

## 罗非鱼源无乳链球菌 ZQ0910 转录调控因子 *rovS* 基因的克隆及表达研究

王 蓓<sup>1,2</sup>, 简纪常<sup>1,2</sup>, 鲁义善<sup>1,2</sup>, 蔡双虎<sup>1,2</sup>,  
黄郁葱<sup>1,2</sup>, 汤菊芬<sup>1,2</sup>, 李桂欢<sup>1,2</sup>, 吴灶和<sup>2,3\*</sup>

(1. 广东海洋大学水产学院, 广东 湛江 524025;

2. 广东省水产经济动物病原生物学及流行病学重点实验室, 广东 湛江 524025;

3. 仲恺农业工程学院, 广东 广州 510225)

**摘要:** 为了对罗非鱼源无乳链球菌 ZQ0910 株毒力相关转录调控因子 *rovS* 进行克隆及表达研究, 实验根据 GenBank 上登录的相关基因设计引物, 采用 PCR 方法扩增该株细菌的 *rovS* 基因, 然后将该基因定向克隆到原核表达载体 pET-28a(+) 中, 在大肠杆菌 Rosetta(DE3) 中进行 IPTG 诱导表达。结果显示, 该基因有 849 个碱基, 编码 282 个氨基酸; 同源基因序列比对显示, 无乳链球菌 ZQ0910 株与无乳链球菌 2 603 V 与 ATCC13813 的 *rovS* 基因的同源性最高; 经 IPTG 诱导后表达的融合蛋白分子量为 34 ku; 用亲和层析后的融合蛋白免疫新西兰大白兔制备多克隆抗体, 经 ELISA 检测效价达到 1:512 000。研究结果表明, 实验成功克隆与表达了 *rovS* 基因, 为深入探讨 RovS 调节因子在调节细菌的代谢、生长和毒力等多种生命活动中的作用提供了理论依据。

**关键词:** 无乳链球菌 ZQ0910; RovS 转录调控因子; 克隆; 原核表达

**中图分类号:** S 943

**文献标志码:** A

无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*) 是一种革兰氏阳性链球菌, 因最先从患乳房炎的牛中分离而得名。近年来, 在我国广东、广西、海南等省罗非鱼养殖地区频频出现范围较大的无乳链球菌引起的爆发性病害, 这使得罗非鱼具有强抗病力、不易患病的观点受到了挑战<sup>[1]</sup>。本实验室研究团队分赴广东、广西和海南省各罗非鱼主养区, 采集多个罗非鱼养殖场的发病鱼样本, 开展病原菌分离、理化、分子鉴定及强弱毒株的筛选等流行病学调查工作, 最终确定编号为 ZQ0910 株为罗非鱼源无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*) 强毒株, 并完成了该菌株的全基因序列的测序、草图绘制及基因注释等工作, GenBank 登录号为 AKAP00000000<sup>[2]</sup>。

细菌为了在宿主体内的不同器官中定植和生存, 它必须感受外界不断变换的环境, 高效率地产生响应, 从而精准地调控特定基因的表达<sup>[3]</sup>。由于随时要涉及到众多基因的协同作用, 因此对细菌来说最有效率的方式莫过于通过众多转录调控因子的相互作用, 形成一个精密的全局调控网络来大批量地调控整个基因组的表达<sup>[4]</sup>。我们通过比较基因组学分析, 除了找到一些传统已知的毒力因子如荚膜多糖和溶血素等基因之外, 有一些新的毒力相关的转录调控因子得以鉴定, 如毒力相关转录调控因子 RovS, 二元信号转导系统等等。Rgg 转录调控因子基因最早是 1992 年在格氏链球菌 (*S. gordonii*) 中发现的, 经过多年的研究发现该基因

收稿日期:2012-09-20 修回日期:2012-11-28

资助项目:国家重点基础研究发展计划(2009CB118704);国家重点基础研究发展计划前期(2011CB111600);广东省科技计划项目(2012B020308009);2011年广东省高等院校学科建设和教学质量与教学改革工程专项

通信作者:吴灶和, E-mail:wuzaohe@163.com

广泛分布于各种革兰氏阳性菌中,包括化脓链球菌、格式链球菌、乳酸乳球菌、2 型猪链球菌等,目前关于该调控因子研究的最为深入的是猪链球菌中的 Rgg 调控因子(又被称做 RopB),证实了其具有对细菌基因组全局的调控功能,并能协同调节细菌的其他生命活动<sup>[5-8]</sup>。无乳链球菌中的 *rovS* 基因是 Rgg 家族的一个重要成员,控制细菌执行多种功能,例如控制胞外蛋白的分泌、细菌素的表达等<sup>[9]</sup>,然而这些研究仅限于人源分离株的研究结果,作为近年罗非鱼链球菌病的主要病原菌之一的鱼源分离株是否具有相应功能以及其如何粘附、定植于鱼体等多个问题尚待解答。

本研究采用生物信息学及分子生物学方法克隆表达了罗非鱼源无乳链球菌 *rovS* 基因,证实了其氨基酸序列与其它革兰氏阳性菌中的 Rgg 家族蛋白有较高的一致性,这为我们深入探讨其调控功能和分子机制鉴定了理论基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌株和质粒

罗非鱼源无乳链球菌强毒株 ZQ0910 由本实验室分离保存; *E. coli* DH5 $\alpha$ 、*E. coli* Rosetta (DE3) 与 pET-28a(+) 均由本实验室保存。克隆载体 pMD18-T 购自 TAKARA 公司。

### 1.2 其它试剂及实验动物

细菌组织基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司, *Taq* DNA 聚合酶、*Nco* I、*Xho* I 限制性内切酶、*T<sub>4</sub>* DNA 连接酶, DNA Marker、DNA 胶回收试剂盒购于 TaKaRa 公司;羊抗兔-HRP 购自 BBI 公司,弗氏完全佐剂与弗氏不完全佐剂均购自 Sigma,新西兰大白兔购自广东医学院实验室动物中心。

### 1.3 细菌基因组 DNA 的提取及 *rovS* 基因的扩增

按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取无乳链球菌基因组 DNA,根据 GenBank 上已登录的 *rovS* 基因序列(登录号:AKAP00000000)设计 1 对引物,分别引入酶切位点 *Nco* I 与 *Xho* I,由生工生物工程(上海)有限公司合成。

上游引物: CATGCCATGGAAAAGAATT-

AGGAAAACACTAAGAAG

下游引物: CCGCTCGAGGCATTCTTTATT-ATTGCCAAGTACTTTTTG

以提取的基因组 DNA 作为模板,通过 PCR 扩增 *rovS* 目的片段,反应条件为预变性 95 °C 5 min,95 °C 1 min,57 °C 30 s,72 °C 1 min,30 个循环,最后 72 °C 延伸 10 min;扩增产物在 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳中检测。根据相对分子质量 Marker 标示,从琼脂糖凝胶上进行切胶回收含有目的片段的凝胶,按照 DNA 快速纯化胶回收试剂盒操作步骤回收目的 PCR 产物。

### 1.4 原核表达载体构建及大肠杆菌诱导表达

PCR 扩增产物经试剂盒纯化后,用 *Nco* I 与 *Xho* I 双酶切该产物,切胶回收后定向插入经同样内切酶双酶切的 pET-28a(+) 质粒载体中,构建重组质粒 pET-RovS,转化入 *E. coli* Rosetta (DE3) 感受态细胞,涂布 LB(含 Kan 100  $\mu$ g/mL) 平板,挑取单个菌落,接种于 5 mL LB 培养基(含 Kan 100  $\mu$ g/mL) 中,37 °C 振荡培养过夜。碱裂解法抽提质粒,经酶切、PCR 菌落及测序鉴定插入正确后以 1:100 的比例接种于新鲜的 LB 培养基(含 Kan 100  $\mu$ g/mL) 中,37 °C 继续振荡培养,至 OD<sub>600</sub> 达到 0.4 ~ 0.6,加 IPTG 诱导表达。

### 1.5 表达条件的优化

不同诱导温度对目的蛋白在大肠杆菌中表达量的影响 将鉴定正确的表达菌接种到 2 mL 含卡那霉素的 LB 培养基中,37 °C 200 r/min 条件下振荡培养 4 h 左右,按体积比为 1:100 的比例接种到新鲜的 LB 培养基(含 Kan 100  $\mu$ g/mL) 中,加入 IPTG 至浓度为 1 mmol/L,分别在 16、28 及 37 °C 条件下诱导 5 h 后离心收集菌体。经超声破碎离心后,取上清液及沉淀以 SDS-PAGE 电泳分析目的蛋白表达的最佳条件。采用解离非连续缓冲系统垂直板电泳,丙烯酰胺浓度:分离胶 12% (v/v),浓缩胶 5% (v/v)。上样量每孔 10  $\mu$ L,在 60 V 恒压电泳约 30 min,再 120 V 恒压电泳约 1 h,考马斯亮蓝 R250 染色,冰醋酸甲醇脱色。

不同 IPTG 浓度对目的蛋白在大肠杆菌中表达量的影响 按照上述不同诱导温度对目的蛋

白在大肠杆菌中表达量的影响的方法培养细菌,分别加入不同体积的 IPTG,使其终浓度分别为 0.2,0.4,0.6,0.8 和 1.0 mmol/L 5 个浓度,在 37 °C 条件下培养 5 h 后各取 1 mL 菌液,以 SDS-PAGE 分析目的蛋白的表达量。

不同诱导时间对目的蛋白在大肠杆菌中表达量的影响 按照上述不同诱导温度对目的蛋白在大肠杆菌中表达量的影响的方法培养细菌,取 1 mL 菌液作为未诱导对照组,其余的菌液加入 IPTG 终浓度为 1.0 mmol/L,在 37 °C 条件下继续振荡培养,分别于诱导后 1、2、3、4、5 h 后各取 1 mL 菌液,以 SDS-PAGE 分析目的蛋白表达的最佳时间。

### 1.6 Western-blotting 检验

将诱导表达后的重组菌进行 SDS-PAGE 电泳后,将其上的蛋白转移至 PVDF 膜,5% 脱脂牛奶封闭 1 h,加入一抗(鼠抗 His 标签抗体,1:2 000 稀释),阴性对照采用注射佐剂 PBS 后的血清;TBST 清洗后加入二抗(HRP 标记的羊抗鼠 IgG,1:500 稀释)清洗,最后加入 DAB 显色液,待出现明显条带后用水冲洗终止反应。

### 1.7 表达产物的纯化

将菌液超声破碎后离心,取上清和沉淀分别做 SDS-PAGE 电泳,鉴定表达产物是否形成了包涵体。按说明书进行蛋白纯化,采用 HisTrap FF crude Columns,上样细胞裂解液,用咪唑洗脱缓冲液洗柱,得到纯化蛋白。

### 1.8 抗血清的制备

将纯化的融合蛋白 pET-RovS 皮下多点注射免疫 4 个月健康的新西兰大白兔(体质量约 2.1 kg),免疫程序如下:①一免:第 1 天,免疫用抗原为弗氏完全佐剂+蛋白;②二免:第 21 天,免疫用抗原为弗氏不完全佐剂+蛋白;③三免:第 35 天,免疫用抗原为弗氏不完全佐剂+蛋白;④第 45 天,进行耳静脉采血 2 mL,用于 ELISA 抗血清效价监测;⑤四免:第 49 天,免疫用抗原为弗氏不完全佐剂+蛋白;⑥终放血:第 56 天,颈动脉采全血。免疫剂量为初次免疫 0.2 mg,二免、三免、

四免均为 0.1 mg。离心分离血清,低温保存待用。

### 1.9 抗血清效价测定

用纯化的重组蛋白为抗原包被 96 孔板,根据预实验确定最适抗原浓度为每孔 0.2 μg,1% BSA 封闭,加入不同稀释比例的免疫血清,阴性对照孔加入免疫前血清,空白对照孔加入 PBS。二抗羊抗兔-HRP 按照 1:8 000 稀释,显色。

## 2 结果

### 2.1 *rovS* 基因的克隆

PCR 扩增出一条 849 bp 的特异条带(图 1),克隆入 pMD18-T 载体,菌落 PCR、酶切鉴定正确后测序,发现该基因含有一个 849 bp 的开放阅读框(ORF),编码 282 个氨基酸,预测分子量约为 33 ku,等电点为 7.429。该基因在 GenBank 上的登录号为 AKAP01000041.1。将该序列及其编码的氨基酸序列与基因库中已登录的其他无乳链球菌的相应基因及氨基酸序列进行同源性比较,结果见图 2,3 所示。

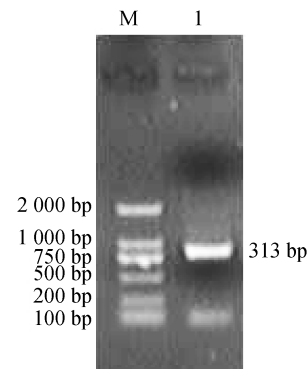


图 1 无乳链球菌 *rovS* 基因的克隆

M. DL2000 分子标记; 1. *rovS* PCR 产物。

### Fig. 1 Cloning of *rovS* gene from *S. agalactiae*

M. DL2000 Marker; 1. PCR product of *rovS*.

### 2.2 原核表达载体的构建

用双酶切后的质粒 pET-28a(+)与双酶切后的 *rovS* 连接,构建的重组质粒命名为 pET-RovS。经 *Nco* I 与 *Xho* I 酶切证实插入了一段约 849 bp 的序列(图 4)。

### 2.3 重组质粒的诱导表达

**最佳诱导温度** 从图 5 可以看出,在其他条件一致的情况下,不同诱导温度下重组融合蛋白的表达量及其可溶性分析表明,37 °C 条件下 *RovS* 全菌蛋白表达量高于 16 及 28 °C 的表达量;融合蛋白均存在于上清中,故该融合蛋白的最佳诱导温度是 37 °C,并存在于上清液中。

**最佳诱导浓度** 在其他条件一致的情况

下,不同 IPTG 浓度均可诱导融合蛋白的表达。随着 IPTG 浓度的增加,诱导的重组融合蛋白表达量也随着增加,浓度为 1.0 mmol/L 的诱导重组融合蛋白表达量最大(图 6-a)。由于 IPTG 对细胞有毒性,高浓度 IPTG 不利于细菌生长,故不再增加 IPTG 的浓度,选择 1.0 mmol/L 作为最佳诱导浓度。

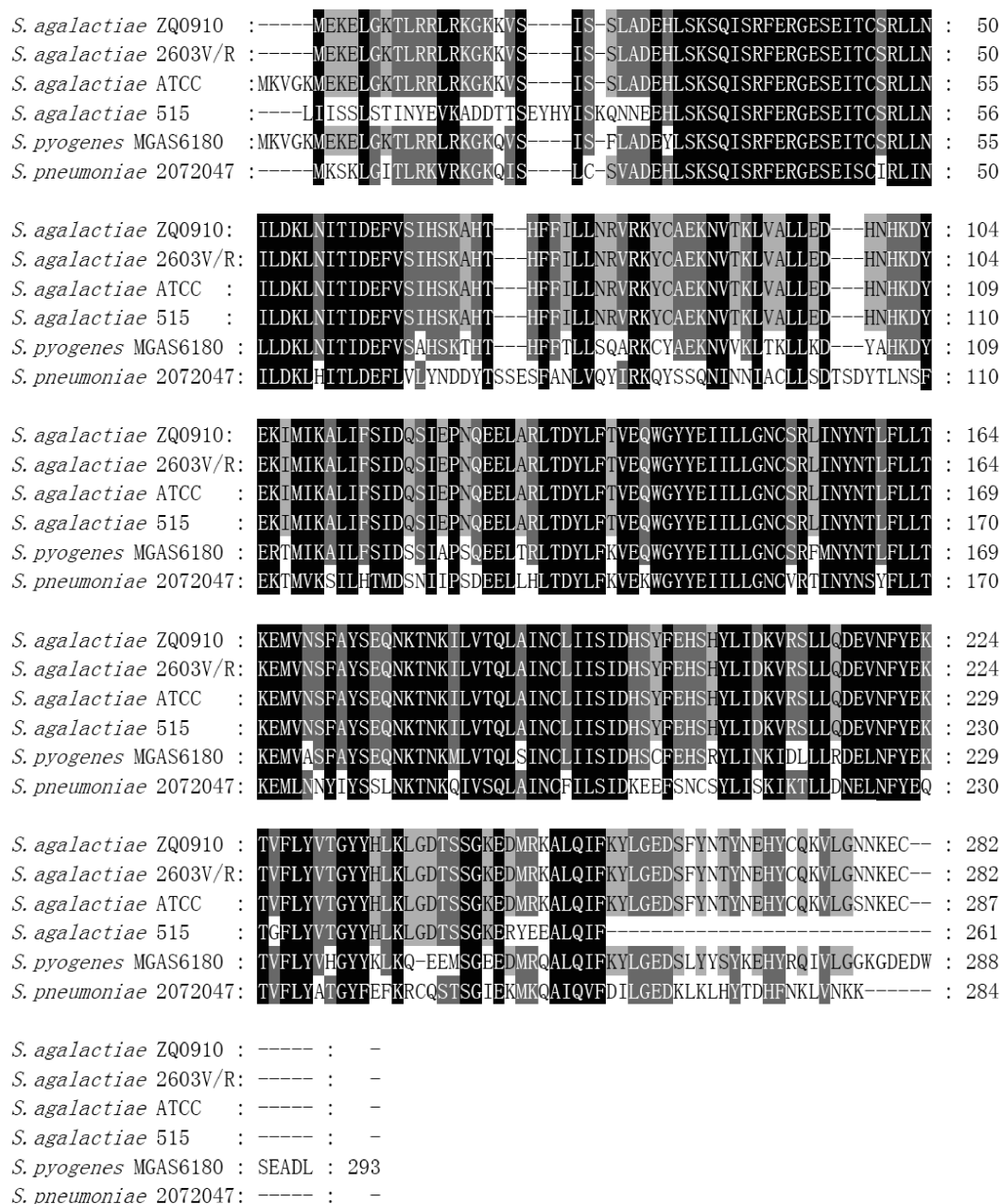


图 2 *RovS* 氨基酸序列与其它已知 *RovS* 氨基酸序列多重比对结果

Fig. 2 Multiple alignments of the deduced amino acid sequence of *RovS* with *RovS* of other species

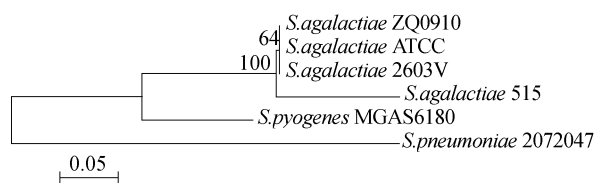


图3 以 NJ 法构建的 Rgg 转录因子家族成员氨基酸序列系统进化树

Fig.3 A phylogenetic tree of Rgg protein family transcriptional regulators constructed with the Neighbor-joining method

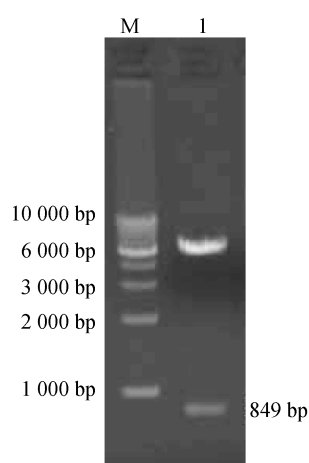


图4 重组质粒 pET-RovS 的酶切鉴定

M. DL2000 DNA 标记; 1. pET-RovS 经 *Nco* I 与 *Xho* I 酶切后结果。

Fig.4 The determination of the recombinant pET-RovS by enzyme restriction

M. DL2000 DNA marker; 1. the result of pET-RovS digested by *Nco* I and *Xho* I.

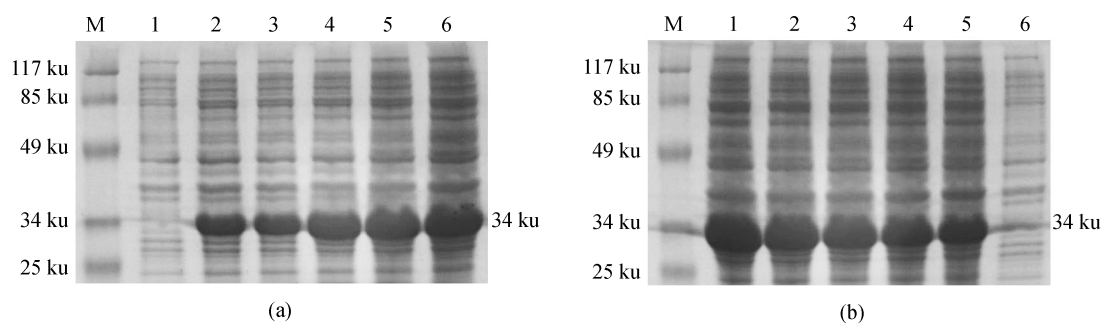


图6 重组菌 Rosetta/pET-RovS 在不同 IPTG 浓度诱导表达 RovS 的 SDS-PAGE 分析

(a) M. 蛋白分子量标准; 1. 诱导前质粒; 2. 0.2 mmol/L; 3. 0.4 mmol/L; 4. 0.6 mmol/L; 5. 0.8 mmol/L; 6. 1.0 mmol/L; (b) M. 蛋白分子量标准; 1.5 h; 2.4 h; 3.3 h; 4.2 h; 5.1 h; 6.0 h。

Fig.6 SDS-PAGE profile of expressed product in recombinant *E. coli* Rosetta(DE3) induced with IPTG at different concentrations

(a) M. protein marker; 1. total protein of pET-RovS not induced; 2. 0.2 mmol/L; 3. 0.4 mmol/L; 4. 0.6 mmol/L; 5. 0.8 mmol/L; 6. 1.0 mmol/L; (b) M. protein marker; 1.5 h; 2.4 h; 3.3 h; 4.2 h; 5.1 h; 6.0 h.

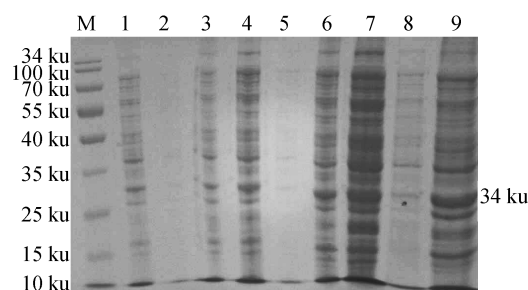


图5 不同温度诱导表达的 SDS-PAGE 分析

M. 蛋白 marker; 1. 16 °C 诱导的全菌蛋白; 2. 16 °C 超声裂解的沉淀; 3. 16 °C 超声裂解的上清; 4. 28 °C 诱导的全菌蛋白; 5. 28 °C 超声裂解的沉淀; 6. 28 °C 超声裂解的上清; 7. 37 °C 诱导的全菌蛋白; 8. 37 °C 超声裂解的沉淀; 9. 37 °C 超声裂解的上清。

Fig.5 SDS-PAGE analysis of expression of the RovS fusion protein at different temperatures

M. protein marker; lane 1, 4, 7. the whole lysate of the transformed *E. coli* induced at 16 °C, 28 °C and 37 °C, respectively; lane 2, 5, 8. the insoluble fraction of the transformed *E. coli* induced at 16 °C, 28 °C and 37 °C, respectively; lane 3, 6, 9. the soluble fraction of the transformed *E. coli* induced at 16 °C, 28 °C and 37 °C, respectively.

最佳诱导时间 诱导时间是影响重组蛋白表达量的重要因素之一,在其他条件一致的情况下,经不同时间(0~5 h)诱导后,时间在 5 h 时融合蛋白的表达量最大且表达量已足够后续实验要求(图 6-b),本着节约成本及时间的原则,故选择 5 h 为最佳诱导表达时间。

## 2.4 重组融合蛋白的纯化及鉴定

将 pET-RovS 质粒转化入 *E. coli* Rosetta (DE3), 经优化条件 (1.0 mmol/L IPTG, 5 h, 37 °C) 诱导后可以表达分子量为 34 ku 左右的融合蛋白; 未经诱导的含重组质粒 pET-RovS 的 Rosetta (DE3) 菌体做为阴性对照, 与诱导后蛋白电泳带相比, 在 34 ku 处并没有蛋白的过量表达, 诱导表达后的菌液经超声波破碎后再离心, 分别用上清和沉淀做 SDS-PAGE, 结果表明, 表达形式为上清 (图 7)。利用 HisTrap HP 亲和柱纯化重组蛋白, 结果表明 250 mmol/L 的咪唑浓度纯化可以得到效果较好的蛋白 (图 8), Western-blotting 实验证明在 34 ku 处有蛋白带, 与预期相符 (图 9)。

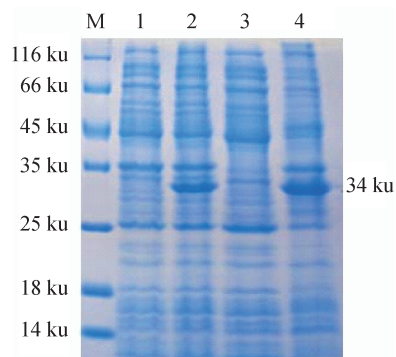


图 7 表达产物的 SDS-PAGE 分析

M. 蛋白 marker; 1. 诱导前样品; 2. 诱导后样品; 3. 超声后沉淀; 4. 超声后上清。

Fig. 7 SDS-PAGE analysis of expression products

M. protein molecular marker; 1. total protein of pET-RovS not induced; 2. total protein of pET-RovS induced; 3. total protein in the precipitate after ultrasonication; 4. total protein in the supernatant after ultrasonication.

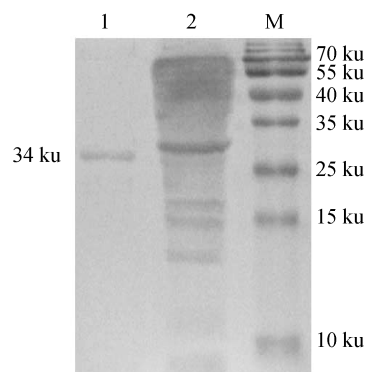


图 8 重组蛋白 RovS 纯化后的 SDS-PAGE 分析

1. 纯化后的 RovS; 2. pET-RovS 诱导; M. 蛋白 marker。

Fig. 8 SDS-PAGE analysis of purified RovS

1. purified RovS; 2. total protein of pET-RovS induced; M. protein molecular marker.

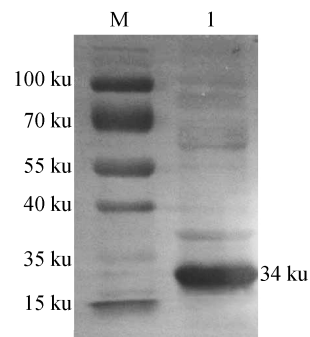


图 9 RovS 的免疫印迹

M. 预染蛋白分子量标准; 1. RovS 蛋白印迹。

Fig. 9 Western-blotting analysis of RovS

M. prestained protein marker; 1. Western-blotting of RovS.

## 2.5 抗血清效价测定和特异性检测

从表 1 及图 8 可以看出, 当抗血清按 1:512 000 倍稀释时, 检测结果仍可以判定为阳性, ELISA 检测抗血清效价为 1:512 000。

表 1 间接 ELISA 检测兔子血清效价  
Tab. 1 Serum titer detected by indirect ELISA

名称	negaive (第 1 孔)	blank (第 2 孔)	A 兔子					B 兔子				
			2K (第 3 孔)	8K (第 4 孔)	32K (第 5 孔)	128K (第 6 孔)	512K (第 7 孔)	2K (第 8 孔)	8K (第 9 孔)	32K (第 10 孔)	128K (第 11 孔)	512K (第 12 孔)
rovS A 值	0.059	0.037	1.779	1.671	1.488	0.839	0.117	1.905	1.763	1.328	0.572	0.189

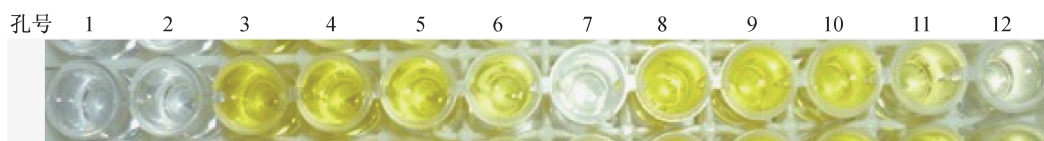


图 10 间接 ELISA 检测兔子血清效价 (TMB 显色实验)

Fig. 10 Serum titer detected by indirect ELISA (TMB chromogenic reaction)

### 3 讨论

罗非鱼,又被称为“白色三文鱼”,是联合国粮农组织推荐的21世纪最有发展前景的淡水养殖品种<sup>[10]</sup>。然而随着高密度养殖和环境日益恶化,病害日趋严重,造成的损失逐年增加。从2009年至今,罗非鱼链球菌病在我国南方罗非鱼多个主养地区泛滥,发病及死亡率高<sup>[11]</sup>,并由传统的高温时节发病演变为趋向于全年大部分时间均可发生,发病率和死亡率直线上升(部分地区可高达90%)。罗非鱼链球菌病(*Streptococcosis*)是一种高温好发、高传染性、高死亡率的细菌性疾病,在世界范围内其病原主要为无乳链球菌(*S. agalactiae*)和海豚链球菌(*S. iniae*)两种,我国南方地区链球菌病疫情区病原主要为无乳链球菌(*S. agalactiae*)。通过对罗非鱼源无乳链球菌ZQ0910株全基因组序列在NCBI网站上公布的相关数据进行基因注释分析,我们得到了一些相关的毒力基因,包括细菌表面蛋白以及毒力调控因子等等。在对细菌毒力基因的研究过程当中,科学家们逐步认识到了毒力表型基因需要毒力相关基因来调控细菌毒力的现象,细菌通过这些毒力相关基因进行高效的调节来实现其在宿主体内的定植、扩散、免疫逃避及繁殖存活<sup>[12]</sup>。Rgg转录调控蛋白家族便是这类基因中最具代表性的一类。Rgg家族的转录调节因子广泛分布于各种革兰氏阳性菌中,并执行多种功能,例如在*Streptococcus gordonii*中的Rgg蛋白家族是胞外糖转移酶G表达所必须的<sup>[13-14]</sup>;在*Streptococcus mutans*中的MutR(Rgg蛋白家族中的一种)是控制变链素I表达的一种重要蛋白<sup>[15]</sup>;在*Streptococcus pyogenes*中Rgg蛋白家族被称为RopB蛋白家族,一方面它控制着分泌性半胱氨酸蛋白酶SpeB的表达<sup>[16-17]</sup>,另一方面它还参与多种二元调控系统的表达,这对于细菌适应外界环境是非常重要的<sup>[18]</sup>;Samen等<sup>[19]</sup>对罗非鱼源*S. agalactiae*中的rovS基因进行了表达及其功能的研究,证实了RovS蛋白在细菌粘附人类纤维蛋白及上皮细胞中起了相当重要的作用,这也为我们研究*S. agalactiae*是通过何种途径感染鱼体提供了思路。

本研究中,将无乳链球菌ZQ0910的rovS基因序列与其编码的氨基酸序列与基因库中已登录

的其他链球菌的相应基因及氨基酸序列进行同源比较,结果表明无乳链球菌ZQ0910rovS基因编码的氨基酸序列与*S. agalactiae* 2603和ATCC 13813的同源性最高,其次是*S. agalactiae* 515,与*S. pneumoniae*的同源性最低。蛋白翻译后修饰(如磷酸化)是一种几乎存在于所有蛋白质形成的过程,修饰后的蛋白才能发挥蛋白功能,该过程主要通过蛋白水解作用裂解或者向一个或多个氨基酸添加一个修饰基团而改变蛋白的特性<sup>[20-21]</sup>。本文研究的RovS蛋白通过推导,在其氨基酸序列中存在6个介导胞外分泌有关的蛋白激酶C磷酸化位点,4个与调节细胞凋亡和细胞周期有关的酪蛋白激酶II磷酸化位点。这些潜在的磷酸化位点在蛋白翻译后得到一定程度的修饰,并且可能在RovS蛋白发挥其生物学功能中起重要调控作用。

本研究利用原核表达载体,在pET原核表达载体体系中获得重组蛋白。利用大肠杆菌表达的重组蛋白通常有两种表达形式,一种是以包涵体的形式表达,诱导表达菌体经破碎、离心沉淀包涵体。这种表达形式蛋白的表达量较高,但蛋白需要经过溶解、复性等处理。另一种是可溶性表达,即重组蛋白存在于上清中,蛋白纯化较为方便且大都具有活性。本实验采用了大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3) Rosetta菌株作为表达菌,Rosetta宿主菌是从BL21衍生而来,可增强带有大肠杆菌稀有密码子的蛋白表达,该菌株通过一个相容性氯霉素抗性质粒补充密码子AUA、AGG、AGA、CUA、CCC和GGA的RNAs,这样Rosetta菌株提供了“万能”的翻译,从而避免因大肠杆菌密码子使用频率导致的表达限制,增加表达产物可溶性表达。陈恬等<sup>[22]</sup>比较了单纯疱疹病毒UL12基因在大肠杆菌BL21和Rosetta菌种的差异表达,结果表明在*E. coli* Rosetta菌中的表达量比在BL21菌中要多。本实验得到了可溶性表达的蛋白,这为我们后续的实验提供了良好的实验基础。

外源蛋白的表达水平不仅与载体、宿主和外源基因有关,还与诱导条件有着密切的联系<sup>[23]</sup>。在诱导过程中温度会影响氧的溶解度、加快或减慢酶的反应速率,从而影响蛋白的性质。诱导剂和时间也是影响重组蛋白表达的重要因子。为了降低诱导剂IPTG对大肠杆菌代谢的毒性作用,

我们必须探索出 IPTG 的最低有效浓度,这也能减少诱导蛋白表达成本。本实验为了获得最优的表达效率,通过固定其他因子,对单个因子进行不同温度、不同 IPTG 浓度和不同诱导时间表达后,获得一个最优化的表达体系,即为:诱导温度 37 ℃,IPTG 终浓度为 1 mmol/L,诱导时间为 5 h。该体系的构建为后续工作中所需要用到大量的重组表达蛋白提供了可靠的实验依据。

本实验获得的重组蛋白表达量较高,且为可溶性表达,因此经处理后可利用 His 标签,采用 HisTrap FF crude Columns 对其进行纯化,重组蛋白的纯度可达 98%,可直接用于免疫实验。为了获取较大量的抗血清,本实验选用了新西兰大白兔来制备多克隆抗体,并在早晨空腹时对兔体采用颈动脉取血方法采集血清,这样可以得到清晰透明的 50 ~ 80 mL 的血清,为后续实验的顺利进行提供了研究基础<sup>[24]</sup>。从间接 ELISA 的检测结果来看,本研究所获得的兔抗无乳链球菌 *RovS* 蛋白血清效价高达 1:512 000,说明 *RovS* 重组蛋白具有较强的免疫原性,可诱导机体产生较强的免疫应答,可以满足后续的实验需求。

本研究采用生物信息学及分子生物学方法克隆表达了罗非鱼源无乳链球菌 *rovS* 基因,证实了其氨基酸序列与其它革兰氏阳性菌中的 *Rgg* 家族蛋白有较高的一致性,这为我们深入探讨其调控功能和分子机制鉴定了理论研究基础。

#### 参考文献:

- [ 1 ] 卢迈新,黎炯,叶星,等. 广东与海南养殖罗非鱼无乳链球菌的分离、鉴定与特性分析[J]. 微生物学通报,2010,37(5):766-774.
- [ 2 ] Wang B, Jian J C, Lu Y S, et al. Complete genome sequence of *Streptococcus agalactiae* ZQ0910, a pathogen causing meningoencephalitis in the GIFT strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. Journal of Bacteriology, 2012, 194 ( 18 ): 5132-5133.
- [ 3 ] Blaser M J, Kirschner D. The equilibria that allow bacterial persistence in human hosts [J]. Nature, 2007, 449(7164):843-849.
- [ 4 ] Kreikemeyer B, Mciver K S, Podbielski A. Virulence factor regulation and regulatory networks in *Streptococcus pyogenes* and their impact on pathogen-host interactions [J]. Trends in Microbiology, 2003, 11(5):224-232.
- [ 5 ] Brown E J. The molecular basis of streptococcal toxic shock syndrome[J]. The New England Journal of Medicine, 2004, 350(20):2093-2094.
- [ 6 ] Chen C, Tang J, Dong W, et al. A glimpse of streptococcal toxic shock syndrome from comparative genomics of *S. suis* 2 Chinese isolates [J]. PLoS One, 2007, 2(3):e315.
- [ 7 ] Li M, Wang C J, Feng Y J, et al. SalK/SalR, a two-component signal transduction system, is essential for full virulence of highly invasive *Streptococcus suis* serotype 2 [J]. PLoS One, 2008, 3(5):e2080.
- [ 8 ] Li M, Shen X, Yan J, et al. GI-type T4SS-mediated horizontal transfer of the 89K pathogenicity island in epidemic *Streptococcus suis* serotype 2 [J]. Molecular Microbiology, 2011, 79(6):1670-1683.
- [ 9 ] Gutekunst H, Eikmanns B J, Reinscheid D J. Analysis of *RogB*-controlled virulence mechanisms and gene repression in *Streptococcus agalactiae* [J]. Infection and Immunity, 2003, 71(9):5056-5064.
- [ 10 ] 卢迈新,黄樟翰. 罗非鱼遗传育种研究[J]. 上海水产大学学报, 2005, 14(2):186-191.
- [ 11 ] 张新艳,樊海平,钟全福,等. 罗非鱼无乳链球菌的分离、鉴定及致病性研究[J]. 水产学报, 2008, 32(5):772-779.
- [ 12 ] Ye C, Bai X, Zhang J, et al. Spread of *Streptococcus suis* sequence type 7, China [J]. Emerging Infectious Diseases, 2008, 14(5):787-791.
- [ 13 ] Sulavik M C, Clewell D B. *Rgg* is a positive transcriptional regulator of the *Streptococcus gordonii* *gtfG* gene [J]. Journal of Bacteriology, 1996, 178(19):5836-5830.
- [ 14 ] Sulavik M C, Tardif G, Clewell D B. Identification of a gene, *rgg*, which regulates expression of glucosyltransferase and influences the Spp phenotype of *Streptococcus gordonii* Challis [J]. Journal of Bacteriology, 1992, 174(11):3577-3586.
- [ 15 ] Poyart C, Trieu-Cuot P. A broad-host-range mobilizable shuttle vector for the construction of transcriptional fusions to beta-galactosidase in gram-positive bacteria [J]. FEMS Microbiology Letters, 1997, 156(2):193-198.
- [ 16 ] Chaussee M S, Ajdic D, Ferretti J J. The *rgg* gene of *Streptococcus pyogenes* NZ131 positively influences extracellular SPE B production [J]. Infection and Immunity, 1999, 67(4):1715-1722.
- [ 17 ] Lyon W R, Gibson C M, Caparon M G. A role for trigger factor and an *rgg*-like regulator in the transcription, secretion and processing of the cysteine



- proteinase of *Streptococcus pyogenes*[J]. The EMBO Journal, 1998, 17(21):6263-6275.
- [18] Chaussee M S, Sylava G L, Sturdevant D E, et al. Rgg influences the expression of multiple regulatory loci to coregulate virulence factor expression in *Streptococcus pyogenes*[J]. Infection and Immunity, 2002, 70(2):762-770.
- [19] Samen U M, Eikmanns B J, Reinscheid D J, et al. The transcriptional regulator RovS controls the attachment of streptococcus agalactiae to human epithelial cells and the expression of virulence genes [J]. Infection and Immunity, 2006, 74(10):5625-5635.
- [20] Blom N, Sicheritz-Pontén T, Gupta R, et al. Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence[J]. Proteomics, 2004, 4(6):1633-1649.
- [21] Mann M, Jensen O N. Proteomic analysis of post-translational modifications[J]. Nature Biotechnology, 2003, 21(3):255-261.
- [22] 陈恬, 李学东, 代富英, 等. I型单纯疱疹病毒UL12基因在大肠杆菌BL21和Rosetta菌中的差异表达[J]. 华西药学杂志, 2012, 27(1):13-16.
- [23] 饶桂荣, 陈文吟, 栗宽源, 等. 重组人抗HbsAg单链抗体的中试发酵工艺研究[J]. 中国生化药物杂志, 2005, 26(3):141-143.
- [24] 黄名英, 傅安静, 文红, 等. 提高兔抗血清制备量的措施[J]. 疫病防制, 2008, 10(234):64-65.

## Cloning and expression analysis of transcriptional regulator *rovS* gene of *Streptococcus agalactiae* ZQ0910 isolated from tilapia

WANG Bei<sup>1,2</sup>, JIAN Jichang<sup>1,2</sup>, LU Yishan<sup>1,2</sup>, CAI Shuanghu<sup>1,2</sup>,  
HUANG Yuchong<sup>1,2</sup>, TANG Jufeng<sup>1,2</sup>, LI Guihuan<sup>1,2</sup>, WU Zaohe<sup>2,3\*</sup>

(1. Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China;  
2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Pathogenic Biology and Epidemiology for Aquatic Economic Animals, Zhanjiang 524025, China;  
3. Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China)

**Abstract:** Cloning and expression analysis of transcriptional regulator *rovS* gene of *Streptococcus agalactiae* ZQ0910 isolated from tilapia were studied in this study. A pair of primers were designed based on *rovS* gene sequence published in GenBank. The gene sequence of coding the RovS protein was cloned and then inserted into the pET-28(+) vector to construct prokaryotic expression plasmid pET-28-RovS. The recombinant RovS fusion protein was overexpressed in *E. coli* Rosetta( DE3) cells in the presence of isopropyl- $\beta$ -thiogalactopyranoside(IPTG). Sequence analysis revealed that *rovS* gene is 849 bp and encodes a putative protein of 282 amino acids, and the amino acid sequence of RovS of *S. agalactiae* ZQ0910 showed highest identity of *S. agalactiae* 2 603 V and ATCC13813. The His-RovS fusion protein with 34 ku molecular mass was successfully expressed in *E. coli* Rosetta( DE3). The soluble recombinant protein was highly expressed under induction conditions of exposure to IPTG and successfully purified on Ni<sup>2+</sup>-IDA column. The purified fusion protein was injected into New Zealand white rabbits to produce polyclonal anti-RovS serum. The antibody titer detected by ELISA reached 1:512 000. In summary, we identified and characterized a novel regulatory gene, termed *rovS*, encoding a regulator of virulence in *S. agalactiae*, which is involved in the expression of known and putative virulence genes in the bacteria.

**Key words:** *Streptococcus agalactiae* ZQ0910; RovS transcription regulator; cloning; prokaryotic expression  
**Corresponding author:** WU Zaohe. E-mail: wuzaohe@163.com