

## 炭疽芽胞杆菌 BslA<sub>(260-652)</sub> 蛋白的表达纯化与黏附功能鉴定

马坤<sup>1,2#</sup>, 王艳春<sup>2#</sup>, 陶好霞<sup>2</sup>, 董杰<sup>2</sup>, 曹诚<sup>2</sup>, 张部昌<sup>1\*</sup>, 刘纯杰<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> 安徽大学生命科学学院, 合肥 230039

<sup>2</sup> 军事医学科学院生物工程研究所, 病原微生物与生物安全国家重点实验室, 北京 100071

**摘要:** 【目的】克隆表达炭疽芽胞杆菌 BslA 的功能区片段并对其生物学功能进行鉴定。【方法】以炭疽芽胞杆菌 A16R 基因组 DNA 为模板 PCR 扩增 bslA<sub>(260-652)</sub> 基因片段, 克隆至 pET-28a(+) 载体。将成功构建的重组质粒转化入大肠杆菌 Rosetta (DE3) 中, 诱导表达后收集菌体经超声破碎后, 对可溶表达部分用镍柱进行亲和层析纯化。以纯化后的蛋白为抗原, 免疫 BALB/c 小鼠制备该蛋白的多抗, 用 ELISA 和 Western blot 检测抗血清; 使用间接免疫荧光实验和细菌黏附实验研究目标蛋白及其抗体的生物学功能。【结果】BslA<sub>(260-652)</sub> 获得了可溶性表达, 纯化后纯度约为 87.4%。以纯化蛋白为抗原, 免疫 BALB/c 小鼠制备的抗血清 ELISA 效价可达 1:20000。将 BslA<sub>(260-652)</sub> 蛋白与 HeLa 细胞共孵育后, 能够直接和 HeLa 的细胞膜结合。细菌黏附实验表明 BslA<sub>(260-652)</sub> 蛋白及其相应的多抗血清都能够显著地抑制炭疽芽胞杆菌 A16R 对 HeLa 细胞的黏附。【结论】大肠杆菌表达得到的炭疽芽胞杆菌 BslA<sub>(260-652)</sub> 蛋白具有与天然蛋白相似的生物活性, 为深入研究 BslA 蛋白在炭疽芽胞杆菌致病过程中的作用奠定实验基础。

**关键词:** 炭疽芽胞杆菌, BslA 蛋白, 多克隆抗体, 免疫荧光, 黏附

中图分类号: R932 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2012) 03-0360-07

炭疽病是由炭疽芽胞杆菌 (*Bacillus anthracis*) 引起的一种人畜共患烈性传染病, 主要通过皮肤、呼吸道和消化道感染动物和人<sup>[1]</sup>。预防炭疽感染最有效的方式就是接种疫苗, 当前应用的疫苗炭疽主要是基于炭疽保护性抗原 PA (protective antigen)<sup>[2-5]</sup>。但大量研究表明, 单独的 PA 蛋白疫苗并不能够提供足够的免疫保护, 目前许多研究者认为 PA 加其它菌体或芽胞组份是一个比较理想的炭疽疫苗研究策略, 具体的组合有 PA 加灭活的芽胞、PA 加芽胞蛋白、PA 加减毒菌株、PA 加荚膜多糖和 PA 结构域联合毒素结构域等<sup>[6]</sup>。因此研究者一

直致力于寻找和鉴定新的炭疽芽胞杆菌保护性抗原<sup>[7-9]</sup>。

BslA 蛋白 (*B. anthracis* S-layer protein A) 由炭疽芽胞杆菌 pXO1 致病岛区域上的 bslA (pXO1-90) 基因编码, 包含 652 个氨基酸残基。BslA 蛋白 N 端 1-259 位氨基酸残基中含有三个保守的 SLH 基序 (S-layer-homologous motifs), 是一种典型的 S 层蛋白, 炭疽芽胞杆菌感染宿主后在体内有稳定的表达<sup>[10]</sup>。天然表达的 BslA 与其它 S 层蛋白一起组成炭疽芽胞杆菌的 S 层, 从而共同展示于菌体表面。

研究表明 BslA 蛋白在炭疽芽胞杆菌致病过程

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2008BA166B03); 国家艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治重大专项 (2008ZX10004-015)

\* 通信作者: Tel: +86-10-66948834, E-mail: liuej@nic.bmi.ac.cn; zhbc@ahu.edu.cn

作者简介: # 共同第一作者。马坤 (1985-), 男, 安徽合肥人, 硕士研究生, 研究方向为病原微生物致病机制, E-mail: makunwx@gmail.com;

王艳春 (1980-), 男, 山西原平人, 助理研究员, 研究方向为病原微生物致病机制及其疫苗, E-mail: springwyc@gmail.com

收稿日期: 2011-11-14; 修回日期: 2011-01-05

中发挥了关键作用,特别是其作为一种黏附素对于炭疽芽胞杆菌侵染机体中的角色是不可或缺的<sup>[11-12]</sup>。BslA 蛋白具有黏附宿主细胞的功能,并且可以使炭疽芽胞杆菌黏附在脑内皮组织使其通过血脑屏障,最终引发致死率几乎为 100% 的炭疽性脑炎。而且进一步的研究表明,BslA 的表达可能是炭疽黏附宿主器官的充要条件<sup>[13]</sup>。另外,BslA 的表达受到炭疽芽胞杆菌核心毒力调控因子 AtxA 的调控,是一种重要的毒力相关蛋白<sup>[14]</sup>。因此研究其 BslA 在炭疽感染过程中有作用机制对于预防和治疗炭疽病都有十分重要的意义。

本研究通过基因工程方法表达并纯化了的可溶性的重组 BslA 蛋白功能区片段 BslA<sub>(260-652)</sub>,制备了相应的多克隆抗体,结果表明 BslA<sub>(260-652)</sub> 蛋白具有天然表达的完整的 BslA 相类似的黏附素活性,相应的多抗血清能够拮抗炭疽芽胞杆菌的黏附作用。这些结果为深入探索 BslA 蛋白黏附分子机理以及炭疽芽胞杆菌的致病机制与免疫预防打下了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物和菌株:雌性 SPF 级 BALB/c 小鼠购自军事医学科学院实验动物中心,共 5 只。质粒 pET-28a (+)、炭疽芽胞杆菌 A16R (pXO1<sup>+</sup>, pXO2<sup>-</sup>)、AP422 (pXO1<sup>-</sup>, pXO2<sup>-</sup>)、Hela 细胞由本室保存;大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、Rosetta (DE3) 为北京博迈德公司产品。

中国药典《生物制品生产检定用菌毒种管理规程》中“常用生物制品生产用菌毒种生物安全分类”规定炭疽芽胞杆菌 A16R 菌株为危害程度第三类微生物,本研究涉及炭疽芽胞杆菌的实验均在二级生物安全实验室进行,具体操作过程在二级生物安全柜中进行,含菌废弃物全部经严格灭菌处理。

1.1.2 主要试剂和仪器:TaqMix 为北京博迈德公司产品,高保真 DNA 聚合酶 Pfu 购自北京全式金生物有限公司,限制性内切酶购自 Fermentas 公司;T4 连接酶购自纽英伦生物技术有限公司;小量质粒提取试剂盒和 DNA 回收试剂盒购自 Promega 公司;中分子量蛋白 Marker 及预染蛋白 Marker 为 Fermentas 公司产品。用于蛋白镍亲和层析纯化的 ProBond<sup>TM</sup> Purification system 购自 invitrogen 公司;完全弗氏佐

剂和不完全弗氏佐剂为 Sigma 公司产品;HRP 酶标记的山羊抗小鼠 IgG 和 FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体购自北京中杉金桥生物科技有限公司;抗炭疽芽胞杆菌核糖体蛋白 L6 的多克隆抗体为实验室自制;可溶型单组分 TMB 试剂盒为天根公司产品;脑心浸液培养基 (BHI) 为 BD 公司产品;RPMI-1640 细胞培养基和胎牛血清、胰蛋白酶购自 Hyclone 公司。

### 1.2 BslA<sub>(260-652)</sub> 表达载体的构建

常规的分子生物实验均参考文献 [15] 进行。实验所用引物设计如下:上游:5' CGGGATCCGAAGAATTGAATCAAAAGTT-3', 下游:5'-CCGCTCGAGACTGTTTGGTATTCTAAGTTT-3'。目的基因扩增用常规 PCR 方法,以炭疽芽胞杆菌 A16R 基因组 DNA 为模板用 pfu 酶进行 PCR 扩增。扩增参数为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;然后 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s、51 $^{\circ}$ C 退火 30 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s、扩增 30 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。反应结束后对 PCR 产物进行电泳分析并纯化回收。回收片段和质粒 pET28a (+) 均用 BamH I 和 Xho I 双酶切后连接转化 DH5 $\alpha$ 。随机挑选菌落进行菌落 PCR 鉴定以及酶切鉴定,鉴定正确的克隆送军事医学科学院八所六室测序。

### 1.3 重组 BslA<sub>(260-652)</sub> 蛋白的表达与纯化

测序正确的重组质粒转化入 *E. coli* Rosetta (DE3),对应单位克隆接种于 5 mL 含浓度为 50  $\mu$ g/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 培养过夜,再取过夜培养菌液按 1:100 的比例接种于含相同浓度的卡那霉素的液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 培养至 OD<sub>600</sub> 约为 0.6-0.8 时,加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG,28 $^{\circ}$ C 诱导表达 8 h。然后于 4 $^{\circ}$ C,10000  $\times$  g,10 min 离心收集菌体,PBS 重悬,超声破碎菌液至澄清,破碎产物于 4 $^{\circ}$ C,15000  $\times$  g 离心 10 min,收集上清,制备蛋白电泳样品进行 12% 的 SDS-PAGE 电泳分析,同时以同样经诱导表达的含 pET28a (+) 质粒的 Rosetta (DE3) 菌株作为阴性对照,观察蛋白表达情况。

上步超声破碎收集的上清经 0.45  $\mu$ m 滤器过滤后用镍离子亲和层析方式纯化表达的目的蛋白,纯化过程按照厂家提供的说明书进行。收集到的目的蛋白通过 HisTrap Desalting 柱进行脱盐,脱盐后再用超滤离心管超滤浓缩,得到的样品进行 SDS-PAGE 电泳,并以凝胶成像分析仪拍照分析蛋白纯度,同时用 BCA 蛋白定量试剂盒进行定量。

#### 1.4 重组蛋白多克隆抗体的制备与检测

动物免疫:选取雌性5到7周BALB/c小鼠于背部皮下多点注射抗原进行免疫,3次免疫抗原剂量均为0.1 mg/只。首次免疫时将抗原加等量完全弗氏佐剂(CFA)充分混合乳化后皮下多点注射,每2周再以抗原加等量不完全弗氏佐剂(IFA)乳化后加强免疫2次。第1次免疫前采血并分离血清作为阴性对照,第1次加强免疫前眼眦静脉采血,用ELISA检测抗血清效价。3次免疫后10天眼眦静脉采血,检测抗血清效价,达到较理想的滴度后,于免疫程序结束后14天摘眼球取血,分离血清。

间接ELISA法检测抗体效价:抗体效价的检测采用间接ELISA法进行。用纯化的BsIA<sub>(260-652)</sub>蛋白以包被液稀释至10 μg/mL,包被于酶标板中,每孔100 μL,4℃过夜。第2天加入不同稀释度待检抗血清,以100倍稀释的免疫前小鼠血清为阴性对照进行ELISA分析,二抗为1:5000稀释的HRP标记山羊抗小鼠IgG,并用可溶型单组分TMB试剂盒进行显色,显色结果用酶标仪在波长450 nm处进行测定,P/N≥2.1时的最高稀释度定为血清的ELISA效价。

抗体特异性鉴定:炭疽芽胞杆菌A16R接种于含0.8%碳酸氢钠的脑心浸液培养甘油基(BHIG),37℃过夜培养,收集菌体进行超声破碎后进行SDS-PAGE电泳分析和免疫印迹分析。以1:10000稀释的BsIA<sub>(260-652)</sub>重组蛋白免疫鼠抗血清为一抗,以1:5000稀释的HRP标记的山羊抗小鼠IgG为二抗,进行Western blot分析,以检测多克隆抗体的特异性。同时以不表达BsIA蛋白的减毒炭疽芽胞杆菌AP422作为阴性对照,以抗炭疽芽胞杆菌核糖体蛋白L6的多克隆抗体检测内参L6的表达。

#### 1.5 蛋白黏附功能鉴定

以Hela细胞为模型鉴定重组蛋白的黏附功能<sup>[16]</sup>。Hela细胞用含有10%胎牛血清的RPMI-1640培养基培养至90%融合,收集细胞并用培养液调细胞至适当浓度,加入提前放置盖玻片(爬片专用)的24孔板中培养,待细胞长至60%~80%时,吸去培养液备用。纯化的BsIA<sub>(260-652)</sub>蛋白用不含血清的RPMI-1640培养基稀释至终浓度为100 μg/mL,按1 mL/孔的量加入24孔板中,同时以未加BsIA<sub>(260-652)</sub>蛋白,仅加培养基的孔作为阴性对照。加样结束后将24孔板放在冰上孵育60 min。

然后弃去孔中液体,细胞用PBS至少洗3次。细胞用含有4%多聚甲醛(PFA)的PBS固定15 min,PBS洗3次。然后使用1%的BSA晃动并室温孵育30 min进行封闭。一抗使用抗BsIA<sub>(260-652)</sub>抗血清,1:200稀释,室温孵育60 min,使用PBS洗3次,每次5 min。加入FITC标记的山羊抗小鼠IgG,室温孵育30 min,使用PBS洗3次,每次5 min。然后使用Hoechst33258对细胞核染色10 min,使用PBS洗2次。将24孔板中的盖玻片取出,然后将样品面朝下,在载玻片上滴加适当的抗萃灭封片剂,然后缓慢地将盖玻片盖于载玻片上,待抗萃灭封片剂干燥后在共聚焦显微镜下(LSM 510 Meta ZEISS)观察。

#### 1.6 细菌黏附抑制实验

从液氮罐中取出冻存的Hela细胞,将其复苏后,接种于24孔板,用含双抗和10%胎牛血清的RPMI1640培养基中传代培养至80%融合,吸干净培养液备用。另取炭疽芽胞杆菌A16R的单菌落接入含10%马血清、0.8%碳酸氢钠的BHI培养基,37℃振荡培养至对数晚期,4℃离心收集菌体,并用生理盐水洗一次备用。黏附实验具体操作过程如下:

蛋白功能鉴定:纯化的BsIA<sub>(260-652)</sub>蛋白用含10%胎牛血清的无抗RPMI1640培养基稀释至终浓度为100 μg/mL,取1 mL加入到细胞培养孔中,同时以直接加1 mL上述培养基的孔作为阴性对照,然后置于4℃孵育2 h。吸去培养液,按50:1的细菌细胞比例加入用同样的培养基重悬的炭疽芽胞杆菌A16R,并调整体积到1 mL,室温下600 × g离心5 min,最后置于37℃、饱和湿度和5% CO<sub>2</sub>的培养箱中孵育4 h。每组样本做2个复孔,用于细菌计数。

抗体功能鉴定:炭疽芽胞杆菌A16R分别用含抗BsIA小鼠血清和正常小鼠血清(1:100稀释)的RPMI1640(含量10%胎牛血清)培养基重悬至3 × 10<sup>9</sup> CFU/mL,混匀,4℃孵育1小时,然后按50:1的细菌细胞比例加入到培养板中,调整体积到1 mL。室温下600 × g离心5 min,最后置于37℃、饱和湿度和5% CO<sub>2</sub>的培养箱中孵育4 h。每组样本做2个复孔,用于细菌计数。

以上样品孵育过程结束后,用生理盐水洗涤5次,然后用细菌计数方法检测黏附到细胞表面的炭疽芽胞杆菌。具体如下:每个细胞培养孔中加入

500  $\mu$ L 浓度为 1% 的 Triton X-100 (经过滤除菌) 裂解细胞,充分混匀后取 100  $\mu$ L 裂解液,用 LB 培养基进行系列稀释后,分别取 100  $\mu$ L 的  $10^1$ 、 $10^2$ 、 $10^3$ 、和  $10^4$  倍稀释的样品,涂布平板于 LB 平板,每个稀释度涂 3 块平板。平板于 37 $^{\circ}$ C 过夜培养后约 15 h 后进行细菌计数,统计每个平板上的 A16R 的菌数,最后利用 GraphPad Prism 5.0 软件作图并分析各组样本中细菌黏附情况。

## 2 结果

### 2.1 重组 BslA<sub>(260-652)</sub> 蛋白的表达

以炭疽芽胞杆菌 A16R 基因组为模板,进行 PCR 反应,得到约 1100 bp 的扩增产物。扩增产物转接到 pET28a(+) 得到重组 pET28a-BslA<sub>(260-652)</sub>,经测序鉴定正确的质粒转入表达宿主菌 *E. coli* Rosetta (DE3) 得到目标重组菌。含表达质粒的重组菌在 28 $^{\circ}$ C 条件下使用终浓度为 1 mmol/L IPTG 诱导 8 h 后收获菌体并用 PBS 重悬,菌体超声裂解产物离心无沉淀产生,可见无包涵体产生;同时,超声裂解物及其离心上清的 SDS-PAGE 电泳分析初步显示,与对照菌株相比,重组菌在相对分子质量 ( $M_r$ ) 约 50 kDa 处有明显的特异蛋白表达条带,与预期的 BslA<sub>(260-652)</sub> 蛋白大小相符,并且主要以可溶的形式存在(图 1)。

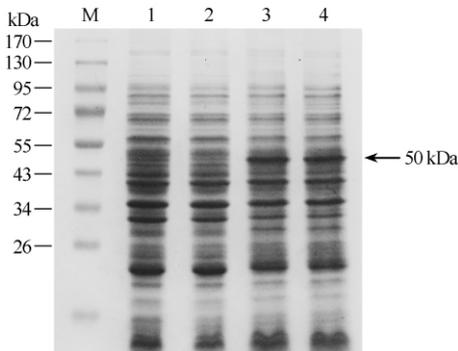


图 1 BslA<sub>(260-652)</sub> 重组蛋白表达分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of recombinant BslA<sub>(260-652)</sub> protein. M: Protein marker; 1: *Rosetta* (DE3); 2: pET28a(+)/*Rosetta* (DE3); 3: pET28a-BslA<sub>(260-652)</sub>/*Rosetta* (DE3), whole cell; 4: pET28a-BslA<sub>(260-652)</sub>/*Rosetta* (DE3), cytoplasm supernatant.

### 2.2 BslA<sub>(260-652)</sub> 重组蛋白的纯化

利用 ProBond<sup>TM</sup> Purification system 进行纯化,每

次上样量为 10 mL,以 20 mmol/L 咪唑和 250 mmol/L 咪唑进行阶段洗脱来分离杂蛋白和目的蛋白,收集目的蛋白洗脱峰,合并,脱盐,脱盐后的目的蛋白经 Milipore 超滤离心管浓缩后,进行 SDS-PAGE 电泳(图 2),以凝胶成像分析仪拍照分析蛋白纯度,凝胶成像分析显示蛋白纯度为到 87.4%,用 BCA 蛋白定量试剂盒进行定量,浓度为 1.35 mg/mL。

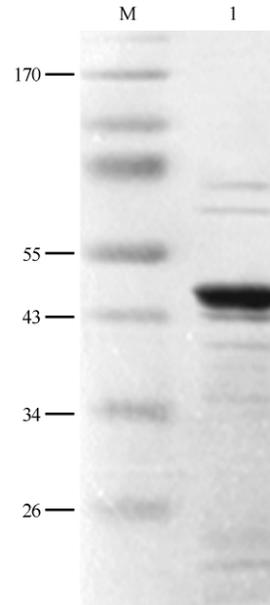


图 2 BslA<sub>(260-652)</sub> 重组蛋白纯化

Fig. 2 Purification of recombination protein BslA<sub>(260-652)</sub>. M: Protein marker; 1: purified BslA<sub>(260-652)</sub>.

### 2.3 动物免疫和抗血清制备

2.3.1 抗体效价测定:5 只 BALB/c 小鼠经过 1 次基础免疫和 2 次加强免疫,最后一次免疫后 14 天摘眼球取血,离心获得血清。第 1 次加强免疫前眼球采血,用 ELISA 检测抗血清效价可达 1:3200 以上,说明抗原能够很好地刺激机体产生免疫反应。第 3 次免疫后,小鼠的血清效价均达到 1:20000。

2.3.2 血清的 Western blot 分析:分别对 A16R、AP422 菌体进行超声,离心取上清进行 SDS-PAGE、转膜、封闭,以 BslA<sub>(260-652)</sub> 重组蛋白免疫鼠抗血清为一抗,以 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 为二抗,进行 Western blot 分析,以检测多克隆抗体的免疫结合特性。结果在分子量接近 70 kDa 处有特异的反应条带,这与成熟的 BslA 蛋白大小基本一致。另外该抗血清在 1:10000 稀释的条件下,免疫印迹几乎没有

杂带。以上结果表明制备的抗体可以识别内源性的 BslA 蛋白(图 3), 且具有较好的特异性。

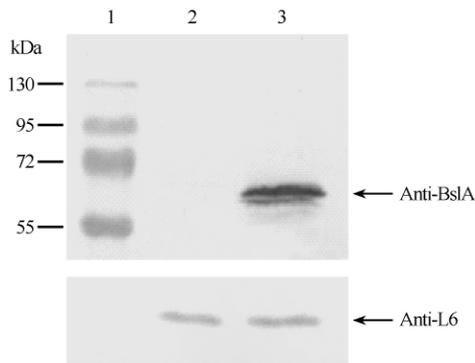


图 3 Western blot 检测内源性 BslA 蛋白

Fig. 3 Identification of endogenous BslA by Western blot. 1: prestained protein marker; 2: AP422; 3: A16R.

## 2.4 重组 BslA<sub>(260-652)</sub> 黏附功能分析

将重组 BslA<sub>(260-652)</sub> 蛋白与 Hela 共同孵育, 使用制备的 BslA 多抗进行间接免疫荧光分析。结果显示, 与只加细胞培养液的对照组相比, BslA<sub>(260-652)</sub> 蛋白能够和 Hela 细胞的细胞膜结合(图 4-B), 表明其具有类似天然蛋白的黏附素活性。

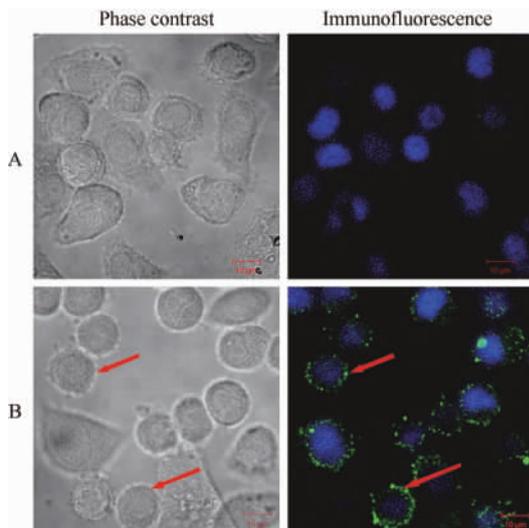


图 4 免疫荧光分析 BslA<sub>(260-652)</sub> 蛋白直接结合到 Hela 细胞膜

Fig. 4 Immunofluorescence analysis of BslA<sub>(260-652)</sub> binding to Hela cell membrane (The scale bar represents 10 (μm)). A: Incubation with RPMI-1640; B: Incubation with BslA<sub>(260-652)</sub>.

## 2.6 BslA<sub>(260-652)</sub> 蛋白及其多抗血清对炭疽芽胞杆菌 A16R 的黏附功能影响

将抗 BslA<sub>(260-652)</sub> 多抗血清与炭疽芽胞杆菌

A16R 共同孵育后, 再用其侵染 Hela 细胞。细菌计数的结果见表 1 和图 5。实验结果表明, 与不加抗血清的对照组相比, 抗 BslA<sub>(260-652)</sub> 多抗血清能显著抑制 A16R 菌对 Hela 细胞的黏附。同样, 用 BslA<sub>(260-652)</sub> 蛋白预处理 Hela 细胞, 也能够明显抑制 A16R 对 Hela 细胞的黏附作用。处理组与对照组之间具有非常显著的差异(图 5)。经计算, 在本研究所用的条件下, 重组蛋白能够抑制约 98.6% 的细菌黏附, 同样抗血清也能够抑制约 98.7% 的细菌黏附。

表 1 黏附实验细菌计数结果

Item	Adhesion bacteria (CFU/well)	
	Protein Group	Serum Group
Control	$8.42 \times 10^5$	$1.13 \times 10^6$
Treatment	$1.58 \times 10^4$	$1.11 \times 10^4$

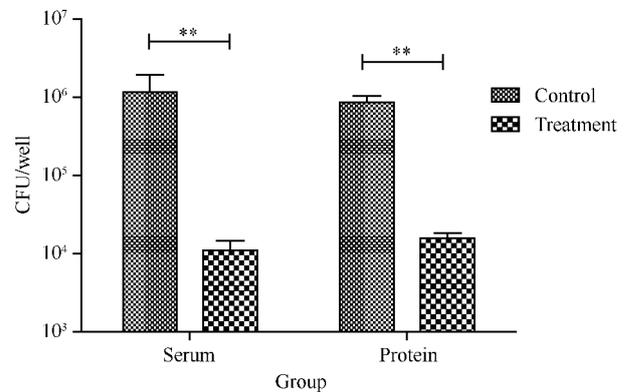


图 5 细菌计数法分析 BslA<sub>(260-652)</sub> 在炭疽芽胞杆菌黏附 Hela 细胞中的作用

Fig. 5 Analysis of the function of BslA<sub>(260-652)</sub> in A16R's Hela adherence by enumeration of colony-forming units on agar medium. Serum group: pretreatment A16R with anti-BslA<sub>(260-652)</sub> serum or not. Protein group: pretreatment Hela cells with BslA<sub>(260-652)</sub> or not. \*\*  $P < 0.01$ .

## 3 讨论

病原微生物在其致病过程中, 第一步往往都需要与宿主细胞相结合, 比如霍乱、白喉、致病性大肠杆菌等<sup>[17]</sup>。对于革兰氏阳性菌而言, 这种与宿主细胞表面相结合的配基都一般形成于菌体外膜, 通过它与宿主细胞的相互作用<sup>[18-19]</sup>。BslA 是炭疽芽胞杆菌 S 层的组成部分, 既是一种 S 层蛋白, 又是一种

黏附素。这种蛋白是炭疽芽胞杆菌体外黏附 BJ1、Caco-2 和 A549、Hela 等上皮细胞以及体内与宿主脾和肾等器官黏附的充分必要条件<sup>[11]</sup>,但具体的作用机制仍不明确,亟待进一步研究。另外, *bslA* 缺失突变株对豚鼠模型的 LD<sub>50</sub> 比野生株高出 2 个数量级,毒力明显降低<sup>[13]</sup>。以上种种现象都证明该蛋白是一种重要的毒力相关的蛋白,对于炭疽芽胞杆菌致病机制和疫苗研究有着十分重要的意义。

BslA 在炭疽芽胞杆菌中的表达量不高,进行 BslA 的功能研究有赖于基因工程技术进行重组表达。但在实验过程中发现,由于 BslA 蛋白 N 末端存在 3 个 SLH 基序,致使该蛋白很难得到可溶性表达,不利于下一步工作的开展,而缺失 N 端的 3 个 SLH 基序对该蛋白除形成 S 层外的功能作用没有太大影响。因此,本研究设计表达了该蛋白的缺失突变体,即功能区片段 BslA<sub>(260-652)</sub>,并成功地在大肠杆菌中实现了可溶性表达,经初步优化后,1L 培养物可获得约 13.5 mg 的 BslA<sub>(260-652)</sub> 蛋白。使用间接免疫荧光技术,证实重组 BslA<sub>(260-652)</sub> 能够和 Hela 细胞膜结合,具有与天然蛋白相同的生物学功能。同时,制备的多抗血清具有较好的特异性,这些为深入研究 BslA 与靶细胞相互作用提供了重要的实验基础。

另外,抗 BslA<sub>(260-652)</sub> 的多克隆抗体能够明显抑制炭疽芽胞杆菌 A16R 对 Hela 细胞的黏附作用,这也进一步提示我们该抗体能够起到一定的免疫保护作用。因为如果体内存在相应的抗体,就会加速机体清除体内炭疽芽胞杆菌的过程,缩短炭疽病的治疗过程,提高治疗效果。

总之,BslA 是一种重要的保护性抗原,可能在新一代炭疽疫苗的研究和开发中扮演重要的角色。因此,本研究为进一步研究炭疽芽胞杆菌的致病机制与免疫预防打下了良好的基础。

## 参考文献

- [1] Mourez M. Anthrax toxins. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 2004, 152 (1): 135-164.
- [2] Ascenzi P, Visca P, Ippolito G, Spallarossa A, Bolognesi M, Montecucco C. Anthrax toxin: a tripartite lethal combination. *FEBS Letters*, 2002, 531 (3): 384-388.
- [3] Brown BK, Cox J, Gillis A, VanCott TC, Marovich M, Milazzo M, Antonille TS, Wieczorek L, McKee KT Jr, Metcalfe K, Mallory RM, Birs D, Polonis VR, Robb ML. Phase I study of safety and immunogenicity of an Escherichia coli-derived recombinant protective antigen (rPA) vaccine to prevent anthrax in adults. *PLoS One*, 2010, 5(11): e13849.
- [4] Cote CK, Rossi CA, Kang AS, Morrow PR, Lee JS, Welkos SL. The detection of protective antigen (PA) associated with spores of *Bacillus anthracis* and the effects of anti-PA antibodies on spore germination and macrophage interactions. *Microbial Pathogenesis*, 2005, 38(5-6): 209-225.
- [5] Welkos S, Friedlander A, Weeks S, et al. In-vitro characterization of the phagocytosis and fate of anthrax spores in macrophages and the effects of anti-PA antibody. *Journal of Medicine Microbiology*, 2002, 1(10): 821-831.
- [6] Chitlaru T, Altboum Z, Reuveny S, Shafferman A. Progress and novel strategies in vaccine development and treatment of anthrax. *Immunological Reviews*, 2011, 239(1): 221-236.
- [7] Bouzianan DG. Current and Future Medical Approaches To Combat the Anthrax Threat. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2010, 53(11): 4305-4331.
- [8] Cote CK, Bozue J, Moody KL, DiMezzo TL, Chapman CE, Welkos SL. Analysis of a novel spore antigen in *Bacillus anthracis* that contributes to spore opsonization. *Microbiology-SGM*, 2008, 154(Pt2): 619-632.
- [9] Sinha K, Bhatnagar R. GroEL provides protection against *Bacillus anthracis* infection in BALB/c mice. *Molecular Immunology*, 2010, 48(1-3): 264-71.
- [10] Ariel N, Zvi A, Grosfeld H, Gat O, Inbar Y, Velan B, Cohen S, Shafferman A. Search for Potential Vaccine Candidate Open Reading Frames in the *Bacillus anthracis* Virulence Plasmid pXO1: In Silico and In Vitro Screening. *Infection and Immunity*, 2002, 70(12): 6817-6827.
- [11] Kern JW, Schneewind O. BslA, a pXO1-encoded adhesin of *Bacillus anthracis*. *Molecular Microbiology*, 2008, 68(2): 504-515.
- [12] Ebrahimi CM, Kern JW, Sheen TR, Ebrahimi-Fardooee MA, van Sorge NM, Schneewind O, Doran KS. Penetration of the blood-brain barrier by *Bacillus anthracis* requires the pXO1-encoded BslA protein. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191(23): 7165-7173.

- [13] Kern JW , Schneewind O. BslA , the S-layer adhesin of *B. anthracis* , is a virulence factor for anthrax pathogenesis. *Molecular Microbiology* , 2009 , 75 ( 2 ) : 324-332.
- [14] Bourgoigne A , Drysdale M , Hilsenbeck SG , Peterson SN , Koehler TM. Global effects of virulence gene regulators in a *Bacillus anthracis* strain with both virulence plasmids. *Infection and Immunity* , 2003 , 71 ( 5 ) : 2736-2743.
- [15] Sambrook J , Fritsch EF , Maniatis T. Molecular cloning A Laboratory Manual. 2<sup>nd</sup> ed , US: Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1992.
- [16] Kirchner M and Meyer TF. Department of Molecular Biology , Max Planck InstituteThe PilC adhesin of the *Neisseria* type IV pilus-binding specificities and new insights into the nature of the host cell receptor. *Molecular Microbiology* , 2005 , 56 ( 4 ) : 945-957.
- [17] Kline KA , Falker S , Dahlberg S , Normark S , Henriques-Normark B. Bacterial Adhesins in Host-Microbe Interactions. *Cell Host & Microbe* , 2009 , 5 ( 6 ) : 580-592.
- [18] Siboo IR , Chambers HF , and Sullam PM. Role of SraP , a serine-rich surface protein of *Staphylococcus aureus* , in binding to human platelets. *Infection and Immunity* , 2005 , 73 ( 4 ) : 2273-2280.
- [19] Jensch I , Gámez G , Rothe M , Ebert S , Fulde M , Somplatzki D , Bergmann S , Petruschka L , Rohde M , Nau R , Hammerschmidt S. PavB is a surface-exposed adhesin of *Streptococcus pneumoniae* contributing to nasopharyngeal colonization and airways infections. *Molecular Microbiology* , 2010 , 77 ( 1 ) : 22-43.

## Recombinant expression , purification and adhesion function identify of *Bacillus anthracis* BslA<sub>(260-652)</sub> protein

Kun Ma<sup>1,2</sup> , Yanchun Wang<sup>2</sup> , Haoxia Tao<sup>2</sup> , Jie Dong<sup>2</sup> , Chen Cao<sup>2</sup> , Buchang Zhang<sup>1\*</sup> , Chunjie Liu<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> School of Life Sciences , Anhui University , Hefei 230039 , China

<sup>2</sup> State Key Laboratory of Pathogens and Biosecurity , Beijing Institute of Biotechnology , Beijing 100071 , China

**Abstract:** [Objective] To obtain the recombinant BslA<sub>(260-652)</sub> protein of *Bacillus anthracis* and prepare its antibody for the adhesion activity studies. [Methods] The fragment coding BslA<sub>(260-652)</sub> was cloned into pET28a(+) plasmid and induced to express recombinant protein in *E. coli* Rosetta (DE3) by Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). The expressed recombinant soluble protein was purified by a column packed with Ni Resin. Purified protein was used as the antigen to immunize BABL/c mice for three times to raise polyclonal antibody. The adhesion activity of BslA<sub>(260-652)</sub> was detected by immunofluorescence experiments and bacterial adherence assays. [Results] The purity of the purified soluble BslA<sub>(260-652)</sub> was about 87.4%. ELISA assay titer of antiserum from vaccinated mice reached 1:20000. Western blot showed the antiserum could specifically recognize endogenous BslA protein. The purified BslA<sub>(260-652)</sub> displayed a typical adhesion-like function. Either the anti-BslA serum or the BslA<sub>(260-652)</sub> protein could inhibit A16R's Hela adherence. [Conclusion] The recombinant BslA<sub>(260-652)</sub> protein was successfully obtained , which would lay the foundation for further research of the anthrax vaccine and the role of this S-layer protein in the pathogenesis of anthrax.

**Keywords:** *Bacillus anthracis* , BslA protein , polyclonal antibody , immunofluorescence , adhesion

( 本文责编: 张晓丽 )

Supported by the Grants from the National Science and Technology Infrastructure Program of China (2008BAI66B03) and by the National S&T Major Project of China (2008ZX10004-015)

\* Corresponding author. Tel: +86-40-66948837; E-mail: liucj@nic.bmi.ac.cn; zhbc@ahu.edu.cn

Received: 14 December 2011/Revised: 5 January 2012