

马链球菌兽疫亚种类 M 蛋白的基因克隆、序列分析 及其在猪源链球菌的检测

范红结 陆承平* 唐家琪

(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)

摘 要 根据已发表的马链球菌兽疫亚种(*Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*)马源株的类 M 蛋白基因序列,设计并合成一对引物,以兽疫亚种猪源 ATCC35246 株的基因组 DNA 为模板,通过 PCR 技术,扩增出类 M 蛋白基因并定向克隆至表达载体 pET-32a(+)中,测定其序列,GenBank 接收号为 AY263781。类 M 蛋白基因含一个完整的开放阅读框,全长为 1137bp,编码 379 个氨基酸残基。经 DNA Star 软件分析,ATCC35246 株类 M 蛋白基因与兽疫亚种马源 W60 株、马亚种的类 M 蛋白基因及 A 群化脓链球菌的 M 蛋白基因的同源性分别为 86.9%、30.8%、29.4%;推导的氨基酸序列的同源性分别为 84.3%、21.9%、23.4%。但 ATCC35246 株类 M 蛋白的 C 末端细胞膜锚定区与 M 蛋白、马亚种类 M 蛋白高度同源。用上述设计的引物进行 PCR 试验,检测 34 株猪源链球菌类 M 蛋白基因,发现所有 16 株 C 群猪源链球菌均能检测出类 M 蛋白基因,而所有猪链球菌(*Streptococcus suis*)1 型和 2 型菌株及 S 群、B 群、D 群链球菌共 13 株均不能检出类 M 蛋白基因,而 5 株未鉴定的猪源链球菌中 3 株能检测出类 M 基因。

关键词: 马链球菌兽疫亚种, 类 M 蛋白基因, 克隆, 检测

中图分类号: S852 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2004)05-0617-04

马链球菌兽疫亚种(*Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*)为兰氏分群中的 C 群链球菌,主要引起马、猪、牛、狗、猫等多种动物下呼吸道感染,并引起败血症、脑膜炎、关节炎等症状^[1]。人与发病动物接触或食用该菌污染的食品,亦可发病,因此该菌为一种重要的人兽共患病的病原^[2]。马链球菌兽疫亚种引起的动物疫病呈世界性分布,但不同区域流行又有各自的特点。欧美等地该病多发生于马、奶牛、羊等动物,而我国主要是在猪群中流行^[3-5]。类 M 蛋白为该菌重要的毒力因子及主要的保护性抗原,国外进行的研究仅限于兽疫亚种马源菌株^[6],对于兽疫亚种猪源类 M 蛋白及其基因的研究未见报道。本试验用 PCR 方法扩增了兽疫亚种猪源 ATCC35246 株类 M 蛋白基因,并进行了克隆和序列测定,分析比较了马源和猪源兽疫亚种类 M 蛋白基因结构和功能的特点,为该病的防制提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

马链球菌兽疫亚种 ATCC35246 株,1977 年分离自我国四川,由 ATCC 收藏;猪链球菌 2 型(*Strepto-*

coccus suis type 2)HA9801 由本室姚火春等从病猪分离、鉴定;金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)禽源大肠杆菌(*Escherichia coli*)O1、大肠杆菌 DH5 α 、BL21、表达载体 pET-32a(+)由本实验室保存。其它马链球菌兽疫亚种及待检菌株均由本实验室保存,来源见表 1。

表 1 34 株猪源链球菌分离株类 M 基因的检测

Table 1 The results of detection of M-like protein gene in 34 *Streptococcus* isolated strains from pigs

NO.	Strain	Source	Serotype	M-like gene
1	ATCC35246	Sichuan	C	+
2	C55126	CVDC	C	+
3	C7463	CVDC	C	+
4	ST171	Guangdong	C	+
5	Sh006431-B1	Shanghai	C	+
6	Sh0016	Shanghai	C	+
7	CW03	Anhui	C	+
8	C166	CVDC	C	+
9	C126	CVDC	C	+
10	C127	CVDC	C	+
11	CY	Jiangsu	C	+
12	CC	Beijing	C	+
13	CT	Hunan	C	+
14	CP-0104	Fujing	C	+

基金项目: 国家 973 项目 (G1999011906)

* 通讯作者。Tel/Fax: 86-25-84396517; E-mail: lucp@njau.edu.cn

作者简介: 范红结 (1968 -) 男, 安徽望江人, 副教授, 博士, 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: 2004-01-06, 修回日期: 2004-04-28

续表 1

NO.	Strain	Source	Serotype	M-like gene
15	CXY012	Henan	C	+
16	CG-74-63	Guangxi	C	+
17	HA9801	Jiangsu	R	-
18	HA9802	Jiangsu	R	-
19	HA9803	Jiangsu	R	-
20	RG9901	Jiangsu	R	-
21	RG9902	Jiangsu	R	-
22	SS2D	Germany	R	-
23	SH006444	Shanghai	R	-
24	SH006653	Shanghai	R	-
25	SH006708	Shanghai	R	-
26	BJ9901	Beijing	R	-
27	SH006746	Shanghai	ND	+
28	SH00461	Shanghai	ND	+
29	SH000470	Shanghai	S	-
30	SH00002	Shanghai	B	-
31	SH00005	Shanghai	D	-
32	Z020	Guangdong	ND	+
33	BL02	Guangdong	ND	-
34	PT 02	Fujian	ND	-

ND :Not differentiable.

1.2 酶和试剂

*Bam*H I、*Sac* I 等限制性内切酶,为纽英伦生物工程公司产品; *Taq* 酶、dNTPs 等 PCR 所用试剂均为 TaKaRa 公司产品; DNA 快速纯化回收试剂盒为 Roche 公司产品; 质粒提取试剂盒为 QIAGEN 公司产品; Amp 为南京第一制药厂产品。

1.3 引物设计和 PCR 扩增

按已发表的兽疫亚种类 M 蛋白基因的序列^[8], 利用 DNASTar 软件自行设计一对引物, 用时在引物两边分别添加 *Bam*H I 和 *Sac* I 酶切位点和保护性碱基, 引物 p₁、p₂ 可扩增兽疫亚种类 M 基因完整的开放阅读框(ORF)。引物由 TaKaRa 公司合成, 引物序列分别为: 上游引物(p₁): 5'-AAGGATCCAAGG-GAATAAAATGGCAAA-3'; 下游引物(p₂): 5'-CGAAGCTTGCTTTACCACTGGGGTAT-3'。PCR 扩增反应体系: ATCC35246 株模板 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 各 1 μ L, ddH₂O 68 μ L, *Taq* 酶 3 μ L, 混匀。扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 5min; 94 $^{\circ}$ C 30s, 57 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 60s, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 10min。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 *Bam*H I 和 *Sac* I 酶切 2h, 65 $^{\circ}$ C 15min 终止反应。

1.4 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 $^{\circ}$ C 振荡培养 12~16h, 以质粒抽提试剂盒抽提质粒,

*Bam*H I 和 *Sac* I 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^[7]。利用 Amp 的抗性和限制性内切酶进行重组菌的筛选和鉴定。重组质粒的序列测定采用 Sanger 双脱氧末端终止法^[8], 由 TaKaRa 公司完成, 以验证其阅读框架, 同时以 BLAST 软件进行同源性分析。

1.5 类 M 蛋白基因和推导的氨基酸序列分析

将测序结果与 GenBank 中已知兽疫亚种马源株、马亚种的类 M 蛋白基因序列及 A 群链球菌 M 蛋白基因序列进行同源性分析, 并对推导的类 M 蛋白氨基酸序列进行比较。

1.6 类 M 基因在 BL21 中的表达

将含重组质粒的大肠杆菌 BL21 接种 LB 肉汤, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 3~4h, 至 OD 值为 0.5~0.6 时, 加入 IPTG 至终浓度 1mmol/mL, 继续剧烈振荡培养 3~4h, 离心沉淀, 加 SDS-PAGE 缓冲液煮沸 10min, 含 pET-32a(+)空质粒的 BL21 按同样方法处理。最后进行 SDS-PAGE。

1.7 猪源链球菌类 M 蛋白基因的检测

将本室保存 34 株猪源链球菌(表 1)按文献[9]的方法提取模板 DNA, 通过 PCR 扩增类 M 蛋白基因, 检测猪源链球菌类 M 蛋白基因表达情况。

2 结果

2.1 PCR 扩增结果

PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后, 出现一条 1150bp 左右的条带, 大小与目的基因一致, 对照组猪链球菌 2 型、金黄色葡萄球菌、禽源大肠杆菌均未扩出目的条带。

2.2 重组质粒的鉴定

PCR 扩增的 ATCC35246 株类 M 基因经酶切、纯化后, 以 *Bam*H I 和 *Sac* I 酶切位点定向克隆至 pET-32a(+)载体, 得到重组质粒, 命名为 pET-32a(+)-ML。重组质粒转化 DH5 α 大肠杆菌宿主菌, 经 Amp 抗性筛选得到重组菌。提取重组质粒, 经 *Bam*H I 和 *Sac* I 双酶切, 均得到大小约 5900 和 1150bp 的片段, 表明类 M 基因已成功克隆。以重组质粒 pET-32a(+)-ML 为材料进行序列测定, 测序结果经网上 BLAST 软件比较证实该基因为马链球菌兽疫亚种类 M 蛋白基因, 含一个开放阅读框, 大小为 1137bp, GenBank 登录号为 AY263781。

2.3 类 M 蛋白基因核酸和推导的氨基酸序列分析

利用 DNASTar 软件对类 M 基因序列与已发表的相应基因序列进行比较发现,ATCC35246 株的类 M 蛋白基因与兽疫亚种马源 W60 株类 M 蛋白基因、马亚种类 M 蛋白基因、A 群链球菌 M 蛋白基因的同源性分别为 86.9%、30.8%、29.4%。与 W60 株类 M 蛋白基因相比,ATCC35246 株的类 M 蛋白基因在 ORF 125bp 处缺失了 CGG 3 个碱基,在 840bp 处插入了 TGAGCCAAAACC 12 个碱基。ATCC35246 株类 M 蛋白基因推导的氨基酸序列与 W60 株类 M 蛋白、马亚种类 M 蛋白、A 群链球菌 M 蛋白的氨基酸同源性分别为 84.3%、21.9%、23.4%。与 W60 株类 M 蛋白氨基酸序列相比,ATCC35246 株类 M 蛋白氨基酸

的变异主要集中在 27~47、120~147 和 168~178 位氨基酸残基之间。

2.4 类 M 蛋白基因的表达

重组菌经 IPTG 诱导后,SDS-PAGE 检测,类 M 蛋白基因在 BL21 中未见表达。不能表达的原因可能是,类 M 蛋白是革兰氏阳性菌的非菌毛黏附素,不适合革兰氏阴性的大肠杆菌 BL21 表达。

2.5 猪源链球菌类 M 蛋白基因检测

所有的 16 株猪源 C 群链球菌均能检测出类 M 蛋白基因,其余 13 株 S 群、D 群、B 群、猪链球菌 2 型、猪链球菌 1 型均不能检出该基因,而 5 株从疑似患链球菌病的病猪体内分离的链球菌中,有 3 株能检测出类 M 基因(表 1,图 1)。

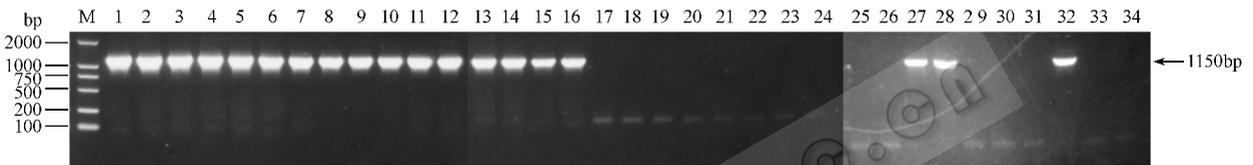


图 1 猪源链球菌类 M 蛋白基因 PCR 检测

Fig.1 The detection of M-like protein gene of pig origin streptococci

3 讨论

类 M 蛋白是马链球菌兽疫亚种重要的毒力因子,研究其结构和功能十分必要。Timoney 等^[6]曾克隆了兽疫亚种马源 W60 株的类 M 蛋白基因,并对其结构和功能进行了分析,但马链球菌兽疫亚种猪源株的类 M 蛋白基因的结构和功能未见报道。马链球菌马亚种类 M 蛋白保守^[10],而马链球菌兽疫亚种 M 蛋白则易变异,不同来源菌株之间抗原性变异较大^[6,10]。本实验以我国猪群中广泛流行的马链球菌兽疫亚种猪源 ATCC35246 株为研究对象,克隆其类 M 蛋白基因,并对其结构和功能进行分析,在国内外尚未见报道。

链球菌表面蛋白的典型特征之一是具有信号肽,C 末端均有锚定区,并具有高度保守的 LPSTGE 的基序。从 ATCC35246 株克隆的类 M 基因推导的氨基酸具有链球菌表面蛋白的典型特征,信号肽的长度是 33 个氨基酸残基,与马链球菌兽疫亚种 W60 株类 M 蛋白(Szpw60)信号肽相比,信号肽末端有 4 个氨基酸发生了突变,与其它链球菌表面的类 M 蛋白相比,信号肽序列相对较短^[6,11],而与链球菌其它一些蛋白如链球菌素 O 和 G 蛋白的信号肽序列相似^[12]。Timoney 等^[6]认为,Szpw60 信号肽的缺失提

示 Szpw60 可能与 A 群链球菌的 M 蛋白关系并不十分密切,有可能是来源于具有调理素活性的一种前体蛋白。

Fischetti 等^[11]认为马链球菌兽疫亚种 W60 株类 M 蛋白与 A 群链球菌 M 蛋白最大的差别在于,其 N 末端缺少 A 和 B 的重复区域,而在 C 末端缺少 C 重复。同为链球菌,兽疫亚种感染宿主动物范围广泛,而 A 群链球菌更适于感染灵长类动物,原因可能与此有关,从 ATCC35246 类 M 基因推导的氨基酸序列分析,亦缺少此类重复。从 GenBank 中比较与 ATCC35246 株类 M 基因的同源性,除 W60 株外,未发现其它基因同源。但类 M 蛋白的 C 末端膜锚定区的氨基酸残基(342~376)却显示了与 A 群链球菌 M 蛋白及链球菌表面其它蛋白极高的同源性。与其它膜表面蛋白一样,ATCC35246 株 C 端锚定区亦具有保守的 LPSTGE 序列。

Timoney 等^[6]报道的兽疫亚种马源 W60 株类 M 蛋白基因含有一个 ORF,其全长为 1128bp。本实验克隆的 ATCC35246 株的类 M 基因的 ORF 为 1137bp,在 W60 株 ORF 的 840bp 处插入了 12 个 bp,分别为 TGAGCCAAAACC,编码 KPEP4 个氨基酸残基,但并未造成移码。此段序列的插入,对该菌的毒力及宿主适应性有何影响有待深入研究。

参 考 文 献

- [1] Collazos J, Echevarria M J, Ayarza R, *et al.* *Streptococcus zooepidemicus* septic arthritis case report and review of group C streptococcal arthritis. *Clin Infect Dis*, 1992, **16**: 744 – 746.
- [2] Barnham M, Ljunggren A, McIntyre M. Human infection with *Streptococcus zooepidemicus* (Lancefield group C): three case reports. *Epidem Infect*, 1987, **98**: 183 – 190.
- [3] 范红结, 陆承平, 唐家琪. 马链球菌兽疫亚种类 M 基因和猪链球菌 2 型 *mrp* 基因片段的融合表达及仔猪免疫试验. 南京农业大学学报 2003 **26**(4): 78 – 81.
- [4] Sharp M W, Prince M J, Gibbens J. *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* infection and bovine mastitis. *Vet Rec*, 1995, **137**: 128 – 129.
- [5] 陆承平. 兽医微生物学. 第三版. 北京: 中国农业出版社, 2001 233 – 246.
- [6] Timoney J F, Walker J, Zhou M, *et al.* Cloning and sequence analysis of a protective M-like gene from *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. *Infect Immun*, 1995, **63**: 1440 – 1445.
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory Manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory press, 1989.
- [8] Sanger F, Nicklen S, Coulson A R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977, **74**: 54 – 65.
- [9] Michael W L, Brown A, Colleins J. A general method for the extraction of DNA from bacterial. *J Microbiol Methods*, 1994, **19**: 167 – 172.
- [10] Moore B O, Bryans J T. Antigenic classification of group C animal streptococci. *J Am Vet Med Assoc*, 1969, **155**: 416 – 420.
- [11] Fischetti V A. Streptococcal M protein: molecular design and biological behaviour. *Clin Microbiol Rev*, 1989, **2**: 285 – 314.
- [12] Fahnestock S R, Alexander P, Nagle J, *et al.* Gene for an immunoglobulin binding protein from a group G *Streptococcus*. *J Bacteriol*, 1986, **167**: 870 – 880.

Cloning and Sequence Analysis of M – like Gene of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* and The Detection of M-like Gene of Streptococci from Pigs

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

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

Abstract: *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, a lancefield group C *Streptococcus*, causes a variety of serious infections in several animal hosts, including meningitis, pneumonia, septic arthritis and mastitis. The antiphagocytic M like protein in cell surface of *S. equi* subsp. *zooepidemicus* is a major virulence factor and protective antigen. In this paper, the M-like gene was amplified from genomic DNA of *S. equi* subsp. *zooepidemicus* ATCC35246 strain by polymerase chain reaction (PCR). Then the amplified fragment was cloned in the proper orientation into the site between *Bam*H I and *Sac* I of pET32-(+) via restriction endonuclease *Bam*H I and *Sac* I. The recombinant plasmid was verified by restriction endonuclease analysis and nucleotide sequencing. Nucleotide sequencing analysis revealed one open reading frame of 1137 in M-like gene, translation of this open reading frame revealed a protein of 379 amino acids. The M-like gene showed 86.9% nucleotide acids homology with M-like gene of *S. equi* subsp. *zooepidemicus* W60 strain, 28% with M-like gene of *S. equi* subsp. *equi* and 29.4% with M protein gene of group A *Streptococcus*. The M-like protein of ATCC35246 strain showed 84.3%, 21.9%, 23.4% amino acid homology with *S. equi* subsp. *zooepidemicus* W60 strain, *S. equi* subsp. *equi* and group A *Streptococcus*. 34 *Streptococcus* isolated strains from pigs were detected for M-like gene by PCR, the results showed all 16 strains of group C *Streptococcus* strain from pigs contained M-like gene, the M-like gene weren't detected in other 13 strains of R, S, B, D group, but 3 strains contained the M-like gene in the other 5 no identified isolated strains of *Streptococcus*.

Key words: *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, M-like protein gene, Cloning, Detection

Foundation item: Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (G1999011906)

* Corresponding author. Tel/Fax: 86-25-84396517; E-mail: lucp@njau.edu.cn

Received date: 01-06-2004