

文章编号: 1000-0615(2019)04-1192-09

DOI: 10.11964/jfc.20171211090

## 菲律宾蛤仔二种I型溶菌酶的重组表达和抑菌活性

魏倩玉<sup>1,2</sup>, 母昌考<sup>1,2\*</sup>, 王春琳<sup>1,2</sup>

(1. 宁波大学应用海洋生物学教育部重点实验室, 浙江 宁波 315211;

2. 宁波大学, 浙江海洋高效健康养殖协同创新中心, 浙江 宁波 315211)

**摘要:** 为研究病原微生物刺激后, 菲律宾蛤仔I型溶菌酶的免疫应答反应, 实验采用重组表达技术, 从菲律宾蛤仔中得到2种I型溶菌酶的重组蛋白rVpILYZ-1和rVpILYZ-2, 发现其均具有较为广谱的抑菌活性; 其中, rVpILYZ-1对副溶血弧菌、灿烂弧菌和藤黄微球菌等具较强的抑菌活性, 而rVpILYZ-2对副溶血弧菌抑菌活性较强, 且二者均通过非酶抑菌活性和胞壁酸酶活性来发挥抑菌作用。结果显示, rVpILYZ-1最适pH和温度分别为6.5和20 °C, 而rVpILYZ-2最适pH和温度则分别为4.5和10 °C。此外, rVpILYZ-1和rVpILYZ-2均具免疫调理活性, 能够促进血细胞对病原菌的吞噬作用。研究表明, VpILYZ-1和VpILYZ-2在菲律宾蛤仔清除病原微生物的免疫应答反应中发挥重要作用。

**关键词:** 菲律宾蛤仔; I型溶菌酶; 重组表达; 抑菌活性

**中图分类号:** S 944.4<sup>7</sup>

**文献标志码:** A

溶菌酶(E.C. 3.2.1.17)是体液免疫的关键组分之一, 在宿主免疫防御中发挥着重要的保护作用<sup>[1]</sup>。研究发现, 溶菌酶具有胞壁酸酶活性, 能够剪切细菌细胞壁中N-乙酰胞壁酸和N-乙酰氨基葡萄糖之间的 $\beta$ -1, 4-糖苷键, 导致细菌裂解<sup>[2]</sup>。目前, 动物界中主要发现了3种类型的溶菌酶, 分别为C型(鸡型或传统型)、G型(鹅型)和I型(无脊椎动物型)溶菌酶<sup>[3]</sup>。

I型溶菌酶是无脊椎动物所特有的一类免疫效应因子, 参与机体对入侵病原微生物的清除反应。早在1975年, Jollès等<sup>[4]</sup>首次在红海盘车(*Asterias rubens*)中发现了I型溶菌酶的存在, 由此揭开了I型溶菌酶研究的序幕。迄今为止, 已在环节动物<sup>[5]</sup>、软体动物<sup>[6]</sup>、节肢动物<sup>[7]</sup>等多种无脊椎动物中发现了I型溶菌酶的存在。研究发现, 无脊椎动物I型溶菌酶具有较为广谱的抑菌活性, 对多种革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌表现出显著的抑菌活性, 且这种抑菌活性被认为与其胞壁酸酶活性密切相关<sup>[8]</sup>。

目前, 虽然已在软体动物中发现了多种I型

溶菌酶的存在, 但关于软体动物I型溶菌酶的生理生化特征及其抑菌活性研究仍相对匮乏。菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)是我国海水养殖的重要经济贝类之一。然而, 近年来病害的频繁暴发已严重影响了其产业的健康可持续发展, 阐明菲律宾蛤仔的先天性防御机制可为其病害防控和良种选育提供借鉴。在已获得的2种菲律宾蛤仔I型溶菌酶基因(VpILYZ-1, GenBank注册号: GQ384413; VpILYZ-2, GenBank注册号: KU221017)的基础上, 本研究比较了此2种I型溶菌酶的抑菌活性和最适酶活性条件等, 研究结果对深入了解菲律宾蛤仔的先天性免疫防御机制具有重要意义, 也可为水产免疫制剂的研发提供参考。

### 1 材料与amp;方法

#### 1.1 菲律宾蛤仔cDNA模板制备

菲律宾蛤仔购自烟台当地水产市场, 个体平均大小为30~40 mm, 置于20~22 °C海水中暂养

收稿日期: 2017-12-13 修回日期: 2018-03-28

资助项目: 国家自然科学基金(41476126); 中国科学院青年创新促进会项目(2016196)

通信作者: 母昌考, E-mail: muchangkao@nbu.edu.cn

1周后开始实验。采集菲律宾蛤仔的鳃组织,利用Trizol(Invitrogen公司)提取样品总RNA,采用M-MLV反转录酶(Promega公司)反转录获得相应的cDNA模板。

## 1.2 蛋白重组表达与复性

根据菲律宾蛤仔I型溶菌酶(VpILYZ-1和VpILYZ-2)的cDNA序列,设计用于原核表达的特异性引物,分别在正、反向引物5'端加入Nde I和Sac I酶切位点。以制备的鳃组织cDNA为模板,通过重组引物(rVpILYZ-1F: 5'-CATATGAGGGAAACACTACGGGATGA-3', rVpILYZ-1R: 5'-GAGCTCTCATTACGAGTATTTACCCCTTTA-3'; rVpILYZ-2F: 5'-CATATGGGTGTGATAGAAAATCCTGTATCATTG-3', rVpILYZ-2R: 5'-GAGCTCCTATGAATTCCAGACGCA-CCCG-3')分别扩增VpILYZ-1和VpILYZ-2成熟肽的编码序列。PCR反应条件:94℃预变性5 min;94℃变性30 s,55℃退火45 s,72℃延伸60 s,35个循环;72℃终延伸10 min。使用琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物,经琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒(天根生化科技有限公司)纯化扩增产物,与pMD18T-simple载体[宝生物工程(大连)有限公司]连接过夜,将重组质粒转化至大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 $\alpha$ 感受态细胞。经菌落PCR筛选阳性菌株后,送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序,验证序列正确性。

按照Plasmid Mini Kit说明书(Omega Bio-tek公司),分别提取重组质粒和pET-21a(+)空白质粒,使用Nde I和Sac I进行双酶切反应,回收酶切目的片段VpILYZ-1和VpILYZ-2;随后,采用T<sub>4</sub>DNA连接酶[宝生物工程(大连)有限公司]连接目的片段与pET-21a(+)载体,构建pET-21a(+)-VpILYZ-1和pET-21a(+)-VpILYZ-2重组质粒,并分别转化至*E. coli* DH5 $\alpha$ 。经菌落PCR反应检测,筛选阳性克隆并进行测序验证,提取构建的质粒转化至*E. coli* BL21(DE3)感受态细胞,涂布于含Amp(氨苄青霉素,50  $\mu$ g/mL)的LB平板,37℃倒置培养过夜。从平板中挑取单菌落,分别接种于含Amp(50  $\mu$ g/mL)的LB液体培养基中,37℃振荡培养3 h;加入异丙基硫代- $\beta$ -D-半乳糖苷(IPTG)至终浓度为0.5 mmol/L,继续培养诱导4 h,对照组为不添加IPTG的菌液样品。诱导结束后,离心培养基收集菌体,重悬于适量Buffer I中(NaCl 29.3 g,咪唑34 g,19 mL 0.5 mol/L

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>和18 mL 0.5 mol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,加蒸馏水至1 L);低温超声波破碎细胞,将破碎后的菌液10 000 r/min离心10 min,收集上清液。采用金属螯合层析方法,利用组氨酸侧链上的咪唑基与金属离子(Ni<sup>2+</sup>)的螯合特性,纯化获得带有His-Tag的融合重组蛋白。经15% SDS-PAGE分离胶电泳分析,考马斯亮蓝-R250染色观察蛋白纯化效果。参照实验室已建立的蛋白复性方法<sup>[9]</sup>,将含有目的蛋白的样品进行尿素梯度溶液复性。复性后蛋白分装,并保存于-80℃超低温冰箱中备用。

## 1.3 重组蛋白的最适活性条件测定

以溶壁微球菌冻干粉(Sigma公司)为底物,分别测定rVpILYZ-1和rVpILYZ-2的最适pH和最适温度<sup>[10]</sup>。选用的pH范围为3.5~10.0(pH间隔为0.5),温度范围为10~60℃(温度间隔10℃),每个处理设置3个重复,将测定的最高活性设置为100%进行数据处理<sup>[11]</sup>。

## 1.4 重组蛋白的抑菌活性分析

以革兰氏阳性菌[藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)]和革兰氏阴性菌[鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)、阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)、哈氏弧菌(*V. harveyi*)、灿烂弧菌(*V. splendidus*)、产气肠杆菌(*E. aerogenes*)、副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)]为供试菌株,测定rVpILYZ-1和rVpILYZ-2的最小抑菌浓度。将梯度稀释的rVpILYZ-1和rVpILYZ-2加入到96孔板中,分别向每孔中加入适量菌悬液(细菌终浓度为5 $\times$ 10<sup>5</sup> CFU/mL);室温孵育24 h后,OD<sub>600</sub>读数,每个处理设置3个平行。实验过程中,以加入空白载体pET-21a(+)表达纯化产物的实验组为阴性对照组。

使用平板计数法,测定rVpILYZ-1和rVpILYZ-2蛋白的抑菌活性。分别培养产气肠杆菌和鳃弧菌至对数生长期,离心后采用PBS缓冲液洗涤菌体;采用PBS缓冲液重悬菌体(细菌浓度为1 $\times$ 10<sup>7</sup> CFU/mL),分别加入rVpILYZ-1或rVpILYZ-2至终浓度为4  $\mu$ mol/L;取混合菌悬液(1次/min,共21次),进行10倍系列稀释,取10  $\mu$ L稀释液涂布于固体培养基上,室温孵育24 h后计数,每个处理设置3个平行。以加入空白载体pET-21a(+)表达纯化产物的实验组为阴性对照组。

## 1.5 重组蛋白的非酶抑菌活性测定

以产气肠杆菌和鳃弧菌为供试菌株,采用

比浊法测定热处理后rVpILYZ-1和rVpILYZ-2的抑菌效果。取培养至对数生长期的细菌, 2 000 r/min离心5 min收集菌体, 采用PBS缓冲液洗涤并稀释菌体至OD<sub>600</sub>为0.5。将rVpILYZ-1和rVpILYZ-2煮沸15 min, 加入菌悬液至蛋白终浓度为4 μmol/L, 每隔2 min采用酶标仪测定OD<sub>600</sub>吸光值, 每个处理设置3个平行。以加入空白载体pET-21a(+)表达纯化产物组作为阴性对照。

### 1.6 重组蛋白的胞壁酸酶活性测定

用PBS缓冲液溶解肽聚糖(PGN, Sigma), 分别加入rVpILYZ-1或rVpILYZ-2, 37 °C孵育0.5 h后测定样品吸光值OD<sub>450</sub>, 通过测定加入溶菌酶后吸光值的变化测定胞壁酸酶活性<sup>[11]</sup>。加入空白载体pET-21a(+)表达纯化产物的组作为阴性对照, 加入鸡卵清溶菌酶(HEWL)的组作为阳性对照。实验过程中, 每个处理设置3个平行。

### 1.7 重组蛋白的促吞噬活性测定

选取藤黄微球菌和灿烂弧菌为供试菌株, 测定rVpILYZ-1和rVpILYZ-2对血细胞吞噬活性的影响。具体方法: 培养菌株至对数生长期, 收集、重悬供试菌株至OD<sub>600</sub>为0.4。采集新鲜的菲律宾蛤仔血淋巴, 3 000 r/min离心10 min(4 °C)收集血细胞, 经PBS缓冲液洗涤、重悬后, 加入重组蛋白至终浓度为4 μmol/L; 随后, 加入5 μL藤黄微球菌或灿烂弧菌悬液, 18 °C孵育30 min。吸取适量混合液涂布于载玻片上, 室温沉降45 min, 甲醇固定10 min后进行吉姆萨染色。利用显微镜观察重组蛋白对血细胞吞噬活性的影响, 每张载玻片随机计数100个血细胞计算吞噬率。吞噬率(%)=(吞噬细菌血细胞数/100个被计数的血细胞)×100%。每个实验组设置3个平行, 以添加空白载体pET-21a(+)表达纯化产物的组作对照组。

### 1.8 数据分析与处理

所有实验数据均以3个平行数据的平均值表示, 实验数据采用单因素方差分析(One-Way ANOVA), 显著性水平设置为 $P < 0.05$ , 极显著性为 $P < 0.01$ 。

## 2 结果

### 2.1 VpILYZ-1和VpILYZ-2的重组表达

采用基因特异性引物, 分别扩增编码VpILYZ-1

和VpILYZ-2成熟肽的基因片段, 构建重组表达载体, 并转化至表达菌*E. coli* BL21(DE3)。经IPTG诱导后, 采用SDS-PAGE检测, 发现重组VpILYZ-1和VpILYZ-2蛋白均被成功诱导表达。其中, 重组蛋白rVpILYZ-1和rVpILYZ-2的分子量分别为22.5和16.5 ku(图1), 均与预测蛋白的分子量相一致。重组蛋白经亲和层析纯化和尿素梯度溶液复性后, 采用BCA法测定rVpILYZ-1和rVpILYZ-2蛋白浓度分别为323.6和372.2 μg/mL。

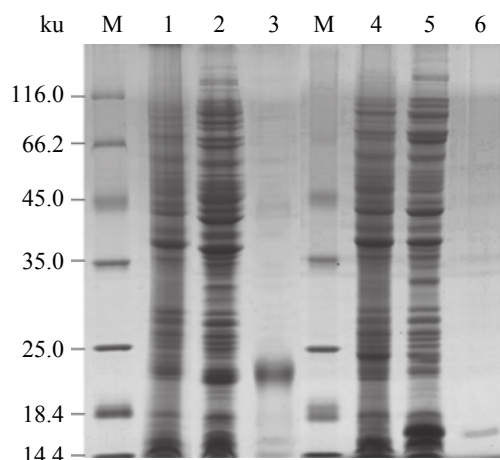


图1 重组蛋白rVpILYZ-1和rVpILYZ-2的SDS-PAGE分析

M. 蛋白Marker; 1. 未诱导的rVpILYZ-1菌株; 2. IPTG诱导后的rVpILYZ-1菌株; 3. 纯化后的rVpILYZ-1; 4. 未诱导的rVpILYZ-2菌株; 5. IPTG诱导后的rVpILYZ-2菌株; 6. 纯化后的rVpILYZ-2

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of the recombinant VpILYZ-1 and VpILYZ-2

M. protein Marker; 1. negative control for rVpILYZ-1, without IPTG induction; 2. induced rVpILYZ-1; 3. purified rVpILYZ-1; 4. negative control for rVpILYZ-2, without IPTG induction; 5. induced rVpILYZ-2; 6. purified rVpILYZ-2

### 2.2 pH、温度对重组蛋白溶菌活性的影响

分别设置14个pH梯度(pH 3.5~10.0)和6个温度梯度(10~60 °C), 测定了pH和温度对-rVpILYZ-1和rVpILYZ-2溶菌活性的影响。结果发现, rVpILYZ-1在pH 6.5时溶菌活性最高, 而在pH 3.5时活性最低, 为最高活性的72.9%(图2-a); rVpILYZ-1的最适溶菌温度为20 °C(图2-b), 在其他温度下溶菌活性均显著降低。对rVpILYZ-2而言, pH 4.5时溶菌活性最高, 而在pH 10.0时活性最低, 仅为最高活性的70.0%(图2-a); rVpILYZ-2的最适溶菌温度为10 °C, 且在20~40 °C范围内溶菌活性均

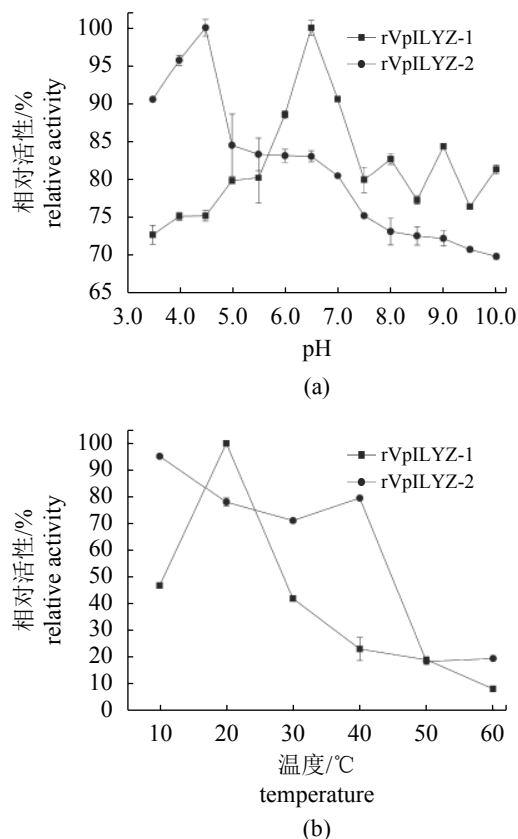


图2 pH和温度对rVpILYZ-1和rVpILYZ-2活性的影响

Fig. 2 Effects of pH and temperature on the activities of rVpILYZ-1 and rVpILYZ-2

保持在最高活性的60%以上(图2-b)。

### 2.3 rVpILYZ-1和rVpILYZ-2的抑菌活性

利用供试菌株, 测定重组蛋白rVpILYZ-1和rVpILYZ-2的抑菌谱。rVpILYZ-1和rVpILYZ-2均具有较为广谱的抑菌能力, 其中rVpILYZ-1对供试的副溶血弧菌、灿烂弧菌、藤黄微球菌、产气肠杆菌和阴沟肠杆菌均表现出较强的抑制作用(最小抑菌浓度介于1.1~2.2  $\mu\text{mol/L}$ ), 但对哈氏弧菌和鳗弧菌的抑菌活性稍弱(表1)。与rVpILYZ-1相比, rVpILYZ-2抑菌活性相对较弱, 仅对副溶血弧菌抑菌效果较强(表1)。

以产气肠杆菌和鳗弧菌为供试菌株, 采用平板计数法测定重组蛋白rVpILYZ-1和rVpILYZ-2的抑菌活性(图3)。结果发现, rVpILYZ-1和rVpILYZ-2对产气肠杆菌和鳗弧菌均具有快速的抑制作用。经rVpILYZ-1和rVpILYZ-2处理后, 产气肠杆菌和鳗弧菌的数量均呈降低趋势, 且rVpILYZ-1的抑菌活性强于rVpILYZ-2。

表1 rVpILYZ-1和rVpILYZ-2最小抑菌浓度

Tab. 1 MIC analysis of rVpILYZ-1 and rVpILYZ-2

测试菌 bacterias	MIC/( $\mu\text{mol/L}$ )	
	rVpILYZ-1	rVpILYZ-2
<b>革兰氏阳性菌 Gram-positive bacteria</b>		
藤黄微球菌 <i>M. luteus</i>	1.1~2.2	2.2~4.4
<b>革兰氏阴性菌 Gram-negative bacteria</b>		
鳗弧菌 <i>V. anguillarum</i>	2.2~4.4	4.4~8.8
阴沟肠杆菌 <i>E. cloacae</i>	1.1~2.2	2.2~4.4
哈氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	3.3~6.6	3.3~6.6
灿烂弧菌 <i>V. splendidus</i>	1.1~2.2	2.2~4.4
产气肠杆菌 <i>E. aerogenes</i>	1.1~2.2	2.2~4.4
副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	1.1~2.2	1.1~2.2

注: MIC为抑制微生物生长的最小浓度

Notes: MIC is the minimum concentration that inhibits the growth of microorganisms

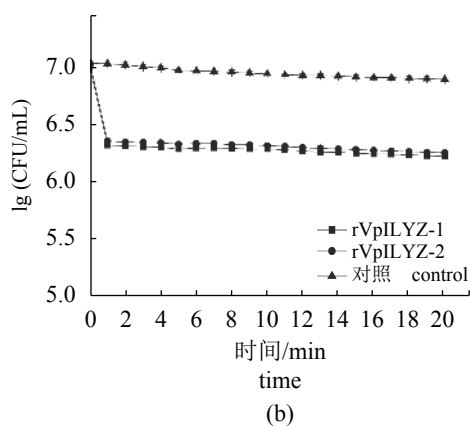
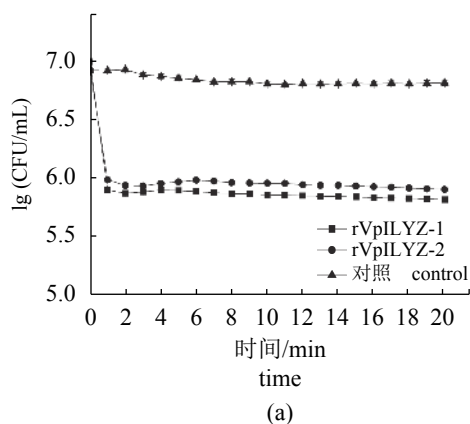


图3 rVpILYZ-1和rVpILYZ-2对产气肠杆菌(a)和鳗弧菌(b)的抑菌活性

Fig. 3 Turbidimetric assay of rVpILYZ-1 and rVpILYZ-2 against *E. aerogenes* (a) and *V. anguillarum* (b)



## 2.4 rVpILYZ-1和rVpILYZ-2的非酶抑菌活性

重组蛋白经沸水煮沸15 min破坏胞壁酸酶等酶活性后,冷却至室温。以产气肠杆菌和鳃弧菌为底物,测定其非酶依赖抑菌活性。在rVpILYZ-1和rVpILYZ-2处理组,产气肠杆菌的OD<sub>600</sub>吸光值由初始值0.558分别降低为0.521和0.512(图4-a),鳃弧菌的OD<sub>600</sub>吸光值也由初始值0.458分别降低为0.405和0.427(图4-b),而对照组吸光值未出现明显下降趋势,表明2种重组蛋白热处理后仍然具有一定的抑菌活性。

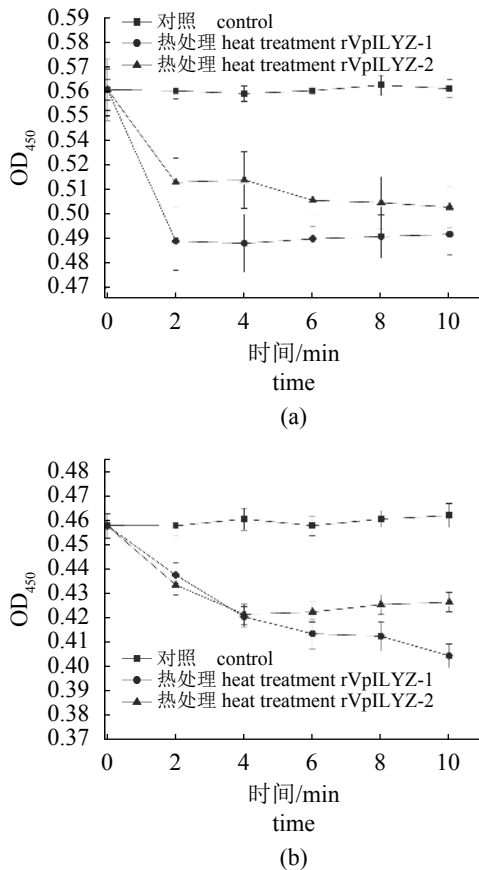


图4 rVpILYZ-1和rVpILYZ-2对产气肠杆菌(a)和鳃弧菌(b)的非酶抑菌活性

Fig. 4 Non-enzymatic antibacterial activities of rVpILYZ-1 and rVpILYZ-2 against *E. aerogenes*(a) and *V. anguillarum*(b)

## 2.5 rVpILYZ-1和rVpILYZ-2的胞壁酸酶活性

利用比浊法测定了rVpILYZ-1和rVpILYZ-2的胞壁酸酶活性。在PGN溶液中分别加入rVpILYZ-1和rVpILYZ-2,其吸光值均显著降低,分别由0.640和0.642降低至0.464( $P<0.01$ )和0.436( $P<0.01$ )(图5),表明重组蛋白具有极显著的胞壁酸酶活性。

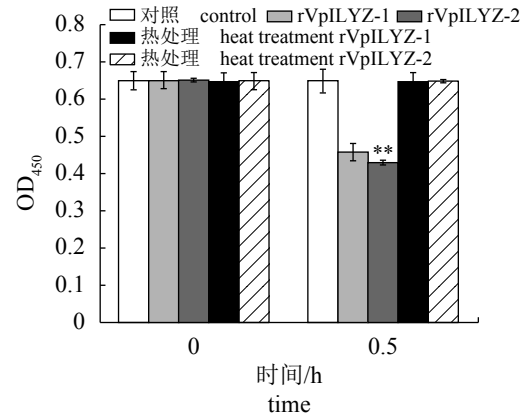


图5 rVpILYZ-1和rVpILYZ-2的胞壁酸酶活性

\*\* 具极显著差异( $P<0.01$ ); 下同

Fig. 5 Muramidase activity of rVpILYZ-1 and rVpILYZ-2

\*\* extremely significant difference ( $P<0.01$ ); the same below

## 2.6 rVpILYZ-1和rVpILYZ-2对血细胞吞噬活性的影响

以藤黄微球菌和灿烂弧菌为应试菌株,测定了rVpILYZ-1和rVpILYZ-2对菲律宾蛤仔血细胞吞噬活性的影响。在对照组中,血细胞对藤黄微球菌和灿烂弧菌的吞噬率分别为10%和11%;当加入rVpILYZ-1后,血细胞对藤黄微球菌和灿烂弧菌的吞噬率分别增加了19%和9%;当加入rVpILYZ-2后,血细胞对藤黄微球菌和灿烂弧菌的吞噬率分别增加了13%和11%(图6)。可见,rVpILYZ-1和rVpILYZ-2能够显著增强血细胞的吞噬活性。

## 3 讨论

溶菌酶是生物体先天性免疫系统的重要组成部分,通常被认为是机体抵御病原侵袭的第一道屏障<sup>[12]</sup>。迄今,I型溶菌酶已被发现广泛存在于无脊椎动物中<sup>[13]</sup>,但对软体动物I型溶菌酶功能的研究仍然较为有限。本研究探讨了菲律宾蛤仔2种I型溶菌酶的抑菌活性、最适条件及其酶活性特性等,可为深入了解菲律宾蛤仔的免疫防御机制提供科学依据。

由于营滤食性生活,软体动物易遭受水体中各类潜在病原微生物的侵袭。在本研究中,rVpILYZ-1和rVpILYZ-2对供试的革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌均表现出较强的抑菌活性,表明VpILYZ-1和VpILYZ-2具有较为广谱的抑菌作用。类似的结果在皱纹盘鲍(*Haliotis discus han-*

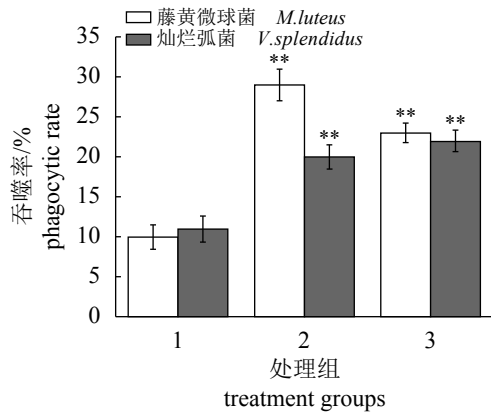


图6 rVpILYZ-1和rVpILYZ-2的血细胞吞噬活性

1. 对照组, 2. rVpILYZ-1, 3. rVpILYZ-2

Fig. 6 Phagocytic rates of hemocytes enhanced by rVpILYZ-1 and rVpILYZ-2

1. control, 2. rVpILYZ-1, 3. rVpILYZ-2

*nai*和文蛤(*Meretrix meretrix*)中也有报道, 其重组I型溶菌酶也对多种革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌表现出较强的抑菌活性<sup>[14-15]</sup>。在rVpILYZ-1和rVpILYZ-2胞壁酸酶活性的实验中, 与添加鸡卵清溶菌酶(HEWL)作阳性对照的处理组相比, 该I型溶菌酶的胞壁酸酶活性较HEWL更强。其中rVpILYZ-1对供试的副溶血弧菌、灿烂弧菌、藤黄微球菌、产气肠杆菌和阴沟肠杆菌均表现出较强的抑制作用。与rVpILYZ-1相比, rVpILYZ-2抑菌活性相对较弱, 仅对副溶血弧菌抑菌效果较强。有关文献报道了拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)I型溶菌酶的抑菌活性, 发现该溶菌酶对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌及真菌均具有广泛的抑菌活性, 其中对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、哈氏弧菌、巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)及枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)具有较强抑菌能力, 而对大肠杆菌JM109、白色念珠菌(*Candida albicans*)及毕赤酵母GS-115(*Pichia pastoris* GS-115)抑菌能力较弱<sup>[16]</sup>。二者对比而言, 本研究介绍的I型溶菌酶对副溶血弧菌等菌株的抑菌活性高于拟穴青蟹I型溶菌酶, 但对于哈氏弧菌的抑菌活性则低于拟穴青蟹I型溶菌酶。另外, 在褶纹冠蚌(*Cristaria plicata*)中也报道了I型溶菌酶的存在, 该溶菌酶对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌均具抑菌作用, 其中对枯草芽孢杆菌抑菌作用较强, 而对大肠杆菌DH5 $\alpha$ 及表皮葡萄球菌(*S. epidermidis*)抑菌能力较弱<sup>[17]</sup>。因此, 不同物种间的I型溶菌酶抑菌作用活性虽各具优势, 但均能

较为广泛地抑制病原微生物增殖, 综上所述, 软体动物I型溶菌酶在抵御病原微生物入侵上发挥着重要的作用。

在针对菲律宾蛤仔生存环境中常见菌株的抑菌活性实验中, 经rVpILYZ-1和rVpILYZ-2处理, 产气肠杆菌和鳗弧菌吸光值均呈下降趋势, 且rVpILYZ-1的抑菌活性强于rVpILYZ-2。二者虽同为菲律宾蛤仔I型溶菌酶, 但二者之间氨基酸相似性仅为35.6%。当受环境盐度刺激时, VpILYZ-1基因在各组织中的表达量均极显著升高, 并随着胁迫时间的延长基因表达量逐渐下降, 而VpILYZ-2基因表达量则随应激时间延长主要呈升高趋势。猜测二者可能由菲律宾蛤仔的不同组织部位合成并分泌, 在受到外界不同条件刺激时表现出不同的表达模式, 行使其抑菌作用抵御外界病原微生物入侵<sup>[18]</sup>。

此外, pH和温度等环境因子已被发现能够影响溶菌酶的溶菌活性<sup>[19]</sup>。通常而言, 海洋双壳贝类I型溶菌酶的最适pH低于7.0<sup>[14, 17]</sup>。例如, 褶纹冠蚌I型溶菌酶在pH 5.5时具有较高的抑菌活性<sup>[17]</sup>。在本研究中, rVpILYZ-1和rVpILYZ-2分别在pH 6.5和4.5时表现出较高活性, 这与紫贻贝(*Mytilus edulis*)中的研究结果相类似<sup>[20]</sup>。然而, rVpILYZ-1和rVpILYZ-2的最适pH与菲律宾蛤仔中C型和P型溶菌酶的最适pH存在较大差异<sup>[12, 14]</sup>, 这可能与不同类型溶菌酶的活性位点差异存在密切相关性<sup>[21]</sup>, 提示不同类型的溶菌酶可协调发挥作用, 共同维持机体免受病原微生物的入侵。此外, rVpILYZ-1、rVpILYZ-2在温度较低时具有较高的活性, 其最适温度约为10~20 $^{\circ}\text{C}$ , 表明rVpILYZ-1、rVpILYZ-2为低温活性酶, 这也与变温水生动物的生理特性相一致。

一般而言, 溶菌酶对病原微生物的抑制途径主要包括2种方式, 即酶依赖性和非酶依赖性抑菌作用<sup>[22]</sup>。在本研究中, rVpILYZ-1、rVpILYZ-2被证实具有酶依赖性和非酶依赖性抑菌活性, 相似的结果在其他无脊椎动物中亦有报道。例如, 在褶纹冠蚌中, 2种I型溶菌酶CpLYZs均具有对溶壁微球菌(*Micrococcus lysodeikticus*)的酶依赖和非酶依赖抑菌活性<sup>[23]</sup>。研究发现, 酶依赖性抗菌活性主要依靠于其胞壁酸酶、几丁质酶或异肽酶活性来实现<sup>[5]</sup>, 而非酶依赖性抑菌机理则相对复杂。目前, 对于I型溶菌酶非酶依赖抑菌活性的研究相对较少, 但有文献报道, 热处理

后无脊椎动物水蛭(*Whitmania pigra*)的I型溶菌酶仍存在非酶依赖性抑菌活性,它与C型溶菌酶不同,其抑菌活性并非由多个螺旋肽协同作用,主要是由单个螺旋肽形成的HLH(螺旋+环+螺旋)起作用<sup>[6]</sup>。热处理后,溶菌酶N端区域的二级结构出现明显改变,而C端的结构保持稳定。在N端区域,第一个 $\alpha$ 螺旋(H1)和部分H2的结构松散,形成loop结构;loop(L3)与H3形成一个规则的、完整的 $\alpha$ 螺旋。在脊椎动物中,溶菌酶的非酶依赖性抗菌活性可能主要来源于双螺旋肽的协同作用<sup>[24]</sup>;同时,溶菌酶自身也具有较高的正电荷等特性,可直接作用于细菌细胞壁或细胞膜,也能够破坏细胞的完整性<sup>[25-26]</sup>。也有学者认为,无脊椎动物I型溶菌酶通常为失稳酶,不具有脊椎动物溶菌酶的多螺旋肽;因此,推测其非酶抑菌活性可能主要依赖于溶菌酶的自身特性(正电荷等)来发挥作用,但具体作用机理尚需结合溶菌酶的结构和功能等方面开展深入研究。

本研究着重探讨了菲律宾蛤仔I型溶菌酶的抗菌活性和生化特性;经最适抗菌活性分析,发现VpILYZs的最适酶活性条件与菲律宾蛤仔栖息环境的理化性质密切相关。此外,VpILYZs具有酶依赖性和非酶依赖性2种抑菌方式,可协同高效地抑制病原微生物,从而维护机体免受病原微生物的入侵。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Dobson D E, Prager E M, Wilson A C. Stomach lysozymes of ruminants. I. distribution and catalytic properties[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1984, 259(18): 11607-11616.
- [ 2 ] Supungul P, Rimphanitchayakit V, Aoki T, *et al.* Molecular characterization and expression analysis of a c-type and two novel muramidase-deficient i-type lysozymes from *Penaeus monodon*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2010, 28(3): 490-498.
- [ 3 ] Jiménez-Cantizano R M, Infante C, Martín-Antonio B, *et al.* Molecular characterization, phylogeny, and expression of c-type and g-type lysozymes in brill (*Scophthalmus rhombus*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 25(1-2): 57-65.
- [ 4 ] Jollès J, Jollès P. The lysozyme from *Asterias rubens*[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1975, 54(1): 19-23.
- [ 5 ] Josková R, Šilerová M, Procházková P, *et al.* Identification and cloning of an invertebrate-type lysozyme from *Eisenia andrei*[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2009, 33(8): 932-938.
- [ 6 ] Cong L N, Yang X J, Wang X X, *et al.* Characterization of an i-type lysozyme gene from the sea cucumber *Stichopus japonicus*, and enzymatic and nonenzymatic antimicrobial activities of its recombinant protein[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2009, 107(6): 583-588.
- [ 7 ] Beckert A, Wiesner J, Schmidtberg H, *et al.* Expression and characterization of a recombinant i-type lysozyme from the harlequin ladybird beetle *Harmonia axyridis*[J]. *Insect Molecular Biology*, 2016, 25(3): 202-215.
- [ 8 ] Carrillo W, García-Ruiz A, Recio I, *et al.* Antibacterial activity of hen egg white lysozyme modified by heat and enzymatic treatments against oenological lactic acid bacteria and acetic acid bacteria[J]. *Journal of Food Protection*, 2014, 77(10): 1732-1739.
- [ 9 ] Yang D L, Wang Q, Chen L Z, *et al.* Molecular characterization and antibacterial activity of a phage-type lysozyme from the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 65: 17-24.
- [ 10 ] Xue Q G, Itoh N, Schey K L, *et al.* A new lysozyme from the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) indicates adaptive evolution of i-type lysozymes[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2007, 64(1): 82-95.
- [ 11 ] Yang D L, Wang Q, Cao R W, *et al.* Molecular characterization, expression and antimicrobial activities of two c-type lysozymes from Manila clam *Venerupis philippinarum*[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2017, 73: 109-118.
- [ 12 ] Jollès P, Jollès J. What's new in lysozyme research? Always a model system, today as yesterday[J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 1984, 63(2): 165-189.
- [ 13 ] Zhang K X, Gao R, Zhang H X, *et al.* Molecular cloning and characterization of three novel lysozyme-like genes, predominantly expressed in the male reproductive system of humans, belonging to the c-type lysozyme/alpha-lactalbumin family[J]. *Biology of Reproduction*, 2005, 73(5): 1064-1071.
- [ 14 ] Bathige S D N K, Umasuthan N, Kasthuri S R, *et al.* A bifunctional invertebrate-type lysozyme from the disk abalone, *Haliotis discus discus*: genome organization,

- transcriptional profiling and biological activities of recombinant protein[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2013, 41(2): 282-294.
- [15] Yue X, Liu B Z, Xue Q G. An i-type lysozyme from the Asiatic hard clam *Meretrix meretrix* potentially functioning in host immunity[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 30(2): 550-558.
- [16] Zhou J, Zhao S, Fang W H, *et al.* Newly identified invertebrate-type lysozyme (*Splys-i*) in mud crab (*Scylla paramamosain*) exhibiting muramidase-deficient antimicrobial activity[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2017, 74: 154-166.
- [17] Dai W J, Wu D, Zhang M, *et al.* Molecular cloning and functional characterization of a novel i - type lysozyme in the freshwater mussel *Cristaria plicata*[J]. *Microbiology and Immunology*, 2015, 59(12): 744-755.
- [18] 祝艳霞, 母昌考, 王春琳. 温度、盐度变化及鳃弧菌刺激对菲律宾蛤仔 I 型溶菌酶基因表达的影响[J]. *水产学报*, 2016, 40(12): 1813-1822.
- Zhu Y X, Mu C K, Wang C L. Expression analysis of two I-type lysozyme genes from *Ruditapes philippinarum* under temperature and salinity stress and *Vibrio anguillarum* challenge[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(12): 1813-1822(in Chinese).
- [19] Ye X, Zhang L L, Tian Y Y, *et al.* Identification and expression analysis of the g-type and c-type lysozymes in grass carp *Ctenopharyngodon idella*[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2010, 34(5): 501-509.
- [20] Olsen Ø M, Nilsen I W, Sletten K, *et al.* Multiple invertebrate lysozymes in blue mussel (*Mytilus edulis*)[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2003, 136(1): 107-115.
- [21] Salih E, Malthouse J P, Kowlessur D, *et al.* Differences in the chemical and catalytic characteristics of two crystallographically 'identical' enzyme catalytic sites. Characterization of actinidin and papain by a combination of pH-dependent substrate catalysis kinetics and reactivity probe studies targeted on the catalytic-site thiol group and its immediate microenvironment[J]. *The Biochemical Journal*, 1987, 247(1): 181-193.
- [22] Nash J A, Ballard T N S, Weaver T E, *et al.* The peptidoglycan-degrading property of lysozyme is not required for bactericidal activity *in vivo*[J]. *Journal of Immunology*, 2006, 177(1): 519-526.
- [23] 吴丹. 褶纹冠蚌i-型溶菌酶基因表达及蛋白活性分析[D]. 南昌: 南昌大学, 2012.
- Wu D. Expression analysis of i-type lysozyme gene from *Cristaria plicata* and enzymatic activity analysis[D]. Nanchang: Nanchang University, 2012(in Chinese).
- [24] Ibrahim H R, Thomas U, Pellegrini A. A helix-loop-helix peptide at the upper lip of the active site cleft of lysozyme confers potent antimicrobial activity with membrane permeabilization action[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(47): 43767-43774.
- [25] Masschalck B, Deckers D, Michiels C W. Lytic and nonlytic mechanism of inactivation of gram-positive bacteria by lysozyme under atmospheric and high hydrostatic pressure[J]. *Journal of Food Protection*, 2002, 65(12): 1916-1923.
- [26] Masschalck B, Michiels C W. Antimicrobial properties of lysozyme in relation to foodborne vegetative bacteria[J]. *Critical Reviews in Microbiology*, 2003, 29(3): 191-214.



## Recombinant expression and antibacterial activities of two I-type lysozymes from *Ruditapes philippinarum*

WEI Qianyu<sup>1,2</sup>, MU Changkao<sup>1,2\*</sup>, WANG Chunlin<sup>1,2</sup>

(1. Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2. Collaborative Innovation Center for Zhejiang Marine High-efficiency and Healthy Aquaculture,

Ningbo University, Ningbo 315211, China)

**Abstract:** Lysozyme is an important immune effector present in phylogenetically diverse organisms, and plays important roles in bacteria elimination. In this study, two I-type lysozymes from *Ruditapes philippinarum* (designated as VpILYZ-1 and VpILYZ-2, respectively) were recombinantly expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3). The recombinant proteins rVpILYZ-1 and rVpILYZ-2 showed broad spectrum of antimicrobial activities. Especially, the rVpILYZ-1 displayed high lytic activities against *V. parahaemolyticus*, *V. splendidus* and *M. luteus*, while rVpILYZ-2 showed strong microbicidal activities against *V. parahaemolyticus*. The antibacterial activities of rVpILYZs may be performed by both the enzymatic way and non-enzymatic ways. The optimum pH and temperature for the lytic activities of rVpILYZ-1 were 6.5 and 20 °C, and the highest antimicrobial activities of rVpILYZ-2 was detected at pH 4.5 and 10 °C. Moreover, both rVpILYZ-1 and rVpILYZ-2 possessed the opsonic activities, and the phagocytic activities of hemocytes were boosted after being incubated with rVpILYZ-1 or rVpILYZ-2. These results suggested that VpILYZ-1 and VpILYZ-2 played important roles in the immune responses of *R. philippinarum*.

**Key words:** *Ruditapes philippinarum*; I-type lysozyme; recombinant expression; antibacterial activity

**Corresponding author:** MU Changkao. E-mail: muchangkao@nbu.edu.cn

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (41476126); Youth Innovation Promotion Association CAS (2016196)