

福氏志贺菌 *ipaB* 基因的克隆及其在酵母细胞中的表达

姚 潇² 王恒樑¹ 闫晓宇¹ 杨伯伦² 黄留玉^{1*}

(¹军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071)

(²陕西师范大学生命科学学院 西安 710062)

关键词 : 福氏志贺菌 , *ipaB* 基因 表达

中图分类号 : Q786 文献标识码 : A 文章编号 : 1001-6209 (2003) 03-0418-04

志贺氏菌引起的细菌性痢疾为一种全球性的肠道传染病。据估计 , 全世界每年感染的人数超过两亿 , 由该病引起的死亡人数有 65 万左右^[1]。该菌的致病性是由体内含有 230 kb 的毒性大质粒决定的 , 而大质粒上一个 31kb 的片段所编码的侵袭质粒抗原(Invasion plasmid antigen , Ipa)是致病所必需的^[2,3]。近年来 , 国内外有关学者在原核生物中对 *ipaB* 基因克隆及功能进行了较广泛的研究^[4,5] , 但在酵母细胞中这方面的研究未见报导。从志贺痢疾杆菌中克隆了 *ipaB* 基因 , 并在酵母细胞中得到了融合表达 , 为将 IpaB 应用于双杂交系统研究其在侵袭过程中的分子机制打下了基础。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

研究所用菌株和质粒见表 1。

表 1 菌株和质粒

菌株或质粒	遗传型及性状	来源
<i>S. flexneri</i> 2a 2457T	wild type , Nal ^r	Maurelli AT
<i>E. coli</i> DH5α	SupE44 , ΔlacU169 , hsdR17 ⁺ , recA1 ⁺ , endA1 ⁺ , gyrA96 ⁺ , thi ⁻ 1 ⁺ , rel A1 ⁺ , Nal ^r	GIBCO/BRL
<i>S. cerevisiae</i> AH109	MATa , trp ⁻ , leu ⁻ , his ⁻ , Ade ⁻ , LacZ ⁻	Clontech
pGBKT7	GAL4 DBD , TRP1 , c-Myc tag , Kan ^r	Clontech
pGBKT-ipaB	IpaB fused to GAL4 DBD , TRP1 , c-Myc tag , Kan ^r	This work

1.2 菌株培养

痢疾杆菌 2457T 先在含 0.025% 刚果红的 TSA (Tryptiscase soy agar) 平皿上划线培养 , 挑取红色菌落接种于 TSB (Tryptiscase soy broth) 培养基在 37℃ 摇床培养。DH5α 用 LB 培养基培养、酵母菌 AH109 用 YPAD 培养基培养、AH109 转化后用 SD/-Trp 培养基筛选培养。抗生素工作浓度 : 卡那霉素(Kan) 50μg/L , 萘啶酮酸(Nal) 40μg/L。

1.3 工具酶及化学试剂

限制性内切酶 , T4 DNA 连接酶、*Taq* DNA 聚合酶、PCR 片段回收试剂盒为 TaKaRa 公司产品 ; 质粒提

基金项目 : 首都二四八重大创新工程(H010210360119) , 国家重点基础研究发展规划项目(G1999054103)

* 通讯作者。Tel/Fax 86-10-83821044 , E-mail : huangly@nic.bmi.ac.cn

作者简介 姚 潇 (1967-) , 男 , 陕西周至人 , 博士研究生 , 主要从事基因工程研究。E-mail : yaoxiao50@hotmail.com

收稿日期 2002-08-30 , 修回日期 2002-11-19

取试剂盒为 Promega 公司产品。c-Myc 单克隆抗体、YPD 和 SD/-Trp 培养基购自 Clontech 公司。

1.4 *ipaB* 基因的扩增

取 50 μ L 培养过夜的痢疾杆菌 ,离心弃上清后加等体积去离子水 ,沸水煮 10min 后离心 ,取菌裂解液的上清 2 μ L 为 PCR 模板 ,反应体系中加入 2.5mmol/L 的 dNTP 8 μ L ,10 \times PCR 缓冲液 10 μ L ,20 μ mol/L 的引物 P₁、P₂ 各 1 μ L ,补水至 100 μ L。反应条件为 :95 $^{\circ}$ C 4min 后 ,按下列参数循环 30 次 ,95 $^{\circ}$ C 变性 30s ,52 $^{\circ}$ C 退火 30s ,72 $^{\circ}$ C 延伸 90s ,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min。

1.5 重组质粒的构建

回收 PCR 扩增片段经 *Nco*I 和 *Pst*I 双酶切后 ,再与质粒 pGBKT7 经 *Nco*I 和 *Pst*I 双酶切的产物在 16 $^{\circ}$ C 连接过夜。连接产物转化大肠杆菌 DH5 α ,提取重组质粒酶切鉴定。

1.6 序列测定

取酶切鉴定正确的重组质粒进行测序 ,由上海博亚生物工程有限公司完成。

1.7 酵母细胞的转化

按文献 [6] 用醋酸锂法将 pGBKT-*ipaB* 转化酵母 AH109 细胞 ,铺 SD/-Trp 平板筛选。

1.8 酵母蛋白的提取

挑取 2mm~3mm 大小的菌落过夜培养后 ,按 Clontech 公司提供的操作说明 ,用尿素/SDS 法提取酵母蛋白质。

1.9 SDS-PAGE 和 Western blotting 分析

按文献 [7] 对表达产物进行 SDS-PAGE 和 Western blotting 分析。由于 pGBKT7 质粒在表达与 GAL4 的融合蛋白中含有 c-Myc 标签 ,所以在 Western blotting 分析时可用 c-Myc 单克隆抗体检测所表达的融合蛋白。

2 结果

2.1 *ipaB* 基因的 PCR 扩增结果

根据 GenBank 中的 *ipaB* 基因序列 ,设计以下引物 :

P1 5'-CAT GCC ATG GTT ATG CAT AAT GTA AGC ACC-3'

P2 5'-AAC TGC AGT CAA GCA GTA GTT TGT TG-3'

P1 的 5'端加入了限制性内切酶 *Nco*I 的识别位点 ,P2 的 5'端加入了限制性内切酶 *Pst*I 识别位点 ,可使 PCR 扩增片段插入到 pGBKT7 表达载体的相应酶切位点中 ,并保证 *ipaB* 基因与 GAL4 的 DNA 结合结构域融合后阅读框架正确。

2.2 pGBKT-*ipaB* 重组质粒的构建

ipaB 基因的 PCR 扩增片段经 *Nco*I 和 *Pst*I 双酶切 ,与表达载体 pGBKT7 经 *Nco*I 和 *Pst*I 双酶切后进行连接 ,并转化大肠杆菌 DH5 α ,将该重组质粒命名为 pGBKT-*ipaB*(见图 1)。提取转化子的质粒 ,经 *Nco*I 和 *Pst*I 双酶切进行鉴定 ,能切出约为 1.7kb 的 *ipaB* 基因片段和 7.3kb 载体片段。实验结果与预期所能得到的片段大小相符 ,表明克隆 *ipaB* 基因成功(见图 2)。

2.3 序列分析

对 pGBKT-*ipaB* 重组质粒进行序列分析 ,结果表明本实验克隆的 *ipaB* 基因所编码的氨基酸与文献 [8] 报道一致。

2.4 pGBKT-*ipaB* 转化酵母 AH109 株

AH109 株为色氨酸营养缺陷型 ,成功转化的 AH109 才可在缺少色氨酸的培养基上生长。培养 3~5d ,挑取一菌落用 PCR 方法扩增 *ipaB* 基因 ,得到约 1.7kb 的条带(结果未显示) ,表明重组质粒转化酵母细胞成功。

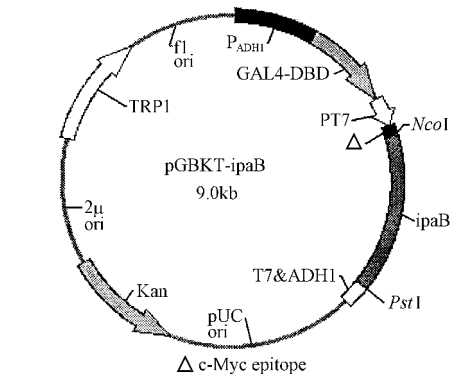


图 1 表达载体 pGBKT-ipaB 质粒图谱

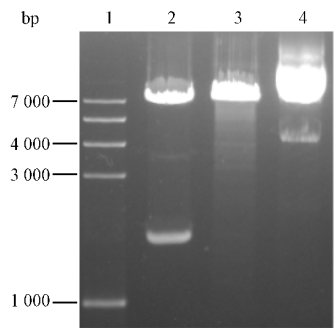


图 2 pGBKT-ipaB 重组质粒的酶切鉴定

1. DNA marker 2. pGBKT-ipaB + *Nco*I + *Pst*I ;
3. pGBKT7 + *Nco*I + *Pst*I 4. pGBKT7.

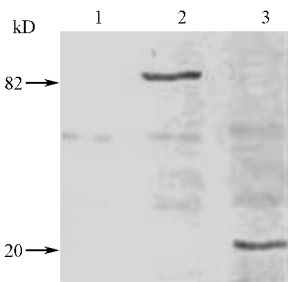


图 3 表达产物的 Western 免疫印迹分析

1. 未转化的 AH109 ;
2. pGBKT-ipaB 转化的 AH109 ;
3. pGBKT7 转化的 AH109.

2.5 表达产物的 SDS-PAGE 和 Western 免疫印迹分析

提取未转化、转化 pGBKT7 和 pGBKT-ipaB 质粒的 AH109 酵母蛋白质 ,进行 SDS-PAGE 和 Western 免疫印迹分析。结果显示 pGBKT7 空质粒转化的酵母细胞表达出一约 20kD 的条带 ,其为融合 c-Myc 标签的 GAL4 转录激活因子 DNA 结合结构域蛋白 ;pGBKT-ipaB 重组质粒转化的酵母细胞表达出一更大分子量的蛋白条带 ,其应为带有 c-Myc 标签的 GAL4 转录激活因子 DNA 结合结构域和 IpaB 融合蛋白 ;AH109 酵母细胞则没有表达条带(见图 3)。

3 讨论

IpaB 在志贺氏菌的致病过程中起着非常重要作用^[9]。为了寻找宿主细胞中与 IpaB 相互作用蛋白分子 ,我们从志贺痢疾杆菌中克隆了 *ipaB* 基因。将其克隆到双杂交系统中的诱饵融合表达载体 pGBKT7 上得到重组质粒。测序结果表明克隆到的 *ipaB* 基因虽与文献报道的

核苷酸序列略有不同 ,但所编码的氨基酸却相同 ,符合后续实验要求。重组质粒转化 AH109 酵母细胞后经 SDS-PAGE 和 Western blotting 检测 ,得到了与 GAL4 DNA 结合结构域的融合表达。但在提取蛋白的过程中 ,由于酵母细胞中含有较多的内源性蛋白酶 ,要适时地添加蛋白酶抑制剂 ,降低对目的蛋白的降解。而且 ,重组质粒转化酵母细胞后应该用 SD/-Trp 培养基筛选和培养 ,但在该培养基中蛋白表达量较低 ,很难检测到目的蛋白。为此 ,我们改用 YPAD 丰富培养基培养转化的酵母细胞 ,使蛋白表达水平有所提高。本工作为进一步应用酵母双杂交系统筛选 IpaB 的相互作用蛋白 ,了解 IpaB 在致病过程中的分子机制奠定了基础。

参 考 文 献

[1] Linderberg A A , Pal T. Strategies for development of potential candidate *Shigella* vaccine. *Vaccine* ,1993 ,**11** :168 ~ 179.
[2] Maurelli A T , Baudry B , d 'Hauteville H , *et al.* Cloning of plasmid DNA sequence involved in invasion of HeLa cells by *Shigella flexneri*. *Infect Immun* , 1985 **49** :164 ~ 171.
[3] Sasakawa C , Kamata K , Sakai T , *et al.* Virulence-assosiated genetic regions comprising 31 kilobases of the 230-kilobase plasmid in *Shigella flexneri* 2a. *J Bacteriol* , 1998 ,**170** :2480 ~ 2484.
[4] Guichon A , Hersh D , Smith M R , *et al.* Structure-function analysis of the *Shiella* virulence factor IpaB. *J Bacteriol* .
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

- 2001 ,**183** (4) :1269 ~ 1276 .
- [5] Picking W L , Mertz J A , Marquart M E , *et al* . Cloning , expression , and affinity purification of recombinant *Shigella flexneri* invasion plasmid antigens IpaB and IpaC . *Protein Expr Purif* , 1996 **8** (4) 401 ~ 408 .
- [6] Gietz D , Jean A , Woods R A , *et al* . Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells . *Nucl Acid Res* , 1992 **20** :1425 .
- [7] Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T . Molecular cloning : a laboratory manual . 2nd ed . New York :Cold Spring Harbor Press , 1989 .
- [8] Venkalesan M M , Buysse J M , Kopecko D J . Characterization of invasion plasmid antigen genes (*ipaBCD*) from *Shigella flexneri* . *Proc Natl Acad Sci USA* , 1988 **85** 9317 ~ 9321 .
- [9] Chen Y , Smith M R , Thirumalai K , *et al* . A bacterial invasin induces macrophage apoptosis by directly binding ICE . *EMBO J* , 1996 **15** 3853 ~ 3860 .

Cloning of *ipaB* Gene from *Shigella flexneri* and its Expression in Yeast Cell

Yao Xiao² Wang Hengliang¹ Yan Xiaoyu¹ Yang Bolun² Huang Liuyu^{1*}

(¹ Institute of Biotechnology , Academy of Military Medical Sciences , Beijing 100071 ,China)

(² College of Life Sciences ,Shanxi Normal University ,Xi 'an 710062 ,China)

Abstract : *ipaB* gene amplified from *S. flexneri* 2a by PCR was cloned into pGBKT7 vector (Named pGBKT-*ipaB*) and sequencing indicated that the amino encoded by the cloned gene was the same as the reported ;The recombination plasmid pGBKT-*ipaB* was transformed into the yeast strain AH109 , in which the fusion expression of IpaB was analyzed with SDS-PAGE and Western blotting . This provided the basis for screening the interacting protein with IpaB by two hybrid system and understanding the function of IpaB in the pathogenesis of *S. flexneri* further .

Key words : *Shigella flexneri* , *ipaB* gene , Expression