



福氏志贺菌毒力蛋白IpaC的表达与纯化

福氏志贺菌(*Shigella flexneri*, *S. flexneri*)是细菌性痢疾的重要致病菌之一[1]。目前的研究认为,细菌性痢疾的发生开始于志贺菌侵入肠上皮细胞,引起局部细胞的死亡和炎症反应[2]。它的发病机制主要与志贺菌的毒力质粒有关,消除该质粒后志贺菌的致病力也随之消失。毒力质粒上一个31 kb大小的片断是志贺菌侵袭所必需的,编码多种与侵袭相关的基因,其中由它编码合成的毒力质粒蛋白(Ipa)B、C、D是志贺菌侵入肠上皮细胞的关键[3]。在菌体外,IpaB和IpaC蛋白是以复合物形式存在并介导福氏志贺菌侵入肠上皮细胞[4]。

但是,有关这些毒力蛋白具体是如何介导志贺菌的入侵的,在入侵的过程中是否有别的物质协助等问题都不是很明确。本实验选择一个与志贺菌毒力明显相关的基因ipaC为靶基因,以基因工程的方法构建其重组表达质粒,表达并纯化毒力蛋白IpaC,旨在进一步了解细菌性痢疾的发病机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株 福氏志贺菌标准株2457T、大肠杆菌BL21(λ DE3)为本教研室保存;表达质粒pET32a由第一军医大学寄生虫学教研室馈赠。

1.1.2 主要试剂 QIA expressionist™ 蛋白纯化系统为德国QIAGEN公司产品;异丙基硫代- β -D半乳糖苷(IPTG)为华美生物工程公司产品;咪唑购自Sigma公司;其他主要生化试剂为美国Sigma公司产品或国内AR级产品。

1.2 方法

1.2.1 表达载体的转化与基因产物的表达 将表达质粒pET32a-ipaC转化用氯化钙处理法得到的感受态大肠杆菌BL21(λ DE3),将转化液涂于含氨卞青霉素的LB平板上,37 °C过夜培养。挑取单菌落接种于20 ml含氨卞抗性的LB培养基中,37 °C、200 r/min振摇过夜。取3 ml过夜培养物接种入含氨卞抗性的100 ml LB培养基中,37 °C以200 r/min振摇,测定D⁶⁰⁰值,直至D⁶⁰⁰值到达0.4~0.6(勿超过0.6)。加入IPTG(终浓度为0.4 μ mol/L)进行诱导,诱导4 h后收菌。将菌液于4 °C,以5 000 \times g离心5 min,弃上清。将沉淀物用Lysis 缓冲液(50 mmol/L NaH₂PO₄、300 mmol/L NaCl、10 mmol/L 咪唑,pH 8.0)悬浮,反复冻融几次后,在冰浴中以中等强度超声破菌,每次45 s,每次间隔45 s,共10次。破菌后,4 °C、15 000 \times g离心25 min,收集上清液备用。沉淀用同样的Lysis缓冲液溶解备用。

1.2.2 表达产物的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测 参照文献[5]进行。收集IPTG诱导前与诱导后4 h的菌液各1 ml,高速离心后分别用100 μ l TE缓冲液悬浮、超声破菌离心后分别取上清和沉淀各100 μ l,在上述样品中各加入100 μ l的上样缓冲液混匀,100 °C水浴,3 min后点样,25 mA恒流通电进行SDS-PAGE检测。电泳后以考马斯亮蓝染色30 min,然后以脱色液脱色,观察结果。

1.2.3 表达产物的纯化 采用QIA expressionist™蛋白纯化系统进行纯化,操作方法按照说明书中

分批纯化法进行。用1 ml resin slurry和4 ml的超声破菌后上清充分混合，于4 °C以200 r/min振摇60 min。将混合液过柱，收集流出液。4 ml洗脱缓冲液(50 mmol/L NaH_2PO_4 、300 mmol/L NaCl、20 mmol/L 咪唑，pH 8.0) 洗涤3次，并分别收集洗涤液。0.5 ml Eluton缓冲液(50 mmol/L NaH_2PO_4 、300 mmol/L NaCl、350 mmol/L 咪唑，pH 8.0)洗脱4次，并分别收集洗脱液。将上述的收集液分别进行SDS-PAGE分析，观察蛋白纯化结果。将纯化后的蛋白冷冻干燥，保存备用。

2 结果

2.1 重组质粒IpaC蛋白的诱导表达以及表达产物的鉴定分析

将重组质粒pET32a-ipaC转化大肠杆菌，在IPTG诱导下表达，分别对诱导前后的表达产物进行SDS-PAGE及考马斯亮蓝染色，可在相对分子质量63 000处见一明显的诱导表达带 (图1)。对此诱导表达带进行黑度密度自动扫描分析，此处表达蛋白量约占总菌体蛋白量的11%。

2.2 重组质粒表达产物的可溶性鉴定以及纯化结果

将超声破菌后上清和沉淀分别进行SDS-PAGE，发现目的蛋白同时存在于上清和沉淀中，表明该目的蛋白的表达有部分为可溶性表达，还有一部分蛋白形成了包涵体。如果仅从上清中提取目的蛋白，即可保证蛋白的天然活性，还可免去蛋白复性这一步，简化了纯化的过程。将纯化后收集的洗脱液进行SDS-PAGE，发现在咪唑浓度为350 mmol/L时纯化效果较好。对纯化的蛋白进行黑度密度自动扫描分析，蛋白的纯度达到90%以上。

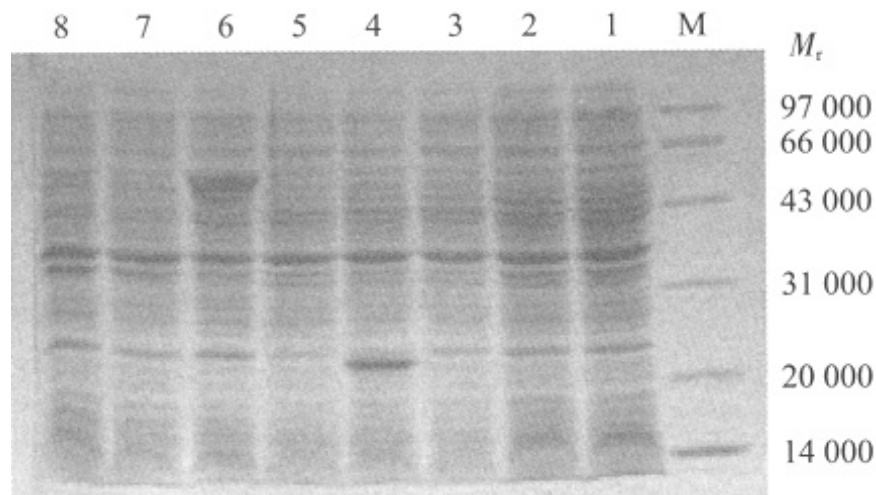


图 1 重组蛋白的SDS-PAGE分析

Fig.1 SDS-PAGE analysis of the fusion protein

M: Marker; Lane 1: E.coli strain BL21 (λ DE3) without induction; Lane 2: BL21 (λ DE3) after induction; Lane 3: pET32a/ BL21(λ DE3) without induction; Lane 4: pET32a/ BL21(λ DE3) after induction; Lane 5: pET32a-ipaC/ BL21(λ DE3) without induction; Lane 6: pET32a-ipaC/ BL21(λ DE3) after induction; Lane 7: Unrecombinant plasmid without induction; Lane 8: Unrecombinant plasmid after induction

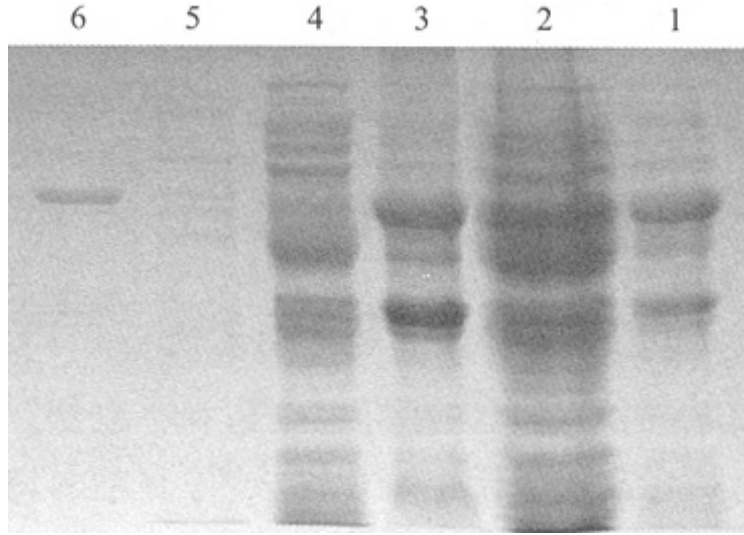


图 2 纯化蛋白的SDS-PAGE分析

Fig.2 SDS-PAGE analysis of the purified protein

Lane 1: pET32a-*ipaC*/BL21(λ DE3) after induction; Lane 2: pET32a-*ipaC*/BL21(λ DE3) lysis supernatant after sonication; Lane 3: pET32a-*ipaC*/BL21(λ DE3) lysis precipitate after sonication; Lane 4: Supernatant after integration; Lane 5: Elution liquid; Lane 6: Purified protein

3 讨论

福氏志贺菌引起的细菌性痢疾在卫生条件相对落后的发展中国家发病率仍然较高，占感染性腹泻发病总数的15%以上[6]，但其具体的发病机制仍不十分清楚。

pET表达质粒系统是近年来出现的一种含T7启动子的原核表达系统，该系列质粒中含有T7启动子、多克隆位点、氨卞青霉素抗性基因、表达产物的N端和(或)C端含有6个连续的组氨酸等。其中T7启动子可高效表达外源蛋白，所表达的外源蛋白量一般占总蛋白量的25%以上，甚至达到细菌总蛋白量的50%[7]。由于pET表达质粒系统的高表达性，越来越广泛地应用于外源蛋白的表达。本实验中外源蛋白的表达量不是很高，约占总蛋白量的11%。可能的原因在于所表达的外源蛋白是一种毒力蛋白，对宿主菌存在着一定的损害。

另外该系列质粒表达的外源蛋白都含有6个连续的组氨酸，它们形成的特殊空间构架，与金属螯合层析介质发生特异性吸附，可用金属螯合亲和层析法进行分离纯化。本实验中所采用的QIA expressionist™蛋白纯化系统就是根据这种原理制成的。采用Ni-NTA螯合层析介质，以咪唑洗脱表达的外源蛋白，纯化过程非常简便，且纯化蛋白的纯度可达到90%以上。

本实验选择福氏志贺菌毒力质粒上编码的侵袭蛋白基因(*ipaC*)作为研究对象，利用基因工程的方法将该基因定向克隆到原核高效表达质粒pET32a中，并将重组质粒转化表达宿主菌BL21(λ DE3)，从而稳定、高效地表达毒力蛋白IpaC。

本研究通过QIA expressionist™蛋白纯化系统得到了高纯度的融合 IpaC蛋白，可借此进一步研究该毒力蛋白的生化特性及免疫学功能，以更好地了解细菌性痢疾的发病机制。同时由于IpaC蛋白具有种属特异性，如制备出该蛋白的单克隆抗体并将之制成胶体金免疫层析试纸条，可快速、简便地诊断细菌性痢疾，降低其危害性。

参考文献:

[1] Hale TL. Genetic basis of virulence in *Shigella* species[J]. *Microbiol Rev*, 1991, 55: 206-24.

[2] Rhodes JE. Selective primary health care :Strategies for control of disease in the

developing world XV Acute diarrhea[J]. Infect Dis Rev, 1984, 6: 840-54.

[3] Menard R, Dehio C, Sansonetti PJ. Bacterial entry into epithelial cells:the paradigm of Shigella[J].Trends Microbiol, 1996, 4(6): 220- 6.

[4] Mernard R, Prevost MC, Gounon P, et al. The secreted Ipa complex of Shigella flexneri promotes entry into mammalian cells[M]. Proc Natl Acad Sci USA,1996, 93(3): 1254-8.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, 著. 金冬雁, 黎孟枫, 译. 分子克隆实验指南[M]. 第2版. 北京: 科学出版社, 1992.

[6] 丁建强. 志贺菌氏菌感染若干方面的研究进展[J]. 国外医学·流行病学传染病学分册(Foreign Med Sci •Section of Epidemiol Lemol Fascicle), 1997, 24(2): 56-60.

[7] 梁国栋. 最新分子生物学实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 2001. 282.

参考文献:

[1] Hale TL. Genetic basis of virulence in Shigella species[J]. Microbiol Rev, 1991, 55: 206-24.

[2] Rhodes JE. Selective primary health care :Strategies for control of disease in the developing world XV Acute diarrhea[J]. Infect Dis Rev, 1984, 6: 840-54.

[3] Menard R, Dehio C, Sansonetti PJ. Bacterial entry into epithelial cells:the paradigm of Shigella[J].Trends Microbiol, 1996, 4(6): 220- 6.

[4] Mernard R, Prevost MC, Gounon P, et al. The secreted Ipa complex of Shigella flexneri promotes entry into mammalian cells[M]. Proc Natl Acad Sci USA,1996, 93(3): 1254-8.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, 著. 金冬雁, 黎孟枫, 译. 分子克隆实验指南[M]. 第2版. 北京: 科学出版社, 1992.

[6] 丁建强. 志贺菌氏菌感染若干方面的研究进展[J]. 国外医学·流行病学传染病学分册(Foreign Med Sci •Section of Epidemiol Lemol Fascicle), 1997, 24(2): 56-60.

[7] 梁国栋. 最新分子生物学实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 2001. 282.