论著

文章编号:1000-5404(2010)04-0338-04

伤寒沙门菌 *bcfD* 基因的克隆表达

胡 勇[1,2],丛延广[1],邱蓉荣[2],张云茹[2],胡福泉[1] (400038 重庆,第三军医大学基础医学部微生物学教研室,重庆市微生物工程实验室[1];重庆理工大学化学与生物工程学院生物工程系[2])

[摘要] **目的** 构建伤寒沙门菌 *BcfD* 基因的原核表达质粒,表达 BcfD 蛋白。**方法** PCR 法从伤寒沙门菌 Ty2 菌株基因组中扩增 *bcfD* 目的基因,经克隆和亚克隆构建原核表达载体 pET-30a-bcf,将该重组质粒转化 *E. coli* BL21(DE3)并进行原核表达,用 SDS-PAGE 和免疫印迹分析表达蛋白。**结果** 扩增到与 *bcfD* 基因预期大小相符的片段,测序证明与 *bcfD* 基因序列完全一致,SDS-PAGE 显示该蛋白主要以包涵体的形式表达,相对分子质量为 42×10^3,免疫印迹分析表明,表达产物与经用大肠杆菌吸附处理后的伤寒患者血清能进行免疫反应。**结论** 成功构建了 *bcfD* 基因原核表达载体并在大肠杆菌中表达了目的蛋白。

[关键词] 沙门菌,伤寒;抗原,细菌;bcfD;原核表达

[中图法分类号] R378.22;R394-33;R394.3 **[文献标志码]** A

Cloning of *bcfD* gene of *Salmonella enterica* serovar typhi and its expression

Hu Yong[1,2], Cong Yanguang[1], Qiu Rongrong[2], Zhang Yunru[2], Hu Fuquan[1] ([1]Department of Microbiology, College of Basic Medical Sciences Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]Department of Biotechnology, Chemistry and Biological Engineering Institute, Chongqing University of Technology, Chongqing, 400050, China)

[Abstract] **Objective** To construct the prokaryotic expression plasmid of *bcfD* gene of *Salmonella enterica* (*S. enterica*) serovar typhi and to express BcfD protein. **Methods** The *bcfD* gene of *S. enterica* serovar typhi strain ty2 was amplified by PCR and subcloned into procaryotic expression vector pET-30a. The recombinant plasmid pET-30a-bcf was transformed into *E. coli* BL21 (DE3) and its procaryotic expression was induced by IPTG. The expressed protein was analyzed by SDS-PAGE and Western bloting. **Results** The DNA segment was amplified to the expected size of *bcfD* gene which was confirmed by *bcfD* gene sequencing. SDS-PAGE showed that the BcfD protein was expressed as inclusion body with a molecular weight of about 42 kDa. Western blot analysis showed immune reaction of the expressed product with the typhoid sera treated with absorbent *E. coli* BL21(DE3). **Conclusion** The prokaryotic expression vector of *bcfD* gene we constructed can express the target protein in *E. coli* BL21 (DE3).

[Key words] *Salmonella typhi*; antigens, bacterial; *bcfD*; procaryotic expression

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30500435), Corresponding author: Hu Fuquan, Tel: 86-23-68752240, E-mail: fuquanhoo@yahoo.com.cn, Cong Yanguang, Tel: 86-23-68752239, E-mail: ygcong@tmmu.edu.cn

伤寒是由伤寒沙门菌引起的急性消化道传染病,是全球性的公共卫生问题[1]。据估计,全球每年发生伤寒病例1 600万例,其中约60万死亡[2]。在我国伤寒是《中华人民共和国传染病防治法》中规定报告的乙类传染病[3]。随着抗生素的广泛使用,耐药株的分离比例越来越高,使爆发流行的危险不断增大,治疗难度和负担都明显增加[2,4]。

致病菌的致病过程是与宿主细胞相互作用的复杂过程,需要许多致病基因的协调作用,致病菌在宿主体内的环境与体外明显不同,为了适应这种环境的变化,细菌会通过调节相应基因的表达作出适应性反应:下调非必须基因的表达,上调在宿主体内存活中起关键作用的基因(例如获得营养的基因和逃避宿主免疫的基因)以及表达那些感染宿主所必须的毒力基因[5,6]。大量的研究表明,这些独特的在体内表达而在体外不

[基金项目] 国家自然科学基金(30500435)

[通信作者] 胡福泉,电话:(023)68752240,E-mail:fuquanhoo@yahoo.com.cn
丛延广,电话:(023)68752239,E-mail:ygcong@tmmu.edu.cn

表达的基因往往对病原菌在体内的生存和致病有重要意义。在前期的工作中,我们利用体内诱导抗原技术(in vivo induced antigen technology, IVIAT)[5,7]筛选到伤寒沙门菌 Ty2 菌株体内诱导表达基因 *bcfD*。Townsend 等[8]通过基因组同源比对,发现伤寒沙门菌基因组中存在 1 个Ⅳ型菌毛操纵子(*agf*)和 12 个伴侣蛋白引导因子装配类(chaperone usher assembly class)菌毛操纵子(*sef*、*fim*、*saf*、*tcf*、*bcf*、*sta*、*stb*、*ste*、*std*、*stc*、*stg*、*sth*)。在这 13 个操纵子中除 sef、fim、saf 和 tcf 外,其余都少见报道[8]。*bcfD* 是操纵子 *bcf*ABCDEFG 的主要结构亚单位蛋白基因,但其生物学特性、致病机制和免疫应答机制都不清楚。本研究的目的是克隆 bcfD 基因,构建原核表达载体,并在大肠杆菌中表达 *bcfD* 基因,为 *BcfD* 蛋白的生物学特性、致病机制研究及预防、诊治新靶位的开发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株和载体

伤寒沙门菌菌株 Ty2 购自中国药品生物制品检定所医学微生物菌种保存中心,pET-30a 质粒、*E. coli* DH5α 和 *E. coli* BL21 (DE3)菌株均由本实验室保存,*pMD* 18-T Simple Vector 为宝生物工程(大连)有限公司产品。

1.2 主要试剂

DNA 聚合酶、*Nde* Ⅰ、*Not* Ⅰ、T_4 DNA 连接酶和 IPTG 均为宝生物工程(大连)有限公司产品,DNA 凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒为上海华舜公司产品,溶菌酶为上海生工产品,卡那霉素美国 Sigma 公司产品,抗伤寒血清由解放军第三医院提供,辣根酶标记山羊抗人 IgG 购自北京中杉金桥生物技术公司,其他均为国产分析纯。

1.3 伤寒沙门菌 Ty2 基因组的提取

常规过夜培养伤寒沙门菌 Ty2 菌株,碱裂解法提取伤寒沙门菌 Ty2 菌株基因组 DNA。

1.4 *bcfD* 基因的 PCR 扩增

根据 GeneBank 中伤寒沙门菌 Ty2 基因组序列中 *bcfD* 基因(GeneID: 1067346)的序列自行设计引物,以提取的细菌总 DNA 为模板进行聚合酶链反应(PCR)。引物序列如下,上游引物 P1:5′-CGCGCATATGAAAATACCTCTTTTATTTGCTC-3′;下游引物 P2: 5′-CGGCGCGGCCGCTTAGTCAAAGTCCACTCGC-3′。在上、下游引物两端分别引入 *Nde* Ⅰ和 *Not* Ⅰ酶切位点,引物由宝生物工程(大连)有限公司合成。PCR 反应条件为:94 ℃ 5 min;94 ℃ 1 min、65 ℃ 1 min、72 ℃ 1 min,共 30 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,按照 DNA 胶回收纯化试剂盒的说明进行纯化、回收。

1.5 原核克隆载体的构建

将纯化后的 PCR 产物与 pMD 18-T 载体在 16 ℃连接过夜,连接产物转化大肠杆菌感受态细胞 DH5α。转化后的细菌涂布于含 X-Gal、IPTG 和 Amp 的 LB 固体平板上,37 ℃过夜培养后,挑取白色菌落,接种于含 Amp 的 LB 液体培养基中,37 ℃振摇过夜,按质粒提取试剂盒说明书提取重组质粒,PCR 扩增鉴定,克隆成功的重组质粒命名为 pMD-bcf。

1.6 原核表达载体构建与筛选

将上述重组质粒和载体 pET-30a 同时进行 *Nde* Ⅰ和 *Not* Ⅰ双酶切,按 DNA 凝胶回收试剂盒说明分别回收目的片段。将两目的 DNA 在 T_4 DNA 连接酶的作用下于 16 ℃连接过夜,连接产物转化大肠杆菌感受态细胞 BL21 (DE3),转化产物涂布于含卡那霉素(50 μg/ml)的 LB 固体平板上,37 ℃过夜培养,挑取克隆接种于含卡那霉素的 LB 液体培养基中,37 ℃振摇过夜,按质粒提取试剂盒说明书提取重组质粒,酶切鉴定。取 1 ml 酶切鉴定证明是正确的重组质粒的相应菌液送宝生物工程(大连)有限公司测序。

1.7 目的蛋白的表达及可溶性分析

挑取测序正确的重组菌单菌落,接种到含卡那霉素的 LB 液体培养基中,37 ℃, 120 r/min 振摇培养至 *D*(600)约为 0.6,取菌液,制备非诱导菌上样样品。在剩余的菌液中加入 IPTG 至终浓度 0.1 mmol/L,诱导培养 5 h,取诱导培养后菌液制备诱导菌上样样品及诱导菌的超声裂解物上清和沉淀上样样品。12% SDS-PAGE 分析,以 pET-30a 转化的 BL21 *E. coli* (DE3)作对照。

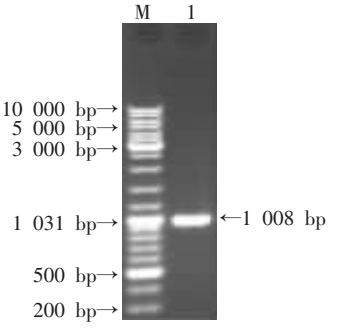
1.8 Western blot 检测目的蛋白

将目的蛋白诱导表达后进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,然后转移至硝酸纤维素膜上。以经 *E. coli* BL21 吸附处理后的伤寒患者血清[经细菌培养确诊为伤寒患者的血清]为一抗[9],按 1∶200 稀释,37 ℃孵育 3 h。以辣根酶标记山羊抗人 IgG 作为二抗,按 1∶5 000 稀释,37 ℃孵育 3 h,二氨基联苯胺(DAB)为底物显色,至目的条带染色清晰时终止反应[10]。以含 pET-30a 的 *E. coli* BL21 作阴性对照。

2 结果

2.1 目的基因的 PCR 扩增产物

以伤寒沙门菌 Ty2 菌株总 DNA 为模板,以 *bcfD* 基因序列设计特异性引物进行 PCR 扩增。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,在 *bcfD* 基因预期大小(1 008 bp)处出现 1 条特异性条带(图 1)。



M: DNA 标准; 1: bcfD PCR 产物

图 1 bcfD 基因的 PCR 扩增产物

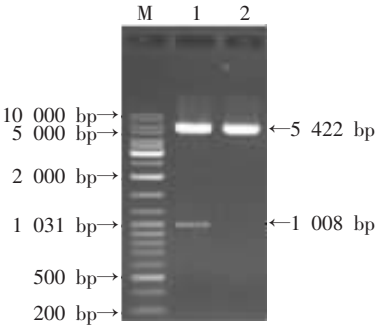
2.2 基因克隆载体的构建

连接产物转化大肠杆菌 DH5α,挑取平板上的白色菌落,提

取质粒,PCR扩增到一条与 *bcfD* 基因大小相符的DNA片段,证明克隆成功,该重组质粒命名为pMD-bcf。

2.3 基因原核表达载体的构建与鉴定

重组质粒pMD-bcf经 *Nde* Ⅰ和 *Not* Ⅰ双酶切后,亚克隆到pET-30a中,构建出重组表达质粒pET-30a-bcf。对重组表达质粒进行 *Nde* Ⅰ和 *Not* Ⅰ双酶切鉴定,结果用1%琼脂糖凝胶电泳进行分析,出现了2条条带,其大小分别和pET-30a载体线性片段(5 422 bp)和插入片段(1 008 bp)大小相当(图2)。测序结果表明,该序列大小为1 008 bp,与Ty2菌株的 *bcfD* 基因(GeneID: 1067346)序列完全一致,表明 *bcfD* 基因已正确克隆到表达载体中。

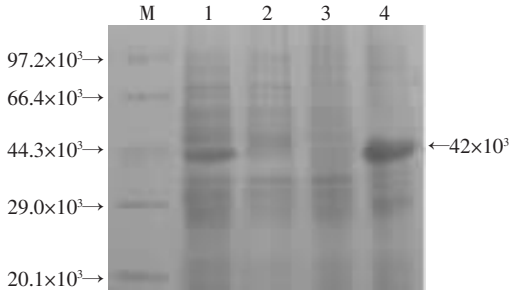


M: DNA标准; 1: pET-30a-bcf质粒经 *Nde* Ⅰ/*Not* Ⅰ双酶切;2:pET-30a质粒经 *Nde* Ⅰ/*Not* Ⅰ双酶切

图2 表达载体pET-30a-bcf的酶切产物鉴定结果

2.4 重组菌的诱导表达与SDS-PAGE分析

取诱导菌和非诱导菌分别制备样品,进行SDS-PAGE分析。诱导的重组菌在约42×10³处都有一特异条带,大小与预期融合BcfD蛋白分子质量一致,并主要以包涵体形式表达,而含空质粒pET-30a的大肠杆菌BL21(DE3)阴性对照菌株经诱导后未见相应蛋白表达(图3)。

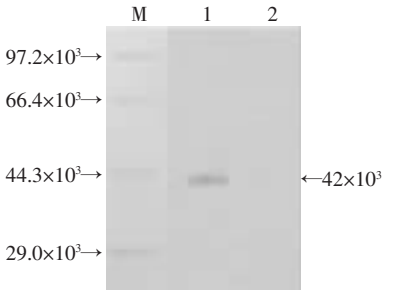


M:蛋白质分子量标准; 1:IPTG诱导表达; 2:阴性对照; 3:IPTG诱导表达超声上清; 4:IPTG诱导表达超声沉淀

图3 重组蛋白的SDS-PAGE分析结果

2.5 重组菌诱导表达蛋白BcfD的Western blot分析

为检验重组菌诱导表达蛋白BcfD是否与伤寒患者血清发生免疫反应,将重组菌诱导表达蛋白制备样品,SDS-PAGE电泳后电转印至硝酸纤维素膜上,以吸附处理后的伤寒患者血清为一抗,辣根酶标记山羊抗人IgG作为二抗进行Western blot分析,预期大小处可见条带,而含pET-30a的 *E. coli* BL21阴性对照无条带(图4)。说明诱导表达的BcfD蛋白能够结合伤寒患者血清。



M:蛋白质分子量标准; 1:pET-30a-bcfD质粒表达蛋白; 2:阴性对照

图4 pET-30a-bcfD质粒表达蛋白的Western blot检测结果

3 讨论

本研究成功构建了原核表达载体pET-30a-bcf,并可高效表达BcfD蛋白,目的融合蛋白主要以包涵体的形式存在。Western blot证实所构建的原核表达载体表达的BcfD蛋白能和伤寒患者血清结合反应。

定植于胃肠道是所有沙门菌感染的特征[11],菌毛是许多革兰氏阴性菌菌体表面的黏附结构,具有粘着细胞(红细胞、上皮细胞)和定居于各种细胞表面的能力。鼠伤寒沙门菌菌毛黏附被认为是启动吸附于肠道表面的潜在因子[12]。目前基因组测序的沙门菌属细菌的基因组中都存在多个菌毛基因,但并不是所有的菌毛基因在体外培养时都表达。如鼠伤寒沙门菌基因组中存在13个菌毛基因操纵子[*agf* (*csg*), *fim*, *lpf*, *pef*, *bcf*, *stb*, *stc*, *std*, *stf*, *sth*, *sti*, *saf*, *stj*],但除 *agf* (*csg*)和 *fim* 操纵子外,其余操纵子在实验室培养条件下或不表达或表达水平很低[13]。这是因为在感染过程中,病原菌在宿主体内必须适应一系列复杂多变的环境,通常在其中任何一个环境中的生存都需要表达一些特殊的毒力因子[5,7],不同的菌毛基因推测会在不同的条件下表达。Huang等[11]证实鼠伤寒沙门菌感染猪的过程中,BcfA蛋白表达并参与黏附、定植过程。Humphries等[14]发现,当注射体外培养的鼠伤寒沙门菌到牛回肠时,BcfA蛋白被诱导表达。

尽管人们对引起伤寒的病原体伤寒沙门菌(*S. enterica* serovar typhi)的研究很重视,但由于人类是其唯一宿主,缺乏动物模型,给研究带来很大不便,因此,到目前为止,人们对致病机制还有许多不清楚的环节,这也阻止了对其防治新方法的研究。在前期的工作中我们利用IVIAT筛选到伤寒沙门菌的体内诱导表达基因 *bcfD*,而大量的研究又表明,体内诱导表达基因往往对病原菌在体内的生存和致病有重要意义[5,7],因此 *bcfD* 基因值得深入研究。本研究成功构建了原核表达载体,并在大肠杆菌中高效表达BcfD蛋白,将为BcfD蛋白的生物学特性、致病机理研究奠定基础,并有利于预防、诊断治疗新靶位的开发。

参考文献：

[1] Chanana V, Majumdar S, Ray P, *et al*. Coordinated expression and immunogenicity of an outer membrane protein from Salmonella enterica serovar Typhi under iron limitation, oxidative stress and anaerobic conditions [J]. J Biomed Sci, 2006, 13(3): 303 - 312.

[2] Parry C M. Antimicrobial drug resistance in Salmonella enterica [J]. Curr Opin Infect Dis, 2003, 16(5): 467 - 472.

[3] 王洪霞，张代涛，李志峰，等. 汤卜逊沙门菌暴发分离株的鉴定及与丙型副伤寒沙门菌的鉴别[J]. 中国人兽共患病学报，2009，25(4)：348 - 351.

[4] Chander H, Majumdar S, Sapru S, *et al*. Reactivity of typhoid patients sera with stress induced 55 kDa phenotype in Salmonella enterica serovar Typhi [J]. Mol Cell Biochem, 2004, 267(1-2): 75 - 82.

[5] Rollins S M, Peppercorn A, Hang L, *et al*. In vivo induced antigen technology (IVIAT) [J]. Cell Microbiol, 2005, 7(1): 1 - 9.

[6] Angelichio M J, Camilli A. In Vivo expression technology [J]. Infect Immun, 2002, 70(12): 6518 - 6523.

[7] Handfield M, Brady L J, Progulske-Fox A, *et al*. IVIAT: a novel method to identify microbial genes expressed specifically during human infections [J]. Trends Microbiol, 2000, 8(7): 336 - 339.

[8] Townsend S M, Kramer N E, Edwards R, *et al*. Salmonella enterica serovar Typhi possesses a unique repertoire of fimbrial gene sequences [J]. Infect Immun, 2001, 69(5): 2894 - 2901.

[9] 胡勇，丛延广，王刚，等. 利用IVIAT技术初步筛选伤寒沙门菌的体内诱导基因[J]. 免疫学杂志，2008，24(5)：500 - 502，506.

[10] 王崧，王军平，陈默，等. 重组融合蛋白rTMP-GH在巴斯德毕赤酵母中表达的研究[J]. 第三军医大学学报，2008，30(21)：2037 - 2040.

[11] Huang Y, Leming C L, Suyemoto M, *et al*. Genome-wide screen of Salmonella genes expressed during infection in pigs, using in vivo expression technology [J]. Appl Environ Microbiol, 2007, 73(23): 7522 - 7530.

[12] Carnell S C, Bowen A, Morgan E, *et al*. Role in virulence and protective efficacy in pigs of Salmonella enterica serovar Typhimurium secreted components identified by signature-tagged mutagenesis[J]. Microbiology, 2007, 153(Pt 6): 1940 - 1952.

[13] Weening E H, Barker J D, Laarakker M C, *et al*. The Salmonella enterica serotype Typhimurium lpf, bcf, stb, stc, std, and sth fimbrial operons are required for intestinal persistence in mice[J]. Infect Immun, 2005, 73(6): 3358 - 3366.

[14] Humphries A D, Raffatellu M, Winter S, *et al*. The use of flow cytometry to detect expression of subunits encoded by 11 Salmonella enterica serotype Typhimurium fimbrial operons [J]. Mol Microbiol, 2003, 48(5): 1357 - 1376.

（**收稿**：2009-07-10；**修回**：2009-09-24）

（编辑　张　维）

文章编号：1000-5404(2010)04-0341-01

个案与短篇

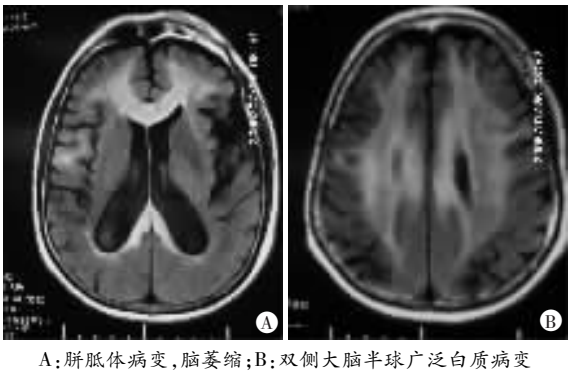
广泛脑白质病变致无动性缄默症1例

王　杰，严云燕，邓志宽　（400037 重庆，第三军医大学新桥医院神经内科）

[关键词] 无动性缄默症；脑白质病
[中图法分类号] R742　**[文献标志码]** B

1　临床资料

患者男性，66岁，因“不言语、纳差和肢体活动减少并加重7 d”2009年8月21日入院，患者入院前7 d“感冒”后开始进食减少，并逐渐加重，出现言语错乱，言语减少，行走不稳、乏力，入院前2 d卧床，动作减少，尚可少量进食。入院前1 d，患者不动，呼之不应，不能进食，遂急送我院急诊收入本科。患者饮酒史40年，每天白酒250 g左右。入院时查体：生命体征稳定，酒糟鼻，心、肺、腹部查体无异常。神经系统查体：呼之不应，双瞳等大等圆，直径3 mm，对光反射灵敏，双眼有追随动作，重压眶刺激无躲避反应和痛苦表情，四肢无自主活动，强痛刺激无明显回缩，四肢肌张力低，双侧巴氏征未引出，脑膜刺激征阴性。血常规：WBC 12 350 × 10^9/L，N 94.8%，L 2.5%，E 0.4%，Hb 145 g/L；电解质、肝肾功能正常；心电图示ST-T改变；胸片显示肺纹理增多；动态脑电图提示中度异常（背景节律差；左侧顶枕区痫样放电可能）；腰穿检查：腰穿脑脊液压力200 mmH_2O，脑脊液常规+生化未见异常，脑脊液压力偏高。行头颅MRI显示：双侧大脑半球广泛白质区域、胼胝体异常信号，脑萎缩（图1）。根据患者症状和体征为：无动性缄默症；继发性脱髓鞘；慢性酒精中毒性脑病？入院后积极营养支持治疗、积极抗感染，并给予纳洛酮、大剂量B族维生素，维持水电解质酸碱平衡，感染得到控制。住院1个月患者病情无明显改善，遂自动出院。



A：胼胝体病变，脑萎缩；B：双侧大脑半球广泛白质病变

图1　广泛脑白质病变致无动性缄默症患者头颅MRI表现

[通信作者] 王　杰，E-mail：xqwj456@sohu.com

（下转368页）