

两歧双歧杆菌中 *serpin* 基因的克隆、 表达与功能分析*

叶若松 黎 鹏 章昭琳 万翠香** 崔 佳 魏 华

(南昌大学食品科学与技术国家重点实验室 南昌 330047)

摘要 从 *Bifidobacterium bifidum* WBB102 基因组中克隆了 *serpin* 基因片段,构建了重组 Serpin 蛋白的原核表达体系,实现了 Serpin 的表达与纯化。纯化的 Serpin 蛋白进行了抑制肠道蛋白酶活性检测,以及对双歧杆菌粘附作用影响的显微观察研究。结果表明:WBB102 中长度为 768 bp 的 *serpin* 基因序列,与 GENE BANK 中 *Bifidobacterium longum* NCC2705 *serpin* 序列同源性为 99.9%。原核表达载体 pBX₂-WBB102 表达的 Serpin 能有效地抑制糜蛋白酶和胰弹性蛋白酶的活性,最高抑制率分别为 90% 和 97%,显微观察结果证实 Serpin 能促进双歧杆菌对 HT-29 细胞的粘附。

关键词 双歧杆菌 Serpin 克隆表达 粘附

中图分类号 Q789

双歧杆菌作为人体肠道的原籍优势菌之一,在调节微生态平衡和促进宿主健康方面具有重要生理作用。粘附和免疫是其作用的两大基础^[1-2],然而有关双歧杆菌粘附肠上皮细胞的作用机制和参与免疫作用的物质不甚清楚。作为与双歧杆菌定植作用有关的外膜蛋白之一,近三年来 Serpin (serine protease inhibitor) 的研究引起了注意。Serpin 是一类多肽类的丝氨酸蛋白酶抑制剂的总称,由 350 至 500 个氨基酸组成。在真核生物中, Serpin 通过调节丝氨酸蛋白酶和半胱氨酸蛋白酶的活性,参与纤溶、炎症反应、细胞迁移、分化以及凋亡等许多重要的生命活动。然而,有关原核生物中 Serpin 功能作用的报道甚少^[3-5]。2006 年瑞士雀巢研究中心发现长双歧杆菌 (*Bifidobacterium longum*) NCC2705 的 Serpin 蛋白可以有效抑制外源蛋白酶的活性,为双歧杆菌黏附于肠道提供帮助。除长双歧杆菌 NCC2705 外, Serpin 在双歧杆菌其它种属中的研究还未见报道。

本文通过分子生物学的方法,拟对两歧双歧杆菌 (*Bifidobacterium bifidum*) WBB102 中的 *serpin* 基因进行克隆,并构建原核表达载体诱导 Serpin 的表达,初步探

讨其生理作用的基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 菌株、质粒和细胞系 两歧双歧杆菌 (*Bifidobacterium bifidum*) WBB102, 大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 和 *E. coli* BL21 由南昌大学食品科学与技术国家重点实验室魏华课题组保藏。表达载体 pBX₂ 质粒由南昌大学兼职教授陶勇博士馈赠,肠上皮细胞 HT-29 由南昌大学医学院馈赠。

1.1.2 试剂与仪器 T₄ DNA 连接酶、限制性内切酶 *Nde* I、*Xho* I, PCR 产物纯化试剂盒、质粒小量快速提取试剂盒, DL2000, 蛋白质 Marker (TaKaRa); Pfu PCR mix (北京东盛); 糜蛋白酶、弹性蛋白酶 (博美生物); 酶底物 MeOSuc-AAPV-AMC (日本 Peptide 公司); 咪唑、Ni²⁺-NTA 树脂 (美国 Merk 公司); 细胞培养液 D-MEM/F-12 (GIBCO 公司)。

超声细胞破碎仪 (宁波新芝生物科技股份有限公司), PCR 仪 (德国 Eppendorf 公司), 离心机 (美国 Thermo 公司), 凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 *serpin* 基因片段的克隆 根据已发表的 *Bifidobacterium longum* NCC2705 基因组序列, 设计

收稿日期:2010-09-14 修回日期:2010-11-16

* 国家“863”计划(2008AA10Z337)、国家自然科学基金(30900038)、江西省主要学科学术带头人培养计划(2009)资助项目

** 通讯作者,电子邮箱:awanwan2000@yahoo.com.cn

serpin 基因活性保守区 RCL 环的上下游引物, 用于重组质粒的构建。

上游: 5'CGCG CGGCCGCCATATGTACCAATCGCT GCTAAGTTTCA3' (*Nde* I)

下游: 5'CAGCTGCAG CTCGAGGAACCGGTGTCGA TCATCTTG 3' (*Xho* I)

PCR 扩增条件: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 30 s、62℃ 30 s、72℃ 45 s 共进行 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min。PCR 扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 用 PCR 产物纯化试剂盒回收。

1.2.2 重组质粒的构建 分别用 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切质粒 pBX₂ 和 PCR 回收产物, 按照质粒 DNA: 目的基因 = 1: 5 进行连接转化, 在氨苄青霉素抗性平板上筛选转化子, 随机挑取单菌落进行 PCR 扩增并提取质粒 DNA, 通过限制性内切酶的酶切验证^[6], 得到阳性重组质粒 pBX₂-WBBI02 后测序。

1.2.3 *Serpin* 的诱导表达 提取测序正确的 pBX₂-WBBI02 质粒转化至 *E. coli* BL21 中, 挑取单菌落至含有 100 μg/ml 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 37℃, 200 r/min 培养 16 h 后菌液按 1: 100 的比例接入新鲜 LB 液体培养基中, 37℃ 振荡培养 2.5 h 左右至 OD₆₀₀ 达 0.4, 加入 IPTG 至终浓度 0.2 mmol/L, 25℃ 继续振荡培养 3 h, 并设未诱导对照和 pBX₂/BL21 空质粒诱导的对照。诱导结束收集菌液, 4000 r/min 离心 10 min, 菌体裂解液 (20 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 7.4) 重悬菌体, 并进行超声破碎, 13000 r/min 离心 5 min 后分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE 蛋白电泳分析。

1.2.4 表达产物的纯化 采用 NTA His · Bind 树脂柱进行纯化, 先用结合缓冲液 (100 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 300 mmol/L NaCl, 10 mmol/L 咪唑) 进行柱平衡, 然后以 0.5 ml/min 的流速上样, 再用 3 倍柱体积的漂洗缓冲液 (100 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 300 mmol/L NaCl, 100 mmol/L 咪唑) 洗脱非特异性结合在柱子上的蛋白。最后用 3 倍柱体积的洗脱缓冲液 (100 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 300 mmol/L NaCl, 250 mmol/L 咪唑) 将目的蛋白大量洗脱收集, SDS-PAGE 检测纯化结果。

1.2.5 *Serpin* 对糜蛋白酶和弹性蛋白酶的抑制活性实验 称取 1 mg 糜蛋白酶, 加入 1 ml 缓冲溶液 A (50 mmol/L Na₃PO₄, 100 mmol/L NaCl, pH 7.2); 称取 1 mg 弹性蛋白酶, 加入 1 ml 缓冲溶液 B (50 mmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L NaCl, pH 8.0) 中。上述两种酶溶液分别用各自的缓冲液稀释成 200 U/ml 的浓度。分别称

取 0.1 mg MeOSuc-AAPV-AMC 加至 1 ml 上述两种缓冲液中, 配制底物缓冲液。

取 50 μl 上述两种酶溶液, 分别加入 0.1 ng、1 ng、5 ng、10 ng 上述步骤纯化的 *E. coli* 重组表达 *Serpin*, 37℃ 孵育 40 min; 加入 5 μl 底物反应缓冲液, 同时设置不加 *Serpin* 对照组, 以及底物对照组。37℃ 孵育 20 min 后用酶标仪在 460 nm 处测 OD₄₆₀ 值。酶活性的抑制率 = 加 *Serpin* 组的 OD 值 - 不加 *Serpin* 对照组的 OD₄₆₀ 值 / 不加 *Serpin* 组的 OD 值。实验设 3 个平行样, 按照常规统计法计算其平均值和标准偏差。

1.2.6 *Serpin* 促进双歧杆菌对细胞的粘附实验 采用不含 *serpin* 基因两歧双歧杆菌 (*Bifidobacterium bifidum*) WBBI01 进行粘附实验, 双歧杆菌和 HT-29 细胞参考文献[6]的方法, 进行培养。

细胞粘附实验: 24 孔细胞培养板中的 HT-29 细胞单层用无菌 PBS 洗 3 遍, 每孔加入 1 ml 双歧杆菌悬浮液。轻柔晃动细胞培养板, 使双歧杆菌分散均匀, 再加入纯化的重组 *Serpin* 蛋白, 并设置不加 *Serpin* 的对照组。将细胞培养板用胶带粘住两边后置于 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养 2.5 h 后, 用 PBS 洗 10 遍, 除去未粘附的双歧杆菌, 置于室温下自然干燥, 甲醇固定 10 min, 革兰氏染色, 油镜下观察双歧杆菌在 HT-29 细胞上的粘附情况。

2 结果

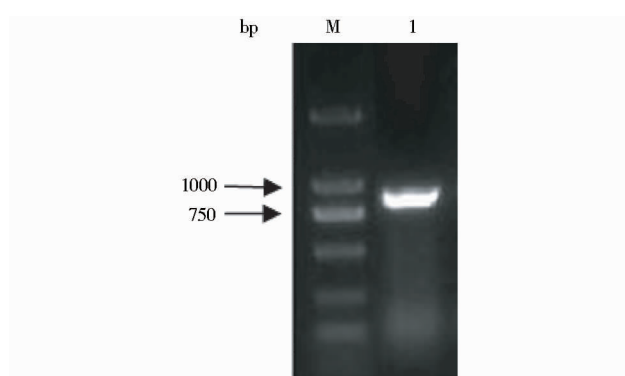
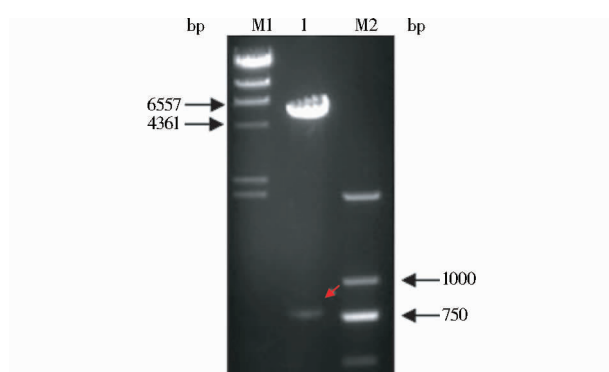
2.1 *Serpin* 的扩增及重组质粒的鉴定

Bifidobacterium bifidum WBBI02 *serpin* 的扩增产物经琼脂糖凝胶电泳, 结果如图 1 所示。在 750 bp 左右可见目的基因片段, 与预期结果相符。重组质粒 pBX₂-WBBI02 双酶切产物电泳图谱如图 2 所示, 酶切产生一条 750 bp 左右的条带和一条与质粒大小相符的条带, 表明目的片段接入表达载体。

阳性重组质粒序列分析表明: 克隆到的 *serpin* 基因片段为 768 bp, 涵盖 *Bifidobacterium longum* NCC2705 *serpin* 的活性 RCL 环区, 与 *Bifidobacterium longum* NCC2705 *serpin* 相比, 其第 374 位碱基, 即全长中第 770 位碱基发生改变, 由 G 代替了 A, 并导致 *Bifidobacterium longum* NCC2705 *Serpin* 中的谷氨酰胺被精氨酸所代替。

2.2 *Serpin* 的诱导表达与纯化

Serpin 的诱导表达结果如图 3 所示。与空质粒诱导带对照, pBX₂-WBBI02/BL21 诱导表达带在约 33 kDa 处有 1 条过量表达蛋白带, 与目的蛋白的预期值

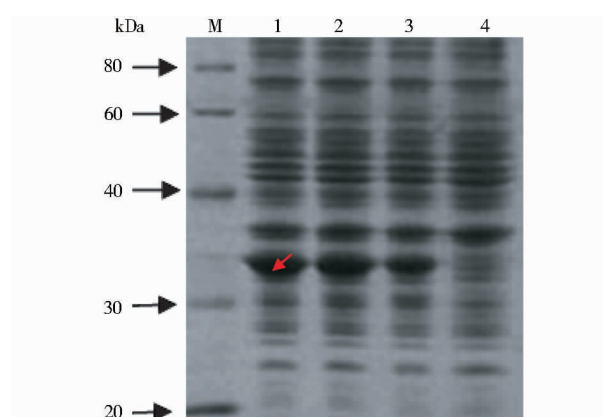
图1 *serpin* 基因 PCR 产物电泳图谱Fig. 1 Electrophoresis pattern of PCR product of *serpin*M: DL2000; 1: PCR product of *serpin*图2 pBX_2 -WBBI02 重组质粒的双酶切鉴定电泳图谱Fig. 2 Electrophoresis pattern of recombinant plasmid pBX_2 -WBBI02 digested by two enzymesM1: λ -Hind III; M2: DL2000; 1: Product of recombinant plasmid pBX_2 -WBBI02 digested by *Nde* I + *Xho* I

33.7 kDa 相符。不加 IPTG 诱导的对照组中也有少量目的蛋白表达。

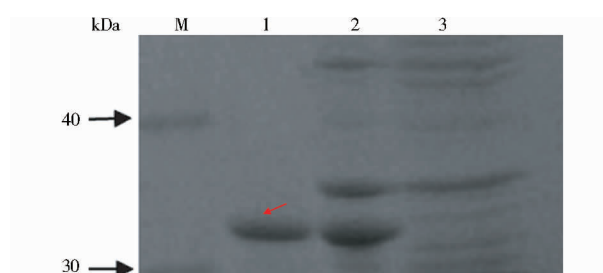
由于 pBX_2 表达蛋白带有 6 个组氨酸残基标签, 组氨酸对 Ni^{2+} -NTA 有很强的吸附能力, 因而可以利用镍离子亲和层析的方法纯化融合蛋白。纯化的 Serpin 经 SDS-PAGE 分析, 结果如图 4 所示, 在相对分子量约 33 kDa 处可见单一条带。

2.3 *E. coli* 重组表达 *Serpin* 的糜蛋白酶和弹性蛋白酶抑制活性检测

糜蛋白酶和弹性蛋白酶经过 Serpin 作用后的活性如图 5 所示, 随着 Serpin 浓度由 0.1 ng 增加至 10 ng, 弹性蛋白酶的活性呈现显著下降趋势, 比较各个浓度的抑制率的差异均有显著性 ($P < 0.01$), 最高活性抑制率达到 97%。糜蛋白酶的活性抑制率在 Serpin 浓度

图3 BL21/ pBX_2 -WBBI02 中 Serpin 表达电泳图谱Fig. 3 Electrophoresis pattern of the expression of Serpin by BL21/ pBX_2 -WBBI02

M: Protein marker; 1: Ultrasonic supernatant of BL21/ pBX_2 -WBBI02 after induction at 25°C; 2: Ultrasonic deposit of BL21/ pBX_2 -WBBI02 after induction at 25°C; 3: Ultrasonic product of BL21/ pBX_2 -WBBI02 without induction; 4: Ultrasonic product of BL21/ pBX_2 after induction

图4 BL21/ pBX_2 -WBBI02 表达的 Serpin 纯化电泳图谱Fig. 4 Electrophoresis pattern of purified Serpin expression by BL21/ pBX_2 -WBBI02

M: Protein marker; 1: Purified Serpin eluate by 250 mmol/L imidazole; 2: Crude lysate of BL21/ pBX_2 -WBBI02; 3: Crude lysate of BL21/ pBX_2

为 1 ng 时达到 90%, 与 Serpin 浓度为 0.1 ng 时抑制率相比, 具有显著性差异 ($P < 0.01$)。上述结果说明 Serpin 蛋白对 2 种酶均具有强烈的抑制作用。

2.4 *E. coli* 重组表达 *Serpin* 促进双歧杆菌对 HT-29 细胞的粘附实验结果

两歧双歧杆菌 (*Bifidobacterium bifidum*) WBBI01 对 HT-29 细胞的黏附结果如图 6 所示, 从图中可以看出, 与对照组 (图 6B) 相比, 添加外源纯化的重组 Serpin 蛋白后, 粘附在 HT-29 细胞上的双歧杆菌数量明显增加

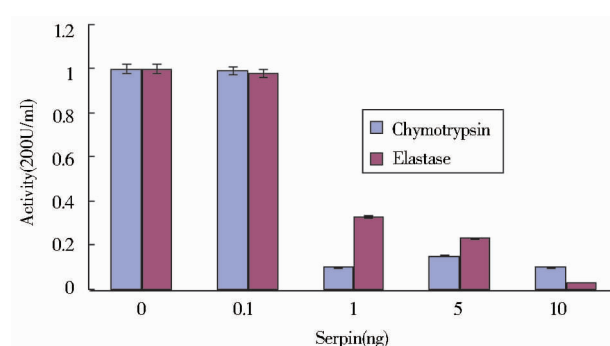


图5 *Bifidobacterium bifidum* WBB102 重组表达 Serpin 对不同蛋白酶的抑制作用

Fig. 5 Activity of protease inhibition by recombinant Serpin from *Bifidobacterium bifidum* WBB102

(图 6A)。

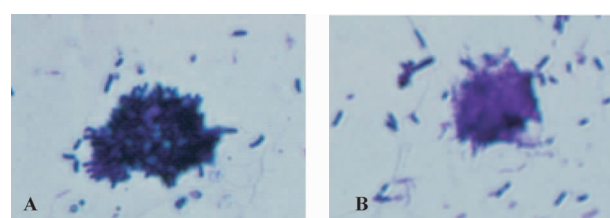


图6 *Bifidobacterium bifidum* WBB102 重组表达 Serpin 促进双歧杆菌粘附肠上皮细胞的显微观察 (放大 1000 倍)

Fig. 6 Microscopical observation of the adherence of *Bifidobacterium bifidum* to HT-29 cell enhanced by Serpin from of *Bifidobacterium bifidum* WBB102 (1000 × magnification)
(A) Adding serpin (B) Control group

3 讨论

人类胃肠道环境中栖息的益生菌(双歧杆菌、乳酸菌等)通过与其它细菌特别是与致病菌竞争粘附肠上皮细胞,实现在机体内的定植,从而影响宿主的微生态平衡和健康。近年来研究发现,无论是益生菌还是致病菌在与肠粘膜作用过程中均需借助一些特殊的外膜蛋白粘附肠上皮细胞,实现定植或侵入。如单核增生李斯特菌粘附入侵时需要外膜蛋白 Internalin A 或 B (毒力侵入因子)的介入^[7],肠毒性大肠杆菌需要粘附素 EtpA 的参与^[8]。作为肠道中的主要益生菌菌群,双歧杆菌的外膜蛋白在粘附定植肠粘膜表面,阻止病原菌的入侵方面发挥着重要作用。Guglielmetti 等^[9]在具有高黏附力的两歧双歧杆菌 MIMBb75 中纯化到一种外

膜脂蛋白 BopA,并证实其参与了双歧杆菌对 Caco-2 细胞的粘附,具有降低白介素-8 水平的功能。Ivanov 等^[5]在 *Bifidobacterium longum* NCC2705 中发现的外膜蛋白 Serpin,是原核生物中发现的极少的丝氨酸蛋白酶抑制剂之一,推测 Serpin 参与了双歧杆菌的粘附作用;Wright 等^[10]在分析 *serpin* 序列的研究中发现原核生物中的 Serpin 是功能性的蛋白酶抑制剂;Nissen 等^[11]在 *Bifidobacterium longum* B12 和 B18, Turrone 等^[12]在 *Bifidobacterium breve* 210B 中分别克隆到类似 *serpin* 的基因。

在我们前期的研究工作中,筛选获得一株高粘附力的两歧双歧杆菌 (*Bifidobacterium bifidum*) WBB102。在此基础上,克隆得到外膜蛋白 Serpin 的基因序列,测序发现其与 GENE BANK 中 *Bifidobacterium longum* NCC2705 *serpin* 序列具有高度同源性,第 374 位发生的碱基突变导致 CAG 编码的谷氨酰胺变成了 CGG 编码的精氨酸。表达的 Serpin 在体外条件下能促进双歧杆菌对 HT-29 细胞的粘附,提示 Serpin 蛋白通过抑制肠上皮细胞分泌的丝氨酸蛋白酶的活性,保护双歧杆菌不受外源蛋白酶的降解,为双歧杆菌的定植提供了有利环境,从而促进双歧杆菌对肠上皮细胞的粘附,这一结果与 Ivanov 等^[5]报道的结果相符。

值得注意的是, NCC2705 中的 Serpin 蛋白能抑制胰弹性蛋白酶和嗜中性粒细胞弹性蛋白酶活性,而不能抑制糜蛋白酶活性。而本研究获得的重组 Serpin 蛋白在极低浓度时即能有效抑制糜蛋白酶活性,这种现象是否可能是由于氨基酸序列改变所导致,尚需进一步的研究来证实。同时,不同双歧杆菌中是否存在 Serpin,且其结构和功能是否存在差异也有待进一步研究。

参考文献

- [1] Riedel C U, Foata F, Philippe D, et al. Anti-inflammatory effects of *Bifidobacteria* by inhibition of LPS-induced NF-kappaB activation. *World J Gastroenterol*, 2006, 12(23): 3729-3735.
- [2] Riedel C U, Foata F, Goldstein D R, et al. Interaction of *Bifidobacteria* with Caco-2 cells-adhesion and impact on expression profiles. *Int J Food Microbiol*, 2006, 110(1): 62-68.
- [3] Roberts T H, Hejgaard J, Saunders N F, et al. Serpins in unicellular *Eukarya*, *Archaea*, and *Bacteria*: sequence analysis and evolution. *J Mol Evol*, 2004, 59(4): 437-447.
- [4] Fulton K F, Buckle A M, Cabrita L D, et al. The high resolution crystal structure of a native thermostable Serpin reveals the

- complex mechanism underpinning the stressed to relaxed transition. J Biol Chem, 2005, 280(9): 8435-8442.
- [5] Ivanov D, Emonet C, Foata F, et al. A Serpin from the gut bacterium *Bifidobacterium longum* inhibits eukaryotic elastase-like serine proteases. J Biol Chem, 2006, 281(25): 17246-17252.
- [6] 陈军, 夏培元, 肖光夏. 双歧杆菌培养上清对铜绿假单胞菌黏附肠上皮细胞影响的研究. 第三军医大学学报, 2006, 28(16): 1641-1643.
- Chen J, Xia P Y, Xiao G X. Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae, 2006, 28(16): 1641-1643.
- [7] Ireton K. Entry of the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes* into mammalian cells. Cell Microbiol, 2007, 9(6): 1365-1375.
- [8] Roy K, Hilliard G M, Hamilton D J, et al. Enterotoxigenic *Escherichia coli* EtpA mediates adhesion between flagella and host cells. Nature, 2009, 457(7229): 594-598.
- [9] Guglielmetti S, Tamagnini I, Mora D, et al. Implication of an outer surface lipoprotein in adhesion of *Bifidobacterium bifidum* to Caco-2 cells. Appl Environ Microbiol, 2008, 74(15): 4695-4702.
- [10] Wright H T, Qian H X, Huber R. Crystal structure of plakalbumin, a proteolytically nicked form of ovalbumin. Its relationship to the structure of cleaved alpha-1-proteinase inhibitor. J Mol Biol, 1990, 213(3): 513-528.
- [11] Nissen L, Pasini L, Biavati B, et al. Cloning and detection of Serpin-like protein encoding gene in *Bifidobacterium longum* strains. Annals Microbiol, 2008, 58(1): 127-131.
- [12] Turrone F, Foroni E, O'Connell Motherway M, et al. Characterization of the serpin-encoding gene of *Bifidobacterium breve* 210B. Appl Environ Microbiol, 2010, 76(10): 3206-3219.

Cloning, Expression and Function Analysis of Serpin Gene in *Bifidobacterium bifidum*

YE Ruo-song LI Peng ZHANG Zhao-lin WAN Cui-xiang CUI Jia WEI Hua

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract The *Serpin* gene has been cloned from the genomic DNA of *Bifidobacterium bifidum* WBB102. A recombinant Serpin expression system in prokaryotic cells, namely, pBX₂- WBB102 was constructed, and the Serpin protein was successfully expressed and purified. An *in vitro* inhibition test of Serpin against intestinal proteinase and the effect of Serpin on the adherence of *Bifidobacterium longum* were approached. The results showed that the *serpin* gene of *Bifidobacterium bifidum* WBB102 is 768 bp, whose similarity is 99.9% with that of *Bifidobacterium longum* NCC2705. The purified Serpin was efficient to inhibit the activities of eukaryotic α -chymotrypsin and pancreatic elastase by maximum 90% and 97%, respectively, microscopical observation proved that Serpin enhanced the adherence of *Bifidobacteria* to HT-29 cells.

Key words *Bifidobacteria* Serpin Clone and expression Adherence