DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.11.025
第22卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 11
2000年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2000

文章编号:1000-5404(2000)11-1077-03

论著

淋球菌 IgA 蛋白酶基因中和表位片段的克隆、表达和鉴定

许福明[1],马文煜[1],项秉懿[2],闫 岩[1],白光春[1],李 元[1] (第四军医大学:[1]微生物学教研室;[2]生物化学与分子生物学教研室;西安 710032)

提 要:目的 克隆和表达编码淋球菌 IgA 蛋白酶中和表位的基因。方法 通过 PCR 扩增淋球菌 IgA 蛋白酶编码基因 1 601~2 722 位序列,克隆后在大肠杆菌中表达,表达产物用重组淋球菌 IgA 蛋白酶免疫血清作 Western 印迹。并用表达产物免疫小鼠血清与产 IgA 蛋白酶的标准菌株培养上清作用,观察免疫血清对酶活性的影响。结果 所克隆的基因在大肠杆菌中获得高效表达,表达产物能与重组淋球菌 IgA 蛋白酶免疫血清反应,表达产物的免疫血清能中和淋球菌 IgA 蛋白酶的活性。结论 所克隆的基因序列中含有淋球菌 IgA 蛋白酶的中和表位,其表达产物能中和淋球菌 IgA 蛋白酶的活性。

关键词:淋球菌;IgA 蛋白酶;表位;基因克隆;基因表达
中图法分类号:R378.16;R394.3 文献标识码:A

Cloning, expression and identification of gene segment encoding the neutralizing epitopes of IgA protease secreted by *Neisseria gonorrhoeae*

XU Fu-ming, MA Wen-yu, XIANG Bing-yi, YAN Yan, BAI Guang-chun, LI Yuan (Department of Microbiology, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China)

Abstract: Objective To clone and express the gene segment encoding the neutralizing epitopes of *Neisseria gonorrhoeae*-secreted IgA protease. Methods A pair of primers with flank site 1 601 to 2 722 of IgA protease gene were designated according to the published full sequence. Plasmid pFP180 which can express the intact IgA protease was used as the template. The 1 100 bp fragment was amplified by PCR and was further directional cloned into pUC18. After the sequencing, the fragment was subcloned into an expression vector, pBV220 and then was transformed into *E. coli* DH5α. The expression product was identified by Western blot with the serum immunized with recombinant IgA. Results The cloned gene was expressed in *E. coli* with high efficiency. The serum of mice immunized with the expression product could inhibit the split activity of IgA protease secreted by *N. gonorrhoeae*. Conclusion The gene fragment cloned contains neutralizing epitopes of IgA protease, and its product can inhibit the activity of IgA protease.

Key words: *Neisseria gonorrhoeae*; IgA protease; epitope; gene cloning; gene expression

IgA 蛋白酶是细菌产生的一种胞外酶,因能特异性裂解人 IgA1 而命名。该酶能破坏机体的粘膜免疫功能,进而增强细菌的致病力。能分泌 IgA 蛋白酶的细菌有奈瑟氏菌属的淋球菌和脑膜炎球菌、肺炎链球菌、流感嗜血杆菌、支原体等。明确淋球菌 IgA 蛋白酶中和表位对于研究其致病菌性及免疫性均有重要意义。本实验旨在探讨其表位在编码基因中的定位。

1 材料和方法

1.1 质粒和菌种

质粒 pFP180 是淋球菌 MS11 株 IgA 编码基因和质粒 pEX31 表达载体的重组质粒,能表达噬菌体 MS2 多聚酶氨基端 12×10^3 部分和 169×10^3 的 IgA 蛋白酶前体[1],大肠杆菌 2136 为 pFP180 质粒的宿主菌,染色体内含 CIts857 基因。该质粒及菌株均由德国 Pohlner 博士惠赠。淋球菌 MKB 为淋球菌 F62 株[2],该菌株能产 2 型 IgA 蛋白酶,由美国 Plaut 博士惠赠。质粒 pUC18 和 pBV220、宿主菌 JM109 和 DH5 均为本室保存。

1.2 主要试剂

Taq 酶、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *EcoR* Ⅰ 及 *Sal* Ⅰ 均

作者简介:许福明(1951—),男,河北省望都县人,博士,副教授,主要从事临床微生物学方面的研究。电话:(029)3373161

收稿日期:2000-03-14;修回日期:2000-05-18

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

购自Promega公司。人IgA1(人骨髓瘤蛋白,Kappa链)购自英国Birmingham。活化生物素购自美国Sigma公司,辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素为美国Vector Laboratories公司产品。

1.3 实验动物

6周龄雌性BALB/c小鼠,由本校实验动物中心提供。

1.4 基因扩增

根据MS11株IgA蛋白酶编码基因序列,分析和设计了特异性扩增1 601至2 722区的1对引物,P1为5' GGGAATTCATGTATTTCGGTTTCCGTGGC,含保护碱基GG、*EcoR*Ⅰ酶切位点及起始码。P2为5' GGTCGACTATGCACTTTGCGCATCGGAAGC,含保护碱基G、*Sal*Ⅰ酶切位点及终止码。以0.1 μg质粒pFP180为模板,扩增条件为:94 ℃ 50 s,55 ℃ 50 s,72 ℃ 90 s,扩增30个循环。取5 μl扩增产物作2%琼脂糖凝胶电泳,鉴定产物大小。

1.5 基因克隆、测序及表达

将PCR产物用*EcoR*Ⅰ和*Sal*Ⅰ双酶切,回收并纯化后定向克隆至质粒pUC18,常规法转化大肠杆菌JM109,随机挑选4个白色克隆,小量制备质粒后,用*EcoR*Ⅰ和*Sal*Ⅰ双酶切初步鉴定,选一个阳性克隆,以Sanger双脱氧末端终止法进行双向序列分析。将重组质粒用*EcoR*Ⅰ和*Sal*Ⅰ双酶切,将所切出的片段回收纯化,与相同酶切的质粒载体pBV220连接,常规法转化大肠杆菌DH5α,随机挑选6个白色克隆用*Eco*RI和*Sal*Ⅰ双酶切初步鉴定,阳性重组菌命名为F1122。选3个阳性克隆扩大培养,32℃培养6 h,转至42 ℃继续诱导培养6 h,集菌后用SDS-PAGE上样缓冲液裂解,作12% SDS-PAGE,以凝胶薄层扫描确定表达产物的产量,对照菌为未诱导的重组菌及不含插入基因的重组菌。

1.6 表达产物的初步鉴定

以质粒pFP180转化大肠杆菌2136,将重组菌在含氨苄青霉素的液体培养基中28 ℃培养6 h,转至42 ℃诱导使其表达含淋球菌IgA蛋白酶的融合蛋白。采用电泳产物微量免疫BALB/c小鼠[3],方法为:该重组菌经12% SDS-PAGE后,电泳转移至硝酸纤维素膜,切取180×10^3部分,洗脱回收,腹股沟皮下免疫。3周后切取SDS-PAGE凝胶中180×10^3部分,与PBS研磨后腹腔追加免疫,每周1次,共追加免疫2次,末次免疫1周后采集血清。将所构建的重组菌F1122经12% SDS-PAGE后,与免疫血清作Western印迹。

1.7 中和表位的初步确定

将重组菌F1122用电泳产物微量免疫BALB/c小鼠,末次免疫1周后采集血清。将免疫血清与淋球菌MKB株培养上清作用后备用。用生物素标记人IgA1,与淋球菌MKB株培养上清作用,电泳转移至硝酸纤维素膜后,以辣根过氧化物酶标记的链霉亲合素显色,比较培养上清在血清处理前后对生物素化人IgA1的裂解活性。

2 结果

2.1 基因的扩增、克隆及序列分析

经30次循环后,获得了大小约为1 100 bp的特异扩增产物。扩增产物与pUC18连接转化大肠杆菌JM109后,挑选4个白色克隆用*EcoR*Ⅰ和*Sal*Ⅰ酶切鉴定均为阳性克隆,选取1号菌提取质粒,纯化后经Sanger双脱氧末端终止法作双向序列分析,与所发表的序列一致[1]。

2.2 基因表达及表达产物的初步鉴定

将所克隆的片段酶切回收并纯化后,与相同酶切的质粒载体pBV220连接,常规法转化大肠杆菌DH5α,随机挑选6个白色克隆用*EcoR*Ⅰ和*Sal*Ⅰ双酶切初步鉴定,其中有4个克隆所提质粒可切出大小约为1 100 bp的片段,阳性重组菌命名为F1122。选3个阳性克隆扩大培养,42 ℃诱导培养6 h,集菌后作12% SDS-PAGE,均有表观分子量为40×10^3的表达带,见图1,将6号菌作凝胶薄层扫描,测得其表达产物的产量约为41%,见图2。经Western印迹,表达产物能与重组淋球菌IgA蛋白酶免疫血清特异性结合,表明所表达的产物具有淋球菌IgA蛋白质酶的抗原性。

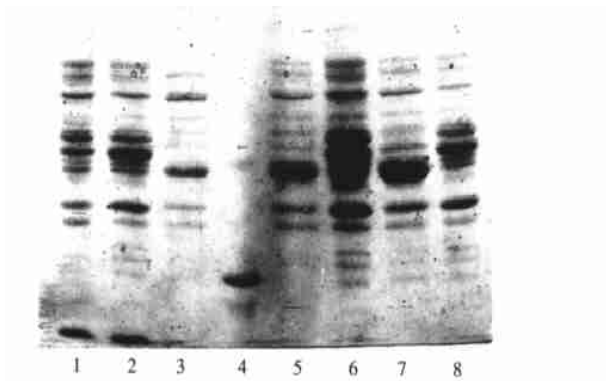


图1 重组子F1122表达的SDS-PAGE结果

Fig 1 SDS-PAGE result of expression by the recombinants F1122

Lane 1: DH5(pBV220); Lane 2, 6, 8: Uninduced control of the recombinants F1122; Lane 3, 5, 7: Induced recombinants F1122; Lane 4: MW marker (25×10^3, 45×10^3)

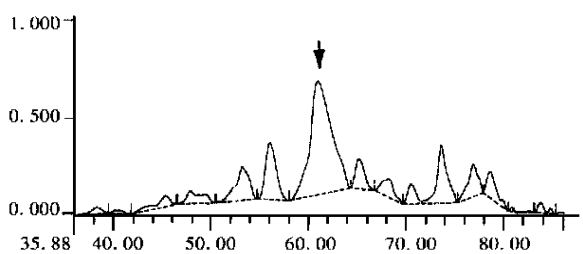


图2 重组子F1122(No. 6)的凝胶扫描结果

Fig 2 Gel scanning of the recombinant F1122(No. 6)

2.3 中和表位的初步确定

生物素标记人IgA1与淋球菌MKB株培养上清作用后,经Western印迹可见其重链被裂解为分子量约为28×10^3和31×10^3大小的两个片段,将重组菌F1122免疫血清与淋球菌MKB株培养上清混合作用后,再与人生物素标记人IgA1则不能裂解IgA1。此结果表明,重组菌F1122的表达产物中具有淋球菌IgA蛋白酶中和表位。

3 讨论

人体粘膜表面的IgA浓度高于其它类型的免疫球蛋白,其中IgA1亚类占IgA总量的55%~75%,是机

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

体抗御淋球菌等细菌感染的主要抗体。不同细菌产生的IgA 蛋白酶作用于人 IgA 的位点不同。淋球菌所产的IgA 蛋白酶有 1 型和 2 型两种，其中 1 型酶作用于 IgA 氨基酸序列的237和 238 位之间的Pro-Ser 键，将重链裂解为 28.5×10^3 和 30.5×10^3 两个片段，2 型酶作用于 IgA 氨基酸序列的 235 和 236 位之间的 Pro-Thr 键，将重链裂解为 28×10^3 和 31×10^3 两个片段。两种类型的酶与脑膜炎球菌的两种 IgA 蛋白酶作用位点一致，但与其它细菌的 IgA 蛋白酶作用位点不同[4]。Mulks 等[5] 检测了 889 份淋球菌临床标本，其中有 199 份(占 22.4%)产 1 型 IgA 蛋白酶，683 份(占 76.8%)产2 型酶，仅有 7 份未测到酶活性。表明此酶与淋球菌的致病性密切相关。其中又以产 2 型酶菌株较多，加之 1 型酶的活性也仅有 2 型的 10%，因此与临床致病相关的菌株主要为产 2 型酶的菌株。

不同菌株的 IgA 蛋白酶编码基因序列有一定差异，我们根据不同菌株淋球菌 IgA 蛋白酶编码基因序列的比较，选取保守区作为目的基因。通过在大肠杆菌中高效表达，表达产物免疫小鼠所获血清能够中和淋球菌 IgA 蛋白酶的活性，表明此保守区是淋球菌 IgA 活性的主要决定区域。其它区域可能主要与 IgA 蛋白酶在向胞外分泌时的跨膜转运有关。

Morelli 等[6] 从脑膜炎球菌的 IgA 蛋白酶中检测出 5 个鼠源性单克隆抗体表位，其中 1、4、5 表位特异性单克隆抗体能中和脑膜炎球菌 IgA 蛋白酶裂解人 IgA 的活性。以往的血清学实验已证明，淋球菌 IgA 蛋白酶免疫动物所产生的抗体不仅能中和淋球菌的 IgA 蛋白酶活性，而且能中和脑膜炎球菌 IgA 蛋白酶的活性。淋球菌与脑膜炎球菌的 IgA 蛋白酶之间存在着共同的中和表位。Lomholt 等[7] 从基因水平研究也发现，淋球菌与脑膜炎球菌所分泌的 IgA 蛋白酶之间存在着广泛交叉的中和表位。脑膜炎球菌 IgA 蛋白酶中和表位集中于其氨基酸序列的第 484 ~660 位。本实验所克隆了编码淋球菌 IgA 蛋白酶部分基因序列，其编码产物为 IgA 蛋白酶氨基酸序列的第 472 ~864 的位置，基因表达产物的免疫血清能中和淋球菌 IgA 蛋白酶的活性，表明这一区域是奈色氏菌属 IgA 蛋白酶中和表位的集中区域。该基因的定位有助于深入研究奈色氏菌属 IgA 蛋白酶的致病性及免疫性，为进一步保护机体的粘膜免疫功能提供一定的思路。

参考文献：

[1] Pohlner J R, Halter R, Beyreuther K, *et al*. Gene structure and extracellular secretion of *Neiseria gonorrhoeae* IgA protease[J]. Nature, 1987, 325(3): 458－462.

[2] Koomey J M, Gill R E, Falkow S. Genetic and biochemical analysis of gonococcal IgA1 protease: Cloning in *Escherichia coli* and construction of mutants of gonococci that fail to produce the activity[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1982, 79(24): 7 881－7 885.

[3] 李 元，马文煜，白光春，等. 空斑法筛选具有中和活性的抗衣原体粘连蛋白 McAb[J]. 细胞与分子免疫学杂志，1996, 12(3): 49－52.

[4] Pohlner J, Klauser T, Kuttler E, *et al*. Sequence-specific cleavage of protein fusions using a recombinant Neisseria type 2 IgA protease[J]. Biotechnology, 1992, 10(7): 799－804.

[5] Mulks M H, Knapp J. Immunoglobulin A1 protease types of *Neisseria gonorrhoeae* and their relationship to auxotype and serovar [J]. Infect Immun, 1987, 55(4): 931－936.

[6] Morelli G, del Valle J, Lammel G J, *et al*. Imunogenicity and evolutionary variability of epitopes within IgA1 protease from serogroup A *Neisseria meningitidis*[J]. Mol Microbiol, 1994, 11(1): 175－187.

[7] Lomholt H, Killian M. Antigenic relationships among immunoglobulin A1 proteases from *Haemophilus*, *Neisseria*, and *Streptococcus* species[J]. Infect Immun, 1995, 62(8): 3 178－3 183.

（编辑 郭建秀）

文章编号：1000-5404(2000)11-1079-01

经验与短篇

抗 Mi^a 引起溶血性输血反应 1 例报道

A case report of hemolytic transfusion reaction caused by anti-Mi^a

肖瑞卿，林武存，吴 毅，张 红 （第三军医大学附属西南医院输血科，重庆 400038）

患者罗某，女，年龄 40 岁，汉族，1998 年 7 月，以食道静脉曲张上消化道出血，急诊收治我院消化科，T 36.3 ℃、P 83 次/min、R 20 次/min、BP 12/8 kPa。实验室检查 WBC 8.1×10^9/L、RBC 2.33×10^{12}/L、HB 61g/L、PLT 97×10^9/L。谷丙转氨酶 13 IU/L、谷草转氨酶20 IU/L、碱性磷酸酶47 IU/L、直接胆红素

作者简介：肖瑞卿(1951－)，女，山东省荣成市人，主任技师，主要从事血型血清学方面的研究，发表论文 40 余篇。电话：(023)68754198

收稿日期：1999-09-15；修回日期：2000-05-15

（下转 1083 页）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net