

王红红,熊 意,马亚茹,等. 羊种布鲁氏菌 043 新疆流行株 *WbdA* 基因和 *WbkE* 基因的原核表达及生物信息学分析[J].江苏农业学报,2017,33(2):367-372.

doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2017.02.020

## 羊种布鲁氏菌 043 新疆流行株 *WbdA* 基因和 *WbkE* 基因的原核表达及生物信息学分析

王红红<sup>1</sup>, 熊 意<sup>1</sup>, 马亚茹<sup>1</sup>, 李 爽<sup>2</sup>, 张 辉<sup>2</sup>, 陈创夫<sup>2</sup>

(1.新疆石河子大学生命科学学院, 新疆 石河子 832000; 2.新疆石河子大学动物科技学院, 新疆 石河子 832000)

**摘要:** 研究分析羊种布鲁氏菌 043 新疆流行株中编码脂多糖的 *WbdA* 基因和 *WbkE* 基因的原核表达以及蛋白的生物信息学信息。以 043 菌株为模板,构建重组质粒 pET-30a-*WbdA* 和 pET-30a-*WbkE*,转化至 *E.coli* BL21(DE<sub>3</sub>) 菌株,IPTG 诱导表达,然后通过 Western Blot 分析检测目的蛋白的表达,最后运用 DNAMAN 和 TMHMM Server v.2.0 软件等对 *WbdA* 基因和 *WbkE* 基因编码的氨基酸序列进行分析。结果显示,成功构建了 *WbdA* 基因和 *WbkE* 基因的原核表达载体 pET-30a-*WbdA* 和 pET-30a-*WbkE*,并且在大肠杆菌中成功表达。生物信息学分析结果显示,043 菌株的 *WbdA* 蛋白和 *WbkE* 蛋白与标准菌株 16M 的 *WbdA* 蛋白和 *WbkE* 蛋白的同源性高。*WbdA* 蛋白有 1 个跨膜结构区,没有信号肽,20 个抗原决定簇,二级结构主要由  $\alpha$ -螺旋构成,利用 Phyre2 在线软件成功构建了该蛋白的 3D 模型。*WbkE* 蛋白没有跨膜结构区,没有信号肽,有 17 个抗原决定簇,二级结构主要由  $\alpha$ -螺旋构成,并利用 Phyre2 在线软件成功构建了该蛋白的 3D 模型。

**关键词:** 布鲁氏菌; *WbdA* 基因; *WbkE* 基因; 原核表达; 生物信息学

**中图分类号:** S852.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2017)02-0367-06

## Prokaryotic expression and bioinformatics analysis of *WbdA* gene and *WbkE* gene of 043 Xinjiang strains of *Brucella melitensis*

WANG Hong-hong<sup>1</sup>, XIONG Yi<sup>1</sup>, MA Ya-ru<sup>1</sup>, LI Shuang<sup>2</sup>, ZHANG Hui<sup>2</sup>, CHEN Chuang-fu<sup>2</sup>

(1. College of Life Technology, Shihezi University, Shihezi 832000, China; 2. College of Animal Science and Technology, Shihezi University, Shihezi 832000, China)

**Abstract:** To prokaryotically express *WbdA* gene and *WbkE* gene encoding lipopolysaccharide (LPS) from 043 Xinjiang strains of *Brucella melitensis*, the recombinant plasmids of pET-30a-*WbdA* and pET-30a-*WbkE* were constructed with 043 strains as the template and transformed into *Escherichia coli* BL 21(DE<sub>3</sub>). The expressions of *WbdA* protein and *WbkE* protein were induced by IPTG and detected by Western blotting. Bioinformatics analysis showed that the *WbdA* protein and *WbkE* protein of strain 043 shared high homologies with those of 16M strain. *WbdA* protein has a transmembrane structure and 20 antigenic determinants, but no signal peptide. The secondary structure is consisted of  $\alpha$ -helix. Similarly, the *WbkE*

protein has 17 antigenic determinants, but no transmembrane domain and signal peptide. The secondary structure is dominated by  $\alpha$ -helix. The 3D models of the two proteins were successfully constructed using Phyre2 online software.

收稿日期:2016-11-24

基金项目:国家“973”计划项目(2010CB530200)

作者简介:王红红(1989-),女,甘肃天水人,硕士研究生,主要从事动物基因工程研究。(E-mail)1760913825@qq.com

通讯作者:陈创夫,(E-mail)ccf-xb@163.com

**Key words:** *Brucella*; *WbdA* gene; *WbkE* gene; prokaryotic expression; bioinformatics

布鲁氏菌 (*Brucella*) 是一种兼性胞内寄生病原菌,可感染包括人在内的多种哺乳动物<sup>[1-3]</sup>。动物感染后表现为流产、睾丸炎等<sup>[4]</sup>,人感染后多引发关节炎、心内膜炎、脑膜炎和神经损伤,严重时患者可能会丧失劳动力<sup>[5-7]</sup>。因此布鲁氏菌病不仅会在畜牧生产上造成巨大的经济损失,而且严重威胁到公共卫生安全<sup>[8]</sup>。布鲁氏菌病的致病机制比较复杂,目前控制和根除布鲁氏菌病的唯一途径是对易感动物进行免疫并对感染动物进行销毁。但是目前常用的疫苗有一定毒力,容易感染人,孕前使用会引起流产,并且难以区别免疫与自然感染产生的抗体。胞壁表面脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) 是布鲁氏菌外膜的主要成分,在逃逸宿主先天免疫和靶定细胞复制到小环境中起重要作用<sup>[9]</sup>,是一种重要的毒力因子,它的缺损会严重影响该菌在体内外的生存能力。同时 LPS 也是布鲁氏菌重要的表面抗原,在布鲁氏菌的诊断和防控中起重要作用。

本研究拟通过对羊种布鲁氏菌 043 新疆流行株 LPS 合成相关的 *WbdA* 基因和 *WbkE* 基因进行克隆和表达,再利用生物信息学解析这 2 个基因编码的蛋白的结构功能,以期为进一步研究这 2 个基因的功能提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株、载体来源及其他试剂** 本研究所用菌株和载体见表 1。2×*Ex Taq* MasterMix、快速琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、高纯度质粒小提试剂盒均购于北京康为世纪生物科技有限公司,T4 DNA Ligase 和 DNA marker 购于 TaKaRa 公司,琼脂糖购于 Bio-west 公司,氯化钠购于上海生工生物工程股份有限公司,胰蛋白胨、酵母提取物、布鲁氏菌固体培养基 (TSA) 和布鲁氏菌液体培养基 (TSB) 均购于 OXOID 公司,琼脂粉购于金鑫天佑公司,卡那霉素和 NC 膜购于 Solarbio 公司,His-Ni 柱购于 GE 公司,其他为国产分析纯。

**1.1.2 引物设计与合成** 羊种布鲁氏菌 043 菌株为新疆地区分离株,尚未公布基因组序列,因此参照 GenBank 上发布的羊种布鲁氏菌国际标准株 16M 的 *WbdA* 和 *WbkE* 基因序列,分别利用 Primer Premi-

er 5.0 软件设计相应的引物序列,引物序列为 *WbdA*-*Bam* I-原-F: 5'-GGATCCATGAATAAGCTCGGCGT-GTTT-3', *WbdA*-*Sac* I-原-R: 5'-GAGCTCCTAGTCTG-CAACAGATTTAAGCAGA-3', *WbkE*-*Bam* H I-原-F: 5'-GGATCCATGCCGCATCTGTATTGGA-3', *WbkE*-*Sac* I-原-R: 5'-GAGCTCTCACTGCATCAGCGACG-TA-3',下划线加斜为对应的酶切位点,引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

表 1 所用菌株和载体

Table 1 Strains and vectors

菌株或载体	用途	来源
大肠杆菌 BL21 (DE3)	表达菌株	本研究室保存
大肠杆菌 DH5α	克隆菌株	本研究室保存
pMD19-T-simple	克隆载体	购自 TaKaRa 公司
pET-30a	表达载体	本研究室保存

### 1.2 方法

**1.2.1 *WbdA*、*WbkE* 基因的 PCR 扩增及克隆** 以热灭活的羊种布鲁氏菌 043 新疆流行株为模板进行扩增。反应体系为 25.0 μl: 上、下游引物各 0.4 μl, ddH<sub>2</sub>O 17.8 μl, dNTP 1.4 μl, 10×PCR Buffer 2.5 μl, 模板 2.0 μl, Pfu DNA 聚合酶 0.5 μl。PCR 反应条件: 95.0 °C 预变性 5 min; 94.0 °C 变性 40 s, 64.1 °C 退火 30 s, 72.0 °C 延伸 110 s, 30 个循环; 72.0 °C 延伸 8 min。产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,用 DNA 胶回收试剂盒纯化 PCR 产物。将产物分别克隆入 pMD19-T-simple 载体并进行双酶切鉴定。

**1.2.2 重组质粒 pET-30a-*WbdA* 和 pET-30a-*WbkE* 的构建** *Bam* H I 酶和 *Sac* I 酶双酶切的 pMD19-T-*WbdA* 和 pMD19-T-*WbkE* 重组质粒,相同双酶切的 pET-30a 载体用 T4 DNA 连接酶连接,16 °C 过夜,转化至 *E.coli* BL21 (DE<sub>3</sub>) 感受态细胞,筛选阳性单克隆,摇菌提取质粒后,用 *Bam* H I 酶和 *Sac* I 酶进行双酶切鉴定,将阳性克隆送至上海生工生物有限公司进行测序。

**1.2.3 目的蛋白的表达及鉴定** 取鉴定正确的阳性菌液,过夜振荡培养。加入浓度为 24 mg/ml 的 IPTG 诱导剂,继续振荡培养。取诱导 0 h、2 h、4 h、6 h、8 h 的菌液,分别收集菌体,加入 80 μl 蒸馏水,再

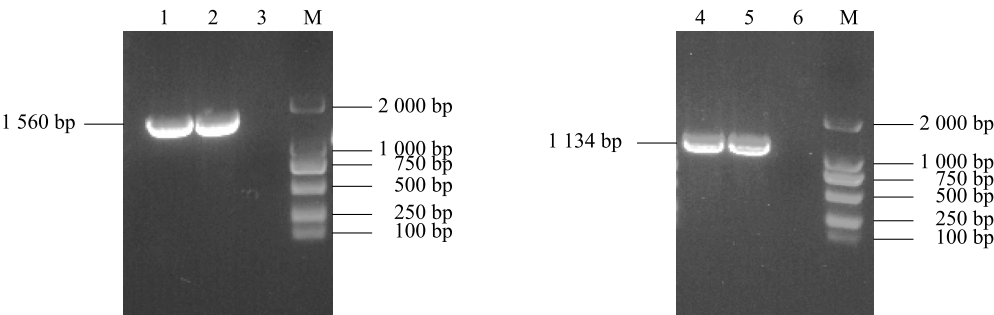
加入 20  $\mu$ l 蛋白上样液(5 $\times$ SDS-PAGE Loding buffer)混匀,沸水煮沸 10 min,取 15  $\mu$ l 蛋白样品进行 SDS-PAGE,凝胶于考马斯亮蓝 R-250 液中染色,并进行薄层扫描分析。将 SDS-PAGE 后的样品转移到硝酸纤维膜上,5%脱脂奶粉封闭 3 h,用 TBS 洗涤 3 次,1 次 15 min,加入接种羊种布鲁氏菌 043 新疆流行株 14 d 后的小鼠血清,4  $^{\circ}$ C 孵育过夜,TBST 洗涤 3 次,1 次 15 min,加入 3  $\mu$ l 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗,室温孵育 1 h,TBST 洗涤 3 次,1 次 15 min,最后加入 10 ml DAB 显色液,蛋白带显色后用去离子水终止显色。

1.2.4 *WbdA* 蛋白和 *WbkE* 蛋白的生物信息学分析  
用 DNAMAN 软件、TMHMM Server v.2.0 在线软件和 SignalP 4.1 Server 在线软件分别分析同源性、跨

膜结构和信号肽,并用 Antigenic Peptides 在线软件、SOPMA 在线软件、Phyre2 在线服务器分别预测 *WbdA* 蛋白和 *WbkE* 蛋白的抗原决定簇以及蛋白质的二、三级结构。最后用 PDBsum Generate 在线评估软件对 *WbdA* 蛋白和 *WbkE* 蛋白的 3D 结构进行评估。

2 结果与分析

2.1 *WbdA* 基因和 *WbkE* 基因的 PCR 扩增及克隆  
以羊种布鲁氏菌 043 新疆流行株为模板,高保真酶扩增出 *WbdA* 基因和 *WbkE* 基因,其片段大小分别为 1 560 bp 和 1 134 bp (图 1)。然后连接至 pMD19-T-simple 上,转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$  中,并利用 *Bam* H I 酶和 *Sac* I 酶进行双酶切验证结果。



1、2: *WbdA* 基因;3:阴性对照;4、5: *WbkE* 基因;6:阴性对照;M:DNA marker 2000。

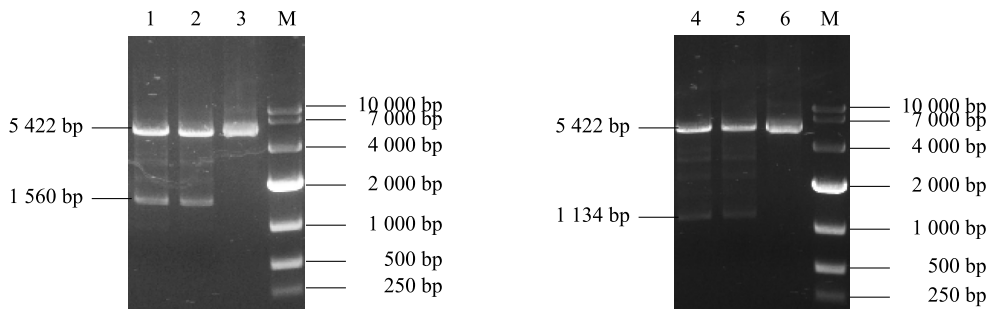
图 1 *WbdA* 基因和 *WbkE* 基因的 PCR 扩增

Fig.1 The PCR amplification of *WbdA* gene and *WbkE* gene

2.2 重组质粒 pET-30a-*WbdA* 和 pET-30a-*WbkE* 的构建

利用 *Bam* H I 酶和 *Sac* I 酶双酶切目的基因和

pET-30a 载体,连接并转化至 *E.coil* BL21( DE<sub>3</sub> )。双酶切阳性质粒得到片段分别为 1 560 bp 和 1 134 bp (图 2),与预期相符。



1、2:pET-30a-*WbdA* 酶切产物;3、6:质粒对照;4、5:pET-30a-*WbkE* 酶切产物;M:DNA marker 10000。

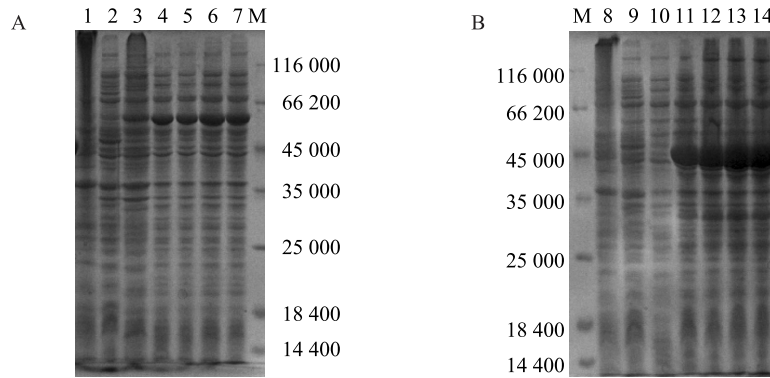
图 2 重组质粒的酶切鉴定

Fig.2 The enzymatic digestion of recombinant plasmid

### 2.3 目的蛋白的 SDS-PAGE 和 Western Blot 鉴定

将鉴定正确的菌液,利用 IPTG 进行诱导表达。最后分别取大肠杆菌 BL21 (DE3) 菌液、pET-30a-DE<sub>3</sub> 菌液以及诱导 0 h、2 h、4 h、6 h、8 h 的菌液,进

行聚丙烯酰胺凝胶电泳。结果(图 3)显示,在预期位置出现了表达蛋白的特异性条带。诱导 6 h 时菌液中重组蛋白表达量最高。

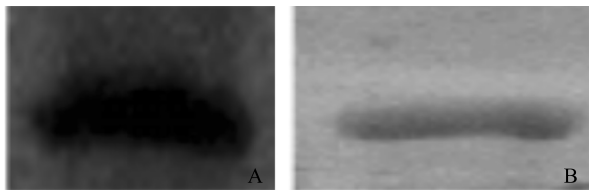


A: His-WbdA 蛋白; B: His-WbkE 蛋白; 1: *E. coli* BL21 (DE3); 2: pET-30a-DE3; 3~7: 诱导 0 h、2 h、4 h、6 h、8 h 的 pET-30a-WbdA; 8: *E. coli* BL21 (DE3); 9: pET-30a-DE3; 10~14: 诱导 0 h、2 h、4 h、6 h、8 h 的 pET-30a-WbkE; M: 蛋白分子 Marker。

图 3 重组蛋白 WbdA 和 WbkE 的 SDS-PAGE 分析

Fig.3 The SDS-PAGE analysis of WbdA fusion protein and WbkE fusion protein

将羊种布鲁氏菌新疆流行株免疫小鼠 14 d 后的血清进行 Western Blot 分析。结果(图 4)显示, WbdA 蛋白和 WbkE 蛋白均有条带。



A: WbkE 蛋白; B: WbdA 蛋白。

图 4 WbkE 蛋白和 WbdA 蛋白的 Western Blot 分析

Fig.4 The Western Blot analysis of purified WbdA and WbkE fusion proteins

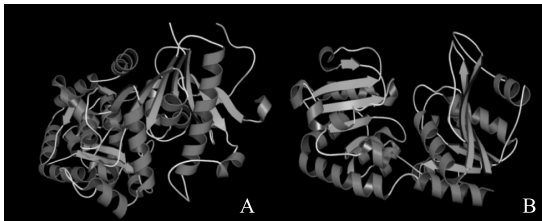
### 2.4 目的蛋白的生物信息学分析

通过 DNAMAN 软件对 *WbdA* 基因碱基序列进行同源性分析,羊种布鲁氏菌 043 新疆流行株与羊种布鲁氏菌 16M 标准株的同源性为 99.94%,第 347 位碱基由 T→C。羊种布鲁氏菌 043 新疆流行株 WbdA 氨基酸序列与羊种布鲁氏菌 16M 标准株的同源性为 99.81%,第 116 位氨基酸由 L→S。羊种布鲁氏菌 043 新疆流行株 *WbkE* 基因碱基序列与羊种布鲁氏菌 16M 标准株的同源性为 99.91%,第 942 位碱基由 G→A。羊种布鲁氏菌 043 新疆

流行株 WbkE 氨基酸序列与羊种布鲁氏菌 16M 标准株的同源性为 100.00%。通过 TMHMM Server v. 2.0 在线软件分析, WbdA 蛋白有 1 个跨膜结构区,位置是从第 119 位氨基酸到第 153 位氨基酸,而 WbkE 蛋白没有跨膜结构区。通过 SignalP 4.1 Server 在线预测, WbdA 蛋白和 WbkE 蛋白均没有信号肽。经 Antigenic Peptides 在线软件分析,羊种布鲁氏菌 043 新疆流行株 WbdA 蛋白有 20 个抗原决定簇,而 WbkE 蛋白只有 17 个抗原决定簇。

经 SOPMA 在线软件分析, WbdA 蛋白中有 243 个氨基酸参与形成  $\alpha$ -螺旋, 占有氨基酸的 46.82%, 90 个氨基酸参与延伸链的形成, 占有氨基酸的 17.34%, 40 个氨基酸参与  $\beta$ -折叠的形成, 占有氨基酸的 7.71%。另外, 还有 146 个氨基酸参与无规卷曲结构的形成, 占有氨基酸的 28.13%, 而 WbkE 蛋白中有 189 个氨基酸参与  $\alpha$ -螺旋的形成, 占有氨基酸的 50.13%, 66 个氨基酸参与延伸链的形成, 占有氨基酸的 17.51%, 28 个氨基酸参与  $\beta$ -折叠的形成, 占有氨基酸的 7.43%。另外, 还有 94 个氨基酸参与无规卷曲结构的形成, 占有氨基酸的 24.93%。通过 Phyre2 在线服务器分析预测, WbdA 蛋白和 WbkE 蛋白的三级结构如图 5 显示。

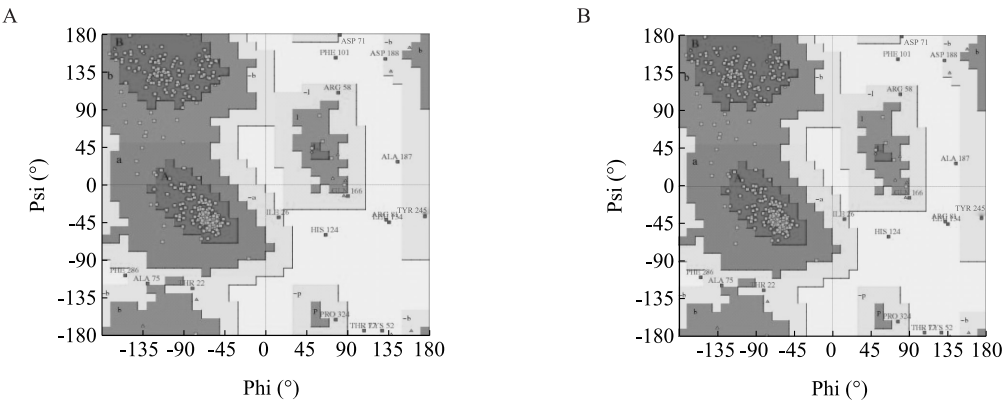




A: WbdA 蛋白; B: WbkE 蛋白。

图 5 WbdA 蛋白和 WbkE 蛋白的三级结构预测

Fig.5 The prediction of tertiary structures of proteins WbkE and WbdA



A: WbdA 蛋白; B: WbkE 蛋白。

图 6 WbdA 蛋白和 WbkE 蛋白的 3D 同源模型拉氏图

Fig.6 The 3D Ramachandran plot of proteins WbkE and WbdA

### 3 讨论

在生物分类学上,布鲁氏菌属于  $\alpha$ -2 变形菌<sup>[10]</sup>。根据宿主偏爱性分为 10 个种<sup>[11]</sup>,除经典的羊种、牛种、猪种、犬种、绵羊附睾种和沙林鼠种外,还包括从海洋哺乳动物中分离到的鳍种和鲸种布鲁氏菌,从红狐狸和土壤中分离到的田鼠型布鲁氏菌,从乳房移植物中分离到的湖浪布鲁氏菌<sup>[12]</sup>。外膜含有的 LPS 是布鲁氏菌主要的毒力因子。LPS 对于革兰氏阴性细菌外膜结构和功能的完整性至关重要。LPS 在革兰氏阴性细菌中广泛存在,含有结构高度保守的部分,是引起哺乳动物免疫的主要抗原之一。LPS 的表型分为光滑型和粗糙型 2 种,对 LPS 合成所需的编码基因进行突变可能产生结构不完整的 LPS,也可能导致布鲁氏菌的表型由光滑型转变为粗糙型。大部分粗糙型布鲁氏菌菌株的毒力较弱,经常被当作减毒活菌苗候选株进行研究。

经 PDBsum Generate 在线评估,在 WbdA 蛋白的 3D 同源模型拉氏图(图 6A)中可以看出,90.0% 以上氨基酸在允许范围内,可以认为该模型的构象符合立体化学的规则,只有 1.0% 的氨基酸位于不允许区域。从 WbkE 蛋白的 3D 同源模型拉氏图(图 6B)中可以看出,90.0% 以上氨基酸在允许范围内,可以认为该模型的构象符合立体化学的规则,但仍有 2.8% 的氨基酸位于不允许区域。

NCBI 数据库已经公布了许多布鲁氏菌的基因组序列(包括相关蛋白),这为生物信息学分析布鲁氏菌奠定了基础。蛋白质的生物功能主要是由蛋白质结构决定的,本研究对蛋白质进行了生物信息学分析,有助于了解蛋白质的相关功能,也可以进一步揭示布鲁氏菌 LPS 相关毒力蛋白与宿主细胞的相互作用。

本试验成功构建了羊种布鲁氏菌 043 新疆流行株 *WbdA* 基因和 *WbkE* 基因的原核表达载体,经过 IPTG 诱导以及 SDS-PAGE 和 Western Blotting 鉴定,成功表达了 WbdA 蛋白和 WbkE 蛋白。本研究发

没有跨膜结构,不能像 WbdA 蛋白那样进行胞内外信号转导等生命活动。二者都没有信号肽,这意味着这 2 种蛋白属于非分泌性蛋白。WbdA 蛋白和 WbkE 蛋白作为布鲁氏菌 LPS 的结构蛋白,保持 LPS 的相对稳定,这为布鲁氏菌抵御不良环境提供了保证。二者都有一定数量的抗原表位,表明这 2 种蛋白作为抗原都能引起良好的免疫应答反应。二者的二级结构都以  $\alpha$ -螺旋为主,都是通过骨架上的羧基和酰胺基团之间形成的氢键维持二级结构的稳定。通过 3D 结构可视化这 2 种蛋白,利于对其生物功能、药物靶点等进行进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] FRANCO M P, MULDER M, GILMAN R H, et al. Human *brucellosis*[J]. The Lancet Infectious Diseases, 2007, 7(12): 775-786.
- [2] 李 军,李常挺,潘 艳,等.羊种布鲁氏菌 NN1202 和 LA1105 株 OPM25 和 OPM31 蛋白 B 细胞抗原表位分析[J].江苏农业科学,2015,43(8):38-41.
- [3] PAPPAS G, PAPADIMITRIOU P, AKRITIDIS N, et al. The new global map of human *brucellosis*[J]. The Lancet Infectious Diseases, 2006, 6(2): 91-99.
- [4] FICHT T A. Intracellular survival of *Brucella*: defining the link with persistence[J]. Veterina Microbiol, 2003, 92(3): 213-223.
- [5] ELZER P H, HAGIUS S D, DAVIS D S, et al. Characterization of the caprine model for ruminant *brucellosis*[J]. Veterinary Microbiology, 2002, 90(1): 425-431.
- [6] HAMDY M E R, EL-GIBALY S M, MONTASSER A M. Comparison between immune responses and resistance induced in BALB/c mice vaccinated with RB51 and Rev. 1 vaccines and challenged with *Brucella melitensis* bv. 3[J]. Veterinary Microbiology, 2002, 88(1): 85-94.
- [7] GODFROID J, CLOECKAERT A, LIAUTARD J P, et al. From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis[J]. Veterinary Research, 2005, 36(3): 313-326.
- [8] 胡 森,步志高.布氏杆菌病概况及其研究进展[J].畜牧兽医科技信息,2003,12(9):63-65.
- [9] HAAG A F, MYKA K K, ARNOLD M F F, et al. Importance of lipopolysaccharide and cyclic  $\beta$ -1, 2-glucans in *Brucella*-mammalian infections[J]. International Journal of Microbiology, 2010, 2010:124509.
- [10] HE Y, XIANG Z. Bioinformatics analysis of *Brucella* vaccines and vaccine targets using VIOLIN[J]. Immunome Research, 2010, 6(1): S5.
- [11] MORENO E, CLOECKAERT A, MORIY6N I. *Brucella* evolution and taxonomy[J]. Veterinary Microbiology, 2002, 90(1): 209-227.
- [12] VON BARGEN K, GORVEL J P, SALCEDO S P. Internal affairs: investigating the *Brucella* intracellular lifestyle[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2012, 36(3): 533-562.

(责任编辑:王 妮)