

坏死梭杆菌白细胞毒素基因 BSBSE 片段的克隆及原核表达^{*}

陈立志^{1,2}, 冯书章³, 张秀华², 王克坚^{2,4}, 刘晓颖²

(1. 吉林大学畜牧兽医学院, 长春 130062; 2. 中国农业科学院特产研究所, 吉林 132109; 3. 解放军军事医学科学院军事兽医研究所, 长春 130062; 4. 厦门大学海洋环境学院, 厦门 361005)

摘要: 以牛源坏死梭杆菌 FNn 株为试材, 根据 GenBank 上已发表的坏死梭杆菌 AF312861 标准菌株的 lktA 序列设计 1 对引物, 利用 PCR 技术扩增出 1 131 bp 的坏死梭杆菌白细胞毒素 BSBSE 基因。将 PCR 产物插入 pGEM-T Easy vector 中, 经双酶切鉴定正确后进行序列测定。分析表明该 BSBSE 序列与 GenBank 上已发表的坏死梭杆菌 AF312861 标准菌株的 lktA 序列的核苷酸同源性为 99%, 推导出的氨基酸序列同源性为 98%。为研究 BSBSE 的免疫原性, 构建了原核表达载体 pMAL-p2X-BSBSE, 用 IPTG 诱导在大肠杆菌中表达。结果表明, BSBSE 基因在大肠杆菌中进行了高效特异性融合表达, 融合蛋白分子量约为 84.5×10^3 , 其中 41.5×10^3 为 BSBSE 基因表达的蛋白质, 43.0×10^3 为 MBP 融合标签, Western-blotting 检测表明该表达产物有免疫原性。

关键词: 坏死梭杆菌; 白细胞毒素; BSBSE; 克隆; 表达

中图分类号: Q78; S852.61 文献标识码: A 文章编号: 1000-5684(2007)05-0568-04

Cloning and Expression of the Leukotoxin BSBSE Gene from *Fusobacterium necrophorum*

CHEN Li-zhi^{1,2}, FENG Shu-zhang³, ZHANG Xiu-hua², WANG Ke-jian^{2,4}, LIU Xiao-ying²

(1. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China; 2. Institute of Economical Wild Animal and Plant Research, CAAS, Jilin 132109, China; 3. The Military Veterinary Institute, Academy of Military Medical Sciences of PLA, Changchun 130062, China; 4. Environmental Science Research Center/Key Laboratory for Marine Environmental Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: According to the sequence of announced lktA gene in *Fusobacterium necrophorum*, a pair of primers were designed. The BSBSE gene was amplified by PCR. The product was cloned into pGEM-T Easy vector. When nucleotide sequence and deduced amino acid sequence were compared with homologous sequence of the FN AF312861 lktA of GenBank, the homologue of the nucleotide sequence is 99% and the homologue of the amino acid sequence is 98%. The BSBSE fragment was inserted into expression vector pMAL-p2X and the plasmid pMAL-p2X-BSBSE were expressed in *E. coli* BL21 by IPTG induction. The SDS-PAGE analysis indicated the weight of the fusion protein was about 84.5×10^3 , which included the 41.5×10^3 protein expressed from BSBSE gene and 43.0×10^3 fusion MBP tag. The recombinant BSBSE-pMAL-p2X production has immunogenicity with western-blotting. The cloning and expression of the BSBSE gene established the foundation of further research on the function and application of the

* 基金项目: “十五”国家科技攻关子课题(2002BA518A04), 中国农业科学院特产研究所科研基金项目(Cs 2005-03)

作者简介: 陈立志(1969-), 副研究员, 在读博士, 研究方向: 反刍动物腐蹄病及经济动物疾病。

收稿日期: 2006-11-20 修回日期: 2007-04-05

BSBSE gene.

Key words: *Fusobacterium necrophorum*; lkt; BSBSE; cloning; expression

坏死梭杆菌(*Fusobacterium necrophorum*)是革兰氏阴性、多形态严格厌氧菌,作为条件致病菌广泛存在于动物和人的口腔及胃肠道内^[1]。它能引起牛羊等家畜和野生动物发生坏死杆菌病,可引起牛的肝脓肿、腐蹄病、坏死性喉炎和其他坏死性病变,也是人 Lemierre/s 综合症的病原^[2]。多年临床实践证明,药物治疗和临床处置无法彻底控制坏死杆菌病^[3],预防和控制坏死杆菌病唯一有效的途径是疫苗免疫。

坏死梭杆菌可分为 A, B, AB, C 型 4 个生物型^[4],其中 A 型和 B 型又分别被归于亚型 Necrophorum(FNn)和亚型 fundulifome(FNf)。坏死梭杆菌 lkt 是一种大的分泌性蛋白,基因开放阅读框位于该操纵子的第 2 位,覆盖在整个坏死梭杆菌 lktA ORF 上的 5 个短的重叠的多肽分别为 BS-BSE, SX, GAS, SH 和 FINAL,免疫抗原表位可能在 BSBSE 和 SH2 段序列上。本试验应用国内分离的牛源坏死梭杆菌 FNn 株,针对白细胞毒素 5 个短肽中的 BSBSE 序列进行了克隆、表达,其目的是为基因工程疫苗的研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

来自国内分离的牛源坏死梭杆菌 FNn 株和牛坏死梭杆菌 FNn 株阳性多克隆血清保存于中国农业科学院特产研究所厌氧菌病实验室。大肠杆菌 C600 和 BL21 感受态细胞购于大连宝生物(TaKaRa)有限公司。兔抗牛 IgG 辣根过氧化物酶标二抗购于广东华拓生物科技有限公司。DL2000 Marker, EX TaqTM DNA 聚合酶、限制性内切酶 BamH I、Xba I 等常用试剂购于大连宝生物(TaKaRa)有限公司。DNA 凝胶回收试剂盒、细菌基因组抽提试剂盒(Wizard genomic DNA purification kit)、pGEM-T Easy vector 质粒和 T₄DNA 连接酶购自 Promega 公司。

1.2 方法

1.2.1 白细胞毒素 BSBSE 基因的 PCR 扩增 根据 GenBank 上已发表的坏死梭杆菌 AF312861 标准菌株的 lktA 序列,应用 Primer Premier 5.0 引物设计软件设计 1 对引物,由大连宝生物公司合成。

P1: 5'-TgAggATccATgAgcggcATcAAAAATAAcg-3'; P2: 5'-TcA TcTAgAATAgAgAAATAgAAccTg-3'。上游引物 P1 中划线部分为 BamH I 位点,下游引物 P2 中划线部分为 Xba I 位点。以细菌基因组抽提试剂盒提取的坏死梭杆菌 FNn 株的基因组为模板,用设计的引物进行 PCR 扩增。反应总体积为 25 μL; 20 mmol/L 引物各 1 μL, 4dNTP 混合物 2.5 μL, 模板 2.0 μL, EX Taq 酶 0.3 μL, 10× buffer 2.5 μL, 无菌去离子水 15.7 μL。

BSBSE 基因扩增条件: 95℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 1 min, 58℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物于 4℃ 保存。PCR 产物经 0.8% 琼脂糖凝胶,结果用凝胶成像仪观察检测。

1.2.2 BSBSE 基因的克隆及鉴定 取回收纯化的目的基因 BSBSE 与 pGEM-T Easy vector 在 4℃ 下连接过夜,转化大肠杆菌感受态细胞 C600 并进行蓝白筛选。用 BamH I 和 Xba I 进行双酶切鉴定。

1.2.3 目的基因 BSBSE-T 的序列测定 用 Sanger 双脱氧链终止法^[5]进行序列测定,应用 T7DNA 通用引物对克隆到载体 pGEM-T Easy vector 上的目的基因 BSBSE 进行序列测定,测序工作由大连宝生物公司完成。

1.2.4 重组表达质粒 BSBSE-pMAL-p2X 的构建及鉴定 目的基因片段 BSBSE BamH I 和 Xba I 粘端与 pMAL-p2X 的 BamH I 和 Xba I 粘端在 T₄DNA 连接酶的作用下,16℃ 连接过夜,转化大肠杆菌感受态细胞 C600,构建重组表达载体 BSBSE-pMAL-p2X。用 BamH I 和 Xba I 进行双酶切鉴定,将鉴定为阳性的质粒转化大肠杆菌感受态细胞 BL21,准备诱导蛋白表达。

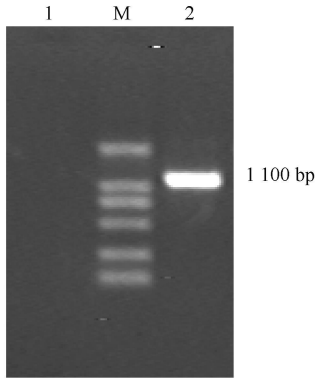
1.2.5 目的蛋白的诱导表达及纯化 按文献[5]方法进行。大量诱导后,超声波破碎进行可溶性鉴定,并应用 Biolabs 公司的 PMAL 融合蛋白纯化系统进行纯化。

1.2.6 western-blotting 检测蛋白免疫原性 应用牛坏死梭杆菌 FNn 株阳性多克隆血清作为一抗,用兔抗牛 IgG 辣根过氧化物酶标二抗, DAB 染色,拍摄 NC 膜照片进行免疫原性分析。

2 结果

2.1 BSBSE 特异性基因片段的 PCR 扩增

由图1可见PCR扩增得到约1100 bp的DNA片段,与预期的BSBSE的片段大小一致。



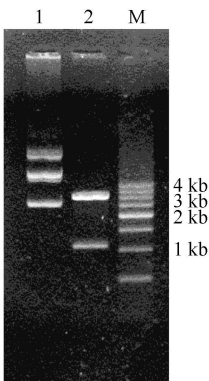
1. PCR 空白对照 PCR negative contrast; M. DL2000 Marker;
2. BSBSE 特异性片段的 PCR 扩增产物 PCR product of BSBSE specific gene

图1 BSBSE PCR 扩增片段电泳图

Fig. 1. Electrophoresis of PCR product of BSBSE specific gene amplification

2.2 重组质粒 BSBSE-T 的酶切鉴定

以 *Bam*H I 和 *Xba* I 双酶切鉴定重组质粒 BSBSE-T。以 0.8% 琼脂糖凝胶电泳,用 500 bp Marker 做标准对照,可见与预期目的基因 (1131 bp) 和载体 (3015 bp) 片段大小一致。这表明通过 PCR 扩增反应所得的 BSBSE 基因序列已插入 T 载体中 (图2)。



1. 质粒 BSBSE-T plasmid BSBSE-T; 2. 重组质粒 BSBSE-T 的双酶切产物 BSBSE-T digested with *Bam*H I and *Xba* I;
3. 500 bp Marker

图2 重组质粒 BSBSE-T 酶切鉴定图

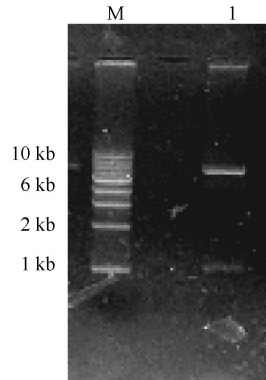
Fig. 2. Analysis of plasmid BSBSE-T by enzyme cleavage

2.3 克隆基因 BSBSE-T 测序

用 Sanger 双脱氧链终止法进行序列测定,与 GenBank 上已发表的坏死梭杆菌 AF312861 标准菌株的 *lktA* 部分核苷酸序列进行比较。结果表明核苷酸序列同源性 99%, 推导出的相应的氨基酸序列同源性 98%, 表明坏死梭杆菌基因 BSBSE 是保守性较高的基因。

2.4 重组表达质粒 BSBSE-pMAL-p2X 的构建

对质粒 BSBSE-pMAL-p2X 进行 *Bam*H I 和 *Xba* I 双酶切鉴定。用 1 kb Marker 做标准对照,可见与预期目的基因 (1131 bp) 和载体 pMAL-p2X (6721 bp) 片段大小一致 (图3)。这表明 BSBSE 基因序列已插入 pMAL-p2X 载体中。将该质粒命名为 BSBSE-pMAL-p2X。



- M. 1 kb Marker; 1. BSBSE-pMAL-p2X *Bam*H I and *Xba* I 双酶切产物 BSBSE-pMAL-p2X digested with *Bam*H I and *Xba* I

图3 BSBSE-pMAL-p2X 质粒 *Bam*H I 和 *Xba* I 双酶切鉴定

Fig. 3. Analysis of plasmid BSBSE-pMAL-p2X by enzyme cleavage

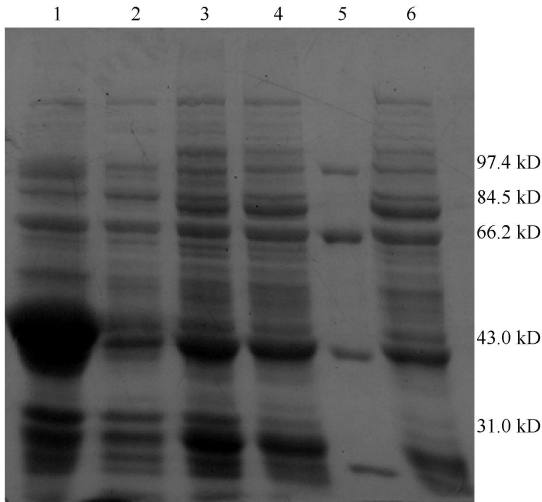
2.5 目的蛋白 SDS-PAGE 电泳

理论计算目的蛋白 BSBSE 分子量约 41.5 kD, pMAL-p2X 与目的蛋白 BSBSE 融合的 MBP 约 43 kD, 故表达的蛋白分子量约 84.5 kD。由图4可见,BSBSE-pMAL-p2X 有明显的表达,与预测的蛋白分子量大小相同,并且大量诱导超声波裂解后,可见液体透明清亮,离心未见沉淀,推测该蛋白为分泌性表达,电泳结果也证实其为分泌性表达。

2.6 Western-blotting 检测结果

重组表达质粒的蛋白表达产物经 SDS-PAGE 后,转移至 NC 膜上进行免疫原性分析。结果显示表达产物能被牛源坏死梭杆菌 FN_n 株的多克隆抗体识别,表明表达产物具有反应原性

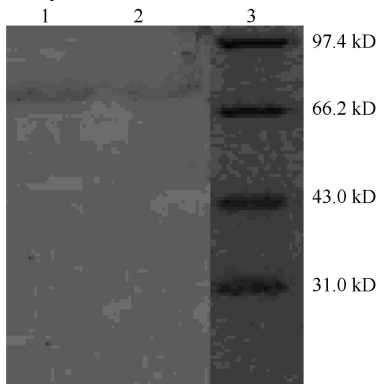
(图 5)。



1. pMAL-p2X 空载体对照 pMAL-p2X induced with IPTG; 2. BSBSE-pMAL-p2X 未诱导样 BSBSE-pMAL-p2X without IPTG induction; 3. BSBSE-pMAL-p2X 诱导后样 BSBSE-pMAL-p2X with IPTG induction; 4. 大量诱导后超声裂解液 Ultrasonic degradation liquid; 5. 中范围蛋白 Marker molecular weight marker; 6. 大量诱导后超声裂解上清液 Supernatant ultrasonic degradation liquid

图 4 BSBSE 与 pMAL-p2X 融合蛋白表达及可溶性分析电泳图

Fig. 4. Analysis of the protein BSBSE of *E. coli* transformant by 8% SDS-PAGE



1, 2. BSBSE-pMAL-p2X Western-blotting; 3. 中范围蛋白 Marker molecular weight Marker

图 5 融合蛋白的 western-blotting 结果

Fig. 5. Analysis of BSBSE-pMAL-p2X Western-blotting

3 讨论

坏死梭杆菌 *lkt* 对中性粒细胞、巨噬细胞和肝细胞有细胞毒性, 该毒素在低浓度可引起炎症, 高浓度的细胞裂解液对 PMNS 的激活要比对淋巴细胞的能力强^[6]。坏死梭杆菌的 *lkt* 3 个顺式基因 (*lktBAC*) 操纵子的完整的核苷酸序列已经确定。*lktA* 基因开放阅读框位于该操纵子的第 2 位, *lktA* 基因编码分子量为 335 956 的蛋白, 比任何已知的细菌外毒素都大, 缺少半胱氨酸的残基, 且其不与任何已知的细菌 *lkt* 序列有同源性^[7]。坏死梭杆菌编码 *lktA* 的整个基因的表达水平较低, 纯化全长重组蛋白存在困难, 且存在蛋白的物理不稳定性。为了获得重组蛋白的更好表达, 对大肠杆菌宿主细胞造成的毒性作用更少, 本研究对白细胞毒素基因的截断短片段 BSBSE 进行了克隆表达, 其结果为坏死梭杆菌新型诊断试剂和疫苗的研制开辟了一条新途径。

参考文献:

- [1] 苗利光, 杨福合, 刘艳环, 等. 坏死梭杆菌病免疫学研究进展[J]. 动物医学进展, 2006, 27(11): 22-25
- [2] NARAGARAJA T G, NARAYANAN S K, STEWART G C, et al. *Fusobacterium necrophorum* infections in animals; pathogenesis and pathogenic mechanisms[J]. Anaerobe, 2005, 11: 239-246.
- [3] 苗利光, 杨福合, 刘艳环, 等. 坏死梭杆菌 FN(A)p2001 株小鼠感染模型的建立[J]. 动物医学进展, 2007, 28(1): 35-37.
- [4] NARAYANAN S K, NAGARAJA T G, CHENGAPPA M M, et al. Cloning, sequencing and expression of the leukotoxin gene from *Fusobacterium necrophorum* [J]. Infect Immun, 2001, 69: 5117-5455.
- [5] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 2 版, 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 北京: 科学出版社, 1998: 602-608
- [6] OCLKE A M, NAGARAJA T G, WILKERSON M J, et al. The leukotoxin operon of *Fusobacterium necrophorum* is not present in other species of *Fusobacterium* [J]. Anaerobe, 2005, 11: 123-129.
- [7] NARAYANAN S K, STEWART G C, CHENGAPPA M M, et al. *Fusobacterium necrophorum* leukotoxin induces activation and apoptosis of bovine leukocytes[J]. Infect Immun, 2002, 70: 4609-4620.