

猪链球菌 2 型一种新的免疫原性蛋白的鉴定及特性分析

张 炜 吴宗福 陆承平*

(南京农业大学农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室 南京 210095)

摘 要 利用免疫蛋白组学方法, 鉴定出链球菌 2 型(*Streptococcus suis* type 2, SS2)江苏分离株 HA9801 具有免疫反应性的蛋白 HM3。应用同源性比对、信号肽预测、跨膜区预测及亚定位预测等生物信息学方法对该蛋白进行分析, 结果显示: 同源性最高的蛋白为屎肠球菌胞外溶解物结合蛋白(41%); 蛋白序列中含有信号肽结构, 7-24 位氨基酸为该蛋白的跨膜区, 预测蛋白定位为除胞质外的未定位置。PCR 扩增出该蛋白的一段基因定向克隆到表达载体 pET-32a(+) 中并转化入 BL21(DE3) 宿主菌。重组菌经 IPTG 诱导后的 SDS-PAGE 图谱在 46kDa 处出现融合蛋白的条带。Western blot 表明, 此融合蛋白可被 SPF 微型猪抗 SS2 血清所识别, 提示该蛋白可作为该菌的亚单位疫苗的候选物。

关键词: 猪链球菌 2 型; 克隆表达; 免疫原性; 免疫蛋白组学

中图分类号: R37, R392 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2007)06-1050-05

猪链球菌(*Streptococcus suis*, SS)是重要的猪细菌病病原。该菌共有 35 个血清型, 其中 2 型 SS2 是最常见的致病血清型, 可致猪脑膜炎、肺炎及关节炎等^[1]。同时, SS2 也是重要的人兽共患病病原, 当人与患病猪及猪肉产品接触时, 可能导致脑膜炎、失聪、心内膜炎及败血性休克等^[2,3]。2005 年四川和 1998 年江苏爆发人感染猪链球菌, 分别导致 38 人和 14 人死亡^[4,5]。

SS2 发病很急, 往往来不及治疗, 所以应以疫苗预防为主。国内外对该菌的疫苗研究从未间断。全菌灭活菌被证明可以对同型猪链球菌的感染产生保护^[6]。除了灭活苗和活苗外, 也有多种亚单位苗被研制。例如溶菌酶释放蛋白(muramidase-released protein, MRP)、胞外因子(extracellular protein factor, EF)和溶血素(sulysin, SLY), 并证明对菌株感染有一定保护率^[7]。但是缺少这些蛋白的 SS2 菌株被证明也可以致病^[1,8,9]。所以应给予 SS2 其它具有免疫原性的蛋白, 特别是 SS2 不同菌株所共有的蛋白以关注, 以期研究出能针对更多不同菌株 SS2 感染的亚单位疫苗。

本实验利用蛋白组学与传统免疫学方法相结合而产生的免疫蛋白组学^[10]方法, 鉴定出可以被 SS2 免疫血清能识别的蛋白。将此类蛋白基因定向克隆到表达载体并在大肠杆菌中表达, 并用免疫转印评

价重组蛋白的免疫原性。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验菌株和实验动物: 猪链球菌 2 型 HA9801 株由本实验室分离、鉴定并保存; 大肠杆菌 TOP10、BL21(DE3) 由本实验室保存。无特定病原体(Specific pathogen Free, SPF)巴马系香猪由上海交通大学华修国教授提供。

1.1.2 主要试剂和仪器: 等电聚焦在 Bio-Rad 公司等电聚焦仪(Protean IEF cell)中进行, 等电聚焦用干胶条(pH 4-7)和蛋白质 Marker 购自 Bio-Rad 公司; 凝胶转印仪(型号 TE77)和组氨酸表达标签纯化柱(HisTrap™ HP)为 GE health care 公司产品; 辣根过氧化物酶酶标兔抗猪 IgG 为博士德公司产品; 胶内酶解和基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)由上海基康公司完成; pMD-18T 载体、Taq DNA 聚合酶、dNTP、BamH I 和 Sal I 内切酶、T4 DNA 连接酶和 DL2000 Marker 为大连宝生物工程有限公司产品; IPTG 为 Promega 公司产品。

1.1.3 引物的设计: 根据免疫蛋白组学鉴定出有免疫原性的蛋白 HM3, 即 SS2 P1/7 株 SSU1664 蛋白的

基金项目: 973 重大项目(2006CB504403)

* 通讯作者: Tel: 86-25-84396517; Fax: 86-02584396517; E-mail: jucp@njau.edu.cn

作者简介: 张 炜(1976-), 博士研究生, 安徽人, 研究方向为兽医微生物与免疫学。E-mail: wszw@yahoo.com.cn

收稿日期: 2007-03-22; 接受日期: 2007-05-22; 修回日期: 2007-08-23

基因(www.sanger.ac.uk),合成一对含 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切位点的引物: S 5' TATGGATCCATCCCTGTTGCA GAC 3'; A 5' CAGTCGACTAGCAGCATCATTAGC 3'。扩增其从 356 到 1143 共 787bp 的 DNA 片段。

1.1.4 免疫血清的制备:三只 SPF 香猪用 HA9801 灭活苗(成都药械厂生产)免疫,按说明书,每头肌肉注射 1mL;三周后 2 免,2 免后 2 周采血,用 ELISA 检测血清的效价,3 只猪的血清均为阳性,取效价最高的血清进行后续实验。

1.2 免疫原性蛋白的鉴定

HA9801 过夜培养物,按 Bumann 等所述的三氯乙酸/丙酮法提取该菌的上清蛋白^[11]。等电聚焦按以下程序在 17℃ 进行:主动水化 14h;250V,30min;500V 30min;4000V 3h;4000V 25,000Vh,同时进行 2 根胶条。等电聚焦完成,平衡后进行 SDS-PAGE。一块胶用于染色(考马斯亮蓝 R-250);另一块用作免疫转印,以 SPF 猪高免血清为一抗,兔抗猪 IgG 为二抗,二氨基联苯胺(Diaminobenzidine, DAB)显色。切取与转印膜上免疫反应点相对应染色胶上的点,进行胶内酶解和 MALDI-TOF-MS。所得到的肽质量指纹图谱(peptide mass fingerprint, PMF)用 MASCOT(<http://www.matrixscience.com>)和/或本地 MASCOT(<http://www.proteomics.cn/mascot>)进行检索。

1.3 蛋白序列的生物信息学分析

由免疫蛋白组学方法所鉴定得来的蛋白序列用 BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)进行同源性分析;信号肽预测软件 SignalIP(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalIP/>)进行信号肽预测;HMMTOP(<http://www.enzim.hu/hmmtop/>)进行预测跨膜区;PSORT(<http://www.psорт.org/>)预测该蛋白的亚细胞定位。

1.4 *hm3* 部分基因的克隆

反应条件为:94℃,4min;94℃ 30s;52℃ 30s;72℃ 30s;72℃ 10min;PCR 产物经 1% 琼脂糖电泳后,用 EB 染色后,用紫外灯观察。

1.5 重组表达质粒 pET32a-*hm3* 的构建及鉴定

扩增的 PCR 产物用胶回收试剂盒回收,用 pMD18-T Vector 连接,并转化于感受态细胞 TOP10 中。通过氨苄抗性平板筛选所得的阳性克隆,命名为 pMD18-T-*hm3*,提取质粒,进行双酶切鉴定。琼脂糖电泳后将回收目的片段 *hm3*,与双酶切过的载体 pET-32a 连接用 T4 连接酶进行连接,并转化入

BL21。阳性质粒命名为 pET32a-*hm3*,对鉴定的阳性克隆测序(由华大基因公司完成)。

1.6 重组蛋白的诱导表达与免疫转印

将 HM3 阳性菌落过夜培养物按 2% 的量接种于 LB 中,振荡培养至 OD 值在 0.4~0.6,加 IPTG 至终浓度 0.8mmol·L⁻¹,继续振荡培养。收集菌体,加上样缓冲液进行 SDS-PAGE(12% 分离胶、5% 浓缩胶)。电泳胶采用半干转印法(0.7mA/cm²,120min),将蛋白转印到 PVDF 膜上。5% 脱脂乳进行封闭,利用 HA9801 免疫的 SPF 猪的多抗为一抗,加入兔抗猪 IgG 二抗,DAB 显色。

1.7 重组蛋白的纯化及鉴定

参照说明书进行。注射器吸取蒸馏水,打开柱的塞子,用提供的接头将柱和注射器连接上,避免空气进入柱中,挪开拧断的末端,用 5ml 蒸馏水洗柱;用 5ml 结合缓冲液平衡柱子,流速 1mL/min;用注射器吸取已处理的样品上样;用 10mL 缓冲液洗涤;用 5ml 洗涤缓冲液洗脱,分 5 管收集,每管 1mL。每管取 20μL 用 SDS-PAGE 检测蛋白的分布及纯度。

2 结果

2.1 免疫蛋白组学

HA9801 上清蛋白的二维电泳图谱如图 1-A 所示,其免疫转印如图 1(B)所示。HM3 经质谱鉴定,获得 PFM 先用 MASCOT(<http://www.matrixscience.com>)检索,未有显著的结果,后改用内网 MASCOT(<http://www.proteomics.cn/mascot>)检索,鉴定为 SS P1/7 预测的 SSU1664 蛋白。

HA17 的 PFM 经 MASCOT 检索后,得出的结果为 SS2 的热休克蛋白 70(heat shock protein 70, DnaK),该蛋白与 *Streptococcus pneumoniae* 的 DnaK 高度同源(Identities = 580/607[95%]),而后者是一个已知的弱免疫原性的蛋白^[12]。所以 HA17 在转印膜显示的是一个蛋白形状的空白区域(图 1-B),应该是其免疫原性弱所致。

2.2 生物信息学分析

因 Sanger 中心上对 P1/7 的 SSU1664 未给出更多的注释,所以将此蛋白序列进行 BLAST,得分最高的为屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)的胞外溶解物结合蛋白第 5 家族成员[extracellular solute-binding protein family 5, Identities = 247/601(41%)],登录号为(GI|69246104)。对 SSU1664 信号肽的预测结果 100% 含有信号肽,切割位点 89.7% 位于第 31 位和第 32 位

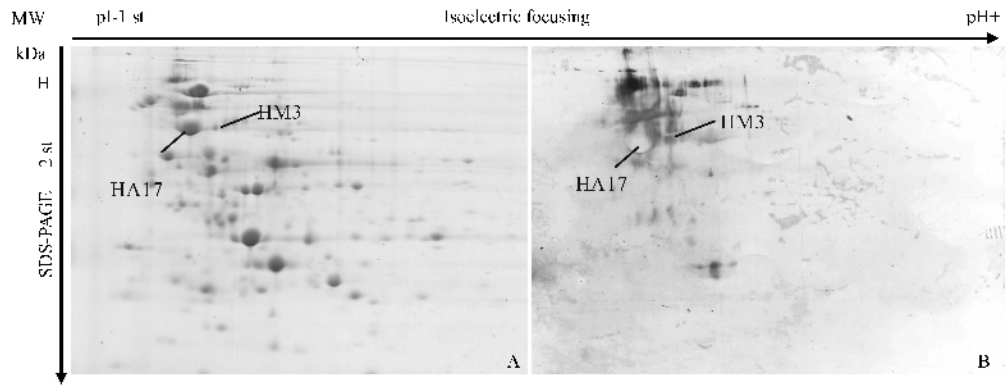


图 1 HA9801 上清蛋白 2D 电泳图谱 (A) 和 2D 免疫转印结果 (B)

Fig.1 2D profile (A) and 2D-western blotting (B) of the extracellular proteins of HA9801.

氨基酸之间。跨膜预测表明该蛋白有一个跨膜区，位于 7-24 位氨基酸。细胞亚定位的得分由高到低为(得分越高,存在于该位置的几率越大):胞外(4.05);膜浆膜(3.08);细胞壁(2.87);膜质(0.00)，最终的位置预测结果为未定。

2.3 PCR 结果和 T 载体克隆鉴定

PCR 产物的电泳表明,787bp 处出现与明显条带(图 2)。pMD18-T-hm3 经 *Bam*HI 和 *Sal*I 双酶切后经电泳可见,质粒分为 787bp 及 2600bp 两个片段。

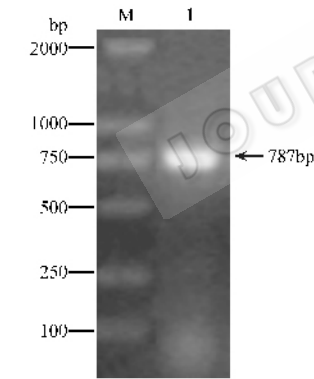


图 2 HM3 基因的 PCR 扩增产物

Fig.2 The PCR products of HM3 fragment gene. M :DL2000 ;1 :PCR products.

2.4 表达载体的鉴定

表达载体经测序表明读框正确,该序列与 Sanger 中心 SS2 P1/7(<http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/blast/submitblast/s-suis>)与 SSu1664 基因中相应序列比对,结果表明有 100%的同源性。

2.5 诱导表达和免疫转印

与诱导前相比,经 IPTG 诱导后,重组菌全菌 SDS-PAGE 45kDa 处出现一明显较粗的蛋白条带,其大小与融合蛋白理论分子量大小一致。经免疫转印后,PVDF 膜上 45kDa 处有一明显的反应条带(图 3)。

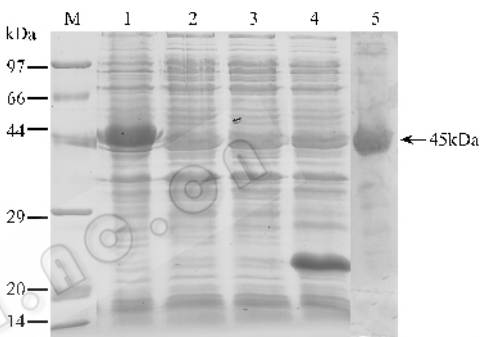


图 3 pET-HM3/BL21 重组菌全菌 SDS-PAGE 及免疫转印

Fig. 3 SDS-PAGE and Western-blotting of expressed recombinant proteins. M : Protein marker ;1 :Lysate of pET-HM3/BL21 after induced with IPTG 2-3 : Lysate of pET-HM3/BL21 before induced with IPTG 4 : Lysate of pETBL21 after induced with IPTG ;5 : Western blot analysis of products of pET-HM3/BL21 expression.

2.6 纯化

纯化后,分管收集,5 管电泳结果显示,45kDa 处出现明显条带而其它部分蛋白含量几乎为零(图 4)。

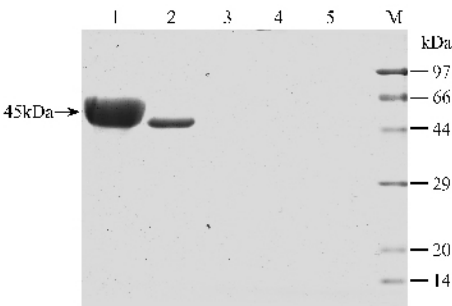


图 4 纯化蛋白 SDS-PAGE

Fig. 4 SDS-PAGE of purified recombinant protein. 1-5 : Ordinal collection purified proteins ; M : Protein marker.

3 讨论

定蛋白纯化,经氨基酸测序,然后根据所测蛋白的序列反推 DNA 序列,经数据库检索或 PCR 扩增得到要鉴定蛋白基因的序列。出于技术的限制,N 端一般只能测 15 个氨基酸,C 端则更少,10 个左右^[13]。蛋白组学作为后基因组时代的重要代表技术,其最大优势是可以将凝胶中的蛋白点进行生物质谱分析,再根据肽质量指纹图谱对基因组数据库进行检索,直接得出蛋白质及 DNA 序列。与以前的方法相比,更快速,更直接。

猪链球菌 2 型的自然感染很普遍^[14],本实验采用了 SPF 动物,大大提高实验的可信度。免疫前后的 ELISA 证实免疫前血清的效价为阴性,二免后的攻毒实验表明,免疫猪可以对 HA9801 产生保护,而空白组猪全部发病死亡^[15]。说明免疫猪体内含有保护性抗体,而此(类)抗体是由免疫疫苗中的保护性抗原产生的。

BLASTn 检索结果表明,最相似的蛋白基因为屎肠球菌的胞外溶解物结合蛋白第 5 家族成员,且此蛋白为预测蛋白。在革兰氏阳性菌中,胞外溶解物结合蛋白是一类通过 N-末端与膜锚定的蛋白,可能是溶解物跨膜转运的受体或触发器(<http://www.ebi.ac.uk/Databases/>)。作者在 HA9801 的膜相关蛋白的免疫蛋白组学研究中,发现 HM3 也可以被 SS2 的免疫血清所识别。这与对该蛋白的细胞 Psortb 在线工具定位预测相符合,进一步印证该蛋白同时存在于 SS2 的菌体表面及分泌物中。

比较蛋白组学分析发现,在 SS2 四川强毒分离株 ZY05719 和国外引进的弱毒株 T15 中,均检测到 HM3。另外,通过 BLASTX 检索,发现该蛋白基因也存在于 SS2 美洲株 89/1589 中。与一般熟知的 SS2 的 MRP、EF 和 SLY 等容易发生缺失相比^[1,8,9],HM3 可能是一种广谱性抗原,因此,该蛋白给亚单位疫苗的研制提供了更大的选择余地。

另一方面,免疫蛋白组学也存在一些困难。如蛋白经过了二个方向的电泳,横向与纵向或多或少的会出现拖尾。再转印到膜上,会将跑胶时产生的拖尾现象放大,很容易产生弥散状。这将给蛋白点比对带来很大的麻烦。本实验中,HM3 附近有一已知弱免疫原性的点 HA17,重复实验表明该点免疫转印在转印膜上都形成一未显色区域,很容易识别,给胶与转印膜的比对带来了很大的方便。

致谢 感谢蛋白组学网(<http://www.proteomics.com.cn/>)提供 MASCOT 检索工具。

参 考 文 献

- [1] Gottschalk M, Segura M. The pathogenesis of the meningitis caused by *Streptococcus suis*: the unresolved questions. *Vet Microbiol*, 2000, **76**(3):259–272.
- [2] Heidt MC, Mohamed W, Hain T, et al. Chakraborty T, Domann E. Human infective endocarditis caused by *Streptococcus suis* serotype 2. *J Clin Microbiol*, 2005, **43**(9):4898–4901.
- [3] Arends JP, Zanen HC. Meningitis caused by *Streptococcus suis* in humans. *Rev Infect Dis*, 1988, **10**(1):131–137.
- [4] Tang J, Wang C, Feng Y, et al. Streptococcal toxic shock syndrome caused by *Streptococcus suis* serotype 2. *PLoS Med*, 2006, **3**(5):e151.
- [5] 姚火春,陈国强,陆承平.猪链球菌 1998 年分离株病原特性鉴定.南京农业大学学报.1999, **22**(2):67–70.
- [6] Kebede M, Chengappa MM, Stuart JG. Isolation and characterization of temperature-sensitive mutants of *Streptococcus suis*: efficacy trial of the mutant vaccine in mice. *Vet Microbiol*, 1990, **22**(2–3):249–257.
- [7] Jacobs AA, van den Berg AJ, Loeffen PL. Protection of experimentally infected pigs by sulysin, the thiol-activated haemolysin of *Streptococcus suis*. *Vet Rec*, 1996, **139**(10):225–228.
- [8] Okwumabua O, Abdelmagid, Omar, Chengappa, M. M. Hybridization analysis of the gene encoding a hemolysin (sulysin) of *Streptococcus suis* type 2: evidence for the absence of the gene in some isolates. *FEMS Microbiol Lett*, 1999, **181**:113–121.
- [9] Galina L, Vecht U, Wisselink HJ, et al. Prevalence of various phenotypes of *Streptococcus suis* isolated from swine in the USA based on the presence of muraminidase-released protein and extracellular factor. *Can J Vet Res*, 1996, **60**:72–74.
- [10] Krah A, Jungblut PR. Immunoproteomics. *Methods Mol Med*, 2004, **94**:19–32.
- [11] Bumann D, Holland P, Siejak F, et al. A Comparison of Murine and Human Immunoproteomes of *Helicobacter pylori* Validates the Preclinical Murine Infection Model for Antigen Screening. *Infect Immun*, 2002, **70**(11):6494–6498.
- [12] Ling E, Feldman G, Portnoi M, et al. Glycolytic enzymes associated with the cell surface of *Streptococcus pneumoniae* are antigenic in humans and elicit protective immune responses in the mouse. *Clin Exp Immunol*, 2004, **138**(2):290–298.
- [13] 夏其昌,曾 嵘.蛋白质化学与蛋白质组学.北京:科学出版社,2004
- [14] Robertson ID, Blackmore DK, Hampson DJ, et al. A longitudinal study of natural infection of piglets with *Streptococcus suis* types 1 and 2. *Epidemiol Infect*, 1991, **107**(1):119–126.
- [15] 陆承平,姚火春,范红结,等.猪链球菌致病性研究及其公共卫生意义.中国预防医学杂志,2006, **4**(4):361–362.

Identification and characterization of a novel antigenic protein of *Streptococcus suis* type 2

ZHANG Wei , WU Zong-fu , LU Cheng-ping *

(Key Laboratory of Animal Disease Diagnostic and Immunology , Ministry of Agriculture , Nanjing Agricultural University , Nanjing 210095 , China)

Abstract : An immunogenic protein , named HM3 , of *Streptococcus suis* type 2 HA9801 was identified by using immunoproteomic assay . Some characters of this protein were analyzed by several online bioinformatical tools , including BLAST , SingIP , HMMTOP and PSORTb . The most homologous sequence of HM3 was extracellular solute-binding protein (gi169246104) of *Enterococcus faecium* . The predictions results showed that HM3 contained Signal peptide and one transmembrane region , and Non-Cytoplasmic Localization were also predicted . Partial gene of this protein were amplified from the genome of HA9801 by PCR and inserted into expression plasmid pET-32a(+) after double digested by *Bam*H I and *Sal* I , then transformed into BL21 (DE3) where they were induced to express by IPTG . After induced , there was specific proteins band of approximately 45kDa on the SDS-PAGE gel . Western-blotting showed that recombinant protein could react with immune serum of HA9801 of SPF (Specefic pathogen Free) mini-swine . This protein could be taken as a vaccine candidate of SS2 .

Keywords : *Streptococcus suis* type 2 ; clone and expression ; immunogenicity ; immunoproteomics

Foundation item : Major Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2006CB504403)

* Corresponding author . Tel 86-25-84396517 ; Fax : 86-25-84396517 ; E-mail : luep@njau.edu.cn

Received : 23 March 2007 / Accepted : 22 May 2007 / Revised : 23 August 2007 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>