

文章编号: 1000-0615(2018)09-1454-09

DOI: 10.11964/jfc.20171011002

海豚链球菌兼职蛋白FBA的克隆表达、抗原性检测及免疫效果评价

刘 韬^{1,2,3}, 陈德芳^{2,4}, 段 靖^{2,3,4}, 王二龙^{2,3}, 王亚军^{1*}, 汪开毓^{2,3*}

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 农业部渔用药物创制重点实验室,

广东省水产动物免疫技术重点实验室, 广东 广州 510380;

2. 四川农业大学鱼病研究中心, 四川 成都 611130;

3. 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;

4. 四川农业大学动物科技学院, 四川 成都 611130)

摘要: 为检测斑点叉尾鲟源海豚链球菌兼职蛋白(fructose-1,6-bisphosphate aldolases, FBA)的抗原性和潜在的疫苗价值, 本实验克隆得到斑点叉尾鲟源海豚链球菌 DX09(基因组登陆号 LXQF01)的 *fba* 基因序列(基因登录号 A7N10_RS06935), 对克隆序列进行生物信息学分析, 并通过原核表达得到重组 FBA 蛋白(rFBA), 制备了兔抗 rFBA 血清用于 FBA 蛋白抗原性检测, 同时通过免疫保护实验评估重组蛋白的免疫保护效果。结果显示, 海豚链球菌 DX09 *fba* 基因有 1 个 882 bp 的开放阅读框(ORF), 编码 293 个氨基酸。生物信息学分析显示, 其分子式为 $C_{1378}H_{2172}N_{368}O_{422}S_8$, 分子质量为 30.9 ku, 理论等电点为 5.01, 不具有信号肽和跨膜区域; 具有保守的裂解酶结构域, 且与其他来源的 FBA 蛋白同源性达 100%; 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 47 ku。Western blot 分析表明, 兔抗 rFBA 血清能特异性结合菌体蛋白。同时免疫保护实验显示, 重组蛋白对斑点叉尾鲟的相对保护率可达 55%, 免疫后鱼体抗体水平相对对照组显著升高。本研究表明, 原核表达的斑点叉尾鲟源海豚链球菌 DX09 rFBA 具备较好的抗原性和免疫保护作用, 具有研发斑点叉尾鲟海豚链球菌亚单位疫苗的潜在价值。

关键词: 斑点叉尾鲟; 海豚链球菌; 兼职蛋白; 原核表达; 候选疫苗

中图分类号: Q 785; S 917

文献标志码: A

斑点叉尾鲟(*Ictalurus punctatus*)于1984年从美国引入我国, 经32年的发展现已经在我国20多个省市推广养殖。然而随着养殖集约化程度的提高, 鲟病害逐年增多, 严重阻碍了斑点叉尾鲟产业的健康发展。笔者所在研究中心近年来的研究发现, 海豚链球菌(*Streptococcus iniae*)的一些菌株正逐渐开始成为危害鲟养殖业的又一种传染性病原^[1-2]。海豚链球菌为β-溶血类链球菌, 是一种人畜共患病原菌^[3], 能感染几乎所有的海、

淡水鱼类, 自1976年Pier等从亚马逊河海豚(*Inia geoffrensis*)皮下的化脓灶内中首次分离得到至今, 其感染宿主范围逐年扩大^[3]。然而, 对该病原菌已有的研究多集中在对尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)、大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)、西大西洋笛鲷(*Lutjanus campechanus*)、斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)等养殖品种的致病性研究^[3], 而本研究中心首次从患病斑点叉尾鲟中分离到海

收稿日期: 2017-10-16 修回日期: 2018-02-18

资助项目: 农业部渔用药物创制重点实验室开放课题(201403)

通信作者: 王亚军, E-mail: yjwang720@163.com; 汪开毓, E-mail: kywang1955@126.com

豚链球菌, 并展开全基因组测序(NCBI基因组登录号GCA_001654755)和致病性相关研究。

目前, 对鱼类链球菌(*Streptococcus* spp.)病防治主要依赖抗生素, 而其抗药性和药物残留问题极大限制了他的应用。因此, 研制安全有效、保护率高、成本可控的鱼类链球菌疫苗具有重要意义。病原菌新型高效保护性抗原的发现和应用在渔用疫苗的研制中有十分重要的作用。目前, 对链球菌抗原性的研究已有较多报道, 最新研究发现链球菌糖酵解途径中的果糖-1,6-二磷酸醛缩酶(fructose-1,6-bisphosphate aldolases, FBA)具有较好的免疫原性, 作为一种兼职蛋白, 其也可以分泌到菌体表面, 帮助菌体黏附宿主和入侵宿主细胞, 是一种有疫苗开发潜力的蛋白^[4]。鉴于此, 本实验以海豚链球菌为研究对象, 克隆得到海豚链球菌*fba*基因, 并对克隆序列进行了基本生物信息学分析, 包括该基因的编码潜力, 所编码蛋白的理化性质、结构域、抗原表位、疏水性、跨膜区、信号肽等方面。同时, 在此基础上对*fba*进行了原核表达及其蛋白的纯化, 并以纯化蛋白作为亚单位疫苗初步测定了其对斑点叉尾鲷的免疫保护效果, 以期为斑点叉尾鲷海豚链球菌亚单位疫苗的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验菌株、试剂及实验动物

斑点叉尾鲷源*S. iniae*DX09强毒株(NCBI基因组登录号GCA_001654755; BioSample: SAMN-04958999; BioProject: PRJNA320907), 由四川农业大学鱼病研究中心分离保存; 细菌总DNA提取试剂盒、 $2\times$ Taq PCR Mastermix、DH5 α 菌株、BL21(DE3)菌株、TMB底物溶液购自天根生化科技(北京)有限公司; 胶回收试剂盒、非预染蛋白Marker、pMD19-T、pET32a(+), T₄连接酶购自TaKaRa公司; 预染蛋白Marker购自北京全式金生物技术有限公司; 限制性内切酶购自Thermo; 质粒抽提试剂盒、牛血清白蛋白(BSA)、Ni-NTA蛋白纯化柱购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂均购自Sigma; HRP goat anti-rabbit IgG购于百奇生物科技(苏州)有限公司; 兔抗斑点叉尾鲷IgM血清为本实验室所有。健康雄性家兔(*Oryctolagus cu-*

niculus)(1.5 kg)购自成都达硕生物科技有限公司。健康斑点叉尾鲷购自某养殖场, 体质量(50 \pm 5) g, 分组饲养于1.5 m \times 1.5 m \times 1.5 m水池中, 水温(22 \pm 3) $^{\circ}$ C, 水质符合渔业水质标准(GB11607-89)。暂养期间每日按体质量2%投喂鲷专用浮性饲料。

1.2 *fba*基因克隆

根据*S. iniae* DX09基因组序列, 用Oligo 7设计引物, *fba*-F: 5'-CGGGATCCATGGCAATCGTTTCAGCA-3'; *fba*-R: 5'-CCCTCGAGTTAAGCTTTGTTTGCTGATCC-3'(下划线为内切酶位点, 上游为BamH I酶切位点, 下游为Xho I酶切位点), 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。*S. iniae* DX09接种于BHI(购于Biotopped)肉汤, 28 $^{\circ}$ C培养16 h, 收集菌体, 提取*S. iniae* DX09基因组DNA并以此模板扩增*fba*基因片段: 94 $^{\circ}$ C预变性5 min; 94 $^{\circ}$ C变性50 s, 55 $^{\circ}$ C退火45 s, 72 $^{\circ}$ C延伸90 s, 30个循环; 72 $^{\circ}$ C终延伸10 min。产物经1%琼脂糖凝胶电泳观察结果。

1.3 *fba*克隆与表达载体构建

PCR产物胶回收纯化并连接pMD19-T, 于16 $^{\circ}$ C条件下连接12 h。连接产物转化至DH5 α 菌株, 挑取阳性克隆子T-*fba*, 分别进行单酶切(BamH I)和双酶切(BamH I+Xho I)鉴定后送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。测序结果与原序列比对一致后, 将酶切产物亚克隆至pET32a(+), 转化至DH5 α 菌株, 提取质粒pET32a(+)-*fba*经PCR和酶切鉴定后进行测序。

1.4 *fba*生物信息学分析

运用NCBI的ORF Finder(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder>)分析*fba*基因的开放阅读框; 运用DNASTAR-EditSeq软件(8.0版本)翻译*fba*的核酸序列, 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SignalP 4.0和TMHMM Sever v2.0对信号肽和跨膜区进行预测; 运用NCBI Conserve 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。

1.5 重组载体表达纯化及兔抗FBA血清制备

质粒pET32a(+)-*fba*转化表达宿主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℃培养过夜。次日按照1:100的比例接种到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℃继续培养4 h后8 000 r/min离心5 min,收集菌体细胞,并用PBS缓冲液重悬菌体,冰浴超声破碎,8 000 r/min离心5 min,收集上清液,采用Ni-NTA树脂亲和层析法纯化蛋白,纯化后的蛋白经梯度透析复性,并进行SDS-PAGE检测FBA蛋白(以*S. iniae* DX09 Ftp作为阳性对照,本研究中心前期表达制备并保存,该蛋白在已测序海豚链球菌基因组中十分保守,是比较稳定表达的免疫原性蛋白^[5])。

健康雄性家兔用于血清抗体制备,将纯化复性后的重组蛋白与弗氏佐剂等比混合乳化,对家兔3次免疫后,颈动脉采血,分离收集血清(首次使用完全弗氏佐剂,第二次和第三次免疫使用不完全弗氏佐剂)。

1.6 免疫印迹检测FBA蛋白的抗原性

过夜培养的*S. iniae* DX09菌液离心后用PBS缓冲液重悬,超声破碎后分离上清液和沉淀,上清液经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缓冲液洗膜3次(8 min/次)。之后分别加入1:500稀释的兔抗FBA重组蛋白血清(以*S. iniae* DX09兔抗血清作为阳性对照,本研究中心前期制备并保存),于室温孵育2 h。洗膜后用HRP goat anti-rabbit IgG(1:500稀释)室温孵育2 h,洗膜后用TMB显色液显色。

1.7 重组FBA免疫斑点叉尾鲷的免疫保护效果评价

为评价*S. iniae* DX09 FBA的免疫效果,以FBA腹腔注射免疫100尾斑点叉尾鲷,每尾实验鱼腹腔注射0.2 mL FBA疫苗,每尾免疫剂量为2 μg/g体质量,对照组注射等量的PBS缓冲液,采用间接ELISA方法检测斑点叉尾鲷血清中的特异性抗FBA蛋白的抗体水平,TMB显色后,用Bio-Rad Model 680酶标仪测定450 nm波长下的吸光度值。同时,于免疫后第4周进行攻毒试验,用复壮后的*S. iniae* DX09菌株以50×LC₅₀ (5×10⁸ CFU/mL)浓度攻毒,0.2 mL/尾进行腹腔注射。观察并记录攻毒后14 d内各组鱼的发病和死亡情况。取濒

死样品鱼的肝脏、脾脏和肾脏组织接菌培养,确定病原菌。按下列公式计算相对保护率(relative percent survival, RPS): $RPS(\%) = [(对照组死亡率 - 免疫组死亡率) / 对照组死亡率] \times 100$ 。使用SPSS 22.0软件对实验数据进行统计学分析,对各组同一指标的数据进行单因素方差分析(One-Way ANOVA),分析结果用(mean±SD)表示, $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

2 结果

2.1 海豚链球菌*fba*基因的扩增、T克隆与鉴定

以*S. iniae* DX09株基因组DNA为模板,PCR扩增*fba*全长,结果扩增出一条位于750~1 000 bp区间大小的片断,与预计片段大小882 bp一致。PCR产物经胶回收纯化后,与pMD19-T载体连接获得重组质粒pMD19-T-*fba*,重组质粒经单、双酶切和PCR鉴定均正确(图1-a)。

2.2 克隆序列的基本生物信息学分析

对重组质粒pMD19-T-*fba*测序,所得序列在ORF Finder中分析,DX09的*fba*基因是一个由882个碱基组成的完整开放性阅读框(ORF),编码一个长度为293个氨基酸的蛋白,GC含量41.50%。利用ProtParam工具预测到*fba*基因编码的多肽相对分子质量为30.9 ku,理论等电点为5.01,分子式为C₁₃₇₈H₂₁₇₂N₃₆₈O₄₂₂S₈。带负电荷残基总数为39,带正电荷残基总数为28,总原子数为4 348,不稳定指数为29.03,脂肪指数为93.99,总平均亲水性为0.020。利用NCBI的CDD (conserved domain database)工具分析发现,*fba*编码的氨基酸序列N末端第6~291位氨基酸之间是1个高度保守的功能结构域,带有醛裂解酶活性位点和锌离子结合位点,属于磷酸盐结合超家族。将*fba*基因编码的氨基酸序列在NCBI上进行BlastP比对,结果显示,*fba*基因编码的氨基酸序列与已公布的不同株型的*S. iniae*株(ISET0901、ISNO、SF1)同源性均达100%,与无乳链球菌(*S. agalactiae*) GBS6株(CP005941.1)同源性达87%,化脓链球菌(*S. salivarius salivarius*) MGAS315株(CP006776.1)同源性达96%。运用DNASTar Pro-tein软件模块分析*fba*基因编码氨基酸序列抗原表位,根据Jameson-Wolf法预测结果显示该条氨基酸序列包含14个主要抗原表位,分别位于5~22、

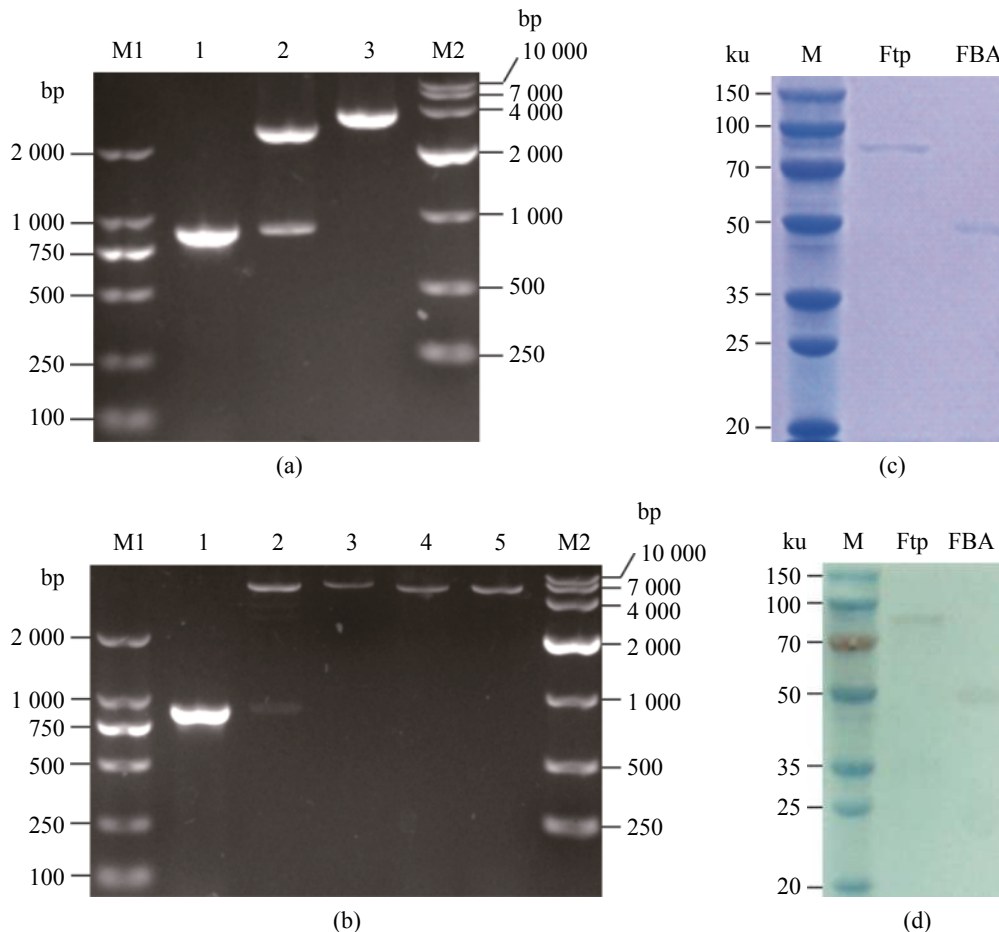


图 1 斑点叉尾鲷源 *S. iniae* DX09 *fba* 基因 T 克隆表达及免疫原性分析

(a) M1. DNA Marker DL2 000, 1. *fba* 基因 PCR 扩增产物, 2. pMD19-T-*fba* 经 *Bam*HI 和 *Xho*I 双酶切产物, 3. pMD19-T-*fba* 经 *Bam*HI 单酶切产物, M2. DNA Marker DL10 000; (b) M1. DNA Marker DL2 000, 1. PCR 扩增产物, 2. pET-32a(+)-*fba* 经 *Bam*HI 和 *Xho*I 酶切, 3. pET-32a(+)-*fba* 经 *Bam*HI 酶切, 4. pET-32a(+)-*fba* 经 *Bam*HI 和 *Xho*I 酶切, 5. pET-32a(+)-*fba* 经 *Bam*HI 酶切, M2. DNA Marker DL10 000; (c) 重组蛋白 SDS-PAGE 分析, M. 蛋白非预染 Marker, Ftp. 阳性对照, FBA. *fba* 基因诱导表达蛋白; (d) western blot 分析 FBA 蛋白的抗原性, M. 蛋白预染 Marker, Ftp. 阳性对照, FBA. *S. iniae* DX09 全菌蛋白与 FBA 抗血清反应

Fig. 1 The clone, expression and analysis of immunogenicity of *fba* gene of *S. iniae* DX09 isolated from *I. punctatus*

(a) M1. DNA Marker DL2 000, 1. product of the bacterial colony PCR, 2. pMD19-T-*fba* digested with *Bam*HI and *Xho*I, 3. pMD19-T-*fba* digested with *Bam*HI, M2. DNA Marker DL 10 000; (b) M1. DNA Marker DL2 000, Lane 1. product of the bacterial colony PCR, Lane 2. digestion of the recombinant plasmid with *Bam*HI and *Xho*I, Lane 3. digestion of the recombinant plasmid with *Bam*HI, Lane 4. pET-32a(+) digestion with *Bam*HI and *Xho*I, Lane 5. pET-32a(+) digestion with *Bam*HI, M2. DNA Marker DL 10 000; (c) SDS-PAGE, M. protein non-prestained Marker, Ftp. positive control, FBA. the purified protein of induced pET32a(+)-*fba*; (d) analysis of FBA protein antigenicity by western blot, M. protein prestained Marker, Ftp. positive control, FBA. the whole bacterial proteins of *S. iniae* DX09

24~28、36~44、86~94、105~109、111~124、131~137、141~161、192~197、208~220、231~235、241~269、279~286、289~293 氨基酸区段。利用 ProtScale 来进行蛋白质的亲疏水性谱绘制, 结果 *fba* 所编码蛋白有 12 个高分值峰 (score > 0), 这些区域为疏水性区域; 有 13 个低分值峰 (score < 0), 这些区域属于亲水性区域。亲水区蛋白质多肽链占据的区域大于疏水区域, 表明该

蛋白可能为亲水蛋白。利用 SignalP 4.1 信号肽预测 *fba* 的信号肽, 结果显示该基因无信号肽区域。利用 TMHMM 在线软件分析, 结果显示 *fba* 所编码蛋白无跨膜区。

2.3 海豚链球菌 *fba* 基因表达载体的构建

将 pMD19-T-*fba* 目的片段酶切亚克隆至表达载体 pET-32a(+), 构建 pET-32a(+)-*fba* 表达质粒, 经单、双酶切显示与预期结果一致 (图 1-b)。

2.4 重组蛋白原核表达及其抗原性分析

将鉴定正确的重组质粒pET-32a(+)-*fba*转化至BL21(DE3)中,将过夜培养的菌液按1:50的比例接种于5 mL LB培养液中,振荡培养至OD₆₀₀=0.6时,加入IPTG至终浓度为1.0 mmol/L;诱导4 h后进行SDS-PAGE检测,出现约47 ku大小的条带(带表达标签)。随后分别对重组质粒pET-32a(+)-*fba*在BL21(DE3)中的表达条件进行优化,结果发现,最佳诱导温度28 °C,最佳诱导IPTG浓度为1 mmol/L,最佳诱导时间为6 h。诱导后的菌体经反复冻融,超声波破碎后分离上清液和沉淀,发现表达重组蛋白以包涵体形式存在。按照生工生物工程(上海)有限公司Ni-NTA-Sefinose Column (BSP079-3)纯化系统操作说明进行纯化。纯化蛋白经梯度脲素复性后进行浓缩,浓缩蛋白用核酸蛋白仪测定浓度达2.4 mg/mL。最后将得到的纯化蛋白再次进行SDS-PAGE检测,同时以本研究中心前期表达制备的海豚链球菌Ftp作为阳性对照(图1-c)。

重组蛋白rFBA经免疫印记western blot方法分析发现,重组融合蛋白均能与兔抗6×His IgG抗体特异性结合,且在相应分子量大小处呈

现明显的条带,表明重组蛋白融合表达成功。此外,对*S. iniae* DX09菌体中的FBA蛋白进行western blot分析,实验结果显示,*S. iniae* DX-09的菌体蛋白能与兔抗FBA重组蛋白血清发生特异性结合,菌体蛋白大小约为47 ku(图1-d),与预测的该蛋白大小一致。结果显示,重组蛋白不仅融合表达成功,且均具有良好的抗原性,可作海豚链球菌基因工程疫苗的候选保护性抗原。

2.5 重组蛋白对斑点叉尾鲷的免疫效果

采用间接ELISA方法测定了rFBA蛋白免疫斑点叉尾鲷后第1周至第8周的抗体消长规律。结果显示,第1周开始均能检测到特异性抗体,且免疫组显著高于PBS缓冲液对照组($P<0.05$),但抗体水平较低;第2周免疫组出现上升趋势,且上升速度快,达到0.901,极显著高于PBS缓冲液对照组($P<0.01$);在第4周免疫组抗体水平达到峰值,与PBS缓冲液对照组存在极显著的差异($P<0.01$);在第5、6周免疫组抗体水平出现轻微下降,与PBS缓冲液对照组存在显著差异($P<0.05$);在第7、8周免疫组抗体水平再次下降,与PBS缓冲液对照组差异不显著(表1)。

表1 斑点叉尾鲷抗体水平变化情况

Tab. 1 Changes of anti-*S. iniae* antibody titer in serum of *I. punctatus* of each group

	时间/周 week							
	1	2	3	4	5	6	7	8
rFBA	0.798±0.03*	0.901±0.04**	0.905±0.03**	0.908±0.06**	0.814±0.1*	0.801±0.22*	0.734±0.08	0.735±0.02
PBS	0.695±0.07	0.696±0.05	0.718±0.02	0.717±0.07	0.707±0.08	0.719±0.02	0.701±0.04	0.709±0.03

注:“*”显著差异($P<0.05$);“**”极显著差异($P<0.01$)

Notes:“*” significant differences;“**” extremely significant differences

在ELISA测定抗体水平的基础上,进一步展开关于FBA对于斑点叉尾鲷免疫保护效果的动物攻毒实验。结果发现,攻毒后第4天斑点叉尾鲷开始出现死亡,死亡鱼出现体色发黑、腹部膨大、部分点状出血等症状,取肝脏、脾脏和肾脏组织划线接种于BHI固体培养基,于37 °C培养24 h,取单菌落经PCR测序并鉴定为海豚链球菌。实验结果显示,在14 d内,rFBA蛋白对斑点叉尾鲷有55%的保护率(图2)。

3 讨论

3.1 海豚链球菌FBA的非酶学功能

传统意义上的看家酶即使在有分泌信号

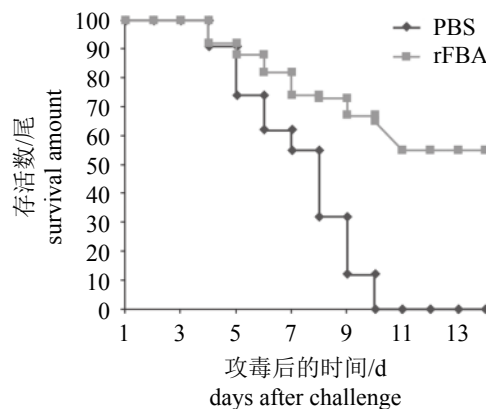


图2 攻毒后的存活数

Fig. 2 Survival amount after challenge

的情况下也可以存在于病原体表面, 并且发挥各种与糖代谢无关的功能, 因而往往具有一定的免疫原性。报道显示, 糖酵解酶, 如: 磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、烯醇酶、果糖-1,6-二磷酸醛缩酶(fructose-1,6-bisphosphate aldolases, FBA)等, 在许多生物体内可作为潜在的毒力因子存在^[6]。虽然长期以来都认为它们是在细胞质糖酵解和糖异生过程中发挥作用, 但现更多不为人知的功能(“兼职”蛋白功能^[7])也逐渐被人们所认知。尽管它们缺少明确的分泌信号, 但在细菌细胞表面仍然发现有糖酵解酶的存在, 而且它们可以和宿主体内的可溶性蛋白以及某些配体相互作用^[8]。例如, 生殖道支原体中, 其表面的GAPDH对粘附人体的粘蛋白发挥了巨大作用^[9]。酿脓链球菌(*S. pyogenes*)和白色念珠菌(*Candida albicans*)的表面GAPDH可以与纤连蛋白相互作用^[10-11]。金黄色酿脓葡萄球菌的细胞壁转铁结合蛋白被证明就是GAPDH^[12]。还有报道显示, GAPDH可以作为无乳链球菌的一个毒力相关的免疫调节蛋白^[13]。此外, 存在于酿脓性链球菌表面的烯醇酶被证明是一种纤溶酶原结合蛋白^[14]; 在猪链球菌(*S. suis*)表面的烯醇酶是纤连蛋白和纤溶酶原结合蛋白^[15-16]; 在炭疽杆菌(*Bacillus anthracis*)表面的烯醇酶是纤溶酶原和黏蛋白的结合蛋白^[17]。FBA常位于多数革兰氏阳性菌的表面, 往往没有分泌信号, 这与本文信号肽预测结果一致。在FBA之前的研究中发现, 肺炎双球菌(*Pneumococcus*)表面FBA能与一个大的有7个跨膜区的受体连接, 属于钙粘蛋白的超家族成员^[18]。FBA对肺炎双球菌还具有一定的免疫原性^[19]。此外, 在猪链球菌中, FBA也被认为是一种表面的具有免疫原性的蛋白^[20]。同时, 在旋盘尾丝虫(*Onchocerca volvulus*)中FBA也表现出一些免疫学相关功能^[21]。目前, 关于海豚链球菌烯醇化酶和GAPDH作为菌体毒力因子和其免疫原性以及作为潜在疫苗的研究已有较多报道^[22-25], 而关于海豚链球菌FBA的非酶功能的研究尚未有报道。鉴于此, 本研究根据已发表的*S. iniae* DX09株*fba*序列设计引物, 成功克隆了*fba*的全长序列, 大小为882 bp。同时通过生物信息学软件对*fba*编码氨基酸的理化特性及组成、信号肽序列、结构域、抗原表位等分子特性进行了初步分析。随后构建了*fba*的原核表达质粒pET32a-*fba*, 表达蛋白大小约为47 ku, 同时将纯化后的FBA免疫斑点又尾蚴获

得了55%免疫保护率和较高的抗体水平, 为该蛋白功能和其潜在疫苗价值的研究奠定了基础。

3.2 海豚链球菌*fba*基因编码序列保守性

在*S. iniae* DX09中, *fba*基因(基因座K710_0412)有882个碱基, 预测可编码293个氨基酸的蛋白(估计分子量为30.9 ku)。在*fba*基因下游(K710_0413)有一个插入序列, 可编码一个转座酶。类似的基因排布还有海豚链球菌菌株ISNO(登录号: CP007587)和海豚链球菌菌株IS-ET0901(登录号: CP007586), 二者*fba*基因下游都有一个整合酶, 这在海豚链球菌中是一个较保守的基因排布。在这3株菌基因组中, *fba*基因的同源性为在100%。另外, *S. iniae* DX09菌株的*fba*基因与无乳链球菌(菌株GBS6)(同源性为85%)和化脓链球菌(菌株MGAS315)(同源性为91%)的*fba*的同源性都大于85%。此外, 将*fba*基因编码的氨基酸序列在NCBI上进行BlastP比对, 结果显示, *fba*基因编码的氨基酸序列与已公布的不同株型的*S. iniae*株(SET0901、ISNO、SF1)同源性均达100%, 与无乳链球菌GBS6株(CP005941.1)同源性达87%, 化脓链球菌MGAS315株(CP006776.1)同源性达96%。这说明在链球菌属中*fba*是一个高度保守的基因, 其编码蛋白在链球菌属细菌中也十分保守, 以其作为候选疫苗可能对不同链球菌产生一定交叉保护。

3.3 海豚链球菌FBA的疫苗靶点潜力

FBA可以可逆地催化果糖1,6二磷酸断裂成磷酸二羟丙酮和三磷酸甘油醛^[26]。根据不同的催化机制, 醛缩酶被分为I类和II类两种类型^[27]。I类FBA可以利用活性位点中的赖氨酸残基使中间体Schif碱的形成更加稳定, 这种类型的FBA常见于高等的真核生物体(动物和植物)^[28]。II类FBA是需要有2价离子辅助, 通常是锌离子, 常见于细菌、古细菌和低等的真核生物(包括只能在异养条件下生长的真菌和绿藻)^[27]。虽然某些生物体包含有2种类型的FBA, 但大多数生物只包含一种类型的FBA。其中, 大肠杆菌(*Escherichia coli*)^[29]、肺炎链球菌(*S. pneumoniae*)^[30]、集胞藻(*Synechocystis* sp.) PCC6803^[31]曾被报道含有2种类型的FBA。II类FBA还可根据其氨基酸序列细分为A型和B型两种类型^[31]。由于2类FBA没有在动物体上发现过, 这提示其可以作为一种治疗物或疫苗靶点^[32]。而本实验克隆表达的FBA属于基因组上的II类FBA蛋白, 在鱼体中也未发现过

II类FBA, 这提示海豚链球菌FBA可以作为一种疫苗靶点。

表位(epitope)过去又称抗原决定簇, 是指存在于抗原分子表面的能够决定抗原特异性的数个氨基酸残基组成的特殊序列及其空间结构。表位一般只占5~7个氨基酸和单糖残基的大小, 至多不超过20个氨基酸残基^[33]。一般根据与抗原受体细胞结合的不同, 分为B细胞抗原表位和T细胞抗原表位^[34]。B细胞表位是指抗原中可被B细胞抗原受体(BCR)或抗体特异性识别并相互结合的线性片段或空间构象型结构^[35]。B细胞表位的预测对免疫原性多肽和新型疫苗分子的设计都有着较大帮助, 并有利于诊断试剂的开发以及临床疾病的诊断。根据对*S. iniae* DX09株*fba*基因编码氨基酸的二级结构预测、抗原决定簇预测、亲/疏水性预测和柔性预测综合分析显示, 该蛋白B细胞表位最可能位于FBA的N末端第16~28、107~110、139~141、178~183、211~214氨基酸残基处。通过B细胞抗原表位预测可以找到具有免疫保护作用的特异性抗原区域, 为亚单位疫苗甚至表位疫苗的研制提供理论参考。

参考文献:

- [1] Chen D F, Wang K Y, Geng Y, *et al.* Pathological changes in cultured channel catfish *Ictalurus punctatus* spontaneously infected with *Streptococcus iniae*[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2011, 95(3): 203-208.
- [2] Chen D F, Wang K Y, Geng Y, *et al.* *Streptococcus iniae* isolated from channel catfish (*Ictalurus punctatus*) in China[J]. *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 2011, 63: 593.
- [3] Baiano J C F, Barnes A C. Towards control of *Streptococcus iniae*[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2009, 15(12): 1891-1986.
- [4] Terao Y, Kawabata S, Kunitomo E, *et al.* Fba, a novel fibronectin-binding protein from *Streptococcus pyogenes*, promotes bacterial entry into epithelial cells, and the *fba* gene is positively transcribed under the Mga regulator[J]. *Molecular Microbiology*, 2001, 42(1): 75-86.
- [5] Zhang B C, Zhang J, Sun L. *Streptococcus iniae* SF1: complete genome sequence, proteomic profile, and immunoprotective antigens[J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e91324.
- [6] Pancholi V, Chhatwal G S. Housekeeping enzymes as virulence factors for pathogens[J]. *International Journal of Medical Microbiology*, 2003, 293(6): 391-401.
- [7] 刘家星, 汪开毓, 陈德芳, 等. 罗非鱼源无乳糖链球菌兼聚蛋白*EF-Tu*的克隆、表达及其抗原性检测[J]. *水产学报*, 2016, 40(3): 334-343.
- Liu J X, Wang K Y, Chen D F, *et al.* Clone, prokaryotic expression and antigenicity detection of moonlighting protein *EF-Tu* of *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(3): 334-343(in Chinese).
- [8] Tunio S A, Oldfield N J, Berry A, *et al.* The moonlighting protein fructose-1,6-bisphosphate aldolase of *Neisseria meningitidis*: Surface localization and role in host cell adhesion[J]. *Molecular Microbiology*, 2010, 76(3): 605-615.
- [9] Alvarez R A, Blaylock M W, Baseman J B. Surface localized glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Mycoplasma genitalium* binds mucin[J]. *Molecular Microbiology*, 2003, 48(5): 1417-1425.
- [10] Pancholi V, Fischetti V A. A major surface protein on group a streptococci is a glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase with multiple binding activity[J]. *Journal of Experimental Medicine*, 1992, 176(2): 415-426.
- [11] Gozalbo D, Gilnavarro I, Azorín I, *et al.* The cell wall-associated glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Candida albicans* is also a fibronectin and laminin binding protein[J]. *Infection and Immunity*, 1998, 66(5): 2052-2059.
- [12] Modun B, Williams P. The staphylococcal transferrin-binding protein is a cell wall glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase[J]. *Infection and Immunity*, 1999, 67(3): 1086-1092.
- [13] Madureira P, Baptista M, Vieira M, *et al.* *Streptococcus agalactiae* GAPDH is a virulence-associated immunomodulatory protein[J]. *Journal of Immunology*, 2007, 178(3): 1379-1387.
- [14] Pancholi V, Fischetti V A. A novel plasminogen/plasmin binding protein on the surface of group a streptococci[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1997, 418: 597-599.
- [15] Tian W X, Zhang W P, Li J K, *et al.* Identification of differentially expressed genes in the growth plate of broiler chickens with thiram-induced tibial dyschondroplasia[J]. *Avian Pathology*, 2009, 38(2): 161-166.
- [16] Esgleas M, Li Y, Hancock M A, *et al.* Isolation and char-

- acterization of α -enolase, a novel fibronectin-binding protein from *Streptococcus suis*[J]. *Microbiology*, 2008, 154(Pt 9): 2668-2679.
- [17] Agarwal S, Kulshreshtha P, Mukku D B, *et al.* α -enolase binds to human plasminogen on the surface of *Bacillus anthracis*[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 2008, 1784(7-8): 986-994.
- [18] Blau K, Portnoi M, Shagan M, *et al.* Flamingo cadherin: a putative host receptor for *Streptococcus pneumoniae* [J]. *Journal of Infectious Diseases*, 2007, 195(12): 1828-1837.
- [19] Ling E, Feldman G, Portnoi M, *et al.* Glycolytic enzymes associated with the cell surface of *Streptococcus pneumoniae* are antigenic in humans and elicit protective immune responses in the mouse[J]. *Clinical & Experimental Immunology*, 2004, 138(2): 290-298.
- [20] Wu Z F, Zhang W, Lu C P. Immunoproteomic assay of surface proteins of *Streptococcus suis* serotype 9[J]. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 2008, 53(1): 52-59.
- [21] McCarthy J S, Wieseman M, Tropea J, *et al.* *Onchocerca volvulus* glycolytic enzyme fructose-1,6-bisphosphate aldolase as a target for a protective immune response in humans[J]. *Infection and Immunity*, 2002, 70(2): 851-858.
- [22] Weinstein M R, Litt M, Kertesz D A, *et al.* Invasive infections due to a fish pathogen, *Streptococcus iniae* study group[J]. *New England Journal of Medicine*, 1997, 337(9): 589-594.
- [23] Kim M S, Choi S H, Lee E H, *et al.* α -enolase, a plasmin(ogen) binding and cell wall associating protein from a fish pathogenic *Streptococcus iniae* strain[J]. *Aquaculture*, 2007, 265(1-4): 55-60.
- [24] LaFrentz B R, Shoemaker C A, Klesius P H. Immunoproteomic analysis of the antibody response obtained in Nile tilapia following vaccination with a *Streptococcus iniae* vaccine[J]. *Veterinary Microbiology*, 2011, 152(3-4): 346-352.
- [25] Ra C H, Kim Y J, Park S J, *et al.* Evaluation of optimal culture conditions for recombinant ghost bacteria vaccine production with the antigen of *Streptococcus iniae* GAPDH[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2009, 19(9): 982-986.
- [26] Zgiby S M, Thomson G J, Qamar S, *et al.* Exploring substrate binding and discrimination in fructose 1,6-bisphosphate and tagatose 1,6-bisphosphate aldolases[J]. *European Journal of Biochemistry*, 2000, 267(6): 1858-1868.
- [27] Arakaki T L, Pezza J A, Cronin M A, *et al.* Structure of human brain fructose 1,6-(bis)phosphate aldolase: linking isozyme structure with function[J]. *Protein Science*, 2004, 13(12): 3077-3084.
- [28] Plater A R, Zgiby S M, Thomson G J, *et al.* Conserved residues in the mechanism of the *E. coli* class II FBP-aldolase I[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1999, 285(2): 843-855.
- [29] Alefounder P R, Baldwin S A, Perham R N, *et al.* Cloning, sequence analysis and over-expression of the gene for the class II fructose 1,6-bisphosphate aldolase of *Escherichia coli*[J]. *Biochemical Journal*, 1989, 257(2): 529-534.
- [30] Jado I, Fenoll A, Cepeda T, *et al.* Cloning, sequencing, and chromosomal location of a putative class-II aldolase gene from *Streptococcus pneumoniae*[J]. *Current Microbiology*, 1999, 39(1): 31-39.
- [31] Nakahara K, Yamamoto H, Miyake C, *et al.* Purification and characterization of class-I and class-II fructose-1,6-bisphosphate aldolases from the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2003, 44(3): 326-333.
- [32] Ramsaywak P C, Labbé G, Siemann S, *et al.* Molecular cloning, expression, purification, and characterization of fructose 1,6-bisphosphate aldolase from *Mycobacterium tuberculosis*—a novel Class II A tetramer[J]. *Protein Expression and Purification*, 2004, 37(1): 220-228.
- [33] 孙建宏, 曹殿军. 细胞的抗原表位研究方法[J]. *动物医学进展*, 2004, 25(5): 18-21.
Sun J H, Cao D J. New approaches for antigen epitope study[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2004, 25(5): 18-21(in Chinese).
- [34] 郭春艳, 赵向绒, 胡军. B细胞抗原表位的研究进展及其应用[J]. *生物技术通讯*, 2013, 24(2): 266-270.
Guo C Y, Zhao X R, Hu J. Research and application of B cell epitope[J]. *Letters in Biotechnology*, 2013, 24(2): 266-270(in Chinese).
- [35] 章辉, 朱荫昌. B细胞表位预测的研究进展[J]. *中国血吸虫病防治杂志*, 2006, 18(3): 236-238, 240.
Zhang H, Zhu Y C. Progress of research on prediction of B cell epitope[J]. *Chinese Journal of Schistosomiasis Control*, 2006, 18(3): 236-238, 240(in Chinese).

Cloning, prokaryotic expression, antigenicity detection and immunization efficacy of moonlighting protein FBA of *Streptococcus iniae*

LIU Tao^{1,2,3}, CHEN Defang^{2,4}, DUAN Jing^{2,3,4}, WANG Erlong^{2,3}, WANG Yajun^{1*}, WANG Kaiyu^{2,3*}

(1. Key Laboratory of Fishery Drug Development, Ministry of Agriculture, Key Laboratory of Aquatic Animal Immune Technology, Guangdong Province, Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China;

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

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

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

Abstract: In order to detect the antigenicity of moonlighting protein FBA (fructose-1,6-bisphosphate aldolases), *fba* gene from *Streptococcus iniae* DX09 isolated from *Ictalurus punctatus* was cloned. The related properties of FBA protein were predicted and its immunization efficacy assay was conducted. rFBA protein was obtained by prokaryotic expression systems and purified by Ni-NTA-Sefinose Column. The purified rFBA protein was used to immunize rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) to obtain the polyclonal rabbit anti-rFBA sera for antigenicity detection. The results showed that *fba* gene had an ORF with 882 bases, encoding 293 amino acids with a $C_{1378}H_{2172}N_{368}O_{422}S_8$ formula, 30.9 ku molecular mass, and a 5.01 theoretical isoelectric point. Furthermore, the deduced amino acids comprised phosphorylation sites, not containing the transmembrane domain and signal peptide sequence. The conserved domains, namely aldolase were predicted via NCBI conseverd domains tool. The comparative analysis revealed an exaggerated degree of homology with other *S. iniae* FBA protein in amino sequences. Additionally, high antigen index of the deduced amino acids was predicted using DNASTar-Protean, which means it can form numerous epitopes. rFBA proteins formed into inclusion bodies were found in the pellet and a band about 47 ku was observed by SDS-PAGE. Moreover, western blot analysis showed that rabbit anti-rFBA sera can combine with the mycoprotein specifically. Immunization efficacy assay suggested that rFBA prevented *S. iniae* DX09 infecting *I. punctatus* with a 55% protective rate. In this study, our results showed that rFBA possesses nice antigenicity and optimal immune protection, implying that the FBA protein can be a subunit vaccine candidate against *S. iniae* in *I. punctatus*.

Key words: *Ictalurus punctatus*; *Streptococcus iniae*; fructose-1,6-bisphosphate aldolases; clone; prokaryotic expression; antigenicity

Corresponding author: WANG Yajun. E-mail: yjwang720@163.com; WANG Kaiyu. E-mail: kywang1955@126.com

Funding projects: Open Fund from Key Laboratory of Fishery Drug Creation, Ministry of Agriculture (201403)