

牛源致病性蜡样芽孢杆菌溶血素 BL 亚基的原核表达及其生物学活性分析

陈云娇, 何云江, 孟庆磊, 刘志林, 张鑫, 贾泽林, 崔佳宇, 王学理*

内蒙古民族大学动物科技学院, 内蒙古 通辽 028042

陈云娇, 何云江, 孟庆磊, 刘志林, 张鑫, 贾泽林, 崔佳宇, 王学理. 牛源致病性蜡样芽孢杆菌溶血素 BL 亚基的原核表达及其生物学活性分析[J]. 生物工程学报, 2023, 39(12): 4939-4949.

CHEN Yunjiao, HE Yunjiang, MENG Qinglei, LIU Zhilin, ZHANG Xin, JIA Zelin, CUI Jiayu, WANG Xueli. Prokaryotic expression and biological activities of the hemolysin BL subunit of a pathogenic *Bacillus cereus* of cattle origin[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(12): 4939-4949.

摘要: 蜡样芽孢杆菌属于革兰氏阳性菌, 分布广泛, 具有一定的致病性。不同的蜡样芽孢杆菌携带有不同的毒力因子, 这直接决定了蜡样芽孢杆菌株致病性的差异。研究和探讨毒力因子分布以及具体毒素的生物活性有助于对蜡样芽孢杆菌病采取更科学的防控。本研究通过原核表达系统将溶血素 BL 三亚基重组表达, 并对表达蛋白进行了纯化和部分生物学活性的检测。研究表明, 牛源致病性蜡样芽孢杆菌溶血素 BL 可以在原核表达系统中成功表达和纯化, 牛源致病性蜡样芽孢杆菌溶血素 BL 拥有溶血性、细胞毒性、很好的免疫原性以及小鼠具有一定的免疫保护性。本研究表达了溶血素 BL 三亚基, 并探究了牛源致病性蜡样芽孢杆菌溶血素 BL 的生物学活性。本研究为进一步揭示蜡样芽孢杆菌溶血素 BL 的致病作用机制和建立针对牛源致病性蜡样芽孢杆菌病的检测方法奠定了理论基础。

关键词: 蜡样芽孢杆菌; 牛; 溶血素 BL 亚基; 原核表达

资助项目: 内蒙古自治区自然科学基金(2021LHMS03008); 内蒙古自治区直属高校基本科研业务费多学科交叉研究项目(GXKY22003)

This work was supported by the Inner Mongolia Autonomous Region Natural Science Foundation (2021LHMS03008) and the Multi-disciplinary Research Project of Basic Research Foundation of Universities Directly under Inner Mongolia Autonomous Region (GXKY22003).

*Corresponding author. E-mail: wangx19577@aliyun.com

Received: 2023-06-28; Accepted: 2023-09-18; Published online: 2023-10-17

Prokaryotic expression and biological activities of the hemolysin BL subunit of a pathogenic *Bacillus cereus* of cattle origin

CHEN Yunjiao, HE Yunjiang, MENG Qinglei, LIU Zhilin, ZHANG Xin, JIA Zelin, CUI Jiayu, WANG Xueli*

College of Animal Science and Technology, Inner Mongolia Minzu University, Tongliao 028042, Inner Mongolia, China

Abstract: *Bacillus cereus* belongs to Gram-positive bacteria, which is widely distributed in nature and shows certain pathogenicity. Different *B. cereus* strains carry different subsets of virulence factors, which directly determine the difference in their pathogenicity. It is therefore important to study the distribution of virulence factors and the biological activity of specific toxins for precise prevention and control of *B. cereus* infection. In this study, the hemolysin BL tripartite was expressed, purified, and characterized. The results showed that the bovine pathogenic *B. cereus* hemolysin BL could be expressed and purified in the prokaryotic expression system, and the bovine pathogenic *B. cereus* hemolysin BL showed hemolysis, cytotoxicity, good immunogenicity and certain immune protection in mice. In this study, the recombinant expression of hemolysin BL tripartite was achieved, and the biological activity of hemolysin BL of bovine pathogenic ceroid spore was investigated. This study may facilitate further investigating the pathogenic mechanism of *B. cereus* hemolysin BL and developing a detection method for bovine pathogenic *B. cereus* disease.

Keywords: *Bacillus cereus*; cattle; hemolysin BL subunit; prokaryotic expression

蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*), 是一种革兰氏阳性、杆状、好氧或兼性厌氧的运动性细菌, 可形成内生性孢子和生物膜, 广泛存在于自然环境中^[1]。*B. cereus* 最初是从牛舍空气中分离到的, 该菌通常呈单个细胞状态, 有时单个细胞也会串联成线状结构^[2-3]。*B. cereus* 曾被认为是一种无害的微生物, 一些 *B. cereus* 还被应用于动物饲料添加剂、人类食品添加剂和环境修复等领域^[4-6]。自 20 世纪 60 年代起, *B. cereus* 因导致多种肠道和肠外感染而逐渐受到重视。根据相关报告, *B. cereus* 在 2018 年是比利时食源性感染的首要病原体; 在 2007-2014 年间, 是法国食源性感染的第二大病原体; 在 2017 年,

是中国食源性感染事件中排名第五的病原体^[7-9]。流行病学数据显示, 与呕吐症状相关的食物包括被 *B. cereus* 污染的大米、面食、糕点和面条, 而与腹泻症状相关的食物则包括被 *B. cereus* 污染的蔬菜、肉制品和奶制品^[10]。此外, 在保加利亚、芬兰、匈牙利和挪威报道的腹泻型疾病频率较高; 而在日本和英国报道的呕吐型疾病频率较高, 这些数据可能反映了不同国家的饮食习惯, 并表明某些食物携带了含有特定毒力因子集合的 *B. cereus* 菌株, 从而更容易引起呕吐或腹泻^[11]。*B. cereus* 的致病力与其携带的不同毒力因子集有关, 其毒力因子主要包括呕吐毒素 (cereulide)、HBL、NHE、肠毒素 FM、肠毒素 T

和 *CytK* 等,这直接决定了 *B. cereus* 致病力的差异。其中 Hbl 是一种主要由 HblB、HblL1 和 HblL2 这 3 个亚基组成的重要毒力因子,由 *hblC*、*hblD* 基因分别编码的两个裂解组分 L1、L2 和 *hblA* 基因编码的结合蛋白 B 组成,对肠道细胞和多种其他人类细胞具有溶血和细胞毒性作用。深入研究牛源致病性 *B. cereus* Hbl 的生物学活性对于揭示其致病机制和防控该病具有重要意义。

目前,关于 *B. cereus* 引起食源性疫情的研究已有报道,但其导致人类和畜禽动物全身性感染病症的机制和作用模式尚不明确。先前的研究表明,*B. cereus* 菌株在毒力方面存在显著差异^[1,12],因此选择具有特定宿主感染能力的致病菌株来探讨其相关毒力因子和致病机制是一个有效的策略。本研究使用 pCold 原核表达系统构建了可以表达牛源致病性 *B. cereus* HblB、HblL1 和 HblL2 蛋白的表达菌株。表达菌株经诱导后表达出 rHblB、rHblL1 和 rHblL2 蛋白,并对表达蛋白进行了纯化和部分生物学活性的检测,以期为进一步揭示牛源致病性 *B. cereus* Hbl 毒素的作用机制和建立相应的检测方法奠定理论基础。

1 材料与方 法

1.1 菌株及实验动物

菌株:牛源致病性 *B. cereus* 由本实验室分离鉴定。该菌株在 GenBank 上已注册的序列号为 OP028902,中国普通微生物菌种保藏中心编号为 CGMCC No.17626。

实验动物:30 只 6-8 周龄雄性昆明小鼠,购自辽宁长生生物技术股份有限公司[实验动物生产许可证号 SCXK(辽)2020-0001]。动物实验研究由内蒙古民族大学动物保护与利用委员会审核通过,动物伦理委员会的相关批准号为:

IMUN20190301。

1.2 主要试剂

4×Protein SDS PAGE Loading Buffer、ProteoGuard™ EDTA-Free Protease Inhibitor Cocktail 购自 TaKaRa 公司;BeyoECL Plus 超敏化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL)试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;凝胶蛋白质蓝染试剂盒和辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的羊抗小鼠 IgG 购自博士德生物(BOSTER);His-Tag (27E8) Mouse mAb #2366 购自 Cellsignal。

1.3 原核表达载体的构建

1.3.1 *hblA*、*hblD*、*hblC* 基因的 PCR 扩增及测序

通过 SnapGene 4.3.6 软件设计无信号肽序列的 in-fusion 克隆引物,通过 primer-BLAST 验证无误后,交由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。*B. cereus* 进行复苏及增菌,参考说明书,使用 TaKaRa MiniBEST Bacteria Genomic DNA Extraction Kit Ver.3.0 进行 *B. cereus* 全基因组 DNA 的提取。以 *B. cereus* 全基因组 DNA 为模板,使用合成的 3 条引物扩增 *hblA*、*hblD* 及 *hblC* 基因(表 1),反应程序为:94 °C 预变性 4 min;94 °C 变性 0.5 min,55 °C 退火 0.5 min,72 °C 延伸 1.5 min,共 30 个循环;72 °C 延伸 7 min。进行 DNA 琼脂糖凝胶电泳分析并回收纯化。回收后进行浓度测定,*hblA* 的浓度为 66.5 ng/μL、*hblD* 的浓度为 72.2 ng/μL、*hblC* 的浓度为 60.1 ng/μL。取 PCR 产物进行测序。

1.3.2 原核表达载体的构建

使用大肠杆菌冷休克表达系统进行 rHblB、rHblL1 和 rHblL2 的原核表达,选择 pColdI 载体分别与纯化的 *hblA*、*hblD* 和 *hblC* 基因连接,获得重组质粒 pColdI-*hblA*、pColdI-*hblD* 和 pColdI-*hblC*。

表 1 扩增 *hblA*、*hblD*、*hblC* 基因的引物Table 1 Primers for amplifying the *hblA*, *hblD*, and *hblC* genes

Gene name	Primer name	Primer sequence (5'→3')	Size (bp)
<i>hblA</i>	<i>hblA</i> -F	<u>GGCATATGGAGCTCGGTACC</u> AGTGAATTGAACAAACGAACAATG	1 071
	<i>hblA</i> -R	<u>GCAGGTCGACAAGCTT</u> CTATTTTTGTGGAGTAACAGTTTCC	
<i>hblD</i>	<i>hblD</i> -F	<u>GGCATATGGAGCTCGGTACC</u> CAAGAAACGACCGCTCAAGA	1 167
	<i>hblD</i> -R	<u>GCAGGTCGACAAGCTT</u> CTACTCCTGTTTAAAAGCAATATCT	
<i>hblC</i>	<i>hblC</i> -F	<u>GGCATATGGAGCTCGGTACC</u> GAAACTCAACAGGAAGGCATGG	1 260
	<i>hblC</i> -R	<u>GCAGGTCGACAAGCTT</u> TAAAATTATATACTTGTTCTTC	

The underlined parts are the homologous arm sequence of the target gene and the pColdI vector, and the bold parts are the restriction sites *Kpn* I or *Hind* III.

1.4 重组蛋白的诱导表达及纯化

参考 BL21 感受态细胞和 pColdI 载体的说明书, 使用热激法进行载体的转化操作, 次日增菌。扩增的菌液提取质粒进行酶切鉴定, 鉴定无误后将表达菌株扩增后与甘油 1:1 混匀保存于 -80°C 备用。

取出 3 株表达菌株进行复苏操作。从已复苏的表达菌中取 50 μL 菌液接种到 5 mL LB 液体培养基中[氨苄霉素(ampicillin, Amp)抗性], 在 37°C 、170 r/min 下培养。培养过程中每隔 1 h 测定一次菌液的 OD_{600} 值, 以监测细胞生长情况。当 OD_{600} 值达到 0.6 时, 将菌液迅速转移到 15°C 冷水中冷却 30 min, 然后向其中加入终浓度为 0.5 mmol/L 的异丙基- β -D-1-硫代半乳糖吡喃糖苷(isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside, IPTG)溶液诱导重组蛋白表达, 并在 15°C 恒温摇床下继续诱导培养 24 h。培养结束后, 对菌液进行重组蛋白可溶性分析。再将重组蛋白纯化后分析, 分别制样进行电泳, 电泳结束后切下凝胶(35–75 kDa)转膜, 两张蛋白膜分别经抗组氨酸标签抗体、*B. cereus* 阳性血清, HRP 标记的羊抗小鼠 IgG 孵育后, 经 ECL 显色, 观察成像结果。

SDS-PAGE 操作如下: 使用凝胶快速配制试剂盒, 制备分离胶和浓缩胶, 将凝胶置于电泳槽中, 加入电泳缓冲液。去除凝胶梳子后, 在样品槽中加入蛋白样品。在 80 V 恒压下电泳 30 min,

使蛋白质在浓缩胶中聚集, 然后提高电压至 120 V。根据 Marker 的迁移情况, 确定电泳终点。电泳结束后, 将 PAGE 浸入考马斯亮蓝染色液中染色 1 h, 然后弃去染色液。用去离子水洗涤, 随后加入脱色液进行脱色处理。最后, 在凝胶成像系统下对 PAGE 进行成像并记录数据。

纯化操作如下: 加入 3 mL 裂解液和 30 μL 蛋白酶抑制剂重悬菌体, 加入 1 mg/mL 溶菌酶, 在冰上放置 30 min。冰上超声裂解细菌。4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 30 min, 收集上清并过滤膜, 取 20 μL 上清留存。将取 1 mL 50% BeyoGold His-tag Purification Resin 离心 10 s, 弃储存液。加入 500 μL 裂解液重悬凝胶并离心 10 s 后弃液。重复 2 次平衡柱。将裂解液上清全部加入离心管中与凝胶混匀, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。将裂解液上清与凝胶混合, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h 后装入空柱管中。取 20 μL 流穿液留存。洗柱 5 次, 每次加入 800 μL 洗涤液并使其自然流出。每次洗柱后取 20 μL 洗柱液留存。洗脱蛋白 7 次, 每次加入 500 μL 洗脱液并自然流出。每次洗脱后取 20 μL 洗脱液留存。将各步骤留存液与 4 \times Protein SDS PAGE Loading Buffer 混匀后制成蛋白样品。

1.5 rHbl 蛋白的生物学活性分析

1.5.1 rHbl 蛋白的溶血性分析

使用灭菌的打孔器在血琼脂平板中分散打孔。将蛋白 rHblB、rHblL1、rHblL2 按照不同

的比例(rHblB:rHblL1 为 1:1; rHblB:rHblL2 为 1:1; rHblL1:HblL2 为 1:1; rHblB:rHblL1:HblL2 为 1:1:1)混合注入孔中,同时设立 PBS 对照。恒温箱温育 3–6 h 后,观察并记录溶血结果^[13]。

1.5.2 rHbl 蛋白的细胞毒性分析

将 rHblB、rHblL1、rHblL2 蛋白按照不同比例(rHblB:rHblL1 为 1:1;rHblB:rHblL2 为 1:1;rHblL1:HblL2 为 1:1;rHblB:rHblL1:HblL2 为 1:1:1)依次稀释到 96 孔细胞培养板中(每孔 100 μ L),随后每孔加入 100 μ L Vero 细胞悬液(10^4 个细胞)。37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养 24 h 后,测定其细胞毒性。以剂量-细胞活性绘制曲线计算细胞半数抑制浓度(median inhibitory concentration, IC₅₀),以蛋白稀释倍数的倒数表示滴度^[14]。

1.5.3 rHbl 蛋白的免疫原性分析及小鼠免疫攻毒试验

取 30 只 6–8 周龄的昆明小鼠,将 rHblB、rHblL1、rHblL2 以及 rHbl (3 种重组蛋白按照 1:1:1 比例混合)分别免疫注射到 24 只小鼠体内,剩余 6 只小鼠注射生理盐水作为对照,首次免疫时免疫源 50 μ g 与弗氏完全佐剂混匀,加强免疫时免疫源 20 μ g 与弗氏不完全佐剂混匀,免疫注射方案及免疫部位见表 2。最后 1 次加强免疫 7 d 后断尾采血。分别以 rHblB、rHblL1、rHblL2

以及 rHbl (3 种重组蛋白混合)蛋白为包被抗原,小鼠阳性血清为一抗,HRP-羊抗小鼠 IgG 为二抗,使用间接酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)法检测效价, P/N \geq 2.1 为阳性,以血清稀释倍数的倒数表示滴度。

牛源致病性 *B. cereus* 用无菌 PBS 溶液洗涤 3 次,制成菌悬液。免疫蛋白和免疫生理盐水的小鼠均腹腔注射 2 倍半数致死量浓度的菌液攻毒,观察并记录小鼠有无异常^[12]。之后分别解剖小鼠,取心、肝、脾、肺、肾和肠组织,制作石蜡切片,分析病理变化。

2 结果与分析

2.1 原核表达载体构建

2.1.1 hblA、hblD、hblC 基因的 PCR 扩增及测序

结果显示, *hblA*、*hblD*、*hblC* 基因出现了大小约为 1.1、1.2、1.3 kb 的条带,与预期大小一致。回收并测序,结果表明,目的基因与 *B. cereus* ATCC 14579 (NZ_CP034551.1)的基因序列相似性达到了 99%。

2.1.2 原核表达载体的构建

DNA 琼脂糖凝胶电泳结果表明, pColdI 载体线性化完全,出现了大小约 4.8 kb 的条带。

表 2 rHbl 蛋白的小鼠免疫方案

Table 2 Program of mouse immunization using the rHbl protein

Mouse number	Primary immunization	First booster immunization	Second booster immunization	Third booster immunization
1–6	rHblB (50 μ g) Subcutaneous injection	rHblB (20 μ g) Subcutaneous injection	rHblB (20 μ g) Subcutaneous injection	rHblB (20 μ g) Subcutaneous injection
7–12	rHblL1 (50 μ g) Subcutaneous injection	rHblL1 (20 μ g) Subcutaneous injection	rHblL1 (20 μ g) Subcutaneous injection	rHblL1 (20 μ g) Subcutaneous injection
13–18	rHblL2 (50 μ g) Subcutaneous injection	rHblL2 (20 μ g) Subcutaneous injection	rHblL2 (20 μ g) Subcutaneous injection	rHblL2 (20 μ g) Subcutaneous injection
19–24	rHbl (50 μ g) Subcutaneous injection	rHbl (20 μ g) Subcutaneous injection	rHbl (20 μ g) Subcutaneous injection	rHbl (20 μ g) Subcutaneous injection
25–30	Normal saline control Subcutaneous injection	Normal saline control Subcutaneous injection	Normal saline control Subcutaneous injection	Normal saline control Subcutaneous injection

凝胶电泳结果显示, pColdI-*hblA*、pColdI-*hblD*、pColdI-*hblC* 质粒经 *Kpn* I 和 *Hind* III 限制性内切酶双酶切后, 分别出现约为 4.4 kb 和 1.0 kb、4.4 kb 和 1.1 kb 以及 4.4 kb 和 1.2 kb 的条带, 初步证实了 pColdI-*hblA*、pColdI-*hblD*、pColdI-*hblC* 载体构建成功。

2.2 重组蛋白的诱导表达及纯化

pColdI-*hblA* (BL21)、pColdI-*hblD* (BL21)、pColdI-*hblC* (BL21) 和空白 pColdI 载体 (BL21) 分

别出现了约为 4.4 kb 和 1.0 kb、4.4 kb 和 1.1 kb、4.4 kb 和 1.2 kb 以及 4.8 kb 大小的条带, 重组菌株分别命名为 BL21-rHblB、BL21-rHblL1 和 BL21-rHblL2。

电泳结果如图 1 所示, 重组蛋白在表达菌株裂解液上清中有明显的条带; 流穿液和含 20 mmol/L 咪唑的洗涤液中没有目的蛋白被洗出, 说明目的蛋白与镍柱结合良好; 含 250 mmol/L 咪唑的洗脱液中可以看见目的蛋白被有效地洗

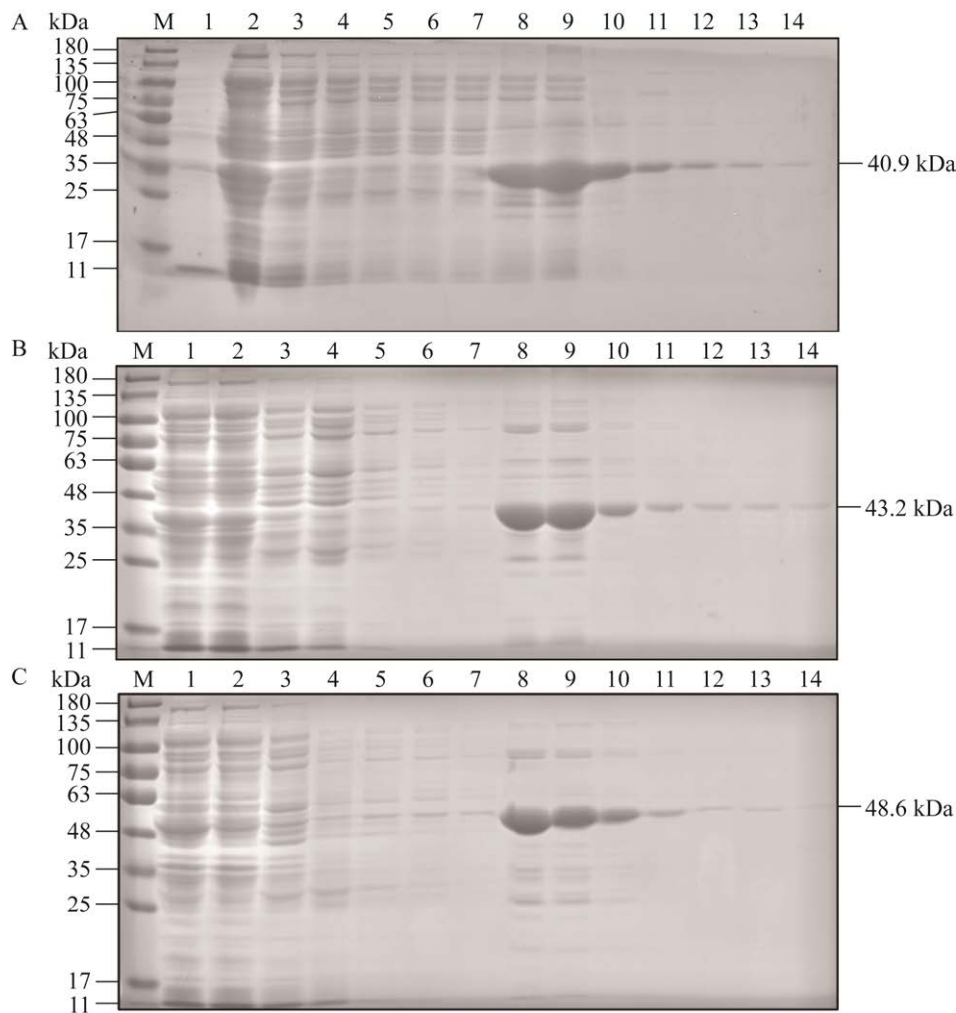


图 1 His 标签重组蛋白 rHblB、rHblL1、rHblL2 的纯化结果

Figure 1 Purification of the His-tagged recombinant proteins rHblB, rHblL1, and rHblL2. A: rHblB. B: rHblL1. C: rHblL2. M: Protein marker; 1: Expression strains (BL21-rHblB, BL21-rHblL1, and BL21-rHblL2) lysate supernatant; 2: The sample flow through the liquid; 3-7: Washing solution (20 mmol/L imidazole) 1-5 times; 8-14: Elution solution (250 mmol/L imidazole) was eluted 1-7 times.

出,除了第 1 和第 2 次洗脱时有少量杂蛋白外,后续洗脱纯度较高;随着洗脱次数增加,目的蛋白含量逐渐减少直至消失。结果表明,利用镍柱纯化了 rHblB、rHblL1、rHblL2 共 3 种重组蛋白。纯化的重组蛋白均能与抗 His 抗体和 *B. cereus* 阳性血清反应(图 2)。

2.3 rHbl 蛋白的生物学活性

2.3.1 rHbl 蛋白的溶血性

PBS 对照组、rHblB 和 rHblL1 共同作用组、rHblB 和 rHblL2 共同作用组、rHblL1 和 rHblL2 共同作用组,37 °C 孵育 3–6 h 期间均未出现溶血现象,延长孵育时间也未出现任何溶血现象;rHblB、rHblL1 和 rHblL2 共同作用组,刚孵育 1 h 后就出现了溶血现象,随着作用时间加长,溶血环逐渐变大,3 h 后达到最大,之后延长孵育时间也未再变大。结果表明,只有 rHbl 三组分共同作用时,才会具有溶血性,任意两种组分组合都不会出现溶血现象(图 3)。

2.3.2 rHbl 蛋白的细胞毒性

结果显示,只有 rHbl 三组分联用时对 Vero 细胞的 IC_{50} 滴度能达到 28,其他组别作用时对细胞无毒性(图 4)。以上结果表明,只有 rHblB、rHblL1 和 rHblL2 共同作用时才具有细胞毒性。

2.3.3 rHbl 蛋白的免疫原性及对小鼠的免疫保护

结果显示,rHbl 的 3 个亚基单独作免疫原时和混合作免疫原时小鼠阳性血清的滴度都高

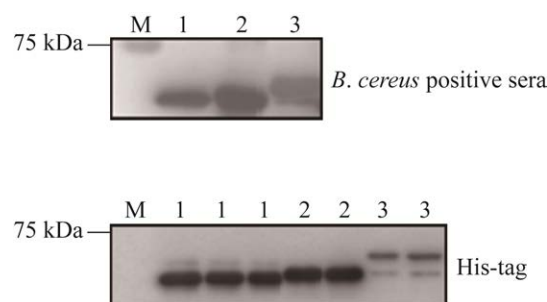


图 2 重组蛋白(rHblB、rHblL1、rHblL2)纯化后蛋白印迹图

Figure 2 Western blotting analysis of purified recombinant proteins (rHblB, rHblL1, and rHblL2). M: Protein marker; 1: rHblB; 2: rHblL1; 3: rHblL2.

达 51 200 (图 5)。记录了攻毒后的小鼠状态,免疫生理盐水攻毒组小鼠,在攻毒 2 h 左右出现浑身抽搐、移动缓慢、全身蜷缩等症状,在攻毒后 10 h 内全部死亡。免疫蛋白攻毒组小鼠,在前期也有类似症状,但在 8 h 后都基本消失,恢复了运动力和采食活力。病理切片结果显示,各免疫后攻毒组病变轻微,趋于正常。生理盐水免疫后攻毒组与未攻毒对照组相比,病理损害较为严重:心肌纤维肿胀、断裂,心肌纤维间有炎性细胞浸润,心肌细胞核消失,呈现经典的蜡样坏死;肝血窦变宽,血窦内有炎性细胞浸润,中央静脉扩张、淤血,邻近中央静脉处肝细胞坏死、核溶解消失;脾脏红髓部分区域大量淋巴细胞坏死、消失;个别肺泡腔内充斥大量红细胞,肺泡壁间质增宽,大量的白细胞

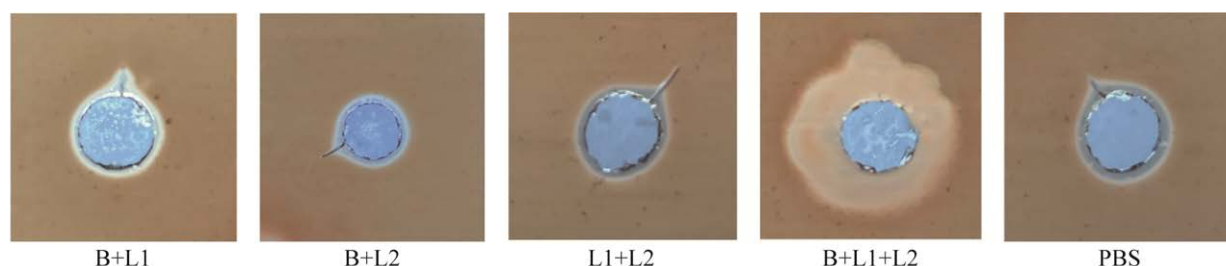


图 3 rHbl 的溶血性

Figure 3 The hemolysis of rHbl. B: rHblB; L1: rHblL1; L2: rHblL2. The same below.

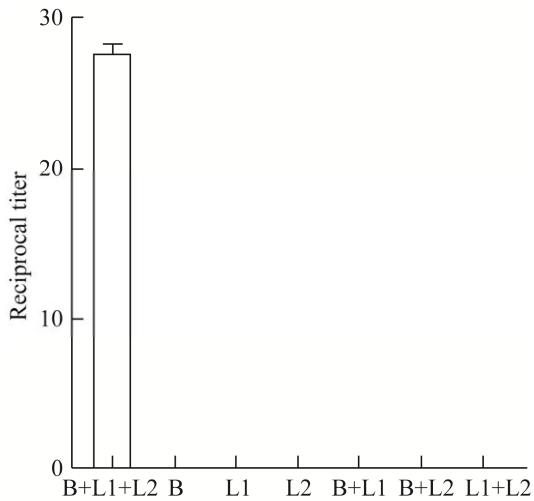


图4 rHbl 蛋白的细胞毒性

Figure 4 The cytotoxicity of the rHbl protein.

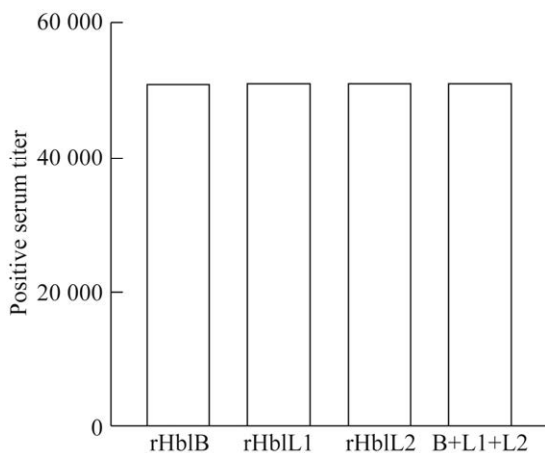


图5 rHblB、rHblL1、rHblL2 抗血清的抗体效价

Figure 5 Antibody titers of anti-rHblB, -rHblL1, and rHblL2 antiserum.

增生；肾小球系膜细胞增生，肾小管上皮细胞脱落、细胞核消失，呈均质化；小肠黏膜上皮脱落，肠腺上皮模糊、多数肠腺细胞坏死消失(图6)。

3 讨论与结论

B. cereus 曾被认为是一种无害的微生物，一些 *B. cereus* 还被应用于动物饲料添加剂、人

类食品添加剂和环境修复等领域^[4,6]。然而，自20世纪60年代起，*B. cereus* 因导致多种肠道和肠外感染而逐渐受到重视。*B. cereus* 除了导致人类的食源性感染外，还能够感染陆生动物^[15-18]、水生动物^[19-23]和鸟类^[24]。*B. cereus* 的毒素是决定其致病性的重要因素，但这些毒素在不同疾病中的具体作用和重要程度仍不清楚。毒素之间或者毒素与其他毒力因子之间可能存在协同效应，导致特定菌株的致病性难以预测^[25]。目前已知有4种 *B. cereus* 毒素与食源性感染相关，其中3种是能引起细胞穿孔的肠毒素：*hbl*、*Nhe*和 *CytK*；另一种是能导致呕吐的呕吐毒素^[26]。这些肠毒素通常在食物中的 *B. cereus* 孢子萌发后产生，并随着食物被宿主摄入而进入小肠发挥作用^[27]。呕吐综合征则与呕吐毒素密切相关，呕吐毒素通常在食物中预先形成，被感染者在摄入受污染的食物后15 min到6 h内出现症状，此时被感染宿主通常会表现出呕吐现象并伴恶心^[28]。

尽管 *B. cereus* 引起食源性暴发的机制已有较多研究，但其导致人类和动物全身性感染的致病因素和作用途径仍不清楚。本研究利用原核表达系统对牛源致病性 *B. cereus* 的 *Hbl* 毒素进行了异源表达。SDS-PAGE 分析表明，3种重组蛋白均以可溶性形式存在于诱导表达菌液的上清中，Western blotting 分析证实了3种重组蛋白的 His 标签蛋白均具有良好的表达水平，为后续的纯化奠定了基础。实验过程中为了选择合适的表达系统，本研究综合考虑了 *HblB*、*HblL1*、*HblL2* 的特性、表达后的目标用途和先前成功的表达方案^[8-9]。此外，本研究还预测了目标蛋白的跨膜结构，结果表明，3种蛋白都是非膜蛋白，因此不受原核表达系统的限制。基于上述分析，成功地构建了3个截去信号肽序列的原核表达载体，并采用大肠杆菌冷休克

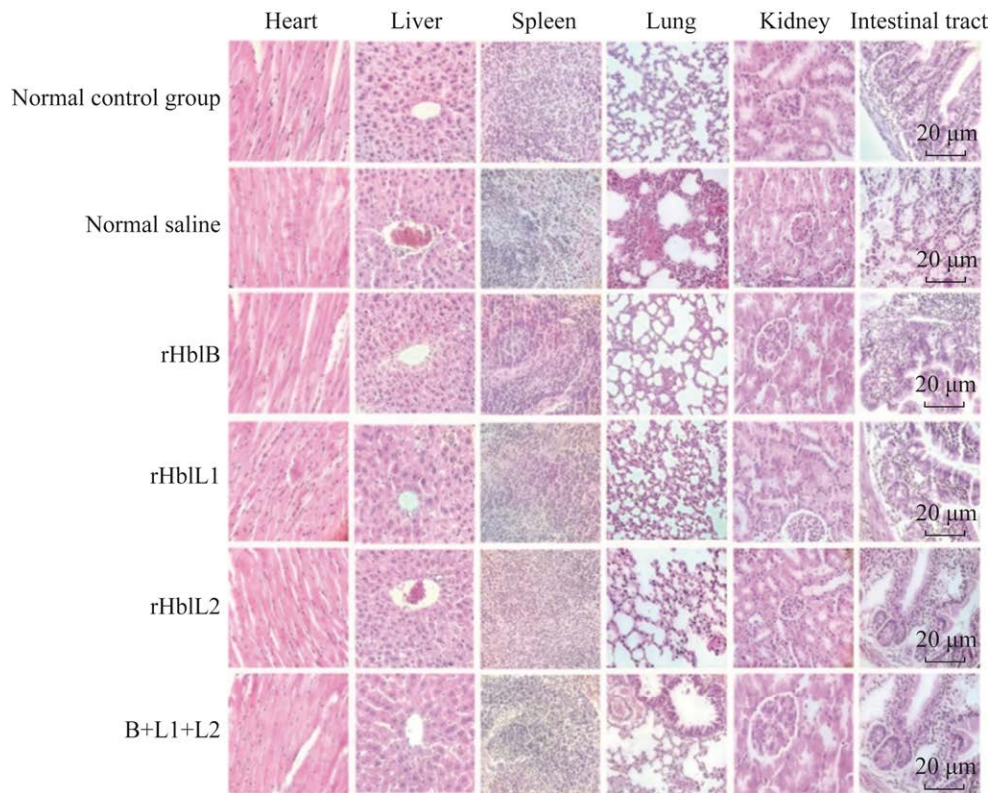


图 6 rHbl 攻毒后小鼠的组织病理变化(400×)

Figure 6 Histopathological changes of mice upon rHbl challenge (400×). Each row represents the pathological section of heart liver, spleen, lung, kidney and intestinal tract in different treatment groups.

表达系统进行重组蛋白表达。Jessberger 等在构建表达载体时将纯化标签放置于 C 端而导致无法通过亲和层析法进行纯化，直接使用了粗提物进行后续试验^[13]。因此，本研究中即使存在少量与 *B. cereus* 肠毒素无关的杂蛋白也不会影响后续试验结果，因为单个组分对细胞没有溶血和细胞毒性作用。在开展生物学活性的探究中，成功证实了重组蛋白具有溶血性、细胞毒性和免疫原性，此外还对小鼠具有一定的保护作用。只有当 3 种 rHbl 组分共同作用时才会引起溶血现象，这与 Jessberger 等^[13]和 Tausch 等^[14]的研究结果一致。

目前，国内已发生多起由致病性 *B. cereus* 引起的牛猝死病例。本研究为牛源致病性 *B. cereus*

感染机制和防控策略提供了新的思路和方法，但仍有许多问题值得进一步探索。例如，牛源致病性 *B. cereus* Hbl 毒素蛋白之间的相互作用和结构变化如何影响其与细胞受体的结合和信号转导；Hbl 毒素是否与其他毒力因子等有协同或拮抗作用；牛源致病性 *B. cereus* Hbl 毒素在不同宿主细胞中的表达水平、分布方式、清除机制等是否存在差异。针对牛源致病性 *B. cereus* Hbl 毒素或其亚基特异性抗体或抑制剂是否能有效预防或治疗牛源致病性 *B. cereus* 感染。这些问题都需要在未来的工作中进行深入的试验验证和理论分析，为牛源致病性 *B. cereus* 感染的精准诊断、预防和治疗提供更多的依据和手段。

REFERENCES

- [1] 高丽, 何珊, 王利利, 刘宇婷, 温彤. 一株食源性蜡样芽孢杆菌的分离及其对小鼠肠黏膜免疫相关因子和肠道菌群的影响[J]. 生物工程学报, 2023, 39(4): 1759-1772.
GAO L, HE S, WANG LL, LIU YT, WEN T. Isolation of a food-borne *Bacillus cereus* and its effects on intestinal mucosal immune-related factors and intestinal flora in mice[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(4): 1759-1772 (in Chinese).
- [2] EHLING-SCHULZ M, LERECLUS D, KOEHLER TM. The *Bacillus cereus* group: *Bacillus* species with pathogenic potential[J]. Microbiology Spectrum, 2019, 7(3): 10.
- [3] EHLING-SCHULZ M, FRENZEL E, GOHAR M. Food-bacteria interplay: pathometabolism of emetic *Bacillus cereus*[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 704.
- [4] 李家旭, 贝翎, 袁晚晴, 黄达荣, 王琨, 彭东, 黎攀, 杜冰. 非致病性蜡样芽孢杆菌的益生功能与应用[J]. 现代食品科技, 2023, 39(4): 341-348.
LI JX, BEI L, YUAN WQ, HUANG DR, WANG K, PENG D, LI P, DU B. Probiotic functions and application of non-pathogenic *Bacillus cereus*[J]. Modern Food Science & Technology, 2023, 39(4): 341-348 (in Chinese).
- [5] 李美蓉, 汪小波, 黄英, 黄坚丽, 梁甲元, 黄日波, 杜丽琴, 韦宇拓. 蜡样芽孢杆菌 GXBC-3 三个普鲁兰酶基因的表达及其酶学特性[J]. 生物工程学报, 2012, 28(4): 466-475.
LI MR, WANG XB, HUANG Y, HUANG JL, LIANG JY, HUANG RB, DU LQ, WEI YT. Gene expression and characterisation of three pullulanases from *Bacillus cereus* GXBC-3[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2012, 28(4): 466-475 (in Chinese).
- [6] EDMUND FARRAR JR. MDW. Serious infections due to "non-pathogenic" organisms of the genus bacillus[J]. The American Journal of Medicine, 1963, 34(1): 134-141.
- [7] JOVANOVIC J, ORNELIS VFM, MADDER A, RAJKOVIC A. *Bacillus cereus* food intoxication and toxicoinfection[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2021, 20(4): 3719-3761.
- [8] GLASSET B, HERBIN S, GUILLIER L, CADEL-SIX S, VIGNAUD ML, GROUT J, PAIRAUD S, MICHEL V, HENNEKINNE JA, RAMARAO N, BRISABOIS A. *Bacillus cereus*-induced food-borne outbreaks in France, 2007 to 2014: epidemiology and genetic characterisation[J]. Eurosurveillance, 2016, 21(48): 304-313.
- [9] 种婷. 食品中蜡样芽孢杆菌检测技术应用进展[J]. 现代食品, 2022, 28(7): 28-30.
CHONG T. Application progress of detection technology of *Bacillus cereus* in food[J]. Modern Food, 2022, 28(7): 28-30 (in Chinese).
- [10] ENOSI TUIPULOTU D, MATHUR A, NGO C, MAN SM. *Bacillus cereus*: epidemiology, virulence factors, and host-pathogen interactions[J]. Trends in Microbiology, 2021, 29(5): 458-471.
- [11] KOTIRANTA A, LOUNATMAA K, HAAPASALO M. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections[J]. Microbes and Infection, 2000, 2(2): 189-198.
- [12] 宋丽丽, 张玲艳, 贾伟娟, 白志恒, 刘媛, 陈云娇, 王学理. 1 株牛源蜡样芽孢杆菌的分离鉴定及毒力基因检测[J]. 西北农业学报, 2019, 28(11): 1735-1741.
SONG LL, ZHANG LY, JIA WJ, BAI ZH, LIU Y, CHEN YJ, WANG XL. Isolation, identification and virulence gene detection of a strain of bovis *Bacillus cereus*[J]. Journal of Northwest Agricultural Sciences, 2019, 28(11): 1735-1741 (in Chinese).
- [13] JESSBERGER N, DIETRICH R, SCHWEMMER S, TAUSCH F, SCHWENK V, DIDIER A, MÄRTLBAUER E. Binding to the target cell surface is the crucial step in pore formation of hemolysin BL from *Bacillus cereus*[J]. Toxins, 2019, 11(5): 281.
- [14] TAUSCH F, DIETRICH R, SCHAUER K, JANOWSKI R, NIESSING D, MÄRTLBAUER E, JESSBERGER N. Evidence for complex formation of the *Bacillus cereus* haemolysin BL components in solution[J]. Toxins, 2017, 9(9): 288.
- [15] 霍晓伟, 宋扬, 刘杰, 范培超, 史量全, 蒙小刚, 刘锴, 温树波, 鲁会军. 一株牛源致病性蜡样芽孢杆菌的分离鉴定与部分生物学特性分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2020, 15(11): 1252-1256.
HUO XW, SONG Y, LIU J, FAN PC, SHI LQ, MENG XG, LIU K, WEN SB, LU HJ. Identification and analysis of the biological characteristics of a *Bacillus cereus* strain from cattle[J]. Journal of Pathogen Biology, 2020, 15(11): 1252-1256 (in Chinese).
- [16] 吴克, 冯航, 白新栋, 陈林千雨, 王娟, 杨增岐. 1 株牛源致病性蜡样芽孢杆菌特征分析[J]. 中国兽医学报, 2022, 42(3): 472-476.
WU K, FENG H, BAI XD, CHEN LQY, WANG J, YANG ZQ. Characteristic analysis of one strain of pathogenic *Bacillus cereus* from cow[J]. Chinese

- Journal of Veterinary Science, 2022, 42(3): 472-476 (in Chinese).
- [17] 崔一龙, 石芸, 杨达汉, 尹有勤, 薛江东, 霍晓伟, 马德慧. 马源蜡样芽孢杆菌的分离鉴定及毒力基因检测[J]. 浙江农业学报, 2019, 31(2): 216-221.
CUI YL, SHI Y, YANG DH, YIN YQ, XUE JD, HUO XW, MA DH. Isolation, identification of horse *Bacillus cereus* and its virulence genes detection[J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2019, 31(2): 216-221 (in Chinese).
- [18] 江地科, 项明源, 王印, 姚学萍, 杨泽晓, 张鹏飞, 廖倡宇, 朱光恒, 姜睿娇. 猪源蜡样芽孢杆菌的分离鉴定与部分生物学特性分析[J]. 中国预防兽医学报, 2019, 41(10): 1063-1066.
JIANG DK, XIANG MY, WANG Y, YAO XP, YANG ZX, ZHANG PF, LIAO CY, ZHU GH, JIANG RJ. Isolation, identification and biological characteristics of *Bacillus cereus* from porcine[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2019, 41(10): 1063-1066 (in Chinese).
- [19] 王琰, 高四合, 单建杰, 罗璋, 刘金兰. 半滑舌鳎源蜡样芽孢杆菌毒性检测及药敏试验[J]. 水产科学, 2018, 37(1): 59-65.
WANG Y, GAO SH, SHAN JJ, LUO Z, LIU JL. Virulence and drug susceptibility of a pathogenic bacterium from half-smooth tongue-sole[J]. Fisheries Science, 2018, 37(1): 59-65 (in Chinese).
- [20] 黎姗梅, 吴柳青, 许飘尹, 盛雪晴, 贺晓晨, 肖双燕, 邱梓晟, 梁静真, 韩书煜, 黄钧. 黄沙鳖致病性蜡样芽孢杆菌的分离鉴定及药敏试验[J]. 西南农业学报, 2020, 33(3): 673-680.
LI SM, WU LQ, XU PY, SHENG XQ, HE XC, XIAO SY, QIU ZS, LIANG JZ, HAN SY, HUANG J. Isolation, identification and antibiotic sensitivity test of pathogenic *Bacillus cereus* from Huangsha turtle[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2020, 33(3): 673-680 (in Chinese).
- [21] 陈丰, 黄亚冬, 孙敬锋, 吕爱军, 胡秀彩, 石洪玥, 邢克智. 鲫鱼肠道蜡样芽孢杆菌的分离鉴定及生物学特征[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(18): 191-194, 203.
CHEN F, HUANG YD, SUN JF, LV AJ, HU XC, SHI HY, XING KZ. Isolation, identification and biological characteristics of *Bacillus cereus* in crucian gut[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2019, 47(18): 191-194, 203 (in Chinese).
- [22] 杨移斌, 余琳雪, 刘永涛, 杨秋红, 苏志俊, 宋恽, 艾晓辉. 罗非鱼源蜡样芽孢杆菌分离、鉴定及药敏特性研究[J]. 淡水渔业, 2017, 47(4): 51-56.
YANG YB, YU LX, LIU YT, YANG QH, SU ZJ, SONG Y, AI XH. Isolation, identification and antibiotic sensitivity of *Bacillus cereus* from tilapia[J]. Freshwater Fisheries, 2017, 47(4): 51-56 (in Chinese).
- [23] 孟庆珍, 尹飞, 傅超英, 陈凡, 刘长军, 袁娜, 王力, 张鸿鹄, 钱冬. 养殖中华鳖蜡样芽孢杆菌的分离、鉴定和致病性研究[J]. 水生生物学报, 2019, 43(3): 570-578.
MENG QZ, YIN F, FU CY, CHEN F, LIU CJ, YUAN N, WANG L, ZHANG HH, QIAN D. Isolation, identification and pathogenicity analysis of *Bacillus cereus* from Chinese soft-shelled turtles, *Pelodiscus sinensis*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2019, 43(3): 570-578 (in Chinese).
- [24] 艾东旭, 李玮, 张晶, 宋显明, 李莲瑞. 病鸽肠道中蜡样芽孢杆菌的分离及鉴定[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2017, 2017(6): 200-202.
AI DX, LI W, ZHANG J, SONG XM, LI LR. Isolation and identification of *Bacillus cereus* in intestinal tract of sick pigeons[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2017, 2017(6): 200-202 (in Chinese).
- [25] DIETRICH R, JESSBERGER N, EHLING-SCHULZ M, MÄRTLBAUER E, GRANUM PE. The food poisoning toxins of *Bacillus cereus*[J]. Toxins, 2021, 13(2): 98.
- [26] AGATA N, OHTA M, MORI M, ISOBE M. A novel dodecadepsipeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*[J]. FEMS Microbiology Letters, 1995, 129(1): 17-19.
- [27] JESSBERGER N, KRANZLER M, Da RIOL C, SCHWENK V, BUCHACHER T, DIETRICH R, EHLING-SCHULZ M, MÄRTLBAUER E. Assessing the toxic potential of enteropathogenic *Bacillus cereus*[J]. Food Microbiology, 2019, 84: 103276.
- [28] EHLING-SCHULZ M, FRICKER M, SCHERER S. *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2004, 48(7): 479-487.

(本文责编 陈宏宇)