

鼠疫菌 V 抗原基因在大肠杆菌中的克隆及表达

傅林锋 王秉翔* 李启明 雷 清 蒋 琳 沈心亮

(兰州生物制品研究所 兰州 730046)

摘 要:从鼠疫杆菌野毒株总 DNA 中利用 PCR 方法扩增出 V 抗原编码基因,将此基因克隆到大肠杆菌的表达质粒 pET-42(+)中,经 IPTG 诱导后,在大肠杆菌 BL21(DE3)细胞中成功地表达出鼠疫菌 V 抗原蛋白。目的蛋白表达量占菌体总蛋白的 32.8%。

关键词:鼠疫杆菌, V 抗原, 基因克隆与表达

中图分类号: Q786 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2003)04-0430-04

鼠疫杆菌(*Yersinia pestis*)是腺鼠疫、肺鼠疫的自然疫源性病原,曾经以“瘟疫”的形式给人类的健康造成了极大的影响,近年个别地区仍有发生。对自然疫源性鼠疫的预防一般采用疫苗、药物、灭鼠等综合措施。由于生物恐怖袭击事件的发生,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。目前世界上使用的人用鼠疫疫苗主要有减毒活疫苗和灭活全菌体疫苗,这两种疫苗免疫效果的确定性和接种反应方面存在一些弱点,为此研制一种保护力更强的新疫苗取代现行疫苗势在必行。

已研究发现的鼠疫杆菌中主要抗原成分或毒力因子有 F1(荚膜抗原)、Lcr(低钙反应蛋白,包括 LcrG, LcrV, LcrH 等)、Yops(耶尔森氏菌外膜蛋白)、Pgn(色素沉着)和 Pst 1(鼠疫毒素 1)等。这些毒力因子的编码基因主要位于细菌质粒上,并且主要集中在分子量 6MD、45MD 和 65MD 3 种质粒上^[1~3]。V 抗原是主要毒力成分,其分子量为 36kD。实验证实鼠疫杆菌的众多抗原蛋白中,V 抗原(LcrV)具有较高免疫原性,且与 F1 抗原有很强的协同保护作用。用鼠疫 V 抗原和 F1 抗原的双价抗原免疫后的小鼠,在抗鼠疫免疫保护力上高于仅用 F1 单价抗原免疫的小鼠^[4,5]。由于 V 抗原的存在使鼠疫菌具有较强的致病性,故在活疫苗中经传代已被去除,从而使其失去了一个较重要的免疫原。利用基因工程手段有选择地表达此保护抗原中的有效成分是研制新型鼠疫疫苗的关键步骤。

本研究以鼠疫野毒株中的全 DNA 为模板,利用 PCR 扩增出鼠疫 V 抗原的全结构蛋白编码基因,将其克隆到大肠杆菌表达质粒 pET-42(+)中,并获得了有效表达,为研制开发新一代基因工程鼠疫疫苗奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

鼠疫杆菌(*Y. pestis*)野毒株为甘肃省地方病研究所保存,大肠杆菌 BL21(DE3)购自

* 通讯作者。Tel 86-931-9340311 转 6116; Fax 86-931-8343199; E-mail: wangbxa@peoplemail.com.cn

作者简介:傅林锋(1963-),女,生物医学高级工程师,学士,主要从事疫苗研制工作。E-mail: linfengfu@yahoo.com.cn

收稿日期: 2002-09-23, 修回日期: 2002-11-26

Novagen 公司,表达质粒 pET-42H(+) 购自 Novagen 公司,PTC-100 PCR 仪为美国 MJ 公司制造,PCR 试剂盒购自 Gibicol 公司、DNA 内切酶、T4 DNA 连接酶和 DNA 纯化试剂盒均购自 Gibicol 公司。

1.2 细菌总 DNA 和质粒的提取

V 抗原结构基因 DNA 扩增模板,在国家一级实验室中制备。将鼠疫菌野毒株接种于含 1% 脑心浸粉(Difco)的厚氏固体培养基^[6]上,37℃ 培养 48 h,取培养物 1 mL,离心,弃上清,沉淀用 pH7.8 TE 溶液悬浮,于 95℃ 水浴中煮 20 min。离心,上清用 0.22 μm 滤膜除菌过滤。滤液置 4℃ 备用用于 PCR 扩增。质粒的提取按常规方法^[7]进行。

1.3 PCR 扩增

根据 Price 等^[7]报道的 *Yersinia pestis* LcrV DNA 序列,经微机分析设计合成了一对引物:P1 为 5'-GCGCATTTTCATATGATTAGAGCCTACGAAC-3'(有下划线处为内切酶 *Nde*I 位点),P2 为 5'-CTCGTGAAGCCTACCAGACGTGTCATCTAG-3'(有下划线处为内切酶 *Hind*III 位点)。

反应条件 94℃ 5min,55℃ 1min,72℃ 2min,然后 94℃ 45s,55℃ 45s,72℃ 80s,共 30 个循环,最后 72℃ 8min。产物进行琼脂糖凝胶电泳检测或置 4℃ 备用。

1.4 DNA 酶切和连接

用于连接的 DNA 片段在连接前先进行纯化,酶切和连接参照产品说明书的方法进行。

1.5 大肠杆菌感受态细胞制备和质粒转化^[7]

大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞按常规方法制备。构建质粒对大肠杆菌的转化用氯化钙法进行,转化的细菌在含 50 μg/mL 卡那霉素的 LB 培养基平板上进行筛选。

1.6 细胞表达培养与破碎

将筛选鉴定成功的重组大肠杆菌接种于 LB 液体培养基(含卡那霉素 50 μg/mL),37℃ 振荡培养过夜,1:20 量接种同一培养基,培养 6 h,加入 IPTG 溶液使终浓度为 1 μg/mL,继续诱导培养 4 h。4℃ 离心收集菌体,经超声波破碎、离心,将上清和沉淀分别制样测定表达蛋白及其浓度。

1.7 电泳分析

DNA 片段和质粒检测采用琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色,自动成像仪下拍照,进行条带和分子量分析。

蛋白质 SDS-PAGE 采用 13% 分离胶、4.5% 浓缩胶,考马斯亮蓝 R250 染色。对蛋白带扫描检测分子量,并测定表达蛋白百分含量。

2 结果

2.1 V 抗原结构基因的获取

经 1% 琼脂糖凝胶电泳,扩增得到的基因片段约为 1000 bp(图 1),与预期的目的 DNA 分子量 998 bp 一致。

2.2 重组质粒的构建和转化

图 2 为重组质粒 pET-42H(+) /LcrVs 的模式图。由于选用 *Nde*I /*Hind*III 双酶切质粒载体,这个质粒中的 GST 标签约 900 bp 被切去,所以构建出非融合型表达质粒,其大小为 6 005 bp。将此重组质粒命名为 pET-42H(+) /LcrVs。

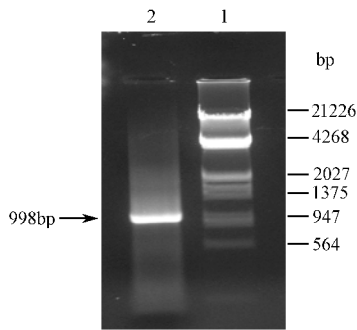


图 1 V 抗原基因 PCR 扩增电泳图

Fig.1 Agrose Gel electrophoresis of antigen V gene PCR amplifier

1. λ DNA/*EcoR* I + *Hind* III ; 2. PCR product.

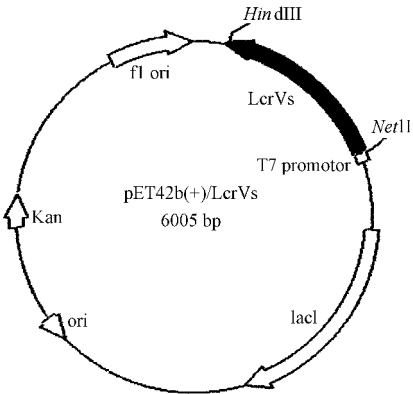


图 2 构建的表达载体 pET-42b(+) + γ LcrVs

Fig.2 The constructed expression vector pET-42b(+) + γ LcrVs

用 *Hind* III/*Xba* I 双酶切法、PCR 法鉴定含有插入片段的重组克隆 ,对阳性克隆进行序列分析 ,将此重组菌命名为 LcrV2058。对提取的质粒 pET-42b(+) + γ LcrVs ,用 PCR 法扩增得到一条 DNA 片段 ,分子量 1000 bp 左右 ,与设计扩增产物分子量接近 ;用 *Hind* III 和 *Xba* I 双酶切 ,经琼脂糖凝胶电泳产生一条约 1000 bp 的目标基因片段电泳带和一条约 5000 bp 的载体片段电泳带(图 3)。说明外源基因片段正确插入表达载体 ,非融合型载体改造是成功的。克隆 V 基因片段 DNA 测序由上海生工生物技术有限公司完成 ,结果在 981 bp 中有 6 个碱基发生了突变 ,全序列碱基排列与文献所提供的序列^[8]符合率为 99.39%。其中 1 个为同义突变 ,5 个为异义突变 ,造成的氨基酸改变为 18Asn→Lys ,72Arg→Lys ,103Glu→Lys ,273Ser→Cys ,321Asp→Glu。

2.3 V 抗原蛋白的表达和初步检测^[9,40]

LcrV2058 菌在含卡那霉素的 LB 液体培养基培养 ,菌体经超声波破碎 ,并经 SDS-PAGE 检测 ,结果显示重组菌株经 IPTG 诱导培养后可高效表达目标蛋白。表达蛋白分子量约为 36 kD(图 4)。经凝胶蛋白密度扫描分析 ,目标蛋白表达量占菌体总蛋白的 32.8%。

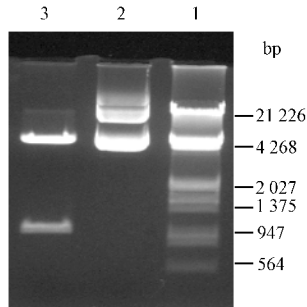


图 3 pET-42b(+) + γ LcrVs 质粒酶切电泳图

Fig.3 Agarose gel electrophoresis of pET-42b(+) + γ LcrVs endoenzyme fragments

1. λ DNA/*EcoR* I + *Hind* III ; 2. pET-42b(+) + γ LcrVs ; 3. pET-42b(+) + γ LcrVs/*Hind* III + *Xba* I .

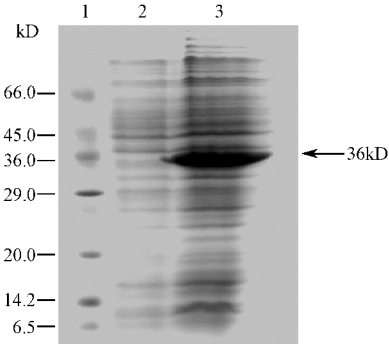


图 4 LcrV2058 菌表达蛋白的 SDS-PAGE

Fig.4 SDS-PAGE of the expression proteins of LcrV2058

1. Molecular marker ; 2. *E. coli* BL21(DE3) ; 3. LcrV2058 .

3 讨论

本实验应用 PCR 技术直接从鼠疫野毒株中调出 V 抗原结构蛋白编码基因,再克隆到原核表达载体 pET-42b(+)上,在 *E. coli* DE3 中实现了高效表达。实验选用 *Nde* I 和 *Hind* III 两种核酸内切酶将质粒中的 GST 标签蛋白切掉,再将目的基因正确插入,构建出了非融合型表达质粒,这样最终所表达的目标蛋白即为非融合型蛋白。这种非融合型蛋白更有利于以后的抗原性研究。

初步的实验结果发现,诱导表达的目标蛋白绝大部分存在于大肠杆菌细胞质中,在破碎细胞的离心沉淀中仅含有少量目标蛋白。至于所构建的重组表达菌株是由于表达量低而不形成包含体,还是其本身就不形成包含体,尚需通过优化表达条件进行实验证明。

参 考 文 献

- [1] Protsenko O A , Anisimov P I , Mozharov O T , *et al.* Detection and characterization of *Yersinia pestis* plasmids determining pesticin I , Fraction I antigen , and " Mouse " toxin synthesis. *Genetika* , 1983 , **19** :1081 ~ 1090.
- [2] Straley S C , Skrzypek E , Plano G V , *et al.* Yops of *Yersinia* spp. pathogenic for humans. *Infect Immun* , 1993 , **61** :3105 ~ 3110.
- [3] Sodeinde O A , Goguen J. Genetic analysis of the 9.5-kilobase virulence plasmid of *Yersinia pestis* . *Infect Immun* , 1988 , **56** : 2743 ~ 2748.
- [4] 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. *Vaccine* , 1998 , **16** (11/12) : 1131 ~ 1137.
- [5] Titball R W , Williamson E D. Vaccination against bubonic and pneumonic plague. *Vaccine* , 2001 , **19** :4175 ~ 4184.
- [6] 陈天寿.微生物培养基的制造与应用.北京:中国农业出版社,1995. p62.
- [7] J. 萨姆布鲁克 , E. F. 费里其 , T. 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南. 金冬雁, 黎孟枫, 译. 第二版. 北京:科学出版社,1993.
- [8] Price S B , Leung K Y , Barve S S , *et al.* Molecular analysis of *lcrGVH* , the V antigen operon of *Yersinia pestis* . *J Bacteriology* , 1989 , **171** (10) :5646 ~ 5653.
- [9] Carr S , Miller J , Leary S E C , *et al.* Expression of a recombinant form of the V antigen of *Yersinia pestis* , using three different expression systems. *Vaccine* , 2000 , **18** :153 ~ 159.
- [10] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术. 第二版. 北京:中国协和医科大学出版社,1999.

Cloning and Expression of *Yersinia pestis* V Antigen in *Escherichia coli* BL21(DE3)

Fu Linfeng Wang Bingxiang* Li Qiming Lei Qing Jiang Lin Shen Xinliang
(Lanzhou Institute of Biological Products , Lanzhou 730046 , China)

Abstract : The structure gene of V antigen was amplified from the wild strain of *Yersinia pestis* by means of PCR , and was cloned into vector pET-42b(+). Then , V antigen was successfully expressed in *E. coli* BL21(DE3) with the induction of IPTG . The expressing amount of the aim protein is as high as 32.8 percent of the total bacterial protein.

Key words : *Yersinia pestis* , V antigen , Gene cloning and expression

* Corresponding author. Tel 86-931-9340311-6116 Ext.6166 ; Fax 86-931-8343199 ; E-mail : wangbxa@peoplemail.com.cn