文章编号 1006-8147(2014)03-0184-04

论 著

重组 CARDs TX 融合蛋白的表达纯化与复性

牛 健,于晓旭,李 雪,鲍会静,刘运德
(天津医科大学医学检验学院,天津 300203)

摘要 **目的**:构建 pET28α-CARDs TX 重组质粒,诱导 CARDs TX 融合蛋白表达,并对其进行纯化与复性研究。**方法**:将 CARDs TX 基因(*MPN* 372)克隆入 pET28α 载体,经 8 次点突变获得 pET28α-CARDs TX 重组质粒。转化大肠杆菌 BL21,IPTG 诱导表达。利用亲和层析技术纯化蛋白并通过 SDS-PAGE 和 Western blot 检测 CARDs TX 的表达和纯化效果。利用尿素梯度复性法和扩大体积透析法对蛋白进行复性研究。**结果**:酶切和测序结果证明 pET28α-CARDs TX 重组质粒的 DNA 序列完全正确,在 BL21 中 CARDs TX 融合蛋白可高效表达,并可获得高纯度目的蛋白。利用扩大体积透析法对目的蛋白复性有较好的效果。**结论**:成功构建出 pET28α-CARDs TX 重组质粒,且 CARDs TX 可在大肠杆菌中高效表达,并可获得高纯度的目的蛋白,为深入研究 CARDs TX 的生物学特性奠定了基础

关键词 CARDs TX;质粒构建;点突变;蛋白纯化;蛋白复性
中图分类号 Q7 **文献标志码** A

Expression, purification and renaturation of recombinant CARDs TX fusion protein

NIU Jian, YU Xiao-xu, LI Xue, BAO Hui-jing, LIU Yun-de
(School of Medical Laboratory, Tianjin Medical University, Tianjin 300203, China)

Abstract **Objective:** To obtain recombinant CARDs TX fusion protein from BL21 cells. **Methods**: The CARDs TX gene (*MPN* 372) was cloned into vector pET28α and the integral CARDs TX expression vector was obtained after single gene point-mutations. The constructed recombinant plasmid was transformed into *E.coli* BL21 for expression under induction of IPTG. The Ni-NTA was used to purify the CARDs TX and the urea was desalted to get the refolding protein. **Results**: Enzyme digestion and gene sequencing analysis showed that pET28α-CARDs TX recombinant plasmid DNA sequences were completely correct. CARDs TX fusion protein could be expressed efficiently in BL21 and high purity target protein could be obtained. Expanded volume dialysis method applied had significant positive effect on the renaturation of the target protein. **Conclusion**: To successfully purify the CARDs TX and construct the CARDs TX expression vector that can be efficiently expressed in *E. coli*.

Key words CARDs TX; plasmid construction; point mutation; protein purification; protein renaturation

肺炎支原体作为非典型肺炎的病原体,不仅能够引起急、慢性呼吸道感染,还可以引起包括皮肤、关节、中枢神经系统等一系列肺外系统疾病[1-4]。然而,肺炎支原体的具体致病机制仍未研究清楚[5-6]。通常认为,肺炎支原体是通过其代谢产物 H_2O_2 和超氧自由基,营养掠夺以及宿主自身的炎症反应导致细胞和组织病变,但一直没有发现肺炎支原体有哪些单独的毒力因子参与临床疾病的发生与发展[7-9]。近期,研究者们发现一种名为社区获得性呼吸窘迫综合征毒素(CARDs TX)蛋白[10],其被认为是目前为止,肺炎支原体体内单一的毒力因子,在肺炎支原体的致病过程中起到了至关重要的作用[8]。CARDs TX 具有 ADP-核糖转移酶和空泡毒性的作用[10-12]。本文通过构建 CARDs TX 表达载体 pET28α-CARDs TX 并表达纯化出 CARDs TX,为研究 CARDs TX 的生物学特性奠定基础,同时也对肺炎支原体所引起疾病的预防和治疗提供一个全新的研究方向。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与菌株 肺炎支原体标准株 MAC(本实验保存菌株),克隆菌株 DH5α 和表达菌株 BL21(北京天根公司),pET28α(本实验室保存质粒)。

1.1.2 主要试剂 细菌基因组 DNA 提取试剂盒、PCR 试剂盒、DNA 纯化回收试剂盒、质粒小提中量试剂盒(北京天根公司),引物(由华大基因公司合成),点突变试剂盒(北京 TransGen 公司),溴化乙锭(北京天根公司),T_4 DNA 连接酶和限制性内切酶 *BamH* I、*Xhol* I(英国 BioLabs 公司),异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)、卡那霉素、考马斯亮蓝(北京索来宝公司),HRP 标记抗 His 标签抗体(上海 Abmart 公

基金项目 天津医科大学重点学科建设与发展规划项目资助(201301)
作者简介 牛健(1989-),男,硕士在读,研究方向:临床检验诊断学;
通信作者:刘运德,E-mail:yundeliu@126.com;鲍会静,E-mail:kris_10713@126.com。

司),镍螯合亲和层析柱(瑞典 bio-works 公司),咪唑(美国 Amresco 公司),透析袋(美国 Spectrum 公司)。

1.2　方法

1.2.1　MAC 基因组的提取　参照细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取 MAC 基因组,利用 Nano-Drop 2000c 分光光度计(thermo scientific)检测其浓度。

1.2.2　*MPN* 372 基因的获取　PCR 扩增 *MPN* 372 基因的引物由北京华大基因公司合成,引入酶切位点以下划线表示。上游引物 5′-CCGGATCCATGC-CAAATCCTGTTAG-3′(酶切位点 *BamH* I), 下游引物 5′-CTCCTCGAGCTAAAAGCGATCAAA-3′ (酶切位点 *Xhol* I);以 MAC 基因组为模板,按 PCR 试剂盒说明书扩增 *MPN* 372。PCR 反应条件为 95 ℃, 5 min; 94 ℃, 30 s; 62 ℃, 45 s; 72 ℃, 30 s; 35 个循环; 72 ℃, 7 min; 终止反应。将 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 切取含 1.7 kb 目的片段凝胶, 利用 DNA 纯化回收试剂盒纯化目的片段并检测其浓度。

1.2.3　CARDs TX 表达质粒的构建　用 *BamH* I 和 *Xhol* I 分别酶切 pET28α 和回收的 *MPN* 372, 在 T_4 DNA 连接酶作用下于 16 ℃连接过夜获得 pET28α-CARDs TX 重组质粒,转化大肠杆菌 DH5α,双酶切鉴定阳性克隆,由华大基因公司测序验证其正确性。

1.2.4　重组质粒的碱基诱导突变及鉴定　参照 *MPN* 372 碱基序列,按点突变试剂盒说明书要求设计突变引物,由北 京华大基因公司合成,具体引物序列见表 1。使用点突变试剂盒对重组质粒上 *MPN* 372 中的 8 个 UGA 密码子进行诱导突变,双酶切鉴定阳性克隆,由华大基因公司测序验证突变的准确性。

1.2.5　pET28α-CARDs TX 重组质粒的表达　将 pET28α-CARDs TX 重组质粒转化大肠杆菌 BL21,涂布于含 1 μg/mL 卡那霉素的 LB 固体培养基 37 ℃培养过夜。随机挑取菌落接种于含 1 μg/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基,37 ℃,220 r/min 至 OD 为 0.4~0.6 时,加入终浓度 1 mmol/L IPTG 诱导 4 h 收菌。利用 SDS-PAGE 和 Western blot 技术鉴定目的蛋白的表达及其可溶性。

1.2.6　CARDs TX 蛋白的纯化　收集 CARDs TX 蛋白诱导表达后的菌液,离心后重悬于蛋白纯化结合缓冲液 (20 mmol/L Na_2HPO_4, 500 mmol/L NaCl, 8 mol/L 尿素, 15 mmol/L 咪唑, pH=7.8)中,在冰浴中超声破菌,最大转速离心 10 min 后,将上清置于镍螯合亲和层析柱中于 4 ℃条件下轻柔振荡结合 1 h。离心弃上清后用蛋白纯化洗涤液 (20 mmol/L Na_2HPO_4, 500 mmol/L NaCl,8 mol/L 尿素, 25 mmol/L 咪唑,pH=7.8)洗镍螯合亲和层析柱 4 次。加入蛋白纯化洗脱液 (20 mmol/L Na_2HPO_4,500 mmol/L NaCl, 8 mol/L 尿素,500 mmol/L 咪唑,pH=7.8)洗脱亲和柱上的目的蛋白。

1.2.7　CARDs TX 蛋白的复性　分别利用尿素梯度透析复性法(将纯化蛋白液置于 10 kDa 孔径的透析袋内,于 4 ℃条件下,依次放入 50 倍体积的 6、4、2、1、0.5、0 mol/L 的含 10%甘油的透析液中各透析 3 h)和扩大体积透析复性法(将纯化蛋白溶液稀释 10 倍后置于 10 kDa 孔径的透析袋内,于 4 ℃条件下放入 50 倍体积的含 10%甘油的 PBS 中透析过夜)对目的蛋白进行复性。

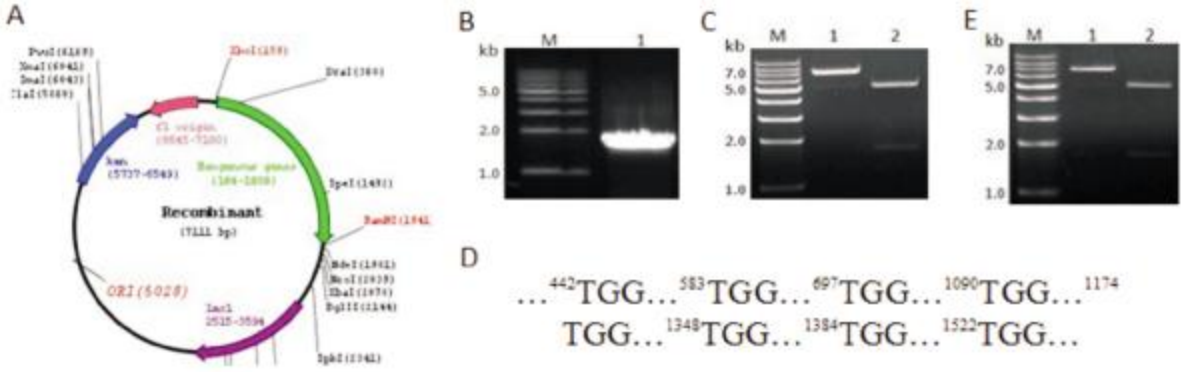
表 1　点突变引物

Tab 1　Point mutation primer

突变位点	引物
第 1 个 UGA 位点	正向:5′-ctaatgtccgtagtgcttggctagtagatgctg-3′
	反向:5′-ccaagcactacggacattagctgctgcaattg-3′
第 2 个 UGA 位点	正向:5′-ccaatgatcaaccatggttgccaacacc-3′
	反向:5′-ccatggttgatcattggcttgggtttgcagc-3′
第 3 个 UGA 位点	正向:5′-gtttgcgtgccctgattggagtccaccttc-3′
	反向:5′-ccaatcagggcacgcaaacgatagcgaagc-3′
第 4 个 UGA 位点	正向:5′-gccgtgaaccaaaagtggaaaatgacaccg-3′
	反向:5′-ccacttttggttcacggcattaaccgcg-3′
第 5 个 UGA 位点	正向:5′-aatggcttgttctggaataccaagag-3′
	反向:5′-ccagaacaagccattttcagtttgacc-3′
第 6 个 UGA 位点	正向:5′-cagctaggctggtattggaggggttattac-3′
	反向:5′-ccaataccagcctagctgaacatcaacaaag-3′
第 7 个 UGA 位点	正向:5′-ccccacaattaagtggttggtcttatcagatg-3′
	反向:5′-ccaaccacttaattgtggggtatagtaataaccc-3′
第 8 个 UGA 位点	正向:5′-ggttacagctgggattgggtagaatggc-3′
	反向:5′-ccaatcccagctgtaaccagtttgtttgttg-3′

2　结果

2.1　pET28α-CARDs TX 重组质粒的构建　质粒构建示意图见图 1A。将 PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳后, 在凝胶成像仪中可见大小为 1776 bp 的特异片段,与 *MPN* 372 大小一致(图 1 B)。将点突变前后的重组质粒经单酶切鉴定均可见大小约为 7.0 kb 的单一条带, 双酶切鉴定均可见两大小分别约为 5.3 kb 和 1.8 kb 的特异条带(图 1 C、1E)。测序结果经 DNAStar Lasergene 7.1 软件比对后发现 PCR 产物的碱基序列与 *MPN* 372 碱基序列一致且将 *MPN* 372 基因上的 8 个 UGA 位点均成功突变成 UGG (图 1 D), 表明已成功获得 pET28α-CARDs TX 重组质粒。

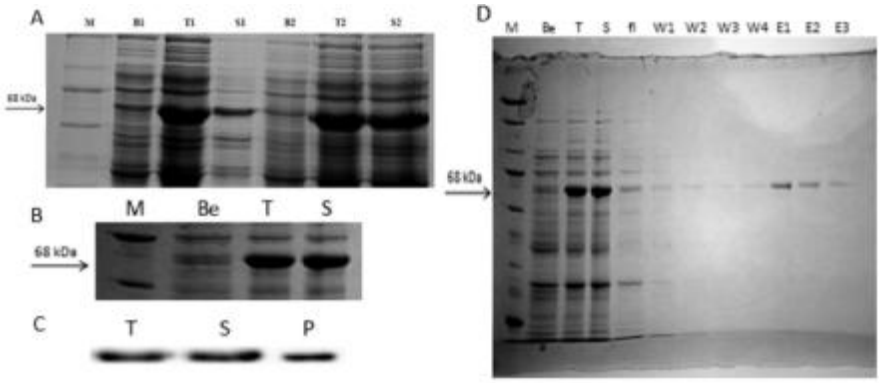


A.质粒构建示意图;B.PCR 产物凝胶电泳后获得 1.7 kb 片段,M:1 kb DNA Ladder. 1:*MPN* 372;C.重组质粒的酶切鉴定,M: 1 kb DNA Ladder, 1:单酶切,2:双酶切;D.点突变结果(上标为突变位点);E.突变后重组质粒的酶切鉴定,M: 1 kb DNA Ladder,1:单酶切,2:双酶切

图 1 pET28α-CARDs TX 重组质粒的构建

Fig 1 The construction of pET28α-CARDs TX recombinant plasmid

2.2 pET28α-CARDs TX 重组质粒的表达及蛋白纯化 将 pET28α-CARDs TX 重组质粒转入 BL21 细菌中,在 IPTG 诱导 4 h 后经 10% SDS-PAGE 分析可见,菌液中存在着明显的蛋白表达带,分子量约为 68 kDa,但经离心后,可溶性蛋白含量很少,因此认为该表达蛋白为不溶性蛋白(图 2 A)。应用 8 mol/L 尿素配置变性蛋白纯化缓冲液,按照相同的纯化条件纯化后,可得到大量的可溶性蛋白,再次证明该重组蛋白为包涵体形式存在(图 2 B)。经 Western blot 分析可见在 68 kDa 分子量位置有特异蛋白条带,证明该不可溶蛋白还有 his 标签,为 rCARDs TX 重组蛋白(图 2 C)。利用镍螯合亲和层析技术成功纯化出变性CARDs TX 蛋白(图 2 D)。

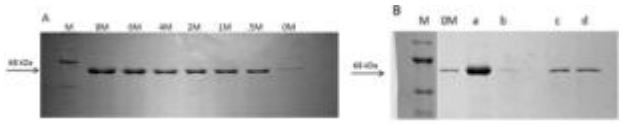


A.表达蛋白的可溶性研究。B1、T1、S1 为非变性,B2、T2、S2 为加入尿素后的变性处理;B.SDS-PAGE 验证蛋白表达。M:protein maker, Be:未经 IPTG 诱导总蛋白,T:经 IPTG 诱导总蛋白,S:经 IPTG 诱导上清蛋白;C.WB 验证蛋白表达与纯化。T:经 IPTG 诱导总蛋白,S:经 IPTG 诱导上清蛋白;D. fl:未与镍柱结合蛋白,W1~4:洗涤液蛋白,E1~3:洗脱液蛋白

图 2 pET28α-CARDs TX 重组质粒的表达及蛋白纯化

Fig 2 Expression and purification of pET28α-CARDs TX recombinant plasmid

2.3 CARDs TX 蛋白的复性 利用尿素梯度透析复性法,在 6、4、2、1、0.5、0 mol/L 尿素浓度分别透析 3 h 后各取 10 μL 作 SDS-PAGE 分析。在此过程中发现在 0 mol/L 尿素浓度透析 3 h 后,有大量沉淀形成,经 SDS-PAGE 分析发现在 0 mol/L 尿素浓度透析 3 h 后的复性溶液中可溶性蛋白的浓度明显下降(图 3A)。利用扩大体积透析复性法并没有发现有沉淀生成,并且还发现将变性蛋白稀释一定倍数后直接 0 mol/L 尿素溶液透析可以获得相同的效果(图3B)。



A.M:protein marker,(0~8)M:不同浓度尿素;B. M:protein marker, 0 M: 稀释 10 倍后的蛋白在 0 mol/L 尿素溶液中透析后最大转速离心后的上清,a:未经稀释蛋白透析前上清,b:未经稀释的蛋白直接过夜透析的上清,c:10 倍稀释蛋白未经透析的上清,d:10 倍稀释蛋白直接过夜透析后的上清,上样量均为 8 μL

图 3 变性蛋白的复性

Fig 3 Renaturation of recombinant CARDs TX fusion protein

3 讨论

社区获得性呼吸窘迫综合征毒素是最近几年发现的肺炎支原体体内的唯一的毒力因子,与百日咳毒素的 S1 亚基拥有非常相近的氨基酸序列。CARDs TX 不仅具有 ADP 核糖化作用,而且还有空泡形成毒性，参与到肺炎支原体的整个致病过程中,是肺炎支原体的重要致病因子。

CARDs TX 是一个分子量大小为 68 kDa，由肺炎支原体 *MPN* 372 基因编码[5]。肺炎支原体在转录和翻译过程中以 UGA 为色氨酸的密码子，而我们知道 UGA 在其他的生物体内是终止密码子，并且在 *MPN* 372 基因序列中有 8 个 UGA 密码子[9]。因此该基因要想在其他生物体内完全表达必须要将 UGA 突变成 UGG。

我们以肺炎支原体 MAC 基因组为模板,将 *MPN* 372 基因扩增出来，将扩增产物克隆入 pET28α 后进行 8 次点突变,获得可以在 BL21 内完整表达的重组质粒。在 IPTG 的诱导下,BL21 大量表达出 CARDs TX，我们利用亲和层析技术将 CARDs TX 蛋白成功纯化出来,由图 2 D 可知,纯化蛋白获得率很高且蛋白很纯,很少有其他蛋白的污染。在对蛋白复性的研究中,我们分别利用尿素梯度透析复性法和扩大体积透析复性法对目的蛋白进行复性。结果发现,利用尿素梯度透析法复性时,在复性的最后阶段即将复性蛋白液置于 0 mol/L 尿素溶液中时产生大量沉淀(图 3 A),而利用扩大体积透析法进行复性时很少发现沉淀的产生，因此,初步确定扩大体积透析法在本研究中比尿素梯度透析复性法更有利于蛋白的成功复性。

综上所述，我们成功构建出 pET28α-CARDs TX 重组质粒,且成功得到 CARDs TX 蛋白,为更深入地研究肺炎支原体的致病机制和 CARDs TX 的生物学功能奠定了基础。

参考文献:

[1] 袁壮, 陆权,万莉雅, 等. 肺炎支原体肺炎的诊治[J]. 中国实用儿科杂志, 2008, 23(8): 561

[2] Waites K B, Talkington D F. Mycoplasma pneumoniae and its role as a human pathogen[J]. Clin Microbiol Rev, 2004, 17(4): 697

[3] 王晓芳, 洪建国. 肺炎支原体与哮喘的关系[J]. 中国实用儿科杂志, 2009, 24(8): 648

[4] 张永明, 刘秀云. 肺炎支原体肺炎及其并发症的诊治进展[J]. 中国当代儿科杂志, 2011, 13(4): 358

[5] Kannan T R, Coalson J J, Cagle M, et al. Synthesis and distribution of CARDs toxin during mycoplasma pneumoniae infection in a murine model[J]. J Infect Dis, 2011, 204(10): 1596

[6] 刘洋, 李敏, 徐佩茹. 肺炎支原体肺炎发病机制研究进展 [J]. 临床儿科杂志, 2011, 29(2): 196

[7] Hu P C, Collier A M, Baseman J B. Interaction of virulent Mycoplasma pneumoniae with hamster tracheal organ cultures [J]. Infect Immun, 1976, 14(1): 217

[8] Techasaensiri C, Tagliabue C, Cagle M, et al. Variation in colonization, ADP-ribosylating and vacuolating cytotoxin, and pulmonary disease severity among Mycoplasma pneumoniae strains [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2010, 182(6): 797

[9] Kannan T R, Baseman J B. ADP-ribosylating and vacuolating cytotoxin of Mycoplasma pneumoniae represents unique virulence determinant among bacterial pathogens [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(17): 6724

[10] Kannan T R, Provenzano D, Wright J R, et al. Identification and characterization of human surfactant protein A binding protein of mycoplasma pneumonia[J]. Infect Immunity, 2005, 73(5): 2828

[11] Johnson C, Kannan T R, Baseman J B. Cellular vacuoles induced by Mycoplasma pneumoniae CARDS toxin originate from Rab9-associated compartments[J]. PLoS One, 2011, 6(7): 308

[12] Peters J, Singh H, Brooks E G, et al. Persistence of community-acquired respiratory distress syndrome toxin-producing Mycoplasma pneumoniae in refractory asthma[J]. CHEST, 2011, 140(2): 401

(2013-11-01 收稿)

(上接第 183 页)

[2] Weichhart T, Saemann M D. The multiple facets of mTOR in immunity[J]. Trends Immunol, 2009, 30(5): 218

[3] Nozato E, Shiraishi M, Miyaguni T, et a1. In situ perfusion of the liver under portosystemic shunt in rats: A stable model of cold ischemia for orthotopic liver transplantation[J]. Transplant Proc, 1998, 30(7): 3718

[4] 安伟, 刘军, 管冬诗, 等. 姜黄素对大鼠肝脏冷缺血再灌注损伤的保护作用及其机制[J]. 中国普通外科杂志, 2010, 19(1): 32

[5] Jo S K, Sung S A, Cho W Y, et a1. Macrophages contribute to the initi-ation of ischemic acute renal failure in rats[J]. Nephrol Dial Transplant, 2006, 21(5): 1231

[6] Yüksek Y N, Kologlu M, Daglar G, et a1. Intestinal ischemia-reperfusion injury augments intestinal mucosal injury and bacterial translocation in jaundiced rats[J]. Hepatogastroenterology, 2004, 51 (55): 171

[7] Ginnan R, Guikema B J, Halligan K E, et a1. Regulation of smooth muscle by inducible nitric oxide synthase and NADPH oxidase in vascular proliferative diseases[J]. Free Radic Biol Med, 2008, 44(7): 1232

[8] Pignatro G, Capone D, Polichetti G, et a1. Neuroprotective, immunosuppmssant and antineoplastic properties of mTOR inhibitors: current and emerging therapeutic options[J]. Curr Opin Pharmacol, 2011, 11(4):378

[9] Kawahara T, Asthana S, Kneteman N M. m-TOR inhibitors: what role in liver transplantation[J]. J Hepatol, 2011, 55(6): 1441

[10] Iadevaia V, Huo Y, Zhang Z, et a1. Roles of the mammalian target of rapamycin, mTOR, in controlling ribosome biogenesis and protein synthesis[J]. Biochem Soc Trans, 2012, 40(1): 168

[11] Lisi L, Navarra P, Feinstein D L, et a1. The mTOR kinase inhibitor rapamycin decreases iNOS mRNA stability in astrocytes[J]. J Neuroinflammation, 2011, 8(1): 1

(2013-10-23 收稿)