

# 重组铜绿假单胞菌外毒素 A 的原核表达和多克隆抗体制备及免疫保护功能分析

刘祥

(陕西理工学院生物科学与工程学院, 陕西 汉中 723001)

**摘要:** 为探索铜绿假单胞菌 ETA 蛋白的免疫保护功能, 采用分子克隆方法获得铜绿假单胞菌 ETA 表达菌株; 利用切胶纯化获得 ETA 蛋白并免疫小鼠, 制备 ETA 蛋白多克隆抗体; 用 ELISA 方法, 检测出 ETA 抗血清滴度达 1 8 000; 蛋白质印迹分析结果表明, 抗血清具有很好的特异性; 小鼠免疫保护试验结果表明, ETA 对铜绿假单胞菌感染的保护率达 50%, 显著高于对照组的免疫保护率。用 DNAMAN 软件对 ETA 序列同源性进行分析, 发现革兰氏阴性菌的同源性高于革兰氏阳性菌, 铜绿假单胞菌种间的同源性高于其他种类细菌的同源性; 用 MEGA 软件对 ETA 的进化分析结果表明, 不同血清型铜绿假单胞菌的亲缘关系高于其他细菌, 据此可推测 ETA 免疫动物产生的特异性抗体可能为不同种类铜绿假单胞菌的感染提供交叉免疫保护。

**关键词:** 铜绿假单胞菌; 外毒素 A; 原核表达; 多克隆抗体; 酶联免疫法; 免疫保护

中图分类号: Q789 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2016)01-0033-06

## Prokaryotic expression, polyclonal antibody preparation and immunoprotection potential of exotoxin A from recombinant *Pseudomonas aeruginosa*

Liu Xiang

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

**Abstract:** To explore the immunoprotection function of *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) exotoxin A (ETA) protein, its strain was obtained by approach of molecular clone; ETA was purified by the way of gel slices, and immunized mice was employed to prepare the polyclonal antibody. Antibody titer was 1 8 000 detected by enzyme-linked immuno sorbent assay(ELISA), and results of western blotting proved that the antiserum had a good specificity; mice specific immune was activated by ETA, and immune protection ratio for mice against *P. aeruginosa* infection was significant higher than the control group, reached to 50%. Results from ETA homology analysis showed that the homology of gram-negative bacteria was higher than gram-positive bacteria, and *P. aeruginosa* homology was higher than that of other species analyzed from software of DNAMAN. Results of phylogenetic analysis showed that the genetic relationship among various *P. aeruginosa* were higher than that of other bacteria. The specific antibodies produced by ETA immune animals might provide cross protection from the infection of different kinds of *P. aeruginosa*.

**Keywords:** *Pseudomonas aeruginosa*; exotoxin A; prokaryotic expression; polyclonal antibody; enzyme-linked immuno sorbent assay(ELISA); immunoprotection

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)又名绿脓杆菌, 为一种人兽共患病原菌, 也是医院感染的常见致病菌<sup>[1]</sup>, 当身体烧伤、重大疾病创伤以及免疫缺陷时易诱发该菌的感染<sup>[2-3]</sup>。目前, 抗生素

滥用使铜绿假单胞菌的耐药性不断提高, 给临床治疗带来较大难度<sup>[4-5]</sup>, 所以, 有必要开发新型的蛋白疫苗。该菌感染的毒力因子主要有 ETA 蛋白、菌毛、内毒素、荚膜、胞外酶 S 等。ETA 蛋白与该

菌的感染密切相关,由 *toxA* 基因编码,具有 3 个结构功能域, I 区与靶细胞表面受体蛋白的结合有关, II 区实现毒素的跨膜转运, III 区发挥细胞毒性作用<sup>[6-7]</sup>。ETA 具有极强的细胞毒性,常被用作分子佐剂与其他抗原融合表达,以提高小分子抗原的免疫应答能力<sup>[8-9]</sup>,在联合蛋白佐剂疫苗上具有应用价值<sup>[10]</sup>。本试验中原核表达、纯化铜绿假单胞菌 ETA 蛋白,制备和鉴定 ETA 蛋白多克隆抗体,检测 ETA 的免疫保护功能,并对 ETA 进行系统进化分析。现将结果报道如下。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 材 料

*P. aeruginosa* PAO1 菌株和 pET-28a 质粒由陕西理工学院生物化学与分子生物学实验室保存;昆明鼠由西安交通大学动物实验中心提供。

#### 1.1.2 主要试剂

蛋白胨、酵母粉、IPTG、胶回收试剂盒和基因组提取试剂盒购于上海生工生物工程技术有限公司;限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III、*Taq* 酶、*T4*-DNA 连接酶、蛋白 marker,以及核酸 marker 均为宝生物工程(大连)有限公司出品;山羊抗小鼠 IgG 二抗与琼脂糖购于美国 Sigma 公司;质粒提取试剂盒购于博日公司。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 ETA 重组菌株的构建

根据 NCBI 公布的铜绿假单胞菌基因序列,设计 ETA 蛋白基因引物 Primer 1(5'-ACGGAATTCATG CACCTGACACCCCA-3')和 Primer 2(5'-GCTAAGC TTTTACTTCAGGTCCTCGC-3'),下划线分别为限制性内酶位点 *EcoR* I 和 *Hind* III。下同。PCR 反应体系与条件以及载体构建方法见文献<sup>[11]</sup>。将获得的重组载体转化大肠杆菌 DH5a 后提取质粒,双酶切检测构建的准确性,并由北京鼎国生物技术公司测序,鉴定 ETA 重组基因序列,最后将重组质粒转化大肠杆菌 BL21 表达菌株<sup>[12]</sup>。

#### 1.2.2 ETA 重组蛋白的表达检测与蛋白纯化

将 ETA 重组菌株过夜培养,转接入新的 LB 培养基中,摇床培养约 2.5 h 后,加入终浓度 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导 5 h,通过 SDS-PAGE 蛋白电泳检测 ETA

蛋白表达情况。待检测到 ETA 正确表达后,大量培养菌株,采用文献<sup>[13]</sup>中的方法对 ETA 蛋白进行切胶纯化与蛋白复性。

#### 1.2.3 ETA 重组蛋白多克隆抗体的制备

选取 4 周龄的雄性昆明鼠 5 只,按照文献<sup>[14]</sup>中的方法对小鼠进行 OprH 蛋白免疫<sup>[14]</sup>。每只小鼠免疫 ETA 蛋白 3 次,每次免疫 50 μg 蛋白,最后,从小鼠眼部取血获得 ETA 抗血清。

#### 1.2.4 ETA 抗体效价与特异性检测

通过 ELISA 酶联法检测抗血清效价<sup>[15]</sup>,其主要步骤为:将纯化的 ETA 蛋白加入到 96 孔板中,用封闭液 200 μL 于 37 °C 孵育 2 h,然后加入不同稀释度的 ETA 小鼠抗血清,再加入二抗溶液,用显色液显色,加入终止液后于酶标仪 450 nm 处读数。

通过蛋白印迹法检测小鼠 ETA 抗血清特异性<sup>[16]</sup>。收集铜绿假单胞菌进行 SDS-PAGE 蛋白电泳,转 NC 膜后,与不同稀释度的 ETA 小鼠抗血清作用,再加入二抗, DAB 显色后检测 ETA 抗血清的特异性。

#### 1.2.5 ETA 免疫保护作用验证

试验组和对照组各选用 20 只昆明鼠,按照文献<sup>[17]</sup>中的方法进行免疫。第 3 次 ETA 蛋白免疫后,用铜绿假单胞菌进行小鼠腹腔攻毒试验,记录小鼠的死亡情况,并计算 ETA 蛋白的免疫保护率<sup>[18]</sup>。采用 SPSS 13.0 软件对试验结果进行卡方检验,验证 ETA 的免疫保护性。

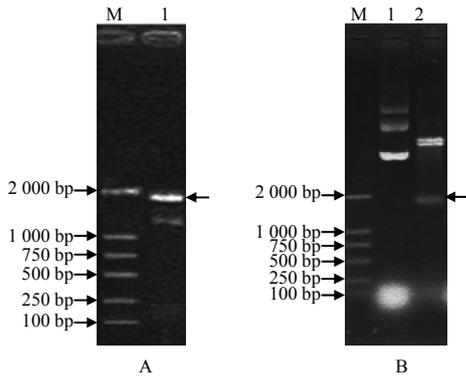
#### 1.2.6 ETA 蛋白序列的系统发生分析

从 NCBI 数据库中收集已经公布的细菌 ETA 蛋白氨基酸序列信息,采用 DNAMAN 和 MEGA5.02 软件,分别进行 ETA 氨基酸序列的同源性分析与系统发生分析<sup>[11-13]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 ETA 重组菌株构建结果

采用 PCR 方法从铜绿假单胞菌基因组中扩增基因,获得约 1 917 bp 的片段(图 1-A)。该片段大小与目的基因大小一致。将 PCR 获得的 ETA 蛋白基因连接入 pET-28a 质粒,转化大肠杆菌 DH5a 菌株;提取质粒,用 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切重组质粒,获得 1 917 bp 片段(图 1-B)。该片段大小与 ETA 蛋白基因大小一致。测序结果显示,重组基因的基因序列与 NCBI 公布的基因序列相同。



A PCR 扩增 ETA 基因；B 双酶切检测重组质粒载体。  
A 中：M DL-2 000；1 ETA 基因。

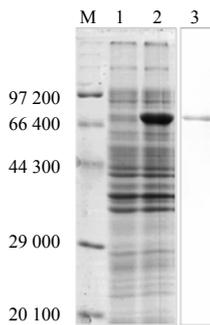
B 中：M DL-2 000；1 ETA 重组质粒载体；2 ETA 重组质粒载体双酶切。

图1 铜绿假单胞菌ETA蛋白重组质粒载体构建检测结果

Fig.1 Recombinant plasmid construction test chart for ETA protein gene of *P. aeruginosa*

### 2.2 ETA 重组蛋白的表达检测与蛋白纯化

从图 2 可看出，重组表达菌株经 IPTG 诱导后，获得相对分子质量 69 000 的条带，ETA 蛋白的表



M 蛋白 Marker；1 未诱导菌株；2 IPTG 诱导菌株；3 复性纯化的 ETA 蛋白。

图 2 铜绿假单胞菌 ETA 蛋白的表达与纯化电泳检测结果

Fig.2 Expression and purification electrophoresis for ETA protein of *P. aeruginosa*

表 1 小鼠免疫 ETA 及攻毒铜绿假单胞菌试验结果

Table 1 Results of immunity of ETA and challenging *P. aeruginosa*

组别	小鼠数/只	攻毒后死亡小鼠数/只				存活小鼠数/只	死亡率/%	保护率/%
		0~48 h	> 48~96 h	> 96~120 h	> 5~15 d			
对照组	20	10	5	1	0	4	80	0
试验组	20	5	2	1	0	12	40	50*

“\*”表示在 0.05 水平上差异显著。

### 2.5 ETA 蛋白序列系统发生分析

采用 DNAMAN 软件对 NCBI 公布的 12 种细菌的 ETA 氨基酸序列进行同源性分析，结果显示：不同细菌间 ETA 蛋白 I 区的同源性比 II 区的高，这可能与 III 区发挥细胞毒性作用有关；不同种类铜绿假单胞菌的同源性接近 100%(图 4)。采用

达与预期相同；采用蛋白电泳切胶纯化、尿素梯度复性获得 ETA 重组蛋白，表明铜绿假单胞菌 ETA 蛋白被成功表达和纯化。

### 2.3 ETA 的小鼠抗血清效价与特异性检测结果

ELISA 法检测结果显示，ETA 抗血清效价为 1 8 000(图 3)。利用蛋白质印迹法，发现不同稀释度 ETA 抗血清有相应的条带出现，而对照无条带显现，表明重组蛋白抗血清与 ETA 蛋白特异性的结合，获得了 ETA 多克隆抗血清。

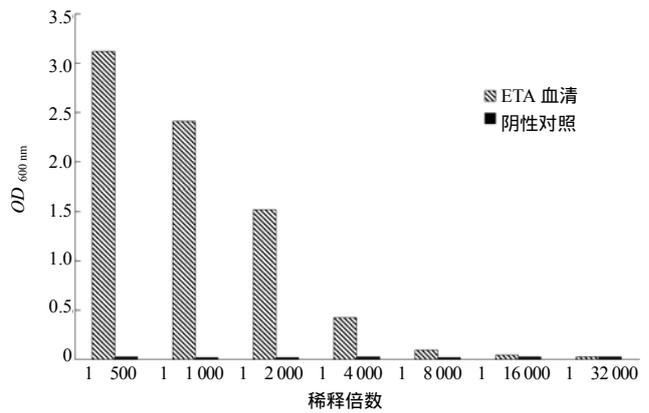


图3 铜绿假单胞菌ETA多克隆抗体效价的检测结果

Fig. 3 Detection for ETA polyclonal antibody titer of the *P. aeruginosa*

### 2.4 ETA 蛋白的免疫保护作用

小鼠免疫 ETA 蛋白，攻毒铜绿假单胞菌，发现攻毒致病菌 5 d 后，小鼠死亡率得到控制。试验结果显示，对照组死亡率为 80%，试验组死亡率为 40%；ETA 免疫小鼠激活的特异性免疫对小鼠铜绿假单胞菌感染的保护率达 50%，相对于对照组具有显著性差异(表 1)。

MEGA 软件构建 ETA 系统进化树，发现革兰氏阴性菌的亲缘关系高于革兰氏阳性菌(金黄色葡萄球菌)，不同种类铜绿假单胞菌的亲缘关系更近(图 5)。据此可推测，ETA 蛋白可能为不同种类铜绿假单胞菌的感染提供交叉免疫保护作用。

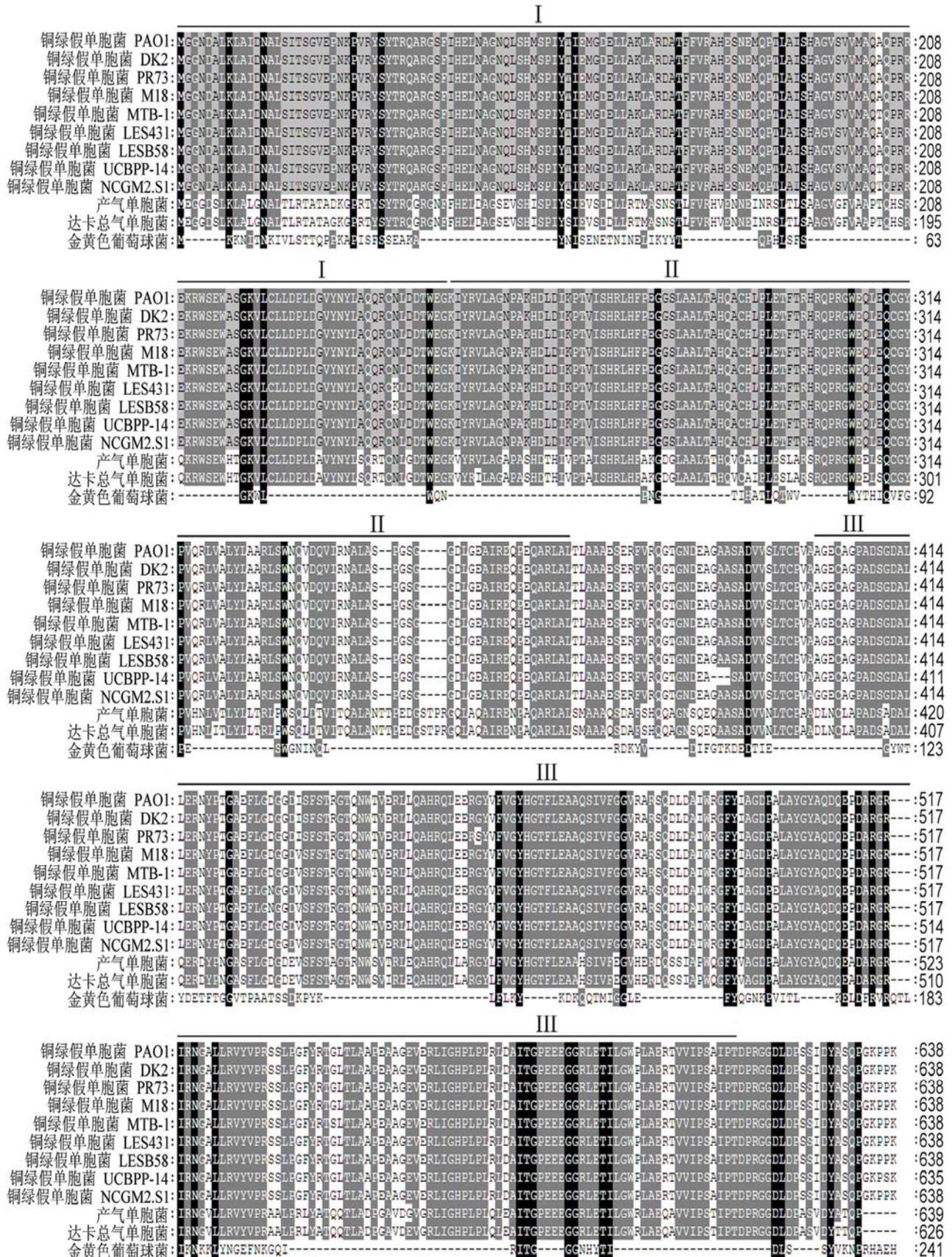


图4 ETA蛋白氨基酸序列的多重比对结果

Fig.4 Multiple alignment of amino acid sequences of ETA protein

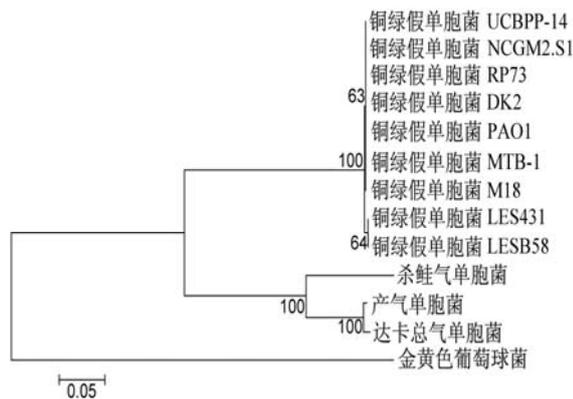


图 5 MEGA 软件构建的 ETA 氨基酸序列系统进化树

Fig.5 Phylogenetic tree from ETA amino acid sequences using MEGA

### 3 结论与讨论

ETA 蛋白是铜绿假单胞菌感染最主要的毒力因子，可激活机体强烈的免疫反应，具有很强的免疫原性<sup>[19]</sup>。由血管内皮 F3 肽与 ETA 制备的融合蛋白可抑制人癌细胞的生长<sup>[8]</sup>；将病毒 M2 蛋白、分泌蛋白 PcrV 与 ETA 制备成联合疫苗，可提高小鼠抵御病菌感染的能力<sup>[9-10]</sup>。ETA 在蛋白疫苗和联合佐剂制备方面具有广泛的应用前景<sup>[20]</sup>。有人利用分子克隆获得了高表达 ETA 的菌株<sup>[21]</sup>，纯化获得了大量的 ETA 蛋白，并对 ETA 的功能进行了初步研究<sup>[22]</sup>。本研究中发现 ETA 激活的小鼠特异性免疫反应对铜绿假单胞菌感染的保护率达 50%，显著高于对照组。

获得 ETA 蛋白抗血清是免疫学功能研究的基础。Soldatenkova 等<sup>[23]</sup>通过免疫方法成功制备了 ETA 小鼠单克隆抗体，研究了 ETA 的细胞毒性。单克隆抗体制备技术复杂，而多克隆抗体成本低，周期短，效果好，是免疫学研究常使用的抗体<sup>[24]</sup>。本试验中将 ETA 蛋白免疫小鼠，成功制备并鉴定了 ETA 多克隆抗体。获得的 ETA 抗血清的效价较低可能是由鼠抗<sup>[13-14]</sup>导致。本试验中通过增加小鼠免疫数获得更多的抗血清，以弥补低鼠抗效价的不足。

ETA 蛋白具有很强的细胞毒性作用，在遗传进化上具有保守性<sup>[6, 25]</sup>。本研究结果表明：不同细菌的 ETA 氨基酸序列具有很高的同源性，且革兰氏阴性菌的同源性高于革兰氏阳性菌；不同种类铜绿假单胞菌的亲缘关系更近。这些发现可为 ETA 蛋白的交叉免疫保护研究提供参考依据。

#### 参考文献：

[1] 姚立红,徐一,陈爱珺,等.铜绿假单胞菌外毒素 A 基

因突变体的构建及其在大肠埃希菌中的表达[J]. 中国生物制品学杂志, 2014, 27(1): 23-27.

- [2] Zhu X, Ma Z, Wang J, et al. Importance of tryptophan in transforming an amphipathic peptide into a *Pseudomonas aeruginosa* targeted antimicrobial peptide [J]. PLoS One, 2014, 9(12): e114605.
- [3] Tanideh N, Rokhsari P, Mehrabani D, et al. The healing effect of licorice on *Pseudomonas aeruginosa* infected burn wounds in experimental rat model[J]. World J Plast Surg, 2014, 3(2): 99-106.
- [4] 胡凯. 铜绿假单胞菌的分布及耐药性分析[J]. 现代预防医学, 2014, 41(21): 3999-4001.
- [5] 刘祥. 铜绿假单胞菌外膜蛋白的 H 原核表达、多克隆抗体制备及免疫保护作用[J]. 第二军医大学学报, 2015, 36(10): 1092-1096.
- [6] 夏海华,于冲,曲晓军,等. 绿脓杆菌外毒素 A 的最新研究进展[J]. 生物技术, 2012, 22(2): 81-85.
- [7] Schäuble N, Cavalié A, Zimmermann R, et al. Interaction of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A with the human Sec61 complex suppresses passive calcium efflux from the endoplasmic reticulum[J]. Channels, 2014, 8(1): 76-83.
- [8] 郭凯,陈泉,周红姿,等. 重组血管内皮受体 F3 肽-铜绿假单胞菌外毒素 A 蛋白抑制肿瘤生长的实验研究[J]. 科学技术与工程, 2014, 14(11): 127-130.
- [9] 徐一,姚立红,陈爱珺,等. 流感病毒 M2 蛋白胞外区与铜绿假单胞菌外毒素 A 融合蛋白的表达及其免疫原性研究[J]. 病毒学报, 2010, 26(3): 189-194.
- [10] 姜明子,冯吁珠. 重组铜绿假单胞菌外毒素 A 和 pcrV 基因质粒的构建及真核表达[J]. 医学研究生学报, 2014, 27(7): 694-697.
- [11] 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.
- [12] 刘祥,陈春琳,王杨科,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.
- [13] 刘祥. 小鼠骨形成蛋白 BMP3 的原核表达及多克隆抗体制备与鉴定[J]. 华北农学报, 2015, 30(3): 8-13.
- [14] 刘祥,俱雄,陈春琳. 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[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2015, 41(4): 350-355.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] 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.

- [18] 俱雄,陈春琳,刘祥,等.大肠埃希菌外膜蛋白 OmpC 的原核表达与免疫保护作用研究[J]. 生命科学研究, 2015, 19(2): 131-136.
- [19] Tafesse F G, Guimaraes C P, Maruyama T, et al. GPR107, a G-protein-coupled receptor essential for intoxication by *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A, localizes to the Golgi and is cleaved by furin[J]. J Biol Chem, 2014, 289(35): 24005-24018.
- [20] Farajnia S, Peerayeh S N, TANOMAND A, et al. Protective efficacy of recombinant exotoxin A-flagellin fusion protein against *Pseudomonas aeruginosa* infection[J]. Can J Microbiol, 2015, 61(1): 60-64.
- [21] 佟伟,董颖,李会.铜绿假单胞菌外毒素 A 原核表达载体的构建及表达[J]. 中国现代医学杂志, 2008, 18(19): 2772-2774.
- [22] Wang X, Li X, Zhang Z, et al. Codon optimization enhances secretory expression of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A in *E. coli*[J]. Protein Expr Purif, 2010, 72(1): 101-106.
- [23] Soldatenkova A V, Iakovleva I V, Gavrilova N V, et al. Production and properties evaluation of monoclonal antibodies against *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A[J]. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol, 2014(1): 30-35.
- [24] 王羽,廖翔,岳俊杰,等.福氏志贺菌 5a 型 M90T 株 GAPDH 蛋白多克隆抗体的制备和鉴定[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2014, 30(4): 407-410.
- [25] Boland E L, Van Dyken C M, Duckett R M, et al. Structural complementation of the catalytic domain of *Pseudomonas* exotoxin A[J]. J Mol Biol, 2014, 426(3): 645-655.

责任编辑: 王赛群

英文编辑: 王 库

## 简讯

### 刘忠松教授主持完成的“油菜黄籽形成的分子机制研究与应用” 成果处于国际同类研究领先水平

2016年1月10日上午,在湖南农业大学召开了刘忠松教授主持完成的“油菜黄籽形成的分子机制研究与应用”成果评价会。与会专家有中国农业科学院副院长王汉中研究员、湖南农业科学院院长邹学校研究员、中科院亚热带作物研究所王克林、西南大学李加纳教授、华中农业大学周永明教授和扬州大学王幼平教授,华中农业大学傅廷栋院士、浙江大学蒋立希教授参加了通信评审。

“油菜黄籽形成的分子机制研究与应用”项目研究始于1987年,刘教授历经20多年潜心研究,取得如下成果:(1)发现了原花色素在芥菜型油菜种皮中的形成与积累决定种皮颜色,率先图位克隆了芥菜型油菜黄籽调控基因 *BjuTT8*;阐明了油菜黄籽形成源于其 *BjuTT8* 基因突变,致使二氢黄酮醇还原酶(DFR)等基因不能被激活转录,从而不能催化原花色素生物合成底物表儿茶素的形成,种皮中不积累原花色素而透明,显现薄而透明种皮、黄色种胚的分子机制。(2)利用全球30多个国家的196份芥菜资源进行 *BjuTT8* 基因等位变异分析,揭示了芥菜型油菜黄籽起源于中国,是在芥菜型油菜形成后人工选择驯化的产物。(3)创建了基于苗期黄籽基因型选择+种子发育早期香草醛染色鉴定的甘蓝型油菜黄籽高油分芥甘种间杂交育种体系,用芥菜型油菜黄籽最佳等位基因资源与甘蓝型油菜优良品种进行种间杂交,创制了甘蓝型油菜黄籽新种质,育成甘蓝型黄籽油菜品种2个,推广应用一千余万亩。(4)该成果发表论文36篇,被引用500余次;获得授权发明专利3项。

专家组充分肯定了该研究的原创性和系统性,一致认为,该成果利用自然突变的遗传稳定芥菜型黄籽种质和人工创制的遗传背景相同的近等基因系,从种皮颜色的决定物质和控制色素合成的基因研究入手,在研究材料和研究思路上有重大创新。该成果处于国际同类研究领先水平。

撰稿人: 吴畏 张振乾