

# 铜绿假单胞菌 SOS 反应阻遏蛋白 LexA 的复性及活性研究\*

陈炫\*\* 汤绍辉 查庆兵 唐晖 刘芳

(暨南大学附属第一医院临床实验中心 广州 510632)

**摘要** 目的:对 LexA 蛋白复性方法进行优化,对复性后的 LexA 蛋白的生物学活性进行分析。方法:采用含有 GSH/GSSG 的缓冲液,一步稀释法对变性 LexA 蛋白进行复性,用镍离子亲和柱及阳离子柱层析法对复性后的 LexA 蛋白进行纯化,再以 Sephadex G-25 凝胶柱脱盐,采用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳和 RP-HPLC 法检测复性效果,Western blot 分析复性前后及经 DTT 处理后的 LexA 蛋白的免疫反应性,凝胶滞留电泳试验检测复性 LexA 蛋白与 DNA 的特异性结合能力。结果:复性后的 LexA 蛋白出现单体和多聚体的形式,多聚体是由单条肽链聚合而成。LexA 单体和多聚体与兔抗 LexA 多克隆抗体均有较好的反应性。复性后的 LexA 蛋白能与 SOS 盒序列发生特异性结合。

**关键词** 铜绿假单胞菌 LexA 复性

**中图分类号** Q51

SOS 反应(SOS response)是细菌 DNA 分子受到较大范围损伤或复制受到抑制时出现的修复机制<sup>[1]</sup>。LexA 是细菌 SOS 反应的阻遏蛋白,它结合在操纵子的调控序列上抑制一系列包括与 DNA 的切除、重组及复制有关的酶的表达。当细菌发生 SOS 反应时,阻遏蛋白 LexA 发生自我切割,其抑制作用被解除,由此产生细菌进化、毒力因子和耐药基因水平传播加速等后果<sup>[2~6]</sup>。

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA)是医院内感染主要的致病菌之一,严重危害人类健康和生命。近年来,随着广谱抗生素、激素及免疫抑制剂的广泛使用,以及各种侵袭性诊断和治疗手段的不断增加,PA 在医院感染中占有越来越重要的地位。PA 具有极强的环境适应力和抗生素耐药性,常表现对多种抗生素多重高度耐药,临床治疗十分棘手,解决此类抗生素耐药的问题迫在眉睫。LexA 蛋白作为一个新的靶蛋白对高效抗菌药物研制和 PA 与宿主的相互关系及其致

病机理的研究均有重要意义。在本研究中,对 LexA 蛋白复性方法进行了优化,并对复性后的 LexA 蛋白的生物学活性进行了分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

铜绿假单胞菌 PAO1 株由本室保存。纯化的 LexA 蛋白及兔抗 LexA 多克隆抗体由本室制备<sup>[7]</sup>。尿素、三氯乙酸、咪唑、BSA、谷胱甘肽氧化型(GSSG)、谷胱甘肽还原型(GSH)、丙烯酰胺、N,N-亚甲基双丙烯酰胺、TEMED、DTT、PMSF、HEPES、鲑精 DNA 等为 Sigma 公司产品。蛋白 Marker 购自北京鼎国生物技术公司。HRP 标记羊抗兔 IgG 购自武汉博士德公司。T4 多核苷酸激酶为 Promega 公司产品,[ $\gamma$ -32 P]ATP 购自北京亚辉生物医学工程公司。镍离子亲和柱、阳离子层析柱及 Sephadex G-25 凝胶柱均为 Amersham 公司产品。探针序列为 ctgtatataatcccagtcactg gataaaacacag,由上海生物工程公司合成。

### 1.2 方法

1.2.1 LexA 蛋白的复性 在 4℃ 搅拌下,在 2h 内,向

包涵体溶解液中缓慢滴加 5 倍体积的复性缓冲液 I (10mmol/L PB, 0.9mmol/L GSSG, 0.8mmol/L GSH, 2mol/L 尿素, pH 8.0), 4℃ 搅拌复性 24h; 再加入 5 倍体积的复性缓冲液 II (20mmol/L Tris-HCl, 0.9mmol/L GSSG, 0.8mmol/L GSH, pH9.0), 充分混匀后, 4℃ 搅拌复性 24h。将上述复性溶液用 0.45 $\mu$ m 孔径的滤膜过滤, 4℃ 下用截流相对分子量为 10000kDa 的膜包在 Sartorius 超滤装置上浓缩 10~20 倍。再用酶切缓冲液等容超 6~8 个体积, 最后用酶切缓冲液将其稀释至蛋白浓度为 2.0mg/ml 左右。

**1.2.2 复性蛋白的镍离子亲和柱层析纯化** 采用镍离子亲和柱层析填料 Chelating Sepharose Fast Flow 装填于 XK16/10 柱中, 上样蛋白总量约为 30mg, 亲和层析缓冲液 C (20mmol/L Tris, pH 8.0) 平衡柱子至基线平稳后, 采用亲和层析缓冲液 D (20mmol/L Tris, 10 mmol/L 咪唑, pH 8.0) 梯度洗脱。

**1.2.3 复性蛋白的离子柱层析纯化** 将 HiTrap IEX selection Kit 中 3 种阳离子层析柱: HiTrap S 1ml, HiTrap SP 1ml 和 HiTrap CM FF 1ml 分别连接到 AKTA explorer-100 层析系统。上样蛋白总量约为 15 mg, 阳离子交换层析缓冲液 A (20mmol/L Tris, pH 7.0) 平衡柱子至基线平稳后, 采用阳离子交换层析缓冲液 B (20mmol/L Tris, 1mol/L NaCl, pH 7.0) 梯度洗脱。

**1.2.4 Sephadex G-25 凝胶柱脱盐** Sephadex G-25 凝胶装柱, 柱型 XK16/20, 柱床体积 33ml, 脱盐缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, pH7.0) 洗脱。

**1.2.5 复性蛋白的分析** (1) 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳: 以非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测蛋白复性程度。(2) RP-HPLC 纯度分析: 用 Agilent 1100 型 HPLC 进行蛋白纯度分析。先用流动相 A (900ml 超纯水、100ml 乙腈和 1.0ml 三氟乙酸) 平衡柱子, 洗脱梯度为流动 B 相 (100ml 超纯水、乙腈 900ml 和 0.9ml 三氟乙酸) 从 0% → 80%, 20min; 柱温 30℃; 流速 1.0ml/min; 上样量 100 $\mu$ l; 检测波长分别为 280nm; 检测时间 20min。

**1.2.6 Western blot 分析** 目的蛋白用 SDS-PAGE 分离后电转移至 NC 膜上, 以 1:500 稀释的兔抗 LexA 多克隆抗体为一抗, 1:20000 稀释的 HRP 标记羊抗兔 IgG 为二抗, 检测 LexA 多抗与不同 LexA 蛋白的免疫反应性。

**1.2.7 探针的标记和纯化** (1) 磷酸化反应: 探针 (11.75mol/ $\mu$ l) 1 $\mu$ l, 10 $\times$  T4 多核苷酸激酶缓冲液 2 $\mu$ l,

ATP (10mol/ml) 5 $\mu$ l, 超纯水 11 $\mu$ l, T4 多核苷酸激酶 1 $\mu$ l。充分混匀后, 37℃ 45min, 68℃ 10min。(2) 探针的纯化: 加 40 $\mu$ l 超纯水, 720 $\mu$ l 10mol/L NH<sub>4</sub>Ac, 混匀, 再加入水 120 $\mu$ l 和预冷的无水乙醇 750 $\mu$ l, 混匀, 于 4℃ 放 2 h, 12 000r/min, 4℃ 离心 20 min。小心吸去上清, 残存的乙醇蒸发后, 将放射性标记的探针重溶于 50 $\mu$ l TE (pH7.6), -20℃ 保存。

**1.2.8 凝胶阻滞试验** (1) DNA 结合反应: 5 $\times$ 凝胶滞留结合缓冲液 2 $\mu$ l, 复性后的 LexA 蛋白 5 $\mu$ l, 鲑精 DNA (4g/L) 1 $\mu$ l, 在室温下 10min 后, 加入 (2 $\mu$ l) 15pmol<sup>32</sup>P-标记的探针, 竞争试验分别加入 30, 50 倍摩尔数的未标记探针, 反应总体积 20 $\mu$ l, 室温下反应 30min。(2) 电泳: 配制 4% PAGE。电泳条件: 100V, 0.5 $\times$  TBE 电泳液, 预电泳 30min, 然后上样、电泳 3h。放射自显影: 将胶用保鲜膜包上后, 放入片盒, 压 X 光胶片, -70℃ 48h, 洗片。

## 2 结果

### 2.1 复性 LexA 蛋白的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳和 Western blot 分析

LexA 纯化后样品缓慢滴入包涵体复性缓冲液 I 后, 出现肉眼可见的乳光, 溶液微浑, 4℃ 搅拌 48 小时后, 用 0.45 $\mu$ m 孔径的滤膜过滤后溶液透明无乳光。超滤后 Lowry 法测定蛋白浓度为 1.0mg/ml, 目的蛋白回收率为 20%。采用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 LexA 发现, 复性前样本呈现单一条带, 复性后样本有较为明显的高分子量蛋白条带产生, 复性后用 DTT 处理样本又呈现单一条带。Western blot 分析发现, LexA 单体和聚体与兔抗 LexA 多克隆抗体均有较好的反应性 (图 1)。

### 2.2 RP-HPLC 检测重组 LexA 的复性

复性前、后的样本在 RP-HPLC 呈现不同的色谱峰形 (图 2), LexA 变性条件下以单体形式存在, 呈现单一主峰 (A), 利用面积归一法分析 LexA 的纯度为 98%。复性后呈现多个色谱峰 (B), 在单体主峰的位置 (同一保留时间处) 也有吸收峰, 反映出复性后除了单体之外, 还有聚体存在, 与非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳的结果一致。利用面积归一法分析 LexA 的纯度为 92.97%。

### 2.3 凝胶滞留试验检测 LexA 蛋白的活性

将复性后的 LexA 与标记的探针 (SOS 盒) 进行凝胶滞留试验, 反应体系中未加 LexA 时仅见游离 DNA

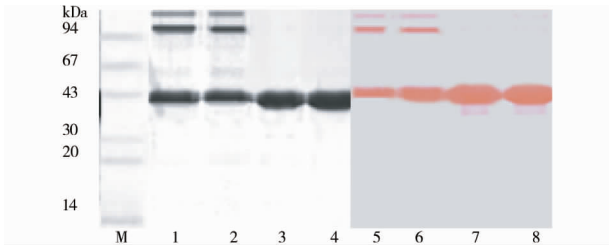


图1 LexA 复性后非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳和 Western blot 检测

M:中分子蛋白质标准;1,2,5,6:复性重组 LexA 蛋白的非变性 PAGE 和 Western blot 分析;3,7:复性重组 LexA 蛋白经 DTT 处理后的非变性 PAGE 和 Western blot 分析;4,8:重组 LexA 蛋白复性前的非变性 PAGE 和 Western blot 分析

Fig.1 The native PAGE and Western blot analysis of renatured recombinant LexA

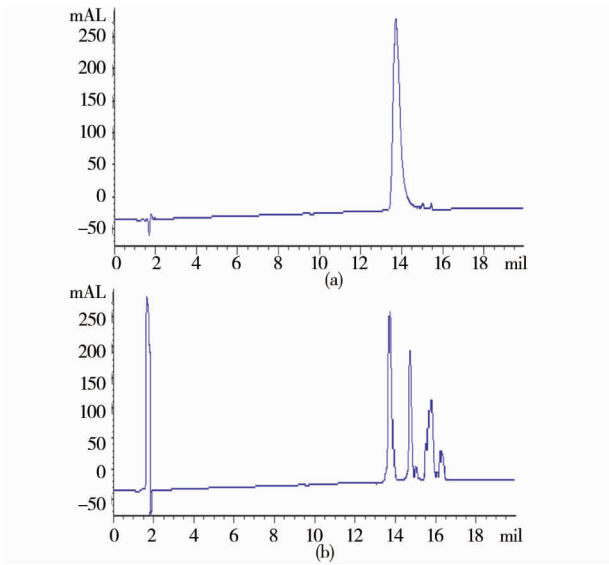


图2 LexA 复性的 RP-HPLC 检测

(a) LexA 复性前 (b) LexA 复性后

Fig.2 The RP-HPLC analysis of renaturation of recombinant LexA

条带(Lane1),探针 LexA 与标记探针发生结合可见一条明显滞后的蛋白 - DNA 结合条带(Lane2),反应体系中加入过量未标记探针进行竞争抑制试验,结合反应明显减弱(Lane3,4),表明复性后的 LexA 能与探针发生特异性结合(图3)。

3 讨论

新近研究表明,细菌可以籍某些自身因素(如 SOS 反应)控制进化以抵抗来自抗生素的攻击,因此阻断细

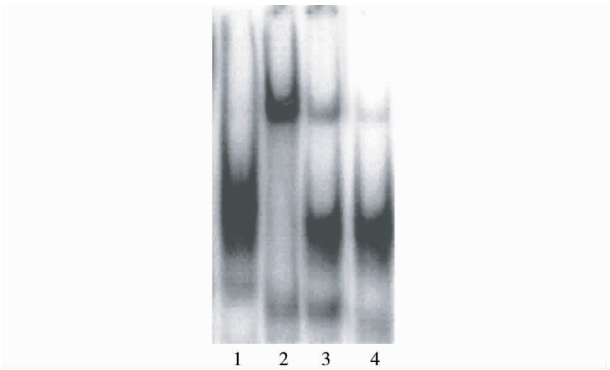


图3 LexA 与 DNA 结合的凝胶滞积电泳试验

1:游离 DNA;2:标记探针 + LexA;3,4:(30 × ,50 × )未标记探针 + 标记探针 + LexA

Fig.3 LexA bind to SOS box as demonstrated by the mobility shift

菌快速突变过程中的一些关键步骤,将成为从根本上克服细菌对抗生素的产生耐药性的关键方法,而关闭 SOS 系统,阻止过度进化,就能防止细菌产生耐药性的级联突变的发生<sup>[8]</sup>。大量活性 LexA 蛋白的获得将为其空间结构和 SOS 反应调控机制的研究以及其抑制药物的筛选奠定基础。在过往实验中,我们已经制备了纯化的 LexA 蛋白<sup>[7]</sup>,现进一步对其进行复性及生物活性分析。

极端 pH 值可以破坏蛋白的次级键从而增进包涵体溶解。本研究中,我们发现 LexA 蛋白包涵体在 pH 值 7-9 范围内的 8mol/L 尿素中溶解较为困难,只有在 pH >9 的 8mol/L 尿素中才能充分溶解。由于蛋白间二硫键的存在,在增溶时一般使用还原剂如巯基乙醇、DTT 等,但在本研究中,是否添加 DTT 对 LexA 蛋白的溶解无显著影响。而在凝胶过滤柱层析纯化时,DTT 的加入明显改善了色谱峰形及纯化效果,表明还原剂有利于二硫键的解离,是 LexA 蛋白的结构和色谱行为更趋于一致,有助于 LexA 蛋白的纯化。

包涵体蛋白一般采用两种纯化方式:一是在变性条件下进行分步纯化;二是先进行复性处理,再进行分步纯化。经过比较, LexA 蛋白在变性条件下(8 mol/L 尿素)纯化效果更好,回收率也较理想,经过二步纯化 LexA 蛋白的纯度达到 98%。高纯度的变性蛋白,可以提高目的蛋白的复性效率,在本研究中我们采用在变性条件下进行分步纯化,取得了较好的效果,为开展 LexA 蛋白的复性以及 LexA 蛋白的生物学活性研究奠定了基础。

蛋白体外复性的基本原理是随着变性剂去除或浓度降低,蛋白就会自发地从变性的热不稳状态向热力学稳定状态转变,形成具有生物活性的天然结构。然而在去除变性剂的同时,蛋白分子间存在大量错误折叠和聚合,蛋白体外复性的效率取决于正确折叠过程与错误折叠过程之间的竞争<sup>[9,10]</sup>。蛋白质的复性过程受到周围环境的影响,如蛋白浓度与纯度、温度、pH 值、离子强度、复性时间、变性剂的残留量等<sup>[11]</sup>。常用的复性方法有透析法、稀释法、超滤法及层析法等<sup>[12]</sup>。稀释法是最简单和常用的复性方法,通过降低蛋白溶液中的变性剂浓度,促进蛋白正确折叠。稀释法有一步稀释法、分步稀释法和连续稀释法等。在稀释时加入适量的氧化-还原剂,如 GSH/GSSG、DTT/GSSG、DTE/GSSG 等,通过促进不正确配对的二硫键快速交换反应,提高了正确配对的二硫键的产率。

在本实验中,我们采用了含有 GSH/GSSG 的缓冲液一步稀释法对 LexA 蛋白进行复性,确定最佳复性条件为复性缓冲液 I (10mmol/L PBS,0.9mmol/L 谷胱甘肽氧化型,0.8mmol/L 谷胱甘肽还原型,2mol/L 尿素,pH 8.0),复性缓冲液 II (20mmol/L Tris-HCl,0.9mmol/L 谷胱甘肽氧化型,0.8mmol/L 谷胱甘肽还原型,pH 9.0)。复性后 LexA 蛋白主要以单体形式存在,还有少量的二聚体和多聚体,复性后 LexA 蛋白纯度达 92.97%,取得较好的复性效果;同时我们用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳和 Western blot,分析发现复性后的 LexA 蛋白出现单体和聚体的形式,而 DTT 处理之后无明显的聚体,表明聚体是由单条肽链聚合而成,Western blot 分析表明 LexA 单体和聚体与兔抗 LexA 多克隆抗体均有较好的反应性,LexA 蛋白复性前和复性后在 RP-HPLC 上的色谱行为存在差异,也反映出复性后 LexA 蛋白有明显的聚体形成,因此,RP-HPLC 在一定程度上可以监测重组蛋白复性效果。

LexA 是细菌 SOS 反应的阻遏蛋白,其生物学作用是与 SOS 反应的调控序列(SOS 盒)结合阻遏 SOS 反应的发生。LexA 包含两个结构域,N 末端是 DNA 结合结构域,C 末端是寡聚化结构域,与二聚体的形成有关。LexA 以二聚体的形式与 SOS 盒结合。LexA 发生自我切割后,其 N-末端和 C-末端分离而失去二聚化的能力,导致与 SOS 盒的亲合力降低,SOS 盒序列暴露,SOS 基因表达的阻遏状态因此被解除<sup>[1,13]</sup>。因此,判断 LexA 的活性需检测其与靶 DNA 序列的特异性结合能力。

本研究采用凝胶滞留试验显示复性后的 LexA 具有与调控序列特异性结合能力,证明复性后的 LexA 具有良好的生物学活性。

## 参考文献

- [1] Elaine O D, Edith M D, Lucinda R. Definition of the micobacterial SOS box and use to identify Lex-refulated genes in *Mycobacterium tuberculosis*. J Bacteriol, 2002, 184: 3287 ~ 3295
- [2] Hastings P J, Rosenberg S M, Slack A, et al. Antibiotic-induced lateral transfer of antibiotic resistance. Trends Microbiol, 2004, 12(9): 401 ~ 404
- [3] Aertsen A, Michiels C W. Upstream of the SOS response; figure out the trigger. Trends Microbiol, 2006, 14(10): 421 ~ 423
- [4] Cirz R T, Romesberg F E. Induction and inhibition of ciprofloxacin resistance conferring mutations in hypermutator bacteria. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50(1): 220 ~ 225
- [5] Levin B R. Noninherited resistance to antibiotics. Science, 2004, 305: 1578 ~ 1579
- [6] Beaber J W, Hochhut B, Waldor M K. SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. Nature, 2004, 427(6969): 72 ~ 74
- [7] 陈炫, 汤绍辉, 唐晖, 等. 铜绿假单胞菌 LexA 蛋白的纯化及免疫活性分析. 中国生物工程杂志, 2007, 27(5): 107 ~ 112  
Chen X, Tang S H, Tang H, et al. China Biotechnology, 2007, 27(5): 107 ~ 112
- [8] Cirz R T, Chin J K, Andes D R, et al. Bacterial SOS may be the key to combating antibiotic resistance. PLoS Biol, 2005, 3: e221
- [9] Lilie H, Schwarz E, Rudolph R. Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. Curr. Opin. Biotechnol. 1998, 9(5): 497 ~ 501
- [10] 黄泓, 张伟. 包涵体的体外复性研究进展. 生命的化学, 2003, 23(5): 397 ~ 399  
Huang H, Zhang W. Chemistry of Life, 2003, 23(5): 397 ~ 399
- [11] 陈惠鹏. 医学生物工程进展. 北京: 人民军医出版社, 2004. 17  
Chen H P. Progress in Biomedical Engineering. Beijing: People's Military Medical Press, 2004. 17
- [12] Clark E B. Protein refolding for industrial processes Curr Opin Biotechnol, 2001, 12(2): 202 ~ 207
- [13] Kelley W L. Lex marks the spot; the virulent side of SOS and a closer look at the LexA regulon. Mol Microbiol, 2006, 62(5): 1228 ~ 1238

# The Renaturation and Activity Study of LexA From *Pseudomonas aeruginosa*

CHEN Xuan TANG Shao-hui CHA Qing-bing TANG Hui LIU Fang

(Department of Clinic Experiment Center, The First Affiliated Hospital of JiNan University, Guangzhou 510630, China)

**Abstract** Objective: To optimize the renaturation procedure of denatured LexA, prepare the repressor LexA from *Pseudomonas aeruginosa* (PA), which have the satisfactory biologic activity. Methods: The LexA was renatured by the GSH/GSSG dilution method, and the renatured protein were purified by  $\text{Ni}^{2+}$  chelate affinity chromatography and gel filtration chromatography, following desalination by Sephadex G-25 gel column. The renaturation result were detected by the native polyacrylamide gel electrophoresis and RP-HPLC. The immunological activity of all LexA proteins, including the denatured, renatured protein and the renatured protein that was treated with the DTT, were determined by Western blot. Results: The renatured LexA appears both monomer and multimer, which is confirmed by the native polyacrylamide gel electrophoresis analysis and RP-HPLC. Gel retardation experiments shows that the renatured LexA have satisfactory biologic activity.

**Key words** *Pseudomonas aeruginosa* LexA Renaturation

## 欢迎订阅《遗传学报》和《遗传》杂志

《遗传学报》、《遗传》杂志是中国遗传学会和中国科学院遗传与发育生物研究所主办、科学出版社出版的核心期刊,已被美国化学文摘(CA)、生物学数据库(BIOSIS)、生物学文摘(BA)、医学索引(Medical Index)、俄罗斯文摘杂志(AJ)以及NCBI、CABI等20多种国内外重要检索系统与数据库收录。刊登内容包括遗传学、发育生物学、基因组学、细胞生物学以及分子进化。读者对象为基础医学、农林牧渔、生命科学领域的科研与教学人员、研究生、大学生、中学生物学教师等。

《遗传学报》曾于2005年获第三届国家期刊奖提名奖,2006~2007年连续获得中国科协精品科技期刊工程项目(B类)资助。自2007年起,《遗传学报》的外文刊名变更为Journal of Genetics and Genomics。

《遗传学报》(ISSN 1673-8527, CN11-5450/R)为月刊,全年12期,国内邮发代号2-819,国外发行代号:M63。2008年定价50元,全年600元。期刊中文网址:遗传学报.cn

《遗传》(ISSN 0253-9772, CN11-1913/R)为月刊,全年12期。国内邮发代号2-810,国外发行代号:M62。2008年定价40元,全年480元。期刊中文网址:遗传.cn

欢迎订阅,欢迎网上注册投稿,欢迎发布广告

联系地址:北京市安定门外大屯路:中国科学院遗传与发育生物研究所编辑室

主 编:薛勇彪;编辑室主任:李绍武 E-mail:ycxb@genetics.ac.cn; yczz@genetics.ac.cn

邮政编码:100101; 电话/传真:010-64889354, 64807669

http://www.Chinagene.cn; http://jgenetgenomics.org; 中国遗传网.cn