基因工程蛋白金葡菌 α-溶血素的纯化及活性检测

张海燕[1,2],马卫明[1],杨宏军[2],王长法[2],何洪彬[2],曹永芝[1]

(1 山东农业大学 动物科技学院,山东 泰安 271018;2 山东省农业科学院 奶牛研究中心,山东 济南 250100)

[摘　要] 【目的】分离纯化基因工程重组蛋白金黄色葡萄球菌溶血素(α-hemolysin,α-HL)并检测其生物学活性,为疫苗研发奠定基础。【方法】对含 pET32a⁺-α-HL 质粒的 BL21(DE3)进行诱导表达,诱导成功后,将重组菌 BL21(DE3)培养物用超声波裂解,并用凝胶过滤层析法对该基因工程蛋白进行分离纯化,用 Bradford 法及兔红细胞分别测定纯化产物的蛋白含量和溶血比活。【结果】纯化产物在 SDS-PAGE 电泳中 53 ku 处呈现出单一清晰带,达电泳级纯度。纯化产物含量约为 0.127 7 mg/mL,溶血比活为 8 192 HU/mg。【结论】成功获得了金黄色葡萄球菌 α-HL,且所获的 α-HL 具有良好的溶血活性。

[关键词] α-溶血素;金黄色葡萄球菌;溶血活性;基因工程蛋白;原核表达

[中图分类号] S856;Q78　　[文献标识码] A　　[文章编号] 1671-9387(2009)05-0029-05

Purification and hemolytyic activity detection of *Staphylococcus aureus* α-hemolysin from gene expression product

ZHANG Hai-yan[1,2],MA Wei-ming[1],YANG Hong-jun[2],
WANG Chang-fa[2],HE Hong-bin[2],CAO Yong-zhi[1]

(1 *College of Veterinary Medicine,Shandong Agricultural University,Taian,Shandong* 271018,*China*;
2 *Cow Research Center,Agricultural Science Academy of Shandong Province,Jinan,Shandong* 250100,*China*)

Abstract:【Objective】The study was to purify the *Staphylococcus aureus* α-hemolysin(α-HL) which was expressed in the host strain BL21(DE3) as a genetic engineering recombinant protein,and then its biologic activity was analyzed to establish foundation for the vaccine research prospect.【Method】The BL21(DE3) containing the plasmid pET32a⁺ α-HL with IPTG was induced to made sure that the interest protein was expressin. Then the BL21(DE3) culture solution under ultrasonic was exposed,and the purification of α-hemolysin was achieved by gel filtration chromatography(GFC). The purified product was analyzed with SDS-polyacrylamide gel electropheresis,and then subjected to the analysis with hemolytic tested on rabbit erythrocyte to detect the median hemolytic dose potency(HD_{50}). Protein concentrations were determined by the method of Bradford.【Result】There was an expected protein band with molecular mass of 53 ku by SDS-PAGE. The protein level was 0.127 7 mg/mL,and hemolysis specific activity was 8 192 HU/mg.【Conclusion】The *Staphylococcus aureus* α-HL was obtained successfully,and it shows good hemolytic activity.

Key words: α-hemolysin;*Staphylococcus aureus*;hemolytic activity;engineered protein;prokaryotic expression

* [收稿日期] 2008-08-28
[基金项目] 山东省农业科学院高技术自主创新基金项目(2006YCX027,2007YCX017-03);山东省农业科学院重大成果培育基金项目(2006YCG012)
[作者简介] 张海燕(1983-),女,山东青岛人,在读硕士,主要从事动物及经济动物疫病防制研究。E-mail:haiyande123@126.com
[通信作者] 马卫明(1970-),男,山东泰安人,副教授,主要从事动物疾病防治研究。E-mail:mawm@sdau.edu.cn

奶牛乳腺炎(Mastitis)不但是造成奶牛业经济损失的最主要原因之一[1],而且还给人类的健康带来了潜在的危害。两年来,研究人员对山东省奶牛场临床型乳腺炎的流行病学进行了较为细致的研究,共得到革兰氏阳性和阴性菌株393株,其中金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*,以下简称金葡菌)、沙门氏菌和大肠杆菌的检出率分别为52%,21.1%和9.24%,证实金葡菌是引起该地区奶牛乳腺炎的主要病原菌[2]。溶血素(α-hemolysin,α-HL),亦称α-毒素,是金葡菌的重要毒力因子之一[1],具有良好的抗原性,经甲醛处理可制成类毒素。近年来国内外研究成果表明,基因工程亚单位疫苗由于具有大剂量高度纯化抗原、无遗传物质、无宿主和培养基成分等优点,在动物传染病的免疫预防中应用较为广泛[2]。

目前,有关金葡菌HL基因工程重组蛋白的研究还较少。本研究拟在张善瑞等[3]成功表达的金葡菌α-HL基因工程重组蛋白的基础上,应用凝胶过滤层析法[4-6],对此基因工程蛋白进行分离纯化,并对蛋白含量和溶血活性[7]进行检测,以期为今后疫苗[2,8-9]的研发奠定基础,也为进一步开展金葡菌α-HL致病机理与免疫机理的研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 菌 种 含pET32a^{+}-α-HL重组质粒的重组菌BL21(DE3),由山东省农业科学院奶牛研究中心实验室构建[3]并保存。

1.1.2 试 剂 蛋白胨和酵母粉购自英国OXOID公司,考马斯亮蓝G-250及α-HL标准品(from *S. aureus*)购自Sigma公司,异丙基-α-D-巯基半乳糖苷(IPTG)购自Promega公司,丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、TRIS-Base及α-巯基乙醇购自Amresco公司,四甲基乙二胺购自Bio-Rad公司,SephadexG-100购自Pharmacia公司,牛血清白蛋白购自Roche公司,凝胶过滤层析柱(14 mm×900 mm)购自上海锦华层析设备厂,其他试剂均为国产分析纯级。

1.1.3 主要仪器 冷冻离心机(3K15型),购自Sigma公司;紫外分光光度计(UV-2000型),购自Tanon公司;电泳仪(DYY-8C),购自北京六一仪器厂;超声破碎仪(VCX600型),购自Sonics & Materials公司。

1.2 主要试剂的配制

SDS-聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)、IPTG(24 mg/mL)、氨苄青霉素(Ampicillin,100 mg/mL)以及LB培养基的配制和保存,均参照TaKaRa宝生物工程(大连)实验室常规试剂配制方法进行。

1.3 金葡菌α-HL的诱导表达

将重组菌BL21(DE3)接种于500 mL LB培养基中,37 ℃恒温摇床孵育8 h,紫外分光光度计测OD_{600}值,在OD_{600}值为0.4～0.6时加入24 mg/mL IPTG,使其终浓度为1 mmol/L[10],37 ℃继续孵育4 h。

1.4 金葡菌α-HL的提取

在无菌条件下,将1.3中诱导的金葡菌α-HL菌液收集于1.5 mL离心管中,14 000 r/min离心30 s,弃上清液,沉淀留样进行SDS-PAGE电泳,以检测α-HL是否诱导成功。

检测诱导成功之后,将1.3中重组菌BL21(DE3)培养物超声波裂解,裂解条件为:4 ℃条件下裂解2 h,14 000 r/min离心25 min,取上清液于磷酸盐缓冲液(PB,pH 9.0)中进行纯化。

1.5 金葡菌α-HL的凝胶过滤层析纯化

称取SephadexG-100 10 g,去离子水浸泡溶胀24 h(室温),弃上清液后灌注层析柱,用PB缓冲液(pH9.0)洗脱平衡,直到流出液的pH值与PB缓冲液的pH值相近为止[6]。将样品缓缓注入凝胶柱中,控制流速为1 mL/min,使样品与凝胶之间充分作用,当样品完全浸入凝胶中时,缓缓注入PB缓冲液洗脱,流速不变,收集洗脱液,3 mL/管,共收集20管,用聚乙二醇透析浓缩至原体积的1/5,用SDS-PAGE电泳检测纯化效率。

1.6 金葡菌α-HL含量的测定

金葡菌α-HL含量的测定参照Bradford法[11]进行,以牛血清白蛋白(BSA)为标准蛋白。

将BSA配制成1 mg/mL的母液,再制成质量浓度分别为10,20,40,60,80,100 μg/mL BSA的标准液,分别与考马斯亮兰G-250显色液混匀,室温放置2 min,用紫外分光光度计在595 nm下测定比色值(OD_{595}),根据比色结果制作蛋白含量标准曲线。

1.7 金葡菌α-HL溶血比活的测定

用体积分数为1%的兔红细胞进行半数红细胞溶血效价的测定[12]。将兔红细胞用磷酸盐缓冲液(0.01 mol/L磷酸钠,0.015 mol/L氯化钠,PBS,pH 7.0)洗涤3次,2 000 r/min离心10 min,收集沉淀,用磷酸缓冲液配成体积分数为1%的红细胞悬液备用。将BSA用PBS配成质量分数1%的BSA溶液,即PBSB,然后将1.5中纯化的α-HL用PBSB

进行倍比稀释[7],与体积分数 1%红细胞悬液相混合,37 ℃温浴 1 h,分别以去离子水和 PBS(pH 7.4)作为完全溶血对照组和不溶血对照组,2 000 r/min 离心 5 min,取上清液用紫外分光光度计在 414 nm 下测定比色值(OD_{414})。按照文献[13-14]的方法,计算溶血比活:溶血比活/($HU \cdot mg^{-1}$)=溶血效价/蛋白浓度。

2　结果与分析

2.1　重组菌 BL21(DE3)的超声波破碎观察

将破碎后的重组菌 BL21(DE3)菌液,于 10×100 油镜下观察,结果如图 1 所示。由图 1 可知,视野中已观察不到形态完整的大肠杆菌,培养的菌液已经匀浆化,说明重组菌 BL21(DE3)破碎比较完全。

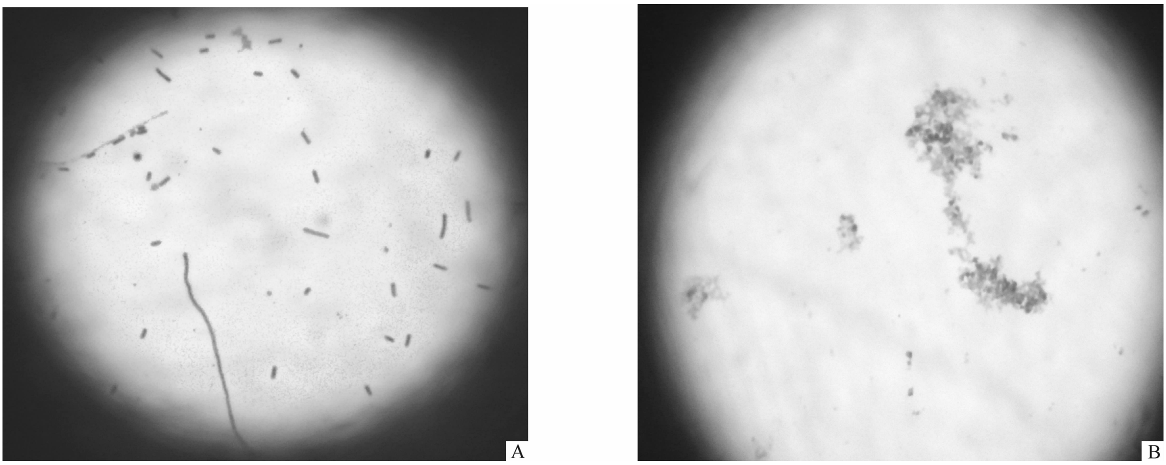

图 1　光学显微镜下重组菌 BL21(DE3)的超声破碎结果(×1 000)

A. 破碎前 ;B. 破碎后

Fig. 1　Micrograph of recombinant BL21(DE3) processed by ultrasonic(×1 000)

A. Before processed;B. After processed

2.2　金葡菌 α-HL 的诱导表达及纯化

图 2 显示,与未诱导株相比,IPTG 诱导株在 53 ku 处有一明显蛋白条带,与预期结果相符,为 α-HL 融合蛋白[3],说明诱导成功。凝胶过滤层析纯化的样品,在 53 ku 处有清晰单一条带,且达到电泳级纯度。

2.3　金葡菌 α-HL 含量的测定

BSA 含量的标准曲线见图 3。凝胶过滤层析得到的纯化金葡菌 α-HL 比色结果为 0.314,将其代入标准曲线方程 $y=0.002\,1x+0.045\,7$ 中,可知 α-HL 蛋白含量约为 0.127 7 mg/mL。

2.4　金葡菌 α-HL 溶血效价的测定

用紫外分光光度计在 414 nm 比色可知,完全溶血对照组(去离子水+兔红细胞)OD_{414} 为 0.957,不溶血对照组(PBS+兔红细胞)OD_{414} 为 0.052,倍比稀释的 α-HL 比色结果如表 1 所示。由表 1 可知,金葡萄 α-HL 的溶血效价 HD_{50} 约为 2^{10}。将溶血效价代入 1.7 节的公式中,可求得金葡菌 α-HL 的溶血比活为 8 192 HU/mg。

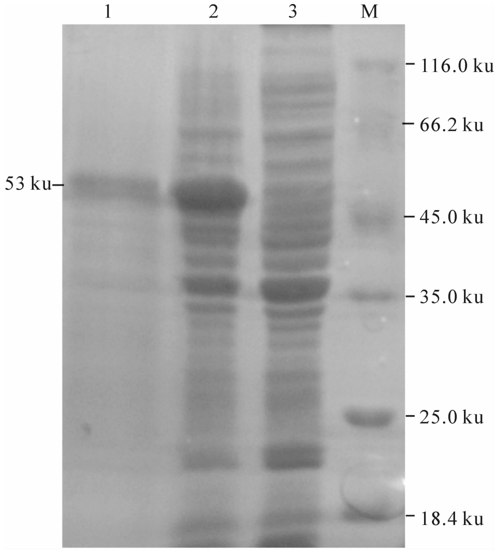

图 2　金葡菌 α-HL 的 SDS-PAGE 电泳结果

M. 蛋白 marker;1. 凝胶过滤层析纯化得到的 α-HL;
2. 诱导之后的重组菌 BL21(DE3)($pET32a^{+}$-α-HL);
3. 诱导之前的重组菌 BL21(DE3)($pET32a^{+}$-α-HL)

Fig. 2　SDS-PAGE analysis of *S. aureus* α-HL

M. Protein marker;1. Purified α-HL with GFC;
2. BL21(DE3)($pET32a^{+}$-α-HL) after induction;
3. BL21(DE3)($pET32a^{+}$-α-HL) before induction

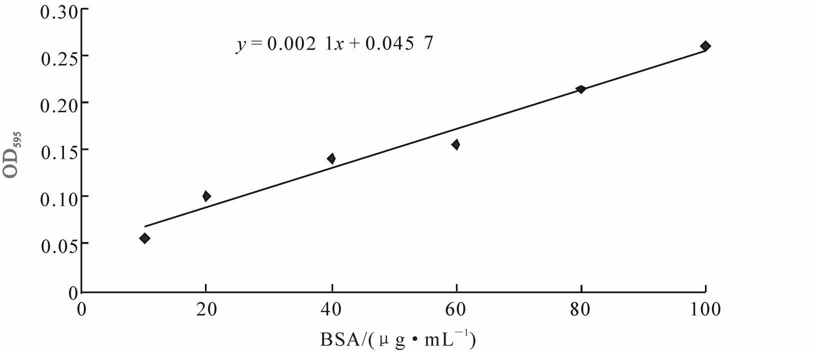

图3 BSA含量的标准曲线

Fig.3 BSA contant standard curve

表1 倍比稀释的金葡菌 α-HL 在 414 nm 的比色值(OD_{414})

Table 1 Multiproportion and shade selection at 414 nm of diluted *S. aureus* α-HL(OD_{414})

α-HL 稀释倍数 Multiproportion of α-HL	OD_{414}	α-HL 稀释倍数 Multiproportion of α-HL	OD_{414}	α-HL 稀释倍数 Multiproportion of α-HL	OD_{414}
2^1	0.881	2^6	0.721	2^{11}	0.122
2^2	0.865	2^7	0.667	2^{12}	0.042
2^3	0.842	2^8	0.603	2^{13}	0.034
2^4	0.800	2^9	0.539	2^{14}	0.036
2^5	0.764	2^{10}	0.251	2^{15}	0.030

3 讨 论

金葡菌细胞壁上的抗原构造比较复杂[1],含有蛋白质和多糖2类抗原,可产生多种毒素和酶,致病性强,其毒力因子主要包括α-HL、黏附素(Adhensin)、荚膜多糖(Capsular polysaccharide)、肠毒素(Enterotoxin)、杀白细胞素及酶类等。α-HL是由金葡菌分泌的一种外毒素[1],其分子质量为33 ku,等电点为8.5,在水中溶解度高,在pH 5~9时稳定[1]。根据α-HL的致病性推测,在乳腺炎的发病过程中,其发挥了重要作用[1]。溶血素的检测方法很多,由于兔红细胞对溶血素的溶细胞作用最为敏感[1],因此常用兔红细胞的溶血试验作为检测溶血素活性的指标之一。

金葡菌α-HL蛋白通过大肠杆菌原核表达之后,获得基因工程重组蛋白,分子量大约为53 ku[3];本研究通过SDS-PAGE检测发现,在53 ku处有单一条带,与预期的α-HL融合蛋白分子量大小一致,且纯化产物达电泳级纯度;用Bradford法[11]测得的纯化产物蛋白含量约为0.127 7 mg/mL;用兔红细胞测定的纯化产物溶血比活为8 192 HU/mg,较α-HL标准品(from *S. aureus*)溶血比活(32 757 U/mg)低,但依然保持良好的溶血活性,说明采用凝胶过滤层析法[4-6]纯化α-HL基因重组蛋白非常成功。Jacos等[15]和Marcelo等[16]曾采用超滤、亲和层析、离子交换层析和凝胶过滤层析法,对猪链球菌2型溶血素进行了纯化,而本试验采用凝胶过滤层析法也可以获得较高的蛋白含量。本试验SDS-PAGE电泳结果还表明,只采取凝胶过滤层析法纯化得到的蛋白,未经其他方法纯化也显示单条带型,说明纯化产物已经达到理想纯度。凝胶过滤层析的介质可以反复应用,并且具有能够大剂量纯化的特点,应用该法在一定程度上节省了实验室资源,且操作也相对比较简单,更节省了时间,为今后大规模的分离纯化工作奠定了基础。

近年来,基因工程亚单位疫苗广泛的研究和应用,为HL基因重组蛋白的疫苗研制提供了理论支持。本试验研究结果为基因工程亚单位疫苗的研发奠定了基础,也有助于对α-HL致病性和免疫原性的进一步了解,将促进对该菌致病机理的认识及该蛋白疫苗的研制。

[参考文献]

[1] Martin D, Paul O, Patrick S. Exotoxins of Staphylococcus aureus [J]. Clinical Microbiology Reviews, 2000, 13: 16-34.

[2] 曹丙蕾.奶牛乳腺炎三联灭活苗的研制及其免疫效力评价[D].山东泰安:山东农业大学,2007.
Cao B L. Development on the triple inactived vaccine of the dairy cattle mastitis and the evaluation of the immunity effectiveness [D]. Taian, Shandong: Shandong Agricultural University, 2007. (in Chinese)

[3] 张善瑞,赵宏坤,杨宏军,等.金黄色葡萄球菌α-溶血素的原核

表达及其生物活性分析 [J]. 农业生物技术学报，200，15(4)：727-728.

Zhang S R，Zhao H K，Yang H J，et al. Prokaryotic expression and bioactivity of the *Staphylococcal* α-Hemolysin [J]. Journal of Agricultural Biotechnolog，2007，15(4)：727-728. (in Chinese)

[4] 张延龄，张　晖. 疫苗学 [M]. 北京：科学出版社，2004：368-371，437-446.

Zhang Y L，Zhang H. Vaccinology [M]. Beijing：Science Press，2004：368-371，437-446. (in Chinese)

[5] 朱立平，陈学清. 免疫学常用实验方法 [M]. 北京：人民军医出版社，2000：66-68.

Zhu L P，Chen X Q. Experimental methods commonly used in immunology [M]. Beijing：Medic of The People Press，2000：66-68. (in Chinese)

[6] 汪家政，范　明. 蛋白质技术手册 [M]. 北京：科学出版社，2000.

Wang J Z，Fan M. Protein technical manuals [M]. Beijing：Science Press，2000. (in Chinese)

[7] Surujballi P，Fackrell B. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Staphylococcus aureus* Alpha-Toxin [J]. Journal of Clinical Microbiology，1984，19(3)：394-398.

[8] 李　明，孙彦伟. 奶牛乳腺炎的防治与研究动态 [J]. 广东畜牧兽医科技，2006，31(3)：11-17.

Li M，Sun Y W. Prevention and control of milch cow mastitis and its research progresses [J]. Guangdong Journal of Animal and Veterinary Science，2006，31(3)：11-17. (in Chinese)

[9] 史冬艳，郝永清. 奶牛乳房炎金黄色葡萄球菌疫苗研究进展 [J]. 中国兽药杂志，2007，41(2)：46-49.

Shi D Y，Hao Y Q. Development of the reasearch for vaccine against bovine mastitis caused by *Staphylococcus aureus* [J]. Chinese Journal of Veterinary drugs，2007，41(2)：46-49. (in Chinese)

[10] 吴一凡，张双全，高秀玉，等. 乳糖诱导 pET 载体表达重组蛋白的研究 [J]. 南京师大学报：自然科学版，2002，25(1)：89-93.

Wu Y F，Zhang S Q，Gao X Y，et al. Expression of b Lymphocyte Stimulator(BlyS) from pE Tplasmid using lactose as inducer [J]. Journal of NanJing Normal University：Natural Science Edition，2002，25(1)：89-93. (in Chinese)

[11] Bradford M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein，utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Anal Biochem，1976，72：248-254.

[12] Geoffroy C，Gaillard J L，Alouf J E，et al. Purification，characterization，and toxicity of the sulfhydryl-actived hemolysin listeriolysin O from *Listeria monocytogenes* [J]. Infect Immun，1987，55(7)：1641-1646.

[13] 方绍庆，陆承平. 猪链球菌 2 型江苏分离株溶血素的纯化 [J]. 中国预防兽医学报，2003，25(5)：363-365.

Fang Q Z，Lu C P. Purification of haemolysin of *Streptococcus suis* type 2 strain HA9801 isolated in Jiangsu Province [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine，2003，25(5)：363-365. (in Chinese)

[14] 陈国强，陆承平，姚火春. 猪链球菌 2 型溶血素的提纯及其生物学特性 [J]. 中国人兽共患病杂志，2001，17(5)：75-77.

Chen G Q，Lu C P，Yao H C. Purification and biological characteristic of a hemolytic toxin of *Streptococcus suis* type2 of Jiangsu strain [J]. Chinese Journal of Zoonoses，2001，17(5)：75-77. (in Chinese)

[15] Jacos A A C. Identification，purification，and characterization of a third-activated haemolysin (Suilyaion) of *Streptcoccus suis* [J]. Infection and Immunity，1995，62：1742-1748.

[16] Marcelo G，Gottschalk. Characterization of *Streptococus suis* capsular type 2 hamelysin [J]. Microbiology，1995，141：189-195.