

丝状支原体丝状亚种 SC 型脂蛋白 Q N 末端基因的 表达、纯化与抗原性分析

高玉龙 辛九庆* 李 媛 王砚范

(中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 国家牛传染性胸膜肺炎参考实验室 哈尔滨 150001)

摘 要:为了表达丝状支原体丝状亚种 SC 型(MmmSC)中国分离株 HVRI X 脂蛋白 Q(LppQ) N 末端基因,将该基因经 PCR 扩增后克隆至原核表达载体 pET32a 中,经酶切、PCR、测序证实获得了重组表达质粒,转化 *Escherichia coli* BL21(DE3)菌,经 IPTG 诱导后获得可溶性融合蛋白,表达量占菌体总蛋白的 53.7%,用 Ni-NTA His·Bind 纯化试剂盒纯化后,蛋白纯度达 95% 以上。表达蛋白经 Western blot 检测其抗原活性,结果表明纯化蛋白可与 CBPP 标准阳性血清发生强烈的反应,而与阴性血清不发生反应。

关键词:牛传染性胸膜肺炎 丝状支原体丝状亚种 SC 型 脂蛋白 Q LppQ 表达

中图分类号:Q78 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2005)05-0788-04

丝状支原体丝状亚种 SC 型(*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC, MmmSC)是引起牛传染性胸膜肺炎(Contagious Bovine Pleuroneumonia, CBPP)的病原,该病又称牛肺疫,被世界动物卫生组织(OIE)列为 A 类传染病^[1]。在 OIE 公布的 15 种 A 类传染病中,CBPP 是唯一由细菌引起的传染病,该病危害严重,这不仅是由于较高的发病率和死亡率,更是由于其限制了牛及其肉制品的对外贸易,严重影响发病国家畜牧业的发展。因而从全球社会经济学角度讲,CBPP 是最严重的动物传染病之一。因此有 CBPP 流行的国家,对它的控制和消灭都非常重视。CBPP 常表现为亚急性或无临床症状感染,这给该病的消灭带来很大困难。补体结合试验(CFT)是 OIE 推荐使用的血清学诊断方法。研究表明,该方法在 CBPP 流行的急性期较为敏感,在急性期过后或感染 3 个月后,其敏感性大大降低^[2,3],同时由于 CFT 所用抗原为 MmmSC 的表面全抗原,这容易与丝状支原体簇的其他成员发生交叉反应,产生假阳性结果^[4-7]。因而,一种敏感、特异的诊断方法的研究对 CBPP 的快速诊断与控制具有重要意义。

近些年来,研究者们对 MmmSC 的表面抗原蛋白进行了广泛的研究,发现膜定位的脂蛋白与 MmmSC 的致病力及刺激机体产生免疫反应有密切关系^[2,8,9],所以成为研究的热点。脂蛋白 A(LppA)是丝状支原体簇所共有的,其中仅有少数几个抗原表位是 MmmSC 所特有的^[10,11];脂蛋白 B(LppB)仅存在于 MmmSC 非洲株^[12];脂蛋白 C(LppC)虽存在于 MmmSC 非洲株、欧洲株和疫苗株,但它的基因序列与丝状支原体簇中 *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC 株和 *Mycoplasma* sp. bovine group 7 株的同源性较高^[13];脂蛋白 Q(LppQ)存在于 MmmSC 非洲株、欧洲株和疫苗株,而在丝状支

原体簇的其他成员中未发现,该基因的 N 末端富含亲水氨基酸,表面暴露,在自然和试验感染牛体内均可诱导产生早期、特异、强大、持续的免疫反应,相反,其 C 末端富含疏水氨基酸,是一种膜内结构,不具有免疫原性^[14]。因而,LppQ N 末端基因编码的蛋白是一种较为理想的 CBPP 诊断抗原。本研究利用基因重组技术将我国 MmmSC 分离株 LppQ N 末端基因克隆到原核表达载体 pET32a 中,利用大肠杆菌进行融合表达,经亲和纯化后,对目的蛋白进行免疫检测,确定其有良好的免疫活性,从而为 CBPP 特异性诊断方法的建立奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒:MmmSC HVRI X 菌株由本实验室保存。大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3)和表达载体 pET32a 购自 Novagen 公司。MmmSC HVRI X 阳性重组质粒 LppQ-CH1 由高玉龙等^[15]构建。

1.1.2 主要试剂:小量 DNA 胶回收试剂盒和质粒抽提试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司;Pyrobest™高保真 DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、DNA Marker 购自 TaKaRa 公司;限制性内切酶 *Eco*R I 和 *Sal* I 购自 Sangon 公司。BugBuster™ Ni-NTA His·Bind 纯化试剂盒购自 Novagen 公司。鱼明胶和 HRP-兔抗牛 IgG 酶标结合物购自 Sigma 公司。

1.2 引物设计

根据 GenBank 中 MmmSC 脂蛋白 LppQ 基因序列(收录号为 AF072716)^[14]设计,引物的核苷酸序列为:上游引物(P1):5'-GCGGAATTCAATGAAAAATAACATATCAGTC-3',其 5' 端设计有 *Eco*R I 位点;下游引物(P2):5'-GACGTCGACATT

基金项目:国家“十五”科技攻关重大专项资助项目(2002BA518A04)

* 通讯作者。Tel 86-451-85935091;E-mail xinjiuqing2001@sohu.com

作者简介:高玉龙(1974-),男,内蒙古呼和浩特人,助理研究员,博士,主要从事畜禽疫病诊断和分子生物学研究。

收稿日期 2005-01-21,修回日期 2005-06-09

AAAGTTTCTAGCTTGTTC-3' 其 5'端设计有 *Sal* I 位点。引物由上海 Sangon 公司合成并经过 HPLC 纯化。以 P1 和 P2 为上、下游引物扩增 LppQ N 末端基因,预期扩增长度为 582bp,克隆至 pET32a 载体,理论上表达一个两端带有 His-tag 的融合蛋白,分子量约为 42kD(pET32a 载体 N 端带有融合蛋白分子量约为 20kD,表达目的蛋白分子量约为 21kD)。

1.3 表达载体的构建和鉴定

以阳性重组质粒 LppQ-CH1 为模板,利用 Pyrobest™ DNA 聚合酶和引物 P1、P2 扩增脂蛋白 LppQ N 末端基因。50μL 反应体系:10× buffer 5μL,2.5mmol/L dNTPs 4μL,DNA 模板 1μL,10μmol/L 引物各 2.5 μL(p1 和 p2),Pyrobest™ DNA 聚合酶 1μL,纯水 34μL。PCR 反应条件:95℃ 5min;94℃ 45s,55℃ 60s,72℃ 60s,共进行 30 个循环,72℃ 10min。PCR 扩增产物用小量 DNA 胶回收试剂盒回收,参照试剂盒说明书进行操作。胶回收产物和 pET32a 质粒分别用 *Eco*R I 和 *Sal* I 双酶切,酶切产物仍按上述方法分别回收。将回收的 LppQ N 末端基因与 pET32a 质粒用 T4 DNA 连接酶连接,构建重组表达载体。重组表达载体转化感受态细胞 BL21(DE3),利用 Amp 抗性筛选重组转化子,并经酶切、PCR 鉴定后送上海 Sangon 公司测序。

1.4 LppQN 末端基因的诱导表达

将鉴定好的阳性重组菌接种于含 LB 培养基(含氨苄霉素 50μg/mL)的试管内,摇床内 37℃、220r/min 过夜培养。次日以 1% 浓度接种 LB 培养基,摇床内 37℃、220r/min 增菌,然后加入 IPTG 进行诱导。为了获得理想的表达量,分别以不同菌液浓度(A_{600} 值为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2)不同 IPTG 浓度(0.2、0.4、0.8、1.0、1.2mmol/L)以及不同诱导时间(1h、2h、3h、4h、5h、过夜)来优化诱导条件。表达产物经超声波破碎后,在 4℃、15000g 离心 10min,上清和沉淀同时用 SDS-PAGE 分析,检测目的蛋白的存在形式,以确定纯化方案。

1.5 融合蛋白的亲纯化

用 BugBuster™ Ni-NTA His· Bind 纯化试剂盒在自然条件下对目的蛋白进行纯化。按纯化试剂盒操作手册说明进行,诱导后的菌液离心收集菌体,加入 BugBuster™ 蛋白裂解液裂解菌体蛋白,离心后收集上清液与镍亲和树脂作用 1h,然后将上清液和树脂一起加入到空柱内,上清液自然流出,然后加入 8mL 洗液(Wash Buffer)洗涤树脂,将未结合的蛋白和与树脂结合不紧密的杂蛋白洗脱掉,再加入 7×0.5mL 蛋白洗脱液(Elute Buffer)洗脱目的蛋白,分管收集目的蛋白洗脱液,用 SDS-PAGE 分析纯度。

1.6 目的蛋白抗原性检测

应用从葡萄牙里斯本(OIE 指定的牛传染性胸膜肺炎参考实验室)进口的 CBPP 阳性血清、HRP-兔抗牛 IgG 酶标结合物进行 Western blot 分析,以检测表达目的蛋白的抗原性。

2 结果

2.1 重组表达载体的鉴定

用 P1、P2 引物进行 PCR 扩增,以 *Eco*R I 和 *Sal* I 酶切,

电泳结果显示 PCR 产物及酶切片段的大小与预测结果一致。利用位于 pET32a 载体 T7 启动子上、下游引物对重组质粒进行测序,结果表明 LppQ N 末端基因插入的位置、大小和读码框均正确。

2.2 LppQ N 末端基因在大肠杆菌中的表达和纯化

阳性重组质粒在大肠杆菌中诱导后,出现目的融合蛋白,大小约 42kD,而非诱导对照在 42kD 附近未出现蛋白条带。通过对表达条件的优化,SDS-PAGE 结果经薄层扫描分析表明,菌液浓度 A_{600} 为 0.8(图略)诱导时间为 3h(图略)IPTG 浓度为 1.0mmol/L(图 1)时,目的蛋白表达量最大,可占菌体总蛋白的 53.7%。由此可见,构建的含 LppQ N 末端基因的重组表达载体转化 BL21(DE3)菌经诱导后能高效表达 LppQ N 末端基因编码蛋白。

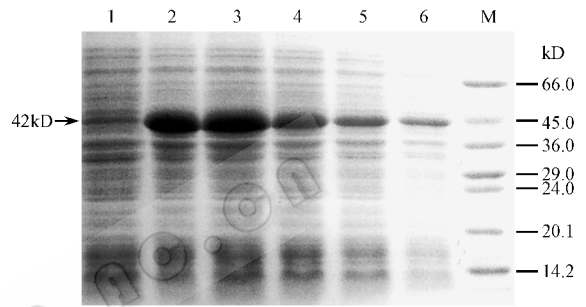


图 1 不同 IPTG 浓度诱导表达目的蛋白的 SDS-PAGE

Fig.1 SDS-PAGE analysis of the recombinant protein induced by different IPTG concentration

1. Uninduced bacteria; 2 ~ 6. Induced with 1.2, 1.0, 0.8, 0.4, 0.2mmol/L IPTG; M. Protein marker.

表达产物经超声波破碎后 4℃、15000g 离心 10min,上清和沉淀同时用 SDS-PAGE 分析,结果表明,目的蛋白主要在上清液中,以可溶形式存在,所以选择在自然条件下纯化目的蛋白。用 SDS-PAGE 分析结果表明,与蛋白裂解液作用后的镍亲和树脂经洗液(Wash Buffer)洗涤后,洗掉许多杂蛋白(图 2,第 2 泳道),分管收集的蛋白洗脱液(Elute Buffer)中蛋白纯度可达 95% 以上(图 2),用考马斯亮兰 G-250 检测试剂(Bradford 法)检测蛋白浓度,第 1、2 管蛋白(图 2,第 3、4 泳道)浓度在 300 ~ 400μg/mL,从第 3 管开始蛋白含量逐渐降低。

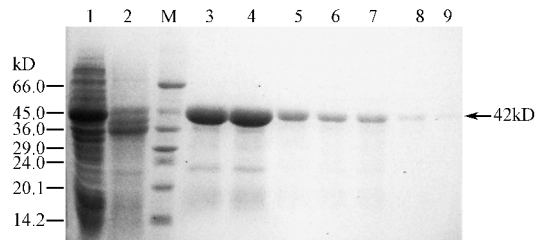


图 2 表达目的蛋白纯化后 SDS-PAGE 分析

Fig.2 SDS-PAGE analysis of purified protein

1.Recombinant protein before purification; 2.Wash buffer; 3 ~ 9. Recombinant protein purified in Elute 1 ~ 7; M. Protein marker.

2.3 目的蛋白抗原性检测

目的蛋白和中分子量蛋白 Marker 经 SDS-PAGE 后,电转移到硝酸纤维素膜(NC)膜上,将 NC 膜用 3% 的鱼明胶于室温下封闭 1h,洗涤 3 次后将其放入以 1:80 倍稀释的 CBPP 阳性血清溶液中,室温下作用 1h,同上洗涤 3 次后将其放入以 1:5000 倍稀释的 HRP-兔抗牛 IgG 酶标结合物溶液中,室温下作用 1h,同上洗涤后,用底物溶液(二氨基联苯胺)显色,同时设阴性对照(血清为 CBPP 阴性血清,其他同上)。结果显示与 CBPP 阳性血清作用的 NC 膜上出现了大约 42kD 左右的条带,而与 CBPP 阴性血清作用的 NC 膜没有任何条带,表明表达的重组蛋白具有抗原活性(图 3)。

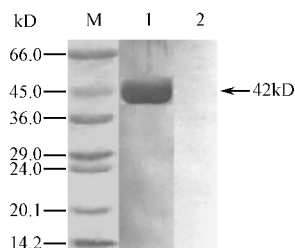


图 3 表达目的蛋白的 Western blot 检测

Fig.3 Western blot analysis of recombinant protein

M. Protein marker; 1. Recombinant protein; 2. Negative control.

3 讨论

MmmSC 无细胞壁,由 3 层细胞膜包裹而成,基因组大小为 1211.7kb^[16],属于丝状支原体簇(Mycoides cluster)成员^[17],该簇还有其他 5 个成员,分别是:① *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* type LC; ② *Mycoplasma capricolum* subsp. *Capricolum*; ③ *Mycoplasma capricolum* subsp. *Capripneumoniae*; ④ *Mycoplasma mycoides* subsp. *Capri*; ⑤ *Mycoplasma* subsp. *bovine* group 7。由于 MmmSC 与其它 5 种支原体有共同抗原决定簇,所以用 MmmSC 全菌体制成的 CFT 抗原进行血清学诊断,存在一定程度的假阳性^[4-7]。研究证实,在 MmmSC 的几种脂蛋白中, LppQ 是 MmmSC 所特有的,而在丝状支原体簇的其他成员中未发现。为了寻找一种较为理想的诊断抗原,本试验克隆并表达了 MmmSC HVRI-X 株 LppQ N 末端基因编码的蛋白,经 Western blot 方法对该蛋白的抗原活性进行了初步分析,试验表明该蛋白可与 CBPP 标准阳性血清发生特异性反应,具有较好的抗原活性。该蛋白是否可作为建立敏感、特异的 CBPP 检测方法的抗原,我们将在下一步的工作中进行研究。

以前的研究已证实^[15],我国不同地区 MmmSC 分离株 LppQ 基因核苷酸及氨基酸序列同源性在 99% 以上,与模式株 PG1 和 GenBank 公布的 LppQ 基因核苷酸及氨基酸序列的同源性也在 99% 以上,可见 LppQ 基因是相当保守的,所以本试验选择了 MmmSC 我国分离株中的 HVRI-X 为研究对象,应用原核表达系统以融合蛋白的形式高效表达了目的蛋白,经优化表达条件后,表达量可占菌体总蛋白的 53.7%。由于 pET32a 载体在多克隆位点的两端都带有 6 个 His 标签,所以

为其纯化提供了方便,本试验用带有 6×His-tagged 的 Ni-NTA 柱子进行纯化,并经 SDS-PAGE 分析显示,蛋白纯度可达 95% 以上。Le Goff 等^[18]从 133 株支原体中筛选出 1 株特异性单抗,该单抗能够识别一种分子量约为 80kD 的 MmmSC 抗原,他们用该单抗建立了用于诊断 CBPP 的竞争 ELISA 方法,但其所识别的约 80kD 的蛋白质抗原性尚未确定。而本研究所表达蛋白的序列、结构清楚,更易于在体外操作。

经多次测序证实^[15,19]与模式株 PG1 和 GenBank 公布的 LppQ 基因核苷酸序列比较,我国 MmmSC 分离株 LppQ 基因在第 38 位碱基均由 A 变成 G,相对应的氨基酸由谷氨酸(Glu)变成甘氨酸(Gly),由于 Glu 为极性酸性氨基酸,而 Gly 为非极性氨基酸,所以该处碱基的改变有可能会影响编码蛋白的结构与活性,本试验表达的蛋白经 Western blot 方法检测证实该处碱基的突变并没有影响编码蛋白的抗原活性。

参 考 文 献

- [1] Trusczyński M, Pearson J, Edwards S. Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. Paris: Office International des Epizooties, 2000.
- [2] Abdo E-M, Nicolet J, Miserz R, et al. Humoral and bronchial immune responses in cattle experimentally infected with *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony type. *Vet Microbiol*, 1998, **59**: 109 - 122.
- [3] Poumarat F, Perrin M, Belli P, et al. Correlation of the excretion of *Mycoplasma* and kinetics of antibodies detected by complement fixation, passive hemagglutination and rapid seroagglutination in *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC experimental infection in cattle. *Rev Elev Med Vet Pays Trop*, 1989, **42**: 357 - 364.
- [4] Cheng X, Frey J, Krawinkler M, et al. Immunological cross-reactions within the *Mycoplasma mycoides* cluster with field sera reacting for contagious bovine pleuropneumonia (CBPP). *IOM Lett*, 1994, **3**: 33.
- [5] Stärk K D C, Vicari A, Kihm U, et al. Surveillance of contagious bovine pleuropneumonia in Switzerland. *Rev Sci Tech*, 1995, **14**: 621 - 629.
- [6] Poumarat F, Perrin M, Belli P, et al. Studies of the origin of false positive reactions in the serodiagnosis of contagious bovine pleuropneumonia. *Rev Elev Med Vet Pays Trop*, 1989, **42**: 371 - 378.
- [7] Etheridge J R, Buttery S H. Improving the specificity and yield of the contagious bovine pleuropneumonia complement fixation test antigen. *Res Vet Sci*, 1976, **20**: 201 - 206.
- [8] Gonçalves R, Regalla J, Nicolet J, et al. Antigen heterogeneity among *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC isolates: discrimination of major surface proteins. *Vet Microbiol*, 1998, **63**: 13 - 28.
- [9] Rawadi G, Romanroman S. *Mycoplasma* membrane lipoproteins induce proinflammatory cytokines by a mechanism distinct from that of lipopolysaccharide. *Infect Immun*, 1996, **64**: 637 - 643.
- [10] Frey J, Cheng X, Monnerat M P, et al. Genetic and serological analysis of the immunogenic 67-kD lipoprotein of *Mycoplasma* sp. *bovine group 7*. *Res Microbiol*, 1998, **149**: 55 - 64.

- [11] Monnerat M P , Thiaucourt F , Poveda J B , *et al.* Genetic and serological analysis of lipoprotein LppA in *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC and *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*. *Clin Diagn Lab Immunol* ,1999 ,**6** 224 – 230.
- [12] Vilei E M , Abdo E-M , Nicolet J , *et al.* Genomic and antigenic differences between the European and African/Australian clusters of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. *Microbiology* , 2000 , **146** 477 – 486.
- [13] Paola P , Sandra M , Frey J , *et al.* Antigenic and genetic characterisation of lipoprotein lppC from *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. *Vet Res* , 2003 , **34** 761 – 775.
- [14] Abdo E-M , Nicolet J , Frey J. Antigenic and genetic characterization of lipoprotein LppQ from *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. *Clin Diagn Lab Immunol* , 2000 , **7** (4) : 588 – 595.
- [15] 高玉龙 , 辛九庆 , 李 媛 , 等. 丝状支原体丝状亚种 SC 型中国不同地区分离株脂蛋白 Q 基因的分子特征. 中国预防兽医学报 2005 **27** (6) :
- [16] Westberg J , Persson A , Holmberg A , *et al.* The genome sequence of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC type strain PG1^T , the causative agent of contagious bovine pleuropneumonia (CBPP). *Genome Research* , 2004 , **14** 221 – 227.
- [17] Pettersson B , Leitner T , Ronaghi M , *et al.* Phylogeny of the *Mycoplasma mycoides* cluster as determined by sequence analysis of the 16S rRNA genes from the two rRNA operons. *J Bacteriol* , 1996 , **178** 4131 – 4142.
- [18] Le Goff C , Thiaucourt F. A competitive ELISA for the specific diagnosis of contagious bovine pleuropneumonia (CBPP). *Vet Microbiol* , 1998 , **60** 179 – 191.
- [19] 高玉龙 , 李 媛 , 王砚范 , 等. 丝状支原体丝状亚种 SC 型脂蛋白 LppQ N 末端基因克隆与序列分析. 中国兽医科技 , 2003 **33** (10) 27 – 30.

Expression , purification and antigen activity analysis of the N-terminal domain of lipoprotein LppQ of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC

GAO Yu-long XIN Jiu-qing* LI Yuan WANG Yan-fan

(Harbin Veterinary Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Science , Harbin 150001 , China)

Abstract : The gene sequence coding the N-terminal domain of LppQ was amplified from *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC (MmmSC) HVRI X strain by PCR using special primers and was cloned into the *EcoR* I / *Sal* I sites of pET32a vector to construct the expression recombinant plasmids. The recombinant plasmids were identified by restriction digestion , PCR and sequence analysis. The gene was overexpressed in *Escherichia coli* BL21(DE3) host cell and the soluble protein was purified with Ni-NTA His·Bind purification kits. The amount of recombinant protein reached 53.7% of the total mass of bacterial protein. The purity of recombinant protein reached to over 95% . The antigen activity of the purified protein was examined with Western blot analysis. The purified protein reacted strongly with the standard positive serum and didn't react with the negative sera of contagious bovine pleuropneumonia (CBPP).

Key words : Contagious bovine pleuropneumonia , *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC (MmmSC) , Lipoprotein Q , Expression