

鸡白痢沙门菌 *ipaJ* 基因的克隆与鉴定

李求春, 徐耀辉, 黄金林, 焦新安*

(扬州大学江苏省人兽共患病学重点实验室, 扬州 225009)

摘要:【目的】从鸡白痢沙门菌 C79-13 中克隆 *ipaJ* 基因, 体外表达该蛋白后进行免疫原性分析。【方法】鸡白痢沙门菌 C79-13 与肠炎沙门菌 50041 进行抑制差减杂交后获得的片段 PEA2、PE31 和 PE44 与猪霍乱沙门菌 C500 疫苗株 pSFD10 质粒上 *ipaJ* 基因高度同源, 拼接后获得了鸡白痢沙门菌完整的 *ipaJ* 基因序列。从鸡白痢沙门菌中克隆出 *ipaJ* 基因并将其构建到原核表达载体 pET-30a(+) 上, Western-blot 检测体外表达蛋白的免疫原性, 同时检测了该基因在鸡白痢沙门菌分离株中的分布。【结果】从鸡白痢沙门菌中克隆了大小为 840 bp 的 *ipaJ* 基因序列, 并获得了体外原核表达的大小为 37 kDa 融合蛋白。该蛋白可与鸡白痢沙门菌阳性血清反应。PCR 结果显示该基因广泛存在于鸡白痢沙门菌菌株中。【结论】本文首次报道和克隆了鸡白痢沙门菌 *ipaJ* 基因, 并证明了 IpaJ 蛋白具有免疫原性。

关键词: 鸡白痢沙门菌; *ipaJ*; 克隆; 免疫原

中图分类号: R37 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 11-1545-05

鸡白痢沙门菌是鸡的重要病原菌, 对禽类养殖业危害性极大, 目前需要新的有效防治措施。因此寻求其致病基因对于了解其致病机理和有效防治鸡白痢沙门菌感染具有重要的意义。抑制差减杂交 (suppression subtractive hybridization, SSH) 是一种以抑制 PCR 与差减杂交相结合的分选差异基因的方法^[1]。此方法已应用于微生物基因组学研究、致病基因和新基因的筛选。在前期研究中, 本实验室利用抑制差减杂交技术构建了鸡白痢沙门菌标准株 C79-13 与参考菌株肠炎沙门菌标准株 50041 的差减文库^[2], 筛选获得了 3 个序列与猪霍乱沙门菌 C500 疫苗株 pSFD10 质粒上的 *ipaJ* 基因高度同源^[3]。将 3 个差减序列拼接获得了完整的 *ipaJ* 基因序列, 编码的蛋白序列与福氏志贺菌侵袭素蛋白 IpaJ 的同源性达 49%^[4]。本文从鸡白痢沙门菌中克隆出大小为 840 bp 的 *ipaJ* 基因, 并将其构建到原核表达载体上获得了体外表达的融合蛋白。

Western blot 证明了该蛋白为鸡白痢沙门菌的免疫原。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与菌株: 克隆载体 PCR[®] 2.1 购自 Invitrogen 公司, 原核表达质粒 pET-30a(+) 购自 Merck 公司, 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 和 BL21(DE3) 由本实验室冻干保存; 鸡白痢沙门菌标准株 C79-13、肠炎沙门菌标准株 50041 购自中国兽药监察所。

1.1.2 主要试剂和仪器: 微量细菌基因组提取试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司。DNA Fragment Purification Kit、*Taq* DNA 聚合酶、高保真 DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *EcoRI* 和 *Xho I*、核酸分子量标准购自宝生物工程(大连)有限公司。兔抗鸡酶标二抗购自美国 Sigma-Aldric 公司。ECL

基金项目: 国家“973 项目”——国家重点基础研究发展计划(2006CB504400); 江苏省自然科学基金(BK2008011)

* 通信作者。Tel: +86-514-87971136; E-mail: jiao@yzu.edu.cn

作者简介: 李求春(1983-), 男, 江苏高淳人, 博士研究生, 主要从事沙门菌致病机理的研究。E-mail: qiuchunli83@yahoo.cn

收稿日期: 2010-04-19; **修回日期:** 2010-06-14

化学发光检测试剂盒购自美国 Pierce 公司。Gene Amp PCR system 2700 购自美国 ABI 公司。Hoefer TE70 semi-dry transfer unit 购自美国 Amersham Biosciences 公司。凝胶成像系统购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 PCR 模板的制备

按照细菌基因组小提试剂盒说明书提取鸡白痢沙门菌 C79-13 的基因组 DNA,用于 *ipaJ* 基因的克隆与构建。本研究用于检测 *ipaJ* 基因在沙门菌中分布的模板制备参照文献[5]的方法进行。

1.3 从鸡白痢沙门菌中克隆 *ipaJ* 基因

1.3.1 引物:根据拼接所得 *ipaJ* 基因的完整序列,设计了一对引物:*ipaJ* F: 5' ATAGAATTCCAGGT ATTCATGCGGTTAAAA3'; *ipaJ* R: 5' CAACTCGAG GCTTCAATCTT CTTACAAA3'。在引物中分别设计 *EcoR* I、*Xho* I 酶切位点和保护性碱基,由上海英骏生物公司合成。

1.3.2 PCR 扩增:采用 25 μ L 反应体系:10 \times PCR buffer 2.5 μ L, dNTP (2.5 mmol/L) 2 μ L, *ipaJ* F (10 μ mol/L) 1.0 μ L, *ipaJ* R (10 μ mol/L) 1.0 μ L, 高保真 DNA 聚合酶 (2.5 U/ μ L) 0.5 μ L, C79-13 基因组 DNA 1.0 μ L, 加超纯水 (SW) 定容至 25 μ L。反应程序:94 $^{\circ}$ C 3 min;94 $^{\circ}$ C 30 s, 62 $^{\circ}$ C 40 s,72 $^{\circ}$ C 50 s, 30 个循环;72 $^{\circ}$ C 3 min。

1.3.3 产物回收:取全部的 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,回收目的条带。将回收后的目的条带用 *EcoR*I 和 *Xho*I 双酶切,3 h 后,加入 1/5 体积的 3 mol/L 醋酸钠和 2.5 倍体积的无水乙醇,-20 $^{\circ}$ C 放置 30 min 后,13800 \times g 离心 10 min,弃上清,用 70% 无水乙醇洗一遍后,烘干,用 SW 溶解后备用。

1.4 重组质粒 pET30a(+)-*ipaJ* 的构建及表达

用 *EcoR*I 和 *Xho*I 双酶切 pET-30a(+)空载体,酶切产物经纯化回收后,与酶切的 *ipaJ* 片段连接构建获得了重组质粒 pET30a(+)-*ipaJ*。将测序鉴定正确的重组质粒转化 BL21 (DE3) 感受态细胞, IPTG 诱导蛋白的表达。SDS-PAGE 检测外源蛋白的表达情况。

1.5 表达产物的 Western blot 分析

Western blot 试验选用本实验室保存的鸡白痢沙门菌阳性血清与体外表达的 IpaJ 融合蛋白,具体程序参照文献[6]。一抗选用鸡白痢沙门菌阳性血清,二抗为 HRP 标记的兔抗鸡 IgG。用 ECL 化学发光检测试剂盒显色拍照。

1.6 *ipaJ* 基因在鸡白痢沙门菌中的分布

选取本室保存的 105 株鸡白痢沙门菌菌株(表 1 显示了 105 株鸡白痢沙门菌的分离地区和年代),液体 LB 培养后,煮沸法提取基因组模板,PCR 检测 *ipaJ* 基因在菌株中的分布情况。

表 1 菌株的来源与分布

Table 1 The source and distribution of isolates

| Years | Yangzhou (扬州) | Beijing (北京) | Nanchang (南昌) | Yangling (杨凌) | Haian (海南) | Dongtai (东台) | Xuzhou (徐州) | Total |
|-------------|------------------|-----------------|------------------|------------------|---------------|-----------------|----------------|-------|
| 1962 - 1970 | 21 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 21 |
| 1986 - 1986 | 0 | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8 |
| 1993 - 1998 | 0 | 0 | 8 | 8 | 23 | 11 | 19 | 69 |
| 2003 - 2006 | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 |
| Total | 28 | 8 | 8 | 8 | 23 | 11 | 19 | 105 |

2 结果

2.1 鸡白痢沙门菌 *ipaJ* 基因全序列的拼接结果

从鸡白痢沙门菌 C79-13 的差减文库中筛选获得了 3 个片段 PEA3、PE31 和 PE44 都与猪霍乱沙门菌 C500 疫苗株 pSFD10 质粒上的 *ipaJ* 基因同源。将 3 个序列拼接后获得了鸡白痢沙门菌完整的 *ipaJ* 基因序列,将序列递交到 GenBank 网站上,登录号为 GU949535.1。

2.2 *ipaJ* 基因的克隆

PCR 的结果显示从鸡白痢沙门菌 C79-13 的基因组中能扩增出目的片段,而肠炎沙门菌 50041 基

因组上不含有该片段,说明差减获得的 *ipaJ* 基因确实为鸡白痢沙门菌特有的片段。

2.3 重组质粒 pET-30a(+)-*ipaJ* 的构建

PCR 产物和 pET-30a(+)双酶切回收后连接、转化,挑取转化所得的单菌落于含卡那霉素液体 LB 中,培养 12 h 后,小提质粒,用 *EcoR* I 单酶切和 *EcoR* I、*Xho* I 双酶切分别进行鉴定,酶切鉴定正确的阳性克隆进行测序,测得的序列与猪霍乱沙门菌 pSFD10 质粒上 *ipaJ* 基因有 3 个核苷酸的变异。将构建正确的重组质粒转化感受态大肠杆菌 BL21 (DE3),获得了携带 pET30a(+)-*ipaJ* 的重组菌 BL21 (DE3)。

2.4 重组质粒的诱导表达

将诱导的重组菌裂解物进行 SDS-PAGE 电泳, 考马斯亮蓝 R250 染色 2 h, 脱色, 同时取含 pET-30a(+) 空载体裂解物及未诱导的重组菌作对照, 结果显示 IpaJ 融合蛋白在 37 kDa 处出现目的条带(图 1-A)。

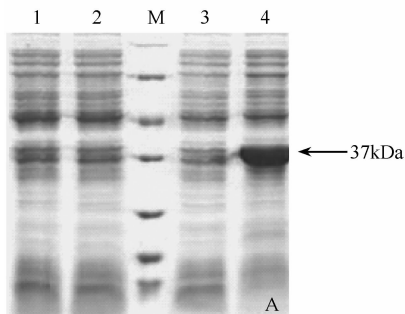
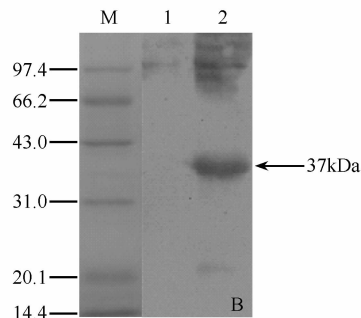


图 1 IpaJ 全菌蛋白的 SDS-PAGE 分析(A)和 Western-blot 鉴定结果(B)

Fig. 1 SDS-PAGE profile of IpaJ and Western-blot analysis. A: IpaJ expressed in BL21(DE3); 1. pET-30a(+)/Bl21(DE3); 2. pET-30a(+)/Bl21(DE3) induced by IPTG; 3. pET-30a(+)-*ipaJ*/Bl21(DE3); M. protein marker; 4-7. pET-30a(+)-*ipaJ*/Bl21(DE3) induced by IPTG. B: Reaction between IpaJ and *Salmonella pullorum* positive serum; M. protein marker; 1. pET30a(+)/Bl21(DE3); 2. pET30a(+)-*ipaJ*/Bl21(DE3) (fusing protein).

2.5 IpaJ 蛋白的 Western-blot 鉴定

Western-blot 试验显示本实验室保存的鸡白痢沙门菌阳性血清能与重组菌表达的 IpaJ 融合蛋白呈现特异性反应(图 1-B), 证明了 IpaJ 蛋白具有免疫原性, 可能参与了细菌的感染过程。



2.6 ipaJ 基因在鸡白痢沙门菌中的分布

对 105 株鸡白痢沙门菌菌株的 PCR 结果显示, 所有的菌株都能扩增出 *ipaJ* 基因。图 2 显示了来

自于不同年代和不同地区的鸡白痢沙门菌都携带该基因, 反映了该基因不随着细菌的分离年代和地区而改变, 广泛存在于鸡白痢沙门菌中。

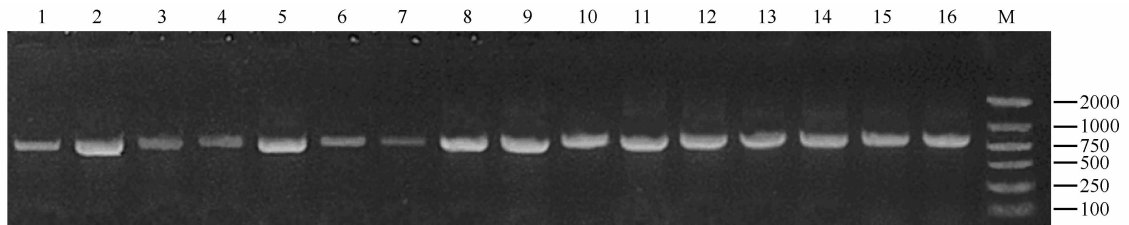


图 2 *ipaJ* 基因在鸡白痢沙门菌菌株中的分布

Fig. 2 Distribution of *ipaJ* gene in *Salmonella pullorum* isolates. M. DL2000 marker; 1-15. *Salmonella pullorum* isolates 6201, 6508, 6701, 6802, 7001, B8601, S9317, S97365, S9809, S9868, S98156, S03021, S04021 and S06004; 16. *Salmonella pullorum* reference strain C79-13.

3 讨论

目前关于鸡白痢沙门菌致病机制的认识还不清楚。为寻找鸡白痢沙门菌的致病基因, 本实验室在前期的研究工作中利用抑制差减杂交法构建了鸡白痢沙门菌标准株 C79-13 的差减文库。鸡白痢沙门菌属于宿主特异性血清型的沙门菌, 其主要宿主是鸡, 对人和其它动物不感染。肠炎沙门菌虽然和鸡白痢沙门菌同源关系相近, 但其属于宿主泛嗜性的血清型。通过选用肠炎沙门菌标准株 50041 做为 SSH 的参照方, 构建了 C79-13 的差减文库, 以期寻找鸡白痢沙门菌特有的核苷酸序列及毒力相关基因^[2]。根据抑制差减杂交的结果, 本实验首次从鸡白痢克隆出了 *ipaJ* 基因, 并获得了体外重组表达的

IpaJ 蛋白, 与福氏志贺菌中 IpaJ 蛋白部分同源。

福氏志贺菌是通过侵入结肠黏膜引发细菌性痢疾的病原菌。细菌入侵宿主细胞所需要的所有基因都存在于其毒性质粒上。*ipa* 基因群编码侵袭素蛋白, *spa* 和 *mxi* 基因群编码 III 型分泌系统所需的蛋白, 负责将侵袭素和胞外蛋白组装形成鞭毛聚集体介导细菌进入靶细胞, 然后细菌溶解液泡膜并在胞质中繁殖^[4,7-8]。肠道沙门菌 III 型分泌系统中的 SPII 基因群与福氏志贺菌中的毒性质粒上 *spa/mxi/ipa* 基因群相似^[9]。鼠伤寒沙门菌分泌蛋白 (Sip) 参与了细菌入侵上皮细胞的作用, 研究发现 Sip 与福氏志贺菌 Ipa 蛋白结构和功能上同源性都很高^[10]。转座子突变发现伤寒沙门菌 SipEBCDA 是细菌侵染细胞所必需的, 而 Sip 蛋白与福氏志贺

菌毒性质粒编码的 Ipa 蛋白序列相似;表达 *sipE* 和 *sipB* 的 *ipaB* 福氏志贺菌突变体恢复了侵染细胞的能力,也证明了 Sip 和 Ipa 蛋白功能的相似性^[11]。

福氏志贺菌中的侵袭素 IpaB、IpaC、IpaD 和 IpaJ 都是细菌感染宿主后的强免疫原,可与感染福氏志贺菌的患者恢复期血清反应^[12-14]。实验也发现鸡白痢沙门菌阳性血清可与体外表达的 IpaJ 蛋白反应,这说明 IpaJ 为鸡白痢沙门菌的免疫原,在感染鸡体的过程中 IpaJ 得到了一定程度的表达。

对本室保存的从 1962 年至 2008 年的 105 株鸡白痢沙门菌分离株的 PCR 结果显示所有的分离株中都含有 *ipaJ* 基因,这也显示了该基因广泛存在于鸡白痢沙门菌中;而与鸡白痢沙门菌亲缘关系较近的鸡伤寒沙门菌和肠炎沙门菌中都不含该基因^[2,15],所以鸡白痢沙门菌在基因组序列上与这两种沙门菌的差别也反映了其在致病性上的独特性。关于 *ipaJ* 基因是如何参与鸡白痢沙门菌的感染过程还有待于更深入的研究。

参考文献

- [1] Diatchenko L, Lau YFC, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93(12): 6025-6030.
- [2] 李求春, 焦新安, 徐耀辉, 潘志明, 黄金林. 鸡白痢和肠炎沙门氏菌抑制差减文库的构建与分析. 扬州大学学报(农业与生命科学版) [*Journal of Yangzhou University(Agriculture and life Sciences Edition)*], 2007, 28(1): 1-4.
- [3] Liu M, Ren Z, Lei C, Wen Y, Yan W, Zheng Z. Sequence analysis and characterization of plasmid pSFD10 from *Salmonella choleraesuis*. *Plasmid*, 2002, 48(1): 59-63.
- [4] Buysse JM, Duniak DS, Hartman AB, Venkatesan MM. Identification and molecular characterization of a 27kDa *Shigella flexneri* invasion plasmid antigen, IpaJ. *Microbial Pathogenesis*, 1997, 23(6): 357-69.
- [5] 黄金林, 焦新安, 文其乙, 潘志明, 张小荣, 张如宽, 刘秀梵. 应用聚合酶链反应快速检测沙门氏菌. 扬州大学学报(农业与生命科学版) [*Journal of Yangzhou University(Agriculture and life Sciences Edition)*], 2002, 23(2): 5-11.
- [6] Sambrook J, Russell David W. 分子克隆实验指南, 黄培堂, 王栋樑, 周晓巍, 等译. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [7] Parsot C, Menard R, Gounon P, Sansonetti PJ. Enhanced secretion through the *Shigella flexneri* Mix-Spa translocon leads to assembly of extracellular proteins into macromolecular structures. *Molecular Microbiology*, 1995, 16(2): 291-300.
- [8] High N, Mounier J, Prévost MC, Sansonetti PJ. IpaB of *Shigella flexneri* causes entry into epithelial cells and escape from the phagocytic vacuole. *EMBO Journal*, 1992, 11(5): 1991-1999.
- [9] Blocker A, Jouihri N, Larquet E, Gounon P, Ebel F, Parsot C, Sansonetti P, Allaoui A. Structure and composition of the *Shigella flexneri* 'needle complex', a part of its type III secretion. *Molecular Microbiology*, 2001, 39(3): 652-663.
- [10] Hueck CJ, Hantman MJ, Bajaj V, Johnston C, Lee CA, Miller SI. *Salmonella typhimurium* secreted invasion determinants are homologous to *Shigella* Ipa proteins. *Molecular Microbiology*, 1995, 18(3): 479-490.
- [11] Hermant D, Ménard R, Arricau N, Parsot C, Popoff MY. Functional conservation of the *Salmonella* and *Shigella* effectors of entry into epithelial cells. *Molecular Microbiology*, 1995, 17(4): 781-789.
- [12] Li A, Rong ZC, Ekwall E, Forsum U, Lindberg AA. Serum antibody responses against *Shigella* lipopolysaccharides and invasion plasmid-coded antigens in *Shigella* infected Swedish patients. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 1993, 25(5): 569-577.
- [13] Oaks EV, Hale TL, Formal SB. Serum immune response to *Shigella* protein antigens in rhesus monkeys and humans infected with *Shigella* spp. *Infection and Immunity*, 1986, 53(1): 57-63.
- [14] Van de Verg LL, Herrington DA, Boslego J, Lindberg AA, Levine MM. Age-specific prevalence of serum antibodies to the invasion plasmid and lipopolysaccharide antigens of *Shigella* species in Chilean and North American populations. *The Journal of Infectious Diseases*, 1992, 166(1): 158-161.
- [15] 徐耀辉, 焦新安, 李求春, 潘志明, 黄金林. 鸡白痢沙门菌基因组差异片段的筛选与分析. 中国兽医科学(*Veterinary Science in China*), 2007, 37(07): 563-567.

Cloning and identification of *ipaJ* gene in *Salmonella pullorum*

Qiuchun Li, Yaohui Xu, Jinlin Huang, Xin'an Jiao*

(Jiangsu Key Laboratory of Zoonosis, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: [**Objective**] Cloning of *ipaJ* gene from *Salmonella pullorum* C79-13, and identification of expressed IpaJ protein as an immunogen of the pathogen. [**Methods**] With suppression subtractive hybridization (SSH) between *Salmonella pullorum* strain C79-13 (tester) and *Salmonella enteritidis* strain 50041 (driver), three subtracted fragments PEA3, PE31 and PE44 showed high homology with *ipaJ* in plasmid pSFD10 of *Salmonella choleraesuis* C500. The three subtracted sequences were spliced together into the whole sequence of *ipaJ* in *Salmonella pullorum*. Then the *ipaJ* gene was amplified from *Salmonella pullorum* by polymerase chain reaction (PCR) and cloned into prokaryotic expressive vector pET-30a(+). Western-blot was used to identify it as an immunogen. The distribution of the gene was also detected in *Salmonella pullorum* isolates. [**Results**] The *ipaJ* gene cloned from *Salmonella pullorum* was 840 bp, and the expressed fusion protein was 37 kDa. Specific reaction was found between *Salmonella pullorum* positive serum and expressed protein by Western-blot assay, confirming its identification as an immunogen of *Salmonella pullorum*. The PCR results showed that the gene exists in all *Salmonella pullorum* strains. [**Conclusion**] The *ipaJ* gene from *Salmonella pullorum* was first reported and cloned, and the expressed IpaJ protein was confirmed as an immunogen of *Salmonella pullorum*.

Keywords: *Salmonella pullorum*; *ipaJ*; cloning; immunogen

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Key Project of China National Programs for Fundamental Research and Development (2006CB504400) and by the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK2008011)

* Corresponding author. Tel: +86-514-87971136; E-mail: jiao@yzu.edu.cn

Received: 19 April 2010/Revised: 14 June 2010

科学出版社书讯 (2010 - 9)

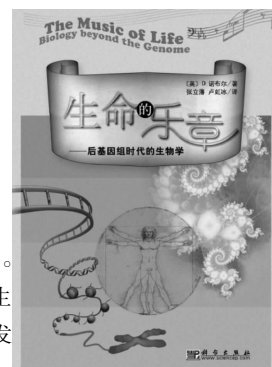
生命的乐章——后基因组时代的生物学

[英] D. 诺布尔 著, 张立藩 卢虹冰 译

978-7-03-028790-8 ¥28.00 2010年9月出版

内容简介: 本书是英国 D. 诺布尔教授于 2006 年出版的一本科普读物 *The Music of Life* 的中译本。原著现已被译成 7 种语言。本书以思辨的题材和运用比喻及讲述故事的手法, 对后基因组时代生命科学所面临的重大问题进行了讨论; 作者还深入浅出地介绍了系统生物学的基本概念和重要发现, 并指出系统层次理论在揭示生命奥秘中的重要意义。

本书不仅可供有关专业的大学生、研究生和科技人员阅读, 也可作为广大科学爱好者和青年学生的一本科普读物。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书 (免邮费)

邮购地址: 北京东黄城根北街 16 号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编: 100717

联系人: 李韶文 (010-64000849) 周文宇 (010-64031535)

网上订购: www.dangdang.com www.joy.com www.amazon.cn www.beifabook.com

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目