

# 猪丹毒丝菌 *spaA* 基因原核表达产物的免疫保护作用研究

席小燕<sup>1</sup>, 蔡巩林<sup>2</sup>, 刘博婷<sup>2</sup>, 许崇波<sup>2</sup>, 周迪<sup>2</sup>, 彭凌<sup>2\*</sup>

(1. 韶关学院医学院, 广东 韶关 512005; 2. 韶关学院生物与农业学院, 广东 韶关 512005)

**摘要:** 本研究利用原核表达系统表达猪丹毒丝菌 *spaA* 基因并鉴定表达产物的免疫保护作用。根据猪丹毒丝菌临床毒株 SG7 *spaA* 基因序列设计引物扩增无信号肽的 *spaA* 基因, 与表达载体 pGEX-4T-1 连接; 将测序鉴定正确的重组载体转化 BL21(DE3) 大肠杆菌细胞, 诱导表达后采用 SDS-PAGE 对表达产物进行鉴定; 经 GST 亲和层析柱纯化后的 *spaA* 蛋白免疫小鼠; 对免疫小鼠采用猪丹毒丝菌毒株进行攻毒, 统计小鼠死亡数, 计算免疫保护率。结果表明, 无信号肽的猪丹毒丝菌 *spaA* 基因成功插入表达载体 pGEX-4T-1, 并转化到 BL21(DE3) 大肠杆菌细胞, 经诱导后成功表达大小为 97 ku 目的蛋白。表达产物经纯化后免疫小鼠能激发机体的良好免疫, 对猪丹毒丝菌毒株的感染能提供完全保护, 结果可为猪丹毒 *spaA* 亚单位疫苗开发提供参考。

**关键词:** 猪丹毒丝菌; *spaA*; 原核表达; 免疫

中图分类号: S852

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2023)03-0079-04

## Study on Immunoprotection of Prokaryotic Expression Product of *SpaA* Gene of *Erysipelothrix rhusiopathiae*

XI Xiaoyan<sup>1</sup>, CAI Gonglin<sup>2</sup>, LIU Boting<sup>2</sup>, XU Chongbo<sup>2</sup>, ZHOU Di<sup>2</sup>, PENG Ling<sup>2\*</sup>

(1. Medical College, Shaoguan University, Shaoguan 512005; 2. Henry Fok College of Biology and Agriculture, Shaoguan University, Shaoguan 512005, China)

**Abstract:** In the study, the *spaA* gene was expressed in the prokaryotic expression system and the immunoprotective effects of the expressed products were identified. According to the *spaA* gene sequence of clinical isolates SG7 of *Erysipelothrix rhusiopathiae*, primers were designed to amplify the *spaA* gene without signal peptide, and then the *spaA* gene was connected to the expression vector pGEX-4T-1. The recombinant vector was transformed into BL21 (DE3) cells of *Escherichia coli*, and the expression product was identified by SDS-PAGE after induction. The mice were immunized with *spaA* protein purified by GST affinity chromatography. The immunized mice were challenged with *Erysipelothrix rhusiopathiae* strain, the death number of mice was counted, and the immune protection rate was calculated. The results showed that the *spaA* gene of *Erysipelothrix rhusiopathiae* without signal peptide was successfully inserted into the expression vector pGEX-4T-1, and the recombinant vector was transferred into BL21 (DE3) cells. The 97 ku target protein was successfully expressed after induction. The purified expression product could stimulate the good immune response of mice and provide complete protection against the infection of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. The results can provide a reference for the development of *Erysipelothrix rhusiopathiae spaA* subunit vaccine.

**Key words:** *Erysipelothrix rhusiopathiae*; *spaA*; Prokaryotic expression; Immune

猪丹毒丝菌 (*Erysipelothrix rhusiopathiae*) 引起

收稿日期: 2020-08-06

基金项目: 广东省自然科学基金项目(2017A030307041); 广东省科技创新战略专项资金-“攀登计划”专项资金项目(pdjh2020b0537)

作者简介: 席小燕(1980-), 女, 实验师, 主要从事动物病原微生物及分子生物学研究工作。

通讯作者: 彭凌, 男, 硕士, 教授, E-mail: 308668576@qq.com

的猪丹毒是一种热性、急性的传染病, 这种细菌的特点是没有鞭毛, 所以不会运动, 外表也没有荚膜, 能生活在酸性条件下。在感染猪丹毒丝菌后的病猪背部皮肤通常会生成紫红色方斑, 且通常带有高热、败血症、慢性关节炎等不良症状的出现<sup>[1-2]</sup>。猪丹毒能在人、禽类、家畜间相互传播<sup>[3]</sup>, 这不仅给猪类养殖户造成重大的经济损失, 还威胁到人类生命健康, 是不可忽视的问题<sup>[4-6]</sup>。

在全世界各个地区和国家,广泛散布猪丹毒,我国也曾是猪丹毒肆虐的国家之一。20世纪90年代后,对于猪丹毒病例的有关报道减少,一度以为该病已彻底消失。然而近年来我国沿海等多个地区仍出现猪丹毒,不时给当地农业经济造成不良影响<sup>[7]</sup>。抗生素是治疗猪丹毒丝菌这类革兰氏阳性菌的有效药物<sup>[8]</sup>,但过多采用抗生素治疗可能会使猪丹毒丝菌产生抗药性<sup>[9-10]</sup>,因而这不是最佳措施。通过注射疫苗形成相应抗体是防治猪丹毒最有效和最彻底的方式,常见疫苗有灭活菌疫苗和减毒活疫苗<sup>[11-12]</sup>。灭活菌疫苗在灭活过程中会出现部分抗原表位受破坏的现象,导致抗原性下降或丧失。减毒活疫苗是一种弱毒株,虽具有良好的抗原性,但存在毒性逆转或诱导隐性感染的风险,若隐性感染加深时,还会发展为慢性疾病,对机体构成一定危害,因而也不是最佳选择<sup>[13]</sup>。近年来,运用基因工程表达特定的抗原蛋白来制备亚单位疫苗具有产量高、安全、稳定等特点,是新型疫苗研究与发展的主攻方向<sup>[7]</sup>。

研究表明,猪丹毒丝菌表面存在一种蛋白对胰岛素敏感,且热稳定性良好,在与宿主细胞黏附的过程中有着重要的作用<sup>[14]</sup>,提示猪丹毒丝菌和宿主细胞间相互作用及毒性的产生与该蛋白有关联,且为保护性抗原<sup>[15-16]</sup>。将表面保护性抗原A(*spaA*)基因克隆至乳酸杆菌并将表达出的蛋白免疫小鼠体后,小鼠能抵抗猪丹毒丝菌的感染,这充分说明 *spaA* 蛋白作为疫苗所具有的免疫效果<sup>[17]</sup>。本研究为进一步探究 *spaA* 蛋白高效和稳定的表达形式,构建了缺失编码信号肽的 *spaA* 基因的融合表达载体,并以纯化的 *spaA* 重组蛋白(无信号肽)免疫小鼠后腹腔注射猪丹毒丝菌毒株,记录小鼠的生存状况以评估该重组蛋白免疫特性。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

猪丹毒丝菌 SG7 从广东某猪丹毒发病猪场分离获得( $LD_{50}$  为  $7.3 \times 10^3$  CFU)<sup>[18]</sup>;表达载体 pGEX-4T-1、大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、BL21(DE3)由韶关学院生物与农业学院分子生物学实验室保存;18~20 g 清洁级昆明小鼠由广东省医学实验动物中心提供。

### 1.2 试剂

限制性内切酶 *Bam*H I、*Sma* I 购自 NEB(北京)有限公司。T4 DNA 连接酶、质粒提取及 DNA 回收试剂盒、GST 琼脂糖、IPTG、2 $\times$ pfu PCR Mix

均购自上海生工。

### 1.3 猪丹毒丝菌 SG7 毒株 *spaA* 基因测序

按照 GenBank 中已发表的猪丹毒丝菌 *spaA* 基因序列(EF688017)设计合成一对引物:上游引物 SpaA-1: 5'-ATGAAAAAGAAAAACACC-3', 下游引物 SpaA-2: 5'-CTATTT TAAACTTCCAT CGT-3' 扩增猪丹毒丝菌 SG7 毒株 *spaA* 全基因,扩增产物由上海生工进行克隆测序。

### 1.4 表达载体的构建

根据上述测定猪丹毒丝菌 *spaA* 基因的 DNA 序列,并通过信号肽分析网站 SignalP 分析氨基酸序列,以推测该序列中信号肽的位置,并在引物设计时去除信号肽序列。设计得到上游引物序列为: 5'-CGCGGATCCGATTTCGACAGATATTTCTGT-3'; 下游引物序列为: 5'-TCCCCCGGGCTATTTAA ACTTCCATCGT-3' (下划线处分别表示引入的 *Bam*H I 和 *Sma* I 酶切位点),扩增产物大小 1 794 bp。PCR 扩增产物经 DNA 回收试剂盒回收后酶切并与同样酶切的载体 pGEX-4T-1 连接后转化感受态细胞 DH5 $\alpha$ ,涂布含氨苄青霉素的 LB 固体培养基,挑取阳性克隆进行测序鉴定。

### 1.5 重组蛋白质的表达与纯化

将测序鉴定正确的重组载体转化大肠杆菌感受态细胞 BL21(DE3),涂布含氨苄青霉素的 LB 固体培养基,挑取阳性克隆接种于含氨苄青霉素的 LB 液体培养基培养至菌体 OD<sub>600 nm</sub> 为 0.9 时,加入 IPTG 至终浓度 0.1 mmol/L,34 °C 诱导表达 6 h 后超声破碎菌体。经 GST 亲和层析柱纯化后 SDS-PAGE 对表达产物进行鉴定。

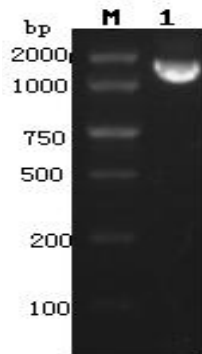
### 1.6 重组蛋白质的免疫保护实验

将 32 只体重 18~20 g 的小鼠随机分为 A、B、C、D 4 个组,8 只/组。A 组为对照组,B、C、D 3 组为免疫试验组,分别用 3 批次重组 SpaA 蛋白进行免疫。免疫程序如下:以 1:1 的比例将纯化收集的重组 SpaA 蛋白和弗氏完全佐剂进行完全乳化后,吸取 0.1 mL(含 50  $\mu$ g 重组 SpaA 蛋白)乳剂经背部皮下注射试验组小鼠<sup>[19]</sup>。14 d 后进行第二次免疫,用弗氏不完全佐剂乳化,免疫剂量与方法同第一次免疫,加强免疫 2 次,间隔 14 d。对照组以灭菌的生理盐水替代重组蛋白。第三次免疫 14 d 后,利用 100 倍  $LD_{50}$  猪丹毒丝菌 SG7 毒株对各组小鼠实施腹腔攻毒,连续观察 12 d 小鼠的生长情况,记录统计各组小鼠死亡数并计算出各组小鼠的免疫保护率。

## 2 结果与分析

### 2.1 *spaA* 基因 PCR 扩增及阳性克隆的鉴定

SG7 毒株 *spaA* 基因测序结果表明,基因全长 1 881 bp,为完整阅读框,与 GenBank 上已登录的猪丹毒丝菌 *spaA* 基因序列的同源性在 99% 以上。信号肽分析网站 SignalP 分析 *spaA* 蛋白氨基酸序列显示该蛋白 N 端 1-29 位氨基酸残基为信号肽序列。使用去除信号肽特异性引物扩增猪丹毒丝菌强毒株 SG7 *spaA* 基因,电泳后显示为一条带,位置在 1 000~2 000 bp,该结果与预期吻合(图 1)。该目的片段与 pGEX-4T-1 载体连接转化感受态细胞 DH5 $\alpha$ ,提取阳性克隆进行测序分析,测序结果与原序列一致,无突变,且阅读框正确,可用于表达。

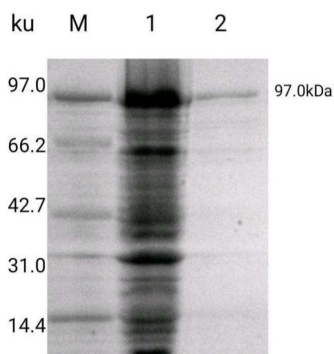


注:M为DNA Marker DL2000;1为 *spaA*

图1 猪丹毒丝菌 *spaA* 基因 PCR 扩增

### 2.2 重组蛋白质的表达与纯化

重组载体转化大肠杆菌 BL21(DE3)后经诱导,对表达产物进行 SDS-PAGE 鉴定,鉴定结果如图 2 所示。*spaA* 基因在大肠杆菌 BL21(DE3)表达成功,在预期的 97 ku 处出现目的蛋白,纯化后电泳检测蛋白条带主要为预期蛋白条带。



注:M为蛋白质 Marker;1为诱导的全菌体蛋白;2为纯化的重组 *spaA* 蛋白

图2 重组蛋白质的 SDS-PAGE 鉴定

### 2.3 动物试验分析

对照小鼠攻毒后均表现出感染病原菌的不良症状,且在攻毒 4 d 内已经全部死亡,脏器出现不同程度损伤,通过细菌分离能分离到攻毒细菌,免疫保护效果 0%;B、C、D 3 组免疫试验组小鼠虽在初期表现出些许不适,但未出现个体死亡情况,通过细菌分离未能分离到攻毒细菌,3 批次重组蛋白免疫保护效果均为 100%(表 1)。

表 1 免疫保护效果评价

组别	小鼠存活数(只)	攻毒细菌检测	保护率(%)
A	0	检出	0
B	8	未检出	100
C	8	未检出	100
D	8	未检出	100

## 3 讨论

猪丹毒是一种能在人与动物间传播的疾病,这种疾病已遍布世界各地,我国也曾经广泛流行过猪丹毒,尽管近年来鲜有报道,但猪丹毒仍然存在,尚未完全消除<sup>[20-21]</sup>。如前所述传统灭活菌疫苗和减毒活疫苗均存在一定的缺陷,利用抗原蛋白来制备亚单位疫苗是预防猪丹毒发生的最佳选择。研究表明,猪丹毒丝菌 *spaA* 蛋白作为抗原免疫动物后能抵抗猪丹毒丝菌毒株的致死攻击<sup>[22]</sup>。本研究为进一步完善 *spaA* 蛋白作为亚单位疫苗的生产 and 制备等过程,考虑到已有相关研究结果,使用缺乏信号肽切除机制的原核表达系统,若有信号肽存在,外源蛋白的表达会受到一定影响<sup>[23]</sup>。且由于信号肽存在大量疏水氨基酸残基,即使目的蛋白表达成功也会影响到蛋白质的可溶性和活性,所以应尽可能除去这段序列<sup>[24]</sup>。为此,本试验引物设计从 *spaA* 基因序列的第 88 位核苷酸开始以避免信号肽表达产生的不良影响。原核表达系统表达产物多,表达外源基因成熟稳定,所以采用大肠杆菌 BL21(DE3)和 pGEX-4T-1 融合表达 *spaA* 基因,用于生产可以降低成本也易于纯化。结果表明利用大肠杆菌表达系统高效稳定地表达了无信号肽的 *spaA* 蛋白,表达产物经纯化后免疫小鼠能激发机体的良好免疫,对猪丹毒丝菌毒株的感染能提供完全保护,可为猪丹毒 *spaA* 亚单位疫苗开发提供参考。

### 参考文献:

- [1] 张翼翥.猪丹毒病的流行病学、临床症状和防控措施[J].现代畜牧科技,2019(11):96-97.

- [ 2 ] Taya Forde, Roman Biek, Ruth Zadoks, et al. Genomic analysis of the multi-host pathogen *Erysipelothrix rhusiopathiae* reveals extensive recombination as well as the existence of three generalist clades with wide geographic distribution[J]. Biomedical Science, 2016, 17(1): 461.
- [ 3 ] Shen H G, Bender J S, Opriessnig T. Identification of surface protective antigen (*spa*) types in *Erysipelothrix reference* strains and diagnostic samples by *spa* multiplex real-time and conventional PCR assays[J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 109(4): 1227-1233.
- [ 4 ] 刘晓波. 猪丹毒丝菌保护性抗原筛选及鉴别诊断ELISA方法初步建立[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2015.
- [ 5 ] Ding Yi, Zhu Dongmei, Zhang Jianmin, et al. Virulence determinants, antimicrobial susceptibility, and molecular profiles of *Erysipelothrix rhusiopathiae* strains isolated from China[J]. Emerging microbes & infections, 2015, 4(11): e69.
- [ 6 ] 葛晨霞, 程晓辉, 董晓庆. 猪群健康保障的有效措施研究[J]. 吉林农业科学, 2011, 36(2): 54-56.
- [ 7 ] 王力波, 刘芳, 谢江, 等. 猪丹毒丝菌不同年代分离菌株流行病学特征及部分生物学特性比较研究[J]. 中国兽医学报, 2016, 36(3): 423-430.
- [ 8 ] 王恩林. 猪丹毒的预防与治疗[J]. 畜牧兽医科技信息, 2019(3): 107.
- [ 9 ] 冯建远, 吴廷瑛, 郭旋, 等. 广西规模化猪场呼吸道病原菌调查及耐药性分析[J]. 中国猪业, 2020, 15(2): 66-69.
- [ 10 ] 梅冬林, 张云影, 赵岭乐, 等. 吉林省安全肉猪生产对策[J]. 吉林农业科学, 2004, 29(4): 48-50.
- [ 11 ] 陈章, 刘晓露, 姚焱彬, 等. 猪丹毒丝菌灭活疫苗制备及其对小鼠免疫效力的评价[J]. 西北农业学报, 2019, 28(6): 877-887.
- [ 12 ] 王千菊, 陈坚, 巫月生, 等. 一株猪丹毒杆菌的分离鉴定及其对活疫苗免疫猪的攻毒试验[J]. 广东畜牧兽医科技, 2014, 39(2): 29-33.
- [ 13 ] 姚焱彬, 陆萍, 杨志鹏, 等. 猪丹毒丝菌 *SpaA* 基因原核表达及表达蛋白质的免疫原性分析[J]. 畜牧兽医学报, 2017, 48(3): 492-500.
- [ 14 ] Takahashi T, Hirayama N, Sawada T, et al. Correlation between adherence of *Erysipelothrix rhusiopathiae* strains of serovar 1a to tissue culture cells originated from porcine kidney and their pathogenicity in mice and swine. [J]. Veterinary Microbiology, 1987, 13(1): 57-64.
- [ 15 ] Makino S, Yamamoto K, Murakami S, et al. Properties of repeat domain found in a novel protective antigen, SpaA, of *Erysipelothrix rhusiopathiae*[J]. Microbial Pathogenesis, 1998, 25: 101-109.
- [ 16 ] Ho To, Nagai S. Genetic and Antigenic Diversity of the Surface Protective Antigen Proteins of *Erysipelothrix rhusiopathiae* [J]. Clinical and Vaccine Immunology, 2007, 14(7): 813-820.
- [ 17 ] Cheun H I, Kawamoto K, Hiramatsu M, et al. Protective immunity of SpaA-antigen producing lactococcus lactis against *Erysipelothrix rhusiopathiae* infection[J]. Journal of Applied Microbiology, 2004, 96(6): 1347-1353.
- [ 18 ] 周迪, 杨旭夫, 彭凌. 红斑丹毒丝菌的分离鉴定及药敏试验[J]. 动物医学进展, 2020, 41(2): 33-38.
- [ 19 ] 王斌, 赵云霞, 江魁, 等. 弗氏佐剂乳化抗原不同注射体积与小鼠鼓包结痂形成及免疫原性的关系[J]. 畜牧兽医学(电子版), 2020(11): 4-6.
- [ 20 ] 吾鲁木汗·那孜尔别克, 刘祝祥, 李科, 等. 猪丹毒丝菌 C43311 株 *spaA* 基因 N 端免疫保护区的克隆和表达[J]. 微生物学报, 2008(2): 207-212.
- [ 21 ] 王宗升, 吕宁宁, 张翔. 猪丹毒疫病防控将成为猪场免疫新常态[J]. 猪业科学, 2019, 36(7): 96.
- [ 22 ] 蒋志琼, 钟泽民, 谭博敏, 等. 丹毒丝菌 *SpaA* 基因免疫保护区的克隆及其在毕赤酵母中的表达[J]. 华南农业大学学报, 2015, 36(3): 20-25.
- [ 23 ] 赵慧, 郑文岭, 马文丽. 信号肽对外源蛋白分泌效率的影响[J]. 生物学杂志, 2003, 20(5): 177-179.
- [ 24 ] 赵庆亮. 嗜吞噬细胞无形体 *msp2*、*msp4* 蛋白的原核表达及免疫原性研究[D]. 石河子: 石河子大学, 2014.

(责任编辑:王昱)

(上接第 61 页)

- [ 10 ] 白耀博, 陈学进, 凤舞剑, 等. 徐州地区草莓灰霉病菌对腐霉利的抗药性研究[J]. 东北农业科学, 2017, 42(1): 31-33.
- [ 11 ] 闫佳会. 25 g/L 咯菌腈悬浮种衣剂防治小麦根腐病田间药效试验[J]. 青海农林科技, 2019(1): 71-73.
- [ 12 ] 张博, 刘苹, 张悦丽, 等. 几种生物制剂对小麦根腐病菌的毒力[J]. 麦类作物学报, 2018, 38(3): 366-371.
- [ 13 ] 孙炳剑, 袁虹霞, 邢小萍, 等. 不同种子处理剂对小麦全蚀病的防治效果[J]. 麦类作物学报, 2008, 28(4): 711.
- [ 14 ] 刘金晶. 一种安全高效小麦种衣剂的研制[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2015.
- [ 15 ] 季明东, 陆长婴, 徐润成. 腈菌唑防治小麦病害的效果[J]. 江苏农业科学, 1994(4): 39-40, 55.
- [ 16 ] 张荣昌. 小麦品种资源对根腐病的抗源筛选与利用[J]. 作物研究, 1995, 9(3): 27-28.

(责任编辑:王昱)