

重组炭疽致死因子的表达及生物活性分析

郭 强 徐俊杰 董大勇 付 玲 陈 薇*

(军事医学科学院微生物流行病学研究所 北京 100071)

摘 要 :使用分泌型表达质粒,实现了重组炭疽致死因子(rLF)在大肠杆菌周质腔中的分泌表达。表达量约占菌体总蛋白的 4%。经过离子交换和凝胶过滤纯化,每升诱导培养物可获得约 3mg 电泳纯的 rLF。蛋白 N 端测序表明,rLF 序列与天然炭疽 LF 一致。体外细胞毒性试验亦显示 rLF 具有很好的生物活性。rLF 的成功表达为今后研究 LF 的作用机理、发展新型炭疽疫苗、筛选针对炭疽致死毒素的抑制剂打下基础。

关键词 :炭疽杆菌,致死因子,蛋白表达,蛋白纯化,大肠杆菌

中图分类号 :Q93 文献标识码 :A 文章编号 :0001-6209(2004)06-0749-03

炭疽是由炭疽杆菌(*Bacillus anthracis*)引起的一种人畜共患的传染病,在目前阶段对人类和农业生产依然构成严重威胁。炭疽杆菌的毒力取决于它的两个毒力因子:聚谷氨酰荚膜和由三种蛋白质构成的炭疽毒素^[1]。

构成炭疽毒素的 3 种蛋白分别是保护性抗原(PA)、致死因子(LF)和水肿因子(EF),它们单独存在时均没有毒素活性,只有 PA 分别和 LF、EF 结合时才会产生毒素效应。PA 和 LF 形成致死毒素,PA 和 EF 形成水肿毒素。它们的作用机理是:PA 和其细胞膜受体结合后被水解生成 PA₆₃,PA₆₃ 聚合成七聚体,PA₆₃ 七聚体再与 LF 或 EF 结合协助它们进入胞浆。LF 在胞浆中发挥金属蛋白酶活性,水解丝裂原激活的蛋白激酶的激酶家族(MAPKKs),由此引发一系列的过程导致细胞的死亡,其具体机制仍在研究中^[2]。

在本实验中,我们使用分泌型表达载体,在大肠杆菌中进行了 rLF 的分泌表达研究,摸索了重组蛋白的纯化工艺,并用细胞毒实验检测了重组 LF(rLF)的生物活性。为今后研究 LF 的作用机理、发展新型炭疽疫苗和筛选针对炭疽致死毒素的抑制剂打下了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

含 LF 基因的质粒 pT-LF、大肠杆菌(*Escherichia*

coli) JM83 株和分泌型原核表达载体 pAS22 由本实验室保存。重组炭疽保护性抗原(rPA)和兔抗 LF 血清由本实验室制备。限制酶、pyrobest DNA 聚合酶和 T4 DNA 连接酶均购自 TaKaRa 公司。质粒提取试剂盒购自 Qiagen 公司。DNA 玻璃奶回收试剂盒购自博大生物工程公司。层析仪器及介质均为 Pharmacia 公司产品。

1.2 表达质粒构建

用 PCR 法从质粒 pT-LF 上扩出 LF 编码序列,用 *Sac* I 酶切 3' 端,形成 5' 平末端 3' 粘末端;同时用 *Stu* I / *Sac* I 双酶切载体 pAS22,也形成 5' 平末端 3' 粘末端。将处理好的载体和片段用 T4 DNA 连接酶连接过夜,转化 *E. coli* JM83 菌,用 PCR 法筛选阳性克隆,DNA 测序由本院八所完成。LF 5' 端引物:5'-CCGCGGGCGGTCATGCTGATGTAG-3';LF 3' 端引物:5'-CGCGAGCTCTGAGTTAATAATGAACCTAATC-3' (含 *Sac* I 位点)。

1.3 rLF 的诱导表达和抽提

带有表达质粒的 JM83 菌株在含 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基中 37 $^{\circ}$ C 250r/min 培养至 OD₆₀₀ 0.2~0.5,加入 IPTG 至 0.5mmol/L,28 $^{\circ}$ C 250 r/min 诱导表达 12h,离心收集细菌沉淀。沉淀加入 1/10 体积的 0.1mg/mL 溶菌酶溶液(20%蔗糖,20mmol/L Tris pH8.0)重悬,冰上放置 5min,离心收集上清。

1.4 rLF 的纯化

首先用 Q Sepharose XL 柱粗纯化。用平衡缓冲

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30300016)

* 通讯作者。Tel 86-10-66948565; Fax 86-10-63815273; E-mail: zhenwei@china.com

作者简介:郭 强(1975-),男,河南许昌人,硕士研究生,从事微生物学和基因工程研究。E-mail: limeguo@sohu.com

其他作者:宋小红

收稿日期:2004-02-26,修回日期:2004-05-10

液(20mmol/L Tris pH8.0 ,1%甘油 ,1mmol/L 2-巯基乙醇 ,1mmol/L EDTA)平衡柱 ,直接将样品上清上柱。冲洗后 ,先后用含 0.1mol/L NaCl 和 0.5mol/L NaCl 的平衡缓冲液洗脱。收集洗脱液 ,进行 12% SDS-PAGE 分析。

含 rLF 的管合并后用 Source 30Q 柱进行下一步纯化。用平衡缓冲液(同上)平衡柱 ,样品用平衡缓冲液稀释 5 倍后上样。冲洗后进行梯度洗脱 (0~0.5mol/L NaCl)。含 rLF 的管合并后超滤浓缩 (Centriplus YM-30 超滤管) ,用 superdex200 凝胶柱进一步纯化。用含 0.15mol/L NaCl 的磷酸盐缓冲液 (0.05mol/L Na₃PO₄ pH 值 7.2)洗脱。

1.5 Western blot 分析

使用本室自制的兔抗 LF 血清为一抗 ,HRP 标记的羊抗兔 IgG(Sigma)为二抗 ,进行 rLF 的 Western blot 分析 ,具体步骤见文献 [8]。

1.6 rLF 的 N 端测序

将纯化后的 rLF 经 10% SDS-PAGE 后 ,电转移至 PVDF 膜上 ,进行蛋白 N 端测序 ,由军事医学科学院仪器中心完成。

1.7 体外细胞毒性实验

小鼠巨噬细胞 J774A.1 以 10⁵/mL 接种于 96 孔培养板 ,长至 90% 满 ,固定 rPA 的浓度为 1μg/mL ,rLF 的浓度从 1μg/mL 起 2/3 稀释加入细胞孔中 ,37℃ 孵育 3h ,加入 100μL MTT(0.5mg/mL) 37℃ 孵育 30min ,吸取上清 ,每孔加入 100μL 盐酸异丙醇 ,振荡溶解沉淀后测 OD₅₄₀。结果取 3 个复孔的平均值。细胞存活率的计算 (加重组蛋白孔 OD₅₄₀ 值/未加蛋白孔 OD₅₄₀ 值)× 100%。

2 结果

2.1 表达质粒构建

表达质粒 pAS22-LF(图 1)以 IPTG 诱导的

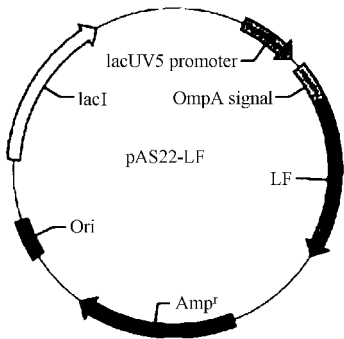


图 1 表达质粒 pAS22-LF 示意图

Fig. 1 Expression plasmid pAS22-LF

lacUV5 启动子调控 LF 的表达 Omp A 信号序列 ,可携带重组蛋白进入大肠杆菌周质腔 ,并且重组蛋白在分泌过程中可切去。经核酸测序证实 ,获得的表达质粒 pAS22-LF 序列与设计完全一致。

2.2 rLF 的表达

含表达质粒的工程菌株在 28℃ 用 0.5mmol/L IPTG 诱导 12h ,rLF 的表达量约占菌体总蛋白的 4%。

2.3 rLF 的纯化鉴定

将含 rLF 的细菌外周质先后用 Q Sepharose XL、Source 30Q 离子交换柱和 Superdex200 凝胶柱进行纯化 ,SDS-PAGE 分析表明外周质的杂蛋白绝大部分被除去 ,重组蛋白在 90kD 处显示为基本单一条带(图 2-B)。将重组蛋白进行 N 端测序 ,其 N 端前 5 个氨基酸残基依次为 AGGHG ,这和天然 LF 的 N 端(AG-GHG)是一致的。1L 培养物经纯化后共获得 3mg rLF。Western Blot 分析显示(图 2-A) ,重组蛋白可以与抗 LF 的兔血清作用 ,进一步证实重组蛋白为目的蛋白 rLF。

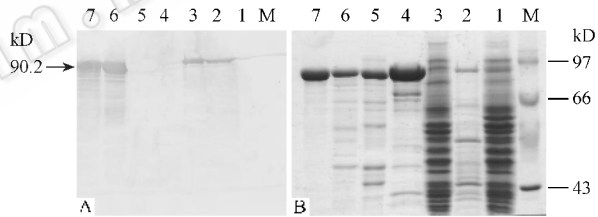


图 2 rLF 的表达与纯化

Fig 2 Expression and purification of rLF

A :Western blot ;B :SDS-PAGE ;M : Protein Marker ;1. Induced cell ;2. Periplasmic extract of induced cell ;3. Uninduced cell ;4. rPA ;5. rLF pool from Q Sepharose XL column ;6. rLF pool from Source 30Q column ;7. rLF pool from Superdex200 column.

2.4 细胞毒性实验

PA 与 LF 结合称为致死毒素(Lethal toxin , LT) ,在体外可导致敏感细胞(如小鼠巨噬细胞 J774A.1)的死亡 [3]。本试验固定 rPA 的浓度 ,把 rLF 的浓度做 2/3 比例梯度稀释后一起作用于 J774A.1 细胞 ,

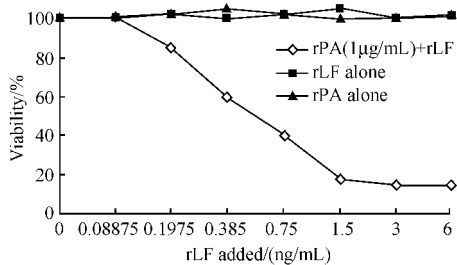


图 3 rLF 的细胞毒性

Fig. 3 Cytotoxicity of rLF

用 MTT 法观察细胞存活率。结果显示,细胞存活率随 rLF 的浓度的降低明显上升,而只加入 rPA 或 rLF 的细胞孔无明显变化(图 3)。当 rPA 为 $1\mu\text{g/mL}$ 时,可导致 50% 细胞死亡的 rLF 浓度(EC_{50})为 0.5ng/mL ,以上结果表明 rLF 在体外有较好的生物学活性。

3 讨论

相对于炭疽保护性抗原,对炭疽致死因子的研究还比较少,特别是 LF 作为一种金属蛋白酶的作用机制还不清楚^[1,2]。无论是研究 LF 在炭疽毒素致病机理中所扮演的角色,还是对 LF 本身的结构和功能进行研究,都需要一定量的纯化蛋白。从炭疽杆菌培养物中分离纯化 LF 产量较低(约 1mg/mL),并且对生产设施的安全性有较高的要求^[4];从大肠杆菌中表达 LF 已有一些成功报道,但都是细胞内表达,由于 LF 容易被胞内蛋白酶降解,因此完整 LF 的产量较低($1\sim 2\text{mg/mL}$),并且纯化困难^[5-7]。

在本实验中,我们构建的表达质粒在 LF 基因片段的 5' 端融合了 Omp A 的信号肽序列,成功地在大肠杆菌中实现了 LF 的可溶分泌型表达。其优点是一方面使 rLF 以可溶形式表达保持其正确构象;另一方面可减少 rLF 被胞内蛋白酶降解。同时, rLF 分泌在细菌的周质腔,这对重组产物的纯化非常有利。从周质腔中抽提目标蛋白可以用两种方法,高低渗法和溶菌酶法,本实验中,用高低渗法做小量抽提(1mL)时很有效,但扩大体积至几升时效果不好,因此我们后来采用了溶菌酶法。和高低渗法相比,

溶菌酶法减少离心操作,且样品可以直接上柱,无须再调整盐浓度。经过 3 步简单的柱纯化,从 1L 诱导培养物可获得约 3mg 电泳纯的 rLF,能够满足进一步活性实验的要求。蛋白 N 端测序表明, rLF N 端序列与天然 LF 一致,体外细胞毒性试验显示出 rLF 具有很好的生物学活性。

这些工作为今后研究 LF 的作用机理、发展新型炭疽疫苗、筛选针对炭疽致死毒素的抑制剂打下基础。

参 考 文 献

- [1] Duesbery N S, Vande Woude G F. Anthrax toxins. *Cell Mol Life Sci*, 1999, **55**(12):1599-1609.
- [2] Ascenzi P, Visca P, Ippolito G, et al. Anthrax toxin: a tripartite lethal combination. *FEBS Letters*, 2002, **531**:384-388.
- [3] Singh Y, Leppla S H, Bhatnagar R, et al. Internalization and processing of lethal toxin by toxin-sensitive and -resistant cells. *J Biol Chem*, 1989, **264**(19):11099-11102.
- [4] Leppla S H. Production and purification of anthrax toxin. *Methods Enzymol*, 1988, **165**:103-116.
- [5] Gupta P, Batra S, Chopra A P, et al. Expression and purification of the recombinant lethal factor of *Bacillus anthracis*. *Infect Immun*, 1998, **66**(2):862-865.
- [6] Robertson D L, Leppla S H. Molecular cloning and expression in *E. coli* of the lethal factor gene of *B. anthracis*. *Gene*, 1986, **44**:71-78.
- [7] Gupta P, Sahai V, Bhatnagar R. Enhanced expression of the recombinant lethal factor of *Bacillus anthracis* by fed-batch culture. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, **285**:1025-1033.
- [8] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Expression and Characterization of The Recombination Anthrax Lethal Factor

GUO Qiang XU Jun-Jie DONG Da-Yong FU Ling CHEN Wei*

(Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

Abstract: The gene encoding anthrax lethal factor (LF) was cloned into a secretory expression plasmid and then expressed in periplasmic space of *E. coli*. The recombinant LF (rLF) expressed was about 4% of the total proteins in *E. coli*. About 3 mg electrophoresis purity rLF could be obtained after the purification of 1 liter culture using ion exchange chromatography and gel filtration. The result of sequencing assay showed that the N-terminal amino acid sequence of rLF was identical to the N-terminal sequence of natural LF. *In vitro* toxicity analysis also shows that rLF has an excellent biological activity. The successful expression of rLF has placed a solid foundation for the research on toxicity mechanism of LF, developing new anthrax vaccines, and screening for inhibitors against anthrax toxin.

Key words: *Bacillus anthracis*, lethal factor, protein expression, protein purification, *Escherichia coli*