

研究简报

兔多杀性巴氏杆菌 C51-3 株黏附蛋白的表达、纯化及其抗原性检测

吾鲁木汗·那孜尔别克¹, 严芳¹, 何翠¹, 张磊¹, 恩特马克·布拉提白^{1,2}

¹ 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 416000

² 新疆大学生命科学与技术学院 新疆生物资源基因工程重点实验室, 乌鲁木齐 830046

摘要: 应用 PCR 从兔多杀性巴氏杆菌 C51-3 株基因组 DNA 中扩增出编码 36 kD 黏附蛋白的 *cp36* 基因, 将其克隆到 pMD18-T 载体并对插入片段进行测序。以重组质粒 pMD18-*cp36* 为模板, 用 PCR 扩增得到编码信号肽除外的成熟黏附蛋白基因 *cpm36*, 并克隆到原核表达质粒 pQE30 中, 得到重组质粒 pQE30-*cpm36*, 转化大肠杆菌 M15, 在 IPTG 诱导下表达融合蛋白 CPM36, 经 Ni^{2+} -NTA 亲和层析纯化。DNA 测序结果表明 *cp36* 基因片段大小为 1032 bp, 与已报道的 16 个血清型多杀性巴氏杆菌 *cp36* 基因的核苷酸序列比较, 同源性在 76.9%~100% 之间。SDS-PAGE 结果显示, 表达分子量约为 37 kD 的带有 6×His 标签的 CPM36 蛋白, 与预期分子量相符。Western blotting 结果表明, 抗重组蛋白抗体分别能与 CPM36 蛋白和多杀性巴氏杆菌 36 kD 蛋白发生特异性反应, 证明原核表达蛋白具有抗原性, 为进一步开展多杀性巴氏杆菌免疫保护性抗原的研究奠定了基础。

关键词: 兔多杀性巴氏杆菌, 黏附蛋白, CPM36, 原核表达, 抗原性

Expression and Purification of an Adhesive Protein of Rabbit *Pasteurella multocida* C51-3 and Detection of Its Antigenicity

Wulumuhan Nazierbieke¹, Fang Yan¹, Cui He¹, Lei Zhang¹, and Entomack Borrathybay^{1,2}

¹ Laboratory of Bioengineering, College of Biology and Environmental Sciences, Jishou University, Jishou 41600, China

² Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering, Xinjiang University, Urumuqi 830046, China

Abstract: The *cp36* gene encoding an adhesive protein was amplified by PCR from genomic DNA of rabbit *P. multocida* C51-3 strain, and cloned into the pMD18-T vector and then sequenced. The mature adhesive protein without a signal peptide of *cpm36* gene was amplified by PCR from the recombinant plasmid pMD18-*cp36*, then cloned into the prokaryotic expression vector pQE30 to provide a recombinant plasmid pQE30-*cpm36*. The recombinant protein of CPM36 was produced in *Escherichia coli* M15 harboring the recombinant plasmid pQE30-*cpm36* by IPTG induction, and the recombinant protein purified by the affinity chromatography with Ni^{2+} -NTA resin. The sequence analyses showed that the ORF of *cp36* gene was 1032 bp in length, and DNA homology of the *cp36* genes between the C51-3 strain and the previously reported different serotype strains of *P. multocida* in GenBank was 76.9 to 100%. The SDS-PAGE analyses revealed a single fusion protein band with a molecular weight of 37 kD, and the Western blotting analysis demonstrated that the recombinant protein CPM36 and native 36 kD protein of C51-3 were recognized specifically by an antiserum against the recombinant protein, suggesting that the recombinant protein is an antigenic protein.

Received: October 31, 2007; **Accepted:** April 26, 2008

Supported by: the National Natural Science Foundation of China (No. 30440084), the Nature Science Found of Hunan Education Bureau (No. 07A055).

Corresponding author: Entomack Borrathybay. Tel: +86-743-8565217; Fax: +86-743-8565323; E-mail: etmkb@jsu.edu.cn

国家自然科学基金(No. 30440084)和湖南省教育厅重点项目(No. 07A055)资助。

Keywords: rabbit *Pasteurella multocida*, adhesive protein, CPM36, prokaryotic expression, antigenicity

兔巴氏杆菌病是由多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella multocida*)感染引起的呼吸道疾病,为家兔的主要传染病之一。兔对多杀性巴氏杆菌特别易感,但本病多呈急性,亚急性发生,很难早期发现和获得及时有效的治疗就发生死亡,对养兔业造成很大的经济损失^[1]。由于多杀性巴氏杆菌有 5 个荚膜血清型和 16 个菌体血清型,这给该病的免疫预防带来了一定的困难,如贵州省金沙县某肉兔养殖专业户,用禽多杀性巴氏杆菌疫苗对饲养的肉兔进行接种造成兔发病死亡^[2]。目前国内外主要使用灭活苗来预防和控制该病,但灭活苗只对同种血清型菌株具有一定保护力,而对异种血清型菌株不能产生保护力或较弱,至今世界各国尚未彻底消灭本病,仍有爆发的报道^[3]。自上世纪 80 年代以来,许多科研工作者通过对多杀性巴氏杆菌荚膜、脂多糖及外膜蛋白等的免疫保护功能进行了一系列的研究,发现许多具有免疫保护功能的抗原物质,但它们的免疫保护力均不稳定,且在不同国家和不同实验室所得到的实验结果之间有一定差异。

在国内,恩特马克等^[4]通过猪多杀性巴氏杆菌对 HeLa 细胞黏附能力的研究表明,猪肺炎灭活菌株对小鼠的毒力强于弱毒菌株,同时在灭活菌株的细胞表面存在 39 kD 的特异蛋白,而此蛋白在弱毒菌株中不存在,暗示了 39 kD 蛋白可能与猪多杀性巴氏杆菌的毒力相关。曹素芳和黄青云^[5]对禽多杀性巴氏杆菌 C48-1 株 *ompH* 基因进行克隆及表达,并检测重组蛋白 OmpH 的免疫保护功能时发现其免疫保护效果优于禽多杀性巴氏杆菌弱毒苗。顾宏伟和陆承平^[6]以兔多杀性巴氏杆菌 C51-17 株为研究材料,分别检测其菌体、外膜蛋白(OMPs)和铁调节外膜蛋白(IROMPs)的免疫保护效果时发现, IROMPs 是兔多杀性巴氏杆菌的交叉保护抗原。

在国外,对多杀性巴氏杆菌交叉保护抗原和毒力因子进行了一系列的研究,并已经取得了很大进展。Heddleston 等用火鸡体内或火鸡胚胎增殖的多杀性巴氏杆菌制成灭活苗,并检测其免疫保护率,结果发现该疫苗不但能为免疫火鸡提供同种血清型菌株 P-1059,而且也能为之提供对异种血清型菌株 X-73 的强毒攻击的免疫保护^[7]。Rimler 等^[8]认为体

内增殖菌体诱发的对异种血清型菌株的免疫保护力是体内多杀性巴氏杆菌独特抗原蛋白表达的结果,将这种诱发免疫宿主产生交叉保护作用的抗原称为交叉保护因子(Cross-protection factors, CPFs)。Rimler 等^[9]进一步对体内增殖多杀性巴氏杆菌的表面蛋白进行了分离及 SDS-PAGE 电泳分析,结果发现分子量为 59~65 kD 和 39 kD 蛋白与本菌交叉保护有关,而且糖类决定簇也可能对交叉保护起重要作用。Entomack 等^[10,11]对禽多杀性巴氏杆菌 P-1059 的有荚膜菌株和无荚膜菌株的荚膜粗提物进行 SDS-PAGE 电泳分析,结果发现 39 kD 蛋白是有荚膜菌株的特异蛋白,并且此蛋白有 A 型多杀性巴氏杆菌对鸡胚成纤维(CEF)细胞的黏附功能。Ali 等^[12,13]用 39 kD 蛋白的单克隆抗体,经免疫电镜技术观察该蛋白在细菌细胞中的定位时发现,39 kD 蛋白定位在细菌细胞壁外的荚膜中,并用纯化蛋白及其抗体做的免疫保护试验结果证明,39 kD 蛋白具有交叉保护功能。后来 Entomack 等^[14]用特异性抗体从 P1059 株表达型基因组文库中克隆出编码该黏附蛋白的基因片段并对其核苷酸序列进行测序,结果表明编码黏附蛋白的基因大小为 1032 bp,是一个阅读框架,编码 343 个氨基酸,前 20 个氨基酸组成信号肽,而成熟蛋白是由 323 个氨基酸组成,预期相对分子质量约为 36 kD。他们进一步对编码 36 kD 成熟黏附蛋白(CPM36)的基因进行了表达和纯化及检测其黏附功能,结果再次证实抗 CPM36 蛋白抗体显著地抑制 A 型多杀性巴氏杆菌对 CEF 细胞的黏附。上述研究结果表明 CPM36 蛋白是具有黏附功能和交叉保护功能的荚膜蛋白,可以作为研制多杀性巴氏杆菌亚单位疫苗的候选抗原。

本实验运用 DNA 重组技术和大肠杆菌表达系统对兔多杀性巴氏杆菌 C51-3 株编码成熟黏附蛋白的基因 *cpm36* 进行了表达、纯化及检测其抗原性,为兔多杀性巴氏杆菌亚单位疫苗的研究和开发奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株和质粒

兔多杀性巴氏杆菌 C51-3 株购自国家兽医微生物

物菌种保藏中心, 大肠杆菌 DH5 α 、M15 均为本实验室保存, 表达质粒 pQE30 由本实验室保存, pMD18-T 载体购自大连宝生物工程有限公司。

1.1.2 试剂

Taq DNA 聚合酶, 限制性内切酶, DNA 连接试剂盒, DNA 凝胶回收试剂盒, 质粒 DNA 纯化试剂盒, PCR 产物纯化试剂盒, 100 bp DNA Ladder Marker, λ -Hind III Digest DNA Marker, 低分子量蛋白质标准均为大连宝生物工程有限公司产品; Brain Heart Infusion(BHI)培养基为 Bacto 公司产品; IPTG 为 Promega 公司产品; X-Gal 为北京鼎国公司产品; His-Bind Resin 和 His-Bind Column 购自 Novagen 公司; 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 和二氨基联苯胺 (DAB) 购自 Sigma 公司; 其它试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 多杀性巴氏杆菌 C51-3 株基因组 DNA 的制备

将 C51-3 株接种于 10 mL 的 BHI 液体培养基中, 在 37°C 静置培养 18 h, 按照 CTAB 法^[15]制备基因组 DNA。

1.2.2 目的基因的克隆和序列测定

根据在 GenBank 数据库中登录的多杀性巴氏杆菌 P-1059B 株黏附蛋白 *cp36* 基因全序列 (Accession No. EF203904), 设计一对引物。上游 P1: 5'-CAGGA TCCATGAAAAAGACAATCGTAGCA-3', 下游 P2: 5'-CAGTCGACTTAGAAGTGTACGCGTAAACC-3', 分别插入 *Bam*H I 和 *Sal* I 酶切位点。引物由上海生工合成。按照以下 PCR 反应程序从多杀性巴氏杆菌 C51-3 株基因组 DNA 中扩增出目的基因 *cp36*: 94°C 预变性 5 min; 94°C, 5 s; 55°C, 1 min; 72°C, 1 min; 30 个循环结束后, 72°C 继续延伸 10 min。纯化 PCR 产物连接到 pMD18-T 载体, 构建重组质粒 pMD18-*cp36* 并转化大肠杆菌 DH5 α 。经菌落 PCR 和 *Bam*H I/*Sal* I 双酶切鉴定重组质粒后送上海生工进行测序。

1.2.3 目的基因核苷酸序列的分子进化分析

从 GenBank 数据库中调出已登录的多杀性巴氏杆菌 *cp36* 基因的核苷酸序列, 用 ClustX 软件将已知序列与 C51-3 株 *cp36* 序列进行多重对比, 然后用 MEGA 软件构建系统进化树。

1.2.4 原核表达载体 pQE30-*cpm36* 的构建

根据 C51-3 株 *cp36* 基因的核苷酸序列设计针对

编码信号肽除外的成熟黏附蛋白的 *cpm36* 基因的上游引物 P3: 5'-CAGGATCCGCAACAGTTTACAATC AAGAC-3', 插入 *Bam*H I 酶切位点, 由上海生工合成, 而下游引物用 1.2.2 中设计的下游引物 P2。与 1.2.2 相同的 PCR 反应程序从重组质粒 pMD18-*cp36* 中扩增出 *cpm36* 基因片段, 并用 PCR 产物纯化试剂盒纯化 PCR 产物。经 *Bam*H I/*Sal* I 双酶切 PCR 产物并用 DNA 凝胶回收试剂盒回收目的 DNA 片段, 与同样经 *Bam*H I/*Sal* I 双酶切的 pQE30 表达载体连接, 构建 pQE30-*cpm36* 表达载体, 转化大肠杆菌 DH5 α , 经菌落 PCR 和双酶切鉴定正确的重组表达质粒送上海生工进行测序, 以验证阅读框架是否正确及有无突变出现。

1.2.5 最适 IPTG 诱导浓度的确定

将序列测定正确的重组质粒 pQE30-*cpm36* 转化大肠杆菌 M15 后, 阳性的单菌落接种于 10 mL 含氨苄青霉素的 LB 培养基中, 于 37°C 振荡培养过夜, 将活化的菌以 2% 接种量接种于 100 mL 含氨苄青霉素的 LB 培养基, 平行做 3 份, 37°C 培养至 OD_{600} 值到 0.6~1.0 时, 分别以终浓度 0.2、0.5、1.0 mmol/L IPTG, 继续培养 4 h 后, 9000 r/min 离心 15 min, 收集菌体, 经 12.5% SDS-PAGE 电泳分析目的蛋白表达情况。将转化了空载体 pQE30 的大肠杆菌 M15 的培养物作为阴性对照。

1.2.6 目的蛋白的纯化

将培养过夜的重组菌以 2% 接种量接种于 200 mL 含氨苄青霉素的 LB 培养基中, 37°C 培养至 OD_{600} 值为 0.6~1.0, 加入终浓度 0.2 mmol/L IPTG, 于 37°C 诱导 4 h, 离心收集的菌体用 PBS 洗涤 1 次, 用溶菌缓冲液溶解, 在冰浴中超声破碎菌体。完全裂解后的菌液 4°C、12 000 r/min 离心 15 min, 分别收集上清和沉淀, 经 12.5% SDS-PAGE 电泳检测目的蛋白的表达形式。按 Ni²⁺-NTA 树脂纯化系统的使用说明书纯化目的蛋白, 用 PEG6000 干粉对纯化蛋白进行浓缩并按 Bradford 法测定纯化蛋白含量, 经 SDS-PAGE 电泳检测纯化蛋白。

1.2.7 抗 6 \times His-*Cpm36* 融合蛋白兔血清的制备

将 200 μ g 纯化蛋白与弗氏完全佐剂等体积混匀, 背部皮下注射新西兰白兔, 隔 7 天用同等剂量蛋白与等体积弗氏不完全佐剂混合加强免疫 2 次, 第 3 次免疫后的第 7 天, 颈动脉采血分离血清。按 Lo 等

的方法^[16]用大肠杆菌 M15 菌体超声波破碎液从抗血清中吸附除针对大肠杆菌抗原的抗体。

1.2.8 表达蛋白抗原性的 Western blotting 检测

上述诱导表达蛋白和纯化蛋白经 SDS-PAGE 电泳分离后, 通过半干式电转仪将蛋白条带转移到硝酸纤维素膜上, 将硝酸纤维素膜短暂漂洗后依次经 5% 脱脂奶粉 4℃ 封闭过夜, 与抗 6×His-Cpm36 融合蛋白的兔血清(1:500)孵育 1 h、与辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG(1:1000)孵育 1 h, 每步完成后均严格洗膜, 最后加 DAB 显色液避光显色。转印地分子量蛋白质标准的硝酸纤维素膜与考马斯亮蓝染色。

2 结果

2.1 目的基因的克隆与序列分析

2.1.1 目的基因的 PCR 扩增

PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳结果显示, 用 PCR 技术从兔多杀性巴氏杆菌 C51-3 株基因组 DNA 中扩增出大小为 1.0 kb 的 DNA 片段, 与预期长度一致(图 1)。

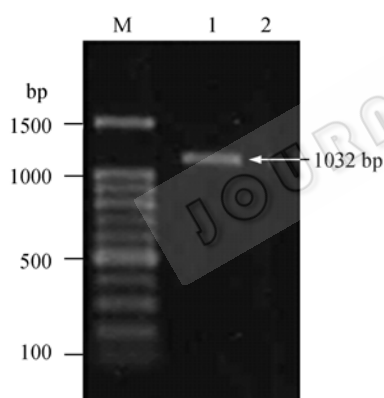


图 1 多杀性巴氏杆菌 C51-3 株 *cp36* 基因的 PCR 扩增
Fig. 1 PCR amplification of *cp36* gene from *P. multocida* C51-3

M: 100 bp DNA ladder marker; 1: PCR product of *ap39* gene;
2: negative control

2.1.2 重组质粒 pMD18-*cp36* 的 PCR 鉴定

经菌落 PCR 鉴定含有重组质粒的重组子, 即任意挑选 4 个白色菌落分别悬浮于 20 μL 的无菌水, 以 1 μL 菌液为模板用引物 P1 和 P2 进行 PCR 扩增, 经琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。PCR 鉴定表明挑选的 4 个克隆都含有重组质粒, PCR 产物的大小与预期值相符(图 2)。

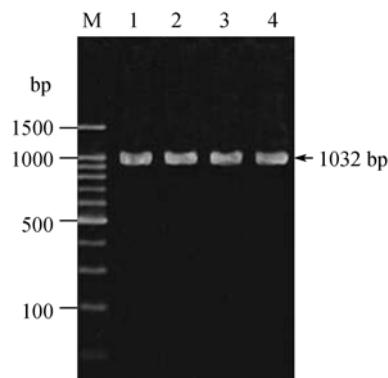


图 2 重组子的 PCR 鉴定

Fig. 2 PCR identification of recombinants

M: 100 bp DNA ladder marker; 1~4: PCR product of recombinants

2.1.3 重组质粒 pMD18-*cp36* 的酶切鉴定

从上述 PCR 鉴定阳性的重组子中提取质粒, 经 *Bam*H I/*Sal* I 双酶切后得到一个大小位于 1032 bp 处的小片段和一个大小位于 2692 bp 的大片段(图 3), 证明目的基因与载体正确连接, 为阳性重组质粒。

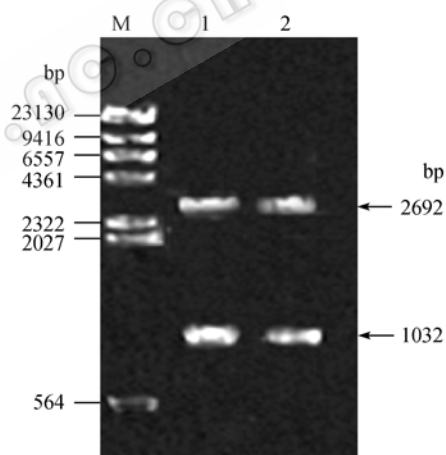


图 3 重组质粒 pMD18-*cp39* 的酶切鉴定

Fig. 3 Restriction analysis of recombinant plasmid pMD18-*cp39*

M: λ -Hind III digest DNA marker; 1 and 2: recombinant plasmid pMD18-*cp36* digested with *Bam*H I and *Sal* I

2.1.4 目的基因的同源分析

测序结果证实 *cp36* 基因大小为 1032 bp, 与预期的结果相一致。同源性分析结果表明, C51-3 与血清型 9 处于一个分支, 二者与血清型 4 在与血清型 5、15、2、3、11、16 形成的进化簇中形成一个独立的亚簇, 说明三者系统进化关系密切。C51-3 株 *cp36* 序列与多杀性巴氏杆菌其他 16 种血清型菌株 *cp36* 核苷酸序列的同源性在 76.9%~100%之间, 与血清型 9、4、5、15、14、1 的同源性分别为 100%、98.7%、

前后的表达蛋白进行 SDS-PAGE 电泳检测, 结果表明, 与未加诱导剂 IPTG 的重组菌相比, 经 0.2 mmol/L IPTG 诱导 4 h 的重组菌在 37 kD 处有一特异的蛋白条带, 而且以可溶蛋白的形式表达在细胞质中, 并纯化蛋白 SDS-PAGE 分析结果表明纯化蛋白的纯度达到 95%(图 7)。用 Bradford 法测定的纯化蛋白含量为 0.44 mg/mL, 表明重组蛋白在大肠杆菌中得到了高效表达。

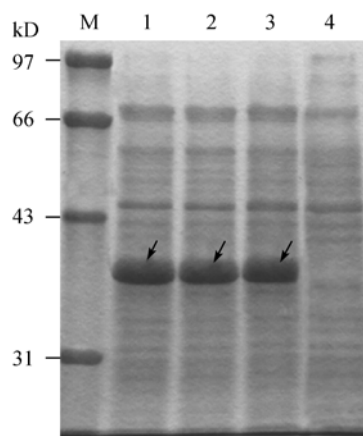


图 6 融合蛋白 6×His-CPM36 的 SDS-PAGE 检测

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of fusion protein of 6×His-CPM36 in *E. coli* M15

M: protein marker; 1~3: *E. coli* M15 harboring pQE30-cpm36 induced with 0.2, 0.5, 1.0 mmol/L of IPTG for 4 h, respectively; 4: *E. coli* M15 harboring pQE30 induced with IPTG. Arrows indicated the position of fusion protein 6×His-CPM36

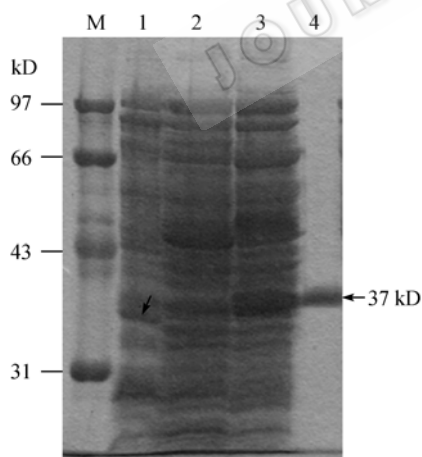


图 7 表达蛋白和纯化蛋白的 SDS-PAGE 检测

Fig. 7 SDS-PAGE analysis of expressed fusion protein and purified protein

M: protein marker; 1: whole-cell lysate of C51-3; 2: precipitate of *E. coli* M15 harboring pQE30-cpm36 induced with IPTG for 4 h; 3: supernatant of *E. coli* M15 harboring pQE30-cp36 induced with IPTG for 4h; 4: purified fusion protein of 6×His-CPM36. Arrow on the right indicate the position of the 6×His-CPM36, and arrow on the left indicate the position of the native 36 kD adhesive protein of C51-3

2.3.3 表达蛋白抗原性的 Western blotting 检测

用纯化的融合蛋白 6×His-CPM36 免疫兔, 获得兔免疫血清。Western blotting 检测结果显示, 抗融合蛋白抗体可以特异识别 37 kD 的融合蛋白 6×His-CPM36 和多杀性巴氏杆菌 C51-3 株 36 kD 黏附蛋白(图 8), 说明表达蛋白具有良好的抗原性。

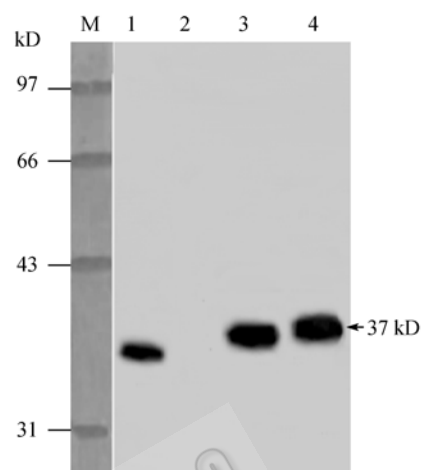


图 8 融合蛋白 6×His-Cp36 抗原性的 Western 印迹检测

Fig. 8 Antigenicity of 6×His-CPM36 by Western blot with antiserum against the recombinant protein

M: protein marker; 1: whole-cell lysate of *P. multocida* C51-3; 2: precipitate of the lysate of *E. coli* M15 harboring pQE30-cpm36 induced with IPTG for 4 h; 3: supernatant of the lysate of *E. coli* M15 harboring pQE30-cpm36 induced with IPTG for 4 h; 4: purified fusion protein 6×His-CPM36. Arrow on the right indicated the position of the 6×His-CPM36

3 讨论

一般认为, 病原菌对宿主粘膜细胞的黏附能力决定病原菌的致病性, 所以, 能否用细菌细胞表面的与黏附相关的蛋白作为免疫原, 诱导机体产生相应的抗体, 进而阻断细菌对宿主细胞表面的黏附, 达到抑制细菌在机体内繁殖的目的, 显然研制新型疫苗的切入点。Dubreuil 等^[17]用 SDS-PAGE 电泳比较生长在 DSA 培养基和含 α , α 2 联吡啶(BIP)的 DSA 培养上的有荚膜强毒株 P1059I、无荚膜的弱毒株 P1059B 和 2723 株的外膜蛋白结构, 并检测这些菌株对小鼠的毒力, 实验结果表明在添加铁离子螯合剂的 BIP 时, 可诱导细菌表达 39 kD 蛋白并增强无荚膜弱毒株对小鼠的毒力, 但不影响荚膜的形成, 暗示荚膜形成可能对该菌的毒力极为重要的, 但细菌表面的其它组分如 OMPs 也是其发挥毒力所必需的。Lübke 等^[18]的研究证明

牛多杀性巴氏杆菌 35 kD 表面蛋白是该菌对牛呼吸道粘膜表面的黏附因子。Entomack 等^[10]的研究表明禽多杀性巴氏杆菌 A 型菌株的荚膜厚度与其致病机制相关,且 39 kD 表面蛋白含量与荚膜厚度直接相关。Entomack 等^[11]进一步研究了禽多杀性巴氏杆菌对 CEF 细胞的黏附过程以及菌体表面组分在黏附过程中所起的作用,结果表明 39 kD 蛋白是本菌对 CEF 细胞的黏附因子。Ali 等^[12,13]用 39 kD 蛋白的单克隆抗体,采用免疫电镜技术观察 39 kD 蛋白在细菌细胞中的位置时发现,它定位在细菌细胞壁外的荚膜中,且具有黏附功能和免疫交叉保护功能。后来 Entomack 等^[14]通过克隆编码 39 kD 黏附蛋白的基因确定该基因的核苷酸序列,测序结果表明该基因大小为 1032 bp,编码 343 个氨基酸,前 20 个氨基酸组成信号肽,而成熟黏附蛋白由 323 个氨基酸组成,其预期相对分子质量约为 36 kD,并在大肠杆菌表达的 36 kD 成熟黏附蛋白(CPM36)仍具有黏附功能。上述研究结果表明 CPM36 蛋白是禽多杀性巴氏杆菌的黏附因子和交叉保护因子,可以作为研制多杀性巴氏杆菌亚单位疫苗的候选抗原。

本研究对兔多杀性巴氏杆菌 A 型 C51-3 株 *cp36* 基因进行了克隆和序列分析,并表达和纯化编码信号肽除外的成熟黏附蛋白 CPM36,并检测其抗原性。目的基因的测序结果证实 *cp36* 基因大小为 1032 bp,编码 343 个氨基酸,前 20 个氨基酸组成信号肽,而成熟黏附蛋白由 323 个氨基酸组成,其预期相对分子质量约为 36 kD,与在 GenBank 数据库中已登录的 16 个血清型多杀性巴氏杆菌之间的同源性在 76.8%~100%之间,说明该基因具有较高的保守性。用 PCR 从重组载体 pMD18-*cp36* 中扩增出编码信号肽除外的成熟黏附蛋白的 *cpm36* 基因片段,将其构建到原核表达载体 pQE30 多克隆位点上,获得重组载体 pQE30-*cpm36*,重组载体的 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切鉴定证明成功构建得到含有目的基因的原核表达质粒 pQE30-*cpm36*。表达蛋白的 SDS-PAGE 检测结果表明,与空载体 pQE30 转化的大肠杆菌相比,pQE30-*cpm36* 转化的大肠杆菌经不同 IPTG 浓度诱导后在 37 kD 处出现表达量较高的蛋白条带,而且表达蛋白 6×His-CPM36 的分子量与理论之相符,说明表达成功。当 IPTG 浓度为 0.2 mmol/L、37°C 诱导 4 h 时,目的蛋白的表达大量约占全菌体总蛋白含

量的 40%。不同浓度 IPTG 诱导后的全菌体总蛋白 SDS-PAGE 结果表明,在不同 IPTG 浓度诱导后的目的蛋白的表达水平基本相同。SDS-PAGE 分析结果表明用镍离子螯合层析柱成功纯化了目的蛋白,并纯化后目的蛋白的纯度达到 95%,而表达蛋白的 Western blotting 检测结果表明重组蛋白 CPM36 具有良好的抗原性。本实验所得到研究结果,为进一步开展 CPM36 蛋白免疫功能的研究奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Kawamoto E, Sawada T, Maruyama T. Prevalence and characterization of *Pasteurella multocida* in rabbits and their environment in Japan. *Jpn J Vet Sci*, 1990, **52**(5): 915-921.
- [2] Song DW, Zhao SY. Rabbits use of fowl cholera vaccine inoculation caused of the pathogenesis and death. *Guizhou J Anim Sci Vet Med*, 2007, **31**(6): 11.
宋德万, 赵仕洋. 家兔使用禽霍乱疫苗预防接种引起发病死亡的报道. 贵州畜牧兽医, 2007, **31**(6): 11.
- [3] Xu HJ, Liu JL, Hu WH, et al. Cross-protection factors of avian *Pasteurella multocida*. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2007, **43**(12): 73-74.
徐海军, 刘俊良, 胡万宏, 等. 禽多杀性巴氏杆菌交叉保护因子. 中国兽医杂志, 2007, **43**(12): 73-74.
- [4] Borrathybay E, Chao QF, Nazarbek U, et al. Study on adhesion of swine *Pasteurella multocida* strains to HeLa cells. *Chin J Vet Med*, 2005, **41**(4): 7-9.
恩特马克·布拉提白, 晁群芳, 吾鲁木汗·那孜尔别克, 等. 猪多杀性巴氏杆菌对 HeLa 细胞的附着能力. 中国兽医杂志, 2005, **41**(4): 7-9.
- [5] Cao SF, Huang QY. Studies on immune efficacy of recombinant subunit vaccine with mature outer membrane protein H against avian *Pasteurella multocida* C48-1. *Vet Sci China*, 2006, **36**(6): 464-467.
曹素芳, 黄青云. 禽多杀性巴氏杆菌 C48-1 成熟外膜蛋白 H 重组亚单位疫苗免疫效果的研究. 中国兽医科学, 2006, **26**(6): 464-467.
- [6] Gu HW, Lu CP. Evaluation of the immunization of iron-regulated outer membrane proteins (IROMPs) of leporid *Pasteurella multocida* in mice model. *Sci Agri Sini*, 2007, **40**(5): 1073-1078.
顾宏伟, 陆承平. 兔多杀性巴氏杆菌铁调节外膜蛋白的小鼠免疫效果分析. 中国农业科学, 2007, **40**(5): 1073-1078.
- [7] Heddleston KI, Gallagher JE, Rebers PA. Fowl cholera: gel diffusion precipitin test for serotyping *Pasteurella multocida* from avian species. *Avian Dis*, 1972, **16**(4): 925-936.
- [8] Rimler RB, Rebers PA, Rhoades KR. Modulation of cross-protection factor(s) of avian *Pasteurella multocida*.

- Avian Dis*, 1979, **23**(4): 989–998.
- [9] Rimler RB. Partial purification of cross-protection factor(s) from *Pasteurella multocida*. *Avian Dis*, 1994, **38**(4): 778–789.
- [10] Borrathybay E, Sawada T, Kataoka Y, *et al.* Capsule thickness and amounts of a 39 kD capsular protein of avian *Pasteurella multocida* type A strains correlate with their pathogenicity for chickens. *Vet Microbiol*, 2003a, **97**(3-4): 215–227.
- [11] Borrathybay E, Sawada T, Kataoka Y, *et al.* A 39 kD protein mediates adhesion of avian *Pasteurella multocida* to chicken embryo fibroblast cells. *Vet Microbiol*, 2003b, **97**(3-4): 229–243.
- [12] Ali HA, Sawada T, Hatakeyama H, *et al.* Characterization of a 39 kDa capsular protein of avian *Pasteurella multocida* using monoclonal antibodies. *Vet Microbiol*, 2004, **100**(1-2): 42–53.
- [13] Ali HA, Sawada T, Noda K. Protectivity of an immunoaffinity-purified 39 kD capsular protein of avian *Pasteurella multocida* in mice. *J Vet Med Sci*, 2004, **66**(12): 1603–1604.
- [14] Borrathybay E, Suzuki K, Sawada T, *et al.* Cloning, sequencing, expression of *cp39* gene encoding *Pasteurella multocida* capsular protein as an adherence factor. *Bull Nippon Vet Anim Sci Univ*, 2004, **53**(2): 89–91.
- [15] Ausubel FM, Brent R, Kingstom RE, *et al.* Short Protocols in Molecular Biology. Yan Zi-Ying and Wang Hai-Lin translation. Beijing: Sciences Press, 1998, 39–40. FM. 奥斯伯, R. 布伦特, RE. 金斯顿, 等. 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, 39–40.
- [16] Lo M, Boyce JD, Wilkie IW, *et al.* Characterization of two lipoproteins in *Pasteurella multocida*. *Microbes Infect*, 2004, **6**(1): 58–67.
- [17] Dubreuil JD, Gilbert L, Jacques M. Cell surface characteristics and virulence in mice of *Pasteurella multocida*. *Zentralbl Bakteriell*, 1992, **276**(3): 366–373.
- [18] Lübke A, Hartmann L, Schröder W, *et al.* Isolation and partial characterization of the major protein of the outer membrane of *Pasteurella haemolytica* and *Pasteurella multocida*. *Zentralbl Bakteriell*, 1994, **281**(1): 45–54.

科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

准噶尔荒漠生物结皮研究

张元明 王雪芹 著

978-7-03-021331-0 ¥ 68.00 2008年5月30日出版

本书以中国典型温带荒漠——准噶尔荒漠为研究区, 综合微生物学、孢子植物学、地貌学等不同学科领域, 将生物结皮作为有机的整体加以深入研究。全面掌握了准噶尔荒漠生物结皮物种组成特征以及沙丘尺度分布规律, 利用遥感技术绘制了生物结皮宏观分布格局图; 探明了荒漠地表生物结皮的胶结方式、形成机制及其演替规律; 分析了生物结皮对种子植物多样性的影响, 提示了生物结皮在荒漠生态系统稳定性中发挥的重要生态功能及其环境意义; 开展了生物结皮人工培养, 确定了主要物种的最适培养条件, 为沙漠化防治提供了新的技术途径。



新疆棉花养分资源综合管理

田长彦 冯固 主编

978-7-03-020085-3 ¥ 78.00 2008年5月30日出版

本书在系统介绍国内外有关养分资源管理的理念与新技术的基础上, 总结了新疆棉花养分资源综合管理研究的最新进展和适用于新疆棉区特点的棉田养分资源综合管理理论与实践。全书共五章, 包括棉花高产优质生长发育规律、棉田生态系统养分资源的平衡、高产栽培体系养分资源综合管理技术与实践等方面的内容。尤其对棉花高产栽培技术、氮素实时监控管理技术、模型与信息技术、节水节肥灌溉技术、棉花专用复合肥技术以及测土配方施肥技术在新疆棉花高产栽培体系中的研究和应用做了较为深入的探讨。全书内容丰富, 理念新颖, 是近年来有关新疆棉田养分资源综合管理最新研究结果的总结。

本书可作为大专院校、科研院所等农学、植物营养、土壤学等专业教学、科研人员和学生的参考用书。



中国海产双壳类图志

徐凤山 张素萍 编著

978-7-03-021339-6 ¥ 188.00 2008年5月22日出版

本书总论部分论及了双壳类的形态特征, 包括贝壳的外形和壳内面的各种肌痕和刻纹、中国海双壳类的区系特点、双壳类的分布和食性与营养、双壳类与人类的关系、双壳类的敌害。各论部分记述了 916 种双壳类 (分隶于 75 科 333 属), 共 136 个彩色图版。每个种给予了简明扼要的形态描述、中国产地、世界分布、生态环境、经济价值和同物异名。除附有清晰的外形照片外, 还有贝壳内面的照片。此外, 本书对涉及的各科、属的特征也作了必要的介绍。

