

周俊明, 何孔旺, 倪艳秀, 等. 猪源马链球菌兽疫亚种类 M 蛋白原核表达及其小鼠免疫保护力分析[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(3): 590-594.

doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2015.03.020

猪源马链球菌兽疫亚种类 M 蛋白原核表达及其小鼠免疫保护力分析

周俊明, 何孔旺, 倪艳秀, 祝昊丹, 俞正玉, 茅爱华, 吕立新, 温立斌, 张雪寒, 王小敏, 汪伟, 李彬, 郭容利

(江苏省农业科学院兽医研究所, 农业部兽用生物制品工程技术重点实验室, 国家兽用生物制品工程技术研究中心, 江苏 南京 210014)

摘要: 为了原核表达猪源马链球菌兽疫亚种去除信号肽的类 M 蛋白质, 并分析该蛋白质对小鼠的免疫保护力, 克隆了马链球菌兽疫亚种 CY 菌株去除信号肽的类 M 蛋白质基因 *Szp*, 并将 *Szp* 基因插入 pET28a 表达载体, IPTG 诱导, 获得重组类 M 蛋白质, 弗氏佐剂乳化重组类 M 蛋白质后, 3 次免疫小鼠, 用同源菌株 CY 攻击。诱导获得分子量约 5.8×10^4 的重组蛋白质, 免疫印迹结果表明该重组类 M 蛋白质能够被马链球菌兽疫亚种猪多抗识别。类 M 蛋白质免疫小鼠的存活率为 60%, 弗氏佐剂乳化灭活 CY 免疫小鼠的存活率为 70%, PBS 对照组小鼠攻毒后 6 d 内全部死亡。表达的类 M 蛋白质可以给予 ICR 小鼠部分的免疫保护力, 保护效果略低于 CY 全菌灭活苗, 提示可以对马链球菌兽疫亚种多种免疫保护性抗原进行联合, 从而进一步提高对动物的免疫保护力。

关键词: 马链球菌兽疫亚种; 类 M 蛋白质; 原核表达; 疫苗

中图分类号: S858.282.61⁺1 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2015)03-0590-05

Prokaryotic expression of M-like protein from *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* of porcine origin and its immunoprotection in mice

ZHOU Jun-ming, HE Kong-wang, NI Yan-xiu, ZHU Hao-dan, YU Zheng-yu, MAO Ai-hua, LÜ Li-xin, WEN Li-bin, ZHANG Xue-han, WANG Xiao-min, WANG Wei, LI Bin, GUO Rong-li

(Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Veterinary Biological Engineering and Technology, Ministry of Agriculture/National Center for Engineering Research of Veterinary Bio-products, Nanjing 210014, China)

Abstract: An open reading frame encoding M-like protein from strain CY of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* of porcine origin without signal sequence was amplified by PCR using chromosomal DNA of CY as template. Amplicon was inserted into plasmid pET28a and transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3). A His-tag fusion protein SzP was then induced with IPTG. Mice were immunized three times with SzP and challenged by the homologous strain CY. The fusion protein SzP with molecular weight about 5.8×10^4 showed the specific immunoreactivity with pig antiserum against strain CY.

收稿日期: 2014-10-08

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项经费项目(201303041); 江苏省自主创新探索性研究项目[CX(11)2060]

作者简介: 周俊明(1983-), 男, 江苏东台人, 硕士, 助理研究员, 主要研究方向为动物传染病防治。(Tel) 025-84390988; (E-mail) zhoujm075@163.com

Six SzP-vaccinated mice survived out of 10 tested mice, and the figure was 7 for whole cell bacterin-vaccinated mice. Meanwhile, the control mice vaccinated with PBS all died 6 days post-infection. It is indicated that the fusion protein SzP delivered certain protection against *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*.

Key words: *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*; M-like protein; prokaryotic expression; vaccine

马链球菌兽疫亚种 (*Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, *S. zooepidemicus*, Sz) 是革兰氏阳性菌,属于链球菌兰氏分群 C 群,可感染多种宿主,包括马、牛、猪、家禽、羊、狗,偶尔也有感染人的病例出现^[1-3]。在中国该菌是一种重要的猪病原菌^[4],能引起猪链球菌病,临床表现有败血症、脑膜炎、心内膜炎和关节炎。1975 年四川省暴发了猪链球菌病,病原即 Sz,大量猪发病死亡,导致严重的经济损失^[5]。刘佩红等^[4]对上海地区 1998 年至 1999 年发病猪体内分离的 15 株猪链球菌进行鉴定,发现仍以 C 群链球菌为主,并且发现所分离的链球菌对多种抗生素产生了较强的耐药性,因此可以采取免疫手段控制该菌引起的猪链球菌病。

目前国内已有多 C 群链球菌灭活疫苗和弱毒苗,但是效果不佳,所以亟需研制出安全、有效的替代疫苗。Hofman 等^[6]利用马链球菌马亚种的类 M 蛋白质,成功地控制了马腺疫。A 群链球菌的 M 蛋白质可有效地刺激机体产生免疫应答^[7]。Moore 等报道 Sz 表面有一种耐酸、耐热的蛋白质^[8],类似于 A 群链球菌的 M 蛋白质,故称该蛋白质为类 M 蛋白质 (SzP)。Timoney 等首次克隆表达马源 SzW60 菌株的 SzP,发现用表达该蛋白质的大肠杆菌裂解物免疫小鼠,能够提供小鼠部分抵抗 W60 菌株攻击的能力^[9];并且在后期研究中,对去除信号肽的 SzP 进行了原核表达及纯化,发现纯化的 SzP 对 ICR 小鼠的免疫保护力为 90%^[10]。范红结等^[11]研究发现,国内分离的 8 株猪源 Sz 类 M 蛋白质基因的核苷酸同源性为 95.4% ~ 99.9%,与马源 W60 株、人源 25064 株的同源性分别为 84.8% ~ 87.0% 和 89.0% ~ 91.8%,提示猪源 Sz 的 SzP,可能有别于马源 Sz。本试验通过 pET28a 载体,表达猪源马链球菌兽疫亚种 CY 菌株去除信号肽的 SzP,选择小鼠为研究对象,旨在评估猪源 Sz 的 SzP 亚单位疫苗,为 SzP 亚单位疫苗的进一步研制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

马链球菌兽疫亚种菌株 CY (分离自发生败血症的病猪体内)、pET-28a 表达质粒、Sz 猪抗血清等均由本实验室保存;THB 培养基,购于美国 BD 公

司;BamH I 酶、Xho I 酶、T4 DNA 连接酶、Ex-Taq DNA 聚合酶,购自大连宝生物工程有限公司;DNA 凝胶回收试剂盒、AxyPrep™ Plasmid Miniprep kit,购自 AXYGen 公司;BL21 感受态细胞、Trans5α 感受态细胞,购自北京全式金生物技术有限公司;HRP 标记的羊抗猪 IgG、HRP 标记的羊抗鼠 IgG、DAB 显色液,购自武汉博士德生物工程有限公司;TMB 购自 Amersco 公司;ELISA 板购自 Costar 公司;Protino Ni-TED 2 000 packed columns,购自 MACHEREY-NA-GEL 公司。

1.2 SzP 编码基因的扩增

用 THB 培养基培养菌株 CY,利用煮沸法提取其模板,参照 GenBank 登录的马链球菌兽疫亚种 CY 类 M 蛋白质编码基因 *Szp* 序列 AY26599,设计 1 对扩增 *Szp* 基因 112 ~ 1 152 bp 区域的引物 (P1:5'-AAG-GATCCGATTCTGTTGAGTCAGCTAA-3';P2:5'-CCTCTC-GAGTTAGTTTCTTTGCGTCTT-3'),并分别在两端添加 BamH I 和 Xho I 酶的酶切位点(引物中下划线部分),交由上海立菲生物技术公司进行合成。利用合成的上下游引物对 *Szp* 基因进行 PCR 扩增,PCR 产物经过琼脂糖凝胶电泳鉴定,用 DNA 凝胶回收试剂盒回收 *Szp* 片段。

1.3 pET28a-Szp 重组质粒的构建与鉴定

将回收的 *Szp* 片段和 pET28a 质粒,分别用 BamH I、Xho I 双酶切;在 T4 DNA 连接酶作用下,将双酶切后的 *Szp* 片段和 pET28a 于 4 ℃ 连接 16 h,再转化进入感受态 BL21;将转化的 BL21 细菌平铺于含卡那霉素 (30 μg/ml) 的 LB 平板,37 ℃ 培养过夜。挑取平板上的菌落,接种于含卡那霉素 (30 μg/ml) 的 LB 液体培养基中,37 ℃ 培养过夜,提取重组细菌的质粒进行 BamH I、Xho I 双酶切鉴定,获得重组质粒 pET28a-Szp,送至上海立菲生物技术公司进行测序鉴定。

1.4 阳性重组菌的诱导表达

利用含有卡那霉素的 LB 液体培养基,体外培养转化有 pET28a-Szp 的重组菌,振荡培养 (220 r/min),至 OD_{600} 值达到 0.4 ~ 0.6 时,加入终浓度 1 mmol/L 的 IPTG 诱导表达 3 h。

1.5 SzP 重组蛋白质的纯化

收集诱导后的菌液,离心获取菌体沉淀,参照

Protino Ni-TED 蛋白质纯化手册,进行重组蛋白质的纯化。利用 RC DC Protein Assay 试剂盒(美国 Bio-Rad 公司产品),测定纯化蛋白质浓度。

1.6 SzP 融合表达蛋白质的 Western-blot 分析

参照文献[12],将 pET28a-Szp 阳性重组菌诱导前、后的菌液分别进行离心,PBS 重悬菌体后,沸水浴 10 min,离心取上清;联合纯化的 SzP 重组蛋白质,共 3 份样品,进行 SDS-PAGE,转印到 PVDF 膜上,1%脱脂奶封闭 PVDF 膜;将 Sz 猪阳性血清稀释 1 000 倍作为一抗,HRP 标记的羊抗猪 IgG 稀释 5 000 倍作为二抗,DAB 显色,双蒸水终止反应。

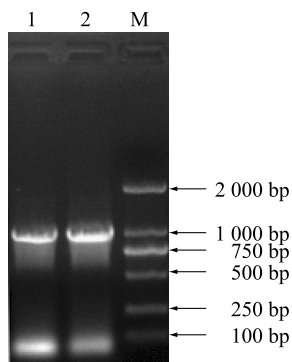
1.7 重组蛋白质免疫小鼠保护力分析

30 只清洁级 6 周龄 ICR 雌性小鼠(购自扬州大学比较医学中心)随机分为 3 组,每组 10 只,依次皮下注射 SzP 重组蛋白质、CY 全菌灭活苗和 PBS,其中 SzP 亚单位疫苗用量为每只 40 μ g,CY 全菌灭活苗用量为每只 10^8 CFU。首免时对免疫物添加弗氏完全佐剂乳化,随后进行 2 次免疫弗氏不完全佐剂乳化的免疫物,免疫间隔 14 d。末次免疫后 14 d,用 CY 菌株腹腔注射小鼠,接种剂量为 5×10^7 CFU。攻毒后连续观察 10 d。

2 结果

2.1 马链球菌兽疫亚种 M 蛋白质基因的扩增

PCR 产物经电泳后,显示 1 条 1 000 bp 左右的条带(图 1),大小与预期一致。



1,2: Szp 的 PCR 扩增片段;M: DL-2 000 marker。

图 1 Szp 基因的 PCR 扩增

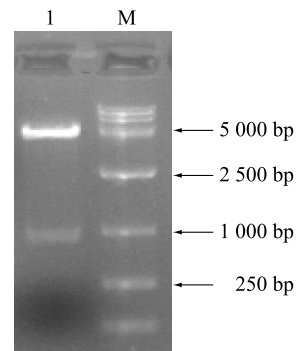
Fig. 1 The PCR amplification of Szp gene

2.2 pET28a-Szp 重组质粒的构建与鉴定

构建的 pET28a-Szp 重组质粒经过 *Bam*H I、

Xho I 双酶切,得到约 5 000 bp 及 1 000 bp 左右的条带(图 2),表明扩增的 Szp 基因片段已经插入到 pET28a 质粒中。

测序结果显示克隆进入 pET28a 载体的 Szp 基因长度为 1 041 bp,与已发表的 CY 菌株 Szp 基因存在 1 个碱基的错配,致使 307 位碱基由 G 突变为 A,编码氨基酸密码子由 GCA(丙氨酸 Ala)突变为 ACA(苏氨酸 Thr),未形成终止密码子。



1: pET28a-Szp 的 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切;M: DL-15 000 marker。

图 2 重组质粒 pET28a-Szp 的酶切鉴定

Fig. 2 Restriction endonuclease identification of recombinant expression plasmid pET28a-Szp

2.3 SzP 重组蛋白质诱导、纯化及 Western-blot 分析

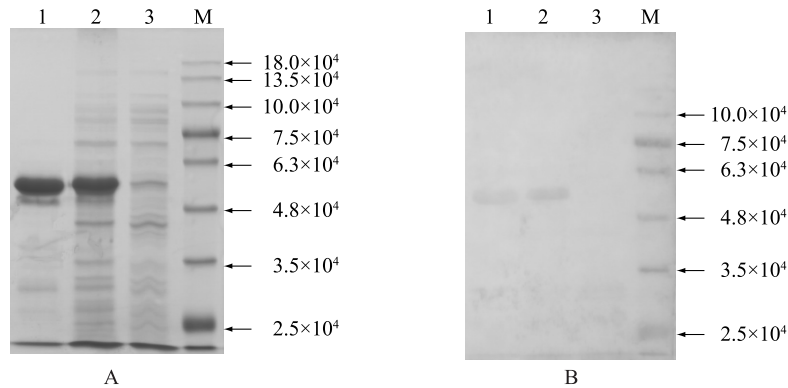
阳性重组菌经过 IPTG 诱导 3 h 后,获得分子量约 5.8×10^4 的 SzP 重组蛋白质。经过 Ni 柱亲和层析后,获得单一的 SzP 重组蛋白质。利用马链球菌兽疫亚种猪抗血清,用 Western-blot 法检测到 5.8×10^4 的 SzP 重组蛋白质(图 3)。

2.4 小鼠免疫保护试验

小鼠攻毒后,对照组小鼠 2 d 内死亡率达到了 60%,免疫组小鼠攻毒后 4 d 存活率维持在 90%,之后陆续出现死亡。发病较重的小鼠临床表现被毛粗立、精神沉郁、行动迟缓。在死亡小鼠肝脏中能够分离到马链球菌兽疫亚种菌株。SzP 重组蛋白质对小鼠的保护率为 60% (6/10),CY 灭活疫苗对小鼠的保护率为 70%,PBS 对照组小鼠全部死亡(图 4)。

3 讨论

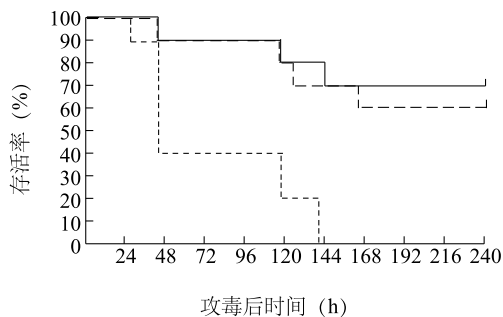
马链球菌兽疫亚种是引发猪链球菌病的一种重要病原菌。范红结等按马源兽疫亚种 W60 菌株的



1: Ni 柱纯化的 SzP 重组蛋白质;2: pET28a-SzP 阳性重组菌粒诱导后;3: pET28a-SzP 阳性重组菌诱导前;M: 蛋白质 Marker。

图 3 SzP 重组蛋白质纯化 (A) 及 Western-blot 分析 (B)

Fig. 3 Purification (A) and Western-blot (B) of the recombinant protein SzP



— CY灭活疫苗组; - - - SzP重组蛋白质组; ··· PBS对照组

图 4 免疫小鼠攻毒后的存活率

Fig. 4 The survival rates of the immunized mice post-infection

SzP 编码基因设计引物,扩增了猪源马链球菌兽疫亚种 35246 菌株的 SzP 编码基因,该段基因包含了 SzP 的信号肽编码序列,随后扩增的基因片段插入 pET32a 载体,重组质粒转化进入 BL21,经过 IPTG 诱导,未能获得重组 SzP^[13]。2011 年 Lin 等利用猪痘病毒载体,表达了 35246 菌株去除信号肽的 SzP,并通过小鼠免疫试验,发现该重组 SzP 对小鼠有 70% 免疫保护力^[14]。Timoney 等利用原核表达载体 pET15b,表达了马源 SzNC78 菌株去除信号肽的 SzP,并利用纯化的 SzP 免疫小鼠,发现 90% 受免小鼠可以抵抗 NC78 的攻击^[9]。

本研究首次对猪源 Sz 去除信号肽的类 M 蛋白质进行了原核表达及纯化,获得分子量约 5.8×10^4 的重组蛋白质,明显高于推测的重组蛋白质分子量 3.7×10^4 。对插入 pET28 载体的 Szp 基因序列测序,发现推导的重组蛋白质 C 端 LPSTGE 上游存在 11

个重复 PEPK,推测由于该部分富含脯氨酸,造成蛋白质迁移率下降,出现表达的重组 SzP 蛋白质表观分子量大于理论分子量的现象,该结果与 Timoney 等观察到的结果^[9]一致。

SzP 能抗吞噬细胞的吞噬作用,有利于细菌在动物体内的生存和繁殖。针对 SzP 的抗体,具备调理素作用,可增强 C3b 在细菌表面的沉积^[15],并且中和 SzP 下调肺泡巨噬细胞表达 TNF α 、TLR6 的能力^[16]。本研究对纯化的 SzP 进行小鼠免疫保护力分析,发现该蛋白质 3 次免疫小鼠后,对小鼠的免疫保护率为 60%,略低于 Sz 灭活疫苗的保护率,与痘病毒表达的类 M 蛋白质保护率相当^[14]。猪源 Sz 的类 M 蛋白质对小鼠的免疫保护率,比马源 Sz 类 M 蛋白质的保护率低,一方面与 Sz 菌株分离来源不同相关,不同地域和不同宿主分离的 Sz 菌株可能会存在致病力上的差异,另一方面类 M 蛋白质编码基因在猪源 Sz 和马源 Sz 之间存在一定差异,从而引起不同的免疫保护表现。Timoney 等^[9]利用基因文库,从马源 SzNC78 菌株中筛选获得一系列免疫原性蛋白质,对其中 11 种蛋白质进行了表达、纯化,并分析了这些蛋白质对 ICR 小鼠的免疫保护力,发现 M 蛋白质(SzM)、膜锚定蛋白质(MAP)和丝氨酸蛋白酶(ScpC)组合形成的三价疫苗,与单组份亚单位疫苗相比较,可提高 10 倍小鼠耐受的攻毒剂量。另外, Timoney 等^[9]还提出, ScpC、SzM 和链激酶(SK)组合形成的亚单位疫苗,理论上可以减轻 Sz 对肺脏的损伤。尽管上述具备良好免疫保护力的蛋白质是在研究马源 Sz 的基础上获得的,但是马源 Sz

和猪源 Sz 细菌在分类上归属同一种,仅仅是细菌分离的宿主不同,所以,对猪源 Sz 中类似蛋白质进行组合研究,或许可以补充单组份亚单位疫苗的不足,对控制 Sz 引发的猪链球菌病有积极作用。

参考文献:

- [1] BERES S B, SESSO R, PINTO S W, et al. Genome sequence of a Lancefield group C *Streptococcus zooepidemicus* strain causing epidemic nephritis; new information about an old disease [J]. PLOS One, 2008, 3(8):e3026.
- [2] EYRE D W, KENKRE J S, BOWLER I C, et al. *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus* meningitis--a case report and review of the literature [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2010, 29(12):1459-1463.
- [3] MORI N, GUEVARA J M, TILLEY D H, et al. *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* meningitis in Peru [J]. J Med Microbiol, 2013, 62(2):335-337.
- [4] LIU P H, SHUN S F, WANG Y K, et al. Identification of swine *Streptococcus* isolates in Shanghai [J]. Chin J Vet Med, 2001, 21(1):42-46.
- [5] FENG Z G, HU J S. Outbreak of swine streptococcosis in Sichuan province and identification of pathogen [J]. Anim Husbandry Vet Med Lett, 1977, 2:7-12.
- [6] HOFMAN A M, STAEMPFLI H R, PRESCOTT J F. Field-evaluation of a commercial M-protein vaccine against *Streptococcus-equi* infection in foals [J]. Amer J Vet Res, 1991, 52(4):589-592.
- [7] ROBINSON J H, KEHOE M A. Group-A *Streptococcal*-M proteins virulence factors and protective antigens [J]. Immunol Today, 1992, 13(9):362-366.
- [8] MOORE B O, BRYANS J T. Antigenic classification of group C animal streptococci [J]. J Am Vet Med Assoc, 1969, 155(2):416-421.
- [9] TIMONEY J F, WALKER J, ZHOU M, et al. Cloning and sequence analysis of a protective M-like protein gene from *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* [J]. Infect Immun, 1995, 63(4):1440-1445.
- [10] VELINENI S, TIMONEY J F. Identification of novel immunoreactive proteins of *Streptococcus zooepidemicus* with potential as vaccine components [J]. Vaccine, 2013, 31(38):4129-4135.
- [11] 范红结,陆承平,唐家琪. 猪源马链球菌兽疫亚种中国分离株类 M 基因特性分析[J]. 中国农业科学, 2006, 39(1):210-214.
- [12] 汪家政,范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京:科学出版社, 2000.
- [13] 范红结,陆承平,唐家琪. 马链球菌兽疫亚种类 M 蛋白的基因克隆、序列分析及其在猪源链球菌的检测[J]. 微生物学报, 2004, 44(5):617-620.
- [14] LIN H X, HUANG D Y, WANG Y, et al. A novel vaccine against *Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus* infections: The recombinant swinepox virus expressing M-like protein [J]. Vaccine, 2011, 29(40):7027-7034.
- [15] MA Z, ZHANG H, YI L, et al. Interaction between M-like protein and macrophage thioredoxin facilitates antiphagocytosis for *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* [J]. PLoS ONE, 2012, 7(2):e32099.
- [16] MA Z, ZHANG H, YI L, et al. Microarray analysis of the effect of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* M-like protein in infecting porcine pulmonary alveolar macrophages [J]. Plos One, 2012, 7(5):e36452.

(责任编辑:张震林)