

· 基础论著 ·

马尔尼菲青霉菌溶血磷脂酶基因的克隆、表达及纯化

李凌华 胡凤玉 陈万山 宋伟南 蔡卫平 唐小平

【摘要】 目的 研究马尔尼菲青霉菌(PM)溶血磷脂酶(*LysoPLs*)基因的克隆、表达和纯化,为研究其致病机制奠定基础。**方法** 采用生物信息学方法,从 PM 酵母相全长 cDNA 文库中识别出 *PMLysoPLs* 基因的同源序列及其全长编码区。通过 PCR 方法扩增 *PMLysoPLs* 基因的编码区序列,构建原核表达载体 pET 30a(+)-*PMLysoPLs*,经 DNA 序列测定鉴定其序列,在大肠埃希菌 BL-21/DE3 中用异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导表达,重组产物采用 His-镍蛋白纯化柱进行纯化。**结果** *PMLysoPLs* 基因长度为 991 bp,其全长编码序列长度为 732 bp,编码 243 个氨基酸,其编码蛋白理论分子量为 26.8 kDa。重组表达载体经序列测定及酶切鉴定与理论推测结果相符。经 IPTG 诱导,该基因在大肠埃希菌 BL-21/DE3 中得到高效的可溶性上清表达,纯化后的重组蛋白分子量为 25~35 kDa,其单一蛋白纯度达 95% 以上。**结论** 本研究成功构建了 *PMLysoPLs* 基因的 pET 30a(+)-原核重组质粒,获得的可溶性重组蛋白表达效率高,可用于进一步研究 PM 溶血磷脂酶的功能。

【关键词】 马尔尼菲青霉菌;溶血磷脂酶;克隆;原核表达

Molecular cloning, expression and purification of the gene encoding lysophospholipase from *Penicillium marneffii* LI Ling-hua, HU Feng-yu, CHEN Wan-shan, SONG Wei-nan, CAI Wei-ping, TANG Xiao-ping. Department of Infectious Diseases, Guangzhou No. 8 People's Hospital, Guangzhou 510060, China

Corresponding author: TANG Xiao-ping, Email: xiaopingtanggz@yahoo.com

【Abstract】 Objective To clone, express and purify the gene encoding lysophospholipase of *penicillium marneffii* (*PMLysoPLs*) for establishing a solid foundation and to investigate its functions in pathogenesis. **Methods** The homologous sequence and full-length coding region of *PMLysoPLs* gene were identified from the full-length cDNA library of *P. marneffii* in yeast phase by bioinformatics tools. Then, the coding region sequence of *PMLysoPLs* gene was amplified to construct the prokaryotic expression plasmid of pET 30a(+)-*PMLysoPLs*. The PCR products were verified by sequencing and expressed in *E. coli* BL-21/DE3 induced by isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG). The recombinant products were purified by Nickel-affinity chromatography column. **Results** The gene was 991 bp and its full-length gene encoding lysophospholipase was presumed to be 732 bp encoding 243 amino acids with theoretical molecular weight being 26.8 kDa. The recombinant expression vector was proved to be concordant with the theoretical presumption by sequencing and endonuclease cleavage. Induced by IPTG, this gene was highly and efficiently expressed in lysate supernatants in *E. coli* BL-21/DE3. The purity of the purified recombinant protein was over 95%. **Conclusions** The prokaryotic recombinant plasmid pET 30a(+)-*PMLysoPLs* was successfully established. Moreover, the dissoluble recombinant protein was highly expressed and appropriate for further study on the function of *PMLysoPLs*.

【Key words】 *Penicillium marneffii*; Lysophospholipase; Clone; Prokaryotic expression

马尔尼菲青霉菌(*penicillium marneffii*, PM)为机会性致病真菌,主要感染免疫功能缺陷人群,尤其

是艾滋病(AIDS)患者^[1]。由于艾滋病患者免疫功能低下,感染 PM 后一般发展为侵袭性真菌病,若未经及时诊断和治疗,病死率极高。近年来,中国南方地区,尤其广东、广西两省,该病的发病率逐年上升,成为威胁该地区艾滋病患者的主要深部真菌病^[2]。PM 具有强侵袭力,经呼吸道、消化道或皮肤破损进入人体后,主要侵犯单核-巨噬细胞系统而引起播散

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2012.02.006

基金项目:广州市卫生局重点科研项目(2009-Zdi-016);广东省自然科学基金(10151006002000000)

作者单位:510060 广州,广州市第八人民医院

通讯作者:唐小平,Email:xiaopingtanggz@yahoo.com

性感染^[3],但目前其相关致病机制尚不清楚。近有研究证实,真菌侵入人体时可分泌细胞外磷脂酶,以溶血磷脂酶为主,参与分解宿主细胞膜磷脂,引起膜的通透性增高和完整性受损,从而促进真菌的侵入^[4-5]。胞外磷脂酶尤其是溶血磷脂酶是白色念珠菌、烟曲霉和新生隐球菌潜在的毒力因子,在其感染早期发挥重要作用^[6-8],有望成为研究 PM 感染艾滋病患者致病机制的重要切入点。本课题组已成功构建了艾滋病患者 PM 临床优势株酵母相全长 cDNA 文库^[9],在对文库进行生物信息学分析时,识别出一个 PM 的溶血磷脂酶(*PMLysoPLs*)基因(编号为 P79-1368)的全长编码基因及其推导的氨基酸。本研究拟对该基因进行克隆、原核表达和纯化,为进一步研究该基因的功能及其在 PM 感染艾滋病患者致病机制中的作用提供一定的实验基础。

材料和方法

一、材料

艾滋病患者 PM 临床优势株酵母相全长 cDNA 文库由本课题组构建,文库载体为 pDONR222 (Invitrogen公司)。原核表达质粒 pET 28a(+)、大肠埃希菌 DH-5 α 及 BL21/DE3 由本实验室保存。

二、主要试剂和工具酶

TaKaRa Ex *Taq* 酶(dNTP)、DNA 标准 marker (DL15 000, DL2 000)购自大连宝生物工程有限公司;限制性内切酶 *Nde* I 和 *Xho* I、T4 DNA 连接酶及蛋白分子标准 marker (SM0431, 分子量范围为: 14.4 ~ 116 kDa)均购自美国 Fermentas 公司;异丙硫代- β -D 半糖苷(IPTG)购自美国 Promega 公司;琼脂糖购自西班牙 Genebase 公司;DNA 凝胶回收试剂盒、质粒纯化试剂盒购自东盛生物科技有限公司;6 \times His 的镍离子亲和层析柱、SDS、丙烯酰胺、亚甲双丙烯酰胺和过硫酸胺等试剂购自上海 Invitrogen 公司。

三、方法

1. 引物合成:根据从文库识别的 *PM*-LysoPLA 全长基因的开放读码框架(open reading frame, ORF),利用 PCRDesign 和 DNAClub 软件设计引物:上游引物:5'-CTACATATGATGTCGTACCGGGCTCC CTT-3', 带有 *Nde* I 酶切位点;下游引物:5'-CATCTCGAGCAGACCAGCTTCTTCGCC-3', 带有 *Xho* I 酶切位点。引物由上海 Invitrogen 公司合成。

2. *PMLysoPLs* 基因的获得:以文库编号为 P79-1368 的质粒为模板,应用设计的特异引物,进行 PCR 扩增目的基因。PCR 反应体系(50 μ l 总反应体系):10 \times buffer (含 Mg^{2+}) 5.0 μ l, 2.5 μ mol/L

dNTP 4.0 μ l, 10 μ mol/L 上、下游引物各 2.0 μ l, 模板 DNA 0.5 μ l, *Taq* 酶 0.3 μ l, 补水至 50 μ l。PCR 反应参数为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 61 $^{\circ}$ C 退火 60 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 共 35 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳,鉴定分子量大小,并用 PCR 凝胶回收试剂盒回收和纯化 PCR 产物,操作方法严格参照说明书。

3. *PMLysoPLs* 基因原核重组质粒的构建及鉴定:回收后的 PCR 产物与原核表达质粒 pET 30a(+)经 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切后,按照浓度比 3:1 通过 T4 DNA 连接酶进行连接,转化大肠埃希菌 DH5 α 感受态细胞,用卡那霉素筛选阳性克隆。对阳性质粒进行 PCR、双酶切、1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定和测序鉴定(送上海 Invitrogen 公司测序)。将测序并比对验证完毕的 pET-30a-*PMLysoPLs* 质粒转化大肠埃希菌 BL-21/DE3/DE3 感受态细胞,用卡那霉素筛选阳性克隆。

4. *PMLysoPLs* 基因的诱导表达:以含 pET30a(+)空质粒的大肠埃希菌 BL-21/DE3 为阴性对照。含有 pET30a(+)-*PMLysoPLs* 基因重组质粒的大肠埃希菌 BL-21/DE3 阳性菌接种到含卡那霉素的培养基中,37 $^{\circ}$ C 震荡培养过夜,次日以 1% 的转接量转接至 100 ml LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C、280 rpm 振摇 2 h,使得菌液 A_{600} 达 0.6 ~ 0.8,加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L,诱导 5 h 后收集菌体检测目的蛋白的表达。4 $^{\circ}$ C 离心 6000 g, 15 min 后收集菌体,每克菌体加入 4 ml 1 \times PBS 重悬,4 $^{\circ}$ C 超声破菌 5 min, 4 $^{\circ}$ C 离心 12 000 g, 20 min, 获得上清。取 30 μ l 上清,加入 8 μ l 4 \times SDS 上样 Buffer 及 2 μ l 1mol/L DTT,煮沸 5 min,室温 12 000 g, 1 min 离心,取上清液。对上清液进行聚丙烯酰胺变性凝胶电泳(SDS-PAGE),使用 5% 浓缩胶(80 V)和 15% 分离胶(120 V)。电泳完毕凝胶用考马斯亮蓝蛋白染色液染色和脱色液脱色,观察被诱导的菌体与未加 IPTG 诱导的菌体(阴性对照组)条带的差异,以及与 pET-30a(+)在大肠埃希菌 BL21/DE3 中诱导的菌体及未加 IPTG 诱导的菌体(同时作为阴性对照组)条带的差异。

5. *PMLysoPLs* 基因的大量诱导表达和纯化:按上述方法对阳性克隆进行大量诱导表达后,4 $^{\circ}$ C 6 000 g 15 min 后离心收集菌体,1 \times 结合缓冲液重悬菌体(4 ml/g 湿菌),4 $^{\circ}$ C 超声破菌,4 $^{\circ}$ C 离心 12 000 g 20 min,收集上清,用 0.45 μ m 微孔滤膜过滤除菌。亲和层析柱预处理:用 5 倍体积灭菌去离子水洗 Ni-NTA 柱,5 倍体积 1 \times 离子化缓冲液(0.1 mol/L $NiSO_4$)使柱子饱和变蓝,5 倍体积 1 \times 结合缓冲液平衡。上样品上清液,分别用 10 倍体积 1 \times 结

合缓冲液及 6 倍体积 100 mmol/L 咪唑缓冲液漂洗, 100 ~ 200 mmol/L 咪唑缓冲液梯度洗脱, 收集不同梯度洗脱的组分。经 SDS-PAGE 分析后的纯化蛋白合并于透析袋中(透析分子量为 8 000 ~ 14 000 Da), 使用 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(0.2 mol/L Na_2HPO_4 , 0.2 mol/L NaH_2PO_4) 4℃ 磁力搅拌透析, 每 6 h 换 1 次液, 共换 3 次。透析后的蛋白参考 Bradford^[10] 所报道方法测定浓度, 加入 0.1% 灭菌甘油 - 80℃ 保存备用。

结 果

一、生物信息学分析结果

在艾滋病患者 PM 临床优势株酵母相全长 cDNA 文库中识别出来的 *PMLysoPLs* 基因, 经 NCBI website 中的 Blastx 比较分析, 结果显示, 该基因全长 991 bp, 其全长编码序列长度为 732 bp, 编码 243 个氨基酸, 是具有 5'-和 3'-非翻译区的完整的全长基因, 其中 77 ~ 808 bp CDS 序列编码了 *PMLysoPLs* 的同源蛋白, 其氨基酸序列与其他物种包括非洲爪蛙、小鼠、刺舌蝇、组织胞浆菌、巴西芽生菌、烟曲霉的 *LysoPLs* 一致性分别为 40%、40%、42%、62%、63% 和 65%, 而与踝节菌属的 *LysoPLs* 相似性高达 91%。

二、*PMLysoPLs* 基因的获取

用特异性引物以 PM 酵母相 cDNA 文库质粒 p79-1368 为模板进行 PCR 扩增, 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 所扩增主带位置在相对分子质量 750 bp 左右, 见图 1 第 1 泳道, 与理论预测值相符, 提示 *PMLysoPLs* 基因已扩增成功。

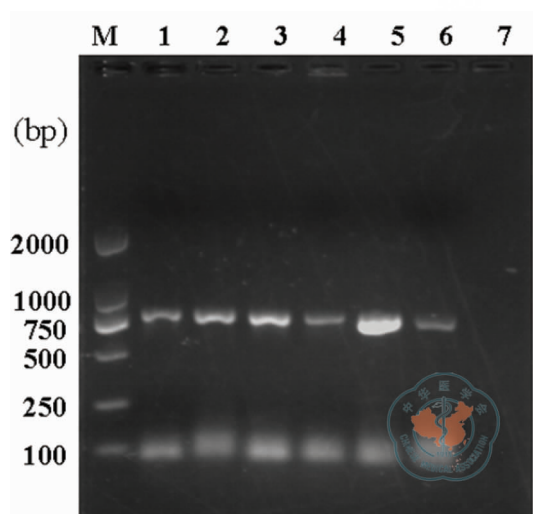


图 1 原核表达载体 pET 30a-*PMLysoPLs* 阳性质粒 PCR 电泳结果

注: M: DL 1000 bp DNA marker, 泳道 1 ~ 6 为 pET 30a-*PMLysoPLs* 重组质粒 PCR 产物, 泳道 7 为阴性对照

三、*PMLysoPLs* 基因原核表达重组质粒的构建

将扩增产物及原核表达载体 pET-30a(+) 用 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切, 酶切产物纯化后用 T4 DNA 连接酶进行连接反应, 构建 pET-30a-*PMLysoPLs* 重组质粒。构建的重组质粒经 PCR 和双酶切。DNA 测序鉴定结果与 PM ATCC 18224-*CsLysoPLA* 核苷酸序列(Accession number: XM_002148841) 比对, 结果显示该片段序列完整且读框正确, 表明原核表达载体 pET 30a(+) -*PMLysoPLs* 构建成功。

四、*PMLysoPLs* 的原核表达、纯化及鉴定

经 pET 30a(+) -*PMLysoPLs* 重组质粒转化的工程菌经 IPTG 诱导表达后, 15% SDS-PAGE 电泳显示在分子量约 27 kDa 处出现明显蛋白条带, 而空质粒转化菌在诱导前后以及重组质粒工程菌在诱导前均无此蛋白条带的出现, 表明此蛋白条带可能是目的蛋白条带(图 2 中 line 4)。菌体裂解上清中亦有该蛋白条带的出现, 证明该蛋白为可溶性表达(图 2 中 line 5)。由于 pET 系列载体表达的融合蛋白均带有 6 × His 标签, 将裂解上清经过金属离子亲和层析柱, 在不同低浓度咪唑梯度漂洗后, 用 200 mmol/L 咪唑洗脱, 获得分子量 25 ~ 35 kDa 的单一蛋白(图 2 中 line 6), 证明目的蛋白纯化成功。所得 *PMLysoPLs* 蛋白纯度达 95% 以上, 浓度为 2.16 g/L。

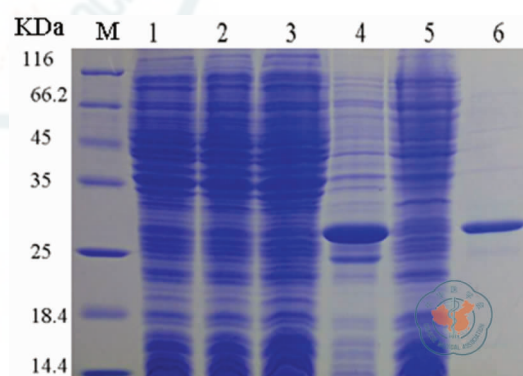


图 2 pET 30a-*PMLysoPLs* 原核表达及纯化产物的 SDS-PAGE 鉴定

讨 论

近年来, 真菌的功能基因组学、蛋白组学研究和生物信息学技术发展迅速, 拓宽了对真菌致病机制研究的范畴。一些常见真菌, 如白色念珠菌、烟曲霉菌、新型隐球菌的致病机制及致病相关基因(如溶血磷脂酶基因)得到了较深入了解, 促进了其他真菌研究的发展^[7, 11-13]。PM 的致病方式与以上真菌相似, 都是以胞外酶和毒素作为重要的致病因子^[14]。因

此,研究 PM 胞外溶血磷脂酶的生物学特性及其在 PM 感染的艾滋病患者中可能发挥的作用和机制,对阐明 PM 感染的艾滋病患者的致病机制具有重要意义。

研究溶血磷脂酶在 PM 感染的艾滋病患者,通过侵犯单核-巨噬细胞系统引起播散性感染而起作用,一条途径可通过蛋白组学等技术手段来寻找其中发挥主要作用的成分,另一途径可通过功能基因组研究,利用生物信息学技术筛选可能参与这一过程的基因^[15]。本课题组利用生物信息学方法,从前期已构建的艾滋病患者 PM 酵母相全长 cDNA 文库中识别出一条与溶血磷脂酶基因同源的全长 cDNA 编码序列,其推测的氨基酸序列与烟曲霉溶血磷脂酶的相似性达到 65%。利用分子克隆技术来研究 PM 胞外溶血磷脂酶基因,为进一步研究其结构和功能提供必需的条件。

在原核细胞表达外源基因,尤其以大肠埃希菌为宿主菌高效表达外源基因时,表达蛋白常在细胞内形成包涵体,不仅不具有物理活性,而且能够水解起始密码子甲硫氨酸的水解酶,不能对所有的表达蛋白都起作用,往往造成所表达的蛋白为非生物体内的天然蛋白^[16]。本研究中,要尽量不使外源 CsLysoPLA 基因在大肠埃希菌中形成包涵体,又要使表达的外源蛋白有一定的含量和比较高的稳定性。为了提高表达水平但不形成包涵体,可采用 IPTG 诱导表达,使细菌的生长与外源基因的表达分开;同时合理控制诱导物的诱导浓度;并且要合理控制细菌诱导前的生长条件与外源基因诱导表达后的生长条件^[16]。本研究采用 1 mmol/L 的 IPTG 诱导,诱导前细菌生长条件为 37℃ 2 h,诱导后生长条件为 37℃ 5 h,使其取得了较为理想的表达效果。对菌体裂解上清进行 SDS-PAGE 电泳,在目的条带(分子量约 27 kDa)处出现明显蛋白条带,证明该蛋白为可溶性表达。利用 Ni-NTA 层析柱对重组蛋白进行纯化时,为提高蛋白的纯度,需使用不同低浓度的咪唑梯度对漂洗。本研究用 200 mmol/L 咪唑洗脱时可获得分子量约 27.5 kDa 的单一蛋白,纯度达 95% 以上,浓度为 2.16 g/L,可以很好地满足下一步免疫动物制备抗体及功能研究的需要。

参 考 文 献

- Baradkar V, Kumar S, Kulkarni SD. *Penicillium marneffei*: the pathogen at our doorstep. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*, 2009, 75(6):619-620.
- 李凌华,唐小平,蔡卫平. 101 例艾滋病合并马尔尼菲青霉菌病的临床研究. *中国艾滋病性病*, 2008, 14(1):12-14.
- 李凌华,胡凤玉,陈万山,等. 马尔尼菲青霉菌溶血磷脂酶基因的克隆、表达及纯化[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志: 电子版*, 2012, 6(2):109-112.
- Vanittanakom N, Cooper CR Jr, Fisher MC, et al. *Penicillium marneffei* Infection and Recent Advances in the epidemiology and molecular biology aspects. *Clin Microbiol Rev*, 2006, 19(1):95-110.
- Karkowska-Kuleta J, Rapala-Kozik M, Kozik A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta Biochim Pol*, 2009, 56(2):211-224.
- Soares DA, de Andrade RV, Silva SS, et al. Extracellular *Paracoccidioides brasiliensis* phospholipase B involvement in alveolar macrophage interaction. *BMC Microbiol*, 2010, 10:241.
- Ma L, Xie L, Dong X, et al. Role of extracellular phospholipase B of *Candida albicans* as a virulent factor in experimental keratomycosis. *Curr Eye Res*, 2009, 34(9):761-768.
- Sánchez A, Escandón P, Castañeda E. In vitro determination of virulence factors activity associated with several *Cryptococcus neoformans* clinical isolates. *Rev Iberoam Micol*, 2008, 25(3):145-149.
- Rementeria A, López-Molina N, Ludwig A, et al. Genes and molecules involved in *Aspergillus fumigatus* virulence. *Rev Iberoam Micol*, 2005, 22(1):1-23.
- 李凌华,胡凤玉,陈万山,等. 艾滋病患者马尔尼菲青霉菌优势株酵母相全长 cDNA 文库的构建和初步分析. *国际流行病学传染病学杂志*, 2010, 37(5):291-295.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72:248-254.
- Siafakas AR, Sorrell TC, Wright LC, et al. Cell wall-linked cryptococcal phospholipase B1 is a source of secreted enzyme and a determinant of cell wall integrity. *J Biol Chem*, 2007, 282(52):7508-7514.
- Theiss S, Ishdorj G, Brenot A, et al. Inactivation of the phospholipase B gene PLB5 in wild-type *Candida albicans* reduces cell-associated phospholipase A2 activity and attenuates virulence. *Int J Med Microbiol*, 2006, 296(6):405-420.
- Brown AJ, Odds FC, Gow NA. Infection-related gene expression in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol*, 2007, 10(4):307-313.
- Chandler JM, Treece ER, Trenary HR, et al. Protein profiling of the dimorphic, pathogenic fungus, *Penicillium marneffei*. *Proteome Sci*, 2008, 6(4):17.
- Rice Full-Length cDNA Consortium, National Institute of Agrobiological Sciences Rice Full-Length cDNA Project Team, Kikuchi S, et al. Collection, mapping, and annotation of over 28,000 cDNA clones from japonica rice. *Science*, 2003, 301(5631):376-379.
- Yuan D, Wang Q, Gao W, et al. Cloning, expression, purification, characterization, crystallization and X-ray diffraction of bifunctional pyrimidine deaminase/reductase from *shigella flexneri* 2a. *Protein Pept Lett*, 2007, 14(9):925-927.

(收稿日期:2011-08-16)

(本文编辑:孙荣华)