

DOI:10.3969/j.issn.1003-5060.2023.01.020

丙二酸盐克罗诺杆菌 PspA 包涵体蛋白的表达、复性及纯化方法优化

蒋秀婷, 凌娜, 叶应旺

(合肥工业大学 食品与生物工程学院, 安徽 合肥 230601)

摘要:为研究丙二酸盐克罗诺杆菌(*Cronobacter malonaticus*)中噬菌体休克蛋白 A(phage shock protein A, PspA)的结构与功能,文章构建了 PspA 融合蛋白表达载体,但重组蛋白以包涵体形式大量表达;为获取较高浓度的可溶性蛋白进行后续探究,使用尿素裂解液使蛋白变性后,经多种方法复性 GST-PspA 包涵体蛋白,使其重新恢复生物学活性。研究表明,4 °C 低温条件下包涵体蛋白经尿素梯度稀释透析以控制复性速率,防止蛋白分子快速聚集,可以实现高效复性和纯化 GST-PspA 融合蛋白。为进一步探索 Psp 系统中各蛋白的功能及相互作用的研究提供一定的参考。

关键词:丙二酸盐克罗诺杆菌;噬菌体休克蛋白(Psp)系统;载体构建;包涵体;蛋白复性

中图分类号:Q936 **文献标志码:**A **文章编号:**1003-5060(2023)01-0131-05

Optimization for expression, renaturation and purification of PspA inclusion body protein of *Cronobacter malonaticus*

JIANG Xiuting, LING Na, YE Yingwang

(School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230601, China)

Abstract: To investigate the structure and function of phage shock protein A(PspA) of *Cronobacter malonaticus*, prokaryotic expression vector carrying PspA was constructed and the protein was expressed in large quantities in the form of inclusion bodies. In order to obtain a high concentration of soluble protein, the urea lysate was used to denature the protein and then the GST-PspA inclusion body protein was renatured to regain its biological activity. The results showed that the dialysis of inclusion body protein by urea gradient dilution at low temperature of 4 °C to control the rate of renaturation and prevent the rapid aggregation of protein molecules could efficiently renature and purify GST-PspA fusion protein. The results can provide reference for further exploration of the functions and interactions of the proteins in the Psp system.

Key words: *Cronobacter malonaticus*; phage shock protein(Psp) system; vector construction; inclusion body; protein renaturation

0 引 言

丙二酸盐克罗诺杆菌(*Cronobacter malonaticus*)是一种常存于动物体及人体肠道内的食源性致病菌,隶属于克罗诺杆菌属(*Cronobacter*。

sp) [1], 对干燥、热、酸、碱及抗生素等极端条件具有一定的耐受性 [2]。婴幼儿配方奶粉(powdered infant formula, PIF)是克罗诺杆菌的主要传播媒介,研究表明在长达 2.5 a 的干燥过程中,接入奶粉中的 27 株肠杆菌只有克罗诺杆菌可被重新复

收稿日期:2021-07-19;修回日期:2021-09-13

基金项目:国家重点研发计划资助项目(2017YFC1601202);国家自然科学基金资助项目(31671951;31972175)

作者简介:蒋秀婷(1996—),女,安徽滁州人,合肥工业大学硕士生;

叶应旺(1977—),男,安徽安庆人,博士,合肥工业大学教授,博士生导师,通信作者,E-mail:yeyw04@mails.ucas.ac.cn.

苏^[3],而食用了克罗诺杆菌的污染奶粉的婴幼儿极易患脑膜炎、败血症或坏死性小肠结肠炎等疾病^[4],致死率最高达 80%^[5]。

热应激、干燥渗透失衡、乙醇、跨膜蛋白缺陷以及过量产生某种膜蛋白(如分泌素)等环境胁迫会导致细胞质膜完整性受损^[6],而噬菌体休克蛋白(phage shock protein, Psp)系统则是一种存在于革兰氏阴性菌的胞外应激反应,能够防止压力条件下质子动力(proton motive force, PMF)的消散,维持细胞存活以及细胞质膜的完整性^[7]。PspA 是一种外周细胞膜蛋白,有研究称其可通过直接的物理作用在细胞膜上形成 PspA-PspF 复合物^[8],抑制 PspF 的 ATP 酶活性和 *psp* 基因的转录来实现负调控^[9]。当细胞膜受到刺激时, PspB-PspC 复合物检测到诱导触发因子^[10],导致 PspA 将 PspF 从细胞膜释放到细胞质中,激活 Psp 系统的转录以缓解环境胁迫下对细胞造成的损害^[11]。

目前,国内外对 PspA 蛋白的研究大多集中于大肠杆菌^[12]、霍乱弧菌^[13]等革兰氏阴性菌中,而在丙二酸盐克罗诺杆菌中该蛋白的结构功能、作用机理及蛋白互作情况仍处于起步阶段。本课题组前期研究发现 PspA 蛋白与丙二酸盐克罗诺杆菌耐受干燥应激有关,因而本研究采用基因工程的方法构建了 PspA 大肠杆菌表达载体,并探讨了 PspA 蛋白包涵体胞外复性、纯化的方法,为研究 PspA 蛋白在丙二酸盐克罗诺杆菌环境胁迫下的调控机制提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 质粒与菌株

表达载体 pGEX-4T-1、丙二酸盐克罗诺杆菌(*Cronobacter malonaticus*)保藏于广东省微生物研究所;大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*) DH5a、*E. coli* BL21 菌株购于生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.1.2 酶与试剂

高保真 DNA 聚合酶(Taq DNA 聚合酶)购于 Takara 公司;T4 连接酶、BamH I、Sal I 限制性内切酶均购于 New England Biolabs 公司;LB 肉汤培养基、LB 琼脂培养基、氨苄青霉素(ampicillin, Amp)、磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)、二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)、Mag-Beads GST 融合蛋白纯化磁珠、细菌基因组

DNA 抽提试剂盒、DNA 胶回收试剂盒、质粒 DNA 小量抽提试剂盒、GeLRed 核酸染料、DL2000/1 kbp DNA Marker、低分子量预染型蛋白 Marker、Tris-HCl 缓冲液、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside, IPTG)、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)、BCA 法微量蛋白质浓度测定试剂盒、还原型谷胱甘肽(reduced glutathione, GSH)、氧化型谷胱甘肽(glutathione oxidized, GSSG)、乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)、精氨酸(L-Arginine, L-Arg)、苯甲基磺酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF)均购于生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.1.3 仪器与设备

聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增仪、BIO-RAD 电泳仪(伯乐生命医学产品有限公司)、温金属浴(北京天根生化科技有限公司)、电热恒温培养箱(上海博迅医疗生物仪器股份有限公司)、恒温培养振荡器(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司)、超低温冰箱(惠而浦(中国)股份有限公司)、高速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 目的基因的扩增

以阪崎克罗诺杆菌基因组 DNA 为模板,根据 GenBank 中已存在的 *pspA* 基因 cDNA、基因组序列和原核表达载体 pGEX-4T-1 质粒图谱设计两端分别含有 BamH I 和 Sal I 酶切位点的引物,其序列见表 1 所列。表 1 中,下划线为酶切位点。

表 1 引物序列

引物	序列	酶切位点
pGEX-pspA-F	<u>CGGGATCC</u> atgggtatttttctcgttt gccgac	BamH I
pGEX-pspA-R	GGGGTCGAC <u>t</u> tattcgccgtcgctg	Sal I

PCR 反应体系为 50 μ L,分别为 Taq DNA 聚合酶 25 μ L,上、下游引物各 1 μ L,模板 DNA 1 μ L,灭菌蒸馏水 22 μ L,低速离心混匀后放至 PCR 仪中,95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,95 $^{\circ}$ C 30 s,58 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 2 min,共 30 个循环,72 $^{\circ}$ C 再延伸 5 min,最后 12 $^{\circ}$ C 储存。PCR 产物经 1.8% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,切下符合预期大小的目的片段,使用 DNA 胶回收试剂盒纯化。

1.2.2 重组质粒表达载体的构建与鉴定

分别将所获得的 *pspA* 基因目的片段与 pGEX-4T-1 载体通过限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Sal* I 进行双酶切,37 °C 反应 30 min,经 1.8% 琼脂糖凝胶电泳鉴定并回收纯化基因片段与载体。两者通过 T4 连接酶在 25 °C 下混合 4 h,获得重组表达载体 pGEX-4T-1-PspA。连接产物转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态菌,转化产物涂布于含 Amp (最终质量浓度为 0.1 g/L) 的 LB 琼脂培养基中,30 °C 过夜培养。在生长菌落中挑取数个单克隆菌落进行鉴定,将获得符合预期条带大小的菌落接种至含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中扩大培养,提取质粒 DNA 送至擎科(南京)生物科技有限公司进行测序,经测序鉴定正确后将该重组质粒命名为 pGEX-4T-1-PspA 进行冻存,并转化至 *E. coli* BL21 感受态菌进行后续操作。

1.2.3 重组蛋白的诱导表达

将经鉴定的重组 BL21-*pspA* 菌株接种于含 Amp(最终质量浓度为 0.05 g/L) 的 LB 液体培养基中,37 °C 培养至对数中期时,加入 0.1 mol/L 的 IPTG 至终浓度为 1.0 mmol/L 进行诱导表达,4 h 后 4 000 r/min 离心培养液,弃上清。配制含 PBS 和 PMSF 的细菌蛋白裂解液重悬沉淀,并进行 15 min 超声破碎后,4 °C、12 000 r/min 离心 20 min,经变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 检测上清液和沉淀中目标蛋白表达情况。

1.2.4 包涵体的复性

包涵体沉淀使用含 8 mol/L 尿素的 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液中重悬并超声破碎,12 000 r/min 离心后取上清,采取以下 4 种方法进行复性。

(1) 方法 1。称取 3.1 g DTT 溶于 1 L 的 0.02 mol/L 的 PBS 缓冲液中,菌体湿重称重后按比例(1 : 15)加入新配制的复性液,4 °C 过夜,12 000 r/min 离心 20 min 取上清保存。

(2) 方法 2。配制含 2 mmol/L GSH 和 0.2 mmol/L GSSG 的 Tris-HCl 复性缓冲液,按比例(1 : 15)缓慢加入新配制的复性液,室温孵育 4~6 h 后,4 °C、12 000 r/min 离心 20 min 取上清保存。

(3) 方法 3。按相应浓度配制包涵体复性缓冲液:0.1 mol/L Tris-HCl、15% 甘油、1 mmol/L EDTA、1 mmol/L GSH、1 mmol/L GSSG、0.5 mol/L L-Arg、1% PMSF、pH 值 8.5。按比例(1 : 10)逐滴加入配制好的复性缓冲液,缓慢搅拌后注入透析袋中,密封放置于 PBS 中,4 °C 透

析 48 h,每隔 12 h 更换透析缓冲液。将透析袋包埋在蔗糖与聚乙二醇粉末中 1 h,对蛋白溶液进行浓缩,4 °C、12 000 r/min 离心 20 min 取上清保存。

(4) 方法 4。按相应浓度配制包涵体复性缓冲液:0.1 mol/L Tris-HCl、15% 甘油、0.1 mol/L NaCl、1 mmol/L GSH、1 mmol/L GSSG、0.5 mol/L L-Arg、1% PMSF、pH 值 8.5。按比例(1 : 10)逐滴加入配制好的复性缓冲液,装入透析袋中放置于 6 mol/L 尿素中 4 °C 透析 12 h,后按 6、4、3、2、1、0 mol/L 的尿素浓度更换透析缓冲液进行梯度透析。将透析袋包埋在蔗糖与聚乙二醇粉末中 1 h,对蛋白溶液进行浓缩。4 °C、12 000 r/min 离心 20 min 取上清保存。

1.2.5 融合蛋白的纯化

取所获得的蛋白上清液,使用 Mag-Beads GST 融合蛋白纯化磁珠进行纯化,洗脱样品经 BCA 试剂盒和 SDS-PAGE 鉴定纯化效率。采用超滤透析对目的蛋白进行浓缩,得到高浓度的 GST-PspA 融合蛋白。

2 结果与分析

2.1 目的基因扩增及表达载体构建与鉴定结果

目的基因 *pspA* 经琼脂糖凝胶电泳分析,结果如图 1 所示。

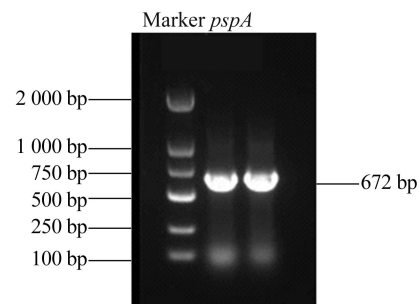
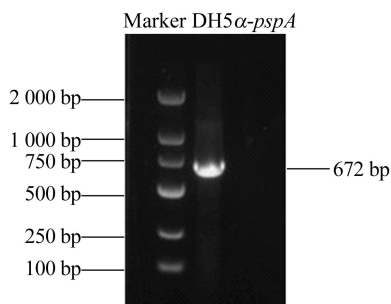


图 1 *pspA* 基因的克隆

由图 1 可知,1 000 bp 左右处有符合 *pspA* 基因 672 bp 大小的特异性条带,表明成功扩增出 *pspA* 基因目的片段。将 PCR 产物和 pGex-4T-1 质粒分别用 *Bam*H I 和 *Sal* I 限制性内切酶进行双酶切。凝胶回收双酶切产物连接转化 *E. coli* DH5 α 感受态菌后,挑取阳性克隆进行 DNA 测序分析,结果如图 2 所示。

由图 2 可知,酶切产物与 GenBank 数据库中 *pspA* 基因片段大小完全一致,且含有 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切位点,表明 pGex-4T-1-PspA 原核表达载体构建成功。

图 2 DH5 α - ψ spA 原核载体的构建分析

率最高,最终获得2.2 mg的高纯度 GST-PspA 融合蛋白。

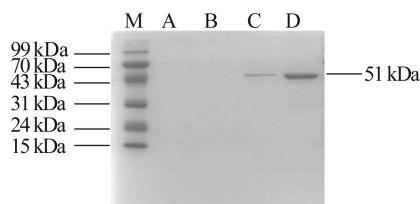


图 4 不同复性方法下重组 PspA 蛋白纯化情况

2.2 重组 BL21- ψ spA 菌株的诱导表达

前期扩增的 ψ spA 序列长度为 672 bp,共编码 223 个氨基酸,其蛋白分子量约为 25 kDa, GST 标签蛋白分子量 26 kDa,因此诱导表达的 GST-PspA 融合蛋白的分子量约为 51 kDa。将 pGex-4T-1- ψ spA 重组质粒转化大肠杆菌表达菌株 BL21,1.0 mmol/L 的 IPTG 诱导融合蛋白表达,以不添加 IPTG 的表达菌株作为阴性对照, SDS-PAGE 检测蛋白表达情况,结果如图 3 所示。图 3 中:M 为蛋白 Marker;1 为阴性对照;2 为蛋白上清液;3 为包涵体蛋白。由图 3 可知,当 IPTG 浓度为 1.0 mmol/L 时,泳道 2 中上清液目的蛋白有略微提高,但泳道 3 显示诱导后在 51 kDa 处有大量的目的融合蛋白,表明重组 BL21- ψ spA 菌株所表达的蛋白多为不可溶的无生物活性的包涵体。

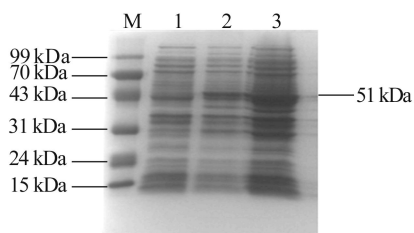


图 3 重组 PspA 蛋白 SDS-PAGE 分析

3 讨 论

细胞质膜保护细胞免受环境胁迫的影响,并赋予细胞结构的完整性。胞质外不同应激条件会破坏质膜平衡,从而导致跨膜电位的损失和 PMF 的耗散,而 Psp 系统则通过保护质膜的完整性来维持质子梯度和保护 PMF。Psp 系统的核心成分是外围质膜结合蛋白 PspA,负责 Psp 反应的负向调节和效应功能^[14],可与内膜结合形成高阶寡聚体效应复合物,修复质膜损伤并保护 PMF^[15]。

本研究通过克隆丙二酸盐克罗诺杆菌 ψ spA 基因全长序列,并成功诱导纯化该基因编码的 PspA 蛋白。实验结果显示,因大肠杆菌表达菌株 BL21 表达效率高,融合蛋白合成速度过快,蛋白间非特异性结合过多,未及时在细胞内进行折叠而聚集形成 PspA 包涵体蛋白^[16]。本实验将所获得的 PspA 包涵体蛋白溶解于高浓度的尿素缓冲液中,通过离子间的相互作用破坏包涵体蛋白间的氢键使之变性,增加蛋白的可溶性。继而缓慢去除变性剂,使目标蛋白从完全伸展状态恢复到正常的折叠结构。本研究中方法 1 和方法 2 为稀释复性法,向包涵体蛋白中直接加入不同配方的缓冲液,改进放置条件,经 SDS-PAGE 检测发现复性效率较低,其原因可能是蛋白溶液体积增加较大,变性剂稀释速度过快,导致可溶性蛋白的重折叠不易控制。方法 3 和方法 4 为透析法,透析袋中的蛋白样品与外透液进行离子交换直到除去大部分小分子物质。方法 4 通过逐步降低透析缓冲液中的尿素浓度来去除蛋白样品中的变性剂,并且在复性缓冲液体系中引入甘油增加溶液的黏度,减小分子碰撞形成聚合体的可能,添加还原性/氧化性谷胱甘肽来促进重组 PspA 蛋白形成正确的二硫键,而精氨酸则能够避免复性中重组 PspA 蛋白相互聚集,具有稳定蛋白质的作

2.3 包涵体蛋白的复性与纯化

经 4 ℃ 过夜梯度透析复性后,用 Mag-Beads GST 融合蛋白纯化磁珠纯化融合蛋白,经洗脱液多次洗脱,SDS-PAGE 检测蛋白纯化情况如图 4 所示。图 4 中:M 为蛋白 Marker;A 为方法 1;B 为方法 2;C 为方法 3;D 为方法 4。

由图 4 可知,51 kDa 处存在单一条带,且亮度最高,融合蛋白有效表达且成功纯化。通过 BCA 试剂盒检测可知,方法 1、方法 2 获得约 0.02 mg 的 GST-PspA 融合蛋白,方法 3 获得约 0.4 mg 的 GST-PspA 融合蛋白,而方法 4 复性效

用^[17]。通过 SDS-PAGE 检测分析 PspA 蛋白的复性纯化效率,结果显示复性方法 4 能够在一定程度上恢复重组蛋白的生物学活性,且效率最高。

克罗诺杆菌对所有年龄段人群都具有致病性,且危害大、致死率高^[18]。克罗诺杆菌作为婴幼儿配方奶粉的 A 类致病菌^[19],近年来引发多起食品安全事件而备受世界卫生组织、国家政府以及消费人群的高度关注。因此,本研究成功诱导了丙二酸盐克罗诺杆菌 PspA 蛋白,为后续从基因及蛋白水平方面探究该菌能够长期存活在干燥环境中的分子调控机制及蛋白互作网络提供理论基础,同时也对减少和避免易染食品的污染和污染后的防治具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] YAN Q Q, CONDELL O, POWER K, et al. Cronobacter species (formerly known as *Enterobacter sakazakii*) in powdered infant formula: a review of our current understanding of the biology of this bacterium[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2012, 113(1): 1-15.
- [2] OLIVER J D. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria[J]. *Fems Microbiology Reviews*, 2010, 34(4): 415-425.
- [3] BARRON J C, FORSYTHE S J. Dry stress and survival time of *Enterobacter sakazakii* and other Enterobacteriaceae in dehydrated powdered infant formula[J]. *Journal of Food Protection*, 2007, 70(9): 2111-2117.
- [4] TOWNSEND S M, HURRELL E, CAUBILLA-BARRON J, et al. Characterization of an extended-spectrum beta-lactamase *Enterobacter hormaechei* nosocomial outbreak, and other *Enterobacter hormaechei* misidentified as *Cronobacter (Enterobacter) sakazakii*[J]. *Microbiology-Sgm*, 2008, 154: 3659-3667.
- [5] ABBASIFAR R, KROPINSKI A M, SABOUR P M, et al. Efficiency of bacteriophage therapy against *Cronobacter sakazakii* in *Galleria mellonella* (greater wax moth) larvae [J]. *Archives of Virology*, 2014, 159(9): 2253-2261.
- [6] JOVANOVIĆ G, MEHTA P, MCDONALD C, et al. The N-Terminal amphipathic helices determine regulatory and effector functions of phage shock protein a (PspA) in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2014, 426(7): 1498-1511.
- [7] JOLY N, ENGL C, JOVANOVIĆ G, et al. Managing membrane stress: the phage shock protein (Psp) response, from molecular mechanisms to physiology[J]. *Fems Microbiology Reviews*, 2010, 34(5): 797-827.
- [8] ELDERKIN S, JONES S, SCHUMACHER J, et al. Mechanism of action of the *Escherichia coli* phage shock protein PspA in repression of the AAA family transcription factor PspF[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2002, 320(1): 23-37.
- [9] OSADNIK H, SCHOEPFEL M, HEIDRICH E, et al. PspF-binding domain PspA(1-144) and the PspA center dot F complex; new insights into the coiled-coil-dependent regulation of AAA plus proteins[J]. *Molecular Microbiology*, 2015, 98(4): 743-759.
- [10] MAXSON M E, DARWIN A J. PspB and PspC of *Yersinia enterocolitica* are dual function proteins: regulators and effectors of the phage-shock-protein response[J]. *Molecular Microbiology*, 2006, 59(5): 1610-1623.
- [11] JOVANOVIĆ G, MEHTA P, YING L, et al. Anionic lipids and the cytoskeletal proteins MreB and RodZ define the spatio-temporal distribution and function of membrane stress controller PspA in *Escherichia coli*[J]. *Microbiology-Sgm*, 2014, 160: 2374-2386.
- [12] JOVANOVIĆ G, LLOYD L J, STUMPF M P H, et al. Induction and function of the phage shock protein extracytoplasmic stress response in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(30): 21147-21161.
- [13] DEANGELIS C M, NAG D, WITHEY J H, et al. Characterization of the *Vibrio cholerae* phage shock protein response [J]. *Journal of Bacteriology*, 2019, 201(14): e00761.
- [14] YAMAGUCHI S, REID D A, ROTHENBERG E, et al. Changes in Psp protein binding partners, localization and behaviour upon activation of the *Yersinia enterocolitica* phage shock protein response[J]. *Molecular Microbiology*, 2013, 87(3): 656-671.
- [15] LENN T, GKEKAS C N, BERNARD L, et al. Measuring the stoichiometry of functional PspA complexes in living bacterial cells by single molecule photobleaching [J]. *Chemical Communications*, 2011, 47(1): 400-402.
- [16] 邝爱丽,陈圆圆,彭志峰. 包涵体的形成原因及其处理方法 [J]. *上海畜牧兽医通讯*, 2009(1): 62-63.
- [17] 余秀娟,赵丽艳,张晓光. 体外蛋白质复性方法及小分子添加剂在复性过程中的作用[J]. *河北北方学院学报(自然科学版)*, 2013, 29(2): 9-15.
- [18] CHANDRASEKARAN S, BURNHAM C A D, WARNER B B, et al. Carriage of *Cronobacter sakazakii* in the very preterm infant gut[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2018, 67(2): 269-274.
- [19] JOSEPH S, FORSYTHE S J. Insights into the emergent bacterial pathogen *Cronobacter* spp., generated by multilocus sequence typing and analysis[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2012, 3: 397.

(责任编辑 张 镗)