

猪流产衣原体 CP/12株 omp-1 基因的克隆与表达

杨琪¹ 何诚¹ 雷鸣¹ 杨利¹ 朱虹² 端青²

(1. 中国农业大学 动物医学院,北京 100094; 2. 军事医学科学院 微生物及流行病学研究所,北京 100077)

摘要 为观察重组 MOMP 蛋白的免疫活性,揭示 *omp-1* 基因(编码 MOMP 蛋白)在猪流产衣原体诊断和防治中的作用,用 PCR 法扩增猪流产衣原体 *omp-1* 基因,将特异性扩增片段克隆入 pMD18-T 载体,测序比较分析序列后确认为目的基因,与 GenBank 中 4 株流产衣原体 *omp-1* 基因和氨基酸序列的相似性均达 99%,与其他各型衣原体代表株的相似性为 71%~88%,氨基酸序列也有较大差异。将 *omp-1* 基因亚克隆到 pET-32a 表达载体上,再对重组表达载体转化 BL21(DE3)表达宿主菌,以 IPTG 诱导该重组菌,结果显示该重组菌表达了融合蛋白;用猪流产衣原体多克隆抗体对表达的重组 MOMP 蛋白进行 Western blot 试验,结果显示该重组 MOMP 蛋白具有结合特异性抗体的活性。

关键词 猪流产衣原体;主要外膜蛋白;克隆;表达

中图分类号 S 851.67

文章编号 1007-4333(2005)03-0056-04

文献标识码 A

Cloning and prokaryotic expression of *omp-1* of *Chlamydomphila abortus* CP/12 of swine

Yang Qi¹, He Cheng¹, Lei Ming¹, Yang Li¹, Zhu Hong², Duan Qing²

(1. College of Animal Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

2. Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100077, China)

Abstract In order to manifest the function of the *omp-1* in preventing and diagnose of swine (strain cp/12), we cloned and expressed the *omp-1* in Ecoli. The gene was amplified by PCR. The specific product was cloned into the pMD18-T Vector. After sequence analysis, it was confirmed to be the target gene. Compared with 4 strains of *Chlamydomphila abortus* in GenBank, the homologies of nucleotide sequences of *omp-1* and its putative protein sequence were 99%, but 71% - 88% similar with other typical strains of *Chlamydia psittaci*. The gene was subcloned into pET-32a vector. The recombinant vector was transformed into the host bacteria BL21 (DE3). Induced by IPTG, the bacteria with recombinant vector expressed 58 ku fusion proteins. Western-blot analysis showed that the protein could react specifically with *Chlamydomphila abortus* polyclonal antibody.

Key words swine *Chlamydomphila abortus*; MOMP; clone; expression

猪流产衣原体按照新的分类方法^[1],属于衣原体科,嗜衣原体属,嗜流产衣原体新种的成员,是比较常见的导致猪流产的病原体。40 ku 的主要外膜蛋白(Omp-1,又称 MOMP)是衣原体膜表面的主要蛋白,存在于衣原体生活周期的各个时期,占表面膜蛋白质总量的 60%,主要结构是 5 个保守区夹杂 4 个可变区(VD ~)^[2]。MOMP 蛋白上具有衣原体属、种、型和亚型的特异性抗原决定簇,并通过

MOMP 蛋白之间或 MOMP 蛋白与其他膜蛋白之间广泛的二硫键来使缺乏肽聚糖结构的衣原体形成一个整体,同时具备粘附宿主细胞,辅助衣原体侵染的功能,还是衣原体从宿主细胞摄取 ATP 等物质的离子信道^[3]。其保护性抗原的特点使 MOMP 成为衣原体外膜蛋白复合物(OMC)中的研究热点。目前国内外主要致力于探讨禽鸚热衣原体及羊流产衣原体 MOMP 蛋白的免疫功能,对猪流产衣原体的

收稿日期: 2005-01-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30370070);北京市自然科学基金资助项目(6052014)

作者简介: 杨琪,硕士研究生;何诚,副教授,通讯作者,主要从事基因工程疫苗研究,E-mail: hecheng@cau.edu.cn

omp-1 基因的特点及重组 MOMP 蛋白的免疫功能的研究还很少。通过克隆猪流产衣原体 CP/12 株的 *omp-1* 基因,比较分析其核苷酸及氨基酸序列的特点,初步探讨其表达产物的免疫学活性,为流产衣原体的诊断和基因工程亚单位疫苗的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料和试剂

1) 菌株。猪流产衣原体 CP/12 株,其感染的鸡胚卵黄囊膜由军事医学科学院提供,本实验室保存。加 PBS 缓冲液(pH7.4,含链霉素 2.5 mg/mL,新霉素 0.5 mg/mL),经研磨制成 20%(体积分数)的悬液,室温放置 2 h,卵黄囊接种 7 日龄 SPF 鸡胚,0.5 mL/枚,收获 3~8 d 死亡的鸡胚卵黄囊备用;大肠杆菌 DH5、BL21(DE3),由本室保存。

2) 试剂。Ex-Taq DNA 聚合酶(含反应用缓冲液、dNTP 混合液),pMD18-T Vector, EcoR、Sal、Pst 等限制性内切酶, T4 DNA 连接酶及 DNA Ladder 2000、15000 均购自 TaKaRa 宝生物工程(大连);异丙基硫代-D-半乳糖苷(IPTG)、蛋白酶 K 购自 Merck 公司;细菌 DNA 提取试剂盒购自北京天为时代科技有限公司;DNA 片段回收试剂盒、HRP 标记兔抗猪抗体(1 500~1 1000)购自北京鼎国生物技术发展中心;衣原体猪标准阳性、阴性血清购自湖北省农业科学院畜牧兽医研究所。

3) pET-32a 质粒。购自 Novagen 公司,本室保存。

1.2 方法

1) 引物的设计与合成。查阅 GenBank 上有关流产衣原体 *omp-1* 序列,设计引物如下:P1 5'-ATGAAA AAA CTC TTG AAA TCG G3'; P2 5'-TTA GAA TCT GA A TTGAGC ATT CAT-3'。引物均由北京奥科生物技术有限责任公司合成。

2) *omp-1* 基因的扩增。取感染鸡胚卵黄囊和正常鸡胚卵黄囊,加适量灭菌生理盐水充分研磨,取适量研磨液于 1.5 mL 离心管中,4 000 r/min 离心 10 min,取上清,再 15 000 r/min 离心 30 min,取沉淀,按细菌 DNA 提取试剂盒的操作步骤提取基因组;PCR 反应按常规方法进行。

3) *omp-1* 基因的克隆。用 DNA 片段回收试剂盒回收特异性扩增片段后,以连接试剂盒将其与 pMD18-T 载体连接,后转化大肠杆菌 DH5,鉴定为阳性者送上海博亚公司测序。测序结果通过

Blast 工具和 DNAMAN 软件进行序列比对分析。

4) *omp-1* 基因的亚克隆与诱导表达。根据测序结果重新设计引物如下 ep1: 5'-GGG GTA CCG GAA TTC CTG GTC CCG CGT TTG CCT GTA GGG AAC CCA GC-3', 5 端带有 Kpn 和 EcoR 酶切位点; ep2: 5'-TT CCG CGG CCG CTA TGG CCG ACG TCG ACG CGT TTA GAA TCT GAA TTG AGC-3', 5 端带有 Sal 酶切位点。用引物 ep1、ep2 按上述条件以带有目的片段的 pMD18-T 质粒为模板进行 PCR 反应,回收扩增产物。将回收产物和 pET-32a 载体分别用 EcoR、Sal 进行双酶切反应,回收酶切产物后用连接试剂盒将二次扩增产物与表达载体连接,转化大肠杆菌 BL21(DE3),筛出阳性克隆后测序。将鉴定正确的重组菌摇菌生长至对数中期后,加 IPTG 至终浓度 1.0 mmol/L,37℃ 诱导 3 h 后,取 1 mL 菌液进行 SDS-PAGE,同时设空菌、空质粒对照,染色、脱色。

5) 重组融合蛋白的免疫学活性测定。重新进行 SDS-PAGE,同时设空菌、空质粒对照,切下凝胶的 Maker 道,考马斯亮蓝染色,脱色;其余按凝胶面积以相应恒定电流将蛋白质转移到聚偏氟乙烯(PVDF)膜上,以 Washing Buffer(TBS, 0.05% Tween-20)清洗膜 3 次后,用 Blocking Buffer(TBS, 5% BSA)封闭 30 min;用以 Blocking Buffer 1 500 稀释的猪衣原体标准阳性血清 4℃ 孵育过夜,洗膜 3 次后用同样 1 500 稀释的 HRP 标记兔抗猪二抗室温孵育 2 h,清洗后加入显色液(18 mL Tris-HCl pH7.6, 12 mg 二氨基联苯胺 DAB, 2 mL 0.3%(质量分数) NiCl₂·20 μL H₂O₂) 中显色,待出现带后立即用去离子水终止显色,合并 Maker 道,观察结果,拍照。

2 结果

2.1 *omp-1* 基因的扩增

根据 GenBank 中报道的序列,设计了引物 P1/P2,进行 PCR 扩增,经琼脂糖凝胶电泳后扩增出约 1 100 bp 的特异性片段,与 GenBank 中收录的序列大小基本一致。

2.2 *omp-1* 基因的克隆

通过菌落 PCR 和双酶切鉴定后,确定目的片段已克隆入 pMD18-T 载体;测序后在 GenBank 中通过 Blast 工具比对后确定为流产衣原体 *omp-1* 基因,用 DNAMAN 软件分析其与其它 GenBank 中收

录衣原体代表株的核苷酸序列相似性,其氨基酸序列的相似性比较结果如图1所示。

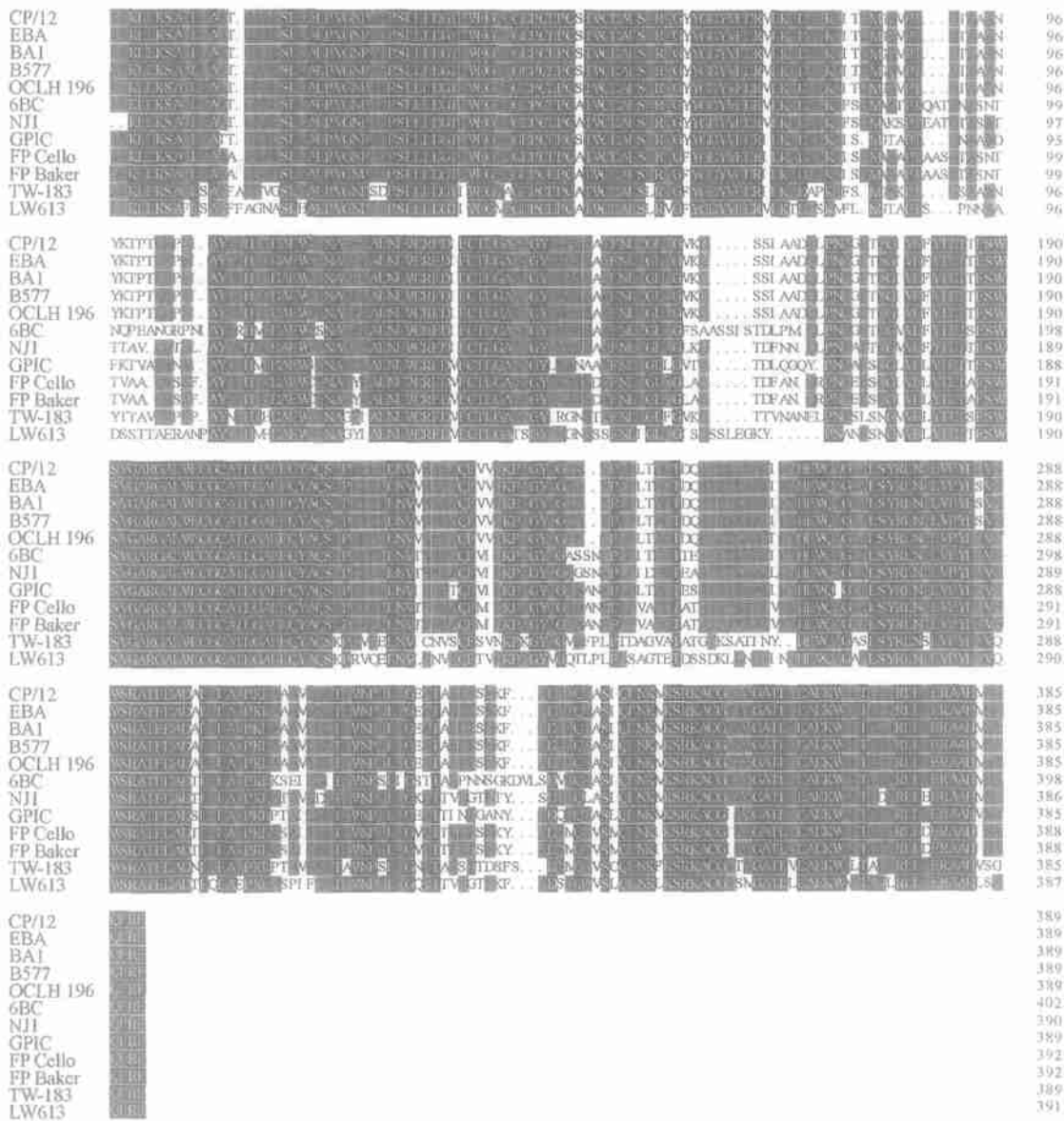


图1 不同衣原体代表株的 MOMP 氨基酸序列相似性比较

Fig.1 Protein sequences alignment of MOMP from different strains

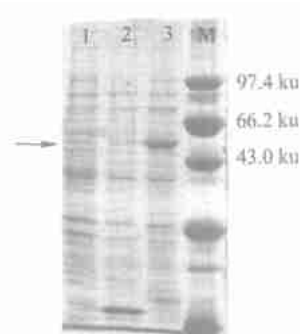
2.3 目的基因的亚克隆与诱导表达

以引物 ep1、ep2 扩增了编码成熟肽的 omp-1 核心区域,与表达载体连接后的双酶切鉴定正确,测序后确认目的基因与表达载体已正确连接。诱导表达后进行 SDS-PAGE,高效表达了融合蛋白,大小约为 58 kD,与预期的 58.08 kD 基本一致,结果见图 2。

2.4 重组融合蛋白的免疫学活性测定

以重组融合蛋白做免疫印迹实验,可见非常特异性的条带,大小与 SDS-PAGE 的结果相同,表明所表达的重组融合蛋白具有结合流产衣原体特异性

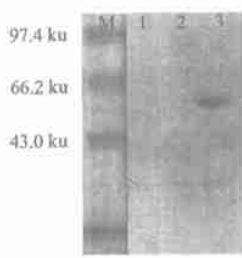
多克隆抗体的特性。



M 为低分子质量蛋白质 Marker;1 为 BL21 (DE3) 空菌对照;2 为 pET-32a 空质粒转化诱导对照;3 为重组质粒转化诱导

图2 诱导表达后的 SDS-PAGE 结果

Fig.2 SDS-PAGE analysis of the strain with recombinant plasmid after inducing



M 为低分子质量蛋白质 Marker; 1 为空菌对照; 2 为空质粒转化对照; 3 为重组菌

图 3 重组蛋白的 Western-blot 分析

Fig. 3 Western-blot analysis of recombinant proteins

3 讨 论

3.1 流产衣原体 *omp1* 核苷酸与氨基酸序列分析

根据文献报道^[5], *omp1* 基因是衣原体中高度保守的序列。从 BLAST 序列比对的结果来看, 本毒株的 *omp1* 基因序列与 GenBank 中收录的流产衣原体 OCLH 196 株、BA1 株(牛)、B577 株(羊)、EBA 株(牛)等都有很高的同源性, 均达到 99% 以上, 这与邱昌庆等^[6]报道的基本一致, 只在核苷酸序列第 856 位由 A 突变为 G, 由此而导致相应位点的氨基酸由 Ser 变为 Glu。这说明流产衣原体的 *omp1* 基因是适合其疫苗研究的位点。

与其他嗜性衣原体属的成员如嗜鸚鵡热衣原体(6BC, NJ1)、嗜豚鼠衣原体(GPIC)、嗜猫衣原体(FP Cello, FP Baker)、嗜肺炎衣原体(TW-183)及嗜家畜衣原体(LW613)的代表毒株的核苷酸相似性分别为 84%~88%、82%、82%、72% 和 72%, 其主要差别集中于 4 个 VD 编码区, 证实了衣原体的 MOMP 中存在属、种特异性抗原。同禽源性毒株氨基酸序列比较发现, 流产衣原体各株在 VD ~ 均发生不同程度的缺失, 这可能提示由此而引起宿主特异性的改变。上述各株流产衣原体之间的 VD 区虽然相同, 但其血清型是否一致有待进一步探讨。本实验提示利用流产衣原体主要外膜蛋白作为抗原来抵抗其他嗜性衣原体的效果如何, 尚需进一步探讨。

目前鉴定衣原体的方法是通过 PCR 扩增衣原体 16S 和 23S 核糖体的特征序列, 再到 GenBank 中去查对比较, 可确定所属^[7]。而鸚鵡热衣原体的分型方法是通过单克隆抗体或 *omp1* 的 RFLPs 分析^[3,8]。图 2、3 及上述分析可知, 嗜性衣原体属各复合群、种间的 *omp1* VD 序列差异较大, 而在群、种内非常保守, 支持了目前的新分类及分型方法。

3.2 重组蛋白的表达与免疫学活性

本实验中, pET-32a 载体高效表达了融合蛋白, 证明 T7 启动子是一个非常有效的启动子, 能够在大肠杆菌中高效表达外源蛋白。表达量及裂解菌体

后的 SDS-PAGE 结果显示其表达产物主要是以包涵体的形式存在, 原因可能为 IPTG 的含量过高, 诱导的温度过高, 或诱导的时间较长等, 在本实验中所用的 IPTG 的含量、诱导温度及诱导时间均为初始条件, 后续的工作将在诱导条件上做优化处理, 同时进行包涵体复性条件的摸索, 以期能够获得尽可能多可溶性蛋白。

表达的重组蛋白具有结合流产衣原体特异性多克隆抗体的能力, 表明其具有某些流产衣原体特异性线性抗原表位。该重组蛋白用于流产衣原体诊断的价值及作为亚单位疫苗能否诱导有效的免疫保护问题有待进一步研究。同时分别以可溶性蛋白与包涵体的形式用于诊断和疫苗的效果评价也值得探讨。

参 考 文 献

- [1] Everett Karin D E, Bush Robin M, Anderson Arthur A. Emended description of the order chlamydiales, Proposal of parachlamydiaceae fam, nov and Simkaniaceae fam. nov, each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family chlamydiaceae, including a new genus and five new species and standards for the identification of Organisms[J]. Int J Syst Bacteriol, 1999, 49 (2): 415-440
- [2] Igietseme J U, Black C M, Caldwell H D, et al. Chlamydia Vaccines: Strategies and Status [J]. Bio-Drugs, 2002, 16: 19-35
- [3] Igietseme J U, Eko F O, Black C M. Contemporary approaches to designing and evaluating vaccines against Chlamydia[J]. Vaccines, 2003, 2(1): 129-146
- [4] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南 [M]. 第 3 版. 黄培堂等译. 北京: 科学出版社, 2002. 1123-1126
- [5] 刘向伟, 端青, 张浩杰, 等. 鸚鵡热衣原体主要外膜蛋白基因序列的扩增、克隆和原核表达 [J]. 微生物学免疫学进展, 2002, 30(2): 32-34
- [6] 邱昌庆, 周继章, 谷玉辉. 猪源鸚鵡热衣原体外膜主蛋白编码基因的克隆和序列测定 [J]. 中国兽医科技, 2002, 32(6): 10-14
- [7] 于恩庶, 李子华, 焦新安, 等. 新发现和再肆虐的传染病续编 [M]. 香港: 亚洲医药出版社, 2000. 169-170
- [8] Sayada C, Andersen A A, Storey C, et al. Usefulness of *omp1* restriction mapping for avian Chlamydia psittaci isolate differentiation [J]. Res Microbiol, 1995, 146: 155-165