



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113201523 A

(43) 申请公布日 2021.08.03

(21) 申请号 202110531815.2

A61K 38/51 (2006.01)

(22) 申请日 2021.05.17

A61P 31/04 (2006.01)

(71) 申请人 吉林大学

地址 130011 吉林省长春市前进大街2699号

(72) 发明人 顾敬敏 王子晶 杜向党 韩文瑜
冀亚路 雷连成 冯新 孙长江

(74) 专利代理机构 吉林长春新纪元专利代理有
限责任公司 22100

代理人 陈宏伟

(51) Int. Cl.

C12N 9/88 (2006.01)

C12N 15/60 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

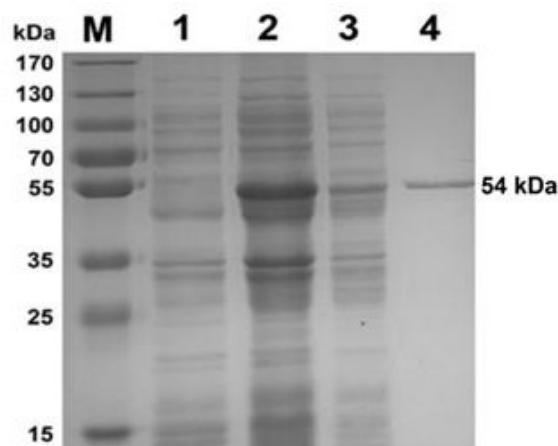
权利要求书1页 说明书4页
序列表3页 附图2页

(54) 发明名称

一种特异性杀灭猪链球菌的基因工程裂解酶及医用用途

(57) 摘要

本发明公开了一种特异性杀灭猪链球菌的基因工程裂解酶(Ply1228)及其制备方法,提供了一个新的猪链球菌噬菌体裂解酶,可以单独或与其他物质复配使用,具有强裂解活性和较宽的裂解谱,能够有效杀灭多种血清型的猪链球菌,为预防和治疗猪链球菌感染引起的疾病提供一种新的药物。



1. 一种特异性杀灭猪链球菌的基因工程裂解酶Ply1228,其氨基酸序列和核苷酸序列如:SEQ No 1所示。

2. 一种包含权利要求书1所述的基因工程裂解酶Ply1228基因的表达载体。

3. 一种包含权利要求书1所述裂解酶Ply1228表达载体重组菌株的构建。

4. 如权利要求1所述基因工程裂解酶Ply1228的表达与纯化方法,其特征在于扩增该裂解酶引物序列如下:

上游引物Ply1228-F :5'-CCGCTCGAGATGATAATCAATCTTGAA-3';

下游引物Ply1228-R :5'- CGCGGATCCTCAAATAGGTTCTTTTGT-3'。

5. 如权利要求1所述的基因工程裂解酶Ply1228的制备方法,步骤如下:

1) 对权利要求书2所述的裂解酶核苷酸序列进行引物设计;

2) 将权利要求书2所述的裂解酶核苷酸序列克隆到表达载体中,得到重组质粒;

3) 将步骤1得到的重组质粒转入菌株,得到重组菌株;

4) 利用重组菌株诱导表达该裂解酶;

5) 进一步纯化步骤3得到的裂解酶。

6. 如权利要求1所述的基因工程裂解酶Ply1228在用于制备预防和治疗由猪链球菌引起的动物和人感染性疾病药物中的用途。

7. 一种预防和治疗由猪链球菌引起的感染性疾病的组合物,其包含权利要求1所述的基因工程裂解酶Ply1228作为有效成分。

8. 如权利要求7所述的组合物包括液体制剂、冻干制剂或口服固体制剂等医药学上的任何剂型。

一种特异性杀灭猪链球菌的基因工程裂解酶及医用用途

技术领域

[0001] 本发明公开了一种特异性杀灭猪链球菌的基因工程裂解酶(Ply1228)及其制备方法,本发明还进一步提供了该基因工程裂解酶(Ply1228)的医用用途,对猪链球菌表现出广谱高效的抗菌活性,属于生物工程技术领域。

背景技术

[0002] 猪链球菌是一种重要的人畜共患病病原体。根据细菌表面荚膜多糖(CPS)的抗原性,可将猪链球菌划分为33个血清型。其中2型、9型、3型、1/2型和7型为猪链球菌最主要的血清型,并且2型猪链球菌在世界范围内分布最广泛和危害最严重。猪链球菌感染可能引起败血症、脑膜炎、心内膜炎、肺炎和关节炎等疾病,致死率非常高。由于抗生素的滥用使得猪链球菌的耐药形势愈发严峻,耐药及多重耐药菌株的不断涌现使抗生素的预防和控制变得更加困难。在当下“减抗”、“限抗”和“禁抗”的背景下,迫切需要寻找一种针对猪链球菌不易产生耐药性的新型抗菌制剂。

[0003] 噬菌体裂解酶是噬菌体基因组编码的作用于细菌细胞壁肽聚糖的一类水解酶。噬菌体裂解酶对革兰氏阳性菌作用广泛。与噬菌体和抗生素相比,噬菌体裂解酶具有如下优势:1、裂解酶直接作用于细菌细胞壁肽聚糖,而肽聚糖是细菌赖以生存的重要结构,肽聚糖的改变可能对细菌产生致命的影响,这也极大地降低了细菌对裂解酶产生抗性的可能;2、裂解酶是蛋白,可以通过体外载体构建、表达和纯化得到,可以大量制备且成本较低;3、裂解酶作为抗菌制剂进入生物体内不存在生物安全性问题。4、裂解酶易于人工设计和改造。革兰氏阳性菌裂解酶结构通常是模块化的,既具有水解催化域(Catalytic domain, CD),也具有细胞壁结合结构域(Catalytic domain, BCD)。我们可以通过将不同来源的CD和BCD组合,构建比亲代裂解酶性能更优良的嵌合裂解酶。这些优势使得裂解酶具有应用于临床耐药及多重耐药猪链球菌感染治疗的巨大潜力。

发明内容

[0004] 本发明公开一种特异性杀灭猪链球菌的基因工程裂解酶(Ply1228),该裂解酶对猪链球菌具有强杀菌活性和宽宿主谱,对猪链球菌8种血清型(2、3、7、9、10、12、14和27型)均显示出强裂解活性。此外,Ply1228在体外表现出较强的酸碱和高温耐受能力。该裂解酶为预防和治疗由猪链球菌感染引起的疾病感染提供一个很有潜力的新药物,具有很好的临床应用价值。

[0005] 本发明公开的一种特异性杀灭猪链球菌的基因工程裂解酶Ply1228,其氨基酸序列见核苷酸序列见序列表。QSE NO:1

本发明提供了来源于猪链球菌基因工程裂解酶Ply1228基因的表达载体及其重组菌株。

[0006] 本发明提供了基因工程裂解酶Ply1228的表达与纯化方法及一般生物学特性
本发明所述的一种来源于猪链球菌基因工程裂解酶Ply1228在特异性裂解猪链球

菌的用途。

[0007] 本发明所述的一种来源于猪链球菌基因工程裂解酶Ply1228用于制备预防和控制猪链球菌感染药物中的用途。

[0008] 本发明所述的一种来源于猪链球菌裂解酶Ply1228在杀灭空间环境、动物和人体中猪链球菌的应用。

[0009] 本发明公开了一种用于杀灭猪链球菌的药物组合物,其包含权利要求书中所述的裂解酶Ply1228作为主要活性成分。

[0010] 本发明所述的组合物包括液体制剂、冻干制剂或口服固体制剂等医药学上的任何剂型。

[0011] 本发明的积极效果在于:

提供了一个新的猪链球菌噬菌体裂解酶,可以单独与其他物质复配使用,具有强裂解活性和较宽的裂解谱,能够有效杀灭多种血清型的猪链球菌,为预防和治疗猪链球菌感染引起的疾病提供一种新的药物。

附图说明

[0012] 图1为本发明裂解酶Ply1228的表达与纯化图;

图2为本发明裂解酶Ply1228形成的抑菌斑图;

图3为本发明裂解酶Ply1228的pH和温度稳定性测定图;

图4为本发明裂解酶Ply1228体外杀菌活性测定图。

具体实施方式

[0013] 以下详细说明都是示例性的,旨在对本发明提供进一步的说明。除非另有指明,本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属技术领域的普通技术人员通常理解相同含义。

[0014] 实施例1

裂解酶的表达与纯化

根据裂解酶Ply1228核苷酸序列(登录号:MW582537)设计上游引物Ply1228-F(5'-CCGCTCGAGATGATAATCAATCTTGAA-3')和下游引物Ply1228-R(5'-CGCGATCCTCAAATAGGTTCTTTGT-3'),利用引物Ply1228-F和Ply1228-R扩增目的基因。利用限制性核酸内切酶*Xho*I和*Bam*HI酶切目的基因和载体pET-15b。将酶切过的目的基因和载体在T4 DNA Ligase的作用下16℃连接过夜。利用热激法将连接产物转化至DH5α感受态细胞,将鉴定正确的重组质粒转化至BL21感受态细胞。

[0015] 将500.0 mL pET-15b-Ply1228-BL21甘油菌培养至对数生长期(OD₆₀₀ = 0.6-0.8),加入1mM IPTG,16℃低温摇床诱导18 h。将诱导后的菌液进行集菌(4℃,8,000 × g, 5 min),并用适量Tris-Cl缓冲液(pH=7.5)进行重悬。随后超声波破碎菌体,离心(4℃,10,000 × g,20 min)收集上清。接下来利用Ni-NTA对蛋白进行亲和层析纯化。将收集的上清加入到镍柱中,反复上样三次。而后分别加入20 mmol和50 mmol的咪唑洗脱杂蛋白,最后加入500 mmol咪唑洗脱目的蛋白。最后浓缩蛋白,在超滤管中加入用的500 mmol目的蛋白洗脱液,离心(4℃,3,500 × g,40 min),取出超滤管中的液体经液氮速冻后保存至-80℃超

低温冰箱。使用BCA蛋白定量试剂盒对纯化后的裂解酶Ply1228进行浓度测定。将诱导前样品,全菌,上清及纯化后蛋白样品进行SDS-PAGE电泳分析。

[0016] 结果如图1所示,1、2、3、4孔分别代表裂解酶Ply1228诱导前菌液、全菌、上清以及纯化后样品,纯化后的裂解酶Ply1228纯度很高。

[0017] 分离胶(12%)配方如下:ddH₂O:3.3、30%丙烯酰胺:4.0、1.5 mol/L Tris·HCl (pH8.8):2.5、10%SDS:0.1、10%过硫酸胺(AP):0.1、TEMED:0.004。

[0018] 浓缩胶配方如下:ddH₂O:6.8、30%丙烯酰胺:1.7、1.0 mol/L Tris·HCl (pH6.8):1.25、10%SDS:0.1、10%过硫酸胺(AP):0.1、TEMED:0.01。

[0019] 实施例2

裂解酶Ply1228平板裂解活性测定

将菌株SC183培养至平台期,用涂布棒将菌液均匀地涂在固体BHI培养基平板上,取纯化的Ply1228(100 μg/mL)10.0 μL悬空滴加在平板上,旁边滴加Tris-NaCl缓冲液10.0 μL作为对照。待平板晾干倒放于37℃恒温培养箱中培养20 h,观察平板裂解情况。结果如图2所示,在箭头处出现透亮空斑,表明裂解酶Ply1228对猪链球菌SC183具有较强的裂解活性。

[0020] 实施例3

不同温度和pH值对裂解酶Ply1228活性的影响

将菌株SC183培养至对数生长期(OD₆₀₀ = 0.6-0.8)。

[0021] 温度稳定性:将用PBS缓冲液重悬的菌液与蛋白(终浓度为100 μg/mL)1:1充分混匀,分别置于4℃、12℃、25℃、37℃、45℃水浴锅中孵育1 h,利用倍比稀释法进行活菌数计数。活性用孵育后活菌数与初始活菌数的差值表示,差值越高说明裂解活性越强。比较不同温度蛋白杀菌活性的差异。

[0022] pH稳定性:用盐酸和氢氧化钠将Tris-NaCl缓冲液pH值分别调为3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0,用不同pH值的Tris-NaCl缓冲液将蛋白Ply1228浓度稀释至100 μg/mL。将用PBS缓冲液重悬的菌液与不同pH值的蛋白1:1充分混匀,置于37℃水浴锅中孵育1 h,利用倍比稀释法进行活菌数测定。计算孵育后活菌数与初始活菌数的差值。比较不同pH值蛋白活性的差异。

[0023] 结果如图3所示,表明Ply1228在体外表现出较强的耐酸碱能力(pH = 3-9)和耐高温能力(4℃-50℃)。

[0024] 实施例4

裂解酶Ply1228体外杀菌活性测定

将菌株SC183培养至对数生长期(OD₆₀₀ = 0.6 - 0.8),用无菌Tris-NaCl缓冲液洗3次。向菌液中加入终浓度分别为50 μg/mL、100 μg/mL和200 μg/mL的纯化Ply1228蛋白,阴性对照组加入等体积的无菌Tris-NaCl缓冲液,同时放入37℃水浴锅中孵育1 h。每10 min取样一次,通过倍比稀释法测定菌落数。本实验重复三次。

[0025] 实施例5

裂解酶Ply1228裂解谱测定

将49株猪链球菌、10株金黄色葡萄球菌、10株大肠杆菌、10株沙门氏菌,10株枯草芽孢杆菌,10株粘质沙雷菌以及10株肺炎克雷伯菌分别培养至对数生长期(OD₆₀₀ = 0.6 -

0.8),然后用无菌Tris-Cl缓冲液洗涤三次,通过倍比稀释法测定初始菌落数。将裂解酶Ply1228(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)添加至菌液,并将混合物在37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育60 min,再次通过倍比稀释法测定菌落数。计算孵育后和初始细菌的减少量。作为阴性对照,将等体积PBS缓冲液添加到细菌悬浮液中共同孵育。此实验重复三次

结果如表1所示,裂解酶Ply1228对猪链球菌表现出特异性裂解活性,且裂解谱较宽,对测试的38株猪链球菌均具有裂解活性。这38株猪链球菌包含8种血清型,分别是2型、3型、7型、9型、10型、12型、14型和27型。裂解酶Ply1228对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌沙门氏菌、枯草芽孢杆菌、粘质沙雷菌和肺炎克雷伯菌均不具有裂解活性。

[0026] 表1 裂解酶Ply1228裂解谱分析

菌株	菌株	Ply1228	
类型	数量	可裂解	不可裂解
2型猪链球菌	9	90	
3型猪链球菌	11	110	
7型猪链球菌	7	70	
9型猪链球菌	10	100	
10型猪链球菌	3	30	
12型猪链球菌	3	30	
14型猪链球菌	3	30	
27型猪链球菌	3	30	
大肠杆菌	10	0	10
肺炎克雷伯菌	10	0	10
沙门氏菌	10	0	10
枯草芽孢杆菌	10	0	10
粘质沙雷菌	10	0	10

结论:

本发明经基因工程制备的裂解酶Ply1228对猪链球菌具有强杀菌活性和宽杀菌谱。因此,该裂解酶可用于有效预防和治疗由猪链球菌感染引起的疾病。该裂解酶大小为54 kD;裂解酶在涂布有猪链球菌SC183的BHI固体平板上可以形成透亮的抑菌斑;Ply1228在体外表现出较强的耐酸碱能力($\text{pH} = 3-9$)和耐高温能力($4^{\circ}\text{C}-50^{\circ}\text{C}$);裂解酶Ply1228能够裂解8种血清型的猪链球菌,包括 2型、3型、7型、9型、10型、12型、14型和27型。

序列表

<110> 吉林大学

<120> 一种特异性杀灭猪链球菌的基因工程裂解酶及医用用途

<160> 2

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 1407

<212> DNA

<213> 猪 (Pig)

<400> 1

```

atgataatca atcttgaaac atccattcgt tggatgagcg accgtgtcgg caaagtctct 60
tactcaatgg actatcgtaa cggtcggaat agctatgact gctctagtgc tgtatattat 120
gcgctaattg caggcgggtc ttttcggca ggttggcgg ttaacacgga gtatatgcat 180
gactggttga ttcgtaacgg atatgttttg gttgctgaaa ataaaccatt taacgcccc 240
agacatgatg tttttatttg gggtaaactg gtttattcca gcggtgaagg tggacacact 300
gggatatttg tagataatgt taacattatc cattgtaact ttaagcgsaa tggattact 360
attgatgatt acaataaagt atcccgtggt atgtattact atctataccg tccggcaaat 420
cagcccagca tcagcaacaa atcattggat cagcttgta aggagacttt ggctggggta 480
catgggaacg gagatgcccg caaagcaagt ttgggcaatc aatatgaacc tgtcatggca 540
gttattaatg gcaaagctac ggcacctaaa aagactgttg accaactggc tcaagaggta 600
atagctggta agcatggcaa cggtgaggct cgcaagcagt cgtaggtac tgactatcca 660
gcagtccaaa agcgtgtgac tgaattgctc aaaaaacagc cctcagagcc gtcaaaaggt 720
gttgaggtaa aacagcccac ggatactaaa ataagccaaa ctgaaccacc tggacaagcc 780
acagaaagca aagaggaagg agacctatct ttcaatgggg caattctcaa aaaatcggtc 840
ttagatgtca tccttgccaa gtgcaaagag cacaatatcc tacctagcta cgctattacc 900
gttctacact ttgaggggct ttgggggtacc tcagctgtag gtaaggcaga taacaactgg 960
ggaggcatga ctatgacaag caatgacttg caatcactc gccctcagg agttattgtc 1020
actagaggtc ttgctcgtcc gtcaaacgaa ggcggatact atatgcacta tgctagtgtg 1080
gatgatttct tgacagactg gttctacttg ctaagggtg gtggttctta caaggtttca 1140
ggagctaaaa ctttagcga ggcagtcaag ggcatttca aagttggtgg tgcagtctat 1200
gattatgctg ctacaggcta tgagaattac ctggtaggga tgtcaagccg tctaacagct 1260
attgagtcgg aaaacgggtc gcttgctaag tacgaccaac agactgttac agatgtcgtc 1320
aagattgata aaatagaagt agcgatagaa ggtattgaag tcacaatcaa cggcacacgc 1380
tatagactta caaaagaacc tatttga 1407

```

<210> 2

<211> 468

<212> PRT

<213> 猪 (Pig)

<400> 2

Met Ile Ile Asn Leu Glu Thr Ser Ile Arg Trp Met Ser Asp Arg Val
 1 5 10 15
 Gly Lys Val Ser Tyr Ser Met Asp Tyr Arg Asn Gly Pro Asn Ser Tyr
 20 25 30
 Asp Cys Ser Ser Ala Val Tyr Tyr Ala Leu Met Ala Gly Gly Ala Ile
 35 40 45
 Ser Ala Gly Trp Ala Val Asn Thr Glu Tyr Met His Asp Trp Leu Ile
 50 55 60
 Arg Asn Gly Tyr Val Leu Val Ala Glu Asn Lys Pro Phe Asn Ala Gln
 65 70 75 80
 Arg His Asp Val Phe Ile Trp Gly Lys Arg Gly Tyr Ser Ser Gly Glu
 85 90 95
 Gly Gly His Thr Gly Ile Phe Val Asp Asn Val Asn Ile Ile His Cys
 100 105 110
 Asn Phe Lys Arg Asn Gly Ile Thr Ile Asp Asp Tyr Asn Lys Val Ser
 115 120 125
 Arg Gly Met Tyr Tyr Tyr Leu Tyr Arg Pro Ala Asn Gln Pro Ser Ile
 130 135 140
 Ser Asn Lys Ser Leu Asp Gln Leu Val Lys Glu Thr Leu Ala Gly Val
 145 150 155 160
 His Gly Asn Gly Asp Ala Arg Lys Ala Ser Leu Gly Asn Gln Tyr Glu
 165 170 175
 Pro Val Met Ala Val Ile Asn Gly Lys Ala Thr Ala Pro Lys Lys Thr
 180 185 190
 Val Asp Gln Leu Ala Gln Glu Val Ile Ala Gly Lys His Gly Asn Gly
 195 200 205
 Glu Ala Arg Lys Gln Ser Leu Gly Thr Asp Tyr Pro Ala Val Gln Lys
 210 215 220
 Arg Val Thr Glu Leu Leu Lys Lys Gln Pro Ser Glu Pro Ser Lys Gly
 225 230 235 240
 Val Glu Val Lys Gln Pro Thr Asp Thr Lys Ile Ser Gln Thr Glu Pro
 245 250 255
 Pro Gly Gln Ala Thr Glu Ser Lys Glu Glu Gly Asp Leu Ser Phe Asn
 260 265 270
 Gly Ala Ile Leu Lys Lys Ser Val Leu Asp Val Ile Leu Ala Lys Cys
 275 280 285
 Lys Glu His Asn Ile Leu Pro Ser Tyr Ala Ile Thr Val Leu His Phe
 290 295 300

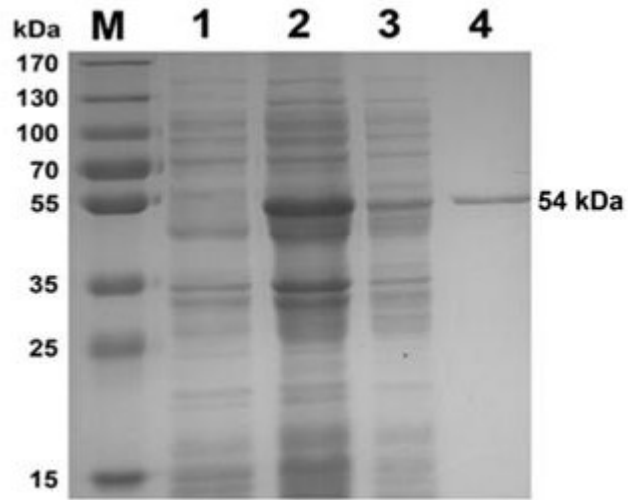


图1

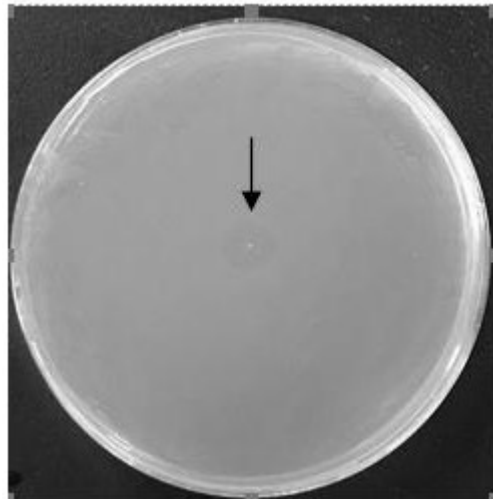


图2

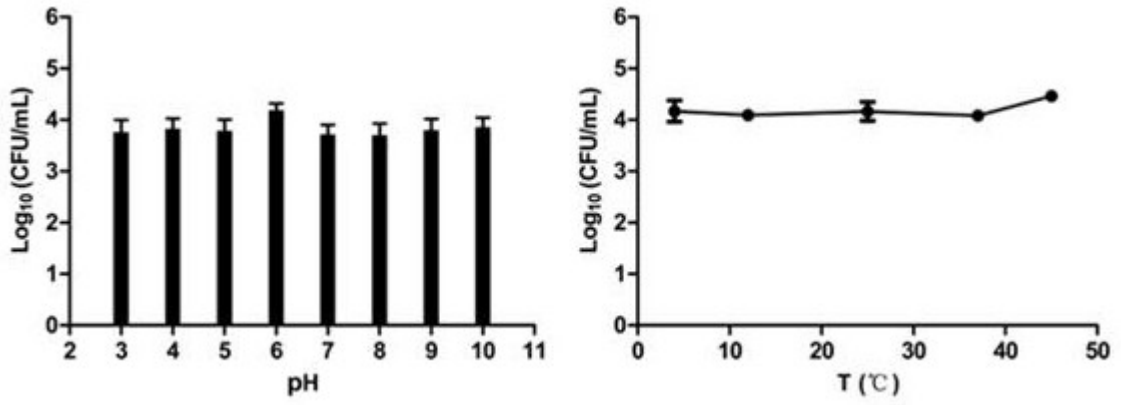


图3

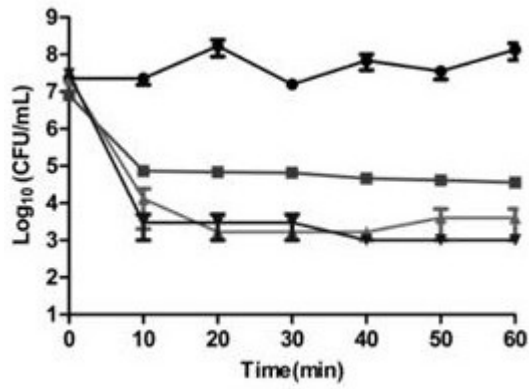


图4