

炭疽杆菌噬菌体裂解酶基因在大肠杆菌中的表达及鉴定

Expression and Bioactive Characterization of Bacteriophage Lysin Gene of *Bacillus anthracis* in *Escherichia coli*

李晓静^{1,2}, 张 豪¹, 付学奇², 李彦英¹, 陈 璟¹, 李玉玲¹, 方宏清^{1*}, 陈惠鹏^{1*}
LI Xiao-Jing^{1,2}, ZHANG Hao¹, FU Xue-Qi², LI Yan-Ying¹, CHEN Jing¹, LI Yu-Ling¹,
FANG Hong-Qing^{1*} and CHEN Hui-Peng^{1*}

1. 军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071

2. 吉林大学生命科学学院, 吉林长春 130023

1. Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

2. College of Life Science, Jilin University, Changchun 130023, China

摘 要 利用 PCR 方法扩增炭疽杆菌噬菌体裂解酶(γ lysin)基因,克隆至大肠杆菌表达载体 pET22b 中,经菌落 PCR 筛选、序列测定和酶切鉴定证实表达载体 pET22b- γ lysin 构建成功,并在 *Escherichia coli* BL21(DE3)中获得了高表达。目的蛋白约占菌体总蛋白的 40%,5L 发酵罐中的产酶水平高达 15g/L。菌体经超声破碎,制备无细胞抽提液,Streamline SP 和 SP HP 柱层析以及 Sephacryl S-100 凝胶过滤三步纯化,得到分子量为 27kD 单一条带的目的蛋白,薄层扫描分析显示其纯度大于 95%。目的蛋白的收率为 19.1%,纯化倍数为 350。生物活性鉴定重组的 γ 噬菌体裂解酶具有特异性:可快速裂解炭疽杆菌,比活为 1400u/mg 左右;而对大肠杆菌、枯草杆菌及蜡样芽孢杆菌没有裂解活性。

关键词 噬菌体裂解酶,炭疽杆菌,大肠杆菌

中图分类号 R392.11 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)02-0216-04

Abstract The lysin gene of *Bacillus anthracis*-diagnosing bacteriophage, obtained by PCR amplification, was cloned into the *Escherichia coli* expression vector pET22b which has been cleaved by *Eco*R I and *Nde* I. The recombinant vector pET22b- γ lysin was verified to be correctly constructed by PCR, sequencing and enzyme digestion, and highly expressed in *E. coli* BL21(DE3), which accounted for about 40 percent of total protein in *E. coli* BL21(DE3), while in the 5L fermentor the expression level reached 15g/L. After expression, disruption and purification with three-step chromatography, Streamline SP, SP HP and Sephacryl S-100, the recombinant γ lysin was finally obtained with purity of higher than 95 percent as determined by gel scan. The final yield following SP HP was 19.1 percent, with a greater-than-350-fold increase in specific activity. The pure enzyme has been shown active to *Bacillus anthracis*, and not to *E. coli*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus*. Its specific activity was about 1400 u/mg.

Key words bacteriophage lysin, *Bacillus anthracis*, *Escherichia coli*

炭疽杆菌噬菌体裂解酶(γ lysin)由 233 个氨基酸残基组成,是 N-乙酰胞壁酸-L-丙氨酸酰胺酶,通

过破坏炭疽杆菌细胞壁中的 N-乙酰胞壁酸和 L-丙氨酸之间的交联而使其裂解^[1]。许多研究表明,噬

Received: September 20, 2004; Accepted: December 21, 2004.

* Corresponding author. Tel: 86-10-66948824; E-mail: fanghongqing@hotmail.com; ChenHP@nic.bmi.ac.cn

1,2 为共同第一作者单位。

菌体裂解酶具有以下特征:1. 噬菌体裂解酶是 dsDNA 噬菌体所特有的在病毒复制晚期合成的一类细胞壁水解酶。2. 多数噬菌体具有编码三种细胞壁水解酶的基因,这三种酶分别是溶菌酶(lysozymes)——水解氨基糖之间的糖苷键,酰胺酶(N-acetylmuramoyl-L-alanine amidases)——水解 N-乙酰胞壁酸和 L-丙氨酸之间的酰胺键和内肽酶(endopeptidases)——水解肽交联桥^[2]。3. 通过序列比较发现所有噬菌体裂解酶在结构上具有相似性,即含有两个结构域:比较保守的 N 端催化区和差异较大的 C 端特异性结合区。4. 裂解酶的高亲和性与种属特异的细胞壁糖基部分有关,后者常常是细菌存活的重要成分。这就是说,细菌难以产生对裂解酶的抗性,裂解酶作为新型抗菌药物具有一定的优势^[3]。

本研究以 γ 噬菌体基因组为模板扩增裂解酶基因,克隆至大肠杆菌表达载体 pET22b 中,经菌落 PCR、序列测定和酶切鉴定证实表达载体 pET22b- γ lysin 构建成功,并在 *E. coli* BL21(DE3) 中获得了高表达。我们还探索了高表达菌株的诱导表达条件及纯化工艺,发现目的蛋白的表达量在 9h 达到最高,占菌体总蛋白的 40% 左右,经三步层析纯化后,目的蛋白的纯度大于 95%。生物活性鉴定重组的 γ 噬菌体裂解酶具有特异性:可快速裂解炭疽杆菌,而对大肠杆菌、枯草杆菌及蜡样芽孢杆菌没有裂解活性。这些工作为下一步酶分子结构的改造研究及动物实验奠定了基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 质粒、菌种: *E. coli* DH5 α 、BL21(DE3) 为本研究室保存,质粒 pET22b 为本室保存。蜡样芽孢杆菌、枯草杆菌购自中国普通微生物菌种保藏管理中心,无毒炭疽杆菌由军事医学科学院微生物流行病学研究所惠赠,诊断用炭疽杆菌噬菌体购自兰州生物制品研究所。

1.1.2 酶、载体、引物和主要试剂: 限制酶、T4 DNA 连接酶为大连宝生物工程有限公司产品。质粒提取试剂盒为 Promega 公司产品。凝胶回收试剂盒为 Q-BIO gene 公司产品。引物由上海博亚公司合成。琼脂糖为 Promega 公司产品。低分子量标准蛋白为 Amersham Pharmacia 公司产品。其它所有化学试剂均为进口或国产分析纯试剂。

1.1.3 培养基: LB 培养基:酵母抽提物 5g/L,胰蛋白胨 10g/L,NaCl 5g/L,pH 7.0。

LB 固体培养基:酵母抽提物 5g/L,胰蛋白胨 10g/L,NaCl 5g/L,pH 7.0,琼脂 10g/L。

培养基 78:酵母抽提物 5g/L,胰蛋白胨 10g/L,NaCl 5g/L,葡萄糖 1g/L,维生素 B₁ 20mg/L。

1.2 方 法

1.2.1 γ 噬菌体裂解酶基因的克隆及表达载体的构建: 提取 γ 噬菌体基因组,以基因组为模板扩增 γ 噬菌体裂解酶基因。1% 琼脂糖电泳回收 702bp 大小片段,与 *Eco*R I 和 *Nde* I 双酶切的 pET-22b 载体连接。转化 *E. coli* DH5 α 后,筛选重组子,对两个重组子进行序列分析。

1.2.2 工程菌的构建及 γ lysin 的表达: 将质粒 pET22b- γ lysin 转化至 *E. coli* BL21(DE3) 中,该工程菌接入含有 100 μ g/mL 氨苄青霉素、0.5mmol/L 乳糖的 LB 液体培养基中,于 37 $^{\circ}$ C 培养 10h 诱导表达。取 100 μ L 离心收集菌体,室温 12000r/min,5min,菌体用纯水悬浮,加入 100 μ L 2 \times SDS 上样缓冲液,SDS-PAGE 分析。发酵培养在德国产 5L 罐中进行,采用 LB 液体培养基。

1.2.3 重组 γ lysin 的纯化: 按 1g 湿菌加入 10mL 破菌缓冲液(20mmol/L Tris,5mmol/L EDTA pH8.0)的比例悬浮菌体超声破碎,离心后上清稀释 1 倍后直接上样。先经过用 50mmol/L 乙酸铵,pH6.6 缓冲液预平衡的 Streamline SP 层析柱,用 0.6mol/L 的乙酸铵,pH6.6 洗脱目的蛋白,收集目的蛋白峰;再经过用 50mmol/L 乙酸铵,pH6.6 缓冲液预平衡的 SP HP 柱,用 0.6mol/L 的乙酸铵,pH6.6 洗脱目的蛋白,收集峰尖部分后经过用 10mmol/L 乙酸铵,pH6.6 预平衡的 Sephacryl S-100 凝胶柱,用 10mmol/L 乙酸铵(pH6.6)洗脱,收集目的蛋白峰;SDS-PAGE 薄层扫描分析蛋白纯度。

1.2.4 γ lysin 的活性检测: 取过夜培养的无毒炭疽杆菌离心收集菌体,1 \times PBS(pH6.6)稀释,等体积分装,测定其初始 OD₆₀₀,分别加入不同浓度的酶液(1.2mg/mL),观察其 OD₆₀₀ 的下降情况,检测对炭疽杆菌的裂解情况。酶活性单位定义为以浓度 1mg/mL 的蛋白为标准,按 1:1 在同体积的菌液中加入同体积不同稀释倍数的酶液,37 $^{\circ}$ C,摇床温育 20min 后,OD₆₀₀ 下降至原值一半时的酶液的稀释倍数。

2 结 果

2.1 pET22b- γ lysin 表达载体的构建

利用 PCR 方法以 γ 噬菌体基因组为模板,扩增

γ lysin 基因,引物设计参照文献[1],并经适当修改,两端加入 *Nde* I 和 *Eco*R I 酶切位点。 γ lysin 5'端引物:5'-GGAATTCATATCGAAATCCAA AAG AAATT-AGTTGATC-3'(内含 *Nde* I 切点); γ lysin 3'端引物:5'-CGGAATTCCTTATTTAACTTCATACCACCAACCTTT-3'(内含 *Eco*R I 切点),方框中的密码子为设计的同义突变密码子。分别用 *Nde* I 和 *Eco*R I 双酶切载体 pET22b 和 PCR 产物,回收所需片段,连接并转化大肠杆菌。经测序分析两个重组子,其基因序列与文献报道均相差一个碱基,但不改变氨基酸残基,从而获得表达质粒 pET22b- γ lysin。对测序正确的重组子的菌落进行 PCR 鉴定、酶切鉴定(图略)进一步表明重组表达载体构建成功。

2.2 重组 γ lysin 的表达与纯化

将阳性的 pET22b- γ lysin 转入 BL21(DE3)后,经乳糖诱导表达后,以全菌体进行 SDS-PAGE,考马斯亮蓝 R250 染色后,在相对分子量约 27kD 处有一明显的表达带,表明 pET22b- γ lysin/BL21(DE3)获得了表达。摇瓶培养 9~10h 菌密度最高,达到 13 *OD*₆₀₀(图 1);表达水平为 1000mg/L;并用于发酵培养,pET22b- γ lysin 工程菌在 5L 发酵罐中生长和表达曲线如图 2。由图可知,发酵 7~9h 时菌密度最高,约 75 *OD*₆₀₀,产酶水平高达 15000mg/L;诱导 9h 时目的蛋白表达量最高,约占菌体总蛋白的 40%。

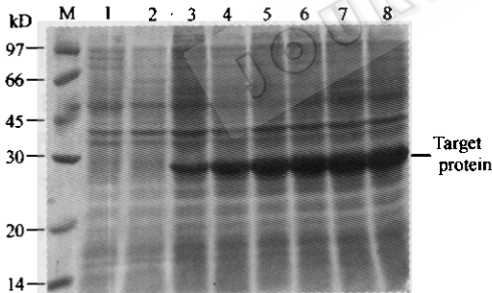


图 1 目的蛋白的 SDS-PAGE 分析图谱

Fig.1 SDS-PAGE analysis of pET22b- γ lysin

M:low molecular weight markers; 1~8:3~10h induced pET22b- γ lysin in *E. coli* BL21(DE3).

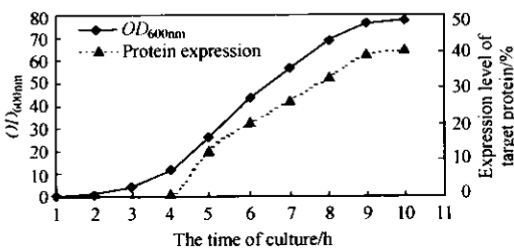


图 2 发酵罐工程菌生长曲线

Fig.2 The growth curve of the pET22b- γ lysin/BL21 in fermentor

2.3 重组 lysin 的分离纯化

菌体悬于破菌缓冲液(20mmol/L Tris, 5 mmol/L EDTA pH8.0)超声破碎,离心后目的产物位于上清中,说明重组 lysin 在 *E. coli* BL21(DE3)中实现了可溶性表达。上清用纯水稀释 1 倍,醋酸调 pH 值至 6.6,过 Streamline SP 柱,进行阶段洗脱;收集含重组 lysin 的组份,合并后过 SP HP 柱,进行阶段洗脱;收集含重组 lysin 的组份过 Sephacryl S-100 凝胶柱,10mmol/L 乙酸铵 (pH6.6)洗脱;收集峰尖部分经 SDS-PAGE 薄层扫描分析显示其纯度大于 95%。各纯化步骤的 SDS-PAGE 分析如图 3。纯化过程中目的蛋白的活性变化如表 1。

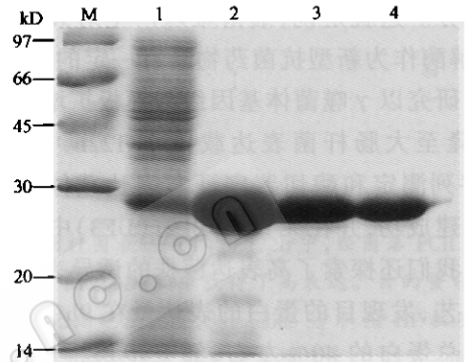


图 3 重组 lysin 的纯化

Fig.3 SDS-PAGE analysis of recombinant lysin purification
M:low molecular weight markers;1:supernatant after sonification;2: streamline SP; 3: SP HP; 4: Sephacryl S-100.

表 1 目的蛋白的活性变化

Table 1 Stepwise purification of the recombinant γ lysin from the supernatant of *E. coli* BL21(DE3)

Purification step	Total protein/mg	Total activity/u	Specific activity/(u/mg)	Yield /%	Times purified
Supernatant	50,000	2.0×10^5	4.0	100	1
Streamline SP	1184.9	9.55×10^4	80.6	47.8	20.2
SP HP	72.2	5.86×10^4	811.9	29.3	202.9
Sephacryl S-100	27.3	3.82×10^4	1400	19.1	350

2.4 重组 lysin 的活性分析

生物活性试验证明重组的 γ 噬菌体裂解酶能特异地快速裂解炭疽杆菌,随着酶终浓度的增加菌密度逐步下降,直至某一值不变。而对枯草杆菌、蜡样芽孢杆菌及大肠杆菌没有裂解作用,如表 2。酶活力单位定义为以浓度 1mg/mL 的蛋白为标准,按 1:1 在同体积的菌液中加入同体积不同稀释倍数的酶液,37 $^{\circ}$ C,摇床温育 20min 后, *OD*₆₀₀ 下降至原值一半时的酶液的稀释倍数 (nu/mL)。酶的比活在 1400

u/mg左右,如图4。

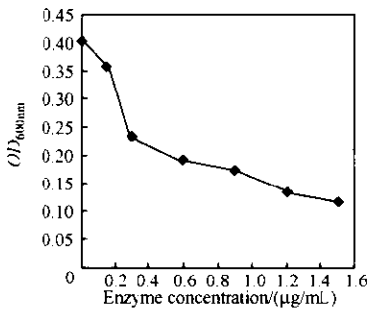


图4 炭疽杆菌噬菌体裂解酶的活性测定

Fig.4 Activity analysis of the lysin from the γ phage of *B. anthracis*

表2 γ 噬菌体裂解酶的特异性

Table 2 The γ lysin's specificity to *B. anthracis*

No. Bacteria	Strain	The starting	The ending	γ lysin activity	
		OD ₆₀₀	OD ₆₀₀		
1	<i>Bacillus cereus</i>	1.126	0.363	0.582	-
2	<i>Bacillus cereus</i>	1.1483	0.364	0.585	-
3	<i>Bacillus cereus</i>	1.173	0.405	0.620	-
4	<i>Bacillus subtilis</i>	1.1105	0.204	0.449	-
5	<i>Bacillus subtilis</i>	1.1655	0.267	0.509	-
6	<i>Bacillus subtilis</i>	1.1849	0.323	0.562	-
7	<i>Escherichia coli</i> (DH5a)		0.376	0.532	-
8	<i>Escherichia coli</i> (BL21)		0.254	0.403	-
9	<i>Bacillus anthracis</i>		0.405	0.089	+

3 讨论

噬菌体裂解酶用来杀灭细菌,已有几十年的历史,但并未在临床得到广泛的应用,根本原因在于其类似于“窄谱抗生素”,一种型别的噬菌体只能裂解它所寄生的那一型细菌。而裂解酶加入至对其敏感的组织中,在缺少噬菌体的敏感组织中引起其细胞壁裂解的现象称为“自外裂解(lysis from without)”^[6]。

2002年, Schuch^[1]等人首次证实了 γ 噬菌体裂解酶(命名为 PlyG)可快速裂解生长中的炭疽杆菌并可有效地杀死感染炭疽杆菌小鼠中的病原菌。

同时 NATO 已将 γ 噬菌体裂解酶用于洗消研究^[4]。炭疽杆菌的许多噬菌体均可裂解蜡样芽孢杆菌,至今发现的炭疽杆菌的噬菌体中只有 γ 噬菌体和 W 噬菌体对炭疽杆菌是特异性的,所以我们选择 γ 噬菌体裂解酶加以研究以确定其在体外对炭疽杆菌的裂解情况^[5]。

大肠杆菌工程菌是最早被用来生产重组蛋白药物的工程菌,其大规模高密度发酵工艺比较成熟。与其它表达系统相比,大肠杆菌表达系统生长周期短,培养方便,操作简便,成本低廉,易于进行工业化批量生产。本实验利用大肠杆菌工程菌 pET22b- γ lysin/BL21(DE3)实现了重组蛋白的高表达,而且易于纯化,并得到了较高的收率。体外活性实验证明,我们在大肠杆菌中表达的 γ lysin 对炭疽杆菌具有生物活性和特异性,为今后裂解酶疫区病原体洗消条件和病原体快速检测方法的探索打下了基础。

REFERENCES(参考文献)

[1] Raymond Schuch, Daniel Nelson, Vincent A. Fischetti A. Bacteriolytic agent that detects and kills *Bacillus anthracis*. *Nature*, 2002, **418**(8):884 - 889

[2] Lopez R, Garcia E, Garcia P, Garcia JL. The pneumococcal cell wall degrading enzymes: A modular design to create new lysins? *Microb Drug Resist*. 1997, **3**(2):199 - 211

[3] Loeffler JM, Nelson D, Fischetti VA. Rapid killing of *Streptococcus pneumoniae* with abacteriophage cell wall hydrolase. *Science*, 2001, **294**(12):2170 - 2172

[4] Geneva, NATO Advanced Research Workshop: "Preparedness against bioterrorism and reemerging infectious diseases-regional capabilities, needs and expectations in Central and Eastern Europe countries", held on 15 - 18 January 2003 in Warsaw, Poland. www.opbw.org/new_process/mx2003/buc_msp.2003_mx_wp33.pdf

[5] Michael H Walter. Efficacy and durability of *Bacillus anthracis* Bacteriophages used against spores. *Journal of Environmental Health*, 2003, **66**(8):9 - 17

[6] Nelson D, Loomis L, Fischetti VA. Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme. *Proc Natl Acad PNAS*, 2001, **98**(7): 4107 - 4112