

猪流产嗜性衣原体 *MOMP* 基因的克隆及原核表达

李西玉^{1,2}, 许信刚¹, 周继章², 邱昌庆², 曹小安², 宫晓炜², 王光华²

(1 西北农林科技大学 动物医学院, 陕西 杨凌 712100; 2 中国农业科学院 兰州兽医研究所 家畜疫病病

原生物学国家重点实验室, 农业部兽医公共卫生重点开放实验室, 甘肃 兰州 730046)

[摘要] 【目的】克隆猪流产嗜性衣原体青海株主要外膜蛋白(Major outer membrane protein, MOMP)基因, 并进行序列分析及原核表达。【方法】根据 GenBank 公布的猪流产嗜性衣原体 *MOMP* 基因的核苷酸序列, 设计并合成 4 条特异性引物, 用套式 PCR 方法扩增猪流产嗜性衣原体青海株 *MOMP* 基因, 将其克隆入 pMD18-T 载体中, 进行测序及序列分析。然后将 *MOMP* 基因亚克隆入原核表达载体 pGEX4T-1 中, 在大肠杆菌 BL21(DE3) 中用 IPTG 诱导表达, 对表达产物进行 SDS-PAGE 和 Western blot 检测。【结果】扩增到猪流产嗜性衣原体青海株 1 170 bp 的 *MOMP* 全长基因。序列分析结果表明, 该基因与已发表的猪流产嗜性衣原体 B11001 株和 CP/12 株核苷酸同源性均为 99.7%。SDS-PAGE 电泳可检测到分子质量约为 66 ku 的融合蛋白, 主要以包涵体形式存在。Western-blot 分析表明, 重组蛋白可被猪流产嗜性衣原体抗体识别。【结论】成功克隆了猪流产嗜性衣原体青海株 *MOMP* 基因, 并进行了原核表达, 表达的蛋白具有抗原活性。

[关键词] 猪; 流产嗜性衣原体; MOMP 蛋白; 原核表达

[中图分类号] S852.67

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2010)07-0033-06

Cloning and prokaryotic expression of the major outer membrane protein coding gene of Swine *Chlamydomphila abortus*

LI Xi-yu^{1,2}, XU Xin-gang¹, ZHOU Ji-zhang², QIU Chang-qing²,
CAO Xiao-an², GONG Xiao-wei², WANG Guang-hua²

(1 College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2 State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, Key Laboratory of Veterinary Public Health of Ministry of Agriculture, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou, Gansu 730046, China)

Abstract: 【Objective】The outer membrane protein (MOMP) gene of Swine *Chlamydomphila abortus* (CA) Qinghai strain was cloned, analyzed and expressed in *E. coli*. 【Method】According to the published complete nucleotide sequence of CA in GenBank, four primers specific to the full-length of *MOMP* gene were designed. The *MOMP* gene fragment amplified by nested PCR was cloned into pMD18-T vector. The recombinant plasmid was sequenced and *MOMP* gene was compared with other GeneBank's CA strains. *MOMP* gene segment was amplified from recombinant plasmid by PCR, then the *MOMP* gene was sub-cloned into vector pGEX4T-1 for prokaryotic expression in BL21(DE3) *E. coli* induced by IPTG. 【Result】The *MOMP* gene of Qinghai strain was 1 170 bp in full-length. It shared 99.7% nucleotide acid sequences homology with different CA strains (B11001 and CP/12). The recombinant fusion proteins were highly effi-

* [收稿日期] 2010-01-11

[基金项目] 国家科技基础性工作专项(2008FY210200); 陕西省科技攻关项目(2009K02-01); 西北农林科技大学“青年学术骨干”支持计划项目(E111020901)

[作者简介] 李西玉(1982—), 男, 河北石家庄人, 在读硕士, 主要从事分子病原学研究。

[通信作者] 许信刚(1974—), 男, 陕西武功人, 副教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事分子病原学研究。

E-mail: xuxingangzhangqi@yahoo.com.cn

周继章(1972—), 男, 青海乐都人, 副研究员, 博士, 硕士生导师, 主要从事动物传染病分子流行病学与免疫学研究。

E-mail: zhoushizhang@126.com

ciently expressed in *E. coli* BL21 in the form of inclusion body. The molecular weight of the expressed fusion protein was approximately 65 ku. Western-blot showed that the recombinant protein can be recognized by *Chlamydomonas abortus* positive serum. 【Conclusion】 CA Qinghai strain *MOMP* gene was cloned and expressed in *E. coli* successfully and the expressed protein had antigen activity.

Key words: swine; *Chlamydia abortus*; MOMP; prokaryotic expression

衣原体是介于细菌和病毒之间的一类严格细胞内寄生性微生物。在 1955 年,美国人 Willigam 等首次报道从猪心包炎病料中分离出衣原体^[1],随后罗马尼亚、前苏联及东欧等许多国家和地区陆续报道了鹦鹉热衣原体对猪的致病性。流产嗜性衣原体属于衣原体科嗜性衣原体属,过去在传统分类法中属于鹦鹉热衣原体血清学 I 型^[2]。猪衣原体病是由流产嗜性衣原体感染引起不同症候群的接触性传染病,临床症状表现为妊娠母猪发生流产、死胎、木乃伊胎、产弱仔,各年龄段猪发生肺炎、多发性关节炎、心包炎、结膜炎、脑炎、脑脊髓炎,并可使公猪发生睾丸炎和尿道炎^[3]。

研究表明,衣原体主要外膜蛋白(Major outer membrane protein, MOMP)存在于其外表面,相对保守,并且不同来源的 MOMP 基因具有较高的同源性^[4]。MOMP 有属、种和血清型特异性的抗原决定簇,并通过 MOMP 蛋白之间或 MOMP 蛋白与其他膜蛋白之间广泛存在的二硫键,使缺乏肽聚糖结构的衣原体形成一个整体^[5]。MOMP 具有粘附宿主细胞及辅助衣原体侵染的功能,而且还是衣原体从宿主细胞摄取 ATP 等物质的离子通道^[6]。因此在衣原体抗原研究中 MOMP 最受关注。本试验利用套式 PCR 方法,对猪流产嗜性衣原体青海分离株 MOMP 基因进行了克隆,并对其进行了序列分析和原核表达,以期对猪流产嗜性衣原体的诊断和基因工程亚单位疫苗的研制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 衣原体菌株与质粒 猪流产嗜性衣原体青海分离株及其感染的鸡胚卵黄囊,由中国农业科学院兰州兽医研究所人畜共患细菌病课题组提供;pGEX4T-1 质粒购于 Invitrogen 公司;*E. coli* DH5 α 感受态细胞、pMD18-T 载体购自大连宝生物工程有限公司;*E. coli* BL21(DE3)感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司。

1.1.2 主要试剂 A 型质粒小型快速提取试剂盒购自北京博大泰克生物基因技术有限责任公司;

Ex Taq DNA 预混酶、DNA 回收试剂盒、DL2000 DNA Marker、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *EcoR* I、*Pst* I、*Sal* I 等均购自大连宝生物工程有限公司;DNA Marker III、HRP 标记羊抗猪 IgG 购自天根生物技术(北京)有限公司;猪流产嗜性衣原体阳性血清由中国农业科学院兰州兽医研究所人畜共患细菌病课题组保存;其他试剂均为国产分析纯。

1.2 引物的设计与合成

根据 GenBank 上发表的猪流产嗜性衣原体 MOMP 基因编码序列,利用 DNA STAR 和 OLIGO 软件设计 2 对特异性引物 P1/P2 和 P3/P4。其中 P1: 5'-GTATGAAAAAACTCTTGAAATCG GC-3', P2: 5'-GCAAGGTTGTAATCTCTAGGTT TCA-3'; P3: 5'-ATGAAAAAACTCTTGAAATCG GC-3', P4: 5'-TTAGAATCTGAATTGAGCATTC ATGT-3'。

P1/P2 引物用于第 1 次扩增, P3/P4 引物用于第 2 次扩增,最终扩增片断为 1 170 bp,含有完整的 MOMP 基因。引物由大连宝生物工程有限公司合成。

1.3 衣原体基因组 DNA 的提取

按照文献[7]介绍方法,并略加改进,进行衣原体基因组 DNA 的提取。①取出一 70 ℃ 保存的猪流产嗜性衣原体青海株感染的鸡胚卵黄囊,融化后取 0.3~0.5 cm³ 剪碎匀浆,加入 400 μ L TE 缓冲液,转入到 1.5 mL 的 EP 管中,以 100 μ L 的 TE 缓冲液冲洗匀浆器,冲洗液一并转入 EP 管中。②加入 100 μ L 200 g/L SDS,混匀。加入蛋白酶 K 至终质量浓度为 200 μ g/mL,混匀后 60 ℃ 水浴 30 min,振荡摇匀后转入 37 ℃ 水浴 2 h,期间振荡数次。加入溶菌酶 30 μ L,置 65 ℃ 水浴 30 min,取出置沸水浴中 5 min;加入等体积的平衡酚,倒转混匀,4 ℃ 下 7 500 r/min 离心 10 min,取上层水相重复提取一次,加入等体积的酚-氯仿-异戊醇(V(酚):V(氯仿):V(异戊醇)=25:24:1)颠倒摇匀 2~3 次,4 ℃ 下 7 500 r/min 离心 10 min。③取上清液加入另一离心管中,加入 2.5 倍体积预冷的无水乙醇,-20 ℃ 沉淀 30 min,12 000 r/min 离心 10 min,弃去所有

液相;用 1 mL 体积分数 70% 乙醇漂洗 2~3 次,12 000 r/min 离心 2 min,室温下干燥。DNA 沉淀物用 50 μ L 灭菌双蒸水溶解,-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.4 *MOMP* 基因的 PCR 扩增

第 1 次 PCR 扩增反应体系的总体积为 50 μ L: Ex *Taq* DNA 酶预混液 25 μ L(含 1.25 U *Taq* 酶), P1/P2 引物(50 pmol/L)各 1 μ L,模板(基因组 DNA)4 μ L,去离子水补足 50 μ L。反应条件为 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 2 min,52 $^{\circ}$ C 退火 40 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min,35 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。第 2 次 PCR 扩增反应体系总体积为 50 μ L: Ex *Taq* DNA 酶预混液 25 μ L(含 1.25 U *Taq* 酶),P3/P4 引物(50 pmol/L)各 1 μ L,一扩产物 2 μ L,去离子水补足 50 μ L。反应条件为 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,54 $^{\circ}$ C 退火 40 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min,30 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。反应结束后取 10 μ L PCR 产物,加入适量 6 $\times$ Loading Buffer,于 10 g/L 琼脂糖凝胶上电泳,分析扩增产物。

1.5 *MOMP* 基因的克隆与序列分析

用 DNA 回收试剂盒对 PCR 产物进行纯化回收,并将回收的 DNA 片段与 pMD18-T 载体连接后转化入 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,经 PCR 及 *Eco*R I 和 *Pst* I 酶切鉴定为阳性者命名为 pMD18-T-MOMP,并送大连宝生物工程有限公司测序。将测序结果应用 DNA Star 分析软件与 GenBank 中已公布的 *MOMP* 序列进行同源性分析,并绘制系统发育进化树。

1.6 原核表达载体的构建与鉴定

根据测序结果,设计扩增 *MOMP* 基因亚克隆的引物 M1/M2,其中 M1:5'-CAGGAATTCTTGC-CTGTAGGGAACC-3',5'端下划线部分为 *Eco*R I 酶切位点;M2:5'-TGAGTCGACGAATCTGAAT-TGAGCATTCA-3',5'端下划线部分为 *Sal* I 酶切位点。

PCR 反应体系体积为 50 μ L: Ex *Taq* DNA 酶预混液 25 μ L(含 1.25 U *Taq* 酶),M1/M2 (50 pmol/L)引物各 1 μ L,pMD18-T-MOMP 质粒 1 μ L,去离子水补足 50 μ L。反应条件为 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,52 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min,30 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。回收目的片段,将其定向插入到原核表达载体 pGEX4T-1 的 *Eco*R I 和 *Sal* I 多克隆位点处,转化大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞,筛选出阳性克隆,进行 PCR 及 *Eco*R I 和 *Sal* I 双酶切鉴定,将鉴定正确的质粒送大连宝生物测序,

以确证 *MOMP* 基因亚克隆插入位置的正确性。将鉴定正确的重组原核表达载体命名为 pGEX4T-1-MOMP。

1.7 重组融合蛋白的诱导表达、可溶性分析及 Western blot 分析

取上述鉴定正确的菌液活化过夜,按照 1:100 (体积比)的比例接种 100 mL 的 LB 培养基(含 Amp 100 μ g/mL),同时接种 6 瓶,37 $^{\circ}$ C 培养至 OD₆₀₀ 为 0.6 时,各吸取 1 mL 菌液作为未诱导对照;分别加 0.1,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0 mmol/L IPTG 诱导,3 h 后每瓶取 1 mL 菌液进行 SDS-PAGE 电泳分析,以确定 IPTG 的最佳诱导浓度。将菌液用最佳 IPTG 浓度分别诱导 1,2,3,4,5,6 h,取样进行 SDS-PAGE 检测,确定 IPTG 的最佳诱导时间。样品处理:将所有收集有菌液的离心管于 12 000 r/min 离心 2 min,弃上清,用 100 μ L pH 7.4 的 PBS 悬浮沉淀菌,加入等体积 2 $\times$ SDS 上样缓冲液,水浴煮沸 10 min,取样作为蛋白样品。

可溶性分析:用 10 倍体积 PBS 悬浮诱导菌沉淀,经超声处理分别取上清和少量沉淀进行 SDS-PAGE 检测。

取上述重组融合蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳,同时设空质粒对照。按照凝胶面积以相应恒定电流(160 mA)将蛋白质转移到硝酸纤维素膜上,切下 Marker 道,氨基黑染色,脱色,其余硝酸纤维素膜用 PBS 清洗 3 次后,用体积分数 3% 的 BSA 室温封闭 5 h;用 PBST 冲洗 4~5 次,加入第 1 抗体猪流产嗜性衣原体阳性血清(1:50 倍稀释),37 $^{\circ}$ C 孵育 1.5 h,用 PBST 洗膜 3 次;加入第 2 抗体 HRP 标记羊抗猪 IgG(1:500 倍稀释),37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h,清洗后加入显色液显色,待出现条带后立即用 PBST 终止显色,合并 Marker 道,观察结果并拍照。

2 结果与分析

2.1 *MOMP* 基因的 PCR 扩增

电泳检测结果显示,扩增得到了 1 条约 1 170 bp 的特异性条带(图 1),与预期片段长度相符。

2.2 pMD18-T-MOMP 重组质粒的鉴定

重组质粒 pMD18-T-MOMP 经 *Eco*R I 和 *Pst* I 双酶切和 PCR 鉴定,结果获得了 1 170 bp 的条带(图 2),与预期片段长度相符合。

2.3 *MOMP* 基因的序列测定与分析

同源性分析结果表明,*MOMP* 基因核苷酸序列与 GenBank 中检索到的衣原体 B11001 株

(EU086705) 和 CP/12 株 (EF202609) 同源性均为 99.7%，分别在 65 位发生 C→T 突变，导致丙氨酸变为缬氨酸；在 930 位发生 G→A 突变，此突变为同义突变；在 1 019 位发生 T→C 突变，导致缬氨酸变为丙氨酸。试验毒株 *MOMP* 基因同 OCLH 196 株 (AJ440239)，EBA 株 (AF269256)，LLG 株 (AF272945)，B577 株 (M73036)，S26/3 株

(CR848038)，TWC+3/95-H 株 (DQ471955)，BA1 株 (L39020)，MN 株 (AF269281)，6BC 株 (M73035)，FP cello 株 (AF269258)，LW613 株 (AJ440240)，GP IC 株 (AF269282) 的同源性分别为 99.8%，99.7%，99.3%，99.7%，99.7%，99.6%，99.7%，83.7%，84.0%，82.9%，70.8%，82.1%。

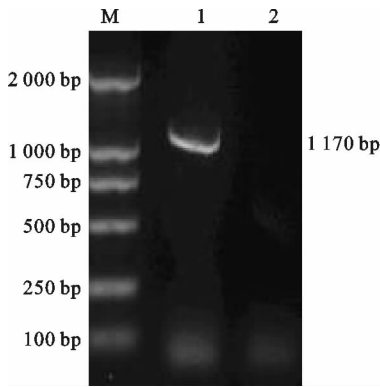


图 1 猪流产嗜性衣原体 *MOMP* 基因的 PCR 扩增
M. DNA 分子质量标准 DL2000;1. *MOMP* 基因的 PCR 扩增产物;2. 阴性对照
Fig.1 PCR amplification of Swine *Chlamydomphila abortus* major outer membrane protein gene
M. DL2000 DNA Marker;1. PCR amplification of *MOMP* gene;2. Negative control

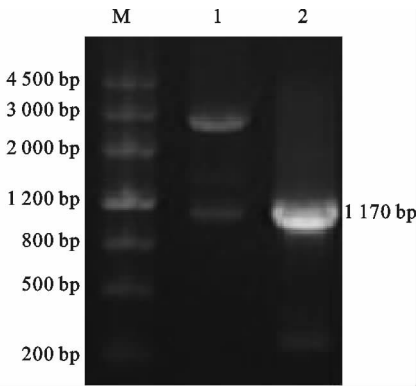


图 2 重组质粒 pMD18-T-MOMP 的双酶切和 PCR 鉴定
M. DNA Marker III;1. pMD18-T-MOMP 的 *EcoR* I 和 *Pst* I 双酶切产物;2. pMD18-T-MOMP 的 PCR 扩增产物
Fig.2 Identification of recombinant plasmid pMD18-T-MOMP by PCR and enzymatic digestion
M. DNA Marker III;1. Product from pMD18-T-MOMP digested by *EcoR* I and *Pst* I;2. Product of pMD18-T-MOMP amplified by PCR

2.4 *MOMP* 基因的系统进化分析

在分析猪流产嗜性衣原体青海株同源性的基础上,进行了核苷酸遗传进化分析,并绘制其系统发生进化树(图 3)。从图 3 可以看出,衣原体青海分离

株 (CAQH) 与 CP/12 株 (EF202609, China) 和 B11001 株 (EU086705, China HB) 处于 2 个相邻分支上,与 TWC+3/95-H 株 (DQ471955, China TW) 位于同一分支上,亲缘关系较近。

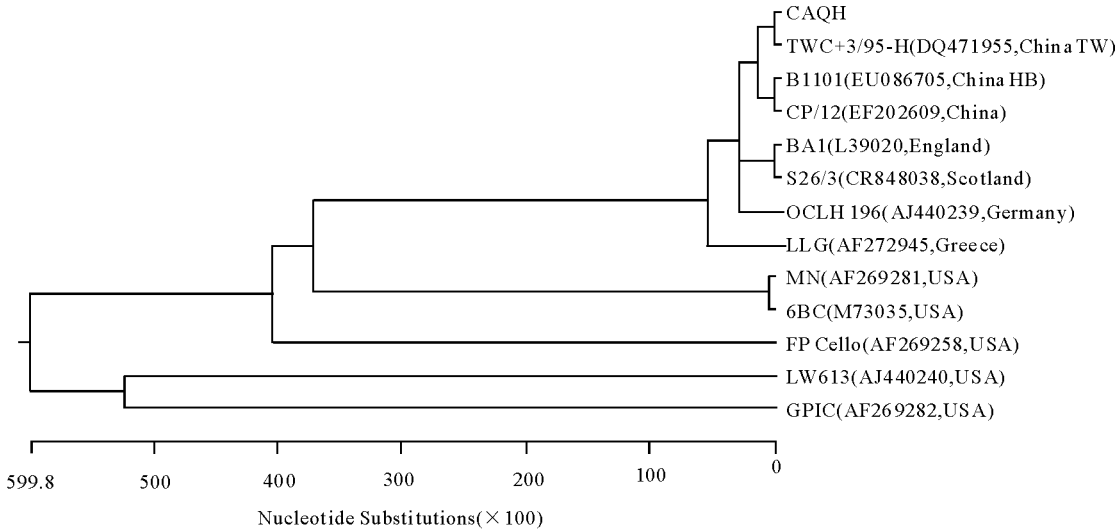


图 3 基于 *MOMP* 基因的猪流产嗜性衣原体青海株 (CAQH) 系统进化分析
Fig.3 Phylogenetic tree of CA *MOMP* gene of QH strain

2.5 *MOMP* 基因编码氨基酸的亲水性及抗原表位分析

供试衣原体 *MOMP* 基因全长 1 170 bp,编码由 389 个氨基酸组成的蛋白,该蛋白分子质量约为 41.8 ku,含有 33 个碱性氨基酸(K、R)、32 个酸性氨基酸(D、E)、160 个亲水性氨基酸(A、I、L、F、W、V)和 105 个极性氨基酸(N、C、Q、S、T、Y)。由亲水

性及抗原表位分析结果(图 4)可知,猪流产嗜性衣原体青海株 *MOMP* 基因编码的外膜主蛋白在 96~118 和 232~246 位氨基酸残基处有较高的亲水性;在 23~34,43~53,74~83,98~108,215~221,233~245 和 250~265 位氨基酸残基处可能存在抗原表位。利用信号肽预测的 SignalP 3.0 Server 在线工具分析,其 1~19 位氨基酸可能为信号肽序列。

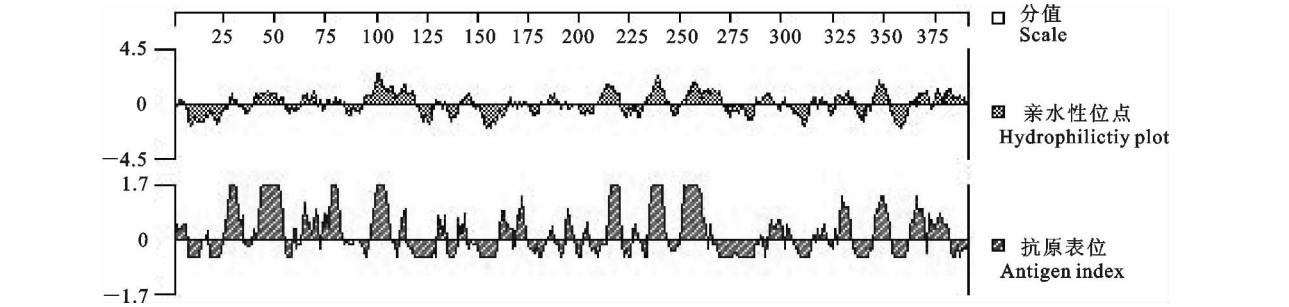


图 4 猪流产嗜性衣原体青海株 *MOMP* 基因编码蛋白的亲水性及抗原表位分析
Fig. 4 Analysis of antigenic epitopes and hydrophilicity of protein encoded by CA *MOMP* gene of QH strain

2.6 pGEX4T-*MOMP* 原核表达载体的构建

重组质粒 pGEX4T-*MOMP* 用 *EcoR* I 和 *Sal* I 进行双酶切和 PCR 鉴定,获得了约 1 101 bp 的目的条带,与预期结果相符(图 5)。测序结果表明,目的基因与表达载体已正确连接,说明重组质粒构建成功。

mmol/L,最佳诱导时间为 4 h。菌液诱导表达后,裂解细胞提取蛋白质,进行 SDS-PAGE 电泳,诱导 3 h 可见 1 条较浓的约 66 ku 的蛋白条带,与预期结果(26 ku 的 GST 融合蛋白+39.6 ku 的 *MOMP* 蛋白)相符,而未诱导对照组未出现该蛋白条带(图 6)。菌液超声处理后,沉淀在 66 ku 处有条带,上清在相应位置没有条带(图 6),证明表达蛋白以包涵体的形式存在。

2.7 重组融合蛋白的 SDS-PAGE 电泳

试验结果显示, IPTG 最佳诱导浓度为 0.4

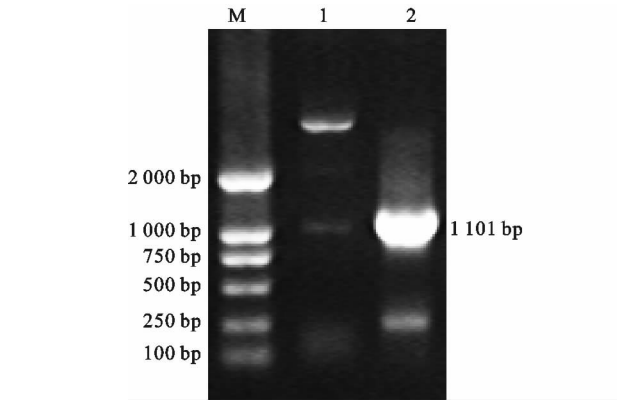


图 5 重组质粒 pGEX4T-*MOMP* 的酶切和 PCR 鉴定
M, DL2000 DNA Marker; 1. pGEX4T-*MOMP* 的 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切产物; 2. pGEX4T-*MOMP* 的 PCR 扩增产物

Fig. 5 Identification of recombinant plasmid by PCR and enzymatic digestion

M, DL2000 DNA Marker; 1. Product from pGEX4T-*MOMP* digested by *EcoR* I and *Sal* I ; 2. Product of pGEX4T-*MOMP* amplified by PCR

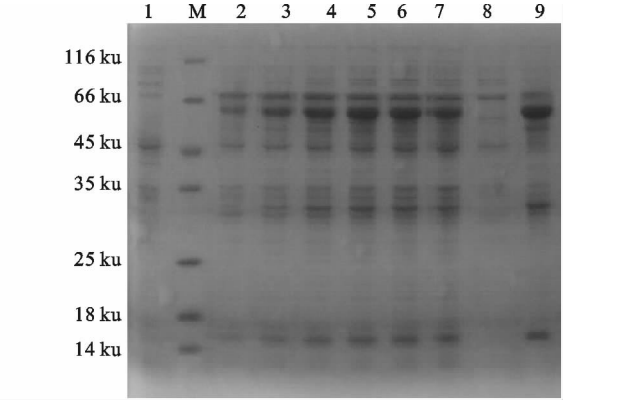


图 6 重组菌诱导表达产物的 SDS-PAGE 电泳结果
1. 未诱导菌液; 2. 蛋白分子质量标准;
2~7. 分别为 IPTG 诱导 1, 2, 3, 4, 5, 6 h 的重组菌;
8. 超声裂解上清; 9. 超声裂解沉淀

Fig. 6 Analysis of the expressed recombination product of IPTG determined by SDS-PAGE

1. Negative control; M, Protein molecular weight Marker; 2~7. Expressed products after 1, 2, 3, 4, 5, 6 h induced by IPTG; 8. Supernatant of split product; 9. Precipitation of split product

2.8 重组融合蛋白的 Western blot 分析

对重组融合蛋白进行 Western blot 检测,结果在 66 ku 处可见特异性条带(图 7),分子质量大小与 SDS-PAGE 结果相同,表明所表达的重组融合蛋白能够与猪流产嗜性衣原体抗体发生特异性结合。

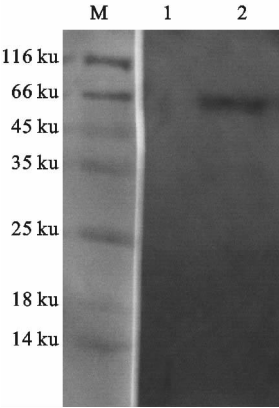


图 7 猪流产嗜性衣原体 MOMP 重组融合蛋白的 Western bolt 分析

M. 蛋白分子质量标准;1. 空载体对照;2. 重组蛋白

Fig. 7 Western blot analysis of the expressed recombination product

M. Protein molecular weight Marker;1. Negative control;
2. Induced product of pGEX-4T-MOMP

3 讨 论

3.1 流产嗜性衣原体 MOMP 基因的序列分析

近年来,我国各省家畜疫病普查结果表明,猪衣原体病在我国南方和北方的规模化猪场流行比较普遍,给我国集约化养猪业带来了巨大的损失^[8]。衣原体外膜主蛋白,也称为外膜蛋白 A(OmpA),是一种多功能蛋白,占外膜蛋白的 60%。MOMP 有属、种和血清型特异性的抗原决定簇,在维持衣原体结构完整性中起重要作用,也是中和抗体的主要靶位^[9],因此在衣原体抗原研究中,MOMP 是最受关注的抗原^[10]。本研究利用套式 PCR 方法成功扩增出猪流产嗜性衣原体青海株 MOMP 基因,序列测定结果表明,该基因长度为 1 170 bp,编码 389 个氨基酸。将猪流产嗜性衣原体青海株 MOMP 基因与国内外报道的流产嗜性衣原体 MOMP 基因进行同源性分析,结果表明分离株与流产嗜性 OCLH 196 株、S26/3 株、TWC+3/95-H 株(羊)、EBA 株、B577 株、LLG 株、BA1 株(牛)等的同源性高达 99% 以上,证实不同宿主来源的鹦鹉热衣原体 MOMP 基因具有很高的同源性,与刘向伟等^[11]的研究结果一致,是合适的疫苗研究位点;与 MN 株和 6BC 株(均

为禽鹦鹉热嗜性衣原体)的同源性为 83.7%~84%,与 GPIC 株(豚鼠嗜性衣原体)的同源性为 82.1%,与 FP cello 株(猫嗜性衣原体)的同源性为 82.9%,与 LW613 株(反刍动物嗜性衣原体)的同源性为 70.8%,提示宿主特异性的改变,使得基因的同源性有所差异^[12]。进化分析表明,猪流产嗜性衣原体青海分离株与台湾株(DQ471955, China TW)位于同一分支上,亲缘关系较近,与其他流产株位于 2 个相邻的分支上,说明青海分离株没有明显的进化差异。

3.2 流产嗜性衣原体 MOMP 的氨基酸序列分析

MOMP 蛋白分子质量约为 41.8 ku,1~19 位为氨基酸信号肽序列。猪流产嗜性衣原体青海分离株 MOMP 基因编码的蛋白在 96~118,232~246 位的氨基酸残基处有较高的亲水性;在 23~34,43~53,74~83,98~108,215~221,233~245,250~265 位氨基酸残基处可能存在抗原表位。MOMP 由 5 个保守区和 4 个可变区(VD)交替组成,保守区有 2 个亲水性较强的抗原表位,VD 区具有亲水特性^[13-14]。4 个 VD 区分别位于氨基酸的 64~83 位(VD I)、139~160 位(VD II)、224~237 位(VD III)和 288~317 位(VD IV),因此 98~108、233~245 可能是 2 个抗原表位。

3.3 MOMP 重组蛋白的表达及其生物学活性分析

将 MOMP 编码区克隆到原核表达载体 pGEX4T-1 上,转入大肠杆菌诱导表达,经 SDS-PAGE 和 Western blot 分析,确定 MOMP 得到表达,且表达的蛋白能与猪流产嗜性衣原体血清抗体发生特异性反应,表明表达的蛋白具有一定的反应原性。在 MOMP 融合蛋白的表达过程中,通过不断地摸索,确定了 IPTG 的最佳诱导浓度为 0.4 mmol/L,最佳诱导时间为 4 h。pGEX 表达系统所表达的融合蛋白以包涵体形式存在。本研究曾尝试通过低温(16℃)和不同诱导时间及更换不同表达载体等方法进行诱导表达,希望获得可溶性蛋白,但均没有成功。总之,MOMP 融合蛋白的成功表达,为猪流产嗜性衣原体的诊断、流行病学调查及亚单位疫苗的研制奠定了基础。

[参考文献]

[1] Su H, Caldwell H D. Kinetics of chlamydial antigen processing and presentation to T cells by paraformaldehyde-fixed murine bone marrow-derived macrophages [J]. Infect Immun, 1995, 3: 946-953.