

猪丹毒丝菌 C43311 株 *spaA* 基因 N 端免疫保护区的克隆和表达

吾鲁木汗·那孜尔别克, 刘祝祥, 李科, 陈义光, 恩特马克·布拉提白*

(吉首大学生物资源与环境科学学院, 省部共建生物工程实验室, 吉首 4160001)

摘要: 采用 PCR 从猪丹毒丝菌 C43311 株基因组中扩增出编码表面保护性抗原 A 的 *spaA* 基因片段, 将其克隆到 pMD18-T 载体并对插入片段进行测序。用 *spaA* 基因 N 端免疫保护区(*spaA*-N)的特异引物从重组质粒 pMD18-*spaA* 中扩增得到 *spaA*-N 片段, 将其定向插入原核表达载体 pGEX-6p-2 中, 构建重组表达质粒 pGEX-*spaA*-N, 转化大肠杆菌 BL21(DE3), 在 IPTG 诱导下表达融合蛋白 GST-SpaA-N, 用 SDS-PAGE 和 Western 印迹检测表达产物。测序结果表明 *spaA* 基因片段大小为 1881bp, 与已报道的不同血清型菌株 *spaA* 基因的核苷酸序列比较, 核苷酸序列同源性在 93% ~ 99% 之间。SDS-PAGE 结果显示表达蛋白约为 64kDa, 与预期的大小相近。Western 印迹检测结果表明, 表达的融合蛋白 GST-SpaA-N 能与 C43311 株 SpaA 蛋白的抗血清发生特异性反应, 证明原核融合表达蛋白具有免疫反应性。

关键词: 猪丹毒丝菌; *spaA* 基因; 融合蛋白; 免疫反应性; 原核表达

中图分类号: S852 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2008) 02-0207-06

猪丹毒是由猪丹毒丝菌 (*Erysipelothrix rhusiopathiae*) 引起的一种人畜共患传染病, 广泛分布于五大洲的各个国家, 是猪传染病中重要而古老的病种之一, 我国也是猪丹毒流行较广泛的国家^[1]。猪丹毒是一种自然疫源性疾, 病猪和带菌猪的分泌物、排泄物和死猪的皮、肉、血、毛、内脏及污染的饲料、饮水、土壤等是主要传染源。多经消化道传给健康猪, 也可由皮肤创伤传入。潜伏期 3 ~ 5 天, 死亡率可达 80% ~ 90%。主要侵害架子猪, 给养猪业造成巨大经济损失, 也给人们的食品卫生带来了威胁^[2]。控制猪丹毒疫病的发生和流行主要是通过接种疫苗, 目前使用的猪丹毒疫苗主要是灭活疫苗和弱毒疫苗, 这对预防猪丹毒的发生起到了一定的作用。但灭活疫苗和弱毒疫苗仍然存在很大的局限性, 至今世界各国尚未彻底消灭本病, 仍有暴发的报道^[3]。

在国外, 对猪丹毒丝菌免疫保护性抗原进行了分子生物学和免疫学的研究, 并已经取得了很大进

展。Galan和Timoney以猪丹毒丝菌感染后的康复期血清为抗体探针从猪丹毒丝菌E1-6P株基因组文库中筛选出具有免疫保护功能的 λ gt11/ersA和 λ gt11/ersB两个克隆, 且 λ gt11/ersA和 λ gt11/ersB的特异性抗体分别能与猪丹毒丝菌 43kDa, 64kDa和 66kDa的表面蛋白发生反应, 结果表明了 43kDa, 64kDa和 66kDa蛋白可能具有免疫保护功能^[4]。Makino等克隆了编码 64kDa表面保护性抗原A的*spaA*基因, 发现SpaA蛋白是 11种主要血清型猪丹毒丝菌的共有抗原, 其C端的重复序列是决定SpaA蛋白对革兰氏阳性菌表面的结合^[5]。Imada等克隆和表达了编码SpaA蛋白N端 342 个氨基酸的基因片段, 并检测其免疫功能, 结果表明该片段能够防止猪丹毒丝菌对猪的感染^[6]。Shimoji 等的研究再次证明SpaA蛋白的N端 2/3 区域通过刺激小鼠免疫系统产生抗体, 小鼠可产生较强的免疫保护力, 能抵御猪丹毒丝菌的侵袭^[7]。从上述研究结果可以看出, SpaA 蛋

基金项目: 吉首大学引进人才科研启动基金项目(2006031)

*通讯作者。Tel: +86-743-8565217; Fax: +86-743-8565323; E-mail: etmkb@jsu.edu.cn

作者简介: 吾鲁木汗·那孜尔别克(1961-), 女, 新疆塔城托里县人, 博士, 副教授, 主要从事动物代谢病研究。E-mail: ulum@jsu.edu.cn

收稿日期: 2007-07-10; 修回日期: 2007-10-08

白具有良好的免疫保护功能,是研制猪丹毒亚单位疫苗的良好抗原。相比之下,我国在此方面的研究仍然停留在宏观病症和传统疫苗上。还尚未见到对猪丹毒丝菌免疫保护性抗原进行系统研究的报道。

本研究运用 PCR 法和大肠杆菌原核表达系统从猪丹毒丝菌 C43311 株基因组 DNA 中克隆和表达了 *spaA* 基因 N 端免疫保护片段,为 SpaA 蛋白免疫保护功能的进一步研究奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:猪丹毒丝菌 C43311 株购自国家兽医微生物菌种保藏中心;感受态大肠杆菌 DH5 α 和 BL21(DE3)、质粒 pGEX-6p-2 由本实验室保存;克隆载体 pMD18-T 为 TaKaRa 生物工程(大连)有限公司产品。

1.1.2 主要试剂和培养基: *Taq* DNA 聚合酶、限制性内切酶、DNA 连接试剂盒、PCR 纯化试剂盒、DNA 回收纯化试剂盒、质粒 DNA 纯化试剂盒、DNA Marker DL2,000、 λ -*Hind* digest DNA Marker、低分子量蛋白质标准均为 TaKaRa 生物工程(大连)有限公司产品; X-Gal 为北京鼎国公司产品; IPTG 为 Promega 公司产品;辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠 IgG 和二氨基联苯胺(DAB)购自 Sigma 公司; Brain Heart Infusion(BHI)培养基购自 Bacto 公司。其它试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 猪丹毒丝菌 C43311 株 SpaA 蛋白的纯化及其抗血清制备

将猪丹毒丝菌 C43311 株接种于含有 0.1% Tween-80 的 BHI(BHI-T)固体培养基中,37 $^{\circ}$ C 培养 24h;挑取单菌落接种于 BHI-T 液体培养基,37 $^{\circ}$ C 培养 18h,利用 Kitajima(1998)等报道的 NaOH 抽提法^[8]制备猪丹毒丝菌 C43311 株表面蛋白标本。目的蛋白采用电洗脱方法^[9]进行纯化,具体如下:用 SDS-PAGE 凝胶与 0.3 mol/L CuCl₃ 溶液染色,从 SDS-PAGE 凝胶上切下目的条带后蒸馏水洗涤 3 次。用电洗脱仪(ATTO)从凝胶条带中纯化 SpaA 蛋白,蔗糖进行浓缩,并用 Bradford 法^[10]测定蛋白含量。

选雌性 5 周龄昆明小白鼠制备抗血清。用纯化的 SpaA 蛋白对小鼠进行 3 次皮下注射,用量分别为 40 μ g、30 μ g 和 20 μ g,免疫周期为 0、14、28d。初次免疫将免疫抗原与弗氏完全佐剂等量混合,第 2 次和第 3 次免疫分别将免疫抗原与弗氏不完全佐剂等量混合,对照组注射生理盐水。第 3 次免疫 1 周后用毛细

吸管眼静脉采血法取血,4 $^{\circ}$ C 过夜,5000r/min 离心 10min 分离血清。以 C43311 株表面蛋白为包被抗原,用 ELISA 法检测血清抗体水平。用 Western 印迹^[11]鉴定 SpaA 抗血清的特异性,即 C43311 株表面蛋白和纯化的 SpaA 蛋白经 SDS-PAGE 分离后,通过半干式电转仪将蛋白条带转移到 NC 膜上,将 NC 膜短暂漂洗后依次经 5%脱脂奶粉 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜,与抗 SpaA 蛋白鼠血清(1:250)孵育 1h、与辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠 IgG(1:1000)孵育 1h,每步完成后均严格洗膜,最后加 DAB 显色液避光显色。

1.3 猪丹毒丝菌 C43311 株基因组 DNA 的制备

将猪丹毒丝菌 C43311 株接种于 BHI-T 固体培养基中,37 $^{\circ}$ C 培养 24h,挑取单菌落接种于 BHI-T 液体培养基,37 $^{\circ}$ C 培养 18h。采用 CTAB 法^[12]制备 C43311 株的基因组 DNA。

1.4 SpaA 编码基因的 PCR 扩增和重组克隆载体的构建

根据在 GenBank 中猪丹毒丝菌 *spaA* 的全基因序列(GenBank 登录号: AB259654)设计引物 P1(5'-GTCGGATCCATGAAAAAGAAAAACACCTA-3')和 P2(5'-GCAAAGCTTCTATTTTAAACTTCCATCGTT-3'),分别插入 *Bam*HI 和 *Hind* III 酶切位点。引物由上海生工公司合成。PCR 反应采用 50 μ L 体系,反应条件为:94 $^{\circ}$ C 5min;94 $^{\circ}$ C 30s,55 $^{\circ}$ C 1min,72 $^{\circ}$ C 1.5min;35 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳进行检测。用 DNA 纯化试剂盒纯化 PCR 产物,PCR 纯化产物与 pDM18-T 载体连接,转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,经含氨苄青霉素的 LB 固体培养基初步筛选白色阳性克隆,进一步用菌落 PCR 和 *Bam*HI/*Hind* III 双酶切鉴定重组子,将鉴定正确的 pMD18-*spaA* 重组质粒在上海生工公司进行测序。

1.5 spaA 基因 N 端免疫保护区的 PCR 扩增和重组表达载体构建

根据 C43311 株 *spaA* 基因 N 端免疫保护片段的核苷酸序列设计引物 P3(5'-GATGGATCCGGGTACC-AAAGTTTCGAAGC-3')和 P4(5'-GCGGTGACGATCTTTAGGTTTTCTTCATCAA-3'),分别插入 *Bam*HI 和 *Sall* 的酶切位点,引物由上海生工公司合成。PCR 反应体系与 1.4 相同。PCR 条件:94 $^{\circ}$ C 5min;94 $^{\circ}$ C 30s,55 $^{\circ}$ C 1min,72 $^{\circ}$ C 1min,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 10min,1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。用 *Bam*HI/*Sall* 双酶切 PCR 产物和载体 pGEX-6P-2 并分别进行切胶回收,用 DNA 连接试剂盒将回收得到的目的 DNA 片段和

pGEX-6P-2 连接, 构建重组表达质粒 pGEX-*spaA*-N, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 经含氨苄青霉素的 LB 固体培养基筛选阳性克隆。用菌落 PCR 和 *Bam*HI/*Sal*I 双酶切鉴定重组子, 通过核苷酸序列测定验证阅读框是否正确及有无突变。

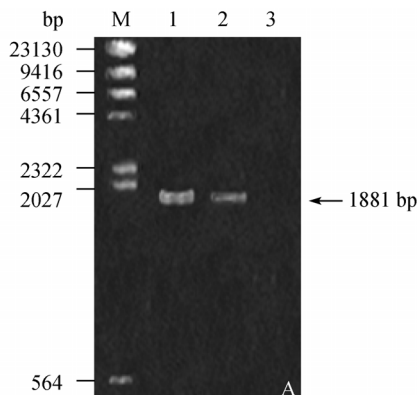
1.6 重组 SpaA-N 在大肠杆菌中的表达及检测

经核苷酸序列测定证明无误后, 将重组质粒 pGEX-*spaA*-N 转化大肠杆菌 BL21(DE3), 挑取单菌落接种于 5mL 的 LB 培养基(含 100 μ g/mL 的氨苄青霉素)中, 37 $^{\circ}$ C 摇床培养 6h。分别取 0.5mL 菌液, 接种到 2 份 20mL 新鲜的 LB 培养基(含 100 μ g/mL 的氨苄青霉素)中, 37 $^{\circ}$ C 摇床培养, 待菌液的 OD₆₀₀ 值到达 0.6 时, 在其中一份菌液加入 IPTG(终浓度为 0.2 mmol/L), 继续培养 4h。取 1mL 菌液, 8000r/min 离心收集菌体, 菌体用 PBS 缓冲液洗涤 2 次, 取 50 μ L 菌悬液后加等体积 1 \times SDS-PAGE 上样缓冲液 100 $^{\circ}$ C 煮沸 10min。采用 4% 浓缩胶和 12.5% 分离胶的 SDS-PAGE 检测表达蛋白。用抗 SpaA 蛋白鼠血清按 Western blot 检测表达蛋白的免疫反应性, 操作步骤与 1.2 相同。转印低分子量蛋白质标准的 NC 膜与考马斯亮蓝染色。

2 结果

2.1 SpaA 蛋白的纯化和免疫原性鉴定

SDS-PAGE 结果显示, 采用电洗脱方法从猪丹毒丝菌 C43311 株总表面蛋白中纯化得到分子量约为 64kDa 的 SpaA 蛋白(图 1-A)。Western 印迹结果表明, 抗 SpaA 蛋白鼠血清在 64kDa 处与猪丹毒丝菌表面蛋白有清晰的反应条带, 这证明 SpaA 蛋白具有良好的免疫反应性(图 1-B)。



2.2 猪丹毒丝菌 *spaA* 基因的克隆与鉴定

2.2.1 PCR 扩增 *spaA* 基因: 应用所设计的引物进行 PCR 扩增, 从猪丹毒丝菌 C43311 株基因组 DNA 中扩增出 1.8 kb 的 DNA 片段, 与预期长度一致(图略)。

2.2.2 重组载体构建和鉴定: 将 PCR 回收产物与 pDM18-T 载体连接, 转化大肠杆菌 DH5 α , 经铺板过夜培养后挑取白色菌落, 用菌落 PCR 初步筛选重组子(图 2-A)后, 提取重组质粒 pMD18-*spaA*, 经 *Bam*HI/*Hind* III 双酶切鉴定, 出现大小为 2692bp 和 1881bp 的条带(图 2-B), 证明目的基因与载体正确连接, 为阳性重组质粒。

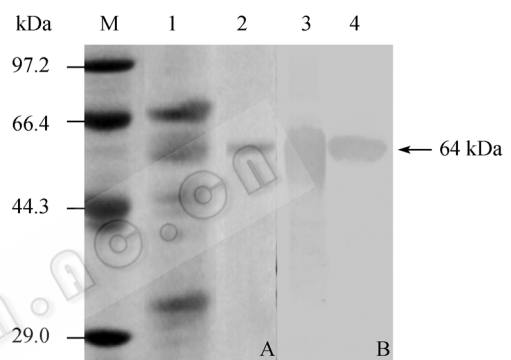


图 1 猪丹毒丝菌总表面蛋白和纯化 SpaA 蛋白的 SDS-PAGE 及 Western blot 鉴定

Fig.1 SDS-PAGE and Western blot analysis of NaOH-extracted surface proteins and purified SpaA protein of *E. rhusiopathiae* C43311 strain. M. Low molecular weight marker; 1 and 3. NaOH-extracted surface proteins; 2 and 4. Purified SpaA protein; A: The gel was stained for protein with Coomassie brilliant blue R-250; B: NaOH-extracted surface proteins and purified SpaA protein reacting with an antiserum against SpaA protein of *E. rhusiopathiae* C43311 strain, respectively. Arrow indicates the position of immunoreactive SpaA protein.

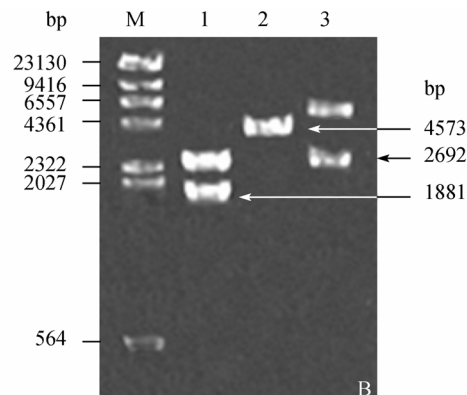


图 2 重组质粒 pMD18-*spaA* 的 PCR(A)及酶切(B)鉴定

Fig.2 Identification of pMD18-*spaA* by PCR (A) and restriction endonuclease digestion (B). A: M. λ -*Hind* III digest DNA Marker; 1. PCR product of *spaA* gene from pMD18-*spaA*; 2. PCR product of *spaA* gene from genomic DNA of C43311 strain; 3. Negative control. B: M. λ -*Hind* III digest DNA Marker; 1. pMD18-*spaA* digested with *Bam*HI and *Hind* III; 2. pMD18-*spaA* without *Bam*HI and *Hind* III digestion; 3. pUC18 without *Bam*HI and *Hind* III digestion.

2.2.3 *spaA* 基因序列分析: 测序结果证实 *spaA* 基因大小为 1881bp, 与预期的结果相一致。同源性分析结果表明, 猪丹毒丝菌 C43311 株 *spaA* 基因的核苷酸序列和不同血清型猪丹毒丝菌 *spaA* 基因之间的同源性为 93%~99%, 这说明该基因有很高的保守性。将 C43311 株 *spaA* 基因的核苷酸序列登录在 GenBank 数据库, 登录号为 EF635597。

2.3 *spaA* 基因 N 端免疫保护区的 PCR 扩增和重组表达载体构建

2.3.1 *spaA* 基因 N 端免疫保护区的 PCR 扩增: 用特

异性引物以重组质粒 pMD18-*spaA* 为模板扩增出 *spaA*-N 片段, PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。出现一条约 1kb 的 DNA 片段, 与预期结果相符(图略)。

2.3.2 原核表达载体 pGEX-*spaA*-N 的构建和鉴定: 将 PCR 产物和 pGEX-6P-2 载体分别用 *Bam*HI/*Sal*I 双酶切, 纯化后用 DNA 连接试剂盒进行连接构建重组质粒 pGEX-*spaA*-N。以重组质粒 pGEX-*spaA*-N 为模板, 经 PCR 扩增, 扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶电泳中为一条 1029bp 的条带, 与预期值相符(图 3-A)。重组表达质粒 pGEX-*spaA*-N 经 *Bam*HI/*Sal*I 双酶切后获得

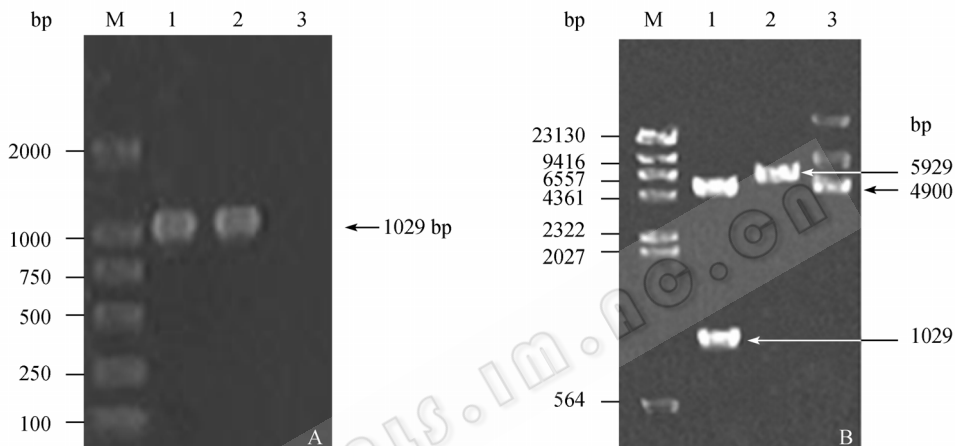


图 3 重组表达质粒 pGEX-*spaA*-N 的 PCR(A)和酶切(B)鉴定

Fig.3 Identification of pGEX-*spaA*-N by PCR (A) and restriction endonucleases digestion (B). A: M. DNA Marker DL2000; 1. PCR product of *spaA*-N from pGEX-*spaA*-N; 2. PCR product of *spaA*-N from genomic DNA; 3. Negative control. B: M. λ -*Hind* III digest DNA Maker; 1. pGEX-*spaA*-N digested with *Bam*HI and *Sal*I; 2. GEX-*spaA*-N without *Bam*HI and *Sal*I digestion; 3. pGEX-6p-2 without *Bam*HI and *Sal*I digestion.

一条 4900bp 的 pGEX-6P-2 线性片段和一条 1029bp 的插入片段(图 3-B), 以上结果证明成功构建得到含有 SpaA 的 N 端免疫保护区域的原核表达质粒 pGEX-*spaA*-N。

2.4 表达蛋白的 SDS-PAGE 检测

表达蛋白的 SDS-PAGE 检测结果表明, 与对照即空载体 pGEX-6P-2 转化的大肠杆菌相比, pGEX-*spaA*-N 转化的大肠杆菌在 64kDa 位置出现表达量较高的蛋白条带(图 4)。

2.5 表达蛋白的 Western blot 检测

表达蛋白的 Western blot 印迹检测结果显示, 抗天然 SpaA 蛋白抗体和 64kDa 的融合表达蛋白之间发生特异性的反应, 这证明融合表达蛋白 GST-SpaA-N 具有免疫反应性(图 5)。

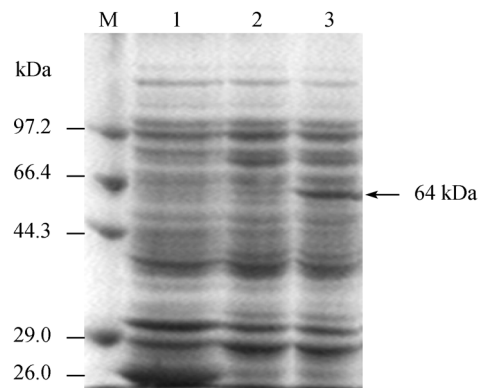


图 4 表达蛋白 GST-SpaA-N 的 SDS-PAGE 鉴定

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of expression protein of GST-SpaA-N in *E. coli* BL21. M. Low molecular weight marker; 1. Whole-cell lysate of *E. coli* BL21 harboring pGEX-6p-2 (IPTG induced for 4h); 2. Whole-cell lysate of *E. coli* BL21 harboring pGEX-*spaA*-N (IPTG uninduced); 3. Whole-cell lysate of *E. coli* BL21 harboring pGEX-*spaA*-N (IPTG induced for 4h). Arrow on the right indicate the position of the GST-SpaA-N, and arrow on the left indicate the position of the GST protein as control.

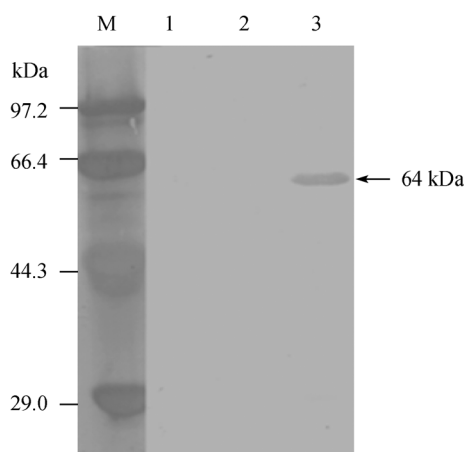


图 5 融合表达蛋白 GST-SpaA-N 免疫反应性的 Western blot 检测

Fig.5 Immunoreactivity of GST-SpaA-N by Western blot with antiserum against SpaA protein of C43311 strain. M. Low molecular weight marker; 1. Whole-cell lysate of *E. coli* BL21 harboring pGEX-6p-2 (IPTG induced for 4h); 2. Whole-cell lysate of *E. coli* BL21 harboring pGEX-*spaA*-N (IPTG uninduced); 3. Whole-cell lysate of *E. coli* BL21 harboring pGEX-*spaA*-N (IPTG induced for 4h). Arrow on the right indicate the position of immunoreactive GST-SpaA-N protein.

3 讨论

猪丹毒分布广泛, 世界各地均有发生, 给世界各国养猪业造成了巨大的经济损失^[13]。目前, 世界各地已有许多不同类型死菌或活菌疫苗, 这些疫苗的应用为防止猪丹毒的发生和流行起到了一定的作用, 但是这些疫苗的效果依赖于动物的敏感性^[14,15]。近几年来, 有报道肉制品中检测出猪丹毒丝菌, 如 Raafat 等人从健康牛扁桃体中分离得到猪丹毒丝菌, 并用分离菌株对小鼠和猪做攻毒试验, 结果显示分离菌株对小鼠和猪有较强的致病性, 这说明健康牛携带致病性的猪丹毒丝菌^[16]。因此, 开发研制新的高效、廉价的检测和治疗方法显得尤为重要。

Takahashi 等通过对丹毒丝菌进行血清学分析, 将丹毒丝菌属(*Erysipelothrix*)分为两个种: 猪丹毒丝菌(*E.rhusiopathiae*)种包括 1a, 1b, 2, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 15, 16, 17, 19, 21 和 N 等 16 个血清型; 扁桃体丹毒丝菌(*E.tonsillarum*)种包括 3, 7, 10, 14, 20, 22 和 23 等 7 个血清型^[17]。Makino 等分别用 SpaA 蛋白的单克隆抗体和 *spaA* 基因的特异性探针对 SpaA 蛋白在 16 个血清型猪丹毒丝菌中的分布进行研究, 结果表明, SpaA 蛋白只有在 1a, 1b, 2, 5, 8, 9, 12, 15, 16, 17 和 N

等 11 个血清型菌株中表达, 而在 4, 6, 11, 19 和 21 等 5 个血清型菌株中没有发现 SpaA 蛋白及其基因^[5]。以上研究结果说明, SpaA 蛋白是引起猪丹毒主要菌株的共有抗原, 并具有良好的免疫保护功能。

本研究运用 PCR 技术从猪丹毒丝菌 C43311 株基因组 DNA 中克隆了 *spaA* 基因, 基因序列分析发现 *spaA* 基因核苷酸序列与在 GenBank 上已登录的序列的同源性在 93%~99%之间, 说明该基因具有很高的保守性。利用 pGEX-6P-2 载体在 BL21 中成功表达了 *spaA* 基因 N 端免疫保护区域, SDS-PAGE 及 Western blot 结果表明, GST-SpaA-N 蛋白大小与国外报道相符, 而且具有免疫反应性, 因此, 本研究为猪丹毒新型亚单位疫苗的研制奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] 肖国生, 曹三杰, 文心田. Dot-PAA-ELISA 快速检测猪丹毒抗体方法的建立与应用. 中国预防兽医学报(*Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*), 2005, 27: 48-50.
- [2] 方永灵, 蒋家贵. 猪丹毒的检疫及处理. 肉品卫生(*Meat Hygiene*), 2005, 10: 30-46.
- [3] Eamens GJ, Forbes WA, Djordjevic SP, et al. Characterisation of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolates from pigs associated with vaccine breakdowns. *Journal of Veterinary Microbiology*, 2006, 115: 329-338.
- [4] Galan GE, Timoney JF. Cloning and expression in *Escherichia coli* of a protective antigen of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Infection and Immunity*, 1990, 58: 3116-3121.
- [5] Makino S, Yamamoto K, Murakami S, et al. Properties of repeat domain found in a novel protective antigen, SpaA, of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Microbial Pathogenesis*, 1998, 25: 101-109.
- [6] Imada Y, Goji N, Ishikawa H, et al. Truncated surface protective antigen (SpaA) of *Erysipelothrix rhusiopathiae* serotype 1a elicits protection against challenge with serotypes 1a and 2b in pigs. *Infection and Immunity*. 1999, 76: 4376-4382.
- [7] Shimoji Y, Mori Y, Fischetti VA. Immunological characterization of a protective antigen of *Erysipelothrix rhusiopathiae*: Identification of the region responsible for protective immunity. *Infection and Immunity*, 1999, 67: 1646-1651.
- [8] Kitajima T, Oishi E, Amimoto K, et al. Protective effect of NaOH-extracted *Erysipelothrix rhusiopathiae* vaccine in pigs. *J Vet Med Sci*, 1998, 60: 9-14.
- [9] Borrahybay E, Sawada T, Kataoka Y, et al. Capsule thickness and amount of a 39 kDa protein of avian *Pasteurella multocida* type A strains correlated with their pathogenicity for chickens. *Vet Microbiology*, 2003, 97: 215-227.

- [10] Bradford, MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72: 284–354.
- [11] 程从升, 蓝雨, 柳燕, 等. 人 H5N1 亚型禽流感病毒安徽株 NS1 基因的克隆及在原核系统中的表达. *微生物学报(Acta Microbiologica Sinica)*, 2007, 47: 418–422.
- [12] Ausubel F, Brent R, Kingstom RE, *et al.* 精编分子生物学实验指南. 颜子颖, 王海林, 译. 北京: 科学出版社, 1998.
- [13] Wood RL, Shuman RD. Swine erysipelas. Scholl E and Lemat AD. In diseases of swine, 4th ed. Ames, IA: Iowa State University Press. pp: 565–620.
- [14] Freeman MJ. Effect of vaccination on the development of arthritis in swine with erysipelas: clinical, hematologic, and gross pathologic observations. *American Journal of Veterinary Research*, 1964, 27: 597–606.
- [15] Seto K, Nishimura Y, Fujiki M, *et al.* Attenuated acriflavin-fast *Erysipelothrix insidiosa*. Relationship between its capability to cause arthritis in mice and immunogenicity in swine. *Journal of Veterinary Medical Science*, 1971, 33: 161–171.
- [16] Hassanein R, Sawada T, Kataoka Y, *et al.* Pathogenicity for mice and swine of *Erysipelothrix* isolates from the tonsils of healthy cattle. *Vet Microbiology*, 2003, 91:231-238.
- [17] Takahashi T, Fujisawa T, Tamura Y, *et al.* DNA relatedness among *Erysipelothrix rhusiopathiae* strains representing all twenty-three serovars and *Erysipelothrix tonsillarum*. *Int J Syst Bacteriol*, 1992, 42: 469–473.

Cloning and expression of N-terminal protective domain of *spaA* gene from *Erysipelothrix rhusiopathiae* C43311

Wulumuhan Nazierbieke, Zhuxiang Liu, Ke Li, Yiguang Chen, Entomack Borrathybay*

(Laboratory of Bioengineering, College of Biology and Environmental Sciences, Jishou University, Hunan 41600, China)

Abstract: The *spaA* gene was amplified by PCR from the genomic DNA of *Erysipelothrix rhusiopathiae* C43311 strain, and inserted into the pMD18-T vector and then sequenced. The N-terminal protective domain of the *spaA* gene was amplified by PCR from the recombinant plasmid pMD18-*spaA*, then cloned into the prokaryotic expression vector pGEX-6p-2 and expressed in *E. coli* BL21 (DE3) by IPTG induction. The expressed protein was identified by SDS-PAGE and Western blot. The sequence analyses showed that the coding region of the *spaA* gene of C43311 strain was 1881bp in length, and the nucleotide sequence homology of the *spaA* genes between the C43311 strain and the previously reported different serotype strains of *E. rhusiopathiae* was 93 to 99%. The SDS-PAGE analyses revealed a single fusion protein band with a molecular weight of 64kDa, and the Western blot results showed that the GST-SpaA-N fusion protein was recognized specifically by an antiserum against the SpaA protein of C43311 strain, suggesting that the fusion protein of GST-SpaA-N possessed high immunoreactivity.

Keywords: *Erysipelothrix rhusiopathiae*; *spaA* gene; fusion protein; prokaryotic expression; immunoreactivity