

谢珊珊, 黄金, 杨发龙. 绵羊肺炎支原体 P109 蛋白质分子特征、原核表达及其免疫反应性[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(4): 824-828.

doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2015.04.018

绵羊肺炎支原体 P109 蛋白质分子特征、原核表达及其免疫反应性

谢珊珊, 黄金, 杨发龙

(西南民族大学生命科学与技术学院/动物医学四川省高等学校重点实验室, 四川 成都 610041)

摘要: 为了研究绵羊肺炎支原体 P109 蛋白质的结构与功能, 本试验对 *p109* 基因进行生物信息学分析, 并对其部分基因片段进行了 PCR 扩增、克隆和原核表达, 采用 Western-blot 方法对其免疫反应性进行分析。结果显示, *P109* 基因与猪肺炎支原体黏附相关基因 *mhp384* 高度同源。重组蛋白质在大肠杆菌 Rosetta (DE3) 工程菌中成功获得表达, 以包涵体的形式存在; 经纯化的重组蛋白质与山羊抗绵羊肺炎支原体全菌血清发生结合反应, 表明 P109 蛋白质是绵羊肺炎支原体的免疫原之一。

关键词: 绵羊肺炎支原体; P109 蛋白质; 原核表达; 免疫反应性

中图分类号: S826 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2015)04-0824-05

Molecular characterization, prokaryotic expression and immunoreactivity of *Mycoplasma ovipneumoniae* P109 protein

XIE Shan-shan, HUANG Jin, YANG Fa-long

(College of Life Science and Technology, Southwest University for Nationalities/Key Laboratory of Veterinary Medicine of University in Sichuan Province, Chengdu 610041, China)

Abstract: To study the structure and function of P109 protein of *Mycoplasma ovipneumoniae*, bioinformatics analysis were performed and a partial fragment of *p109* was cloned and expressed in *Escherichia coli*. Immunoreactivity of P109 was analyzed by Western-blot. *P109* was highly homologous to *M. hyopneumoniae mhp384*, an adhesion-related gene. The recombinant protein was successfully expressed in *Escherichia coli* Rosetta (DE3) as inclusion body. The purified recombinant protein reacted with goat serum against *M. ovipneumoniae*, suggesting protein P109 was one of the immunogens of *M. ovipneumoniae*.

Key words: *Mycoplasma ovipneumoniae*; P109 protein; prokaryotic expression; immunoreactivity

绵羊肺炎支原体 (*Mycoplasma ovipneumoniae*) 可感染绵羊、山羊以及其他野生小反刍动物, 是引起非

典型肺炎的病原, 其在全球范围内流行, 危害严重^[1-4]。系统进化分析结果表明绵羊肺炎支原体和引起猪地方流行性肺炎的病原——猪肺炎支原体 (*Mycoplasma hyopneumoniae*) 的亲缘关系最近^[5-6]。在猪肺炎支原体中, 黏附素 P97 及其旁系同源蛋白质是重要的毒力因子, 在介导支原体对宿主细胞的黏附过程中发挥着重要作用, 而且也是重要的免疫原, 可诱导机体产生抗体^[7-8], 从而在研制亚单位疫

收稿日期: 2015-04-27

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31272588); 四川省杰出青年学术技术带头人培育计划项目 (2013JQ0040)

作者简介: 谢珊珊 (1992-), 女, 安徽安庆人, 本科, 主要从事生物技术研究。(Tel)17755647950; (E-mail) 1035724831@qq.com

通讯作者: 杨发龙, (E-mail) yfalong@hotmail.com

苗及建立血清学诊断技术时具有重要的意义。对绵羊肺炎支原体 SC01 株的全基因组进行分析时发现,在绵羊肺炎支原体基因组中存在一组与 P97 及其旁系同源基因高度同源的基因家族^[9]。其中,绵羊肺炎支原体 *p109* 基因与猪肺炎支原体 *mhp843* 高度相似,而后的编码产物已被证明是重要的黏附素和免疫原^[7,10]。因此,有理由推测绵羊肺炎支原体 P109 也极有可能是重要的功能蛋白质之一。

本研究对 *p109* 基因的分子特征进行了分析,并对其进行了原核表达和免疫反应性分析,为进一步研究其结构与功能,以及为其在亚单位疫苗及血清学诊断中作为抗原的可能性提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌株、载体及血清

绵羊肺炎支原体 SC01 株由西南民族大学动物医学四川省高校重点实验室分离鉴定和保存,*E. coli* DH5 α 、Rosetta (DE3) 感受态细胞均购自大连宝生物工程有限公司,pET-32(a+) 载体为 Novagen 公司产品,山羊抗绵羊肺炎支原体 SC01 株阳性血清由西南民族大学动物医学四川省高校重点实验室制备,HRP 标记兔抗山羊 IgG 为 Bio-Rad 公司产品。

1.2 主要试剂

限制性内切酶 *Bam* H I、*Xho* I 为 NEB 公司产品,*Taq* DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶为 TaKaRa 公司产品,AxyPrepTM DNA Gel Extraction Kit、AxyPrepTM Plasmid Miniprep Kit 均为 Axygen 公司产品,Immun-Star WesternC Chemiluminescence Kit 为 Bio-Rad 公司产品,HistrapTM HP 重组蛋白质纯化柱为 GE Healthcare 公司产品。

1.3 *p109* 基因序列分析

采用 NCBI 的 BLAST 工具及 DNASTAR 软件包中 MegAlign、EditSeq 和 Protean 工具对核苷酸及氨基酸序列分子量大小及与其他基因的相似性进行比较分析;蛋白质信号肽、跨膜区以及脂蛋白质预测分别利用在线工具 SignalP4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)、TMHMM (www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/) 以及 LipoP 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/LipoP/>) 进行;抗原表位分析采用在线分析站点 (<http://imed.med.ucm.es/Tools/antigenic.pl>) 进行。

1.4 引物设计

由于在 *p109* 基因中近 3' 端含有 2 个 TGA (在支原体中编码色氨酸) 密码子,故依据抗原表位分析结果和引物设计原则,在其 5' 端设计 1 对引物。引物序列如下:P109F:5'-CGC GGATCCCAGATTGGT-TATTCCTAGGAGC-3' (下划线部分为 *Bam* H I 酶切位点),P109R:5'-CCG CTCGAGATTACCATCAAGATTAGCC (下划线部分为 *Xho* I 酶切位点),该引物扩增片段大小 852 bp (其编码 P109 蛋白质第 119 至第 402 位氨基酸),引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.5 目的片段的 PCR 扩增

采用常规酚/氯仿法提取绵羊肺炎支原体 SC01 株基因组 DNA 作为模板,利用上述引物对 P109F/P109R 进行 PCR 扩增。PCR 反应总体系为 25.000 μ l,包含 dNTP (各 2.5 mmol/L) 2.000 μ l、MgCl₂ (25 mmol/L) 2.000 μ l、上下游引物 (10 μ mol/L) 各 1.000 μ l、*Taq* DNA 聚合酶 (5 U/ μ l) 0.125 μ l、10 \times PCR buffer 2.500 μ l、DNA 模板 2.000 μ l 以及去离子水 14.375 μ l。反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,51 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,16 $^{\circ}$ C 结束反应。PCR 产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.6 原核表达载体的构建

采用 DNA Gel Extraction Kit 对 PCR 产物进行纯化回收。用 *Bam* H I 和 *Xho* I 分别对纯化的 PCR 产物和 pET-32(a+) 进行双酶切,并经纯化回收后,采用 T4 连接酶进行连接反应。连接产物转化到 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,随后涂布至含有 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 琼脂平板培养基上,37 $^{\circ}$ C 培养 24 h。挑取阳性菌落,接种至含有 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 肉汤中培养过夜,采用 AxyPrepTM Plasmid Miniprep Kit 提取质粒。通过 PCR 扩增对质粒进行鉴定,并交由上海生工生物工程有限公司进行测序确认。重组表达载体命名为 pET-32(a+)-P109,由其编码表达的重组蛋白质命名为 rP109。

1.7 重组蛋白质的诱导表达、可溶性分析和纯化

将上述鉴定正确的重组阳性质粒 pET-32(a+)-P109 和空载体 pET-32(a+) 分别转化 *E. coli* Rosetta (DE3) 感受态细胞,挑取单个菌落接种到含有 100 μ g/ml 氨苄青霉素和 34 μ g/ml 氯霉素的 LB 肉汤中,37 $^{\circ}$ C、160 r/min 振荡培养过夜。取 500 μ l 培养菌液

接种到 50 ml 含有 100 $\mu\text{g/ml}$ 氨苄青霉素和 34 $\mu\text{g/ml}$ 氯霉素的 LB 肉汤中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养至 OD_{600} 为 0.6 后, 加入 0.5 mmol/L 的 IPTG 进行诱导表达, 收集诱导前及诱导后不同时间点的菌液 2 ml, 离心收集菌体, PBS 重悬后采用 SDS-PAGE 电泳检测重组蛋白质的表达情况。

选择上述得到的最佳表达条件对目的蛋白质进行大量表达, 12 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液, 沉淀采用 10 ml 裂解液进行重悬, 并采用超声破碎仪在冰浴中进行超声裂解。在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 以 12 000 r/min 离心 20 min, 收集上清液, 对沉淀采用 5 ml PBS 液 (0.01 mol/L, pH 7.4) 进行重悬。用 SDS-PAGE 电泳对沉淀和上清液中的重组蛋白质进行检测, 以鉴定其可溶性。随后, 利用 GE Healthcare 公司生产的 HisTrapTM HP 重组蛋白质纯化柱, 按照说明书对重组蛋白质 rP109 进行纯化。

1.8 Western-blot 分析

用纯化的 rP109 蛋白质制样, 进行 SDS-PAGE 电泳, 用半干转印仪转移至硝酸纤维素膜上。50 g/L 脱脂奶粉封闭过夜, TBST 洗涤 3 次 (每次 10 min) 后以 1:600 倍稀释的山羊抗绵羊肺炎支原体 SC01 株阳性血清为一抗孵育 2 h; 同法洗涤后孵育二抗 2 h, 二抗为 1:6 000 稀释的 HRP 标记的兔抗山羊 IgG; 最后洗涤后加 Immun-Star WesternC Chemiluminescence Kit 发光剂, 于 VersaDoc 成像系统中成像, 读取结果。以绵羊肺炎支原体抗体阴性的山羊血清作为对照。

2 结果

2.1 *p109* 基因的生物信息学分析

p109 基因 CDS 全长为 2 904 bp, G+C 含量为 28.44%, 编码的蛋白质分子量为 108 900, 等电点为 4.91。该基因包含 2 个用于编码色氨酸的 TGA 密码子, 分别位于第 1 996 bp 和 2 692 bp 处。经 BLAST 比较分析, *p109* 基因与猪肺炎支原体黏附相关基因 *mhp843* 相似性最高, 两者间核苷酸序列相似性为 47.00%, 编码氨基酸序列相似性为 45.30%, 表明 *p109* 为 *mhp843* 的直系同源基因。

跨膜结构域及信号肽分析结果显示, P109 蛋白质在其 N 端有 1 个明显的跨膜区螺旋, 位于 9~31 aa。抗原表位分析结果显示 P109 蛋白质包含丰富的抗原表位, 通过预测发现其包含 33 个可能的抗原

表位, 该蛋白质的平均抗原趋势为 1.008 1 (图 1)。

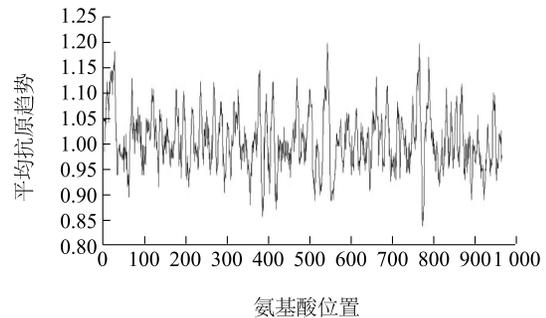


图 1 P109 抗原表位预测

Fig.1 Prediction of antigenic epitope of protein P109

2.2 *p109* 基因片段的 PCR 扩增

以绵羊肺炎支原体 SC01 株基因组 DNA 为模板, 用 P109F/P109R 引物进行 PCR 扩增, 电泳得到与预期大小相符的条带 (图 2)。



M: DNA 分子质量标准; 1: 绵羊肺炎支原体 SC01 株基因组 DNA。

图 2 *p109* 基因片段的 PCR 扩增结果

Fig.2 PCR amplification of *p109* fragment

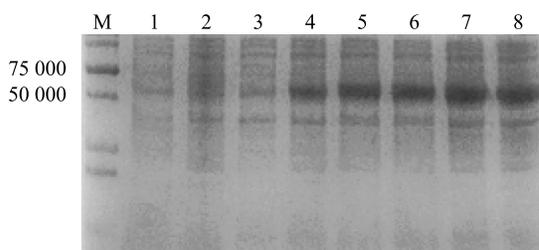
2.3 原核表达载体的构建及鉴定

PCR 产物连接至 pET-32(a+) 载体, 转化 *E. coli* DH5 α 细胞, 筛选得到阳性克隆, 以提取的重组质粒为模板, 采用 P109F/P109R 进行 PCR 扩增, 所得条带大小与预期相符。对 PCR 鉴定为阳性质粒进行测序, 结果显示目的片段的序列与绵羊肺炎支原体 SC01 株 *p109* 基因相应区域完全相同, 在 pET-32(a+) 载体中的插入位置正确。

2.4 重组蛋白质的表达、可溶性分析和纯化

重组质粒 pET-32(a+)-*P109* 转化 *E. coli* Rosetta (DE3) 感受态细胞后进行 IPTG 诱导表达, 在不同时间点收集菌体进行 SDS-PAGE 电泳检测, 结果 (图 3) 显示, 重组工程菌经 IPTG 诱导后, 在 50 000 处出

现明显的表达条带,其大小与预期(50 900)相符,表明目的片段以融合蛋白质的形式得到了有效表达。

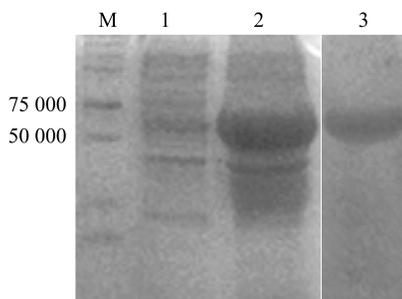


M:蛋白分子量标准;1~2: IPTG 诱导前、后含空载体的 *E. coli* Rosetta(DE3) 裂解物;3: IPTG 诱导前含重组载体的 *E. coli* Rosetta(DE3) 裂解物;4~8: IPTG 诱导后 2 h、4 h、6 h、8 h、12 h 后含重组载体的 *E. coli* Rosetta(DE3) 裂解物。

图3 重组 P109 蛋白质的诱导表达

Fig. 3 Prokaryotic expression of recombinant P109 protein

为分析重组蛋白质的可溶性,用全菌裂解物上清液和沉淀制样后进行 SDS-PAGE 分析,结果显示,表达的重组蛋白质主要存在于沉淀中,说明该蛋白质以包涵体形式进行表达。利用 Histrap™ HP 纯化柱对重组 P109 蛋白质进行纯化,经 SDS-PAGE 电泳,仅在 51 000 处出现单一条带(图 4),说明纯化效果良好。



M:蛋白分子量标准;1:上清液;2:裂解物沉淀;3:纯化产物。

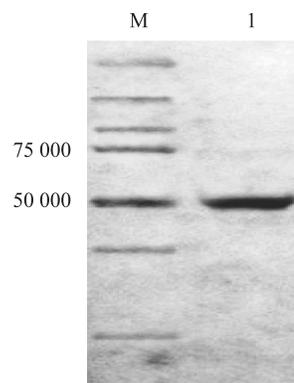
图4 表达产物的可溶性分析及纯化

Fig. 4 Solubility analysis and purification of recombinant P109 protein

2.5 重组蛋白质 Western-blot 分析

将纯化的重组蛋白质进行 SDS-PAGE 电泳,转至硝酸纤维素后以山羊抗绵羊肺炎支原体高免血清作为一抗,以辣根过氧化物酶标记的兔抗山羊 IgG 为二抗进行 Western-blot 分析,结果(图 5)显示,重组蛋白质在 51 000 处出现一条特异条带,表明重组

蛋白质与山羊抗绵羊肺炎支原体全菌抗体发生特异性结合,重组 P109 蛋白质具有良好的免疫反应性。



M:蛋白分子量标准;1:纯化的重组蛋白质 P109。

图5 重组蛋白质的 Western-blot 分析

Fig. 5 Western-blot analysis of recombinant P109 protein

3 讨论

与大多数病原性细菌不同,致病性支原体一般不产生毒素及侵袭素等典型的毒力因子,主要是通过位于膜表面的黏附素附着于细胞表面,并通过有毒中间代谢产物对宿主细胞造成损伤。同时,支原体作为一种没有细胞壁的特殊原核微生物,其膜表面蛋白质也是诱导机体产生免疫应答的主要免疫原。因此,深入研究支原体中与黏附相关蛋白质的结构与功能对于阐明其致病机理、开发血清学诊断技术和研发亚单位疫苗均具有十分重要的意义。

绵羊肺炎支原体是引起山羊及绵羊非典型肺炎的病原,随着养羊业从散养向集约化舍养方式的转变,其危害也不断严重。然而,目前对该病原的重要功能蛋白质知之甚少。此前,我们对绵羊肺炎支原体可能的黏附素分子 P113 的分子特征和免疫反应性进行了研究^[11-12],表明其与猪肺炎支原体的黏附素 P97 高度同源,并且是良好的免疫原。研究结果表明,猪肺炎支原体存在多个 *p97* 基因的旁系同源基因,且多数同样参与黏附过程,也是良好的免疫原。其中,由 *mhp384* 编码的蛋白质(Mhp384)同样可以结合到猪气管上皮细胞纤毛,参与黏附过程^[10]。猪肺炎支原体在感染宿主细胞的过程中,Mhp384 可以在体内获得表达,并且诱导机体产生抗体^[7]。本研究对绵羊肺炎支原体 *p109* 基因的生物

信息学分析结果表明,其与 *mhp384* 为直系同源基因,在其 N 端具有一跨膜区,并含有丰富的抗原表位。为研究该蛋白质的功能,本研究对编码绵羊肺炎支原体 P109 的部分基因片段进行了克隆,并在大肠杆菌中成功进行高效表达。利用山羊抗绵羊肺炎支原体全菌抗体进行免疫印迹分析,结果表明纯化得到的重组蛋白质能与山羊抗绵羊肺炎支原体全菌抗体特异性结合,说明 P109 是绵羊肺炎支原体的免疫原之一。这同时也说明本研究所表达的重组蛋白质可以作为抗原,在 ELISA 等绵羊肺炎支原体血清抗体检测试剂盒的研制和亚单位疫苗的开发等方面具有潜在的应用价值。

参考文献:

- [1] HANDELAND K, TENGS T, KOKOTOVIC B, et al. *Mycoplasma ovipneumoniae*-a primary cause of severe pneumonia epizootics in the Norwegian Muskox (*Ovibos moschatus*) population [J]. Plos One, 2014, 9(9):e106116.
- [2] RONG G, ZHAO J M, HOU G Y, et al. Seroprevalence and molecular detection of *Mycoplasma ovipneumoniae* in goats in tropical China [J]. Trop Anim Health Prod, 2014, 46(8):1491-1495.
- [3] RIFATBEGOVIC M, MAKSIMOVIC Z, HULAJ B. *Mycoplasma ovipneumoniae* associated with severe respiratory disease in goats [J]. Vet Rec, 2011, 168(21): 565.
- [4] BESSER T E, CASSIRER E F, POTTER K A, et al. Association of *Mycoplasma ovipneumoniae* infection with population limiting respiratory disease in free-ranging rocky mountain bighorn sheep (*Ovis canadensis*) [J]. Clin Microbiol, 2008, 46(2): 423-430.
- [5] PETERSSON B, UHLÉN M, JOHANSSON K E. Phylogeny of some mycoplasmas from ruminants based on 16S rRNA sequences and definition of a new cluster within the hominis group [J]. Int J Syst Bacteriol, 1996, 46(4): 1093-1098.
- [6] LI M, Ma C J, LIU X M, et al. Molecular cloning of HSP70 in *Mycoplasma ovipneumoniae* and comparison with that of other mycoplasmas [J]. Genet Mol Res, 2011, 10(2): 834-848.
- [7] ADAMS C, PITZER J, MINION F C. *In vivo* expression analysis of the P97 and P102 paralog families of *Mycoplasma hyopneumoniae* [J]. Infection and Immunity, 2005, 73(11): 7784-7787.
- [8] HSU T, ARTIUSHIN S, MINION F C. Cloning and functional analysis of the P97 swine cilium adhesin gene of *Mycoplasma hyopneumoniae* [J]. J Bacteriol, 1997, 179(4):1317-1323.
- [9] YANG F L, TANG C, WANG Y, et al. Genome sequence of *Mycoplasma ovipneumoniae* strain SC01 [J]. Journal of Bacteriology, 2011, 193(18): 5018.
- [10] DEUTSCHER A T, TACCHI J L, MINION F C, et al. *Mycoplasma hyopneumoniae* surface proteins Mhp385 and Mhp384 bind host cilia and glycosaminoglycans and are endoproteolytically processed by proteases that recognize different cleavage motifs [J]. J Proteome Res, 2012, 11(3):1924-1936.
- [11] 张贤宇,杨发龙,冯旭飞,等. 绵羊肺炎支原体 P113 蛋白 N 端原核表达及其抗原性分析 [J]. 中国兽医杂志, 2013, 49(7): 7-10.
- [12] 杨发龙,张贤宇,汤承,等. 绵羊肺炎支原体 P113 蛋白 C 端重复区的表达及其免疫原性研究 [J]. 中国兽医科学, 2013, 43(7): 733-737.

(责任编辑:袁 伟)