

文章编号: 1000-0615(2019)03-0661-10

DOI: 10.11964/jfc.20171111035

尼罗罗非鱼无乳链球菌Sip蛋白乳酸菌活载体口服疫苗的研制及其免疫效果

蔡玉臻^{1,2}, 刘志刚¹, 卢迈新^{1*}, 可小丽¹, 高风英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, 水产科学国家级实验教学示范中心, 国家水生动物病原库, 上海 201306)

摘要: 链球菌病是威胁我国罗非鱼养殖产业健康发展的重要病害之一。为研制出免疫效果好、操作简便的罗非鱼链球菌病疫苗, 本研究构建重组表达无乳链球菌Sip蛋白的穿梭质粒pNZ8124-Sip, 通过酶切和测序验证后电转化乳酸乳球菌NZ9000, 获得能够诱导重组表达无乳链球菌Sip蛋白的乳酸菌活菌载体疫苗。采用SPS-PAGE电泳摸索最佳诱导浓度和诱导时间以获得最大表达量, 通过镍柱纯化目的蛋白并进行Western blot检测; 利用不同浓度的重组乳酸菌活载体疫苗灌胃口服免疫尼罗罗非鱼, 采用间接ELISA法测定免疫后血清抗体水平变化, 通过人工腹腔注射感染无乳链球菌获得相对免疫保护率。研究结果显示, 构建的重组乳酸乳球菌可通过nisin诱导表达大小为48 ku特异性蛋白, 与目的蛋白大小一致; PAGE电泳显示, 重组蛋白主要以可溶蛋白和包涵体2种形式存在, 其中胞内可溶性蛋白浓度达7.65 mg/mL; 诱导表达的最佳条件为100 ng/mL nisin诱导6 h; Western blot检测结果显示, 诱导蛋白可与鼠抗His标签抗体特异性结合。口服免疫结果显示, 中浓度组(2.24×10^{10} CFU/mL)和低浓度组(2.24×10^9 CFU/mL)免疫2次能够显著提高尼罗罗非鱼的血清抗体水平和抗无乳链球菌感染能力, 中浓度免疫组的相对免疫保护率最高为41.0%。本研究可为罗非鱼链球菌病口服疫苗的研究奠定基础, 具有广阔的应用前景。

关键词: 尼罗罗非鱼; 无乳链球菌; Sip蛋白; 乳酸菌活载体疫苗; 免疫保护效果

中图分类号: Q 785; S 941

文献标志码: A

1967年, 罗非鱼(*Oreochromis spp.*)成为联合国粮农组织推荐的优良养殖品种, 目前已有135个国家养殖罗非鱼, 其已成为第二个被全世界广泛养殖的淡水鱼类^[1-2]。随着养殖规模的扩大, 养殖环境不断恶化, 罗非鱼病害频发。2009年以来罗非鱼链球菌病在我国南方主养区大范围地暴发, 在国外, 如马来西亚、巴西、美国等地区也有暴发, 严重威胁罗非鱼的健康养殖^[3-4]。

无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)为革兰

氏阳性菌, 是鱼类条件致病菌, 主要危害温水性鱼类, 1966年第一次在金色美鲷(*Notemigonus crysoleucas*)中分离得到^[5]。海水和淡水鱼类中均有无乳链球菌感染的报道, 其主要引起败血症和脑膜炎^[6-8]。无乳链球菌按Lancefield血清型分类归为B群无乳链球菌(group B streptococcus, GBS), 根据荚膜多糖抗原可分为Ia、Ib及II-IX等10种血清型^[9]。无乳链球菌有多种表面抗原蛋白, 其中研究较多的有荚膜多糖抗原、Alp蛋白

收稿日期: 2017-11-09 修回日期: 2018-01-12

资助项目: 广东省自然科学基金(2016A030313146); 现代农业产业技术体系专项(CARS-46); 广东省海洋与渔业局科技项目(A201601B05); 广东省疫病防治专项资金(20170070000600403); 广州市科技计划项目(201707010312)

通信作者: 卢迈新, E-mail: mx-lu@163.com

家族(α 、Rib、R28和Alp2等表面抗原蛋白)、 β 蛋白、ScpB蛋白、Lmb蛋白、FbsA蛋白、Sip蛋白和LrrG蛋白等,这些表面抗原蛋白常用作GBS亚单位疫苗的候选蛋白^[10-14]。通过不同血清型GBS的多基因组分析和筛查研究显示,ScpB蛋白、Sip蛋白、C5 α +Rib蛋白和 β 蛋白4个候选抗原蛋白可用作通用型GBS疫苗^[15]。Sip蛋白是在2000年由Brodeur通过免疫学筛选获得并命名的,其存在于所有血清型的GBS菌株中,且高度保守,相似率高达98%^[16]。Sip蛋白在多种动物模型中进行免疫实验,均发现其有较强的免疫原性^[17-18]。

目前,针对罗非鱼无乳链球菌病尚无科学有效的防治措施,主要依赖抗生素类化学药物进行防治,易导致菌株耐药性和药物残留。疫苗具有安全、高效、无残留等优点,可替代抗生素类药物成为罗非鱼链球菌病防控的重要途径。目前,罗非鱼无乳链球菌疫苗主要有灭活疫苗^[19]、减毒疫苗、DNA疫苗^[20]和基因工程亚单位疫苗等多种类型^[3]。灭活疫苗成分相对复杂、对不同个体免疫效果差异大、对细胞内寄生细菌保护效果相对较弱;减毒疫苗毒力可能恢复,同时贮藏运输条件高;基因工程亚单位疫苗较难分离纯化;上述疫苗普遍采用注射免疫方式,大批量免疫导致工作量大。益生菌活载体疫苗是以益生菌为载体菌,通过基因工程技术重组病毒、细菌或寄生虫等病原基因,构建能表达外源抗原或携带外源DNA疫苗的重组益生菌,这些重组菌能通过口服或滴鼻的方式将抗原传递至宿主黏膜系统,进而刺激免疫宿主产生免疫反应^[21]。乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)被公认为安全级(generally recognized as safe, GRAS)微生物,是人和动物肠道内的常见细菌,用于活载体疫苗制备已经相当成熟。Li等^[22]利用衣壳VP2基因插入乳酸杆菌/大肠杆菌穿梭载体pPG1(胞外锚定质粒)或pPG2(分泌型质粒)后转化乳酸杆菌,口服免疫结果显示,分泌型重组菌可作为虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)抗IPNV感染的候选活细菌疫苗。Anuradha等^[23]用嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)气溶素基因D1和D4插入pNZ8048质粒后电转乳酸菌NZ9000,灌胃口服免疫尼罗罗非鱼(*O. niloticus*)后其相对免疫保护率为70%~100%。乳酸乳球菌口服活载体疫苗因具有生产成本低、制备简单、无需分离纯化、易于标准化、安全性好、可直接口服、无需佐剂,适合大规模群体免疫等特点,在罗非鱼链

球菌疫苗的开发利用中具有广阔的应用前景,但目前关于尼罗罗非鱼源无乳链球菌Sip蛋白的乳酸菌活菌载体口服疫苗尚未见报道。

本研究通过重组构建表达尼罗罗非鱼无乳链球菌Sip蛋白的乳酸乳球菌NZ9000-pNZ8124-Sip,优化其表达条件并进行Western blot验证后制备成乳酸菌活载体疫苗,通过灌胃口服的方式免疫尼罗罗非鱼,通过无乳链球菌人工感染获得其免疫保护效果。本研究可为罗非鱼链球菌病口服疫苗的研究奠定基础,具有广阔的应用前景。

1 材料与方法

1.1 实验材料及试剂

实验用尼罗罗非鱼取自中国水产科学研究院珠江水产研究所高要水产种质中心,全长(8 \pm 1)cm,体质量(15 \pm 2)g。无乳链球菌为本实验室分离、鉴定和保存的尼罗罗非鱼源致病菌株(WC1535)。大肠杆菌MC1063 (*Escherichia coli*, MC1063)、乳酸乳球菌NZ9000、pNZ8124质粒和Nisin购自REBIO公司。

质粒提取、胶回收试剂盒购自OMEGA公司,pMD19-T Vector、限制性内切酶、T4 DNA连接酶、His Bind亲和纯化镍柱试剂盒购自TaKaRa公司;蛋白超滤管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Proteintech公司;ECL化学显色液购自Millipore公司;Easy 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 Sip基因重组表达载体的构建

根据GenBank公布的无乳链球菌Sip基因序列(CP0001141),设计特异性上下游引物SipF(5'-CGGGGTACCCCAAGAAACAGATACGACG-3')和SipR(5'-CCCAAGCTTTAGTGATGGTGATG-GTGATGGTTAAAGGATACGTGAA-3'),SipF带有Kpn I酶切位点(下划线所示),SipR带有Hind III酶切位点(下划线所示)和6个His的标签序列(斜体所示),引物由广州艾基生物技术有限公司合成。提取无乳链球菌基因组DNA,以其为模板进行PCR扩增,扩增体系总体积为25 μ L:上下游引物SipF、SipR各0.5 μ L(10 mmol/L),模板DNA 0.5 μ L, mix预混液12.5 μ L,双蒸水11 μ L。PCR反应条件:94 $^{\circ}$ C预变性5 min;94 $^{\circ}$ C变性

30 s, 52 °C退火30 s, 72 °C延伸90 s, 共30个循环; 72 °C终延伸10 min。琼脂糖凝胶电泳回收目的条带后连接pMD19-T质粒, 转化*E. coli* DH5 α 感受态细胞, 重组菌株DH5 α -pMD19-T-Sip涂布于含氨苄青霉素(10 μ g/mL)的LB固体培养基上, 置于37 °C培养箱过夜培养。阳性克隆经PCR和*Kpn* I、*Hind* III双酶切鉴定后送至广州艾基生物技术有限公司测序验证。

从DH5 α -pMD19-T-Sip菌株中提取质粒pMD19-T-Sip, 将pMD19-T-Sip质粒和pNZ8124质粒分别进行*Kpn* I、*Hind* III双酶切, 酶切条件为37 °C孵育4 h, 胶回收酶切后的Sip片段和pNZ8124质粒, T4 DNA连接酶16 °C连接过夜, 将连接产物转化*E. coli* MC1061感受态细胞, 获得重组菌株MC1061-pNZ8124-Sip, 阳性克隆经PCR和*Kpn* I、*Hind* III双酶切鉴定后进行测序验证。

从MC1061-pNZ8124-Sip菌株中提取pNZ8124-Sip质粒电击转化乳酸乳球菌NZ9000感受态细胞, 构建重组菌株NZ9000-pNZ8124-Sip。电转的条件为2 000 V, 200 Ω , 电击4.5~5 ms。阳性克隆经PCR和*Kpn* I、*Hind* III双酶切筛选鉴定后进行测序验证。

1.3 Sip蛋白诱导表达条件的优化和SDS-PAGE电泳

将测序验证的重组乳酸乳球菌NZ9000-pNZ8124-Sip和NZ9000-pNZ8124接种至5 mL的含氯霉素(10 μ g/mL)的BHI液体培养基中, 30 °C下过夜静置培养, 第2天以1:50比例扩大培养, 培养至OD₆₀₀约为0.4时, 加入不同浓度的nisin诱导剂, 设置实验组诱导浓度梯度分别为10, 100和1 000 ng/mL, 对照组为未加诱导剂的NZ9000-pNZ8124-Sip和未含有目的基因的空载体NZ9000-pNZ8124, 30 °C下诱导4 h, 摸索最佳诱导浓度。在最佳诱导浓度条件下设置诱导时间梯度为0、1、2、4、6和8 h, 摸索最佳诱导时间。诱导后8 000 r/min离心10 min分离菌体和培养基, 以菌体质量(g)、PBS缓冲液体积(mL)比为1:1混合后液氮研磨破碎, 8 000 r/min离心后分离菌液上清液和沉淀; 培养基中分泌蛋白通过30 ku超滤管浓缩, 6 000 r/min离心10 min, 保存超滤管中浓缩的培养基, 然后进行SDS-PAGE凝胶电泳。

1.4 Sip重组蛋白的纯化、蛋白含量测定与Western blot检测

重组乳酸乳球菌NZ9000-pNZ8124-Sip诱导表

达后采用His标签蛋白纯化试剂盒根据说明书步骤纯化Sip重组蛋白。通过SDS-PAGE凝胶电泳检测纯化效果, 并采用BCA法测定纯化蛋白的含量。

取纯化后的Sip蛋白SDS-PAGE电泳后用湿转法转印至PVDF膜上, 使用5%脱脂奶粉溶液在小型摇床上4 °C封闭1 h, 将PVDF膜置于鼠抗His单克隆抗体(1:2 000稀释)溶液中, 4 °C孵育过夜。次日, 将PVDF膜经TBST缓冲溶液清洗3次, 每次5 min; 再用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体(1:5 000稀释)室温孵育2 h, TBST缓冲溶液洗脱3次后采用ECL化学发光法显影并采集图像。

1.5 重组乳酸乳球菌口服免疫实验及其免疫保护效果评价

将实验鱼随机分为6组, 每组160尾, 暂养2周后进行免疫实验。用5 L的螺口瓶大量培养NZ9000-pNZ8124-Sip、NZ9000-pNZ8124和NZ9000菌株, 其中重组乳酸乳球菌NZ9000-pNZ8124-Sip在最佳诱导条件下(100 ng/mL nisin条件下诱导6 h)诱导表达, NZ9000-pNZ8124和NZ9000菌株不诱导。5 000 r/min离心10 min收集上述菌体后采用PBS缓冲溶液重悬, 通过比浊法测定菌液浓度。NZ9000-pNZ8124-Sip用PBS缓冲溶液稀释成3个浓度梯度, 分别为 2.24×10^9 、 2.24×10^{10} 和 2.24×10^{11} CFU/mL, NZ9000-pNZ8124和NZ9000菌株稀释浓度为 2.24×10^{10} CFU/mL, 采用上述菌液进行灌胃口服免疫尼罗罗非鱼(100 μ L/尾), 空白对照组灌胃口服等体积的PBS缓冲溶液, 每组3个重复, 每个重复50尾。隔周免疫1次, 共免疫2次。第1次免疫后第1、2、4、8、16和21天分别从每组中随机取3尾鱼, 尾静脉采血, 分离血清。采用间接ELISA法测定血清抗体水平, 具体操作: 用包被缓冲液稀释纯化的Sip蛋白至5 ng/ μ L, 每孔100 μ L加至96孔酶标板, 4 °C孵育过夜; PBST溶液洗涤3次后加入封闭液, 37 °C封闭2 h; PBST溶液洗涤3次后加入1:50比例稀释的尼罗罗非鱼血清, 37 °C孵育1 h; PBST溶液洗涤3次后加入HRP标记的兔抗尼罗罗非鱼IgM抗体(1:1 000稀释), 37 °C孵育1 h; PBST洗涤3次后用TMB显色液显色30 min, 加入2 mol/L H₂SO₄终止反应, 采用酶标仪测定450 nm波长下的OD值。

首次免疫后第21天采用无乳链球菌WC1535(培养条件: 血平板, 37 °C)进行人工感染实验, 攻毒所用的菌液浓度为 2.25×10^7 CFU/mL (LD₅₀)。对各组实验鱼进行腹腔注射攻毒, 每尾注射

100 μL, 每组注射20尾, 水温为(31±2) °C, 连续2周统计各组鱼死亡情况, 计算各组相对免疫保护率(relative percent survival, RPS)。

相对免疫保护率(RPS)计算公式:

RPS=[1-(免疫组死亡率/对照组死亡率)]×100%

1.6 统计分析

运用SPSS 22.0软件中单因素方差分析方法对各组相对免疫保护率及其抗体水平之间差异的显著性进行分析(P<0.05表示差异显著; P<0.01表示差异性极显著)。

2 结果

2.1 Sip基因重组穿梭表达载体的构建

构建的pNZ8124-Sip质粒经Kpn I、Hind III双酶切后, 1%琼脂糖凝胶电泳结果显示有3 260 bp和1 265 bp左右的2条条带, 分别与pNZ8124载体、PCR扩增的Sip片段大小一致(图1), 将经酶切、菌液PCR鉴定正确的重组质粒送样测序, 结果与预测序列一致, 说明成功构建了尼罗罗非鱼无乳链球菌Sip蛋白乳酸菌重组表达质粒pNZ8124-Sip。

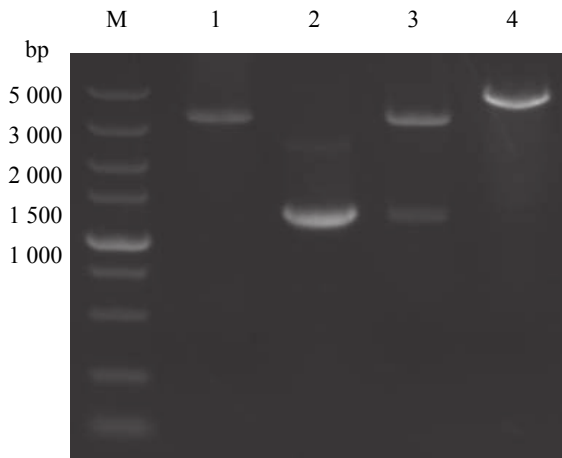


图1 重组表达质粒pNZ8124-Sip的双酶切鉴定和PCR鉴定

M. DNA Marker DL5000; 1. pNZ8124经Kpn I单酶切; 2.阳性克隆中扩增的Sip基因; 3.pNZ8124-Sip经Kpn I和Hind III双酶切; 4. pNZ8124-Sip经Kpn I单酶切

Fig. 1 Digestion and PCR identification of recombinant plasmid pNZ8124-Sip

M. DNA Marker DL5000; 1. recombinant plasmid of pNZ8124 digested by Kpn I; 2.PCR product of Sip gene; 3.pNZ8124-Sip digested by Kpn I and Hind III; 4. pNZ8124-Sip digested by Kpn I

2.2 Sip蛋白诱导表达条件的优化及其主要存在形式

30 °C条件下诱导4 h, NZ9000-pNZ8124空载体及nisin诱导剂浓度为0、10 ng/mL时重组乳酸菌无相应的特异条带出现, 而nisin浓度为100、1 000 ng/mL时均有特异性条带, 且在nisin浓度为100 ng/mL时条带最明显, 条带在48 ku左右, 大小与Sip目的蛋白分子量预期大小相符, 说明nisin浓度为100 ng/mL为最佳诱导浓度, 也说明了重组蛋白在乳酸菌NZ9000表达载体中成功表达(图2)。在获得最佳诱导浓度的前提下, 为了获得最佳诱导时间, 将重组表达菌在30 °C、nisin诱导剂浓度为100 ng/mL的条件下分别诱导0、1、2、4、6和8 h, 结果显示, 除了0 h其他各组均有目的蛋白的表达, 且在6 h时目的蛋白表达量最大, 说明nisin诱导6 h为最佳的诱导时间(图3)。

在最佳诱导条件下诱导后取重组乳酸乳球菌的全菌液、破碎后上清液、破碎后沉淀、纯

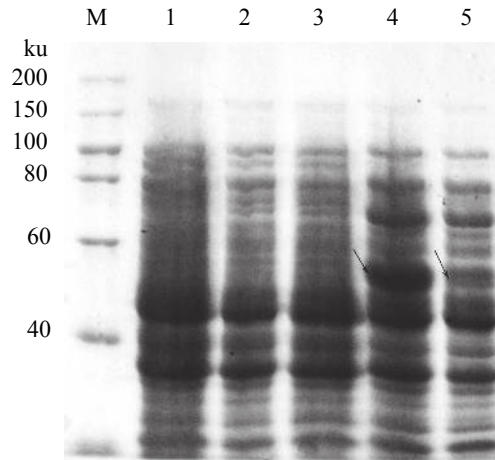


图2 重组乳酸乳球菌在不同nisin浓度下诱导表达产物的SDS-PAGE分析

M. 蛋白Marker; 1. 未诱导NZ9000-pNZ8124菌上清液蛋白; 2. 未诱导NZ9000-pNZ8124-sip菌上清液蛋白; 3. 诱导剂浓度为10 ng/mL重组菌上清液蛋白; 4. 诱导剂浓度为100 ng/mL重组菌上清液蛋白; 5. 诱导剂浓度为1 000 ng/mL重组菌上清液蛋白

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the induced expression products of recombinant L. lactis at different nisin concentrations

M. protein Marker; 1. supernatant protein of NZ9000-pNZ8124 bacteria ; 2. supernatant protein of NZ9000-pNZ8124-sip bacteria; 3. supernatant protein of recombinant bacteria induced with 10 ng/mL nisin; 4. supernatant protein of recombinant bacteria induced with 100 ng/mL nisin; 5. supernatant protein of recombinant bacteria induced with 1 000 ng/mL nisin

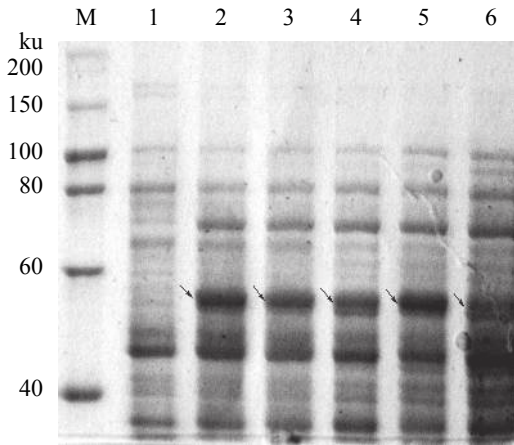


图3 重组乳酸乳球菌在不同诱导时间下表达产物的 SDS-PAGE分析

M. 蛋白Marker; 1. 未诱导重组菌上清液蛋白; 2. 诱导时间1 h重组菌上清液蛋白; 3. 诱导时间2 h重组菌上清液蛋白; 4. 诱导时间4 h重组菌上清液蛋白; 5. 诱导时间6 h重组菌上清液蛋白; 6. 诱导时间8 h重组菌上清液蛋白

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the expression products of recombinant *L. lactis* at induced time

M. protein Marker; 1. supernatant protein of uninduced recombinant bacteria; 2. supernatant protein of recombinant bacteria induced 1 h; 3. supernatant protein of recombinant bacteria induced 2 h; 4. supernatant protein of recombinant bacteria induced 4 h; 5. supernatant protein of recombinant bacteria induced 6 h; 6. supernatant protein of recombinant bacteria induced 8 h

化后的目的蛋白和浓缩的培养基中可溶性蛋白, 进行10% SDS-PAGE电泳分析。结果显示, 除空白对照外均有目的蛋白表达, 且破碎后沉淀中的特异条带最亮, 其次为破碎后上清液, 培养基中特异条带最暗, 说明重组表达的Sip蛋白主要以包涵体和胞内可溶性蛋白形式存在, 少量能够分泌到胞外的培养基中(图4)。

2.3 Sip重组蛋白Western blot分析与蛋白含量测定

重组乳酸乳球菌诱导表达的胞内可溶性目的蛋白纯化后进行Western blot分析, ECL化学发光法显色结果显示, 经纯化的重组蛋白在PVDF膜上呈现清晰的单一印迹, 且和预期大小一致(图5)。纯化后的胞内可溶性Sip蛋白通过BCA法测定其含量可达7.65 mg/mL, 可用于后续的口免疫实验。

2.4 重组乳酸菌口服免疫后尼罗罗非鱼血清特异性抗体水平变化及其相对免疫保护率

间接ELISA法检测各组尼罗罗非鱼初次免疫

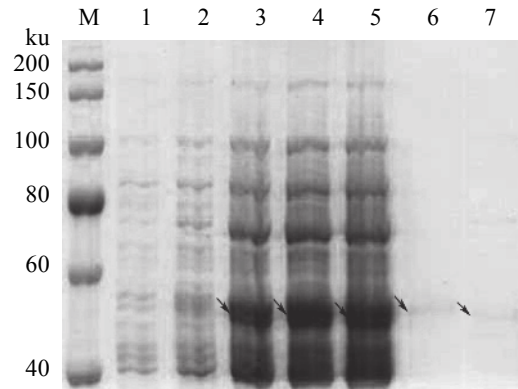


图4 重组乳酸乳球菌诱导表达产物的 SDS-PAGE分析

M. 蛋白Marker; 1. 未诱导重组菌上清液蛋白; 2. 未诱导重组菌全菌蛋白; 3. 重组菌诱导全菌蛋白; 4. 重组菌诱导后上清液蛋白; 5. 重组菌诱导后沉淀蛋白; 6. 纯化后的上清液蛋白; 7. 培养基中分泌蛋白

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of induced expression products of recombinant *L. lactis*

M. protein Marker; 1. supernatant protein of uninduced recombinant bacteria; 2. total protein of uninduced recombinant bacteria; 3. total protein of induced recombinant bacteria; 4. supernatant protein of induced recombinant bacteria; 5. precipitated protein of induced recombinant bacteria; 6. purified supernatant protein; 7. secretory protein in medium

后第1、2、4、8、16和21天的血清抗体水平结果发现, NZ9000、NZ9000-8124以及高浓度的NZ9000-8124-sip (2.24×10^{11} CFU/mL)并不能引起尼罗罗非鱼的特异性免疫反应而产生相应抗体; 而中浓度NZ9000-8124-sip (2.24×10^{10} CFU/mL)和低浓度NZ9000-8124-sip (2.24×10^9 CFU/mL)可显著提高血清特异性抗体水平($P < 0.05$), 且随着时间推移呈现先增加后降低的趋势, 分别在16 d和4 d达到峰值, 中浓度组的抗体水平要高于低浓度组(图6)。

首次免疫后第21天人工注射感染无乳链球菌, 结果发现, 中浓度组(NZ9000-8124-sip-2)和低浓度(NZ9000-8124-sip-3)组的相对免疫保护率较高, 显著高于高浓度组(NZ9000-8124-sip-1)和NZ9000组($P < 0.05$), 中浓度组的相对免疫保护率最高, 为41.0%(图7)。

3 讨论

无乳链球菌是罗非鱼的重要致病菌, 链球菌病的大面积暴发严重制约着罗非鱼养殖产业的健康发展。本研究利用分泌型诱导表达载体

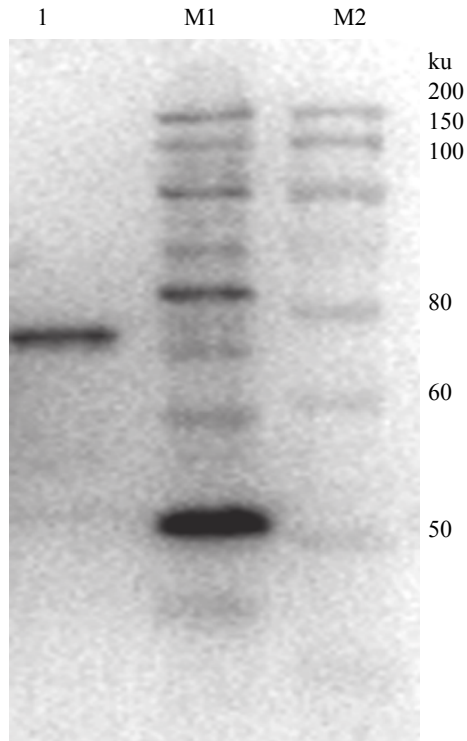


图5 重组乳酸乳球菌诱导表达Sip蛋白的Western blot分析

M₁. Western Marker; M₂. 蛋白Marker; 1. 纯化后的胞内可溶性Sip蛋白

Fig. 5 Western blot analysis of the Sip protein induced by recombinant *L. lactis*

M₁. Western Marker; M₂. protein Marker; 1. purified intracellular soluble Sip protein

pNZ8124构建了重组表达Sip蛋白的乳酸乳球菌NZ9000-pNZ8124-Sip, 并成功诱导目的蛋白的表达, nisin诱导剂浓度为100 ng/mL, 诱导时间为6 h时目的蛋白获得最大表达量。研究表明, pNZ8124表达载体中nisA启动子的活性由nisR(胞浆内反应调节子)和nisK(膜结合感应蛋白)双组分调节系统调节, nisK接受外源nisin肽信号, 自身磷酸化后激活nisR, 之后nisR激活nisA启动子, 启动下游基因的表达, 该启动子的活性与培养基中的nisin浓度成线性关系, 其诱导效率可达1 000倍以上^[24]。Shigemori等^[25]利用pNZ8148质粒构建了重组表达过敏原荞麦蛋白的乳酸乳球菌NZ9000, 其最佳nisin诱导浓度为100 ng/mL, 最佳诱导时间为3 h, 这与本研究结果类似。但在大多数乳酸菌表达载体的研究中, 最常用的nisin的浓度为10 ng/mL, 最佳诱导时间为2.5~6 h, 这可能与表达载体、表达菌株以及重组蛋白的差异性有关。

本研究结果显示, 重组表达Sip蛋白主要存

在于破碎后菌液上清液和沉淀中, 培养基中目的蛋白量较少, 这表明Sip蛋白主要以胞内可溶蛋白和包涵体2种形式存在, 培养基中的分泌型蛋白含量最少。外源蛋白在乳酸菌中表达, 由于不完全折叠或错误折叠而产生疏水性表面, 从而导致其聚集形成包涵体, 不具有生物学活性; 而正确折叠成天然结构的外源蛋白则以可溶性蛋白形式存在, 具有生物学活性^[26]。虽然本研究构建的重组表达载体利用乳酸菌USP₄₅的信号肽来引导Sip蛋白的分泌表达, 但是其分泌表达效率较低, 这与USP₄₅的信号肽的异源性以及分泌蛋白前体所形成的构象密切相关^[27]。本研究构建的重组乳酸菌可诱导表达大量具有生物学活性的可溶性Sip蛋白, 浓度可达7.65 mg/mL, 可直接用于鱼体免疫, 无需蛋白复性。重组表达Sip蛋白纯化后经Western blot分析表明, 目的蛋白可与鼠抗His的单克隆抗体特异性结合显示单一条带, 说明目的蛋白成功表达。

重组乳酸菌灌胃口服免疫尼罗罗非鱼结果显示, 中浓度组(2.24×10^{10} CFU/mL)和低浓度组(2.24×10^9 CFU/mL)免疫2次能够显著提高尼罗罗非鱼的血清抗体水平和抗无乳链球菌感染能力。乳酸菌活载体疫苗激活鱼体免疫应答的作用机制即携带目的抗原蛋白的乳酸菌进入肠道, 被吞噬细胞吞噬后呈递目的抗原蛋白, 在肠道黏膜表面首先启动黏膜免疫, 再由免疫球蛋白IgT的抗体介导产生特异性系统免疫反应和相应的抗体^[28]。中浓度组和低浓度组尼罗罗非鱼首次免疫后, 血清特异性抗体水平均呈现先增加后递减的趋势, 中浓度组的血清抗体峰值大于低浓度组, 且持续时间也较长。这说明重组乳酸菌中浓度组口服免疫能够更为显著地激活鱼体的免疫反应, 这与该组产生较高的相对免疫保护率相吻合。重组乳酸菌高浓度组免疫后, 其免疫保护效果和血清抗体与NZ9000阴性对照相比无显著差异, 其可能由于高浓度组免疫剂量过高, 使鱼体肠道产生了免疫耐受。免疫耐受是肠道免疫系统先天存在的一种生理功能, 在栖息菌和食物抗原不应答、不引起炎症反应和保持肠道组织完整性等方面具有重要作用^[29]。研究表明, 疫苗免疫剂量是影响其免疫效果的重要因素之一, 剂量过高易引起免疫耐受或毒性反应, 导致抗原特异性应答的T细胞与B细胞在抗原刺激下不能被激活, 不能产生特异

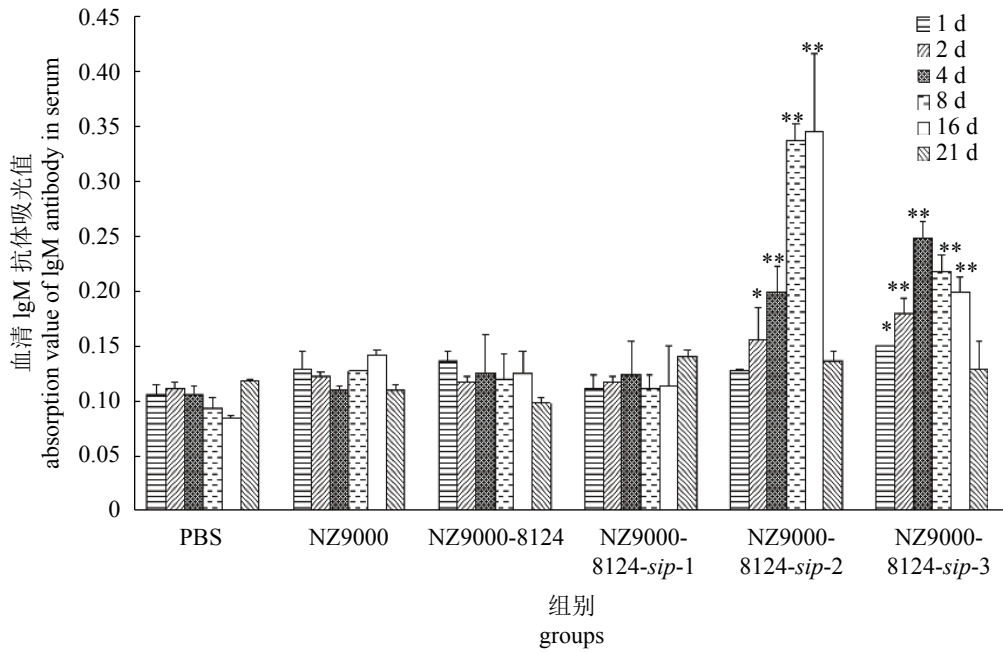


图 6 重组乳酸乳球菌口服免疫尼罗罗非鱼后血清抗体水平的变化

* 代表相同时间点各组与PBS对照组之间存在显著性差异($P<0.05$), **代表差异极显著($P<0.01$); NZ9000-8124-sip-1为高浓度(2.24×10^{11} CFU/mL)免疫组, NZ9000-8124-sip-2为中浓度(2.24×10^{10} CFU/mL)免疫组, NZ9000-8124-sip-3为低浓度(2.24×10^9 CFU/mL)免疫组

Fig. 6 The change of serum antibody level of *O. niloticus* orally immunized by recombinant *L. lactis*

* represents it was significantly different compared with PBS control group at the same time point ($P<0.05$), ** represent extremely significant ($P<0.01$), NZ9000-8124-sip-1 represents the group immunized with high concentration of recombinant bacteria (2.24×10^{11} CFU/mL), NZ9000-8124-sip-2 represents the group immunized with medium concentration of recombinant bacteria (2.24×10^{10} CFU/mL), NZ9000-8124-sip-3 represents the group immunized with low concentration of recombinant bacteria (2.24×10^9 CFU/mL)

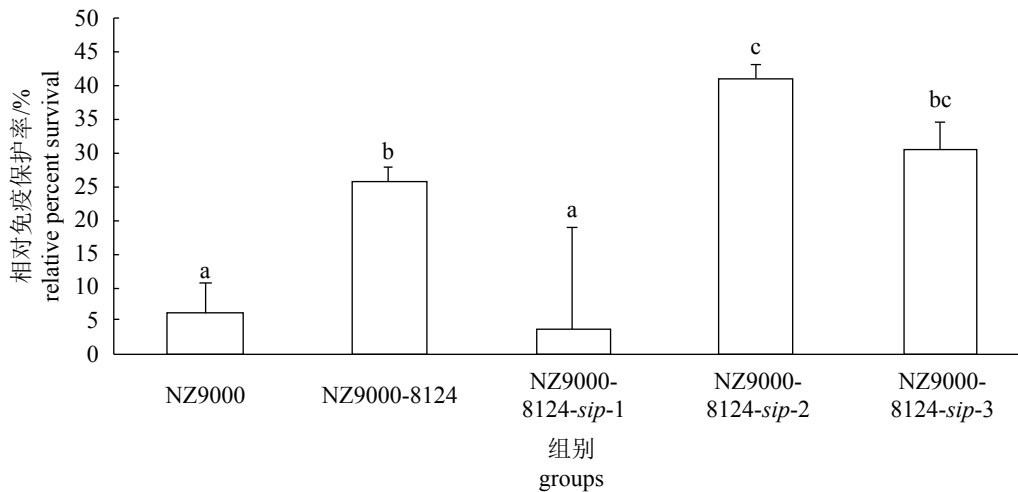


图 7 重组乳酸乳球菌口服免疫尼罗罗非鱼的相对免疫保护率

数值为mean±SD; 各组上方字母不同表示组间差异显著, $P<0.05$; NZ9000-8124-sip-1为高浓度(2.24×10^{11} CFU/mL)免疫组, NZ9000-8124-sip-2为中浓度(2.24×10^{10} CFU/mL)免疫组, NZ9000-8124-sip-3为低浓度(2.24×10^9 CFU/mL)免疫组

Fig. 7 The RPS of *O. niloticus* orally immunized with recombinant *L. lactis*

Data were shown as mean±SD; the different letters above columns represent significant difference, $P<0.05$; NZ9000-8124-sip-1 represents the group immunized with high concentration of recombinant bacteria (2.24×10^{11} CFU/mL), NZ9000-8124-sip-2 represents the group immunized with medium concentration of recombinant bacteria (2.24×10^{10} CFU/mL), NZ9000-8124-sip-3 represents the group immunized with low concentration of recombinant bacteria (2.24×10^9 CFU/mL)

性免疫效应细胞及特异性抗体^[30]。

Li等^[22]制备的猪(*Sus scrofa*)轮状病毒Vp4荚膜蛋白乳酸菌活载体疫苗以浓度为 10^9 CFU/mL的浓度口服免疫小鼠(*Mus musculus*)可显著诱导其产生非特异性免疫和特异性免疫。Anuradha等^[23]构建了嗜水气单胞菌气溶素基因D1和D4乳酸菌活载体疫苗,口服免疫尼罗罗非鱼后结果显示,基因D1活载体疫苗口服浓度 10^6 CFU/mL组的效果较优于 10^8 CFU/mL组,而基因D4的结果则与之相反。结合上述研究结果和本实验结果可以推断,重组乳酸菌疫苗的最佳口服免疫浓度与所携带的抗原基因、免疫对象和表达载体均有关系,本实验中 2.24×10^{10} CFU/mL为该疫苗的最佳免疫浓度,不同乳酸菌活载体疫苗的最佳免疫浓度需要进行摸索。Rioux等^[31]用6种血清型无乳链球菌(Ia/c, Ib, II, III, V和VI)的Sip蛋白注射免疫小鼠后,获得了89%的相对免疫保护率。黎炯等^[32]利用重组Sip蛋白注射免疫罗非鱼获得的最高相对免疫保护率为87%,罗非鱼血清抗体滴度达到1:128 000。本研究表明,中浓度的重组乳酸菌口服免疫尼罗罗非鱼免疫保护效果最高,为41.0%,这远低于上述研究中Sip蛋白注射免疫的保护效果,这可能与免疫方法以及肠道黏膜系统对抗原的摄取效率有关,因此进一步优化口服免疫方法、开展抗原胞外锚定表达或抗原摄取细胞定向呈递是我们下一步研究工作。本研究可为罗非鱼链球菌病口服疫苗的开发奠定理论基础,对利用疫苗防控罗非鱼链球菌病从而实现罗非鱼的无抗健康养殖具有重要意义。

参考文献:

- [1] Wang M, Lu M X. Tilapia polyculture: a global review[J]. *Aquaculture Research*, 2016, 47(8): 2363-2374.
- [2] Liu G J, Zhu J L, Chen K M, et al. Development of *Streptococcus agalactiae* vaccines for tilapia[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2016, 122(2): 163-170.
- [3] 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.
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(in Chinese).
- [4] Pretto-Giordano L G, Müller E E, De Freitas J C, et al. Evaluation on the pathogenesis of *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 2010, 53(1): 87-92.
- [5] Robinson J A, Meyer F P. Streptococcal fish pathogen[J]. *Journal of Bacteriology*, 1966, 92(2): 512.
- [6] Plumb J A, Schachte J H, Gaines J L, et al. *Streptococcus* sp. from marine fishes along the Alabama and Northwest Florida coast of the gulf of Mexico[J]. *Transactions of the American Fisheries Society*, 1974, 103(2): 358-361.
- [7] Garcia J C, Klesius P H, Evans J J, et al. Non-infectivity of cattle *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* and channel catfish, *Ictalurus punctatus*[J]. *Aquaculture*, 2008, 281(1-4): 151-154.
- [8] Mian G F, Godoy D T, Leal C A G, et al. Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia[J]. *Veterinary Microbiology*, 2009, 136(1-2): 180-183.
- [9] Slotved H C, Kong F R, Lambertsen L, et al. Serotype IX, a proposed new *Streptococcus agalactiae* serotype[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2007, 45(9): 2929-2936.
- [10] 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.
- [11] Yi T, Li Y W, Liu L, et al. Protection of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) against *Streptococcus agalactiae* following immunization with recombinant FbsA and α -enolase[J]. *Aquaculture*, 2014, 428-429: 35-40.
- [12] Kayansamruaj P, Pirarat N, Kondo H, et al. Genomic comparison between pathogenic *Streptococcus agalactiae* isolated from Nile tilapia in Thailand and fish-derived ST7 strains[J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2015, 36: 307-314.
- [13] Chen M, Wang R, Luo F G, et al. *Streptococcus agalactiae* isolates of serotypes Ia, III and V from human and cow are able to infect tilapia[J]. *Veterinary Microbiology*, 2015, 180(1-2): 129-135.
- [14] Li W, Wang H Q, He R Z, et al. Major surfome and

- secretome profile of *Streptococcus agalactiae* from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): insight into vaccine development[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 55: 737-746.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] Xue G H, Yu L H, Li S T, *et al.* Intranasal immunization with GBS surface protein Sip and ScpB induces specific mucosal and systemic immune responses in mice[J]. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 2010, 58(2): 202-210.
- [18] Manning S D, Wood S, Kasha K, *et al.* Naturally occurring antibodies for the group B streptococcal surface immunogenic protein (Sip) in pregnant women and newborn babies[J]. *Vaccine*, 2006, 24(47-48): 6905-6912.
- [19] Li L P, Wang R, Liang W W, *et al.* Development of live attenuated *Streptococcus agalactiae* vaccine for tilapia via continuous passage *in vitro*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 45(2): 955-963.
- [20] Zhu L, Yang Q, Huang L Y, *et al.* Effectivity of oral recombinant DNA vaccine against *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2017, 77: 77-87.
- [21] 余丽芸, 王桂华, 唐彦君. 乳酸菌作为口服疫苗载体的研究进展[J]. *生物技术通报*, 2008(5): 48-50.
- Yu L Y, Wang G H, Tang Y J, *et al.* Advancement of lactic acid bacteria as oral vaccine[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2008(5): 48-50(in Chinese).
- [22] Li Y J, Ma G P, Li G W, *et al.* Oral vaccination with the porcine rotavirus VP4 outer capsid protein expressed by *Lactococcus lactis* induces specific antibody production[J]. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010, 2010: 708460.
- [23] Anuradha K, Foo H L, Mariana N S, *et al.* Live recombinant *Lactococcus lactis* vaccine expressing aerolysin genes D1 and D4 for protection against *Aeromonas hydrophila* in tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, 109(5): 1632-1642.
- [24] De Vos W M. Gene expression systems for lactic acid bacteria[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 1999, 2(3): 289-295.
- [25] Shigemori S, Yonekura S, Sato T, *et al.* Expression of the immunoreactive buckwheat major allergenic storage protein in *Lactococcus lactis*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(8): 3603-3611.
- [26] Arya R, Sabir J S M, Bora R S, *et al.* Optimization of culture parameters and novel strategies to improve protein solubility. In García-Fruitós E. *Insoluble Proteins: Methods and Protocols*[M]. New York, NY: Humana Press, 2015: 45-63.
- [27] 朱向东, 徐波. 乳酸菌蛋白质分泌表达研究进展[J]. *中国微生物学杂志*, 2008, 20(1): 91-92.
- Zhu X D, Xu B. Research progress of secretion expression of lactic acid bacteria proteins[J]. *Chinese Journal of Microecology*, 2008, 20(1): 91-92(in Chinese).
- [28] Mercenier A, Müller-Alouf H, Grangette C. Lactic acid bacteria as live vaccines[J]. *Current Issues in Molecular Biology*, 2000, 2(1): 17-25.
- [29] Strobel S, Mowat A M. Immune responses to dietary antigens: oral tolerance[J]. *Immunology Today*, 1998, 19(4): 173-181.
- [30] 江强, 周必英. 寄生虫疫苗免疫剂量的研究现状[J]. *国际医学寄生虫病杂志*, 2014, 41(2): 90-93.
- Jiang Q, Zhou B Y. The research status of immune dose of the parasite vaccine[J]. *International Journal of Medical Parasitic Diseases*, 2014, 41(2): 90-93(in Chinese).
- [31] Rioux S, Martin D, Ackermann H W, *et al.* Localization of surface immunogenic protein on group B streptococcus[J]. *Infection and Immunity*, 2001, 69(8): 5162-5165.
- [32] 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[J]. *水生生物学报*, 2012, 36(4): 626-633.
- 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(in Chinese).

Preparation of live recombinant *Lactococcus lactis* vaccine expressing Sip protein of *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia (*Oreochromis niloticus*) and immunogenicity analysis

CAI Yuzhen^{1,2}, LIU Zhigang¹, LU Maixin^{1*}, KE Xiaoli¹, GAO Fengying¹, CAO Jianmeng¹

(1. Key Laboratory of Tropical and Subtropical Fishery Resource Application and Cultivation, Ministry of Agriculture, Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China;

2. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, National Pathogen Collection Center for Aquatic Animals, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Streptococcosis is a serious disease that threatens the development of *Oreochromis niloticus* industry in China. In order to make a vaccine of *Streptococcus agalactiae* with high immune efficiency and simple operation, we constructed a recombinant shuttle-plasmid pNZ8124-Sip which could express Sip protein of *S. agalactiae*. The recombinant plasmid was electro-transferred into *Lactococcus lactis* NZ9000 after being identified by enzyme digestion and sequencing analysis. The SDS-PAGE was used to obtain the optimum induced concentration of nisin and induction time. The Sip protein was purified by Ni-chelating affinity chromatography and tested by Western blot. *O. niloticus* was vaccinated orally by gavage with different concentration of the recombinant *L. lactis* NZ9000-pNZ8124-Sip. The ELISA was used to test the change of serum antibody. The relative percent survival (RPS) was obtained by artificial abdominal injection with *S. agalactiae*. The SDS-PAGE showed that the molecular weight of expressed protein was 48 ku, which is equal to the expected protein size. The recombinant protein mainly existed as soluble protein and inclusion bodies. The concentration of purified protein could reach 7.65 mg/mL. The optimal condition was induction with 100 ng/mL nisin for 6 h. Western blot results showed that the recombinant Sip protein could be specifically combined with the mouse anti-His tag antibody. Oral immunization showed that the serum antibody and the resistance to *S. agalactiae* were significantly improved in the middle concentration group (2.24×10^{10} CFU/mL) and the low concentration group (2.24×10^9 CFU/mL). The RPS of the middle concentration was 41.0%, which was the highest. This study can lay a foundation for research on oral vaccine of *O. niloticus* against *S. agalactiae* and has a broad prospect of application.

Key words: *Oreochromis niloticus*; *Streptococcus agalactiae*; Sip protein; live recombinant *Lactococcus lactis* vaccine; immunogenicity

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

Funding projects: Natural Science Foundation of Guangdong Province (2016A030313146); China Agriculture Research System (CARS-46); Guangdong Marine and Fishery Bureau Science and Technology Project(A201601B05); Fish Disease Prevention and Control Special Foundation of Guangdong Province (20170070000600403); Science and Technology Program of Guangzhou (201707010312)