

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
51(5):630-636; 4 May 2011
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

异源表达的幽门螺杆菌 *cag4* 蛋白有溶菌糖基转移酶活性

王文凯¹, 钟桥², 谢立苹², 邵世和^{2*}

江苏大学,¹ 附属人民医院检验科,² 基础医学与医学技术学院病原生物学研究室, 镇江 212013

摘要:【目的】构建融合基因原核表达载体 pET-28a-cag4, 并表达重组融合蛋白 cag4, 分析重组融合蛋白的酶活性, 为新型抗生素(或是抗菌药物)的研发提供作用靶位。【方法】本研究利用 PCR 技术从幽门螺杆菌 NCTC11637 中克隆了 *cag4* 基因; 经 T-A 克隆, 酶切鉴定, 构建了原核表达载体 pET-28a-cag4; 经测序鉴定正确后, 转化进入大肠埃希菌 BL21(DE3) 进行异源表达。利用 IPTG 体外诱导后, 经 SDS-PAGE 和 Western Bolt 鉴定目的蛋白表达后, 采用 Ni²⁺-NTA 柱在变性条件下纯化目的蛋白, 并对重组蛋白进行透析复性处理。将 SDS 煮沸法获得的溶壁微球菌肽聚糖掺入 SDS-PAGE 作为底物, 进行酶谱分析。【结果】在大肠埃希菌 BL21(DE3) 中获得高效表达的重组蛋白; 经 SDS-PAGE 和 Western Bolt 鉴定表达后, 采用 Ni²⁺-NTA 柱在变性条件下纯化, 并进行透析复性处理。将 SDS 煮沸法获得的溶壁微球菌肽聚糖掺入 SDS-PAGE 作为底物, 进行酶谱分析, 表明目的蛋白具有明显的肽聚糖水解活性; 通过监测浊度下降速率, 比较其在不同 pH 条件下活性的变化, 即 $\Delta A / (\text{min} \cdot \text{mg protein})$, 结果表明, 幽门螺杆菌 *cag4* 蛋白具有溶菌糖基转移酶活性。【结论】幽门螺杆菌 *cag4* 蛋白具有溶菌糖基转移酶活性。

关键词: 幽门螺杆菌, *cag4* 蛋白, IV 型分泌系统, 异源表达, 酶谱分析

中图分类号: Q936 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011) 05-0630-07

溶菌糖基转移酶 (lytic transglycosylase, LT) 广泛分布于细菌, 能够水解 N-乙酰胞壁酸酯 (N-acetylmuramic acid, MurNAc) 和 N-乙酰葡萄糖胺 (N-acetylglucosamine, GlcNAc) 之间的 β -1, 4 糖苷键。与溶菌酶不同的是其不是发生水解作用, 而是发挥糖基转移酶的活性, 即在 N-乙酰胞壁酸酯 MurNAc 内部形成了 1, 6 糖苷键。由于该酶广泛的参与细菌的分裂繁殖、生物被膜形成以及细菌毒性蛋白的转运, 因此与细菌的致病性密切相关^[1]。其中, 广泛分布于细菌的 III、IV 型分泌系统中的溶菌糖基转移酶, 可以水解肽聚糖层, 使得胞内蛋白进入周浆间

隙, 促进分泌转运装置的装配形成, 从而使得细菌发挥毒性作用^[2]。而在幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, 简称 *H. pylori*) Cag 致病岛中, 也编码一个 IV 型分泌样装置, 负责转运毒性蛋白 CagA 进入宿主细胞, 发挥毒性作用^[3]。近年来, 虽然 Cag 致病岛 IV 型分泌样装置的研究取得了一定的进展^[4], 但该分泌装置的装配形成机制尚未明确。本文利用原核表达技术成功地获得具有良好的水解活性的 *cag4* 重组蛋白, 并对其酶活性和理化特性做了初步鉴定; 旨在进一步阐明幽门螺杆菌致病机制, 为新型抗生素(或是抗菌药物)的研发提供作用靶位。

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30870096); 江苏省高校自然科学基金项目 (08KJB310001); 江苏大学临床医学科技发展基金项目 (JLY20080051)

* 通信作者。Tel: +86-511-5038375-326; E-mail: shaoshihe2006@163.com

作者简介: 王文凯 (1972-), 男, 吉林吉林市人, 硕士, 研究方向为抗感染免疫。E-mail: wangwenkai3000@yahoo.com.cn

收稿日期: 2010-09-19; **修回日期:** 2011-02-28

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: *H. pylori* NCTC11637 由中国疾病预防控制中心传染病预防研究所张建中教授馈赠, 大肠埃希菌 DH5 α 及 BL21 (DE3)、溶壁微球菌为江苏大学基础医学与医学技术学院中心实验室保存。

1.1.2 主要试剂和仪器: 哥伦比亚培养基、厌氧袋购自 OXOID 公司; Ex TaqDNA 聚合酶、dNTP、限制性核酸内切酶 *EcoR* I 及 *Xho* I、T4-DNA 连接酶、IPTG、DL2000 DNA Marker 及蛋白质分子量标准(低)购自 TaKaRa 公司; DL1Kb DNA marker 购自金思特生物有限公司; Ni²⁺-NTA 购自 Qiagen 公司; pGEM-T 载体购自 Promega 公司; pET-28a 载体由江苏大学医学技术学院中心实验室保存; 超速离心机 Beckman 公司。

1.2 幽门螺杆菌 *cag4* 蛋白基因的克隆

根据幽门螺杆菌 *cag4* 蛋白基因的全长序列, 设计上、下游引物: P1 : 5'-CGGGAATTCTTGTGGGA AATGGAT-3'; P2 : 5'-ATTCTCGAG C TACTCG TTATATCGCACTT-3', 在其 5' 端分别引入 *EcoR* I、*Xho* I 酶切位点, PCR 产物长度为 510 bp。引物由上海生工生物技术有限公司合成。以 *H. pylori* NCTC11637 菌株基因组 DNA 为模板, 用 Ex Taq 聚合酶进行 PCR 扩增(25 μ L 反应体系)。扩增参数为: 94 $^{\circ}$ C, 5 min; 94 $^{\circ}$ C, 30 s; 52 $^{\circ}$ C, 30 s; 72 $^{\circ}$ C, 1 min, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色, GeNius 凝胶电泳图像分析系统分析鉴定并用胶回收试剂盒回收 PCR 产物。

1.3 T-A 克隆和原核表达载体 pET-28a-*cag4* 的构建

胶回收的 PCR 产物与 pGEM-T 载体, 加 1 μ L T4-DNA 连接酶, 4 $^{\circ}$ C 连接过夜。连接产物转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞。转化后的细菌涂布于含 50 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 平板上, 37 $^{\circ}$ C 培养 16 h。挑取菌落转种于含氨苄青霉素 50 μ g/mL 的 LB 液体培养基, 37 $^{\circ}$ C 振荡 12 h, 用碱裂解法进行质粒提取, 并进行 *EcoR* I、*Xho* I 双酶切鉴定。

胶回收酶切目的片段, 构建表达 pET-28a-*cag4*, 转化感受态细菌 *E. coli* BL21 (DE3), 转化好的细菌涂布含 100 μ g/mL 卡那霉素的 LB 琼脂培养基培养

12-16 h, 挑选单菌落接种于含卡那霉素的 LB 液体培养基中, 置 37 $^{\circ}$ C 摇床振荡培养 12 h, 抽提质粒, 酶切鉴定。

1.4 蛋白诱导表达和鉴定

经酶切鉴定构建成功的重组工程菌, 接种于含 100 μ g/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中, 在 37 $^{\circ}$ C 振荡至菌液 OD₆₀₀ 达到 0.6, 加入 IPTG 诱导后, 收集菌液进行 SDS-PAGE 鉴定。同时, 设立阴性对照。

取诱导后的菌液进行 SDS-PAGE 电泳后, 然后 4 $^{\circ}$ C 电转移至 PVDF 膜上, 用含 5% 脱脂奶粉的封闭液室温封闭 3 h, 换新鲜的封闭液, 加入鼠抗 His 单克隆抗体作为一抗, 37 $^{\circ}$ C 摇床反应 1 h。1 \times PBST 洗涤 3-5 次, 每次 5 min, 于 1 \times PBST 中加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗兔 IgG 作为二抗, 37 $^{\circ}$ C 摇床反应 1 h, 最后 DAB 显色至目的条带清晰时将膜转移至双蒸水终止反应。

1.5 蛋白的纯化和复性

通过比较不同诱导时间和 IPTG 浓度后, 确定了最佳诱导条件, 即 1 mmol/L IPTG, 诱导 4 h。细菌活化后, 按照 1:200 稀释后加入 500 mL LB 中, 进行大量诱导。收集菌体后, 重悬于 lysis buffer (50 mmol/L NaH₂PO₄ · 2H₂O, 300 mmol/L NaCl, 5 mmol/L iminazole and 8 mol/L urea [pH 8.0]) 中, 冰上超声破碎 (200 W)。离心后, 收集上清和镍柱 Ni²⁺-NTA (Qiagen) 室温结合 1 h 后纯化。洗涤去除蛋白后, 利用 Elute buffer (50 mmol/L NaH₂PO₄ · 2H₂O, 100 mmol/L NaCl, 200 mmol/L imidazole, 8 mol/L urea, and 5 mmol/L DTT [pH 8.0]) 进行洗脱, 收集蛋白后, SDS-PAGE 鉴定。

蛋白透析之前将透析袋放入含 2% NaHCO₃ 和 1 mmol/L EDTA 的蒸馏水中煮沸 10 min, 用蒸馏水反复冲洗, 再放入含 1 mmol/L EDTA 的蒸馏水煮沸 10 分钟, 自然冷却, 加入待透析的蛋白, 分别用含 6、4、3、2、1 mol/L 尿素 PBS 在 4 $^{\circ}$ C 条件下梯度透析, 各 4 h, 最后用不含尿素的 PBS 平衡过夜。收集透析液, SDS-PAGE 鉴定。

1.6 细菌肽聚糖的提取与酶谱分析

参照 Zeiger^[5] 报道的方法并加以改良, 具体按以下步骤进行。

溶壁微球菌接种 LB 培养基后, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。收集细菌后, 重悬于 20 mL 冰预冷的 25 mmol/L 磷酸盐缓冲液中。将菌液逐滴加入煮沸的 8% SDS 溶液

中,煮沸1 h, 41000 × g 15℃ 离心30 min收集后沉淀,再重复煮沸1次。用磷酸盐缓冲液洗涤沉淀重复5次后,再利用超速离心机 162000 × g 25℃ 离心30 min后,收集后乙醚脱脂后,干燥获得肽聚糖。

酶谱分析^[6],即将收集的肽聚糖作为底物掺入单体溶液中,配成12%的分离胶,进行Native-PAGE电泳。电泳后,采用复性缓冲液(20 mmol/L sodium phosphate buffer [pH 7.0], 0.1% Triton X-100, 10 mmol/L MgCl₂), 37℃ 孵育48 h。采用1%的亚甲基蓝染色后,双蒸水脱色。实验过程,设立溶菌酶和牛白蛋白分别为阳性和阴性对照。

1.7 浊度实验

将热致死后的溶壁微球菌,重悬于不同pH值的磷酸盐缓冲液(pH 5.0 - 7.0)中,调整到其浊度在OD₆₀₀为1.0。分别加入5 μg/mL的重组蛋白后,37℃ 孵育,监测其浊度值的变化速率,计算ΔA/(min·mg protein)值代表酶活性的大小^[7-8]。

1.8 统计学处理

每组样本测定重复3次。所有检测值均以±S表示。组间差异的比较采用两样本间t检验,P < 0.05为差异具有显著性。

2 结果

2.1 幽门螺杆菌cag4蛋白与其他溶菌转移酶的氨基酸序列同源性分析

从NCBI数据库,检索获得不同细菌分泌系统中溶菌糖基转移酶的基因序列;再根据PFAM数据库,搜索分析这些溶菌糖基转移酶的催化保守区域,再采用clustalX 1.8将这些催化区域进行多重序列比较分析后,利用GenDoc软件显示结果。结果表明,序列之间具有一定的保守性(图1)。其中,cag4中第56位氨基酸(GLU56),被推测认为是发挥溶菌糖基转移酶的催化活性的活性中心。

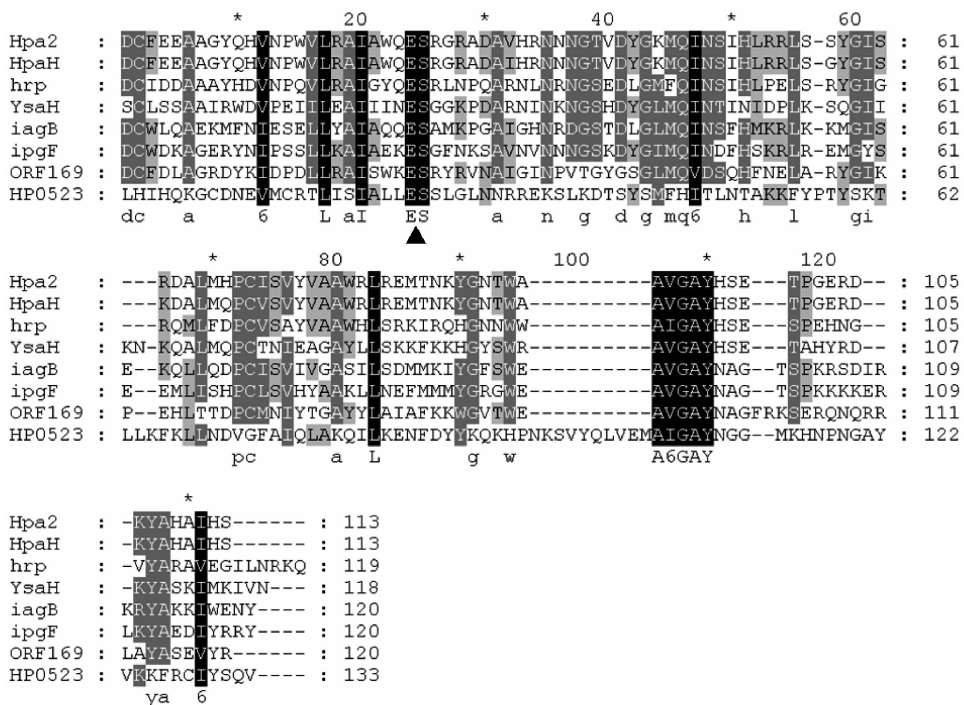


图1 不同细菌分泌系统溶菌糖基转移酶催化功能域的多重序列比较分析

Fig. 1 Multiple alignment analysis of lytic transglycosylase from different bacterial secretion system.

从NCBI数据库搜索获得以下氨基酸序列: Hpa2 (AAM40539), HpaH (AAL78295), hrp (CAD17992), YsaH (AAF82325), iagB (AAL21757), ipgF (CAC05810), ORF169 (BAA97940) 以及 CAG4

(AAF80194)。

2.2 原核表达载体 pET-28a-cag4 的构建

PCR结果显示在510 bp左右有一条带,与预计大小一致,无非特异性条带。将PCR产物与pGEM-

T 载体连接产物转化至 DH5 α , 随机挑取菌落, 抽提质粒, 双酶切产物电泳后, 阳性克隆出现的两条带分别位于约3003 bp和510 bp处。

质粒 pET-28a 和 TA 克隆鉴定阳性的质粒分别经 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切后, 回收酶切片段, 16 $^{\circ}$ C 连接过夜, 连接产物转化至 *E. coli* BL21, 随机挑取菌落, 抽提质粒, 双酶切产物电泳后, 阳性克隆出现的两条带分别位于5.3 kb和510 bp处(图 2)。

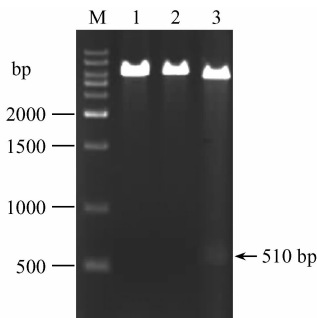


图 2 pET-28a-cag4 质粒酶切鉴定图

Fig.2 Double restriction enzyme digestion map of the recombinant plasmid pET-28a-cag4. M. DNA 1kb Marker, 1. The digested products of pET-28a-cag4 with *EcoRI*, 2. The digested products of pET-28a-cag4 with *XhoI*, 3. The digested products of pET-28a-cag4 with *EcoRI* and *Xho* I.

2.3 幽门螺杆菌 *cag4* 蛋白重组蛋白的表达与纯化

原核表达载体 pET-28a-cag4 转化至 *E. coli* BL21 中获得重组工程菌, 接种 LB 液体培养基, 于 37 $^{\circ}$ C 培养至 *OD*₆₀₀ 达到 0.6 时, 加入终浓度为 1 mmol/L IPTG 诱导 4 h, 收集菌体进行 SDS-PAGE 检测, 可见在约 Mr23 kDa 处出现 1 条新的蛋白带(图 3), 与理论预测值基本相符。空载体转化菌 pET-28a/ BL21 诱导后和未诱导重组工程菌在同一位置未出现相应的蛋白带。将诱导后的全菌进行 SDS-PAGE 分离后电转移至 NC 膜上, 依次加入一抗体和二抗, DAB 显色后在相对分子量为 23000 的新生蛋白带处, 有一特异性条带, 同时以空载体菌为对照, 未发现条带, 说明该蛋白带为目的蛋白, 图 3。

收集菌体溶解于裂解液中, 冰上 30 min 后, 超声破碎, 10000 \times g 离心收集上清和沉淀, 沉淀溶解于裂解液中, SDS-PAGE 电泳分析目的蛋白的溶解度, 发现目的蛋白主要存在于沉淀中, 即以包涵体形式存在表达, 故采用变性条件下纯化蛋白。纯化后, 采用 SDS-PAGE 电泳鉴定表明, 蛋白纯度达 98% 以上, 见图 4。纯化后蛋白, 进一步采用透析法进行蛋

白的复性处理。

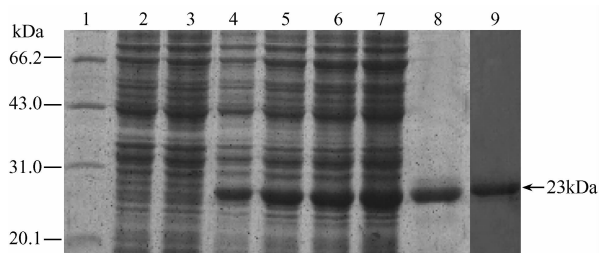


图 3 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定结果图

Fig.3 The result of SDS-PAGE and Western Blot 1. SDS-PAGE Marker 2. pET28a-BL21 3. recombinant plasmid pET28a-cag4 not induced; 4, 5, 6, 7. Supernatant of broken from *Escherichia coli* BL21 with pET28a-cag4 induced by IPTG (4 for 1h, 5 for 2h, 6 for 3h, 7 for 4h); 8. The purified recombinant protein; 9. Analysis of proteins by Western blot.

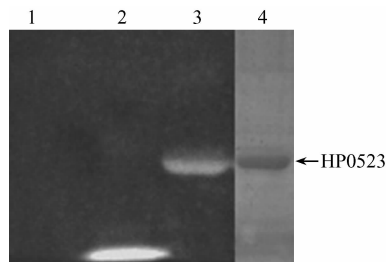


图 4 酶谱分析结果图

Fig.4 The zymogram analysis of *cag* pathogenicity island protein 4 1. the negative control; 2. the positive control(14.4kDa) 3. the *cag4* protein; 4. SDS-PAGE *cag4* protein.

2.4 重组蛋白酶活性的鉴定

复性处理后的蛋白, 加入掺入溶壁微球菌为底物的聚丙烯酰胺凝胶中, 100 V 2 h 电泳分离后, 进行复性处理和 37 $^{\circ}$ C 孵育处理。结果如图 4 可见, 加入溶菌酶和重组蛋白幽门螺杆菌 *cag4* 蛋白的泳道 2, 3, 都有明显的溶解痕迹, 而蛋白的泳道 1 未见。其中, 溶菌酶的分子量大小约为 14.4 kDa, 而幽门螺杆菌 *cag4* 蛋白约为 23 kDa。结果说明幽门螺杆菌 NTCT11637 *cag4* 蛋白具有溶菌糖基转移酶活性。

2.5 不同 pH 条件下的酶活性变化

将溶壁微球菌重悬于不同 pH 值的磷酸盐缓冲液(5.0, 6.0, 7.0)中, 调整 *OD*₆₀₀ 为 1.0, 分别加入浓度为 5 μ g/mL 的重组 *cag4* 蛋白, 37 $^{\circ}$ C 作用, 间隔 15 min 测定 *OD*₆₀₀, 连续测定 2 h, 每次重复测定 3 次。采用 $\Delta A / (\text{min} \cdot \text{mg protein})$ 值计算不同 pH 组酶活性大小, 每次结果重复测定 3 次, 计算均值和标准差, 结果以均值 \pm 标准差表示; 组间差异采用两样

本 t 检验,结果表明 $P < 0.05$,呈显著性差异,如图 5 所示,pH 6.0 时的该酶活性较强。说明幽门螺杆菌 NTCT11637 *cag4* 蛋白在偏酸性环境 (pH 6.0) 下,其酶活性较强。

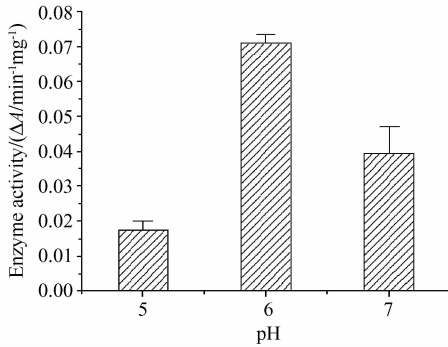


图 5 重组 *cag4* 在不同 pH 条件下的酶活性大小

Fig. 5 The enzyme activity of recombinant *cag* pathogenicity island protein 4 at different pH values.

3 讨论

H. pylori 感染在世界范围内流行,现已证实感染 *H. pylori* 者,特别是 I 型 *H. pylori* (含 Cag-PAI),可以导致慢性胃炎、消化性溃疡,甚至胃癌和黏膜相关性淋巴瘤 (MALT) 的发生^[3]。现已证明,CagPAI 是编码一个 IV 型样分泌系统 (type IV like secretion system) 转运 CagA 蛋白进入宿主细胞,发挥毒性作用,导致一系列的病理变化^[3]。虽然目前对该结构的研究取得了一定的进展,但仍有许多问题尚未阐明,如其装配形成机制,底物蛋白识别机制等等。然而,细菌的肽聚糖层作为天然的屏障,给该多蛋白复合物的组装形成,造成了很大的困难。因此,分泌系统中发挥溶菌功能的组分,如 VirB1、ORF169 等,在多蛋白复合物装配形成过程中起重要的作用。然而,这些溶菌糖基转移酶在氨基酸序列上存在着很大的差异,可能仅仅是部分序列发挥水解肽聚糖功能,如根瘤农杆菌 VirB/D 转运系统中 VirB1^[9]。因此,我们将不同细菌分泌系统中的溶菌糖基转移酶,利用 PFAM 数据库检索获得其发挥酶活性的保守功能域,进行多重序列之间的比对研究。结果表明 *cag4* 基因和其他细菌分泌系统中溶菌糖基转移酶具有高度的同源性。其中,在 α -螺旋结构的末端存

在一个保守的谷氨酸 (Glu),可以形成一个催化的活性中心,发挥催化活性作用。结合 Slt35 的三维晶体结构研究表明,在溶菌糖基转移酶的氨基酸序列中还存在一个保守的 AVGAY 基序,可能是与肽聚糖结合作用的功能域^[10] (图 1)。

临床上 *H. pylori* 感染常采用根除治疗,但根除之后可以导致体内的菌群比例失衡,易产生新的胃肠道疾病。因此,根除疗法势必不是理想的治疗手段。另一方面,随着对克拉霉素和甲硝唑的等抗生素的原发耐药率普遍上升,也对这种治疗方案提出了新的挑战。寻找和研制新型抗生素或是抗菌药物迫在眉睫。溶菌糖基转移酶是细菌分泌毒性蛋白关键酶之一,具有良好的保守性,是新型抗生素良好的候选作用靶位。此次利用原核表达技术,重组获得了大量具有酶活性的幽门螺杆菌 *cag4* 蛋白,为其结构与功能的研究和生物抑制剂的研发奠定了坚实基础。

溶菌糖基转移酶,与溶菌酶不同的是能在 N-乙酰胞壁酸酯 MurNAc 内部形成了 1,6 糖苷键。而国外学者^[11-12] 通过对其水解产物进行 HPLC-MS 质谱分析发现,其主要的水解产物是胞壁肽、四肽 (muropeptide GlcNAc-(1,6 anhydro) MurNAc-tetrapeptide) 等。而这些水解产物,可以被胞内受体 Nod1 识别,活化初始免疫应答,导致炎症因子释放^[13-14]。因此,我们可以推测:*H. pylori* 在感染过程中,幽门螺杆菌 *cag4* 蛋白不仅仅水解肽聚糖,促进分泌系统的装配而发挥致病作用,还可以利用其水解产物,诱导炎症反应。此外,在分泌系统装配过程中,溶菌糖基转移酶,水解肽聚糖释放蛋白质进入周浆间隙,组装形成分泌装置。但这种作用释放势必要得到及时的终止,才能避免多蛋白的聚集,而影响其装配形成效率。那么,细菌又是如何控制其表达,或是分泌其他抑制剂来终止这种反应呢? 这些问题都值得进一步深入研究。

参考文献

- [1] Scheurwater E, Reid CW, Clarke AJ. Lytic transglycosylases. bacterial space-making autolysins. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 2008, 40(4):586-91.

- [2] Zahrl D, Wagner M, Bischof K, Bayer M, Zavec B, Beranek A, Ruckstuhl C, Zarfel GE, Koraimann G. Peptidoglycan degradation by specialized lytic transglycosylases associated with type III and type IV secretion systems. *Microbiology*, 2005 Nov;151(Pt 11): 3455-67.
- [3] Olbermann P, Josenhans C, Moodley Y, Uhr M, Stamer C, Vauterin M, Suerbaum S, Achtman M, Linz B. A global overview of the genetic and functional diversity in the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *PLoS Genet.* 2010 Aug 19;6(8):e1001069.
- [4] Zhong Q, Shao SH, Cui LL, Mu RH, Ju XL, Dong SR: Type IV secretion system in *Helicobacter pylori*. a new insight into pathogenicity. *Chinese medical journal*, 2007, 120(23):2138-2142.
- [5] Zeiger AR, Wong W, Chatterjee AN, Young FE, and Tuazon CU. Evidence for the secretion of soluble peptidoglycans by clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Infection and immunity*, 1982 September 37(3): 1112-1118.
- [6] Blackburn NT, Clarke AJ. Assay for lytic transglycosylases: a family of peptidoglycan lyases. *Analytical biochemistry*, 2000, 284(2):388-393.
- [7] Zhao YP, Zhang H, Yang YJ. Improvement of lysozyme measurement. *food science & technology*, 2002, 23(3): 116-119.
- [8] Li DH, Chi YJ. Facility detection of lysozyme activity. *Chinese Dairy Industry*, 2002, 30(5):128-129.
- [9] Zupan J, Hackworth CA, Aguilar J, Ward D, Zambryski P. VirB1 promotes T-pilus formation in the vir-Type IV secretion system of *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of bacteriology*, 2007, 189(18):6551-6563.
- [10] van Asselt EJ, Dijkstra AJ, Kalk KH, Takacs B, Keck W, Dijkstra BW. Crystal structure of *Escherichia coli* lytic transglycosylase Slt35 reveals a lysozyme-like catalytic domain with an EF-hand. *Structure*, 1999, 7(10):1167-1180.
- [11] Fukushima T, Kitajima T, Yamaguchi H, Ouyang Q, Furuhashi K, Yamamoto H, Shida T, Sekiguchi J. Identification and characterization of novel cell wall hydrolase CwlT: a two-domain autolysin exhibiting N-acetylmuramidase and DL-endopeptidase activities. *The Journal of biological chemistry*, 2008, 283(17):11117-11125.
- [12] Viollier PH, Shapiro L. A lytic transglycosylase homologue, PleA, is required for the assembly of pili and the flagellum at the *Caulobacter crescentus* cell pole. *Molecular microbiology*, 2003, 49(2):331-345.
- [13] Inohara N, Ogura Y, Nunez G. Nods: a family of cytosolic proteins that regulate the host response to pathogens. *Current opinion in microbiology*, 2002, 5(1):76-80.
- [14] Viala J, Chaput C, Boneca IG, Cardona A, Girardin SE, Moran AP, Athman R, Mémet S, Huerre MR, Coyle AJ, DiStefano PS, Sansonetti PJ, Labigne A, Bertin J, Philpott DJ, Ferrero RL. Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nature immunology*, 2004, 5(11):1166-1174.

Heterogenous expression and characterization of *cag4* in *Helicobacter pylori*

Wenkai Wang¹, Qiao Zhong², Liping Xie², Shihe Shao^{2*}

¹Clinical Laboratory, ² Department of Microbiology, School of medical technology, the Affiliated People's Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212002, China

Abstract: [**Objective**] To construct prokaryotic fusion gene expression vector pET-28a-*cag* pathogenicity island protein 4 (*cag4*), express the recombinant fusion protein *cag4* and analyze the enzyme activity of recombinant protein. [**Methods**] We cloned *cag4* gene, this encoded lytic transglycosylase in CagPAI of *Helicobacter pylori* NCTC11637 via PCR method. After TA cloning and restriction enzyme digested confirmed, we constructed prokaryotic expression plasmid pET-28a-*cag4* and transformed the plasmid into *E. coli* BL21 (DE3) for heterogenesis expression after it is sequenced. We performed SDS-PAGE and Western blot. We purified and collected the recombinant protein by using Ni²⁺-NTA columns under denaturation condition. We renatured the recombinant protein via dialysis. Besides, we isolated peptidoglycan from *Micrococcus lysodeikticus* by SDS boiling method. We detected the enzyme activity of recombinant protein by zymogram analysis and the effect of pH values by turbidimetric analysis. [**Results**] The recombinant protein has the enzyme activity of lytic transglycosylase. The enzyme activity, which defined as the rate of degraded ($(A \cdot \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1})$), was higher at pH 6.0 group than other groups (pH 5.0 and 7.0). [**Conclusion**] The *cag4* of *Helicobacter pylori* NCTC11637 has the enzyme activity of lytic transglycosylase.

Keywords: *Helicobacter pylori*, IV type secretion system, *cag4* protein, Heterogenous expression, activity analysis

(本文责编:张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30870096), the Natural Science Foundation of the Jiang Su Higher Education of China (08KJB310001) and the Science & Technology Develop Foundation of Clinical Medicine of Jiang Su University (JLY20080051).

* Corresponding author. Tel: +86-511-5038375-326; E-mail: shaoshihe2006@163.com

Received: 19 November 2010/Revised: 28 February 2011

《微生物学报》关于署名

经过本刊审查通过后即将发表的稿件,作者在修改时,如果对“作者或单位的署名”进行变更,与最初的投稿不同,本刊要求:作者必须再提供有关证明,否则不能生效!此项规定早已公布在本刊的网页上,并且在本刊的纸质出版物中也多次公布。请作者登陆本刊网页(<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>),在首页内、“常见问题”中有显示,点开左侧的“署名”,其中有详细的说明和办理方法。

- (1) 如变单位署名顺序,需要原研究内容所属单位(通常是第一署名单位)的证明信,证明内容:原署名顺序→现署名顺序→盖章。
- (2) 如变更作者署名顺序,需要通讯作者和第一作者同意的签字证明。证明内容:原作者姓名及顺序→修改之后的作者姓名及顺序。
- (3) 将此证明信返回编辑部(邮寄原件或扫描后 E-mail 发来),新的变更即可生效。