

• 论 著 •

肺炎链球菌重组 PrtA 蛋白克隆与表达的相关研究

卢杰^{1△}, 王忠伟², 计红², 马越¹, 李昶³, 姜世君¹

(1. 大庆医学高等专科学校基础医学部, 黑龙江大庆 163312; 2. 黑龙江八一农垦大学动物科技学院, 黑龙江大庆 163319; 3. 大庆医学高等专科学校招生就业办公室, 黑龙江大庆 163312)

摘要:目的 构建携带 PrtA 基因的原核表达载体, 诱导表达具有活性的重组 PrtA 融合蛋白。方法 根据 GenBank 中肺炎链球菌表面蛋白细胞壁相关丝氨酸蛋白酶 A(PrtA) 蛋白基因序列, 设计合成了一对特异性引物, 扩增目的片段, 建立了 RT-PCR 检测方法。应用 RT-PCR 方法扩增得到 PrtA 蛋白基因, 并克隆到 pMD18-T 载体上, 筛选、鉴定阳性重组子 pMD18-T-PrtA, 然后克隆到原核表达载体 pET-30a(+) 上, 经双酶切、PCR 鉴定, 获得重组表达质粒 pET-30a-PrtA。将含有 pET-30a-PrtA 的重组菌, 经终浓度为 0.6 mmol/L 的 IPTG 诱导后, 重组 PrtA 蛋白获得高效表达。通过 Western blot 检测结果, 检测表达的重组 PrtA 蛋白的反应原性。结果 所获 PrtA 基因与 GenBank 的基因序列同源性为 99%; 重组质粒经 IPTG 诱导, 不同浓度的 IPTG 均能诱导重组蛋白表达, 且 IPTG 终浓度为 0.6 mmol/L 时, 目的蛋白的表达量最高, 约占菌体总蛋白的 18%。通过抗-His 标签单克隆抗体在 IPTG 诱导 6 h 的重组菌蛋白中检测到一条大小约为 40×10^3 的特异性清晰条带, 与预期结果相符, 表明表达的蛋白为肺炎链球菌重组 PrtA 蛋白。结论 成功地克隆和表达了肺炎链球菌表面蛋白细胞壁 PrtA, 为进一步研究以 PrtA 蛋白作为免疫原预防和治疗由肺炎链球菌引起的疾病奠定基础。

关键词: 链球菌, 肺炎; 克隆, 分子; 基因表达; 链球菌表面蛋白细胞壁相关丝氨酸蛋白酶

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.01.005

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)01-0013-03

Cloning and prokaryotic expression of recombinant pneumococcal PrtA protein

Lu Jie^{1△}, Wang Zhongwei², Ji Hong², Ma Yue¹, Li Chang³, Jiang Shijun¹

(1. Department of Basic Medicinet, Daqing Medical College, Daqing, Heilongjiang 163312, China;

2. College of Animal Science and Technology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing, Heilongjiang

163319, China; 3. Admission and Employment Offices, Daqing Medical College, Daqing, Heilongjiang 163312, China)

Abstract: **Objective** To construct a prokaryotic expression vector carrying PrtA gene, and to express recombinant pneumococcal surface proteins cell wall associated serine proteinase A(PrtA) fusion protein with activities. **Methods** PrtA gene specific primers were designed and synthesized according to database in GenBank. RT-PCR, amplifying target fragment was constructed by testing different optimized condition. Then, PrtA gene was amplified by RT-PCR from total RNA and cloned into pMD18-T vector. The positive pMD18-T-PrtA plasmid was constructed by screening and identification. Then the target gene was subcloned into the downstream of pET-30a(+) vector, which was denominated as pET-30a-PrtA, and the insertion of target gene into pET-30a(+) vector was confirmed by PCR and restriction enzyme digestion. The recombinant strain E. coli BL21 (pET-30a-PrtA) was induced by 0.6 mmol/L IPTG and the recombinant PrtA protein was expressed at high level. It has been proved that the recombinant PrtA protein of Streptococcus pneumoniae(S. pneumoniae) had good reactionogenicity by western-blot. **Results** The PrtA gene shared 99% nucleotide homology to GenBank sequences. Reconstructed pET-30a-PrtA plasmid, being induced by IPTG, showed that different concentrations of IPTG all could induce recombinant protein expression, and when the concentration of IPTG eventually was 0.6 mmol/L, the expression of objective protein reached the highest level, accounts for about 18% of thalline total proteins. Clear specificity channel of molecular weight about 40×10^3 could be detected among thalline total proteins of reconstructed plasmid, when being induced by IPTG for 6 h, with monoclonal antibody labeled by Anti-His, which matched with expectation and indicated that the expressed protein was recombinant pneumococcal PrtA protein. **Conclusion** PrtA gene from S. pneumoniae was cloned and expressed successfully, laying bases for further research of PrtA protein to be used as immunogen for the prevention and treatment of diseases caused by S. pneumoniae.

Key words: streptococcus pneumoniae; cloning, molecular; gene expression; pneumococcal surface proteins cell wall associated serine proteinase A

肺炎是最常见的一种呼吸道疾病, 主要是由细菌和病毒引起^[1], 其中最主要的病原菌是肺炎链球菌。研究表明, 疫苗免疫是预防肺炎链球菌的最有效方法, 开发新型、安全、高效抗链球菌的疫苗已成为控制该菌感染的研究热点^[2]。肺炎链球菌表面蛋白细胞壁相关丝氨酸蛋白酶 A(PrtA) 是链球菌重要的一种相关性蛋白, 丝氨酸蛋白酶是一类以丝氨酸为活性中心的

重要的蛋白水解酶^[3], 在生物有机体中起着重要而广泛的生理作用, 其通过对蛋白酶原的激活或抑制而起调节因子作用, 丝氨酸蛋白酶还在胚胎发育、组织重建、细胞分化、血管形成、病原侵入等过程中都发挥着重要的作用^[4-5]。因此, PrtA 是开发新型疫苗的理想候选抗原, 已有研究表明以 PrtA 蛋白为靶向制备肺炎链球菌蛋白亚单位疫苗及核酸疫苗, 将为解决肺炎链

△ 通讯作者, E-mail: luxinxin_12345@163.com。

球菌感染的预防问题提供一定的参考及研究基础^[6]。本研究运用基因工程的方法,将扩增的 PrtA 基因与表达载体相连,在大肠杆菌内成功表达^[7],为进一步研究血清中抗 PrtA 蛋白的间接 ELISA 方法的建立奠定前期基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器 肺炎链球菌标准株 ATCC10231、大肠杆菌菌株 JM109、DH5 α 由大庆医学高等专科学校微生物实验室保存;E. coli BL21(DE3)和 pET30a(+)表达载体由哈尔滨医科大学微生物实验室惠赠;pMD18-T 载体、氨苄西林购自 TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司;T₄ DNA 连接酶、限制性内切酶 BamH I 和 Xho I 购自美国 Promega 公司;二硫苏糖醇(DTT)购自美国 Ameresco 公司;异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)、dNTP、LA TaqTM DNA 聚合酶、DGL2000 DNA 标记为北京鼎国生物技术公司产品;GoldviewTM DNA 染料购自北京赛百盛基因技术有限公司;琼脂糖凝胶 DNA 纯化试剂盒购自杭州维特洁生化技术有限公司;一抗为实验室制备免疫后效价高的免疫血清,二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG,购自 SIGMA 公司;其他化学试剂为国产分析纯。PCR 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成,UV-754 分光光度计为上海亚荣生化仪器厂产品。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 Primer Premier5.0 软件设计并合成特异性引物。上游引物:5' ATA GGA TCC AAG CAA TCA AGG GAC TA 3';下游引物:5' CCG CTC GAG TTA CCC GTA GCG ACA AC 3'。

1.2.2 基因组 DNA 的提取和扩增 采用蛋白酶 K 法提取肺炎链球菌标准株 ATCC10231 基因组 DNA,PCR 扩增基因 DNA^[8]。反应体系:5 μ L 10 倍 PCR 反应液(2.5 mmol/L MgCl₂)、4 μ L[三磷酸脱氧核糖核苷(dNTP)(2.5 mmol/L)]、1 μ L 上游引物(10 μ mol/L)、1 μ L 下游引物(10 μ mol/L)、0.5 μ L LA TaqTM DNA 聚合酶(5 U/ μ L)、1 μ L DNA 模板,加入双蒸水至总体积为 50 μ L。反应条件:94 $^{\circ}$ C 4 min;94 $^{\circ}$ C 45 s,50 $^{\circ}$ C 40 s,72 $^{\circ}$ C 50 s,30 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 10 min。反应结束后,PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定并回收。

1.2.3 PCR 扩增产物的纯化及 PrtA 基因的克隆、鉴定。 按照琼脂糖凝胶 DNA 纯化试剂盒说明书纯化 PCR 扩增产物,并通过 T₄ DNA 连接酶与 pMD18-T 载体连接得到重组质粒 pMD18-T-PrtA,热激法转化 E. coli BL21(DE3)感受态细胞,将其涂布于含氨苄西林的 LB 培养基上,37 $^{\circ}$ C 培养过夜,提取重组质粒酶切鉴定;未酶切组作为对照组。

1.2.4 重组质粒 pMD18-T-PrtA 的序列测定和序列分析。 使用 DNASTar 软件包分析序列测定结果。酶切鉴定正确的重组质粒 pMD18-T-PrtA 送上海生工生物技术服务有限公司进行序列测定,并使用 DNASTar 软件包分析测序结果。

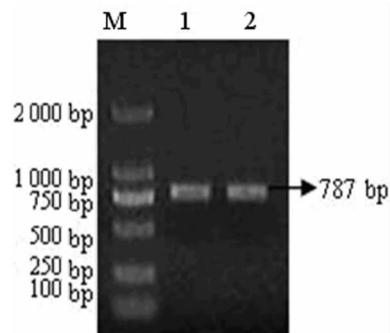
1.2.5 重组 PrtA 蛋白原核表达载体的构建和 PrtA 蛋白的诱导表达、纯化及定量。 将重组质粒双酶切、回收的 PrtA 基因和线状表达载体连接,转化大肠杆菌感受态细胞,酶切鉴定阳性重组菌 pET-30a-PrtA。阳性重组菌 pET-30a-PrtA 用不同浓度的 IPTG(终浓度 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mmol/L)和不同诱导时间(1、2、3、4、5、6 h)对表达菌株进行表达优化;利用 pET-30a(+)原核表达载体带有的 6 $\times$ His-tag 选择性标签,应用蛋白纯化系统,按照产品说明进行重组蛋白的纯化。

1.2.6 Western blotting 检测抗体特异性。 将目的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳分离,然后转移到硝酸纤维素膜上,转膜时间 4 h。转膜结束后,用洗涤缓冲液漂洗硝酸纤维素膜 3 次,抗

PrtA 多克隆抗体为一抗,羊抗鼠 HRP IgG 为二抗孵育,用 DAB 显色液进行显色。

2 结果

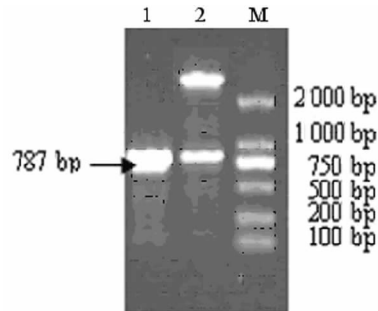
2.1 RT-PCR 扩增 PrtA DNA 片段 用引物引导的 PCR 产物紫外灯下可观察到明显的条带,片段大小约 787 bp,与预计的一致,PCR 结果见图 1。



M:DL2000 DNA 标记;1,2:PCR 产物。

图 1 RT-PCR 产物

2.2 重组质粒的 PCR 及酶切鉴定 将 PCR 产物与 pMD18-T 载体连接,PCR 鉴定结果如图 2 所示。对有可能插入目的基因的重组质粒进一步进行酶切鉴定,经 BamH I 和 Xho I 双酶切的重组质粒,切出一条约 787 bp 的片段,见图 2。

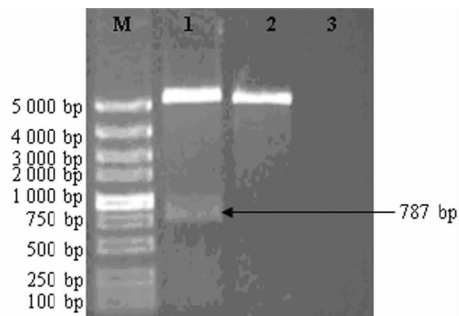


M:DL2000 DNA 标记;1:pET-30a-PrtA PCR 产物;2:重组质粒酶切产物。

图 2 重组质粒的 PCR 鉴定与酶切鉴定结果

2.3 PrtA 基因序列分析 将 PCR 和酶切鉴定正确的重组质粒送上海生工生物公司进行序列测定,PrtA 基因测序结果与原设计序列经 DNASTar 软件分析,其同源性为 99%。

2.4 表达重组质粒的酶切鉴定 重组质粒的酶切鉴定见图 3。pET-30a-PrtA 经 BamH I 和 Xho I 进行双酶切后,出现 5 356 bp 的线性化片段和 787 bp 的目的片段。

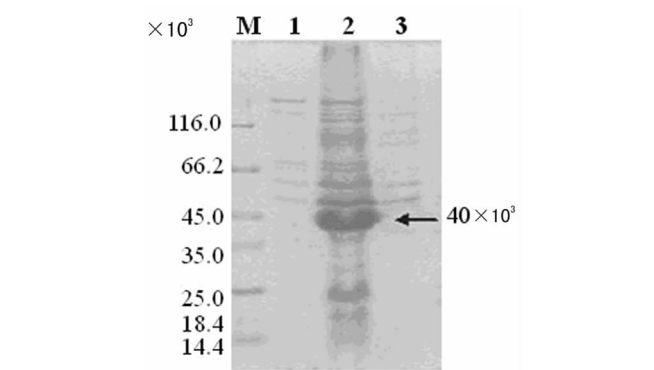


M:DNA 5000 marker;1:重组表达载体;2:表达载体;3:空白对照。

图 3 pET-30a-PrtA 双酶切(BamH I 和 Xho I)

2.5 重组 PrtA 基因在宿主菌中的表达 将转化菌接种于 LB

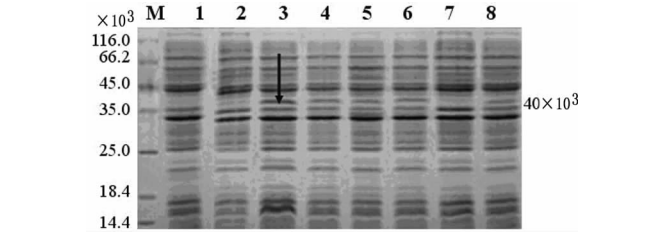
培养基后,培养至对数生长期时加 IPTG 诱导 6 h,进行 SDS-PAGE 电泳检测,在约 40×10^3 处可见目的条带出现,结果见图 4。



M: 低相对分子质量蛋白标准; 1: 诱导前对照; 2: 包涵体; 3: 上清液。

图 4 包涵体蛋白

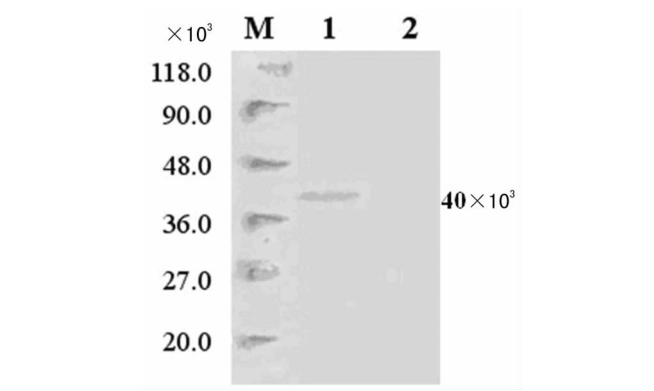
2.6 IPTG 诱导重组蛋白表达的最适浓度 不同浓度的 IPTG 诱导表达的重组菌蛋白经过 SDS-PAGE 分离和 Band-scan 软件分析显示,不同浓度的 IPTG 均能诱导重组蛋白表达,且 IPTG 浓度为 0.6 mmol/L 时,目的蛋白的表达量最高,约占菌体总蛋白的 18%,见图 5。



M: 低相对分子质量蛋白标准; 1~6: 诱导 1~6 h 重组质粒 pET-30a-PrtA(DE3), 箭头指向 3 h; 7: 诱导的空载体 pET30a(+); 8: 未诱导的空载体 pET30a(+).

图 5 不同浓度的 IPTG 诱导重组蛋白表达

2.7 重组蛋白的 Western blot 分析 通过抗-His 标签单克隆抗体在 IPTG 诱导 6 h 的重组菌蛋白中检测到一条大小约为 40×10^3 的特异性清晰条带(图 6),与预期结果相符,表明表达的蛋白确为重组蛋白。



M: 蛋白核; 1: PrtA 融合蛋白; 2: 阴性对照。

图 6 重组蛋白的 Western blot 检测

3 讨论

肺炎链球菌是获得性呼吸道感染的一种重要病原微生物,也是引起细菌感染性疾病的主要致病菌,肺炎链球菌疫苗在肺炎链球菌感染防治中的作用越来越突出,发展肺炎链球菌蛋白

疫苗迫在眉睫^[9-10]。伴随着肺炎链球菌新的毒力蛋白质不断发现^[11],各种蛋白质的组合方式和投递途径优化,会出现能够防治肺炎链球菌感染的蛋白疫苗^[12-13]。

原核表达是一种十分有效的表达外源基因的技术,具有操作简单、表达量高、易于纯化等特点。pET30a(+)载体所表达的蛋白 N 末端带有 $6 \times \text{His}$ tag,这有利于重组蛋白的大量纯化。本研究所表达的重组 PrtA 蛋白以包涵体的形式存在于细菌中,与可溶性蛋白相比,包涵体具有抗酸碱、抗酶解、不易破碎等特点。在进行包涵体的分离和纯化过程中,本实验采用了多种方法,包括在菌体中加入细胞裂解液、溶菌酶、反复低温冻融、超声波破碎等,以便打断包涵体蛋白分子内和分子间的非共价键、离子键和疏水键,使多肽伸展,包涵体充分溶解。进行 Tricine-SDS-PAGE 电泳后,可以看见纯化后的 PrtA 融合蛋白条带含有很少的杂蛋白。本实验的免疫抗原为纯化后的融合蛋白,相对分子质量为 40×10^3 ,足以引起动物机体的免疫反应,而且抗原本身为原核细胞所表达的蛋白,具有多个抗原决定簇。为了验证所表达的重组蛋白是否具有反应原性,用 Western blot 方法对其进行了鉴定,结果表明,表达的重组 PrtA 蛋白具有良好的反应原性,为进一步研究 PrtA 蛋白的免疫原性奠定基础,亦为制备诊断抗原、抗血清提供理论依据,对肺炎链球菌诊断方法的建立具有重要意义,也为肺炎链球菌蛋白联合疫苗中蛋白质的组合方式和投递途径的优化应用提供证据。

参考文献

- [1] 李迟佳,王亚亭. 侵袭性肺炎链球菌疾病的研究进展[J]. 实用儿科临床杂志, 2010, 25(10): 94-97.
- [2] Helena K, Juhani E. New vaccines for the prevention of pneumococcal infections[J]. Emerg Infect Dis, 1996, 2(4): 289-298.
- [3] 何智, 陈政良. 补体系统丝氨酸蛋白酶的结构与功能[J]. 国外医学免疫学分册, 2004, 27(6): 316-319.
- [4] Maxwell MK, Enrico DC. Molecular markers of serine protease evolution[J]. Embo J, 2001, 20(12): 3036-3045.
- [5] Hu YC. Baculovirus as a highly efficient expression vector in insect and mammalian cells[J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2005, 26(4): 405-416.
- [6] 陆军, 严维耀, 郑兆鑫. 基因疫苗——防治疾病的新武器[J]. 生命的化学, 2000, 20(1): 17-19.
- [7] 章德广, 王正敏, 徐江红. 肺炎链球菌表面黏附素 A 的原核表达和抗原性分析[J]. 中国眼耳鼻喉科杂志, 2009, 9(1): 20-22.
- [8] 王恩, 刘岚. 肺炎链球菌实验室检测技术研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(11): 1144-1145.
- [9] 曹炬. 肺炎链球菌蛋白质疫苗研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2007, 28(3): 214-216.
- [10] 李娜. 肺炎链球菌疫苗免疫效应及研究进展[J]. 儿科药理学杂志, 2009, 15(1): 49-52.
- [11] 邹莎莎, 程安春, 汪铭书. 肺炎链球菌毒力因子的研究进展[J]. 中国人兽共患病学报, 2009, 25(4): 372-376.
- [12] Cecile F, Meryam B, Laure R. New adhesin functions of surface-exposed pneumococcal proteins[J]. BMC Microbiol, 2010, 10(7): 190.
- [13] Shaper M, Landon W, William HB. Serine protease PrtA from streptococcus pneumoniae plays a role in the killing of S. pneumoniae by apolactoferrin[J]. Infection and Immunity, 2011, 6(79): 2440-2450.