

# 变形链球菌表面蛋白抗原(PAc)的 A 区和 P 区融合共表达、纯化及抗原性研究<sup>\*</sup>

李富祥<sup>1,2</sup>, 杜小刚<sup>1</sup>, 毕保良<sup>3</sup>, 张以芳<sup>1</sup>, 马 岚<sup>4</sup>

(1. 云南农业大学 动物科学技术学院, 云南 昆明 650201; 2. 云南省热带亚热带动物病毒病重点实验室, 云南 昆明 650224; 3. 云南农业大学 科技处, 云南 昆明 650201; 4. 云南大学 单克隆抗体工程技术中心, 云南 昆明 650091)

**摘要:**变形链球菌(*Streptococcus mutans*)是引起人类龋齿的主要致病菌,其表面蛋白(PAc)是龋齿疫苗研究的主要对象.在该研究中,变形链球菌 *pac* 基因的功能 A 区和 P 区经 PCR 扩增后,以连接链 Gly<sub>4</sub>SerGly<sub>4</sub> 连接,并克隆至 pET32a 质粒中构建成 pET32a-A-P 重组表达载体,经 IPTG 诱导表达后,表达产物 A-P 重组蛋白(rA-P 蛋白)经饱和硫酸铵沉淀、镍亲和层析、疏水层析、离子交换层析纯化,其纯度明显提高,可达 96% 以上.rA-P 蛋白再经过肠激酶切除质粒融合标签和经镍亲和层析纯化后,获得 rsA-P 目的蛋白,其分子质量为 80 ku 左右,纯度可达 98% 以上.Western blot 结果表明,目的蛋白 rsA-P 与鼠抗 *S. mutans* MT8148 菌血清以及鼠抗 rsA-P 蛋白血清发生较好的免疫反应.因此,rsA-P 目的蛋白具有 PAc 的 A 区和 P 区抗原性的完整性,为变形链球菌龋齿基因工程亚单位疫苗的研制奠定基础.

**关键词:**变形链球菌;PAc;重组蛋白;龋齿

**中图分类号:**R 392.11 **文献标识码:**A **文章编号:**0258-7971(2008)06-0625-05

变形链球菌(*S. mutans*)是引起人类龋齿的主要致病菌,其表面蛋白 PAc(Cell surface protein antigen, PAc)又称为表面抗原 SA(Surface antigen),Ag I / II, P1, Pag, SpaA, SpaP 等,含有 1 500~1 566 个氨基酸残基<sup>[1]</sup>,分子质量约为 180~210 ku. Brady 等<sup>[2]</sup>根据变链菌表面蛋白的初级结构将其氨基酸序列分为 1 个信号肽区(aa1~38),2 个保守区(A 区(aa186~464)和 P 区(aa840~963)),V 区(aa679~823),1 个壁跨区(aa1 486~1 535)和一个跨膜区(aa1 536~1 556).其中 A 区富含丙氨酸,含有 82 个氨基酸残基的重复序列,呈  $\alpha$ -螺旋状,属于粘附功能区,与唾液糖蛋白具有高度的亲合力;P 区富含脯氨酸,表现为高度疏水性,呈暴露状,形成伸展状态的  $\beta$ -片层结构,含有丰富的 T, B 淋巴细胞粘附表位,其近 N 端对人具有很好的免疫原性<sup>[3]</sup>. PAc 是致龋变链菌主要的毒力因子之一,在细菌对牙面的初始粘附中起重要作用,并具有良好的免疫原性,可诱导机体的保护性免疫应答,且与人心脏组织无交叉反应<sup>[4]</sup>,克服了变链菌全菌疫苗与人心肌的共同抗原诱发心脏组织交叉反应抗体而导致心肌损害,诱发风湿性心脏病和风湿性关节炎的不足.另外,PAc 还能诱导细胞免疫应答,它能诱导机体单核细胞、齿髓细胞和牙周周围膜细胞产生 INF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 等细胞因子并促进其释放<sup>[5]</sup>.研究表明用从变链菌培养物中提取的 PAc 主动免疫和用抗 PAc 单抗被动免疫能抵抗变链菌引起的龋齿<sup>[6~8]</sup>.因此,PAc 成为龋齿疫苗研究的主要对象<sup>[9]</sup>.目前,PAc 的不同功能区的表达和纯化已有报道,但表达量不高,所纯化的重组蛋白纯度不高,难以得到大量高纯度的重组蛋白,限制了龋齿基因工程亚单位疫苗的研究.基于 PAc 的 A 区和 P 区的重要免疫学功能,本研究

\* 收稿日期:2008-03-15

基金项目:国家发改委生物技术产业化专项基金资助(计高技[2002]1454号).

作者简介:李富祥(1979- ),男,云南人,硕士,助理研究员,主要从事微生物与免疫学方面的研究.

通讯作者:马 岚,女,副教授,硕士生导师,主要从事动物细胞工程、抗体工程技术方面的研究,E-mail:mamilan@vip.sina.com.

将 *pac* 基因的 A 区和 P 区联合高效表达和纯化制备 A-P 重组蛋白(recombinant A-P protein, rA-P), 为重组 rA-P 目的蛋白的免疫学功能和龋齿亚单位疫苗研究提供参考.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 *E. coli* DH5a, BL2(DE3) 菌株和 pET32a 质粒均由云南大学单克隆抗体工程技术中心保存; 变链菌 MT8148 为日本分离 C 型强毒株, 由武汉大学口腔医学院樊明文教授惠赠.

1.1.2 主要试剂 *Taq* 酶, DNA Ligation 试剂盒, 限制性核酸内切酶 *Kpn* I, *Bam*H I 及 *Sal* I 均为 TaKaRa 产品; IPTG 为 BBI 产品; 氨苄青霉素(AMP)、DAB 为 Sigma 产品; 福氏完全佐剂(FCA)和福氏不完全佐剂(FIA)为 Gibco 产品; 重组肠激酶试剂盒为 Merck 产品; HRP-标记的羊抗鼠 IgG 和蛋白质分子量 Marker 为 Pierce 产品; Chelating-Sepharose, Phenyl Sepharose, HiTrap Q Sepharose 层析填料为 GE Healthcare 产品; 小量质粒柱式提取试剂盒、小量基因组提取试剂盒和 DNA 纯化用试剂盒为上海华舜公司产品; 其他化学试剂均为分析纯以上级别.

### 1.2 方法

1.2.1 pET32a-A-P 原核表达载体的构建 根据 MT8148 菌 *pac* 基因序列(GeneBank 登录号为 X14490)以及 pET32a 多克隆位点, 设计合成 4 条引物.

片段 A 区扩增引物:

Af: 5' - GGGGTACCGACGACGACGACAAGGTTAAAACACCTGAAGAAGCAGTCC - 3', 下划线部分为 *Kpn* I 酶切位点, 虚下划线部分为 enterokinase 位点.

Ar: 5' - TCCACCTCCACCGGATCCACCTCCACCTTTTGATATTTGGCAAGATCTGC - 3', 斜体部分为 Gly<sub>4</sub>SerGly<sub>4</sub> 连接链用于连接 A, P 基因, 下划线部分为 *Bam*H I 酶切位点.

片段 P 区扩增引物:

Pf: 5' - GGTGGAGGTGGATCCGGTGGAGGTGGAGTTAATGTTTCCTAAAGTTACTAAG - 3' 斜体部分为 Gly<sub>4</sub>SerGly<sub>4</sub> 连接链, 下划线部分为 *Bam*H I 酶切位点.

Pr: 5' - TTCCGCGGCCGCTATGGCCGACGTCGACCTAGAAATGAACAGTTGGATCAGATGG - 3', 下划线部分为 *Sal* I 酶切位点, 下划波浪线部分为终止密码子.

以提取变链菌 DNA 为模板, 扩增 *pac* 基因的 A 区和 P 区, PCR 反应条件均为: 94 °C 预变性 10 min, 加入 *Taq* DNA 聚合酶后 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 进行 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min. 扩增的 A, P 两基因片段用限制性核酸内切酶 *Bam*H I 酶切并纯化后, 用 DNA Ligation 试剂盒连接成 A-P 基因融合片段. 再以 *Kpn* I 和 *Sal* I 酶切后定向克隆到 pET32a 质粒中, 并对插入片段进行序列测定和 PCR(Af 和 Pr 为引物)及酶切鉴定, 构建成表达载体 pET32a-A-P<sup>[10]</sup>.

1.2.2 pET32a-A-P 诱导表达及纯化和鉴定 pET32a-A-P 重组质粒转化 *E. coli* BL21(DE3) 表达菌株, 于 100 μg/mL AMP-LB 液体培养基 37 °C 培养至对数中期, 加入终浓度为 2 mmol/L IPTG 诱导表达, 收集菌体沉淀, 超声破碎细菌(rA-P 蛋白以可溶形式表达并分泌于大肠杆菌周质空间), 依次用 20% 饱和硫酸铵沉淀(Saturated Ammonium Sulfate)→镍离子亲和层析(Chelating Separose)→疏水层析(Phenyl Sepharose)→阴离子交换层析(Hitrap Q sepharose)纯化 rA-P 蛋白, SDS-PAGE 分析结果.

1.2.3 肠激酶切割 rA-P 蛋白及纯化和鉴定 经 1.2.2 纯化的 rA-P 蛋白用肠激酶切除融合标签获得 rsA-P 目的蛋白(20 mL rA-P 蛋白溶液中加入 1 mL 稀释的肠激酶溶液, 20 °C 水浴酶切 48 h), SDS-PAGE 分析酶切结果. 并用镍离子亲和层析纯化酶切 rsA-P 蛋白, SDS-PAGE 分析纯化结果.

1.2.4 小鼠抗 rsA-P, MT8148 抗血清的制备 rsA-P 蛋白以 0.1 mg/只的剂量免疫 4 只 Balb/c 鼠(6 周龄), 首次免疫以 FCA 与 rsA-P 混匀进行皮下多点免疫, 以后每间隔 10 d, 以同样剂量 rsA-P 蛋白与 FIA 混匀后皮下免疫, 共免疫 4 次, 末次免疫 10 d 后, 鼠眼眶采血分离制备 rsA-P 抗血清. 以同样方法制

备 MT8148 菌抗血清,免疫剂量为每只鼠  $4 \times 10^7$  个变链菌,菌悬液直接免疫<sup>[12]</sup>.

1.1.5 Western blot 检测 rsA-P 蛋白 经 1.2.3 纯化的 rsA-P 目的蛋白 SDS-PAGE 电泳后,电转移至醋酸纤维素膜(NC 膜)上,NC 膜经含 5%脱脂奶的 Tris 缓冲液封闭后,分别加入稀释的 rsA-P 抗血清和 MT8148 菌抗血清与 rsA-P 蛋白反应,再加入 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 与之反应,DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 底物液显色.

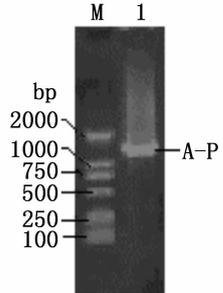
## 2 结果

2.1 pET32a-A-P 表达载体构建和鉴定 以 pET32a-A-P 重组质粒为模板,Af 和 Pr 为引物 PCR 扩增 A-P 基因,扩增片段大小在 1 000~2 000 bp 之间,与 A-P 片段预期的理论值 1 536 bp 相符(图 1).且插入片段的序列测定结果表明,A-P 融合基因序列稳定,重组表达质粒构建正确.

2.2 rA-P 蛋白的表达、纯化和鉴定 pET32a-A-P 经 IPTG 诱导表达后,SDS-PAGE 分析有明显的 97 ku 重组蛋白条带,而 pET32a,BL21 菌经 IPTG 诱导后无明显的相应蛋白条带,表明此条带为特异性条带(见图 2),经分析 rA-P 重组蛋白表达量占菌体总蛋白量的 30%.诱导表达的 rA-P 蛋白经硫酸铵分级沉淀、镍离子亲和层析、疏水层析、阴离子交换层析纯化后,纯度有明显提高:40%(20%饱和硫酸铵沉淀)→60%(镍离子亲和层析)→80%(疏水层析)→96%(阴离子交换层析),见图 3,4.

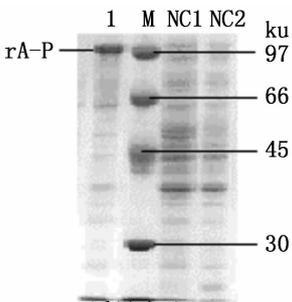
2.3 肠激酶切割 rA-P 蛋白的纯化和鉴定 纯化的 rA-P 蛋白经肠激酶切除融合标签,并经镍离子亲和层析纯化后,即得到 rsA-P 目的蛋白,见图 5.结果表明,rA-P 的 Mr 为 97 ku 左右,酶切后得到 Mr 分别为 80 ku 和 17.4 ku 的 2 个蛋白质,其中 80 ku 的蛋白即为 rsA-P 目的蛋白,其 Mr 值与理论值 74.7 基本一致,表明 rsA-P 的构建是成功的.纯化后的 rsA-P 蛋白纯度可达 98%,见图 6.

2.4 Western blot 检测 rsA-P 目的蛋白 rsA-P 蛋白经 SDS-PAGE 电泳后电转移至 NC 膜上,分别与鼠抗 MT8148 血清和鼠抗 rsA-P 蛋白血清进行 western blot 检测(图 7),结果表明纯化的 rsA-P 目的蛋白具有较高的抗原性,与 MT8148 菌抗血清和 rsA-P 抗血清均发生特异性的免疫反应.



1:A-P 融合片段 PCR 产物;M:DNA Marker  
图 1 重组载体 pET32a-A-P 的 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳分析

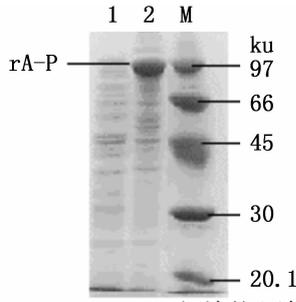
Fig.1 Analysis of PCR product for recombinant vector pET32a-A-P by agarose gel electrophoresis



1:rA-P 诱导表达;  
NC1:BL21 菌诱导表达;  
NC2:pET32a 诱导表达;  
M:标准蛋白

图 2 rA-P 蛋白的诱导表达

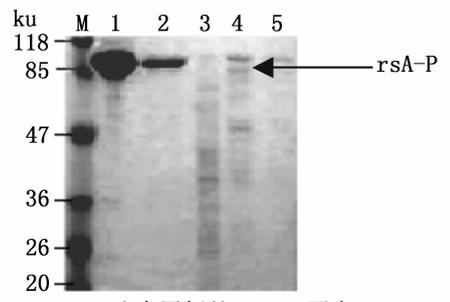
Fig.2 rA-P protein expressed in *E. coli*



1:20% SAS 沉淀的上清;  
2:20% SAS 沉淀的 rA-P 蛋白;  
M:标准蛋白

图 3 饱和硫酸铵沉淀纯化 rA-P 蛋白

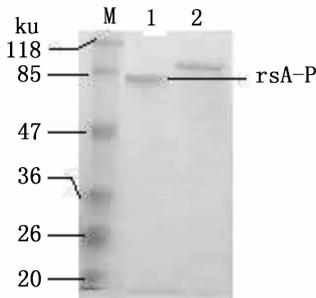
Fig.3 rA-P protein purified by SAS



1:疏水层析的 rA-P 蛋白;  
2:阴离子交换层的 rA-P 蛋白;  
3~5:不同级杂蛋白峰;  
M:标准蛋白

图 4 不同层析纯化 rA-P 蛋白

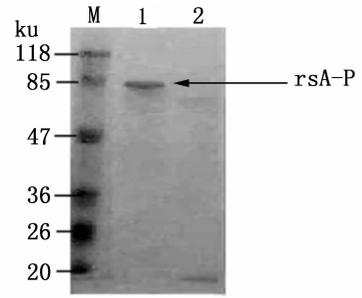
Fig.4 rA-P protein purified by different chromatography



1:酶切后的 rA-P 蛋白;2:酶切前 rA-P 蛋白;  
M:标准蛋白

图 5 肠激酶切 rA-P 蛋白分析

Fig. 5 Analysis of rA-P protein digested by enterokinase



1:纯化的 rsA-P 蛋白;2:杂蛋白洗脱峰;  
M:标准蛋白

图 6 镍离子亲和层析纯化 rsA-P 目的蛋白分析

Fig. 6 Purification and electrophoresis analysis of rsA-P protein digested by enterokinase

### 3 讨论

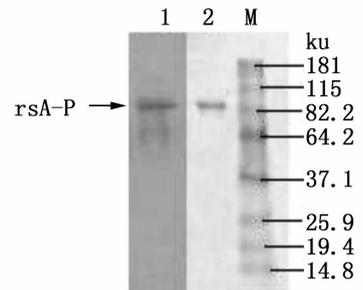
构建的 pET32a-A-P 重组表达载体经鉴定,其基因序列正确,稳定遗传.转化大肠杆菌 BL21(DE3)经 IPTG 诱导表达和 SDS-PAGE 检测分析,获得分子质量约为 97 ku 的蛋白条带,而 BL21 菌和 pET32a 诱导后均无该蛋白表达.因此,该条带为特异 rA-P 蛋白.本研究通过改变 IPTG 的浓度(1~5 mmol/L)、诱导表达的温度(30,35,37,42 °C)和诱导表达时间(1~5 h)确定 pET32a-A-P 重组质粒最佳诱导表达条件为 30 °C,2 mmol/L IPTG 诱导表达 5 h,其表达量可达到 30%.

rA-P 重组蛋白是一个融合蛋白,其分子质量为 97 ku,从 N 端到 C 端依次含有:融合标签(153aa)、肠激酶位点(5aa)、A 区(344aa)、Gly<sub>4</sub>SerGly<sub>4</sub> 连接区(9aa,具有柔韧性,不影响其连接的 A、P 区的正确折叠)、P 区(168aa).经分析,rA-P 蛋白以可溶性蛋白形式表达并分泌定位于大肠杆菌周质空间.在周质空间中形成二硫键并折叠成正确的空间构像,并以有活性的可溶状态存在,又由于周质空间的蛋白酶水解活性较低,因此分泌到周质空间的蛋白更加稳定,这有利于其活性的保持和分离纯化.分泌表达最大的优点是表达的外源蛋白活性较高且便于纯化,无须进行重新折叠复性等复杂的处理过程,同时可避免细菌蛋白酶的降解,降低外源蛋白对宿主细胞的毒性作用,但其产量一般低于包涵体形式的表达.

rA-P 蛋白经硫酸铵沉淀、镍亲和层析、疏水层析、离子交换层析纯化后,可获得较高含量的 rA-P 蛋白,其质量分数达到 96% 左右.rA-P 蛋白经肠激酶切除融合标签和纯化后,获得 rsA-P 目的蛋白.rsA-P 目的蛋白经 MT8148 菌抗血清和 rA-P 蛋白抗血清的 Western blot 分析,rsA-P 蛋白对 PAc 抗原的 A 区和 P 区抗原性有较好的保持.为下一步以 PAc 为基础的研究奠定了良好的基础,也为不同蛋白功能区的联合研究提供了理论指导.

### 参考文献:

- [1] JENKINSON H F, DEMUTH D R. Structure, function and immunogenicity of streptococcal antigen I // polypeptides[J]. Mol Microbiol, 1997, 23(2): 183-190.
- [2] BRADY L J, CROWLEY P J, MA JK Brady LJ, et al. Restriction fragment length polymorphisms and sequence variation within the *spaP* gene of *Streptococcus mutans* serotype c isolates[J]. Infect Immun, 1991, 59(5): 1 803-1 810.
- [3] TAKAHASHI I, OKAHASHI N, SASAKAWA C, et al. Homology between surface protein antigen gene of *Streptococcus so-*



1:与 MT8148 菌抗血清反应;  
2:与 rsA-P 抗血清反应;  
M:标准蛋白

图 7 Western blot 分析 rsA-P 目的蛋白

Fig. 7 Analysis of target rsA-P protein by western blot

- brinus* and *Streptococcus mutans* [J]. FEBS Lett, 1989, 249(2): 383-388.
- [4] WU H Y, RUSSELL M W. Immunological cross-reactivity between *Streptococcus mutans* and human heart tissue examined by cross-immunization experiments [J]. Infect Immun, 1990, 58(11): 3 545-3 452.
- [5] MARC ENGELS-DEUTSCH, ANNE LISE PINI, YOSHIHISA YAMASHITA, et al. Insertional inactivation of *pac* and *rmlB* genes reduces the release of tumor necrosis factor alpha, interleukin-6, and interleukin-8 induced by *Streptococcus mutans* in monocytic, dental pulp, and periodontal ligament cells [J]. Infection and Immunity, 2003, 5 169-5 177.
- [6] KATZ J, RUSSELL M W, HARMON C C, et al. Induction of salivary IgA responses to *Streptococcus mutans* antigen I / II after intranasal immunization [J]. Adv Exp Med Biol, 1995, 371B: 1 153-1 156.
- [7] LEHNER T, RUSSELL M W, CALDWELL, J et al. Immunization with purified protein antigens from *Streptococcus mutans* against dental caries in rhesus monkeys [J]. Infect Immun, 1981, 34(2): 407-415.
- [8] MA J K, HUNJAN M, SMITH R, et al. An investigation into the mechanism of protection by local passive immunization with monoclonal antibodies against *Streptococcus mutans* [J]. Infect Immun, 1990, 58: 3 407-3 414.
- [9] ZHANG P, JESPERGAARD C, LAMBERTY-MALLORY L, et al. Enhanced immunogenicity of a genetic chimeric protein consisting of two virulence antigens of *Streptococcus mutans* and protection against infection [J]. Infect Immun. 2002, 70: 6 779-6 787.
- [10] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南 [M]. 3 版. 黄培堂, 译. 北京: 科学出版社, 2002.
- [11] 奥斯伯 F, 布伦特 R, 金斯顿 R E, 等. 精编分子生物学实验指南 [M]. 颜子颖, 王海林, 译. 北京: 科学出版社, 1999.
- [12] 吕琦, 张爱玲, 王泽华, 等. 抗盐酸克伦特罗单抗克隆抗体的制备和鉴定 [J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2006, 28(1): 88-92.

## Research on the fusion, co-expression, purification and antigenicity to functional A and P region of surface protein antigen(PAc) of *Streptococcus mutans*

LI Fu-xiang<sup>1,2</sup>, DU Xiao-gang<sup>1</sup>, BI Bao-liang<sup>3</sup>, ZHANG Yi-fang<sup>1</sup>, MA Lan<sup>4</sup>

(1. College of Animal Science, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;

2. Yunnan Province Tropical and Subtropical Animal Virus Disease Laboratory, Kunming 650224, China;

3. Division of Science & Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;

4. Monoclonal Antibody Technology Center, Yunnan University, Kunming 650091, China)

**Abstract:** *Streptococcus mutans* is the major pathogen causing dental caries for human, which its surface protein antigen(PAc) is widely researched as vaccine for dental caries. The functional A & P region of *pac* gene of *Streptococcus mutans* were amplified by PCR and linked by 3' terminal of A region and 5' terminal of P region with a linker encoding a flexible peptide Gly<sub>4</sub>SerGly<sub>4</sub>, and the recombinant expression vector pET32a-A-P was constructed by inserting the A-P functional gene into pET32a vector. After induced with IPTG, the products, recombinant A-P protein (rA-P), were purified through four steps, including saturated ammonium sulfate (SAS), Nickel affinity chromatography, hydrophobic chromatography and ion exchange chromatography, and its purity was up to 96%. Furthermore, the target rsA-P protein, which its Mr was about 80 ku and its purity was up to 98%, was prepared by digesting rA-P with enterokinase to cleavage the fusion tag and being purified by nickel affinity chromatography. And rsA-P protein reacted with high strong specificity to two antisera against *Streptococcus mutans* MT8148 and rsA-P protein, which were derived from mice. Therefore, the target rsA-P protein, showed the antigenic integrity for the functional A & P region of PAc, and was provided to research on genetic subunit vaccine of dental caries to *Streptococcus mutans*.

**Key words:** *Streptococcus mutans*; PAc; recombinant protein; dental caries