

猪链球菌 2 型次黄嘌呤核苷酸脱氢酶基因的克隆与鉴定

段志涛^{1,2}, 何孔旺^{1*}, 张雪寒¹, 倪艳秀¹, 陆承平²

(¹ 江苏省农科院兽医所农业部畜禽疫病诊断重点开放实验室 南京 210014)

(² 南京农业大学动物医学院 南京 210095)

摘 要 根据 GenBank 猪链球菌 2 型(SS2)报道序列,对江苏分离株 SS2-H 部分测序,发现位于已知毒力基因 *orf2* 与 *mrp* 之间存在两个新的开放阅读框序列。选取可能含有抗原决定簇肽段对应的核苷酸序列,该阅读框(2738~3694)编码 319 个氨基酸残基,分子量为 33.5kDa,与已知任何基因无同源性。通过 InterPro、PHD、DNASTAR 分析阅读框,并定向克隆至 pET-32α(+) 载体中,转化至大肠杆菌 BL21,表达出分子量为 48kDa 的融合蛋白,蛋白免疫转印可被 SS2 的抗血清识别,具有免疫原性,并且含有 IMP dehydrogenase 结构域,催化 IMP 生成 XMP,流式细胞仪检测该蛋白可明显影响 Hep-2 细胞周期。

关键词: 猪链球菌 2 型,毒力因子,IMPDH

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2006)05-0730-04

猪链球菌病是分布范围极广的猪传染病,可引起青年猪患脑膜炎、胸膜炎、关节炎、败血症及新生仔猪突然死亡^[1,2],并可感染人^[3],是一种重要的人畜共患传染病。猪链球菌(*Streptococcus suis*)根据菌体荚膜抗原特性的不同,可以分为 35 个血清型(1~34 型及 1/2 型)^[4],其中 2 型流行最广,对猪的致病性亦最强。我国于 1990 年首次在广东发现猪链球菌 2 型(*Streptococcus suis* serotype 2, SS2)^[5],1998 年在江苏南通地区爆发由 SS2 引起的急性败血型传染病^[6],2005 年再次在四川暴发 SS2 传染病,并有相关从业人员感染致死,故引起世界范围内的高度重视。在 SS2 中,又可区分为强毒株、弱毒株和无毒株。溶菌酶释放蛋白(MRP)和细胞外蛋白因子(EF)被认为是 SS2 的两种重要毒力因子。通常认为强毒株毒力因子表现型为 MRP⁺EF⁺,弱毒株为 MRP⁺EF^{*}(EF 类似物),无毒株为 MRP⁻EF⁻^[7,8]。但 Galina 等^[9]报道的表现型为 MRP⁻EF⁻ 的菌株还可致脑膜炎,表明还存在有其他的毒力因子。

Smith 等^[10]利用体内互补法将强毒株基因文库引入到弱毒株中,接种无菌仔猪,再从中枢神经系统分离病原,成功发现一段毒力相关基因。这段毒力相关基因序列包括两个完整的阅读框,其中 *orf2* 与已知任何基因无同源性,经研究证明是一毒力因子^[11]。本课题组对 SS2 江苏分离株进行基因测序,

发现 *orf2* 位于 *mrp* 基因序列之前,在两者之间还存在有一个新的开放阅读框,与已知的基因无同源性。本试验根据 DNASTAR 软件对该基因进行序列分析,选取可能含有抗原决定簇肽段对应的核苷酸序列,进行克隆、表达,并对表达蛋白的生物学特性进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒 SS2-H 系 1998 年从江苏海安发病猪场分离^[12],表达质粒 pET-32α(+) 宿主菌大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5α、BL21 由江苏省农业科学院兽医研究所保存。

1.1.2 试剂和仪器: Ex TaqTM(5U/μL, TaKaRa 公司), Agarose (Promega 公司), 胰蛋白胨(Tryptone) 酵母抽提物(Yeast extract)(OXOID 公司); EcoR I、Xho I 及 DNA 纯化试剂盒(TaKaRa 公司); 新生犊牛血清(NCS, Gibico 公司); RPMI1640(Gibico 公司); 羊抗猪 IgG-HRP(美国 BETHYL); 氯化氮蓝四唑(NBT), 吩嗪硫酸甲酯(PMS), NAD⁺(Sigma 公司), 亲和层析柱(Novagen 公司); MiniCyclerTM(MJ Research)PTC-100 PCR 仪; 复日 RF-980 生物电泳图像分析系统(上海复日科技有限公司); 流式细胞仪(Becton Dickinson)

基金项目: 国家 973 项目“子课题(2006CB504403)江苏省自然科学基金重点项目(BK2006721)

* 通讯作者。Tel 86-25-84390748; E-mail: hekongwang@yahoo.com

作者简介: 段志涛(1978-)男,河南人,硕士研究生,研究方向为兽医微生物与免疫学。E-mail: lzuanzhitao@sohu.com

收稿日期: 2005-10-20, 接受日期: 2005-12-28, 修回日期: 2006-03-20

1.2 菌种培养和 DNA 提取

挑取血平板上的单菌落于 Todd-Hewitt 肉汤, 37°C 过夜振荡培养; 取 1 mL 菌液离心, 常规方法^[13]提取 SS2-H 染色体 DNA, 溶于 TE 缓冲液中, 置 -20°C 备用。大肠杆菌于 LB 培养基中, 37°C 过夜振荡培养, 如果需要, LB 培养基中加入氨苄青霉素 100 µg/mL。

1.3 引物序列和基因克隆

根据 GenBank 登陆序列 (DQ097893), 利用 DNASTAR 软件分析, 选取抗原性较强的核苷酸序列, 按照正确的阅读顺序自行设计一对引物, 引物两端分别添加限制性酶切位点 *EcoR* I 和 *Xho* I 及保护性碱基, 引物序列为 P1: 5'-CTGGAATTCCTGTTTGA GTCTTGCTCCC-3'; P2: 5'-TTCCTCGAGCTGTTCG TTTGAAGTGGT-3', 引物由大连宝生物工程有限公司合成。

PCR 反应体系: SS2 模板 DNA 1 µL, 10 × reaction buffer 2.5 µL, 25 mmol/L MgCl₂ 1.8 µL, 2.5 mmol/L dNTPs 2 µL, 50 µmol/L P1 1 µL, 50 µmol/L P2 1 µL, ddH₂O 16.4 µL, *Taq* 酶 0.5 µL, 离心 10s 混匀, 立即进行 PCR 反应, PCR 反应条件: 95°C 5min, 94°C 30s, 60°C 30s, 72°C 60s, 共 30 个循环, 72°C 10min。以双蒸水为阴性对照。

PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶上电泳分离后, 紫外灯下切割目的条带, 用 DNA 纯化试剂盒回收 PCR 产物, 并用 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切 3h, 65°C 15min 终止反应。按分子克隆的常规方法, 将酶切片段先连接到 T 载体上, 转化到感受态大肠杆菌 DH5α 细胞中, 酶切后再将目的片段连接到 pET-32α(+) 中, 转化感受态大肠杆菌 BL21 细胞中, 通过氨苄青霉素和利用限制性内切酶进行筛选和鉴定。

1.4 重组蛋白的诱导表达和纯化

表达重组蛋白含有 6 个连续的组氨酸 (His) 残基, 使用镍柱亲和层析纯化。将阳性菌落过夜培养物按 2% 的量接种于 100 mL LB (含 100 µg/mL 氨苄青霉素), 37°C 振荡培养至 A₆₀₀ 在 0.4~0.6, 加 IPTG 至终浓度 1 mmol/L, 继续振荡培养 3~4h, 收集菌体, 重悬于 4 mL binding buffer (5 mmol/L 咪唑, 0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.9), 冰浴 30min。超声裂解直至不再粘稠, 10000g 离心 20min, 收集上清进行镍柱亲和层析, 纯化后的蛋白 -20°C 保存备用。

1.5 免疫转印

采用半干转印法^[14]。诱导表达的重组蛋白在 12% 分离胶, 5% 浓缩胶中进行 SDS-PAGE 分析, 电

泳后用硝酸纤维膜 (NC) 将凝胶在 Tris-Gly 缓冲系统中转移电泳, 0.65 mA/cm² 转印 100min, 5% 脱脂奶封闭, SS2 免疫猪制备的多抗为一抗, HRP 标记的羊抗猪 IgG 为二抗, DAB 显色试剂盒显色。

1.6 IMPDH 活性染色

纯化后的重组蛋白用 3% 浓缩胶, 7% 分离胶的非变性 PAGE 分析。把胶放入下列反应混合物中 (总体积 25 mL): 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 20 mmol/L IMP, 0.3 mg/mL 氯化氮蓝四唑 (NBT), 0.05 mg/mL 吩嗪硫酸甲酯 (PMS), 0.01 mol/L KCl 及 0.5 mmol/L NAD⁺。反应结束后 7% 乙酸漂洗数次。

1.7 流式细胞仪测定细胞周期

用含 10% 无支原体新生犊牛血清的 RPMI1640 完全营养液稀释纯化蛋白制成 10 µg/mL, 20 µg/mL 和 100 µg/mL 的工作液, 3 种浓度的蛋白溶液同时同法进行试验。给长满单层的 HEp-2 细胞换上蛋白溶液, 置 37°C 分别孵育 12h, 胰酶消化细胞, 制成单细胞悬液, 调节细胞浓度为 1 × 10⁶/mL。加入乙醇至 75% 浓度, 室温固定 10min。加入 1% 体积的碘化丙吡啶溶液 (69 µmol/L 磷酸酰肌-38 mmol/L 柠檬酸钠, pH 7.3), 室温避光放置 10min。以流式细胞仪测定细胞周期。用 RPMI1640 (10% 犊牛血清) 营养液同倍稀释配制空 pET-32α 载体悬液作阴性对照。

2 结果

2.1 PCR 扩增和基因测序与分析

以 SS2 为模板 PCR 产物电泳后, 在 750~1000 bp 之间出现一条亮带, 大小与预期的一致。该目的片段 810 bp, G/C 含量 46.8%, 与已知任何基因无同源性, 编码的目的蛋白含有 264 个氨基酸, 和已知次黄嘌呤核苷酸脱氢酶 (Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase, IMPDH) 蛋白具有较低同源性 (18%~25%), InterPro 分析该蛋白含有 IMPDH 功能结构域, 其结构模型为 [LIVMT][RK][LIVM]-G-[LIVM]-G-x-G-[SRK][LIVMAT]-C-x-T, C 端可能为 IMP 的结合部位。

2.2 重组质粒在 BL21 中的表达和免疫转印

SDS-PAGE 结果表明, 在 IPTG 的诱导下, 转化有重组质粒的 BL21 可表达 48 kDa 的融合蛋白, 3h 的诱导量最高, 融合蛋白主要以可溶形式存在, 超声破菌后的上清中, 沉淀中仅有少量 (图 1)。免疫转印结果表明, 融合蛋白可与 SS2-H 的抗血清反应, 说明扩增的片段含有 SS2 的抗原决定簇 (图 1), 该扩增片段是 SS2 的一种抗原成分, 具有抗原性。

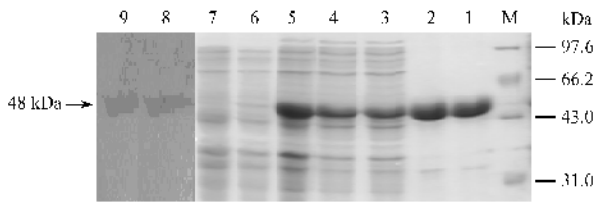


图1 表达产物的 SDS-PAGE 和免疫印迹分析

Fig.1 Detection of induced expression proteins by SDS-PAGE(1~7) and Western blot(8,9). M. Molecular standard; 1 and 2. Soluble fractions after Ni affinity chromatography; 3 and 4. Proteins in sonicated supernatant; 5. Crude extract from induced cells with 1mmol/L IPTG; 6. Crude extract from uninduced cells carrying expression vector; 7. Crude extract from cells without expression vector; 8 and 9. Analysis of the expressed product by Western blot.

2.3 活性染色

重组蛋白可催化 IMP 反应生成 XMP,该反应为鸟嘌呤核苷酸(GTP)经典合成途径的限速反应,IMPDH 为其限速酶,反应依赖 NAD^+ 的参加。吩嗪硫酸甲酯(PMS)和氯化氮蓝四唑(NBT)均为接受电子的染料,IMPDH 与底物染色液在 $37^\circ C$ 保温,脱下的氢最后传递给 NBT 生成不溶于水的蓝紫色的 NBTH(图2)。

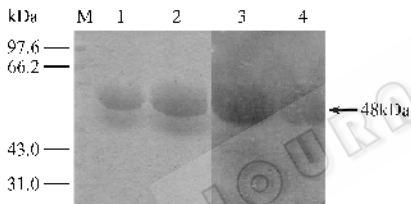


图2 IMPDH 非变性电泳和活性染色

Fig.2 IMPDH analysis with non-denaturing electrophoresis and activity staining. M. Molecular standard; 1 and 2. Protein by native PAGE; 3 and 4. Protein by IMPDH activity staining.

2.4 蛋白对细胞周期的影响

目的蛋白明显影响 Hep-2 细胞周期,不同的蛋白处理组呈现出一定量的关系。表现为 S 期细胞数明显增加,最大达 38.2%,而 G0/G1 期细胞数减少,最大达 47.9%(表1)。

表1 重组蛋白对 Hep-2 细胞周期的影响

| Protein | G1(%) | S(%) | G2/M(%) |
|-----------------------------------|-------|-------|---------|
| Protein without expression vector | 60.62 | 28.93 | 10.45 |
| Fusion protein(10 μ g/mL) | 59.35 | 32.44 | 8.22 |
| Fusion protein(20 μ g/mL) | 56.96 | 36.62 | 6.42 |
| Fusion protein(100 μ g/mL) | 12.72 | 67.12 | 20.15 |

3 讨论

SS2 系 1998 年江苏^[12]和四川猪群急性败血型传染病分离出的病原,与国外参考株的表面大分子

高度同源(>98%)。SS2 的毒力因子较为复杂,至今还有许多未知毒力因子。不同 SS2 型菌株的致病力不同,这种差异与各菌株的毒力因子直接相关。根据目前报道 SS2 主要有 5 个毒力因子,即 ORF2、溶菌酶释放蛋白(MRP)、胞外因子(EF)、溶血素(SLY)^[15]和纤维蛋白原结合蛋白(FBP)^[16]。但其相互间的位置排序还不是很清楚,有关毒力岛的概念也仅是一种推测。本实验结果表明,在 *orf2* 和 *mrp* 之间存在有两个新的开放阅读框,InterPro 分析其中一阅读框(2738~3694)预测得到蛋白质序列功能注释,该蛋白质序列具有 IMP dehydrogenase/GMP reductase 功能结构域;用 PHD、DNAstar 进行二级结构预测,含有 12 个 α 螺旋(56.92%),5 个 β 折叠(10.38%)及无规则卷曲(32.70%);2 个 N-糖基化位点,1 个蛋白激酶磷酸化位点,8 个酪氨酸激酶 II 磷酸化位点及 5 个 N-十四(烷)酰化位点。

通过 PCR 扩增这一阅读框,克隆到表达载体 pET-32(+)中组氨酸基因下游,转化至大肠杆菌 BL21 中,经 IPTG 诱导,成功地表达出分子量约为 48kDa 的融合蛋白。免疫印迹显示该融合蛋白可被 SS2 抗血清识别,具有良好的抗原性;该蛋白具有 IMPDH 结构域,通过活性染色证明可催化 IMP 反应生成 XMP,具 IMPDH 活性。通过 Hep-2 细胞周期的分析表明该蛋白可明显改变细胞周期,表现为处于 S 期即细胞 DNA 合成期的细胞数增加;处于 G1 期即细胞间隙期的细胞数减少,细胞表现出旺盛的分裂增生能力。蛋白浓度增加到 100 μ g/mL 时,引起细胞 G2/M 期的数量明显增加,可能由于改变细胞其他信号传导途径,导致细胞停滞于 G2/M 期,具体原因尚不清楚。

目前已报道的 IMPDH 有两种亚型,其中 II 型最先是肿瘤细胞中诱导出来的,通过对其晶体结构的分析,其后又分别在大鼠、三毛滴虫、肺炎链球菌和疏螺旋体中分离出来^[17]。IMPDH 通常以四聚体形式存在,是鸟嘌呤核苷酸 GTP 经典合成途径的限速酶,这一反应依赖于 NAD^+ 的参加,对细胞增殖分化的影响十分重要。IMPDH 蛋白氨基酸序列在哺乳动物保守性较高^[18],如人和鼠的同源性可达 89%,但在细菌之间却存在较大的差异,GenBank 数据库显示肺炎链球菌(ZP00404150)和化脓链球菌(YP281355)的同源性仅为 23%,本实验亦证实了这种差异性。本实验首次从 SS2 克隆表达出 IMPDH,并证实其实活性,对细菌本身的增殖具有重要作用。该基因位于 *orf2* 和 *mrp* 之间,可能对其毒力有协同

作用, 为 SS2 一种新的毒力因子。

参 考 文 献

- [1] Clifton-Hadley FA. *Streptococcus suis* type 2 infection. *Br Vet J*, 1983, **139**(1):1-5.
- [2] Vecht U, van Leengoed LAMG, Verheyen ERM. *Streptococcus suis* infection in pigs in the Netherlands (part one). *Vet Q*, 1985, **7**(3):315-321.
- [3] Arends JP, Zanen HC. Meningitis caused by *Streptococcus suis* in humans. *Rev Infect Dis*, 1988, **10**(1):131-137.
- [4] Staats JJ, Feder I, Okwuabia O, et al. *Streptococcus suis*: Past and present. *Vet Res Commun*, 1997, **21**(6):381-407.
- [5] 黄毓茂, 黄引贤, 余志东, 等. 2 型猪链球菌的初步研究. *中国畜禽传染病*, 1993, **2**(5):1-3.
- [6] 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.
- [7] Vecht U, Wisselink HJ, Jellema ML, et al. Identification of two proteins associated with virulence of *Streptococcus suis* type 2. *Infect Immun*, 1991, **59**(9):3156-3162.
- [8] Vecht U, Wisselink HJ, Jellema ML, et al. Virulence of *Streptococcus suis* type 2 stains in newborn germfree pigs depends on phenotype. *Infect Immun*, 1992, **60**(2):550-556.
- [9] Galina L, Vecht U, Wisselink HJ, et al. Prevalence of various phenotypes of *Streptococcus suis* isolated from swine in the U.S.A. based on the presence of muramidase-released protein and extracellular factor. *Can J Vet Res*, 1996, **60**(1):72-74.
- [10] Smith HE, Herma B, Wisselink HJ, et al. Selection of virulence-associated determinants of *Streptococcus suis* serotype 2 by *in vitro* complementation. *Infect Immun*, 2001, **69**(3):1961-1966.
- [11] 李干武, 姚火春, 陆承平. 在猪链球菌 2 型江苏分离株中发现新的 ORF2 毒力相关基因. *农业生物技术学报*, 2003, **11**(3):295-298.
- [12] 倪艳秀, 何孔旺, 王继春, 等. 猪链球菌 2 型的 PCR 快速检测. *中国兽医学报*, 2002, **22**(5):474-476.
- [13] Sambrook J, Russell DW. 分子克隆实验指南. 黄培堂, 等译. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [14] Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, et al. 精编分子生物学实验指南. 颜子颖, 王海滨, 译. 第一版. 北京: 科学出版社, 1998.
- [15] Jacobs AA, Loeffen PL, VAN den Berg AJ, et al. Identification, purification, and characterization of a thiol-activated hemolysin (suilysin) of *Streptococcus suis*. *Infect Immun*, 1994, **62**(5):1742-1748.
- [16] Meehan M, Lynagh Y, Woods C, et al. Fibrinogen-binding protein (TgBP) of *Streptococcus equi* subsp. *equi* additionally binds IgG and contributes to virulence in a mouse model. *Microbiology*, 2001, **147**(12):3311-3322.
- [17] Barry MG, Thomas DC. IMP dehydrogenase: structural aspects of inhibitor binding. *Current Medicinal Chemistry*, 1999, **6**(7):519-536.
- [18] Frank RC, Eliezer H. Cloning and sequence analysis of the human and Chinese Hamster Inosine-5-monophosphate dehydrogenase cDNAs. *The Journal of Biological Chemistry*, 1988, **30**(263):15769-15772.

Cloning and characterization of the gene encoding IMPDH of *Streptococcus suis* serotype 2

DUAN Zhi-tao^{1,2}, HE Kong-wang^{1*}, ZHANG Xue-han¹, NI Yan-xiu¹, LU Cheng-ping²

(¹ Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

(² Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract Given the lack of effective vaccines to control *Streptococcus suis* infection and the lack of a rapid and reliable molecular diagnostic assay to detect its infection, *S. suis* serotype 2 was sequenced partly in an effort to identify important virulence factors. Two new open reading frames were found located between *orf2* and *mvp*. One of new open reading frame (2738 ~ 3694) that encoded a polypeptide of 319 amino acid residues with a calculated molecular mass of 33.5kDa was identified by Western blot. GenBank database search revealed that the derived amino acid sequence shared low homology with sequences of known function from other genes. Second structure was analyzed by InterPro, PHD, DNASTAR software, the deduced protein had functional domains typical of IMP dehydrogenase (IMPDH). The PCR product of the open reading frame was transformed into *E. coli* BL21 and the fusion protein of 48kDa was expressed. The recombinant protein was reactive with serum from pigs experimentally infected with virulent strains of *S. suis* type 2, suggesting that the protein is immunogenic. IMPDH activity staining confirmed that the protein has IMPDH function and can catalyze the rate-limiting reaction of GTP biosynthesis, the NAD-dependent reduction of IMP into XMP. Flow cytometry (FCM) revealed that the protein had apparent effect on HEP-2 cell cycle.

Keywords: *Streptococcus suis* serotype 2; Virulence factor; IMPDH

Foundation item: National 973 Program of China (2006CB504403); Jiangsu Natural Science Foundation (BK2006721)

* Corresponding author. Tel 86-25-84390748; E-mail hekongwang@yahoo.com

Received 20 October 2005/Accepted 28 December 2005/Revised 20 March 2006