



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20170125

## 金黄色葡萄球菌脱水鲨烯脱氢酶(CrtN)和 DNA结合蛋白 Sso7d 的融合表达

赵元蕾<sup>1,2</sup>, 郑迎迎<sup>2</sup>, 郭瑞庭<sup>2</sup>, 贾士儒<sup>1</sup>, 刘卫东<sup>2</sup>

(1. 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457; 2. 中国科学院天津工业生物技术研究所, 天津 300308)

**摘要:** 分子质量相对小的 DNA 结合蛋白 Sso7d 可以帮助蛋白折叠, 提高蛋白表达量并有助于晶体生长. 为解决金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 脱水鲨烯脱氢酶 (dehydroqualene desaturase, CrtN) 蛋白较难在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中进行可溶表达的问题, 借助小分子 DNA 结合蛋白 Sso7d, 将其与 CrtN 基因通过重叠 PCR (Overlapping PCR) 连接起来, 连至 pET-46 Ek/LIC 载体上, 在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中进行带有 6-His 标签的融合表达. 通过核酸电泳及序列测定进而确定所连接基因的正确性, 经 Ni-NTA 亲和层析与凝胶过滤层析对目的蛋白进行纯化, 利用聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 和免疫印迹 (Western blot) 对目的蛋白进行确证. 通过对 CrtN-Sso7d 以及 Sso7d-CrtN 进行分析比较, 发现 CrtN-Sso7d 的表达量较高且能得到较多高纯度蛋白, 这将被用来进行后续蛋白结晶和结构解析工作.

**关键词:** 脱水鲨烯脱氢酶; DNA 结合蛋白; 金黄色葡萄球菌; 融合表达; 纯化

中图分类号: Q51 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2018)04-0020-06

### Fusion Expression of Dehydroqualene Desaturase (CrtN) from *Staphylococcus aureus* and DNA Binding Protein Sso7d

ZHAO Yuanlei<sup>1,2</sup>, ZHENG Yingying<sup>2</sup>, GUO Ruiting<sup>2</sup>, JIA Shiru<sup>1</sup>, LIU Weidong<sup>2</sup>

(1. College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China;

2. Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China)

**Abstract:** Small molecular-weight DNA binding protein Sso7d can help protein folding and growing into protein crystals. To obtain dehydroqualene desaturase (CrtN) protein from *Staphylococcus aureus* with high purity, Sso7d was used to help the expression and purification. Sso7d were ligated on both N and C terminals of CrtN through overlapping polymerase chain reaction (PCR). After being cloned onto pET-46 Ek/LIC vector, the eligible plasmids were transformed into *E. coli* BL21 (DE3) for expression after sequencing. IPTG was used to induce the expression of recombinant protein with His-tag. The target protein was purified with Ni-NTA affinity chromatography, and gel filtration chromatography and then verified by SDS-PAGE and Western blot. CrtN-Sso7d showed a better expression level and produced more and better proteins compared with Sso7d-CrtN. This study can be used for further protein crystallization and structural analysis.

**Key words:** CrtN; DNA binding protein; *Staphylococcus aureus*; fusion expression; purification

感染性疾病是引起人类死亡的第二主要原因<sup>[1]</sup>, 而金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 则是引起人类感染的主要病原体之一<sup>[2]</sup>. 它可以引起局部化脓感染, 也可以引发坏死性肺炎、心内膜炎和骨髓炎等

感染性疾病<sup>[3]</sup>. 抗生素是 20 世纪医学史上最伟大的发现, 对于人类平均寿命的延长起了关键的作用<sup>[4]</sup>, 让医生们在对抗金黄色葡萄球菌感染时有了更好的治疗方案. 但由于抗生素的大量使用, 使得金黄色葡

收稿日期: 2017-05-10; 修回日期: 2017-07-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31470240); 国家自然科学基金青年科学基金资助项目 (31600638)

作者简介: 赵元蕾 (1992—), 男, 山东人, 硕士研究生; 通信作者: 刘卫东, 副研究员, liu\_wd@tib.cas.cn

萄球菌对其产生了抗性,进化出了各种耐药性变体,最知名的当属“超级细菌”耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 MRSA (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*)<sup>[5]</sup>. 欧盟食品管理局 (EFSA) 以及欧盟疾控中心 (ECDC) 在 2013 年发布的研究报告称,在住院病人感染中,51% 的导管相关血流感染、52% 的尿路导管相关感染、42% 的呼吸性肺炎以及 43% 的外科手术部位感染均与金黄色葡萄球菌相关<sup>[6]</sup>. 金黄色葡萄球菌引起的感染也被认为是许多家禽以及宠物的病原来源<sup>[7]</sup>,因此深入了解金黄色葡萄球菌在宿主体内表达调控的生理过程,寻找对抗金黄色葡萄球菌的一些新的思路显得尤为重要<sup>[8]</sup>. 有研究<sup>[9-10]</sup>表明,当金黄色葡萄球菌出现缺少色素或色素减少的突变种时,其抵抗脂肪酸侵害的能力就迅速减弱,有可能被宿主直接杀死. 因此,阻碍金黄色葡萄球菌中色素的生物合成可以作为对抗其感染的一种新的策略<sup>[11]</sup>.

金黄色葡萄球菌的色素 STX 是由一系列酶催化生成<sup>[12]</sup>. 2008 年, Eric Oldfield 团队解析出了色素合成起始酶 CrtM 的蛋白结构,借此合理设计出 CrtM 高效抑制剂,为筛选抵抗金黄色葡萄球菌的新药物提供了思路<sup>[13]</sup>. 而 CrtN 也是金黄色葡萄球菌色素 STX 合成过程中的关键酶. 它能够催化脱水鲨烯 (dehydro-squalene) 经三步连续脱氢反应生成色素 STX 的中间产物 4, 4'-四神经孢子 (4, 4'-diaponeurosporene)<sup>[14]</sup>. 抑制 CrtN 的功能可以降低金黄色葡萄球菌的致病性. 2016 年,上海药物所的蓝乐夫研究员筛选了 CrtN 的 400 多种抑制剂,发现萘替芬 (naftifine hydrochloride) 是可以对 3 种 MRSA 起到抑制作用的最有效的抑制剂<sup>[15]</sup>. 但在没有解析得到 CrtN 蛋白结构、对其具体催化机制不清楚的前提下,寻找设计酶的抑制剂有着非常大的局限性且工作量巨大. 通过解析 CrtN 蛋白结构,可以更准确地了解酶的作用机理及作用位点,省时省力地找到高效且毒性小的抑制剂.

Sso7d 蛋白是来自极端嗜热古生菌硫磺矿硫化叶菌的小分子 DNA 结合蛋白<sup>[16]</sup>,相对分子质量为  $7.3 \times 10^3$ . 有学者研究发现 Sso7d 的蛋白晶体的每个晶格中都只有一个蛋白质分子<sup>[17]</sup>,而且本实验室已有先例证明,其可以有效地帮助蛋白正确折叠,有利于晶体内部蛋白分子之间有序堆叠,促进高分辨蛋白晶体的形成<sup>[18]</sup>.

本课题组曾尝试在大肠杆菌中对 CrtN 进行表达,但发现目的蛋白绝大部分以包涵体形式存在,无法得到可溶 CrtN 蛋白. 本研究中引入 DNA 结合蛋

白 Sso7d, 将其与 CrtN 在大肠杆菌中的表达进行融合表达尝试,以期获得纯度较高的目标蛋白,为后续进行蛋白结晶及结构解析工作,以及进一步揭示其催化机理并合理设计 CrtN 靶点抑制剂,筛选新型金黄色葡萄球菌抗生素奠定基础.

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 载体和菌株

pET3b-Sso7d 质粒为本实验室保存, pET-46 Ek/LIC 载体购自 Invitrogen 公司, 大肠杆菌 (*E. coli*) DH5 $\alpha$  感受态、*E. coli* BL21 (DE3) 感受态均购自北京康为世纪生物科技有限公司.

#### 1.1.2 试剂与仪器

氨苄青霉素, BBI 公司; IPTG, Solarbio 公司, 蛋白 marker、MES SDS Running Buffer、SDS-PAGE 电泳胶, Invitrogen 公司; pET-46 Ek/LIC Cloning Kits, Novagen 公司; DNA marker, 上海捷瑞生物工程有限公司; Ex Taq 聚合酶、dNTPs 及 PCR 反应缓冲液, TaKaRa 公司; 蛋白染液考马斯亮蓝 G250, 北京康为世纪生物科技有限公司; 高纯度质粒小量快速提取试剂盒、PCR 产物回收试剂盒, Biomed 公司; 一抗 (鼠源抗 His-tag), ABCAM 公司; 二抗 (HRP 山羊抗小鼠), 北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司.

PCR 仪、高速冷冻离心机, 德国 Eppendorf 公司; 核酸电泳仪与凝胶成像系统, 美国 Bio-Rad 公司; 恒温摇床, 江苏太仓试验设备厂; 低温高压细胞破碎机, 广州聚能生物科技有限公司; ÄKTA 纯化系统, 美国 GE 公司; 蛋白质电泳仪, Invitrogen 公司; 硝酸纤维素膜、超滤管, 美国 Merck Millipore 公司.

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 引物设计与合成

根据发表在 NCBI 的金黄色葡萄球菌 CrtN 基因序列及商品化载体 pET-46 Ek/LIC 的信息设计上、下游特异性引物 pET-46 Ek/LIC-CrtN-sense: 5'-GACGACGACAAGCATCACCACCACCATCACATGAA GATTGCAGTAATTGGTGCAGGTGTC-3' (下划线为 6 个 His 标签)、pET-46 Ek/LIC-CrtN-antisense: 5'-GAGGAGAAGCCCGGTTATACGCCCGCTCAATA TCTTTAATC-3'. 上游引物加入了 6 个 His 组氨酸标签. 根据发表在 NCBI 的金黄色葡萄球菌 CrtN 基因序列、小分子 DNA 结合蛋白 Sso7d 基因序列及商品化载体 pET-46 Ek/LIC 的信息设计上、下游特异性引

物, CrtN 基因与 Sso7d 基因之间添加 5 个氨基酸 (AGAGA) 作为 Linker. 根据 Sso7d 连接在 CrtN 的 N

端和 C 端两种情况, 分别设计引物见表 1. 以上引物均由上海生工生物工程有限公司合成.

表 1 Overlapping PCR 所用引物  
Tab. 1 Primers for overlapping PCR

引物名称	碱基序列 (5'→3')
46-Sso7d-sense	GACGACGACAAGATATGGCAACAGTAAAGTTCAAGTAC
Sso7d-antisense	TTACTTCTTTT GCTTCTCTAACATTTGTAG
CrtN-sense	TTAGAGAAGCAAAAGAAGGCAGGAGCAGGAGCAATGAAGATTGCAGTAATTGGTGCA (下划线为 Linker)
46-CrtN-antisense	GAGGAGAAG CCCGGTTATACGCCCCGCTCAATATCTTT
46-CrtN-sense	GACGACGACAAGATATGAAGA TTGCAGTAATTGGTGCA
CrtN-antisense	TTATACGCCCCGCTCAATATCTTTAATCAT
Sso7d-sense	GATATTGAGCGGGCGTAGCAGG AGCAGGAGCAATGGCAACAGTAAAGTTCAAGTAC (下划线为 Linker)
46-Sso7d-antisense	GAGGAGAAGCCCGTTACTTCTTTTCTTCTCTAACAT

1.2.2 基因的 PCR 扩增

(1) 以全基因合成的 CrtN 序列 (由上海生工生物工程有限公司合成) 为模板扩增 CrtN 基因. PCR 反应体系为 100 μL: Ex Taq 酶 1 μL, 10 × Buffer 10 μL, 2.5 mmol/L 的 dNTPs 5 μL, 10 mmol/L pET-46 Ek/LIC-CrtN-sense 2 μL, 10 mmol/L pET-46 Ek/LIC-CrtN-antisense 2 μL, 150 ng/μL CrtN 基因模板 3 μL, 无菌水 77 μL. PCR 参数设置: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 加热变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 循环 30 次; 72 °C 总延伸 7 min. 电泳后的 PCR 产物用 PCR 产物回收试剂盒纯化回收.

(2) 以 Sso7d 连接在 CrtN 的 N 端为例. overlapping PCR 共分为 3 个关键的步骤:

第一步, 用合成的引物, 以全基因合成 CrtN 序列和 pET3b-Sso7d 质粒为模板分别扩增 CrtN 和 Sso7d. 其中扩增 CrtN 基因的引物为 CrtN-sense 与 46-CrtN-antisense, 扩增 Sso7d 基因的引物为 46-Sso7d-sense 与 Sso7d-antisense. PCR 反应体系及参数设置与 (1) 相同, 电泳后的 PCR 产物用 PCR 产物回收试剂盒分别纯化回收.

第二步, 将回收后的两个目的片段 Sso7d 与 CrtN 作为正反向引物进行 PCR, 此次没有模板. PCR 反应体系为 25 μL: Ex Taq 酶 0.5 μL, 10 × Buffer 5 μL, 2.5 mmol/L dNTPs 2.5 μL, 62 ng/μL 的回收片段 Sso7d 5 μL, 55 ng/μL 的回收片段 CrtN 5 μL, 无菌水 7 μL. PCR 参数设置: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 加热变性 30 s, 58 °C 退火 10 min, 72 °C 延伸 5 min, 循环 10 次; 72 °C 总延伸 10 min.

第三步, 取上一步 PCR 的产物作为模板扩增 Sso7d-CrtN 目的基因. PCR 反应体系为 100 μL: Ex Taq 酶 1 μL, 10 × Buffer 10 μL, 上一步 PCR 产物

7 μL, 10 mmol/L 的 46-Sso7d-sense 1 μL, 10 mmol/L 46-CrtN-antisense 1 μL, 2.5 mmol/L dNTPs 10 μL, PCR stimulant 20 μL, 无菌水 77 μL. PCR 参数设置: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 加热变性 30 s, 65 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 循环 30 次; 72 °C 总延伸 7 min. 电泳后的 PCR 产物用 PCR 产物回收试剂盒纯化回收.

Sso7d 连接在 CrtN 的 C 端 PCR 过程与上述过程基本相同. 其中, 第一步扩增 Sso7d 基因的引物为 Sso7d-sense 与 46-Sso7d-antisense, 扩增 CrtN 基因的引物为 46-CrtN-sense 与 CrtN-antisense; 第三步扩增 CrtN-Sso7d 目的基因时, 加入的正反向引物分别为 46-CrtN-sense 和 46-Sso7d-antisense.

1.2.3 重组质粒的构建

使用 pET-46 Ek/LIC Cloning Kits 将纯化回收到的目的片段连接在 pET-46 Ek/LIC 载体上. 反应体系为 20 μL: T4 DNA 聚合酶 0.4 μL, 25 mmol/L dATP 2 μL, 100 mmol/L DTT 1 μL, 10 × T4 DNA 连接酶 Buffer 2 μL, 纯化 DNA 片段 14.6 μL. 将上述体系轻轻混匀, 置于 22 °C 金属浴上 30 min, 然后转至 75 °C 金属浴上 20 min. 取体系溶液 10 μL 加入 1 μL pET-46 Ek/LIC 载体, 混匀后置于 22 °C 金属浴上 1 h, 再加入 25 mmol/L EDTA 1 μL, 置于 22 °C 金属浴上 5 min, 至此连接完成. 将连接产物采用 42 °C 热激法转化到 E. coli 感受态细胞 DH5α, 涂布于含有 100 mg/L 氨苄青霉素抗性的 LB 平板上, 37 °C 倒置培养 12 ~ 16 h. 挑取平板上单个圆润菌落到 5 mL LB 培养基中扩大培养, 待菌液 A<sub>600</sub> = 0.6 ~ 0.8 时, 进行菌液 PCR 验证, 并将验证阳性的菌液送至华大基因测序. 取测序正确的菌液提取质粒, 将 1 μL 提取的质粒转化到 E. coli 感受态细胞 BL21 (DE3), 涂布于

含有 100 mg/L 氨苄青霉素抗性的 LB 平板上, 37 °C 倒置培养 12 ~ 16 h.

#### 1.2.4 蛋白的诱导表达

挑取平板上的单菌落接种到 20 mL LB 培养基中, 同时加入氨苄青霉素抗性至终质量浓度为 100  $\mu$ g/L. 37 °C、220 r/min 培养至菌液  $A_{600} = 0.6 \sim 0.8$ , 按 2% 的接菌量转入 1 L 含氨苄青霉素抗性的 LB 培养基中, 37 °C、220 r/min 培养至菌液  $A_{600} = 0.6 \sim 0.8$ , 降温至 16 °C, 加入终浓度为 0.5 mmol/L 的诱导剂 IPTG, 继续培养 16 h, 离心收集沉淀菌体.

#### 1.2.5 蛋白纯化

收集到的菌体沉淀用 Ni Buffer A (25 mmol/L Tris, 500 mmol/L NaCl, 20 mmol/L Imidazole, pH 7.5) 重悬, 使用高压匀浆破碎机进行破碎. 先将机器预冷至 4 °C, 破碎时设定压力为 800 ~ 1 000 MPa, 破碎 2 ~ 3 次, 破碎后的菌液于 4 °C、15 500 r/min 离心 1 h, 上清液用 0.45  $\mu$ m 滤膜进行过滤, 得到粗酶液.

Ni-NTA 亲和层析: 取 20 mL Ni Sepharose 6 Fast Flow 填料装入预装柱 XK-16 中, 先用水冲洗约 3 个柱体积至电导稳定, 再用 Ni Buffer A 冲洗最少 1 个柱体积; 使用 ÄKTA Purifier, 以 4 mL/min 的流量上样; 上完样后用 Ni Buffer A 缓冲液冲洗柱子直至 UV 吸收峰降至 100 以下; 设置 0 ~ 100% Ni Buffer B (25 mmol/L Tris, 500 mmol/L NaCl, 250 mmol/L Imidazole, pH 7.5), 60 min 梯度洗脱, 同时设置收集 3.0 mL/管; 收集结束后, SDS-PAGE 检测收集管中的蛋白纯度, 收集合并较纯的目的蛋白.

凝胶过滤层析(分子筛): 根据目的蛋白的相对分子质量选用截留相对分子质量为  $1 \times 10^4$  的浓缩管, 4 °C、3 000 r/min 浓缩较纯的蛋白至 1 ~ 2 mL; 选用 Hiload™ 16/600 Superdex™ 200 pg 进行凝胶层析, 先用 Buffer C (25 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, pH 7.5) 冲洗至少 1 个柱体积平衡柱子; 使用 ÄKTA 蛋白纯化仪, 设置最高柱压 0.15 MPa, 0.5 mL/min 流量上样浓缩好的蛋白; 上样后直接用 Buffer C 洗脱, 同时 1.0 mL/管收集洗脱液; 收集结束后, SDS-PAGE 检测收集管中的蛋白纯度, 收集合并较纯的目的蛋白.

#### 1.2.6 蛋白的浓度测定及 Western blot 分析

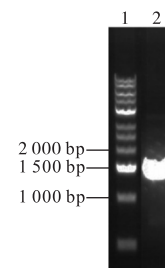
根据目的蛋白的相对分子质量大小, 可以选择截留相对分子质量为  $1 \times 10^4$  的超滤管进行浓缩. 浓缩到约 1 mL, 按 BCA 试剂盒操作步骤绘制标准曲线测定蛋白质量浓度, 同时 SDS-PAGE 检测蛋白纯度. 利用电转仪将凝胶中的蛋白转到硝酸纤维素膜上, 随后用 5% 脱脂牛奶封闭, 依次加入 anti-His 鼠单抗一

抗, 羊抗鼠 IgG 二抗, 最后用 DAB 试剂直接在膜上显色.

## 2 结果与分析

### 2.1 目的基因 CrtN 的扩增、载体构建及测序鉴定

CrtN 基因的大小为 1 509 bp, 外加 6 个组氨酸标签, 目的基因的大小应为 1 527 bp. 经过 PCR 扩增和琼脂糖凝胶电泳后, 使用 DNA 回收试剂盒对目的片段进行胶回收. 取回收的产物 2  $\mu$ L 进行琼脂糖凝胶电泳验证, 结果如图 1 所示, 条带大小在 1 500 bp 左右, 与预期一致. 将切胶回收后得到的产物与 pET-46Ek/LIC 载体连接, 经氨苄青霉素抗性筛选出阳性菌株, 送至北京华大基因研究中心测序, 测序结果表明克隆的基因与原序列一致且已经连接在 pET-46 Ek/LIC 载体上.



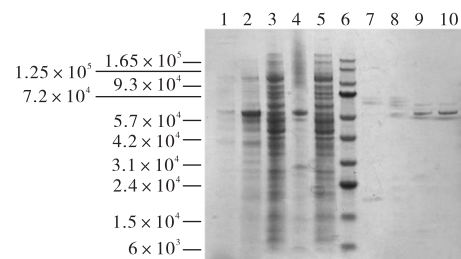
1. DNA marker; 2. CrtN

图 1 CrtN 基因 PCR 结果

Fig. 1 PCR result of gene CrtN

### 2.2 pET-46 Ek/LIC-CrtN 的表达纯化

将阳性重组质粒转入 *E. coli* BL21 (DE3) 表达, 培养 5 L, 加诱导剂 IPTG 前取出 1 mL 菌体作诱导前对照. 经过 Ni-NTA 亲和层析后, SDS-PAGE 分析如图 2 所示.



1. 诱导前; 2. 诱导后; 3. 上清液; 4. 沉淀; 5. 流穿; 6. 蛋白 marker; 7—10. 收集组分 8, 13, 18, 24

图 2 CrtN Ni-NTA 亲和层析纯化

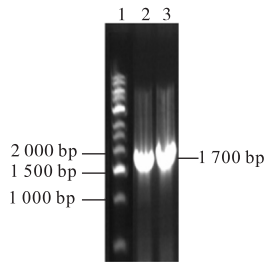
Fig. 2 Result of CrtN purification with Ni-NTA

CrtN 蛋白预测大小为  $5.67 \times 10^4$ , 在图 2 中, 由

诱导前后对比可以看到在  $5.7 \times 10^4$  处有比较明显的目的蛋白表达条带,因此 IPTG 可以诱导表达出目的蛋白. 但经过纯化发现,蛋白主要以包涵体的形式存在于沉淀中,在上清液、流穿及后续收集中只检测到极少的目的蛋白条带,所以考虑添加 Sso7d 与 CrtN 一起表达,可有助于蛋白以可溶形式表达.

### 2.3 目的基因 CrtN 与 Sso7d 的扩增、载体构建及测序鉴定

CrtN 的大小为 1 509 bp, Sso7d 的大小为 192 bp, 中间添加了 5 个氨基酸序列作为 Linker. 共设计了 Sso7d 连接在 CrtN 的 N 端与 C 端两种. 经过 Overlapping PCR 得到的目的产物大小应为 1 716 bp. 产物纯化后进行琼脂糖凝胶电泳验证, 结果如图 3 所示, 得到目的片段与预期大小相符. 将切胶回收后得到的产物与 pET-46 Ek/LIC 载体连接, 经氨苄青霉素抗性筛选出阳性菌株, 送至北京华大基因测序, 测序结果表明克隆的基因与原序列一致且已经连接在 pET-46 Ek/LIC 载体上.



1. DNA marker; 2. Sso7d-CrtN; 3. CrtN-Sso7d

图 3 CrtN 连接 Sso7d 的 PCR 结果

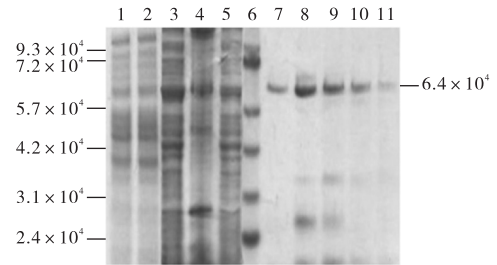
Fig. 3 PCR result of CrtN gene with Sso7d

### 2.4 Sso7d-CrtN 蛋白的表达纯化

将阳性重组质粒转入 *E. coli* BL21 (DE3) 表达, 大批量培养 5 L, 加诱导剂 IPTG 前取出 1 mL 菌体作空白对照. 经过 Ni-NTA 亲和层析后, SDS-PAGE 分析如图 4 所示. CrtN 蛋白预测大小为  $5.67 \times 10^4$ , Sso7d 融合标签的大小为  $7.3 \times 10^3$ , 因此目的蛋白的大小预计为  $6.4 \times 10^4$ , 结果与此相符. 由图 4 可以看出, IPTG 诱导前后目的蛋白表达条带没有明显的增加, 但高压破碎后的上清液中还是可以看到目的蛋白表达条带. Ni-NTA 亲和层析后可以收集到少量目的蛋白, 表明有少量蛋白被诱导出来且以可溶形式存在.

收集 4—15 管较纯的目的蛋白, 浓缩至 1 mL, 使用分子筛层析纯化, SDS-PAGE 分析如图 5 所示. 由图 5 可以看到 5—8 泳道的目的蛋白上方有一条杂带, 而 9—11 泳道的目的蛋白下方也有多条杂带, 总体来说目的蛋白较杂且量不多. 收集 16—28 管目的

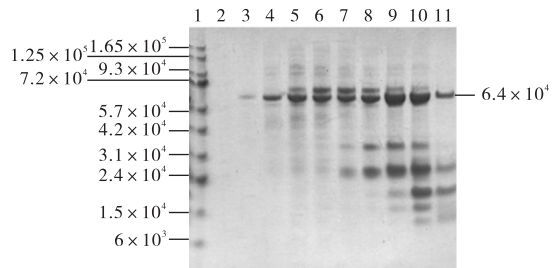
蛋白.



1. 诱导前; 2. 诱导后; 3. 上清液; 4. 沉淀; 5. 流穿; 6. 蛋白 marker; 7—11. 收集组分 4, 7, 10, 13, 17

图 4 Sso7d-CrtN Ni-NTA 亲和层析纯化

Fig. 4 Result of Sso7d-CrtN purification with Ni-NTA



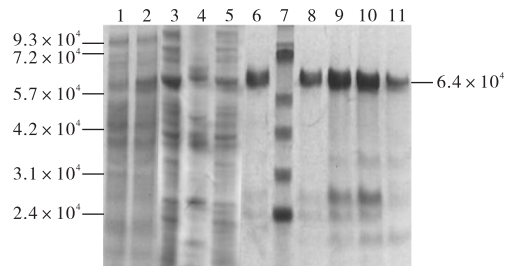
1. 蛋白 marker; 2—11. 收集组分 10, 12, 14, 16, 18, 21, 23, 25, 28, 33

图 5 Sso7d-CrtN 分子筛层析纯化

Fig. 5 Result of Sso7d-CrtN purification with GF

### 2.5 CrtN-Sso7d 蛋白的表达纯化

蛋白表达纯化过程同 2.4 节. 经过 Ni-NTA 亲和层析后, SDS-PAGE 分析如图 6 所示. 由图 6 可知, IPTG 诱导后目的蛋白表达条带有少量的增加, Ni-NTA 亲和层析后可以收集到大量的目的蛋白, 且蛋白的可溶表达量显著提升.



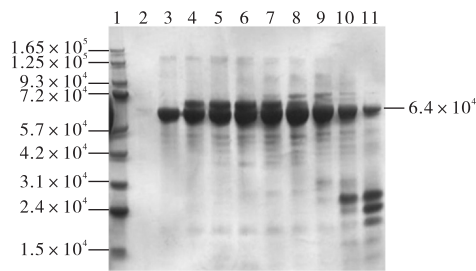
1. 诱导前; 2. 诱导后; 3. 上清液; 4. 沉淀; 5. 流穿; 6. 收集组分 4; 7. 蛋白 marker; 8—11. 收集组分 6, 8, 11, 18

图 6 CrtN-Sso7d Ni-NTA 亲和层析纯化

Fig. 6 Result of CrtN-Sso7d purification with Ni-NTA

收集 4—18 管目的蛋白浓缩至 1 mL 过分子筛. 经分子筛层析后, SDS-PAGE 分析如图 7 所示. 由图 7 可以看到, 目的蛋白量多且纯度得到改善. 收集 18—50 管目的蛋白.





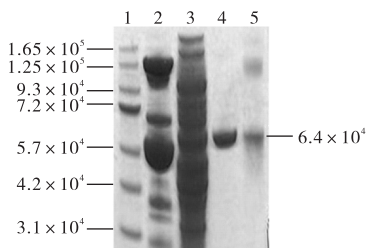
1. 蛋白 marker; 2—11. 收集组分 16、18、21、25、29、32、35、40、45、50

图7 CrtN-Sso7d分子筛层析纯化

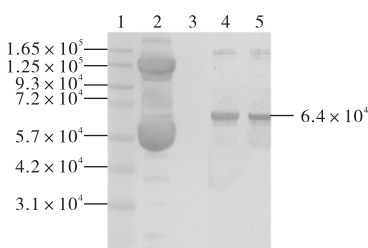
Fig. 7 Result of CrtN-Sso7d purification with GF

## 2.6 CrtN连接Sso7d的目的蛋白浓度测定及免疫印迹(Western blot)分析

将收集的目的蛋白用截留量为  $1 \times 10^4$  的超滤管浓缩,使用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度,得到 pET-46 Ek/LIC-Sso7d-CrtN 蛋白约 1 mg, pET-46 Ek/LIC-CrtN-Sso7d 蛋白约 12 mg. Western blot 分析结果如图 8 所示. 由图 8 可知,表达纯化得到的蛋白(泳道 4、5)与阳性对照(泳道 2)有相同的特异反应,而阴性对照(泳道 3)没有条带,因此证明表达为目的蛋白。



(a) SDS-PAGE 考马斯亮蓝染色验证结果



(b) Western blot 分析结果

1. 蛋白 marker; 2. 阳性对照; 3. 阴性对照; 4. CrtN-Sso7d; 5. Sso7d-CrtN

图8 CrtN连接Sso7d蛋白Western blot分析结果

Fig. 8 Analysis of CrtN with Sso7d with Western blot

## 3 结语

经尝试 CrtN 无法直接在大肠杆菌中进行高效表达,通过将 Sso7d 分别连接于 CrtN 的 N 端和 C 端,

利用 Ni-NTA 层析与凝胶过滤层析进行纯化,并对它们的表达效果进行比较. 实验结果表明, Sso7d 连接在目的蛋白 CrtN 的 N 端和 C 端对于目的蛋白的表达具有不同影响. 当 Sso7d 连接在 CrtN 的 C 端时,目的蛋白表达量显著提高且可溶表达比例增多. SDS-PAGE 和 Western blot 结果证实,纯化所得蛋白为金黄色葡萄球菌 CrtN 蛋白,且纯度可以用于后续的蛋白结晶及结构解析工作. 此外,有关 Sso7d 连接在不同位置对蛋白表达的影响还未见文献报道,本文的这些尝试宜可为使用 Sso7d 提高蛋白表达工作提供一定的参考。

## 参考文献:

- [1] Lowy F D. *Staphylococcus aureus* infections[J]. New England Journal of Medicine, 1998, 339(8): 520-532.
- [2] O'Connell K M, Hodgkinson J T, Sore H F, et al. Combating multidrug-resistant bacteria: Current strategies for the discovery of novel antibacterials[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2013, 52(41): 10706-10733.
- [3] Janzon L, Arvidson S. The role of the delta-lysin gene (hld) in the regulation of virulence genes by the accessory gene regulator (agr) in *Staphylococcus aureus* [J]. *The EMBO Journal*, 1990, 9(5): 1391-1399.
- [4] Demain A L, Sanchez S. Microbial drug discovery: 80 years of progress[J]. *The Journal of Antibiotics*, 2009, 62(1): 5-16.
- [5] Fischbach M A, Walsh C T. Antibiotics for emerging pathogens[J]. *Science*, 2009, 325(5944): 1089-1093.
- [6] European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. EU Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2013[J]. *EFSA Journal*, 2015, 13(2): 1-178.
- [7] Antoci E, Pinzone M R, Nunnari G, et al. Prevalence and molecular characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among subjects working on bovine dairy farms[J]. *Le Infezioni in Medicina*, 2013, 21(2): 125-129.
- [8] Bauer P R, Sampathkumar P. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in ICU: What is the best prevention strategy?[J]. *Critical Care Medicine*, 2017, 45(8): 1413-1414.

(下转第 32 页)