

猪传染性胸膜肺炎放线杆菌 *apxIA* 基因在大肠杆菌中的融合表达与纯化

黄琦^{1,2} 谢芝勋^{1*} 庞耀珊¹ 刘加波¹ 邓显文¹ 谢志勤¹ 谢丽基¹

(1. 广西兽医研究所生物技术实验室 南宁 530001)

(2. 广西大学动物科技学院预防兽医系 南宁 530005)

摘要: 选取猪传染性胸膜肺炎放线杆菌(APP)*apxIA* 基因序列中的抗原决定簇集中的区域, 采用PCR方法从APP血清1型参考株259的基因组DNA中, 扩增*apxIA*基因中约954 bp的片段, 连接到pMD-18T载体, 经测序正确后, 以EcoRI和NotI双酶切, 亚克隆到原核表达载体pGEX-4T-1中, 转化大肠杆菌DH5 α , 经0.4 mmol/L IPTG诱导表达, 产物通过尿素变性复性, 并以Glutathione Sepharose 4B亲和层析的方法对目的蛋白进一步纯化。SDS-PAGE分析结果显示, 目的基因在大肠杆菌DH5 α 中以包涵体形式高效表达, 经薄层凝胶扫描分析占菌体总蛋白的32%, 纯化后的GST融合蛋白纯度达到95%, 为亚单位疫苗和诊断抗原的研究奠定了基础。

关键词: 胸膜肺炎放线杆菌, *apxIA* 基因, 大肠杆菌, 融合表达, 纯化

Fusion Expression of *apxIA* Gene of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in *Escherichia coli* and Its Product Purification

HUANG Qi^{1,2} XIE Zhi-Xun^{1*} PANG Yao-Shan¹ LIU Jia-Bo¹ DENG Xian-Wen¹

XIE Zhi-Qin¹ XIE Li-Ji¹

(1. Biotechnology Lab of Guangxi Veterinary Research Institute, Nanning 530001)

(2. College of Animal Science Technology, Guangxi University, Nanning 530005)

Abstract: A 954 bp fragment corresponded to the main antigen determinant domain of *apxIA* gene of *Actinobacillus pleuropneumoniae*(APP) was amplified by polymerase chain reaction (PCR), from serovar I reference strain 259 and was ligated to pMD-18T vector for sequencing. After confirming the sequence correct, the extracted plasmid DNA was digested with EcoRI and NotI, followed by subsequent ligation into the prokaryotic expression vector, pGEX-4T-1, to construct an expression plasmid pGEX-4T-1/*apxIA*. The recombinant expression vector was transformed into *E. coli* DH5 α for expression under the induction of 0.4 mmol/L IPTG. Glutathione Sepharose 4B was used for a further purification after the GST-fusion protein denatured and refolded by Urea. SDS-PAGE analysis revealed that the recombinant pGEX-4T-1/*apxIA* could be able to express efficiently in a form of inclusion body with 32% accumulated total amount of bacterial

基金项目: 广西科技攻关项目资助(No. 桂科攻 0537008-3B); 广西区水产畜牧局科研计划(No. 桂渔牧科 061910); 新世纪百千万人才工程国家级入选专项资金项目(No. 945200603)

* 通讯作者: Tel: 0771-3105702; 信箱: xiezhixun@126.com

收稿日期: 2007-11-15; 接受日期: 2008-01-22

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

protein and the purity quotient of the GST-fusion protein was up to 95%. It is suitable for the clinical diagnosis and subunit vaccine of *actinobacillus pleuropneumoniae* infection.

Keywords: *Actinobacillus pleuropneumoniae*(APP), *apxIA* gene, *E. coli*, Fusion expression, Purify

胸膜肺炎放线杆菌(*Actinobacillus pleuropneumoniae*, APP)是猪传染性胸膜肺炎 Porcine contagious pleuropneumonia, PCP)的病原菌,该病是一种以肺脏出血、坏死以及纤维素性渗出为特征的猪的高度传染性呼吸道传染病^[1],急性病例死亡率高,慢性耐过的猪生长缓慢、屠宰废弃率高,还常因带菌成为再次爆发和流行的潜在传染源。Apx毒素被认为是APP最主要的毒力因子和免疫原,其中Apx I毒素具有很强的溶血性和较强的细胞毒性,由血清型 1、5、9、10 和 11 分泌,是APP较有效的保护性抗原之一^[2,3]。本试验利用蛋白质分析软件Anthe 5.0,分析了*apxIA*基因序列中抗原位点及亲水区域,选取了主要抗原决定簇相对集中的区域,扩增了*apxIA*的部分基因,构建了原核表达载体,在大肠杆菌DH5 α 中获得高效表达,并对融合蛋白进行了纯化,获得纯度很高的重组蛋白,为下一步新型疫苗多肽成分和ELISA诊断抗原的研究奠定了基础。现将实验结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 菌种、质粒和试剂

APP 血清 1 型国内标准株 259 购自中国兽药监察所;宿主菌 *E. coli* DH5 α 和载体 pGEX-4T-1 由本室保存。T4 连接酶、限制性内切酶、pMD-18T 载体购自宝生物(大连)生物工程公司;HRP 标记的山羊抗兔 IgG 购自晶美生物公司;溶菌酶、IPTG、NAD、氨苄青霉素(Amp)等为 Promega 公司产品;PPLO 培养基和马血清为 GIBCO 公司产品;Glutathion sepharose 4B 为 Amersham-Pharmacia 产品。

1.2 APP 基因组 DNA 的提取

APP259 菌株接种于添加 0.1% NAD 和 5% 马血清的 PPLO 平板上,在 5% CO₂ 条件下 37℃ 培养 24 h 后用灭菌水洗下平板上的菌落,离心收集细菌,按庞耀珊^[4]的方法提取DNA。

1.3 APP259 标准阳性血清的制备

参考文献[5]的方法,培养基为添加了 0.1% NAD 和 5% 马血清的 PPLO。

1.4 *ApxIA* 表达载体的构建

1.4.1 引物的设计和合成: 参考GenBank中*apxIA*的

序列(编号: AF363361),利用Anthe 5.0 软件分析其抗原位点的分布情况及蛋白的亲水性,截取其中抗原决定簇相对集中的区域,设计一对包含 *EcoR* I 和 *Not* I 酶切位点的特异性引物用于扩增目的基因片段。序列为: P1: 5'-GCGAATTTCGAACGAGTTGCAACGA-3'; P2: 5'-GCGCGGCCGCGCGACTACCAAGAAT-3'。引物由上海生工生物工程公司合成。

1.4.2 *apxIA* 基因的扩增及测序: 以 APP 血清 1 型国内参考株 259 基因组 DNA 为模板进行目的基因的 PCR 扩增,反应条件为 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 1 min, 55℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min。0.7% 琼脂糖凝胶电泳,用小量胶回收试剂盒回收 PCR 产物后连接到 pMD-18T 载体,转化大肠杆菌 DH5 α , 阳性重组质粒送宝生物(大连)生物工程公司测序。

1.4.3 *apxIA* 基因原核表达载体的构建: 将 *apxIA* 基因以 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切以后,与经过相同双酶切的 pGEX-4T-1 载体连接,转化大肠杆菌 DH5 α , 构建原核表达载体 pGEX-4T-1/*apxIA*, 分别用 PCR 及酶切的方法鉴定阳性重组质粒。

1.5 *apxIA* 基因在大肠杆菌 DH5 α 中的表达

将含阳性重组质粒 pGEX-4T-1/*apxIA* 的转化菌活化后,按 1:50 的比例接种于 LB+Amp(含氨苄青霉素 50 μ g/mL)中 37℃ 培养至生长对数期(OD_{600} 约为 0.55~0.65),加入 IPTG 至终浓度为 0.4 mmol/L 诱导 4 h。表达的菌体离心沉淀后以适量 PBS 悬浮,加入溶菌酶至终浓度为 100 μ g/mL,超声裂解至菌体不再粘稠后于 4℃ 12000 r/min 离心 10 min,分离上清与沉淀,12% SDS-PAGE 电泳,确定表达产物是以可溶性形式存在(上清中)还是以包涵体形式存在(沉淀中),凝胶扫描分析其占菌体总蛋白的百分比含量。

1.6 包涵体的溶解及复性

收集诱导表达的细菌,以原培养液 1/20 体积的 PBS 悬浮,加入溶菌酶作用(终浓度为 100 μ g/mL),在冰浴中超声波裂解,每次 2 s,间隔 2 s,共 5 min,4℃ 10000 r/min 离心 5 min,弃上清,PBS 重新悬浮沉淀,重复以上步骤 3 次。沉淀以含 8 mol/L 尿素的缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, 2 mmol/L EDTA,

100 mmol/L NaCl, 0.5% (*V/V*) Triton X-100, pH 9.0) 溶解, 室温摇动作作用 1 h~2 h, 4 12000 r/min 离心 10 min, 收集上清, 装入预处理的透析袋中, 在 PBS(加入尿素浓度依次递减为 4 mol/L→2 mol/L→0 mol/L)中 4 进行梯度透析, 换液时间间隔 2 h, 最后再以 PBS 透析过夜, 透析完毕后 4 12000 r/min 离心 10 min。

1.7 GST 重组融合蛋白过柱纯化

将复性后的蛋白溶液按 10:1 的比例加入经 PBS 预处理的 50% Glutathione Sepharose 4B 柱床, 4 摇动作作用 2 h, 3000 r/min 离心 5 min, 小心吸出上清, PBS-T(含 0.5% Triton X-100, *V/V*)洗涤 3 次, 加入还原型谷胱甘肽洗脱液(10 mmol/L reduced glutathione, 50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0)4 摇动作作用 1 h, 3000 r/min 离心 5 min 收获上清, 重复洗脱步骤 2~3 次, 取每次洗脱产物进行 SDS-PAGE 检验其纯度, 同时以 Western-blot 检测其免疫活性。最后合并洗脱产物, 以紫外分光光度计测定其在 260 nm 和 280 nm 的光密度值, 蛋白质浓度(mg/mL)=($1.45 \times OD_{280} - 0.74 \times OD_{260}$) \times 稀释倍数。蛋白溶液过滤除菌, 小量分装冻存于-80。

2 结果

2.1 *apxIA* 基因的 PCR 扩增及测序

经琼脂糖凝胶电泳, 获得大小约为 954 bp 的条带, 与预期片段大小一致(见图 1)。用 DNASTAR 软件比较测序结果与 GenBank 中登录的其它 *apxIA* 基因序列的同源性, 结果显示其核苷酸同源性在 97.6%~99.5%之间。

2.2 重组质粒 pGEX-4T-1/*apxIA* 的鉴定

碱裂解法小量提取重组转化子 pGEX-4T-1/*apxIA*/DH5 α 的质粒 DNA, 经 PCR 鉴定得到一条 954 bp 的条带; 用 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切, 获得约为 954 bp 的目的片段和约 4950 bp 的载体片段(见图 2)。经测序证实目的基因插入正确。

2.3 *apxIA* 基因在大肠杆菌 DH5 α 中的表达

诱导表达的 DH5 α 重组菌经 SDS-PAGE 分析发现, 目的蛋白(相对分子质量 M_r 为 35000 D)以包涵体形式表达, 存在于菌体沉淀中, 与 GST(M_r 为 25600 D)形成 M_r 为 60600 D 的融合蛋白, 凝胶扫描分析显示其占菌体总蛋白的 32% (见图 3)。

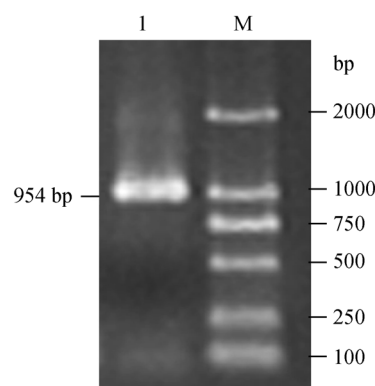


图 1 *apxIA* 基因的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of *apxIA*

1: PCR 扩增产物; M: DNA 分子质量标准

1: Product of PCR; M: DL2000 DNA Marker

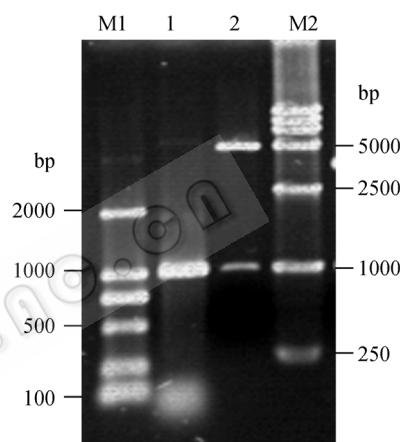


图 2 重组质粒的 PCR 及酶切鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid by PCR and enzyme digestion

M1: DNA 分子质量标准; 1: PCR 鉴定产物; 2: *EcoR* I/*Not* I 双酶切产物; M2: DNA 分子质量标准

M1: DL2000 DNA Marker; 1: pGEX-4T-1/*apxIA* identified by PCR; 2: pGEX-4T-1/*apxIA* digested by *EcoR* I and *Not* I; M2: DL15000 DNA Marker

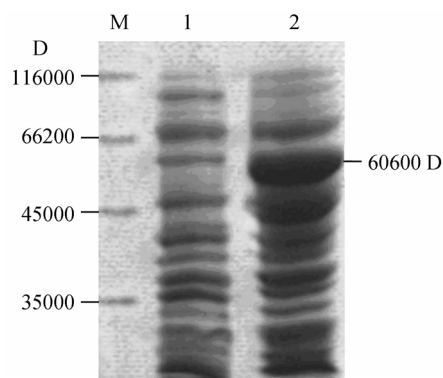


图 3 pGEX-4T-1/*apxIA*/DH5 α 表达产物的 SDS-PAGE 分析
Fig. 3 SDS-PAGE analysis of pGEX-4T-1/*apxIA* /DH5 α expression product

M: 蛋白质分子量标准; 1: 未诱导对照; 2: 诱导的 pGEX-4T-1/*apxIA* /DH5 α

M: Protein Marker; 1: Control(-), non-induced; 2: pGEX-4T-1/*apxIA* /DH5 α , induced

2.4 包涵体的溶解及复性

表达产物经 4 次超声波裂解和离心, 前 3 次收集的上清中均可见较多菌体蛋白, 经 4 次超声裂解的产物能被 8 mol/L 的尿素全部溶解, 经凝胶扫描显示融合蛋白约占包涵体蛋白的 67% (见图 4)。包涵体复性后蛋白溶解良好, 离心无沉淀。

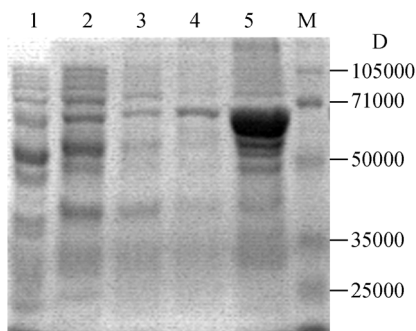


图 4 裂解产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of sonicated product

1-4: 超声波裂解后的上清; 5: 超声波裂解后的沉淀; M: 蛋白质分子量标准

1-4: Supernatant after sonication; 5: Precipitation after sonication; M: Protein Marker

2.5 GST 融合蛋白的过柱纯化及浓度测定

经 Glutathione Sepharose 4B 过柱纯化的产物, SDS-PAGE 的结果显示均只含一条蛋白带, 经凝胶扫描显示其纯度达 95% (见图 5), Western-blotting 结果显示在与目的蛋白大小一致的位置, 出现特异性的反应条带, 证明目的蛋白能与标准阳性血清发生反应 (见图 6)。紫外分光光度计测定其在 260 nm 和 280 nm 的光密度值, 按照蛋白质浓度计算公式计算蛋白的浓度为 1.78 mg/mL。

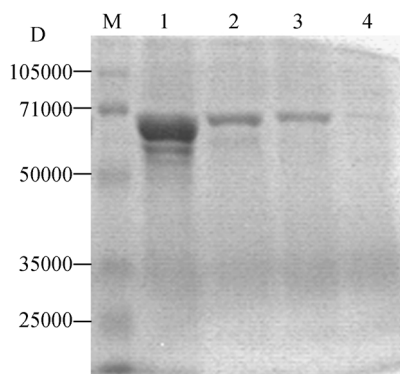


图 5 复性蛋白纯化后的 SDS-PAGE 分析

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of refolded protein after purification

M: 蛋白质分子量标准; 1: 复性后的蛋白; 2-4: 过柱纯化产物

M: Protein Marker; 1: Refolded protein; 2-4: Purified product by Glutathione Sepharose 4B

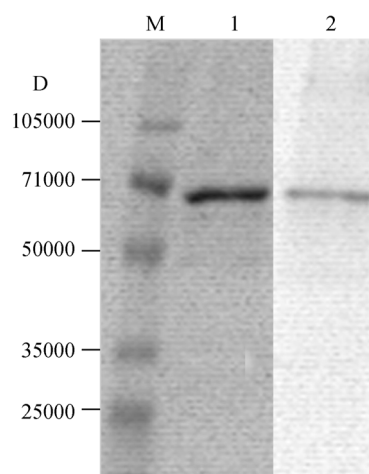


图 6 纯化蛋白的 Western-blot 分析

Fig. 6 Western-blot analysis of purified protein

M: 蛋白质分子量标准; 1: 过柱纯化的蛋白; 2: 免疫印迹

M: Protein Marker; 1: Purified product by Glutathione Sepharose 4B; 2: Result of Western-blot

3 讨论

传统 APP 灭活苗免疫效果不理想, 仅能减轻临床症状和肺部感染程度, 不能刺激动物机体产生高效价抗体, 也不能对其他血清型的感染提供有效的交叉保护力, 因其不含菌体生长过程中分泌的 Apx 毒素^[6,7], 这些毒素在免疫保护方面起关键的作用^[8-10]。天然毒素的提取产量低, 过程繁琐且成本较高, 已证实基因工程表达的重组毒素蛋白, 添加到疫苗中作为亚单位成分可使疫苗获得更好的保护力^[11,12]。本实验从大肠杆菌中高效表达了 ApxIA 毒素蛋白并进行纯化, 获得高纯度的融合蛋白, 为新型亚单位疫苗和诊断抗原的进一步研究奠定了基础。

以 *E. coli* 菌株为代表的原核表达系统, 在短时间内能以低成本获得大量表达蛋白, pGEX-4T-1 表达载体带有强的 *tac* 启动子, 在 IPTG 诱导下可高效表达, 快速的蛋白合成使产物大量堆积, 以至于没有足够的时间进行正确的折叠和二硫键的配对, 形成包涵体沉淀, 但有利的是包涵体对宿主毒性小且可抗蛋白酶的 attack。一般包涵体中含有 50% 以上的重组蛋白。本实验表达的蛋白存在于包涵体中, 约占 67%, 包涵体占整个菌体总蛋白的 32%, 在裂解细胞时采用了先加溶菌酶作用, 后分次超声破菌的方法, 使含有目的蛋白的包涵体释放出来, 在每次超声后弃去上清重新加 PBS 悬浮, 这个过程不但利

于超声破菌,也逐步除去了可溶性的菌体杂蛋白,能获得比较纯的包涵体,省却了包涵体洗涤和纯化的步骤。经多次实验发现,超声裂解3次基本上能除去大部分菌体可溶蛋白。Triton X-100 是一种中性去垢剂,可除去包涵体表面吸附的一些不溶性杂蛋白,如大肠杆菌的核糖体元件、外膜蛋白、脂多糖等细胞碎片^[13]。包涵体经透析复性后,制备成水溶性溶液,经50% Glutathione Sepharose 4B亲和层析,GST融合蛋白被特异地吸附,以还原型的谷胱甘肽分次洗脱,实验发现两次洗脱已基本上将结合的GST融合蛋白洗下,最终获得纯度高达95%的GST-ApxIA融合蛋白,且免疫反应性良好,可供基因工程亚单位疫苗或高纯度的诊断抗原的研究使用。

参 考 文 献

- [1] 斯特劳 BE,阿莱尔 SD,蒙加林 WL 等著.赵德明,张中秋,沈建忠主译.猪病学.第八版.北京:中国农业大学出版社,2000,pp. 357-367.
- [2] Tascon RI, Vazquezholand J, GuLierrezmar Lin CB. The RTX holomolysins ApxI and ApxII are major virulence factor of the swine pathogen *Actinobacillus pleuropneumoniae*: evidence from mutation analysis. *Mol Microbiol*, 1994, **14**(2): 207-216.
- [3] Frey J, Nicolet J. Immunological properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae* hemolysin I. *Vet Microbiol*, 1991, **28**(1): 61-73.
- [4] 庞耀珊,谢芝勋,刘加波,等.二温式PCR检测猪传染性胸膜肺炎放线杆菌方法的建立与应用.广西农业科学, 2006, **37**(2): 203-205.
- [5] 陈凡,何启盖,陈焕春,等.胸膜肺炎放线杆菌生物I型标准抗血清的制备及初步临床应用.中国预防兽医学报, 2004, **26**(6): 458-461.
- [6] Rosendal S, MacInnes JI. Characterition of an attenuated strain of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serotype 1. *Am J Vet Res*, 1990, **51**(5): 711-717.
- [7] Prideaux CT, Pierre L, Krywult J, et al. Protection of mice against challenge with homologous and heterologous serovars of *Actinobacillus pleuropneumoniae* after live vaccination. *Curr Microbiol*, 1998, **37**(5): 324-332.
- [8] Haesebrouck F, Chiers K, Van Overbeke I, et al. *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in pigs: the role of virulence factors in pathogenesis and protection. *Vet Microbiology*, 1997, **58**(2-4): 239-249.
- [9] Byrd W, Hooke AM. Temperature-sensitive mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* induce protection in mice. *Infect Immun*, 1997, **65**(6): 2206-2210.
- [10] Seah JN, Frey J, Kwang J. The N-terminal domain of RTX toxin ApxI of *Actinobacillus pleuropneumoniae* elicits protective immunity in mice. *Infect and Immunity*, 2002, **70**(11): 6464-6467.
- [11] 王春来,刘思国,邵美丽,等.重组ApxIIA对胸膜肺炎放线杆菌灭活疫苗免疫效果的影响.中国兽医科学, 2006, **36**(6): 434-438.
- [12] 刘建杰,陈焕春,李冲,等.新型基因工程亚单位疫苗对猪传染性胸膜肺炎的保护效力研究.中国农业科学, 2005, **38**(3): 596-600.
- [13] Fischer B, Sumner I. Isolation, renaturation, and formation of disulfide bonds of eukaryotic proteins expressed in *E. coli* as inclusion bodies. *Biotech Bioeng*, 1993, **41**(1): 3-13.