

肺炎球菌表面蛋白 A(PspA)的克隆表达及交叉免疫作用

林子琳¹ 林海英¹ 汪媛媛¹ 白锴凯¹ 郭养浩^{1,2*}

(1. 福州大学药物生物技术研究所 福建 福州 350002)

(2. 福建省医疗仪器和医药技术重点实验室 福建 福州 350002)

摘要: 本工作从中国临床最常见的 5 种荚膜血清型肺炎链球菌(FY01, FY05, FY6B, FY19F, FY23F)克隆获得编码 PspA 蛋白 N 端 α -螺旋区的基因片段。分别将 5 种 PspA 基因片段克隆到表达载体 pET-27b(+)上, 成功构建重组质粒 pET-*pspA*, 转化大肠杆菌 BL21(DE3)。经乳糖诱导表达和亲和层析分离, 获得高纯度重组蛋白。通过家族专属引物 PCR 的方法鉴定这 5 种荚膜血清型肺炎球菌的 PspA 蛋白所属家族, 并进一步根据基因测序结果通过生物信息学方法鉴定了所属支系。FY01 rPspA、FY6B rPspA、FY19F rPspA 同属于家族 I 支系 1, FY05 rPspA 属于家族 I 支系 2, FY23F rPspA 属于家族 II 支系 3。以 FY01 rPspA 免疫小鼠, 在 20 $\mu\text{g/mL}$ 免疫剂量时抗体滴度达到 1: 210000, 显示了重组蛋白较好的免疫原性。Western blotting 交叉免疫反应性研究表明, 抗 FY01 rPspA 抗血清与 FY01 rPspA、FY6B rPspA 和 FY19F rPspA 反应性较好, 而与另外两种重组蛋白几乎无反应, 提示 PspA 交叉免疫作用仅限于本支系内。动物保护实验表明, FY01 rPspA 免疫的小鼠对 FY6B、FY01 两种菌的攻击具有较好的保护作用, 对 FY05、FY23F 的攻击未见明显的保护作用。本研究成果对于研制高效肺炎球菌疫苗具有重要的指导意义。

关键词: 肺炎球菌表面蛋白 A(PspA), 交叉保护作用, 家族, 支系, 克隆表达

Cloning and Expression of Pneumococcal Surface Protein A and Its Cross-immunoreactivity

LIN Zi-Lin¹ LIN Hai-Ying¹ WANG Yuan-Yuan¹ BAI Kai-Kai¹ GUO Yang-Hao^{1,2*}

(1. Institute of Pharmaceutical Biotechnology and Engineering, College of Biological Science and Biotechnology, Fuzhou, Fujian 350002, China)

(2. Fujian Key Laboratory of Medical Instrumentation and Pharmaceutical Technology, Fuzhou, Fujian 350002, China)

Abstract: In this study, we cloned genes coding the N-terminal region of PspA (pneumococcal surface protein A) from five of the most epidemic pneumoniae serotypes in China (FY01, FY05, FY6B, FY19F, FY23F). The obtained genes were respectively constructed into prokaryotic expression vector pET-27b(+), and then recombinant plasmids pET-*pspA* were respectively transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3) for PspA expression. Induced with lactose, the five recombinant proteins were highly expressed and then purified by Ni-chelation chromatography. PCR with Family special primers was carried out to identify Family of PspA,

* 通讯作者: ✉ yanghaoguo@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-11-03; 接受日期: 2008-12-22

and Clade of PspA was identified by means of bioinformatics according to the sequencing results. FY01rPspA, FY6B rPspA and FY19FrPspA belonged to Clade 1 of Family , FY05rPspA belonged to Clade 2 from Family and FY23F rPspA belonged to Clade 3 from Family . Strong immunogenicity had been demonstrated in mice immuned with FY01rPspA at dose of 20 $\mu\text{g/mL}$ each, of which antiserum antibody titer reached 1:210000. Result of western blotting showed that FY01rPspA antiserum reacted well with Y6B rPspA and FY19FrPspA but poorly with the other two, which suggested that cross-immunoreactivity was restricted in the same Clade. Mice immuned with FY01rPspA protected well against FY6B, while against FY05, FY23F was not effectively protected. The result in this study has much instructive significance for the development of a new efficient vaccine against pneumoniae.

Keywords: Pneumococci surface protein A(PspA), Clone and expression, Cross-immunoprotection, Family of PspA, Clade of PspA

肺炎球菌(*Streptococcus pneumonia*, SPN)被证明是人类重要病原菌已有 100 年的历史了,对其感染的防治问题还远未解决。至今由它引起的疾病仍然是重要的全球性疾病之一,严重地危害人类健康^[1]。

现在全球广泛使用的 SPN 疫苗是 merck 公司生产的 23 价多糖疫苗。特异性多糖疫苗在抗病原体感染,激活体液免疫系统等方面发挥了重要的作用。然而,多糖是 T 细胞非依赖型抗原,不能产生免疫记忆,对婴幼儿、老年人及其他年龄段免疫功能低下者保护作用弱。目前国外仍处于临床试验阶段的 7 价结合疫苗^[2]将 7 种荚膜多糖与白喉毒素蛋白载体结合,克服了多糖疫苗非 T 细胞依赖性的缺点,但仍存在荚膜多糖血清型数量有限且抗蛋白抗体对病原菌缺乏特异性保护作用的不足之处。近年来,国内外研究热点集中于 SPN 菌外膜蛋白,这些蛋白是 SPN 菌重要的毒力因子。研究表明,肺炎球菌表面蛋白 A(*pneumococci surface protein A*, PspA)的 α -螺旋端是一个重要的抗原决定区域^[3],直接暴露在周围的环境中,虽有较大变异性,但在不同的血清型 SPN 中有广泛的同源性,是最有希望的疫苗候选抗原^[4]。根据该段氨基酸序列,PspA 蛋白被划分为 3 个家族(Family),再细分为 6 个支系(Clade)^[4]。由于绝大多数 SPN 菌 PspA 属于 、 两家族,系统地研究特定的 PspA 蛋白在 2 个家族的不同家族间、同一家族内、同一支系内的交叉免疫作用具有重要的意义,将为 PspA 蛋白作为疫苗成分,从而覆盖大部分菌型来限制 SPN 菌的免疫逃逸奠定重要基础。目前国内外的研究报导大都限于 PspA 蛋白对不同荚膜血清型 SPN 的保护作用,从 PspA 蛋白所属家族

及支系方面考察交叉保护作用的报导极少。对中国临床常见 SPN 的 PspA 所属家族及支系的鉴定也未见报道。

本工作从中国最常见的临床致病菌 FY6B、FY05、FY01、FY23F 和 FY19F 这 5 种亚型 SPN 中克隆 pspA 目的基因,构建 pET-pspA 重组质粒,在大肠杆菌中表达,并纯化得到 5 种上述 PspA 蛋白 N 端片段;对 5 种菌型 PspA 蛋白所属家族和支系进行鉴定;并进一步将 PspA 蛋白作为疫苗成分,考察不同家族不同支系间交叉反应性和对小鼠交叉保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌种、实验动物: SPN 菌 FY01、FY05、FY6B、FY19F 和 FY23F 由中国药品生物制品检定所提供。pET-27b(+)质粒和大肠杆菌 DH5 α 、BL21(DE3)购自 Novagen 公司。昆明鼠(KM),18 g~22 g,雌鼠,购自福建医科大学动物科。

1.1.2 试剂、耗材: PCR 引物由上海生工合成,核酸测序由 TaKaRa 完成。基因组提取试剂盒,质粒 DNA 小量纯化试剂盒,胶回收试剂盒,即用 PCR 扩增试剂盒,Protein Marker,Marker DL2000 购自 TaKaRa 公司;限制性内切酶 *Xho*、*Nco*, dNTPs、*Taq* DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠 IgG 免疫球蛋白(二抗)为厦门鹭隆公司产品;Ni₂NTA 柱为 Qiagen 公司产品;其它试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 目的基因片段的获得: 用基因组提取试剂盒从 5 种血清型 SPN 菌中提取基因组。根据文献[5],

合成了带有 *Xho*、*Nco* 酶切位点的 PCR 引物 PspA26(F) 和 PspA409(R), 进行目的基因的 PCR 扩增。

1.2.2 pET-PspA 重组质粒的构建及验证: 将 1.2.1 获得的 PCR 产物及 pET 质粒进行 *Xho* 和 *Nco* 双酶切处理, 酶切产物分别在 1.2% 和 0.8% 的琼脂糖凝胶上纯化回收。将双酶切处理的目的基因与 pET 线性载体片断进行酶连反应, 酶连产物转化感受态大肠杆菌 DH5 α , 涂布卡那霉素平板过夜培养, 随机挑选克隆至含卡那霉素的 LB 液体培养基中培养 12 h, 提取质粒进行 PCR 验证; 进一步挑取 PCR 验证阳性克隆双酶切验证。

1.2.3 重组蛋白的诱导表达及纯化: 从验证成功的重组菌 DH5 α 中提取重组质粒, 转化大肠杆菌 BL21(DE3), 筛选转化子。在 LB 液体培养基(含卡那霉素 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$)中培养 4 h 后加 1.5% 乳糖诱导 8 h, 离心收集菌体。超声波破碎离心得到的上清液经滤膜过滤, 调整 pH 至 8.0, 进行 Ni-NTA 亲和层析纯化, 采用咪唑溶液梯度洗脱, 分步收集洗脱液。SDS-PAGE 检测目标蛋白, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存目标蛋白溶液。

1.2.4 五种荚膜血清型 SPN 菌 PspA 的家族鉴定及支系鉴定: 1) PspA 所属家族鉴定: 根据文献合成了 PspA 家族特异性引物: 家族 LSM12/SKH63, 家族 LSM12/SKH52^[6,7]。以 5 种血清型 SPN 菌基因组为模板, 分别采用家族 和 家族 特异性引物进行 PCR。若以家族 引物扩增, 获得 1000 bp 产物, 即可鉴定为家族 ; 以家族 引物扩增, 获得 1200 bp 产物, 即可鉴定为家族 。 2) PspA 所属支系鉴定: 重组质粒测序, 得到目的基因的序列, 在 GenBank 数据库进行序列比对, 根据文献[2]中已报导的支系菌型, 从同源性较高的几种菌型推断 5 种荚膜血清型 SPN 菌 PspA 所属支系。

1.2.5 免疫学特性研究: 1) 不同免疫剂量及不同免疫次数的血清抗体效价测定: 取纯化获得的 FY01-PspA 重组蛋白, 用灭菌生理盐水稀释成 4 个浓度[2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 含 1/10 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 佐剂]。将 18 g~22 g 昆明小鼠随机分为 4 组, 每组 12 只, 分别以 0.5 mL/(只·次)的剂量腹腔注射上述 4 个浓度疫苗。空白组腹腔注射含 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 佐剂的生理盐水。一次免疫 14 d 后每组取 6 只小鼠眼眶采血; 另 6 只进行二次免疫, 14 d 后眼眶采血。离心获得抗血清。间接 ELISA^[8]测定抗体效价。 2)

Western blotting 检测交叉反应性: 以 0.5% 甲醛处理 2 h 后的 SPN 菌全菌腹腔注射小鼠, 5 d 后眼眶采血, 制备全菌抗血清; 采用 20 $\mu\text{g}/\text{只}$ 腹腔注射小鼠, 制备 FY01 重组蛋白抗血清; 按 1.2.3 方法分别制备 5 种重组菌菌体裂解液, 离心, 上清液在 10% SDS-PAGE 胶上分离后, 电转至硝酸纤维素薄膜, 丽春红染色检测电转效果。分别以全菌抗血清, FY01 重组蛋白抗血清, 空白小鼠血清作为一抗, 做 Western blotting。 3) 重组蛋白免疫小鼠对不同菌型 SPN 攻击的交叉保护作用: 以注射等量 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 佐剂的小鼠为空白对照, 观察 FY01 重组蛋白二次免疫后的小鼠抵抗 5 种菌型 SPN 攻击的情况: 二次免疫 2 周后腹腔注射 5 种菌型 SPN(血琼脂平板培养过夜后用一定生理盐水洗下, 均稀释至约 1.8×10^8 CFU/mL), 14 d 内观察存活情况, 分析平均存活时间及总存活率。采用 SPSS 13.0 统计软件对数据进行显著性分析。

2 结果与讨论

2.1 目的基因的克隆

分别以 5 种亚型 SPN 菌基因组为模板, 采用引物 PspA26(F) 和 PspA409(R) 进行 PCR 扩增。PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳^[8]。FY01 的 PCR 产物见图 1 泳道 2, 可观察到一条 1000 多 bp 的条带, 该基因片段编码 PspA 带有胆碱结合区第一个重复序列的 N 端 α -螺旋区。

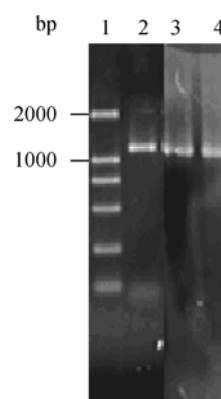


图 1 pET-pspA 重组质粒的 PCR 验证

Fig. 1 PCR products of gel recombinant vector pET-FY01rPspA

注: 1: DL2000 DNA marker; 2: 从基因组 PCR 扩增的目的基因; 3: 经双酶切处理的目的基因; 4: 重组质粒的 PCR 验证。

Note: 1: DL2000 DNA marker; 2: Target gene amplified from genome; 3: *PspA* gene digested with *Nco* I, *Xho* I; 4: Recombinant vector identification with PCR.

2.2 pET-pspA 重组质粒的构建及验证

对上述 PCR 产物进行双酶切时, 仅有两端的几个碱基被切除, 因此在电泳图中双酶切产物(图 1 泳道 3)与原 PCR 产物的位置相当。将 pET 质粒双酶切处理, 回收 5414 bp 的条带, 得到 pET 质粒双酶切线性载体。

经双酶切处理的载体与目的基因回收纯化后直接酶连, 酶连产物转化大肠杆菌。在含卡那霉素的平板上筛选转化子, 提取质粒, 进行 PCR 验证及双酶切验证。PCR 验证结果见图 1 泳道 4, 与泳道 2 条带位置相符。质粒的双酶切验证结果见图 2 泳道 3, 5000 多 bp 处和 1000 多 bp 处各有一条带, 对照同样双酶切处理的 pET 质粒, 新增 1000 多 bp 的目的基因条带。实验结果表明已成功构建重组质粒 pET-pspA。

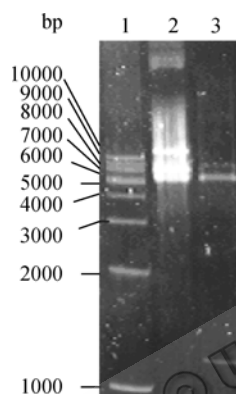


图 2 pET-pspA 重组质粒的双酶切验证

Fig. 2 Recombinant vector digested with *Nco* I, *Xho* I

注: 1: 1kb ladder; 2: pET 载体的双酶切产物; 3: 重组质粒的双酶切验证。

Note: 1: 1kb ladder; 2: pET igested with *Nco* I, *Xho* I; 3: Recombinant vector digested with *Nco* I, *Xho* I.

2.3 重组蛋白的诱导表达及纯化

诱导培养收集的菌泥按 1.2.3 方法得到的 5 种重组菌裂解液, 其 SDS-PAGE 电泳图见图 3(泳道 2~7)。与不含 *pspA* 目的基因的空载体菌体(泳道 1)相比, 5 种含 *pspA* 目的基因的重组菌均有明显的特异性新增高表达条带。实验表明, 5 种重组蛋白 FY01rPspA、FY05rPspA、FY6BrPspA、FY19FrPspA 和 FY23FrPspA 都得到高度表达, 其分子量范围在 60 kD~94 kD 之间。

pET-27b(+)带有 *pelB* 融合表达信号肽, 协助目的蛋白转运到细胞周质, 促进蛋白正确折叠; 转运

时信号肽被信号肽酶(SP)切除, 表达出来的蛋白为可溶性蛋白。通过 BandScan 软件扫描蛋白质电泳图, 计算得出重组蛋白 PspA 约占可溶解总蛋白的 62%。

重组蛋白带有 C 端 6-HIS 标签, 可以用 Ni-NTA 亲和层析柱分离纯化。其亲和原理主要是基于组氨酸上咪唑基团的电负性, 带有组氨酸标签的重组蛋白能以比较强的亲和性吸附在亲和凝胶。纯化后的 PspA 蛋白呈单一条带, 达到电泳纯。经亲和层析纯化后的重组蛋白 FY01-PspA 的电泳图见图 3 泳道 8。

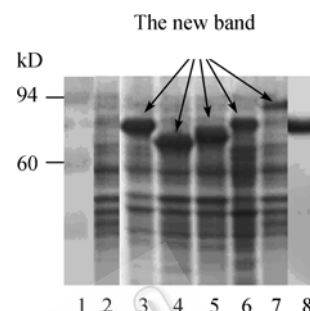


图 3 重组蛋白的 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 3 SDS-PAGE analyse of recombinant protein

注: 1: Marker; 2: 空载体菌体裂解液; 3: pET-FY01PspA 重组菌裂解液; 4: pET-FY05PspA 重组菌裂解液; 5: pET-FY6BPspA 重组菌裂解液; 6: pET-FY19PspA 重组菌裂解液; 7: pET-FY23FPspA 重组菌裂解液; 8: 亲和层析纯化的重组蛋白 FY01rPspA。

Note: 1: Marker; 2: Lysis solution of BL21 with pET; 3: Lysis solution of BL21 with pET-FY01PspA; 4: Lysis solution of BL21 with pET-FY05PspA; 5: Lysis solution of BL21 with pET-FY6BPspA; 6: Lysis solution of BL21 with pET-FY19PspA; 7: Lysis solution of BL21 with pET-FY23FPspA; 8: Purified FY01rPspA.

2.4 五种荚膜血清型 SPN 菌 PspA 的家族鉴定及支系确定

2.4.1 家族鉴定: 以 5 种荚膜血清型 SPN 菌的基因组为模板, 分别以 PspA 家族 和家族 的特异性引物进行 PCR。若以家族 特异性引物进行扩增, 获得 1000 bp 产物, 即可鉴定其 PspA 属于家族 ; 以家族 引物扩增, 获得 1200 bp 产物, 即可鉴定为家族 。PCR 产物的电泳结果见表 1, FY01、FY05、FY6B、FY19F 四种亚型在用家族 专属引物扩增时均发现 1000 bp 的产物, 在用家族 专属引物扩增时无明显条带, 由此推断 FY01、FY05、FY6B、FY19F 4 种亚型的 PspA 属于家族 。FY23F 在用家族 专属引物扩增时电泳结果无明显条带, 而用家族 专属引物扩增时发现在 1200 bp 处有条带, 推断 FY23F-PspA 属于家族 。

表 1 五种荚膜血清型 SPN 菌 PspA 的家族及支系鉴定
Table 1 Type identification of PspA from the five serotype

	FY01	FY05	FY6B	FY19F	FY23F
Products of PCR with Family I primers	1000 bp products	1000 bp products	1000 bp products	1000 bp products	
Products of PCR with Family primers					1200 bp products
Clade identification	支系 1	支系 2	支系 1	支系 1	支系 3

2.4.2 支系鉴定: 5 种重组质粒经测序后, 进行 Blast 分析, 根据已报道的不同家族不同支系 SPN 菌 PspA α -螺旋端的 DNA 序列的同源性比对, 即可进行 PspA 所属支系的鉴定。FY01pspA 与 DBL1 同源性达 94%, FY6BpspA 与 AC94pspA 同源性达 89%, FY19FpspA 与 BG8838 同源性达 99%, FY05pspA 与 DBL5 同源性达 98%, FY23FpspA 与 EF3296 同源性达 99%。参考文献[3], DBL1、AC94、BG8838 同属家族 支系 1, DBL5 属家族 支系 2, EF3296 属家族 支系 3。由此, 我国最主要的 5 种 SPN 菌所属支系的鉴定结果见表 1, FY01pspA、FY6BpspA、FY19FpspA 属于家族 支系 1; FY05pspA 属于家族 支系 2; FY23FpspA 属于家族 支系 3。

2.5 免疫原性及交叉反应性研究

2.5.1 不同免疫剂量血清抗体效价测定: 本工作重点研究了重组蛋白 FY01rPspA 的免疫原性与交叉反应性。按 1.2.5 方法 1 免疫小鼠, 制备抗血清, 并测定抗体滴度。将 P/N 值等于 2.1 时对应的抗体稀释倍数作为每只小鼠抗血清的抗体滴度, SPSS 软件统计分析同一个免疫剂量 6 只小鼠抗血清效价得到该免疫剂量下的抗体滴度。由图 4 可见, 重组蛋白具有较好的免疫原性, 同一个剂量下二次免疫抗体效价明显高于一次免疫。当免疫剂量小于 20 $\mu\text{g}/\text{只}\cdot\text{次}$ 时, 随着抗原剂量的加大, 抗体效价升高。而 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 剂量的抗原产生的抗体

效价大致相同。实验表明, 较佳的重组蛋白 FY01rPspA 的免疫策略为: 免疫二次, 每次免疫剂量为 20 $\mu\text{g}/(\text{只}\cdot\text{次})$ 。

2.5.2 Western blotting 检测交叉反应性结果: 1) FY01 重组蛋白抗血清对 5 种重组蛋白的交叉免疫反应性研究。

为考察 5 种重组蛋白间的交叉免疫反应情况, 我们以 FY01 重组蛋白在小鼠体内产生的抗血清为一抗, 做 Western blotting, 结果见图 5。对照图 a 各重组蛋白的位置, 图 b 在 FY01rPspA、FY6BrPspA、FY19FrPspA 位置处有较清晰的条带, 在 FY05rPspA、FY23FrPspA 处为空白。图 c 则无显示任何重组蛋白条带。表明 FY01 重组蛋白抗血清除可与自身免疫原 FY01 重组蛋白有较好的免疫反应性外, 对同属于 家族支系 1 的 FY6BrPspA、FY19FrPspA 两种重组蛋白也有较好的交叉免疫反应性, 而对属于不同家族的 FY23FrPspA, 乃至同家族不同支系的 FY05rPspA 无交叉反应。

2) 全菌抗血清对 5 种重组蛋白的交叉免疫反应性研究。

本工作将代表 3 个支系的 FY01、FY05、FY23F 全菌以适当的剂量腹腔注射小鼠, 分别制备 3 种抗血清。考察全菌抗血清对 5 种重组蛋白的交叉反应性。重组蛋白的相对位置见图 6a; 空白小鼠的抗血清与 5 种重组蛋白无反应(图 6b); 图 6c 表明 FY01

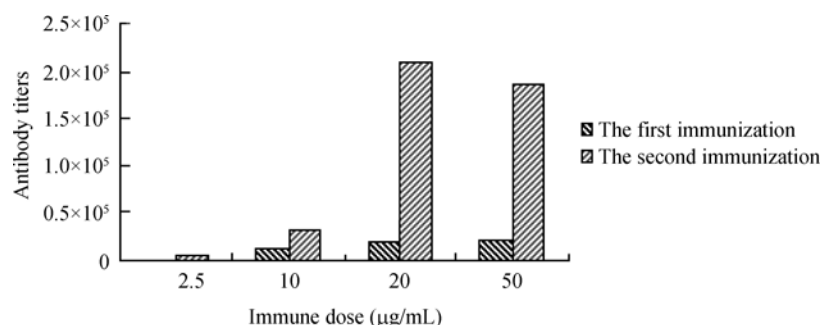


图 4 不同免疫剂量 rPspA 蛋白抗血清抗体滴度

Fig. 4 Antibody titers responded by rPspA with different doses

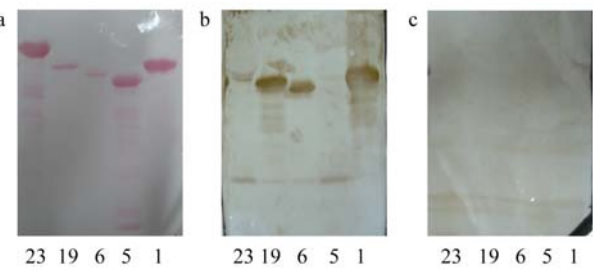


图 5 FY01 重组蛋白抗血清对五种重组蛋白的交叉免疫反应性

Fig. 5 Cross-immunoreaction of FY01rPspA antiserum with the five recombinant proteins

注: 1, 5, 6, 19, 23: FY01, FY05, FY6B, FY19F, FY23F; a: 转膜后丽春红染色; b: FY01 重组蛋白抗血清; c: 空白小鼠血清。

Note: 1, 5, 6, 19, 23: FY01, FY05, FY6B, FY19F, FY23F; a: Colouration with Ponceau S; b: FY01rPspA antiserum; c: Control antiserum.

全菌抗血清对属于支系 1 的 FY01rPspA、FY6BrPspA、FY19FrPspA 有较好的免疫反应性; 图 d 和 e 均表明, FY05 全菌抗血清, FY23F 全菌抗血清只能与自身的

PspA 产生免疫反应。实验结果表明: (1) PspA 的免疫交叉反应仅限于本支系, 此结论与 2.5.2 结论 1) 相符; (2) 重组 PspA 代替原菌天然 PspA 作为免疫原的可行性。

3) 动物交叉保护性实验

为了考察 FY01 重组蛋白产生的多克隆抗体抵抗不同菌型 SPN 感染的保护作用, 本工作在小鼠二次免疫 FY01rPspA 后, 分别用 5 种菌型 SPN 腹腔注射小鼠。14 d 内观察免疫组及各自对照组小鼠存活情况(14 d 不死的存活时间按 14 d 算)。

由表 2 可见, FY01rPspA 免疫的小鼠对于 FY6B 菌的攻击, 具有显著的保护作用, P 值小于 0.01, 免疫组全部存活且存活天数比空白组延长了 9 天; 对于 FY01 菌的攻击, 尽管存活天数及存活率与空白组相比都无显著的提高, 但仍显示出一定的保护作用; 对 FY05 及 FY23F 两种亚型的攻击, P 值均大于 0.05, 无显著差异, 且两者的存活率均为零, 未观察到明显的保护作用。



图 6 以全菌血清为一抗的免疫印迹

Fig. 6 Western blotting with antiserum against intact pneumonias

注: 1, 5, 6, 19, 23: FY01, FY05, FY6B, FY19F, FY23F; a: 丽春红染色; b: 空白小鼠血清; c: FY01 全菌抗血清; d: FY05 全菌抗血清; e: FY23F 全菌抗血清。

Note: 1, 5, 6, 19, 23: FY01, FY05, FY6B, FY19F, FY23F; a: Colouration with Ponceau S; b: Serum of control mice; c: Antiserum against intact FY01; d: Antiserum against intact FY05; e: Antiserum against intact FY23F.

表 2 FY01rPspA 免疫小鼠对不同亚型菌攻击的平均存活天数及存活率表			
Table 2 Protection against different serotypes immuned with FY01rPspA			
Attack serotypes	Groups	Mean survival time	Survival rate(%)
FY01	Control	1.00	0
	Immuned mice	2.25($P<0.01$)	0
FY05	Control	2.00	0
	Immuned mice	2.50($P>0.05$)	0
FY6B	Control	5.17	16.6
	Immuned mice	14.00($P<0.01$)	100
FY23F	Control	3.00	0
	Immuned mice	6.13($P>0.05$)	0

3 结论

1) 本工作首次从中国临床最常见的 5 种荚膜血清型肺炎球菌(FY01, FY05, FY6B, FY19F, FY23F) 中克隆得到编码具有免疫保护作用表位的 PspA 蛋白的基因片段。成功构建了 5 种重组质粒, 并在大肠杆菌中成功表达, 经纯化获得了 5 种高纯度重组蛋白。

2) 本工作首次鉴定了 PspA 蛋白所属家族及支系。FY01, FY6B, FY19FPspA 蛋白属于家族 支系 1, FY05PspA 蛋白属于家族 支系 2, FY23FPspA 蛋白属于家族 支系 3。

3) 重组蛋白抗血清免疫印迹实验表明, PspA 蛋白在同一支系内具有较好的交叉免疫反应性。全菌抗血清免疫印迹实验进一步表明交叉免疫反应性限于本支系, 同时表明重组蛋白代替天然蛋白作为免疫原的可行性。

4) 动物保护实验结果表明, FY01 重组蛋白仅对表达支系 1 PspA 蛋白的肺炎球菌亚型有较好的免疫保护作用。本研究结果为后续的高效疫苗的研发奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] 江山, 杨耀. 肺炎球菌疫苗的发展和现状. 上海预防医学杂志, 2006, 18(12): 640-642.
- [2] 张世勇. 健康儿童接种 7 价肺炎链球菌结合疫苗可减少该菌所致的疾病. 国外医学: 流行病学, 传染病学分册, 2002, 29(4): 253.
- [3] Hazeline Roche, Anders Ha kansson, Susan K Hollingshead, *et al.* Regions of PspA/EF3296 best able to elicit protection against *Streptococcus pneumoniae* in a murine infection model. *Infection and Immunity*, 2003, 71(3): 1033-1041.
- [4] Susan K Hollingshead, Robert Becker, David E Briles. Diversity of PspA: mosaic genes and evidence for past recombination in *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and Immunity*, 2000, 68(10): 5889-5900.
- [5] Dennis O Gor, Xuedong Ding, David E Briles. Relationship between surface accessibility for ppmA, psaA, and pspA and antibody-mediated immunity to systemic infection by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*, 2005, 73(3): 1304-1312.
- [6] Payne DB, A Sun, JC Butler, *et al.* PspA family typing and PCR-based DNA fingerprinting with BOX A1R primer of *pneumococci* from the blood of patients in the USA with and without sickle cell disease. *Epidemiol Infect*, 2005, 133: 173-178.
- [7] Maria Claudia Vela Coral, Nacxiry Fonseca, Elizabeth Castañeda, *et al.* Pneumococcal surface protein A of invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates from Colombian children. *Emerg Infect*, 2001, 7(5): 832-836.
- [8] 黄金钟. 肺炎球菌表面蛋白 A(PspA)及其荚膜多糖交联物的免疫原性和交叉保护作用. 生物化学与生物物理进展, 2008, 35(5): 536-539.
- [9] 林子琳. 肺炎球菌表面蛋白 A(PspA)的克隆表达及交叉免疫学特性研究. 福州大学硕士毕业论文, 2008.
- [10] Miyaji EN, Ferreira DM, Lopes APY, *et al.* Analysis of serum cross-reactivity and cross-protection elicited by-immunization with DNA vaccines against *Streptococcus pneumoniae* expressing PspA fragments from different clades. *Infect Immun*, 2002, 70(9): 5086-90.

栏目介绍

教学科研单位及成果展示

为了更好地宣传我国生命科学领域取得的成绩, 总结和交流我国微生物学研究和开发的新成果, 增强学术刊物与科研、教学和开发等各界同仁的广泛合作与联系, 共谋发展, 决定开设“教学科研单位及成果展示”栏目, 现诚邀有关单位参加。具体安排如下:

- 1、在《微生物学通报》显著位置开辟精美彩色专版, 刊登科研、开发、教学单位介绍, 展示科研成果、学科建设成就、生物技术新产品等, 图文并茂, 生动活泼, 每页内容要求: 图片 2~5 张, 文字 1000 字以内。
- 2、参加单位将获赠刊有本单位宣传内容的本期《微生物学通报》刊物 5 本; 获赠《微生物学通报》杂志全文检索数据光盘版(1974~2006)一张。
- 3、参加单位提供的简介、科研及教学成果、学科建设成就、新产品新技术展示、招生信息、人才引进及招聘启事、优秀人才推介等内容均可在本刊网站的“科研单位成果展示”等栏目免费发布一年, 并可将主页网址与我刊友情链接。
- 4、参加单位应保证宣传材料真实客观、数据翔实、文责自负, 来稿请加盖公章, 以示负责。
- 5、本栏目将适当收取版面制作及网页维护费。
- 6、本栏目联系方式:

联系电话: 010-64807336; 010-64807521

联系人: 武文 王 闯

电子信箱: gg@im.ac.cn