

# 鼠伤寒沙门氏菌 I 相鞭毛蛋白 基因 *fliC<sup>I</sup>* 的克隆和鉴定\*

蔡学忠 焦新安 张如宽 刘秀梵

(扬州大学农学院 扬州 225009)

**摘 要** 以提纯的鼠伤寒沙门氏菌 8705 染色体 DNA 为材料,经 EcoR I 消化,过 Sepharacyl S-400 柱,得到大于 400bp 的酶切片段;然后随机克隆到质粒 pGEM-3Zf(-)中,转化大肠杆菌 LC2a(hag<sup>-</sup>, recA<sup>-</sup>);在氨苄青霉素平板上共得到 6013 个转化子,从中筛选出 1 个有动力的克隆,少量制备质粒 DNA,经酶切电泳鉴定,该克隆的外源片段大小为 15.3kb,将其命名为 pGI4015。动力、动力抑制试验和 Southern blot 分子杂交试验证明 pGI4015 中载有鼠伤寒沙门氏菌 I 相鞭毛蛋白基因 *fliC<sup>I</sup>*;利用其 BamH I 和 Sal I 位点删除与鞭毛蛋白表达无关的序列,构建亚克隆质粒 pGI4015BS,使得 *fliC<sup>I</sup>* 定位于更小的区域——3.8kb 的 BamH I / Sal I 插入片段上。

**关键词** 鼠伤寒沙门氏菌, I 相鞭毛蛋白基因 *fliC<sup>I</sup>*, 克隆

沙门氏菌的鞭毛由三大部分组成:基体部、丝状部和钩状部;鞭毛蛋白是鞭毛丝状部结构蛋白,由 *fliC* 基因所编码。据 1988 所公布的鼠伤寒沙门氏菌基因图谱<sup>[1]</sup>介绍,与鞭毛相关的基因主要分布于染色体 DNA 上的三个区域:23cs (centisome)、40cs 和 56cs,共 37 个基因,Joys 和 Wei 于 1985 年先后克隆到 H-1<sup>i</sup>、H-1<sup>c</sup>、H-1<sup>d</sup>、H-1<sup>a</sup>、H-1<sup>f</sup> 基因<sup>[2~4]</sup>,1993 年 Barbara J. Masten 又克隆了 H-1<sup>g</sup> 系列抗原复合体基因<sup>[5]</sup>。

1992 年王志亮等人成功地研制了沙门氏菌属特异性单克隆抗体<sup>[6]</sup>;焦新安等人<sup>[7]</sup>将该单抗所针对的属特异性共同抗原表位定位到鞭毛的丝状部。本研究的出发点是从鼠伤寒沙门氏菌染色体 DNA 中克隆其 H-1<sup>i</sup> 基因,为认识共同抗原表位的遗传背景和进一步定位打下基础;同时为将鞭毛蛋白基因用作表达外源基因载体的构建创造条件。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株和质粒(见表 1)

### 1.2 生化试剂

核酸限制性内切酶: EcoR I、BamH I、Hind III 是华美生物工程公司产品,其它购自 Boehringer Mannheim (BM) 公司和 Promega 公司。非放射性 DNA 标记与检测试剂盒: BM 公司产品。沙门氏菌 O 抗原、H 抗原单因子血清: 购自兰州生物制品研究所。

\* 国家自然科学基金和江苏省青年科技基金资助项目,部分工作得到霍东英基金会青年教师基金资助。  
本文于 1995 年 8 月 12 日收到。

表1 实验所用菌株、质粒的名称、特性和来源

Table 1 The names, feature and sources of the bacteria and plasmids in the experiment

名称 Strain	特性 Characteristic	来源 Source
鼠伤寒沙门氏菌 8705 <i>S. typhimurium</i>	抗原式: 1, 4, (5), 12 : i : 1, 2	本实验室保存 This lab
大肠杆菌 ( <i>E. coli</i> ) LC2a	Amp <sup>-</sup> , hag <sup>-</sup> , recA <sup>-</sup>	美国 Texas 大学 Rasika M. Marshey, Ph.D. 惠赠
pGEM-3Zf(-)	Amp <sup>+</sup>	本实验室保存 This lab.
pH I 101	pBR322+fliC <sup>i</sup>	日本 Okayama 大学 Masatoshi Enomoto, Ph.D. 惠赠

### 1.3 鼠伤寒沙门氏菌 I 相鞭毛蛋白基因 *fliC<sup>i</sup>* 的克隆和筛选

1.3.1 核酸分子生物学方法: 根据细菌自身结构的特点, 参照真核生物高分子量核 DNA 的提取方法<sup>[8]</sup>提取细菌染色体 DNA; 染色体 DNA 的限制性酶切, Sepharcyl S-400 柱层析, 载体质粒的酶切, 去磷酸化, DNA 重组, 感受态细胞的制备和转化等操作方法均见文献<sup>[8]</sup>。

1.3.2 鞭毛蛋白基因 *fliC* 克隆的筛选: 挑取 Amp<sup>+</sup> 平板上所有的转化菌落, 穿刺 2×YT 半固体培养基, 37℃ 培养 24h, 对着光线观察穿刺线的生长情况, 筛选出有动力 (即沿穿刺线向四周蓬松生长) 的克隆。

### 1.4 I 相鞭毛蛋白基因 *fliC<sup>i</sup>* 的鉴定

1.4.1 插入片段大小的测定: 用碱裂解法制备质粒 DNA, 用 BamH I + Sca I, BamH I + EcoR V, Sca I + EcoR V 进行双酶切, 测定插入片段的大小, 并将该克隆命名为 pG I 4015。

1.4.2 动力重复试验和动力抑制试验: 将筛选的阳性克隆质粒 DNA 重新转化大肠杆菌 LC2a, 穿刺半固体观察动力, 并以 H-1<sup>i</sup> 单因子血清 (凝集价为 1 : 320) 做动力抑制试验。

1.4.3 Southern blot 分子杂交试验: 以 pH I 101 / HindIII 的 4.5kb 片段<sup>[9]</sup>为探针, 参照非放射性 DNA 标记及检测试剂盒说明书介绍的方法进行。

1.4.4 阳性克隆转化菌鞭毛形态的电镜观察: 将载有福尔马膜的铜网飘浮于阳性克隆的 LB 培养物上, 在 D.D.W 液滴上轻轻漂洗, 用 1% 的磷钨酸染色, 37℃ 烘干, 电镜观察鞭毛的形态。

1.4.5 转化菌鞭毛蛋白 SDS-PAGE 和免疫转印分析: 以改良酸解法提取转化菌和鼠伤寒沙门氏菌鞭毛蛋白, 按文献<sup>[8]</sup>进行 SDS-PAGE 电泳和免疫转印分析。所用鞭毛蛋白属特异性共同抗原表位单抗 de7 为本室研制<sup>[6, 7]</sup>。

### 1.5 I 相鞭毛蛋白基因的亚克隆及其酶谱分析

1.5.1 *fliC<sup>i</sup>* 的亚克隆: 先从 pGI 4015 / BamH I 的两个酶切片段中筛选出有动力的克隆, 构建质粒 pG I 4015B; 然后进一步从 pG I 4015B / Sal I 的 3 个酶切片段中筛选出

有动力的片段, 构建质粒 pG I 4015BS.

1.5.2 质粒 pG I 4015BS 的酶谱分析: 选用在 *fliC<sup>I</sup>* 基因中单酶切位点的限制性内切酶 *EcoR* V、*Sca* I、以及 *Sal* I + *BamH* I 对质粒 pG I 4015BS 进行酶切电泳分析, 并计算亚克隆质粒 pG I 4015BS 插入片段的大小.

## 2 结果

### 2.1 沙门氏菌 I 相鞭毛蛋白基因 *fliC<sup>I</sup>* 的克隆和筛选

克隆过程如图 1. 染色体 DNA 经 *EcoR* I 完全消化、过柱, 与线性去磷酸化质粒

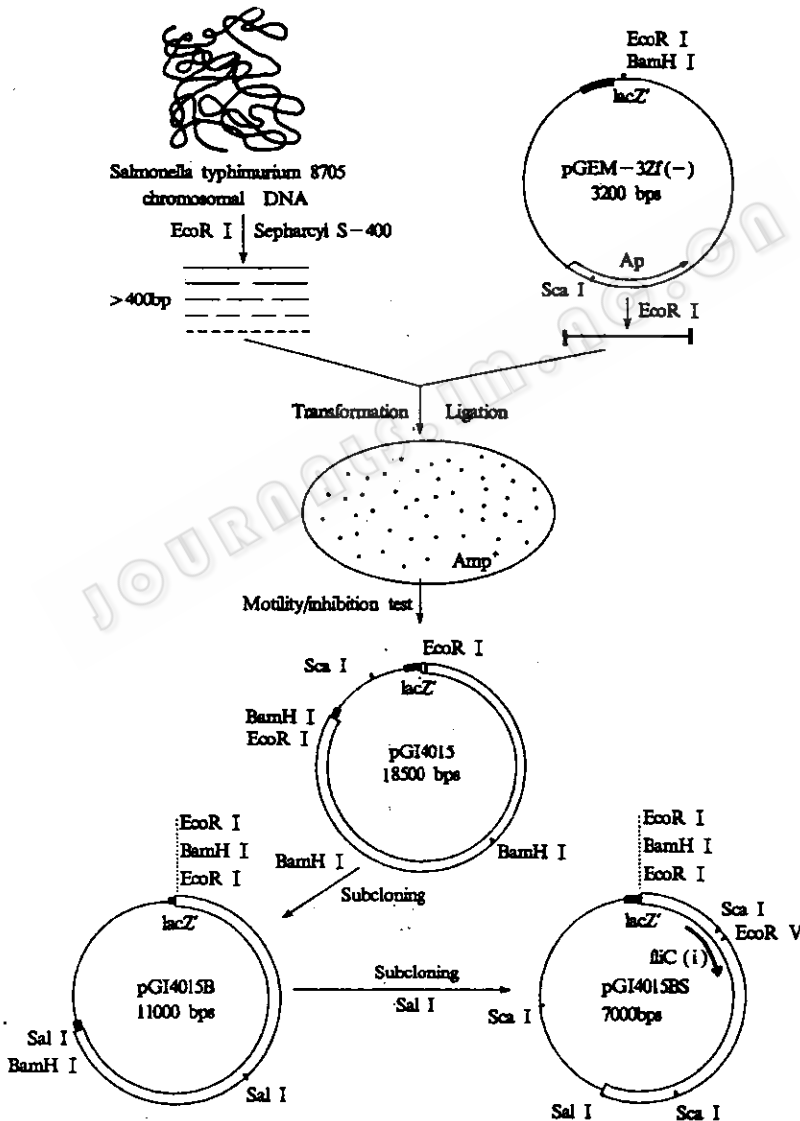


图 1 pG I 4015BS 的构建及其限制性酶切图谱

Fig.1 The construction and restriction mapping of pG I 4015BS

pGEM-3Zf(-)连接,转化大肠杆菌 LC2a,在氨苄青霉素平板上共筛选到 6013 个转化子,将这些转化子穿刺  $2 \times$  YT 半固体培养基,在进行动力学检查时,第 4015 个转化子具有动力,纯化该克隆备用。

## 2.2 鞭毛蛋白基因克隆的鉴定

**2.2.1 插入片段的鉴定及其大小的计算:**第 4015 号克隆的 Miniprep 结果表明该质粒中载有 1 个大小在 10.0kb 以上的外源片段,该质粒被命名为 pGI4015。图版 I-1 是 pGI4015 限制性酶切图谱,根据质粒 pGI4015 的 BamHI+EcoRV、BamHI+ScaI 和 EcoRV+ScaI 的酶切片段的大小,计算得质粒 pGI4015 的大小为 18.5kb。

**2.2.2 动力和动力抑制试验:**动力重复试验和动力抑制试验表明, pGI4015 不仅能够将动力学特性在大肠杆菌 LC2a 中稳定地传递,而且能够被一定浓度 (1:320) 的  $H-1^i$  单因子血清所抑制,从这一试验中可以得出结论: pGI4015 中载有鼠伤寒沙门氏菌 I 相鞭毛蛋白基因  $fliC^i$ ,而且该基因在 LC2a 中能够稳定地表达。

**2.2.3 Southern blot 分子杂交试验:**为进一步验证所克隆的质粒中载有  $H-1^i$  基因,将样品 pGI4015/EcoRI, pGI4015BS/BamHI+Sall, pH1101/HindIII 与  $fliC^i$  特异性探针进行 Southern blot 分子杂交 (图版 I-2), 可以看到 pGI4015 在 15.3kb 的位置处有一清晰的杂交条带,证实了 pGI4015 质粒中确实载有  $fliC^i$  基因。同时,亚克隆后的质粒 pGI4015BS 在 3.8kb 的位置处出现一清晰的杂交条带,说明  $fliC^i$  基因被定位于 3.8kb 片段中。

**2.2.4 转化菌 pGI4015 的鞭毛形态观察:**在 H300 透射电镜下,可以看到从菌体上发出 1 根或数根长而弯曲的鞭毛 (图版 I-3)。

**2.2.5 转化菌鞭毛蛋白 SDS-PAGE 和免疫转印分析结果:**用改良酸解法可以从转化菌中把  $fliC^i$  表达产物提取出来,而转化前 LC2a 提取不到鞭毛蛋白。转化菌鞭毛蛋白 SDS-PAGE 如图版 I-4, 免疫转印结果图略。 $fliC^i$  表达的鞭毛蛋白分子量为 49000, 这与野生型鼠伤寒沙门氏菌鞭毛蛋白一致,它们均与单抗 de7 出现明显的条带反应。这一结果从免疫学角度证实了  $fliC^i$  基因的成功克隆与表达,另一方面,从基因水平验证了鞭毛蛋白分子上携带着共同抗原表位。

## 2.3 $fliC^i$ 的亚克隆和酶谱分析

**2.3.1  $fliC^i$  的亚克隆:**为了便于  $fliC^i$  的酶切图谱分析和定序等工作,对 pGI4015 进行了亚克隆。利用其中的 BamHI 和 Sal I 位点,去除与鞭毛蛋白表达无关的片段,构建质粒 pGI4015BS; 将  $fliC^i$  定位到更小的区域 (3.8kb 的外源片段) 上 (图版 I-5)。Southern blot 分子杂交试验中 pGI4015BS 样品在 3.8kb 处出现 1 条明显的杂交条带 (图版 I-2), 从 DNA 水平上证实了  $fliC^i$  已被亚克隆到质粒 pGI4015BS 中。

**2.3.2 质粒 pGI4015BS 的酶谱分析:**从图版 I-5 中可以看出质粒 pGI4015BS 中有 Sca I 位点 3 个, BamH I、Sal I 和 EcoR V 位点各 1 个, Sca I 酶切片段的大小都在 2.3kb 左右,而  $fliC^i$  的只有 1.5kb,所以在  $fliC^i$  中至少有 1 个 Sca I 位点;从这个酶切图上并不能确定这些位点在质粒 pGI4015BS 中的准确位置,但根据 Joys 报道<sup>[4]</sup>的序列,在  $fliC^i$  基因中有 Sca I 和 EcoR V 位点各 1 个,且都位于可变区,可以推测在作者克隆的  $fliC^i$  基因中也有上述位点。因为 Sca I 和 EcoR V 位点都位于  $fliC^i$  的可变区,且只有 1 个位

点,因此当 *fliC<sup>I</sup>* 用作表达外源基因的载体时,这些位点可以作为外源基因的候选插入位点。

### 3 讨 论

本实验采用随机筛选的方法成功地克隆到鼠伤寒沙门氏菌 H-1<sup>I</sup> 基因 (*fliC<sup>I</sup>*),所克隆到的 *fliC<sup>I</sup>* 位于 15.3kb 的 EcoR I 酶切片段上,与 1985 年 Joys<sup>[2]</sup>报道的 4.3kb 的 EcoR I 酶切片段相差较大,但这并不矛盾。因为 15.3kb 和 4.3kb 并不代表 *fliC<sup>I</sup>* 的大小,而是 *fliC<sup>I</sup>* 与其最近 EcoR I 位点关系的反映,这种差异主要是所用菌株的不同引起的。

本实验成功的关键之一是宿主细胞的选择。目前最常用的宿主细胞是大肠杆菌,它和沙门氏菌同属肠杆菌科,两者的蛋白质转录和翻译系统能够部分兼容,给沙门氏菌基因的克隆带来了方便,但用作鞭毛蛋白基因克隆的宿主细胞还必须具备:鞭毛蛋白基因大部分或全部缺失;这种缺失是同源重组缺陷型,保证阳性克隆的鞭毛蛋白完全是由沙门氏菌鞭毛蛋白基因表达的,而不是一种融合蛋白(即供体菌和受体菌的嵌合体蛋白);除鞭毛蛋白基因缺失外,具有完整的鞭毛系统。我们所用的菌株 LC2a 具有上述特征。

沙门氏菌的鞭毛现象有两个例外,即鸡伤寒沙门氏菌 (*S. gallinarum*) 和鸡白痢沙门氏菌 (*S. pullorum*)。到目前为止,就其无鞭毛现象的分子遗传学解释还没有确切的报道,仅仅是一些分析性的推测,作者认为可以用 *fliC<sup>I</sup>* 基因对其分子遗传学机制开展一些探索性工作。

现在的研究表明:*fliC* 中间可变区的某些区域是非必需的,可以用作表达外源基因的载体<sup>[3]</sup>;鞭毛蛋白在沙门氏菌中能够高效表达,几乎全菌的 2% 的生物合成能被用于鞭毛蛋白的合成<sup>[3]</sup>;减毒的沙门氏菌可以口服免疫,直接与体腔粘膜接触,刺激粘膜免疫<sup>[10]</sup>;由于鞭毛自身装配的特点,鞭毛蛋白和其它蛋白质相比具有细胞外分泌的优点;沙门氏菌可以在巨噬细胞和其它具有吞噬功能的细胞中存活并生长,能够有效地将抗原提呈给 T 细胞<sup>[10]</sup>。以上特点都为其作为载体提供了很好条件。到目前为止,乙肝表面抗原、霍乱毒素 B 亚单位抗原、HIV-1 的 gp120,啮类动物柏氏疟原虫的环子孢子蛋白,酿脓链球菌 E 群 M 蛋白等先后成功地在 *fliC<sup>d</sup>* 或 *fliC<sup>I</sup>* 上得到了表达,并使实验动物能够产生一定的免疫保护作用<sup>[9~11]</sup>,因此在用质粒 pGI4015BS 作为表达保护性抗原基因的载体应用方面还值得进一步尝试。

### 参 考 文 献

- [1] Sanderson KE, Roth JR. *Microbiol Rev*, 1988, 52: 485~582.
- [2] Joys T M. *J Biol Chem*, 1985, 260: 15758~15761.
- [3] Wei L N, Joys T M. *J Mol Biol*, 1985, 186: 791~803.
- [4] Wei L N, Joys T M. *Nucleic Acids Research*, 1986, 14: 3227.
- [5] Masten B J, Joys T M. *J Bacteriol*, 1993, 175(17): 5359~5385.
- [6] 王志亮, 焦新安, 张如宽, 等. 江苏农学院学报, 1993, 14(2): 69~72.
- [7] 焦新安, 杨静, 王志亮, 等. 中华微生物与免疫学杂志, 1993, 13(6): 351~353.
- [8] J. 萨姆布鲁克, E. F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯等主编(金冬雁, 黎孟枫等译). 分子克隆实验指南. 第二版. 北京: 科学出版社, 1993. 1~595.
- [9] Okazaki N, Matsuo S, Saito K et al. *J Bacteriol*, 1993, 175: 758~766.

- [10] Wu J Y, Newton S, Judd A. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, **86**: 4726~4730.  
 [11] Newton S M C, Jacob C O, Stocker B A D. *Science*, 1989, **244**: 70~72.

## CLONING AND IDENTIFICATION OF *fliC*<sup>i</sup> GENE OF *SALMONELLA TYPHIMURIUM*

Cai Xuezhong Jiao Xinan Zhang Rukuan Liu Xiufan

(Department of Veterinary Medicine, Agricultural College, Yangzhou University, Yangzhou 225009)

**Abstract** Purified *Salmonella typhimurium* 8705 chromosomal DNA was digested with EcoR I. DNA fragments above 400bp were obtained by Sepharcl S-400 chromatography and cloned into vector pGEM-3Zf(-), then transformed into host cell LC2a (hag<sup>-</sup>is recA<sup>-</sup>). One out of 6013 transformants was found to be motile and this clone was named pGI4015. Miniprep proved that pGI4015 contained an inserted fragment about 15.3kb. Motility/inhibition tests as well as Southern blot hybridization showed that pGI4015 bear the H-1<sup>i</sup> gene of *S. typhimurium*. With the aid of BamH I and Sal I site, sequences unrelated to flagellin in the cloned DNA fragment was removed, and a 3.8kb fragment containing *fliC* gene was subcloned.

**Key words** *Salmonella typhimurium*, *fliC*<sup>i</sup> gene, Clone

### 图 版 说 明

#### Explanation of plate

1. 质粒 pGI4015 限制酶切图谱 Agarose gel electrophoretic pattern of pGI4015  
 A. pGI4015/BamH I; B. pGI4015/EcoR V; C. pGI4015/Sca I; D. pGI4015/Pst I;  
 E. pGI4015/BamH I+EcoR V; F. pGI4015/BamH I+Sca I; G. pGI4015/EcoR V+Sca I;  
 H. Marker( $\lambda$ DNA/Hind III).
2. pGI4015 和 pGI4015BS 分子杂交图 Hybridization of pGI4015/EcoR I and pGI4015BS/BamH I+Sal I with *fliC*<sup>i</sup>-specific probe  
 A. pH I 101/Hind III; B. pGI4015/EcoR I; C. pGI4015BS/BamH I+Sca I;
3. 转化菌 pGI4015BS 的鞭毛形态的电镜观察 (5000 $\times$ ) The flagellar shape of pGI4015BS transformant under the electron microscope (5000 $\times$ )
4. 鞭毛蛋白 SDS-PAGE 结果 The SDS-PAGE pattern of flagellin  
 A. Flagellin of pGI4015BS expressed in *E. coli* LC2a; B. Flagellin of *S. typhimurium*; C. Marker.
5. 质粒 pGI4015BS 酶切电泳图 Agarose gel electrophoretic pattern of pGI4015BS  
 A. pGI4015BS/BamH I; B.C. pGI4015BS/EcoR V; D. pGI4015BS/Sca I; E. Marker( $\lambda$  DNA/Hind III); F. pGI4015BS (undigested).