

腐蹄病致病因子节瘤拟杆菌蛋白酶在大肠杆菌中的高效表达及其启动子分析

官云浩

(农业部动物检疫所, 青岛)

E. Moses

(澳大利亚维多利亚州兽医研究所, 墨尔本)

节瘤拟杆菌是羊腐蹄病的主要致病因子, 它能产生细胞外蛋白酶。本文所报道的是其中的一种蛋白酶(40 kDa)基因的亚克隆、在大肠杆菌中的高效表达以及 N-末端多肽序列。用 SphI + ScaI 酶切原克隆(插入片段约为 15kb), 鸟枪法克隆于 pTZ18R 载体, 用免疫学方法筛选其亚克隆文库, 并用 SDS/聚丙烯酰胺凝胶电泳检测其表达。然后纯化其亚克隆 DNA 片段, 用 Sau3A1 消化, 克隆于 pKK₂₃₂₋₃ 启动子选择载体, 进行启动子的分离和分析。用分光光度计方法定量测定 CAT (氯霉素乙酰转移酶)活性, 从而确定其启动子的强弱。

关键词 节瘤拟杆菌; 表达; 启动子分析

腐蹄病 (Footrot) 是羊的一种常见传染病, 此病是由节瘤拟杆菌引起的^[1]。节瘤拟杆菌 (*Bacteroides nodosus*) 是一种革兰氏阴性厌氧菌, 它能产生细胞外蛋白酶^[2-3]。有人认为腐蹄病的致病机理是由于这些蛋白酶能降解许多种羊的蹄与皮的蛋白而引起的, 降解的蛋白包括弹性蛋白、角蛋白、纤维蛋白原、胶原等, 其酶的活性需有二价金属离子的存在。另外, 由于节瘤拟杆菌有纤毛结构, 所以它本身也是很重要的致病因子。

几年前, 有关腐蹄病的研究几乎集中在节瘤拟杆菌的表面抗原——纤毛上, 因为它在疾病的感染及免疫性方面起着重要作用。而近几年的研究却主要集中在细胞外蛋白酶的克隆及疫苗研制^[4]。

节瘤拟杆菌的基因组能编码多种细胞外蛋白酶。认为有两种解释: 一是其基因组中存在多种编码基因, 分别编码出不同的多肽; 二是其单结构基因编码的多肽经

翻译后修饰而形成的一些同功异构酶。

澳大利亚 E. Moses 已构建了节瘤拟杆菌 A 198 株的基因文库, 经免疫学方法筛选出 6 个克隆株(未发表数据)。其基因工程疫苗的试验正在进行中, 已初步证明纯化的蛋白酶的灭活苗对腐蹄病感染有一定的保护力。

本文报道其中一个蛋白酶基因的亚克隆和高效表达以及基因的调控——启动子的分离和分析。

材料和方法

(一) 菌株、载体及克隆株

菌株: 节瘤拟杆菌 A198 株 (或 VCS 1001), 属于血清组 A。

载体: pTZ18R、pKK₂₃₂₋₃ 均购于 Pharmacia 公司。

克隆株: 由 E. Moses 构建^[5]。插入

本文于 1990 年 5 月 28 日收到。

片段为 15kb, 表达的蛋白酶的分子量为 40kDa。其插入片段是 BamHI 消化的节瘤拟杆菌 DNA 片段, 重组于 pBR322 载体。转化大肠杆菌 DH5 α 细胞, 从免疫学方法筛选出的阳性菌落中得到的克隆株。

(二) 亚克隆 (Subcloning)

用 Triton X-100 裂解, CsCl 梯度离心的方法提取质粒 DNA^[5]。用多种限制性内切酶消化得到原克隆的酶切图谱。然后采用 SphI + Scal 酶切原克隆, 用鸟枪法克隆到 pTZ18R 载体上, 转化到大肠杆菌 DH5 α 细胞中, 在含有 Amp (氨苄青霉素) 的琼脂平皿上选取白色菌落 (含插入片段), 用牙签将其接种到新的 Amp 琼脂平皿上, 培养过夜。

(三) 免疫学筛选

把硝酸纤维素膜平铺在长有菌落的 Amp 琼脂板上, 将菌落印到膜上。使膜的菌面向上, 放在浸有 2% SDS 的滤纸上 30 分钟, 再用氯仿蒸气裂解细菌 30 分钟, 然后用 3% 白明胶-TBS (0.5mol/L NaCl/20mmol/L Tris. HCl, pH7.5) 37 $^{\circ}$ C 1 小时进行封闭, 用 TBS 洗膜, 把膜放入兔抗纯化的蛋白酶抗血清 (用 1% 白明胶/TBS 作 1:100 稀释) 室温作用 2 小时或过夜, 再用含 0.05% 吐温-20 的 TBS 洗三次, 然后放入过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG (1% 白明胶作 1:1000 稀释), 室温作用 2 小时, 洗涤后, 放入显色液中显色 (60mg 4-氯-1-萘酚溶于 20 ml 甲醇, 与含 0.015% H₂O₂ 的 TBS 混合)。

(四) 亚克隆的分析与酶切分析图

所得到的阳性菌落, 用碱变性方法提取质粒 DNA^[6]。然后用 SphI 酶切, 电泳观察其插入片段。再用 AccI、HpaI、KpnI、PvuII、HindIII、PstI、SphI、BamHI、Scal、EcoRI 和 ClaI 分别进行单酶解、双酶解

及三酶解, 然后得到其限制性内切酶分析图。

(五) PAGE 检测其表达

挑选单个菌落, 接种于 5ml LB-Amp 培养基, 振荡培养过夜。取 1ml 培养物于 Eppendorf 管中, 离心沉淀细胞, 然后把细胞悬于 250 μ l 样品缓冲液中, 置沸水浴 5 分钟, 离心 2 分钟去除不溶的细胞碎片。取 20 μ l 加样到 0.1% SDS-10% 聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳^[7]。

(六) Western 转移及 N-末端多肽序列分析

电泳完毕, 按照 western 转移的方法, 把蛋白质转移到 PVDF 膜 (ImmobilonTM-P, 孔径 0.45 μ m, Millipore Corporation, Bedford)。然后用 0.5% Ponceau S/5% 乙酸染色 10 分钟, 蒸馏水洗 2 分钟, 膜晾干后剪下所表达的蛋白带, 直接用蛋白质序列仪测定其 N-末端氨基酸组成。

(七) 启动子选择克隆

把亚克隆用 SphI + Scal + BamHI 三酶解, 用低熔点琼脂糖方法^[6]纯化其最大片段 (约 4.7kb, 含有蛋白酶基因)。将此片段用 Sau3AI 消化, 用鸟枪法克隆于载体 pKK232-8^[8] (它是一个启动子选择载体), 转化到 DH5 α 大肠杆菌细胞, 含有启动子的重组体可在含氯霉素的琼脂板上生长。

(八) 启动子强度测定

1. 细胞抽提物的制备: 从含氯霉素的琼脂平皿中挑选单个菌落接种到含有 Amp 的 5ml LB 培养基中, 培养过夜。按 1:100 把过夜培养物接种到 5ml 含 50 μ g/ml Amp 的 LB 培养基中, 长至 A₆₀₀ = 0.5 左右。然后把培养物置于冰上, 离心沉淀细胞, 用 1ml 50 mmol/L Tris. HCl/30 μ mol/L DTT 洗涤细胞, 离心收集细胞, 并悬于上述洗涤液中, 置 -70 $^{\circ}$ C 1 小时, 融解后超声波处理打碎细胞 (三次, 每次 10

秒钟,中间至少间隔 20 秒),离心去掉细胞碎片,将上清液转移到新管中。

2. 氯霉素乙酰转移酶 (CAT) 活性测定: 在装有循环恒温水套的 0.5ml 样品池中,加入 600 μ l 反应混合物 (8mg DTNB (5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid) 溶于 2ml 1 mol/L Tris.HCl (pH7.9), 200 μ l 10mmol/L 乙酰辅酶 A 中,用水调至总体积为 20ml), 平衡 3 分钟,加入 20 μ l 细胞抽提物,混匀后调吸光度 A 为零,立即加入 6 μ l 10mmol/L 氯霉素,混匀后用自动记录分光光度计记录其波长为 412 nm 的吸收曲线。

3. β -内酰胺酶活性测定: 两个带有恒温水套的样品池用 0.1mol/L PB (pH7.0) 作空白,调吸光度为 0,取一样品池加入 1.2ml 反应混合物 (41.5 μ g/ml 头孢霉素 II 溶于 0.1mol/L PB),平衡 3 分钟后,其吸光度应为 1.2—1.4,然后加入 40 μ l 细胞抽提物,用分光光度计自动记录波长在 255 nm 的酶反应曲线。

结果和讨论

(一) 节瘤拟杆菌蛋白酶的亚克隆

由于原克隆的插入片段为 15kb,因此我们决定将其亚克隆。所采用的方法是: HindIII + Scal 酶切,克隆于 pTZ18R 载体;用 SphI + Scal 酶切,也克隆于 pTZ18R 载体(原克隆中只有一个 Scal 切点,位于 pBR 322 载体上)。转化大肠杆菌 DH5 α 后,挑选白色菌落,用免疫学方法进行筛选。从 SphI 转化的重组体中筛选到 11 个阳性菌落,而经 HindIII 酶切所转化的重组体中未得到阳性菌落,这说明在蛋白酶基因上可能有 HindIII 切点。所得阳性菌落的斑点很浓,说明其基因的表达很强。提取阳性菌落的质粒 DNA,进行酶切鉴定,电泳分离后观察其插入片段为 4.67kb。当

用 BamHI 和 Scal 酶切时,电泳后均有两条带,而原克隆用的是 BamHI,又无 Scal 切点,由此可推测其亚克隆的插入片段存在一段 pBR322 载体。

(二) 亚克隆的限制性内切酶分析图

如材料和方法(四)所述,用多种酶解单酶解、双酶解和三酶解而得亚克隆的限制性内切酶分析图(图 1)。

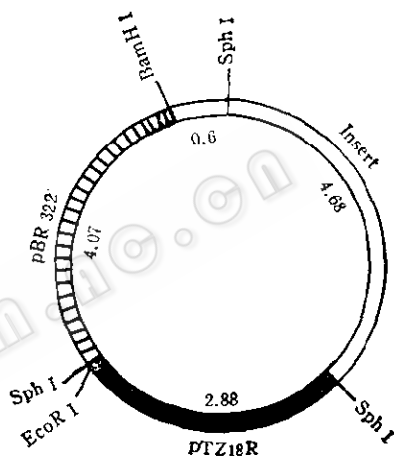


图 1 亚克隆的限制性内切酶分析图

Fig. 1 The restriction map of subcloned protease gene

由图可见,亚克隆的插入片段由两个 SphI 片段组成。其中一个片段来自 pBR 322 载体 (4.07kb) 加上原克隆上 0.6kb 一段,从 0.6kb 片段的编码能力上看,它不足以编码 40kDa 的蛋白酶,因此其编码基因是在 4.68kb 的片段上。

为继续进行亚克隆,将 4.68kb 的 DNA 片段纯化,试图克隆于 SphI 酶切的质粒载体 pTZ18R 或 pUC18,但转化大肠杆菌细胞后,在含 Amp 琼脂板上未见任何菌落,而电泳检查其连接反应进行得很好。不能转化大肠杆菌的原因可能是由于过度表达而对宿主细胞产生毒性作用。由此看来已不可能继续进行亚克隆而得到与此基因

长度相当的 DNA 片段。另外,此结果也说明亚克隆中含有 pBR 322 部分载体 DNA 片段可能对 4.68 kb 片段的克隆起稳定作用。

(三) SDS/PAGE 检测蛋白酶的表达

制备阳性菌落的细胞抽提物,取 20 μ l 进行 SDS/PAGE,结果见图 2。此结果表明所得亚克隆的表达是很强的,因为在 40 kD 处可见到一条很浓的蛋白质带,这与免疫学方法筛选的结果一致。

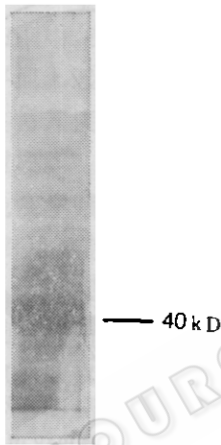


图 2 SDS/PAGE 检测蛋白酶的表达

Fig. 2 Electrophoretic analysis of subcloned protease expression

(四) 表达的蛋白酶 N-末端多肽序列

用蛋白质序列仪测定表达的蛋白酶的 N-末端多肽序列为:

Ala-Phe-Asn-Ile-Arg-Asn-His-Leu-Leu-Ser-Leu-Ala-Asn-

(五) 启动子克隆及其强度

所得亚克隆的表达如此之强,我们认为它不是利用大肠杆菌已知的启动子,而是基因本身具有的启动子来指导其表达的,因此我们进行了一些启动子方面的研究。

用低熔点琼脂糖纯化 4.68 kb DNA 片段,用 Sau3AI 消化后,克隆于 BamHI 酶

切的载体 pKK₂₃₂₋₃₀。此载体在多克隆位点的前面有一 CAT (氯霉素乙酰转移酶) 基因,它的启动子部分已被去掉,因此插入多克隆位点处的 DNA 片段只要含有启动子,即可使 CAT 基因表达,转化的菌落可生长在含氯霉素的琼脂板上,测定 CAT 的活性可得到启动子的强度。凡不含启动子的 DNA 片段插入载体后,转化后则不能生长在含氯霉素的琼脂板上。

在实验中,我们除了检测 CAT 的活性外,还检测了 β -Lactamase (β -内酰胺酶)的活性,这样可以消除质粒拷贝数的影响。

所采用的计算方法如下:

CAT 比活性 = $\Delta A_{412} / 0.0136 / \text{mg 蛋白质}$

β -Lactamase 比活性 = $(\Delta A_{255} / \text{min}) \times (375 / \text{mg 蛋白质})$

$\frac{\text{CAT 比活性}}{\text{Lactamase 比活性}} \times 1000$ 即为该启动子的强度

根据上述公式,我们把克隆的片段酶切后按插入片段大小分组,用分光光度计自动记录酶反应的吸收曲线,计算出启动子的强弱:最强的克隆 13 号为 1436、11 号为 1270、4 号为 1008,较弱的 18 号为 48.7。但从序列分析及电泳观察,较强的三个克隆都含有一个共同片段,只不过是 4 号与 11 号都接上了另一段约 50bp 的 DNA 片段,此共同片段即含有所分离的启动子序列。

参 考 文 献

- [1] Moses, E. et al.: *Gene*, 77: 219—228, 1989.
- [2] Green, R.: *J. Gen. Microbiol.*, 131: 2871—2876, 1985.
- [3] Gordon, L. et al.: *Res. Vet. Sci.*, 39: 165—172, 1985.
- [4] Elleman, T. C.: *Microbiol. Review*, 52(2): 233—247, 1988.
- [5] Sambrook, et al.: *Molecular Cloning—A Labora-*

- tory Manual (second edition), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.
- [6] Maniatis, T. et al.: Molecular Cloning—A Laboratory Manual, p. 368, 170, Cold Spring Har-

- bor Laboratory Press, New York, 1982.
- [7] Laemmli, U. K.: *Nature*, 227: 680—685, 1970.
- [8] Brosius, J.: *Gene*, 27: 151, 1984.

OVEREXPRESSION OF AN EXTRACELLULAR *BACTEROIDES NODOSUS* PROTEASE IN *E. COLI* AND ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF ITS PROMOTER

Gong Yunhao

(National Animal Quarantine Institute, Qingdao)

E. Moses

(Veterinary Research Institute, Melbourne, Australia)

Bacteroides nodosus is the essential causative agent of ovine footrot. It produces extracellular proteases which involved in pathogenesis of footrot. In this paper, we report the subcloning of *Bacteroides nodosus* protease, its overexpression in *E. coli* and its N-terminal polipeptide sequence. The subclone library was constructed in *E. coli* using SphI digested original clone (15 kb) and plasmid PTZ18R and screened using immunological assay. The expression was observed using SDS-PAGE. The

subcloned DNA fragment was then cutted with Sau3AI, cloned into pKK₂₃₂₋₈ vector to perform promoter isolation and analysis. The promoter strength was determined using spectrophotometric assay.

Key words

Bacteroides nodosus; Expression; Promoter analysis