

贺容,张生珍,王超,等.羊种布氏杆菌3型 *Omp25* 基因序列及其表达蛋白生物信息学分析[J].江苏农业科学,2016,44(4):25-28.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.04.007

羊种布氏杆菌3型 *Omp25* 基因序列及其表达蛋白生物信息学分析

贺容¹,张生珍¹,王超¹,刁正鹏¹,薛红梅²,徐立青²,李增魁¹

(1.青海大学农牧学院动物医学系,青海西宁810000;2.青海省地方病预防控制所,青海西宁810000)

摘要:为进一步研究外膜蛋白 *Omp25* 的结构和功能,以羊种布氏杆菌3型青海省海晏县自然株为研究对象,通过基因的克隆测序,采用生物信息学方法对外膜蛋白 *Omp25* 基因及其编码的氨基酸序列的理化性质、分子结构、分子表面可能性、柔韧性、亲水性、抗原指数、B细胞抗原表位进行了详细分析。结果显示:羊种布氏杆菌3型 *Omp25* 分子一级结构的氨基酸序列的各项参数存在5段共同区段,其中59~74、93~112、182~202位氨基酸的各项生物信息学参数尤为突出,是其B细胞表位优势区的可能性很大。

关键词:羊种布氏杆菌3型;*Omp25*基因;序列测定;生物信息学分析

中图分类号:S855.99 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)04-0025-03

羊布氏杆菌病是由布氏杆菌(*Brucella*)引起的一种人畜共患传染病,该病在全球范围内流行^[1],临床特征为慢性疲劳、波浪热、生殖系统损坏及全身性疾病^[2]。青海省是人、畜见布氏杆菌病的高发区,1954年青海省首次分离出布氏杆菌,到2000年省内布氏杆菌病得到有效控制,并且达到国家颁布的布氏杆菌病“控制区”标准^[3],但是2006年该病疫情呈回升状态^[4]。虽然目前针对该病的疫苗已经存在,但是由于疫苗使用不当造成布氏杆菌感染家畜或人的事件时有发生^[5],可见其保护率、安全性均很低。

布氏杆菌外膜蛋白(outer membrane proteins) *Omp25*/*Omp31* 家族免疫原性强,可诱导免疫动物产生高滴度特异性抗体,纯化蛋白可用于布鲁菌病的诊断^[6]。由于布氏杆菌的外膜蛋白(OMP)暴露于S菌的表面,不仅能与IgG抗体发生反应,而且还可以引起保护性免疫反应,一直被作为研究的重点^[7]。本研究采用羊种布氏杆菌3型青海省海晏县自然野毒株,对其外膜蛋白 *Omp25* 基因进行克隆,用生物信息学方法对 *Omp25* 基因及其蛋白结构进行了分析和预测,避免试验的盲目性,为大量制备重组 *Omp25* 蛋白及其免疫原性及布氏杆菌多表位疫苗的设计奠定了基础,还可通过试验进一步对比验证其生物学活性,也为布氏杆菌病的诊断、用药及疫苗研究提供线索。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

羊种布氏杆菌3型23号^[8]由青海省地方病预防控制所

徐立青老师惠赠。

1.2 细菌的培养及基因组DNA的提取

将布氏杆菌23号划线于肝浸液固体培养基,生长24h。挑单个菌落置于肝浸液液体培养基,于37℃、200 r/min振荡培养48h,取3mL菌液置于2个1.5mL无菌离心管中,80℃水浴30min,将灭活菌液按照细菌DNA提取试剂盒说明操作,分装后于-20℃冰箱保存备用。

1.3 引物合成

参考GenBank基因编码区序列,结合克隆载体pMD19-T的阅读框,应用Primer 5.0设计羊布氏杆菌 *Omp25* 基因PCR引物,预计其扩增目的片段长度为640bp。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,具体信息见表1。

表1 引物相关信息

序列	长度(bp)	酶切位点
F:5'-GCGAATTCATGCGCACTCTTAAGTC-3'	25	<i>Eco</i> R I
R:5'-GCCTCGAGAGAACTGTAGCCGATG-3'	25	<i>Xho</i> I

1.4 *Omp25* 基因的PCR扩增

PCR反应体系为25μL,其中模板1μL,浓度为10μmol/L的上、下游引物各0.5μL,ddH₂O 10.5μL,2×*Taq* PCR Master Mix(含染料)12.5μL。扩增条件:95℃预变性5min;94℃45s,55℃50s,72℃1min,32个循环;72℃延伸10min。反应完毕后,取10μL反应液在1%琼脂糖凝胶中电泳,检查扩增结果。

1.5 *Omp25* 基因克隆载体的构建

Omp25 基因PCR产物经胶回收试剂盒回收后与pMD19-T载体于16℃连接3h,连接体系为:0.5μL pMD19-T载体,2μL *Omp25* 基因PCR产物,2.5μL Solution I。取5μL连接产物,转化100μL的DH5α感受态细胞,将转化菌均匀涂布于含异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)、X-gal的LB氨苄青霉素(Amp,100μg/mL)固体培养基上;次日挑白

收稿日期:2015-01-04

基金项目:青海科技厅项目(编号:2013-H-809)。

作者简介:贺容(1990—),女,湖南衡阳人,硕士研究生,主要从事青藏高原畜禽生理学研究。E-mail:qhryhr@126.com。

通信作者:李增魁,硕士,副教授,主要从事动物性食品安全研究。E-mail:lizengku0502@163.com。

色菌落,接种于 3 mL 含氨苄青霉素的液体 LB 培养基中, 37 °C、200 r/min 振荡培养 14 h,按照质粒小量抽试剂盒说明提取质粒;用 *EcoR* I、*Xho* I 双酶切鉴定,挑取阳性克隆,送上海华大基因科技有限公司测序。阳性克隆命名为 pMD19-T-Omp25。

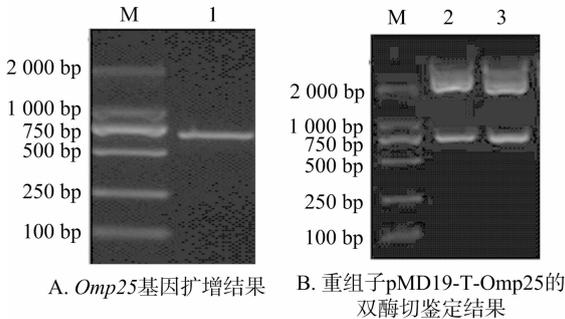
1.6 Omp25 基因抗原表位预测

综合利用 DNAMAN、ProtParam、DANStar、SOPMA、SWISS-MODEL、BepiPred 生物学软件系统对 Omp25 分子的立体结构、分子的亲水性、表面可能性、柔韧性及免疫学特性进行分析。

2 结果与分析

2.1 Omp25 基因扩增结果及克隆后双酶切鉴定结果

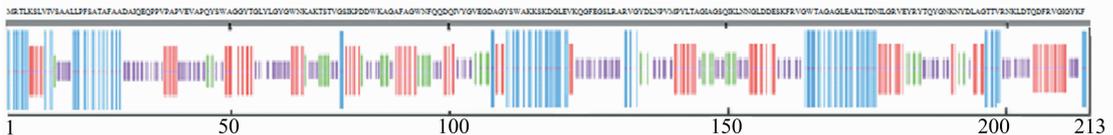
Omp25 基因扩增片段及克隆后双酶切鉴定结果均与预计长度相符,详见图 1。



A. *Omp25* 基因扩增结果 B. 重组子 pMD19-T-Omp25 的双酶切鉴定结果
M—maker DL2000; 1—*Omp25* 基因扩增结果; 2、3—重组子 pMD19-T-Omp25 的双酶切鉴定结果

2.2 *Omp25* 基因的核苷酸序列及其编码的蛋白氨基酸序列
经测序显示,*Omp25* 基因核苷酸序列长为 640 bp,共编码 213 个氨基酸,详见图 2。

2.3 Omp25 蛋白分子抗原表位预测结果



氨基酸位点
蓝色表示 α -螺旋;绿色表示 β -转角;紫色表示无规卷曲;红色表示延伸链
图3 *Omp25* 二级结构预测结果

通过同源建模服务器 SWISS-MODEL 建立 *Omp25* 蛋白的三级结构,由图 4 可见,*Omp25* 分子是一种 β 折叠桶样的蛋白质分子,分子至少含有 8 个跨膜区,其中有 4 个跨膜区暴露于膜外,它是种跨膜脂蛋白分子。

利用 DNASTAR 的 Emini 法分析 *Omp25* 蛋白分子表面的可能性,结果显示:*Omp25* 蛋白溶剂表面可能性较大(表面可及性指数 ≥ 1) 出现在 27~32、57~74、84~107、148~154、177~205 位氨基酸,详见图 5,它们成为分子的抗原表位的可能性较大。

利用 DNASTAR 的 Karplus-Schulz 法预测 *Omp25* 蛋白质分子多肽链骨架区的柔韧性,结果见图 6。结果显示:*Omp25* 分子一级结构的氨基酸序列中的 28~33、48~75、85~119、140~154、168~204 位氨基酸柔韧性较大,表示这段蛋白质肽段的柔韧性较大,它在空间发生扭曲、折叠的概率高,能够

	10	20	30	40	50	60
1	ATGCGCACTCTTAAGTCTCGTAATCGTCTCGGCTGGCTTGCTGCCGTTCTCTGCGACC					
1	M R T L K S L V I V S A A L L P F S A T					
	70	80	90	100	110	120
61	GCTTTTGCTCCGACGCCATCCAGGAACAGCGCTCCGGTCCGGTGAAGTAGCT					
21	A F A A D A I Q E Q P P V P A P V E V A					
	130	140	150	160	170	180
121	CCCCAGTATAGCTGGCTGGTATACCGGCTTTACCTTGGCTACGGCTGGAACAAG					
41	P Q Y S W A G G Y T G L Y L G Y G W N K					
	190	200	210	220	230	240
181	GCCAAGACCAGCACCGTTGGCAGCATCAAGCTGACGATTTGGAAGGCTGGCGCCTTTGCT					
61	A K T S T V G S I K P D D W K A G A F A					
	250	260	270	280	290	300
241	GGTGGAACCTCCAGCAGGACGATCGTATACGGGTTGAAGGTATGCAGGTTATTC					
81	G W N F Q Q D Q I V Y G V E G D A G Y S					
	310	320	330	340	350	360
301	TGGCCAAGAAGTCCAAGGACGGCCTGGAAGTCAAGCAGGCGCTTTGAAGCTCGCTCGCT					
101	W A K K S K D G L E V K Q G F E G S L R					
	370	380	390	400	410	420
361	GCCCGGTTGGCTACGACCTGAACCCGGTTATGCGGTACCTCACGGCTGATTGCGCGT					
121	A R V G Y D L N P V M P Y L T A G I A G					
	430	440	450	460	470	480
421	TCGCAGATCAAGTAACAACGGCTTGGACGACGAAAGCAAGTTCGCCGGTGGTGGACG					
141	S Q I K L N N G L D D E S K F R V G W T					
	490	500	510	520	530	540
481	GCTGGTCCGGTCTCGAAGCCAAGCTGACGGACAACATCTCCGGCCGGTTGAGTACCGT					
161	A G A G L E A K L T D N I L G R V E Y R					
	550	560	570	580	590	600
541	TACACCCAGTACGGCAACAAGAACTATGATCTGGCCGGTACGACTGTTCCGAACAAGCTG					
181	Y T Q Y G N K N Y D L A G T T V R N K L					
	610	620	630	640		
601	GACACGAGGATTTCCCGCTCGGCATCGGCTACAAGTCT					
201	D T Q D F R V G I G Y K F					

图2 *Omp25* 基因核苷酸序列及其编码的蛋白氨基酸序列

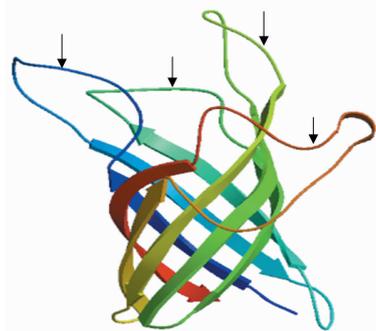
利用生物学软件 DNASTAR、ExPASy 服务器的 ProtParam 分析羊Ⅲ型布氏杆菌外膜蛋白 Omp25 分子的理化性质,详见表 2。

表 2 *Omp25* 分子的理化性质结果

氨基酸序列长度(bp)	相对分子质量	等电点	电荷 (pH 值=7.0)	280 nm 摩尔消光系数	$D_{280\text{ nm}}$
213	23 185	8.63	1.912	52 370	2.259

通过 NPS@ IBCP 服务器的 SOPMA 预测 *Omp25* 的二级结构,详见图 3。可见其 α -螺旋占 24.88%, β -转角占 13.15%,无规卷曲占 37.07%,延伸链占 24.88%,总体来看该蛋白的卷曲程度较高,因此成为 B 细胞表位可能性大。

形成丰富的二级结构。因此 *Omp25* 分子的这 5 段肽段形成分子抗原表位的可能性较大。



箭头表示跨膜区域
图4 *Omp25* 三级结构预测结果

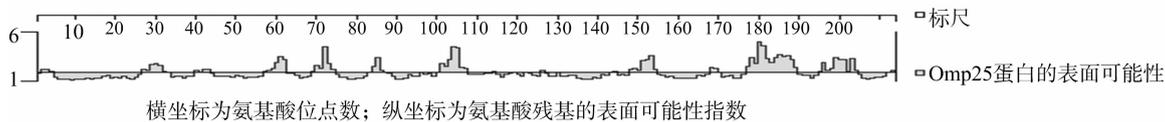


图5 Omp25 分子表面可能性分析结果

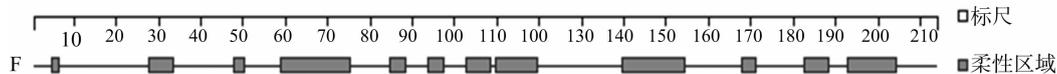


图6 Omp25 分子柔韧性分析结果

利用 DNASTar 的 Hydropathy - Kyte - Doolittle 法分析 Omp25 蛋白分子的亲水性, 详见图 7。结果显示: 分子的亲水性区分布远远大于疏水区、高亲水区, 有利于蛋白的表达, 其

中分子的一级结构中 26 ~ 35、55 ~ 76、82 ~ 126、143 ~ 158、174 ~ 205 位氨基酸为高亲水区 (≥ 0), 这些区域暴露于分子表面的概率较大, 成为分子的抗原表位的可能性也最大。

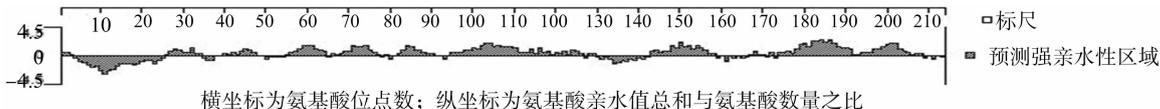


图7 Omp25 分子亲水性分析结果

利用 DNASTar 的 Antigenic Index - Jameson - Wolf 法进行抗原指数分析, 详见图 8。结果显示: Omp25 分子一级结构氨基酸序列中抗原指数显著的是 26 ~ 33、56 ~ 75、84 ~ 128、

143 ~ 155、163 ~ 171、183 ~ 207 位氨基酸。各区段形成分子的抗原表位的可能性十分大, 也是研究 Omp25 分子的抗原决定簇的主要对象。

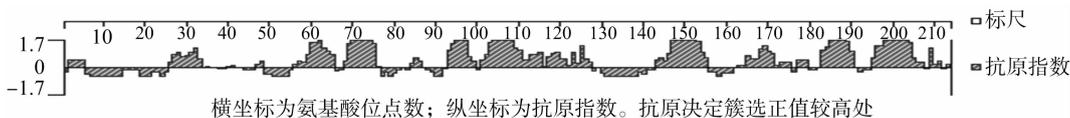


图8 Omp25 分子抗原指数分析结果

利用 CBS Prediction Servers 中的 BepiPred 预测 Omp25 蛋白分子的 B 细胞抗原表位, 整理后将临界值大于 0.5 的输出见表 3。结果显示, 该蛋白含有 8 个潜在的抗原表位, 预测最高的区域位于 28 ~ 48 位氨基酸区段。

Omp25 基因, 成功克隆入 pMD19 - T 载体上。测序结果显示, 获得了特异的布氏杆菌 Omp25 基因, 为下一步研究奠定了基础。

利用各种生物信息学软件分析工具, 对外膜蛋白 Omp25 分子的理化性质的分析有助于制定和采取合理的克隆表达策略, 提高目的蛋白的高效可溶性表达, 以获得活性重组蛋白, 进而为其作为免疫抗原提供材料。此外, 对 Omp25 蛋白分子的理化性质、抗原指数和 B 细胞抗原表位等多个参数的分析可见, Omp25 分子一级结构的氨基酸序列的各项参数存在 5 段共同区段, 即 28 ~ 33、59 ~ 74、93 ~ 112、148 ~ 154、182 ~ 202 位氨基酸, 这些区段各项参数都较显著, 其中 59 ~ 74、93 ~ 112、182 ~ 202 位氨基酸区段尤为突出, 成为抗原决定簇的可能性很大。这些分析预测结果都为外膜蛋白 Omp25 的研究起到指导作用, 相应区段有可能成为药物的靶分子, 或是诊断抗原的候选分子。在后续试验中, 笔者将选择这 3 段区段进行抗原性研究, 以期研制具有一定抗原免疫原性和保护性的亚单位疫苗^[11]。

表 3 Omp25 蛋白分子 B 细胞抗原表位分析结果

编号	起始位点	终止位点	序列	分值	长度 (个)
1	28	48	AIQEPPVPAPVEVAPQYSWAGG	1.242	21
2	59	77	NKAKTSTVGSIKPDDWKAG	1.006	19
3	93	112	VEGDAGYSWAKSKDGLGVK	0.720	20
4	114	114	G	0.632	1
5	148	154	GLDDESK	0.847	7
6	160	160	T	0.509	1
7	162	164	GAG	0.603	3
8	182	202	TQYGKNYDLAGTTVRNKLDI	0.562	21

3 讨论

布氏杆菌外膜蛋白 (outer membrane proteins) Omp25/Omp31 家族免疫原性强, 近期研究表明, 外膜蛋白 Omp25 与布氏杆菌毒力相关, 缺失 Omp25 基因的突变株对小鼠的毒力明显减弱, 且无法在小鼠体内长期存活。同时, Omp25 蛋白具有抑制 TNF - α 产生和分泌的作用, 从而有利于布氏杆菌在细胞内存活^[9-10]。可见对外膜蛋白 Omp25 的进一步研究不可忽视。

本试验在布氏杆菌 Omp25 基因两端加上合适的酶切位点, 通过 PCR 方法获得海晏县分离羊种布氏杆菌 3 型菌株的

参考文献:

[1] Tiwari A K, Kumar S, Pal V, et al. Evaluation of the recombinant 10 - kilodalton immunodominant region of the BP26 protein of *Brucella abortus* for specific diagnosis of bovine brucellosis [J]. Clinical and Vaccine Immunology, 2011, 18(10): 1760 - 1764.

[2] Kaufmann A F, Fox M D, Boyce J M, et al. Airborne spread of brucellosis [J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 1980, 353(1): 105 - 114.

晏华春,马晓燕,依明·苏来曼,等.和田羊 *KRT35* 基因遗传多样性及其与羊毛长度的关联性分析[J].江苏农业科学,2016,44(4):28-30.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.04.008

和田羊 *KRT35* 基因遗传多样性及其与羊毛长度的关联性分析

晏华春,马晓燕,依明·苏来曼,刘红娇,韩煜茹,刘婷婷

(新疆农业大学动物科学学院,新疆乌鲁木齐 830052)

摘要:以随机采集的400只和田羊个体的血样为材料,利用PCR-SSCP、DNA测序等技术研究分析和田羊 *KRT35* 基因的多态性,并与羊毛长度进行关联分析。和田羊 *KRT35* 基因具有多态性,存在3种基因型,即AA、AB和BB,且处于Hardy-Weinberg非平衡状态,多态信息含量(PIC)为0.3663,属于中度多态($0.5 > PIC > 0.25$)。测序结果显示,与原基因碱基序列相比,*KRT35* 基因编码区片段在RT35基因组c.122位置发生错义突变T→C。关联分析结果表明,和田羊不同基因型之间羊毛长度差异均不显著。

关键词:和田羊;*KRT35* 基因;多态性;羊毛长度;关联分析

中图分类号: S826.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)04-0028-03

和田羊作为和田地毯产业链中的重要环节,其羊毛品质的提高将直接促进地毯质量的全面提升,将有力支撑地方经济的可持续发展。毛纤维具有高度的组织结构,其中毛纤维的90%是由角蛋白中间丝(keratin intermediate filament, KRT-IF)和角蛋白关联蛋白(keratin-associated proteins, KAPs)构成^[1-2]。研究发现,在美利奴羊中,KAP1.1、KAP1.3、K33等KAPs影响羊毛性状和品质^[3],KAP1-4也影响羊毛性状^[4],KRT27、KRT85、KRT35、KRT31、KRT38、KAP6.1和KAP4.3等影响毛囊分裂和毛囊结构^[5]。遗传因素涉及绵羊品种及其他重要功能基因,是影响绵羊经济性状

的基本因素^[6-7]。所以很多学者普遍通过基因方面的研究,认为多基因对毛绒性状影响较大,可能存在主效基因,因此当前的研究热点主要是毛绒纤维的角蛋白中间丝和角蛋白关联蛋白相关基因的研究。*KRT35* 基因是角蛋白中间丝蛋白家族之一,本试验选择优良的异质半粗毛短脂尾和田羊作研究对象,采用PCR、DNA测序等技术对和田羊 *KRT35* 基因进行多态性检测,并和其对应的羊毛长度进行关联性分析,主要为找到改善其羊毛长度分子标记位点,为新疆和田羊经济性状的选育、品种资源的保存提供一定的遗传学理论依据,从而达到对当地农牧民生活质量的提高。

收稿日期:2015-03-11

基金项目:新疆维吾尔自治区高校科研计划科学研究重点项目(编号:XJEDU2013117)。

作者简介:晏华春(1988—),男,安徽阜阳人,硕士研究生,研究方向为动物遗传育种。E-mail:1939477313@qq.com。

通信作者:依明·苏来曼,维吾尔族,副教授,硕士生导师,研究方向为动物遗传育种。E-mail:yusulaiman@aliyun.com。

1 材料与与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验样本的采集 本试验选择年龄、个体差异小,健康无病的新疆和田羊400只,作为试验材料。采集血样是和田羊颈部静脉5 mL,用枸橼酸钠抗凝,置于-20℃长期冻存。

1.1.2 主要药品和试剂 Taq DNA聚合酶、上下游引物、dNTPs、Marker、Tris平衡酚、6×Loading buffer、10×PCR buff-

[3]徐立青,李积权,肖俊贲,等.青海省2例新发布鲁杆菌病的调查分析[J].中国地方病学杂志,2008,27(3):348.

[4]徐立青,李超,许红星,等.2006—2008年青海省人间布鲁氏菌病流行病学资料分析[J].中国媒介生物学及控制杂志,2010,21(4):389-390.

[5]王传清,李星.布鲁氏菌病的流行和研究现状及防控策略[J].中国动物检疫,2009,26(6):63-65.

[6]Estein S M, Cheves P C, Fiorentino M A, et al. Immunogenicity of recombinant Omp31 from *Brucella melitensis* in rams and serum bactericidal activity against *B. ovis* [J]. Vet Microbiol, 2004, 102(3/4): 203-213.

[7]Cloeckert A, Vizcaíno N, Paquet J Y, et al. Major outer membrane proteins of *Brucella* spp.: past, present and future [J]. Veterinary Microbiology, 2002, 90(1/2/3/4): 229-247.

[8]薛红梅,徐立青,崔步云,等.3株布氏菌的流行病学调查[J].现代预防医学,2014,41(23):4225-4226.

[9]Jubier-Maurin V, Boigegrain R A, Cloeckert A, et al. Major outer membrane protein Omp25 of *Brucella suis* is involved in inhibition of tumor necrosis factor alpha production during infection of human macrophages [J]. Infection and Immunity, 2001, 69(8): 4823-4830.

[10]Edmonds M D, Cloeckert A, Elzer P H. *Brucella* species lacking the major outer membrane protein Omp25 are attenuated in mice and protect against *Brucella melitensis* and *Brucella ovis* [J]. Veterinary Microbiology, 2002, 88(3): 205-221.

[11]Boigegrain R A, Salhi I, Alvarez-Martinez M T, et al. Release of periplasmic proteins of *Brucella suis* upon acidic shock involves the outer membrane protein Omp25 [J]. Infection and Immunity, 2004, 72(10): 5693-5703.