

葡萄球菌核酸酶的制备及性质研究

洪 流, 郎君超, 贺冬梅, 刘坤锋, 吴 洁*

(中国药科大学微基因药学实验室, 南京 210009)

摘要 为获得纯度较高的葡萄球菌核酸酶(SNase)以研究其与糖尿病的关系, 构建基因工程表达菌 *E. coli* BL21/pET28a-His-SNase, 诱导其表达可溶性胞外蛋白, 并对纯化的 SNase 进行初步性质研究。采用分子生物学方法设计和构建含有 SNase 基因的表达载体 pET28a-His-SNase, 再转入 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞。经过乳糖诱导表达、超声破碎及镍柱亲和色谱等纯化步骤后, 以 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定 His-SNase, 并对其性质进行了初步研究。结果表明, 乳糖诱导后 His-SNase 能高效表达, 亲和色谱后纯度高达 85% 以上, 且其具备较高的核酸酶活性, 作用 pH 范围较广, 有很好的耐热性。本研究为进一步探究葡萄球菌核酸酶与糖尿病的关系奠定了基础。

关键词 糖尿病; 葡萄球菌核酸酶; 组氨酸标签; 分离纯化

中图分类号 Q789 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2017)02-0214-06

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20170213

引用本文 洪 流, 郎君超, 贺冬梅, 等. 葡萄球菌核酸酶的制备及性质研究[J]. 中国药科大学学报, 2017, 48(2): 214–219.

Cite this article as: HONG Liu, LANG Junchao, HE Dongmei, et al. Studies on preparation and properties of Staphylococcus nuclease[J]. J China Pharm Univ, 2017, 48(2): 214–219.

Studies on preparation and properties of Staphylococcus nuclease

HONG LIU, LANG JUNCHAO, HE DONGMEI, LIU KUNFENG, WU JIE*

Laboratory of Minigene Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract In order to study the relationship between Staphylococcal nuclease (SNase) and diabetes mellitus, genetic engineering bacteria *E. coli* BL21/pET28a-His-SNase was constructed, the expression of soluble extracellular protein SNase was induced and a preliminary research was made on it. An expression vector pET28a-His-SNase plasmid containing the His-SNase gene was constructed and transformed into *E. coli* BL21 (DE3) competent cells. The protein was induced by lactose and purified by ultrasound destruction and Ni-affinity chromatography, respectively. It was then analyzed by SDS-PAGE and Western blot. The enzymatic properties for SNase has been preliminary studied as well. Results indicated that the purity of the correctly expressed fusion protein His-SNase was over 85%. SNase showed good activity within a wide range of pH and good heat resistance. This experiment might be a foundation work for the further study on the relationship between SNase and with diabetes.

Key words diabetes mellitus; Staphylococcal nuclease; His-tag; separation and purification

This study was supported by National Natural Science Foundation of China (No. 81673340, 31270985) and the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK20161462)

1型糖尿病(type 1 diabetes mellitus, T1DM)是一种自身免疫性疾病, 是由于胰腺中分泌胰岛素的胰岛 β 细胞遭到了自身免疫性T细胞的靶向性破坏, 导致胰岛素的绝对缺乏而产生^[1-2]。目前临床主要采用注射胰岛素治疗^[3], 但无法从根本上阻

止1型糖尿病发生。胰岛移植、干细胞治疗方案虽取得一定效果, 但尚未发展成熟, 还处于摸索阶段, 有待科研人员进一步开发^[4-5]。因此, 寻求更加安全有效、易于临床应用的糖尿病治疗方法是科研人员迫切需要重点解决的重点课题。

中性粒细胞是先天免疫系统的重要组成部分,属于炎症反应的一线细胞,在抵抗微生物入侵中发挥着重要作用^[6~7]。活化的中性粒细胞会释放自身线粒体和核内染色质DNA到胞外,包裹各种颗粒蛋白酶形成纤维网样结构,称为中性粒细胞胞外诱捕网^[8](neutrophil extracellular traps, NETs)。研究发现,NETs中84%的蛋白质是自身免疫病、肿瘤或者两者共有的自身抗原,并且NETs中的修饰酶也可以对自身和外来的蛋白质进行修饰,导致两者转变为自身抗原^[9]。NETs过分强盛或清除受阻与自身免疫病的发生发展有很大关系,如系统性红斑狼疮(SLE)、类风湿性关节炎(RA)、自身免疫性小血管炎、糖尿病等^[10~12]。研究发现,糖尿病患者体内NETs标志物的水平显著升高,NOD小鼠胰腺在2周龄时就已经出现了NETs升高异常^[13~14],体外实验也表明:高血糖会上调中性粒细胞脱亚胺酶4(PAD4)基因的表达,PAD4催化组蛋白的瓜氨酸化加剧染色质解聚,最终促进NETs的形成^[15~16]。基于以上研究,本课题组设想降解体内过分强盛的NETs有可能对糖尿病的发病进程产生影响。

NETs的主要结构成分是DNA,所以破坏NETs的DNA骨架就能降解NETs^[17]。葡萄球菌核酸酶(Staphylococcus nuclease, SNase)是由金黄色葡萄球菌分泌的一种单链蛋白,具有磷酸二脂酶活性。在Ca²⁺的存在下,对单链或双链DNA有较强的降解能力。该酶结构简单,仅由1条单肽链组成,不含半胱氨酸和二硫键,能够可逆地去折叠和重折叠^[18~19]。本课题组前期已经发现表达SNase的重组乳酸乳球菌口服灌胃NOD小鼠能有效降低糖尿病的发病率(数据待发表)。

为进一步深入研究SNase与糖尿病的关系,本实验成功构建了原核表达质粒pET28a-His-SNase,转化E.Coli BL21(DE3)中,建立了纯化His-SNase的简要工艺,并且初步研究了pH和温度对SNase活性的影响。

1 材料

1.1 菌种、质粒及实验动物

载体pET28a-Hsp65-6P277、pCYT:SNase质粒以及菌种E.coli BL21均为中国药科大学微基因实验室保存。清洁级BALB/c雌性小鼠(4~6周龄),购自扬州大学,合格证号:SCXK(苏)2012-0004。

1.2 试剂

各种限制性内切酶、T4-DNA连接酶(美国赛默飞世尔公司);Ni Sepharose 6 Fast Flow(美国通用医疗公司);质粒小量制备试剂盒、PCR产物纯化试剂盒、琼脂糖凝胶切胶回收试剂盒(北京天根生物科技有限公司);引物(南京金斯瑞生物科技有限公司);DNA Marker、蛋白预染Marker(北京全式金生物科技有限公司);辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗小鼠IgG抗体和DAB显色液(武汉博士德生物工程有限公司);其他试剂均为国产分析纯。

2 方法

2.1 His-SNase融合蛋白表达载体的构建

2.1.1 SNase基因的获得 利用引物设计软件Oligo分别设计上游引物P1和下游引物P2,P1:5'-CATGCCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCA CAGCACGGCAATGCATCACAAAC-3';P2:5'-CCGCTCGAGTTATTGACCTGAATCAGCG-3'。上游引物P1引入Nco I酶切位点以及组氨酸标签基因,下游引物P2引入Xho I酶切位点。采用PCR技术,从pCYT:SNase质粒中克隆获得SNase基因序列。扩增条件为94℃预变性10 min;94℃变性30 s,55℃退火30 s,68℃延伸1 min,共30个循环;68℃延伸10 min。

2.1.2 重组表达载体的构建与鉴定 将PCR产物与pET28a-Hsp65-6P277载体质粒分别由Nco I、Xho I双酶切,纯化后加T4-DNA连接酶4℃连接过夜,将过夜产物转化至E.coli BL21(DE3)感受态细胞,抽提质粒,PCR方法验证,并将核酸序列送至南京金斯瑞生物科技有限公司测定。

2.2 融合蛋白的诱导表达

将鉴定成功的重组菌培养4 h后,加入乳糖(终浓度5 mmol/L)进行诱导,37℃继续培养,分别在0,2,3,4,5,6 h取样,测A₆₀₀,离心收取菌体沉淀,进行15% SDS-PAGE分析,观察目的蛋白条带位置和表达量,确定最佳诱导时间。

2.3 融合蛋白的分离纯化

大规模培养重组菌,在融合蛋白表达量达最大值时离心收集菌体,超声破碎,低温离心收集上清液,弃沉淀。取上清液进行Ni-NTA柱纯化,分别用50,75,100,1 mol/L咪唑对融合蛋白His-SNase进行洗脱,收集每个峰的洗脱液,15% SDS-PAGE

分析。最后将样品透析除盐、冻干保存。

2.4 抗 SNase 鼠多克隆抗体的制备

将4~6周龄BALB/c小鼠随机分成2组:蛋白免疫组和空白对照组,每组6只。蛋白免疫组:免疫3次。首次免疫,将融合蛋白His-SNase冻干粉用弗氏完全佐剂配制成2 mg/mL质量浓度(蛋白定量采用考马斯亮蓝G-250法),皮下注射,每只0.1 mL。2 w和4 w时,用弗氏不完全佐剂与蛋白溶液按照同样的方法进行乳化,皮下注射,每只0.1 mL,共免疫2次。免疫结束后,眼眶取血,离心获得含有抗SNase鼠多克隆抗体的血清。空白对照组:1 mL的生理盐水与等体积的弗氏佐剂以同样的方法进行乳化,给药方式同上。

2.5 融合蛋白的Western blot 鉴定

用“2.4”中获得的抗SNase鼠多克隆抗体作为一抗对融合蛋白His-SNase进行Western blot鉴定分析。

2.6 不同反应pH对SNase活性的影响

分别取不同pH的DNA酶裂解缓冲液,pH分别设置如下:pH 3.6、4.8(3 mmol/L MgCl₂,3 mmol/L CaCl₂,200 mmol/L NaAC/HAC),pH 6.0、6.8、7.2、7.6、8.0(3 mmol/L MgCl₂,3 mmol/L CaCl₂,200 mmol/L Na₂HPO₄/NaH₂PO₄)的,共7个梯度。加入质粒DNA(pET28a:HSP65-6P277,0.5 μg/μL)20 μL,再加入纯化的SNase样品(0.1 mg/mL)5 μL于EP管中混匀,总体积控制在37.5 μL。在37 °C水浴裂解10 min后,加入0.33 mmol/L EDTA(pH 8.0)溶液12.5 μL终止反应。取所得溶液5 μL用于琼脂糖凝胶电泳检测。同上操作,只加入纯化的SNase样品(0.1 mg/mL)2 μL,在37 °C水浴中裂解10 min后进行琼脂糖凝胶电泳。

2.7 不同反应温度对SNase活性的影响

取DNA酶裂解缓冲液(3 mmol/L MgCl₂,3 mmol/L CaCl₂,200 mmol/L Na₂HPO₄/NaH₂PO₄,pH 7.2)10 μL,加入质粒DNA(pET28a:HSP65-6P277,0.5 μg/μL)20 μL。再加入纯化的SNase样品(0.1 mg/mL)5 μL在EP管中混匀。取5管,分别置于4,25,37,55,100 °C的水浴中孵育10 min,加入0.33 mmol/L EDTA(pH 8.0)溶液12.5 μL终止,取所得溶液5 μL加入6×loading dye 1 μL用于

0.8%的琼脂糖凝胶电泳,观察条带荧光强度强弱。

3 结果

3.1 pET28a-His-SNase的构建

构建pET28a-His-SNase质粒,如图1,得pET28a-His-SNase质粒载体含有质粒的阳性克隆培养于含卡那霉素的LB培养基中,培养14 h,采用质粒小量制备试剂盒提取质粒琼脂糖凝胶电泳,紫外光下观察电泳结果,与预计大小基本一致,如图2。将挑选的阳性克隆进行测序验证,经比对后所有碱基均与设计的相一致,证实构建的克隆是正确的。即成功的构建了包含重组质粒pET28a-His-SNase的基因工程菌。

3.2 His-SNase融合蛋白的诱导表达

乳糖诱导表达融合蛋白,经15% SDS-PAGE分析,在20 kD附近出现目的蛋白条带,与预测相对分子质量相符;且在诱导4 h时表达量最高,通过Bandscan软件分析融合蛋白的表达量可达菌体总蛋白量的48.1%,如图3。

3.3 融合蛋白的分离纯化

经乳糖诱导4 h后,收集菌体并超声破碎,离心后对上清液和沉淀取样,15% SDS-PAGE分析发现目的蛋白存在于菌体裂解液上清液中为可溶性表达。镍柱亲和色谱结果表明融合蛋白在咪唑浓度为75 mmol/L时被洗脱,如图4和图5。

3.4 Western blot 鉴定融合蛋白

融合蛋白His-SNase经过镍柱纯化后,使用抗SNase鼠多克隆抗体对其进行Western blot鉴定分析,如图6。经乳糖诱导后的转化菌产生能与抗SNase鼠多克隆抗体特异识别的蛋白,约20 kD;而未转化的E. coli BL21工程菌未出现特异反应的条带。

3.5 不同反应pH对SNase活性的影响

控制酶浓度、反应温度和反应时间相同的条件下,比较pH对SNase活性的影响。图7(A)琼脂糖电泳结果显示从pH 4.8至pH 9.2之间,体系中的质粒DNA被完全降解,pH 3.6时显示大部分降解,因此其作用pH范围较广,酸性、中性及碱性环境都可以发挥酶解作用。当减少加入SNase的量时,结果如7(B)显示,碱性条件下SNase的活性较中性及酸性条件更高。

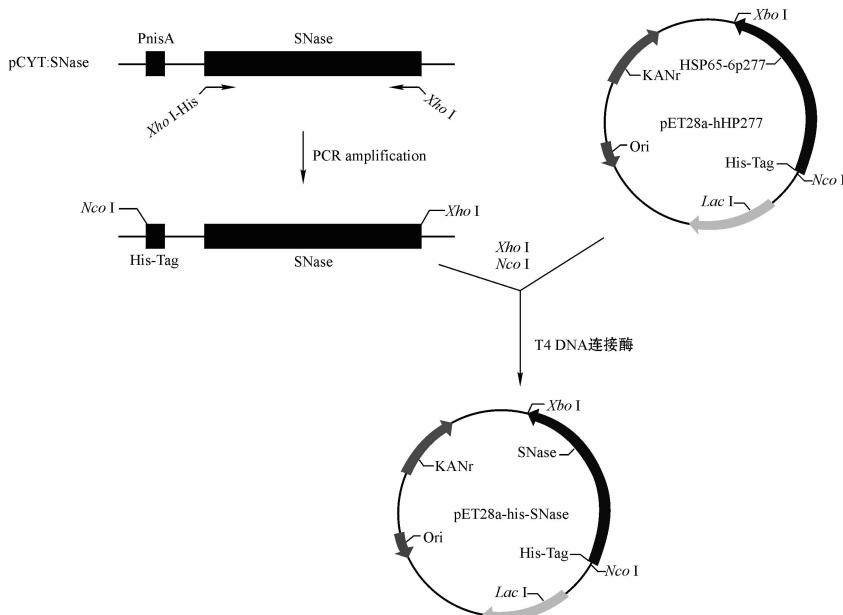


Figure 1 Schematic diagram of the plasmid of pET28a-His-SNase

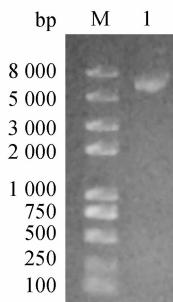


Figure 2 0.8% agarosegel electrophoresis results of recombinant plasmid pET28a-His-SNase

M: DNA molecular weight standards; Lane 1: Recombinant plasmid pET28a-His-SNase from the clone

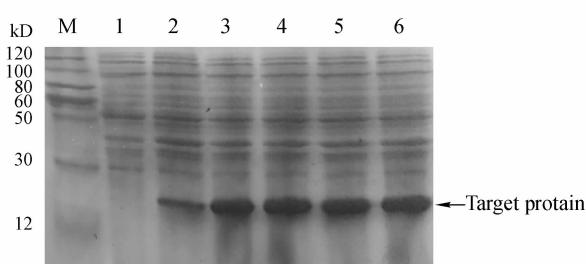


Figure 3 15% SDS-PAGE analysis of the expression levels of fusion protein His-SNase induced by lactose for different time

M: Protein marker; Lane 1: Total protein of *E. coli* BL21 (DE3) transformed with pET28a-His-SNase without lactose induction; Lane 2-6: Total protein of *E. coli* BL21 (DE3) transformed with pET28a-His-SNase induced with lactose for 2, 3, 4, 5, 6 h, respectively

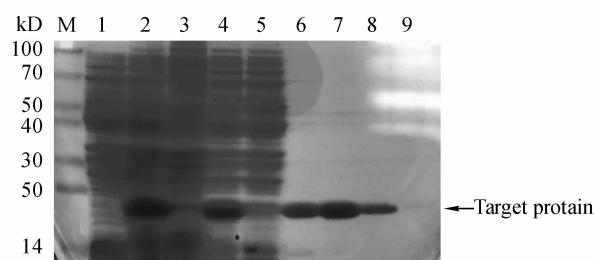


Figure 4 15% SDS-PAGE analysis of the expression of recombinant protein His-SNase and purification with different concentration of imidazole

M: Protein marker; Lane 1: Total protein of *E. coli* BL21 (DE3) transformed with pET28a-His-SNase without lactose induction; Lane 2: Total protein of *E. coli* BL21 (DE3) transformed with pET28a-His-SNase induced with lactose for 4 h; Lane 3: Precipitate of the lysate of *E. coli* BL21 (DE3) transformed with pET28a-His-SNase; Lane 4: Supernatant of the lysate of *E. coli* BL21 (DE3) transformed with pET28a-His-SNase; Lane 5: Proteins flow through from Ni Sepharose; Lane 6-9: Gradient elution with 50, 75, 100, 1 mol/L of imidazole

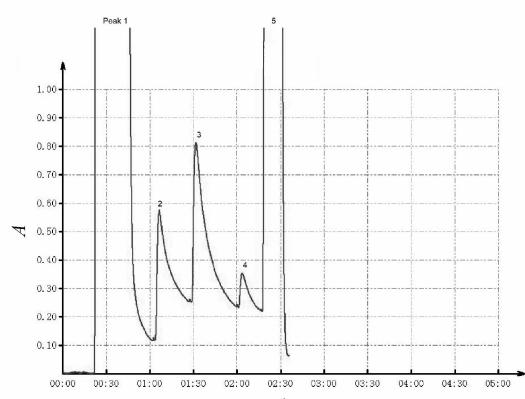


Figure 5 Affinity chromatography with Ni Sepharose
Peak 1: Proteins flow through; Peak 2-5: Elution with 50, 75, 100, 1 mol/L of imidazole

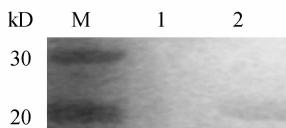


Figure 6 Western blot analysis of purified fusion protein His-SNase
M: Protein marker; Lane 1: Total cell proteins of *E. coli* BL21; Lane 2: Purified His-SNase

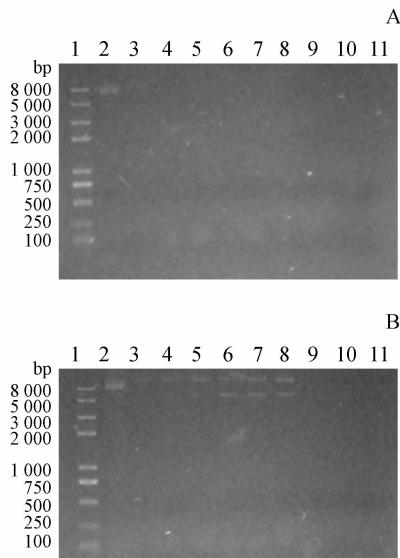


Figure 7 0.8% Agarose electrophoresis analysis of the different pH in reaction system
Lane 1: DNA Marker; Lane 2: Plasmid; Lane 3-11: pH 3.6, 4.8, 6.0, 6.8, 7.2, 7.6, 8.0, 8.6, 9.2
A: SNase(0.5 μg) + DNA(10 μg); B: SNase(0.2 μg) + DNA(10 μg)

3.6 不同反应温度对 SNase 活性的影响

控制酶浓度、反应 pH 和反应时间相同的条件下,比较不同温度下酶活情况,图 8 琼脂糖电泳结果显示,从 25~100 °C 之间,体系中的质粒 DNA (0.5 μg/μL) 被完全降解,且 4 °C 时 SNase 也有一定的活性。因此 SNase 具有较宽的作用温度和很高的耐热活性。

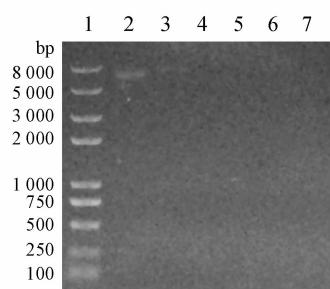


Figure 8 0.8% Agarose electrophoresis analysis of the different temperature in reaction system
Lane 1: DNA Marker; Lane 2: Plasmid; Lane 3-7: 4 °C, 25 °C, 37 °C, 55 °C, 100 °C

4 讨论

关于中性粒细胞胞外诱捕网 (neutrophil extracellular traps, NETs) 与自身免疫性疾病的关系在近几年才获得人们的重视。NETs 内含有的多种蛋白质是自身免疫疾病、肿瘤或两者共同的自身抗原。目前已有研究表明,系统性红斑狼疮 (SLE) 患者体内 NETs 的含量过高,同时在 1 型糖尿病患者和 2 周龄 NOD 小鼠体内异常增多的弹性蛋白酶也主要来源于 NETs。因此推测,通过早期干预降解 NETs 或许能延缓甚至阻止 1 型糖尿病的发生。而 SNase 具有磷酸二脂酶活性,对单链或双链 DNA 有较强的降解能力。本课题组早期研究也证明了肠道黏膜给药 SNase 能在一定程度上减轻 NOD 小鼠糖尿病的发病率,因此,本研究尝试通过原核表达的方式获得纯度较高的 SNase,为进一步深入探讨其与糖尿病的关系奠定基础。

在蛋白纯化工艺中,利用基因工程手段将经过改造优化的标签与目的蛋白融合表达,通过简单快速的亲和色谱获得高纯度的重组融合蛋白已被广泛运用于蛋白质结构和功能的探讨及重组蛋白分离纯化工艺中^[20-21]。研究表明,选用 His 标签一般不会对目的蛋白的理化性质造成影响,也不会改变目的蛋白的可溶性,并使操作步骤方便高效^[22]。

本实验通过基因工程的方法,以质粒 pCYT: SNase 中的 SNase 基因序列为模板,同时在 SNase 的基因序列 N 端添加组氨酸标签 (His-Tag) 基因,采用 PCR 方法,将获得基因序列定向克隆到 pET-28a 原核表达载体中,再转入 *E. coli* BL21 感受态细胞,筛选获得含有重组质粒 pET28a-His-SNase 的工程菌,该重组菌经乳糖诱导后表达较高。由于添加 His 标签,通过一步镍柱亲和色谱能获得纯度 85% 的目的蛋白,并经 Western blot 验证了其特异性。最后评估了不同反应 pH 和温度对 SNase 活性的影响,证明其作用 pH 范围很广,且有很好的耐热性,100 °C 仍然有较高活性。而 DNase1 在高温和酸性条件下容易失活^[23]。因此相比 DNase1,SNase 具有更高的稳定性和耐热性。

参考文献

- [1] Haskins K, Portas M, Bergman B, et al. Pancreatic islet-specific T-cell clones from nonobese diabetic mice[J]. *Proc Nat Acad Sci U S A*, 1989, **86**(20): 8000–8004.
- [2] Panina-Bordignon P, Lang R, van Endert PM, et al. Cytotoxic T cells specific for glutamic acid decarboxylase in autoimmune diabetes[J]. *J Exp Med*, 1995, **181**(5): 1923–1927.
- [3] Bekris LM, Kavanagh TJ, Lernmark A. Targeting type 1 diabetes before and at the clinical onset of disease [J]. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2006, **6**(1): 103–124.
- [4] White SA, Shaw JA, Sutherland DER. Pancreas transplantation [J]. *Lancet*, 2009, **373**(9677): 1808–1817.
- [5] Wen Y, Chen B, Ildsrød ST. Stem cell-based strategies for the treatment of type 1 diabetes mellitus[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2011, **11**(1): 41–53.
- [6] Mócsai A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond[J]. *J Exp Med*, 2013, **210**(7): 1283–1299.
- [7] Segal AW. How neutrophils kill microbes[J]. *Annu Rev Immunol*, 2005, **23**: 197–223.
- [8] Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria[J]. *Science*, 2004, **303**(5663): 1532–1535.
- [9] Darrah E, Andrade F. NETs; the missing link between cell death and systemic autoimmune diseases[J]. *J Front Immunol*, 2012, **3**: 428.
- [10] Villanueva E, Yalavarthi S, Berthier CC, et al. Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus [J]. *J Immunol*, 2011, **187**(1): 538–552.
- [11] Kessenbrock K, Krumbholz M, Schonemarck U, et al. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis[J]. *Nat Med*, 2009, **15**(6): 623–625.
- [12] Khandpur R, Carmona-Rivera C, Vivekanandan-Giri A, et al. NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis [J]. *Sci Transl Med*, 2013, **5**(178): 178ra40.
- [13] Wang Y, Xiao Y, Zhong L, et al. Increased neutrophil elastase and proteinase 3 and augmented NETosis are closely associated with β-cell autoimmunity in patients with type 1 diabetes[J]. *Diabetes*, 2014, **63**(12): 4239–4248.
- [14] Diana J, Simoni Y, Furio L, et al. Crosstalk between neutrophils, B-1a cells and plasmacytoid dendritic cells initiates autoimmune diabetes[J]. *Nat Med*, 2013, **19**(1): 65–73.
- [15] Dwivedi N, Upadhyay J, Neeli I, et al. Felty's syndrome autoantibodies bind to deiminated histones and neutrophil extracellular chromatin traps[J]. *Arthritis Rheum*, 2012, **64**(4): 982–992.
- [16] Nakashima K, Hagiwara T, Yamada M. Nuclear localization of peptidylarginine deiminase V and histone deimination in granulocytes[J]. *J Biol Chem*, 2002, **277**(51): 49562–49568.
- [17] Simon D, Simon HU, Yousefi S. Extracellular DNA traps in allergic, infectious, and autoimmune diseases[J]. *Allergy*, 2013, **68**: 409–416.
- [18] Taniuchi H, Anfinsen CB. Simultaneous formation of two alternative enzymology active structures by complementation of two overlapping fragments of staphylococcal nuclease[J]. *J Biol Chem*, 1971, **246**(7): 2291–2301.
- [19] Shortle D, Meeker AK. Residual structure in large fragments of staphylococcal nuclease: effects of amino acid substitutions[J]. *Biochemistry*, 1989, **28**(3): 936–944.
- [20] Singh PK, Chan PF, Hibbs MJ, et al. High-yield production and characterization of biologically active GST-tagged human topoisomeraseIIα protein in insect cells for the development of a high-throughput assay[J]. *Protein Expr Purif*, 2011, **76**(2): 165–172.
- [21] Vorackova I, Suchanova S, Ulbrich P, et al. Purification of proteins containing zinc finger domains using immobilized metal ion affinity chromatography[J]. *Protein Expr Purif*, 2011, **79**(1): 88–95.
- [22] Zakalskiy AE, Zakalska OM, Rzhepetskyy YA, et al. Overexpression of (His)6 tagged human arginase I in *Saccharomyces cerevisiae* and enzyme purification using metal affinity chromatography[J]. *Protein Expr Purif*, 2012, **81**(1): 63–68.
- [23] Shiokawa D, Tanuma S. Characterization of human DNase1 family endonucleases and activation of DNase gamma during apoptosis [J]. *Biochemistry*, 2001, **40**: 143–152.