

## 研究报告

## 肺炎链球菌血红素结合脂蛋白 PiuA 的表达、纯化和表征

乐尧金 郭众 阳小燕\*

(遵义医学院珠海校区生物工程系 珠海市中药基础及应用研究重点实验室 广东 珠海 519041)

**摘要:**【背景】肺炎链球菌是社区获得性肺炎最常见的致病菌之一，它也会引起脑膜炎、鼻窦炎、中耳炎、菌血症等一系列疾病，对人类(特别是儿童、老人、免疫缺陷患者)健康造成重大威胁。铁是肺炎链球菌生存和感染所必需的元素之一，其中血红素转运系统 PiuABCD 是肺炎链球菌最重要的铁转运系统。【目的】克隆、表达和纯化肺炎链球菌血红素转运系统脂蛋白 PiuA，并在体外表征 PiuA 蛋白的血红素结合特性。【方法】将肺炎链球菌 D39 菌株中的 *piuA* (*spd\_1652*)基因连接到载体 pBAD-HisA 上，在大肠杆菌 Top10 菌株中进行异源表达，然后运用 Ni-NTA 亲和层析纯化 PiuA-His 蛋白，并用肠激酶切掉 His 标签获得不含标签的 PiuA 蛋白，最后运用圆二色谱、紫外光谱和荧光光谱表征 PiuA 蛋白的血红素结合特性。【结果】构建了 pBAD/HisA-PiuA 重组表达载体，获得了纯度大于 95%的 PiuA 蛋白，圆二色谱显示 PiuA 蛋白与 Hemin 结合后，其二级结构不发生改变；紫外光谱结果显示 PiuA 蛋白具有血红素结合能力；荧光光谱结果显示 apo-PiuA 蛋白与 Hemin 结合常数  $K=3.4\times 10^5$  L/mol。【结论】肺炎链球菌血红素转运系统脂蛋白 PiuA 能够特异地结合血红素，为肺炎链球菌的生存和感染提供必需的铁源，PiuA 蛋白的体外表征结果为针对 PiuABCD 血红素转运系统设计抗菌药物奠定了基础。

**关键词:** 肺炎链球菌，血红素结合脂蛋白 PiuA，圆二色谱，紫外光谱，荧光光谱

## Expression, purification and characterization of hemin-binding lipoprotein PiuA from *Streptococcus pneumoniae*

LE Yao-Jin GUO Zhong YANG Xiao-Yan\*

(Zhuhai Key Laboratory of Basic and Applied Research in Chinese Medicine, Department of Bioengineering, Zhuhai Campus of Zunyi Medical College, Zhuhai, Guangdong 519041, China)

**Abstract:** [Background] *Streptococcus pneumoniae* is one of the most common pathogens of community-acquired pneumonia, and causes a variety of other serious diseases including bacterial meningitis, sinusitis, otitis media and bacteremia, and poses health threats to humans, especially among children and the elderly, or individuals with immature/compromised immune systems. Iron is essential for Streptococcal survival and infection, and haem ABC uptake system PiuABCD is the most iron ABC uptake system for *S. pneumoniae*. [Objective] Clone, express and purify

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (81603162)

\*Corresponding author: Tel: 86-756-76233310; E-mail: ouyangxiangyan@126.com

Received: January 06, 2018; Accepted: March 28, 2018; Published online (www.cnki.net): April 12, 2018  
基金项目: 国家自然科学基金(81603162)

\*通信作者: Tel: 86-756-76233310; E-mail: ouyangxiangyan@126.com

收稿日期: 2018-01-06; 接受日期: 2018-03-28; 网络首发日期(www.cnki.net): 2018-04-12

hemin-binding lipoprotein PiuA belonging to haem ABC uptake system PiuABCD, and characterize its hemin-binding properties *in vitro*. **[Methods]** The *piuA* (*spd\_1652*) gene from *S. pneumoniae* D39 strain was ligated into pBAD-HisA vector, and expressed in *E. coli* Top 10 strain, then the PiuA-His fusion protein was purified using Ni-NTA affinity chromatography, and the His tag free PiuA protein was obtained by cutting off the His tag with enterokinase. Finally, the hemin-binding properties of PiuA protein were characterized by circular dichroism, UV spectroscopy and fluorescence spectroscopy. **[Results]** We successfully constructed recombinant vector pBAD/HisA-PiuA, and acquired the PiuA protein with the purity higher than 95%. CD spectra showed that hemin binding did not induce any significant structural change in PiuA, UV spectroscopy revealed that PiuA protein can specifically bind hemin, and fluorescence spectroscopy demonstrated that the binding constant  $K$  between the PiuA and hemin is  $3.4 \times 10^5$  L/mol. **[Conclusion]** Hemin-binding lipoprotein PiuA can specifically bind to hemin and provide the iron for Streptococcal survival and infection, these characterization results of PiuA protein provide basis data for design of antibacterial drug targeted for haem ABC uptake system PiuABCD.

**Keywords:** *Streptococcus pneumoniae*, Hemin-binding lipoprotein PiuA, Circular dichroism spectra, UV spectroscopy, Fluorescence spectroscopy

肺炎链球菌是一种革兰氏阳性菌，会引起肺炎、脑膜炎、鼻窦炎、中耳炎、菌血症等一系列疾病，对人类(特别是儿童、老人、艾滋病患者和其他免疫缺陷患者)健康造成重大威胁<sup>[1-2]</sup>。WHO 估算全球每年有至少 120 万婴幼儿死于肺炎链球菌引起的疾病，其中 90%为发展中国家儿童<sup>[3-4]</sup>。疫苗和抗生素是目前预防和治疗肺炎链球菌感染疾病的主要手段。但是近年来随着各种抗生素在临床上的广泛使用以及不合理应用，导致了细菌的抗药性迅速提高和传播，耐青霉素肺炎链球菌(Penicillin resistant *Streptococcus pneumoniae*, PRSP)在世界范围内广泛传播(同时伴有对其他抗生素的多重耐药)。一些地区的菌株对青霉素的耐药率高达 45%，使得肺炎链球菌感染的治疗面临越来越大的困难<sup>[5]</sup>。由于耐抗生素的肺炎链球菌的发生率越来越高，抗菌药的研究与开发速度已远远跟不上细菌耐药的速度的，因此迫切需要筛选新的药物用于治疗肺炎链球菌感染性疾病。

在过去的 10 年里，人们发现过渡金属离子在宿主-病原体相互作用过程中发挥着重要作用，尤其是铁离子作为过渡金属对细菌的细胞生理学尤为重要<sup>[6-8]</sup>。铁是绝大多数细菌生存和感染所必需的元素，但是宿主环境中游离存在的铁离子非常有

限( $<10^{-18}$  mol/L)，所以细菌进化出了对铁离子具有高度亲和力的铁 ABC 摄取系统(Iron ABC uptake systems)，这些系统可直接从宿主细胞中的转铁蛋白、含血红素蛋白和非血红素含铁蛋白中掠夺铁离子。由于铁 ABC 摄取系统在链球菌中具有高度的保守性，均由类似的蛋白(脂蛋白、ATP 结合蛋白和疏水的膜蛋白)构成，且其中的脂蛋白是暴露在细胞膜外的，可以成为这些细菌引发的感染性疾病的疫苗候选物和药物靶标<sup>[9-11]</sup>。因此，针对细菌铁摄取系统和铁代谢设计的抗菌药物和疫苗也逐渐成为研究热点，对解决当前耐药菌感染和细菌耐药性问题意义重大<sup>[12-15]</sup>。

肺炎链球菌中已知的铁 ABC 摄取系统有 4 个，即血红素转运系统 PiuABCD、铁色素转运系统 PiaABCD、铁离子转运系统 PitABCD、以及新发现的铁转运系统 Operon 804<sup>[16-18]</sup>。其中脂蛋白 PiuA 和 PiaA 存在于所有已知的肺炎链球菌中，是小鼠全身和肺部感染模型中所必需的毒力因子，用重组表达的 PiuA 和 PiaA 蛋白作为抗原免疫小鼠，能帮助小鼠对抗侵袭性肺炎链球菌疾病，因此 PiuA 和 PiaA 蛋白被认为是一种新型的有前景的肺炎链球菌疫苗<sup>[19-22]</sup>。本实验拟对肺炎链球菌血红素转运系统脂蛋白 PiuA 进行克隆、表达和纯

化,并在体外表征 PiuA 蛋白的血红素结合特性,为针对 PiuABCD 血红素转运系统设计抗菌药物奠定基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 菌株和质粒

肺炎链球菌 D39 (*Streptococcus pneumoniae* D39),美国菌种保藏中心(American type culture collection, ATCC);大肠杆菌(*Escherichia coli*) Top10 菌株和载体 pBAD-HisA, Invitrogen 公司。

### 1.2 主要试剂和仪器

Todd-Hewitt Broth 和 Yeast extract, OXOID 公司;细菌 DNA 提取试剂盒, OMEGA 公司; PrimeSTAR HS (Premix)、DNA Maker、T4 DNA 连接酶和各种限制性内切酶, TaKaRa 公司;PCR 产物纯化回收试剂盒、胶回收试剂盒,天根生化科技有限公司;Ni-NTA 亲和层析纯化柱, QIAGEN 公司;重组肠激酶,中大南海海洋生物技术工程有限公司;L-(+)阿拉伯糖、Hemin 和氨苄青霉素, Sigma 公司;小鼠 His-tag 单克隆抗体,碧云天生物技术有限公司;羊抗鼠二抗, Abcam 公司;ECL 化学发光液, Bio-Rad 公司。

普通 PCR 仪, Applied Biosystems 公司;超声波细胞破碎仪,宁波新芝生物仪器公司;圆二色谱仪,应用物理公司;紫外分光光度仪、NanoDrop 2000C 超微量分光光度计和电感耦合等离子体质谱仪 ICP-MS, Thermo 公司;荧光分光光度计,日立高新技术公司。

### 1.3 *piuA* 基因的克隆、重组质粒 pBAD/HisA-*piuA* 的构建和鉴定

根据 GenBank 数据库中肺炎链球菌 D39 的 *piuA* (*spd\_1652*)基因序列,利用 Primer Premier 5.0 设计并合成编码去信号肽脂蛋白 *piuA* 基因的引物, *piuA*-F: 5'-GGCGGCGAGCTCGAGACCAGTAGCTCTGCTC-3' (划线部分为 *Sac* I 酶切位点), *piuA*-R: 5'-CGCCGCGAATTCTTATTTCAAAGCTTTTG-3' (划线部分为 *Eco*R I 酶切位点),以肺炎

链球菌 D39 总基因组 DNA 为模板扩增目的基因,PCR 反应体系(100  $\mu$ L): PrimeSTAR HS (Premix) 50  $\mu$ L, 引物 *piuA*-F 和 *piuA*-R (10  $\mu$ mol/L) 各 4  $\mu$ L, DNA 模板(100 ng/ $\mu$ L) 2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 40  $\mu$ L。PCR 反应条件:95  $^{\circ}$ C 5 min; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 55  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min。

用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,利用胶回收试剂盒回收纯化目的片段。用 *Sac* I、*Eco*R I 内切酶进行双酶切回收的目的基因片段及载体 pBAD-HisA, 37  $^{\circ}$ C 酶切 4 h, T4 DNA 连接酶连接目的基因和载体,连接比例为目的基因:载体为 4:1, 16  $^{\circ}$ C 连接过夜,取 20  $\mu$ L 连接产物转化至 *E. coli* Top10 感受态细胞,经氨苄青霉素抗性平板筛选阳性重组子,对其进行双酶切验证及 DNA 测序验证,经 NCBI BLAST 比对分析测序结果,得到正确的重组质粒命名为 pBAD/HisA-*piuA*。

### 1.4 重组蛋白 PiuA-His 的诱导表达、纯化和不含 His 标签 PiuA 蛋白的获得

将测序正确的含 pBAD/HisA-*piuA* 质粒的 Top10 菌株接种于含有氨苄青霉素(100 ng/ $\mu$ L)的 LB 培养基中, 37  $^{\circ}$ C、220 r/min 振荡培养过夜。次日将活化的菌种按 1:100 转接入新鲜培养基扩大培养, 37  $^{\circ}$ C、220 r/min 振荡培养至 *OD*<sub>600</sub> 约为 0.6-0.8 时,加入 L-(+)阿拉伯糖至终浓度为 0.04%,同样的条件继续诱导表达 4-6 h 后收集菌体, 4  $^{\circ}$ C、6 000 r/min 离心 30 min,并用 1 $\times$ PBS 缓冲液洗涤菌体 2 次。将收集到的菌体于液氮和 37  $^{\circ}$ C 反复冻融 3 次,然后冰浴超声 30 min (5 s 开 5 s 关)至菌液变澄清透亮,超声破碎物于 4  $^{\circ}$ C、10 000 r/min 离心 30 min,弃沉淀,上清液用于过柱纯化。

采用 Ni-NTA 亲和层析纯化柱对重组蛋白进行纯化,具体步骤根据说明书所示。利用 10 kD 超滤管浓缩融合蛋白, 4  $^{\circ}$ C、5 000 r/min 超滤至 500  $\mu$ L,用 20 mmol/L Tris-HCl (含 100 mmol/L NaCl)洗 3 次。利用重组肠激酶切掉含有 6 $\times$ His 标签的融合蛋白(室温, 16 h)。将酶切产物再次经

Ni-NTA 柱分离, 上样后的初次流出液即为去掉标签的 PiuA 蛋白。用 12% SDS-PAGE 对 PiuA 蛋白的纯度进行检测, 并用 Western blotting 对获得的 PiuA 蛋白进行鉴定。

### 1.5 Western blotting 鉴定 PiuA 蛋白

分别取 3  $\mu\text{g}$  的 PiuA-His 重组蛋白和不含 His 标签的 PiuA 蛋白于 12% SDS-PAGE 进行分离, 通过湿转法将蛋白转印至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 按照 1:1 000 比例稀释加入小鼠 His-tag 单克隆抗体, 或者按照 1:2 000 比例稀释加入我们自己制备的小鼠 PiuA 多克隆抗体, 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。洗脱后加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠二抗, 室温孵育 1 h, 再次洗去未结合的二抗, 最后通过 ECL 化学发光液检测。

### 1.6 PiuA 蛋白的血红素结合特性研究

#### 1.6.1 电感耦合等离子体质谱仪(ICP-MS)检测纯化的 PiuA 蛋白中金属含量

纯化后的 PiuA 蛋白用 10 kD 超滤管浓缩后经 BCA 法测定蛋白浓度, 用超纯水将蛋白样品稀释至 5  $\mu\text{mol/L}$ , 在样品中加入 10  $\mu\text{mol/L}$  标准品铜作为内参, 送暨南大学分析测试中心, 用 ICP-MS 仪器测定样品中的金属元素含量(Fe、Mn、Zn、Cu、In), 每个金属元素重复测定 3 次。

#### 1.6.2 Apo-PiuA 蛋白样品的制备

纯化后的 PiuA 蛋白溶液呈粉红色, 经 ICP-MS 测定后含有等摩尔的铁, 后续的实验需要用到 apo-PiuA (即不含金属元素的 PiuA), 因此采用盐酸胍变性方法去除 PiuA 蛋白中的金属离子并通过透析使蛋白尽可能回复到天然活性状态。盐酸胍在高浓度(4–8 mol/L)水溶液时能断裂氢键, 从而使蛋白质发生不同程度的变性, 且盐酸胍引起的变性通常是可逆的。盐酸胍变性具体步骤: 500  $\mu\text{L}$  的高浓度 PiuA (25  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) 样品, 加入盐酸胍(终浓度为 8 mol/L)至 2 mL 左右, 4  $^{\circ}\text{C}$  处理 4 h 后, 加入 50 mmol/L 的 EDTA 至终浓度为 25 mmol/L, 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜处理(约 12 h)。接下来先用 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(含 10 mmol/L 的 EDTA 和 100 mmol/L 的

NaCl, pH 7.4)透析一次, 然后用 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(含 100 mmol/L 的 NaCl, pH 7.4)继续透析 4 次, 最后用 10 kD 超滤管浓缩后经 BCA 法测定蛋白浓度, 将 apo-PiuA 蛋白样品用超纯水稀释至 5  $\mu\text{mol/L}$ , 利用 ICP-MS 仪器测定样品中的金属元素含量(Fe、Mn、Zn、Cu、In)。

#### 1.6.3 圆二色谱(CD)分析 PiuA 蛋白的二级结构

远紫外区(190–250 nm) CD 光谱主要反映蛋白质氨基酸间肽键的圆二色性。二级结构不同的蛋白由于  $\alpha$  螺旋、 $\beta$  折叠及无规卷曲在远紫外区具有特征吸收峰, 在 CD 光谱中呈现不同的特征谱峰。圆二色谱测定野生型蛋白 PiuA、apo-PiuA 及结合血红素(Hemin)的 PiuA (PiuA+Hemin)的二级结构。高浓度的蛋白样品用 20 mmol/L Tris-HCl (含 100 mmol/L NaCl, pH 7.4)缓冲液稀释至 3  $\mu\text{mol/L}$  的测试蛋白样品, 样品池为石英比色皿(1 mm), 测定参数如下: 扫描波长 190–250 nm, 扫描温度 25  $^{\circ}\text{C}$ , 扫描速率 100 nm/min, 带宽 1.0 nm。每次扫描重复 3 次, 取平均值得到平滑曲线即为最后的 CD 光谱, 扣除缓冲液背景。蛋白二级结构用 CDPro 软件进行计算。

#### 1.6.4 紫外光谱检测 PiuA 蛋白与血红素结合情况

Apo-PiuA (50  $\mu\text{mol/L}$ )与过量 Hemin 室温孵育 2 h 后, 依次过脱盐柱和 10 kD 超滤柱, 用缓冲液洗 6 次, 去掉不与 PiuA 结合以及非特异结合的 Hemin, 剩下的样品即为血红素特异饱和的 PiuA 蛋白, 命名为 PiuA+Hemin。用 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4, 含有 100 mmol/L NaCl)缓冲液分别制备浓度均为 25  $\mu\text{mol/L}$  Hemin 溶液、apo-PiuA 溶液和 PiuA+Hemin 溶液各 500  $\mu\text{L}$ , 分别按照相同的参数用紫外分光光度计从 200–600 nm 波段进行扫描, 每个实验重复扫描 3 次。

#### 1.6.5 荧光光谱检测 PiuA 蛋白与血红素结合情况

用 20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4, 含有 100 mmol/L NaCl)缓冲液稀释 apo-PiuA 蛋白至终浓度为 3  $\mu\text{mol/L}$ , 用相同的缓冲液制备 3 mmol/L 高浓度的 Hemin 溶液, 依次向 apo-PiuA 蛋白溶液滴加 0.2 倍当量的

Hemin 溶液,每滴加一次,打开磁力搅拌器搅拌 5 min,使蛋白与金属离子反应完全,然后扫描荧光猝灭光谱,每次扫描均重复 3 次,实验条件和参数如下:1 cm 四面透光的石英比色皿,内有磁力搅拌子不断搅拌,激发波长 280 nm,扫描范围 300–450 nm,扫描速度 1 200 nm/min,电压 530 V,激发单元狭缝 5.0 nm,发射单元狭缝 5.0 nm,设置自动响应时间,水浴锅温度设置 25 °C 恒温。获得的实验数据用 Origin 8.5 软件中的 Hill 方程拟合,计算得出 PiuA 蛋白与 Hemin 的结合常数  $K$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 重组表达载体 pBAD/HisA-*piuA* 构建和鉴定

以肺炎链球菌 D39 总基因组 DNA 为模板,PCR 反应扩增去除信号肽的 *piuA* 基因(870 bp),扩增产物经 1%琼脂糖凝胶验证(图 1A),与目的基因大小吻合。随机在 Amp 抗性平板上挑选 8 个 *piuA* 连接转化后的克隆,提取质粒,*Sac* I、*Eco*R I 双酶切鉴定,进行 1%琼脂糖凝胶电泳,结果有 5 个阳性克隆的插入片段与目的基因大小一致(图1B)。为进一步确认重组质粒的正确性,将所得的阳性克隆送 Invitrogen 公司测序,测序结果经序列比对显示目的基因与 NCBI 数据库中的肺炎链球菌 D39 的 *piuA* 基因 100%匹配,且没有发生移码和基因突变,表明重组表达载体 pBAD/HisA-*piuA*

构建成功。

### 2.2 PiuA 蛋白诱导表达、纯化检测和鉴定

将测序正确的含 pBAD/HisA-*piuA* 质粒的 Top10 菌株接种到 LB 培养基中,经 L-(+)阿拉伯糖诱导表达 4–6 h 后收集菌体,超声破碎裂解菌体,裂解后的全蛋白上清液通过 Ni-NTA 亲和层析柱纯化,用不同浓度咪唑(10–500 mmol/L)进行梯度洗脱,在 50 mmol/L 咪唑浓度洗脱液中能最大量收获条带单一的 PiuA-His 融合蛋白(图 2A),表明 PiuA-His 融合蛋白是可溶性表达的。重组肠激酶能识别序列 DDDDK,将 His 标签切掉,纯化后的不含 His 标签的 PiuA 蛋白经 12% SDS-PAGE 分析,可以看出经过纯化后得到单一的 PiuA (31.6 kD)蛋白条带(图 2B),且蛋白纯度在 95%以上。另外由于 PiuA-His 融合蛋白带有标签蛋白 His,可与 Anti-His 抗体发生特异性抗原-抗体反应,因此运用 His 抗体作为一抗,进行 Western blotting 检测,从 PVDF 膜上可观察到特异的单一蛋白条带(图 2C),且分子量大小与 PiuA 蛋白一致;另一方面,运用 PiuA 鼠多克隆抗体作为一抗,进行 Western blotting 检测了 PiuA-His 和 PiuA 蛋白,如图 2D 所示,从 PVDF 膜上可观察到特异的单一蛋白条带。以上结果表明 PiuA 蛋白制备成功,可进一步用于体外生化表征。

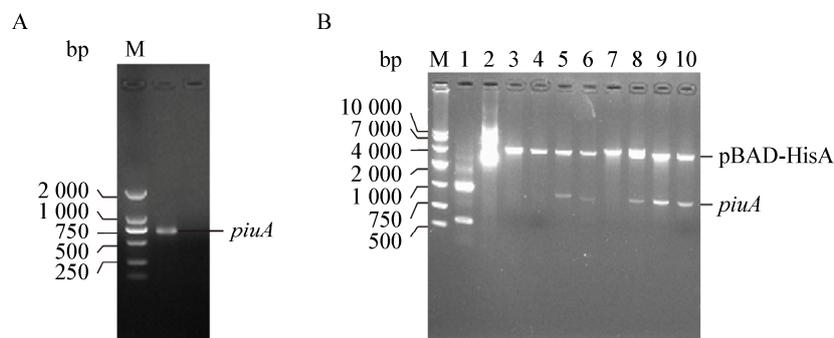


图 1 *piuA* 基因的扩增及重组表达载体 pBAD/HisA-*piuA* 的鉴定

Figure 1 Amplification of *piuA* and identification of recombinant plasmid pBAD/HisA-*piuA*

注: A: PCR 扩增 *piuA* 基因; B: 重组表达载体 pBAD/HisA-*piuA* 双酶切验证。

Note: A: PCR product of *piuA*; B: Restriction enzyme analysis recombinant plasmid pBAD/HisA-*piuA* with *Sac* I and *Eco*R I.

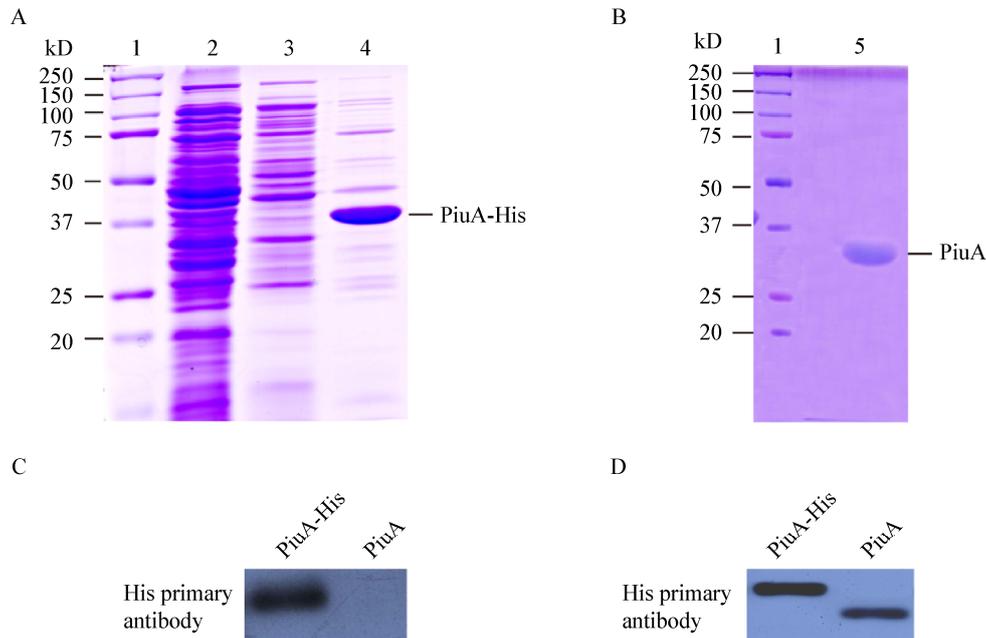


图2 PiuA-His 融合蛋白和 PiuA 蛋白的纯化检测和 Western blotting 验证

Figure 2 Detection of PiuA-His fusion protein and PiuA protein with 12% SDS-PAGE, and verification of them by using Western blotting

注：A：12%的 SDS-PAGE 检测 PiuA-His 融合蛋白；1：蛋白 Marker；2：全蛋白上清液；3：10 mmol/L 咪唑洗脱液；4：50 mmol/L 咪唑洗脱液；B：12%的 SDS-PAGE 检测 PiuA 蛋白，5：纯化后的 PiuA 蛋白；C：Western blotting 验证 PiuA-His 融合蛋白和 PiuA 蛋白，His 抗体作为一抗；D：Western blotting 验证 PiuA-His 融合蛋白和 PiuA 蛋白，PiuA 鼠多克隆抗体作为一抗。

Note: A: Detection of PiuA-His fusion protein with 12% SDS-PAGE; 1: Protein marker; 2: Whole protein supernatant; 3: Proteins eluted with 10 mmol/L imidazole; 4: Proteins eluted with 50 mmol/L imidazole; B: Detection of PiuA protein with 12% SDS-PAGE, 5: Purified PiuA protein; C: Verification of PiuA-His fusion protein and PiuA protein by using Western blotting with His antibody; D: Verification of PiuA-His fusion protein and PiuA protein by using Western blotting with PiuA mouse polyclonal antibody.

### 2.3 ICP-MS 检测纯化的 PiuA 蛋白和 apo-PiuA 蛋白中的金属含量

纯化后的 PiuA 蛋白溶液呈粉红色，ICP-MS 测定结果显示，纯化后的每个 PiuA 蛋白分子含有一个铁离子，不含其他金属离子(表 1)。经过摸索，最终采用 8 mol/L 的盐酸胍和 25 mmol/L 的 EDTA 对 PiuA 蛋白进行变性螯合出其中的血红素，获得 apo-PiuA 蛋白，然后经过 48 h 的透析使蛋白复性，ICP-MS 测定结果显示，apo-PiuA 蛋白不含任何金

属离子(表 1)。

### 2.4 CD 分析 PiuA、apo-PiuA 和 PiuA+Hemin 蛋白的二级结构

从图 3 的 CD 光谱得知，PiuA、apo-PiuA 和 PiuA+Hemin 蛋白的二级结构几乎一致，表明采用盐酸胍变性方法获得的 apo-PiuA 蛋白通过透析的方法恢复到了天然的状态，可用于后续的实验。同时发现 PiuA 蛋白与 Hemin 结合后，其二级结构几乎不发生改变。

表 1 ICP-MS 测定 PiuA 和 apo-PiuA 蛋白中金属离子 Fe、Mn、Zn、Cu 和 In 的含量

Table 1 The content of Fe, Mn, Zn, Cu and In of PiuA and apo-PiuA proteins by using ICP-MS analysis

Proteins	Fe ( $\mu\text{mol/L}$ )	Mn ( $\mu\text{mol/L}$ )	Zn ( $\mu\text{mol/L}$ )	Cu ( $\mu\text{mol/L}$ )	In ( $\mu\text{mol/L}$ )
PiuA	5.01 $\pm$ 0.22	0.15 $\pm$ 0.08	1.12 $\pm$ 0.25	0.13 $\pm$ 0.08	9.95 $\pm$ 0.50
apo-PiuA	0.66 $\pm$ 0.12	0.25 $\pm$ 0.06	0.95 $\pm$ 0.08	0.05 $\pm$ 0.00	10.18 $\pm$ 0.38

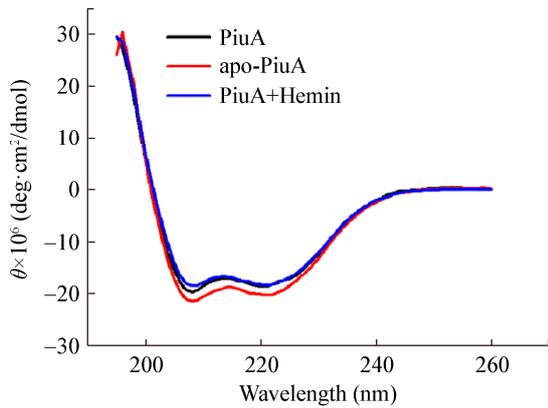


图3 CD分析 PiuA、apo-PiuA 和 PiuA+Hemin 蛋白的二级结构

Figure 3 Secondary structures of PiuA, apo-PiuA and PiuA+Hemin by using CD analysis

## 2.5 紫外光谱检测 apo-PiuA 蛋白与血红素结合情况

将 30  $\mu\text{mol/L}$  血红素溶液、apo-PiuA 溶液和 PiuA+Hemin 溶液分别进行紫外分光光度计扫描后,紫外光谱图 4 显示 apo-PiuA 蛋白只在 280 nm 处有一蛋白特征吸收峰, PiuA+Hemin 蛋白除了在 280 nm 的蛋白吸收峰外,还在 401 nm 处有一血红素特征吸收峰,且与等摩尔量的 Hemin 的吸收峰相比,吸收峰向长波长方向移动,即有明显的红移(图 4),表明 PiuA 蛋白具有血红素结合能力。

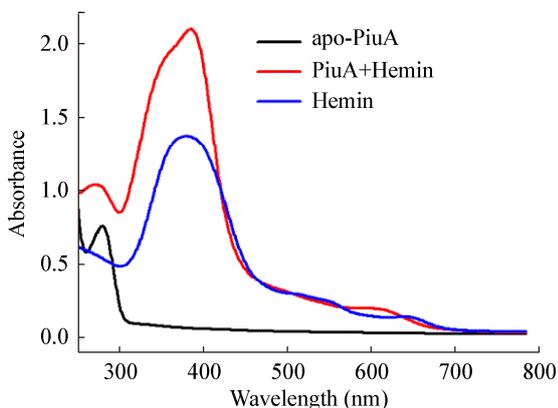


图4 apo-PiuA 蛋白与血红素结合的紫外光谱检测

Figure 4 UV spectroscopy analysis of PiuA with (PiuA+Hemin) and without (apo-PiuA) hemin

## 2.6 荧光光谱检测 apo-PiuA 蛋白与血红素结合

apo-PiuA 蛋白与血红素结合的强弱可以利用荧光光谱检测,向 apo-PiuA 蛋白溶液(3  $\mu\text{mol/L}$ )中不断滴加高浓度 Hemin,由于 apo-PiuA 蛋白与 Hemin 结合后相互作用产生微环境变化而造成电子跃迁,然后回至基态,在 333 nm 处发生荧光猝灭现象(图 5A),表明 Hemin 的结合引起了 apo-PiuA 蛋白空间构象的变化。根据 Origin 8.5 软件中的 Hill 方程 $[y=V_{\max} \times x^n / (k^n + x^n)]$ 对 Hemin 浓度和 333 nm 处的绝对荧光值做曲线拟合,计算得出 apo-PiuA 蛋白与 Hemin 结合常数为  $K=3.4 \times 10^5 \text{ L/mol}$ (图 5B)。

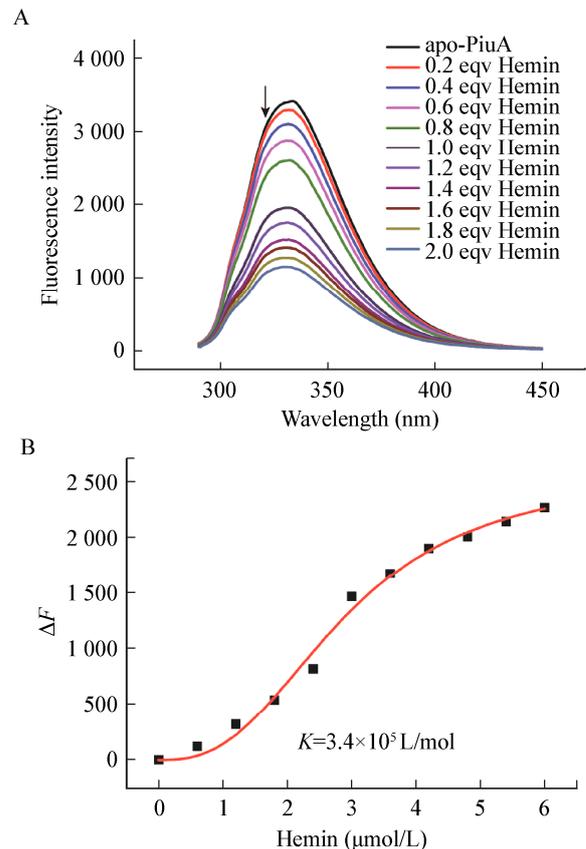


图5 apo-PiuA 与血红素结合的荧光光谱图(A)以及 Hill 方程拟合的曲线(B)

Figure 5 Fluorescence spectroscopy of hemin titration to apo-PiuA protein (A), and the fluorescence quenching at 333 nm was fitted with a Hill plot to calculate the binding constant  $K$  (B)

### 3 讨论与结论

铁离子是细胞代谢过程中许多蛋白或酶的辅助因子,主要参与电子传递、氧的激活、呼吸作用、过氧化氢物的还原、氨基酸和 DNA 的合成以及光合作用等代谢过程,是大多数细菌生存以及形成感染的必需元素<sup>[8,23-25]</sup>。肺炎链球菌作为当今世界范围内引发感染和死亡的重要病原菌之一,在感染宿主(人)过程中,必须从人体获得养分,这其中就包括铁、锰、锌、铜等微量元素<sup>[6]</sup>。血红素占人体总铁源的 80%以上,为了从人体中获取血红素满足自身的生存和感染,肺炎链球菌进化出了血红素摄取系统 PiuABCD。依靠该摄取系统的 ATP 结合蛋白 PiuB 提供能量,脂蛋白 PiuA 作为底物结合蛋白能够直接特异地结合血红素,并与膜蛋白 PiuC 和 PiuD 相互作用将血红素释放并转运到肺炎链球菌体内。由于脂蛋白 PiuA 存在于所有已知的肺炎链球菌中,目前已被证明是潜在的肺炎链球菌疫苗候选物,但是目前对 PiuA 蛋白结合和释放血红素的过程并没有细致深入地研究。

金属组学(Metallomics)是 2002 年逐渐发展起来的一门综合研究生命体内金属和类金属元素的分布、存在的形态、属性、含量、与其他生物大分子结合的结构及其在生物体中的生理作用和功能的学科<sup>[26]</sup>,开展金属组学和金属蛋白质组学研究将有助于认识微量元素生物效应及其机理、与微量元素相关疾病的发生机制的基础,同时也是金属药物设计的理论依据<sup>[27]</sup>。目前常用的研究金属蛋白质体外结构与功能研究的技术主要有电感耦合等离子体质谱仪(ICP-MS)、圆二色谱(CD)、紫外光谱、荧光光谱、停留光谱仪、等温热滴定仪(ITC)、电子顺磁共振(EPR)、X 射线衍射、核磁共振(NMR)、X 射线吸收光谱等<sup>[27]</sup>。其中 ICP-MS 能分析溶液中含量在 ppb 或者 ppb 以下的一系列金属元素和 B、Si、As、Te、P、Se、S 等非金属元素<sup>[27]</sup>;圆二色谱(CD)能利用平面偏振光研究溶液中蛋白质、DNA 等生物大分子二级和三级结构和构象变化<sup>[28]</sup>;由于蛋白大分子中含有具有环状共轭体系

的芳香族氨基酸,在近紫外区 190–400 nm 处发生  $n-\pi$  电子跃迁,产生紫外光谱,同样地,蛋白大分子内部的芳香族氨基酸也能在氙灯光源照射下,发生电子跃迁而产生荧光光谱,因此紫外光谱和荧光光谱被广泛应用于研究蛋白质结构和构象、蛋白与小分子或者金属离子的相互作用等<sup>[29-30]</sup>。

本研究从肺炎链球菌 D39 基因组中克隆出 *piuA* 基因,构建 pBAD/HisA-*piuA* 重组表达载体,在大肠杆菌 Top10 菌株中进行异源表达,运用 Ni-NTA 亲和层析纯化获得纯度大于 95%的 PiuA 蛋白(不含 His 标签)。盐酸胍在高浓度(4–8 mol/L)水溶液中能断裂氢键,从而使蛋白质发生不同程度的变性,且盐酸胍引起的变性通常是可逆的,可以通过透析的方法使蛋白恢复到天然的状态。由于纯化后的 PiuA 蛋白溶液呈粉红色,ICP-MS 测定结果显示,纯化后的每个 PiuA 蛋白分子含有一个铁离子,后续的实验需要 apo-PiuA 蛋白(即不含金属元素的 PiuA 蛋白),因此我们采用 8 mol/L 的盐酸胍和 25 mmol/L 的 EDTA 去除 PiuA 蛋白中的血红素从而获得的 apo-PiuA 蛋白,并通过透析的方法使其恢复到天然的状态,用圆二色谱扫描 apo-PiuA 蛋白的二级结构可以看出蛋白完全恢复到天然的状态。最后运用 ICP-MS、圆二色谱、紫外光谱和荧光光谱手段表征了 apo-PiuA 蛋白与血红素结合前后的生化性质的变化,实验结果显示 PiuA 能特异地结合血红素,结合常数  $K=3.4 \times 10^5$  L/mol;而且 PiuA 蛋白与血红素结合后,二级结构几乎不发生改变。此外,后续我们将选取国内一些肺炎链球菌分离株进一步研究其中的 PiuA 蛋白,并比较其与参考株肺炎链球菌 D39 菌株的异同。这些结果有利于阐明脂蛋白 PiuA 的血红素结合特性和机理,为开发针对 PiuABCD 血红素转运系统的抗菌药物提供了理论基础。

### REFERENCES

- [1] van Der Poll T, Opal SM. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia[J]. *The Lancet*, 2009, 374(9700): 1543-1556
- [2] Kadioglu A, Weiser JN, Paton JC, et al. The role of *Streptococcus*

- pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease[J]. Nature Reviews Microbiology, 2008, 6(4): 288-301
- [3] WHO. Pneumococcal disease[EB/OL]. <http://www.who.int/ith/vaccines/pneumococcal/en/>
- [4] Kim GL, Seon SH, Rhee DK. Pneumonia and *Streptococcus pneumoniae* vaccine[J]. Archives of Pharmacal Research, 2017, 40(8): 885-893
- [5] Yesilkaya H, Andisi VF, Andrew PW, et al. *Streptococcus pneumoniae* and reactive oxygen species: an unusual approach to living with radicals[J]. Trends in Microbiology, 2013, 21(4): 187-195
- [6] Turner AG, Ong CIY, Walker MJ, et al. Transition metal homeostasis in *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus pneumoniae*[J]. Advances in Microbial Physiology, 2017, 70: 123-191
- [7] Ge RG, Sun XS. Iron acquisition and regulation systems in *Streptococcus* species[J]. Metallomics, 2014, 6(5): 996-1003
- [8] Cassat JE, Skaar EP. Iron in infection and immunity[J]. Cell Host & Microbe, 2013, 13(5): 509-519
- [9] Nguyen MT, Gotz F. Lipoproteins of gram-positive bacteria: key players in the immune response and virulence[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2016, 80(3): 891-903
- [10] Kohler S, Voß F, Gómez Mejía A, et al. Pneumococcal lipoproteins involved in bacterial fitness, virulence, and immune evasion[J]. FEBS Letters, 2016, 590(21): 3820-3839
- [11] Counago RM, McDevitt CA, Ween MP, et al. Prokaryotic substrate-binding proteins as targets for antimicrobial therapies[J]. Curr Drug Targets, 2012, 13(11): 1400-1410
- [12] Yang XY, Sun B, Zhang L, et al. Chemical interference with iron transport systems to suppress bacterial growth of *Streptococcus pneumoniae*[J]. PLoS One, 2014, 9(8): e105953
- [13] Kim HK, DeDent A, Cheng AG, et al. IsdA and IsdB antibodies protect mice against *Staphylococcus aureus* abscess formation and lethal challenge[J]. Vaccine, 2010, 28(38): 6382-6392
- [14] Ballouche M, Cornelis P, Baysse C. Iron metabolism: a promising target for antibacterial strategies[J]. Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery, 2009, 4(3): 190-205
- [15] Kaneko Y, Thoendel M, Olakanmi O, et al. The transition metal gallium disrupts *Pseudomonas aeruginosa* iron metabolism and has antimicrobial and antibiofilm activity[J]. The Journal of Clinical Investigation, 2007, 117(4): 877-888
- [16] Yang XY, He K, Du G, et al. Integrated translomics with proteomics to identify novel iron-transporting proteins in *Streptococcus pneumoniae*[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7(1): 78
- [17] Brown JS, Gilliland SM, Ruiz-Albert J, et al. Characterization of pit, a *Streptococcus pneumoniae* iron uptake ABC transporter[J]. Infection and Immunity, 2002, 70(8): 4389-4398
- [18] Brown JS, Gilliland SM, Holden DW. A *Streptococcus pneumoniae* pathogenicity island encoding an ABC transporter involved in iron uptake and virulence[J]. Molecular Microbiology, 2001, 40(3): 572-585
- [19] Jomaa M, Terry S, Hale C, et al. Immunization with the iron uptake ABC transporter proteins PiaA and PiuA prevents respiratory infection with *Streptococcus pneumoniae*[J]. Vaccine, 2006, 24(24): 5133-5139
- [20] Jomaa M, Yuste J, Paton JC, et al. Antibodies to the iron uptake ABC transporter lipoproteins PiaA and PiuA promote opsonophagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*[J]. Infection and Immunity, 2005, 73(10): 6852-6859
- [21] Brown JS, Ogunniyi AD, Woodrow MC, et al. Immunization with components of two iron uptake ABC transporters protects mice against systemic *Streptococcus pneumoniae* infection[J]. Infection and Immunity, 2001, 69(11): 6702-6706
- [22] Chen YX, Zhou CZ, Shi WW. *Streptococcus pneumoniae* PiuA protein fragment and preparation method thereof. China, CN102807611(B)[P]. 2015-01-07. [https://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/biblio?CC=CN&NR=102807611B&KC=B&FT=D&ND=4&date=20150107&DB=&locale=en\\_EP](https://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/biblio?CC=CN&NR=102807611B&KC=B&FT=D&ND=4&date=20150107&DB=&locale=en_EP)
- [23] Schaible UE, Kaufmann SH. Iron and microbial infection[J]. Nature Reviews Microbiology, 2004, 2(12): 946-953
- [24] Andrews SC, Robinson AK, Rodríguez-Quinones F. Bacterial iron homeostasis[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2003, 27(2/3): 215-237
- [25] Wilks A, Burkhard KA. Heme and virulence: how bacterial pathogens regulate, transport and utilize heme[J]. Natural Product Reports, 2007, 24(3): 511-522
- [26] Haraguchi H. Metallomics as integrated biometal science[J]. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2004, 19(1): 5-14
- [27] Shi W, Chance MR. Metallomics and metalloproteomics[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2008, 65(19): 3040-3048
- [28] Ding XL, Gao HQ. Applications and experimental methods of circular dichroism spectroscopy[J]. Experimental Technology and Management, 2008, 25(10): 48-52 (in Chinese)  
丁晓岚, 高红旗. 圆二色光谱技术应用和实验方法[J]. 实验技术与管理, 2008, 25(10): 48-52
- [29] Wierzychowski KL. Photochemistry and UV spectroscopy of proteins and nucleic acids[J]. Postepy Biochemii, 2015, 61(3): 242-252
- [30] Yin YX, Xiang BQ, Tong L. The application of studying fluorescence spectroscopy on protein[J]. Experimental Technology and Management, 2010, 27(2): 33-36,40 (in Chinese)  
尹燕霞, 向本琼, 佟丽. 荧光光谱法在蛋白质研究中的应用[J]. 实验技术与管理, 2010, 27(2): 33-36,40