[文章编号]　1000 - 4718(2007)11 - 2262 - 03

# 淋病奈瑟菌临床菌株外膜蛋白 PIA 基因序列分析及原核表达系统的构建

孙爱华[1]，宋春涵[2]，吴森林[1]，毛亚飞[3]，周海鸥[1]，严　杰[3△]
([1]浙江医学高等专科学校，浙江 杭州 310053；[2]金华职业技术学院医学院，浙江 金华 321027；[3]浙江大学医学院微生物和寄生虫学教研室，浙江 杭州 310031)

[摘　要]　**目的**：分析本地区淋病奈瑟菌临床菌株外膜蛋白 PIA 基因核苷酸及氨基酸序列，构建 PIA 基因的原核表达系统。**方法**：采用高保真 PCR 扩增 9 株淋病奈瑟菌全长 PIA 基因序列，T - A 克隆测序后与 GenBank 公布的序列进行同源性比较。构建 PIA 原核表达系统。采用不同浓度 IPTG 诱导重组目的蛋白 rPIA 表达，10% SDS - PAGE 和 Bio - Rad 凝胶图像分析系统检测 rPIA 表达情况。采用 Ni - NTA 亲和层析法提纯 rPIA，SDS - PAGE 检测提纯效果。**结果**：与报道的 PIA 基因序列(GenBank No：L19962)比较，9 株淋病奈瑟菌核苷酸和氨基酸序列相似性分别高达 99.6% - 100% 和 99.1% - 100%，均属于 IA6 血清型。rPIA 表达量可占细菌总蛋白量的 50.1%，提纯后仅显示单一的目的蛋白条带。**结论**：IA6 为本地区淋病奈瑟菌优势血清型，该基因序列相当保守。所构建的 PIA 基因原核表达系统能高效表达 rPIA，为今后研制淋病奈瑟菌血清学检测试剂盒及疫苗研制奠定了基础。

[关键词]　奈瑟球菌，淋病；基因，PIA；序列分析；原核表达
[中图分类号]　R363　　　[文献标识码]　A

## Sequence analysis and prokaryotic expression system construction of PIA genes isolated from *Neisseria gonorrhoeae*

SUN Ai - hua[1], SONG Chun - han[2], WU Sen - lin[1], MAO Ya - fei[3], ZHOU Hai - ou[1], YAN Jie[3]
([1] *Zhejiang Medical College*, *Hangzhou* 310053, *China*; [2] *Medical School of The Professional Technique College of Jinhua*, *Jinhua* 321027, *China*; [3] *Department of Medical Microbiology and Parasitology*, *Zhejiang University School of Medicine*, *Hangzhou* 310031, *China. E - mail*: *Med_bp@ zju. edu. cn*)

[**ABSTRACT**]　**AIM**: To analyze the nucleotide and putative amino acid sequences of PIA genes isolated from *N. gonorrhoeae* and to construct the prokaryotic expression system of PIA gene. **METHODS**: The entire PIA genes from 9 strains of *N. gonorrhoeae* were amplified by using high fidelity PCR. The target amplification fragments were sequenced after T - A cloning. Homology comparison of the nucleotide and putative amino acid sequences of PIA genes from the isolates with the reported sequences in GenBank was then performed. A prokaryotic expression system of PIA gene was constructed. Different dosages of IPTG were applied to induce the expression of the target recombinant protein (rPIA) and 10% SDS - PAGE plus Bio - Rad Agarose Image Analysor was used to determine the expression level of rPIA. rPIA was extracted using Ni - NTA affinity chromatography and the purified effect was detected by SDS - PAGE. **RESULTS**: In comparison with the reported PIA gene sequences (GenBank No: L19962), the homologies of nucleotide and putative amino acid sequences of PIA genes from the isolates were 99.6% - 100% and 99.1% - 100%, respectively, which indicated that all the isolates were belonging to serovars IA6. Output of rPIA was as high as 50.1% of the total bacterial proteins. The purified rPIA only showed a single target protein fragment in gel. **CONCLUSION**: Serovar IA6 is dominant in the local *N. gonorrhoeae* isolates and sequences of the encoding gene are relatively conserved. The constructed prokaryotic expression system is able to express rPIA with high efficiency, which may lay a foundation for further development of serological detection kit and vaccine of *N. gonorrhoeae*.

[**KEY WORDS**]　*Neisseria gonorrhoeae*; Genes, PIA; Sequence analysis; Prokaryotic expression

淋病奈瑟菌感染引起的淋病是全球流行的主要性传播疾病之一。目前我国流行的各类性传播疾病中，淋病发病率居于首位。多数淋病患者可以自愈，但易转为慢性病变过程；患者可产生特异性免疫力，

[收稿日期] 2006 - 04 - 06　　[修回日期] 2006 - 10 - 16
*[基金项目]浙江省医药卫生科学研究基金资助项目(No. 2004A018)
△通讯作者 E - mail：Med_bp@ zju. edu. cn

但并不持久，再感染者常见[1]。有文献报道，淋病奈瑟菌外膜蛋白抗原易于变异，这可能是该菌免疫逃避以及患者特异性抗体维持时间短暂的可能机制之一[2]。因此，筛选并确定变异小、表达量高的淋病奈瑟菌表面蛋白抗原，对于疫苗研制或实验室检测均有重要意义。淋病奈瑟菌外膜蛋白主要有3类：PI、PⅡ和PⅢ，其中PI占外膜蛋白总量的60%以上[3,4]。PI由一个等位基因编码，可分为PIA和PIB 2类，故一株淋病奈瑟菌仅含有PIA或PIB[5,6]。本研究，我们拟分析本地区淋病奈瑟菌临床菌株PIA基因的同源性，构建PIA基因原核表达系统并建立了目的产物提纯方法，以期为后继淋病奈瑟菌临床诊断试剂盒乃至疫苗研制奠定基础。

## 材 料 和 方 法

### 1 菌株及表达系统

9株淋病奈瑟菌由杭州市第三人民医院和杭州市第一人民医院检验科细菌室分离并鉴定；原核表达载体pET42和表达宿主菌 *E. coli* BL21DE3均由Novagen公司提供。

### 2 DNA提取

新鲜细菌培养物经生理盐水3次离心洗涤后取沉淀，用上海博彩生物科技有限公司(Bio－Color)的基因组提纯试剂盒提取DNA。DNA溶于TE缓冲液中，采用紫外分光光度法测定其浓度和纯度[7]。

### 3 PIA基因的扩增

参考GenBank中淋病奈瑟菌(No：L19962)PIA基因序列以及内切酶图谱分析结果，自行设计用于扩增全长PIA基因并含合适内切酶的上下游引物。上游引物序列：5'－CGC <u>CAT ATG</u> (*Nde* I) AAA AAA TCC CTG ATT GCC CTG－3'，下游5'－CGC <u>CTC GAG</u> (*Xho* I) GAA TTT GTG GCG CAG AAC GAC－3'。引物由上海英骏生物技术有限公司(Invitrogen)合成。PCR总体积为100 μL，内含2.5 mol/L dNTP、250 nmol/L引物、2.5 U Taq－Pfu酶(TaKaRa)、100 ng DNA模板、1×PCR缓冲液(pH8.3)。PCR参数：94 ℃ 5 min；94 ℃ 30s，54 ℃ 30 s，72 ℃ 90 s，30个循环；72 ℃ 10 min。采用1.5%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。全长PIA基因目的扩增条带预期大小为984 bp。

### 4 T－A克隆和核苷酸序列测定

采用Bio－Color公司的3S柱离心式琼脂糖DNA小量快速纯化试剂盒提纯PCR产物。采用TaKaRa公司T－A克隆试剂盒，将目的扩增片段克隆至pMD18－T载体中，转化入 *E. coli* DH 5α株并在BL培养基中扩增，氨苄西林和蓝白斑多重筛选，碱变性法提取质粒[7]。委托Invitrogen公司测定9株淋病奈瑟菌临床菌株重组质粒中全长PIA基因片段的核苷酸序列。

### 5 PIA基因序列分析

参照已公布的PIA基因序列(GenBank No：L19962)，采用Wonderful分子生物学软件，对所检测的淋病奈瑟菌株PIA基因核苷酸及氨基酸序列进行比较。

### 6 PIA基因原核表达系统的构建

将7号病人标本的pMD18－T－PIA及pET42分别在 *E. coli* DH 5α中扩增后，碱变性法提取质粒，双酶切获得目的基因片段，回收PIA基因片段及线性化pET42，用大肠杆菌T4连接酶进行连接。连接产物转化于表达宿主菌 *E. coli* BL21DE3中，经卡那抗性培养筛选后，碱变性法提取重组质粒，双酶切初步鉴定后再次测序。

### 7 目的重组蛋白的表达和提纯

所构建的PIA基因原核表达系统pET42－PIA－BL21DE3在含50 mg/L卡那霉素的LB培养液中37 ℃振荡培养4 h后，加入终浓度分别为0.5和1.0 mmol/L的IPTG，37 ℃诱导4 h。采用10% SDS－PAGE和Bio－Rad凝胶图像分析系统分析表达情况，采用Ni－NTA亲和层析法提纯表达的目的蛋白。

## 结 果

### 1 PCR扩增结果

从9株淋病奈瑟菌DNA中均可获得预期大小的全长PIA基因扩增片段，见图1。

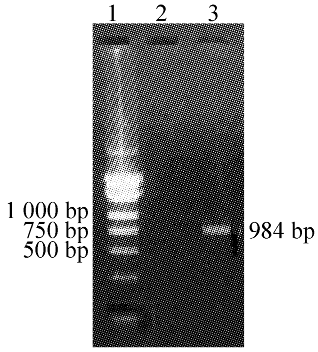


Fig 1 Amplication fragment of the entire PIA gene from *N. gonorrhoeae* isolate. 1：1 Kb marker; 2：blank control; 3：the target PCR product.

**图1 淋病奈瑟菌临床菌株中扩增的全长PIA基因片段**

### 2 核苷酸和氨基酸序列分析

与已公布的PIA基因序列(GenBank No：L19962)比较，9株淋病奈瑟菌PIA基因核苷酸序列核苷酸和氨基酸序列相似性均分别高达99.6%－100.0%和99.1%－100.0%，且均为IA－6血清型。

### 3 重组PIA蛋白的表达和提纯效果

经SDS－PAGE检测，0.5和1.0 mmol/L的IPTG均能有效地诱导pET42－PIA－BL21DE3表达

目的重组蛋白 rPIA,但 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导效果更好,其表达量可占细菌总蛋白量的 50.1%,见图 2。经 Ni－NTA 亲和层析法提取后,rPIA 显示为单一的蛋白条带,见图 3。

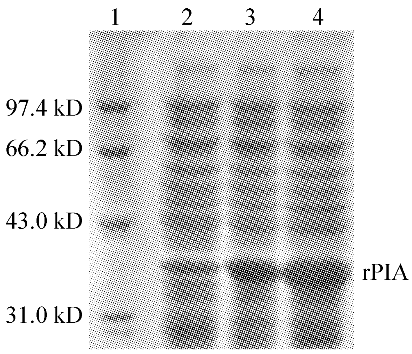


Fig 2 Expression level of rPIA induced by IPTGs with different dosages. 1: protein marker; 2: uninduced; 3－4: induced by 1.0 and 0.5 mmol/L IPTG, respectively.

**图 2 不同浓度 IPTG 诱导的重组 rPIA 表达情况**

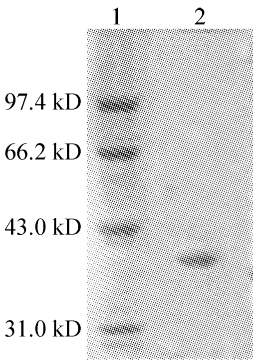


Fig 3 The purified rPIA by Ni－NTA affinity chromatography. 1: protein marker; 2: purified rPIA.

**图 3 Ni－NTA 亲和层析法提纯的 rPIA 条带**

## 讨 论

淋病奈瑟菌是引起性病的常见病原体之一,近年来感染率仍呈上升趋势。目前临床上对淋病奈瑟菌的检测主要依赖病原菌分离培养,建立基于抗原和抗体特异性免疫反应的淋病奈瑟菌检测方法,因其简便易行,仍有其实际使用价值。由于 PI 在淋病奈瑟菌外膜蛋白中含量最高、PIA 基因的保守性[3,4],以及淋病病人 PIA 抗体具有抗菌和调理作用,能保护同型菌株引起的再感染[8],因而 PIA 是制备诊断试剂盒或基因工程疫苗重要的候选抗原之一。

我们对 9 株淋病奈瑟菌 PIA 基因序列分析结果表明,上述各序列之间或与报道的同血清型 PIA 基因序列(GenBank No: L19962)比较,核苷酸和氨基酸序列相似性分别高达 99.6%－100.0% 和 99.1%－100.0%,提示该基因序列确实相当保守。在 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导下,我们构建的原核表达系统 pET42－PIA－BL21DE3 目的重组蛋白表达量可达细菌总蛋白量 50.1%,表明 rPIA 获得了高效表达。PIA 基因的保守性及高表达对于 rPIA 作为淋病奈瑟菌疫苗或检测试剂盒的候选抗原具有实际价值。

PIA 基因存在遗传多样性及一定的重组变异频率,采用单克隆抗体均可将其分为若干血清型,不同地区优势流行的 PIA 基因型有明显差异[9,10]。根据 PIA 基因序列,本研究中分离的淋病奈瑟菌 PIA 基因均为 IA－6 血清型,提示 IA－6 血清型淋病奈瑟菌是本地区流行的优势血清型。

### [参 考 文 献]


[1] 岑建萍, 程 浩, 曾凤英, 等. 奈瑟菌外膜 porin I 蛋白基因的构建、表达和鉴定[J]. 中华皮肤科杂志, 2002, 35(6): 432－434.

[2] Mee BJ, Thomas H, Cooke SJ, et al. Structural comparison and epitope analysis of outer－membrane protein PIA from strains of Neisseria gonorrhoeae with differing serovar specificities[J]. J Gen Microbiol, 1993, 139(11): 2613－2620.

[3] Buchanan TM, Hildebrandt JF. Antigen－specific serotyping of Neisseria gonorrhoeae: characterization based upon principal outer membrane protein[J]. Infect Immun, 1981, 32(3): 985－994.

[4] Sandstrom EG, Chen KC, Buchanan TM. Serology of Neisseria gonorrhoeae: coagglutination serogroups WI and WII/III correspond to different outer membrane protein I molecules[J]. Infect Immun, 1982, 38(2): 462－470.

[5] McKnew DL, Lynn F, Zenilman JM, et al. Porin variation among clinical isolates of Neisseria gonorrhoeae over a 10－year period, as determined by Por variable region typing [J]. J Infect Dis, 2003, 187(8):1213－1222.

[6] Perez－Losada M, Viscidi RP, Demma JC, et al. Population genetics of Neisseria gonorrhoeae in a high－prevalence community using a hypervariable outer membrane porB and 13 slowly evolving housekeeping genes[J]. Mol Biol Evol, 2005, 22(9): 1887－1902.

[7] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning, a latoratory manual[M]. New York: Gold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1.21－1.52, 2.60－2.80, 7.30－7.35, 9.14－9.22.

[8] Fudyk JC, Maclean DJ, Simonsen JN, et al. Genetic diversity and mosaicism at the por locus of Neisseria gonorrhoeae[J]. J Bacteriol, 1999, 181(3):5591－5599.

[9] Bash MC, Zhu P, Gulati S, et al. Por variable－region typing by DNA probe hybridization is broadly applicable to epidemiologic studies of Neisseria gonorrhoeae[J]. Clin Microbiol, 2005, 43(4): 1522－1530.

[10] Sosa J, Ramirez－Arcos S, Ruben M, et al. High percentages of resistance to tetracycline and penicillin and reduced susceptibility to azithromycin characterize the majority of strain types of Neisseria gonorrhoeae isolates in Cuba, 1995－1998[J]. Sex Transm Dis. 2003, 30(5): 443－448.