

2 型猪链球菌锌转运蛋白 A 对小鼠免疫保护作用*

李先富¹ 潘秀珍^{1,2} 韩明月^{1,2} 刘文静^{1,2} 王长军^{1,2} 唐家琪¹

摘要:目的 研究猪链球菌(*Streptococcus suis* *S. suis*) 锌转运蛋白 A(ZnuA) 对小鼠接种致死量 2 型猪链球菌(*S. suis* 2) 菌株的免疫保护作用,为进一步研究 *S. suis* 2 亚单位疫苗奠定实验基础。方法 采用聚合酶链反应(PCR) 检测 *znuA* 基因在不同血清型 *S. suis* 中的分布情况;蛋白免疫印迹(western blot) 检测 ZnuA 在 *S. suis* 2 的表达,利用流式细胞术对 ZnuA 进行细胞定位,动物实验研究 ZnuA 蛋白的免疫保护作用。结果 除血清型 17、21 和 30 型菌株及荷兰分离株 T15 菌株外,其他 30 个血清型 *S. suis* 菌株、7996 菌株以及 3 株 *S. suis* 2 型国内分离菌株基因组中均扩增到目的条带;*S. suis* 2 菌体蛋白与兔抗 ZnuA 蛋白的血清能发生特异性反应;兔抗 ZnuA 血清标记 *S. suis* 2 的荧光强度明显较高;ZnuA 重组蛋白免疫组小鼠死亡率较低。结论 ZnuA 是一种具有免疫保护作用的蛋白,可作为 *S. suis* 的亚单位疫苗候选分子。

关键词: 2 型猪链球菌; 锌转运蛋白 A; 免疫保护作用

中图分类号: R 378.1⁺2

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2012)01-0042-03

Immunoprophylaxis of ZnuA from *Streptococcus suis* 2 in mice LI Xian-fu, PAN Xiu-zhen, HAN Ming-yue, et al. Department of Microorganism Research Institute for Military Medicine of Nanjing Military Command, People's Liberation Army(Nanjing 210002, China)

Abstract: Objective To test the immunoprophylaxis of ZnuA in *Streptococcus suis* 2(*S. suis*) and to provide experimental evidence for the study of sub-unit vaccine. **Methods** Based on the sequence of ZnuA of the Chinese strain 05ZYH33 of *S. suis* 2, the primers were designed and the target DNA fragment was amplified using the genomic templates of different serotypes of *S. suis*. Western blot was performed to detect the expression of ZnuA of *S. suis* 2. An assay based on flow cytometry (FCM) was developed to detect the localization of ZnuA on the surface of *S. suis* 2. A animal test was done to study the immunoprotection of ZnuA. **Results** The target DNA fragment was amplified in most serotypes of *S. suis* (except strains SS17, 21, 30 and isolated strain T15). Fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis and western blot showed that ZnuA localized on the surface of *S. suis*. Immunization with purified ZnuA could protect BALB/c mice against the challenge with a highly virulent *S. suis* 2 strain 05ZYH33. **Conclusion** ZnuA could protect BALB/c mice against the challenge of a highly virulent *S. suis* 2 strain 05ZYH33, which suggests that ZnuA may be a candidate for the development of antibacterial protein sub-unit vaccine.

Key words: *S. suis* 2; ZnuA; immunoprophylaxis

猪链球菌(*Streptococcus suis* *S. suis*) 是重要的人畜共患病原体,可致猪患脑膜炎、败血症、关节炎等病症;人类感染该菌,可致脑膜炎、败血症等,甚至导致病死率极高的链球菌中毒性休克综合症,严重危害人类健康^[1-3]。目前尚无可预防 *S. suis* 感染的有效疫苗。课题组前期研究制备了锌转运蛋白 A(ZnuA) 重组蛋白并发现该蛋白具有良好的免疫原性^[4]。本研究通过聚合酶链反应(PCR) 检测 *znuA* 基因在不同血清型 *S. suis* 中的分布情况,对 ZnuA 蛋白进行细胞表面定位,观察重组 ZnuA 对 Balb/c 小鼠接种致死量 2 型猪链球菌(*S. suis* 2) 菌株的免疫保护作用,为进一步研究 *S. suis* 2 亚单位疫苗奠定实验基础,现将结果报告如下。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 *S. suis* 2 菌株 98012、Habb 为江苏患者分离株,05ZYH33 为四川人源分离株,HA68 为江苏猪源分离株(均为本实验室保存);7996 和 T15(荷兰 Greeff 教授惠赠);33 株血

清型标准参考株(加拿大 Gottschalk 教授惠赠);含表达质粒 pET-32a::znuA 的 *E. coli* BL21(DE3) 宿主菌(本实验室保存)。

1.1.2 实验动物 4 周龄 SPF 级 BALB/c 小鼠 20 只,雌性,体重 13~14 g(军事医学科学院试验动物中心;动物合格证号:SCXK(军)2007-004)。

1.1.3 试剂 PCR 扩增试剂盒(大连 TaKaRa 公司);DNA 胶回收试剂盒(美国 Promega 公司);DNA marker、protein marker(美国 Fermenta 公司);弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂(美国 Sigma 公司);辣根过氧化物酶(HRP) 标记山羊抗兔 IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司);diaminobenzidine(DAB) 显色液(武汉博士德生物工程有限公司);底物 O-phenylenedimaine(OPD)(南京大治生物技术有限公司);氨苄青霉素(ampicillin) 和卡那霉素(kanamycin)(上海生物工程有限公司);其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 不同血清型 *S. suis* 的 *znuA* 基因扩增 根据 05ZYH33 菌株的基因组中 *znuA* 基因序列^[5] 设计合成引物。上游引物为 5'-TCAGCTGCAACGAATCTTATC-3';下游引物为 5'-TTAGTCTTATCGGTTTCTT-3',引物由上海赛百盛生物技术公司合成。分别以不同血清型 *S. suis* 标准株、7996、T15 以及 *S. suis* 2 国内分离株基因组为模板,采用 PCR 扩增 *znuA* 基因,预计扩增目的片段大小为 837 bp。PCR 程序为 94℃ 5

* 基金项目: 国家自然科学基金(30730081;81071317;30972638);江苏省自然科学基金(BK2010113;BK2010114;BK2010025;BK2009042)

作者单位: 1. 南京军区军事医学研究所流行病学微生物研究所,江苏南京 210002; 2. 南京师范大学生命科学学院

作者简介: 李先富(1962-) 男,安徽全椒人,实验师,本科,研究方向: 免疫学。

通讯作者: 潘秀珍 E-mail: panxiuzhen_2004@163.com

min; 94 °C 30 s; 56 °C 1 min; 72 °C 90 s, 共 26 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。1% 琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行分析。

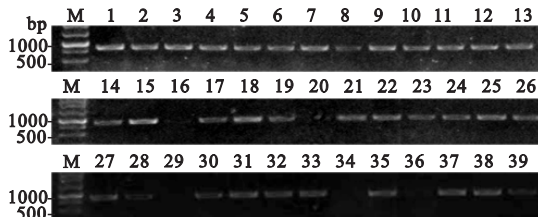
1.2.2 Western blot 检测 ZnuA 蛋白表达 (1) 05ZYH33 菌体蛋白抽提: 挑取 *S. suis* 2 05ZYH33 单菌落接种于 5 mL Todd-Hewitt broth (THB) 液体培养基中, 37 °C 振荡培养过夜。取细菌培养物 1.5 mL, 12000 r/min 离心 5 min, 收集沉淀, 超纯水洗涤 3 次。100 μL 超纯水重悬, 100 °C 水浴处理 10 min。加入 8 mmol/L 尿素 400 μL, 10% SDS 400 μL, 1 mmol/L 二硫苏糖醇 10 μL, 4 °C 过夜处理。12 000 r/min 离心 5 min, 收集上清。(2) 蛋白免疫印迹 Western blot: 取抽提的 05ZYH33 细菌蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 采用电转印法将蛋白转移至硝酸纤维素膜上, 用 5% 脱脂奶粉 37 °C 封闭 1 h 后, 加 1:10 000 稀释的兔抗 ZnuA 蛋白的血清 4 °C 过夜, 加 1:1 000 稀释的 HRP 标记山羊抗兔 IgG, 37 °C 孵育 1 h, 加底物 DAB/H₂O₂ 显色。

1.2.3 流式细胞术分析 取 10⁸ 菌落形成单位 (cfu) 的 05ZYH33 细菌, 经 0.01 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.4) 洗 3 次后, 悬于 100 μL PBS 中, 加入兔抗 ZnuA 蛋白的多抗血清 (1:100) 4 °C 静置 1 h。0.01 mmol/L PBS 洗 3 次后, 悬于 100 μL PBS 中, 并加入 FITC-羊抗兔 IgG (1:50) 4 °C 静置 1 h。0.01 mmol/L PBS 洗 4 次后, 悬于 500 μL PBS 中, 同时加入等量 4% 多聚甲醛固定 30 min, 流式细胞仪检测细菌荧光量。

1.2.4 小鼠免疫实验 ZnuA 重组蛋白按文献 (4) 制备, BALB/c 小鼠 20 只分成实验组和对照组, 每组 10 只。在接种 05ZYH33 菌株之前, 实验组分 3 次注射 ZnuA 蛋白, 对照组同步注射磷酸盐缓冲液 (PBS)。免疫步骤如下: 实验组每只小鼠皮下注射 25 μg 用弗氏完全佐剂乳化的 ZnuA 蛋白, 每只 100 μL。2 周后, 皮下注射 25 μg 用弗氏不完全佐剂乳化的 ZnuA 蛋白, 每只 100 μL。1 周后, 皮下注射 25 μg 用弗氏不完全佐剂乳化的 ZnuA 蛋白, 每只 100 μL。1 周后, 实验组和对照组分别腹腔接种 10⁸ cfu 的 05ZYH33 各 1 mL。

2 结果

2.1 不同血清型 *S. suis* 的 znuA 基因分布 (图 1) PCR 扩增结果显示, 在所有被检的菌株中, 除血清型 17、21 和 30 型菌株及荷兰分离株 T15 菌株外, 其他 30 个血清型 *S. suis* 菌株、7996 菌株以及 4 株 *S. suis* 2 型国内分离菌株基因组中均扩增到 837 bp 目的条带, 表明 znuA 基因广泛存在于大多数血清型 *S. suis* 中。

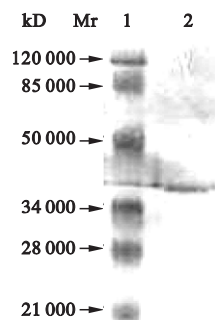


注: M: 250 bp DNA Marker; 1: 1/2 血清型; 2~6: 1~5 血清型; 7~11: 7~11 血清型; 12~33: 12~33 血清型; 34: 阴性对照; 35: 7996 株; 36: T15 株; 37: HA68 株; 38: 98012 株; 39: HA68 株。

图 1 不同血清型 *S. suis* 的 znuA 基因分布

2.2 ZnuA 蛋白表达 (图 2) 采用 Western blot 检测菌体 ZnuA 蛋白, 结果显示 05ZYH33 细菌蛋白能与兔抗 ZnuA 蛋白血清发生反应, 在蛋白分子量大小约为 36 000 Da 处有 1 条明

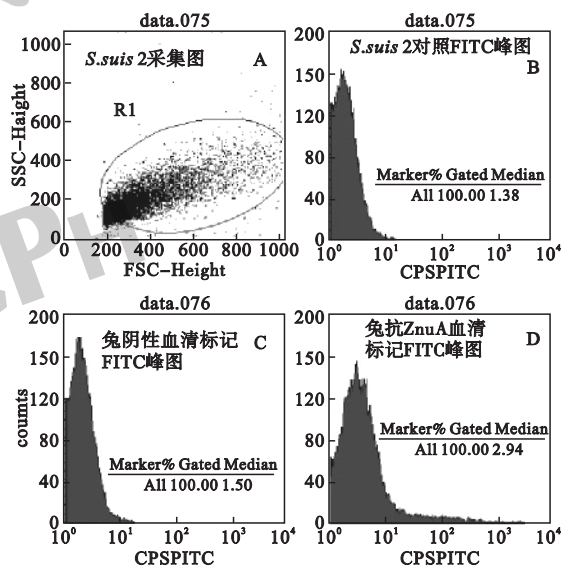
显条带, 表明 05ZYH33 细菌蛋白与兔抗 ZnuA 蛋白的血清能发生特异性反应, ZnuA 是一个 05ZYH33 菌体中表达的蛋白。



注: 1: 蛋白 Marker; 2: 细菌 05ZYH33 蛋白。

图 2 细菌蛋白免疫印迹

2.3 细胞表面定位 (图 3) 采用流式细胞术对 ZnuA 蛋白进行细胞定位。结果显示, 兔抗 ZnuA 血清标记 *S. suis* 2 的平均荧光强度明显高于兔阴性血清标记 *S. suis* 2 和未标记对照 *S. suis* 2 的平均荧光强度, 表明 ZnuA 是一个存在于 *S. suis* 2 菌体表面的蛋白。



注: A: 未标记对照 *S. suis* 2 采集图; B: 未标记对照 *S. suis* 2 平均荧光强度; C: 兔阴性血清标记 *S. suis* 2 平均荧光强度; D: 兔抗 ZnuA 血清标记 *S. suis* 2 平均荧光强度。

图 3 ZnuA 的流式细胞术定位

2.4 小鼠免疫保护作用 在接种 10⁸ cfu 05ZYH33 菌 12 h 后, 对照组小鼠死亡 8 只, ZnuA 重组蛋白免疫小鼠死亡 1 只; 24 h 后, 对照组小鼠全部死亡, 死亡率 100%; ZnuA 重组蛋白免疫小鼠死亡 4 只, 死亡率 40.00%, 其余生存状态良好, 存活 >7 d。2 组小鼠 24 h 存活率差异有统计学意义 (P < 0.001)。表明 ZnuA 重组蛋白对 Balb/c 小鼠有一定免疫保护作用, 可作为 *S. suis* 亚单位疫苗的候选分子。

3 讨论

研究表明, 虽然青霉素能够成功治疗大部分 *S. suis* 感染病例, 但越来越多 *S. suis* 青霉素抗性菌株被分离出来, 而且长期使用抗生素会使一些 *S. suis* 菌株产生抗药性 (2, 6-8), 因此研制疫苗是控制 *S. suis* 感染的重要手段。目前尚无人用猪链球菌疫苗, 甚至也无有效的可用于猪的疫苗。本课题组近年来在猪链球菌疫苗的研究方面进行了一系列工作, 发现了一些具有免疫保护作用的猪链球菌菌体蛋白分子 (9-13)。

猪链球菌 ZnuA 是新近发现的具有亚单位疫苗开发前景

的细菌表面蛋白⁽⁴⁻⁵⁾。通过对 *S. suis* 2 中国强毒株 05ZYH33 进行全基因组序列测定并进行基因组功能注释,生物信息学分析发现基因组中的含有高亲和力和锌 ABC 转运蛋白组分编码基因 *znuA* (*Ssu05_2086*)。同源比对发现,该编码基因与多种细菌的锌 ABC 转运蛋白编码基因具有较高的序列同源性⁽⁵⁾。韩明月⁽⁴⁾从 *S. suis* 2 中国强毒株 05ZYH33 中克隆表达出 *ZnuA* 重组蛋白,并利用 His 亲和层析获得较高纯度的蛋白,Western blot 分析结果证实,*ZnuA* 重组蛋白与 *S. suis* 2 感染猪恢复期血清能发生特异性反应,表明 *ZnuA* 具有良好的免疫原性,是一种在 *S. suis* 2 感染过程中表达的蛋白。本研究结果表明,*znuA* 基因广泛存在于不同血清型的 *S. suis* 中,*ZnuA* 是不仅是一个 *S. suis* 2 菌体中表达的蛋白,还是一种菌体表面蛋白。动物免疫实验结果表明,*ZnuA* 重组蛋白对 Balb/c 小鼠具有良好的免疫保护作用,*ZnuA* 可作为一个亚单位疫苗候选分子。本研究为进一步研究 *ZnuA* 在 *S. suis* 致病过程中的作用机理以及 *S. suis* 疫苗的研究提供依据。

参考文献

- (1) Staats JJ, Feder I, Okwumabua O, et al. *Streptococcus suis*: past and present [J]. *Vet Res Commun*, 1997, 21(6): 381-407.
- (2) Gottschalk M, Segura M, Xu J. *Streptococcus suis* infections in humans: the Chinese experience and the situation in North America [J]. *Anim Health Res Rev*, 2007, 8(1): 29-45.
- (3) Tang JQ, Wang CJ, Feng YJ, et al. Streptococcal toxic shock syndrome caused by *Streptococcus suis* serotype 2 [J]. *PLoS Medicine*, 2006, 3(5): e151.
- (4) 韩明月, 潘秀珍, 邵珠卿, 等. 2 型猪链球菌中国强毒株 *znuA* 基因的原核表达及免疫学活性分析 [J]. *免疫学杂志*, 2010, 26(3): 220-223.

- (5) 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.
- (6) Gottschalk M, Xu J, Calzas C, et al. *Streptococcus suis*: a new emerging or an old neglected zoonotic pathogen? [J]. *Future Microbiol*, 2010, 5(3): 371-391.
- (7) Straw BE, D'Allaire S, Mengeling WL, et al. Diseases of swine Ames [M]. IA: Iowa State University, 2005, 769-783.
- (8) Huang YT, Teng LJ, Ho SW, et al. *Streptococcus suis* infection [J]. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 2005, 38(5): 306-313.
- (9) Shao Z, Pan X, Li X, et al. HtpS, a novel immunogenic cell surface exposed protein of *Streptococcus suis*, confers protection in mice [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2011, 314(2): 174-182.
- (10) Feng Y, Pan X, Sun W, et al. *Streptococcus suis* enolase functions as a protective antigen displayed on the bacterial cell surface [J]. *J Infect Dis*, 2009, 200(10): 1583-1592.
- (11) Ge J, Feng Y, Ji H, et al. Inactivation of dipeptidyl peptidase IV attenuates the virulence of *Streptococcus suis* serotype 2 that causes streptococcal toxic shock syndrome [J]. *Curr Microbiol*, 2009, 59(3): 248-255.
- (12) Pan X, Ge J, Li M, et al. The orphan response regulator CovR: a globally negative modulator of virulence in *Streptococcus suis* serotype 2 [J]. *J Bacteriol*, 2009, 191(8): 2601-2612.
- (13) Liu L, Cheng G, Wang C, et al. Identification and experimental verification of protective antigens against *Streptococcus suis* serotype 2 based on genome sequence analysis [J]. *Curr Microbiol*, 2009, 58(1): 11-17.

收稿日期: 2010-07-09

(孔繁学编辑 王奕校对)

【实验研究】

小米多肽对小鼠免疫调节作用*

刘剑利 曹向宇 李其久 候潇

摘要:目的 研究小米多肽对小鼠的免疫调节作用。方法 小米多肽分为高、中、低剂量组,分别为 250、500、1 000 mg/(kg·d) 喂饲小鼠 30 d,通过淋巴细胞转化试验、半数溶血值(HC₅₀)、腹腔巨噬细胞吞噬功能、免疫器官指数的测定,研究小米多肽对小鼠免疫调节作用。结果 不同剂量的小米多肽有明显的刺激淋巴细胞转化作用;500、1 000 mg/(kg·d) 小米多肽剂量组 HC₅₀ 分别为(171.33 ± 8.77)、(175.91 ± 9.22),吞噬率分别为(59.45 ± 5.16)%、(65.7 ± 4.31)%;吞噬指数分别为(0.83 ± 0.11)、(0.88 ± 0.09),与对照组比较差异有统计学意义(P < 0.01),脾脏指数和胸腺指数均明显增加(P < 0.01)。结论 小米多肽具有明显的免疫调节作用。

关键词: 小米多肽; 免疫调节; 小鼠

中图分类号: R 392.6

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2012)01-0044-02

Immunoregulation functions of millet peptides in mice LIU Jian-li, CAO Xiang-yu, LI Qi-jiu, et al. *Department of Biochemistry School of Life Science Liaoning University(Shenyang 110036, China)*

Abstract: Objective To investigate immunoregulation functions of millet polypeptides in mice. **Methods** Totally 160 healthy mice were randomly divided into 4 groups and were orally administered with millet polypeptides at the doses of 250, 500 and 1 000 mg/kg·d for 30 days, respectively. Lymphocyte transformation test, determination of 50% haemolysis concentration(HC₅₀), phagocytic function of macrophage and immune organ index were determined. **Results** Different dose of millet polypeptides could enhance lymphocyte transformation. The phagocytic percentage in the mice of 500, 1 000 mg/kg·d millet peptides group were 59.45 ± 5.16%, 65.7 ± 4.31%; the phagocytic index were 0.83 ± 0.11, 0.88 ± 0.09; HC₅₀ were 171.33 ± 8.77, 175.91 ± 9.22. The millet polypeptides treatment group had significant differences in spleen index and

* 基金项目: 辽宁省科技厅农业攻关计划项目(2009209001); 辽宁省教育厅高等学校科研项目(L2010154; 2009A811); 辽宁大学“211 工程”三期建设项目
作者单位: 辽宁大学生命科学院生物化学教研室 辽宁 沈阳 110036
作者简介: 刘剑利(1980-) 男 辽宁朝阳人 讲师 硕士 研究方向: 食品生物技术。
通讯作者: 曹向宇, E-mail: xiangyucao@yahoo.cn