

# 猪链球菌 2 型 srtBCD 菌毛岛 SSU2099 基因的克隆表达与免疫学特性

陈红娜<sup>1,2</sup> 王长军<sup>1,2</sup> 秦跃红<sup>1,2</sup> 潘秀珍<sup>2</sup> 唐家琪<sup>1,2\*</sup>

(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:** 通过同源性比较及生物信息学分析,发现猪链球菌 2 型 srtBCD 菌毛岛上菌毛辅助亚基编码基因 SSU2099, PCR 扩增目的片段,克隆入表达载体 pET32a 中原核表达,亲和层析法纯化重组蛋白。ELISA 结果显示重组蛋白能够刺激小鼠产生高效价的免疫抗体,动物保护性实验表明该蛋白具有良好的免疫保护作用。提示菌毛亚基编码基因 SSU2099 是重要的疫苗候选分子,进一步研究该蛋白的定位和功能对于系统阐释 srtBCD 菌毛岛在猪链球菌 2 型致病机制中的作用有重要意义。

**关键词:** 猪链球菌 2 型, SSU2099, 原核表达, 免疫保护

## Molecular Cloning and Immunological Characterization of SSU2099 Gene from srtBCD Pilus Island of *Streptococcus suis* 2

CHEN Hong-Na<sup>1,2</sup> WANG Chang-Jun<sup>1,2</sup> QIN Yue-Hong<sup>1,2</sup>  
PAN Xiu-Zhen<sup>2</sup> TANG Jia-Qi<sup>1,2\*</sup>

(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:** An open reading fragment, SSU2099, encoding pilus gene from srtBCD pilus island was identified based on bioinformatics analysis of the genome sequence of 05ZYH33 and alignment with relative protein family. The target DNA fragment was amplified using a pair of primers specific to SSU2099 gene. SSU2099 gene was cloned into prokaryotic expression plasmid pET32a subsequently, and the recombinant protein was expressed and purified. The mice anti-SSU2099 serum was obtained by immunizing mice with recombinant SSU2099 protein, and the titer of the serum was analyzed by ELISA. Animal test showed that vaccinating mice with recombinant SSU2099 confer a significant protection, which indicated that SSU2099 can serve as a novel vaccine candidate. Further studying of the localization and function of SSU2099 may adds novel insights into the role that srtBCD pilus island plays in pathogenicity of *Streptococcus suis* 2.

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30972638, 30730081, 30671848, 30600533); 江苏省自然科学基金项目(No. BK2009042, BK2008066, BK2007013)

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

收稿日期: 2009-12-21; 接受日期: 2010-03-22

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

**Keywords:** *Streptococcus suis* 2, SSU2099, Prokaryotic expression, Immunoprotection

猪链球菌 2 型(*Streptococcus suis* serotype 2, *S. suis* 2)是一种重要的人兽共患病病原菌,它不但可引起猪脑膜炎、关节炎、肺炎、败血病以及急性死亡等多种临床疾病,给全世界的养猪业造成巨大的经济损失,同时也可感染人致败血病、脑膜炎、关节炎等病,特别是近年来我国还发生了 *S. suis* 2 引发的中毒性休克综合症(*Streptococcal toxic shock syndrome*, STSS),病死率极高<sup>[1-2]</sup>。对其他链球菌的研究证实,菌毛作为细菌重要的附属结构,在细菌的粘附和侵袭方面起着关键作用,致病链球菌中的菌毛样结构是重要的毒力因子<sup>[3-4]</sup>。加拿大学者通过电镜观察负染后的猪链球菌,在菌体表面发现存在菌毛样结构,其直径范围为 3 nm–14 nm,长度可达 20  $\mu\text{m}$ <sup>[5]</sup>。鉴于菌毛样结构在 *S. suis* 2 致病机制中的作用尚不清楚,本研究通过同源比对分析,首次发现在 *S. suis* 2 05ZYH33 株基因组中存在 2 组可能编码菌毛样结构的操纵子,分别为 *srtBCD* 和 *srtF* 菌毛岛,其结构特征和肺炎链球菌及无乳链球菌中的菌毛岛结构相似<sup>[3,6-7]</sup>。其中,菌毛辅助亚基编码基因 *SSU2099* 位于 *srtBCD* 菌毛岛上,本文对 *SSU2099* 进行克隆、表达,并研究其免疫学特性,以期探讨菌毛样结构在 *S. suis* 2 强毒株中的致病作用和作为疫苗候选分子的可能。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

*S. suis* 2 05ZYH33 菌株分离自 2005 年四川资阳中毒性休克综合症病人,本室保存。宿主菌 *E. coli* DH5 $\alpha$  和 *E. coli* BL21,为本实验室保存;表达质粒 pET32a 为 Novage 公司产品,质粒 pMD18-T 为 TaKaRa 公司产品。6 周龄 SPF 级 BALB/c 小鼠购自北京动物中心。

PCR 扩增试剂盒, DNA 割胶回收试剂盒,限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Hind* III, T4 连接酶均为 TaKaRa 公司产品。DNA Marker 和蛋白 Marker 为 Fermentas 公司产品, Todd Hewitt Broth 培养基购于 Difco 公司,引物由上海赛百盛基因技术有限公司合成。弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂为 Sigma 产品,辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗鼠 IgG、底物 OPD,购自南京大治生物技术有限公司。Anti-His

单克隆抗体购自北京天根生物技术公司, 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 SSU2099 的同源性比对分析及进化树的绘制:** 利用 NCBI 的 BLAST 程序,对 *SSU2099* 基因进行在线检索分析,获得相似性显著的同源序列,同时利用 ClustalX 软件对这些同源序列进行比对,并通过 MEGA 4.0 软件绘制 *SSU2099* 的进化树。

**1.2.2 目的基因的扩增和重组表达载体的构建:** 根据基因序列设计引物,上游引物为 5'-GGATCCC AAGCACAAGATTCTTTT-3' (下划线部分为 *Bam*H I 酶切位点);下游引物为 5'-AAGCTTTTACACATT TCCTGTATA-3' (下划线部分为 *Hind* III 酶切位点)。PCR 扩增程序: 95°C 5 min; 94°C 50 s, 52°C 1 min, 72°C 1 min, 30 个循环; 72°C 10 min。PCR 产物经电泳鉴定后与 pMD18-T 连接,转化至感受态 DH5 $\alpha$ ,用试剂盒提取质粒,酶切,电泳鉴定。将重组质粒和表达载体 pET32a 分别酶切,电泳后用胶回收试剂盒回收。回收产物用 T4 DNA 连接酶连接后转化至感受态 DH5 $\alpha$ ,菌液经 PCR 验证为阳性者用试剂盒提取质粒,酶切,电泳鉴定,将阳性者进一步测序。

**1.2.3 重组蛋白的表达和纯化:** 重组表达载体转化感受态 *E. coli* BL21,验证后 IPTG 诱导表达 4 h,收集菌体超声破碎,离心后的上清过滤,用 Ni<sup>2+</sup>离子亲和层析柱纯化融合蛋白,12% SDS-PAGE 电泳鉴定目的蛋白的分子量。

**1.2.4 Western blotting:** 将纯化的 *SSU2099* 重组蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,采用电转印法将蛋白转移至硝酸纤维素膜上,5%脱脂奶粉封闭 1 h;加小鼠 His 单抗血清(1:100),4°C 过夜;用 HRP 标记的羊抗鼠 IgG (1:1000)孵育 1 h;加底物邻苯二胺(DAB)显色。

**1.2.5 多抗血清的制备及滴度检测:** *SSU2099* 重组蛋白和弗氏完全佐剂按体积比 1:1 乳化,小鼠皮下多点注射,注射量为 100  $\mu\text{g}$ /只;1 周后用重组蛋白和等体积弗氏不完全佐剂进行 2 次免疫;1 周后用同样方法进行第 3 次免疫;第 4 周用重组蛋白进行追加免疫,7 d 后眼球眶动脉采血,分离血清。将纯化的 *SSU2099* 蛋白用包被缓冲液稀释成 1 mg/L,每孔 100  $\mu\text{L}$  包被 ELISA 板,4°C 过夜;用 1% BSA 封闭 1 h;

将梯度稀释的小鼠多抗血清加入孔中, 100  $\mu$ L/孔, 孵育 1 h; 加入羊抗鼠 IgG (1:5000), 100  $\mu$ L/孔, 孵育 1 h; OPD 显色 5 min, 浓硫酸终止显色, 酶标仪 490 nm 处读取 OD 值。

**1.2.6 动物保护性实验:** SPF 级 6 周龄 BALB/c 小鼠 20 只, 随机分为 2 组, 实验组注射乳化重组蛋白 SSU2099, 对照组用 PBS 缓冲液代替重组蛋白乳化, 按上述方法免疫, 接种 28 d 后对小鼠用野毒株 05ZYH33 进行攻击, 约  $1 \times 10^8$  CFU/只 ( $LD_{50} \approx 4 \times 10^7$  CFU), 并观察小鼠的发病和死亡情况。

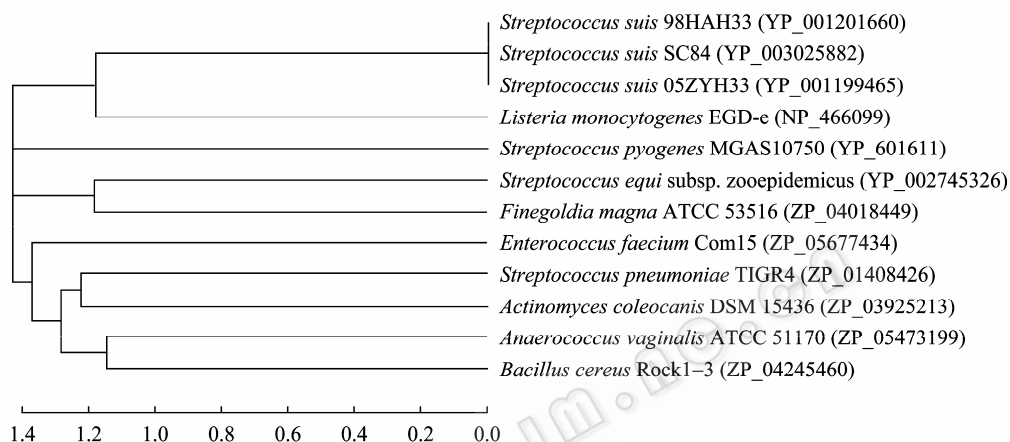


图 1 *S. suis* 2 05ZYH33 SSU2099 的进化树

Fig. 1 Phylogenetic trees of 12 representative isolates based on comparison of amino acid sequences

Note: Numbers in parentheses are GenBank accession numbers. Bar: Phylogenetic distance.

## 2.2 重组表达质粒的鉴定

提取大肠杆菌 DH5 $\alpha$  中重组表达质粒, 进行 *Bam*H I 单酶切和 *Bam*H I/*Hind* III 双酶切鉴定, 电泳结果显示(图 2)目的基因大小约 700 bp, 与预期一致。

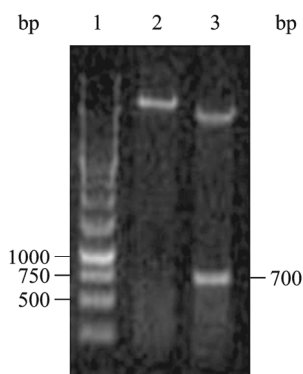


图 2 重组质粒的酶切鉴定

Fig. 2 Identification of the recombinant plasmid by restriction enzymes

Note: 1: 1 kb DNA marker; 2: The plasmid digested by *Bam*H I; 3: The plasmid digested by *Bam*H I and *Hind* III.

## 2 结果

### 2.1 SSU2099 的生物信息学分析

通过比对发现(图 1), *S. suis* 2 05ZYH33 中 SSU2099 基因编码蛋白的氨基酸序列与 GenBank 上多种菌相关蛋白具有序列同源性, 其与 *Streptococcus pneumoniae* 同源 53%, 与 *Streptococcus pyogenes* 同源 52%, 与 *Streptococcus equi* 同源 52%, 与 *Enterococcus faecium* 同源 50%, 与 *Listeria monocytogenes* 同源 46%。

### 2.3 重组蛋白的表达和纯化

用重组质粒转化感受态大肠杆菌, IPTG 诱导表达 4 h 后, 电泳可见约 50 kD 处有一新生蛋白条带(图 3), 表明 SSU2099 在原核系统内得到表达。Ni<sup>2+</sup> 离子亲和层析柱纯化重组表达产物, 电泳显示纯化产物为单一条带(图 3)。

### 2.4 Western blotting

Western blotting 结果显示(图 4), SSU2099 蛋白可以和 His 单抗发生免疫反应, 在 50 kD 处有特异反应条带, 进一步验证了重组蛋白的表达。

### 2.5 小鼠抗血清的效价测定

ELISA 检测小鼠抗血清效价, 高达 1:1024000, 表明 SSU2099 能够刺激小鼠产生高水平的抗体。

### 2.6 动物保护性实验

如图 5 所示, 小鼠用 05ZYH33 野毒株菌液攻击后, PBS 对照组有 9 只死亡, 而 SSU2099 重组蛋白免疫的实验组仅有 2 只死亡, 两组具有显著差异 ( $P < 0.001$ ), 提示 SSU2099 重组蛋白对小鼠具有明显的保护作用。

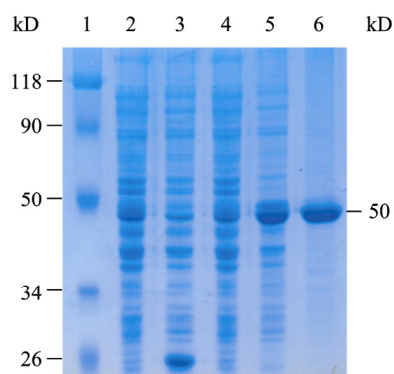


图3 SDS-PAGE 检测蛋白表达

Fig. 3 Expression analysis of interested protein via SDS-PAGE

Note: 1: Protein marker; 2: pET32a/BL21 uninduced with IPTG; 3: pET32a/BL21 induced with IPTG; 4: pET32a::SSU2099/BL21 uninduced with IPTG; 5: pET32a::SSU2099/BL21 induced with IPTG; 6: Purified recombinant.

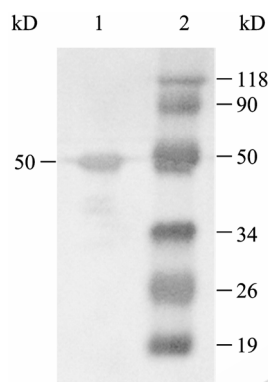


图4 SSU2099 表达验证

Fig. 4 Western blotting of the recombinant

Note: 1: Recombinant SSU2099; 2: Protein marker.

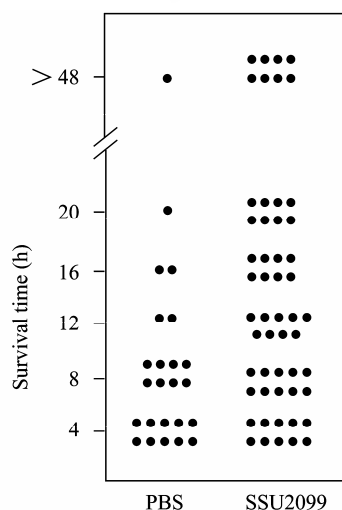


图5 SSU2099 保护性点图

Fig. 5 SSU2099 protection experiment

Note: 1: Immunifaction with PBS; 2: Immunifaction with SSU2099.

### 3 讨论

猪链球菌病的发生及流行,甚至引发公共卫生事件,值得业界高度关注和认真制定预防策略<sup>[1-2]</sup>。传统控制猪链球菌感染的方法是注射预防和治疗性抗生素,该法已引起许多副作用,包括近几年不断有耐药菌株出现<sup>[1,8]</sup>。鉴于此,从猪链球菌中鉴定毒力相关表面蛋白作为分子疫苗候选者的研究非常有现实意义。最近,革兰氏阳性菌中菌毛的致病机理及菌毛蛋白具有的保护性成为研究的热点<sup>[3]</sup>。科学家在对B组链球菌(Group B Streptococcus, GBS)以蛋白为基础的通用疫苗研究中,共筛选出4种抗原具有显著保护性,其中3种抗原为菌毛结构蛋白<sup>[9]</sup>。并且已证实多种链球菌中的菌毛亚基蛋白可作为疫苗候选者<sup>[10-12]</sup>。

本研究通过对已完成测序的 *S. suis* 2 中国强毒株 05ZYH33 基因组注释分析,发现 *S. suis* 2 中菌毛相关基因分别位于 *srtBCD* 岛和 *srtF* 岛上。其中, *srtBCD* 岛由菌毛主要结构蛋白 SSU2101 和菌毛辅助亚基 SSU2099、SSU2100 以及 sortase 酶家族的 *srtBCD* 构成,与肺炎链球菌 TIGR4 菌株 *rlrA* 菌毛岛相似<sup>[13]</sup>; *srtF* 岛含有菌毛主要结构蛋白 SSU0474 和辅助亚基 SSU0473,与 GBS 中无乳链球菌菌毛岛 2b 高度同源。然而,国外学者在对 *S. suis* 2 P1/7 研究过程中,认为 *S. suis* 2 中 *srtBCD* 岛上的主要结构蛋白(命名为 *sbp2*)发生无义突变<sup>[14]</sup>,因此 *srtBCD* 岛不参与菌毛的形成过程。基于上述分析,我们试图探讨具有中国特色的能引起 STSS 的强致病株和其他国家分离到的致病株所共有的 *srtBCD* 菌毛岛是否存在差异。已有的研究表明,在细菌和宿主粘附过程中,菌毛辅助亚基首先和宿主上皮细胞的受体结合,进而运输毒力因子,引发粘膜炎症,破坏粘膜屏障,最终导致细菌侵袭组织<sup>[9]</sup>。

通过对 05ZYH33 中 *srtBCD* 菌毛岛菌毛辅助亚基编码基因 SSU2099 和 SSU2100 生物信息学分析,结果显示 SSU2099 与多种菌具有高度序列同源性,而 SSU2100 的同源性相对较低,并且 SSU2099 含有菌毛蛋白特有的 E-box 基序,该基序在菌毛蛋白锚定过程中起着重要作用。因此,我们首先克隆表达了菌毛辅助亚基编码基因 SSU2099,结果表明 SSU2099 蛋白可以刺激小鼠产生高效价的抗体,由于 ELISA 检测猪链球菌中菌毛辅助亚基蛋白免疫小

鼠多抗血清的效价值国内外尚未报道, 本研究尚属首例, 无法对其进行比较, 但科学家通过 ELISA 检测 A 组链球菌中 HtpA 蛋白免疫 BALB/c 小鼠时, 抗体效价为  $2^{20}$  [15], 酿脓链球菌中纤维结合蛋白 FBP54 抗体效价高达  $1 \times 10^6$  [16]。动物保护性实验提示, 菌毛亚基蛋白 SSU2099 是较好的保护性抗原分子, 可以作为猪链球菌的疫苗候选靶标。这与肺炎链球菌中菌毛蛋白 rrgB 是一种新奇的保护性抗原论点完全一致 [17]。SSU2099 重组蛋白及高滴度抗血清的制备对于深入研究 srtBCD 菌毛簇基因和基因之间的相互作用和调节, 以及菌毛在细菌分子致病机理中的作用有积极意义。

## 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] Chen C, Tang J, Dong W, *et al.* A glimpse of *Streptococcal toxic shock syndrome* from comparative genomics of *S. suis* 2 chinese isolates. *PLoS ONE*, 2007, **2**(3): e315.
- [3] Telford JL, Barocchi MA, Margarit I, *et al.* Pili in gram-positive pathogens. *Rev Microbiol*, 2006, **4**(7): 509–519.
- [4] Nelson AL, Ries J, Bagnoli F, *et al.* RrgA is a pilus-associated adhesin in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol*, 2007, **66**(2): 329–340.
- [5] Jacques M, Gottschalk M, Foiry B, *et al.* Ultrastructural study of surface components of *Streptococcus suis*. *J Bacteriol*, 1990, **172**(6): 2833–2838.
- [6] 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.
- [7] Roberto R, Cira DR, Marco S, *et al.* Identification of novel genomic islands coding for antigenic pilus-like structures in *Streptococcus agalactiae*. *Molecular Microbiology*, 2006, **61**(1): 126–141.
- [8] Huang YT, Teng LJ, Ho SW, *et al.* *Streptococcus suis* infection. *J Microbiol Immunol Infect*, 2005, **38**(5): 306–313.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] Pezzicoli A, Santi I, Lauer P, *et al.* Pilus backbone contributes to group B *Streptococcus* paracellular translocation through epithelial cells. *J Infect Dis*, 2008, **198**(6): 890–898.
- [12] 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.
- [13] Vanier G, Fittipaldi N, Slater JD, *et al.* New putative virulence factors of *Streptococcus suis* involved in invasion of porcine brain microvascular endothelial cells. *Microb Pathog*, 2009, **46**(1): 13–20.
- [14] Fittipaldi N, Takamatsu D, Domínguez-Punaro MdC, *et al.* Mutations in the gene encoding the ancillary pilin subunit of the *Streptococcus suis* srtF cluster result in pili formed by the major subunit only. *PLoS ONE*, 2010, **5**(1): e8426.
- [15] Kunitomo E, Terao Y, Okamoto S, *et al.* Molecular and biological characterization of histidine triad protein in group A *Streptococci*. *Microbes Infect*, 2008, **10**(4): 414–423.
- [16] Kawabata S, Kunitomo E, Terao Y, *et al.* Systemic and mucosal immunizations with fibronectin-binding protein FBP54 induce protective immune responses against *Streptococcus pyogenes* challenge in mice. *Infect Immun*, 2001, **69**(2): 924–930.
- [17] Gianfaldoni C, Censini S, Hillerlingmann M, *et al.* *Streptococcus pneumoniae* pilus subunits protect mice against lethal challenge. *Infect Immun*, 2007, **75**(2): 1059–1062.