

赵 位,喻 东,程建国,等. 林麝源肺炎克雷伯氏菌新 LysR 家族转录因子的原核表达[J]. 江苏农业科学,2020,48(9):82-85.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.09.015

林麝源肺炎克雷伯氏菌新 LysR 家族转录因子的原核表达

赵 位¹,喻 东¹,程建国²,李秋波²,康纪平²,罗 燕¹

(1. 四川农业大学动物医学院,四川温江 611130; 2. 四川养麝研究所,四川都江堰 611830)

摘要:为研究林麝源肺炎克雷伯氏菌新 LysR 家族转录因子 kp05372 的功能,采用 PCR 方法扩增林麝源肺炎克雷伯氏菌新 LysR 家族转录因子 kp05372 基因,连接 T 载体进行克隆,双酶切后连接表达载体 pET-32(a),构建重组表达质粒,并转入大肠杆菌 BL21(DE3)细胞,然后对其最佳表达时间、温度、IPTG 浓度进行筛选,利用 SDS-PAGE 与 Western Blot 鉴定重组蛋白,得到约 53.2 ku 的融合蛋白,与预期大小一致。本研究成功构建 kp05372 基因表达载体,并筛选出最佳表达条件,为进一步研究该蛋白结构功能奠定了基础。

关键词:林麝;肺炎克雷伯氏菌;kp05372 基因;原核表达

中图分类号: Q936 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)09-0082-04

林麝(*Moschus berezovskii*)为《濒危野生动植物种国际贸易公约》附录 II 和国家一级保护动物,其雄性分泌的麝香为名贵的中药材和高级动物香料,具有重要的社会价值和经济价值。人工养殖是林麝资源保护的主要对策之一,我国从 1958 年开始人工养殖林麝,历经半个多世纪,发展仍较缓慢。影响林麝人工养殖的一个重要原因是林麝化脓性肺炎疾病的发病率和死亡率高^[1]。林麝患化脓性肺炎后前期一般不易发现,发现时已经处于较严重阶段,基本上无救治希望^[2]。引起圈养林麝化脓性肺炎的病原菌种类繁多,包括大肠杆菌、沙门氏菌、肺炎链球菌、巴氏杆菌、绿脓杆菌、金黄色葡萄球菌和肺炎克雷伯氏菌等多种病原^[3-4]。

肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)属于肠杆菌科克雷伯菌属。自 Friedlander(1882 年)首次从病人的肺组织中分离得到该菌后,在大熊猫、疣猴、金丝猴和林麝等多种珍稀动物体内均分离得到该菌^[5-8]。该菌为条件性致病菌,在机体免疫力下降或长期使用抗生素导致菌群失调时,可引起人或动物感染肺炎、脑膜炎、肝脓肿、肠炎、腹膜炎等多

种疾病^[9]。在肺炎克雷伯氏菌基因组中分布着大量转录调节因子,其中 LysR 家族转录因子是最大的调节蛋白家族^[10],其调控的目的基因参与了细菌的毒力、新陈代谢、运动性、抗氧化、黏附和分泌等^[11]。前期研究中,课题组在患化脓性肺炎和腹泻林麝的肠道中分离出 1 株肺炎克雷伯氏菌,该菌株对小鼠具有强致病性,全基因组测序分析发现,该菌株基因组序列中有 1 段序列大小为 909 bp 的编码序列(登录号:KX026659),命名 kp05372,通过生物信息学方法分析发现,该基因为 1 个新的 LysR 家族转录因子,可能具有 LysR 家族转录因子相似的功能^[12]。因此,本研究拟通过对该基因进行原核表达,以期为该基因的功能研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验菌株与质粒

林麝源肺炎克雷伯氏菌菌株由笔者所在实验室保存;感受态大肠杆菌 DH5 α 和 BL2(DE3),购自天根生化科技有限公司;克隆载体 pMD19-T sample 载体,购自大连 TaKaRa 公司;表达载体 pET-32a(+)为笔者所在实验室保存。

1.2 主要试剂

细菌基因组 DNA 提取试剂盒及 DNA Marker(DL2000)、DNA 纯化回收试剂盒、质粒抽提试剂盒、SDS-PAGE 凝胶试剂盒、Western Blot 试剂盒;限制性内切酶 *Kpn* I、*Eco*R I、D2000 plus DNA ladder、Trans 2K plus II DNA Marker、蛋白质 Marker、DNA T₄ 连接酶、PVDF 膜、考马斯亮蓝 R250、IPTG

收稿日期:2019-05-11

基金项目:四川省科技计划(编号:2018JY0644);四川省省级科研院所科技成果转化资金。

作者简介:赵 位(1991—),男,四川泸州人,硕士研究生,主要从事动物病原微生物与分子生物学研究。E-mail:ZWHNZM@163.com。

通信作者:罗 燕,教授,主要从事动物病原微生物与分子生物学研究。E-mail:Lycjg@163.com。

和 2 × SDS 凝胶上样缓冲液、抗 His 标签单克隆抗体、二抗(兔抗鼠)等。

1.3 pMD19 - T/kp05372 重组克隆载体构建与鉴定

运用 Primer 5.0 和 Oligo 6.0 设计扩增 *kp05372* 基因的特异性引物(P1:5′ - GGTACCATGAACGGGATCAGTTTCAACC - 3′, 下划线碱基为 *Kpn* I 酶切位点; P2:5′ - GAATTCTTAGCTGCGACGCTCCTG - 3′, 下划线碱基为 *Eco* R I 酶切位点)。以 GPKP 菌株 DNA 为模板, 进行 *kp05372* 基因的 PCR 扩增。PCR 反应体系为: 2 × *Taq* PCR Master Mix 12.5 μL, 10 mmol/L P1 引物 1.0 μL, 10 mmol/L P2 引物 1.0 μL, DNA 模板 1.0 μL, ddH₂O 9.5 μL。PCR 反应程序为: 94 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 30 s, 63 ℃ 退火 1 min, 72 ℃ 延伸 1 min, 30 个循环; 72 ℃ 延伸 10 min, 4 ℃ 保存。将扩增产物进行电泳、胶回收和测序, 测序结果与目标序列进行比对、验证, 然后利用 T₄ 连接酶将其与 pMD19 - T 载体 16 ℃ 连接过夜, 将连接产物转化至 *E. coli* DH5α 感受态细胞中, 然后取 100 μL 涂于含 0.1 mg/mL 氨苄青霉素(Amp)的 LB 培养基上, 37 ℃ 恒温培养 16 h 后, 挑取单菌落分别接种于 LB 液体培养基中, 37 ℃ 恒温振荡 16 h。随后分别提取质粒, 以 P1、P2 为引物, 进行 PCR 和用 *Kpn* I、*Eco* R I 单、双酶切验证。

1.4 pET - 32a(+) /kp05372 重组表达质粒构建与鉴定

利用 *Kpn* I 和 *Eco* R I 酶对重组克隆质粒 pMD19 - T/kp05372 和表达质粒 pET - 32a(+) 双酶切。pMD19 - T/kp05372 质粒 37 ℃ 酶切 2 h, pET - 32a(+) 质粒 37 ℃ 酶切 12 h, 电泳分离酶切产物, 然后胶回收目的片段, 16 ℃ 连接过夜。连接反应体系如下: 目的片段 5.0 μL; pET - 32a(+) 片段 1.0 μL; T₄ Ligase 0.5 μL; T₄ Ligase Buffer 1.0 μL; H₂O 2.5 μL。最后将连接产物转入感受态细胞 *E. coli* DH5α, 涂布于含 0.1 mg/mL Amp 的 LB 固体培养基, 于 37 ℃ 培养箱中培养 12 h, 分别挑取阳性克隆菌株, 提取质粒进行 PCR 和 *Kpn* I、*Eco* R I 单、双酶切验证, 对鉴定正确的重组表达质粒送公司进行测序。

1.5 重组蛋白的诱导表达及条件优化

将 pET - 32a(+) /kp05372 重组质粒阳性 *E. coli* BL21(DE3) 接种于含 0.1 mg/mL Amp 的 LB 液体培养基中, 37 ℃ 温度振荡培养至 $D_{600\text{ nm}}$ 约为 0.6,

分别加入 IPTG 至终浓度为 0.0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 mmol/L, 诱导培养 4 h, 各取菌液 1 mL。同时, 取部分 IPTG 浓度为 0.6 mmol/L 菌液离心, 收集上清, 用 Tris - HCl(pH 值 = 8.0) 洗涤沉淀, 超声波裂解菌体, 离心, 收集沉淀。同时, 在 IPTG 浓度 0.6 mmol/L 组设置 28、30、37 ℃ 温度梯度及 1、2、3、4、5、6、7、8、9 h 的诱导时间梯度。最后, 分别在 0.6 mmol/L 菌液上清、裂解上清、裂解沉淀、不同 IPTG 浓度菌液、不同诱导时间菌液、不同温度梯度菌液沉淀样品中, 加入 25 μL PBS 和 25 μL 2 × SDS 凝胶上样缓冲液, 混匀后沸水煮 5 min, 10 000 r/min 离心 1 min, 取 10 μL 上层液体 SDS - PAGE 电泳, 经考马斯亮蓝 R250 染色后脱色, 利用凝胶成像系统分析目的蛋白的表达情况。同时, 设置诱导的空载体 pET - 32a(+) BL21(DE3) 转化菌作为对照。

1.6 重组蛋白免疫印迹分析

重组蛋白经 SDS - PAGE, 蛋白转印至 PVDF 膜上, TBST 重复洗膜 3 次, 5 min/次; 然后 4 ℃ 5% 脱脂奶粉封闭过夜, 加入抗 His 标签单克隆抗体 37 ℃ 孵育 1 h, TBST 重复洗膜 3 次, 5 min/次; 加入 1:4 000 倍稀释后的兔抗小鼠 IgG/HRP 37 ℃ 孵育 1 h, TBST 重复洗膜 3 次, 5 min/次; 最后用 ECL 显色分析。

2 结果与分析

2.1 pMD19 - T/kp05372 重组克隆质粒构建

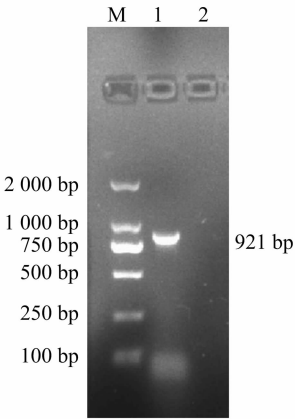
采用 PCR 和单、双酶切对重组克隆质粒 pMD19 - T/kp05372 进行验证, 胶回收目的片段并进行测序, 测序结果(图 1 和图 2) 分析表明扩增的基因片段序列及读码框正确, 扩增片段长度为 921 bp。

2.2 pET - 32a(+) /kp05372 重组表达载体构建

采用 PCR 和单、双酶切对重组表达质粒 pET - 32a(+) /kp05372 进行验证, 由图 3 和图 4 可知, 鉴定结果与理论结果相符, 表明目的基因片段已成功连上表达质粒。

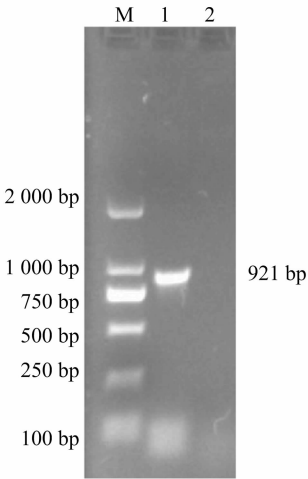
2.3 重组菌最优表达条件的优化

重组阳性菌在不同温度(28、30、37 ℃), 不同 IPTG 浓度(0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 mmol/L), 不同时间(1、2、3、4、5、6、7、8、9 h) 诱导后, 收集菌体和上清。将菌体超声波裂解, 收集上清和沉淀, SDS - PAGE 检测, 结果见图 5、图 6 和图



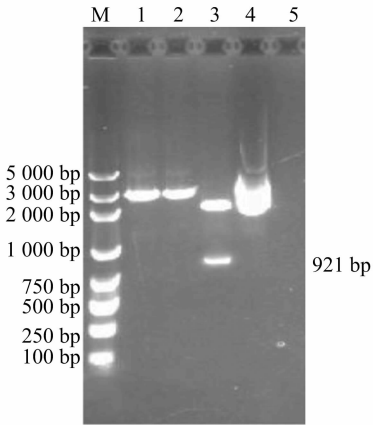
M—DNA Marker DL2000; 1—*kp05372* 基因序列;
2—空白对照

图1 *kp05372* 基因列 PCR 扩增



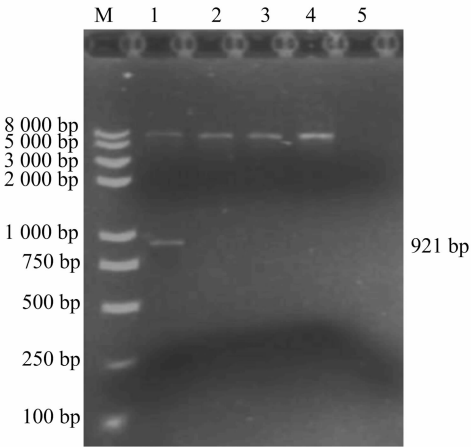
M—DNA Marker DL2000; 1—*kp05372* 基因序列;
2—空白对照

图3 *kp05372* 基因列 PCR 扩增



M—D2000 plus DNA ladder; 1—*EcoR* I 单酶切;
2—*Kpn* I 单酶切; 3—pMD19/*kp05372* 双酶切;
4—pMD19/*kp05372* 质粒; 5—空白对照

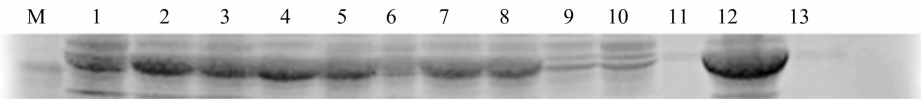
图2 重组质粒 pMD19/*kp05372* 单、双酶切产物



M—Trans 2K plus II DNA Marker; 1—pET-32a(+)/*kp05372*
双酶切; 2—*Kpn* I 单酶切; 3—*EcoR* I 单酶切; 4—
pET-32a(+)/*kp05372* 质粒; 5—空白对照

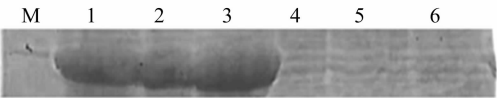
图4 重组质粒 pET-32a(+)/*kp05372* 单、双酶切产物

7, 重组质粒在 37 ℃、0.6 mmol/L IPTG、诱导表达 6 h 的重组蛋白表达量最高, 大小约为 53.2 ku。



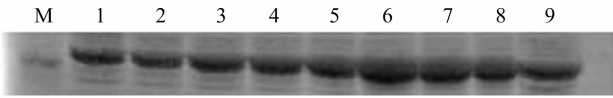
M—蛋白质分子质量标准; 1~8—重组蛋白在 0.0~1.4 mmol/L IPTG 浓度下表达产物; 9—空载体在 0.6 mmol/L IPTG 浓度下表达产物; 10—空载体无 IPTG 表达产物; 11—重组质粒裂解上清; 12—重组质粒裂解沉淀; 13—重组质粒表达菌液上清

图5 重组蛋白在宿主菌中的分布及诱导 IPTG 浓度的优化分析



M—蛋白质分子质量标准; 1~3—重组蛋白 28、32、
37 ℃ 下诱导 6 h 表达产物; 4~6—空载体 28、32、
37 ℃ 下诱导 6 h 表达产物

图6 重组蛋白在不同温度下表达产物 SDS-PAGE 分析



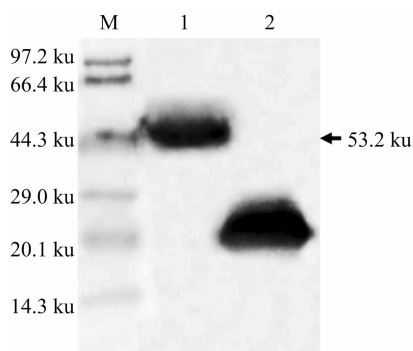
M—蛋白质分子质量标准; 1~9—重组蛋白在 0.6 mmol/L
IPTG 浓度下诱导 1~9 h 表达产物

图7 重组蛋白诱导不同时间表达产物 SDS-PAGE 分析

2.4 重组蛋白免疫印迹分析

将组氨酸标签单克隆抗体作为一抗, HRP 偶

联 IgG 作为二抗, 用增强型化学荧光 (ECL) 试剂作为底物显色液, 免疫印迹分析结果见图 8。



M—蛋白质 marker; 1—重组蛋白; 2—空载体

图8 重组蛋白 Western-blotting 分析

3 讨论

自人工养殖林麝以来,林麝的驯化期还较短,仍然保持警觉胆怯、易受惊和不易近人等野性。林麝患细菌性肺炎后一般不易发现,发现患病时已经处于较严重阶段,基本上无救治希望,以死亡而告终^[2]。目前,对林麝细菌性肺炎的研究仍处于初始阶段,主要是集中在血液生理生化指标测定、病原分离鉴定、病理组织学观察及病原菌小鼠体内感染模型的构建上^[13-15],尚未有林麝化脓性肺炎发病机理研究。LysR 家族转录因子在原核生物中参与了多种功能的调节,在细菌特定功能中扮演着重要角色^[16]。对林麝源肺炎克雷伯氏菌新转录因子进行表达,对后期研究其参与的调控机制具有重要作用,可为探究肺炎克雷伯氏菌介导的林麝化脓性肺炎的发病机理奠定基础。

在蛋白的表达过程中,随温度、IPTG 浓度、时间等诱导条件的改变,重组蛋白的表达量也发生改变。目标蛋白在 37 ℃ 时表达量最高,IPTG 浓度为 0.6 mmol/L 时,目的蛋白表达量最高,诱导时间为 1~9 h 时,KP05372 蛋白的表达量都比较高,当诱导时间为 6 h 时,目的蛋白的表达量达到最高,这说明目的蛋白最佳诱导时间为 6 h,Western-blot 结果表明,目的蛋白可与 His 标签的单抗发生特异性结合,说明重组菌可正确地表达。本研究成功构建了肺炎克雷伯氏菌 GPKP 菌株 LysR 家族转录因子原核表达载体,且在大肠杆菌 BL21(DE3)中成功表达出目的蛋白,为进一步研究该蛋白的结构和功能奠定了基础。

参考文献:

- [1]姜俊庆,程建国,赵 位,等. 林麝源解食子酸链球菌的分离鉴定及进化分析[J]. 中国兽医杂志,2017,53(10):20-23.
- [2]刘春燕. 林麝 *Moschus berezovskii* 养殖种群死亡原因及其生命生理特征研究[D]. 上海:华东师范大学,2008.
- [3]闫 敏,颜其贵,杨光友. 圈养麝的群发性疾病[J]. 经济动物学报,2016,20(2):112-117.
- [4]李秋波,颜其贵,康纪平,等. 麝化脓病细菌性病原诊断鉴定[J]. 野生动物,2012,33(4):211-213.
- [5]Lu M G, Jiang J, Liu L, et al. Complete genome sequence of *klebsiella pneumoniae* strain hkuople, a cellulose - degrading bacterium isolated from giant panda feces [J]. Genome Announcements,2015,3(6):e01315-e01318.
- [6]王艳君,冯永其,徐 静. 东非黑白疣猴肺炎克雷伯氏菌的分离鉴定[J]. 上海畜牧兽医通讯,2018(5):14-15+17.
- [7]郭定宗,胡薛英,周诗其,等. 金丝猴肺炎克雷伯氏菌及埃希氏大肠杆菌败血症的病理学观察[J]. 华中农业大学学报,2001,20(1):60-62.
- [8]Wei Z, Qing T, Yan L, et al. Isolation, identification, and genome analysis of lung pathogenic *klebsiella pneumoniae* (LPKP) in forest musk deer[J]. Journal of Zoo and Wildlife Medicine,2017,48(4):1039-1048.
- [9]Candan E D, Aksöz N. *Klebsiellapneumoniae*: characteristics of carbapenem resistance and virulence factors [J]. Acta Biochimica Polonica,2015,62(4):867-874.
- [10]Henikoff S, Haughn G W, Calvo J M, et al. A large family of bacterial activatorproteins[J]. Proc Natl Acad Sci,1988,85(18):6602-6606.
- [11]Kovaleva G Y, Gelfand M S. Transcriptional regulation of the methionine and cysteine transport and metabolism in streptococci [J]. FEMS Microbiology Letters,2007,276(2):207-215.
- [12]赵 位,王吴优,程建国,等. 林麝肺炎克雷伯氏菌的分离鉴定及其 *hp05372* 基因的生物信息学分析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2017,45(12):1-7.
- [13]何迟酩,林进生,邓家波,等. 林麝血液生理生化指标研究[J]. 四川动物,2012,31(3):456-459.
- [14]程建国,冯亚文,王 朋,等. 几种引起林麝肺部疾病病原菌的分离鉴定及药敏分析[J]. 中国兽医杂志,2013,49(12):72-76.
- [15]王吴优,田 青,程建国,等. 林麝肺源致病性大肠杆菌感染 BALB/c 小鼠模型的建立及评价[J]. 微生物学通报,2018,45(6):1333-1341.
- [16]Maddocks S E, Oyston P C. Structure and function of the LysR - type transcriptional regulator (LTTR) family proteins [J]. Microbiol,2008,154(Pt 12):3609-3623.