

## 重组炭疽水肿因子的表达与生物活性分析

董大勇 徐俊杰 宋小红 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** 炭疽毒素包括 3 种蛋白因子,即保护性抗原(PA)、致死因子(LF)和水肿因子(EF)。EF 是钙调蛋白依耐的腺苷酸环化酶,可使细胞 cAMP 浓度升高,导致宿主防御能力下降。为深入研究炭疽毒素的作用机理,构建了原核表达质粒,在大肠杆菌中表达出重组 EF(rEF)。经鉴定,rEF 以可溶形式表达于细菌胞质中。经过金属螯和层析、阳离子交换层析和凝胶层析,每升诱导培养物可获得约 5mg 重组蛋白。用重组蛋白免疫家兔获得了兔多抗,能够在细胞试验中中和 rEF,体外细胞试验显示 rEF 具有很好的生物活性,在 J774A.1 和 CHO 细胞试验中,能与 LF 共同竞争和 PA 的结合位点,相互抑制。上述工作为深入研究炭疽毒素的作用机理,开发针对 EF 的毒素抑制剂打下基础。

**关键词** 炭疽杆菌,水肿因子,炭疽毒素,表达

中图分类号:Q78 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2005)03-0459-04

炭疽是一种古老的传染病,炭疽杆菌是细菌学中发现最早的病原菌之一,同时也是潜在的生物恐怖病原,自美国“9.11”事件之后,国内外对炭疽的研究越来越多,主要集中在研发新型炭疽疫苗和对炭疽毒素研究等方面。

炭疽杆菌的毒力取决于它的两个毒力因子:以  $\gamma$  健相联结的聚-D-谷氨酰荚膜和由 3 个蛋白组分构成的炭疽毒素。荚膜由质粒 pXO2 编码,在体内可以抵抗细胞的吞噬,在引起感染的过程中起重要作用,在体外能掩盖噬菌体受体,防止噬菌体的裂解作用。炭疽毒素是炭疽杆菌最重要的毒力因子,也是研究蛋白酶配体与真核细胞相互作用的良好模型。它由质粒 pXO1 编码,包括 3 种蛋白质成分:保护性抗原(Protective antigen, PA)致死因子(Lethal factor, LF)和水肿因子(Edema factor, EF)。炭疽毒素是符合蛋白毒素 A/B 结构模式,单独的 PA、LF、EF 都无毒性,PA 是结合亚单位 B,EF、LF 是效应亚单位 A,PA + LF 静脉注射能造成动物死亡,称致死毒素(Lethal toxin, LT);PA + EF 皮下注射可造成水肿,称为水肿毒素(Edema toxin, ET)。PA 能诱导机体的保护性免疫,是获美国 FDA 批准的炭疽疫苗(Anthrax vaccine adsorbed, AVA)的主要免疫活性成分;EF 是钙调蛋白依耐的腺苷酸环化酶,可使细胞 cAMP 浓度升高,导致宿主防御能力下降;LF 是一种锌依耐的金属蛋白酶,目前已发现的底物均属于丝裂原激活的蛋白激酶的激酶家族(MAPKKs),经过一系列未知的级联反应导致巨噬细胞裂解<sup>[2]</sup>,两者在细菌感染的早期发挥着重要的作用<sup>[3,4]</sup>。也有研究显示,在细菌出芽、繁殖和巨噬细胞消散的过程中无需毒素参与<sup>[5]</sup>,因此,关于毒素在细菌出芽、繁殖中的作用还需要在不同的宿主中进一步研究。

为深入研究炭疽毒素的作用机理,开发针对 EF 的毒素抑制剂,本文构建了原核表达质粒,在大肠杆菌中表达出了重组 EF(rEF),并进行了纯化、鉴定及生物学活性研究。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 菌种、质粒和细胞** 含 EF 基因的质粒 pT-EF 由本室保存。pQE-30 原核表达载体购自 Qiagen 公司。大肠杆菌(*Escherichia coli*)M15[pREP],基因型为 NaIStrsrifslac-ara-gal-mlt-F-recA + uvr+ 本室保存。小鼠巨噬细胞 J774A.1 和中国仓鼠卵巢细胞 CHO 均购自上海中国科学院细胞研究所。

**1.1.2 主要试剂**:限制酶 *Ex Taq* 酶, T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司;质粒提取试剂盒购自 Qiagen 公司;DNA 片段回收试剂盒购自上海华舜生物工程公司;Biotrak cAMP EIA kit, AKTA Explorer 层析仪器和介质均购自 Amersham Pharmacia 公司;基因工程重组 PA(rPA)和重组 LF(rLF)由本室制备<sup>[6,7]</sup>。

#### 1.2 表达质粒构建

用 PCR 法从质粒 pT-EF 上扩出 EF 基因片段(不含信号肽,从成熟蛋白第 1 个密码子开始),用 *Bam*H I / *Sac* I 双酶切,载体 pQE-30 经同样酶切后,与片段连接过夜,常规转化 *E. coli* M15 菌,用 PCR 法筛选阳性克隆,提质粒进行酶切鉴定和序列测定。DNA 测序由 TaKaRa 公司完成。EF 5'端引物(32mer): 5'-CGCGGATCCATGAATGAACATTACACTGAGAG-3' (含 *Bam* H I 位点);EF 3'端引物(34mer): 5'-CGC GAGCTCTTATTTTTCATCAATAATTTTTTGG-3' (含 *Sac* I 位点)。

基金项目 国家自然科学基金(30300016)

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

作者简介 董大勇(1974-)男,黑龙江讷河市,博士研究生,从事微生物学研究。E-mail: dayong-dong@sohu.com

其他作者 李冠霖,葛 猛

收稿日期 2004-11-20,修回日期 2005-01-10

### 1.3 工程菌诱导表达

工程菌单克隆接种于 20mL  $2 \times$  YT 培养液中(含 100 $\mu$ g/mL 氨基青霉素), 37 $^{\circ}$ C、250r/min 培养至饱和,即为种子液。将种子液以 20mL/L 的比例加入 5L 三角烧瓶中(内含 1L  $2 \times$  YT 培养液, 50 $\mu$ g/mL 氨基青霉素), 37 $^{\circ}$ C、250r/min 培养至  $OD_{600}$  0.7~0.8, 加入 IPTG 至 0.5mmol/L, 37 $^{\circ}$ C、250r/min 诱导表达 5h, 离心收集细菌沉淀备用。

### 1.4 rEF 的纯化和鉴定

5L 诱导培养物离心得到的菌体,用 100mL 溶液 A (50mmol/L 磷酸钠 pH8.0, 300mmol/L NaCl)重悬,加溶菌酶至 1mg/mL,冰上放置 30min,加入 PMSF 至 1mmol/L,超声 20min, 4 $^{\circ}$ C、12000g 离心 10min,收集上清 12000g 再离心 10min,用 AKTA Explorer 进一步纯化 rEF。

首先用 Ni-Sepharose 柱纯化。用缓冲液 B 溶液 A 加 1% 甘油, 2mmol/L 2-巯基乙醇)平衡柱,样品 1mL/min 上样。用 B + 20mmol/L 咪唑洗柱, B + 100mmol/L 咪唑洗脱。收集洗脱液,进行 12% SDS-PAGE 分析。含 rEF 的管合并后,用 Milipore 超滤管(截留分子量 30000)浓缩,并置换缓冲液 C (20mmol/L 磷酸钾 pH7.0, 1% 甘油, 2mmol/L 2-巯基乙醇, 1mmol/L EDTA),用 SP FastFlow 柱纯化。柱用溶液 C 平衡后上样,用含 0~0.25mol/L NaCl 的溶液 C 进行梯度洗脱。含 rEF 的管合并后用 Milipore 超滤管浓缩,用 Superdex 200 进行精纯,所用缓冲液为 50mmol/L 磷酸钠 pH7.2, 0.15mol/L NaCl。获得的 rEF - 70 $^{\circ}$ C 保存。

将各步纯化样品进行 12% SDS-PAGE,观察纯化效果。用抗-rEF 多克隆抗体(见 1.5)为一抗,HRP 标记羊抗兔 IgG (Sigma)为二抗,进行 Western blot 分析。

### 1.5 抗 rEF 兔多抗的制备

用纯化的 rEF 抗原免疫健康家兔,采用背部皮下分点注射,免疫时间为第 0、3、6 周,第 8 周心脏采血。免疫剂量为 0.5mg/只,首次免疫使用完全弗氏佐剂,后两次用不完全弗氏佐剂。抗血清用 ELISA 法测定滴度。

### 1.6 rEF 的生物学活性

测量用 Biotrak cAMP EIA kit 按试剂盒说明书操作。CHO 细胞以  $10^4$ /mL 接种于 96 孔培养板,固定 rPA 的浓度为 1 $\mu$ g/mL, rEF 的浓度从 50 $\mu$ g/mL 起倍比稀释加入细胞孔中, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2h,显微镜下观察细胞形态的变化,检测 cAMP 水平的变化,取 3 个复孔的平均值。

### 1.7 rEF 与 rLF 的竞争能力

EF 和 LF 对 PA 均有高度的亲和力,EF 和 LF 之间对 PA 结合位点的竞争可以在 J774A.1 和 CHO 细胞试验中证明。

中国仓鼠肾细胞 CHO 以  $10^4$ /mL 接种于 96 孔培养板,在 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中过夜培养,固定 rPA 和 rEF 的浓度为 0.1 $\mu$ g/mL, rLF 的浓度从 40 $\mu$ g/mL 起倍比稀释加入细胞孔中, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2h,显微镜下观察细胞形态的变化,用 Biotrak cAMP EIA kit 检测 cAMP 水平的变化,结果取 3 个复孔的平均值。

小鼠巨噬细胞 J774A.1 以  $10^5$ /mL 接种于 96 孔培养板,

长至 90% 满,固定 rPA 的浓度为 1 $\mu$ g/mL, rEF 浓度从 10 $\mu$ g/mL 起倍比稀释加入细胞孔中, 37 $^{\circ}$ C 孵育 3h,加入 100 $\mu$ L MTT (0.5mg/mL), 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min,吸取上清,每孔加入 100 $\mu$ L 盐酸异丙醇,振荡溶解沉淀后测  $OD_{540}$ 。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  $OD_{540}$  值/未加蛋白孔  $OD_{540}$  值)  $\times$  100%。固定 rPA 的浓度为 1 $\mu$ g/mL, rEF 的浓度从 40 $\mu$ g/mL 起倍比稀释加入细胞孔中, 37 $^{\circ}$ C 孵育 3h,用 MTT 法计算细胞存活率(方法同上)。固定 rPA 和 rLF 的浓度为 1 $\mu$ g/mL, rEF 的浓度从 10 $\mu$ g/mL 起倍比稀释加入细胞孔中, 37 $^{\circ}$ C 孵育 3h,用 MTT 法计算细胞存活率(方法同上)。

### 1.8 抗-rEF 兔多抗对 CHO 细胞的保护作用

中国仓鼠肾细胞 CHO 以  $10^4$ /mL 接种于 96 孔培养板,在 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中过夜培养,固定 rPA 和 rEF 的浓度为 0.1 $\mu$ g/mL,抗-rEF 兔多抗的浓度从 1/50 起对倍稀释加入细胞孔中, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2h,显微镜下观察细胞形态的变化,用 Biotrak cAMP EIA kit 检测 cAMP 水平的变化,结果取 3 个复孔的平均值。

## 2 结果

### 2.1 表达质粒的构建

将 PCR 获得的 EF 基因片段插入 pQE30 载体,获得了表达质粒 pQE-EF(图略)。pQE30 表达载体属于 PDS 质粒家族,是一种低拷贝质粒。它含有噬菌体 T5 启动子和两个乳糖操纵子序列,有核糖体结合位点以确保高转录效率,有转录终止密码子以保证转录的有效终止。同时它含有 6 个组氨酸编码序列。使重组蛋白的 N 端产生 6 个组氨酸,通过金属离子的螯和作用,带 6 个组氨酸的重组蛋白就可以连接到 Ni-NTA 琼脂柱上,经过洗涤和洗脱可获得高纯度的重组蛋白。经测序证实,获得的表达质粒 pQE-EF 序列与设计完全一致。

### 2.2 rEF 的表达、纯化和鉴定

含表达质粒的工程菌株经 IPTG 诱导后,可获得 rEF 的表达,SDS-PAGE 分析,发现 rEF 以可溶形式表达于细菌胞质中,分子量约 90kD,均与预期相符(图 1-A)。经鉴定, rEF 以可溶形式表达于细菌胞质中。经过金属螯和层析、阳离子交换层析和凝胶层析,纯化产物用 Lowry 法测定蛋白浓度,计算出每升诱导培养物大约可获得约 5mg 重组蛋白(图 1-A)。

### 2.3 抗 rEF 兔多抗的制备

用重组蛋白免疫家兔获得了兔多抗。抗血清用 ELISA 法测定, rEF 抗体滴度  $> 10^6$ 。用此多抗对 rEF 进行 Western blot 分析,结果表明,在推测分子量处显示明显条带(图 1-B),对 CHO 细胞实验中,兔多抗可抑制 rEF 生物学活性(图 2)。

### 2.4 rEF 的生物学活性

在 CHO 细胞试验中, rEF 能增加细胞内 cAMP,引导 CHO 细胞产生特异的形态学反应。显微镜观察用 rEF 50ng/mL 和 PA 1 $\mu$ g/mL 处理细胞能引起细胞的拉长反应, cAMP 测定显示 rEF 能显著增长细胞内的 cAMP 水平(图 3)。而单独加入 rPA 或 rEF 不能提高 cAMP 水平,也未见 CHO 细胞发生形态学的改变。

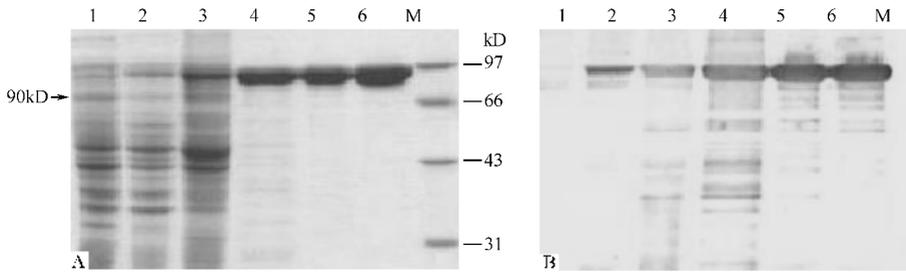


图 1 rEF 的表达和纯化

Fig.1 Expression and purification of rEF

A :SDS-PAGE ;B : Western blot. 1. Uninduced cell 2. Induced cell 3. Supernatant of sonication 4. rEF pool from Ni sepharose column 5. rEF pool from SP Fast Flow column 6. rEF pool from Superdex200 column M. Protein marker.

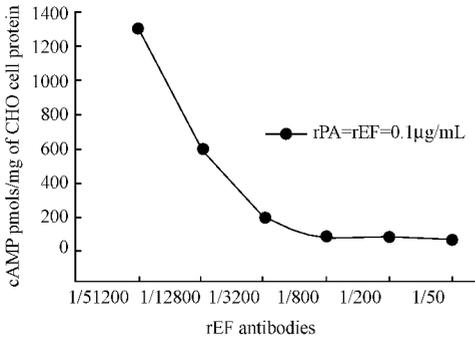


图 2 抗-rEF 多抗的保护作用

Fig.2 Protection of anti-rEF antibodies

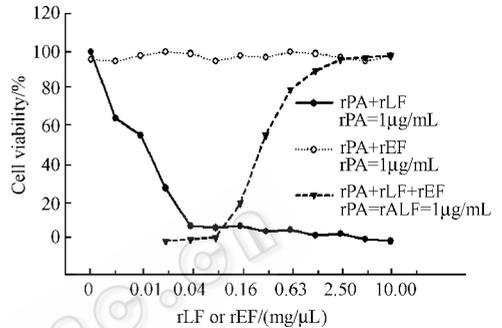


图 4 rEF 与 rLF 的竞争抑制

Fig.4 Competition with rLF

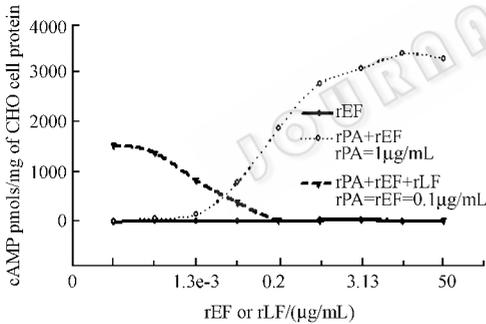


图 3 rEF 的生物活性

Fig.3 Biological activity of rEF

2.5 rEF 与 rLF 的竞争试验

rEF 和 rLF 之间对 rPA 结合位点的竞争抑制,有 rLF 存在时,在 CHO 细胞中共孵育 rEF 和 rPA,当 rLF 增加时,rEF 引起的 CHO 细胞的 cAMP 反应降低,当 rLF 高于 rEF 倍量时,能显著降低 cAMP 的水平(图 3)。

JA774A.1 与致死毒素(1μg/mL LF 和 1μg/mL PA)共孵育 3h 后,全部细胞发生死亡,然而当有 rEF 存在时,JA774A.1 细胞存活率升高,当 rEF 浓度高于 rLF 时,细胞存活率有显著提高(图 4)。

3 讨论

EF 是一种细菌腺苷酸环化酶,在被真核细胞辅助因子钙调蛋白激活后引起宿主细胞内 cAMP 水平的快速升高,使

细胞因子网络被打断,引起炭疽的一些临床症状,如水肿等。ET 具有广泛的细胞敏感性,可作用于各种类型的细胞,都造成 cAMP 增多,这点与 LT 只对巨噬细胞发生急性致死作用不同,对 EF 进行研究不仅是因为它是炭疽的毒素成分,还因为它是一种通过受体介导的内吞进入细胞的细菌腺苷酸环化酶,但与哺乳动物参与腺苷酸循环中的蛋白质在结构上又没有明显的一致性,它为人们提供了研究 cAMP 如何调节细胞代谢过程的又一模型<sup>[8]</sup>。

从炭疽杆菌中直接纯化 EF,产量仅有 0.4~0.8mg/mL,并且存在安全问题<sup>[9]</sup>。因此本研究的目的是建立快速有效的 EF 表达纯化系统。成熟 EF 蛋白共 767 个氨基酸,加上载体上带的组氨酸序列标签,共 779 个氨基酸,预测分子量在 90kD 左右。SDS-PAGE 显示获得的重组蛋白分子量与预测一致。经过简单的纯化步骤,每升诱导培养物可获得约 5mg 重组蛋白。用重组蛋白免疫家兔获得了兔多抗,并能在细胞试验中中和 rEF,体外细胞试验也显示 rEF 具有很好的生物活性,在 J774A.1 和 CHO 细胞试验中,能与 rLF 共同竞争和 rPA 的结合位点,相互抑制。本研究为深入研究炭疽毒素的作用机理,开发针对 EF 的毒素抑制剂打下基础。

参 考 文 献

[ 1 ] Mock M , Fouet A . Anthrax . *Annu Rev Microbiol* , 2001 55 647 - 671 .

[ 2 ] Chaudry G J , Moayeri M , Liu S , et al . Quickening the pace of anthrax research : three advances point towards possible therapies . *Trends Microbiol* 2002 10 ( 2 ) : 58 - 62

- [ 3 ] Guide-Rontani C , Levy M , Ohayon H. Germination of *Bacillus anthracis* spores within alveolar macrophages. *Mol Microbiol* , 1999 , **31** : 9 - 17 .
- [ 4 ] Guide-Rontani C , Levy M , Ohayon H. Fate of germinated *Bacillus anthracis* spores in primary murine macrophages. *Mol Microbiol* , 2002 **42** : 931 - 938 .
- [ 5 ] Dixon T C , Fadl A A , Koehler T M. Early *Bacillus anthracis* macrophage interactions : intracellular survival and escape. *Cell Microbiol* 2000 **2** : 453 - 463 .
- [ 6 ] 徐俊杰 ,董大勇 ,宋小红 ,等 . 重组炭疽保护性抗原的表达、纯化与生物活性分析 . 生物工程学报 , 2004 **20** ( 5 ) : 652 - 655 .
- [ 7 ] 郭强 ,徐俊杰 ,董大勇 ,等 . 重组炭疽致死因子的表达及生物活性分析 . 微生物学报 , 2004 **44** ( 6 ) : 749 - 751 .
- [ 8 ] Drum C L , Yan S Z , Bard J , et al . Structural basis for the activation of anthrax adenyl cyclase exotoxin by calmodulin. *Nature* , 2002 **415** ( 24 ) : 396 - 402 .
- [ 9 ] Leppla S H. Production and purification of anthrax toxin. *Methods Enzymol* , 1988 **165** : 103 - 116 .

## Expression and analysis of biological activity of the recombination anthrax edema factor

DONG Da-yong XU Jun-jie SONG Xiao-hong FU Ling CHEN Wei\*

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

**Abstract** : Anthrax toxin consists of three separate proteins , protective antigen ( PA ) , lethal factor ( LF ) and edema factor ( EF ) . EF is bacterial adenylate cyclase which , upon activation by its eukaryotic cofactor , calmodulin , causes a rapid increase in the intracellular cAMP level of host cells . EF can reduce the protective ability of host animal . In order to further research the mechanism of anthrax toxin , the expression plasmid was constructed and the structural gene for anthrax edema factor ( EF ) was expressed in *Escherichia coli* . Recombinant EF ( rEF ) was purified to homogeneity by a three-step procedure involving metal chelating affinity chromatography , cation-exchange chromatography and gel chromatography . From 1 liter of culture , 5mg of biologically active EF was easily purified . Rabbits were immunized with rEF , anti-EF antibodies were prepared and can neutralize rEF in cells . Tests *in vitro* proved rEF have good biological activity . rEF can compete the binding regions of PA with rLF in J774A.1 and CHO cells . rEF and rLF can restrain each other by competition . The successful expression of rEF has placed a solid foundation for the research on toxicity mechanism of EF , and screening for inhibitors against EF .

**Key words** : *Bacillus anthracis* , Edema factor , Anthrax toxin , Protein expression

Foundation item : Chinese National Natural Science Foundation ( 30300016 )

\* Corresponding author . Tel 86-10-66948565 ; Fax 86-10-63815273 ; E-mail : chenwei@china.com

Received date : 11-20-2004

## 写作要点

凡投送本刊的稿件 ,如涉及到以下内容 ,请作者按照本刊要求撰写。

1. 摘要 :中英文摘要均采用第三人称叙述 ,不允许出现第一人称 ,如“本文、本研究、我们……”等。研究论文摘要包括目的、方法、结果和讨论 ,综述摘要包括论述内容的发展水平、自己的评论和展望。英文摘要中也可以加入自己的一些观点 ,用过去时态叙述作者工作 ,用现在时态叙述作者结论。要求语法正确 ,句子通顺 ,最好请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再投来。

2. 系统发育树 :系统树中菌名应列出全称及菌株号 ;名字后加括号 ,其内含序列号 ;还应标出分枝点上的数字 ( 即 Bootstrap 值 ) 。图注应说明“树”上所有的内容 ,包括 括号中的序列号、分支点上的数字涵义、比例尺代表的意义 ( 如 0.01 ) 。 [ 参见 :微生物学报 , 2004 **44** ( 2 ) : 143 . ]

3. 测序结果 :因本刊版面紧张 ,所有测序结果 ( 核酸、蛋白质 ) ,请作者先通过计算机网络进入国际基因库 EMBL ( 欧洲 ) 或 GenBank ( 美国 ) 或 DDB ( 日本 ) ,申请得到国际基因库接受号 ( Accession No. ) 后再投稿。

4. 参考文献 :参考文献按文内引用的先后排序 ,必须是作者在论文中直接引用的、发表在正式出版物上的文献。未正式发表的文献 ( 包括私人通讯、毕业论文等 ) 一般不作为文献引用 ,必要时可作为脚注处理。

《微生物学报》编辑部