

## 猪胸膜肺炎放线杆菌毒素 III A 基因的克隆、 序列分析及原核表达

陈汉阳 刘军发 何启盖 肖少波 陈焕春\*

(华中农业大学畜牧兽医学院动物病毒室 武汉 430070)

**摘 要** 因胸膜肺炎放线杆菌的致病性主要是由毒素决定的,故参照猪胸膜肺炎放线杆菌血清 2 型菌株的序列(GenBank L12145)设计了一对特异性引物,用 PCR 的方法扩增 *apx III A* 基因并得到了长 3 466bp 的片段,然后将其克隆到 pMD-18T 中,经酶切鉴定和序列分析表明克隆是成功的,再将 *apx III A* 插入到原核表达载体 pET-28b 后,转化 BL21(DE3),在 IPTG 诱导下获得高效表达,经 Western blotting 检测证实表达产物有活性。以表达产物包被 ELISA 板,建立了特异、敏感的 ELISA 诊断方法。

**关键词** 胸膜肺炎放线杆菌,毒素 III A (*apx III A*),克隆,原核表达

中图分类号:Q786 文献标识码:A 文章编号:1006-6179(2003)03-0324-06

猪传染性胸膜肺炎是危害当前世界各国养猪业的主要疾病之一,这种病是由胸膜肺炎放线杆菌(*Actinobacillus pleuropneumoniae*, App)引起的。目前 App 共发现有 15 种血清型<sup>[1]</sup>,并且各个国家流行的优势血清型各不相同。不同血清型之间及同一血清型的不同菌株的毒力均存在差异,致病性也有强弱之分,从而导致该病的诊断和治疗非常困难。近年来的研究表明,与病原菌毒力相关的因子有毒素、荚膜、外膜蛋白、脲酶等,其中毒素既是主要的毒力因子,也是主要的免疫原,可作为诊断抗原建立血清学检测方法,还可以用于诊断和衡量免疫状态,因此毒素研究已成为该病研究热点。

胸膜肺炎放线杆菌共有 4 种毒素,即毒素 I, II, III 以及最近发现的毒素 VI,它们均属于 RTX 毒素家族。毒素 I 具有很强的溶血活性,毒素 II 相对较弱,毒素 III 虽没有溶血活性,但细胞毒性较强。分泌表达上述毒素均需相邻的 B、C、A、D 四种基因的共同作用,其中 A 基因编码毒素的结构蛋白。因此对毒素 III A 基因进行克隆和表达,将有助于阐明 App 的分子致病机理,在研制新型疫苗和建立诊断方法等方面具有潜在的理论价值和应用前景。这方面的研究国内尚未见报道。

本试验以胸膜肺炎放线杆菌血清 2 型标准菌株为材料,克隆鉴定了编码毒素 III 结构蛋白的 A 基因,进行序列分析后实现了在大肠杆菌的表达,表达产物经 Western blotting 和 ELISA 证实有生物活性,现将结果报道如下。

基金项目 国家自然科学基金(30200011),湖北省“十五”重点科技攻关项目(2001AA201B02)

\* 通讯作者。Tel/Fax 86-27-87282608; E-mail hzauvet@public.wh.hb.cn

作者简介 陈汉阳(1979-)男,湖北人,现为华中农业大学预防兽医学专业硕士研究生。

E-mail:chenhanyang\_2008@yahoo.com.cn

收稿日期 2002-08-26,修回日期 2002-12-02

# 1 材料和方法

## 1.1 材料

**1.1.1 菌株、质粒和载体** : App 血清 2 型 由中国农业科学院兰州兽医研究所逯忠新研究员惠赠 ; pMD-18T( T-Vector ) 购自大连宝生物公司 ; pBluescript II SK( + ) *E. coli* DH5 $\alpha$ 、BL21、pET-28b 本室保存。

**1.1.2 工具酶及主要试剂** : 限制性内切酶、Ex Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶( TaKaRa ) , DNA 凝胶回收试剂盒( 上海生工生物工程有限公司 ) , 猪抗 App 血清 2 型抗血清( 本室自制 ) , HRP 标记鼠抗猪 IgG 抗体( 华美生物公司 ) , 其它试剂均为分析纯。

**1.1.3 培养基** : LB 培养基、PPL0 培养基 均按常规方法配制。

**1.1.4 引物** : 根据 GanBank 上 App 血清 2 型的序列( L12145 ) 设计合成( 上海生工生物工程有限公司 ) 了一对特异性引物 , 扩增片段大小为 3 466bp。

上游引物序列为 5'GTACTTGGTCAAGCATGTTAGCCG 3' ;

下游引物序列为 5'TAACGTGTTGACCATCATCTCGCC 3'。

## 1.2 方法

**1.2.1 App 基因组的提取及 PCR 模板的制备** : 具体操作参照文献 [ 2 ] 进行。

**1.2.2 PCR 反应条件** : 94 $^{\circ}$ C 预热 4min , 94 $^{\circ}$ C 变性 60s , 67 $^{\circ}$ C 复性 75s , 72 $^{\circ}$ C 延伸 165s , 30 个循环 , 最后再 72 $^{\circ}$ C 延伸 12min。

**1.2.3 PCR 产物的鉴定及克隆** : PCR 扩增得到的片段经琼脂糖凝胶电泳鉴定 , 在紫外灯下观察回收后 , 与 T-Vector 连接 , 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  , 经蓝白斑筛选得到阳性克隆子 , 酶切鉴定 , 获得重组质粒 , 再经测序分析克隆成功与否及片段插入载体的方向。

**1.2.4 序列测定** : 采用双脱氧法 , 由上海生工生物工程有限公司完成。

**1.2.5 表达质粒的构建** : 因为 T-Vector 与 pET-28b 表达载体的酶切位点的限制 , 导致 *apx III A* 无法正向插入到表达载体中 , 所以在表达载体的构建过程中引进了一个过渡载体 pBluescript II SK+( pSK ) , 利用其丰富的多克隆位点 , 选择不同的酶切组合 , 使 *apx III A* 可以顺利正向插入到表达载体 pET-28b 中。

首先用 *Bam*H I 和 *Sal* I 分别消化重组质粒( *apx III A* /T-Vector ) , 将酶切产物连接到中间载体 pSK 中 , 得到过渡重组质粒 *apx III A* /pSK 后 , 再用 *Sal* I 和 *Not* I 分别消化 *apx III A* /pSK 及 pET-28b 后回收 , 连接 , 得到表达重组表达质粒 *apx III A* /pET-28b。技术路线见图 1。

**1.2.6 *apx III A* 基因的表达及 Western blotting 检测** : 用重组表达质粒 *apx III A* /pET-28b 转化 BL21。将其表达的蛋白质进行 SDS-PAGE 电泳。然后以猪抗 App 血清 2 型抗血清为一抗 , HRP 标记鼠抗猪 IgG 抗体为二抗进行 Western blotting 分析 , 具体操作见参考文献 [ 3 ]。

**1.2.7 ELISA 方法的初步建立** : 用表达的 *apx III A* 及空白载体 pET-28b 分别包被 ELISA 板 , 以猪抗 App 抗体为一抗 , 以 HRP 标记鼠抗猪 IgG 抗体为二抗 , 再按常规方法进行 ELISA 测定  $OD_{630}$  值 , 比较阴阳性血清的  $OD_{630}$  值大小 , 确定阴阳性结果的判定标准 ; 以所建立的 ELISA 方法检测了 71 份血样。

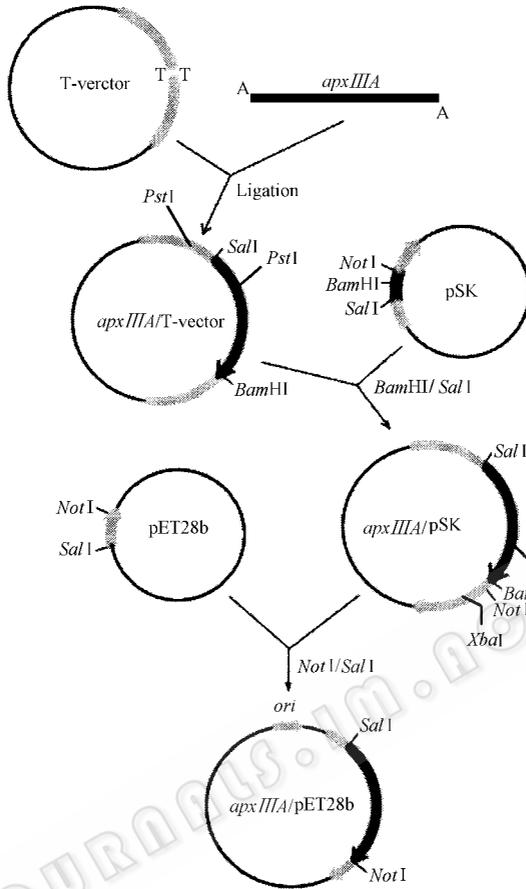


图 1 重组质粒 *apx III A* /pET-28b 的构建

Fig.1 Construction of recombinant plasmid of *apx III A* /pET-28b

## 2 结果

### 2.1 *apx III A* 基因的 PCR 扩增

扩增大小为 3 466bp,与预计的大小一致。

### 2.2 *apx III A* 克隆到 T-Vector 及其方向的酶切鉴定

比较 *apx III A* 及 T-Vector 的限制性酶切图谱,发现在扩增的 *apx III A* 基因中的 5' 端 934bp 的地方有一 *Pst I* 酶切位点,同时在 T-Vector 的 3' 端也有一 *Pst I* 位点(图 1),若 *apx III A* 正向插入到 T-Vector 酶切片段大小应为 3 626bp 和 2 533bp,若是反向,则大小为 940bp 和 5 225bp。*Pst I* 单酶切的结果(图 2)说明 *apx III A* 成功克隆进了 T-Vector 且是反向插入的。

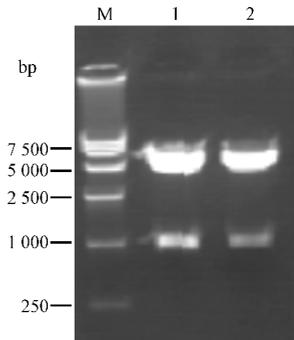


图 2 重组质粒 *apx III A* /T-Vector 的酶切鉴定

Fig.2 Characterization of *apx III A* /T-Vector by *Pst I*

M. DL-15 000; 1. 2. *apx III A* /T-Vector(*Pst I*).

### 2.3 *apx III A* 基因的序列分析

将测序结果上 NCBI 网站作 Blaster2 分析(图 3),其中 Query 为测序结果, Sbjct 为 NCBI 公布的序列 L12145. 分析比较发现它们核苷酸同源性 99.3%, 推测氨基酸同源性达 98.2%。

```

Query: 51   gtacttggccaagcatgtagccgacttaaaaaaggctgaagaagccaaaagacaag 110
Sbjct: 741  gtacttggccaagcatgtagccgacttaaaaaaggctgaagaagccaaaagacaag 800
Query: 111  ccaaaaaggctacgatgtaactaaaatggtttgcaatatggggtgagtcaagcaaat 170
Sbjct: 801  ttaaaaaggctacgatgtaactaaaatggtttgcaatatggggtgagtcaagcaaat 860
Query: 171  tacaagcattagcagctggttaaagccgttcaaaagtacggtataaattagtttagtta 230
Sbjct: 861  tacaagcattagcagctggttaaagccgttcaaaagtacggtataaattagtttagtta 920
Query: 231  ttccaaaagagatgatgacggaagtgttgtaacggtttctttgatttagtaaaagcagctg 290
Sbjct: 921  ttccaaaagagatgatgacggaagtgttgtaacggtttctttgatttagtaaaagcagctg 980
Query: 291  aggaattagcattcaagttaaataatgtaaccgtaataatggaagttgccataaaa 350
Sbjct: 981  aggaattagcattcaagttaaataatgtaaccgtaataatggaagttgccataaaa 1040
Query: 351  gtttaggtaccgcagaccaattcttgggtttaacagaacgtggacttactttatttgcac 410
Sbjct: 1041 gtttaggtaccgcagaccaattcttgggtttaacagaacgtggacttactttatttgcac 1100
Query: 411  cgcaactagatcagttcttacaaaaacattcaaaaatttctaacgtagtggcgagttcta 470
Sbjct: 1101 cgcaactagatcagttcttacaaaaacattcaaaaatttctaacgtagtggcgagttcta 1160
Query: 471  ctggtgatgcagtaagtaacttgctaagagtcaaactattatttcaggaattcaatctg 530
Sbjct: 1161 ctggtgatgcagtaagtaacttgctaagagtcaaactattatttcaggaattcaatctg 1220
Query: 531  tattaggtactgtattagcaggtattaatcttaataagactattattagtgccggttcag 590
Sbjct: 1221 tattaggtactgtattagcaggtattaatcttaataagactattattagtgccggttcag 1280
Query: 591  agctcgaattagctgaagctgggtttctttagcctctgagctcgtagtaaatattgcta 650
Sbjct: 1281 agctcgaattagctgaagctgggtttctttagcctctgagctcgtagcaaatattgcta 1340
Query: 651  aaggtacaacaacaatagatgctttcactacacaaatccagaactttgggaaattagtg 710
Sbjct: 1341 aaggtacaacaacaatagatgctttcactacacaaatccagaactttgggaaattagcgg 1400
Query: 711  taaatgctaaagggtta 727
Sbjct: 1401 aaaatgctaaagggtta 1417

```

图 3 克隆基因 *apx III A* 的序列分析

Fig.3 Sequence alignment of *apx III A* (Query) and L12145(Sbjct)

### 2.4 表达重组质粒的构建及鉴定结果

构建过渡载体的目的是为了利用 pSK 上的多克隆位点使 *apx III A* 可以正向插入到表达载体 pET-28b 中。用 *Xba I* 对过渡重组质粒进行酶切, 鉴定克隆及插入方向(图 1), 得到两条带, 与预期的大小一致, 分别为 930bp 和 5 100bp(图 4), 证明 *apx III A* 克隆进了 pSK 载体中。而重组表达质粒经 *Sal I* 和 *Not I* 酶切后, 得到预期的两条带, 大小分别为 3 400bp 和 5 500bp, 至此原核表达质粒构建成功(图 5)。

### 2.5 *apx III A* 基因的表达及检测

对表达产物进行 SDS-PAGE 分析, 以空白载体为对照, 发现在 116.0kD 处多出一条蛋

白质带,约 112.5kD(见图 6),与文献报道 $apx III A$  的分子量相符,用制备包涵体<sup>[4]</sup>的方法纯化表达的蛋白质,将此蛋白进行 Western blotting 分析,出现阳性反应。

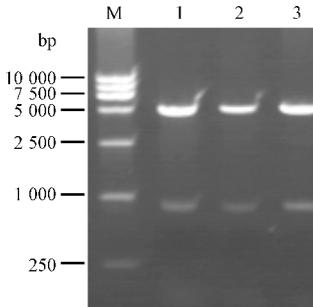


图 4 重组质粒 $apx III A$  /pSK 的酶切  $Xba I$  鉴定

Fig.4 Characterization of  $apx III A$  /pSK by  $Xba I$   
M. DL-15 000 ; 1 ~ 3.  $apx III A$  /pSK (  $Xba I$  ).

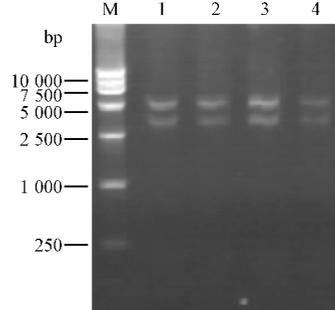


图 5 表达质粒 $apx III A$  /pET-28b 的酶切鉴定

Fig.5 Characterization of  $apx III A$  /pET-28b by  $Sal I$  +  $Not I$   
M. DL-15 000 ; 1 ~ 4.  $apx III A$  /pET-28b (  $Sal I$  +  $Not I$  ).

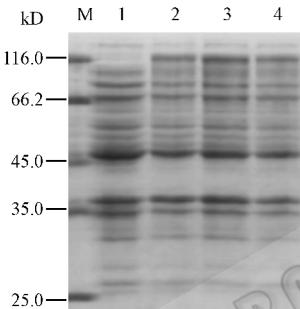


图 6 SDS-PAGE 的结果

Fig.6 SDS-PAGE analysis of expressed  
 $apx III A$  /pET-28b in BL21  
M. Protein Marker SM-043I( MBI );  
1. pET-28b ; 2 ~ 4. pET-28b/ $apx III A$  .

## 2.6 ELISA 试验结果

共检测了 71 份血清,其中抗 $apx III A$  血清阳性为 44 份,抗 $apx III A$  血清阴性为 27 份,阴阳性血清的平均  $OD_{630}$  值见表 1。实验结果与 IHA 试验结果比较,要求样品的  $OD_{630}$ /标准阳性  $OD_{630} > 0.6$  才可以判为阳性。

表 1 运用 $apx III A$  建立的 ELISA 方法检测病例的结果

Table 1 The results of checking cases by ELISA depending on  $apx III A$

Cases	$OD_{630}$	
	Blank vector	Expressed protein
Negative	0.104	0.278
Positive	0.153	1.015

## 3 讨论

猪传染性胸膜肺炎放线杆菌产生和分泌的毒素共有 4 种,不同毒素的生物活性有差异,在这些毒素中毒素 III 具有最强的细胞毒性,因此获得此纯化的毒素,及其功能的研究将有助于阐明胸膜肺炎放线杆菌致病的分子机制。然而,尽管该毒素可以分泌到细菌培养基中,但由于培养基中蛋白质成分相当复杂,加之抗 $apx III A$  抗体的获得也比较困难,因此,运用常规的分选纯化技术很难得到数量较多且含量相对较纯的毒素 III。本试验采用基因工程方法,成功地在原核生物中表达了编码毒素 III 的结构蛋白。虽然不是完整地表达整个毒素 III 基因,但是表达产物经 Western blotting 和 ELISA 试验证实有活性。这些结果为该病原菌的进一步深入研究,如以该毒素为抗原建立诊断方法以及研制亚单位疫苗奠定了基础。

另外本文应用 PCR 技术扩增的 $apx III A$  基因,经序列分析表明,它不仅与血清型 2 同

源性极高,而且和其它血清型也有相当高的同源性,如与血清 8 型的同源性就高达 98%,可见该基因是相当保守的,因此也可将扩增此基因的 PCR 技术用于分子诊断。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Blackall P J, Klaasen H L, van den Bosch H, et al. Proposal of a new serovar of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: serovar 15. *Vet Microbiol*, 2002, **84**( 1 ~ 2 ) : 47 ~ 52.
- [ 2 ] Christopher T, Lesley P, Jolanta K. Protection of mice against challenge with homologous and heterologous serovars of *Actinobacillus pleuropneumoniae* after live vaccination. *Current Microbiology*, 1998, **37**: 324 ~ 332.
- [ 3 ] J. 萨姆布鲁克, E. F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯著(金冬雁、黎孟枫等译). 分子克隆实验指南. 第二版. 北京: 科学出版社, 1998.
- [ 4 ] 卢圣栋. 现代分子生物学技术. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999.

## Cloning and Expression of the *apx III A* Gene of *Actinobacillus pleuropneumoniae*

Chen Hanyang Liu Junfa He Qigai Xiao Shaobo Chen Huanchun\*

( *Labs of Animal Viuras, Huazhong Agriculture University, Wuhan 430070, China* )

**Abstract**: The *apx III A* gene of *Actinobacillus pleuropneumoniae* ( App ) was amplified by PCR. The amplified DNA fragment 3 466bp was cloned into pMD18-T. After R. E. analysis and sequencing, the *apx III A* gene in pMD18-T was ligated into pBluescrip II SK( + ), the recombinant expression plasmid pET-28b/*apx III A* was constructed and analysed with R. E., the protein of *apx III A* gene expressed in *E. coli* BL21 was detected by Western blotting. Based on expressed *apx III A* protein as antigen, empty expression vector as control, the ELISA to detect antibody against *apx III A* was developed and was primarily used to detect serum samples.

**Key words**: *Actinobacillus pleuropneumoniae* ( App ), *apx III A*, Clone, Expression

Foundation item: The 10th Five Years Key Programs for Science and Technology Development of Hubei Province ( 2001AA201B02 )

\* Corresponding author. Tel/Fax 86-27-87282608, E-mail: zhzauvet@public.wh.hb.cn

Received date: 08-26-2002

### 致 谢

《微生物学报》创刊于 1953 年 4 月,至今已走过了 50 年的历程。50 年来,《微生物学报》共出版 43 卷、185 册、发表论文 3440 余篇(截止到 2003 年第 3 期),见证了新中国微生物学发展的历史。办刊期间,得到了国内外广大专家、作者、读者的大力支持和帮助。值此创刊 50 周年之际,谨向为《微生物学报》做出贡献的所有人士表示衷心的感谢,并致崇高敬意! 21 世纪是生物学飞速发展的时代,为了将本刊办得更好,真诚希望广大的作者和读者一如既往地支持我们,多多提出宝贵意见和建议,促进学科发展。