

## 四种分子伴侣促进牛支原体膜蛋白在大肠杆菌中可溶性表达研究

王艳芳<sup>1,2</sup> 周雅坪<sup>1</sup> 张新竹<sup>1</sup> 李松建<sup>1</sup> 麻昌姣<sup>1</sup> 黄海碧<sup>1</sup> 郝永清<sup>1,3\*</sup>

(1. 内蒙古农业大学 兽医学院, 呼和浩特 010018;

2. 包头医学院 基础医学与法医学院, 内蒙古 包头 014060;

3. 内蒙古农业大学 农业部动物疾病临床诊疗技术重点实验室, 呼和浩特 010018)

**摘要** 为研究分子伴侣是否可以促进牛支原体膜蛋白在大肠杆菌中以可溶性形式表达及表达的蛋白是否具有活性,应用原核表达和 Western blot 方法进行检测,结果表明:1)牛支原体一个膜蛋白 M1 的截短片在大肠杆菌表达系统中以包涵体形式表达,改变诱导时间、温度以及诱导剂浓度均未改变其表达形式;2)将 4 种分子伴侣 pG-KJE8、pGro7、pG-Tf2 和 pTf16 分别与含有目的蛋白的重组质粒在表达工程菌(BL21)中共表达,当加入终浓度为 1.0 mmol/L IPTG 以及 0.5 mg/mL L-阿拉伯糖或 5.0 ng/mL 四环素的诱导剂,37 °C 诱导 5 h,发现分子伴侣 pG-Tf2 和 pG-KJE8 能显著提高 M1 截短片的可溶性表达,其他 2 种分子伴侣未改变 M1 的表达形式;3)可溶性表达的 M1 截短片与牛支原体阳性血清可以发生特异性反应。因此,研究发现 2 种分子伴侣可以使牛支原体膜蛋白在大肠杆菌表达系统中以可溶性形式表达,但未改变其生物活性,该研究结果可为建立牛支原体有效的血清学诊断方法及亚单位疫苗的研制奠定基础。

**关键词** 分子伴侣; 牛支原体; 膜蛋白; 可溶性表达; 原核表达系统

**中图分类号** Q78 **文章编号** 1007-4333(2018)12-0075-09 **文献标志码** A

## Soluble expression promotion of *Mycoplasma bovine* membrane protein by four types molecular chaperones in *Escherichia coli*

WANG Yanfang<sup>1,2</sup>, ZHOU Yaping<sup>1</sup>, ZHANG Xinzhu<sup>1</sup>, LI Songjian<sup>1</sup>,  
MA Changjiao<sup>1</sup>, HUANG Haibi<sup>1</sup>, HAO Yongqing<sup>1,3\*</sup>

(1. College of Veterinary Science, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China;

2. College of Preclinical and Forensic Medicine, Baotou Medical College, Baotou 014040, China;

3. Key Laboratory of Animal Genetics and Genomics of Ministry of Agriculture, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China)

**Abstract** To study whether molecular chaperones could promote the expression of *Mycoplasma bovis* membrane protein in soluble form in *Escherichia coli* and the expressed protein was active or not, prokaryotic expression and Western blot methods were adopted in this study. The results showed that: 1) The truncated membrane fragment of M1 from *M. bovis* was expressed in inclusion body in *E. coli* expression system. Its expression form remained unchanged by changing induction time, temperature or induction agent doses; 2) Four types of molecular chaperone, pG-KJE8, pGro7, pG-Tf2 and pTf16, were respectively combined with recombinant plasmid and expressed in BL21 with the final concentrations of 1.0 mmol/L IPTG and 0.5 mg/mL L-Arabia sugar or 5.0 ng/mL tetracycline inducer, After 5 h induction at 37 °C, it was found that molecular chaperones pG-Tf2 and pG-KJE8 significantly increased the soluble expression of truncated M1 fragment, and the other 2 chaperones didn't change the expression of M1; 3) The truncated M1 fragment had specific reaction with the positive serum of *Mycoplasma*. In conclusion, the four types of molecular chaperones promoted the soluble membrane protein of *M. bovis* expressed in *E. coli* expression system, and didn't

收稿日期: 2018-02-05

基金项目: 2017 年内蒙古农业大学动植物新品种选育(培育)专项(YZGC2017027); 国家科技支撑计划(2012BAD13B00)

第一作者: 王艳芳, 博士研究生, E-mail: wyf-nmgnd@163.com

通讯作者: 郝永清, 教授, 主要从事微生物与免疫学研究, E-mail: haoyq1960@163.com

change its bioactivity. This result laid foundation for establishing effective serological diagnosis method and producing the subunit vaccine of *M. bovis*.

**Keywords** molecular chaperone; *Mycoplasma bovis*; membrane protein; soluble expression; prokaryotic expression system

牛支原体(*Mycoplasma bovis*)可以引起牛关节炎、肺炎、流产等多种疾病<sup>[1-2]</sup>。该病原首次从美国牛乳腺炎组织中分离到<sup>[3]</sup>。牛支原体相关疾病给世界养牛业带来了巨大的经济损失,严重阻碍养牛业发展<sup>[4]</sup>。欧美地区每年由支原体引起的相关疾病导致的直接经济损失达1.6亿欧元;英国每年平均有15.7万头牛因各种肺炎死亡,由支原体造成的经济损失为3亿英镑左右<sup>[5]</sup>。据调查,美国支原体牛感染率高达70%,引起的经济损失达1.08亿美元<sup>[6-7]</sup>。我国于2008年首次从病牛呼吸道中分离得到牛支原体<sup>[8]</sup>。至此,我国多个地方发现牛支原体病例,牛支原体已经对我国养牛业造成严重威胁,经济损失逐年增长<sup>[9]</sup>。对牛支原体膜蛋白的深入研究,可为建立牛支原体有效的血清学诊断方法和亚单位疫苗的研制提供理论依据。

因为生产成本低、操作简单和生产率高,原核表达系统一直是表达外源蛋白的首选方案。然而,许多研究表明外源蛋白尤其膜蛋白在大肠杆菌中的表达仅有少数以可溶性形式表达,大部分以包涵体形式表达。通过优化表达条件,改变诱导剂的加入量、调整诱导温度以及时间,虽然可以提高表达量,但很难改变其表达形式<sup>[10]</sup>。如何能使牛支原体膜蛋白以可溶性表达是目前研究热点。分子伴侣可以促进外源蛋白在原核表达系统中以可溶性表达,有效减少包涵体的形成,并不影响蛋白的活性<sup>[11-12]</sup>。本研究拟以牛支原体的一个膜蛋白截短片段为研究对象,构建原核表达载体 pET32a-M1,将截短型牛支原体 M1 蛋白分别与 4 种分子伴侣在大肠杆菌中共表达,从而使 M1 蛋白以可溶性形式表达,为研制牛支原体亚单位疫苗和建立牛支原体有效的血清学诊断方法奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种及载体

*M. bovis* 分离株为内蒙古农业大学预防兽医学重点实验室分离、保存;表达载体 pET-32a(+),为内蒙古农业大学预防兽医学重点实验室保存;大肠杆菌(*Escherichia coli*)感受态细胞 Trans T1 和

BL21(DE3)购自北京全式金生物技术有限公司(Transgen,北京);Chaperone Plasmid Set 购自宝生物工程(大连)有限公司(Takara,大连)。

### 1.2 试剂

PrimeSTAR HS DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶购自宝生物(大连)工程有限公司(Takara,大连);限制性核酸内切酶购自 Thermo 公司(美国);DNA Marker 购自北京天根生化科技有限公司(北京);DNA 纯化回收试剂盒、质粒小提试剂盒购自 Axygen 公司(美国);预染蛋白分子量标准购自北京全式金生物技术有限公司(Transgen,北京);Ni-NAT His Bind 购自生工生物工程(上海)股份有限公司;6×Loading buffer 购自碧云天生物技术有限公司(北京);酵母提取物和胰蛋白胨购自 OXOID 公司(英国);马血清购自草原绿野有限公司(呼和浩特);其他试剂均为国产分析纯级产品。

### 1.3 *M. bovis* 基因组的提取

*M. bovis* 分离株接种至支原体 PPLO 液体培养基中,37 °C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 32 h。取 3 mL 菌液,12 000 r/min 低温离心 20 min,无菌 PBS 洗涤 3 次,按照支原体基因组提取试剂盒说明书提取基因组,-80 °C 保存。

### 1.4 膜蛋白基因的分析、扩增及优化

以 Uniprot 数据库中 *M. bovis* PG45 株膜蛋白(E4PZT2)序列为参照,获取基因序列开放阅读框。利用生物信息学预测蛋白的抗原决定区以及功能结构区。应用软件对序列进行分析,在该序列中有 4 个色氨酸密码子 TGA(终止密码子),通过 Overlap PCR 扩增膜蛋白的截短序列,同时将序列中 1 个 TGA 突变为同义密码子 TGG,并在上下游引物中分别加入 *Bam*HI 和 *Sac*I 酶切位点,表 1 为引物序列。PCR 反应体系均为:模板 DNA 2.0 μL、10.0 μmol/L 上下游引物各 1.0 μL、dNTP Mixture 1.0 μL、Prime STAR HS DNA Polymerase 0.5 μL、5×Prime STAR Buffer (Mg<sup>2+</sup> plus) 10.0 μL、灭菌双蒸水 31.5 μL。PCR 反应条件均为:94 °C 预变性 5 min;94 °C 1 min,55 °C 45 s,72 °C 60 s 为 1 个循环,进行 32 个循环;72 °C 延伸 10 min;最后 4 °C 保温。

表 1 M1 基因 Overlap PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences of M1 gene for overlap PCR amplification

引物名称 Primer name	序列(5'-3') Sequence(5'-3')	产物大小/bp Amplicon size
F	CGGGATCCAACAACAGAGATCTAACCGATCACT	253
R1	TATTTATTGCAAGCCACTCTTCATT	
F1	TTGAATATAGAAATGAAGAGTGGCT	398
R	CCGAGCTCCGATTTATCTCTACGGCTGTTTTTA	

注：下划线为限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Sac* I 序列；斜体为突变位点。

Note: Sequences underlined represent restriction enzyme sites of *Bam*H I and *Sac* I, respectively; *Italic* letter represents mutated site.

### 1.5 构建原核表达载体 pET32a-M1

将 pET-32a(+)质粒与优化扩增的 M1 基因片段分别用 *Bam*H I 和 *Sac* I 进行双酶切,片段酶切总体积为 30  $\mu$ L: M1 基因片段 3  $\mu$ L, 10 $\times$ buffer 3  $\mu$ L, *Bam*H I 1  $\mu$ L, *Sac* I 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 22  $\mu$ L。载体双酶切体系为 30  $\mu$ L:载体质粒 25  $\mu$ L, 10 $\times$ buffer 3  $\mu$ L, *Bam*H I 1  $\mu$ L, *Sac* I 1  $\mu$ L。37  $^{\circ}$ C 水浴双酶切 1 h,酶切产物用 DNA 胶回收试剂盒进行回收, 16  $^{\circ}$ C 过夜连接后转化 Trans T1 感受态,将 PCR 和双酶切鉴定为阳性的质粒送上海生工生物工程股份有限公司进行序列分析,将测序正确的质粒命名为 pET32a-M1。

### 1.6 原核表达 pET32a-M1 及确定表达形式

重组质粒 pET32a-M1 分别转化大肠杆菌表达菌 BL21(DE3),挑取单个菌落进行 PCR 鉴定,并扩培于 5 mL LB(含 100  $\mu$ g/mL Amp)液体培养基过夜培养后,按照 1:100 体积比接种于 50 mL LB(含 100  $\mu$ g/mL Amp)液体培养基,37  $^{\circ}$ C 培养至 OD<sub>600</sub> 为 0.7 左右时加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG,继续 37  $^{\circ}$ C 振荡培养,诱导 5 h,5 000 r/min 离心 20 min 收集菌体,无菌 PBS 洗涤 2 次,6ml PBS 回溶,超声破碎 15 min(65%,工作时间 5 s,间歇 5 s),12 000 r/min 低温离心 10 min,沉淀用与上清等体积的生理盐水回溶,加入 6 $\times$ Loading buffer 煮 10 min,取 15  $\mu$ L 上清和沉淀进行 SDS-PAGE。

### 1.7 4 种分子伴侣共表达菌株的构建

将伴侣蛋白质粒 pG-KJE8、pGro7、pG-Tf2 和 pTf16(图谱见图 1)分别转化 BL21 感受态后,再制备成感受态细胞。将 pET32a-M1 阳性质粒 1  $\mu$ L 与 100  $\mu$ L 制备好的含分子伴侣的感受态细胞轻轻混匀,冰上放置 30 min,42  $^{\circ}$ C 热激 90 s,冰上放置 2 min,

再加入 LB 培养液 500  $\mu$ L, 37  $^{\circ}$ C 振荡培养 1 h,取 100  $\mu$ L 菌液涂布于含有 Amp 和 Cm 的双抗固体培养基,37  $^{\circ}$ C 过夜培养,每个平板挑选 2 个单菌落进行 PCR 鉴定并在含有 Amp 和 Cm 的双抗液体培养基中扩大培养,37  $^{\circ}$ C、180 r/min 振荡培养 12 h,保存菌种。

### 1.8 目的蛋白与伴侣分子共表达及优化表达条件

将不含有分子伴侣和含有分子伴侣的菌按 1:500 体积比接种于抗性 LB 培养液中,37  $^{\circ}$ C 过夜振荡培养,将活化后的菌液按体积比 1:100 比例接种于含有相应抗性的 35 mL LB 培养液中,37  $^{\circ}$ C 继续培养 3 h,当 OD<sub>600</sub> 接近 0.7 时,根据不同分子伴侣加入不同的诱导剂和 IPTG,进行分子伴侣和牛支原体 M1 蛋白诱导表达。在含有伴侣蛋白质粒 pG-KJE8 和 pET32-M1 的菌液中加入终浓度为 0.5 mg/mL L-阿拉伯糖,终浓度为 5.0 ng/mL 四环素,终浓度为 1.0 mmol/L IPTG 的诱导剂;在含有伴侣蛋白质粒 pGro7、pTf16 和 pET32a-M1 的菌液中加入终浓度为 0.5 mg/mL L-阿拉伯糖和终浓度为 1.0 mmol/L IPTG 的诱导剂;在含有伴侣蛋白质粒 pG-Tf2 和 pET32-M1 的菌液中加入终浓度为 5 ng/mL 四环素和终浓度为 1 mmol/L IPTG 的诱导剂(各质粒编码的伴侣蛋白质种类及诱导物见表 2);37  $^{\circ}$ C、180 r/min 振荡培养 5 h;不含分子伴侣的重组表达菌只加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 诱导表达;将诱导后的菌液,5 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, PBS 洗涤 2 次,5 mL PBS 回溶,超声波破碎 10 min(65%,工作 5 s,间歇 5 s),4  $^{\circ}$ C,12 000 r/min 离心 10 min 后,沉淀用与上清等体积的生理盐水回溶,加入 6 $\times$ Loading buffer 煮 10 min,取 15  $\mu$ L 上清和沉淀进行 SDS-PAGE。

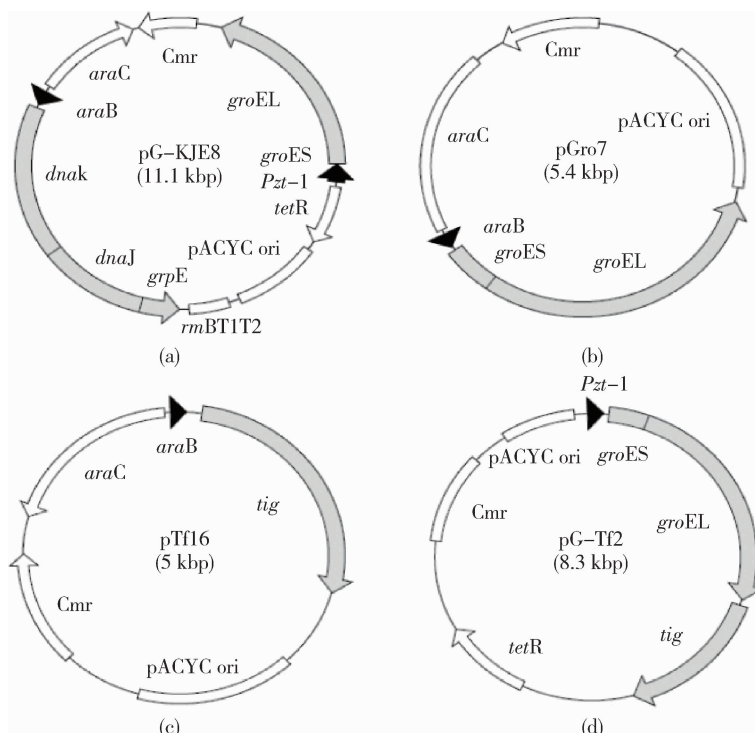


图1 四种分子伴侣蛋白质质粒图谱

Fig. 1 Plasmid profiles of four molecular chaperone proteins

表2 各质粒编码的伴侣蛋白质种类及诱导物

Table 2 Plasmid encoded chaperone proteins and inducer

质粒 Plasmid	伴侣蛋白质 Chaperone proteins	启动子 Promotor	诱导物 Inducer	抗性标记 Resistance marker
pG-KJE8	dnaK-dnaJ-grpE groES-groEL	araB Pzt-1	L-Arabinose Tetracyclin	Cm
pGro7	groES-groEL	araB	L-Arabinose	Cm
pKJE7	dnaK-dnaJ-grpE	araB	L-Arabinose	Cm
pG-Tf2	groES-groEL-tig	Pzt-1	Tetracyclin	Cm
pTf16	tig	araB	L-Arabinose	Cm

### 1.9 目的蛋白的纯化与鉴定

收集诱导表达的重组菌, PBS 洗涤后, 超声破碎后, 12 000 r/min 离心 15 min, 收集上清, 经镍柱亲和纯化, 收集洗脱液, 进行 SDS-PAGE 分析, 上样量为 15  $\mu$ L。

### 1.10 目的蛋白生物活性检测

将纯化的目的蛋白经 10% SDS-PAGE, 用湿转法至 PVDF 膜, 条件为 100 V, 40 min。转印后的 PVDF 膜用 5% 脱脂乳 37  $^{\circ}$ C 摇床封闭 6 h, 含 0.5% Tween-20 的 Tris-HCl 缓冲液 (Tris (hydroxymethyl)

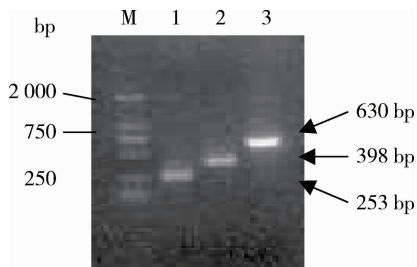
aminomethane, TBST) 振荡洗涤 3 次, 每次 10 min, 加入 1 : 50 倍稀释的牛支原体兔源阳性血清, 4  $^{\circ}$ C 过夜孵育, TBST 振荡洗涤 3 次, 每次 10 min, 加入辣根过氧化物酶 (Horse radish peroxidase, HRP) 标记的羊抗兔 IgG (1 : 3 000), 37  $^{\circ}$ C 孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次后, DAB 显色试剂盒显色。

## 2 结果与分析

### 2.1 M1 基因截短片段的扩增及优化

参照 Uniprot 数据库中 *M. bovis* PG45 株中膜

蛋白(E4PZT2)的序列,获得完整的基因序列开放阅读框,为 1 248 bp,编码 416 个氨基酸。利用 primer 5.0 分析发现有 4 个终止密码子,分别位于第 82、107、208 和 351 个氨基酸。利用 DNAMAN 对 M1 蛋白进行抗原性预测在第 130~337 氨基酸这段蛋白序列中,亲水性区域较多,抗原指数较高,为表面抗原的可能性较大,故扩增 DNA 序列中 388~1 011 bp 的序列,其中 625~627 bp 需要进行突变,将 TGA 突变为 TGG。通过 Overlap PCR 扩增获得牛支原体 M1 基因序列,其大小为 630 bp,与预期大小相一致(图 2)。PCR 扩增产物送上海生工生物公司测序,测序结果通过 NCBI Blast,结果显示与牛支原体标准株 PG45 的同源率为 99%,与 NM2012 株,HB0801 株,CQ-W70 株,Hubei-1 株的同源率为 98%。



M, DNA marker DL2000; 1, 引物 F、R1 的扩增产物; 2, 引物 F1、R 的扩增产物; 3, F、R 的扩增产物。

M, DNA marker DL2000; 1, PCR product amplified with primers F/R1; 2, PCR product amplified with primers F1/R; 3, PCR product amplified with primers F/R.

图 2 牛支原体 M1 基因的 overlap PCR 扩增产物

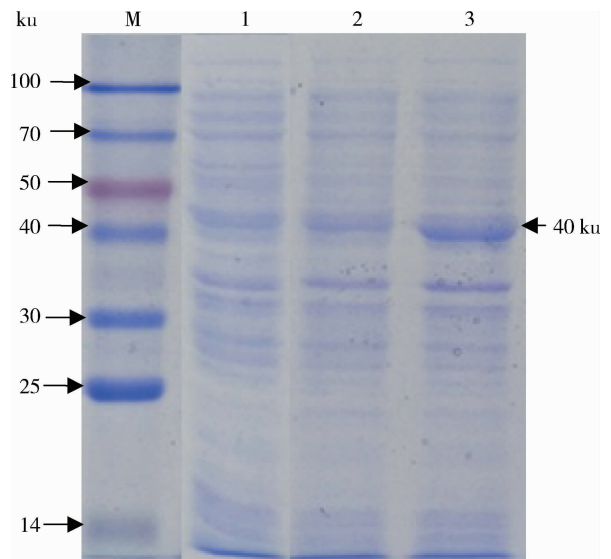
Fig. 2 Overlap PCR amplification of *Mycoplasma bovis* M1 gene

## 2.2 原核表达载体 pET32a-M1 的构建与表达

pET32a-M1 重组质粒送上海生工测序,测序结果 blast 比对,与 *M. bovis* PG45 株、HB0801 株、NM2012 株、Hubei-1 株和 CQ-W70 株的同源性达 99%,1 处 TGA 成功突变为 TGG。重组质粒进行 *Bam* H I 和 *Sac* I 双酶切鉴定,与预期结果一致,表达载体 pET32a-M1 构建成功。

将鉴定后的 pET32a-M1 重组阳性质粒,转化 BL21 菌,涂板挑单菌落,经 PCR 鉴定正确后,将菌接种于 AMP<sup>+</sup> 抗性的 LB 培养基中,37 °C 振荡培养过夜,将培养好的菌液以 1:100 体积比扩培于 AMP<sup>+</sup> 抗性的 LB 培养基中,37 °C 振荡培养至 OD<sub>600nm</sub>

为 0.6~0.8 时加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L,25 °C 诱导表达 5 h 后收集菌体,煮沸裂解后进行 SDS-PAGE 电泳,上样量均为 15 μL,与空白对照相比较,重组蛋白有表达,其分子质量为 40 ku,与预期大小一致(图 3)。将诱导表达后的菌体进行超声破碎,分别取 15 μL 上清和沉淀进行 SDS-PAGE 分析,表达的蛋白以包涵体形式存在(图 4)。



M, 蛋白预染 Marker; 1, IPTG 诱导 pET-32a(+)空载体重组菌; 2, 未诱导 pET32a-M1 重组菌; 3, IPTG 诱导 pET32a-M1 重组菌。

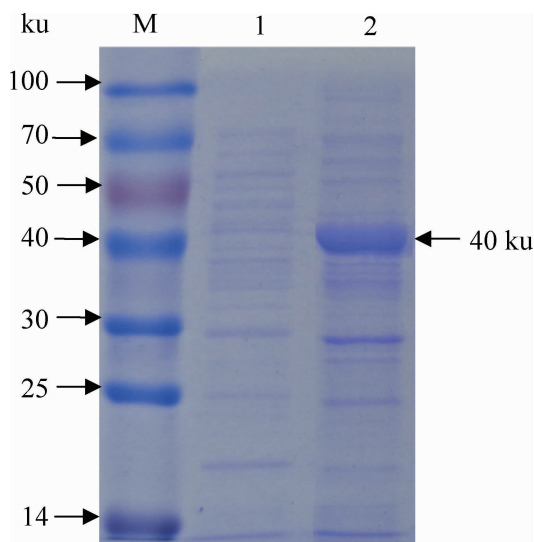
M, Protein molecular weight marker; 1, Product from pET-32a(+) after IPTG induction; 2, Product from pET32a-M1 before IPTG induction; 3, Product from pET32a-M1 after IPTG induction.

图 3 重组 M1 蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the recombinant protein M1

## 2.3 分子伴侣与目的蛋白的共表达

分别将含有分子伴侣的重组表达菌体进行诱导表达,SDS-PAGE 结果显示含有分子伴侣 pG-Tf2 和 pG-KJE8 的菌体超声波上清可见相对分子质量为 40 ku 的目的条带,大小与全菌蛋白的 SDS-PAGE 电泳一致,而沉淀中几乎无目的蛋白;含有分子伴侣 pTf16 和 pGro7 的菌体目的蛋白仍以包涵体形式表达;说明分子伴侣 pG-Tf2 和 pG-KJE8 均能促进目的蛋白可溶性表达,而分子伴侣 pTf16 和 pGro7 对支原膜蛋白的表达形式没有影响(图 5)。

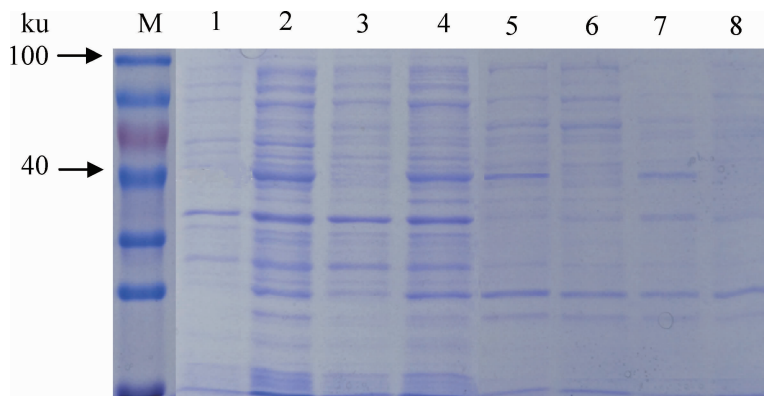


M, 蛋白预染 Marker; 1, IPTG 诱导 pET32a-M1 重组菌上清; 2, IPTG 诱导 pET32a-M1 重组菌沉淀。

M, Protein molecular weight marker; 1, Product from pET32a-M1 after IPTG induction (supernatant); 2, Product from pET32a-M1 after IPTG induction (inclusion body).

图 4 重组 M1 蛋白的表达情况 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the expression of recombinant protein M1



M, 蛋白预染 Marker; 1, 诱导 pTf16 和 pET32a-M1 重组菌上清; 2, 诱导 pG-Tf2 和 pET32a-M1 重组菌上清; 3, 诱导 pGro7 和 pET32a-M1 重组菌上清; 4, 诱导 pG-KJE8 和 pET32a-M1 重组菌上清; 5, 诱导 pTf16 和 pET32a-M1 重组菌沉淀; 6, 诱导 pG-Tf2 和 pET32a-M1 重组菌沉淀; 7, 诱导 pGro7 和 pET32a-M1 重组菌沉淀; 8, 诱导 pG-KJE8 和 pET32a-M1 重组菌沉淀。

M, Protein molecular weight marker; 1, Product from pTf16 and pET32a-M1 after induction (supernatant); 2, Product from pG-Tf2 and pET32a-M1 after induction (supernatant); 3, Product from pGro7 and pET32a-M1 after induction (supernatant); 4, Product from pG-KJE8 and pET32a-M1 after induction (supernatant); 5, Product from pTf16 and pET32a-M1 after induction (inclusion body); 6, Product from pG-Tf2 and pET32a-M1 after induction (inclusion body); 7, Product from pGro7 and pET32a-M1 after induction (inclusion body); 8, Product from pG-KJE8 and pET32a-M1 after induction (inclusion body).

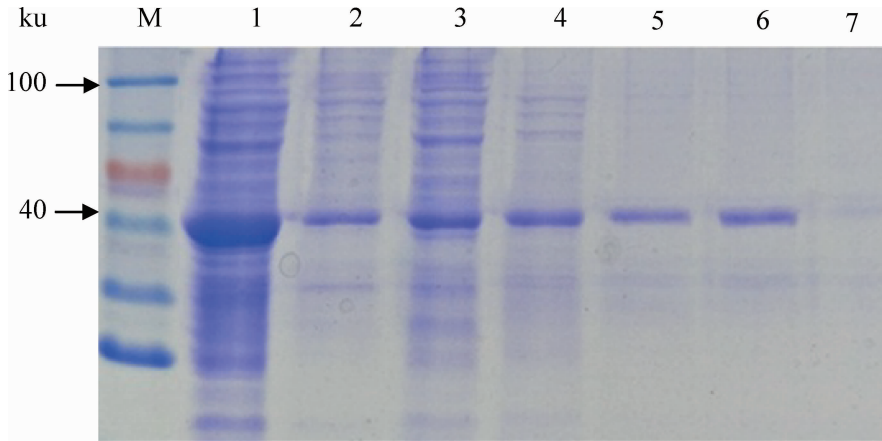
图 5 分子伴侣与目的蛋白共表达 SDS-PAGE

Fig. 5 Co-expression of SDS-PAGE with molecular chaperone and target protein

## 2.4 目的蛋白的纯化与鉴定

将含有 pG-KJE8 和 pET32a-M1 质粒的重组菌,进行诱导表达,对表达菌液进行超声破碎,12 000 r/min离心 15 min,取上清,经 0.45  $\mu$ m 滤膜

过滤后用 Ni 柱纯化目的蛋白,用不同浓度咪唑洗脱,收集的洗脱液经 SDS-PAGE 分析检测,160 和 200 mmol/L 的咪唑洗脱的条带比较单一,300 mmol/L 的咪唑洗脱的没有目的条带(图 6)。



M, 蛋白预染 Marker; 1, 诱导 pG-KJE8 和 pET32a-M1 重组菌上清; 2, 流穿液; 3, 60 mmol/L 咪唑洗脱液; 4, 100 mmol/L 咪唑洗脱液; 5, 160 mmol/L 咪唑洗脱液; 6, 200 mmol/L 咪唑洗脱液; 7, 300 mmol/L 咪唑洗脱液。

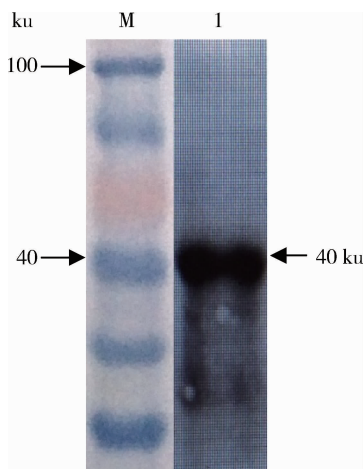
M, Protein molecular weight marker; 1, Product from pG-KJE8 and pET32a-M1 after induction (supernatant); 2, Fluid penetrating fluid; 3, 60 mmol/L imidazole eluent; 4, 100 mmol/L imidazole eluent; 5, 160 mmol/L imidazole eluent; 6, 200 mmol/L imidazole eluent; 7, 300 mmol/L imidazole eluent.

图 6 M1 蛋白的纯化

Fig. 6 Purified protein of M1

## 2.5 Western blot 分析目的蛋白生物活性

纯化后的目的蛋白经 SDS-PAGE 电泳,可与牛支原体的阳性血清发生特异性结合(图 7),说明分子伴侣保证牛支原体 M1 在原核表达系统中以可溶性形式表达,表达形式的改变未影响其生物活性。



M, 蛋白预染 Marker; 1, 纯化的 M1。

M, Protein molecular weight marker; 1, Purified M1.

图 7 Western blot 分析 M1 蛋白生物活性

Fig. 7 Western blot analysis of the bioactivity of M1 protein

## 3 讨论

牛支原体是危害我国养牛业的重要病原之一。牛支原体没有细胞壁,因此膜蛋白起着重要的作用。膜蛋白的深入研究有利于亚单位疫苗制备以及 ELISA 检测方法的建立。本科研发团队利用 iTRAQ 技术对牛支原体进行蛋白组学研究,发现牛支原体膜蛋白 M1 可能是牛支原体重要的免疫原性的蛋白(未发表)。对牛支原体研究最多的就是牛支原体可变表面脂蛋白(Variable surface lipoproteins, Vsp),近年来国内外对牛支原体的其他膜蛋白也进行了深入的研究,如表面脂蛋白 P81、P48、P68、P33、EF-Tu、PDHA 等<sup>[13-15]</sup>。根据 P81 建立的多重 PCR 检测方法,可以鉴别牛支原体和无乳支原体<sup>[16]</sup>; P48 保守性高,用于 ELISA 检测<sup>[17]</sup>; P68 在部分牛支原体菌株中缺失,其功能还有待进一步研究<sup>[18]</sup>。

通过改变诱导温度、将分子伴侣与目的蛋白共表达<sup>[19]</sup>或加入山梨醇等化学物质<sup>[20]</sup>可以提高外源蛋白的可溶性表达。本试验通过改变诱导温度,诱导剂的浓度等方法均未改变膜蛋白 M1 的表达形

式,不同的分子伴侣可以辅助某一蛋白的正确折叠,本研究将目的蛋白与4种分子伴侣共表达,发现2种分子伴侣可以减少包涵体的形成,提高可溶性表达,这在牛支原体蛋白研究中从未报道过。

质粒 pG-KJE8 表达 DnaK、DnaJ、GrpE、GroES 和 GroEL 5 种蛋白。在辅助蛋白 DnaJ 和核糖体交换因子 GrpE 的帮助下,DnaK 通过其自身构象发生变化,实现快速与折叠中间体的结合与释放,促进蛋白质正确折叠<sup>[21]</sup>。伴侣蛋白 GroEL 与 GroES 辅助蛋白可以形成一个空腔,为蛋白的正确折叠提供微环境,进而促进去折叠蛋白向天然状态的流动,加速蛋白质折叠<sup>[22]</sup>。质粒 pG-Tf2 除表达 GroES、GroEL 还有 Trigger factor(TF 因子)。TF 因子是细菌中唯一与核糖体结合的分子伴侣,其 COOH 末端可与新生肽链疏水部位结合,从而防止新生肽链过快过早的折叠,进而使新生肽链正确折叠<sup>[23]</sup>。在 GroES-GroEL 的协同下,可以提高蛋白自发折叠成天然结构的概率。有研究表明 TF 因子还具有协助多亚基蛋白组装的功能<sup>[24]</sup>。这是目前对分子伴侣促进可溶性表达的机制研究,还有许多有待于进一步研究。

牛支原体膜蛋白的表达大部分利用原核表达系统,其具有生产成本低、效率高、操作简单等诸多优点,被广泛运用,然而许多研究表明牛支原体的膜蛋白、脂质膜蛋白在大肠杆菌表达体系中多以包涵体形式表达,这给牛支原体膜蛋白的深入研究带来了许多困难<sup>[14-15]</sup>。本试验研究发现分子伴侣 pG-Tf2 和 pG-KJE8 可以使牛支原体 M1 截短蛋白以可溶性形式表达,减少包涵体的形成,可为以包涵体形式表达的牛支原体膜蛋白的深入研究提供理论依据。如果能进一步确定哪一种分子伴侣可以帮助哪种空间构型的蛋白实现可溶性表达,将大大节约生产成本,促进亚单位疫苗的快速发展。本研究通过 Western blot 验证了纯化的膜蛋白具有生物活性,为建立高效的牛支原体血清学诊断方法奠定了基础。

## 参考文献 References

[1] Fox L K. Mycoplasma mastitis: Causes, transmission and control [J]. *Veterinary Clinics of North America-Food Animal Practice*, 2012, 28(2): 225-37

[2] Gagea M I, Bateman K G, Dreumel T V, McEwen B J, Carman S, Archambault M, Shanahan R A. Naturally occurring *Mycoplasma bovis*-associated pneumonia and

polyarthritis in feedlot beef calves[J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2006, 18: 29-40

[3] Hale H H, Hemboldt C F, Plastringe W N, Stula E F. Bovine mastitis caused by a *Mycoplasma* species[J]. *The Cornell Veterinarian*, 1962, 52: 582-591

[4] Tschopp R, Bonnemain P, Nicolet J, Burnens A. Epidemiological study of risk factors for *Mycoplasma bovis* infections in fattening calves [J]. *Schweizer Archiv fur Tierheilkunde*, 2001, 143(9): 461-467

[5] Kauf A C W, Rosenbusch R F, Paape M J, Bannerman D D. Innate immune response to intramammary *Mycoplasma bovis* infection[J]. *Journal of Dairy Science*, 2007, 90(7): 3336-48

[6] Sparagano O. *Mycoplasma* of ruminants: Pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics-Book review [J]. *Tropical Animal Health and Production*, 1998, 30(4): 228-228.

[7] Niang M, Diallo M, Cisse O, Kone M, Doucoure M, Roth J A, Balcer-Rodrigues V, Dedieu L. Pulmonary and serum antibody responses elicited in Zebu cattle experimentally infected with *Mycoplasma mycoides* subsp *mycoides* SC by contact exposure[J]. *Veterinary Research*, 2006, 37(5): 733-44

[8] 辛九庆,李媛,郭丹,宋念华,胡守萍,陈超,裴洁,曹培丽.国内首次从患肺炎的犍牛肺脏中分离到牛支原体[J]. *中国预防兽医学报*, 2008, 30(9): 661-664

Xin J Q, Li Y, Guo D, Song N H, Hu S P, Chen C, Pei J, Cao P L. First isolation of *Mycoplasma bovis* from calf lung with pneumoniae in China[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2008, 30(9): 661-664 (in Chinese)

[9] 郭雨丝,陈颖钰,赵刚,郭爱珍.牛支原体病研究进展[J]. *中国奶牛*, 2015, 14: 36-41

Guo Y S, Chen Y Y, Zhao G, Guo A Z. The progress on *Mycoplasma bovis*[J]. *China Dairy Cattle*, 2015, 14: 36-41 (in Chinese)

[10] 张树军,狄建军.大肠杆菌 ybfE 基因的三种原核质粒表达水平的对比及蛋白纯化[J]. *生物技术*, 2017, 27(4): 372-382

Zhang S J, Di J J. Comparison of expression levels of *E coli ybfE* gene in three kinds of prokaryotic plasmids and the protein purification[J]. *Biotechnology*, 2017, 27(4): 372-382 (in Chinese)

[11] Nishihara K, Kanemori M, Kitagawa M, Yanaqi H, Yurac T. Chaperone coexpression plasmids: Differential and synergistic roles of DnaK-DnaJ-GrpE and GroEL-GroES in assisting folding of an allergen of Japanese cedar pollen, Cryj2, in *Escherichia coli*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(5): 1694-1699

[12] Nishihara K, Kanemori M, Yanaqi H, Yura T. Overexpression of trigger factor prevents aggregation of recombinant proteins in *Escherichia coli* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66: 884-889



- [13] 李强, 赵泽慧, 牛耀祖, 许立华. 牛支原体膜蛋白研究进展[J]. 动物医学进展, 2016, 37(6): 84-87  
Li Q, Zhao H Z, Niu Y Z, Xu L H. Progression membrane proteins of *Mycoplasma bovis* [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2016, 37(6): 84-87 (in Chinese)
- [14] 苏炜德, 李娜, 薛慧文, 邢小勇, 郝宝成, 伏小平, 温峰琴, 项海涛, 包世俊. 牛支原体 *pdha* 和 *pdhβ* 基因的克隆、原核表达及亚细胞的定位[J]. 农业生物技术学报, 2016, 24(4): 567-575  
Su W D, Li N, Xue H W, Xing X Y, Hao B C, Fu X P, Wen F Q, Xiang H T, Bao S J. Cloning and prokaryotic expression of *pdha* and *pdhβ* genes from *Mycoplasma bovis* and its subcellular localization[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2016, 24(4): 567-575 (in Chinese)
- [15] 马海彬, 韩继成, 孙文超, 解长占, 靖杰, 肖朋朋, 赵飞, 张萍, 鲁会军, 金宁一. 牛支原体 P81 蛋白的表达及纯化[J]. 中国病原生物学杂志, 2017, 12(1): 64-66  
Ma H B, Han J C, Sun W C, Xie C Z, Jing J, Xiao P P, Zhao F, Zhang P, Lu H J, Jin N Y. Prokaryotic expression and purification of P81 in *Mycoplasma bovis*[J]. *Journal of Pathogen Biology*, 2017, 12(1): 64-66 (in Chinese)
- [16] 李媛, 董惠, 张美晶, 陈超, 曹培丽, 郭丹, 姜海芳, 辛九庆. 牛支原体套式 PCR 检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2009, 31(9): 709-711  
Li Y, Dong H, Zhang M J, Chen C, Cao P L, Guo D, Jiang H F, Xin J Q. Development of a nested PCR assay for detection of *Mycoplasma bovis* [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2009, 31(9): 709-711 (in Chinese)
- [17] Robino P, Alberti A, Pittau M, Chessa B, Miciletta M, Nebbia P, Le Grand D, Rosati S. Genetic and antigenic characterization of the surface lipoprotein P48 of *Mycoplasma bovis*[J]. *Veterinary Microbiology*, 2005, 109(3-4): 201-209
- [18] Lysnyansky I, Yogev D, Levisohn S. Molecular characterization of the *Mycoplasma bovis* p68 gene, encoding a basic membrane protein with homology to P48 of *Mycoplasma agalactiae* [J]. *Fems Microbiology Letter*, 2008, 279(2): 234-242
- [19] 黄海荣, 董旭, 张宗德, 赵雁林, 姜广路, 李强. 应用分子伴侣共表达系统表达结核分枝杆菌编码蛋白[J]. 中国防痨杂志, 2009, 31(2): 76-79  
Huang H R, Dong X, Zhang Z D, Zhao Y L, Jiang G L, Li Q. Coexpression of protein of *M tuberculosis* with molecular chaperone[J]. *Chinese Journal of Antituberculosis*, 2009, 31(2): 76-79 (in Chinese)
- [20] Jin H H, Han N S, Kweon D H, Park Y C, Seo G H. Effects of environmental factors on *in vivo* folding of *Bacillus macerans* cyclodextrin glycosyltransferase in recombinant *Escherichia coli* [J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2001, 11(1): 92-96
- [21] Broadley S A, Hartl F U. The role of molecular chaperones in human misfolding diseases[J]. *FEBS Letters*, 2009, 583(16): 2647-2653
- [22] 闫啸. 分子伴侣 GroES/GroEL 介导重组蛋白可溶表达及折叠与组装初步研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2012  
Yan X. Soluble expression of recombinant proteins mediated by chaperonin GroEL/GroES and the folding-assembly mechanism[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2012 (in Chinese)
- [23] Hoffmann A, Bukau B, Kramer G. Structure and function of the molecular chaperone trigger factor [J]. *Biochimica et Biophysica Acta-molecular Cell Research*, 2010, 1803(6): 650-661
- [24] Martinez-Hackert E, Hendrickson W A. Promiscuous substrate recognition in folding and assembly activities of the trigger factor chaperone[J]. *Cell*, 2009, 138(5): 923-934

责任编辑: 杨爱东