DOI:10.16016/j.1000-5404.201508052

类鼻疽伯克霍尔德菌Ⅲ型分泌系统蛋白 BsaL 的制备和免疫反应性分析

方 瑶,胡 艺,朱 攀,任春艳,马腾飞,王 昆,毛旭虎 (400038 重庆,第三军医大学西南医院医学检验系临床微生物及免疫学教研室)

[摘要] **目的** 构建表达重组的类鼻疽伯克霍尔德菌Ⅲ型分泌系统结构蛋白 BsaL 的大肠工程菌,制备高纯度、高质量的重组 BsaL 蛋白样品,探讨其作为类鼻疽菌检测的候选抗原的可行性。**方法** 基因工程技术构建表达重组 BsaL 蛋白的大肠工程菌,通过亲和层析、凝胶过滤层析等纯化方法得到高纯度的 BsaL 蛋白。包被 BsaL 蛋白于 96 孔板,分析其用于检测临床类鼻疽菌株的敏感性和特异性。**结果** 成功构建了表达重组 BsaL 蛋白的大肠工程菌,诱导、表达及纯化后得到高纯度(>99%)、高浓度(20 mg/mL)的重组 BsaL 蛋白。该蛋白在类鼻疽菌检测方面表现出较好的灵敏度(85%)和特异性(89%)。**结论** 成功表达了重组的 BsaL 蛋白,获得了高纯度的 BsaL 蛋白样品,在类鼻疽菌的诊断方面展示出较好的应用价值。

[关键词] 类鼻疽伯克霍尔德菌;Ⅲ型分泌系统(TTSS);BsaL;ELISA
[中图法分类号] R341;R378.99;R394-33 [文献标志码] A

Expression and immunological evaluation of BsaL, type Ⅲ secretion system protein of *Burkholderia pseudomallei*

Fang Yao, Hu Yi, Zhu Pan, Ren Chunyan, Ma Tengfei, Wang Kun, Mao Xuhu (Department of Clinical Microbiology and Immunology, College of Medical Laboratory Science, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To express recombinant BsaL, type Ⅲ secretion system protein of *Burkholderia pseudomallei*, for detecting the bacterium based on enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Methods** PET-28a/BsaL plasmid was constructed and introduced into *Escherichia coli* BL21. BsaL-His was induced by IPTG and purified by affinity chromatography and gel filtration chromatography. Then, the recombinant protein was applied to 96-well plate for detecting *Burkholderia pseudomallei*-containing samples. **Results** BsaL-His with high purity (>99%) and high concentration (20 mg/mL) was prepared and applied to detecting *Burkholderia pseudomallei* at relative high specificity (89%) and sensitivity (85%). **Conclusion** BsaL protein is successfully expressed and purified, and it can be applied to detecting *Burkholderia pseudomallei*.

[**Key words**] *Burkholderia pseudomallei*; Type Ⅲ secretion system protein; BsaL; ELISA

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China(81471914). Corresponding author: Mao Xuhu, E-mail:371095902@qq.com

类鼻疽伯克霍尔德菌(*Burkholderia pseudomallei*),简称类鼻疽菌,于 1912 年被 Whitmori 和 Krishnaswami 在泰国仰光首次分离到[1],导致的疾病称为类鼻疽。类鼻疽临床表现多种多样,有“似百样病”之称,死亡率高达 40%~60%[2],且耐药谱广泛、复发率高(约 20%)[2-4]。鉴于其强致病性、易培养、耐药性强等特点,类鼻疽菌已经被美国 CDC 列为I类病原体(生物恐怖剂)[2]。

类鼻疽现主要流行于热带及亚热带地区,包括澳大利亚北部、东南亚和我国的海南、台湾、广东、广西等地[5-7]。目前,培养出阳性菌落是类鼻疽诊断的唯一金标准,市面上还没有商业化的类鼻疽菌检测试剂盒,临床误诊和漏诊率很高[3,6]。

Ⅲ型分泌系统是研究类鼻疽菌致病机制的重要研究方向,也是该菌感染诊断和预防的重要靶标[1]。当

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81471914)
[通信作者] 毛旭虎,E-mail:371095902@qq.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151207.1701.007.html(2015-12-07)

类鼻疽菌感染宿主细胞时,其Ⅲ型分泌系统(Type Three Secretion System, TTSS)能形成一个类似注射器样的结构将细菌的效应或者毒力蛋白注入宿主细胞内,影响宿主细胞功能,实现病原菌的感染和免疫逃逸。该注射器的针管就是由结构蛋白 BsaL 单体呈螺旋状聚合而成[8],本研究的目的即是通过表达重组 BsaL 蛋白,探讨其应用于类鼻疽诊断的效果,为下一步设计诊断试剂盒打下理论和物质基础。

1 材料与方法

1.1 载体、菌株和标本

PET-28a 载体购自英俊捷基(Invitrogen,USA)、19-T 载体购自(TAKARA,USA),大肠工程菌 DH5α 及 BL21 感受态细菌均购自北京天根公司。100 株临床类鼻疽菌株(经 16S DNA 测序鉴定[9]和 MLST 基因分型[10]的临床分离株,BPC001-100,其中包括标准株类鼻疽菌 BPC006)均分离自三亚市人民医院检验科,类鼻疽病人血清标本(12 例)、新鲜皮肤软组织的脓肿标本(6 例)来自三亚市人民医院呼吸科和感染科,4 种阴性对照菌株(本室保存的大肠杆菌 DH5α,绿脓杆菌 PAO1,鲍曼不动杆菌 17978 和金黄色葡萄球菌 MRSA 252)作为 ELISA 检测的对照菌株样品。

1.2 试剂及仪器

T4 连接酶(TaKaRa,USA),AKATA 蛋白纯化仪(USA),凝胶过滤层析柱 Superdex 75 10/300GL(GE HealthCare,USA),J2-MC 高速冷冻离心机(Beckman,USA),TMB 底物显色液(北京天根生物科技公司)。

1.3 方法

1.3.1 构建表达重组 BsaL 蛋白的大肠工程菌 利用 primer 5.0 设计 BsaL 引物,加上保护碱基和酶切位点后序列为 BsaL-F,5′-CCCATATGAGCAATCCCCCG-ACCCC-3′,BsaL-R,5′-CCTCGAGGCGGAAGTTCGAGA-CGA-3′,PCR 产物大小为 270 bp,预测重组蛋白大小约 10.6×10^3(Editseq 软件预测)。PCR 得到目的基因片段,经测序后比对序列结果(NCBI 数据库),确认该片段为 BsaL 编码基因-BPSS1548。将目的基因片段与 19-T 载体进行连接反应(16 ℃,2 h),连接产物转化入 DH5α 后提取质粒,酶切后回收带有粘性末端的基因片段,与表达载体 PET-28a 进行连接反应(16 ℃,过夜),连接产物转化入大肠工程菌 BL21 中。

1.3.2 在不同温度(16、25、37 ℃)、不同诱导剂 IPTG 浓度(终浓度 0.25、0.5、1 mmol/L)、不同诱导时间(5、10、16 h)条件下诱导 PET-28a/BsaL-BL21 表达目的蛋白,SDS-PAGE 电泳鉴定表达情况。同时,取目的蛋白处凝胶块,送公司(中科院北京生命科学研究所)进行蛋白质的 N(氨基)端测序(6 个氨基酸残基测序)确认目的蛋白(BsaL)。

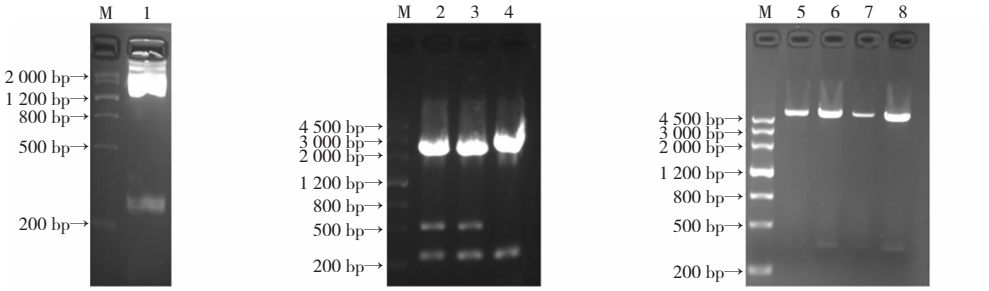
1.3.3 纯化重组蛋白 BsaL 将扩大培养的 1 L 表达菌 PET-28a/BsaL-BL21 低温离心(6 000 r/min,20 min,4 ℃)后收集菌体,缓冲液(25 mmol/L Tris,50 mmol/L NaCl,2% 甘油)重悬菌体,超声裂解细菌(功率 230 W,超 8 s,停 8 s,共超声 50 min)。低温离心(12 000 r/min,4 ℃)20 min 后用 0.80 目滤膜过滤,加入 3 mL Ni^{2+} 亲和填料共孵育(4 ℃,过夜)。依次用 25 mmol/L、50、100 、200 mmol/L 浓度梯度的咪唑洗脱与 Ni^{2+} 填料结合的目的蛋白,SDS-PAGE 电泳鉴定洗脱下的蛋白浓度。选取纯度高的蛋白样品进行凝胶过滤层析(Superdex200 16/60 层析柱),流速控制在 0.5 mL/min。用 Millipore 超滤管浓缩经过凝胶过滤层析纯化后的蛋白溶液,BCA 法测定蛋白浓度。

1.3.4 BsaL 重组蛋白作为诊断靶标的可行性分析

评价基于 BsaL 重组蛋白的 ELISA 法检测类鼻疽菌的灵敏度和特异性:用 5 ~ 10 μg/mL 的 BsaL 重组蛋白包被凹底型 96 孔板(4 ℃,过夜)。选取 100 株临床类鼻疽菌株、类鼻疽病人血清标本(12 例)和新鲜皮肤软组织的脓肿标本(6 例)依次作为受试样品,检测基于 BsaL 重组蛋白抗原的 ELISA 法检测类鼻疽菌感染的灵敏度和特异性。

1.3.4.1 BsaL 重组蛋白的 ELISA 法检测类鼻疽菌的灵敏度分析 分别将 100 株类鼻疽临床分离株、12 例类鼻疽病人血清标本和 6 例脓肿标本进行 ELISA 检测。将类鼻疽临床分离株复苏活化至菌液 $D(600)=0.3$(约 10^6 CFU/mL),进行灭活处理(100 ℃,10 min),等体积的含 BSA 蛋白的 LB 溶液作为空白对照;血清标本按 1∶100 稀释后使用,脓液标本按照1∶200 稀释后使用。均加入包被的 96 孔板中共孵育 1 h。洗板 3 次,加类鼻疽菌多克隆抗体(本室制备,按 1∶500 稀释度使用)孵育 1 h。洗板 3 次,加 HRP-羊抗兔抗体,加 TMB 显色液,显色 10 min 后终止,酶标仪上读数。阳性判断标准:受试样品 $D(450)$ 值高于阴性对照 $D(450)$ 值两倍以上可以判读为检测阳性。

1.3.4.2 BsaL 重组蛋白的 ELISA 法检测类鼻疽菌的特异性分析 此处的特异性分析主要是为了探讨 BsaL 重组蛋白抗原的 ELISA 法分辨类鼻疽菌和其它细菌的能力。随机选取 1 株类鼻疽菌株,阴性菌株选用伤寒沙门菌,洋葱伯克霍尔德菌,伯克氏菌 E264,布鲁氏菌,肠出血大肠杆菌 O157∶H7,大肠杆菌 DH5α,绿脓杆菌 PAO1,鲍曼不动杆菌 17978 和金黄色葡萄球菌 MRSA 252 共 9 种细菌。阴性对照菌每株做两个复孔,空白对照选择等体积的含 BSA 蛋白的 LB 溶液。按照 1.2.4.1 方法制备相同浓度的细菌悬液,并进行灭活处理和 ELISA 法检测,判读方法同前。



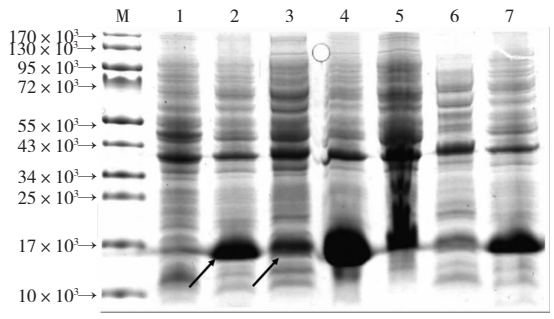
M: 标准 1: BsaL 基因 PCR 产物,2、3、4: BsaL 基因连接 T 载体后经双酶切(*Nde*1 和 *Xho*1)鉴定,5、6、7、8:BsaL 基因连接 PET-28a 载体后经双酶切(*Nde*1 和 *Xho*1)鉴定

图 1 BsaL 基因克隆及其载体构建

2 结果

2.1 构建表达重组 BsaL 蛋白的大肠工程菌

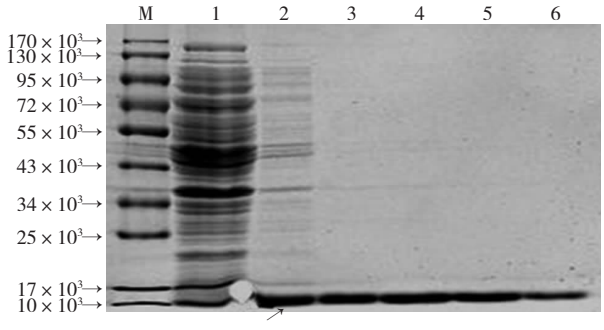
2.1.1 BsaL 基因 PCR 95 ℃预变性 4 min,95 ℃变性 1 min,56℃退火 1 min,72 ℃延伸 1 min,前 3 个步骤循环重复 30 次,最后 72 ℃延伸 7 min,目的基因产物大小为 270 bp(如图 1A 所示)。BsaL 的 PCR 产物连接 19-T 克隆载体后转化入 DH5α 工程菌进行目的基因的扩增,提取质粒酶切鉴定(*Nde*1 和 *Xho*1 双酶切),筛选连接成功的(图 1B)。而后用 *Nde*1 和 *Xho*1 双酶切 T 载体回收目的基因片段,并将其与表达载体 PET-28a 连接。将连接产物转化入 DH5α,酶切鉴定插入片段(大小约为 270 bp 左右,图 1C)。片段 DNA 测序结果显示其与 GenBank 公布的 BsaL 基因序列一致(100% identity)。至此,将构建好的 PET-28a/BsaL 质粒转化入 BL21。



M:标准,1:诱导前(37 ℃),2: 1 mmol/L IPTG 诱导后,3、4: 2 的超声裂解液上清和沉淀,5: 0.5 mmol/L IPTG 诱导后,6、7: 5 的超声裂解液上清和沉淀,箭头:目的蛋白

图 2 BsaL 重组蛋白的诱导表达结果

2.1.2 PET-28a/BsaL 的诱导表达 IPTG 诱导重组蛋白表达(如图 2 所示):在 16 ℃和 25 ℃条件下 BsaL 重组蛋白可溶性表达量较高,但表达量较 37 ℃低(结果未展示)。后续采用 37 ℃作为诱导 BsaL 蛋白表达的温度条件。进一步采用不同浓度的 IPTG 诱导蛋白的表达,发现 1 mmol/L 诱导剂诱导蛋白产量较多,在培养 5 h 即能获得较大产量,且可溶表达的重组蛋白也较多(图 2 中条带 3)。

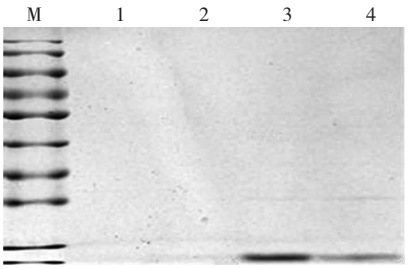


M:标准,1:流穿液,2: 25 mmol/L 咪唑洗脱蛋白液,3: 50 mmol/L 咪唑洗脱,4: 100 mmol/L 咪唑洗脱,5: 200 mmol/L 咪唑洗脱,6: 500 mmol/L 咪唑洗脱;箭头:目的蛋白

图 3 BsaL 重组蛋白纯化的蛋白电泳鉴定结果

2.2 纯化重组蛋白 BsaL-His

采用 25、50、100、200、500 mmol/L 不同浓度的咪唑洗脱结合上 Ni^{2+} 亲和填料的蛋白,电泳鉴定洗脱液,目的蛋白纯度最高能达到 90% 以上(图 3 条带 3-6,约 12×10^3 大小处)。将杂蛋白较少的咪唑蛋白洗脱蛋白溶液经浓缩后上机(AKATA 纯化仪)进行凝胶过滤层析。蛋白出峰(紫外吸收峰 280 nm)体积在 12.48 mL,而且提示蛋白呈单体形式,并未发生自发性的聚合。电泳鉴定纯化蛋白的纯度超过 95%(图 4),可以满足后续检测分析的纯度要求。Millipore 超滤离心(6 000 r/min,3 h)后浓缩蛋白至 30 mg/mL。



M:标准;1、2:刚出现 UV 吸收峰时的蛋白样品,3、4:吸收峰处收集的蛋白样品;箭头:目的蛋白

图 4 BsaL 重组蛋白的电泳鉴定结果

2.3 基于BsaL重组蛋白抗原的ELISA法检测类鼻疽菌的灵敏度和特异性

2.3.1 BsaL重组蛋白的ELISA法检测类鼻疽菌的灵敏度分析 将100株类鼻疽临床分离株菌液样本按照1.3.4.1中的方法进行检测,有85例样品判读为阳性,阳性率为85%(即灵敏度)。同理,将12例类鼻疽病人血清标本和6例脓肿标本进行ELISA检测,其中6例血清标本和2例脓液标本表现为阳性,阳性率分别为50%和33%。

2.3.2 BsaL重组蛋白的ELISA法检测类鼻疽菌的特异性分析 同2.3.1检测方法,实验结果显示,只有伯克氏菌E264和类鼻疽菌样品检测为阳性,剩余样品均判读为阴性反应。提示基于BsaL重组蛋白抗原的ELISA法检测类鼻疽菌具有很高的特异性(8/9≈89%)。

3 讨论

类鼻疽菌作为一种具有生物威胁的病原菌,广泛肆虐在东南亚及澳大利亚北部等地,并随着环境微生态的改变和极端气候条件的增多呈扩散之势[11-13]。我国海南正是类鼻疽的主要流行区域,且在福建、广东、广西等地都有过人类鼻疽感染的报道,病死率很高。随着国际交往的增加,输入性的类鼻疽也不断被报道,人间传播的可能性也依然存在[14-16]。

类鼻疽临床表现多样,在临床上极易误诊和漏诊,初诊误诊率几乎100%,尤其是在类鼻疽非流行区域[17]。目前在我国类鼻疽的诊断主要还是依靠类鼻疽的分离培养及生化鉴定,但是分离率并不高,同时生化鉴定也需要与其它相似菌株相区分,比如洋葱伯克霍尔德菌,伯克氏菌和唐菖蒲伯克霍尔德菌等。而目前还没有类鼻疽菌的检测试剂盒,这极大地制约了类鼻疽菌的临床诊断,尤其在非疫区的类鼻疽感染的筛查,也不便于我们进一步的流行病学调查。

类鼻疽菌的Ⅲ型分泌系统参与了类鼻疽菌侵袭、感染和播散的多个方面,是研究该菌感染诊断和预防的重要靶标。本实验针对类鼻疽伯克霍尔德菌Ⅲ型分泌系统结构蛋白BsaL,对其进行重组表达,获得了高纯度、高浓度的重组BsaL蛋白,但是BsaL蛋白并没有像天然状态下发生自发性聚合,而是呈单体形式。这可能是由于重组蛋白的标签的影响,也可能是其融合还需要其他伴侣分子的辅助才得以完成。同时,我们探讨了基于BsaL重组蛋白抗原作为诊断靶标的可行性,利用类鼻疽菌株、相关标本和阴性菌株对其进行评价,提示该蛋白在类鼻疽菌检测方面表现一定的应用价值,为下一步研发类鼻疽的诊断试剂盒打下基础。

参考文献:

[1] Galyov E E, Brett P J, DeShazer D. Molecular insights into Burkholderia pseudomallei and Burkholderia mallei pathogenesis[J]. Annu Rev Microbiol, 2010, 64: 495-517. DOI: 10.1146/annurev.micro.112408.134030

[2] Wiersinga W J, Currie B J, Peacock S J. Melioidosis[J]. N Engl J Med, 2012, 367(11): 1035-1044. DOI:10.1056/NEJMra1204699

[3] White N J. Melioidosis[J]. Lancet, 2003, 361(9370): 1715-1722.

[4] Mima T, Schweizer H P, Xu Z Q. *In vitro* activity of cethromycin against Burkholderia pseudomallei and investigation of mechanism of resistance[J]. J Antimicrob Chemother, 2011, 66(1): 73-78. DOI:10.1093/jac/dkq391

[5] Ma G, Zheng D, Cai Q, *et al*. Prevalence of Burkholderia pseudomallei in Guangxi, China[J]. Epidemiol Infect, 2010, 138(1): 37-39. DOI:10.1017/S0950268809990264

[6] Yang S. Melioidosis research in China[J]. Acta Trop, 2000, 77(2): 157-165.

[7] 毛旭虎. 加强类鼻疽的研究[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(13): 1315-1317.

[8] Wang Y, Ouellette A N, Egan C W, *et al*. Differences in the electrostatic surfaces of the type III secretion needle proteins PrgI, BsaL, and MxiH[J]. J Mol Biol, 2007, 371(5): 1304-1314.

[9] 杨小敏, 方瑶, 顾江, 等. 特异引物PCR鉴定类鼻疽伯克霍尔德菌方法的建立和优化[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(14):1427-1431.

[10] Godoy D, Randle G, Simpson A J, *et al*. Multilocus sequence typing and evolutionary relationships among the causative agents of melioidosis and glanders, Burkholderia pseudomallei and Burkholderia mallei[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(5): 2068-2079.

[11] Chen Y S, Lin H H, Mu J J, *et al*. Distribution of melioidosis cases and viable Burkholderia pseudomallei in soil: evidence for emerging melioidosis in Taiwan[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(4): 1432-1434. DOI:10.1128/JCM.01720-09

[12] Chen Y L, Yen Y C, Yang C Y, *et al*. The concentrations of ambient Burkholderia pseudomallei during typhoon season in endemic area of melioidosis in Taiwan[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2014, 8(5): e2877. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002877

[13] Chen H, Xia L, Zhu X, *et al*. Burkholderia pseudomallei sequence type 562 in China and Australia[J]. Emerg Infect Dis, 2015, 21(1): 166-168. DOI:10.3201/eid2101.140156

[14] Kunakorn M, Jayanetra P, Tanphaichitra D. Man-to-man transmission of melioidosis[J]. Lancet, 1991, 337(8752): 1290-1291.

[15] Allen R K. Melioidosis: a cause of pneumonia to suspect in travellers back from Oceania[J]. Rev Mal Respir, 2002, 19(6): 807-808.

[16] Wiersinga W J, van-der-Poll T. Burkholderia pseudomallei tropism and the melioidosis road map[J]. J Infect Dis, 2009, 199(12): 1720-1722. DOI:10.1086/599211

[17] Peacock SJ. Melioidosis[J]. Curr Opin Infect Dis, 2006, 19(5): 421-428. DOI:10.1097/01.qco.0000244046.31135.b3

(收稿:2015-08-12;修回:2015-10-24)

(编辑 邓强庭)