

布鲁氏菌 omp28 基因的克隆、表达及重组蛋白的反应原性分析

王秀丽,蒋玉文*,毛开荣,丁家波,程君生,王楠

(中国兽医药品监察所,北京 100081)

[收稿日期] 2012-12-17 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2013) 06-0004-05 [中图分类号] S852.61

[摘要] 本研究克隆了羊种布鲁氏菌 16M 株、羊种布鲁氏菌 M28 株、犬种布鲁氏菌、绵羊附睾种布鲁氏菌、牛种布鲁氏菌 A19 株、猪种布鲁氏菌 S2 株的 omp28 基因并对以上不同种菌株的 omp28 基因序列及编码的氨基酸序列进行了比对,结果显示不同种布鲁氏菌 omp28 基因之间仅 6 个碱基不同,而且只有 2 个氨基酸不同,亲水性分析结果显示两处氨基酸的差异对蛋白亲水性不造成影响。将羊种布鲁氏菌 16M 的 omp28 基因亚克隆到 pET32a 中表达,OMP28 在低温下诱导以可溶性形式高效表达。Western-blot 结果显示 OMP28 反应原性良好,是布鲁氏菌病诊断抗原的可能选择。

[关键词] 布鲁氏菌;omp28 基因;克隆表达;反应原性

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(20090327)

作者简介: 王秀丽,硕士,从事兽用生物制品的检验及研究。

通讯作者: 蒋玉文。E-mail:jiangyuwen@ivdc.gov.cn

应用^[9]。比较试验结果表明,本试剂盒与 IFA 试验和商品化进口试剂盒的总符合率分别为 96.63% 和 97.75%,适合猪场血清抗体检测,对 PCV2 流行病学调查有重要意义;不同来源疫苗人工免疫血清检测结果表明,本试剂盒适合市场上基因工程疫苗和全病毒灭活苗的免疫猪血清抗体的检测,可用于疫苗效果评价和猪群免疫抗体水平的监测。

参考文献:

- [1] 李玉梅. 猪圆环病毒的流行及诊断[J]. 养殖技术顾问, 2010,9:155.
- [2] 龚乾龙,王欢,邓治邦. 检测猪圆环病毒方法的研究进展[J]. 上海畜牧兽医通讯,2010,(6):17-19.
- [3] 张燕霞,朱连德. 猪圆环病毒疫苗应用现状[J]. 猪业科学, 2011,(11):32-34.
- [4] Mahé D, Blanchard P, Truong C, *et al.* Differential recognition of ORF2 protein from type 1 and type 2 porcine circoviruses and identification of immunorelevant epitopes[J]. J Gen Virol, 2000,

81:1815-1824.

- [5] 廖园园,朱薇,李建,等. 猪圆环病毒 2 型 Cap 蛋白 ELISA 检测方法的建立及初步应用[J]. 中国兽药杂志, 2012,46(6):1-4.
- [6] 赵玉龙,焦玉兰,郁宏伟,等. 一种猪圆环病毒 II 型 ELISA 抗体检测试剂盒的临床应用[J]. 中国兽药杂志, 2011,45(3):31-34.
- [7] Shang S B, Li Y F, Guo J Q, *et al.* Development and validation of a recombinant capsid protein-based ELISA for detection of antibody to porcine circovirus type 2[J]. Research in Veterinary Science, 2008,84(1):150-157.
- [8] Pornthippa Nawagitgul, Igor Morozov, Steven R Bolin, *et al.* Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein[J]. Journal of General Virology, 2000,81:2281-2287.
- [9] 刘长明,陆月华,张超范,等. 猪圆环病毒 2 型重组 Cap 蛋白在昆虫杆状病毒中的表达[J]. 中国预防兽医学报, 2005,27(6):479-482.

(责任编辑:侯向辉)

Cloning and Expression of *Brucella* omp28 Gene and Analysis on Reactogenicity of Recombinant *Brucella* OMP28

WANG Xiu-li, JIANG Yu-wen*, MAO Kai-rong, DING Jia-bo, CHENG Jun-sheng, WANG Nan

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Abstract: In this study, omp28 genes of different *Brucella* species including *Brucella melitensis* 16M, *Brucella melitensis* M28, *Brucella canis*, *Brucella ovis*, *Brucella abortus* A19, *Brucella suis* S2, were cloned and sequenced. The sequence alignment results of amino acid and nucleotide showed that 6 base pairs and 2 amino acids were different among omp28 genes in different *Brucella* species, however had no influence to the hydrophily of OMP28. Omp28 gene of *Brucella melitensis* 16M were cloned into pET32a plasmid and expressed *in vitro*, OMP28 which was expressed in a soluble form at lower temperature, was identified by western-blot, and the results showed that recombined protein obtained had a good reactogenicity and will be a good potential antigen for brucellosis diagnosis.

Key words: *Brucella*; omp28 gene; cloning and expression; reactogenicity

随着分子生物学和免疫学技术的不断发展,目前报道的布鲁氏菌外膜蛋白有7种,免疫印迹从羊种布鲁氏菌中发现外膜蛋白28(OMP28)是用于诊断的重要抗原。在印度也有不同的实验室用OMP28-ELISA检测布鲁氏菌的抗体,且效果好^[1-3]。将OMP28蛋白的核酸序列在GenBank中BLAST搜索,发现有21个布鲁氏菌株含有与羊种布鲁氏菌16M株的omp28序列同源性为100%的序列,11株同源性为99%,且细微的差别对蛋白的生物活性不造成影响,证明omp28在布鲁氏菌中是非常保守的序列,所以对omp28基因的克隆与表达对于新的布鲁氏菌抗体检测方法的研究有十分重要的意义。

1 材料与方法

1.1 菌株及试剂 羊种布鲁氏菌16M株、羊种布鲁氏菌M28株、犬种布鲁氏菌、绵羊附睾种布鲁氏菌、牛种布鲁氏菌A19株、猪种布鲁氏菌S2株由中国兽医药品监察所保存;羊布鲁氏菌病阳性血清由哈尔滨兽医研究所提供,感受态细胞BL21、DH5 α 由天根生化科技有限公司提供;pET32a载体由本实验室保存,rTaq酶、EcoR I内切酶、Xho I内切酶、simple pMD18-T载体由大连宝生物(TaKaRa)公司提供。

1.2 方法

1.2.1 目的基因的扩增 用DNA快速提取试剂盒提取羊种布鲁氏菌16M株、羊种布鲁氏菌M28

株、犬种布鲁氏菌、绵羊附睾种布鲁氏菌、牛种布鲁氏菌A19株、猪种布鲁氏菌S2株的基因组,参考GenBank公布的布鲁氏菌16M株的omp28基因序列,用Mega4.0分析软件对omp28基因进行序列分析,设计上游引物F_{omp28}和下游引物R_{omp28},在上游和下游引物上分别添加EcoR I和Xho I酶切位点。并将omp28基因的终止子TAA去掉,并添加一个碱基A使其在载体中正确表达。引物序列如下:F_{omp28}, CGGAATTCATGAACACTCGTGCTAG,(划线部分为EcoR I的酶切位点), R_{omp28}, CG-GCTCGAGACTTGATTTCAAAAAC(划线部分为Xho I的酶切位点),以F_{omp28}、R_{omp28}为引物,按94℃ 10 min, 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 2 min(30个循环), 72℃ 10 min的程序扩增目的片段。用1%的琼脂糖凝胶电泳验证PCR扩增的结果,用琼脂糖凝胶DNA玻璃奶纯化回收试剂盒回收目的片段。

1.2.2 omp28基因的克隆、核酸序列/氨基酸序列比对及亲水性分析 估算T载体与目的片段之间的摩尔比,控制在1:3~1:8之间,将扩增的不同种布鲁氏菌omp28基因分别与T载体连接,筛选阳性克隆,送上海生工生物技术有限公司测序。将不同种布鲁氏菌omp28基因的测序结果以及基因编码的氨基酸序列用Mega4.0分析并进行序列比对。分别对omp28基因编码蛋白的氨基酸序列进行亲水性分析。

将羊种布鲁氏菌16M株的omp28基因序列在

GenBank 中 BLAST, 搜索与 omp28 基因核苷酸序列相似性较高的基因。

1.2.3 pET32a-omp28 表达载体的构建及鉴定

将羊种布鲁氏菌 16M 株的 omp28 基因的 T 载体克隆和 pET32a 载体同时用 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切, 回收酶切产物, 将 omp28 基因亚克隆到 pET32a 表达载体中, 筛选阳性克隆, 经 PCR 鉴定和酶切鉴定正确后送上海生工生物技术有限公司测序, 阳性克隆命名为 pET32a-omp28。

1.2.4 重组菌的诱导表达及表达产物的鉴定

取鉴定为阳性的重组质粒以及 pET32a 空质粒分别转化到 BL21 宿主细胞中, 挑取 pET32a-omp28 重组菌单菌落接种于 100 mL 含 100 μ g/mL Amp 的 LB 液体培养基中, 在 37 $^{\circ}$ C 以 200 r/min 的速度振荡培养 5 h。加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 分别在 37 $^{\circ}$ C 和 28 $^{\circ}$ C 200 r/min 诱导表达 6 h。挑取 pET32a 空质粒重组菌单菌落在 37 $^{\circ}$ C 同上振荡培养 5 h 后加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 继续诱导表达 6 h, 作为对照。

将诱导后菌液 45 mL 以 10000 r/min 离心, 将沉淀重悬于 15 mL PBS 中, 超声波裂解菌体, 裂解条件为工作 5 s, 间歇 5 s, 20 个循环。处理后再次离心。沉淀再次用 30 mL pH 7.4 的 PBS 重悬, 分别取菌液离心后上清、经超声波处理后上清、超声波处理后沉淀 200 μ L, 加入 50 μ L 5 $\times$ loading buffer 混匀后煮沸 10 min, 各取 10 μ L 上清液与标准分子量蛋白 Marker 上样, 恒压 120 V, SDS-PAGE 至溴酚蓝电泳至凝胶底部。取下凝胶用 30 mL 考马斯亮蓝染色液染色 30 min, 加 50 mL 脱色液在脱色摇床上脱色三遍, 1 h/次, 至条带清晰, 观察结果, 分析表达形式。

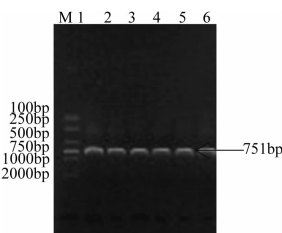
1.2.5 重组蛋白的 Western-blot 分析

SDS-PAGE 结束后, 通过 Bio-Rad 电转仪将蛋白条带转移至 PVDF 膜上。120 mA 恒流, 低温转印 1.5 h。转印完毕, 用 TBST 漂洗后, 置于 5% 的脱脂奶粉中, 于 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜封闭。然后 TBST 洗三次, 每次 5 min。将膜置于 1:50 倍稀释的羊布鲁氏菌阳性血清中, 37 $^{\circ}$ C 摇床低速结合 1 h。TBST 洗三次, 每次 5 min。再将膜置于 1:20000 倍稀释的 HRP 标记的兔抗羊 IgG 抗体中, 作用 1 h。TBST 洗三次, 每次 5 min。最后用 OPD 底物缓冲系统显色并观察结果。

2 结果

2.1 不同种布鲁氏菌 omp28 基因扩增结果

以羊种布鲁氏菌 16M 株、羊种布鲁氏菌 M28 株、犬种布鲁氏菌、绵羊附睾种布鲁氏菌、牛种布鲁氏菌 A19 株、猪种布鲁氏菌 S2 株的基因组为模板, 以 F_{omp28} 、 R_{omp28} 为引物扩增出大小为 751 bp 的 omp28 基因片段, 与预期结果相符 (图 1)。



M. DNA 分子质量标准 (DL 2000); 1. 羊种布鲁氏菌 16M 株;

2. 犬种布鲁氏菌; 3. 绵羊附睾种布鲁氏菌; 4. 牛种布鲁氏菌 A19 株; 5. 猪种布鲁氏菌 S2 株; 6. 羊种布鲁氏菌 M28 株

图 1 不同种布鲁氏菌 omp28 基因扩增结果

2.2 不同种布鲁氏菌 omp28 基因的克隆、序列比对及亲水性分析

将羊种布鲁氏菌 16M 株、羊种布鲁氏菌 M28 株、犬种布鲁氏菌、绵羊附睾种布鲁氏菌、牛种布鲁氏菌 A19 株、猪种布鲁氏菌 S2 株的 omp28 基因的 T 载体克隆为模板, 以 F_{omp28} 和 R_{omp28} 为引物, 分别进行 PCR 扩增, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 结果显示, PCR 可以扩增出与预期大小 (751 bp) 一致的条带, 初步证明克隆的质粒是正确的 (图 2)。

用 Mega 4.0 对不同种布鲁氏菌的 omp28 基因测序结果及基因编码蛋白氨基酸的序列进行比对, 结果显示, omp28 基因的核苷酸序列在不同种布鲁氏菌中总共有 6 个位点存在差异, 但编码的蛋白质仅有 2 个氨基酸发生变化。序列之间碱基的差异以及对编码氨基酸的影响见表 1。不同种布鲁氏菌 OMP28 亲水性分析结果显示, OMP28 的亲水性区域主要集中在 1~130 个氨基酸形成的多肽段, 个别氨基酸的变化对整个蛋白亲水性影响不大, 而蛋白的抗原决定位点主要集中在亲水区域, 因此推断, 该两个氨基酸的变化对 OMP28 蛋白的抗原性无影响。

将羊种布鲁氏菌 16M-omp28 基因在 GenBank 中 BLAST, 搜索结果显示, 不同种布鲁氏菌及疫苗株 omp28 基因的相似性在 99% 以上, 而在沙门氏菌、大肠杆菌 O:157、小肠结肠炎耶尔森菌 O:9 中不存在。

表 1 不同种布鲁氏菌 omp28 基因序列差异及对氨基酸的影响

布鲁氏菌种	核苷酸突变位点						氨基酸变化位点							氨基酸变化
	111	140	304	405	498	501	37	47	102	135	166	167		
羊布鲁氏菌 16M 株	C	T	A	C	C	C	P	M	N	P	A	V	—	
猪种布鲁氏菌 S2 株	C	C	A	T	C	C	P	T	N	P	A	V	47 位 M－T	
牛种布鲁氏菌 A19 株	T	T	G	C	C	C	P	M	D	P	A	V		
羊种布鲁氏菌 M28 株	C	T	G	C	C	C	P	M	D	P	A	V	102N－D	
绵羊附睾种布鲁氏菌	C	T	A	C	T	T	P	M	N	P	A	V	—	
犬种布鲁氏菌	C	T	A	T	C	C	P	M	N	P	A	V	—	

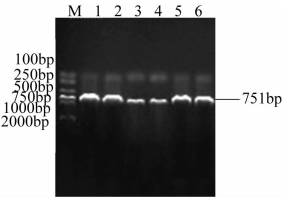
2.3 重组表达载体 pET32a - omp28 的构建及鉴定

以重组质粒 pET32a - omp28 为模板, F_{omp28} 、 R_{omp28} 为引物 PCR 扩增,能扩增出与预期大小相符合的核酸条带(图 3)。用 *EcoR* I 和 *Xho* I 对重组质粒进行双酶切,切下的小片段与预期大小一致,与 PCR 方法扩增的片段大小一致,结果见图 4。

将重组的 pET32a - omp28 质粒送上海生工测序,测序结果与 GenBank 中的序列比对,发现与公布的 16M 株 omp28 基因的相似性为 100%,核酸序列、编码氨基酸序列也与公布的完全一致,说明插入载体的序列完全正确且不存在移码或核苷酸的缺失等现象。

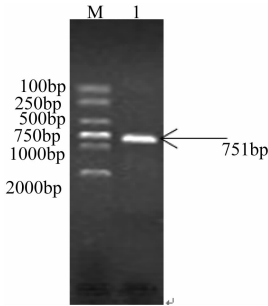
2.4 重组菌的诱导表达及表达产物的鉴定 将 37℃ 和 28℃ 诱导的菌体分别经超声波处理后,将菌液离心后的上清、超声波处理后的上清、超声处理后的沉淀经 SDS - PAGE 分析,结果显示 37℃ 诱导的重组蛋白主要在超声波处理后的沉淀中,说明主要是以包涵体的形式存在,而 28℃ 诱导表达的菌体重组蛋白主要在超声波处理后的上清中,说明重组蛋白主要是以可溶性的胞浆蛋白的形式存在(图 5)。

2.5 重组蛋白的反应原性分析 Western - blot 分析结果表明,pET32a - OMP28 重组蛋白无论是以包涵体形式存在还是以可溶性形式存在,都能与布鲁氏菌的阳性血清发生反应,说明该蛋白的反应原性良好,结果见图 6。



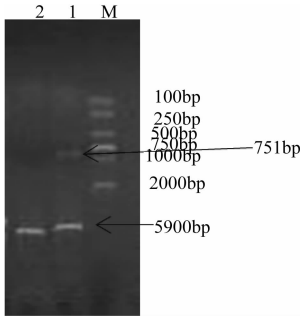
M:DNA 分子质量标准(DL 2000);1:羊种布鲁氏菌 16M 株;
2:犬种布鲁氏菌;3:绵羊附睾种布鲁氏菌;4:牛种布鲁氏菌
A19 株;5:猪种布鲁氏菌 S2 株;6:羊种布鲁氏菌 M28 株

图 2 不同种布鲁氏菌 omp28 基因 PCR 鉴定结果



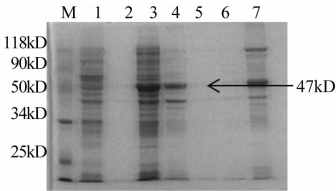
M:DNA 分子质量标准(DL 2000);1:pET32a - omp28 重组质粒以 F_{omp28} 和 R_{omp28} 为引物的 PCR 扩增条带

图 3 pET32a - omp28 重组质粒 PCR 鉴定结果



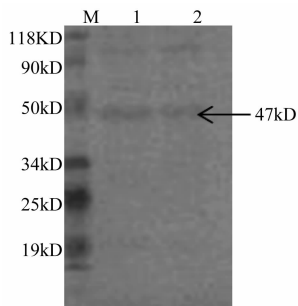
M:DNA 分子质量标准(DL 2000);1:*EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切结果;
2:*EcoR* I 单酶切结果

图 4 pET32a - omp28 重组质粒的酶切鉴定结果



M:蛋白分子量标准;1:未诱导的 pET32a 空载体;
2:重组表达载体 28℃ 诱导生长的培养基;
3:重组表达载体 28℃ 诱导菌体超声波破碎后的上清;4:重组表达载体 28℃ 诱导菌体超声波破碎后的沉淀;5:37℃ 诱导重组表达载体生长的培养基;6:37℃ 诱导菌体超声波破碎后的上清;7:37℃ 诱导菌体超声波破碎后的沉淀

图 5 OMP28 表达形式分析



M:蛋白分子量标准;1:28℃诱导表达菌体超声波破碎上清;
2:37℃诱导表达菌体超声波破碎沉淀

图6 OMP28蛋白 Western-blot 反应原性分析

3 讨论

关于布鲁氏菌的蛋白能否用于布鲁氏菌病的诊断,国内外进行了大量的研究。不同株布鲁氏菌的外膜蛋白在20世纪80年代首次被鉴定具有免疫原性和抗原保护力^[4]。布鲁氏菌的OMP10、OMP25、OMP31、BCSP等蛋白也都曾经有人用原核表达系统或真核表达系统表达及对重组蛋白的抗原性进行研究,且证明以上蛋白都有不同程度的反应原性^[5-8]。

文献报道用重组布鲁氏菌OMP28蛋白作抗原检测布鲁氏菌病IgG抗体效果良好^[1-3]。基因序列分析和蛋白亲水性分析预测,个别氨基酸的差异不会影响OMP28蛋白的抗原性;在GenBank中搜索omp28基因的相似序列,结果显示不同种布鲁氏菌omp28基因的相似性大于99%,且仅存在布鲁氏菌中。因此本研究仅构建了具有代表性的羊种布鲁氏菌16M-omp28的重组表达载体,分析OMP28蛋白的反应原性。Western-blot结果表明本研究所获得的重组OMP28反应原性良好,可以作为抗原检测布鲁氏菌病IgG抗体,解决脂多糖(LPS)作为抗原无法检测粗糙型布鲁氏菌感染的问题。

布鲁氏菌pET32a-OMP28重组蛋白在37℃诱导表达时由于蛋白表达速度过快,来不及折叠即以包涵体的形式沉淀,而通过28℃低温诱导,该蛋白主要以可溶性形式表达。选择28℃低温诱导表

达OMP28蛋白不仅有利于OMP28蛋白更好的恢复天然结构,提高抗原的反应原性,而且便于蛋白的纯化。

在GenBank中搜索布鲁氏菌omp28基因的同源序列结果显示,omp28基因在与布鲁氏菌存在血清学交叉反应的小肠结肠炎耶尔森菌O:9、都柏林沙门氏菌、大肠杆菌O:157中不存在,因此,用OMP28蛋白作抗原检测布鲁氏菌病,可以有效解决布鲁氏菌病与小肠结肠炎耶尔森菌等血清学诊断中的交叉反应,显示其有良好的应用前景。

参考文献:

- [1] Michel S Zymunt, Sylvie B aucheron, Nies Vizcino, *et al.* Sigle Step Purification and Evaluation of Recombinant BP26 Protein for Serological Diagnosis of *Brucella ovis* Infection in Rams [J]. Veterinary Microbiology, 2002, 87: 213-220.
- [2] Pallab Chaudhuri, Rajeev Prasad, Vinth Kumar, *et al.* Recombinant OMP28 Antigen-based Indirect ELISA for Serodiagnosis of Bovine Brucellosis [J]. Molecular and Cellular Probes, 2010, 24: 142-145.
- [3] Gupta V K, Ranjeeta Kumari, Jyoti Vohra, *et al.* Comparative Evaluation of Recombinant BP26 Protein for Serological Diagnosis of *Brucella melitensis* Infection in Goats [J]. Small Ruminant Research, 2010, 93: 119-125.
- [4] Cloeckert A, Viziano N, Paquet J Y. Major Outer Membrane Protein of *Brucella* spp. Past, Present and Future [J]. Veterinary Microbiology, 2002, 90: 229-248.
- [5] 陈伟业, 王淑杰, 王永. 重组布鲁氏菌BP26蛋白和OMP31蛋白作为间接ELISA诊断抗原的研究 [J]. 中国人兽共患病学报, 2006, 22(6): 518-521.
- [6] 杨春华, 邱昌庆, 曹小安. 流布布鲁氏菌omp28基因的克隆与原核表达 [J]. 中国兽医科学, 2007, 37(6): 465-468.
- [7] 宫晓为, 景涛, 王国治. 布鲁氏菌BP26蛋白的表达纯化及抗原性的研究 [J]. 中国人兽共患病学报, 2009, 25(11): 1085-1088.
- [8] Durairandian Thavasvelan, Ashu Kumar, Sapana Tiwari, *et al.* Cloning and Expression of Immunoreactive *Brucella melitensis* 28 kDa Outer-membrane Protein (OMP28) Encoding Gene and Evaluation of the Potential of OMP28 for Clinical Diagnosis of Brucellosis [J]. Med Microbiol, 2010, 59: 421.

(责任编辑:侯向辉)