggttgg gaagtccacc gcatgccgac agatgcaaat
 ccacgggctg gagcattttt tgtccaatcg gtgccatate accaatttgg acatacggga attgtcattg
 aggacagcga cggtataacc atgcgcacga tcgagcaaaa cattgatggc aatgcagatg ctttatatgt
 aggcgcaccagctcgtttta acactcgtga ttttactggc gttattgggtt ggttttacc accatatcaa
 ggagatgcag tcacacaaac cgtcagcaca gagccgcaaa cgtctgacac catcgtagag acaccaa
 ctggtacctt tacgctcgat gttgcagaga ttaatattag acgttggcca agcctcgcca gcgaagtagt
 aggcagctac aagcaaggcg atactgtcgg ctttgacagc gaaggttatg ccaatggcta ctactggatt
 agctatgtcg gcggctctgg gaaacgcaac tatttagcta ttggtcagac tgataaagac gaaatcgta
 tcagtctttg gggtaaatta aat,如SEQ ID NO.2所示。

[0047] 实施例4 裂解酶lys1644结构预测

将裂解酶lys1644的氨基酸序列(SEQ ID NO.1)提交至Pfam在线服务器(<http://pfam.xfam.org/>)对其结构域进行预测,结果如图2所示;由图2可知,Glucosaminidase是第1个裂解结构域,CHAP是第二个裂解结构域,SH3-5为结合结构域;Glucosaminidase在蛋白质序列中,在数值2起始,在数值145终止;CHAP在蛋白质序列中,在数值163起始,在数值296终止;SH3-5在蛋白质序列中,在数值322起始,在数值390终止。

[0048] 使用AlphaFold Colab网站(<https://colab.research.google.com/github/sokrypton/ColabFold/blob/main/AlphaFold2.ipynb#scrollTo=AzIKiDiCaHan>)进行链球菌前噬菌体裂解酶lys1644的三维结构预测,将其氨基酸序列(SEQ ID NO.1)提交,下载预测结果后使用pymol软件对其结构域进行绘制,结果如图3所示。

[0049] 实施例5裂解酶lys1644理化性质分析

氨基酸数量:401,相对分子质量:44336.26,理论pI:4.82,氨基酸种类、数量及占比分别为:Ala (A) 40 10.0%,Arg (R) 13 3.2%,Asn (N) 19 4.7%,Asp (D) 33 8.2%,Cys (C) 5 1.2%,Gln (Q) 18 4.5%,Glu (E) 19 4.7%,Gly (G) 40 10.0%,His (H) 8 2.0%,Ile (I) 25 6.2%,Leu (L) 21 5.2%,lys (K) 21 5.2%,Met (M) 6 1.5%,Phe (F) 18 4.5%,Pro (P) 14 3.5%,Ser (S) 23 5.7%,Thr (T) 24 6.0%,Trp (W) 13 3.2%,Tyr (Y) 19 4.7%,Val (V) 22 5.5%,Pyl (O) 0 0.0%,Sec (U) 0 0.0%,(B) 0 0.0%,(Z) 0 0.0%,(X) 0 0.0%,带负电荷的残基总数(Asp + Glu):52,带正电荷的残基总数(Arg + lys):34;原子个数组成:C为1987;H为2969;N为527;O为609;S为11,分子式: $C_{1987}H_{2969}N_{527}O_{609}S_{11}$,总原子数为6103,消光系数为100060消光系数以 $M^{-1} cm^{-1}$ 为单位,在280nm水中测量;吸光值为:0.1% (=1 g/l) 2.257;该蛋白序列N端为蛋氨酸(Met);预估半衰期为:30 hours (mammalian reticulocytes, in vitro).>20 hours (yeast, in vivo).>10 hours

(*Escherichia coli*, in vivo); 不稳定指数: 不稳定指数(II) 计算为38.01, 这说明该蛋白分类是稳定的; 脂肪族指数(Aliphatic index)为: 70.62, 整体平均亲水性(GRAVY)为: -0.390。

[0050] 实施例6 裂解酶lys1644的体外抑菌活性测定和抑菌谱测定

将链球菌在BHI培养基中培养至对数期, 菌液离心后Tris-HCl (pH为7.5) 洗涤沉淀2次, 然后用Tris-HCl重悬菌体并调节OD₆₀₀为0.6左右, 后浓缩为原本体积的1/2。在96孔板中将100μL浓缩菌液与不同浓度(0、50、100、150、200 μg/mL)的100μL裂解酶lys1644混合, 使混合液的OD₆₀₀数值为0.6左右, 裂解酶终浓度分别为0、25、50、75、100 μg/mL。以100μL浓缩菌液和100μL的Tris-HCl混合液作为对照, 每组3个平行, 置于多功能酶标仪中37℃静置培养, 每10min测定OD₆₀₀数值, 绘制OD₆₀₀随时间变化的曲线。

[0051] 结果如图4所示, 不同浓度的裂解酶lys1644处理组的OD₆₀₀数值呈逐渐下降趋势, 菌液逐渐清亮, 不添加裂解酶的OD₆₀₀数值基本无变化。其中, 25μg/mL裂解酶组的下降趋势稍差; 当裂解酶浓度大于50μg/mL时, OD₆₀₀数值的下降趋于一致, 说明50μg/mL的应用浓度即可达到最好的抑菌效果。

[0052] 分别取市售的停乳链球菌、金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌用于裂解酶lys1644的裂解谱测定。将待测菌株在37℃培养至对数生长中期, 菌液离心后Tris-HCl (pH 7.5) 洗涤沉淀2次, 然后用Tris-HCl重悬菌体并调节OD₆₀₀为0.6左右, 后浓缩为原本体积的1/2。在96孔板中将100μL浓缩菌液与100 μg/mL的100μL裂解酶lys1644混合, 使混合液的OD₆₀₀数值为0.6左右, 裂解酶终浓度为50 μg/mL, 以100μL浓缩菌液和100μL的Tris-HCl混合液作为对照, 每组3个平行, 置于多功能酶标仪中37℃静置培养。在0h和1h时测定OD₆₀₀数值, 计算OD₆₀₀值下降比例, 以OD₆₀₀>20%表示能够裂解, 以测定裂解酶lys1644的裂解谱。

[0053] 裂解谱结果如表4所示, 该裂解酶lys1644对3株停乳链球菌具有特异性较强的裂解效果, 此外, 该裂解酶还对金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌具有一定的裂解效果, 该结果显示裂解酶lys1644具有在链球菌属内对停乳链球菌较为专性的抑菌能力。

[0054] 表4裂解酶lys1644裂解谱裂解结果

菌株名称	来源	裂解能力
停乳链球菌 SD 24	本实验室分离	+
停乳链球菌 SD 5-1	本实验室分离	+
停乳链球菌 4-4	本实验室分离	+
表皮葡萄球菌 SX 1-1	本实验室分离	+
金黄色葡萄球菌 H4	本实验室分离	+

[0055] 实施例7 裂解酶lys1644 pH和温度稳定性鉴定

裂解酶lys1644的pH稳定性分析: 将链球菌在BHI培养基中培养至对数期, 菌液均分为8组, 离心后分别用不同pH缓冲液(50mM NaCl、50mM Na₂HP0₄, pH分别调至4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11)洗涤沉淀2次, 然后用相应的pH缓冲液重悬菌体并调节OD₆₀₀为0.6左右, 后浓缩为原本体积的1/2。在96孔板中将不同pH条件下100 μL浓缩菌液分别于同pH的100 μg/mL的100 μL裂解酶lys1644(裂解酶使用不同pH的Tris-HCl稀释配制)混合, 使混合液的OD₆₀₀数值为

0.6左右,裂解酶终浓度为50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。混合后迅速置于酶标仪测定初始 A_{630} 数值,然后将不同pH条件下的细菌与裂解酶混合液放置于 37°C 进行孵育,1 h后测定最终的 A_{630} 数值,并计算 ΔA_{630} 数值。以100 μL 浓缩菌液和100 μL 的Tris-HCl混合液作为对照,每组3个平行。

[0056] 测定结果如图5所示,裂解酶lys1644在pH值为6的条件下 ΔA_{630} 值最高,具有最高的裂解活性,且随着pH值的升高或降低,裂解酶活性呈现不同程度的下降。

[0057] 裂解酶lys1644的温度稳定性分析:将链球菌在BHI培养基中培养至对数期,菌液离心后Tris-HCl(pH为7.5)洗涤沉淀2次,然后用Tris-HCl重悬菌体并调节 OD_{600} 为0.6左右,后浓缩为原体积的1/2,然后把浓缩菌液分别于 4°C , 25°C , 37°C , 42°C , 56°C 放置30 min,同时将需要加入的裂解酶lys1644在对应温度下进行相同处理。在96孔板中将100 μL 浓缩菌液与100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的100 μL 裂解酶lys1644混合,使混合液的 OD_{600} 数值为0.6左右,裂解酶终浓度为50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。混合后迅速置于酶标仪测定初始 A_{630} 数值,然后将细菌与裂解酶的混合液再放置到不同的温度条件下进行孵育,1 h后测定 A_{630} 终值,并计算 ΔA_{630} 数值。以100 μL 浓缩菌液和100 μL 的Tris-HCl混合液作为对照,每组3个平行。

[0058] 测定结果如图6所示,裂解酶lys1644在温度为 37°C 的条件下 ΔA_{630} 值最高,具有最高的裂解活性,且随着温度的升高或降低,裂解酶活性呈现不同程度的下降。在所测定的所有温度条件下,裂解酶lys1644都保持了较高的裂解活性,具有较好的温度稳定性。

[0059] 综上所述,裂解酶lys1644的最适酶活条件为pH=6, 37°C 。且裂解酶lys1644具有较好的温度稳定性。

[0060] 本说明书中各个实施例采用递进的方式描述,每个实施例重点说明的都是与其他实施例的不同之处,各个实施例之间相同相似部分互相参见即可。

[0061] 对所公开的实施例的上述说明,使本领域专业技术人员能够实现或使用本发明。对这些实施例的多种修改对本领域的专业技术人员来说将是显而易见的,本文中所定义的一般原理可以在不脱离本发明的精神或范围的情况下,在其它实施例中实现。因此,本发明将不会被限制于本文所示的这些实施例,而是要符合与本文所公开的原理和新颖特点相一致的最宽的范围。

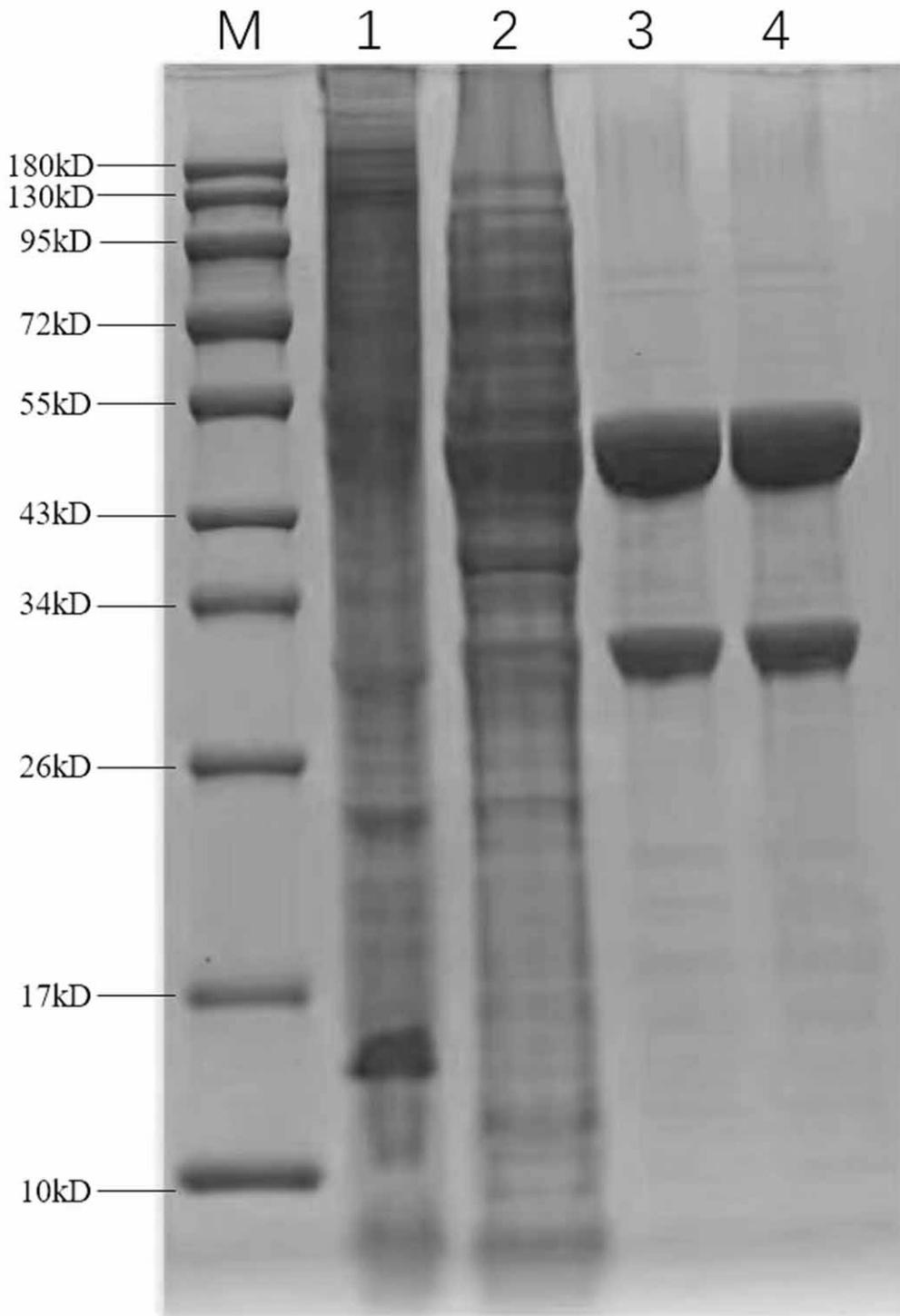


图 1



图 2



图 3

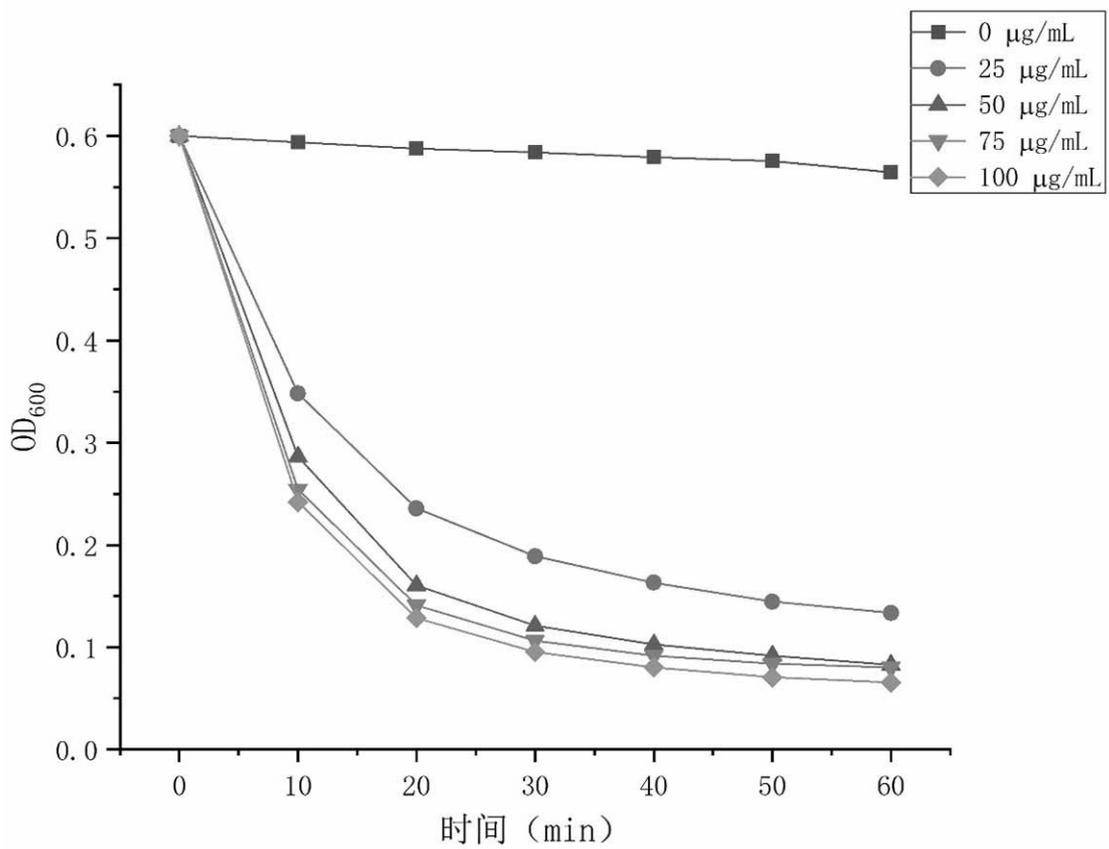


图 4

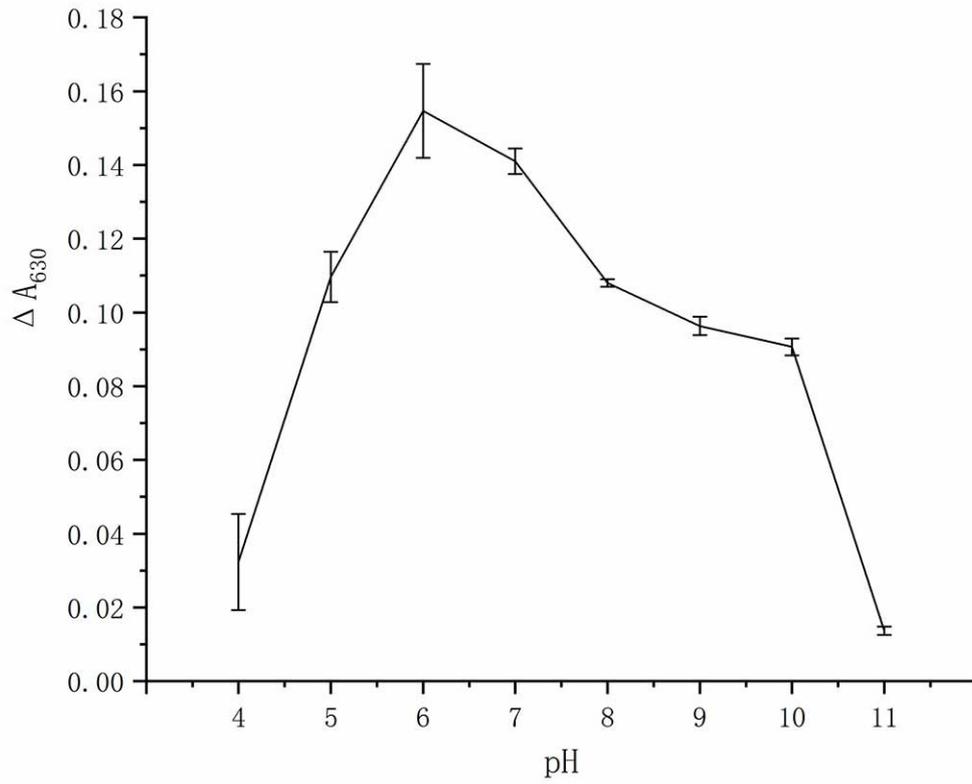


图 5

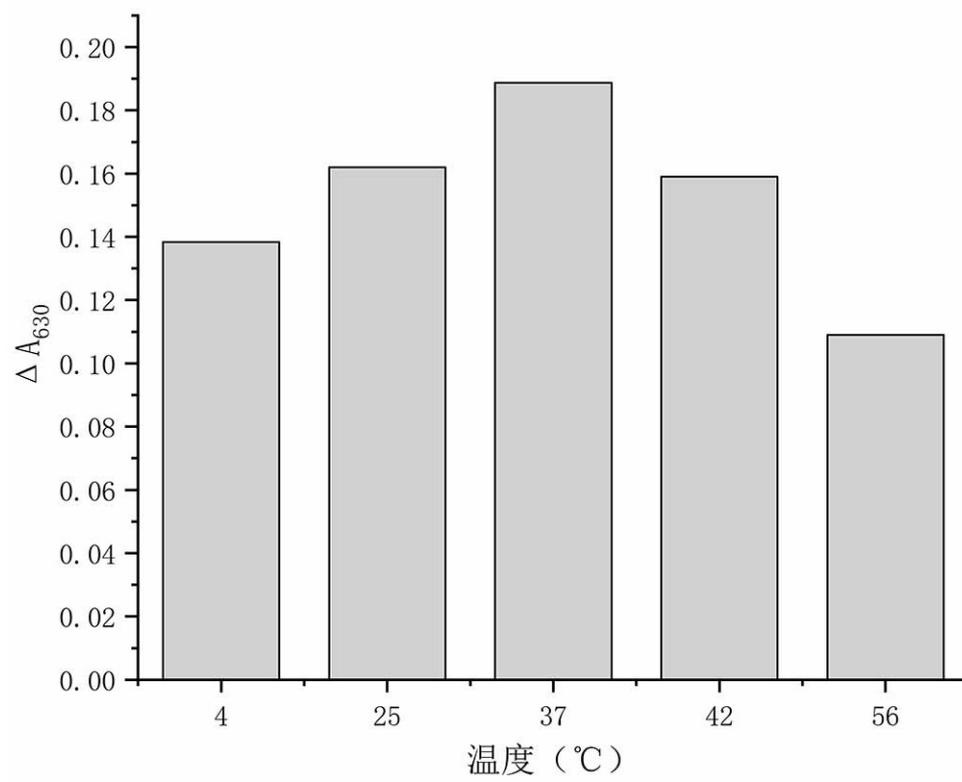


图 6