

中国莱姆病螺旋体伽氏疏螺旋体 PD91 鞭毛蛋白的基因克隆和表达

吕冰 万康林 侯学霞 郝琴 耿震

【摘要】 目的 对中国莱姆病螺旋体伽氏疏螺旋体基因种参照菌株 PD91 的鞭毛蛋白编码基因进行克隆表达与基因序列分析。方法 设计引物,用聚合酶链反应(PCR)技术获得 PD91 的鞭毛蛋白编码基因片段,经酶切、连接,插入质粒 pET-11d 中,构成重组质粒 pET11d-fla,转化致大肠埃希菌 BL21,提取质粒进行酶切、DNA 测序和氨基酸序列分析鉴定,诱导表达,筛选高效表达株,应用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和免疫印迹(WB)方法,鉴定重组蛋白及其抗原性。结果成功地获得了鞭毛蛋白的编码基因片段和基因重组,重组蛋白在宿主菌 BL21 中高效表达。WB 结果显示重组鞭毛蛋白与 PD91 的鞭毛蛋白具有相同的抗原性。经测序显示该鞭毛蛋白的基因片段长度为 1011 bp,与北美莱姆病螺旋体标准株 B31 的 DNA 碱基序列及氨基酸序列比较分析,同源性分别为 94.70%、95.85%。结论 在国内首次成功地对中国莱姆病螺旋体伽氏疏螺旋体基因种的鞭毛蛋白基因进行了克隆表达,并证实具有良好的抗原性,为莱姆病血清学诊断研究提供了较好的基础。

【关键词】 莱姆病螺旋体;鞭毛蛋白;克隆表达

Cloning and expression of flagellin gene from a Chinese *Borrelia burgdorferi* PD91 strain LU Bing, WAN Kang-lin, HOU Xue-xia, HAO Qin, GENG Zhen. National Institute of Communicable Disease Control & Prevention, Chinese Center of Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China
Corresponding author: WAN Kang-lin

【Abstract】 Objective To study the cloning and expression of flagellin gene from Chinese *Borrelia burgdorferi* PD91 strain and to evaluate the feasibility of using recombinant protein as diagnostic antigen when comparing the gene sequence with flagellin gene from North American *Borrelia burgdorferi* B31. **Methods** The piece of genes coding flagellin from Chinese *Borrelia burgdorferi* PD91 by polymerase chain reaction (PCR) method was obtained and constructed recombinant plasmid before transformed into *E. coli* BL21 strain and induced. The recombinant plasmid was identified with enzyme cutoff and gene sequence comparison. Efficient expression strain was selected and the expression product was analyzed with sodium amplified polymorphic-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western-blot method. **Results** The recombinant protein (r-flagellin) expressed in host bacteria was successful. By means of western-blot assay, the immunological response showed the same antigenicity between r-flagellin and PD91 flagellin. The piece of genes coding flagellin of PD91 was 1011 bp, but when comparing with that of North American *Borrelia burgdorferi* it showed 94.70% homology. Homology between the sequence of amino acid of the r-flagellin and that of B31 flagellin was 95.85%. **Conclusion** Flagellin gene of *Borrelia garinii* of Chinese Lyme disease spirochete was successfully cloned and expressed for the first time. It was proved that the immunoreactivity of r-flagellin was the same as the natural flagellin.

【Key words】 *Borrelia burgdorferi*; Flagellin; Cloning and expression

莱姆病(Lyme disease)是一种由若干不同基因种的伯氏疏螺旋体(*Borrelia burgdorferi*),即莱姆病螺旋体(Lyme disease spirochaete)引起的人兽共患病。1992年 Bruckbauer 等^[1]研究发现,莱姆病螺

旋体蛋白成分中 p100、p41、OspA、OspC 与其他病原体交叉反应最小,是作为莱姆病血清学诊断的合适抗原,其中的 p41 指的就是鞭毛丝状体核心蛋白(鞭毛蛋白)^[2,3]。中国莱姆病螺旋体具有独特的分子特征,明显区别于北美和欧洲莱姆病螺旋体^[4]。我们对中国莱姆病螺旋体伽氏疏螺旋体(*Borrelia garinii*)基因种参照菌株 PD91 株鞭毛蛋白进行基因重组,并对重组鞭毛蛋白进行初步的抗原性鉴定,为研究中国莱姆病的特异性诊断试剂提供基础。

基金项目:国家“十五”科技攻关资助项目(2001BA705B07);国家自然科学基金资助项目(31070820)

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
通讯作者:万康林

材料与方法

1. 菌株、质粒和基因组 DNA 制备 :中国莱姆病螺旋体伽氏疏螺旋体基因种参照菌株 PD91, 常规接种于 BSK 培养基 33℃ 培养 5~7 d, 暗视野显微镜下观察生长良好 4℃ 离心收集菌体。常规方法制备全基因组 DNA^[5]。PD91、克隆表达菌大肠埃希菌 BL21 及质粒 pET-11d 均由中国疾病预防控制中心传染病预防控制所提供。

2. 引物设计 :参照文献 [1], 菌株 B31 基因序列设计引物, 由赛百盛公司合成, 扩增鞭毛蛋白全基因的引物序列为 :引物 5' 上游 :CAT GCC ATG GCA ATG ATT ATC AAT CAT AAT AC ;下游 :CGC GGA TCC GCG TTA TCT AAG CAA TGA CAA AAC, 扩增片段为 1~1011 bp。

3. 主要试剂 :限制性内切酶 Nco I、BamH I、T4 连接酶、dNTP、TaqDNA 聚合酶、异丙基硫代 β 半乳糖苷 (IPTG) 等购自华美公司。聚合酶链反应 (PCR) 产物纯化试剂盒、小量质粒提取试剂盒购自上海生物工程公司。

4. 鞭毛蛋白基因的克隆表达、鉴定 :

(1) 鞭毛蛋白基因的克隆表达 :以 PD91 全基因组 DNA 为模板, 用上述引物进行 PCR 扩增, 产物回收。将产物及表达载体质粒 pET-11d 分别用 Nco I、BamH I 酶切、回收。T4 连接酶连接 PCR 产物和载体质粒, 转化至大肠埃希菌 BL21。提取质粒用 Nco I、BamH I 双酶切进行阳性克隆鉴定。将阳性克隆的菌株活化 A_{600} 约 0.6, 加入 IPTG, 使其终浓度 1 mmol/L, 37℃ 诱导 3 h。收集菌体, 采用 15% 聚丙烯酰胺凝胶为分离胶, 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 检测。

(2) 鞭毛蛋白编码基因序列分析 :基因测序由上海生物工程公司完成。

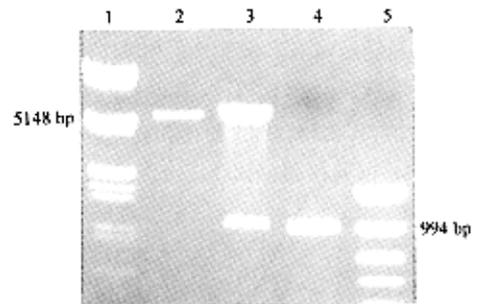
(3) 重组鞭毛蛋白免疫印迹 (Western blot, WB) 分析 :以空载体的转化菌为阴性对照, PD91 为阳性对照, 采用 15% 聚丙烯酰胺凝胶为分离胶, SDS-PAGE, 用电转仪将凝胶上的蛋白转到硝酸纤维素膜上, 5% 脱脂奶粉封闭 24 h, 洗涤后与 1:20 兔抗 PD91 血清反应 4 h, 洗涤后再加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的 SPA, 4℃ 过夜。洗涤后 4-氯-1-萘酚显色液显色 15 min, 去离子水终止反应。

(4) 应用 DNA Star 软件比较重组鞭毛蛋白与莱姆病螺旋体 B31 株鞭毛蛋白基因序列及氨基酸

序列。

结 果

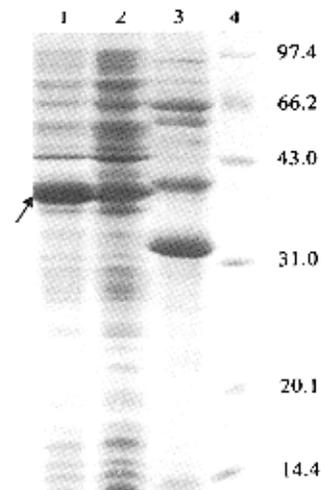
1. 重组质粒酶切鉴定 :转化菌 BL21 活化, 提取质粒, 经内切酶 Nco I、BamH I 酶切鉴定, 结果见图 1。图 1 第 3 泳道为重组质粒酶切, 结果为 2 条基因片段, 分别与空白质粒 (2 泳道) 及 PCR 产物 (4 泳道) 相同。



1 :DNA/EcoRI + HindIII Markers :21, 227, 5148, 4937, 4268, 3530, 2027, 1904, 1584, 1375, 947, 831, 564, 125 bp ; 2 :质粒 pET11d 经 NcoI, BamHI 酶切 ; 3 :重组质粒 pET11d-fla 经 NcoI, BamHI 酶切 ; 4 :fla PCR 产物 ; 5 :PCR-markers :1543, 994, 697, 515, 377, 237 bp

图 1 重组质粒 pET11d-fla 酶切鉴定

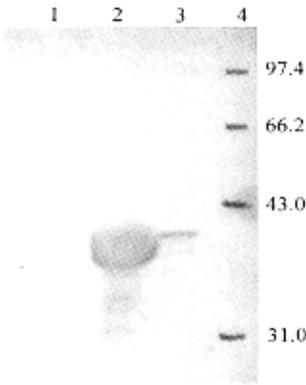
2. 重组鞭毛蛋白在宿主菌中的诱导表达 :表达产物用 15% SDS-PAGE 检测, 如图 2 箭头所示。经 gel-pro analyzer 3.1 软件分析表明, 诱导后的重组鞭毛蛋白表达量为全菌总蛋白表达量的 33.16%。



1 携带重组质粒 pET11d-fla 的大肠埃希菌 BL21 经 IPTG 诱导表达 3 h 后 ; 2 :携带重组质粒 pET11d-fla 的大肠埃希菌 BL21 经 IPTG 诱导表达前 ; 3 :莱姆病螺旋体 PD91 ; 4 :低相对分子量 (M_r) 蛋白 Markers ($\times 10^3$)

图 2 莱姆病螺旋体 PD91 株重组鞭毛蛋白的 SDS-PAGE 分析

3. 重组鞭毛蛋白中央区抗原性分析 :经 WB 分析证实, 重组鞭毛蛋白中央区与莱姆病螺旋体 PD91 株鞭毛蛋白具有相同的抗原性 (图 3)。



1 阴性对照 BL21-pET11d; 2 重组鞭毛蛋白; 3 莱姆病螺旋体 PD91 株; 4 M_r 标准 ($\times 10^3$)

图3 重组鞭毛蛋白 WB 分析

4. 基因测序结果及氨基酸序列分析: 基因测序由上海生物工程公司完成。以下是北美标准菌株 B31 与重组质粒测序结果比较。同源率为 94.7%。氨基酸序列比较二者同源率为 95.85%。

(1) 核苷酸序列比较: 序列中 * 所对应的行为北美标准菌株 B31 鞭毛蛋白基因序列, ** 所对应的行为重组质粒 *r-fla* 基因序列。

```
* 1 atgattatca atcataaac atcagctatt aatgcttcaa gaaataatgc cattaatgct
**
61 gctaatttta gtaaaaccca agagaagcct tctagtggtt acagaattaa tcgagcttct
121 gatgatgctg ctggtatggg ggtttctggc aagattaatg ctcaataaac aggcttatca
181 caagcttcta gaaacacttc aaaagctatc aattttattc agacaacaga aggaaattta
241 aatgaagtag aaaaagtttt agtaagaatg aaagaattag cagttcaatc aggtaacgga
301 acgtattcag acgcagacag aggttctata cagattgaaa tagagcaact tacagacgaa
361 attaatagaa ttgctgatca ggctcaaatc aaccaaagtc acatgtttgc aaacaaatct
421 gcttccocaa atgtaaaaac agctgaagag ctiggaatgc agcctgcaaa aattaacaca
481 ccagcatcac ttccagatc tcaagctctc tggactttta gagttcatgt gggagcaaat
541 caagatgaag caattgctgt aaatatttat tcagctaagc ttgcaaatct ttttgcigtg
601 gagggagctc aagctgctca ggtgcoactt gttcaagagg gtgctcaaga agaaggagct
661 cagcaaccaa cacotgctac agcacotact caaggtggag ttaattctcc tgttaatggt
721 acaaccacag ttgatgctaa tacatcaact gctaaaatag aaaatgctat tagaatgata
781 agtgatcaaa gagcaaatth aggtgcttcc caaaatagac ttgaatctat aagaatagc
841 aotgagtatg ctattgaaaa tctaaaagca tcttatgctc aaataaaga tgcataatg
901 acagatgagg ttgtagcagc tacaatcaat agtattttaa ctcaatctgc aatggcaatg
961 attgcacagc ctaatcaagt tctcaaatat gttttgctat tgottagata a
```

(2) 氨基酸序列比较: 序列中 * 所对应的行为北美标准菌株 B31 鞭毛蛋白氨基酸序列, ** 所对应

的行为重组鞭毛蛋白氨基酸序列。

```
* MIINHNTSAINASRRNAINAANLSKIQEKLSSGYRINRASDDAAGMGVSGKINAQIT
** -----G-----G-----R
GLSQASRNITSKAINFIQTITBCNLNEVERVLRMKELAVQSGNGTYSADDRGSIQIE
-----R-----
EQLTDEINRIADQAQYNQMHLMSKNSASQNVKTAEBELGMQPAKINTFASLSCSQAS
-----R-----
WTLRVHVGANQDEIAIVNYSANVANLFAEGGAQAAQAAIPVQEGAQEBGAQOQTP
-----A-----S-----T-----Q-----A-----
ATAPITQGGVNSPNNVTTTVDANTSLAKIENAIMESDQRANLGAQRNRLSEIKNSTE
-----S-----D-----
YAIENLKASYAQIKDATMIDEVVAATNSILITQSAMAMIAQANQVQYVLSLLR
-----P-----R-----G-----
```

讨 论

最初莱姆病血清学诊断是应用全细胞抗原,由于全细胞抗原与许多其他疾病病原体有交叉反应,特异性不十分理想。Bruckbauer 等^[1]对莱姆病螺旋体蛋白抗原与其他细菌的蛋白抗原进行交叉反应研究时发现,鞭毛蛋白是交叉反应最小的蛋白中的一种。所以,能否应用鞭毛蛋白作为诊断试剂一直是使科研工作者十分感兴趣的工作课题。

在螺旋体感染机体时,鞭毛蛋白具有很强的免疫原性,最先引起机体免疫反应,其抗体在患病后最早出现,并且在病程中始终存在^[2]。本实验目的在于构建重组鞭毛蛋白,并研究其免疫反应性,对其是否能作为良好的诊断试剂进行基础性研究。本试验克隆表达的中国莱姆病螺旋体鞭毛蛋白表达量为全菌表达量的 33.16%,用 WB 方法证实重组鞭毛蛋白与莱姆病螺旋体 PD91 株鞭毛蛋白有同样的免疫反应性,证明了其作为诊断试剂的可行性。2000 年 Joppe 等^[6]在研究感染了莱姆病螺旋体的狗的血清抗体时发现,所有感染莱姆病的狗血清中均发现抗鞭毛蛋白抗体及抗 P39 抗体。但是 2001 年, Austin 等^[7]在莱姆病患者免疫反应研究中发现只有 46% 的急性期患者与 72% 康复期患者血清中存在抗鞭毛蛋白抗体(IgM 或 IgG)。由此,估计重组鞭毛蛋白单独用作诊断试剂的灵敏度不会十分理想,如果联合 P39、OspC 等特异性蛋白用作诊断试剂,会取得良好的效果。重组鞭毛蛋白基因测序结果及其同北美标准菌株 B31 基因序列比较表明,二者 94.7% 的同源性,氨基酸序列比较结果为 95.85% 同源性。氨基酸差异基本集中于鞭毛蛋白的中部及羧基端。

许多国内外学者都尝试应用鞭毛蛋白代替全细胞抗原作为诊断抗原。1996 年谢杏初、刘惠君^[8]以莱姆病螺旋体鞭毛蛋白作抗原,应用酶联免疫吸附试验(ELISA)方法对新疆 385 份体检血清、12 份梅

毒血清检验,并用免疫荧光做比较,结果表明,应用鞭毛蛋白抗原检测,具有较高特异度、敏感度,检验一致性好,是比较理想的莱姆病实验室诊断方法之一。Wei 等^[2]也认为在早期莱姆病患者,纯化的鞭毛蛋白或富含鞭毛蛋白的片段对提高 ELISA 的敏感度和特异度要优于全细胞抗原。但鞭毛蛋白也被认为与梅毒等疾病产生较严重的交叉反应,尤其是氨基端及羧基端,很多学者认为中央区段是鞭毛蛋白的特异性区段,与其他病原体没有交叉反应。所以联合其他特异性蛋白并去除蛋白两端的高同源序列,是提高鞭毛蛋白诊断试剂特异度及灵敏度的主要方法,这也为下一步工作指引了方向。

参 考 文 献

1 Bruckbauer HR, Preac-Mursic V, Fuchs R, et al. Cross-reactive proteins of *Borrelia burgdorferi*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1992, 11: 224-232.

2 Wei J, Benjamin JL, William S, et al. Mapping the major antigenic domains of the native flagellar antigen of *Borrelia burgdorferi*. J Clin, 1992, 30: 1535-1540.

3 Robert B, Erol F, Daniel R, et al. Molecular characterization of the humoral response to the 41-KD flagellar antigen of *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease agent. Infect And Immunity, 1991, 59: 3531-3535.

4 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.

5 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 著. 金冬雁, 黎孟枫, 译. 分子克隆试验指南. 北京: 科学出版社, 2002. 8.

6 Joppe WRH, Hovius KE, Anneke O, et al. Antibodies against specific proteins of and immobilizing activity against three strains of *Borrelia burgdorferi* sensu lato can be found in symptomatic but not in infected asymptomatic fogs. J Clin Microbiol 2000, 38: 2611-2621.

7 Austin V, Lisa G, Jodie AF. Cellular and humoral immune responses to *Borrelia burgdorferi* antigens in patients with culture-positive early Lyme disease. Infect Immunity 2001, 69: 7437-7444.

8 谢杏初, 刘惠君. 应用莱姆病螺旋体鞭毛蛋白抗原——ELISA 试验检测 385 份体检血清 OD 值的结果. 地方病通报, 1996, 11: 30-31.

(收稿日期 2003-08-18)

(本文编辑:尹廉)

· 疾病控制 ·

贵州省平塘县两村碘缺乏病与蛋白质摄入相关性调查

古明宏 李翼斌 朱臣凯 王明祥 左世民

为防治碘缺乏病,探索食盐加碘后碘缺乏病与蛋白质摄入的相关性,我们于 2002 年 3~4 月,在贵州省平塘县汤锅营村、么村进行了综合的调查,现将结果报告如下。

1. 对象与方法:调查平塘县汤锅营村、么村村民、8~10 岁在校学生及两村基本情况。甲状腺肿调查以触诊法,判定标准为 WHO 推荐的 3 型 3 度;尿碘测定用砷-铈接触法;盐碘测定用直接滴定法;膳食调查采用 3 日称重法,数据输入计算机,用 Excel 2000 进行相关的统计分析。

2. 结果:两村同属于平塘县者密镇,距离镇 1.5 km,地理环境、气候条件、生活习惯一致,2001 年汤锅营村年平均收入(400 元)低于么村(1300 元);两村学生均在者密镇小学、中学上学。甲状腺肿、尿碘、盐碘调查结果表明,汤锅营村甲肿率 11.76%,么村甲肿率 2.12%,经 χ^2 检验($\chi^2 = 4.68, P < 0.05$)差异有显著性,汤锅营村、么村学生尿碘中位数分别为 500.8 $\mu\text{g/L}$ 、267.7 $\mu\text{g/L}$,经 t 检验($t = 5.07, P < 0.01$)差异有显著性,两村居民户家中食盐碘量差异无显著性(表 1)。在两村各随机抽取 25 户村民,采用 3 日称重法,对其进行了膳食调查。汤锅营村和么村均以大米为主食,辅以面食作一定量补充,每人每日蛋白质、脂肪、热量等摄入分别为 26.8 g 和 47.5 g、43.6 g 和 68.8 g、871 kcal 和 1419 kcal,么村均高于

汤锅营村。

表 1 汤锅营村、么村尿碘、盐碘测定结果

地点	甲状腺		尿碘值		盐碘	
	调查人数	甲肿人数 (%)	样品数	中位数 ($\mu\text{g/L}$)	样品数	均值 (mg/kg)
汤锅营村	34	4(11.76)	29	500.80	11	27.00
么村	47	1(2.12)	30	260.70	10	29.50
合计	81	5(6.17)	59	380.75	21	28.25

3. 讨论:两村居民没有特殊的生活饮食习惯,居民盐碘均值及每人每日碘盐摄入量差异无显著性,表明人群碘摄入水平及摄入途径趋于相当,但人群尿碘均值、甲状腺肿大率却存在明显差异,说明两村在某种程度上存在一定的影响因素。通过对两村居民膳食调查发现,膳食中营养素及热量每人每日摄入量均低于 1988 年 10 月中国营养学会修订的《推荐的每日膳食中营养素供给量》标准,汤锅营村显著低于么村,因此,蛋白质摄入较低的汤锅营村呈现人群高甲肿率、尿碘高、低智商现象。此次调查结果可初步认为,汤锅营村人均收入低,生活条件差,机体营养物质摄入明显不足,导致高尿碘、高甲肿率、低智商等一系列相关联的临床症状与体征,在碘营养补充充足的条件下,机体蛋白质水平的高低,可能是影响碘缺乏病病情的重要相关因素。

(收稿日期 2003-10-28)

(本文编辑:尹廉)