维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)06-0571-04

肺炎链球菌毒力因子 PspA 的原核表达、纯化及鉴定

胥文春,曹 炬,许颂霄,罗进勇,阳 强,尹一兵

(重庆医科大学医学检验系实验诊断教研室 临床检验诊断学省部共建教育部重点实验室,重庆 400016)

【摘 要】目的:通过构建原核表达载体,获得肺炎链球菌毒力因子 PspA 重组蛋白。方法:分离培养肺炎链球菌 TIGR4,获取其染色体 DNA,采用基因体外重组法将 PspA 序列克隆到原核表达载体 PET-32(a)上,用酶切及测序鉴定。将重组质粒转化到大肠杆菌 BL21(DE3)中,经 IPTG 诱导,进行蛋白纯化,获得的重组蛋白用 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定。结果:克隆的 DNA 序列与 GenBank 中的数据相符,获得的重组蛋白 PspA 纯度达到 90%。结论:成功表达和纯化了 PspA,为肺炎链球菌多肽联合疫苗研制和该蛋白的结构生物学分析奠定了基础。

【关键词】肺炎链球菌;PspA;疫苗

【中国图书分类法分类号】R392.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-12-25

Expression and purification of *streptococcus pneumoniae* virulence factor PspA

XU Wenchun, et al

(*Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics, Ministry of Education, Faculty of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To obtain purified PspA produced by prokaryotic expression system. *Methods*: Template DNA was isolated from cultured Streptococcus pneumonia TIGR4.By gene recombination technology in vitro, sequence encoding PspA antigen epitope was cloned into PET-32 (a) expression vector. After being confirmed by sequencing, expressed antigen protein was identified by SDS-PAGE and Western blot. *Results*: The DNA sequence analysis confirmed that the cloned PspA gene was according to GenBank data.The PspA fusion protein was proved by Western blot. *Conclusion*: A highly expressed recombinant PspA protein was successfully obtained.

【Key words】Streptococcus pneumonia; PspA; Vaccine

肺炎链球菌是一种广泛传播的条件致病菌,目前仍然是严重侵袭性感染如脑膜炎、肺炎、败血症等最重要的病原体之一,全球每年死于肺炎链球菌感染的总人数大致与结核相仿[1]。流行病学调查显示,即使应用抗生素,肺炎链球菌感染后的死亡率仍然较高,并且耐药菌株还在不断增加,因此疫苗在其感染防治中的作用越来越重要。目前主要应用的是 23 价多糖疫苗和 7 价结合疫苗,但前者覆盖的血清型有限且不是 T 细胞依赖性的,对免疫系统发育不完善的 2 岁以下小孩和老年人的保护性弱[2];后者存在荚膜血清型转换和载体携带的荚膜多糖血清型数量有限以及生产成本很高,不适合在发展中国家大量使用,并且在肺炎高发人群中的保护作用小等问题[3],因此必须发展新型的肺炎链球菌疫苗,肺炎链球菌蛋白质(多肽)疫苗是目前发展前景最好的一种。肺炎链球菌自身的一些蛋白质如肺炎链球菌表面蛋白 A(PspA)、溶血素(ply)及肺炎链球菌胆碱结合蛋白 A(CbpA)等是肺炎链球菌蛋白疫苗的候选组分,它们作为肺炎链球菌毒力因子在肺炎链球菌引起的感染性疾病中起着重要的作用[4-6]。我们用基因重组技术表达并纯化肺炎链球菌毒力因子 PspA,为肺炎链球菌蛋白疫苗研制和 PspA 的结构生物学分析奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

作者介绍:胥文春(1968-),女,博士研究生,副教授,主要研究方向:病原微生物的致病机理及防治。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30471873)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.1.1 菌种和质粒 血清 4 型肺炎链球菌 TIGR4 购自美国国家菌种保藏中心(ATCC);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-32(a)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 *EcoR*I、*Kpn*I 为 Takara(大连)产品;IPTG 为 Sigma 产品;PrimeStarDNA 聚合酶,T4DNA 连接酶为 Takara(大连)产品;丙烯酰胺、双丙烯酰胺和 DAB 为 Sigma 产品;His TagM-cAb、His Bind Column(Ni-NTA)柱及 HRP 标记羊抗鼠 IgG 为 Novagen 公司产品;完全弗氏佐剂(CFA)和不完全弗氏佐剂(IFA)购于 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 目的片段的亚克隆 将肺炎链球菌 TIGR4 在 C+Y 培养基中增菌到对数生长中后期,按操作说明书提取基因组 DNA,以之为模板扩增 PspA 的 α 螺旋区(1329bp)。上游引物:5'-CGGGTACCATGATTTTAACAAGTCTAGCCAG-3',含 *Kpn*I 位点;下游引物:5'-CGGAATTCTTATTCTTCTTCATCTCCATC-3',含 *EcoR*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 聚合酶行 PCR 扩增,扩增条件:94℃预变性 5min;94℃1min,58℃1min,72℃1.5min,30 个循环;72℃延伸 5min。PCR 产物经 1%的琼脂糖凝胶电泳鉴定后,胶回收并与 PMD-18T 克隆载体连接,转化 DH5α 感受态细胞,蓝白筛选,选择阳性克隆增菌,提取质粒,酶切鉴定插入重组子,并送上海生工生物技术有限公司做双向测序。

1.2.2 PET-PspA 表达载体的构建 将测序正确的克隆载体用 *Kpn*I、*EcoR*I 双酶切,胶回收纯化目的片段。PET-32(a)表达载体经同样酶切处理,回收大片段。T4 DNA 连接酶连接,16℃过夜,转化感受态细胞 DH5α,扩增单菌落,提取质粒,双酶切及 PCR 鉴定。重组质粒转化感受态表达菌株 BL21(DE3),涂布于含 100mg/L 氨苄青霉素平板上,37℃培养 24~48h。

1.2.3 PET-PspA 重组载体的诱导表达 将重组表达载体转化的 BL21(DE3)单菌落接种入 LB 培养液(含 100mg/L 氨苄青霉素)中,37℃,250r/min 振摇过夜,再将饱和培养物按 1:20 接种至含相同抗生素浓度的 LB 培养液中,37℃,250r/min 振摇培养,待 A600=0.6~1.0 时加 IPTG(终浓度 =1mmol/L)诱导,37℃振摇 1~4h,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℃ 12000g 离心 10min 收获细菌。以 Binding Buffer (5mmol/L 咪唑,500mmol/L Na,20mmol/L Tris-HCl)洗 1 次,按 1g 湿菌重悬于 10ml 相同的溶液在冰上超声破菌。相关参数为:功率 235W,总时间 20min,每超声 3s 间隔 3s。将细菌超声破碎液以 12000g 低温离心 1h,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。

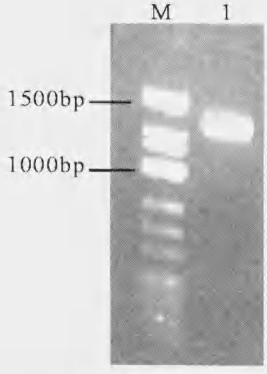
将超声破菌后的上清液用 0.45μm 滤膜过滤后转入镍层析柱内,依次加入 Binding Buffer、Wash Buffer(20mmol/L 咪唑,500mmol/L NaCl,20mmol/L Tris-HCl,pH7.9)洗柱,最后用 6 倍柱床体积的 Elute Buffer (400mmol/L 咪唑,500mmol/L NaCl,20mmol/L Tris-HCl,pH7.9)进行目的蛋白的洗脱,测定各洗脱管的 A_{280} 值。收集 Elute Buffer 洗脱蛋白,依次以 PBS 溶液进行透析除盐。Bradford 法蛋白定量,12% SDS-PAGE 监测各阶段目的蛋白情况。

1.2.5 Western blot 检测 取诱导的全菌裂解物,经 SDS-PAGE 用电转仪 60mA,转移 2h。以 1%BSA(PBS)为封闭液,His Tag McAb 1:1000 PBST(0.02Tween20)稀释为一抗,羊抗鼠 HRP-IgG 1:3000 稀释为二抗,DAB 为显色底物做 Western blot 检测。

2 结 果

2.1 目的片段的亚克隆

PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳,在 1300bp 附近出现清晰的扩增条带,产量高,无非特异条带(图 1),测序结果也证明基因克隆正确。



M:DNA 标准;1:PspA PCR 产物

图 1 PspA PCR 扩增产物

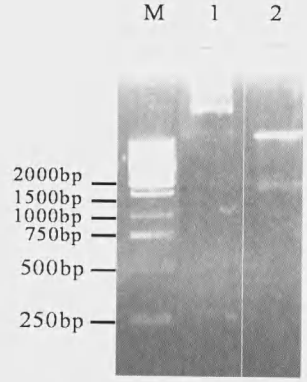
2.2 表达载体的构建

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,质粒抽提和双酶切后进行 1%的琼脂糖凝胶电泳,于期望位置上出现目的条带(图 2),PCR 也出现预期条带,证明 PspA 编码序列正确克隆入 PET-32(a)载体。

2.3 融合蛋白诱导表达与纯化

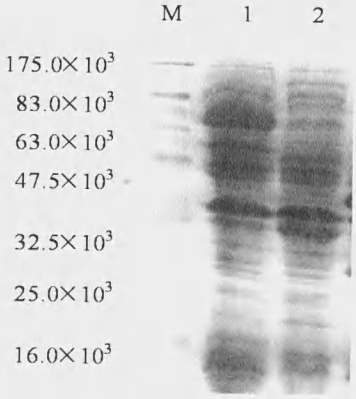
由 SDS-PAGE 图可见(图 3),转化菌诱导后,较未诱导菌有一条明显增粗的蛋白条带,其相对分子量为 70ku 左右,与期望值相符合(PspA 蛋白约为

维普资讯 http://www.cqvip.com



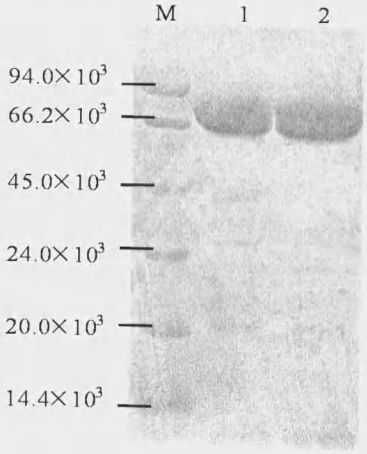
M:DNA 标准;1:PET-32(a)/PspA;2:PET-32(a)/PspA 双酶切结果

图 2 重组表达载体的双酶切鉴定



M:蛋白质标准;1:诱导转化菌的蛋白质表达产物;2:未诱导转化菌的蛋白质表达产物

图 3 重组蛋白的 SDS-PAGE 分析



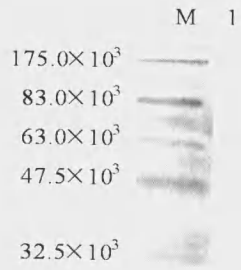
M:蛋白质标准;1~2:纯化的 PspA

图 4 纯化的 PspA 的 SDS-PAGE 电泳图

50ku,再加上 20ku 左右的硫氧还原蛋白)。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 4h 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,其中以上清形式存在为主。镍离子柱亲和层析后,透析除去咪唑,SDS-PAGE 证明纯化产物为单一蛋白,目的蛋白已达到相当纯度,凝胶扫描显示纯度达 90%(图 4)。

2.4 Western blot 检测

诱导的全菌裂解物于 70ku 左右处出现一条深棕色带(一抗为 HisTagMcAb,图 5),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。



M:蛋白标准(考马斯亮蓝染色);1:纯化蛋白(Western blot)

图 5 重组蛋白的 Western blot 分析

3 讨 论

PspA 是肺炎链球菌重要的毒力因子,在所有临床分离的肺炎链球菌中均发现其存在,目前它是肺炎链球菌蛋白疫苗候选成分的研究热点。PspA 主要由五个域组成:从 N 端到 C 端依次分为信号肽、α 螺旋区、组氨酸富集区、胆碱结合区和 C 端尾巴。其中 α 螺旋区是暴露在肺炎链球菌表面起着重要的毒力作用的功能区,用重组的 PspA 肽段主动免疫小鼠发现其氨基末端的 α 螺旋区是其表位所在点,也是抗体的作用靶点[7]。我们依据 TIGR4 的全基因组序列设计引物,扩增了 PspA 从 19 位到 1347 位共 1329 个碱基序列,这一序列包含了 PspA α 螺旋区和脯氨酸富集区等最重要的功能区和表位。

PET-32(a)原核表达载体含硫氧还原蛋白的编码序列,其可以增加目的蛋白的可溶性,我们采用该系统构建了 PET-PspA 表达载体。用不同浓度 IPTG 诱导,发现在终浓度为 0.2~1.0mmol/L 之间均可实现这一区域以可溶形式的高效表达,但在终浓度为 1.0mmol/L 诱导后 4h 表达最高。不同温度条件下的诱导,37℃、30℃和 40℃对其表达量和表达形式

维普资讯 http://www.cqvip.com

都无明显的影响。在经过镍离子亲和层析，透析除咪唑后，得到了纯度达到 90%的重组蛋白。从一级结构的序列分析、融合蛋白的分子量以及其带有的 6 个组氨酸接头等几方面，证实了该表达蛋白为 PspA。PspA 的成功表达为研制其单克隆抗体、动物免疫奠定了物质基础。

PspA 缺陷菌株在小鼠体内毒力明显下降，作为肺炎链球菌重要的毒力因子，其主要作用是与乳铁蛋白结合使其丧失功能并抑制补体活化，降低 C_{3b} 在肺炎链球菌表面的沉淀从而干扰补体介导的吞噬调理作用，而吞噬调理作用被认为是宿主清除肺炎链球菌最主要的途径[8,9]，但 PspA 在肺炎链球菌致病中所起的作用还没有完全阐明。目前还没有任何有关 PspA 结构生物学方面的报道，我们期待在实现其高效可溶性表达的基础上，能够研究其结构生物学，进一步阐明其功能。

（通讯作者：尹一兵，电话 023-68485658，E-mail:yibingyin@21cn.com。）

参 考 文 献

[1] Balakrishnan I,Crook P,Morris R,et al. Early predictors of mortality in *pneumococcal* bacteraemia[J].J Infect,2000;40(3):256-261.

[2] Veenhoven R,Le Thomas I,Uiterwaal C,et al. The vaccine impact surveillance network-invasive *pneumococcal* study group.Are current recommendations for *pneumococcal* vaccination appropriate for Western Australia[J].Med J Aust,2000;2(173):S36-40.

[3] Zhang JR,Mostov KE,Lamm ME,et al.The polymeric immunoglobin receptor translocates *pneumococci* across human nasopharyngeal epithelial cells[J].Cell,2000;102(6):827-837.

[4] Gor DO,Ding X,Briles DE,et al.Relationship between surface accessibility for PpmA, PspA,and PsaA and antibody-mediated immunity to systemic infection by *streptococcus pneumoniae*[J].Infect Immun,2005;73(3):1304-1312.

[5] Garcia-Suarez Mdel M,Cima-Cabal MD,Florez N,et al. Protection against *pneumococcal pneumoniae* in mice by monoclonal antibodies to pneumolysin[J].Infect Immun,2004;72(8):4534-4540.

[6] Rosenow C,Ryan P,Weiser JN,et al.Contribution of novel choline-binding proteins to adherence,colonization and immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae*[J].Mol Microbiol,1997;25(5):819-829.

[7] Roche H,Hakansson A,Hollingshead SK,et al.Regions of PspA/EF3296 best able to protect against *streptococcus pneumoniae* in murine infection model[J].Infect Immun,2003;71(3):1033-1041.

[8] Bogaert D,De Groot R,Hermans PW. *Streptococcus pneumoniae* colonization:the key to pneumoncoccal disease[J].Lancet Infect Dis,2004;4(3):144-154.

[9] Briles DE,Hollingshead SK,Nabors GS,et al.The potential for using protein vaccines to protect against otitis media caused by *streptococcus pneumoniae*[J].Vaccine,2001;19(S11):S87-95.

（上接第 567 页）

深入的研究，以阐明羊水膜内转运和平衡调控的分子机制，有望为羊水量异常的治疗提供新的策略。

参 考 文 献

[1] Daneshmand SS,Cheung CY,Brace RA. Regulation of amniotic fluid volume by intramembranous absorption in sheep:Role of passive permeability and vascular endothelial growth factor[J].Am J Obstet Gynecol,2003;188(3):786-793.

[2] Matsuzaki T,Tajika Y,Tserentsoodol N,et al.Aquaporins:a water channel fanmily[J].Anat Sci Int,2002;77(2):85-93.

[3] Hayflick L.The establishment of a line (WISH)of human amnion cells in cintimuous cultivation[J].Exp Cell Res,1961;23:14-20.

[4] Gradilone SA,Garcis F,Huebert RC,et al.Glucagon induces the plasma membrane insertion of functional aquaporin-8 water channels in isolated rathepatocytes[J].Hepatoloty,2003;37(6):1435-1441.

[5] Calamita G,Mazzone A,Cho YS,et al.Expression and localization of the aquaporin-8 water channel in rat testis[J].Biology of reproduction,2001;64:1660-1666.

[6] Wang S,Chen J,Katherine T,et al.Expression of aquaporin-8 and its up-regulation by cyclic adenosine monophosphate in human WISH cells[J]. Am J Obstet Gynecol,2003;18:997-1001.

[7] Wang S,Kallichanda N,Song W,et al. Expression of aquaporin-8 in human placenta and chorioamniotic membranes:evidence of molecular mechanism for intramembranous amniotic fluid resorption[J]. Am J Obstet Gynecol,2001;185:1226-1231.