

炭疽杆菌芽孢外壁胶原样蛋白 (BclA) 的多态性分析*

李冠霖 徐俊杰 董大勇 宋小红 陈薇**

(军事医学科学院微生物流行病学研究所 病原微生物生物安全国家重点实验室 北京 100071)

摘要: 炭疽杆菌芽孢外壁胶原样蛋白 (BclA) 是芽孢外壁发状菌丝的主要结构成分, 也是芽孢的主要免疫原。从国内分离的 3 株炭疽杆菌中克隆出 BclA 基因并进行了序列分析, 结果发现有 2 株 (A16R 和 40048) 的 BclA 与国外报道菌株长度不同, 分别含有 388 个和 322 个氨基酸, 72 个和 50 个 GXX 三氨基酸重复序列, 5 个和 3 个含 21 个氨基酸的 (GPT), GDTGTT 重复序列 (BclA 重复)。另一株 40022 的 BclA 与国外报道的 53169 株完全一致, 含有 370 个氨基酸, 66 个 GXX 重复, 5 个 BclA 重复。对我国炭疽杆菌 BclA 蛋白多态性的分析为进行炭疽杆菌的基因分型以及研究炭疽芽孢的免疫原性和致病机理打下基础。

关键词: 炭疽杆菌, BclA 蛋白, 多态性, 芽孢

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 01-0100-05

Polymorphism of the *Bacillus anthracis* BclA Protein

LI Guan-Lin XU Jun-Jie DONG Da-Yong SONG Xiao-Hong CHEN Wei**

(State Key Laboratory of Pathogen and Biosafety, Beijing Institute of Microbiology and Epidemiology, Beijing 100071)

Abstract: *Bacillus anthracis* collagen-like protein (BclA) is a structural component of the exosporium filaments, as well as the immunodominant antigen on the spore surface. The genes encoding BclA proteins were cloned and sequenced from three *Bacillus anthracis* strains separated from China. It was founded that the BclA proteins of strain A16R and 40048, containing 388 and 322 amino acids, 72 and 50 copies of GXX repeat, 5 and 3 copies of 21-amino-acid sequence (GPT), GDTGTT (BclA repeat) respectively, are different from those reported by foreign scholars; while the BclA protein of strain 40022, containing 370 amino acids, 66 copies of GXX repeat, and 5 copies of BclA repeat, is identical with that of strain 53169 reported by others. The results are helpful for the molecular typing of *B. anthracis* strains, and provide a basis for the elucidation of the pathogenesis and immunogenicity of *B. anthracis* spore.

Key words: *Bacillus anthracis*, BclA protein, Polymorphism, Spore

在电镜下观察, 炭疽杆菌芽孢的最外层包裹着芽孢外壁 (exosporium), 由六角点阵结构的类晶体基层和发丝状外围区域组成。芽孢外壁直接与外界环境或宿主细胞接触, 因此在芽孢的存活和致病机理中可能具有重要作用。研究发现, 芽孢外壁占芽孢总质量的 2%, 含有 50% 的蛋白、20% 的脂、20% 的糖类和 10% 的其他成分^[1]。蛋白质组分析显示芽孢外壁中至少包含 137 种不同蛋白, 但实验中有可能掺入了芽孢内部蛋白^[2]。用高度纯化的芽孢外壁分析, 发现其中大约有 20 种蛋白^[3,4]。

最早被发现并且最受关注的芽孢外壁蛋白是一种胶原样糖蛋白, 称为 BclA (*Bacillus collagen-like protein of anthracis*)^[5]。该蛋白是芽孢外壁发状菌丝的主要结构成分, 其最大特点是蛋白序列内含有一个胶原样区域 (collagen-like region, CLR), 由若干个 GXX 三氨基酸重复序列组成, 其中绝大多数是 GPT 重复, 并且具有特征性的含 21 个氨

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 30300016)

Project granted by Chinese national natural science fund (No. 30300016)

** 通讯作者 Tel: 010-66948565, Fax: 010-63815273, E-mail: cw789661@yahoo.com

收稿日期: 2005-04-25, 修回日期: 2005-06-04

氨酸残基的(GPT)₅GDTGTT序列,称为BclA重复。进一步研究发现,不同炭疽杆菌菌株的BclA蛋白长度不同,而这种多态性是由CLR中GXX重复序列数目不同造成的^[6]。BclA蛋白长度不同是芽孢外壁发状菌丝长度不同的原因,但目前还未发现这种多态性对芽孢致病性的影响。

本研究克隆了国内3株炭疽芽孢杆菌的BclA基因,并和国外报道的序列进行了比较分析。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

炭疽芽孢杆菌A16R株和40022株为本单位保存,40048株从中国兽医药品监察所引进。其中A16R株为我国生产皮上划痕人用炭疽活疫苗使用的减毒株;40022株和40048株为自然界分离的有毒株,用于效检炭疽疫苗的保护性。

1.2 材料

E. coli DH5 α 菌株由本实验室保存。pMD18-T载体, T4DNA连接酶, Ex Taq酶购自TaKaRa公司。质粒提取试剂盒购自Qiagen公司。DNA回收试剂盒购自博大生物工程公司。测序由上海博亚公司完成。

1.3 PCR引物

引物设计参考炭疽杆菌Ames株BclA序列(GenBank注册号:AJ516936),由上海博亚公司合成。

5'端引物: BclA1: 34mer

5'-GAGGAATTCATGTCAAATAATAATTATTCAAATG-3'

EcoR I

3'端引物: BclA2: 35mer

5'-CGACCTGCAGTTAAGCAACTTTTTCATAATAATG-3'

Pst I

1.4 基因的扩增

分别从培养不同炭疽杆菌菌株的平板上挑取少量细菌,置100 μ L纯水中,煮沸10min,离心后取5 μ L上清进行PCR反应。反应总体积50 μ L,含1 \times Ex Taq buffer, 0.2mmol/LdNTPs,引物各0.5 μ mol/L, 2.5U Ex Taq。94 $^{\circ}$ C预变性5min, 94 $^{\circ}$ C 30s, 60 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 120s, 30循环, 72 $^{\circ}$ C延伸7min。

1.5 克隆和序列分析

PCR产物用1%琼脂糖凝胶电泳分离,切下目的片段,用DNA回收试剂盒回收。回收的PCR产物直接与pMD18-T载体连接,常规转化*E. coli* DH5 α 菌,在涂有X-gal和IPTG的LB平板(40 μ L 2% X-gal, 7 μ L 20% IPTG, 氨苄青霉素100 μ g/mL)上37 $^{\circ}$ C倒置培养过夜。选择过夜培养平板上的白色克隆进行PCR鉴定,阳性克隆提取质粒用*EcoRI*和*PstI*双酶切进一步鉴定后送测序。序列结果与其它已发表的炭疽菌株BclA序列进行比较,使用软件包括Vector NTI, Clustalx等。

2 结果

2.1 基因的扩增

用PCR从国内3株炭疽杆菌A16R、40022和40048中扩增出BclA基因,琼脂糖凝

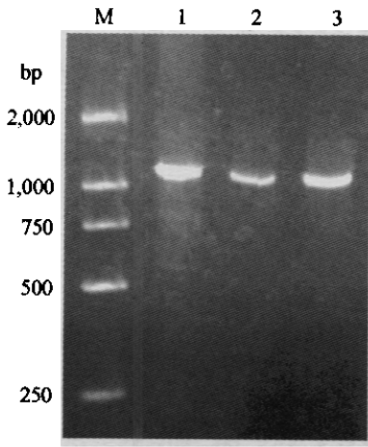


图1 3株炭疽杆菌 BclA 基因的扩增
1 分子量 Marker, 2 A16R 株,
3 40022 株, 4 40048 株

胶电泳显示扩增片段在 1,000bp 左右,但大小不同(图1)。

2.2 序列测定

将 PCR 产物回收后与 pMD18-T 载体连接后送测序,结果显示 3 株菌 A16R, 40022, 40048 的 BclA 基因全长分别为 1,167bp, 1,113bp 和 969bp, 分别编码 388, 370 和 322 个氨基酸。所测序列已在 GenBank 注册,注册号分别为: AY995120 (A16R), AY995121 (40022) 和 AY995122 (40048)。序列比较显示 3 株菌的 BclA 基因 5' 端和 3' 端碱基完全一致,而中间序列长度不同,翻译成氨基酸,发现差别主要在胶原样区域 (CLR) GXX 重复序列的数目上(图2),而 BclA 蛋白 N 端 40 个氨基酸和 C 端 132 个氨基酸是完全一致的(图3)。

A16R	MSNNYSNGL NPDESLSASA FDPNLVGPTL PPIPPFTLPT GPTGPTGPTG	50
40022	MSNNYSNGL NPDESLSASA FDPNLVGPTL PPIPPFTLPT GPTGPTGPTG	50
40048	MSNNYSNGL NPDESLSASA FDPNLVGPTL PPIPPFTLPT GPTGPTGPTG	50
A16R	PTGPTGPTGP TGPTGPTGPT GDTGTTGPTG PTGPTGPTGP TGDGTGTTGPT	100
40022	PTGPTGPTGP TGPTGPTGPT GDTGTTGPTG PTGPTGPTG. PT	91
40048	PTGPTGPTGP TGPTGPTGPT GDTGTTGPTG PTGPTGPTG. PT	91
A16R	GPTGPTGPTG PTGPTGPTGP TGPTGPTGPT GPTGPTGPTG PTGPTGDTGT	150
40022	GPTGPTGPTG PTGPTGDTGT TGPTGPTGPT GPTGPTG... DTGT	132
40048	GPTGPTGPTG PTG.	104
A16R	TGPTGPTGPT GPTGPTGPTG PTGPTGPTGP TGPTGPTGPT GDTGTTGPTG	200
40022	TGPTGPTGPT GPTGPTGPTG PTGPTGPTGP TGPTGPTGPT GDTGTTGPTG	182
40048 PT GPTGPTGPTG DTGTTGPTGP TGPTGPTGPT GDTGTTGPTG	146
A16R	PTGPTGPTGP TGDGTGTTGPT GPTGPTGPTG PTGPTGPTGA TGLTGPTGPT	250
40022	PTGPTGPTGP TGDGTGTTGPT GPTGPTGPTG PTGPTGPTGA TGLTGPTGPT	232
40048	PTGPTG... .. PT GPTGPTGPTG PTGPTGPTGA TGLTGPTGPT	184
A16R	GPSGLGLPAG LYAFNSGGIS LDLGINDPVP FNTVGSQFGT AISQLDADTF	300
40022	GPSGLGLPAG LYAFNSGGIS LDLGINDPVP FNTVGSQFGT AISQLDADTF	282
40048	GPSGLGLPAG LYAFNSGGIS LDLGINDPVP FNTVGSQFGT AISQLDADTF	234
A16R	VISETGFYKI TVIANTATAS VLGGLTIQVN GVPVPGTGSS LISLGAPIVI	350
40022	VISETGFYKI TVIANTATAS VLGGLTIQVN GVPVPGTGSS LISLGAPIVI	332
40048	VISETGFYKI TVIANTATAS VLGGLTIQVN GVPVPGTGSS LISLGAPIVI	284
A16R	QAITQITTP SLVEVIVTGL GLSLALG TSA SIIIEKVA	388
40022	QAITQITTP SLVEVIVTGL GLSLALG TSA SIIIEKVA	370
40048	QAITQITTP SLVEVIVTGL GLSLALG TSA SIIIEKVA	322

图2 3株炭疽杆菌 BclA 氨基酸序列比较
黑体部分为 CLR 区域,突出显示为 BclA 重复

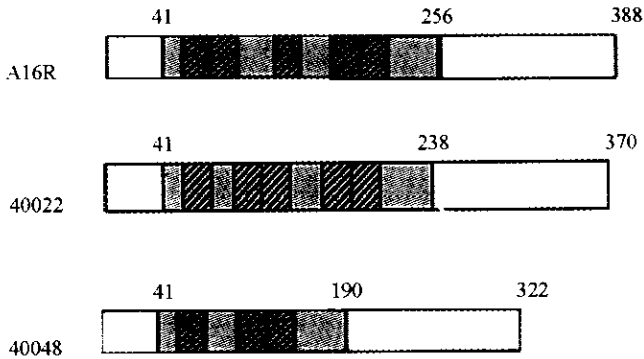


图3 3株炭疽杆菌 BclA 蛋白模式图
阴影部分为 CLR 区域, 斜线部分为 BclA 重复

2.3 不同菌株 BclA 序列分析

实验测定的 3 株炭疽菌株与国外报道的 12 株菌株 BclA 蛋白比较见表 1。A16R 株和 40048 株的 BclA 与国外报道菌株长度不同, 分别含有 388 个和 322 个氨基酸, 72 个和 50 个 GXX 重复, 5 个和 3 个 BclA 重复。40048 株具有 3 个 BclA 重复的模式在国外报道的菌株中没有出现。另一株 40022 的 BclA 与国外报道的 53169 株完全一致, 含有 370 个氨基酸, 66 个 GXX 重复, 5 个 BclA 重复。

表 1 15 株炭疽杆菌 BclA 蛋白的分析比较

菌株*	BclA 基因 (bp)	BclA (aa)	CLR (aa)	GXX/GPT	BclA 重复	GenBank 注册号
7702 (steme)	1338	445	273	91/71	8	AJ516937
8189	1176	391	219	73/57	6	AJ516938
<u>A16R</u>	1167	388	216	72/58	5	AY995120
Ames	1149	382	210	70/54	6	AJ516936
53169	1113	370	198	66/52	5	AJ516939
<u>40022</u>	1113	370	198	66/52	5	AY995121
<u>40048</u>	969	322	150	50/40	3	AY995122
9602R	789	262	90	30/22	2	AJ516941
A2R	789	262	90	30/22	2	AJ516940
6183R	789	262	90	30/22	2	AJ516942
6602	762	253	81	27/21	1	AJ516943
RA3R	762	253	81	27/21	1	AJ516945
7611R	762	253	81	27/21	1	AJ516944
5725R	735	244	72	24/18	1	AJ516946
4229	672	223	51	17/11	1	AJ516947

* 黑体下划线为本实验测定菌株, 其余为国外报道菌株^[7]

3 讨论

BclA 氨基端 40 个氨基酸和羧基端 132 个氨基酸在不同菌株中是完全相同的,而中间的胶原样区域 (CLR) 是高度多态的。已发表的 12 株炭疽杆菌的 BclA 中, GXX 重复的数目从 17-91 不等,可分为 8 组, BclA 重复数目有 1、2、5、6、8 几类,但未发现 3、4、7 的重复模式^[7] (表 1)。而本实验测定的 A16R 株和 40048 株的 BclA 基因序列不同与任何已报道的其它炭疽菌株,其编码的蛋白分别包含 72 个和 50 个 GXX 重复,属于 2 个新组。特别是 40048 株具有 3 个 BclA 重复的模式在国外报道的菌株中没有发现。另一株 40022 的 BclA 与国外报道的 53169 株完全一致,提示它们在基因型上高度相似。

炭疽芽孢杆菌菌株间的基因差异很小,给基因分型造成困难。目前主要使用多位点数目可变串联重复序列分析 (MLVA) 来进行分子分型。Keim 等使用细菌染色体和质粒上的 8 个基因位点进行分型,将 426 株炭疽杆菌分成 89 个型^[8]。另一项研究描述了 14 个炭疽芽孢杆菌多态性标志,有 5 个高度多态,其中有 1 个 Ceb-Bams13 就在 BclA 基因内^[9]。BclA 蛋白由于 CLR 区域中 GXX 氨基酸重复序列数目的多态性而导致其发状菌丝长短的多样性^[7],是首个被证实基因变化与表型变化相关的包含可变串联重复序列 (VNTR) 的炭疽芽孢杆菌蛋白,因此为在亚显微结构也无法鉴别的炭疽菌的分型提供了新的方法。

Steichen 等发现 BclA 是炭疽芽孢主要的免疫原^[4],近年来也发现抗芽孢抗体对炭疽感染具有免疫保护作用^[10],因此 BclA 有可能成为一种炭疽疫苗组分。BclA 的长度多态性对炭疽芽孢的致病性和对环境的抵抗力的影响还有待观察。BclA 蛋白富含苏氨酸残基,被高度的糖基化,可能与芽孢的稳定性密切相关。而芽孢外壁发状菌丝位于芽孢的最外面,因此 BclA 的变化也可能与芽孢对不同环境的适应有关。

对我国炭疽杆菌 BclA 蛋白多态性的分析为进行炭疽杆菌的基因分型以及研究炭疽芽孢的免疫原性和致病机理打下基础。

参考文献

- [1] Mock M, Fouet A. *Annu Rev Microbiol*, 2001, **55**: 647 ~ 671.
- [2] Matz LL, Beaman T C, Gerhardt P. *J Bacteriol*, 1970, **101**: 196 ~ 201.
- [3] Liu H, Bergman N H, Thomason B, *et al.* *J Bacteriol*, 2004, **186** (1): 164 ~ 178.
- [4] Steichen C, Chen P, Kearney J F, *et al.* *J Bacteriol*, 2003, **185** (6): 1903 ~ 1910.
- [5] Todd SJ, Moir A J G, Johnson M J, *et al.* *J Bacteriol*, 2003, **185** (11): 3373 ~ 3378.
- [6] Sylvestre P, Couture-Tosi E, Mock M. *Mol Microbiol*, 2002, **45** (1): 169 ~ 178.
- [7] Sylvestre P, Couture-Tosi E, Mock M. *J Bacteriol*, 2003, **185** (5): 1555 ~ 1563.
- [8] Keim P, Price L B, Klevytska A M, *et al.* *J Bacteriol*, 2000, **182**: 2928 ~ 2936.
- [9] Le Fleche P, Hauck Y, Onteniente L, *et al.* *BMC Microbiol*, 2001, **1**: 2.
- [10] Brossier F, Levy M, Mock M. *Infect Immun*, 2002, **70**: 661 ~ 664.