

技术方法

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000325

肺炎链球菌热休克蛋白 GrpE 的表达、纯化及热稳定性研究

张宏鹏¹, 赵沙沙², 龙小滨³, 吴爽¹, 白垒³, 罗森⁴, 黄爱龙³, 汪德强³

(1. 重庆医科大学检验医学院临床检验诊断重点实验室, 重庆 400016; 2. 成都中医药大学附属医院检验科, 成都 610072;

3. 感染性疾病分子生物学教育部重点实验室, 重庆 400016; 4. 重庆市渝北区人民医院医学检验科, 重庆 401120)

【摘要】目的:肺炎链球菌可引起细菌性肺炎和脑膜炎、发热性菌血症等多种疾病。对肺炎链球菌热休克蛋白 GrpE 进行克隆表达, 纯化及热稳定性测定, 以便于进一步分析肺炎链球菌感染的分子机制。**方法:**利用 PCR 技术扩增 GrpE 基因, 构建重组质粒 pW28-GrpE, 并在大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E.coli*) B834 中表达, Ni²⁺-NTA 亲和层析柱和 DEAE 阴离子交换层析柱纯化 GrpE 蛋白, Hiload Superdex 75 凝胶层析柱分析在溶液中的聚集状态, 热稳定性 (thermal shift assay, TSA) 法测定热稳定性。**结果:**①成功构建重组质粒 pW28-GrpE, 在表达菌 *E.coli* B834 中可溶性表达。②获得高纯度 (95.0% 以上) GrpE 蛋白, 发现该蛋白在溶液中以二聚体形式存在。③测定 GrpE 蛋白在 pH 6.0、20 mmol/L 盐浓度缓冲液中有较高热稳定性。**结论:**利用经典的蛋白质克隆表达纯化技术, 获得了高表达量高纯度的 GrpE 蛋白, 并初步测定其热稳定性为下一步蛋白晶体培养、三维结构解析及感染机制研究提供重要基础。

【关键词】肺炎链球菌; 热休克蛋白 GrpE; 蛋白质表达纯化; 热稳定性**【中图分类号】**R378.1⁴**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2014-03-17Expression, purification and thermal stability of heat shock protein GrpE from *Streptococcus pneumoniae*Zhang Hongpeng¹, Zhao Shasha², Long Xiaobin³, Wu Shuang¹, Bai Lei³, Luo Miao⁴, Huang Ailong³, Wang Deqiang³

(1. Key Laboratory of Clinical Laboratory Diagnosis, College of Laboratory Medicine,

Chongqing Medical University; 2. Department of Clinical Laboratory, Teaching Hospital of Chengdu University of

Traditional Chinese Medicine; 3. Key Laboratory of Molecular Biology on Infectious Diseases, Ministry of

Education, Chongqing Medical University; 4. Department of Clinical Laboratory,

People's Hospital of Yubei District in Chongqing)

【Abstract】Objective: Streptococcus pneumoniae is a major cause of several diseases. To express and purify the heat shock protein GrpE from Streptococcus pneumoniae in order to uncover the infectious mechanism. **Methods:** Being amplified by PCR, the open reading frame of GrpE was subcloned into pW28 and expressed in *Escherichia coli* (*E.coli*) B834. The bacterial protein was purified by nickel chromatography column and anion-exchange chromatography column subsequently. The aggregation of GrpE in solution was analyzed by gel filtration column (Hiload Superdex 75) and its thermal stability was characterized with thermal shift assay (TSA) method. **Results:** The GrpE protein was expressed in *E.coli* B834 as soluble. The purified protein with high purity of 95.0% exhibited homodimer in solutions. The recombinant GrpE protein presented relative stabilization in a solution at pH 6.0 and 20 mmol/L NaCl. **Conclusion:** The GrpE protein with high purity was expressed in *E.coli* B834 and its thermal stability was determined with TSA method.

【Key words】Streptococcus pneumoniae; heat shock protein GrpE; expression and purification; thermal stability

肺炎链球菌是一种革兰氏阳性机会致病菌, 常定植于呼吸道上皮, 其感染可能引起威胁生命的呼

吸系统疾病或全身性疾病, 例如菌血症、腹膜炎等^[1]。肺炎链球菌所致疾病已经成为世界范围的重大公共卫生问题。在 2005 年, 世界卫生组织统计全球每年约 160 万人死于肺炎, 其中约 100 万为年龄小于 5 岁的儿童^[2]。仅在美国 2010 年约 5 万人死于肺炎链球菌感染所致的肺炎成为第 9 位的致死性疾病^[3]。目前, 抗生素作为治疗肺炎链球菌感染的首选方案, 然而肺炎链球菌对各种抗生素的耐药性也逐

作者介绍: 张宏鹏, Email: zhang396211@163.com,

研究方向: 病原微生物重要蛋白结构与功能。

通信作者: 汪德强, Email: cquwangdq@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 31240082); 国家青年自然科学基金资助项目 (编号: 81301395); 重庆市自然科学基金资助项目 (编号: 2011BB5124)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000325.html>

渐增强(如 β -内酰胺类,大环内酯类和四环素类抗生素),甚至出现了耐万古霉素的菌株,这使临床治疗变得更加困难^[4]。

分子伴侣蛋白与多种生理功能相关,例如蛋白质折叠、蛋白的降解和在外界压力条件下阻止蛋白发生聚合等^[5]。热休克蛋白 GrpE 作为 DnaK 的伴侣蛋白,在受热的条件下发生伸展,导致与之相互作用的 DnaK 蛋白受损。由于 GrpE 和 DnaK 之间的相互作用对 DnaK 的活性有至关重要的作用,GrpE 蛋白被称为细菌的热感应器^[6]。近期研究发现,肺炎链球菌 GrpE 蛋白与细菌黏附宿主的上皮细胞有关^[7]。而人的呼吸道上皮细胞正是其最主要的定殖场所,因此通过解析肺炎链球菌 GrpE 蛋白的三维结构来揭示其性状及功能,对于进一步分析肺炎链球菌感染的分子机制具有重要的临床意义。热稳定性 (thermal shift assay, TSA) 法是一种快速、灵敏的方法检测蛋白质的热稳定性,有助于分析蛋白质与配体之间的相互作用和筛选蛋白质结晶的条件等^[8]。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒及菌株 肺炎链球菌 TIGR4 (ATCC49619) 购自美国 ATCC 微生物菌种保存中心。大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*) DH5 α 及 *E. coli* B834 为实验室保存。载体质粒 pW28 由 pET-28a (中国科学院高能物理研究所王大成院士馈赠) 改造而来。

1.1.2 主要试剂及仪器 DL 2000 DNA Marker、各种限制性内切酶 (*Bam*H I 和 *Xho* I) 及 Buffer、ExTaq 酶及 Buffer 购自 Takara 公司,蛋白质 Marker D530A 购自北京全式金公司,质粒抽提试剂盒、T4 DNA 连接酶及 Buffer 购自 Promega 公司,质粒纯化试剂盒购自上海生工公司,糖原及 BCA 试剂盒购自碧云天公司,蛋白荧光染料 SYPRO Orange 购自 Invitrogen 公司。PCR 仪、Gel Doc 1000 数字化凝胶成像仪、蛋白质电泳槽购自 Bio-Rad 公司, EPS-300 核酸电泳仪购自 Eppendorf 公司, NANOD 1000 微量分光光度计购自 Thermo 公司,超声波处理系统购自 SONICS 公司,蛋白质超滤系统购自 Micon 公司, Ni²⁺-NTA 亲和层析柱、DEAE 阴离子交换层析柱、Hiload Superdex 75 凝胶层析柱购自 GE Healthcare 公司。

1.2 方法

1.2.1 pW28-GrpE 重组质粒的构建 在 NCBI 中检索肺炎链球菌 TIGR4 (*S. pneumoniae* TIGR4) 的全基因组序列,并对 GrpE 基因进行初步生物信息学分析,应用软件 Primer Premier 5 设计引物(序列参见表 1),由北京华大基因公司合成。以肺炎链球菌 TIGR4 基因组 DNA 为模板,进行 PCR 反应扩增 GrpE 基因,反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共循环 25 次, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10

min, 4 $^{\circ}$ C 保存。用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增的目的片段。用糖原沉淀法回收目的基因片段。以限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I 分别酶切扩增基因和载体 pW28。用糖原沉淀法纯化 DNA 后进行连接。将双酶切纯化后的目的片段和载体 pW28 片段用 T4 DNA 连接酶在 16 $^{\circ}$ C 连接 16 h, 转入克隆宿主菌 *E. coli* DH5 α 后涂布于 50 mg/L 卡那霉素的 LB 固体培养基上 37 $^{\circ}$ C 过夜培养。选取单克隆菌放大后进行 PCR 鉴定。选取阳性菌送往华大基因公司测序。

1.2.2 GrpE 的表达 将测序正确的重组质粒转化至 *E. coli* B834 表达菌株中,用三分区划线法铺于含 50 mg/L 卡那霉素的 LB 固体培养基上, 37 $^{\circ}$ C 恒温培养 10 h, 挑取单菌落加入 1 ml LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C, 210 r/min, 摇床培养至 A_{600nm} 约为 0.2 时, 加入 IPTG (终浓度为 1 mmol/L) 于 37 $^{\circ}$ C 摇床中诱导表达, 4 h 后离心分离菌体。通过 12.0% SDS-PAGE 电泳鉴定目的蛋白的表达情况, 并对有目的基因表达的菌种进行表达条件的优化(包括培养时间、温度、诱导剂 IPTG 浓度等), 最终选取条件为 37 $^{\circ}$ C, 210 r/min, 摇床培养至 A_{600nm} $\approx$ 0.5 时, 以终浓度 0.2 mmol/L IPTG 诱导剂, 于 19 $^{\circ}$ C 恒温条件下诱导表达 12 h。

表 1 引物序列

Tab.1 Primers sequences

基因	引物序列	碱基数(bp)
GrpE 正向	5'-CCGGGATCCATGGCCCAAGATAT	330
	AAAAAATG-3'	
	反向 5'-CCGCTCGAGTTATTCTTTCAAA	
	GCGTGAATC-3'	

下划线: The site of *Bam*H I and *Xho* I

1.2.3 GrpE 的纯化 用 Binding Buffer (20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 300 mmol/L NaCl) 重悬菌体, 混匀, 在冰水浴中进行超声破碎细菌: 4 $^{\circ}$ C, 超声 4 s, 间隔 6 s, 振幅 30.0%, 超声破碎时间 10 min。然后高速低温离心 (4 $^{\circ}$ C, 12 000 r/min, 15 min), 取上清液以 4 s/drop 的流速穿过经 Binding Buffer 平衡过的 Ni²⁺-NTA 亲和层析柱, 然后用 Washing Buffer (20 mmol/L 咪唑, 20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 300 mmol/L NaCl) 洗脱杂蛋白质, 最后用 30 ml Elution Buffer (500 mmol/L 咪唑, 20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 300 mmol/L NaCl) 洗脱目的蛋白质。为进一步提高蛋白质的纯度, 通过 ExPASy 对 GrpE 的等电点预测为 4.66, 选用 DEAE 阴离子交换层析柱继续纯化, 上样前用平衡缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0) 平衡 DEAE 阴离子交换层析柱, 最后用 600 ml 梯度洗脱液 (0~500 mmol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0) 进行洗脱, 并用自动收集器收集洗脱样品 (1 ml/min)。用 12.0% SDS-PAGE 电泳鉴定蛋白质的纯度, 并用 BCA 法测定蛋白质样品浓度。将蛋白质冻存于 -80 $^{\circ}$ C 备用。

1.2.4 GrpE 在溶液中的聚集状态 利用凝胶层析法测定 GrpE 在溶液中的聚集状态。先用标准蛋白质: 溶菌酶 (14.4 kD), 胰凝乳蛋白酶原 (25 kD), 鸡卵清蛋白质 (43 kD), 牛血清蛋白质 (67 kD) 对 Hiload Superdex 75 凝胶层析柱进行标定, 流速为 1.0 ml/min, 然后测定 GrpE 在 buffer (20 mmol/L

Tris-HCl pH 8.0, 200 mmol/L NaCl) 中的聚集状态。根据洗脱曲线记录下标准蛋白质及 GrpE 的洗脱体积, 计算出 GrpE 在溶液中的分子量大小并对其进行聚合形式做出分析判断。

1.2.5 TSA 法测定 GrpE 的热稳定性 取 GrpE 蛋白 (0.5 μ g), 稀释于 30 μ l 的不同 pH 和浓度的缓冲液中。用 7.5% 的冰醋酸将 5000X 的 SYPRO Orange 染料稀释成 10X, 将蛋白和染料混合后室温低速离心混匀。样品由 25 $^{\circ}$ C 加热至 85 $^{\circ}$ C, 每分钟增加 1 $^{\circ}$ C, 荧光定量 PCR 仪收集荧光信号。

2 结果

2.1 GrpE 基因的克隆与表达质粒的构建

扩增后的 PCR 产物经过 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定在 330 bp 处有 1 条特异性的条带, 与预测的 GrpE 基因大小相符 (图 1)。同时对构建好的重组质粒进行双酶切鉴定 (*Bam*H I 和 *Xho*I) 结果同样在 330 bp 处有特异性条带。将构建好的质粒送往华大基因公司测序, 序列与 GenBank 收录的 GrpE 基因序列完全吻合, 结果表明重组质粒构建成功。

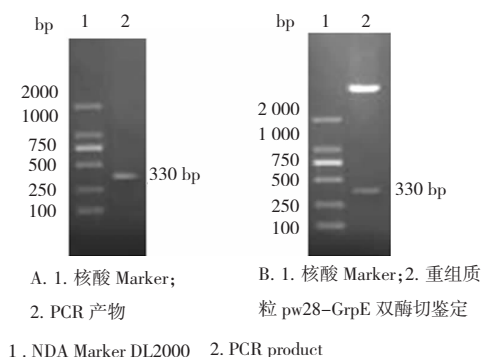


图 1 GrpE 基因扩增及双酶切鉴定
Fig.1 Agarose electrophoresis of GrpE amplification and digestion identification

2.2 重组蛋白质 GrpE 的表达和纯化

用构建好的质粒对 GrpE 蛋白进行表达及纯化, 结果如 SDS-PAGE 电泳结果所示 (图 2、图 3), 在分子量约为 25 kDa 处有明显的蛋白条带, 与重组蛋白质表观分子量相符合, 证实该蛋白为可溶性上清表达, 破菌液和上清液高浓度表达而穿透液未见蛋白, 表明蛋白挂柱效果较好。DEAE 纯化后目的蛋白纯度可达 95.0% 以上。BCA 法测定蛋白浓度为 10 mg/ml。

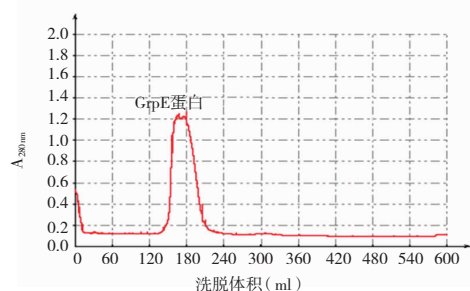


图 2 GrpE DEAE 层析纯化图谱
Fig.2 Chromatographic curve of DEAE column

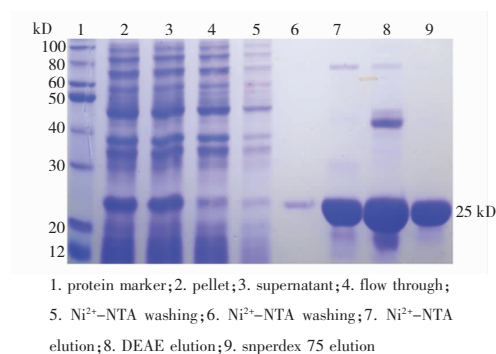


图 3 GrpE 纯化结果
Fig.3 SDS-PAGE results of GrpE after purification

2.3 凝胶层析鉴定 GrpE 在溶液中的聚集状态

用 Superdex 75 凝胶层析柱测定 GrpE 蛋白质的聚集状态, 结果显示 GrpE 蛋白为单峰, 经过拟合公式: $\text{LogMW} = -0.0154V_e + 5.58606$ 计算后发现该蛋白在溶液 (20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 200 mmol/L NaCl) 中以二聚体形式存在 (图 4)。

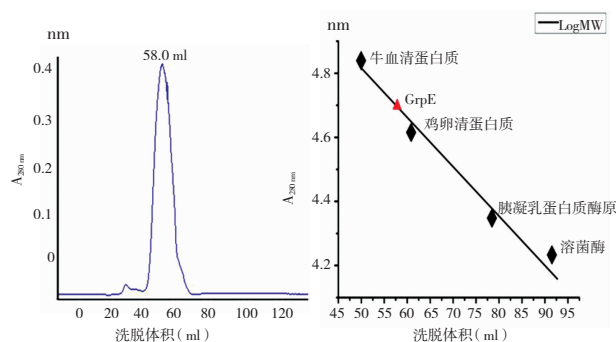


图 4 GrpE 分子筛纯化图谱
Fig.4 Chromatographic curve of Superdex 75 column

2.4 TSA 法测定 GrpE 蛋白的热稳定性

分别选取不同 pH 范围和盐浓度范围的缓冲液, 结果为 Bio-Rad IQ5 荧光定量 PCR 收集的荧光信号。图 5 中 A、C 为蛋白的溶解曲线, B、D 为溶解曲线的峰值。测定 GrpE 在 pH 4.0、6.0、8.0 的热稳定性结果如 A、B 所示; GrpE 在 pH 为 6.0 时具有较高的稳定性。同时在 pH 为 6.0 的缓冲液中测定盐浓度的变化对 GrpE 蛋白的影响, 结果如图 C、D 所示; GrpE 在 pH 为 6.0 盐浓度为 20 mmol/L 的缓冲液中有较高的热稳定性。

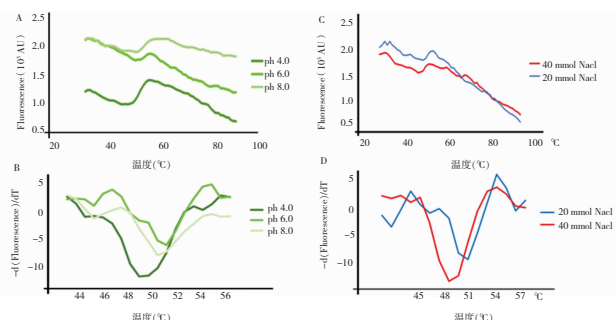


图 5 GrpE 热稳定性结果
Fig.5 TSA results of GrpE

3 讨 论

肺炎链球菌是一种常见的病原体,特别是其引起的社区获得性肺炎具有很高的致死率^[9]。由于近年来肺炎链球菌对抗生素抵抗有上升趋势,现在其只对万古霉素敏感,但由于剂量和入侵组织的问题而不适合用于治疗^[10-11]。这就需要选择新的抗菌药物来治疗肺炎链球菌的感染。有相关报道提出肺炎链球菌热休克蛋白 GrpE 参与宿主细胞的黏附过程。但目前为止,没有任何关于肺炎链球菌热休克蛋白 GrpE 表达、纯化以及热稳定性的相关报道。本文成功构建 pW28-GrpE 重组质粒并采用蛋白纯化经典步骤对热休克蛋白 GrpE 进行了纯化,同时首次报道了其在溶液(20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 200 mmol/L NaCl)中以二聚体形式存在。

以往蛋白质结晶过程中采用坐滴法或悬滴法对晶体结晶条件进行大量筛选。而本文创新性的引用了周晖皓、Zhou 等^[12]和 Chen 等^[13]使用的 TSA 法测定蛋白的热稳定性。以减少晶体结晶条件的筛选,从而通过蛋白质晶体学方法来研究肺炎链球菌热休克蛋白 GrpE。实验中测定了 GrpE 蛋白质在不同 pH 和盐浓度的稳定性变化,尽管生物信息学预测过程中 GrpE 的等电点预测为 4.66,但在本实验中测得 GrpE 蛋白在 pH 为 6.0 的条件下更为稳定,这将有助于进一步获取高纯度 GrpE 蛋白质和高分辨率蛋白质晶体提供良好的条件。但文章中依然存在不足之处,如在 DEAE 阴离子交换层析纯化蛋白时,在 50 kDa 左右出现了一条不明的杂带,虽然后续的纯化过程中将其去除但未对其进行进一步研究。同时没有通过三维结构来阐明肺炎链球菌 GrpE 的相关功能等,但这一方向也是下一步研究的重点。

本文下一步的主要研究是肺炎链球菌 GrpE 蛋白的三维结构,通过其三维结构来进一步阐释其功能及分子机制。获得蛋白质晶体是首要解决的问题,基于已有的研究基础已经获得了高表达量高纯度的 GrpE 蛋白,热稳定性的测定将极大的提高蛋白质结晶的可能性^[14]。之后将采用悬滴气相扩散法来获得蛋白质晶体,优化相关的条件来获得晶体衍射数据解析三维结构,同时用 TSA 法进一步研究肺炎链球菌 GrpE 蛋白与配体间的相互作用,并且从分子水平探索肺炎链球菌的感染机制。

参 考 文 献

- [1] Kadioglu A, Weiser JN, Paton JC, et al. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2008, 6(4): 288-301.
- [2] Pilishvili T, Lexau C, Farley MM, et al. Sustained reductions in invasive pneumococcal disease in the era of conjugate vaccine[J]. *J Infect Dis*, 2010, 201(1): 32-41.
- [3] Wunderink RG, Waterer GW. Clinical practice. Community-acquired pneumonia[J]. *N Engl J Med*, 2014, 370(6): 543-551.
- [4] Cho EY, Lee H, Choi EH, et al. Serotype distribution and antibiotic resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolated from invasive infections after optional use of the 7-valent conjugate vaccine in Korea, 2006-2010[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2014, 78(4): 481-486.
- [5] Hartl FU, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein[J]. *Science*, 2002, 295(5561): 1852-1858.
- [6] Barthel S, Rupprecht E, Schneider D. Thermostability of two cyanobacterial GrpE thermosensors[J]. *Plant Cell Physiol*, 2011, 52(10): 1776-1785.
- [7] Murakami J, Terao Y, Morisaki I, et al. Group A streptococcus adheres to pharyngeal epithelial cells with salivary proline-rich proteins via GrpE chaperone protein[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(26): 22266-22275.
- [8] Dupeux F, Rower M, Seroul G, et al. A thermal stability assay can help to estimate the crystallization likelihood of biological samples[J]. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2011, 67(Pt 11): 915-919.
- [9] Irfan M, Farooqi J, Hasan R. Community-acquired pneumonia[J]. *Curr Opin Pulm Med*, 2013, 19(3): 198-208.
- [10] Tleyjeh IM, Tlaygeh HM, Hejal R, et al. The impact of penicillin resistance on short-term mortality in hospitalized adults with pneumococcal pneumonia: a systematic review and meta-analysis[J]. *Clin Infect Dis*, 2006, 42(6): 788-797.
- [11] Peterson LR. Penicillins for treatment of pneumococcal pneumonia: does in vitro resistance really matter? [J]. *Clin Infect Dis*, 2006, 42(2): 224-233.
- [12] Zhou H, Sun L, Yang XL, et al. ATP-directed capture of bioactive herbal-based medicine on human tRNA synthetase[J]. *Nature*, 2013, 494(7435): 121-124.
- [13] Chen WQ, Karnaukhova E, Lubec G. The use of native gels for the concomitant determination of protein sequences and modifications by mass spectrometry with subsequent conformational and functional analysis of native proteins following electro-elution[J]. *Amino Acids*, 2013, 44(5): 1381-1389.
- [14] Yeh AP, McMillan A, Stowell MH. Rapid and simple protein-stability screens: application to membrane proteins[J]. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2006, 62(Pt 4): 451-457.

(责任编辑:关蕴良)