



研究报告

猪链球菌 2 型溶血素基因的表达及其免疫原性

吴华健 毛天骄 杨龙斌 王玮 魏建忠 孙裴 李郁*

安徽农业大学动物科技学院 安徽 合肥 230036

摘要:【背景】猪链球菌(*Streptococcus suis*, SS)是一种重要的人兽共患病原菌,有 35 种血清型,其中以猪链球菌 2 型(SS2)危害最为严重。研究发现,各种血清型 SS 分泌的溶血素(Suilysin, SLY)可能具有较好的免疫保护作用,因此,SLY 作为 SS 基因工程亚单位疫苗的成分具有较大优势。【目的】获得 SS2 安徽强毒株(AH10-8 株)溶血素基因(*sly*)的表达产物,并对其免疫原性进行测定分析。【方法】根据 GenBank 数据库中登录号为 DQ443533.1 的全长 *sly* 序列,设计合成一对分别带有 *Bam*H I、*Xho* I 酶切位点的特异性引物,利用 PCR 从 AH10-8 株中扩增 *sly* 基因,构建 pET-30a-*sly* 原核表达重组质粒,将重组质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3)中,进行 IPTG 诱导表达和 His-Tag 镍柱纯化蛋白,SDS-PAGE 检测 SLY,Western blotting 鉴定 SLY 的反应原性;利用昆明鼠和斑马鱼进行 SLY 免疫攻毒保护试验,间接 ELISA 方法检测昆明鼠血清 IgG 抗体效价,观察比较病理组织变化及其免疫保护率。【结果】重组质粒 pET-30a-*sly* 在大肠杆菌中实现高效表达,获得大小为 60 kD 的目的蛋白,与预期大小的 SLY 分子质量一致,能与 SS2 阳性血清发生特异性反应。SLY 和 AH10-8 株灭活全菌体 3 次免疫昆明鼠后的血清 IgG 抗体效价分别为 1:6 400、1:204 800 (以 AH10-8 株全菌体的超声裂解物为包被抗原)和 1:102 400、1:51 200 (以 SLY 为包被抗原);SLY 和 AH10-8 株灭活全菌体对昆明鼠和斑马鱼的免疫保护率分别为 40%、80%和 84%、92%;病理组织变化与攻毒对照组之间差异明显。【结论】成功表达的 SLY 具有良好的反应原性和免疫原性,可诱导机体产生保护性免疫反应,有望成为研制 SS2 新型疫苗的候选成分。

关键词: 猪链球菌 2 型, 溶血素基因, 原核表达, 免疫原性

Foundation items: Key Project of National Spark Program (2014GA710002); Science and Technology Project of the Yangtze River Delta in Anhui (1101c0603065); Anhui Pig Industry System Fund (Anhui Agricultural Science [2016]84)

***Corresponding author:** E-mail: liyouer@163.com

Received: 09-03-2018; **Accepted:** 16-07-2018; **Published online:** 27-07-2018

基金项目: 国家星火计划重点项目(2014GA710002); 安徽省长三角联合科技攻关项目(1101c0603065); 安徽省生猪产业体系基金(皖农科[2016]84 号)

***通信作者:** E-mail: liyouer@163.com

收稿日期: 2018-03-09; **接受日期:** 2018-07-16; **网络首发日期:** 2018-07-27

Expression and immunogenicity of the *sly* gene of *Streptococcus suis* type 2

WU Hua-Jian MAO Tian-Jiao YANG Long-Bin WANG Wei WEI Jian-Zhong
SUN Pei LI Yu*

College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036, China

Abstract: [Background] *Streptococcus suis* (SS) is an important zoonotic pathogen with 35 serotypes, of which the most serious is *Streptococcus suis* type 2 (SS2). Suilysin (SLY) secreted by various serotypes of SS may have a better immune protection. Therefore, SLY has a great advantage as a component of SS genetic engineering subunit vaccine. [Objective] To express the suilysin gene (*sly*) from a highly virulent strain (AH10-8) of SS2 in Anhui Province and to determine the immune protection of the SLY protein. [Methods] The full-length of *sly* was amplified by using a pair of specific primers with *Bam*H I and *Xho* I sites. Subsequently, the PCR-amplified *sly* gene was cloned into the pET-30a vector. The plasmid was transformed into *E. coli* BL21 and expressed under the IPTG induced promoter. SLY was visualized by SDS-PAGE, and the protein antigenicity was confirmed by Western blotting. Zebrafish and Kunming mice were used to carry out SLY immune attack protection test, and the IgG antibody titer of serum in Kunming mice was detected by indirect ELISA, and the pathological changes and the protective rate were observed. [Results] The *sly* gene that cloned into pET-30a vector was highly expressed in *E. coli* BL21. The molecular weight of the SLY protein was about 60 kD and it is in accordance with the expected molecular weight of *sly* and SLY protein could react with serum from the SS2 infected patients. The serum antibody titers induced by the SLY protein and AH10-8 inactivated whole cells immune to IgG after three times were 1:6 400, 1:204 800 (ultrasound lysate of AH10-8 strain whole cell used as antigen) and 1:102 400, 1:51 200 (the SLY protein used as antigen). The relative protection rates of *sly* and AH10-8 inactivated total bacteria to Kunming mice and zebrafish were 40%, 80%, 84% and 92%, respectively. There was obvious difference between pathological changes in control group and experimental group. [Conclusion] The expressed SLY protein has a good reactivity and immunogenicity, which can induce a protective immune response. SLY protein can be a good candidate for the development of the SS2 vaccine.

Keywords: *Streptococcus suis* type 2, Suilysin gene, Prokaryotic expression, Immunogenicity

猪链球菌(*Streptococcus suis*, SS)是一种重要的人兽共患病原菌, 依据表面荚膜多糖(Capsular polysaccharide, CPS)的抗原性可将其分为 35 个血清型(1-34 型和 1/2 型), 其中猪链球菌 2 型(SS2)分布最广、致病力最强, 可导致人的感染甚至死亡^[1]。1998 年和 2005 年分别在我国江苏、四川暴发了大规模的 SS2 感染人和猪的疫情, 造成养猪业经济损失惨重并严重威胁着公共卫生安全, 引起人们的高度关注^[2]。

目前药物治疗容易引起抗生素的滥用, 从而导致耐药菌株的产生, 免疫接种仍然是预防猪链球菌病的有效方法。然而 SS 血清型众多, 各血清

型之间交叉保护性差, 常规疫苗免疫不能刺激动物机体产生足够的保护力^[3]。细菌毒力的强弱通常与抗原性的高低呈正相关, 细菌的毒力因子一般被认为是潜在的保护性抗原^[4-5]。当前研究较多的 SS 毒力因子主要有荚膜多糖、溶菌酶释放蛋白(Muramidase-released protein, MRP)、胞外因子(Extracellular protein factor, EF)和溶血素(Suilysin, SLY)。其中 SLY 属于依赖胆固醇的细胞溶素家族(CDCs)成员, 是一种成孔毒素, 由 *sly* 基因编码, 分子量约 54 kD, 除能溶解多种动物的红细胞外, 还对多种细胞有毒性作用^[6]。大量研究表明, SLY 是影响 SS 致病性的重要因素之一, Seitz

等通过构建 SS2 的 *sly*⁻株与 *sly*⁺株对猪上皮细胞黏附、入侵的比对试验发现, SLY 能够介导 SS2 侵袭宿主细胞, 导致细胞溶解^[7]。Allen 等研究发现, 当 *sly* 基因缺失后, SS2 的溶血活性丧失, 对昆明鼠及猪的致病力均减弱^[8]。焦安心的研究结果显示, *ef*⁺/*mrp*⁺/*sly*⁺为 SS2 优势毒力基因型, SLY 几乎存在于所有的高毒力菌株中。SLY 还是一种良好的免疫保护性抗原^[9]。Jacobs 等从 SS2 的培养物中提取菌体自身分泌的 SLY 免疫昆明鼠, 采用致死剂量 SS2 攻击, 结果显示 SLY 对昆明鼠的免疫保护率可达 100%^[10]。吉利伟等在分析 SS2 菌株 ZY05719 全基因组序列的基础上, 原核表达了长度约为 1 200 bp 的 *sly* 基因片段, 并对其进行了免疫效力评价, 证实 SLY 具有较好的免疫保护力^[11]。

本研究拟对 SS2 安徽分离强毒株(AH10-8 株) *sly* 全基因片段克隆表达, 利用表达的重组 SLY 与 AH10-8 株灭活全菌体, 对昆明鼠和斑马鱼进行两种动物模型的免疫攻毒保护性试验, 同时采用间接 ELISA 方法检测昆明鼠血清中特异性抗体(IgG), 鉴定分析 SLY 的免疫原性, 从而为深入探究 SLY 在发展 SS2 基因亚单位疫苗方面的重要价值提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 菌株、血清及载体

SS2 安徽分离强毒株(AH10-8)源自 2010 年安徽地区临床急性败血性病猪, 对斑马鱼的 LD₅₀ 为 0.62×10² CFU, 根据 SS2 标准菌株 ATCC43765 对斑马鱼的 LD₅₀ 为 3.14×10⁴ CFU^[12], 确定 AH10-8 株为强毒株, 由安徽农业大学动物传染病研究室分离鉴定和保存。SS2 阳性鼠血清、猪丹毒丝菌(*Erysipelothrix rhusiopathiae*)(血清型 1a 型)阳性鼠血清、副猪嗜血杆菌(*Haemophilus parasuis*, HPS)(血清型 13 型)阳性鼠血清均为本实验室制备和保存。克隆载体 pMD19-T、原核表达载体 pET-30a(+)、大肠杆菌感受态细胞 Trans1-T1 和 BL21(DE3)均由本实验室保存。

1.2 主要试剂及仪器

胰酪胨大豆酵母浸膏肉汤(TSB-YE)、胰酪胨大豆酵母浸膏琼脂(TSA-YE), 绍兴天恒生物科技有限公司; 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、质粒抽提试剂盒, 北京天根生化有限公司; 限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I、T4 DNA 连接酶、*Taq* DNA 聚合酶、异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)、DNA Marker DL2000、DNA Marker DL5000, 宝生物(大连)工程有限公司; 完全/不完全弗氏佐剂、过硫酸铵(APS)、十二烷基硫酸钠(SDS)、辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠 IgG 抗体, Sigma 公司; His-Tag 镍柱填料, 北京瑞达恒辉科技发展有限公司。

恒温培养振荡器, 上海智城分析仪器有限公司; 凝胶成像系统, 上海圣科仪器设备有限公司; 高速冷冻离心机, Beckman 公司; 全波长多功能酶标仪, 伯腾仪器有限公司; PCR 仪, 耶拿分析仪器股份公司。

1.3 试验动物

试验用 4~6 周龄 SPF 级雌性昆明鼠购自安徽医科大学实验动物中心。试验用 80 日龄、体长约 3.5 cm 的 AB 系斑马鱼购自合肥裕丰花鸟市场御龙水族馆。

1.4 基因组 DNA 的提取

将 AH10-8 株接种于 TSB 肉汤(含有 5%小牛血清)中培养 14 h, 取 1 mL 菌液于 1.5 mL 离心管中, 12 000 r/min 离心 2 min, 用双蒸水重悬菌体沉淀, 煮沸 10 min, 冰浴 5 min, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液为 DNA 模板, -20 °C 保存备用。

1.5 *sly* 基因的 PCR 扩增

根据 GenBank 登录号为 DQ443533.1 的 *sly* 全基因序列设计一对特异性扩增引物, 上、下游引物中分别引入 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点, 引物由金斯瑞生物有限公司合成, 预期扩增片段为 1 494 bp。上游引物 *sly*-1: 5'-CGCGGATCCATGAGAAAAAGTTCGCACTTG-3', 下游引物 *sly*-2: 5'-CCGCCTG

AGTTACTCTATCACCTCATCCGCATAC-3', 酶切位点均为下划线标识。PCR 反应体系(25 μ L): PCR 高保真 Mix (2 \times) 12.5 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 0.5 μ L, 灭菌双蒸水 6.5 μ L, DNA 模板(1 μ g/L) 5 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 40 s, 58 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 扩增产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像系统观察。

1.6 重组表达载体的构建与鉴定

采用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒对 1.5 中 PCR 产物进行回收, 并与 pMD19-T 连接后转化入 Trans1-T1 感受态细胞, 涂布于含氨苄青霉素抗性的 LB 平板上, 37 $^{\circ}$ C 培养 12 h, 挑取单菌落加入 5 mL LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C、150 r/min 振荡培养 12 h 后, 12 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 质粒抽提试剂盒提取质粒, 进行 *sly* 目的基因片段的 PCR 鉴定。目的片段验证后进行重组质粒提取, 进一步对重组质粒进行 *Bam*HI、*Xho*I 酶切(单酶切、双酶切)和测序验证。将双酶切后的目的片段和 pET-30a(+) 进行连接, 连接产物转化入 BL21(DE3) 感受态细胞。提取 pET-30a-*sly* 重组质粒, 进行 PCR 和双酶切鉴定。将鉴定为阳性的重组质粒送至南京金斯瑞生物科技有限公司测序, 使用 DNASTar 进行序列分析。

1.7 重组 SLY 的表达与纯化

将阳性克隆菌接种于含卡那霉素(50 μ g/mL)的 LB 液体培养基中, 于 37 $^{\circ}$ C、150 r/min 振荡培养 3.5 h (OD_{600} =0.6–0.8)后分别加入 IPTG 至终浓度 0.25、0.50、0.75、1.00 mmol/L 进行诱导, 在 5、7、9 h 后各取 50 mL 菌液, 12 000 r/min 离心 5 min 收集菌体进行超声破碎, 超声方式: 超声 3 s 停 4 s, 振幅 30%, 超声 20 min, 至菌液透明, 全程冰浴。再离心收集上清裂解液和沉淀, 分别进行 SDS-PAGE 电泳, 分析重组蛋白的分泌方式。同时设立阴性对照, 阴性对照为 pET-30a(+) 转化到 BL21(DE3) 感受态细胞后的表达产物。对超声破碎

后的离心沉淀分别用包涵体洗涤缓冲液(pH 8.0)洗涤 2–3 次, 离心弃上清液保留沉淀, 再用 Buffer B (pH 8.0)溶解包涵体沉淀, 离心保留上清液。采用 His-Tag 镍柱纯化样品, 收集纯化后的蛋白液并放入透析袋中, 将透析袋置尿素浓度依次为 8、4、2、1 mol/L 复性缓冲液中进行透析复性, 每种透析液透析时间为 6 h, 最后对复性蛋白进行 SDS-PAGE 分析。

1.8 重组 SLY 的溶血活性检测

将浓度为 0.1 mg/mL 的纯化蛋白质加入终浓度为 5 mmol/L 的二硫苏糖醇(DTT), 室温(25 $^{\circ}$ C)作用 30 min 恢复溶血活性。用 PBS (pH 7.0)按 1:2–1:2¹² 进行倍比稀释, 各加 50 μ L 至 96 孔板, 分别加入等量的 1%、2% 兔血红细胞, 37 $^{\circ}$ C 作用 2 h 后观察溶血情况, 同时设 PBS 作阴性对照。

1.9 重组 SLY 的细胞毒性检测

将浓度为 0.5 mg/mL 的 SLY 纯化蛋白质经过滤除菌后, 加入终浓度为 5 mmol/L 的二硫苏糖醇(DTT), 室温(25 $^{\circ}$ C)作用 30 min 恢复溶血活性。用无血清的 DMEM 按 1:2–1:2⁷ 进行倍比稀释后, 加入已长满单层的 Vero 细胞上, 于 5% CO₂ 环境下 37 $^{\circ}$ C 培养 24 h, 同时设无血清的 DMEM 作阴性对照, 观察其细胞病变。

1.10 重组 SLY 的 Western blotting 分析

纯化的重组 SLY 经 SDS-PAGE 后, 转移至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h。加 SS2 阳性血清(1:25 稀释)于 25 $^{\circ}$ C、80 r/min 孵育 1.5 h, PBS 洗涤 PVDF 膜 3 遍。再加 HRP 标记的羊抗鼠 IgG (1:2 000 稀释)于 25 $^{\circ}$ C、80 r/min 孵育 1 h, PBS 洗涤 PVDF 膜 3 遍。DAB 底物室温避光显色 10 min, 暗室中曝光。采用上述相同的方法将重组 SLY 与 *E. rhusiopathiae* 重组 SpaA 蛋白, 重组 SLY 与 HPS 重组 TbpA 蛋白分别转印至 2 张 PVDF 膜, 脱脂奶粉封闭, 分别加 *E. rhusiopathiae* 阳性血清(1:25 稀释)、HPS 阳性血清(1:25 稀释)作为一抗, 再加 HRP 标记的羊抗鼠 IgG (1:2 000 稀释), 显色

曝光。

1.11 重组 SLY 的免疫攻毒保护性试验

1.11.1 安全性试验

选取 4–6 周龄 SPF 级雌性昆明鼠 10 只和 80 日龄、体长约 3.5 cm 的 AB 系斑马鱼 20 尾，昆明鼠注射 0.4 mL/只重组 SLY (含纯化蛋白 100 μg)，斑马鱼注射 20 μL/尾重组 SLY (含纯化蛋白 4 μg)，2 周后观察昆明鼠、斑马鱼的健康状况。

1.11.2 动物免疫试验

(1) 昆明鼠免疫试验。选取 4–6 周龄 SPF 级雌性昆明鼠 20 只，随机分成 4 组，每组 5 只。试验组 A、B、C、D 分别为重组 SLY 免疫组、AH10-8 株灭活全菌体免疫组(AH10-8 株接种 TSB 培养基，37 °C、150 r/min 振荡培养 14 h，0.3%甲醛灭活 12 h，灭菌 PBS 清洗 4 次)、攻毒对照组、阴性对照组。A 组免疫剂量为 0.25 mL/只(含纯化蛋白 50 μg)，B 组免疫剂量为 0.25 mL/只(10^9 CFU/0.25 mL)，C、D 组注射剂量为 0.25 mL/只(弗氏佐剂+灭菌 PBS)。初次免疫使用弗氏完全佐剂，免疫 7 d、14 d 后分别进行第 2、3 次加强免疫，使用弗氏不完全佐剂，免疫途径均为腹部皮下多点注射(表 1)。

(2) 斑马鱼免疫试验。选取 80 日龄、体长约 3.5 cm 的 AB 系斑马鱼 100 尾，随机分成 4 组，每组 25 尾。试验组 a、b、c、d 分别为重组 SLY 免疫组、AH10-8 株灭活全菌体免疫组(AH10-8 株接种 TSB 培养基，37 °C 振荡培养 14 h，0.3%甲醛灭活

12 h，灭菌 PBS 清洗 4 次)、攻毒对照组、阴性对照组。a 组免疫剂量为 10 μL/尾(含纯化蛋白 2 μg)，b 组免疫剂量为 10 μL/尾(10^9 CFU/10 μL)，c、d 组注射剂量为 10 μL/尾(弗氏佐剂+灭菌 PBS)。初次免疫使用弗氏完全佐剂，免疫 7、14 d 后分别进行第 2、3 次加强免疫，使用弗氏不完全佐剂，免疫途径均为腹腔注射(表 2)。

1.11.3 昆明鼠血清 IgG 检测

在一次免疫、二次免疫及三次免疫 7 d 后对所有组昆明鼠进行眼球静脉丛采血，分离血清。分别用纯化的重组 SLY (包被液稀释至 10 μg/mL)和 AH10-8 株全菌体的超声裂解物(包被液稀释至 10 μg/mL)作为包被原，每孔 100 μL 包被酶标板，4 °C 过夜。PBST 洗涤 3 次之后，每孔加入 200 μL 封闭液(5%脱脂奶粉)，37 °C 条件下封闭 2 h。再用 PBST 洗涤 3 次之后，每孔加入 100 μL 倍比稀释的待检血清或阴性血清，血清稀释度从 1:25 稀释至 1:52 428 800 (2 倍递进方式)，设置 2 个重复孔，并设置阴性对照，37 °C 条件下反应 1.5 h。PBST 洗涤 3 次后，加入 HRP 标记的羊抗鼠 IgG (1:3 000 稀释)，37 °C 条件下反应 1 h。PBST 洗涤 4 次后，每孔加入 100 μL TMB 显色液，室温下避光反应 10 min 后，每孔加入 H₂SO₄ 终止液，用酶标仪进行检测，读取 490 nm 的吸光值(*OD*₄₉₀)。根据待测血清 *OD*₄₉₀ 值(*P*)/阴性血清 *OD*₄₉₀ 值(*N*)判定结果，*P/N*≥2.1 为阳性，否则为阴性。

表 1 昆明鼠免疫试验

Table 1 Immunological test of Kunming mice

组别 Groups	免疫成分 Immune components	免疫剂量 Immune dose (mL)	免疫数量 Immune number	免疫途径 Immunological pathway
A	重组 SLY Recombinant SLY	0.25	5	腹腔注射 Intraperitoneal injection
B	AH10-8 株灭活全菌体 Inactivated total bacteria of AH10-8 strain	0.25	5	腹腔注射 Intraperitoneal injection
C	弗氏佐剂+PBS Freund's adjuvant+PBS	0.25	5	腹腔注射 Intraperitoneal injection
D	弗氏佐剂+PBS Freund's adjuvant+PBS	0.25	5	腹腔注射 Intraperitoneal injection

表 2 斑马鱼免疫试验

Table 2 Protective test of immune attack in zebra fish

组别 Groups	免疫成分 Immune components	免疫剂量 Immune dose (μL)	免疫数量 Immune number	免疫途径 Immunological pathway
A	重组 SLY	10	25	腹腔注射
	Recombinant SLY			Intraperitoneal injection
B	AH10-8 株灭活全菌体	10	25	腹腔注射
	Inactivated total bacteria of AH10-8 strain			Intraperitoneal injection
C	弗氏佐剂+PBS	10	25	腹腔注射
	Freund's adjuvant+PBS			Intraperitoneal injection
D	弗氏佐剂+PBS	10	25	腹腔注射
	Freund's adjuvant+PBS			Intraperitoneal injection

1.11.4 攻毒试验

在第三次免疫 7 d 后, 对 A、B、C、a、b、c 组进行攻毒, 攻毒菌为 AH10-8 株。AH10-8 株接种 TSB 培养基, 37 °C、150 r/min 振荡培养 14 h。A、B、C 组的攻毒剂量均为 5 LD₁₀₀ (AH10-8 株对昆明鼠 LD₁₀₀ 为 1.90×10⁹ CFU), 攻毒途径均为腹腔注射。a、b、c 组的攻毒剂量均为 50 LD₅₀ (AH10-8 株对斑马鱼 LD₅₀ 为 0.62×10² CFU), 攻毒途径均为腹腔注射。D、d 组均腹腔注射等量灭菌 PBS。攻毒后观察昆明鼠(A、B、C 组)、斑马鱼(a、b、c 组)的临床症状及死亡情况, 并计算免疫保护率。计算公式为: 免疫保护率(%)=[1-免疫组死亡率/对照组死亡

率]×100。

1.11.5 病理学观察

解剖各组昆明鼠, 取肺、肝、脾常规制作石蜡切片, H-E 染色, 观察其病理组织学变化。

2 结果与分析

2.1 重组 SLY 的表达与纯化

用 IPTG 对含 pET-30a-sly 的重组菌进行诱导表达, 经 SDS-PAGE 分析, IPTG 最佳诱导时间为 9 h, 最佳诱导终浓度为 0.25 mmol/L, 目的蛋白主要以包涵体的形式存在, 并于预期的 60 kD 处出现蛋白质条带。纯化后的蛋白浓度为 0.8–0.9 mg/mL (图 1)。

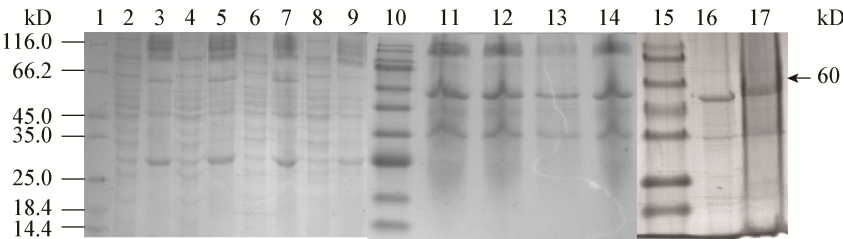


图 1 重组 SLY 的诱导表达存在形式、条件优化及纯化

Figure 1 SDS-PAGE analysis of recombinant SLY in the form of expressed protein, conditions optimization and purification

注: 1: 蛋白 Marker (14.4–116.0 kD); 2: 诱导 5 h 的表达产物超声上清; 3: 诱导 5 h 的表达产物超声沉淀; 4: 诱导 7 h 的表达产物超声上清; 5: 诱导 7 h 的表达产物超声沉淀; 6: 诱导 9 h 的表达产物超声上清; 7: 诱导 9 h 的表达产物超声沉淀; 8: 诱导 9 h 的 pET-30a 空白载体超声上清; 9: 诱导 9 h 的 pET-30a 空白载体超声沉淀; 10: 蛋白 Marker (10–180 kD); 11: 0.25 mmol/L IPTG 诱导表达产物; 12: 0.50 mmol/L IPTG 诱导表达产物; 13: 0.75 mmol/L IPTG 诱导表达产物; 14: 1.00 mmol/L IPTG 诱导表达产物; 15: 蛋白 Marker (14–120 kD); 16: 纯化后重组蛋白; 17: 纯化前重组蛋白。

Note: 1: Protein molecular weight marker, 14.4–116.0 kD; 2: Supernatant after ultrasonic disruption from inducing express products for 5 h; 3: Pellets after ultrasonic disruption from inducing express products for 5 h; 4: Supernatant after ultrasonic disruption from inducing express products for 7 h; 5: Pellets after ultrasonic disruption from inducing express products for 7 h; 6: Supernatant after ultrasonic disruption from inducing express products for 9 h; 7: Pellets after ultrasonic disruption from inducing express products for 9 h; 8: Supernatant after ultrasonic disruption from inducing pET-30a for 9 h; 9: Pellets after ultrasonic disruption from inducing pET-30a for 9 h; 10: Protein molecular weight marker, 10–180 kD; 11: Induced express products with 0.25 mmol/L IPTG; 12: Induced express products with 0.50 mmol/L IPTG; 13: Induced express products with 0.75 mmol/L IPTG; 14: Induced express products with 1.00 mmol/L IPTG; 15: Protein molecular weight marker, 14–120 kD; 16: Purified SLY protein; 17: Unpurified SLY protein.

2.2 重组 SLY 的溶血活性检测

将浓度为 0.1 mg/mL 的重组 SLY 1:2⁴ 倍比稀释后能使 1% 兔血红细胞完全溶解; 浓度为 0.1 mg/mL 的纯化 SLY 重组蛋白 1:2³ 倍比稀释后能使 2% 兔血红细胞完全溶解, 而作为阴性对照的 PBS 不能引起溶血(图 2)。

2.3 重组 SLY 的细胞毒性检测

将浓度为 0.5 mg/mL 的纯化 SLY 重组蛋白 1:2⁵ 倍比稀释后仍对 Vero 细胞产生细胞毒性, 主要表现

为引起细胞的颗粒增多、圆缩和脱落, 而作为阴性对照的无血清的 DMEM 不能引起细胞病变(图 3)。

2.4 重组 SLY 的 Western blotting 分析

结果显示, 纯化重组 SLY 与 SS2 阳性血清发生特异结合反应, 在约 60 kD 处出现了特异性显色条带(图 4); 复性后的纯化重组 SLY 不与 *E. rhusiopathiae* 和 HPS 阳性血清产生交叉反应。表明重组 SLY 既具有良好的反应原性, 又具有很好的特异性。

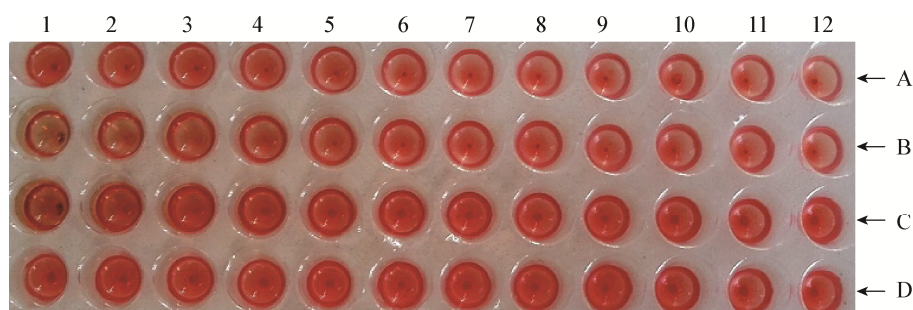


图 2 重组 SLY 的溶血性

Figure 2 Hemolytic purified recombinant SLY

注: 1-12: 重组 SLY 1:2-1:2¹² 倍比稀释; A: 1% 兔血红细胞的阴性对照; B: 1% 兔血红细胞的实验组; C: 2% 兔血红细胞的实验组; D: 2% 兔血红细胞的阴性对照。

Note: 1-12: Purified SLY protein 1:2-1:2¹² fold dilution; A: 1% rabbit red blood cell negative control; B: 1% rabbit red blood cells in the experimental group; C: 2% rabbit red blood cells in the experimental group; D: 2% rabbit red blood cell negative control.

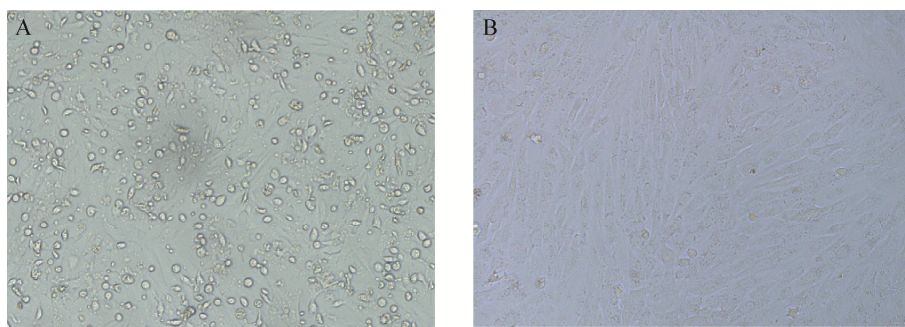


图 3 重组 SLY 的细胞毒性

Figure 3 Cytotoxicity purified recombinant SLY

注: A: 重组 SLY 对 Vero 的细胞毒性; B: 正常 Vero 细胞。

Note: A: Cytotoxicity of SLY protein on Vero cells; B: Normal Vero cells.

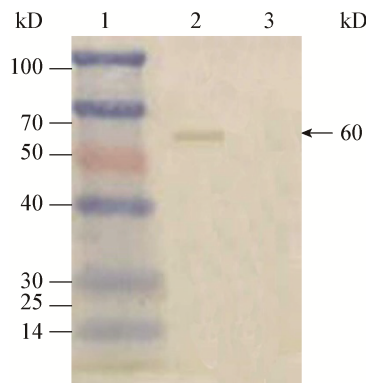


图 4 纯化后重组 SLY 的 Western blotting

Figure 4 Western blotting analysis of purified SLY protein

注: 1: 蛋白 Marker (14–100 kD); 2: 纯化后重组 SLY; 3: 阴性对照。

Note: 1: Protein molecular weight marker, 14–100 kD; 2: Purified SLY protein; 3: Negative control.

2.5 重组 SLY 的免疫攻毒保护性试验

2.5.1 安全性试验

重组 SLY 接种昆明鼠、斑马鱼 2 周后存活率均为 100%，健康状况良好。重组 SLY 对实验动物毒性较低，具有良好的安全性。

2.5.2 昆明鼠血清 IgG 检测

重组 SLY 和 AH10-8 株灭活全菌体免疫昆明鼠后，以重组 SLY 作为抗原，检测三次免疫后的血

清 IgG 抗体效价分别为 1:51 200、1:102 400；以 AH10-8 株全菌体的超声裂解物作为抗原，检测三次免疫后的血清 IgG 抗体效价分别为 1:204 800、1:6 400。结果显示，重组 SLY 与 AH10-8 株全菌体一免、二免、三免后 IgG 含量均逐级升高。以重组 SLY 作为抗原，重组 SLY 免疫后抗体效价值高于 AH10-8 株灭活全菌体；以 AH10-8 株全菌体的超声裂解物作为抗原，AH10-8 株灭活全菌体免疫后抗体效价值高于重组 SLY (表 3)。

2.5.3 昆明鼠、斑马鱼免疫保护率

在三次免疫 7 d 后以 AH10-8 株对昆明鼠和斑马鱼进行攻毒，攻毒对照组昆明鼠、斑马鱼在攻毒后 72 h 内全部死亡。空白对照组昆明鼠、斑马鱼全部存活，健康状况良好。其中重组 SLY 免疫组昆明鼠在攻毒后 24 h 内开始陆续死亡，7 d 未死亡昆明鼠表现萎靡不振、反应迟钝、食欲下降，被毛杂乱且无光泽度等临床症状。AH10-8 株灭活全菌体免疫组在攻毒 48 h 后开始出现死亡，7 d 未死亡昆明鼠健康状况良好。重组 SLY 对昆明鼠、斑马鱼免疫后的免疫保护率分别为 40%、84%；AH10-8 株灭活全菌体对昆明鼠、斑马鱼免疫后的免疫保护率分别为 80%、92% (表 4)。

表 3 重组 SLY 免疫昆明鼠的血清 IgG 检测结果

Table 3 Results of IgG antibody in mice immunized with recombinant SLY

免疫次数 Immune times	重组 SLY 包被抗原 The recombinant SLY protein as antigen to detect		AH10-8 株全菌体的超声裂解物包被抗原 AH10-8 of whole cell lysate as antigen	
	AH10-8 株灭活全菌体	重组 SLY 免疫抗体效价	AH10-8 株灭活全菌体免	重组 SLY 免疫抗体效价
	免疫抗体效价 Antibody titer against AH10-8 inactivated whole cells	Antibody titer against the recombinant SLY protein	疫抗体效价 Antibody titer against AH10-8 inactivated whole cells immune	Antibody titer against the recombinant SLY protein
一次免疫 First immunization	1:800	1:1 600	1:1 600	1:400
二次免疫 Second immunization	1:3 200	1:12 800	1:51 200	1:1 600
三次免疫 Third immunization	1:51 200	1:102 400	1:204 800	1:6 400

表 4 重组 SLY 免疫攻毒保护性试验结果
Table 4 Results of recombinant SLY immune challenge protective test

实验动物 Experimental animal	AH10-8 株灭活全菌体 AH10-8 inactivated whole cells		重组 SLY The recombinant SLY protein		阴性对照死亡率 Negative control mortality (%)	空白对照死亡率 Blank control mortality (%)
	免疫保护率	死亡率	免疫保护率	死亡率		
	Immune protection rate (%)	Mortality (%)	Immune protection rate (%)	Mortality (%)		
昆明鼠 Kunming mice	80	20 (1/5)	40%	60% (3/5)	100% (5/5)	0 (0/5)
斑马鱼 Zebrafish	92	8 (2/25)	84%	16% (4/25)	100% (25/25)	0 (0/25)

2.5.4 病理组织学观察

(1) 肺：攻毒对照组昆明鼠肺泡壁严重充血，肺泡破裂，肺气肿，间质增宽；重组 SLY 免疫组昆明鼠肺脏充血，肺泡腔变小，部分肺泡纤维化，少量炎性细胞浸润；AH10-8 株灭活全菌体免疫组的昆明鼠肺脏轻微充血，炎性细胞变性坏死；重组 SLY 免疫组及 AH10-8 株灭活全菌体免疫组与攻毒对照组相比，病理变化差异明显(图 5)。

(2) 肝：攻毒对照组昆明鼠肝脏严重淤血、水肿，中央静脉周围细胞变性坏死；重组 SLY 免疫组昆明鼠肝脏少量肝细胞空泡样变性，部分细胞核淡染、消失，大量炎性细胞浸润；AH10-8 株灭

活全菌体免疫组昆明鼠肝脏轻微出血，肝细胞细胞核轻微淡染；重组 SLY 免疫组及 AH10-8 株灭活全菌体免疫组与攻毒对照组相比，病理变化差异明显(图 6)。

(3) 脾：攻毒对照组昆明鼠脾脏淤血，内散在大量红细胞，淋巴细胞坏死，间质增宽；重组 SLY 免疫组昆明鼠脾脏充血，间质增宽，红髓大量多核巨噬细胞浸润；AH10-8 株灭活全菌体免疫组昆明鼠脾脏轻微充血，少量多核巨噬细胞浸润；重组 SLY 免疫组及 AH10-8 株灭活全菌体免疫组与攻毒对照组相比，病理变化差异明显(图 7)。

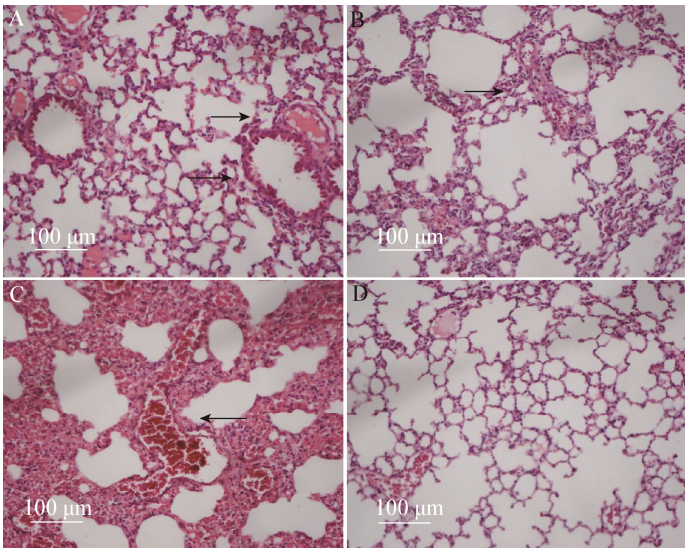


图 5 各组昆明鼠肺脏病理组织变化(H-E 染色, 200×)
Figure 5 Histological aspect of lung from Kunming mice of various groups (H-E staining, 200×)

注：A：重组 SLY 免疫组；B：AH10-8 株灭活全菌体免疫组；C：攻毒对照组；D：空白对照组。
Note: A: Recombinant SLY protein-immunized group; B: AH10-8 inactivated whole cells-immunized group; C: Challenge control group; D: Blank control group.

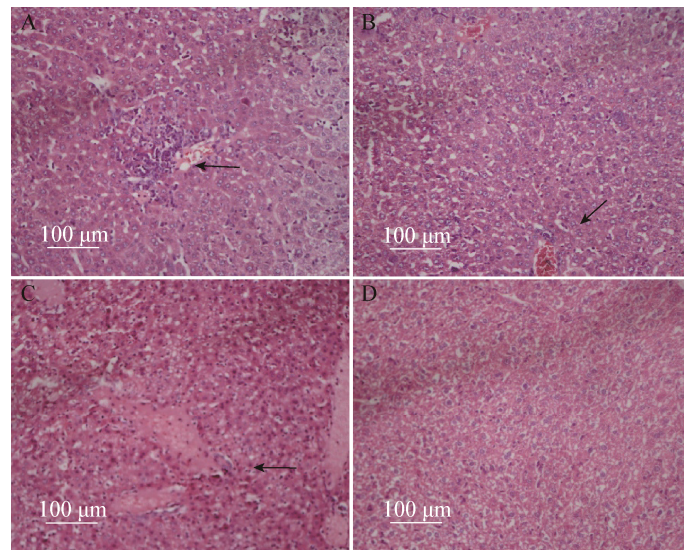


图 6 各组昆明鼠肝脏病理组织变化(H-E 染色, 200×)

Figure 6 Histological aspect of liver from Kunming mice of various groups (H-E staining, 200×)

注: A: 重组 SLY 免疫组; B: AH10-8 株灭活全菌体免疫组; C: 攻毒对照组; D: 空白对照组.

Note: A: Recombinant SLY protein immunized group; B: AH10-8 inactivated whole cells immunized group; C: Challenge control group; D: Blank control group.

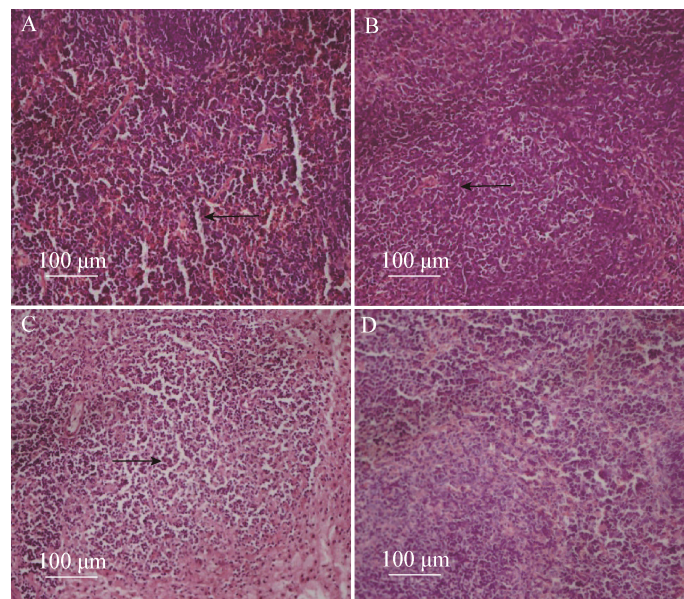


图 7 各组昆明鼠脾病理组织变化(HE 染色, 200×)

Figure 7 Histological aspect of spleen from Kunming mice of various groups (HE staining, 200×)

注: A: 重组 SLY 免疫组; B: AH10-8 株灭活全菌体免疫组; C: 攻毒对照组; D: 空白对照组.

Note: A: Recombinant SLY protein immunized group; B: AH10-8 inactivated whole cells immunized group; C: Challenge control group; D: Blank control group.

(4) 肾: 攻毒对照组昆明鼠肾脏严重出血、水肿, 间质大量炎性细胞浸润; 重组 SLY 免疫组昆明鼠肾脏充血, 肾小管上皮细胞肿大, 少量炎性细胞

浸润; AH10-8 株灭活全菌体免疫组昆明鼠肾脏轻微充血; 重组 SLY 免疫组及 AH10-8 株灭活全菌体免疫组与攻毒对照组相比, 病理变化差异明显(图 8)。

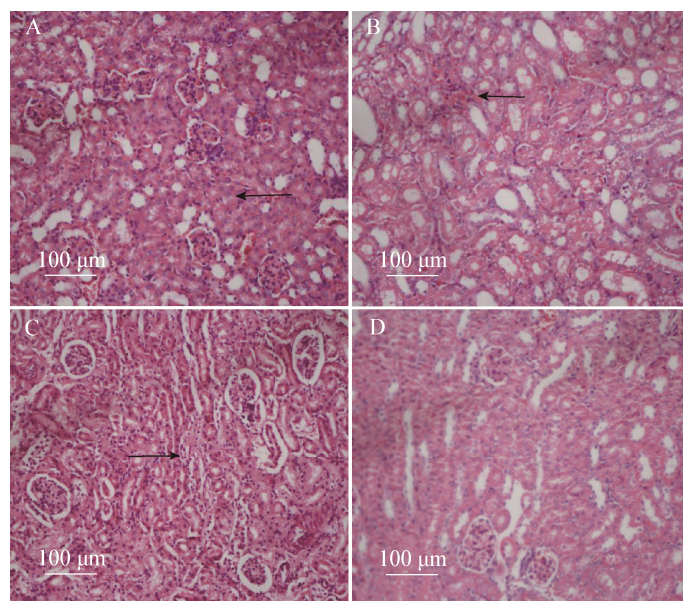


图 8 各组昆明鼠肾脏病理组织变化(H-E 染色, 200×)

Figure 8 Histological aspect of kidney from Kunming mice of various groups (H-E staining, 200×)

注: A: 重组 SLY 免疫组; B: AH10-8 株灭活全菌体免疫组; C: 攻毒对照组; D: 空白对照组。

Note: A: Recombinant SLY protein immunized group; B: AH10-8 inactivated whole cells immunized group; C: Challenge control group; D: Blank control group.

3 讨论

当前临床上猪链球菌病的防治主要依靠疫苗接种和药物控制。常用的疫苗有灭活疫苗和弱毒疫苗两类。由于灭活苗通常只刺激机体产生体液免疫,且在灭活过程中可能造成细菌抗原表位的缺失或抗原性减弱,不能产生足够的保护力;弱毒苗的效力很容易受母源抗体和抗生素的干扰,且弱毒菌株存在毒力返强以及诱导隐性感染的可能性。而且 SS 血清型众多,各血清型之间交叉保护性差,现有的疫苗不能对猪链球菌病产生较好的免疫效果^[3]。抗生素的应用虽然能够有效控制细菌性疾病的发生与流行,但是耐药菌株的普遍产生以及随之而来的生物安全问题也十分令人担忧。因此,筛选出具有良好免疫原性的抗原蛋白用于研制基因工程亚单位疫苗已成为研究的主要方向^[13]。

SLY 属于巯基激活的细胞毒素家族,可与宿主细胞受体结合,并导致细胞通透性增加以及细胞

裂解, *sly*⁺菌株具有细胞毒性作用^[14]。国内外众多学者证实,SLY 是 SS 主要的毒力因子,广泛存在于 SS 高毒力菌株中^[15]。同时 SLY 也具有较好的免疫原性,可诱导机体产生保护性免疫反应。SLY 存在于 SS 多种血清型中,不同血清型 SS 的 SLY 具有高度的保守性。更重要的是,各型 SS 产生的 SLY 生物学特性一致,以 SLY 作为抗原的疫苗能对不同血清型的 SS 产生交叉保护作用,可以有效地刺激机体产生体液免疫和细胞免疫,SLY 作为疫苗的一种重要组成成分已成为研究的关注点^[16]。SS 自身产生的 SLY 提纯过程复杂、提纯量低、代价昂贵,因此通过体外表达获得较纯的 SLY 将有助于其功能的研究和基因工程疫苗的研制^[17]。王海丽等^[18]从 *sly* 中获取第 230–593 氨基酸残基区域的基因片段进行原核表达,并没有进一步对重组蛋白做免疫原性分析。王华等^[19]原核表达了 653 bp 大小的 *sly* 部分片段,免疫昆明鼠后可以诱导昆明鼠的体液免疫应答并对强毒株 SS2 攻击起到保护作用。众多学者针对 *sly* 基因体外表达的研究都只是

表达 SLY 的部分片段,缺乏对整段 SLY 的体外表达及其免疫原性分析。本研究通过 pET-30a 成功克隆表达了 SS2 安徽分离强毒株(AH10-8 株) *sly* 全基因片段(1 494 bp),蛋白以包涵体形式存在,这与倪艳秀等^[20]用 pET-32a 表达 *sly* 部分基因片段的蛋白(一半以融合蛋白的形式存在于上清中)有差异,可能的原因一是构建的重组质粒表达载体不同,二是 SLY 中疏水性氨基酸占氨基酸总量的 36.6%^[21],疏水性氨基酸数量多也会降低蛋白质溶解度。本研究克隆表达的 SLY 结构完整、纯度高,具有良好的生物学活性。经鉴定,重组 SLY 与 SS2 相应的目的蛋白相对分子质量大小相同,可与 SS2 阳性血清呈特异性反应,具有良好的反应原性。通过对斑马鱼、昆明鼠两种实验动物的免疫攻毒保护性试验,表明表达的 SLY 具有良好的免疫原性,有望成为研制 SS2 新型疫苗的候选成分。本研究全面且精确的评价了 SLY 蛋白在发展 SS 亚单位疫苗方面的重要价值。重组 SLY 针对 SS2 攻击的免疫保护效果较灭活全菌体的稍差,分析可能的原因:(1) 抗原表位单一,重组 SLY 只存在单一的抗原表位,而灭活全菌体仍具有天然细菌的形态结构,因此也具有天然细菌完整的抗原表位,能刺激机体产生较强的免疫应答。(2) 有效抗原量不足,表达条件与表达时间的不同,均能影响重组 SLY 的表达结构及表达量,从而导致其免疫原性下降。虽然重组 SLY 免疫保护效果稍差,但是 SLY 存在于血清型众多的 SS 菌株中,交叉免疫保护好^[16];而且重组蛋白可以向融合蛋白方向发展,表达后的产物对动物机体可能有一定毒性,但不引发任何病理变化,对免疫保护试验没有影响,较其整个菌体蛋白的毒性更小,这也进一步体现了亚单位疫苗比全细菌灭活疫苗有更好的安全性^[12]。

在昆明鼠攻毒试验中,攻毒对照组昆明鼠均呈急性死亡,肺、肝、脾、肾以充血、水肿为主,组织损伤及炎症反应严重;重组 SLY 及 AH10-8 株灭活全菌体免疫组昆明鼠的死亡时间较

攻毒对照组延迟,肺、肝、脾、肾虽有充血和水肿,但比攻毒对照组轻微,其中肺、脾组织内可见炎性细胞浸润,为急性炎症后期或慢性炎症,且组织损伤也较严重,由此可见,机体在免疫应答的同时,也会造成自身组织和细胞的损伤。研究表明,抗原所引起的细胞免疫反应在诱发慢性炎症中扮演着重要角色。炎症痊愈的结局是机体溶解吸收炎性渗出物及坏死组织。AH10-8 株灭活全菌体免疫组昆明鼠的肺可见大量炎性细胞变性坏死,提示为炎症的转归。重组 SLY 免疫组脾脏红髓可见大量多核巨噬细胞,提示为肉芽肿性炎症;而 AH10-8 株灭活全菌体免疫组脾脏轻微充血,未见多核巨噬细胞,提示抗原已被机体吞噬或清除,炎症逐渐好转。综上所述,AH10-8 株灭活全菌体较重组 SLY 对昆明鼠有着更好的免疫保护效果。

包被抗原的质量对 ELISA 检测抗体水平的灵敏度和特异性具有决定性影响。本研究利用间接 ELISA 方法检测昆明鼠血清抗体效价,采用了灭活全菌体的超声裂解物和重组 SLY 两种包被抗原,通过对两组实验数据的比较分析,可更为客观全面评价 SLY 蛋白的免疫效力。其中以 AH10-8 株全菌体的超声裂解物为包被抗原,ELISA 检测结果显示 AH10-8 株灭活全菌体免疫抗体效价较重组 SLY 更高,而以重组 SLY 为包被抗原,ELISA 检测结果显示 SLY 免疫抗体效价值较 AH10-8 株灭活全菌体更高。可能的原因是由于 AH10-8 株灭活全菌体包括多种抗原,免疫后刺激机体产生的 IgG 也应比较全面,与 AH10-8 株全菌体的超声裂解物作为包被抗原结合反应的灵敏度更高。而重组 SLY 是具有特异性的一种有效抗原,免疫机体后产生的 IgG 具有针对性和特异性,与重组 SLY 作为包被抗原结合反应的特异性更高。因此,不同的包被抗原会导致 ELISA 检测抗体水平的结果产生一定的差异。从免疫攻毒试验结果还可以看出 SS2 灭活全菌体和重组 SLY 免疫斑马鱼,对 SS2 的攻击有着更好的敏感性,表明斑马鱼较昆明鼠更适合作为

研究 SS2 的实验动物, 这与 Rowe 等^[22]和 de la Cruz Domínguez-Punaro 等^[23]关于斑马鱼模型可以评估 SS2 菌株毒力的报道一致。

4 结论

本研究利用大肠杆菌表达系统成功克隆表达了重组 SLY, 通过昆明鼠及斑马鱼的免疫及攻毒保护试验, 表明重组 SLY 具有良好的反应原性和免疫原性, 可诱导机体产生保护性免疫反应, 有望成为研制 SS2 新型疫苗的候选成分, 为深入研究 SS2 的致病机制和基因工程亚单位疫苗的研制奠定了理论依据和科学基础。

REFERENCES

- [1] Okura M, Osaki M, Nomoto R, et al. Current taxonomical situation of *Streptococcus suis*[J]. Pathogens, 2016, 5(3): 45
- [2] Zhou Y, Dong XX, Li ZW, et al. Predominance of *Streptococcus suis* ST1 and ST7 in human cases in China, and detection of a novel sequence type, ST658[J]. Virulence, 2017, 8(6): 1031-1035
- [3] Chen C, Tang JQ, Dong W, et al. A glimpse of Streptococcal toxic shock syndrome from comparative genomics of *S. suis* 2 Chinese isolates[J]. PLoS One, 2007, 2(3): e315
- [4] Zhao WQ, Liu X, Huang QY, et al. *Streptococcus suis* sorption on agricultural soils: role of soil physico-chemical properties[J]. Chemosphere, 2015, 119: 52-58
- [5] Baums CG, Valentin-Weigand P. Surface-associated and secreted factors of *Streptococcus suis* in epidemiology, pathogenesis and vaccine development[J]. Animal Health Research Reviews, 2009, 10(1): 65-83
- [6] Gottschalk M, Segura M. The pathogenesis of the meningitis caused by *Streptococcus suis*: the unresolved questions[J]. Veterinary Microbiology, 2000, 76(3): 259-272
- [7] Seitz M, Baums CG, Neis C, et al. Subcytolytic effects of suilysin on interaction of *Streptococcus suis* with epithelial cells[J]. Veterinary Microbiology, 2013, 167(3/4): 584-591
- [8] Allen AG, Bolitho S, Lindsay H, et al. Generation and characterization of a defined mutant of *Streptococcus suis* lacking suilysin[J]. Infection and Immunity, 2001, 69(4): 2732-2735
- [9] Jiao AX. Isolation, identification and biological characteristic research of *Streptococcus* from pig in Anhui[D]. Hefei: Master's Thesis of Anhui Agricultural University, 2015 (in Chinese)
焦安心. 安徽地区猪源链球菌分离鉴定及其生物学特性研究[D]. 合肥: 安徽农业大学硕士学位论文, 2015
- [10] Jacobs AA, Loeffen PL, van Den Berg AJ, et al. Identification, purification, and characterization of a thiol-activated hemolysin (suilysin) of *Streptococcus suis*[J]. Infection and Immunity, 1994, 62(5): 1742-1748
- [11] Ji LW, Cai WG, Liu MX, et al. Development of recombinant subunit vaccine of *Streptococcus suis* type 2 suilysin[J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2009, 41(10): 57-59 (in Chinese)
吉利伟, 蔡伟刚, 刘民星, 等. 猪链球菌 2 型溶血素重组亚单位疫苗的研制[J]. 畜牧与兽医, 2009, 41(10): 57-59
- [12] Pu JY, Huang XX, Lu CP. Virulence detection of *Streptococcus suis* type 2 in zebrafish[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2007, 40(11): 2655-2658 (in Chinese)
濮俊毅, 黄新新, 陆承平. 用斑马鱼检测猪链球菌 2 型的致病力[J]. 中国农业科学, 2007, 40(11): 2655-2658
- [13] Zhao JP, Wei YM, Song DS, et al. Analysis of Immune effect on *Streptococcus suis*-*Haemophilus parasuis* bivalent subunit vaccine in mice[J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2012, 43(10): 1639-1644 (in Chinese)
赵建平, 魏燕鸣, 宋岱松, 等. 猪链球菌-副猪嗜血杆菌二联亚单位疫苗在小鼠的免疫效力分析[J]. 畜牧兽医学报, 2012, 43(10): 1639-1644
- [14] Wei ZG, Li R, Zhang AD, et al. Characterization of *Streptococcus suis* isolates from the diseased pigs in China between 2003 and 2007[J]. Veterinary Microbiology, 2009, 137(1/2): 196-201
- [15] Takeuchi D, Akeda Y, Nakayama T, et al. The contribution of suilysin to the pathogenesis of *Streptococcus suis* meningitis[J]. The Journal of Infectious Diseases, 2014, 209(10): 1509-1519
- [16] Ma YZ, Fang WH, Xu HS. Construction of an attenuated *Salmonella typhimurium* harbouring eukaryotic expression vector carrying *Streptococcus suis* sly gene[J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2013, 29(4): 915-917 (in Chinese)
马有智, 方维焕, 徐海圣. 携带猪链球菌溶血素基因真核表达载体的减毒沙门氏菌的构建[J]. 江苏农业学报, 2013, 29(4): 915-917
- [17] Eisenberg T, Hudemann C, Hossain HM, et al. Characterization of five zoonotic *Streptococcus suis* strains from Germany, including one isolate from a recent fatal case of Streptococcal toxic shock-like syndrome in a hunter[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2015, 53(12): 3912-3915
- [18] Wang HL, Xu GY, Ge CC, et al. Prokaryotic expression of the immunodominant region of Sichuan human meningitis *Streptococcus suis* serotype 2 suilysin[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2010, 30(4): 477-479, 484 (in Chinese)
王海丽, 徐公义, 葛长城, 等. 四川脑膜炎病例猪链球菌 2 型溶血素抗原表位富集区的原核表达[J]. 中国兽医学报, 2010, 30(4): 477-479, 484
- [19] Wang H, Wang JW, Chen YP, et al. Cloning and co-expression of the suilysin gene and 38 kDa protein gene of *Streptococcus suis* serotype 2[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2007, 7(7): 977-980 (in Chinese)
王华, 王君玮, 陈义平, 等. 猪链球菌 2 型溶血素基因与 38 kDa

- 蛋白基因克隆及联合表达[J]. 现代生物医学进展, 2007, 7(7): 977-980
- [20] Ni YX, He KW, Zhou JM, et al. Prokaryotic expression, bioactivity and immunoprotection test of suilysin mature protein of *Streptococcus suis* type 2[J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2013, 29(2): 335-340 (in Chinese)
- 倪艳秀, 何孔旺, 周俊明, 等. 猪链球菌 2 型溶血素成熟蛋白的原核表达及其生物学特性与免疫保护性[J]. 江苏农业学报, 2013, 29(2): 335-340
- [21] Zhou MG. Development and application of indirect ELISA and indirect hemagglutination assay for antibodies detection against *Streptococcus suis* serotype 2 strains[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2007 (in Chinese)
- 周明光. 猪 2 型链球菌间接 ELISA 和间接血凝抗体检测方法建立及应用[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2007
- [22] Rowe HM, Withey JH, Neely MN. Zebrafish as a model for zoonotic aquatic pathogens[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2014, 46(1): 96-107
- [23] de la Cruz Domínguez-Punaro M, Segura M, Radzioch D, et al. Comparison of the susceptibilities of C57BL/6 and A/J mouse strains to *Streptococcus suis* serotype 2 infection[J]. Infection and Immunity, 2008, 76(9): 3901-3910

稿件书写规范

高校教改纵横栏目简介及撰稿要求

“高校教改纵横”栏目, 是中国微生物学会主办的科技期刊中唯一的教学类栏目, 也是中国自然科学核心期刊中为数不多的教学栏目。该栏目专为微生物学及其相关学科领域高校教师开辟, 一方面为高校微生物学科的教师提供一个发表论文的平台, 同时微生物关联学科的一部分确实优秀的论文也可以在此发表, 是微生物学及相关领域教学研究、交流、提高的园地。

本栏目的文章有别于其他实验类研究报告, 特色非常鲜明。要求作者来自教学第一线, 撰写的稿件内容必须要有新意、要实用, 不是泛泛地叙述教学设计与过程, 而是确实有感而发, 是教学工作中的创新体会, 或者在教学中碰到的值得商榷的、可以与同行讨论的有价值的论题。在内容选材上应该有鲜明的特点和针对性, 做到主题明确、重点突出、层次分明、语言流畅。教师的教学思路应与时俱进, 注意将国内外新的科技成果和教学理念贯穿到教学之中, 只有这样才能真正起到教与学的互动, 促进高校生物学教学的发展, 更多更好地培养出国家需要的高科技创新人才。这也是本栏目的目的所在。

同时, 为了给全国生物学领域的教学工作者提供一个更广阔更高层次的交流平台, 本栏目还开辟了“名课讲堂”版块, 邀约相关生命科学领域, 如微生物学、分子生物学、生物医学、传染病学、环境科学等的教学名师、知名科学家就教学和学生培养发表观点, 推荐在教学改革、教学研究、引进先进教学手段或模式以及学生能力培养等方面有突出成绩的优秀论文, 为高校教师以及硕士、博士研究生导师提供一个可资交流和学习平台, 促进高校教学和人才培养水平的提高。

欢迎投稿! 欢迎对本栏目多提宝贵意见!