

结核杆菌 D29 噬菌体几丁质酶基因的表达式及功能研究

朱成钢^{1)*} 丁志山²⁾

(¹⁾ 浙江大学生命科学学院生物化学研究所, 杭州 310029; ²⁾ 浙江省中医学院生命科学系, 杭州 310053)

摘要 噬菌体一般通过表达内容素来降解宿主菌细胞壁上的肽聚糖. 用 PCR 技术从结核杆菌 D29 噬菌体基因组中克隆了 *gene10*, 并使其在大肠杆菌中得到了高效表达, 蛋白质 C 端带有 6xHis. 用镍柱亲和纯化了大肠杆菌表达的 gp10 蛋白可溶性部分. 活性测定表明, gp10 不但具有几丁质酶活性, 还具有溶菌酶活性, 是一种双功能的酶. 耻垢杆菌经 gp10 作用后, 其生长受到抑制, 扫描电镜观察发现部分耻垢杆菌被降解. 说明与其他种类噬菌体降解细胞壁的方式不同, D29 噬菌体可能利用 gp10 的溶菌酶活性使结核杆菌细胞壁降解. 这有助于揭示结核杆菌噬菌体与其宿主的相互作用机制, 是关于噬菌体几丁质酶的首次报道.

关键词 噬菌体, 结核杆菌, 几丁质酶

学科分类号 Q786, S855.2

噬菌体在感染细菌的后期可水解细菌的细胞壁, 从而释放出子代噬菌体. 自然界中, 所有的细菌都有相应的噬菌体. 目前的研究认为, 各种噬菌体都是通过表达内容素 (endolysin 或 lysin) 打开细胞壁上各种分子的共价键, 使细胞壁水解, 从而杀死细菌的. Endolysin 降解细菌细胞壁的机理与溶菌酶不同, 溶菌酶是在肽聚糖上的 N-乙酰葡萄糖胺和 N-乙酰胞壁酸之间切开^[1], 而 endolysin 是切开肽聚糖上糖基与肽之间或肽与肽之间的共价键, 从而使细胞壁降解. 如大肠杆菌的 λ 噬菌体表达的 R 和 Rz 蛋白^[2], 李斯特菌噬菌体表达的 A118 蛋白、A500 蛋白、A511 蛋白^[3], 肺炎链球菌噬菌体 Dp-1 的内容素 Pal^[4], A 族链球菌噬菌体的内容素 C1^[5], 炭疽杆菌 γ 噬菌体的 PlyG 等^[6], 都是噬菌体表达的用于降解宿主细胞壁肽聚糖的 endolysin. 因此, 表达内容素被认为是噬菌体裂解宿主细胞壁的普遍方式.

几丁质(chitin) 是一种由 N-乙酰葡萄糖胺以 β -1,4 糖苷键连接而成的多糖, 是大多数真菌细胞壁的主要成分, 也大量存在于昆虫或节肢动物的甲壳中. 细菌细胞壁不含几丁质. 几丁质酶(chitinase) 可切开 N-乙酰葡萄糖胺之间的 β -1,4 糖苷键从而使几丁质降解. 很多细菌、真菌、放线菌、植物中都有几丁质酶的表达, 主要用于降解几丁质获取碳源或防止微生物的侵害. 一些病毒如小球藻病毒 (PBCV-1)、苹果卷叶蛾颗粒病毒(CpGV)、棉铃虫单

核衣壳核型多角体病毒(HaSNPV)中也发现有几丁质酶基因.

D29 噬菌体是一种烈性噬菌体, 能够感染几乎所有的结核分支杆菌, 也可以感染同属分支杆菌的耻垢杆菌, 其基因组序列已全部测定完成^[7]. 通过序列分析, 发现结核杆菌 D29 噬菌体基因组中的 *gene10* 具有几丁质酶的结构域, 可能和细胞壁的降解有关. 为了研究噬菌体降解结核杆菌细胞壁的机理, 我们从 D29 噬菌体基因组中克隆出了几丁质酶基因 *gene10*, 使其在大肠杆菌中得到了表达, 发现结核杆菌噬菌体几丁质酶不但具有几丁质酶功能, 还具有溶菌酶功能. 并且这一几丁质酶对耻垢杆菌有裂解作用. 这与其他噬菌体通过 endolysin 来降解宿主细胞壁的方式不同, 对研究噬菌体病毒与宿主之间的相互作用机制有重要意义.

1 材料和方法

1.1 材料

结核杆菌 D29 噬菌体和耻垢杆菌 mc²155 株, 大肠杆菌 TG1 株和 BL21 (DE3) star 为本室保存.

* 通讯联系人.

Tel: 0571-86971414, Fax: 0571-86971501

E-mail: cgzhu@zju.edu.cn

收稿日期: 2005-03-08, 接受日期: 2005-05-08

1.2 试剂

pMD 18-T vector, Taq 酶, 各种限制性内切酶均购于 Takara 公司, 引物合成与测序由上海基康生物技术公司完成. 结核杆菌培养基 Middlebrook 7H9 及添加剂 AODC 购自于 Difco 公司. Ni-NTA 为 Qiagen 公司产品, 其他试剂为国产分析纯或进口分装.

1.3 噬菌体基因组 DNA 的纯化

将耻垢杆菌在 50 ml Middlebrook 7H9 (含 10% AODC) 培养基中, 37℃ 培养到对数生长期 ($A_{650} \approx 0.25$), 再加入 1 ml D29 噬菌体 (10^9 PFU/ml), 37℃ 继续培养 4 h, 再加入 5 ml 氯仿, 37℃ 培养 2 h, 促进噬菌体的释放. 培养物中加入无 DNase 的 RNase 至终浓度 1 mg/L, 37℃ 消化 30 min, 加入固体 NaCl 至终浓度 1 mmol/L, 冰浴 1 h, 4℃ 10 000 g 离心 10 min 后, 上清中加入 PEG1000 固体至终浓度为 10%, 冰浴同时搅拌 1 h, 4℃ 10 000 g 离心 10 min 后, 加入 6 ml TMN 液 (10 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 10 mmol/L $MgCl_2$) 重悬沉淀, 20 000 g 离心 1 h, 加入 0.6 ml TMN 液重悬沉淀, 加 EDTA (pH 8.0) 至终浓度 20 mmol/L, 加蛋白酶 K 至终浓度 50 mg/L, 加 SDS 至终浓度 0.5%, 56℃ 温浴 1 h, 加 1 倍体积的平衡酚, 混匀后 12 000 g 离心 10 min, 在上清中加入 1 倍体积的氯仿, 12 000 g 离心 10 min, 取上清, 加入 1/10 体积的 3 mol/L NaAc (pH 7.0), 2 倍体积无水乙醇, 混匀后勾出 DNA 沉淀, 在 70% 乙醇中洗涤并干燥后, 溶于 400 μ l TE 中备用.

1.4 基因的克隆和在大肠杆菌中的表达

根据 D29 噬菌体基因组的 gp10 基因序列, 我们合成了克隆几丁质酶基因编码顺序的引物. 上游引物 gp10-A: 5' cccatatgacgctcatagtcacacgcgacc 3', 5' 端引入一个 *Nde* I 限制性酶切位点, 下游引物为 gp10-B: 5' gaattctcatagggctccattcttgccgatg 3', 5' 引入一个 *Xho* I 位点, 并去掉了终止密码子, 使 gene10 能和 pET-22b 载体上的 6 $\times$ His 融合表达. PCR 体系及扩增条件为: 5 $\times$ PCR 缓冲液 5 μ l, gp10-A 和 gp10-B 引物各 1 μ l, 基因组 DNA 1 μ l, 每种 2.5 mmol/L dNTP 4 μ l, Takara EX Taq 1 μ l, 加去离子水至 50 μ l, 混匀后在如下条件下进行扩增: 94℃ 5 min, 94℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 1.5 min, 35 个循环; 72℃ 10 min. PCR 产物与 pMD 18-T vector 直接连接, 连接产物转化 TG1 感

受态细胞, 重组克隆测序后正确, 得到 pMD-gp10 载体. 用 *Nde* I / *Xho* I 双酶切 pMD-gp10, gp10 基因经低熔点胶回收后与 *Nde* I / *Xho* I 酶切后的 pET-22b 质粒连接, 连接产物转化 TG1 感受态细胞, 从酶切鉴定正确的重组克隆中提取质粒, 转化到 BL21 (DE3) star 感受态细胞中. 挑取单克隆培养后提取质粒测序, 证明得到为正确插入的 pET-gp10 表达菌. 基因的克隆、酶切、回收、转化等都按文献[8]进行.

1.5 几丁质酶的纯化及 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

1 L 的 BL21(DE3)star pET-gp10 菌株在 37℃ 培养到对数生长期时, 加入 IPTG 至终浓度 0.5 mmol/L, 诱导 6 h, 培养物 10 000 g 离心 10 min, 沉淀细菌用 20 mmol/L Tris (pH 8.0) 洗一次后用 10 ml 的 20 mmol/L Tris-HCl, 0.5 mmol/L NaCl, 5 mmol/L 咪唑, pH 8.0 溶液重悬, 超声破碎细菌, 10 000 g 离心 15 min, 上清过 Ni-NTA 柱, 用 5 倍体积的 20 mmol/L Tris-HCl, 0.5 mmol/L NaCl, 5 mmol/L 咪唑, pH 8.0 洗柱后, 再用 20 mmol/L Tris-HCl, 0.5 mmol/L NaCl 溶液, 咪唑浓度从 5 mmol/L 到 500 mmol/L 进行线性洗脱, 每管收集物进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 合并所需纯化产物, 并对 20 mmol/L Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 pH6.0 溶液进行透析, 分装后放入 -80℃ 备用. 表达及纯化产物的 SDS-PAGE 按文献[8]进行.

1.6 几丁质酶活性检测

胶体几丁质的制备按文献[9]进行. 100 ml 的 pH 6.0 的磷酸盐溶液中加入 1 g 琼脂糖, 再加入胶体几丁质使其终浓度为 1%, 灭菌后每培养皿约 10 ml 铺平板. 平板凝固后, 用打孔器打出直径为 0.6 cm 的孔. 孔中加入 50 μ l 的样品, 37℃ 培养 24 h.

1.7 溶菌酶活性检测

在 LB 培养基中, 将大肠杆菌 TG1 菌株培养到对数生长期, 离心浓缩后与已灭菌并温度降至 45℃ 的 LB 固体培养基混匀, 每培养皿约 10 ml 铺平板, 平板凝固后用取样器吸管头打出直径为 5 mm 的孔. 每孔中加入 5 μ l 的样品, 37℃ 培养 24 h.

1.8 扫描电镜

耻垢杆菌培养至对数生长期, 在 5 ml 培养物中加入过滤除菌的 100 μ l 纯化产物, 37℃ 培养 24 h. 培养物在 A_{650} 测吸光度后按 Borelli 等^[10]的方

法制备扫描电镜样品, 观察重组的几丁质酶对耻垢杆菌的裂解作用.

2 结 果

2.1 基因的克隆、表达和纯化

经过 PCR, 我们克隆出了一条 1.5 kb 左右的特异性 DNA 片段, 大小与 D29 噬菌体 gp10 基因相符. 将片段与 pMD-18 T 载体连接后得到 pMD-gp10 载体, 经测序表明, 我们克隆的序列为 1 480 bp, 与 D29 噬菌体 gp10 基因一致. 将 pMD-gp10 载体用 *Nde* I / *Xho* I 酶切, 回收的 gp10 基因插入到 pET-22b 质粒中, 得到 pET- gp10 载体. 将此载体转化 BL21(DE3)star 菌株, 得到 gp10 的表达菌株. 从表达菌株中提取 pET- gp10 质粒进行插入片段两端测序, 证明片段插入正确. 表达菌株经 IPTG 诱导, 产物经亲和柱纯化后进行 SDS-PAGE, 证明 gp10 基因得到了高效表达, 表达量达到细菌总蛋白的 50% 左右. 其中未诱导的细菌也有较高水平的外源产物表达, 这与我们所用的宿主菌为高表达的 BL21(DE3)star 菌株有关. 表达产物分子质量为 43 ku, 而按 gp10 基因序列推导的蛋白质分子质量为 54.8 ku, 有较大的差异. 这可能与表达产物信号肽的剪切有关(图 1). 合并纯化蛋白质, 并用 20 mmol/L Na₂HPO₄, NaH₂PO₄ pH 6.0 溶

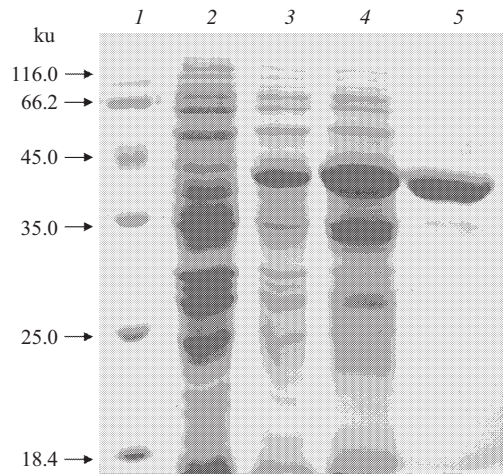


Fig.1 Production and purification of gp10 protein
Proteins were separated by SDS-PAGE and stained with Coomassie blue. 1: standards molecular mass proteins; 2: total proteins of *E.coli* BL21 without the plasmid; 3: total proteins of *E.coli* BL21with pET-gp10 without induced with IPTG; 4: total proteins of *E.coli* BL21with pET-gp10 after induction with IPTG; 5: protein purified by affinity chromatography.

液进行透析, 蛋白质浓度为 0.6 g/L, 分装后放入 -80℃ 备用.

2.2 几丁质酶活性检测

如图 2a 显示, A 孔中为含 pET-22b 质粒的 BL21(DE3)star 的破碎上清, B 孔中为纯化的 gp10 蛋白. A 孔周围没有透明圈出现, 而 B 孔周围有明显的透明圈, 这说明表达的 gp10 蛋白对几丁质有明显的降解作用, 具有几丁质酶活性.

2.3 溶菌酶活性检测

如图 2b 显示, A 孔中为含 pET-22b 质粒的 BL21(DE3)star 的破碎上清, B 孔中为纯化的 gp10 蛋白. B 孔周围的透明圈说明纯化的蛋白质对固体培养基中的大肠杆菌有降解作用. 说明表达的 gp10 蛋白同时具有溶菌酶的活性.

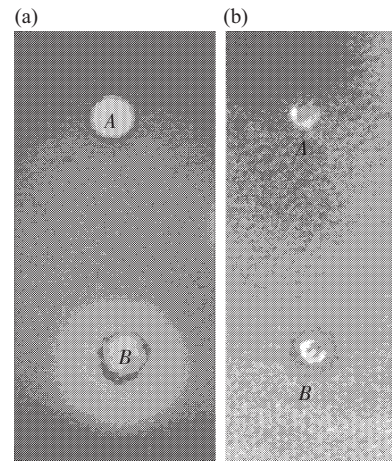


Fig.2 Well diffusion assay for the chitinase activity (a) and lysozyme activity (b) of the purified gp10
A: supernatant of *E.coli* BL21with pET-gp10; B: purified expression gp10.

2.4 gp10 作用后耻垢杆菌的形态学观察

5 ml 处于对数生长期的耻垢杆菌经 100 μl 纯化 gp10 在 37℃ 作用 24 h 后, 吸光度检测表明, 未加 gp10 的耻垢杆菌 A_{650} 由 0.176 上升到 0.556, 而加 gp10 的耻垢杆菌 A_{650} 由 0.176 上升到 0.451, 说明纯化的 gp10 对耻垢杆菌的生长具有抑制作用. 样品经用戊二醛固定等处理后, 再用扫描电镜观察耻垢杆菌经 gp10 作用后形态上的变化. 如图 3a 为正常的耻垢杆菌, 它形态上比较完整均一, 为典型的杆状. 图 3 b 为经纯化 gp10 作用后的耻垢杆菌, 在视野中匀浆状的区块较多, 有些还保留了耻垢杆菌的形态. 这说明 gp10 蛋白对耻垢杆菌的细胞壁有降解作用.

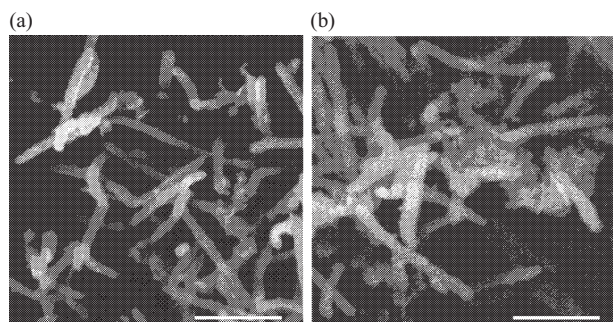


Fig.3 SEM of gp10-treated *M.smegmatis*

(a) *M.smegmatis* not treated by gp10. (b) *M.smegmatis* morphological changes induced by gp10. Bars=5 μ m.

3 讨 论

研究表明, 噬菌体 endolysin 具有高效的抗菌作用. Nelson 等^[5]从链球菌 C1 噬菌体裂解液中纯化出 endolysin, 在 5 s 内, 10 ng 的 endolysin 可使 1×10^7 个 A 族链球菌死亡. 这种高效的抗菌作用是任何抗生素无法比拟的. 因此, 噬菌体 endolysin 又称为“酶生素”, 被认为是下一代的抗生素.

结核病是由结核分支杆菌感染引起的慢性疾病, 由于它可通过唾液传播, 在历史上曾广泛传播, 夺去了数亿人的生命. 异烟肼、利福平、链霉素等药物的出现, 使结核病一度得到了很好的控制, 但近年来结核病的发生又有上升的趋势. 目前以从结核杆菌中分离出近 250 种噬菌体, 但对结核杆菌噬菌体的破壁机理还缺乏研究. 我们本来希望从结核杆菌噬菌体中找到类似于其他噬菌体的 endolysin 基因. 通过对已知基因组序列的 D29 噬菌体的各个 ORF BLAST 比对, 发现其基因组中没有具备 endolysin 基因保守序列的基因, 但 ORF10 具有几丁质酶的结构域. 因此, 我们通过 PCR 克隆出了 gene10, 并使其在大肠杆菌中得到了高效表达, 其 C 端带有 6xHis 标签. 用 Ni-NTA 亲和柱, 我们纯化出了重组的 D29 噬菌体几丁质酶在大肠杆菌中的可溶性部分. SDS-PAGE 表明, 表达并纯化的几丁质酶分子质量为 43 ku, 比按 gene10 序列推导的蛋白质分子质量 54.8 ku 明显要小, 这可能是由于信号肽的切割造成的. 用孔扩散法 (Well diffusion assay) 检测了纯化的几丁质酶活性, 发现其具有明显的降解几丁质活性. 另外用孔扩散法证明纯化的几丁质酶活性同时具有溶菌酶活性. 因此, D29 噬菌体的 gene10 表达的是一种具有几丁质酶 / 溶菌酶双重活性的酶. 扫描电镜观察结果表明, D29 噬菌体几丁质酶作用后, 有一部分耻垢杆菌发生裂

解, 这证明它可对耻垢杆菌细胞壁有水解作用.

以上的研究结果表明, 由于结核分支杆菌特殊的细胞壁结构, 其噬菌体裂解宿主细胞壁的机理与其他细菌的噬菌体有所不同. 其他细菌噬菌体通过表达 endolysin 降解细胞壁, 而结核杆菌噬菌体通过表达蛋白质的溶菌酶活性来降解肽聚糖. 同时, 吸光度检测表明纯化的几丁质酶作用后对耻垢杆菌生长的抑制率仅为 30%. 明显小于其他噬菌体 endolysin 对其宿主的降解效率. 这是否由于重组几丁质酶在大肠杆菌中信号肽的切割位点不同造成的活性不同, 还是由于耻垢杆菌肽聚糖外层阿拉伯糖和半乳糖共价连接成的 AG 层, 和占细胞壁干重 60% 的脂质层从空间上阻碍了几丁质酶和肽聚糖的结合, 或是否噬菌体同时还需表达其他的酶用于细胞壁其他成分的降解, 这些都是要在今后的研究中需要解决的问题.

参 考 文 献

- Kalousek S, Schrot G, Lubitz W, *et al.* Expression of the *Alcaligenes eutrophus* phbA gene in *Escherichia coli* using a positive selection vector based on phage Lambda lysis genes. *J Biotechnol*, 1994, **33** (1): 15~19
- Jespers L, Sonveaux E, Fastrez J, *et al.* Overexpression of the phage lambda lysozyme cloned in *Escherichia coli*: use of a degenerative mixture of synthetic ribosome binding sites and increase of the protein stability *in vivo*. *Protein Eng*, 1991, **4** (4): 485~492
- Loessner M J, Wendlinger G, Scherer S. Heterogeneous endolysins in *Listeria monocytogenes* bacteriophages: a new class of enzymes and evidence for conserved holin genes within the siphoviral lysis cassettes. *Mol Microbiol*, 1995, **16** (6): 1231~1241
- Loeffler M J, Nelson D, Fischetti V A. Rapid killing of *Streptococcus pneumoniae* with a bacteriophage cell wall hydrolase. *Science*, 2001, **294** (5549): 2170~2172
- Nelson D, Loomis L, Fischetti V A. Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98** (7): 4107~4112
- Schuch R, Nelson D, Fischetti V A. A bacteriolytic agent that detects and kills *Bacillus anthracis*. *Nature*, 2002, **418** (6900): 884~889
- Ford M E, Sarkis G J, Belanger A E, *et al.* Genome structure of mycobacteriophage D29: implications for phage evolution. *J Mol Biol*, 1998, **29**;279(1):143~164
- 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 F, 曼尼阿蒂斯 T. 金冬雁, 黎孟枫等译. 分子克隆实验指南. 第二版. 北京: 科学出版社, 1996. 1~69
- Sambrook J, Fritsch F, Maniatis T. Translated by Jin D Y, Li M F, *et al.* *Molecular Cloning*. 2nd. Beijing: Science Press, 1996. 1~69
- 柳良好, 徐 同. 哈茨木霉几丁质酶诱导及其对水稻纹枯病菌的拮抗作用. *植物病理学报*, 2003, **33** (4): 359~363
- Liu L H, Xu T. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2003, **33** (4): 359~363
- Borelli V, Vita F, Shankar S, *et al.* Human eosinophil peroxidase induces surface alteration, killing, and lysis of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*, 2003, **71** (2): 605~613

Expression and Function Analysis of Mycobacteriophage D29 Chitinase Gene

ZHU Cheng-Gang^{1)*}, DING Zhi-Shan²⁾

⁽¹⁾*Institute of Biochemistry, College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China;*

⁽²⁾*Department of Life Science, Zhejiang College of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310053, China)*

Abstract Endolysins or lysins are cell-wall-hydrolysing enzymes synthesized during late gene expression in the lytic cycle of bacteriophage multiplication and enable the release of progeny virions from infected cells through degradation of the bacterial peptidoglycan. The gene10 was amplified from purified DNA of Mycobacteriophage D29 by using PCR and was expressed with 6×His tag in *E.coli*. The soluble portion of recombinant protein was purified by Ni-NTA column and the activity was detected. The results showed that gp10 is a bi-functional enzyme, has chitinase and lysozyme activities. The cell wall degradation was observed by SEM.

Key words bacteriophage, mycobacterium tuberculosis, chitinase

*Corresponding author . Tel: 86-571-68971414, Fax: 86-571-86971501, E-mail: cgzhu@zju.edu.cn

Received: March 8, 2005 Accepted: May 8, 2005