

论著·基础研究

金黄色葡萄球菌 N-乙酰甘露糖胺-6-磷酸 2-异构酶基因的克隆与表达*

顾冰倩¹, 龚奕¹, 何颖芝¹, 张玲莉¹, 何文迪¹, 夏佳音², 陈新江^{1△}

(1. 宁波卫生职业技术学院, 浙江 宁波 315100; 2. 浙江医药高等专科学校, 浙江 宁波 315100)

摘要:目的 对金黄色葡萄球菌 N-乙酰甘露糖胺-6-磷酸 2-异构酶基因(APE)进行克隆、鉴定与表达, 为新型抗菌药物的设计提供参考依据。方法 采用聚合酶链反应(PCR)扩增 APE 基因, 将扩增产物酶切后与原核表达载体 pET-32a(+)连接, 构建表达 APE 的重组质粒, 将重组质粒先转化大肠杆菌 TG1 内并提取质粒, 经 PCR、双酶切鉴定后再转化表达宿主大肠杆菌 BL21(DE3), 对转化菌株进行诱导后进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳。结果 构建了表达载体 pET-32a(+)-APE, 在 37℃ 经异丙基-β-D 硫代半乳糖苷诱导时获得表达, 表达的蛋白质相对分子质量为 45.2×10^3 。结论 APE 基因成功克隆到表达质粒内并获得了表达。

关键词: 葡萄球菌, 金黄色; 药物释放系统; 克隆, 生物; 基因表达; N-乙酰甘露糖胺-6-磷酸 2-异构酶

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.23.008 **中图法分类号:**R378.1+1

文章编号:1673-4130(2018)23-2876-03 **文献标识码:**A

The cloning and expression of N-acetylmannosamine-6-phosphate 2-epimerase gene from *Staphylococcus aureus**GU Bingqian¹, GONG Yi¹, HE Yinzhi¹, ZHANG Lingli¹, HE Wendi¹, XIA Jiayin², CHEN Xinjiang^{1△}

(1. Ningbo College of Health Sciences, Ningbo, Zhejiang 315100, China; 2. Zhejiang Pharmaceutical College, Ningbo, Zhejiang 315100, China)

Abstract: Objective To clone, identify, and express the N-acetylmannosamine-6-phosphate 2-epimerase (APE) gene from *Staphylococcus aureus* in order to provide reference data for the design of new antibacterial drugs. **Methods** APE gene was amplified with polymerase chain reaction (PCR) from *Staphylococcus aureus*, inserted into pET-32a(+), transformed into *Escherichia coli* TG1, and plasmid DNA was extracted, and digested with restriction endonucleases. The right insertion was retransformed into *E. coli* BL21(DE3). The cultures were loaded onto SDS-PAGE. **Results** The expression vector pET-32a(+)-APE was constructed and expressed in the presence of isopropyl-beta-D galactosyl thioglycoside at 37℃, The relative molecular mass of the expressed protein was 45.2×10^3 . **Conclusion** The APE gene was successfully cloned into the expression plasmid and obtained the expression.

Key words: staphylococcus aureus; drug delivery systems; cloning, organism; gene expression; N-acetylmannosamine-6-phosphate 2-epimerase

糖肽类抗生素如万古霉素, 被认为是治疗严重耐甲氧西林金黄色葡萄球菌感染的最佳药物, 但随着万古霉素中介金黄色葡萄球菌和万古霉素耐药金黄色葡萄球菌的出现, 临床治疗面临着严峻挑战^[1-2]。迫切需要寻找新的药物靶点, 研发新的药物用于治疗耐药金黄色葡萄球菌感染^[3-5]。参与唾液酸分解代谢的酶是尚未被利用的有希望的药物作用靶点^[6]。唾液酸(如 N-乙酰神经氨酸)是一个大家族, 存在于真核细胞表面的糖分子末端^[7]。金黄色葡萄球菌编码的酶能清除机体的唾液酸并运输到细菌细胞中, 通过一系列反应转化为果糖-6-磷酸。N-乙酰甘露糖胺-6-磷酸 2-异构酶是完成唾液酸分解代谢的关键分子^[8-9], 是抗金黄色葡萄球菌感染药物设计的一个可行的靶标。

1 材料与方法

1.1 菌种与质粒 金黄色葡萄球菌(ATCC 25923)购自广东环凯微生物科技有限公司。大肠杆菌 TG1、BL21(DE3)、表达质粒 pET-32a(+)均为宁波卫生职业技术学院医学技术实训中心保存。

1.2 试剂 限制性核酸内切酶(BamH I、Hind III)、2×聚合酶链反应(PCR)Master Mix 均为北京全式金公司产品。基因组 DNA 小量抽提试剂盒、质粒小量抽提试剂盒(通用型)、DNA Ladder (0.2~12.0 kb)、DNA 凝胶回收试剂盒、T4 连接酶、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶配制试剂盒、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液、考马斯亮蓝染色试剂盒、蛋白质相对分子质量标准[(14.4~116.0)×

* 基金项目: 宁波卫生职业技术学院自然科学重点项目(2016Z02); 浙江医药高等专科学校校级科研项目(ZPCSR2016008)。

作者简介: 顾冰倩, 女, 学生, 主要从事分子检验技术方面的研究。△ 通信作者, E-mail: 781720113@qq.com。

本文引用格式: 顾冰倩, 龚奕, 何颖芝, 等. 金黄色葡萄球菌 N-乙酰甘露糖胺-6-磷酸 2-异构酶基因的克隆与表达[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(23): 2876-2878.

10³]为碧云天公司产品。其他常规试剂均为进口或国产分析纯。

1.3 仪器 法国梅里埃 VITEK 2 Compact 全自动细菌鉴定及药敏分析系统、美国 Bio-Rad 水平和垂直电泳槽、Bio-Rad PowerPac Basic 电泳仪、英国 Thermo Px2 PCR 扩增仪、苏净集团安泰公司 SW-CJ-IF 生物安全柜、巩义市予华仪器 ZF-20D 暗箱式紫外分析仪、美国 Wealtec Dolphin-Doc plus 凝胶成像分析系统、江苏太仓市华美生化仪器厂 THZ-98 恒温摇床、德国 Heraeus Biofuge stratos 台式高速冷冻离心机。

1.4 方法

1.4.1 模板的制备 金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 冻干菌种用脑心浸液制成悬浮液,将菌悬液吸出接种于血平板,37℃培养 24~48 h,传代 2 次后挑取单个菌落作纯培养,采用全自动细菌鉴定及药敏分析系统鉴定确认菌种,挑取适量纯培养物加入 5 mL LB 液体培养基中,220 r/min、37℃振荡过夜。按碧云天公司基因组 DNA 小量抽提试剂盒说明书操作,获得基因组 DNA。

1.4.2 引物设计 根据 GenBank(序列号 CP009361)中金黄色葡萄球菌 N-乙酰甘露糖胺-6-磷酸 2-异构酶基因(APE)序列,采用生物软件 Premier 5.0 设计特异性引物,为便于定向克隆,在上、下游引物 5'端分别引入 BamH I (GGATCC)和 Hind III (AAGCTT)酶切位点。引物序列为 APE F: 5'-CGC GGA TCC ATG TTA CCA CAT GGA TTA ATA GTA TCT-3' APE R: 5'-CCC AAG CTT TTA ATC TTC CAT AAT TTG AAC AAA ACG-3'。

1.4.3 目的基因扩增 以金黄色葡萄球菌基因组 DNA 为模板,用所设计的正向引物和反向引物扩增 APE 基因。反应体积 50 μL,引物各 200 nmol/L,模板 400 ng,2×PCR Master Mix 25 μL。94℃预变性 5 min,然后按 94℃ 30 s、50℃ 30 s、72℃ 60 s 循环 30 次,最后 72℃延伸 7 min。产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳并在紫外灯下快速割取含目的片段的凝胶,按碧云天 DNA 凝胶回收试剂盒说明书操作回收,得到目的基因。

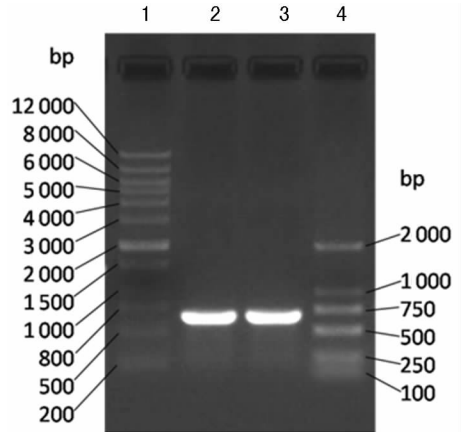
1.4.4 目的基因亚克隆 目的基因与载体 pET-32a(+)分别酶切、回收后按摩尔比 6:1 混匀,在 22.5℃、经 T4 DNA 连接酶连接 1 h,并转化感受态大肠杆菌 TG1。将转化菌接种于 100 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 琼脂平皿,37℃培养过夜。挑取单个菌落,接种于含 100 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,37℃培养过夜。按碧云天质粒小量抽提试剂盒提取质粒 DNA,并行 BamH I 和 Hind III 双酶切分析和 PCR 鉴定。

1.4.5 目的基因的诱导表达 对双酶切、PCR 验证后的 pET-32a(+)-APE 质粒进行提取,转化表达菌株 BL21(DE3)。将转化的 BL21(DE3)大肠杆菌接种于 5 mL LB 液体培养基中,以 pET-32a(+)

对照,37℃振荡培养过夜。次日将该菌液以 1%比例接种于 LB 液体培养基中,37℃培养至 OD600 值为 0.6~0.8,加异丙基-β-D 硫代半乳糖苷(IPTG)至终浓度 1 mmol/L,37℃继续振荡培养 4 h,分别取适量诱导表达菌液及其对照菌液进行 SDS-PAGE 分析,考马斯亮蓝 R250 染色并脱色后观察结果。

2 结果

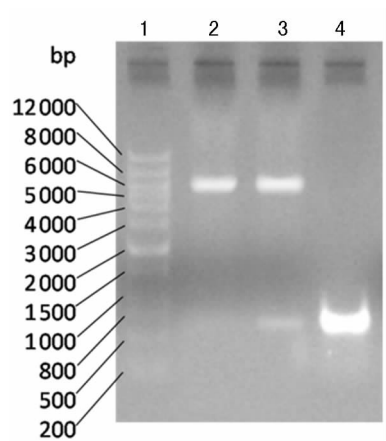
2.1 APE 基因的扩增 APE 基因的 PCR 产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳,扩增片段大小与预期的 687 bp 相符。见图 1。



注:1. DNA Ladder Marker(0.2~12.0 kb);2、3. APE 基因 PCR 产物;4. DL2000 Marker

图 1 APE 的 PCR 产物电泳图

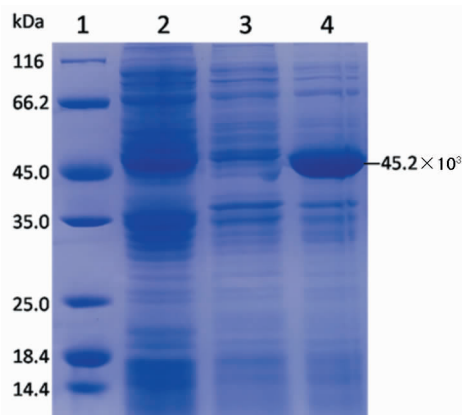
2.2 重组表达质粒的构建和鉴定 重组表达质粒 pET-32a(+)-APE 经 BamH I、Hind III 双酶切,得到 5 900 bp 的 pET-32a(+)-线性片段和约 670 bp 的插入片段,成功构建了 APE 基因的原核表达质粒 pET-32a(+)-APE。见图 2。



注:1. DNA Ladder Marker;2. pET-32a(+)-APE (BamH I / Hind III);3. pET-32a(+)-APE (BamH I / Hind III);4. APE 基因的 PCR 产物

图 2 重组质粒 pET-32a(+)-APE 的酶切鉴定图

2.3 SDS-PAGE 分析 pET-32a(+)-APE 转化的 BL21(DE3)经 IPTG 诱导后获得了表达,表达的蛋白相对分子质量为 45.2×10³,与预期大小一致。目的蛋白约占菌体总蛋白的 53%。而含空质粒 pET-32a(+)-E. coli BL21(DE3)对照则未见该蛋白表达。见图 3。



注:1. 蛋白质分子量标准;2. 诱导的空载体对照;3. 未诱导总蛋白;4. 诱导后总蛋白

图 3 APE 重组蛋白的 SDS-PAGE 分析

3 讨 论

提取金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 基因组之前本研究先采用全自动细菌鉴定及药敏分析系统鉴定确认菌种,确保挑选到的是金黄色葡萄球菌菌落,避免挑到可能存在的杂菌菌落。为使金黄色葡萄球菌的生化反应更加典型,在鉴定前采用血平板进行培养。通过鉴定,确认菌种后再抽提基因组 DNA。以提取到的基因组 DNA 作为模板进行 PCR 反应,成功获得了 687 bp 的基因扩增产物。

APE 基因两端 A、T 含量较高,所以,本研究设计了较长的引物,上、下游引物均为 36 nt, Tm 值在 50 ℃ 以上,有效避免了杂带的产生,获得了理想的扩增产物。

质粒小量抽提试剂盒提取的质粒 DNA 浓度较低,对重组表达质粒 pET-32a(+)-APE 进行双酶切鉴定时 5 900 bp 的 pET-32a(+)线性片段在琼脂糖凝胶中的条带较为明显,而只有 670 bp 左右的插入片段的条带,其亮度只有 pET-32a(+)条带的 1/10 左右,常规检测方法看不到该条带。本研究对抽提到的重组质粒采用常规乙醇沉淀方法加以浓缩,双酶切鉴定时才显示了两条带。

不同种类的细菌其 N-乙酰甘露糖胺-6-磷酸 2-异构酶存在差异,弄清该异构酶的保守结构对研发新的药物具有积极意义^[10-12]。由于缺乏关于该酶结构的相关文献,目前还很难预测参与催化的残基^[13-15]。本研究克隆了 N-乙酰甘露糖胺-6-磷酸 2-异构酶基因并成功表达了融合蛋白,且目的蛋白占菌体总蛋白量的一半以上。为进一步研究 APE,开发以 APE 为靶点的新型抗感染药物奠定了一定基础。

参考文献

[1] 钱鑫,谢娟.耐万古霉素金黄色葡萄球菌的研究进展[J].中国医院药学杂志,2014,34(15):1314-1319.
[2] FOSTER TJ. Antibiotic resistance in Staphylococcus aureus. Current status and future prospects[J]. FEMS Microbiol Rev, 2017, 41(3): 430-449.

[3] Mangasuli SN, Hosamani KM, Devarajegowda HC, et al. Synthesis of coumarin-theophylline hybrids as a new class of anti-tubercular and anti-microbial agents[J]. Eur J Med Chem, 2018, 146: 747-756.
[4] ASSIS LM, NEDELJKOVIC M, DESSEN A. New strategies for targeting and treatment of multi-drug resistant Staphylococcus aureus [J]. Drug Resistance Updates, 2017, 31: 1-14.
[5] KOCH G, WERMSE C, ACOSTA I C, et al. Attenuating staphylococcus aureus virulence by targeting flotillin protein scaffold activity[J]. Cell Chem Biol, 2017, 24(7): 845-857.
[6] VIMR ER, KALIVODA KA, DESZO EL, et al. Diversity of microbial sialic acid metabolism[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2004, 68(1): 132-153.
[7] BLUNDELL PA, LE NPL, ALLEN J, et al. Engineering the fragment crystallizable (Fc) region of human IgG1 multimers and monomers to fine-tune interactions with sialic acid-dependent receptors[J]. J Biol Chem, 2017, 292(31): 12994-13007.
[8] OLSON ME, KING JM, YAHR TL. Sialic acid catabolism in Staphylococcus aureus[J]. J Bacteriol, 2013, 195(8): 1779-1788.
[9] SIEGEL SJ, ROCHE AM, WEISER JN. Influenza promotes pneumococcal growth during coinfection by providing host sialylated substrates as a nutrient source[J]. Cell Host Microbe, 2014, 16(1): 55-67.
[10] NORTH RA, KESSANS SA, GRIFFIN MD, et al. Cloning, expression, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of N-acetylmannosamine-6-phosphate 2-epimerase from methicillin-resistant Staphylococcus aureus[J]. Acta Crystallogr F Struct Biol Commun, 2014, 70(Pt 5): 650-655.
[11] ITO S. Features and applications of microbial sugar epimerases[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2009, 84(6): 1053-1060.
[12] STEENBERGEN S M, LICHTENSTEIGER C A, CAUGHLAN R, et al. Sialic acid metabolism and systemic pasteurellosis[J]. Infect Immun, 2005, 73(3): 1284-1294.
[13] HWANG J, KIM BS, JANG SY, et al. Structural insights into the regulation of sialic acid catabolism by the Vibrio vulnificus transcriptional repressor NanR[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(30): E2829-2837.
[14] Garron ML, Cygler M. Structural and mechanistic classification of uronic acid-containing polysaccharide lyases [J]. Glycobiology, 2010, 20(12): 1547-1573.
[15] FUJIWARA T, SABURI W, MATSUI H, et al. Structural insights into the epimerization of β -1,4-linked oligosaccharides catalyzed by cellobiose 2-epimerase, the sole enzyme epimerizing non-anomeric hydroxyl groups of unmodified sugars [J]. J Biol Chem, 2014, 289(6): 3405-3415.