

# V 型分泌系统菌体表面展示 F18 大肠杆菌黏附素及其受体结合位点的确定

原志伟 蒋 颖 王建设 朱国强\*

(扬州大学兽医学院 扬州 225009)

**摘 要** :自主转运蛋白(V 型分泌系统)的  $\beta$  结构域已被证明可以将异源性多肽展示在细菌表面。运用 DNA 重组技术优化构建 V 型分泌系统 *MisL* 并在菌体表面展示 F18 大肠杆菌黏附素 *FedF* 及其受体结合域 *FedF1*。含重组质粒 *pnirBMisL-fedF* 或 *pnirBMisL-fedF1* 大肠杆菌(*E. coli*)DH5 $\alpha$  经厌氧诱导后,分别与兔抗 F18ab 菌毛 *FedF* 亚单位单因子血清和 F18 大肠杆菌黏附素受体易感性仔猪的小肠上皮细胞做玻板凝集试验和体外黏附试验,结果表明上述两株诱导表达重组菌与 *FedF* 抗血清发生明显的凝集反应,且能较好地黏附于 F18 大肠杆菌黏附素受体易感性仔猪小肠上皮细胞。而菌体表面展示 F18 大肠杆菌黏附素 *FedF* 突变体 *FedF* M $\Delta$  黏附素受体结合域第 88 和 89 位组氨酸残基双突变为丙氨酸的重组菌则失去上述凝集和黏附特性。以上试验结果说明, F18 大肠杆菌黏附素 *FedF* 及其受体结合域 *FedF1* 在大肠杆菌表面得到了功能性表达,并进一步证明了位于 *FedF* 受体结合域内第 88 和 89 位组氨酸残基对 *FedF* 受体结合域的形成至关重要。

**关键词** :V 型分泌系统;自主转运蛋白;菌体表面展示;*FedF* 受体结合域

**中图分类号** :Q939.91 **文献标识码** :A **文章编号** :1001-6209(2007)02-0319-05

V 型分泌系统又称自主转运蛋白分泌系统,是革兰氏阴性菌 5 种蛋白分泌系统中最为简单的一种,且自主转运蛋白在跨外膜转运过程中似乎不需要能量和辅助因子(蛋白)的参与。更为可喜的是自主转运蛋白羧基端的  $\beta$  结构域有效地将异源多肽功能性地展示在细菌表面已得到证明<sup>[1]</sup>。

*FedF* 亚单位为 F18ab 和 F18ac 两种不同血清型大肠杆菌中高度保守的共同功能性粘附素,不同 F18ab 和 F18ac 的 *FedF* 能与仔猪小肠上皮细胞上相同的大分子受体相结合<sup>[2]</sup>。进一步研究发现,位于 *FedF* 亚单位内的第 60 至第 109 位氨基酸残基区段是 *FedF* 亚单位与仔猪小肠上皮细胞相互作用的受体结合域,在此结合域内 3 个氨基酸残基(Lys-72、His-88、His-89)显著影响着 *FedF* 亚单位与仔猪小肠上皮细胞相结合的能力,其中任何两个氨基酸的突变(即 Lys-72 $\rightarrow$ Ala 或 His-88/His-89 $\rightarrow$ Ala),都会使 *FedF* 粘附素与仔猪肠上皮细胞的结合能力完全丧失<sup>[3]</sup>。遗传学相关研究表明,*FedF* 粘附素介导的 F18 大肠杆菌对仔猪小肠上皮细胞的黏附取决于仔猪小肠上皮细胞上是否存在 F18 菌毛的受体以及具有显性遗传特性<sup>[4]</sup>。鉴于自主转运蛋白介导的菌体表面展示有望作为开发细菌活载体疫苗的有效工

具,我们运用肠道沙门氏菌自主转运蛋白 *MisL* 的  $\beta$  结构域成功地将 F18ab 菌毛黏附素 *FedF* 及其受体结合域 *FedF1* 展示在大肠杆菌(*E. coli*)DH5 $\alpha$  表面并得到了功能性表达,从而为构建断奶仔猪腹泻和仔猪水肿病的细菌活载体疫苗奠定了基础,同时我们也对 *FedF* 受体结合域内的第 88 和 89 位组氨酸进行双突变以研究其对 *FedF* 受体结合域形成的重要作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 质粒和菌株** :质粒 *pnirBMisL* 含有受 *pnirB* 厌氧启动子调控的大肠杆菌不耐热肠毒素 B 亚单位(LTB)信号肽序列和自主转运蛋白 *MisL* 的  $\beta$  结构域编码序列,产 F18ab 菌毛大肠杆菌标准株 107/86(O139:K12:H1)和产 F18ac 菌毛大肠杆菌标准株 2134R(O157:H19)均由美国宾夕法尼亚大学兽医学院微生物实验室惠赠。质粒 *p18ab* 为本实验室构建,含有 F18ab 菌毛整个操纵子 *fed* 基因<sup>[5]</sup>。大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 $\alpha$  为本室保存。

**1.1.2 试验动物和抗体** :试验中所用两头 30~35 日龄断奶仔猪购自江苏省扬州市瘦肉型猪繁殖场,

\* 通讯作者。Tel 86-514-7972590;Fax 86-514-7972218;E-mail: yzgqzhu@hotmail.com, yzgqzhu@yzu.edu.cn

作者简介:原志伟(1979-)男,山东威海人,硕士研究生,主要从事病原微生物致病机理及免疫机理研究。

收稿日期:2006-06-15;接受日期:2006-07-21;修回日期:2006-10-22

为三元杂交猪。两头仔猪 M307 基因型通过采用 PCR-RFLP 技术结合 FUT1 基因测序鉴定:一头为 M307 GG 型,一头为 M307 AG 型 均为 F18 大肠杆菌黏附素受体易感猪<sup>[6]</sup>。兔抗 F18ab 菌毛 FedF 亚单位单因子血清由本室成大荣博士惠赠。

**1.1.3 主要试剂和仪器:**限制性内切酶 *Nhe* I 购自 NEB 公司;T4 DNA 连接酶购自 Roche 公司  $\lambda$ -HindIII DNA Marker、DL-2000 DNA Marker、*Ex Taq* polymerase 及 DNA 凝胶回收试剂盒为 TaKaRa 公司产品;小牛肠碱性磷酸酶(CIAP)购自华美生物工程公司;光学显微镜及拍摄系统为日本 Olympus 公司生产。

## 1.2 引物设计及 *fedF1*、*fedF* 和 *fedF*(M)基因的 PCR 扩增

根据 GenBank 中 F18ab *fedF* 序列,用 DNASTar 软件设计两对引物,P1、P2 用于扩增 F18ab 菌毛黏附素 FedF 受体结合域基因 *fedF1*(FedF 亚单位第 60 与 109 位氨基酸之间的序列);P3、P4 用于扩增不含信号肽的 F18ab 菌毛黏附素 *fedF* 基因。P1:5'-CAGGCTAGCACTTTGACATGCCAGGCTGGAAC-3'; P2:5'-CAGGCTAGCTGTACCGAATCCTACTTGTGAC-3'; P3:5'-CAGGCTAGCTCTACTCTACAAGTAGAC-3'; P4:5'-CAGGCTAGCCTGTATCTCGAAAACAAT-3'。上述引物 5'端引入酶切位点 *Nhe* I。引物由上海基康生物工程公司合成。*fedF1* 基因和 *fedF* 基因的扩增均以质粒 p18ab 为模板,按常规 PCR 方法进行,扩增产物经 *Nhe* I 酶切后,用 DNA 凝胶回收试剂盒回收。另,我们采用 SOEing PCR 定点突变法构建了 F18ab 菌毛黏附素 FedF 突变体 FedF(M),将 FedF 亚单位内的第 88 和 89 位组氨酸都突变为中性的丙氨酸。

## 1.3 重组质粒 pnirBMisL-*fedF1*、pnirBMisL-*fedF* 及 pnirBMisL-*fedF*(M)的构建与鉴定

将上述 3 个基因插入经 *Nhe* I 酶切及去磷酸化后的 pnirBMisL 质粒载体(图 1)。从阳性转化菌中

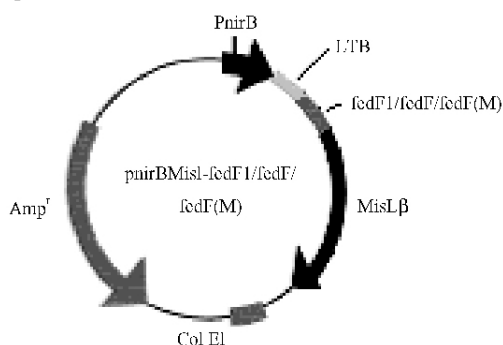


图 1 重组质粒 pnirBMisL-*fedF1*/fedF/fedF(M)图谱

Fig.1 Map of the recombinant plasmid pnirBMisL-*fedF1*/fedF/fedF(M).

抽提质粒,用 PCR 或双酶切的方法鉴定阳性克隆,然后将阳性克隆送上海申能博彩生物科技有限公司测序,以进一步鉴定 *fedF1*、*fedF* 或 *fedF*(M)基因插入载体 pnirBMisL 的正反方向以及上述 3 种基因序列是否发生突变。测序引物为 pnirI:5'-TTCAGGTAAATTT GATACATCAAA-3'。

## 1.4 3 种重组质粒在受体菌中诱导表达

经测序鉴定阅读框为正向的分别含有 F18ab 菌毛黏附素 FedF、FedF 受体结合域 FedF1、FedF 突变体 FedF(M)的 3 种不同重组菌首先在有氧的环境中振荡培养过夜,再置于厌氧罐中诱导表达 6h。同时设含有 pnirBMisL 空载体的大肠杆菌 DH5 $\alpha$  做同步对照。

## 1.5 FedF 单因子凝集试验

将上述 3 种诱导表达的重组菌和含有 pnirBMisL 空载体的大肠杆菌 DH5 $\alpha$  用 PBS 洗涤 3 次后各取 20  $\mu$ L,分别与等量的兔抗 F18ab FedF 亚单位单因子血清(1:100 稀释)于玻片上混合后于灯光下观察结果。

## 1.6 仔猪小肠上皮细胞的黏附试验及黏附抑制试验

### 1.6.1 仔猪小肠上皮细胞的分离和制备:具体步骤参照文献 7 进行。

**1.6.2 重组菌与仔猪小肠上皮细胞的体外黏附:**将厌氧诱导的重组菌用 PBS 反复离心洗涤 3 次,调整细菌浓度至约  $1 \times 10^9$  CFU/mL。取上述菌液 0.5mL 和 0.5mL 仔猪小肠上皮细胞混合,37 $^{\circ}$ C 孵育 30min 后,1000r/min 离心 5min,用 PBR 溶液悬浮后取 50  $\mu$ L 滴于洁净玻片上,自然干燥,火焰固定,用美兰染色 3~5min,油镜观察结果。同时设产 F18ab 菌毛大肠杆菌标准株 107/86、产 F18ac 菌毛大肠杆菌标准株 2134P 和含 pnirBMisL 空载体的大肠杆菌 DH5 $\alpha$  分别做阳性和阴性对照。

**1.6.3 重组菌与仔猪小肠上皮细胞的体外黏附抑制试验:**重组菌 pnirBMisL-*fedF1* 和 pnirBMisL-*fedF* 与兔抗 F18ab 菌毛 FedF 亚单位单因子血清(1:100 稀释)混合于 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min 后,用上述相同的方法与仔猪小肠上皮细胞作用。美兰染色后显微镜下观察,对照同上。

## 2 结果

### 2.1 *fedF1*、*fedF* 和 *fedF*(M)基因的 PCR 扩增

*fedF1*、*fedF* 和 *fedF*(M)基因的 PCR 扩增产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分析,结果表明成功地扩增出了特异性的目的条带,*fedF1* 大小约为 168bp,*fedF* 和 *fedF*(M)大小约为 832bp,均与预期大小一致。

2.2 重组质粒 **pnirBMisL-fedF1**、**pnirBMisL-fedF** 及 **pnirBMisL-fedF( M )** 的鉴定

两个重组质粒 **pnirBMisL-fedF1** 用 PCR 方法扩增出 168bp 条带 ,初步判定为单一 *fedF1* 片段正向或反向插入载体 **pnirBMisL** ,重组质粒 **pnirBMisL-fedF** 或 **pnirBMisL-fedF( M )** 用 *Bam*H I 酶切鉴定 ,正向插入为 1.5kb 和 3.2kb 两个片段 ,反向插入为 1.9kb 和 2.8kb 两个片段。将上述阳性克隆送去测序后 ,分别得到了 *fedF1* 基因、*fedF* 基因和 *fedF( M )* 基因按正确阅读框克隆入载体 **pnirBMisL** 的重组质粒 ,且测序结果显示 3 种插入序列没有发生突变 ,与发表序列完全相同。

2.3 FedF 单因子凝集试验

同标准株 107/86 和 2134P 一样 ,经厌氧诱导表达的重组菌 **pnirBMisL-fedF1** 和 **pnirBMisL-fedF** 均能与兔抗 F18ab 菌 *fedF* 亚单位单因子血清( 1:100 稀释 )产生明显的凝集 ,而重组菌 **pnirBMisL-fedF( M )** 和含 **pnirBMisL** 空载体的大肠杆菌 DH5 $\alpha$  与上述血清不产生凝集。

2.4 仔猪小肠上皮细胞的黏附试验及黏附抑制试验

显微镜下观察表明 ,诱导表达的 **pnirBMisL-fedF1** 或 **pnirBMisL-fedF** 重组菌和标准株 107/86 或 2134P 一样均能较好地吸附于易感仔猪小肠上皮细胞( 图 2 ) ,但 **pnirBMisL-fedF( M )** 重组菌没有黏附上述小肠上皮细胞的特性( 图略 )。和表达 F18ab 或 F18ac 的 *E. coli* 标准株 107/86 和 2134P 一样 ,诱导表达的重组菌 **pnirBMisL-fedF1** 和 **pnirBMisL-fedF** 分别与兔抗 F18ab 菌毛 FedF 亚单位单因子血清( 1:100 稀释 )作用 30min 后 ,几乎丧失了吸附易感仔猪小肠上皮细胞的能力( 图 3 )。

3 讨论

自主转运蛋白通常由 3 个不同的功能区组成 :  
①氨基端的信号肽序列 ,②载客结构域( passenger domain ) ,③羧基端的  $\beta$  结构域( 又称转运单位 )。自主转运蛋白( autotransporter )在氨基端信号肽的引导下到达细菌内膜表面 ,然后通过 *Sec* 依赖的分泌通路实现跨内膜转运 ,氨基端的信号肽序列被切除后自主转运蛋白进入外周质间隙 ,紧接着羧基端的  $\beta$  结构域通过折叠形成反平行的  $\beta$  折叠股在外膜上形成一个类似于细菌通道蛋白的孔道 ,具有生物学活性的载客结构域通过该孔道伸向细胞外环境。载客结构域到达细菌表面后仍可仍与细菌外膜相连 ,也可以被其它一些蛋白酶( 或者自催化机制 )切割而进入细胞外环境<sup>[1]</sup>。鉴于上述 V 型分泌系统自身转运

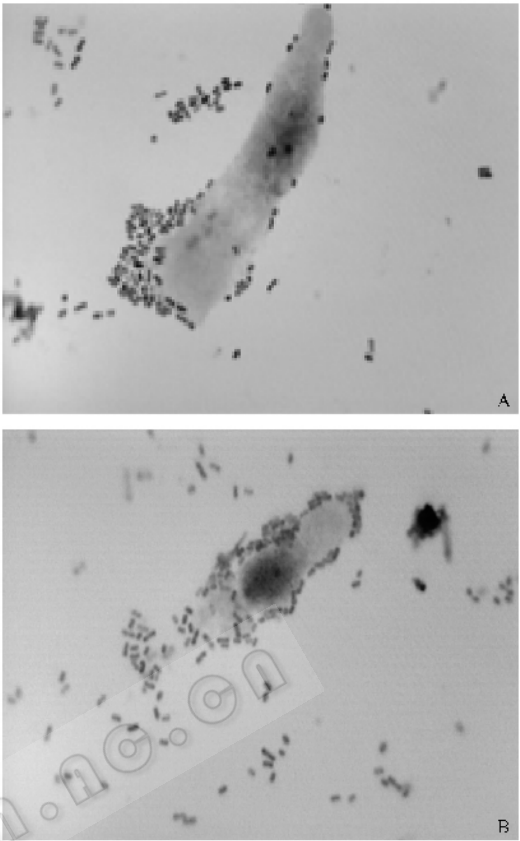


图 2 诱导表达的重组菌 **pnirBMisL -fedF1( A )**和 **pnirBMisL -fedF( B )**黏附易感仔猪小肠上皮细胞 ( 1000  $\times$  )

Fig.2 Adherence of the recombinant *E. coli* displaying FedF1( A )and FedF( B )to the small intestine epithelial cell.

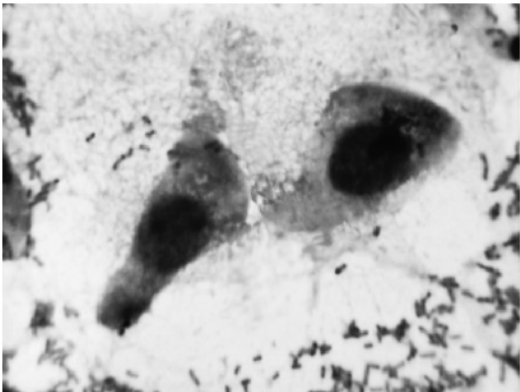


图 3 诱导表达的重组菌 **pnirBMisL-fedF1/fedF** 与抗血清作用后与易感仔猪小肠上皮细胞的黏附( 1000  $\times$  )

Fig.3 Adhesion inhibition test of the small intestine epithelial cells for the recombinant *E. coli* **pnirBMisL- fedF1** or **pnirBMisL-fedF** after preincubation with anti-rabbit sera against FedF subunit of F18ab fimbriae.

蛋白载客结构域的广泛多样性和 C 末端蛋白转运单位不需要任何辅助蛋白就能形成类似细菌膜孔道蛋白( Porin )的跨膜通道 ,并在 G<sup>-</sup> 菌表面分泌展示

载客结构域, Klauser 等<sup>[8]</sup>最先报道淋病奈瑟球菌 (*Neisseria gonorrhoeae*) 免疫球蛋白 IgA1 蛋白酶能表达该载客结构域的异源多肽——霍乱弧菌毒素 B 亚单位, 并通过转运蛋白单位转运分泌到外膜并展示在大肠杆菌和伤寒沙门氏菌表面, Veiga 等<sup>[9]</sup>用该系统表达和展示出能折叠形成二硫键空间构象的单链抗体 ScFv。大肠杆菌自身转运蛋白 AIDA-I (与扩散粘附有关的粘附素) 在自身宿主细胞表面也能分别有效展呈功能性 Y-hsp60 蛋白[小肠结肠炎耶森氏菌 (*Yersinia enterocolitica*) 热休克蛋白 60] 的 T 细胞表位, 酶学活性的  $\beta$ -内酰胺酶和具有直接侵入 HeLa 细胞活性的结核分枝杆菌毒力因子 InV X<sup>[10~12]</sup>。沙门氏菌外膜纤连蛋白结合蛋白 MisL (实质为膜插入和分泌蛋白, protein of membrane insertion and secretion), 由肠炎沙门氏菌第 3 毒力岛 SPI-3 ORF 编码, 与 AIDA-1C 末端结构域高度同源, 同时也被鉴定为自身转运蛋白, 它不仅能在鼠伤寒和伤寒沙门氏菌表面展示日发恶性疟原虫环孢子蛋白 (Circumsporozoite protein, CSP) 的功能性主要 B-cell 表位 (NANP 寡多肽重复单位), 且异源载客结构域容量达 20kDa<sup>[13]</sup>。本研究首先将 F18 大肠杆菌黏附素 FedF 的受体结合域 FedF1 利用沙门氏菌自主转运蛋白 MisL 的  $\beta$  结构域成功地展示在大肠杆菌 DH5 $\alpha$  表面, 紧接着我们又利用该系统将完整的 F18 大肠杆菌黏附素 FedF 展示在大肠杆菌 DH5 $\alpha$  表面, 且异源载客结构域容量达 28kDa, 如此大分子量的蛋白利用 V 型分泌系统在革兰氏阴性菌表面获得成功展示在国内外尚属首次。通过对 FedF 受体结合域内的第 88 和 89 位组氨酸进行双突变后, FedF 亚单位与仔猪小肠上皮细胞的结合能力完全丧失, 这表明第 88 和 89 位组氨酸对 FedF 受体结合域形成至关重要, 也进一步证实了 Smeds 等<sup>[3]</sup>的报道。

V 型分泌系统介导的菌体表面表达在生物技术上的应用具体表现在以下几方面: ① 抗原决定簇的暴露用于疫苗研究; ② 多肽文库的表达用于抗原表位定位或抗体特异性检测; ③ 特定受体或配体 (ligand) 的展示用于受体-配体的结合试验或受体、配体的纯化; ④ 分析异源多肽/蛋白质的功能性结构域; ⑤ 在细菌表面表达一些生物酶构建新型生物催化剂。本研究利用 V 型分泌系统菌体表面表达 F18 大肠杆菌的保护性抗原 FedF 黏附素, 从而为构建断奶仔猪腹泻和仔猪水肿病的细菌活载体疫苗奠定了基础, 同时也对黏附素 FedF 的功能性结构域进行了深入分析。我们相信随着对 V 型分泌系统的进一

步研究它将在生物技术上的应用发挥重大作用。

## 参 考 文 献

- [1] Henderson IR, Fernando NG, Desvaux M, et al. Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004, **68**(4): 692–744.
- [2] Smeds A, Hemman K, Jakava K, et al. Characterization of the Adhesion of *Escherichia coli* F18 fimbriae. *Infection and Immunity*, 2001, **69**(12): 7941–7945.
- [3] Smeds A, Pertovaara M, Timonen T, et al. Mapping the binding domain of the F18 fimbrial adhesin. *Infect Immun*, 2003, **71**(4): 2163–2172.
- [4] Vogeli P, Bertschinger HM, Stamm M, et al. Genes specifying receptors for F18 fimbriated *Escherichia coli*, causing oedema disease and postweaning diarrhea in pigs, map to chromosome 6. *Anim Genet*, 1996, **27**(5): 321–328.
- [5] 张建军, 朱国强, Schifferli DM. 猪产肠毒素大肠杆菌 F18 菌毛操纵子 *fedF18ab* 和 *fedF18ac* 基因克隆、表达及生物活性的研究. 江苏畜牧兽医研究. 见: 刘铁铮. 中国农业出版社. 第一版. 北京: 中国农业出版社, 2005.
- [6] 施启顺, 黄生强, 柳小春, 等. 不同猪种 *E. coli* F18 受体基因的多态性. 遗传学报, 2003, **30**(3): 221–224.
- [7] Alwan A, Designan T, O'Sullivan M, et al. Quantitative assay of *Salmonella* adherence to intestinal epithelial cells: a new method for assessing novel intervention products. *J Microbiol Methods*, 1998, **33**(2): 163–170.
- [8] Klauser T, Kramer J, Otzelberger K, et al. Characterization of the *Neisseria* IgA beta-core. The essential unit for outer membrane targeting and extracellular protein secretion. *J Mol Biol*, 1993, **234**: 579–593.
- [9] Veiga E, de Lorenzo V, Fernandez LA. Probing secretion and translocation of a beta-autotransporter using a reporter single-chain Fv as a cognate passenger domain. *Mol Microbiol*, 1999, **33**(6): 1232–1243.
- [10] Konieczny MP, Suhr M, Noll A, et al. Cell surface presentation of recombinant (poly-)peptides including functional T-cell epitopes by the AIDA autotransporter system. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2000, **27**(4): 321–332.
- [11] Lattemann CT, Maurer J, Gerland E, et al. Autodisplay: functional display of active  $\beta$ -lactamase on the surface of *Escherichia coli* by the AIDA-I autotransporter. *J Bacteriol*, 2000, **182**(13): 3726–3733.
- [12] Maurer J, Jose J, Meyer TF. Autodisplay: one-component system for efficient surface display and release of soluble recombinant proteins from *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1997, **179**(3): 794–804.
- [13] Fernando RP, Rocío LK, Araceli SM, et al. Expression of the *Plasmodium falciparum* immunodominant epitope (NANP) 4 on the surface of *Salmonella enterica* using the autotransporter MisL. *Infect Immun*, 2002, **70**(7): 3611–3620.

## Display of the F18 fimbrial adhesin on the bacterial surface using type V secretion system and characterization of the binding domain of the adhesin

YUAN Zhi-wei, JIANG Ying, WANG Jian-ye, ZHU Guo-qiang\*

(College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

**Abstract** The  $\beta$  domains of autotransporters (also called type V secretion system) have been demonstrated to be feasible tools to display foreign passenger domain on the bacterial surface. In the present work, using the DNA manipulation the type V secretion system MisL displaying the binding domain FedF1 of the F18ab fimbrial adhesin was constructed, and the full length adhesin FedF of F18ab fimbriae and the FedF mutant (with the 88<sup>th</sup> and 89<sup>th</sup> amino acid residues changed from Histadine to Alanine) on the surface of *E. coli* DH5 $\alpha$ , respectively. The recombinant *E. coli* DH5 $\alpha$  with the different recombinant plasmids of pnirBMisL-fedF1, pnirBMisL-fedF and pnirBMisL-fedF(M) were induced at anaerobic conditions. After induction, the binding domain FedF1 of the FedF and adhesin FedF displayed on the surface of *E. coli* DH5 $\alpha$  were tested for their agglutination and adhesion capability with the anti-rabbit sera against FedF subunit or the small intestinal epithelial cells from susceptible piglets. The results showed that the pnirBMisL-fedF1 or pnirBMisL-fedF recombinant bacteria could agglutinate with the anti-rabbit sera against FedF subunit and adhere to the small intestinal epithelial cells well. But the recombinant bacterial strain with the recombinant plasmid pnirBMisL-fedF(M) completely abolished the agglutination characteristic and receptor adhesiveness. These results confirmed that the binding domain FedF1 of the F18ab fimbrial adhesin and the adhesin FedF of F18ab fimbriae could be transported and displayed functionally on the surface of *E. coli* DH5 $\alpha$  by using type V secretion system and the His-88 and His-89 amino acid residues located in the FedF adhesin were important for the formation of the binding domain of the adhesin FedF of F18ab fimbriae.

**Keywords** : type V secretion system ; autotransporter ; bacterial surface display ; binding domain of fedF for F18 fimbriae

\* Corresponding author. Tel : 86-514-7972590 ; Fax : 86-514-7972218 ; E-mail : yzgzhu@yzu.edu.cn, yzgzhu@hotmail.com