

• 论 著 •

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌青霉素结合蛋白 2a 转肽酶区的克隆、表达及纯化鉴定^{*}

马洪玉, 兰小鹏, 陈 敏[△]

(南京军区福州总医院检验科, 福建福州 350025)

摘要:目的 构建编码耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)青霉素结合蛋白 2a (PBP2a)转肽酶区基因片段的原核表达载体,并表达、纯化及鉴定蛋白。方法 从临床标本中分离鉴定 MRSA,设计针对编码 PBP2a 转肽酶区基因片段的引物,采用聚合酶链式反应(PCR)扩增目的基因片段,克隆至 pET28a(+)载体,双酶切鉴定并测序,转化大肠杆菌 BL21(DE3)plysS 株;用 0.7 mmol/L 异丙基硫代-β-D-半乳糖苷(IPTG)诱导表达后,利用 Ni 亲和层析技术纯化目的蛋白;蛋白免疫印迹法(WB)鉴定重组蛋白。结果 重组表达载体经 BamH I、EcoR I 酶切,产物在预期大小处出现条带,测序结果显示有两个碱基突变,无移码突变。所表达的 PBP2a 蛋白经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和 WB 鉴定,在相对分子质量 38×10^3 处可见一新生蛋白条带。结论 成功构建了 PBP2a 转肽酶区原核表达载体,并获得了高效表达,制备了高纯度的目的蛋白。

关键词:耐甲氧西林金黄色葡萄球菌; mecA 基因; 青霉素结合蛋白 2a; 转肽酶区

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.05.008

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)05-0597-03

Cloning, prokaryotic expression, purification and identification of the transpeptidase domain of penicillin binding protein 2a of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*^{*}

Ma Hongyu, Lan Xiaopeng, Chen Min[△]

(Department of Clinical Laboratory, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command, Fuzhou, Fujian 350025, China)

Abstract: Objective To construct the prokaryotic expression vector of the gene fragment which encodes the transpeptidase domain of penicillin binding protein 2a(PBP2a) of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*(MRSA), and to express, purify and identify the objective protein. **Methods** Strains of MRSA were isolated and identified from clinical samples, according to the sequence of mecA gene recorded in GenBank, the primers of mecA fragment which encoded the transpeptidase domain of PBP2a was designed. The gene fragment from MRSA was amplified by using polymerase chain reaction(PCR) and cloned into pET28a(+) plasmid. After being identified by enzyme digestion and sequencing, the recombinant plasmid was transformed into the strain of *Escherichia coli* BL21(DE3)plysS. The expression of transpeptidase domain of PBP2a was induced by 0.7 mmol/L IPTG, the expressed products were purified by using Ni affinity chromatography, then were analyzed by using Western blot. **Results** The recombinant expression vector was digested by BamH I and EcoR I, and the products were at the expected size. The result of sequencing showed two bases undergoing mutation, while there were no frameshift mutations. The expressed protein was identified by using SDS-PAGE and Western blot, a new protein band was visible at the relative molecular mass of 38×10^3 . **Conclusion** The corresponding prokaryotic expression vector is successfully constructed, and the transpeptidase domain of PBP2a is successfully expressed and purified.

Key words: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; mecA gene; penicillin binding protein 2a; transpeptidase domain

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)是医院感染的重要病原菌之一,该菌对多种 β-内酰胺类抗菌药物具有内在耐药性,给临床治疗带来严重困难^[1-2]。主要耐药机制为 MRSA 获得 mecA 基因,编码青霉素结合蛋白 2a(PBP2a),PBP2a 与 β-内酰胺类抗菌药物亲和力很低,因而使得 MRSA 对大多数抗菌药物耐药^[3]。PBP2a 由 N-末端跨膜区、非青霉素结合区和转肽酶区 3 部分组成。本研究采用从临床分离鉴定的 MRSA 菌株,应用基因重组技术将编码 PBP2a 转肽酶区的 DNA 片段克隆至大肠杆菌表达载体,实现了其在大肠杆菌中的高效表达,并对重组蛋白进行了纯化和鉴定,为后续相关研究打下

基础。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 MRSA 临床分离株、质粒 pET28a(+)均由本室保存;大肠杆菌 DH5α 及 BL21(DE3)plysS 株购自全式金生物技术有限公司。

1.2 材料与方法 聚合酶链式反应(PCR)所用试剂 Taq MIX、限制性核酸内切酶 BamH I、EcoR I 及 T4 DNA 连接酶均购自日本 Takara 公司;PCR 纯化、质粒提取及胶回收试剂盒购自上海生物工程股份有限公司;Ni 亲和层析预装柱购自美国 Novagen 公司;PCR 扩增仪购自杭州博日科技有限公司;

^{*} 基金项目:福建省科技计划社会发展重点项目(2012Y0058)。

作者简介:马洪玉,女,主管检验技师,主要从事临床微生物与检验研究。

[△] 通讯作者, E-mail: fzcmin@qq.com。

凝胶成像仪购自珠海黑马医学仪器有限公司; 兔抗 PBP2a 抗体购自 Rio Ray 公司。

1.3 方法

1.3.1 PCR 扩增目的基因片段 根据已公布的 *mecA* 基因序列, 由 Invitrogen(上海) 公司合成一对寡核苷酸引物, 上游引物: 5'-CGG GAT CCA CTA TTG ATG CTA AAG TTC A-3'; 下游引物: 5'-GGA ATT CGC AAC CCA CGT TAC CGG ATT G-3'^[4]。用接种针挑取本院检验科微生物实验室保留的 MRSA 菌落, 加入双蒸水 18 μ L, Taq MIX 20 μ L, 上下游引物各 1 μ L, 混匀, 94 $^{\circ}$ C 预变性 10 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

1.3.2 重组表达载体的构建 PCR 所获得的的目的基因片段经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 按胶回收试剂盒说明书回收纯化后用 BamH I、EcoR I 酶切, 并与同样酶切的 pET28a(+) 载体 T4 DNA 连接酶连接, 转化大肠杆菌 DH5a 感受态菌。通过酶切鉴定筛选出阳性重组子, 并将阳性重组子送至 Invitrogen(上海) 公司进行序列测定。

1.3.3 重组蛋白的表达 将重组质粒转化表达菌株 BL21 (DE3)plysS, 然后挑取单个菌落, 接种至含卡那霉素抗性的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 220 r/min 振荡培养过夜后, 以 1:100 转接于新鲜的含卡那霉素的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 培养至吸光度值(A 值)为 0.6, 取 1 mL 作为对照, 其余加 100 mmol/L 的异丙基硫代- β -D-半乳糖苷(IPTG)至终浓度为 0.7 mmol/L, 继续诱导培养 5 h, 取 1 mL 培养液离心收集细菌, 重悬于 50 μ L 磷酸盐缓冲液(PBS)中, 加等体积 2 $\times$ 上样缓冲液, 100 $^{\circ}$ C 煮沸 5 min, 取 10 μ L 进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析。

1.3.4 重组蛋白的复性 将 1 mL 过夜培养的菌液转接种于 100 mL 含卡那霉素的 LB 培养基中, 按上述方法诱导目的蛋白的产生; 4 $^{\circ}$ C 离心收集沉淀物, 将沉淀用 40 mL 的缓冲液 A (20 mmol/L Tris-HCl, pH7.5, 10 mmol/L 乙二胺四乙酸, 1% Triton X-100)重悬, 冰浴中超声破碎, 10 000 r/min 离心 10 min 收集沉淀; 以 40 mL 的缓冲液 A 洗涤包涵体两次, 离心去上清, 称量包涵体净重; 加入 40 mL 缓冲液 B[50 mmol/L 3-环己基氨基-1-丙磺酸, pH11.0, 3% N-十二烷基肌胺酸钠和 1 mol/L 二硫苏糖醇(DTT)]轻轻混匀, 室温孵育 15 min, 10 000 r/min 离心 10 min 至溶液澄清。将含有可溶蛋白的上清转入透析袋中, 每次透析所用缓冲液体积为 2 000 mL 缓冲液 C (0.02 mol Tris-HCl, pH8.5, 0.1 mmol/L DTT)4 $^{\circ}$ C 透析 3 h, 透析两次, 以缓冲液 D (即不加 DTT 的缓冲液 C)继续透析两次, 以加入终浓度分别为 1.0、0.2 mmol/L 的还原型谷胱甘肽和氧化型谷胱甘肽缓冲液 D, 4 $^{\circ}$ C 透析过夜; 4 $^{\circ}$ C 1 000 r/min 离心 10 min 去除沉淀, 0.45 μ m 滤器过滤。

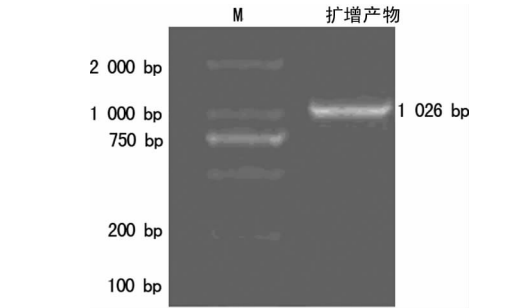
1.3.5 重组蛋白的纯化 预装柱经结合缓冲液 (0.5 mol NaCl, 5 mmol/L imidazole, 20 mmol/L Tris-HCl, pH7.9) 平衡后, 4 $^{\circ}$ C 条件下, 将透析后的液体上样, 控制流速为 10 mL/h, 依次用 10 mL 结合缓冲液、10 mL 漂洗缓冲液 (0.5 mol NaCl, 60 mmol/L imidazole, 20 mmol/L Tris-HCl, pH7.9)、5 mL 洗脱缓冲液 (0.5 mol NaCl, 1 mol imidazole, 20 mmol/L Tris-HCl, pH7.9) 洗柱, 分别收集洗脱液。分别取 10 μ L 洗脱液加

入等量 2 $\times$ SDS 上样缓冲液, 混匀, 100 $^{\circ}$ C 煮沸 5 min, SDS-PAGE 电泳。

1.3.6 蛋白免疫印迹法(WB)鉴定重组蛋白 取 5 μ L 纯化蛋白液, 加等体积 2 $\times$ SDS 上样缓冲液, 100 $^{\circ}$ C 煮沸 5 min, SDS-PAGE 电泳, 以未诱导菌的提取液做对照, 经转膜、封闭、结合稀释 1 000 倍兔抗 PBP2a 一抗、稀释 2 000 倍的羊抗兔二抗体后, 发光鉴定, 标定标记物, 进行扫描。

2 结 果

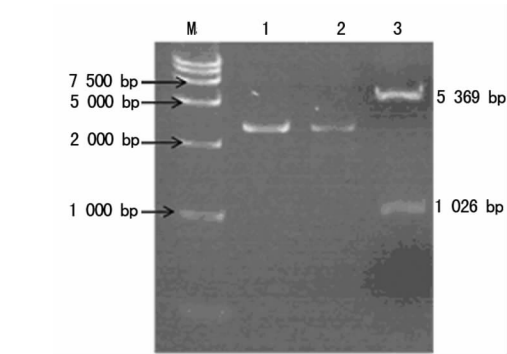
2.1 PCR 扩增目的基因片段 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 约 1 000 bp 附近可见清晰的扩增条带, 与目的片段预期大小一致。见图 1。



M:DNA 分子量标记物。

图 1 PCR 扩增目的基因片段

2.2 重组表达载体的酶切鉴定和测序 重组表达载体经 BamH I、EcoR I 酶切, 产物在预期大小 (1 026 bp) 处出现条带, 见图 2。测序结果与基因文库登录的目的片段序列 (GenBank; X52593) 仅有两个碱基位点不一致, 无移码突变, 核酸同源率为 99.8%。见图 2。



M:DNA 分子量标记物; 1、2: 非目的克隆酶切产物; 3: 目的克隆酶切产物。

图 2 BamH I /EcoR I 酶切重组表达载体

2.3 重组蛋白的表达与纯化 重组质粒转化菌经 IPTG 诱导后, 在相对分子质量约 38×10^3 处新增明显条带, 与理论相对分子质量一致。0.7 mmol/L IPTG 诱导的蛋白条带最深。见图 3 (见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

2.4 重组蛋白的鉴定 经过 WB 纯化的重组蛋白在 38×10^3 附近有明显的阳性条带, 而对对照菌的提取液则为阴性。见图 4 (见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

3 讨 论

自 20 世纪 60 年代报道 MRSA 以来, MRSA 所致的医院感染率逐年上升, 成为全球关注的严重医院和社区感染病原

菌^[5-6]。MRSA 是多重耐药菌,耐药性的遗传决定子为 *mec*,长约 $(30\sim50)\times10^3$,位于细菌染色体上,由 *mecA*、*mecI*、*mecRI* 及 $(20\sim40)\times10^3$ 的 *mec* 相关 DNA 组成。*mecA* 为结构基因,编码产生 PBP2a 蛋白。PBP2a 含有 668 个氨基酸,相对分子质量为 78×10^3 ,该蛋白由 N-末端跨膜区、非青霉素结合区和转肽酶区 3 部分组成,其中转肽酶区内含 β -内酰胺类抗菌药物作用位点^[7-8],在细菌耐药中起主要作用。

目前,MRSA 感染的诊断和治疗策略主要以 PBP2a 为靶标^[9-10],PBP2a 蛋白的表达是前提。本研究应用 PCR 技术扩增 PBP2a 转肽酶区基因片段 $1\,026\times10^3$,测序结果与基因文库登录的目的片段序列仅有两个碱基位点不一致,无移码突变,核酸同源为 99.8%。在重组蛋白的表达中笔者做了大量的试验,使用不同表达载体,包括谷胱甘肽巯基转移酶(GST)表达载体的 PGEX-4T、HIS 表达载体的 pet-22b、pet-28a。在不同的 IPTG 诱导浓度(0.4、0.7、1.0 mmol/L),不同的诱导时间(2、4、6、8、12 h),不同的温度(16、20、25、30、37 ℃)下检测,均为包涵体表达的蛋白,证实在浓度 0.7 mmol/L 的 IPTG 37 ℃诱导 6 h,蛋白的表达量最大,诱导其在大肠杆菌中高效表达。随后应用 Ni 亲和层析对重组蛋白进行了纯化,笔者优化了溶解包涵体、结合、漂洗和洗脱条件,得到了高纯度蛋白。

本实验所表达的 PBP2a 蛋白经 SDS-PAGE 电泳和 WB 鉴定,在相对分子质量 38×10^3 处均可见一新生蛋白条带,与 MRSA-PBP2a 转肽酶区的相对分子质量相吻合,说明已成功诱导了 PBP2a 转肽酶区蛋白,对 PBP2a 的分子生物学特性做了进一步探索,为 MRSA 感染的临床诊断和防治方法的研究提供了理论基础,将极大地推进 MRSA 感染难题的攻克。

参考文献

[1] 张连芝,王欣,周密,等.医院耐甲氧西林金黄色葡萄球菌感染现状的分析[J].中国实验诊断学,2010,14(6):1365-1366.

(上接第 576 页)

布及药物敏感性变迁[J].安徽医药,2008,12(3):237-239.

[8] 黄晓霞,汤进,柏莹. PCT、CRP、WBC、Neu%在鉴别诊断儿童细菌感染及 G⁺与 G⁻菌感染中的应用评价[J].国际检验医学杂志,2013,34(14):1850-1852.

[9] 杨德平,狄勇, WBC、CRP 联合检测对早期细菌感染性疾病的诊断价值[J].国际检验医学杂志,2014,35(11):1485-1486.

[10] 刘慧琳,刘桂花,马青变.降钙素原对急诊脓毒症患者早期诊断的价值[J].中国危重病急救医学,2012,24(5):298-301.

[11] Hashimoto H, Kitagawa K, Hougaku H, et al. Relationship between C-reactive protein and progression of early carotid atherosclerosis in hypertensive subjects[J]. Stroke, 2004, 35(7):1625-1630.

[12] McWilliam S, Riordan A. How to use C-reactive protein[J]. Arch Dis Child Educ Pract Ed, 2010, 95(2):55-58.

[13] 龚国富,段秀群,程丰,等. PCT、CRP 检测对社区获得性肺炎的诊断价值分析[J].国际检验医学杂志,2013,34(1):105-106.

[2] 李笃军,苏维奇,朱元祺.胶东地区耐甲氧西林金黄色葡萄球菌耐药性的研究[J].中国实验诊断学,2012,16(2):290-292.

[3] Monecke S, Coombs G, Shore AC, et al. A field guide to pandemic, epidemic and sporadic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus*[J]. PLoS One, 2011, 6(4):e17936.

[4] 徐霞,谢闰娥,杜晶春.耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 PBP2a 转肽酶区的克隆表达及纯化鉴定[J].生物技术通讯,2006,17(4):543-545.

[5] 潘宏升,田素飞,年华,等.耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的分子流行病学研究[J].微生物学杂志,2011,31(1):34-38.

[6] Stefanis S, Chung DR, Lindsay JA, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*(MRSA): global epidemiology and harmonization of typing methods[J]. Int J Antimicrob Agents, 2012, 39(4):273-282.

[7] Olarte NM, Valderrama IA, Reyes KR, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in a Colombian hospital intensive care unit: phenotypic and molecular characterization[J]. Biomedica, 2010, 30(3):353.

[8] Yamada K, Yanagihara K, Hara Y, et al. Clinical features of bacteremia caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a tertiary hospital[J]. Tohoku J Exp Med, 2011, 224(1):61.

[9] Fitzgerald-Hughes D, Devocelle M, Humphreys H. Beyond conventional antibiotics for the future treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: two novel alternatives[J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2012, 65(3):399-412.

[10] 于一云,王红,张淑文,等.复方清热颗粒剂对 MRSA PBP2a 表达影响的实验研究[J].中国中医急症,2009,18(9):1483-1486.

(收稿日期:2015-10-22)



[14] Carrol ED, Mankhambo LA, Jeffers G, et al. The diagnostic and prognostic accuracy of five markers of serious bacterial infection in Malawian children with signs of severe infection[J]. PLoS One, 2009, 4(8):e6621.

[15] Tang J, Long W, Yan L, et al. Procalcitonin guided antibiotic therapy of acute exacerbations of asthma: a randomized controlled trial[J]. BMC Infect Dis, 2013, 13:596.

[16] Loonen AJ, de Jager CP, Tosserams JA, et al. Biomarkers and molecular analysis to improve bloodstream infection diagnostics in an emergency care unit[J]. PLoS One, 2014, 9(1):e87315.

(收稿日期:2015-10-10)

