

• 论 著 •

铜绿假单胞菌重组质粒 pGEX-PopB 的构建、鉴定及其在大肠埃希菌中的表达效率*

何爱琳, 李文桂[△], 梁诚诚

(重庆医科大学附属第一医院传染病寄生虫病研究所, 重庆 400016)

摘要:目的 构建和鉴定铜绿假单胞菌重组质粒 pGEX-PopB, 并研究该质粒在大肠埃希菌 BL21(DE3) 中的表达。方法 以铜绿假单胞菌 PA01 标准株的 DNA 为模板, 通过 PCR 扩增 PopB 基因。经酶切后与载体 pGEX-1 λ T 连接, 构建重组质粒 pGEX-PopB, 电穿孔将其转化至大肠埃希菌 BL21(DE3)。异丙基硫代- β -D-半乳糖苷(IPTG)诱导重组菌 BL21(pGEX-PopB)的表达, SDS-PAGE 和 Western blot 对表达产物进行分析和鉴定。结果 PCR 扩增出 1 200 bp 的 PopB 基因; 双酶切和 PCR 证实 PopB 基因成功插入 pGEX-1 λ T 中; SDS-PAGE 发现重组菌表达相对分子质量约 66×10^3 的融合蛋白, 其蛋白表达量约占菌体总量的 20%; Western blot 证实铜绿假单胞菌感染的鼠血清能特异性识别该重组蛋白。结论 成功构建了铜绿假单胞菌重组质粒 pGEX-PopB, 并在大肠埃希菌 BL21(DE3) 中高效表达具有抗原特异性的融合蛋白。

关键词: 铜绿假单胞菌; pGEX-PopB; 大肠埃希菌

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.22.006

中图法分类号: R446.5

文章编号: 1673-4130(2020)22-2709-04

文献标识码: A

Construction, identification and expression of the recombinant plasmid pGEX-PopB derived from *Pseudomonas aeruginosa* in *Escherichia coli**

HE Ailin, LI Wengui[△], LIANG Chengcheng

(Institute of Infections and Parasitic Diseases, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: **Objective** To construct and identify the recombinant plasmid pGEX-PopB of *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) and study its expression in *Escherichia coli* (*E. coli*) BL21 (DE3). **Methods** The PopB gene was amplified by PCR using the DNA of *P. aeruginosa* PA01 standard strain as template. After digestion with the vector pGEX-1 λ T, the recombinant plasmid pGEX-PopB was constructed and electroporated to transform *E. coli* BL21 (DE3). The expression of recombinant BL21 (pGEX-PopB) was induced by isopropylthio- β -D-galactoside (IPTG), and the expressed product was analyzed and identified by SDS-PAGE and Western blot. **Results** The PopB gene of 1 200 bp was amplified by PCR, the PopB gene was successfully inserted into pGEX-1 λ T by double enzyme digestion and PCR, and the fusion protein with relative molecular weight of about 66×10^3 was expressed by SDS-PAGE. It accounted for 20% of the total bacterial cells. Western blot confirmed that the sera in mice infected with *P. aeruginosa* could specifically recognize the recombinant protein. **Conclusion** The recombinant plasmid pGEX-PopB of *P. aeruginosa* was successfully constructed and the antigen-specific fusion protein highly expressed in *E. coli* BL21 (DE3).

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*; pGEX-PopB; *Escherichia coli*

铜绿假单胞菌(Pa)是一种机会性病原体,在人体可引起多种疾病。该菌常与院内感染有关,尤其在免疫功能低下的患者中易致病,常引起肺炎、尿路感染和菌血症等^[1]。Pa 具备明显的抗菌能力,可通过其内在和获得性的耐药机制来对抗大多数抗菌药物,造成

多重耐药株和完全耐药株的产生,对免疫受损者和住院患者构成严重威胁^[2-3]。有学者对 2006—2016 年临床分离的 Pa 菌株进行调查分析,结果显示多重耐药 Pa 感染的患者其病死率高达 44.6%,是导致患者死亡的最大风险因素之一^[4]。若 Pa 感染未及时控

* 基金项目:重庆市科学技术协会地方病专项基金(2008AB5055、2008AB5008、2008AB5054)。

作者简介:何爱琳,女,在读硕士研究生,主要从事病原微生物的分子生物学研究。 [△] 通信作者, E-mail: cqliwengui@163.com。

本文引用格式:何爱琳,李文桂,梁诚诚. 铜绿假单胞菌重组质粒 pGEX-PopB 的构建、鉴定及其在大肠埃希菌中的表达效率[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(22): 2709-2712.

制,将给临床治疗带来极大的挑战。现有对抗 Pa 感染的新疗法包括注射疫苗,使用噬菌体、益生菌、抗菌肽及毒力抑制剂等^[5],其中疫苗可有效减少特定病原体的数量,从而改善抗菌药物耐药性,是防治 Pa 感染的重要手段之一^[6]。膜蛋白 PopB 是Ⅲ型分泌系统(T3SS)转运蛋白的组成成分之一,利用该系统能将效应蛋白注入真核细胞内,从而抑制宿主细胞的免疫功能,引发感染^[7-8]。RAO 等^[9]用 PopB 蛋白可诱导 Pa 感染的囊性纤维化患者产生体液免疫反应,提示其具有抗原性,是一种新型的治疗 Pa 感染候选疫苗分子。本研究拟将 PopB 基因插入表达载体 pGEX-1λT,构建 pGEX-PopB,并研究该重组质粒在大肠埃希菌的表达效率,从而为 Pa 疫苗的研制提供有价值的资料。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株和宿主菌 pGEX-1λT、Pa 的 PA01 标准株和大肠埃希菌 BL21(DE3)由本所保存。

1.2 主要试剂 UNIQ-10 柱式细菌基因组抽提试剂盒、PCR 扩增试剂盒、UNIQ-1 柱式 PCR 产物纯化试剂盒、UNIQ-10 柱式质粒小量抽提试剂盒、高效感受态细胞制备试剂盒、异丙基硫代-β-D-半乳糖苷(IPTG)、丙烯酰胺、N,N-亚甲基双丙烯酰胺、二氨基联苯胺(DAB)显色试剂及考马斯亮蓝试剂均购自生工生物工程(上海)股份有限公司;BamH I、EcoR I、T4 DNA 连接酶和 DNA 标记物购自美国 Fermentas 公司;LB 液体和固体培养基由本所制备;中相对分子质量蛋白购自北京鼎国昌盛生物技术公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠 IgG 购自北京鼎今生物科技有限公司;Pa 感染的鼠血清由本所保存。

1.3 方法

1.3.1 PopB 基因的扩增及鉴定 根据 PopB 基因的 DNA 序列和载体 pGEX-1λT 的特点设计 1 对引物,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成引物。P1(上游引物):5'-GCGGATTC-TTT GGA TCC ATG AAT CCG ATA ACG CTT G-3';P2(下游引物):5'-GCGAATTC-TTT GAA TTC TCA GAT CGC TGC CGG TCG-3'。5'端处分别引入 BamH I 和 EcoR I 酶切位点。按照细菌基因组抽提试剂盒的说明书抽提 Pa DNA。以提取的 DNA 为模板,P1 和 P2 为引物,PCR 扩增 PopB 基因。扩增条件:95℃预变性 5 min,95℃变性 30 s,55℃退火 30 s,72℃延伸 50 s,共 35 个循环,最后 72℃再次延伸 10 min。用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物。

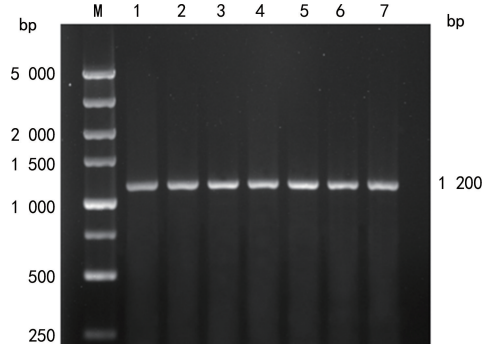
1.3.2 重组质粒 pGEX-PopB 的构建及鉴定 将 PopB 的扩增产物和载体 pGEX-1λT 用 BamH I 和 EcoR I 双酶切,并按照纯化试剂盒说明书对酶切产物进行纯化。酶切体系共 60 μL:42.0 μL 的 PCR 产物或载体,BamH I 和 EcoR I 各 1.3 μL,6.0 μL 的 10×Tango 缓冲液,9.4 μL 的灭菌去离子水。置 37℃水浴 2 h;将载体和 PopB 基因片段按比例约 1:

5 混合,并在 T4 DNA 连接酶作用下建立连接体系,共 20 μL:13 μL 的载体片段,3 μL 的 PopB 基因片段,T4 DNA 连接酶和 10×T4 Buffer 各 2 μL。置 4℃连接过夜后 70℃水浴 10 min;将连接产物电穿孔转化至大肠埃希菌感受态 BL21(DE3),37℃150 r/min 振荡培养 1 h 后接种于含氨苄西林(50 μg/mL)的溶菌肉汤(LB)固体培养基上进行筛选。在培养基中挑取单菌落后加入同上述浓度氨苄西林的 LB 液体培养基中,37℃200 r/min 振荡培养 72 h 后抽提质粒,按上述酶切体系双酶切,并以提取的质粒为模板,按上述 PCR 条件扩增 PopB 基因。分别对酶切产物和 PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.3.3 pGEX-PopB 在大肠埃希菌 BL21(DE3)中的诱导表达、分析及鉴定 将含有重组质粒 pGEX-PopB 的菌液振荡培养至 600 nm 波长处吸光度值为 0.5~0.8,取适量作为未诱导对照,剩余菌液加入 IPTG(1 mmol/L),37℃诱导表达,分别在 1、3、5、7、9、11、13 h 收集菌液,5 000 r/min 离心 2 min,弃上清液,分别吸取 50 μL 的上样缓冲液和 20 μL 的菌液,将其混合后煮沸 5 min,吸取 20 μL 样品经 SDS-PAGE 电泳,考马斯亮蓝试剂染色后脱色至凝胶透明、条带清晰,BIO-RAD 凝胶成像仪分析重组蛋白表达量。SDS-PAGE 电泳后,切下蛋白标记物,考马斯亮蓝试剂染色约 1 h 后脱色,余下凝胶 150 mA 恒流电转膜 2 h,取出 NC 膜,封闭液封闭 2 h,PBS 漂洗 3 次;加入一抗(1:100 稀释的 Pa 感染鼠血清),室温转摇封闭 2 h,PBS 漂洗 3 次;加入二抗(1:1 000 稀释的 HRP 标记羊抗鼠 IgG),室温孵育 2 h,PBS 漂洗 3 次;加入新配制的 DAB 显色剂避光反应 10~15 min,用双蒸水洗膜终止反应并成像。

2 结果

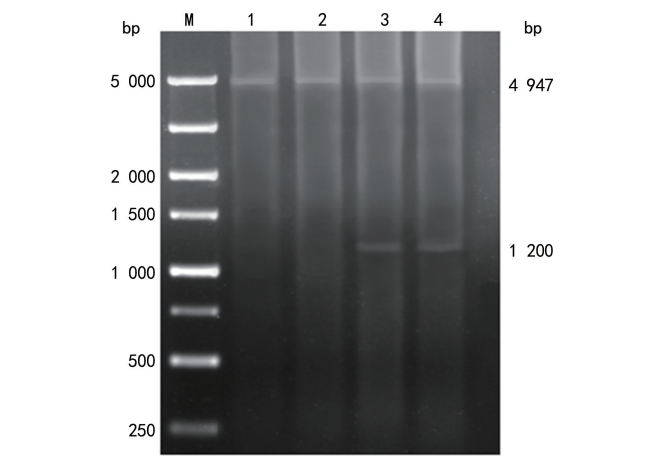
2.1 PopB 基因的鉴定 以 PA01 标准株的 DNA 为模板,扩增获得 1 200 bp 的 PopB 基因片段,见图 1。



注:M 为 DNA 标记物;1~7 为 PopB 基因的 PCR 产物。

图 1 PopB 基因 PCR 扩增产物鉴定

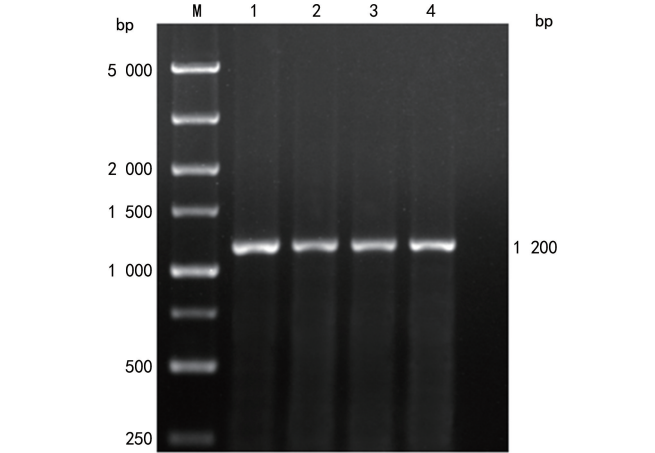
2.2 重组质粒 pGEX-PopB 的酶切鉴定 重组质粒用 BamH I 和 EcoR I 双酶切分别获得 4 947 bp 的 pGEX-1λT 载体片段和 1 200 bp 的 PopB 基因片段,见图 2。



注:M 为 DNA 标记物;1、2 为 pGEX-1λT;3、4 为重组质粒 pGEX-PopB 双酶切产物。

图 2 pGEX-PopB 的双酶切鉴定

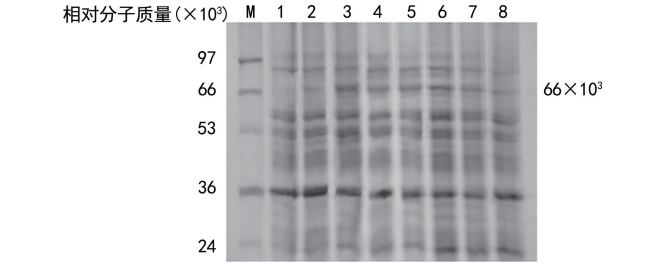
2.3 重组质粒 pGEX-PopB 的 PCR 鉴定 从具有氨苄西林抗性的重组菌中提取质粒,并以该质粒为模板经 PCR 扩增可获得 1 200 bp 的 PopB 基因片段,见图 3。



注:M 为 DNA 标记物;1~4 为重组质粒 pGEX-PopB 的 PCR 扩增产物。

图 3 重组质粒 pGEX-PopB 的 PCR 扩增产物鉴定

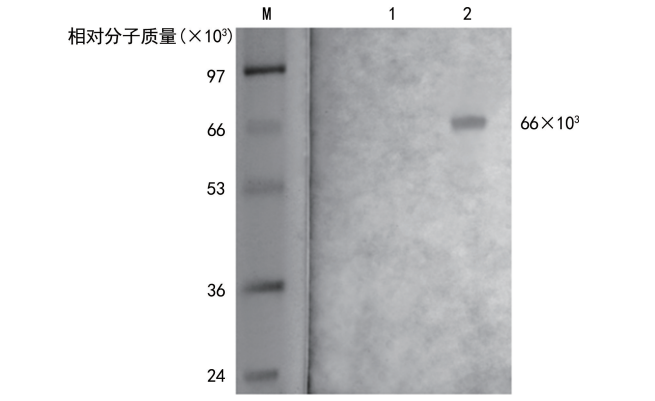
2.4 重组质粒 pGEX-PopB 在大肠埃希菌 BL21 (DE3)中表达产物的 SDS-PAGE 分析 重组质粒 pGEX-PopB 转化大肠埃希菌 BL21 (DE3),IPTG 诱导表达,SDS-PAGE 电泳结果显示其蛋白表达量约为 66×10^3 。BIO-RAD 凝胶成像仪提示 PopB 融合蛋白占全菌总量的 20%,在 IPTG 诱导 3~5 h 时其表达量较高,而未诱导的转化菌无此条带,见图 4。



注:M 为中相对分子质量蛋白标记物;1 为未诱导的重组菌;2~8 为分别经 IPTG 诱导 1、3、5、7、9、11、13 h 的重组菌。

图 4 重组菌 pGEX-PopB 表达产物的 SDS-PAGE 分析

2.5 Western blot 鉴定 将大肠埃希菌表达的 PopB 蛋白与 Pa 感染的鼠血清做 Western blot,在相对分子质量为 66×10^3 M 处有一特异性反应条带,而非诱导的重组菌无此条带,见图 5。



注:M 为中相对分子质量蛋白标记物;1 为未诱导对照组;2 为 PopB 蛋白与 Pa 感染鼠血清反应 Western blot 结果。

图 5 重组菌 pGEX-PopB 表达产物的 Western blot 鉴定

3 讨 论

PopB 蛋白是 T3SS 中高度保守的成分之一,也是公认的毒力因子之一^[10]。研究证实,用纯化的重组 PopB 蛋白免疫小鼠能诱导 IgG 特异性抗体的产生,并且对致命的 Pa 感染可产生明显的保护作用,表明 PopB 具有免疫原性,是极具研究价值的疫苗分子之一^[11]。WU 等^[12]以 PA01 株基因组为模板,通过 PCR 扩增 PopB 基因,克隆至载体 pET-28b 构建重组质粒,并转化大肠埃希菌 BL21 (DE3),IPTG 诱导表达约 40×10^3 的重组 His-PopB 蛋白,用该蛋白免疫小鼠可诱导其产生抗 Pa 感染的保护力。本研究以 PA01 株 DNA 为模板,PCR 扩增获得 1 200 bp 的 PopB 基因片段,构建了 pGEX-PopB 重组质粒,为研究载体 pGEX-1λT 表达的融合蛋白打下了基础。

大肠埃希菌表达系统是当前常用的外源蛋白表达系统。BL21 具有易于培养、遗传背景明确、成本低、生长速度快及可表达各种外源基因等优点,是生产重组蛋白常用的表达菌株之一。pGEX 载体可用于构建高水平表达的目的基因片段,其中 pGEX-1λT 是以大肠埃希菌为宿主,并且能高效表达融合蛋白的载体之一。pGEX-1λT 多克隆位点的上游包含有表达 26×10^3 蛋白的谷胱甘肽 S-转移酶 (GST) 基因片段。GST 能提高外源蛋白稳定性和可溶性,同时又保留蛋白的抗原性和生物活性。带有 GST 标签的融合蛋白能通过特定的目的基因插入 pGEX-1λT 的多克隆位点,其上含有 lacIq 基因,该基因的表达产物可作为抑制剂结合在 tac 启动子的操纵子区,加入诱导剂 IPTG 后,目的基因能在 tac 启动子的调控下高效表达目的蛋白。刘潇等^[13]将 OprI 基因插入 pGEX-1λT,构建重组质粒 pGEX-OprI,再将该质粒导入 BL21 中可成功表达 Pa 的目的蛋白。

本研究采用的电穿孔技术是分子生物学中质粒

DNA 转化大肠埃希菌常用的方法之一。该技术由于操作简单快捷,转化效率高,已广泛应用于原核细胞外源生物分子的导入。用于电穿孔的 BL21 感受态是由 37 ℃ 培养的细菌所制备,转化效率达 $10^8 \sim 10^9$ cfu/ μ g DNA。通过 EP 技术可诱导 I 型干扰素的分泌,促炎性细胞因子的产生,如白细胞介素(IL)-1 β 、IL-8 和 IL-17 等,同时可增加转化生长因子水平,提高自然杀伤细胞、抗原呈递细胞和巨噬细胞的募集,起到类似于佐剂的作用,从而增强免疫效应。EP 可明显提高基于质粒 DNA 编码的免疫原性蛋白的表达,在疫苗或基因治疗领域具有广阔的应用前景。已报道电穿孔技术辅助的 DNA 疫苗在登革热、艾滋病和埃博拉病毒病等动物模型中诱导了理想的保护性免疫反应^[14-16]。

4 结 论

本研究在成功构建重组质粒 pGEX-PopB 基础上,采用电穿孔转化至大肠埃希菌感受态 BL21 (DE3),经 IPTG 诱导后表达与预期结果相符的融合蛋白,该融合蛋白占菌体总量的 20 %,且在诱导 3~5 h 时表达量达较高水平。Western blot 证实该融合蛋白可被 Pa 感染的鼠血清特异识别,表明重组蛋白具有一定的免疫原性,为 Pa 疫苗的进一步研制奠定了良好的基础。

参考文献

- [1] SKARIYACHAN S, SRIDHAR V S, PACKIRISAMY S, et al. Recent perspectives on the molecular basis of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and approaches for treatment and biofilm dispersal[J]. *Folia Microbiol (Praha)*, 2018, 63(4): 413-432.
- [2] PANG Z, RAUDONIS R, GLICK B R, et al. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies[J]. *Biotechnol Adv*, 2019, 37(1): 177-192.
- [3] MAURICE N M, BEDI B, SADIKOT R T. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: host response and clinical implications in lung infections[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2018, 58(4): 428-439.
- [4] MATOS E C, ANDRIOLO R B, RODRIGUES Y C, et al. Mortality in patients with multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections: a meta-analysis[J]. *Rev Soc Bras Med Trop*, 2018, 51(4): 415-420.
- [5] BURROWS L L. The therapeutic pipeline for *pseudomonas aeruginosa* infections[J]. *ACS Infect Dis*, 2018, 4(7): 1041-1047.
- [6] BAINDARA P, MANDAL S M. Antimicrobial peptides and vaccine development to control Multi-Drug resistant bacteria[J]. *Protein Pept Lett*, 2019, 26(5): 324-331.
- [7] TANG Y, ROMANO F B, BREÑA M, et al. The *pseudomonas aeruginosa* type III secretion translocator PopB assists the insertion of the PopD translocator into host cell membranes[J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(23): 8982-8993.
- [8] DORTET L, LOMBARDI C, CRETIN F, et al. Pore-forming activity of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system translocon alters the host epigenome[J]. *Nat Microbiol*, 2018, 3(3): 378-386.
- [9] RAO A R, LAXOVA A, FARRELL P M, et al. Proteomic identification of OprL as a seromarker for initial diagnosis of *Pseudomonas aeruginosa* infection of patients with cystic fibrosis[J]. *J Clin Microbiol*, 2009, 47(8): 2483-2488.
- [10] ROMANO F B, TANG Y, ROSSI K C, et al. Type 3 secretion translocators spontaneously assemble a hexadecameric transmembrane complex[J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(12): 6304-6015.
- [11] SCHAEFERS M M, DUAN B, MIZRAHI B, et al. PLGA-encapsulation of the *Pseudomonas aeruginosa* PopB vaccine antigen improves Th17 responses and confers protection against experimental acute pneumonia[J]. *Vaccine*, 2018, 36(46): 6926-6932.
- [12] WU W, HUANG J, DUAN B, et al. Th17-stimulating protein vaccines confer protection against *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2012, 186(5): 420-427.
- [13] 刘潇, 李文桂, 罗广旭. 铜绿假单胞菌外膜蛋白 OprI 原核表达载体的构建及其在大肠杆菌中的表达[J]. *生物技术通讯*, 2018, 148(4): 42-46.
- [14] SHENG Z, CHEN H, FENG K, et al. Electroporation-Mediated immunization of a candidate DNA vaccine expressing dengue virus serotype 4 prM-E antigen confers long-term protection in mice[J]. *Virol Sin*, 2019, 34(1): 88-96.
- [15] LAMBRICHT L, VANVARENBERG K, DE BEUCK-ELAER A, et al. Coadministration of a plasmid encoding HIV-1 gag enhances the efficacy of cancer DNA vaccines[J]. *Mol Ther*, 2016, 24(9): 1686-1696.
- [16] PATEL A, REUSCHEL E L, KRAYNYAK K A, et al. Protective efficacy and long-term immunogenicity in cynomolgus macaques by Ebola virus glycoprotein synthetic DNA vaccines[J]. *J Infect Dis*, 2019, 219(4): 544-555.

(收稿日期: 2019-12-20 修回日期: 2020-06-25)