

致病钩体表层膜蛋白新基因(Lslp)的克隆 表达及免疫原性研究

胡昌华^{1,2} 鲍 朗^{2*} 谢建平¹ 张会东²

(¹ 西南师范大学生命科学学院现代生物医药研究所 重庆 400715)

(² 四川大学华西医学中心 成都 610041)

摘 要 克隆表达钩端螺旋体表层膜蛋白新基因 Lslp 并分析表达产物的免疫原性。根据前期研究得到的致病钩体新基因 Lslp(GenBank AF325807)的序列设计引物,在 6 株致病钩体中扩增 Lslp 基因并测序。以 BamH I 酶切 Lslp 和 pGEX 1- λ T 构建重组质粒并用酶切和 PCR 鉴定,进一步在大肠杆菌中诱导表达,并进行免疫印迹分析,纯化表达产物免疫家兔,ELISA 检测血清抗体滴度。结果显示 Lslp 在 6 株致病钩体中均能扩增出相应片段,且序列同源性达到 99.6%。构建高效原核表达重组质粒 pGST-Lslp,经 IPTG 诱导在大肠杆菌中可表达出 66kD GST 融合蛋白,并能与全钩抗血清发生免疫印迹反应,将上述融合蛋白免疫新西兰大白兔产生 1:5120 高滴度的 IgG 抗体。研究结果提示致病钩体膜蛋白新基因 Lslp 可在大肠杆菌进行高效表达,表达产物能被全钩抗血清识别,为研究钩体的致病机制和筛选保护性抗原提供了基础。

关键词 钩端螺旋体,表层膜蛋白基因 Lslp,克隆表达,免疫原性

中图分类号 R379.5 **文献标识码** A **文章编号** 1001-6209(2004)04-0500-04

钩端螺旋体(*Leptospira*,简称钩体)是系统发育进化上结构和遗传特征都较特殊的一类微生物,它所导致的钩端螺旋体病是在世界范围内流行的人兽共患的自然疫源性疾[1]。钩体的全基因组序列于 2003 年由中国科学院完成,对钩体的功能基因组研究具有重大意义[2]。赖型钩体是中国独有的引起肺弥漫性出血致人死亡的强毒力菌株,但其致病分子机理和疫苗靶标尚未被阐明。本实验室通过赖型钩体与双曲钩体之间的基因组差异筛选得到了一个只存在于致病钩体而不存在于非致病钩体中的与其他细菌表层膜蛋白同源的具有完整阅读框的表层膜蛋白新基因(*Leptospira* S-layer like protein, Lslp)[3,4]。钩体 Lslp 基因经生物信息学预测分析显示全长 1062bp,编码 353 个氨基酸,与海栖热孢菌的表层 S-layer 样蛋白具有高度同源性(3×10^{-9}),在 GenBank 中注册(AF325807)。鉴于细菌膜蛋白在微生物致病性与宿主相互作用、免疫保护等方面的特殊性,有必要对 Lslp 基因进行表达观察其是否编码完整的蛋白质,进而分析其表达产物是否具有免疫原性。对该基因功能进行系统研究,将有助于阐明钩体致病的

分子机理以及预防疫苗的设计和基因药物的开发。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 问号钩体赖型 017 株、双曲钩体 Patoc 型 Patoc I 株、质粒 pGEX λ -1T 和宿主菌大肠杆菌(*Escherichia coli*)JM109 株均由本室保存。赖型 56601 株、犬型 56603 株、澳洲型 56607 株、波摩那型 56608 株、流感伤寒型 56609 株五株致病钩体由中国药品生物制品检定所提供。

1.1.2 主要试剂 PCR 试剂盒(TaKaRa),TMB-Elisa(GIBICOL/BRL),Bulk GST purification Modules kit(Pharmacia),弗氏完全、不完全佐剂(Roche),辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG(中山生物工程公司),兔抗钩体多价抗体血清由本室保存。

1.2 钩体基因组 DNA 的提取

提取方法按照文献[3]进行。

1.3 钩体 Lslp 基因的扩增、重组质粒 pGST-Lslp 的构建

上游引物 P₁:5'-GACAGGATCCATGGAAGTCAAA

基金项目 国家自然科学基金项目(30070670);重庆市应用基础研究项目(2002-7481)

* 通讯作者。Tel/Fax 86-28-85501007;E-mail baolang@wcums.edu.cn

作者简介 胡昌华(1967-),男,四川省开江县人,博士,副教授,主要从事微生物基因组研究和新药研发工作。Tel/Fax 86-23-68252365;

E-mail: chhu@vip.sina.com

收稿日期 2003-10-31,修回日期 2004-03-18

CTCGTCTTG-3'(*Bam*H I 位点),下游引物 P₂ :5'-GAACGGATCC AGATTTTCGAGAAAGTTCTTA -3'(*Bam*H I 位点),引物由美国生命技术公司合成。

以赖型钩体 017 株基因组 DNA 为模板 ,用引物 P₁、P₂ 进行 PCR 扩增。按照分子克隆常规方法^[5]进行酶切、连接、转化和鉴定。以 *Bam*H I 单酶切鉴定是否有外源片段插入 ,然后用 *Eco*R I 酶切鉴定插入片段的连接方向 ,筛选出正向重组子。

1.4 重组质粒 pGST-Lslp 在大肠杆菌中的表达和印迹分析

从 LB 平板上分别挑取含空质粒 pGEX 1-λT 和含重组质粒 pGST-Lslp 的菌落接种于 3mL LB 液体培养基中振荡培养 12h ,再以 1:500 转种于液体 LB 中培养至 OD 值 0.6 ~ 0.8 期间加入终浓度 0.1mol/L IPTG 进行诱导于第 1、2、3h 分别收集细菌用于制备总蛋白样品。按文献^[5]的方法进行 SDS-PAGE 和 Western blot 。一抗血清为兔抗钩体多价血清 ,二抗为 HRP 标记羊抗兔 IgG。

1.5 兔抗 Lslp 蛋白血清的制备

用 Bulk GST purification Modules Kit 纯化 GST 融合蛋白。SDS-PAGE 检查纯化效果以及分光光度计检查融合蛋白的浓度(1OD₂₈₀ = 0.5mg/mL)。

取上述纯化蛋白 ,加消毒生理盐水配制成约 0.2mg/mL 的混合液 ,加等体积弗氏完全佐剂。背部皮下多点免疫 2 只新西兰大白兔 ,初次两周后注射含氟氏不完全佐剂的抗原蛋白液 ,2 周后再次加强免疫 ,从耳缘静脉取血用 ELISA 方法检查抗体效价。有合适的抗体滴度后再过一周从股动脉放血 ,收集血清。另取一只新西兰大白兔用生理盐水作为对照。

1.6 ELISA 测定兔抗钩体 Lslp 血清 IgG 的滴度

抗原为重组融合蛋白 ,一抗为待检测兔抗钩体 Lslp 血清 ,二抗为 HRP 标记羊抗兔 IgG ,以底物液 TMB-ELISA 显色 ,用酶标仪(Bio-Rad550 型)490nm 处测定 OD 值。抗体滴度定义为 :OD 值高于生理盐水对照组加 2 倍对照组标准差的最高稀释度。

2 结果

2.1 钩体 Lslp 基因的 PCR 扩增和序列测定

在赖型 017、56601、56603、56607、56608、56609 等 6 株致病钩体中皆扩增出一条 1000bp 大小的条带 ,Patoc 株中未扩增出相应条带(图略)。

产物纯化后用 ABI3700 测序仪测序 ,上述钩体 Lslp ORF 序列长度均为 1062 bp。利用 ClustlW 程序进行核苷酸序列的多重比对 ,发现序列极度保守 ,同

源性高达 99.6%(数据未显示)。

2.2 重组质粒的克隆和鉴定

酶切分析显示 *Bam*H I 单酶切重组质粒产生 4.9kb 和 1.1kb 两条酶切条带 ,提示该重组质粒已包含一 1.1kb 的插入片段。为鉴定插入子的连接方向 ,用 *Eco*R I 酶切重组质粒产生约 4.9kb 和 1.1kb 条带的为正向连接(*Lslp* 基因在 49bp 处有一个 *Eco*R I 酶切位点) ,说明 *Lslp* 基因与 pGEX1-λT 已正确定向重组 ,命名为 pGST-Lslp。以该重组质粒 DNA pGST-Lslp 为模板 ,以上述引物进行 PCR 扩增 ,能扩出约 1kb 条带 ,而以空质粒为模板未扩出相应条带 ,进一步证实重组质粒 pGST-Lslp 构建成功。

2.3 重组质粒 pGST-Lslp 在大肠杆菌中的融合表达和免疫印迹

经 IPTG 诱导的 pGEX 1-λT 表达产物在 26 kD 处出现 GST 蛋白带(图 1) ,经 IPTG 诱导的 pGST-Lslp 表达产物在 66kD 处出现明显的蛋白带。由于 *Lslp* 基因编码 40kD 的蛋白质 ,加上 26kD GST 蛋白 ,故 66kD 蛋白为包含 *Lslp* 编码蛋白质的 GST 融合蛋白。改变 IPTG 诱导时间(1h、2h、3h) ,表达量有所不同 ,以 3h 的诱导时间表达量较高。

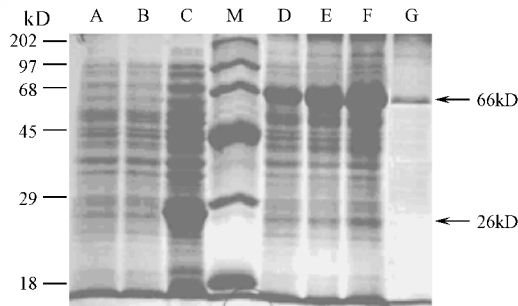


图 1 重组质粒 pGST-Lslp 表达产物的 SDS-PAGE 分析
Fig.1 SDS-PAGE analysis of fusion expression protein from *E. coli* JM 109 bearing GST and *Lslp* gene
M. Protein molecular weight marker ; A and B. *E. coli* JM 109 ; C . Expressed products of pGEX1-λT induced by IPTG ; D ~ F. Expressed products of pGST-Lslp induced by IPTG in 1h , 2h , 3h respectively ; G. purified fusion protein by GST purification modules .

将凝胶上的蛋白质转移到硝酸纤维膜上 ,用丽春红染色证实转移成功后 ,与兔抗全钩抗原血清进

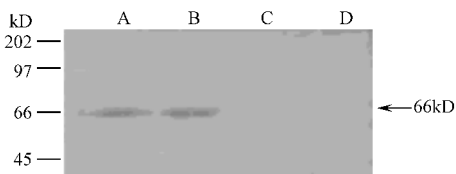


图 2 重组质粒 pGST-Lslp 表达产物的免疫印迹分析
Fig.2 Western blot of expressed fusion protein of recombinant plasmid pGST-Lslp
A and B. Expressed products of pGST-Lslp by IPTG ; C. Expressed products of pGEX1-λT by IPTG ; D . *E. coli* JM 109 .

行免疫印迹反应。结果如图 2 显示, pGST-Lslp 表达产物在 66kD 左右出现一棕色反应带, 而空质粒载体 pGEX 1- λ T 和空宿主菌 JM109 表达产物无特异印迹带出现。

2.4 兔抗 GST-Lslp 融合蛋白的抗体滴度测定

初次免疫后 7d 未检测到抗体, 14d 后可检测到低滴度的抗体(1:20)。加强免疫后 14d, 抗体滴度明显升高, 可达 1:320, 免疫后 42 天抗体滴度最高可至 1:5120, 该抗体的动态变化见图 3。

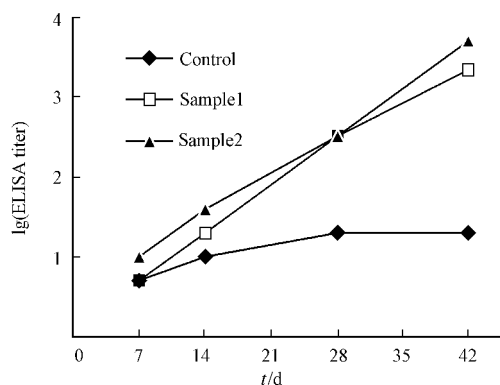


图 3 重组融合蛋白 GST-Lslp 免疫家兔产生的抗体滴度动态变化

Fig.3 The log Elisa analysis of antibody response in rabbits after immunization with expressed fusion protein of GST-Lslp

Antibody levels were determined by Elisa against purified fusion protein of GST-Lslp.

3 讨论

S-layer 蛋白是许多原核生物细胞壁或细胞膜中重要的组成成分, 层状排列在细胞外层, 分子量变化较大, 相互之间同源性较低。目前研究认为 S-layer 蛋白可能与细菌在不同环境包括对不同宿主的适应能力相关, 其功能主要与保护屏障作用、细胞粘附与表面识别、分子与离子运输通道、酶的作用底物和毒力因子有关^[6]。对致病菌胎儿弯曲菌(*Campylobacter fetus*)的研究结果显示, S-layer 蛋白直接与毒力相关, 能抵抗宿主的消化酶及吞噬细胞的作用而产生免疫逃逸, 进而对宿主产生损伤或致病作用^[7,8]。Wang 等^[9]在研究直肠弯曲菌(*Campylobacter fetus*) S-layer 蛋白与致病性的关系时证实 S-layer 蛋白能帮助菌体逃逸宿主的免疫反应, 细菌离体传代培养 15~17 代, S-layer 蛋白表达明显减低, 使毒力减弱, 提示二者可能存在正相关性。鱼类致病菌杀鲑气单胞菌属(*Aeromonas salmonicida*)的 S-layer 蛋白由于保护细菌不被溶解和吞噬, 因而被认为是致病的毒力因子^[10]。这些研究皆提示 S-layer 蛋白与毒力相关。因此, 有必要对赖型钩体表面蛋白 Lslp 基因进

行克隆、表达、免疫相关研究以及动物实验等系列生物学功能实验, 以探讨该基因与钩体致病性的关系以及发展亚单位疫苗的可能性。

表达一个基因编码产物可以有融合蛋白和非融合蛋白两种方式。融合蛋白因其高效、易纯化、易检测而应用更为广泛。我们选用 GST 融合表达载体构建重组质粒在大肠杆菌中进行表达。pGEX1- λ T 载体有高效的 *tac* 启动子和易于检测的谷胱甘肽 S 转移酶(GST)基因。重组质粒 pGST-Lslp 经 IPTG 诱导后经 SDS-PAGE 观察到在 66kD 处出现高效表达的蛋白条带。由于 GST 表达蛋白分子量为 26kD, Lslp 基因理论分子量为 40.1kD, 因此这一相对于对照特异出现的 66kD 条带很可能是 GST 与 Lslp 基因编码产物的融合蛋白。进一步用 Western blot 分析显示重组蛋白能与兔抗全钩血清发生反应, 提示表达蛋白具有可被抗钩体血清抗体识别的抗原表位。

用重组融合蛋白免疫家兔用 ELISA 方法检测产生滴度达 1:5120 的抗体反应, 提示该蛋白具有一定的免疫原性, 这与我们用生物信息学技术进行的抗原性预测的结果相符(另文发表)。说明赖型钩体 Lslp 蛋白存在具有免疫原性的抗原表位, 而在其他已知的钩体外膜蛋白中, OmpL1^[11]、LipL41^[12]、LipL32^[13]都显示一定的免疫原性, 成为可能的保护性抗原, 具体免疫原性和免疫保护的特性还有待进一步研究。

钩体 Lslp 是致病钩体表层的一个层状排列样的膜蛋白。本文仅就其克隆表达和免疫原性进行了初步分析, 其功能性质还不能完全加以肯定, 进一步对其免疫保护性和对细胞或组织的损伤和致病等方面进行研究, 将对了解钩端螺旋体的致病机制、发展新的亚单位疫苗和血清学诊断试剂具有重要的理论意义和应用价值。

参 考 文 献

- [1] Faine S. Leptospirosis. In: Evans A, et al. ed. Bacterial infections of humans. New York: Plenum Medical Book Company, 1998: 395-419.
- [2] Reng S, Fu G, Jiang X, et al. Unique physiological and pathogenic features in *Leptospira interrogans* reveals by whole-genome sequencing. *Nature* 2003, **422**: 888-893.
- [3] 鲍朗, 胡昌华, 李学敏, 等. 利用抑制消减杂交技术研究钩端螺旋体致病新基因. *中华微生物学与免疫学杂志*, 2001, **21**(5): 574-577.
- [4] 胡昌华, 鲍朗, 张会东, 等. 致病钩端螺旋体特异消减片断的序列测定与分析. *西南师范大学学报*, 2004, **29**(3): 434-438.

- [5] Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T . Molecular cloning : a laboratory manual . 2nd ed . New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press ,1989 , 4.39 – 4.50 ,18.47 – 18.56 .
- [6] Sara M , Sleytr U B . S-layer proteins . *J Bacteriol* 2000 , **182**(4) : 859 – 868 .
- [7] Blaser M J , Gotschlich E C . Surface array protein of *Campylobacter fetus* : cloning and gene structure . *J Biol Chem* , 1990 , **265**(24) : 14529 – 14535 .
- [8] Tummuru M K R , Blaser M J . Rearrangement of sapA homologs with conserved and variable regions in *Campylobacter fetus* . *Proc Natl Acad Sci USA* ,1993 , **90** :7265 – 7269 .
- [9] Wang B , Kraig E , Kolodrubetz D . A new member of the S-layer protein family : characterization of the crs gene from *Campylobacter rectus* . *Infect Immun* , 1998 , **66**(4) :1521 – 1526 .
- [10] Evenberg D , Versluis R , Lugtenberg B . Biochemical and immunological characterization of the cell surface of the fish pathogenic bacterium *Aeromonas salmonicida* . *Biochem Biophys Acta* , 1985 , **815**(2) 233 – 244 .
- [11] Haake D A , Champion C I , Martinich C , et al . Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding OmpL1 , a transmembrane outer membrane protein of pathogenic *leptospira* spp . *J Bacteriol* , 1993 , **175**(13) :4225 – 4234 .
- [12] Shang E S , Summers T A , Haake D A . Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding LipL41 , a surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species . *Infect Immun* ,1996 **64** : 2322 – 2330 .
- [13] Haake D A , Chao G , Zuerner R L , et al . The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection . *Infect Immun* , 2000 , **68**(4) :2276 – 2285 .

Cloning ,Expression and Immunogenicity of S-layer Membrane Protein Gene(Lslp) of Pathogenic *Leptospira interrogans*

HU Chang-Hua^{1 2} BAO Lang^{2*} XIE Jian-Ping¹ ZHANG Hui-Dong²

(¹ Institute of Modern Biopharmaceuticals , School of Life Science , Southwest China Normal University , Chongqing 400715 ,China)

(² Western China Medical Center , Sichuan University , Chengdu 610041 ,China)

Abstract : S-layer proteins was assumed to play crucial role in the virulence of pathogens . In order to elucidate of role of *Leptospira interrogans* S-layer protein , the encoding gene was cloned and expressed in *E. coli* . The immunogenicity of the recombinant protein was assayed . The primer for PCR amplification was based on previous data (GenBank AF325807) , genomic DNA from 6 strains of *Leptospira interrogans* were used as template for amplification separately . The resulting PCR fragments of Lslp genes from 6 different pathogenic strains were sequenced and aligned . Lslp gene of *Leptospira interrogans* serovar Lai was subjected to further studies . The recombinant plasmid pGST-Lslp was constructed and used to transfer the host *E. coli* JM109 . The recombinant fusion protein was purified and used to immunize the rabbit . The antibody titers was determined by ELISA with Lslp-immunized rabbit serum . The results showed the new S-layer protein gene was highly conserved in 6 strains of pathogenic *Leptospira interrogans* . The sequence homology was 99.6% . The gene was not detected in nonpathogenic *Leptospira* . The apparent molecular weight of the expressed GST fusion protein was 66 kD . Western blot demonstrated a clear band reacted with rabbit anti-pan *Leptospira* serum . The maximum antibody titers of Lslp-immunized reaction reached 1 :5120 . These data indicate that the surface-layer protein (Lslp) of *Leptospira interrogans* can be recognized by host and its role in the host-pathogen interaction needs further investigation . The study provide clue for further explaining the molecular mechanism of pathogenic *Leptospira* and screening the target for the vaccine design .

Key words : *Leptospira* , S-Layer protein , Cloning and Expression , Immunogenicity