

鼠疫杆菌 YscF 抗原基因在大肠杆菌中的表达及鉴定

崔 萍^{1,2,3}, 于三科¹, 罗德炎², 王希良²

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100; 2 军事医学科学院 微生物流行病学研究所, 北京 100071;

3 临沂师范学院, 山东 临沂 276000)

[摘 要] 为了克隆表达鼠疫耶尔森氏菌的 YscF 抗原基因, 并对其免疫原性进行初步研究, 将 PCR 扩增的 YscF 基因连接到 pMD-18T 载体, 测序正确后再将 YscF 基因连接到表达载体 PET32a, 构建 PET32a-YscF 重组质粒, 并在大肠杆菌 BL21(DE3) 中诱导表达; 诱导表达蛋白采用 Ni²⁺ 亲和层析法纯化, Western blot 检测其免疫原性。结果显示, 28 ku 的 PET32a-YscF 融合蛋白能被抗鼠疫的多抗识别, 说明表达产物具有良好的抗鼠疫抗原特异性。

[关键词] 鼠疫耶尔森氏菌; YscF 抗原; 克隆表达

[中图分类号] Q786

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)11-0019-05

Expression and identification of YscF antigen gene of *Yersinia pestis* in *E. coli*

CUI Ping^{1,2,3}, YU San-ke¹, LUO De-yan², WANG Xi-liang²

(1 College of Animal Sciences and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Science, Beijing 100071, China;

3 Linyi Normal University, Linyi, Shandong 276000, China)

Abstract: YscF gene of *Yersinia pestis* was cloned and expressed, and preliminary study on immunogenicity of recombinant protein YscF was carried out. YscF gene was inserted into pMD-18T vector after sequence correction, and recombinant expression plasmid PET32a-YscF was constructed by inserting YscF into PET32a and induced with IPTG; the target protein was purified by Ni²⁺ affinity chromatography; immunogenicity was detected by Western blot. The results indicated that the 28 ku expressed protein could be recognized by *Yersinia pestis* positive serum as expected. It's proved that recombinant YscF is a possible alternative or adjunct protective vaccine antigen against plague. So YscF is an important protective antigen of *Y. pestis*.

key words: *Yersinia pestis*; YscF antigen; cloning expression

鼠疫耶尔森氏菌(*Yersinia pestis*)也称鼠疫杆菌,是引起鼠疫的病原菌,由于鼠疫的高致病性以及作为生物武器的潜能,已引起世界各国对鼠疫的高度警惕。恐怖袭击常采用气溶胶感染,可直接引起原发性肺鼠疫流行,因而更需要研究安全有效的鼠疫疫苗^[1]。研究发现,鼠疫杆菌中的主要抗原成分或毒力因子有荚膜抗原(F1)、低钙反应蛋白(Lcr,

包括 LcrG、LcrV、LcrH 等)、耶尔森氏菌外膜蛋白(Yops)、色素沉着(Pgm)和鼠疫菌素 1(Pst 1)等^[2-3]。其中 F1 和 LcrV 具有较高的免疫原性,但是这些亚单位后选疫苗也存在缺陷,如 F1 抗原并不是所有致病性鼠疫杆菌都有的, LcrV 抗原有免疫抑制作用^[4-5]。

Y. pestis 通过接触依赖的 III 型分泌系统

†收稿日期] 2006-10-12

[作者简介] 崔 萍(1979-),女,陕西渭南人,助教,在读硕士,主要从事基因工程疫苗研究。

[通讯作者] 于三科(1957-),男,陕西扶风人,教授,主要从事动物疫病防控研究。

(TTSS)运输毒力因子进入宿主细胞,其中 Yop 分泌蛋白(YscF)聚合形成 2 nm 的管道连接细菌和哺乳动物细胞,它是鼠疫杆菌表面表达的一种蛋白,也是一种毒力因子^[6]。本研究应用基因重组技术等,诱导表达、纯化 YscF,测定其抗原特异性等,以期为研制开发新一代基因工程鼠疫疫苗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 限制性内切酶 *Bam*H、*Hind*Ⅲ, T4 DNA 连接酶和 *Taq* DNA 聚合酶,均为 TaKaRa 公司产品;DNA 凝胶回收试剂盒,购自上海华舜公司;质粒 DNA 小提试剂盒,为 Promega 公司产品;DAB 显色剂,购自欣经科生物制品公司;羊抗兔的酶标二抗,购自博大泰克生物制品公司;兔抗鼠的多抗,由军事医学科学院免疫学实验室制备;羊抗鼠的二抗,购自 Sigma 公司。

1.1.2 菌种及质粒 *E. coli* DE3、*E. coli* DH5 α 均购自 Tiangen 公司;pMD18-T 载体,为 TaKaRa 公司产品;PET32a,为军事医学科学院免疫学实验室保存;鼠疫 EV76 株全菌体 DNA 模板,为军事医学科学院免疫学实验室保存;鼠疫诊断血清,为兰州生物制品研究所产品。

1.2 鼠疫杆菌 YscF 抗原基因的 PCR 扩增

1.2.1 引物的设计与合成 利用 Primer 5.0 引物分析软件,根据鼠疫杆菌 EV76 株全基因序列中 YscF 的编码序列设计 1 对引物 P1 和 P2。

P1: 5'-CGG GGA TCC ATGA GTA ACTTC TCTGGA TTT-3';

P2: 5'-CCG AAGCTT TGGGA ACTTCTG-TAGGA TGCC-3'。

酶切位点分别为 *Bam*H 和 *Hind*Ⅲ,由 Invitrogen 基因技术有限公司合成。

1.2.2 PCR 扩增 以 EV76 鼠疫杆菌全菌体 DNA 为模板,用特异性引物 P1/P2 进行扩增。PCR 反应体系为 25 μ L,其中全菌体 DNA 2 μ L,10 $\times$ PCR 缓冲液 2.5 μ L,dNTP 2 μ L,引物 P1/P2 各 1 μ L,超纯水 16.25 μ L,*Taq* DNA 聚合酶 0.25 μ L。PCR 反应条件:95 预变性 5 min;94 1 min,55 30 s,72 45 s,30 个循环;最后 72 延伸 7 min。

1.3 重组质粒 PET32a-YscF 的构建及鉴定

1.3.1 PCR 产物回收与纯化 将鼠疫杆菌 YscF 抗原基因 PCR 扩增产物,经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳后,用 DNA 凝胶回收试剂盒回收纯化,操作按试

剂盒说明书进行。

1.3.2 重组质粒 pMD18-T/YscF 的构建 在 T4 DNA 连接酶的作用下,将鼠疫杆菌 YscF 抗原基因 PCR 回收产物与 pMD18-T 载体连接,氯化钙法转化 *E. coli* DH5 α ,经氨苄青霉素抗性和 β -半乳糖苷酶系统挑选阳性克隆,用菌落 PCR 的方法以及限制性内切酶 *Bam*H 和 *Hind*Ⅲ 双酶切鉴定 YscF 抗原编码基因的正确性,同时送 Invitrogen 基因技术有限公司测序。

1.3.3 重组质粒 PET32a-YscF 的构建 用质粒 DNA 小提试剂盒提取 pMD18-T/YscF 的阳性克隆,*Bam*H 和 *Hind*Ⅲ 双酶切回收,在 T4 DNA 连接酶的作用下将双酶切回收产物连接至 PET32a 载体上,氯化钙法转化 *E. coli* DE3,用抗生素平板筛选阳性克隆。

1.3.4 重组质粒 PET32a-YscF 的鉴定 以质粒提取试剂盒提取阳性质粒,菌落 PCR 扩增目的基因,以 *Bam*H 和 *Hind*Ⅲ 双酶切质粒,琼脂糖凝胶电泳观察结果。同时送 Invitrogen 基因技术有限公司测序。

1.4 PET32a-YscF 的诱导表达及表达产物的检测

1.4.1 重组质粒 PET32a-YscF 的诱导和表达 将含重组质粒 PET32a-YscF 的 *E. coli* DE3 阳性克隆,接种于含氨苄青霉素的 LB 培养基上,在 37 培养过夜,然后按体积比 1:100 接种于同一培养基,培养 3~4 h 至 OD₆₀₀ = 0.6~0.8,加入 IPTG 溶液至终浓度为 1 mmol/mL,37 继续培养 4 h,得重组菌 BL21-YscF。

1.4.2 表达产物的 SDS-PAGE 及 Western blot 检测 IPTG 诱导表达的培养物,加入 4 $\times$ SDS-PAGE 样品处理液,100 变性 5 min,进行 SDS-PAGE 电泳。样品经 SDS-PAGE,并转至硝酸纤维素膜上,15 g/L 酪蛋白封闭过夜,1:50 兔抗鼠的多抗及 1:800 羊抗鼠的二抗逐级标记,加入 DAB(对氨基联苯胺)显色,按常规法进行 Western blot 分析。

1.4.3 表达产物的初步纯化 诱导表达目的蛋白的菌体 4 离心,取上清,加 TE 缓冲液,冰浴条件下超声裂解菌体,8 000 r/min 离心 40 min,取上清用 0.44 nm 的滤器过滤,以镍离子亲和柱纯化。上样缓冲液为 0.02 mol/L 磷酸盐缓冲液、0.5 mol/L NaCl(pH 7.4),洗脱液为上样缓冲液中补加咪唑至 0.5 mol/L (pH 7.4),上样前样品及柱子均以上样缓冲液平衡,样品以 0.45 μ m 滤膜过滤,收集 300 nm 咪唑峰。

2 结果与分析

2.1 鼠疫杆菌 YscF 抗原基因的 PCR 扩增结果

鼠疫杆菌 YscF 抗原基因 PCR 扩增后,经 10

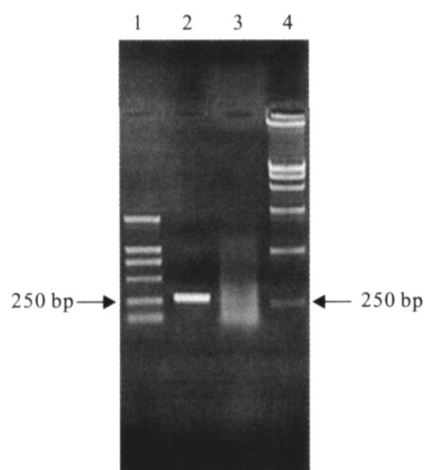


图 1 鼠疫杆菌 YscF 抗原基因的 PCR 扩增产物电泳图

1. DNA 标准 DL 2 000; 2. YscF PCR 扩增产物;
3. 阴性对照; 4. DNA 标准 DL 15 000

Fig. 1 Agarose gelelectrophoresis of product of YscF gene PCR amplification

1. DNA Marker DL 2 000; 2. PCR product of YscF;
3. Negative control; 4. DNA Marker DL 15 000

2.2 重组质粒 pMD18- T/ YscF 的测序及双酶切鉴定结果

重组质粒 pMD18- T/ YscF 测序结果显示, YscF 抗原基因序列与通过 GenBank 检索到的 YscF 抗原基因序列完全相同。BamH 和 Hind 双酶切鉴定可见 1 条 pMD18- T 的载体片段和 261 bp 的目的片段,均与预期结果相同(图 2)。

2.3 重组质粒 PET32a- YscF 的鉴定

含有 YscF 抗原基因序列的重组质粒 PET32a- YscF 的测序结果显示 YscF 抗原基因正确,经 BamH 和 Hind 双酶切,可见 1 条 PET32a 载体片段和 261 bp 的目的片段,都与预期结果相同(图 3)。

2.4 重组质粒 PET32a- YscF 的表达及鉴定

将表达 YscF 抗原的大肠杆菌 DE3 阳性克隆接种于含氨苄青霉素的 LB 培养基上, IPTG 诱导后,表达产物进行 SDS- PAGE 分析,结果表明,经 IPTG 诱导的重组菌(PET32a- YscF)因为在 C 端融合了 6 个组氨酸(HT- YscF),所以于相对分子量约 28 ku 处可见一明显表达的融合蛋白带,与预期的蛋白分子量大小相符(图 4)。

g/L 琼脂糖凝胶电泳分析,结果(图 1)显示,在 261 bp 处有一条特异的扩增条带,片段长度与预期值一致,说明成功地克隆了 YscF 抗原基因。

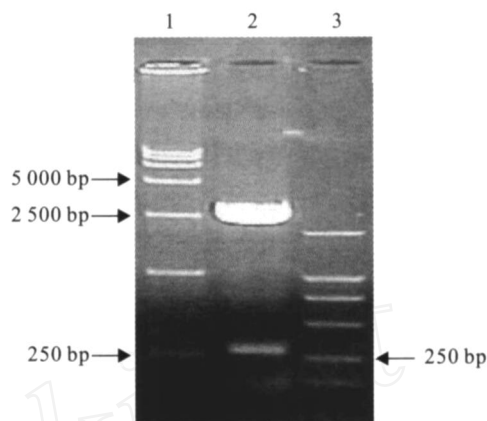


图 2 重组质粒 pMD18- T/ YscF 的双酶切电泳图

1. DNA 标准 DL 15 000; 2. pMD18- T/ YscF 经 BamH 和 Hind 双酶切; 3. DNA 标准 DL 2 000

Fig. 2 Endo-digests of plasmid pMD18- T/ YscF

1. DNA Marker DL 15 000; 2. Plasmid pMD18- T/ YscF digested with BamH and Hind ;
3. DNA Marker DL 2 000

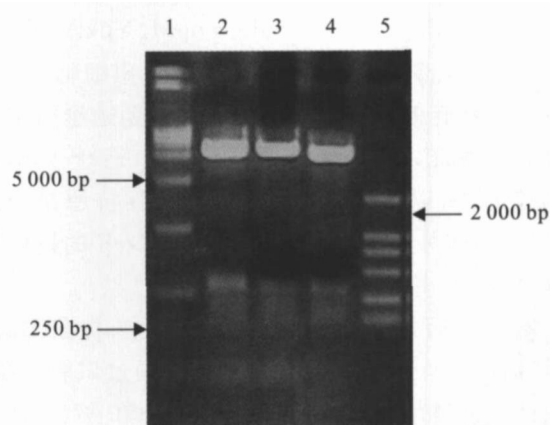


图 3 重组质粒 PET32a- YscF 的双酶切电泳图

1. DNA 标准 DL 15 000; 2 ~ 4. PET32a- YscF 经 BamH 和 Hind 双酶切; 5. DNA 标准 DL 2 000

Fig. 3 Endo-digests of PET32a- YscF

1. DNA Marker DL 15 000; 2 - 4. Plasmid PET32a- YscF digested with BamH and Hind ; 5. DNA Marker DL 2 000

2.5 重组质粒 PET32a- YscF 的 Western blot 鉴定

经 Western blot 检测显示,在分子量约 28 ku 附近出现的蛋白能够被兔抗鼠的多抗所识别,说明表达产物具有良好的抗鼠疫抗原特异性(图 5)。

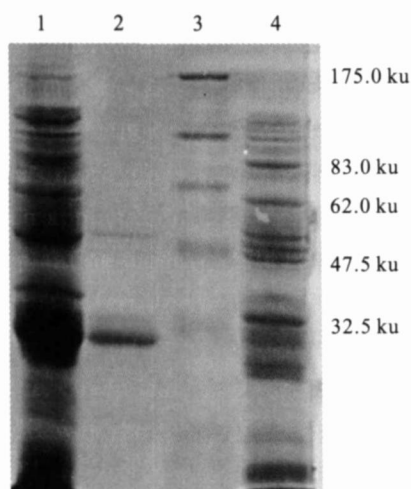


图 4 SDS-PAGE 分析 YscF 融合蛋白的表达

1. YscF 融合蛋白;2. 纯化后的 YscF 融合蛋白;
3. 低分子量蛋白标准;4. 空白对照

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of YscF fusion protein expression

1. YscF fusion protein;2. Purified YscF fusion protein;
3. Protein molecular weight Marker;4. Blank control

3 讨 论

鼠疫耶尔森氏菌通过型分泌系统运输毒力因子至宿主细胞,型分泌系统基因位于 70 kb 的 pCD1 质粒。它由 29 种蛋白装备形成注射器样大分子结构,运输 Yop H、Yop E、Yop M、YpkA、Yop K 和 YopJ 等至少 6 种 Yop 效应器进入靶细胞。Yop 效应器能够有效地保护鼠疫耶尔森氏菌逃避宿主的免疫监视系统,而 Yop 传送系统是受 YscF 分泌蛋白调控的,所以 YscF 多肽作为保护性抗原是合理的^[7-9]。菌体外面暴露的 YscF 被抗 YscF 的抗体所识别,能够阻止其他毒力因子的释放^[10-13]。

本研究通过基因重组技术,在大肠杆菌 BL21 中成功地表达了 YscF 抗原基因,且通过试验证明,重组菌在液体培养时,重组 YscF 抗原在 37℃ 诱导表达效果最好。此外,BL21 重组菌菌体裂解物 SDS-PAGE 电泳表明,重组 YscF 抗原主要存在于上清,所以是可溶性表达,避免了以包涵体形式存在的蛋白复性过程中暴露于有机溶剂,使蛋白免疫原性遭到破坏的问题,有利于 YscF 抗原的提取及纯化。由于重组质粒 PET32a⁺-YscF 在 BL21 中所表达的目的蛋白融合了 6 个组氨酸,为选用 Ni²⁺亲和层析方法纯化重组 YscF 抗原奠定了基础。同时 Western blot 结果也表明,重组 YscF 抗原与鼠疫菌阳性血清结合,具有天然 YscF 抗原的活性。

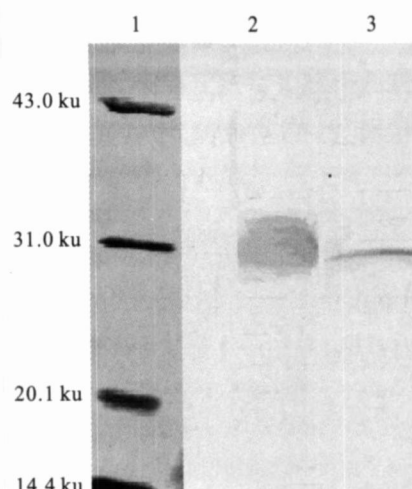


图 5 重组菌(BL21-YscF)的表达蛋白免疫印迹

1. 低分子量蛋白标准;2. YscF 融合蛋白;
3. 纯化后的 YscF 融合蛋白

Fig. 5 Western blotting of expressed protein from BL21-YscF

1. Protein molecular weight Marker;
2. YscF fusion protein;3. Purified YscF fusion protein

目前,鼠疫亚单位疫苗的研究主要集中在 F1 抗原和 V 抗原,而且 F1 抗原和 V 抗原的组合应用具有增加的保护效果。F1 抗原与 V 抗原诱导保护性免疫应答的最佳摩尔比为 2:1。由单独的抗原因子合并组成的亚单位疫苗(F1+V),其免疫效力优于在基因基础上二者融合的疫苗(F1-V)^[14]。所以推测,由包括 F1 抗原和 V 抗原在内的许多抗原组成的混合苗可能会被证明有协同作用,具有更好的免疫保护效果^[15]。下一步可将 3 种保护性抗原融合表达形成的三价亚单位候选苗和 3 种抗原合并组成的混合苗共同免疫动物,比较其免疫保护力。本试验为鼠疫疫苗的进一步开发奠定了基础。

【参考文献】

- [1] 刘斌,郑文岭,邓海,等.鼠疫耶尔森氏菌 F1 抗原在酿酒酵母中的表达及鉴定[J].细胞与分子免疫学杂志,2005,21(4):425-431.
- [2] 王革,王秉翔.重组鼠疫菌 F1 抗原在大肠杆菌中的表达及免疫原性分析[J].微生物学免疫学进展,2005,33(3):25-29.
- [3] 黄顺军,王希良,李名扬,等.鼠疫 F1-V 融合蛋白在大肠杆菌中的高效表达及鉴定[J].免疫学杂志,2004,20(3):152-155.
- [4] 傅林锋,戴瑞霞,应莲芳,等.重组鼠疫菌 V 抗原的纯化及其豚鼠免疫保护力初探[J].微生物学免疫学进展,2004,32(3):16-19.
- [5] 李蓓.鼠疫耶尔森氏菌 LcrV(V 抗原)的研究进展[J].微生物学免疫学进展,2004,32(2):35-38.
- [6] 汪家政,范明.蛋白质技术手册[M].北京:科学出版社,

- 2000:1-77.
- [7] Wieslaw S,Bradford S P,Jeremy G. *Yersinia pestis* Yop secretion protein F:Purification and protective efficacy against bubonic plague[J]. Protein Expression and Purification,2005,42:166-172.
- [8] Haim G,Sara C,Tamar B,et al. Effective protective immunity to *Yersinia pestis* infection conferred by DNA vaccine coding for derivatives of the F1 capsular antigen[J]. Infect Immun,2003,71:374-383.
- [9] Jyls M,Kelly A D,David S B,et al. Immunization of mice with YscF provides protection from *Yersinia pestis* infections[J]. BMC Microbiol,2005,38(5):1-10.
- [10] Taff J,Jeffrey J A,Sony L C,et al. Intranasal protollinTM/F1-V vaccine elicits respiratory and serum antibody responses and protects mice against lethal aerosolized plague infection[J]. Vaccine,2005,38(5):1-10.
- [11] Heath D G,Anderson G W,Mauro J M,et al. Protection against experimental bubonic and pneumonic plague by a recombinant capsular F1-V antigen fusion protein vaccine[J]. Vaccine,1998,16(11-12):1131-1137.
- [12] Straley S C,Skrzypek E,Plano G V. Yops of *Yersinia* spp. pathogenic for humans[J]. Infect Immun,1993,61:3105-3110.
- [13] Blocker A,Jouihri N,Larquet E,et al. Structure and composition of the *Shigella flexneri* "needle complex",a part of its type III secretion[J]. Mol Microbiol,2001,39(3):652-663.
- [14] Philipovski A V,Cowan C,Wulff-Strobel C R,et al. Antibody against V antigen prevents Yop-dependent growth of *Yersinia pestis*[J]. Infect Immun,2005,73:1532-1542.
- [15] Titball R W,Williamson E D. *Yersinia pestis* (plague) vaccines[J]. Expert Opin Biol Ther,2004,4(6):965-973.

(上接第 18 页)

- [19] Varshney R K,Thiel T,Stein N,et al. In silico analysis on frequency and distribution of microsatellites in ESTs of some cereal species[J]. Cellular & Molecular Biology Letters,2002,7:537-546.
- [20] Yue G H,Orban L. Microsatellites from genes show polymorphism in two related *Oreochromis species*[J]. Molecular Ecology notes,2002,2:99-100.
- [21] Rohrer G A,Fahrenkrug S C,Nonneman D,et al. Mapping microsatellite markers Identified in porcine EST sequences[J]. Animal Genetics,2002,33:372-376.
- [22] Yue G H,Ho M Y,Orban L,et al. Microsatellites within genes and ESTs of common carp and their applicability in silver crucian carp[J]. Aquaculture,2004,234:85-98.
- [23] Tóth G,Gáspár Z,Jurka J. Microsatellites in different eukaryotic genomes:survey and analysis[J]. Genome Research,2000,10:1967-1981.
- [24] Wierdl M,Dominska M,Petes T D. Microsatellite instability in yeast:dependence on the length of the microsatellite[J]. Genetics,1997,146:769-779.
- [25] Morgante M,Hanafey M,Powell W. Microsatellites are differentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes[J]. Nature Genetics,2002,30:194-200.
- [26] Li Y C,Korol A B,Fahima T,et al. Microsatellites within genes:structure,function,and evolution[J]. Mol Biol Evol,2004,21(6):991-1007.