

猪链球菌 2 型 FBPS 的纤连蛋白结合部位的初步确定

孙理云 范红结 陆承平*

(南京农业大学 农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室 南京 210095)

摘 要 根据猪链球菌 2 型江苏分离株 HA9801 的 *fbps* 基因序列,设计合成不同的引物,用含全长 *fbps* 的 pMD-T-FBPS 质粒为模板,通过 PCR 技术,扩增不同片段 *fbps*,并按正确的阅读框架定向克隆到表达载体 pET-32a(+),构建分别表达全长 7~82、7~165 和 87~320 氨基酸 FBPS 的重组表达质粒 pFBPS、pFBPS(7~82)、pFBPS(7~165)和 pFBPS(87~320)将重组质粒转化大肠杆菌 BL 21(DE)株,经 IPTG 诱导,表达 rFBPS(7~82)、rFBPS(7~165)、rFBPS(87~320)和 rFBPS(全长),分子量分别为 29、34、42 及 83kD 的融合蛋白。配基亲和 Western blot 试验表明,表达的融合蛋白除 rFBPS(7~82)外,均可与人纤连蛋白(Fn)结合,由此可以推断 SS2 的纤连蛋白/血纤蛋白原结合蛋白(FBPS)N 端 87~165 氨基酸区域为具有结合活性的线性部位。

关键词 猪链球菌 2 型 纤连蛋白/血纤蛋白原结合蛋白 融合表达 纤连蛋白结合部位

中图分类号 S852 文献标识码 A 文章编号 0001-6209(2005)05-0753-04

纤连蛋白(Fibronectin, Fn)是一种二聚体糖蛋白,分子量约 440kD,由多种类型的细胞表达产生,以可溶形式存在于血浆和体液中及以纤维状存在于细胞外基质(ECM)^[1]。血纤蛋白原(Fibrinogen, Fgn)是由 α 、 β 和 γ 3 种肽链组成的一种糖蛋白,分子量为 340kD,为血浆的一种可溶性形式成分,血栓的一种不溶性成分,也是 ECM 的成分^[2]。Fn 和 Fgn 都有多种功能域,与不同的底物结合^[1,2],Fn 和 Fgn 同时也是细菌黏附的底物^[3]。黏附是病菌建立定植和感染的前提^[4]。业已证明,化脓性链球菌等通过其 Fn 结合蛋白与 Fn 相互作用,促进细菌黏附于宿主组织和侵袭宿主细胞^[5]。

猪链球菌(*Streptococcus suis*, SS)是猪多种传染性疾病的病原,也可致人脑膜炎^[6,7]。迄今为止,猪链球菌的血清型已发现有 35 个。型与型之间及型内不同菌株的毒力不同。猪链球菌 2 型(SS2)被认为是毒力最强的,最常由发病动物分离^[7]。SS2 天然栖息地是上呼吸道(尤其在扁桃体和鼻腔)生殖道和消化道。SS2 对上皮细胞、人脑毛细血管内皮细胞、小鼠巨嗜细胞有黏附作用^[8~10];曾巧英等^[11]亦证实,SS2 江苏分离株 HA9801 体外可黏附仔兔扁桃体上皮细胞、肺、脾血管内皮细胞、HEp-2 细胞,其溶菌酶释放蛋白(MRP)具黏附作用。但是除 MRP 之外,是否还有其他黏附因子,报道甚少。Greiff 等^[12]

报道 SS2 的 Fn/Fgn 结合蛋白(FBPS)为一种毒力因子,而国内尚未开展这方面研究。为此在对 SS2 江苏分离株 HA 9801 的 *fbps* 进行克隆序列测定的基础上,用大肠杆菌表达系统融合表达纤连蛋白/血纤蛋白原结合蛋白(FBPS)不同片段,确定与 Fn 的结合区域,为进一步研究 FBPS 功能及应用打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒 SS2 江苏分离株 HA 9801^[13](简称 HA901)大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α 、大肠杆菌 BL 21(DE)本室保存。表达质粒 pET-32a(+), pMD-T-FBPS 质粒,本实验室用克隆载体 pMD-T-18 构建的含 HA9801 *fbps* 的质粒。

1.1.2 试剂 *ExTaq* DNA 聚合酶、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶及 DNA 胶回收试剂盒均为大连 TaKaRa 公司产品;dNTPs 为 Promega 公司产品;兔抗人 Fn 抗体为武汉博士德生物工程公司产品;碱性磷酸酶标记的山羊抗兔 IgG 为华美生物工程公司产品。

1.2 融合表达载体的构建

1.2.1 PCR 引物设计和合成 根据 HA9801 *fbps* 的测定序列,依所要扩增的片段,利用 Primer Premier5.0 软件设计引物如下: P1: 5'-GACGGATCCTTTTACATCACATGACGG-3'(下划线为

基金项目 国家 973 项目 "子课题(G1999011906)

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

作者简介 孙理云(1969-)男,河南省封丘县人,博士研究生,助理研究员,研究方向为预防兽医学及分子微生物学。

收稿日期 2005-02-25,修回日期 2005-06-21

*Bam*H I 酶切位点); P2: 5'-CCGTCGACGTATTTCCGCAGAATCAT-3'(下划线为 *Sal*I 酶切位点); P3: 5'-GTCTCGAGTGGACGAATATAGGTGGAG-3'(下划线为 *Xho*I 酶切位点); P4: 5'-CAGGGATCCATTATCCAGGAGATTC-3'(下划线为 *Bam*H I 酶切位点); 另采用 Greff 等^[12]设计的下列引物以构建 *fbps* 基因全长表达载体: P5: 5'-GCGGATCCGATGACGATGACAAA TCTTTTGACGGATTTTTTTTAC-3'(下划线为 *Bam*H I 酶切位点); P6: 5'-CCCAAGCTTGGGCATGAACTAGATTTTCATGG-3'(下划线为 *Hind*III 酶切位点)。其中用 P1 和 P2 扩增 *fbps* 基因开放阅读框中的 19~246bp 间的 228bp 片段; P1 和 P3 扩增 19~495bp 间的 477bp 片段; P4 和 P6 扩增 259~1659bp 间的 1401bp 片段; 用 P5 和 P6 扩增全长基因。所有引物均由 TaKaRa 公司合成。

1.2.2 PCR 反应和产物鉴定: 采用碱裂解法提取 pMD-T-FBPS 质粒为 PCR 的模板。1.5mL 过夜培养的大肠杆菌 DH5 α 抽提的质粒溶于 20 μ L 超纯水。按如下顺序和条件依次加入各反应物进行扩增: 质粒 1 μ L, 10 \times buffer (Mg²⁺ free) 5.0 μ L, 25mmol/L MgCl₂ 4.0 μ L, 10mmol/L dNTPs 1.0 μ L, 分别加引物 P1 和 P2、P1 和 P3、P4 和 P6 及 P5 和 P6 终浓度为 1.0 μ mol/L, *ExTaq* DNA 聚合酶 1U, 补水至 50 μ L, 混匀后进行扩增。94 $^{\circ}$ C 5min 变性后的 PCR 反应条件分别为: P1 和 P2 引物对, 94 $^{\circ}$ C 30s, 62 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 30s, 20 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min; P1 和 P3 引物对, 94 $^{\circ}$ C 30s, 56 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 30s, 20 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min; P4 和 P6 引物对, 94 $^{\circ}$ C 30s, 58 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 40s, 20 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min; P5 和 P6 引物对, 94 $^{\circ}$ C 30s, 62 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 60s, 20 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min。PCR 产物在含溴化乙锭的 1% 琼脂糖凝胶上电泳, 紫外光下观察 PCR 扩增情况。切下含有目的条带的琼脂块, 用 DNA 胶回收试剂盒回收凝胶中的 DNA。回收的目的片段用相应的限制性内切酶 37 $^{\circ}$ C 酶切 2h, 再用 DNA 胶回收试剂盒回收酶切目的片段。

1.2.3 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(+) 质粒的宿主菌 *E. coli* DH5 α 单菌落, 37 $^{\circ}$ C 摇培过夜, 按碱裂解法抽提质粒。抽提的质粒用与 PCR 产物相应的酶双酶切, 其后用 DNA 胶回收试剂盒回收酶切产物。将 PCR 产物的双酶切回收产物与质粒双酶切回收产物用 T4 DNA 连接酶 16 $^{\circ}$ C 连接 3h 后, 转化感受态大肠杆菌 DH5 α 。感受态细菌的制备、转化均按分子

克隆的常规方法进行, 利用 Amp 抗性筛选重组菌, 提取质粒进行酶切鉴定和测序。序列测定由上海中科开瑞生物芯片科技股份有限公司完成。

1.3 重组质粒在大肠杆菌中的表达

将重组质粒按常规方法转化感受态的大肠杆菌 BL21(DE) 利用 Amp 抗性筛选重组菌, 挑取单个菌落接种 LB 肉汤培养基中(每 mL 含 100 μ g Amp), 37 $^{\circ}$ C 条件下剧烈摇动培养, 当菌液浓度达 OD₆₀₀ 为 0.4~0.6 时, 加入 IPTG 至终浓度 1mmol/L, 37 $^{\circ}$ C 继续剧烈摇动培养 4h。

1.4 FBPS 的 Fn 结合部位的确定

参考 Wann 等^[14]的方法, 采用配基亲和 Western blot 试验。

1.4.1 SDS-PAGE 及电转移: 采用 Laemmli 不连续 SDS-PAGE 系统^[15]。将细菌裂解后进行 SDS-PAGE 分析。浓缩胶浓度为 4%, 分离胶浓度为 12%。起始电压为 80V, 指示剂溴酚蓝进入分离胶将电压调整为 160V, 恒压电泳至结束。各样品均有一重复, 一块凝胶用考马氏亮蓝 G-250 染色。另一块凝胶用于电转移。参经常规方法^[16]采用半干式电转移仪将凝胶电泳分离的蛋白质转移到硝酸纤维素膜上。

1.4.2 配基亲和 Western blot 试验: 参考 Wann 等^[14]的方法, 电转移结束后, 硝酸纤维素膜用 10mmol/L Tris-HCl (pH7.4) (含 0.1% Tween-20 和 150mmol/L NaCl) (TBS-T) 的洗涤缓冲液洗涤。用封闭缓冲液 50mmol/L Tris-HCl (pH8.0) (含 1% 牛血清白蛋白, 0.05% Tween-20 和 150mmol/L NaCl) (TBS-BT) 封闭硝酸纤维素膜后, 将硝酸纤维素膜用 Fn 浓度为 10 μ g/mL 的 TBS-BT 5mL 室温下孵育过夜。TBS-T 洗涤后膜用 TBS-BT 稀释兔抗人 Fn 抗体(稀释度为 1:1000)室温下温和振荡孵育至少 2h。洗涤后将膜用 TBS-BT 稀释的碱性磷酸酶标记的山羊抗兔 IgG (稀释度为 1:200)室温下孵育至少 2h。其后, 参经常规方法进行显色反应。

2 结果

2.1 *fbps* 全长 ORF 及其不同片段的扩增

用引物 P1 和 P2、P1 和 P3、P4 和 P6 及 P5 和 P6 扩增的产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外光下观察分别可见在 250bp、500bp、1400bp 和 1700bp 附近有一特异条带, 大小与预期结果相符。

2.2 重组表达质粒的构建和重组质粒插入片段序列的测定

将经过双酶切的 PCR 产物与相应双酶切的

pET-32a(+) 载体连接,并转化 DH5 α 感受态细胞,挑取菌落,增菌培养后,小规模提取质粒。用相应的内切酶进行酶切鉴定,将用 P1 和 P2、P1 和 P3、P4 和 P5、P5 和 P6 引物对扩增产物构建的阳性重组质粒分别命名为 pFBPS(7~82)、pFBPS(7~165)、pFBPS(87~320) 和 pFBPS。

将测序结果与 HA9801 的 *fbps* 相比较,序列一致,仅 pFBPS(87~320) 插入片段在 703bp 处缺失碱基 C,导致此处出现终止密码子出现。

2.3 重组质粒在 BL 21 中的表达和 FBPS 的 Fn 结合部位的初步确定

重组质粒 pFBPS(7~82)、pFBPS(7~165)、pFBPS(87~320) 和 pFBPS 转化表达菌 BL21(DE),用含 Amp(100 μ g/mL) 的 LB 培养至 OD₆₀₀ 约 0.4 左右,加 IPTG 至终浓度 1mmol/L,经 3h 诱导后,培养物 7000r/min 离心 10min,PBS 洗涤沉淀两次,沉淀加入蛋白上样缓冲液煮沸 5~10min,进行 SDS-PAGE 分析(图 1-A)。在 SDS-PAGE 图谱中,相应的重组菌蛋白图谱均有新的条带出现。其中 pFBPS(7~82) 重组菌表达的融合蛋白 rFBPS(7~82) 出现在约 29kD 处,pFBPS(7~165) 重组菌表达的 rFBPS(7~165) 约在 34kD 处,pFBPS 重组菌表达的全长 FBPS 约在 83kD 处,与预期的大小一致。而 pFBPS(87~320) 重组菌表达的 rFBPS(87~320) 则在 42kD,与核酸测序结果相符。

配基亲和 Western blot 试验结果表明,rFBPS(7~165)、rFBPS(87~320) 和 rFBPS(全长) 与 Fn 结合,但 rFBPS(7~82) 不与 Fn 结合(图 1-B)。可见 FBPS 与 Fn 的结合部位在 87~165 氨基酸之间。

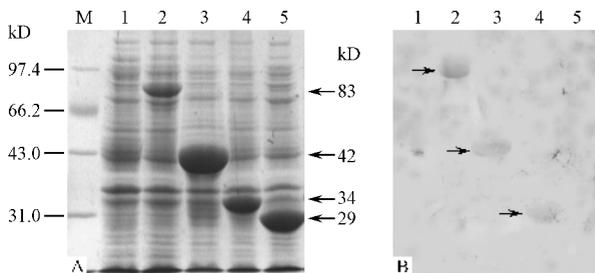


图 1 (A) 不同表达菌诱导后裂解产物 SDS-PAGE 图谱; (B) 配基亲和 Western blot

Fig. 1 (A) SDS-PAGE of lysates of BL 21 harbouring different recombinant plasmid induced by IPTG (B) Ligand affinity Western blot analysis

M. Protein marker; 1. pET-32a(+); 2. pFBPS; 3. pFBPS(87~320); 4. pFBPS(7~165); 5. pFBPS(7~82).

3 讨论

Fn 结合蛋白是值得重视的细菌非菌毛黏附素。FBPS 是新近鉴定的 SS2 的一种毒力因子,与 Fn 和 Fgn 结合,相对分子质量约 63kD,Greeff 等^[12]克隆表达了 SS2 的全长 FBPS,并证明其与人 Fn 结合,但结合位置未作研究。本试验通过配基亲和 Western blot 试验证明,FBPS 的 N 端区域有结合人 Fn 的活性部位,而且该结合部位是线性结构,可为今后的分子疫苗设计提供重要依据。

SS2 江苏分离株的 FBPS 与肺炎链球菌的 PavA 同源性 73.0%,与化脓性链球菌的 FBPS54 的同源性 68.8%。它们同属革兰阳性菌的一类新毒力因子——无锚的黏附素和侵袭素^[17],位于细菌表面,没有与细菌蛋白分泌有关的前导序列,没有定位于细胞表面的 LPXTG 基序及促进保留于细菌表面的胆碱结合序列。其分泌机制如何,怎样与细菌表面再连接,在何处发挥生物功能等尚待解决。

化脓性链球菌的 FBPS54 的 Fn 结合位置在 1~89 氨基酸^[18],肺炎链球菌的 551 个氨基酸组成的 PavA C 端 362 氨基酸残基多肽不与 Fn 结合^[19]。在 Fn 结合区的共有长度的同源性,FBPS 与 FBPS54 和 PavA 分别为 76.% 和 77.8%。FBPS 除 85~165 的氨基酸片段外,165~320 的氨基酸片段有无 Fn 结合活性,有待进一步证实。

参 考 文 献

- [1] Roumen P, Kenneth M Y. Fibronectin at a glance. *J Cell Sci*, 2000, **115**: 3861-3863.
- [2] Herrick S, Blanc-Brude O, Gray A, et al. Fibrinogen. *Int J Biochem Cell Biol*, 1999, **31**: 741-746.
- [3] 陆承平. 兽医微生物学. 第三版. 北京: 中国农业出版社, 2001, **58**, 336.
- [4] Beachey E H. Bacterial adherence: adhesin-receptor interaction mediating the attachment of bacteria to mucosal surface. *J Infect Dis*, 1981, **143**: 325-344.
- [5] Danny J, Elisabeth R W, Bernd K, et al. Role of fibronectin-binding MSCRAMMs in bacterial adherence and entry into mammalian cells. *Matrix Biol*, 1999, **18**: 211-223.
- [6] Arends J P, Zanen H Z. Meningitis caused by *Streptococcus suis* in humans. *Rev Infect Dis*, 1988, **10**: 131-137.
- [7] Allgaier A, Goethe R, Wisselink H J, et al. Relatedness of *Streptococcus suis* isolates of various serotypes and clinical backgrounds as evaluated by macrorestriction analysis and expression of potential virulence traits. *J Clin Microbiol*, 2001, **39**: 445-453.

- [8] Lalonde M, Segura M, Lacouture S, *et al.* Interactions between *Streptococcus suis* serotype 2 and different epithelial cell lines. *Microbiol*, 2000, **146** : 1913 - 1921.
- [9] Charland N, Nizer V, Rubens C E, *et al.* *Streptococcus suis* type 2 interactions with human brain microvascular endothelial cells. *Infect Immun*, 2000 **68** : 637 - 643.
- [10] Segura M, Gottschalk M. *Streptococcus suis* interactions with the murine macrophage cell line J774 : adhesion and cytotoxicity. *Infect Immun*, 2002, **70** : 4312 - 4322.
- [11] 曾巧英, 陆承平. 猪链球菌 2 型溶菌酶释放蛋白的黏附作用. *南京农业大学学报* 2002 **25** (4): 67 - 71.
- [12] Greff A, Herma B, Robin V, *et al.* Contribution of fibronectin-binding protein to pathogenesis of *Streptococcus suis* Serotype 2. *Infect Immun*, 2002, **70** : 1319 - 1325.
- [13] 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** : 67 - 70.
- [14] Wann E R, Gurusiddappa S, Höök M. The Fibronectin-binding MSCRAMM FnbA of *Staphylococcus aureus* is a bifunctional protein that also binds to fibrinogen. *J Bio Chem*, 2000, **275** : 13863 - 13871.
- [15] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, **227** : 680 - 685.
- [16] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 分子克隆实验指南. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 第二版. 北京: 科学出版社, 1996.
- [17] Chhatwal G S. Anchorless adhesins and invasins of Gram-positive bacteria : a new class of virulence factors. *Trends Microbiol*, 2002, **10** : 205 - 208.
- [18] Courtney H S, Li Y, Dale J B, *et al.* Cloning, sequencing and expression of a fibronectin/fibrinogen-binding protein from group A streptococci. *Infect Immun*, 1994, **62** : 3937 - 3946.
- [19] Holmes A R, Roderick M, Millsap K W, *et al.* The *pavA* gene of *Streptococcus pneumoniae* encodes a fibronectin-binding protein that is essential for virulence. *Mol Microbiol*, 2001, **41** : 1395 - 1408.

Determination of fibronectin-binding region of FBPS of *Streptococcus suis* type 2

SUN Li-yun FAN Hong-jie LU Cheng-ping*

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

Abstract: Fusion expression plasmid pFBPS, pFBPS(7 ~ 82), pFBPS(7 ~ 165) and pFBPS3(87 ~ 320) of *Streptococcus suis* type strain HA9801 were generated by cloning different fragments of *fbps* amplified from pMD-T-FBPS by PCR into plasmid pET-32 α ₊. It has been confirmed that the recombinant proteins, FBPS, FBPS(87 ~ 320), and FBPS(7 ~ 167), which are expressed by recombinant plasmid pFBPS, pFBPS(87 ~ 320) and pFBPS(7 ~ 165), respectively, bound human fibronectin by ligand affinity Western blot assay. The results indicate the primary fibronectin-binding domain of FBPS lies within 87 ~ 165 amino acid residues region.

Key words: *Streptococcus suis* type 2, Fibronectin/fibrinogen-binding protein, Fusion expression, Fibronect-binding domain

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

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

Received date 02-25-2005

欢迎订阅 2006 年《微生物学报》

《微生物学报》为双月刊(双月 4 日出版) 2006 年每期页码为 160 面 单价为 30.00 元 全年定价 180 元。读者可以通过以下 3 种方式订阅本刊。刊号为 :ISSN 0001-6209 ; CN11-1995/Q。

1. 邮发 :全国各大邮局均可订阅。

国内邮发代号 2-504 ; 国外发行代号 :BM67

2. 邮购 :欢迎广大读者直接与本刊编辑部联系购买 , 可通过邮局汇款 , 我们将按期免费邮寄。

汇款地址 (100080) 北京海淀中关村 中国科学院微生物研究所内

收款人 《微生物学报》编辑部

电话 (010) 62630422 ; E-mail :actamicro@sun.im.ac.cn

另外 本刊编辑部现存有少量过期期刊 , 如有需要者可与编辑部联系 , 款到即免费寄上。(注 :请事先与编辑部电话或 e-mail 联系 , 获悉每册售价。敬请在汇款单上注明所购刊物的年代、卷、期和数量)

3. 科学出版社期刊分社发行部 :直接与科学出版社联系。

地址 (100717) 北京东黄城根北街 16 号 ; 电话 (010) 64034563 ; E-mail : journal@cspp.net