

利用 SOE-PCR 与 TD-PCR 技术对气肿疽梭菌 *Flia(C)-NanA* 融合基因扩增方法的构建

李香春¹, 金鑫^{1*}, 朴春宇², 金成德³, 朴春实⁴ (1. 延边大学农学院动物医学系, 吉林延吉 133000; 2. 延吉市动物卫生检疫站, 吉林延吉 133000; 3. 吉林省晖春畜牧管理局, 吉林晖春 133000; 4. 吉林省珲春市动物卫生监督所, 吉林晖春 133300)

摘要 [目的] 构建联合表达气肿疽梭菌的鞭毛蛋白与分泌蛋白神经氨酸酶的方法, 用以制备气肿疽生物工程亚单位疫苗。[方法] 根据已公布的气肿疽梭菌 *Flia(C)* 和 *NanA* 序列设计引物, 联合使用 SOE-PCR 与 TD-PCR 技术, 建立融合基因 *Flia(C)-NanA* 的扩增方法。[结果] 试验成功扩增出了融合基因 *Flia(C)-NanA*。[结论] SOE-PCR 方法无需在引物设计中加入酶切位点进行连接, 降低了试验成本, 且 2 个基因间未加入其他核酸序列, 避免了表达出影响免疫效果的蛋白; TD-PCR 的应用节省了试验时间, 避免了筛选退火温度的繁琐步骤, 解决了基因丢失的问题。

关键词 气肿疽梭菌; 融合基因; SOE-PCR; TD-PCR

中图分类号 S188 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2013)24-09921-03

A Method Construction of Amplification Fusion Gene *Flia(C)-NanA* of *Clostridium chauvoei* by SOE-PCR and TD-PCR Technology
LI Xiang-chun et al (Veterinary Medicine Department, Agricultural College, Yanbian University, Yanji, Jilin 133000)

Abstract [Objective] In order to prepare gene engineering vaccines of blackleg, a method to combined express flagellin and secretory protein neuraminidase of *Clostridium chauvoei* was constructed. [Method] According to the published *Flia(C)* and *NanA* sequences of *C. chauvoei*, the primers were designed. Then using SOE-PCR combined with TD-PCR technology, the amplified method of fusion gene *Flia(C)-NanA* was constructed. [Result] The fusion gene *Flia(C)-NanA* was amplified successfully. [Conclusion] The SOE-PCR method without restriction sites to connect in the primer design, reduced the cost of the experiment, and between the two genes did not join the other nucleic acid sequences, to avoid the expression of protein affected immune effect; the application of TD-PCR saved the test time, and could avoid tedious steps for screening of annealing temperature and the gene loss problem.

Key words *Clostridium chauvoei*; Fusion gene; SOE-PCR; TD-PCR

气肿疽梭菌(*Clostridium chauvoei*)又名肖氏梭菌、费氏梭菌,俗称黑腿病杆菌,为细菌纲芽孢杆菌科梭菌属的专性厌氧菌^[1-2],是原先被认为是反刍动物细菌性传染病——气肿疽的病原菌。该病又称黑腿病(black leg)或鸣疽,被国际兽医局评为第三类传染病,是一种急性、热性传染病,以发病急、传播速度快和反复性为重要特征,往往来不及治疗就会导致病畜死亡^[3]。在中国可见的报道中,气肿疽几乎每年都有新的病例报告,尤其是老疫区,给我国的畜牧业带来严重的经济损失。美国和日本 2 例人感染气肿疽死亡的病例,使气肿疽给人类的健康也带来了可怕的威胁^[4]。

目前,国内外对于气肿疽的研究并不多,对于气肿疽疫苗研究也局限于传统的灭活苗和弱毒苗,这两者虽然免疫效果较为理想,但副作用大,易导致人工造病^[5];另外,在疾病的检测上,无法区分感染动物和免疫动物。而气肿疽基因工程苗方面的研究还未见报道。NCBI 上已发表的气肿疽梭菌的序列有:鞭毛基因 *Flia(C)*、神经氨酸酶基因 *NanA*、细胞毒素基因 *CctA*、质粒基因、三磷酸腺苷基因、*Spo0A* 蛋白基因、16S rRNA、23S rRNA,其中可作为基因工程苗候选基因的有鞭毛基因 *Flia(C)*、神经氨酸酶基因 *NanA* 和细胞毒素基因 *CctA*。该试验选择前 2 个基因进行串联,这是因为鞭毛蛋白是气肿疽梭菌的重要抗原,但鞭毛蛋白的提取对试验条件要求高,程序复杂,相比之下,体外表达蛋白更易获得^[6]。根据

气肿疽发病迅速的特点,有学者推测这可能与气肿疽梭菌能产生神经氨酸酶有关^[7]。将鞭毛蛋白和神经氨酸酶作为基因工程疫苗的候选抗原,则对气肿疽病的防治是一种双保险,即使单一鞭毛蛋白疫苗的保护力不能阻止细菌的入侵,加之神经氨酸酶疫苗的保护,会大幅降低气肿疽梭菌扩散的速度,为治疗赢得宝贵的时间。

SOE-PCR 即重叠延伸 PCR,该技术利用 PCR 的方法将 2 个不同来源的基因拼接在一起^[8-10]。TD-PCR 即降落 PCR,是利用逐渐降低退火温度来扩增目的片段的方法。该方法避免了对退火温度的筛选,对于扩增不稳定的基因是个很好的方法。笔者主要采用这 2 种方法对气肿疽梭菌 *Flia(C)-NanA* 融合基因进行扩增。

1 材料与方法

1.1 材料 气肿疽梭菌标准株 *C*_{54.1},购自中国药品检验所,由延边大学农学院预防兽医实验室保存;*Ex Taq* DNA 聚合酶、DNA Marker 15 000 均购自 TaKaRa 公司,其他试剂为进口或国产分析纯。

1.2 引物的设计与合成 根据 GenBank 中已公布的气肿疽梭菌的 *Flia(C)* 和 *NanA* 基因序列,在蛋白分析网站进行蛋白三级结构的分析^[11-12],根据分析结果,截取 2 个基因的部分基因应用引物设计软件 Primer 5.0 设计以下引物: A1 和 A2 是 *Flia(C)* 的引物, A2 虚线部分为 *NanA* 基因引物序列, B1 和 B2 是 *NanA* 的引物, B1 直线部分为 *Flia(C)* 基因引物序列(图 1)。

1.3 核酸 DNA 的提取 使用酚-氯仿抽提法^[13]提取气肿疽梭菌核酸 DNA。

1.4 TD-PCR 程序设计 *Flia(C)* 基因 TD-PCR 程序设计

作者简介 李香春(1988-),女,吉林白山人,硕士研究生,研究方向:动物传染病, E-mail: liyuning@126.com。* 通讯作者,副教授,从事动物传染病方面的研究, E-mail: jinxin@ybu.edu.cn。

收稿日期 2013-07-14

A1: 5'-GCAGGTAAGTCAATGA-3'; A2: 5'-AATAGCCATAATCTCTTTTACTTGCCAGCACTCATGT-3'
 B1: 5'-ACATGAGTCTGCAAGTAAAAAGAAGATTATGCTATT-3'
 B2: 5'-TTCCTTTGCTGAGTTTCAC-3'

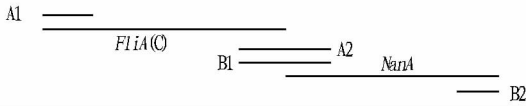


图1 各引物扩增方式

为:95℃预变性10 min;95℃变性30 s,56℃退火,每个循环降低1℃,72℃延伸30 s,进行13个循环,退火温度降至44℃,再进行17个循环。*NanA*基因的退火时间改为1 min,*FliA(C)-NanA*融合基因的退火时间为90 s。

1.5 SOE-PCR 程序设计 以气肿疽梭菌核酸DNA为模板,分别以A1和A2、B1和B2为引物扩增*FliA(C)*、*NanA*。不经凝胶回收,直接以两组PCR产物为模板,A1和B2为引物进行融合基因*FliA(C)-NanA*目的片段的扩增。

2 结果与分析

2.1 三级结构分析结果 气肿疽梭菌*FliA(C)*开放阅读框的氨基酸序列分析(图2)显示,羧基端鞭毛活性区域在第960~1188个碱基之间;胺基端鞭毛活性区域在第81~486个碱基之间。

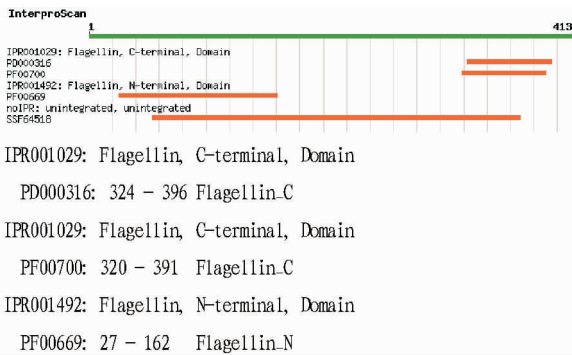


图2 *FliA(C)*开放阅读框的氨基酸序列分析

气肿疽梭菌*NanA*基因开放阅读框的氨基酸序列分析(图3)显示,羧基端171~558有2个凝血因子活力区;在570~1110碱基处有一个糖苷水解酶家族,并且有唾液酸酶活力,1305~1428碱基处,有4个糖苷水解酶活力区;在93~552碱基处有类似半乳糖结合位点;在567~1113碱基处有刀豆蛋白样葡萄糖凝集素;1152~2310碱基序列为唾液酸酶活力区。

2.2 引物设计结果 根据三级结构分析结果,截取*FliA(C)*67~495碱基处进行引物设计,目的片段长度为429 bp。截取*NanA*7~1119 bp处序列进行引物设计,目的片段长度为1113 bp。

2.3 目的基因扩增结果 气肿疽梭菌*FliA(C)*、*NanA*及融合基因*FliA(C)-NanA*的PCR扩增结果见图4和图5。

3 讨论

试验截取了气肿疽梭菌*FliA(C)*、*NanA*的部分片段来进行扩增,原因有2个:①根据推测,来选择免疫活力区,剔除多余部分,以减少蛋白间的相互影响;②因为将2个基因

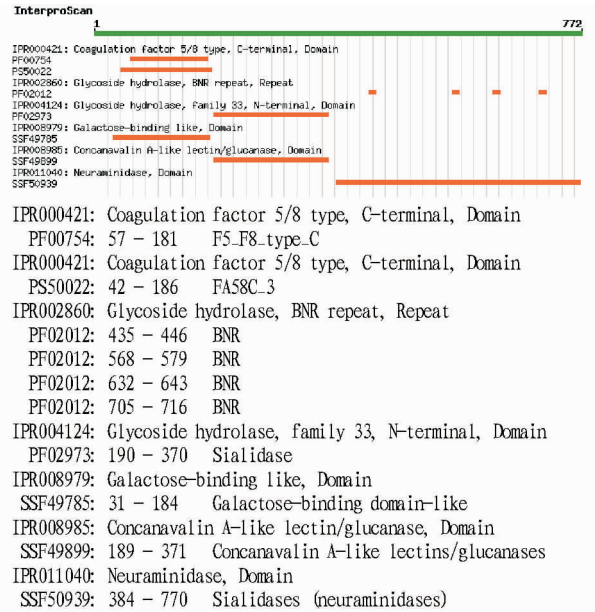
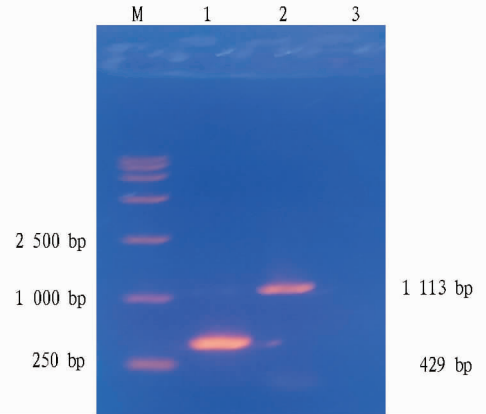
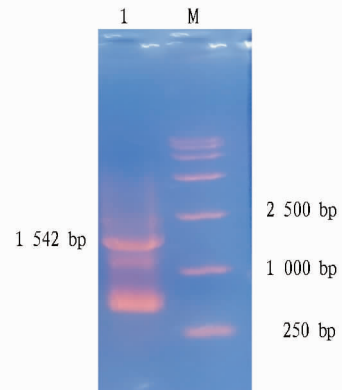


图3 *NanA*开放阅读框的氨基酸序列分析



注:M. DNA分子量标准;1. *FliA(C)*基因的PCR产物;2. *NanA*基因的PCR扩增产物;3. 水对照。

图4 气肿疽梭菌*FliA(C)*与*NanA*目的片段的PCR扩增结果



注:M. DNA分子量标准;1. 融合基因*FliA(C)-NanA* PCR扩增产物。

图5 气肿疽梭菌融合基因*FliA(C)-NanA*目的片段的PCR扩增结果

进行串联,目的是为了表达目的基因,而目的基因过长,不利于表达的进行^[14-17]。试验扩增目的片段采用降落PCR的方

法,是因为在使用普通 PCR 程序进行试验的过程中,发现这 2 个基因,无论是完整的开放阅读框,还是截取的短片段目的基因都存在一个不稳定的状态,即在相同药品、相同仪器、相同程序并保证没有试验操作错误的前提下,从前能够扩增出的目的片段会在一个时间点后扩增不出来;或用 *rTaq* DNA 聚合酶筛选退火温度后,更换 *Ex Taq* DNA 聚合酶目的片段也会“消失”。而降落 PCR 虽然在程序的设定上较为麻烦,但省去了退火温度筛选的步骤,而且解决了目的片段突然消失的问题。该试验也存在缺点,即 SOE-PCR 的融合 PCR 时,出现了杂带,这有可能是由于引物设计不够完善,提高最高退火温度可能会改善,但这并不影响后续的凝胶回收或克隆表达的试验。

气肿疽的发病地区呈顽固性,因气肿疽梭菌有芽孢,抵抗力强,存在于土壤中,很难将其彻底消灭^[18]。而且此病发病急,死亡率高,未经治疗死亡率达 100%^[19]。据此可得出,控制或消灭该传染病的最好方法即预防。现有的疫苗为灭活苗和弱毒苗,这些传统疫苗存在保护率低、安全性差、副作用大等弊端^[20],所以,在生物工程高速发展的今天,人们有条件制备气肿疽的生物工程疫苗,以减少该病在畜牧业中带来的损失。*NanA* 基因全长 2 519 kb,编码 772 个氨基酸,编码蛋白为唾液酸酶,该蛋白与疾病的传播及病原体的定殖息息相关,且在气肿疽的感染过程中,与病程的快速发展也有着极其重要的关系。因此此基因表达的蛋白有可能延长病程,减慢气肿疽梭菌在体内的繁殖速度,从而为治疗该病争取时间,另一方面鞭毛蛋白是气肿疽梭菌的重要抗原,在细菌侵染的初期就会对机体起到保护作用。这样神经氨酸酶和鞭毛蛋白 2 种重要抗原所制备疫苗的双重保护,为气肿疽的控制增加了新希望。该试验为制备气肿疽的双表达亚单位疫苗奠定了基础,为疫苗的制备提供了理论依据。

参考文献

- [1] 丁宜宝. 兽用疫苗学[M]. 北京:中国农业出版社,2008:468-470.
- [2] 陆承平. 兽医微生物学[M]. 北京:中国农业出版社,2007:197-198.
- [3] 陈博言. 兽医传染病学[M]. 北京:中国农业出版社,2006:302-304.
- [4] NAGANO N, ISOMINE S, KATO H, et al. Human Fulminant Gas Gangrene

(上接第 9913 页)

提取结果都比较理想。该方法还可用于冷冻植物材料的 DNA 提取。对于一些次生代谢产物较多的植物材料,研磨时可适量加一些 PVP,防止褐化^[1-2],还可有效去除多糖^[3-4],可获得高质量的 DNA。

参考文献

- [1] 邓力超,邱道寿,屠乃美,等. PVP 对烟草基因组 DNA 提取的影响[J]. 广东农业科学,2009(5):37-39.
- [2] 陈瑾,迪丽拜尔·托乎提,郭卫东. 五种提取草珊瑚叶片总 DNA 方法的比较研究[J]. 新疆师范大学学报:自然科学版,2008,27(1):87-89.
- [3] 孔德政,刘芝平,田云芳. 改良 CTAB 法对碗莲叶片基因组 DNA 提纯效

- Caused by *Clostridium chauvoei* [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2008,46(4):1545-1547.
- [5] 金鑫,鲁承,许玲玲,等. 气肿疽灭活苗的制造[J]. 延边大学学报,1998(5):31.
- [6] MAYUML,蒋玉文. 抗气肿疽梭菌鞭毛单克隆抗体的生产鉴定及保护作用[J]. *Infection and Immunity*,1987,55(8):1779-1783.
- [7] VILEI E M, JOHANSSON A, SCHLATTER Y, et al. Genetic and functional characterization of the *NanA* sialidase from *Clostridium chauvoei* [J]. *Veterinary Research*,2001,42(2):1186-1297.
- [8] 谷铁军,张凤羽,段治,等. SOE-PCR 合成狂犬病毒单链抗体基因 Fv57 [J]. *生物技术*,2011,21(3):36-39.
- [9] 张艳丽,张文卿,徐腾飞,等. 利用 SOE-PCR 技术构建 *eglAp-rhIL-12* 融合基因的条件优化[J]. *青岛大学医学院学报*,2012,48(2):101-104.
- [10] 钟志成,黎斌耀,朱利,等. 一种可用于多 DNA 片段连接的新 SOE-PCR 方法[J]. *热带医学杂志*,2010,10(3):253-257.
- [11] ARNOLD K, BORDOLI L, KOPP J, et al. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modeling [J]. *Bioinformatics*,2006,22:195-201.
- [12] ZDOBNOV E M, APWEILER R. InterProScan - an integration platform for the signature - recognition methods in InterPro [J]. *Bioinformatics*, 2001,17(9):847-848.
- [13] 张维铭. 现代分子生物学实验手册[M]. 北京:科学出版社,2008:78-79.
- [14] 智海东,王云峰,陈洪岩. 我国兽用基因工程研发现状与策略[J]. *动物医学进展*,2011,32(6):174-178.
- [15] 段翠兰. 溶藻弧菌外膜蛋白的抗原性分析及其亚单位疫苗的研制[D]. 湛江:湛江海洋大学,2004.
- [16] 冯胜军,孙万邦. 空肠弯曲杆菌亚单位抗原研究概况及进展[J]. *遵义医学院学报*,2003,26(1):84-88.
- [17] 代雅. 抗 TIR-scFv-EGFP 融合蛋白的构建,表达及特异性研究[D]. 武汉:华中科技大学,2007.
- [18] 马贵平. 气肿疽梭菌毒素的研究[J]. *中国畜禽传染病*,1991(2):46-49.
- [19] HALM A, WAGNER M, JOSEF KÖFER, et al. Novel Real - Time PCR Assay for Simultaneous Detection and Differentiation of *Clostridium chauvoei* and *Clostridium septicum* in Clostridial Myonecrosis [J]. *Journal of Clinical Microbiology*,2010,48(4):1093-1098.
- [20] 韩雪清,刘湘涛. 基因工程疫苗的研究进展[J]. *中国兽医科技*,2003,33(5):1133-1136.
- [21] LIU S Z, ZHANG M, TANG X, et al. Transformation of *Arabidopsis* by Rice *OsWRKY78::GFP* Fusion Gene and Subcellular Localization of *OsWRKY78* Protein [J]. *Agricultural Science & Technology*,2012,13(7):1395-1398.
- [22] 邱道寿,刘晓津,王军,等. TAT PTD - Tachyplesin 融合基因的重叠延伸 PCR 法合成[J]. *安徽农业科学*,2013,41(4):1438-1441.
- [23] 刘佳,黄丛林,吴忠义,等. TAV-CP/CVB-CP/CChMvd 基因片段的融合及其 RNAi 载体的构建[J]. *华北农学报*,2013(1):106-111.

果的影响[J]. *沈阳农业大学学报*,2005,36(4):428-431.

- [4] HU Y C, SUN Z H, WANG J, et al. Comparison on Four Extraction Methods of Genomic DNA from *Clematis fasciculiflora* Franch [J]. *Agricultural Science & Technology*,2011,12(10):1420-1423.
- [5] HU Y C, SUN Z H, WANG J, et al. Comparison on four extraction methods of genomic DNA from *Clematis fasciculiflora* Franch [J]. *Agricultural Science & Technology*,2011,12(10):1420-1423.
- [6] 王仕玉,郭凤根,刘芸君,等. 云南岩白菜资源的 DNA 提取和 ISSR 引物筛选[J]. *华北农学报*,2012(S1):24-26.
- [7] 张楠,谢放. 高质量加工番茄基因组 DNA 提取方法的改进[J]. *湖南农业科学*,2011(15):16-17,20.