

· 实验研究 ·

中国莱姆病螺旋体 PD91 重组 OspC 的鉴定和抗原性检测

陈建 万康林

【摘要】 目的 重组中国莱姆病螺旋体 PD91 外膜蛋白 (α OspC) 并在大肠埃希菌中表达, 用于早期莱姆病诊断的研究。方法 用聚合酶链反应 (PCR) 扩增出 PD91 外膜蛋白 C 基因, 定向克隆到表达载体 PET-11D 构建重组质粒 PET-11D-ospC。用 PCR、限制性内切酶分析及序列测定等方法鉴定重组质粒。用 Western Blot 检测其抗原性。结果 OspC 基因被正确克隆到表达载体 PET-11D 中。序列测定结果证实与国外已报道的序列存在一定的差异。OspC 具有强抗原性。结论 该项研究为国内莱姆病的早期特异性诊断的研究奠定了基础。

【关键词】 莱姆病螺旋体; 外膜蛋白 C; 抗原性

Recombinant OspC identification and antigenicity detection from *Borrelia burgdorferi* PD91 in China
CHEN Jian, WAN Kang-lin. Institute of Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

Corresponding author: WAN Kang-lin. E-mail: wankanglin@icdc.com.cn

【Abstract】 Objective To recombine OspC gene from *Borrelia burgdorferi* PD91 of China and expressed it in *E. coli* for early diagnosis of Lyme disease. **Methods** The OspC gene was amplified from the genome of *Borrelia burgdorferi* PD91 strain by polymerase chain reaction and recombined with plamid PET-11D. The recombinant plamid PET-11D-OspC was identified with PCR, restriction endonuclease analysis and sequencing. The antigenicity was verified with Western Blot. **Results** OspC gene was cloned correctly into vector PET-11D. The resultant sequence was definitely different from the published sequence. The recombinant OspC seemed to have had strong antigenicity. **Conclusion** The findings laid basis for the studies on early diagnosis of Lyme disease.

【Key words】 *Borrelia burgdorferi*; Outer surface protein C; Antigenicity

莱姆病是由伯氏疏螺旋体引起的一种多器官、多系统感染的人兽共患性疾病。在我国莱姆病的早期诊断是一个亟待解决的问题。然而莱姆病螺旋体外膜蛋白 (α outer surface protein, α OspC) 是莱姆病螺旋体主要外膜蛋白之一。它具有较强的抗原性。主要用于莱姆病的早期诊断研究。当机体被感染后, 早期可导致慢性游走性红斑, 进而引起心肌炎、心包炎、脑膜炎、面神经麻痹等, 晚期出现关节炎、萎缩性皮炎、周围神经炎等临床症状^[1]。早期发现莱姆病患者, 其治疗效果良好, 中晚期治疗效果较差。因此对中国莱姆病螺旋体 OspC 克隆表达, 得到抗原性较好的 OspC 并能用于莱姆病的早期诊断具有重要

的应用价值^[2,3]。本项研究对中国莱姆病螺旋体第二基因种 (*Borrelia garilli*) 代表菌株 PD91 的 OspC 基因克隆和表达及抗原性检测, 将为我国莱姆病早期诊断研究提供重要依据。

材料与方法

1. 菌株的培养与基因组 DNA 的制备: 中国莱姆病螺旋体菌株 PD91 由中国疾病预防控制中心传染病预防控制所提供。菌株经 BSKII 培养基培养, 显微镜下取对数期生长菌集菌。按常规 DNA 提取方法制备全基因 DNA。

2. 所用工程菌: 表达载体 PET-11D, 宿主菌为大肠埃希菌 BL21 (德国 Novagen 公司产品)。

3. 主要试剂: NcoI, BamHI (华美公司产品), DNA 回收试剂盒 (Sangon 公司产品), T₄ DNA 连接酶, TaqDNA 聚合酶, dNTP, 异丙基硫代 β -D 半乳糖 (IPTG), 酵母粉、胰蛋白胨、丙烯酰胺及 N,N'-亚甲

基金项目 科技部“十五”攻关课题资助项目(2001BA705B07)

作者单位: 102206 北京, 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所

第一作者现工作单位: 453000 新乡医学院

通信作者: 万康林 wankanglin@icdc.com.cn

基双丙烯酰胺及其他生化试剂(美国 Promega 公司、Sigma 公司、Fluka 公司产品)。

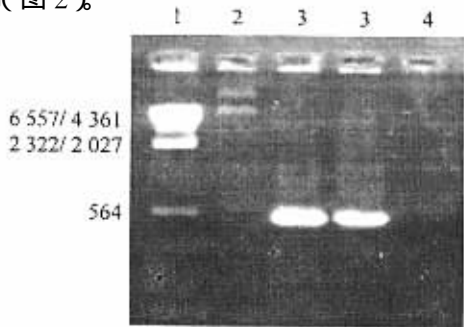
4. 引物设计:PCR 引物设计参考引物设计原则,用 Oligo 软件自行设计。上游引物 5'-CCACCATGGGGATACCGCATCTACT-3',下游引物 5'-CGGGATCCCTTATGCCACAACAGG-3'由上海博雅公司合成,上游引物分别含有 NcoI 和 BamHI 酶切位点。

5. PD91 OspC 基因和载体质粒 PET-11D 构建:以提取的 PD91 全基因 DNA 为模板扩增 OspC,分别用 NcoI 和 BamHI 酶切,1% 琼脂糖电泳,并用 DNA 回收柱回收 PCR 产物。载体 PET-11D 也用 NcoI 和 BamHI 酶切,质粒回收柱回收。此后用 T₄ 连接酶连接,转化大肠杆菌 DE3 感受态细胞。挑阳性克隆子诱导表达,SDS-PAGE 电泳分析表达量。

6. 克隆及表达产物鉴定及抗原性检测:阳性克隆子经 PCR、NcoI 和 BamHI 双酶切鉴定、基因测序鉴定正确。Western Blotting 鉴定表达蛋白及抗原性。

结 果

1. PD91 菌株 OspC 基因扩增及酶切鉴定:用 1% 琼脂糖凝胶电泳结果显示,自行设计引物扩增出单一条带,分子量大小约为 560 bp(图 1)。用 NcoI 和 BamHI 分别酶切 PET-11D-ospC 重组质粒,1% 琼脂糖电泳显示出与预计的伯氏疏螺旋体 PD91 OspC 相同分子量 DNA 片段 562 bp 和 5 600 bp 的质粒带(图 2)。

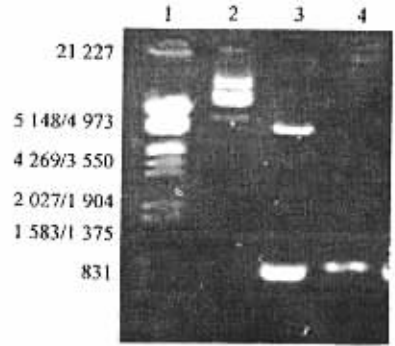


1: Lambda DNA 标准分子量 2: PET-11D; 3: 扩增的 OspC 目的基因; 4: 对照

图1 目的基因的 PCR 产物

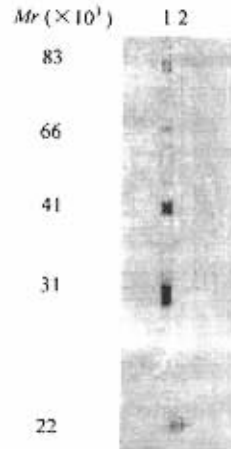
2. 克隆片段的序列分析及与国外代表株同源性比较:经序列测定,克隆的 PD91 菌株 OspC 基因碱基长度为 562 bp,编码 154 氨基酸(因去除了部分信号肽序列)。核苷酸同源性与美国标准菌株 B31 是 77%;与欧洲标准菌株 Pko 同源性为 80%,其核苷

酸序列与国内外已报道的菌株的 OspC 同源性介于 65%~92% 之间。



1: Lambda DNA/HindIII + EcoRI 分子量标准; 2: PET-11D; 3: PET-11D-ospC 的 BamHI + NcoI 双酶切; 4: PD91 扩增出的目的基因
图2 重组质粒的酶切鉴定(1.0% 琼脂糖电泳)

3. 表达蛋白免疫印迹结果:阳性克隆子经 IPTG 诱导培养,SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜、封闭后,用于莱姆病阳性血清检测。表达蛋白(相对分子质量为 23×10^3)与阳性血清在 22×10^3 处有一强蛋白印迹带;PD91 菌与阳性血清反应,出现了 P83、P66、P41、P31、P22 等主要几个印迹带(图 3)。



1: PD91 菌与阳性患者蛋白印迹结果 2: 表达蛋白与阳性患者血清蛋白印迹结果

图3 Western Blotting 结果

讨 论

OspC 是莱姆病螺旋体的主要蛋白质之一,它在莱姆病的早期诊断是一种较特异性抗原,国外已多次报道用 OspC 来诊断早期莱姆病。但是在不同的基因种,甚至在同一基因型的不同的菌株间差异性也较大^[4,5]。我国的莱姆病菌株和国外菌株也存在较大的差异。结果显示,伽氏疏螺旋体(*Borrelia garilli*)基因种 PD91 菌株 OspC 基因碱基(去掉了编码信号肽的部分碱基)含 562 bp,编码 154 个氨基

酸。核苷酸与美国标准菌株 B31 同源率为 77% ;与欧洲标准菌株 Pko 同源率为 80% ,其核苷酸序列与已报道的菌株的 OspC 同源性介于 65% ~ 92% 之间。也表明了 OspC 基因异质性较大。

重组质粒 PET-11D-ospC 用 IPTG 诱导表达外膜蛋白 C 经 Western Blotting 证实表达的 C 蛋白与阳性患者血清反应 ,具有较强的抗原性和较好的特异性。更重要的是本研究所选用 PD91 菌株为我国莱姆病螺旋体第二基因种 (*Borrelia garilli*) 占我国莱姆病菌株的 60% 以上)代表菌株 ,为从莱姆病患者脑脊液分离到的菌株 ,并具有致病性。

在目前 ,我国莱姆病诊断抗原均为全菌抗原 ,与患者血清抗体易产生交叉反应 ,因而大大降低了诊断的特异性 ,加之全菌培养成本花费较大。本研究构建的表达载体可以在大肠埃希菌中高效表达 ,表达量约为全菌的 20% 以上 ,能获得大量纯化的重组抗原 ,用于莱姆病的早期诊断 ,可大大节省诊断成本 ,又提高了诊断的特异性。所以 PET-11D-ospC 表达载体的成功构建 ,并能大量诱导表达 OspC ,通

过其抗原性的研究 ,为今后莱姆病早期诊断提供了良好的基础。

参 考 文 献

- 1 张哲夫,万康林,张金声,等.我国莱姆病的流行病学和病原学研究.中华流行病学杂志,1997,18:8-11.
- 2 Wilske B, Habermann C, Fingerle V, et al. An improved recombinant IgG immunoblot for serodiagnosis of Lyme borreliosis. Med Microbiol Immunol (Berl), 1999, 188:139.
- 3 Rauer S, Spohn N, Rasiah C, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant OspC and the internal 14-kDa flagellin fragment for serodiagnosis of early Lyme disease. J Clin Microbiol, 1998, 36:857.
- 4 Wallich R, Siebers A, Jahraus O, et al. DNA vaccines expressing a fusion product of outer surface proteins A and C from *Borrelia burgdorferi* induce protective antibodies suitable for prophylaxis but not for resolution of Lyme disease. Infect Immun, 2001, 69:2130.
- 5 Wieneke CA, Lovrich SD, Callister SM, et al. Evaluation of whole-cell and OspC enzyme-linked immunosorbent assays for discrimination of early Lyme borreliosis from OspA vaccination. J Clin Microbiol, 2000, 38:313.

(收稿日期 2003-01-20)

(本文编辑:尹廉)

· 疾病控制 ·

贵港市 409 例毒鼠强中毒流行病学分析

冼明甫 李玉霞 王力珩 范进南 覃兆览 梁其松

为掌握毒鼠强中毒规律,制定有效的预防控制措施,对贵港市 1999~2002 年血液、尿液、洗胃液等生物材料中一种及以上定性或定量检出毒鼠强的全部 409 例病例,录入计算机,利用 SPSS 统计软件进行分析。409 例中毒病例,死亡 40 例,年均中毒率为 2.2/10 万,病死率为 9.78%。每年 3~4 月份为中毒高峰,9~10 月份出现第二次小高峰。中毒者中年龄最小为 6 月龄,最大为 82 岁,以 10 岁以下儿童发生中毒最多(83.1%),其中又以 2~5 岁的儿童为中毒高峰人群(54.3%);中毒人群中男性 229 例,女性 180 例;中毒发生地乡镇占 95.8%,市区占 4.2%;中毒途径主要是误食与自杀自服、投毒,其中以误食居多,占 59.7%,无明确毒鼠强接触史次之,占 27.9%,误食的食物以拌鼠药的红薯粒、花生粒(鼠饵)为主,占 46.9%。中毒方式以单人散发性为主,占 64.3%,家庭聚集性占 29.3%,学校集体性中毒占 6.4%。

1999~2002 年贵港市毒鼠强中毒已成为该市急性中毒和死亡的第一位。中毒的发生有明显季节性,这是因为该地区常年鼠害猖獗,且当地的群众习惯使用灭鼠药灭鼠,甚至一些地区的农民在播种时喜欢用鼠药拌种子。3~4 月、9~10 月份是该地区的春耕播种、秋收季节,群众为防止鼠害而普遍使用鼠药,从而导致中毒人数的剧增,出现中毒高峰。染毒方式以误食为主,无明确毒物接触史次之,误食的食物以红薯粒、花生粒等鼠饵居多。中毒有明显的区域性,主要发生在农村。中毒多呈散发性,家庭聚集性次之,学校集体性中毒发生少,但危害大。中毒在各年龄段均可能发生,但以 2~5 岁的儿童为绝大多数,与该年龄段的儿童活动性大、不具备认知能力有关。我国虽早已禁止生产使用毒鼠强鼠药,但中毒事件仍不断发生,目前国家已立法严禁毒鼠强的非法生产、销售,从源头上杜绝中毒的发生。

(收稿日期 2003-04-24)

(本文编辑:张林东)