

猪链球菌 2 型 *mrp* 基因免疫功能片段的克隆、表达及动物试验

范红结¹ 陆承平^{1*} 唐家琪²

(¹ 南京农业大学 畜禽疫病诊断与免疫重点开放实验室 南京 210095)

(² 南京军区南京军事医学研究所 南京 210002)

摘 要 根据猪链球菌 2 型 (*Streptococcus suis* type 2) 国外分离株的溶菌酶释放蛋白 (Muramidase-released protein, MRP) 的基因序列, 设计并合成一对引物, 利用 PCR 技术扩增了江苏分离株的开放阅读框 298 ~ 827bp 间 529bp 的基因片段, 并定向克隆至 pET-32a(+) 表达载体中。重组质粒经限制性酶切鉴定和测序, 转化至大肠杆菌 BL21, 经 IPTG 诱导, 可表达分子量约 42kD 的蛋白。经过镍亲和层析柱层析, 获得纯化的重组蛋白。以重组蛋白免疫 Balb/c 小鼠, 以 5 LD₅₀ 猪链球菌强毒株攻击后小鼠的相对存活率达 62.5%。证实所表达的 MRP 片段为重要的保护性抗原。

关键词 猪链球菌 2 型, *mrp* 基因, 克隆, 免疫原性

中图分类号 S852 文献标识码 A 文章编号 0001-6209(2004)01-0054-04

猪链球菌 (*Streptococcus suis*) 可引起猪的脑膜炎、关节炎以及败血症等疾病, 并可致青年猪猝死^[1,2]。该菌亦可引起人类的感染, 导致脑膜炎等严重疾患^[3], 是一种重要的人兽共患病的病原体。猪链球菌共分为 35 个血清型^[4~6], 其中猪链球菌 2 型呈全球分布, 且临床分离的比例最高。在猪链球菌 2 型中, 存在强毒、弱毒以及无毒 3 种不同毒力的菌株^[7,8]。强毒株与无毒株的最大差别是前者呈 MRP⁺, 而后者呈 MRP⁻。MRP⁺ 的猪链球菌往往可引起严重的临床症状, MRP⁻ 的菌株则不致任何症状, 可见 MRP 是该菌重要的毒力因子^[9]。对该病的致病机理目前仍缺乏足够的认识, 国内外迄今亦未有高效的疫苗来防制该菌引发的猪链球菌病。本实验克隆了 *mrp* 基因的功能片段, 并研究其表达蛋白结构和功能, 以丰富对该菌致病机理的认识, 进而为制备控制该病的高效亚单位疫苗提供有益的数据。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

猪链球菌 2 型 (*Streptococcus suis* type 2) HA9801 由本室姚火春等^[10]从病猪分离、鉴定; 猪链球菌 2 型 SS2-D 由江苏农业科学院兽医研究所何孔旺研究员惠赠; A 群链球菌 (*Streptococcus group A*) 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 以及大肠杆菌 DH5 α 、

BL21、表达载体 pET-32a(+) 由本实验室保存。攻击用菌株为 SS2-D, 其对 Balb/c 小鼠的半数致死量为 2.0×10^6 CFU^[11]。

1.2 酶和试剂

Sac I 和 *Hind* III 等限制性内切酶以及 *Taq* 酶、dNTPs 等 PCR 所用试剂均为宝生物工程 (大连) 有限公司产品; 质粒抽提试剂盒、QIAGEN 镍亲和层析柱为 QIAGEN 公司产品; DNA 回收试剂盒为 Roche 公司产品; 弗氏完全佐剂及弗氏不完全佐剂为 Sigma 公司产品; Amp 为南京第一制药厂产品。

1.3 PCR 引物设计

根据所要扩增的片段, 设计一对引物, 引物两端分别添加 *Sac* I 和 *Hind* III 酶切位点和保护性碱基, 引物 P1 和 P2 可扩增猪链球菌 2 型 MRP 基因开放阅读框 (ORF) 298 ~ 827bp 间 529bp 的片段。上述引物由宝生物工程 (大连) 有限公司合成。引物序列分别为: 上游引物 P1: 5'-GTAGAGCTCGAACAGGTAA-CATCAGA-3'; 下游引物 P2: 5'-CAGAAGCTTAAGAG-TAACGAATGTAGG-3'。

1.4 PCR 扩增

按下列顺序和条件依次加入各反应物并进行 PCR 扩增。HA9801 模板 DNA 2 μ L, 10 \times buffer 10 μ L, 25mmol/L MgCl₂ 8 μ L, 2.5 mmol/L dNTPs 8 μ L, 引物 P1 和 P2 (0.1 μ mol/L) 各 1 μ L, ddH₂O 68 μ L, *Taq* 酶

基金项目: 国家 973 项目子课题 (G1999011906)

* 通讯作者。Tel/Fax: 86-25-4396517; E-mail: lucp@njau.edu.cn

作者简介: 范红结 (1968 -), 男, 安徽望江人, 讲师, 在职博士生, 主要从事兽医微生物与免疫学研究。E-mail: fhj-68@sohu.com

收稿日期: 2003-04-14, 修回日期: 2003-09-02

(5U/ μ L) β μ L。扩增的条件为 :94℃ 5min ;94℃ 30s , 55℃ 30s ,72℃ 60s ,30 个循环 ,72℃ 10min。

1.5 PCR 产物的回收和酶切

PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶电泳 ,后以 DNA 回收试剂盒回收目的片段 ,并以 *Sac* I 和 *Hind* III 酶切 2h ,65℃ 15min 终止反应。

1.6 重组质粒的构建和鉴定

在含有 100 μ g/mL Amp 的 LB 肉汤中接种携带 pET-32a(+)空质粒的 DH5 α 大肠杆菌单菌落 ,37℃ 摇瓶培养 12 ~ 16h ,以质粒抽提试剂盒抽提质粒 ,*Sac* I 和 *Hind* III 双酶切后 ,以 DNA 回收试剂盒回收酶切产物。将 PCR 双酶切回收产物与空质粒双酶切回收产物进行连接 ,并转化感受态的 DH5 α 宿主菌。感受态细菌的制备、转化均按常规方法进行^[11] ,利用 Amp 的抗性和限制性内切酶进行重组菌的筛选和鉴定。

1.7 重组质粒的测序和序列分析

重组质粒的序列测定采用 Sanger 双脱氧末端终止法^[12] ,由宝生物工程(大连)有限公司完成 ,以验证其阅读框架 ,并以 BLAST 软件进行同源性分析。

1.8 重组质粒在大肠杆菌中的表达和纯化

将重组质粒按常规方法转化感受态的大肠杆菌 BL21 ,利用 Amp 抗性筛选重组菌 ,挑单菌落接种 LB 肉汤中(含 100 μ g/mL Amp) ,37℃ 剧烈摇瓶培养 2 ~ 4h ,当菌液浓度达 A_{600} 0.5 ~ 0.6 时 ,加 IPTG 至终浓度 1mmol/L ,37℃ 继续剧烈摇瓶培养 2 ~ 4h。6000r/min 离心 5min ,沉淀以 pH7.2 10mmol/L 的 PBS 洗涤 3 次 ,加等体积的电泳上样缓冲液煮沸 10min ,SDS-PAGE 检测。含空 pET-32a(+)的大肠杆菌 BL21 亦同样经 IPTG 诱导处理后 ,SDS-PAGE 检测表达情况。以超声波破碎诱导的重组菌 ,收集上清 ,以 QIAgen 镍亲和层析柱进行亲和层析 ,具体步骤按使用说明书进行。

1.9 重组蛋白动物免疫试验

将收集的重组蛋白以 pH7.2 10mmol/L 的 PBS 分别稀释至 800 μ g/mL、400 μ g/mL 和 100 μ g/mL ,加入等量的弗氏完全佐剂 ,腹腔免疫 Balb/c 小鼠(购自南京军区总医院实验动物中心 ,约 8 周龄) ,0.2mL/只 ;3 周后以同样浓度的弗氏不完全佐剂加强免疫 ,2 周后以 5 LD_{50} 的 SS2-D 菌株进行攻击^[13]。同时设立全菌免疫对照组和空白对照组。免疫攻击保护效率以相对存活率^[14]表示 :相对存活率(Relative percent survival ,RPS)% = 100% \times (1 - 免疫组发病率)/对照组发病率。

2 结果

2.1 PCR 结果

PCR 产物经电泳后 ,出现一条约 550bp 的条带 ,大小与预期一致 ,而对照的猪链球菌 2 型、A 群链球菌及金黄色葡萄球菌抽提的全菌 DNA 模板均未扩增出条带。

2.2 重组质粒的鉴定

MRP 基因片段经回收 ,以 *Sac* I 和 *Hind* III 酶切位点定向克隆至 pET-32a(+)中 ,获得重组质粒 ,命名为 pET-32a(+)529。重组质粒转化感受态的 DH5 α 宿主菌 ,经 Amp 抗性筛选得到重组菌。提取重组质粒 ,经 *Sac* I 和 *Hind* III 双酶切 ,得到 5900bp 和 550bp 左右的片段 ,说明 *mrp* 片段已成功克隆。

2.3 重组质粒的表达

重组 BL21 转化菌经 IPTG 诱导后 ,菌体 SDS-PAGE 显示有一 42kD 的蛋白带 ,表达量占菌体总蛋白的 32% ,而含 pET-32a(+)空载体的 BL21 菌在该处无特异条带(图 1)。

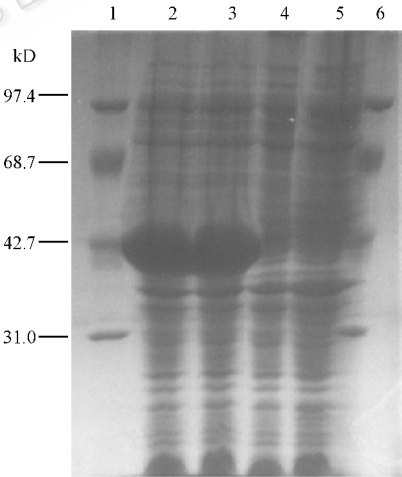


图 1 表达产物 SDS-PAGE

Fig.1 SDS-PAGE of expression products

1 6. Protein molecular weight marker ;2 3. *E. coli* BL21 harboring pET-32a(+)529 induced by IPTG ;4. *E. coli* BL21 harboring pET-32a(+) ;5. *E. coli* BL21 harboring pET-32a(+)529 before induced by IPTG.

2.4 测序结果和序列分析

克隆的序列长度经测序为 529bp ,经用 DNA star 和 BLAST 软件进行同源性分析 ,其与已发表的猪链球菌 2 型 D₂₈₂ 株的 *mrp* 高度同源 ,仅有一个碱基(对应于 *mrp* 基因的 608 位碱基)不同 ,HA9801 株为 T ,D₂₈₂ 株为 C ,编码的氨基酸 HA9801 为 F ,D₂₈₂ 株为 L ,构建质粒未出现移码现象。

2.5 重组蛋白免疫效力

经 QIAgen 镍亲和层析柱层析获得纯化的 *mvp* 基因片段所表达的重组蛋白,浓度达2.65mg/mL,以 PBS 稀释后,分别加弗氏完全和不完全佐剂免疫后,以 5LD₅₀ SS2-D 菌株攻击,小鼠的相对存活率达 62.5%(表 1)。

表 1 重组蛋白的免疫保护效力试验
Table 1 Immune protective efficiencies of recombinant protein against SS2-D

Immunogen	Inoculate dose	Number of mice	Challenge dose/ × 10 ⁷	Number of death	RPS/ %
Recombinant protein	80μg/One mice	10	1.0	5	62.5
Recombinant protein	40μg/One mice	10	1.0	5	62.5
Recombinant protein	20μg/One mice	10	1.0	6	50
HA9801	5 × 10 ⁷ CFU	10	1.0	2	100
CK		10	1.0	8	

3 讨论

MRP 作为猪链球菌 2 型菌体表面的蛋白,分子量为 136 kD,其结构和分布复杂,纯化完整的蛋白十分困难,因而研究其结构和功能更是难上加难。Hilde E 等^[9]将 MRP 完整基因克隆至大肠杆菌宿主菌中,并表达一种分子量与 MRP 相等的蛋白。但表达量相当低,无法得到足够的蛋白以进行研究,究其原因,可能是高水平表达 MRP 对大肠杆菌宿主菌有毒性作用。

Signas C 等^[15]克隆了 MRP 一段基因,表达的蛋白为 619 至 985 氨基酸的片段,发现其与金黄色葡萄球菌的纤维素结合蛋白的功能很相似,而 MRP 其它的功能区的基因未见克隆和表达。欧瑜等^[16]首次克隆了江苏分离株 HA9801 *mvp* 基因 750 ~ 1634bp 的片段,并进行了原核表达,通过免疫印迹分析,表达蛋白表面有 MRP 抗体结合表位,但对于是否是 MRP 的功能片段,未作深入研究。本试验根据软件分析结果,克隆了 HA9801 株 *mvp* 基因的 298 ~ 827bp 间 529bp 片段,表达的蛋白具有保护性抗原的功能,提示该片段可能为 MRP 重要的功能区。

豚鼠、BALB/C 小鼠、家兔对猪链球菌 2 型有一定的敏感性^[17]。本试验选用 Balb/c 小鼠为动物模型,空白对照组有 80% 小鼠死亡。选用相对存活率 (RPS) 代替免疫保护率,更能反映重组蛋白的实际免疫保护效果^[13],因为免疫保护率只是反映免疫组的攻击存活率,而相对存活率除反映免疫组的攻击

存活率外,还反映了对照组的发病率,像猪链球菌 2 型发病致死率达不到 100% 的这类细菌,相对存活率的值大于免疫保护率,更能反映实际的免疫保护效果。

MRP 与马链球菌表面的类 M 蛋白、G 群链球菌 G 蛋白、金黄色葡萄球菌的 A 蛋白、化脓链球菌的 M6 蛋白,除信号肽区和 C 端锚定区域有同源性外,其余部位无氨基酸同源性^[18]。但与 A 群链球菌 M 蛋白一样,MRP 具有抗吞噬、粘附以及调理素等功能,故将 MRP 列为类 M 蛋白之列^[19]。*mvp* 基因完整的 ORF 有 3657bp,本试验克隆的基因片段位于近 ORF 的起始部位,编码的氨基酸位于 MRP 的 N 端,根据马链球菌表面的类 M 蛋白的结构分析^[18],推测本试验表达的蛋白可能在调理素的功能区域内。

参 考 文 献

[1] Clifton-Hadley F A. *Streptococcus suis* type 2 infections. *Br Vet J*, 1983, **139**: 1 - 5.

[2] Vecht U L, Van Leengoed M G, Verheyen R M. *Streptococcus suis* infections in pigs in The Netherlands (part one). *Vet Q*, 1985, **7**: 315 - 321.

[3] Arends J P, Zanen H C. Meningitis caused by *Streptococcus suis* in humans. *Rev Infect Dis*, 1988, **10**: 131 - 137.

[4] Gottschalk M, Higgins R, Jacques R. Description of 14 new capsular types of *Streptococcus suis*. *J Clin Microbiol*, 1989, **27**: 2633 - 2636.

[5] Gottschalk M, Higgins R, Jacques M, et al. Characterization of six new capsular types (23 - 28) of *Streptococcus suis*. *J Clin Microbiol*, 1991, **29**: 2590 - 2594.

[6] Higgins R, Gottschalk M, Henrichsen J. Description of six new capsular type (29 - 34) of *Streptococcus suis*. *J Vet Diagn Investig*, 1995, **7**: 405 - 406.

[7] Vecht U, Wissclink H J, Jellema M L, et al. Identification of two proteins associated with virulence of *Streptococcus suis* type 2. *Infect Immun*, 1991, **59**: 3156 - 3162.

[8] Vecht U, Wisselink H J, Van Dijk J E, et al. Virulence of *Streptococcus suis* type 2 strains in newborn germfree pigs depends on phenotype. *Infect Immun*, 1992, **60**: 550 - 556.

[9] Smith Hilde E, Vecht Uri, Gielkens Arno L J, et al. Cloning and nucleotide sequence of the gene encoding the 136-KD surface protein (Muramidase-released protein) of *Streptococcus suis* type 2. *Infect Immun*, 1992, **60**: 2361 - 2367.

[10] 姚火春,陈国强,陆承平. 猪链球菌 1998 分离株病原特性鉴定. *南京农业大学学报*, 1999, **22**(2): 67 - 70.

[11] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory press, 1989.

[12] Sanger F, Nicklen S, Coulson A R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **74**: 54 - 64.

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

- [13] 王继春,何孔旺,何家惠,等. 猪链球菌 2 型对小鼠的致病性. 中国兽医科技, 2001, **31**(8) : 27 - 29.
- [14] Ellis A E. Fish vaccination. ACADEMIC PRESS, London, 1988.
- [15] Signas C, Raucci G, Jonsson K, *et al.* Nucleotide sequence of the gene for a fibronectin-binding protein from *S. aureus*: use of this peptide sequence in the synthesis of biologically active peptide. *Proc Natl Acad Science USA*, 1989, **86**: 699 - 703.
- [16] 欧瑜,陆承平. 猪链球菌 2 型溶菌酶释放蛋白基因片段的克隆与表达. 农业生物技术学报, 2002, **10**(1) : 72 - 75.
- [17] Vecht U, Stockhorst-Zurwieden N, Tetenburg B J, *et al.* Virulence of *Streptococcus suis* type 2 for mice and pig appeared host-specific. *Vet Microbiol*, 1997, **58**(1) : 5360.
- [18] John F T, John W, Mei Z, *et al.* Cloning and sequencing analysis of a protective M-like protein gene from *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. *Infect Immun*, 1995, **63**: 1440 - 1445.
- [19] Pancholi V, Fischetti V A. Major surface protein on group A *streptococci* is a glyceraldehydes-3-phosphate-dehydrogenase with multiple binding activity. *J Exp Med*, 1992, **176**: 415 - 426.

Cloning, Expression and Animal Experiment of the Immunopotential Fragment of *mrp* Gene from *Streptococcus suis* type 2

FAN Hong-Jie LU Cheng-Ping* TANG Jia-Qi

(Key Laboratory of Animal Disease Diagnosis and Immunology, Ministry of Agriculture Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract : *Streptococcus suis* type 2 infections are a common cause of septicemia, arthritis, meningitis and sudden death in young pigs. During the last few years, *S. suis* type 2 infections had become a obvious problem in China, and a pathogenic *S. suis* type 2 strain named HA9801 was isolated in Jiangsu Province in 1998. The strain produced both muramidase-released protein (MRP) and extracellular protein (EF). The nucleotide sequence analysis showed that the *mrp* gene had high homology between HA 9801 and other reported isolates. The 529bp sequence of *mrp* gene was amplified from genomic DNA of *Streptococcus suis* type 2 strain HA9801 by polymerase chain reaction (PCR). Then the amplified fragment encoding the putative antigenic epitopes was cloned in the proper orientation into the site between *Sac* I and *Hind* III of pET32-a(+) via restriction endonuclease *Sac* I and *Hind* III. The recombinant plasmid was verified by restriction endonuclease analysis and nucleotide sequencing, and it was transformed into its host *E. coli* strain BL21, a recombinant protein of 40kD was highly expressed after induced by IPTG and purified by Ni-nitrilotriacetic acid affinity chromatography. The Balb/c mice were immunized with the purified recombinant protein and the 62.5% of mice were survival after challenge with *Streptococcus suis* type 2 strain SS₂-D. It demonstrated that the recombinant protein was a protective antigen and maybe a critical functional fragment of MRP. The recombinant protein locates the N-terminus of MRP, and the MRP function is similar to the M proteins of group A *Streptococci*. It suggested that the recombinant protein may locates the opsonogenic functional region, since the N-terminus of the mature M protein had opsonogenic activity.

Key words : *Streptococcus suis* type 2, *mrp* gene, Cloning, Immunogenicity