

# 重组 ETEC k88ac-LT<sub>B</sub> 干酪乳杆菌在人工消化液中的生存性能

魏春华<sup>1</sup>, 刘建奎<sup>1</sup>, 侯喜林<sup>1</sup>, 王桂华<sup>2</sup>, 余丽芸<sup>1,2</sup>

1 黑龙江八一农垦大学动物科技学院, 大庆 163319

2 黑龙江八一农垦大学生命科学技术学院, 大庆 163319

**摘要:** 探讨重组干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)在人工消化液中的存活能力。将 K88ac-LT<sub>B</sub> 基因从表达载体 pQE-30 克隆到 *L. casei* 细胞表面表达载体 pLA 中, 构建了重组表达载体 pLA-K88ac-LT<sub>B</sub>, 并将其电转化至 *L. casei* 中, 在 MRS 培养基中培养后, Western blotting 检测, 有约 71.2 kD 蛋白得到了表达, 表达蛋白的大小与理论值相符且可被抗血清所识别, 间接免疫荧光实验及流式细胞结果表明, 多聚谷氨酸合成酶 A 蛋白(pgsA)能够将融合蛋白成功地展示在菌体表面。将重组菌接种于人工模拟的胃肠液中, 通过平板计数观察其存活能力。结果表明, 重组干酪乳杆菌在人工消化液中均具有良好的存活性能, 符合益生菌的基本特征, 为实验动物模型的建立奠定了基础。

**关键词:** ETEC, 干酪乳杆菌, 表面表达, 生存性能

## Survival properties of ETEC surface-displayed K88ac-LT<sub>B</sub> on *Lactobacillus casei*

Chunhua Wei<sup>1</sup>, Jiankui Liu<sup>1</sup>, Xilin Hou<sup>1</sup>, Guihua Wang<sup>2</sup>, and Liyun Yu<sup>1,2</sup>

1 College of Animal Science and Technology, Heilongjiang August First Land Reclamation University, Daqing 163319, China

2 College of Life Science and Technology, Heilongjiang August First Land Reclamation University, Daqing 163319, China

**Abstract:** K88ac-LT<sub>B</sub> gene derived from pQE30-K88ac-LT<sub>B</sub> was cloned into the expression vector pLA and then the recombinant vector was transformed into the competent cells *Lactobacillus casei* 525. The recombinant bacteria were grown at 37°C, in MRS broth. Western blotting analysis with rabbit-anti-K88ac-LT<sub>B</sub> polyclonal serum indicated that the recombinant protein reacted with the specific antibodies. The results showed that the molecular weight of the recombinant protein was about 71.2 kD. The K88ac-LT<sub>B</sub> fusion protein on the cell surface was confirmed by immunofluorescence microscopy and flow cytometric analysis. In addition, the survival of recombinant *Lactobacillus casei* 525 was studied in imitative gastrointestinal environments such as artificial gastro fluid (pH 1.5–5.5), artificial intestinal fluid, bile(0.3–3.0 g/L). The results indicated that the recombinant strain survived well in artificial gastric fluids at pH 2.5–4.5 in 5 h. The recombinant *Lactobacillus casei* 525 could slowly grow in the artificial intestinal fluid for different time, and could survive in 0.3% bile.

**Received:** July 2, 2008; **Accepted:** November 12, 2008

**Supported by:** The Science and Technology Project for Returnee by National Ministry of Personnel, the Foundation of Heilongjiang Educational Committee(No. 11511249), the Foundation of the Key Science and Technology Research in Daqing(No. SGG2006-011), Program for graduate student of Heilongjiang Province.

**Corresponding author:** Xilin Hou, Liyun Yu. Tel: +86-459-6819292; Fax: +86-459-6819201; E-mail: xly\_hou@yahoo.com.cn

国家人事部留学回国人员科技项目, 黑龙江省教育厅课题(No. 11511249), 大庆市攻关课题(No. SGG2006-011), 研究生创新工程资助。

**Keywords:** ETEC, *Lactobacillus casei*, surface display, survival properties

仔猪腹泻是养猪生产中的常见传染病,给世界养猪业造成了巨大经济损失。产肠毒素大肠杆菌 K88(ETEC K88)是引发新生和断奶前仔猪腹泻病的最主要致病菌,我国有约 35%的仔猪腹泻病是因 ETEC K88 侵染而引起的,其致死率在 10%~30%之间。仔猪小肠上皮细胞有无 ETEC K88 受体是仔猪被 ETEC K88 感染时是否发病的关键。ETEC K88 入侵猪肠道后,通过其特异性黏附素附着于小肠上皮细胞表面的受体,大量繁殖产生肠毒素,致使肠上皮细胞分泌功能亢进,大量水和电解质进入肠腔而引起腹泻<sup>[1-3]</sup>。

乳酸菌是一组重要的应用于食品发酵和贮藏的革兰氏阳性微生物。其中,双歧杆菌首先得到重视,随后,嗜酸乳杆菌也被广泛研究并得以应用。近年来,益生菌研究重点已经逐渐转向以干酪乳杆菌为代表的适温益生菌。随着乳酸菌分子生物学的发展和电转化转基因技术的建立以及乳酸菌不同表达信号的分离和克隆,以乳酸菌作为活载体进行疫苗、药物、微生态制剂等外源蛋白传递的研究受到了人们的广泛关注,利用乳酸菌作为抗原传递载体进行黏膜免疫的研究,则是近年来该领域的前沿和热点<sup>[4-6]</sup>。

目前普遍认为,在宿主细胞表面表达外源抗原是活载体疫苗向黏膜免疫系统提呈抗原的最佳方式。因此,本研究采用一种新型细胞表面展示系统,借助于枯草芽孢杆菌的 pgsA 锚定蛋白将 K88ac-LT<sub>B</sub> 连接在 pLA 上,从而在 *L. casei* 表面表达,通过人工消化液中生存性能的研究表明重组干酪乳酸菌在胃肠道环境中均具有良好的存活性能,从而为乳酸菌口服疫苗的研制提供了理论参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 菌株、质粒

pQE30-K88ac-LT<sub>B</sub>,由预防兽医学实验室构建保存;干酪乳杆菌表面表达载体 pLA,由本实验室构建并保存;干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)购自中国典型培养物保藏中心。

#### 1.1.2 主要试剂

兔源抗 K88ac-LT<sub>B</sub> 和抗 pgsA 血清由本实验室制

备保存;HRP 标记的羊抗兔 IgG 和 MRS 培养基均购自 Sigma 公司;FITC 标记的羊抗兔 IgG 购自中杉金桥生物技术有限公司;胃蛋白酶(德国 Merck 公司生产,酶活力 1:10 000);胰蛋白酶(美国 Sigma 公司生产,酶活力 1:250);其他生化试剂均为国产分析纯产品。

#### 1.1.3 引物

PCR 鉴定时所用引物如下:

K88 F: 5'-CGCGGATCCATGAAAAAGACTCTGA-3';

K88 R: 5'-CGCGAGCTCTTAACTATAAATAACG-3';

pgsA F: 5'-CGCGGTACCATGAAAAAGAAC TG-3';

pgsA R: 5'-CGCGGATCCTTTAGATTTTAGTT TGTC-3'.

## 1.2 方 法

### 1.2.1 重组质粒的构建

重组质粒 pQE30-K88ac-LT<sub>B</sub> 经 BamH I 和 Hind III 双酶切后,回收目的基因片段 K88ac-LT<sub>B</sub>,与双酶切的 pLA 载体连接,按照 Aymerich MT 等<sup>[7]</sup>方法制备 *L. casei* 感受态细胞,将重组质粒及空载体对照在 2.3 kV、100Ω、25 μF 的电击条件下转化,电击时间约为 4 ms,将转化子涂布于 MRS 固体培养基(含氯霉素 10 μg/mL),37°C 厌氧培养 48 h,挑选菌落,按照 Ian B. Powell 等<sup>[8]</sup>方法从乳酸杆菌中提取质粒 DNA,PCR 鉴定阳性克隆,重组质粒命名为 pLA-K88ac-LT<sub>B</sub>。

### 1.2.2 重组质粒的表达及产物的鉴定

将重组质粒的单个菌落接种于 5 mL MRS 液体培养基中过夜培养,活化菌种按 1:100 比例接种于 10 mL MRS 培养基中进行培养,当 A<sub>600</sub> 达到 1 时,每隔 1 h 取 1 mL 样品,共取 3 次。样品以 3500 r/min 离心 5 min,菌体用 500 μL 10 mg/mL 的溶菌酶悬浮,37°C 水浴作用 45 min,沸水浴 5 min,灭活溶菌酶,3500 r/min 离心 5 min,弃上清,加入样品缓冲液(含 DTT),混匀,沸水浴 10 min,12 000 r/min 离心 5 min,以蛋白质标准分子量为参考,进行 12% SDS-PAGE 电泳分析。

1) 免疫印迹(Western blotting):取表达 3 h 后的

含空质粒和含重组质粒的蛋白样品进行 SDS-PAGE, 电泳结束后, 经 SAV140 型 MINIBLOTMOUDLE 转印装置将蛋白转移到经转印缓冲液平衡的硝酸纤维素膜上。转印结束后, 5% 脱脂乳 4°C 封闭过夜, 以免源抗 K88ac-LT<sub>B</sub> 和抗 pgsA 血清作为第一抗体, 以辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG 作为第二抗体孵育, 反应结束后在 DAB 显色溶液中显色, 观察结果。

2) 间接免疫荧光检测: 取表达 3 h 后的阳性重组菌和空载体对照菌液 1 mL, 离心去上清后, 分别用 PBS 低速离心洗涤 3 次, 之后重悬于 PBS 中, 取适量涂片, 用 95% 冷乙醇室温固定 30 min, 5% 脱脂乳室温封闭 1 h, PBS 洗 3 次, 于被检标本上滴加兔源抗 K88ac-LT<sub>B</sub> 血清抗体, 置于湿盒中, 37°C 感作 1 h, PBS 洗 3 次, 滴加 FITC 标记的抗兔荧光二抗 (1:100 稀释), 置于湿盒中, 室温感作 2 h (避光), PBS 洗 3 次, 最后用蒸馏水洗 1 次, 甘油缓冲液封片后镜检。

3) 流式细胞检测分析: 取表达 3 h 后的阳性重组菌和干酪乳杆菌 (*L. casei*), 用 300 目筛网过滤, 4°C, 3500 r/min 离心 5 min 收集菌体, PBS 洗 2 次, 重悬于 PBS 中, 使菌体数达到  $5 \times 10^7 \sim 5 \times 10^8$  CFU/mL, 加入 5% BSA 的 PBS 室温封闭 1 h, PBST 洗 3 次, 加入兔源抗 K88ac-LT<sub>B</sub> 血清室温作用 2 h, PBST 洗 3 次, 加入 FITC 标记的抗兔荧光二抗 4°C 作用 2 h, PBST 洗 3 次, 悬于 PBS 中在流式细胞仪下检测。

### 1.2.3 重组干酪乳杆菌培养液 pH 及生长动态

在 MRS 液体培养基中分别接种非重组干酪乳杆菌、重组干酪乳杆菌菌液, 37°C 静置培养过夜使菌种活化。将活化的菌种以 1:50 的接种量接入 MRS 液体培养基, 混合均匀后。取少量作为 0 h 样品, 测定培养液的  $A_{690}$  值, 以未接种的培养基作为空白对照调零, 同时测定培养液的 pH。37°C 厌氧培养。每隔 2 h 取样分别测培养液的  $A$  值与 pH。

### 1.2.4 人工胃液耐受性试验

人工胃液的配制按照中国药典 2005 版第二部人工胃液的配制方法配制。即取浓度为 1 mol/L 的盐酸, 加去离子水稀释, 使 pH 分别达到 1.5、2.5、3.5、4.5 和 5.5, 以每 100 mL 液体加 1 g 胃蛋白酶的比例进行配制, 充分溶解后, 用微孔滤膜 (孔径 0.2  $\mu$ m) 过滤除菌, 待用。将在 MRS 液体培养基中活化的菌种按 10% 接种量, 接种于以上不同 pH 的人工胃液中,

混匀, 37°C 培养, 每隔 0.5 h 取样, 直至 5 h。以无菌水做 100 倍倍比稀释, 采用平板计数法进行活菌计数。

### 1.2.5 人工肠液液耐受性试验

按照中国药典 2005 版第二部人工肠液的配制方法配制。取  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.68 g, 加去离子水溶解, 调 pH 至 6.8, 定容至 100 mL, 加入 1 g 胰蛋白酶, 充分溶解后, 用微孔滤膜 (孔径 0.2  $\mu$ m) 过滤除菌, 待用。将在 MRS 液体培养基中活化的菌种 10% 接种于人工肠液, 混匀, 37°C 培养, 每隔 0.5 h 取样, 直至 5 h。以无菌水做 100 倍倍比稀释, 采用平板计数法进行活菌计数。

### 1.2.6 胆汁耐受力试验

在 MRS 培养基中加入猪胆盐, 分别配制成胆汁质量分数为 0.05%、0.1%、0.2%、0.3% 和 0.4% 的 MRS 液体培养基, 118°C 灭菌待用。将活化的菌种以 10% 接种量接种于不同胆汁浓度的 MRS 液体培养基中, 37°C 厌氧培养 8 h, 观察生长情况。

## 2 结果

### 2.1 重组干酪乳杆菌 PCR 鉴定及序列分析

以提取的重组质粒作为模板, 分别以 K88 和 pgsA 的 F、R 为引物, 经 PCR 扩增出约 505 bp 和 1116 bp 的基因片段 (图 1)。同时将 K88 PCR 产物连接到 T 载体上, 送至北京基诺博实有限公司测序, 通过 DNASTAR 软件将所测得的基因序列同 GenBank 中发布的标准序列进行比较表明核苷酸序列的一致性达 99.8% 以上, 从而说明重组质粒成功转入干酪乳杆菌。

### 2.2 蛋白在干酪乳杆菌中的表达与鉴定

将重组质粒的单个菌落接种于 5 mL MRS 培养基, 过夜培养活化, 活化菌液按 1:10 接种于 MRS 培养基中, 37°C 培养 24 h, 取菌液, 溶菌酶裂解, 表达蛋白经 SDS-PAGE 电泳和 PVDF 膜转印后, 分别与兔源抗 K88ac-LT<sub>B</sub> 血清和兔源抗 pgsA 血清作用, 再经羊抗兔 IgG/HRP 二抗作用, Western blotting 分析, 在预期位置出现明显的条带 (71.2 kD), 与预计大小一致; 而干酪乳杆菌对照未见此条带, 含空质粒 pLA 对照可见其标签蛋白 (约 43 kD), 未见目的条带 (图 2), 说明表达的蛋白可被兔源 K88ac-LT<sub>B</sub> 抗血清和 pgsA 抗血清所识别。

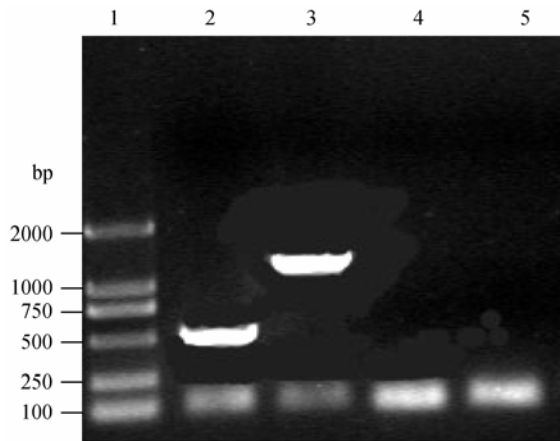


图1 重组质粒的PCR鉴定

Fig. 1 Identification of the recombinant plasmids by PCR. 1: DL2000 DNA marker; 2: amplified K88 by PCR; 3: amplified pgsA by PCR; 4, 5: negative control.

### 2.3 免疫荧光显微技术和流式细胞检测分析

以含空质粒 pLA 的乳杆菌为对照, 与含重组质粒的干酪乳杆菌一同进行间接免疫荧光实验, 分别用电子显微镜的明视野和绿色荧光进行检测, 实验结果表明, 重组干酪乳杆菌经荧光显微镜检查可见明显的绿色荧光(图 3A), 含空质粒 pLA 的乳杆菌未见绿色荧光(图 3B)。明视野下可见到与荧光视野下相同的细菌形态。由此表明, 重组干酪乳杆菌表达了外源蛋白 pLA-K88ac-LT<sub>B</sub>, 同时也表明表达的重组蛋白存在于菌体表面。

流式细胞计量术在数量上分析表面表达的融合蛋白, 含空质粒 pLA 的乳杆菌为与含重组质粒的干酪乳杆菌, 经一抗和二抗标记后进行流式细胞检测

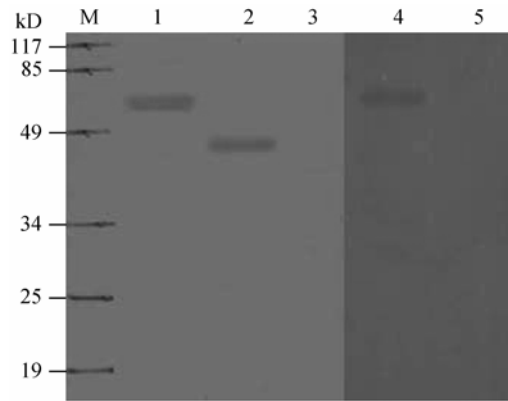


图2 重组蛋白以抗 K88ac-LT<sub>B</sub>(1, 2, 3)和 pgsA(4, 5)抗体作为一抗的 Western blotting 分析结果

Fig. 2 Western blotting analysis of the recombinant protein using anti-K88ac-LT<sub>B</sub> Ab(1, 2, 3) and anti-pgsA Ab (4, 5). M: prestained protein molecular weight marker; 1: pLA-K88ac-LT<sub>B</sub>/L. casei (71.2 kD, at 3 h); 2: pLA/L. casei as control (at 3 h); 3: L. casei as control (at 3 h); 4: pLA-K88ac-LT<sub>B</sub>/L. casei (71.2 kD, at 3 h); 5: L. casei as control (at 3 h).

分析, 结果表明, 重组干酪乳杆菌的荧光信号强度明显高于含有空质粒 pLA 的干酪乳杆菌阴性对照组(图 3C), 结果与免疫荧光检测结果相符, 进一步证明抗原蛋白大量表达在乳杆菌表面。

### 2.4 重组干酪乳杆菌培养液 pH 及生长状况动态分析

间隔 2 h 取培养菌液检测 pH (图 4)及其 A<sub>690</sub> 值(图 5)。从结果可知重组干酪乳杆菌酸化培养液及其生长状态与非重组菌(未转化外源基因的乳杆菌)基本相同, 说明外源基因的插入并未影响重组菌的生长。

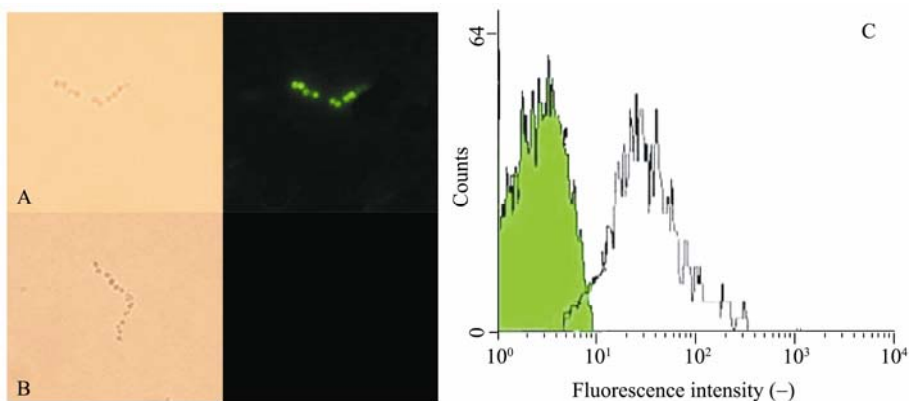


图3 免疫荧光和流式细胞仪检测重组蛋白

Fig. 3 Immunofluorescence microscopy and flow cytometry analysis of the recombinant protein. (A) Recombinant *L. casei* cells expressing pLA-K88ac-LT<sub>B</sub>. Bright-field images are shown on the left. (B) schematic diagram of *L. casei* contain plasmid DNA pLA as control (C) Fluorescence-activated cell sorter histograms of wild-type *L. casei* (filled) and of the recombinant *L. casei* cells (open). The cells were probed with rabbit anti-K88ac-LT<sub>B</sub> polyclonal antibodies, followed by anti-rabbit IgG antibody and fluorescence isothiocyanate-conjugated streptavidin.

### 2.5 人工胃液耐受性试验

重组干酪乳杆菌在 pH 为 1.5 的人工胃液中, 经过 5 h 培养, 存活率很低, 基本不能存活, 在 pH 为 2.5、3.5 的人工胃液中均能保持较高的存活率。在 pH 为 4.5、5.5 时重组干酪乳杆菌具有较显著的生长趋势(图 6)。

### 2.6 人工肠液耐受性试验

重组干酪乳杆菌在人工肠液中经过不同培养时间后, 检测到的活菌数呈上升趋势, 说明耐受性良好(图 7)。

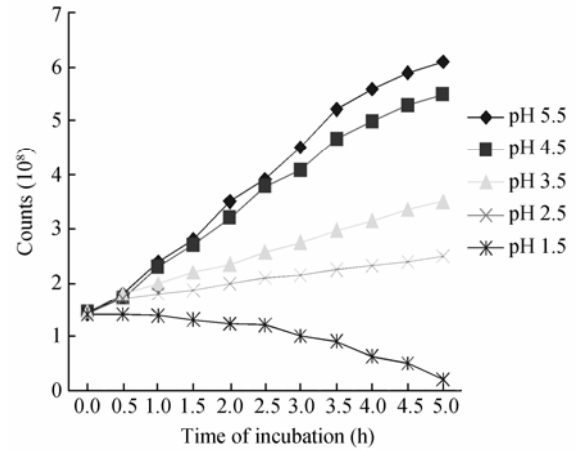


图 6 人工胃液的耐受性  
Fig. 6 Tolerance in artificial gastro fluid.

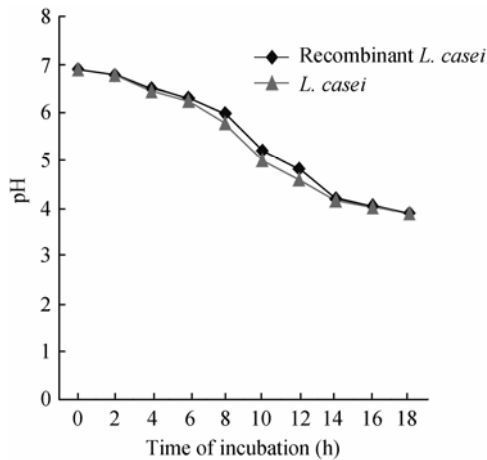


图 4 培养液 pH 变化  
Fig. 4 pH changes in culture.

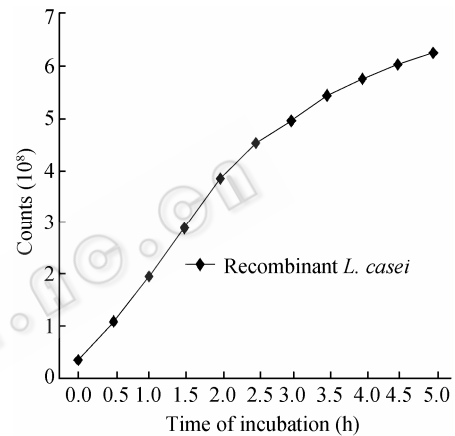


图 7 人工肠液的耐受性  
Fig. 7 Tolerance in artificial intestinal fluid.

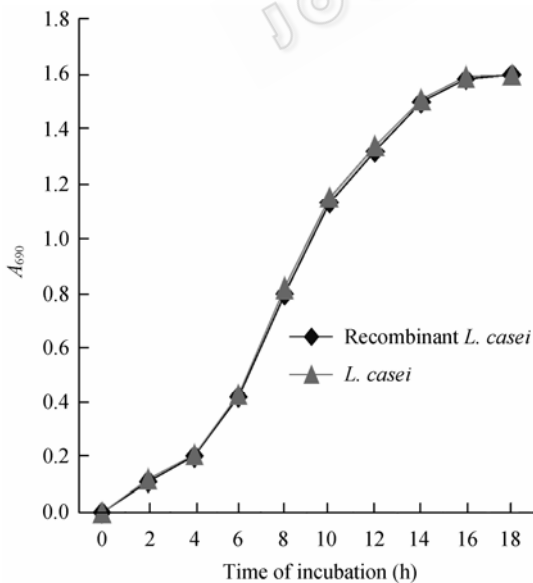


图 5 干酪乳杆菌生长曲线  
Fig. 5 Growth curve of *L. casei*.

### 2.7 胆汁耐受力试验

重组干酪乳杆菌对肠道胆汁环境具有良好的耐受性, 在 0.05%、0.1%的胆汁酸盐环境中生长良好, 在胆汁酸盐浓高达 0.3%时, 仍能缓慢生长(表 1)。

表 1 重组干酪乳杆菌对胆汁的耐受性结果

Concentrations of bile (%)	Growth conditon	A <sub>690</sub>
0.05	++	0.360
0.10	++	0.320
0.20	+	0.200
0.30	±	0.065
0.40	-	0.000

“++” Growth well; “+” Growth; “±” Growth slowly; “-” No growth.

## 3 讨论

产肠毒素性大肠杆菌(ETEC)给我国乃至世界的

畜禽养殖业带来了极大的危害,造成了巨大的经济损失。对于腹泻性疾病,口服免疫突出的优点是可有效地刺激黏膜免疫细胞产生分泌型 IgA 并引起全身免疫,但口服免疫需要克服免疫保护性抗原在到达肠道粘膜之前,在胃和肠道中被降解或灭活的可能,为了满足这一要求必须用活载体系统来传递完整无损的抗原成分<sup>[9-12]</sup>。虽然以细菌、病毒为活载体均可达到这一目的,但作为安全无毒,能在肠道粘膜定居的乳酸菌被认为是最合适的载体系统。另外,乳酸菌本身是肠道益生菌,在体内能够发挥许多生理功能,诸如改善胃肠道功能、提高免疫能力、抗菌、降低胆固醇、调节血脂等。目前普遍认为,在宿主细胞表面表达外源抗原是活载体疫苗向黏膜免疫系统提呈抗原的最佳方式,据此,本实验采用了一种基于枯草芽孢杆菌 pgsA 锚定蛋白的新型细胞表面表达系统,在这个系统中,目的蛋白通过 N 端与 pgsA 相连,从而使融合蛋白高效表达在细胞表面。通过 Western blotting, 间接免疫荧光和流式细胞术的检测表明目的蛋白成功表达并锚定在乳酸菌表面,通过在人工消化液中生存性能的研究,表明重组干酪乳杆菌在消化环境中均具有良好的存活性能,说明重组干酪乳酸菌能够顺利到达胃肠道而发挥免疫效果,从而为乳酸菌作为活疫苗载体生产基因工程苗奠定了基础。

## REFERENCES

- [1] Van den Broeck W, Cox E, Oudega B, *et al.* The F<sub>4</sub> fimbrial antigen of *E. coli* and its receptors. *Vet Microbiol*, 2000, **71**(3-4): 223-244.
- [2] Fang L, Gan Z, Marquardt RR. Isolation, affinity purification, and identification of piglet small intestine mucosa receptor for enterotoxigenic *Escherichia coli* k88ac+ fimbriae. *Infect Immun*, 2000, **68**(2): 564-569.
- [3] Billey LO, Erickson AK, Francis DH. Multiple receptors on porcine intestinal epithelial cells for the variants of *Escherichia coli* F4 fimbrial adhesin. *Vet microbial*, 1998, **59**(2): 203-212.
- [4] Pouwels PH, Leer RJ, Boersma WJ, *et al.* The potential of *Lactobacillus* as a carrier for oral immunization; development and preliminary characterization of vector systems for targeted delivery of antigen. *Biotechnology*, 1996, **44**: 183-192.
- [5] Nouaille S, Ribeiro LA, Miyoshi A, *et al.* Heterologous Protein production and delivery systems for *Lactococcus lactis*. *Genet Mol Res*, 2003, **2**(1): 102-111.
- [6] Scheppler L, Vogei M, Zuercher AW, *et al.* Recombinant *Lactobacillus johnsonii* as a mucosal vaccine delivery vehicle. *Vaccine*, 2002, **20**:2913-2920.
- [7] Aymerich MT, Hugas M, Garriga M, *et al.* Electrotransformation of meat lactobacilli. Effect of several parameters on their efficiency of transformation. *J Appl Bacteriol*, 1995, **75**: 320-325.
- [8] Powell IB, Achen MG, Hillier AJ, *et al.* A simple and rapid method for genetic transformation of lactic *Streptococci* by electroporation. *Appl Environ Microbiol*, 1988, **54**(3): 655-660.
- [9] Eriksson K, Holmgren J. Recent advances in mucosal vaccines and adjuvants. *Curr Opin Immunol*, 2002, **14**: 666-672.
- [10] Brandtzaeg P. Role of secretory antibodies in the defence against infections. *Int J Med Microbiol*, 2003, **293**: 3-15.
- [11] Michetti P, Mahan MJ, Schlauch JM, *et al.* Monoclonal secretory immunoglobulin A protects mice against oral challenge with the invasive pathogen *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun*, 1992, **60**: 1786-1792.
- [12] Taylor HP, Dimmock NJ. Mechanism of neutralization of influenza virus by secretory IgA is different from that of monomeric IgA or IgG. *J Exp Med*, 1985, **161**: 198-209.