

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
49(2):186-190; 4 February 2009
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

新抗菌靶点分选酶基因(*srtA*)在两种原核载体中的克隆表达

罗立新, 江彬强, 陈谋通

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广州 510006)

摘要 【目的】革兰氏阳性菌的表面蛋白在病原菌致病性方面具有重要作用, 表面蛋白锚定到细胞壁过程的关键酶—分选酶成为抗感染的新靶点。【方法】本文利用 GenBank 中的分选酶 A 基因(*srtA*)序列设计特异性引物, 以金黄色葡萄球菌基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 获得 618 bp 的 DNA 片段。按照常规分子克隆操作成功构建两种原核表达载体 *pet22-srtA* 和 *pTRX-srtA*, 转入大肠杆菌感受态 BL21(DE3)中, 在 1 mmol/L IPTG 诱导下进行表达。利用 SDS-PAGE 和 Western blot 进行鉴定和分析。【结果】结果显示 (1)重组载体 *pet22-srtA* 和 *pTRX-srtA* 分别表达出相对分子量为约 45 kDa 和 39 kDa 的外源蛋白。【结论】(2)分子伴侣硫氧还蛋白(*Trx*)有利于分选酶 A 基因的可溶性表达。该实验为后续的分选酶酶学性质研究特别是抑制剂筛选研究奠定良好基础。

关键词: 分选酶; 原核表达; 金黄色葡萄球菌; 抗菌

中图分类号: Q814 **文献标识码**: A **文章编号**: 0001-6209(2009)02-0186-05

抗菌药物在临床治疗应用中取得了辉煌成果, 但与此同时众多抗生素的广泛使用也导致了各种耐药菌的产生。目前细菌的耐药性不断增加, 几乎所有已经批准的抗菌药物均存在不同程度的耐药性。抗生素在使用过程中存在很强的选择性压力, 难以避免会出现抗性更强的耐药菌, 抗菌药物研发陷入进退维谷的尴尬。如何寻找新的抗菌靶点, 有效并安全地解决细菌耐药性问题成为当前国内外生化领域的研究热点。

革兰氏阳性细菌耐药性的产生与锚定在细胞壁上表面蛋白^[1]的作用密切相关: 细菌表面蛋白在宿主中复制, 有助于细菌的吸附并可躲避宿主免疫系统的攻击。表面蛋白是在细胞质中合成, 主要通过一种叫分选酶(sortase)^[2]的转肽酶的催化作用, 而锚定到细胞壁上。分选酶识别表面蛋白的 C-末端保守氨基酸序列 LPXTG 片段锚定信号, 苏氨酸(T)和

甘氨酸(G)之间被裂解, 产生一个苏氨酸的羧基末端, 与细胞壁五个甘氨酸交联桥的氨基形成酰氨键, 从而使表面蛋白被锚定到细胞壁的肽聚糖上。通过抑制分选酶的作用, 破坏表面蛋白的锚定过程, 破坏致病菌感染机制, 使其被宿主的免疫系统识别而杀灭。因此分选酶有望成为新的抗菌靶酶^[3], 有助于缓解日益严重的致病菌耐药性问题。

分选酶基因几乎存在于所有革兰氏阳性细菌中, 其数量和功能在不同细菌内存在一定的差异, 其中包括酶识别底物的机制及所识别分选信号序列差异^[4]。现有研究结果^[5]表明分选酶家族中 *SrtA* 相对 *SrtB* 而言在致病性方面起更为关键的作用。目前国外研究主要集中在金黄色葡萄球菌分选酶 A 的抑制剂筛选方面^[6-7], 而在国内相关研究报道较少。分选酶基因 N 末端为疏水性较强的膜锚定序列^[1], 对于该基因的表达有较大影响。原核表达载

基金项目: 国家自然科学基金(20776051)

作者简介: 罗立新(1966-), 男, 广东兴宁人, 博士, 副教授, 主要从事微生物制药和生物化工方面的研究。Tel/Fax: +86-20-39380098;

E-mail: bilxluo@scut.edu.cn

收稿日期: 2008-08-15; 修回日期: 2008-10-17

体 pet22k(+) 携带的 *pelB* 信号肽^[8-9] 可将蛋白输送到细胞周质空间,周质空间的氧化环境有利于蛋白折叠和二硫键的形成;而表达载体 pTRX 携带的分子伴侣硫氧还蛋白^[10-11] (*Trx*) 是高度可溶的多肽,有助于基因在大肠杆菌细胞中的正确折叠,增强目的蛋白的溶解性。本研究拟利用 pet22 和 pTRX 两种载体进行 *srtA* 基因的原核表达,期望克服其较强疏水性的膜锚定序列带来的障碍,获得分选酶 A 蛋白,为后续的分选酶酶学性质研究特别是抑制剂筛选研究奠定良好基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) 由华南理工大学轻工与食品学院石磊教授惠赠,大肠杆菌(*Escherichia coli*) GT116 和 BL21(DE3) 和质粒 pet22 均为本实验室保存,表达载体 pTRX 为本实验室构建并保存。

1.1.2 主要试剂和仪器 :*Taq* DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、各种限制性内切酶(*Xho* I、*Kpn* I、*Nco* I)、pMD20-T Vector、pMD19-T Simple Vector、蛋白质低分子量标准、DNA 分子量标准,购自 TaKaRa 公司;凝胶回收试剂盒购自广州美津生物技术有限公司;甲叉双丙稀酰胺、Tris-base、丙稀酰胺、考马斯亮蓝 G-250 等购自广州威佳公司,IPTG 和 X-Gal 购自上海生工公司。His 多克隆抗体购自 GE healthcare 公司,HRP 标记的羊抗鼠 IgG 购自 sigma 公司。台式高速冷冻离心机(Eppendorf,Centerifuge 5804R 型),PCR 仪(Eppendorf,Mastertycler 型),凝胶成像分析系统(Bio-Rad,Universal Hood II 型)蛋白电泳仪(北京六一仪器厂,DYY-III 型)。

1.2 金黄色葡萄球菌总 DNA 的抽提

金葡菌单菌落接种于 2 mL 的 LB 培养基中,37℃,200 r/min 过夜培养。菌液离心后菌体沉淀采用溶菌酶处理结合 CTAB^[12] 法进行 DNA 抽提,进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.3 目的基因的克隆

1.3.1 引物设计 :根据 GenBank 中分选酶 A 基因(AF162687) 利用 Primer 5.0 软件,自行设计两对引物 primer1、primer2 和 primer3、primer4 如表 1 所示,两对引物两端添加限制性酶切位点 *Nco* I、*Xho* I 和 *Kpn* I、*Xho* I (带下划线),其扩增产物均为分选酶 A 基因(*srtA*),携带不同限制性酶切位点以克隆到 pet22k(+) 和 pTRX 两种不同载体中,分别命名为

PCR 产物 I 和 PCR 产物 II。

表 1 引物设计

Table 1 Design of PCR primer		
PCR product	Primers	Sequence(5'→3')
PCR product I	primer1	CCAATGGCAATGAAAAAATGACAAAATCGAT
	primer2	CTCGAGGGTTTACTTCTGTAGTACAAAGATT
PCR product II	primer3	CGGGGTACC.AAAAAATGGACAAATC GATT
	primer4	GCCTCTCGAGTTATTGACTTCTGTAGCTACAA

1.3.2 *srtA* 基因的扩增和 TA 克隆 :以金葡菌 DNA 为模版,50 μL 体系扩增 *srtA* 基因。扩增条件:94℃ 5 min,94℃ 45 s,55℃ 45 s,72℃ 1 min,30 个循环;72℃ 8 min。同时以灭菌双蒸水作阴性对照。PCR 产物 I 和 PCR 产物 II 进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳和切胶回收,分别与 pMD20-T Vector 和 pMD19-T Simple Vector 连接,转化感受态大肠杆菌 GT116,通过蓝白斑筛选,单、双酶切鉴定,测序等获取阳性克隆质粒,分别命名为 pMD20-*srtA* 和 pMD19-*srtA*。

1.4 *srtA* 基因原核表达载体的构建

按分子克隆常规方法抽提 pMD20-*srtA*、pMD19-*srtA*、pet22k(+) 和 pTRX 共计 4 种质粒。利用 *Nco* I 和 *Xho* I 酶切 pMD20-*srtA* 和 pet22k(+),切胶回收酶切产物。两种酶切产物连接后转化到感受态大肠杆菌 GT116 中。同时用无菌水作阴性对照。利用氨苄青霉素进行抗生素筛选转化子,并通过单双酶切鉴定,测序等获取重组表达载体 pet22-*srtA*。同样利用 *Kpn* I 和 *Xho* I 酶切 pMD19-*srtA* 和 pTRX 载体,进行连接,转化,筛选,鉴定和测序,获得重组表达载体 pTRX-*srtA*。

1.5 重组载体在大肠杆菌中的诱导表达和纯化

重组表达载体 pet22-*srtA* 和 pTRX-*srtA* 分别转化到感受态大肠杆菌宿主菌 BL21(DE3) 中。将阳性菌落过夜培养物按 1% 比例接种到含 150 μg/mL 氨苄青霉素(Amp)的 LB 培养基中,37℃,200 r/min 培养至 A_{600} 约 0.6,取 2 mL 培养物做未诱导对照,剩余培养液添加 IPTG 至 1 mmol/L,继续培养约 6~8 h,离心收集菌体。按 Qiagen 产品说明书进行蛋白的初步纯化。

1.6 重组蛋白的蛋白质印迹检测

诱导表达的重组蛋白在 12% 分离胶,5% 浓缩胶中进行 SDS-PAGE 电泳分析,用半干电转仪转膜后,5% 脱脂奶粉封闭 1 h,然后加入 1:2000 稀释的鼠抗 His 多克隆抗体,4℃ 过夜孵育后,0.1% TBST 洗膜,加入 1:2000 稀释的羊抗鼠 IgG 室温孵育 1 h,0.1% TBST 洗膜,加入化学发光液,于暗室中利用 X 光片进行显影 2 min,水洗,然后定影 5 min。

2 结果

2.1 分选酶基因的 PCR 扩增和重组表达载体构建

从金黄色葡萄球菌总 DNA 中 PCR 扩增后得到的 PCR 产物 I 和 II 的大小均为 618 bp 左右,和预期的分选酶 A 基因大小一致。重组 T 载体 pMD20-*srtA* 和 pMD19-*srtA* 的测序结果经过 NCBI Blast 分析,与 GenBank 中金黄色葡萄球菌株 8325-4 的 *srtA* 基因 (AF162687) 序列同源率为 100%。

重组质粒 pet22-*srtA* 和 pTRX-*srtA* 经过双酶切,分别得到约 5500 bp 和 618 bp 的 DNA 片段,符合预期结果,表明构建成功两种 *srtA* 基因的原核表达质粒 pet22-*srtA* 和 pTRX-*srtA*。重组载体测序结果已递交到 GenBank,其登录号分别为:FJ439573 和 FJ439574。

2.2 分选酶基因在大肠杆菌中的诱导表达

含 pTRX-*srtA* 质粒的大肠杆菌 BL21(DE3)在 39 kDa 处出现明显表达带,为分选酶 A 与硫氧还蛋白的融合表达产物,和预期蛋白大小相一致。相同位置菌体裂解上清液存在明显的表达带,说明融合蛋白实现了可溶性表达。携带 pet22-*srtA* 质粒的大肠杆菌 BL21(DE3)诱导后在大约 45 kDa 处有清晰的表达带,其大小和预期蛋白大小存在一定差异。而菌体裂解上清液在 45 kDa 位置没有明显条带出现。在重组载体 pet22-*srtA* 中 *srtA* 基因和 *pelB leader* 以及 His Tag 融合表达;在重组载体 pTRX-*srtA* 中 *srtA* 基因则和硫氧还蛋白(*Trx*)基因以及 His Tag 融合表达,因此 *srtA* 基因在 pet22-*srtA* 和 pTRX-*srtA* 两种原核载体中的表达产物大小有所不同,分别为 45 kDa 和 39 kDa。

2.3 重组蛋白的蛋白质印迹检测

Western 印迹显示在相对分子量 39 kDa 处, pTRX-*srtA* 组的诱导表达产物及其纯化样品均出现清晰的显色条带; pet22-*srtA* 组诱导表达产物在 45 kDa 处有明显显色条带,证实目标蛋白在大肠杆菌中获得了表达。

3 讨论

细菌的耐药性问题给抗菌药物在临床治疗中的应用带来很大障碍。革兰氏阳性菌的表面蛋白对于细菌致病性具有重要作用,所以表面蛋白锚定到细胞壁过程的关键酶—分选酶作为新的药物靶点成为研究的热点。鉴于分选酶 A 在细菌致病性方面的重要作用,目前研究主要以分选酶 A 作靶酶开展酶

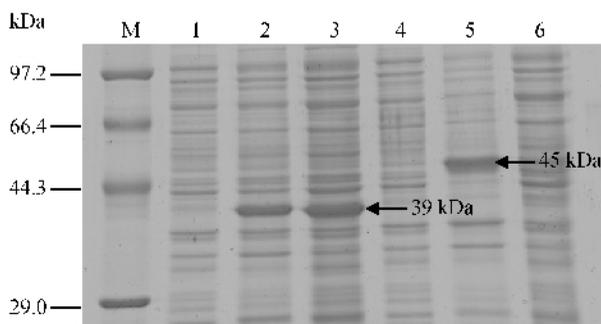


图1 重组质粒 pTRX-*srtA* 和 pet22-*srtA* 诱导表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of expression Sortase A produced by recombinant plasmid pet22-*srtA* and pTRX-*srtA*. M. Takara protein Molecular weight marker (low); 1. Expression of pTRX-*srtA*/BL21 (DE3) without IPTG induction ; 2. Expression of pTRX-*srtA*/BL21 (DE3) under IPTG induction ; 3. Supernatant of *E. coli* cells harboring Sortase A expressed by pTRX-*srtA* ; 4. Expression of pet22-*srtA*/BL21 (DE3) without IPTG induction ; 5. Expression of pet22-*srtA*/BL21 (DE3) under IPTG induction ; 6. Supernatant of *E. coli* cells harboring Sortase A expressed by pet22-*srtA*.

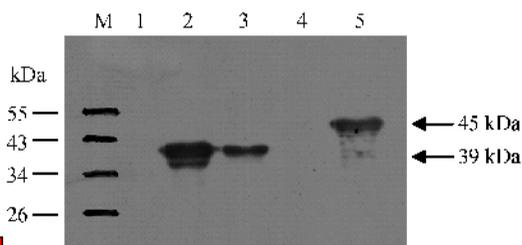


图2 重组蛋白分选酶 A 的 Western blot 分析

Fig. 2 Western blot analysis of recombinant protein Sortase A. M. PageRuler Prestained Protein Ladder ; 1. Expression of pTRX-*srtA*/BL21 (DE3) without IPTG induction ; 2. Recombinant protein Sortase A-*Trx* produced by pTRX-*srtA* ; 3. Recombinant protein Sortase A-*Trx* purified by affinity chromatography ; 4. Expression of pet22-*srtA*/BL21 (DE3) without IPTG induction ; 5. Recombinant protein Sortase A produced by pet22-*srtA*.

学性质研究特别是抑制动力学^[6-7]研究,并且业已获得一批抑制剂如肽酰重氮甲烷(Cbz-Leu-Pro-Ala-Thr-CHN₂) 和 肽 酰 氯 乙 烷 (Cbz-Leu-Pro-Ala-Thr-CH₂Cl) 等等。国内的分选酶抑制剂筛选研究则尚未有所报道。

表达载体 pet22(+)携带 *pelB* 信号肽^[8-9]可将外源基因分泌到细胞周质空间,有利于蛋白的正确折叠和二硫键的形成。此外目的蛋白本身 N 末端前 20 - 30 个氨基酸的疏水性和净电荷分布等因素^[9]也能影响蛋白在大肠杆菌中的分泌表达。分选酶 A 蛋白含有 206 个氨基酸,其中 N 末端有一段疏水性很强的膜锚定序列^[11]。对于该基因在大肠杆菌

中的表达有很大影响。Ilangovan 等^[13]在大肠杆菌中表达分选酶时去除 *srtA* 基因 N 末端一段 DNA 序列 (SrtA_{ΔN59}) 避开膜锚定序列产生的障碍,以可溶性形式表达获得约 16.6 kDa 的 SrtA_{ΔN59} 蛋白。而董亚青^[14]等利用 pGEX4T-2 进行猪链球菌 *srtA* 完整基因的原核表达,重组蛋白几乎均以包涵体形式存在。本研究中重组载体 pet22-*srtA* 主要是包涵体表达,诱导后的 pet22-*srtA*-BL21(DE3) 菌体裂解上清液中几乎没有目标表达产物出现,而裂解沉淀中则有大量的目标蛋白存在(结果未显示),与董亚青^[14]等的研究一致。另外,SDS-PAGE 分析显示目标蛋白的表观分子量与预期蛋白大小存在一定的差异,结果也和董亚青^[14]的研究相类似(猪链球菌分选酶 A 基因 750 bp,表达产物表观分子量 55 kDa)。具体原因尚不清楚,可能与分选酶 N 末端较强的疏水性存在一定关系。

大肠杆菌表达载体 pTRX 含有的硫氧还蛋白^[9-10](thioredoxin, *Trx*) 属于短融合型标签,对外源基因活性影响较小,一般情况下与该分子伴侣融合表达的外源蛋白都能正确折叠并表现出其全部生物学性质,同时与硫氧还蛋白融合表达还可降低外源蛋白在大肠杆菌中的降解速度,有助于外源蛋白性质的稳定;此外,有些情况下硫氧还蛋白融合表达还能提高外源蛋白的表达量。本实验应用硫氧还蛋白与分选酶 A 基因融合构建成功重组质粒 pTRX-*srtA*, 可克服分选酶 A 的 N 末端膜锚定序列带来的障碍,实现了分选酶 A 在大肠杆菌中的可溶性表达,省却了包涵体表达带来的变性、复性等麻烦,方便了后续的分选酶 A 蛋白的纯化以及酶学性质研究。同时对于其他疏水性较强基因如其他分选酶家族基因的原核表达也有借鉴作用。

本研究成功地在 大肠杆菌中克隆表达金黄色葡萄球菌分选酶 A 基因,为今后的分选酶性质研究尤其是抑制剂筛选研究奠定良好基础。实现分选酶抑制剂的大规模筛选,可望建立新型抗菌药物筛选模式,对于深层开发我国丰富的中草药资源和解决致病菌耐药性问题都具有重大意义。

参考文献

- [1] Mazmanian SK, Liu G, Hung TT, et al. *Staphylococcus aureus* sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall. *Science*, 1999, 285(5428): 760 - 763.
- [2] Hung TT, Liu G, Mazmanian SK, et al. Anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. Sortase catalyzed in vitro transpeptidation reaction using LPXTG peptide and NH₂-Gly(3) substrates. *Journal of Biological Chemistry* 2000 275(13): 9876 - 9881.
- [3] 罗立新,施周铭.一种抗革兰氏阳性致病菌新型靶酶——分选酶.生物化学与生物物理进展(*Progress in Biochemistry and Biophysics*) 2006 33(9): 828 - 833.
- [4] Osaki M, Takamatsu D, Shimoji Y, et al. Characterization of *Streptococcus suis* genes encoding proteins homologous to Sortase of gram-positive bacteria. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184(4): 971 - 982.
- [5] Jonsson IM, Mazmanian SK, Schneewind O, et al. The role of *Staphylococcus aureus* sortase A and sortase B in murine arthritis. *Microbes and Infection*, 2003 5(9): 775 - 780.
- [6] Kruee RG, Frankel BA, McCafferty DG, et al. Inhibition of the *Staphylococcus aureus* sortase transpeptidase SrtA by phosphinic peptidomimetics. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2004, 12(13): 3723 - 3729.
- [7] Chenna BC, Shinkre BA, Lucius AL, et al. Identification of novel inhibitors of bacterial surface enzyme *Staphylococcus aureus* Sortase A. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 2008, 18(1): 380 - 385.
- [8] 王恩多,郑勇刚,李勇,等.头孢菌素酰化酶基因在大肠杆菌中的表达规律.生物化学与生物物理学报(*Acta Biochimica et Biophysica Sinica*) 2002 34(4): 526 - 531.
- [9] 彭其胜,李月红,雷连成,等.L-1023-57-PE40 分泌表达的初步研究.微生物学报通报(*Microbiology*) 2006 33(2): 74 - 80.
- [10] 游晓华,秦永文,黄盛东,等.重组 TRX-BNP 融合蛋白的构建和表达.第二军医大学学报(*Academic Journal of Second Military Medical University*) 2006 27(6): 679 - 681.
- [11] 张雷,陈建平,张莉,等.嗜肺军团菌 *flaA* 基因的克隆及原核融合表达.四川大学学报:医学版(*Journal of Sichuan University (Medical Science Edition)*), 2007 38(2): 194 - 197.
- [12] Osber F, Brent R, Kingsden RE. 精编分子生物学实验指南.颜子颖,王海林,译.第一版.北京:科学出版社,1998.
- [13] Ilangovan U, Hung TT, Schneewind O, et al. Structure of sortase, the transpeptidase that anchors proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. *PNAS*, 2001, 98(11): 6056 - 6061.
- [14] 董亚青,王长军,郑峰,等.猪链球菌 2 型 05ZYH33 强毒株 *srt* 同源序列及 *srtA* 原核表达抗原性的分析.细胞与分子免疫学杂志(*Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*) 2007 23(5): 399 - 405.

Cloning and expression of the novel antimicrobial target enzyme Sortase gene in two prokaryotic vectors

Lixin Luo^{*}, Binqiang Jiang, Moutong Chen

(School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract [Objective] Sortase is a novel anti-infection target enzyme for its critical action of anchoring surface proteins to the cell wall. **[Methods]** We amplified the *srtA* gene from *Staphylococcus aureus* chromosomal DNA by PCR technique, and then constructed two prokaryotic expression vectors *pet22-srtA* and *pTRX-srtA* with regular molecular cloning operation. The *pet22-srtA* and *pTRX-srtA* were transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3) competent cells and overexpressed under 1 mmol/L IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactoside) induction. **[Results]** SDS-PAGE and western blot results show that approximately 45 kDa and 39 kDa proteins were expressed by *pet22-srtA* and *pTRX-srtA* respectively. **[Conclusion]** The molecular chaperone thioredoxin was beneficial to the prokaryotic expression of *srtA* gene. Moreover, the experiment laid solid foundation to study sortase's enzymatic property and inhibitors screening especially.

Keywords: sortase; prokaryotic expression; *Staphylococcus aureus*; antimicrobial

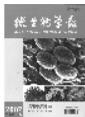
(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (20776051)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-20-39380098; E-mail: btlxluo@scut.edu

Received: 15 August 2008/ Revised: 17 October 2008

2009 年中国科学院微生物所期刊联合编辑部联合增订全面启动!

	《微生物学报》月刊(每月4日出版), 单价55.00元, 全年定价660元。刊号:ISSN 0001-6209; CODEN WSHPA8。国内邮发代号2-504; 国外邮发代号:BM67。
	《生物工程学报》月刊(每月25日出版), 单价65.00元, 全年定价780元。刊号:ISSN 1000-3061; CODEN SGXUED。国内邮发代号82-13; 国外邮发代号:BM5608。
	《微生物学通报》月刊(每月20日出版), 单价48.00元, 年价576元。刊号:ISSN 0253-2654; CODEN WSWPDI。国内邮发代号2-817; 国外邮发代号:BM413。
	《菌物学报》双月刊(单月15日出版), 单价80元, 全年定价480元。刊号:ISSN 1672-6472/Q, CODEN JXUUAЕ。国内邮发代号2-499; 国外邮发代号:Q723。
订阅	欢迎广大读者与本刊发行部联系订购, 我们将按期免费为您邮寄。
	汇款地址(100101)北京市朝阳区大屯路中国科学院微生物研究所 B401
	收信人《×××》编辑部; 联系人 韩力; 电话(010)64807521; E-mail: hlanl@im.ac.cn
	请在附言处注明“订刊费”及所订期刊名称、年代、卷、期和数量