

文章编号:1000-5862(2019)02-0177-07

嗜根考克氏菌翻译延伸因子P基因的 克隆、表达及其条件优化

杨娇娇,龙中儿*,黄运红

(江西师范大学生命科学学院 江西 南昌 330022)

摘要:为获得大量可溶性重组蛋白 EF-P 用以构建以 EF-P 蛋白为靶标的新型、高效抗细菌抗生素筛选模型,研究嗜根考克氏菌 DC2201 *efp* 基因的体外克隆、表达及表达条件的优化。首先对 *efp* 基因进行生物信息学分析,随后经 PCR 特异性扩增获得 *efp* 基因并将其插入表达质粒 pET-29a(+) 中,重组质粒(pET-29a(+)-*efp*)转化至表达宿主菌株 *E. coli* BL21(DE3)进行诱导表达,通过优化诱导表达条件(起始菌体浓度、温度、IPTG 终浓度、时间)获得大量可溶性目的蛋白,最后对表达产物进行镍离子亲和层析柱纯化及 SDS-PAGE、MALDI-TOF-TOF 鉴定。结果获得相对分子质量大小约为 25 kDa 的蛋白条带,与预测的目的重组蛋白相对分子质量大小相符。选择 $O_{D600\text{ nm}}=0.4$,于 20℃ 经 $0.7\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 IPTG 诱导 6 h 可获得大量可溶性目的蛋白。

关键词:翻译延伸因子 P; 基因克隆; 表达; 条件优化

中图分类号:Q 34 **文献标志码:**A **DOI:**10.16357/j.cnki.issn1000-5862.2019.02.11

0 引言

自 1928 年 Alexander Fleming 发现青霉素以来,人类利用抗生素治愈了许多临床上由微小病原体引起的感染。但随着抗生素的广泛使用和滥用,病原体(尤其是细菌)对抗生素产生了相应的抵御机制,由此出现了许多对某种抗生素或多种抗生素产生抗性的病原微生物^[1-2]。因此,为减缓耐药病原微生物的出现,新型抗生素的筛选及新型抗生素作用靶标的发现与研究具有重要意义。

翻译延伸因子 P(Elongation factor P,简称 EF-P)是由 Glick 等于 1975 年发现的除 EF-Tu、EF-G 和 EF-Ts 以外的第 4 种延伸因子^[3],其主要功能是通过稳定核糖体上的肽酰 tRNA 并促进肽键合成,以减缓由新生肽链上的聚脯氨酸序列引起的翻译延迟^[4-6]。许多含有聚脯氨酸序列的蛋白质在细菌的生命活动中具有重要的作用,因此,当缺失编码 EF-P 蛋白的基因时,细菌的生命活动将会受到不同程度的影响,如生长速度和活力降低^[7-12],对高渗、酸、洗涤剂、抗生素等胁迫条件的敏感性降低^[12-13],

以及毒力减弱^[8-9]等。此外,EF-P 蛋白广泛存在于细菌中,且在不同细菌中的氨基酸序列比较保守,与真核生物同功能蛋白 eIF5A 的序列相似性不高^[14]。因此,在耐药菌层出不穷的情况下,翻译延伸因子 P 由于其上述特性被认为是筛选新型抗细菌抗生素的理想靶位。

本文选择抗菌药敏试验的标准质量控制菌株^[15]——嗜根考克氏菌 DC2201 为研究材料,通过 PCR 扩增得到其 *efp* 基因,构建 pET-29a(+)-*efp* 表达载体,并转至表达宿主中进行目的蛋白的异源表达,通过优化表达条件获得大量可溶性的 EF-P 重组蛋白,最后利用镍柱亲和层析柱纯化获得目的重组蛋白,并对其进行鉴定,为后续研究 EF-P 蛋白的体外生物活性,进而构建靶向 EF-P 的新型抗生素筛选模型奠定基础。

1 实验材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株与质粒 *E. coli* DH5 α 感受态细胞和

收稿日期:2018-05-15

基金项目:国家自然科学基金(31360018),江西省重点研发计划(20161BBF60077)和江西省教育厅科学技术研究(GJJ170215)资助项目。

通信作者:龙中儿(1970-),男,江西崇仁人,教授,博士,主要从事微生物学研究。E-mail: longzhong'er@163.com

E. coli BL21(DE3) 感受态细胞均购自北京索莱宝生物科技有限公司, pMD19-T 克隆载体购自宝生物工程(大连)有限公司, 嗜根考克氏菌 DC2201 和 pET-29a(+) 表达载体由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂 细菌全基因组提取试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、质粒小提试剂盒、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、PCR 相关制品、DNA 分子量标准以及蛋白质分子量标准等均购自宝生物工程(大连)有限公司, Ni-NTA Spin Column 试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 *efp* 基因序列的生物信息学分析 利用 ProtParam 工具、TMHMM 软件和 SignalP 预测工具等对嗜根考克氏菌 DC2201 EF-P 蛋白的基本理化性质进行分析, 其中包括氨基酸组成、相对分子量及等电点、跨膜区和信号肽序列的有无等方面; 利用 PredictProtein 和 InterProScan 软件预测蛋白质的 2 级结构及其结构域; 利用 SWISS-MODEL 软件对蛋白质的 3 维结构进行同源建模; 用 MEGA 软件对基因的系统进化树进行绘制。

1.2.2 *efp* 基因的扩增 根据细菌基因组小量提取试剂盒的操作说明, 提取嗜根考克氏菌 DC2201 的全基因组; 参照 NCBI 上嗜根考克氏菌 DC2201 全基因组序列中的 *efp* 基因序列设计一对特异性引物:

正向引物 F1: 5'-GGAATTCCATATG GCAACCAG-CAACGACATCAA-3' (下划线为 NdeI 酶切位点);

反向引物 R1: 5'-ATAAGAAT GCGGCCGC-CTCGTTGACGCGTCCCAGGTAGT-3' (下划线为 Not I 酶切位点);

以嗜根考克氏菌全基因组作为模板扩增 *efp* 基因, 其扩增反应过程设定为: (i) 94 °C 预变性 1 min; (ii) 94 °C 变性 30 s; (iii) 62 °C 退火 30 s; (iv) 72 °C 延伸 40 s; (v) 从 (ii) ~ (iv) 循环 30 次; (vi) 72 °C 延伸 10 min. 最终通过 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物的片段大小及效率。

1.2.3 基因的克隆载体及表达载体的构建 将利用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收的 PCR 产物与 pMD19-T 克隆载体在 T4 DNA 连接酶的作用下于 16 °C 连接过夜, 随后将连接液转至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中进行蓝白斑筛选, 最后将通过质粒 PCR 和双酶切鉴定的阳性克隆子(pMD19-T-*efp*) 送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

用限制性内切酶 Nde I 和 Not I 分别双酶切处理上述测序正确的重组克隆载体 pMD19-T-*efp* 及表达载体 pET-29a(+) , 通过琼脂糖凝胶 DNA 回收试

剂盒回收相应的目的片段, 随后在 T4 DNA 连接酶的作用下将 2 者形成连接产物。再将连接液转至表达宿主大肠杆菌 BL21(DE3) 感受态细胞中, 通过卡那霉素抗性筛选、质粒 PCR 以及双酶切鉴定的阳性克隆子(pET-29a(+) -*efp*) 送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

1.2.4 目的重组蛋白 EF-P 的诱导表达及条件优化

将载有重组表达载体(pET-29a(+) -*efp*) 的表达宿主菌接种于 5 mL 的 LB 液体培养基(50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Kan^r) 中, 于 37 °C、180 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养中过夜, 随后转接至含相同终浓度卡那霉素的 50 mL LB 液体培养基中进行相同条件的扩大培养。当菌体达到一定浓度时, 加入 IPTG 诱导目的重组蛋白的表达, 分析起始菌体浓度、温度、IPTG 浓度和诱导时间对目的蛋白表达的影响。待目的蛋白充分诱导表达后, 用 SDS-PAGE 检测目的蛋白的表达情况。

1.2.5 目的蛋白的纯化及鉴定 在最优的目的蛋白表达条件下大量表达目的蛋白, 8 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 菌体用 1 \times PBS(pH 值为 7.4) 洗涤, 用 6 倍裂解缓冲液重悬后, 超声破碎细胞(2 s 工作, 3 s 间歇) 15 min, 4 °C、10 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min 后取上清, 用平衡好的 Ni-NTA 亲和层析柱对上清液进行不同浓度的咪唑洗脱, 纯化得到目的蛋白, 最后对目的蛋白进行透析除盐, 透析完毕后取小部分蛋白样品分别进行 SDS-PAGE 和基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-TOF) 鉴定, 其余部分保存于 -80 °C。

2 结果与分析

2.1 *efp* 基因及其表达产物 EF-P 的生物信息学分析

2.1.1 EF-P 蛋白的理化性质分析 生物信息学分析的结果表明 *efp* 基因全长为 564 bp, 编码氨基酸 187 个, 蛋白质分子量为 20.516 02 kDa, 等电点(PI) 为 4.83, 表明 EF-P 为酸性蛋白质, 其总平均亲水性为 -0.372, 属亲水性蛋白。利用 TMHMM 软件和 Signal P 预测工具对 EF-P 蛋白跨膜区和信号肽序列进行分析, 结果显示 EF-P 蛋白没有跨膜区和信号肽序列, 因此可推断该蛋白为胞内蛋白。经过进一步的亚细胞定位, 结果显示其位于细胞质中。上述分析结果为 EF-P 的体外可溶性表达奠定了理论基础。

2.1.2 EF-P 蛋白的结构预测 根据 Predict Protein 预测其 2 级结构, 结果显示 EF-P 蛋白是非球蛋白, 且无二硫键, 其主要由 6.42% 的 α 螺旋、54.55% 的 β 折叠和 39.04% 的无规卷曲组成。采用 InterProScan 软件预测其结构域, 结果表明该蛋白属于翻

译延伸因子 P (EF-P) 家族, 其主要的结构域有核酸结合结构域、核糖体蛋白 L2 的结构域 2、翻译蛋白质 SH3 样结构域超家族、翻译延伸因子 P (EF-P) 的 KOW 样结构域、中心区域以及 C 端结构等。根据 GO 注释可知, 其主要的功能是翻译延伸。通过 SWISS-MODEL 对 *efp* 基因编码的蛋白质进行 3 维结构的同源建模, 结果如图 1 所示。



图 1 EF-P 蛋白 3 维结构预测图

2.1.3 EF-P 蛋白的系统进化分析 根据冯思玲^[16]对系统发育树方法的介绍, 选择邻接法 (neighbor-joining) 构建系统发育树, 进行自举 2 000 次以验证系统发育树的可信度, 结果如图 2 所示。对同属于考克氏菌属的菌种而言, 其 EF-P 氨基酸序列的同源性和相似性最高, 而与节细菌属、细小短杆菌属、罗斯氏菌属以及其他属于放线菌纲 (富含高 GC 含量) 菌种的同源性和相似度仅次于同属的细菌, 表明在富含高 GC 含量的菌种中, EF-P 氨基酸序列的保守性较强。另外, 对于不属于放线菌纲的土壤杆菌属以及大肠杆菌属, 其 EF-P 序列的相似度低于 50%。由此可见, 嗜根考克氏菌 EF-P 与含高 GC 含量的放线菌纲菌种具有较高的相似度 (平均高于 90%)。

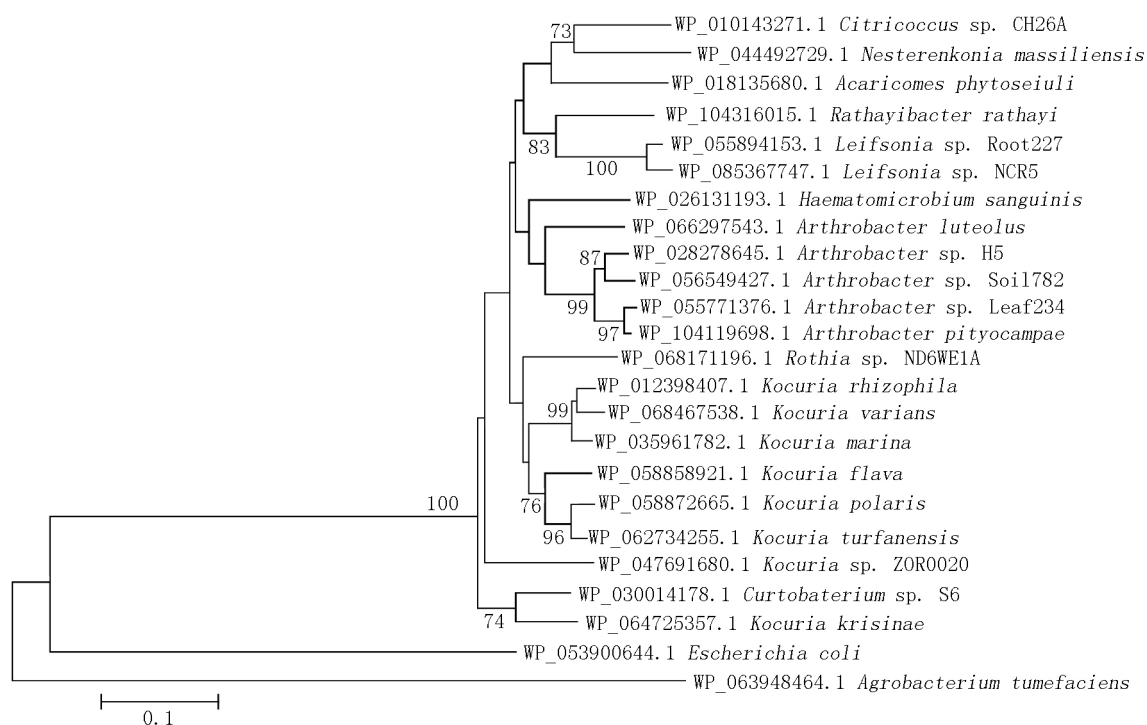


图 2 嗜根考克氏菌 EF-P 蛋白系统进化树

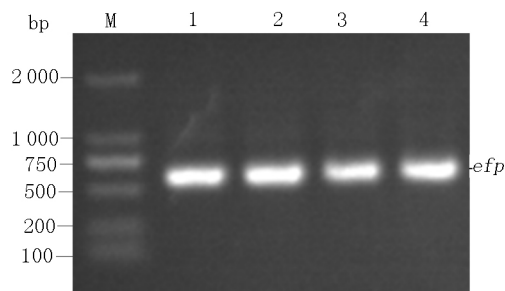
2.2 *efp* 基因的克隆

以嗜根考克氏菌 DC2201 基因组为模板, 利用特异性引物 PCR 并通过琼脂糖凝胶电泳鉴定, 成功获得 1 个大约为 550 bp 的 DNA 片段 (见图 3), 与 *efp* 基因的理论 DNA 片段大小 561 bp 相符, 表明实验成功扩增得到目的基因片段。

2.3 重组克隆载体 pMD19-T-*efp* 与表达载体 pET-29a(+) -*efp* 的构建

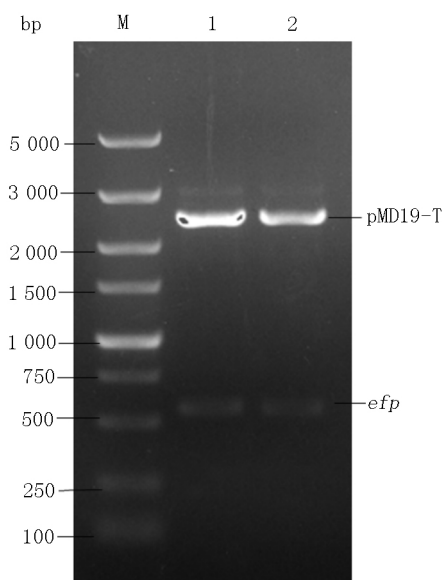
2.3.1 重组克隆载体 pMD19-T-*efp* 的鉴定 将 *efp* 基因与克隆载体 pMD19-T 连接并转化至大肠杆菌 DH5 α 筛选阳性克隆子提取质粒, 经 Nde I 和 Not I 2 种限制性内切酶的双酶切处理后, 经琼脂糖凝胶电泳鉴定, 结果如图 4 所示, 成功获得约为 2 500 bp 和

550 bp 的 2 条条带, 与理论的 pMD19-T 载体 2 692 bp 和 *efp* 基因 561 bp 相符。将该阳性克隆子送至测序公司测序, 表明了插入片段为 *efp* 基因的目的片段, 因此这表明重组克隆载体 pMD19-T-*efp* 构建成功。



M: DL2 000 核酸分子量标准; 1~4: PCR 产物。

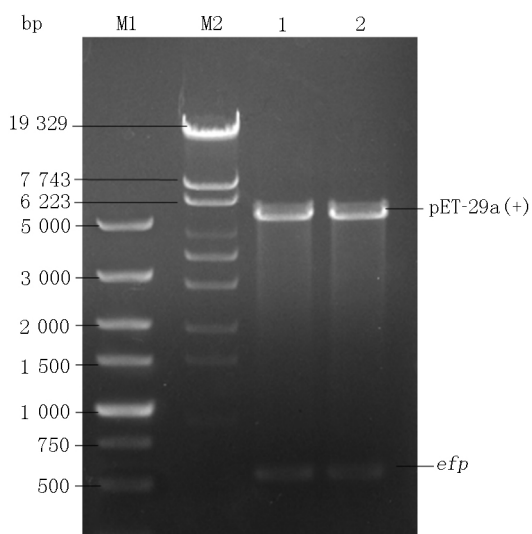
图 3 嗜根考克氏菌 *efp* 基因 PCR 电泳图



M: DL5 000 核酸分子量标准; 1~2: 由 Nde I、Not I 这 2 种限制性内切酶双酶切 pMD19T-*efp*。

图 4 pMD19T-*efp* 重组质粒双酶切鉴定

2.3.2 重组表达载体 pET-29a(+) -*efp* 的鉴定 将测序正确的重组克隆载体 pMD19-T-*efp* 和表达载体 pET-29a(+) 分别用 Nde I 和 Not I 这 2 种限制性内切酶处理后, 将酶切后的目的片段和表达载体用 T4DNA 连接酶连接, 随后将连接产物转化至表达宿主中, 经双酶切鉴定, 结果如图 5 所示, 成功获得了约为 5 500 bp 和 550 bp 的 2 条条带, 与 pET-29a(+) 载体 5 371 bp 和 *efp* 基因 561 bp 相符。将其送至测序公司测序, 测序结果正确, 这表明重组表达载体 pET-29a(+) -*efp* 构建成功。

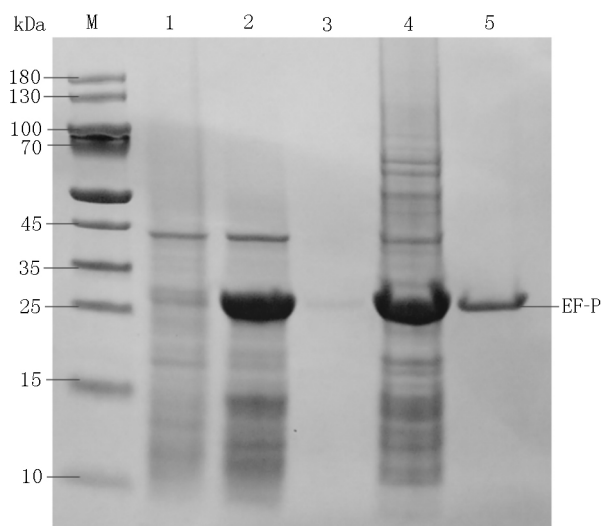


M1: DL5 000 核酸分子量标准; M2: λ -EcoT4 I digest 核酸分子量标准; 1~2: 由 Nde I、Not I 这 2 种限制性内切酶双酶切 pET-29a(+) -*efp*。

图 5 pET-29a(+) -*efp* 重组质粒双酶切鉴定

2.4 重组蛋白 EF-P 的表达与纯化

将经测序正确的重组表达载体 pET-29a(+) -*efp* 转入表达菌株 *E. coli* BL21(DE3) 中进行诱导表达, 在 37 °C、180 r·min⁻¹ 培养条件下, 以终浓度为 1 mmol·L⁻¹ 的 IPTG 为诱导剂对表达菌株进行诱导表达 5 h, 收集菌样后, 以 SDS-PAGE 电泳鉴定。结果如图 6 所示, 实验组在约 25 kDa 附近出现大量表达的蛋白质条带, 而对照组(未加 IPTG 诱导)在相应位置未出现显著性条带, 初步判断目的蛋白得到了大量表达。对其进一步的可溶性分析发现, 在 37 °C 下, 目的蛋白可能由于表达过快, 未能及时正确折叠, 因此其主要存在于沉淀中, 即以包涵体的形式存在。另外, 由于构建的重组表达载体在蛋白质 C 端带有 6 × His 标签, 因此可利用镍柱亲和层析柱纯化得到目的蛋白, 再通过基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-TOF)进行验证, 与理论蛋白进行比对, 其 *P* 值小于 0.05, 进一步佐证了该蛋白为重组蛋白 EF-P。

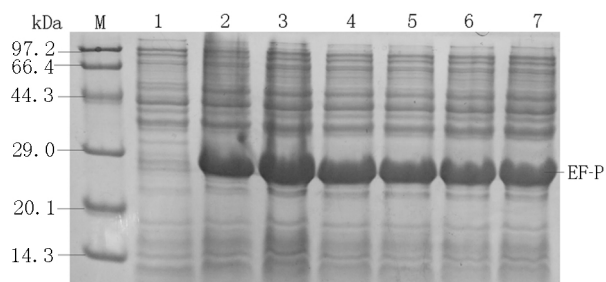


M: 蛋白质分子量标准; 1: 未经 IPTG 诱导的总蛋白; 2: 经 1 mmol·L⁻¹ 的 IPTG 诱导的总蛋白; 3: 细胞破碎上清液总蛋白; 4: 细胞破碎沉淀总蛋白; 5: 纯化的重组蛋白 EF-P。

图 6 重组蛋白 EF-P 的表达与纯化

2.5 重组蛋白 EF-P 的表达条件的优化及可溶性分析

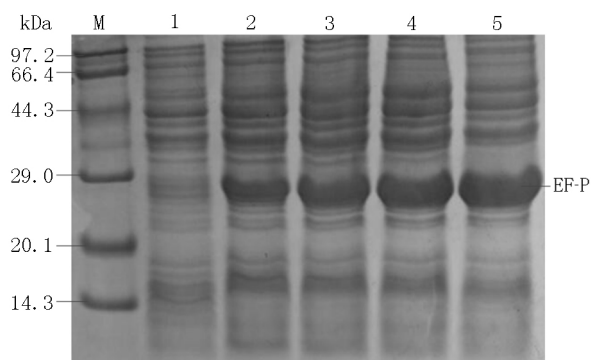
2.5.1 诱导前菌体浓度对重组蛋白 EF-P 表达的影响 菌体浓度反映菌体所处的生理状态, 是影响外源蛋白表达的重要因素。不同初始菌体浓度($O_{D_{600\text{ nm}}}$ = 0.2、0.4、0.6、0.8、0.9、1.0)对重组蛋白 EF-P 表达的影响如图 7 所示, 在 37 °C、添加 IPTG 终浓度为 1 mmol·L⁻¹、诱导表达 5 h 条件下, 菌悬液 $O_{D_{600\text{ nm}}}$ = 0.4 时, 目的蛋白的表达量相对较高; $O_{D_{600\text{ nm}}}$ = 0.6 ~ 1.0 时, 目的蛋白的表达趋于平缓的状态。因此, 针对重组蛋白 EF-P 的表达量最大化而言, 可选择 $O_{D_{600\text{ nm}}} = 0.4$ 作为起始菌体浓度进行诱导表达。



M: 蛋白质分子量标准; 1: 诱导前总蛋白; 2~7: 诱导前不同浓度的菌体 ($O_{D_{600\text{ nm}}} = 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 0.9, 1.0$) 于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 经 $1\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ IPTG 诱导 5 h 的总蛋白。

图7 诱导前菌体浓度对重组蛋白 EF-P 表达的影响

2.5.2 诱导温度对重组蛋白 EF-P 表达的影响 诱导温度影响蛋白质的表达速度,是影响外源蛋白表达的另一重要因素。不同诱导温度 ($20, 25, 30, 37\text{ }^{\circ}\text{C}$) 对重组蛋白 EF-P 表达的影响如图 8 所示,当初始菌体浓度 $O_{D_{600\text{ nm}}} = 0.4$ 、添加终浓度为 $1\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 IPTG 诱导菌株表达 5 h 条件下,随着温度的上升,重组蛋白 EF-P 的表达量也逐步上升。因此,针对重组蛋白 EF-P 的表达量最大化而言,选取 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 作为其诱导温度。



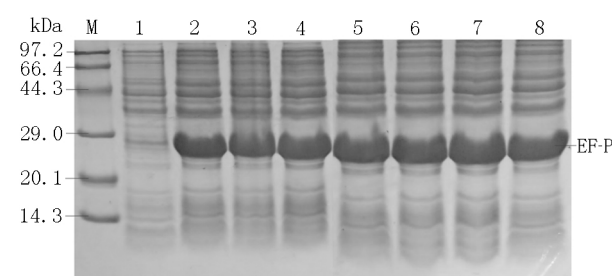
M: 蛋白质分子量标准; 1: 诱导前总蛋白; 2~5: 不同诱导温度 ($20, 25, 30, 37\text{ }^{\circ}\text{C}$) 经 $1\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ IPTG 诱导 5 h 的总蛋白。

图8 诱导温度对重组蛋白 EF-P 表达的影响

2.5.3 IPTG 终浓度对重组蛋白 EF-P 表达的影响

适量的 IPTG 可诱导蛋白质的表达,但 IPTG 浓度过高会对细胞产生毒害作用而减少蛋白表达,因此 IPTG 终浓度也是影响外源蛋白表达的因素之一。添加不同终浓度的 IPTG ($0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9, 1.1, 1.3\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 诱导重组蛋白 EF-P 表达的影响如图 9 所示,当初始菌体浓度 $O_{D_{600\text{ nm}}} = 0.4$ 、于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 诱导表达菌株 5 h 条件下,随着 IPTG 浓度的上升,重组蛋白 EF-P 的表达量呈现先上升后持平的趋势,在 IPTG 终浓度为 $0.1\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,目的蛋白的表达量已达到较好的水平, IPTG 的终浓度为 $0.7\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,目的蛋白的表达量趋于最高,当大于 $0.7\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,其表达量已经开始趋于平缓,因此可以选取 $0.7\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为诱导表达重

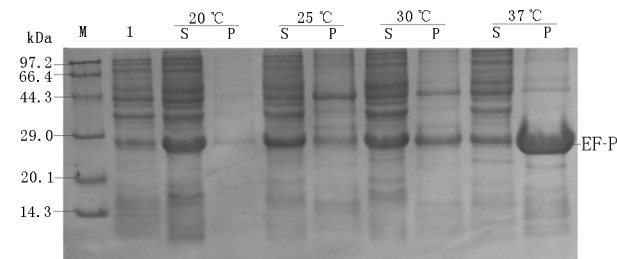
组蛋白 EF-P 的 IPTG 终浓度。



M: 蛋白质分子量标准; 1: 诱导前总蛋白; 2~8: $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下不同 IPTG 终浓度 ($0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9, 1.1, 1.3\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 诱导 5 h 的总蛋白。

图9 IPTG 终浓度对重组蛋白 EF-P 表达的影响

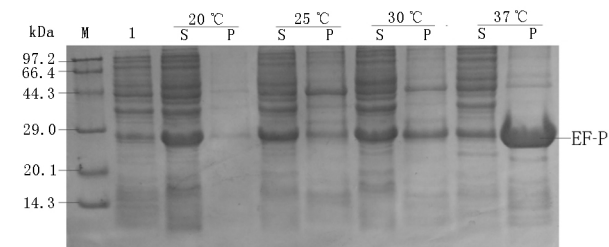
2.5.4 诱导时间对重组蛋白 EF-P 表达的影响 诱导时间与蛋白质的累积量成正相关,也是影响外源蛋白表达的因素之一。不同诱导时间 ($3, 4, 5, 6, 7\text{ h}$) 对重组蛋白 EF-P 表达的影响如图 10 所示,当初始菌体浓度 $O_{D_{600\text{ nm}}} = 0.4$ 、于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 添加 $0.7\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的终浓度 IPTG 对表达菌株进行诱导表达,随着时间的延长,重组蛋白 EF-P 的表达量呈现先上升后平缓的趋势。当诱导 6 h 时,目的蛋白的表达量达到最高,因此可以选取 6 h 作为诱导表达重组蛋白 EF-P 的诱导总时长。



M: 蛋白质分子量标准; 1: 诱导前总蛋白; 2~6: $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下,经 $0.7\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ IPTG 诱导不同时间 ($3, 4, 5, 6, 7\text{ h}$) 的总蛋白。

图10 诱导时间对重组蛋白 EF-P 表达的影响

2.5.5 诱导温度对重组蛋白 EF-P 可溶性表达的影响 优化表达条件的最终目的是获得最大量的可溶性重组蛋白 EF-P。由实验可知,重组蛋白 EF-P 在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下表达量最高,但是在对其进行可溶性分析时发现, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 所表达的目的蛋白多存在于包涵体中。为进一步获得最大量的可溶性目的蛋白,实验研究了诱导温度 ($20, 25, 30, 37\text{ }^{\circ}\text{C}$) 对重组蛋白的可溶性影响,结果如图 11 所示。由图 11 可见,随着表达温度的升高,表达的总蛋白量也增高,但目的蛋白的存在形式由可溶蛋白变为包涵体的形式。由于包涵体的处理方式需要变性复性,且最终恢复的生物活性不能达到最佳状态,因此选用可溶性的重组蛋白对后续实验更为有利。基于此,可选取 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 作为其诱导温度。



M: 蛋白质分子量标准; 1: 诱导前总蛋白; 2~9: 不同诱导温度下经 $0.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ IPTG 诱导 6 h 的上清液总蛋白(S)和沉淀总蛋白(P)。

图 11 诱导温度对重组蛋白 EF-P 可溶性表达的影响

3 讨论

EF-P 是继发现的 3 种延伸因子(EF-Ts、EF-Tu、EF-G)之后的第 4 种延伸因子,它们虽然都是在翻译过程中起作用,但是 2 者之间又有所不同,前 3 种延伸因子是作用于所有的蛋白质翻译延伸过程中,而 EF-P 仅仅是防止在合成含有 PPG、PPP 或较长脯氨酸序列的过程中出现的核糖体失速问题,因此 EF-P 主要在此类蛋白质的翻译延伸过程中有重要的作用。目前,国内外有关 EF-P 蛋白的研究主要集中于挖掘不同菌种 EF-P 翻译后的修饰方式^[17-20]、缺失 EF-P 及其修饰酶对于细菌的生长发育的影响^[21-23]以及 EF-P 如何稳定核糖体及 tRNA 的结构^[24-27],从而减缓因聚脯氨酸新生肽链导致的翻译延宕。鲜见有将 EF-P 作为新型抗生素作用靶点的研究报道。

为研究 EF-P 作为靶标用于筛选新型抗生素模型,本研究首先利用 PCR 技术扩增了来自嗜根考克氏菌 DC2201 的 *efp* 基因,并成功构建重组表达载体 pET-29a(+)-*efp*,最后经过异源表达获得重组蛋白 EF-P。为获得大量的可溶性重组蛋白 EF-P,实验研究了不同的表达条件对重组蛋白 EF-P 的可溶性表达的影响,最终发现诱导前菌体浓度和 IPTG 终浓度对于目的蛋白的表达影响并不显著,诱导时间及温度对目的蛋白的表达则有着显著影响。此外,当诱导温度升高时,目的蛋白的表达量逐步提高,但主要存在于包涵体中。由于包涵体的处理会一定程度上影响目的蛋白的生物活性,而后续实验需要 EF-P 具有较好的生物活性。因此,进一步优化了诱导温度对于重组蛋白 EF-P 可溶性表达的影响,最终确定其表达优化条件为:在 $OD_{600 \text{ nm}} = 0.4$,诱导温度为 20°C 时,对含有重组表达载体的表达宿主加以 $0.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 IPTG 诱导 6 h,最终获得大量的可溶性目的蛋白。最后针对重组蛋白 EF-P 进行镍柱亲和和层析纯化、SDS-PAGE 分析后,得到分子量大小约为 25 kDa 的蛋白条带,和 EF-P 蛋白理论分子量

20.516 02 kDa 不同,原因可能是除 EF-P 蛋白本身氨基酸序列以外还含有因酶切位点的选择以及 C 端组氨酸标签的缘故,导致重组蛋白的 C 端冗余了一段序列,因此最终获得的重组蛋白分子量大于理论蛋白分子量。为了进一步鉴定所得蛋白确为 EF-P 蛋白,本实验利用 MALDI-TOF-TOF 鉴定,其比对结果 *P* 值小于 0.05,表明结果具有统计学意义,可信度较高,因此可进一步证明所得重组蛋白为 EF-P 重组蛋白。

本研究获得的大量可溶性重组蛋白 EF-P 对于后续构建靶向 EF-P 蛋白的抗菌抗生素筛选模型提供了物质基础。此外,国内外目前对于 EF-P 蛋白修饰方式的研究主要集中在硬壁菌门的梭菌纲和变形菌纲^[28],鲜见有关于高 GC 含量的放线菌纲进行 EF-P 蛋白的翻译后修饰方式的研究报道,同时也鲜见报道缺失 *efp* 基因对于放线菌纲菌种的影响。因此,本文研究体外重组表达放线菌纲嗜根考克氏菌 DC2201 的 EF-P 蛋白具有一定的理论意义。

4 参考文献

- [1] Zinner S H. Antibiotic use: present and future [J]. New Microbiology 2007, 30(3): 321-325.
- [2] Dan I A. Persistence of antibiotic resistant bacteria [J]. Current Opinion in Microbiology 2003, 6(5): 452-456.
- [3] Doerfel L K, Rodnina M V. Elongation factor P: function and effects on bacterial fitness [J]. Biopolymers 2013, 99(11): 837-845.
- [4] Doerfel L K, Wohlgemuth I, Kothe C, et al. EF-P is essential for rapid synthesis of proteins containing consecutive proline residues [J]. Science 2013, 339(6115): 85-88.
- [5] Ude S, Lassak J, Starosta A L, et al. Translation elongation factor EF-P alleviates ribosome stalling at polyproline stretches [J]. Science 2013, 339(6115): 82-85.
- [6] Lassak J, Wilson D N, Jung K. Stall no more at polyproline stretches with the translation elongation factors EF-P and IF-5A [J]. Molecular Microbiology 2016, 99(2): 219-235.
- [7] Zou S B, Hersch S J, Roy H, et al. Loss of elongation factor P disrupts bacterial outer membrane integrity [J]. Journal of Bacteriology 2012, 194(2): 413-425.
- [8] Kaniga K, Compton M S, Curtiss R, et al. Molecular and functional characterization of *Salmonella enterica* serovar typhimurium *poxA* gene: effect on attenuation of virulence and protection [J]. Infection and Immunity, 1998, 66(12): 5599-5606.
- [9] Charles T C, Nester E W. A chromosomally encoded two-component sensory transduction system is required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Journal of Bacteriology 1993, 175(20): 6614-6625.
- [10] Peng Wentao, Banta L M, Charles T C, et al. The *chvH* locus of *Agrobacterium* Encodes a homologue of an elonga-

- tion factor involved in protein synthesis [J]. Journal of Bacteriology 2001 ,183(1) : 36-45.
- [11] Florencia I ,Ugalde J E ,Nora I D I. *Brucella abortus efp* gene is required for an efficient internalization in HeLa cells [J]. Microbial Pathogenesis 2012 ,52(1) : 31-40.
- [12] Bearson S M ,Bearson B L ,Brunelle B W et al. A mutation in the *poxA* gene of *Salmonella enterica* serovar typhimurium alters protein production elevates susceptibility to environmental challenges and decreases swine colonization [J]. Food-borne Pathogens and Disease 2011 ,8(8) : 725-732.
- [13] Dyk T K V ,Smulski D R ,Chang Yingying. Pleiotropic effects of *poxA* regulatory mutations of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* , mutations conferring sulfometuron methyl and alpha-ketobutyrate hypersensitivity [J]. Journal of Bacteriology ,1987 ,169(10) : 4540-4546.
- [14] Swaney S ,McCroskey M ,Shinabarger D ,et al. Characterization of a high-throughput screening assay for inhibitors of elongation factor *p* and ribosomal peptidyl transferase activity [J]. Journal of Biomolecular Screening 2006 ,11(7) : 736.
- [15] Takarada H ,Sekine M ,Kosugi H ,et al. Complete genome sequence of the soil actinomycete *Kocuria rhizophila* [J]. Journal of Bacteriology 2008 ,190(12) : 4139-4146.
- [16] 冯思玲. 系统发育树构建方法研究 [J]. 信息技术 , 2009(6) : 38-40.
- [17] Bullwinkle T J ,Zou S B ,Rajkovic A ,et al. (*R*) - β -lysine-modified elongation factor P functions in translation elongation [J]. Journal of Biological Chemistry ,2013 ,288 (6) : 4416.
- [18] Rajkovic A ,Erickson S ,Witzky A ,et al. Cyclic rhamnosylated elongation factor P establishes antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Mbio 2015 ,6(3) : 155-170.
- [19] Payne R J ,Wang Siyao ,Corcilius L ,et al. Synthesis of rhamnosylated arginine glycopeptides and determination of the glycosidic linkage in bacterial elongation factor P [J]. Chemical Science 2017 ,8(3) : 2296.
- [20] Lassak J ,Keilhauer E C ,Fürst M ,et al. Corrigendum: arginine-rhamnosylation as new strategy to activate translation elongation factor P [J]. Nature Chemical Biology ,2015 ,11(4) : 266-270.
- [21] Balibar C J ,Iwanowicz D ,Dean C R. Elongation factor P is dispensable in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Current Microbiology 2013 ,67(3) : 293-299.
- [22] Choi E ,Choi S ,Nam D ,et al. Elongation factor P restricts *Salmonella's* growth by controlling translation of a Mg^{2+} transporter gene during infection [J]. Sci Rep 2017 ,7: 42098.
- [23] Navarre W W ,Zou S ,Roy H ,et al. PoxA , YjeK and elongation factor P coordinately modulate virulence and drug resistance in *Salmonella enterica* [J]. Molecular Cell , 2010 ,39(2) : 209-221.
- [24] Aoki H ,Xu J ,Emili A ,et al. Interactions of elongation factor EF-P with the *Escherichia coli* ribosome [J]. Febs Journal 2008 ,275(4) : 671-681.
- [25] Mohapatra S ,Choi H ,Ge Xueliang ,et al. Spatial distribution and ribosome-binding dynamics of EF-P in live *Escherichia coli* [J]. Mbio 2017 ,8(3) : e00300-17.
- [26] Ude S ,Lassak J ,Starosta A L ,et al. Translation elongation factor EF-P alleviates ribosome stalling at polyproline stretches [J]. Science 2013 ,339(6115) : 82-85.
- [27] Peil L ,Starosta A L ,Lassak J ,et al. Distinct XPPX sequence motifs induce ribosome stalling ,which is rescued by the translation elongation factor EF-P [J]. PNAS , 2013 ,110(38) : 15265-15270.
- [28] Rajkovic A ,Ibba M. Elongation factor P and the control of translation elongation [J]. Annual Review of Microbiology 2017 ,71(1) : 117-131.

The Cloning ,Expression and Its Condition Optimization of Gene Encoding Elongation Factor P from *Kocuria rhizophila*

YANG Jiaojiao ,LONG Zhonger* ,HUANG Yunhong

(College of Life Sciences ,Jiangxi Normal University ,Nanchang Jiangxi 330022 ,China)

Abstract: In order to obtain a large number of soluble recombinant protein EF-P to construct a novel and highly effective antibiotic screening model targeting EF-P protein ,the *efp* gene from *Kocuria rhizophila* DC2201 is cloned and expressed and the expression conditions is optimized. At first *efp* is analyzed by bioinformatics method. Subsequently ,the gene is amplified by PCR and inserted into the expression vector pET-29a(+) . The recombinant plasmid (pET-29a(+) -*efp*) is transformed into the expression host strain *E. coli* BL21(DE3) to induce its expression. It can obtain many target proteins by optimizing the expression conditions (initial bacterial density ,induction temperature ,IPTG final concentration ,induction time) . Finally ,the expression products is purified by nickel ion affinity chromatography and identified by SDS-PAGE and MALDI-TOF-TOF. A protein band with approximately 25 kDa is showed ,which is consistent with the predicted molecular weight of recombinant protein. Under $O_{D_{600\text{ nm}}} = 0.4$,a lot of soluble protein can be obtained by inducing with $0.7\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ IPTG at $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 6 h.

Key words: elongation factor P; gene cloning; expression; condition optimization

(责任编辑: 刘显亮)