

• 短篇论著 •

双歧杆菌表达肠致病性大肠埃希菌 EspA 蛋白的体外研究

余治健, 李多云, 徐俊, 刘晓军, 邓名贵, 潘伟光, 郑金鑫, 陈重, 邓启文*

广东医学院附属深圳市南山区人民医院感染科, 深圳市内源性感染诊治重点实验室, 广东 深圳 518052

摘要:目的 构建肠致病性大肠埃希菌(*Enteropathogenic E.coli*, EPEC) EspA 蛋白双歧杆菌表达重组菌株, 并验证蛋白表达。方法 采用常规 PCR 扩增 EspA 片段, 体外构建重组质粒 pBAD-EspA, 转化大肠杆菌 BL21 感受态细胞培养, 挑取单克隆提取质粒, 双酶切和 PCR 对重组质粒鉴定。pBAD-EspA 电转化长双歧杆菌感受态细胞, 挑取阳性克隆并 PCR 鉴定, 经木聚糖诱导表达, 蛋白质印迹试验(Western blot)分析验证 EspA 蛋白在双歧杆菌中的表达。结果 经酶切后琼脂糖凝胶电泳及测序结果证明 pBAD-EspA 重组质粒构建成功。pBAD-EspA 重组质粒转化双歧杆菌后经阿拉伯糖诱导, 在诱导表达不同时间点菌液沉淀均有良好的蛋白表达。结论 体外成功构建表达 EPEC EspA 蛋白的长双歧杆菌, 为制备 ESPA 口服疫苗提供科学依据。

关键词: 肠致病性大肠埃希菌; EspA 基因; 双歧杆菌; 蛋白诱导表达**中图分类号:** R378.21 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-9727(2014)8-993-03Research on the *in vitro* expression of *Enteropathogenic E. coli* EspA protein in *Bifidobacteria*

YU Zhi-jian, LI Duo-yun, XU Jun, LIU Xiao-jun, DENG Ming-gui, PAN Wei-guang, ZHENG Jin-xin, CHEN Zhong, DENG Qi-wen

Department of Infectious Diseases, Affiliated Nanshan People's Hospital of Guangdong Medical College, Shenzhen, Guangdong 518052, China

Corresponding author: DENG Qi-wen, E-mail: qiwendeng@hotmail.com

Abstract: **Objective** To construct the expression vector of *Enteropathogenic E. coli* (EPEC) EspA gene and identify the induced expression of EspA protein in *Bifidobacteria*. **Methods** The EspA gene fragment was amplified and the recombinant plasmid pBAD-EspA was constructed *in vitro*, then were transformed it the BL21 competent bacteria. The positive bacteria cells was picked and verified by PCR. The expression of EspA protein in *Bifidobacteria* was induced by arabinose *in vitro* and detected by western blotting. **Results** The recombinant plasmid pBAD-EspA was successfully constructed and demonstrated by agarose gel electrophoresis and DNA sequencing. The expression of EspA protein in *Bifidobacteria* induced by arabinose was demonstrated by western blotting *in vitro*. **Conclusion** The recombinant *Bifidobacteria* expressing EspA protein was constructed *in vitro*.

Key words: EPEC; EspA gene; *Bifidobacteria*; Protein induced expression

肠致病性大肠杆菌(*Enteropathogenic E.coli*, EPEC)感染是一种严重危害儿童健康的肠道传染病, EPEC 主要通过黏附和脱落损伤(Attaching and effacing injury, A/E injury, 即 A/E 损伤)导致肠黏膜损伤, 目前尚无疫苗应用于该细菌感染的预防^[1-2]。在 EPEC 的 A/E 损伤启动过程中, 早期起核心作用的是 EspA, EspB, EspD 蛋白形成的“鞘样”转导管连接菌体和宿主细胞, 因此 EspA, EspB, EspD 蛋白在 EPEC 早期黏附过程中起关键作用, 靶向这些蛋白阻断 EPEC 致病一直是研究热点^[3-5]。目前已有靶向 EspA 蛋白阻断 EPEC 感染上皮细胞的研究报道; 同时 EspA 具有较好的抗原活性, 提示通过 EspA 抗体或作为免疫原可能是阻断 EPEC 侵袭上皮细胞的潜在策略; 由于 EspA 蛋

白在 EPEC 致 A/E 损伤过程中起着至关重要的作用, 同时该蛋白具有良好的免疫源性, 在细菌的黏附和定植中起着关键作用, 可能作为候选免疫原制备 EPEC 疫苗^[6-8]。双歧杆菌是重要肠道益生菌, 近年已有通过双歧杆菌肠道调控表达蛋白制备免疫调节剂或疫苗的研究报道, 为探讨双歧杆菌表达 EPEC 的 EspA 蛋白功能特点及制备 EspA 口服疫苗的可能性, 本文构建和验证双歧杆菌 EspA 蛋白的体外诱导表达研究^[9-10]。

1 材料与方法

1.1 pBAD-EspA 重组质粒构建 采用常规 PCR 从 1 株 EPEC 菌株(PID: PRJNA186398)的基因组 DNA 中扩增 EspA 基因, 两端加 BamHI 和 XhoI 酶切位点, 同

基金项目: 国家自然科学基金项目(NO.81170370); 深圳市科技创新委员会项目(No.201202173, 201203211)**作者简介:** 余治健(1979~), 男, 博士, 副主任医师, 研究方向: 肠道细菌免疫及细菌变异。***通讯作者:** 邓启文, E-mail: qiwendeng@hotmail.com

时在最外侧加CG和GG保护性碱基,以提高酶切效率。XhoI和BamHI双酶切EspA基因和pBAD-gIII质粒,产物大小分别为580bp(EspA-XhoI and BamHI)和5.4kb(pBAD-XhoI and BamHI)。将EspA基因和pBAD质粒重组连接,将重组质粒pBAD-EspA转化入BL21感受态细菌培养。采用质粒提取试剂盒(E.Z.N.A.[®] Plasmid Mini Kit I)提取重组质粒,严格按照说明书进行操作。XhoI和BamHI双酶切提取的重组质粒,并经琼脂糖凝胶电泳和测序鉴定。

1.2 pBAD-EspA转化长双歧杆菌诱导表达及鉴定 长双歧杆菌(ATCC 15707)在含0.05%L-半胱氨酸的MRS培养基中培养,采用37℃厌氧环境培养。根据文献描述方法制备双歧杆菌感受态细菌^[9],将pBAD-EspA和pBAD-gIII质粒电转化双歧杆菌,转化后的感受态涂于MRS平板中筛选(含氨苄西林100mg/mL)。36h后挑取阳性克隆放入MRS液中震荡厌氧培养(含氨苄西林100mg/mL),次日收集0.15mL OD600的菌液接种于15mL MRS培养基并置于37℃培养3h,另取部分用于提取双歧杆菌质粒酶切鉴定。加L-阿拉伯糖(0.01, 0.05, 0.1% w/v)用于刺激EspA在双歧杆菌菌体中的表达。经过6~12h的刺激培养后离心,取菌体裂解离心后上清液置于-20℃保存 Western blotting分析蛋白表达水平。

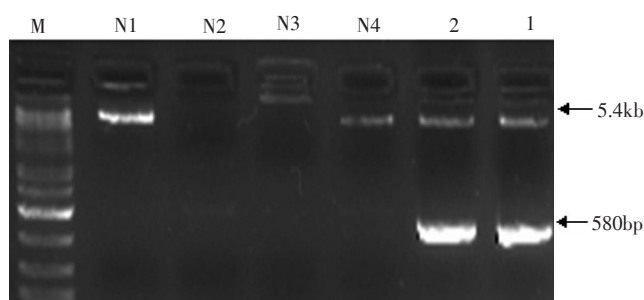
1.3 Western blotting分析EspA蛋白 用菌体裂解液离心后上清液冰上解冻15min,加入10mL的native Lysis Buffer重悬沉淀。冰上孵育30min,每10min温和混匀一次。14 000g 4℃离心30min,保留上清。取5μL的上清,细菌裂解物上清液中的蛋白质通过SDS-PAGE和电转染到硝酸纤维素膜上做蛋白印记分析而分离。重组EspA蛋白用免疫印迹法测定。小鼠抗人HA单克隆抗体(preproTech)作为一抗(1:1 000),采用ECL试剂盒检测纤维膜上的蛋白表达。

2 结果

2.1 pBAD-EspA重组质粒 pBAD-EspA重组质粒经XhoI和BamHI双酶切后,琼脂糖凝胶电泳结果见图1。pBAD-EspA重组质粒经酶切后,产生了2条明亮的条带,大小与设计相符,分别约为580bp(EspA-XhoI and BamHI)和5.4kb(pBAD-XhoI and BamHI)。EspA测序结果提示其序列与EPEC菌株(PID: PRJ-NA186398)中对应序列一致(测序图略)。

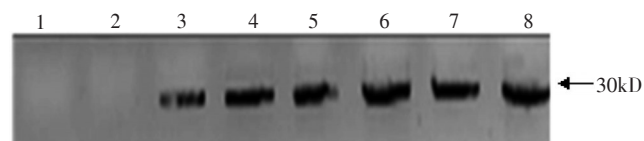
2.2 EspA基因诱导表达及鉴定结果 双歧杆菌pBAD-EspA质粒诱导表达及鉴定结果见图2。pBAD-EspA重组质粒经L-阿拉伯糖诱导后获得了高表达。如图2所示,在诱导表达不同时间点,在6h和12h培养后菌体裂解液离心上清中均有良好的表

达。而阴性对照则无任何表达条带。



M: DNA分子marker, DL15000(TAKARA); N1和N3为空白质粒酶切对照, N2为完全空白对照; 1和2为大肠杆菌和双歧杆菌pBAD-EspA质粒BamHI/XhoI酶切电泳图。

图1 酶切鉴定pBAD-EspA凝胶电泳图



1,2为阴性对照; 3,4,5为6h上清蛋白表达; 7,8,9为12h菌体裂解液离心上清蛋白表达。

图2 pBAD-EspA表达western blotting

3 讨论

利用双歧杆菌作为载体或宿主菌表达一些特定功能的蛋白或多肽制备口服疫苗及恶性肿瘤基因治疗已经成为生物医药领域的研究热点之一。有研究将双歧杆菌经尾静脉途径注射于鼠肿瘤模型表明双歧杆菌能显著抑制瘤组织快速增长;长型双歧杆菌(*B.longum*)静脉注射能选择性地使肿瘤组织缺氧区生长繁殖并抑制肿瘤的生长^[10]。近年来的研究已表明双歧杆菌是安全的肿瘤靶向治疗的新型载体之一,主要应用于大肠杆菌表达系统,由于宿主差异性这些质粒在双歧杆菌中表达有一定限制,表达效果并不理想,本研究通过体外成功构建了含有EspA基因重组质粒,并经L-阿拉伯糖诱导后获得了高表达蛋白产物,这一结果为进行制备表达EspA蛋白双歧杆菌的应用奠定基础^[9]。由于EspA是EPEC转导管形成的关键蛋白,目前已有多项研究证明阻断EspA蛋白的功能活性可望沉默或降低EPEC的致病性,本研究证实通过体外可制备诱导EspA蛋白表达的双歧杆菌,该双歧杆菌可望成为阻断EPEC致腹泻的有效方法,但其效果仍有待后续的体内功能研究进一步证实。

参考文献

- [1] Amisano G, Fornasero S, Migliaretti G, et al. Diarrheagenic *Escherichia coli* in acute gastroenteritis in infants in North-West Italy[J]. New Microbiol, 2011, 34(1):45-51.
- [2] Garmendia J, Frankel G, Crepin VF. Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infections: Translocation, Translocation, Translocation[J]. Infect Immun, 2005, 73(5):2573-2585.

脑病发展为严重的进行性痴呆,多数因恶病质而死亡。目前尚无特效治疗,饮食治疗能减少内源性毒性代谢产物的产生。推荐高蛋白、高碳水化合物、低脂肪饮食。高碳水化合物饮食能代偿受损的糖异生,减少脂肪分解。主要药物治疗包括各种维生素和辅助因子,补充辅酶Q₁₀可增加呼吸链的功能,清除由于呼吸链功能障碍产生的活性氧簇(ROS),对抗氧化应激反应,改善MELAS患者的病情,包括神经系统体征以及血和脑脊液乳酸、丙酮酸浓度。核黄素对累及脂质代谢患者疗效较好,ATP补充能量,联合肉碱、多种维生素长期治疗,能激活丙酮酸脱氢酶,促进有氧氧化,可使MELAS患者幻听、幻视等症状消失,并改善患者不耐受疲劳的状态。如血清肌酶谱明显升高或组织病理学检查发现脂肪堆积者,则可选用皮质激素治疗。运动及感染可加重乳酸中毒,可用NaHCO₃治疗;癫痫治疗药物首选卡马西平类,应避免使用干扰呼吸链药物如丙戊酸钠、巴比妥类、四环素、氯霉素等^[7]。

MELAS综合征临床表现复杂多样,远期预后差,死亡率较高,故早期诊断及积极治疗,对于改善患者整体预后具有重要的临床意义。应掌握该病的诊断要点,在今后的工作中不断积累总结,对该病的诊断

必须与临床、神经影像学、病理、基因检测相结合,才能作出正确诊断。

参考文献

- [1] 袁云.线粒体脑肌病伴高乳酸血症和卒中发作的临床研究进展[J].中华神经科杂志,2007,40(11):775-776.
- [2] Iizuka T,Sakai F,Suzuki N,et al.Neuronal hyperexcitability in stroke-like episodes of MELAS syndrome[J].Neurology,2002,59(6):816-824.
- [3] Bruce A,Robert K,et al.Chronical treatment of mitochondrial disease patients with dichloroacetate[J].Molecular genetics and metabolism,2004,83(1):138.
- [4] 周君霞,张淑芳,逯军.少儿MELAS综合征临床、影像、病理和基因分析[J].实用医学杂志,2013,29(20):3382-3384.
- [5] Iizuka T,Sakai F.Pathogenesis of stroke-like episodes in MELAS:analysis of neurovascular cellular mechanisms[J].Curr Neurovasc Res,2005,2(1):29-45.
- [6] Kaufmann P,Shungu DC,Sano MC,et al.Cerebral lactic acidosis correlates with neurological impairment in MELAS[J].Neurology,2004,62(8):1297-1302.
- [7] 吴洵昶,朱国行,王晋扬,等.以癫痫持续状态起病的线粒体脑肌病合并乳酸血症与脑卒中样发作的临床特征分析[J].中国临床神经科学,2012,20(1):37-42.

收稿日期:2014-06-11 编辑:史金端

(上接第994页)

- [3] Guttman JA, Li Y, Wickham ME, et al. Attaching and effacing pathogen-induced tight junction disruption *in vivo* [J]. Cell Microbiol, 2006, 8(4):634-645.
- [4] Luo W, Donnenberg MS. Analysis of the function of enteropathogenic *Escherichia coli* EspB by random mutagenesis[J]. Infect Immun, 2006, 74(2):810-820.
- [5] Hartland EL, Daniell SJ, Delahay RM, et al. The type III protein translocation system of enteropathogenic *Escherichia coli* involves EspA-EspB protein interactions[J]. Mol Microbiol, 2000, 35(6):1483-1492.
- [6] Singh MP1, Shaw RK, Knutton S, et al. Identification of amino acid residues within the N-terminal domain of EspA that play a role in EspA filament biogenesis and function[J]. J Bacteriol, 2008, 190(6):2221-2226.
- [7] La Ragione RM1, Patel S, Maddison B, et al. Recombinant anti-EspA antibodies block *Escherichia coli* O157:H7-induced attaching and effacing lesions in vitro[J]. Microbes Infect, 2006, 8(2):426-433.
- [8] Kühne SA1, Hawes WS, La Ragione RM, et al. Isolation of recombinant antibodies against EspA and intimin of *Escherichia coli* O157:H7[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(7):2966-2976.
- [9] Yu Zhijian, Huang Zhen, Sao Chongwen, et al. Oral immunization of mice using *Bifidobacterium longum* expressing VP1 protein from enterovirus 71[J]. Arch Virol. 2013;158(5):1071-1077.
- [10] Fujimori M, Amano J, Taniguchi S. The genus *Bifidobacterium* for cancer gene therapy[J]. Curr Opin Drug Discov Devel, 2002, 5:200-203.

收稿日期:2014-04-16 编辑:符式刚