

李在建,王 旭,龙良启,等. 副猪嗜血杆菌神经氨酸酶序列分析及可溶性表达[J]. 江苏农业科学,2018,46(6):40-42.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.06.010

副猪嗜血杆菌神经氨酸酶序列分析及可溶性表达

李在建^{1,2}, 王 旭², 龙良启², 操继跃²

(1. 聊城大学农学院, 山东聊城 252000; 2. 华中农业大学动物医学院, 湖北武汉 430070)

摘要:以副猪嗜血杆菌 *nanH* 为研究对象,对副猪嗜血杆菌不同标准株的神经氨酸酶序列和活性进行分析,同时通过原核表达获得了可溶性表达的有活性的神经氨酸酶。结果表明,副猪嗜血杆菌的神经氨酸酶包含 1 个 RIF 功能域和 2 个 Asp-box 区,其活性区域包括由 Arg163、Arg233 构成的精氨酸三联体、Glu148、Tyr267 和 Asp182; *NanH* 的可溶性表达表明,副猪嗜血杆菌神经氨酸酶以可溶性表达的形式存在,同时使用神经氨酸酶检测试剂盒检测有活性,为进一步研究神经氨酸酶的功能提供依据。

关键词:副猪嗜血杆菌;神经氨酸酶;唾液酸;可溶性表达

中图分类号: S852.61+2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)06-0040-03

副猪嗜血杆菌 (*Haemophilus parasuis*, HPS) 是猪呼吸道常在的一种 NAD 依赖的革兰氏阴性菌,属于巴氏杆菌科^[1],显微镜下观察为多种形态的杆状细菌。在某些特殊环境下能入侵机体,从而引发猪的浆液性或纤维素性多发性浆膜炎、关节炎、脑膜炎等,俗称格拉瑟氏病 (Glässer's disease)^[2-3] 或引起猪的急性败血症^[4]。副猪嗜血杆菌病主要影响 2 周~4 月龄的猪,常在仔猪保育阶段发病,发病率一般在 10%~15%,严重时死亡率高达 50%。随着养猪业规模的迅速扩大和养殖模式的改变,近些年流行趋势日趋严重,已成为危害养猪业的主要细菌性病原,造成了大量的经济损失^[5-7]。唾液酸作为细菌代谢中一种重要的分子,一方面可以作为细菌的能量供细菌生存所需,另一方面细菌又可以利用唾液酸作为自己的结构物质与宿主细胞相互作用。

本研究以副猪嗜血杆菌的 *nanH* 基因为研究对象,研究副猪嗜血杆菌不同标准菌株中 *nanH* 序列的差异及神经氨酸酶活性的不同;同时第一次通过大肠杆菌原核表达获得有活性的神经氨酸酶。

1 材料与方法

1.1 载体与质粒

原核表达载体载体 pET-28a(+) 和 pET-32a(+) 购自 Invitrogen 公司。

1.2 工具酶及主要试剂

所有的限制性内切酶、T₄ DNA 连接酶、DNA Marker、高保

真酶 Pyrobest DNA Polymerase 均购自大连宝生物公司 (TaKaRa)。

PCR 产物纯化试剂盒、DNA 胶回收试剂盒均为 Omega 产品。

BL21(DE3) pLysS 感受态细胞、质粒小提试剂盒购自北京金式金生物技术有限公司。

胰酶大豆琼脂 (TSA)、胰酶大豆琼脂 (TSB) 均购自 Difco 公司。烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD) 购自中国上海化学试剂公司。

琼脂糖、胰蛋白胨以及酵母浸出物等购自 OXOID 公司。神经氨酸酶检测试剂盒购自碧云天生物制品公司。

1.3 重组质粒的构建

nanH 全长 PCR 纯化回收产物酶切体系 (总体积 50.0 μL) 见表 1。载体 pET-28a(+) 酶切体系 (总体积 50.0 μL) 见表 2。

表 1 <i>nanH</i> 全长 PCR 纯化回收产物酶切体系	
名称	用量 (μL)
<i>EcoR</i> I	2.2
<i>Xho</i> I	2.3
10 × H Buffer	5.0
纯化回收后 PCR 产物	18.0
双蒸水	22.5

表 2 载体 pET-28a(+) 酶切体系	
名称	用量 (μL)
<i>EcoR</i> I	2.2
<i>Xho</i> I	2.3
10 × H Buffer	5.0
pET-28a(+) 质粒	20.0
双蒸水	20.5

收稿日期:2016-10-13

项目来源:聊城大学博士启动基金 (编号:318051314)。

作者简介:李在建 (1986—), 男, 山东青州人, 博士, 讲师, 主要从事兽医医药理与微生物学研究, E-mail: lizj8603@163.com; 共同第一作者:王 旭 (1983—), 男, 兽医师, 硕士。

人参研究, 2014 (3): 52-55.

[10] 田 磊, 姜 云, 陈长卿, 等. 一株人参内生 1-氨基环丙烷-1-羧酸 (ACC) 脱氨酶活性细菌的筛选、鉴定及其对宿主生长的影响 [J]. 微生物学报, 2014, 54 (7): 760-769.

[11] 王 卓, 于慧美, 刘 鼎, 等. 人参内生真菌的分离及其抗肿瘤活性研究 [J]. 中国现代中药, 2013, 15 (9): 748-751.

[12] 姜 云, 尹 望, 陈长卿, 等. 人参内生可培养细菌 16S rDNA-RFLP 分析 [J]. 东北林业大学学报, 2012, 40 (8): 34-39.

载体 pET-32a(+) 酶切体系(总体积 50.0 μL)见表 3。

表 3 载体 pET-32a(+) 酶切体系

名称	用量(μL)
<i>Eco</i> R I	2.2
<i>Xho</i> I	2.3
10 × H Buffer	5.0
pET-32a(+) 质粒	20.0
双蒸水	20.5

纯化回收的 PCR 酶切产物与质粒载体的连接反应体系(总体积 20.0 μL)见表 4。

表 4 纯化回收的 PCR 酶切产物与质粒载体的连接反应体系

名称	用量(μL)
10 × T ₄ DNA Ligase Buffer	2.0
T ₄ DNA Ligase	1.0
纯化回收的 PCR 酶切产物	8.0
酶切回收的质粒载体	2.0
双蒸水	7.0

所有组分加完后,使用移液器充分混匀,置于 22 ℃ 温箱中连接过夜。取 10.0 μL 连接产物转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,小量制备质粒,鉴定正确的质粒-20℃ 保存。

1.4 神经氨酸酶粘附功能的研究

(1)使用接种环将副猪嗜血杆菌 0165 均匀接种于 TSA V. S. 平板上,37 ℃ 温箱培养 12 h,使用无菌 5 mL PBS 将细菌洗下来,5 000 r/min 离心 5 min,收集菌体。尽量弃净上清,使用 1 mL DMEM 细胞生长液重悬,并取相应量按 1 : 100 比例用生长液稀释。(2)从 CO₂ 培养箱中取出提前 1 d 接好的 24 孔板的细胞,观察细胞形态。弃掉每孔的生长液,使用 PBS 洗涤细胞 2 次。(3)将细菌悬液加入到细胞板中(MOI = 100),阴性对照每孔加入 20 μL 空载体破碎后上清,样品组加入神经氨酸酶样品,室温 4 000 r/min 离心 10 min,于 37 ℃ 5% CO₂ 培养 4 h。(4)取出细胞板,使用 PBS 洗 2 次,每孔加入 100 μL 胰酶将细胞消化,每孔加入 100 μL 细胞裂解液,然后加入 900 μL PBS 补足至 1 mL,反复吹打至细胞完全裂解。(5)细胞裂解产物取 10⁻¹、10⁻² 2 个稀释度涂平板计数。

2 结果与分析

2.1 不同细菌间 *nanH* 基因序列比较结果

将 *nanH* 基因序列在 NCBI 数据库中比对,发现巴氏杆菌属中,本试验测定的副猪嗜血杆菌 SH0165 菌株 *nanH* 基因序列与多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella multocida*) 同源性达到 60%,与溶血性曼氏杆菌(*Mannheimia haemolytica*) 同源性达到 58%,与其他非巴氏杆菌属如产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*) 同源性达到 38%,与索氏梭菌(*Clostridium sordellii*) 同源性达到 34%,与鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*) 同源性达到 31%。

将 15 株副猪嗜血杆菌标准血清型菌株的神经氨酸酶(NA)做进化树分析,结果见图 1。

2.2 副猪嗜血杆菌不同标准血清型神经氨酸酶活性分析

提取副猪嗜血杆菌 13 株标准株总蛋白后,使所有待测样品蛋白浓度统一为 2.32 μg/μL,在 S = 60 情况下使用 BioTeK Synergy HT 荧光酶标仪和碧云天神经氨酸酶检测试剂盒检测

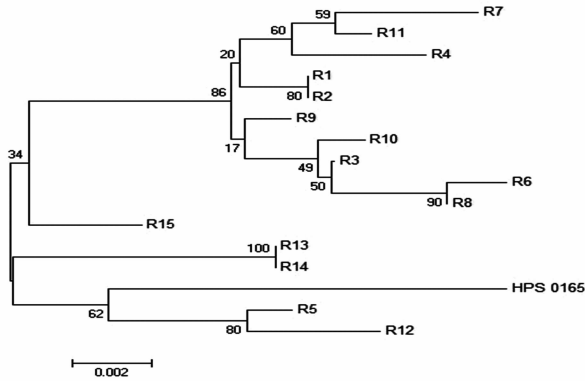


图 1 15 株 HPS 标准血清型菌株和 SH0165 株 *nanH* 基因遗传进化树

其中神经氨酸酶活性,每个样品平行 3 次,荧光检测结果如图 2 所示,发现不同血清型副猪嗜血杆菌菌株的神经氨酸酶活性并不相同。

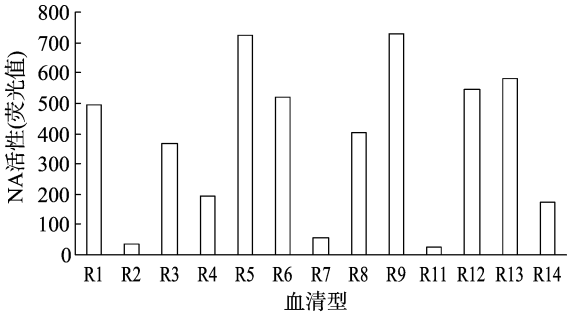
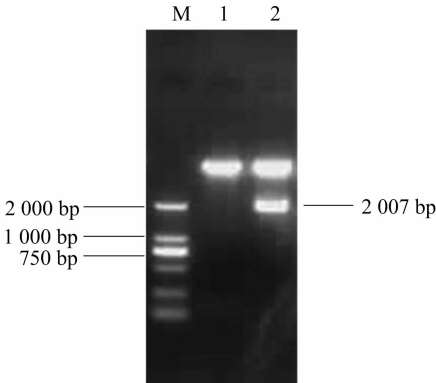


图 2 HPS 不同血清型 NA 活性检测结果

2.3 神经氨酸酶可溶性表达的研究

2.3.1 重组表达质粒的构建及鉴定 *nanH* 基因全长表达从起始密码子开始,至终止密码子结束。因为在设计引物时引入了酶切位点,因此将 PCR 产物与载体分别酶切后,将 *nanH* 基因分别插入表达载体 pET-32a 中,构建重组表达质粒。用 *Eco*R I 和 *Xho* I 双酶切重组表达质粒鉴定,所得条带与预期一致(图 3)。

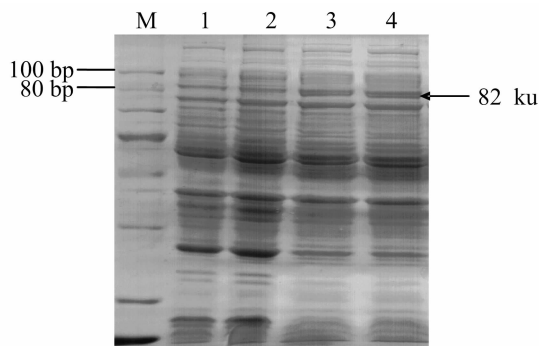


M—DNA Marker (DL2000); 1—*Eco*R I 和 *Xho* I 双酶切空载体 pET-32a; 2—*Eco*R I 和 *Xho* I 双酶切重组质粒 pET-32a-NA

图 3 重组表达质粒 pET-32a-NA 酶切鉴定

2.3.4 SDS-PAGE 鉴定 将重组表达质粒 pET-32a-NA 转入 BL21(DE3) pLysS 原核表达感受态细胞,挑取阳性克隆后,18 ℃ 低温诱导 16 h,集菌破碎后进行 SDS-PAGE 电泳。

由图 4 表明,重组表达质粒 pET-32a-NA 转化菌株在大小约为 80 ku 处有 1 条特异性表达带,而在 pET-32a 空载体菌株的相应位置没有此蛋白带,证明 NA 在大肠杆菌 BL21 (DE3) pLysS 中表达在上清,即为可溶性表达。同时,使用神经氨酸酶检测试剂盒检测上清样品, $S=70$ 时,3 次平行结果为 289、271、296,平均值为 285,以 pET-32a 转化 BL21 (DE3) pLysS 破碎后上清为阴性对照,检测结果为 79、89、71,平均值为 79。实际荧光值 = 阳性值 - 阴性值,因此实际荧光值为 206,结果证明上清中 NA 有活性。



M—蛋白marker; 1—pET-32a / BL21(DE3) pLysS诱导全菌;
2—pET-32a-NA/ BL21(DE3) pLysS未诱导全菌;
3—pET-32a-NA/ BL21(DE3) pLysS诱导破碎后全菌

图4 NA蛋白在大肠杆菌 BL21(DE3) pLysS 中的可溶性表达分析

4 讨论

通过试验研究发现,副猪嗜血杆菌 *nanH* 基因高度保守,且在 15 株标准血清型中其核苷酸同源性高达 99.54%,而氨基酸的同源性高达 99.29%,证明神经氨酸酶(NA)是副猪嗜血杆菌生存所必需的^[6]。通过试验推测,可能神经氨酸酶并不直接决定副猪嗜血杆菌毒力的高与低,但却是副猪嗜血杆菌具有毒力所必不可少的条件。

同时,本试验研究了副猪嗜血杆菌 15 株标准菌株以及其他一些细菌的神经氨酸酶的核苷酸和氨基酸序列,寻找出副猪嗜血杆菌神经氨酸酶的活性区域,发现这些活性区域高度保守^[8]。缺失 NA 或调节 NA 的基因制成弱毒疫苗,或者添加某种抑制剂抑制神经氨酸酶的活性从而降低细菌的毒力,也可以成为未来神经氨酸酶应用于生产实践的一个方面。

本试验尝试使用大肠杆菌原核表达神经氨酸酶,在试验过程中使用了多种表达载体,如 pET-28a、pET-30a、pET-32a、pGEX-KG,转化 BL21 (DE3) 后神经氨酸酶都以包涵体的形式存在,但在经过包涵体的纯化和复性后检测重组蛋白没有活性,尝试了多种包涵体复性的方法,却一直无法获得有活性的蛋白。最后经过数次尝试,终于将重组质粒转化 BL21 (DE3) pLysS 表达菌株,经过 18 °C 低温诱导 16 h 后重组蛋白破碎后在上清中,也就是以可溶性表达的形式存在,使用神经氨酸酶检测试剂盒检测蛋白有活性^[9-10]。但是蛋白表达量较低,使用蛋白纯化仪多次纯化无法获得目的蛋白。

神经氨酸酶是唾液酸为副猪嗜血杆菌所利用的第一步,而对于副猪嗜血杆菌更为重要的是唾液酸的代谢。如研究者所说,唾液酸不仅是世界上最有趣的一个分子,更为最重要的一个分子。如前言所述,唾液酸进入细菌后不仅可以作为营养物质为细菌提供碳源和氮源,另一方面唾液酸参与构成细菌表面结构,在细菌与宿主的互作中起到重要的作用,如逃避宿主先天免疫系统的杀伤、促进生物被膜的形成以及提高毒素的毒力^[11-12]。因此,研究唾液酸代谢过程的重要性不言而喻。

参考文献:

- [1] Biberstein E L, White D. C. A proposal for the establishment of two new *Haemophilus* species [J]. *Journal of Medical Microbiology*, 1969, 2(1): 75-78.
- [2] Amano H, Shibata M, Kajio N, et al. Pathologic observations of pigs intranasally inoculated with serovar 1, 4 and 5 of *Haemophilus parasuis* using immunoperoxidase method [J]. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 1994, 56(4): 639-644.
- [3] Oliveira S, Pijoan C. *Haemophilus parasuis*: new trends on diagnosis, epidemiology and control [J]. *Veterinary Microbiology*, 2004, 99(1): 1-12.
- [4] Peet R L, Fry J, Lloyd J, et al. *Haemophilus parasuis* septicaemia in pigs [J]. *Australian Veterinary Journal*, 1983, 60(6): 187.
- [5] Rubies X, Kielstein P, Costa L, et al. Prevalence of *Haemophilus parasuis* serovars isolated in Spain from 1993 to 1997 [J]. *Veterinary Microbiology*, 1999, 66(3): 245-248.
- [6] Cai X W, Chen H C, Blackall P J, et al. Serological characterization of *Haemophilus parasuis* isolates from China [J]. *Veterinary Microbiology*, 2005, 111(3/4): 231-236.
- [7] 黄银云, 胡新岗, 郭广富, 等. 一例副猪嗜血杆菌病的综合诊断 [J]. *江苏农业科学*, 2016, 44(6): 333-335.
- [8] Zhou H Z, Yang B, Xu F Z, et al. Identification of putative virulence-associated genes of *Haemophilus parasuis* through suppression subtractive hybridization [J]. *Veterinary Microbiology*, 2010, 144(3/4): 377-383.
- [9] 蔡旭旺. 副猪嗜血杆菌的分离鉴定及诊断方法与灭活疫苗的研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2006: 18-20.
- [10] Kuroiwa A, Hisatsune A, Isohama Y, et al. Bacterial neuraminidase increases IL-8 production in lung epithelial cells via NF- κ B-dependent pathway [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009, 379(3): 754-759.
- [11] Olvera A, Ballester M, Nofrarias M, et al. Differences in phagocytosis susceptibility in *Haemophilus parasuis* strains [J]. *Veterinary Research*, 2009, 40(3): 24.
- [12] Hui J, Yun W, Rui Z, et al. Identification of genes transcribed by *Haemophilus parasuis* in necrotic porcine lung through the selective capture of transcribed sequences (SCOTS) [J]. *Environmental Microbiology*, 2008, 10(12): 3326-3336.