

· 论 著 ·

# 结核分枝杆菌 H37Rv 色氨酸合成酶 亚基编码基因的克隆、表达及酶学性质分析

赵静静 徐胜凤 王虹军 沈洪波 王洪海

**【摘要】** 目的 克隆表达色氨酸合成酶 亚基编码基因并对其进行功能分析。方法 以结核分枝杆菌(简称结核杆菌) H37Rv 基因组为模板, 扩增 *trpA* 基因, 构建 pET30a-*trpA* 重组质粒; 转化重组质粒到大肠埃希菌 DH5 并在 BL21( DE3) 诱导表达, 纯化可溶性的结核杆菌重组色氨酸合成酶 亚基(His-rMtTrpA)。十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和质谱分析测定相对分子质量(*M<sub>r</sub>*)后, 用圆二色光谱(CD)分析和同源建模方法检测二级和三级结构。研究不同浓度 His-rMtTrpA 对 亚基酶活反应的影响。结果 成功克隆了 813 bp 的目的基因 *trpA*, 并获得了高纯度的 His-rMtTrpA 蛋白。重组蛋白 *M<sub>r</sub>* 为  $33.151 \times 10^3$  (含载体蛋白)。25 时 His-rMtTrpA 的二级结构包括 31.8% 螺旋、31.8% 折叠、8.4% 转角和 27.9% 无规则卷曲, 它的三维模型显示为( / )<sub>8</sub>桶状结构。酶学性质研究表明, 在 His-rMtTrpA 与 MtTrpB 的摩尔比为 2.2 时, 色氨酸合成酶 亚基可以最大限度促进 亚基酶活反应。结论 成功得到高纯度的重组目的蛋白 His-rMtTrpA, 其功能分析为针对色氨酸合成酶的药物筛选设计提供理论基础。

**【关键词】** 结核分枝杆菌; 色氨酸合成酶; 亚基; 同源建模

## Cloning, expression and enzymatic analysis of the recombinant tryptophan synthase subunit from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

ZHAO Jing-jing, XU Sheng-feng, WANG Hong-jun, SHEN Hong-bo, WANG Hong-hai (State Key Laboratory of Genetic Engineering, Institute of Genetics, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China)

**【Abstract】 Objective** To clone and express the *Mycobacterium tuberculosis* tryptophan synthase subunit (MtTrpA) gene *trpA* and to study the role of MtTrpA. **Methods** The *trpA* gene was amplified by PCR from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv strain genomic DNA and cloned into a prokaryotic expression vector pET30a. The resulting recombinant expression plasmid pET30a - *trpA* was then transformed into the *E. coli* strain DH5 and a high-level expression *E. coli* BL21 (DE3) was established after induction with IPTG. SDS - PAGE and MALDI - TOF determined the relative molecular weight of this recombinant protein His - rMtTrpA. Its secondary and 3D structures were determined by circular dichroism and homologous modeling. The enzyme studies tested the functions of MtTrpA. **Results** The *Mycobacterium tuberculosis* *trpA* gene (813 bp) and highly purified recombinant His - rMtTrpA protein were obtained. The relative molecular weight of recombinant His - rMtTrpA protein was determined to be  $33.151 \times 10^3$  (vector included). Secondary structure of His - rMtTrpA had about 31.8% helix, 31.8% sheet, 8.4% turn, 27.9% random coil at 25 . Homologous modeling shows His - rMtTrpA as ( / )<sub>8</sub> - barrel protein. His - rMtTrpA can most effectively activate reaction when molecular ratio of MtTrpA and MtTrpB was 2.2. **Conclusion** This study obtained purified His - rMtTrpA; Functional analysis paved the way for further design of inhibitors against this enzyme.

**【Key words】** *Mycobacterium tuberculosis*; Tryptophan synthase; subunit; Homologous modeling

结核病是由结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) (简称结核杆菌) 感染引起的慢性传染病, 严重威胁人类的健康, 其发病率和病死率逐年增加<sup>[1,2]</sup>。近年来, 由于结核杆菌的多重耐药菌株的出现, 以及结核杆菌和人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 之间的协同作用, 结核病的情况日益严峻<sup>[3]</sup>, 迫切需要开发新型抗结核药

物来缩短治疗时间, 杀死耐药结核杆菌。

结核杆菌体内重要代谢途径中的关键酶是开发新型抗结核药物的重要靶标。色氨酸生物合成途径在哺乳动物体内不存在, 却是细菌生存所必需的, 因为细菌必须自行合成色氨酸。有研究表明结核杆菌的色氨酸营养缺陷型菌株不能在巨噬细胞内繁殖和存活<sup>[4,5]</sup>, 证明该代谢途径对结核杆菌的存活至关重要<sup>[6,7]</sup>。因此, 色氨酸生物合成途径中的关键酶成为开发新型抗结核药物的潜在靶点。

色氨酸合成酶 (tryptophan synthase, TSase) (据国际系统分类法, 该酶的编号为 EC 4.2.1.20) 催化色氨酸合成途径中的最后 2 步反应, 在色氨酸合成

作者单位: 复旦大学生命科学学院遗传学研究所遗传工程国家重点实验室, 上海 200433

通讯作者: 王洪海, E-mail: hhwang@fudan.edu.cn;

沈洪波, E-mail: hongboshen@fudan.edu.cn

过程中起重要作用,因此有必要探明该酶的作用机制。TSase 包含  $\alpha$  和  $\beta$  亚基,具有  $\alpha\beta$  亚基结构的异质四聚体,其中  $\alpha$ 、 $\beta$  亚基分别由 *trpA* 和 *trpB* 基因编码<sup>[8]</sup>。 $\alpha$  亚基可以独立催化  $\text{L-tryptophan}$  反应, $\beta$  亚基可以独立催化  $\text{L-tryptophan}$  反应,而  $\alpha$ 、 $\beta$  亚基的复合体可以催化  $\text{L-tryptophan}$  反应。同时有资料表明, $\alpha$ 、 $\beta$  亚基能够相互促进单个亚基的催化反应能力<sup>[9]</sup>。本实验室已对 TSase  $\alpha$  亚基的酶学性质进行了研究,现拟研究  $\alpha$  亚基的功能特性以及它与  $\beta$  亚基的相互作用。我们利用基因工程技术,以大肠埃希菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*) 为表达宿主菌,表达并纯化具有酶学活性的可溶性重组结核分枝杆菌色氨酸合成酶  $\alpha$  亚基(简称 His-rMtTrpA),并对其性质进行初步研究。

## 材料和方法

1. 材料 结核杆菌 H37Rv 菌株和大肠埃希菌株 BL21 (DE3)、DH5 以及 MtTrpB 蛋白均由本实验室保存;质粒 pET30a 和 Ni·NTA His·Bind 树脂及亲和层析柱购于 Novagen 公司,各种限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司,胶回收试剂盒、细菌基因组抽提试剂盒、聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 产物纯化试剂盒和质粒抽提试剂盒均购于上海华舜生物工程公司;引物合成与测序由上海生工生物技术有限公司完成;异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷 (isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside, IPTG)、咪唑和用于酶活性测定的试剂,包括 L-丝氨酸、吡啶、吡哆醛磷酸盐 (pyridoxal-5-phosphate, PLP) 等均购自 Sigma 公司;其他试剂均为国产分析纯。

## 2. 方法

(1) 结核杆菌的培养和基因组 DNA 的抽提: 将结核杆菌标准株 H37Rv 接种到含有 10% oleic acid-albumin-dextrose complex (OADC) (DIFCO, Becton-Dickinson) 和含有 0.5% 甘油的 Middlebrook 7H9 Broth (DIFCO, Becton-Dickinson) 中,在 37℃ 恒温摇床中培养至对数生长期,需要培养 2~3 周。结核杆菌基因组 DNA 的提取按华舜公司细菌基因组抽提试剂盒的实验步骤进行操作。

(2) *trpA* 基因的克隆: 根据结核杆菌 H37Rv 菌株 *trpA* 基因序列,使用软件 Oligo 设计引物,并在两端加上合适的限制性内切酶 *Hind*、*Xho* 的酶切位点和保护碱基。引物序列如下: 上游为 5'-AAAAAGCTTATGGTGGCGGTGGAACAGAGC-3'; 下游为

5'-AAACTCGAGTCATGCGGACATCCCTAGTCG-3'。PCR 条件: 95℃ 预变性 3 min; 95℃ 变性 1 min, 62℃ 退火 30 s, 68℃ 延伸 1.5 min, 进行 40 个扩增循环; 68℃ 延伸 10 min。

(3) *trpA* 基因重组质粒载体的构建: PCR 扩增产物经限制性内切酶消化及胶回收纯化后,与经同样限制性内切酶消化的表达载体 pET30a 连接,连接产物转化 DH5, 经电泳、酶切筛选和 DNA 测序鉴定,得到重组质粒 pET30a-*trpA*。抽提重组质粒,转化 BL21。DNA 序列鉴定提交上海生物工程技术服务有限公司,使用 ABI PRISM 3730 型自动测序仪完成。

(4) 结核杆菌色氨酸合成酶  $\alpha$  亚基 (*Mycobacterium tuberculosis* tryptophan synthase subunit, MtTrpA) 的诱导表达: 挑取已表达重组质粒 pET30a-*trpA* 的 BL21 单菌落,将其接种于含 50  $\mu\text{g/ml}$  卡那霉素的液体 LB 培养基中培养 (37℃, 220 r/min) 过夜。次日按 5% (V/V) 接种量转接到新鲜 LB 培养基中培养 (37℃, 220 r/min) 至  $A_{600}$  吸光值为 0.6~0.8 时加入 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L,低温诱导培养 (18℃, 220 r/min) 16 h。离心收集菌体 (6 000 r/min, 4℃, 10 min), 保存于 -80℃ 备用。

(5) His-rMtTrpA 的纯化: 使用 Ni·NTA His·Bind 树脂,参照操作手册进行重组蛋白的纯化。操作步骤: 50 ml 培养基离心收集的菌体经 5 ml 结合缓冲液 (50 mmol/L Tris, 10 mmol/L 咪唑, pH 8.0) 重悬浮,超声波破碎,高速离心 (14 000 r/min, 60 min), 收集上清液,上柱。分别用含 10、50、70 mmol/L 咪唑的洗涤缓冲液梯度洗脱非特异性吸附的杂蛋白,再以含 300 mmol/L 咪唑的洗脱缓冲液将目的蛋白洗脱下来;对纯化得到的 His-rMtTrpA 进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE), 经考马斯亮蓝染色鉴定。纯化产物透析除盐浓缩,然后采用 Bradford 法测定蛋白浓度。

(6) 高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 分析和质谱测定: 取 25  $\mu\text{g}$  重组蛋白进行 HPLC 分析,条件如下: 反相色谱柱 Zorbax300SB-CN C-18 柱 (Agilent), 流动相 A (0.1% TFA), 流动相 B (0.085% TFA/CAN), pH 6.5, 流速为 1 ml/min, 用 UNICORN v3.20 软件检测,根据色谱峰分析图,收集峰对应的组分。MALDI-TOF 测定重组蛋白的相对分子质量 (*M<sub>r</sub>*), 仪器为 Voyager-DE-PRO (Applied Biosystem, USA)。

基质是 sinapinic acid。参数设置如下: grid, 95%; delayed time, 1 100 ns; low mass gate,  $1 \times 10^3$ , 25 kV。

(7) His-rMtTrpA 的二级结构研究: 用 JASCO J-715 分光偏振计 (NESLAB RTE-111, NESLAB, Toyko, Japan) 测定重组蛋白的二级结构, 波长从 190 nm 到 250 nm, 蛋白样品浓度为 0.18 mmol/ml, 溶于 5 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液, pH 7.5, 温度 25 。所得结果为经过系统平滑计算和空白校正的 5 次扫描结果的平均值。二级结构参数由计算机程序 PROSEC 计算<sup>[10]</sup>。

(8) His-rMtTrpA 的三维结构同源模建: 重组蛋白的三维同源模建由软件 Modeller8.0<sup>[11]</sup> 完成。

(9) His-rMtTrpA 对 MtTrpB 酶活反应影响: MtTrpB 酶活性通过 Kirschner 等<sup>[12]</sup> 的方法测定, 200  $\mu$ l 体系中含 0.1 mmol/L Tris-HCl (pH7.8)、0.15 mmol/L NaCl、0.2 mmol/L indole、0.04 mol/L L-丝氨酸、0.05 mmol/L PLP、MtTrpB 和不等量的 His-rMtTrpA。JASCOPSC-985 维持反应体系在 37 , JASCO U-550 UV/VIS 紫外分光光度计记录 290 nm 下 PLP 的特异吸收。保持 MtTrpB 2  $\mu$ l 量不变, 测不同浓度 His-rMtTrpA 对 MtTrpB 酶活反应的影响。

## 结 果

1. trpA 基因表达重组质粒的构建与鉴定 以 H37Rv 菌株的基因组 DNA 为模板, PCR 扩增 trpA 基因片段, 产物经琼脂糖凝胶电泳分析, 呈现约 800 bp 大小的特异性扩增条带 (图 1)。扩增产物连接到 pET30a 质粒中, 并转入 DH5 感受态细胞, 筛选阳性克隆并酶切鉴定, 得到约 800 bp 的片段 (图 2), 与目的片段的理论值 813 bp 相符。上海生工测序结果与结核杆菌基因组数据库一致。将鉴定后的阳性重组子转化 BL21 菌株。

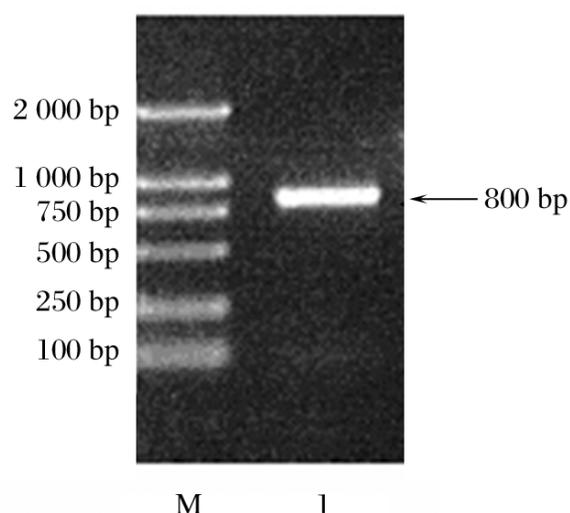


图 1 trpA 基因的 PCR 扩增产物  
Fig 1. trp gene amplified by PCR  
M: DL2 000; lane 1: products of trpA

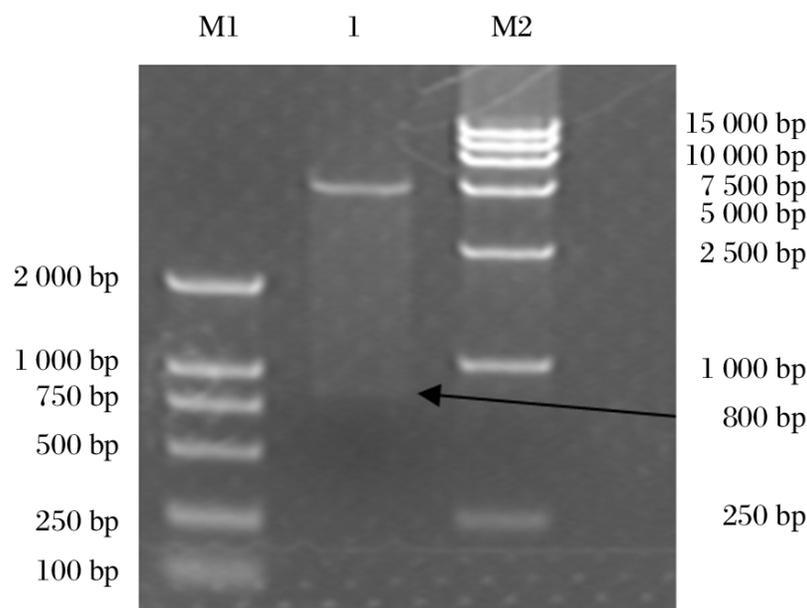


图 2 pET30a-trpA 的酶切鉴定  
Fig 2. Restriction enzyme analysis of pET30a-trpA  
M1: DL2 000; M2 : DL15 000;  
Lane 1: pET30a-trpA digested by restriction enzyme (red)

2. pET30a-trpA 在 BL21 中的表达 含重组质粒的 BL21 在终浓度 1 mmol/L IPTG, 20 , 诱导 12 h 后, 离心收集菌体, SDS-PAGE 分析发现明显的目的蛋白表达条带。菌体超声破壁后, 大部分重组蛋白以包涵体的形式存在, 但上清液中仍有明显的可溶性目的蛋白条带存在。为提高有活性的目的条带蛋白的表达量, 经表达条件 (IPTG 浓度、诱导温度、诱导时间) 优化后, 确定最合适的表达条件为: 0.5 mmol/L IPTG, 20 , 诱导 12 h (图 2)。

3. His-rMtTrpA 蛋白的亲和纯化 依据 His-Bind 方法纯化可溶性 His-rMtTrpA 蛋白, SDS-PAGE 电泳检测发现 1 条  $M_r$  约  $33 \times 10^3$  的特异性蛋白条带 (图 3)。随后, 我们检测了蛋白的纯度和大小。

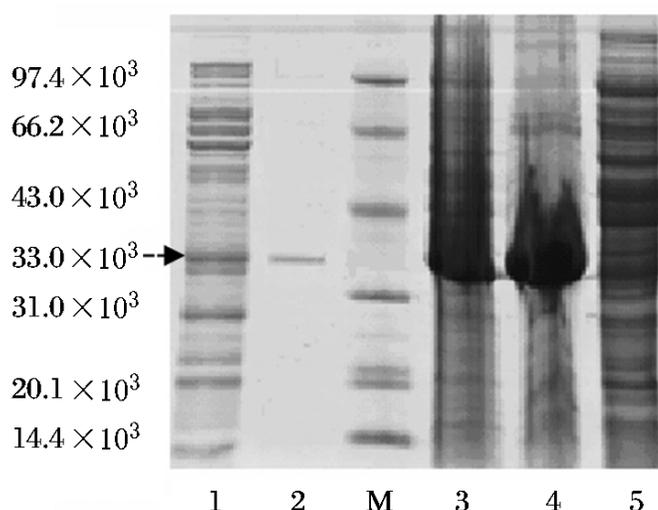


图 3 His-rMtTrpA 的 SDS-PAGE  
Fig 3. SDS-PAGE of His-rMtTrpA  
Lane 1: products after washing of 10 mmol imidazole; Lane 2 : purified His-rMtTrpA; M: protein marker; Lane 3: whole bacteria; lane 4 : bacterial precipitate; Lane 5: bacterial supernatant

4. HPLC 和质谱鉴定 HPLC 分析结果表明纯化得到的 His-rMtTrpA 纯度 > 95%，纯度较高。图 4 显示质谱测定重组蛋白  $M_r$  为  $33.151 \times 10^3$  (含载体蛋白  $M_r$  约  $5.500 \times 10^3$ )，所以实测目的蛋白  $M_r$  为  $27.651 \times 10^3$ ，与理论  $M_r$   $27.7276 \times 10^3$  接近。这表明我们成功表达并纯化了目的蛋白。

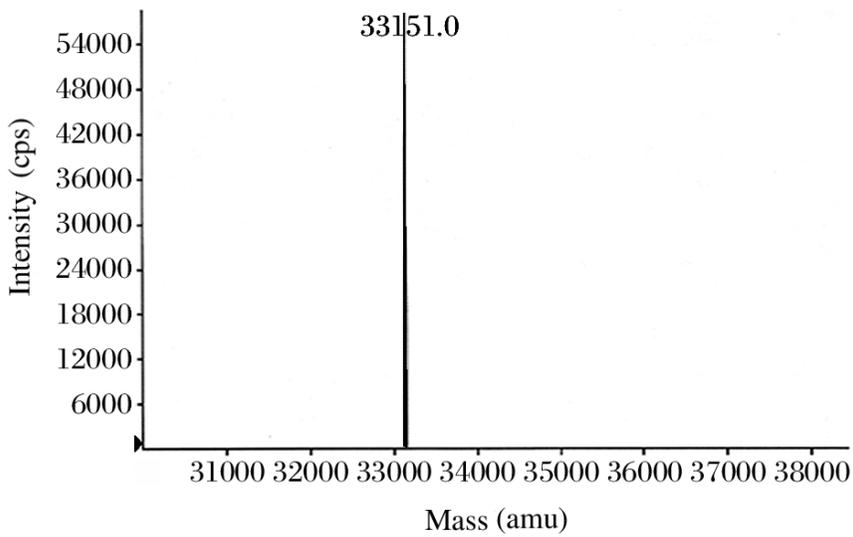


图 4 His-rMtTrpA 纯化后的 MALDI-TOF 分析结果  
Fig 4. MALDI-TOF results of purified His-rMtTrpA

5. His-rMtTrpA 的二级结构测定分析 纯化蛋白的圆二色光谱 (circular dichroism, CD) 分析发现，在 193 nm 附近有 1 个最大椭圆率，在 208 nm 和 217 nm 附近有 2 个最小椭圆率 (图 5)。结果表明 25 时 His-rMtTrpA 的二级结构为 31.8% 螺旋、31.8% 折叠、8.4% 转角、27.9% 无规则卷曲，说明 His-rMtTrpA 呈现 / 结构。另外，在 25 (常温)、37 (最适)、50 和 70 不同温度梯度下测定蛋白二级结构，发现随温度升高 螺旋和 转角所占比例逐步增加， 折叠所占比例逐步降低，而无规则卷曲所占比例基本保持不变 (图 6)。

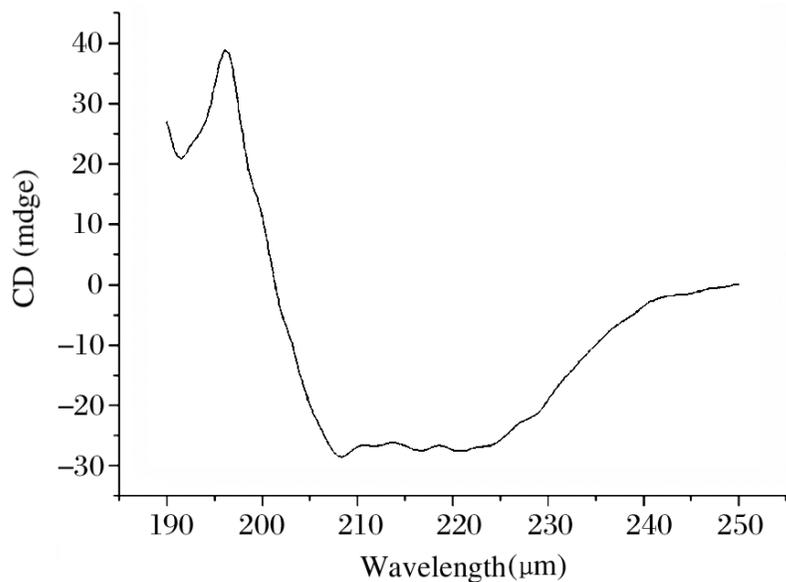


图 5 His-rMtTrpA 的圆二色仪图谱  
Fig 5. CD result of His-rMtTrpA

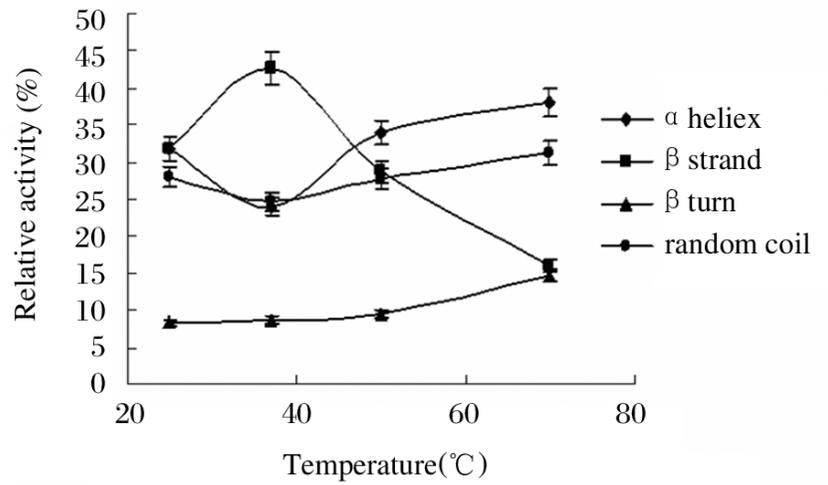


图 6 温度对 His-rMtTrpA 二级结构的影响  
Fig 6. Effect of temperature on the secondary structure of His-rMtTrpA

6. His-rMtTrpA 的三维模建 以 *Thermus thermophilus* TrpA (1.34, PDB 号为 1ujp) 为模板模拟 His-rMtTrpA 三维模型，两者一级序列同源性的 44.83%，模型较可靠。如图 7 所示，His-rMtTrpA 蛋白是 ( / ) 桶状结构，和已测得的理论二级结构数据相符。



图 7 His-rMtTrpA 的三维结构模型  
Fig 7. 3D structure of His-rMtTrpA

7. His-rMtTrpA 对 亚基催化反应的影响 Bradford 法测定纯化后的 His-rMtTrpA 酶蛋白浓度为  $9.095 \mu\text{g/ml}$ 。在  $200 \mu\text{l}$  反应体系中，保持 MtTrpB 量不变 ( $3.223 \times 10^{-1} \mu\text{g/ml}$ )，在加入 MtTrpB 启动反应前分别加入 His-rMtTrpA  $0, 9.095 \times 10^{-2}, 1.819 \times 10^{-1}, 3.638 \times 10^{-1}, 4.5475 \times 10^{-1}, 6.82125 \times 10^{-1}, 9.095 \times 10^{-1}, 1.13685 \mu\text{g/ml}$ ，测不同浓度 His-rMtTrpA 对 MtTrpB 酶活性的影响。结果显示 MtTrpA 对 MtTrpB 酶活反应有较大影响。随 His-rMtTrpA 量增多，MtTrpB 酶活性逐渐上升，当 His-rMtTrpA/MtTrpB 的浓度比达到 1.411，即摩尔比

为 2.2 时, 酶活性最大, 随后 MtTrpB 酶活性又随 His-rMtTrpA 的增加而逐渐下降(图 8)。

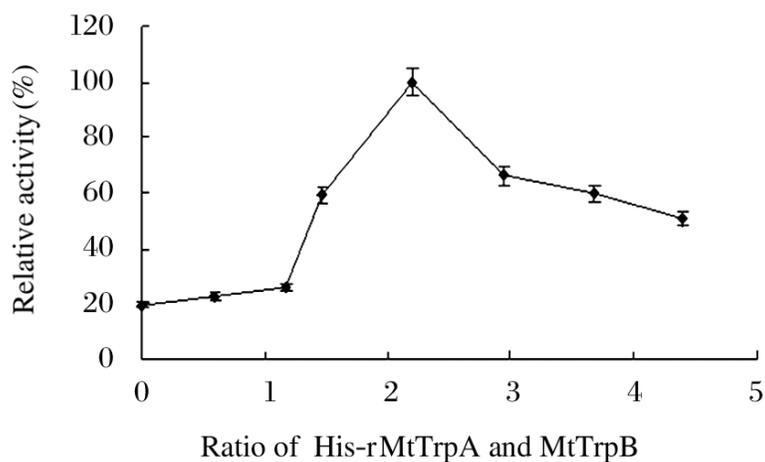


图 8 His-rMtTrpA 对 MtTrpB 酶反应活性的影响

Fig 8. Influence of His-rMtTrpA on reaction

## 讨 论

实验过程中, 我们以 pET30a 质粒为载体构建了 MtTrpA 重组质粒, 在大肠埃希菌中高效表达。同时对诱导条件进行优化时发现, 长时间低浓度 IPTG 诱导可得到高表达的可溶性重组蛋白。纯化结果显示纯度高, 表明文中 Ni · NTA His · Bind 树脂亲和纯化是一种方便、有效的纯化方法。

通过 CD 和同源模建的方法, 我们分析了 His-rMtTrpA 蛋白的结构。CD 结果显示 His-rMtTrpA 呈现 / 结构。同源模建获得的模型证明了这点, 而且表明 MtTrpA 蛋白为( / )。桶状结构。

酶活性分析结果表明, His-rMtTrpA 可明显促进 MtTrpB 酶促反应。而且在 His-rMtTrpA/MtTrpB 的摩尔比为 2.2 时, MtTrpB 酶活性最高。在其他微生物中研究<sup>[9]</sup>发现, MtTrpB 构成二聚体。按理论来说, 亚基的摩尔比应该为 1 1, 但实际反应中存在一个动态反应平衡的过程, 亚基的过量也许更加有助于促进亚基与亚基间的结合, 有利于亚基的反应。具体机制有待于进一步探究。

TSase 催化吲哚-3-甘油磷酸脱掉甘油醛-3-磷酸形成吲哚, 同时还能催化吲哚与丝氨酸结合, 脱水形成色氨酸。该酶的 2 个亚基各存在 1 个活性中心, 吲哚在亚基的活性中心形成以后, 直接通过亚基间的通道进入亚基活性中心进行反应<sup>[13]</sup>。因此, TSase 是研究小分子配体如吲哚分子在蛋白质分子内的转移运输通道、分子运输过程中的能量传递途径以及研究两个活性中心之间的协同作用和活性中心间的信号传递途径等蛋白质亚基间相互作用的典型模型。

在未来的研究工作中, 我们还可以通过生物信

息学方法与突变实验结合, 找出 MtTrpA 与 MtTrpB 间的反应通道, 深入探索蛋白质相互作用机制, 为针对酶活性中心特点的药物筛选设计以及蛋白质的结构设计提供理论基础。

## 参 考 文 献

1. Eatkenheuer G, Taelman H, Lepage P, et al. The return of tuberculosis. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 1999, 34: 139 ~ 146
2. <http://www.tb123.org>
3. DeAngelis CD, Flanagan A. Tuberculosis—a global problem requiring a global solution. *JAMA*, 2005, 293: 2793 ~2794
4. Bange FC, Brown AM, Jacobs WR. Leucine auxotrophy restricts growth of *Mycobacterium bovis* BCG in macrophages. *Infect Immun*, 1996, 64: 1794 ~1799
5. Gordhan BG, Smith DA, Alderton H, et al. Construction and phenotypic characterization of an auxotrophic mutant of *Mycobacterium tuberculosis* defective in L-arginine biosynthesis. *Infect Immun*, 2002, 70: 3080 ~3084
6. Parish T, Stoker NG. The common aromatic amino acid biosynthesis pathway is essential in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology*, 2002, 148: 3069 ~3077
7. Sasseti CM, Boyd DH, Rubin EJ. Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. *Mol Microbiol*, 2003, 48: 77 ~84
8. 张绪梅, 郭长江, 刘云, 等. 大肠杆菌 tpBA 基因的克隆表达. *生物技术通讯*, 2006, 17: 12 ~14
9. Miles EW. Tryptophan synthase: a multienzyme, complex with an intramolecular tunnel. *Chem Rec*, 2001, 1: 140 ~ 151
10. Xu SF, Yang YP, Wang HH, et al. Purification and characterization of a functionally active *Mycobacterium tuberculosis* prephenate dehydrogenase. *Protein Express Purif*, 2006, 49: 151 ~158
11. Marti-Renom MA, Stuart A, Fiser A, et al. Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 2000, 29: 291 ~325
12. Kirschner K, Wiskocil RL, Foehn M, et al. The tryptophan synthase from *E. coli*. An improved purification procedure for the subunit and binding studies with substrate analogue. *Eur J Biochem*, 1975, 60: 513 ~523
13. Banik U, Ahmed SA, McPhie P, et al. Subunit assembly in the tryptophan synthase alpha2/beta2 complex, stabilization by pyridoxal phosphate aldimine intermediates. *J Biol Chem*, 1995, 270: 7944 ~7949

(收稿日期: 2008-06-24)