

医药卫生

羊布鲁菌外膜蛋白 Omp25d 的原核表达、鉴定及纯化

张 蕾 张芳琳 张 亮 王海涛 胡 刚 吴兴安 徐志凯 白文涛*

(第四军医大学微生物学教研室, 西安 710032)

摘 要 研究羊布鲁菌外膜蛋白 Omp25d 基因的克隆, 原核表达, 以及纯化, 根据羊布鲁菌 M5 株外膜蛋白 Omp25d 蛋白基因序列设计引物, 扩增出大小约为 650 bp 的目的基因片断, 克隆入融合表达载体 pGEX-4T-1, 构建重组质粒 pGEX-4T-1-Omp25d。在大肠杆菌中将该蛋白表达并用亲和层析法纯化。用 Western-blot 分析方法鉴定 GST-Omp25d 蛋白。结果成功地构建了 pGEX-4T-1-Omp25d 原核表达载体并在大肠杆菌中表达了 Omp25d 基因, 纯化后所获得的融合蛋白与兔抗布鲁菌血清发生特异性反应。表明研究成功构建了 pGEX-4T-1-Omp25d 元和表达载体, 并且在大肠杆菌中进行表达, 纯化的融合蛋白具有良好的免疫原性。

关键词 羊布鲁菌 Omp25d 蛋白 克隆 表达 纯化

中图法分类号 R378.5; **文献标志码** B

布鲁菌(*Brucella*)是一种兼性细胞内寄生菌, 属于布鲁菌属。布鲁菌属可分为7种, 其中羊布鲁菌(*B. melitensis*)、牛布鲁菌(*B. abortus*)、猪布鲁菌(*B. suis*)主要引起人兽共患布鲁菌病(*Brucellosis*)^[1]。布鲁菌病是一种流行范围广, 危害严重的人兽共患病, 仅在拉丁美洲每年造成至少6亿美元的损失, 在美国平均每年损失为1.5亿美元^[2]。我国的布鲁菌病从1992年起疫情开始回升, 疫区波及1200多个区县, 受威胁人口约3.5亿, 现有布鲁菌病患者30~50万, 每年仅青海新疆两地因布鲁菌病直接造成的经济损失估计达到1亿元以上^[3]。

布鲁菌外膜蛋白(outer membrane proteins)具有很强的抗原性, 能够诱导免疫动物产生较强的特异性抗体, 且可用于布鲁菌病的检测^[4]。布鲁菌外膜蛋白特别是Omp25/Omp31家族蛋白, 常用于作为潜在的保护抗原或者诊断抗原。近期研究发现,

Omp25/Omp31家族包含Omp31, Omp31b, Omp25, Omp25b, Omp25c, Omp25d, Omp22七种蛋白, 其中Omp25d是一种免疫显性抗原, 并且已被证实与布鲁菌的毒力有关^[5,6]。因此, 本文构建了编码Omp25d蛋白的基因, 并将其克隆到大肠杆菌中进行了表达。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒及其他试剂

羊布鲁菌M5疫苗株由中国疾病预防控制中心传染病预防控制所崔步云教授惠赠。大肠杆菌DH5 α 为本实验室保存。pGEX-4T-1和兔抗布鲁菌感染血清为本室保存; HRP标记的羊抗兔(IgG)购自中山公司; Taq DNA聚合酶、限制性内切酶、T4 DNA连接酶等购自上海生工及大连宝生物公司; 质粒提取试剂盒购及胶回收纯化试剂盒购自上海博亚公司。

1.2 引物

根据GenBank中序列, 设计羊布鲁菌Omp25d基因编码区上下游引物(分别含有BamH I和Xho I酶切位点), 由上海博亚生物工程公司合成:

2010年6月10日收到 军队科技攻关项目(06G091)、
国家自然科学基金(30901281)资助

第一作者简介: 张 蕾, 博士研究生, E-mail: xzl07309@fmmu.edu.cn。

* 通讯作者简介, 白文涛。E-mail: baiwtao@fmmu.edu.cn。

P1:5′ - GAGGGATCCGGAATGACGTTCAAAAATC-TAC -3′

P2:5′ - GCCTCGAGTCAGAACTTATAGGCAACG -3′。

1.3 Omp25d 基因 PCR 扩增及表达载体的构建

从新鲜的布鲁菌 M5 株兔血清培养平板上,挑取单菌落接种于 5 mL 2 × YT 液体培养基中,37℃ 振荡培养过夜,取 1 mL 离心集菌,50 μL 纯水重悬,煮沸 10 min,离心,取上清作为模板,应用上述引物 PCR 扩增 Omp25d 基因片段。反应条件为 95℃ 10 min,80℃ 5 min,94℃ 1 min,55℃ 1 min,72℃ 2 min,循环 30 次,72℃ 延伸 10 min。PCR 产物经酚氯仿法抽提、乙醇沉淀后,用 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切,1% 琼脂糖凝胶电泳回收纯化后,与相同酶切的 pGEX-4T-1 载体连接,电穿孔法转化大肠杆菌 DH5α,培养于氨苄青霉素琼脂平板,次日挑取克隆,提取质粒。用 *Bam*H I 和 *Xho* I 相双酶切鉴定挑取阳性克隆,送上海博亚测序,阳性克隆命名为 pGEX-4T-1-Omp25d。

1.4 GST-Omp25d 融合蛋白的表达

将 pGEX-4T-1-Omp25d 转化至 DH5α,转接于 5 mL 2 × YT(含氨苄青霉素 100 μg/mL)中,37℃ 振荡培养,待菌液培养至 $A_{600} = 0.4 \sim 0.6$ 时,加入终浓度 1 mmol/L 的 IPTG 诱导表达,继续培养 4 h。于诱导前后取菌液 1 mL,离心集菌重悬于 50 μL dH₂O 中。诱导前样品加入 2 × 上样缓冲液;诱导后样品经超声裂菌,离心后分别收集上清和沉淀,加入等体积 2 × 上样缓冲液。将样品煮沸 10 min。取 15 μL 样品进行 SDS-PAGE,凝胶于考马斯亮蓝 R250 液中染色。以 pGEX-4T-1 空载体为表达阴性对照。

1.5 GST-Omp25d 融合蛋白的表达条件优化及其纯化

1.5.1 GST-Omp25d 融合蛋白的表达条件优化

以及大量培养

将 pGEX-4T-1-Omp25d 转化至 DH5α,转接于 5 mL 2 × YT(含氨苄青霉素 100 μg/mL)中,280 r/min,37℃ 振荡培养 14 h;按 1:100 转接于 1 000 mL

2 × YT 液体培养基中,扩大培养至 $OD_{600nm} = 0.4 \sim 0.6$ 时,加入终浓度 0.4 mmol/L 的 IPTG,15℃ 诱导表达过夜。4℃ 离心集菌。用 25 mL 结合缓冲液(PBS)重悬细菌沉淀,加入终浓度 1% 的 Triton X-100 后再加入溶菌酶至终浓度 1.5 g/L,混匀后室温放置 20 min。加入蛋白酶抑制剂 PMSF,至终浓度为 25 mg/L,混匀。冰浴条件下间断温和超声 20 min。40 000 × *g* 离心 15 min,取上清,用 0.45 μm 滤膜过滤样品。

1.5.2 GST-Omp25d 融合蛋白的纯化

采用 GSTrap 1 mL 柱亲和层析纯化 Omp25d 蛋白,按产品说明书进行操作。主要步骤简述如下:以 0.125 mL/min 流量将上述样品过柱,用 10 mL PBS 流洗,加含有 50 mmol/L 还原型谷胱甘肽洗脱液洗脱,按(0.5—1) mL/管分别收集流洗液及洗脱液。每个收集管各取 15 μL 液体样后进行 SDS—PAGE。BCA 法测定蛋白浓度。

1.6 纯化后 GST-Omp25d 蛋白的 Western-blot 鉴定

将纯化后产物以及阴性对照大肠杆菌裂解液,经 SDS-PAGE 后转移到 PVDF 膜上,5% 脱脂牛奶室温封闭 3 h,用 TBS 洗涤 3 次,每次 15 min,加入 1:1 000 稀释的兔抗布鲁菌阳性血清,4℃ 孵育过夜,TBS 洗涤后,加入 1:3 000 稀释的 HRP-羊抗兔 IgG,室温孵育 1 h,TBS/T 洗涤后,DAB 显色,去离子水终止显色。

2 结果

2.1 Omp25d 基因 PCR 扩增结果

以羊布鲁菌 M5 株基因组 DNA 为模板,采用引物 P1 和 P2,扩增出约 650 bp 片段,与预期相符(图 1)。

2.2 原核表达重组质粒的鉴定结果

将上述片段克隆入 pGEX-4T-1 中,经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切鉴定(图 2)正确后,挑取阳性克隆进行序列测定和 BLAST 分析,结果表明所获片段与羊布鲁菌 Omp25d 蛋白基因序列的同源性均为

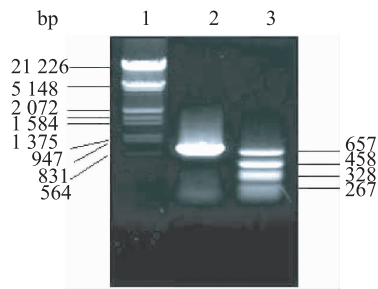


图1 PCR 扩增羊布鲁菌 Omp25d 基因结果
1—Lambda DNA/*Eco*R I + *Hind* III Marker, 2—Omp25d
gene, 3—*p*gem 7*f* *Hae* III DNA Marker

100%,表明载体构建正确。阳性克隆命名为 pGEX-4T-1-Omp25d。

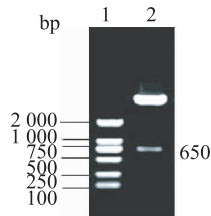


图2 pGEX-4T-1-Omp25d 表达载体酶切鉴定
1—DL2000 DNA Marker,
2—omp25d-4T1 (*Bam*H I + *Xho* I)

2.3 重组质粒表达产物分析结果

取含 pGEX - 4T - 1 - Omp25d 重组菌在 37℃ 诱导 4 h,由图 3 可见表观分子量约 51 kDa 的蛋白,与目的融合蛋白大小一致,且蛋白主要以包涵体形式存在。

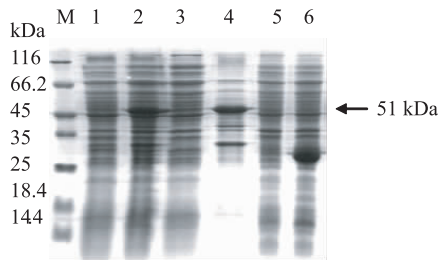


图3 37℃ 诱导表达 GST-Omp25d
融合蛋白的 SDS-PAGE 结果

M—marker, 1, 2—uninduced and induced cell lysate ov pGEX-4T-1-Omp25d/DH5 α (37℃, 4h), 3, 4—the supernatant and the sediment of the cell lysate of pGEX-4T-1-Omp25d/DH5 α (37℃, 4h); 5, 6—the control of pGEX-4T-1/DH5 α

2.4 Omp25d 融合蛋白的可溶性表达及其纯化

采取低温诱导,发现在 15℃ 诱导,蛋白上清表达明显增加(图 4)。将离心后上清液上柱纯化,得到浓度为 2.8 mg/mL 的蛋白,SDS-PAGE 结果显示,其与目的蛋白大小一致,约为 51 kDa。

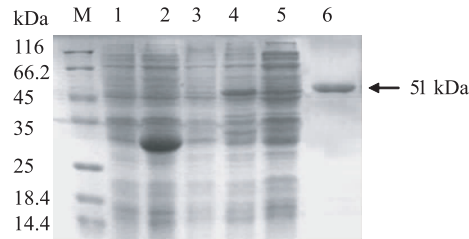


图4 GST-Omp25d 融合蛋白纯化的 SDS-PAGE 分析
M—marker, 1, 2—the control of pGEX-4T-1/DH5 α , 3, 4—uninduced and induced cell lysate of pGEX-4T-1-Omp25d/DH5 α (15℃, over night), 5, 6—the purified infusion protein.

2.5 Omp25d 融合蛋白 Western blot 检测结果

将诱导后菌裂解液上清电泳转移至 PVDF 膜后,用羊布鲁菌兔免疫血清检测,结果可见明显的阳性条带,相对分子量约为 51 kDa(图 5),而阴性对照大肠杆菌裂解液则无任何条带。结果表明该融合蛋白可与羊布鲁菌兔免疫血清特异性结合。

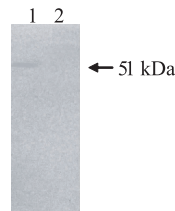


图5 Omp25d 融合蛋白的 Western blot 分析结果
1—the purified infusion Gst-Omp25d protein reacted with the rabbit antiserum, 2—*E. coli* cell lysate as negative control

3 讨论

布鲁菌外膜蛋白 Omp25d 属于 Omp25/Omp31 家族,是与布鲁菌毒力相关的一种蛋白^[7-9]。Martí'n-Martí'n 等^[9]发现缺失 Omp25d 基因的绵羊附睾布鲁菌对 HeLa 细胞和 J774. A1 细胞的胞内增殖能力明显减弱,证明 Omp25d 与布鲁菌的侵袭力

和毒力有关。他们还将 Omp25/Omp31 家族七种蛋白在布鲁菌各个种属菌体表面的存在及分布进行了比较,结果显示,布鲁菌毒力与 Omp25/Omp31 家族七种蛋白(包括 Omp25d)的存在和分布有关。这就进一步证实了,Omp25d 是布鲁菌的一种毒力因子。然而,他们还指出,Omp25c 在野生型菌株中大量存在,而 Omp25d 的量则相对较少,可能是由于它被 Omp25 蛋白覆盖有关^[9]。但是,Omp25d 在布鲁菌各种型间保持高度保守,无序列缺陷,具有核蛋白结合位点,并且在各个种型间均存在^[10]。因此,Omp25d 可以用于有可能应用于检测和疫苗方面的研究。

由于布鲁菌属于胞内寄生菌,机体抗菌免疫以细胞免疫为主。与 Omp25d 同属于布鲁菌 Omp25/Omp31 家族外膜蛋白的 Omp31,不仅可以引起保护性体液免疫,同时可以诱导特异性细胞免疫,是布鲁菌病亚单位疫苗或 DNA 疫苗的良好候选靶点^[11]。同时 Omp31 也可用于布鲁菌病诊断^[12]。Omp25 亦是布鲁菌毒力基因,有研究表明,缺失 Omp25 基因的布鲁菌致病性降低,可用于布鲁菌病减毒活疫苗的研制。Caro-Herna'ndez 等^[14]将布鲁菌 Omp22 与 Omp25d 的毒力进行比较,将 Omp25d 补加到 Omp22 缺陷的布鲁菌上,结果毒力小于原始野生株,但是又大于 Omp22 缺陷株。所以作者认为 Omp25d 是一种毒力因子,但其毒力弱于 Omp22。因此,我们构建并表达了布鲁菌 Omp25d 蛋白,为进一步研究 Omp25d 在诊断和疫苗方面的应用奠定基础。

本实验构建了含有布鲁菌外膜蛋白 Omp25d 的原核表达载体 pGEX-4T-1-Omp25d,并在大肠杆菌中进行了诱导表达。原核表达要求简单且表达效率较高,但有些蛋白特别是分子量较大的蛋白在高水平表达时容易形成包涵体,故在本次研究中经过反复优化诱导条件。采用低温诱导至 15℃,使表达的融合蛋白可溶性增强。结果显示 Omp25d 融合蛋白在低温诱导下为可溶性表达,并且 Western-blot 证实融合蛋白可与布鲁菌兔免疫血清特异结合。融合蛋白的成功表达,为应用 Omp25d 蛋白进行下一步的研究奠定基础。

参 考 文 献

- 1 John M, Betsy B, God freg H, *et al.* The cloning, expression, and nucleotide sequence of a gene coding for an immunogenic *Brucella abortus* protein. *Gene*, 1988; 63(1): 1—8
- 2 Srečvatsan S, Bookout B, Ringpis F, *et al.* A Multiplex approach to molecular detection of *Brucella abortus* and/or *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *J Clin Microbiol*, 2000; 38(7): 2602—2610
- 3 尚德秋. 布氏菌研究进展. *中国地方病防治杂志*, 2004; 19(4): 204—213
- 4 Silvia M. Estein P. Immunogenicity of recombinant Omp31 from *Brucella melitensis* in rams and serum bactericidal activity against *B. ovis*. *Veterinary Microbiology*, 2004; 102: 203—213
- 5 Cloeckaert A, Verger M, Grayon M, *et al.* Classification of *Brucella* spp. Isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the Omp2 locus. *Microbes Infect*, 2001; 3: 729—738
- 6 Marti'n-Marti'n I, Caro tterhán dez P, Sancho P, *et al.* Analysis of the occurrence and distribution of the Omp25/Omp31 family of surface proteins in the six classical *Brucella* species. *Vet Microbiol*, 2009; 137: 74—82
- 7 Edmonds M, Cloeckaert A, Elzer P. *Brucella* species lacking the major outer membrane protein Omp25 are attenuated in mice and protect against *Brucella melitensis* and *Brucella ovis*. *Vet Microbiol*, 2002; 88: 205—221
- 8 Edmonds M, Clouckaert A, Booth N, *et al.* Attenuation of a *Brucella abortus* mutant lacking a major 25 kDa outer membrane protein in cattle. *Am J Vet Res*, 2001; 62: 1461—1466
- 9 Edmonds M, Cloeckaert A, Hagius S, *et al.* Pathogenicity and protective activity in pregnant goats of a *Brucella melitensis* Δ omp25 deletion mutant. *Res Vet Sci*, 2002; 72: 235—239
- 10 Manterola L, Guzman-Verri C, Chaves-Olarte E, *et al.* BvrR/BvrS-controlled outer membrane proteins Omp3a and Omp3b are not essential for *Brucella abortus* virulence. *Infect Immun*, 2007; 75: 4867—4874
- 11 Estein M, Cassataro J, Vizcaino N, *et al.* The recombinant Omp31 from *Brucella melitensis* alone or associated with rough lipopolysaccharide induces protection against *Brucella ovis* infection in BALB/c mice. *Microbes Infect*, 2003; 5(2): 85—93
- 12 Gupta K, Verma K, Singh V, *et al.* Serological diagnostic potential of recombinant outer membrane protein (Omp31) from *Brucella melitensis* in goat and sheep brucellosis. *Small Ruminant Research*, 2007; 70: 260—266
- 13 Caro-Herna'ndez P, Ferna'ndez-Lago L, de Miguel M, *et al.* Role of the Omp25/Omp31 family in outer membrane properties and virulence of *Brucella ovis*. *Infect Immun*, 2007; 75: 4050—4061

(下转第 6154 页)

Identification of Soil Water Horizontal Movement Model under Drip-irrigation

LI Guang-xia, SUN Hai-yan, LIU Shan-shan, LI Xiao-bin

(Shanghai Ocean University, Shanghai 200091, P. R. China)

[**Abstract**] The soil water movement, which has influence on crop development under drip irrigation, is mainly affected by the drip discharge. The transfer function models between drip discharge and water horizontal movement distance are identified based on the data gathered from soil water horizontal movement experiment under drip irrigation, the particle swarm optimization algorithm has been applied to identification and optimization of every parameter of the transfer function model. Comparing the dynamic transformation of soil water horizontal movement models of same drip discharge, the validity of transfer function model is validated, adjusting real time drip discharge is proposed by transfer function model, it can solve the feedback adjusting of water horizontal movement distances according to crop root, the water of crop root is supplied available, and waste of water resource is reduced.

[**Key words**] drip irrigation soil water horizontal movement model identification

(上接第 6149 页)

Construction, Expression and Purification of Gene Encoding Omp25d Protein of *Brucella melitensis* in Prokaryotic Cell

ZHANG Lei, ZHANG Fang-lin, ZHANG Liang, Wang Hai-tao, Hu Gang, WU Xing-an, XU Zhi-kai, BAI Wen-tao*

(Department of Microbiology, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, P. R. China)

[**Abstract**] To clone and express the brucella outer membrane protein Omp25d, the gene of the protein was amplified from *Brucella melitensis* with PCR method, then the PCR product was subcloned into vector pGEX-4T-1 and expressed in *E. coli*. It is purified via affinity chromatography purification system. The purified protein is detected by Western-blot. According to the SDS-PAGE and Western-blot analysis, the recombinant plasmid pGEX-4T-1-Omp25d could be expressed successfully in *E. coli* and the fusion protein could react with serum from *Brucella* infected rabbit. The fusion gene encoding Omp25d protein is constructed and purified successfully and the good immunogenicity of the protein with high efficiency of expression was demonstrated.

[**Key words**] *Brucella melitensis* Omp25d cloning gene expression purification