文章编号:1000-5404(2008)18-1753-03

论著

# 肺炎链球菌毒力因子 ClpP 蛋白酶的体外表达及纯化

袁 军[1],陈 曜[2],曹 炬[1],尹一兵[1] (重庆医科大学:[1]医学检验系,临床检验诊断学省部共建教育部重点实验室,重庆 400016;[2]附属第二医院感染科,重庆 400010)

**摘 要:目的** 构建 ClpP 原核表达载体,获取原核表达的 ClpP 蛋白分子。**方法** 分离培养 TIGR4 型肺炎链球菌,获取其染色体 DNA,采用基因体外重组的方法将完整的 ClpP 读码框克隆到 pET-32a 原核表达载体,并经测序鉴定,所表达的抗原蛋白用 Western blot 鉴定,镍柱纯化并透析复性,真空冷冻干燥保存。**结果** 测序结果证实克隆的基因与 GenBank 中的序列相符,Western blot 证实获得了 ClpP 融合蛋白。**结论** 获得了高表达的重组抗原蛋白,经镍柱纯化后纯度可达 90% 以上。

**关键词:** 毒力因子;肺炎链球菌;ClpP 蛋白
**中图法分类号:** Q503;Q556.9;R378.12 **文献标识码:** A

# Expression and purification of ClpP of *Streptococcus pneumoniae in vitro*

YUAN Jun[1], CHEN Yao[2], CAO Ju[1], YIN Yi-Bing[1] ([1]Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics, Ministry of Education, Faculty of Laboratory Medicine, Chongqing 400016, [2]Department of Infectious Diseases, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

**Abstract:** Objective To obtain purified ClpP molecule produced by its prokaryotic expression system. Methods Template DNA was isolated from cultured TIGR4 *Streptococcus pneumoniae* by gene recombination technology *in vitro*. Complete ClpP open reading frame (ORF) was cloned into pET-32a expression vector after being confirmed by sequencing. Antigen protein expressed was identified by Western blotting, purified through $Ni^{2+}$ affinity chromatography and processed by dialysis and final vacuum freeze drying preservation. Results The DNA sequence analysis confirms that the cloned ClpP gene was identical to that in GenBank. ClpP fusion protein was proved by Western blot analysis. Conclusion A highly expressed recombinant ClpP fusion antigen protein is successfully obtained, which establishes a material basis on exploring the function of ClpP protein and the mechanism of preventing infection of streptococcus pneumoniae by ClpP.

**Key words:** virulence factory; streptococcus pneumonia; ClpP

肺炎链球菌是肺炎、脑膜炎和中耳炎的主要病因,是引起全世界范围内婴幼儿、老年人和免疫缺陷个体疾病的主要病原菌。其毒力主要依赖于表面的荚膜多糖和一系列的毒力蛋白如 Ply、PspA、PsaA、CbpA 等[1],这些毒力因子在肺炎链球菌的致病过程中起着关键的作用,但对这些经典毒力蛋白的研究并不能完全阐明肺炎链球菌的致病机制,有必要对其他毒力蛋白进行深入的研究,尤其是肺炎链球菌在应激反应过程中产生的一些热休克蛋白质,ClpP 就是其中的一种。在本研究中,我们用基因重组的技术表达纯化了一种新颖的肺炎链球菌毒力因子蛋白,它在各株间的保守性相当强,为研究其功能和作为新的肺炎链球菌疫苗蛋白奠定基础。

**基金项目:** 国家自然科学基金(30400376,30471838,30371275)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30400376, 30471838, 30371275)
**作者简介:** 袁 军,男,重庆市人,硕士,助理研究员,主要从事分子微生物方面的研究。电话:(023)68485555,E-mail:yj6848@yahoo.com.cn
**通信作者:** 尹一兵,电话:(023)68485658
**收稿日期:** 2007-01-12;**修回日期:** 2007-11-02

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒 TIGR4 型肺炎由美国 Morrison 教授惠赠,大肠杆菌 DH5α、BL21(DE3)为本室保存;质粒 PMD18-T 载体为 TaKaRa (大连)产品,pET-32a 为本室保存。

1.1.2 试剂 DNA 提取试剂盒为上海华舜公司产品;限制性内切酶 *Eco*RⅠ, *Sac*Ⅰ为 TaKaRa(大连)产品;IPTG 为 Sigma 产品;PrimeStarDNA 聚合酶,$T_4$DNA 连接酶为为 TaKaRa(大连)产品;丙烯酰胺、双丙烯酰胺和 DAB 为 Sigma 产品;His TagMcAb, His Bind Column(Ni-NTA)柱及 HRP 标记羊抗鼠 IgG 为 Novagen 公司产品;咪唑、尿素、NaCl 和 Tris 碱为 BBI 产品。

### 1.2 方法

1.2.1 目的片段的亚克隆 将 TIGR4 型肺炎链球菌在 C + Y 培养基中增菌到对数生长中后期,按试剂操作说明书提取基因组 DNA 以之作为模板扩增 ClpP 的开放读码框架(598 bp)。上游引物:5′-CGAATTCATGATTCCTGTAGTTAT-3′,含 *Eco*R Ⅰ位点;下游引物:5′-CGAGCTCTTAGTTCAATGAATTGTTG-3′,含 *Sac* Ⅰ位点,引物由上海生工生物技术公司合成。使用 PrimeStar 高保真 DNA 聚合酶,以肺炎链球菌基因组 DNA 为模板。扩增条件:热启动 94 ℃,5 min;变性 94 ℃,1 min;退火 53 ℃,1 min;延伸 72 ℃,1 min;30 个循环,末次 72 ℃,10 min。PCR 产物行 1% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定后,切胶回收纯化。采用 PMD-18T 载体系统,转化 DH5α 感受态细胞,选择阳性克隆,酶切鉴定插入重组子,并送往上海生工生物技术有限公司做双向测序。

1.2.2 PET-ClpP 表达载体的构建 将测序后的克隆载体用 *Eco*R Ⅰ、*Sac* Ⅰ双酶切,回收,纯化目的片段。pET-32a 表达载体经相同酶切处理,回收大片段。$T_4$ DNA 连接酶连接,16 ℃过夜,转化感受态细胞 DH5α,扩增生长单菌落,提取质粒,双酶切,琼脂糖凝胶电泳鉴定。重组质粒转化感受态表达菌株 BL21(DE3),涂布于含 100 mg/L 氨苄青霉素平板上,37 ℃培养 24 ~ 48 h。

1.2.3 PET-ClpP 重组载体的诱导表达 将重组表达载体转化的 BL21(DE3)的单个菌落接种入 LB 培养液(含 100 mg/L 氨苄青霉素)中,37 ℃,250 r/min 振摇过夜,再将饱和培养物按 1∶20 接种至含相同浓度抗生素浓度的 LB 培养液中,37 ℃,250 r/min振摇培养,待 $D(280) = 0.6 \sim 1.0$ 时加 IPTG(终浓度 =1 mmol/L)诱导,37 ℃振摇 1 ~ 4 h,离心收集诱导菌,12% SDS-PAGE 分析表达情况。

1.2.4 表达产物的分离,纯化 4 ℃ 12 000 × *g* 离心 10 min 收获细菌。以 Binding Buffer (500 mmol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl, 5 mmol/L 咪唑)洗涤液洗 1 次,按 1 g 湿菌重悬与 10 ml 相同的溶液在冰上超声破菌。相关参数:功率 235 W,总时间 20 min,每超声 3 s,间隔 3 s。将细菌超声破碎液以 12 000 × *g* 低温离心 1 h,收集上清液,同时以相同上清液体积的超声破碎缓冲液重悬沉淀,行 SDS-PAGE 以明确蛋白是在上清液还是在包涵体中。

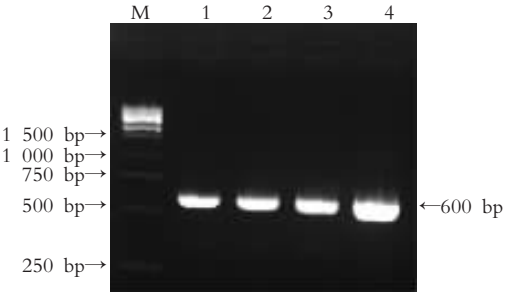
以 Binding Buffer 洗涤超声破碎后的细菌沉淀 3 次。条件:4 ℃,12 000 × *g* 10 min,每次都弃上清收集沉淀。将洗涤后的沉淀用含 8 mol/L 尿素的 Binding Buffer(pH = 7.9)重悬,冰浴 1 h,期间混匀数次以充分裂解包涵体,裂解完全后溶液变得较为清亮。4 ℃,12 000 × *g* 离心 10 min,上清用 0.45 μm 滤膜过滤,以上清转入镍层析柱内,依次加入含 8 mol/L 尿素的 Binding Buffer,Wash Buffer(20 mmol/L 咪唑,500 mmol/L NaCl,20 mmol/L Tris-HCl,pH = 7.9)洗柱,最后用 6 倍柱床体积的 Elute Buffer(400 mmol/L 咪唑,500 mmol/L NaCl,20 mmol/L Tris-HCl,8 mol/L尿素,pH = 7.9)进行目的蛋白的洗脱,测定各洗脱管的 $D(280)$ 值。收集 Elute Buffer 洗脱蛋白,依次以 6、4、2、0 mol/L 尿素溶液进行透析(500 mmol/L NaCl,20 mmol/L Tris-HCl, pH = 7.5)。Bradford 法蛋白定量,12% SDS-PAGE 监测各阶段目的蛋白情况。真空冷冻干燥保存备用。

1.2.5 Western blot 测定 取诱导的全菌裂解物,经 SDS-PAGE 用电转仪 60 mA,转移 2 h。封闭液 1% BSA(PBS),加入一抗 His Tag McAb 1∶1 000 PBST(0.02 Tween20)稀释,二抗羊抗鼠 HRP-IgG 1∶3 000 稀释,DAB 显色底物,行 Western blot 检测。

## 2 结果

### 2.1 目的基因的扩增

PCR 产物 1% 琼脂糖凝胶电泳,可见清晰的扩增条带,无非特异条带,分子大小 600 bp 左右,见图 1。

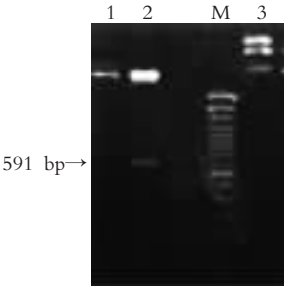



M:DNA 标准; 1 -4:ClpP PCR 产物

**图 1 ClpP PCR 扩增产物电泳图**

### 2.2 表达载体的构建与鉴定

扩增产物克隆于 PMD-18T 载体,得到多个阳性克隆,质粒抽提和双酶切鉴定,测序结果与 GenBank 公布的序列一致。克隆载体双酶切,目的片段回收后与 pET 载体连接,经转化,质粒抽提和双酶切行 1% 的琼脂糖凝胶电泳,于期望位置上出现目的条带,见图 2,证明 ClpP 开放读码框架正确克隆入 pET-32a 载体。PCR 结果也证明基因克隆正确。

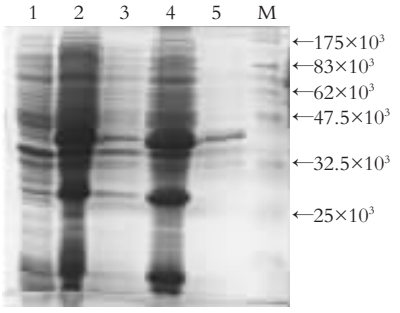



1: pET32a 空载体双酶切; 2: pET32a/ClpP 载体双酶切; M: DNA 标准;3: pET32a/ClpP 载体

**图 2 重组表达载体的双酶切鉴定**

### 2.3 融合蛋白诱导表达与纯化

转化菌诱导后,较未诱导菌有 1 条明显增粗的蛋白条带,其相对分子质量为 $42 \times 10^3$ 左右,与期望值相符合(ClpP 蛋白为 $21 \times 10^3$,再加上 $20 \times 10^3$ 左右的硫氧还蛋白)。考马斯亮蓝 R-250 染色后,经过 Bio-Rad 扫描仪扫描,目的蛋白占全菌蛋白的 35% 左右,目的蛋白表达以诱导后 4 h 最高。该目的蛋白以包涵体沉淀和可溶性上清两种形式存在,其中以包涵体形式存在为主。包涵体用 8 mol/L 的尿素溶解后,镍离子柱亲和层析后,透析复性,SDS-PAGE 证明纯化产物为单一蛋白,凝胶扫描显示纯度达 90%。见图 3。




1：非诱导 PET-ClpP 重组菌；2：诱导 PET-ClpP 重组菌；3：诱导后 PET-ClpP 重组菌超声破碎后上清溶液；4：诱导后 PET-ClpP 重组菌超声破碎后沉淀；5：纯化的 ClpP 蛋白；M：标准

**图 3　重组蛋白 ClpP 的 SDS-PAGE 电泳图**

### 2.4　Westen blot 测定

诱导的全菌裂解物于相对分子质量为 $42\times10^3$ 左右处出现 1 条深棕色带(一抗 His Tag McAb,图 4),表明目的蛋白带有组氨酸接头,确证获得了带有 6 个组氨酸接头的融合蛋白。

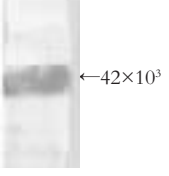



**图 4　重组蛋白 ClpP Western blot 分析**

## 3　讨论

肺炎链球菌从气道(30 ~ 34 ℃)转移到血液和(或)脑膜(37 ℃),遭受了 1 个热休克的过程,这种温度的上升使其瞬时合成了一系列高度保守的热休克蛋白质。这些蛋白质包括 ClpP、DnaK、GroEl 等,其中 ClpP 是一种 ATP 依赖的色氨蛋白酶[2],参与许多蛋白质正确折叠、修复、降解、复合物形成并调节其输出,影响着这些蛋白质的表达和功能。因此,ClpP 对肺炎链球菌的毒力和致病都起着关键的作用,其缺陷株在小鼠感染模型中相对于野生菌株毒力大大减弱。ClpP 调节着肺炎链球菌其他毒力基因如 Ply、CbpA 等的表达,并且在肺炎链球菌感受态形成过程中起作用。Chastanet 等[3]就发现 ClpP 缺陷菌株中两种感受态相关基因的诱导增强,表明在应激条件下 ClpP 负调控肺炎链球菌感受态的形成。虽然目前公认 ClpP 与肺炎链球菌毒力相关,但这种相关是由于 ClpP 对应激过程中错误折叠或者失活的蛋白质的酶解作用所引起,还是由于其对毒力基因的调控作用引起,目前尚不清楚。因此有必要得到纯 ClpP 蛋白,进一步对其功能做研究。本研究从 TIGR4 型肺炎链球菌中 PCR 成功扩增出 ClpP 开放读码框架,插入到 PMD-18T 载体中测序鉴定无碱基突变后,再克隆进原核表达载体中,在 IPTG 的诱导下,获得了目的蛋白的高效表达。目的蛋白以包涵体沉淀和可溶性上清两种形式存在,前者便于纯化制备抗体,后者有利于做功能研究和结构解析。

对不同肺炎链球菌株 ClpP 基因序列分析表明它在肺炎链球菌各株间相当保守,氨基酸序列和组成一致。肺炎链球菌依据其表面的荚膜多糖成分可分为 90 多种血清型,现在多糖疫苗已经暴露了它的不足,菌株间保护作用有限。蛋白质疫苗是肺炎链球菌的发展方向[4-6],而目前候选疫苗蛋白质所针对的肺炎链球菌表面蛋白如 PspA、CbpA 等都存在着在菌株间变异的问题,保护作用较为局限,而 ClpP 在菌株间的高度保守性则消除了其他蛋白质在这方面的缺陷。而且热休克过程中,应激反应使得 ClpP 在肺炎链球菌细胞壁中的含量大大增加,可以占总 ClpP 的 34% 以上(此时细胞质中为 60% 左右),而在 30 ℃时肺炎链球菌细胞质中的 ClpP 大概占到总 ClpP 的 82.4%。这些热休克过程中在细胞壁中新增加的 ClpP 有什么样的功能目前还不清楚,推测它们在帮助肺炎链球菌适应宿主环境,从而引起疾病中起着重要的作用。

ClpP 很有希望成为新的肺炎链球菌候选疫苗蛋白,并很有可能在抵抗肺炎链球菌侵袭性感染时发挥重要作用,然而目前对其在抗肺炎链球菌感染方面的研究报道还很少。本实验中我们采用基因体外重组的方法成功表达了 ClpP 蛋白,其表达量占全菌蛋白的 35% 以上,满足了大量纯化的要求。利用镍离子亲和层析方法,我们得到了大约 50 mg 纯度达 90% 以上的蛋白抗原,为下一步探索其作为新的候选蛋白疫苗抗肺炎链球菌感染提供了基础。

**参考文献:**

[1] Swaitlo E, Ware D. Novel vaccine strategies with protein antigens of Streptococcus pneumoniae[J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2003, 38(1): 1-7.

[2] Ibrahim Y M, Kerr A R, Silva N A, *et al*. Contribution of ATP-dependent protease ClpCP to the autolysis and virulence of Streptococcus pneumoniae [J]. Infect Immun, 2005, 73(2): 730-740.

[3] Chastanet A, Prudhomme M, Claverys J P, *et al*. Regulation of Streptococcus pneumoniae clp genes and their role in competence development and stress survival [J]. J Bacteriol, 2001, 183(24): 7295-7307.

[4] Ogunniyi A D, Woodrow M C, Poolman J T, *et al*. Protection against Streptococcus pneumoniae elicited by immunization with pneumolysin and CbpA[J]. Infect Immun, 2001, 69(10): 5997-6003.

[5] McCool T L, Weiser J N. Limited role of antibody in clearance of Streptococcus pneumoniae in a murine model of colonization[J]. Infect Immun, 2004, 72(10): 5807-5813.

[6] Veenhoven R, Bogaert D, Uiterwaal C, *et al*. Effect of conjugate pneumococcal vaccine followed by polysaccharide pneumococcal vaccine on recurrent acute otitis media: a randomised study[J]. Lancet, 2003, 361(9376): 2189-2195.

(编辑　王小寒)