

郝秀静,马超,李敏,等. 结核分枝杆菌 Erp 蛋白 PGLTS 的 4 基序突变体的构建[J]. 江苏农业科学,2016,44(7):31-34.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.07.008

结核分枝杆菌 Erp 蛋白 PGLTS 的 4 基序突变体的构建

郝秀静,马超,李敏,赵东,马佳丽

(西部特色生物资源保护与利用教育部重点实验室/宁夏大学,宁夏银川 750021)

摘要:以结核分枝杆菌 H37Ra DNA 为模板,通过 PCR 扩增,获得靶基因 *erp* 片段。采用重叠延伸 PCR 的方法得到 *erp* 基因 PGLTS 的 4 基序的突变体,依次删除突变体的 C-末端、N-末端和 C/N-端,构建重组质粒 pET28a-C₄、pET28a-N₄、pET28a-CN₄,转化 BL21(DE3)pLysS。对重组菌株 IPTG 诱导后的表达产物进行 Tricine SDS-PAGE,得到大小分别约为 11.2、15.4、4.8 ku 的目的蛋白。Western blotting 分析结果表明,目的蛋白表达特异。

关键词:结核分枝杆菌;重复输出蛋白;重叠延伸 PCR;PGLTS;原核表达

中图分类号:S855.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)07-0031-03

牛结核病是影响养牛业最为严重的疫病之一,且该病为人畜共患传染病,既造成了极大的经济损失还严重威胁着人类健康,其主要致病菌为牛结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)^[1]。重复输出蛋白(exported repeated protein, ERP)是牛结核分枝杆菌上的一个重要毒力因子^[2],别称 P36、Pirg 或 Rv3810,它是一种分泌蛋白,存在于结核分枝杆菌复合体所有成员(结核分枝杆菌、牛型结核分枝杆菌、非洲分枝杆菌、卡介苗和田鼠分枝杆菌)中^[3],而在其他细菌种内没有发现同族体,使得 Erp 成为结核分枝杆菌家族的一个特异信号分子。ERP 蛋白全长为 284 个氨基酸,由 3 个不同区域组成,其中 1~22 个氨基酸是信号肽序列,中心是基于 PGLTS 基序的 12 个重复区^[4],N-末端结构域(氨基酸 1~80)和 C-末端结构域(氨基酸 176~284)高度保守。N-末端含有运送 Erp 通过质膜的信号肽序列,由 22 个氨基酸组成,带正电荷的碱性氨基酸(尤其是精氨酸和赖氨酸)含量较为丰富,对于蛋白质定位和导肽序列识别有一定作用^[5-6]。C-末端富含疏水性氨基酸,可能与膜骨架网络和细胞质膜之间的连接有关,Kocincova 等证实 Erp 蛋白疏水性 C-末端的作用——将 Erp 锚定在细菌表面^[7]。中间是 PGLTS 重复区,它的重复区具有一定的可变性,如麻风分枝杆菌的 PGLTS 重复区是 4 基序、牛结核分枝杆菌是 12 基序、而耻垢分枝杆菌是 21 基序^[5]。为研究 Erp 的 PGLTS 区基序变化以及 C-末端、N-末端与功能的关系,本研究通过查询 GeneBank 中 *erp* 基因序列,以结核分枝杆菌 H37Ra DNA 为模板,通过 PCR 扩增,获得靶基因 *erp* 片段。采用重叠延伸 PCR 的策略,得到含 4 基序的 PGLTS 突变体及基序 C-末端、N-末端和 C/N-末端缺失突变体并构建到原核表达载体中,经 IPTG 诱导表达,为以后进一步深入研究其基序变化以及 C 端、N 端功能奠定基础。

收稿日期:2015-10-23

基金项目:宁夏回族自治区科技支撑计划(编号:4130397);国家自然科学基金(编号:30960289)。

作者简介:郝秀静(1978—),女,河北安国人,硕士,讲师,主要从事动物病原微生物相关研究。E-mail:haoxiujing@126.com。

通信作者:李敏,博士,教授,主要从事动物病原微生物相关研究。

E-mail:lim@nxu.edu.cn;limingfm@126.com。

1 材料与方法

1.1 材料

结核分枝杆菌 H37Ra、大肠杆菌 DH(5α)和质粒 pET28a(+)由西部特色生物资源保护与利用教育部重点实验室保存,MD18-T Vector、BL21(DE3)pLysSp 购自 Transgene 公司。

1.2 试剂与仪器

限制性核酸内切酶 *Hind* III、*Kpn* I、*Xho* I、T₄ DNA 连接酶和 Wizard PCR preps DNA Purification System 为 Promega 公司产品;Taq PCR MasterMix 试剂盒、Pfu PCR MasterMix 试剂盒、HRP-DAB 底物显色试剂盒、D2000 等 DNA marker、100 ku 等预染蛋白质 marker 为天根生化科技(北京)有限公司产品;IPTG、X-Gal、氯霉素、氨苄青霉素购自 Sigma 公司;胰化蛋白胨(tryptone)、酵母提取物(yeast extract)为 OXOID 产品;氨基乙酸(甘氨酸)、琼脂粉等化学试剂为索莱宝公司产品。

1.3 引物设计

利用 Primer Premier 5.0 设计的引物由生工生物工程(上海)有限公司合成,主要包括:EP1,cccAAGCTTATGCAGAACTGAGGCAGACG(*Hind* III);EP2,attGCTACCTTATGCGACGGTCACG(*Kpn* I);EP3,GTAAATGGGGATATCCTTGGCAGTGGCGCCTACGACGG;EP4,CCGTCTAGGCGCCACTGCCAAGGATATCCCATAC;EP5,CGCGCTGTTCAGGGCAGGGTATCTGTCTAGGTCCAGGATG;EP6,CATCCTGGACCTGACAGATACCCTGCCCTGAACACGCGC;EP7,ccccAAGCTTCTGGACCTACGGCGTCCG(*Hind* III);EP8,ccgCTCGAGCTAGGTGACAGGTACG(*Xho* I);PN1,cccAAGCTTCCGTACAGACGCGGACGCAAGCTCTCGACCGCATGAGCTCGATCGGCGCACTGTCTAGTACGAGTGTGAGCTCCATGACATCACACGTC(*Hind* III);PN2,cccAAGCTTGTGAACGCCTATGCGAGTACGAGTC(*Hind* III);PC,ccgCTCGAGTGAGTTGACGACGTCCAGC(*Xho*I)。其中,小写字母表示保护性碱基,下划线表示酶切位点,长引物 PN1 表示在 5'端加上 Erp 信号肽序列。

1.4 野生型 *erp* 序列扩增

以结核分枝杆菌 H37Ra 基因组 DNA 为模板,引物 EP1、

EP2 扩增 *erp*。50.0 μL 反应体系包括 20 ng/ μL DNA 1.0 μL 、10 mol/L 上游引物 2.0 μL 、10 mol/L 下游引物 2.0 μL 、2 \times *Taq* PCR MasterMix 25.0 μL 、ddH₂O 20.0 μL 。反应条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min,58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min 20 s,扩增 30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。反应产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5 ERP 4 基序突变体的构建

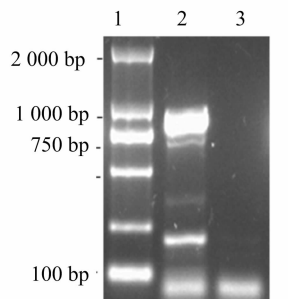
1.5.1 ERP 6 基序突变体的构建 利用重叠延伸技术,以 EP1、EP3 和 EP2、EP4 为引物,以重组质粒 pMD18-T-E 为模板,依次经过第 1、第 2 轮 PCR 扩增得到 *erp* 6 个基序的突变体片段,连接到 pMD18-T 载体上,命名为 pMD18-T-6。

1.5.2 ERP 4 基序全长突变体的构建 利用重叠延伸技术,以 EP1、EP5 和 EP2、EP6 为引物,以重组质粒 pMD18-T-6 为模板,依次经过第 1 轮、第 2 轮 PCR 扩增得到 *erp* 4 基序的序列片段。

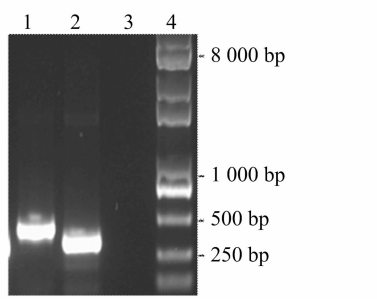
1.6 4 基序缺失突变体的表达载体构建 以 EP7、PN1、PN2、PC、EP8 为引物,以 pMD18-T-4 为模板,扩增 *erp* 4 基序 C-端、N-端和 C/N-端缺失基因片段。缺失基因扩增产物和表达载体 pET28a(+) 连接,构建 4 基序为 PGLTS 突变体 C-端、N-端和 C/N-端缺失的原核表达载体,并命名为 pET28a-C₄、pET28a-N₄、pET28a-CN₄。

1.7 核苷酸序列测定

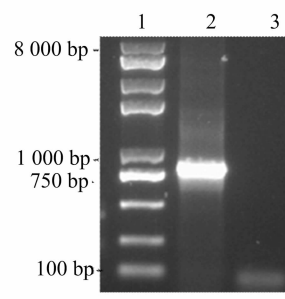
利用 ABI PRISM 3730 核苷酸序列分析仪,对质粒 pET28a-C₄、pET28a-N₄、pET28a-CN₄ 进行核苷酸序列测定,以获得 *erp*(4 基序)的突变序列,具体工作由生工生物工程(上海)有限公司完成。



1—D2000; 2—PCR扩增产物;
3—阴性对照
图1 PCR扩增 erp 全长电泳图示



1— erp 6基序上游 429 bp; 2— erp 6基序上游 336 bp; 3—阴性对照; 4—8000 bp DNA marker
图2 SOE-PCR 第 1 轮扩增产物电泳图示



1—8000 bp DNA marker; 2— erp 6基序 765 bp; 3—阴性对照
图3 SOE-PCR 第 2 轮扩增产物电泳图示

2.2.2 ERP 4 基序全长突变体的构建 利用重叠延伸技术,以 EP1、EP5 和 EP2、EP6 为引物,以重组质粒 pMD18-T-6 为模板,依次经过第 1 轮(图 4)、第 2 轮(图 5)PCR 扩增得到 *erp* 4 基序的序列片段。

2.3 4 基序缺失突变体及其表达载体的构建

利用 PCR 技术,以 EP9、PN1、PN2、PC、EP10 为引物,以 pMD18-T-4 为模板,扩增 *erp* 4 基序 C-端、N-端和 C/N-端缺失基因片段,分别为 405、495、231 bp 的产物(图 6)。

缺失基因扩增产物和表达载体 pET28a(+) 经过 *Hind* III 和 *Xho* I 双酶切,经 Wizard PCR preps DNA Purification System 试剂盒纯化回收后用 T₄ DNA Ligase 进行连接,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,连接产物转化至 BL21(DE3) pLysS 中,提取质粒进行酶切鉴定(图 7),将筛选得到的阳性重组子分别命名为 pET28a-C₄、

1.8 IPTG 诱导表达重组蛋白并检测

接种环划线 BL21(DE3) pLysS(pET28a-C₄、pET28a-N₄、pET28a-CN₄),过夜培养 12 h,挑取单个菌落,接种于含 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kan 的 LB 培养基中,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 下培养 12~16 h。将该菌液以 1% 接种量接种于含 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kan LB 培养基的三角瓶中,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 下摇瓶 3 h,加入 IPTG 使终浓度达到 1 mmol/L,于 32 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 下过夜诱导表达,进行 SDS-PAGE 检测。

1.9 重组表达产物的 SDS-PAGE 及 Western blotting 分析

将挑取的阳性菌落进行培养,加入 IPTG,于 32 $^{\circ}\text{C}$ 下过夜诱导表达,收集菌体,提取蛋白后进行 SDS-PAGE 检测及 Western blotting 分析,检测时阳性血清为 1:200 倍稀释的兔阳性血清,二抗为 1:800 倍稀释的 HRP 标记的兔抗鼠 IgG。

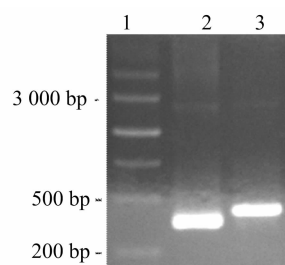
2 结果与分析

2.1 野生型 *erp* 序列扩增

利用 PCR 技术从结核分枝杆菌 H37Ra 基因组 DNA 中扩增出大小约为 855 bp 的基因片段(图 1),连接到 pMD18-T 载体中。

2.2 ERP 4 基序突变体的构建

2.2.1 ERP 6 基序突变体的构建 利用重叠延伸技术,以 EP1、EP3 和 EP2、EP4 为引物,以重组质粒 pMD18-T-E 为模板,依次经过第 1 轮(图 2)、第 2 轮(图 3)PCR 扩增得到 *erp* 6 个基序的突变体片段,连接到 pMD18-T 载体中。将含有目的基因的重组质粒分别进行酶切鉴定和序列测定,与预期结果一致,将重组质粒命名为 pMD18-T-6。



1—marker III; 2— erp 4基序上游 333 bp;
3— erp 4基序上游 402 bp
图4 SOE-PCR 第 1 轮扩增产物电泳图式

pET28a-N₄、pET28a-CN₄。对其进行核苷酸序列测定,结果表明其基因序列和阅读框架正确。

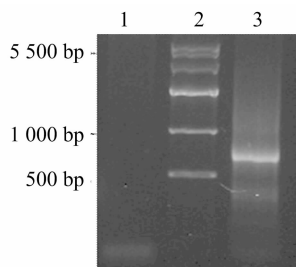
1—阴性对照；2—5 000 bp DNA marker；3—*erp 4* 基序 735 bp

图5 SOE-PCR 第 2 轮扩增产物电泳图式

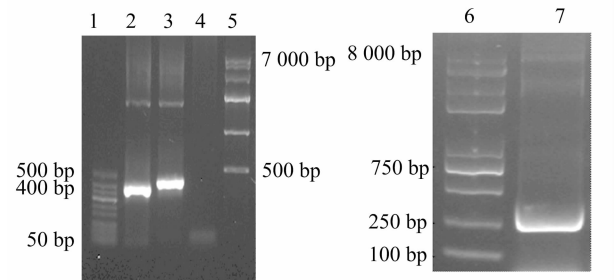
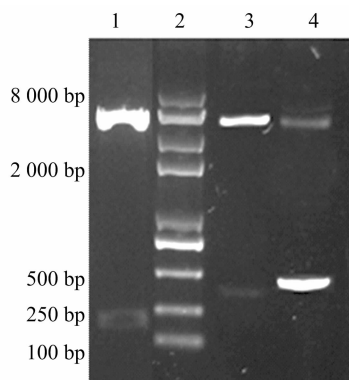
1—50 bp DNA Ladder；2—*erp 4* 基序 C-端缺失 405 bp；3—*erp 4* 基序 N-端缺失495 bp；4—阴性对照；5—MarkerIV；6—8000 bp DNA Marker；7—*erp 4* 基序末端缺失 231 bp图6 PCR扩增*erp 4* 基序缺失基因电泳图式1—pET28a-CN₄ Hind III/Xho I 酶切片段；2—8 000 bp DNA Marker；3—pET28a-C₄ Hind III/Xho I 酶切片段；4—pET28a-N₄ Hind III/Xho I 酶切片段

图7 阳性重组子酶切鉴定电泳图式

2.4 IPTG 诱导表达重组蛋白及 SDS - PAGE 分析

将用于毒性蛋白表达的 BL21 (DE3) pLysS 菌株作为 pET28a - C₄、pET28a - N₄、pET28a - CN₄ 融合基因的表达宿主菌,经转化挑取单个菌落培养, IPTG 过夜诱导,菌体处理后,用 Tricine SDS - PAGE 分析,结果表明菌体中含有目的蛋白(图 8),分子量大小分别约为 11.2、15.4、4.8 ku,与理论值相符,表明融合基因可在 BL21 (DE3) pLysS 中实现表达。

2.5 表达产物的 Western blotting 分析

BL21 (DE3) pLysS (pET28a - C₄)、BL21 (DE3) pLysS (pET28a - N₄) 和 BL21 (DE3) pLysS (pET28a - CN₄) 表达产物进行 Western blotting 试验分析,结果表明,重组蛋白可以被 His - Tag 特异性抗体识别,在约 11.2、15.4、4.8 ku 处出现识别条带,而阴性对照在相同的位置没有条带(图 9),表明毒性蛋白在宿主菌中特异表达。

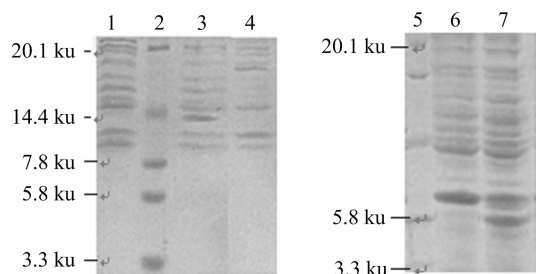
1—BL21(DE3) pLysS[pET28a(+)]表达产物；2—超低分子量蛋白质Marker；3—BL21(DE3) pLysS(pET28a-C₄)表达产物；4—BL21(DE3) pLysS(pET28a-N₄)表达产物；5—超低分子量蛋白质 marker；6—BL21(DE3) pLysS[pET28a(+)]表达产物；7—BL21(DE3) pLysS(pET28a-CN₄)表达产物

图8 表达产物Tricine SDS-PAGE 图谱

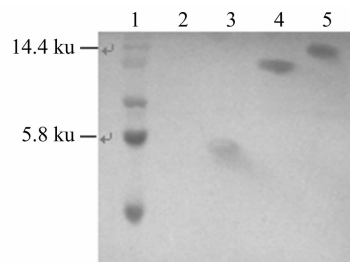
1—超低分子量蛋白质 marker；2—BL21(DE3) pLysS [pET28a(+)]表达产物；3—BL21(DE3) pLysS(pET28a-CN₄)表达产物；4—BL21(DE3) pLysS(pET28a-C₄)表达产物；5—BL21(DE3) pLysS(pET28a-N₄)表达产物

图9 表达产物 Western blotting 结果

3 结论与讨论

结核病是由结核分枝杆菌引起的一种人畜共患病,它严重威胁人类健康,大约每年导致 180 万人死亡^[8]。*erp* 基因是结核分枝杆菌中一个重要的毒力基因,Christine 等研究发现 Erp 蛋白在分枝杆菌的细菌壁渗透性屏障形成中起重要作用,Erp 缺陷可造成细菌壁通透性的缺陷,使之可以透过一些亲脂性物质,致使细菌对宿主的防御反应敏感,如活性氧、活性氮和防御素等可以透过细菌壁而对细菌起到杀伤作用^[9]。Erp 不仅仅是一种毒力因子,在麻风结核杆菌中还是一种免疫优势抗原,可以诱发机体的细胞免疫和体液免疫。早期研究空洞和非空洞结核病患者时发现,Erp 蛋白仅可以刺激空洞性结核病患者机体产生抗体,而在结核病潜伏感染者体内很少甚至没有抗体产生^[10]。

Kyte - Doolittle 分析 Erp 蛋白时显示,C - 末端富含疏水性氨基酸可能与膜骨架网络和细胞质膜之间的连接有关。Kocincova 等对耻垢结核分枝杆菌 Erp 进行突变,阐释该蛋白疏水性 C - 末端将 Erp 锚定在细菌表面。ERP 蛋白的 N - 端,PGLTS 重复区序列的不同对该蛋白质的致病性和输出运输具有较大的影响,但是目前在 ERP 基序变化以及 C、N 端功能方面的研究还不是很清楚。

本试验成功克隆了结核分枝杆菌 *erp*,对 *erp* 进行一系列突变,得到 4 个基序的突变体,以 pET28a (+) 为载体构建大肠杆菌融合表达系统——BL21 (DE3) pLysS (pET28a - C₄)、BL21 (DE3) pLysS (pET28a - N₄) 和 BL21 (DE3) pLysS (pET28a - CN₄),经 Tricine SDS - PAGE 检测,目的蛋白大小

曹芳芳,李 娟,刘海峰. 山葡萄 *DFR* 基因全长 cDNA 的克隆与序列分析[J]. 江苏农业科学,2016,44(7):34-38.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.07.009

山葡萄 *DFR* 基因全长 cDNA 的克隆与序列分析

曹芳芳,李 娟,刘海峰
(延边大学农学院,吉林延吉 133000)

摘要:应用 RT-PCR 和 SMART RACE 等技术克隆山葡萄二氢黄酮醇 4-还原酶基因的全长 cDNA 序列,结果表明,该基因全长 1 362 bp,包括 1 014 bp 的完整开放阅读框,推测其编码 337 个氨基酸。该基因表达产物相对分子质量为 37.50 ku,等电点为 5.95,是稳定蛋白,不包含信号肽。蛋白质疏水性分析结果表明,DFR 疏水性最大值为 2.511,最小值为 -2.267,平均值为 -0.146,整体表现为亲水性。二级结构分析结果表明,DFR 的二级结构主要以 α -螺旋 (35.31%) 和不规则卷曲 (46.29%) 为蛋白最大量的结构元件。对不同植物 DFR 氨基酸序列进行多重比对发现,同源性较高,DFR 与 NADPH 结合区域和底物结合区域都表现出高度保守。用推导的氨基酸序列与蛋白质数据库进行同源性比较,其氨基酸序列与欧亚种葡萄、大豆、矮牵牛等植物的 DFR 氨基酸序列两两比对的相似性系数分别为 98%、76%、74%。

关键词:山葡萄;二氢黄酮醇 4-还原酶;克隆;序列分析

中图分类号: S663.101 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)07-0034-05

山葡萄 (*Vitis amurensis*) 为葡萄科葡萄属多年生藤本植物,植株似葡萄而细小。山葡萄是葡萄属中最抗寒的一个种,是葡萄属植物抗性育种的珍贵资源,已被多个国家和地区所重视。山葡萄是一种经济价值很高的野生经济植物,成熟后的果实味甜酸,富含果汁,可生食,用山葡萄浆果酿造的葡萄

酒品质优良,是我国东北地区葡萄酒工业的主要原料。葡萄酒具有预防心脑血管疾病的作用,原花青素^[1]是其中最主要的作用成分。研究表明,原花青素存在较强的抗氧化活性和抗癌活性,对降低毛细血管的渗透性有重要的药理作用。葡萄酒的品质与葡萄中原花青素的含量有直接关系^[2]。花青素类化合物也是植物中可溶性天然色素的主要来源,因此研究花色苷植物资源有重要意义。花青素直接或间接影响果实的外观颜色形成,在合成花青素过程中^[3],DFR (dihydroflavonol 4-reductase,二氢黄酮醇-4-还原酶)起决定性作用。DFR 反应需要 NADPH(还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸)的参与。DFR 依赖 DHM(dihydromyricetin,二氢杨梅黄酮)、DHK(dihydrokaempferol,二氢槲非醇)、DHQ(dihydroquercetin,二氢槲皮素)

收稿日期:2015-06-05

基金项目:国家自然科学基金(编号:31260067)。

作者简介:曹芳芳(1989—),女,吉林松原人,硕士研究生,主要从事山葡萄基因克隆研究。E-mail:caofangfang1207@163.com。

通信作者:刘海峰,博士,副教授,从事山葡萄分子生物学研究。E-mail:shiyanshiqixiang@163.com。

为 11.2、15.4、4.8 ku。Western blotting 结果显示,目的蛋白能被特异性抗体识别,本研究结果为进一步研究 Erp 的功能奠定了基础。

参考文献:

- [1] Rodwell T C, Moore M, Moser K S, et al. Tuberculosis from *Mycobacterium bovis* in binational communities, United States[J]. Emerging Infectious Diseases, 2008, 14(6): 909-916.
- [2] Camacho L R, Ensergueix D, Perez E, et al. Identification of a virulence gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* by signature-tagged transposon mutagenesis[J]. Molecular Microbiology, 1999, 34(2): 257-267.
- [3] Berthet F X, Rauzier J, Lim E M, et al. Characterization of the mycobacterium tuberculosis erp gene encoding a potential cell surface protein with repetitive structures[J]. Microbiology, 1995, 141(9): 2123-2130.
- [4] Bigi F, Alito A, Fisanotti J C, et al. Characterization of a novel *Mycobacterium bovis* secreted antigen containing PGLTS repeats[J]. Infection and Immunity, 1995, 63(7): 2581-2586.
- [5] de Mendonca - Lima L, Picardeau M, Raynaud C, et al. Erp, an extracellular protein family specific to mycobacteria[J]. Microbiology, 2001, 147(8): 2315-2320.
- [6] 马佳丽,郝秀静,赵 东,等. 结核分枝杆菌输出重复蛋白 8 基序突变体的构建及表达分析[J]. 农业生物技术学报, 2012, 20(9): 1072-1079.
- [7] Kocincová D, Soudén B, de Mendonça - Lima L, et al. The Erp protein is anchored at the surface by a carboxy-terminal hydrophobic domain and is important for cell-wall structure in *Mycobacterium smegmatis*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2004, 231(2): 191-196.
- [8] WHO Global tuberculosis control surveillance, planning, financing[R]. World Health Organization, 2013.
- [9] Cosma C L, Klein K, Kim R, et al. *Mycobacterium marinum* Erp is a virulence determinant required for cell wall integrity and intracellular survival[J]. Infection and Immunity, 2006, 74(6): 3125-3133.
- [10] Martinez V, Carcelain G, Badell E, et al. T-cell and serological responses to Erp, an exported *Mycobacterium tuberculosis* protein, in tuberculosis patients and healthy individuals[J]. BMC Infectious Diseases, 2007, 7(1): 1471-1482.