

# 罗非鱼源无乳链球菌溶血素基因 体外表达及其免疫原性\*

王 蓓<sup>1,2,3</sup> 李桂欢<sup>1,2,3</sup> 王 培<sup>1,2,3</sup> 汤菊芬<sup>1,2,3</sup>  
鲁义善<sup>1,2,3</sup> 吴灶和<sup>2,3,4</sup> 简纪常<sup>1,2,3</sup>①

(1. 广东海洋大学水产学院 湛江 524088; 2. 广东省水产经济动物病原生物学及流行病学重点实验室 湛江 524088;  
3. 广东省水产经济动物病害控制重点实验室 湛江 524088; 4. 仲恺农业工程学院 广州 510225)

**摘要** 为研究罗非鱼源无乳链球菌溶血素(Hemolysin, Hly)对鱼体的免疫保护作用,根据已获得的无乳链球菌 ZQ0910 全基因组序列设计引物扩增 *hly* 基因,定向克隆于原核表达载体 pET-28a 中,构建原核重组质粒 pET-28a-hly,经 IPTG 诱导表达后,制成亚单位疫苗免疫吉富罗非鱼,并分析疫苗的免疫保护力。结果显示, *hly* 基因产物大小 1335 bp,编码 444 个氨基酸,经测序与 GenBank 报道的链球菌属 Hly 氨基酸序列同源性可达 99%。经 IPTG 诱导表达后, SDS-PAGE 分析可见一条 51.7 kD 的特异条带; Western blotting 分析结果说明表达的 Hly 蛋白能与 His-Tag 单抗特异性结合;制备的亚单位疫苗免疫鱼体后第 14 天即可检测到抗体产生,并在第 28 天达到峰值,抗体效价为 1:4096,免疫保护率为 70%。由此证实,该亚单位疫苗有望成为预防由无乳链球菌引起的罗非鱼链球菌病的基因工程类疫苗。

**关键词** 无乳链球菌; 溶血素; 原核表达; 免疫原性

**中图分类号** S917 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2014)06-0060-08

罗非鱼(*Oreochromis nilotices*), 又称“白色三文鱼”, 是联合国粮农组织推荐的 21 世纪最有发展前景的淡水养殖品种(雷光英等, 2009; 储霞玲等, 2012), 然而随着高密度养殖和环境日益恶化, 病害日趋严重, 造成的损失逐年增加。从 2009 年至今, 罗非鱼链球菌病在我国罗非鱼多个主养区泛滥, 发病率及死亡率高, 并由传统的高温时节发病演变为全年大部分时间均可发生, 部分地区发病率和死亡率可达 90% (林庆强, 2010)。

无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)是一种革兰氏阳性链球菌, 是近年来引起我国南方地区罗非鱼链球菌病的主要病原菌之一(Wang *et al.*, 2012)。该菌

的表面蛋白在细菌侵染机体时, 首先粘附于上皮细胞, 并通过与宿主细胞外基质或血浆蛋白相互作用来逃避宿主的免疫监视, 目前已相继报道多种致病蛋白, 包括表面免疫相关蛋白(Surface immunogenic protein, Sip)、cpB 蛋白、Lmb 蛋白等(沈定数等, 2007)。此外, 链球菌的某些分泌性蛋白也可能在致病过程中起到至关重要的作用, 这些分泌性蛋白一旦达到一定的浓度, 就可以发挥作用(Baums *et al.*, 2009)。其中最重要的分泌性蛋白就是溶血素(Hemolysin, Hly), 它作为一种公认的毒力因子, 在动物细菌性疾病的感染发展过程中起着重要作用(Gottschalk *et al.*, 2000、2007), 并且有研究表明, 在猪链球菌不同血清型中产生的溶血

\* 国家自然科学基金青年基金(31302226)、国家科技支撑计划项目(2012BAD17B02; 2012BAD17B03)、广东省科技计划农业攻关项目(2012B020308009)和广东省 2012 年鱼病防治专项资金(2130108)共同资助。王 蓓, E-mail: wong19820204@126.com

① 通讯作者: 简纪常, 研究员, E-mail: jianjichang@126.com

收稿日期: 2014-04-30, 收修改稿日期: 2014-06-18

素在理化特征及免疫原性方面均相同,是一种理想的免疫原,可作为基因工程疫苗靶标(王雅等,2012)。

对于细菌性疾病的防治,我国养殖业主要依赖于抗生素的使用,虽然在短期内能起到一定的效果,但并不能从根本上控制疾病的发生,并且会引起耐药性、药物残留及食品安全等问题(解俊等,2013;邓楠楠等,2012)。因此,为了预防罗非鱼链球菌病,人们不断地研究和探索链球菌病疫苗。亚单位疫苗因其安全性好、技术成熟、便于产业化等优点得到了科学家的青睐。本研究扩增得到溶血素基因并进行体外高效表达,制备亚单位疫苗并对其免疫保护率进行初步研究,旨在为今后进一步研制罗非鱼源无乳链球菌亚单位疫苗奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株与实验用鱼

罗非鱼源无乳链球菌强毒株 ZQ0910 由本实验室分离保存(Wang *et al.*, 2012)。大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、BL21(DE3)与 pET-28a(+)均由本实验室保存。实验用鱼为湛江国联罗非鱼种苗基地提供的健康吉富罗非鱼,体重为(100 $\pm$ 10) g,实验前驯养 7 d,继续饲养 42 d 用于免疫及攻毒实验。

### 1.2 试剂及仪器

克隆载体 pMD18-T、限制性内切酶 *EcoR* I、*Sal* I、T4 DNA 连接酶和 Ex *Taq* DNA polymerase 均购自 TaKaRa 公司(日本);小鼠抗 His-Tag 单克隆抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗鼠 IgG 和显色底物 DAB 均为 Invitrogen 产品(美国);细菌基因组 DNA 提取试剂盒为天根生化科技(北京)有限公司产品(中国);HisTrap HP 为 GE 公司产品(美国),Anti-Tilapia (*O. niloticus*) IgM monoclonal antibody 购于英国 Aquatic Diagnostics Ltd 公司。PCR 仪为美国 Bio-Rad 公司产品。

### 1.3 细菌基因组 DNA 的提取及 *hly* 基因的扩增

按照天根生化科技(北京)有限公司细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取无乳链球菌基因组 DNA,根据 GenBank 上已登录的 Hly 氨基酸序列(EIM70828.1)设计特异性引物 hlyF/hlyR,分别引入酶切位点 *EcoR* I 与 *Sal* I,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

hlyF: 5'-CGCGGAATTCATGGAAGACCCTGG-CAGTCA-3'

hlyR: 5'-ATCCTCGAGTGACTGCCAGGGTCT-TCCAT-3'

反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 57 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检验后切胶回收,然后克隆入 pMD18-T 载体,菌落 PCR 鉴定后将阳性克隆送生工生物工程(上海)股份有限公司测序并进行生物信息学分析。

### 1.4 原核重组质粒构建及体外诱导表达

将测序结果正确的阳性质粒扩大培养,抽提质粒后,采用 *EcoR* I 和 *Sal* I 进行双酶切并定向插入到经相同内切酶酶切的 pET-28a(+)质粒中,构建重组质粒 pET-28a-hly。将重组质粒转化入大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞中,筛选阳性菌落并进行 PCR 检测和测序。将测序结果正确的阳性菌落以 1:100 的比例接种于含 Amp<sup>+</sup>(100  $\mu$ g/ml)的 LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C 振荡培养至 OD<sub>600nm</sub> 为 0.4-0.6,加异丙基- $\beta$ -硫代半乳糖 1 mmol/L 进行诱导,5 h 后收集菌体,进行 SDS-PAGE 分析。

### 1.5 重组融合蛋白纯化

将重组质粒菌种扩大培养于 100 ml 含 Kana<sup>+</sup>的 LB 培养基中,经 IPTG 诱导表达后,离心收集菌体,采用超声波裂解法对菌体进行裂解,收集蛋白,使用 HisTrap<sup>TM</sup> HP 柱在不同浓度咪唑洗脱缓冲液的作用下进行纯化,进行 SDS-PAGE 电泳分析。按照 Bradford 蛋白质定量测定试剂盒说明书进行蛋白含量测定。

### 1.6 Western blot 分析

将诱导表达后的重组菌进行 SDS-PAGE 电泳后,将蛋白转印至 PVDF 膜上,以 5% 脱脂牛奶封闭过夜,分别先后加入一抗(鼠抗 His 单克隆抗体,1:2000 稀释)、二抗(HRP 标记的羊抗鼠 IgG,1:500 稀释)、DAB 显色液进行显色拍照。

### 1.7 疫苗制备及免疫动物

用 0.01 mol/L 的 PBS 调整体外表达的溶血素蛋白浓度为 500  $\mu$ g/ml,取 4.5 ml 蛋白与等体积的弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂在注射器中充分混合。将暂养 7 d 的吉富罗非鱼分为两组,每组 180 尾鱼分组(每组 3 个重复,每个重复 60 尾鱼)进行腹腔注射 Hly 抗原,每尾注射 0.1 ml,对照组 1 注射相同剂量的无菌 PBS。

### 1.8 取血与攻毒

免疫后第 14-49 天每 7 d 从各实验组随机取 5 尾实验鱼采血,分离血清,采用间接酶联免疫吸附法(ELISA)检测抗体效价。免疫后第 28 天从上述两组试

实验鱼中每组随机抽取 30 尾(包括平行组),每尾腹腔注射 0.1 ml  $1 \times 10^8$  CFU/ml 的无乳链球菌活菌悬液,另设对照组 2(健康的未注射抗原及 PBS)不注射无乳链球菌活菌悬液,观察 14 d,记录实验鱼的发病与死亡情况,计算 Hly 抗原对吉富罗非鱼的免疫保护率(Relative percentage survival, RPS)和累计存活率。免疫保护率计算参照 Amend(1981),计算公式:

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

$$\text{累计存活率} = (\text{试验末鱼尾数} / \text{试验初鱼尾数}) \times 100$$

## 1.9 数据处理

实验数据均采用 SPSS 13.0 统计软件进行方差分析(ANOVA),并用均值多重比较分析法(LSD 法)检验组内及组间的差异显著性。 $P < 0.05$  为差异显著, $P < 0.01$  为差异极显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 hly 基因扩增、重组质粒构建及序列鉴定

以罗非鱼源无乳链球菌 ZQ0910 株基因组 DNA 为模板,扩增出 hly 基因,PCR 特异条带与预期的 1335 bp

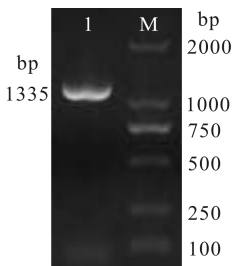


图 1 无乳链球菌 ZQ0910 hly 基因克隆

Fig.1 Cloning of hly gene from *S. agalactiae*

M: DL2000 分子量标准;  
1: hly PCR 产物  
M: DL2000 marker; 1: PCR product of hly

大小相符(图 1)。构建的重组质粒 pET-28a-hly 经双酶切后鉴定,约在 5.3 kb 和 1.3 kb 处有特异性条带,与理论分子量相符(图 2)。经过酶切鉴定的阳性重组菌 DNA 测序结果经生物信息学分析表明, hly 基因编码 444 个氨基酸(登录号: EIM70828.1)。与 GenBank 上其他链球菌氨基酸序列进行比对结果表明,本研究克隆得到的 hly 基因及其编码的 Hly 蛋白与其他种类链球菌 hly 基因及蛋白序列同源性达到 99%(图 3、图 4)。

### 2.2 Hly 融合蛋白表达分析与纯化

软件预测 Hly 蛋白的分子量为 49.7 kD, pET28a 的融合表达标签约为 2.0 kD。从图 5 可以看出,将 pET28-Hly 重组质粒转化入表达菌中并在 1 mmol/L IPTG 的诱导下可以特异表达分子量约为 51.7 kD 的融合蛋白,以 3 个对照组[pET28-Hly 未诱导、pET-28a(+)诱导、pET-28a(+)诱导后]相比,pET28-Hly

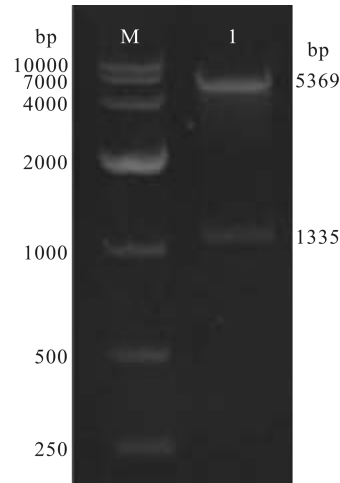


图 2 重组质粒 pET-28a-hly 酶切鉴定

Fig.2 The determination of pET-28a-hly recombinants by enzyme restriction

M: DL10000 bp 分子量标准;  
1: pET-28a-hly 经 EcoRI 和 SalI 酶切后结果  
M: DL10000 bp marker; 1: The result of pET-28a-hly digested by EcoRI and SalI

在表达菌中得到了成功表达,并且大小与预期相符。

分别将超声离心后的上清液和沉淀用 SDS-PAGE 电泳进行分析,结果表明,Hly 融合蛋白主要存在于沉淀中,上清液中几乎检测不到蛋白,因此该融合蛋白主要以包涵体形式表达(图 5)。

采用 HisTrap™ HP 亲和层析柱纯化重组蛋白,用不同浓度的咪唑缓冲液对纯化融合蛋白进行洗脱。结果表明,浓度为 90 mmol/L 的咪唑纯化效果最佳,融合蛋白浓度约为 720 μg/ml。

### 2.3 Hly 重组质粒表达产物 Western blotting 分析

以鼠抗 His 单克隆抗体为一抗,HRP 标记的羊抗鼠 IgG 为二抗,对诱导后重组菌的表达蛋白进行免疫印迹分析,结果显示仅在 51.7 kD 处出现一条特异性条带,表明该蛋白已得到成功表达(图 6)。

### 2.4 抗体血清效价检测

分别在第 14、21、28、35、42、49 天给免疫后的罗非鱼进行血清采集,用间接 ELISA 法测定抗体效价。从实验结果获知,抗原免疫鱼体后,实验用罗非鱼能产生较强的特异性免疫应答,并且免疫组与对照组之间均存在显著差异( $P < 0.01$ )。免疫后第 14 天鱼体即可产生抗体,在免疫后第 28 天抗体水平达到峰值,当第 49 天试验结束时,试验组的抗体效价均能达到 1:64 以上(图 7),Hly 的效价最高可达到为 1:4096。

### 2.5 疫苗安全性评价

将 Hly 蛋白亚单位疫苗注射 10 尾健康罗非鱼,7 d 以后全部存活,均无临床症状出现,解剖后无病理变化,证明该种抗原是安全的,可以用于后续实验。

### 2.6 累计存活率及免疫保护率

实验鱼在无乳链球菌 ZQ0910 活菌攻击后 14 d 内

```

ATGGGTACAGCTGTTCTCTTACCTAAGAGTGATGAGAATAATGATTTGCCCTCCAGCTTTACTGGTTATTTTAAAG
M G Q L F S S P K S D E N N D L P S S F T G Y F K
AAATTTAATACGGGAAGAAAATCAATTTCTCAAGAGATCCTCAATTTGATGAATTAAGGATGAGAAAAGGGAAT
K F N T G R K I I S Q E I L N L I E L R M R K G N
ATTGATTGACAACTCTGCAATCAGTGATGCATTAAGAAAATCGATAGTAGTGTGCTCAATGTTGCTCACC
I Q L T N S A I S D A L K E I D S S V L N V A V T
GGGAGACGGGATCAGGGAAGTCCAGCTTCAATACCTGAGAGGCATGGGAATGAAGAAGAAGGTCAGCT
G E T G S G K S S F I N T L R G I G N E E E G A A
AAAACGGGTTGGTGGAGTAACCATGGAAAAGACATCCATACAAAACACCCAATATACCCAATGTTGGT
K T G V V E V T M E R H P Y K H P N I P N V V F W
GACCTGCCTGGGATTGGGAAGCACAATTTCCACCAACACTTACCTGGAGAAAATGAAGTTCTATGATACGAT
D L P L L G S T N F P P N T Y L E K M K F Y E Y D
TTCTTATTATTTTCGGCCACACGCTTCAAGAAAATGATATAGACATTCGCAAGCAATCAGCATGATGAAG
F F I I I S A T R F K K N D I D I A K A I S M M K
AAGGAATTCTACTTCGTGAGAACCAGGTGGACTCTGACATAACAAATGAAGCAGATGGCAAACCTCAAACCTT
K E F Y F V R T K V D S D I T N E A D G K P Q T F
GACAAAGAAAAGGTCCTGCAGGACATCCGCCTTAACGTGTGAACACCTTTAGGGAGAATGGCATTGCTGAGCCA
D K E K V L Q D I R L N C V N T F R E N G I A E P
CCAATCTTCTGCTCTTAACAAAATGTTGTCACTATGACTTCCCCGCTCTGATGGACAAGCTGATAAGTGAC
P I F L L S N K N V C H Y D F P V L M D K L I S D
CTCCCTATCTACAAGACACAATTTTATGGTCTCCTTACCCAATATCACAGATTCAGTCATTGAAAAGAAGCGG
L P I Y K R H N F M V S L P N I T D S V I E K K R
CAATTTCTGAAGCAGAGGATTTGGCTGGAAGGATTTGCTGACCTAGTGAATATCATCCCTTCTGACCTTT
Q F L K Q R I W L E G F A A D L V N I I P S T L T F
CTCTTGACAGTGATTTGGAGACTCTGAAGAAAAGCATGAAAATCTACCCACTGTGTTTGGAGTGGATGAAAACA
L L D S D L E T L K K S M K F Y R T V F G V D E T
TCTTTGCAGAGATTAGCTAGGACTGGGAAATAGAGGTGGATCAGGTGGAGCCATGATAAAATCTCCTGCTGTG
S L Q R L A R D W E I E V D Q V E A M I K S P A V
TTCAAACCTACAGATGAAGAAAACAATACAAGAAAGGCTTTCAAGATATATTCAGGAGTTCTGTTGGCTAATGGF
F K P T D E E T I Q E R L S R Y I Q E F C L G A N G
TACTTACTTCTAAAAATAGTTTTCTTAAAGAAAATTTTACCTGAAAATATTATTTCTTGCATGGTGAAGTGAG
Y L L P K N S F L K E I F Y L K Y Y F L D M V T E
GATGCTAAAACCTTCTTAAAGAGATATGTTTAAAGAACTAG
D A K T L L K E I C L R N *

```

图 3 无乳链球菌 *hly* 基因序列及其推测的氨基酸序列

Fig.3 DNA sequence and deduced amino acid sequence of *hly* in *S.agalactiae*

```

S. agalactiae ZQ0910 : MEDPQSQSLILQFVILLILTLNFAFFSASEMALVSLNRSKVEQKAEEDGDKRYRLLDVLBNPNFLSTIQVGIITFISLLQ : 80
S. agalactiae SA20-06 : MEDPQSQSLILQFVILLILTLNFAFFSASEMALVSLNRSKVEQKAEEDGDKRYRLLDVLBNPNFLSTIQVGIITFISLLQ : 80
S. pyogenes M1 : MEDPQSQSLIQFLLLVLLNFAFFSASEMALVSLNRSRVEQKAAEDGDKRYRLLDVLBNPNFLSTIQVGIITFISLLS : 80
S. ictaluri 707-05 : MEDPVSQFLIQFLLLVLLNFAFFSASEMALVSLNRSRVEQKAAEDGDKRYRLLDVLBNPNFLSTIQVGIITFISLLS : 80

S. agalactiae ZQ0910 : GASLSASLGRVVISGWLGN SATARTAGSIIILIFLTYYSIVLGELYPKRIAMNLDKRLAIVSAPIIIFLGKIVSPFVWLLS : 160
S. agalactiae SA20-06 : GASLSASLGRVVISGWLGN SATARTAGSIIILIFLTYYSIVLGELYPKRIAMNLDKRLAIVSAPIIIFLGKIVSPFVWLLS : 160
S. pyogenes M1 : GASLSASLGRVVISGWLGN SATARTAGTIIISLVFLTYYSIVLGELYPKRIAMNLDKRLAIVSAPIIIFLGRLVSPFVWLLS : 160
S. ictaluri 707-05 : GASLSASLGRVVISGWLGSATACTAGSIIISLIFLTYYSIVLGELYPKRIAMNLDKRLAIVSAPIIIFLGRLVSPFVWLLS : 160

S. agalactiae ZQ0910 : ASTNLLSRI TPMTFDDADEIMTRDEIEYMLTNSSEITLDAEEIEMLQGFISLDEMAREVMVPRDFAFMIDINDDAQSNIE : 240
S. agalactiae SA20-06 : ASTNLLSRI TPMTFDDADEIMTRDEIEYMLTNSSEITLDAEEIEMLQGFISLDEMAREVMVPRDFAFMIDINDDAQSNIE : 240
S. pyogenes M1 : ASTNLLSRI TPMTFDDADEIMTRDEIEYMLTNSSEITLDAEEIEMLQGVFSLDEMAREVMVPRDFAFMIDINDDAPLENIQ : 240
S. ictaluri 707-05 : ASTNLLSRI TPMTFDDADEIMTRDEIEYMLTNSSEITLDAEEIEMLQGFISLDEMAREVMVPRDFAFMIDINDDAFINIQ : 240

S. agalactiae ZQ0910 : GILSQNFSRVPVYDIDKDRVVGVLHTRKRLLEAGFRITGFDITDLRKILQEPLFVPETIFVDDLLRLRNTQNQMAILLDEY : 320
S. agalactiae SA20-06 : GILSQNFSRVPVYDIDKDRVVGVLHTRKRLLEAGFRITGFDITDLRKILQEPLFVPETIFVDDLLRLRNTQNQMAILLDEY : 320
S. pyogenes M1 : EILKQSF SRIPVYDIDKDKIIGL IHTKRLLES GFROGFDIINMRKMLQEPLFVPETIFVDDLLRLRNTQNQMAILLDEY : 320
S. ictaluri 707-05 : EILKQSF SRIPVYDIDKDKVIGL IHTKRLLEAGFRIDFENINLRKILQEPLFVPETIFVDDLLRLRNTQNQMAILLDEY : 320

S. agalactiae ZQ0910 : GGVAGLVTLEDLLEEIVGEIDDETDIAEQFVREIDENIYIVLGMTLNEFNDFYFTELESDDVDTIAGYYLTGVGSIPNQ : 400
S. agalactiae SA20-06 : GGVAGLVTLEDLLEEIVGEIDDETDIAEQFVREIDENIYIVLGMTLNEFNDFYFTELESDDVDTIAGYYLTGVGSIPNQ : 400
S. pyogenes M1 : GGVAGLVTLEDLLEEIVGEIDDETDIAEQFVREIDENIYIVVGMTLNEFNDFYFTELESDDVDTIAGFYLTGIGTIPSQ : 400
S. ictaluri 707-05 : GGVAGLVTLEDLLEEIVGEIDDETDIAEQFVREIDENIYIVVGMTLNEFNDFYFTELESDDVDTIAGFYLTGIGTIPSQ : 400

S. agalactiae ZQ0910 : EEKVAYEVDSDKDKHITLINDKVKDGRITKLKVLSDIEQNIERD : 444
S. agalactiae SA20-06 : EEKVAYEVDSDKDKHITLINDKVKDGRITKLKVLSDIEQNIERD : 444
S. pyogenes M1 : EQKEAYEVDSDKDKHITLINDKVKDGRITKLKVLSDIEQNIERD : 444
S. ictaluri 707-05 : EEKESFACDSDKDKHITLINDKVKDGRITKLKVLSDIEQNIERD : 444

```

图 4 无乳链球菌 Hly 氨基酸序列与其他物种的 Alignment 分析

Fig.4 Multiple alignments of Hly amino acid sequence of *S.agalactiae* with other species

GenBank accession numbers of the Hly are as follows: *S.agalactiae* ZQ0910: EIM70828.1; *S.agalactiae* SA20-02:YP\_006951537.1; *S.pyogenes* M1:NP\_268699.1; *S.ictaluri* 707-05:ZP\_09125482.1

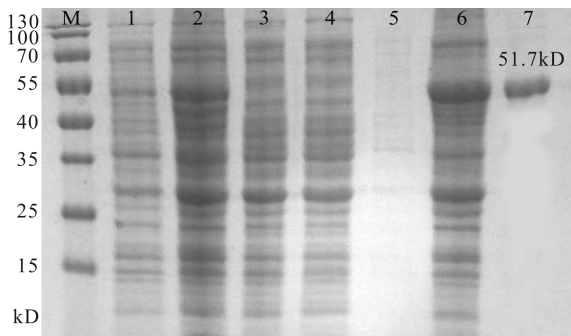


图 5 Hly 融合蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig.5 SDS-PAGE analysis of the Hly fusion protein

M: 蛋白分子量标准; 1: pET28-Hly 诱导前; 2: pET28-Hly 诱导后; 3: pET28 空载体诱导前; 4: pET28 空载体诱导后; 5: 超声上清液; 6: 超声沉淀; 7: 纯化后蛋白

M: Protein MW standards; 1: pET28-Hly without IPTG induction; 2: pET28-SIP with IPTG induction; 3: pET28 without IPTG induction; 4: pET28 with IPTG induction; 5: Supernatant protein induced at 37°C; 6: Sedimentation protein induced at 37°C; 7: Purification of Hemolysin fusion protein

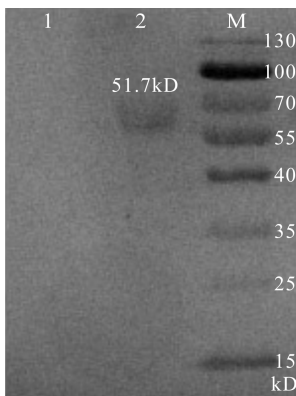


图 6 用 His-Tag 单克隆抗体进行 Western blotting 分析

Fig.6 Western blotting analysis of the purified Hly fusion protein

M: 蛋白分子量标准; 1: 未诱导 pET28-Hly; 2: 纯化后的 Hly 融合蛋白  
M: Protein MW standards; 1: Purified Hly fusion protein; 2: pET28-Hly without IPTG induction

组获得了最高的存活率, 为 70%, Hly 组获得了 70% 的免疫保护率(表 1、图 8)。

### 3 讨论

自 Robinson 等(1966)首次在鱼体上分离到致病

出现了不同程度的发病死亡现象, 死亡时间基本发生于第 4-12 天之间, 未免疫的对照组 1 在 14 d 内全部发病死亡, 未攻毒的健康鱼组(对照组 2)在 14 d 内均未出现死亡现象。发病鱼出现了体表充血、眼球突出、角膜混浊、体色变深等症状, 解剖发现发病鱼具有肝脏淤血、出血、脾脏肿大、肠腔积水等典型的链球菌病的发病症状。其中, 注射 Hly 的试验组存活率较不注射 Hly 的试验组 1 有显著提高。随着攻毒时间的推移, 各试验组鱼死亡数在增加, 至 14 d 时, 对照组 1 实验用鱼全部死亡。计算得出 Hly

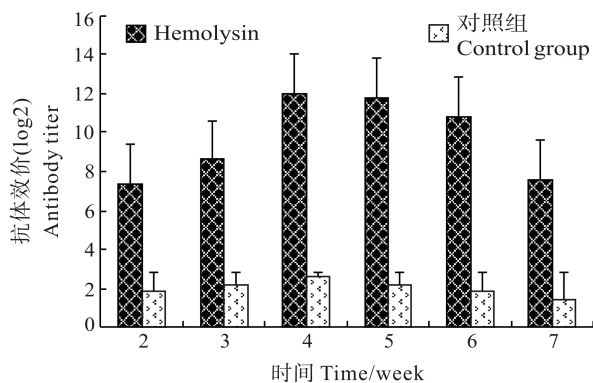


图 7 间接 ELISA 法测定的免疫罗非鱼各时期抗体效价

Fig.7 Antibody titers of vaccinated fish detected by ELISA

表 1 Hemolysin 对免疫吉富罗非鱼后获得的累计存活率  
Tab.1 Effects of Hemolysin on the survival rate of *O. niloticus*

注射无乳链球菌后天数 Days after injection with <i>S. agalactiae</i> (d)	累计存活率 Survival rate (%)		
	对照组 1 Control 1	对照组 2 Control 2	Hemolysin 组 Hemolysin group
1	100	100	100
2	67±3.32*	100	100
3	60±1.45	100	100
4	60±1.53*	100	93±1.12**
5	47±2.65	100	93±1.03
6	40±4.56*	100	87±5.74
7	40±2.21	100	87±3.31
8	20±3.39*	100	73±4.56**
9	10±2.87*	100	73±1.53
10	0	100	73±6.73
11	0	100	70±3.54
12	0	100	70±3.12**
13	0	100	70±2.87
14	0	100	70±1.12

注: \*\*表示与对照组 1 相比差异极显著( $P<0.01$ ); \*表示与对照组 1 相比差异显著( $P<0.05$ )。对照组 1 为生理盐水

Note: \*\*: significant difference compared with control group 1 ( $P<0.01$ ); \*: significant difference compared with the control group ( $P<0.05$ ). The control group 1 is injected with normal saline

性无乳链球菌至今, 链球菌病在世界范围内的多个地区、多种鱼类品种中成为了重要的感染性病原。罗非鱼作为一种具有良好养殖前景的品种, 近年来也常常受到链球菌病的危害, 造成的经济损失逐年增加(鲁义善, 2012)。因此, 必须加强对罗非鱼链球菌病的预防和控制(储霞玲等, 2010、2012)。消灭和控制传染病的有效途径之一是采用疫苗预防。传统的疫苗是基于全菌体的灭活疫苗或减(弱)毒疫苗, 然而随全

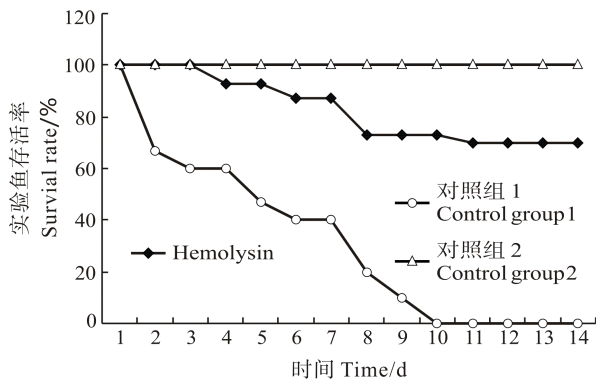


图 8 用无乳链球菌 ZQ0910 攻毒后 Hemolysin 免疫的罗非鱼累计存活率

Fig.8 The survival rate of immunized *O. niloticus* challenged with *Streptococcus agalactiae* ZQ0910

菌疫苗进入机体的非抗原物质不仅会干扰机体对抗原的免疫应答,还会对宿主产生严重的毒副作用,存在安全隐患。随着基因工程技术及基因组序列的测定,亚单位疫苗成为了研究热点,它的优点在于组分清楚、安全性好、便于产业化等(李桂欢等, 2014)。国内外众多学者致力于此类疫苗的研制,黎炯等(2012)将无乳链球菌的表面免疫相关蛋白制备成亚单位疫苗,应用到吉富罗非鱼中,获得了 79% 的保护率。卢志山等(2004)<sup>1)</sup>研制了变形链球菌毒力因子亚单位疫苗并免疫小鼠,也得到了良好的免疫保护率。可见,采用链球菌属的毒力因子或表面蛋白作为其亚单位疫苗的设计靶点是可行的,这为研制无乳链球菌亚单位疫苗提供了思路。

保护性抗原能刺激宿主机体产生相应的免疫应答,使其具备清除外源物质的能力。细菌表面抗原、胞外蛋白和毒力因子均可作为保护性抗原应用到疫苗研发中(王涛等, 2006; Knaust *et al*, 2004)。溶血素也被称为细胞溶素,它是一种能使细胞溶解的毒素,是革兰氏阳性细菌和阴性细菌的重要致病因子(Bhakdi *et al*, 1988、1994),在动物细菌性疾病的感染发展过程中起着重要作用。王海丽等(2011)通过克隆表达猪链球菌溶血素基因证实了其可作为猪链球菌病基因工程疫苗靶标的可能性。此外,张翠娟等(2009)也将体外表达的嗜水气单胞菌溶血素制成的类毒素疫苗免疫小鼠,获得了较高的保护效力。因此认为溶血素可以作为一种理想的疫苗候选分子。本研究在获得罗非鱼源无乳链球菌 ZQ0910 株全基因组序列的前提

下,克隆表达了无乳链球菌溶血素蛋白,经免疫印迹实验证明了重组溶血素蛋白具有特异的免疫原性,并在此基础上,制备了亚单位疫苗免疫足量的吉富罗非鱼,在 28 d 的养殖周期内,血清效价最高可达 1:4096,最后的攻毒实验中,获得 70% 的免疫保护率,略低于黎炯等(2012)采用表面免疫相关蛋白制备的亚单位疫苗的保护率,这可能是由于本实验周期较长、鱼体间存在个体差异等因素所造成。

原核蛋白表达系统是研究者最常用的外源蛋白表达系统,外源蛋白在大肠杆菌中有两种表达形式,即可溶性蛋白和不溶性的包涵体(范翠英等, 2012)。可溶性蛋白可以保留蛋白质的天然生物学活性,而包涵体则不具有生物学活性,但是在下游生产中以包涵体形式表达的蛋白质具有相对优越性,例如可以较好地抵御外源蛋白酶对其自身的酶解作用,进行蛋白纯化时不需考虑目的蛋白失活等问题。两种外源蛋白表达形式各具优缺点,对于本研究而言,表达的蛋白是作为抗原免疫动物探讨其免疫原性,对于蛋白的表达形式并无刻意的要求。有研究表明,重组表达蛋白与天然蛋白具有同等的致敏性、交叉反应及免疫原性(杜欣军等, 2009),因此,本研究借助 pET 原核表达系统获得了溶血素蛋白包涵体,采用 HisTrap<sup>TM</sup> HP 亲和层析柱纯化得到重组目的蛋白,并成功应用到后续实验中,取得良好的实验效果。如何将体外表达的溶血素蛋白进行蛋白复性并应用于动物实验是今后进一步研究的方向。

本研究成功克隆、表达了罗非鱼源无乳链球菌溶血素保护性抗原,构建了该基因的高效表达菌株,并通过动物活体实验证实了溶血素抗原具有良好的免疫原性,可作为由无乳链球菌引起的罗非鱼链球菌病的基因工程疫苗的候选靶蛋白,为罗非鱼链球菌病的防治提供了一定的实验依据,使将溶血素基因工程类疫苗应用于田间水产动物成为可能,对该种疾病的防治研究具有参考价值。

## 参 考 文 献

- 王涛,刘纯杰. 反向疫苗学分析方法及在疫苗开发中应用进展. 微生物免疫学进展, 2006, 34(1): 66-73  
王雅,张安定,李冉,等. 猪链球菌 2 型 III 型溶血素的研究. 中国动物传染病学报, 2012, 20(4): 39-44

1) 卢志山. 变形链球菌 SBR 制备及免疫小鼠后机体抗体应答和局部细胞因子表达变化. 山东大学硕士学位论文, 2004, 62-64

- 王海丽, 徐公义, 葛长城, 等. 猪链球菌 2 型溶血素融合蛋白的制备及免疫活性测定. 安徽农业科学, 2011, 39(6): 3604-3605
- 邓楠楠, 王印庚, 张正, 等. 黄芪多糖佐剂对大菱鲆五联疫苗免疫增效作用. 渔业科学进展, 2012, 33(2): 35-42
- 李桂欢, 王蓓, 鲁义善, 等. 罗非鱼源无乳链球菌甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因的克隆与原核表达. 水产科学, 2014, 33(3): 175-180
- 张翠娟, 于宙亮, 田莉琰, 等. 嗜水气单胞菌溶血素基因的克隆表达及其类毒素的免疫原性分析. 生物工程学报, 2009, 25(2): 251-256
- 杜欣军, 张伟伟, 孙伟英, 等. 凡纳滨对虾原肌球蛋白基因表达模式与重组表达. 渔业科学进展, 2009, 30(4): 38-43
- 沈定数, 周雪艳. 无乳链球菌表面蛋白的研究进展. 中国微生物杂志, 2007, 19(5): 472-473
- 林庆强. 罗非鱼的链球菌病防治. 科学养鱼, 2010(11): 56
- 范翠英, 冯利兴, 樊金玲, 等. 重组蛋白表达系统的研究进展. 生物技术, 2012, 22(2): 76-80
- 储霞玲, 曹俊明, 万忠, 等. 2009 年广东罗非鱼产业发展现状分析. 广东农业科学, 2010(7): 270-272
- 储霞玲, 曹俊明, 白雪娜, 等. 2011 年广东罗非鱼产业发展现状分析. 广东农业科学, 2012(8): 12-14
- 鲁义善. 罗非鱼链球菌病五年反思与考校. 海洋与渔业: 水产前沿, 2012(9): 59-60
- 雷光英, 曹俊明, 万忠, 等. 2008 年度广东省罗非鱼产业发展现状分析. 广东农业科学, 2009(7): 240-243
- 解俊, 彭程远, 金珊, 等. 灭活鲫鱼诺卡氏菌对乌鳢非特异性免疫指标的影响. 渔业科学进展, 2013, 34(4): 71-76
- 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
- Amend DF. Potency testing of fish vaccines. In: International symposium on fish biologics: Serodiagnostics and vaccines. Dev Biol Stand, 1981, 49: 447-454
- Baums CG, Valentin-weigand P. Surface-associated and secreted factors of *Streptococcus suis* in epidemiology, pathogenesis and vaccine development. Anim Health Res Rev, 2009, 10(1): 65-83
- Bhakdi S, Tranum-Jensen J. Damage to cell membranes by pore-forming bacterial cytolysins. Progress in Allergy. 1988, 40: 1-43
- Bhakdi S, Grimminger F, Suttorp N, et al. Proteinaceous bacterial toxins and pathogenesis of sepsis syndrome and septic shock: the unknown connection. Med Microbiol Immun, 1994, 183(3): 119-144
- Gottschalk M, Segura M. The pathogenesis of the meningitis caused by *Streptococcus suis*: the unresolved questions. Vet Microbiol, 2000, 76(3): 259-272
- Gottschalk M, Segura M, Xu J. *Streptococcus suis* infections in humans: the Chinese experience and the situation in North America. Anim Health Res Rev, 2007, 8(1): 29-45
- Knaust A, Frosch M. Genome-based vaccines. Int J Med Microbiol, 2004, 294(5): 295-301
- Robinson JA, Meyer FP. Streptococcal fish pathogen. J Bacteriol, 1966, 92(2): 512
- Wang B, Jian JJ, Lu YS, et al. Complete genome sequence of *Streptococcus agalactiae* ZQ0910, a pathogen causing meningoencephalitis in the GIFT strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). J Bacteriol, 2012, 194(8): 5132-5133

(编辑 冯小花)

## Expression and Immunogenicity Analysis of Hemolysin Gene in *Streptococcus agalactiae* Isolated from *Oreochromis niloticus*

WANG Bei<sup>1,2,3</sup>, LI Guihuan<sup>1,2,3</sup>, WANG Pei<sup>1,2,3</sup>, TANG Jufen<sup>1,2,3</sup>, LU Yishan<sup>1,2,3</sup>,  
WU Zaohe<sup>2,3,4</sup>, JIAN Jichang<sup>1,2,3</sup>①

(1. Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088; 2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Pathogenic Biology and Epidemiology for Aquatic Economic Animals, Zhanjiang 524088;  
3. Guangdong Key Laboratory of Control for Diseases of Aquatic Economic Animals, Zhanjiang 524088;  
4. Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225)

**Abstract** *Streptococcus* is a genus of spherical gram-positive bacteria that can infect a wide range of hosts. Streptococcal diseases of cultured fish caused by *Streptococcus agalactiae* have been frequently reported in South China, which incurred catastrophic economic losses. Vaccine is one of effective ways to control and eradicate infectious diseases, and so far no effective subunit vaccine for *S. agalactiae* diseases has been developed. To test whether Hemolysin (Hly) is a potential candidate for vaccine development of *Oreochromis niloticus*, we cloned *hly* gene based on bioinformatics analysis and constructed and expressed it. The open reading frame of *hly* gene contains 1335 bp that encodes 444 amino acid residues. Alignment analysis indicated that the Hly protein was highly homologous to Hly proteins from other *Streptococcus*(99%). SDS-PAGE confirmed the expression of Hly (51.7 kD) in *Escherichia coli* BL21(DE3). Then, the recombinant Hly protein was purified by affinity chromatography, which was used for vaccination in Tilapia, *O. niloticus*. Immunogenicity was confirmed by subsequent western blotting. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) analysis demonstrated that Hly produced an observable antibody response in all vaccinated fish, and the maximum antibody titers in the sera reached 1:4096. The RPS value for the Sip vaccine was 70. Tilapia vaccinated with Hly was highly resistant to the infection of the contaminant *S. agalactiae*. These results indicate that Hly is an effective vaccine candidate against *S. agalactiae* for tilapia, *O. niloticus*.

**Key words** *Streptococcus agalactiae*; Hemolysin; Prokaryotic expression; Immunogenicity

① Corresponding author: JIAN Jichang, E-mail: jianjichang@126.com