

罗非鱼源无乳链球菌兼职蛋白EF-Tu的 克隆、表达及其抗原性检测

刘家星^{1,2,3}, 汪开毓^{1,2*}, 陈德芳^{1,3}, 刘 韬^{1,2},
贺 扬^{1,2}, 曾宇鲲^{1,2}, 蒋 洁^{1,2}

(1. 四川农业大学鱼病研究中心, 四川 成都 611130;

2. 四川农业大学动物疫病与人类健康/四川省重点实验室, 四川 成都 611130;

3. 四川农业大学动物科技学院, 四川 成都 611130)

摘要: 为检测罗非鱼源无乳链球菌兼职蛋白EF-Tu(延伸因子Tu, Elongation Factor Tu)的抗原性, 本实验克隆了罗非鱼源无乳链球菌 HN0303的EF-Tu基因序列, 并进行了蛋白相关性质的预测和系统发育树的构建。通过原核表达得到EF-Tu重组蛋白, 同时利用纯化的蛋白免疫家兔获得多克隆兔抗EF-Tu重组蛋白血清以用于EF-Tu蛋白抗原性检测。结果显示, 罗非鱼源无乳链球菌HN0303 EF-Tu基因有1个由1197个碱基组成的ORF, 编码398个氨基酸。生物信息学分析显示其分子式为C₁₉₃₃H₃₀₉₆N₅₃₂O₆₁₅S₁₁, 分子质量为43.981 ku, 理论等电点为4.749; 具有多个磷酸化位点, 不具有信号肽和跨膜区域; 具有保守的EF-Tu结构域、EF-Tu-II结构域和EF-Tu-III结构域, 且与其他来源无乳链球菌的EF-Tu蛋白具有很高的同源性; 具有较高的抗原指数, 表明其可形成多个抗原表位。SDS-PAGE检测发现, 诱导表达的重组蛋白以包涵体的形式出现在沉淀中, 大小约为66.4 ku。Western Blot分析表明, 兔抗EF-Tu重组蛋白血清能分别特异性结合菌体蛋白和EF-Tu重组蛋白。同时使用兔抗EF-Tu重组蛋白血清封闭罗非鱼源无乳链球菌 HN0303表面的EF-Tu蛋白后, 无乳链球菌 HN0303粘附EPC(*Epithelioma papulosum cyprini*, 鲤鱼上皮细胞)的能力下降了79.99%±2.43%。本研究表明, 原核表达的罗非鱼源无乳链球菌 EF-Tu重组蛋白具备较好的抗原性, 用其制备的兔抗血清能够较好地抑制罗非鱼源无乳链球菌的粘附, 推测其可能为罗非鱼源无乳链球菌亚单位疫苗的候选蛋白。

关键词: 罗非鱼; 无乳链球菌; EF-Tu; 克隆; 原核表达; 抗原性

中图分类号: Q 785; S 917

文献标志码: A

罗非鱼(*Oreochromis spp.*)俗称非洲鲫鱼, 因其生长迅速, 繁殖力强, 适应能力强等优点, 是世界性养殖鱼类, 也是我国重要的淡水养殖鱼类。近年来, 无乳链球菌感染给罗非鱼养殖业造成极大的威胁, 尤其是高温季节广东和海南两省养殖罗非鱼发生的暴发性无乳链球菌病, 该病害发生的范围广, 鱼感染率与死亡率均较高, 个别发病率超过50%, 发病鱼死亡率超

过95%^[1]。

无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)为革兰氏阳性菌, 呈球形或卵圆形, 成对或短链状排列^[2]。它是链球菌属的一个种, 按照Lancefield氏血清学分类法把无乳链球菌归为B群链球菌, 因为该群仅有无乳链球菌一种, 因此无乳链球菌又称B群链球菌(GBS)。GBS是人畜共患病的病原之一, 危害较为严重, 能引起婴儿败血症、脑

收稿日期: 2015-12-03 修回日期: 2016-01-15

资助项目: 长江学者和创新团队发展计划(IRT0848)

通信作者: 汪开毓, E-mail: kywang1955@126.com

膜炎等,同时也是牛、山羊和绵羊等动物的慢性乳腺炎的主要病原菌之一^[3]。目前生产中通过使用抗生素来控制链球菌病,但实际效果并不理想,且抗生素滥用所导致的环境问题以及食品安全问题越来越受到诟病。使用疫苗来预防水生动物病害是当今水产养殖业的主流趋势,而目前水产疫苗研究的主要技术问题就在于高免疫原性抗原物的发现。近几年已有无乳链球菌几种新的重要的保护性抗原蛋白陆续被报道,包括BPS蛋白^[4]、Sip蛋白^[5]、C5a肽酶^[6]和Rib蛋白^[7]等。

延伸因子Tu(Elongation Factor Tu, EF-Tu)是细菌细胞中含量很丰富的一种蛋白质,它在蛋白质生物合成的延伸过程中起到了关键性的作用,它与核糖体的相互作用使肽链延长^[8-9]。传统观念认为,一个基因编码一种蛋白质,且具有一种特定功能。随着研究的深入,越来越多的蛋白质被发现具有不同的功能。1999年Jeffery^[10]把这一类具有2种或2种以上功能的蛋白质称为兼职蛋白质(moonlighting proteins)。最新研究表明细菌的延伸因子Tu,作为一种重要的兼职蛋白,一方面与细菌自身蛋白质合成密切相关,另一方面它还能分泌到菌体表面,可能作为一种重要的毒力因子帮助无乳链球菌入侵机体^[11]。而最近一项关于人源GBS高免疫原性蛋白的鉴定中显示,EF-Tu是4个较高免疫原性蛋白中的一个(其他3个分别是烯醇化酶、醛脱氢酶和触发因子)^[12]。目前对于罗非鱼源*S. agalactiae*的EF-Tu蛋白是否具有好的免疫原性,能否有效刺激罗非鱼免疫应答,抵抗*S. agalactiae*感染的相关研究还未见报道。

本实验克隆了罗非鱼源*S. agalactiae*的EF-Tu基因序列,对其蛋白序列进行了一般性分析并通过基因工程手段获得了EF-Tu重组蛋白,同时制备兔抗重组蛋白免疫血清,对重组蛋白的抗原性做了初步研究。通过该研究以期能够为*S. agalactiae* EF-Tu蛋白功能的研究、亚单位疫苗的开发以及罗非鱼无乳链球菌病的防治提供思路。

1 材料与方法

1.1 实验菌株、试剂及实验动物

罗非鱼源*S. agalactiae*强毒株HN0303,由四川农业大学鱼病研究中心分离并保存;细菌组

DNA提取试剂盒,2×Taq PCR Mastermix,大肠杆菌DH5 α 菌株、BL21(DE3)菌株购自天根生化科技有限公司;非预染蛋白maker,克隆载体pMD19-T, T4 DNA连接酶购自TaKaRa;预染蛋白maker购自北京全式金生物技术有限公司;限制性内切酶购自Thermo;质粒小量抽提试剂盒和Ni-NTA蛋白纯化预装柱购自生工生物工程(上海)股份有限公司;pET32a(+),EPC传代细胞由四川农业大学鱼病研究中心提供;弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂均购自Sigma公司;其他试剂均为国产分析纯;健康雄性家兔2只(1.5 kg)购自成都达硕生物科技有限公司。

1.2 EF-Tu 基因克隆

根据GenBank中已报道的罗非鱼源*S. agalactiae*基因序列(NO. AKAP01000020.1),运用Primer Premier 5.0分别设计上下游引物,EF-Tu-F: 5'-CGCGGATCCATGGCAAAGAAAAATACGAT-3'; EF-Tu-R: 5'-CCGCTCGAGTTAAGCTTCGATTCTGAAAC-3'(下划线为限制性内切酶酶切位点,上游为BamHI酶切位点,下游为XhoI酶切位点),引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。将罗非鱼源*S. agalactiae* HN0303菌种接种于BHI(脑心浸液培养基,购于Biotopped)肉汤,于28℃恒温培养24 h,收集菌体,根据天根细菌基因组DNA提取试剂盒操作说明提取罗非鱼源*S. agalactiae* HN0303基因组DNA,并以此基因组DNA为模板进行PCR扩增。PCR反应条件:94℃预变性5 min;94℃50 s,55℃45 s,72℃90 s,共30个循环;72℃延伸10 min。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳观察扩增结果。

1.3 EF-Tu 基因克隆质粒与表达质粒的构建及鉴定

将PCR产物按照TaKaRa胶回收试剂盒说明书纯化回收产物后构建pMD19-T/EF-Tu质粒,于16℃连接12 h。将连接产物转化入大肠杆菌DH5 α ,挑取阳性克隆子,经菌落PCR、单酶切(BamHI)、双酶切(BamHI+XhoI)鉴定后送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。测序结果与原序列进行比对一致后,将pMD19-T/EF-Tu克隆质粒与原核表达质粒pET32a(+))分别用BamHI和XhoI进行双酶切,用T4连接酶连接回收的EF-Tu片段与pET32a(+))片段,于16℃连接12 h,随后转化

入大肠杆菌DH5 α 中,提取质粒pET32a(+)/*EF-Tu*经PCR和单双酶切鉴定后进行测序。

1.4 *EF-Tu*生物信息学分析

运用NCBI的ORF Finder分析*EF-Tu*基因的开放阅读框;运用DNASTAR-EditSeq软件翻译*EF-Tu*的氨基酸序列,并分析其相对分子量和等电点;运用ExPASy-ProtScale进行亲、疏水性预测;运用ExPASy-NetPhos进行磷酸化位点预测;运用SignalP 4.0和TMHMM Server v2.0对信号肽和跨膜区进行预测;运用NCBI Conserved Domains对保守结构域进行预测;运用DNASTAR-Protean预测其可形成抗原表位的氨基酸区域;运用Uniprot比对氨基酸序列后下载同源序列,运用MEGA6.0软件进行氨基酸序列的多重比对,使用似然法构建系统发育树。

1.5 重组表达质粒的诱导表达及纯化

将测序正确的重组表达质粒pET32a(+)/*EF-Tu*转化入表达宿主菌BL21(DE3),挑选阳性克隆子接种于含Amp(100 μ g/L)的LB培养液中37 $^{\circ}$ C培养过夜。次日按照1:100接种到LB-Amp培养液中,待培养至OD₆₀₀值为0.6时,加入IPTG至终浓度1 mmol/L进行诱导表达,37 $^{\circ}$ C继续培养4 h。8000 r/min离心5 min,收集菌体,并用PBS重悬菌体,冰浴超声处理后离心收集上清液和沉淀,并进行SDS-PAGE,观察目的蛋白的表达及分布情况。目的蛋白的纯化采用Ni-NTA树脂亲和层析法,纯化步骤按预装柱说明书进行,纯化后的蛋白经梯度透析复性。

1.6 兔抗*EF-Tu*重组蛋白血清制备

选用健康雄性家兔2只用于血清抗体制备,将纯化复性后的重组蛋白与弗氏佐剂等比混合,乳化后对家兔进行皮下多点注射免疫。第1次免疫使用弗氏完全佐剂与蛋白质等比混合注射(抗原注射浓度1 mg/mL,每只注射1 mL);第1次免疫后分别于10 d和17 d进行加强免疫,分别使用弗氏不完全佐剂与蛋白质等比混合注射(抗原注射浓度2 mg/mL,每只注射1 mL)。第3次免疫之后耳缘静脉采血,分离血清,使用琼脂扩散法检测血清抗体效价,若血清抗体效价达到1:16,则耳缘静脉注射重组蛋白(抗原注射浓度2 mg/mL,每只注射1 mL),3 d后颈动脉采血,分离收集血清。免疫开始前一天对家兔进行耳

缘静脉采血,分离血清作为阴性对照。

1.7 免疫印迹检测*EF-Tu*蛋白的抗原性

收集过夜培养的罗非鱼源*S. agalactiae* HN0303,离心后用PBS进行100倍浓缩重悬,超声破碎后分离上清液和沉淀。将破碎后全菌、上清液、沉淀以及重组蛋白经SDS-PAGE后,用半干法转移至NC膜上。将膜置于含5%的脱脂奶粉中封闭,于室温中孵育2 h,封闭后PBST洗膜3次(8 min/次)。之后分别加入1:500稀释的兔抗*EF-Tu*重组蛋白血清,于室温孵育2 h。洗膜后用辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG(1:500稀释),于室温孵育2 h,洗膜后用DAB显色液显色。

1.8 *EF-Tu*蛋白对细菌粘附EPC的影响

采用细菌计数法,间接评估*EF-Tu*蛋白对*S. agalactiae*粘附EPC的作用。24孔细胞培养板培养EPC至适宜浓度。用不含胎牛血清和抗生素的Hank's液进行洗涤。同时过夜培养的罗非鱼源*S. agalactiae* HN0303调整浓度至 10^7 cfu/mL。并用补体灭活的兔抗*EF-Tu*重组蛋白血清10 μ L(1:100稀释)加入调整浓度后的细菌中,于37 $^{\circ}$ C共孵育1 h,阴性对照组加入等量的阴性血清。处理后的细菌加入洗涤后的细胞中,在含5%的CO₂培养箱中37 $^{\circ}$ C孵育2 h。随后用PBS洗涤细胞3次,每孔加入200 μ L胰蛋白酶消化10 min,移走全部细胞至灭菌EP管中。加入0.01% TritonX-100溶解,连续稀释至 10^{-2} ~ 10^{-4} 进行细菌计数,通过对比对照组和实验组的菌落数检测*EF-Tu*蛋白对细胞粘附的影响。选取菌落数在30~300的稀释度进行计算,结果计算公式为抑制率=[(对照组菌落数-实验组菌落数)/对照组菌落数] \times 100%,实验进行3次重复,结果以平均数 \pm 标准差(mean \pm SD)表示。

2 结果

2.1 *EF-Tu*基因克隆与鉴定

以罗非鱼源*S. agalactiae* HN0303基因组DNA为模板,根据所设计的引物,PCR扩增*EF-Tu*片段,PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳后,在1200 bp左右出现一条特异性条带,与预计片段大小1197 bp一致(图1)。

2.2 *EF-Tu*基因克隆质粒与表达质粒的构建及鉴定

回收PCR产物片段,重组到pMD19-T质粒载

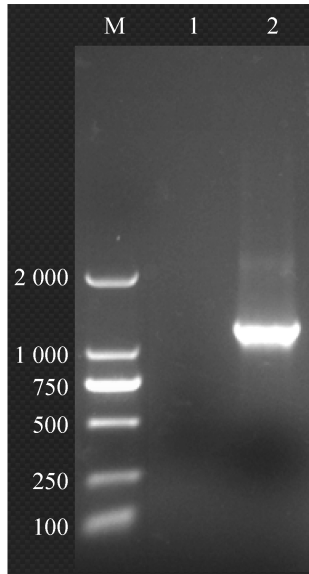


图1 罗非鱼源*S. agalactiae* HN0303 *EF-Tu*基因PCR扩增

M. DNA Maker DL 2000; 1. PCR阴性对照; 2. PCR阳性扩增产物

Fig. 1 The PCR amplification products of *EF-Tu* gene of *S. agalactiae* HN0303 isolated from tilapia

M. DNA Maker DL 2000; 1. negative PCR amplification products; 2. positive PCR amplification products

体中, 获得重组克隆质粒pMD19-T/*EF-Tu*。pMD19-T/*EF-Tu*分别使用*Bam*H I单酶切、*Bam*H I和*Xho* I双酶切鉴定, 酶切后经1%琼脂糖凝胶电泳观察: 单酶切后出现一条大小约3900 bp的条带, 与pMD19-T载体(2692 bp)和*EF-Tu*片段(1197 bp)之和大小一致; 双酶切后出现2条分别为2700 bp和1200 bp左右的条带, 与pMD19-T载体和*EF-Tu*片段大小一致(图2-a)。将重组克隆质粒pMD19-T/*EF-Tu*进行测序, 结果与目的基因碱基序列一致, 将测序结果上传至GenBank, 获得基因登陆号为KT957429。原核表达重组质粒pET32a(+)/*EF-Tu*同样通过单双酶切后, 琼脂糖凝胶电泳结果显示大小与pET32a(+)载体(5900 bp)和*EF-Tu*片段大小一致(图2-b)。将酶切、菌落PCR鉴定正确的重组表达质粒pET32a(+)/*EF-Tu*进行测序, 结果与pMD19-T/*EF-Tu*重组克隆质粒序列一致, 说明重组表达质粒构建正确。

2.3 *EF-Tu* 生物信息学分析

经测序结果发现罗非鱼源*S. agalactiae* HN0303的*EF-Tu*基因具有1197个碱基, 这些碱基共同组成一个完整的开放阅读框(ORF), 该阅读

框编码是1条由398个氨基酸残基组成的肽链, 理论相对分子质量为43.981 ku, 理论等电点为4.749, 分子式为 $C_{1933}H_{3096}N_{532}O_{615}S_{11}$ 。ExPASy-ProtScale进行亲、疏水性分析显示, *EF-Tu*多肽链具有5个主要的疏水区, 分别位于氨基酸序列的28~40, 102~112, 131~141, 214~222和363~372位, 整个蛋白最大疏水性值为2.044, 最小值为-2.989, 亲水区域所占的比例大于疏水区域, 预测*EF-Tu*蛋白为亲水性。通过ExPASy-NetPhos对磷酸化位点预测, 发现序列具有9个丝氨酸磷酸化位点、9个苏氨酸磷酸化位点和7个酪氨酸磷酸化位点。通过SignalP 4.0和TMHMM Sever v2.0对信号肽和跨膜区进行在线分析, 结果显示*EF-Tu*蛋白无信号肽存在, 且该蛋白无明显跨膜区域存在。NCBI Conserve Domains分析发现该序列具有保守的*EF-Tu*结构域、*EF-Tu-II*结构域和*EF-Tu-III*结构域, 这些结构与肽链延伸过程中GTP和tRNA绑定有关, 经Uniprot比对发现该序列结构在*S. agalactiae*中同源性非常高, 与链球菌属内其他细菌的同源性也在95%以上。DNASTAR-Protean分析其可形成抗原表位的氨基酸区域(图3), 其亲水指数和抗原指数大于0, 表面可及性大于1, 根据Kyte^[13]等关于指数与抗原表位形成的关系, 该蛋白形成抗原表位的可能性大, 可形成多个抗原表位。通过Uniprot比对后下载同源性序列构建系统发育树(图4), 结果显示, 罗非鱼源*S. agalactiae* HN0303与现在已报道的*S. agalactiae* *EF-Tu*蛋白序列聚为一支, 表明该蛋白在*S. agalactiae*中具有很高的同源性, 属于保守蛋白之一。

2.4 重组蛋白的诱导表达和纯化

将重组表达质粒转化入大肠杆菌BL21 (DE3)中, 由于重组表达质粒pET32a(+)/*EF-Tu*在目的蛋白的N端融合了多聚组氨酸标签(6×His), 其蛋白分子量会比目的蛋白分子量多20.4 ku。因此经IPTG诱导表达后的pET32a(+)/*EF-Tu*重组表达质粒在66.4 ku左右出现1条明显的条带, 大小和目的蛋白与融合标签之和一致, 说明重组蛋白在大肠杆菌表达载体中获得成功表达。将表达菌株BL21(DE3)用超声波破碎仪超声波破碎后, 离心取上清液和沉淀经SDS-PAGE, 结果显示目的蛋白存在于沉淀包涵体中(图5-a)。重组蛋白包涵体变性后经Ni-NTA树脂亲和层析法纯化及透析

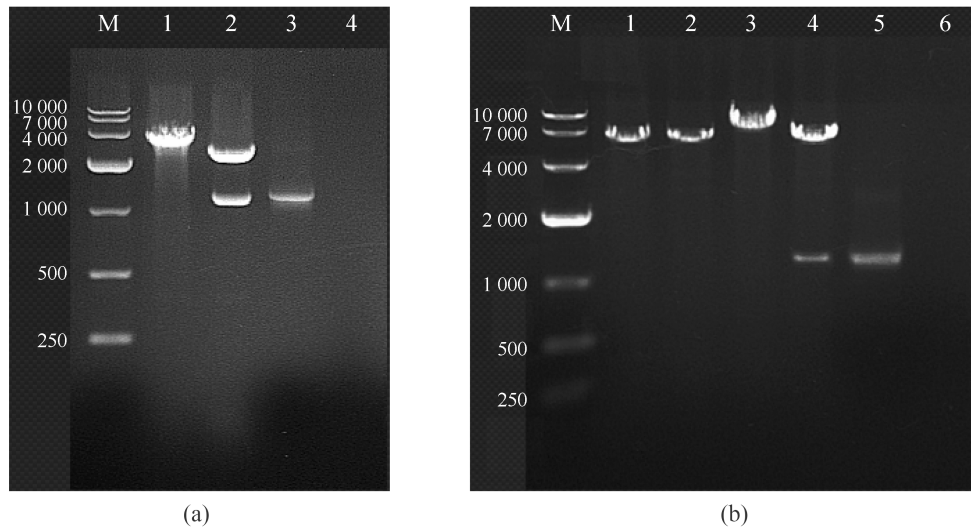


图 2 重组克隆质粒(a)与重组表达质粒(b)的菌落PCR鉴定、单酶切鉴定和双酶切鉴定
 (a) M. DNA Maker DL 10000, 1. 重组克隆质粒pMD19-T/*EF-Tu*经*Bam*H I单酶切鉴定, 2. 重组克隆质粒pMD19-T/*EF-Tu*经*Bam*H I、*Xho* I双酶切鉴定, 3. 重组克隆质粒pMD19-T/*EF-Tu*菌落PCR阳性产物, 4. 菌落PCR阴性对照; (b) M. DNA Maker DL 10000, 1. 原核表达质粒pET32a(+)经*Bam*H I单酶切鉴定, 2. 原核表达质粒pET32a(+)经*Bam*H I、*Xho* I双酶切鉴定, 3. 重组表达质粒pET32a(+)/*EF-Tu*经*Bam*H I单酶切鉴定, 4. 重组表达质粒pET32a(+)/*EF-Tu*经*Bam*H I、*Xho* I双酶切鉴定, 5. 重组表达质粒pET32a(+)/*EF-Tu*菌落PCR阳性产物, 6. 菌落PCR阴性对照

Fig. 2 Identification of recombinant cloning plasmid (a) and recombinant expression plasmid (b) by colony PCR, single and double restriction enzyme digestion

(a) M. DNA Maker DL 10000, 1. recombinant cloning plasmid pMD19-T/*EF-Tu* digested with *Bam*H I, 2. recombinant cloning plasmid pMD19-T/*EF-Tu* digested with *Bam*H I and *Xho* I, 3. the positive colony PCR amplification products of recombinant cloning plasmid pMD19-T/*EF-Tu*, 4. the negative colony PCR amplification products of recombinant cloning plasmid pMD19-T/*EF-Tu*; (b) M. DNA Maker DL 10000, 1. expression plasmid pET32a(+) digested with *Bam*H I, 2. expression plasmid pET32a(+) digested with *Bam*H I and *Xho* I, 3. recombinant expression plasmid pET32a(+)/*EF-Tu* digested with *Bam*H I, 4. recombinant expression plasmid pET32a(+)/*EF-Tu* digested with *Bam*H I and *Xho* I, 5. the positive colony PCR amplification products of recombinant expression plasmid pET32a(+)/*EF-Tu*, 6. the negative colony PCR amplification products of recombinant expression plasmid pET32a(+)/*EF-Tu*

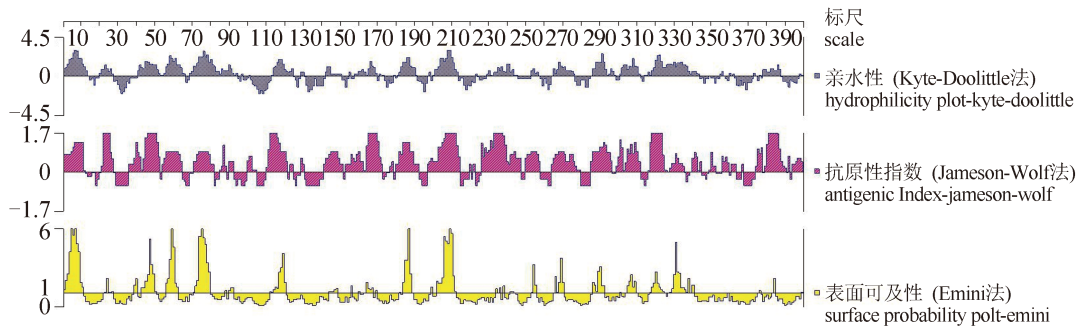


图 3 罗非鱼源*S. agalactiae* HN0303 *EF-Tu*氨基酸序列的亲水性、抗原性指数及表面可及性预测

Fig. 3 Prediction of hydrophilicity, antigenicity and surface probability of *EF-Tu* amino acid sequence of *S. agalactiae* HN0303 isolated from tilapia

袋复性处理，纯化后的目的蛋白条带单一，与诱导蛋白大小一致(图5-b)。

2.5 *EF-Tu* 蛋白抗原性分析

对罗非鱼源*S. agalactiae* HN0303菌体的*EF-*

*Tu*蛋白以及重组蛋白进行Western Blot分析，实验结果显示罗非鱼源*S. agalactiae* HN0303的菌体蛋白以及重组蛋白均能与兔抗*EF-Tu*重组蛋白血清发生特异性结合，菌体蛋白大小为44 ku左右(图6-a)，与预测的该蛋白大小一致，重组蛋白大

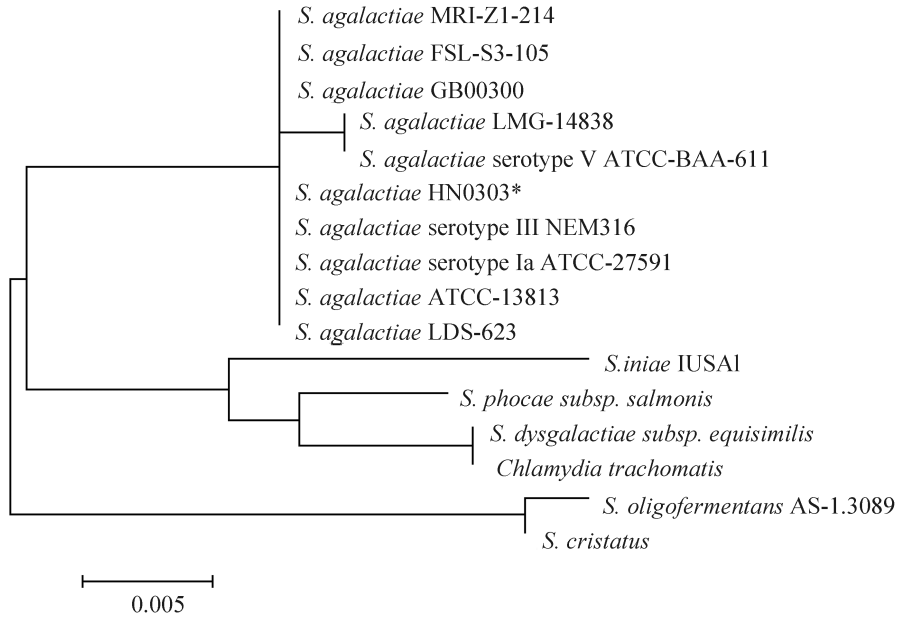


图 4 罗非鱼源 *S. agalactiae* HN0303 EF-Tu 蛋白序列与其他菌株序列的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of the EF-Tu amino acid sequence of *S. agalactiae* HN0303 and other strains

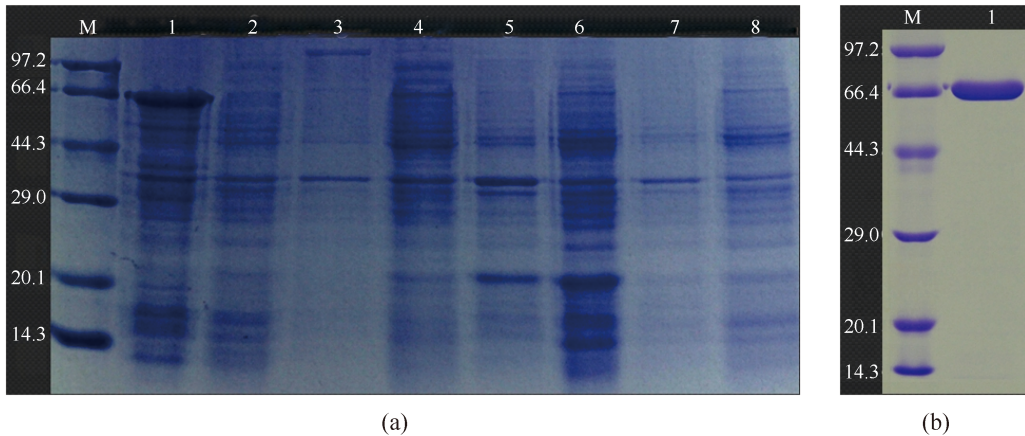


图 5 重组蛋白 EF-Tu 的诱导表达分析

(a) M. 蛋白非预染Maker, 1. pET32a(+)/EF-Tu 诱导表达沉淀, 2. pET32a(+)/EF-Tu 诱导表达上清液, 3. pET32a(+)/EF-Tu 未诱导表达沉淀, 4. pET32a(+)/EF-Tu 未诱导表达上清液, 5. pET32a(+)空载诱导表达沉淀, 6. pET32a(+)空载诱导表达上清液, 7. pET32a(+)空载未诱导表达沉淀, 8. pET32a(+)空载未诱导表达上清液; (b) M. 蛋白非预染Maker, 1. pET32a(+)/EF-Tu 诱导表达纯化蛋白

Fig. 5 Analysis of expression of recombinant protein EF-Tu by SDS-PAGE

(a) M. protein non-prestained Maker, 1. the insoluble fractions of induced pET32a(+)/EF-Tu, 2. the soluble fractions of induced pET32a(+)/EF-Tu, 3. the insoluble fractions of uninduced pET32a(+)/EF-Tu, 4. the soluble fractions of uninduced pET32a(+)/EF-Tu, 5. the insoluble fractions of induced pET32a(+), 6. the soluble fractions of induced pET32a(+), 7. the insoluble fractions of uninduced pET32a(+), 8. the soluble fractions of uninduced pET32a(+); (b) M. protein non-prestained Maker, 1. the purified protein of induced pET32a(+)/EF-Tu

小为 64 ku 左右(图 6-b)。此外在菌体蛋白中, 菌体破碎后的上清液中 EF-Tu 蛋白的含量明显高于沉淀(即外膜上的蛋白)。结果表明大肠杆菌原核表达的重组蛋白 EF-Tu 能够有效地刺激家兔产生特异性抗体, 具有良好的抗原性, 获得的抗体能够与菌体自身的蛋白以及重组蛋白发生特异

性结合, EF-Tu 蛋白既存在于胞质还能够分泌到外膜上。

2.6 EF-Tu 蛋白对细菌粘附 EPC 的影响

用兔抗 EF-Tu 重组蛋白血清封闭罗非鱼源 *S. agalactiae* HN0303 表面的 EF-Tu 蛋白影响细菌的粘附能力。通过等梯度稀释粘附细胞的细菌后

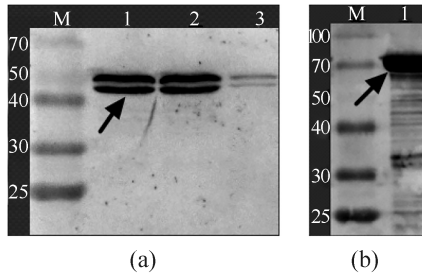


图6 Western Blot分析EF-Tu蛋白的抗原性

(a) M. 蛋白预染Maker, 1. 罗非鱼源 *S. agalactiae* HN0303全菌蛋白, 箭头所示特异性结合条带, 2. 罗非鱼源 *S. agalactiae* HN0303全菌上清液, 3. 罗非鱼源 *S. agalactiae* HN0303全菌沉淀; (b) M. 蛋白预染Maker; 1. EF-Tu重组蛋白, 箭头所示特异性结合条带

Fig. 6 Analysis of EF-Tu protein antigenicity by Western Blot

(a) M. protein prestained Maker, 1. the whole bacterial proteins of *S. agalactiae* HN0303 isolated from tilapia. Arrow showed the specific binds, 2. the soluble fractions of *S. agalactiae* HN0303, 3. the insoluble fractions of *S. agalactiae* HN0303; (b) M. protein prestained Maker, 1. recombinant protein of EF-Tu. Arrow showed the specific binds

铺板计数, 结果发现细菌在 10^{-2} 稀释倍数中的菌落数满足30~300, 选取该稀释度进行计数, 结果见表1。根据公式计算结果为 $79.99\% \pm 2.43\%$, 即抗体封闭后抑制细菌的粘附率, 说明加入兔抗血清降低了细菌的粘附能力。结果表明, 兔抗EF-Tu重组蛋白血清能够有效地封闭 *S. agalactiae* 表面的EF-Tu蛋白, 使得细菌的粘附能力下降。

3 讨论

近年来, 罗非鱼感染无乳链球菌的报道屡见不鲜, 其给罗非鱼养殖业带来非常严重的损失。生产上使用化学药物和抗生素来防治该病, 实际效果并不理想且存在许多问题。目前疫苗在预防疾病方面取得了良好的成效, 通过

疫苗免疫, 能够刺激鱼体自身的免疫系统, 达到预防疾病的作用。目前无乳链球菌已经发现有10种荚膜多糖血清型^[14], 为了研制不依赖于血清型的GBS通用疫苗, 人们在具有高保护性蛋白抗原的鉴定方面做了大量的研究^[15]。2005年前, 已有少数GBS的蛋白抗原作为潜在的候选疫苗成分被鉴定出来, 主要包括Rib、C蛋白 α 和 β 亚基, Sip、C5a肽酶等^[4-7]。但是除了Sip、C5a肽酶外, 这些蛋白抗原或者不能在所有菌株中表达或者在不同菌株中高度变异^[16]。因此寻找免疫原性高且能够在不同菌株中都能表达的蛋白抗原将成为疫苗开发的热点。

现在已鉴定的细菌中大多数兼职蛋白一般是一些糖酵解酶或其他一些代谢有关酶以及分子伴侣, 这些蛋白质具有高度的保守性。它们可以定位于细胞表面发挥其附加功能, 这些蛋白质在许多病原微生物表面被发现, 并且往往与病原的致病过程有关。现有研究表明, 兼职蛋白的附加功能主要有粘附、绑定和调节宿主免疫应答^[11]。已有越来越多的研究证明EF-Tu是一个重要的兼职蛋白, 可作为细菌的一个重要毒力因子。例如, 定位于肺炎支原体和绿脓假单胞菌的EF-Tu可以介导病原与纤连蛋白和其他一些宿主蛋白的绑定^[17]。同时, 土拉热杆菌 (*Francisella tularensis*)可通过EF-Tu与核仁蛋白的反应促进其入侵宿主细胞^[18]。有研究表明用类鼻疽杆菌 (*Burkholderia pseudomallei*)EF-Tu作为口服疫苗可以减少类鼻疽杆菌在小鼠肺部的定殖, 同时可以诱导小鼠良好的体液免疫反应和细胞免疫反应^[19]。本研究通过对原核表达EF-Tu重组蛋白进行抗原性检测以及粘附性实验, 推测EF-Tu蛋白可能为罗非鱼源 *S. agalactiae* 的毒力因子和免疫原性蛋白, 可作为对抗罗非鱼源 *S.*

表1 EF-Tu蛋白对罗非鱼源 *S. agalactiae* HN0303粘附EPC的影响

Tab. 1 Effect of EF-Tu protein on *S. agalactiae* HN0303 isolated from tilapia adhesion to EPC

实验重复 test repeat	1	2	3
对照组菌落数 the number of colonies in the control group	156×10^2	176×10^2	238×10^2
实验组菌落数 the number of colonies in the test group	30×10^2	40×10^2	43×10^2
抑制率 inhibition rate	80.77%	77.27%	81.93%
平均数 \pm 标准差 mean \pm SD		$79.99\% \pm 2.43\%$	

*agalactiae*的一个新的、具有较大开发潜力的候选亚单位疫苗。

本实验成功克隆了罗非鱼源*S. agalactiae* *EF-Tu*基因,理论上预测该蛋白的亲水区域大于疏水区域,为亲水性蛋白,与实验中该蛋白为可溶性蛋白是一致的。有研究发现兼职蛋白的蛋白序列中通常既不包含与表面锚定有关的序列,也不包含分泌信号,所以细菌的兼职蛋白最初又称“非锚定蛋白”或“非典型分泌蛋白”^[11],而在本研究中对EF-Tu蛋白序列的分析也显示其不具有信号肽和跨膜区域。对该蛋白序列抗原表位分析显示该蛋白可形成多个抗原表位,是一个抗原性较高的蛋白。根据目前报道的引起鱼类发病的*S. agalactiae*主要是I a、I b和Ⅲ这3种血清型^[20]。从系统发育树分析发现,EF-Tu蛋白在血清型I a、Ⅲ中高度同源性,在不同血清型的*S. agalactiae*中皆有表达。鉴于该蛋白的高保守性和免疫原性的特点,推测其可作为*S. agalactiae*亚单位疫苗的候选蛋白。

在Western Blot实验中,当兔抗血清在与菌体蛋白结合过程中,在目的蛋白上方50 ku附近出现了一条结合条带,目前对该条带蛋白属性未知。有研究报道,具有生物活性的蛋白在其被激活行使功能时,将进行磷酸化修饰,通常被修饰后的蛋白其在SDS-PAGE中的迁移率相对较低,从而Western Blot结果将出现2条带^[21-22]。而对EF-Tu蛋白磷酸化位点进行预测,发现该蛋白具有较多的磷酸化位点,被磷酸化修饰的可能性非常大。因此推测目的蛋白上方的结合条带为该蛋白磷酸化修饰后的蛋白可能性较大,同时也可能与EF-Tu蛋白的前体有关,对于该条带的属性可通过制备单克隆抗体进一步验证。此外,对比菌体蛋白Western Blot结果发现,菌体破碎后上清液中EF-Tu蛋白的含量,明显高于沉淀,而沉淀中的蛋白主要来自细菌的外膜上。因此该蛋白主要是在胞质中行使肽链延伸功能,同时也有少部分蛋白被分泌到胞质外与细菌的粘附入侵有关,行使其兼职功能。

细菌粘附因子在*S. agalactiae*入侵宿主中具有重要作用,如BibA能促进*S. agalactiae*吸附到机体细胞表面,有利于*S. agalactiae*与人子宫颈和肺上皮细胞结合^[23]。鲤(*Cyprinus carpio*)上皮细胞因其生长条件较低、易于培养且敏感性较高,目前广泛应用于鱼类病理学和比较病理学中,它

作为一种重要的鱼类上皮细胞系而应用于粘附相关的研究中^[24]。因此,为进一步论证EF-Tu蛋白是否与罗非鱼源*S. agalactiae*粘附相关,本研究发现通过抗体封闭罗非鱼源*S. agalactiae*表面的EF-Tu蛋白而使细菌的粘附能力较大减弱,表明该兔抗血清封闭了罗非鱼源*S. agalactiae*表面的EF-Tu蛋白,阻碍了罗非鱼源*S. agalactiae*对细胞的粘附。由此可知EF-Tu蛋白在罗非鱼源*S. agalactiae*感染过程中,对细菌粘附具有一定作用,与无乳链球菌的致病力相关,该蛋白可能为罗非鱼源*S. agalactiae*的粘附因子。

通过本研究成功克隆了罗非鱼源*S. agalactiae* HN0303 *EF-Tu*基因,并在大肠杆菌中得到了高效表达,并对其抗原性做了初步检测,以期能够为罗非鱼无乳链球菌亚单位疫苗的研发提供基础,为生产中罗非鱼无乳链球菌病的防治工作提供帮助。

参考文献:

- [1] 汪开毓,陈德芳,黄凌远.罗非鱼无乳链球菌病诊治[J].海洋与渔业:水产前沿,2011,(8):55-58.
Wang K Y, Chen D F, Huang L Y. The diagnosis and treatment of *Streptococcus agalactiae* disease from tilapia[J]. Fisheries Advance Magazine, 2011, (8):55-58(in Chinese).
- [2] 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.
Zhang X Y, Fan H P, Zhong Q F, et al. Isolation, identification and pathogenicity of *Streptococcus agalactiae* from tilapia[J]. Journal of Fisheries of China, 2008, 32(5):772-779(in Chinese).
- [3] Tettelin H, Maignani V, Cieslewicz M J, et al. Complete genome sequence and comparative genomic analysis of an emerging human pathogen, serotype V *Streptococcus agalactiae*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002, 99(19):12391-12396.
- [4] 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.
- [5] 黄锦炉,汪开毓,肖丹,等.罗非鱼源无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*) *Sip*基因的克隆、鉴定及分子特性分析[J].海洋与湖沼,2011,42(4):554-560.

- Huang J L, Wang K Y, Xiao D, *et al.* Characterization of the *sip* gene in the strain *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2011, 42(4):554–560(in Chinese).
- [6] 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.
- [7] 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[J]. *动物医学进展*, 2012, 33(3):24–28.
- 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(in Chinese).
- [8] Stark H, Rodnina M V, Rinke-Appel J, *et al.* Visualization of elongation factor Tu on the *Escherichia coli* ribosome[J]. *Nature*, 1997,389(6649):403–406.
- [9] 王志敏, 牛义, 许俊强, 等. 植物翻译延伸因子EF-Tu的研究进展[EB/OL]. [2013-03-06]. <http://www.paper.edu.cn/releasepaper/content/201303-177>.
- Wang Z M, Niu Y, Xu J Q, *et al.* Advance in protein synthesis elongation factor EF-Tu in plants[EB/OL]. [2013-03-06]. <http://www.paper.edu.cn/releasepaper/content/201303-177>(in Chinese).
- [10] Jeffery C. Moonlighting proteins[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 1999, 24(7):8–11.
- [11] Wang G Q, Xia Y, Cui J, *et al.* The roles of moonlighting proteins in bacteria[J]. *Current Issues in Molecular Biology*, 2014,16:15–22.
- [12] Brzywczy-Wloch M, Gorska S, Brzozowska E, *et al.* Identification of high immunoreactive proteins from *Streptococcus agalactiae* isolates recognized by human serum antibodies[J]. *FEMS microbiology letters*, 2013,349(1):61–70.
- [13] Kyte J, Doolittle R F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein.[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1982, 157(1):105–132.
- [14] 常瑞祥, 王旭荣, 杨志强, 等. 无乳链球菌黏附因子研究进展[J]. *动物医学进展*, 2014,35(2):101–104.
- Chang R X, Wang X R, Yang Z Q, *et al.* Progress on adhesion factors of *Streptococcus agalactiae*[J]. *Progress In Veterinary Medicine*, 2014, 35(02):101–104(in Chinese).
- [15] 沈定树, 周雷艳. 无乳链球菌表面蛋白的研究进展[J]. *中国微生态学杂志*, 2007,19(5):472–473.
- Shen D S, Zhou L Y. Advances in *Streptococcus agalactiae* surface proteins[J]. *Chinese Journal of Microecology*, 2007, 19(5):472–473(in Chinese).
- [16] 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.
- [17] Balasubramanian S, Kannan T R, Baseman J B. The surface-exposed carboxyl region of *Mycoplasma pneumoniae* elongation factor Tu interacts with fibronectin[J]. *Infection and immunity*, 2008,76(7):3116–3123.
- [18] Moreau G B, Mann B J. Adherence and uptake of *Francisella* into host cells.[J]. *Virulence*, 2013, 4(8):826–832.
- [19] Nieves W, Heang J, Asakrah S, *et al.* Immunospecific responses to bacterial elongation factor Tu during *Burkholderia* infection and immunization[J]. *PloS One*, 2010,5(12):e14361.
- [20] 夏杰, 易弋, 罗福广, 等. 无乳链球菌致病因子的研究进展[J]. *中国畜牧兽医*, 2013, 40(10):220–223.
- Xia J, Yi Y, Luo F G, *et al.* Research progress on pathogenic factors in *Streptococcus agalactiae*[J]. *China Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2013, 40(10): 220–223(in Chinese).
- [21] 任向波, 吴秀丽, 李芬. 不同裂解液对血管蛋白提取和磷酸化蛋白免疫印迹的影响[J]. *河南师范大学学报(自然科学版)*, 2015, 43(5):102–106.
- Ren X B, Wu X L, Li F. Effect analysis of different cell lysate on the extraction of total protein from vascular tissue and detection of phosphor-protein by Western Blot[J]. *Journal of Henan Normal University(Natural Science Edition)*, 2015,43(5) 102–106(in Chinese).
- [22] Arditi M, Zhou J, Torres M, *et al.* Lipopolysaccharide stimulates the tyrosine phosphorylation of mitogen-activated protein kinases p44, p42, and p41 in vascular endothelial cells in a soluble CD14-dependent manner. Role of protein tyrosine phosphorylation in lipopolysaccharide-induced stimulation of endothelial cells.[J]. *Journal of Immunology*, 1995, 155(8): 3994–4003.
- [23] Santi I, Scarselli M, Mariani M, *et al.* BibA: a novel immunogenic bacterial adhesin contributing to group B

- Streptococcus* survival in human blood.[J]. Molecular Microbiology, 2007, 63(3):754–767.
- [24] Fijan N, Sulimanović D, Bearzotti M, *et al.* Some properties of the *Epithelioma Papulosum Cyprini* (EPC) cell line from carp *Cyprinus carpio*[J]. Annales de L'Institut Pasteur/Virologie, 1983, 134(2):207–220.

Clone, prokaryotic expression and antigenicity detection of moonlighting protein EF-Tu of *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia

LIU Jiaying^{1,2,3}, WANG Kaiyu^{1,2*}, CHEN Defang^{1,3}, LIU Tao^{1,2},
HE Yang^{1,2}, ZENG Yukun^{1,2}, JIANG Jie^{1,2}

(1. Fish Disease Research Center, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China;

2. Key Laboratory of Animal Diseases and Human Health of Sichuan Province, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China;

3. College of Animal Science and Technology, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

Abstract: In order to detect the antigenicity of moonlighting protein EF-Tu (Elongation Factor Tu), *EF-Tu* gene from *Streptococcus agalactiae* HN0303 isolated from tilapia was cloned. The related properties of EF-Tu protein were predicted and its phylogenetic tree was also constructed. The rEF-Tu protein was obtained by prokaryotic expression systems and purified by Ni-NTA-Sefinose Column. The purified rEF-Tu protein immunized rabbits were used to obtain the polyclonal rabbit anti-rEF-Tu sera for antigenicity detection. The results showed that *EF-Tu* gene had an ORF with 1197 bases, encoding 398 amino acids with a $C_{1933}H_{3096}N_{532}O_{615}S_{11}$ formula, 43.981 ku molecular mass, and a 4.749 theoretical isoelectric point. Furthermore, the deduced amino acids comprised phosphorylation sites, but did not contain the transmembrane domain and signal peptide sequence. Three conserved domains, namely EF-Tu, EF-Tu-II and EF-Tu-III existed in the deduced amino acids via NCBI Conserved Domains tool. Phylogenetic analysis revealed an exaggerated degree of homology with other *S. agalactiae* EF-Tu protein. Additionally, high antigen index of the deduced amino acids was predicted using DNASTar-Protean, which means it can form numerous epitopes. rEF-Tu proteins formed into inclusion bodies were found in the pellet and an about 66.4 ku band was observed by SDS-PAGE. Moreover, Western Blot analysis showed that rabbit anti-rEF-Tu sera can combine the tropina with recombinant protein specifically. Adhesion test suggested that rabbit anti-rEF-Tu sera prevented *S. agalactiae* HN0303 adhering the EPC (*Epithelioma papulosum cyprini*) with a decrease of $79.99\% \pm 2.43\%$. In this study, our results showed that rEF-Tu possesses nice antigenicity and the rabbit anti-rEF-Tu sera can inhibit the *S. agalactiae* HN0303 adhesion obviously, which suggested that the EF-Tu protein may become a subunit vaccine candidate against *S. agalactiae* in tilapia.

Key words: tilapia; *Streptococcus agalactiae*; EF-Tu; clone; prokaryotic expression; antigenicity

Corresponding author: WANG Kaiyu. E-mail: kywang1955@126.com

Funding projects: Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University (IRT0848)