

# 第一类整合酶表达载体的构建及鉴定

顿博影, 曾冰冰, 闫鹤, 石磊

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东 广州 510640)

**摘要:** *IntI1* 基因是编码整合酶的基因, 采用 PCR 方法对 *IntI1* 基因片断进行扩增, 扩增子采用 *NedI* 和 *BamHI* 双酶切, 并克隆到 pET19b 载体上。把构建好的载体转化至 *E.coli* BL21 (DE3) 中, 在 IPTG 下进行诱导表达。经 SDS-PAGE 电泳鉴定以及使用特异性抗 His-整合酶单克隆抗体的 Western-Blotting 证明该重组 *E.coli* BL21 (DE3) -*IntI1* 在 IPTG 诱导下可表达整合酶, 此为整合酶表达调控研究奠定了基础。

**关键词:** 整合酶; *IntI1*; 不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳; Western 免疫印迹; 食品

**中图分类号:** Q55; **文献标识码:** A; **文章编号:** 1673-9078(2008)01-0011-03

## Construction and Identification of the Class1

### Integrases Expression Vector

DUN Bo-ying, ZENG Bing-bing, YAN He, SHI Lei

(College of Light Industry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** Class1 integrase gene was amplified by PCR, then the amplicon was connected to pET19b vector after cutting by *NedI* and *BamHI*. The recombinant plasmids were induced to express integrase in *E.coli* BL21(DE3), and the integrase was identified by SDS-PAGE and Western Blot. The results showed that the integrase can be expressed in *E.coli* BL21(DE3).

**Key words:** integrase; *IntI1*; SDS-PAGE; Western Blot; food

长期滥用抗生素会使微生物产生耐药性。抗生素滥用和细菌耐药性增加这种互为因果式的发展必然导致抗生素在动物源性食品中蓄积富集, 造成食品中药物残留超标, 直接危害动物源性食品的卫生安全, 影响人民群众的身体健康。在这些过程中, 细菌耐药性基因起关键的作用。

病原菌耐药性的产生是通过自身基因的突变积累的, 主要是在水平方向上获取耐药性基因。整合子 (Integrans) 是水平传播的重要基因元件, 是细菌基因组中的可移动遗传物质并携带位点特异性重组系统的组分, 可将许多耐药基因盒 (resistance gene cassette) 整合在一起, 从而形成多重耐药<sup>[1]</sup>。整合子是由一个编码整合酶 (integrase) 的 *intI* 基因, 二个基因重组位点 *attI* 和 *attC* 及一个启动子构成。*intI* 位于整合子的 5'-保守区域, 所编码的整合酶负责催化基因盒在 *attI* 和 *attC* 上的整合及切除<sup>[2,3]</sup>。目前发现的整合酶有数种, 其中第一类整合酶最为常见, 主要携带抗性基因<sup>[4]</sup>。

收稿日期: 2007-09-20

作者简介: 顿博影, 在读硕士, 研究方向: 糖类物质及药物的制备与生物利用

通讯作者: 石磊, 教授

目前, 整合子系统已经作为细菌耐药性的最新机制正越来越引起研究者的关注。

为系统研究整合酶的调控机制, 我们对 *intI1* 基因进行了克隆、表达及鉴定。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 质粒与菌株

具有 6 xHis-tagged proteins 的表达系统的 pET19b 质粒<sup>[5]</sup>购自捷瑞生化有限公司; 质粒纯化试剂盒购自 TaKaRa 公司; 沙门氏菌及大肠杆菌 DH5 $\alpha$  本实验室保存; *E.coli* BL21 购自上海坤肯生物化工有限公司。

#### 1.1.2 酶与试剂

T4 DNA Ligase、限制性内切酶 *NedI* 和 *BamHI* 购自 TaKaRa 公司; Ati-His Atibody、羊抗鼠 IgG-HRP 购自天根生化科技有限公司; X-gal、IPTG 购自 TaKaRa 公司。

#### 1.1.3 LB 液体培养基

NaCl 1 g, 蛋白胨 1 g, 酵母膏 0.5 g, 琼脂粉 2 g, 溶于蒸馏水调 pH 至 7.4 并定容至 100 mL。

## 1.2 方法

1.2.1 *Inti1* 基因的扩增与表达载体的构建<sup>[3,6,7]</sup>

采用 PCR 方法对沙门氏菌第一类整合子 *Inti1* 基因片段进行扩增, 扩增子与载体 pET19b 用 *Ned1* 和 *BamH1* 双酶切, 在 1%琼脂糖凝胶电泳分别回收相应条带后, 用 T4DNA 连接酶在 16 °C 过夜连接。并对 pET19b-*intil1* 阳性菌落进行 PCR 扩增验证。

1.2.2 整合酶的诱导表达

将重组质粒 pET19b-*intil1*, 导入感受态细胞 *E.coli* BL21 (DE3) 中, 把转化后细菌涂布于含氨苄青霉素 (100 µg/mL) 的 LB 平板上 37 °C 过夜培养。挑选阳性克隆, 在含氨苄青霉素 (50 µg/mL) 的 LB 培养液中 37 °C 培养过夜。测其 OD 值, 并稀释至 10<sup>8</sup> 个/mL<sup>[8,9]</sup>, 将菌液分装入 5 个试管中, 其中 1 管做阴性对照, 另 4 管加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 在 37 °C 振荡培养。10000 r/min, 4 °C, 2 min 离心去上清液后, 用 PBS 清洗两次。用 0.5 mL 20 mmol/L Tris-Cl (pH 7.5), 8 mol/L 尿素, 1 mol/L NaCl 混合液悬浮细胞, e100 W 功率超声 2 s, 间隔 2 s, 2 min 超声破碎细胞<sup>[8]</sup>。30 µL 样品与 30 µL 样品缓冲液 95 °C 处理 5 min<sup>[9]</sup>。取 12 µL 样液进行 SDS-PAGE。

1.2.3 Western 免疫印迹鉴定整合酶的表达

将凝胶同样大小的膜和滤纸浸入转移缓冲液中 15 min, 将电泳完毕的凝胶做上记号, 剥离至盛有转移缓冲液的皿中平衡 15 min, 洗去胶上的 SDS 等离子, 装好整体夹入转移盘中, 置转移盘于转移槽缓冲液中, 胶侧置负极膜侧置正极<sup>[10]</sup>。通电 (60 V) 转移 2 h。转移完后凝胶进行蛋白染色以确定蛋白转移情况, 膜用 1 倍的立春红染色 5 min。将吸印蛋白的膜面置上, 在封闭液中室温缓慢摇动 1 h, 将膜转移到一抗液体中, 过夜反应。用 PBS-0.05%吐温 20 洗涤膜 3 次, 每次 10 min, 将膜转移到二抗液体中, 室温缓慢摇动 1 h, 洗去二抗。将膜浸入显色液中, 室温下摇动 10~20 min 直至显色, 充分显色后立即浆膜转至水中, 终止显色反应, 充分洗涤显色液, 以免背景过深, 膜空气干燥, 封入塑料袋中避光保存。

2 结果

2.1 *Inti1* 基因的扩增与 PET19b-*IntI1* 载体的构建

2.1.1 *Inti1* 全基因片段的 PCR 扩增

对 *Inti1* 基因片段进行 PCR 扩增, 结果见图 1。从图 1 可知, 1000 bp 左右出现了亮带, 这说明 *Inti1* 基因片段已被扩增。

2.1.2 pET19b 质粒与 *Inti1* 片断的连接

将按 1.2.1 方法操作已连接上 *Inti1* 片段的 pET19b

质粒, 转入感受态细胞进行培养。挑取阳性菌落接种到 LB 液体培养基中, 培养, 提质粒。并对质粒进行 PCR 扩增, 如图 2。图 2 表明有些 pET19b 已经连接上了 *Inti1* 片断。

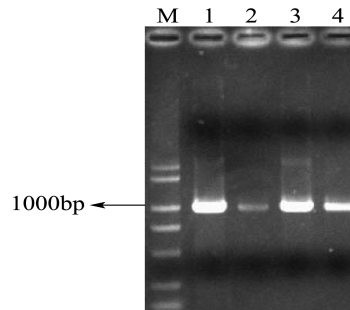


FIG. PCR amplification of *intil* DNA

Lanes 1 and 2 DNA fragments were amplified with primers *intil-puc18* up and *intil-puc18* down. Lanes 3 and 4 DNA fragments were amplified with primers *intil-pet19b* up and *intil-pet19b* down.

图 1 *intil* DNA 的 PCR 扩展

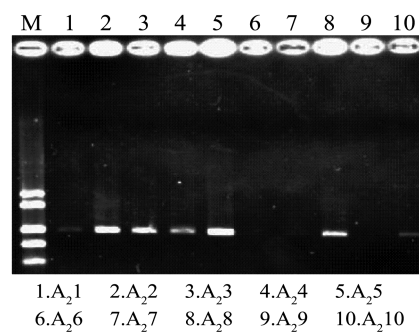


图 2 pET19b 质粒与 *Inti1* 片断的连接示意图

2.2 整合酶基因在 *E.coli* BL21 中的诱导表达

培养已含有重组质粒的 *E.coli* BL21 细菌, 加入 1 mmol/L 的 IPTG 并在 37 °C 分别诱导 2 h、3 h、4 h、5 h, 用 SDS-PAGE 分析, 结果如图 3 所示。

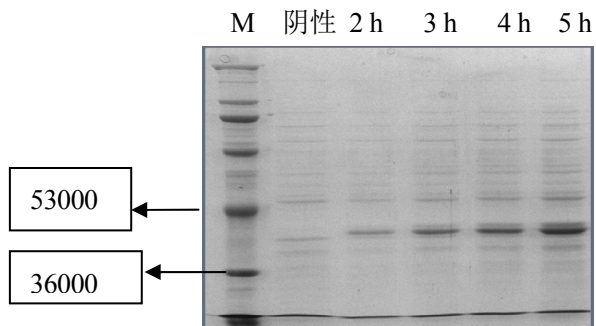


图 3 整合酶基因在 *E. coli* BL21 中的诱导表达电泳图

图 3 显示在相对分子质量 38000 处有四个明显的蛋白电泳条带, 与预期的整合酶大小一致。未诱导的 *E.coli* BL21 则无表达条带。此结果表明我们构建的 pET19b-*IntI1* 载体能得到有效的表达。

2.3 Western Blot 鉴定结果

因为整合酶上带有 6×His Tagged Protein, 所以为

了进一步确证PET19b-*IntI1*质粒在大肠杆菌内获得表达,以Ati-His Atibody为一抗,羊抗鼠IgG-HRP为二抗,对转印了重组菌诱导表达产物的硝酸纤维素膜进行免疫印迹反应(Western Blotting),结果如图4所示。

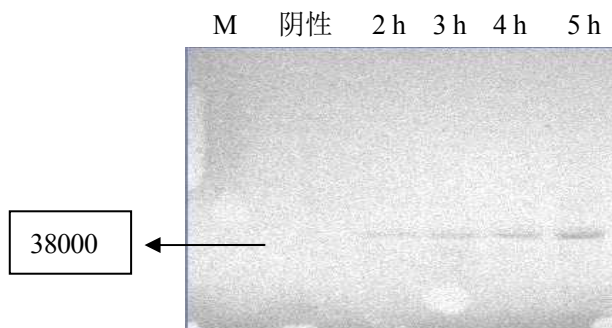


图4 Western Blot 鉴定结果

从图4可见,在Marker的相对分子质量约为38000的位置均出现四条明显的阳性带,表明*IntI1*基因在大肠杆菌BL21(DE3)内成功获得表达。

### 3 讨论

在畜牧养殖业中,为防治疾病感染及促进动物生长,大量的抗生素被应用于饲料中,由于剂量不足及残留造成了大量耐药菌株的出现和传播。细菌的耐药性可通过食物链转移到人群。严重地威胁着人类身体健康,细菌耐药问题日益成为人们关注的焦点。

整合子是一种基因单位,包括位点特异性重组功能的基因决定簇,在整合酶的作用下能捕获外来耐药基因。整合于整合子上的基因盒可借助整合子的启动子而得以表达。由于整合酶的催化整合作用及基因盒的可动性,使得耐药基因在细菌的种内及种间传播,对食品安全及人类健康造成很大危害,因此,对整合酶及耐药基因盒的表达调控因子进行研究,寻找沉默其基因表达的方法对控制和解决整合子引起的耐药问题具有重大意义<sup>[11]</sup>。

本文从*IntI1*基因的扩增及PET19b-*IntI1*载体的构建成功地获得了整合酶的表达。并利用PET19b质粒上的6xHis系统鉴定了重组表达的整合酶。构建了整合酶在原核生物中的表达系统。寻找整合酶的表达抑制<sup>[12]</sup>,为食源性引起的细菌耐药问题的解决提供了依据。

### 参考文献

[1] Carolina Johansson, Masood Kamali-Moghaddam and Lars Sundstrom, Integron integrase binds to bulged hairpin DNA. *Nucleic Acids Research*. 2004(32):4033-4043  
 [2] Mei Elansary, Dr. Deshmukh Gopaul, Institut Pasteur. Expre-

ssion and Solubility Study of the Integrase and Integration Host Factor of a Microbacteriophage of Tuberculosis. *PennScience*.2003(21):14-18

- [3] François Drouin, Josiane Me'lancon and Paul H. Roy\*.The IntI-Like Tyrosine Recombinase of *Shewanella oneidensis* Is Active as an Integron Integrase. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*.2002(184):1811-1815  
 [4] Xinhui Li, Lei Shi\*, Weiqing Yang, Lin Li, Shinji Yamasaki. New Array of *aacA4-catB3-dfrA1* Gene Cassettes and a Noncoding Cassette from a Class-1-Integron-Positive Clinical Strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*.2006(50):2278-2279  
 [5] PET19b质粒说明书  
 [6] Gregory Le'on and Paul H. Roy\*.Excision and Integration of Cassettes by an Integron Integrase of *Nitrosomonas europaea*. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*. 2003(185): 2036-2041  
 [7] M. VICTORIA FRANCIA, JUAN C. ZABALA, FERNANDO DE LA CRUZ, AND JUAN M. GARCIA L-OBO\*.The IntI1 Integron Integrase Preferentially Binds Single-Stranded DNA of the *attC* Site. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*.1999(181): 6844-6849  
 [8] Alain Raynal,Annick Friedmann,Karine Tuphile,Michel Guérineau and Jean-Luc Pernodet.Characterization of the *attP* site of the integrative element pSAM2 from *Streptomyces ambofaciens*. *Microbiology*,2002(148):61-67  
 [9] Carolina Johansson, Jenny Samskog, Lars Sundstr, Henrik Wadensten, Lennart Bjksten and John Flensburg.Differential expression analysis of *Escherichia coli* proteins using a novel software for relative quantitation of LC-MS/MS data. *Proteomics* .2006(6):4475-4485  
 [10] Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell Instruction Manual  
 [11] Dun Yang, Frank Buchholz, Zhongdong Huang, Andrei Goga, Chih-Ying Chen, Frances M. Brodsky\*and J. Michael Bishop\*.Short RNA duplexes produced by hydrolysis with *Escherichia coli* RNase III mediate effective RNA interference in mammalian cells. Contributed by J. Michael Bishop. 2002(99):9942-9947  
 [12] Xiuyuan Hu, Sharlene Hipolito, Rebecca Lynn, Violet Abraham, Silvester Ramos and Flossie Wong-Staal.Relative gene-silencing efficiencies of small interfering RNAs targeting sense and antisense transcripts from the same genetic locus. *Nucleic Acids Research*. 2004( 32):4609-4617