



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.2014.05.001

运用绿色荧光蛋白探讨肉葡萄球菌双精氨酸分泌途径

高 强¹, 许保银¹, 程逸冰¹, 王 林², 张朝正¹, 田萍萍¹

(1. 工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津市工业微生物重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457; 2. 天津科技大学计算机科学与信息工程学院, 天津 300222)

摘 要: 根据肉葡萄球菌(*Staphylococcus carnosus*) TM300 的基因组序列设计引物, 经 PCR 扩增得到其 *tufA* 基因的启动子 *Peftu* 片段与大肠杆菌-葡萄球菌穿梭载体 pBT2-Tat-GFP 连接, 构建了穿梭质粒 pBT2-ETG. 结果表明, 穿梭质粒 pBT2-ETG 成功地转入大肠杆菌与肉葡萄球菌宿主中稳定表达具有活性的绿色荧光蛋白 GFP, 并被转运到肉葡萄球菌宿主的细胞壁, 为进一步研究肉葡萄球菌双精氨酸(Tat)转运系统正确分泌其他外源蛋白奠定了实验基础.

关键词: 肉葡萄球菌; 绿色荧光蛋白(GFP); 双精氨酸转运途径; 启动子 *Peftu*; Tat 信号肽

中图分类号: Q933 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2014)05-0001-05

GFP Translocation of Twin-arginine Secretion Pathway in *Staphylococcus carnosus*

GAO Qiang¹, XU Baoyin¹, CHENG Yibing¹, WANG Lin², ZHANG Chaozhen¹, TIAN Pingping¹

(1. Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China; 2. College of Computer Science and Information Engineering, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300222, China)

Abstract: According to the genome sequence of *Staphylococcus carnosus* TM300 genome, a pair of primers was designed for PCR amplification of promoter *Peftu* of *tufA* gene. The PCR-amplified promoter *Peftu* fragment was cloned into plasmid pBT2-Tat-GFP and chemically transformed into *E. coli* host. A shuttle vector pBT2-ETG was thereby constructed and successfully transformed into *E. coli* and *S. carnosus* TM300 hosts, respectively. The experimental results reveal that GFP was expressed by the *E. coli*-*Staphylococcus* shuttle vector pBT2-ETG in both *E. coli* and *S. carnosus* hosts. The expressed GFP was translocated to the cell walls of *S. carnosus* host in fluorescent active form. Thereby, a preliminary experimental basis was laid for the further study of other exogenous protein secretion via twin-arginine translocation pathway in *S. carnosus*.

Key words: *Staphylococcus carnosus*; GFP; twin-arginine translocation pathway; promoter *Peftu*; Tat signal peptide

作为肉制品发酵行业中形成肉制品风味的关键菌种, 肉葡萄球菌(*Staphylococcus carnosus*)在欧洲等地被用作发酵肉产品起始培养物已经超过 60 年^[1]. 与其他葡萄球菌相比, 它不产生任何毒素、溶血素、凝固酶或聚集因子, 是葡萄球菌属中被完全确认的食品级 GRAS (generally regarded as safe) 菌株^[2]. 肉葡萄球菌具有很低的胞外蛋白水解能力, 所以该菌可以作为基因克隆宿主菌^[3]用于分子遗传学方面进行葡萄球菌属相关代谢途径的研究, 以及安全正常地表达和分泌异源蛋白.

绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 是一类存在于包括水母、水螅和珊瑚等腔肠动物体内的生物发光蛋白, 1962 年由 Shimomura 等^[4]在多管水母中首次发现. GFP 受到紫外或蓝光激发时可发射出绿色荧光, 发色团是自身分子内由 3 个氨基酸残基 (甘氨酸、酪氨酸和苏氨酸) 所组成的, 其绿色荧光的产生无需底物或辅因子, 并且持续时间较长^[5].

根据信号肽的结构, 可将其分为分泌型 (Sec) 信号肽、双精氨酸转运 (twin-arginine translocation, Tat) 信号肽和脂蛋白 (Lip) 信号肽等^[6]. 目前对 Sec

收稿日期: 2014-01-18; 修回日期: 2014-04-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31370075, 31101275); 国家高技术研究发展计划“863 计划”资助项目 (2012AA021302)

作者简介: 高 强 (1965—), 男, 陕西府谷人, 教授, gaoqiang@tust.edu.cn.

系统的研究已相当完善, Sec 转运系统只能转运未折叠或部分折叠的蛋白质^[7], 而 Tat 转运系统可将处于正确折叠状态的蛋白质转运到细胞外, 在基因工程领域中可以用于分泌无法通过 Sec 系统转运的外源蛋白^[8]. GFP 作为一种理想的报告蛋白, 可以在 *S. carnosus* 内表达^[9], 但能否被正确地折叠和跨膜转运将取决于所选用的 Tat 信号肽序列^[10-12].

穿梭载体是能在 2 种不同的生物中复制的载体, 通常用于克隆已扩增的基因^[13]. 目前, 用于肉葡萄球菌宿主表达外源蛋白的质粒载体基本上都是非穿梭质粒, DNA 连接产物直接转化肉葡萄球菌的效率低, 转化较困难, 而大肠杆菌-葡萄球菌的穿梭质粒, 如 pBT2 载体^[14], 就很好地解决了这个问题. 因此, 本实验以穿梭载体 pBT2 为骨架, 通过导入强启动子, 构建高效表达外源 GFP 的穿梭载体, 探究双精氨酸分泌信号肽在肉葡萄球菌中对 GFP 的转运效果, 从而为深入理解肉葡萄球菌中双精氨酸信号肽分泌机理及研究其他外源蛋白在肉葡萄球菌中的表达奠定实验基础.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 由天津市工业微生物重点实验室保藏(保藏号 TCCC 11800); 肉葡萄球菌(*Staphylococcus carnosus*) TM300 菌株由德国图宾根大学微生物遗传学研究所的 Goetz 教授^[3]馈赠. pMD19-T Simple Vector 购自宝生物工程(大连)有限公司; 大肠杆菌-葡萄球菌穿梭质粒 pBT2-Tat-GFP 由本实验室以 pBT2 质粒为骨架构建得到, 其中的 Tat 信号肽来源于肉葡萄球菌的铁依赖型过氧化物酶(FepB)^[11].

1.1.2 酶与试剂

Taq DNA 聚合酶、1 kbp DNA Ladder 和 DNA Marker III 购于天根生化科技(北京)有限公司; T4 DNA Ligase、限制性内切酶 *Kpn* I、*Bam* HI 和低分子质量蛋白质 Marker 购自 Fermentas 中国公司. PCR 引物合成及 DNA 测序工作委托北京六合华大基因科技股份有限公司完成; 质粒 DNA 的提取、DNA 片段胶回收与产物纯化采用购自天津宝瑞生物技术有限公司的 GeneBond 系列试剂盒. 其他试剂和药品为进口分析纯或生化级试剂.

1.1.3 培养基和培养条件

大肠杆菌和肉葡萄球菌的培养均使用 LB 培养基(胰蛋白胨 10 g/L, 酵母浸提物 5 g/L, NaCl 10 g/L, 固体培养基含琼脂 20 g/L). 对于重组菌株的筛选, 氨苄青霉素终质量浓度为 100 μ g/mL, 氯霉素终质量浓度为 10 μ g/mL. 肉葡萄球菌感受态细胞的培养使用 B2 培养基(酪蛋白 10 g/L, 酵母浸提物 25 g/L, 葡萄糖 5 g/L, NaCl 25 g/L, K₂HPO₄ 1 g/L). 电转化孵育使用 TSB 培养基(胰蛋白胨 17 g/L, 大豆蛋白胨 3 g/L, 葡萄糖 2.5 g/L, NaCl 5 g/L, K₂HPO₄ 2.5 g/L)^[15]. 大肠杆菌和肉葡萄球菌的振荡培养条件均为 37 $^{\circ}$ C、180 r/min.

1.2 方法

1.2.1 启动子 *Peftu* 的扩增

编码 EF-Tu(延伸因子)的 *tuf* 基因广泛存在于原核生物中, 其主要生物功能是在蛋白质合成过程中负责肽链的延伸, 而且 *tuf* 基因的启动子属于强启动子, 因此根据 *S. carnosus* TM300 基因组中 *tufA* 基因(GenBank ID: 7551602)的启动子 *Peftu* 序列, 设计出 1 对引物 *eftu1* 和 *eftu2*, 用于扩增启动子 *Peftu* 片段. *eftu1*: 5'-GGGTACCTTTTTTGGTAGGGTTCCTGAATT-3'(*Kpn* I); *eftu2*: 5'-CGGATCCCTATGAAATCTCTCCTCTTCTTAATAAAAAG-3'(*Bam* HI)

使用玻璃微珠法^[16]提取的肉葡萄球菌基因组为模板, 利用引物 *eftu1* 和 *eftu2* 以 PCR 法扩增启动子 *Peftu*. 扩增采用 50 μ L 体系: ddH₂O 17.5 μ L, 模板 2.5 μ L, *eftu1* 2.5 μ L, *eftu2* 2.5 μ L, 2 \times Taq PCR MasterMix 聚合酶 25 μ L. 扩增程序为: 95 $^{\circ}$ C 10 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 62.8 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 10 min. 琼脂糖凝胶电泳 PCR 产物, 并对产物进行切胶回收.

1.2.2 pBT2-ETG 载体的构建

启动子 *Peftu* 的 PCR 扩增产物与质粒 pMD19-T Simple Vector 通过 T4 Ligase 于 16 $^{\circ}$ C 过夜连接后, 使用化学转化法转化进入 *E. coli* DH5 α , 提取大肠杆菌转化子质粒, 对其进行 *Kpn* I/*Bam* HI 双酶切验证及 PCR 验证. 挑取携带有重组质粒的阳性转化子 *E. coli* DH5 α 单菌落接种在含 Amp 的 LB 培养液中, 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 过夜培养, 培养物送至北京六合华大基因科技股份有限公司进行测序.

使用 *Kpn* I/*Bam* HI 对质粒 pBT2-Tat-GFP 进行双酶切, 用 DNA 片段纯化回收试剂盒纯化回收相应的酶切产物, 与测序正确并经相同双酶切的 PCR 产物通过 T4 Ligase 于 16 $^{\circ}$ C 进行过夜连接, 连接产物使

用化学转化法转化进入 *E. coli* DH5 α 宿主细胞中, 提取大肠杆菌转化子质粒, 对其进行 *Kpn* I/*Bam* HI 双酶切验证及 PCR 验证, 并将该质粒命名为 pBT2-ETG, 其图谱见图 1.

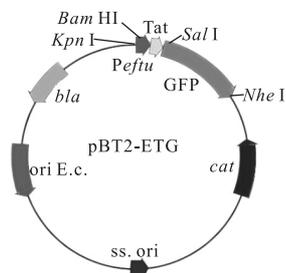


图 1 穿梭表达质粒 pBT2-ETG 图谱

Fig. 1 Map of the shuttle vector pBT2-ETG

1.2.3 肉葡萄球菌的电转化

参照 Gao 等^[17]改进的方法将连接产物电转化进入肉葡萄球菌, 并对转化子质粒进行双酶切和 PCR 验证.

1.2.4 GFP 的表达

分别接种阳性重组菌株 *S. carnosus* TM300/pBT2-ETG、*S. carnosus* TM300/pBT2-Tat-GFP、*E. coli*/pBT2-ETG、*E. coli*/pBT2-Tat-GFP, 阴性对照菌株 *S. carnosus* TM300、*E. coli* DH5 α 于 5 mL LB 培养液中, 37 °C、180 r/min 过夜培养; 转接 0.5 mL 过夜培养物于 50 mL LB 培养液中, 37 °C、180 r/min 继续培养 16 h, 以表达 GFP.

1.2.5 表达产物 GFP 的检测

荧光显微镜观察: 各取 10 μ L 按 1.2.4 方法培养的菌液, 滴在载玻片表面并盖好盖玻片后, 置于荧光显微镜下观察各菌液的荧光产生情况.

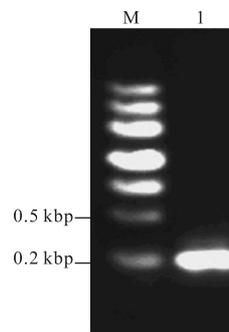
SDS-PAGE 与 Native-PAGE 分析: 参考 Meissner 等^[10]的方法, 分别提取阳性重组菌株与阴性对照菌株的细胞壁和原生质体中蛋白组分, 以发酵液为对照, 使用 5%的浓缩胶和 12%的分离胶进行 SDS-PAGE 与 Native-PAGE 检测.

2 结果与分析

2.1 启动子 Pefu 片段的 PCR 扩增

通过 PCR 反应扩增 Pefu 片段产物经琼脂糖凝胶电泳显示, 在 200 bp 附近出现特异的单一 DNA 条带. 将 PCR 产物与 pMD19-T Simple Vector 连接后进行测序, 经过 DNA 序列比对, PCR 产物与目的基因

序列一致. PCR 产物电泳分析结果见图 2.



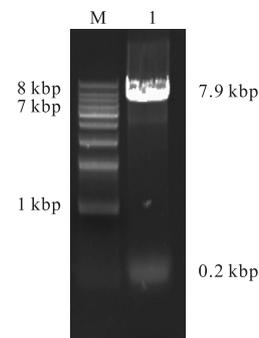
M. DNA Marker III; 1. 引物 eftu1 和 eftu2 的 PCR 产物

图 2 启动子 Pefu PCR 扩增验证电泳图

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of PCR product of the promoter Pefu

2.2 pBT2-ETG 载体的构建

Kpn I/*Bam* HI 双酶切在大肠杆菌中构建的 pBT2-ETG 载体, 酶切产物经琼脂糖凝胶电泳显示在 200 bp 与 8 kbp 附近分别出现 DNA 条带, 与预计的目的片段大小一致, 初步证明启动子 Pefu 已成功地克隆到 pBT2-Tat-GFP 载体中. 酶切产物电泳分析结果见图 3.



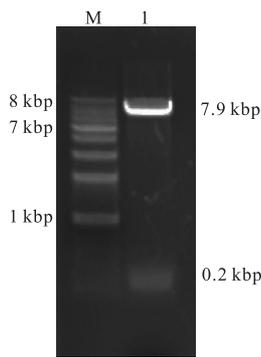
M. 1 kbp DNA Ladder; 1. pBT2-ETG 双酶切产物

图 3 大肠杆菌重组质粒 pBT2-ETG 的 *Kpn* I 和 *Bam* HI 双酶切验证

Fig. 3 Identification of pBT2-ETG in *E. coli* by *Kpn* I and *Bam* HI digestion

2.3 肉葡萄球菌的转化验证

肉葡萄球菌培养物经玻璃微珠破壁, 使用 GeneBond 试剂盒提取 pBT2-ETG 质粒, *Kpn* I/*Bam* HI 双酶切产物经琼脂糖凝胶电泳显示, 在 200 bp 和 8 kbp 附近出现 DNA 条带, 与预计的目的基因片段大小一致, 说明穿梭载体 pBT2-ETG 已成功转化入肉葡萄球菌宿主中. 肉葡萄球菌重组质粒 pBT2-ETG 的 *Kpn* I 和 *Bam* HI 双酶切验证分析结果见图 4.



M. 1 kbp DNA Ladder; 1. pBT2-ETG 双酶切产物

图4 肉葡萄球菌重组质粒 pBT2-ETG 的 *Kpn* I 和 *Bam* HI 双酶切验证

Fig. 4 Identification of pBT2-ETG in *S. carnosus* by *Kpn* I and *Bam* HI digestion

2.4 荧光显微镜观察

使用 NIKON ECLIPSE TE2000-U 型荧光显微镜观察转化子菌液, 结果如图 5 所示。

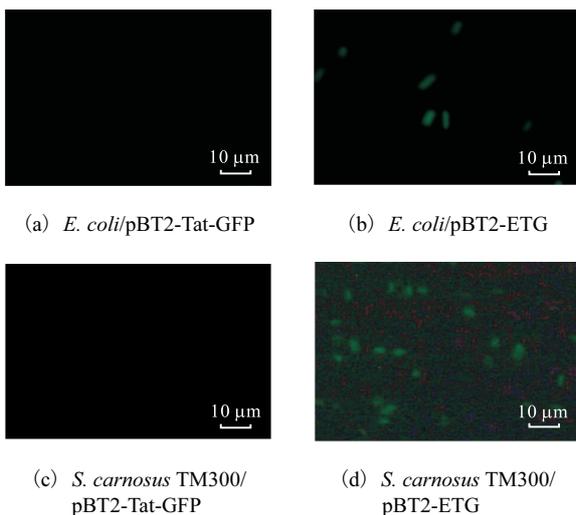


图5 GFP 荧光表达观察

Fig. 5 Observation of GFP expression

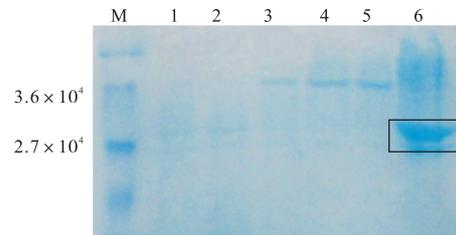
由图 5 可以看出, 构建成功的重组大肠杆菌和肉葡萄球菌宿主菌株均能发出荧光, 说明 pBT2-ETG 载体编码的 GFP 能够表达并正确折叠, 是具有活性的蛋白质。

2.5 SDS-PAGE 分析

经玻璃微珠破碎, 分别提取 *S. carnosus* TM300 重组菌株与对照菌株的细胞壁和原生质体进行 SDS-PAGE 蛋白电泳, 结果见图 6。同时对其发酵液进行蛋白电泳分析, 以确定 GFP 是否能够分泌到宿主细胞外的培养基中。

本研究中, 经 N-末端修饰的目的蛋白 GFP 的相对分子质量约为 3×10^4 。在图 6 中重组菌株细胞壁部位所在的泳道出现了目的条带, 这表明 GFP 蛋白

成功表达并转运到肉葡萄球菌宿主细胞的细胞壁部位。但是发酵液的蛋白电泳图在目的位置没有出现目的条带, 说明 GFP 蛋白未能分泌到胞外(图略)。



M. Protein Marker; 1. *S. carnosus* TM300 原生质体; 2. *S. carnosus* TM300/pBT2-Tat-GFP 原生质体; 3. *S. carnosus* TM300/pBT2-ETG 原生质体; 4. *S. carnosus* TM300 细胞壁部位; 5. *S. carnosus* TM300/pBT2-Tat-GFP 细胞壁部位; 6. *S. carnosus* TM300/pBT2-ETG 细胞壁部位

图6 肉葡萄球菌原生质体与细胞壁部位蛋白质的 SDS-PAGE 分析

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of the GFP in protoplasts and cell walls of *E. coli* and *S. carnosus* TM300 hosts

2.6 Native-PAGE 分析

为检测重组菌株表达的 GFP 是否具有活性, 提取出 *E. coli* DH5 α 重组菌株、*S. carnosus* TM300 重组菌株及其对照菌株的细胞壁和原生质体进行了 Native-PAGE 活性蛋白电泳, 结果如图 7 所示。



M. Protein Marker; 1. *E. coli* DH5 α 原生质体; 2. *E. coli*/pBT2-Tat-GFP 原生质体; 3. *E. coli*/pBT2-ETG 原生质体; 4. *S. carnosus* TM300 细胞壁部位; 5. *S. carnosus* TM300/pBT2-Tat-GFP 细胞壁部位; 6. *S. carnosus* TM300/pBT2-ETG 细胞壁部位

图7 大肠杆菌原生质体部位与肉葡萄球菌细胞壁部位的蛋白质的 Native-PAGE 分析

Fig. 7 Native-PAGE analysis of GFP in protoplast of *E. coli* and cell walls of *S. carnosus* TM300

在图 7 中可以看出, 如箭头所指方向, GFP 目的条带出现在重组菌株 *S. carnosus* TM300/pBT2-ETG 的细胞壁部位(泳道 6), 这表明重组菌株 *S. carnosus* TM300/pBT2-ETG 表达的活性 GFP 成功地分泌到了宿主细胞壁部位。

3 结 语

本实验在构建大肠杆菌-肉葡萄球菌穿梭质粒 pBT2-ETG 的过程中, 先将目的基因与构建的连接产

物高效地转化入大肠杆菌,通过大肠杆菌繁殖扩增获得了大量重组质粒,再提取此重组质粒电转化入肉葡萄球菌,从而较好地解决了连接产物直接转化肉葡萄球菌效率较低的问题。

穿梭质粒 pBT2-Tat-GFP 引入的强启动子 *P_{eftu}* 可以使融合基因 *tat-gfp* 在大肠杆菌与肉葡萄球菌宿主中均得到高效表达,并通过 Tat 信号肽的作用,将 GFP 正确折叠并转运至肉葡萄球菌细胞壁部位。该强启动子通过提高外源蛋白在肉葡萄球菌中的表达效率,使得 pBT2 表达载体系统易于进行克隆操作。本研究的成果也为相应的细胞表面展示与活菌疫苗等的研发奠定了理论与应用的基础。

致谢:本文受天津市高等学校科技发展基金资助(项目编号:20120803),谨致谢忱!

参考文献:

- [1] 王永霞. 肉品发酵剂的菌种筛选及在发酵香肠中的应用[D]. 北京:中国农业大学,2004.
- [2] Schleifer K H, Fischer U. Description of a new species of the genus *Staphylococcus*: *Staphylococcus carnosus*[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1982, 32(2): 153–156.
- [3] Goetz F. *Staphylococcus carnosus*: A new host organism for gene cloning and protein production[J]. Society for Applied Bacteriology Symposium Supplement, 1990, 69(S19): 49S–53S.
- [4] Shimomura O, Johnson F H, Saiga Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*[J]. Journal of Cellular and Comparative Physiology, 1962, 59(3): 223–239.
- [5] Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression[J]. Science, 1994, 263(5148): 802–805.
- [6] Driessen A J, Fekkes P, van der Wolk J P. The Sec system[J]. Current Opinion in Microbiology, 1998, 1(2): 216–222.
- [7] Tjalsma H, Bolhuis A, Jongbloed J D H, et al. Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: A genome-based survey of the secretome[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2000, 64(3): 515–547.
- [8] Wu L F, Ize B, Chanal A, et al. Bacterial twin-arginine signal peptide-dependent protein translocation pathway: Evolution and mechanism[J]. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 2000, 2(2): 179–189.
- [9] Gao Q. Role of staphylococcal(phospho)lipases for growth on lipids as major carbon source and in host cell response[D]. Tuebingen, Germany: Eberhard Karls Universitaet, 2007.
- [10] Meissner D, Vollstedt A, van Dijk J M, et al. Comparative analysis of twin-arginine(Tat)-dependent protein secretion of a heterologous model protein(GFP) in three different Gram-positive bacteria[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 76(3): 633–642.
- [11] Biswas L, Biswas R, Nerz C, et al. Role of the twin-arginine translocation pathway in *Staphylococcus*[J]. Journal of Bacteriology, 2009, 191(19): 5921–5929.
- [12] 于长燕,郑秀,朱燕,等. 肉葡萄球菌 *tat-gfp* 融合基因的构建与表达[J]. 生物技术通报, 2011(8): 203–207.
- [13] 肖硕,洪华珠,彭建新. 基因工程菌中重组质粒的稳定性研究进展[J]. 生物技术通报, 2008(4): 9–12.
- [14] Brueckner R. Gene replacement in *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus xylosus*[J]. FEMS Microbiology Letters, 1997, 151(1): 1–8.
- [15] Loeffblom J, Konqvist N, Uhlén M, et al. Optimization of electroporation-mediated transformation: *Staphylococcus carnosus* as model organism[J]. Journal of Applied Microbiology, 2007, 102(3): 736–747.
- [16] 赵文怡,高强,谯娜娜,等. 玻璃微珠法提取葡萄球菌基因组 DNA 的研究[J]. 现代食品科技, 2010, 26(2): 154–156, 202.
- [17] Gao Q, Wang M X, Yu C Y, et al. Optimization of the electroporation conditions for DNA transformation of *Staphylococcus carnosus*[C]// Zhang T C, Ouyang P K, Kaplan S, et al. Proceedings of the 2012 International Conference on Applied Biotechnology (ICAB 2012): Lecture Notes in Electrical Engineering. Heidelberg, Germany: Springer, 2014: 1699–1707.

责任编辑:常涛