

• 动物及兽医生物技术 •

乳房链球菌 GapC 蛋白的表达及其 B 细胞抗原表位的预测与鉴定

王汉青, 张雪静, 张欢, 陈晓萌, 张宝江, 苏艳

新疆农业大学 动物医学学院, 新疆 乌鲁木齐 830052

王汉青, 张雪静, 张欢, 陈晓萌, 张宝江, 苏艳. 乳房链球菌 GapC 蛋白的表达及其 B 细胞抗原表位的预测与鉴定. 生物工程学报, 2022, 38(1): 148-159.

WANG HQ, ZHANG XJ, ZHANG H, CHEN XM, ZHANG BJ, SU Y. Prokaryotic expression of the GapC protein of *Streptococcus uberis* and prediction, identification of its B-cell epitopes. Chin J Biotech, 2022, 38(1): 148-159.

摘要: 乳房链球菌 *Streptococcus uberis* 的 GapC 蛋白是一种位于该菌表面的具有甘油醛-3-磷酸脱氢酶活性的蛋白, 其参与细胞活动, 表现出多种生物学活性, 此外还具有良好的抗原性。文中旨在对乳房链球菌 GapC 蛋白可能的 B 细胞抗原表位进行预测, 分析和验证候选表位肽的免疫原性。利用 *S. uberis* 分离株 RF5-1 克隆 *gapC* 基因, 构建重组表达质粒 pET-28a-GapC, 诱导表达 GapC 重组蛋白, 并以纯化蛋白免疫家兔, 获得抗 GapC 多抗。利用生物信息学软件预测并分析 GapC 细胞抗原表位的三维结构和空间位置及对 GapC 蛋白及表位的同源性比较。结果表明, 表达纯化了 44 kDa 的 GapC 蛋白具有良好的反应性。利用表位预测软件筛选并合成针对 *S. uberis* GapC 蛋白的 6 个线性和 3 个构象优势 B 细胞表位多肽, 三维结构的分析显示, 筛选的多肽具有良好的抗原表位形成条件。以纯化的 *S. uberis* GapC 蛋白免疫家兔制备多抗, 通过间接 ELISA 对抗原表位进行鉴定。ELISA 检测结果显示, 9 条抗原表位肽均可不同程度地与抗 GapC 多抗反应, 其中表位²⁶⁶AANDSYGYTEDPIVSSD²⁸²与多抗反应水平显著高于其他表位。研究结果为深入了解 *S. uberis* GapC 蛋白的免疫学特性和利用其有效抗原表位奠定了基础。

关键词: 乳房链球菌; GapC 蛋白; 原核表达; B 细胞表位; 表位多肽

Received: April 12, 2021; Accepted: July 16, 2021; Published online: July 29, 2021

Supported by: University Scientific Research Projects of Xinjiang Uygur Autonomous Region, China (XJEDU2018I009)

Corresponding author: SU Yan. Tel: +86-991-8762704; E-mail: 2006au@163.com

基金项目: 新疆维吾尔自治区高校科研计划 (XJEDU2018I009)

Prokaryotic expression of the GapC protein of *Streptococcus uberis* and prediction, identification of its B-cell epitopes

WANG Hanqing, ZHANG Xuejing, ZHANG Huan, CHEN Xiaomeng, ZHANG Baojiang, SU Yan

College of Veterinary Medicine, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, Xinjiang, China

Abstract: The GapC protein of *Streptococcus uberis* located on the surface of bacteria is a protein with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity. It participates in cellular processes and exhibits a variety of biological activities. In addition, it has good antigenicity. The aim of this study was to predict the possible B-cell epitopes of the GapC protein and verify the immunogenicity of candidate epitope peptides. The *gapC* gene of *S. uberis* isolate RF5-1 was cloned into a recombinant expression plasmid pET-28a-GapC and inducibly expressed. The purified protein was used to immunize experimental rabbits to produce anti-GapC polyclonal antibodies. The three-dimensional structure and three-dimensional location of the GapC B-cell epitopes and the homology comparison of the GapC protein and its B-cell epitopes were carried out using bioinformatics softwares. The results showed that the 44-kDa GapC protein had a good immunological reactivity. Six linear and 3 conformational dominant B-cell epitopes against the GapC protein were selected and synthesized. Three dimensional analysis indicated that the selected peptides have better antigen epitope formation potential. Rabbit anti-GapC polyclonal antibodies were generated after immunized with the purified GapC protein, and the polyclonal antibodies were used to identify the epitope peptide by an indirect ELISA. The ELISA results showed that all of the 9 epitope peptides could react with anti-GapC polyclonal antibodies with varying titers. Among them, the epitope polypeptide ²⁶⁶AANDSYGYTEDPIVSSD²⁸² reacted with the polyclonal antibodies significantly stronger than with other epitope peptides. This study laid an experimental foundation for in-depth understanding of the immunological properties and utilizing effective epitopes of the GapC protein of *S. uberis*.

Keywords: *Streptococcus uberis*; GapC; prokaryotic expression; B-cell epitope; Epitope peptide

奶牛乳房炎是奶牛乳腺受到多种因素刺激引起的乳腺炎症。该病为奶牛业临床多发性疾病,可造成很大的经济损失,严重威胁着奶牛养殖业和公共卫生^[1]。引起奶牛乳房炎的病原菌以金黄色葡萄球菌、无乳链球菌、乳房链球菌 *Streptococcus uberis*、停乳链球菌和大肠杆菌最为常见^[2], *S. uberis* 在国内外多地感染率和检出率较高^[3]。因耐药菌株的不断发生,接种疫

苗被认为是预防该病的有效方法。目前传统的乳房链球菌疫苗(包括灭活疫苗和荚膜多糖疫苗)存在着保护力低,且基因工程亚单位疫苗仍存在着对多种链球菌交叉保护力不佳等问题。此外,目前有关 *S. uberis* 的疫苗研究较少且免疫效果并不理想^[4]。

近年来,表位疫苗作为一种新型乳房炎疫苗研发的新方向,被认为具有广阔的应用前景。

抗原表位是抗原分子中决定抗原特异性的基团,可与B细胞受体及T细胞受体特异结合而引起免疫应答,显示表位疫苗比传统疫苗更安全、保护率更高^[5-6]。Wang 等研究表明,乳房炎金黄色葡萄球菌 GapC 的 B 细胞表位免疫后可对该菌感染产生良好的体液免疫应答和保护作用^[7]。

GapC 蛋白是 *S. uberis* 表面一种具有甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 活性的蛋白,具有转铁蛋白活性和纤溶酶活性,是原核及真核生物糖酵解途径中的关键酶之一,可逆性地催化甘油醛-3-磷酸转化成 1,3-二磷酸甘油酸,参与 DNA 复制和修复,导致细胞凋亡的发生,表现出多种生物活性,是该菌的重要毒力和抗原分子^[8]。以往研究表明,无乳链球菌和 *S. uberis* 的 GapC 蛋白具有很好的免疫原性^[9-12],且 GapC 亚单位疫苗的免疫效力优于全菌灭活疫苗^[8]。研究还发现,GapC 在引起乳房炎的各种链球菌之间存在交叉免疫保护^[13],被认为是有潜力的候选抗原。以往研究对乳房链球菌 GapC 表位进行了分析预测^[14],但对表位的鉴定尚无报道。最近,吴金花等对停乳链球菌 GapC 蛋白进行分析并鉴定了一个高度保守的 B 细胞表位^[9]。

本研究克隆了 *S. uberis* RF5-1 *gapC* 基因,制备了高纯度的 GapC 蛋白,采用生物信息学软件分析和预测 GapC 蛋白的结构特性和可能的 B 细胞抗原表位,并以表达纯化的 GapC 蛋白免疫实验动物,根据免疫试验筛选和确定其

潜在的 B 细胞抗原表位,可为当地奶牛乳房炎防控提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株和实验动物

分离株 *S. uberis* RF5-1 由新疆农业大学微生物与免疫实验室分离鉴定并保存;大肠杆菌 DH5 α 、大肠杆菌 BL21(DE3)、原核表达载体 pET-28a(+) 由新疆农业大学微生物与免疫实验室保存;健康新西兰大白兔购自新疆医科大学实验动物中心。

1.1.2 主要试剂

T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 (*Xho* I、*Bam*H I)、*Taq* DNA 聚合酶、DL2000 DNA marker、DL5000 DNA marker 购自 TaKaRa 公司;质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒购自天根公司;弗氏佐剂购自 Sigma 公司;TMB 显色液购自北京索莱宝科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 *gapC* 基因的扩增及表达质粒的构建

根据 *S. uberis gapC* 基因序列,用 Primer Premier 5.0 设计引物,分别引入酶切位点 *Bam*H I 和 *Xho* I (表 1),由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。以 *S. uberis* RF5-1 基因组 DNA 为模板,PCR 扩增 *gapC* 基因,回收 PCR 产物并测序。将测序正确的目的基因与 pET-28a 连接,重组质粒经酶切鉴定后送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

表 1 扩增乳房链球菌 *gapC* 的引物

Table 1 Primers used for amplification of the *gapC* of *S. uberis*

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Size (bp)
RF5-1-F	GCGGATCCATGGTAGTTAAAG	1 005
RF5-1-R	GACCTCGAGTAGCGATTTTGT	

1.2.2 GapC 蛋白的诱导表达及纯化

将测序成功的重组质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3) 中, 挑取单菌落接种到含有卡那霉素 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养至 OD_{600} 达到 0.8, 然后, 加入异丙基硫代半乳糖苷 (isopropyl β -D-thiogalactoside, IPTG) 诱导并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 继续培养 6 h, 离心收集菌液, 用超声波裂解仪破碎菌体, 离心并收集沉淀, 用 8 mol/L 的尿素透析复性法对目的蛋白进行纯化, 通过 SDS-PAGE 检测纯化蛋白, 并检测蛋白的浓度。

1.2.3 GapC 蛋白的 Western blotting 分析

将纯化后的 GapC 蛋白经 SDS-PAGE 后转印至 NC 膜上, 转印结束后将膜置于 5% 脱脂乳封闭液中封闭 2 h; 以 *S. uberis* RF5-1 免疫后兔血清 (1 : 1 000) 为一抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, PBST 洗涤 3 次后加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG (1 : 5 000) 为二抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, PBST 洗涤 3 次, 用 DAB 底物溶液显色。

1.2.4 GapC 蛋白 B 细胞表位预测与结构分析

根据 *S. uberis* RF5-1 GapC 蛋白的序列信息, 分析该蛋白的一级结构和二级结构, 并采用 BepiPred (<http://tools.iedb.org/main/>) 与 ABCpred (https://webs.iiitd.edu.in/raghava/abcpred/ABC_submission.html) 两种方法预测与分析其 B 细胞抗原表位, 选取 2 种方法共同识别的优势表位, 筛选的表位多肽由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。利用 SWISS-MODEL 在线软件对 *S. uberis* RF5-1 GapC 蛋白进行同源建模, 获得其三级结构。对预测表位多肽氨基酸序列的三维结构及位置进行显示。

1.2.5 GapC 蛋白氨基酸序列的同源性比较分析

利用 MegAlign 软件将分离株 *S. uberis* RF5-1 GapC 蛋白氨基酸序列与 GenBank 内参考菌株停乳链球菌 *Streptococcus dysgalactiae*、无乳链球菌 *Streptococcus agalactiae*、乳房链球菌 *S. uberis*、猪链球菌 *Streptococcus suis*、金黄色

葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 及大肠杆菌 *Escherichia coli* 序列进行同源性比较分析。

1.2.6 GapC 蛋白多克隆抗体的制备与交叉反应特性

将 6 只新西兰大白兔随机分为 2 组, 每组 3 只, 分别为 GapC 蛋白免疫组、PBS 对照组, 共免疫 2 次, 每次免疫 200 $\mu\text{g}/\text{只}$, 采用背部皮下多点注射。首次免疫, 将抗原与弗氏完全佐剂等体积混合乳化, 第二次采用弗氏不完全佐剂乳化。两次免疫间隔为 14 d, 初次免疫后 0 d、14 d 和 35 d 采血分离血清, 用间接 ELISA 方法检测多克隆抗体的滴度。用纯化的 GapC 重组蛋白 (400 ng/孔) 作抗原进行包被, 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h, 加入 *S. uberis*、*S. dysgalactiae* 及 *S. agalactiae* 特异性多抗 (1 : 1 000) 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 加入 1 : 5 000 稀释 HRP 标记的羊抗兔 IgG 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 45 min, 洗涤 5 次, 用 TMB 显色 15 min, 终止反应, 测定 OD_{450} 值。

1.2.7 GapC 蛋白 B 细胞表位的鉴定

用 100 μL (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 表位肽 4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜, PBST 洗涤 3 次后用 5% 脱脂牛奶封闭 2 h; 用 PBST 洗涤 3 次后以兔抗 GapC 血清 (1 : 1 000) 为一抗, 每孔加入 100 μL 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min。用 PBST 洗涤 3 次后加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG (1 : 6 000) 为二抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, PBST 洗涤 3 次后, 加入 TMB 显色, 终止后测定 OD_{450} 值。

2 结果与分析

2.1 gapC 基因扩增及表达质粒的构建

以 gapC 特异性引物对 *S. uberis* RF5-1 菌株基因组 DNA 进行 PCR 扩增后, 得到 1 kb 左右的目的条带, 与预期大小一致 (图 1A), 测序结果表明, 成功扩增得到目的基因。将测序成功的目的基因与载体连接, 重组质粒经双酶切鉴定 (图 1B) 及测序正确后命名为 pET-28a-GapC。

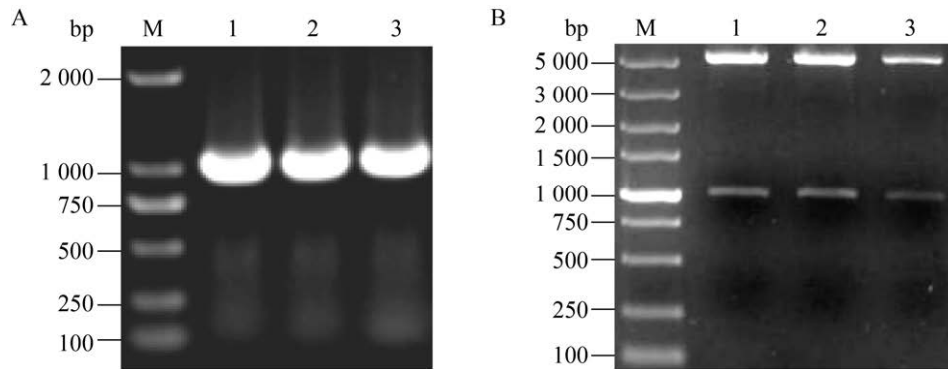


图1 表达质粒的构建 A: *gapC* 基因的 PCR 扩增; B: 表达质粒的双酶切鉴定

Figure 1 Construction of expression plasmid. (A) PCR amplification of *gapC*. M: DL2000 DNA marker; 1–3: *gapC* gene. (B) Double digestion of pET-28a-GapC. M: DL5000 DNA marker; 1–3: double digestion of pET-28a-GapC.

2.2 GapC 蛋白的表达纯化结果

将重组质粒 pET-28a-GapC 转化 *E. coli* BL21(DE3) 并诱导表达后, 进行 SDS-PAGE 分析。结果表明, 可在 44 kDa 左右出现一条明显的蛋白条带 (图 2), 与预期大小相符。

2.3 重组蛋白的 Western blotting 分析结果

纯化后的 GapC 蛋白经 Western blotting 分析 (图 3), 可在 44 kDa 位置出现与目的蛋白大小一致的特异性条带, 表明 GapC 可与 *S. uberis* 阳性血清发生特异性反应。

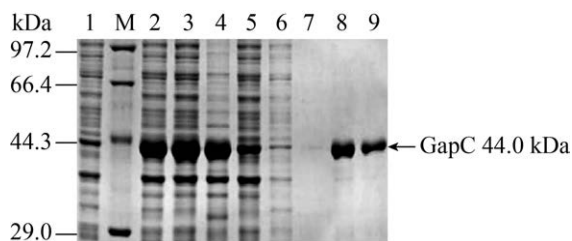


图2 重组 GapC 蛋白的 SDS-PAGE 分析

Figure 2 SDS-PAGE analysis of GapC. M: protein marker; 1: recombinant bacterial extract before induction; 2: recombinant bacterial extract after induction; 3: supernatant after ultrasonic disruption; 4: pellets after ultrasonic disruption; 5–6: different imidazole elution; 8–9: purified recombinant protein.

2.4 GapC 蛋白 B 细胞表位的预测与表位的同源性比较

利用 ABCpred 及 BepiPred 在线软件分析和预测 *S. uberis* RF5-1 GapC 蛋白的 B 细胞表位; 综合两种方法得到乳房链球菌 GapC 9 个潜在的 B 细胞表位 (表 2)。将 *S. uberis* RF5-1 GapC 表位序列与 *S. dysgalactiae* 及 *S. agalactiae* 的相关序列比较后发现, 除 PL2 表位氨基酸序列在 3 种菌中完全同源, 其余表位氨基酸序列均表现出一定的差异。

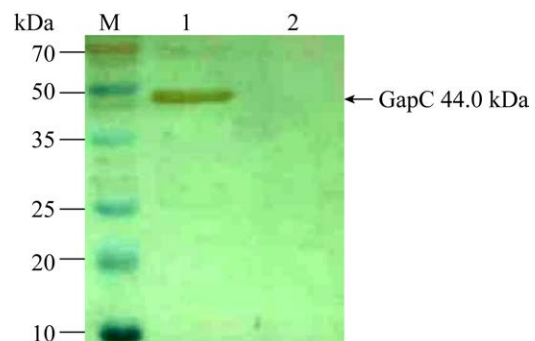


图3 GapC 蛋白的 Western blotting 结果

Figure 3 Western blotting analysis of the purified GapC protein. M: prestained protein marker; 1: purified GapC; 2: negative control.

表 2 乳房链球菌 (*S. uberis*) RF5-1 GapC 抗原表位的筛选及 3 种不同链球菌表位的同源性比较Table 2 Epitope prediction of the GapC of *S. uberis* and homology comparison of epitopes of three different streptococci

Strain	Peptide position	Sequence	
<i>S. uberis</i> RF5-1	22-43	QNVEGVEVTRINDLTDPNMLAH	(PL1)
<i>S. agalactiae</i> (AF421899)		QNVEGVEVARINDLTDPKMLAH	
<i>S. dysgalactiae</i> (AF375662)		QNVEGVEVTRINDLTDPNMLAH	
<i>S. uberis</i> RF5-1	46-58	LKYDTTQGRFDGT	(PL2)
<i>S. agalactiae</i> (AF421899)		LKYDTTQGRFDGT	
<i>S. dysgalactiae</i> (AF375662)		LKYDTTQGRFDGT	
<i>S. uberis</i> RF5-1	72-92	FIKVSAEKDPENIDWATDGVE	(PL3)
<i>S. agalactiae</i> (AF421899)		FVKVSAEREPANIDWATDGV	
<i>S. dysgalactiae</i> (AF375662)		FIKVSAERDPENIDWATDGVE	
<i>S. uberis</i> RF5-1	184-205	YTGDMILDGPHRGGDLRRARA	(PL5)
<i>S. agalactiae</i> (AF421899)		YTGDMVLDGPHRGGDLRRARA	
<i>S. dysgalactiae</i> (AF375662)		YTGDMILDGPHRGGDLRRARA	
<i>S. uberis</i> RF5-1	248-268	TELVAVLEKETSVEEINAAMK	(PL6)
<i>S. agalactiae</i> (AF421899)		TELVAVLEKETSAAEEVNAVMK	
<i>S. dysgalactiae</i> (AF375662)		TELVVTLDKNSVDEINAAMK	
<i>S. uberis</i> RF5-1	266-282	AAMKAAANDSYGYTEDPI	(PL7)
<i>S. agalactiae</i> (AF421899)		AVMKAAANESYGYTEDPI	
<i>S. dysgalactiae</i> (AF375662)		AAMKAASNDSFGYTEDPI	
<i>S. uberis</i> RF5-1	162-171	KALQDNFGVK	(PC1)
<i>S. agalactiae</i> (AF421899)		KALQDNFGVK	
<i>S. dysgalactiae</i> (AF375662)		KALHDAFGIQ	
<i>S. uberis</i> RF5-1	-	DLTDPNM-AH-KYDTTQGRFDGTV	(PC2)
<i>S. agalactiae</i> (AF421899)		DLTDPKM-AH-KYDTTQGRFDGTV	
<i>S. dysgalactiae</i> (AF375662)		DLTDPNT-AH-KYDTTQGRFDGTV	
<i>S. uberis</i> RF5-1	59-78	EVKDGGFEVNGNFIKVSAAEK	(PC3)
<i>S. agalactiae</i> (AF421899)		EVKDGGFEVNGKFKVSAER	
<i>S. dysgalactiae</i> (AF375662)		EVKEGGFEVNGNFIKVSAAER	

2.5 GapC 蛋白 B 细胞表位的三维结构

利用 SWISS-MODEL 在线软件预测 *S. uberis* RF5-1 GapC 蛋白的三级结构并进行同源建模获得其三维结构。并对 GapC 及预测表位多肽氨基酸序列的三维结构及空间位置进行显示 (图 4)。该结果显示, 在选择表位肽的空间结构中分布较多 β 转角、 β 折叠和无规则卷曲, 且这些表位肽在 GapC 蛋白空间结构中具有表面可及性, 具有良好的抗原表位形成条件。

2.6 GapC 蛋白氨基酸序列的同源性比较分析

将分离株 *S. uberis* RF5-1 GapC 蛋白氨基酸序列与参考菌株序列进行同源性比较后, 分离株与 GenBank 内 *S. uberis* GapC 氨基酸同源性为 99.4%–100%; 与 *S. agalactiae* GapC 氨基酸序列 AF421899 的同源性为 93.7%; 与 *S. dysgalactiae* GapC 氨基酸序列 AF375662 的同源性为 92.5% (图 5), 表明 GapC 基因在乳房炎 3 种致病性链球菌中保守性较好。

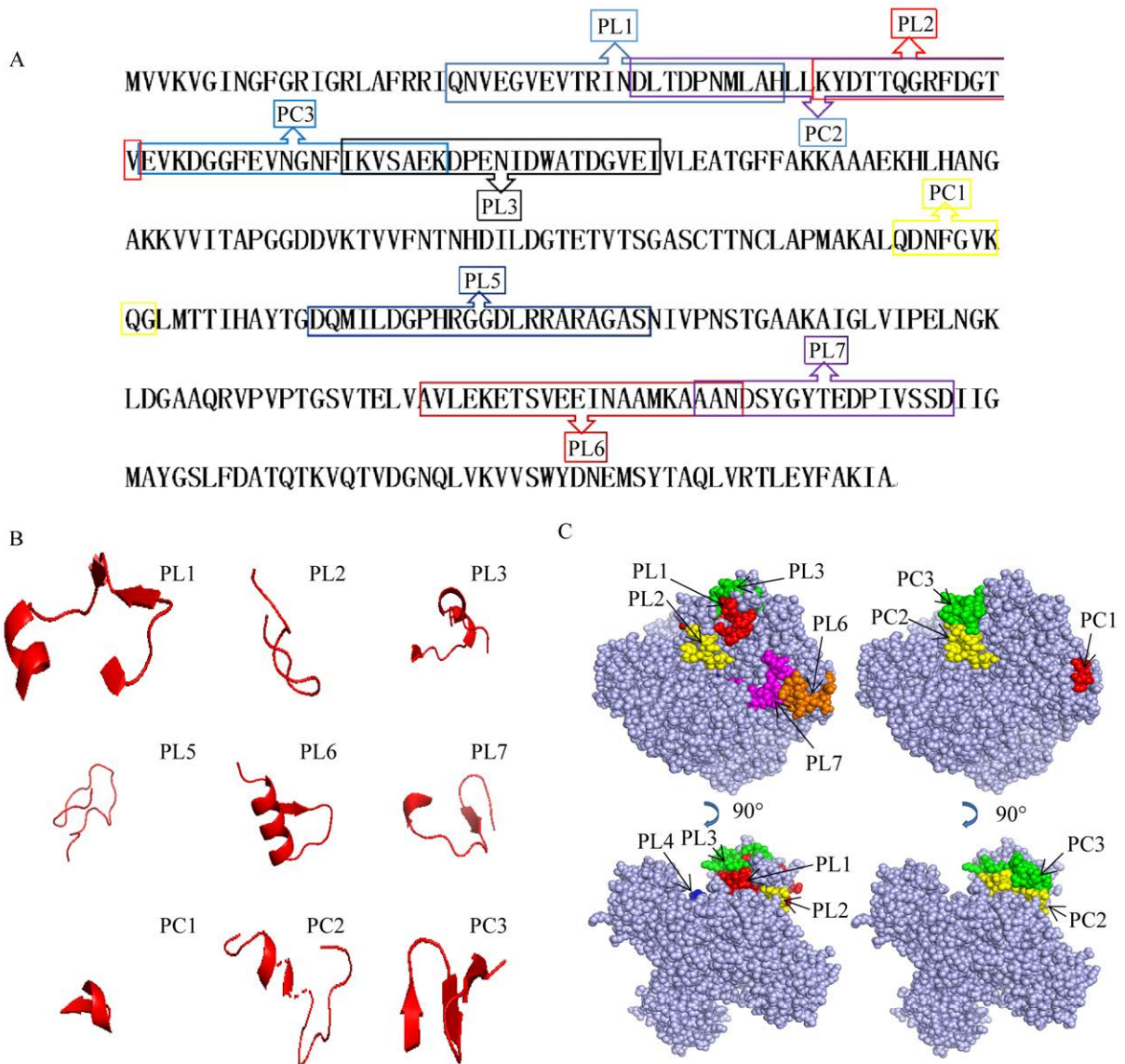


图 4 GapC 蛋白预测的抗原表位位置 (A)、三维结构 (B) 及三维空间位置 (C)

Figure 4 Prediction of epitope position (A), three-dimensional structure (B) and three-dimensional location (C) of the GapC B-cell epitopes.

2.7 兔抗 GapC 多抗与 3 种不同链球菌的交叉反应

用间接 ELISA 对第 2 次免疫后兔抗 GapC 多抗的检测结果表明,免疫组诱导的抗体效价可达 1 : 8 100 (图 6A), 表明该蛋白成功诱导了高滴度抗体的产生。分离株 *S. uberis* RF5-1

GapC 蛋白对 3 种乳房炎相关链球菌 *S. uberis*、*S. dysgalactiae* 及 *S. agalactiae* 特异性多抗的交叉反应结果显示,该蛋白对 *S. uberis* 特异抗体结合能力最高,对 *S. dysgalactiae* 特异性多抗的结合能力最低,该结果与序列同源性分析结果一致 ($P < 0.05$) (图 6B)。

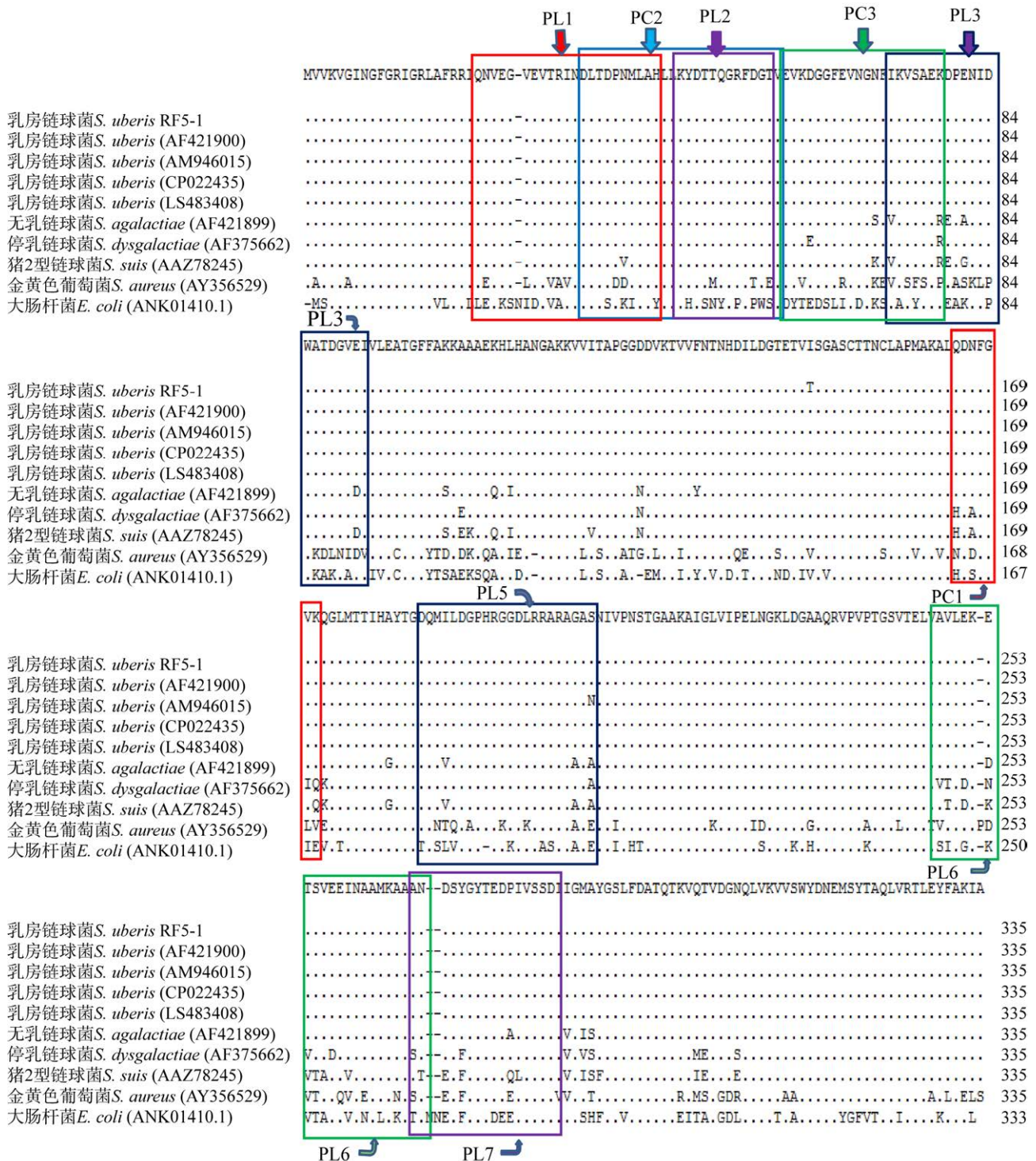


图5 GapC 氨基酸序列同源性比较

Figure 5 Comparisons of the amino acid sequence homology of GapC.

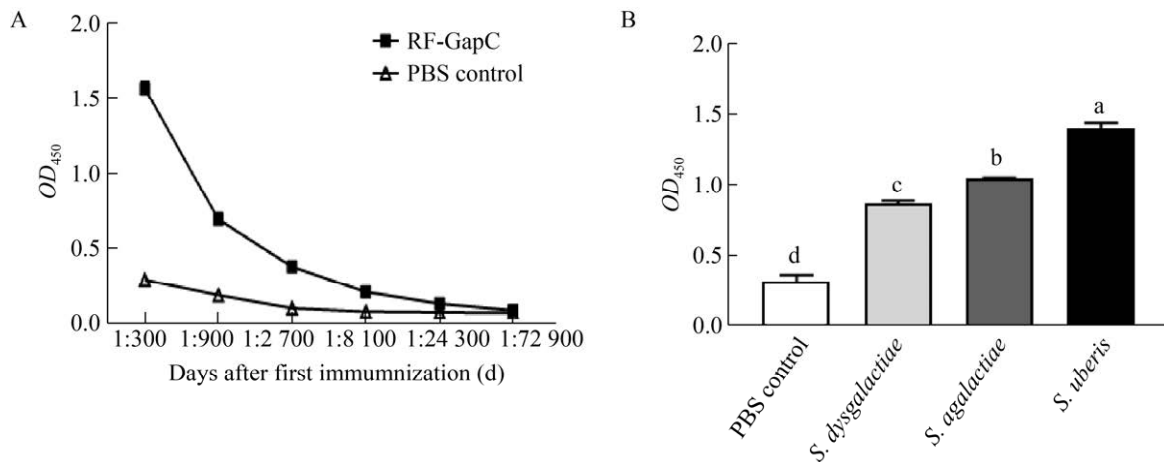


图6 *S. uberis* RF5-1-GapC 免疫兔血清 IgG 检测

Figure 6 Detection of serum IgG in *S. uberis* RF5-1-GapC immunized rabbit. (A) Detection of serum antibody titers in immunized white rabbits. (B) Detection of 3 streptococci in *S. uberis* RF5-1 GapC immunized rabbit serum. The error bars refer to the deviation. The lowercase letters indicate that the difference among different phosphate-solubilizing bacteria was significant ($P < 0.05$). The same below.

2.8 B 细胞优势表位的鉴定

以表位多肽作抗原分别与兔抗 GapC 多抗进行 ELISA 检测, 结果显示, 与对照组相比, 9 种表位多肽均可与兔抗 GapC 多抗发生特异性反应, 多肽与抗体的亲和力不同。PL7 对多抗的亲和力最高, 其次为 PL1、PL2 和 PL3 多肽, PL5、PL6、PC1、PC2 和 PC3 的亲和力较低 ($P < 0.05$)。这提示, GapC 的第 266–282 位氨基酸 (²⁶⁶AANDSYGYTEDPIVSSD²⁸²) 为优势 B 细胞表位 (图 7)。

3 讨论

奶牛乳房炎是一种奶牛常发疾病, 给全球奶牛业造成严重危害^[15]。*S. uberis* 是引起奶牛乳房炎的重要病原菌之一^[16-17]。目前传统的 *S. uberis* 疫苗存在保护力不足、缺乏交叉免疫、防控效果不理想等问题。表位是决定疫苗抗原性的关键基因, 基于表位的多肽疫苗已成为新型疫苗的代表之一, 具有安全、稳定且可塑性强的优势。

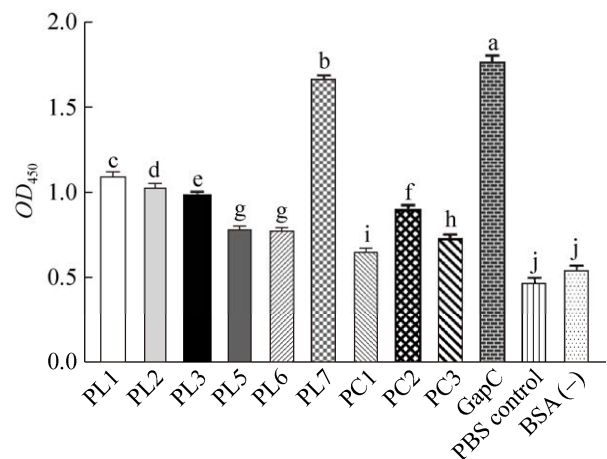


图7 表位多肽 ELISA 检测结果

Figure 7 ELISA results of epitope polypeptides.

GapC 是 *S. uberis* 的重要毒力因子, 该蛋白具有甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 活性^[9], 可促进该菌对宿主细胞的黏附, 对该菌的早期感染和侵入起重要作用, 并被证实有良好的免疫原性^[18-20]。张辉等^[8]利用小鼠免疫攻毒模型表明, GapC 蛋白的保护率达到 70%, 高于全菌灭活疫苗的保护率 30%。魏玉华等对 *S. dysgalactiae*

GapC 的第 1-150 位氨基酸 (aa 1-150) 进行了表达免疫并制备了单克隆抗体, 分析其生物学活性^[21]。马骏等构建了基于金黄色葡萄球菌 FnBPA 和 *S. dysgalactiae* GapC1-150 的多表位疫苗, 证明其具有良好的免疫原性^[22]。

以往研究表明, GapC 在 *S. dysgalactiae*、*S. agalactiae* 和 *S. uberis* 的氨基酸序列的同源性分别为 90%、93% 和 94%^[8]。杜海燕等研究发现, 不同来源链球菌菌株 GapC 相对保守, 研究结果发现猪链球菌 2 型 (CVCC606、1998 年江苏株 HA9801、2005 年四川株 ZY05719 和加拿大株 S735)、化脓链球菌 (YLG 和 CP000017)、奶牛乳房炎链球菌 (AF421899、AF421900.1 及 AF375662) 和肺炎链球菌 (FM211187) 等同源性较高 (可达 85.3%–98.3%), 且有较多的潜在抗原表位^[12]。Yu 等研究表明, GapC 不同类型乳房炎链球菌之间存在交叉免疫保护^[13]。褚明亮等研究发现, *S. uberis* 本地分离株与 GenBank 中 *S. uberis* 的 GapC 的基因序列同源率为 99%^[23]。夏春雷等比较发现, *S. uberis* 本地分离株与 GenBank 中公布的菌株 *S. uberis* (AF421900) 的 GapC 的氨基酸同源率为 100%, 与 *S. agalactiae* (AF421899) GapC 基因的同源率为 91.4%, 与 *S. dysgalactiae* (AF375662) gapC 基因序列的同源率为 88.9%^[24]。本研究对 *S. uberis* 分离株 RF5-1 gapC 克隆测序并与相关参考菌株比较分析结果与夏春雷等得出结果基本一致。该菌 GapC 氨基酸序列与奶牛乳房炎有关的 3 种链球菌亲缘关系较高, 本研究中 *S. uberis* GapC 对 3 种不同链球菌特异性抗体的交叉反应也再次证明了这一点。因此, GapC 可为不同种类链球菌感染诱发的奶牛乳房炎提供一种交叉免疫保护作用, 为利用该蛋白开展表位多肽疫苗的研制奠定了基础。

本研究结合传统生物信息学软件和在线预

测分析软件, 预测分析了本课题组分离鉴定 *S. uberis* RF5-1 株 GapC 蛋白的 B 细胞抗原表位, 结合多种软件筛选候选抗原表位, 并通过抗原多肽的免疫生物学试验结果确定了优势的 B 细胞抗原表位 (PL1、PL2、PL3 和 PL7 多肽), 避免了单纯使用一种软件的局限性。利用生物试验验证了筛选表位的功能性, 为进一步进行表位疫苗的构建奠定了基础。

Zhang 等通过单克隆抗体确定了 *S. dysgalactiae* 的 B 细胞表位³⁰TRINDLT³⁶^[25], 并利用噬菌体展示文库确定了一个 *S. dysgalactiae* 的 B 细胞表位⁴⁸DTTQGRFD⁵⁵^[26]。随后, Zhang 等又利用 *S. agalactiae* GapC 单克隆抗体 1E11 结合噬菌体展示文库结合的方法鉴定了另一个表位⁹⁷TGFFAKK¹⁰³, 并进一步通过定点诱变的方法确定了该表位的核心基序为 G98、F99、F100 和 K103^[27]。这些研究均是对 *S. dysgalactiae* 的 B 细胞表位预测的结果。刘祥等通过生物信息学方法预测 *S. uberis* GapC 的 B 细胞表位, 证明该蛋白存在 5 个 B 细胞表位, 分别为 aa 57–66、75–88、121–128、191–206 和 266–279^[14]。但该研究均未对这些表位的免疫生物功能进行鉴定和分析。本研究通过分析确定了 4 个潜在的 B 细胞表位, 分别位于 aa 22–43、46–58、72–92 和 266–282。对比后发现, 本研究关于 *S. uberis* 的表位预测其中有 2 个 B 细胞表位 (aa 72–92 和 aa 266–282) 与刘祥等的研究结果 (aa 75–88 和 aa 266–275) 相近, 其他表位差异较大, 推测可能是由于生物试验和预测方法的差异导致。该差异也再次证明了抗原表位鉴定中生物试验的必要性。

本研究对 *S. uberis* 新疆分离株的 RF5-1 GapC 蛋白进行表达纯化, 采用生物信息学方法对 GapC 蛋白进行序列同源性分析, 并对其三维立体构象和 B 细胞表位进行预测分析, 利用 GapC 制

备的多抗可特异性识别筛选的表位, 获得了1个优势线性表位 (266 AANDSYGYTEDPIVSSD 282), 该结果为今后开展乳房链球菌抗原表位研究和进一步开发乳房炎不同种链球菌的多表位疫苗奠定了基础。

REFERENCES

- [1] 赵高乾, 王素英, 李广善, 等. 奶牛乳房炎主要病原菌感染流行规律研究进展. 中国畜牧兽医, 2019, 46(11): 3378-3386.
Zhao GQ, Wang SY, Li GS, et al. Research progress on infection epidemic patterns among major dairy cow mastitis pathogenic bacteria. China Animal Husbandry Vet Med, 2019, 46(11): 3378-3386 (in Chinese).
- [2] 王丹, 杨峰, 李新圃, 等. 奶牛乳房炎病原菌诊断技术研究进展. 中国畜牧兽医, 2017, 44(6): 1811-1817.
Wang D, Yang F, Li XP, et al. Research progress on diagnosis technology of dairy cow mastitis pathogens. China Animal Husbandry Vet Med, 2017, 44(6): 1811-1817 (in Chinese).
- [3] 白东东, 李新圃, 杨峰, 等. 世界奶牛乳房炎研究发展态势图谱分析. 动物医学进展, 2019, 40(4): 80-87.
Bai DD, Li XP, Yang F, et al. Development trend map analysis of bovine mastitis in the world. Prog Vet Med, 2019, 40(4): 80-87 (in Chinese).
- [4] Leitner G, Yadlin N, Lubashevsky E, et al. Development of a *Staphylococcus aureus* vaccine against mastitis in dairy cows. II. Field trial. Vet Immunol Immunopathol, 2003, 93(3/4): 153-158.
- [5] Takaiwa F. A rice-based edible vaccine expressing multiple T-cell epitopes to induce oral tolerance and inhibit allergy. Immunol Allergy Clin North Am, 2007, 27(1): 129-139.
- [6] Sakarellos-Daitsiotis M, Krikorian D, Panou-Pomonis E, et al. Artificial carriers: a strategy for constructing antigenic/immunogenic conjugates. Curr Top Med Chem, 2006, 6(16): 1715-1735.
- [7] Wang MY, Zhai L, Yu W, et al. Identification of a protective B-cell epitope of the *Staphylococcus aureus* GapC protein by screening a phage-displayed random peptide library. PLoS One, 2018, 13(1): e0190452.
- [8] 张辉, 陈伟. 奶牛乳房炎性乳房链球菌 GapC 重组蛋白的免疫保护性研究. 中国预防兽医学报, 2014, 36(10): 810-812.
Zhang H, Chen W. Immunoprotection of mice with the recombinant GapC of *Streptococcus uberis*. Chin J Prev Vet Med, 2014, 36(10): 810-812 (in Chinese).
- [9] 吴金花, 布日额, 锡林高娃, 等. 牛乳房炎无乳链球菌表面免疫相关蛋白及磷酸甘油酸激酶对奶牛的免疫保护作用. 中国生物制品学杂志, 2014, 27(8): 994-996.
Wu JH, BU RE, XI LGW, et al. Immune protection of surface immunogenic protein of dairy cow mastitis *Streptococcus agalactiae* and phosphoglycerate kinase to dairy cow. Chin J Biol, 2014, 27(8): 994-996 (in Chinese).
- [10] 王鹤, 梁宏儒, 胡旭, 等. 无乳链球菌 GapC 蛋白和鼠伤寒沙门菌鞭毛蛋白的融合表达及纯化. 中国生物制品学杂志, 2013, 26(2): 171-175.
Wang H, Liang HR, Hu X, et al. Fusion expression and purification of fusion protein of *S. agalactiae* GapC and *S. typhimurium* FliC. Chin J Biol, 2013, 26(2): 171-175 (in Chinese).
- [11] 王凤, 汤德元, 宋立, 等. 3种奶牛乳房炎链球菌的 gapC 基因原核表达及其免疫原性研究. 养殖与饲料, 2013(6): 10-15.
Wang F, Tang DY, Song L, et al. Prokaryotic expression and immunogenicity of gapC gene of *Streptococcus mastitis* in dairy cows. Animals Breed Feed, 2013(6): 10-15 (in Chinese).
- [12] 杜海燕, 张霞, 程振涛, 等. 基于 GapC 基因链球菌 DNA 疫苗构建及其免疫效果. 动物医学进展, 2011, 32(4): 32-35.
Du HY, Zhang X, Cheng ZT, et al. Construction and immune effect of DNA vaccine based on gapC gene of *Streptococcus*. Prog Vet Med, 2011, 32(4): 32-35 (in Chinese).
- [13] Yu LQ, Fan ZY, Ma JZ, et al. Cross-protective effect of a novel multi-antigen-chimeric vaccine against *Streptococcus* and *Staphylococcus aureus* infection in mice. J Med Microbiol, 2014, 63(12): 1732-1740.
- [14] 刘祥, 孔智翔, 殷书平, 等. 奶牛乳房炎重要候选疫苗蛋白的抗原表位分析及三联重组表位疫苗的氨基酸序列设计. 浙江农业学报, 2016, 28(9): 1476-1484.
Liu X, Kong ZX, Yin SP, et al. Epitope analysis of important vaccine candidate proteins and design of amino acid sequence of triple recombinant epitope vaccine. Acta Agric Zhejiangensis, 2016, 28(9): 1476-1484 (in Chinese).
- [15] 刘龙海, 李新圃, 杨峰, 等. 奶牛乳房炎疫苗研究进展. 动物医学进展, 2016, 37(1): 100-105.
Liu LH, Li XP, Yang F, et al. Progress on mastitis vaccines in dairy cows. Prog Vet Med, 2016, 37(1): 100-105 (in Chinese).

- [16] Schlegel L, Grimont F, Collins MD, et al. *Streptococcus infantarius* sp. nov., *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* subsp. nov. and *Streptococcus infantarius* subsp. *coli* subsp. nov., isolated from humans and food. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2000, 50(Pt 4): 1425-1434.
- [17] Käppeli N, Morach M, Zurfluh K, et al. Sequence types and antimicrobial resistance profiles of *Streptococcus uberis* isolated from bovine mastitis. *Front Vet Sci*, 2019, 6: 234.
- [18] Madureira P, Baptista M, Vieira M, et al. *Streptococcus agalactiae* GAPDH is a virulence-associated immunomodulatory protein. *J Immunol*, 2007, 178(3): 1379-1387.
- [19] Nagarajan R, Ponnuraj K. Cloning, expression, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Streptococcus agalactiae* NEM316. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*, 2014, 70(pt 7): 938-941.
- [20] Song B, Yang X, Sun H, et al. Immunogenicity of amino acids 1-150 of *Streptococcus* GapC displayed on the surface of *Escherichia coli*. *Microb Pathog*, 2017, 105: 288-297.
- [21] 魏玉华, 张丽萌, 周雪, 等. 抗停乳链球菌 GapC_{1-150aa} 单克隆抗体的制备及生物活性. 黑龙江八一农垦大学学报, 2016, 28(1): 53-58, 87.
Wei YH, Zhang LM, Zhou X, et al. Preparation and biological activities of 3 monoclonal antibody strains against GapC_{1-150aa} from *Streptococcus dysgalactiae*. *J Heilongjiang Bayi Agric Univ*, 2016, 28(1): 53-58, 87 (in Chinese).
- [22] 马骏, 王然, 刘硕, 等. 基于金黄色葡萄球菌 FnBPA 和停乳链球菌 GapC 的多表位疫苗免疫原性研究. 黑龙江八一农垦大学学报, 2021, 33(1): 60-67, 114.
Ma J, Wang R, Liu S, et al. Immunogenicity of multi-epitope vaccines based on *S. aureus* FnBPA and *S. dysgalactiae* GapC. *J Heilongjiang Bayi Agric Univ*, 2021, 33(1): 60-67, 114 (in Chinese).
- [23] 褚明亮, 陈创夫, 刘君, 等. 乳房链球菌 GAPC 基因的克隆及原核表达. 动物医学进展, 2008, 29(6): 58-61.
Chu ML, Chen CF, Liu J, et al. Cloning and prokaryotic expression of gene encoding GAPC of *Streptococcus uberis*. *Prog Vet Med*, 2008, 29(6): 58-61 (in Chinese).
- [24] 夏春雷, 杨玉英. 链球菌 GapC 蛋白的表达及其多克隆抗血清的制备. 中国预防兽医学报, 2008, 30(11): 893-896.
Xia CL, Yang YY. Expression of *Streptococcus uberis* GapC protein and preparation of mouse antisera against *Streptococcus uberis* GapC protein. *Chin J Prev Vet Med*, 2008, 30(11): 893-896 (in Chinese).
- [25] Zhang L, Zhou X, Fan Z, et al. Identification of a conserved B-cell epitope on the GapC protein of *Streptococcus dysgalactiae*. *Microb Pathog*, 2015, 83-84: 23-28.
- [26] Zhang L, Zhang H, Fan Z, et al. Identification of a conserved linear B-Cell epitope of *Streptococcus dysgalactiae* GapC protein by screening phage-displayed random peptide library. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0131221.
- [27] Zhang L, Zhang H, Fan Z, et al. Production of mouse monoclonal antibody against *Streptococcus dysgalactiae* GapC protein and mapping its conserved B-cell epitope. *Res Vet Sci*, 2015, 98: 39-41.

(本文责编 陈宏宇)