

猪链球菌 2 型菌毛样结构蛋白 SSU2101 原核表达及免疫保护性

秦跃红^{1,2} 王长军^{1,2} 董瑞萍^{1,2} 潘秀珍² 唐家琪^{1,2*}

(1. 南京医科大学基础医学院 江苏 南京 210029)

(2. 南京军区军事医学研究所 江苏 南京 210002)

摘要: 为了研究猪链球菌 2 型(*Streptococcus suis* serotype 2, *S. suis* 2) 05ZYH33 株预测的菌毛样结构蛋白(Pili-like protein, PLP) SSU2101 的免疫保护性作用, 本试验通过 PCR 扩增出 *plp* 基因片段, 进一步将目的基因克隆到表达载体 pET32a 中, IPTG 诱导重组蛋白表达, 亲和层析法纯化目的蛋白。Western blot 分析表明该重组蛋白具有良好的免疫原性, 动物试验结果证实 PLP 蛋白对 *S. suis* 2 强致病株感染小鼠具有显著的免疫保护作用, 提示菌毛样结构蛋白 SSU2101 是理想的猪链球菌 2 型亚单位疫苗的候选分子。

关键词: 猪链球菌 2 型, 菌毛样结构蛋白, 免疫原性, 免疫保护作用

Expression of Pili-like Protein SSU2101 of *Streptococcus suis* Serotype 2 and Evaluation of Its Protective Abilities to a Mouse Model

QIN Yue-Hong^{1,2} WANG Chang-Jun^{1,2} DONG Rui-Ping^{1,2}
PAN Xiu-Zhen² TANG Jia-Qi^{1,2*}

(1. School of Basic Medical Sciences, Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210029, China)

(2. Institute of Military Medical Sciences, Nanjing Command, Nanjing, Jiangsu 210002, China)

Abstract: To prokaryotic express pili-like protein(PLP) SSU2101 of the Chinese strain 05ZYH33 of *Streptococcus suis* serotype 2(*S. suis* 2), elucidate its immunogenicity and immunoprotection. The *plp* gene was amplified by PCR, and then cloned into prokaryotic expression plasmid pET32a. The recombinant plasmid was transformed into *E. coli* BL21 competent cells to express the recombinant PLP(rPLP). The rPLP protein was purified by affinity chromatography methods. Western blot indicated clearly that the rPLP shares strong specific immunogenicity. Animal infection experiments demonstrated that the rPLP protect mice from lethal challenge with *S. suis* 2 infection, which suggest rPLP might be a candidate component of *S. suis* 2 protein vaccine.

Keywords: *Streptococcus suis* serotype 2, Pili-like protein, Immunogenicity, Immunoprotection

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No. 30730081, 30671848, 30600533); 江苏省自然科学基金资助项目(No. BK2008066, BK2007013)

* 通讯作者: Tel: 86-25-84526002; ✉: tjq85@hotmail.com

收稿日期: 2009-04-23; 接受日期: 2009-06-26

猪链球菌 2 型(*Streptococcus suis* serotype 2, *S. suis* 2)是一种重要的人畜共患病病原菌,不仅可致猪脑膜炎、关节炎、心内膜炎、肺炎、败血症,还可感染人类导致脑膜炎、败血症、心内膜炎等,并且可引发严重的链球菌中毒休克综合征(*Streptococcal toxic shock syndrome*, STSS),病程凶险,病死率极高^[1]。尤其是 1998 年和 2005 年分别在我国江苏和四川爆发大规模的疫情,造成了人民生命财产的重大损失。由于 *S. suis* 2 的毒力因子和致病机理尚不清楚,还没有有效用于预防的疫苗,因此加快对其致病机理及疫苗候选分子的研究显得十分迫切。

近几年对 A 组链球菌、B 组链球菌和肺炎链球菌的研究中发现,菌毛在细菌黏附、侵袭和致病过程中起到关键作用,并且菌毛结构蛋白能够在其动物模型中产生免疫保护作用,可作为疫苗的候选靶标^[2]。1990 年 Jacques 等通过电子显微镜观察到 *S. suis* 菌毛样结构的存在^[3],通过对本实验室保存的 *S. suis* 2 型中国强毒株 05ZYH33 的全基因组注释分析,本课题组发现两个在结构特征上与已知革兰氏阳性病原菌菌毛编码基因完全一致的基因簇,分别编码一组 sortase 转肽酶和与已知菌毛结构蛋白同源的膜蛋白,命名为 srtBCD 和 srtF 菌毛岛^[4],其中 srtBCD 菌毛岛仅存在于强毒株中。鉴于此,我们选取 srtBCD 菌毛岛编码主要结构蛋白的基因 *SSU2101* 进行克隆、表达和纯化,并对其免疫原性及免疫保护作用进行研究,为系统开展国内强毒株菌毛岛功能研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 质粒和菌株:菌株 05ZYH33,本实验室保存;表达质粒 pET32a 及其宿主菌 *E. coli* DH5 α 和 *E. coli* BL21,本实验室保存;质粒 pMD-18T 为 TaKaRa 公司产品。

1.1.2 试剂:PCR 扩增试剂盒,限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I, T4 连接酶均为 TaKaRa 公司产品。DNA 胶回收试剂盒为 Promega 公司产品。弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂为 Sigma 公司产品,辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗鼠和山羊抗兔 IgG、底物 OPD,购自南京大治生物技术有限公司。DAB 显色液购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 菌毛相关基因的筛选:用 Blast 和 Clustal W 等生物信息学工具对本实验室 *S. suis* 2 05ZYH33 基因序列进行分析,筛选编码菌毛结构蛋白的基因。

1.2.2 PCR 扩增 *plp* 基因:根据筛选所得序列设计合成引物,进行 PCR 扩增。上游引物为 5'-GGATCCAAACACTTAGTCCATGCC-3',划线部分为 *Bam*H I 酶切位点;下游引物为 5'-CTCGAGTTATTC AATTTCACCATG-3',划线部分为 *Xho* I 酶切位点。引物由上海赛百盛生物公司合成。PCR 体系:10 \times Taq buffer 5 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 3.2 μ L, 2.5 mmol/L dNTPs 4 μ L, 模板 DNA 2 μ L, 10 pmol/ μ L 上游,下游引物各 1 μ L, Taq 酶 0.5 μ L, ddH₂O 33.3 μ L。PCR 程序:95 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 52 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

1.2.3 目的片段的克隆:1%琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物,胶回收试剂盒回收目的片段。将回收的目的片段与 pMD18-T vector 16 $^{\circ}$ C 水浴过夜连接,连接产物转化 DH5 α 感受态细菌,经 PCR 检测为阳性者提取质粒,酶切,电泳鉴定。

1.2.4 重组表达载体 pET32a::*plp* 的构建和鉴定:质粒 pMD18-T::*plp* 和 pET32a 载体分别用 *Bam*H I/*Xho* I 双酶切,并用胶回收试剂盒回收目的片段。经 T4 连接酶连接后转化 DH5 α 感受态,菌液经 PCR 检测为阳性者提取质粒,酶切,电泳鉴定。阳性菌株送至南京金思特生物技术有限公司测序。

1.2.5 重组体的表达及纯化:将重组表达载体转化 *E. coli* BL21,菌液浓度培养至 OD₆₀₀ 约为 0.6 时,1 mmol/L IPTG 诱导表达 4 h, 12% SDS-PAGE 电泳检测是否有目的蛋白的表达。将重组体扩大培养并经 IPTG 诱导表达,离心收集菌体, PBS 重悬后冰浴超声破碎菌体,离心后的上清过 Ni²⁺亲和层析柱,得纯化后的 PLP 重组蛋白。

1.2.6 Western blot 分析 PLP 重组蛋白的免疫原性:取纯化蛋白进行 SDS-PAGE,结束后采用电转印法将蛋白转移至硝酸纤维素膜上,用 5%脱脂奶粉 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 h 后,加兔抗 05ZYH33 多抗血清(1:100 稀释), 4 $^{\circ}$ C 过夜,加二抗,为 HRP 标记的山羊抗兔 IgG(1:5000 稀释), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,加底物 DAB 显色。

1.2.7 动物免疫保护试验:6 周龄的 SPF 级 BALB/c

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

小鼠 20 只, 随机分为实验组和对照组, 每组 10 只。实验组首次每只小鼠皮下多点注射 50 μg 重组蛋白 PLP(用等体积弗氏完全佐剂乳化), 以后分别在第 14 天、21 天各加强免疫 1 次, 蛋白剂量相同, 佐剂改为弗氏不完全佐剂。对照组同步注射弗氏佐剂乳化的等量 PBS。第 24 天断尾采血, 分离血清, 间接 ELISA 测定抗血清效价。第 28 天实验组和对照组腹腔注射 05ZYH33 菌液各 1 mL(约 2×10^8 CFU), 次日观察小鼠发病及死亡情况, 共观察 1 周。

1.2.8 间接 ELISA 测定血清抗体滴度: 用纯化的 PLP 重组蛋白 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 包被 96 孔酶标板, 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置过夜; 每孔加入 100 μL 封闭液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h; 多抗血清从 1:100 开始倍比稀释, 每孔加入 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h; HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 1:8000 稀释,

100 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h; OPD 底物显色液, 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 反应 10 min 后加入终止液 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 终止反应; 酶标仪检测 OD_{490} 值, $P/N > 2.1$ 为阳性。

2 结果

2.1 *srtBCD* 菌毛岛在 05ZYH33 全基因组中的发现

通过与 GenBank 中已知的蛋白序列进行同源性比对, 发现在四川分离株 05ZYH33 全基因组中, *srtBCD* 基因簇上游有 3 个含 IPXTG 锚定基序和 E-box 保守序列^[5]的假定表面蛋白编码基因, 其中 *SSU2101* 编码产物与肺炎链球菌菌毛主要结构蛋白有 33% 的同源性, 并且包含一个菌毛结构蛋白特有的 VYPKN 基序^[6], 见图 1。

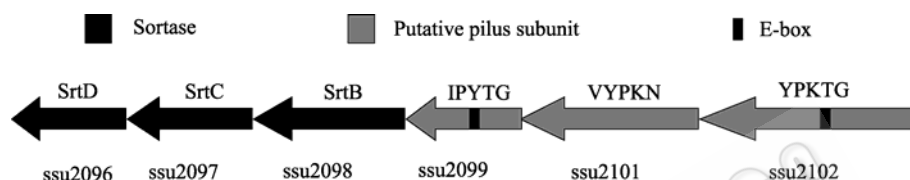


图 1 05ZYH33 基因组中的 *srtBCD* 菌毛岛

Fig. 1 Putative pilus island in genome of 05ZYH33 strain

2.2 目的片段的克隆

以 05ZYH33 基因组 DNA 为模板, 对目的基因进行 PCR 扩增, 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测(图 2)。PCR 扩增产物与预测的目的基因分子量大小相符, 约 790 bp。

2.3 重组表达质粒的鉴定

重组质粒 pET32a::*plp* 经 *Bam*H I/*Xho* I 双酶切, 1%琼脂糖电泳显示酶切片段 *plp* 的长度约 790 bp(图 2)。对阳性转化子进行序列分析, 结果显示克隆的靶基因序列与 05ZYH33 基因组目的基因序列完全一致, 编码 263 个氨基酸。

2.4 目的蛋白在大肠杆菌中的表达及纯化

SDS-PAGE 表明, 含重组表达质粒 pET32a::*plp* 的 *E. coli* BL21 经 IPTG 诱导后在约 50 kD 处有一条明显的新生蛋白条带, 分子量大小与预期一致(图 3)。利用 His 亲和层析柱对表达产物进行初步纯化, 电泳可见一条特异的蛋白条带, 表明得到了较高纯度重组蛋白(图 4)。

2.5 Western blot 分析

Western blot 结果显示, 重组蛋白 PLP 可以与兔抗 05ZYH33 全菌抗血清发生特异性反应, 在约

50 kD 处出现明显的显色条带(图 5), 表明重组蛋白 PLP 具有特异的抗原活性。

2.6 间接 ELISA 测定血清抗体滴度

最后一次免疫小鼠 3 d 后剪尾取血, 间接 ELISA 测定鼠抗 PLP 多抗血清的效价可达 1:204800, 结果见表 1。

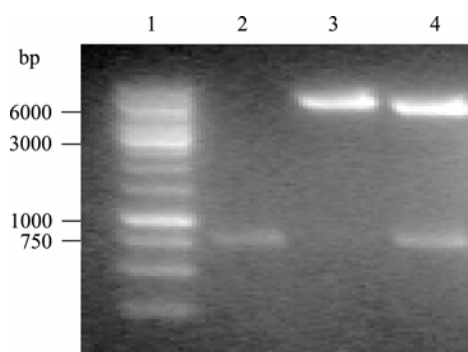


图 2 重组质粒 pET32a::*plp* 的双酶切鉴定

Fig. 2 Identification of the recombinant plasmid pET32a::*plp* by double restriction enzymes

注: 1: 1 kb DNA marker; 2: PCR 产物; 3: *Bam*H I 单酶切重组质粒 pET32a::*plp*; 4: *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切重组质粒 pET32a::*plp*。

Note: 1: 1 kb DNA marker; 2: The products of PCR; 3: Recombinant vector pET32a::*plp* were digested with *Bam*H I; 4: Recombinant vector pET32a::*plp* were digested with *Bam*H I and *Xho* I.

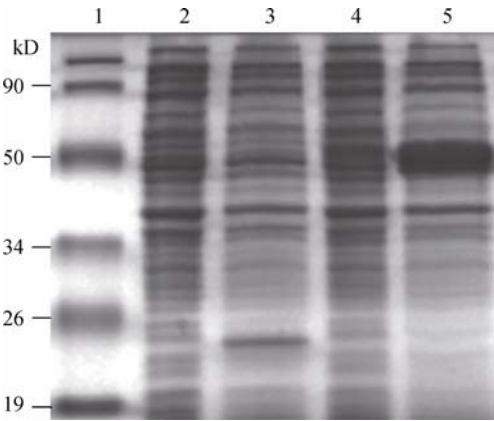


图 3 SDS-PAGE 检测重组蛋白 PLP

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the expression of the recombinant protein PLP

注: 1: 蛋白 marker; 2: pET32a/BL21 诱导前; 3: pET32a/BL21 诱导后; 4: pET32a::plp/BL21 诱导前; 5: pET32a::plp/BL21 诱导后.

Note: 1: Protein marker; 2: Expression of pET32a/BL21 without IPTG induction; 3: Expression of pET32a/BL21 under IPTG induction; 4: Expression of pET32a::plp/BL21 without IPTG induction; 5: Expression of pET32a::plp/BL21 under IPTG induction.

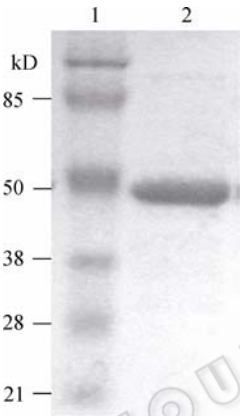


图 4 纯化后的重组蛋白 PLP

Fig. 4 Purified recombinant PLP

注: 1: 蛋白 marker; 2: 纯化后的重组蛋白 PLP.

Note: 1: Protein marker; 2: Purified recombinant PLP.

2.7 动物免疫保护试验

2×10⁸ CFU 的 05ZYH33 攻毒后观察小鼠 1 周, 用 PBS 免疫的对照组小鼠攻毒 12 h 死亡 8 只, 余 2

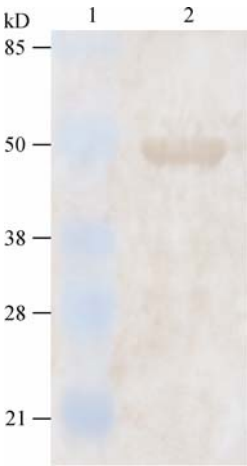


图 5 重组蛋白 PLP 的免疫印迹

Fig. 5 Western blot of the recombinant PLP

注: 1: 蛋白 marker; 2: 重组蛋白 PLP.

Note: 1: Protein marker; 2: Recombinant PLP.

只精神萎靡, 发病严重, 24 h 内全部死亡; 而重组蛋白 PLP 免疫组的 10 只小鼠在攻毒后均无明显发病症状, 全部存活, 表明重组蛋白 PLP 具有显著的免疫保护作用。

3 讨论

细菌对宿主细胞的黏附是其侵入机体和引发宿主致病的关键一步, 菌毛在革兰氏阴性菌中主要涉及对宿主的黏附和侵袭, 是一个重要的毒力因子^[7]。最近几年, 以微生物学家 Schneewind 教授为首的几个研究组, 采用基因敲除、免疫电镜、免疫印迹等技术, 先后在白喉棒杆菌、化脓链球菌、肺炎链球菌、唾液链球菌、无乳链球菌等革兰氏阳性菌的菌毛基因表达与调控、分子装配以及生物学功能的研究中取得了突破性进展^[2,6,8]。研究显示, 菌毛是由菌毛主要结构蛋白和次要结构蛋白通过 sortase 转肽酶的作用共价聚合而成的, 是革兰氏阳性菌与宿主细胞相互作用的重要功能结构, 其中次要结构蛋白可能与宿主细胞的亲嗜性相关, 在细菌黏附、定殖

表 1 间接 ELISA 法检测血清抗体滴度 Table 1 Serum antibody titer detect by indirect ELISA									
抗体稀释倍数 Dilution ratio	800	1600	3200	6400	12800	25600	51200	102400	204800
OD ₄₉₀ /多抗血清 OD ₄₉₀ /Anti-PLP serum	0.512	0.508	0.515	0.475	0.401	0.345	0.278	0.200	0.115
OD ₄₉₀ /阴性对照 OD ₄₉₀ /Negative control	0.037	0.034	0.033	0.033	0.034	0.032	0.030	0.035	0.035
P/N 值 Positive/Negative	13.84	14.94	15.61	14.39	11.79	10.78	9.27	5.71	3.29

<http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>

和侵袭过程中发挥关键作用^[9-11]。值得关注的是, GAS 和 GBS 的菌毛主要结构蛋白还被证实是理想的疫苗候选分子^[12-14]。上述进展对于拓展其他革兰氏阳性致病菌的病原学研究有重要借鉴意义。

关于猪链球菌 2 型菌毛的研究, 早在 1990 年加拿大学者通过电子显微镜在菌体表面发现存在直径大约 2 nm, 长 250 nm 的菌毛样结构^[3]。通过对本实验室保存的 *S. suis* 2 型中国强毒株 05ZYH33 的全基因组注释分析, 我们发现 SrtBCD 和 SrtF 编码基因在基因组中分别与毗邻的数量不等的膜锚定蛋白形成基因簇, 且上述膜锚定蛋白与肺炎链球菌和(或)化脓链球菌的菌毛主要结构蛋白或次要结构蛋白同源; 进一步分析发现, 预测为菌毛结构蛋白的多个膜蛋白序列含有菌毛特征性“E-box”基序, 其中一个预测的主要结构蛋白(SSU2101)还含有菌毛结构蛋白基序(VYPKN)。上述基因簇组成形式与前述多种革兰氏阳性病原菌的菌毛基因结构特征完全一致, 推测可能是与 *S. suis* 2 菌毛合成及装配相关的基因簇, 分别命名为 srtBCD 菌毛岛和 srtF 菌毛岛。有意义的是, 对已完成基因组测序的国内另两株 *S. suis* 2(98HAH12 和 05JYS68)全基因组序列进行菌毛基因的同源检索分析, 发现国内强毒株 98HAH12 同样含有上述两个菌毛岛, 基因的序列同源性均大于 98%; 而国内无毒株 05JYS68 基因组仅含有 srtF 菌毛岛, srtBCD 菌毛岛完全缺失。因此系统开展 srtBCD 菌毛岛基因功能、分子结构和功能研究, 对于全面认识“中国特色”*S. suis* 2 强毒株的病原生物学特性有重要意义。

本研究从 05ZYH33 srtBCD 菌毛岛中选取一个主要结构蛋白编码基因 *SSU2101* 进行克隆表达, 利用 His 亲和层析获得纯度较高的重组蛋白 PLP, 用兔抗 05ZYH33 全菌血清进行 Western blot, 证明其具有良好的免疫原性, 并且动物试验表明重组蛋白 PLP 具有显著的免疫保护作用, 显示重组蛋白 PLP 是一种良好的猪链球菌保护性疫苗候选分子, 为后续进一步研究该菌毛岛其他基因的功能奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Tang JQ, Wang CJ, Feng YJ, *et al.* Streptococcal toxic shock syndrome caused by *Streptococcus suis* serotype 2. *PLoS Med*, 2006, **3**(5): 668–676.
- [2] Telford JL, Barocchi MA, Margarit I, *et al.* Pili in Gram-positive pathogens. *Nat Rev Microbiol*, 2006, **4**(7): 509–519.
- [3] Jacques M, Gottschalk M, Foirey B, *et al.* Ultrastructural study of surface components of *Streptococcus suis*. *J Bacteriol*, 1990, **172**(6): 2833–2838.
- [4] Wang CJ, Li M, Feng Y, *et al.* The involvement of sortase A in high virulence of STSS-causing *Streptococcus suis* serotype 2. *Arch Microbiol*, 2009, **191**(1): 23–33.
- [5] Ton-That H, Marraffini LA, Schneewind O. Sortases and pilin elements involved in pilus assembly of *Corynebacterium diphtheriae*. *Mol Microbiol*, 2004, **53**(1): 251–261.
- [6] Ton-That H, Schneewind O. Assembly of pili on the surface of *Corynebacterium diphtheriae*. *Mol Microbiol*, 2003, **50**(4): 1429–1438.
- [7] Merz AJ, So M. Interactions of pathogenic *neisseriae* with epithelial cell membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2000, **16**: 423–457.
- [8] Scott JR, Zähler D. Pili with strong attachments: gram-positive bacteria do it differently. *Mol Microbiol*, 2006, **62**(2): 320–330.
- [9] Barocchi MA, Ries J, Zouai X, *et al.* A pneumococcal pilus influences virulence and host inflammatory responses. *PNAS*, 2006, **103**(8): 2857–2862.
- [10] Mandlik A, Swierczynski A, Das A, *et al.* Pili in gram-positive bacteria: assembly, involvement in colonization and biofilm development. *Trends Microbiol*, 2008, **16**(1): 33–40.
- [11] Fälker S, Nelson AL, Morfeldt E, *et al.* Sortase-mediated assembly and surface topology of adhesive pneumococcal pili. *Mol Microbiol*, 2008, **70**(3): 595–607.
- [12] Maione D, Margarit I, Rinaudo CD, *et al.* Identification of a universal group B streptococcus vaccine by multiple genome screen. *Science*, 2005, **309**(5731): 148–150.
- [13] Mora M, Bensi G, Capo S, *et al.* Group A *Streptococcus* produce pilus-like structures containing protective antigens and Lancefield T antigens. *PNAS*, 2005, **102**(43): 15641–15646.
- [14] Margarit I, Rinaudo CD, Galeotti CL, *et al.* Preventing bacterial infection with pilus-based vaccines: the group B streptococcus paradigm. *J Infect Dis*, 2009, **199**(1): 108–115.