

· 实验室研究 ·

鼠疫耶尔森菌 *cafI* 基因的克隆表达及其产物免疫学评价

王鹏 石国祥 王海滨 俞东征 张建中

【摘要】 目的 表达具有免疫学活性重组 F1 抗原(rF1), 并以其构建检测鼠疫抗体胶体金试纸条。方法 将去掉信号肽编码序列的 *cafI* 基因片段与载体质粒 pET32a(+) 通过 *Bam*HI 和 *Not* I 双酶切位点进行连接, 将重组质粒 [*cafI*-pET32a(+)] 转化入 BL21(DE3) 中进行诱导表达, 表达产物经亲和层析纯化, 以纯化 rF1 及天然 F1 抗原制备双检测鼠疫抗体胶体金试纸条, 并对浙江省 528 份人血清标本进行检测。结果 含 *cafI*-pET32a(+) 的 BL21(DE3), 经诱导产生相对分子质量 (M_r) 约为 35.5×10^3 的 rF1 融合蛋白; rF1 融合蛋白检测鼠疫抗体的敏感性等同甚至超越天然 F1 抗原; 在 528 份人血清标本的检测中, rF1 与天然 F1 的符合率为 97.9% ($\kappa=0.466$), 有较好一致性。结论 制备的 rF1, 具有良好免疫学活性, 该 rF1 可替代天然 F1 抗原, 用于鼠疫免疫学检测。

【关键词】 鼠疫耶尔森菌; 重组 F1 抗原; *cafI* 基因; 克隆表达; 免疫学活性

Clone expression of the *cafI* gene of *Yersinia pestis* and immunological evaluation on recombinant F1 antigen WANG Peng¹, SHI Guo-xiang², WANG Hai-bin¹, YU Dong-zheng¹, ZHANG Jian-zhong¹. 1 Department of Diagnosis, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China; 2 Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention

Corresponding author: ZHANG Jian-zhong, Email: zhangjianzhong@icdc.cn

This work was supported by a grant from the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2006AA2Z4A7)

【Abstract】 Objective To get recombinant F1 antigen (rF1) and to construct the detection dipstick of plague antibody. Methods The *cafI* gene removing the signal peptide coding sequence was cloned into plasmid pET32a(+) by double-digested sites of *Bam*HI and *Not* I. Recombinant plasmid *cafI*-pET32a(+) was transformed into BL21(DE3) and the rF1 was expressed. Expression products were purified by affinity chromatography. Dual detection dipstick of plague antibody was constructed with purified rF1 and natural F1, and evaluated with 528 human serum samples of Zhejiang province. Results The fusion protein rF1 of 35.5 KD was expressed by BL21 strains containing *cafI*-pET32a(+). The sensitivity of rF1 showed equivalent to or higher than the natural F1 antigen in detecting plague antibody. It seemed that there was a better consistency of 97.9% ($\kappa=0.466$) when 528 human sera was detected by rF1 and natural F1. Conclusion We successfully extracted the rF1 with good immunological activity that might be used to detecting *Yersinia pestis*.

【Key words】 *Yersinia pestis*; Recombinant F1 antigen; *cafI* gene; Clone expression; Immunological activity

鼠疫免疫学检测与诊断主要是以鼠疫耶尔森菌(鼠疫菌)的特异性抗原——F1 抗原为基础^[1,2]。F1 抗原是由鼠疫菌约 110 kb 质粒(pMT1 质粒)上 *cafI* 基因编码的一种荚膜蛋白, 自然状态下以单体及聚合体形式存在, 其单体相对分子质量 (M_r) 约为

15.5×10^3 , 等电点为 4.3^[3,4]。长期以来, 制备鼠疫检测和诊断用的 F1 抗原都是由鼠疫菌培养获得。自鼠疫菌体上提取 F1 抗原, 费时、耗力, 且纯度不高, 随着分子生物学技术的发展, 克隆表达 *cafI* 基因从而生产重组 F1 抗原(rF1) 成为可能。国内已有学者报道 F1 抗原的相关克隆表达^[5,6], 其中, 表达基因皆为包含信号肽编码序列的 *cafI* 基因。以上文献都报道制备出有生物学活性的 rF1 抗原, 但其与天然 F1 抗原活性比较并未提及, 也未见用其制备出鼠疫诊断试剂的有关报道。由于天然 F1 抗原并不包含信

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2010.01.017

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划)(2006AA2Z4A7)

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(王鹏、王海滨、俞东征、张建中); 浙江省疾病预防控制中心微生物所(石国祥)

通信作者: 张建中, Email: zhangjianzhong@icdc.cn

号肽,上述研究中克隆表达的包含信号肽或更多氨基酸的重组产物是否会影响其活性,以及其与天然 F1 抗原活性的差异多大,不得而知。为此本研究采用“一步法”克隆表达去除信号肽编码序列的 *cafI* 基因,诱导产生具有生物学活性的 rF1,以其构建了检测鼠疫抗体的胶体金试纸条,并在浙江省人群血清中进行初步应用评价。

材料与方 法

1. 材料:

(1) 人血清标本: 1 份青海省鼠疫患者血清(凝效价 1:160)、528 份浙江省人血清标本(浙江省疾病预防控制中心提供)和 1 份正常人血清(本室保存);鼠疫免疫血清(鼠疫疫苗株 EV76 免疫新西兰大白兔制备,效价 1:10 000)和天然 F1 抗原(青海省疾病预防控制中心提供)。

(2) 鼠疫菌 DNA 模板: 自 EV76 中提取, 10 ng/ μ l。载体质粒: pET32a(+)(Merk);感受态菌株: *E. coli* BL21(DE3)(TIANGEN);分子生物学主要试剂: Ex Taq 酶(TaKaRa),限制性内切酶 *Bam*HI、*Not* I (Promega), T4 DNA 连接酶(Promega), IPTG(1 mol/L), 10 \times BugBuster™ 裂解液(Merk), Ni 柱(His SpinTrap, GE);其他试剂: 用于 SDS-PAGE 的全套试剂及设备,用于免疫印迹分析的全套试剂及设备,胶体金试纸条制备相关全套试剂及设备。

2. 方法:

(1) 引物设计: 根据 NCBI 公布的鼠疫菌 *cafI* 基因序列(NCBI: AL117211 85950.86462), 并去除其信号肽编码序列(去除第 1~60 位核苷酸)及终止密码子(第 511~513 位核苷酸 TAA), 设计上游引物 F1s 和下游引物 F1a, 在引物的 5' 端人工加上酶切位点序列及保护碱基, 具体为 F1s: 5'-CGC GGA TCC GCG GCA GAT TTA ACT GCA AGC A-3' (下划线部分序列为 *Bam*HI 酶切位点), F1a: 5'-ATT TGC GGC CGC TTG GTT AGA TAC GGT TAC GGT TAC A-3' (下划线部分序列为 *Not* I 酶切位点), 引物由上海生物工程公司合成。

(2) 重组表达质粒 *cafI*-pET32a(+) 的构建及鉴定: PCR 扩增 *cafI* 基因, 条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 60 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 20 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 s。将 PCR 产物与质粒 pET32a(+) 分别用 *Bam*HI 与 *Not* I 双酶切, 条件为 37 $^{\circ}$ C 3 h。将酶切产物以摩尔比 4:1(目的片段:载体)比例混合, 加入 T4 DNA 连接酶, 22 $^{\circ}$ C 3 h 进行连接。取

10 μ l 连接产物转化大肠埃希菌 BL21(DE3) 感受态细胞。长出的克隆进行 PCR 鉴定, 同时提取质粒, 以 *Bam*HI、*Not* I 双酶切进行鉴定。

(3) rF1 诱导表达及分析: 将酶切鉴定正确的 *cafI*-pET32a(+) 重组质粒进行 *cafI* 基因序列测定, 序列与参考序列完全一致者进行诱导表达。诱导条件: IPTG 0.5 mmol/L, 37 $^{\circ}$ C 4 h。收集菌体, 以裂解液裂解菌体, 并对全菌蛋白, 裂解上清及沉淀进行 SDS-PAGE 电泳分析。

(4) 表达产物纯化及其免疫印迹分析: 采用 Ni 柱纯化表达产物, 纯化后的 rF1 以 1.5 mg/ml 喷涂于硝酸纤维素膜(NC 膜), 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜; 将鼠疫免疫血清、正常兔血清、鼠疫患者血清和正常人血清以 1:100 稀释后与上述喷制好的膜进行免疫印迹分析。

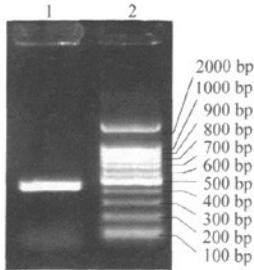
(5) 胶体金试纸条的制备及对浙江人血清标本检测: 采用 40 nm 的金颗粒标记金黄色葡萄球菌 A 蛋白; 同时将纯化 rF1 抗原及天然 F1 抗原以 1.5 mg/ml 浓度、1 μ l/cm 喷划于 NC 膜上; 按常规组装成检测鼠疫抗体胶体金试纸条(北京庄浩生物技术公司制备)。将鼠疫免疫血清分别进行 1:1000、2000、4000、8000、16 000、32 000 稀释, 同时将正常兔血清 1:1000 稀释, 分别滴加于制成的胶体金试纸条, 15 min 后观测结果。采用以上试纸条对浙江省 528 份人血清标本(以 PBS 行 1:10 稀释)进行检测, 评价 rF1 融合蛋白与天然 F1 抗原检测人血清标本的效果。

结 果

1. *cafI* 基因片段获得及重组质粒 *cafI*-pET32a(+) 的鉴定: *cafI* 基因 PCR 扩增产物大小约 500 bp, 与理论片段(471 bp)相符(图 1)。以 *Bam*HI 单酶切 pET32a(+) 及 *cafI*-pET32a(+), 后者要比前者片段大 500 bp 左右, 说明有片段插入质粒 pET32a(+) 中; 以 *Bam*HI、*Not* I 双酶切重组质粒 *cafI*-pET32a(+), 切出 2 个片段, 其中较大片段约 5000 bp, 与质粒 pET32a(+) 相近, 较小片段约 500 bp 与目的 *cafI* 基因片段大小一致(图 2)。

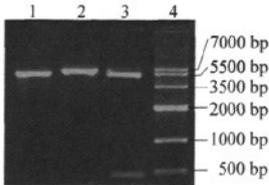
2. 表达产物纯化及其免疫印迹分析: 如图 3 所示, 转化后的 BL21 经诱导可以高效表达 rF1(泳道 3) 融合蛋白, 该抗原部分以可溶形式存在(泳道 4), 表达产物上清经 Ni 柱纯化后得到高纯度的 rF1 融合蛋白(泳道 6), 该 rF1 融合蛋白带 HIS 标签, M_r 约为 35.5×10^3 。

纯化 rF1 的免疫印迹分析见图 4, 纯化 rF1 与鼠疫患者血清及鼠疫免疫血清都有良好反应, 与正



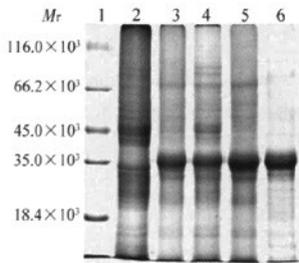
注:1:cafI 基因片段; 2:分子质量标准

图1 去信号肽编码序列 cafI 基因 PCR 产物电泳



注:1:以 BamHI 酶切 pET32a(+); 2:以 BamHI 酶切 cafI-pET32a(+); 3:以 BamHI 与 NotI 双酶切 cafI-pET32a(+); 4:分子质量标准

图2 重组质粒 cafI-pET32a(+) 酶切鉴定



注:1:分子质量标准; 2:诱导前全菌蛋白; 3:诱导后全菌蛋白; 4:诱导后菌体裂解上清; 5:诱导后的菌体裂解沉淀; 6:纯化诱导后菌体裂解上清

图3 转化后的BL21 诱导表达产物的 SDS-PAGE 结果



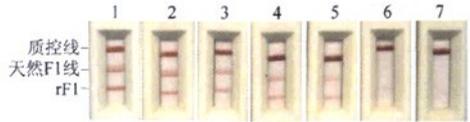
注:1:rF1 与鼠疫免疫血清(1:100)反应; 2:rF1 与正常兔血清(1:100)反应; 3:rF1 与鼠疫患者血清(1:100)反应; 4:rF1 与正常人血清(1:100)反应

图4 纯化 rF1 与鼠疫血清的免疫印迹结果

常人及正常兔血清无反应。结果表明该 rF1 有较好的免疫反应性及特异性。

3. 胶体金试纸条实验室评价:从图 5 可以看出,天然 F1 抗原线的显色带较宽,而 rF1 融合蛋白线较窄,在阳性兔血清 1:32 000 稀释时,天然 F1 抗原线已不明显,而 rF1 融合蛋白线仍可识别,说明本研究的 rF1 融合蛋白较天然 F1 抗原用于检测时的敏感度相当甚至更高。对于正常兔血清,2 条检测线都未显色。

4. 胶体金试纸条检测人血清:采用天然 F1 与



注:1~6:免疫兔血清做不同倍数稀释,依次为 1:1000、2000、4 000、8000、16 000、32 000 稀释; 7:正常兔血清

图5 以 rF1 构建的胶体金试纸条测定鼠疫免疫兔血清结果

rF1 检测 528 份浙江省人血清标本,结果经检测 $\chi^2 = 1.21 (P > 0.05)$, 差异无统计学意义。528 份血清标本中,天然 F1 检测线阳性 8 份(1.5%), rF1 检测线阳性 13 份(2.5%); 其中两者共同阳性为 5 份(1.0%), 共同检测阴性 512 份(97.0%)。经一致性检测,两者的符合率为 97.9% ($\kappa = 0.466$), 有较好的一致性。

对 528 份血清标本的检测中,共有 11 份血清两者结果不符,其中 8 份 rF1 检测阳性(F1 检测阴性), 3 份 F1 检测阳性(rF1 检测阴性)。这 11 份标本显色均很弱,血清经醛化血球吸收后,进行血凝法测定,结果皆为阴性。

讨 论

鼠疫免疫检测的历史就是 F1 抗原检测的历史。从最初的间接血球凝集试验(IHA),到现在普遍使用的胶体金免疫层析法(GICA),都是以 F1 抗原为基础。F1 抗原是鼠疫大质粒(pMT1 质粒)上 cafI 基因编码的一种荚膜蛋白,也是鼠疫一种重要的毒力因子(抗吞噬因子)。用于诊断的 F1 抗原是自菌体提取而得,传统方法是丙酮沉淀法,最近有新方法的文献报道^[7]。自菌体中提取 F1 抗原,需培养大量鼠疫菌,而鼠疫菌生长较为缓慢,且提取过程步骤繁琐,耗时较多,生产 1 g 左右 F1 抗原约需 1 个月;由于步骤繁琐时间冗长,F1 抗原的质量很难标准化,各批次间纯度与活性差异较大,对鼠疫监测数据的比对及各实验室数据的共享造成困难。且自菌体中提取的 F1 抗原只是一种粗制抗原,其中混有鼠疫菌的其他组分,这些组分往往干扰着鼠疫的特异诊断^[8]。

rF1 则克服了天然 F1 上述缺陷,不仅易提取、纯度高,产品质量也可严格控制,各个批次之间产品可比性强,成本也只相当提取天然 F1 的 1/10 左右。

rF1 已在国外疫苗研究中广泛采用^[9-11],我国现今使用的检测鼠疫抗体免疫试剂仍是使用粗提天然 F1 抗原。本研究研制的 rF1 融合蛋白,与刘斌等^[5]、王革和王秉翔^[6]研究中记载的 rF1 相比,本研究 rF1 不含信号肽,理论上讲,其构象与天然成熟的完整

F1 分子更相似。经实验室及现场测试,以本研究 rF1 构建的金标试纸条,其敏感性等同甚至超越天然 F1 构建的金标试纸条,特异性也较高。

本研究中发现 11 份两者检测结果不符的血清,一方面,检测所用的天然 F1 与 rF1 中,可能有少量混杂成分,而造成交叉反应;另一方面,不符的 11 份标本显色均十分弱(与图 5 中第 6 试纸条相似),肉眼观察的偏差可能造成结果差异。

近年来,在浙江、广州等地血清学调查,在部分正常人中检测到高滴度的 F1 抗体^[12,13],这些 F1 抗体阳性血清不是鼠疫患者血清,但也不是一般意义的健康人血清。本研究采用浙江省正常人血清进行 rF1 免疫学活性测定,其目的在于检测浙江省正常人血清对于天然 F1 抗原与重组 F1 的反应性是否一致,从而为寻找正常人血清 F1 抗体阳性的实质提供更多线索。本研究结果显示,两者检测结果符合率为 97.9% ($\kappa=0.466$),有较好的一致性。进一步说明浙江省正常人群中 F1 抗体不是由杂散抗体的交叉反应引起。

总之,本研究成功构建了具有良好免疫学活性的 rF1,有望将 rF1 最终替代天然 F1 抗原,用于鼠疫免疫学检测。

参 考 文 献

[1] Chanteau S, Rahalison L, Ratsitorahina M, et al. Early diagnosis of bubonic plague using F1 antigen capture ELISA assay and rapid immunogold dipstick. *Int J Med Microbiol*, 2000, 290: 279-283.

[2] Chanteau S, Rahalison L, Ralafiarisoa L, et al. Development and testing of a rapid diagnostic test for bubonic and pneumonic plague. *Lancet*, 2003, 361: 211-216.

[3] Tito MA, Miller J, Griffin KF, et al. Macromolecular organization of the *Yersinia pestis* capsular F1 antigen: insights from time-of-flight mass spectrometry. *Protein Sci*, 2001, 10: 2408-2413.

[4] Chromy BA, Choi MW, Murphy GA, et al. Proteomic characterization of *Yersinia pestis* virulence. *J Bacteriol*, 2005, 187: 8172-8180.

[5] Liu B, Zheng WL, Deng H, et al. Expression and identification of F1 antigen of *Y. pestis* in *saccharomyces cerevisiae*. *Chin J Cell*

Mol Immunol, 2005, 21(4): 425-427. (in Chinese)

刘斌,郑文岭,邓海,等.鼠疫耶尔森氏菌 F1 抗原在酿酒酵母中的表达及鉴定. *细胞与分子免疫学杂志*, 2005, 21(4): 425-427.

[6] Wang G, Wang BX. Expression and immunogenicity study on the recombinant F1 antigen of *Yersinia pestis* in *E. coli*. *Prog Microbiol Immunol*, 2005, 33(3): 25-29. (in Chinese)

王革,王秉翔.重组鼠疫菌 F1 抗原在大肠杆菌中的表达及免疫原性分析. *微生物学免疫学进展*, 2005, 33(3): 25-29.

[7] Wang T, Qi Z, Wu B, et al. A new purification strategy for fraction 1 capsular antigen and its efficacy against *Yersinia pestis* virulent strain challenge. *Protein Expr Purif*, 2008, 61: 7-12.

[8] Shi LY, Wang P, Tang X, et al. Observation on composition of the crude F1 antigen and F1 antibodies of *Yersinia pestis* and their immune cross reactions. *Chin J Endemiol*, 2006, 25(6): 598-600. (in Chinese)

石丽媛,王鹏,唐雪,等.对常规制备的鼠疫 F1 抗原、抗体组分及免疫交叉反应的观测. *中国地方病学杂志*, 2006, 25(6): 598-600.

[9] Spiers ID, Alpar HO, Eyles JE, et al. Studies on the co-encapsulation, release and integrity of two subunit antigens: rV and rF1 from *Yersinia pestis*. *J Pharm Pharmacol*, 1999, 51: 991-997.

[10] Del PG, Santi L, Andrianaivoarimanana V, et al. Plant-derived recombinant F1, V, and F1-V fusion antigens of *Yersinia pestis* activate human cells of the innate and adaptive immune system. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2009, 22: 133-143.

[11] Sodhi A, Sharma RK, Batra HV, et al. Recombinant fraction 1 protein of *Yersinia pestis* activates murine peritoneal macrophages *in vitro*. *Cell Immunol*, 2004, 229: 52-61.

[12] Chen YJ, Mei JH, Lan YQ, et al. Discussion of a positive human serum to F1 antigen of *Yersinia pestis*. *Chin J Ctrl Endem Dis*, 2004, 19(2): 95-96. (in Chinese)

陈永金,梅建华,兰玉清,等.一份人血清鼠疫 F1 抗体的讨论. *中国地方病防治杂志*, 2004, 19(2): 95-96.

[13] Zhang T, Xia LX, Liang QG, et al. Investigation of serum epidemiology from the plague foci population in Leizhou island, Guangdong. *Chin J Ctrl Endem Dis*, 2007, 22(1): 16-18. (in Chinese)

张涛,夏连续,梁秋光,等.广东省雷州市鼠疫疫源地人群血清流行病学调查及分析. *中国地方病防治杂志*, 2007, 22(1): 16-18.

(收稿日期:2009-07-30)

(本文编辑:张林东)