

牛布鲁氏菌 *Wbkc* 基因原核表达及抗原性分析

李向阳^{1,2,3} 王学理^{2,3} 刘凯² 霍晓伟² 武迎红² 张显华²

1. 内蒙古民族大学成人教育学院, 通辽 028043; 2. 内蒙古民族大学动物科技学院, 通辽 028043;

3. 内蒙古民族大学农牧交错地带农业技术开发与应用研究所, 通辽 028043

摘要 克隆牛布鲁氏菌的甲酰基转移酶基因(*Wbkc*), 在大肠杆菌中表达/纯化, 并对甲酰基转移酶的抗原性进行分析。以牛布鲁氏菌的染色体 DNA 为模板, 扩增 *Wbkc* 基因, 双酶切后克隆至 pET-28a 上, 在大肠杆菌 BL21 中诱导表达, His Trap FF 层析柱纯化, Western blot 鉴定甲酰基转移酶的抗原性。提取的重组质粒经 PCR 鉴定、双酶切鉴定和测序分析确定目的基因成功插入到了克隆载体中。SDS-PAGE 分析证明, 表达产物为相对分子质量 29 000 的融合蛋白。Western blot 结果表明, 表达的蛋白具有特异的免疫反应原性。

关键词 甲酰基转移酶基因(*Wbkc*); 牛布鲁氏菌; 原核表达; 抗原性

中图分类号 S 852.61 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2013)06-0106-04

布鲁氏菌(*Brucella*)是一种短小的球杆状胞内寄生菌, 可引起反刍动物睾丸炎和流产^[1-2], 感染人类时的主要症状有波状热、多汗、肌肉疼痛等。最新的研究成果表明牛布鲁氏菌表面脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)分子与其胞内生存能力和毒力有关。LPS 产生的抗血清可用于人类及动物的布鲁氏菌病的诊断^[3-4]。*Wbkc* 基因编码光滑型布鲁氏菌脂多糖(LPS)O 链合成必需的甲酰基转移酶, 该基因的缺失或破坏通过影响光滑表型的形成而使其毒力发生衰减或消失。笔者通过克隆牛布鲁氏菌的 *Wbkc* 基因, 在大肠杆菌中表达, 并对表达物进行 Western blot 分析, 旨在为布鲁氏菌病的诊断性蛋白的寻找和布鲁氏菌基因缺失疫苗的研制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 质粒与菌毒株

pET-28a(+)载体、大肠杆菌 DH5 α 和 BL-21 均由笔者所在实验室保存; pMD18-T Vector 购于宝生物工程(大连)有限公司; 牛布鲁氏菌购自中国兽医药品监察所; 辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠 IgG 购自北京博奥森生物公司; His Trap FF 柱购自 GE Healthcare 公司。

1.2 酶与化学试剂

PCR Kit、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *Bam*H I / *Sal* I、IPTG、X-gal、DNA marker 均购于 TaKaRa 公司(大连); 蛋白质 marker 购自生工生物(上海)有限公司; 普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、离心柱型质粒提取试剂盒均购自上海优萌科学仪器有限公司; 氨苄青霉素(ampicilin, Amp)、卡那霉素(kanamycin, Kan)均购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.3 引物设计及合成

根据 GenBank 上发表的牛布鲁氏菌株的 *Wbkc* 基因序列(Gene ID: 1197129.), 以及 pMD18-T Vector 和 pET-28a(+)Vector 的特点分别设计两端含有限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Sal* I 酶切位点的引物。上游(含有 *Bam*H I 酶切位点): 5'-CGCG-GATCCGCAAAAAGCGGCCAAAGCCTGG-3'; 下游(含有 *Sal* I 酶切位点): 5'-ACGCGTCGACGCTG-GATCTTCTCCCGTCGTAA-3', 由上海生物工程技术服务有限公司合成。

1.4 目的基因的克隆

以提取的牛布鲁氏菌基因组 DNA 为模板, 将 *Wbkc* 基因进行 PCR 扩增, 回收纯化并与 pMD18-T Vector 连接。将重组质粒转化。筛选阳性克隆、双酶切并进行测序。

收稿日期: 2013-04-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(31260608)、内蒙古自治区高等学校科学技术研究重点项目(NJZZ12117)和内蒙古自治区通辽市与内蒙古民族大学科技合作项目(sxzD2012131)

李向阳, 博士, 副教授。研究方向: 传染病诊断及治疗。E-mail: 13904752248@139.com

PCR 的扩增条件为：94 ℃ 预变性 4 min；94 ℃ 1 min，58 ℃ 30 s，72 ℃ 1 min，进行 30 个循环；72 ℃ 延伸 10 min。

1.5 pET-28a-Wbkc 表达载体的构建和鉴定

将鉴定正确的 pMD18-T-Wbkc 质粒和 pET-28a 表达载体用 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切，回收双酶切后的载体片段，T4 连接酶 16 ℃ 连接过夜，其产物转化细胞，培养过夜后挑取单菌落 37 ℃ 摇菌培养。提取质粒用 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切鉴定。筛选的阳性克隆菌株由基因公司测序完成。

1.6 目的基因的诱导表达及重组蛋白表达形式的分析

将空载体 pET-28a(+) 和测序正确的重组表达质粒 pET-28a-Wbkc 分别转化 BL-21 细胞，卡那霉素(终质量浓度为 100 μg/mL)筛选单菌落，接种于 LB 培养液中，37 ℃ 振荡培养过夜。加入不同梯度浓度 IPTG，分别在诱导 2、3、4、5、6 h 时取培养菌液，SDS-PAGE 进行电泳分析，以确定最佳条件。对阳性菌株进行诱导及裂解破碎后，分别收集上清液及沉淀物，进行聚丙烯酰胺凝胶电泳，对融合蛋白进行可溶性分析。

1.7 重组蛋白纯化

重组菌在 LB 培养基中扩大培养，离心收集菌体，加入冰预冷的 50 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)，2 mmol/L EDTA 洗涤，依次加溶菌酶至 0.1 mg/mL，1/10 的 1% Triton X-100，37 ℃ 孵育 15 min，终浓度为 1 mmol/L 的 PMSF，置冰浴中超声裂解菌体，直至溶液不再粘稠，离心取上清液用 0.45 μm 滤膜过滤。然后目的蛋白经过 His Trap FF 柱进行纯化和收集^[5]。

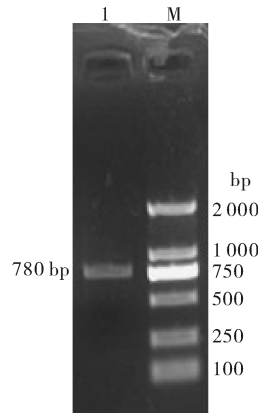
1.8 Western blot 免疫鉴定

Western blot 通过特异性抗体对凝胶电泳处理过的细胞或生物组织样品进行着色。通过分析着色的位置和着色深度获得特定蛋白质在所分析的细胞或组织中的表达情况的信息。用 Western blot 分析重组蛋白的免疫原性。采用的是牛布鲁氏菌，试剂主要购自宝生物工程(大连)有限公司。稀释度采用 1：200~1：500 不同梯度。

2 结果与分析

2.1 Wbkc 特异性基因片段的 PCR 扩增

使用 DL2000 DNA marker，以 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳，约在 780 bp 处出现 1 条清晰条带，与预期片段大小相近(图 1)。



1. 目的片段的扩增 The target genes amplified by PCR; M. 分子质量标记物 DNA marker DL2000.

图 1 Wbkc 特异性基因片段 PCR 产物的电泳结果

Fig.1 Electrophoresis result of Wbkc specific gene fragment of PCR products

2.2 重组克隆和表达载体的构建

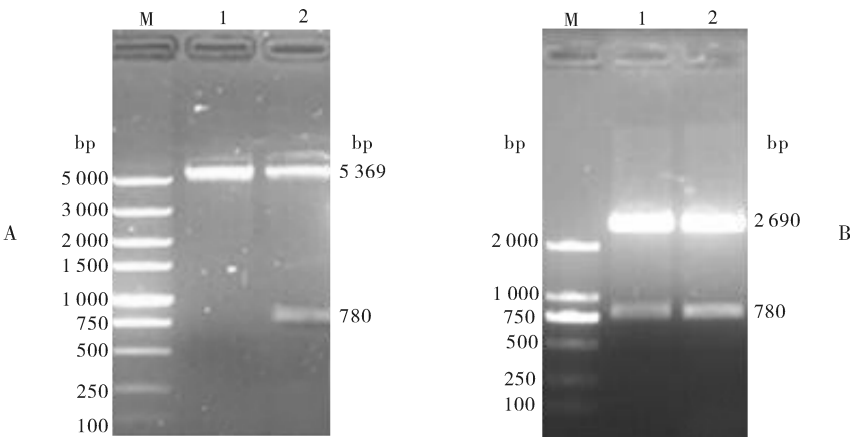
琼脂糖凝胶电泳分析显示，重组克隆质粒 pMD18-T-Wbkc 经 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切的产物可见 780 bp 的目的基因条带和 2 690 bp 的载体条带，大小与预期一致(图 2-A)。重组表达质粒 pET-28a-Wbkc 分别经 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切的产物可见约 5 369 bp 的载体条带和 780 bp 的目的基因条带，大小均与预期的一致(图 2-B)。重组克隆质粒 pMD18-T-Wbkc 和表达质粒 pET-28a-Wbkc 的测序结果与 GenBank 中登录的 *Wbkc* 基因序列(基因 ID:1197129.)一致，表明重组质粒构建成功，目的基因 *Wbkc* 正确插入表达载体的阅读框中。

2.3 重组蛋白的诱导表达

将重组质粒 pET-28a-Wbkc 转入大肠杆菌 BL21 中进行诱导表达，优化 IPTG 浓度、诱导温度及诱导时间，然后进行电泳分析。结果表明其表达产物的相对分子质量与预测的相对分子质量 29 000 相符(图 3)。重组蛋白的阳性菌株大量诱导后，离心收集菌体，用 PBS 悬浮，超声裂解破碎，分别收集上清和沉淀。用 His trap FF 层析柱将表达的融合蛋白进行纯化，并进行 SDS-PAGE 电泳，显示清晰的目的条带(图 3)。

2.4 Western blot 分析

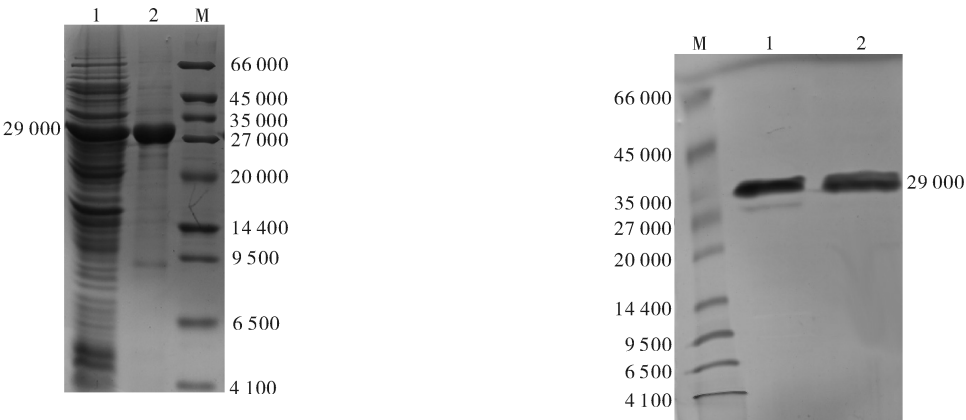
表达重组蛋白的宿主菌经 IPTG 诱导后，进行 SDS-PAGE 电泳，转膜至硝酸纤维素膜，采用小鼠抗组氨酸标签的单抗作为一抗，辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠抗体为二抗进行免疫印迹分析，同时



A. pMD18-T-Wbkc;M. DNA marker DL2000; 1,2. 质粒 pMD18-T-Wbkc 的双酶切产物 Products of plasmid pMD18-T-Wbkc double enzyme; B. pET-28a-Wbkc;M. DNA marker DL2000; 1. 质粒 pET-28a 的双酶切产物 Products of plasmid pET-28a double enzyme; 2. 质粒 pET-28a-Wbkc 双酶切产物 Products of plasmid pET-28a -Wbkc double enzyme.

图 2 重组质粒 pMD18-T-Wbkc(A)、pET-28a-Wbkc(B) 的双酶切产物鉴定 (*Bam*H I / *Sal* I)

Fig.2 Recombinant plasmid double enzyme product identification (*Bam*H I / *Sal* I)



M. 蛋白分子相对分子质量标准 Relative molecular mass protein molecules; 1. 表达产物的 SDS-PAGE Expression product to SDS-PAGE experiments; 2. 纯化的重组蛋白 Purified product of Wbkc protein.

图 3 目的蛋白的表达和纯化 SDS-PAGE 分析

Fig.3 Objective protein expression and purification

SDS-PAGE analysis

采用布鲁氏菌病畜阳性血清进行检测。结果表明，诱导后在表达重组蛋白的位置上出现了明显的印迹反应（图 4）。

3 讨论

布鲁氏菌病是由布鲁氏菌引起的人畜共患病。常规采用细菌学检测方法检测，该技术在实践中由于布鲁氏菌对所需培养条件的要求高，布鲁氏菌在杂菌环境较难生长，培养周期长；利用细菌多糖抗原的血清学检测也由于存在交叉反应和不能鉴别天然感染与接种疫苗所产生的抗体，使临床应用受到限

M. 蛋白分子相对分子质量标准 Relative molecular mass protein molecules; 1, 2. pET-28a-Wbkc 表达产物 The expressed product of pET-28a-Wbkc.

图 4 重组蛋白的 Western blot 检测

Fig.4 The results of Western blot of

recombinant protein

制^[6-7]，布鲁氏菌表面 LPS 分子的完整性与布鲁氏菌的胞内生存能力和毒力有关。而 *Wbkc* 是光滑型布鲁氏菌形成相关的基因之一，已有的研究证实布鲁氏菌细胞壁的脂多糖结构中的 O 链决定其光滑型或表型，O 链缺失会导致光滑型变成粗糙型。

原核表达载体 pET-28a 含组氨酸标签 (His-tag)，这在后续纯化过程中可与镍离子亲和层析柱中镍琼脂糖珠结合而达到纯化蛋白的目的^[8-9]。在诱导 pET-28a-Wbkc 融合蛋白表达的过程中，IPTG 的浓度、培养温度和培养时间均可影响融合蛋白的表达量和表达形式；通过优化试验，发现 pET-28a-

Wbkc 诱导表达的最佳 IPTG 浓度为 1.0 mmol/L，最佳诱导温度为 37 ℃，最佳诱导时间为 4 h。

本试验通过扩增牛布鲁氏菌甲酰基转移酶基因 *Wbkc*，并进行原核表达甲酰基转移酶，证明其具有特异的免疫反应原性，是一种非常好的布鲁氏菌诊断抗原。同时本试验也为后期的蛋白质生物信息学研究和基因缺失标记疫苗株的研制提供了坚实的基础。

参 考 文 献

[1] BOSCHIROLI M L, FOULONGNE V, O'CALLAGHAN D. Brucellosis: a world wide zoonosis[J]. *Curr Opin Microbiol*, 2001, 4 (1): 58-64.

[2] 王景龙, 屈海龙, 王秀然, 等. 羊型布氏菌 *Wbkc* 基因真核表达载体的构建和鉴定[J]. *中国生物制品学杂志*, 2011, 24 (8): 889-892.

[3] PORTE F, NAROENI A, OUHRANI-BETTACHE S, et al. Role of the *Brucella suis* lipopolysaccharide O antigen in phagosomal genesis and in inhibition of phagosome-lysosome fu-

sion in murine macrophages [J]. *Infection and Immunity*, 2003, 71(3): 1481-1490.

[4] SANTOS L, THAIS L, CARDOSO, et al. Inactivation of formyltransferase (*Wbkc*) gene generates a *Brucella abortus* rough strain that is attenuated in macrophages and in mice [J]. *Vaccine*, 2010, 28(34): 5627-5634.

[5] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南 [M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 1998: 42-60.

[6] SURENDRAN N. Live *Brucella abortus* rough vaccine strain RB51 stimulates enhanced innate immune response *in vitro* compared to rough vaccine strain RB51SOD and virulent smooth strain 2308 in murine bone marrow-derived dendritic cells [J]. *Veterinary Microbiology*, 2011, 147(1/2): 75-82.

[7] PANAGIOTIS S, GEORGIOS P, PANAGIOTA B, et al. Cell-mediated immunity in human brucellosis [J]. *Microbes and Infection*, 2011, 13(2): 134-142.

[8] KANG C S, SON S Y, BANG I S. Biologically active and C-amidated hinnavinII-38-Asn produced from a Trx fusion construct in *Escherichia coli* [J]. *Microbiol*, 2008, 46(6): 656-659.

[9] HEDHAMMAR M, GRASLUND T, HOBER S. Protein engineering strategies for selective protein purification [J]. *Chem Eng Technol*, 2005, 28(11): 1315-1320.

Expression and antigenicity analysis of *Wbkc* gene of *Brucella abortus*

LI Xiang-yang^{1,2,3} WANG Xue-li^{2,3} LIU Kai² HUO Xiao-wei²
WU Ying-hong² ZHANG Xian-hua²

1. Adult Education College, Inner Mongolia University for Nationalities, Tongliao 028043, China;
2. College of Animal Science and Technology, Inner Mongolia University for Nationalities, Tongliao 028043, China;
3. Institute of Agricultural Technology Development and Application of Farming-pastoral Zone, Inner Mongolia University for Nationalities, Tongliao 028043, China

Abstract In order to clone the formyltransferase gene (*Wbkc*) of *Brucella abortus*, express the gene in *E. coli* and detect the immunogenicity of the expressed protein, the *Wbkc* gene was amplified from the genomic DNA of *Brucella abortus* by PCR. The amplified fragments were digested with *Bam*H I and *Sal* I and then cloned into the pET28a vector. The constructed recombinant plasmid pET28a-*Wbkc* was transformed to *E. coli* BL-21 and induced to express the fusion protein. The protein was then purified by histidine-binding resin column chromatography and the immunogenicity was detected by Western blot. The recombinant plasmid was verified by PCR, double-enzyme cleavage and sequencing analysis. A specific protein band of 29 000 (relative molecular mass) was identified by SDS-PAGE and the expressed product showed good immunoreactivity by Western blot.

Key words *Wbkc* gene; *Brucella*; prokaryotic expression; antigenicity

(责任编辑: 边书京)