

• 基础实验研究论著 •

链球菌溶血素 O 抗原的原核表达及条件优化

胡锡林, 花 欢, 邓群英

(南京军区鼓浪屿疗养院检验科, 福建厦门 361002)

摘要:目的 构建链球菌溶血素 O 抗原(SLO)的重组表达质粒,并优化其在大肠杆菌中的最佳表达条件。方法 以 A 群链球菌 DNA 为模板,采用 PCR 法扩增 SLO 基因,将扩增的基因连接 pET-32a(+)表达载体构建 pET-32a(+)-SLO 重组质粒,重组质粒转化到大肠杆菌 BL21(DE3)中,转化后的表达菌经异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导和自诱导的方式分别诱导及纯化,最终确定最佳的表达条件。结果 PCR 扩增的基因大小与 SLO 基因大小一致,测序完全正确。不同浓度的 IPTG 诱导均为包涵体表达,且表达量均较低;自诱导的方式,不仅表达量明显提高,且实现了部分可溶性表达。结论 成功构建了 SLO 的原核表达质粒,优化筛选出能高效可溶性表达的诱导条件,纯化获得了 SLO 重组融合蛋白质,为进一步的基础及临床研究应用奠定基础。

关键词:链球菌溶血素 O 抗原; 包涵体; 自诱导; 蛋白纯化

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.19.003

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)19-2581-03

Prokaryotic expression of streptolysin O antigen and its condition optimization

Hu Xilin, Hua Huan, Deng Qunying

(Department of Clinical Laboratory, Gulangyu Sanatorium of Nanjing Military Command, Xiamen, Fujian 361002, China)

Abstract: **Objective** To construct the recombinant streptolysin O antigen(SLO) prokaryotic expression plasmid and establish its best expression condition in *Escherichia coli*. **Methods** The DNA fragment encoding SLO was amplified from streptococcal genomic DNA template by PCR, and then incorporated into pET-32a(+) vector to construct pET-32a(+)-SLO recombinant plasmid. pET-32a(+)-SLO was transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3) and SLO protein was expressed and purified by isopropyl- β -D-thiogalactoside(IPTG)-induction and auto-induction, respectively. **Results** The results of DNA electrophoresis and DNA sequencing showed that pET-32a(+)-SLO recombinant plasmid was constructed successfully. When IPTG at different concentration was used, SLO expressed as inclusion body and its expression efficiency was low. Under auto-induction condition, SLO expressed as partly soluble manner, and its expression efficiency increased. **Conclusion** The prokaryotic expression plasmid pET-32a(+)-SLO is constructed successfully and the best condition for SLO expression and purification from *Escherichia coli* culture is established, which lay the foundation for further basic and clinical application research with SLO.

Key words: streptolysin O antigen; inclusion body; auto-induction; protein purification

链球菌溶血素 O 抗原(streptolysin O, SLO)是溶血性链球菌的代谢产物之一,具有溶血作用和强抗原性。溶血性链球菌感染后患者体内可检出 SLO 抗体,临床通过检测血清中有无 SLO 抗体产生(抗 SLO 试验),可以诊断患者近期是否感染过溶血性链球菌,也可以用于辅助诊断风湿热、肾小球肾炎等^[1]。

抗 SLO 试验的测定原理是以 SLO 为抗原的抗原抗体反应为基础。SLO 的来源有 2 种途径:(1)通过 A 群链球菌培养获得。该方法培养条件复杂、产量低、不易纯化,但活性及抗原性较好。(2)通过重组表达法获得。最常用的是大肠杆菌原核表达,该方法操作简单、易纯化、产量高、批间差异小,已被广泛应用。自诱导(auto-induction)是针对大肠杆菌 T7 表达系统的优化表达策略,该方法由美国学者提出并进行完善,无论在产出蛋白质的质量还是数量上都比传统方法有很大提高^[2-4]。

1 材料与与方法

1.1 材料 A 群链球菌基因组 DNA、DH5a 菌种、大肠杆菌 BL21(DE3)、pET-32a(+)质粒由本院保存;SLO 多克隆抗体由广州格瑞林生物科技公司惠赠。

1.2 仪器与试剂 Ni Sepharose Fast Flow 层析柱及填料均

购自 Amersham 公司,限制性内切酶为 Thermo 公司产品,连接酶购自 Toyobo 公司,DL2000 DNA、BCA 蛋白定量试剂盒、胶回收和质粒提取试剂盒及 PCR Taq Mixture 均购自天根生物科技有限公司,辣根过氧化物酶(HRP)标记的兔抗羊二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司,其他试剂均为分析纯。

1.3 方法

1.3.1 SLO 基因的 PCR 扩增及表达载体构建 根据 Genbank 提供的 SLO 基因序列(M18638)设计 PCR 引物,并在正向引物 5'加入 Nco I 酶切位点及相应保护碱基,反向引物 5'加 XhoI I 酶切位点及保护碱基。引物序列如下,上游引物:5'-CAT GCC ATG GGC AAC AAA CAA AAC ACT GCT AGT ACA G-3';下游引物:5'-CCG CTC GAG CTA TTA CTT ATA AGT AAT CGA ACC ATA TGG G-3'。取合成的引物片段稀释成 10 nmol/L,按如下方法进行 PCR。反应体系:上、下游引物各 1 μ L 加入 1 μ L 基因组 DNA,补水至 50 μ L,再混合入 50 μ L PCR Taq Mixture,配成 100 μ L 反应体系。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,60 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 2 min,循环 30 次,72 $^{\circ}$ C 5 min。将 PCR 产物和 pET-32a(+)质

粒用 Nco I 及 XhoI I 双酶切后,4 ℃ 连接过夜,连接产物转化 DH5a,双酶切鉴定并进行测序。

1.3.2 pET-32a(+)-SLO 重组质粒的诱导表达 经测序验证的 pET-32a(+)-SLO 重组质粒转化入大肠杆菌 BL21 (DE3),挑取阳性克隆接种于含有 50 g/mL 氨苄西林的 LB 培养基中,置于的 20 mL 螺纹管中,于 37 ℃、220 r/min 振荡培养过夜,分别采用异丙基硫代-β-D-半乳糖苷(IPTG)诱导和自诱导的方式分别诱导。IPTG 诱导法:将过夜菌液转种于 5 支盛有 5 mL LB 培养基的 20 mL 螺纹管中,于 37 ℃、220 r/min 振荡培养至对数期后,分别加入 IPTG 至终浓度为 0.1、0.2、0.4、0.8、1 mmol/L,继续于 28 ℃ 振荡培养 20 h。自诱导法:过夜菌液转种于 2 支盛有 5 mL 自诱导培养基的 20 mL 螺纹管中,于 28 ℃、220 r/min 振荡培养 20~24 h。1 L 自诱导培养基含:胰蛋白胨 15.00 g,酵母提取物 7.50 g,NaCl 5.00 g,Na₂HPO₄ 7.10 g,KH₂PO₄ 6.80 g,(NH₄)₂SO₄ 3.30 g,MgSO₄ 0.24 g,甘油 1.00%,以上成分高压灭菌后加入无菌过滤的葡萄糖 0.50 g 和乳糖 2.00 g。电泳条件:诱导菌以 12% 的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳,条件为 80 V 恒压 40 min,待样品进入分离胶后,改为 120 V 恒压 60 min。

1.3.3 SLO 重组蛋白的表达及纯化 分别采用 IPTG(最适条件)诱导及自诱导的方法诱导 1 L 表达菌,使用 Ni Sepharose Fast Flow 分别对破菌上清及沉淀进行纯化。破菌上清纯化法:6 000 r/min 离心 10 min 收集菌体,使用 His-Binding 缓冲液重悬后,冰上超声破菌,4 ℃ 高速离心,留上清液过滤后用 AKT Aprime 上柱,用 His-Binding 缓冲液平衡后,采用 His-Elution 缓冲液(10%B)先洗脱非特异性结合的杂蛋白质,平衡后再用 His-Elution 缓冲液(100%B)将目的蛋白质洗下。破菌沉淀纯化法:10 000 r/min 离心 10 min 收集破菌沉淀,使用包涵体 His-Binding 缓冲液充分溶解,4 ℃ 高速离心,留上清液经过滤后用 AKT Aprime 上柱,用包涵体 His-Binding 缓冲液平衡后,采用包涵体 His-Elution 缓冲液(10%B)先洗脱非特异性结合的杂蛋白质,平衡后再用 His-Elution 缓冲液(100%B)将目的蛋白质洗下。以上纯化产物用 12% 的 SDS-PAGE 电泳进行鉴定,并用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白质浓度。

1.3.4 SLO 重组蛋白的鉴定 包被稀释液稀释不同纯化来源的 SLO 重组蛋白,稀释浓度为 5 μg/mL,每孔加入 100 μL,4 ℃ 包被过夜。将 SLO 多克隆抗体用抗体稀释液稀释成不同浓度,37 ℃ 孵育 1 h,加工作浓度的酶标二抗 100 μL,37 ℃ 1 h,洗板,TMB 显色后测定其 450 nm 处吸光度值。

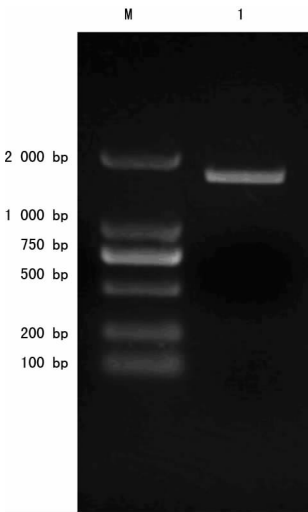
2 结 果

2.1 SLO 基因的 PCR 扩增及表达载体构建 在 1 000 bp 与 2 000 bp 之间有一条明亮的产物条带,见图 1,与 Genbank 提供的 SLO 基因序列(M18638,1 614 bp)大小相近,经 Nco I 及 XhoI I 双酶切后成功连接 pET-32a(+)-表达载体,测序 PCR 产物序列与 SLO 基因序列(M18638)完全一致。成功构建了 pET-32a(+)-SLO 重组表达质粒。

2.2 pET-32a(+)-SLO 重组质粒的诱导表达 pET-32a(+)-SLO 重组质粒转化到 BL21(DE3)后,经 IPTG 诱导和自诱导均诱导出一条明显表达带,相对分子质量为(70~100)×10³,与预计融合蛋白的相对分子质量一致。不同浓度 IPTG 诱导蛋白的相对分子质量差异不大,均明显少于自诱导系统表

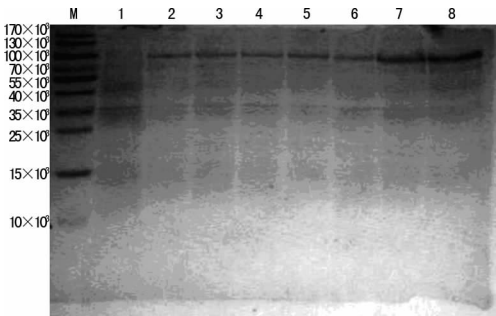
达量,见图 2。

2.3 SLO 重组蛋白的表达及纯化 IPTG 诱导菌纯化仅在包涵体中纯化出 24 mg 目的蛋白,自诱导菌在上清液及包涵体中分别纯化出目的蛋白 30 mg 和 40 mg,见图 3。自诱导产出蛋白的质量和数量上都比 IPTG 诱导法有很大提高,见表 1。



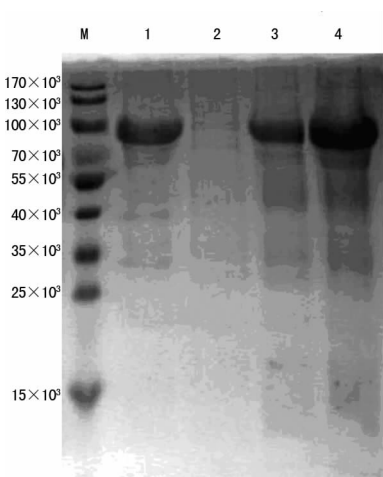
M:marker;1:PCR 产物。

图 1 PCR 产物电泳结果



M:marker;1:未诱导产物;2~6:0.1、0.2、0.4、0.8、1.0 mmol/L IPTG 诱导产物;7~8:自诱导产物。

图 2 诱导蛋白电泳结果



M:marker;1:上清液中自诱导纯化产物;2:上清液中 IPTG 诱导纯化产物;3:包涵体中 IPTG 纯化产物;4:包涵体中自诱导纯化产物。

图 3 纯化蛋白电泳结果

2.4 SLO 重组蛋白的鉴定 不同纯化来源的 SLO 重组蛋白均能够被 SLO 多克隆抗体识别,且抗原性无明显差异,见图 4

(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

表 1 不同诱导方法产出纯化蛋白的结果对比

诱导方法	上清液中的纯化蛋白(mg)	包涵体中的纯化蛋白(mg)	总量(mg)
IPTG 诱导	0	24	24
自诱导	30	40	70

3 讨 论

SLO 是 A 群链球菌的代谢产物之一,由 538 个氨基酸构成,相对分子质量为 60×10^3 ,SLO 能够使细胞膜产生大的孔道,使大量有毒物质进入细胞质,从而对细胞产生毒性作用^[5]。SLO 具有很强的抗原性,机体因感染 A 群链球菌可导致的咽炎、扁桃体炎、猩红热、风湿热等疾病,机体可立即产生抗 SLO 抗体。临床通过测定抗 SLO 抗体用于诊断 A 群链球菌感染^[6]。

SLO 是制备抗 SLO 抗体的主要试剂原料^[7-8]。获得 SLO 的方法有天然培养和重组表达获得。天然培养是通过大规模培养 A 群链球菌获得其代谢产物,再分离获得 SLO,该方法最大的优点是得到的 SLO 为天然结构,但操作复杂、产量低,受环境因素影响,目前基本被重组表达法取代。大肠杆菌表达系统是目前使用最为广泛、最简单和经济的方法,其优势在于:表达基因明确;在普通培养基中生长迅速;表达时可以带上相应纯化标签,实现快速分离纯化^[9]。其缺陷在于:缺乏真核细胞的翻译后修饰系统;易造成表达过快、折叠混乱而导致的包涵体表达,失去原有的功能。

由于不同的诱导条件在一定程度上决定了目的蛋白的产量和质量,因而找到该目的蛋白优化的诱导表达条件就非常重要。自诱导是针对大肠杆菌 T7 表达系统建立的一种优化诱导条件,该系统中大肠杆菌以葡萄糖为碳源支持生长至饱和,待葡萄糖消耗完全,培养基中的乳糖则开始起作用。在 lacY 与 lacZ 的基因产物——乳糖透过酶(lactose permease)和 β -半乳糖苷酶(β -galactosidase)的协助下,乳糖穿过细胞膜并部分

转化为异乳糖开启大肠杆菌 T7 表达系统。笔者开始选用 IPTG 诱导系统,表达量极低;而后采用自诱导的方式,不仅表达量明显提高,并实现了部分可溶性表达。

总之,成功构建了 SLO 的原核表达质粒,优化筛选出能高效可溶性表达的诱导条件,纯化获得了 SLO 重组融合蛋白,为 SLO 临床定量检测技术及应用研究奠定基础。

参考文献

[1] 张晶梅,于魁忠. C 反应蛋白、红细胞沉降率、抗链球菌溶血素 O 在风湿性心脏病手术中的变化及预测价值[J]. 临床合理用药杂志,2011(9):84-85.

[2] Gombert AK, Kilikian BV. Recombinant gene expression in Escherichia coli cultivation using lactose as inducer[J]. J Biotechnol, 1998,60(1/2):47-54.

[3] Studier FW. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures[J]. Protein Expr Purif, 2005,41(1):207-234.

[4] Chen WB, Nie Y, Xu Y, et al. Enhancement of extracellular pullulanase production from recombinant Escherichia coli by combined strategy involving auto-induction and temperature control[J]. Bioprocess Biosyst Eng, 2014,37(4):601-608.

[5] 唐新杰,盛玲玲,张群,等. 链球菌溶血素 O 提高细胞的通透性[J]. 中国组织工程研究,2012,16(46):8689-8692.

[6] Madeleine WC. Pathogenesis of group A streptococcal infections[J]. Clin Microbiol Rev, 2000,13(3):470-511.

[7] Hall EH, Gurel V, Dahlberg AE, et al. Inhibition of human breast cancer matrigel invasion by streptolysin O activation of the EGF receptor ErbB1[J]. Cell Signal, 2011,23(12):1972-1977.

[8] Bru T, Clarke C, McGrew MJ, et al. Rapid induction of pluripotency genes after exposure of human somatic cells to mouse ES cell extracts[J]. Exp Cell Res, 2008,314(14):2634-2642.

[9] 戚大梁,王强,易维京. 抗组氨酸标签单克隆抗体的制备、鉴定及应用[J]. 重庆医学,2013,42(32):3918-3920.

(收稿日期:2014-04-16)

(上接第 2580 页)

Med Commun, 2008,29(12):1113-1122.

[6] Liu CM, Ma JQ, Sun YZ. Puerarin protects the rat liver against oxidative stress-mediated DNA damage and apoptosis induced by lead[J]. Exp Toxicol Pathol, 2012,64(6):575-582.

[7] Tang XL, Liu XJ, Tian Q, et al. Dynamic oxidative stress and DNA damage induced by oestrogen deficiency and protective effects of puerarin and 17 β -oestradiol in ovariectomized rats[J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2012,111(2):87-91.

[8] Beck H, Plate KH. Angiogenesis after cerebral ischemia[J]. Acta Neuropathol, 2009,117(5):481-496.

[9] Vasir B, Jonas JC, Steil GM, et al. Gene expression of VEGF and its receptors Flk-1/KDR and Flt-1 in cultured and transplanted rat islets[J]. Transplantation, 2001,71(7):924-935.

[10] Yao RQ, Zhang L, Wang W, et al. Cornel iridoid glycoside promotes neurogenesis and angiogenesis and improves neurological function after focal cerebral ischemia in rats[J]. Brain Res Bull, 2009,79(1):69-76.

[11] An SS, Jin HL, Kim KN, et al. Neuroprotective effect of combined hypoxia-induced VEGF and bone marrow-derived mesenchymal

stem cell treatment[J]. Childs Nerv Syst, 2010,26(3):323-331.

[12] Arenillas JF, Sobrino T, Castillo J, et al. The role of angiogenesis in damage and recovery from ischemic stroke[J]. Curr Treat Options Cardiovasc Med, 2007,9(3):205-212.

[13] Wong KH, Li GQ, Li KM, et al. Kudzu root: traditional uses and potential medicinal benefits in diabetes and cardiovascular diseases[J]. J Ethnopharmacol, 2011,134(3):584-607.

[14] Xu X, Zheng X. Potential involvement of calcium and nitric oxide in protective effects of puerarin on oxygen-glucose deprivation in cultured hippocampal neurons[J]. J Ethnopharmacol, 2007,113(3):421-426.

[15] 陈连璧,柴强,赵爱萍,等. 葛根素对犬脑血流的影响[J]. 中国中药杂志,1995,20(9):560-562.

[16] Gu M, Roy S, Raina K, et al. Inositol hexaphosphate suppresses growth and induces apoptosis in prostate carcinoma cells in culture and nude mouse xenograft; PI3K-Akt pathway as potential target[J]. Cancer Res, 2009,69(24):9465-9472.

(收稿日期:2014-06-01)