

# 罗非鱼无乳链球菌 C5a 肽酶的克隆 及原核表达质粒构建

李庆勇<sup>1,2</sup> 可小丽<sup>1</sup> 卢迈新<sup>1</sup> 朱华平<sup>1</sup> 高风英<sup>1</sup>

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, 广州 501380;  
2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306

**摘要** 为进一步了解无乳链球菌表面蛋白 C5a 肽酶 *scpB* 基因免疫表位及毒力作用基团的相关信息, 通过提取罗非鱼无乳链球菌基因组 DNA, 利用特异性引物 PCR 扩增出 *scpB* 基因的全长开放阅读框(ORF)。结果表明, 该基因包括 3 405 bp 的 ORF, 可编码 1 134 个氨基酸, 与已报道的人源无乳链球菌 ScpB 的氨基酸同源性达 99.74%。利用生物信息学软件 DNASTar、Clustal X 2.0 和 MEGA 5.05 及在线分析工具 ExPASy ProtParam、NCBI Protein blast 及 Conserved Domain 等对推导的氨基酸序列进行分析, 结果显示罗非鱼无乳链球菌 *scpB* 基因编码的氨基酸序列含有 3 个催化三联体(catalytic triad)位点、7 个假定活性位点(putative active site)、2 个特异位点(specific hits), 以及 4 个超家族结构(2 个肽酶超家族结构 Peptidases-S8-S53 superfamily、1 个类纤连蛋白超家族结构 DUF1034 superfamily 和 1 个鞭毛钩蛋白超家族结构 FlgD-Ig superfamily); 并且该氨基酸序列有多个抗原表位, 推测 ScpB 蛋白应具有较强的免疫原性, 可作为候选的蛋白疫苗成分。将该片段插入原核表达载体 pET32a(+), 转入大肠杆菌 BL21(DE3), 挑取阳性克隆, 经 PCR、酶切及测序鉴定表明成功构建原核表达载体 pET32a(+)/*scpB*。

**关键词** 罗非鱼; 无乳链球菌; C5a 肽酶; 克隆; 原核表达质粒

**中图分类号** Q 959.483 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2013)04-0092-08

罗非鱼(tilapia)是世界性的养殖鱼类。近年来大量暴发链球菌病, 严重危害该产业的发展。链球菌病(streptococcosis)是罗非鱼养殖中危害最严重的疾病之一, 传染性强, 死亡率高, 药物治疗困难。卢迈新等<sup>[1]</sup>通过传统的生理生化分析与分子鉴定及人工感染回归试验, 确定引发南方罗非鱼主产区暴发大规模流行病的病原为无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)。

无乳链球菌(*S. agalactiae*)是一类广泛分布于自然界的革兰氏阳性菌, 按 Lancefield 血清学分类归为 B 群, 因为无乳链球菌是唯一拥有 B 群特异性抗原的链球菌, 因而也被称为 B 群无乳链球菌(group B *Streptococcus*, GBS)。GBS 不仅能引起多种鱼类患病<sup>[2-6]</sup>, 对人类和其他动物也均有较大的危害。研究证实, GBS 表面蛋白能刺激宿主机体产生保护性免疫<sup>[7]</sup>, 因此成为 GBS 疫苗研制的靶标。迄

今已鉴定出 GBS 多种表面蛋白, 如 ScpB、Alp 家族、Lmb 和 FbsA 等, 其中 ScpB 是 GBS 表面蛋白 C5a 肽酶(streptococcol C5a peptidase from group B *Streptococcus*)的简称, 能灭活补体 C5a。ScpB 灭活补体 C5a 的作用, 能刺激机体产生保护性抗体。ScpB 不仅可以在 GBS 表面表达, 而且在人源  $\beta$  溶血性 A 族链球菌、C 和 G 族链球菌表面也均可表达<sup>[8-11]</sup>, 鉴于 ScpB 广泛存在于多种血清型的菌株中, 高度保守且具有良好的免疫原性, 因而成为 GBS 的重要候选抗原之一。国内外迄今未有鱼源无乳链球菌 *scpB* 基因的相关研究报道。

笔者克隆 GBS 表面蛋白 C5a 肽酶 *scpB* 基因全长 ORF 序列, 并通过基因工程手段构建重组融合表达质粒 pET32a(+)/*scpB*, 同时应用生物信息学工具对该基因进行分析, 以期进一步了解其免疫表位及毒力作用基团相关信息, 为无乳链球菌 C5a 肽

收稿日期: 2012-10-31

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-49)和广东省海洋渔业科技推广专项(A201101C02)

李庆勇, 硕士研究生。研究方向: 水产健康养殖。E-mail: byqyli@163.com

通讯作者: 卢迈新, 研究员。研究方向: 水产健康养殖。E-mail: mx-lu@163.com

酶免疫机制以及基因工程疫苗的研制提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验菌株及材料

无乳链球菌试验株由国家罗非鱼产业技术体系养殖与病害研究室分离、鉴定并保存,编号为 ZP-N。

PCR 反应体系所用试剂均购自上海申能博彩生物科技有限公司;pMD19-T Vector、各种限制性内切酶及克隆宿主菌株大肠杆菌 DH5 $\alpha$  菌株购自 TaKaRa 公司;表达宿主菌株大肠杆菌 BL21(DE3) 菌株、胶回收及质粒提取试剂盒购自 TIANGEN 公司;细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自 OMEGA 公司;pET32a(+ ) Vector 购自 Novagen 公司;T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司。

### 1.2 引物设计与合成

根据 GenBank 上无乳链球菌 *scpB* 基因序列(登录号:U56908.1),利用 Primer 5.0 在其开放阅读框(open reading frame, ORF)上设计 1 对引物,并加入 1 对酶切位点。上游引物:5'-CG GAA TTC ATG TCT ACG AGC ATC TTG CT-3',划线部分为添加的 *EcoR* I 酶切位点;下游引物 5'-CGCG CTC GAG CTA TTT TTT AGT TTC TTT TT G -3',划线部分为添加的 *Xho* I 酶切位点。该对引物预期可扩增出 3 405 bp 的片段。引物由上海生物工程技术有限公司合成。

### 1.3 无乳链球菌 C5a 肽酶 *scpB* 基因的 PCR 扩增和重组克隆质粒的构建

GBS ZP-N 菌株接种于脑心浸液液体培养基(brian heart infusion, BHI)中,37 °C 恒温培养 16 h 收集菌体,OMEGA 细菌基因组 DNA 提取试剂盒(D3350-01)提取无乳链球菌基因组 DNA,以此为模板,进行 PCR 扩增。PCR 扩增体系为 50  $\mu$ L,上下游引物各 1  $\mu$ L(10 pmol/ $\mu$ L),10  $\times$  PCR Buffer 5  $\mu$ L,4  $\times$  dNTP 1  $\mu$ L, *Taq* 0.5  $\mu$ L,模板 DNA 2  $\mu$ L,灭菌双蒸水 39.5  $\mu$ L。反应条件:94 °C 预变性 5 min;94 °C 30 s,54 °C 45 s,72 °C 2 min 15 s,共 35 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min。取 5  $\mu$ L 扩增产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果。TIANGEN 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(DP209-02)回收 PCR 产物,连接 pMD19-T 载体,构建重组质粒 pMD19-T/*scpB*,重组质粒转入大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细

胞,在含氨苄青霉素(AMP)的 LB 平板上挑取阳性克隆,经 PCR 鉴定后送上海英骏生物技术有限公司测序。

### 1.4 *scpB* 基因核酸序列特征分析

测序结果用 NCBI 的 ORF Finder 工具分析开放阅读框,并利用 NCBI 的 Nucleotide blast 工具进行序列的相似性搜索。采用 DNASar (MegAlign) 与已知菌株的 *scpB* 基因进行同源性比较。

### 1.5 ScpB 氨基酸序列特征分析

运用 ExPASy-ProtParam tool 在线分析工具将 *scpB* 基因序列翻译成氨基酸序列,NCBI Conserved Domains 工具分析其蛋白结构域。应用 ProtScale 进行亲/疏水性分析,TMHMM 进行跨膜区预测;PredictProtein 预测蛋白质二级结构。DNASar (Protean) 软件预测 ScpB 可形成抗原表位的氨基酸区域。

### 1.6 ScpB 氨基酸序列的同源性分析

利用 NCBI 的 Protein blast 程序进行氨基酸序列同源性检索,利用 Clustal X 2.0 和 MEGA 5.05 软件对以下 GenBank ScpB 氨基酸序列进行同源性分析及系统进化树构建:无乳链球菌(*S. agalactiae*) ScpB 氨基酸序列(ZP00781402.1, ZP00786256.1, AAF04282.2, AAF04280.2, NP735749.1 及 AAB17762.1);化脓链球菌(*S. pyogenes*) ScpB 氨基酸序列(YP597451.1, NP608046.1, YP001129198.1, AEQ25263.1, ZP7459869.1 及 YP061036.1);停乳链球菌(*S. dysgalactiae*) ScpB 氨基酸序列(YP002996646.1 和 EGR88058.1)。

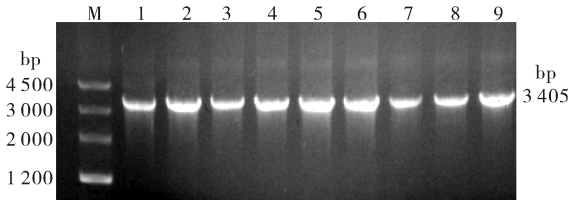
### 1.7 *scpB* 基因重组表达质粒的构建

采用 TIANGEN 质粒小提试剂盒(DP103-02)提取测序正确的重组克隆质粒 pMD19-T/*scpB*, *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切 pMD19-T/*scpB* 和表达载体 pET32a(+),分别回收 3 405 bp 的目的片段及 pET32a(+),T4 DNA 连接酶连接 7 h,构建重组表达质粒 pET32a(+ )/*scpB*。将重组质粒转化入 BL21(DE3)感受态细胞,经氨苄青霉素抗性筛选,挑取单个阳性菌落,接种于含 1 mL LB/AMP 液体培养基的 1.5 mL 离心管中,37 °C 振荡培养 12 h,以菌液为模板做菌落 PCR 鉴定。对阳性菌体进行扩大培养,提取质粒,*EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定,鉴定结果为阳性的菌液送上海英骏生物技术有限公司测序。

## 2 结果与分析

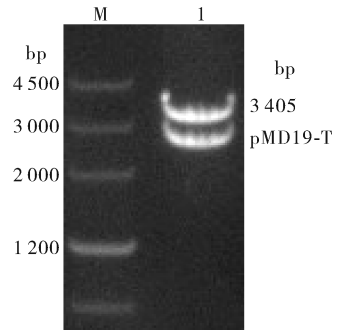
### 2.1 无乳链球菌 C5a 肽酶 *scpB* 基因的 PCR 扩增及 T 克隆鉴定

以罗非鱼无乳链球菌基因组 DNA 为模板,根据设计的引物,PCR 扩增特异片段,产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后,在 3 400 bp 左右处有 1 条特异的 DNA 条带,与预计片段大小 3 405 bp 一致(图 1)。PCR 产物经胶回收纯化后,与 pMD19-T 载体连接获得重组克隆质粒 pMD19-T/*scpB*,重组克隆质粒经 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定,结果显示 2 条明显的条带,1 条大小约为 3 405 bp,与目的片段大小相同;另 1 条带 2 700 bp 左右,与载体 pMD19-T 大小相同(图 2)。本文基因登录号为 JQ964085。



M. Marker III; 1~9. 分离株 PCR 产物 PCR product of isolated.

图 1 无乳链球菌 C5a 肽酶基因的 PCR 扩增结果  
Fig. 1 PCR amplification result of C5a peptidase gene of *S. agalactiae*



M. Marker III; 1. 重组克隆质粒经 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定 pMD19-T/*scpB* Digestion identifications with *EcoR* I and *Xho* I.

图 2 重组克隆质粒 pMD19-T/*scpB* 的酶切鉴定  
Fig. 2 Identification of recombinant plasmid of pMD19-T/*scpB* by restriction enzyme digestion

### 2.2 *scpB* 基因核酸序列分析

重组质粒 pMD19-T/*scpB* 测序结果表明,罗非鱼无乳链球菌 *scpB* 基因 ORF 全长为 3 405 bp,与已报道的人源无乳链球菌 *scpB* 基因核苷酸序列的同源性高达 99.7% (GenBank 登录号:AF189004. 2),与化脓链球菌的 *scpB* 基因同源性高达 97.7% (GenBank 登录号:AE009949. 1),与停乳链球菌的 *scpB* 基因同源性达 97.8% (GenBank 登录号:AP010935. 1)。各种链球菌 *scpB* 核苷酸序列同源性通过 DNASTar (MegAlign) 比较,结果如图 3 所示。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	█	97.8	99.8	98.2	97.7	98.0	98.2	97.9	97.9	99.6	1
2	2.2	█	97.8	98.5	98.7	98.3	98.5	98.4	98.3	97.7	2
3	0.2	2.3	█	98.1	97.6	97.9	98.1	97.9	97.8	99.7	3
4	1.8	1.5	1.9	█	98.3	99.5	100.0	99.4	99.5	98.1	4
5	2.3	1.3	2.4	1.8	█	98.3	98.3	98.2	98.0	97.5	5
6	2.1	1.7	2.1	0.5	1.8	█	99.5	99.8	98.9	97.8	6
7	1.8	1.5	1.9	0.0	1.8	0.5	█	99.4	99.5	98.1	7
8	2.1	1.7	2.2	0.6	1.8	0.2	0.6	█	98.9	97.8	8
9	2.1	1.8	2.2	0.5	2.0	1.1	0.5	1.1	█	97.7	9
10	0.4	2.4	0.3	2.0	2.5	2.2	2.0	2.2	2.3	█	10
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	

数字 1、3、4、7 和 9 分别为无乳链球菌(*S. agalactiae*)AE009948. 1、AF189004. 2、AL766850. 1、CP00114. 1 和 U56908. 1; 数字 2 和 5 分别为化脓链球菌 (*S. pyogenes*) AE009949. 1 和 AM295007. 1; 数字 6 和 8 分别为停乳链球菌 (*S. dysgalactiae*) AP010935. 1 和 CP002215. 1; 数字 10 为试验菌株 ZP-N。Numbers 1, 3, 4, 7 和 9 分别为 AE009948. 1, AF189004. 2, AL766850. 1, CP00114. 1 和 U56908. 1 of *S. agalactiae*; numbers 2 and 5 分别为 AE009949. 1 和 AM295007. 1 of *S. pyogenes*; numbers 6 and 8 分别为 AP010935. 1 和 CP002215. 1 of *S. dysgalactiae*; number 10 is ZP-N.

图 3 不同种链球菌 *scpB* 基因核苷酸序列同源性比对

Fig. 3 Alignment of nucleotide sequence homology of *scpB* gene from *Streptococcus* spp.



### 2.3 ScpB 氨基酸序列特征分析

ExPASy ProtParam 工具及 DNASTar (Edit-Seq) 预测表明, 罗非鱼无乳链球菌 *scpB* 基因的全长 ORF 编码 1 条由 1 134 个氨基酸残基组成的多肽, 分子质量为 124. 43 ku, 等电点理论值为 5. 5, 分子式为  $C_{5464}H_{8603}N_{1491}O_{1790}S_{19}$ 。*scpB* 推导氨基酸序列成分分析(表 1) 表明, 蛋白质中含量较高的氨基酸为 Ala (9. 7%)、Lys (9. 3%) 和 Thr (8. 8%), 含量较少的氨基酸为 Trp (0. 6%), 不含有 Cys、Pyl 和 Sec。亲/疏水性预测分析表明, ScpB 多肽链有 6 个主要的疏水区, 分别位于氨基酸序列的 106~115 位、205~219 位、236~253 位、396~401 位、494~508 位和 1 106~1 122 位, 整个蛋白质疏水性最大值为 2. 109, 最小值为 -3. 255, 亲水区占据该蛋白的多肽链的区域远远大于疏水区域。在线预测工具 TMHMM Server v 2. 0 跨膜区预测, 结果表明该多肽链存在跨膜区, 位于 1 094~1 134 氨基酸之间。Predictprotein 预测结果表明, ScpB 蛋白的二级结构组成中, 螺旋(helix)占 10. 93%, 折叠(sheet)占 24. 78%, 环(loop)占 64. 29%。

推导出的氨基酸序列通过 NCBI 上的 Protein blast 比对及 Conserved Domain 工具分析(图 4) 发现, 罗非鱼无乳链球菌 ScpB 氨基酸序列含有 3 个催化三联体(catalytic triad)位点, 分别在第 110~121、177~187 及 494~504 个氨基酸之间, 该催化三联体由 Asp/His/Ser 3 个氨基酸组成; 有 7 个假

定活性位点(putative active site), 其中在第 100~300 个氨基酸残基间有 4 个, 第 350~500 个氨基酸之间有 3 个; 含有 2 个特异位点(specific hits)Peptidases-S8-S53-peptidase, 位于 Peptidases-S8-S53 超家族结构域内; 另外, ScpB 还含有 4 个超家族结构, 分别为 2 个肽酶超家族结构(peptidases-S8-S53 superfamily)、1 个类纤连蛋白超家族结构(DUF1034 superfamily)和 1 个鞭毛钩蛋白超家族结构(FlgD-Ig superfamily), 经一次迭代分析显示, Peptidases-S8-S53 超家族结构域位于 S8 和 S53 家族结构域内, 含有肽键内切酶(endopeptidases)和肽键外切酶(exopeptidases), S8 和 S53 家族结构域中分别具有 Asp/His/Ser 和 Glu/Asp/Ser 催化三联体位点; DUF1034 超家族结构域中具有 1 个类似纤连蛋白结构域的结构, 并且该家族含有几个未知功能的结构域, 这些结构域在几种细菌和植物中的肽酶中也有存在; FlgD-Ig 超家族结构域中含有 1 个  $\beta$  夹心折叠(beta sandwich fold)结构的免疫球蛋白, 该结构发现于鞭毛钩封盖蛋白(flagellar hook capping protein)中的 FlgD-Ig 蛋白。

用 DNASTar 预测该蛋白的抗原性, 根据有关指数与表位形成的关系, 即当亲水性 > 0、抗原指数 > 0、表面可及性 > 1 时, 形成表位的可能性较大<sup>[22-24]</sup>, 发现无乳链球菌 *scpB* 基因编码的氨基酸可形成多个抗原表位(图 5), 推测该蛋白应具有较强的免疫原性。

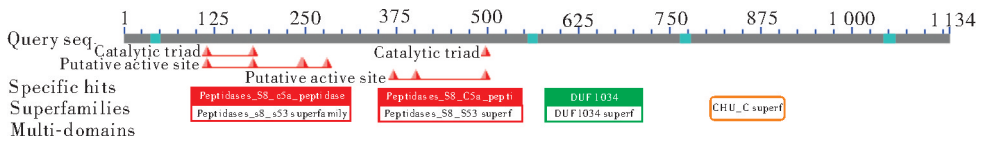


图 4 罗非鱼无乳链球菌 ScpB 结构预测结果

Fig. 4 Prediction result of conserved domain in ScpB of tilapia *S. agalactiae*

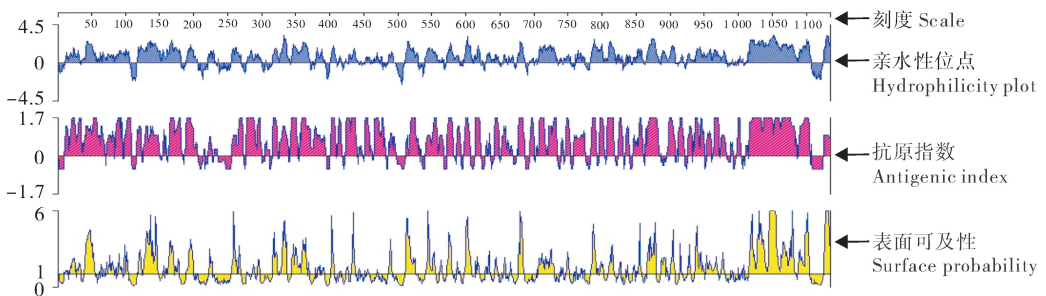


图 5 *scpB* 基因的亲水性、表面可及性和抗原性预测

Fig. 5 Prediction of hydrophilicity, surface probability and antigenicity of *scpB* gene

表 1 罗非鱼无乳链球菌 *scpB* 基因序列推导肽链的氨基酸组分

Table 1 Composition of amino acid deduced by *scpB* gene of tilapia *S. agalactiae*

类型 Type	比例/% Percent	氨基酸 Amino acid	数量 Number	比率/% Ratio
疏水氨基酸 Hydrophobic amino acid	36.4	Ala(A)	110	9.7
		Ile(I)	44	3.9
		Leu(L)	73	6.3
		Met(M)	19	1.7
		Phe(F)	34	3.0
		Pro(P)	61	5.4
		Trp(W)	7	0.6
		Val(V)	66	5.8
亲水氨基酸 Hydrophilic amino acid	34.9	Asn(N)	55	4.9
		Gln(Q)	44	3.9
		Gly(G)	69	6.1
		Ser(S)	83	7.2
		Thr(T)	100	8.8
		Tyr(Y)	45	4.0
酸性氨基酸 Acidic amino acid	14.5	Asp(D)	93	8.2
		Glu(E)	71	6.3
碱性氨基酸 Basic amino acid	14.2	Arg(R)	36	3.2
		His(H)	19	1.7
		Lys(K)	105	9.3

2.4 ScpB 蛋白氨基酸序列的同源性分析

利用 DNAMAN 对 14 个相关菌株的 ScpB 氨基酸序列分别进行两两比对和多重比对,发现罗非鱼无乳链球菌 *scpB* 基因推导的氨基酸序列与其他链球菌的 ScpB 氨基酸具有较高的同源性,其中与人源无乳链球菌的 ScpB 氨基酸同源性最高,达 99.74%(GenBank 登录号:ZP00781402.1),与化脓

链球菌的 ScpB 氨基酸同源性高达 96.56%(NP 608046.1),与停乳链球菌的 ScpB 氨基酸同源性高达 96.83%(YP 002996646.1)。

用 Clustal X 2.0 软件和 MEGA 5.05 程序构建该 14 个菌株的系统进化树(图 6),发现罗非鱼无乳链球菌 ScpB 与人源无乳链球菌亲缘关系较近,与停乳链球菌亲缘关系稍远,与化脓链球菌亲缘关系最远。

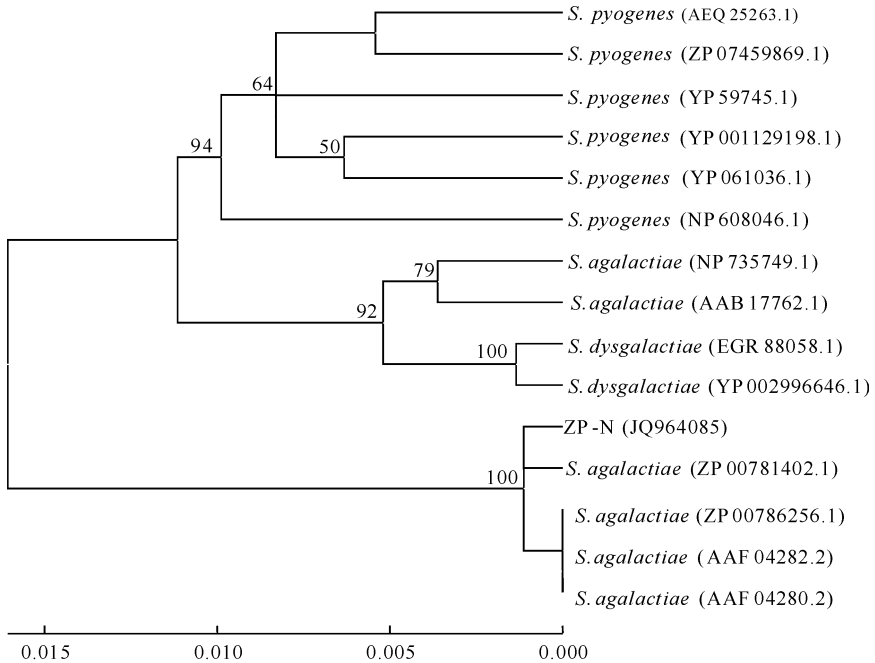
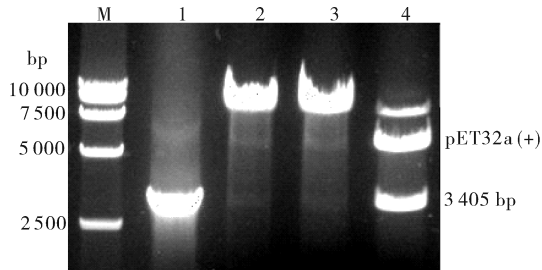


图 6 罗非鱼无乳链球菌 ScpB 与参考菌株同源氨基酸序列进化树分析

Fig. 6 Phylogenetic tree analysis based on ScpB amino acids of *S. agalactiae* reference strains

## 2.5 重组表达质粒的构建与鉴定

将克隆到的 *scpB* 基因重组入原核表达载体 pET32a(+) 中, 构建原核表达质粒 pET32a(+)/*scpB*, 经 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切后在 3 405 bp 左右处有 1 条特异的 DNA 条带(图 7), 而且菌落 PCR 扩增出 3 405 bp 左右的特异条带, 说明重组质粒构建正确, 将经过双酶切和菌落 PCR 鉴定的重组质粒送样测序, 结果与 T 克隆重组质粒测序结果比对, 相似度达 100%, 说明重组表达质粒构建正确。



M. Marker DL 15000; 1. PCR 产物 PCR product; 2. *EcoR*I 酶切鉴定 Digestion by *EcoR*I; 3. *Xho*I 酶切鉴定 Digestion by *Xho*I; 4. *EcoR*I 和 *Xho*I 双酶切鉴定 Digestion by *EcoR*I and *Xho*I.

图 7 重组表达质粒的双酶切鉴定和 PCR 鉴定

Fig. 7 Digestion and PCR identification of recombinant plasmid pET32a(+)/*scpB*

## 3 讨论

无乳链球菌(GBS)是我国罗非鱼的重要致病菌之一, 不同菌株致病力不同。研究表明, GBS 的致病力强弱与其所携带的毒力因子有关, 在大多数情况下, GBS 可根据环境调整各毒力基因的表达水平<sup>[12-14]</sup>。毒力因子在细菌感染的发生、流行等方面发挥极其重要的作用。ScpB 蛋白是细菌重要的毒力因子和保护性抗原, 可刺激机体产生保护性抗体<sup>[15]</sup>。Bohnasack 等<sup>[16]</sup>发现, 正常人血清中含有能抑制可溶性 ScpB 蛋白活性的 IgG 抗体, 但此类抗体对 GBS 表面表达的 ScpB 不起作用, 因此认为这种抗体是通过干扰纤连蛋白(Fn)的结合而具有抗感染的作用。这种保护性抗体是由 ScpB 蛋白刺激宿主机体而产生的, 因此有可能成为 GBS 疫苗成分。Cheng 等<sup>[17]</sup>研究表明, ScpB 蛋白具有调理素作用, 能启动巨噬细胞对 GBS 的杀伤作用。并且由于其几乎存在于所有 GBS 中, 免疫原性好, 且持续保护作用时间长, 因此被认为是 T 细胞依赖抗体最好的蛋白成分, 成为 GBS 疫苗研究的靶标。荚膜多糖疫苗虽然已进入临床试验阶段, 但因不能预防多

个血清型 GBS 引起的感染而使其应用受到限制<sup>[18]</sup>, 而动物试验证实 GBS 表面蛋白 ScpB 抗体可同时抵御多个 GBS 血清型的感染, 具有非血清型依赖性保护作用, 并且具有多种免疫渠道, 可能成为免疫预防 GBS 感染的未来研究方向<sup>[19]</sup>。

蛋白质的性质主要取决于其氨基酸序列和空间构象, 对无乳链球菌 C5a 肽酶的氨基酸结构进行比较有助于了解其高级结构和功能。本研究通过 NCBI 上的 Conserved Domain 工具对 ScpB 氨基酸序列保守区进行分析发现, 罗非鱼无乳链球菌 ScpB 蛋白 C 末端包含一个肽聚糖序列, 这个序列与一些革兰氏阳性菌的表面蛋白相同, 具有抗原性, 能刺激机体产生抗体, 可作为 GBS 疫苗的备选抗原, 同时也从侧面佐证了 ScpB 具有免疫原性, 可能对具有该肽聚糖序列的病原菌都有一定的免疫作用。本研究预测得到的氨基酸序列有多个保守区, 而 Brown 等<sup>[20]</sup>对人源 ScpB 氨基酸序列结构进行分析发现该蛋白共有 5 个保守区: 1 个枯草杆菌蛋白酶相似区, 1 个蛋白酶结合区以及 3 个 III 型纤连蛋白区, 而这几个保守区都具有抗原性。疏水性预测表明, 罗非鱼无乳链球菌 ScpB 多肽链的亲水区所占据的区域远远大于疏水区, 表明该蛋白为亲水蛋白, 并且该多肽链含有跨膜区, 综合亲水性(hydrophilicity)、表面可及性(surface probability)和抗原指数(antigenic index)分析, 表明该蛋白存在较多的 B 细胞抗原表位, 具有较好的免疫原性, 这与 Cleary 等<sup>[21]</sup>研究发现的 ScpB 能在多核白细胞结合区裂解趋化因子并能产生抗体的结论相吻合。通过预测我们可以确定, ScpB 蛋白为一个较大的抗原分子, 分子质量达 124 ku, 这也就意味着该蛋白抗原决定簇数目较多。但是, 由于抗原决定簇通常由几个氨基酸残基组成, 真正起免疫作用的可能只是部分氨基酸, 在确保整体蛋白有免疫作用的情况下, 下一步的工作是要确定其抗原表位的具体位置。另外, 通过对 ScpB 氨基酸序列同源性比较和进化树分析, 发现罗非鱼无乳链球菌的 ScpB 与人源的无乳链球菌 ScpB 亲缘关系较近, 这为判断罗非鱼 GBS 的来源提供了部分参考依据。

随着现代分子生物学技术的发展, 应用基因工程技术重组表达来获取高纯度保护性抗原重组蛋白作为疫苗, 是一个很好的发展方向。获得充足的重组蛋白的前提就是构建好重组表达载体。本研究中

我们选择 pET32a(+) 作为表达载体,因其带有能高效表达外源基因的 T7 启动子,带有短融合型的硫氧还蛋白(thioredoxin, Trx) 标签,该融合伴随蛋白能促使异源蛋白正确折叠,且对其活性影响较小。该表达载体还带有 6 个 His 标签。因一般蛋白质不具备连续组氨酸结构,因此,引入连续的 6 个组氨酸可使融合蛋白具有很高的特异性,可通过镍柱亲和层析快速纯化。大肠杆菌作为目前应用最广泛的原核表达系统,在表达目的蛋白时具有快速、高效、经济等优点<sup>[22]</sup>。本研究选择了与 pET 载体系统相匹配的,整合有 T7 RNA 聚合酶基因的大肠杆菌 BL21(DE3)。应用此设计,在试验中我们用 PCR 的方法扩增出目的片段,然后插入 pET32a(+) 中,构建成 pET32a(+)/scpB 融合表达质粒载体,并且使用了 EcoR I 和 Xho I 2 个限制性内切酶,保证了基因剪切及连接的方向性和特异性。

本研究成功构建了罗非鱼无乳链球菌的 scpB 基因全长 ORF 的重组表达质粒,为获得大量的 ScpB 蛋白进行免疫研究奠定了基础。并对推导的 ScpB 氨基酸序列进行比对预测分析,发现该蛋白具有较好的免疫原性,揭示了其疫苗研制的可行性,为 GBS 的分子生物学诊断和 ScpB 蛋白结合疫苗的研制提供了重要的信息。然而,本研究尚未对罗非鱼无乳链球菌的 ScpB 蛋白的免疫表位进行定位,因此,完整的 ScpB 蛋白能否有效地保护罗非鱼免受 GBS 的侵害,具体是哪一部分起保护作用,这将在我们后续的试验中予以证实。

## 参 考 文 献

- [1] 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.
- [2] MATA A I, GIBELLO A, CASAMAYOR A, et al. Multiplex PCR assay for detection of bacterial pathogens associated with warm-water streptococcosis in fish[J]. Appl Environ Microbiol, 2004, 70(5):3183-3187.
- [3] LUCIENNE G P, ERNST E M, PHILLIP K, et al. Evaluation on the pathogenesis of *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. Braz Arch Biol Technol, 2010, 53(1):87-92.
- [4] EVANS J J, KLESIOUS P H, GILBERT P M, et al. Characterization of  $\beta$ -hemolytic group B *Streptococcus agalactiae* in cultured sea bream (*Sparus auratus* L.) and wild mullet (*Liza klunzingeri*), in Kuwait [J]. J Fish Dis, 2002, 25:505-513.
- [5] EVANS J J, WIEDENMAYER A A, KLESIOUS P H, et al. Survival of *Streptococcus agalactiae* from frozen fish following natural and experimental infections [J]. Aquaculture, 2004, 233:15-21.
- [6] SUANYUK N, KONG F, KO D, et al. Occurrence of rare genotypes of *Streptococcus agalactiae* in cultured red tilapia (*Oreochromis* sp.) and Nile tilapia (*O. niloticus*) in Thailand relationship to human isolates [J]. Aquaculture, 2008, 284:35-40.
- [7] GUNNAR L, MARGARETHA S C, THOMAS A. Surface proteins of *Streptococcus agalactiae* and related proteins in other bacterial pathogens [J]. Clin Microbiol Rev, 2005(1):102-127.
- [8] HILL H R, BOHNASACK J F, MORRIS E Z, et al. Group B streptococci inhibit the chemo-tactic activity of the fifth component of complement [J]. J Immunol, 1988, 141:3551-3556.
- [9] BOHNASACK J F, MOLLISON K W, BUKO A M, et al. Group B streptococci inactivate complement component C5a by enzymic cleavage at the C-terminus [J]. Biochem J, 1991, 273(3):635-640.
- [10] BOHNASACK J F, ZHOU X N, WILLIAMS P A, et al. Purification of the proteinase from group B streptococci that inactivates human C5a [J]. Biochim Biophys Acta, 1991, 1079:222-228.
- [11] CHEN C C, CLEARY P P. Complete nucleotide sequence of the streptococcal C5a peptidase gene of *Streptococcus pyogenes* [J]. J Biol Chem, 1990, 265:3161-3167.
- [12] DENIZE M G, CIBELE B, VERONICA C G, et al. Effect of subinhibitory concentration of chlorhexidine on *Streptococcus agalactiae* virulence factor expression [J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2006, 28:143-146.
- [13] LAURENT M, IZABELA S, NICOLE M G, et al. Remodeling of the *Streptococcus agalactiae* transcriptome in response to growth temperature [J]. PLoS One, 2008(3):1-12.
- [14] QIAN Y, MENG Z, DEAN J H, et al. A proteomic investigation of *Streptococcus agalactiae* grown under conditions associated with neonatal exposure reveals the upregulation of the putative virulence factor C protein  $\beta$  antigen [J]. International Journal of Medical Microbiology, 2010, 300:331-337.
- [15] CHENG Q, STAFSLIEN D, PURUSHOTHAMAN S S, et al. The group B streptococcal C5a peptidase is both a specific protease and an invasin [J]. Infect Immun, 2002, 70(5):2408-2413.
- [16] BOHNASACK J F, ZHOU X N, GUSTIN J N, et al. Bacterial evasion of the antibody response: human IgG antibodies neutralize soluble but not bacteria-associated group B streptococcal C5a-ase [J]. J Infect Dis, 1992, 165:315-321.
- [17] CHENG Q, CARLSON B, PILLAI S, et al. Antibody against surface-bound C5a peptidase is opsonic and initiates macrophage killing of group B streptococcal [J]. Infect Immun, 2001, 69(4):2302-2308.
- [18] 王海东,王爱华,尹立琴,等. 新生儿血清 B 族链球菌表面蛋白



- ScpB 抗体检测[J]. 临床儿科杂志, 2010, 28(3): 233-236.
- [19] 于丽华, 沈叙庄. B 族链球菌疫苗的研究进展[J]. 国际儿科学杂志, 2007, 34(1): 43-46.
- [20] BROWN C K, GU Z Y, MATSUKA Y V, et al. Structure of the streptococcal cell wall C5a peptidase [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102: 18391-18396.
- [21] CLEARY P P, PRAHBU U, DALE J B, et al. Streptococcal C5a peptidase is a highly specific endopeptidase[J]. Infect Immun, 1992, 60: 5219-5223.
- [22] SWARTZ J R. Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2001, 12: 195-201.

## Cloning and construction of recombinant expression plasmid of C5a peptidase of *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia

LI Qing-yong<sup>1,2</sup> KE Xiao-li<sup>1</sup> LU Mai-xin<sup>1</sup> ZHU Hua-ping<sup>1</sup> GAO Feng-ying<sup>1</sup>

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

2. College of Fisheries & Life, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

**Abstract** *Streptococcus agalactiae* surface proteins can stimulate the host to produce protective immune. The protein C5a peptidase is widespread in a variety of serotypes of *Streptococcus* strains, highly conserved and has good immunogenicity. It is a possible carrier protein that could induce protective immune response by itself. However, the immune epitopes and the role of virulence groups of *S. agalactiae* *scpB* gene of fish is still unclear. In this study, the *scpB* gene was amplified from genome DNA of *S. agalactiae* isolated from tilapia by PCR with specific primers. Restriction analysis and DNA sequencing confirmed that the *scpB* gene has a ORF of 3 405 bp, encoding 1 134 amino acid, which was highly conserved and had a surprising degree of homology among strains isolated from other mammals. Molecular analysis of *scpB* gene was performed by bioinformatics tools such as DNASTar, Clustal X 2.0, MEGA 5.05, ExPASy ProtParam, NCBI Protein blast, and NCBI Conserved Domain et al. The results showed that the amino acid encoded by the *scpB* gene contained 3 catalytic triad, 7 putative active sites, 2 specific hits, and 4 super families (2 Peptidases-S8-S53, 1 DUF1034, and 1 FlgD-Ig). Moreover, it was found that C5a peptidase had multiple epitopes, suggesting that the protein may have strong immunogenicity. Then the PCR product was inserted into pET32a(+) and the constructed recombinant plasmid pET32a(+)/*scpB* was transformed to *E. coli* BL21(DE3) for expression. The positive colony, which were identified by PCR and digestion (*EcoR* I and *Xho* I), showed that the recombinant plasmid pET32a(+)/*scpB* was constructed successfully. This study paved the way for further study of immune mechanism and polypeptide vaccine based on C5a peptidase from the tilapia *S. agalactiae*.

**Key words** tilapia; *Streptococcus agalactiae*; C5a peptidase; cloning; recombinant expression plasmid