

重组大肠埃希菌外膜蛋白 OmpT 的载体构建和表达条件优化及多克隆抗体制备

刘祥, 俱雄, 陈春琳

(陕西理工学院生物科学与工程学院, 陕西 汉中 723001)

摘要: 通过分子克隆, 获得了 OmpT 蛋白的表达菌株; 利用切胶纯化, 获得了 OmpT 蛋白。用 OmpT 蛋白免疫小鼠, 制备多克隆抗体, 采用 ELISA 法检测抗体滴度为 1 1 600, 用 Western Blotting 法检测抗血清特异性较好。采用正交试验, 获得 OmpT 菌株的适宜表达条件为诱导菌液 $OD_{600\text{nm}}$ 为 1.0, IPTG 添加终浓度为 0.3 mmol/L, 诱导时间为 8 h, 诱导温度 32 °C; 适宜培养条件为葡萄糖质量分数 0%, 转速 230 r/min, 装液量 50 mL。

关键词: 大肠埃希菌; 外膜蛋白 OmpT; 多克隆抗体

中图分类号: Q816 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2015)04-0350-06

Construction, expression condition optimization and polyclonal antibody preparation for recombinant vector of OmpT, an *Escherichia coli*

Liu Xiang, Ju Xiong, Chen Chunlin

(College of Biological Sciences and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong, Shaanxi 723001, China)

Abstract: OmpT, a major outer membrane protein of *Escherichia coli*, had a good prospect in vaccine development for its better immune detection. The expression strain of OmpT was obtained employing molecular clone technology and purified using gel slices approach, and the polyclonal antibody was prepared from immunized mice. The antibody titer tested by ELISA approach was 1 1 600, and the antiserum tested by Western Blotting method had good specificity. From the results of orthogonal experiment, the optimal condition for inducing expression of OmpT protein were 1.0 $OD_{600\text{nm}}$ value of strain, 0.3 mmol/L final concentration of IPTG, 8 h of inducing time and maintaining temperature in 32 °C; The optimal cultural condition for glucose concentration, rotation rate, and medium volume were 0%, 230 r/min and 50 mL, respectively. These work provided a ground for industrial fermentation, protein function and vaccine development of OmpT.

Keywords: *Escherichia coli*; OmpT protein; polyclonal antibody

大肠埃希菌(*Escherichia coli*)广泛存在于自然环境中, 按其致病机理可分为产肠毒素性、肠道侵袭性、肠道致病性、肠集聚黏附性和肠出血性5种^[1], 可引起人畜共患病^[2], 包括腹泻^[3]、脑膜炎^[4]、尿道感染^[5]、食物中毒^[6]等; 由其导致的奶牛乳房炎发病率呈逐年上升趋势, 给奶制品生产及品质带来重大影响^[7-8]。大肠埃希菌外膜蛋白酶 T(outer

membrane protease T, OmpT)位于细菌外膜, 是大肠埃希菌的主要毒力相关因子之一^[9], 可提高细菌抵抗宿主免疫系统的能力^[10-11], 也是细菌进入中枢神经的黏附因子^[4], 并介导细菌在尿路上皮细胞的定植^[12]。此外, OmpT具有很高的免疫原性, 能有效提高小鼠对致病性大肠埃希菌的免疫抵抗能力^[13], 所以, OmpT有望成为候选的蛋白亚单位疫苗。本

研究中利用分子克隆方法获得大肠埃希菌 OmpT 蛋白表达菌株；纯化 OmpT 蛋白，免疫小鼠，制备小鼠 OmpT 抗血清；通过正交试验确定 OmpT 适宜的表达条件与培养条件，旨在为 OmpT 工业发酵与疫苗开发提供参考。

1 材料与amp方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

E. coli K12 菌株、*E. coli* DH5a 菌株、*E. coli* BL21 菌株和 pET-32a 质粒均由陕西理工学院生物化学与分子生物学实验室保存。

1.1.2 主要试剂

DNA 聚合酶、连接酶及内切酶购于大连宝生生物工程公司；质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒均购于上海生物工程有限公司；IPTG 购于 BBI 公司；二抗购于 Sigma 公司，基因测序在北京奥科鼎盛生物科技有限公司进行。引物由北京奥科鼎盛生物科技有限公司合成。其他试剂均为国产，分析纯。

1.2 方法

1.2.1 重组载体的构建

依据 GenBank 数据库公布的 *E. coli* K12 的全基因组序列设计 *ompT* 基因引物。引物序列为 Sense Primer(5'-tgaggatccatgcggcgcaaacctc tg-3') 和 Anti-sense Primer(5'-gctctcgaagttaaaatgtgtactta ag-3')(下划线分别表示限制性内切酶的位点 *Bam*H I 和 *Xho* I)。PCR 反应体系(25 μ L)：PCR 缓冲液 2.5 μ L，10 mmol/L dNTP 2 μ L，25 μ mol/L 引物各 1 μ L，模板 DNA 10 μ L，*Taq* 酶 0.2 μ L，补水至 25 μ L。PCR 循环参数：94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min，然后进行 30 个循环(94 $^{\circ}$ C 变性 45 s，55 $^{\circ}$ C 退火 45 s，72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s)，最后 72 $^{\circ}$ C 充分延伸 10 min，4 $^{\circ}$ C 保温。用 PCR 产物和 pET-32a 质粒载体进行双酶切，用连接酶连接后转化 *E. coli* DH5a，并对重组质粒进行双酶切和测序鉴定，最后将重组质粒转化 *E. coli* BL21 表达菌株，进行 OmpT 表达^[14]检测。

1.2.2 重组蛋白的表达检测与纯化

选取经鉴定后的重组菌接入 LB(Amp) 液体培养基中过夜培养，以 1 : 100 转接到新鲜 LB 培养基中，待 $OD_{600\text{ nm}}$ 约为 0.5 时，加入终浓度 0.5 mmol/L 的 IPTG，37 $^{\circ}$ C 诱导 5 h，收集菌体，用蛋白电泳检测 OmpT 表达情况。利用 SDS-PAGE 电泳方法^[15]对 OmpT 进行蛋白纯化。

1.2.3 小鼠多克隆抗体制备

将每只昆明鼠免疫 OmpT 蛋白 50 μ g，第 1 次采用弗氏完全佐剂，免疫 14 d 后进行第 2 次免疫，第 2 次免疫 7 d 后，进行第 3 次免疫。第 3 次免疫 7 d 后于小鼠眼部取血，将血清置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中过夜析出，离心取上清，-80 $^{\circ}$ C 冰箱中保存备用^[15]。

1.2.4 蛋白抗体的效价与特异性检测

用 ELISA 法检测抗血清效价，主要步骤为：将 OmpT 蛋白溶解至 0.05 μ g/ μ L，在对应的 96 孔板中加入 100 μ L 抗原，37 $^{\circ}$ C 孵育 3 h；倒空液体，清洗 3 次，加入 300 μ L 封闭液，37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h，加 100 μ L 不同稀释度小鼠抗血清(每种稀释度均有 3 个重复)，37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min；充分洗涤后加入 100 μ L 二抗(1 : 3 000 稀释)，37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min；充分洗涤后，每孔加入 50 μ L 底物 A 与 50 μ L 底物 B 的混合液，37 $^{\circ}$ C 避光显色 10 min，迅速加入终止液，酶标仪^[16]450 nm 读数。

采用 Western blotting 方法检测 OmpT 小鼠抗血清特异性^[17]，主要步骤为：将大肠埃希菌过夜培养，收集菌体，SDS-PAGE 蛋白电泳，转 NC 膜，加入不同稀释度的小鼠抗血清(对照加入阴性抗血清)，洗涤后，加入二抗(1 : 3 000 稀释)孵育，洗涤后 DAB 显色。

1.2.5 OmpT 蛋白氨基酸序列系统进化树

利用 NCBI 数据库中已公布的细菌 OmpT 氨基酸序列，通过 MEGA5.02 软件进行聚类分析，并采用 Neighbour-Joining 方法^[14]构建系统发生树。

1.2.6 重组蛋白诱导表达条件的优化

选用 $L_9(3^4)$ 正交试验确定蛋白诱导表达的适宜条件。正交试验分为培养条件与蛋白诱导表达条件两部分^[18]，试验的因子与水平见表 1 和表 2。

表 1 表达菌株培养条件正交试验的因子与水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiment for cultural condition of strain expression

因子	代号	水平		
		1	2	3
葡萄糖质量分数(%)	a	0	0.4	1
转速(r/min)	b	180	200	230
装液量(mL)	c	50	75	100

表 2 蛋白诱导条件正交试验的因子与水平

Table 2 Factors and levels of orthogonal experiment for protein induced condition

因子	代号	水平		
		1	2	3
加 IPTG 菌 $OD_{600\text{nm}}$ 值	e	0.5	0.8	1
IPTG 终浓度(mmol/L)	f	0.1	0.3	0.5
诱导时间(h)	g	3	8	12
诱导温度($^{\circ}\text{C}$)	h	28	32	37

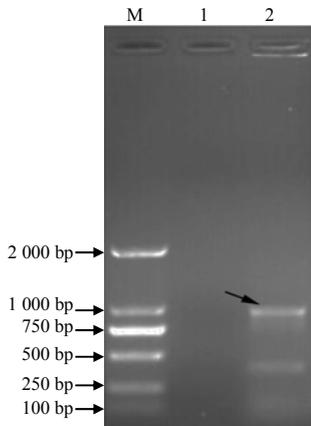
OmpT表达菌株培养条件优化的正交试验：将重组菌株置于LB(Amp)液体培养基中过夜培养，以1:100(体积)转接入新鲜培养基，按照正交试验模型要求培养，并记录所得菌液的 $OD_{600\text{nm}}$

OmpT表达菌株诱导条件优化的正交试验：根据表达菌适宜培养条件试验结果，依照正交试验模型要求的不同条件培养至合适 $OD_{600\text{nm}}$ ，加入不同终浓度的IPTG诱导相应时间。分别吸取1 mL菌液离心，将沉淀加入200 μL 的2 \times SDS 上样缓冲液中，沸水煮样，并上样10 μL 进行SDS-PAGE电泳。使用Phoretix 1D软件对获得的蛋白电泳条带进行光密度分析。

2 结果与分析

2.1 重组载体的构建结果

从大肠埃希菌基因组中PCR扩增到约1 000 bp的片段，片段大小与预期大小一致(图1)。将由PCR

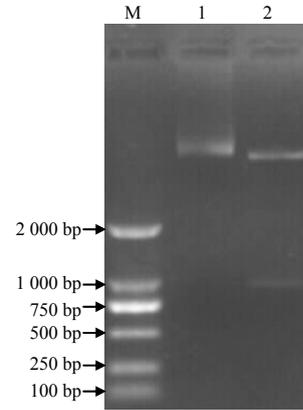


M DNA marker ; 1 阴性对照 ; 2 *ompT* 基因。

图1 大肠埃希菌*ompT*基因的PCR扩增电泳结果

Fig.1 PCR amplification electrophoresis of *E. coli ompT* gene

扩增得到的目的基因与pET-32a质粒进行双酶切，通过连接酶连接转化DH5a菌株，提取重组质粒，双酶切，获得约1 000 bp的片段，片段大小与预测大小一致(图2)。基因测序结果表明，构建的*ompT*基因的序列与NCBI公布的序列相同，证明重组质粒克隆成功。



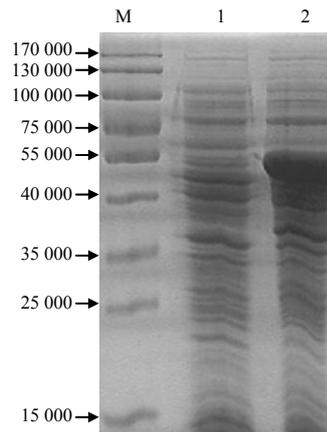
M DNA marker ; 1 重组质粒 ; 2 重组质粒双酶切。

图2 重组质粒的双酶切结果

Fig.2 Results of recombinant plasmid digested by restriction enzyme

2.2 重组蛋白的表达与纯化结果

为检测重组蛋白的表达情况，将重组菌株经IPTG诱导，蛋白电泳获得相对分子质量约56 000的蛋白条带，其中包含约35 000的OmpT蛋白和20 400的融合蛋白标签，其大小与预期大小一致；采用SDS-PAGE蛋白电泳切胶纯化获得的OmpT蛋白如图3所示。



M Protein Marker ; 1 未诱导菌株 ; 2 IPTG诱导菌株 ; 3 OmpT蛋白纯化。

图3 OmpT蛋白的表达与纯化电泳图谱

Fig.3 Expression and purification electrophoresis of OmpT protein

2.3 小鼠抗血清效价与特异性检测结果

对获得的小鼠OmpT抗血清采用ELISA法检

测，发现其抗体效价可以达到 1 : 1 600(图4)。Western blotting 方法的分析结果表明，不同稀释度 OmpT 抗血清出现明显条带，而对照无对应条带(图 5)，表明 OmpT 抗血清可与 OmpT 蛋白特异性结合，OmpT 蛋白小鼠多克隆抗体被成功制备。

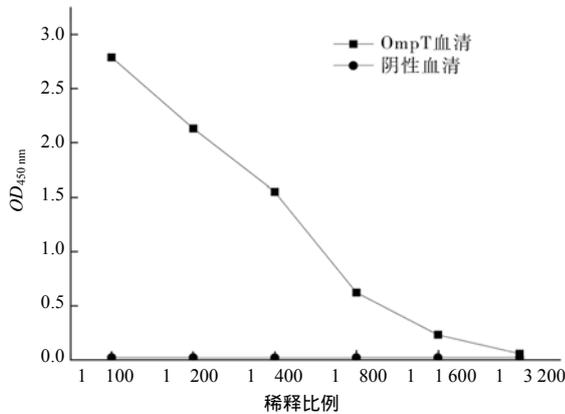
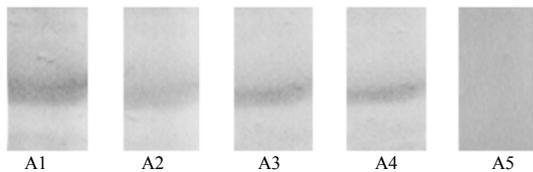


图 4 OmpT 多克隆抗体效价的测定结果

Fig.4 Polyclonal antibody titer of the OmpT



A1 1 : 200 稀释的抗血清; A2 1 : 400 稀释的抗血清; A3 1 : 800 稀释的抗血清; A4 1 : 1 600 稀释的抗血清; A5 1 : 200 稀释的阴性对照血清。

图 5 OmpT 多克隆抗体特异性的 Western blotting 检测结果

Fig.5 Specificity of OmpT polyclonal antibody identification using Western blotting

2.4 OmpT 蛋白氨基酸序列系统进化分析

由图6可见，不同种大肠埃希菌有聚在一起的趋势，间接说明 OmpT 蛋白在不同种大肠埃希菌间具有同源性，可能存在交叉的免疫保护作用。

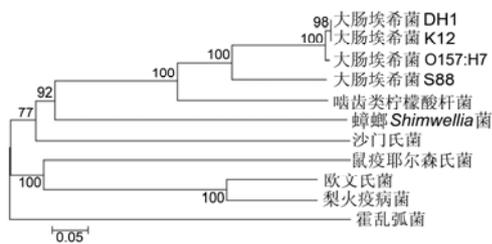


图 6 OmpT 氨基酸序列系统进化树

Fig.6 Phylogenetic tree from OmpT amino acid sequences

2.5 重组菌株的诱导表达

2.5.1 菌株最适培养条件的正交试验结果

由正交试验结果(表3)的极差值(表4)可以看出，

各因子对表达菌株生长的影响从大到小依次为培养基装液量、葡萄糖浓度、转速。由极差分析获得的表达菌培养的最优组合为 a₁b₃c₁(葡萄糖浓度为 0，转速为 230 r/min，培养基装液量为 50 mL)。表 5 方差分析结果显示，葡萄糖浓度、转速及装液量对表达菌株培养的影响达到显著水平。

表 3 表达菌株的培养结果

Table 3 Results of the cultural experiment for strain expression

试验号	OD _{600 nm}
a ₁ b ₁ c ₁	1.863±0.011
a ₁ b ₂ c ₂	1.698±0.004
a ₁ b ₃ c ₃	1.651±0.021
a ₂ b ₁ c ₂	1.558±0.007
a ₂ b ₂ c ₃	1.515±0.033
a ₂ b ₃ c ₁	1.808±0.026
a ₃ b ₁ c ₃	1.467±0.011
a ₃ b ₂ c ₁	1.679±0.007
a ₃ b ₃ c ₂	1.620±0.008

表 4 表达菌株培养条件的极差分析结果

Table 4 Range results of cultural condition for strain expression

项目	a	b	c
均值 1	1.737	1.630	1.783
均值 2	1.627	1.633	1.625
均值 3	1.589	1.693	1.544
极差	0.149	0.063	0.239

表 5 表达菌株不同培养条件下 OD_{600 nm} 的方差分析结果

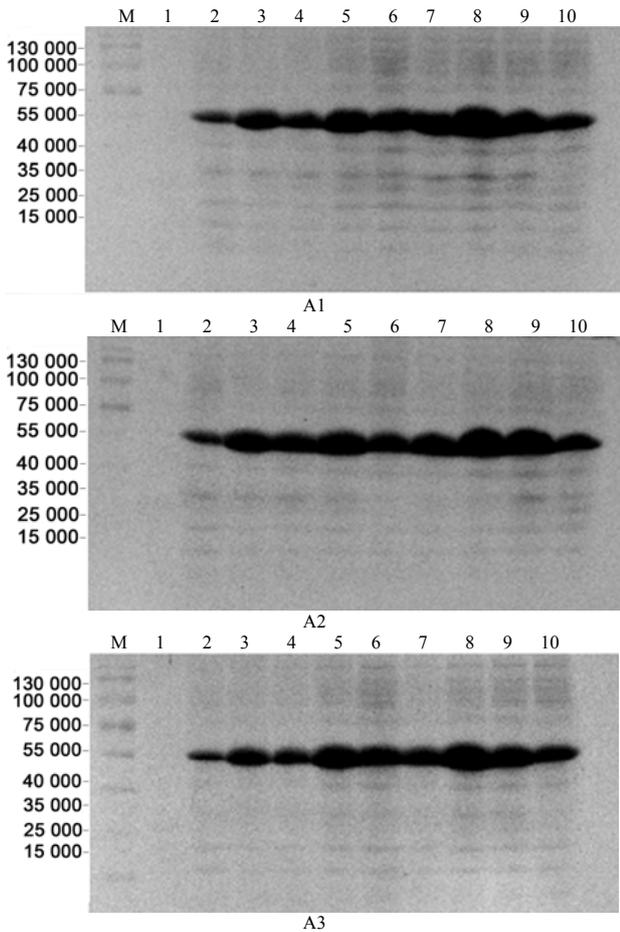
Table 5 Variance analysis of cultural condition for strain expression

因子	均方根	F	P
a	0.055	115.423	0.001
b	0.013	26.732	0.002
c	0.134	282.306	0.001

2.5.2 OmpT 蛋白适宜诱导表达条件的正交试验结果

将正交试验获得的表达菌株进行 SDS-PAGE 电泳(图7)，用 Phoretix 1D 软件分析电泳条带图谱，获得蛋白条带的光密度值如表 6 所示。由表 7 中的极差分析结果可知，各因子对 OmpT 蛋白诱导表达的影响从大到小依次为诱导温度、IPTG 诱导时菌体 OD_{600 nm}、IPTG 诱导终浓度、诱导时间。由极差分析获得最适宜 OmpT 蛋白表达的组为 e₃f₂g₂h₂(加 IPTG 诱导菌液的 OD_{600 nm} 为 1.0，IPTG 终浓度为 0.3 mmol/L，诱导时间为 8 h，诱导温度为 32 °C)。表 8 中的方差分析结果显示，加 IPTG 菌液浓度、IPTG

诱导浓度及诱导温度3个因子对OmpT蛋白表达的影响达到显著水平。



A1、A2、A3表示3次重复试验；M Protein marker；1、2、3的诱导时间均为3 h，诱导温度分别为28、32、37℃；4、5、6的诱导时间均为8 h，诱导温度分别为28、32、37℃；7、8、9的诱导时间均为12 h，诱导温度分别为28、32、37℃。

图7 正交试验获得的 OmpT 表达菌株 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig.7 SDS-PAGE electrophoresis of OmpT strain expression from orthogonal experiment

表6 OmpT 蛋白表达各试验的光密度值

Table 6 Value of optical density from different expression experiments of OmpT protein

试验号	光密度值 ($\times 10^4$)
e ₁ f ₁ g ₁ h ₁	2.576±0.322
e ₁ f ₂ g ₂ h ₂	4.960±0.084
e ₁ f ₃ g ₃ h ₃	3.750±0.467
e ₂ f ₁ g ₂ h ₃	5.815±0.481
e ₂ f ₂ g ₃ h ₁	4.804±0.160
e ₂ f ₃ g ₁ h ₂	5.440±0.325
e ₃ f ₁ g ₃ h ₂	6.208±0.165
e ₃ f ₂ g ₁ h ₃	5.894±0.291
e ₃ f ₃ g ₂ h ₁	4.057±0.153

表7 OmpT 蛋白表达各试验光密度值的极差分析结果

Table 7 Range analysis on the value of optical density from different expression experiments of OmpT protein

项目	极差			
	e ($\times 10^4$)	f ($\times 10^4$)	g ($\times 10^4$)	h ($\times 10^4$)
均值 1	3.762	4.866	4.637	3.812
均值 2	5.353	5.220	4.944	5.536
均值 3	5.386	4.415	4.920	5.153
极差	1.624	0.804	0.307	1.724

表8 OmpT 蛋白表达各因子光密度值的方差分析结果

Table 8 Variance analysis on the value of optical density from different expression experiments of OmpT protein

因子	均方根	F	P
e	7.759	56.295	0.001
f	1.461	10.601	0.002
g	0.263	1.909	0.177
h	7.372	53.485	0.001

3 结论与讨论

大肠埃希菌是导致奶牛乳房炎疾病的主要细菌之一，给奶制品业带来的损失巨大^[7-8]。OmpT蛋白是大肠埃希菌主要的外膜蛋白之一，具有显著的免疫保护作用^[13]，有望制备成奶牛乳房炎疾病的候选蛋白疫苗。本研究中构建大肠埃希菌OmpT表达菌株，获得纯化的OmpT蛋白，免疫小鼠制备了特异性较好的OmpT多克隆抗体，为OmpT功能研究奠定基础。此外，本研究发现OmpT氨基酸序列在不同种类大肠埃希菌间具有同源性，可能为不同种类的大肠埃希菌感染提供交叉免疫保护作用。

本试验结果表明：未诱导时，菌体适宜培养条件为葡萄糖浓度0%，转速230 r/min，装液量50 mL。有研究发现充足的氧气以及合适的转速有利于菌体的生长^[19]。这与本实验证实提高培养基转速，减少装液量，可增加细菌对氧气、营养的充分吸收结果一致。在菌株IPTG诱导后，适宜OmpT蛋白诱导条件为：诱导时IPTG菌液OD_{600 nm}为1.0，IPTG终浓度0.3 mmol/L，诱导时间8 h，诱导温度32℃。IPTG是β-半乳糖苷酶的活性诱导物质，高浓度的IPTG具有一定的细胞毒性，抑制蛋白的表达^[20-21]。本试验结果进一步证实低浓度IPTG(0.3 mmol/L)有利于蛋白的表达。

参考文献:

[1] Rosano G L, Ceccarelli E A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and

- challenges[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5: 172.
- [2] Hussein A H, Ghanem I A, Eid A A, et al. Molecular and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolated from broiler chicken flocks in Egypt[J]. *Avian Dis Avian*, 2013, 57(3): 602–611.
- [3] Premjani V, Tilley D, Gruenheid S, et al. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* OmpT regulates outer memb biogenesis[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2014, 355(2): 185–192.
- [4] Wan L, Guo Y, Hui C Y, et al. The surface protease ompT serves as *Escherichia coli* K1 adhesin in binding to human brain micro vascular endothelial cells[J]. *Pak J Pharm Sci*, 2014, 27(3): 617–624.
- [5] Obaid J M, Mansour S R, Elshahedy M S, et al. Uropathogenic *Escherichia coli* isolates with different virulence genes content exhibit similar pathologic influence on Vero cells[J]. *Pol J Microbiol*, 2014, 63(1): 43–49.
- [6] Rawa S V, Sarreal C Z, Mandrell R E. Strain differences in fitness of *Escherichia coli* O157: H7 to resist protozoan predation and survival in soil[J]. *PloS One*, 2014, 9(7): e102412.
- [7] 余婷, 安慧慧, 吴聪明, 等. 奶牛乳房炎分离大肠杆菌的耐药性及脉冲场凝胶电泳分型研究[J]. *中国兽医杂志*, 2013, 49(9): 6–11.
- [8] 徐继英, 刘俊林, 李先波, 等. 我国部分地区奶牛乳房炎源大肠杆菌生物学特性及耐药性分析[J]. *农业生物技术学报*, 2012, 20(9): 1035–1041.
- [9] 惠长野, 郭研, 吴书驰, 等. 大肠杆菌 K1 致病株外膜蛋白 T 体外功能[J]. *微生物学报*, 2010, 50(1): 48–53.
- [10] Hui C Y, Guo Y, He Q S, et al. *Escherichia coli* outer membrane protease OmpT confers resistance to urinary cationic peptides[J]. *Microbiol Immunol*, 2010, 54(8): 452–459.
- [11] Koprivnjak T, Peschel A. Bacterial resistance mechanism against host defense peptides[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2011, 68(13): 243–2254.
- [12] Premjani V, Tilley D, Gruenheid S, et al. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* OmpT regulates outer membrane vesicle biogenesis[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2014, 355(2): 185–192.
- [13] 佟春玉, 李润婷, 呼瑞, 等. 重组大肠杆菌外膜蛋白 OmpT 对小鼠免疫保护作用的研究[J]. *中国预防兽医学报*, 2013, 35(8): 658–662.
- [14] 刘祥. 福氏志贺菌 2 型外膜蛋白 A 的原核表达及多克隆抗体的制备[J]. *动物医学进展*, 2015, 36(5): 6–10.
- [15] 陈春琳, 刘祥, 王成富, 等. 重组铜绿假单胞菌外膜蛋白 OprI 的原核表达及多克隆抗体制备[J]. *生物技术*, 2015, 25(1): 23–27.
- [16] 刘祥, 陈春琳, 王扬科, 等. 小鼠骨桥蛋白的原核表达及多克隆抗体的制备与鉴定[J]. *中国畜牧兽医*, 2015, 42(5): 1069–1075.
- [17] 刘祥, 陈春琳, 牟欢, 等. 重组人骨硬化蛋白的表达、纯化及多克隆抗体制备[J]. *生物技术*, 2014, 24(6): 68–72.
- [18] 刘祥. 溶藻弧菌附着定植因子 ACFA 原核载体构建、表达条件优化及多克隆抗体制备[J]. *华北农学报*, 2015, 30(1): 35–41.
- [19] Xua M, Suna Q, Sua J, et al. Microbial transformation of geniposide in *Gardenia jasminoides* Ellis into genipin by *Penicillium nigricans*[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2008, 42(5): 440–444.
- [20] Yildirim N, Mackey M C. Feedback regulation in the lactose operon: A mathematical modeling study and comparison with experimental data[J]. *Biophysical Journal*, 2003, 84(5): 2841–2851.
- [21] 刘祥. 铜绿假单胞菌外膜蛋白 F 原核载体构建、表达条件优化及免疫保护作用研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2015, 25(11): 12–16.

责任编辑: 王赛群

英文编辑: 王 库