

朱伟峰, 谭凯, 王芳, 等. 支气管败血波氏菌截短 *BcfA* 表达的重组蛋白及其免疫活性分析[J]. 江苏农业学报, 2021, 37(3): 699-703.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2021.03.019

支气管败血波氏菌截短 *BcfA* 表达的重组蛋白及其免疫活性分析

朱伟峰^{1,2,3}, 谭凯^{1,2,3}, 王芳^{1,2,3}, 程序^{1,2,3}, 仇汝龙^{1,2,3}, 范志宇^{1,2,3}, 陈露^{1,2,3}

(1.江苏省农业科学院兽医研究所, 江苏 南京 210014; 2.农业农村部兽医生物制品工程技术重点实验室, 江苏 南京 210014; 3.国家兽医生物制品工程技术研究中心, 江苏 南京 210014)

摘要: 为提高支气管败血波氏菌保护性抗原 *BcfA* 重组蛋白的表达量和可溶性, 对编码 *BcfA* N 端 373 位氨基酸残基之后的 *BcfA* 基因碱基序列进行了克隆和表达, 截短后的 *BcfA* 表达量提高了 10 倍, 且主要为可溶性表达。Western blot 结果显示, 截短 *BcfA* 表达后的重组蛋白与支气管败血波氏菌感染康复血清反应依然明显。免疫保护力试验结果表明截短 *BcfA* 表达的重组蛋白依然对支气管败血波氏菌表现出良好的免疫保护作用。

关键词: 支气管败血波氏菌; 波氏菌黏附因子 A (*BcfA*); 截短表达; 保护性抗原

中图分类号: S858.291.63 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2021)03-0699-05

Recombinant protein expressed from *BcfA* in *Bordetella bronchiseptica* and its immune activity analysis

ZHU Wei-feng^{1,2,3}, TAN Kai^{1,2,3}, WANG Fang^{1,2,3}, CHENG Xu^{1,2,3}, QIU Ru-long^{1,2,3}, FAN Zhi-yu^{1,2,3}, CHEN Lu^{1,2,3}

(1. Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 2. Key Laboratory of Veterinary Biological Engineering and Technology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Nanjing 210014, China; 3. National Center for Engineering Research of Veterinary Bioproducts, Nanjing 210014, China)

Abstract: To improve the expression and solubility of *BcfA* recombinant protein of a protective antigen against *Bordetella bronchiseptica*, the base sequence of *BcfA* gene encoding amino acid residues of the N-terminal after the 373rd position was cloned and expressed. The expression of shortened *BcfA* was increased by ten times, and the expression form was mainly soluble. Western blot results showed that the truncated protein encoded by *BcfA* still exhibited obvious reaction with convalescent serum infected by *Bordetella bronchiseptica*. The results of immunoprotection test showed that recombinant protein expressed from truncated *BcfA* still showed good immunoprotection against *Bordetella bronchiseptica*.

Key words: *Bordetella bronchiseptica*; *Bordetella* adhesion factor A (*BcfA*); truncated expression; protective antigen

收稿日期: 2020-11-03

基金项目: 江苏省农业科技自主创新基金项目 [CX(19)3016]; 江苏省自然科学基金青年基金项目 (BK20190270); 财政部和农业农村部国家现代农业产业技术体系资助项目 (CARS-43-C-1)

作者简介: 朱伟峰 (1984-), 男, 河北石家庄人, 博士, 助理研究员, 主要从事新型疫苗设计与动物疫病防控基础研究。
(Tel) 025-84392720; (E-mail) zhuweifeng8@126.com

通讯作者: 王芳, (E-mail) rwangfang@126.com

支气管败血波氏菌 (*Bordetella bronchiseptica*) 是一种能感染多种哺乳动物、引起动物发生鼻炎和肺炎的革兰氏阴性细小杆菌。此菌以犬、猪及兔的感染最为普遍, 常导致犬传染性支气管炎、猪传染性萎缩性鼻炎和兔支气管败血波氏菌病。此外, 支气管败血波氏菌和其他病原体之间存在协同作用, 从而

增加其他原发性和继发性病原体引起的呼吸道疾病的严重程度,对养殖业造成较大经济损失^[1]。此外,人类也可以发生支气管败血波氏菌感染^[2-3]。

目前已经研制或有报道的支气管败血波氏菌疫苗主要包括灭活疫苗、弱毒疫苗和亚单位疫苗 3 种。与灭活疫苗和弱毒疫苗相比,亚单位疫苗具有安全、稳定和可以借助基因工程手段大量生产的优点,正成为兽用疫苗研究的重要方向^[4-5]。支气管败血波氏菌的波氏菌黏附因子 A (*Bordetella* colonization factor A, BcfA) 蛋白是一种和细菌定殖有关的外膜蛋白,具有良好的免疫保护力,是支气管败血波氏菌亚单位疫苗研制的重要候选抗原^[6-7]。但是 BcfA 重组蛋白的表达量不高,而且主要以包涵体形式表达,这不利于其临床应用。本研究的目的是通过对 BcfA 进行截短表达,从而获得一种表达量高、可溶性好、且较好地保留了原 BcfA 全长蛋白免疫活性的重组蛋白。

1 材料和方法

1.1 质粒、菌种及培养

质粒载体 pET28a(+), 基因工程宿主菌 BL21 (DE3)、支气管败血波氏菌 BJL0504 (分离于患鼻炎的家兔) 由江苏省农业科学院兔病团队保存并提供。胰蛋白胨大豆肉汤 (TSB) (添加 10% 小牛血清)、胰蛋白胨大豆琼脂 (TSA) (添加 4.0% 小牛血清、0.2% 羊血) 购自青岛海博生物有限公司,用于波氏菌培养。LB 液体或固体培养基购自青岛海博生物有限公司,用于培养大肠基因工程宿主菌。

1.2 蛋白质氨基酸序列分析

以 GenBank 公布的支气管败血波氏菌 NCTC8344 株全基因组序列中的 BcfA 基因序列为参考序列进行分析。使用 SignalP5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 确定信号肽序列。使用 Bepipred-2.0 (<http://tools.immuneepitope.org/bcell/>) 确定 BcfA 的 B 细胞表位分布情况。多序列比对使用在线软件 Clustal Omega (<http://www.clustal.org/omega/>) 完成,比较本试验所用的 BcfA 蛋白氨基酸序列和 NCTC8344 株参考序列之间的相似性。

1.3 BcfA 基因的克隆

以支气管败血波氏菌 NCTC8344 株的 BcfA 基因序列为参考序列,设计引物 373T-F (CAGCAAATGGGTCGCGGATCCACGATCGCGCGCTCGATAC, 字

母下有横线的为与载体相同的同源臂,下同) 和 373T-R (GCAAGCTTGTGCGACGGAGCTCTCCCAGCAGGCCGCCCTC) 扩增截短的 BcfA 碱基序列,45Q-F (CAGCAAATGGGTCGCGGATCCCAGGGGGCGCCGTCTTTC) 和 45Q-R (GCAAGCTTGTGCGACGGAGCTCTCCCAGCAGGCCGCCCTC) 扩增成熟的全长 BcfA 碱基序列。使用试剂盒^[8]提取支气管败血波氏菌 BJL0504 菌株全基因组 DNA 模板。然后对目的基因片段进行 PCR 扩增。使用 Ban H I 和 Hind III 限制性内切酶酶切质粒后按照试剂盒 (南京诺唯赞公司产品) 说明书的要求进行同源重组连接,将 BcfA 的 PCR 扩增 DNA 片段连接到质粒载体 PET28a(+) 上。待重组质粒转入 BL21 (DE3) 宿主工程菌以后,将 PCR 鉴定的阳性克隆送至南京擎科公司测序,进一步验证连接的正确性及所克隆基因的完整性。

1.4 表达、纯化及鉴定

对 BcfA 工程菌进行异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导表达并优化诱导条件,包括比较不同 IPTG 浓度 (0.2 mmol/L、0.4 mmol/L、0.6 mmol/L、0.8 mmol/L、1.0 mmol/L) 的诱导效果和比较不同温度 (16 °C、28 °C、37 °C) 下的诱导表达效果。对过夜诱导表达后的工程菌使用超声波裂解破碎,然后高速离心并分别收集裂解液上清液和包涵体沉淀,进行十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)。电泳结束后使用考马斯亮蓝对凝胶染色以检测表达效果。按照 Ni 磁珠 (南京金斯瑞公司产品) 说明书的要求操作,使用 250 mmol/L 咪唑洗脱纯化目的重组蛋白。通过 Bradford 法测定纯化后的蛋白质浓度进而估测重组蛋白表达量。

1.5 BcfA 重组蛋白与支气管败血波氏菌感染康复血清反应的检测

将 BcfA 重组蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳后再转到 NC 膜上。使用 5% 的脱脂乳过夜封闭后,加入由实验室提前制备并保存的 BJL0504 株兔感染康复血清 (1/500),于 37 °C 下孵育 1 h。经过磷酸盐吐温缓冲液 (PBST) 彻底漂洗后,在 37 °C 下孵育 HRP 偶联羊抗兔 IgG (1/10 000) 1 h。最后经过 PBST 彻底洗涤以后,进行电化学发光 (ECL) 显色。

1.6 小鼠免疫与血清抗体检测

取 30 只 46 周龄 C57BL/6 雌鼠,随机分成 3 组,1 组对照,2 组试验,每组 10 只。试验组分别免疫 BcfA 截短重组蛋白 (BcfA-373T) 和 BcfA 全长重

组蛋白(BcfA-45Q)。试验组首次免疫使用弗氏完全佐剂,加强免疫使用弗氏不完全佐剂,2次免疫间隔21 d。抗原剂量为每只100 μg 。对照组使用PBS代替重组蛋白,其他处理与试验组相同。所有小鼠于第2次免疫10 d后采集制备小鼠血清,测定抗体产生情况。以纯化的BcfA重组蛋白包被ELISA板(每孔1 μg),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育2 h,彻底洗涤3次以后,使用5%的脱脂乳于37 $^{\circ}\text{C}$ 下封闭1 h,然后37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育待检血清(1/200)1 h,以PBST彻底洗涤后37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育HRP偶联的羊抗鼠二抗30 min,经过5遍洗涤以后加入100 μl TMB单组分显色液(湖州英创公司产品)显色并读数。

1.7 攻毒试验

ELISA检测确认特异性抗体产生后进行攻毒试验。参照文献[6]的方法开展试验,仅做少量必要的修改。取处于对数生长末期的支气管败血波氏菌菌液按照每只 1.5×10^7 CFU(35 μl)的剂量对小鼠滴鼻攻毒,攻毒7 d后的小鼠脱颈椎处死,无菌解剖取出肺脏,使用组织研磨仪充分研磨肺脏组织后,对样品进行连续稀释计数,计算每只小鼠的肺脏组织载菌量。并对肺脏内的细菌进行菌落形态学观察和PCR鉴定^[8]。

1.8 数据处理与统计学检验

试验数据均使用平均值 \pm 标准差来表示。用*t*检验检测试验组和对照组的统计学差异,差异显著判定标准为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 BcfA 重组蛋白的信号肽与 B 细胞表位预测结果

BcfA一级结构共包含969个氨基酸残基。SignalP5.0预测结果表明BcfA的N端前44个氨基酸残基属于信号肽序列,故成熟的BcfA全长从第45个氨基酸残基(Q)开始,本研究所表达的BcfA全长重组蛋白即是从第45个氨基酸残基开始的,记为BcfA-45Q。选择Bepipred-2.0软件默认的0.5作为氨基酸残基构成表位的阈值,预测结果表明BcfA的表位主要分布于C端,特别是后600个氨基酸残基序列(图1)。本研究选择了重组表达373T以后的BcfA(称为BcfA-373T)。连接产物测序和多序列比对结果表明本研究所克隆的BJL0504株*BcfA*基因序列与参考菌株NCTC8344的*BcfA*基因序列完全相同。使用在线软件Bepipred-2.0([\[muneeptope.org/bcell/\]\(http://muneeptope.org/bcell/\)\)预测分值高于0.5构成B细胞表位的几率较大。](http://tools.im-</p>
</div>
<div data-bbox=)

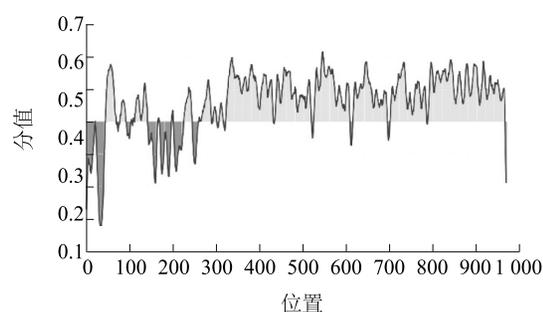


图1 BcfA的氨基酸残基构成B细胞表位能力预测结果

Fig.1 Prediction results of the ability of BcfA amino acid residues in constituting B cell epitopes

2.2 BcfA 重组蛋白的截短表达效果

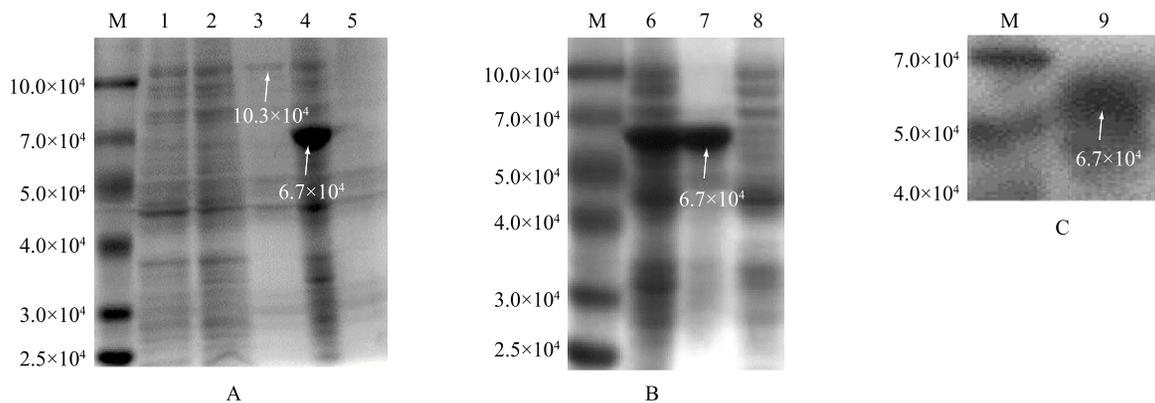
将*BcfA*基因重组质粒转入BL21基因工程大肠杆菌后,通过各种诱导条件的优化,选用0.5 mmol/L IPTG,37 $^{\circ}\text{C}$ 下进行诱导表达,得到表达量较高的BcfA重组蛋白。截短BcfA的表达量显著增加,而且主要为可溶性表达,易于进行纯化(图2A、图2B)。全长BcfA表达的重组蛋白(BcfA-45Q)的表达量约为0.03 mg/ml,而截短BcfA表达的重组蛋白(BcfA-373T)的表达量约为0.30 mg/ml,即与全长BcfA的表达量相比截短BcfA的表达量提高了10倍左右。Western blot检测结果表明,BcfA-373T泳道存在1条相对分子质量为 6.7×10^4 左右的条带(图2C),这表明截短BcfA表达的蛋白质能够与支气管败血波氏菌感染康复血清反应,即截短表达后依然保留着BcfA的反应原性。

2.3 截短重组蛋白免疫后血清抗体水平

ELISA检测结果显示加强免疫10 d后全长BcfA重组蛋白(BcfA-45Q)免疫组和截短BcfA重组蛋白(BcfA-373T)免疫组均产生了高水平的特异性抗体(图3A)。攻毒后的检测结果表明BcfA-373T免疫组和BcfA-45免疫组小鼠肺脏内的支气管败血波氏菌数量都仅平均为约每只10 CFU,二者差异不显著,均显著低于对照组小鼠肺脏内的支气管败血波氏菌数量(平均每只约 1×10^5 CFU)(图3B)。

3 讨论

尽管目前已经有文献报道了BcfA、PRN、FHA、DNT等保护性抗原^[9-10],但这些保护性抗原的重组



M:分子大小标识;1:含空体的 BL21 菌体粗蛋白;2:全长 *BcfA* 重组菌经过诱导后的上清液菌体重组蛋白 BcfA-45Q;3:全长 *BcfA* 重组菌经过诱导后的包涵体重组蛋白 BcfA-45Q(约 1.03×10^5);4:截短 *BcfA* 重组菌经过诱导后的上清液菌体重组蛋白 BcfA-373T(约 6.7×10^4);5:截短 *BcfA* 重组菌经过诱导后的包涵体蛋白 BcfA-373T;6:纯化前的上清液菌体重组蛋白 BcfA-373T;7:纯化后的上清液菌体重组蛋白 BcfA-373T;8:经过 Ni 磁珠吸附处理后的上清液菌体重组蛋白 BcfA-373T;9:孵育支气管败血波氏菌感染康复血清的 Western blot 试验中 BcfA-373T 泳道出现符合预期大小的条带(6.7×10^4)。

图2 BcfA 重组蛋白的表达

Fig.2 Expression of BcfA recombinant proteins

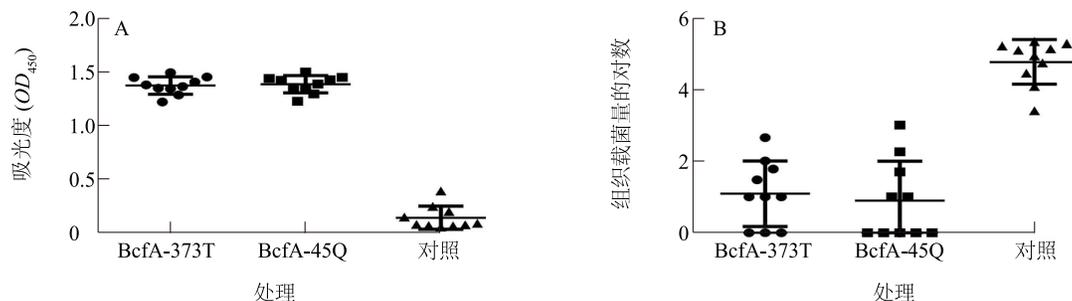


图3 免疫后小鼠体内 BcfA 特异性抗体产生情况(A)和攻毒后小鼠的肺脏载菌量(B)

Fig.3 Production of BcfA-specific antibodies in mice after immunization (A) and the bacterial load in the lungs of mice after challenge of the bacterium (B)

蛋白表达量不高,且主要表达形式都是包涵体,需要溶解复性后才能起到保护性抗原的作用,这会增加生产工艺和生产成本。目前已经有多种保护性抗原通过截短表达提升了表达量和可溶性^[11-12]。故本研究在分析 BcfA 各个氨基酸残基构成 B 细胞表位能力的基础上对 *BcfA* 进行截短表达。试验结果表明截短后的 *BcfA* 表达量提升了 10 倍左右,并且以可溶性表达为主。截短后的 BcfA 重组蛋白与支气管败血波氏菌感染康复血清反应依然明显,这表明截短表达的重组蛋白 BcfA-373T 较好地保留了原蛋白质的免疫原性。

在此前的文献报道中有的学者曾经采用腹腔注射攻毒而后观察小鼠死亡率的方法评估保护性抗原的效力^[13-14]。考虑到支气管败血波氏菌引发的动物疫病主要表现为呼吸道局部感染,如猪的传染性

萎缩性鼻炎、家兔传染性鼻炎和肺炎、犬传染性支气管炎等^[1],我们认为通过呼吸道攻毒并评估攻毒后小鼠肺脏的载菌量能够更好地模拟自然感染并更好地反映保护性抗原对局部感染的免疫保护作用,所以我们采用了滴鼻攻毒的方式,这将使试验结果更具有参考意义。通过呼吸道攻毒也是很多学者采用的一种支气管败血波氏菌攻毒方式^[15-16]。

截短的 BcfA(BcfA-373T)免疫组的组织载菌量显著低于对照组,这表明截短的 BcfA 具有很好的免疫保护力。BcfA-373T 与 BcfA-45Q 免疫组的组织载菌量差异不显著,且与已有报道^[4]一致。所以应该认为截短后的 BcfA 依然保留着全长 BcfA 的免疫活性,可以用于后续的疫苗研究。

总之,本研究通过截短表达提高了 BcfA 重组蛋白的表达量和可溶性,为后期研制以 BcfA 重组蛋白

抗原为基础的基因工程疫苗提供了基础。

参考文献:

- [1] 吴 润. 波氏菌属[M]//陆承平. 兽医微生物学. 北京: 中国农业出版社, 2001:275-278.
- [2] SAMEED M, SULLIVAN S, DEEPAK J. The curious cough: a case report of cystic lung disease caused by *Bordetella bronchiseptica* in a patient with AIDS[J]. *Chest*, 2018,154(4):138.
- [3] MONTI M, DIANO D, ALLEGRINI F, et al. *Bordetella bronchiseptica* pneumonia in a patient with lung cancer; a case report of a rare infection[J]. *BMC Infectious Diseases*, 2017,17(1):644.
- [4] AI W C, PENG Z, WANG F, et al. A Marker-free *Bordetella bronchiseptica* aroA/bscN double deleted mutant confers protection against lethal challenge[J]. *Vaccines*, 2019,7(4):176.
- [5] 孟庆文,童光志,韩凌霞. 基因工程疫苗概述[M]//童光志,王云峰. 动物基因工程疫苗原理与方法. 北京: 化学工业出版社, 2009:81-91.
- [6] YOUNT K, JENNINGS-GEE J, CAUTION K, et al. *Bordetella* colonization factor A (BcfA) elicits protective immunity against *Bordetella bronchiseptica* in the absence of an additional adjuvant[J]. *Infection and Immunity*, 2019,87(10):e00506-1910.
- [7] SUKUMAR N, LOVE C, CONOVER M, et al. Active and passive immunizations with *Bordetella* colonization factor A pProtect mice against respiratory challenge with *Bordetella bronchiseptica*[J]. *Infection and Immunity*, 2009,77(2):885-895.
- [8] 范志宇,魏后军,胡 波,等. 兔多杀性巴氏杆菌和支气管败血波氏杆菌复合 PCR 方法的建立及临床应用[J]. *江苏农业学报*, 2015,31(2):376-381.
- [9] ZHAO Z Q, XUE Y, TANG X B, et al. Immunogenicity of recombinant protective antigen and efficacy against intranasal challenge with *Bordetella bronchiseptica*[J]. *Vaccine*, 2009,27(18):2523-2528.
- [10] WANG C W, LIU L P, ZHANG Z, et al. Immunological and protective effects of *Bordetella bronchiseptica* subunit vaccines based on the recombinant N-terminal domain of dermonecrotic toxin[J]. *International Immunopharmacology*, 2015,28(2SI):952-959.
- [11] ZHU W, WU C, KANG C, et al. Evaluation of the protective efficacy of four newly identified surface proteins of *Erysipelothrix rhusiopathiae*[J]. *Vaccine*, 2018,36(52):8079-8083.
- [12] YANG C Y, PAN H R, WEI M X, et al. Hepatitis E virus capsid protein assembles in 4M urea in the presence of salts[J]. *Protein Science*, 2013,22(3):314-326.
- [13] 赵 宁,王 芳,恽时锋,等. 兔支气管败血波氏杆菌 DNT 蛋白的分段表达及其免疫保护性研究[J]. *中国预防兽医学报*, 2011,33(8):648-652.
- [14] LIU Y, CHEN H, WEI Q, et al. Immune efficacy of five novel recombinant *Bordetella bronchiseptica* proteins[J]. *BMC Veterinary Research*, 2015,11(1):173.
- [15] WANG C W, LIU L P, ZHANG Z, et al. Immunological and protective effects of *Bordetella bronchiseptica* subunit vaccines based on the recombinant N-terminal domain of dermonecrotic toxin[J]. *International Immunopharmacology*, 2015,28(2):952-959.
- [16] 赵战勤,薛 云,吴 斌,等. 重组百日咳杆菌黏附素蛋白免疫小鼠可完全抵抗支气管败血波氏杆菌的致死性感染[J]. *微生物学报*, 2008,48(3):337-341.

(责任编辑:张震林)