

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2018.06.02

猪链球菌 Ide 通用截短蛋白原核表达及纯化研究

曲光刚^{1,2*}, 王长江^{3,4}, 李书光⁴, 李茂峰⁵, 武曰星³, 金婷婷³, 韩文瑜², 沈志强^{1,3,4*}

(1. 山东省滨州畜牧兽医研究院博士后科研工作站, 山东滨州 256600; 2. 吉林大学博士后科研流动站, 长春 130062;

3. 山东绿都生物科技有限公司, 山东滨州 256600; 4. 山东省滨州畜牧兽医研究院, 山东滨州 256600;

5. 阳信县综合检验检测中心, 山东滨州 251800)

[收稿日期] 2017-11-14 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2018) 06-0007-06 [中图分类号] S852.61

[摘 要] 为利用大肠埃希菌表达猪链球菌 Ide 通用截短蛋白, 通过对 GenBank 公布的 IdeS 蛋白家族基因同源性分析, 使用 Primer 5.0 软件设计一对特异性引物, 以猪链球菌 2 型强毒株 JZLQ 全基因组为模板, 采用 PCR 方法扩增 Ide 基因截短片段, 经 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切后将目的片段分别克隆到 pET28a、pET32a 和 pET-sumo 表达载体上, 分别转化宿主菌 *E.coli* BL21 (DE3)。通过优化诱导温度及诱导剂 IPTG 浓度进行表达并对表达产物进行 SDS-PAGE 分析。结果显示, PCR 扩增片段大小约为 1200 bp, 经双酶切和测序验证构建正确; 三种重组表达载体转化大肠埃希菌后均有目的蛋白表达, 但不同表达条件下目的蛋白表达量存在差异, 其中 pET28a-TrIde 重组表达载体用 25 °C 诱导、IPTG 终浓度为 1 mmol/L 时可实现重组蛋白的高效可溶性表达, 为 Ide_{Suis} 蛋白在猪链球菌通用疫苗研发方面的研究奠定了基础。

[关键词] 猪链球菌 2 型; IgM 裂解酶; 原核表达; SDS-PAGE 分析

Prokaryotic Expression and Purification of Truncated Ide General Protein of *Streptococcus suis*

QU Guang-gang^{1,2*}, WANG Chang-jiang^{3,4}, LI Shu-guang⁴, LI Mao-feng⁵,

WU Yue-xing³, JIN Ting-ting³, HAN Wen-yu², SHEN Zhi-qiang^{1,3,4*}

(1. Post-doctoral Research Center of Shandong Binzhou Animal Science & Veterinary Medicine Academy, Binzhou, Shandong, 256600, China;

2. Post-doctoral Research Mobile Station of Jilin University, Changchun 130062, China; 3. Shandong Lvdou Biotechnology Co., Ltd. Binzhou, Shandong 256600, China; 4. Shandong Binzhou Animal Science & Veterinary Medicine Academy, Binzhou, Shandong 256600, China;

5. Yangxin County Comprehensive Inspection and Testing Center, Binzhou, Shandong 256600, China)

Corresponding authors: SHEN Zhi-qiang, E-mail: bzshenzq@163.com; QU Guang-gang, E-mail: guanggangqu@163.com

Abstract: To express the truncated Immunoglobulin M-degrading enzyme (TrIde) of *Streptococcus suis* serotype 2, sequence homology of the IdeS family was analyzed and one pair of specific primers was designed using software Primer 5.0. The target sequence fragment was amplified by PCR using the genome DNA of strain JZLQ as a template. The amplified target DNA named TrIde was cut by *Bam*H I and *Hind* III and then was inserted into

作者简介: 曲光刚, 博士, 从事预防兽医学研究与应用。

通讯作者: 沈志强, E-mail: bzshenzq@163.com; 曲光刚, E-mail: guanggangqu@163.com

vector pET28a、pET32a 和 pET-sumo, respectively, to generate pET28a-TrIde、pET32a-TrIde 和 pET-sumo-TrIde recombinant vector. These recombinant vectors were then transformed into *E. coli* BL21 (DE3) for over expression. The *E. coli* cells containing different recombinant vectors were induced in different temperature conditions with different IPTG concentration for 8 hours, respectively. These specimens were analyzed by SDS-PAGE. Results showed that a fragment about 1200 bp in length was amplified from the genome of JZLQ strain and was confirmed right by double enzyme digestion and sequencing methods. SDS-PAGE analysis indicated that TrIde protein can be expressed by all of these recombinant vector but pET28a-TrIde performed better at 25 °C with 1 mmol/L IPTG. This research served as a basis for the study of the vaccine development of *S. suis* 2.

Key words: *Streptococcus suis* 2; Immunoglobulin M-degrading enzyme; prokaryotic expression; SDS-PAGE analysis

猪链球菌 (*Streptococcus suis*, *S. suis*) 感染猪可引起脑膜炎、关节炎和败血症等疾病, 给养猪业造成严重的经济损失^[1-3]。根据荚膜多糖抗原性的差异, 猪链球菌可以分为 35 个血清型。研究表明, 不同血清型的猪链球菌及同一血清型中不同菌株之间的致病力各有差异^[4]。其中猪链球菌 2 型是从病猪体内最常分离出的血清型, 致病力最强, 同时它也是一种重要的人畜共患病原体, 可导致生猪从业人员的感染和死亡^[5-6]。有关猪链球菌的致病机制及其预防研究已经成为公共卫生领域的研究热点^[7]。

天然免疫球蛋白 M (IgM) 含有 C1q 结合基序, 它可以结合到病原体表面而引发经典的补体级联反应^[8], 在抵抗不同病原体及关联先天免疫和获得性免疫过程中起重要作用^[9]。由于单体膜表面 IgM 是猪主要的 B 细胞受体^[9-10], 并且猪体内缺少 IgD, 因此 IgM 对猪尤为重要。研究发现猪感染链球菌后体内会有 IgM 发生降解^[11], 在此过程中猪链球菌 IgM 降解酶 (Immunoglobulin M-degrading enzyme of *S. suis*, Ide_{Ssuis}) 发挥了重要作用^[11], 这提示 Ide_{Ssuis} 蛋白可能是一种有效的猪链球菌抗原。此外, J Seele 等的研究结果表明, Ide_{Ssuis} 蛋白的氨基酸序列截短至第 432 个氨基酸时仍具有 IgM 降解活性^[12]。

研究通过克隆 Ide_{Ssuis} 基因截短片段 TrIde 序列, 分别构建原核表达载体 pET28a-TrIde、pET32a-TrIde 和 pET-sumo-TrIde, 转化 *E. coli* BL21 (DE3) 后通过 IPTG 诱导表达, 为猪链球菌通用亚单位疫苗的开发提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料 猪链球菌 2 型强毒株 JZLQ 为实验室分离保存。载体 pET28a、pET32a、pET-sumo 购自 Invitrogen 公司; 宿主菌 *E. coli* DH5 α 、*E. coli* BL21 (DE3)、rTaq DNA 聚合酶, 限制性内切酶 *Bam*H I、*Hind* III, T4 DNA 连接酶均购自宝生物工程 (大连) 有限公司; 质粒提取试剂盒: Plasmid Mini Kit I (200)、胶回收试剂盒: Gel Extraction Kit (200) 均购自美国 OMEGA 公司; 氨苄青霉素 (Ampicillin) 与卡那霉素 (Kanamycin) 购自 SIGMA 公司。

1.2 方法

1.2.1 猪链球菌 2 型 TrIde 基因扩增 根据 GenBank 数据库中猪链球菌 2 型 Ide_{Ssuis} 基因序列设计合成 1 对上、下游分别含有 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切位点的特异性引物。上游引物: 5'-CGGGATC-CATGGATACAGTTGTTACAGGAGTGAATGA-3', 下游引物: 5'-CCAAGCTTTGTCTGACTAGCTGTTTCT-TTGG-3' (下划线分别为 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切位点)。引物由上海生工生物工程有限公司合成。提取猪链球菌 2 型强毒株 JZLQ 全基因组 DNA, 以此为模板经 PCR 方法扩增出 TrIde 基因片段, 预期大小为 1200 bp 左右。TrIde 基因扩增反应参数为 98 °C 10 s, 55 °C 5 s, 72 °C 40 s, 35 个循环。扩增产物通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测片段大小。

1.2.2 原核重组表达载体的构建及鉴定 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后用胶回收试剂盒切胶回收, 纯化后与 pET28a、pET32a 和 pET-sumo 载体分别用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Hind* III 进行双酶

切,而后分别用胶回收试剂盒进行回收纯化;回收产物在 T4 DNA 连接酶作用下连接 1 h 后转入 DH5 α 感受态细胞,分别涂布相应抗性 LB 筛选平板,于 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中过夜培养;分别挑取筛选平板上的单菌落于 LB 液体培养基中,经培养后提取质粒进行双酶切鉴定,并将阳性质粒送上海生工生物工程有限公司进行测序。

1.2.3 TrIde 蛋白的诱导表达及可溶性分析 将测序正确的重组表达载体 pET28a-TrIde、pET32a-TrIde、pET-sumo-TrIde 分别转化 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞,涂布抗性平板后挑取单菌落过夜培养,次日按 1% 比例将过夜培养物接种于新鲜 LB 培养基中继续培养,至 OD₆₀₀ 达到 0.5 左右时,分别加入 IPTG 至终浓度为 0.1 mmol/L、1 mmol/L,分别在 25 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ C 条件下诱导表达 8 h。诱导表达后的菌体细胞经超声波破碎后高速离心分离上清和沉淀,分别进行 SDS-PAGE 电泳分析。

1.2.4 TrIde 蛋白纯化及阳性血清制备 采用优化后的最佳条件对 TrIde 目的蛋白进行诱导表达,表达产物经镍亲和层析柱纯化,纯化后的蛋白溶液采用 BCA 法微量蛋白浓度测量试剂盒测定浓度,蛋白分装后放置-80 $^{\circ}$ C 保存。

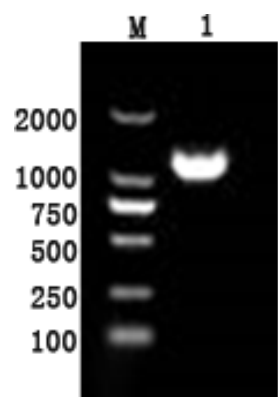
将纯化好的目的蛋白制成疫苗免疫清洁级新西兰兔,400 μ g/只。免疫方式为皮下注射,第 1 次免疫时采用抗原与等体积的弗氏完全佐剂充分混匀后免疫;第 2 次免疫于首次免疫 14 d 后进行,抗原与等体积的弗氏不完全佐剂充分混匀乳化后进行免疫。第 3 次免疫在首次免疫 28 d 后进行,免疫条件同前一次。第 3 次免疫一周后采血,用 ELISA 方法测定血清抗体效价。

1.2.5 Western blotting 分析 目的蛋白及空白菌变性后经 SDS-PAGE 电泳,电泳结束后将凝胶放置在转膜缓冲液中平衡 20 min,采用半干法转印蛋白到硝酸纤维素膜上,磷酸盐缓冲液漂洗后用体积分数为 10% 的 TBST 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜。再加入体积分数 5% 的 TBST 稀释的兔阴性血清,37 $^{\circ}$ C 振荡孵育 1 h, TBST 漂洗 3 次,加入按 1:2000 稀释的 HRP 标记的羊抗兔二抗,37 $^{\circ}$ C 振荡孵育 30 min, TBST 漂洗 3 次后进行 DAB 显色观察结果。

2 结 果

2.1 TrIde 目的基因的扩增 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,PCR 扩增产物片段大小约为 1200 bp,与预期目的片段大小相符,且未见非特异性扩增条带(图 1)。

2.2 重组表达载体鉴定 琼脂糖凝胶电泳结果显示,三种重组表达载体分别用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切后均得到一条大小约为 1200 bp 的条带,另一条条带位置在 2000 bp 以上(图 2),为切开的载体片段。测序结果进一步表明重组表达载体构建正确。

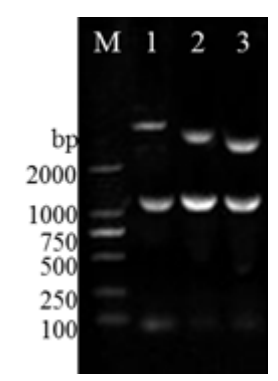


M:DL2000 Marker;1:TrIde 基因片段 PCR 产物

M: DL2000 Marker; 1: PCR product of TrIde

图 1 TrIde 基因 PCR 扩增产物 1%琼脂糖凝胶电泳结果

Fig 1 PCR product of TrIde detected by 1% agarose gel electrophoresis



M:DL2000 Marker;1:pET32a-TrIde 双酶切结果;

2:pET-sumo-TrIde 双酶切结果;3:pET28a-TrIde 双酶切结果

M: DL2000 Marker; 1: Double digestion products of pET32a-TrIde;

2: Double digestion products of pET-sumo-TrIde;

3: Double digestion products of pET28a-TrIde

图 2 重组表达质粒双酶切鉴定

Fig 2 Double digestion assay of recombinant expression vectors

2.3 TrIde 目的蛋白诱导表达

2.3.1 不同表达载体表达效果比较 在 *E. coli* BL21 (DE3) 中分别对三种重组表达载体进行 TrIde 目的蛋白的诱导表达, 结果显示 pET28a-TrIde 重组表达载体的表达效果最佳, 目的蛋白表达量高且可溶率为 95% 以上 (图 3); pET32a-TrIde 重组表达载体表达的目的蛋白也具有较好的可溶性, 但表达量比 pET28a-TrIde 重组表达载体略低 (图 3, 第 2、5 泳道); pET-sumo-TrIde 重组表达载体表达的目的蛋白大部分以包涵体形式存在, 可溶性目的蛋白的表达量低于 pET28a-TrIde 重组表达载体 (图 3, 第 2、8 泳道)。

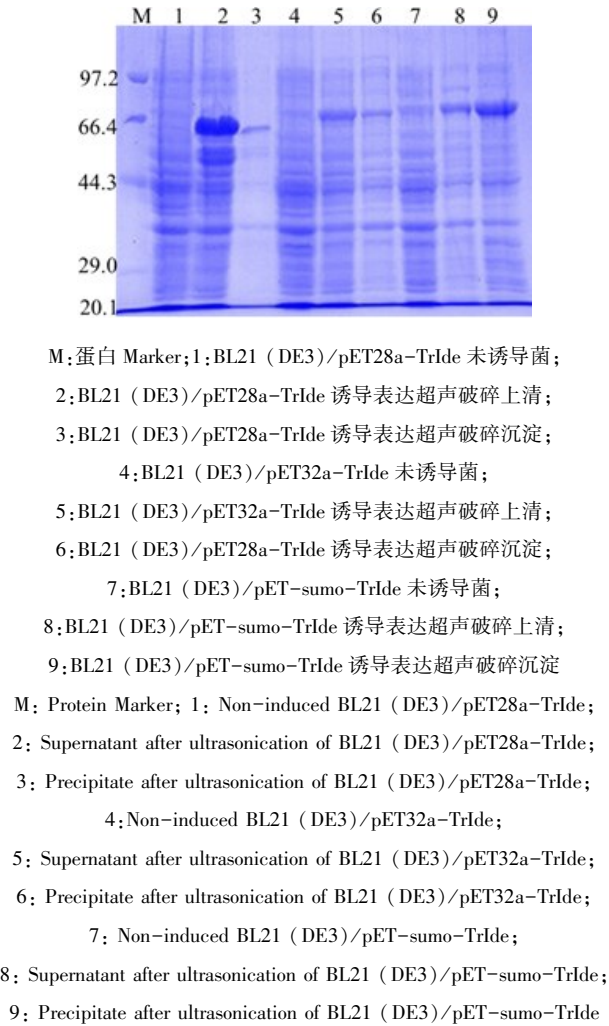


图 3 三种不同重组表达载体诱导
表达结果 SDS-PAGE 分析

Fig 3 SDS-PAGE analysis of TrIde induced
by different recombinant bacteria

2.3.2 pET28a-TrIde 重组表达载体表达条件的优化 SDS-PAGE 结果显示, 重组菌 BL21 (DE3)/pET28a-TrIde 经诱导后表达产物大小约 50 kD, 条带位置与预期目的蛋白分子质量大小一致 (图 4); 不同温度条件对目的蛋白的表达量具有较大影响, 25 ℃ 条件下目的蛋白的表达量比 37 ℃ 条件下高, 且可溶性较好 (图 4, 第 1、3 和 5、7 泳道)。25 ℃ 条件下 IPTG 浓度对目的蛋白表达量及可溶性几乎无影响 (图 4, 第 1、2 和 3、4 泳道)。

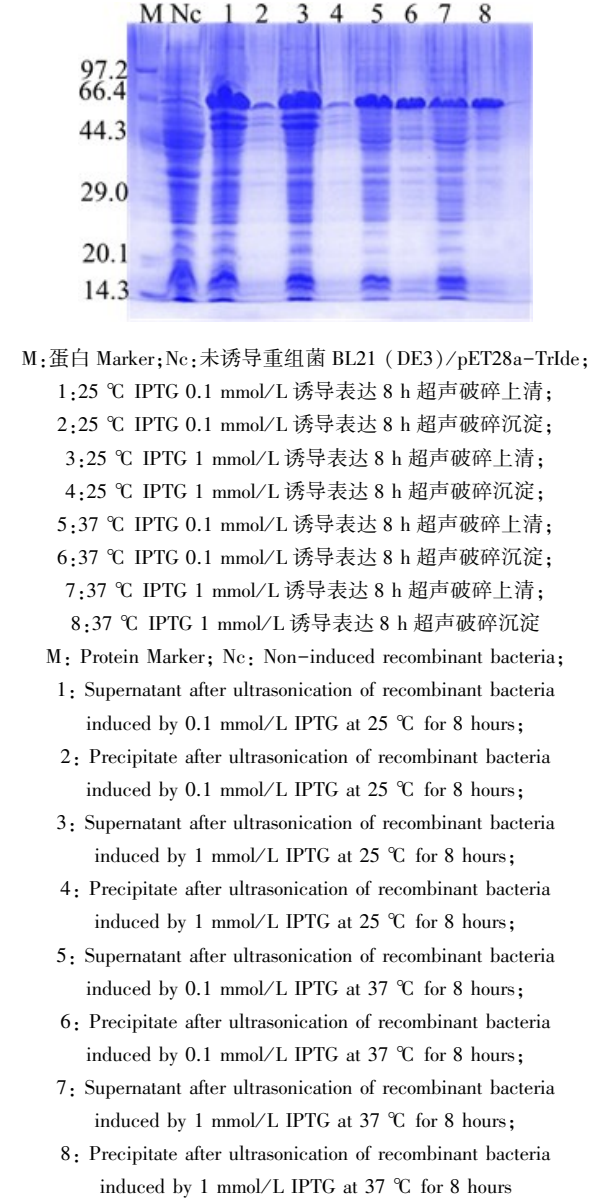
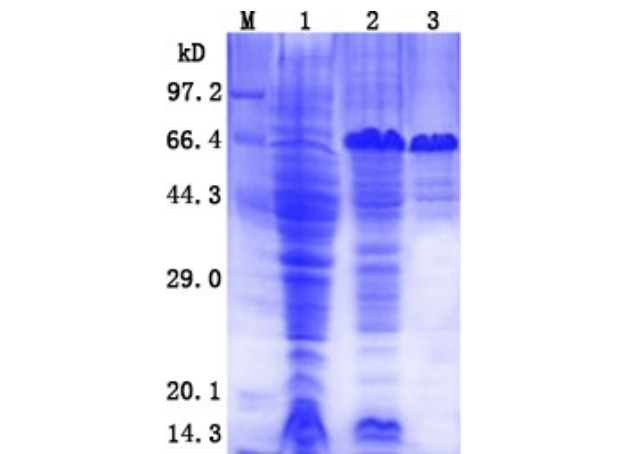


图 4 重组菌 BL21 (DE3)/pET28a-TrIde
不同诱导条件下表达结果 SDS-PAGE 分析

Fig 4 SDS-PAGE analysis of recombinant
TrIde induced by different conditions

2.4 TrIde 蛋白纯化 选择诱导表达效果较好的重组菌 BL21 (DE3)/pET28a-TrIde 以最佳条件进行目的蛋白诱导表达,蛋白溶液经镍亲和层析柱纯化。纯化后的蛋白进行 SDS-PAGE(图 5),灰度分析结果显示目的蛋白纯度可达 95%,BCA 法测定蛋白浓度为 1.8 mg/mL。



M: 蛋白 Marker; 1: 阴性对照;
2: 菌体超声破碎后离心上清; 3: 亲和层析纯化后的蛋白
M: protein Marker; 1: Negative control;
2: Supernatant after ultrasonication; 3: Purified TrIde protein

图 5 TrIde 蛋白纯化 SDS-PAGE 分析

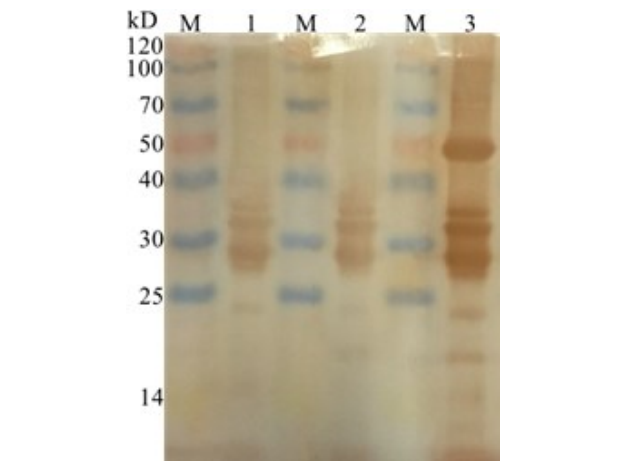
Fig 5 SDS-PAGE analysis of purified TrIde protein

2.6 Western blotting 分析 免疫印迹结果显示,空载体菌及未诱导的转化菌在 50 kD 处均无表达条带,诱导菌则有明显条带(图 6),提示经 IPTG 诱导后重组菌表达了截短的 Ide_{SsuIs} 蛋白 TrIde,且 TrIde 重组蛋白能被抗 2 型猪链球菌阳性血清识别,表明该重组蛋白具有良好的抗原反应和免疫原性。

3 讨论

由于猪链球菌的致病机制十分复杂,目前在猪链球菌病预防过程中尚未有广谱、高效的疫苗。一般认为猪链球菌致病力强弱是由其毒力因子决定的,但由于猪链球菌的毒力因子种类繁多、结构与功能复杂多变、各毒力因子之间的联系错综复杂,因此其致病机制尚未研究清楚^[12-13]。目前研究的较为深入的致病性毒力因子主要包括荚膜多糖、溶菌酶释放蛋白与猪溶素等^[14]。

人类病原菌酿脓链球菌分泌一种针对 IgG 特



M: 预染 Marker; 1: 空载体表达产物;
2: 未诱导菌表达产物; 3: TrIde 重组蛋白
M: Marker; 1: Expression product of empty vector;
2: Non-induced expression product; 3: TrIde recombinant protein

图 6 TrIde 重组蛋白 Western blotting 分析

Fig 6 Western blotting analysis of TrIde protein

异性的内肽酶 IdeS,该酶可在 IgG 铰链区高效裂解人类 IgG。有研究表明猪链球菌 Mac 家族基因编码一种具有 IdeS 蛋白酶活性的酶(Ide_{SsuIs})^[15],该酶被证明与 IdeS 同型但不具有 IgG 裂解活性,而是专一性的裂解 IgM,并且裂解效率极高。此外,Ide_{SsuIs} 蛋白酶氨基酸序列的全长不是其裂解活性所必需的。Jana Seele 等证明 Ide_{SsuIs} 蛋白酶只需从第 35 号到第 432 号氨基酸长度的片段就具有较好的 IgM 裂解活性^[11]。

研究对 Ide_{SsuIs} 开放阅读框基因序列推测的氨基酸序列进行分析后,选取了长度为 1227 bp 的具有裂解活性的片段进行克隆表达。利用 pET28a、pET32a 和 pET-sumo 载体质粒分别构建 Ide_{SsuIs} 的重组表达载体 pET28a-TrIde 和 pET32a-TrIde 和 pET-sumo-TrIde,利用 BL21 (DE3) 作为宿主菌,通过不同温度条件及诱导剂 IPTG 浓度的优化,实现了该蛋白在大肠埃希菌原核表达系统中的可溶性表达。利用 pET28a 载体质粒表达的蛋白分子量理论值为 46 kD,但 SDS-PAGE 电泳结果显示其表观分子量略大于 46 kD。其表观分子量偏大的原因可能是与标准蛋白相比其电荷密度较低造成的^[16]。

分别把目的基因 TrIde_{SsuIs} 片段克隆入不同的表

达载体构建三种重组表达质粒,并分别比较其表达效果,结果显示 pET28a 载体质粒能够实现该目的基因的可溶性表达,且目的蛋白表达量较高,便于该蛋白的后续纯化工作。Ide_{Ssuis} 蛋白的可溶性表达为该蛋白的纯化及免疫原性分析奠定了基础。

IgM 是体液免疫过程中的重要参与者,发生感染后 IgM 首先出现,它是感染初期的标志性物质。由于 Ide_{Ssuis} 对 IgM 具有非常高效和专一性的裂解作用,这可能是造成猪链球菌 2 型感染后产生免疫逃逸的机制之一。该酶参与了宿主免疫应答早期阶段的宿主-病原体相互作用,同时 Ide_{Ssuis} 在大部分链球菌中都有表达,因此,该蛋白的可溶性表达为猪链球菌通用疫苗的研发提供了新的方向和思路。后续需通过猪链球菌攻毒保护实验来验证该重组蛋白的免疫效果及保护作用。

参考文献:

- [1] Segura M, Zheng H, De Greeff A, *et al.* Latest developments on *Streptococcus suis*: an emerging zoonotic pathogen: part 1 [J]. *Future Microbiology*, 2014, 9(4): 441-444.
- [2] Fittipaldi N, Segura M, Grenier D, *et al.* Virulence factors involved in the pathogenesis of the infection caused by the swine pathogen and zoonotic agent *Streptococcus suis* [J]. *Future Microbiology*, 2012, 7(2): 259-279.
- [3] 简娟娟, 刘 利, 王 维. 猪链球菌 2 型感染的临床特征和治疗 [J]. *现代畜牧科技*, 2015 (2): 69-69.
Jian J J, Liu L, Wang W. Clinical characteristics and treatment of *Streptococcus suis* type 2 infection [J]. *Modern Animal Husbandry Science & Technology*, 2015 (2): 69-69.
- [4] Goyette-Desjardins G, Auger J P, Xu J, *et al.* *Streptococcus suis*, an important pig pathogen and emerging zoonotic agent—an update on the worldwide distribution based on serotyping and sequence typing [J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2014, 3(6): e45.
- [5] Kerdsin A, Dejsirilert S, Puangpatra P, *et al.* Genotypic profile of *Streptococcus suis* serotype 2 and clinical features of infection in humans, Thailand [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2011, 17(5): 835-842.
- [6] Sriskandan S, Slater J D. Invasive disease and toxic shock due to zoonotic *Streptococcus suis*: an emerging infection in the East? [J]. *PLoS Med*, 2006, 3(5): e187.
- [7] Lun Z R, Wang Q P, Chen X G, *et al.* *Streptococcus suis*: an

- emerging zoonotic pathogen [J]. *The Lancet Infectious Diseases*, 2007, 7(3): 201-209.
- [8] Butler J E, Zhao Y, Sinkora M, *et al.* Immunoglobulins, antibody repertoire and B cell development [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2009, 33(3): 321-333.
- [9] Ochsenbein A F, Zinkernagel R M. Natural antibodies and complement link innate and acquired immunity [J]. *Immunology Today*, 2000, 21(12): 624-630.
- [10] Butler J E, Sun J, Navarro P. The swine Ig heavy chain locus has a single JH and no identifiable IgD [J]. *International Immunology*, 1996, 8(12): 1897-1904.
- [11] Seele J, Singpiel A, Spoerry C, *et al.* Identification of a novel host-specific IgM protease in *Streptococcus suis* [J]. *Journal of Bacteriology*, 2013, 195(5): 930-940.
- [12] Seele J, Beineke A, Hillermann L M, *et al.* The immunoglobulin M-degrading enzyme of *Streptococcus suis*, Ide_{Ssuis}, is involved in complement evasion [J]. *Veterinary Research*, 2015, 46(1): 45-59.
- [13] 高尚庆, 雷连成, 韩文瑜. 猪链球菌 2 型基因工程疫苗研究进展 [J]. *生物技术通报*, 2007 (2): 33-35.
Gao S Q, Lei L C, Han W Y. Progress in the research of genetically engineering vaccine of *Streptococcus suis* serotype 2 [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2007 (2): 33-35.
- [14] Okura M, Takamatsu D, Maruyama F, *et al.* Genetic analysis of capsular polysaccharide synthesis gene clusters from all serotypes of *Streptococcus suis*: potential mechanisms for generation of capsular variation [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(8): 2796-2806.
- [15] 马建华, 魏建忠. 猪链球菌毒力因子研究进展 [J]. *动物医学进展*, 2014, 35(8): 95-99.
Ma J H, Wei J Z. Progress on virulence factors of *Streptococcus suis* [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2014, 35(8): 95-99.
- [16] Lei B, DeLeo F R, Hoe N P, *et al.* Evasion of human innate and acquired immunity by a bacterial homolog of CD11b that inhibits opsonophagocytosis [J]. *Nature Medicine*, 2001, 7(12): 1298-1305.
- [17] 曲光刚, 杨金芳, 李茂峰, 等. 猪链球菌 Sao-M 和 Ide_{Ssuis} 蛋白的原核表达与反应原性分析 [J]. *中国兽药杂志*, 2016, 50(6): 1-4.
Qu G G, Yang J F, Li M F, *et al.* Expression and Western blotting analysis of *Streptococcus suis* Sao-M and Ide_{Ssuis} [J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2016, 50(6): 1-4.