论著

文章编号:1000-5404(2008)12-1114-04

肠出血性大肠杆菌O157:H7 LexA蛋白的表达、纯化及鉴定

沙建平,邹全明,张卫军,杨 珺,毛旭虎,郭 刚,罗 萍,刘开云,陈洪章 (第三军医大学医学检验系临床微生物学及免疫学教研室,重庆市生物制药工程技术研究中心,重庆 400038)

摘 要:目的 对EHEC O157:H7 LexA进行表达、纯化,并检测其免疫活性。**方法** lexA基因片段插入表达载体pET22b(+),在*E. coli* BL21(DE3)中表达。包涵体经洗涤并用8 mol/L尿素溶解,Heparin Agrose亲合柱层析为第一步纯化,Superdex75凝胶过滤层析作为第二步精细纯化,HPLC测定LexA蛋白的浓度,将纯化的LexA蛋白经注射途径免疫家兔,制备兔抗lexA血清,采用免疫双扩、ELISA及Western blot分析LexA的免疫活性。**结果** lexA以包涵体形式表达,表达产量高达总菌体蛋白的40%左右,经Heparin Agrose亲合柱层析和凝胶过滤层析两步组合纯化目的蛋白,经HPLC测定目的蛋白的最终纯度为98%,表达及纯化的lexA具有良好的免疫活性。**结论** 在*E. coli* BL21(DE3)中表达的LexA蛋白具有良好的免疫活性。

关键词: 肠出血性大肠杆菌O157;lexA;纯化;免疫活性
中图法分类号: R341;R378.21;R392-33 **文献标识码:** A

Expression, purification and identification of EHEC O157:H7 LexA protein

SHA Jian-ping, ZOU Quan-ming, ZHANG Wei-jun, YANG Jun, MAO Xu-hu, GUO Gang, LUO Ping, LIU Kai-yun, CHEN Hong-zhang (Department of Clinical Microbiology and Immunology, College of Pharmacy and Laboratory Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To clone lexA gene from enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7, and express and purify it, and measure its immunogenicity. **Methods** The objective fragment was amplified from standard EHEC O157:H7 cells by PCR, and then linked with the vector pET22b(+). The objective protein was induced to express in the BL21(DE3) cells after transfection. The expressed protein was purified by 2 steps of Heparin Agrose chelate affinity chromatography and gel filtration chromatography respectively. The purified lexA protein was used to immune the rabbits to prepare the polyclonal antibody. ELISA and Western blotting was used to detect the obtained serum. **Results** The expressed protein was found in insoluble form, accounted for 40% of the total bacteria protein. The final purity was 98%, which was determined by HPLC. The obtained protein was confirmed to have sound immunogenicity. **Conclusion** Our obtained recombinant LexA protein expressed in *E. coli* BL21(DE3) has good immunological activity.

Key words: enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7; purification; LexA; immunological activity

自肠出血性大肠杆菌O157(enterohemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC O157)于1982年被确认为致病菌以来,由其引发的食物中毒在世界各地发生了暴发流行,该菌的感染已经成为一个全球性的公共卫生问题[1]。感染该菌可致人患严重腹泻、出血性结肠炎、溶血性尿毒综合征(hemolytic uremic syndrome, HUS)及血栓性血小板减少性紫癜(thrombocytopenic purpura,TTP)等严重并发症,甚至可导致死亡[2]。对于HUS,目前尚无特异性治疗及预防措施。

志贺毒素(Shiga toxins,Stxs)是EHEC的主要毒力因子,是导致出血性肠炎及HUS发生的基础。Stxs的编码基因位于λ噬菌体,整合于EHEC O157的染色体上,因而其表达与裂解循环中的晚期噬菌体基因转录共调节[3]。近年研究发现,细菌的SOS反应能诱导原来沉默的噬菌体基因高水平表达,从而导致Stxs的大

基金项目:国家高技术研究发展计划("863"计划)(2001AA215161)
Supported by the National"863"High-Tech Development Plan of China (2001AA215161)
作者简介:沙建平,男,广西壮族自治区桂林市人,博士,副教授,主要从事临床微生物的感染及控制方面的研究。电话:13268122984,E-mail:shajianping99@sina.com
通信作者:邹全明,电话:(023)68752316
收稿日期:2007-07-03;修回日期:2007-10-20

量产生[4]。SOS 反应是细菌 DNA 分子严重损伤或复制受抑制时的修复方式,许多临床常用的抗生素均能诱导此反应的发生[5]。LexA 是 SOS 反应中起关键调控作用的蛋白,已成为新药研究的潜在靶点[6],因此制备大量高纯度的 LexA 蛋白具有重要意义。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　质粒、菌株、引物及动物　　EHEC O157: H7 的标准菌株 EDL933 *E. coli* BL21(DE3)、hsdS gal (λ cIts857 indI Sam7 nin5 lavUV5-T7),第三军医大学医学检验系临床微生物学及免疫学教研室保存。质粒 pET22b(+)购自 Novagen 公司(美国)。日本大耳白兔 2 只,普通级,雄性,体质量 2 kg 左右,由第三军医大学实验动物中心提供,批号:医动字第 310101017 号。细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自北京天为时代生物公司。尿素、三氯乙酸、磺基水杨酸、Tricine、TEMED、IPTG、咪唑、BSA、谷胱甘肽氧化型、谷胱甘肽还原型为 Sigma 公司产品, T_4 DNA 连接酶、*Taq* 酶、限制性内切酶均为 TaKaRa 公司产品,DNA 标准、蛋白标准购自北京鼎国生物技术公司。ÄKTA explorer-100 蛋白纯化仪购自瑞典 Pharmacia 公司,Biostat C 15 L 生物发酵罐购自德国 B Braun 公司,HPLC 1100 Series 购自美国 Aglient 公司。

1.1.2　引物　　根据 GenBank 中已发布的 EHEC O157: H7 的 lexA 基因的序列设计特异性扩增引物。上游引物为: 5′-GGAATTCCATATGAAAGCGTTAACGGCCAG-3′,下划线部分为设计的 *Nde* Ⅰ酶切位点,下游引物为: 5′-GGATCCTTACAGC-CAGTCGCCGTTG-3′,下划线部分为 *Bam*H Ⅰ酶切位点。引物由上海英骏生物技术有限公司合成。

1.2　方法

1.2.1　LexA 蛋白的表达　　肠出血性大肠杆菌 O157: H7 (EHEC O157: H7)的培养:取冻存的 EHEC O157: H7的标准菌株 EDL933,三线法划线接种于 LB 固体培养基上,于 37 ℃培养 24 h。挑取单菌落接种 LB 液体培养基,37 ℃,150 r/min,培养过夜。

1.2.2　EHEC O157: H7标准菌株 EDL933 染色体 DNA 的制备　　按常规 Proteinase K 消化法进行。

1.2.3　PCR 产物的回收　　PCR 反应体系以 EHEC O157: H7 染色体 DNA 为模板,扩增目的片段。扩增条件:94 ℃预变性 5 min,94 ℃变性 50 s,55 ℃退火 60 s,72 ℃延伸 50 s,35 个循环,72 ℃完全延伸 20 min。反应完毕后作 1% 琼脂糖凝胶电泳,4 500 bp DNA 标准为相对分子质量参照,鉴定扩增产物相对分子质量大小。PCR 产物回收纯化与 T-载体 pMD18-T 连接过夜(16 ℃),连接产物采用常规 $CaCl_2$ 法转化 *E. coli* DH5α 感受态。在含 IPTG 和 X-gal 的 Amp^+ LB 平板上 37 ℃培养,挑选阳性克隆。常规碱裂解法提取质粒,*Nde* Ⅰ、*Bam*H Ⅰ双酶切鉴定阳性重组子(命名为 pMD18-T-LexA)。

1.2.4　lexA 基因在大肠杆菌中的表达　　pMD18-T-lexA 经 *Nde* Ⅰ、*Bam*H Ⅰ双酶切,目的片段回收纯化后与相同酶切的表达载体 pET-22b(+)连接,转化 *E. coli* DH5α 感受态。*Nde* Ⅰ和 *Bam*H Ⅰ双酶切鉴定阳性重组子后进行 DNA 测序以证实外源基因序列的正确性。阳性克隆于 Amp^+ LB 液体中培养,37 ℃,150 r/min 振荡培养至菌液 $D(600)$ 达 0.6 ~ 0.8 时,加入终浓度 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导表达 8 h,集菌后用 SDS-PAGE 上样缓冲液裂解,15% SDS-PAGE 鉴定。

1.2.5　LexA 蛋白的纯化　　重组工程菌 pET22b- lexA/BL21 (DE3)的发酵:采用 15 L 发酵罐,发酵过程中种子菌 10% 比例接种,保持 70% 溶氧、温度 37 ℃、pH 7.0,在 $D(600)$ 未达到 2 时不加补料,待葡萄糖浓度降为 0.1% 时加入 0.5 mmol/L 终浓度的 IPTG 诱导 6 h 收菌,4 ℃ 8 000 × *g* 离心 15 min。弃上清,收集细菌,冻存备用。

包涵体的提取:将高效表达的菌体 200 ~ 500 g 以包涵体洗涤液Ⅰ(50 mmol/L PB, pH 7.0)按 1∶9(质量体积分数)混悬浮破菌,再以 1∶10(质量体积分数)分别用包涵体洗涤液Ⅱ(50 mmol/L PB,1.0% Triton X-100,pH 7.0)和包涵体洗涤液Ⅲ(50 mmol/L PB,2 mol/L 尿素,pH 7.0)各洗涤 2 次。洗涤条件为:4 ℃搅拌 20 min,15 000 r/min 离心 40 min,收集包涵体沉淀,最后将洗涤后的包涵体与包涵体溶解液(50 mmol/L 磷酸盐缓冲液,8 mol/L 尿素,pH 9.0)以 1∶10(质量体积分数)的比例混合,4 ℃搅拌过夜,15 000 r/min 离心 45 min,取上清备用。

柱层析纯化:Heparin Agrose 柱亲和层析:将以上包涵体溶解液过滤浓缩,备为上柱样品,采用 Heparin Agrose 亲合柱层析填料装填于 XK16/10 柱中,用 5 倍体积的双蒸水流洗后,预先用平衡液平衡层析柱(2.5 cm × 40 cm, 120 ml heparin agrose, Bio-Rad)。将过滤浓缩好的包涵体溶解液上柱,用亲合层析缓冲液 A(50 mmol/L PB,8 mol/L 尿素)平衡柱子至基线平稳后,再以亲合层析缓冲液 B(50 mmol/L PB,8 mol/L 尿素,0.5 mol/L 咪唑)梯度洗脱。根据洗脱峰收集样品,最后用 1 mol/L NaCl 洗脱直至将所有蛋白质全部洗下为止。通过 SDS-PAGE 分析目的蛋白的纯化效果,确定 Heparin Agrose 柱亲和层析最佳的纯化条件。

凝胶过滤柱纯化:使用 Superdex-75 凝胶柱进行纯化,先用 1 倍体积的双蒸水平衡柱子,再用 1 倍体积的凝胶过滤层析缓冲液(50 mmol/L PB,8 mol/L 尿素)平衡柱子,收集洗脱峰组分。

1.2.6　目的蛋白的分析　　还原 SDS-PAGE 分析:收集蛋白样品用加 DTT 上样缓冲液处理,进行还原 SDS-PAGE 电泳,凝胶成像系统扫描分析纯化蛋白的纯度和相对分子质量。

HPLC 纯度分析:用 Agilent 1100 型 HPLC 进行蛋白纯度分析,检测波长分别为 280 nm,检测时间为 21 min。

1.2.7　LexA 的免疫实验及免疫效果检测　　每只白兔每次抗原免疫用量 1.0 mg。取 2.5 mg LexA 蛋白加完全弗氏佐剂 2.5 ml,研磨成乳剂,皮下注射白兔。第 3 周和第 4 周分别加强免疫 1 次,第 6 周起,于兔耳缘静脉取血,用琼脂糖双扩法检测特异性抗体的效价。心脏放血,离心后分装, -70 ℃冻存备用。

双向免疫扩散:将熔化的琼脂倒于载玻片上,用打孔器打孔,孔径 3 mm,孔距 4 mm,将待测抗体作 1∶2 ~ 1∶64 稀释,LexA 原液作一定稀释后加入中间孔中,每孔约 10 μl。放入湿盒中,37 ℃作用 24 h,观察结果。ELISA 检测按常规方法进行,以 $D_{样品}$ 与 $D_{阴性}$ 之比≥2.1 者为阳性。

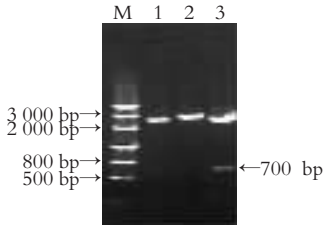
Western blot 检测 LexA 多抗血清的免疫反应性。将纯化后的 LexA,先用 SDS-PAGE 分离,再电转移至 NC 膜上,以 1∶500

稀释的 LexA 多抗为一抗,1∶20 000 稀释的 HRP 标记羊抗兔 IgG 为二抗,检测 LexA 多抗与 LexA 蛋白的免疫反应性。

2 结果

2.1 lexA 基因的扩增及重组质粒的酶切鉴定

扩增片段约 700 bp,与预期片段大小相符。重组质粒双酶切得到片段大小约为 700 bp(图 1),证实 pET22b(+)-lexA 构建正确。将酶切鉴定正确的 pET22b(+)-lexA 重组质粒送交测序公司进一步鉴定,表明碱基序列及读码框构建正确。

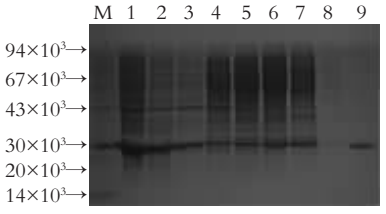


M:4 500 bp DNA 标准;1、3:pET22b(+)-lexA 质粒;2:空载体

图 1 重组表达质粒 pET22b(+)-lexA 的酶切鉴定

2.2 重组工程菌 pET22b(+)-lexA/BL21(DE3)的表达及纯化

重组质粒 pET22b(+)-lexA 转化感受态 BL21(DE),收集诱导前后的重组工程菌及超声破菌上清与沉淀,SDS-PAGE 分析 IPTG 诱导表达 LexA 蛋白情况,温度分别为 37 ℃,IPTG 浓 0.5 mmol/L。结果表明,重组工程菌诱导表达蛋白,表观相对分子质量约为 23×10^3,与理论分子值相符。见图 2。



M:标准;1:包涵体,重组工程菌在37℃下诱导前;2-7:重组工程菌在37 ℃下分别诱导10、8、6、4、2、1 h;8:超声破菌后的上清;9:两步纯化后 LexA 蛋白

图 2 SDS-PAGE 鉴定目的蛋白表达

2.3 LexA 的柱层析纯化

亲和层析纯化:使用 Heparin Agrose 亲和层析柱对目的蛋白进行一步纯化实验发现:pH 9.0 层析缓冲液纯化效果较好,而且蛋白最稳定。

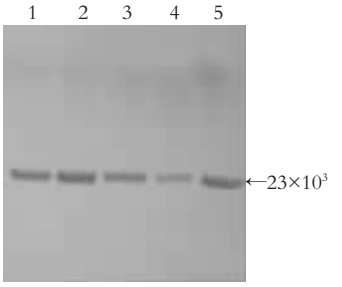
凝胶过滤柱层析纯化:经 Heparin Agrose 亲和纯化的 LexA 蛋白样品,再次上样使用 Superdex-75 凝胶过滤纯化柱以进一步纯化。且一次层析可以获得约 200 mg 的纯化蛋白,凝胶成像扫描分析 SDS-PAGE 电泳上的两步组合纯化目的蛋白纯度为 98%。如图 2 的 9 泳道所示。

2.4 纯化蛋白的纯度检测

在 RP-HPLC 上纯化后的目的蛋白样品出现 1 个色谱吸收峰,保留时间为 16.74 min,利用面积归一法[7]分析 LexA 的纯度为 98.97%。

2.5 Western blot 检测 LexA 的免疫反应性

Western blot 检测兔抗 LexA 多抗的免疫反应性发现,LexA 多抗与纯化后 LexA 能够发生明显的免疫反应,说明兔抗 LexA 多抗具有较好的免疫反应性,见图 3。



1-5:纯化后 LexA 蛋白

图 3 Western blot 鉴定纯化后 LexA 蛋白的免疫活性

2.6 双向免疫扩散结果

双向免疫扩散结果显示,在抗体稀释度为 1∶32 时,出现明显沉淀线,兔抗 LexA 多克隆抗体效价为 1∶32。

2.7 ELISA 结果

ELISA 显示,抗 LexA 多抗血清在稀释度为 1∶600 000 时,D(492)值分别是 0.447 和 0.468,与兔阴性血清的比值为 3.4 和 3.5,均 >2.1,因而判定兔抗 LexA 血清的滴度为 600 000 EU。

3 讨论

目前,EHEC O157∶H7的全基因组测序已经完成,但对其感染仍缺乏有效的治疗方法,临床上针对 O157∶H7菌的感染主要采用抗生素治疗及支持治疗。然而,新近的研究表明,使用抗生素治疗 EHEC O157 感染有可能诱导 SOS 反应而导致 Stxs 的大量产生,从而增加 HUS 等严重并发症发生的风险[8]。因此,防止或抑制细菌 SOS 反应的发生对 EHEC O157∶H7严重并发生的预防和治疗有重要意义。LexA 是细菌 SOS 反应最重要的调节蛋白,制备大量高纯度的 LexA 蛋白对 EHEC O157∶H7发生机制及治疗方法的研究具有重要意义。

大肠杆菌表达系统是分子生物学基础研究中重要的表达系统之一,同时也是生物制药工业的首选宿主菌[9]。在构建 LexA 表达载体时,我们将 LexA 基因重组到 *E. coli* 的表达载体 pET22b(+)上,转化 *E. coli* BL21(DE3)宿主菌,进行诱导表达。在 pET22b(+)载体上高水平表达了 LexA 蛋白,其表达形式以包涵体蛋白为主,但超声破菌上清里含有 LexA 蛋白,说明 LexA 在 pET22b(+)和 *E. coli* BL2(DE3)系统既有包涵体表达也有可溶性表达,SDS-PAGE 均能检测到明显的蛋白条带。

为获得大量的细胞粗提液以备纯化 LexA 蛋白,我们采用德国 B. Braun 15 L 发酵罐,进行了细菌的大体积培养,发酵过程所用培养基为改良 M9-CAA 培养

基,在培养过程中保持50%溶氧、温度37 ℃、pH 7.4,在$D(600)$未达到2时不加补料,定时取样测定培养液浓度并注意防止污染。在蛋白质纯化过程中,我们尝试了其他一些DNA结合蛋白的纯化方法,如硫酸盐沉淀与透析,离子交换层析DEAE-cellulose, phosphocellulose等,然而纯化效果不佳,显然, EHEC O157: H7 LexA对这些传统的纯化方法无明显特异性。生物肝素具有配位亲合体,可以模拟DNA结合序列,对DNA结合蛋白具有很强的亲合力,适用于DNA结合蛋白的初步纯化。本实验证实,肝素亲和层析法对EHEC O157: H7 LexA蛋白选择性强、纯化倍数高、亲合性强,初步纯化后的LexA蛋白再经Superdex75凝胶过滤层析纯化后,其纯度达98%以上,此纯化方法成功地得到了高产量、高纯度的LexA蛋白。这为LexA蛋白的进一步研究提供了基础。

参考文献:

[1] 周志江. 肠道出血性大肠杆菌O157[M]. 北京:军事医学科学出版社,2002:15.
[2] Caprioli J, Peng L, Remuzzi G. The hemolytic uremic syndromes[J]. Curr Opin Crit Care, 2005, 11(5): 487-492.
[3] Aertsen A, Faster D, Michiels C W. Induction of Shiga toxin-converting prophage in Escherichia coli by high hydrostatic pressure[J]. Appl Environ Microb, 2005, 71(3): 1155-1162.
[4] Thorpe C M. Shiga toxin-producing Escherichia coli infection[J]. Clin Infect Dis, 2004, 38(9): 1298-1303.
[5] Aertsen A, Michiels C W. Upstream of the SOS response: figure out the trigger[J]. Trends Microbiol, 2006, 14(10): 421-423.
[6] Cirz R T, Chin J K, Andes D R, *et al*. Bacterial SOS May be the key to combating antibiotic resistance [J]. PLoS Biol, 2005, 3(6): e221.
[7] 李发美. 医药高效液相色谱技术[M]. 北京:人民卫生出版社, 1999: 210-226.
[8] Akiyoshi D E, Rich C M, O'Sullivan-Murphy, S, *et al*. Characterization of a human monoclonal antibody against Shiga toxin 2 expressed in Chinese hamster ovary cells[J]. Infect Immun, 2005, 73(7): 4054-4061.
[9] 董德祥. 疫苗技术基础与应用[M]. 北京:化学工业出版社, 2002: 250-253.

(编辑 龙 亮)

文章编号:1000-5404(2008)12-1117-01

个案与短篇

"中国数字人女1号"骨骼系统数字仿真及全身骨骼数据库初步建立

傅 栋[1],靳安民[1], 唐海亮[2],田 京[1],于 博[1],钟世镇[3] ([1]南方医科大学珠江医院骨科中心, 广州 510280;[2]武警8650部队医院放射科, 山西 榆次 030600;[3]南方医科大学临床解剖学研究所, 广州 510515)

本研究对"中国数字人女1号"(VCH-F) CT断层图像,运用Mimics软件在家用娱乐级个人计算机对全身骨骼结构建模进行尝试,对简化建模过程,提高建模效率进行探讨。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

Dicom格式CT断层数据;计算机硬件:AMD Athlon64 3200$^+$中央处理器,2G DDR RAM内存,200 G硬盘,256 M显存Radeon X1600Pro显卡,19寸液晶显示器;计算机环境:Windows XP/ Professional操作系统;应用软件:医学3D图像编辑处理软件Mimics 10.0(Materialise Software, Belgium),有限元分析软件MSC FEA-MSC AFEA 2005 R2(MSC Software, America)。

1.2 原始数据来源及采集过程

原始数据由南方医科大学临床解剖学研究所提供。数据来源为19岁女性,身高155 cm,体质量46 kg。Somatom Plus 4螺旋CT机(西门子公司,德国)对全身分7序列扫描。层间距全部为1.0 mm,管电压140 kV,电流119.25 mAs,头部序列214层,螺距0.441 mm,脖胸部序列262层,螺距0.965 mm,腹部以下序列螺距全是0.977 mm,腹部序列205层,骨盆及双手序列229层,双下肢序列203层,双膝关节及双足序列各为304层,全身共1 721层。

1.3 "中国数字人女1号"骨骼系统整体及组合数字模型建立

Mimics 10.0导入每序列Dicom格式断层图像,经二次内插值处理,界定骨组织阈值在226~3 071亨氏单位,软件自动形成所有截面骨骼组织边缘轮廓曲线,图像经编辑、补洞处理,定位骨骼种子点,区域增长处理3D计算出每序列整体骨骼,以STL文件格式导出。Reposition功能对7序列整体骨骼STL文件配对,布尔计算得到"中国数字人女1号"骨骼系统整体数字模型。用计算机自动分割及人工半自动分割方法,对全身骨骼分别进行标识和分割。这些子模型拼接起来,得到骨骼系统组合数字模型。

1.4 全身骨骼数据库初步建立

"中国数字人女1号"数据是2002年4层螺旋CT机扫描采集,层间距1.0 mm,螺距0.977 mm,对骨骼局部细节显示不

(下转1121页)

基金项目:国家高技术研究发展计划重点项目("863"计划)(2002AA231021) Supported by the National "863" High-Tech Development Plan of China (2002AA231021)
作者简介:傅 栋,男,浙江省绍兴市人,博士研究生,医师,主要从事脊柱外科及骨科数字影像仿真方面的研究。电话:13725325321, E-mail: gdfudong@126.com
通信作者:靳安民,电话:(020)61643250
收稿日期:2007-12-04;修回日期:2008-03-25