

徐海, 鲍熹, 董洪燕, 等. T7 噬菌体穿孔素的克隆表达及对宿主损伤研究[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(24): 45–49.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.24.008

# T7 噬菌体穿孔素的克隆表达及对宿主损伤研究

徐海<sup>1</sup>, 鲍熹<sup>2</sup>, 董洪燕<sup>1</sup>, 郭长明<sup>1</sup>, 邓碧华<sup>2</sup>, 卢宇<sup>2</sup>, 朱善元<sup>1</sup>

(1. 江苏农牧科技职业学院/江苏省兽用生物制药高新技术研究重点实验室, 江苏泰州 225300;

2. 江苏省农业科学院动物免疫工程研究所, 江苏南京 210014)

**摘要:**为研究 T7 噬菌体穿孔素 (Holin) 蛋白对宿主细菌的增殖性能的影响, 根据 T7 噬菌体 gene 17.5 设计引物, PCR 扩增 *Holin* 基因和序列分析, 将该基因插入原核表达载体构建重组表达菌 BL-Holin。IPTG 诱导 Holin 蛋白表达, SDS-PAGE 和 Western-blot 检测目标蛋白。分光光度法测定 Holin 蛋白对宿主细菌增殖性能的影响, 扫描电镜观察重组菌诱导后表面结构的损伤情况。结果表明, 成功扩增 *Holin* 基因, 构建的重组菌能高效表达 Holin 蛋白。T7 噬菌体 Holin 蛋白含有 1 个跨膜区, 氨基端位于胞外, 羧基端位于胞内。Holin 蛋白的表达量随诱导时间延长而逐渐增加, 细菌浓度从诱导 0 h 至 2 h 逐渐升高, 2 h 后细菌浓度开始下降, 直至 6 h, 电镜观察发现诱导细菌表面塌陷、皱缩进而死亡。研究结果显示, Holin 蛋白具有抑菌活性, 这为进一步开发噬菌体抗菌制剂提供应用基础和技术支持。

**关键词:**穿孔素; 表达; 宿主损伤; T7 噬菌体

**中图分类号:** S188 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)24-0045-04

噬菌体是分子生物学起源与发展的模式生物, 在发现之初就被用于细菌感染性疾病的治疗, 随着人类进入抗生素时代使得噬菌体逐渐淡出人们的视野。近年来, 细菌的耐药性已然成为全球范围内的公共健康问题, 每年有近百万因耐药菌感染引起的死亡病例, 面对这一严峻问题, 人们开始寻找新的抗菌产品, 这其中噬菌体作为细菌的天然杀手再次受到研究人员的关注<sup>[1-2]</sup>。然而, 利用噬菌体防控细菌感染也面临一个棘手问题, 噬菌体宿主识别谱窄, 一种噬菌体往往只侵染一种或一类细菌, 这限制了噬菌体在抗菌领域推广与应用<sup>[3]</sup>。烈性噬菌体裂解系统中的溶菌酶、穿孔素等蛋白作用于细菌的细胞壁、细胞膜, 引起细菌裂解, 效率高且不受宿主谱的限制, 对细菌具有广谱的裂解活性, 已成为开发新型抗菌制剂的热点之一<sup>[4-6]</sup>。

烈性噬菌体裂解宿主细菌的过程有着紧密的调控、遵循着严格的时间顺序<sup>[7-9]</sup>。溶菌酶-穿孔素二元裂解模型的提出对这一过程给予系统的解析。穿孔素是控制裂解时间的小分子量疏水性跨

膜蛋白, 在特定时间以寡聚体形式聚集于细胞内膜上并形成稳定的跨膜孔道, 是噬菌体启动裂解步骤的“定时器”<sup>[10-12]</sup>。溶菌酶是一种胞质水解酶, 随着孔道的打开, 溶菌酶被释放到胞外, 对肽聚糖层进行高效的切割<sup>[13-14]</sup>。近年来发现的 Spanin 蛋白对二元裂解模型做了进一步完善, 该蛋白定位在细菌外膜, 通过构象变化破坏细菌外膜结构<sup>[15-16]</sup>。在溶菌酶、穿孔素和 Spanin 的共同作用下, 被侵染细菌彻底崩解。因此, 研究上述 3 种蛋白与宿主细菌的作用关系, 探明各自对宿主的损伤机制, 才能更科学地加以利用。

T7 噬菌体是侵染大肠杆菌的小型烈性噬菌体, 具有良好的生长性能, 侵染宿主细菌 1~2 h 即能完全裂解。对 T7 噬菌体的生物学背景已有相对全面的研究, 其全部基因序列已经测定, 是噬菌体研究的理想模型。本研究通过原核系统表达 T7 噬菌体穿孔素蛋白, 分析其结构特征, 揭示该蛋白对宿主的损伤作用, 并测定其抑菌活性, 以期新型抗菌制剂的开发提供有益探索。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

质粒、菌株与噬菌体: 质粒 pET-28a(+) 为笔者所在实验室保存。大肠杆菌 BL21-DE3、T7 select 415-1b 噬菌体购自 Merck 公司。

收稿日期: 2020-04-14

基金项目: 江苏农牧科技职业学院院级课题 (编号: NSF201902)。

作者简介: 徐海 (1982—), 男, 江苏扬州人, 副研究员, 主要从事兽用生物制品研发工作。E-mail: hai\_x@126.com。

通信作者: 朱善元, 博士, 教授, 主要从事水禽疫病研究。E-mail: jstzsy@126.com。

主要试剂:限制性内切酶、*Taq* DNA 聚合酶、*T<sub>4</sub>* DNA 连接酶、反转录酶为大连宝生物公司产品;HRP 标记抗 His 标签二抗购自 Abcom 公司;引物由金斯瑞生物公司合成,引物序列为:Holin - F:5' - ATACCATGGGCGTGTCTATCATTAGACT - 3',Holin - R:5' - AGACTCGAGTCACTCCTTATTGGCT - 3',引入中下划线分别表示限制酶切位点(*Nco* I 和 *Bam*H I);其余试剂均为分析纯。

### 1.2 Holin 基因分析

将 *Holin* 基因翻译成对应蛋白序列,利用在线分析工具 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM> - 2.0) 对其进行跨膜区预测;在 Pfam 数据库 (<http://pfam.xfam.org>) 进行比对,分析 *Holin* 蛋白所属的家族;Protparam 工具 (<https://web.expasy.org/protparam>) 分析蛋白的理化性质;SOPMA 工具 ([https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_sopma.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)) 对蛋白质二级结构进行分析。

### 1.3 重组菌构建

以 T7 select415 - 1b 噬菌体基因组为模板,PCR 扩增 *Holin* 基因。根据预设的酶切位点将基因片段插入原核表达载体 pET - 28a(+),构建重组表达质粒 pET - *Holin*,*Nco* I 和 *Bam*H I 双酶切鉴定及测序分析。将序列正确的重组表达质粒化学转化导入大肠杆菌 BL21 - DE3 感受态细胞,筛选表达 *Holin* 蛋白的重组菌 BL - *Holin*。

### 1.4 Holin 蛋白诱导表达与鉴定

挑取单菌落 BL - *Holin* 接入含有 1  $\mu\text{g/mL}$  卡那霉素的 LB 培养基中,37  $^{\circ}\text{C}$  摇床过夜培养。取 50  $\mu\text{L}$  过夜培养菌液至 5 mL 新鲜卡那霉素抗性 LB 培养基中,37  $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 摇床培养 2 h,加入工作浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 进行诱导。同时,设 BL21 和 BL - *Holin* 未诱导对照。从诱导起始点开始,每隔 2 h 取样,经 12% SDS - PAGE 检测蛋白表达情况。转印蛋白至 NC 膜,用 HRP 标记的羊抗 His tag 二抗鉴定 *Holin* 蛋白。

### 1.5 Holin 蛋白表达对宿主菌增殖的影响

以 1 : 100 比例转接过夜培养的 BL21、BL - *Holin* 至新鲜培养基,在对数生长前期往重组菌 BL - *Holin* 中加入工作浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 进行诱导,同时设 BL21 和未诱导对照组,于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/s 摇床持续培养。从转接起始点开始每隔 1 h 取 200  $\mu\text{L}$  培养液测定  $D_{600\text{nm}}$ ,绘制 3 组细菌的生长

曲线。

### 1.6 Holin 蛋白表达对宿主菌表面结构的影响

以 1 : 100 比例转接过夜培养的 BL - *Holin* 重组菌,在对数生长前期加入 IPTG 进行诱导,持续诱导 3 h,同时设未诱导对照。5 000 r/min,10 min 收集重组菌,PBS 重悬洗涤 1 次,再次离心后收集沉淀,采用 4% 多聚甲醛固定。样品送至扬州大学检测中心,扫描电镜观察细菌表面结构。

## 2 结果

### 2.1 Holin 蛋白序列分析

利用多种生物学软件对 T7 噬菌体 *Holin* 蛋白进行分析:Protparam 工具显示 T7 噬菌体 *Holin* 蛋白由 67 个氨基酸组成,相对分子质量为 7 359,稳定系数为 7.71,总平均亲水性为 0.464,为稳定、疏水性蛋白质。Pfam 数据库比对结果表面 T7 噬菌体 *Holin* 蛋白属于 Phage\_holin\_2\_2 家族(PF10746)。TMHMM 软件分析表明其氨基酸端 1 ~ 36 aa 位于胞外区,37 ~ 55 aa 为跨膜区,56 ~ 67 aa 的羧基端为胞内区。SOPMA 工具显示,*holin* 蛋白。 $\alpha$  - 螺旋、 $\beta$  - 折叠、 $\beta$  - 转角、延长链、和无规则卷曲分别占氨基酸总数的 56.72%、0.00%、7.46%、10.45% 和 25.37% (图 1)。

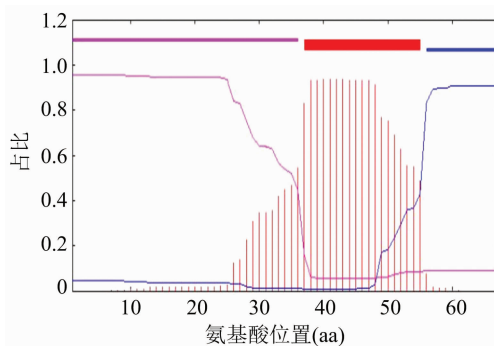


图1 T7 噬菌体 *Holin* 蛋白跨膜区预测

### 2.2 Holin 基因的克隆及重组质粒构建

由图 2 - A 和 2 - B 可知,以 T7 噬菌体基因为模板,PCR 扩增出约 250 bp 的 *Holin* 基因,测序结果表明获得基因片段序列正确。将该基因片段插入 pET - 28a(+) 载体,成功构建重组表达质粒载体 pET - *Holin*,*Nco* I 和 *Bam*H I 双酶切鉴定正确。

### 2.3 Holin 蛋白诱导表达及鉴定

由图 3 - A 可知,对数生长前期的重组菌 BL - *Holin* 经 IPTG 诱导后细菌浓度并未迅速上升,相反随着诱导时间的延长,重组菌出现裂解现象,培养

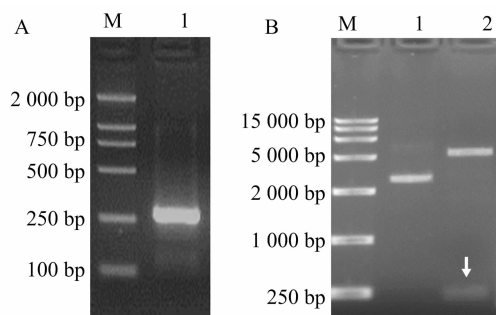


图 A 表示 *Holin* 基因 PCR 扩增; 其中, M—DL 2000 Marker; 1—*Holin* 基因。B 图表示重组表达载体酶切鉴定; 其中, M—DL 15000 Marker; 1—pET-*Holin* 质粒; 2—pET-*Holin* 质粒双酶切鉴定

图2 *Holin* 基因扩增及重组表达载体构建

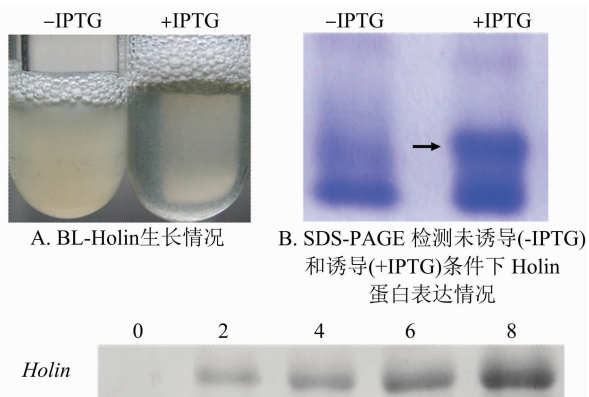
液变清亮且泡沫增多。由图 3 - B 可知, SDS - PAGE 检测诱导菌有蛋白表达。由图 3 - C 可知, 利用 *Holin* 蛋白羧基端融合表达的 His 标签进行 Western - blot 检测, 进一步确定诱导产生 *Holin* 蛋白, 并且随着诱导时间的延长 *Holin* 蛋白的累积量逐渐增加。

#### 2.4 *Holin* 蛋白的表达对宿主细菌增殖的影响

IPTG 诱导重组大肠杆菌 BL - *Holin* 表达 *Holin* 蛋白, 通过对重组表达菌不同时间点的浊度测定来评价 *Holin* 蛋白对宿主细菌增殖能力的影响, 由图 4 可知, BL - *Holin* 转接后 2 h 开始诱导, 细菌浊度缓慢上升至 4 h, 然后浊度逐渐下降, 6 ~ 8 h 浊度维持在较低水平, 8 h 后浊度开始缓慢上升。而未经诱导的 BL - *Holin* 表现出与 BL21 相似的增殖性能, 表明 *Holin* 蛋白的表达抑制宿主的正常增殖。

#### 2.5 *Holin* 蛋白对宿主细菌表面结构的损伤

通过扫描电镜观察经 IPTG 诱导和未诱导的



C. Western-blot 检测重组菌诱导 0、2、4、6、8 h 后 *Holin* 蛋白表达情况

图3 *Holin* 蛋白诱导表达及鉴定

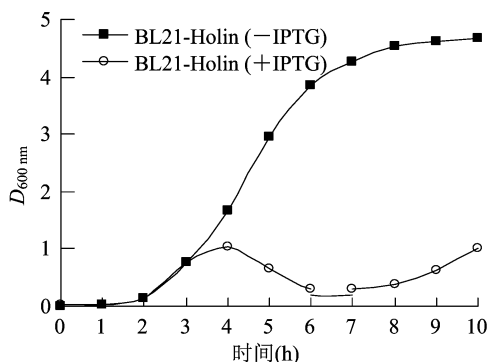
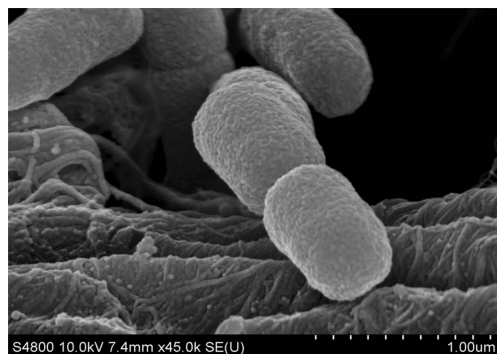
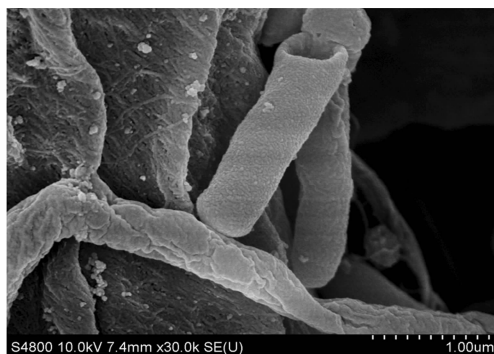


图4 BL-*Holin* 生长性能测定

BL - *Holin* 重组菌表面结构变化, 评价 *Holin* 蛋白对宿主的损伤情况。由图 5 - B 可知, 诱导表达 *Holin* 蛋白的重组菌表面塌陷, 菌体皱缩, 而未经诱导的重组菌保持完整的表面结构(图 5 - A)。由此可知, 重组菌表达 *Holin* 蛋白后造成胞膜的损伤, 其结构完整性被破坏致使内容物释放到胞外, 引起菌体死亡。



A. 未经诱导的 BL-*Holin*



B. 诱导表达 *Holin* 的 BL-*Holin*

图5 *Holin* 蛋白对宿主细菌表面损伤作用

### 3 讨论

上世纪 40 年代开始, 噬菌体研究进入早期的黄

金时代, 以  $\lambda$  噬菌体和 T4 噬菌体作为模式生物的相关研究为现代分子生物学的建立作出了卓越贡献。Young 于 1992 年首次提出了著名的穿孔素 -

溶菌酶二元裂解系统理论,清晰地阐明了 $\lambda$ 噬菌体裂解宿主的过程<sup>[17]</sup>。当然,这一理论将肽聚糖层的破坏作为裂解宿主菌的主要标志,却忽视了细菌外膜对裂解过程的阻碍。近年来,第三类裂解相关蛋白 Spanin 的发现进一步完善了该理论,至此 $\lambda$ 噬菌体裂解宿主的过程可分为 3 个步骤:Holin 蛋白在细菌内膜打孔,释放胞内溶菌酶切割肽聚糖层,Spanin 通过构象变化撕裂细菌外膜,最终导致细菌的彻底崩解。参与这一过程的穿孔素、溶菌酶和 Spanin 均能造成细菌表面结构的损伤,因此被视为开发新型抗菌制剂的候选物质而备受关注。

T7 噬菌体裂解系统研究报道较少,现已明确溶菌酶(gene3.5)、穿孔素(gene17.5)以及可能发挥 Spanin 功能的 gene18.5/18.7 构成了 T7 噬菌体裂解系统<sup>[15,18]</sup>。本研究对 T7 噬菌体 Holin 蛋白进行序列分析,发现该蛋白分子仅有 1 个跨膜区,属于 Phage\_holin\_2\_2 家族(PF10746),氨基酸端位于胞外,羧基端位于胞内,这与报道的 T4、T5 噬菌体的 Holin 蛋白拓扑结构相同。为了不影响 T7 噬菌体 Holin 蛋白的跨膜转运,选择位于胞内的羧基端融合表达 His 标签用于 Western-blot 检测。结合图 3-C 和图 4,重组菌诱导后 2 h 内 Holin 蛋白处于积累阶段,此时细菌浓度缓慢上升,当 Holin 蛋白量积累到一定阈值后造成细菌膜结构损伤,此时细菌浓度逐渐下降并维持在较低水平。继续诱导后期至 8 h,此时 Holin 蛋白积累量仍然增加,而细菌浓度也逐步增加,对于这一现象尚需要进一步研究分析。由图 5 可见,Holin 蛋白在细菌内膜聚集并形成孔道,由于缺少溶菌酶的释放,并不会对胞外结构造成直接破坏,但此时胞内可溶性蛋白、电解质等可通过孔道流失,菌体呈现塌陷、皱缩状态,最终死亡。

作为噬菌体裂解系统,穿孔素、溶菌酶无论单独使用还是联合使用,均能起到有效抑制细菌增殖的作用<sup>[19]</sup>。穿孔素还可以作为转运载体,辅助药物、核酸、蛋白质进入菌体内部,进一步提高抗菌效率<sup>[20-21]</sup>。此外,噬菌体在入侵宿主时需要在菌体表面开孔注入核酸物质,例如 T7 噬菌体的 gp16 能够水解细胞壁启动感染,这类蛋白也可以用作抗菌制剂的开发<sup>[22]</sup>。本研究对 T7 噬菌体的穿孔素进行原核表达,分析该蛋白的结构、评价其抑菌活性,并初步解析其损伤细菌膜结构的机制,这可为进一步研究穿孔素的抑菌机制以及开发利用穿孔素的抗菌活性做出有益的探索。

## 参考文献:

- [1] Abedon S T. Use of phage therapy to treat long-standing, persistent, or chronic bacterial infections [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2019, 145: 18-39.
- [2] Gorski A, Miedzybrodzki R, Wegrzyn G, et al. Phage therapy: current status and perspectives [J]. *Medicinal Research Reviews*, 2020, 40: 459-63.
- [3] Hyman P. Phages for phage therapy: isolation, characterization, and host range breadth [J]. *Pharmaceuticals*, 2019, 12(1): 35.
- [4] Baase W, Liu L, Tronrud D E, et al. Lessons from the lysozyme of phage T4 [J]. *Protein Science*, 2010, 19(4): 631-641.
- [5] Junn H J, Youn J, Suh K H, et al. Cloning and expression of *Klebsiella* phage K11 lysozyme gene [J]. *Protein Expression and Purification*, 2005, 42: 78-84.
- [6] Yang D, 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.
- [7] Cahill J, Young R. Phage lysis: multiple genes for multiple barriers [J]. *Advances in Virus Research*, 2019, 103: 33-70.
- [8] Young R. Phage lysis: three steps, three choices, one outcome [J]. *Journal of Microbiology*, 2014, 52(3): 243-258.
- [9] Young R. Phage lysis: do we have the hole story yet [J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2013, 16: 790-7.
- [10] Mehner-Breitfeld D, Rathmann C, Riedel T, et al. Evidence for an adaptation of a phage-derived holin/endolysin system to toxin transport in *Clostridioides difficile* [J]. *Frontier in Microbiology*, 2018, 9: 2446.
- [11] Fernandes S, Sao-Jose C. More than a hole: the holin lethal function may be required to fully sensitize bacteria to the lytic action of canonical endolysins [J]. *Molecular Microbiology*, 2016, 102(1): 92-106.
- [12] White R, Chiba S, Pang T, et al. Holin triggering in real time [C]// *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108: 798-803.
- [13] Proen<sup>?</sup> a D, Fernandes S, Leandro C, et al. Phage endolysins with broad antimicrobial activity against *Enterococcus faecalis* clinical strains [J]. *Microbial Drug Resistance*, 2012, 18(3): 322-332.
- [14] Matamp N, Bhat S G. Phage endolysins as potential antimicrobials against multidrug resistant *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus*: current status of research and challenges ahead [Z]. 2019.
- [15] Berry J, Rajaure M, Pang T, et al. The spanin complex is essential for lambda lysis [J]. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(20): 5667-5674.
- [16] Berry J, Savva C, Holzenburg A, et al. The lambda spanin components Rz and RzI undergo tertiary and quaternary rearrangements upon complex formation [J]. *Protein Science*, 2010, 19(10): 1967-1977.
- [17] Young R. Bacteriophage lysis: mechanism and regulation [J]. *Microbiological Reviews*, 1992, 56(3): 430-481.

胡珊珊,陈开莉,陈红贤,等.黑水虻抗菌肽的克隆及其生物信息学分析[J].江苏农业科学,2020,48(24):49-52.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.24.009

# 黑水虻抗菌肽的克隆及其生物信息学分析

胡珊珊,陈开莉,陈红贤,邬开鑫,尤忠毓

(嘉兴学院生物与化学工程学院,浙江嘉兴 314001)

**摘要:**为了开发新型昆虫抗菌肽资源,以黑水虻幼虫为研究对象,采用 RT-PCR 技术从黑水虻幼虫总 RNA 中扩增到一个新型抗菌肽基因 DLP-5,并利用在线生物软件和工具分析了抗菌肽 DLP-5 的生物信息学特征。结果表明,DLP-5 由 40 个氨基酸残基组成,分子量为 4 226.83 u,等电点为 7.87,具有两性特征,其中 N 端为疏水性,C 端为亲水性,具有 3 个磷酸化位点,无糖基化位点、信号肽序列和跨膜区。DLP-5 的三级结构包含 1 个 N 端的 loop 区、1 个  $\alpha$  螺旋和 1 对反向平行  $\beta$  折叠,构成了防御素类抗菌肽典型的“环-螺旋-折叠”结构,说明 DLP-5 是一个新型的防御素类抗菌肽,可通过与微生物膜相互作用发挥其抗菌活性。

**关键词:**昆虫抗菌肽;黑水虻;基因克隆;生物信息学

**中图分类号:** S188 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)24-0049-04

昆虫抗菌肽是昆虫受到刺激或感染后由体内血淋巴产生的一类小分子碱性多肽,经体内和体外的抗菌活性研究发现,它具有广谱抗菌活性、分子量小、容易合成、不易形成耐药性等特性,可作为传统抗生素的潜在替代抗菌制剂<sup>[1-2]</sup>。黑水虻(*Hermitia illucens* L.)是双翅目水虻科扁角水虻属的一种资源昆虫,其幼虫以动物粪便、腐烂的有机物及植物性垃圾为食,在禽畜粪便及餐厨垃圾的无害化处理中应用前景广阔<sup>[3]</sup>。夏婧等利用大肠杆菌和金黄色葡萄球菌诱导黑水虻幼虫产生抗菌肽,该抗菌肽可以有效抑制大肠杆菌的生长,稳定性研

究发现,黑水虻抗菌肽具有很好的热稳定性、反复冻融性<sup>[4-5]</sup>。Park 等利用 cDNA 末端快速扩增技术从黑水虻幼虫的 cDNA 中成功克隆了抗菌肽编码基因 DLP1-DLP4<sup>[6]</sup>;Li 等在毕赤酵母中重组表达了黑水虻抗菌肽 DLP2 和 DLP4,活性研究表明 DLP2 和 DLP4 具有较强的抗菌性能,特别是对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌具有快速的杀灭活性,其最小杀菌浓度(MIC)为 0.01  $\mu\text{mol/L}$ <sup>[7]</sup>。Elhag 等从黑水虻幼虫的 cDNA 中筛选到了 7 种抗菌肽基因 [*cecropinZ1*、*sarcotoxin1*、*sarcotoxin* (2a)、*sarcotoxin* (2b)、*sarcotoxin3*、*stomoxynZHI* 和 *stomoxynZHI* (a)],并利用大肠杆菌表达系统成功表达了 *stomoxynZHI*,活性研究表明,重组 *stomoxynZHI* 对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)、核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)均具有较高的抗菌活性<sup>[8]</sup>。由此可见,黑水虻及其幼虫体内含有丰富的内源性抗菌肽,本试验旨在克隆新型黑水虻抗菌

收稿日期:2020-04-29

基金项目:浙江省嘉兴市科技计划(编号:2017AY33087);嘉兴学院大学生科研训练计划(编号:8517193164)。

作者简介:胡珊珊(1999—),女,浙江绍兴人,主要从事天然产物开发研究。E-mail:1443767113@qq.com。

通信作者:尤忠毓,博士,副教授,主要从事天然产物开发研究。E-mail:elmer0718@163.com。

[18] Summer E J, Berry J, Tran T, et al. Rz/RzI lysis gene equivalents in phages of Gram-negative hosts [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2007, 373(5): 1098-1112.

[19] Lu N, Sun Y, Wang Q Q, et al. Cloning and characterization of endolysin and holin from *Streptomyces avermitilis* bacteriophage phiSASD1 as potential novel antibiotic candidates [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 147: 980-989.

[20] Saier M H Jr, Reddy B L. Holins in bacteria, eukaryotes, and archaea: multifunctional xenologues with potential biotechnological

and biomedical applications [J]. *Journal of Bacteriology*, 2015; 197: 7-17.

[21] Park S Y, Jy L, Chang W S, et al. A coupling process for improving purity of bacterial minicells by holin/lysin [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2011, 86(1): 108-110.

[22] Heineman R H, Molineux I J, Bull J J. Evolutionary robustness of an optimal phenotype: re-evolution of lysis in a bacteriophage deleted for its lysis gene [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 2005, 61(2): 181-191.