

# 猪链球菌 IgG 结合蛋白的原核表达及其与不同动物 IgG 的结合性

王婧, 张安定, 李冉, 金梅林

华中农业大学动物医学院 农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070

**摘要:** 猪链球菌 IgG 结合蛋白 (SPG) 是一种可与多种动物 IgG 结合的细胞壁蛋白, 广泛地存在于猪链球菌的各个血清型中, 被认为是共同抗原。然而其在猪链球菌中的生物学意义并不清楚。本实验用 PCR 方法从猪链球菌 1/2、1、2 和 9 型菌株基因组中扩增 SPG 基因, 构建 pET28a-SPG 重组表达载体, 将其转入大肠杆菌 BL21 菌株。IPTG 诱导表达后, 重组蛋白经 SDS-PAGE 及 Western blotting 鉴定为可高效表达。镍亲和层析及分子筛两步纯化后获得纯度较高的目的蛋白。Western blotting 及 ELISA 试验结果表明, 所有纯化的目的蛋白均可与不同动物 IgG 结合, 其中与人和猪 IgG 的结合能力相对较高, 但不同血清型猪链球菌 SPG 与同种动物 IgG 的结合活性没有明显差异。

**关键词:** 猪链球菌, SPG, 原核表达, 亲和性

## Prokaryotic expression of recombinant *Streptococcus suis* IgG binding protein and its binding activity with IgG

Jing Wang, Anding Zhang, Ran Li, and Meilin Jin

State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

**Abstract:** *Streptococcus suis* (*S. suis*) IgG-binding protein (SPG) was present in all *S. suis* strains examined. It showed binding activities with IgG from various host species. Little was known about the biological role of this protein, but it was commonly believed that it acted as virulence factor. In this study, the genes encoding SPG were amplified respectively from the total DNA of the *S. suis* serotype 1/2, 1, 2 and 9 with PCR and expressed in *Escherichia coli* BL21 by plasmid pET28a as vector. The recombinant proteins were first purified with affinity chromatography (Ni-NTA), and further purified by sephadexG-200 gel chromatography. The recombinant SPG proteins were identified to have binding activities with IgG of different host species, and for human and porcine IgG they showed better binding activities. But the SPG from different serotypes of *S. suis* showed no great differences in their binding activities with IgG from the same host species.

**Keywords:** *Streptococcus suis*, IgG-binding protein, prokaryotic expression, binding activity

猪链球菌(*Streptococcus suis*)感染已成为影响全世界养猪业的重要问题之一, 主要引起猪脑膜炎、

心内膜炎、关节炎、败血症等, 并可感染人<sup>[1,2]</sup>。猪链球菌致病机理尚不太清楚, 迄今为止, 已知的致

Received: September 11, 2008; Accepted: February 10, 2009

Supported by: National Program on Key Basic Research Project (973 Program) (No. 2006CB504404).

Corresponding author: Meilin Jin. Tel: +86-27-82786905; E-mail: jinmeilin@mail.hzau.edu.cn

国家重点基础研究发展规划(973 计划) (No. 2006CB504404)资助。

病相关因子有荚膜多糖 CPS、溶菌酶释放蛋白 MRP、胞外因子 EF、溶血素 SLY 和粘附素等,然而新的相关因子仍在不断的被发现<sup>[3,4]</sup>。猪链球菌 IgG 结合蛋白(SPG)与葡萄球菌 A 蛋白(SPA)一样能非特异性地结合猪、牛、羊、鼠等动物及人的 IgG,从而可能影响抗体的活性<sup>[5]</sup>。检测发现,所有血清型的猪链球菌均有这种蛋白,表明它是一种共同抗原。但是,它在毒力方面的作用尚不清楚<sup>[6]</sup>。本研究主要通过构建 SPG 的高效原核表达体系,大量获取纯度较高的蛋白,并鉴定表达蛋白与人、鼠、猪和羊 IgG 的结合性,初步验证 SPG 的功能。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株和质粒

2 型猪链球菌(*S. suis* serotype 2, SS2)SC-19 为 2005 年四川分离强毒株,1/2、1、9 型猪链球菌(SS1/2、SS1、SS9)由本实验室分离获得;表达载体 pET28a 以及表达菌株 BL21 均由本实验室保存。

### 1.2 主要试剂

DNA 限制性内切酶、*Taq* DNA 聚合酶、dNTPs 等试剂均为宝生物工程(大连)有限公司产品;DNA 回收试剂盒为上海生工产品;His 单克隆抗体购自晶美公司;HRP 标记的人的 IgG(1 mg/mL)、ECL 显色试剂盒购自 PIERCE 公司;HRP 标记的猪、鼠、羊 IgG(1 mg/mL)购自 Sigma 公司;Bradford 蛋白质定量试剂盒由香港 HOU-BIO 生物科技有限公司提供。

### 1.3 引物设计

根据 GenBank 上 SPG 全基因序列(Accession No. DQ410872.1)设计一对特异性引物,两端分别添加 *Sac* I 和 *Sal* I 酶切位点,并分别扩增猪链球菌 1/2、1、2、9 型菌株的 SPG 基因开放阅读框(863~1865 bp),设计的引物如下(下划线部分为引入的酶切位点):

SPG1: 5'-CAAGAGGGAGCTCAAAGTGAGGTA CACTATGG-3';

SPG2: 5'-CTTGACGTCGACGATCCTACATTT CTTCAAG-3'。

### 1.4 重组质粒的构建及质粒转化

按照《分子克隆实验指南》(第三版)<sup>[7]</sup>标准方法,通过 PCR 方法从猪链球菌全基因组中分别扩增 SPG 基因,PCR 胶回收产物经过 *Sac* I 和 *Sal* I 双酶切后连接到表达载体 pET28a,随后对重组质粒进行双酶切、PCR 鉴定及 DNA 测序分析,鉴定正确的重组质

粒转化大肠杆菌 BL21。

### 1.5 重组质粒在大肠杆菌 BL21 中的表达及纯化

#### 1.5.1 重组质粒在大肠杆菌 BL21 中的表达

将转化重组载体的 BL21 菌株接种于含有卡那霉素的 LB 液体培养基中,37°C 振荡培养 3 h,加入异丙基  $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG)至终浓度 0.8 mmol/L,28°C 继续培养 6 h。收集菌液加入上样缓冲液后,沸水浴 10 min,立即放入冰浴中,10 000 r/min 离心 1 min,取上清进行 SDS-PAGE 鉴定。表达的重组蛋白分别命名为 SPG-1/2、SPG-1、SPG-2 和 SPG-9。

#### 1.5.2 重组蛋白的纯化

利用 AKTA-FPLC 系统采用亲和层析的方法纯化出带有 His 标签的重组蛋白 SPG。

超声波破碎诱导的重组菌,收集上清,使用 Qiagen 公司的 Ni-NTA 亲和层析柱进行亲和层析,收集纯化样品浓缩后使用 Amersham 公司的 G200 凝胶过滤柱进行二次纯化,具体步骤均按使用说明书进行。

### 1.6 Western blotting 鉴定重组蛋白

根据《精编分子生物学实验指南》(第四版)<sup>[8]</sup>标准步骤,将重组表达产物经 10% SDS-PAGE 后转移至硝酸纤维素膜上,以小鼠抗 His 标签单克隆抗体为一抗,HRP 偶联的山羊抗小鼠 IgG 为二抗,对重组 SPG 蛋白进行鉴定。

### 1.7 重组蛋白的活性检测

#### 1.7.1 用 Western blotting 检测重组蛋白的活性

利用 Bradford 蛋白质定量试剂盒将重组表达产物精确定量,具体步骤按产品说明书进行。用 0.9% 的 NaCl 溶液调节所有重组蛋白浓度为 0.5 mg/mL,10% SDS-PAGE 分别上样 30  $\mu$ L,并根据 1.5 步骤转膜并封闭过夜,然后分别与 HRP 标记的人、鼠、猪和羊的 IgG 于 37°C 孵育 1 h, ECL 显色并鉴定。

#### 1.7.2 用 ELISA 检测重组蛋白的活性

将精确定量后的重组表达产物调整浓度为 6.25  $\mu$ g/mL,并分别包被酶标板,加入倍比稀释的 HRP 标记的人、鼠、猪和羊 IgG,37°C 孵育 40 min,以 P/N 2 为判断标准,计算抗体滴度。

## 2 结果

### 2.1 SPG 基因的克隆及重组 SPG 质粒的鉴定

用 SPG 特异性引物,分别以 SS1/2、1、2、9 基

基因组为模板,经过 PCR 扩增,均得到大小约 1000 bp 左右的条带,与预期结果一致(图 1)。SPG 基因经过克隆至表达载体后,重组质粒分别用 *Sac* I 和 *Sal* I 双酶切、PCR 扩增及克隆菌测序进行鉴定。

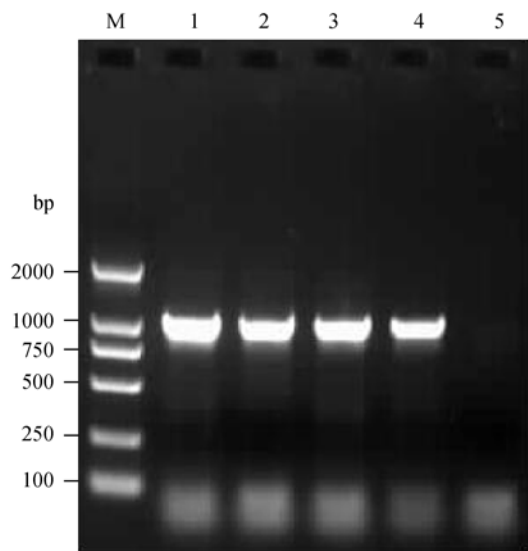


图 1 SPG 基因的克隆

Fig. 1 Cloning of SPG genes. 1: SS1/2; 2: SS1; 3: SS2; 4: SS9; M: DNA marker.

## 2.2 重组蛋白 SPG 的表达、纯化及 Western blotting 鉴定

### 2.2.1 重组蛋白 SPG 的表达

将测序正确的重组质粒转入大肠杆菌 BL21, 表达产物经 10% SDS-PAGE 分析大小约为 45 kD。SS1、SS2 和 SS9 菌株的 SPG 表达产物主要以可溶性蛋白的形式存在于上清中, 而 SS1/2 菌株的 SPG 表达产物主要以包涵体的形式存在。

### 2.2.2 重组蛋白 SPG 的 Western blotting 分析

根据重组蛋白带有 His 标签这一特点, 利用 His 的单克隆抗体, 采用 Western blotting 的方法鉴定诱导蛋白。结果显示, 在 45 kD 处可见一明显条带, 表明目的蛋白已明确表达(图 2)。

### 2.2.3 重组蛋白 SPG 的纯化

由目的蛋白在 C 端含有 6 个连续的 His 的特性, 可利用 AKTA-FPLC 系统采用 Ni-NTA 亲和层析的方法纯化出带有 His 标签的重组蛋白 SPG。纯化时采用 50 mmol/L 的咪唑为上样缓冲液, 洗脱时系统咪唑浓度由 100 mmol/L 提高到 250 mmol/L, 于 250 mmol/L 洗脱时出现目的蛋白的洗脱峰, 收集洗脱样品, SDS-PAGE 鉴定结果显示目的蛋白得到初

步纯化, 小分子量的蛋白杂带已经去除, 但仍有部分大分子量蛋白杂带。

由于一次纯化后的大分子量蛋白与目的蛋白的分子量差异较大, 因此可采用凝胶过滤的方法对一次纯化的蛋白进行二次纯化, SDS-PAGE 结果显示 6His-SPG 蛋白呈单一条带, 纯化结果见图 3。

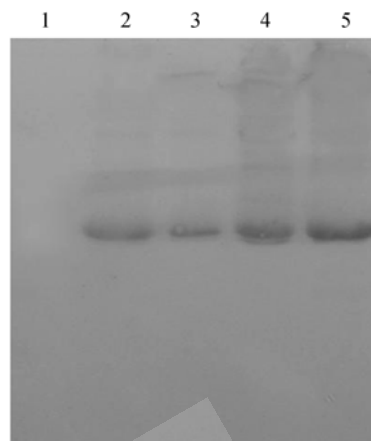


图 2 重组 SPG 蛋白的 Western blotting 鉴定

Fig. 2 Expression of recombinant SPG proteins by Western blotting analysis. 1: BSA; 2: SPG-1/2; 3: SPG-1; 4: SPG-2; 5: SPG-9.

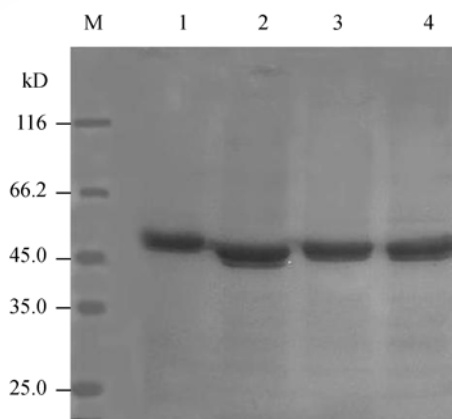


图 3 重组 SPG 蛋白的纯化

Fig. 3 Purification of recombinant SPG proteins. 1: SPG-1/2; 2: SPG-1; 3: SPG-2; 4: SPG-9; M: protein marker.

## 2.3 重组蛋白的活性检测

### 2.3.1 用 Western blotting 检测重组蛋白的活性

将试验中表达的不同血清型猪链球菌 SPG 蛋白经精确定量后转膜, 并与 HRP 标记的人、鼠、猪及羊 IgG 共孵育, 经显色试剂盒显色后, 可看见目的蛋白的特异性条带(图 4~7), 证明试验中所有 SPG 重组蛋白具有与 IgG 结合的活性。



图 4 重组 SPG 蛋白与人 IgG 的结合活性

Fig. 4 Binding activity of the recombinant SPG proteins with the human IgG. 1: BSA; 2: SPG-1/2; 3: SPG-1; 4: SPG-2; 5: SPG-9.

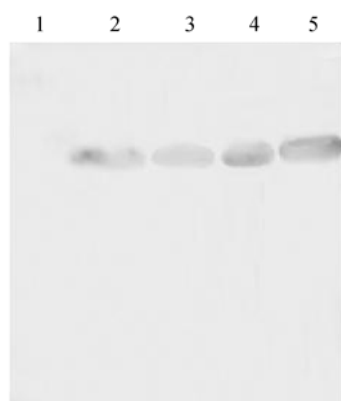


图 5 重组 SPG 蛋白与羊 IgG 的结合活性

Fig. 5 Binding activity of the recombinant SPG proteins with the goat IgG. 1: BSA; 2: SPG-1/2; 3: SPG-1; 4: SPG-2; 5: SPG-9.

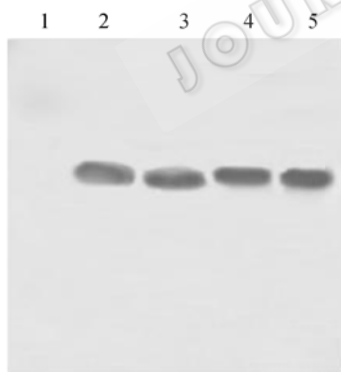


图 6 重组 SPG 蛋白与猪 IgG 的结合活性

Fig. 6 Binding activity of the recombinant SPG proteins with the porcine IgG. 1: BSA; 2: SPG-1/2; 3: SPG-1; 4: SPG-2; 5: SPG-9.

### 2.3.2 用 ELISA 检测重组蛋白的活性

用 ELISA 方法检测重组蛋白对不同动物 IgG 亲和活性见表 1, 从图表中可以看出不同血清型 SPG 与同种动物 IgG 的结合活性没有明显差异, 但是所有 SPG 与人和猪 IgG 的结合能力都相对较高。

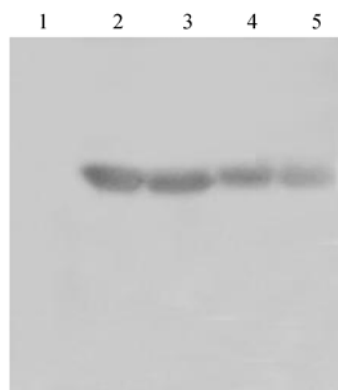


图 7 重组 SPG 蛋白与鼠 IgG 的结合活性

Fig. 7 Binding activity of the recombinant SPG proteins with the mouse IgG. 1: BSA; 2: SPG-1/2; 3: SPG-1; 4: SPG-2; 5: SPG-9.

表 1 重组 SPG 蛋白与不同动物 IgG 结合的平均滴度

Table 1 ELISA titer of the recombinant SPG proteins binding with IgG

Protein	IgG				
	Human	Mouse	Porcine	Goat	PBS
SPG-1/2	1:20	1:8	1:40	1:8	<1:2
SPG-1	1:20	1:4	1:20	1:8	<1:2
SPG-2	1:20	1:8	1:40	1:10	<1:2
SPG-9	1:20	1:10	1:40	1:10	<1:2

## 3 讨论

SPG 作为一种重要的 IgG 结合蛋白, 与 SPA 等其他同类蛋白相比有着更广泛的结合能力<sup>[9]</sup>。在猪链球菌中, 该蛋白广泛地存在于各种血清型当中。虽然已有学者研究认为, 该类 IgG 结合蛋白很可能作为一种致病性因子, 在 A 群链球菌的侵染中起到了重要作用, 但是到目前为止, 关于此类蛋白的生物学作用仍不十分清楚<sup>[10]</sup>。同时, 也有实验研究表明, 在 G 群链球菌中的 IgG 结合蛋白造成了 IgG 在菌体表面的聚集, 而这种聚集作用在一定程度上破坏了补体途径的激活及其调理作用的发挥<sup>[11]</sup>。而 SPG 同样作为一种 IgG 结合蛋白, IgG 又作为机体免疫系统中的重要免疫球蛋白, 两者的结合是否会影响 IgG 的活性, 是否会影响免疫系统的活性, 又是否会带来猪链球菌侵入机体后的抗吞噬作用, 同时 IgG 的 Fc 端是激活补体经典途径的重要成分, SPG 与 IgG Fc 端的结合, 又是否同样会影响补体反应的调控, 影响补体的生物学效应, 这一切都有待于进一步的研究。

本研究利用 pET28a 表达系统成功高效表达了猪链球菌的 SPG 蛋白,实验证实所有重组表达蛋白均具有与不同动物 IgG 结合的生物活性。试验中选择表达 SPG 蛋白的 4 个不同血清型的猪链球菌菌株,在致病力上存在一定差别,其中 SS2 SC-19 的致病性为最强且可以感染人。Western blotting 及 ELISA 实验显示,所选择的 4 个血清型猪链球菌 SPG 蛋白均可与 IgG 结合,其中与人和猪 IgG 的结合能力都相对较高,这可能与不同动物对猪链球菌的敏感性不同有关。但不同猪链球菌的 SPG 与同种动物 IgG 的结合活性没有明显差别。该研究初步表明 SPG 蛋白与猪链球菌致病性的强弱可能没有明显关系,但可能加强了猪链球菌在易感动物中的致病能力,然而确切结论仍需要进一步试验证实。

利用 Ni-NTA 亲和层析以及分子筛凝胶过滤的双重纯化方法,可以获得纯度较高的目的蛋白。且该表达纯化的方法可以用于猪链球菌多种血清型的菌株中。该研究为进一步探讨 SPG 蛋白在猪链球菌中的生物学意义奠定了良好的基础。

## REFERENCES

- [1] Li J, Niu ZX. Advance in *Streptococcus suis*. *Prog Vet Med*, 2004, **25**(3): 31–33.  
李军, 牛钟相. 猪链球菌病研究进展. *动物医学进展*, 2004, **25**(3): 31–33.
- [2] Arends JP, Zanen HC. Meningitis caused by *Streptococcus suis* in humans. *Rev Infect Dis*, 1988, **10**: 131–137.
- [3] Vecht U, Stockhofe-Zurwieden N, Teteburg BJ, *et al*. Virulence of *Streptococcus suis* type 2 for mice and pigs appeared host-specific. *Vet Microbiol*, 1997, **58**: 53–60.
- [4] Zhao HM, Pan XZ, Tang JQ. Advance in virulence factors and detection methods of *Streptococcus suis*. *J Microbiol*, 2006, **26**(1): 77–80.  
赵华梅, 潘秀珍, 唐家琪. 猪链球菌毒力因子和鉴定方法的研究进展. *微生物学杂志*, 2006, **26**(1): 77–80.
- [5] Serhir B, Higgins R, Foify B, *et al*. Detection of immunoglobulin-binding proteins in *Streptococcus suis*. *J Gen Microbiol*, 1993, **139**: 2953–2958.
- [6] Lu LL, Li R, Zheng YL, *et al*. *Chin J Health Lab Tech*, 2008, **18**(3): 570–572.  
路玲玲, 李蓉, 郑玉玲, 等. 2 型猪链球菌毒力因子研究进展. *中国卫生检验杂志*, 2008, **18**(3): 570–572.
- [7] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [8] Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, *et al*. *Short Protocols in Molecular Biology*. 4th Ed. Canada: John Wiley & Sons, 1999.
- [9] Björck L, Kronvall G. Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent. *J Immunol*, 1984, **133**(2): 969–974.
- [10] Serhir B, Dubreuil D, Higgins R, *et al*. Purification and characterization of a 52-kilodalton immunoglobulin G-binding protein from streptococcus suis capsular type 2. *J Bacteriol*, 1995, **177**(13): 3830–3836.
- [11] Nitsche-Schmitz DP, Johansson HM, Sastalla I, *et al*. Group G streptococcal IgG binding molecules FOG and protein G have different impacts on opsonization by C1q. *J Biol Chem*, 2007, **282**(24): 17530–17536.