张露珊,董靖,周顺,等.无乳链球菌分选酶 A 的表达、纯化与活性检测[J].华中农业大学学报,2020,39(4):99-104.
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2020.04.014

无乳链球菌分选酶 A 的表达、纯化与活性检测

张露珊[1,2],董靖[2],周顺[2],刘永涛[2],胥宁[2],杨秋红[2],艾晓辉[1,2]

1.上海海洋大学水产与生命学院,上海 201306; 2.中国水产科学研究院长江水产研究所, 武汉 430223

摘要　以提取的无乳链球菌 ATCC51487 菌株全基因组为模板,通过 PCR 扩增出 $srtA_{\Delta N82}$ 基因,经 *Eco*RⅠ和 *Xho*Ⅰ 双酶切、抗性筛选等方法构建重组表达载体,测定不同诱导温度、诱导剂浓度及诱导时间对表达产物的影响,利用亲和层析和离子交换层析纯化蛋白,并使用荧光共振能量转移法测定蛋白活性。结果显示,试验构建的 pGEX-6p-1-$srtA_{\Delta N82}$ 载体转化至 BL21(DE3)后,在 37 ℃条件下经 1 mmol/L IPTG 诱导表达 6 h 后可得到大量的可溶性蛋白,且纯度大于 85%。纯化后的 $SrtA_{\Delta N82}$ 与底物作用后,可显著提高反应体系的荧光强度,表明得到的 $SrtA_{\Delta N82}$ 具有较好的生物学活性。

关键词　无乳链球菌; 分选酶 A; 催化活性; 靶标; 荧光共振能量转移; 活性检测

中图分类号　S 948　　**文献标识码**　A　　**文章编号**　1000-2421(2020)04-0099-06

近年来,我国罗非鱼养殖中无乳链球菌病频发,造成巨大的经济损失,严重制约了罗非鱼产业的健康可持续发展。为了防治该病,罗非鱼养殖过程中通常使用化学抗菌药物,但长期或过量使用导致耐药菌株的产生,给生态环境和人类健康带来了潜在的威胁[1],因此,寻求化学抗菌药物的替代品已成为大势所趋。

无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)是一种在自然界中分布广泛的革兰氏阳性菌,按血清学分类属于 B 族链球菌(group B *Streptococcus*, GBS)[2]。分选酶是一类膜结合转肽酶,广泛分布于革兰氏阳性菌中,该酶表面蛋白对细菌的生存和致病力起关键作用,如宿主细胞黏附、营养获取、免疫逃避等[3]。分选酶根据结构不同可以分为 4 种,其中分选酶 A(sortase A,SrtA)和分选酶 B 在细菌的致病方面起更为关键的作用[4]。SrtA 能够识别表面蛋白 C 端的 LPXTG 分选信号,并在 T 与 G 之间切割肽键,从而使表面蛋白被锚定到细胞壁的肽聚糖上[5]。对许多革兰氏阳性菌进行 *srtA* 基因敲除试验后发现,病原菌无法正常地将表面蛋白锚定到 *srtA* 缺失的细胞壁上,从而一定程度上降低了病原菌的致病性[5-6],表明 *srtA* 与细菌表面蛋白锚定到细胞壁密切相关[7]。因此,分选酶 A 成为抗革兰氏阳性菌感染的靶标。目前对于 SrtA 的研究大多是以金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)为模型,并进行 SrtA 抑制剂的筛选[8],而对于无乳链球菌 SrtA 的研究较少。

本研究拟构建 pGEX-6p-1-$srtA_{\Delta N82}$ 原核表达载体,优化 $srtA_{\Delta N82}$ 基因在大肠杆菌中的表达条件,通过亲和层析和离子交换得到高纯度的重组 SrtA;进一步通过荧光共振能量转移法测定其催化活性,旨在为筛选治疗无乳链球菌的药物奠定基础。

1　材料与方法

1.1　供试菌和试剂

无乳链球菌 ATCC51487(四川农业大学汪开毓教授赠送),原核表达载体 pGEX-6p-1、大肠杆菌 DH5α、BL21(DE3)、DNA 凝胶回收试剂盒、质粒小提试剂盒购自北京天根生化公司,pfu 高保真聚合酶、限制性内切酶 *Eco*RⅠ、*Xho*Ⅰ、DNA 链接酶和异丙基-β-*D*-硫代半乳糖苷(IPTG)购自 Thermo Fisher Scientific 公司,谷胱甘肽琼脂糖凝胶(Glutathione Sepharose 4B)购自 GE 公司,引物合成和 DNA 测序由武汉天一辉远公司完成。

1.2　目的基因扩增

根据 Baldeep 等[3]对 SrtA N 端的 82 个氨基酸

收稿日期: 2019-08-27
基金项目: 国家重点研发计划项目(2019YFD0900104); 国家自然科学基金项目(31702368)
张露珊,硕士研究生. 研究方向:水产药理学. E-mail: 762349157@qq.com
通信作者: 艾晓辉,研究员. 研究方向: 水产药理学. E-mail: aixh@yfi.ac.cn

进行了截短。根据NCBI中无乳链球菌2603V/R株*srtA*基因序列设计特异性引物。上游引物序列为：cggaattcTCTGCTCAAACGAAATCAC，下游引物序列为：ccgctcgagTTAAAATGCTTTTA-ATATC。为了方便连接载体，分别在上、下游引物的5'端添加*Eco*RⅠ和*Xho*Ⅰ酶切位点(下划线)。以提取的ATCC51487菌株全基因组为模板进行扩增，扩增产物经2%琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.3 重组质粒构建

纯化$srtA_{\Delta N82}$片段和提取的pGEX-6p-1质粒用*Eco*RⅠ和*Xho*Ⅰ内切酶进行酶切，然后加入DNA连接酶在23 ℃水浴中连接1 h。连接产物经过化学转化后均匀地涂布至含有氨苄青霉素(100 μg/mL)的LB琼脂平板上，在37 ℃生化培养箱中培养16～18 h。次日采用无菌牙签从平板上挑取单菌落至LB液体培养基(含氨苄青霉素)中，在37 ℃摇床中150 r/min振荡培养。培养至菌液浑浊后取1 μL为模板进行PCR鉴定，将PCR为阳性的菌液进行测序。此外，提取测序正确菌液的质粒进行双酶切鉴定。

1.4 重组蛋白表达分析

依据董靖等[9]的方法进行适当的改进，将构建的pGEX-6p-1-$srtA_{\Delta N82}$原核表达载体转化至BL21(DE3)表达菌中，从平板上挑取单菌落扩大培养，将培养至对数生长期的菌液冻存至－80 ℃冰箱备用。取100 μL菌液加入至10 mL LB液体培养基中培养，当菌液生长至吸光度($OD_{600\ nm}$)为0.6～0.8时加入IPTG，使其浓度达到1 mmol/L。继续培养6 h后高速离心(4 ℃，10 000 r/min)1 min收集菌体。收集的菌体用适量的PBS重悬后采用12% SDS-PAGE电泳分析蛋白表达情况。

1.5 可溶性表达条件分析

1)温度对蛋白表达的影响。将含有重组表达载体的BL21(DE3)表达菌株接种至LB液体培养基(含氨苄青霉素)中，在37 ℃恒温摇床中培养16～18 h，取菌液按1∶100的比例分别接种至2个装有LB培养基的三角瓶中，在37 ℃摇床中培养至$OD_{600\ nm}$＝0.8时，分别置于37 ℃和16 ℃摇床中，加入IPTG诱导剂(浓度分别为1 mmol/L和0.2 mmol/L)，分别继续培养6 h和16 h后高速离心收集菌体。重悬后的菌体加入1 mg/mL溶菌酶，4 ℃反应30 min后16 000 r/min离心10 min，分别收集反应后的上清液和未裂解的菌体沉淀，进行SDS-PAGE电泳分析。

2)诱导时间对蛋白表达的影响。将含有重组表达载体的BL21(DE3)表达菌株接种至LB液体培养基(含氨苄青霉素)中，在37 ℃恒温摇床中培养16～18 h，取1 mL培养好的菌液接种至100 mL含有Amp的LB培养基中，在摇床中培养至$OD_{600\ nm}$＝0.8时，在诱导前以及加入终浓度为1 mmol/L IPTG诱导后的不同时间(1、2、3、4、5和6 h)收集菌体进行SDS-PAGE电泳。

1.6 $SrtA_{\Delta N82}$的表达与纯化

将含有pGEX-6p-1-$srtA_{\Delta N82}$的重组菌株接种至LB液体培养基(含氨苄青霉素)中，在37 ℃恒温摇床中培养16～18 h，取10 mL培养好的菌液接种至1 L含有Amp的LB培养基中，在37 ℃、150 r/min培养至$OD_{600\ nm}$为0.8，之后加入IPTG使其终浓度为1 mmol/L，继续在摇床中培养6 h，4 ℃、10 000 r/min离心收集菌体，将收集的菌体重悬于冰冷的PBS溶液中。

重悬的菌体置于冰上采用超声破碎仪裂解，4 ℃、16 000 r/min离心45 min后收集上清液置于层析柜中备用。将收集的上清通过填有Glutathione Sepharose™4B柱料的重力柱，重复过柱3～5次，用300 mL抽滤的PBS对非特异性结合上的杂蛋白进行洗脱，期间不时地重悬柱料，通过亲和层析对目的蛋白进行初次纯化。洗杂结束后的重力柱加1 mg/mL PreScission在4 ℃酶切过夜。次日，用抽滤的PBS洗脱目的蛋白，用考马斯亮蓝G-250检测目的蛋白是否洗脱结束。采用超滤管将目的蛋白中的PBS替换为离子交换A液(25 mmol/L Tris，pH 7.9)；进一步将浓缩后的目的蛋白过HiTrap柱，用离子交换B液(25 mmol/L Tris，500 mmol/L NaCl，pH 7.9)洗脱，收集含有$SrtA_{\Delta N82}$的组分，进行SDS-PAGE电泳分析。合并纯度较高的目的蛋白组分，通过超滤将缓冲液更换为另一缓冲液(50 mmol/L Tris，5 mmol/L $CaCl_2$，150 mmol/L NaCl，pH 7.5)。纯化后的蛋白于－80 ℃保存。

用在酶切之前得到的重组蛋白于12% SDS-PAGE电泳进行分析，将电泳胶内的蛋白经湿转法转移至PVDF膜。湿转后的膜放入5%脱脂奶粉中37 ℃封闭2 h，洗膜，膜与鼠抗GST单克隆抗体(1∶1 000)室温孵育1 h，洗膜后与辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠Ig G(1∶1 000)室温孵育1 h，TBST洗膜，用ECL试剂发光后在暗室中显影。

1.7　能量转移共振法测定 $SrtA_{\Delta N82}$ 活性

酶活反应在黑色不透光 96 孔板中进行，反应体系为 300 μL，其中包含 5 μmol/L 的 $SrtA_{\Delta N82}$，终浓度为 20 μmol/L 的荧光底物（Dabcyl-QALPET-GEE-Edans），避光放入 37 ℃恒温培养箱中，孵育 1 h，避光取出，使用酶标仪测定荧光值的变化，设定激发波长为 350 nm，记录波长为 520 nm。设置 $SrtA_{\Delta N82}$ 缓冲液作为阴性对照，每组待测样品重复 3 次。通过荧光值的变化分析 $SrtA_{\Delta N82}$ 的活性。

2　结果与分析

2.1　pGEX-6p-1-$srtA_{\Delta N82}$ 重组表达载体的构建

图 1 为扩增所得到的 $srtA_{\Delta N82}$ 的 DNA 片段，在 474 bp 附近有特异性扩增条带，与预期大小一致。将连接产物转化至大肠杆菌 DH5α 后，从 LB 平板上随即挑取的 5 个单菌落经菌液 PCR 鉴定后发现其中 1 号、3 号、4 号、5 号 4 个样品含有目的基因，2 号样品不含目的基因，为空载体，如图 2 所示。对 PCR 鉴定为阳性的菌液进行了质粒提取和双酶切鉴定，结果如图 3 所示，阳性质粒双酶切后在 5 kb 左右和 0.5 kb 左右处分别有质粒（pGEX-6p-1）和 $srtA_{\Delta N82}$ 条带。

M：DNA marker（DL 2000）；1，2：分选酶 A 基因 $srtA_{\Delta N82}$.

图 1　分选酶 A $srtA_{\Delta N82}$ 扩增电泳图

Fig.1　Electrophoresis pattern of $srtA_{\Delta N82}$

M：DNA marker；1-5：不同单菌落 Different colonies.

图 2　菌液 PCR 扩增电泳图

Fig.3　Electrophoresis pattern of colony PCR

2.2　$SrtA_{\Delta N82}$ 的表达与条件优化

为分析 $srtA_{\Delta N82}$ 基因在大肠杆菌 BL21（DE3）菌株中是否表达，通过蛋白电泳分析了加入 IPTG（1 mmol/L）诱导前后的菌体总蛋白。如图 4 所示，经 IPTG 诱导后的大肠杆菌在分子质量约为 42 ku 处有明显的条带，而诱导前的菌体在该位置有微弱的表达条带，且该条带的分子质量与 GST-$SrtA_{\Delta N82}$ 融合蛋白的理论分子质量 42 ku 一致。以上结果表明，本试验构建的 pGEX-6p-1-$srtA_{\Delta N82}$ 原核表达载体在大肠杆菌 BL21（DE3）中能够表达。

M：DNA marker（DL 2000）；1：质粒双酶切 Double digestion of the plasmid.

图 3　重组载体双酶切电泳图

Fig.3　Electrophoresis pattern of the recombinant plasmid after double digestion

M：蛋白质分子质量标准 Protein marker；1：诱导前 Before induction；2：37 ℃诱导 6 h Induced at 37 ℃ for 6 h.

图 4　$SrtA_{\Delta N82}$ 预表达 SDS - PAGE 电泳图

Fig.4　Electrophoresis pattern of $SrtA_{\Delta N82}$ expression

为了获得 $SrtA_{\Delta N82}$ 的可溶性表达，试验分析了 37 ℃和 16 ℃ 2 个温度下的表达形式。如图 5 所示，16 ℃和 37 ℃条件下细菌裂解液上清中均有目的蛋白，表明该 2 种不同温度下 $SrtA_{\Delta N82}$ 均能可溶性表达，且在 37 ℃条件下表达量较高。此外，通过对诱导时间的分析发现，加入 IPTG 后继续诱导 6 h 可以得到最大表达量（图 6）。因此，本试验确定的诱导表达温度为 37 ℃，诱导剂 IPTG 浓度为 1 mmol/L，诱导时间 6 h。

通过 Western-blot 试验确定表达蛋白的正确性，结果如图 7 所示，在分子质量 42 ku 处出现了清晰的条带，证明目的蛋白在大肠杆菌中获得了大量的表达。

M:蛋白质分子质量标准 Protein marker;1:16 ℃菌体裂解沉淀 Bacterial lysis precipitation,16 ℃;2:16 ℃菌体裂解上清 Bacterial lysis supernatant,16 ℃;3:37 ℃菌体裂解沉淀 Bacterial lysis precipitation,37 ℃;4:37 ℃菌体裂解上清 Bacterial lysis supernatant,37 ℃.

图5 2种温度条件下的表达形式SDS-PAGE电泳图

Fig.5 Expression form analysis in two temperatures

M:蛋白质分子质量标准 Protein marker;0:诱导前 Before induction;1-6分别为诱导后1、2、3、4、5、6 h。0 1,2,3,4,5,6 h respectively after induction.

图6 诱导时间对表达量影响的SDS-PAGE电泳图

Fig.6 Impact of time on the level of target protein after IPTG induction

图7 重组蛋白的Western-blot

Fig.7 Western-blot analysis of recombinant protein

2.3 蛋白纯化

按本文"2.2"中确定的表达条件进行大量诱导表达,将得到的菌体裂解液进行亲和层析,目的蛋白被初步纯化并去掉了N端融合的GST标签;进一步采用HiTrap Q阴离子交换柱进行离子交换层析,经过梯度洗脱后得到纯度较高的$SrtA_{\Delta N82}$(图8)。纯化后的$SrtA_{\Delta N82}$经BandScan (Glyko)软件计算其纯度大于85%。

M:Marker;1:$SrtA_{\Delta N82}$.

图8 纯化后的蛋白电泳图

Fig.8 Electrophoresis pattern of SrtA after purification

2.4 重组$SrtA_{\Delta N82}$的催化活性

通过能量转移共振试验发现,纯化的$SrtA_{\Delta N82}$与荧光底物在37 ℃孵育1 h之后,其荧光强度极显著($P<0.01$)高于阴性对照组,分别为1 821.667±292.740和877.00±72.45,表明纯化后的分选酶具有良好的生物活性。

3 讨 论

SrtA是在革兰氏阳性菌致病过程中起着关键作用的一类酶,一些毒力因子通过SrtA催化的转肽反应附着在细胞壁上[10]。SrtA的N端含有跨膜区,是含有N端信号肽的膜蛋白,因此,全长SrtA难以纯化而且性质不稳定[11]。朱芳等[12]构建的金黄色葡萄球菌SrtA重组表达载体pET32a-*srtA*,分别将N端24和59个氨基酸截短,得到的目的蛋白大部分是可溶性表达。本试验为了提高SrtA的表达效率,稳定重组蛋白的性质,参考Baldeep等[3]的方法对SrtA N端前82个氨基酸进行了截短,重组蛋白也获得了可溶性表达。

有研究发现培养温度、诱导剂浓度和培养时间是影响重组蛋白的表达量和表达形式的重要因素[13]。邱家章[14]采用与本文相同的载体构建了金黄色葡萄球菌α-溶血素的原核表达载体,表达时发现温度为37 ℃时重组蛋白主要以包涵体形式存在,而温度为16 ℃时重组蛋白则主要以可溶形式存在。董亚青[15]构建的猪链球菌2型05ZYH33菌株的pGEX-4T-2-*srtA*表达载体也含有GST标签,但经过表达后发现SrtA主要以包涵体形式存在,跨膜区截短后的SrtA以可溶形式存在。闵迅[16]构建的肺炎链球菌NCTC7466(D39)菌株的SrtA-pET32a(+)-BL21(DE3)表达载体,当IPTG浓度为0.3 mmol/L、温度为22 ℃时,SrtA主要以可溶形式出

现在菌体裂解上清中。以上结果提示不同细菌的 SrtA 重组表达时其出现可溶性蛋白的温度也不尽相同。因此，为了提高 SrtA 的可溶性，方便纯化，本试验使用带有 tac 启动子且含有 GST 标签的 pGEX 系列载体，研究了 IPTG 浓度和温度对 SrtA 表达形式的影响。结果发现，不同诱导温度和诱导剂浓度 $SrtA_{\Delta N82}$ 融合蛋白均以可溶形式存在，表明不同温度对 $SrtA_{\Delta N82}$ 的可溶性表达没有影响。此外，吴琳[17]在研究诱导时间对 SrtA 蛋白表达量的影响时，发现在 37 ℃、6 h 蛋白表达量最大，与本文结果一致。

为了得到较纯的目的蛋白，一般采用超滤、沉淀、层析等方法对得到的蛋白进行分离纯化。邓思[18]采用谷胱甘肽琼脂糖凝胶柱进行亲和层析，获得了高纯度的蛋白，但该方法使用时比较繁琐，需要控制流速、样品浓度及 pH 等多个因素，任何环节操作不当，都会降低蛋白纯度。秦宗华等[19]利用强阴离子交换层析法、凝胶过滤层析法和 Sephadex G-75 分子排阻层析法得到了较高的白蛋白纯度。但单独使用凝胶过滤耗费较大，需要与其他方法联用，才能发挥最大的效果[20]。本试验采用亲和层析和离子交换层析相结合的方法来纯化目的蛋白，首先利用 GST 标签进行初步的亲和层析纯化，切除标签后根据目的蛋白等电点通过离子交换层析的方法进行精细纯化。两种方法结合尽管延长了操作时间，但可以有效提高目的蛋白纯度。

能量转移共振是目前测定 SrtA 活性普遍采用的方法。罗立新等[21]采用 GS115/pKFS-QAL-PETGEE-linker-EGFP 底物测定金黄色葡萄球菌 SrtA 活性，发现荧光强度较阴性对照增加了 84.1。而本试验中以合成的 Dabcyl-QALPETGEE-Edans 作为底物，加入 $SrtA_{\Delta N82}$ 后其荧光强度提高了 944，与阴性对照组差异极显著。表明本试验表达和纯化的 $SrtA_{\Delta N82}$ 具有良好的生物学活性，可以作为靶标筛选 SrtA 活性抑制剂。

参考文献 References

[1] 李焯新，蔡小辉，黄瑜，等. 中草药与抗生素联用对罗非鱼源无乳链球菌的体外抑菌作用[J]. 广东海洋大学学报，2016，36(4)：45-49. LI Z X，CAI X H，HUANG Y，et al. Antibacterial effect *in vitro* on *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia with combination of Chinese herbs and antibiotics[J]. Journal of Guangdong Ocean University，2016，36(4)：45-49 (in Chinese with English abstract).

[2] 汪开毓，付希，肖丹，等. 罗非鱼源无乳链球菌 *cpsE* 基因的克隆和分子特性分析[J]. 水产学报，2011，35(5)：660-667. WANG K Y，FU X，XIAO D，et al. Cloning and molecular characterization of *cpsE* gene of tilapia *Streptococcus agalactiae*[J]. Journal of fisheries of China，2011，35(5)：660-667 (in Chinese with English abstract).

[3] BALDEEP K，ALEXANDRA S，KRISHNAN V，et al. Preliminary crystallographic study of the *Streptococcus agalactiae* sortases，sortase A and sortase C1[J]. Acta crystallographica section F，2010，66(9)：1096-1100.

[4] 罗立新，江彬强，陈谋通. 新抗菌靶点分选酶基因(srtA)在两种原核载体中的克隆表达[J]. 微生物学报，2009(2)：186-190. LUO L X，JIANG B Q，CHEN M T. Cloning and expression of the novel antimicrobial target enzyme sortase gene in to prokaryotic vectors[J]. Acta microbiologica sinica，2009(2)：186-190 (in Chinese with English abstract).

[5] LALIOUI L，PELLEGRINI E，DRAMSI S，et al. The SrtA sortase of *Streptococcus agalactiae* is required for cell wall anchoring of proteins containing the LPXTG motif，for adhesion to epithelial cells，and for colonization of the mouse intestine [J]. Infection and immunity，2005，73(6)：3342-3350.

[6] 杨应红，罗有福，李子成. 抗耐药金黄色葡萄球菌新药的研究进展[J]. 华西药学杂志，2010，25(4)：494-496. YANG Y H，LUO Y F，LI Z C. Research progress of new drug resistance to*Staphylococcus aureus*[J]. West China journal of pharmaceutical sciences，2010，25(4)：494-496 (in Chinese).

[7] ILANGOVAN U，TON-THAT H，IWAHARA J，et al. Structure of sortase，the transpeptidase that anchors proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*[J]. Proceedings of the national academy of sciences，2001，98(11)：6056-6061.

[8] 张冰. 查尔酮抗金黄色葡萄球菌分选酶 A 和 α-溶血素的作用研究[D]. 长春：吉林大学，2018. ZHANG B. Chalcone attenuates *Staphylococcus aureus* virulence by targeting sortase A and alpha-hemolysin[D]. Changchun：Jilin University，2018 (in Chinese with English abstract).

[9] 董靖，刘永涛，胥宁，等. 嗜水气单胞菌气溶素的表达纯化和活性实验[J]. 中国渔业质量与标准，2019，9(1)：29-35. DONG J，LIU Y T，XU N，et al. Expression，purification and characterization of aerolysin from *Aeromonas hydrophila*[J]. Chinese fishery quality and standards，2019，9(1)：29-35 (in Chinese with English abstract).

[10] NOBBS A H，LAMONT R J，JENKINSON H F. *Streptococcus* adherence and colonization[J]. Microbiology and molecular biology reviews：MMBR，2009，73(3)：407-450.

[11] LU C，ZHU J，WANG Y，et al. *Staphylococcus aureus* sortase A exists as a dimeric protein *in vitro*[J]. Biochemistry，2007，46(32)：9346-9354.

[12] 朱芳，邓思，罗立新. 分选酶 A 在 pET32a (+)原核表达载体中的表达和鉴定[J]. 生物技术通报，2011(6)：218-222. ZHU F，DENG S，LUO L X. Expression and identification of sortase A in pET32a (+) expression vector[J]. Biotechnology bulletin，2011(6)：218-222(in Chinese with English abstract).

[13] 刘晓娟，张力青，李健，等. γ-突触核蛋白的克隆、表达及纯化[J]. 首都医科大学学报，2011，32(2)：254-258. LIU X J，

ZHANG L Q, LI J, et al. Cloning, expression and purification of human synuclein gamma[J]. Journal of Capital Medical University, 2001, 32(2): 254-258(in Chinese with English abstract).

[14] 邱家章. 黄芩苷抗金黄色葡萄球菌α-溶血素作用靶位的确证[D].长春:吉林大学,2012.QIU J Z. The target confirmation of baicalin against *Staphylococcus aureus* α-hemolysin [D]. Changchun: Jilin University, 2012(in Chinese with English abstract).

[15] 董亚青. 猪链球菌2型强毒株 *srtA* 基因缺失株的构建及其毒力分析[D].南京:南京农业大学,2007.DONG Y Q. Construction of *SrtA* gene knock-out mutant of *Streptococcus suis* type2 and analysis of its virulence[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2007 (in Chinese with English abstract).

[16] 闵迅. 肺炎链球菌Gts、PotD及SrtA蛋白联合免疫对其感染的保护作用及肺炎链球菌外膜蛋白SPD1741和SPD0280的初步晶体学研究[D].重庆:重庆医科大学,2012.MIN X. Protection against pneumococcal infection elicited by immunization with glutamyl trna synthetase, polyamine transport protein D and sortase A[D]. Chongqing: Chongqing Medical University, 2012(in Chinese with English abstract).

[17] 吴琳. 抗感染新靶点分选酶A的酵母展示系统的构建研究[D].广州:华南理工大学,2010.WU L. Construction of yeast displaying system of novel anti-infective target sortase A[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2010 (in Chinese with English abstract).

[18] 邓思. GST-SrtA融合蛋白在大肠杆菌中的表达、纯化及活性测定[D].广州:华南理工大学,2012.DENG S. Expression, purification and characterization of GST-SrtA fusion protein in *Escherichia coli* [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2012(in Chinese with English abstract).

[19] 秦宗华,陈婷,李任强. 强阴离子交换色谱结合分子排阻色谱纯化血清中免疫球蛋白和白蛋白[J].色谱,2012,30(8):851-855. QING Z H, CHEN T, LI R Q. Purification of immunoglobulin and serum albumin from serum via strong anion exchange chromatography coupled with molecular exclusion chromatography[J]. Chinese journal of chromatography, 2012, 30(8): 851-855(in Chinese with English abstract).

[20] 王超,薛勇,刘鑫,等. 天然藻胆蛋白纯化技术研究进展[J]. 食品工业科技,2011,32(4):445-448.WANG C, XUE Y, LIU X, et al. Review on purification technology of natural phycobiliprotein[J]. Science and technology of food industry, 2011, 32(4): 445-448 (in Chinese with English abstract).

[21] 罗立新,吴琳,林影. 酵母表面展示分选酶底物用于分选酶活性检测[J]. 微生物学报,2009,49(11):1534-1539.LUO L X, WU L, LIN Y. Studies on the sortase activity assay via display its substrates on yeast surface[J]. Acta microbiologica sinica, 2009, 49(11): 1534-1539 (in Chinese with English abstract).

Expression, purification and characteristics of sortase A from *Streptococcus agalactiae*

ZHANG Lushan[1,2], DONG Jing[2], ZHOU Shun[2], LIU Yongtao[2], XU Ning[2], YANG Qiuhong[2], AI Xiaohui[1,2]

1. *College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai* 201306, *China*;
2. *Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan* 430223, *China*

Abstract Recombinant expression vector of the *Streptococcus agalactiae* ATCC51487 gene was established by using PCR amplification, double digestion of *Eco*RⅠ and *Xho*Ⅰ, and resistance screening, etc. Effects of induction temperature, concentration and time on the expression products were examined. The protein was purified by affinity chromatography and ion exchange chromatography, and the activity of SrtA was determined using energy transfer resonance. The results showed that after the $srtA_{\Delta N82}$- pGEX - 6p - 1 vector was transformed into BL21 (DE3), a large amount of soluble protein were obtained by inducing at 1 mmol/L IPTG at 37 ℃ for 6 h. The purity of SrtA was higher than 85%. Moreover, the purified SrtA could significantly increase the fluorescence intensity when co-incubated with the substrate, indicating that the recombinant SrtA had good biological activity.

Keywords *Streptococcus agalactiae*; sortase A; catalyze activity; target; fluorescence resonance energy transfer(FRET); active detection

(责任编辑:边书京)