

结核分枝杆菌去乙酰化酶 2 的克隆及酶学研究

林雅宁,董 剑,徐忠玉(中国人民解放军第一七五医院/厦门大学附属东南医院检验科,福建漳州 363000)

【摘要】 目的 构建结核分枝杆菌去乙酰化酶 2(Sir2)原核表达载体,并进行表达纯化及酶学研究。**方法** 以结核分枝杆菌 H37Rv 基因组 DNA 为模板,聚合酶链反应扩增 Sir2 基因,构建 pET-28a-Sir2 重组质粒,在 E. coli BL2(DE3)中诱导表达蛋白,经 Ni^{2+} -NTA 柱纯化,最后通过去乙酰化酶试验测定 Sir2 酶活的最适反应温度和 pH 值,以及吡嗪酰胺对其酶活的影响。**结果** 成功构建了 Sir2 原核表达载体,并能在 E. coli BL21(DE3)中高效表达。随后对纯化的 Sir2 蛋白进行依赖于 NAD^+ 的去乙酰化活性研究,得到该酶的最适反应温度是 25 ℃,最适反应 pH 值是 9.0。在偏酸性环境中,吡嗪酰胺对酶活有抑制,而在偏碱性环境中,没有抑制作用。**结论** 利用分子克隆技术,获得了高纯度的 Sir2 蛋白并获得其酶活最适反应温度和最适 pH 值,及吡嗪酰胺对其有抑制效果,为研究抗结核药物吡嗪酰胺的抑菌机制提供一定基础。

【关键词】 结核分枝杆菌; 去乙酰化酶; 基因克隆; 蛋白纯化; 吡嗪酰胺

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.18.021 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)18-2703-02

Study on cloning and enzymology of deacetylase protein Sir2 from Mycobacterium tuberculosis H37Rv LIN Ya-ning, DONG Jian, XU Zhong-yu (Department of Clinical Laboratory, 175 Hospital of PLA/Affiliated Dongnan Hospital of Xiamen University, Zhangzhou, Fujian 363000, China)

【Abstract】 Objective To construct the deacetylase protein Sir2 prokaryotic expression vector of Mycobacterium tuberculosis(MTb) and to conduct the expression purification and enzymologic study. **Methods** Sir2 gene was amplified from MTb H37Rv genomic DNA as the template by PCR and then the recombinant plasmid pET-28a-Sir2 was constructed. The expression protein was induced in E. coli BL2(DE3) and purified by Ni^{2+} -NTA affinity chromatography. Finally the optimal reaction temperature and pH value of Sir2, and influence of pyrazinamide(PZA) on enzyme activity were detected by the acetylation enzyme test. **Results** Sir2 prokaryotic expression vector was successfully constructed and could be highly expressed in E. Coli BL21(DE3). Then the purified Sir protein was conducted the NAD^+ dependent deacetylation activity research. The obtained optimal pH was 9.0 and the optimal reaction temperature was 25 ℃. PZA had the inhibition effect to the Sir2 enzymatic activity under weakly acidic environment, but without the inhibiting effect under the basic pH environment. **Conclusion** The highly purified protein is obtained by using themolecular cloning technique, the optimal pH and optimal reaction temperature are also obtained, PZA has the inhibiting effect on it, which provides certain foundation for researching the antibacterial mechanism of ant-tuberculous drug PZA.

【Key words】 mycobacterial; deacetylase; gene clone; expression and purification; PZA

结核分枝杆菌(Mycobacterium tuberculosis H37Rv)是目前全球最可怕的流行性致病菌之一,结核病在我国发病率呈回升趋势^[1-3]。随着化疗药物的广泛应用,结核杆菌的耐药率日趋上升,特别是耐多药结核病(MDR-TB),给结核病的控制工作带来巨大困难^[4-5]。因此,寻找一种有效的药物靶标分子的任务迫在眉睫。去乙酰化酶(Sir2)蛋白是一类依赖于 NAD^+ 的去乙酰化酶,它在细胞的长寿与衰老、基因沉默、凋亡等生理活动中具有十分重要的调节作用^[6]。近年来 Li 发现了 Sir2 参与了分枝杆菌的非同源末端连接修复^[7]。Sir2 抑制 p53 蛋白的乙酰化,从而抑制依赖于 p53 蛋白的细胞凋亡,使 DNA 损伤修复有更充裕的时间^[8]。Sir2 蛋白具有 ADP-核糖基转移酶活性和依赖于 NAD^+ 的去乙酰化酶。烟酰胺是 Sir2 家族蛋白的天然抑制物,早期研究发现烟酰胺对结核菌有良好的抑制效果,因此,作者猜测 PZA 的作用机制可能与 Sir2 有关^[9-10]。本文克隆表达结核分枝杆菌的 Sir2 蛋白,对它的去乙酰酶活进行鉴定,并检测 PZA 对其抑制效果,期望通过对结核分枝杆菌 Sir2 蛋白的研究,能为抗结核病药物 PZA 的作用机

制和耐药机制提供新线索,为结核新药的设计和筛选提供靶标和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 结核分枝杆菌 H37Rv 由漳州疾控中心赠送,用于克隆、表达的质粒 pET28a,大肠杆菌菌株 E. coli BL21(DE3)均由本实验室保存。

1.2 仪器与试剂 聚合酶链反应(PCR)仪购自美国 ABI, Ni^{2+} -NTA 树脂购自 Novagen 公司,电泳装置购自 BIO-RAD 公司,荧光光度计购自 Bio-TEK 公司。DNA 聚合酶、限制性内切酶、 T_4 DNA 连接酶均为 Takara 公司产品。PCR 产物纯化试剂盒、胶回收试剂盒,质粒提取试剂盒,底物 Boc-lys(Ac)-AMC 为 Omega 公司产品。

1.3 方法

1.3.1 Sir2 基因的扩增和克隆 从 Genbank 中获得结核分枝杆菌的 Sir2(Rv1151c)基因的全核苷酸序列 714 bp,使用 Primer 5.0 软件设计引物扩增,上游引物:5'-TACTCCATG-GTTATGCGAGTGGCGGTGCTCA-3'和下游引物:5'-ATTA-

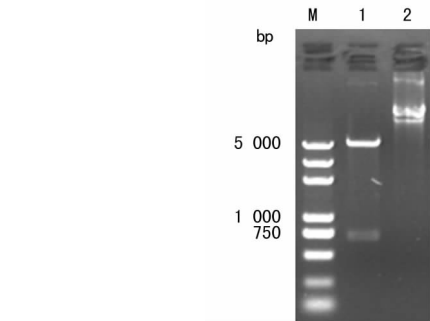
GACTCCTATTTTCAGCAGGGCGGGCA-3'。在上下游引物中分别引入酶切位点 Nco I 和 Sac I。PCR 扩增循环条件为: 95 ℃ 5 min,一个循环;95 ℃ 50 s,60 ℃ 50 s,72 ℃ 1 min 30 s,进行 30 个循环反应;最后 72 ℃ 延伸 7 min。基因 PCR 扩增后琼脂糖凝胶电泳回收目标条带,胶回收后产物用 Nco I 和 Sac I 双酶切消化后与载体 pET-28a 进行连接,然后转化入 E. coli BL21 得到 E. coli BL21/pET-28a-Sir2,经过表达验证、酶切验证或 PCR 验证后进行全基因测序。

1.3.2 Sir2 的表达和纯化 重组菌株在相应的抗菌药物 LB 培养基中培养过夜后接种于新鲜的 LB 中,OD₆₀₀ 为 0.5 时加入 0.4 mmol/L 的 IPTG,18 ℃ 诱导 10 h。利用 Ni²⁺-NTA 亲和层析柱纯化蛋白。SDS-PAGE 检测纯度,浓度用 Bio-Rad 公司生产的蛋白质浓度测定。

1.3.3 Sir2 依赖于 NAD⁺ 的去乙酰化酶活性 本试验利用乙酰化荧光底物 Boc-lys(Ac)-AMC 和 NAD⁺ 作为反应底物测定依赖于 NAD⁺ 的去乙酰化酶活性。测定酶活的反应体系组成:20 mmol/L Tris-HCl 缓冲 (pH8.0),200 mmol/L NaCl,50 mmol/L KH₂PO₄,250 mmol/L EDTA,500 μmol/L NAD⁺,20 μmol/L 荧光底物,20 μg His-Sir2 重组酶,以不加入 NAD⁺ 和不加入酶的反应作为阴性对照。进行酶反应条件优化,以获得较佳的酶反应条件。反应混合物避光静置,于一定恒温反应 2 h。终止反应:加入 60 μg/mL 胰蛋白酶,37 ℃ 保持 30 min。然后使用酶标仪测定荧光值(激发光 340;发射光 460)。PZA 抑制试验:在上述反应体系内,加入梯度浓度的已知 PZA。反应混合物避光静置,于 25 ℃ 恒温反应 2 h,然后加入终止缓冲液,于 37 ℃ 反应 30 min,测定荧光(激发光 340;发射光 460)。

2 结 果

2.1 结核分枝杆菌 Sir2 表达载体的构建与验证 从结核分枝杆菌基因组中 PCR 扩增出全长 714 bp 的 Sir2 基因片段,通过基因工程连接到 pET-28a 载体中,酶切验证后进行全基因测序,见电泳图 1。



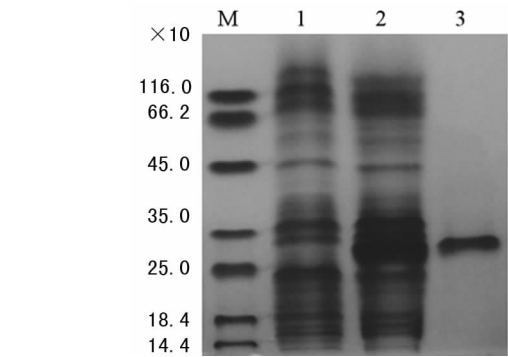
注:泳道 M,DNA Marker DL 2000 plus;泳道 1,重组质粒 pET-28a-Sir2;泳道 2,重组质粒 pET-28a-Sir2 Nco I 和 Sac I 双酶切。

图 1 pET-28a-Sir2 重组质粒的鉴定

2.2 结核分枝杆菌 Sir2 的表达及纯化 对表达菌株 E. coli BL21/pET-28a-Sir2 先进行了 Sir2 蛋白表达条件的优化和可溶性分析,发现该蛋白在表达时形成大量包涵体。通过摸索发现,在 0.4 mmol/L 的 IPTG,18 ℃ 诱导下,有利于形成可溶性蛋白,因此,采取该条件进行该蛋白的大量表达。经过特异亲和层析,获得纯的 Sir2 蛋白见图 2,目的条带约 30×10³。

2.3 Sir2 依赖于 NAD⁺ 的去乙酰化酶活性测定 首先用荧光法测 Sir2 蛋白依赖于 NAD⁺ 的去乙酰化活性。结果显示,阴性对照值荧光强度范围在 50 左右,而添加了 His-Sir2 重组酶的荧光值在 1 000 左右,说明 Sir2 确实具有依赖于 NAD⁺ 的去

乙酰化活性。



注:泳道 M,蛋白 Marker;泳道 1,pET-28a 菌株对照;泳道 2,pET-28a-Sir2 重组子;泳道 3,纯化的 Sir2 蛋白。

图 2 SDS-PAGE 分析 Sir2 蛋白

2.3.1 最适合反应温度和 pH 值 测定了不同温度和 pH 条件下 Sir2 的去乙酰化酶活性。结果显示,25 ℃ 下 Sir2 蛋白的酶活力最强,见图 3。最适 pH 值试验表明,pH<7 时随着 pH 降低,酶活逐渐降低;pH>7 时,随着 pH 的升高,活力逐步加强,在 pH 9 左右达到顶峰,最适反应 pH 值为 9,见图 4。

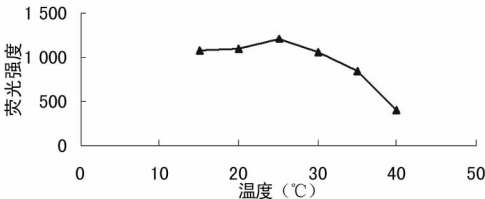


图 3 Sir2 酶活最适反应温度曲线

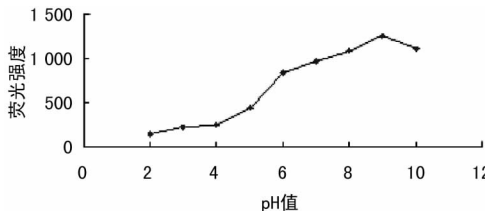


图 4 Sir2 酶活最适反应 pH 值曲线

2.3.2 PZA 抑制试验 在偏酸性(pH5.5)环境和偏碱性环境(pH8.0)中测定不同浓度 PZA 对 Sir2 酶活的影响。在偏碱性条件 PZA 对 Sir 酶活没有抑制效果;偏酸性条件,PZA 表现出抑制活性,但抑制强度弱,600 μmol/L 浓度下酶活力仍保持 80%,且随着浓度增大抑制效果增强不明显。

3 讨 论

Sir2 蛋白是一类依赖于 NAD⁺ 的去乙酰化酶,它的序列从原核生物到真核生物都很保守,但不同物种间 Sir2 蛋白还是会存在差异^[11-12]。结核杆菌 Sir2 基因 GC 水平达到 66.80%。外源表达条件下容易产生包涵体,这可能与大肠杆菌内缺乏辅助结核菌 Sir2 折叠的分子伴侣有关。本研究通过诱导条件的优化,最后在 OD₆₀₀ 为 0.5 时加入 0.4 mmol/L 的 IPTG,18 ℃ 诱导 10 h,蛋白可溶性提高,有利于蛋白质的纯化和保持生物学功能。本研究证明了结核分枝杆菌 Sir2 蛋白是依赖于 NAD⁺ 的去乙酰化酶,其活性对温度和 pH 值是敏感的。37 ℃ 左右酶失去大部分活性,而 37 ℃ 本是结核菌在人畜体内生存时的实际环境温度,原因可能是体外反应条件不足以完全恢复其在体内的活力。

PZA 是一种重要的抗结核菌药物,对处(下转第 2707 页)

确切定论,需进一步更大数量的研究证实。值得注意的是,仅仅依据 1 个或者几个生化检验来作为判断病情的依据是不足的,研究中也存在 CRP、PCT 明显升高而患者最终存活个案,临床医师需要将生化指标与临床症状统一起来,综合分析,指导临床工作。

参考文献

[1] Fine MJ, Auble TE, Yealy DM, et al. A prediction rule to identify low-risk patients with community-acquired pneumonia[J]. *N Engl J Med*, 1997, 336(4): 243-250.

[2] 赵珊,冯海萍,王琼娇,等.血清降钙素原在社区获得性肺炎中的临床价值[J]. *中国医师进修杂志*, 2012, 35(4): 1-4.

[3] Niederman MS, Mandel LA, Anzuete A, et al. Guidelines for the management of adults with community acquired pneumonia. Diagnosis, assessment of severity, antimicrobial therapy, and prevention[J]. *Am J Crit Care Med*, 2001, 3(7): 1730-1754.

[4] Fry AM, Shay DK, Holman RC, et al. Trends in hospitalizations for pneumonia among persons aged 65 years or older in the United States, 1988-2002[J]. *JAMA*, 2005, 294(21): 2712-2719.

[5] Marrie TJ, Lau C, Wheeler SL, et al. A controlled trial of a critical pathway for treatment of community-acquired pneumonia. CAPITAL Study Investigators. Community-Acquired Pneumonia Intervention Trial Assessing Levon-

oxacin[J]. *JAMA*, 2000, 283(6): 749-755.

[6] 张威.老年社区获得性肺炎严重度指数 PSI 和 CURB-65 评分应用价值研究[J]. *临床肺科杂志*, 2013, 18(11): 2114-2115.

[7] Sierna R, Rello J, Bailen MA, et al. C-reactive protein used as an early indicator of infection in patients with systemic inflammatory response syndrome[J]. *Intensive Care Med*, 2004, 30(11): 2038-2045.

[8] 施斌,施毅.血清 C 反应蛋白变化在社区获得性肺炎病情评估中的价值[J]. *江苏医药*, 2011, 37(7): 781-784.

[9] Nseir W, Farah R, Mograbi J, et al. Impact of serum C-reactive protein measurements in the first 2 days on the 30-day mortality in hospitalized patients with severe community-acquired pneumonia: a cohort study[J]. *J Crit Care*, 2013, 28(3): 291-295.

[10] 石玉玲,廖扬,曾珠,等.血清降钙素原在下呼吸道感染疾病中的诊断与应用[J]. *中华医院感染学杂志*, 2010, 20(1): 44-46.

[11] 董亚琼.老年重症肺炎患者血清降钙素原与前清蛋白检测的临床意义[J]. *检验医学与临床*, 2014, 11(8): 1093-1095.

[12] 李兵,张冰雁.C 反应蛋白检测在重症肺炎疗效评价中的意义[J]. *检验医学与临床*, 2013, 10(20): 2742-2744.

(收稿日期:2015-03-12 修回日期:2015-04-10)

(上接第 2704 页)

于酸性环境中缓慢生长的吞噬细胞内的结核菌来说,PZA 是目前最佳杀菌药物。在体内它并非直接作用于病菌,而是依靠病菌自身的吡嗪酰胺酶将其活化成为吡嗪酸,才能起作用,但是其作用靶点至今不明确。本研究发现偏碱性条件 PZA 对 Sir 酶活没有抑制效果;偏酸性条件,PZA 表现出弱的抑制活性。

总之,本试验构建了结核菌的原核表达载体并在大肠杆菌中诱导表达。通过优化诱导条件最后纯化到该蛋白,试验也证明了 Sir2 具有去乙酰化酶活性,最适反应温度是 25℃,pH9.0,偏酸性环境中 PZA 对其有较弱的抑制作用。本研究表明吡嗪酰胺的作用机制可能与 Sir2 有关。

参考文献

[1] Watts G. WHO annual report finds world at a crossroad on tuberculosis[J]. *BMJ*, 2012, 345(1): 7051-7061.

[2] 吴雪琼,张宗德,乐军.分枝杆菌分子生物学[M].北京:人民军医出版社,2010:131-132.

[3] 刘剑君,么鸿雁.我国结核病的流行现状和防治对策[J]. *预防医学论坛*, 2006, 12(5): 638-640.

[4] Le Chevalier F, Cascioferro A, Majlessi L, et al. Mycobacterium tuberculosis evolutionary pathogenesis and its putative impact on drug development[J]. *Future Microbiol*, 2014, 9(1): 969-985.

[5] Drusano GL, Neely M, Van Guilder M, et al. Analysis of combination drug therapy to develop regimens with shortened duration of treatment for tuberculosis[J]. *PLoS One*,

2014, 9(7): 311-321.

[6] Sharma A, Costantini S, Colonna G. The protein-protein interaction network of the human Sirtuin family[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1834(10): 1998-2009.

[7] Li Z, Wen J, Lin Y, et al. A Sir2-like protein participates in Mycobacterial NHEJ[J]. *PLoS One*, 2011, 79(2): 316-330.

[8] Cohen HY, Lavu S, Bitterman KJ, et al. Acetylation of the C terminus of Ku70 by CBP and PCAF controls Bax-mediated apoptosis[J]. *Mol Cell*, 2004, 13(5): 627-638.

[9] Huan E. French priority in the discovery of the antituberculous action of nicotinic compounds[J]. *Therapie*, 1952, 7(4): 371-376.

[10] De Simoni G, Spina G, Zorini AO. Possible therapeutic use of new preparations with antituberculous action (pyrazinamide and cycloserine); preliminary note[J]. *Minerva Med*, 1956, 47(80): 973-980.

[11] Brachmann CB, Sherman JM, Devine SE, et al. The Sir2 gene family, conserved from bacteria to humans, functions in silencing, cell cycle progression, and chromosome stability[J]. *Genes Dev*, 1995, 9(23): 2888-2902.

[12] Hou B, Liu X, Zheng F, et al. Molecular cloning, modeling and differential expression of a gene encoding a silent information regulator-like protein from *Sporothrix schenckii* [J]. *Int J Mol Med*, 2014, 33(6): 1415-1422.

(收稿日期:2015-04-11 修回日期:2015-05-15)