

实用生物信息技术课程期末交流报告

生物信息技术在腐败梭菌病基因工 程疫苗研究中的应用

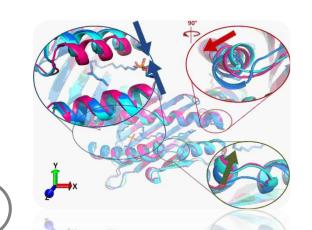
报告人:彭国瑞

小组成员:安兴奎(组长)、薛庆婉

张启龙、彭国瑞

组 别: G13

报告内容



课题研究背景

课题研究内容

生物信息技术的应用

研究进展

下一步工作设想



研究背景 🙎



- 腐败梭菌(Clostridium septicum)是一种革兰氏阳性厌氧杆 菌,广泛分布于土壤,人和动物消化道及粪便中,是一种 常见人畜共患病原菌, 其致病范围广, 可引起多数动物和 人的恶性水肿病,伤口感染可致气性坏疽病。
- 另外,已有证实该菌还与人的直肠癌有关。



临床医学











实用生物信息技术课程期末交流报告



动物医学



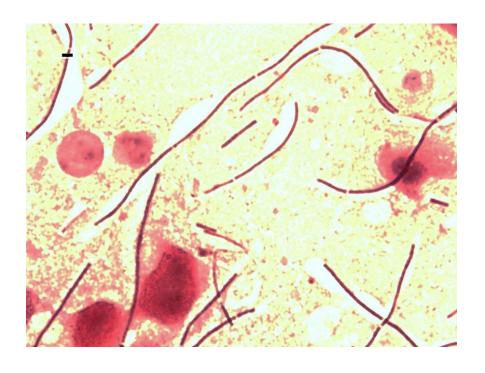
羊经消化道感染引起的羊快疫(Braxy),是一种常见、多发、非接触、致死性传染病,以突然发病、不表现临床症状即发生急性死亡为特征。



实验动物模型









腐败梭菌α外毒素



腐败梭菌产生的α毒素是该菌最主要的致死性毒力因子,并且也是唯一经过鉴定的毒力因子和保护性抗原。

具有溶血、致死和坏死三种生物活性,直接引起动物急性休克性死亡。

因此,对α毒素研究在动物疾病防控和公共卫生学中均具有十分重要的意义。



研究内容 《



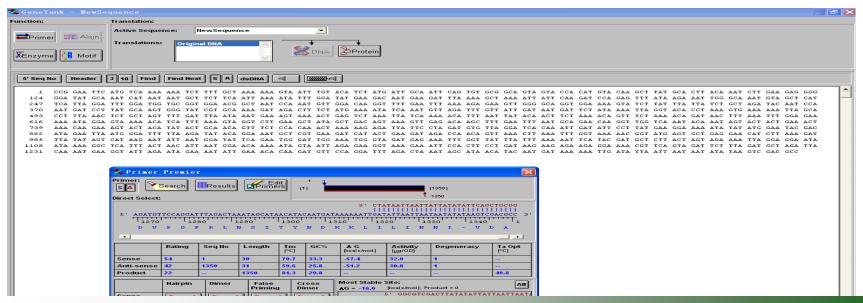
- 设计引物, 扩增获得α毒素基因;
- 构建含α毒素基因的重组工程菌:
- 对制备得到的重组α毒素的生物学特性研究;
- 对重组α毒素的免疫原性进行研究:
- 分析α毒素的氨基酸序列特性与空间结构。



一、引物设计



- NCBI核酸数据库查找Alpha Toxin Gene of Clostridium septicum;
- 参考已登录的完整基因用primer5.0设计上下游扩增引物;
- · PCR扩增获得α毒素基因。







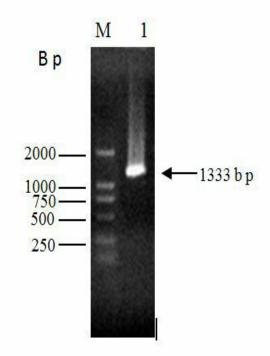


图1 腐败梭菌α毒素基因的PCR产物

Fig.1 Agaroegel eletrophoresis of PCR products of α-toxin gene from clostridium septicum C55-1



二、构建克隆表达载体



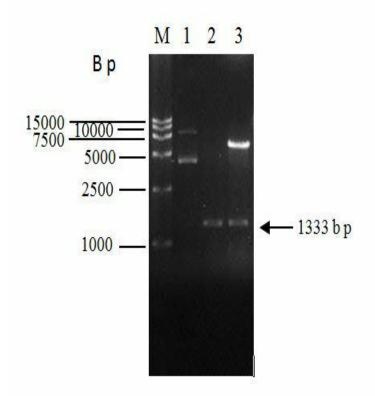


图2 重组表达质粒pET28a-csa的鉴定

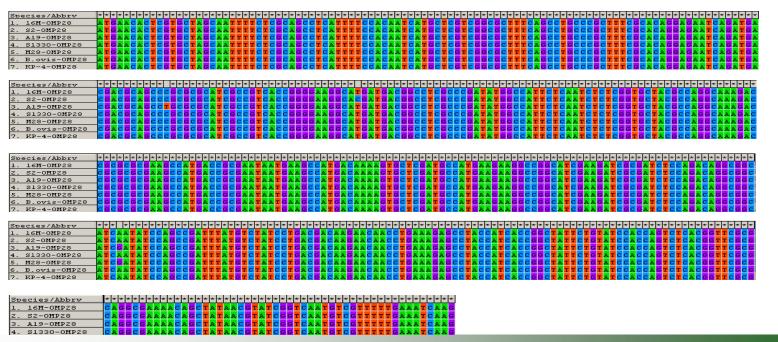
Fig.2 Analysis of recombinant prokaryotic expression plasmids pET28a-csa



基因序列比对



- 1、对构建的克隆表达载体进行序列测定;
- 2、将获得的序列与NCBI已公布的序列作比对;
- 3、用mega软件将目的基因序列与已提交的腐败梭菌α毒素基因序同原性列比对,序列相似度近100%。





三、重组α毒素的表达



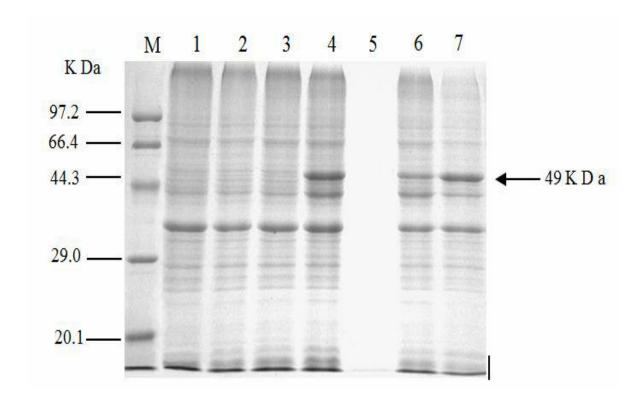


图3 重组表达质粒在大肠杆菌 BL21中的表达 Fig.3 Recombinant expression plasmids expressed in E.coil BL21



氨基酸序列比对

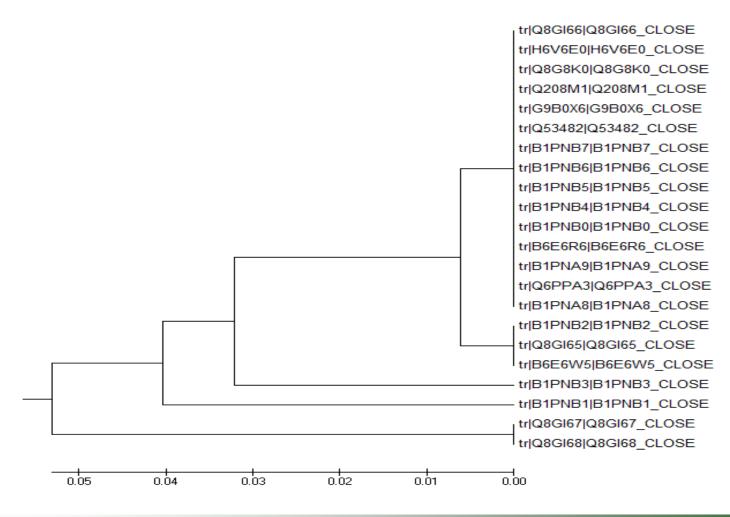


Species/Abbrv	*******************************
1. 16M-0MP28	MNTRASNFLAASFSTIMLVCAFSLEAFAGENGMETGEFARIAVECECMMIASERGMAILNLSVLEGAKTAREAMIENNEAMEKVLEAMEKACIEGEFC
2. S2-OMP28	MNTRASNFLAASFSTIMLVCAFSLEAFAGENGMETGEARIAVECECEMTASECMAILNLEVLEGAKTANNEAMTENVLEAMEKVLEAMEKACIEDEC
3. A19-0MP28	MNIRASNFLAASFSIIMLVCAFSLEAFAGENGMIIGEGEAFACENGMIAEGEARIAVICEGMIIASEGMAILNISVLEGAKIAEARIANNEAMINVLEAMINACIEGEG
4. S1330-0MP28	MNTRASNFLAASFSTIMLVCAFSLEAFAGENGMETGPARIAVECECMMTASPOMAILNISVLEGAMEAMEAMEMULDAMEKACIEDEG
5. M28-0MP28	MNTRASNIFLAASISTIMLV CAFSL PAFAQENQMITQPARIAVICE CMMTASPOMAILNISVL ROAKTARBAMTANNEAMIKVLDAMKKAGIED ROLQIIGG
6. B.ovis-OMP28	MNTRASNIFLAASISTIMLV <mark>gafslpafaqenqminqpar</mark> lavig <mark>gec</mark> mmiaspomailnlsvl <mark>rqakiarbambaminvldamkkagiboro</mark> lqiigg
7. KP-4-0MP28	MNTRASNFLAASFSTIMLVGAFSLPAFAQENQMTTQPARIAVTGEGMMTASPDMAILNLSVLRQAKTARBAMTANNBAMTKVLDAMKKAGIEDRDLQTGG
Species/Abbrv	** ** ** ** ** ** ** **
1. 16M-0MP28	INIQPIYVYPDDKNNLKEPTITGYSVSTSLTVSVRELANVCKILDESVTLGVNQGGDLNLVNDNPSAVINEARKSAVANAIAKAKTLADAAGVGLGRVVE
2. S2-OMP28	INIOPIYVYPDDKNNLKEPTITCYSVSTSLTVEVRELANVCKILDESVTLCVNOGGDLNLVNDNPSAVINEARKEAVANAIAKAKTLADAACVGLGRVVE
3. A19-OMP28	IDIQPIYVYPDDKNNLKEPTITGYSVSTSLTVRVRELANVCKILDESVTLGVNQGGDLMLVNDNPSAVINEARKRAVANAIAMAKTLADAAGVGLGRVVE
4. S1330-OMP28	INIQPIYVYP <mark>DDKNNLKEPTITGYEVSTSLTVEVRE</mark> LANVCKIL <mark>DESVTLGVNQGGDLMLVNDNPS</mark> AVIN EARKE AVANAIAKAKTLADAAGVGLGEVVE
5. M28-OMP28	IDIQPIYVYPDDKNNLKEPTITGYEVSTSLTVRVRELANVCKILDESVTLGVNQGGDLNLVNDNPSAVINEARKRAVANAIAKAKTLADAAGVGLGRVVE
6. B.ovis-OMP28	INIQPIYVYPDDKNNLKEPTITGYSVSTSLTVRVARLANVÇKILDESVTLÇVNQGÇDLMLVNDNPSAVINEARKRAVANAIAKAKTLADAAGVÇLÇRVVE
7. KP-4-0MP28	INIQPIYVYPDDKNNLKEPTITGYSVSTSLTVRVRELANVCKILDESVTLGVNQGGDLNLVNDNPSAVINEARKEAVANAIAKAKTLADAAGVGLGRVVE
7. KF-4-0HF20	「日本工業日子 F.A. 子室の経験性性の必要を与するとなった。
Species/Abbrv	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
1. 16M-0MP28	ISBLSBBBM PMPIARGE PTMLAAA PMMSVPIAA GEMSYNVSVMVVFBIK
2. S2-OMP28	ISBLSBBBM PMPIARGE FEMILAAA PMMSVPIAA GEMSYNVSVM VVFEIK
3. A19-0MP28	ISELSEDEM EMPIAEGE FETHLAAA EMMEVEIAA GEMEYNVEVM VVFEIK
4. S1330-OMP28	ISELSRPPMPMPIARCOFRIMLAAAPDMSVPIAAGEMSYNVSVMVVFEIR
5. M28-OMP28	ISELSRPPMPMPIARCOFRIMLAAAPDMSVPIAAGEMSYNVSVMVVFEIK
6. B.ovis-OMP28	ISELSRPEMEMEMEIARGEFRIMLAAAEMISVEIAAGEMSYNVSVMVVFEIK
7. KP-4-0MP28	ISELSEPENEMPIAEGEFRIMLAAA BONSVEIAAGENSYNVSVEVVVFEIK

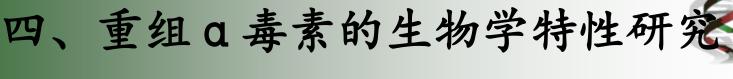


构建进化树









1、用腐败梭菌阳性高免血清作为一抗对表达产物进 行Western-blot分析

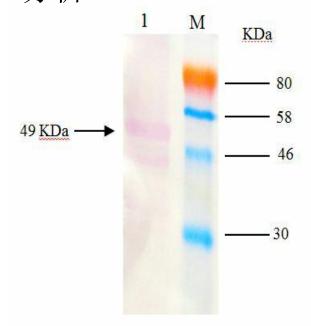


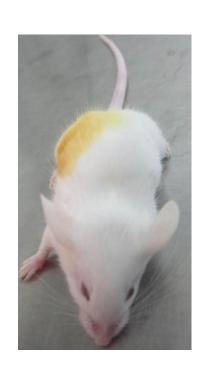
图4 表达产物的Western-blot分析

Fig.4 Western-blot analysis of expression products



2、重组 a 毒素的毒性测定







重组α毒素尾静脉注射小鼠,24h内即可致死小鼠,毒性较强的活性成分甚至注射后1min内小鼠即发生死亡,所有死亡小鼠生前均表现出与天然毒素相同的被毛粗乱、失明和后肢麻痹等中毒症状。

经测定1mL重组α毒素混合液能使350只小鼠死亡。



五、重组α毒素的免疫原性



 将含α毒素的重组大肠杆菌经灭活脱毒处理后制成 腐败梭菌病灭活疫苗免疫大耳白兔。

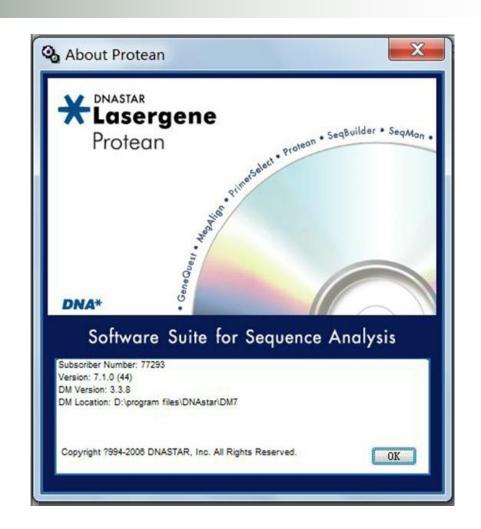
 免疫一次后,用20个致死量的天然毒素攻击,对 照组全部死亡,免疫组全部健活。

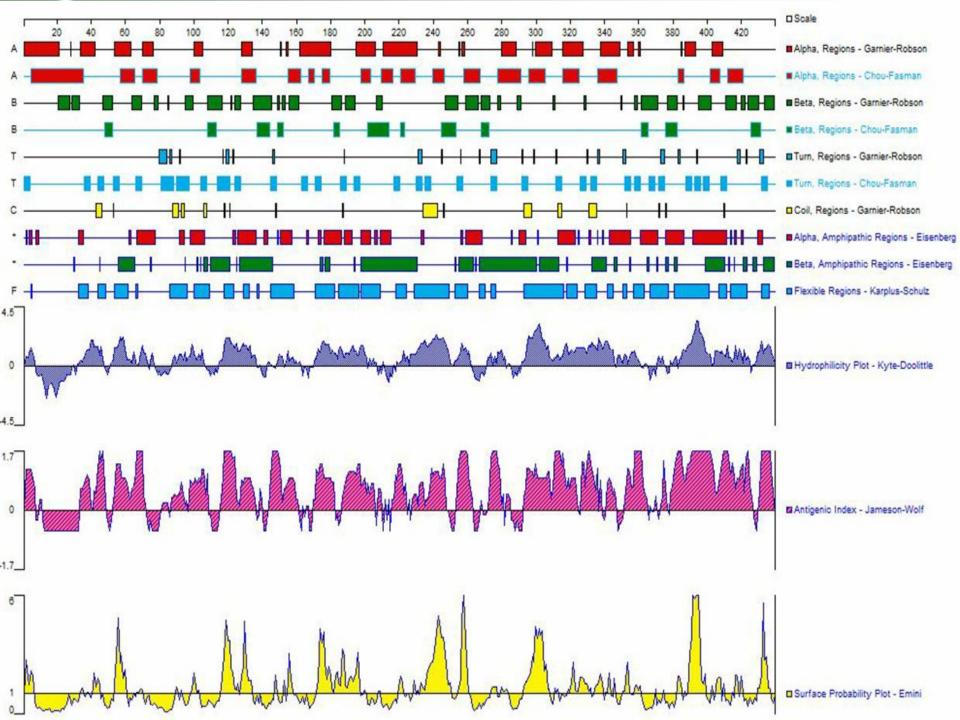


六、α毒素蛋白质结构与序列分析?



1、使用DNAstar-Protean对重组α毒素的氨酸序列进行分析,获得其α螺旋、β折叠、亲水性、以及抗原表位等性质。

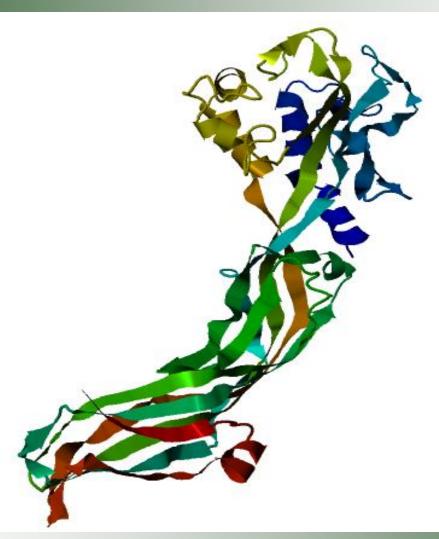






2、重组 a 毒素的结构预测







下一步工作设想



1、完善腐败梭菌病基因工程疫苗实现商品化应用。

- 2、以重组α毒素氨基酸序列抗原表位分析结果为依据,进一步分析能够刺激机体产生免疫应答的关键位点。
- 3、以与预测的重组α毒素空间结构结果为依据,通过试验验证其产生生物活性的表位





