DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.13.009
第25卷第13期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 13
1140 2003年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 200

论著

文章编号:1000-5404(2003)13-1140-03

铜绿假单胞菌噬菌体 PaP3 一个结构蛋白的 N-端测序及编码基因的确定

张克斌,金晓琳,朱军民,陈志瑾,饶贤才,胡福泉 (第三军医大学基础医学部微生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 确定铜绿假单胞菌噬菌体 PaP3 的主要结构蛋白基因。方法 将噬菌体 PaP3 颗粒用 CsCl 梯度离心纯化,SDS-PAGE 电泳其结构蛋白后,电转印于 PVDF 膜上,再用 Edman 降解法对主要结构蛋白作 N 端测序,根据蛋白 N 端 5 个氨基酸残基序列逆推其编码读框。结果 PaP3 主要结构蛋白的 N 端 5 个氨基酸残基顺序为:Ala-Thr-Pro-Thr-Asn。结论 据此推定其编码基因为 ORF 36 354~37 307(负链)编码的蛋白,该蛋白共有 318 氨基酸,其等电点为 7.70,分子质量为 35 024.46。

关键词:铜绿假单胞菌;噬菌体;蛋白质;N 端测序
中图法分类号:Q939.48;R394-33;R394.3 文献标识码:A

N-end sequencing and determination of coding gene of a structural protein in *Pseudomonas aeruginosa* phage PaP3

ZHANG Ke-bin, JIN Xiao-lin, ZHU Jun-min, CHEN Zhi-jin, RAO Xian-cai, HU Fu-quan (Department of Microbiology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To determine the coding gene of the major structural protein in *Pseudomonas aeruginosa* phage PaP3. Methods Phage particles of PaP3 were purified by CsCl gradient centrifugation. The phage structural proteins were analyzed by SDS-PAGE and transferred to PVDF film. Then N-end of the major structural protein was sequenced by Edman degradation method. The sequence of 5 amino acids at N-end was used to concluded the coding gene of the major structural protein. Results The sequence of the 5 amino acids at the N-end of the major structural protein were Ala-Thr-Pro-Thr-Asn. Conclusion The coding gene of the major protein of phage PaP3 is ORF 36 354~37 307 (reverse). The protein consists of 318 amino acids and its putative isoelectric point (pI) is 7.70, molecular weight (MW) is 35 024.46.

Key words: *Peudomonas aeruginosa*; phage; protein; N-end sequencing

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)是人体最重要的条件致病菌之一,是创(烧)伤及免疫受损机体最易感染的细菌之一,严重危害着人类的健康。噬菌体(Bacteriophage)是细菌的病毒[1~3],有望发展成为抗细菌感染的生物制剂[1]。最近,铜绿假单胞菌 PAO1 菌株全基因组测序工作已完成[2],而铜绿假单胞菌噬菌体的基因组研究工作的积累仍非常有限。为此,我们对一新分离的铜绿假单胞菌溶原性噬菌体 PaP3 展开了全基因组测序[3],序列已登录 GenBank(Accession number:AY078382);生物信息学分析发现 69 个预测基因;在氨基酸水平的比对分析发现 4 个预测基因的编码产物有同源性序列的存在并能初步确定其功能[4]。但未发现噬菌体衣壳蛋白等结构蛋白的同源性蛋白的存在,不能确定 PaP3 的结构蛋白的编码基因,也无法对这些蛋白及病毒颗粒特性进行进一步研究。本研究直接纯化噬菌体 PaP3 颗粒,将其结构蛋白行 SDS-PAGE,电泳蛋白带电转印至 PVDF 膜,然后作蛋白 N-端测序,再逆向确定其编码基因并推断其蛋白特性,为进一步对该蛋白的特性和功能的研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 噬菌体 PaP3 颗粒的 CsCl 梯度离心纯化

1.1.1 CsCl 梯度液的制备 参照文献[5]λ 噬菌体纯化方法和 CsCl(Sangon,上海生工)密度梯度。按表 1 制备各梯度液,在 5 ml 半透明聚丙烯离心管中,从高密度到低密度依次加入各梯度液 1 ml,注意保持梯度液间界面清晰。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30070037),重庆市攻关课题(2000)
作者简介:张克斌(1968-),男,四川省岳池县人,博士,主治医师,讲师,主要从事微生物学和分子生物学方面研究,发表论文 10 篇。现在附属新桥医院医学实验技术中心。电话:(023)68755381
通信作者:胡福泉,电话:(023)68752240,E-mail:hoofuquan@yahoo.com.cn
收稿日期:2002-11-27;修回日期:2003-04-19

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 1　梯度液的制备(100 ml)

Tab 1　Preparation of CsCl density gradient system(100 ml)

Density(ρ)(g/ml)	CsCl(g)	TM buffer *(ml)	Refractive ratio
1.45	60	85	1.376 8
1.50	67	82	1.381 5
1.70	95	75	1.399 0

*: TM buffer: 0.05 mol/L Tris-HCl, pH 7.5; 0.2%$MgSO_4 \cdot 7H_2O$

1.1.2　PaP3 颗粒的纯化　　噬菌体颗粒的制备见文献[6]。将噬菌体颗粒液小心加在梯度离心液上, 注意保持界面的清晰, 于 4 ℃, 22 000 r/min 离心 2 h; 用针头小心从管顶插入, 收集灰色的噬菌体颗粒条带, 转入预先用透析液[10 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris-Cl(pH 8.0), 10 mmol/L $MgCl_2$] 煮好的透析袋中; 于 4 ℃液中透析, 每 30 min 换液 1 次, 共换液 5、6 次即可。再于 Speed Vac Plus SC110A(Savant)低温离心干燥机上浓缩。

1.2　噬菌体 PaP3 蛋白的 SDS-PAGE 电泳

参照文献[5]方法略加改进。标本处理: 取噬菌体 PaP3 纯化颗粒浓缩液, 加入等量的 2× 蛋白加样缓冲液[含 0.12 mol/L Tris-HCl(pH 6.8), 20%(体积分数)甘油, 4%(w/v)SDS, 10%(体积分数) β-巯基乙醇(上海生工, 使用时加入)], 混匀, 于沸水中煮沸 10 min, 使 PaP3 结构蛋白充分变性, 置室温冷却。同法处理低分子质量标准蛋白质。低分子质量标准蛋白质由中科院上海生物化学研究所监制, 共 6 个组份, 分子质量从大到小依次为: 兔磷酸化酶 B(97 400)、牛血清白蛋白(66 200)、兔肌动蛋白(43 000)、牛碳酸酐酶(31 000)、胰蛋白酶抑制剂(20 100)、鸡蛋清溶菌酶(14 400)。其余方法见文献[5]。电泳后凝胶用 GEL-DOS 1000(BioRad)凝胶成像仪成像, 分子质量大小分析使用 Quantity 1 软件。

1.3　PaP3 蛋白转印 PVDF 膜

参照网站 http://www.expasy.ch/ch2d/protocols/protocols.fm8.html/ 上提供的条件和方进行。SDS-PAGE 凝胶去积层胶, ddH_2O 浸泡 3 min; 将凝胶与约大于凝胶块的 PVDF 膜一并置 PVDF 电转印缓冲液[Tris 13 mmol/L, 甘氨酸 100 mmol/L, 甲醇 10%]中平衡 30 min; 按文献[5]方法制备电转印三明治夹层, 电泳槽置于 4 ℃冰箱内以保证电转印时槽内温度低于 15 ℃, 电转印 90 V 持续 3 h; 取转印后 PVDF 膜于 0.5%考马斯亮蓝 R-250 甲醇液中, 室温染色 5 min; 50%甲醇脱色, 直至 PVDF 膜背景干净, 蛋白条带清晰, 37 ℃烤干, 干净滤纸夹放送检测序。

1.4　蛋白 N-端测序

转至 PVDF 膜上蛋白样品送北京大学生命科学院进行 N-端测序, 使用 Edman 降解法, 在 PE ABD Protein Sequence 494A 上完成。由于样品量的要求, 只进行了 35× 10^3 结构蛋白的 N 端 5 个氨基酸残基的测序。

1.5　35× 10^3 结构蛋白读框的确定

根据 N-端 5 个氨基酸序列, 从 Genemark 所预测的 69 个待定基因中查询对应编码读框。

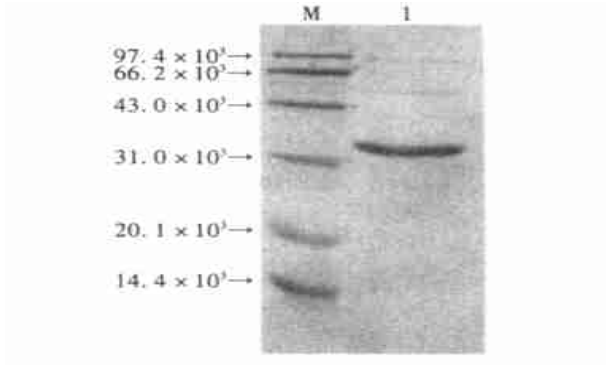
1.6　35× 10^3 结构蛋白一般性质分析

在网站: http://www.expasy.ch/上对 35× 10^3 结构蛋白的分子质量(Molecular weight, MW)、等电点(Isoelectric point, pI)和氨基酸组成进行分析。

2　结果

2.1　噬菌体蛋白 SDS-PAGE 电泳图谱

SDS-PAGE 电泳结果如图 1。经 SDS-PAGE 电泳后, 在凝胶上可以清晰地看到 3 条带, 分子质量分别为 35× 10^3、50× 10^3 和 90× 10^3, 其中 35× 10^3 蛋白量最大, 50× 10^3 和 90× 10^3 蛋白量较少。其余条带模糊难辨。



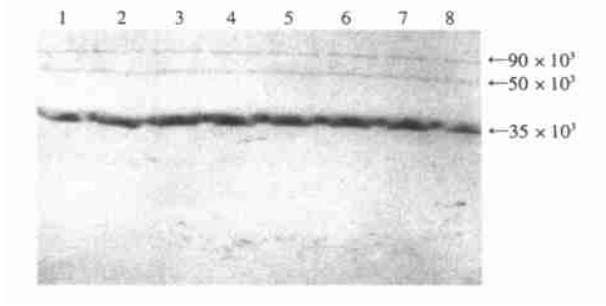
M: Marker; 1: Phage PaP3

图 1　PaP3 噬菌体蛋白 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig 1　SDS-PAGE electrophoresis of the structural proteins of phage PaP3

2.2　噬菌体蛋白转印 PVDF 膜图谱

将电泳分离条带转印到PVDF膜上, 见图 2。共 8 条泳道的膜上存在染色清晰的蛋白条带有 3 条, 分别是 35× 10^3、50× 10^3 和 90× 10^3, 其中 35× 10^3 蛋白量最大, 50× 10^3 和 90× 10^3 蛋白量较小。



1~8: Phage PaP3 structural proteins transferred

图 2　PaP3 噬菌体蛋白转印 PVDF 膜图谱

Fig 2　Diagram of phage PaP3 structural proteins transferred to PVDF film

2.3　35× 10^3 结构蛋白 N-端测序结果

经 N-端测序, 得知 35× 10^3 蛋白 N-端 5 个氨基酸测序是: Ala-Thr-Pro-Thr-Asn。

2.4　35× 10^3 蛋白编码 ORF 的确定

从 Genemark 所预测的 69 个待定基因编码产物中, 查询到 N-端 5 个氨基酸序列为 Ala-Thr-Pro-Thr-Asn 的蛋白只有一个(N-

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

末端的第一个蛋氨酸丢失，这是常见现象），即 ORF 36 354～37 307（负链）编码的蛋白。该蛋白共有 318 个氨基酸，完整的氨基酸序列为：

MATPTNAVSTVEINGKREDLIDIIYNIAPYDTPFMSAIGKGVATAITHE
WQTDELRQPGKNTRVEGEDATIKAGSFTTMLNNYCQISDETLQVTGTA
DRVKKAGRKNELAYQLAKKSKELKLDMEYALVGAPQAKVQRNTTTP
GQMANIFAYYKTNGSIGANGVAPVGDGSNTGTAGDLRLLTEDMLLNAS
ESIWRNGGQANSIQTSSSIKKAISKNMKGRATEITLDASDNRIAQTVDV
YESDFGKYTIRANRWFHENTLFVFDPKMHSLCYLRPFFQHELAKTGD
SEKRQLLVEYTFRVNNEKSGALIRDVVAQL

2.5 35×10^3 蛋白性质分析

上述 ORF 36 354～37 307 所编码的 318 个氨基酸的蛋白质，其 pI 为 7.70，MW 为 35 024.46。从该蛋白的预测分子质量可以看出于与上述 35×10^3 蛋白（图 1）的电泳的结果极为吻合，这也从另一方面说明 35×10^3 蛋白的编码基因正是 ORF 36 354～37 307。

3 讨论

由于噬菌体能充分利用其宿主菌的 DNA 复制、转录和翻译工具，完成自己的 DNA 复制和蛋白质的合成，及噬菌体颗粒的组装。所以噬菌体基因组所编码的蛋白主要是噬菌体本身必需的结构蛋白和一些 DNA 复制和转录的调节蛋白及一些蛋白组装所需的辅助蛋白，而其中结构蛋白的拷贝数较高，调节蛋白和辅助蛋白的转录和翻译水平很低。所以，经敏感性一般的 SDS-PAGE 电泳后，能在凝胶上清晰可见的往往是噬菌体的结构蛋白。噬菌体结构蛋白图谱也因不同的噬菌体而出现很大的差异，有的噬菌体结构蛋白经 SDS-PAGE 电泳后出现几十条不同的条带，而有的仅 3～5 条带[6]。

噬菌体 PaP3 结构蛋白经 SDS-PAGE 电泳后，清晰的条带只有 3 条，分子质量分别约为 35×10^3、50×10^3 和 90×10^3，其中 35×10^3 蛋白量最大，50×10^3 和 90×10^3 蛋白量较小。由此可见，35×10^3 蛋白为其主要结构蛋白，其拷贝数最高。通常说来，噬菌体衣壳蛋白的拷贝数最高，因此推测 35×10^3 蛋白是噬菌体 PaP3 的衣壳蛋白。但最终的证实需要纯化 35×10^3 蛋白，制备其相应的抗体，作免疫电镜观察确定。

除 HPLC 等高质量纯化蛋白方法外，SDS-PAGE 电泳后，通过电转印或其它转印如真空转印 PVDF 膜后，再洗脱测序是一种常规而方便的蛋白测序样品制备方法。在进行 PVDF 膜电转印时，本研究参考了网站 http://www.expasy.ch/ch2d/protocols/protocols.fm8.html/ 上的方法，采用其提供的缓冲液和电转印条件，实验证明该方法是可行的，但转印后凝胶染色发现仍有相当一部分的蛋白未能转印到 PVDF 膜上，将电转印条件改为恒压 90 V，持续 6 h，甚至延长至过夜，结果发现未能明显提高蛋白的转印效率，其原因尚不清楚。

目前，国际上多采用 Edman 降解法进行蛋白质 N-端测序，该方法的成熟性和自动化程度都很高。但就对测序样品的需求量而言，目前国内外尚有差距，美国 Applied biosystems 公司能检测的样品量下限为 10 pmol/L，但他们对 PVDF 膜有着较高的要求，但需其指定的 Problot 公司的 PVDF 膜，在国内短期内能获得该公司的 PVDF 膜并非易事。本研究采用了 Roche 公司的 PVDF 膜，在北京大学生命科学院进行蛋白质 N-端测序，其对样品的要求量为 500 pmol/L，膜上只有 35×10^3 蛋白条带能达到其用量要求，而 50×10^3 和 90×10^3 蛋白带较弱，与所需样品量相去甚远，所以本研究仅测定了 35×10^3 蛋白的 N-端 5 个氨基酸残基，而 50×10^3 和 90×10^3 蛋白将在随后的大量噬菌体颗粒纯化后经 HPLC 分离到足够样品量后进行。

35×10^3 蛋白 N-端测序结果是 ATPTN，即从氨基端开始前面五个氨基酸依次是：A，Ala（丙氨酸）、T，Thr（苏氨酸）、P，Pro（脯氨酸）、T，Thr（苏氨酸）和 N，Asn（门冬酰胺）。而在其相应的基因组的读框上其 N-端为 MATPTN，即在 A，Ala（丙氨酸）前有一个 M，Met（甲硫氨酸），这是因为在样品制备过程中，甲硫氨酸极易断裂脱落所致。

在对 35×10^3 蛋白在核酸和蛋白水平进行 BLAST 分析时，均未发现有明显同源性序列存在。故在对其二、三级结构特别是三级结构进行预测分析时，因缺乏已知的蛋白质结构参照，其可信程度极低，故在此不作二、三级结构预测。

参考文献：

[1] 网上快讯：噬菌体重返生物治疗舞台[J]. 国外医学微生物学分册，1999，22(4)：42.

[2] Stover C K，Pham X Q，Erwin A L，*et al*. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1，an opportunistic pathogen[J]. Nature，2000，406(6799)：959－964.

[3] 张克斌，金晓琳，朱军民，等. 铜绿假单胞菌噬菌体 PaP3 基因组测序[J]. 第三军医大学学报，2002，24(4)：378－380.

[4] 张克斌，金晓琳，朱军民，等. 铜绿假单胞菌噬菌体 PaP3 基因组的初步注释[J]. 第三军医大学学报，2002，24(4)：381－384.

[5] J. 萨姆布鲁克. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 北京：科学出版社，1996：133－135，880－885.

[6] Tremblay D M，Monieau S. Complete genomic sequence of the lytic bacteriophage DT1 of Streptococcus thermophilus[J]. Virol，1999，255(1)：63－76

（编辑 张大春）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net