

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
50(3):418-422; 4 March 2010  
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

## 猪链球菌谷氨酰胺 tRNA 合成酶的原核表达产物的小鼠免疫试验

胡睿铭, 赵战勤, 李伦勇, 李增强, 汤细彪, 段龙川, 吴斌\*

(华中农业大学农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070)

**摘要:**【目的】猪链球菌谷氨酰 tRNA 合成酶 (Glutamyl tRNA Synthetase, GtS) 是一种催化谷氨酰胺与对应的 tRNA 发生酯化反应形成谷氨酰 tRNA 的蛋白酶。本研究通过小鼠免疫保护力实验来评价 GtS 的免疫原性。【方法与结果】使用 clustalX 对 GenBank 中链球菌属的 GtS 进行同源性分析, 结果显示 GtS 的氨基酸序列在链球菌属内同源性达到 95% 以上。利用原核表达系统在大肠杆菌 BL21 中表达 (His)<sub>6</sub>-GtS 融合蛋白。SDS-PAGE 和 Western blot 结果表明该融合蛋白在 BL21 菌株中高效表达, 并且具有良好的免疫原性。融合蛋白经过组氨酸标签纯化试剂盒 (Novagen) 纯化后获得纯度为 93.3%、浓度为 433 μg/mL 的重组蛋白 rGtS。在小鼠免疫保护试验中, 使用 rGtS 混合弗氏佐剂免疫 Balb/c 小鼠。免疫后用 4 倍 LD<sub>50</sub> 剂量的 SC19 菌株 (1.2 × 10<sup>9</sup> CFU) 攻毒, rGtS 免疫组小鼠的存活率达 50% (4/8), 高于空载体对照 (1/8)。【结论】本研究证实 rGtS 融合蛋白具有良好免疫原性, 能够提供部分的保护, 是一种非常有潜力的亚单位疫苗候选蛋白。

**关键词:** 猪链球菌; 谷氨酰胺 tRNA 合成酶; 免疫原性

**中图分类号:** Q392      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2010) 03-0418-05

猪链球菌病是由链球菌属中 C、D、E、L 群链球菌以及猪链球菌引致猪疫病的总称<sup>[1-2]</sup>。临床上主要表现出淋巴结脓肿、脑膜发炎、关节发炎以及败血症等主要特征。由于猪链球菌是世界范围内引致猪链球菌病最主要的病原, 所以猪链球菌的防控日益引起人们的重视。而疫苗免疫被认为是最有效的猪链球菌防控手段。因此研制有效的疫苗产品是防治猪链球菌病的关键<sup>[2-3]</sup>。

最初人们在研究亚单位疫苗时, 通常将注意力放在毒力相关或者致病相关的蛋白<sup>[3]</sup>。但是这些抗原往往是导致血清型差异的抗原, 虽然免疫原性好但是交叉保护力差, 对血清型较多的病原效果有限。随着蛋白质组学和抗体组学技术的发展, 发现与代谢紧密相关的一些蛋白 (如三磷酸甘油醛脱氢

酶, 谷氨酰胺 tRNA 合成酶, Heat Shock Protein family 等) 具有良好的免疫原性, 并且与菌株的致病性密切相关<sup>[4-9]</sup>。因此, 代谢相关基因作为亚单位疫苗研制中候选基因的可行性成为当前疫苗研究的热点。

谷氨酰胺 tRNA 合成酶 (Glutamyl tRNA Synthetase, GtS) 是一种催化谷氨酸与对应的 tRNA 发生酯化反应形成谷氨酰 tRNA 的蛋白酶。GtS 的氨基酸序列非常保守: 不同链球菌之间同源性达到 95%。针对肺炎链球菌和百日咳杆菌的蛋白质组学研究发现 GtS 具有一定的免疫原性<sup>[10-13]</sup>。因此, 本研究选择 GtS 作为亚单位疫苗的候选蛋白, 通过原核表达系统表达 GtS, 使用纯化的融合蛋白免疫小鼠, 以小鼠免疫保护力实验来评价 GtS 的免疫原性。

**基金项目:** 国家公益性农业行业科研专项 (200803020); 国家科技攻关项目的资助 (2006BAD06A18-2)

\* 通信作者。Tel: +86-27-87286974; Fax: +86-27-87281795; E-mail: wub@mail.hzau.edu.cn

**作者简介:** 胡睿铭 (1984-), 男, 江西南昌人, 硕士研究生, 研究方向为细菌分子生物学和基因工程疫苗。E-mail: huruiming@gmail.com

**收稿日期:** 2009-10-08; **修回日期:** 2009-12-08

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株、质粒和试验动物:**猪链球菌 2 型 (*Streptococcus suis*, serotype 2) 菌株 SC-19 (MRP<sup>+</sup>, EF<sup>+</sup> 和 SLY<sup>+</sup>)。受体菌株大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、表达菌株大肠杆菌 BL21 为本实验室保存。表达载体 pET28a(+), 猪链球菌 SC-19 株的小鼠阳性血清、阴性血清由本实验室提供, 兔阳性血清由本实验制备。3-4 周龄、SPF 级雌性 BALB/c 小鼠和新西兰大白兔购自湖北省医学科学院实验动物中心。

**1.1.2 主要试剂和仪器:**TSA 或 TSB 培养基购自

美国 BD 公司。DNA Marker、DNA Polymerase、T4 DNA Ligase 和限制性内切酶购自大连 TaKaRa 公司。DNA 回收试剂盒购自上海生工生物工程有限公司。所有引物由上海生工生物工程有限公司合成。蛋白质 Marker 购自 Fermentas 公司; HRP 标记的羊抗鼠 IgG 抗体、底物 DAB 购自 SouthernBiotech 公司。本实验涉及的仪器有:微量移液器,超净工作台,PCR 仪 (ABI9700), 酶标仪, Eppendorf 离心机, 水平电泳仪, 垂直电泳仪, western 转膜仪。

### 1.2 *gts* 基因的克隆、序列分析及表达载体的构建

序列分析所用的序列均来自 Genbank, 登陆号 (GI number) 以及对应的种名见表 1。

表 1 序列分析所用序列的登录号

Table 1 GI numbers of the sequence used in sequence analysis

GI number	Species name	GI number	Species name
146321874	<i>S. suis</i> 98HAH33	15901888	<i>S. pneumoniae</i> TIGR4
146319681	<i>S. suis</i> 05ZYH33	15674424	<i>S. pyogenes</i> M1
223933973	<i>S. suis</i> 89/1591	195977374	<i>S. equi</i> subsp <i>zooepidemicus</i>
22536298	<i>S. agalactiae</i> 2603V/R	125718928	<i>S. sanguinis</i> SK36

分别利用生物学网络软件 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 和 ClustalX 进行氨基酸序列分析。Blastp 被用于同源蛋白检索, clustalX 被用于 GtS 多序列分析。

参考 GenBank 公布的 *gts* 基因序列 (GI number: 146321874) 设计引物, P1: 5'-GCCAAGCTTCAAC ATCTGCAAATGACGAC-3' 和 P2: 5'-CCCGGATCCA TGCCCGTACAGCATTGTTT-3' (上下游引物分别引入 *Hind* III 和 *Bam*H I 限制性酶切位点)。引物扩增区域为 1503 bp 长的基因编码区。按细菌基因组试剂盒 (购自上海生工生物工程有限公司) 说明书提取猪链球菌 2 型菌株 SC-19 基因组, 将其作为 PCR 模板进行 PCR 扩增, PCR 产物用 UNIT-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒 (购自上海生工生物工程有限公司) 回收, 按照产品说明书将其连接到 pMD18-T 质粒。将连接产物转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  细胞, 通过氨苄青霉素抗性来筛选阳性克隆, 提取重组质粒。用 *Hind* III 和 *Bam*H I 酶切位点将 *gts* 基因由 pMD-18T 转移至 pET28a(+), 命名为 pET-gts, 通过卡那霉素抗性筛选阳性克隆, 提取质粒进行酶切鉴定和序列测定 (所有测序由上海生工生物工程有限公司完成)。

### 1.3 *gts* 基因的表达和 Western blot 分析

将重组质粒 pET-gts 转化大肠杆菌 BL21, 挑取单菌落于含有卡那霉素 (终浓度为 50  $\mu$ g/mL) 的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C、225 r/min 摇床培养至对数生长期时 ( $OD_{600}$  = 0.6 - 1.0), 加入 IPTG 诱导表达 4 h。通

过 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)<sup>[14]</sup> 分析蛋白的表达特性。根据产品说明书, 用组氨酸标签蛋白纯化试剂盒 (Novagen) 对表达产物 (命名为 rGtS) 进行纯化。重组蛋白浓度通过分光光度计进行测定, 纯度经 SDS-PAGE 电泳和 GelExpert 软件 (NucleoTech 公司 NucleoVision 凝胶成像系统自带软件) 进行分析。按文献[14]所述方法对表达产物 rGtS 进行 Western blot 分析, 经过 IPTG 诱导的, 含有 pET28a 空载体的 BL21 全菌作为对照。一抗为 SC-19 灭活后多次免疫新西兰大白兔所制阳性血清。二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 抗体。

### 1.4 小鼠免疫保护试验

取 4 周龄雌性 BALB/c 小鼠, 共 24 只, 随机分成 3 组, 每组 8 只。第一组皮下免疫纯化的 rGtS 蛋白 25  $\mu$ g (与弗氏完全佐剂混合), 分别于 14 d 和 28 d 后加强免疫 (抗原量仍然为 20  $\mu$ g, 佐剂改用弗氏不完全佐剂), 中间间隔 14 d。第二组 (空载体蛋白对照组) 免疫经过诱导的含有 pET-28a 空载体的 BL21 全菌 (与弗氏完全佐剂混合)。第三组 (空白对照组) 注射相同体积的无菌 PBS。首免后开始每周对每组小鼠进行断尾采血, 直到攻毒前。采用间接 ELISA 检测每组平均抗体水平 (ELISA 板包被抗原为纯化的 rGtS 蛋白, 100 ng/孔)。三免后 14 d, 使用 4 倍 LD<sub>50</sub> 剂量 ( $1.2 \times 10^9$  CFU) 的 SC-19 菌株对小鼠进行腹腔攻毒。小鼠攻毒后观察 30 d, 死亡小鼠立即剖检并进行病原菌的分离鉴定。

## 2 结果和分析

### 2.1 GtS 蛋白的序列分析

BLAST 分析表明,本研究中所克隆的 GtS 基因

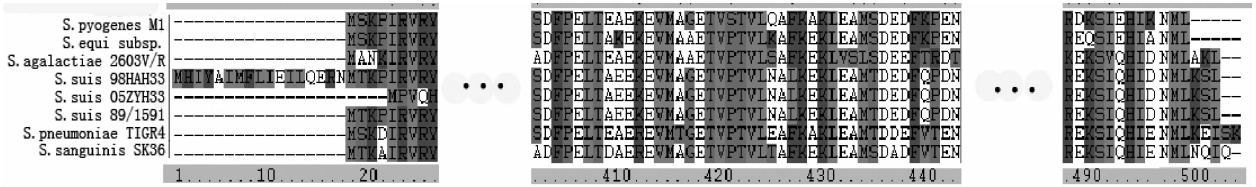


图 1 不同链球菌中 Gln 基因的多序列比对

Fig. 1 Multiple sequence alignment of Gln from different Streptococci species.

### 2.2 gts 基因的克隆、表达及 Western blot 鉴定

将 1602 bp 的 PCR 产物经 *Hind* III 和 *Bam*H I 酶切后连入 pET28a, 得到重组质粒 pET-gts。酶切验证与预期结果一致,测序结果也表明 pET-gts 表达载体中的 *gts* 基因片段完全正确。SDS-PAGE 表明含重组质粒 pET-gts 的 *E. coli* BL21 菌株在 IPTG 诱导后表达分子量约为 58kDa 的融合蛋白。IPTG 诱导 4 h 后融合蛋白的表达量约为菌体总蛋白量的 28.7%。融合蛋白主要以可溶形式存在于细胞裂解液的上清中。通过镍离子亲和层析纯化后,得到浓度为 433  $\mu$ g/mL、纯度为 93.3% 的融合蛋白 rGtS (图 2-A)。Western blot 分析表明,重组蛋白 rGtS 能够与猪链球菌 SC-19 株的兔阳性血清发生特异性的免疫反应。这表明克隆的基因片段得到正确表达,而且证明 rGtS 具有一定的免疫原性(图 2-B)。

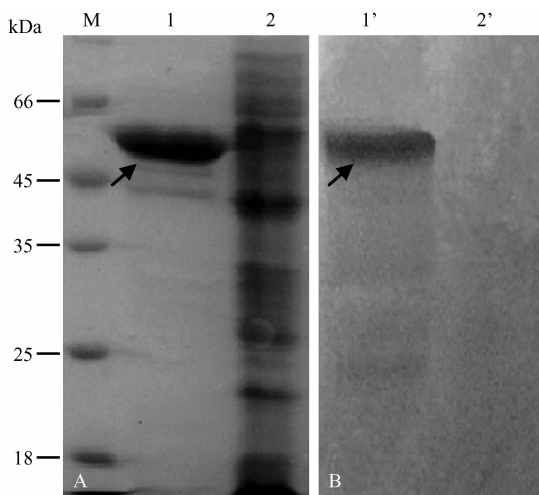


图 2 融合蛋白 rGtS 的 PAGE (A) 和 Western blot (B) 结果

Fig. 2 SDS-PAGE (A) and Western blot (B) analyses of rGtS. A: M. Marker; 1. rGtS after purification (arrow); 2. induced BL21 with pET28a vector; B; 1'. Western blot analysis of purified rGtS; 2'. *E. coli* strain with pET28a vector.

编码的蛋白质序列与已公布的 7 个链球菌 GtS 氨基酸序列进行同源性分析,结果显示 GtS 高度保守,同源性均在 95% 以上(图 1)。

### 2.3 rGtS 免疫小鼠的抗体消长规律

通过 ELISA 方法检测免疫小鼠血清样品的抗体消长规律,结果表明 rGtS 免疫组小鼠的血清抗体水平于首次免疫后迅速升高,在第 14 d 时抗体的 OD630 平均值已达到 0.8,在第二次加强免疫后抗体水平继续升高,到第 42 d 时 OD630 平均值达到 1.4(图 3)。我们发现 pET28a 空载体对照组小鼠的抗体水平略有升高。可能是由于提纯的重组蛋白中混有少量 BL21 菌体蛋白。而空白对照组小鼠在整个免疫期间的抗体均为阴性,没有变化。

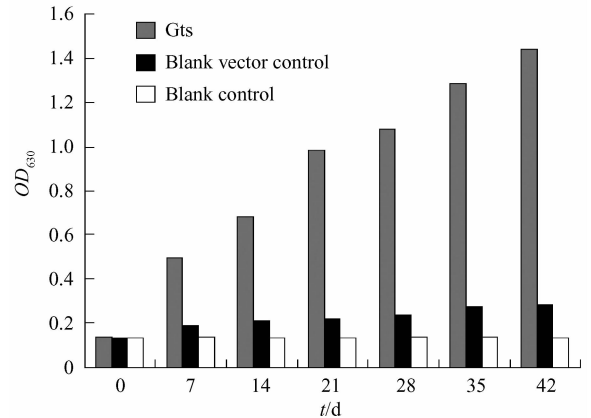


图 3 免疫后不同时间小鼠体内 rGtS ELISA 抗体水平

Fig. 3 Antibody titers against rGtS by ELISA at different time of post vaccination in mice.

### 2.4 rGtS 小鼠免疫保护力试验

在第二次加强免疫后 14 d,对所用小鼠进行腹腔攻毒,攻毒剂量为 4 倍 LD<sub>50</sub> ( $1.2 \times 10^9$  CFU)。rGtS 免疫组、空载体对照组和空白对照组小鼠攻毒后均表现出一定的临床症状。空白对照组所有小鼠在 2 d 内全部死亡,空载体对照组在 2 d 后有 1 只小鼠存活 (12.5%),rGtS 免疫组则有 4 只小鼠存活 (50%)。空白载体对照组存活的小鼠康复精神一直萎靡,生长缓慢,被毛蓬乱;而免疫组的小鼠症状

较对照组要轻。死亡小鼠剖检可见肺有明显的坏死、出血,渗出液增多、变稠,脾脏肿大。从死亡小鼠心血、肝脏、脾脏、肺脏和肾脏均能回收到攻毒菌株。

### 3 讨论

在 2007 年, Nebenzahl 通过蛋白质组学和小鼠免疫保护力实验证明在肺炎链球菌中 GtS 具有一定的免疫原性,能够部分的保护致死剂量的攻毒。Nebenzahl 还证明 GtS 具有黏附上皮细胞的作用,而针对 GtS 的抗体能够抑制肺炎链球菌对肺泡上皮细胞 A549 的黏附<sup>[12-13]</sup>。黏附是细菌在呼吸道定殖非常关键的一步。研究显示,一旦对细胞的黏附受到抑制,细菌会很快的被免疫系统清除。但是并不是所有具有黏附功能的蛋白都具有保护力。之前报道三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)具有一定的黏附功能<sup>[6]</sup>,但是并不具有免疫保护力。通过 clustalX 多序列比对分析发现,GtS 序列在链球菌中高度保守。这一特点正是亚单位疫苗候选蛋白所必须的。如果氨基酸序列差异过大必然导致交叉保护力差(比如链球菌 M 蛋白,鞭毛蛋白等)。我们通过大肠杆菌 BL21 表达并提纯 rGtS 蛋白。使用全菌灭活后多次免疫新西兰大白兔制备的猪链球菌阳性血清和提纯的 rGtS 蛋白进行 Western blot 反应,初步证明了 rGtS 具有一定的免疫原性。用提纯的重组蛋白混合弗氏佐剂免疫 Balb/c 小鼠。通过间接 ELISA 检测免疫后的小鼠血清证明 rGtS 可以刺激机体产生较高的 IgG 抗体。在 4 倍 LD<sub>50</sub> 菌量腹腔攻毒的情况下,rGtS 可以为小鼠提供 50% 的保护力。虽然 rGtS 不能提供完全的保护,不足以单独作为亚单位疫苗,但是仍然显示了良好的免疫原性,能够提供一定的保护,可作为亚单位疫苗的添加成分。而且 GtS 存在于所有猪链球菌菌株中,且序列保守,不存在交叉保护力差的问题。除了 GtS,在猪链球菌中,目前还报道了一些亚单位疫苗候选蛋白,如 Sao, GAPDH 和 Enolase。如果将这些蛋白有选择的组合在一起,有可能获得保护力高而且保护面广的亚单位疫苗,相关实验正在进行中。

### 4 结论

在小鼠免疫保护力实验中,rGtS 显示了良好的免疫原性,能在 4 倍 LD<sub>50</sub> 菌量腹腔攻毒的情况下,为小鼠提供 50% 的保护力。再者由于 GtS 序列保守,不存在交叉保护力的问题。所以 GtS 是一个非常具有潜力的亚单位疫苗候选蛋白。

### 参考文献

- [ 1 ] 何家惠,诸长贵,徐筠遐,等. 猪急性败血型链球菌病的诊断及病原鉴定. 中国人兽共患病杂志 ( Chinese Journal of Zoonoses ),1999,15(5):1990-1991.
- [ 2 ] 姚火春,陈国强,陆承平. 猪链球菌 1998 分离株病原特性鉴定. 南京农业大学学报 ( Journal of Nanjing Agricultural University ),1999,22(2):67-70.
- [ 3 ] Lun ZR, Wang QP, Chen XG, et al. Streptococcus suis: an emerging zoonotic pathogen. Lancet Infectious Diseases 2007;7(3):201-209.
- [ 4 ] Wisselink HJ, Stockhofe-Zurwieden N, Hilgers LA, et al. Assessment of protective efficacy of live and killed vaccines based on a non-encapsulated mutant of Streptococcus suis serotype 2. Veterinary Microbiology 2002;84(1-2):155-68.
- [ 5 ] Wisselink HJ, Vecht U, Stockhofe-Zurwieden N, et al. Protection of pigs against challenge with virulent Streptococcus suis serotype 2 strains by a muramidase-released protein and extracellular factor vaccine. Veterinary Record 2001;148(15):473-477.
- [ 6 ] Brassard J, Gottschalk M, Quessy S. Cloning and purification of the Streptococcus suis serotype 2 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and its involvement as an adhesin. Veterinary Microbiology 2004;102(1-2):87-94.
- [ 7 ] Li Y, Gottschalk M, Esgleas M, Lacouture S, et al. Immunization with recombinant Sao protein confers protection against Streptococcus suis infection. Clinical Vaccine Immunology 2007;14(8):937-943.
- [ 8 ] Tan C, Fu S, Liu M, et al. Cloning, expression and characterization of a cell wall surface protein, 6-phosphogluconate-dehydrogenase, of Streptococcus suis serotype 2. Veterinary Microbiology 2008;130(3-4):363-370.
- [ 9 ] Zhang A, Chen B, Mu X, et al. Identification and characterization of a novel protective antigen, Enolase of Streptococcus suis serotype 2. Vaccine 2009;27(9):1348-1353.
- [ 10 ] Emrah Altundis a, Burcu E. Tefona, Volkan Yıldırmıa, et al. Immunoproteomic analysis of Bordetella pertussis and identification of new immunogenic proteins. Vaccine 27(2009) 542-548
- [ 11 ] Zhang A, Xie C, Chen H, et al. Identification of immunogenic cell wall-associated proteins of Streptococcus suis serotype 2. Proteomics 2008;8(17):3506-3515.

- [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. *Clinical Experimental Immunology* 2004;138 (2):290-298.
- [13] Mizrachi Nebenzahl Y, Bernstein A, et al. *Streptococcus pneumoniae* surface-exposed glutamyl tRNA synthetase, a putative adhesin, is able to induce a partially protective immune response in mice. *The Journal of Infectious Disease* 2007;196 (6):945-953.
- [14] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 分子克隆实验指南. 金东雁, 黎孟枫, 等译. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002.

## Prokaryotic expression and immunization of Glutamyl tRNA Synthetase of *Streptococcus suis*

Ruiming Hu, Zhanqin Zhao, Lunyong Li, Zengqiang Li, Xibiao Tang, Longchuan Duan, Bin Wu\*

(State Key Laboratory of Agriculture Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** [ **Objective** ] Glutamyl tRNA Synthetase (Gts) is a protease which catalyzes esterification between tRNA and glutamine. The immunogenicity of Gts was evaluated through immunization and challenge experiment. [ **Methods and results** ] We cloned *gts* from the genome of SC19, and inserted it into prokaryotic expression plasmid pET28a-gts. The recombinant vector was transformed into *E. coli* BL21. Induced by IPTG, one 58 kD protein, was expressed and purified by using Ni<sup>+</sup> - NTA column (Novagen). The purity of rGts was 93.3% and the concentration of purified protein was 433 μg/mL. We proved the immunogenicity of recombinant protein rGts by western blot analysis. We immunized Balb/c mice with rGts and Freund's adjuvant, and after two boost vaccinations, all mice were challenged with 4 times LD50 amount of SC19 (1.2 × 10<sup>9</sup> CFU). The survive rate of vaccination group is 50% (4/8), significantly higher than blank vector control group (1/8). [ **Conclusion** ] These results proved that Gts has certain immunogenicity and can offer partial protection against high dose challenge. Therefore Gts could be a potential candidate of subunit vaccine against *Streptococcus suis*.

**Keywords:** *Streptococcus suis*; Glutamyl tRNA Synthetase; immunogenicity

(本文责编: 张晓丽)