

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (2) :193 - 197; 4 February 2015
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140331

含不同个数基序乳酸乳球菌肽聚糖锚钩蛋白结合活性比较

乔绪稳^{1,2}, 李鹏成¹, 郑其升¹, 陈瑾¹, 于晓明¹, 侯立婷¹, 吴楠¹, 侯继波^{1*}

¹江苏省农业科学院国家兽用生物制品工程研究中心, 江苏 南京 210014

²扬州大学兽医学院, 江苏 扬州 225009

摘要: 【目的】比较两种含不同个数基序乳酸乳球菌肽聚糖锚钩蛋白 (protein anchor, PA) 的结合活性。【方法】首先应用 PCR 技术分别扩增得到含有 2 个或 3 个自溶素基序 (Lysin Motif, LysM) 基因片段的 PA2 与 PA3; 然后应用 pET-32a(+) 质粒构建原核表达载体, 将其转化大肠杆菌 BL-21 (DE3), 进行诱导表达, 获得目的蛋白; 最后将经复性后的 PA2、PA3 融合蛋白与 GEM (Gram-positive Enhancer Matrix, GEM) 颗粒结合, 经 Western blot、透射电镜与 SDS-PAGE 进行结合鉴定与结合活性比较分析。【结果】融合蛋白 PA2、PA3 复性后都能与 GEM 结合, PA3 与 GEM 颗粒的结合活性明显好于 PA2。【结论】含有 3 个 LysMs 的 PA 对 GEM 的结合活性明显优于含有 2 个 LysMs 的 PA。本研究可为进一步完善乳球菌外壳-蛋白锚钩展示系统提供理论基础。

关键词: 乳酸乳球菌, 肽聚糖锚钩蛋白, 原核表达, GEM, 结合活性

中图分类号: Q936 **文章编号:** 0001-6209 (2015) 02-0193-05

乳酸乳球菌肽聚糖锚钩蛋白 (Protein anchor, PA) 是乳球菌外壳-蛋白锚定表面展示系统的关键组成部分^[1]。该系统中乳球菌外壳实际上是经过热酸处理后得到的球形肽聚糖基质 (Gram-positive Enhancer Matrix, GEM), 其表面通过 PA 实现目的蛋白展示, 如用于多种 (细菌、寄生虫、病毒) 蛋白抗原展示^[2-4]。该系统生物安全性好, 目的蛋白装载量大, 制造成本低, 已成为疫苗、医药、生物催化剂和全细胞生物酶展示等领域的研究热点。

肽聚糖 PA 为乳球菌主要自溶素 AcmA (N-乙酰葡糖胺糖苷酶的一种, N-Acetylmuraminidase) 蛋白 C-端结构域^[5]。天然的 PA 结构域包含 3 个被异源性序列间隔开的自溶素基序 (Lysin Motif, LysM), 每个 LysM 由 45 个氨基酸残基组成, 且高度同源, 也被

称为重复基序。Anton Steen 等^[6]通过构建 AcmA 突变菌株, 发现缺失或增加 LysM 的个数, 会导致 AcmA 结合、溶解细胞壁的活性发生改变, 从而引起细菌本身生长形态、半衰期等生物学特性改变。那么, 体外表达的不同 LysM 重复基序的 PA 对 GEM 的结合活性是否不同? 国内外未见报道。

本试验旨在比较不同重复基序 LysM 的 PA 对 GEM 的结合活性。首先分别设计含有 2 个与 3 个 LysMs 的 PA, 命名为 PA2 和 PA3, 分别构建原核表达载体进行诱导表达; 然后将目的蛋白与肽聚糖外壳-GEM 颗粒结合, 应用 Western blot、电子显微镜观察进行结合鉴定; 最后比较 PA2、PA3 与 GEM 颗粒结合活性。本试验结果, 可进一步完善乳球菌外壳-蛋白锚钩表面展示系统, 为今后的实际应用研究提供理论基础。

基金项目: 江苏省农业科技自主创新资金项目 [CX (12) 5062]; 公益性行业 (农业) 科研专项 (201303046)

* 通信作者。Tel: +86-25-84392008; E-mail: houjibo@jaas.ac.cn

作者简介: 乔绪稳 (1987-), 女, 江苏徐州人, 硕士研究生, 研究方向为兽用生物制品研发, E-mail: 529227873@qq.com

收稿日期: 2014-06-26; **修回日期:** 2014-09-25

1 材料和方法

1.1 材料

乳酸乳球菌 MG1363, 购自中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心; 大肠杆菌 (*E. coli*) DH5 α 、BL21 (DE3) 均为国家兽用生物制品工程技术研究中心保存, pET32a (+) 原核表达载体也为该实验室保存。RNA 提取试剂、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶和 PCR 试剂、pMD-19T 载体均购自大连 TaKaRa 公司; 质粒提取试剂及胶回收试剂盒为 Omega 公司产品; BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天生物技术研究; 其他试剂均为国产分析纯。GM17 培养基与 LB 培养基均由本实验室自行配制。

1.2 肽聚糖锚钩蛋白基因克隆、原核表达载体构建与重组表达菌的获得

乳酸乳球菌肽聚糖锚钩蛋白 PA2 的获得详见李鹏成等^[7]的方法。PA3 原核表达载体的构建与表达略作改进。简要概述: 提取乳酸乳球菌 MG1363 细菌总 RNA; 然后应用随机引物与 d(T) 引物反转录获得 cDNA; 最后应用 PCR 方法扩增获取目的基因。PCR 所用引物设计如下: 3LysMs 序列上游引物: 5'-GGATCCACTACTT ATACCGTCAAATC-3'; 下游引物: 5'-CCGCTCGAG TTATTTTATTCGTAGAT ACTGAC-3'。以上扩增的目的基因上游引物加入的酶切位点均为 *Bam*H I, 下游引物加入的酶切位点均为 *Xho* I。PCR 反应条件、3LysMs 基因的克隆、pET-32a (+)-3LysMs 原核表达载体的构建及表达菌株的获得同 PA2^[7]。

1.3 重组质粒在大肠杆菌中的诱导表达

将含有 pET-32a (+)-3LysMs 重组质粒的 BL21 表达宿主菌, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜后, 取此培养物按 1% 体积比接种于加入氨苄的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养。培养约 2-3 h, OD_{600} 为 0.6 时, 加入终浓度为 1 mmol/L IPTG, 15 $^{\circ}$ C 继续振荡培养, 诱导 12 h, 离心收集菌体, 以 1/10 菌液体积的 PBS 重悬沉淀, 冰浴下超声波破碎菌体, 离心收集上清和沉淀, 经 12% SDS-PAGE 分析, 观察蛋白的分布情况。

1.4 PA 的纯化与复性

PA 的纯化与复性参见李鹏成等^[7]中描述的方法进行。

1.5 GEM 颗粒的制备

乳酸乳球菌 MG1363 在新鲜 GM17 培养基中 30 $^{\circ}$ C 静止培养过夜, 6000 \times g 5 min, 离心收集菌体, 灭菌纯水洗涤 1 次, 然后用 1/5 体积 0.1 mol/L 的 HCl 重悬, 煮沸 30 min, PBS 洗涤 3 次, 计数, 以 2.5×10^9 为 1 U, -80 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.6 PA 与 GEM 颗粒的结合 Western blot 鉴定

将 500 μ L (1 mg/mL) 复性的目的蛋白与 1 U GEM 颗粒室温孵育 30 min, 6000 \times g, 5 min 离心收集沉淀。PBS 洗涤 3 次, 经 Western blot 鉴定其结合效果。试验操作: 取收集的沉淀用适量 PBS 重悬后 12% SDS-PAGE 电泳, 然后将蛋白转移至 PVDF 膜上; 5% 脱脂乳室温封闭 1 h, 加鼠 His 单克隆抗体 (1:10,000), 4 $^{\circ}$ C 过夜; TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 再加 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG (1:10,000), 膜室温孵育 2h, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 最后应用 DAB 显示蛋白条带。

1.7 PA 与 GEM 颗粒的结合电镜观察鉴定

收集结合后 GEM-PA3 (2) 沉淀, 6000 \times g, 5 min; 弃上清后加入含 2.5% 戊二醛的 PBS (0.1 mol/L, pH7.2), 4 $^{\circ}$ C 固定 2h; PBS 漂洗 3 次, 每次 10 min; 依次以 30%、50%、75%、95% 乙醇顺序脱水各 1 次, 每次 10 min; 然后以无水乙醇重复脱水 2 次, 每次 10 min; 再用 50%、70%、90%、100% 乙酸异戊酯逐级取代乙醇, 每级置换 2 min; 将样品放入 Hep-2 临界干燥器内, 加液态二氧化碳作介质进行干燥, 干燥后的标本放入高真空蒸发器中, 喷金镀膜, 最后在 Model S-3000N 型透射显微镜下观察, 拍照。

1.8 PA3、PA2 与 GEM 颗粒的结合活性比较

复性后 PA3、PA2 目的蛋白较纯, 纯度达到 90% 以上 (结果未显示)。因此, 本试验首先应用 BCA 蛋白浓度检测试剂盒定量蛋白浓度, 然后各取等量等体积的 PA (500 μ g 蛋白溶于 1 mL PBS 缓冲液中,) 分别与 1 U GEM 颗粒室温孵育 30 min, 6000 \times g, 离心 5 min, 收集结合后沉淀与上清, 取相同上样量, 经 SDS-PAGE 电泳, 考马斯蓝染色分析比较锚钩蛋白 PA3、PA2 与 GEM 的结合活性。

2 结果

2.1 PA3 原核表达载体鉴定

重组表达质粒 pET-32a (+)-3LysMs 经 *Bam*HI 与

Xho I 分别限制性双酶切, 可以得到 585 bp 左右的片段, 其中约 5900 bp 为酶切后载体大小 (图略), 表明 PA3 原核表达载体构建正确。

2.2 重组蛋白诱导表达

如图 1 所示, 将含有 pET-32a (+)-3LysMs 与 pET-32a (+) 的 BL21 菌体 IPTG 诱导表达后收集菌体, 经 12% SDS-PAGE 电泳分析, 诱导的 pET-32a (+) 菌体有一处不同于未转入质粒的细菌的特异性条带 (泳道 2), 即载体蛋白的大小约为 20 kDa。含有 pET-32a (+)-3LysMs 菌体表达 37 kDa 大小的特异性条带, 即 PA3 融合蛋白 (泳道 4)。表明含有 3 个 LysMs 的肽聚糖锚钩蛋白相对分子量约为 17 kDa。融合蛋白 PA3 表达形式鉴定发现, 收集 IPTG 诱导后重组菌体超声破碎后, SDS-PAGE 分析, 可见沉淀中有明显的融合蛋白特异性条带 (泳道 5), 而上清中无特异性条带 (泳道 3), 表明 PA3 主要以包涵体形式表达。

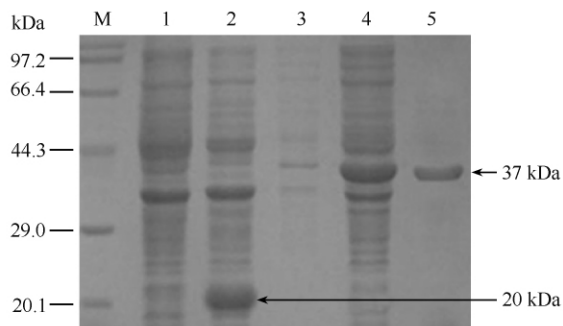


图 1. 重组 pET-32a (+)-3LysMs 表达产物的 SDS-PAGE 分析

Figure 1. SDS-PAGE of recombinant pET-32a (+)-3LysMs expressed in *E. coli*. M, molecular weight Marker; lane 1, BL21; lane 2, pET32a (+)/BL21; lane 3, Supernatant of supersonic schizolytic pET-32a (+)-3LysMs/BL21; lane 4, pET-32a (+)-3LysMs/BL21; lane 5, Precipitate of supersonic schizolytic pET-32a (+)-3LysMs/BL21.

2.3 PA 与 GEM 颗粒的结合 Western blot 鉴定

PA2、PA3 与 GEM 颗粒室温孵育后收集沉淀, 进行 Western blot 鉴定发现, 应用 His 标签单克隆抗体可检测到特异性条带, 表明 PA2、PA3 都可与 GEM 颗粒结合, 并具有良好的锚定活性 (图 2)。

2.4 PA 与 GEM 颗粒的结合电镜观察

PA2、PA3 与 GEM 颗粒室温孵育后, 离心收集沉淀, 经电镜观察发现: 未经热酸处理的乳酸乳球菌胞质中可见多处深染, 并且核区可见大量核酸 (图

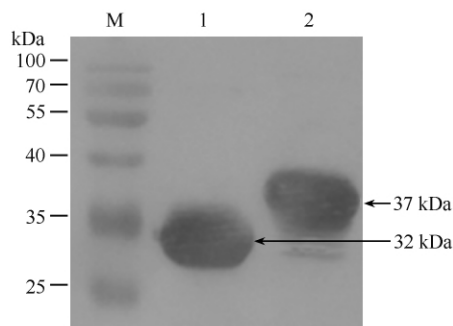


图 2. PA 与 GEM 颗粒结合 Western blot 鉴定

Figure 2. Western blot assay of the anchoring activity between the PA and GEM. M, molecular weight Marker; lane 1, PA2; lane 2, PA3.

3-A); 处理后的乳酸乳球菌, 即 GEM 颗粒, 可见胞质中染色均一, 其胞质内的大量蛋白及核酸已去除, 表明 GEM 颗粒制备成功 (图 3-B); PA2、PA3 与 GEM 颗粒孵育后, GEM 表面可见大量细小絮状结合物, 即 PA2、PA3 复合物 (图 3-C, D)。

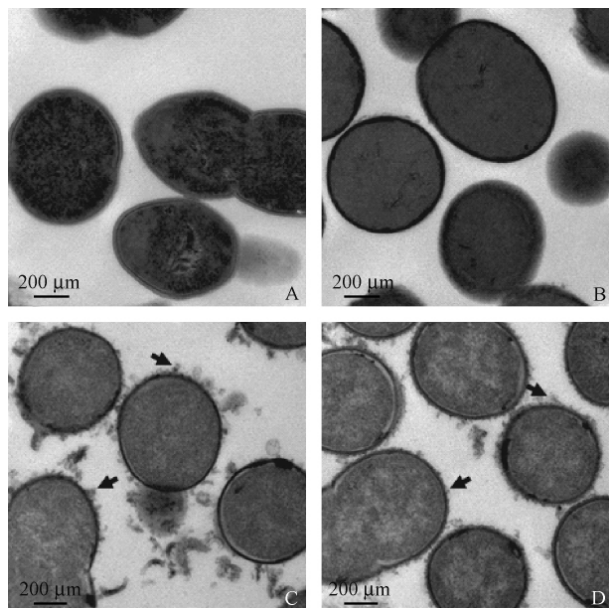


图 3. PA 与 GEM 颗粒的结合透射电镜观察 (15000 ×)

Figure 3. TEM images for GEM and GEM particles binding with PA (15000 ×). A: *L. lactis*; B: GEM; C: GEM-PA2; D: GEM-PA3.

2.5 PA2、PA3 与 GEM 颗粒的结合活性比较

等量的 PA2、PA3 分别与 1 U 的 GEM 颗粒结合后离心收集上清及沉淀, 取相同上样量的样品进行 SDS-PAGE, 考马斯亮蓝染色分析。结果显示 (图 4), PA2 主要存在于上清中, 沉淀中很少; 相反, PA3 则主要存在于沉淀中, 上清中很少, 表明 PA3 与 GEM 颗粒的结合活性明显高于 PA2。

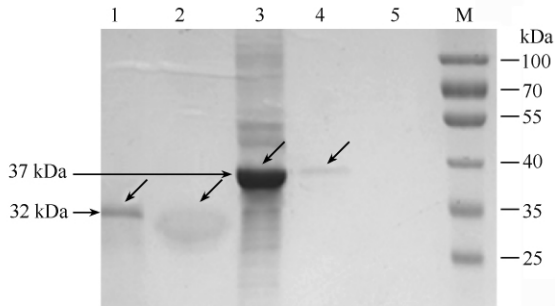


图 4. PA2、PA3 结合活性 SDS-PAGE 分析

Figure 5. SDS-PAGE assay of the anchoring activity between PA2, PA3 and GEM. Lane 1, Precipitation, after incubation between PA2 and GEM; lane 2, Supernatant, after incubation between PA2 and GEM; lane 3, precipitate, after incubation between PA3 and GEM; lane 4, Supernatant, after incubation between PA3 and GEM; lane 5, GEM; M, molecular weight Marker.

3 讨论

PA 作为乳球菌外壳-蛋白锚定表面展示系统的重要组成部分,其展示的目的蛋白与 PA 的融合设计是关键。我们前期试验中发现,在大肠杆菌中 PA2 要比 PA3 容易表达^[7]。通常融合基因的大小影响宿主菌目的蛋白的表达,PA2 比 PA3 少 45 个氨基酸,我们推断目的蛋白选择与 PA2 融合设计可能比 PA3 更有利于蛋白的表达。并且,Anton Steen 等人^[6]发现,与天然含有 3 个 LysMs 的相比,含 2 个 LysMs 的突变株 (*L. lactis* MG1363*acmA* Δ 1) 不影响其自溶,表明 2 个 LysMs 同样具有锚定活性。因此,本试验研究比较 PA2 与 PA3 对 GEM 颗粒的结合活性,以期为目的蛋白与 PA 的融合设计提供试验依据。

乳球菌外壳-蛋白锚定系统是一种新型的表面展示系统,研究表明 PA 具有回向锚定肽聚糖的功能^[1]。关于 PA 锚定活性的研究,国外报道大都集中于乳酸乳球菌宿主体内进行表达研究^[1,4,8,9]。应用自身宿主菌表达 PA 蛋白可确保 PA 具有更高的锚定活性。然而,由于乳酸乳球菌属于革兰氏阳性菌,外源基因的转化表达较难,其次蛋白表达产量也较低。因此,本研究选择常用的大肠杆菌表达系统进行体外表达 PA 融合蛋白。大肠杆菌表达系统以其成本低廉、生产率高、操作简单等优点备受青睐,常常作为表达重组蛋白的首选表达系统。

天然 PA 结构域含有 3 个 LysMs,其重复序列之间的间隔序列是由丰富的丝氨酸、苏氨酸与天冬氨

酸组成^[6]。乳酸乳球菌细胞中的蛋白酶 HtrA 可以对这些间隔氨基酸进行剪切从而降解 AcmA 的 C-端结构域^[4]。国外构建的表达 PA 宿主菌大都为 HtrA 与 AcmA 双缺失的乳酸乳球菌^[1,4,8-9]。本试验应用大肠杆菌表达系统融合表达获得目的蛋白,PA3 与 PA2 的诱导表达条件存在差异。PA2 在诱导早期 1-2 h 即可获得大量表达,之后随着诱导时间增加蛋白表达逐渐减少,可能与间隔序列被逐渐破坏,目的蛋白不断被降解有关^[7]。对于 PA3 的表达,在前期的试验中我们尝试过 20°C、25°C、30°C 诱导均没有得到目的蛋白。本试验中 PA3 则在更低温 15°C 进行较长时间的诱导 (12 h) 获得。我们推测低温可能致使大肠杆菌菌体内可能存在 HtrA 相似的酶活性降低,从而避免蛋白的降解实现目的蛋白的表达。

本研究应用大肠杆菌体外表达获得 PA2、PA3 蛋白可以锚定于 GEM 颗粒表面,虽然含有 2 个 LysMs 的 PA 同样具有锚定活性,但天然含 3 个 LysMs 的 PA 与 GEM 颗粒的结合活性明显优于含有 2 个 LysMs 的 PA,该结果与 Okano 等人报道一致^[5]。有学者认为^[1,6],多个重复基序有可能形成多价结构域,从而增加 PA 的锚定活性;但研究发现,含有 4 个 LysMs 的 PA 锚定活性却明显下降。由于目前 PA 的蛋白晶体结构仍不清楚,因此,不同重复个数的 LysM 的 PA 在三维结构上差异与其锚定活性的相关性,有待进一步研究。

参考文献

- [1] Bosma T, Kanninga R, Neef J, Audouy SA, van Roosmalen ML, Steen A, Buist G, Kok J, Kuipers OP, Robillard G, Leenhouts K. Novel surface display system for proteins on non-genetically modified gram-positive bacteria. *Applied Environmental Microbiology*, 2006, 72 (1): 880-889.
- [2] Audouy SA, van Selm S, van Roosmalen ML, Post E, Kanninga R, Neef J, Estevao S, Nieuwenhuis EE, Adrian PV, Leenhouts K, Hermans PW. Development of *Lactococcal* GEM-based pneumococcal vaccines. *Vaccine*, 2007, 25 (13): 2497-2506.
- [3] Buist G, Steen A, Kok J, Kuipers OP. LysM, a widely distributed protein motif for binding to (peptido) glycans. *Molecular Microbiology*, 2008, 68 (4): 838-847.
- [4] van Roosmalen ML, Kanninga R, El Khattabi M, Neef J,

- Audouy S, Bosma T, Kuipers A, Post E, Steen A, Kok J, Buist G, Kuipers OP, Robillard G, Leenhouts K. Mucosal vaccine delivery of antigens tightly bound to an adjuvant particle made from food-grade bacteria. *Methods*, 2006, 38 (2): 144-149.
- [5] Okano K, Zhang Q, Kimura S, Narita J, Tanaka T, Fukuda H, Kondo A. System using tandem repeats of the cA peptidoglycan-binding domain from *Lactococcus lactis* for display of both N- and C-terminal fusions on cell surfaces of lactic acid bacteria. *Applied Environmental Microbiology*, 2008, 74 (4): 1117-1123.
- [6] Steen A, Buist G, Horsburgh GJ, Venema G, Kuipers OP, Foster SJ, Kok J. AcmA of *Lactococcus lactis* is an N-acetylglucosaminidase with an optimal number of LysM domains for proper functioning. *Federation of European Biochemical Societies Journal*, 2005, 272 (11): 2854-2868.
- [7] Li P, Sun B, Qiao X, Zheng Q, Hou J. Construction of prokaryotic expression vector of *Lactococcus lactis* peptidoglycan protein anchor and its expression. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2013, 29 (6): 1399-1404. (in Chinese)
- 李鹏成, 孙冰, 乔绪稳, 郑其升, 侯继波. 乳酸乳球菌肽聚糖锚钩蛋白原核表达载体的构建与表达. *江苏农业学报*, 2013, 29 (6): 1399-1404.
- [8] Hu S, Kong J, Kong W, Guo T, Ji M. Characterization of a novel LysM domain from *Lactobacillus fermentum* bacteriophage endolysin and its use as an anchor to display heterologous proteins on the surfaces of lactic acid bacteria. *Applied Environmental Microbiology*, 2010, 76 (8): 2410-2418.
- [9] Ramasamy R, Yasawardena S, Zomer A, Venema G, Kok J, Leenhouts K. Immunogenicity of a malaria parasite antigen displayed by *Lactococcus lactis* in oral immunisations. *Vaccine*, 2006, 24 (18): 3900-3908.

Comparison of the binding activity of *Lactococcus lactis* peptidoglycan protein anchor with different number of motifs

Xuwen Qiao^{1,2}, Pengcheng Li¹, Qisheng Zheng¹, Jin Chen¹, Xiaoming Yu¹, Liting Hou¹, Nan Wu¹, Jibo Hou^{1*}

¹National Research Center of Engineering and Technology for Veterinary Biologicals, Jiangsu Academy of Agricultural Science, Nanjing 210014, Jiangsu Province, China

²College of Veterinary, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu Province, China

Abstract: [Objective] The aim of the present study was to compare the binding activity of *Lactococcus lactis* peptidoglycan protein anchor (PA) with different number of motifs. [Methods] *L. lactis* PA gene sequences with 2 and 3 lysin motifs (LysM) were obtained by PCR amplification. Then, the recombinant plasmid of pET-32a(+) containing PA gene was constructed and transformed into *E. coli* BL21 (DE3), and induced to express the fusion protein PA2 and PA3. The purified and refolded PA2 and PA3 were incubated with gram positive enhancer matrix (GEM). The binding activities of PA2 and PA3 were identified and compared by Western blot, TEM and SDS-PAGE. [Results] The PA2 and PA3 could bind to GEM. The anchoring activity of PA3 was obviously superior to the PA2. [Conclusion] The data indicated that PA with 3 LysMs had a better binding capacity compared with 2 LysMs. The results provided foundations to further improve the design of GEM-PA display system.

Keywords: *Lactococcus lactis*, peptidoglycan protein anchor, prokaryotic expression, GEM, binding activity

(本文责编:王晋芳)