

红球菌 R04 气囊蛋白 GvpA 与 GvpJ 表达与定位的初步研究^{*}

白兴华, 杨秀清[△], 王 洋, 席婧雯(山西大学生物技术研究所 030006)

【摘要】 目的 探讨红球菌 R04 气囊蛋白 GvpA 与 GvpJ 表达与定位的初步研究。**方法** 通过气囊结构蛋白 GvpA 与 GvpJ 基因的克隆和鉴定, 分析蛋白的诱导表达, 以及荧光显微镜观察。**结果** 由于蛋白质构成的气囊结构广泛存在于自然界许多微生物中, 其内充满气体, 为水生微生物提供浮力。基因组测序发现土壤微生物红球菌 *Rhodococcus* sp. R04 中也存在气囊蛋白基因簇。经比对推测, 在红球菌中 GvpA 是构成气囊的主要结构蛋白, GvpJ 与 GvpA 同源性很高, 推测其参与气囊帽子结构的形成。**结论** 本实验克隆并表达了红球菌 R04 气囊蛋白 GvpA 和 GvpJ, 并对其蛋白定位进行了分析, 该研究为阐明 R04 气囊蛋白的生理功能提供了基础。

【关键词】 气囊; GvpA; GvpJ; 表达; 定位

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2014.21.003 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2014)21-2950-03

Expression and localization of gas vesicle protein GvpA and GvpJ in *Rhodococcus* sp. R04^{*} BAI Xing-hua, YANG Xiu-qing, WANG Yang, XI Jing-wen (Biotechnology Research Institute of Shanxi University, Taiyuan, Shanxi 030006, China)

【Abstract】 Objective To conduct a preliminary study on the expression and location of airbag protein GvpA and GvpJ in *Rhodococcus* sp. R04. **Methods** Through the airbag structure protein GvpA and GvpJ gene cloning and identification, the protein induced expression was analyzed and fluorescence microscope observation was performed. **Results** Due to the airbag structure of the protein components widely exists in many microorganisms in nature, which is full of gas, provide buoyancy to aquatic organisms. The genome sequencing found that the airbag protein gene cluster also exists in soil microbial *Rhodococcus* sp. R04. By comparing speculation, GvpA in *Rhodococcus* sp. R04 is the main structural protein constituting airbags, GvpJ and GvpA have very high homology, speculating that GvpJ and GvpA participate in the formation of airbag cap structure. **Conclusion** This experiment clones and expresses the GvpA and GvpJ R04 airbag protein of *Rhodococcus* sp R04, and its protein localization is analyzed, the research provides the basis for elucidating the physiological function of R04 airbag protein.

【Key words】 air bags; GvpA; GvpJ; express; positioning

德国微生物学家 Klebahn 首次在蓝藻细胞中发现了一种具有折光性的亚细胞结构, 称为伪空胞^[1-2]。其内含有气体, 为细胞提供浮力。在光学显微镜下发现, 当有压力存在的条件下, 伪空胞会消失, 通过这种方法可以把伪空胞和其他细胞组成结构区分开来。随后在其他的浮游细菌中也发现了类似的结构特征^[3], 命名为气囊, 大量充满气体的气囊结构堆积在一起形成囊泡, 从而为细胞提供浮力。气囊蛋白 GvpA 是形成气囊的主要骨架蛋白, 单体一个紧挨着一个逐渐形成厚约 2 nm, 长为 0.2~1.5 μm 的囊状结构, 气囊蛋白 GvpC 紧紧附着于此囊泡结构外围, 起着加强固定的作用^[4]。在 Pfeifer^[5]的报道中介绍了嗜盐细菌、微胞藻属、芽孢杆菌以及链霉菌属等的气囊蛋白基因簇。

本实验室对红球菌 *Rhodococcus* sp. R04 基因组测序后也发现其存在气囊蛋白基因簇, 经 Blast 比对后, 其序列与 *Rhodococcus pyridinivorans* AK37 的相似性高达 98%, 此基因簇包括 8 个基因, 分别为 GvpK、GvpS、GvpL、GvpJ、GvpO、GvpF、GvpG 及 GvpA。其中 GvpA 为主要结构蛋白基因; GvpJ 和 GvpS 与 GvpA 同源性很高, 推测为参与气囊帽子结构的组成; GvpO、GvpK 和 GvpG 推测为伴侣蛋白基因, 参与气囊的装配; GvpL 和 GvpF 功能不详。在 Offner^[6]的报道中, 通过

对气囊蛋白基因进行突变, 发现气囊蛋白除控制气囊形状外, 还影响菌株色泽与浑浊度。红球菌 R04 是土壤微生物, 不需要气囊结构来提供浮力, 因此, 推测其气囊蛋白存在其他生理功能。本文对红球菌 R04 气囊结构蛋白 GvpA 及 GvpJ 在大肠杆菌中初步进行表达及定位研究, 为下一步研究气囊蛋白生理功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 菌株 *Rhodococcus* sp. R04, *E. coli* DH5a, *E. coli* BL21 由本实验室保存。

1.1.2 质粒 重组质粒 pETm3c, pEGFP 由本实验室保存。

1.1.3 培养基 蛋白胨 10 g/L, 酵母粉 5 g/L, NaCl 5 g/L。氨苄青霉素的使用终浓度为 50 mg/L。

1.1.4 试剂与仪器 限制性内切酶、质粒提取试剂盒及胶回收试剂盒购自上海生工科技有限公司; FastPfu DNA Polymerase 购自北京全式金生物技术有限公司; 酵母提取物, 胰蛋白胨购自 Oxoid 公司; 氨苄青霉素为美国 Sigma-Aldrich 公司的产品; 蛋白质相对分子质量标准及 T4DNAligase 购自 Fermentas 公司; JY-II 超声波细胞粉碎机购自宁波新芝科器研究所; Delta Vision Deconvolution microscope 购自美国 Delta Vision 公司。

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(3080030)。

作者简介: 白兴华, 女, 研究生, 主要从事生物化学与分子生物学研究。 [△] 通讯作者, E-mail: xqyang@sxu.edu.cn。

1.2 气囊结构蛋白 GvpA 与 GvpJ 基因的克隆和鉴定

1.2.1 引物设计 根据红球菌 R04 气囊结构蛋白 GvpA 与 GvpJ 的基因序列,绿色荧光标签蛋白 GFP 基因序列,用 Primer 5.0 软件设计引物。上游引物 F1:5'-TAG AAT TCA TGG CCC GTC CCA ACT CGT CCG-3'(EcoR I);下游引物 R1:5'-TAA AGC TTG TCC TCA CCC CTG CGT GAT CGT CG-3'(Hind III)。上游引物 F2:5'-TAG AAT TCA TGA CGG TGG TCG GTG GGG GAG GCG-3'(EcoR I);下游引物 R2:5'-TAA AGC TTG TCA CGG TTC TCC TCG TCC ACG ATC-3'(Hind III)。上游引物 F3:5'-TAG AAT TCA TGA GTA AAG GAG AAG AAC-3'(EcoR I);下游引物 R3:5'-TAA AGC TTT TAT TTG TAT AGT TCA TCC-3'(Hind III)。上游引物 F4:5'-TAG GAT CCA TGA GTA AAG GAG AAG AAC-3'(BamH I);下游引物 R4:5'-TAG AAT TCT TAT TTG TAT AGT TCA TCC-3'(EcoR I)引物由上海生工科技有限公司合成。

1.2.2 聚合酶链反应(PCR)扩增 提取红球菌 R04 的基因组和质粒 pEGFP,作为 PCR 模板扩增气囊蛋白和绿色荧光蛋白基因。PCR 反应条件:94 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 60 s,30 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。获得 GvpA、GvpJ、GFP 基因 PCR 产物。

1.2.3 重组表达质粒的构建及鉴定 用 EcoR I 和 Hind III 对 pETm3c 进行双酶切,回收后与经同样酶切回收的 GvpA、GvpJ 及 GFP 基因在 T4 DNA 连接酶作用下 16 ℃ 连接过夜,转化 E. coli DH5a 感受态细胞,筛选、鉴定得到阳性重组质粒命名为 pETm3c-GvpA、pETm3c-GvpJ、pETm3c-GFP。再用 BamH I 和 EcoR I 对 pETm3c-GvpA 和 pETm3c-GvpJ 及 GFP 基因片段进行双酶切后连接转化,筛选、鉴定得到阳性重组质粒命名为 pETm3c-GFP-GvpA 和 pETm3c-GFP-GvpJ。由深圳华大生物技术有限公司测序。

1.3 蛋白的诱导表达 鉴定和测序分析正确后,将抽提的重组质粒转化感受态细胞 BL21,挑取阳性菌落接种于 5 mL 含氨苄的 LB 中,37 ℃ 200 r/min 摇床培养至 OD600 值为 0.6,加入异丙基硫代半乳糖(IPTG)使其终浓度为 1 mmol/L,继续诱导 5 h,收集菌体超声后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测,同时设立未诱导表达对照。

1.4 荧光显微镜观察 上述菌株经 IPTG 诱导培养 5 h 后,将菌液稀释至 OD600 约为 0.035,取 20 μL 滴于盖玻片中央,盖好盖玻片,于 100 倍油镜观察,激发光波长为 488 nm。

2 结 果

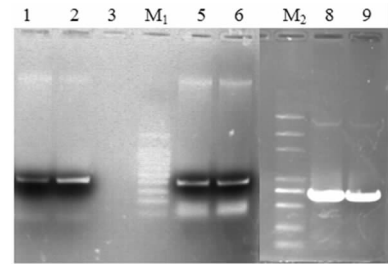
2.1 气囊结构蛋白 GvpA、GvpJ 及绿色荧光蛋白的表达

2.1.1 气囊结构蛋白 GvpA、GvpJ 及绿色荧光蛋白基因的 PCR 扩增 以抽提的红球菌 R04 基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,结果获得了 GvpA、GvpJ 及 GFP 基因特异性扩增条带,大小分别约为 363、393、711 bp(图 1)。

2.1.2 重组子的 PCR 筛选 将连接转化的菌株备份后放于装有 30 μL 超纯水,煮沸 5 min 作为菌液 PCR 的模板,以 pETm3c 治理为模板做阴性对照。通用引物阴性对照扩增片段约为 300 bp。阳性克隆片段分别为 663、693、1 010 bp(图 2)。将获得的阳性克隆菌株经深圳华大有限公司测序后序列正确(结果未显示)。

2.1.3 目的蛋白的表达 将上述经测序后获得的阳性克隆重组质粒转入 E. coli BL21 感受态细胞,接种于 5 mL LB 试管培养基,经 IPTG 诱导表达后收集菌体超声破碎,进行 15% SDS-

PAGE 检测,见图 3。其中 2 号泳道为气囊蛋白 GvpJ 的表达条带,为单体形式;泳道 3 为气囊蛋白 GvpA 的表达条带,既存在单体形式,也存在多聚体;泳道 4 为绿色荧光蛋白 GFP 的表达条带,其相对分子质量为 32.67×10^3 。



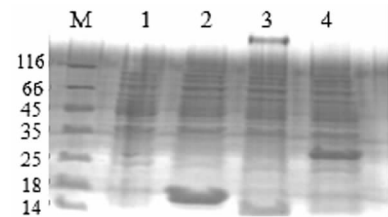
注:1、2 为 GvpJ 扩增结果;5、6 为 GvpA 基因 PCR 扩增结果;8、9 为 GFP 基因的扩增结果;M1 为 100 bp DNA Marker(相对分子质量为 100、200、300、400、500、600、700、800、900、1 000 和 1 500 bp);M2 为 D2000plus DNA Marker(相对分子质量为 100、250、500、750、1 000、2 000、3 000 和 5 000 bp)。

图 1 GvpA、GvpJ 和 GFP 基因的 PCR 扩增结果



注:1~3 为 pETm3c-GvpJ 阳性扩增结果;5~7 为 pETm3c-GvpA 阳性扩增结果;8、11 为 pETm3c-GFP 阳性扩增结果;4 和 12 为阴性对照;M 为 D2000plus DNA Marker。

图 2 菌液 PCR 扩增筛选结果



注:1 为未诱导表达对照;2 为 pETm3c-GvpJ 诱导表达;3 为 pETm3c-GvpA 诱导表达;4 为 pETm3c-GFP 诱导表达;M 为低相对分子质量蛋白标准。

图 3 表达蛋白的 SDS-PAGE 分析

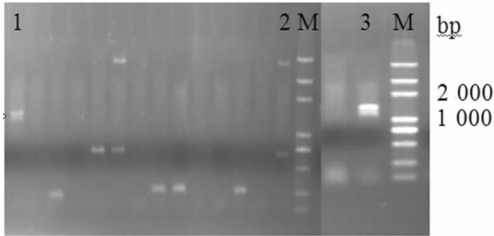
2.2 气囊结构蛋白的定位

2.2.1 融合表达重组质粒的构建与筛选 用 BamH I 和 EcoR I 对 pETm3c-GvpA 和 pETm3c-GvpJ 及 GFP 基因片段进行双酶切后连接转化,通过菌液 PCR 筛选阳性克隆重组质粒,见图 4。经测序 1 和 3 号均为正确阳性克隆重组菌株。

2.2.2 重组质粒的表达鉴定 将上述经测序后获得的阳性克隆重组质粒转入到 E. coli BL21 感受态细胞,接种于 5 mL LB 试管培养基,经 IPTG 诱导表达后收集菌体超声破碎,进行 15% SDS-PAGE 检测显示均正常表达,见图 5。其中泳道 2 为气囊蛋白 GvpJ 的表达条带,泳道 3 为气囊蛋白 GvpJ 与绿色荧光蛋白 GFP 融合表达条带;泳道 4 为气囊蛋白 GvpA 的表达条带,主要以多聚体形式存在,泳道 5 为气囊蛋白 GvpA 与绿色荧光蛋白 GFP 融合表达条带;泳道 6 为绿色荧光蛋白单独表达条带。由图 5 可以说明气囊蛋白 GvpA、GvpJ 与绿色荧

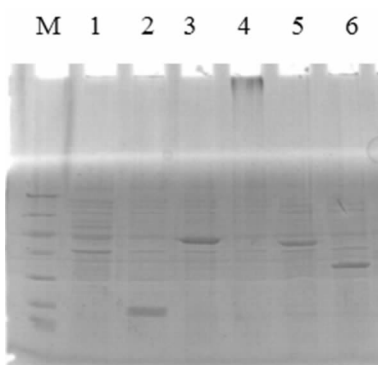
光蛋白融合表达成功。

2.2.3 荧光显微镜观察 用 5 mL LB 试管培养菌株 BL21 + pETm3c-GFP、BL21 + pETm3c-GFP-GvpJ 及 BL21 + pETm3c-GFP-GvpA。经 IPTG 诱导培养 5 h 后,将菌液稀释至 OD₆₀₀ 约为 0.035,取 20 μ L 滴于盖玻片中央,盖好盖玻片,于 100 倍荧光显微镜观察,绿色荧光蛋白为可溶性蛋白,分布于整个细胞中,而气囊蛋白 GvpA 与 GvpJ 均分布于细胞的两端。



注:1 为 pETm3c-GFP-GvpJ 阳性扩增结果;2 为 pETm3c-GvpJ 阴性对照;3 为 pETm3c-GFP-GvpA 阳性扩增结果;M 为 D2000plus DNA Marker。

图 4 融合表达重组质粒菌液 PCR 筛选结果



注:M 为低相对分子质量蛋白标准(同图 3);1 为未诱导对照;2 为 pETm3c-GvpJ 诱导表达;3 为 pETm3c-GFP-GvpJ 诱导表达;4 为 pETm3c-GvpA 诱导表达;5 为 pETm3c-GFP-GvpA 诱导表达;6 为 pETm3c-GFP 诱导表达。

图 5 表达蛋白的 SDS-PAGE 分析

3 结 论

本实验首次在设计扩增气囊蛋白基因所需的引物时以起始密码子 ATG 开始,结果表达载体构建好后却没有正常表达(结果为显示)。经分析重新设计扩增引物时添加了核糖体结合位点的序列,而核糖体结合位点是起始密码子前连续的 5~7 个 GA 序列,因此引物易形成二聚体,同时 GC 含量增大,所需退火温度升高,因此对于 GvpA 及 GvpJ 的扩增虽然特异性强,但扩增浓度偏小(图 1)。经 SDS-PAGE 电泳分析,气囊蛋白 GvpA(13.4×10^3)及 GvpJ(14.4×10^3)表达,而图 3 所示, GvpA 与 GvpJ 的条带均大于实际值,是因为基因构建到 pETm3c 载体上后表达所用启动子为载体的启动子,在其本身的起始密码子与载体启动子间仍有约 60 bp 的碱基序列同时表达,因此真实表达的蛋白序列偏大。图 3 中泳道 3 为 GvpA 的表达情况, GvpA 为气囊形成的主要结构蛋白^[7-10],其以单体紧紧靠近逐渐形成气囊结构^[11],图中显示 GvpA 表达后既有单体形式,又存在多聚体形式。

经过诱导及 SDS-PAGE 电泳分析,图 5 显示融合蛋白 GvpA-GFP 和 GvpJ-GFP 均表达正常。通过荧光显微镜观察发现气囊蛋白 GvpA 与 GvpJ 均分布于大肠杆菌细胞的两端,或者细胞分裂时中间隔膜附近。有报道中提到的气囊蛋白功能是

形成气囊结构,从而为水生微生物提供浮力而调节其在深水中的深度。而近些年通过基因组测序等,科学家们发现在许多土壤微生物中也存在气囊蛋白的基因序列^[12],因此科学家们推测气囊蛋白可能还存在其他生理功能。本实验对气囊主要结构蛋白进行表达及定位观察,为下一步探究气囊蛋白生理功能提供参考数据。

参考文献

- [1] Dassarma S, Karan R, Priya D, et al. Folasade ekulona and barbara smith. an improved genetic system for bioengineering buoyant gas vesicle nanoparticles from haloarchaea[J]. BMC Biotechnol, 2013, 19(13): 112-113.
- [2] Miklaszewska M, Waleron M, Morin N, et al. 2012 Elucidation of the gas vesicle gene clusters in cyanobacteria of the genus *Arthrospira* (Oscillatoriales, Cyanophyta) and correlation with ITS phylogeny[J]. Eur J Phycol, 2012, 186(11): 9-11.
- [3] Walsby AE, Dunton PG. Gas vesicles in actinomycetes[J]. TRENDS Microbiol, 2006, 14(3): 99-100.
- [4] Daviso E, Belenky M, Griffin RG, et al. Gas vesicles across kingdoms; a comparative solid-state nuclear magnetic resonance study[J]. J Mol Microbiol Biotechnol, 2013, 23(4/5): 281-289.
- [5] Pfeifer F. Distribution, formation and regulation of gas vesicles[J]. Nat Rev Microbiol, 2012, 10(10): 705-715.
- [6] Offner S, Hofacker A, Wanner G, et al. Eight of fourteen gvp genes are sufficient for formation of gas vesicles in halophilic archaea[J]. J Bacteriol, 2000, 182(15): 4328-4336.
- [7] Strunk T, Hamacher K, Hoffgaard F, et al. Structural model of the gas vesicle protein GvpA and analysis of GvpA mutants in vivo[J]. Mol Microbiol, 2011, 81(1): 56-68.
- [8] Ezzeldin HM, Klauda JB, Solares SD. Modeling of the major gas vesicle protein, GvpA: From protein sequence to vesicle wall structure[J]. J Struct Biol, 2012, 179(6): 18-28.
- [9] Sivertsen AC, Bayro MJ, Belenky M, et al. Solid-State NMR Characterization of Gas[J]. Biophys J, 2010, 159(5): 1932-1939.
- [10] Sivertsen AC, Marvin JB, Belenky M, et al. Judith herzfeld 2012 solid-state NMR evidence for inequivalent GvpA subunits in gas vesicles[J]. J Mol Biol, 2012, 387(4): 1032-1039.
- [11] Ramsay JP, Williamson NR, Spring DR, et al. A quorum-sensing molecule acts as a morphogen controlling gas vesicle organelle biogenesis and adaptive flotation in an enterobacterium[J]. Proc Natl Acad Sci, 2011, 108(36): 14932-14937.
- [12] Aharon O. The Function of Gas Vesicles in Halophilic Archaea and Bacteria: Theories and Experimental Evidence[J]. Life, 2013, 10(3): 19-20.