

• 基础实验研究论著 •

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 PBP2a 蛋白的低温诱导表达纯化及免疫原性的鉴定*

金 姝¹, 邹玉涵¹, 朱祖怀¹, 闫佩毅¹, 黄德魁², 郑佐娅^{3△}

(1. 上海市普陀区人民医院检验科, 上海 200060; 2. 上海市普陀区人民医院心内科, 上海 200060; 3. 上海交通大学医学院医学检验实验室, 上海 200027)

摘要:目的 探讨耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)PBP2a 的原核表达及其免疫源性的鉴定。方法 根据基因文库登录的 mecA 基因的编码序列, 设计合成了一对寡核苷酸引物, 将 mecA 基因的 70~2 006 bp 克隆至 pET28a 载体, 转化 *E. coli* BL21(DE3); 经 IPTG 低温诱导表达后, 利用镍琼脂糖凝胶亲和层析技术纯化目的蛋白; 用抗 PBP2a 抗体鉴定纯化蛋白的免疫源性。结果 成功构建了不含跨膜区的 PBP2a 原核表达载体, 在低温诱导条件下获取的蛋白纯化后无杂蛋白; 该蛋白能与商品化抗 PBP2a 单克隆抗体结合。结论 利用分子克隆技术, 获得了高纯度的不含跨膜区的 PBP2a 蛋白, 且该蛋白具有免疫源性, 为进一步制备抗 PBP2a 单克隆抗体奠定了基础。

关键词: 葡萄球菌, 金黄色; 青霉素结合蛋白质类; 原核表达

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2014. 01. 003

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)01-0006-03

Low temperature induced expression and purification of PBP2a of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and identification of its immunogenicity*

Jin Shu¹, Zou Yuhai¹, Zhu Zuhui¹, Yan Peiyi¹, Huang Dekui², Zheng Zuoya^{3△}

(1. The Clinical Laboratory of Shanghai People's Hospital of Putuo District, Shanghai 200060, China;

2. the Cardiovascular Medicine Department of Shanghai People's Hospital of Putuo District, Shanghai 200060, China;

3. Shanghai Jiaotong University Medical Laboratory, Shanghai 200027, China)

Abstract: Objective To express the PBP2a of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, and identify its immunogenicity.

Methods According to the sequence of mecA gene published on GenBank, primers were designed and synthesized. The 70 — 2 006 bp length of mecA gene was cloned into pET28a plasmid, and the recombinant plasmid was transformed into *E. coli* BL21 (DE3). The expression was induced by IPTG at low temperature and the expressed product was purified by Ni²⁺ sepharose affinity chromatography. The immunogenicity was identified by the anti-PBP2a monoclonal antibody. **Results** The recombinant expression vector for PBP2a was constructed successfully, and the purified PBP2a protein expressed at low temperature had no hybrid protein. The purified protein could bind with anti-PBP2a monoclonal antibody. **Conclusion** Using molecular cloning technology, purified PBP2a protein was obtained and the protein has immunogenicity, which establish the foundation for further preparation of monoclonal antibody.

Key words: *Staphylococcus aureus*; penicillin-binding proteins; prokaryotic expression

控制医院内和社区 MRSA 的感染及其扩散是全球范围的重要公共卫生策略^[1]。2007 年, 欧洲抗菌药物监测网(监测了 31 个欧洲国家, 超过 600 家实验室)报道每 100 000 个住院患者日的 MRSA 菌血症的发病率从 0.2%(瑞典)上升到 24.4%(葡萄牙)^[2]。2005 年美国监测网(监测了全美国 300 家临床微生物实验室)报道了在非 ICU 病房、ICU 病房及门诊分离出的金黄色葡萄球菌中 MRSA 的比例分别为 59%、55% 和 48%^[3]。2007 年美国 CDC 报道^[4], 在 2004 年中有 63% 的金黄色葡萄球菌感染是由 MRSA 导致, 较 1995 年的 22% 增加了 3 倍, 而该数据在 1974 年仅有 2%。两项荟萃分析的结果显示, 与 MRSA 血流感染相关的病死率是甲氧西林敏感的金黄色葡萄球菌(MSSA)的两倍。MRSA 感染的治疗费用显著高于 MSSA。因此对 MRSA 的早期诊断显得尤为重要。

MRSA 的耐药机制是耐药基因 mecA 编码的膜蛋白青霉素结合蛋白 2a(PBP2a)不能被内酰胺类抗菌药物识别, 从而其细胞壁不能破坏。美国临床实验室标准化委员会指出检测 mecA 和其表达的 PBP2a 是预报对苯唑西林耐药最准确的方

法。使用分子生物学或免疫学方法检测 mecA 基因或 PBP2a 蛋白诊断 MRSA 的速度较常规的细菌培养和鉴定快 12~48 h。本文的目的是在体外用分子生物学的方法表达 PBP2a 蛋白, 制备抗 PBP2a 单克隆抗体, 为制备 PBP2a 蛋白的快速检测试剂奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 MRSA 标准株 33591。

1.1.2 载体与主要试剂 PET28a 载体购于 Novagen 公司、镍琼脂糖凝胶购于北京韦氏博慧、pGEMT 载体购于 Promega 公司; TaKaRa LA Taq 耐热保真聚合酶购于 Takara 公司; DNA 回收试剂盒购自北京天根生化公司; EcoR I、BamH I 等限制性核酸内切酶购于 NEB 公司; LB 琼脂、卡那霉素、IPTG、X-Gal 等均由于上海生工公司生产; PBP2a 单克隆抗体购自美国 MyBioSource 公司; Anti-Mouse IgG 购自 SIGMA 公司; ECL 试剂盒购自 Amersham 公司。WB Standard Marker 1.0 (为一种可用化学发光法检测到的分子量蛋白标准)购自杭州

* 基金项目: 上海市普陀区科技自主创新资助项目(项目编号: 普 KW11103)。 作者简介: 金姝, 女, 副主任检验师, 主要从事医学免疫学及分子检验研究。 △ 通讯作者, Email: zhengzy521@163.com。

贤至生物公司。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 用北京天根生化公司的 TIANamp Bacteria DNA Kit 提取 MRSA 标准株 33591 的 DNA。

1.2.2 目的基因扩增 *mecA* 基因序列全长 2 007 bp, 其中 1~69 bp 编码跨膜区。由上海生工生物工程有限公司合成一对寡核苷酸引物, 上下游分别引入了限制性内切酶 *Bam*H I、*Eco*R I 的识别序列和保护性碱基, 扩增 *mecA* 全长中除跨膜区以外的 70~2 006 bp。

上游引物: 5'-TAA TGG ATC CGC TTC AAA AGA TAA AGA AAT-3' (70~89 bp); 下游引物: 5'-TAA TGA ATT CGT TTT GAT ATT CAT CTA TAT CGT A-3' (1 990~2 006 bp); 反应条件为: 94 ℃ 预变性 5 min, (94 ℃ 变性 1 min, 43 ℃ 退火 1 min, 72 ℃ 延伸 2 min) × 30 个循环, 72 ℃ 延伸 10 min。取反应产物 20 μL, 在 1.0% 琼脂糖凝胶中, 经 90 V 电压下电泳 60 min, 凝胶成像系统成像分析。扩增的 *mecA* DNA 序列共 1 938 bp, 其编码成熟的缺失 N 末端跨膜序列(氨基酸位点 24 到 668)的 PBP2a 蛋白。

1.2.3 酶切、连接 PCR 产物分别回收, 与 pGEMT 连接, 转化 DH5α 菌, 用 AIX(含有 0.1 mg/mL Ampicillin, 0.1 mg/mL IPTG, 0.02 mL X-gal) LB 平板筛选蓝白斑, 提取白斑的质粒 DNA, 用 *Bam*H I 及 *Eco*R I 酶切鉴定, 筛选阳性克隆 pGEMT-*mecA*, 送上海生工公司测定插入片段的序列, 并与 GenBank 中登录的 *mecA* 序列进行比较。

1.2.4 *mecA* 基因原核表达载体的构建 将测序正确的 pGEMT-*mecA* 载体经 *Bam*H I / *Eco*R I 双酶切后, 回收的 *mecA* 基因片段与同样酶切的 pET-28a 载体连接, 转化 BL21 (DE3) 菌, 用含有 30 ng/mL 卡那霉素的 2 × YT 平板培养过夜。

1.2.5 重组蛋白表达 将新鲜转化菌 BL21(DE3) 单个克隆挑到 5 mL 含有卡那霉素 (30 ng/mL) 的 LB 培养液中, 37 ℃ 振荡培养过夜至饱和。次日以 1 : 100 取过夜培养的转化菌 BL21(DE3) 接种 200 mL 含有卡那霉素 (30 ng/mL) 的 2 × YT 培养液中, 37 ℃ 振荡培养至 A600 在 0.6 左右。然后用 1 mmol/L IPTG 诱导 His 标签 rPBP2a 蛋白表达, 22 ℃ 静置培养 24 h。

1.2.6 重组蛋白纯化

1.2.6.1 样品准备 4 000 r/min 离心 30 min 收集细菌沉淀, 用 20 mL 含 1 mmol/L PMSF、0.4 mg/mL 溶菌酶的 PBS 重悬, 冰浴 30 min 后, 用 COLE-PARMER 750w 超声破碎仪破碎细菌, 设置振荡 1 s, 冷却间断 3 s, 40% 能量, 共 20 s。加入终浓度为 0.02% 的 Triton X-100, 冰浴 15 min 后, 用前述方法超声。加入终浓度为 10 μg/mL 的 DNase、RNase, 室温 10 min。10 000 r/min 离心 15 min 收集包涵体沉淀。沉淀用 20 mL 含 8 mol/L 尿素的 binding buffer (0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl, 5 mmol/L imidazole, pH 7.9) 溶解包涵体沉淀, -20 ℃ 过夜。次日将溶解的包涵体溶液 4 000 r/min 离心 30 min, 上清液用 4.5 μm 滤膜过滤。

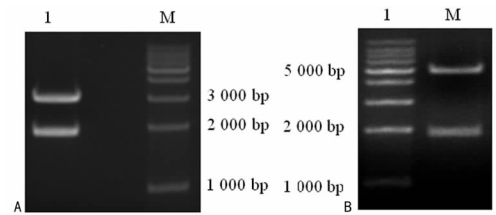
1.2.6.2 样品的层析 取 10 mL 镍琼脂糖凝胶溶液加入纯化柱中, 待其缓慢沉降后为 8 mL 凝胶, 滴加 25 mL 纯水洗柱; 用 35 mL 含 8 mol/L 尿素的 binding buffer (0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl, 5 mmol/L imidazole, pH 7.9) 平衡纯化柱; 将准备好的 20 mL 样品过柱; 用 50 mL 含 8 mol/L 尿素的 wash buffer (0.5 mol/L NaCl, 30 mmol/L imidazole, 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.9) 洗涤纯化柱的杂蛋白; 用 10 mL 含 8

mol/L 尿素的 elute buffer (0.5 mol/L imidazole, 0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.9) 洗脱纯化柱上目的蛋白, 0.5 mL/管收集蛋白。Bradford 法测蛋白浓度。

1.2.7 重组蛋白的鉴定 纯化产物经 SDS-PAGE 电泳, 浓缩胶浓度为 4%, 电流强度为 50~80 mA/gel; 分离胶浓度为 10%, 电流强度为 40~70 mA/gel; 电泳结束后, 以 15v 恒压、室温下 30 min 将蛋白质转移至硝酸纤维素膜 (NC 膜) 上。NC 膜用含 10% 脱脂奶粉的 TBST (含 0.1% Tween20 的 TBS) 封闭液 4 ℃ 封闭过夜。加入含 3.5 μg/mL 的 PBP2a 单克隆抗体的封闭液, 室温孵育 2 h, 用 TBST 漂洗 3 次后, 加入含 70 ng/mL Anti-Mouse IgG 的封闭液, 室温孵育 1 h, 用 TBST 漂洗 3 次后, ECL 试剂盒显影。

2 结果

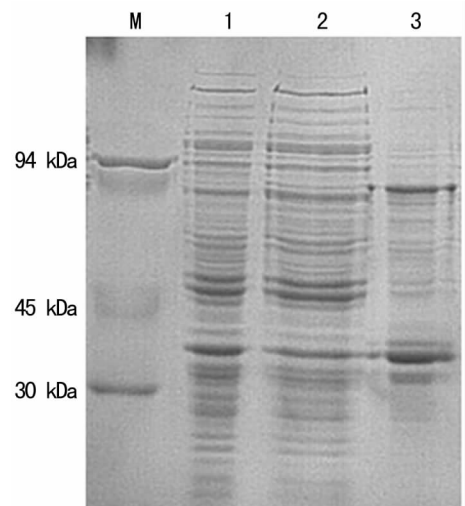
2.1 pGEMT-*mecA* 载体的构建 将 *mecA* PCR 产物经切胶纯化后, 连接 pGEM-T 载体, 转化 DH5α 细菌, 挑取平板中单菌落白斑, 转接种 LB 液体培养基, 12 h 后提取质粒 DNA, 用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切, 可见 2 kb 左右的目的基因片段和 3 kb 左右的载体片段 (图 1A)。



A: 质粒 pGEM-T easy-*mecA* 酶切; B: 质粒 pET-32a-*mecA*. M: DNA 标准; 1: *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切重组质粒。

图 1 重组质粒的酶切鉴定

2.2 重组表达载体 pET-28a-*mecA* 的构建 将 pGEM-T-*mecA* 载体分别用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切, 与经相同酶切的 pET28a 载体 DNA 连接, 转化 DH5α 用于质粒扩增, 同时转化 BL21(DE3) 用于蛋白表达。挑取细菌, 提取质粒 DNA, 相同酶切鉴定出含约 2 kb 插入片段的 5 kb 重组质粒 (图 1B), 命名为: pET-28a-*mecA*。



M: 标准蛋白; 1: 未诱导菌; 2: IPTG 诱导菌上清液; 3: IPTG 诱导菌包涵体沉淀。

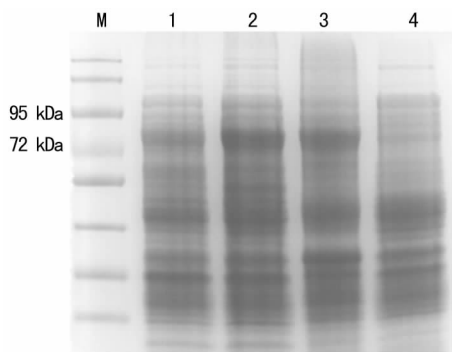
图 2 重组蛋白的表达

2.3 重组蛋白 PBP2a 的诱导表达 重组菌 37 ℃ 诱导表达 4 h 后, 经超声波裂解, 离心后, 取裂解上清液和沉淀, SDS-PAGE 电泳, 结果发现: 表达产物主要存在于包涵体沉淀中 (图 2), 融

合蛋白的相对分子质量大小约 80 000。重组菌分别于 37 ℃、22 ℃、20 ℃ 诱导培养 24 h 后,全菌裂解产物经 SDS-PAGE 电泳(图 3),结果显示 22 ℃ 诱导培养 24 h 后重组蛋白的表达量最高。

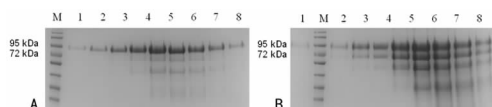
2.4 重组蛋白 PBP2a 的纯化 重组蛋白经镍琼脂糖凝胶亲和层析柱纯化后,可见 80 kD 处有清晰条带,重组菌在 22 ℃ 诱导表达后纯化的蛋白基本未见杂蛋白带(图 4A),而在 37 ℃ 条件下诱导表达的蛋白有显著的杂蛋白带,考虑为蛋白降解条带(图 4B)。

2.5 Western-blot 分析纯化的重组 PBP2a 蛋白的免疫原性 将纯化后的重组蛋白经 SDS-PAGE 电泳后,转 NC 膜,以 1:1 000 稀释的鼠抗 PBP2a 蛋白单克隆抗体进行 Western-blotting 检测,如图 5 所示,空载体菌体蛋白无杂交条带,而纯化后的重组蛋白出现了一条杂交条带。



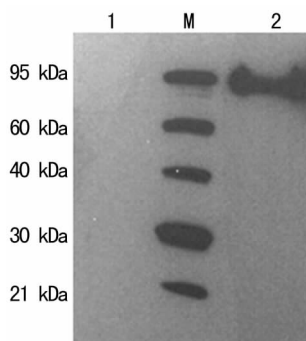
M:标准蛋白;1:37 ℃ 诱导菌;2:22 ℃ 诱导菌;3:20 ℃ 诱导菌;4:22 ℃ 未诱导菌。

图 3 重组蛋白表达温度的优化



A:诱导表达温度 22 ℃;B:诱导表达温度 37 ℃;M:标准蛋白;1~9 泳道为 500 mmol/L 咪唑洗脱液,每 0.5 mL 收集一管洗脱液,分析 9 管。

图 4 重组菌诱导表达后纯化的结果



1:空载体转化菌;M:标准蛋白;2:纯化后的蛋白。

图 5 Western-blot 分析纯化的重组 PBP2a 蛋白的免疫原性

3 讨论

检测 PBP2a 蛋白是预报 MRSA 的金标准之一。临床分离得到金黄色葡萄球菌后,立即检测其 PBP2a 蛋白,即可预报 MRSA,无需等待 18~24 h 的细菌鉴定,可尽早对患者进行隔离,避免交叉感染。制备抗 PBP2a 蛋白的单克隆抗体是检测 PBP2a 蛋白的基础,而获取较纯的 PBP2a 蛋白是制备单克隆

抗体的前提。本课题组在前期的实验中制备了全长 PBP2a 蛋白用以免疫小鼠获取抗体^[5],发现全长 PBP2a 蛋白主要表达在包涵体中,可以获得较高纯度的蛋白,但蛋白浓度仅能以 50 μg/次腹腔免疫小鼠获取多克隆抗体,尚不足以大量获取纯化蛋白以 200 μg/次小鼠尾静脉注射免疫制备单克隆抗体。

PBP2a 蛋白全长 668aa,包括一个 N 端 23aa 的跨膜区。为了获得最佳的蛋白质生产和纯化,以及确保良好的免疫应答,在可能的情况下应尽可能避免蛋白质跨膜区,这些疏水区在大肠杆菌中表达经常出现问题,造成表达困难、易出现包涵体、纯化困难等^[6]。据 Matsui 等^[7]报道采用 pETBlue2 载体、22 ℃ 的低温诱导 24 h 可将去跨膜区的 PBP2a 蛋白以可溶性形式表达在细菌裂解上清液中。本课题用 pET-28a 载体表达不含跨膜区的 PBP2a 蛋白,目的是获得可溶性的重组蛋白,便于纯化获得高产量。采用常规的 37 ℃ 诱导 4~5 h,重组蛋白的表达量低,且以包涵体形式表达。Rosana 等^[8]报道低温(20 ℃)通过改变 RNA 解旋酶的转录和显著延长蛋白半衰期而增加蛋白的表达。Wu 等^[9]研究报道在 23 ℃ 的低温条件下表达重组血红蛋白,其产量和活性均显著增加。笔者结合诸多研究的报道选择 22 ℃ 低温诱导,发现低温诱导后蛋白虽仍以包涵体形式表达,但纯化后杂蛋白显著减少,蛋白纯度明显增加,蛋白浓度为 0.5~1 mg/mL,每 200 mL 重组菌可获得约 1~2 mg 纯化蛋白。该蛋白可与商品化的抗 PBP2a 单克隆抗体结合,免疫印迹实验显示出单一条带,表明纯化蛋白具有免疫原性,可用以制备抗体。本研究表明在蛋白表达的研究应用中降低细菌诱导培养的温度可以改善蛋白表达的结果。

参考文献

- [1] Mediavilla JR, Chen L, Mathema B, et al. Global epidemiology of community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA)[J]. *Curr Opin Microbiol*, 2012, 15(5):588-595.
- [2] Tacconelli E, De Angelis G, de Waure C, et al. Rapid screening tests for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at hospital admission: systematic review and meta-analysis[J]. *Lancet Infect Dis*, 2009, 9(4):546-554.
- [3] Styers D, Sheehan DJ, Hogan P, et al. Laboratory-based surveillance of current antimicrobial resistance patterns and trends among *Staphylococcus aureus*; 2005 status in the United States[J]. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 2006, 5(1):2.
- [4] Klevens RM, Morrison MA, Nadle J, et al. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States[J]. *J Am Med Ass*, 2007, 298(15):1763-1771.
- [5] 金姝,朱祖怀,闫佩毅,等.耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 PBP2a 的原核表达及多克隆抗体的制备[J]. *国际检验医学杂志*, 2012, 33(1):1-3.
- [6] Howard GC, Kaser MR. Making and using antibodies[M]. 北京:科学出版社,2010:8.
- [7] Matsui H, Hanaki H, Inoue M, et al. Development of an immunochromatographic strip for simple detection of penicillin-binding protein 2'[J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2011, 18(2):248-253.
- [8] Rosana AR, Chamot D, Owtrim GW. Autoregulation of RNA helicase expression in response to temperature stress in *Synechocystis* sp. PCC 6803[J]. *PLoS One*, 2012, 7(1):10.
- [9] Wu JM, Wang SY, Fu WC. Lower Temperature Cultures Enlarge the Effects of Vitreoscilla Hemoglobin Expression on Recombinant *pichia pastoris*[J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13:13212-13226.