DOI:10.16016/j.1000-5404.201512037

类鼻疽杆菌毒素分子 BLF1 的重组表达及生物学活性

任春艳,方 瑶,李 倩,胡 艺,马腾飞,胡治强,袁顺翎,周 杰,汪黎鸿,何晓奕,毛旭虎 (400038 重庆,第三军医大学西南医院医学检验系临床微生物及免疫学教研室)

[**摘要**] **目的** 重组、表达类鼻疽杆菌毒素 BLF1 并研究其生物学活性。**方法** 运用 DNA 重组技术,以 pGEX 为表达系统在大肠杆菌中表达 BLF1 蛋白;以纯化重组蛋白 rBLF1 免疫新西兰大白兔,获得抗 rBLF1 血清,Western blot 及 ELISA 鉴定抗血清;不同浓度 rBLF1 蛋白腹腔注射 BALB/c 小鼠,观察小鼠生存率; A549 细胞模型中,通过 CCK-8 实验研究目的蛋白的细胞毒性效应及抗体阻断作用。**结果** 从类鼻疽杆菌基因组 DNA 中 PCR 得到了 BLF1 目的基因,连接到 pGEX-6p-2 质粒,经双酶切及测序表明重组质粒构建成功。GST-BLF1 蛋白经诱导表达、酶切纯化得到了相对分子质量为 23×10^3 的高纯度 rBLF1,免疫家兔抗血清 ELISA 效价达 1∶1 280 000,Western blot 鉴定在目的蛋白位置处出现特异印记条带。重组 rBLF1 蛋白腹腔注射 BALB/c 小鼠,小鼠死亡率与蛋白剂量呈正相关。rBLF1 蛋白能明显杀伤 A549 细胞,抗体可有效阻断其杀伤作用。**结论** 成功重组表达了具有生物活性的 rBLF1,该蛋白具有明显杀伤 A549 肿瘤细胞的作用,同时能够导致小鼠死亡但表现出一定耐受性。

[**关键词**] 类鼻疽杆菌;BLF1 蛋白;毒素;细胞毒性
[**中图法分类号**] R378.99; R392-33; R392.7 [**文献标志码**] A

Recombinant expression and biological characterization of *Burkholderia pseudomallei* toxin BLF1

Ren Chunyan, Fang Yao, Li Qian, Hu Yi, Ma Tengfei, Hu Zhiqiang, Yuan Shunling, Zhou Jie, Wang Lihong, He Xiaoyi, Mao Xuhu (Department of Clinical Microbiology and Immunology, Faculty of Medical Laboratory Sciences, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To express recombinant *Burkholderia pseudomallei* toxin BLF1 and observe its biological characterization. **Methods** The pGEX expression system was adopted to express recombinant BLF1 protein through recombinant DNA technology. The target protein was used to immunize New Zealand white rabbits, and the immunogenicity of the expressed protein was identified by ELISA and Western blotting. The survival rate of BALB/c mice was observed after intraperitoneal injection of different concentrations of rBLF1 protein. The purified protein acted on A549 cells to study its cytotoxicity and the blocking effect of antibody by detecting the number of living cells with CCK-8 kit. **Results** BLF1 gene was amplified by PCR from genomic DNA of *Burkholderia pseudomallei* and cloned into vector pGEX-6P-2. The recombinant plasmid highly expressing GST-BLF1 protein was identified by restricting enzyme digestion, PCR and DNA sequencing. The expressed protein was about 23×10^3 at molecular weight . After immunization, the titer of polyclonal antibody reached 1∶1 280 000 by ELISA. A specific positive band was found in the target protein position by Western blotting. After intraperitoneal injection of rBLF1 protein, the mortality of BALB/c mice was positively correlated with the dosage of rBLF1 protein. rBLF1 protein can obviously kill A549 cells and antibodies could inhibit its role effectively. **Conclusion** Recombinant rBLF1 protein with biological activity

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(81471914)
[**通信作者**] 毛旭虎,E-mail:maoxh2012@hotmail.com
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160408.1356.002.html(2016-04-08)

is successfully expressed, and can effectively kill A549 cells. The protein shows cytotoxicity to normal cells, but the normal cells can tolerate the toxin to some extent. All these results provide a basis for further studying pathogenesis of *Burkholderia pseudomallei*, seeking active prevention and treatment measures, and widening the application of BLF1 toxin in antitumor field.

[**Key words**] *Burkholderia pseudomallei*; BLF1 protein; toxin; cytotoxicity

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81471914). Corresponding author: Mao Xuhu, E-mail: maoxh2012@hotmail.com

类鼻疽伯克霍尔德菌(*Burkholderia pseudomallei*,BP)是一种革兰阴性杆菌,主要存在水或土壤中,极易感染与传播,主要引起以肺炎和多发性脓肿为特点的类鼻疽病,该病诊断难,致病性强,治疗困难,死亡率高达40%,目前尚无针对类鼻疽的有效疫苗[1-3]。研究表明,类鼻疽杆菌在全球的分布范围正在逐步扩大,故加强类鼻疽的研究对疾病的防治具有重要意义[4]。类鼻疽杆菌致死因子1(*Burkholderia* lethal factor 1,BLF1)是类鼻疽杆菌被发现的第1个重要致病因子,进入机体后能够促进宿主细胞真核翻译起始因子4A(eukaryotic translation initiation factor 4A,eIF4A)的第339位谷氨酰胺(Gln^{339})脱酰胺变为谷氨酸(Glu^{339}),使其失去mRNA的解旋酶活性,抑制蛋白质的翻译起始阶段,进而抑制蛋白质的合成,使感染宿主细胞受到损伤,导致疾病的发生[5]。获取BLF1毒素并研究其致病机制对类鼻疽的诊断及防治具有重要意义。

近年来,随着蛋白合成抑制剂在抗肿瘤治疗方面的作用逐渐被认可,人们对蛋白质翻译起始因子eIF4A的抑制剂在靶向抗肿瘤治疗中的应用的关注度也越来越高[6-7]。BLF1作为潜在的eIF4A解旋酶活性抑制剂,能够抑制蛋白质的合成。那么我们可以设想,如果将该毒素递送至肿瘤细胞后,毒素是否具有广谱杀伤肿瘤细胞的作用呢?目前国内外尚少见关注于BLF1与肿瘤细胞的报道[8]。本研究拟通过基因工程技术重组表达BLF1(rBLF1)蛋白,初步研究BLF1对肿瘤细胞的杀伤作用,为进一步研究该蛋白在抗肿瘤治疗中的应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

BPC006菌株、宿主菌*E. coli* XL1-Blue、pGEX-6P-2质粒、A549细胞为本实验室保存;细菌DNA基因组提取试剂盒、DNA胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自美国Omega公司;高保真DNA聚合酶、*Bam*HⅠ和*Xho*Ⅰ限制性内切酶、DNA连接酶、DNA Marker、蛋白Marker购自大连TaKaRa公司;PreScission protease(PSP酶)购于瑞士GE Healthcare公司;HRP标记山羊抗兔IgG抗体,购自北京中杉金桥公司;细胞计数试剂盒购于日本Dojindo公司。

1.2 方法

1.2.1 pGEX-6P-2-BLF1表达载体的构建 以BPC006株的全基因组DNA为模板,引物序列正义链:5′-CGGGATCCATGCCCAACTCACTCGAAG-3′(*Bam*HⅠ);反义链:5′-CCGCTCGAGCTATTGCTTGCGCTGCTG-3′(*Xho*Ⅰ),PCR扩增目的基因BLF1(636 bp),将BLF1片段和pGEX-6P-2质粒同时进行*Bam*HⅠ/*Xho*Ⅰ双酶切,酶切产物用DNA ligation mix于16 ℃连接4 h,连接产物转化*E. coli* XL1-Blue感受态细胞,在含氨苄的LB平板上37 ℃过夜培养,挑取阳性单克隆转接于氨苄抗性的LB液体培养基中过夜培养,提取质粒,进行*Bam*HⅠ/*Xho*Ⅰ双酶切验证,将双酶切验证正确的质粒进行DNA测序。

1.2.2 rBLF1蛋白的表达和纯化 阳性重组工程菌于37 ℃培养至*D*(600)为0.6~0.8,加入0.2 mmol/L IPTG于30 ℃诱导3 h后收集菌体,SDS-PAGE检测融合蛋白GST-BLF1的表达情况。菌体加入PBS缓冲液重悬菌体,200 W超声裂解15 min,于4 ℃、12 000 r/min离心20 min,分离上清和沉淀。将含有GST-BLF1融合蛋白的上清与Glutathione Sepharose 4B室温旋转结合4 h,4 ℃、12 000 r/min离心5 min,收集特异性结合GST融合蛋白的Glutathione Sepharose 4B,并加入等体积PBS缓冲液和PreScission protease(PSP酶),于4 ℃旋转酶切过夜。4 ℃离心后收集上清,SDS-PAGE检测rBLF1蛋白的纯度。

1.2.3 多克隆抗体的制备及鉴定 2 mg纯化rBLF1蛋白制品,以等体积弗氏完全佐剂充分乳化后,皮下多点接种于新西兰大白兔,每间隔7 d接种1次,共接种3次,第3次加强免疫14 d后进行心脏取血,分离血清于-80 ℃保存备用。

rBLF1蛋白作为抗原包被酶标板(0.4 μg/孔),5%的脱脂奶粉封闭,间接ELISA检测抗体效价,倍比稀释抗血清(1∶10 000~1∶1 280 000),HRP标记的山

羊抗兔 IgG 为二抗,未免疫家兔血清作为阴性对照,检测抗体滴度,结果判断标准:$A_{样品} \geqslant 2.1A_{阴性}$。

将目的蛋白条带转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)薄膜上,加入抗血清孵育后,以 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体检测 rBLF1 蛋白的特异性条带,牛血清白蛋白(BSA)作为对照。

1.2.4　动物毒性实验　　选取 50 只 6 周龄雌性 BALB/c 小鼠,分为 5 组,每组 10 只。其中 4 组分别经腹腔注射 150、100、50、25 μg rBLF1 蛋白,另 1 组注射同体积 PBS(0.01 mol/L,pH 7.4)作为对照,观察小鼠生存率。

1.2.5　细胞毒性实验　　将处于对数期生长的 A549 细胞加入 96 孔板中(1×10^3/孔),5% CO_2,37 ℃孵箱中培养。次日加入 rBLF1 蛋白以及 5 倍和 10 倍量的多克隆抗体中和后的 rBLF1 蛋白,每孔蛋白浓度分别为 100、50、25、12.5、6.25、3.125、1.562 5 μg/mL;并设阳性对照:吡柔比星;阴性对照:0.01 mol PBS 缓冲液(pH 7.4)及空白对照。每隔 48 h 更换 1 次药物,120 h 后用 CCK-8 试剂盒检测活细胞的数量。

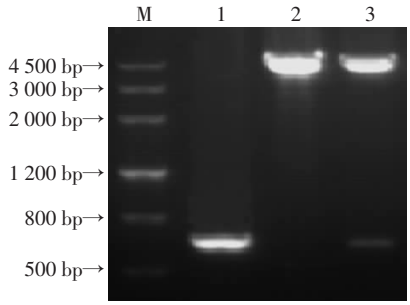
1.3　统计学处理

数据采用 GraphPad Prism 5 统计软件进行处理。

2　结果

2.1　BLF1 基因的扩增及原核表达载体 pGEX-6P-2-BLF1 的构建

以 BPC006 株全基因组 DNA 为模板,经 PCR 扩增得到目的基因 BLF1(636 bp),重组质粒 pGEX-6P-2-BLF1 经 *Bam*HⅠ/*Xho*Ⅰ双酶切鉴定目的片段与理论大小一致(图 1),DNA 测序结果与 GenBank 公布的 BLF1 基因序列一致。

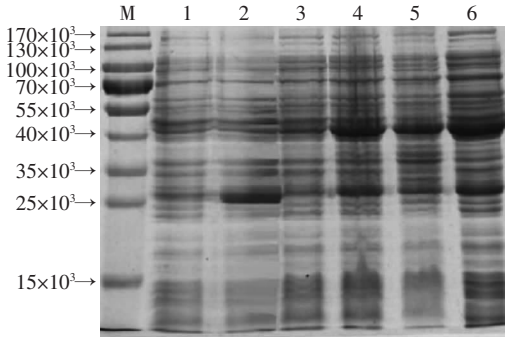


M:DNA 标准;1:BLF1 基因扩增产物;2:质粒 pGEX-6P-2 经 *Bam*HⅠ/*Xho*Ⅰ双酶切产物;3:重组质粒 pGEX-6P-2-BLF1 经 *Bam*HⅠ/*Xho*Ⅰ双酶切产物

图 1　BLF1 基因的扩增及重组质粒的鉴定

2.2　rBLF1 蛋白的诱导表达

重组质粒 pGEX-6P-2-BLF1 转化 *E. coli* XL1-Blue,菌液经 IPTG 诱导表达的 GST-BLF1 融合蛋白与预期蛋白相对分子质量一致,表达量达 90%,且主要为可溶性表达(图 2)。

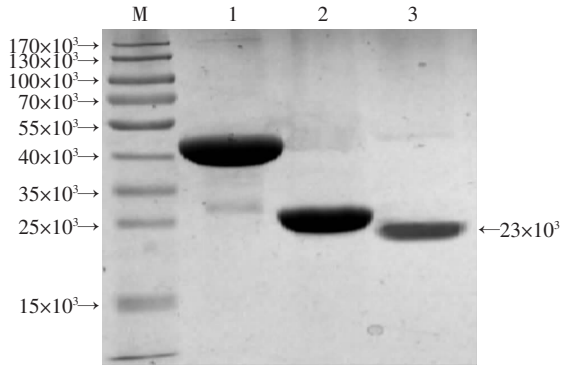


M:标准;1:菌液 pGEX-6p-2/XL1-Blue;2:菌液 pGEX-6p-2/XL1-Blue 于 30 ℃诱导 3 h;3:菌液 BLF1/XL1-Blue;4:菌液 BLF1/XL1-Blue 30 ℃诱导 3 h;5:菌液 BLF1/XL1-Blue 经超声破碎后的沉淀;6:菌液 BLF1/XL1-Blue 经超声破碎后的上清

图 2　融合蛋白在 *E. coli* XL1-Blue 中的表达

2.3　rBLF1 蛋白的纯化

将表达的 GST-BLF1 融合蛋白纯化后,用 PreScission protease(PSP 酶)将 GST 标签切除,得到 rBLF1,经 SDS-PAGE 检测表明 rBLF1 条带为 23×10^3,与预期相对分子质量一致(图 3)。



M:标准;1:GST-BLF1 融合蛋白;2:GST 标签;3:rBLF1

图 3　rBLF1 蛋白的纯化

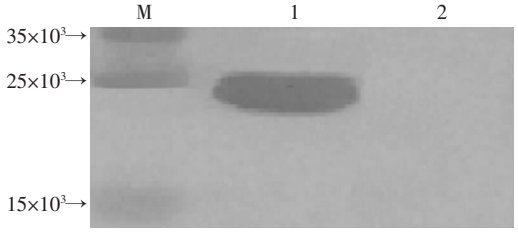
2.4　多克隆抗体的制备

重组蛋白免疫家兔,ELISA 检测结果显示,抗体滴度达 1 280 000。以 BLF1 蛋白作为抗原制备的抗血清作为一抗,以山羊抗兔 IgG 作为二抗对 rBLF1 进行 Western blot 分析,在 23×10^3 出现特异性免疫印迹条带(图 4)。

2.5　动物毒性实验

rBLF1 通过腹腔注射于 BALB/c 小鼠后可引起动物死亡。5 d 内,小鼠基本无死亡;毒素蛋白剂量为 25 μg

时,小鼠死亡率为 10%,后期小鼠死亡率随着蛋白剂量的增加而升高(图 5)。



M:标准;1:rBLF1;2:BSA

图 4 rBLF1 多克隆抗体的免疫印迹检测

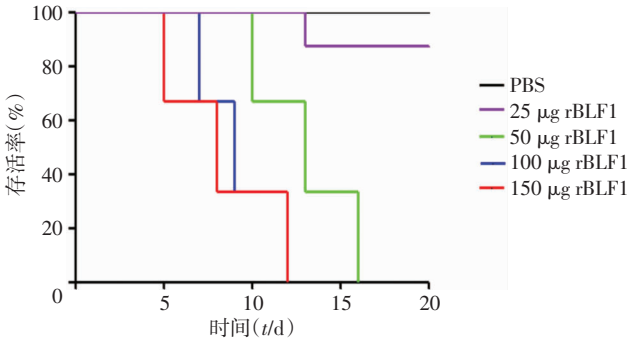


图 5 rBLF1 蛋白对 BALB/c 小鼠的致死作用

2.6 细胞毒性实验

正常生长的 A549 细胞折光性好,胞膜较清晰,胞质透亮。经 rBLF1 蛋白作用 120 h 后,可见 96 孔板内 A549 细胞贴壁减少,胞质圆缩,随着蛋白浓度的升高,细胞多见碎片或明显皱缩。经 CCK-8 试剂盒检测可见细胞存活率随着 rBLF1 蛋白浓度的增加而降低,呈剂量依赖性,而 rBLF1 蛋白经多克隆抗体中和后,细胞存活率增高,说明 rBLF1 能够杀伤 A549 细胞,而多克隆抗体能够抑制 rBLF1 蛋白杀伤作用(图 6)。

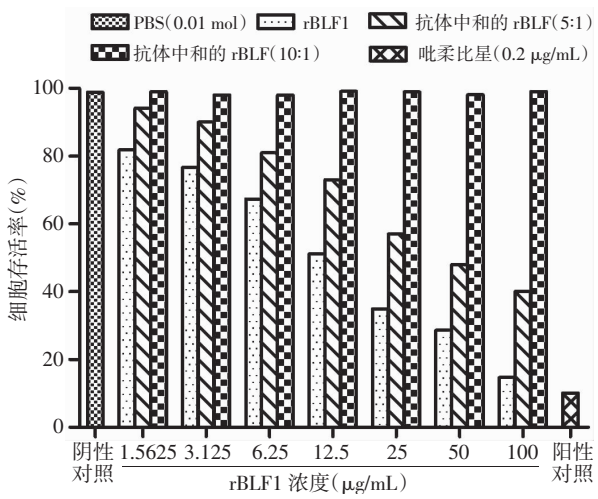


图 6 rBLF1 蛋白对 A549 细胞的毒性作用

3 讨论

BLF1 作为类鼻疽杆菌的首个被发现的致死因子,在致病过程中发挥重要作用,于 2011 年被英国科学家 Cruz-Migoni 等[5]发现。BLF1 由 BPSL1549 基因编码,结构类似于大肠杆菌细胞毒性坏死因子 1(CNF1-C),主要通过干扰蛋白质翻译起始,导致肌动蛋白细胞骨架的改变,并最终导致细胞死亡[9-10]。本研究采用 pGEX 载体,高效表达了 GST-BLF1 融合蛋白,并运用亲和层析方法纯化获得了纯度较高的 rBLF1 蛋白,经细胞和动物实验证实其具有生物学活性。

类鼻疽杆菌的致病机制尚不清楚,而 BLF1 作为其第 1 个被发现的能够导致死亡的毒力因子,在类鼻疽杆菌的致病中发挥着重要作用。类鼻疽的临床表现与多种疾病相似,故诊断极难,而 BLF1 作为类鼻疽杆菌的致死因子,能够引起强烈的免疫应答,其特异性的抗体检测将来可用于类鼻疽的实验室诊断。同时毒素 BLF1 的蛋白结构解析及其作用于细胞的分子生物学机制的研究,为寻找新型药物靶点奠定了坚实的理论基础,如将 BLF1 作为靶点研究新型的小分子药物,可用于钝化 BLF1 的作用位点,阻止其脱酰胺作用,进而防止细胞损伤,阻止疾病的发生。因 BLF1 对细胞的毒性较高,Cruz-Migoni 等[5]对其活性位点进行突变后,突变体 C94S 毒性显著下降,其谷氨酰胺脱酰胺酶活性受到抑制,将来可作为疫苗候选抗原。

BLF1 作用靶点为蛋白翻译起始因子 eIF4A 的解旋酶,能够抑制宿主细胞蛋白合成。本实验证实毒素 rBLF1 具有广谱细胞毒性,既能明显杀伤肿瘤细胞,同时也能杀伤正常细胞。但是从动物实验结果我们可看出,该毒素对正常小鼠致死剂量较高(与其他生物毒素如蓖麻毒素 10 μg/kg 相比)作用速度较慢(5 d 以前未见死亡),说明正常细胞对其可能具有一定耐受性。而肿瘤细胞生长旺盛,则更利于毒素的作用发挥。rBLF1 表现出对肿瘤细胞比较敏感、具有耐受正常细胞的特点[11],为毒素的抗肿瘤治疗提供了可行性。进一步我们正在探索毒素的治疗用药窗口剂量,使其在杀伤肿瘤细胞的同时不影响正常细胞的功能。另外,BLF1 是一种生物毒素,作为肿瘤药物作用于机体后,对正常细胞仍然具有一定的毒副作用,为了降低其毒副作用,可采用靶向给药方式将毒素递送至肿瘤细胞,如可通过双特异性抗体技术、抗体融合技术将 BLF1 结合的单克隆抗体或整合素 αVβ3 配体 RGD 肽靶向呈递肿瘤靶细胞发挥其肿瘤杀伤作用[12-15]。

参考文献:

[1] Wiersinga W J, Currie B J, Peacock S J. Melioidosis[J]. N Engl J Med, 2012, 367(11): 1035 – 1044. DOI: 10.1056/NEJMra1204699

[2] Foong Y C, Tan M, Bradbury R S. Melioidosis: a review [J]. Rural Remote Health, 2014, 4(4): 2763.

[3] Silva E B, Dow S W. Development of *Burkholderia mallei* and *pseudomallei* vaccines[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2013, 3: 10. DOI: 10.3389/fcimb.2013.00010

[4] 毛旭虎. 加强类鼻疽的研究[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(13): 1315 – 1317. DOI: 10.16016/j.1000-5404.2011.13.013

[5] Cruz-Migoni A, Hautbergue G M, Artymiuk P J, *et al*. A *Burkholderia pseudomallei* toxin inhibits helicase activity of translation factor eIF4A[J]. Science, 2011, 334(6057): 821 – 824. DOI: 10.1126/science.1211915

[6] Lindqvist L, Pelletier J. Inhibitors of translation initiation as cancer therapeutics[J]. Future Med Chem, 2009, 1(9): 1709 – 1722. DOI: 10.4155/fmc.09.122

[7] Chu J, Pelletier J. Targeting the eIF4A RNA helicase as an anti-neoplastic approach[J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1849(7): 781 – 91. DOI: 10.1016/j.bbagrm.2014.09.006

[8] Hautbergue G M, Wilson SA. BLF1, the first *Burkholderia pseudomallei* toxin, connects inhibition of host protein synthesis with melioidosis[J]. Biochem Soc Trans, 2012, 40(4): 842 – 845. DOI: 10.1042/BST20120057

[9] Fabbri A, Travaglione S, Ballan G, *et al*. The cytotoxic necrotizing factor 1 from *E. coli*: a janus toxin playing with cancer regulators[J]. Toxins (Basel), 2013, 5(8): 1462 – 1474. DOI: 10.3390/toxins5081462

[10] Buetow L, Flatau G, Chiu K, *et al*. Structure of the Rho-activating domain of *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor 1 [J]. Nat Struct Biol, 2001, 8(7): 584 – 588.

[11] From S, Plusa T. Today's threat of ricin toxin[J]. Pol Merkur Lekarski, 2015, 39(231): 162 – 164.

[12] Danhier F, Le-Breton A, Preat V. RGD-based strategies to target *al*pha(v) beta(3) integrin in cancer therapy and diagnosis [J]. Mol Pharm, 2012, 9(11): 2961 – 2973. DOI: 10.1021/mp3002733

[13] Fauvel B, Yasri A. Antibodies directed against receptor tyrosine kinases: current and future strategies to fight cancer [J]. MAbs, 2014, 6(4): 838 – 851. DOI: 10.4161/mabs.29089

[14] Kontermann R E, Brinkmann U. Bispecific antibody[J]. Drug Discov Today, 2015, 20(7): 838 – 847. DOI: 10.1016/j.drudis.2015.02.008

[15] de-Bruyn M, Bremer E, Helfrich W. Antibody-based fusion proteins to target death receptors in cancer[J]. Cancer Lett, 2013, 332(2): 175 – 183. DOI: 10.1016/j.canlet.2010.11.006

(收稿:2015-12-06;修回:2016-02-25)

(编辑 邓强庭)