

单核细胞增生李斯特菌 *ladR* 基因在两种原核表达载体中的克隆表达及纯化分析

陈月桃^{1,2}, 陈谋通¹, 吴清平¹, 张菊梅¹, 程健恒¹, 孙奇凡¹, 王涓²

(1. 广东省微生物研究所, 广东省科学院; 华南应用微生物国家重点实验室; 广东省菌种保藏与应用重点实验室; 广东省微生物应用新技术公共实验室, 广东广州, 510070) (2. 华南农业大学食品学院, 广东广州, 510642)

摘要: 利用特异性引物扩增 *ladR* 基因序列, 分别构建单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*) *ladR* 基因的两种原核表达载体, 即含有 6 个 His 标签的 pET-28a-*ladR* 表达载体和含有 GST 标签的 pGEX-4T-*ladR* 表达载体。通过诱导时间、温度和浓度优化两种表达载体的蛋白表达条件, 比较分析两种表达载体的 LadR 蛋白可溶性表达水平, 利用 Western-Blot 进行 LadR 蛋白表达验证。本研究成功构建了 pET-28a-*ladR* 和 pGEX-4T-*ladR* 表达载体, 在大肠杆菌 BL21 中分别表达出 His-LadR 和 GST-LadR 融合蛋白。通过凝血酶切除 GST 标签, 纯化后得到 LadR 蛋白。在最佳表达条件 IPTG 为 0.5 mmol/L, 22 °C 诱导过夜下, pGEX-4T-*ladR* 表达载体中 LadR 的表达量比 pET-28a-*ladR* (IPTG 为 1.0 mmol/L, 22 °C 诱导过夜) 中 His-LadR 蛋白的表达量高 4.48 倍。本研究结果表明, GST 标签有利于 *ladR* 基因的可溶性表达, 为后续的 LadR 蛋白的功能分析和转录调控机理研究奠定了良好基础。

关键词: 单增李斯特菌; LadR 蛋白; 原核表达; 蛋白纯化

文章编号: 1673-9078(2019)10-58-65

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.10.010

Expression and Purification of *ladR* Gene of *Listeria monocytogenes* in Two Prokaryotic Vectors

CHEN Yue-tao^{1,2}, CHEN Mou-tong¹, WU Qing-ping¹, ZHANG Ju-mei¹, CHENG Jian-heng¹, SUN Qi-fan¹, WANG Juan²

(1. Guangdong Institute of Microbiology Guangdong Academy of Sciences; State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China; Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application; Guangdong Open Laboratory of Applied Microbiology, Guangzhou 510070, China)

(2. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: The *ladR* genes was amplified using the specific primers, and then two prokaryotic expression vectors pET-28a-*ladR* (carried six His-tag) and pGEX-4T-*ladR* (carried a GST-tag) were constructed. The protein expression conditions of the two expression vectors were optimized, including induction time, temperature and concentration. The soluble expression levels of LadR protein in these two expression vectors were compared. The pET-28a-*ladR* and pGEX-4T-*ladR* expression vectors were successfully constructed and expressed the His-LadR and GST-LadR fusion proteins in *E. coli* BL21. The GST-LadR fusion protein was excised by thrombin and purified to obtain a LadR protein. Under the optimal expression conditions of 0.5 mmol/L isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG) and induction at 22 °C for 12 h, the expression level of LadR protein in pGEX-4T-*ladR* expression vector was 4.48-fold higher than that of His-LadR protein in pET-28a-*ladR* (IPTG of 1.0 mmol/L, and induction at 22 °C for 12 h). The results of this study indicated that the GST-tag was beneficial for the soluble expression of the *ladR* gene, which could provide a good foundation for functional analysis and transcriptional regulation mechanism of the LadR protein in *L. monocytogenes*.

Key words: *Listeria monocytogenes*; LadR protein; prokaryotic expression; protein purification

收稿日期: 2019-06-01

基金项目: 广东省基础与应用基础研究项目 (2017A030313173); 国家自然科学基金资助项目 (31701718); 广州市珠江科技新星专项资助项目 (201710010018); 广东省科学院创新驱动发展能力专项项目 (2017GDASCX-0201)

作者简介: 陈月桃 (1994-), 女, 在读研究生, 研究方向: 食品微生物安全

通讯作者: 吴清平 (1962-), 男, 博士, 研究员, 中国工程院院士, 研究方向: 食品微生物安全监测和控制

单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, 简称单增李斯特菌) 是一种在环境中较为常见革兰氏阳性菌兼性厌氧短杆菌, 可致人和动物产生败血症、脑膜炎及单核细胞增多症等李斯特菌病, 致死率高达 20%~30%, 被 WHO 列为四大重要的食源性致病菌之一^[1]。

单增李斯特菌可以耐受各种低冷、高热、干燥等食品加工环境, 与其能够在食品生产设备表面形成一种胶囊状的生物膜密切相关^[2], 其生物膜对过氧乙酸、季铵盐类和臭氧等传统消毒剂均具有一定的抵抗能力^[3,4], 导致其持续污染食品加工环境及食品, 给食品工业及公众健康带来严重的风险隐患^[5]。笔者前期利用 iTRAQ 定量蛋白组学研究单增李斯特菌 LuxS/AI-2 群体感应系统调控生物膜形成发现 *luxS* 缺失株 *LadR* 蛋白表达水平显著上调。单增李斯特菌 *LadR* 蛋白与霍乱弧菌 *AphA* 蛋白二级结构高度相似, 均属于 *PadR* 转录调控蛋白家族^[6]。霍乱弧菌 *QS* 自诱导物 *AIs* 依次结合受体蛋白可以提高主要转录调节子 *hapR* 的表达, 而 *HapR* 蛋白具有抑制 *vpsT* 和 *aphA* 基因表达的功能。*VpsT* 与 *c-di-GMP* 结合促进生物膜形成相关基因的表达, 对生物膜形成起着正调节作用, 而转录因子 *AphA* 不但诱导毒力基因表达, 而且抑制 *acgA* (含有 EAL 结构域) 和 *acgB* (含有 GGDEF 结构域) 基因的表达^[7,8], 可见霍乱弧菌中群体感应系统结合 *c-di-GMP* 信号途径调节生物膜形成和毒力因子表达。同时, 副溶血性弧菌 *AphA* 通过直接抑制 *qrr4*、*aphA* 和 *opaR* 的转录或间接抑制 *scrABC* 和 *scrG* 的表达从而参与副溶血性弧菌 *c-di-GMP* 合成及生物膜形成调控^[9,10]; 表明在革兰氏阴性菌中, *AphA* 蛋白是介导群体感应系统调控胞内 *c-di-GMP* 含量影响生物膜的关键因子。因此, 推断单增李斯特菌 *LadR* 蛋白可能与 *AphA* 具有相似功能, 通过调控胞内 *c-di-GMP* 水平影响生物膜的形成。除此之外, Huillet 等^[11]研究发现 *ladR* 基因 (编码 *LadR* 蛋白) 反向位于多重耐药外排泵 *mdrL* 基因的上游, 并猜测 *LadR* 调控蛋白可能与 *mdrL* 基因的启动子区域结合, 从而对 *MdrL* 的表达起负调控作用。徐雅梦等发现 *ladR* 基因缺失株中 *mdrL* 的转录水平提高了 51 倍, 同时 *ladR* 基因缺失株对苯扎氯铵 (benzalkonium chloride, BC) 的耐受性增强, 通过 EMSA 实验证实了 His-*LadR* 蛋白与 *mdrL* 的启动子区结合, 表明 *LadR* 蛋白可能通过对 *mdrL* 的负调控作用从而影响单增李斯特菌的 BC 耐受性^[12,13]。

LadR 蛋白以负调控 *mdrL* 表达的方式影响单增李斯特菌的 BC 耐受性, 但 *LadR* 蛋白调控的分子机理以及调控的潜在蛋白仍有待阐明, 因此通过构建表达载体表达和纯化 *LadR* 蛋白将有利于进一步探讨其潜在的分子机制和调控功能。本研究利用两种常用的质粒 pET-28a 和 pGEX-4T-1 构建 *ladR* 基因的原核表达载体, 优化两种表达载体的最佳诱导条件, 比较两种表达载体的可溶性表达水平, 并纯化出 His₆-*LadR* 蛋白和 *LadR* 蛋白, 旨在为 *LadR* 蛋白的分子调控机制的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞从北京博迈德基因技术有限公司购买, 大肠杆菌 DH 5 α 感受态细胞、798-1LM 菌株、携带质粒 pET-28a 和 pGEX-4T-1 的大肠杆菌 DH 5 α 均为本实验室保存。

1.1.2 主要的试剂和仪器

细菌 DNA 提取试剂盒、高纯质粒 DNA 微量提取试剂盒和凝胶 DNA 小量回收试剂盒购于广州美基生物科技有限公司; 限制性核酸内切酶 *EcoR* I、*Sal* I 和 *Nco* I 从大连 TAKARA 生物技术有限公司购买; T4 DNA Ligase 购买于美国 NEB 公司; SDS-PAGE 和 Western Blot 相关试剂均购买于广州睿日生物科技有限公司; 预染蛋白 Marker 购买于武汉博士德生物工程有限公司; Anti-His Mouse 和 Anti-Mouse IgG HRP 购买于北京全式金生物技术有限公司; 亲和层析柱 His TrapTM HP (5 mL)、GSTrapTM FF (5 mL) 以及凝血酶均购买于美国 GE healthcare 公司; 还原型谷胱甘肽、Tris-base 和咪唑均从广州诺德生化科技有限公司购买; 垂直电泳装置为美国 Bio-rad 公司; 超声波细胞破碎仪 (SONICS VC-505), 蛋白纯化仪 (GE/AKTA start), 全能型成像系统 (Bio-rad Chemidoc MP)。

1.2 目的基因的克隆

1.2.1 引物设计

利用 Primer premier 5 软件设计 *ladRF1/ladRR1* (酶切位点 *Nco* I、*EcoR* I) 和 *ladRF2/ladRR2* (酶切位点 *EcoR* I、*Sal* I) 两对引物如表 1 所示, 扩增的产物分别命名为 *ladR1* 和 *ladR2*, 分别克隆至 pET-28a 和 pGEX-4T-1 两种载体上。

表 1 表达载体构建引物

Table 1 Primers used to construct expression vectors

Primer	Sequence (5'-3')	Enzyme	Length/bp	Tm/°C
<i>ladRF1</i>	CATGCCATGGGCCATCATCATCATCATC ACATGATACCAAATGTCTTAGAATATACG	<i>Nco</i> I	531	58
<i>ladRR1</i>	CCGGAATTCTTATAGTATTTTATACATTTCCGCAC	<i>Eco</i> R I		
<i>ladRF2</i>	CCGGAATTCATGATACCAAATGTCTTAGAATATACG	<i>Eco</i> R I	531	58
<i>ladRR2</i>	ACGCGTCGACTTATAGTATTTTATACATTTCCGCAC	<i>Sal</i> I		

注：下划线为限制性酶切位点。

1.2.2 *ladR* 基因的扩增

以细菌 DNA 提取试剂盒提取 798-1 LM 的总 DNA 为模板扩增 *ladR* 基因，PCR 体系为 50 μ L，各做两管；扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 3 min，94 $^{\circ}$ C 50 s，58 $^{\circ}$ C 50 s，72 $^{\circ}$ C 1 min，35 cycles；72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳和凝胶 DNA 小量回收试剂盒回收。

1.3 *ladR* 基因原核表达载体的构建

利用高纯质粒 DNA 微量提取试剂盒提取质粒 pET-28a 和 pGEX-4T-1，与目的基因 *ladR1* 和 *ladR2* 同时进行双酶切，T4 DNA 连接酶连接后转化至大肠杆菌 DH 5 α 感受态细胞中，分别用卡那霉素和氨苄青霉素进行筛选，从而得到 pET-28a-*ladR* 和 pGEX-4T-*ladR* 重组载体，通过双酶切进行验证，并送至赛默飞公司测序。将测序成功的质粒重组载体再转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 中，阳性克隆子于 -20 $^{\circ}$ C 保存至后续实验。

1.4 pET-28a-*ladR* 和 pGEX-4T-*ladR* 表达载体

的蛋白表达条件优化

活化 pET-28a-*ladR* 和 pGEX-4T-*ladR* 表达载体的 BL21 菌液，以 5% 接种量分别接种于含有卡那霉素（终浓度 50 μ g/mL）和氨苄青霉素（终浓度 100 μ g/mL）的 LB 培养基中，37 $^{\circ}$ C 摇床培养至菌液 OD₆₀₀=0.5~0.8。通过控制单一变量的方法，确定诱导的浓度、时间和温度。（1）诱导浓度确定：加入 IPTG 至终浓度分别为 0.1 mmol/L、0.5 mmol/L、1.0 mmol/L 和 1.5 mmol/L，30 $^{\circ}$ C 摇床 200 r/min 培养 8 h。取诱导后的菌液 3 mL，4 $^{\circ}$ C 8000 r/min 离心 15 min，用 600 μ L PBS 重悬，同时加入 1% 的蛋白酶抑制剂，在冰水上超声 5 s 停 5 s，功率 36%，工作时间 5 min。4 $^{\circ}$ C，12000 r/min 离心 15 min，吸出上清至新的离心管，菌体用同体积 PBS 重悬，分别加入 6 $\times$ protein loading buffer 至终浓度为 1 $\times$ ，沸水浴 10 min。各取 10 μ L 样

品进行 SDS-PAGE 分析（分离胶 12%，浓缩胶 5%），确定最佳诱导的 IPTG 浓度。（2）诱导时间确定：加入（1）确定的最佳 IPTG 的浓度，20 $^{\circ}$ C 分别诱导 6 h、8 h、10 h、过夜，其余步骤同上。（3）诱导温度的确定：根据（1）和（2）确定的 IPTG 浓度和诱导时间，设置 16 $^{\circ}$ C、20 $^{\circ}$ C、26 $^{\circ}$ C 和 30 $^{\circ}$ C 四个不同温度进行诱导，其余步骤同上。从而确定诱导 pET-28a-*ladR* 和 pGEX-4T-*ladR* 载体表达的最佳诱导浓度、时间和温度。

1.5 融合蛋白纯化条件优化

1.5.1 His₆-LadR 融合蛋白纯化条件的优化

以 5% 的接种量扩大培养菌液 50 mL，按照 1.4 确定的 pET-28a-*ladR* 表达载体的最佳诱导条件进行诱导，离心后的菌体用 8 mL Tris（20 mmol/L）和 NaCl（150 mmol/L），PH=8.0 混合溶液重悬，加入 1% 的蛋白酶抑制剂，超声离心后的上清用 0.22 μ m 的滤头过滤，通过亲和层析柱 His TrapTM HP 纯化目标蛋白。配置洗脱液 A 液：Tris（20 mmol/L）+NaCl（150 mmol/L），PH=7.4；B 液：Tris（20 mmol/L）+NaCl（150 mmol/L）+咪唑（500 mmol/L），pH=7.4。将待纯化的蛋白混合液以 0.5 mL/min 的低流速进样，用不同比例的 A、B 液进行洗脱，依次为 4% B、20% B、30% B、40% B、60% B 和 100% B，洗脱过程的流速为 1 mL/min，收集各个阶段的流穿液，通过 SDS-PAGE 确定目标蛋白的最佳洗脱条件，并用 Western Blot 检测目标蛋白。

1.5.2 GST-LadR 融合蛋白的纯化

同样培养 50 mL 的目标菌液，按照 1.4 确定的 pGEX-4T-*ladR* 表达载体的最佳诱导条件进行诱导，离心后的菌体用 8 mL PBS 重悬，随后的样品制备同 1.5.1，用亲和层析柱 GSTrapTM FF 纯化目标蛋白。配置洗脱液：还原型谷胱甘肽（10 mmol/L）+Tris（50 mmol/L），pH=8.0。蛋白粗提液以 0.5 mL/min 的流速进样，用至少 5 个柱体积的 PBS 洗脱未结合的蛋白，再用洗脱液以流速为 1 mL/min 洗脱目标蛋白，收集的

流穿液通过 SDS-PAGE 进行检测。确定目标蛋白后用超滤管浓缩, BCA 蛋白定量试剂盒进行定量。

根据 GST-LadR 融合蛋白的定量结果, 每 mg 蛋白加 10 U 凝血酶 37 °C 酶切 6 h 和过夜, 从而将目标蛋白 LadR 与 GST 标签分开, 通过 SDS-PAGE 观察酶切效果。根据最佳的酶切条件进行酶切, 再通过亲和层析柱 GSTrap™ FF 纯化, 酶切后的蛋白溶液在低流速 (0.3 mL/min) 进样的同时收集流穿液 (即目标蛋白), 上样结束后用少量 PBS 洗脱残留的目标蛋白, 再用洗脱液洗脱 GST 标签及酶切不完全的融合蛋白, 利用 SDS-PAGE 进行验证。

1.6 融合蛋白和 LadR 蛋白的定量

按照 1.5 优化的蛋白纯化条件纯化 His₆-LadR 和 GST-LadR 融合蛋白, 用超滤管进行换盐及浓缩, 通过 BCA 蛋白定量试剂盒测定目标蛋白浓度。GST-LadR 融合蛋白经过凝血酶酶切, 亲和层析柱 GSTrap™ FF 纯化后通过超滤管进行浓缩, 再用 BCA 蛋白定量试剂盒定量, 从而计算两种表达载体的蛋白可溶表达量。

2 结果与讨论

2.1 pET-28a-ladR 和 pGEX-4T-1-ladR 重组载体构建

体构建

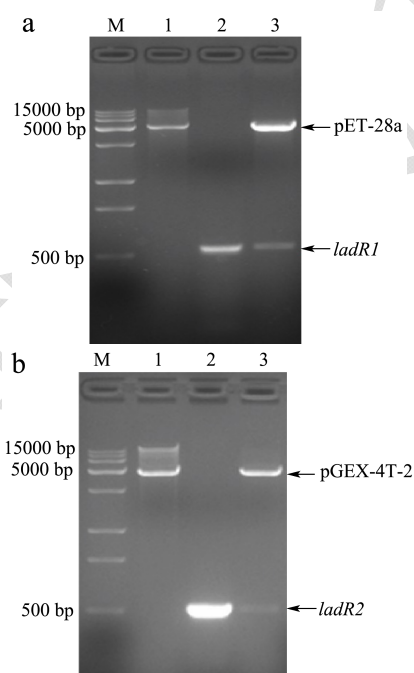


图1 重组载体 pET-28a-ladR 和 pGEX-4T-ladR 双酶切验证

Fig.1 Identification of recombinant vector pET-28a-ladR and pGEX-4T-ladR by double enzyme digestion

注: a: pET-28a-ladR 重组载体的双酶切验证; b: pGEX-4T-ladR 重组载体的双酶切验证; M: DL15k DNA Marker; 1: EcoRI 酶切空载体; 2: PCR 扩增 ladR 目的基因; 3: EcoRI、NcoI 和 EcoRI、SalI 双酶切重组载体。

以 798-1 LM 的 DNA 为模板, 扩增目的基因 ladR1 和 ladR2, 利用相应的快速核酸内切酶进行载体和目的基因的双酶切, 通过 T4 DNA Ligase 进行连接, 双酶切验证的结果如图 1 所示。质粒用 EcoRI 单酶切的条带约 5369 bp (pET-28a)、4969 bp (pGEX-4T-1), PCR 扩增出目的基因约 531 bp, 双酶切两种重组载体可见存在与质粒和目的基因大小一致的条带。

2.2 原核表达载体诱导条件的优化

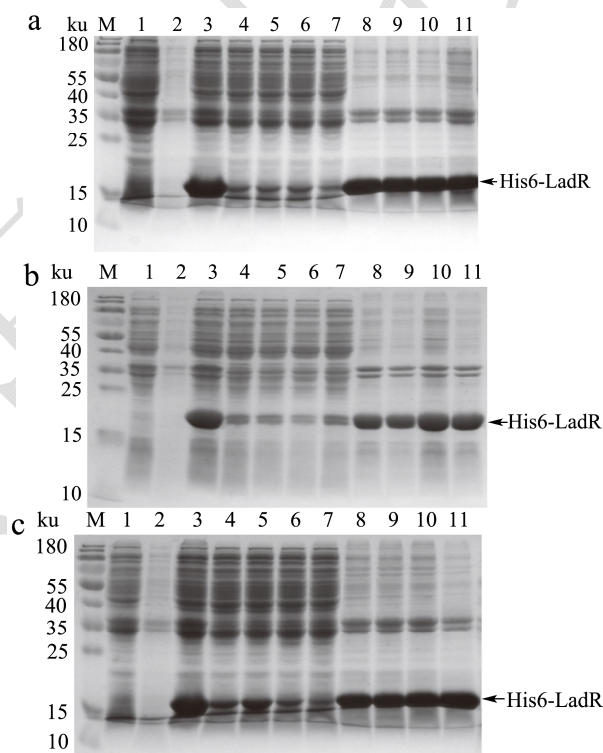


图2 pET-28a-ladR 表达载体诱导条件的优化

Fig.2 Optimization of induction conditions for pET-28a-ladR expression vector

注: a: 确定 IPTG 诱导浓度。30 °C 诱导 8 h, IPTG 浓度分别为 0.1 mmol/L、0.5 mmol/L、1.0 mmol/L 和 1.5 mmol/L; b: 确定诱导时间。IPTG 浓度 1.0 mmol/L, 20 °C 诱导, 诱导时间分别为 6 h、8 h、10 h、过夜; c: 确定诱导温度。IPTG 浓度 1.0 mmol/L, 过夜诱导, 诱导温度分别为 16 °C、20 °C、26 °C 和 30 °C。M: 预染蛋白 Marker; 1: 空载体; 2: 诱导前的全菌; 3: 诱导后的全菌; 4~7: 诱导后的上清; 8~11: 诱导后的菌体。

通过控制单一变量的方法, 比较 pET-28a-ladR 和 pGEX-4T-ladR 原核表达载体在不同 IPTG 浓度、诱导时间和诱导温度下上清的蛋白表达量 (可溶表达水

平),从而确定最佳的诱导条件。设定 IPTG 诱导浓度为 0.1 mmol/L、0.5 mmol/L、1.0 mmol/L 和 1.5 mmol/L, 30 °C 培养 8 h, 如图 2a 所示, IPTG 浓度为 1.0 mmol/L 时, 上清中目标蛋白的含量最高, 因此确定最佳诱导浓度为 1.0 mmol/L; 类似的, 在相同条件即 IPTG 浓度 1.0 mmol/L, 诱导温度 20 °C, 设定诱导时间为 6 h、8 h、10 h 和过夜, 最终确定最佳诱导时间为过夜诱导; 在相同条件即 IPTG 浓度 1.0 mM, 诱导过夜, 设定诱导温度为 16 °C、20 °C、26 °C 和 30 °C, 最终确定最佳诱导温度为 20 °C。因此得出 pET-28a-ladR 表达载体的最佳诱导条件为 IPTG 浓度 1.0 mmol/L, 20 °C 诱导过夜(图 2)。以同样的方法确定 pGEX-4T-1-ladR 表达载体的最佳诱导条件为 IPTG 浓度 0.5 mmol/L, 20 °C 诱导过夜(图 3)。

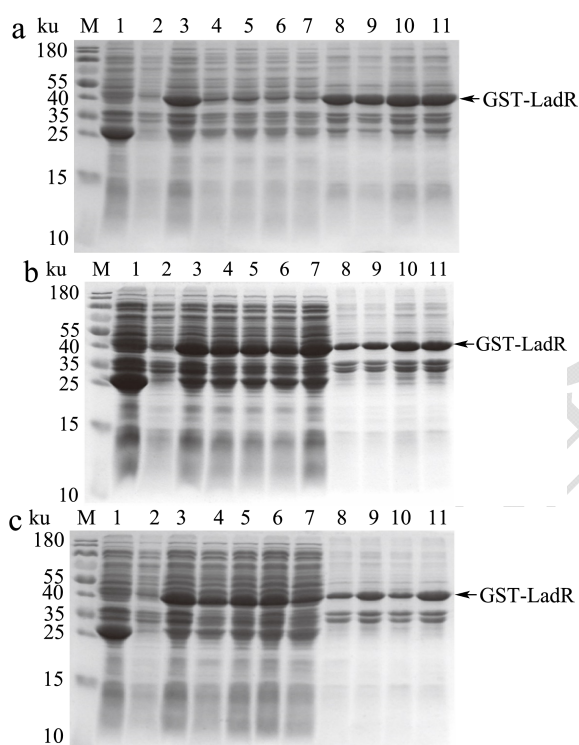


图3 pGEX-4T-*ladR* 表达载体诱导条件的优化

Fig.3 Optimization of induction conditions for pGEX-4T-*ladR* expression vector

注: a: 确定 IPTG 诱导浓度; 30 °C 诱导 8 h, IPTG 浓度分别为 0.1 mmol/L、0.5 mmol/L、1.0 mmol/L 和 1.5 mmol/L; b: 确定诱导时间。IPTG 浓度 0.5 mmol/L, 20 °C 诱导, 诱导时间分别为 6 h、8 h、10 h、过夜; c: 确定诱导温度。IPTG 浓度 0.5 mmol/L, 过夜诱导, 诱导温度分别为 16 °C、20 °C、26 °C 和 30 °C。M: 预染蛋白 Marker; 1: 空载体; 2: 诱导前的全菌; 3: 诱导后的全菌; 4~7: 诱导后的上清; 8~11: 诱导后的菌体。

2.3 His₆-LadR 融合蛋白纯化与分析

按照 2.2 的最佳诱导条件扩大培养 pET-28a-ladR 表达载体菌液 50 mL, 诱导 His₆-LadR 融合蛋白的表达, 通过亲和层析柱 His TrapTMHP 纯化可溶表达的蛋白, 用不同比例的 A、B 洗脱液梯度洗脱蛋白, 收集的流穿液进行 SDS-PAGE 分析(图 4a)。结果表明 4% B 液和 20% B 液洗脱的流穿液几乎没有目标蛋白, 30% B 液和 40% B 液洗脱时蛋白纯化仪的 UV 值保持不变, 表明蛋白洗脱量很低, 因此未接收流穿液。60% B 液洗脱的流穿液杂蛋白含量低, 可见微弱的目标蛋白条带。100% B 液洗脱的流穿液通过超滤管换盐浓缩后在 15~25 ku 之间可见清晰的目标条带, 且蛋白纯度高。将杂蛋白含量低的洗脱液混合进一步用超滤管浓缩, 通过 Western Blot 分析, 在目标蛋白位置有清晰的条带(图 4b)。因此确定 His₆-LadR 融合蛋白的最佳洗脱条件: (1) 用 40% B 液洗脱杂蛋白, (2) 用 60% B 液洗脱目标蛋白(流穿液再次过柱纯化), (3) 用 100% B 液洗脱目标蛋白。

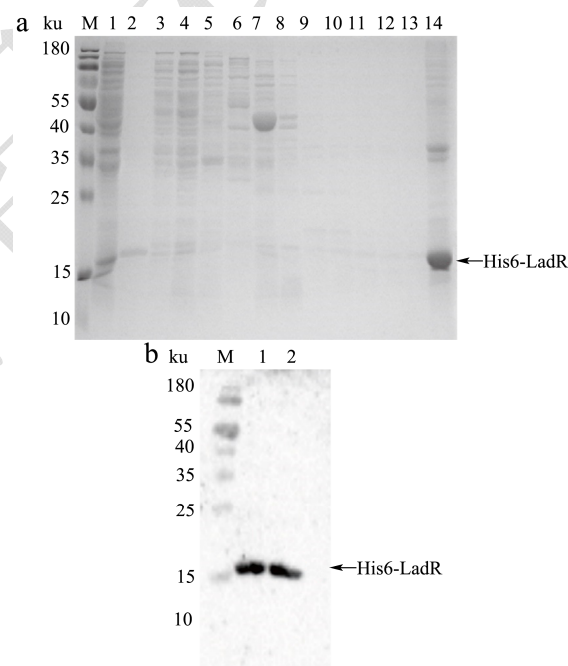


图4 pET-28a-*ladR* 表达的 His₆-LadR 融合蛋白的纯化和 Western Blot 分析

Fig.4 Purification and Western Blot analysis of His₆-LadR fusion protein expressed by pET-28a-ladR

注: M: 预染蛋白 Marker; 图 a、His₆-LadR 融合蛋白在亲和层析柱 His TrapTMHP 的洗脱过程; 1: 诱导后的上清(未纯化的样品); 2: 100% B 液洗脱的流穿液浓缩至 3 mL 的样品; 3~5: 上样过程的流穿液; 6: 4% B 液洗脱的流穿液; 7~8: 20% B 液洗脱的流穿液; 9~13: 60% B 液洗脱的流穿液; 14: 诱导后的菌体。图 b、纯化后蛋白的 Western Blot 分析, 1~2: 纯化后的融合蛋白 His₆-LadR。

2.4 GST-LadR 融合蛋白纯化

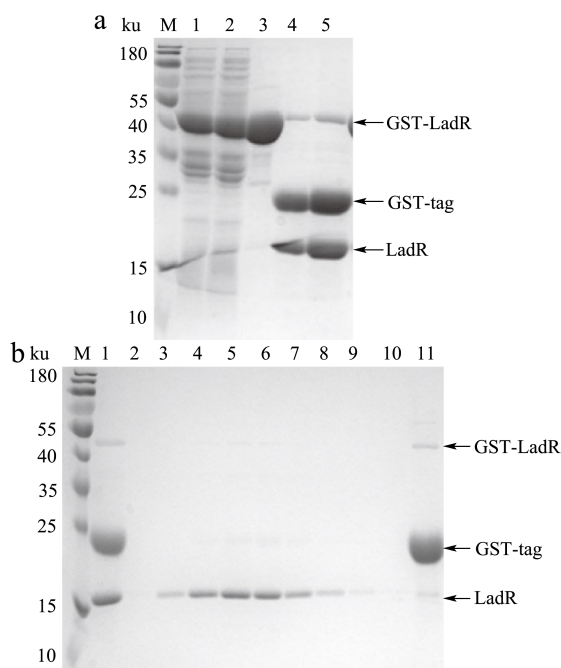


图5 pGEX-4T-*ladR*表达的 GST-LadR 融合蛋白的纯化和 GST 标签的去除

Fig.5 Purification and cleavage of GST-tag of GST-LadR fusion protein expressed by pGEX-4T-*ladR*

注: M: 预染蛋白 Marker; 图 a、pGEX-4T-*ladR* 表达的 GST-LadR 融合蛋白的纯化及凝血酶酶切 GST 标签, 1: 诱导后的上清; 2: 诱导后的菌体; 3: 纯化后的蛋白; 4-5: 凝血酶 37 °C 酶切 6 h 后稀释 5 倍和 3 倍的样品。图 b、GST 标签的去除和 LadR 蛋白纯化, 1: 凝血酶 37 °C 过夜酶切 GST 标签; 2~10: 进样过程中的流穿液 (即 LadR 蛋白); 11: 洗脱液。

培养 50 mL pGEX-4T-*ladR* 表达载体菌液, 根据最佳诱导条件诱导 GST-LadR 融合蛋白表达, 通过亲和层析柱 GSTrapTM FF 纯化, 纯化的蛋白加入凝血酶 37 °C 酶切 6 h 和过夜进行稀释检测, 最终确定 37 °C 酶切过夜效果最佳。用蛋白纯化仪对酶切后的样品进行纯化, 酶切不彻底的 GST-LadR 融合蛋白和 GST 标签将会结合在 GSTrapTM FF 柱子上, 因此进样过程的流穿液即为目标蛋白 LadR, 还原型谷胱甘肽-Tris 溶液洗脱的流穿液为 GST 标签和少量的 GST-LadR 融合蛋白, 通过 SDS-PAGE 进行分析。结果表明成功纯化出 GST-LadR 融合蛋白, 并去除了 GST 标签并纯化出 LadR 蛋白。如图 5 所示, 在 40~50 ku 有清晰的 GST-LadR 融合蛋白条带, 在约 26 ku 附近有清晰的 GST 标签条带, 同时在 15~25 ku 处可见目标蛋白 LadR 的条带, 约为 19 ku。

2.5 LadR 蛋白的定量分析

利用最佳的蛋白纯化条件纯化的目标蛋白通过超滤管浓缩后, BCA 蛋白定量试剂盒测定 His₆-LadR 融合蛋白的浓度约为 0.25 mg/mL, His₆-LadR 融合蛋白的总质量约为 0.15 mg; GST-LadR 融合蛋白的浓度约为 6.50 mg/mL, 融合蛋白总质量约为 3.90 mg; 用凝血酶切除 GST-LadR 融合蛋白的 GST 标签后, LadR 蛋白的浓度约为 0.56 mg/mL, LadR 蛋白的总质量约为 0.672 mg。可见 pGEX-4T-*ladR* 原核表达载体表达的 LadR 可溶性蛋白含量高, 约为 pET-28a-*ladR* 载体表达的 His₆-LadR 融合蛋白的 4.48 倍。通过 SDS-PAGE 分析可见在约为 19.7 ku 处有 His₆-LadR 融合蛋白的条带, 在约为 19 ku 处有目标蛋白 LadR 的条带 (图 6)。

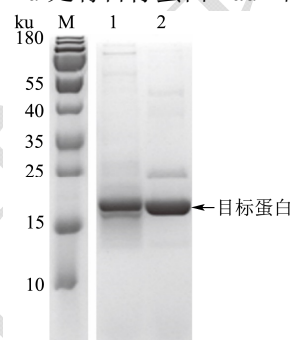


图6 His₆-LadR 融合蛋白和 LadR 蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig.6 SDS-PAGE analysis of His₆-LadR fusion protein and LadR protein

注: M: 预染蛋白 Marker; 1: His₆-LadR 融合蛋白; 2: LadR 蛋白。

3 结论

3.1 LadR 蛋白是由 *ladR* (*lmo1408*) 基因编码的 176 个氨基酸组成, 属于 PadR 转录负调控蛋白家族, 通过对相关厚壁菌门进行系统发育分析表明, LadR 在所有已测序的李斯特菌基因组中均具有保守性, 在 PadR 转录调控家族中是一个独立的类群。Huillet 等^[6]研究发现单增李斯特菌 LadR 蛋白负调控 *mdrL* 基因的表达, 进而影响菌株对 BC 的耐受性。同时还发现 *ladR* 基因参与 *prfA* 调控 LM 的毒力基因 *hly* 的表达, 但具体的调控机制还未可知^[6]。AphA 蛋白和 LadR 蛋白在二级结构上高度相似^[11], 已知 AphA 蛋白通过调控 c-di-GMP 的水平进而影响生物膜的形成^[9,10], 然而 LadR 蛋白的转录调控机理和调控的潜在蛋白尚未明晰。

3.2 目前大肠杆菌的原核表达系统是最广泛应用的蛋白表达系统, 原核表达的质粒载体种类较多, 根据不同的研究对象选择不一。pET 系列重组质粒载体在 IPTG 诱导表达条件下, 其表达产物易于在宿主菌 (*E.coli* BL21) 内聚集, 造成菌体体积增大, 生长受

抑制^[14]。杜昭弘等^[15]构建的 pET28a-PTD-Ag85B 重组质粒在 *E.coli* BL21 中高效表达,但主要以包涵体的形式存在。本研究构建的 pET-28a-*ladR* 重组载体在诱导表达后, His₆-LadR 融合蛋白也主要以包涵体的形式存在,超声破碎上清液的目标蛋白含量很低(图2),这与杜昭弘等^[15]的结果一致。利用 pET-28a 质粒构建的表达载体,其表达的蛋白主要以包涵体形成存在,大部分需要将包涵体内的蛋白溶出,并进行复性才能满足后续的研究,这不仅增加了实验的繁琐程度还可能对蛋白的活性造成影响。然而目前对于如何提高 pET-28a 质粒载体的可溶性表达还未可知,这可能与插入的外源基因相关。

3.3 pGEX-4T-1 载体带有 *tac* 启动子,可以高效可溶地表达插入的外源基因,其携带的 GST 标签不仅有助于蛋白的纯化还可以通过凝血酶切除,对蛋白的功能分析和转录调控的研究提供极大的便利^[16]。李春英等^[17]利用 pGEX-4T-1 质粒构建了 pGEX-4T-1/TRP-1 表达载体,对表达产物进行可溶性分析,发现可溶性表达的蛋白占到 95%。张树军等^[16]比较大肠杆菌 *ybfE* 的三种表达载体 pET16b、pET32a 和 pGEX-4T-1 的表达水平,结果表明 pGEX-4T-1-*ybfE* 表达载体的可溶性表达水平最高,纯化后的蛋白浓度为 0.724 mg/mL, pET16b-*ybfE* 次之,只有 0.086 mg/mL, pET32a-*ybfE* 表达的蛋白主要以包涵体存在。本研究构建的 pGEX-4T-*ladR* 表达载体的蛋白可溶性表达水平较高,纯化后的 LadR 蛋白(浓度为 0.56 mg/mL)比 pET-28a-*ladR* 表达的 His₆-LadR 融合蛋白高 4.48 倍,与张树军等^[16]的结果基本一致,体现了 pGEX-4T-1 载体高效可溶性表达的特点。

3.4 本研究成功构建了 LadR 蛋白的两种原核表达载体 pET-28a-*ladR* 和 pGEX-4T-*ladR*,优化两种表达载体的蛋白的可溶表达和纯化条件,获得 His₆-LadR 融合蛋白和 LadR 蛋白,为后续的 LadR 蛋白的功能分析和转录调控机理研究奠定了良好基础。

参考文献

- [1] Lyytikäinen O, Nakari U M, Lukinmaa S, et al. Surveillance of listeriosis in Finland during 1995-2004 [J]. Euro Surveillance, 2006, 11(6): 82-85
- [2] Ferreira V, Wiedmann M, Teixeira P, et al. *Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: epidemiology, strain characteristics, and implications for public health [J]. Journal of Food Protection, 2014, 77(1): 150-170
- [3] Nicholas R, Dunton P, Tatham A, et al. The effect of ozone and open air factor on surface-attached and biofilm environmental *Listeria monocytogenes* [J]. Journal of Applied Microbiology, 2013, 115(2): 555-564
- [4] Poimenidou S V, Chrysadaku M, Tzakoniati A, et al. Variability of *Listeria monocytogenes* strains in biofilm formation on stainless steel and polystyrene materials and resistance to peracetic acid and quaternary ammonium compounds [J]. International Journal of Food Microbiology, 2016, 237: 164-171
- [5] Barbosa J, Borges S, Camilo R, et al. Biofilm formation among clinical and food isolates of *Listeria monocytogenes* [J]. International Journal of Microbiology, 2013, 524-975
- [6] Huillet E, Larpin S, Pardon P, et al. Identification of a new locus in *Listeria monocytogenes* involved in cellobiose-dependent repression of *hly* expression [J]. FEMS Microbiology Letters, 1999, 174(2): 265-272
- [7] Kovacicova G, Skorupski K. Regulation of virulence gene expression in *Vibrio cholerae* by quorum sensing: HapR functions at the *aphA* promoter [J]. Molecular Microbiology, 2002, 46(4): 1135-1147
- [8] Krasteva P V, Fong J C, Shikuma N J, et al. *Vibrio cholerae* VpsT regulates matrix production and motility by directly sensing cyclic di-GMP [J]. Science, 2010, 327(5967): 866-868
- [9] 张义全. AphA 和 OpaR 对副溶血弧菌密度感应系统相关基因的转录调控机制研究 [D]. 北京:中国人民解放军军事医学科学院, 2014
- [10] 黄倩, 张义全, 胡小许, 等. AphA 蛋白促进副溶血弧菌 c-di-GMP 合成和生物膜形成 [J]. 微生物学报, 2014, 54(5): 525-531
- [11] HUANG Qian, ZHANG Yi-quan, HU Xiao-xu, et al. AphA is an activator of C-di-GMP synthesis and biofilm formation in *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2014, 54(5): 525-531
- [12] Huillet E, Velge P, Vallaey S T, et al. *LadR*, a new PadR-related transcriptional regulator from *Listeria monocytogenes*, negatively regulates the expression of the multidrug efflux pump MdrL [J]. FEMS Microbiology Letters, 2006, 254(1): 87-94
- [13] 徐雅梦, 姜晓冰, 于涛, 等. MdrL 外排泵在单核细胞增生李斯特菌对苯扎氯铵耐受中的作用 [J]. 微生物学通报, 2018,

- 45(6):1273-1282
- XU Ya-meng, JIANG Xiao-bing, YU Tao, et al. Role of efflux pump MdrL in tolerance to benzalkonium chloride in *Listeria monocytogenes* [J]. Microbiology China, 2018, 45(6): 1273-1282
- [13] 徐雅梦,姜晓冰,于涛.单核细胞增生李斯特菌 LadR 蛋白对外排泵 MdrL 的调控机制研究[J].生物技术通报,2018,34(12):1-6
- XU Ya-meng, JIANG Xiao-bing, YU Tao. Regulation of efflux pump MdrL by LadR in *Listeria monocytogenes* [J]. Biotechnology Bulletin, 2018, 34(12): 1-6
- [14] 陈燊,朱善良.PET 质粒表达对宿主菌的影响研究[J].江苏教育学院学报(自然科学版),2011,27(1):30-34,92
- CHEN Yu, ZHU Shan-liang. Impact of PET plasmid expression on the *E. coli* [J]. Journal of Jiangsu Institute of Education (Natural Sciences), 2011, 27(1): 30-34, 92
- [15] 杜昭弘,王婉,戴京京,等. pET28a-PTD-Ag85B 质粒构建及原核表达条件的优化[J].齐齐哈尔医学院学报,2015,36(14): 2029-2032
- DU Zhao-hong, WANG Wan, DAI Jing-jing, et al. Plasmid construction and optimization of prokaryotic expression for pET28a-PTD-Ag85B [J]. Journal of Qiqihar University of Medicine, 2015, 36(14): 2029-2032
- [16] 张树军,狄建军.大肠杆菌 *ybfE* 基因的三种原核质粒表达水平的对比及蛋白纯化[J].生物技术,2017,27(4):337-341,382
- ZHANG Shu-jun, DI Jian-jun. Comparison of expression levels of *E. coli ybfE* Gene in three kinds of prokaryotic plasmids and the protein purification [J]. Biotechnology, 2017, 27(04): 337-341, 382
- [17] 李春英,高天文,刘玉峰.酪氨酸酶相关蛋白-1 的基因克隆表达及纯化[J].中国皮肤性病杂志,2001,15(6):12-14
- LI Chun-ying, GAO Tian-wen, LIU Yu-feng. Gene cloning, expression and purification of human TRP-1 [J]. The Chinese Journal of Dermatovenereology, 2001, 15(6): 12-14

(上接第 43 页)

- [16] Gonzales G F, Valerio L G Jr. Medicinal plants from Peru: A review of plants as potential agents against cancer [J]. Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry, 2006, 6(5): 429-444
- [17] 王爱华,刘英梅,王丽丽,等.玛咖生物碱对人肝癌细胞 Bel-7402 和 H22 荷瘤小鼠的抑制作用[J].现代食品科技, 2018,34(11):52-56
- WANG Ai-hua, LIU Ying-mei, WANG Li-li, et al. Inhibition of Bel-7402 human hepatoma cells and H22 tumor-bearing mice by maca alkaloids [J]. Modern Food Science and Technology, 2018, 34(11): 52-56
- [18] CUI B, ZHENG BL, HE K, et al. Imidazole alkaloids from *Lepidium meyenii* [J]. J Nat Prod, 2003,66(8): 1101-1103
- [19] 陈晓东.人参皂苷 Rh2 对荷结肠癌 CT-26 小鼠抗肿瘤作用及免疫指标的影响[D].天津:天津医科大学,2010
- CHEN Xiao-dong. Effect of Ginsenoside Rh2 on tumor and immune indexes of colon cancer CT26 mice [D]. Tianjin: Tianjin Medical University, 2010
- [20] Dhupkar P, Gordon N. Interleukin-2: old and new approaches to enhance immune-therapeutic efficacy [J]. Advances in Experimental Medicine and Biology, 2017, 995: 33-51
- [21] Syedbasha M, Egli A. Interferon lambda: Modulating immunity in infectious diseases [J]. Frontiers in Immunology, 2017, 8: 119

(上接第 285 页)

- [17] 刘焕军,罗安伟,牛远洋,等.梨新鲜度与其挥发性成分的关系研究[J].北方园艺,2016,8:121-126
- LIU Huan-jun, LUO An-wei, LIU Yuan-yang, et al. Research on the relationship between freshness of the pear and its volatile components [J]. Northern Horticulture, 2016, 8: 121-126
- [18] 王轩.不同产地红富士苹果品质评价及加工适宜性研究[D].北京:中国农业科学院,2013
- WANG Xuan. Research on quality evaluation and processing suitability of fuji apple from different chinese origins [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences Dissertation, 2013
- [19] 贾惠娟.水果香气物质研究进展[J].福建果树,2007,2:31-34
- JIA Hui-juan. Research progress of aroma substances in fruits [J]. Southeast Horticulture, 2007, 2: 31-34