

文章编号:1007-2985(2013)05-0085-04

# 红斑丹毒丝菌 C43065 株 spaA 基因的克隆和表达<sup>\*</sup>

刘丹丹,杨振龙,吾鲁木汗·那孜尔别克

(吉首大学生物资源与环境科学学院,湖南 吉首 416000)

**摘要:**通过 PCR 从红斑丹毒丝菌 C43065 株基因组 DNA 中扩增出编码信号肽除外的成熟 SpaA 蛋白基因 spaA,将其克隆到表达载体 pET32a 的 BamH I 和 Hind III 位点上,构建重组表达质粒 pET-spaA,转化大肠杆菌 BL21,在 IPTG 诱导下表达 N 端带有 Trx 标签的融合蛋白 rSpaA,SDS-PAGE 检测表达蛋白,DNA 测序结果表明,spaA 基因大小为 1794 bp,编码由 597 个氨基酸残基组成的成熟 SpaA 蛋白,SDS-PAGE 结果显示在大肠杆菌 BL21 中成功表达了分子量约为 86 kDa 的重组 rSpaA,为进一步开展 SpaA 保护区域的研究奠定基础。

**关键词:**红斑丹毒丝菌;spaA 基因;克隆;原核表达

**中图分类号:**S588.28

**文献标志码:**A

**DOI:**10.3969/j.issn.1007-2985.2013.05.021

猪丹毒是一种由猪的血清型 1 和 2 红斑丹毒丝菌(*Erysipelothrix rhusiopathiae*)引起的接触性传染病,对养猪业造成严重的经济损失<sup>[1]</sup>。目前,预防猪丹毒的灭活疫苗和弱毒疫苗只能预防特急性、急性和风疹性疾病,而无法预防本菌引起的慢性疾病,且在疫苗应用中仍有疫情再次爆发,至今世界各地尚未彻底消灭本病<sup>[2-3]</sup>。因此,研究红斑丹毒丝菌菌体表面蛋白的免疫功能,为猪丹毒的免疫预防可提供理论依据。

Kitajima 等<sup>[4]</sup>用血清型 2 红斑丹毒丝菌菌体表面蛋白研制疫苗,保护试验结果显示,该蛋白疫苗能保护 SPF 猪受同源菌株和异源菌株的致死性感染,并推测 64~67 ku 的菌体表面蛋白可能具有保护作用。Makino 等<sup>[5]</sup>用单抗从血清型 2 红斑丹毒丝菌基因组文库中克隆出编码 64 ku 表面保护性抗原 A(surface protective antigen A,SpaA)的基因,用大肠杆菌表达系统分别表达重组 rSpaA 和缺失 C 端 160 个氨基酸残基的 ΔSpaA,并检测它们对小鼠的保护作用,结果表明,rSpaA 的保护作用与其 C 端的 160 个氨基酸序列有关。但 Imada 等<sup>[6]</sup>的研究表明,SpaA 的保护作用与其 N 端 342 个氨基酸序列(SpaA-N)有关。吾鲁木汗等<sup>[7]</sup>用 PCR 从血清型 2 红斑丹毒丝菌基因组中克隆出 spaA-N 基因序列并进行原核表达,保护试验结果显示,rSpaA-N 免疫组小鼠对强毒株 C43065 攻毒的保护率为 100%。

上述研究结果表明,SpaA 是红斑丹毒丝菌的保护性抗原,但是其 C 端重复序列的保护作用尚未清楚。笔者采用 PCR 从强毒株 C43065 基因组中克隆出编码信号肽除外的成熟 SpaA 的基因,并对 spaA 基因进行原核表达。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

红斑丹毒丝菌 C43065 株购自中国兽医菌种保藏管理中心;大肠杆菌 DH5α 和 BL21 购自大连宝生物工程股份有限公司;原核表达载体 pET32a 由本实验室保存;Ex TaqDNA 聚合酶、dNTPs、限制性核酸内切酶、DNA 连接试剂盒、质粒 DNA 提取试剂盒、胶回收试剂盒、DL2000 DNA marker、λ-Hind III digest DNA

\* 收稿日期:2013-06-09

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31072142)

作者简介:刘丹丹(1987-),女,湖南邵东人,吉首大学生物资源与环境科学学院硕士研究生,主要从事微生物生态学

研究  
通讯作者:吾鲁木汗·那孜尔别克,吉首大学生物资源与环境科学学院教授,博士,从事畜禽传染病免疫预防,E-mail:ulum@jsu.edu.cn.

marker、protein marker 均为大连宝生物工程有限公司产品;IPTG 为 Promega 公司产品;BHI(Brain Heart Infusion)液体培养基和 BHI(Brain Heart Infusion Agar)固体培养基均为 Difco 公司产品.

## 1.2 方法

1.2.1 红斑丹毒丝菌 C43065 株基因组 DNA 的提取 BHI 固体培养上划线接种 C43065 菌株,将单菌落接种于含有质量分数为 0.1% Tween-80 的 BHI(BHI-T)液体培养基中,37℃ 静置培养 18 h,采用 CTAB 法制备基因组 DNA.

1.2.2 *spaA* 基因的 PCR 扩增和重组表达载体的构建 根据 C43065 株 *spaA* 基因的核苷酸序列(登录号为: EF688017) 设计引物 P1 (5'-CGCGGATCCGATTCGACAGATATTTTC-3') 和 P2 (5'-CG-CAAGCTTCTATTTTAACTTCCATC-3'),分别插入 BamH I 和 Hind III 酶切位点(下划线部分),引物由大连宝生物工程有限责任公司合成.PCR 反应体系为 50  $\mu$ L,反应条件(温度/时间):94  $^{\circ}$ C/5 min;94  $^{\circ}$ C/30 s,55  $^{\circ}$ C/1 min,72  $^{\circ}$ C/1.8 min;35 个循环;最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min.采用质量分数为 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,采用 BamH I 和 Hind III 双酶切 PCR 产物和载体 pET32a 并分别进行切胶回收,用 DNA 连接试剂盒将回收得到的 DNA 片段和构建重组表达质粒 pET-*spaA*,转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞,经含氨苄青霉素的 LB 固体培养基筛选阳性克隆,用菌液 PCR、BamH I 和 Hind III 酶切鉴定重组子,通过 DNA 测序验证阅读框是否正确及有无突变.

1.2.3 重组蛋白 rSpaA 的表达及检测 经 DNA 测序证明无误后,将重组质粒 pET-*spaA* 转化大肠杆菌 BL21,挑取单菌落接种于 5 mL 的 LB 培养基(含质量浓度为 100  $\mu$ g/mL 的氨苄青霉素)中,37  $^{\circ}$ C 摇床培养 6 h.分别取 0.5 mL 菌液,接种到 2 份 20 mL 新鲜的 LB 培养基(含质量浓度为 100  $\mu$ g/mL 的氨苄青霉素)中,37  $^{\circ}$ C 摇床培养,待菌液的 OD<sub>600</sub> 值到达 0.6 时,在其中一份菌液加入 IPTG(浓度为 0.2 mmol/L),30  $^{\circ}$ C 继续培养 4 h.取 1 mL 菌液,8000 r/min 离心 2 min 弃上清收集菌体,菌体用 PBS 溶液洗涤 2 次,取 50  $\mu$ L 菌液后加等体积 2 $\times$ SDS-PAGE 上样缓冲液 100  $^{\circ}$ C 煮沸 10 min.采用 4% 浓缩胶和 12.5% 分离胶的 SDS-PAGE 检测表达蛋白.为了检测表达蛋白的表达形式,将诱导后的菌体悬浮于 20 mL 的 PBS 溶液中,反复冻融 3 次后,用超声波破碎机破碎菌体(超声条件:超声 5 s 间隔 6 s,共 15 min),离心收集上清和沉淀,通过 SDS-PAGE 检测目的蛋白在大肠杆菌 BL21 中的表达情况.

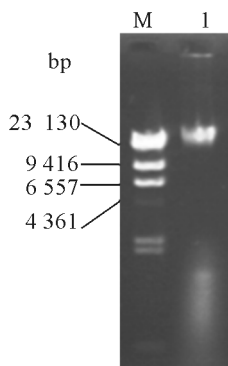
## 2 实验结果

### 2.1 红斑丹毒丝菌 C43065 株基因组 DNA 的制备

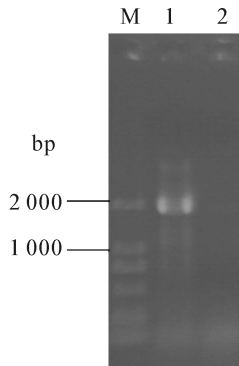
采用 CTAB 法提取 C43065 株基因组 DNA 后,用质量分数为 0.6% 的琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA.结果显示 C43065 株基因组 DNA 大小约为 23 kb 左右(见图 1),与已报道的红斑丹毒丝菌基因组大小一致.

### 2.2 红斑丹毒丝菌 C43065 株 *spaA* 基因的 PCR 扩增

用 *spaA* 基因的特异性引物经 PCR 从红斑丹毒丝菌 C43065 株基因组 DNA 中扩增出大小约为 1.7 kb 的片段(见图 2),与预期值相符.



M: $\lambda$ -Hind III digest DNA marker;  
1:Genomic DNA of C43065



M:DL2000 DNA marker;1:PCR product of *spaA*;  
3:Negative control

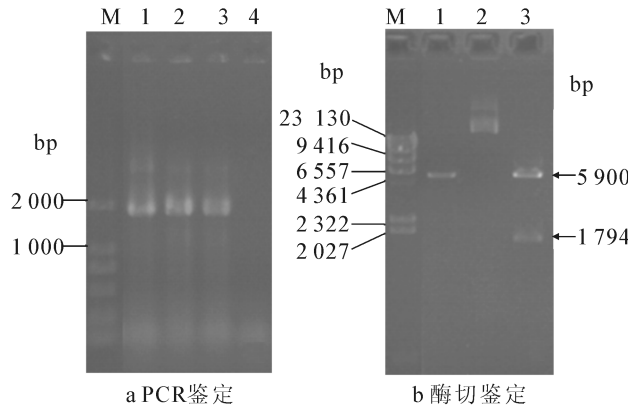
图 1 红斑丹毒丝菌 C43065 株基因组 DNA 的琼脂糖电泳检测 图 2 红斑丹毒丝菌 C43065 株 *spaA* 基因的 PCR 扩增

### 2.3 重组表达质粒 pET-spaA 的构建和鉴定

将上述扩增的 PCR 产物和 pET32a 载体分别用 BamH I 和 HindIII 双酶切,纯化后用 DNA 连接试剂盒进行连接并构建重组表达质粒 pET-spaA. 通过 PCR 检测在重组质粒 pET-spaA 中的插入 DNA 片段大小,琼脂糖电泳检测结果显示 PCR 产物大小为 1.7 kb(见图 3-a),重组质粒 pET-spaA 经 BamH I 和 HindIII 酶切后获得 1 条 1.8 kb 的插入片段(见图 3-b),而 DNA 测序结果表明重组质粒含有 1794 bp 的插入片段,其编码信号肽除外的 597 个氨基酸的成熟 SpaA 蛋白.

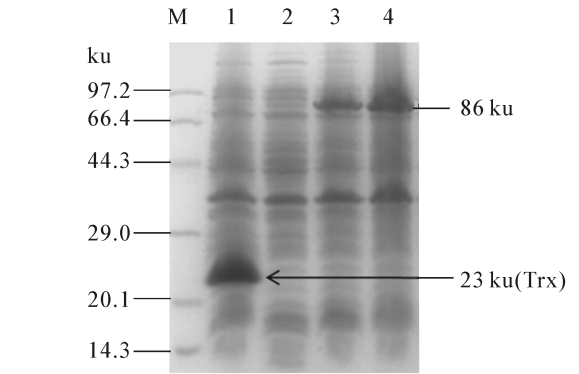
### 2.4 表达蛋白的 SDS-PAGE 检测

SDS-PAGE 检测结果表明,与对照即空载体 pET32a 转化的大肠杆菌 BL21 相比,pET-spaA 转化的大肠杆菌 BL21 在 86 ku 位置出现表达量较高的蛋白条带(见图 4 泳道 3),与预期的融合蛋白 Trx-SpaA 分子量相符. 表达后的菌体经反复冻融和超声波破碎后,分别取上清液和沉淀进行 SDS-PAGE 分析,结果表明重组 rSpaA 蛋白以可溶蛋白的形式存在于上清中(见图 4 泳道 4).



A: M. DL2000 DNA marker; 1-3: PCR products of spaA; 4. Negative control. B: M,  $\lambda$ -HindIII digest DNA marker; 1. pET32a digested with BamHI; 2. Undigested pET-spaA; 3: pET-spaA digested with BamH I and HindIII

图 3 重组质粒 pET-spaA 的 PCR(a)和酶切(b)鉴定



M: Protein marker; 1: E. coli BL21 harboring pET32a; 2: E. coli BL21 harboring pET-spaA without IPTG induction; 3: Precipitate of E. coli BL21 harboring pET-spaA induced with IPTG; 4: Supernatant of E. coli BL21 harboring pET-spaA induced with IPTG

图 4 重组蛋白 rSpaA 的表达及其可溶性分析

## 3 讨论

(1) 采用 PCR 从血清型 2 红斑丹毒丝菌 C43311 基因组中克隆编码 SpaA-N 的基因片段,用原核表达系统表达 rSpaA-N 并检测其保护作用,实验结果表明,重组 rSpaA-N 完全保护小鼠受强毒株 C43065 的致死性感染<sup>[7]</sup>. Makino 等<sup>[8]</sup>的研究表明,SpaA 的结构及其 C 端重复序列和肺炎链球菌胆碱结合蛋白之间有很高的同源性,而 SpaA 通过其 C 端重复序列能够与枯草芽孢杆菌和肺炎链球菌等革兰氏阳性菌细胞壁的脂磷壁酸(LTA)结合,提示 LTA-SpaA 复合物可能在红斑丹毒丝菌致病过程中发挥一定的作用. 文献<sup>[7-8]</sup>研究结果可知:SpaA 是红斑丹毒丝菌的主要保护性抗原,可作为猪丹毒亚单位疫苗的候选抗原,但是 SpaA 蛋白 C 端重复序列的保护作用和致病作用尚未清楚.

(2) 经 PCR 从红斑丹毒丝菌 C43065 基因组中克隆出编码 SpaA 蛋白的 spaA 基因,将其克隆至表达载体 pET32a 的多克隆位点上,转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态,通过 PCR 筛选重组菌后提取其质粒 DNA, DNA 测序结果表明,spaA 基因大小为 1794 bp,编码 597 个氨基酸残基的成熟 SpaA 蛋白,与已报道的 C43065 株和 C43311 株的 spaA 基因序列完全相同.<sup>[9-10]</sup>将重组质粒 pET-spaA 导入大肠杆菌 BL21 感受态后,通过 IPTG 诱导表达目的蛋白,SDS-PAGE 结果显示在重组菌 pET-spaA/BL21 的超声波破碎液中观察到分子量约为 86 ku 的蛋白条带,与预期值相符,为进一步开展 SpaA 蛋白保护区域及其致病机理的研究奠定基础.

## 参考文献:

- [1] TAKAHASHI T, FUJISAWA T, TAMURA Y, et al. DNA Relatedness Among *Erysipelothrix Rhusiopathiae* Strains Representing All Twenty-Three Serovars and *Erysipelothrix Tonsillarum* [J]. Int. J. Syst. Bacteriol, 1992, 42(3): 469 - 473.
- [2] FTHENAKIS G, CHRISTODOULOPOULOS G, LEONTIDES L, et al. Abortion In Ewes Associated with *Erysipelothrix Rhusiopathiae* [J]. Small Ruminant Research, 2006, 63(1 - 2): 183 - 188.
- [3] EAMENS G, CHIN J, TURNER B, et al. Evaluation of *Erysipelothrix Rhusiopathiae* Vaccines in Pigs by Intradermal Challenge and Immune Responses [J]. Vet. Microbiol, 2006, 116(1 - 3): 138 - 148.
- [4] KITAJIMA T, OISHI E, AMIMOTO K, et al. Protective Effect of NaOH-Extracted *Erysipelothrix Rhusiopathiae* Vaccine in Pigs [J]. J. Vet. Med. Sci., 1997, 60(1): 9 - 14.
- [5] MAKINO S, YAMAMOTO K, MURAKAMI S, et al. Properties of Repeat Domain Found in a Novel Protective Antigen, SpaA, of *Erysipelothrix Rhusiopathiae* [J]. Microb. Pathog, 1998, 25(2): 101 - 109.
- [6] IMADA Y, GOJI N, ISHIKAWA H, et al. Truncated Surface Protective Antigen (SpaA) of *Erysipelothrix Rhusiopathiae* Serotype 1a Elicits Protection Against Challenge with Serotypes 1a and 2b in Pigs [J]. Infect Immun., 1999, 67(9): 4 376 - 4 382.
- [7] 吾鲁木汗·那孜尔别克, 张磊, 何翠, 等. 猪丹毒丝菌天然 SpaA 和重组 SpaA-N 免疫保护效果的评价 [J]. 微生物学报, 2010, 50(3): 367 - 372.
- [8] MAKINO SI, YAMAMOTO K, ASAKURA H, et al. Surface Antigen, SpaA, of *Erysipelothrix Rhusiopathiae* Binds to Gram-Positive Bacterial Cell Surfaces [J]. FEMS Microbiol Lett, 2000, 186(2): 313 - 317.
- [9] 吾鲁木汗·那孜尔别克, 张磊, 何翠, 等. 猪丹毒丝菌 C43065 株表面保护性抗原 AN 端保护区在大肠杆菌中的表达 [J]. 生物技术通讯, 2008, 19(4): 548 - 551.
- [10] 吾鲁木汗·那孜尔别克, 刘祝祥, 李科, 等. 猪丹毒丝菌 C43311 株 spaA 基因 N 端免疫保护区的克隆和表达 [J]. 微生物学报, 2008, 48(2): 207 - 212.

## Cloning and Expression of spaA Gene of *Erysipelothrix Rhusiopathiae* C43065

LIU Dan-dan, YANG Zhen-long, NAZIERBIEKE Wulumuhan

(College of Biology and Environmental Sciences, Jishou University, Jishou 416000, China)

**Abstract:** The spaA gene encoding mature surface protective antigen A (SpaA) without signal peptide was amplified from genomic DNA of *E. rhusiopathiae* C43065 by PCR. The BamH I and Hind III digested PCR product was cloned into prokaryotic expression vector pET32a to generate a recombinant plasmid pET-spaA. The recombinant protein rSpaA was expressed in *E. coli* BL21 harboring the recombinant plasmid pET-spaA by IPTG inducing, and the expressed protein was determined by SDS-PAGE. The DNA sequence analysis showed that the spaA gene of C43065 strain was 1794 bp in length. SDS-PAGE analysis revealed a single protein band with a molecular weight of 86 kDa successfully expressed in *E. coli* BL21. The expressed protein of rSpaA will contribute to further study on protective domain of this protein.

**Key words:** *Erysipelothrix rhusiopathiae*; spaA gene; cloning; prokaryotic expression

(责任编辑 易必武)