

袁 橙, 郭长明, 左伟勇, 等. 制备大肠杆菌菌蜕的方法比较[J]. 江苏农业学报, 2020, 36(2): 410-416.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2020.02.022

制备大肠杆菌菌蜕的方法比较

袁 橙¹, 郭长明¹, 左伟勇¹, 郝福星¹, 左沁丹¹, 蔺辉星²

(1. 江苏农牧科技职业学院动物医学院, 江苏 泰州 225300; 2. 南京农业大学动物医学院/教育部动物健康与食品安全国际合作联合实验室/农业部动物细菌学重点实验室, 江苏 南京 210095)

摘要: 为进一步研究大肠杆菌菌蜕的制备技术, 以 pBV221、pCold IV 和 pETDuet1 载体为基础构建了表达噬菌体 *E* 基因的溶菌质粒, 并利用 pETDuet1 的 2 个多克隆位点构建了同时表达 *E* 基因和金黄色葡萄球菌核酸酶 *A* 的双表达溶菌质粒。经检测, pBV221-*E*/DH_{5α} 组和 pCold-*E*/BL₂₁ 组的裂解效率最高, 但 pCold-*E*/BL₂₁ 组的裂解起始时间晚于其他几组。诱导剂的浓度对 pETDuet1-*E*-SNA/BL₂₁ (DE3) 的裂解效率有较大影响。电泳结果显示, 随着 *E* 基因的表达, 细菌 DNA 逸出膜外, 同时金黄色葡萄球菌核酸酶 *A* 将 DNA 降解为 250 bp 以下的小片段。除 pBV221-*E*/BL₂₁ 组外, β-丙内酯可实现对其他试验组菌蜕的完全灭活。电镜观察发现, 几组菌蜕在结构上并无明显差别。与对照菌相比, 菌蜕结构完整, 电子密度低且不均匀, 细胞膜有不同程度的皱缩。

关键词: 菌蜕; 大肠杆菌; *E* 基因; 金黄色葡萄球菌核酸酶 *A*; 裂解效率

中图分类号: S852.5⁺2

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2020)02-0410-07

Comparison of preparation methods for of bacterial ghosts from *Escherichia coli*

YUAN Cheng¹, GUO Chang-ming¹, ZUO Wei-yong¹, HAO Fu-xing¹, ZUO Qin-dan¹, LIN Hui-xing²

(1. College of Veterinary Medicine, Jiangsu Agri-animal Husbandry Vocational College, Taizhou 225300, China; 2. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University/MOE Joint International Research Laboratory of Animal Health and Food Safety /Key Lab of Animal Bacteriology, Ministry of Agriculture, Nanjing 210095, China)

Abstract: In order to further study the preparation technology of bacterial ghosts from *Escherichia coli*, the bacteriolytic plasmids expressing bacteriophage *E* gene were constructed based on vectors including pBV221, pCold IV and pETDuet1. Using two polychonal sites of pETDuet1, a double expression plasmid expressing *E* gene and *Staphylococcus aureus* nuclease *A* was constructed. The lysis efficiency of pBV221-*E*/DH_{5α} group and pCold-*E*/BL₂₁ group was the highest, but the lysis initiation time of pCold-*E*/BL₂₁ group was later than other groups. The concentration of inducer had a great influence on the lysis efficiency of pETDuet1-*E*-SNA/BL₂₁ (DE3). Electrophoresis results showed that with the expression of *E* gene, bacterial DNA escaped from the cell membrane. Meanwhile, *Staphylococcus aureus* nuclease *A* degraded DNA to a small fragment below 250 bp. The β-propiolactone could completely inactivate the bacterial ghost of experimental groups expect

pBV221-*E*/BL₂₁ group. Electron microscopic observation indicated that there was no significant difference in the structure of the bacterial ghost among different groups. Compared with *Escherichia coli*, the electron density of bacterial ghost was lower and uneven, the cell membrane shrank, and the structure was complete.

Key words: bacterial ghost; *Escherichia coli*; gene *E*; *Staphylococcus aureus* nuclease *A*; lysis efficiency

收稿日期: 2019-08-24

基金项目: 江苏省高等学校自然科学研究面上项目 (17KJB230003);
江苏省高校优秀科技创新团队项目 (201753); 江苏农牧
科技职业学院科研项目 (NSF201605)

作者简介: 袁 橙 (1986-), 女, 江苏盐城人, 博士, 讲师, 从事细菌菌
蜕制备和寄生虫分子免疫研究。 (E-mail) 840289909@qq.
com

通讯作者: 蔺辉星, (E-mail) linhuix@ 163. com

1985年,Lubitz等发现噬菌体PhiX174的裂解基因*E*在革兰氏阴性菌中表达后能使菌体形成跨膜孔道,细胞质及细胞器等从孔道逸出,形成细菌空壳^[1],这种细菌空壳被称为菌蛻或菌影。与福尔马林灭活细菌疫苗相比,菌蛻的制备过程没有损坏细菌菌体的抗原结构,其免疫原性得到了较好的保留^[2-3],因此可将其作为新型灭活疫苗、疫苗载体或佐剂使用。目前,国内外的相关报道中大都采用*E*基因单独表达来制备菌蛻^[4-7]。也有研究者尝试使用15个柔性氨基酸接头将*E*基因和金黄色葡萄球菌核酸酶A(*SNA*)基因串联,通过2个蛋白质在宿主菌中共表达来制备菌蛻^[2,8-9]。*SNA*是一种胞外核酸非专一性磷酸二酯酶,能降解单链或双链DNA或RNA。在菌蛻制备中该蛋白质的表达可将细菌DNA(包括耐药基因和毒素基因)降解为400 bp以下的小片段,从而提高菌蛻使用的安全性^[2]。

为研究不同原核表达载体对宿主菌的裂解效率,比较大肠杆菌菌蛻不同制备方法的效果,为大肠杆菌菌蛻疫苗载体和致病性大肠杆菌菌蛻疫苗的研制奠定基础,本研究利用温控型表达载体pBV221、冷休克表达载体pCold IV和双蛋白表达载体pETDuet1构建4种重组质粒用于大肠杆菌菌蛻的制备,对不同制备方法的裂解效率、灭活率等进行比较,同时对双蛋白表达质粒中*SNA*蛋白对宿主菌DNA的降解效果进行检验,对4种制备方法进行综合评估。

1 材料与方法

1.1 菌株、载体及试剂

1.1.1 菌株 大肠杆菌DH_{5α}和BL₂₁感受态细胞购自TaKaRa公司,BL₂₁(DE3)感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司。由于大肠杆菌DH_{5α}菌株无乳糖启动子阻遏蛋白基因*lacI^q*,故不需要异丙基硫代半乳糖苷(Isopropyl β-D-Thiogalactoside, IPTG)。大肠杆菌BL₂₁来源于B株,为Lon蛋白水解酶、ompT外膜蛋白水解酶缺陷型,有利于外源蛋白的稳定表达,可用于pCold I-IV DNA的蛋白质表达。因为BL₂₁宿主不表达T7 RNA聚合酶,所以不适合于启动子为T7的蛋白质表达体系(如pET系列)。BL₂₁(DE3)菌株整合了T7噬菌体基因组,可用于高效表达克隆于含有噬菌体T7启动子的表达载体(如pET系列)的基因。

1.1.2 质粒 温控型表达载体pBV221、冷休克表

达载体pCold IV和双蛋白表达载体pETDuet1由江苏农牧科技职业学院动物流行病学研究中心保存。

1.1.3 试剂 PCR试剂盒、ClonExpress® II One Step克隆试剂盒、胶回收试剂盒、核酸染料GelRed、DL2000 Plus DNA marker等购自南京诺唯赞生物科技有限公司。限制性内切酶和连接酶为赛默飞世尔科技(中国)有限公司产品。质粒提取试剂盒为爱思进生物技术(杭州)有限公司产品。酵母提取物、胰蛋白胍、氯化钠、氨苄青霉素、IPTG等试剂为Sigma-Aldrich公司产品,按照《分子克隆实验指南》^[10]中配方制备LB液体、固体培养基和磷酸盐缓冲液(PBS)等。抗性选择培养基中氨苄青霉素的工作质量浓度为100 mg/L。所用引物由英潍捷基公司合成。

1.2 4种溶菌质粒的构建

根据NCBI公布的噬菌体PhiX174的裂解基因*E*碱基序列合成*E*基因(276 bp)并连接至pUC57载体,命名为pUC57-*E*。用限制性内切酶EcoR I和Sal I双酶切重组质粒pUC57-*E*和表达载体pBV221,利用T4 DNA连接酶将*E*基因片段连接至载体pBV221,构建重组质粒pBV221-*E*。

根据载体pCold IV多克隆位点(Multiple cloning site, MCS)序列和pETDuet1的第1个MCS序列,分别设计插入*E*基因片段正/反向PCR引物(见表1)。以pUC57-*E*为模板扩增,使得PCR产物5'和3'最末端分别带有与线性化载体两末端一致的序列和酶切位点。按照ClonExpress® II One Step克隆试剂盒说明书,完成重组质粒pCold IV-*E*和pETDuet1-*E*的构建。

根据NCBI公布的*SNA*序列,合成其无信号肽的膜外区序列453 bp并连接至pUC57载体,命名为pUC57-*SNA*。根据载体pETDuet1的第2个MCS序列,设计插入*SNA*基因片段正/反向PCR引物(见表1),按照ClonExpress® II One Step克隆试剂盒说明书,完成重组质粒pETDuet1-*E*-*SNA*的构建。

将以上重组质粒转化至DH_{5α},在抗性平板上筛选阳性克隆。提取阳性克隆质粒,通过双酶切和测序对阳性克隆进行进一步鉴定。

1.3 运用溶菌质粒制备大肠杆菌菌蛻

参考《分子克隆实验指南》^[10]中方法,将上述溶菌质粒转化至适宜的宿主菌。同时将空质粒pBV221、pCold IV和pETDuet1分别转化相应宿主菌作为对照,进行溶菌动力学试验。试验分组见表2。

表 1 重组质粒构建所用引物序列

Table 1 Sequences of primers used in the construction of recombinant plasmid

引物名	序列(5'→3')	酶切位点
<i>E</i> _{Cold} -F	accctcagggatccgaattcATGCTACGCTGGACTTTGTGG	<i>Eco</i> R I
<i>E</i> _{Cold} -R	ctatctagactgcaggctgacTCACTCCTTCCGCACGTAATTT	<i>Sal</i> I
<i>E</i> _{pET} -F	ccacagccaggatccgaattcATGCTACGCTGGACTTTGTGG	<i>Eco</i> R I
<i>E</i> _{pET} -R	tgcggccgcaagcttgcgacTCACTCCTTCCGCACGTAATTT	<i>Sal</i> I
SNA-F	ggcagatctcaattggatcATGGCAACTCAACTAAAAAATTACAT	<i>Eco</i> R V
SNA-R	ggtttctttaccagactcgagTTATTGACCTGAATCAGCGTTGTC	<i>Xho</i> I

序列中小写字母为线性化载体末端序列,小写斜体字母为酶切位点,大写字母为插入基因序列。

将 pBV221-*E*/DH_{5α}、pBV221/DH_{5α}、pBV221-*E*/BL₂₁和 pBV221/BL₂₁菌液于 28 ℃振荡培养至 *OD*₆₀₀约为 0.5 时,取 2 ml 菌液样品作为诱导前对照,然后将菌液置于 42 ℃诱导表达,每隔 30 min 取样测量 *OD*₆₀₀值。将 pCold IV-*E*/BL₂₁和 pCold IV/BL₂₁菌液于 37 ℃振荡培养至 *OD*₆₀₀约为 0.5 时,取 2 ml 菌液样品作为诱导前对照,然后将菌液置于 16 ℃,添加 IPTG 诱导表达,每隔 1 h 取样测量 *OD*₆₀₀值。将 pETDuet1-*E*/BL₂₁(DE3)、pETDuet1-*E*-SNA/BL₂₁(DE3)和 pETDuet1/BL₂₁(DE3)菌液于 37 ℃振荡培养至 *OD*₆₀₀约为 0.5 时,取 2 ml 菌液样品作为诱导前对照,然后将菌液置于 37 ℃,添加 IPTG 诱导表达,每隔 30 min 取样测量 *OD*₆₀₀值。IPTG 的诱导浓度见表 2。

表 2 不同大肠杆菌菌液制备方法的裂解效率

Table 2 Lysis efficiency of different preparation methods of *Escherichia coli* ghost

溶菌质粒	宿主菌	培养温度/ 诱导温度 (℃/℃)	IPTG 浓度 (mmol/L)	裂解效率 (%)
pBV221- <i>E</i>	DH _{5α}	28/42	0	99.99
pBV221- <i>E</i>	BL ₂₁	28/42	0	12.00
pCOLD IV- <i>E</i>	BL ₂₁	37/16	0.5	99.99
pETDuet1- <i>E</i>	BL ₂₁ (DE3)	37/37	0.5	88.45
pETDuet1- <i>E</i> -SNA	BL ₂₁ (DE3)	37/37	0.5	50.00
pETDuet1- <i>E</i> -SNA	BL ₂₁ (DE3)	37/37	1.0	90.44
pETDuet1- <i>E</i> -SNA	BL ₂₁ (DE3)	37/37	1.5	62.00

以上菌液振荡培养至转化有溶菌质粒的菌液 *OD*₆₀₀值不继续下降时,停止诱导并取 2 ml 菌液作为诱导后样品。将试验组诱导前菌液样品用生理盐水进行 10⁻⁴~10⁻⁶稀释,诱导停止时菌液样品进行

10⁻¹~10⁻³稀释,每个稀释度涂 3 块无抗 LB 平板,37 ℃恒温培养 12 h。选取合适稀释度的平板进行计数,取 CFU 平均值计算裂解率。计算公式为:裂解率=(1-诱导后 CFU/诱导前 CFU)×100%^[11]。

1.4 SNA 蛋白对宿主菌 DNA 的降解作用检测

取方法 1.3 中 pETDuet1-*E*-SNA/BL₂₁(DE3)诱导前(0 h)和诱导后(2 h)的菌液样品各 1 ml 瞬时离心,移取上清液备用。菌体沉淀用煮沸裂解法提取 DNA^[12];将沉淀溶于 100 μl PBS(pH7.4),进行沸水浴(10 min)和冰浴(5 min),12 000 g 离心 10 min 取上清液。取样品 5 μl 通过 1%琼脂糖凝胶电泳分析 SNA 蛋白对细菌 DNA 的降解活性。同时制备 pETDuet1-*E*/BL₂₁(DE3)诱导后(2 h)的菌液样品作为对照。

1.5 菌液的灭活

菌液停止诱导后,向菌液溶液中加入 β-丙内酯至终体积分数为 0.025%,并置于 42 ℃作用 1 h,离心菌液收集菌体沉淀,沉淀用灭菌 PBS(pH7.4)溶液清洗 3 遍后重悬,加入 β-丙内酯至终体积分数为 0.05%,再置于 42 ℃作用 2 h。分别取灭活后的菌液溶液涂板进行无菌检验。

1.6 透射电镜观察菌液

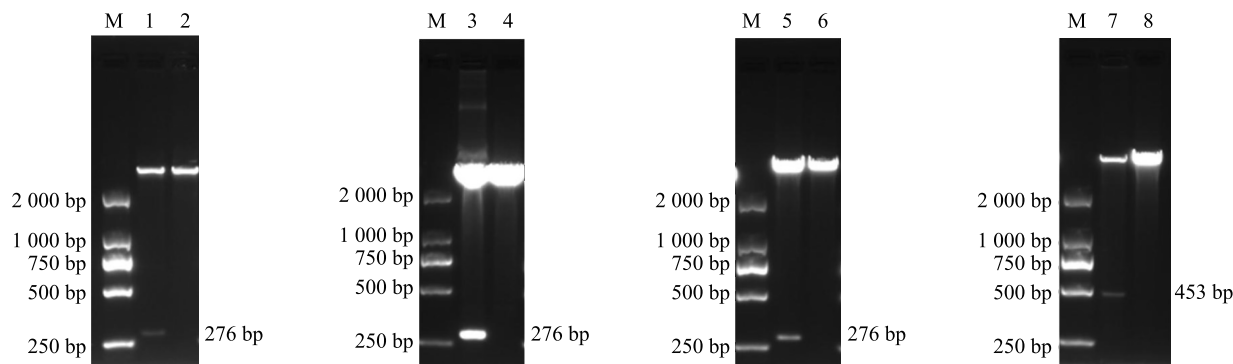
用负染色方法对灭活后的大肠杆菌菌液 pBV221-*E*/DH_{5α}、pBV221-*E*/BL₂₁、pCold IV-*E*/BL₂₁、pETDuet1-*E*/BL₂₁(DE3)和 pETDuet1-*E*-SNA/BL₂₁(DE3)进行染色。同时培养转化有不同空载体的宿主菌作为对照样品。透射电镜观察样品的制备方法为:将铜网置于不干胶底纸上,向铜网上滴加一滴大肠杆菌菌液,静置 10 min 后用滤纸吸取菌液,再向铜网上滴加一滴 2%磷钨酸染液,染色 1 min 后吸去染液,置于红外烘灯下处理 10 min。使用 Philips 透射电子显微镜(Tecna 12)观察菌体结构。

2 结果

2.1 溶菌质粒的构建

重组质粒双酶切结果显示重组质粒 pBV221-*E*、pCold IV-*E* 和 pETDuet1-*E* 中的插入基因片段长度

与 *E* 基因长度一致(图 1)。重组质粒 pETDuet1-*E*-*SNA* 中第 2 个 MCS 位点中的插入基因片段长度与 *SNA* 基因长度一致。依据质粒测序结果选择插入基因片段序列完全正确的克隆用于后续试验。



M: DL2000 Plus DNA marker; 1: pBV221-*E* 质粒 *Eco*R I 和 *Sal* I 酶切; 2: pBV221 质粒 *Eco*R I 和 *Sal* I 酶切对照; 3: pCold IV-*E* 质粒 *Eco*R I 和 *Sal* I 酶切; 4: pCold IV 质粒 *Eco*R I 和 *Sal* I 酶切对照; 5: pETDuet1-*E* 质粒 *Eco*R I 和 *Sal* I 酶切; 6: pETDuet1 质粒 *Eco*R I 和 *Sal* I 酶切对照; 7: pETDuet1-*E*-*SNA* 质粒 *Eco*R V 和 *Xho* I 酶切; 8: pETDuet1-*E* 质粒 *Eco*R V 和 *Xho* I 酶切对照。

图 1 重组质粒的酶切鉴定

Fig.1 Identification of recombinant plasmids by enzyme digestion

2.2 宿主菌的生长曲线

通过检测发现,在诱导 30 min 内, pBV221-*E*/DH_{5α} 菌液 *OD*₆₀₀ 即开始下降,在诱导 150 min 后数值趋于稳定,约为 0.30(图 2A)。在诱导 30 min 后, pBV221-*E*/BL₂₁ 菌液 *OD*₆₀₀ 开始下降,在诱导 120 min 后达到最低,约为 0.55(图 2A)。pCold-*E*/BL₂₁ 菌液 *OD*₆₀₀ 在 *E* 蛋白诱导表达 2 h 后开始下降,诱导 4 h 后数值趋于稳定,约为 0.30(图 2B)。当 IPTG 终浓度为 0.5 mmol/L 时, pETDuet1-*E*/BL₂₁ (DE3) 菌液 *OD*₆₀₀ 在诱导 30 min 内开始下降,90 min 后停止下降,约为 0.20。pETDuet1-*E*-*SNA*/BL₂₁ (DE3) 菌液在诱导 30 min 后开始下降,120 min 后达到最低值,约 0.30(图 2C)。当提高 IPTG 终浓度至 1.5 mmol/L 时, pETDuet1-*E*-*SNA*/BL₂₁ (DE3) 菌液 *OD*₆₀₀ 的下降时间晚于 0.5 mmol/L 和 1.0 mmol/L 诱导组(图 2D)。与此同时,转化有空载体的各对照菌液的 *OD*₆₀₀ 一直保持上升趋势(图 2)。

2.3 溶菌质粒的裂解效率

经计算,得到不同菌蛻制备方法的裂解效率(表 2)。表 2 显示, pBV221-*E* 溶菌质粒对 DH_{5α} 和 pCold IV-*E* 溶菌质粒对 BL₂₁ 的裂解效率均较高,可达 99.99%。而 pBV221-*E* 对 BL₂₁ 的裂解效率最低,

为 12.00%。pETDuet1-*E*-*SNA* 对 BL₂₁ (DE3) 的裂解效率受 IPTG 浓度的影响,在 IPTG 浓度为 1.0 mmol/L 时裂解效率较高,为 90.44%。

2.4 *SNA* 蛋白对宿主菌 DNA 的降解作用

IPTG 诱导后 0 h, pETDuet1-*E*-*SNA*/BL₂₁ (DE3) 细菌培养上清液中未见明显的基因组条带,而同时时间点的细菌裂解物中可见大片段基因组条带(图 3)。在 *E* 蛋白对菌膜打孔的作用下细菌 DNA 渗出,诱导后 2 h 的 pETDuet1-*E*/BL₂₁ (DE3) DNA 样品中无基因组条带,而诱导后 2 h 的 pETDuet1-*E*/BL₂₁ (DE3) 细菌培养上清液样品中出现未被降解的基因组条带(图 3)。经 IPTG 诱导后 2 h,在 *SNA* 蛋白的作用下, pETDuet1-*E*-*SNA*/BL₂₁ (DE3) 细菌 DNA 被降解,诱导后细菌培养上清液和细菌裂解物中均未出现大片段基因组条带,仅有约 100 bp 左右的条带(图 3)。

2.5 不同方法制备的大肠杆菌菌蛻灭活效果

通过涂板检验发现,经 β-丙内酯灭活处理后 pBV221-*E*/BL₂₁ 菌蛻溶液中仍有活菌存在,而 pBV221-*E*/DH_{5α}、pCold-*E*/BL₂₁、pETDuet1-*E*/BL₂₁ (DE3) 和 pETDuet1-*E*-*SNA*/BL₂₁ (DE3) 4 种菌蛻溶液中无活菌。

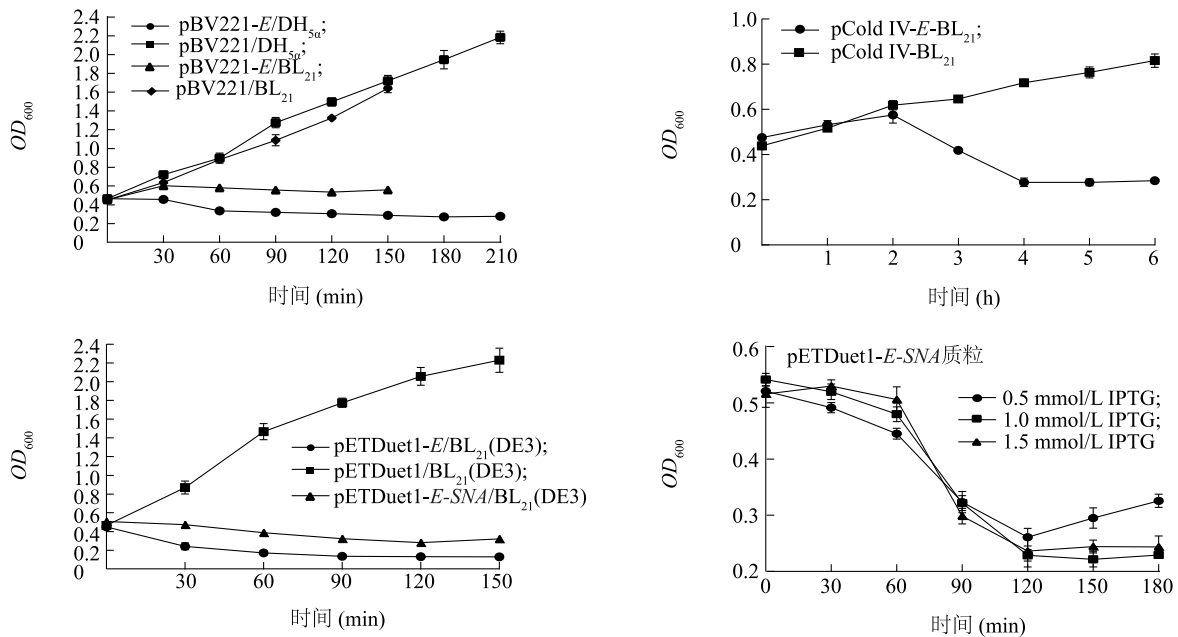
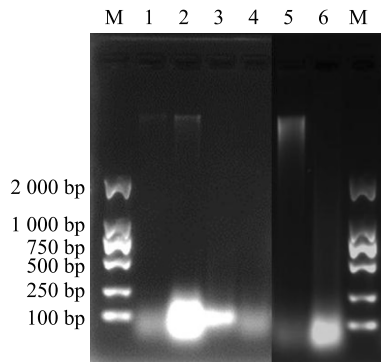


图2 大肠杆菌诱导培养后的生长曲线

Fig.2 Growth curve of *Escherichia coli* after inducing

M: DL2000 Plus DNA marker; 1: pETDuet1-*E-SNA*/BL₂₁(DE3) 诱导 0 h 细菌培养上清液; 2: pETDuet1-*E-SNA*/BL₂₁(DE3) 诱导 0 h 细菌 DNA; 3: pETDuet1-*E-SNA*/BL₂₁(DE3) 诱导 2 h 细菌培养上清液; 4: pETDuet1-*E-SNA*/BL₂₁(DE3) 诱导 2 h 细菌 DNA; 5: pETDuet1-*E*/BL₂₁(DE3) 诱导 2 h 细菌培养上清液; 6: pETDuet1-*E*/BL₂₁(DE3) 诱导 2 h 细菌 DNA。

图3 大肠杆菌 BL₂₁(DE3) 诱导前后 DNA 电泳分析Fig.3 Electrophoretic analysis of total DNA of *Escherichia coli* BL₂₁(DE3)

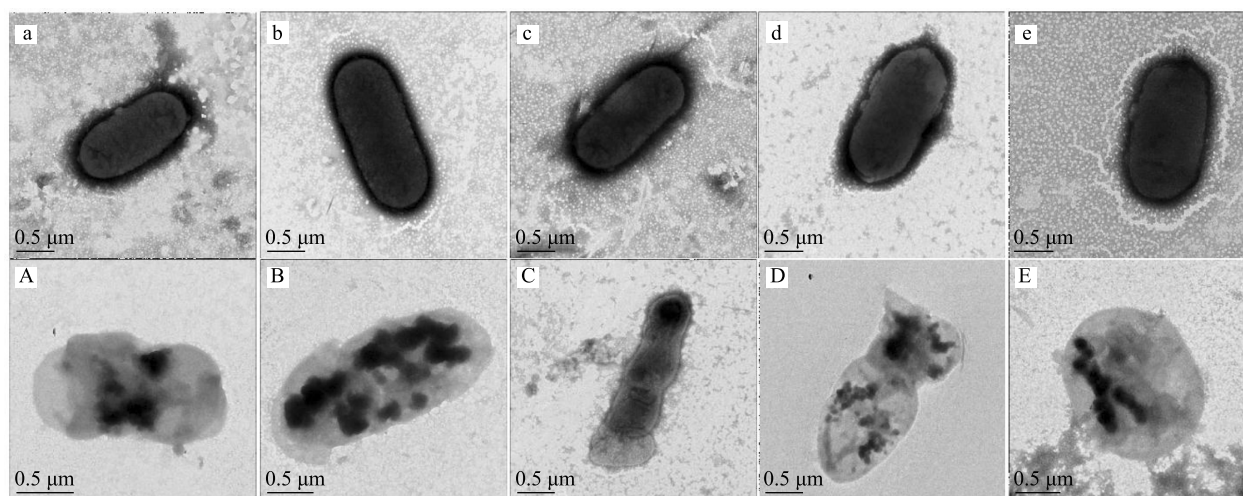
2.6 大肠杆菌菌蛻的结构

透射电镜观察,结果(图4)显示,对照菌结构完整,菌体电子密度较高且分布均匀,而几种菌蛻的电子密度明显降低且分布不均,细胞膜出现不同程度的皱缩变形,对照菌和菌蛻样品均未见鞭毛结构。

3 讨论

目前,已报道的大肠杆菌菌蛻的制备方法较多,其中大多数方法均利用了噬菌体 *E* 基因在大肠杆菌中的表达。有研究者尝试利用细胞穿透肽在大肠杆菌中的表达来制备菌蛻,未能获得成功^[8]。另有研究者将 *E* 和 *SNA* 串联表达,同时实现了细菌的高效裂解和基因组 DNA 的降解。这些研究中,被用于 *E* 基因表达的载体包括 pBV220、pBV221、pBAD、pET32a、pML1、pDKL01 等。这些载体中,除 pBAD 外,均不能实现 2 个以上蛋白质的共表达。被用于表达的大肠杆菌中既有致病菌又有工程菌,如 *E. coli* pop 2135、*E. coli* O157 : H7、禽致病性大肠杆菌 APEC1 (O45)、CH2 (O78)、O78K80,以及工程菌 TOP10、JN10、DH_{5α} 和 BL₂₁(DE3) 等^[11,13-15]。人们在将获得的菌蛻作为菌苗的研究中,往往选择致病菌作为表达菌,而在将菌蛻作为核酸或重组蛋白载体的研究中,一般选择工程菌用于菌蛻制备。本研究创新性地将 pCold IV 冷休克表达载体和 pETDuet1 双表达载体运用于大肠杆菌菌蛻制备,并与 pBV221 载体制备方法进行综合比较。

研究中发现,不同菌蛻制备方法中的宿主菌裂解效率有较大差别。pBV221-*E* 溶菌质粒对 DH_{5α} 和 pCold IV-*E* 溶菌质粒对 BL₂₁ 的裂解效率较高,达



a: pBV221/DH_{5α} 对照; b: pBV221/BL₂₁ 对照; c: pCold/BL₂₁ 对照; d: pETDuet1/BL₂₁ (DE3) 对照; e: pETDuet1-E/BL₂₁ (DE3) 对照; A: pBV221-E/DH_{5α} 菌蛻; B: pBV221-E/BL₂₁ 菌蛻; C: pCold-E/BL₂₁ 菌蛻; D: pETDuet1-E/BL₂₁ (DE3) 菌蛻; E: pETDuet1-E-SNA/BL₂₁ (DE3) 菌蛻。

图4 大肠杆菌菌蛻的透射电镜检测

Fig.4 Transmission electron micrographs of *Escherichia coli* ghost

99.99%。而 pBV221-E 对 BL₂₁ 的裂解效率最低,且相同灭活条件下不能实现对菌蛻的完全灭活。这提示我们将 pBV221-E 用于不同来源宿主菌的菌蛻制备时,裂解效率有较大差异。pCold 系列载体属于大肠杆菌冷休克表达载体,可在低温下诱导目的蛋白的表达,提高表达产物的溶解性和稳定性^[16]。在本研究中 pCold IV-E 的裂解效率接近 100%,但其缺点是需要较长的诱导表达时间。前期试验中, pETDuet1-E-SNA 组 IPTG 终浓度为常用的 0.5 mmol/L,但细菌裂解效率仅为 50%,明显低于 pETDuet1-E 组。在后续试验中将 IPTG 诱导浓度提高为 1.0 mmol/L 和 1.5 mmol/L 后发现,当 IPTG 终浓度为 1.0 mmol/L 时,该质粒对宿主菌的裂解效率优于 0.5 mmol/L 和 1.5 mmol/L 组,为 90.44%。我们推测,这是因为不同诱导剂浓度对 E 蛋白和 SNA 蛋白的共表达具有较大影响,从而影响了蛋白质对宿主菌的裂解作用。从宿主菌生长曲线中可以看出, pCold IV-E/BL₂₁ 的 OD₆₀₀ 值下降时间晚于其他组。这可能是因为 pCold IV 属于低温诱导表达载体,其适宜的表达温度为 16℃,而细菌在此温度下增殖速度较慢, E 蛋白表达速度也受到影响。本研究中,其他菌蛻制备组的 OD₆₀₀ 值下降时间均为 30 min 前后,且在诱导约 90~120 min 后趋于稳定。这 2 个时间点早于国内外的部分报道^[2,11,17],提示这几种方

法在生产周期上可能有一定优势。

值得注意的是,虽然不同制备方法的裂解效率有较大差异,但是除 pBV221-E/BL₂₁ 外,其他试验组均能实现 β-丙内酯处理下的 100% 灭活。提示裂解效率达到一定的数值后,裂解效率的高低将不会对 β-丙内酯的灭活效果产生影响。与常用的甲醛灭活剂相比,β-丙内酯不直接作用于蛋白质,而是作用于病原体 DNA 或 RNA,因此能保持病原良好的免疫原性,且作用时间短,易水解无残留,不会引发严重的接种反应^[18]。如果从降低生产成本的角度考虑, pBV221-E/DH_{5α} 方法不需添加诱导剂,通过提高培养温度即可完成细菌裂解,有显著优势。如果从提高安全性的角度考虑,虽然 pETDuet1-E-SNA/BL₂₁ (DE3) (IPTG 1.0 mmol/L) 组的裂解效率不是最高,但该方法可实现细菌 DNA 的降解,因此理论上获得的菌蛻产品的安全性更好。这与国内一些学者的研究结果一致^[2,19]。同时, pETDuet1 还可与 pACYC-Duet1 双表达载体联合使用,在合适的宿主菌中实现 4 个基因的共表达,在菌蛻制备的同时实现其他外源基因的表达,进一步拓展菌蛻的功能。同时值得注意的是, pET 系列载体的表达需要使用融合有 T7 噬菌体 RNA 聚合酶的宿主菌^[20],这在一定程度上限制了该载体的使用。

通过电镜观察发现,不同方法获得的菌蛻均能

保持较为完整的细菌形态,但是未观察到鞭毛结构。这提示如果将溶菌质粒转入禽致病性大肠杆菌分离株进行菌蛻制备,获得的菌蛻可能具有更好的免疫原性,更适合作为菌苗使用^[14,21]。而利用 DH_{5α}、BL₂₁和 BL₂₁(DE3)等工程菌制备的菌蛻因宿主菌来源清晰,可用于核酸疫苗和亚单位疫苗等疫苗菌蛻载体的制备。

综上所述,与溶菌质粒 pCold IV-E 和 pETDuet1-E 相比,pBV221-E 和 pETDuet1-E-SNA 在未来的生产和应用中更具潜力。我们将在本研究的基础上对溶菌质粒进行改造,继续开展将细菌菌蛻作为新型疫苗递送系统的研究。

参考文献:

- [1] LUBITZ W, PUGSLEY A P. Changes in host cell phospholipid composition of ϕ X174 gene E product[J]. Fems Microbiology Letters, 1985, 30(1/2):171-175.
- [2] 彭 凌,杨旭夫.重组双基因鸭源大肠杆菌菌蛻的制备[J].中国人兽共患病学报,2018,34(7):639-642.
- [3] SZOSTAK M P, HENSEL A, EKO F O, et al. Bacterial ghosts: non-living candidate vaccines [J]. Journal of Biotechnology, 1996, 44(1-3):161-170.
- [4] HENSEL A, HUTER V, KATINGER A, et al. Intramuscular immunization with genetically inactivated (ghosts) *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 9 protects pigs against homologous aerosol challenge and prevents carrier state[J]. Vaccine, 2000, 18(26):2945-2955.
- [5] MAYR U B, HALLER C, HAIDINGER W, et al. Bacterial ghosts as an oral vaccine: a single dose of *Escherichia coli* O157 : H7 bacterial ghosts protects mice against lethal challenge[J]. Infection & Immunity, 2005, 73(8):4810.
- [6] MARCHART J, DROPMANN G, LECHLEITNER S, et al. *Pasteurella multocida* - and *Pasteurella haemolytica* -ghosts: new vaccine candidates[J]. Vaccine, 2003, 21(25):3988-3997.
- [7] SERYUN K, SUNGKOO Y K, KIHONG K. Protection of tilapia (*Oreochromis mosambicus*) from edwardsiellosis by vaccination with *Edwardsiella tarda* ghosts.[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2006, 20(4):621-626.
- [8] 胡剑刚,董洪亮,付立夏,等.制备禽致病性大肠杆菌菌蛻的三种方法比较[J].生物工程学报,2017,33(12):2009-2016.
- [9] 孙 颖. App 菌影装载多杀性巴氏杆菌 OmpH 外膜蛋白 DNA 疫苗的研究[D]. 天津:天津农学院,2011.
- [10] 萨姆布鲁克 J, 格林 M R. 分子克隆实验指南[M].4 版.北京:科学出版社, 2017: 138-142.
- [11] WENXING Z, YUYU Z, XINLI L. Efficient production of safety-enhanced *Escherichia coli* ghosts by tandem expression of PhiX 174 mutant gene E and staphylococcal nuclease A gene[J]. Microbiological Research, 2015, 176:7-13.
- [12] 曹春光. 苏鲁部分地区禽致病性大肠杆菌的分离及 2 个 O78 分离株致病性的研究[D].扬州:扬州大学,2015.
- [13] VILTE D A, LARZÁBAL M, MAYR U B, et al. A systemic vaccine based on *Escherichia coli* O157 : H7 bacterial ghosts (BGs) reduces the excretion of *E. coli* O157 : H7 in calves[J]. Veterinary Immunology & Immunopathology, 2012, 146(2):169-176.
- [14] LAGZIAN M, BASSAMI M R, DEHGHANI H. *In vitro* responses of chicken macrophage-like monocytes following exposure to pathogenic and non-pathogenic *E. coli* ghosts loaded with a rational design of conserved genetic materials of influenza and Newcastle disease viruses [J]. Veterinary Immunology & Immunopathology, 2016, 176:5-17.
- [15] TUNTUFYE H N, ONS E, PHAM A D, et al. *Escherichia coli* ghosts or live *E. coli* expressing the ferri-siderophore receptors Fe-pA, FhuE, IroN and IutA do not protect broiler chickens against avian pathogenic *E. coli* (APEC) [J]. Veterinary Microbiology, 2012, 159(3/4):470-478.
- [16] 张文文,王小敏,肖 琦,等.猪 TTV2 *ORF1* 基因的原核表达及多克隆抗体的制备[J].江苏农业学报,2014,30(1):119-124.
- [17] 李小妹,马 跃,李安兴,等.禽致病性大肠杆菌(APEC)菌蛻的制备研究[J].中国预防兽医学报,2007,20(6):423-427.
- [18] 徐守振,尹燕博,王 新.动物疫苗中常用抗原灭活剂的研究进展[J].中国畜牧兽医,2010,37(9):162-167.
- [19] 付立夏,张 磊,李欣容,等.金黄色葡萄球菌核酸酶 A 在温控双表达载体中的表达及其活性分析[J].生物学杂志,2018,35(2):34-37.
- [20] 李鹏成,孙 冰,乔绪稳,等.乳酸乳球菌肽聚糖锚蛋白原核表达载体的构建与表达[J].江苏农业学报,2013,29(6):1399-1404.
- [21] 吕敏娜,覃宗华,余劲术,等.鸭源大肠杆菌 O₇₈ 菌蛻的制备及免疫原性研究[J].中国预防兽医学报,2010,32(9):712-715.

(责任编辑:张震林)