

猪源马链球菌兽疫亚种表达的类 M 蛋白黏附抑制性单抗的获得

范红结, 何 赏, 陆承平*

(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 根据马链球菌兽疫亚种(*Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*)猪源株 ATCC35246 株的类 M 蛋白基因序列, 通过 PCR 技术 扩增出无信号肽的类 M 蛋白基因并定向克隆至表达载体 pET-32a(+)中。重组质粒经酶切鉴定和测序后, 在大肠杆菌 BL21 中表达 获得 60kDa 产物, Western blot 显示 其与 ATCC35246 株多克隆抗血清反应 抗原性良好。以 His 亲和层析柱纯化重组类 M 蛋白作为抗原免疫 8 周龄的 BALB/c 小鼠, 采用淋巴细胞杂交瘤技术制备了 12 株稳定分泌抗类 M 蛋白单抗的细胞株 特异性检测显示其与 A 群链球菌、猪链球菌 2 型以及马链球菌马亚种等没有交叉反应。单抗亚类鉴定显示 其中 6 株为 IgG1 3 株为 IgG2 另外 3 株为 IgM。从腹水中纯化的单抗效价为 $2.56 \times 10^4 \sim 1.01 \times 10^5$ 。黏附抑制实验显示 其中一株单抗能阻断类 M 蛋白黏附 HEp-2 细胞。

关键词: 马链球菌兽疫亚种; 类 M 蛋白基因; 表达; 单抗

中图分类号: S852; Q939 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2007)04-0710-04

马链球菌兽疫亚种(*Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*)属于兰氏分群的 C 群链球菌, 其没有宿主专嗜性, 可通过消化道、外伤、手术、注射疫苗或治疗等途径感染多种动物, 如马、猪、牛、狗、猫等, 引发败血症、脑膜炎、心内膜炎、关节炎、乳腺炎等^[1-3]。人类因食用污染的食物或与发病动物密切接触后, 亦可引发该菌感染^[4,5], 因此该菌为一种重要的人兽共患病的病原。马链球菌兽疫亚种是我国猪链球菌病的主要病原之一, 1977 年四川地区发生大流行, 30 多万头猪死亡, 迄今为止仍呈地方流行^[6,7]。类 M 蛋白为该菌的重要毒力因子及保护性抗原, 但其在该菌的致病过程中的具体作用, 目前还不清楚。该蛋白是一种锚定在细胞壁表面的蛋白, 通常采用热酸法提取, 但不能获得完整的纯化产物, 从而限制了该蛋白的功能研究^[8]。范红结等曾克隆了兽疫亚种类 M 蛋白基因, 但未能表达^[9]; 苏良科等曾报表达了类 M 基因 528bp 的片段, 但全基因的表达未见报道^[10]。本研究采用 PCR 方法扩增猪源兽疫亚种 ATCC35246 株去信号肽的类 M 蛋白基因, 并进行表达, 同时研制针对类 M 蛋白的特异性单克隆抗体, 为研究类 M 蛋白的功能特别是该蛋白与宿主的呼吸道上皮细胞的相互作用机制奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和菌株: 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(*Streptococcus suis* type 2) HA9801 由本室姚火春等从病猪分离、鉴定; 马链球菌马亚种(*Streptococcus equi*) 由扬州大学董国雄教授馈赠; A 群链球菌(*Streptococcus* group A) 由上海市畜牧

兽医站张苏华研究员馈赠; 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。EcoR I、Xho 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; HT、HAT 等培养基、单抗亚类鉴定试剂盒(SBAClonotyping™ System/HR, Cat. No. 5300-05) 降植烷, 为 Sigma 公司产品; 兔抗兽疫亚种 ATCC35246 株的抗血清, 本实验室保存; NC 膜、酶标记的羊抗兔 IgG、DAB 均为华美公司产品。

1.1.2 实验动物及细胞: 8 周龄 BALB/c 小鼠, 每只约 25g, 由南京军区总医院实验动物中心提供。HEp-2 细胞, 由本实验室保存。

1.1.3 引物设计: 按已发表的猪源兽疫亚种类 M 蛋白基因的序列^[9], 利用 DNASTar 软件自行设计一对引物, 同时在引物的 5' 端分别添加 EcoR I 和 Xho I 酶切位点和保护性碱基, 引物 p1、p2 可扩增兽疫亚种类 M 蛋白去信号肽的全基因。引物由上海英骏生物技术公司合成, 其序列分别为: 上游引物(P1) 5'-GTAGAATTCGCCCTCTTGGTTGGTGTG-3'; 下游引物(P2) 5'-GGTCTCGAGCTTACTTTCTTTGCGTC-3'。

1.2 PCR 扩增、重组质粒的构建和鉴定

按下列顺序和条件依次加入各反应物并进行 PCR 扩增。ATCC35246 株模板 DNA 2 μ L, 10 \times buffer 10 μ L, 25mmol/L MgCl₂ 8 μ L, 2.5mmol/L dNTPs 8 μ L, 引物 P1 和 P2 各 1 μ L, ddH₂O 68 μ L, Taq 酶 3 μ L, 混匀后进行扩增。扩增的条件为: 94 $^{\circ}$ C

基金项目: 教育部科学技术研究重点项目(106091); 江苏省自然科学基金项目(BK2004106)

* 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: 2006-12-27; 接受日期: 2007-04-11; 修回日期: 2007-05-17

4min; 94℃ 1min, 57℃ 1min, 72℃ 2min, 33 个循环; 72℃ 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 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切 2h, 65℃ 15 min 终止反应。在含有 100μg/mL Amp 的 LB 肉汤中接种携带 pET-32a(+) 空质粒的 DH5α 大肠杆菌单菌落, 37℃ 振荡培养 12~16 h, 以质粒抽提试剂盒抽提质粒, *EcoR* I 和 *Xho* 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 DH5α 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, 同时采用 Sanger 双脱氧末端终止法^[12]对重组质粒的序列测定, 以验证其阅读框架, 由上海英骏生物技术公司完成。

1.3 类 M 蛋白基因在 BL21 中的表达

将含重组质粒的大肠杆菌 BL21 接种 LB 肉汤, 37℃ 振荡培养, 至 OD 值 0.5~0.6 时, 加 IPTG 至终浓度 1mmol/mL, 继续剧烈振荡培养 3~4h。经离心, 超声破碎, 后进行 SDS-PAGE 电泳, 结果用图象分析系统扫描分析, 同时以 His 亲和层析柱对融合蛋白进行纯化。

参照文献的方法进行半干式转印^[11]。取经 IPTG 诱导后的重组菌超声波破碎上清加等量电泳上样缓冲液后煮沸 5min, 进行 SDS-PAGE。蛋白转印至 NC 膜后, 进行免疫杂交, 一抗为纯化兔抗兽疫亚种 ATCC35246 株的抗血清, 二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG, DAB 显色。

1.4 抗类 M 蛋白单克隆抗体制备及筛选

取 8~12 周龄 BALB/c 雌性小鼠 4 只, 以纯化的重组类 M 蛋白为免疫原, 按文献报道的方法进行免疫^[13]。最后一次免疫 3 天后取免疫鼠脾脏细胞与对数生长期的 SP/0 细胞进行融合, SP/20 细胞的培养、小鼠脾脏细胞及饲养细胞的制备、细胞的融合、杂交瘤细胞的克隆等均按常规的方法进行^[13]。杂交瘤细胞分泌上清单抗的筛选以间接 ELISA 进行, 筛选的抗原为 ATCC35246 株全菌灭活抗原。

1.5 腹水单抗的制备及单抗亚类鉴定

取 2 月龄以上的雄性 BALB/c 小鼠, 腹腔注射降植烷后, 再注射杂交瘤细胞制备腹水单抗, 具体按文献报道进行^[13]。收集腹水单抗后以改良辛酸法进行单抗的纯化, 同时以间接 ELISA 测定其效价, 包被抗原用纯化重组类 M 蛋白。采用抗体亚类试剂盒测定 McAb 亚类。

1.6 单抗的黏附抑制作用

具体按文献报道的方法进行^[16]。每份样品设 3 个重复, 并重复实验一次。

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 1100bp 左右的条带, 大小与目的基因一致, 对照组马链球菌马亚种、猪链球菌 2 型均未扩出目的条带。

2.2 重组质粒的鉴定和序列测定

PCR 扩增的 ATCC35246 株去信号肽的类 M 蛋白基因定向克隆至 pET-32a(+) 载体, 得到重组质粒, 命名为 pET-32a(+)-M。重组质粒经 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切, 得到大小约 5900 和 1100bp 的片段, 表明类 M 蛋白基因已成功克隆。

以重组质粒 pET-32a(+)-ML 为材料进行序列测定, 测序结果经 BLAST 证实该基因为马链球菌兽疫亚种类 M 蛋白基因, 大小为 1093bp, 与马链球菌兽疫亚种 ATCC35246 株类 M 基因一致, 未出现移码现象。

2.3 表达的类 M 蛋白的免疫印迹

重组菌菌体超声波破碎上清经 SDS-PAGE 表明, 在 IPTG 诱导下, 转化有重组质粒的 BL21 表达了分子量约为 60 kDa 的重组融合蛋白, 通过对凝胶分析表明, 融合蛋白的表达量约为 32%, 说明融合基因在 BL21 中进行了高效表达(图 1)。

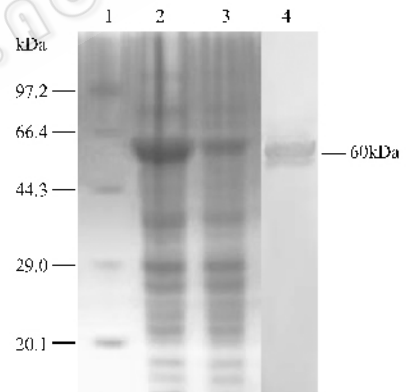


图 1 表达蛋白 SDS-PAGE 及 western blot 检测结果

Fig.1 SDS-PAGE and western blot of expressed proteins. M. Protein Marker; 1. Expression product induced by IPTG; 2. Non-induced product; 3. Western blot.

2.4 单抗的制备及亚类鉴定

通过淋巴细胞杂交瘤技术, 获得了 12 株能稳定分泌抗马链球菌兽疫亚种类 M 蛋白的单克隆抗体细胞株(表 1)。其分泌的单抗与 A 群链球菌、猪链球菌 2 型、马链球菌马亚种、金黄色葡萄球菌、禽大肠杆菌均不发生交叉反应, 分别命名为 F4、F5、F6、611、613、621、622、623、1D4、2C8、3F4、5E6。制备的相应腹水单抗纯化后, 经间接 ELISA 检测, 效价范围在

表 1 单抗的亚类、效价和特异性

Table 1 The characterization of monoclonal antibody against M-like protein

McAb	F4	F5	F6	611	613	621	622	623	1D4	2C8	3F4	5E6
Subclass	IgG1	IgM	IgG2b	IgG1	IgG1	IgG2b	IgG2b	IgG1	IgM	IgG1	IgG1	IgG2b
Titer	2.56×10^4	5.12×10^4	5.12×10^4	2.56×10^4	5.12×10^4	1.02×10^5	5.12×10^4	2.56×10^4	2.56×10^4	5.12×10^4	5.12×10^4	2.56×10^4
Cross reaction	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

25600 ~ 102400 之间。单抗亚类鉴定结果显示,其中 6 株为 IgG1, 4 株为 IgG2b, 另外 2 株为 IgM。

2.5 单抗对 HEp-2 细胞的黏附抑制作用

单抗黏附抑制作用显示,单抗 2C8 能阻断类 M 蛋白结合 HEp-2 细胞,而其他单抗未见阻断作用,未与单抗感作的类 M 蛋白能结合 HEp-2 细胞,而阴性对照未见结合(图 2)。

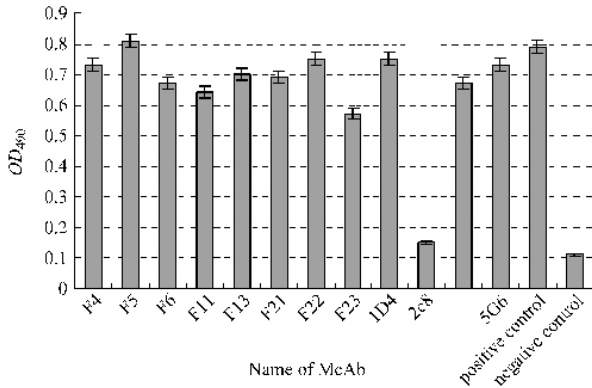


图 2 单抗对 HEp-2 细胞的黏附抑制

Fig.2 The adhesion inhibition of McAb to HEp-2.

3 讨论

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,引起败血症、关节炎等疫病^[1,8,9]。自吴硕显等 1949 年在上海地区首次报道该菌引起的猪链球菌病以来,该病一直在我国猪群中存在,呈地方流行。目前,我国尽管有防控该病的弱毒疫苗,但安全性存在问题。因此,开展猪源马链球菌兽疫亚种毒力因子研究,对阐明该菌的致病机理及新型疫苗的开发十分必要。

Moore 和 Bryans 最早报道马链球菌兽疫亚种菌体表面有一种耐酸、耐热、对胰酶敏感的蛋白,且认为该蛋白类似于 A 群链球菌的 M 蛋白^[14]。Timoney 首次证实马源兽疫亚种类 M 蛋白具有调理素作用,并为该菌重要的保护性抗原,但对猪源菌株未见相关报道^[8]。本实验室曾报道猪源兽疫亚种 ATCC35246 株含完整信号肽的类 M 蛋白基因,含一个 1137 bp ORF,与马源菌株类 M 蛋白基因的同源性为 86.9%,但一直未能表达^[9]。本文通过切除类 M 蛋白基因的部分信号肽序列,获得了分子量约 60 kDa 的表达产物。究其原因,可能是在大肠杆菌中,类 M 蛋白信号肽引导蛋白折叠和分泌的机制与马链球菌兽疫亚种不同,故信号肽影响了该基因的表达。本文中表达蛋白的分子量约 60 kDa,比文献报道的 58 kDa 稍大,可能与表达载体融合的一小段 His 蛋白有关。

A 群链球菌 M 蛋白是由 2 个 α 螺旋的链卷曲成类似于绞绳的结构^[15],具有黏附宿主上皮细胞以及抗吞噬等多种生物学功能,马链球菌兽疫亚种类 M 蛋白结构与其相似,亦

同样具有黏附上皮细胞等功能(材料另文发表)。本文研制了 12 株针对类 M 蛋白的特异单抗,其中 2C8 单抗能够阻断类 M 蛋白黏附 HEp-2 细胞。故该单抗与类 M 蛋白相应表位结合的肽段可模拟类 M 蛋白黏附细胞的受体,利用该特异单抗,通过噬菌体肽库展示技术,可筛选到与单抗相匹配的肽段,这对阐明马链球菌兽疫亚种类 M 蛋白黏附上皮细胞的分子机制有重大意义。

参 考 文 献

- [1] Sharp MW, Prince M, Gibbens J. *Streptococcus zooepidemicus* in fection and bovine mastitis. *Vet Rec*, 1995, **137**:128-129.
- [2] Salasia SI, Pasaribu FH, Wibawan WT, et al. Persistent occurrence of a single *S. zooepidemicus* clone in the pig and monkey population in Indonesia. *J Vet Sci*, 2004, **5**(3):263-265.
- [3] LasHeras A, Vela AI, Fernandez E, et al. Unusual outbreak of clinical mastitis in dairy sheep caused by *S. zooepidemicus*. *J clin Microbiol*, 2002, **40**(3):1106-1108.
- [4] Ural O, Tuncer I, Dikici N, et al. *Streptococcus zooepidemicus* meningitis and bacteraemia. *Scand Infect Dis*, 2003, **35**(3):206-207.
- [5] Tony MK, Anthony B, Travis MG, et al. Fatal case of toxic shock-like syndrome due to group C *Streptococcus* associated with superantigen exotoxin. *J Clin Microbiol*, 2004, **42**:2866-2869.
- [6] 陆承平. 兽医微生物学. 第三版. 北京:中国农业出版社, 2001:233-246.
- [7] 蔡宝祥. 家畜传染病学. 第四版. 北京:中国农业出版社, 2001:94-95.
- [8] Timoney JF, 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.
- [9] 范红结, 陆承平, 唐家琪. 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. *微生物学报*, 2004, **44**(5):617-620.
- [10] 苏良科, 陆承平. 马链球菌兽疫亚种中国株的类 M 蛋白基因抗原表位片段的克隆、表达. *中国人兽共患病杂志*, 2004, **20**(7):633-636.
- [11] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory press, 1989.
- [12] Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977, **74**:54-64.
- [13] 刘秀梵. 单克隆抗体在农业中的应用. 第一版. 合肥:安徽科技出版社, 1995.
- [14] Moore BO, Bryans JT. Antigenic classification of group C animal streptococci. *J Am Vet Med Assoc*. 1969, **155**:416-420.
- [15] Fischetti VA, Parry DA, Manjula BN, et al. Conformational characteristics of the complete sequence of A *Streptococcal* M6 protein. *Proteins*, 1988, **3**(1):60-69.

Development and characterization of monoclonal Antibody against M-like Protein of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* from pig

FAN Hong-jie , HE Shang , LU Cheng-ping*

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

Abstract : *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* belongs to lancefield group C streptococcus , which can cause disease both in animals and humans. It has been associated with a wide variety of serious infections , including meningitis , pneumonia , septic arthritis and mastitis. The M like proteins on the surface of *S. equi* subsp. *zooepidemicus* have an antiphagocytic role analogous to that of group A streptococcal M proteins that are essential in establishing infection. In the present study , the M-like gene without partial signal peptide sequence was amplified from genomic DNA of *S. equi* subsp. *zooepidemicus* ATCC35246 strain isolated from pig by polymerase chain reaction (PCR). Then the amplified fragment was cloned in the proper orientation into the site between *EcoR* I and *Xho* I of pET32-a(+) via restriction endonuclease *EcoR* I and *Xho* I . The recombinant plasmid was verified by restriction endonuclease analysis and nucleotide sequencing , then transformed into *E. coli* BL21. An fusion protein was expressed in BL21 after induced by IPTG , SDS-PAGE analysis showed that the recombinant protein had a molecular weight of 60 kD , Western blotting showed a positive reaction with the antiserum against ATCC35246. To prepare the monoclonal antibodies (McAbs) against the M-like protein , 6 ~ 8 weeks old BABL/c mice were immunized endermicly with purified recombinant M-like protein by Ni-nitrilotriacetic acid affinity chromatography. Splenocytes from the immunized mice were fused with SP2/0 and indirect ELISA was used to screen hybridoma cells. 12 hybridoma cell lines secreting McAbs against M-like protein of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* were generated , and indirect ELISA confirmed that these McAbs only reacted with M-like protein , but not reacted with other bacteria such as group A Streptococci , *Streptococcus suis* type 2 , *Streptococcus equi* . The indirect ELISA titers of these 12 ascites McAbs were about 2.56×10^4 to 1.01×10^5 , and the subtype of these McAbs belong to IgG2b, IgG1, IgM. The results of adhesion inhibition showed McAbs 2C8 could inhibit the adhesion of M-like protein to HEp-2 cell.

Keywords : *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* , M-like protein gene , expression , McAbs

Foundation item : Key Project of Educational Ministry for Science Research (106091) Jiangsu Province Natural Science Foundation (BK2004106)

* Corresponding author. Tex/Fax : 86-25-4396517 ; E-mail : lucp@njau.edu.cn

Received 27 December 2006/Accepted :11 April 2007/Revised :17 May 2007