

猪传染性胸膜肺炎放线杆菌 *flic* 基因的 克隆表达及生物信息学分析

李任峰¹, 田香勤², 何启盖³, 王自良¹, 赵 坤¹, 李学斌¹, 王三虎¹

(1 河南科技学院 动物科学学院, 河南 新乡 453003; 2 新乡医学院 医学研究中心, 河南 新乡 453003;

3 华中农业大学 动物医学院 农业微生物学国家重点实验室动物病原分室, 湖北 武汉 430070)

【摘 要】 【目的】构建猪传染性胸膜肺炎放线杆菌(*Actionobacillus pleuropneumoniae*, App)鞭毛蛋白(*flic*)编码基因的重组表达质粒, 对其编码蛋白进行生物信息学分析, 并将其在原核细胞中进行表达。【方法】利用 PCR 方法扩增 *flic* 基因片段, 将其克隆至 pMD-18T 载体后测序, 利用生物信息学软件对其编码蛋白的二级结构及跨膜区进行预测。构建重组表达质粒 pGEX-*flic*, 转化大肠杆菌工程菌 BL₂₁, 经 IPTG 诱导表达后, 通过 SDS-PAGE 及 Western-blot 对表达蛋白进行鉴定。【结果】获得的目的基因片段长度为 528 bp, 测序表明其序列与 GenBank 公布的一致; 软件预测结果显示, 该蛋白具有多个明显的二级结构成分及跨膜区; SDS-PAGE 检测表明, 在约 50 ku 处有一特异性条带; Western-blot 检测表明, 表达蛋白具有良好的抗原活性。【结论】成功获得了 App 的 *flic* 基因, 其编码的蛋白质具有较多的 α 螺旋区和无规则卷曲区域, 表达的鞭毛蛋白具有生物学活性。

【关键词】猪传染性胸膜肺炎放线杆菌; *flic* 基因; 鞭毛蛋白; 生物信息学

【中图分类号】S828.286.3; S852.61⁺9 【文献标识码】A 【文章编号】1671-9387(2009)10-0025-06

Cloning expression and bioinformation analysis of *flic* gene of *Actionobacillus pleuropneumoniae*

LI Ren-feng¹, TIAN Xiang-qin², HE Qi-gai³, WANG Zi-liang¹,
ZHAO Kun¹, LI Xue-Bin¹, WANG San-hu¹

(1 Veterinary Medicine College, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang, Henan 453003, China;

2 Morphology laboratory, Xinxiang Medical College, Xinxiang, Hnan 453003, China;

3 Division of Animal Infectious Disease, National Key Laboratory of Agricultural Microbiology,
Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China)

Abstract: 【Objective】The study cloned the *flic* gene of App and performed sequencing and analysis of biological information. 【Method】Polymerase chain reaction PCR was used to amplify the *flic* gene from. The secondary structure and membrane-spanning regions of *flic* protein was predicted by biosoftware. Then the *flic* gene was cloned into the *E. coli* expression vector pGEX-KG, which was induced with IPTG and the fusion protein was analyzed by SDS-PAGE and Western-blot. 【Result】The 528 bp fragment of *flic* gene was successfully cloned into vector, the pGEX-*flic* recombinant plasmid was expressed and induced by IPTG and Western-blot method showed good antigenicity of the recombinant protein, and there were flexible regions such as coil region and turn region in *flic* protein. 【Conclusion】A confirmed *flic* gene has been obtained and analyzed, providing a good foundation for research on motility and ontogenesis of App furtherly.

* [收稿日期] 2009-02-18

[基金项目] 河南省科技厅科技攻关项目(0524040001)

[作者简介] 李任峰(1978—), 男, 河南驻马店人, 讲师, 主要从事动物分子病原学研究。E-mail: lirenfeng@sina.com

[通信作者] 王三虎(1962—), 男, 河南焦作人, 教授, 硕士生导师, 主要从事动物分子病原学研究。

Key words: *Actionobacillus pleuropneumoniae*; *flic* gene; flagellin; bio-informatics

猪传染性胸膜肺炎是由胸膜肺炎放线杆菌(*Actionobacillus pleuropneumoniae*, App)引起的一种严重猪呼吸系统接触性传染病,该病以急性出血性纤维素性胸膜肺炎和慢性纤维素性坏死性胸膜肺炎为特征^[1],广泛存在于世界所有养猪国家。近年来,该病的临床发病猪群有明显增多趋势,给世界养猪业带来了严重危害。

App 分为 2 个生物型,其中生物 I 型为“脲酶”阴性菌,而从猪体内分离到的通常为生物 II 型^[2]。目前,对于该菌致病性的研究,主要集中在 APX I、APX II、APX III 3 种毒素及其荚膜多糖、脂多糖(LPS)的抗原性等方面^[3],而对其运动性和侵染细胞机制的研究报道较少。鞭毛是大多数革兰氏阴性杆菌所具有的运动器官,在细菌的致病性方面发挥着重要作用^[4],目前尚未见国内对 App 鞭毛蛋白的研究报道。本研究依据 App 与大肠杆菌(*Escherichia coli*)、沙门氏菌(*Salmonella*)、痢疾志贺氏细菌(*Shigellosis*)鞭毛蛋白 *flic* 基因的高度同源性^[5]设计了 1 对引物,运用 PCR 方法扩增出 App 鞭毛蛋白 *flic* 基因,对其编码蛋白的二级结构和跨膜区特性进行了预测,并将该基因克隆到原核表达载体 pGEX-KG 中,在大肠杆菌 BL₂₁ 中进行表达,以期 App 的运动性和致病机理研究以及新型基因工程疫苗的研发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及载体 App 血清 I 型菌株 App I、大肠杆菌 DH5 α 、大肠杆菌 BL₂₁ (DE3)、pMD-18T 载体及原核表达载体 pGEX-KG,均由华中农业大学动物病毒室保存。

1.1.2 工具酶及主要试剂 限制性内切酶、EX TaqTM聚合酶、T₄ DNA 连接酶等分子生物试剂,购自大连生物工程有限公司;DNA 凝胶回收试剂盒,购自上海生物工程有限公司。其他所有试剂均为分析纯试剂。

1.1.3 培养基 LB 培养基等均按常规方法配制。

1.1.4 PCR 引物 根据 App 鞭毛蛋白的 N 端序列以及 C 端与其他细菌(*Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigellosis*)高度同源的特点,利用 Primer 5.0 软件设计 1 对引物,送上海生物工程有限公司合成。上游引物 P1 序列:5'-ATCGAATTCGGATGACGCAGCG

GGTCAGTC-3',下游引物 P2 序列:5'-AGGGAGCTCTTAGATCCGGCCAGTATCAGGG-3'。

1.2 方法

1.2.1 App 基因组 DNA 的提取 挑取 App 血清 I 型单菌落,接种于 2 mL 液体培养基中,37 °C 培养过夜,从中取出 1 mL,8 000 r/min 离心 5 min,弃上清,将沉淀悬浮于 1 mL TE 中,加 10 ng/mL 的溶菌酶 30 μ L,于 37 °C 保存,2 h 后加入 2 mol/L NaCl 50 μ L,质量分数 10% SDS 110 μ L,10 mg/mL 的蛋白酶 K 5 μ L,50 °C 过夜,用酚-氯仿-异戊醇溶液(V(酚):V(氯仿):V(异戊醇)=100:99:1)抽提 2 次,取上清,然后用 0.6 倍体积的异丙醇进行沉淀,再用体积分数 75%乙醇洗 2 次,抽干后用 30 μ L TE 溶解沉淀,于-20 °C 保存。

1.2.2 App *flic* 基因的 PCR 扩增 PCR 扩增体系 50 μ L:10 $\times$ Buffer(含 20 μ mol/L Mg²⁺)5.0 μ L,10 μ mol/L dNTPs 1.5 μ L,10 μ mol/L 上、下游引物各 0.5 μ L,模板 DNA 1 μ L,2 U/ μ L EX TaqTM DNA 聚合酶 1 μ L,超纯水 40.5 μ L。反应程序如下:94 °C 预热 5 min;94 °C 变性 1 min,53 °C 变性 40 s,72 °C 延伸 1 min,35 个循环;最后再 72 °C 延伸 10 min。

1.2.3 pMD-18T-*flic* 质粒的构建与鉴定 PCR 扩增得到的片段经琼脂糖凝胶电泳后,在紫外灯下切下目的条带,按 DNA 凝胶回收试剂盒说明进行回收,回收后与 pMD-18T 载体连接,构建 pMD-18T-*flic* 质粒,转化大肠杆菌 DH5 α ,用含氨苄青霉素的 LB 平板筛选克隆子。提取筛选得到的克隆子质粒,进行 PCR 和 *Eco*R I、*Xho* I 双酶切鉴定,证明所得重组子含有所需的克隆片段,将阳性克隆子送上海生物工程有限公司测序。

1.2.4 *flic* 蛋白二级结构及跨膜区预测 应用 NPS@ 服务器(<http://pbil.ibcp.fr/html/index.php>)上的 GOR4 法^[6]、PHD^[7]法和 SOPMA 法^[8] 3 种方法,对 *flic* 蛋白的二级结构成分进行预测。利用 TMpred 服务器(http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)对 *flic* 蛋白的跨膜区进行预测。

1.2.5 表达质粒的构建及酶切鉴定 首先用 *Eco*R I 和 *Xho* I 双酶切重组质粒 pMD-18T-*flic*,回收 528 bp 的片段,再与 *Eco*R I 和 *Xho* I 双酶切的 pGEX-KG 载体连接,得到重组表达质粒 pGEX-*flic*,并进行酶切鉴定。

1.2.6 转化大肠杆菌 BL₂₁ 用所得的重组表达质粒 pGEX-*flic* 转化大肠杆菌 BL₂₁,然后涂布于含有卡那霉素的 LB 平板,37 ℃温床培养,24 h 后将菌种接种于加有卡那霉素的 LB 液体培养基中,37 ℃震荡培养,4 h 后取菌液 100 ℃加热 5 min 后,作为模板进行 PCR 筛选,获得阳性重组大肠杆菌。

1.2.7 表达蛋白的 SDS-PAGE 电泳 将阳性大肠杆菌悬液按 1 : 10 的体积比接种于 LB 培养基,37 ℃、250 r/min 震荡培养至 OD₆₀₀ 为 0.5~0.6 时,加入终浓度为 1 mmol/L 的 TPTG,诱导 4 h 后,3 000 r/min 离心 10 min,将菌体重悬于 PBS 中,超声波破碎(40%功率,破碎 8 min),然后于 4 ℃ 10 000 r/min 离心 10 min,将上清和沉淀分别与上样缓冲液混合后,100 ℃加热 10 min,120 g/L SDS-PAGE

电泳,考马斯亮蓝染色。

1.2.8 表达蛋白的 Western-blot 分析 表达产物经 100 g/L 的 SDS-PAGE 电泳,取下凝胶进行转印,电转移至硝酸纤维膜上,分别以兔抗 App 血清为一抗、山羊抗兔 IgG-HRP 为二抗进行免疫印迹试验,最后将 NC 膜在含有 DAB 和 H₂O₂ 的显色液中显色后,置于水中终止显色,晾干后拍照。

2 结果与分析

2.1 App *flic* 基因的 PCR 扩增

扩增获得 1 条约 528 bp 的条带(图 1),与预期长度相符,说明 App I 菌株中可能含有 *flic* 基因,初步确定扩增出的片段为目的基因片段。

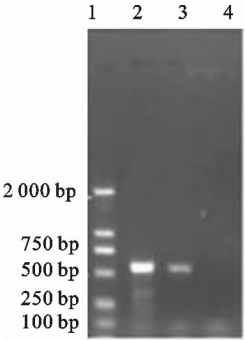


图 1 App *flic* 基因的 PCR 扩增

1. DNA Marker DL 2000;2,3. *flic* 基因的 PCR 扩增产物(528 bp);4. 空白对照

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis analysis of PCR products of *flic*

1. DNA Marker DL 2000;2,3. PCR products of *flic*(528 bp); 4. Control

2.2 重组质粒 pMD-18T-*flic* 的酶切鉴定

由图 2 可见,重组质粒经 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切后,得到长约 2 600 和 528 bp 的 2 条条带,均与预期长度相符,表明 *flic* 基因已被成功克隆。

2.3 *flic* 基因序列的生物信息学分析

2.3.1 *flic* 蛋白的二级结构预测 由图 3 可知,采用不同方法预测的结果不尽相同(图 3)。GOR4 法预测结果显示,*flic* 蛋白有 4 个 α -螺旋中心,9 个 β -折叠区段;PHD 法预测结果显示,*flic* 蛋白有 4 个 α -螺旋中心,10 个 β -折叠区段;SOPMA 法预测结果显示,*flic* 蛋白有 7 个 α -螺旋中心,9 个 β -折叠区段,并有 6 个转角区域。3 种方法预测的共有 α -螺旋中心在 Thr33-Ala36、Val137-Lys140 和 Glu 145-Asn146

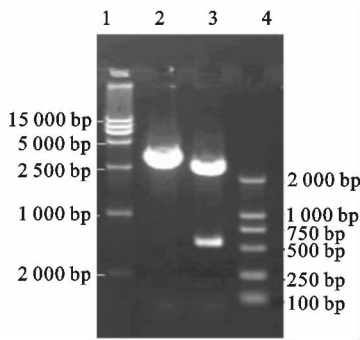


图 2 pMD-*flic* 的酶切鉴定

1. DNA Marker(DL 15000);2. pMD-*flic* 的 *Xho* I 单酶切产物;
3. pMD-*flic* 的 *EcoR* I、*Xho* I 双酶切产物;
4. DNA 分子量标准(DL 2000)

Fig. 2 Identification of recombinant pMD-18T-*flic* by restricted endonuclease enzyme

1. DNA marker(DL 15000);2. pMD-*flic*/*Xho* I ;
3. pMD-*flic*/*EcoR* I + *Xho* I ;4. DNA Marker(DL 2000)

区域,其共有的 β -折叠区段为 Trp50-Cys51、Ile71-Met75、Trp115-Leu118、Ser125-Val126 和 Ile149-Thr152。

2.3.2 *flic* 蛋白的跨膜区预测 利用 TMpred 服务器对 *flic* 蛋白跨膜区进行预测,其结果如图 4 所示。图 4 结果表明,在第 21~38 位氨基酸编号间可能存在一跨膜区段。

2.4 重组表达质粒 pGEX-*flic* 的 PCR 和酶切鉴定

以重组表达质粒 pGEX-*flic* 为模板,扩增后在约 528 bp 处有 1 条条带,再用 *EcoR* I 和 *Xho* I 对重组质粒 pGEX-*flic* 进行双酶切,图 5 结果显示,在约 5 000 和 528 bp 处各有 1 条条带。

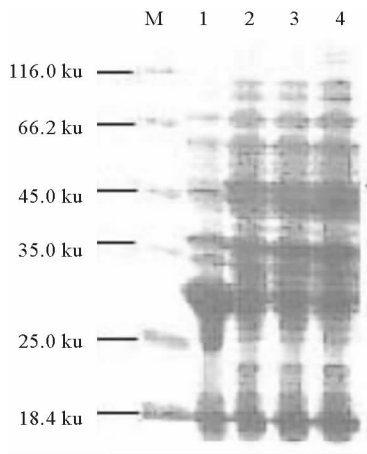


图 6 pGEX-flic 表达物的 SDS-PAGE 电泳分析

1. pGEX-KG 质粒转化菌的表达产物;
2~4. pGEX-flic 质粒转化菌的表达产物;
M. 蛋白质分子量标准

Fig. 6 SDS-PAGE of the expression of flic recombinant protein

1. The expression product of pGEX-KG;
2-4. The expression product of pGEX-flic recombinant protein; M. Protein Marker

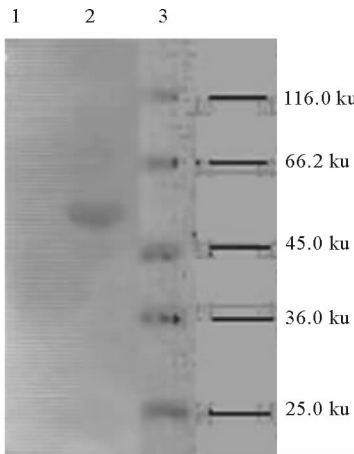


图 7 pGEX-flic 融合蛋白的 Western blot 分析

1. PGEX-KG 空载体对照; 2. pGEX-flic 融合蛋白;
3. Protein Marker

Fig. 7 Western-blot analysis of the expression of flic recombinant protein

1. PGEX-KG control; 2. Western-blot analysis of the expression of flic recombinant protein; 3. Protein Marker

3 讨 论

鞭毛是细菌的一种特殊结构,约半数的杆菌、极少数球菌和所有的螺旋菌及弧菌都有鞭毛,其不但与细菌的运动有关,而且在细菌的感染与免疫及细菌分类鉴定等方面发挥着重要作用。由于研究技术的限制,人们最早研究鞭毛是从其染色方法开始的,随着现代分子生物学技术的飞速发展,人们开始从基因水平来研究鞭毛作为运动器官的分子机制及其与毒力相关的基因。目前研究较多的是鞭毛蛋白的中央区段和 *flic* 基因^[9-13]。另外,在细菌鞭毛蛋白结构研究方面,国外已有相关报道^[14-16],以上研究为本研究的开展提供了重要参考。

生物信息学是一门生物学、数学、计算机技术相交叉的学科,其采用各类分子生物学数据库和分析软件对已知的核酸和蛋白质序列进行比对、分析,建立计算模型,从而对其结构、功能进行推断及预测,现已成为生物信息学研究的一种趋势^[17]。蛋白质的组成、结构决定其功能,通过研究蛋白质序列结构特征,可以科学地阐明蛋白质的功能和蛋白质细胞的定位^[18]。

本研究在对 *flic* 基因序列克隆的基础上,首次借助于计算机技术和生物学软件对 App *flic* 蛋白的二级结构进行了预测和分析。其中 GOR4 方法是

一种基于统计的预测方法,其将蛋白质的氨基酸残基当做一连串的信息值来处理后进行预测;PHD 方法采用神经网络模型进行预测,是当前公认的预测效果较好的方法之一;SOPMA 方法是通过比对不同氨基酸残基在特定结构内部的一致性来预测蛋白质的二级结构。由于这 3 种方法的实现路线及研究重点不同,因此这 3 种方法的预测结果也有所不同。本研究综合 3 种方法的预测结果,表明该蛋白含有较多的无规则卷曲结构,无规则卷曲结构是比较松散的结构,易于发生形变,以突出到蛋白表面,有利于与抗体结合,因此这些区域成为抗原表位的可能性较大。

跨膜结构域是膜中蛋白与膜脂结合的主要部位,一般由 20 个左右的疏水氨基酸残基组成,其可形成螺旋,并与膜脂相结合。预测和分析跨膜结构域,对认识蛋白质的结构、功能、分类以及在细胞中的作用部位均有一定的意义。以上研究结果为进一步研究确定 App *flic* 蛋白的抗原表位奠定了基础。

猪传染性胸膜肺炎放线杆菌共分 15 个血清型,各个血清型之间的表型和基因型差异较大,国内尚未见对其鞭毛蛋白的研究报道。本研究对 App 鞭毛蛋白 *flic* 基因进行了克隆及生物信息学分析,并实现了其在大肠杆菌 BL₂₁ 中的表达,这为 App 新型基因工程疫苗及其致病机理的研究提供了参考。

[参考文献]

- [1] 宣长和. 猪病学 [M]. 2 版. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2003:119.
Xuan C H. Diseases of swine [M]. 2nd Edition. Beijing: China Agricultural Science and Techniques Publishing House, 2003: 119. (in Chinese)
- [2] 斯特劳. 猪病学 [M]. 8 版. 赵德明, 张仲秋, 沈建忠, 译. 北京: 中国农业大学出版社, 2000:357-358.
Strew B E. Diseases of swine [M]. 8th Edition. Zhao D M, Zhang Z Q, Shen J Z, Translated. Beijing: China Agricultural Science and Techniques Publishing House, 2000: 357-358. (in Chinese)
- [3] Bosse J T, Janson H, Sheehan B J, et al. *Actionobacillus pleuropneumoniae* pathobiology and pathogenesis of infection [J]. Microbes and Infection, 2002, 4(2): 225-235.
- [4] 李任峰, 何启盖. 细菌鞭毛研究概况及进展 [J]. 微生物学通报, 2005, 32(6): 124-127.
Li R F, He Q G. The research advances on the bacterial flagella [J]. Microbiology, 2005, 32(6): 124-127. (in Chinese)
- [5] Negrete-Abascal E, Reyes M E, Garcia R M, et al. Flagella and motility in *Actinobacillus pleuropneumoniae* [J]. J Bacteriol, 2003, 185(2): 664-668.
- [6] Garnier J, Gibrat J F, Robson B. GOR secondary structure prediction method version IV [J]. Methods in Enzymology, 1996, 266: 540-553.
- [7] Rost B, Sander C. Prediction of protein secondary structure at better than 70% accuracy [J]. J Mol Biol, 1993, 232(2): 584-599.
- [8] Geourjon C, Deleage G. significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments [J]. Comput Appl Biosci, 1995, 11(6): 681-684.
- [9] Maynarelli L A. Antigenic flagellar epitope of *Borealis Burgdorferi* in serologic tests for diagnosis of lyme borreliosis [J]. Clin Micriol, 1992, 30(12): 3158-3162.
- [10] 吕冰, 万康林. 中国莱姆病螺旋体鞭毛蛋白中央区的基因克隆与表达 [J]. 中华微生物与免疫学杂志, 2004, 24(8): 611-614.
Lü B, Wan K L. Cloning and expression of the central fragment of flagellin gene from the Chinese strain PD91 of *Borrelia garinii* [J]. Chinese Journal of Microbiology and Immunology, 2004, 24(8): 611-614. (in Chinese)
- [11] Reid S D, Selander R K, Whittam T S. Sequence diversity of flagellin alleles in pathogen *Escherichia coli* [J]. J Bacteriol, 1999, 181(1): 153-160.
- [12] Chua K L, Chan Y Y, Gan Y H. Flagella are virulence determinants of *Burkholderia pseudomallei* [J]. Immune, 2003, 71(4): 1622-1629.
- [13] Wei L N, Joys T M. Covalent structure of three phase-1 flagellar filament proteins of *Salmonella* [J]. J Mol Biol, 1985, 186: 791-803.
- [14] Grewal N, Salunke D M. The antigenic domain of flagellin from *S. paratyphi* shares a structural fold with subtilisin [J]. FEBS Lett, 1993, 322(2): 111-114.
- [15] Yonekura K, Maki-Yonekura S, Namba K. Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy [J]. Nature, 2003, 424(6949): 643-50.
- [16] Maruyama Y, Momma M, Mikami B, et al. Crystal structure of a novel bacterial cell-surface flagellin binding to a polysaccharide [J]. Biochemistry, 2008, 47(5): 1393-1402.
- [17] Doytchinova I A, Flower D R. VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines [J]. BMC Bioinformatics, 2007, 8: 4.
- [18] Saha S, Raghava G P. Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using Recurrent Neural Network [J]. Proteins, 2006, 65(1): 40-48.