



于涵,王丽娜,郭东华,等.牛坏死杆菌 43K OMP 的截短表达及多克隆抗体的制备[J].黑龙江农业科学,2022(4):68-72.

牛坏死杆菌 43K OMP 的截短表达及多克隆抗体的制备

于涵,王丽娜,郭东华,贺显晶

(黑龙江八一农垦大学 动物科技学院,黑龙江 大庆 163319)

摘要:为制备牛坏死杆菌截短 43K OMP 多克隆抗体,以 A25 菌株基因组 DNA 为模板,特异性扩增 43K OMP 基因的 4 个相互重叠的截短片段,构建原核表达载体,利用大肠杆菌原核表达系统对截短基因进行表达并纯化蛋白,同时免疫家兔制备多克隆抗体。结果表明:43K OMP 基因截短片经 IPTG 诱导成功表达,蛋白大小分别为 32 kDa、30 kDa、28 kDa 和 30 kDa,运用蛋白制备的多克隆抗体 43K OMP-1、43K OMP-2、43K OMP-3 和 43K OMP-4 的效价分别为 1:25 600、1:51 200、1:25 600 和 1:51 200,且制备的抗体能识别天然 43K OMP。

关键词:牛坏死杆菌;43K OMP;原核表达;多克隆抗体

牛坏死杆菌(*Fusobacterium necrophorum*)是一种革兰氏阴性的厌氧多形性菌,是一种典型的机会性病原体,常与动物及人类的坏死性化脓性感染有关^[1]。大量研究显示,牛坏死杆菌的毒力因子主要包括白细胞毒素(Leucotoxin)、溶血素(Hemolysin)、血凝素(Hemagglutinin)等^[2]。近年来研究发现,坏死杆菌在牛子宫内膜炎和牛乳房炎的感染中广泛参与,严重影响了牛的生产性能^[3-4]。坏死杆菌病给养殖业带来了巨大的损失,是畜牧业有待解决的重大问题,因此,研究坏死杆菌致病机理具有深远的意义。

外膜蛋白(Outer Membrane Protein, OMPs)作为革兰阴性厌氧菌主要的组成成分和毒力因子,在维持细菌结构、调节物质运输、黏附宿主细胞和介导免疫逃避等方面具有重要作用^[5-6]。43K OMP(43 kDa outer membrane protein)作为坏死杆菌的重要外膜蛋白,与坏死杆菌属其他梭菌成员的 OMPs 具有高度相似性,广泛存在于牛坏死杆菌的不同分离菌株中^[7]。2014 年, Kumar 等^[8]的研究验证了 43K OMP 的存在,并发现其有黏附牛血管内皮细胞(EJG 细胞)的功能。同时,43K OMP 可以提高小鼠的体液免疫和细胞

免疫水平,对坏死杆菌感染起到一定的防治作用^[9],可作为坏死杆菌疫苗的候选抗原用于防治动物坏死杆菌病。目前针对坏死杆菌 43K OMP 功能的研究还处于初始阶段,其生物学功能还需要进一步揭示。本研究将 43K OMP 基因截短成 4 个互相重叠的片段,对截短片进行原核表达并纯化蛋白,利用纯化蛋白免疫家兔,制备多克隆抗体,旨在为牛坏死杆菌基因工程疫苗的研究提供试验材料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物及菌株 SPF 级家兔,购于哈尔滨医科大学实验动物学部;坏死杆菌 A25 菌株,保存于黑龙江八一农垦大学兽医病理学实验室。

1.1.2 主要试剂 预染蛋白 Marker 等购于近岸蛋白科技有限公司;限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho*I、*E. coli* BL21(DE3)、*E. coli* DH5 α 、2 \times premix 预混酶等购于大连宝生物技术有限公司;细菌基因组提取试剂盒、质粒小提试剂盒等购于天根生化科技有限公司;弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂购自 Sigma 公司;HRP-山羊抗兔 IgG、IPTG 等购自 Biosharp 公司;天然 43K OMP 和重组 43K OMP 蛋白为黑龙江八一农垦大学兽医病理学实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 参照吕思文等^[10]进行引物设计,委托生工生物工程(上海)股份有限公司进行引物合成(表 1)。

收稿日期:2022-01-21

基金项目:黑龙江省大学生创新创业项目(202110223068);黑龙江八一农垦大学三纵科研支持计划青年创新人才项目(ZRCQC202103)。

第一作者:于涵(2000—),女,本科生,专业方向为奶牛腐蹄病综合防控技术研发。E-mail:1178416907@qq.com。

通信作者:贺显晶(1985—),女,博士,副教授,从事动物厌氧菌疾病的综合防治研究。E-mail:xianjinghe@126.com。

表 1 引物信息

目的片段	引物序列(5'-3')	扩增位置	片段大小/bp
43K OMP-1	F:TCTGGATCCGAAGTGATGCCTGCTCCTATG	55~324	270
	R:ATTCTCGAGTTAGTTTACAGAAGCTTTTGT		
43K OMP-2	F:GCTGGATCCAACTTCACTGAAAATCAAAAT	301~597	297
	R:TGACTCGAGTTATTCTAATGCAGTTGTTTT		
43K OMP-3	F:ACTGGATCCGAAATTGGTCCTTCATATAAA	574~879	306
	R:TTTCTCGAGTTACCAGAAAGTTTCATATTC		
43K OMP-4	F:TTAGGATCCGAAACTTTCTGGGCTTGGGAT	847~1134	297
	R:TTCCTCGAGTTAGAAAGTAACCTTCATACC		

1.2.2 细菌培养 将坏死杆菌 A25 菌种解冻后,接种于苜蓿培养基内,在厌氧箱中 37 ℃培养,鉴定后备用,其中气体环境含 80%~85% N₂、10% CO₂、5%~10% H₂。

1.2.3 截短 43K OMP 基因片段原核表达载体的构建及鉴定 使用基因组提取试剂盒提取坏死杆菌菌株的 DNA。以牛坏死杆菌 43K OMP 的 1 个基因截短片段为例,以坏死杆菌 A25 菌株基因组 DNA 为模板扩增目的基因,PCR 反应体系和条件见表 2。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳分析鉴定后进行胶回收,经纯化后的截短片段使用 BamH I 和 XhoI 进行双酶切,回收后双酶切产物的连接体系如下:pET-32a 载体 1 μL,胶回收产物 3 μL,连接 buffer 2 μL,T4 DNA 连接酶1 μL,ddH₂O 13 μL。轻柔混匀后瞬离,16 ℃连接14 h。将连接产物转化到 *E. coli* DH5α 感受态细胞,并在 LB(Amp⁺)固体培养基上培养,挑取单菌落后进行鉴定。将阳性菌落扩大培养后提取质粒测序并进行序列比对分析。

表 2 PCR 反应体系和条件

反应体系 (25 μL)		反应条件	
2 × premix Taq预混酶	12.5 μL	95 ℃	5 min
上游引物	1.0 μL	95 ℃	1 min
下游引物	1.0 μL	54 ℃	1 min
ddH ₂ O	9.5 μL	72 ℃	1 min
模板	1.0 μL	72 ℃	10 min

1.2.4 43K OMP 基因截短片段原核表达及纯化 将 4 个阳性质粒转化入大肠杆菌 BL21(DE3)

感受态细胞中,当阳性菌液 OD₆₀₀ 为 0.6 左右时,加入 IPTG 1 mmol·L⁻¹ 进行诱导表达。收集菌液超微破碎后,将上清和沉淀进行 SDS-PAGE 分析,对目的蛋白条带进行切胶纯化并鉴定。

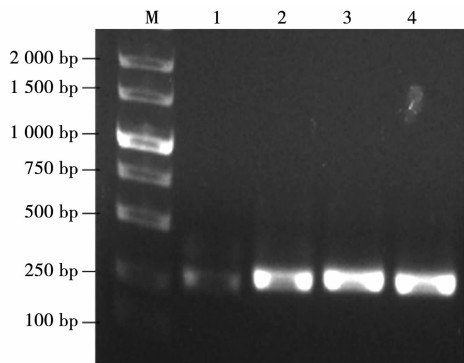
1.2.5 多克隆抗体的制备及效价测定 将纯化的 4 段截短蛋白与弗氏佐剂 1:1 混合,乳化为油包水状态,按照每只家兔 500 μg 的蛋白剂量,皮下多点注射,免疫家兔。首次免疫后 14 d 和 21 d,将截短蛋白与不完全佐剂混合后,进行二免和三免,其中注射剂量和注射方式与首次免疫相同。三免后 7 d 进行家兔心脏取血,分离血清备用。采用间接 ELISA 方法进行多抗效价测定:用 100 μL 的 43K OMP 重组蛋白(1 μg·mL⁻¹)包被 96 孔板,4 ℃过夜;PBST 清洗 3 次,加入 5%脱脂乳,37 ℃封闭 2 h;弃液后 PBST 清洗 3 次,加入稀释的血清样本,37 ℃作用 1 h;弃液后 PBST 清洗 3 次,TMB 显色 15 min 后终止反应,用酶标仪检测的 OD₄₅₀。

1.2.6 多克隆抗体特异性的检测 天然 43K OMP 经 SDS-PAGE 电泳后,将蛋白条带转至 PVDF 膜上,经 5%脱脂乳封闭后,用制备的多抗 4 ℃孵育过夜;PBST 清洗后,加入 HRP-山羊抗兔 IgG 为二抗(1:1 000),室温孵育 1 h;PBST 清洗后避光显色后利用凝胶成像系统照胶观察。

2 结果与分析

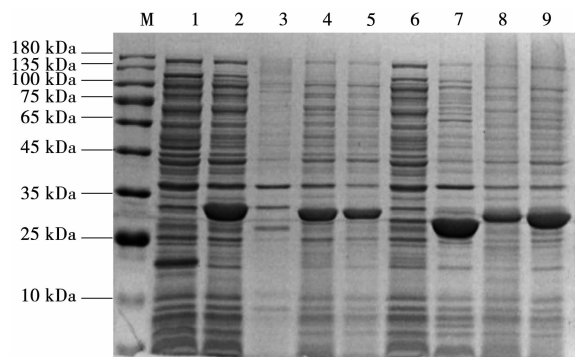
2.1 截短 43K OMP 基因片段的原核表达 琼脂糖凝胶电泳结果显示,成功扩增出 4 个目的片段,大小分别为 270,297,306 和 297 bp,与

预期片段大小一致(图 1)。4 个截短片段经转化后,阳性菌质粒测序结果与设计序列完全一致。阳性菌诱导表达后,截短片段大小分别为 32,30,28 和 30 kDa,且 43K OMP-1 在上清中表达,43K OMP-3 在沉淀中表达,而 43K OMP-2 和 43K OMP-4 在上清和沉淀中均有表达(图 2)。



M. DNA marker DL 2000;1. 43K OMP-1;2. 43K OMP-2;
3. 43K OMP-3;4. 43K OMP-4。

图 1 截短片段的 PCR 扩增结果



M. 蛋白 Marker;1. pET-32a;2. pET-32a-1 菌液上清;
3. pET-32a-1 菌液沉淀;4. pET-32a-2 菌液上清;5. pET-32a-2
菌液沉淀;6. pET-32a-3 菌液上清;7. pET-32a-3 菌液沉淀;
8. pET-32a-4 菌液上清;9. pET-32a-4 菌液沉淀。

图 2 截短片段的原核表达结果

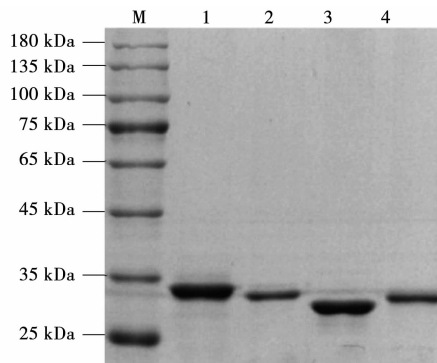
2.2 43K OMP 截短蛋白纯化结果

重组截短蛋白纯化结果显示,纯化蛋白为单一条带,蛋白大小分别为 32,30,28 和 30 kDa,与目的蛋白大小相符(图 3)。

2.3 多克隆抗体的效价及特异性检测

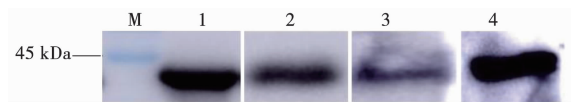
间接 ELISA 方法检测 4 段截短表达蛋白制备的多克隆抗体,其效价分别为 1:25 600、1:51 200、1:25 600 和 1:51 200。同时,制备的多克隆抗体均能识别天然 43K OMP,与 43K OMP

进行特异性结合(图 4)。



M. 蛋白 Marker;1. 43K OMP-1 重组蛋白;2. 43K OMP-2
重组蛋白;3. 43K OMP-3 重组蛋白;4. 43K OMP-4 重组蛋白。

图 3 截短蛋白的纯化结果



M. 蛋白 Marker;1. 43K OMP-1 多抗;2. 43K OMP-2 多抗;
3. 43K OMP-3 多抗;4. 43K OMP-4 多抗。

图 4 多克隆抗体的 Western blot 结果

3 讨论

坏死杆菌是革兰氏阴性厌氧多形性细菌,是人和动物坏死性化脓性疾病的主要致病原之一,在牛、羊等反刍动物中以腐蹄病和肝脓肿最为常见^[11-13]。坏死杆菌的毒力因子主要包括:白细胞毒素、溶血素、内毒素、蛋白水解酶、黏附因子等^[14],这些毒力因子在细菌侵入机体、黏附宿主细胞、逃避机体天然防御以及形成坏死性感染等方面发挥着重要的作用。研究初期,人们发现坏死杆菌白细胞毒素对家兔、绵羊的白细胞和牛的外周血白细胞有很强的毒性作用^[15-16],其溶血素对白细胞也具有毒性作用,但不同物种对其敏感性不同,以兔红细胞最为敏感^[17]。因此,长期以来,白细胞毒素和溶血素一直作为坏死杆菌病防治的重要候选抗原,并进行了深入的研究^[18-19],尽管这两种蛋白在一定程度上抑制了如腐蹄病、乳房炎等坏死杆菌病的发生^[20],但其临床效果远远不够,因此,有必要对坏死杆菌的其他功能蛋白进行拓展性研究,以明确坏死杆菌的致病机制,有效防治坏死杆菌病的发生。

OMPs 是革兰氏阴性细菌外膜的主要成分,占外膜的 50%,在细菌与外界环境之间的沟通中

起到桥梁作用,受到研究人员的广泛关注。许多革兰氏阴性菌的 OMPs 能介导细菌与宿主细胞的黏附^[21-22],除此之外细菌的 OMPs 具有免疫原性且能诱导保护性免疫反应,因此研究并开发 OMPs 基因工程疫苗具有十分广阔的应用前景^[23]。前期研究发现,坏死杆菌不同亚种间外膜蛋白有所不同,在 *Fnn* 亚种 (subsp. *necrophorum*) 中最显著的是大小为 40 kDa 的蛋白,在 *Fnf* 亚种 (subsp. *funduliforme*) 中最显著的是大小为 37.5 kDa 的蛋白^[24]。此外,徐晶等^[25]在鹿源坏死杆菌中提取了一个大小为 44.5 Ku 的蛋白,并发现其有就较好的免疫原性。2013 年, Sun 等^[7]发现 43K OMP 后,有研究人员用坏死杆菌感染重组 43K OMP 免疫过的小鼠,发现 43K OMP 对小鼠具有免疫保护作用。随后 He 等^[26]研究证明,43K OMP 可以黏附 BHK-21 细胞,并利用免疫共沉淀试验,筛选出了 70 个疑似差异蛋白。由此可知,43K OMP 在坏死杆菌感染机体的过程中,发挥着重要黏附作用,由于其对机体有很好的免疫保护作用,已经成为基因工程疫苗的候选抗原之一。

原核表达系统能在短时间内获得大量目的蛋白,其成本低廉、培养简单、耗时短,是生物科学研究中的重要技术。本研究采用原核表达技术,构建了 4 个原核表达载体,并以 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞作为表达菌,对目的基因进行原核表达。本研究构建了 43K OMP 的 4 个截短表达载体,并成功表达了 4 个截短重组蛋白。由于表达的蛋白有的在上清表达,有的在沉淀表达,故采取切胶纯化方法纯化蛋白以获得大量抗原,并制备多克隆抗体^[27]。且制备的 43K OMP-1、43K OMP-2、43K OMP-3 和 43K OMP-4 抗体的效价分别为 1:25 600 和 1:51 200、1:25 600、1:51 200,并用天然 43K OMP 检测其反应原性,结果表明 4 段坏死杆菌截短 43K OMP 多克隆抗体都具有良好的反应原性,为后续坏死杆菌 43K OMP 功能的研究及坏死杆菌致病机理的探索提供依据,也为坏死杆菌基因工程疫苗的研究奠定了基础。

4 结论

本研究构建 4 个坏死杆菌 43K OMP 基因截

短片段的原核表达载体,表达 43K OMP 的 4 个截短基因片段,同时制备了 4 个截短 43K OMP 的多克隆抗体,抗体效价分别为 1:25 600、1:51 200、1:25 600 和 1:51 200。

参考文献:

- [1] PILLAI D K, AMACHAWADI R G, BACA G, et al. Leukotoxic activity of *Fusobacterium necrophorum* of cattle origin[J]. *Anaerobe*, 2019, 56: 51-56.
- [2] MENON S, PILLAI D K, NARAYANAN S. Characterization of *Fusobacterium necrophorum* subsp. *necrophorum* outer membrane proteins[J]. *Anaerobe*, 2018, 50: 101-105.
- [3] FRANCIS A M, JEON S J, CUNHA F, et al. Draft genome sequences of two *Fusobacterium necrophorum* strains isolated from the uterus of dairy cows with metritis[J]. *Microbiology Resource Announcements*, 2019, 8 (17): e00201-19.
- [4] 祁世荣. 奶牛五种恶性乳房炎诊治总结[J]. *中国奶牛*, 1999 (2): 44-46.
- [5] 任士飞, 徐建生, 董国雄, 等. 细菌黏附研究进展[J]. *中国预防兽医学报*, 2004, 26(3): 238-240.
- [6] KUMAR A, PETERSON G, NAGARAJA T G, et al. Outer membrane proteins of *Fusobacterium necrophorum* subsp. *necrophorum* and subsp. *funduliforme*[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2014, 54(8): 812-817.
- [7] SUN D, ZHANG H, LV S, et al. Identification of a 43-kDa outer membrane protein of *Fusobacterium necrophorum* that exhibits similarity with poreforming proteins of other *Fusobacterium* species[J]. *Journal of Medical Microbiology*, 2013, 95(1): 27-33.
- [8] KUMAR A, GART E, NAGARAJA T G, et al. Adhesion of *Fusobacterium necrophorum* to bovine endothelial cells is mediated by outer membrane proteins [J]. *Veterinary Microbiology*, 2012, 162(2-4): 813-818.
- [9] 蒋剑成, 张思瑶, 汪锋锋, 等. 牛坏死杆菌 43 kDa OMP 对小鼠免疫效果的评价[C]//中国畜牧兽医学学会兽医病理学分会第二十四次学术研讨会, 中国病理生理学会动物病理生理学专业委员会第二十三次学术研讨会, 中国实验动物学会实验病理学专业委员会第三次学术研讨会, 中国兽医病理学家第三次学术研讨会论文集, 2018: 41.
- [10] 吕思文, 张红, 孙东波, 等. 牛坏死杆菌 43ku 外膜蛋白截短片段的原核表达[J]. *中国畜牧兽医*, 2014, 41(4): 56-61.
- [11] RIORDAN T. Human Infection with *Fusobacterium necrophorum* (Necrobacillosis), with a focus on Lemierre's Syndrome[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2007, 20(4): 622.
- [12] JOLOBE O M P. *Fusobacterium necrophorum* hepatic abscess and colorectal cancer[J]. *The American Journal of Medicine*, 2020, 133(7): e392.

- [13] NAGARAJA T G, NARAYANAN S K, STEWART G C, et al. *Fusobacterium necrophorum* infections in animals: Pathogenesis and pathogenic mechanisms[J]. *Anaerobe*, 2005, 11(4): 239-246.
- [14] UMANA A, SANDERS B E, YOO C C, et al. Utilizing whole *Fusobacterium* genomes to identify, correct, and characterize potential virulence protein families[J]. *Journal of Bacteriology*, 2019, 201(23): 1-20.
- [15] LUDLAM H A, MILNER N J, BRAZIER J S, et al. lktA-encoded leukotoxin is not a universal virulence factor in invasive *Fusobacterium necrophorum* infections in animals and man [J]. *Journal of Medical Microbiology*, 2009, 58(4): 529-530.
- [16] TADEPALLI S, STEWART G C, NAGARAJA T G, et al. Human *Fusobacterium necrophorum* strains have a leukotoxin gene and exhibit leukotoxic activity[J]. *Journal of Medical Microbiology*, 2008, 57(2): 225.
- [17] KWAKU A K, YOSHITAKA G, NAOAKI M, et al. The erythrocyte receptor for *Fusobacterium necrophorum* hemolysin: Phosphatidylcholine as a possible candidate[J]. *Fems Microbiology Letters*, 1998(1): 65.
- [18] 吕思文, 张虹, 郭东华. 牛羊坏死杆菌保护性抗原的筛选与鉴定[C]//中国畜牧兽医学会, 中国病理生理学会. 2013年中国畜牧兽医学会兽医病理学分会暨中国病理生理学会动物病理生理学专业委员会学术研讨会论文集, 2013: 296-301.
- [19] MACHADO V S, BICALHO M L D S, ROSSI R, et al. Subcutaneous immunization with inactivated bacterial components and purified protein of *Escherichia coli*, *Fusobacterium necrophorum* and *Trueperella pyogenes* prevents puerperal metritis in holstein dairy cows[J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): 91734-91734.
- [20] 郭东华, 王君伟, 孙玉国, 等. 牛腐蹄病坏死梭杆菌菌株白细胞毒素基因的原核表达及其免疫活性分析[J]. *中国预防兽医学报*, 2007, 29(6): 435-438.
- [21] NAKAGAKI H, SEKINE S, TERA O Y, et al. *Fusobacterium nucleatum* envelope protein FomA is immunogenic and binds to the salivary statherin-derived peptide[J]. *Infection & Immunity*, 2010, 78(3): 1185-1192.
- [22] GLAZER S, SOL A, ABED J, et al. Fap2 of *Fusobacterium nucleatum* is a galactose inhibitable adhesin, involved in coaggregation, cell adhesion and preterm birth[J]. *Infection & Immunity*, 2015, 83(3): 1104-1113.
- [23] 朱必凤, 杨旭夫, 彭凌, 等. 副猪嗜血杆菌外膜蛋白的免疫原性[J]. *中国兽医学报*, 2013, 33(6): 838-842, 848.
- [24] KUMAR A, PETERSON G, NAGARAJA T G, et al. Outer membrane proteins of *Fusobacterium necrophorum* subsp. *necrophorum* and subsp. *funduliforme*[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2014, 54(8): 812-817.
- [25] 徐晶, 陈立志, 李淑艳, 等. 坏死梭杆菌 44.5 ku 外膜蛋白的免疫原性分析[J]. *中国兽医科学*, 2016(4): 512-515.
- [26] HE X, WANG L, LI H, et al. Screening of BHK-21 cellular proteins that interact with outer membrane protein 43K OMP of *Fusobacterium necrophorum*[J]. *Anaerobe*, 2020, 63: 102184.
- [27] HE X J, JIANG K, XIAO J W, et al. Interaction of 43K OMP of *Fusobacterium necrophorum* with fibronectin mediates adhesion to bovine epithelial cells[J]. *Veterinary Microbiology*, 2022, 266: 109335.

Expression and Polyclonal Antibody Preparation of Truncated 43K OMP Protein from *Fusobacterium necrophorum*

YU Han, WANG Li-na, GUO Dong-hua, HE Xian-jing

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China)

Abstract: In order to prepare the polyclonal antibody of *Fusobacterium necrophorum*, so as to promote the research of genetic engineering vaccine from *Fusobacterium necrophorum*, the study used A25 gene DNA as template to amplify four fragments of 43K OMP gene overlap each other, and constructed prokaryotic expression vector. The purified protein was immunized to rabbits by prokaryotic expression system of *E. coli*, and then the polyclonal antibody was prepared and identified. The results showed that the truncated 43K OMP proteins were successfully expressed, and the length of the truncated protein size was 32 kDa, 30 kDa, 28 kDa and 30 kDa respectively. The polyclonal antibodies 43K OMP-1, 43K OMP-2, 43K OMP-3 and 43K OMP-4 prepared by the protein were 1:25 600, 1:51 200, 1:25 600, 1:51 200. The prepared antibody can recognize natural 43K OMP, which lays a foundation for the research of genetic engineering vaccine of *Fusobacterium necrophorum*.

Keywords: *Fusobacterium necrophorum*; 43K OMP; prokaryotic expression; polyclonal antibody