

· 论 著 ·

空肠弯曲菌 penner o 19 cjaA 基因的克隆表达

邢丛丛 李震中 白欣立 徐 飞 简 朔 李 鑫 赵子春 高爱民 薛 峰

【摘要】 目的 克隆空肠弯曲菌 penner o 19 cjaA 基因, 构建其原核表达载体, 诱导表达及纯化蛋白, 为基因工程疫苗的研制打下基础。方法 扩增空肠弯曲菌 penner o 19 cjaA 基因, 构建 pGEM-T-cjaA 克隆载体, 以 EcoRI 和 XhoI 为酶切位点构建 pGEX-4T-1-cjaA 原核表达载体。表达载体转化 E. coli BL21 后诱导表达, SDS-PAGE 鉴定表达产物, 用 Glutathione Sepharose^{4B} 纯化重组蛋白。结果 成功构建 pGEX-4T-1-cjaA 表达载体, 并获得浓度为 10¹⁴ g/L 的 GST-CjaA 重组蛋白。结论 成功构建 pGEM-T-cjaA 克隆载体及 pGEX-4T-1-cjaA 表达载体, 获得重组蛋白 GST-CjaA, 为研究空肠弯曲菌疫苗打下基础。

【关键词】 空肠弯曲菌; cjaA 基因; 原核表达; 载体构建; 蛋白纯化

中图分类号: R37 文献标识码: A 文章编号: 1006-351X(2011)02-0081-04

Construction of the prokaryotic express vector of cjaA gene of campylobacter jejuni XING Cong-cong, LI Zhen-zhong, BAIXI n-li XU Fei JAN Shuo LI Xin, ZHAO Zi-chun, GAO Ai-min, XUE Feng Department of Neurology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China

Corresponding author LI Zhen-zhong Email: johndocte@vip.163.com

【Abstract】 Objective To construct prokaryotic expression vector carrying campylobacter jejuni penner o 19 cjaA gene, express it in E. coli and purify protein. **Methods** The cjaA gene were amplified by PCR. The clone vector pGEM-T and expression vector pGEX-4T-1 with inserted cjaA gene were constructed. The target protein was expressed in E. coli BL21. The protein was identified and analyzed by SDS-PAGE. The target protein was purified by Glutathione Sepharose^{4B}. **Results** Constructed the expression vector pGEX-4T-1-cjaA, purified the recombinant protein. **Conclusion** The recombinant plasmid pGEM-T-cjaA and pGEX-4T-1-cjaA have been successfully constructed and the GST-CjaA protein is purified, which lays the foundation for the further development of C. jejuni genetic engineering vaccine.

【Key words】 Campylobacter jejuni CjaA gene Prokaryotic expression Vector construction Purify protein

空肠弯曲菌 (campylobacter jejuni Cj) 通过食源性或水源污染导致人畜腹泻、肠炎, 是世界范围内导致人畜腹泻、肠炎的主要病原菌。空肠弯曲菌感染后自身免疫反应高度相关急性运动性轴索型吉兰-巴雷综合征 (acute motor axonal neuropathy AMAN), 并在动物模型中得到了证实^[1]。预防细菌污染食物、水源及减少人畜空肠弯曲菌的感染率是降低空肠弯曲菌相关疾病发病率的措施之一。

微生物外膜分子刺激机体免疫反应, 记忆 T 细胞及保护性抗体可以抵御外源细菌的增殖、侵袭。cjaA

基因是保守性基因, CjaA 的 C 末端氨基酸绑定于内膜, 部分氨基酸暴露于外膜, 是 ABC 型半胱氨酸转运系统成分之一, 半胱氨酸在空肠弯曲菌的生理代谢中尤为重要, CjaA 具有高免疫原性, 是细菌外膜抗原及疫苗候选成分之一。

本实验以空肠弯曲菌 penner o 19 基因组为模板克隆表达 cjaA 基因, 纯化后重组蛋白免疫机体产生抗体既可抵御空肠弯曲菌的感染亦能特异性抵御空肠弯曲菌 penner o 19 的感染, 减少空肠弯曲菌的感染率及 AMAN 的发病率。

材料和方法

一、材料

空肠弯曲菌 penner o 19 由本实验室保存。E. coli 菌 DH5、BL21 和质粒 pGEX-4T-1 由清华大学医学院常智杰教授惠赠。Taq DNA polymerase pycrobest DAN

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30471919); 国家高技术研究发展计划 (2006AA02A208); (863 计划 2006AA02A2080)

作者单位: 050000 石家庄, 河北医科大学第二医院神经内科 (邢丛丛、李震中、李鑫、赵子春、高爱民), 儿科 (白欣立); 江苏出入境检验检疫局动植物与食品检测中心 (徐飞、薛峰); 厦门大学医学院 (简朔)

通信作者: 李震中, Email: johndocte@vip.163.com

polymerase dNTP, T4DNA 连接酶, 限制性内切酶 (EcoR I 和 XhoI), DNA Marker, 低分子量蛋白 Marker 购自 Takara 公司; pGEM-T Kit 购自 Promega 公司, DNA 凝胶回收与纯化试剂盒, 高纯度质粒小量提取试剂盒购自威格拉斯公司; IPTG, 考马斯亮蓝 R-250 购自 Sigma 公司; Glutathione Sepharose^{4B} 购自 GE 公司。

二、方法

1 获取基因组 DNA: 将空肠弯曲菌 penner α 19 接种于 CM0739 培养基, 置于含 10% CO₂, 5% O₂ 的微需氧环境中, 37°C 培养 48h, 采用 DNA 抽提试剂盒提取 C. jejuni penner α 19 基因组 DNA, 采样分光光度计测其浓度 180ng/μl

2 扩增 cjaA 基因 参考 Genebank (编号 NZ AASL01000001) 报道 cjaA 序列, 在其上下游设计引物, 引物序列如下, Pfor AGAGCTAGAATTCCTCCA CAAGA; Pprev ATTGAGCAAAGAATTTAATCTTGC. PCR 反应条件为 94°C 预变性 5min, 94°C 变性 30s, 53°C 退火 30s, 72°C 延伸 1min, 30 个循环, 72°C 延伸 10min, 4°C 保存。1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物, 用 DNA 凝胶回收纯化试剂盒回收纯化 PCR 产物。

3 构建 pGEM-T-cjaA 重组质粒: 将纯化的 cjaA 和 pGEM-T 按 4:1 摩尔比室温连接 1h 转化 E. coli DH5α 感受态细胞, 用带有氨苄霉素的 LB 培养基筛选重组质粒 pGEM-4T-1-cjaA 阳性克隆, 用 EcoR I 酶切鉴定重组质粒并送 invitrogen 公司测序鉴定。

4 构建 pGEX-4T-1-cjaA 重组质粒: 以阳性克隆质粒 pGEM-4T-1-cjaA 为模板, 以 cjaA CDS 为目的序列, 以 EcoR I 和 XhoI 为酶切位点设计引物, 引物序列如下, Pfor cgagaattcATGAAAAAATACTTCTAAG; Pprev tatctcgagAATTTTCCACCTCAATC. 扩增 cjaA 基因并回收纯化, 用 EcoR I 和 XhoI 双酶切 cjaA 和 pGEX-4T-1 回收纯化 cjaA 和 pGEX-4T-1 并按 4:1 摩尔比 16°C 连接 3h 转化 E. coli DH5α 感受态细胞, 用带有氨苄霉素的 LB 培养基筛选重组质粒 pGEX-4T-1-cjaA 阳性克隆, 用 EcoR I 和 XhoI 双酶切鉴定重组质粒并送 invitrogen 公司测序鉴定。

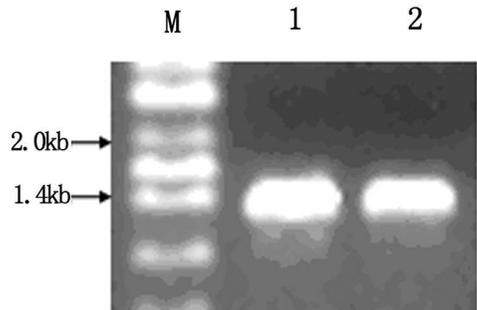
5 重组质粒诱导表达及表达形式的分析: 将阳性克隆重组质粒 pGEX-4T-1-cjaA 转化 E. coli BL21, 接种阳性克隆于带有氨苄霉素的 LB 培养基 37°C 220 转/分过夜增菌, 按 1:100 转接菌液于 30°C 150 转/分增菌至 A600=0.4 用终浓度 0.1mmol/L 的 IPTG 诱导培养 4h 离心收集菌体, 用 PBS 重悬菌体, 冰浴超声破碎细菌至悬液清亮, 分离全菌, 上清, 沉淀, 用 10% 分离胶进行 SDS-PAGE 电泳, 用考马斯亮蓝 R-250 染液染色

和脱色液脱色后观察重组蛋白表达形式。

6 重组蛋白纯化: 于 4°C 8000 转/分离心 15min 收集诱导培养 200ml 菌体, 用 PBS 重悬菌体, 冰浴超声破碎细菌 30min, 收集超声碎菌后的上清液, 用活化的 Glutathione Sepharose^{4B} 结合重组蛋白, 用 PH8.8 20mM GSH 洗脱液洗脱重组蛋白, 将纯化蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 用考马斯亮蓝 R-250 染液染色和脱色液脱色后分析重组蛋白的纯化结果。

结 果

1. cjaA 基因扩增结果 (图 1)

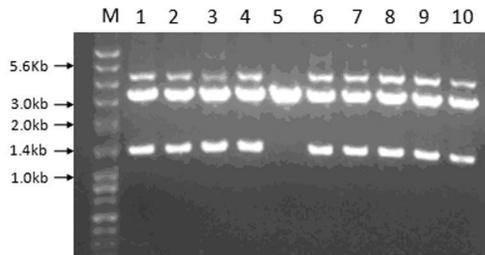


M: DNA ladder 1~2: cjaA 基因扩增条带

图 1 cjaA 基因 PCR 扩增

以空肠弯曲菌基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。电泳结果显示 PCR 扩增产物为单一条带, 大小位于 1.4Kbp 处。

2 重组质粒 pGEM-T-cjaA 酶切及测序结果 (图 2)



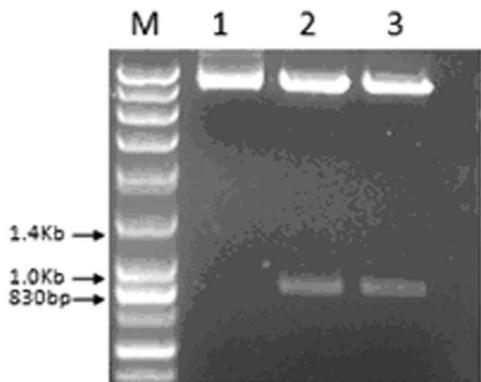
M: DNA marker 1~10 pGEM-T-cjaA 用 EcoR I 酶切

图 2 重组质粒 pGEM-T-cjaA 单酶切琼脂糖凝胶鉴定

重组质粒 pGEM-T-cjaA 用 EcoR I 酶切后得到大小位于 1.4Kbp 的插入片段, 说明 cjaA 已经成功插入到 pGEM-T 的多克隆位点。

以 pGEM-T 通用引物双向测序插入基因 cjaA, 用 DNASTAR 比对测序结果确定 penner α 19 cjaA CDS 序列。

3 重组质粒 pGEX-4T-1-cjaA 酶切及测序结果 (图 3)



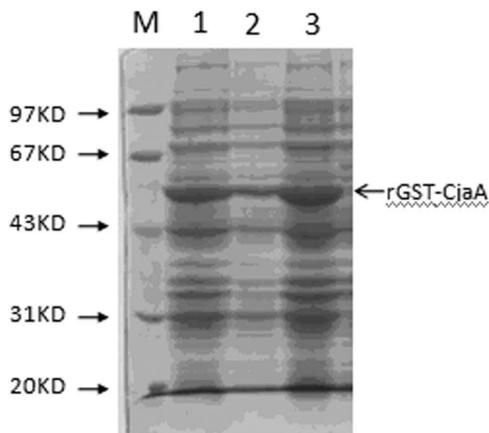
M: Marker 1~ 3 pGEX-4T-1-cjaA 用 EcoRI和 XhoI双酶切

图 3 重组质粒 pGEX-4T-1-cjaA 双酶切琼脂糖凝胶鉴定

重组质粒 pGEX-4T-1-cjaA 用 EcoRI和 XhoI双酶切得到大小位于 840bp的插入片段,说明 cjaA CDS序列已经成功插入到 pGEX-4T-1的多克隆位点。

以 pGEX-4T-1通用引物双向测序插入基因 cjaA,用 DNASTAR 比对结果确定测序正确质粒。

4 重组质粒的诱导表达及表达形式分析 (图 4)

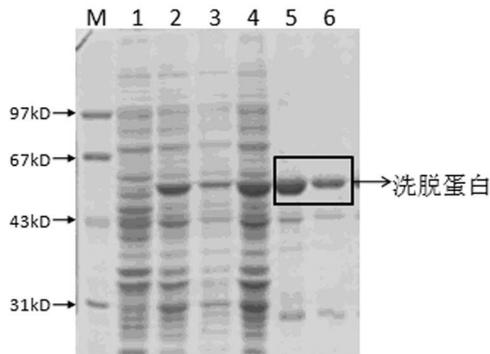


M: 低分子量蛋白 Marker 1 诱导后全菌; 2 诱导后上清; 3 诱导后沉淀

图 4 重组蛋白 rGST-CjaA 诱导表达及表达形式 SDS-PAGE 鉴定

阳性克隆重组质粒 pGEX-4T-1-cjaA 转化 E. coli BL21, 于 30℃ 150rpm/min 用终浓度为 0.1mmol/L 的 IPTG 诱导培养 4h, 分离全菌, 上清, 沉淀, 通过 SDS-PAGE 考马斯亮蓝染色分析 58KD 处有特异性重组蛋白条带 (图 3), 因为质粒 pGEX-4T-1 在多克隆位点上游有一段 GST 编码序列 (分子量约为 28KD) 与 CjaA (分子量约为 30KD) 蛋白融合表达, 所以重组蛋白的分子量与预计理论值是相符的。

5 重组蛋白纯化结果 (图 5)



M: 低分子量蛋白 Marker 1: 未诱导; 2 诱导后全菌; 3 诱导后上清; 4 诱导后沉淀; 5 洗脱蛋白 1; 6 洗脱蛋白 2

图 5 重组蛋白 rGST-CJAA 表达及纯化 SDS-PAGE 鉴定

收集诱导培养菌体, 冰浴超声破碎细菌 30min, 收集超声碎菌后的上清液, 用活化的 Glutathione Sepharose^{4B} 结合重组蛋白, 用 pH 8.8 20mM GSH 的洗脱液洗脱重组蛋白, 用 10% 的分离胶进行 SDS-PAGE 电泳, 用 R-250 染液染色和脱色液脱色后分析重组蛋白的纯化结果。

讨 论

空肠弯曲菌是发现于动物肠道内的革兰氏阴性菌, 呈弯曲的杆状。对鸡, 火鸡和牛的研究表明, 一群家禽或一栏家畜有高达 50% ~ 100% 的个体携带空肠弯曲菌。从表层水中也可分离出大量的空肠弯曲菌。他通过污染的水和食物, 接触感染的动物或口腔性行为传染给人, 全球每年约有 50 亿人口的感染率^[2]。发达国家空肠弯曲菌性肠炎的暴发流行多是因为污染的水源、牛奶及进食烹饪不当的食物。

1972 年于腹泻病人的大便标本中分离空肠弯曲菌, 目前的研究未能完全揭示空肠弯曲菌的毒力及致病机制, 较少的研究说明空肠弯曲菌感染后多变的免疫反应^[3]。空肠弯曲菌的感染导致禽畜及人群的弯曲菌性肠道疾病及感染后免疫反应相关疾病, 抵御细菌的感染及其暴发流行是公共卫生的任务之一。自 1921 年 Monsieur 传代培育获得减毒结核杆菌疫苗 (BCG) 以来, 疫苗的研究应用在抵御了病原微生物的感染中起重要作用。传统的疫苗包括减毒活疫苗和灭活疫苗, 新型疫苗以基因疫苗为主。

亚单位疫苗需要选择合适的保护性抗原及将其呈递给免疫系统的途径, 至今鞭毛蛋白及外膜蛋白被认为是候选亚单位疫苗^[4]。革兰氏阴性细菌的极性氨基酸大多锚定于核周质, 革兰氏阳性细菌的极性氨基酸大多锚定于细胞膜上, 而空肠弯曲菌的 CjaA 锚定于外膜上, 是其具有免疫原性的因素之一。2008 年

Stuart等^[5]应用互补蛋白质组学技术验证了 CjaA 是膜相关蛋白,且能被兔抗空肠弯曲菌血清识别^[6]。

CjaA (Cj0982c 30kDa)和 CjaC (Cj0734c 28kDa)与原核生物的 ABC 转运系统具有同源性, CjaA 具有高免疫原性及不同血清型菌株间具有高度保守性,且 CjaA 与 CjaC 具有结构同源性,使得 CjaA 成为极有价值的疫苗候选抗原。在 Agnieszka等^[7]的实验中给予鸡载有 CjaA 蛋白的减毒沙门菌疫苗口服免疫,可刺激机体产生空肠弯曲菌特异性 IgG 抗体及肠道分泌性 IgA 抗体,在安全性实验中能抵御空肠弯曲菌的感染。

CjaA 是空肠弯曲菌疫苗候选抗原之一,本实验以分子克隆技术得到了空肠弯曲菌 CjaA 的融合蛋白,为亚单位疫苗的进一步开发研制打下基础,降低禽畜类及人群的空肠弯曲菌感染率,减少腹泻及感染后免疫相关疾病的发生率。

参 考 文 献

[1] 李春岩,薛平,刘瑞春,等.空肠弯曲菌致鸡格林巴利综合征动物

模型的初步研究.脑与神经疾病杂志,1994 2 68-69

- [2] Tan CC, O'Brien AD, Gk et al. Campylobacter species don't put all your eggs in one chicken. Clin Infect Dis 2002; 34: 719-720.
- [3] Oberhelman RA, Taylor DN. Campylobacter infection in developing countries. American Society for Microbiology 2000; 139-153.
- [4] Wildens PR, Thomas LM, Long KA, et al. The specificity of antibody in chicken immunized to reduce intestinal colonization with Campylobacter jejuni. Vet Microbiol, 1998; 64: 39-50.
- [5] Cordwell SJ, Len AC, Touma RG, et al. Identification of membrane-associated proteins from Campylobacter jejuni strain using complementary proteomics technologies. Proteomics 2008; 8: 122-139.
- [6] Wyszynska A, Zycka J, Godawska R, et al. The Campylobacter jejuni/coli cjaA (cj0982c) Gene Encodes an N-glycosylated lipoprotein localized in the inner membrane. Curr Microbiol 2008; 57: 181-188.
- [7] Wyszynska A, Raczko A, Lis M, et al. Oral immunization of chickens with avirulent Salmonella vaccine strain carrying C. jejuni 72D z/92 cjaA gene elicits specific humoral immune response associated with protection against challenge with wild-type campylobacter. Vaccine 2004; 22: 1379-1389.

(2010-04-28 收稿)

· 论 著 ·

110例脑梗死患者的全脑数字减影血管造影的临床研究

王 松

【摘要】 目的 探讨脑梗死患者与颅内-颅外段动脉狭窄或闭塞的关系及其临床意义。方法 选择符合脑梗死诊断标准的 110例患者行全脑数字减影血管造影(DSA)检查,对颈内动脉系统脑梗死(ICA-CI)和椎-基底动脉系统脑梗死(VB-CI)患者的颅内-颅外段动脉狭窄或闭塞进行分析比较。结果 110例脑梗死患者中 85例(77.27%)有动脉狭窄或闭塞。其中 25例(22.73%)为单纯颅外段动脉狭窄或闭塞,41例(37.27%)为单纯颅内段动脉狭窄或闭塞,19例(17.27%)为颅内-颅外段动脉多发性狭窄或闭塞。DSA共检出动脉狭窄或闭塞 173支,颅外动脉段狭窄或闭塞 65支(37.57%),颅内段动脉狭窄或闭塞 108支(62.43%)。颅内段动脉狭窄或闭塞发生率(62.43%)明显高于颅外段动脉(37.57%)。颅外段动脉狭窄或闭塞的好发部位依次为:颈内动脉颅外段 26支(15.03%),椎动脉颅外段 19支(10.98%),颈总动脉 14支(8.09%),锁骨下动脉 6支(3.47%)。颅内段动脉狭窄或闭塞的好发部位依次为:大脑中动脉 37支(21.39%),颈内动脉颅内段 25支(14.45%),椎动脉颅内段 18支(10.40%),大脑后动脉 11支(6.36%),大脑前动脉 9支(5.20%),基底动脉 8支(4.62%)。ICA-CI组单纯颅外段动脉狭窄或闭塞高于 VB-CI组($P < 0.05$),ICA-CI组单纯颅内段动脉狭窄或闭塞高于 VB-CI组($P < 0.01$),ICA-CI组颅内-颅外段动脉多发狭窄或闭塞低于 VB-CI组($P < 0.05$)。ICA-CI组单纯颅内段动脉狭窄或闭塞高于单纯颅外段动脉狭窄或闭塞,VB-CI组单纯颅内段动脉狭窄或闭塞高于单纯颅外段动脉狭窄或闭塞($P < 0.05$)。动脉狭窄及粥样硬化斑块与年龄、高血压、低血压、糖尿病、高甘油三酯(TG)、高总胆固醇(TC)、高

基金项目:菏泽市立医院科研基金资助项目(Y2008SN01)

作者单位:274000山东,菏泽市立医院神经内科