

文章编号: 1003-8701(2015)01-0082-04

气肿疽梭菌细胞毒素 CctA 基因的克隆 及生物信息学分析

云中宴¹, 任春宇², 车 达³, 金清洙⁴,
段雪岩¹, 司 唯¹, 金 鑫^{1*}

(1. 延边大学农学院动物医学系, 吉林 延吉 133002; 2. 延边州畜牧总站, 吉林 延吉 133000;
3. 延边州动物疫病预防控制中心, 吉林 延吉 133000; 4. 延吉市动物卫生监督所, 吉林 延吉 133000)

摘 要: 根据 GenBank 中气肿疽梭菌细胞毒素 CctA 基因的参考序列, 采用 PCR 方法扩增细胞毒素 CctA 基因。在将该基因进行克隆和测序后利用生物信息学方法, 对细胞毒素 CctA 蛋白的理化性质、结构功能域、蛋白质二级结构和三级结构及抗原表位等重要参数进行了预测和分析。结果表明: 与参考序列(JQ692583)相比, 存在 3 处突变, 核苷酸序列的同源性和氨基酸序列的同源性均为 99.4%; CctA 蛋白的理论等电点为 8.00, 不存在跨膜区和信号肽序列, 二级结构以 β -折叠和无规则卷曲为主, 主要有 4 个抗原表位区域。本研究为 CctA 蛋白功能的深入研究提供了参考, 并为气肿疽梭菌单克隆抗体的制备及合成肽疫苗的研发奠定了基础。

关键词: 气肿疽梭菌; 细胞毒素 CctA 基因; 克隆; 序列分析

中图分类号: S852.44

文献标识码: A

DOI: 10.16423/j.cnki.1003-8701.2015.01.019

Cloning and Bioinformatics Analysis of Cytotoxic CctA gene in *Clostridium chauvoei*

YUN Jin-yan¹, REN Chun-yu², CHE Da³, JIN Qing-zhu⁴, DUAN Xue-yan¹, SI Wei¹, JIN Xin^{1*}

(1. Department of Veterinary Medicine, Agricultural College of Yanbian University, Yanji 133002;

2. Animal Husbandry Station of Yanbian Autonomous Prefecture, Yanji 133000;

3. Animal Disease Prevention and Control Center of Yanbian, Yanji, 133000; 4. Animal Health Inspection of Yanji, Yanji 133000, China)

Abstract: Cytotoxic CctA gene was amplified by PCR according to the GenBank *Clostridium chauvoei* cytotoxic CctA gene reference sequence. After cloning and sequencing, the cytotoxic CctA protein physical and chemical properties, the structure and function domain, protein secondary structure and tertiary structure and antigen epitope and other important parameters were predicted and analyzed by bioinformatics methods. The result showed that compared to the reference sequence (JQ692583) there were three point mutations, the sequence homologies of nucleotides and amino acids were both 99.4%. The theoretical isoelectric point of protein was 8.00. Cytotoxic CctA protein didn't exist in the transmembrane region and signal peptide sequence. The secondary structures were mainly in beta-folding and random curl, and there were 4 main antigenic epitope regions. This study provided a reference for further research on cytotoxic CctA protein function, and laid the groundwork for *Clostridium chauvoei* monoclonal antibodies, synthetic peptide vaccine research and development.

Keywords: *Clostridium chauvoei*; Cytotoxic CctA gene; Cloning; Bioinformatics analysis

收稿日期: 2014-10-18

基金项目: 吉林省教育厅“十二五”科学技术研究项目(吉教科合字[2014]第6号)

作者简介: 云中宴(1990-), 女, 在读硕士, 研究方向: 动物传染病学。

通讯作者: 金 鑫, 男, 博士, 教授, E-mail: jinxin@ybu.edu.cn

气肿疽梭菌(*Clostridium chauvoei*), 又名费氏梭菌、肖氏梭菌, 为气肿疽的病原, 可引起牛、羊等反刍动物的急性、热性、败血性传染病^[1-2]。气肿疽梭菌是一类革兰氏阳性厌氧菌, 但在老龄培养物上则为阴性^[3]。虽然气肿疽梭菌一直被认为是特异性感染反刍动物的病原体, 但也有两例人感

染气肿疽梭菌死亡的报道^[4-5]。

气肿疽梭菌细胞毒素 A (CctA) 是 Joachim Frey 等经过全基因序列分析得出的一种新型蛋白质毒素,该毒素是细菌毒素的杀白细胞素总科、 β -微孔形成毒素的一种^[6]。经系统发生树分析,细胞毒素 A 与毒素 β 和毒素 NetB 具有较近的亲缘关系,可认为是梭状芽孢杆菌分支出来的新亚科毒素^[6-8]。成熟的细胞毒素 A,同产气荚膜梭菌的毒素 NetB、毒素 β 还有金黄色葡萄球菌毒素 α 具有类似的功能,具有膜特异性,可参与气孔的形成^[9-13]。细胞毒素 A 是气肿疽梭菌的主要细胞毒素和溶血素,在气肿疽疫苗的研究中,是非常有价值的候选基因^[8]。本研究扩增出气肿疽梭菌的细胞毒素 CctA 基因序列,并分析该基因序列的进行同源性、氨基酸序列的理化性质和功能域,预测该蛋白的二级结构、三级结构及 B 细胞抗原表位,旨在为气肿疽梭菌的分析免疫学的深入研究提供线索。

1 材料与方法

1.1 试验材料及试剂

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学实验室保存;NI-DL3000 DNA Marker 购自 Newbio industry 公司;Ex Taq DNA 聚合酶、pMD18-T Simple 载体、DNA 纯化回收试剂盒、质粒小量提取试剂盒等均购自大连宝生物工程有限公司;其他试剂为国产分析纯。

1.2 细胞毒素 CctA 基因引物的设计与合成

应用 Premier 5.0 软件,根据气肿疽梭菌 ATCC 10092 菌株细胞毒素 CctA 基因序列(登录号:JQ692583),设计一对特异性引物,预期的扩增全长为 501 bp。上游引物 5'端加入 *Bam*H I 酶切位点(下划线部分),下游引物 5'端加入 *Xho* I 酶切位点(下划线部分),由北京新产业科技公司合成。

上游引物 P1: 5'-3': CGGGATCCGGTGGGTAT-TATCAAGC; 下游引物 P2: 5'-3': CCCTCGAGAGTTCCTTTTGGTGC。

1.3 细胞毒素 CctA 基因的扩增与克隆

采用酚-氯仿抽提法提取气肿疽梭菌菌体核酸 DNA,并用紫外分光光度仪测定其浓度。以气肿疽梭菌标准株(C_{54-1})的 DNA 为模板进行细胞毒素 CctA 基因 PCR 扩增,PCR 反应在 25 μ L 体系中进行:95 $^{\circ}$ C 5 min,95 $^{\circ}$ C 30 s,48.8 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min。将 PCR 产物纯化后与

pMD 18-T Simple 连接,经过 PCR 鉴定和酶切鉴定后将正确的阳性克隆质粒送往上海立菲生物技术有限公司测序。

1.4 细胞毒素 CctA 基因的序列比对分析

应用分子生物学软件 Genedoc 对测序后的细胞毒素 CctA 基因序列与 GenBank 中气肿疽梭菌细胞毒素 CctA 基因序列进行比对分析,对核苷酸及氨基酸序列的差异进行比较分析。

1.5 细胞毒素 CctA 蛋白的理化性质及功能区域分析

应用 ExPASy、SignalP、TMHMM 和 Biotech 软件对细胞毒素 CctA 蛋白的理化性质、信号肽位点、跨膜区及蛋白质表达后的可溶性进行分析。

1.6 细胞毒素 CctA 蛋白的二级结构预测

应用 SOPMA 方案^[14]对细胞毒素 CctA 蛋白的二级结构成分进行预测。

1.7 细胞毒素 CctA 蛋白的三级结构预测

应用 SWISS-PDB viewer 软件的 SWISS-model^[15]与 CPHmodels 软件对细胞毒素 CctA 蛋白的三级结构进行分子模拟。

1.8 细胞毒素 CctA 蛋白抗原表位预测

应用 DNA Star 软件和 ProPred 软件对细胞毒素 CctA 蛋白的氨基酸序列进行分析,预测该蛋白的抗原表位。

2 结果与分析

2.1 细胞毒素 CctA 基因扩增

以气肿疽梭菌标准株(C_{54-1})的 DNA 为模板,P1、P2 为引物,扩增出片段为 501bp 的特异性产物,与预期目的条带相符(图 1)。

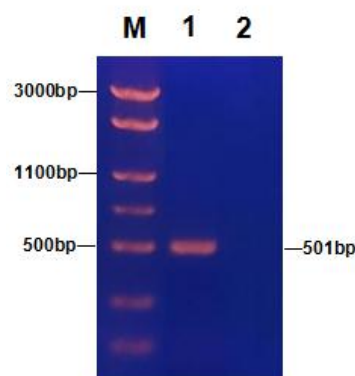


图 1 目的基因的 PCR 扩增

M:DL 3000 DNA Marker;1:目的基因扩增;2:阴性对照

2.2 细胞毒素 CctA 基因的全序列比对分析

将测序得到的细胞毒素 cctA 基因核苷酸序列与 GenBank 中气肿疽梭菌标准株中细胞毒素 CctA

3 讨 论

气肿疽梭菌产生的主要毒素氧稳定溶血素、氧不稳定溶血素、脱氧核糖核酸酶和透明质酸酶、神经氨酸酶、鞭毛蛋白和细胞毒素等随着研究的深入越来越多地受到了人们的关注^[16-19]。而气肿疽梭菌细胞毒素 CctA 为杀白细胞毒素总科中的一种成孔毒素,同许多其他具有重要毒力因子的致病性梭菌属一样具有很强的致病性,也是具有重要研究价值的候选基因,因用于研制黑腿病疫苗的主要保护性抗原而被重视^[20]。

生物信息学随着计算机技术和分子生物学技术的快速发展,已经逐渐成为推动基因组学及后基因组学研究的一种重要技术^[21]。氨基酸序列和三维构象之间是靠蛋白质二级结构维系的,而对蛋白质二级结构预测可获得许多重要的信息。细胞毒素 CctA 蛋白的二级结构是由 β -折叠和无规则卷曲组成,在一定程度上起到了稳定蛋白的作用。而对细胞毒素 CctA 蛋白的三级结构进行模拟,则为进一步探索气肿疽梭菌细胞毒素 CctA 蛋白的结构及功能提供了更全面的研究依据。

在生物信息学分析中,柔韧性、亲水性、表面可能性、二级结构、抗原指数等是决定蛋白质抗原表位的主要参数。尽管表面可能性和亲水性是形成表位的主要条件,但多种因素的共同参与才能决定表位是否具有抗原性。本研究对细胞毒素 CctA 蛋白的抗原表位可能区域进行分析预测,这为核酸疫苗的研制及单克隆抗体的制备等研究奠定了基础,为分子免疫学的深入研究提供线索,对气肿疽的免疫及防治工作具有重要意义。

参考文献:

- [1] Groseth P K, Ersdal C, Bjelland A M, et al. Large outbreak of blackleg in housed cattle[J]. Vet Rec, 2011, 169(13):339.
- [2] 陈溥言. 兽医传染病[M]. 北京:中国农业出版社, 2006: 302-304.
- [3] 丁宜宝. 兽医疫苗学[M]. 北京:中国农业出版社, 2008: 468-470.
- [4] Nagano N, Isomine S, Kato H, et al. Human fulminant gas gangrene caused by *Clostridium chauvoei* [J]. J Clin Microbiol, 2008(4): 1545-1547.
- [5] Weatherhead J E, Tewardy D J. Lethal human neutropenic enterocolitis caused by *Clostridium chauvoei* in the United States: tip of the iceberg[J]. J Infect, 2012 (64): 225-227.
- [6] Frey J, Johansson A, Burki S, et al. Cytotoxin CctA, a major virulence factor of *Clostridium chauvoei* conferring protective immunity against myonecrosis[J]. Vaccine, 2012(30): 5500-5505.
- [7] Keyburn A L, Boyce J D, Vaz P, et al. NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*[J]. PLoS Pathog, 2008, 4(2): 26.
- [8] Hunter S E, Brown J E, Oyston P C, et al. Molecular genetic analysis of beta-toxin of *Clostridium perfringens* reveals sequence homology with alpha-toxin, gamma-toxin, and leukocidin of *Staphylococcus aureus*[J]. Infect Immun, 1993(61): 3958 - 3965.
- [9] Song L, Hobaugh M R, Shustak C, et al. Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore[J]. Science, 1996, 274(5294): 1859 - 1866.
- [10] Nagahama M, Kihara A, Miyawaki T, et al. *Clostridium perfringens* beta-toxin is sensitive to thiol-group modification but does not require a thiol group for lethal activity[J]. Biochim Biophys Acta, 1999, 1454(1): 97 - 105.
- [11] Steinhorsdottir V, Fridriksdottir V, Gunnarsson E, et al. Site-directed mutagenesis of *Clostridium perfringens* beta-toxin: expression of wild-type and mutant toxins in *Bacillus subtilis*[J]. FEMS Microbiol Lett, 1998, 158(1): 17 - 23.
- [12] Walker B, Bayley H. Key residues for membrane binding, oligomerization, and pore forming activity of staphylococcal alpha-hemolysin identified by cys-teine scanning mutagenesis and targeted chemical modification[J]. J Biol Chem, 1995, 270(39): 23065 - 23071.
- [13] Walker B, Bayley H. Restoration of pore-forming activity in staphylococcal alpha-hemolysin by targeted covalent modification[J]. Protein Eng, 1995(8): 491-495.
- [14] Geourjon C, Deleage G. Significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments[J]. Comput Appl Biosci, 1995, 11(6): 681-684.
- [15] Arnold K, Bordoli L, Kopp J, et al. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling[J]. Bioinformatics, 2006(22): 195-201.
- [16] Useh N M, Ajanusi J O, Esievo K A, et al. Characterization of a sialidase (neuraminidase) isolated from *Clostridium chauvoei* (Jakari strain)[J]. Cell Biochem Funct, 2006, 24(4): 347-352.
- [17] Verpoort J A, Joubert F J, Jansen B C. Studies on the soluble antigen and hemolysin of *Clostridium chauvoei* strain 64[J]. S Afr J Agric Sci, 1966(9): 153-172.
- [18] Hangombe B M, Kohda T, Mukamoto M, et al. Purification and sensitivity of *Clostridium chauvoei* hemolysin to various erythrocytes[J]. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 2006, 29(4): 263-268.
- [19] Vilei E M, Johansson A, Schlatter Y, et al. Genetic and functional characterization of the NanA sialidase from *Clostridium chauvoei*[J]. Vet Res, 2011, 42(1): 2.
- [20] Marti-renom M A, Stuart A C, Fiser A, et al. Comparative protein structure modeling of genes and genomes[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001(98): 2944-2946.
- [21] Kojima A, Uchida I, Sekizaki T, et al. Cloning and expression of a gene encoding the flagellin of *Clostridium chauvoei*[J]. Vet Microbiol, 2000, 6(13): 359-372.