微生物学通报
Microbiology
tongbao@im.ac.cn

JAN 20, 2008, 35(1): 15~19
©2008 by Institute of Microbiology, CAS

研究报告

猪链球菌 2 型烯醇化酶的分子克隆与免疫学特性

孙 雯[1,2] 潘秀珍[1,2*] 王长军[2] 郑 峰[2] 唐家琪[2*]

(1. 南京师范大学生命科学院 南京 210046)
(2. 南京军区军事医学研究所 南京 210002)

摘 要: 对新近测定的猪链球菌 2 型(*S. suis* 2) 05ZYH33 全基因序列进行生物信息学分析, 并与相关家族蛋白进行同源性比较, 设计合成引物, PCR 法扩增出约 1.3 kb 的烯醇化酶编码基因 (*enolase*, *eno*), 将其克隆入 pMD-18T 载体中, 进一步亚克隆入表达载体 pET32a。将重组表达质粒 pET32a::*eno* 转化 *E. coli* BL21 (DE3), 经 IPTG 诱导表达后, SDS-PAGE 初步检测到分子量约为 75kD 的蛋白带。通过 His-Tag 亲和层析纯化, 获得融合蛋白 His-ENO。Western-blot 表明该表达产物具有免疫原性。基于 ELISA 进行的细胞定位实验证实了 Enolase 可以部分存在 *S. suis* 2 05ZYH33 细菌的表面。这提示了 Enolase 作为一种新发现的抗原对于引发猪链球菌相关疾病可能发挥着重要的作用。

关键词: 猪链球菌 2 型, 烯醇化酶, ELISA

Molecular Cloning and Immunological Characterization of Enolase from *Streptococcus suis* 2

SUN Wen[1,2] PAN Xiu-Zhen[1,2*] WANG Chang-Jun[2] ZHENG Feng[2] TANG Jia-Qi[2*]

(1. *Nanjing Normal University*, *Nanjing* 210046)
(2. *Institute of Military Medical Sciences*, *Nanjing Command*, *Nanjing* 210002)

Abstract: To understand the *enolase* (*eno*) gene and its product in *Streptococcus suis* serotype 2 (*S. suis* 2), bioinformatics was adopted to analyze the whole genome sequence of the Chinese strain 05ZYH33 of *S. suis* 2. A highly homologous *eno* gene was unveiled by the genome-wide mining. A pair of specific primers was designed for the *eno*, and the target DNA fragment of 1.3 kb was successfully amplified using the genomic template of 05ZYH33. Subsequently, *eno* gene was inserted into pMD18-T vector, and then subcloned into prokaryotic expression vector pET32a, generating a recombinant expression plasmid pET32a::*eno*. The resulting plasmid was confirmed by direct DNA sequencing and transformed into *E. coli* BL21 (DE3) competent cells. Protein expression analysis showed that a 75 kD protein can be observed in 12% SDS-PAGE, indicating that the recombinant 6His-fused ENO protein can be produced in *E. coli* under the induction of IPTG. Western-blot experiment demonstrated clearly it shares strong specific antigenicity. Moreover, ELISA result suggested that ENO can occur on the surface of 05ZYH33 strain. Together, our data supported that

基金项目: 国家 863 项目(No.2006AA0Z455); 国家自然科学基金项目(No.30730081、No.30670105、No.30600533)[0]; 江苏省自然科学基金资助项目(No.BK2006014, No.BK2007013)
* 通讯作者: Tel: 025-84507094; ✉: panxiuzhen_2004@163.com (潘秀珍); tjq85@hotmail.com (唐家琪)
收稿日期: 2007-04-12; 接受日期: 2007-05-14
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

ENO can function as a novel antigen, and may play pivotal roles in the severe infection of *S. suis* 2.

Keywords: *Streptococcus suis* serotype 2 (*S. suis* 2), Enolase, ELISA

猪链球菌 2 型(*S. suis* 2)是重要的人畜共患病病原菌。迄今为止, *S. suis* 2 已在 20 多个国家和地区导致了 200 多起人群的恶性感染事件和区域性流行, 其造成的临床疾病包括脑膜炎、败血症、关节炎等[1]。尤为值得关注的是, 在江苏(1998 年)、四川(2005 年)两省暴发了 *S. suis* 2 大规模流行感染猪和人的疫情, 并且病人临床表现为国内外罕见的中毒性休克综合征(STSS)[1, 2]。细菌的表面成分不仅涉及细菌的防御机制, 同时也与细菌发挥毒力作用, 例如黏附、定植、侵袭、组织中的穿梭等有着密切的关系[3]。近来发现某些细菌参与基础代谢的蛋白能出现在细胞表面, 其中很大一部分既没有分泌信号序列也没有保守的 LPXTG 细胞壁锚定结构[4]。烯醇化酶(Enolase, ENO)似乎就是这样一种蛋白, 其基础功能是在细胞质中可催化 2-磷酸甘油酸盐转化为磷酸烯醇丙酮酸盐, 但也已发现其能出现在多种病原菌胞外且具有与血纤溶酶原结合的能力, 同时参与感染过程[5]。然而 ENO 在 *S. suis* 2 致病机制的研究中尚未见报道。课题组在分析本实验室已完成的 *S. suis* 2 全基因组序列时, 发现了一个与其他细菌 Enolase 编码基因高度同源的类似物, 进而对该 *eno* 基因进行克隆、表达及定位分析, 为进一步探明该基因可能在 *S. suis* 2 致病中的作用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

菌株 05ZYH33(分离自四川资阳的中毒性休克综合征病人)、表达质粒 pET32 及其宿主菌 *E.coli* DH5α和 *E.coli* BL21, 本实验室保存; 质粒 pMD-18T 为 TaKaRa 公司产品。

PCR 扩增试剂盒, DNA 胶回收试剂盒, 限制性内切酶 *Bam*HⅠ和 *Xho*Ⅰ, T4 连接酶均为 TaKaRa 公司产品。DNA Marker 和蛋白 Marker 为晶美公司产品。

1.2 方法

1.2.1 *eno* 基因的生物信息学分析: 用 BLAST 和 Clustal W 程序筛选本实验室 *S. suis* 2 05ZYH33 全基因组序列中可能的 ENO 编码序列, 并对其进行系统进化分析。

1.2.2 *enolase* 基因的分子克隆: 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′-GCGGATCCATGTCAATTATTACTG-3′, 画线部分为 *Bam*HⅠ酶切位点; 下游引物为 5′-GCCTCGAGTTATTTTTTCAAGTTGTAG-3′, 画线部分为 *Xho*Ⅰ酶切位点。引物由上海基康生物有限公司合成。PCR 程序为 95℃ 5 min; 95℃ 30 s; 51℃ 30 s; 72℃ 1 min, 共 25 个循环, 最后 72℃ 10 min。PCR 产物经胶回收试剂盒回收后与 pMD-18T 连接, 转化至 DH5α感受态细菌, 菌液经 PCR 检测为阳性者用试剂盒提取质粒, 酶切, 电泳鉴定。

1.2.3 重组表达质粒 pET32::*eno* 的构建: 质粒 pMD-18T::*eno* 和 pET32a 载体分别用 *Bam*HⅠ/*Xho*Ⅰ双酶切, 并用胶回收试剂盒回收核酸。T4 DNA ligase 连接后转化至 DH 5α感受态, 菌液经 PCR 检测为阳性者用试剂盒提取质粒, 酶切, 电泳鉴定。结果为阳性者送往上海英俊生物技术有限公司进行测序, 对测定结果进行分析。

1.2.4 ENO 的表达和纯化: 将重组表达载体转化 *E. coli* BL21 (DE3), 经 IPTG 诱导表达 4h, 收集菌体超声破碎。离心后分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳, 明确是否有目的蛋白的表达。将重组菌扩大培养并经 IPTG 诱导表达, 超声裂解, 离心后的上清用 Ni^{2+} 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。

1.2.5 ENO 的免疫原性分析: 采用电转印法将 12% SDS-PAGE 电泳后膜上的蛋白转移至硝酸纤维素膜上, 5%脱脂奶封闭, 加兔抗 ZY05719 抗血清(1∶100)37℃孵育 1 h, 再加 HRP 标记的羊抗兔 IgG(1∶1000)37℃ 孵育 1 h, 加底物邻苯二胺(DAB)显色。

1.2.6 ENO 多抗体血清的制备: 取一只健康大鼠(约 250 g), 用 200 μg 重组蛋白加等体积弗氏完全佐剂进行腹部皮下多点注射; 一周后, 以等量抗原加等体积弗氏不完全佐剂第 2 次腹部皮下多点注射; 一周后同第 2 次方法进行第 3 次免疫; 一周后用 200 μg 蛋白直接注射, 7 天后尾静脉采血检测, 最后颈动脉采血法采集血, 分离血清。

1.2.7 ELISA 分析: 分别用多聚赖氨酸, 全菌超声裂解上清蛋白包被 ELISA 板, 4℃过夜; PBST 洗 3 次

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

(其中多聚 lys 孔加入 10^6 甲醛灭活菌，再用戊二醛进行处理), 5%脱脂奶封闭 1h, PBST 洗 3 次，各种组分分别加入鼠抗 ENO 蛋白的多抗血清(1：4000)，免疫前的大鼠血清作为阴性(1：4000)对照, 37℃孵育 1h; PBST 洗 3 次，加入羊抗鼠 IgG(1：10000)，37℃孵育 1h，PBST 洗 3 次，OPD 显色，酶标仪 490nm 处读数。

2 结果

2.1 *eno* 基因在 05ZYH33 全基因组中的发现

通过同源性分析发现，四川分离株 05ZYH33 全基因组中 CDSSSU1503 含有 *eno* 近似序列，与 GenBank 上的 *S. pneumoniae* (accession No.CAC-83091)、*S. sobrinus* (accession No.CAD60544) 、*S. pyogenes* (accession No.ABN54671)、*S. agalactiae* (accession No.AAL85688)核酸序列相似性分别为 90%、90%、88%、88%。比对结果显示, *eno* 与其他已公布的 *eno* 序列有着一定程度的相似性，ENO 蛋白序列比核苷酸序列更加保守，从进化树中(图 1)可以看出，*S. suis* 2 05ZYH33 的 ENO 蛋白与 *S. agalactiae* 的相应蛋白亲缘关系最近。

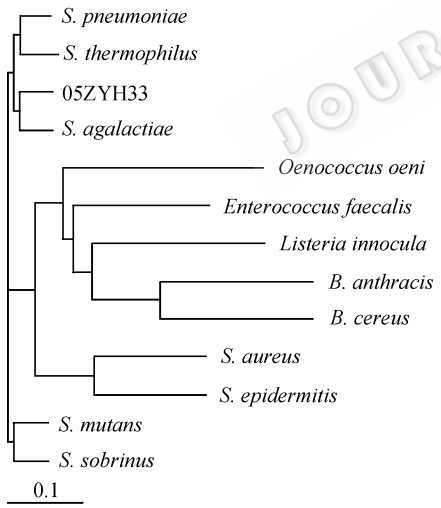

图 1 *S. suis* 05ZYH33 ENO 蛋白的进化树

Fig. 1 Phylogenetic trees of 13 representative isolates based on comparison of amino acid sequence with known sequences

2.2 pET32::*eno* 的构建和鉴定

重组表达载体 pET32::*eno* 通过 *Bam*HⅠ/*Xho*Ⅰ双酶切后，1% 琼脂糖电泳显示 05ZYH33 中 *eno* 片段的长度约 1300 bp，序列测定显示该片段全长 1308 bp，编码 435 个氨基酸(图 2)。

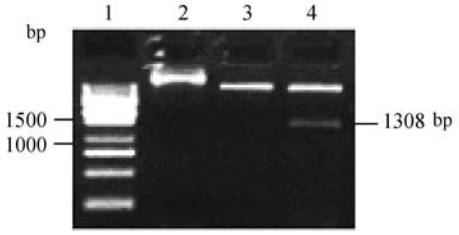

图 2 重组质粒 pET32::*eno* 的双酶切鉴定

Fig. 2 Identification of the recombinant plasmid pET32::*eno* by double restriction enzymes.

1: 1000 bp DNA marker; 2: 质粒 pET32::*eno*; 3: *Hin*d Ⅲ单酶切; 4: *Bam*H I/*Xho* Ⅰ双酶切

1: 1000 bp DNA marker; 2: pET32::*eno* vector; 3: digested by *Hind* Ⅲ; 4: digested by *Bam*H I and *Xho* Ⅰ

2.3 ENO 的表达及纯化

含重组表达质粒 pET32::*eno* 的大肠杆菌 BL21，经 IPTG 诱导后, SDS-PAGE 分析表明在约 75 kD 处有一明显的新生蛋白条带(图 3)，分子量大小与预期一致。利用 His-Beads 对表达产物进行了纯化, 纯化后的表达产物只有 1 条特异条带(图 4)。

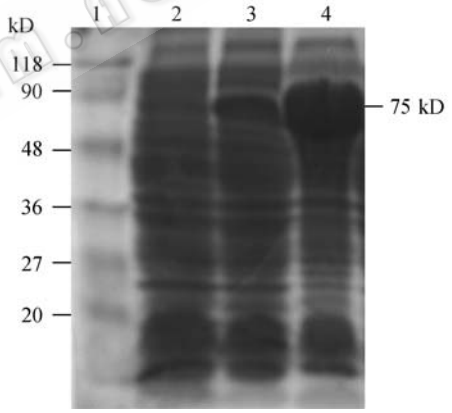

图 3 SDS-PAGE 检测蛋白表达

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

1: 蛋白 marker; 2: 1mmol/L IPTG 诱导的 pET32/ BL21; 3: 未经诱导的 pET32::*eno*/BL21; 4: 1mmol/L IPTG 诱导的 pET32::*eno* / BL21

1: protein marker; 2: pET32/BL21 induced with IPTG; 3: pET32::*eno*/BL21 uninduced with IPTG; 4: pET32::*eno* / BL21 induced with IPTG

2.4 ENO 的免疫活性

Western blot 的结果显示, ENO 蛋白可以与全菌兔抗 ZY05719 抗血清反应，在特定位置处有明显的条带(图 5)，表明重组 ENO 蛋白具有特异性抗原活性。

2.5 ENO 在 *S. suis* 2 的分布

分别用全菌、全菌超声裂解蛋白包被, ELISA 结果显示(图 6)，不论是全菌裂解蛋白还是细胞壁成分

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

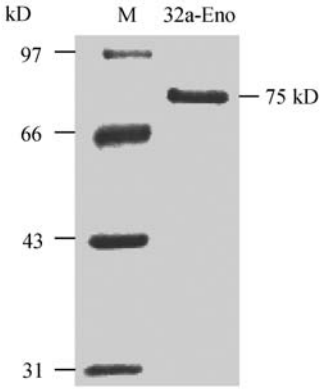

图 4 纯化后的 ENO 蛋白电泳图谱

Fig. 4 SDS-PAGE profile of the purified recombinant ENO

1: 蛋白 marker; 2: 6His-fused ENO

1: protein marker; 2: pET32::*eno*(Expressed products after induced by IPTG and several washes)

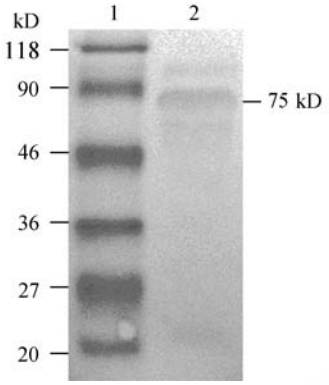

图 5 ENO 的免疫检测

Fig. 5 Western blot of the recombinant ENO

1: 蛋白 marker; 2: 重组 ENO

1: Protein Marker; 2: Recombinant ENO

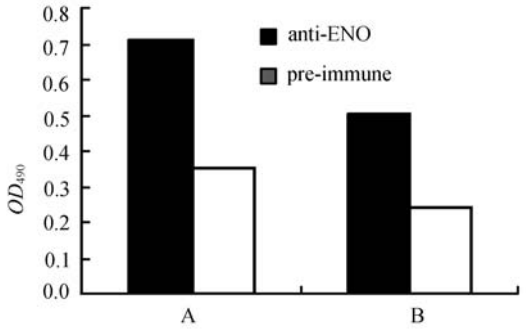

图 6 ELISA 检测 ENO 在 *S. suis* 2 的分布

Fig. 6 Subcellular localization of ENO in *S. suis* 2 revealed by ELISA

A: 全菌超声裂解上清蛋白包被 ELISA 板; B: 灭活全菌包被 ELISA 板

A: ELISA plates were coated with whole bacteria sonication lysis samples; B: ELISA plates were coated with whole-cell samples

都对阳性抗 ENO 血清有着明显的应答，表明 ENO 不仅存在于细胞溶质中，也存在于细菌的表面。

3 讨论

S.suis 2 致病性的研究多集中在毒力因子的研究，如荚膜多糖(CPS)、溶菌酶释放蛋白(MRP)、胞外因子(EF)等。寻找新的毒力因子和探索其可能的新机制极为重要。本研究从 *S. suis* 2 中国强毒株 05ZYH33 中克隆 *eno* 基因，进行原核表达，获得融合蛋白 His-ENO。序列分析表明 *eno* 全长 1308 bp，编码 435 个氨基酸。系统进化分析表明 *S. suis* 2 的 *eno* 与一些同样能引起心内膜炎[6]、关节炎、肺炎、败血症以及中毒性休克综合征(STSS)的细菌的 *eno* 高度同源，暗示其在进化中高度保守。例如 *S. pyogenes*(96%)、*S. agalactiae* (94%)、*S. sobrinus*(91%)、*S. pneumoniae*(93%)以及 *S. aureus*(81%)。免疫印记显示 ENO 具有良好的免疫原性。全菌 ELISA 结果支持 ENO 蛋白可部分存在于 *S. suis* 2 的细胞表面这一假设，暗示该蛋白其在恶性感染中扮演一定的角色。ENO 除了参与糖代谢过程外，还具有其他生物学功能。多种革兰氏阳性菌，如金黄色葡萄球菌，A、C、G 群链球菌以及某些重要的革兰氏阴性菌如沙门氏菌，它们表面的 ENO 蛋白均能结合大量的血纤溶酶原。在哺乳动物中，这种相互作用促使细胞外基质的降解，有助于细菌在组织间的穿梭和转移[3,8,9,10,11]。此外由于不少真核细胞表面也存在 ENO 蛋白，在 *S. suis* 2 感染宿主的过程中，宿主产生的抗细菌 ENO 抗体能够与自身的 ENO 发生交叉反应在加速组织损坏的同时将会加剧炎症反应，引发关节炎等自身免疫性疾病 [4]。当然，关于细胞质中的 ENO 蛋白分泌到细胞外并锚定在细胞壁上的分子机理目前还不清楚。ENO 在 *S. suis* 2 侵染宿主过程中发挥的作用以及是否会引起宿主细胞病变的问题尚需进一步探讨。总之，ENO 作为一个潜在的毒力因子为进一步探索 *S. suis* 2 的致病机理提供了思路。

致谢：本课题的实施得到了中国科学院微生物研究所高福实验室猪链球菌课题组冯友军博士研究生的支持和帮助，在此表示衷心的感谢。

参 考 文 献

[1] Tang J, Wang C, Feng Y, *et al*. Streptococcal Toxic Shock Syndrome Caused by *Streptococcus suis* Serotype 2. *PLoS Med*, 2006, **3**(5): e151.

[2] Chen C, Tang J, Dong W, *et al*. A Glimpse of Streptococcal Toxic Shock Syndrome from Comparative Genomics of

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

S.suis 2 Chinese Isolates. *PLoS ONE*, 2007, **2**(3): e315.

[3] Bergmann S, Rohde M, Gursharan S, *et al*. α-Enolase of *Streptococcus pneumoniae* is a plasmin(ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface. *Mol Microbiol*, 2001, **40**(6): 1273–1287.

[4] Patricia AF, Pancholi V, Marcelo MN, *et al*. Antibodies to Streptococcal Surface Enolase React with Human a-Enolase:Implications in Poststreptococcal Sequelae. *J Infect Dis*, 2000, **182**(1): 1712–21.

[5] Veiga MI, uarte M, inis M, *et al*. Enolase from *Streptococcus sobrinus* is an immunosuppressive protein. *Cell Microbiol*, 2004, **6**(1): 79–88.

[6] Fluegge K, Schweier O, Schiltz E, *et al*. Identification and immunoreactivity of proteins released from *Streptococcus agalactiae*. *Clin Microbiol Infect Dis*, 2004, **23**(11): 818–824.

[7] Martin JGH, Joanne CM.Identification of Major Outer Surface Proteins of *Streptococcus agalactiae*. *Infect Immun*, 2002, **70**(3): 1254–1259.

[8] Ehinger S, Schubert WD, Bergmann SJ, *et al*. Plasmin (ogen)-binding a-Enolase from S*treptococcus pneumoniae*: Crystal Structure and Evaluation of Plasmin(ogen)- binding Sites. *Mol Biol*, 2004, **343**(4): 997–1005.

[9] Whiting GC, Evans JT, Patel S, *et al*. Purification of native Æ-enolase from *Streptococcus pneumoniae* that binds plasminogen and is immunogenic. *J Med Microbiol*, 2002, **51**(10): 837–843.

[10] Derbise A, Song YP, Parikh S, *et al*. Role of the C-Terminal Lysine Residues of Streptococcal Surface Enolase in Glu-and Lys-Plasminogen-Binding Activities of Group A Streptococci. *Infect Immun*, 2004, **72**(1): 94–105.

[11] Ge J,Diana MC, Richard LG, *et al*. *Streptococcus mutans* Surface α-Enolase Binds Salivary Mucin MG2 and Human Plasminogen. *Infect Immun*, 2004, **72**(11): 6748–6752.

编辑部公告

《微生物学通报》编辑部公告

《微生物学通报》编辑部已随同中科院微生物研究所从北京海淀中关村搬迁至朝阳区大屯路中科院奥运村园区。

为加快稿件的审理过程，加强与审稿专家、作者及读者的互动和交流，我刊已从 2007 年 7 月 5 日起正式启用新版远程投稿及编辑系统。该系统能实现远程投稿、远程查稿、在线审稿、在线编辑等功能。欢迎广大作者、读者和审稿专家使用！今后，我刊所有来稿都将通过该系统进行管理，关于稿件的一切信息也都将通过网络告知作者。

如果您在使用过程中发现任何问题，请随时与我刊编辑部联系。

另，为减少稿件积压，进一步缩短出版周期，我刊从 2008 年起将刊期从双月刊变更为月刊，欢迎广大作者踊跃投稿！

临时通讯地址：北京朝阳区大屯路中科院微生物所《微生物学通报》编辑部（100101）
新的固定邮编地址确定后我们将及时公告
编辑部电话：010-64807511; E-mail：tongbao@im.ac.cn
网址：http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn

《微生物学通报》编辑部

2007-5-20

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