

嗜水气单胞菌外膜蛋白基因 *ompTS* 的高效表达及其免疫原性

谢俊锋 叶巧真* 何建国 戴伟君 黄 晓 何鸣筱 陈 诚

(中山大学生命科学学院 生物防治国家重点实验室 广州 510275)

摘 要 根据嗜水气单胞菌外膜蛋白基因 *ompTS* 的核苷酸序列设计引物,运用聚合酶链式反应(PCR)扩增出与预期大小相符的基因片段。将此基因片段克隆至质粒 pRSET A 的 *Bam*HI 和 *Eco*RI 位点,构建重组质粒,转化大肠杆菌 BL21(DE3),经 IPTG 诱导获得高效表达,SDS-PAGE 蛋白电泳表明在 39.9kD 处出现超强特异带,占总蛋白的 51%。以 Ni-NTA-Conjugate 抗体进行 Western blot 分析证明该 39.9kD 的蛋白为所表达的融合蛋白。纯化融合蛋白注射雄性新西兰大白兔可诱导产生特异抗体。ELISA 和 Western blot 检测结果显示,该抗体与表达的融合蛋白和从嗜水气单胞菌中提取的 36.9 kD 外膜蛋白均呈阳性反应,表明所表达的融合蛋白仍保持原有外膜蛋白的免疫原性,为此融合蛋白作为疫苗的候选成份提供理论基础。

关键词 嗜水气单胞菌,外膜蛋白 OmpTS, *ompTS* 基因,基因表达,免疫原性

中图分类号 Q786 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2002)03-0300-04

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)普遍存在于土壤和水体环境中,一般认为是条件致病菌^[1],可引起多种动物的败血症,对淡水养殖动物的危害尤为严重^[2]。此菌存在有多种血清型,随地域和宿主的的不同而有所差异,限制了灭活疫苗的使用范围。解决此问题的关键在于找出嗜水气单胞菌的共同保护性抗原,以制备对不同血清型菌株均有保护作用的疫苗。

外膜蛋白基因 *ompTS* 是我们新近发现的基因,与嗜水气单胞菌 porin II 基因的核苷酸序列有 83.5%的同源性,各编码 351 和 355 个氨基酸,其氨基酸序列的前 20 个氨基酸残基均为信号肽^[3],由此推断 OmpTS 是 Porin II 家族的外膜蛋白,而 Porin II 较为广泛地存在于嗜温气单胞菌中,可激活补体经典途径(C_{1q})^[4]。本研究选取嗜水气单胞菌外膜蛋白基因 *ompTS* 在大肠杆菌中进行表达并分析其免疫原性,旨在为进一步研究 OmpTS 及其能否作为基因工程亚单位疫苗的候选成分奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和载体 嗜水气单胞菌(Ah961004)分离

自患病的濒死中华鳖,由中山大学生命科学学院寄生虫研究室保存。质粒载体:pRSET A(Invitrogen,图1),受体菌:大肠杆菌 XL1-Blue、BL21(DE3)均由香港大学动物系 Dr. S.M.Chan 惠赠。

1.1.2 实验动物 2~3kg 新西兰雄性大白兔,购自广东省医学实验中心。

1.1.3 试剂和酶类 酶类购自 PromegaTM 和 GIBCO BRLTM 公司。试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 PCR 扩增 反应条件为 95℃ 5min,1 个循环;95℃ 45s,55℃ 45s,72℃ 1min,30 个循环;72℃ 延伸 10min。

1.2.2 基因克隆与表达 PCR 产物用琼脂糖凝胶回收试剂盒(购自 GIBCO BRLTM 公司)回收。PCR 产物以 *Bam*HI 和 *Eco*RI 酶切,定向克隆至表达质粒 pRSET A,转化大肠杆菌 XL1-Blue,经酶切分析、序列测定筛选得到重组质粒(pRA-omp3)(如图2),pRA-omp3 转化大肠杆菌 BL21(DE3),在含 50μg/mL Amp 的 SOB 培养基中以 IPTG 诱导表达 4h。离心收菌后,用 1×PBS 重悬,液氮中冻融 3 次,加入等体积的 2×SDS 上样缓冲液进行 SDS-PAGE 电泳。

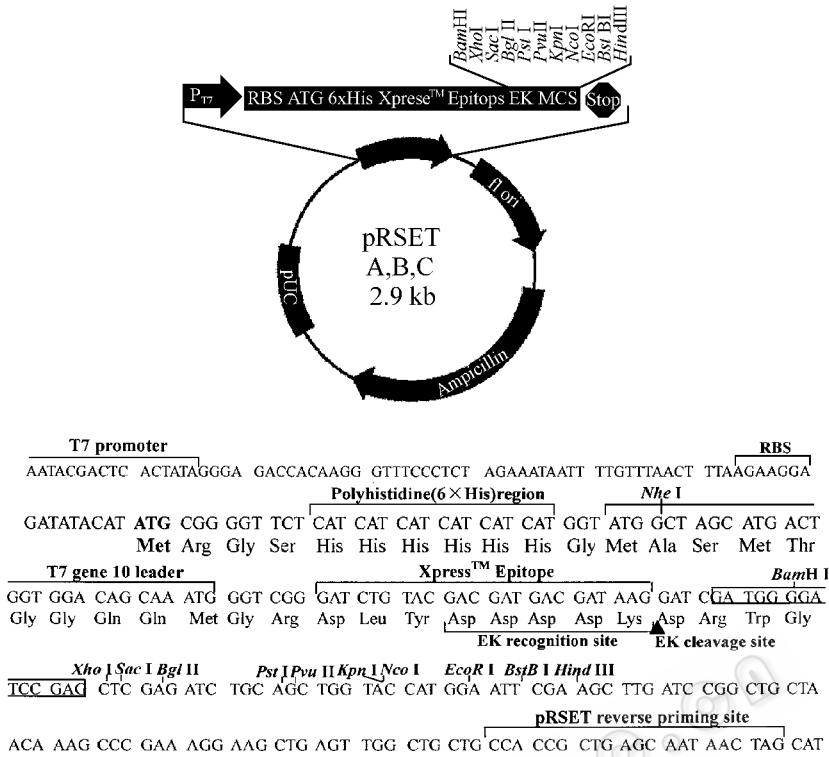


图 1 表达质粒 pRSET A 结构图及其多克隆位点

Fig.1 Map of pRSET A and its MCS

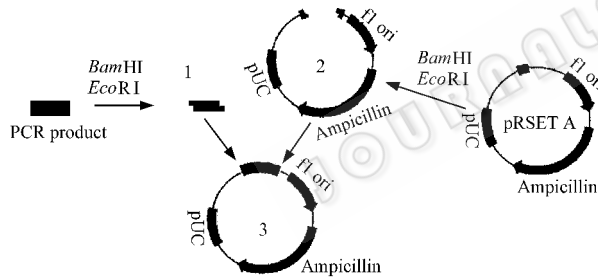


图 2 重组质粒 pRA-omp3 构建过程

Fig.2 Construction of recombinant plasmid pRA-omp3

1. PCR product ; 2. Linear plasmid ; 3. Recombinant plasmid

1.2.3 包涵体的收集、纯化、洗涤和溶解 :参照参考文献 5 的方法进行。

1.2.4 融合蛋白的纯化 :以 ProBond™ Column(Qia-gen)亲和凝胶柱纯化融合蛋白,参照操作说明书进行。

1.2.5 SDS-PAGE 电泳 :按常规的方法在小型蛋白电泳仪上进行恒压电泳。所用的分离胶浓度为 12% ,浓缩胶为 4% ,100V 电泳约 3h 至溴酚蓝跑至胶底 ,取下胶后用染色液染色 30min 以上 ,脱色液脱色至背景干净。观察蛋白带型 ,干胶保存。

1.2.6 蛋白转印(Western blot) :按常规方法在蛋白转印装置上进行蛋白转移。4℃ ,50V 转印约 2h。转移于硝酸纤维素膜上的蛋白的检测参照 Invitrogen

公司《Anti-Xpress™ Antibody》免疫检测方法进行。

1.2.7 嗜水气单胞菌 OMP 的提取 :参照参考文献 [6]

1.2.8 免疫血清的制备 :对约 2.5kg 的纯种新西兰雄性家兔以皮下多点注射进行免疫。第一次注射剂用完全福氏佐剂与纯化的融合蛋白混合研磨均匀后使用 ,第二次注射剂用不完全福氏佐剂混合。总注射量为 0.2g/kg 体重。两针之间间隔 15 ~ 20d ,并于第二针 7 ~ 10d 后取血。颈动脉放血 50 ~ 70mL ,置于 37℃ ,30min ,然后 4℃ 过夜 ,低速离心后取上清即为血清。

按常规方法进行 ELISA 检测以测定血清效价。

2 结 果

2.1 PCR 扩增

根据嗜水气单胞菌外膜蛋白基因 *ompTS*(Gen-Bank 登录号 :AF276639) ,设计 1 对引物 ,扩增去除编码信号肽序列的 1008 bp *ompTS* 部分结构基因。上游引物为 :5' AAGGATCCGCAGTGGTTTATGAC 3' ,引入 BamHI 位点 ;下游引物为 :5' CCGAATTCT-TAGAAGTTGTATTG 3' ,引入 EcoRI 位点 ,总扩增片段长为 1024bp。PCR 扩增的结果显示 ,在约 1kb 处出现一条亮带 ,表明扩增出与预期大小相符的 DNA 片段。

2.2 重组质粒的构建

用 *Bam*HI 和 *Eco*RI 双酶切 pRSET A 和 PCR 产物,进行粘端连接,转化大肠杆菌 XL1-blue。随机挑取单菌落培养,碱裂解法提取质粒,经双酶切,1%琼脂糖电泳观察到与预期的基因片段大小相符的约 3kb 和 1kb 的两条片段(图 3),初步认定为阳性克隆子。对重组质粒进行 DNA 测序,序列分析结果表明插入的片段是缺失编码信号肽序列的 *ompTS* 基因,且该片段以正确的方向插入质粒中,重组质粒再转入溶源大肠杆菌 BL21(DE3)中进行 IPTG 诱导表达。

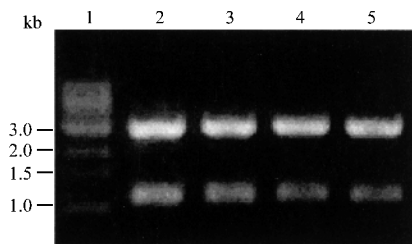


图 3 重组质粒的 *Eco*RI/ *Bam*HI 酶切鉴定

Fig.3 Determination of recombinant plasmids by *Eco*RI/ *Bam*HI
1.1kb DNA ladder ; 2~5. Recombinant plasmids digested by *Eco*RI/ *Bam*HI

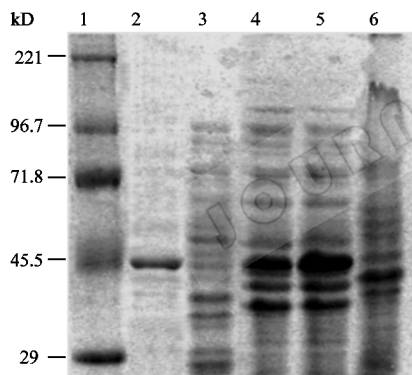


图 4 表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig.4 SDS-PAGE analysis of expression products

1.Prestained low molecular protein marker ; 2.Purified fusion protein ;
3.Not recombinant bacteria ;4&5.Recombinant bacteria ;
6.OMPs of *A. hydrophila*

2.3 表达产物的鉴定

根据测序的结果,借助 DNASTar 软件进行序列分析表明缺失信号肽序列的 *ompTS* 基因可编码 335 个氨基酸、推定分子量为 36.9kD 的蛋白,再加上 pRSET A 质粒上编码的约 3kD 的蛋白片段,推测融合蛋白为 39.9kD。表达菌经冻融处理、进行 SDS-PAGE 电泳,而后,一块胶用考马斯亮蓝 R-250 染色,显示在预期大小处有特强的蛋白染色带(图 4);另一块胶用电转移方法把蛋白转移至硝酸纤维素膜进行 Western blot 分析,用识别融合蛋白中的表达载体 N

端前导肽的抗体 Ni-NTA-Conjugate 检测也显示在预期大小处有阳性反应带出现(图 5),表明已表达出预期的重组蛋白。利用 CS-950 凝胶薄层扫描仪(SHIMADZU™)检测 SDS-PAGE 电泳胶,得出此融合蛋白占菌体总蛋白的 51%。由于目的基因片段在 pRSET 表达载体系统中高效表达,表达产物有时部分形成包涵体。

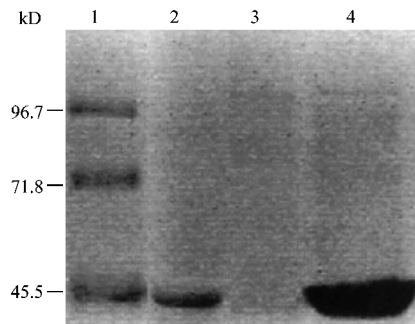


图 5 用 Ni-NTA-Conjugate 抗体进行 Western blot 分析

Fig.5 Western blot analysis using the antibody of Ni-NTA-Conjugate

1.Prestained low molecular protein marker ; 2.Purified fusion protein ;
3.Not recombinant bacteria ;4.Fusion protein in lysate

2.4 融合蛋白的免疫原性

以表达的融合蛋白为抗原免疫新西兰大白兔,ELISA 效价测定,免疫 50d 时可诱生抗体滴度为 1:1024 的抗融合蛋白血清。以此融合蛋白抗体为一抗,羊抗兔-HRP 血清(博士德)为二抗进行 ELISA 和 Western blot 检测,结果显示,该抗体不仅与表达的融合蛋白呈阳性反应,而且与从嗜水气单胞菌中提取的外膜蛋白混合物(ELISA 检测结果)及 36.9 kD 外膜蛋白呈阳性反应(图 6),表明所表达的融合蛋白仍保持原有外膜蛋白的免疫原性。

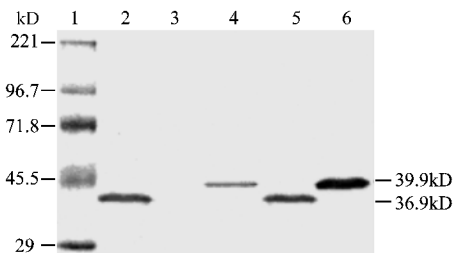


图 6 用融合蛋白的抗体进行 Western blot 分析

Fig.6 Western blot analysis using the antibody of fusion protein

1.Prestained low molecular protein marker ; 2&5.OMPs of *A. hydrophila* ;
3.Not recombinant bacteria ;4&6.Recombinant bacteria

3 讨 论

已有报道通过基因工程表达的 OMP 具有良好

的免疫原性和保护作用^[7]。实验经诱导表达产生分子量为 39.9kD 的融合蛋白,可引起动物机体的免疫反应,说明该蛋白具有免疫原性,而且由其诱导产生的抗体作为一抗,在 ELISA 检测中可与提取自嗜水气单胞菌的 OMP 混合物起阳性反应,Western blot 分析进一步显示该抗体可与 36.9 kD 外膜蛋白结合。说明缺失编码信号肽序列的 *ompTS* 基因和质粒片段共同表达的融合蛋白与野生型嗜水气单胞菌 36.9 kD 外膜蛋白(即 OmpTS)的抗原结合位点没有改变,有望作为基因工程亚单位疫苗的候选成分,而且融合蛋白不需要进行切除 N-端质粒肽段非目的片段的操作,这将大大降低 OmpTS 融合蛋白基因工程疫苗的成本。

在实验过程中,诱导表达的融合蛋白偶尔形成包涵体。估计是经 IPTG 诱导后,*ompTS* 基因高效表达,以至融合蛋白在大肠杆菌内过量积存,菌体为了物质和功能的平衡,形成了包涵体。在 Western blot 实验中,包涵体和菌裂解液中所得的融合蛋白均可以与融合蛋白抗体结合,因此包涵体的融合蛋白不用经过复性处理仍保存有抗原抗体结合的活性。鉴于在裂解液中的融合蛋白的表达量已高达 51%,因此在其它生物学活性实验中不考虑使用包涵体中的融合蛋白。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Janda J M, Sharon L A, Shideh K *et al.* Further studies on biochemical characteristics and serologic properties of the genus *Aeromonas*. *J Clinical Microbiol*, 1996, **34**(8):1930 ~ 1933
- [2] YE Q Z(叶巧真). Study on the pathogens of red and white abdominal shell disease of *Trionyx sinensis*. Ph D thesis of Sun Yat-Sen University, Guangzhou, 1999
- [3] HUANG X(黄晓), YE Q Z(叶巧真), HE J Q(何建国) *et al.* Cloning and sequence analysis of outer membrane protein gene *ompTS* of *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Fisheries of China*(水产学报), 2001, **25**(6):552 ~ 558
- [4] Merino S, Nogueras M M, Aguilar A *et al.* Activation of the complement classical pathway (C1q binding) by mesophilic *Aeromonas hydrophila* outer membrane protein. *Infect Immun*, 1998, **66**(8):3825 ~ 3831
- [5] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning : A laboratory manual*. 2nd ed, New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [6] CHEN H Q(陈怀青), LU C R(陆承平). Analysis of S-layer protein and OMP composition on *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Nanjing Agricultural University*(南京农业大学学报), 1993, **16**(20):69 ~ 73
- [7] ZHAO X R(赵香汝). Structure and function of bacterial outer membrane protein. *Chinese Journal of Veterinary Science and Technology*(中国兽医学报), 1999, **29**(10):20 ~ 23

The Expression of *Aeromonas hydrophila ompTS* Gene and the Immunogenicity of Recombinant OmpTS

XIE Jun-Feng YE Qiao-Zhen* HE Jian-Guo DAI Wei-Jun

HUANG Xiao HE Ming-Xiao CHEN Cheng

(State Key Lab of Biocontrol, School of Life Sciences, Sun Yat - Sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract Primers were designed based on *ompTS* gene reported recently. With the specific primers, one target fragment about 1024bp lacking the signal sequence of *ompTS* gene was amplified from *A. hydrophila* genomic DNA via PCR. The *ompTS* gene was hyperexpressed using gene fusion expression vector pRSET system, and the recombinant OMP exhibited a size of 39.9kD with SDS-PAGE and Western blot analysis, which showed about 51% of total lysate proteins. Antibody to the purified recombinant OMP reacted not only to the recombinant OMP but also to the purified OMPs from *A. hydrophila* in ELISA and the 36.9kD OMP in Western blot. The result indicates that the recombinant OMP has the same epitope with the nature one.

Key words *Aeromonas hydrophila*, outer membrane protein OmpTS, *ompTS* gene, gene expression, immunogenicity

Received : 10-08-2001

This work was supported by Grant from the National Natural Science Foundation of China(No.30000128).

* Corresponding author. Tel : 86-20-84113793 ; Fax : 86-20-84036215 ; E-mail : xiaozheny@yahoo.com