

文章编号 :1001- 4721(2009)01- 0014- 05

坏死梭杆菌白细胞毒素基因 SH 片段的克隆与表达

赵利芳^{1,2} 陈立志² 张秀华² 冯书章^{3*} 王克坚⁴ 刘晓颖² 陆伟² 冯凯^{1,2} 王秀东² 姚志利²

(1.江苏科技大学生物与环境工程学院,江苏 镇江 212018; 2.中国农业科学院特产研究所,吉林 吉林 132109;
3.中国人民解放军军事医学科学院军事兽医研究所,吉林 长春 130062; 4.厦门大学海洋环境科学教育部重点实验室
环境科学研究中心,福建 厦门 361005)

摘要 坏死梭杆菌白细胞毒素是坏死杆菌病的主要致病因子,白细胞毒素基因(*lkt*)是其编码基因。以分离到的国内牛源坏死梭杆菌 FN(A)菌株 F4 基因组 DNA 为模板,应用 PCR 方法扩增白细胞毒素基因 SH 片段,克隆至 pMD18-T 载体上,以 *Bam*H 和 *Hind* III 酶切的目的片段 SH 与相应酶切的 pET32a 载体连接构建 pET32a-SH 重组表达质粒,经转化 *E. coli* BL21(DE3)后用 IPTG 进行蛋白诱导,SDS-PAGE 检测重组蛋白表达情况。结果表明,扩增基因序列大小为 1 800 bp,SDS-PAGE 检测重组蛋白有效表达,表达得到大小为 80.2 kDa 的目的蛋白,采用镍柱亲和层析方法纯化 SH 重组蛋白,获得了纯度达 95%的重组蛋白,经 Western-blot 证实,该蛋白对抗坏死杆菌阳性血清具有反应活性。

关键词 坏死梭杆菌 SH 克隆 表达

中图分类号 :S855.1⁺2 Q786

文献标识码 :A

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

ZHAO Li-fang^{1,2}, CHEN Li-zhi², ZHANG Xiu-hua², FENG Shu-zhang^{3*},
WANG Ke-jian⁴, LIU Xiao-ying², LU Wei², FENG Kai^{1,2},
WANG Xiu-dong², YAO Zhi-li²

(1. Institute of Biological and Environmental Engineering of Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang 212018, China; 2. Institute of Special Wild Economic Animals and Plant Science, CAAS., Jilin 132109, China; 3. Institute of Military Veterinary, Academy of Military Medical Sciences of Chinese Peoples's Liberation Army, Changchun 130062, China; 4. Environmental Science Research Center, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: The leukotoxin of *Fusobacterium necrophorum* (FN) is considered to be one of the main virulence factors. The *lkt* gene encodes for FN. In this study, the SH fragment of *lkt* gene was amplified by PCR using the F4 genome as the template, which was isolated from the Chinese *Fusobacterium necrophorum* strain. The fragment was then cloned to the pMD18-T vector for sequencing. Thereafter, the SH fragment was subcloned into the multiple cloning sites of the pET32 to construct pET32a-SH recombinant plasmid, which was then transformed into *E. coli* BL21 (DE3) with IPTG induction for expression. SDS-PAGE was used to analyze the recombinant protein. The results showed that the SH fragment of about 1800 bp was amplified and was about 80.2 kDa. The fusion protein was purified by Ni-NTA affinity chromatography under denature conditions, and their purity was above 95%. Western-blot analysis indicated the SH fragment had antigenicity against *Fusobacterium necrophorum*.

Key words: *Fusobacterium necrophorum*; SH; Cloning; Expression

收稿日期 2009-02-13

基金项目：“十五”国家科技攻关子课题(2002BA518A04);吉林省科技发展计划项目(20070570);吉林市科技发展计划项目(200805)

作者简介 赵利芳(1982-)女,河南濮阳人,硕士研究生,从事经济动物分子细菌学研究。

*通讯作者 冯书章(1954-)男,研究员,博士生导师,从事免疫预防研究。

坏死梭杆菌属革兰氏阴性专性厌氧多形态杆菌,经常引起动物的坏死性病变,是人类 Lemierre's 综合症的病原菌^[1]。Lemierre's 综合症具有口咽传染病的特征,导致持续高热和零散的可迁移性脓肿,包括颈内静脉血栓性静脉炎^[2]。坏死梭杆菌是肝脓肿、腐蹄病、坏死性喉炎(犊牛白喉)和牛其他坏死性疾病的主要病原菌^[3,4],给集约化养牛业带来了严重的影响。

国内外学者在坏死梭杆菌疫苗方面做了大量研究工作,发现菌体细胞质、细胞质类毒素、福尔马林灭活菌体、坏死梭杆菌培养上清液均可产生不同程度的免疫保护^[5]。细胞毒素、内毒素、溶血素、血凝素和一些酶,如 DNA 酶可能是致病因子^[6,7],说明这些毒素和酶可能是潜在的免疫原。一些研究发现,白细胞毒素(*lkt*)、蛋白质细胞毒素是主要的致病因子^[5-7]。白细胞毒素是坏死杆菌病的主要致病因子,已在动物实验中得到证实^[8]。因此,白细胞毒素基因成为研制坏死梭杆菌基因工程疫苗的首选靶基因^[9,10]。

但是,坏死梭杆菌白细胞毒素(*lktA*)的全基因表达水平较低,纯化全长重组蛋白难度大且重组蛋白的物理性质不稳定,在 *lktA* 的 5 个短肽中,SH 同 BSBSE 都是坏死梭杆菌的保护性抗原基因片段。因此,本研究对白细胞毒素短肽中的保护性抗原片段 SH 进行了克隆表达,为坏死梭杆菌基因工程疫苗研究提供基础数据。

1 材料与方 法

1.1 酶与主要试剂

Ex Taq DNA 聚合酶、DL2000 DNA Marker、限制性内切酶 *Bam*H、*Hind* 和 pMD18-T 载体均购自 Takara (大连) 公司。细菌基因组抽提试剂盒和小量 DNA 胶回收试剂盒购于北京天根生物工程有限公司。T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司。HRP 标记兔抗牛 IgG 购自 MBI 公司。邻苯二胺(OPD)购自美国 Sigma 公司。蛋白 Marker 购于 Serva 公司。

坏死梭杆菌 F4 为本研究室分离鉴定并保存,牛源坏死梭杆菌阳性血清由本实验室保存;大肠杆菌感受态细胞 C600 由本实验室保存;*E.coli* BL21 (DE3) 和 pET32a 载体由哈尔滨兽医研究所刘思国研究员赠送。

1.2 方 法

1.2.1 引物的设计 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 Premier5.0 引物设计软件设计 1 对引物,上游引物中含 *Bam*H 位点,下游引物中含 *Hind* 位点,划线部分为限制内切酶酶切位点,引物由大连宝生物公司合成。

P_U 5'- TgCCGGATCCACTCAAAAATGTACAAATGCT- 3'

P_L 5'- TTAAGCTTTGCAGTTCCCAAACCACAGT- 3'

1.2.2 基因组 DNA 提取与目的基因的扩增 菌株基因组 DNA 提取依照北京天根生物工程有限公司的细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书所示进行操作。以得到的牛坏死梭杆菌 F4 菌株基因组 DNA 为模板,用 *EX Taq* DNA 聚合酶,引物 P_U、P_L PCR 扩增 SH。

扩增的循环参数为 95℃ 预变性 5 min,然后 94℃ 变性 1 min、63℃ 退火 1 min 和 72℃ 延伸 2 min,30 个循环,最后 72℃ 延伸 10 min。扩增产物用 0.9% 的琼脂糖凝胶电泳 30 min (130 V),紫外灯下检测扩增结果,用上海华舜生物工程有限公司的胶回收试剂盒纯化回收 PCR 产物。

1.2.3 目的基因的克隆与鉴定 取回收纯化的目的基因 SH 与 pMD18-T 载体在 16℃ 下连接过夜。取 10μ L 连接产物转化到制备好的 100μ L C600 感受态细胞中,在含 Amp 的 X-gal 平板筛选出阳性重组质粒 T-SH,阳性重组质粒用酶切和 PCR 方法鉴定。

1.2.4 目的基因 SH 的序列测定 应用通用引物对克隆到载体 pMD18-T 上的 SH 基因进行序列测定,测序工作由上海生工生物工程技术服务有限公司完成。

1.2.5 重组表达质粒 pET32a-SH 的构建 取鉴定阳性的重组质粒 T-SH 用 *Hind* /*Bam*H 大量酶切回收的小片段产物与 *Hind* /*Bam*H 进行双酶切回收纯化的 pET32a 进行连接,转化至大肠杆菌感受态细胞 C600 中,在含 Amp 的 X-gal 平板上筛选出阳性重组质粒 pET32a-SH,用酶切和 PCR 方法进行鉴定。

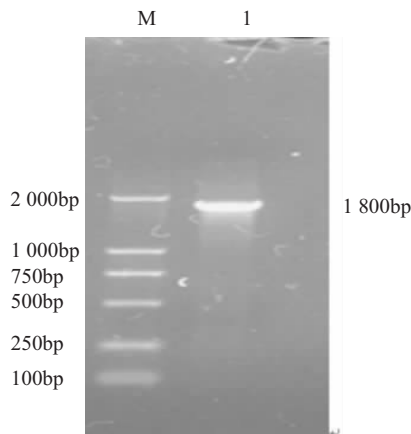
1.2.6 目的蛋白的诱导表达与纯化 目的蛋白的诱导表达 蛋白诱导表达及蛋白可溶形式鉴定参考《分子克隆实验指南》(2002)所述的方法^[11]。亲和层析法纯化蛋白 可溶性鉴定后得知目的蛋白以不可溶的包涵体形式表达,因 pET32a 含有 2 个 His 标签,用 Novagen 公司的 Ni-NTA His-Bind 树脂在变性条件下纯化包涵体。

1.2.7 纯化蛋白的 Western-blot 分析 将牛源坏死梭杆菌阳性血清作为一抗,HRP 标记的兔抗牛 IgG 作为二抗,参考《分子克隆实验指南》(2002)所述的方法对表达的蛋白进行分析^[11]。

2 结 果

2.1 基因组 DNA 提取与目的基因的扩增

以坏死梭杆菌 F4 的基因组为模板进行 PCR 扩增,用 0.9% 琼脂糖凝胶电泳,DL2000 为对照,SH 特异性基因扩增片段约为 1 800 bp,与预期大小一致,见图 1。

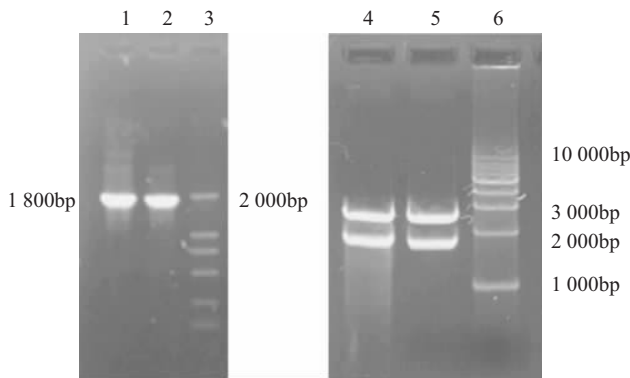


M. DL2000 Marker; 1. PCR product of SH specific gene

图 1 SH PCR 扩增片段电泳

2.2 目的基因的克隆与鉴定

抽提的 T-SH 质粒，用 *Hind* / *Bam*H 双酶切鉴定，并将质粒稀释 20 倍作为模板进行 PCR 鉴定。双酶切得到 1 818 bp 和载体 2 700 bp 片段，PCR 鉴定得到 1 800 bp 片段与预期的结果一致。这表明通过 PCR 扩增所得的 SH 基因序列已插入 T 载体中，获得了阳性重组质粒，T-SH 见图 2。



1,2. T-SH PCR; 3. DL2000 Marker;

4,5. T-SH digested with *Hind* / *Bam*H ;6. 1kb Marker

图 2 重组质粒酶切鉴定和 PCR 鉴定

2.3 克隆基因 T-SH 序列分析结果

用 Sanger 双脱氧链终止法进行序列测定，用生物学分析软件 DNASTar 对测序结果与 GenBank 上已发表的坏死梭杆菌标准菌株 *Fusobacterium necrophorum* leukotoxin gene(序列号 DQ672338.1)的 *lktA* 部分核苷酸序列进行比较结果表明，核苷酸序列同源性和氨基酸序列同源性和为 98.1%，推导出的相应的氨基酸序列同源性和为 98.3% (见图 3)。

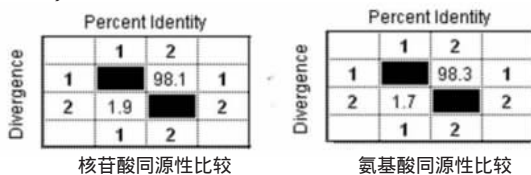
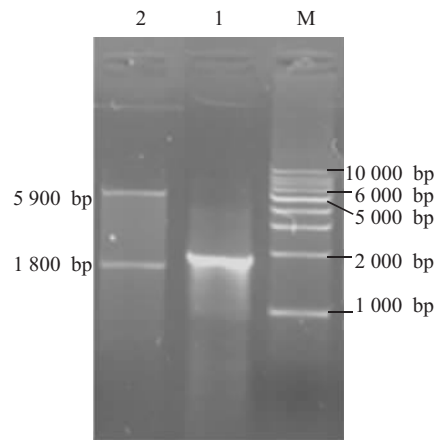


图 3 SH 与 *lktA* SH 核苷酸同源性和氨基酸同源性和比较

2.4 重组表达质粒 pET32a-SH 的构建

对质粒 pET32a-SH 进行 *Bam*H / *Hind* 双酶切和 PCR 鉴定(见图 4)，用 1 kb Marker 做标准对照，可以见到与预期目的基因(1 800bp)和载体 pET32a(5 900bp 左右)片段大小一致。这表明 SH 已插入 pET32a 载体中，将该质粒命名为 pET32a-SH。



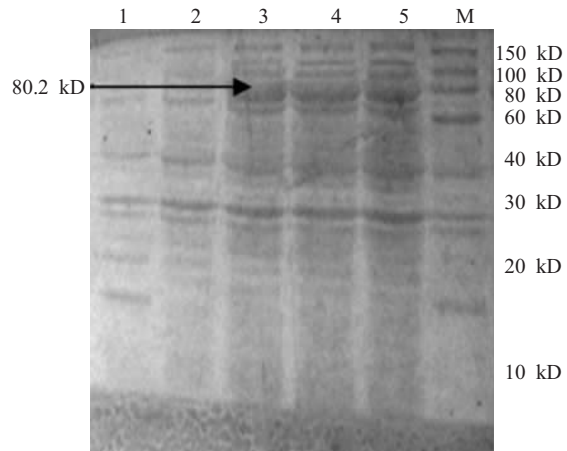
1. pET32a-SH PCR; M. 1kb Marker;

2. pET32a-SH digested with *Hind* / *Bam*H

图 4 重组质粒 pET32a-SH 酶切和 PCR 鉴定

2.5 目的蛋白诱导表达与纯化

2.5.1 目的蛋白诱导表达 理论计算 SH 重组蛋白分子量约 61.0 kD，pET32a 与目的蛋白 SH 融合部分约 19.2 kD，故表达的重组蛋白约 80.2 kD。从图 5 可见 SH 有明显的表达，与预测的目的蛋白大小相同。且大量诱导超声波裂解后，液体不透明清亮，离心有大量沉淀，推测该蛋白为包涵体表达，电泳结果证实了蛋白为包涵体表达。



1. pET32a induced with IPTG; 2. SH without IPTG induction; 3. SH with IPTG induction of 4h; 4. SH with IPTG induction of 6h; 5. SH with IPTG induction of 7h; M. high Molecular weight Marker

图 5 SH 融合蛋白表达 SDS-PAGE 电泳

2.5.2 重组蛋白纯化

应用 Novagen 公司的 Ni 亲和层析树脂进行纯化,应用包涵体纯化方法进行纯化,获得了纯度达 95% 的重组蛋白,见图 6。

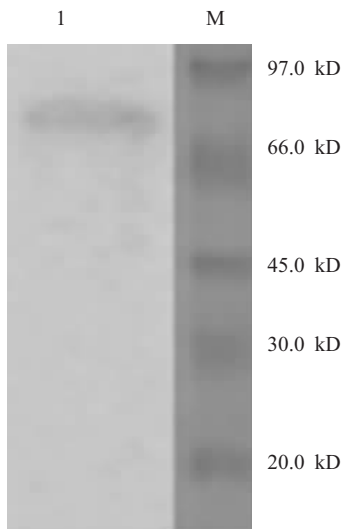


1~4. Purified SH; 5. SH buffer B

图 6 SH 蛋白 Ni 亲和纯化电泳图

2.6 Western-blot 检测分析

纯化的重组蛋白产物经 SDS-PAGE 后,转移至 NC 膜上进行反应原性分析,结果显示表达产物能被坏死梭杆菌的阳性血清识别,表明 SH 重组蛋白具有反应原性,见图 7。



1. SH Western-blot; M. molecular weight Marker

图 7 融合蛋白的 Western-blot 结果

3 讨论

Narayanan SK 报道 SH 是抗原性、保守性较好的基因^[10,12]。对其序列、大小、来源以及表达产物的大小进行分析,证明该片段能够在原核表达系统中进行表达。对 SH 基因进行了克隆、原核表达及反应原性分析,SH 在 *E.coli* BL21(DE3) 中获得了高效表达。

表达外源蛋白的系统虽然较多,但大肠杆菌表达系统具有培养方便、操作简单、成本低廉、表达量大、易于纯化和易于工业化批量生产等优点,是实验室获取重组蛋白的一种重要工具。由于 pET32a 原核表达载体所带的融合标签小,重组蛋白折叠时不易掩盖被研究蛋白的表位,能够保持蛋白原有的特性和空间结构。因此本实验利用 pET32a 原核表达载体,表达了坏死梭杆菌 F4 株的 SH 蛋白,表达的重组蛋白以包涵体形式存在。虽然以包涵体形式表达的蛋白需要复性,而且复性后蛋白的活性容易降低。但该方法可避免胞内蛋白水解酶的作用,有利于目的蛋白的富集和分离纯化。本实验利用 pET32a 原核表达载体本身所带的 His 标签,先在变性条件下,用镍离子亲和层析法纯化目的蛋白,然后检测重组蛋白浓度,再用 Western-blot 检测重组纯化的 SH 蛋白,检测重组蛋白有反应活性,与报道的结果一致。

本实验实现了国内分离的牛源坏死梭杆菌 FN(A) 菌株白细胞毒素基因 SH 片段在大肠杆菌中的表达,为制备国内坏死梭杆菌重组白细胞毒素基因工程疫苗奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Mulligan M. Ear, nose, throat, head and neck infections. In S. M. Finegold and W. L. George (ed.), *Anaerobic infections in humans*[J]. Academic Press, New York, N.Y.1989, 263- 288.
- [2] Hagelskjaer K J, Prag J. Human necrobacillosis, with emphasis on Lemierre's syndrome[J].*Clin. Infect. Dis*, 2000,31:524- 532.
- [3] Langworth B F. *Fusobacterium necrophorum*: its characteristics and role as an animal pathogen[J]. *Bacteriol. Rev*, 1977, 41: 373- 390.
- [4] Nagaraja T G. Necrobacillosis associated with *Fusobacterium necrophorum*. 1998, 400- 402.
- [5] Tan Z L, Nagaraja T G, Chengappa M M. Factors affecting leukotoxin activity of *Fusobacterium necrophorum* [J]. *Veterinary Microbiol*, 1992, 33: 15- 28.
- [6] Tan Z L, Nagaraja T G, Chengappa M M. *Fusobacterium necrophorum* infections: virulence factors, pathogenic mechanism and control measures [J]. *Vet. Res. Commun*, 1996, 20: 113- 140.
- [7] Emery D L, Vaughan J A, Clark B L, et al. Virulence determinants of *Fusobacterium necrophorum* and their prophylactic potential in animals[J]. In: Stewart D J, Peterson J E, McKern N M, Emery D L, editors. *Foot rot in Ruminants. Proceedings of a workshop Melbourne Australia: CSIRO Division of Animal Health, Australian Wool Corporation*. 1986, 267- 274.

[8] Coyle- Dennis J E, Lauerman L H. Correlation between leukocidin production and virulence of two isolates of *Fusobacterium necrophorum*. [J]. *Am. J. Vet. Res.*, 1979, 40: 274- 276.

[9] Tan Z L, Nagaraja T G, Chengappa M M. Biological and biochemical characterization of *Fusobacterium necrophorum* leukotoxin [J]. *Am. J. Vet. Res.*, 1994, 55(4): 55- 521.

[10] Narayanan S K, Nagaraja T G, Chengappa M M. Cloning, sequencing, and expression of the leukotoxin gene from *Fusobacterium necrophorum* [J]. *Infection And Immunity*, 2001, 69

(9): 5547- 5455.

[11] 萨姆布鲁克 J ,拉塞尔 D W.黄培堂, 等译校.分子克隆实验指南(第 3 版)[M].北京:科学出版社, 2002, 1233- 1236, 1713- 1726.

[12] Narayanan S K, Chengappa M M, George Stewart C. Immunogenicity and protective effects of truncated recombinant leukotoxin proteins of *Fusobacterium necrophorum* in mice [J]. *Veterinary Microbiology*, 2003, 93(4): 335- 3.

(上接第 13 页)

由以上数据分析可知,东北马鹿群体 MSTN 基因 2 个等位基因的纯合度比杂合度高, PIC 表现为低度多态。

3 讨论

动物 MSTN 基因是进化过程中高度保守的,特别是 MSTN 基因生物活性区更加保守^[2],东北马鹿 MSTN 基因也不例外。通过 PCR- SSCP 检测,对东北马鹿 MSTN 基因成熟区段进行 PCR- SSCP 分析,结果发现了一个颠换,即 G→A,但该突变并没有引起氨基酸的变异,GTA、GTG 密码都编码缬氨酸,并没影响氨基酸的变化。此突变与双肌牛不同,保守性区域未出现碱基的插入、替换和缺失,因此,对 MSTN 基因功能影响相当小或几乎没有影响。进一步证明 MSTN 基因成熟区段在进化上是相当保守的,虽然在 DNA 水平上有多态性,但在氨基酸水平上却没有改变。但由于本实验观察个体数量不大,实验结果仍需得到进一步的证实。

参 考 文 献

[1] 姜运良,连正兴,李 宁,等.肌肉生长抑制素基因的研究进展 [J].*遗传*, 2000,22(2):119- 121.

[2] McPherron A C, Lawler A M, Lee S J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- B superfamily member [J]. *Nature*, 1997, 387(6628):83- 90.

[3] McPherron AC, Lee S J. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1997, 94: 12457- 12461.

[4] Ji S, Losinski R L. Myostatin expression in porcine tissues: tissue specificity and developmental and postnatal regulation [J]. *American Journal of Physiology*, 1998, 275(1):1265- 1273.

[5] 蔡辉国,陈佩贞. PCR- SSCP 分析实践 [J]. *生物化学与生物物理进展*. 1995, 22(5):473- 475.

[6] 王镜岩,等. *生物化学* [M]. 北京:高等教育出版社, 2002.

[7] 阎龙飞,张玉麟. *分子生物学* [M]. 北京:中国农业大学出版社, 1997.

欢迎订阅 2009 年《特种经济动植物》

《特种经济动植物》是由中华人民共和国农业部主管、中国农业科学院特产研究所主办的全国唯一的特种经济动植物专业性国家级科技类期刊,全国邮发报刊重点推荐杂志。公开发行,月刊,大 16 开本,56 页,每月 10 日出版。一刊在手,致富不愁。

办刊宗旨 面向生产和用户。突出刊物的科学性、实用性、超前性、灵活性;为科技兴农、振兴农村经济、农民科技致富服务;奉行科学、适用、及时的办刊方针;保持“实、新、短、特、活”的特色;介绍特产农业、特色农业新技术、新成果、新品种、新经验、新信息;使广大读者学到新知识、掌握新要领,成为广大读者选项、致富的好帮手。

主要内容 ①特种经济动物 毛皮动物、经济(野生)动物、珍(野)禽、观赏动物、国内外畜禽优良品种、肉用犬、各地特有水(海)产动物、各地特有动物。②特种经济植物 经济植物、野生(名特)果树、药源、观赏、

油料、饲料、蜜源、园林草坪、海(水)生、防风固沙(氮)等植物,高产作物、野生蔬菜、名特蔬菜、各地名产、牧草、食用菌等的栽培、加工、植物保护等。③信息荟萃 国内毛皮市场及世界毛皮拍卖会行情,全国十大中药材市场特种经济动、植物类中药材市场行情,特种经济动植物发展前景及其权威预测、专家论坛、专家提醒、供求信息等。

订阅办法 全国各地邮局(所)均可订阅,邮发代号 12- 183,每期 4.0 元,全年 48.0 元(含邮费)。也可随时从邮局汇款至编辑部订阅。

地址 吉林省吉林市左家镇鹿鸣大街 15 号 邮编 132109
单位 中国农业科学院特产研究所《特种经济动植物》编辑部

联系人:包秀芳 周淑荣

E- mail tzjdz@126.com

电话 (0432)6513067 6513069(兼传真)