论著

文章编号:1000-5404(2007)11-1060-03

重组溶葡萄球菌蛋白的原核表达、纯化及生物学活性研究

吴 燕,伍素华,罗向东,苏踊跃,陈晓玲,陈 渝 (第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 原核表达重组溶葡萄球菌蛋白并检测其杀菌效力。**方法** 在成熟溶葡萄球菌蛋白编码序列的基础上,设计重组序列,采用PCR技术扩增,克隆至大肠埃希菌表达载体,IPTG诱导表达,用微量稀释法研究其对金黄色葡萄球菌(简称金葡菌)的杀菌效果。**结果** 目的DNA片段克隆至表达载体后经测序鉴定正确,在大肠埃希菌中获得高效表达,经免疫印迹鉴定重组蛋白表达正确。重组溶葡萄球菌蛋白对金葡菌的最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)和最小杀菌浓度(minimum bactericidal concentration, MBC)均小于传统抗生素。**结论** 成功表达重组溶葡萄球菌蛋白,其对金葡菌有强大的杀菌效力。

关键词: 溶葡萄球菌蛋白;原核表达;金黄色葡萄球菌;生物活性

中图法分类号: R341; R378.11; R394.3 **文献标识码:** A

Prokaryotic expression, purification of recombinant lysostaphic protein and an initial study on its biological activities

WU Yan, WU Su-hua, LUO Xiang-dong, SU Yong-yue, CHEN Xiao-lin, CHEN Yu (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To express lysostaphic protein in *Escherichia coli* (*E. coli.*) and evaluate its biological activities. **Methods** The coding sequence of mature protein obtained by PCR was cloned into the prokaryotic expression plasmid. The target protein was expressed in *E. coli.* induced by IPTG. The bacteriocidal activities of purified protein were evaluated *in vitro* by microdilution method. **Results** The recombinant plasmid was identified by DNA sequencing. The protein was successfully expressed in *E. coli.* and verified by Western blotting. The MIC and MBC of the protein to *staphylococcus aureus* were smaller than the traditional antibiotics. **Conclusion** We have successfully expressed competent lysostaphic protein in prokaryotic expression system, which has a powerful bactericidal ability against *staphylococcus aureus*.

Key words: lysostaphic protein; prokaryotic expression; *staphylococcus aureus*; biological activities

金黄色葡萄球菌(简称金葡菌)是社区和医院感染的主要病原菌,目前糖肽类抗生素是治疗金葡菌感染最有效的药物,但在全球范围内已报道多例对万古霉素耐药的感染病例[1-3]。针对金葡菌日益增强的耐药性,如何开发更有效的药物治疗金葡菌感染,同时能防止耐药性的产生是临床上亟待解决的难题。溶葡萄球菌酶(lysostaphin)的发现给耐药金葡菌感染的治疗带来了希望。它是由模仿葡萄球菌(*staphylococcus simulans*)分泌的一种金属蛋白酶,具有水解葡萄球菌细胞壁肽聚糖五肽桥联的催化活性,对金葡菌有强大的溶菌作用[4]。但由于天然的溶葡萄球菌酶产量少,难以纯化,使人们难以对溶葡萄球菌酶在人体内应用的安全性、有效性和稳定性进行深入的研究,这极大地限制了溶葡萄球菌酶的开发和应用。因此,我们在溶葡萄球菌酶的基础上经过基因重组改良,精简优化了蛋白结构,构建了重组质粒,在大肠埃希菌中诱导表达重组溶葡萄球菌蛋白,为进一步研究溶葡萄球菌蛋白的空间结构和生物学特性奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料和试剂

溶葡萄球菌蛋白原始DNA序列从pRG系列质粒获得,T_4 DNA连接酶、T_4 DNA聚合酶、限制性核酸内切酶*Nde* Ⅰ和*Xho* Ⅰ和电泳中所用标准购自TIANWEI公司。表达载体pET42a(+)、His标签单克隆抗体和蛋白纯化试剂盒购自Novagen公司。凝胶成像分析系统和酶标仪均购自美国Bio-Rad公司。菌株由本所微生物室惠赠。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 以pRG重组质粒为模板,通过PCR选择

作者简介: 吴 燕(1971-),女,四川省岳池县人,硕士研究生,主管护师,主要从事医院感染方面的研究,现在西南医院全军眼科中心。电话:13808327732, E-mail: hwuy2001@sina.com

通讯作者: 罗向东,伍素华, 电话:(023)68754316, E-mail: luoxd@mail.tmmu.com.cn

收稿日期: 2007-01-22; **修回日期:** 2007-03-14

性地扩增溶葡萄球菌蛋白基因。在基因序列的 5′端和 3′端分别引入限制性核酸内切酶位点 *Nde* Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ。上游引物为:5′-GCACTCATATGGCTGCAACACATGAACAT-3′,(下划线处为 *Nde* Ⅰ 酶切位点)。下游引物为:5′-ACGAGCTCGAGCTTTAT-AGTTCCCCAAAG-3′(下划线处为 *Xho* Ⅰ 酶切位点)。委托上海 Invitrogen 生物技术有限公司合成。

1.2.2　基因扩增　　PCR 反应体系由 50 μl 反应体系组成:模板 DNA 1 μl、上下游引物各 1 μl(15 pmol),25 mmol/L dNTP's mix 4 μl, 10 × Pfu buffer 5 μl, Pfu 酶 1 μl, ddH_2O 37 μl。反应条件为:94 ℃预变性 3 min,然后 94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 2 min,30 个循环,72 ℃延伸 5 min。反应结束后,电泳检测并回收。

1.2.3　重组表达质粒的构建　　将回收产物和 pET42a(+)分别用 *Nde* Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ 双酶切, T_4 DNA 连接酶进行连接,转化大肠埃希菌 DH5α,挑取阳性克隆经 PCR 和酶切初步鉴定正确后,送上海生工公司测序,测序正确的重组质粒命名为 pET42lys。

1.2.4　重组质粒在宿主菌 BL21(DE3)PlysS 中的表达　　将鉴定无误的 pET42lys 阳性菌落和 pET42a(+)单菌落接种于 5 ml 卡那抗性 LB 培养基(50 μg/ml),37 ℃振摇过夜,按 1∶100 比例转接至 1 L 新鲜卡那抗性培养基,37 ℃振荡培养至 *D*(600)值约 0.6 ~ 0.8,加入诱导剂 IPTG 至终浓度为 1.0 mmol/L,25 ℃继续振摇 6 h 后收集菌液。

1.2.5　重组蛋白表达形式的鉴定和纯化　　采用固定化金属离子亲和层析(IMAC)的方法纯化蛋白。将诱导后的 1 L 菌液离心后去上清,加入蛋白抽提试剂和核酸酶,裂解细菌,4 ℃离心 20 min,分装上清(可溶组分)和沉淀(不溶组分)。分别在细菌裂解液中加入 Ni-NTA His. Bind 树脂悬液,轻柔混匀后分别装入到空色谱柱中,漂洗杂蛋白,洗脱目的蛋白。将纯化后的蛋白分别进行 SDS-PAGE 电泳。

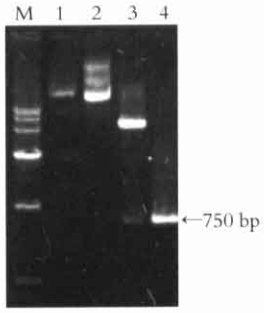
1.2.6　重组蛋白的 Western blot 鉴定　　重组蛋白经 12% SDS-PAGE 电泳后,半干法(1 mA/cm^2,60 min)电转移至 NC 膜,5% 脱脂奶粉封闭,加入抗 His 标签单克隆抗体(1∶2 000 稀释),4 ℃过夜,1‰ TBST 洗膜,加入 HRP 标记羊抗鼠 IgG(1∶2 000 稀释),室温下孵育 1 h,1‰ TBST 洗膜,化学发光试剂检测。

1.2.7　重组蛋白体外抗菌活性的研究　　采用微量稀释法[5]在 96 孔培养板(COSTAR)进行,测定重组蛋白和新青霉素Ⅱ、万古霉素、克林霉素对 1 株金葡菌标准菌株(ATCC 25923)和 2 株临床分离株(金葡菌$^{2\#}$和 MRSA$^{5\#}$)的 MIC 和 MBC。检测菌过夜培养后用 MH 肉汤稀释至 5 × 10^5 cfu/ml。取系列稀释的重组蛋白和其他 3 种抗生素各 10 μl,分别加入 90 μl 稀释好的待测菌;设 MH 肉汤为空白对照孔调零,稀释的待测菌为阴性对照孔,各孔混匀后置 37 °C 温箱培养 24 h 后观察结果。采用酶标仪测定各测试孔吸光度值[*D*(490)]。

2　结果

2.1　重组质粒 pET42lys 转化结果鉴定

重组质粒 pET42lys 经双酶切后,可见大小约 750 bp 的目的片段,经测序证实结果正确,表明原核表达载体构建成功,见图 1。

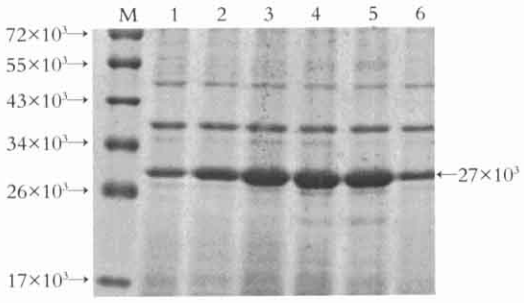


M: DNA 标准(D15000); 1: 质粒对照; 2: 阳性重组质粒; 3:阳性重组质粒经 *Nde* Ⅰ/*Xho* Ⅰ 双酶切; 4: 目的基因 PCR 扩增产物

图 1　重组质粒目的基因酶切鉴定

2.2　重组蛋白的诱导表达

重组蛋白经 SDS-PAGE 电泳鉴定,可见一相对分子质量约为 27 × 10^3 的蛋白条带。用 Quantity One 软件分析,结果显示重组蛋白表达的最佳条件是 25 ℃,IPTG 诱导 6 h,IPTG 诱导的最佳浓度是 1.0 mmol/L。SDS-PAGE 电泳和考马斯亮蓝染色结果见图 2。

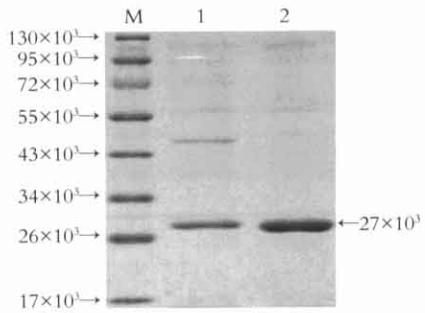


M: 蛋白标准; 1 - 5: IPTG(1.0 mmol/L)诱导后 1、3、6、12、24 h; 6: 未诱导

图 2　不同诱导时相点 SDS-PAGE 电泳图

2.3　重组蛋白的纯化

重组蛋白主要以包涵体形式在细胞质不溶性表达,少量为细胞质可溶性表达;纯化后蛋白用 BCA 法定量测得浓度为 1 869.543 7 μg/ml,纯化后可溶蛋白的纯度约为 80%,包涵体蛋白的纯度在 95% 以上,见图 3。

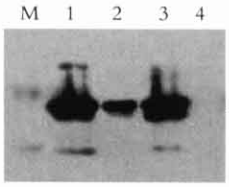


M:蛋白标准; 1:纯化后可溶蛋白; 2:纯化后包涵体

图 3　12% SDS-PAGE 分析蛋白纯化情况

2.4 重组蛋白免疫印迹鉴定

Western blot 分析显示，pET42lys 转化大肠埃希菌 BL21(DE3)PlysS 经诱导表达后的菌体裂解物与抗 His. Tag 单克隆抗体反应，在相对分子质量约 27×10^3 处出现特异表达的蛋白条带，与预测基本一致；而 pET42a(+)转化大肠埃希菌 BL21(DE3)PlysS 后，其菌体裂解物无此反应，说明所表达的融合有 6×His. Tag 的目的蛋白是正确的，结果见图4。



M：蛋白标准；1,3：IPTG 诱导后总蛋白；2：目的蛋白纯化后；4：阴性对照

图4 重组蛋白的免疫印迹分析

2.5 重组蛋白体外抗菌活性的研究

通过表1，可见重组溶葡萄球菌蛋白对金葡菌和 MRSA 的抑菌和杀菌浓度不仅小于克林霉素和新青霉素Ⅱ，还优于目前临床上杀菌效果最好的万古霉素。说明重组溶葡萄球菌蛋白具有强大的杀菌作用，对金葡菌和 MRSA 均有良好的杀菌效果。

表1 重组溶葡萄球菌蛋白对金黄色葡萄球菌体外抗菌活性的测定(μg/ml)

抗生素		金葡菌(ATCC25923)	金葡菌[2#]	MRSA[5#]
新青霉素Ⅱ	MIC	31.25	3.9～62.5	500～1 000
	MBC	2 000	>1 000	>2 000
克林霉素	MIC	3.9	7.8	>2 000
	MBC	1 000	1 000	>2 000
万古霉素	MIC	<0.97	1.95	1.95
	MBC	3.9	3.9	3.9
重组溶葡萄球菌蛋白	MIC	0.003～0.78	<0.78	0.78
	MBC	0.39～1.56	1.56～3.125	1.56～3.125

3 讨论

天然溶葡萄球菌酶基因编码一种蛋白前体，产生菌先表达蛋白前体，分泌到胞外后经巯基蛋白酶作用切去 N 端多个 13aa 重复序列而成为成熟的溶葡萄球菌酶，成熟溶葡萄球菌酶比酶前体的活性约高 4.5 倍[6]。与抗生素只干扰细菌的生长期不同，溶葡萄球菌酶对静止期和活动期葡萄球菌均有杀灭作用。在20世纪60～70年代，人们曾进行一些动物试验和个案的病例治疗，由于酶的生物纯度不高和担心其免疫原性，同时抗葡萄球菌的药物有效，停止了该药的进一步研究。近年来，由于耐药葡萄球菌感染在临床日益流行，迫使人们再次将溶葡萄球菌酶的药用研究提到日程上来。

文献[7]报道在 CMV 启动子控制下，在真核生物系统中表达溶葡萄球菌酶肽链内切酶前体。文献[8]报道从模仿葡萄球菌的粗提取物中纯化生产溶葡萄球菌酶肽链内切酶，但是这些方法生产的溶葡萄球菌酶很容易被热原和变应原污染，或者表达为溶葡萄球菌酶前体，生物学活性极低。在本研究中，为了增强天然溶葡萄球菌酶的杀菌活性和保存时间，我们特意对其蛋白结构进行了重新设计，保留了杀菌活性结构，在蛋白的 N 端和 C 端分别添加了保护性基团；构建了 pET42lys 表达载体，用大肠埃希菌 BL21(DE3)PlysS 作为表达宿主，高效表达了 C 端带有 6 个组氨酸标签(6×His. Tag)的重组溶葡萄球菌蛋白。重组蛋白产量为细菌总蛋白的40%，纯度>95%。重组蛋白的相对分子质量为 27×10^3，与文献[4]报道的成熟溶葡萄球菌酶相同。本研究也使溶葡萄球菌蛋白的生产不用从其生物学活性极低的蛋白前体开始，而是直接表达杀菌活性强的成熟溶葡萄球菌蛋白。通过重组蛋白对标准质控株和临床分离株的体外抗菌活性研究，证明重组溶葡萄球菌蛋白保持了强大的抑菌和杀菌活性，对金葡菌和 MRSA 均能迅速杀灭；其抗菌效果优于万古霉素等传统抗生素，这给临床上难治性金葡菌感染的治疗带来了希望。总之，重组溶葡萄球菌蛋白在大肠埃希菌中的成功克隆、表达和纯化使大量生产溶葡萄球菌蛋白成为可能，这对于研究溶葡萄球菌蛋白的结构、功能和评估其临床治疗潜力，预防葡萄球菌感染均有重要意义。

参考文献：

[1] Sievert D M, Boulton M L, StoltmanG, *et al*. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin-United States, 2002[J]. Morb Mortal Wkly Rep, 2002, 51: 565-567.

[2] Tenover F C, Weigel L M, Appelbaum P C, *et al*. Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus isolate from a patient in *Pennsylvania*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48(1): 275-280.

[3] Tenover F C, Biddle J W, Lancaster M V. Increasing resistance to vancomycin and other glycopeptides in *Staphylococcus aureus*[J]. Emerg Infect Dis, 2001, 7(2): 327-332.

[4] Recsei P A, Gruss A D, Novick R P. Cloning, sequence, and expression of the lysostaphin gene from *Staphylococcus simulans*[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987, 84(5): 1127-1131.

[5] 倪语星，洪秀华. 细菌耐药性监测与抗感染治疗[M]. 北京：人民军医出版社，2002：55-56.

[6] Thumm G, Gotz F. Studies on prolysostaphin processing and characterization of the Lysostaphin immunity factor (Lif) of *Staphylococcus simulans* biovar staphylolyticus[J]. Mol Microbiol, 1997, 23(6): 1251-1265.

[7] Williamson C M, Bramley A J, Lax A J. Expression of the lysostaphin gene of *Staphylococcus simulans* in a eukaryotic system[J]. Appl Environ Microbiol, 1994, 60(3): 771-776.

[8] Marova I, Dadak V. Modified simplified method for isolation of lysostaphin from the culture filtrate of *Staphylococcus staphylolyticus*[J]. Folia Microbiol (Praha), 1993, 38(3): 245-252.

(编辑 郭建秀)