

炭疽毒素受体胞外区在毕赤酵母中分泌表达、纯化与活性鉴定*

赵 剑¹⁾ 徐俊杰¹⁾ 缪 静²⁾ 李 冰¹⁾ 杨秀旭¹⁾ 宋小红¹⁾ 陈 薇^{1)**}

¹⁾军事医学科学院微生物流行病研究所, 病原微生物生物安全国家重点实验室, 北京 100071;

²⁾烟台师范大学生命科学院, 烟台 264025)

摘要 使用分泌型表达载体, 实现了重组炭疽毒素受体胞外区 (rATR(CMG2)-EXCELL) 在毕赤酵母 KM71H 培养物上清中的分泌表达. 表达量约占培养物上清总蛋白质的 20%. 经过螯合柱初步纯化, 每升诱导培养物可获得约 1 mg 电泳纯的 rATR(CMG2)-EXCELL. 体外与配基 PA 结合试验和细胞保护试验显示, rATR(CMG2)-EXCELL 具有很好的生物活性. rATR(CMG2)-EXCELL 的成功表达为今后研究炭疽毒素受体的作用机理、发展新型炭疽治疗药物打下基础.

关键词 炭疽杆菌, 炭疽毒素受体, 蛋白质表达, 毕赤酵母

学科分类号 Q5

炭疽是由革兰氏阳性菌 *Bacillus anthracis* 芽孢感染引起的疾病. 近年来由于在美国发生的生物恐怖事件, 有关炭疽预防、治疗和监控及与其相关的基础理论成为国际上研究的热点之一^[1]. 目前的病理学模型认为炭疽杆菌分泌的外毒素对于逃避宿主免疫系统和宿主死亡都起着至关重要的作用^[2].

炭疽杆菌表达两种分别由染色体外质粒编码的毒力因子: 第一种毒力因子是主要由 D 多聚谷氨酸组成的荚膜, 荚膜的包裹阻止了免疫细胞对炭疽杆菌的吞噬. 第二种毒力因子是由 pXO1 编码的炭疽毒素. 炭疽毒素包括两种 A-B 型毒素, 每种都有不同的催化部分: 水肿因子 (edema factor, EF) 和致死因子 (lethal factor, LF). 两个催化部分共享一个结合的 B 部分——保护性抗原 (protective antigen, PA). 两种毒素分别命名为致死毒素和水肿毒素^[3].

保护性抗原 PA (protective antigen) 与其受体 ATR (anthrax toxin receptor) 的相互作用是毒素进入细胞发挥作用的前提. 2001 年发现了炭疽毒素的一个受体, Bradley 等^[4]用 HeLa 细胞 cDNA 文库表达互补 PA 结合缺陷细胞, 筛选到一个片段大小为 1.5 kb 克隆可互补 PA 结合缺陷. 该 cDNA 克隆后被命名编码 ATR (anthrax toxin receptor, GenBank 索取号 AF421380). 通过对 GenBank 搜索的结果分析还得到了另一个 cDNA 克隆——CMG2 (capillary morphogenesis gene 2, GenBank 索取号 AY233452),

与 ATR (TEM8) 编码蛋白质总体上 40% 氨基酸相同, 配基结合区 VWA/I 有 60% 氨基酸相同^[5]. 两种 cDNA 在 PA 结合实验和互补受体缺陷细胞实验, 及纯化的蛋白质中和 PA 的细胞保护实验, 都证实该蛋白质同样具有 PA 受体的功能^[5]. 因此, 与预先设想的单一受体不同, 目前已发现的 ATR (TEM8) 和 ATR (CMG2) 都可充当 PA 受体.

重组表达的两种受体的 VWA/I 结构域和 PA 结合与细胞表面受体竞争, 从而起到保护细胞不受毒素侵害的作用. 因而两种受体都具有成为潜在的炭疽治疗药物的可能^[4,5]. 目前的研究结果表明, 重组表达的两种受体 VWA/I 结构域与 PA 结合活性不同. ATR (CMG2) 与 ATR (TEM8) 相比, 其 PA 的结合活性及中和 PA 从而保护细胞不受毒素侵害的细胞保护活性要好一些. 其具体原因还有待进一步研究^[6].

甲醇营养型酵母表达系统的研究近年来得到迅速发展, 此表达系统具有高表达、高稳定、高分泌的特点, 其宿主巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 自身分泌蛋白质少, 正确信号肽剪切和折叠的外源蛋白比例大, 利于下游分离、纯化和大规模发酵生产^[7,8].

*国家自然科学基金资助项目 (30300016).

** 通讯联系人.

Tel: 010-66948565, Fax: 010-63815273, E-mail: chenwei@china.com

收稿日期: 2005-02-22, 接受日期: 2005-03-31

本研究从 HeLa 细胞 cDNA 中克隆到 ATR (CMG2) 基因, 将编码胞外区部分的基因插入 pPICZ α A 中, 转化毕赤酵母 KM71H, 获得可分泌表达 ATR(CMG2)胞外区的菌株. 表达菌株甲醇诱导后, 培养基上清的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 经考马斯亮蓝染色, 可看到分子质量约为 33 ku 处有空载体对照没有的条带, 与理论预期分子质量相符. 利用组氨酸标签初步纯化 ATR (CMG2), 胞外区具有 PA 结合活性并在细胞模型实验中可中和 PA 而保护细胞不受毒素侵害. ATR (CMG2)受体胞外区的表达为探索其与 PA 结合分子机制、评估其潜在治疗药物可能性打下基础.

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌菌株 TOP10F'、甲醇酵母菌株 *Pichia pastoris* KM71H、表达载体 pPICZ α A、HRP-anti-c-myc (辣根过氧化物酶偶联的小鼠抗 c-myc 抗体)、抗生素 ZeocinTM、lyticase、SuperScriptTM Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis 均购自美国 Invitrogen 公司; RNAagents[®] Total RNA Isolation System 购自 Promega 公司; J774A.1 小鼠巨噬细胞、HeLa 细胞、DH5 α 菌株、PA、LF 贮存液本室保存; 引物由北京奥科生物技术有限公司合成; Pyrobest DNA 聚合酶、限制性内切酶、T4 连接酶购自 TaKaRa 公司; DNA 琼脂糖电泳凝胶回收试剂盒购自上海生工生物工程公司; 质粒提取试剂盒购自 Qiagen 生物技术有限公司; 层析仪器及介质均为 Pharmacia 公司产品.

1.2 表达载体构建

分别应用 RNAagents[®] Total RNA Isolation System 和 SuperScriptTM Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis 从 HeLa 细胞中制备 RNA, 并反转录成 cDNA. RNA 的提取及反转录按试剂盒说明书操作. ATR(CMG2)cDNA 序列来自 GenBank (accession code AY233452), 根据序列设计引物对. A1Left: 5' AGGATGGTGGCGGAGC-GGTC 3'; A1Right: 5' TCCAACCCCTCGACCA-CCAT 3'. 应用引物对 A1Left 和 A1Right, 从 HeLa 细胞 cDNA 中扩增 ATR(CMG2)开放阅读框的信号肽和胞外区基因片段 ATR(CMG2)signal-excell. PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 52 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 30 循环; 72 $^{\circ}$ C 2 min. 根据准备表达 ATR

(CMG2)胞外区和与分泌表达载体连接及信号肽剪切原则设计引物, 引物分别含有 *EcoR* I、*Not* I 限制性内切酶位点, 将 ATR(CMG2)胞外区 35~315 位氨基酸残基编码序列克隆入表达载体 pPICZ α . ApiczLeft: 5' gctgaattcGAGCAGCCCTCCT 3'; ApiczRight: 5' ctggcggcgcACATTCTGTGGCT 3'. 应用 ApiczLeft、ApiczRight 引物对扩增 ATR (CMG2)signal-excell. PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 65 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 30 循环; 72 $^{\circ}$ C 2 min. 将扩增得到的片段用 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切 3 h, 1% 琼脂糖凝胶电泳回收 800 bp 以上的唯一一条带. 将 pPICZ α A 用 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切 3 h, 1% 琼脂糖凝胶电泳回收电泳条带. 电泳回收得到的 pPICZ α A 酶切片段与处理好的 ATR(CMG2)胞外区的片段按摩尔比 1: 4 比例混合, 用 T4 连接酶 16 $^{\circ}$ C 连接过夜. 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α . 应用 ApiczLeft、ApiczRight 引物对 PCR 筛选转化后得到的克隆, 将呈阳性的克隆扩增提取质粒, 送军事医学科学院生物工程研究所测序.

1.3 转化酵母细胞及高抗性转化子的筛选

以限制性内切酶 *Sac* I 将重组质粒 pPICZ α A-CMG2 线性化后, 与经处理的酵母细胞混合, 用 BioRad Gene Pulser 电转仪电击, 参数为: 1.3 kV, 25 μ F, 200 Ω . 电击后, 经温育, 各取 200 μ l 菌液分别涂布于含抗生素 ZeocinTM 100、500、1 000 mg/L 的固体 YPDS 培养基上, 30 $^{\circ}$ C 温育 2~4 天, 筛选抗性强、生长快的转化子.

1.4 阳性克隆的筛选

1.4.1 直接 PCR 初步筛选阳性克隆. 无菌牙签挑取转化子重悬于 10 μ l 无菌水中, 加入 5 μ l lyticase, 30 $^{\circ}$ C 温育 10 min, -80 $^{\circ}$ C 冷冻 10 min. 得到裂解液 0.5 μ l 作为模板, 可用于 20 μ l 体系 PCR 鉴定.

1.4.2 阳性克隆的诱导表达及鉴定. 重组酵母在 5 ml BMGY 中培养至 $A_{600} = 4 \sim 6$, 离心收集菌体, 重悬于 5 ml BMMY 于 30 $^{\circ}$ C 诱导 96 h, 取 1 ml 培养液离心取上清, 按比例加入上样缓冲液, 15% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳. 预期表达产物具有 312 个氨基酸残基, 在不考虑糖基化情况分子质量为 33860.64 u.

1.5 rATR (CMG2) -EXCELL 的初步纯化

按 Prebond 说明书操作, 利用表达蛋白质 C 端 6 组氨酸标签使用镍柱纯化, 洗脱峰在 60 mmol/L 咪唑出现. 洗脱样品对 TBS (20 mmol/L Tris $\cdot$ HCl, 150 mmol/L NaCl, pH 7.5) 透析过夜, 考马斯亮蓝

染色法测定蛋白质浓度，冷冻于-70℃备用。

1.6 rATR (CMG2) -EXCELL 的 N 端氨基酸测序

中国医学科学院基础医学研究所 PROCISE 491 测序仪测 N 端 5 个氨基酸。

1.7 PA 结合活性检测

用包被液稀释 PA 至 2 mg/L，100 μl/ 孔包被 96 孔板 4℃ 过夜，3% BSA TBS 封闭 1 h，TBS 略为清洗，初步纯化的样品用含 1 mmol/L CaCl₂ 的 TBS 稀释到 0~5 mg/L，室温结合 2 h，TBS 清洗后用 1:2 000 稀释的 HRP-anti-myc 抗体杂交，显色。

1.8 细胞保护活性检测

小鼠巨噬细胞 J774A.1 按 1×10⁴/ 孔贴壁培养于 96 孔板，24 h 后吸去培养液上清，分别加入 100 μl 用培养液稀释的 PA、LF、PA+LF、PA+LF+rATR(CMG2)-EXCELL，其中 PA 和 LF 终浓度为 50×10⁻³ mg/L，rATR(CMG2)-EXCELL 为 0~250×10⁻³ mg/L，37℃ 培养 3 h，测定时吸弃每孔培养液，将 MTT 母液用无血清培养液按 1:1 000 稀释后，每孔 100 μl 加入 96 孔板中，37℃、5% CO₂ 饱和湿度的温箱中培养 3 h。弃去上述培养液，加入 0.04 mol/L 盐酸异丙醇于 570 nm 波长测吸光度，结果取 3 个复孔的平均值。

2 结 果

2.1 表达质粒的构建

以 HeLa 细胞 cDNA 为模板，先后用 A1Left、A1Right 引物和 ApiczLeft、ApiczRight 进行 PCR 扩增反应，得到 850 bp 左右的扩增产物，经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析，结果见图 1。将 ATR(CMG2)-EXCELL 基因片段插入 pPICZαA 载体，获得了表达质粒 pPICZαA-CMG2(图 2)。pPICZα 为分泌型的毕赤酵母表达载体。它以甲醇诱导的 AOX1 (醇氧化酶 1) 启动子调控外源基因的表达，在多克隆位点

前融合了 α-factor 的信号序列使表达的蛋白质进入培养液中，在 C 端有 c-myc 标签和 6 组氨酸标签方便检测和纯化。经测序证实，获得的表达质粒 pPICZαA-CMG2 序列与设计一致 (图 2)。

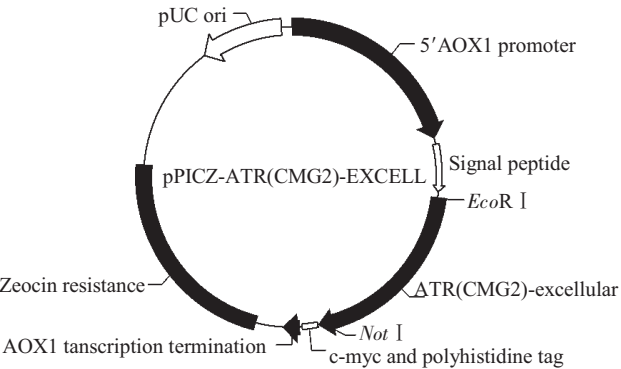


Fig.2 Expression plasmid pPICZ-ATR (CMG2) -EXCELL

2.2 阳性酵母克隆筛选和诱导表达

经 PCR 鉴定呈阳性克隆的 1~6 号经 1% 甲醇诱导 4 天，培养液上清经 SDS-PAGE 和考马斯亮蓝染色后，5 号克隆在 30 ku 左右有阴性对照(pPICZα 转化的 KM71H) 没有的条带，与理论预期分子质量 33 ku 相符(图 3)。

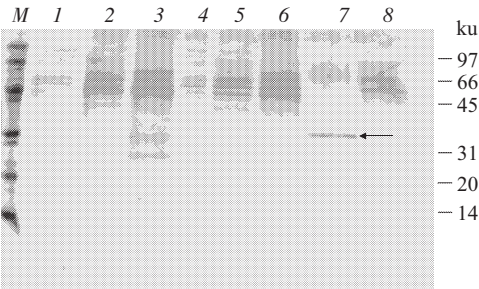


Fig.3 Selection of rATR (CMG2) -EXCELL
1: pPICZα transformed KM71H clone after induction for 96 h; 2~8: PCR assay positive KM71H clones after induction for 96 h.

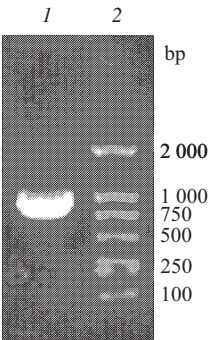


Fig.1 PCR results of ATR (CMG2) -EXCELL
1: PCR products of ATR(CMG2)-EXCELL; 2: Molecular mass marker.

2.3 rATR (CMG2) -EXCELL 的初步纯化

与克隆筛选时得到的电泳结果不同，发酵表达的重组蛋白质出现了以 N-糖基化形式为主。纯化后的样品经 SDS-PAGE 和考马斯亮蓝染色，可见分子质量为 66 ku 到 97 ku 的一条弥散的条带。经去 N 糖基化反应，电泳后出现 33 ku 左右单一条带，该分子质量与理论预期无糖基化的蛋白质分子质量相符。1 L 培养物经纯化后共获得约 1 mg 纯的 ATR (CMG2)-EXCELL (图 4)。

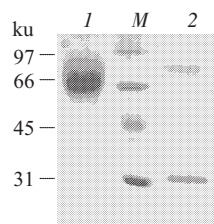


Fig.4 Glycosylated and deglycosylated selection of rATR (CMG2) -EXCELL

1: purified glycosylated rATR (CMG2)-EXCELL; 2: deglycosylated rATR (CMG2)-EXCELL.

2.4 rATR (CMG2) -EXCELL 的 N 端测序 5 个氨基酸序列

5 个氨基酸序列为 EAEFE 与预期信号肽剪切位点一致。

2.5 rATR (CMG2) -EXCELL 与 PA 结合活性鉴定

rATR (CMG2)-EXCELL 包括与 PA 结合的 VWA/I 结构域, 该结构域通过金属离子依赖的结合位点(metal ion dependent adhesion site, MIDAS)保守序列与 PA 的结合(图 5)。

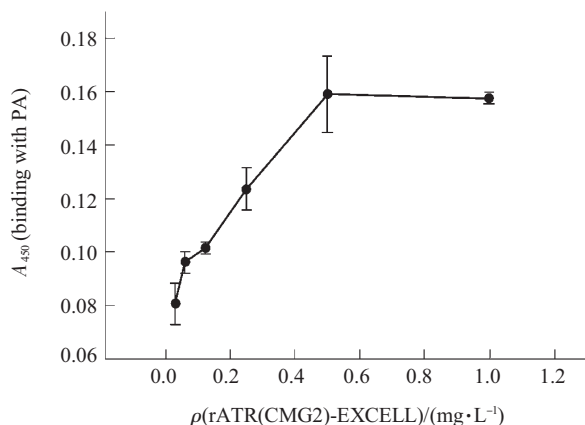


Fig.5 rATR (CMG2) -EXCELL binds with PA in vitro

●—●: rATR(CMG2)-EXCELL binding with PA.

2.6 rATR (CMG2) -EXCELL 细胞保护活性鉴定

在本文采用的实验条件下, 小鼠巨噬细胞 J774A.1 在 PA 加 LF 处理 3 h 后全部死亡, 只加 PA 或 LF 则无毒害作用。结果表明, 在 rATR (CMG2)-EXCELL 与 PA 摩尔比约为 3:1 (62.5 ng rATR (CMG2)-EXCELL, 50 ng PA) 情况下, PA 的作用完全被 ATR (CMG2)-EXCELL 阻断(图 6)。

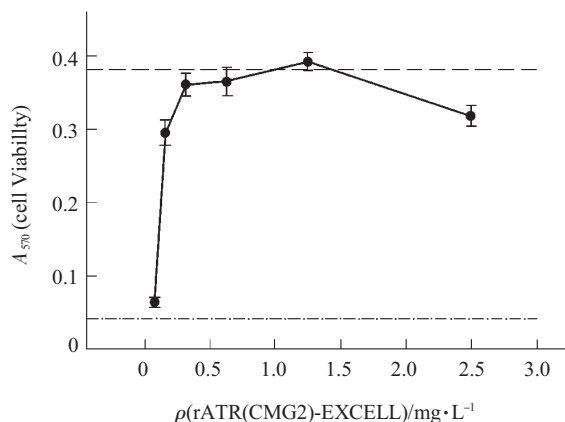


Fig.6 Protection activity of rATR (CMG2) -EXCELL

●—●: rATR (CMG2)-EXCELL+PA+LF; — — : PA alone or LF alone; - - - : PA+LF.

3 讨 论

直到 2001 年关于炭疽毒素受体的研究才取得了突破性进展^[9]. 而后 ATR (TEM8) 和 ATR (CMG2) 的 VWA/I 结构域的活性鉴定和 ATR (CMG2) 的 VWA/I 晶体结构的解析, 为我们探索炭疽病理的分子细节提供许多有用的信息, 并且在实践中提供了一种炭疽治疗的新途径, 也为阻断受体和毒素相互作用小分子药物的开发建立了理论基础^[10]. 但是, 对二者同样具有炭疽毒素受体的功能也提出了新的问题. 在炭疽致病过程中的作用孰轻孰重, 两种受体是否具有组织特异性而在不同细胞导致对毒素敏感性, 在敏感器官的单一细胞表面何种受体含量较高, 体外实验中与 PA 结合活性较高的 rATR (CMG2) 是否更加倾向引导毒素作用等等^[11,12].

无论是研究炭疽毒素受体在炭疽毒素致病机理中所扮演的角色, 还是对炭疽毒素受体潜在药用价值的研究, 都需要一定量的纯化蛋白质. 在本实验中, 我们构建的表达质粒在 ATR (CMG2) 胞外区基因片段的 5' 端融合了 α -factor 的信号肽序列, 3' 端利用了载体本身具有的 c-myc 和多聚组氨酸标签, 成功地在毕赤酵母中实现了 ATR (CMG2) 胞外区的可溶分泌型表达. 其优点是: 一方面使 rATR (CMG2) 以可溶形式表达保持其正确构象; 另一方面可减少 rATR (CMG2) 被胞内蛋白质酶降解. 同时, rATR (CMG2) 分泌在培养液上清中并具有检测和纯化标签, 对重组产物的检测和纯化非常有利. 研究中还发现图 3 中的摇瓶培养基上清电泳中 rATR (CMG2) 分子质量与发酵后纯化的 rATR (CMG2) 大小不同, 经去 N 糖基化反应证明, 分子质量多出的部分为

rATR(CMG2)高度糖基化所致. 关于蛋白质在毕赤酵母表达中 N 和 O 糖基化影响因素的文献报道不是很多, 毕赤酵母的特点就是 N 糖基化的糖链较短、对蛋白质分子质量影响不大, 但是本研究室在工作中发现毕赤酵母表达的 PDGF、干扰素类似物和具有 N 糖基化位点的蛋白质在发酵后糖基化程度都有较大提高, 原因可能是发酵全过程中的溶氧比摇瓶要高, 但溶氧对糖基链的增大具体作用过程仍不清楚(结果未发表). 经螯合柱纯化从 1 L 诱导培养物可获得约 1 mg 电泳纯的 rATR(CMG2), 能够满足进一步活性实验的要求. 与理论预期相符, 在二价阳离子如 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 存在, 而没有 EDTA 螯合剂存在的情况下, ATR(CMG2)-EXCELL 可与 PA 结合. 可以推测 C 端的 c-myc 标签和 6 组氨酸标签对重组的胞外区与 PA 结合的 VWA 结构域的正确折叠没有很大影响, 并且 MIDAS 保守序列中的天冬氨酸是结合所必需的. 体外细胞毒性试验显示出 rATR(CMG2)具有生物学活性, 在 rATR(CMG2)和 PA 的摩尔比约为 3:1 条件下可完全中和 PA, 保护细胞不受 LF 毒害. 这些工作为今后研究炭疽毒素的作用机理、发展新型炭疽治疗用药、筛选针对 PA 与受体作用的抑制剂打下基础.

参 考 文 献

- Bradley K A, J A Young. Anthrax toxin receptor proteins. *Biochem. Pharmacol*, 2003, **65** (3): 309~314
- Bull J J, Parrish C R. Microbiology. A binding contract for anthrax. *Science*, 2002, **297** (5579): 201~202
- Bradley K A, Mogridge J, Jonah G, *et al.* Binding of anthrax toxin to its receptor is similar to alpha integrin-ligand interactions. *J Biol Chem*, 2003, **278** (49): 49342~49347
- Bradley K A, Mogridge J, Mourez M, *et al.* Identification of the cellular receptor for anthrax toxin. *Nature*, 2001, **414** (6860): 225~229
- Scobie H M, Rainey G J, Bradley K A, *et al.* Human capillary morphogenesis protein 2 functions as an anthrax toxin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100** (9): 5170~5174
- Santelli E, Bankston L A, Leppla S H, *et al.* Crystal structure of a complex between anthrax toxin and its host cell receptor. *Nature*, 2004, **430** (7002): 905~908
- Romanos M A, Scorer C A. Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast*, 1992, **8** (6): 423~488
- Buckholz R G, Gleeson, M A G, *et al.* Yeast systems for the commercial production of heterologous protein. *Biotechnology*, 1991, **9** (11): 1067~1072
- Chaudry G J, Moayeri M, Liu S, *et al.* Quickening the pace of anthrax research: three advances point towards possible therapies. *Trends Microbiol*, 2002, **10** (2): 58~62
- Friedlander A M. Tackling anthrax. *Nature*, 2001, **414** (6860): 160~161
- Kurzchalia T. Anthrax toxin rafts into cells. *J Cell Biol*, 2003, **160** (3): 295~96
- Beauregard K E, Collier R J, Swanson J A, *et al.* Proteolytic activation of receptor-bound anthrax protective antigen on macrophages promotes its internalization. *Cell Microbiol*, 2000, **2** (3): 251~258

Expression, Purification and Characterization of The Recombinant Excellular Portion of Anthrax Toxin Receptor*

ZHAO Jian¹⁾, XU Jun-Jie¹⁾, MIAO Jing²⁾, LI Bing¹⁾,
YANG Xiu-Xu¹⁾, SONG Xiao-Hong¹⁾, CHEN Wei^{1)**}

(¹)State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Institute of Microbiology and Epidemiology,
Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China;

(²)School of Life Science, Yantai Normal University, Yantai 264025, China)

Abstract The gene fragment encoding ATR (CMG2)-EXCELL (excellular portion of anthrax toxin receptor/capillary morphogenesis factor) was cloned into a secretory expression plasmid and then expressed in media supernatant of *Pichia pastoris*. The recombinant rATR(CMG2)-EXCELL expressed was about 20% of the total proteins in media supernatant. About 1 mg electrophoresis purity rATR(CMG2)-EXCELL could be obtained after the purification of 1 L culture using chelating column. *In vitro* binding activity analysis and cell protection experiments have shown that rATR (CMG2)-EXCELL has an excellent biological activity. The successful expression of rATR(CMG2)-EXCELL has placed a solid foundation for the research on binding mechanism of ATR and PA(protective antigen) and developing new cure for anthrax.

Key words *Bacillus anthracis*, anthrax toxin receptor, protein expression, *Pichia pastoris*

*This work was supported by a grant from The National Natural Sciences Foundation of China (30300016).

**Corresponding author. Tel: 86-10-66948565, Fax: 86-10-63815273, E-mail: chenwei@china.com

Received: February 22, 2005 Accepted: March 31, 2005