

罗非鱼无乳链球菌 LrrG 蛋白的原核表达及免疫原性分析

陈雪^{1,2}, 可小丽¹, 卢迈新^{1*}, 刘志刚¹, 高凤英¹, 朱华平¹, 曹建萌¹

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 农业部热带亚热带水产资源利用与养殖重点实验室, 广东 广州 510380;

2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: LrrG 蛋白是无乳链球菌较保守的表面蛋白之一。为获得罗非鱼源无乳链球菌 LrrG 蛋白并探讨其在罗非鱼体内的免疫原性, 本实验根据 GenBank 中已报道的人源无乳链球菌 LrrG 基因序列, 设计特异性引物, 扩增获得罗非鱼源无乳链球菌的 LrrG 基因。分析表明, 其 ORF 为 2 361 bp, 编码 786 个氨基酸, 与人源无乳链球菌 LrrG 基因核苷酸序列的相似性高达 98.48%。LrrG 蛋白含有 3 个保守的 LRR 结构域, 并可形成多个抗原表位。将 LrrG 基因片段克隆转入原核表达载体 pET-32a(+), 构建重组质粒 pET-32a(+)/LrrG, *E. coli* BL21(DE3) 22 °C 诱导表达 6 h。SDS-PAGE 显示, 诱导表达蛋白的分子量为 108.9 ku, 并且该重组蛋白以可溶和包涵体 2 种形式存在。经 His Bind 亲和柱纯化及超滤管浓缩后, LrrG 可溶蛋白浓度达 3.40 mg/mL。鱼体注射免疫实验表明, LrrG 可溶蛋白对罗非鱼的相对免疫保护率达 69.28%, 且免疫后 4 周的血清抗体滴度为 1:800。该研究为深入探讨无乳链球菌 LrrG 蛋白作为罗非鱼基因工程疫苗的潜在应用价值奠定了基础。

关键词: 罗非鱼; 无乳链球菌; LrrG 蛋白; 原核表达; 蛋白纯化; 免疫原性

中图分类号: Q 785; S 941

文献标志码: A

罗非鱼 (*Oreochromis* spp.) 具有食性杂、生长快、繁殖力强、适应性广等优点, 是世界范围主要养殖品种之一。近年来, 随着罗非鱼链球菌病的暴发, 其养殖业受到了巨大的危害。本实验室通过生理生化分析、分子鉴定和人工回归感染等实验, 确认南方罗非鱼主产区大规模暴发的链球菌病主要病原为无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*)^[1]。无乳链球菌为革兰氏阳性菌, 呈球形或卵圆形, 成对或短链状排列, 过氧化氢酶和氧化酶反应为阴性, CAMP (Christie, Atkins and Munch-Petersen) 呈阳性, 且大多为 β 溶血^[2]。按 Lancefield 血清学分类, 无乳链球菌归为 B 群链球菌 (Group B *streptococcus*), 因该群仅有无乳链球菌 1 种, 因此无乳链球菌也称 B 群链球菌 (GBS)。

利用疫苗预防罗非鱼链球菌病是未来主要发展趋势之一。链球菌部分表面蛋白具有较好免疫

原性, 并被证明是理想的候选蛋白疫苗和免疫检测靶标。目前已发现并完成动物实验的 GBS 表面蛋白有 C5a 肽酶^[3-4]、C α 蛋白^[5]、Rib 蛋白^[6]、Sip 蛋白^[7-8] 以及 BPS 蛋白^[9] 等。LrrG 蛋白是 GBS 较保守的表面蛋白之一, 存在于所有的 GBS 菌株中^[10]。因该蛋白含有 LRR (leucine-rich repeat) 结构, Seepersaud 等^[10] 将其命名为 LrrG。LRR 结构, 即富亮氨酸重复序列, 通常由 20 ~ 29 个氨基酸残基组成^[11], 其广泛存在于真核和原核生物的细胞和组织中。该结构最早发现于人类血清中, 被认为是一种未知功能的糖蛋白, 即富亮氨酸 α_2 -糖蛋白 (leucine-rich α_2 -glycoprotein)^[12]。实验表明, 人源 GBS LrrG 蛋白为小鼠抵抗不同血清型 GBS 的感染提供了良好的免疫保护^[10], 且该蛋白的多肽片段能促进吞噬细胞对 GBS 的吞噬功能^[13]。但鱼源无乳链球菌 LrrG 蛋白对鱼类抵抗 GBS 感染、刺激鱼类免疫应答等方面的研

收稿日期: 2014-01-17

修回日期: 2014-03-08

资助项目: 现代农业产业技术体系专项资金资助 (CARS-49); 广州市科技计划项目 (2013J4100078; 201300000064)

通信作者: 卢迈新, E-mail: mx-lu@163.com

究目前尚未见报道。

本实验克隆了罗非鱼源无乳链球菌 *LrrG* 基因的主要功能区序列,分析了其核酸和氨基酸序列,并对 *LrrG* 蛋白的结构和抗原表位进行了预测,同时运用基因工程手段构建了重组表达质粒 pET-32a(+)/*LrrG*,初步完成了 *LrrG* 重组蛋白对罗非鱼抵抗 GBS 感染的免疫保护效果研究。为罗非鱼无乳链球菌基因工程疫苗的研制及应用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 实验菌株及试剂

罗非鱼源无乳链球菌强毒株 LZ1F,分离于患病吉富罗非鱼(GIFT *Oreochromis niloticus*),由国家罗非鱼产业技术体系养殖与病害研究室分离、鉴定并保存。

细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自 OMEGA 公司;pMD19-T Vector、限制性内切酶及 *E. coli* DH5 α 菌株购自 TaKaRa 公司;胶回收、质粒提取试剂盒和 *E. coli* BL21(DE3) 菌株购自 Tiangen 公司;pET-32a(+) Vector 和 His Bind 亲和纯化试剂盒购自 Merck 公司;T₄ DNA 连接酶购自 Promega 公司;蛋白超滤管和 PVDF 膜购自 PALL 公司;鼠抗 His 单克隆抗体购自 Abmart 公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠抗体购自武汉博士德生物工程有限公司;HRP 标记的兔抗罗非鱼 IgM 抗体购自南京钟鼎生物技术有限公司;ECL 化学发光液购自 Millipore 公司;TMB 显色液购自 Biopanda 公司;Easysee II Western marker 购自北京全式金生物技术有限公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.2 *LrrG* 克隆质粒的构建

根据 GenBank 中已报道的人源无乳链球菌 *LrrG* 基因序列(登录号:AY909605.1),设计一对特异性引物,上游引物(P1):5'-CGGAATTCATGTCTTTAAAACAAGTAAAG-3' (下划线为 *EcoR* I 酶切位点);下游引物(P2):5'-CGCTCGAGTTATTTTCTTGCTCGTTTCC-3' (下划线为 *Xho* I 酶切位点),均由上海生工生物工程有限公司合成。

培养罗非鱼源无乳链球菌 LZ1F 菌株至对数生长期,收集菌体。提取无乳链球菌基因组 DNA,并以此为模板,进行 PCR 扩增。扩增体系

总体积为 50 μ L:上下游引物 P1、P2 各 1 μ L(10 mmol/L),10 \times Buffer(含 Mg²⁺)5 μ L,4 \times dNTP 1 μ L,*Taq* DNA 聚合酶 0.5 μ L,模板 DNA 2 μ L,灭菌双蒸水补足。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 2 min 15 s,共 35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测并回收,构建质粒 pMD19-T/*LrrG*,转入 *E. coli* DH5 α ,经单克隆菌液 PCR 和 *EcoR* I、*Xho* I 双酶切筛选鉴定后送上海英骏生物技术有限公司测序。

1.3 *LrrG* 基因及氨基酸序列分析

利用 NCBI 的 ORF Finder 和 BLAST 分析 *LrrG* 基因的开放阅读框,并进行序列的相似性分析。运用 DNASTAR-EditSeq 软件翻译 *LrrG* 氨基酸序列,分析其相对分子量及等电点,利用 ExPASy-ProtParam 分析其氨基酸序列;利用 NCBI Conserved Domains 分析其蛋白结构域;应用 PSIPRED V3.3 预测该蛋白的二级结构;应用 ExPASy-ProtScale 进行亲疏水性预测;TMHMM Server v2.0 预测跨膜区;DNASTAR-Protean 预测其可形成抗原表位的氨基酸区域。

1.4 *LrrG* 表达质粒的构建与重组蛋白的诱导表达

将 pMD19-T/*LrrG* 克隆质粒和原核表达质粒 pET-32a(+)用 *EcoR* I、*Xho* I 双酶切,用 T₄ DNA 连接酶连接回收的 *LrrG* 片段与酶切后的 pET-32a(+),构建表达质粒 pET-32a(+)/*LrrG*,转入 *E. coli* BL21(DE3),经菌液 PCR 筛选和 *EcoR* I、*Xho* I 双酶切鉴定,挑选阳性克隆进行测序。

将测序正确的重组菌扩大培养,加入终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG,22 $^{\circ}$ C 诱导 6 h 后,离心收集菌体进行超声波破碎,SDS-PAGE 检测上清液和沉淀。选择高表达的菌株,以 1:100 的比例接种到 500 mL LB(Amp⁺)培养基里大规模培养至对数生长期(OD₆₀₀ = 0.6)后加入终浓度为 0.1 mmol/L IPTG,22 $^{\circ}$ C 诱导重组蛋白表达。离心收集菌体后,用 20 mL Binding buffer(20 mmol/L Tris-HCl,500 mmol/L NaCl,5 mmol/L imidazole, pH = 7.9)悬浮,冰浴超声破碎 60 min,超声时间 5 s,间隔 10 s,功率 300 W。离心保存上清液可溶蛋白,沉淀用含 2 mol/L 脲的 PBS 溶液清洗 2 次。用含 8 mol/L 脲的 PBS 溶液彻底溶解包涵体,再

分别用 50 倍体积的 4 mol/L 脲 PBS、2 mol/L 脲 PBS 和 Binding buffer 逐步透析复性,每次 16 h。

1.5 LrrG 重组蛋白的亲纯化、Western blot 分析与蛋白含量测定

将上步收集的可溶蛋白和包涵体分别过 His Bind 亲和柱纯化。按照操作说明依次加入 5 倍体积 charge buffer (50 mmol/L NiSO₄) 和 3 倍体积 Binding buffer,再加入 5 倍体积可溶蛋白或包涵体,孵育 20 min 后,用 10 倍体积 Binding buffer 清洗,再以 20、40、60、80、100 和 200 mmol/L 咪唑梯度洗脱,收集每步洗脱液。SDS-PAGE 检测可溶蛋白和包涵体洗脱的浓度和纯化效果,-20 °C 分装保存纯化后的可溶蛋白和包涵体。

重组蛋白经 SDS-PAGE 电泳后,用湿转法转至 PVDF 膜。5% 脱脂奶粉封闭后进行抗体孵育,一抗为 Abmart 的鼠抗 His-Tag 单克隆抗体 (1:5 000 稀释),4 °C 低速摇床过夜孵育,用 TBST 漂洗 3 次,每次 10 min,再加入 HRP 标记的羊抗鼠二抗 (1:10 000 稀释),常温孵育 1 h 后用 TBST 漂洗。采用 ECL 化学发光法显影并采集图像。

采用纯化后的 LrrG 可溶蛋白进行后续的罗非鱼免疫保护实验。用 BCA 法测定超滤管浓缩纯化后的可溶蛋白含量。

1.6 LrrG 可溶蛋白的免疫、攻毒实验与血清抗体滴度的检测

选取同等规格的健康吉富罗非鱼 [体质量平均为 (6.0 ± 1.2) g],实验前暂养 1 周后,将实验鱼随机分为 2 组备用。用 PBS 稀释纯化后的 LrrG 可溶重组蛋白至所需浓度,进行腹腔注射免疫,实验组 LrrG 可溶蛋白免疫剂量为 2 μg/g (蛋白量/鱼体质量),对照组注射等体积 PBS。实验组和对照组每组 36 尾鱼,每组设重复。免疫 4 周后,以 GBS 半致死浓度 LD₅₀ (2.1 × 10⁶ cfu/mL),对所有实验鱼进行腹腔攻毒,每尾注射 100 μL。连续记录各组鱼死亡情况,2 周后,计算免疫相对保护率 (relative percent survival, RPS),公式为

$$RPS = (1 - \text{实验组死亡率} / \text{对照组死亡率}) \times 100\%$$

免疫后第 2、4 周,每组随机挑选 3 尾鱼,尾静脉采血,收集血清。按间接 ELISA 法测定血清抗体滴度:包被缓冲液稀释 LrrG 可溶蛋白至 10 ng/μL,每孔 100 μL 加至 96 孔酶标板,4 °C 过夜;PBST 洗涤后加入封闭液,37 °C 封闭 2 h;PBST 洗

涤后加入采集的罗非鱼血清,按第 1 孔 1:100 比例稀释,37 °C 孵育 1 h;PBST 洗涤后加入 HRP 标记的兔抗罗非鱼 IgM 抗体 (1:1 000 稀释),37 °C 孵育 1 h;PBST 洗涤后用 TMB 显色液显色 30 min,加入 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应。OD 值采用酶标仪 450 nm 波长测定,按 γ 值大小判定结果 (γ ≥ 2.1 即为阳性)。

$$\gamma = (\text{测定样本 OD 值} - \text{空白对照 OD 值}) / (\text{阴性血清 OD 值} - \text{空白对照 OD 值})$$

2 结果

2.1 LrrG 基因的克隆与鉴定

以无乳链球菌基因组 DNA 为模板,PCR 扩增 LrrG 片段,PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后,在 2 400 bp 左右有 1 条特异的 DNA 条带,与预计的片段大小 2 361 bp 一致。回收该片段,重组到 pMD19-T 克隆载体中,获得重组克隆质粒 pMD19-T/LrrG。pMD19-T/LrrG 经 EcoR I、Xho I 双酶切后,1% 琼脂糖凝胶电泳显示有 2 条分别为 2 700 和 2 400 bp 左右的条带,分别与 pMD19-T 载体 (2 692 bp)、PCR 扩增的 LrrG 片段大小一致 (图 1)。

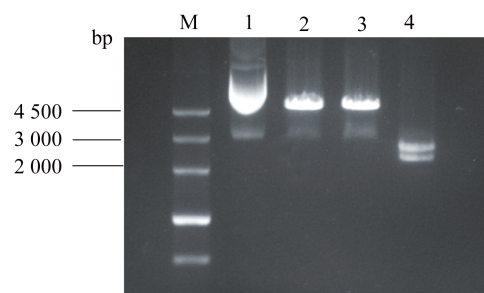


图 1 罗非鱼无乳链球菌克隆质粒 pMD19-T/LrrG 的双酶切鉴定

M. DNA Marker III; 1. 重组克隆质粒 pMD19-T/LrrG; 2. pMD19-T/LrrG 经 EcoR I 单酶切; 3. pMD19-T/LrrG 经 Xho I 单酶切; 4. pMD19-T/LrrG 经 EcoR I、Xho I 双酶切

Fig. 1 Identification of recombinant plasmid of pMD19-T/LrrG by restriction enzyme digestion

M. DNA Marker III; 1. recombinant plasmid of pMD19-T/LrrG; 2. pMD19-T/LrrG digested by EcoR I; 3. pMD19-T/LrrG digested by Xho I; 4. pMD19-T/LrrG digested by EcoR I and Xho I

2.2 LrrG 基因及氨基酸序列分析

重组质粒 pMD19-T/LrrG 的测序结果表明,罗非鱼源无乳链球菌 LrrG 基因有 1 个由 2 361

个碱基组成的完整开放阅读框(ORF),已上传至 GenBank,登录号为 KC920814。其与已报道的人源无乳链球菌 *LrrG* 基因(GenBank 登录号: AY909605.1)核苷酸序列的相似性高达 98.48%,与化脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)全基因序列(GenBank 登录号: AE004092.1)相似性达 87%,与停乳链球菌(*Streptococcus dysgalactiae*)的全基因序列(GenBank 登录号: AP011114.1)相似性也达 87%。

DNASTAR-EditSeq 预测表明,罗非鱼无乳链球菌 *LrrG* 基因的 ORF 编码 1 条由 786 个氨基酸残基组成的肽链,相对分子量为 88.514 1 ku,理论等电点为 9.26,分子式为 $C_{3951}H_{6343}N_{1095}O_{1184}S_{12}$ 。ExPASy-ProtParam 推导 *LrrG* 氨基酸序列成分分析显示(表 1),蛋白质中含量较高的氨基酸为 Leu(10.8%)、Lys(10.2%),含量较少的氨基酸为 Cys(0.1%)和 Trp(0.3%),不含有 Pyl 和 Sec。

通过 Conserved domain 分析发现,罗非鱼无乳链球菌 *LrrG* 序列的第 2~93、180~308、257~376 个氨基酸残基之间均有保守的 LRR 结构域(图 2)。PSIPRED 预测结果表明,罗非鱼无乳链球菌 *LrrG* 的二级结构组成中无规则卷曲占 68.83%, β -折叠和 α -螺旋分别占 21.37% 和 9.8%。

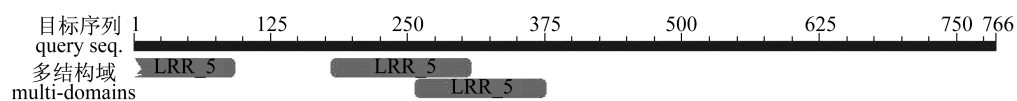


图 2 罗非鱼无乳链球菌 *LrrG* 结构预测结果

Fig. 2 Prediction result of conserved domain in *LrrG* of tilapia *S. agalactiae*

亲/疏水性分析表明,*LrrG* 多肽链有 3 个主要的疏水区,主要位于氨基酸序列的 264~272 位,613~621 位,761~777 位,整个蛋白质疏水性最大值为 3.122,最小值为 -2.667,亲水区域远大于疏水区域。在线预测工具 TMHMM Server v2.0 进行跨膜区预测,结果显示该肽链存在跨膜区,位于第 759~778 位氨基酸之间。根据 Kyte 等^[14]关于指数与表位形成的关系,当亲水性大于 0,抗原指数大于 0,表面可及性大于 1 时,形成表位的可能性较大,DNASTAR-Protean 推测 *LrrG* 蛋白可以形成多个抗原表位(图 3)。

2.3 *LrrG* 重组表达质粒的构建与鉴定

将克隆的 *LrrG* 片段重组入 pET-32a(+)原核表达载体。原核表达质粒 pET-32a(+)/*LrrG* 经 *EcoR* I、*Xho* I 双酶切后,琼脂糖凝胶电泳检测

表 1 罗非鱼无乳链球菌 *LrrG* 基因序列推导氨基酸组分
Tab. 1 Composition of amino acid deduced by *LrrG* gene of tilapia *S. agalactiae*

类型 type	比例/% percent	氨基酸 amino acid	数量 number	比率/% ratio
疏水性氨基酸 hydrophobic amino acid	38.0	Ala(A)	55	7.0
		Ile(I)	47	6.0
		Leu(L)	85	10.8
		Met(M)	11	1.4
		Phe(F)	33	4.2
		Pro(P)	27	3.4
		Trp(W)	2	0.3
亲水性氨基酸 hydrophilic amino acid	32.7	Val(V)	47	6.0
		Asn(N)	56	7.1
		Gln(Q)	37	4.7
		Gly(G)	47	6.0
		Ser(S)	45	5.7
		Thr(T)	42	5.3
		Tyr(Y)	25	3.2
酸性氨基酸 acidic amino acid	13.2	Cys(C)	1	0.1
		Asp(D)	44	5.6
碱性氨基酸 basic amino acid	16.1	Glu(E)	52	6.6
		Arg(R)	34	4.3
		His(H)	16	2.0
		Lys(K)	80	10.2

显示在 5 900 bp 左右有一明显条带,大小与酶切后的 pET-32a(+)质粒一致;在 2 400 bp 左右处有 1 条特异的 DNA 条带,符合 *LrrG* 片段的大小(图 4)。将经酶切、菌液 PCR 鉴定正确的重组质粒送样测序,结果与克隆重组质粒测序一致,说明重组表达质粒构建正确。

2.4 *LrrG* 重组蛋白的诱导表达和纯化

将重组表达质粒转化入 *E. coli* BL21(DE3), 22 °C 下诱导表达 6 h,诱导后在 110 ku 左右有 1 条明显的条带,条带大小约等于 *LrrG* 蛋白分子量 88.5 ku 与 pET-32a(+)载体的融合标签 20.4 ku 之和,表明重组蛋白在大肠杆菌(*Escherichia coli*)表达载体中成功表达。冰浴超声破碎后 SDS-PAGE 检测发现,在上清液和沉淀中均有重组目的蛋白,且上清液中的条带比沉淀中的颜

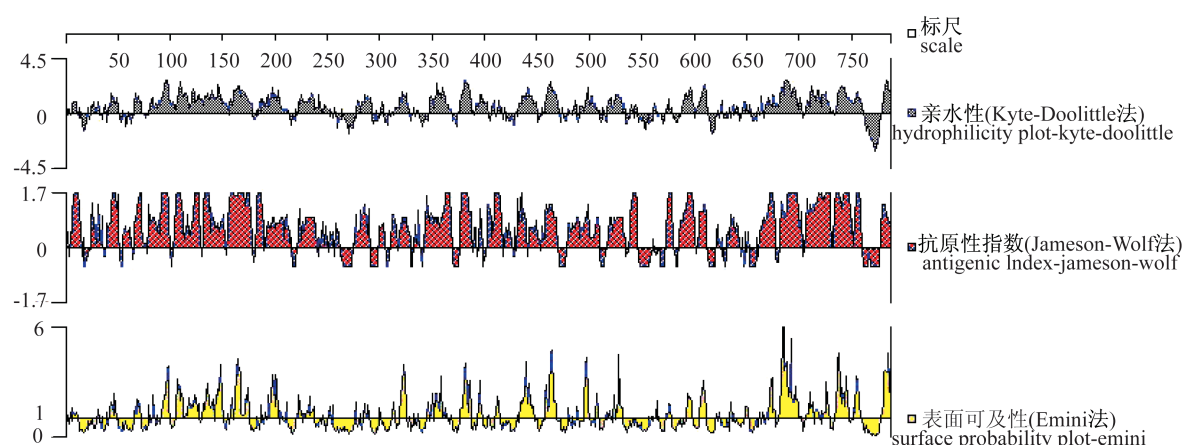


图 3 罗非鱼无乳链球菌 LrrG 氨基酸序列的亲水性、表面可及性和抗原性预测

Fig. 3 Prediction of hydrophilicity, surface probability and antigenicity of LrrG

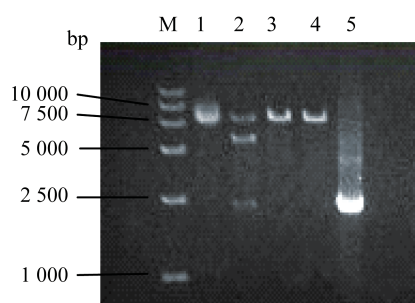


图 4 重组表达质粒 pET-32a(+)/LrrG 的双酶切鉴定和 PCR 鉴定

M. Marker DL15000; 1. 重组表达质粒 pET-32a(+)/LrrG; 2. pET-32a(+)/LrrG 经 *EcoRI* 和 *XhoI* 双酶切; 3. pET-32a(+)/LrrG 经 *EcoRI* 单酶切; 4. pET-32a(+)/LrrG 经 *XhoI* 单酶切; 5. 菌液 PCR 产物

Fig. 4 Digestion and PCR identification of recombinant plasmid pET-32a(+)/LrrG

M. Marker DL15000; 1. recombinant plasmid of pET-32a(+)/LrrG; 2. pET-32a(+)/LrrG digested by *EcoRI* and *XhoI*; 3. pET-32a(+)/LrrG digested by *EcoRI*; 4. pET-32a(+)/LrrG digested by *XhoI*; 5. PCR product

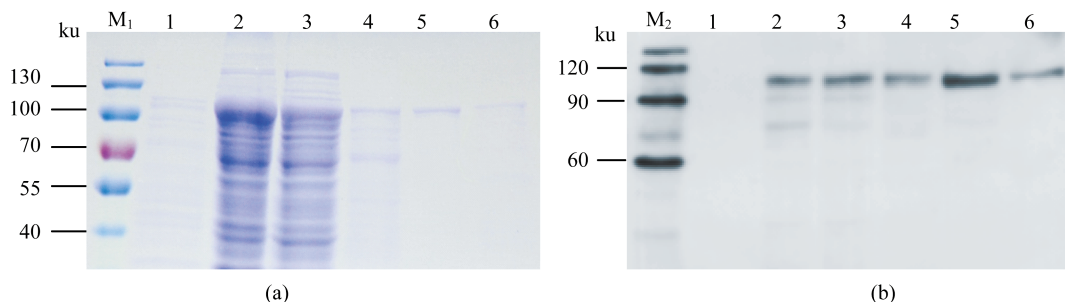


图 5 LrrG 重组蛋白诱导表达产物的 SDS-PAGE (a) 和 Western blot (b) 分析

M₁. 蛋白 marker; M₂. western marker; 1. 未诱导重组菌全菌蛋白; 2. 重组菌诱导产物; 3. 未纯化的可溶蛋白; 4. 未纯化的复性后包涵体; 5. 纯化后的可溶蛋白; 6. 纯化后的包涵体

Fig. 5 SDS-PAGE analysis (a) and Western blot (b) of expressed recombinant LrrG protein

M₁. protein marker; M₂. western marker; 1. total protein of uninduced recombinant bacterium; 2. total protein of induced recombinant bacterium; 3. unpurified soluble protein; 4. unpurified inclusion body after renaturation; 5. purified soluble protein; 6. purified inclusion body

色深,说明 LrrG 重组蛋白以可溶蛋白和包涵体 2 种形式存在,在 22 ℃ 诱导条件下以可溶蛋白为主。可溶蛋白和已变性、复性的包涵体经 His Bind 亲和柱纯化,均在 100 mmol/L 咪唑浓度下成功洗脱,纯化后的可溶蛋白和包涵体目的条带单一,与诱导蛋白大小一致(图 5-a)。

2.5 LrrG 重组蛋白的 Western blot 分析和蛋白含量测定

对未诱导重组菌全菌蛋白、重组菌诱导产物、可溶蛋白、包涵体、纯化后的可溶蛋白、纯化后的包涵体进行 Western blot 分析,ECL 化学发光法显色发现,除未诱导菌液之外均显示明显的目的条带,纯化后的可溶蛋白和包涵体条带单一、清晰(图 5-b)。

纯化后的可溶蛋白经超滤管浓缩后,BCA 法测定其含量为 3.40 mg/mL,用于后续的免疫保护实验。

2.6 LrrG 可溶蛋白对罗非鱼的免疫保护效果
用 2 $\mu\text{g/g}$ (蛋白量/鱼体质量) 的 LrrG 可溶蛋白免疫尼罗罗非鱼, 4 周后, 用 2.1×10^6 CFU/

mL 的罗非鱼源无乳链球菌人工攻毒免疫组和对照组, 免疫组罗非鱼死亡率较低, 相对免疫保护率达 69.28% (表 2)。

表 2 LrrG 可溶蛋白对罗非鱼抗无乳链球菌感染的免疫保护作用
Tab.2 Immunoprotection of LrrG soluble protein against *S. agalactiae* infection in tilapia

组别 group	攻毒鱼尾数 no. challenged	存活鱼尾数 no. survival	存活率/% survival rate	相对免疫保护率/% RPS
蛋白组 protein group	68	59	86.76	69.28
PBS 组 PBS group	65	37	56.92	

2.7 罗非鱼血清抗体水平的 ELISA 分析
用 ELISA 法分别测定了免疫后第 2 周和第 4 周的罗非鱼血清。结果表明, 蛋白免疫组血清抗体滴度明显高于对照组, LrrG 可溶蛋白组免疫后

2 周和 4 周的血清分别稀释 1:400、1:800 时仍为阳性结果, 显示了较高的抗体水平。并且免疫后 2 周血清抗体最大 OD 值为 0.351 5, 免疫后 4 周为 0.463 5 (表 3)。

表 3 ELISA 检测免疫罗非鱼血清的抗体滴度
Tab.3 ELISA analysis for antibody titer of the immunized tilapia

稀释度 dilution	OD 值 OD value				阴性血清 negative serum	空白对照 control
	免疫后 2 周 2 weeks post-immuned		免疫后 4 周 4 weeks post-immuned			
	蛋白组 protein group	PBS 组 PBS group	蛋白组 protein group	PBS 组 PBS group		
1:100	0.351 5	0.263 5	0.463 5	0.309 5	0.185 5	0.122 0
1:200	0.216 0	0.172 0	0.267 0	0.177 0	0.151 0	0.121 0
1:400	0.182 0	0.137 5	0.185 0	0.126 0	0.137 0	0.107 5
1:800	0.137 0	0.122 0	0.147 5	0.118 0	0.131 0	0.118 5
1:1 600	0.115 5	0.104 0	0.119 0	0.113 5	0.124 0	0.115 0
1:3 200	0.114 5	0.096 5	0.127 0	0.112 0	0.114 5	0.122 5

注:表中血清抗体 OD 值均为平行组的平均值

Notes: the OD values of serum antibody in the table are averages of the parallel groups

3 讨论

目前防治罗非鱼链球菌病的方法主要包括抗生素及化学药物治疗。但生产实践中发现, 抗生素药物的不当使用容易引发细菌耐药性^[15], 而化学药剂对环境污染大, 容易引起药物残留。疫苗能为鱼类提供病原特异性抗体或抵抗能力, 成为链球菌病免疫预防研究的主流方向。目前大多数候选 GBS 疫苗是利用荚膜多糖刺激机体引起免疫反应产生抗体^[16-17], 但无乳链球菌血清型众多^[18], 这表明针对不同血清型的 GBS 可能需要不同的疫苗^[19], 这使传统的荚膜多糖疫苗因为免疫原性单一而受到限制^[20]。因此, 研制针对所有不同血清型 GBS 的保守蛋白抗原疫苗逐渐成为研究热点^[10,21-24]。有学者通过不同血清型 GBS 的基因组分析和筛查, 发现了一系列的蛋白候选抗原^[25], LrrG 蛋白便是其中之一。于丽华等^[13]

研究表明, LrrG 蛋白是人源无乳链球菌重要表面毒力蛋白之一, 其在小鼠体内表现出了良好的免疫原性。

本研究首先克隆了罗非鱼源无乳链球菌 *LrrG* 基因序列, BLAST 分析发现, 其与人源无乳链球菌 *LrrG* 基因 (AY909605.1) 同源性高达 98.48%。LrrG 蛋白含有 3 个保守 LRR 结构域, 靠近氨基酸序列的氨基端, 分布于无乳链球菌表面。Bierne 等^[26]、Cabanes 等^[27] 以及 Sabet 等^[28] 均发现, 单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*) 的内化素是具有 LRR 结构的复合蛋白家族, 其能够增强李斯特菌感染细胞的能力。Brinster 等^[29] 研究表明, 粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*) 类似内化素的表面蛋白 ElrA (enterococcal leucine-rich protein A) 包含有 LRR 结构域, 它不仅与该菌在体内的传染过程密切相关, 而且还能刺激粪肠球菌产生炎症反应。此外,

肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 表面蛋白 PcpA (pneumococcal choline binding protein A) 氨基端有 22 ~ 26 个氨基酸长度的 LRR 结构,与细胞黏附作用有关,能够显著保护小鼠免患肺炎和败血症^[30]。Seepersaud 等^[10]通过基因组筛查发现人源无乳链球菌 LrrG 蛋白是一个保守,与细胞壁结合的 GBS 表面蛋白,且能以一种剂量依赖关系黏附于上皮细胞表面,在 GBS 感染中发挥着黏附因子的作用,而且,LrrG 蛋白免疫小鼠后,能刺激机体产生大量的 IgG 抗体,使其免受 GBS 感染。由此推测 LrrG 蛋白与无乳链球菌感染及细胞黏附密切相关,揭示了 LrrG 蛋白作为潜在候选蛋白疫苗的可能性。

本研究通过对罗非鱼源无乳链球菌 LrrG 的氨基酸序列分析,发现 *LrrG* 基因的 ORF 编码 1 条由 786 个氨基酸残基组成的肽链,其中 Leu 含量最高,占有氨基酸组分的 10.8%,这与 LrrG 特殊的保守结构密切相关。*LrrG* 基因的氨基酸序列特征预测显示,LrrG 蛋白含有跨膜区,这与已报道的 LrrG 蛋白定位于 GBS 的表面相对应。此外,LrrG 蛋白亲水区占据该蛋白肽链的区域远大于疏水区域,且本实验可表达可溶蛋白,因此该蛋白为亲水蛋白。抗原表位预测显示,*LrrG* 基因编码的氨基酸能够形成多个抗原表位。该结果与人源无乳链球菌 LrrG 蛋白相一致。

为了获得大量高纯度的表达蛋白,选择合适、高效的表达载体是关键。较多研究者采用 pET-32a(+) 作表达载体,均获得高产量的包涵体蛋白^[31-32]。而且通过温度与诱导剂浓度的调整,可获得高纯度的可溶蛋白^[33]。本研究在高温 37 °C 下,以 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导表达 LrrG 蛋白主要以包涵体形式存在;当温度降低到 22 °C 时,IPTG 浓度降低到 0.1 mmol/L,诱导 6 h 后,LrrG 蛋白能以可溶蛋白和包涵体 2 种形式存在,且可溶蛋白含量较高,浓缩后浓度达 3.40 mg/mL,这说明降低诱导温度和诱导物浓度可以增加可溶蛋白的表达。LrrG 可溶蛋白和包涵体纯化后,经 Western blot 分析,均显色条带单一,能与鼠抗 His 的单克隆抗体发生良好的免疫反应,说明 LrrG 蛋白表达成功,可用于后续鱼体免疫实验。

LrrG 蛋白的免疫原性初步研究表明,未使用佐剂的情况下,攻毒后相对免疫保护率达 69.28%,表明 LrrG 蛋白对罗非鱼具有免疫保护

效果。ELISA 法检测免疫后罗非鱼血清抗体水平,免疫后 4 周血清抗体滴度高于免疫后 2 周。弗氏佐剂是常用的免疫佐剂,有助于刺激机体产生免疫应答,提高应答抗体滴度^[34]。因此,选择高效佐剂与 LrrG 蛋白联合免疫罗非鱼,以进一步提高该蛋白对罗非鱼的免疫保护效果,将是下一步的研究重点。

参考文献:

- [1] Lu M X, Li J, Ye X, et al. Identification and characterizations of *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia cultured in Guangdong and Hainan provinces [J]. *Microbiology China*, 2010, 37 (5): 766 - 774. [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.微生物学通报,2010,37(5):766-774.]
- [2] Liu G, Zhang W, Lu C. Identification of immunoreactive proteins *Streptococcus agalactiae* isolated from cultured tilapia in China [J]. *Pathogens and Disease*, 2013, 69 (3): 223 - 231.
- [3] Cheng Q, Debol S, Lam H, et al. Immunization with C5a peptidase or peptidase-type III polysaccharide conjugate vaccines enhances clearance of group B *Streptococci* from lungs of infected mice [J]. *Infection and Immunity*, 2002, 70 (11): 6409 - 6415.
- [4] Li Q Y, Ke X L, Lu M X, et al. Cloning and construction of recombinant expression plasmid of C5a peptidase of *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2013, 32 (4): 92 - 99. [李庆勇,可小丽,卢迈新,等.罗非鱼无乳链球菌 C5a 肽酶的克隆及原核表达质粒构建.华中农业大学学报,2013,32(4):92-99.]
- [5] Maeland J A, Bevanger L, Lyng R V. Antigenic determinants of alpha-like proteins of *Streptococcus agalactiae* [J]. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 2004, 11 (6): 1035 - 1039.
- [6] Zhang R, Du X J, Xu G X, et al. Cloning and recombinant expression of rib gene of *Streptococcus agalactiae* surface protein [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2012, 33 (3): 24 - 28. [张荣,杜欣军,徐桂香,等.无乳链球菌表面蛋白 *Rib* 基因克隆与重组表达.动物医学进展,2012,33(3):24-28.]
- [7] Martin D, Rioux S, Gannon E, et al. Protection from group B streptococcal infection in neonatal mice by maternal immunization with recombinant Sip protein [J]. *Infection and Immunity*, 2002, 70 (9):

- 4897 - 4901.
- [8] Li J, Ye X, Ke X L, *et al.* Cloning, expression and immunogenicity analysis of surface immunogenic protein(SIP) of tilapia *Streptococcus agalactiae*[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2012, 36(4) :626 - 633. [黎炯,叶星,可小丽,等.罗非鱼无乳链球菌 Sip 基因的克隆、表达及免疫原性分析.水生生物学报, 2012, 36(4) :626 - 633.]
- [9] Erdogan S, Fagan P K, Talay S R, *et al.* Molecular analysis of group B protective surface protein, a new cell surface protective antigen of group B streptococci [J]. *Infection and Immunity*, 2002, 70 (2) :803 - 811.
- [10] Seepersaud R, Hanniffy S B, Mayne P, *et al.* Characterization of a novel leucine-rich repeat protein antigen from Group B streptococci that elicits protective immunity [J]. *Infection and Immunity*, 2005, 73(3) :1671 - 1683.
- [11] Kobe B, Kajava A V. The Leucine-rich repeat as a protein recognition motif [J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2001, 11(6) :725 - 732.
- [12] Takahashi N, Takahashi Y, Putnam F W. Periodicity of leucine and tandem repetition of a 24-amino acid segment in the primary structure of Leucine-rich α_2 -glycoprotein of human serum [J]. *Proceedings of the National Academy Science of the United States of America*, 1985, 82(7) :1906 - 1910.
- [13] Yu L H, Shen X Z, Kong Q L, *et al.* Expression and functional study of fragment peptides of group B streptococcal LrrG protein [J]. *Chinese Journal of Microbiology and Immunology*, 2007, 27(11) :983 - 987. [于丽华,沈叙庄,孔庆利,等. B 族链球菌表面蛋白 LrrG 的分段表达及其免疫原性和功能研究.中华微生物学和免疫学杂志, 2007, 27(11) :983 - 987.]
- [14] Kyte J, Doolittle R F. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1982, 157 (1) :105 - 132.
- [15] Huo H H, Ke X L, Lu M X, *et al.* Serotype and drug resistance of *Streptococcus agalactiae* from tilapia farmed in Hainan province [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2013, 35(5) :350 - 354. [霍欢欢,可小丽,卢迈新,等.海南罗非鱼无乳链球菌血清型及耐药性研究.中国预防兽医学报, 2013, 35(5) :350 - 354.]
- [16] Paoletti L C, Kasper D L. Conjugate vaccines against group B *Streptococcus* types IV and VII [J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 2002, 186 (1) :123 - 126.
- [17] Wessels M R, Paoletti L C, Kasper D L, *et al.* Immunogenicity in animals of a polysaccharide-protein conjugate vaccine against type III group B *Streptococcus* [J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 1990, 86(5) :1428 - 1433.
- [18] Ye X, Li J, Lu M X, *et al.* Identification and molecular typing of *Streptococcus agalactiae* isolated from pond-cultured tilapia in China [J]. *Fisheries Science*, 2011, 77(4) :623 - 632.
- [19] Percha B, Newman M E, Foxman B. Transmission probabilities and durations of immunity for three pathogenic group B *Streptococcus* serotypes [J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2011, 11 (6) :1407 - 1412.
- [20] Maione D, Margarit I, Rinaudo C D, *et al.* Identification of a universal Group B *Streptococcus* vaccine by multiple genome screen [J]. *Science*, 2005, 309(5731) :148 - 150.
- [21] Brodeur B R, Boyer M, Charlebois I, *et al.* Identification of group B streptococcal Sip protein, which elicits cross-protective immunity [J]. *Infection and Immunity*, 2000, 68(10) :5610 - 5618.
- [22] Cheng Q, Carlson B, Pillai S, *et al.* Antibody against surface-bound C5a peptidase is opsonic and initiates macrophage killing of group B streptococci [J]. *Infection and Immunity*, 2001, 69(4) :2302 - 2308.
- [23] Heath P T, Feldman R G. Vaccination against group B *Streptococcus* [J]. *Expert Review of Vaccines*, 2005, 4(2) :207 - 218.
- [24] Johri A K, Paoletti L C, Glaser P, *et al.* Group B *Streptococcus*: global incidence and vaccine development [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2006, 4(12) :932 - 942.
- [25] Yu L H, Shen S Z. Progress in group B streptococcal vaccine [J]. *International Journal of Pediatrics*, 2007, 34(1) :43 - 46. [于丽华,沈叙庄. B 族链球菌疫苗的研究进展.国际儿科学杂志, 2007, 34(1) :43 - 46.]
- [26] Bierne H, Sabet C, Personnic N, *et al.* Internalins: a complex family of Leucine-rich repeat-containing proteins in *Listeria monocytogenes* [J]. *Microbes and Infection*, 2007, 9(10) :1156 - 1166.
- [27] Cabanes D, Dehoux P, Dussurget O, *et al.* Surface proteins and the pathogenic potential of *Listeria monocytogenes* [J]. *Trends in Microbiology*, 2002, 10 (5) :238 - 245.

- [28] Sabet C, Lecuit M, Cabanes D, *et al.* LPXTG Protein InlJ, a newly identified internalin involved in *Listeria monocytogenes* virulence [J]. *Infection and Immunity*, 2005, 73(10):6912 - 6922.
- [29] Brinster S, Posteraro B, Bierne H, *et al.* Enterococcal leucine-rich repeat-containing protein involved in virulence and host inflammatory response [J]. *Infection and Immunity*, 2007, 75(9):4463 - 4471.
- [30] Glover D T, Hollingshead S K, Briles D E. *Streptococcus pneumoniae* surface protein PcpA elicits protection against Lung infection and fatal sepsis [J]. *Infection and Immunity*, 2008, 76(6):2767 - 2776.
- [31] Gao H, Xue L J, Liu X B, *et al.* Gene cloning, expression, purification, and *in vitro* adhesion activity determination of amino-terminal fragment of *Helicobacter pylori* BabA protein [J]. *China Biotechnology*, 2013, 33(3):34 - 40. [高涵, 薛利军, 刘小北, 等. 幽门螺杆菌 BabA 蛋白 N 段的基因克隆、表达纯化及体外粘附活性评价. 中国生物工程杂志, 2013, 33(3):34 - 40.]
- [32] Gasparian M E, Ostapchenko V G, Yagolovich A V. Overexpression and refolding of thioredoxin/TRAIL fusion from inclusion bodies and further purification of TRAIL after cleavage by enteropeptidase [J]. *Biotechnology Letters*, 2007, 29(10):1567 - 1573.
- [33] Cao Y J, Hu D S, Liu Z G, *et al.* Cloning, expression and immunogenicity of the full-length and fragments of major milk allergen α s1-casein [J]. *Chinese Journal of Immunology*, 2010, 26(7):601 - 605. [曹燕娟, 胡东生, 刘志刚, 等. 牛奶主要过敏原 α s1-酪蛋白全长与片段区基因的克隆表达、纯化及免疫原性鉴定. 中国免疫学杂志, 2010, 26(7):601 - 605.]
- [34] Shen K F, Cao L, Yin J G, *et al.* Progress in adjuvants [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2007, 28(B08):34 - 36. [沈克飞, 曹兰, 尹继刚, 等. 免疫佐剂研究进展. 动物医学进展, 2007, 28(B08):34 - 36.]

Prokaryotic expression and immunogenicity analysis of LrrG protein of *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia

CHEN Xue^{1,2}, KE Xiaoli¹, LU Maixin^{1*}, LIU Zhigang¹, GAO Fengying¹,
ZHU Huaping¹, CAO Jianmeng¹

(1. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Science, Key Laboratory of Tropical & Subtropical Fishery Resource Application & Cultivation, Ministry of Agriculture, Guangzhou 510380, China;
2. College of Fisheries & Life, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Tilapia is one of the important species in aquaculture in the world. In recent years, tilapia aquaculture has been badly damaged by streptococcosis. *Streptococcus agalactiae* is one of the major causative agents, which has caused severe economic losses in many species of freshwater, marine and estuarine fish worldwide. Vaccine is one of the main development future strategies to prevent fish streptococcosis. Some surface proteins of *S. agalactiae* have been documented and proved to be the ideal antigen candidates of protein vaccines, which included LrrG protein. The LrrG protein is one of the conserved surface proteins of *S. agalactiae*, which exists in all kinds of serotype of *S. agalactiae* strains. The LrrG protein of *S. agalactiae* isolated from human has been verified to protect mice from *S. agalactiae* infection. However, it has not been reported whether the LrrG protein from fish *S. agalactiae* isolates possessed the similar effect. In order to obtain plenty of LrrG protein and explore its immune protection in tilapia, in this study we designed the specific primers and cloned the *LrrG* gene sequence from tilapia virulent *S. agalactiae* strain according to the reported *LrrG* gene in GenBank of human *S. agalactiae*. The sequencing results showed that the ORF of the cloned *LrrG* was 2 361 bp in length and encoded 786 amino acids and contained 3 conserved LRR (Leucine-rich repeat) domains. The α -helix accounted for 68.83% in its secondary structure. NCBI Blast indicated that the homology of *LrrG* gene sequences of *S. agalactiae* from tilapia and human was 98.48%. The LrrG protein could form antigenic epitope based on the analysis of three indexes, i.e. hydrophilicity, surface probability and antigenic index. This suggests that the LrrG protein may have potential immunogenicity. The *LrrG* fragment was subcloned into pET-32a(+) vector and expressed in *E. coli* BL21 (DE3) by IPTG induction at 22 °C. SDS-PAGE showed the molecular weight of expressed protein was 108.9 ku, which is equal to the expected protein size. The recombinant protein existed as soluble protein and inclusion bodies. The soluble protein was highly purified by Ni-chelating affinity chromatography and the concentration could reach 3.40 mg/mL by ultrafiltration. Preliminary experiment showed that the relative percent survival of tilapia immunized with LrrG protein against tilapia streptococcosis was 69.28%. ELISA analysis indicated the serum antibody titer of post-immuned tilapia for 4 weeks was 1:800. These findings provide the useful information for further investigation to evaluate the potential value of the LrrG protein as tilapia genetic engineering vaccine.

Key words: tilapia; *Streptococcus agalactiae*; LrrG protein; prokaryotic expression; protein purification; immunogenicity

Corresponding author: LU Maixin. E-mail: mx-lu@163.com