

丁一峰, 聂若男, 朱文娟, 等. 沙门菌噬菌体 T139 基因组分析及其裂解酶 LysT40 的异源表达和活性鉴定[J]. 华中农业大学学报, 2021, 40(6): 176-185. DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2021.06.022

沙门菌噬菌体 T139 基因组分析及其裂解酶 LysT40 的异源表达和活性鉴定

丁一峰, 聂若男, 朱文娟, 王吉, 王佳, 王小红

华中农业大学食品科学技术学院, 武汉 430070

摘要 为开发噬菌体裂解酶作为一种新型的抗菌剂,用于沙门菌的防控,采用生物信息学及异源表达蛋白的方法,获得鼠伤寒沙门菌噬菌体 T139 的裂解酶,并验证裂解酶对鼠伤寒沙门菌的裂解活性。通过对鼠伤寒沙门菌噬菌体 T139 基因组进行分析,发现该基因组全长 38 854 bp,平均 GC 含量为 49.10%,不包含 tRNA 基因。进化树分析表明噬菌体 T139 属于 T7 噬菌体属,共预测出 43 个 ORFs,有 23 个被赋予已知功能。多序列比对及保守结构域分析表明,*orf* 40 基因编码的蛋白(LysT40)包含 126 个氨基酸残基,具有内肽酶保守结构域,为可能的噬菌体裂解酶。LysT40 二级结构中存在大量的螺旋结构(70.63%),使得该蛋白能够保持结构稳定。将 *orf* 40 进行异源表达、纯化,经过 SDS-PAGE 和 Western blot 分析,在 10~15 ku 处获得单一目标蛋白条带,纯化的蛋白质质量浓度为 280 $\mu\text{g/mL}$ 。LysT40 在 30 min 内对氯仿或 EDTA 预处理的鼠伤寒沙门菌具有较好的裂解活性,吸光值 OD_{600} 相比于对照组分别下降 0.18 和 0.31。

关键词 鼠伤寒沙门菌; 基因组分析; 噬菌体裂解酶; 表达纯化; 裂解活性; 食源性致病菌; 抗菌药物替代品

中图分类号 TS 201.3; R 117 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2021)06-0176-10

沙门菌是引起食源性疾病的主要原因之一,包括 2 600 多个血清型,其中鼠伤寒沙门菌是关系到食品安全的最主要血清型^[1]。感染沙门菌的症状包括恶心、呕吐、腹痛、腹泻、发烧和头痛等,其在工业化国家和不发达国家每年造成 9 380 万例食源性疾病和 15.5 万人死亡^[2]。在中国,从 2008 年到 2012 年,大约有 70 例沙门菌病的报告,4 151 例住院病例和 4 例死亡^[2-4]。常规使用抗菌药物一直被认为是消除沙门菌污染最有效的干预策略。然而,最近多重耐药沙门菌的流行加重了其对公共健康的威胁,因此,减少食品中的沙门菌污染对预防人类沙门菌病至关重要。在过去 10 年中,出现各种基于化学、物理或生物制剂的策略来灭活食品中的沙门菌,如臭氧^[5]、电解氧化水^[6]、高压二氧化碳^[7]和噬菌体^[1]。然而,这些技术在食品行业的应用仍有一些局限性,如商业应用的成本高(臭氧)、功效低(电解氧化水)、严格的安全要求(高压二氧化碳)和细菌抗性(噬菌体)^[1,5-8]等。因此,开发新的抗菌药物替代

品势在必行。

噬菌体是一类能够特异性侵染特定细菌的天然病毒,能够专门识别并有效杀死它们的目标细胞^[9]。然而,细菌为了对抗噬菌体的侵染,已经进化出来抵抗噬菌体“入侵”的免疫系统,产生细菌抗性。因此,具有宿主特异性和宿主裂解活性的噬菌体细胞内溶素可能比噬菌体更值得进一步研究应用^[10-11]。

细胞内溶素(endolysins)是由噬菌体编码的酶,又称为裂解酶,在复制周期结束时通过降解细胞壁的主要结构成分(肽聚糖,PG),从而裂解宿主细菌细胞,释放新组装的子代噬菌体。裂解酶是一种新型的生物控制剂,当它在大肠杆菌中以重组蛋白的形式外源表达时,可以杀死目标细菌^[12]。裂解酶已被证实其在控制食品中的细菌污染^[13]和防治医学领域的细菌感染方面的功效^[14]。因此,裂解酶作为针对感染性病原体的有效抗菌剂具有很大的潜力。与抗菌药物相比,裂解酶有多种优势。首先,裂解酶专门针对细菌中的肽聚糖层,截至目前,还未出现耐

收稿日期: 2021-07-15

基金项目: “十三五”国家重点研发计划重点专项(2017YFC1600100); 国家自然科学基金面上项目(31772054)

丁一峰, E-mail: yifengding@webmail.hzau.edu.cn

通信作者: 王小红, E-mail: wxh@mail.hzau.edu.cn

药性的报道^[15];其次,裂解酶可以通过基因工程改造,以改变其宿主范围和杀灭效率^[16-17];再次,由于裂解酶的蛋白质性质,可以克隆到表达载体中进行大规模的合成^[18]。感染革兰阳性菌的噬菌体裂解酶已被充分研究,但感染革兰阴性菌的噬菌体裂解酶的应用仍处于初级阶段。这是由于革兰阴性菌细胞壁的特殊结构,其外膜阻止裂解酶从外部进入肽聚糖层^[19-20]。然而,外膜透过剂(outer membrane permeabilizers, OMPs)和噬菌体裂解酶可以一起作用于革兰阴性菌,如假单胞菌、大肠杆菌和沙门菌^[21]。为了利用裂解酶的这一优势,需要进一步研究开发基于噬菌体裂解酶的新型生物控制剂,以对抗食源性致病菌。

本研究对实验室前期分离得到的1株裂解性沙门菌噬菌体 T139^[22]及其裂解酶 LysT40 进行生物信息学分析和蛋白裂解活性分析,旨在为开发噬菌体裂解酶这一新型抗菌剂用于沙门菌的防控奠定研究基础。

1 材料与方法

1.1 菌株

噬菌体 T139 由实验室前期以鼠伤寒沙门菌(*Salmonella Typhimurium*) ATCC 13311 为宿主菌从污水样品中分离并保存,为1株裂解性、短尾噬菌体科(Podoviridae)的鼠伤寒沙门菌噬菌体。

1.2 仪器与试剂

5417R 小型台式冷冻离心机,德国 Eppendorf 公司;BSO-130011A2 超净台,苏净集团苏州安泰空气技术有限公司;HNY-2102C 全温振荡培养箱,武汉瑞华仪器设备有限公司;M200 PRO 酶标仪,瑞士 Tecan 公司;Optima L-90K 超速离心机,美国 Beckman Coulter 公司;Odyssey Fc 化学发光成像系统,美国 LI-COR;POWER/PAC300 小型蛋白电泳系统、Universal Hood II 凝胶扫描成像仪,美国 Bio-Rad 公司。

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、PCR 产物回收试剂盒、15 kb DNA Marker, TaKaRa 公司;质粒 pET28b 和 *E. coli* BL21 (DE) 感受态细胞,美国 Addgene 公司;DNase I、RNase A、HisPur Ni-NTA Resin 蛋白纯化、6x-His Tag Monoclonal Antibody、Super Signal West Pico、Goat anti-Mouse IgG Cross-Adsorbed Secondary Antibody, 美国 Thermofisher 公司;BCA 蛋白定量试剂盒、10 ku

超滤管,默克生命科学;30%丙烯酰胺、TMEED,广州 Bio-Foxx;中分子质量蛋白质标准、DAB 显色液、Western 封闭液,碧云天生物;透析袋,广州健阳生物有限公司;鼠抗组氨酸抗体、山羊抗鼠抗体,北京中杉金桥生物技术有限公司;QIAquick Gel Extraction Kit, 美国 QI 公司;AxyPrep™ Plasmid Miniprep Kit 250-prep, 爱思进生物技术有限公司;酶标板,型号 9018, 美国康宁公司。

根据噬菌体 T139 基因组注释结果,设计上下游引物扩增 *orf* 40 基因序列,引物序列如下:F: CCGCTCGAGCCATGGGCTACAACCACGGT; R: CATGCCATGGCTCGAGTTGCTGCATCTCTT(下划线分别代表 *Xho*I 和 *Nco*I 酶切位点),由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.3 噬菌体 T139 颗粒的富集

参考文献[23]中 λ 噬菌体颗粒提取方法,简述如下:LB 培养基中培养对数期的宿主菌液加入噬菌体 T139 悬液,37℃摇床振荡培养至培养液由浑浊变至澄清。加入氯仿,37℃振荡培养。加入 DNase I 和 RNase A 消化宿主菌的 DNA 和 RNA。向溶液中加入固体 NaCl(终浓度为 1 mol/L),冰浴 1 h 后离心,收集上清液。在上清中加入固体 PEG 8000 沉淀噬菌体颗粒,于 4℃冰箱过夜沉淀。低温离心,回收沉降的噬菌体,去上清。将沉淀重悬于 TE 缓冲液中,使用氯仿抽提噬菌体悬液中的 PEG 和细胞碎片离心,分离有机相和亲水相,回收含噬菌体颗粒的亲水相,4℃保存。

1.4 噬菌体 T139 基因组提取与测序

用 DNase I (1 U/ml)和 RNase A (10 μ g/ml)处理如前所述富集得到的噬菌体 T139,以消化细菌核酸。混合物在 37℃下孵育 40 min。然后加热到 95℃使酶失活,再孵育 10 min。用噬菌体 DNA 分离试剂盒(NORGRN BIOTEK CORP, Thorold, ON, Canada)提取和纯化噬菌体 T139 的基因组 DNA,按照说明书将噬菌体基因组与 *Hind*III 和 *Eco*RV 混合,37℃水浴 4 h,样品采用琼脂糖凝胶电泳分析酶切图谱。噬菌体 T139 的基因组使用全基因组鸟枪法(whole genome shotgun, WGS)策略和 Illumina Hiseq DNA 测序平台(Illumina, San Diego, CA, USA)进行测序。使用软件 SPAdes 3.14.0对合格的序列进行重新组装,得到 T139 的完整基因组序列。

1.5 噬菌体 T139 基因组生物信息学分析

使用 GeneMarkS (<http://topaz.gatech.edu/GeneMark/>)、ORF finder (https://indra.mullins.microbiol.washington.edu/sms2/orf_find.html) 和 RAST (<https://rast.nmpdr.org/rast.cgi>) 对所有开放阅读框架 (Open reading frames, ORFs) 进行预测。使用 BLASTp 与蛋白域数据库进行注释和功能分析。编码 tRNA 的基因用 tRNAscan-SE (<http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/>) 进行筛选。基因组是用软件 BRIG (0.95) 生成的。推测的毒力因子和抗生素抗性基因由毒力因子数据库 (VFDB, <http://www.mgc.ac.cn/VFs/>) 和综合抗生素抗性数据库 (CARD, <https://card.mcmaster.ca/analyze/rgi>) 进行筛选。

根据 ICTV (The International Committee on Taxonomy of Viruses) 的病毒分类和 NCBI 数据库的 BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), 选择相似度较高的噬菌体。使用 MEGA 7 软件, 以末端酶大亚基的蛋白序列为基础, 构建系统发育树 (Tree method: Neighbor-Joining)。

1.6 LysT40 生物信息学分析

通过在线工具 ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) 预测 LysT40 序列的理化性质, 包括等电点、不稳定系数和亲水系数; 使用 NCBI CDD 和 Pfam 数据库预测序列保守结构域; 通过在线工具 PredictProtein (<https://www.predictprotein.org/>) 预测 gp38 序列的二级结构; 使用 BLASTp 搜索非冗余数据库 (non-redundant database, nr database), 找到与 LysT40 相似的氨基酸序列。同时, 用 Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) 和 Jalview 2.11.0 软件对沙门菌噬菌体裂解酶的序列 (来自 BLASTp) 进行比较。然后, 通过 NCBI 保守域数据库和 Pfam 数据库对保守域进行预测。LysT40 序列的二级结构是由 Jalview 2.11.0 软件中的在线工具 JPred 在线服务器预测的。

1.7 裂解酶基因 *orf* 40 的克隆以及重组表达载体的构建

噬菌体 T139 基因组经过功能注释后预测到 *orf* 40 是编码噬菌体裂解酶中内肽酶的基因。以噬菌体 T139 的基因组为模板, 设计引物 F: CCGCTCGAGCCATGGGCTACAACCACGGT; R: CATGCCATGGCTCGAGTTGCTGCATCTCTT (下

划线分别代表 *Xho*I 和 *Nco*I 酶切位点) 扩增目的基因 *orf* 40。参照 TaKaRa 公司的 *Xho*I 和 *Nco*I 限制性内切酶说明书, 使用限制酶 *Xho*I 和 *Nco*I 酶切扩增产物和质粒 pET28b, 37 °C 过夜酶切。按照 QIAquick Gel Extraction Kit 操作说明书对酶切产物进行回收, 并进行琼脂凝胶电泳检测。根据 T4 DNA 连接酶说明书, 将裂解酶基因与 pET28b 的双酶切产物连接, 构建重组表达载体 pET28b-*orf* 40。将上述连接产物转化 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞。

1.8 重组蛋白 LysT40 的表达和纯化

挑取含重组质粒的单菌落接种于含卡那霉素 (50 μ g/mL) 的 LB 培养基中, 37 °C 过夜培养。吸取未经诱导的菌液作为阴性对照, 在剩余的菌液中加入异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG, 终浓度 1 mmol/L), 将加入 IPTG 后的菌液与未诱导的对照均分别按下列不同条件进行培养: 16 °C 过夜培养, 30 °C 培养 4 h, 37 °C 培养 4 h。收集不同表达条件的样品, 12 000 r/min 离心 15 min 收集菌体。用 200 μ L 的 PBS 重悬菌体, 超声破碎细胞, 超声时间 2 s, 间隔 2 s, 总计 4 min, 离心分离上清和沉淀。分别取 10 μ L 样品进行 SDS-PAGE 验证表达情况。

将阳性单菌落转接于 LB 培养基中, 37 °C 培养。加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L, 16 °C 过夜培养, 离心收集诱导表达后的菌体, 加入 PBS 缓冲液, 超声处理 (超声时间 2 s, 间隔 2 s, 总计 30 min), 离心后收集上清。采用 HisPur Ni-NTA 树脂亲和层析纯化目的蛋白。将蛋白样品分装置于 -20 °C 保存, 取 2.5 μ L 进行 SDS-PAGE 和 Western blot 检测。采用 BCA 蛋白定量试剂盒绘制标准曲线, 计算样品中的蛋白浓度。

1.9 裂解酶 LysT40 裂解活性验证

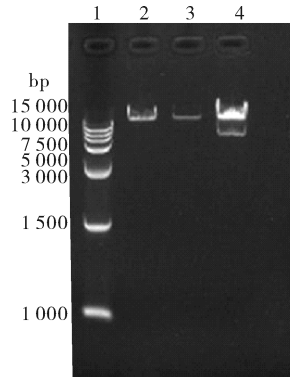
参照 Mikoulinskaia 等^[24] 和 Lim 等^[25] 的方法, 步骤如下: 接种宿主菌鼠伤寒沙门菌 ATCC 13311 于 LB 液体培养基中过夜生长, 按 1 : 100 (V/V) 转接于 25 mL 培养基中振荡培养 3 h, 使用含氯仿 (0.5%, V/V) 或是 100 mmol/L EDTA 的 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.2) 重悬菌体, 温和震荡后静置 20 min, 采用无菌去离子水离心洗涤 3 次, 将沉淀重悬于含有 0.1% Triton X-100 的 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.2) 缓冲液中, 并调整 OD₆₀₀ 为 0.8~1.0, 将 50 μ L 裂解酶 (终浓度 2 μ mol/L) 添加至 200 μ L 细菌重悬液中, 使用相同体积的含 0.1% Triton

X-100 的 Tris-HCl 缓冲液代替裂解酶作为对照, 观察并测定 OD₆₀₀ 值。试验重复 3 次, 每次设 3 个平行。运用 GraphPad Prism 软件进行绘图和分析。

2 结果与分析

2.1 噬菌体 T139 基因组酶切图谱分析

噬菌体 T139 的基因组酶切电泳图如图 1 所示。由图 1 可知, 噬菌体 T139 的基因组无蛋白及 RNA 污染, 经过 4 h 水浴酶切, 噬菌体 T139 基因组成功被 *EcoRV* 酶切, 证实噬菌体 T139 的基因组为双链 DNA。



1: 15 000 bp DNA marker; 2: 噬菌体 T139 基因组; 3: 基因组经 *Hind*Ⅲ 酶切; 4: 基因组经 *EcoRV* 酶切。1: 15 000 bp DNA marker; 2: Complete genome of phage T139; 3: Nucleic acid digested by *Hind*Ⅲ; 4: Nucleic acid digested by *EcoRV*.

图 1 噬菌体 T139 基因组的酶切电泳图

Fig.1 Genome and restriction enzyme electrophoresis of phage T139

2.2 噬菌体 T139 功能基因组学分析

经测序后分析发现, 噬菌体 T139 的基因组长度为 38 854 bp, 碱基分布情况为 A(24.39%)、T(26.51%)、C(26.17%)、G(22.93%), C+G 平均含量为 49.10%。噬菌体 T139 全基因组序列 BLASTn 分析比较的结果显示, 噬菌体 T139 与某些噬菌体基因组的同源性较高。首先, 与沙门菌噬菌体 BP12A(索引号: KM366096.1) 全基因组相似性最高, 覆盖范围为 95%, 相似性为 98.2%; 另外, 与大肠杆菌噬菌体 BA14(索引号: EU734171.1) 相似性较高, 覆盖范围为 89%, 相似性为 85.46%。

噬菌体 T139 基因组共有 43 个 ORF, 最长 ORF 为 3 948 bp, 最短的仅 150 bp, 平均长度为 813 bp。ORF 总长为 34 977 bp, 占全长的 90.02%。经过 BLAST 比对, 推测出的 43 个 ORF 中有 23 个 ORF 已确定功能, 注释见表 1。按照功能的不同,

表 1 噬菌体 T139 的开放读框及其功能预测

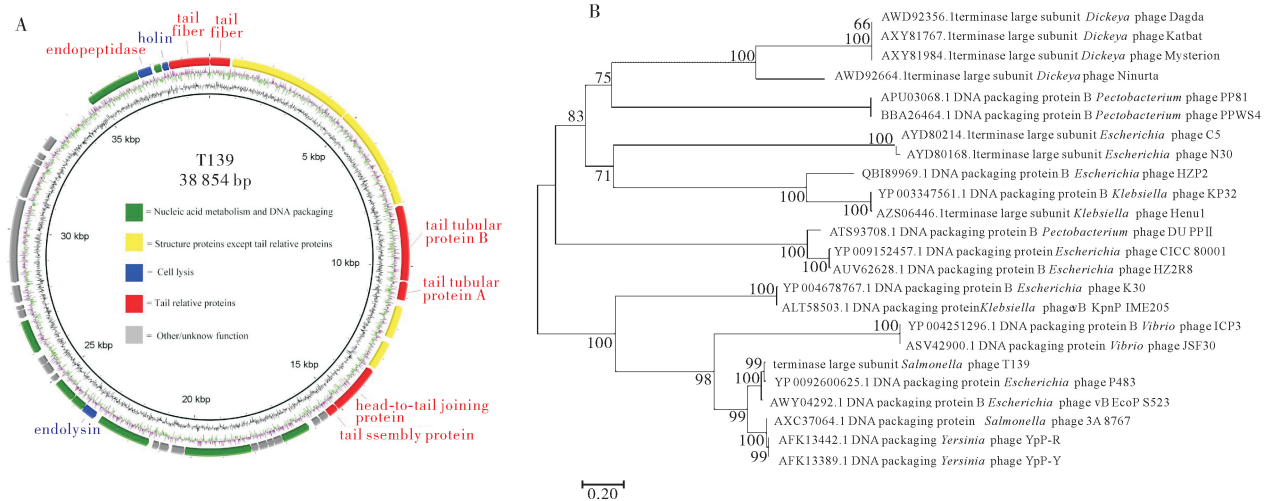
Table 1 ORF and its function prediction of phage T139

开放阅读框 ORF	基因位点 Gene positions	功能 Functions
1	3~644	Phage tail fibers
2	716~4 663	DNA injection channel protein C
3	4 687~6 963	DNA injection channel protein B
4	6 966~7 580	DNA injection channel protein A
5	7 583~7 999	Internal virion protein A
6	8 079~10 454	Tail tubular protein B
7	10 490~11 080	Tail tubular protein A
8	11 288~12 322	Major capsid protein
9	12 490~13 401	Capsid assembly protein
10	13 473~15 074	Head-to-tail joining protein
11	15 087~15 425	Tail assembly protein
12	15 443~15 718	Hypothetical protein
13	15 738~15 983	Hypothetical protein
14	16 151~17 065	Exonuclease
15	17 062~17 349	Hypothetical protein
16	17 346~17 555	Hypothetical protein
17	17 555~17 848	Hypothetical protein
18	17 859~18 086	Hypothetical protein
19	18 086~20 200	DNA polymerase
20	20 213~20 629	Hypothetical protein
21	20 717~21 019	Hypothetical protein
22	21 033~21 245	Gene products 4.3
23	21 377~23 089	Primase/helicase protein
24	23 258~23 713	Endolysin (swissprot)
25	23 710~24 156	N-Acetylmuramoyl-L-alanine amidase
26	24 156~24 863	Endonuclease I
27	24 931~25 122	Single-stranded DNA-binding protein
28	25 210~25 560	Bacterial RNA polymerase inhibitor
29	25 560~25 820	Hypothetical protein BP12A_10
30	26 000~27 073	Gene products 1.6
31	27 174~27 434	DNA ligase, ATP-dependent
32	27 436~27 585	Deoxyguanosine triphosphohydrolase inhibitor
33	27 679~28 236	Gene products 1.1
34	28 325~30 976	Hypothetical protein PP74_07
35	31 050~32 153	RNA polymerase
36	32 167~32 349	Protein kinase
37	32 369~32 566	Hypothetical protein
38	32 712~33 179	Gene products 0.6A
39	34 783~36 540	S-Adenosyl-L-methionine hydrolase
40	36 550~36 996	Terminase large subunit
41	37 080~37 313	Endopeptidase
42	37 339~37 545	Terminase small subunit
43	37 558~38 853	Holin
		Tail fibers protein

被分类为核酸代谢与 DNA 包装、除尾部之外的结构蛋白基因、裂解相关基因、尾部相关蛋白及未知蛋白五大类, 其基因组图谱如图 2A 所示。噬菌体 T139 的基因注释中共注释到 3 个与裂解宿主细胞相关的基因, 包括细胞内容素 (ORF24, endolysin)、内肽酶 (ORF40, endopeptidase) 和穿孔素 (ORF42, holin), 进一步证明噬菌体 T139 是 1 株裂解性噬菌体。利用 MEGA 软件构建的噬菌体 T139 进化树如图 2B 所示, 基于保守的末端酶大亚基序列构建

系统发育树,由图 3B 可知,噬菌体 T139 与噬菌体 *Escherichia* phage P483 形成一簇,二者亲缘关系最近,属于短尾噬菌体科 T7 型噬菌体属。采用 tRNAscan-SE 预测全基因组中的 tRNA 基因,结果显示无 tRNA。利用 Res Finder 预测噬菌体

T139 基因组中无抗生素抗性基因,利用 Virulence Finder 预测噬菌体 T139 基因组中不存在毒力基因。因此,该结果从遗传背景上证实噬菌体 T139 应用于食品中病原菌防控及噬菌体治疗的安全性。



A: 噬菌体 T139 基因组图谱。每一圈代表的含义(由内向外)依次为:以 bp 为单位的基因刻度; GC 含量; GC 偏移,偏移值大于零为绿色,小于零为紫红色;基因组基因注释。B: 噬菌体 T139 的进化关系(以末端酶大亚基序列构建进化树)。A: Genome map of phage T139. The meaning of each circle (from the inside) sequentially represented: the gene scale of bp; GC content; GC skew, values greater than zero are in green and the smaller are in magenta; genomic gene annotation. B: Evolutionary relationships of phage T139 (construction of an evolutionary tree with terminal enzyme large subunit sequences).

图 2 噬菌体 T139 功能基因组学分析

Fig.2 Functional genomic analysis of phage T139

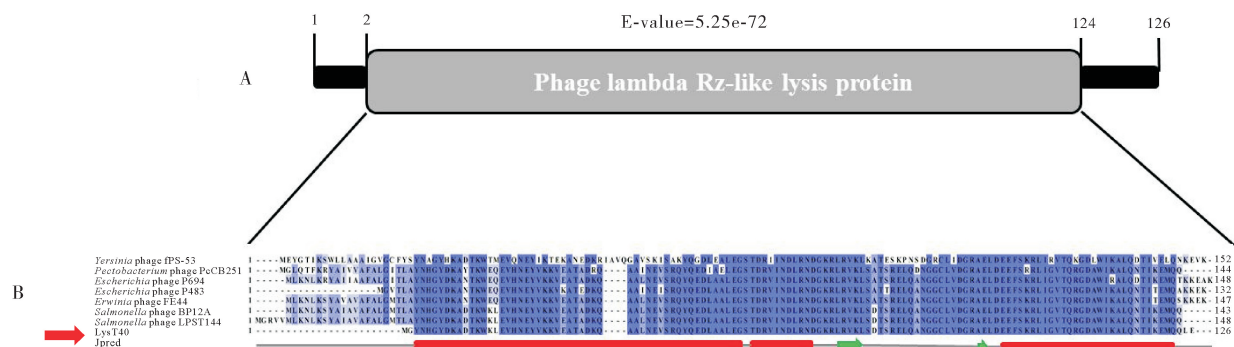
2.3 裂解酶 LysT40 生物信息学分析

根据对噬菌体 T139 功能基因组的分析,选取基因功能注释的内肽酶(ORF40, endopeptidase)的序列(表 1)作为研究对象。利用 ProtParam 工具对 LysT40 序列理化性质进行分析,结果发现 LysT40 由 126 个氨基酸组成,等电点为 5.46,不稳定系数为 25.66,亲水系数为 -0.887。一般而言,不稳定系数小于 40 表明该蛋白较为稳定,亲水系数为负值表明该蛋白具有一定的亲水性。通过 BLASTp 对 LysT40 进行序列比对分析,发现 LysT40 与噬菌体内肽酶有很高的相似度。选择 BLASTp 结果中的内肽酶序列进行多序列比对,它们是沙门菌噬菌体 LPST144(相似度 98.39%, E 值 $9e-84$), BP12A(相似度 98.39%, E 值 $1e-83$), 欧杆菌噬菌体 FE44(相似度 94.31%, E 值 $6e-79$), 埃希菌噬菌体 P694(相似度 93.05%, E 值 $3e-78$)和 P483(相似度 90.24%, E 值 $3e-76$), 果胶杆菌属噬菌体 PcCB251(相似度 90.32%, E 值 $7e-76$), 耶尔森菌噬菌体 fPS-53(相似度 65.62%, E 值 $4e-50$)。LysT40 序列是保守的,与其他噬菌体内肽酶有很高的同源性。随后,通过

NCBI CDD 和 Pfam 32.0 对 LysT40 的保守域进行分析。根据 NCBI CDD 和 Pfam 预测,它属于 Phage_lysis Superfamily (Accession cl22701)中的 Phage lambda Rz-like lysis protein (Accession PHA00276), 介于 2~124 AA。分析表明, LysT40 参与宿主的裂解,表明它是一种内肽酶(endopeptidases)。LysT40 的二级结构以螺旋结构为主,占氨基酸全长为 70.63%, 片状结构较少(5.56%), 说明该裂解酶具有稳定的结构(图 3)。

2.4 裂解酶基因 orf 40 的克隆及重组表达载体 pET28b- LysT40 的构建

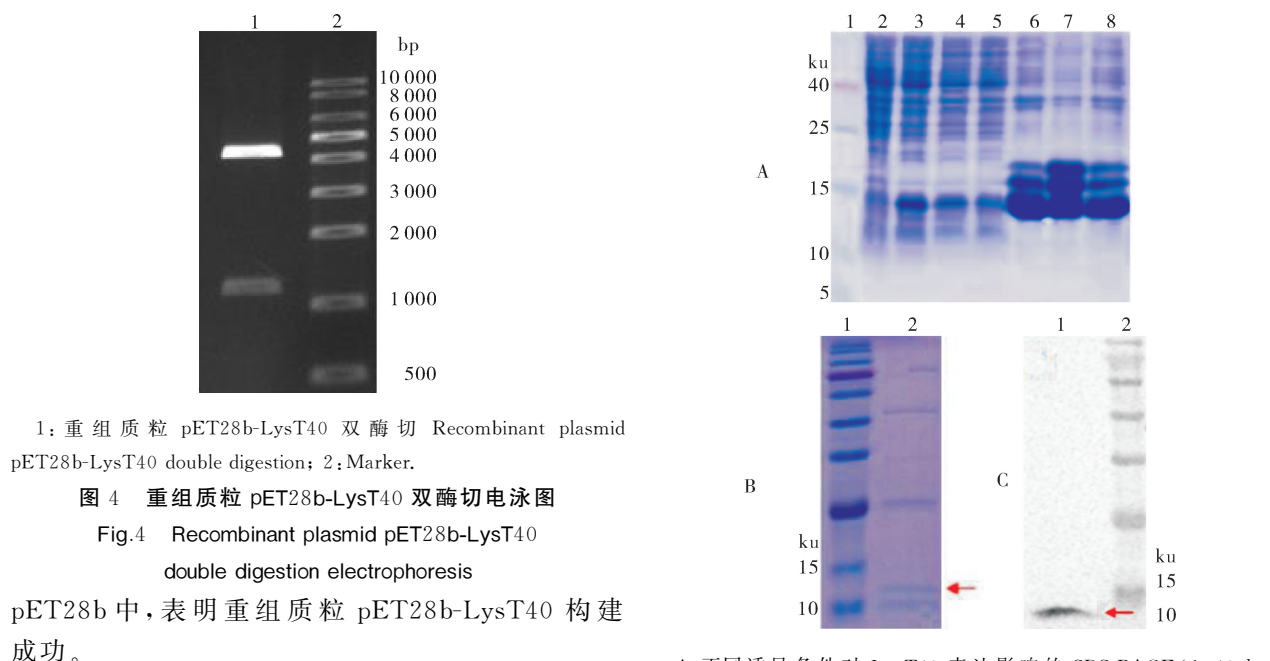
以噬菌体 T139 的基因组序列为模板,设计上下游引物扩增目的基因,将裂解酶基因克隆到原核表达载体 pET28b 中(目的基因插入位点为酶切位点 *Xho*I 和 *Nco*I 处),构建重组质粒 pET28b-LysT40。为了便于观察目标条带,采用 *Mlu*I 和 *Xho*I 对重组质粒进行双酶切鉴定,结果显示酶切产物包括载体条带(约 4 400 bp)和包含目的基因的条带(约 1 300 bp)(图 4)。同时,重组质粒的测序结果表明,内肽酶的基因已正确地插入到载体



A: 裂解酶 LysT40 结构域分析; B: 多序列比对结果与 LysT40 二级结构分析, 图中蓝色的深浅代表序列之间的相似度, 颜色越深代表相似度越高, 红色箭头代表 LysT40 序列, 红色线条代表螺旋结构, 绿色箭头表示片层结构。A: Endolysin LysT40 structural domain analysis; B: Multiple sequence comparison results with LysT40 secondary structure analysis, the shades of blue in the graph represent the similarity between sequences, the darker the color represents the higher similarity, red arrows represent LysT40 sequences, red lines represent helical structures, green arrows represent sheet structures.

图3 噬菌体 T139 裂解酶 LysT40 生物信息学分析

Fig.3 Bioinformatics analysis of phage T139 lyase LysT40



1: 重组质粒 pET28b-LysT40 双酶切 Recombinant plasmid pET28b-LysT40 double digestion; 2: Marker.

图4 重组质粒 pET28b-LysT40 双酶切电泳图

Fig.4 Recombinant plasmid pET28b-LysT40 double digestion electrophoresis

pET28b 中, 表明重组质粒 pET28b-LysT40 构建成功。

2.5 重组蛋白的表达和纯化

重组表达载体 pET28b-LysT40 转化感受态大肠杆菌 BL21(DE3) 后, 使用 IPTG 诱导表达, 并探究在不同诱导条件下的表达效果。预测的内肽酶融合蛋白分子质量理论值约 14 ku, 从图 5A 可知, BL21(DE3) 表达的蛋白大小与预测值相符。目的蛋白多以包涵体的形式存在于破碎沉淀中, 在破碎上清中浓度较低。为了便于纯化, 选择直接纯化上清液。另外, 目标蛋白在上清中的表达量于 16 °C 下过夜诱导浓度较高, 因此选择 16 °C 下过夜诱导为最佳条件。裂解酶 LysT40 经纯化后 (图 5B), 可在 10~15 ku 获得目的蛋白条带, 但是纯

A: 不同诱导条件对 LysT40 表达影响的 SDS-PAGE (1: 40 ku Marker; 2: 诱导前菌体; 3: 16 °C 诱导过夜上清蛋白; 4: 30 °C 诱导 4 h 上清蛋白; 5: 37 °C 诱导 4 h 上清蛋白; 6: 16 °C 诱导过夜沉淀蛋白; 7: 30 °C 诱导 4 h 沉淀蛋白; 8: 37 °C 诱导 4 h 沉淀蛋白); B: 重组蛋白的纯化 (1: 180 ku Marker; 2: 纯化后的蛋白); C: 蛋白印迹 (1: 纯化后的蛋白; 2: 180 ku Marker)。A: SDS-PAGE of different induction conditions on LysT40 expression (1: 40 ku Marker; 2: Strain before induction; 3: Supernatant protein induction overnight at 16 °C; 4: Supernatant protein induction 4 h at 30 °C; 5: Supernatant protein induction 4 h at 37 °C; 6: Sediment protein induction overnight at 16 °C; 7: Sediment protein induction 4 h at 30 °C; 8: Sediment protein induction 4 h at 37 °C); B: Lysin protein SDS-PAGE (1: Marker; 2: Protein after purification); C: Western blot (1: Purified protein; 2: 180 ku Marker).

图5 LysT40 蛋白的表达与纯化

Fig.5 Expression and purification of LysT40 protein

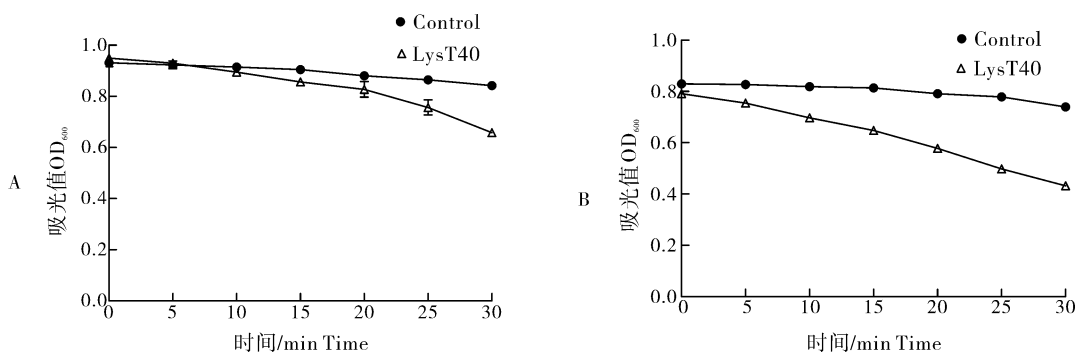
度较低,纯化后蛋白经 BCA 试剂盒定量测定,其质量浓度为 280 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。用 Western blot 分析(图 5C),结果显示在 10~15 ku 有单一条带,即获得目的蛋白 LysT40。

2.6 裂解酶 LysT40 对细菌的裂解活性

将鼠伤寒沙门菌的细胞壁经过氯仿或 EDTA 处理后,利用浊度法检测裂解酶 LysT40 对于细菌的裂解活性,结果如图 6 所示。氯仿预处理的菌液中加入裂解酶之后,实验组的 OD₆₀₀ 值相比于对照组大约从 5 min 时开始下降,直至 30 min 时相比于对照组下降 0.18,下降约 21%(图 6A)。EDTA 预处理的菌液中加入裂解酶之后,实验组的 OD₆₀₀ 值相

比于对照组从 0 min 开始下降,直至 30 min 时相比于对照组下降 0.31,下降约 42%(图 6B)。相比之下,EDTA 预处理的裂解效果优于氯仿预处理的裂解效果。

由于外膜的保护,革兰阴性菌在很大程度上对外源添加的裂解酶具有抵抗力。然而,用氯仿/EDTA 去除细胞外膜可以显著提高 LysT40 对宿主细胞的裂解活性。在本研究中,使用 2 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 LysT40 作用于外膜透过剂预处理的鼠伤寒沙门菌(ATCC13311),其 OD₆₀₀ 下降了约 42%,表现出较好的裂解活性,具有作为食品中抗沙门菌制剂的潜力。



A: 氯仿预处理鼠伤寒沙门菌 ATCC 13311; B: EDTA 预处理鼠伤寒沙门菌 ATCC 13311。A: Chloroform-treated *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311; B: EDTA-treated *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311。

图 6 裂解酶 LysT40 对鼠伤寒沙门菌 ATCC 13311 裂解效果

Fig.6 Lytic effect of LysT40 on *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311

3 讨论

噬菌体基因组学的研究意义重大,主要体现在 2 个方面,一是噬菌体种群的丰度为噬菌体基因组如何与宿主联系以及种群的进化机制提供解释;二是基因组学推进噬菌体用于遗传、生物技术和临床工具开发的用途^[26]。目前已有 300 多株沙门菌噬菌体完成全基因组研究工作。不同的噬菌体基因组大小也不尽相同,另外,截至 2008 年噬菌体基因组大小在 10 kb 以下的占 20%,基因组大小在 30~50 kb 的占 50%,基因组大小在 100~200 kb 的占 6%,统计结果虽不能完全真实地反映环境中噬菌体基因组大小的分布,但在一定程度上能够反映当时噬菌体的分离方法及可用的测序技术等^[27]。噬菌体 T139 基因组经过软件分析发现不包含 tRNA, tRNA 存在多种病毒的基因组中,其中在大的双链 DNA 基因组的原核生物中最常见,对于噬菌体来说,编码的 tRNA 在肌尾噬菌体科和长尾噬菌体科

中是常见的,最多每个基因组中编码 41 个 tRNA^[28]。存在于噬菌体中的 tRNA 对应于被噬菌体基因高度使用的密码子,烈性噬菌体比温和噬菌体含有更多的 tRNA,推测 tRNA 可能有助于噬菌体获取更高的裂解性^[29]。

本研究所用噬菌体 T139 为短尾噬菌体科,全基因组分析其基因组大小为 38 854 bp。Blast 分析结果显示 T139 与 T7 噬菌体属的沙门菌噬菌体 BP12A 全基因组相似性最高,相似性为 98.2%。进化树分析表明该噬菌体与同属于短尾噬菌体科的 T7 型噬菌体属的噬菌体 P483 亲缘关系最近。根据国际病毒分类委员会的标准噬菌体基因组序列相似性超过 50% 的可认定为同一属,故噬菌体 T139 属于 T7 型噬菌体属^[30]。噬菌体 T139 基因组功能注释将其功能基因大致分为核酸代谢与 DNA 包装、除尾部之外的结构蛋白基因、裂解相关基因、尾部相关蛋白及未知蛋白五大类,其中有 3 个与细胞裂解相关的功能基因,证明该噬菌体的裂解性能。

基因组序列比对分析表明噬菌体 T139 不含有毒力基因和抗生素抗性基因,从遗传背景上证实噬菌体 T139 应用于食品中生物防控及噬菌体治疗的安全性。噬菌体 T139 的基因注释中共注释到 3 个与裂解宿主细胞相关的基因,包括细胞内溶素(ORF24, endolysin)、内肽酶(ORF40, endopeptidase)和穿孔素(ORF42, holin),本研究选取裂解酶之一的内肽酶(ORF40, endopeptidase)作为研究对象,验证其裂解能力,为今后开发基于裂解酶的抗菌剂奠定研究基础。

本研究异源表达、纯化得到噬菌体 T139 中与裂解相关的内肽酶 LysT40,并证实其对氯仿或 EDTA 处理后的沙门菌具有裂解活性。一般情况下,噬菌体裂解酶作用于革兰阴性菌细胞壁上的肽聚糖靶点,而由于革兰阴性菌细胞壁表面有一层外膜作为屏障,会阻止裂解酶直接作用于肽聚糖,因此,需要首先采用透膜剂(如氯仿和 EDTA)对菌体进行预处理,再采用浊度法研究裂解酶的裂解活性^[27,31-32]。本研究在透膜剂的协助下,该内肽酶能够有效裂解宿主菌,30 min 后细菌的吸光值 OD₆₀₀ 相比于未加裂解酶的对照组分别下降 0.18 和 0.31,下降幅度约 21% 和 42%,有较好的裂解活性。在 Henry 等^[33]的研究中,加入重组裂解酶 gp29 1 h 后大肠杆菌吸光值 OD₆₀₀ 下降约 30%;Lim 等^[25]的研究中,不加透膜剂 EDTA 时,裂解酶 SPN1S 不影响细胞悬液中菌量,当加入 EDTA 时,裂解酶导致细菌活力显著降低。裂解酶杀菌的机制在于裂解细菌细胞壁肽聚糖结构。肽聚糖结果中的 N-乙酰胞壁酸和 N-乙酰葡萄糖胺之间的糖苷键及 N-乙酰胞壁酸和寡肽之间的连接键在细菌种属之间通常是保守的,因此,裂解酶通常能够表现出较广的裂解效果^[34]。裂解酶 SPN1S 能够在 10 min 内裂解所有测试的 21 株 EDTA 处理的革兰阴性菌株,对大肠杆菌具有最高活性,但没有检测到针对革兰阳性菌株的活性^[25]。作为一种有前途的替代物,裂解酶有许多优点,如快速裂解细胞、特定的宿主范围^[35]、无特异性抗药性^[14,36-38]等。由于这些优点,裂解酶被认为是一种替代性的抗菌剂,在食品工业中有潜在的应用价值。本研究对噬菌体 T139 的基因组进行分析,并对裂解酶 LysT40 进行裂解活性验证,将其与外膜透剂作用于沙门菌,使得菌体裂解,表明其具有作为抗菌剂的潜力。在未来的研究中,将在裂解酶 LysT40 的稳定性、裂解谱等方面开展相关研

究。另一方面,该裂解酶的裂解效果较弱,利用分子改造等手段改造裂解酶 LysT40 的氨基酸组成,提高裂解酶的酶解能力。

由于噬菌体对细菌的特异性裂解使得噬菌体成为一种天然的抗菌剂,然而国内利用噬菌体进行食品抑菌处理仍处于初步阶段,且并没有获得批准的商业噬菌体制剂,仍需要进一步的探索和研究。本研究在对鼠伤寒沙门菌噬菌体 T139 基因组进行分析的基础上,发掘到一个编码裂解酶中内肽酶的基因序列,采用蛋白质二级结构分析和异源表达纯化,成功验证该内肽酶基因 *orf* 40 的表达产物 LysT40 对沙门菌具有裂解活性,具有潜在的应用前景,可为构建新型抗菌剂提供技术支撑。

参考文献 References

- [1] DUC H M, SON H M, HONJOH K I, et al. Isolation and application of bacteriophages to reduce *Salmonella* contamination in raw chicken meat[J]. LWT-food science and technology, 2018, 91: 353-360.
- [2] ENG S K, PUSPARAJAH P, AB MUTALIB N S, et al. *Salmonella*: a review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance[J]. Frontiers in life science, 2015, 8(3): 284-293.
- [3] LUO Q Y, LI S S, LIU S K, et al. Foodborne illness outbreaks in China, 2000-2014[J]. Int J Clin Exp Med, 2017, 10(3): 5821-5831.
- [4] 黄熙, 黄琼, 石玮, 等. 广州市非伤寒沙门菌感染流行病学负担分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2014, 26(3): 217-222. HUANG X, HUANG Q, SHI W, et al. Epidemiological burden of nontyphoidal *Salmonella* infection in Guangzhou[J]. Chinese journal of food hygiene, 2014, 26(3): 217-222 (in Chinese with English abstract).
- [5] MOHAMMAD Z, KALBASI-ASHTARI A, RISKOWSKI G, et al. Reduction of *Salmonella* and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* on alfalfa seeds and sprouts using an ozone generating system[J]. International journal of food microbiology, 2019, 289: 57-63.
- [6] CAP M, ROJAS D, FERNANDEZ M, et al. Effectiveness of short exposure times to electrolyzed water in reducing *Salmonella* spp and imidacloprid in lettuce[J/OL]. LWT-food science and technology, 2020, 128: 109496 [2021-07-15]. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109496>.
- [7] SCHULTZE D M, COUTO R, TEMELLI F, et al. Lethality of high-pressure carbon dioxide on Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, *Salmonella* and surrogate organisms on beef jerky[J/OL]. International journal of food microbiology, 2020, 321: 108550 [2021-07-15]. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108550>.
- [8] MUKHOPADHYAY S, RAMASWAMY R. Application of e-

- merging technologies to control *Salmonella* in foods; a review [J]. Food research international, 2012, 45(2): 666-677.
- [9] VANDAMME E J, MORTELMANS K. A century of bacteriophage research and applications: impacts on biotechnology, health, ecology and the economy! [J]. Journal of chemical technology & biotechnology, 2019, 94(2): 323-342.
- [10] 谢平林. 噬菌体及其裂解酶防控家畜细菌性疾病的研究进展 [J]. 国外畜牧学(猪与禽), 2020, 40(8): 59-63. XIE P L. Research progress of bacteriophage and its lyase in prevention and control of bacterial diseases in livestock [J]. Animal science abroad (pigs and poultry), 2020, 40(8): 59-63 (in Chinese).
- [11] 杨航, 余军平, 危宏平. 裂解酶治疗的研究进展与应用前景 [J]. 微生物学通报, 2015, 42(1): 178-184. YANG H, YU J P, WEI H P. Research progress in lysis therapy [J]. Microbiology China, 2015, 42(1): 178-184 (in Chinese with English abstract).
- [12] DING Y F, ZHANG Y, HUANG C X, et al. An endolysin Ly-sSE24 by bacteriophage LPSE1 confers specific bactericidal activity against multidrug-resistant *Salmonella* strains [J/OL]. Microorganisms, 2020, 8(5): 737 [2021-07-15]. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8050737>.
- [13] SCHMELCHER M, LOESSNER M J. Bacteriophage endolysins: applications for food safety [J]. Current opinion in biotechnology, 2016, 37: 76-87.
- [14] ROACH D R, DONOVAN D M. Antimicrobial bacteriophage-derived proteins and therapeutic applications [J/OL]. Bacteriophage, 2015, 5(3): e1062590 [2021-07-15]. <https://doi.org/10.1080/21597081.2015.1062590>.
- [15] RODRÍGUEZ-RUBIO L, GERSTMANS H, THORPE S, et al. DUF3380 domain from a *Salmonella* phage endolysin shows potent N-acetylmuramidase activity [J]. Applied and environmental microbiology, 2016, 82(16): 4975-4981.
- [16] DÍEZ-MARTÍNEZ R, DE PAZ H D, GARCÍA-FERNÁNDEZ E, et al. A novel chimeric phage lysis with high *in vitro* and *in vivo* bactericidal activity against *Streptococcus pneumoniae* [J]. Journal of antimicrobial chemotherapy, 2015, 70(6): 1763-1773.
- [17] BLÁZQUEZ B, FRESCO-TABOADA A, IGLESIAS-BEXIGA M, et al. PL3 amidase, a tailor-made lysis constructed by domain shuffling with potent killing activity against pneumococci and related species [J/OL]. Frontiers in microbiology, 2016, 7: 1156 [2021-07-15]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4963390/pdf/fmicb-07-01156>. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01156.
- [18] FERNÁNDEZ-RUIZ I, COUTINHO F H, RODRIGUEZ-VALERA F. Thousands of novel endolysins discovered in uncultured phage genomes [J/OL]. Frontiers in microbiology, 2018, 9: 1033 [2021-07-15]. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01033>.
- [19] LARPIN Y, OECHSLIN F, MOREILLON P, et al. *In vitro* characterization of PlyE146, a novel phage lysis that targets Gram-negative bacteria [J/OL]. PLoS One, 2018, 13(2): e0192507 [2021-07-15]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192507>.
- [20] YAN G M, LIU J F, MA Q, et al. The N-terminal and central domain of colicin A enables phage lysis to lyse *Escherichia coli* extracellularly [J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2017, 110(12): 1627-1635.
- [21] SCHMELCHER M, DONOVAN D M, LOESSNER M J. Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials [J]. Future microbiology, 2012, 7(10): 1147-1171.
- [22] 聂若男, 李晚宁, 杨其乐, 等. 1株裂解性短尾沙门氏菌噬菌体 T139 的生物学特性及其对牛奶和牛肉的抑菌作用 [J]. 食品科学, 2019, 40(18): 130-136. NIE R N, LI W N, YANG Q L, et al. Biological characteristics of a lytic short-tailed *Salmonella* phage T139 and its antibacterial effect in milk and ground beef [J]. Food science, 2019, 40(18): 130-136 (in Chinese with English abstract).
- [23] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南 [M]. 3版. 北京: 科学出版社, 1996: 185-187. SAMBROOK J, FREICH E F, MANNY ATIS T. Molecular cloning: a laboratory manual [M]. 3rd ed. Beijing: Science Press, 1996: 185-187.
- [24] MIKOULINSKAIA G V, ODINOKOVA I V, ZIMIN A A, et al. Identification and characterization of the metal ion-dependent L-alanyl-D-glutamate peptidase encoded by bacteriophage T5 [J]. The FEBS journal, 2009, 276(24): 7329-7342.
- [25] LIM J A, SHIN H, KANG D H, et al. Characterization of endolysin from a *Salmonella typhimurium*-infecting bacteriophage SPN1S [J]. Research in microbiology, 2012, 163(3): 233-241.
- [26] HENDRIX R W. Bacteriophage genomics [J]. Current opinion in microbiology, 2003, 6(5): 506-511.
- [27] JOSHI H, JAIN V. Novel method to rapidly and efficiently lyse *Escherichia coli* for the isolation of recombinant protein [J]. Analytical biochemistry, 2017, 528: 1-6.
- [28] DREHER T W. Viral tRNAs and tRNA-like structures [J]. Wiley interdisciplinary reviews: RNA, 2010, 1(3): 402-414.
- [29] BAILLY-BECHET M, VERGASSOLA M, ROCHA E. Causes for the intriguing presence of tRNAs in phages [J]. Genome research, 2007, 17(10): 1486-1495.
- [30] ADRIAENSSENS E M, RODNEY BRISTER J. How to name and classify your phage: an informal guide [J/OL]. Viruses, 2017, 9(4): 70 [2021-07-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28368359/>. DOI: 10.3390/v9040070.
- [31] GUO T T, ZHANG C C, LIU W, et al. Functional analysis of the N-terminal region of endolysin Lyb5 encoded by *Lactobacillus fermentum* bacteriophage ϕ PYB5 [J]. International journal of food microbiology, 2015, 203: 1-7.
- [32] LI M, LI M Z, LIN H, et al. Characterization of the novel T4-like *Salmonella enterica* bacteriophage STP4-a and its endolysin [J]. Archives of virology, 2016, 161(2): 377-384.
- [33] HENRY M, BEGLEY M, NEVE H, et al. Cloning and expression of a mureinolytic enzyme from the mycobacteriophage

- TM4[J].FEMS microbiology letters,2010,311(2):126-132.
- [34] 李萌.宽裂解谱沙门氏菌噬菌体的基因组学分析及其重组内溶素抑菌活性研究[D].青岛:中国海洋大学,2014.LI M.Genomic analysis of broad-host-range *Salmonella* bacteriophage and lytic activity of the recombinant phage-encoded endolysin[D].Qingdao:Ocean University of China,2014 (in Chinese with English abstract).
- [35] ZHANG H M,BUTTARO B A,FOUTS D E,et al.Bacteriophage ϕ Ef11 ORF28 endolysin,a multifunctional lytic enzyme with properties distinct from all other identified *Enterococcus faecalis* phage endolysins[J/OL].Applied and environmental microbiology,2019,85(13):e00555-19[2021-07-15].https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30979842/. DOI: 10.1128/aem.00555-19.
- [36] CHA Y,SON B,RYU S.Effective removal of staphylococcal biofilms on various food contact surfaces by *Staphylococcus aureus* phage endolysin LysCSA13[J/OL].Food microbiology,2019,84:103245[2021-07-15].https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103245.
- [37] GUO M Q,FENG C Y,REN J,et al.A novel antimicrobial endolysin, LysPA26, against *Pseudomonas aeruginosa* [J/OL].Frontiers in microbiology,2017,8:293[2021-07-15].https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00293.
- [38] YANG Q L,DING Y F,NIE R N,et al.Characterization of a novel T7-like *Salmonella* Typhimurium (ATCC13311) bacteriophage LPST144 and its endolysin[J/OL].LWT-food science and technology,2020,123:109034[2021-07-15].https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109034.

Genome analysis of *Salmonella* phage T139 and heterologous expression, activity characterization of its endolysin LysT40

DING Yifeng, NIE Ruonan, ZHU Wenjuan, WANG Ji, WANG Jia, WANG Xiaohong

College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract In order to develop phage endolysin as a novel antibacterial agent for the prevention and control of *Salmonella*, the endolysin of *Salmonella* Typhimurium phage T139 was obtained by bioinformatics and heterologous expression of protein. The lytic activity of endolysin against *Salmonella* Typhimurium was verified. The genome of *Salmonella* Typhimurium phage T139 was analyzed and found to be 38 854 bp long, with an average GC content of 49.10% and no tRNA gene. The results of evolutionary tree analysis showed that phage T139 is belonged to the genus T7 phage with 43 ORFs predicted in total, 23 ORFs being assigned known functions. The results of multiple sequence alignment and conserved structural domain analysis showed that the protein encoded by the *orf* 40 gene (LysT40) containing 126 amino acid residues with a conserved structural domain of phage endopeptidase, making it a possible phage endolysin. The presence of a large number of helical structures (70.63%) in the secondary structure of LysT40 allows the protein to maintain the stable structure. The endopeptidase gene *orf* 40 was heterologously expressed, purified and analyzed by SDS-PAGE and Western blot to obtain a single target protein band at 10-15 ku at a purified protein concentration of 280 μ g/mL. LysT40 had significantly lytic activity against chloroform or EDTA pretreated *Salmonella* Typhimurium within 30 min, with absorbance values OD₆₀₀ decreasing by 0.18 and 0.31 compared to the control. It will provide a basis for developing phage endolysin as antimicrobial agents to control *Salmonella* Typhimurium.

Keywords *Salmonella* Typhimurium; genome analysis; phage endolysin; expression and purification; lytic activity; food-derived pathogenic bacteria; antibacterial drug alternatives

(责任编辑:赵琳琳)