

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810051044.1

[51] Int. Cl.
G12N 15/31 (2006.01)
G12N 15/70 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 21/64 (2006.01)

[43] 公开日 2010年2月3日

[11] 公开号 CN 101638660A

[22] 申请日 2008.8.1

[21] 申请号 200810051044.1

[71] 申请人 长春理工大学

地址 130022 吉林省长春市卫星路 7989 号

[72] 发明人 王春风 李景梅 刘琼 田坚

[74] 专利代理机构 吉林长春新纪元专利代理有限
责任公司
代理人 纪尚

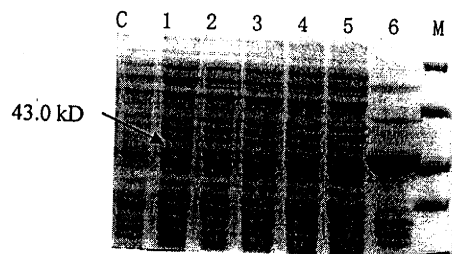
权利要求书 2 页 说明书 16 页 附图 3 页

[54] 发明名称

嗜酸乳杆菌 S - 层蛋白表面展示系统的构建

[57] 摘要

一种嗜酸乳杆菌 S - 层蛋白表面展示系统的构建, 属于生物技术领域, 其特征是: 基因的获得, (1) PCR 扩增, (2) SlpA 基因与 pMD18 - TVector 系统连接, (3) 克隆质粒 pMD18T - S 的鉴定。构建, (1) 目的基因和双标记表达载体的获得, (2) 双标记表达载体与 SlpA 的连接转化, (3) 表面展示载体系统鉴定, (4) S - 层蛋白在重组体表面锚定表达情况检测。其有益效果是: 1. 所构建的载体可以用于转化入 S - 层蛋白基因缺陷的乳酸菌内来研究乳酸菌 S - 层蛋白形成的机制。2. 利用 DNA 重组技术, 将病原体的保护性抗原基因与该表面展示载体上的乳酸菌 S - 层蛋白相融合。



1、一种嗜酸乳杆菌 S-层蛋白表面展示系统的构建，其特征是：

a、嗜酸乳杆菌 S-层蛋白 S1pA 基因的获得

(1) S1pA 基因的 PCR 扩增

将复苏的嗜酸乳杆菌菌种采用染色体提取试剂盒，按说明书操作提取染色体 DNA；根据已发表 S-层基因的序列，设计了一对引物，在引物的 5' 端和 3' 分别加有酶 *Sac* I 和 *Kpn* I 酶切位点；用 *Ex Taq* DNA 聚合酶以染色体 DNA 为模板进行 PCR 扩增目的基因；引物的设计：根据已发表的 S-层蛋白基因序列设计引物；

P1: 5' GGC GAGCTCATGAAGAAAAATTT 3'

Sac I

P2: 5' GTG GGTACCTTATCTAAAGTTTG 3'

Kpn I

(2) S1pA 基因与 pMD18-T Vector 系统连接

将回收产物与载体初步定量，设计连接反应体系，在 0.5 mL 离心管中加入 PCR 纯化产物 4 μ L，pMD18-T Vector 1 μ L，Ligation Mix 5 μ L，混匀，16 $^{\circ}$ C 连接 2 h 后，转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞；

(3) 克隆质粒 pMD18T-S 的鉴定

将转化后的细胞取 100-200 μ l 菌液涂布于准备好的 LB-AMP 琼脂平板 (含 200 μ g/ml AMP, 20 %X-gal 和 40 mmol/L IPTG) 37 $^{\circ}$ C 培养过夜；蓝白斑筛选出转化子，酶切及 PCR 鉴定后，送至 TAKARA 公司测序，序列测定后应用 DNASTar 软件进行分析，将阳性转化子命名为 pMD18T-S；

b、表面展示系统 pW425et-S 的构建

(1) 目的基因 S1pA 和双标记表达载体 pW425et 的获得

将双标记表达载体 pW425et 和克隆质粒 pMD18T-S 质粒用 *Sac*I 和 *Kpn*I 限制性内切酶进行酶切，以获取粘末端的 pW425et 载体及 *S1pA* 基因片段；酶切完毕后，进行 1% 琼脂糖凝胶电泳，用维特洁回收纯化试剂盒回收纯化，以用于下一步连接；

(2) 双标记表达载体 pW425et 与 S1pA 的连接转化

将回收纯化后具有粘末端的 *S1pA* 基因及 pW425et 载体片段，按照一定的比例加入到 0.5 mL 离心管混匀后，同时设空载体对照组 (所加 *S1pA* 片段用双蒸水替代)，经 T4 DNA Ligase

在 16 °C 连接 2 h, 4°C 过夜; 将连接产物 10 μL 转化到 100 μL 感受态细胞 X13 中, 同时向另 100 μL 感受态细胞中加入 10 μL 灭菌双蒸水, 作为阴性对照, 加入 5 μL 没有进行酶切的 pW425et 质粒作为阳性对照, 吸取 150 μL 培养物涂布于 LB-EM (EM: 200 μg/ml) 平板, 37 °C 过夜培养;

(3) 表面展示载体系统 pW425et-S 鉴定

提取转化成功的细菌质粒, 分别用 *SacI* 和 *KpnI* 进行酶切鉴定, PCR 鉴定, 筛选出阳性重组子;

(4) S-层蛋白在重组体 *E. coli* X13S8 表面锚定表达情况检测

(a) pW425et-S 表达产物的 SDS-PAGE 分析

挑取转化成功的单菌落, 分别接种于 10 mL LB-EM 培养液, 37°C 振摇过夜, 取 5 mL 过夜培养物接种于 100 mL LB-EM 培养液, 37°C 200 r/min 振摇培养使其 OD₆₀₀ 在 0.6~0.8 之间。添加 40mM DL-苏氨酸, 继续培养, 加入之前取菌一次, 之后每 2 h 取一次菌液, 至第 10 h, 最后统一调 OD₆₀₀ 值至 0.68, 样品处理好后, 取上清 15 μL 按进行 12% 凝胶 SDS-PAGE 分析;

(b) 表达 S-层蛋白的 Western blotting 分析

表达产物经 SDS-PAGE 后, 以 BIO-RAD 系统电转移至 PVDF 膜上, 经牛血清白蛋白封闭后, 依次加入乳杆菌 S-层蛋白多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG, 最后在联苯胺 (DAB) 溶液中显色, 并观察结果;

(c) 用全细胞 ELISA 检测 S-层蛋白在大肠杆菌的表面锚定情况

将大肠杆菌 X13 空载体和重组菌 X13S8 诱导 8 h 的细胞, 再用 PBS 按梯度稀释到 OD₆₀₀ 分别为 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25, 进行全细胞 ELISA 检测 S-层蛋白在大肠杆菌的表面锚定情况;

(d) 免疫荧光检测

收集经诱导后培养 8 h 的重组菌大肠杆菌 X13S8, PBS 洗涤, 用 2% 的甲醛固定于载玻片, 以大肠杆菌 X13 为对照, 在载玻片上滴加稀释的鼠抗 S-层蛋白抗体, 然后加入用异硫氰酸荧光素标记的兔抗鼠 IgG 血清 (1:100), 包埋载玻片, 用荧光显微镜进行检测。

嗜酸乳杆菌 S-层蛋白表面展示系统的构建

技术领域

本发明属于生物技术领域。

背景技术

1 微生物细胞表面展示技术

微生物细胞表面展示(Microbial cell-surface display, MCSD)是指利用分子生物学技术和免疫学等技术将外源保护性肽类分子和蛋白质分子锚定展示在微生物细胞表面,即将外源蛋白与菌体的某一表面蛋白相融合,借助菌体蛋白的表面识别和表面定位功能将前者定位在细胞表面,前者称为乘客蛋白,后者称为运载蛋白,这样表达出的基因产物不需进行提取、纯化,复性等操作,可以直接利用全细胞进行表达出蛋白的后续工作^[1]。

2 表面展示系统的研究现状

2.1 噬菌体表面展示系统

噬菌体表面展示技术(phage display) 是由Smith 于1985年首先建立起来的一种新的生物技术^[2], 它能将表达的外源多肽或蛋白以融合蛋白的形式展示在噬菌体的表面,保持相对独立的空间构象和原有的生物活性^[3]。该项技术比较成熟,已成功地用于抗原表位筛选,酶抑制剂和受体拮抗剂分离,细胞信号转导途径以及抗体工程研究等。常用的噬菌体表面展示系统主要有丝状噬菌体、 λ 噬菌体及T4 噬菌体展示系统等。虽然它们都具有噬菌体展示系统的优点,但对于丝状噬菌体来说,它不能展示那些难以分泌的肽和蛋白质,而且它的N端可融合外源多肽的容量有限,较大蛋白的融合会造成空间障碍,影响噬菌体的装配,使其失去感染力。而对于 λ 噬菌体,大分子蛋白的融合会抑制噬菌体的组装,使其生长受到影响,因此这两种噬菌体更适用于构建短肽库和cDNA 表达文库^[4],而不适于构建重组疫苗和表达分子量具有完整结构域的蛋白质^[5,6,7]。

2.2 细菌表面展示系统

细菌表面展示系统是继噬菌体表面展示系统之后发展起来的,其呈现载体多样,可根据不同需要呈现蛋白或多肽。近年来其应用已扩展到重组细菌疫苗,多肽库筛选,全细胞吸附剂,全细胞催化剂以及作为诊断的细胞固相试剂等多个领域。目前有多种细菌表面展示系统

可供利用,除了以往对细菌的外膜蛋白、脂蛋白、表面附属结构亚单位如鞭毛、菌毛等研究较多外,近几年又开发出多种新的表面展示系统。研究较多的有冰晶核蛋白、自体转运蛋白S-层蛋白等。此外,尚有研究利用枯草杆菌的芽胞外膜,L-型大肠杆菌和变形杆菌的细胞膜来展示外源蛋白。每种展示系统都有其自身的缺点,例如展示蛋白大小的限制,错误定位,形成包涵体,外膜不稳定等,因此需要开发新的系统,以进一步优化表面展示系统^[8]。

2.3 酵母表面展示系统

酵母表面展示系统是继噬菌体展示技术创立后发展起来的真核展示系统,酵母表达体系不但有原核表达体系的特点,同时具有真核细胞翻译后蛋白加工修饰的过程,酵母的蛋白质折叠和分泌机制与哺乳动物细胞非常相似,对人的蛋白质表达和展示更具优越性。将酶,抗原,抗体和六聚组氨酸等不同蛋白和多肽展示在酵母细胞表面,可实现各种各样的用途。酵母细胞颗粒大大可用流式细胞仪进行筛选和分离。目前报道的两种酵母展示系统分别以 α 或 α 凝集素作为融合骨架。在蛋白质的定向进化、口服疫苗的研制等多方面均有报道。酵母表面展示技术的发展非常迅速,同时,在不断地完善和改进,应用于越来越多的领域。由于其具有转录后修饰,有效的空间折叠蛋白的优势,使之对真核生物蛋白展示具有独特的优势。但同时也存在许多不利因素,如重组酵母缺少选择性标记,生长调节苛刻;如果配体对细胞有毒性作用,有可能导致酵母死亡,无法得到目的克隆^[9]。

3 S-层蛋白及其在微生物表面展示系统中的应用

3.1 S-层蛋白的发现、定位和超微结构

许多古细菌和真细菌在原生质外层都具有一层非常重要的细胞外壁结构,称为表面层(Surface layers),由单一的蛋白质或糖蛋白亚单位组成,在菌体表面自我装配形成规则晶格的单分子层,又称S-层蛋白质(S-layer protein),它与位于其下方的细胞包被(细胞膜、外膜或细胞壁)以非共价键方式连接,完整的包裹着细菌菌体,是生物进化过程中最简单的一种生物膜^[10,11]。

由于细菌外壁结构的不同,S层与其它细胞表层结构之间的关系较复杂,在研究比较多的古细菌中S层能与原生质末紧密连接在一起从而被整合到质脂双分子层中。根据国内外的研究报道,S层在原核生物的存在状况可分三种情况:在革兰氏阴性(G^-)古细菌中,外鞘结构最简单,由细胞膜和S层组成,S层紧贴在细胞膜外则作为细胞壁成分直接与细胞膜相连;革兰氏阳性(G^+)古细菌和真细菌的S层蛋白与肽聚糖层相连,存在于细胞壁外面; G^- 真细菌的S层存在于外膜的外层,其外鞘结构依次为细胞膜、肽聚糖层、外膜和S层^[12,13]。对于有荚膜和S层的细菌,荚膜存在于S层外面^[14]。

在真细菌和古细菌中,S层可在细胞生长和分裂的所有阶段完全覆盖在细胞表面。过去,S层的广泛存在并不被人们所关注,因为实验室条件下S-layers 比较脆弱,而且可能随培养

时间的延长而丢失, 所以对其形态学的研究有较大难度, 目前较多的应用切片技术(thin sections)、冷冻蚀刻技术、电子负染技术和重结晶技术等来进行菌体表面形态的观察^[15]。最近, 随着显微镜技术的提高, 人们得到了清晰度分辨率更高的S-层蛋白的电子图像, 许多图像显示了亚单位通道动态的开放与闭合^[16]。独立存在的表层蛋白在溶液中或者在细胞表面上具有再结晶的能力^[17], 目前对该能力研究比较多的表层蛋白主要来源于芽孢杆菌科的某些种类。S-层的晶格结构为倾斜形、四方形或六角形, 在这些晶格中S-层亚单位是对齐并对称排列的, 在古细菌中大多数是以六角形对称排列。这些形态学单位相邻最近两个中心间距为2.5~35 nm。因此S-层是多孔的网状结构, 其孔隙占据了整个表面积的30%~70%, 同一S-层中孔隙的大小和形状是相同的, 一般在2~8 nm这个范围内。

3.2 S-层蛋白的化学成分和组成

对多种S-层蛋白质的化学分析和遗传研究指出无论是在哪种细菌中, S-层蛋白的组成相似, 由单一的蛋白质或糖蛋白亚单位组成, 分子量在40.0到170.0 kD之间一般疏水性氨基酸占40%~60%, 含有大量谷氨酸和天冬氨酸(15%), 赖氨酸的含量也相当高(10%), 极少存在含硫氨基酸。20%的氨基酸构成 α 螺旋, 40%为 β 折叠, 非周期性的折叠和 β -转角在5%~45%之间。一般情况下, S-层蛋白的等电点在4~6, 也有报道表明许多乳酸杆菌的等电点很高, 个别为8~10。许多古细菌和G⁺细菌的S-层蛋白被糖基化, 可与糖链共价结合, 糖链一般由含中性己糖、戊糖、庚糖、6-脱氧己糖和氨基糖的20~50个重复单位组成。在有些S-层蛋白中还有磷酸化修饰作用^[18]。

3.3 S-层蛋白的分子生物学, 遗传学和生物合成

克隆和序列分析S-层蛋白基因的研究, 为人们对S-层的遗传学和生物合成带来了许多新的了解, 虽然组成S-层的氨基酸组成没有明显的差别, 但不能反映基因序列的真实情况, 古细菌和真细菌基因序列的同源性小, 在亲缘关系相近的细菌中时常可以发现同源基因, 如嗜酸乳杆菌ATCC4356和瑞士乳杆菌编码S-层蛋白基因的同源性高达80%, 而短乳杆菌与前两者的同源性却很低。对于一个中等大小的杆状细胞来说, 完整的S-层大约由 5×10^5 个单体组成, 因此为了维持S-层在细胞表面的存在, 对于代时为20~30分钟的细菌来说, 每秒种至少必须合成500个S-层蛋白多肽, 并且运送到细胞表面组装成S-层, 因此可以认为S-层蛋白的启动子是非常强的, 如嗜酸乳酸杆菌(*Lactobacillus acidophilus*) S-层蛋白的启动子是细菌中最强启动子之一的乳酸脱氢酶基因启动子的两倍^[19]。在短乳杆菌中, S-层蛋白的表达由两个相关的启动子控制, 一个位于起始密码子附近, 并且主要用于对数生长期和稳定期, 另一个启动子用于其他时期控制S-层蛋白的表达。

大多数S-层蛋白在N-末端含有决定分泌的信号肽序列, 信号肽由12~34(多为19~34)个氨基酸组成, 经由信号肽序列途径分泌, 虽然不同菌株的分泌途径不同, S-层蛋白合成以后必须分泌到细胞外才能形成S-层, 该序列在组装成S-层之前会被切除。在有些细菌的S-层

蛋白中存在 I 型分泌机制以及不依赖于信号肽的分泌机制。但是已经了解到了S-层蛋白表达后的修饰途径如羧基端碎片的去氨基化, 氨基酸残基的磷酸化和去糖基化。

3.4 S-层蛋白功能结构

S-层可有效地与细胞壁结合, 已有报道芽孢杆菌属(*Bacillus*)、棒状杆菌(*Corynebacterium*)、和嗜热细菌(*Thermo bacterium*)的S-层蛋白存在着许多与细胞壁相结合的区域, 研究表明许多S-蛋白的N-端、细胞联合胞外酶的C-端以及革兰氏阳性细菌的其它胞外蛋白中存在一个或是多个拷贝的保守结构域, 称为的S-层蛋白同源区(Surface Layer Homology, SLH)^[20-23], 起着在细胞表面锚定的作用, 典型的S-层蛋白和细胞联合胞外蛋白具有三个重复的SLH, 每一个SLH含50-60个氨基酸, 其中有10-15个氨基酸是高度保守的。将SLH与提纯的细胞壁进行体外作用实验, 结果表明, SLH与S-层蛋白锚定到细胞壁上有关, 缺少SLH的S-层不能锚定到细胞壁上。在G⁺ 细菌中, 其坚硬的细胞壁除了主要由肽聚糖组成外, 还有一层由磷壁酸质, 糖醛酸磷壁酸质、脂磷壁酸质, 或脂聚糖组成的次生细胞壁聚合物(Secondary cell wall polymers)。已证实, 在许多S-层蛋白的N-末端正是这个SLH结构起着锚定在细胞表面的作用, 通过非共价键锚定在次生细胞壁聚合物上。在有些G⁺ 细菌中, 其S-层蛋白没有SLH 结构, 但它们可通过在N-末端带正电区域来锚定。如嗜热脂肪芽孢杆菌野生株和乳酸杆菌的S-层蛋白没有SLH, 但是嗜热脂肪芽孢杆菌野生株的S-层蛋白的N-端部分仍然是高度保守的, 且能识别并结合到带净电荷的次生细胞壁多聚物上, 其次生细胞壁多聚物由四糖重复单位组成。乳酸杆菌的S-层蛋白能识别并结合到中性多聚糖上。

3.5 S-层蛋白功能及潜在应用价值

3.5.1 S-层蛋白功能

一般认为S-层蛋白的功能有: 维持细胞结构, 启动细胞黏附和表面识别^[24], 如抗原受体遮蔽层(phage receptor-masking layer)^[25]、主要毒力决定子(major determinant for virulence)^[26]、淀粉酶粘附结构(attachment structure for amylase)、分子筛(molecular sieves)、细胞的保护性屏障(protective coats)、分子和离子通道 (molecular and ion traps)、细胞粘附和表面识别促进因子(promoters for cell adhesion and surface recognition)以及细胞形状决定因子(cell shape determinants)^[27] 等, 然而 S-层蛋白的许多功能尚不清楚。目前已发现400多种细菌和古细菌有S-层蛋白质, 所以表明它在适应环境方面有重要的意义。乳酸菌中, 表层蛋白是迄今为止人们研究最多的表面粘附蛋白。

3.5.2 应用潜能

由于S-层蛋白质具有很多独特的性质, 例如构成的蛋白质亚基成分单一, 表面蛋白质之间存在孔隙的形态和大小一致, 解离的S-层蛋白能够进行再组装等, 所以它在生物技术、分

子纳米技术、仿生学等诸多方面将有很多可应用的价值,但是所有应用的前提是S-层蛋白在溶液中或者在合适的表面上进行装配形成S-层蛋白质的能力。实验证明,解离的S-层蛋白可以在很多介质表面进行装配,例如硅晶片、金属、多聚体以及脂质体等。S-层蛋白在溶液中自我装配的过程中可以作为抗菌物质载体佐剂而结合抗原菌,从而在免疫治疗过程中起作用^[28]。由于很多病毒的核衣壳表面含有的S-层蛋白质经过解离后可以在脂膜表面重新结晶,因此S-层蛋白质可以在诊断学、疫苗、药物分选和定位、基因治疗等领域中有广泛的应用。Schultze-Lam 等1992 年发现藻青菌中的S-层蛋白质在溶液中作为模板而存在,能够诱导多种矿物质在其周围聚集^[29]。S-层蛋白质形成过程的可重复性使其可以作为固定的基质进行应用,例如作为某些功能性分子(如酶、免疫球蛋白等)的结合位点等,一旦功能性分子和S-层蛋白质相互结合,就可以作为生物分析传感器、亲和性微粒子和亲和性膜等广泛应用于工业生产中。

3.6 S-层蛋白用于微生物细胞表面展示的优势

S-层作为菌体面对环境的最外层屏障,是菌体适应周围环境的重要结构。随着遗传、结构、装配和功能等方面研究的逐渐深入,人们意识到了 S-层蛋白质潜在的应用价值。其基因的可操作性,独特的自装配特性及其单分子晶体层的结构都很有应用前景,目前已经应用在异源蛋白质的分泌性表达、表面展示和纳米科技等方面。在利用其研制活载体疫苗方面与其他表面蛋白相比,用 S-层蛋白作为微生物细胞表面展示的载体蛋白具有无可比拟的优势,首先, S-层可有效地与细胞壁结合,已有报道乳酸菌(*Lactobacillus*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、棒状杆菌(*Corynebacterium*)、和嗜热菌(*Thermobacterium*)的 S-层蛋白存在着许多与细胞壁相结合的区域,研究表明许多 S-蛋白的 N-末端存在一个或是多个拷贝的保守结构域 SLH,起着在细胞表面锚定的作用;其次, S-层蛋白表达量高,可达细胞蛋白的 20%,这是所有表面蛋白中每单位细胞摩尔分子最高的一种(5×10^5 /细胞),并能在细胞生长和分裂的所用阶段覆盖在细胞表面,说明 S-层蛋白基因有较强的表达和分泌系统,有利于其所携带得外源基因的表达,这使其在各种生物工程方面应用占有很高的优势^[30];最后, S-层蛋白能容许外源序列的插入,尤其是革兰氏阳性菌的蛋白表面展示系统有着相同或类似的表面锚定机制,允许多达几百个氨基酸的外源蛋白序列插入,插入的外源序列不明显影响重组 S-层蛋白的生物合成和表面定位,而且不明显影响宿主细胞的正常生长,即 S-层蛋白对外源序列具有较强的包容性,而其他表面蛋白如膜蛋白、附属结构蛋白等在这方面则逊色的多,外源序列的插入有可能造成宿主菌的生长缺陷和细胞壁的不完整性。

3.7 乳酸菌 S-层蛋白的特点

乳酸菌的许多种属都发现了含有S-层蛋白,分子量大小在43-71 kD之间,并且克隆和表达了短乳杆菌ATCC 8287 (*L. brevis* ATCC 8287),嗜酸乳杆菌(*L. acidophilus*)、瑞士乳杆菌(*L. helveticus*)、卷曲乳杆菌(*L. crispatus*)、鸡乳杆菌(*L. gallinarum*)等S-层蛋白基因。氨基酸序

列分析表明此蛋白含有两个保守区, 即一个是N-末端信号序列, 大约由30个氨基酸组成, 蛋白的分泌由总的分泌途径所控制, 另一个为C-末端区域, 大约由123个氨基酸组成, 能使蛋白锚定在细胞表面^[31,32],

在嗜酸乳杆菌、卷曲乳杆菌和瑞士乳杆菌(*Lactobacillus helveticus*)等当中, S-层蛋白的C-末端较为保守, N-末端的保守序列比较短, 而短乳杆菌等当中保守性主要存在于N-末端。例如, 短乳杆菌ATCC 8287中, 表层蛋白*SlpA*(Surface layer protein A)分子氮端的81个氨基酸残基构成的结构域是该蛋白质在体外介导细菌粘附到人类细胞系中的结构基础, 而嗜酸乳杆菌群的S-层蛋白的C-末端存在高度保守的序列, 介导S-层蛋白亚单位与细胞壁结合, 与其他乳酸菌株S-层蛋白的锚定序列相比同源性80%~90%。在两个保守区之间是可变区, 此可变区介导S-层蛋白与活体外组织结合, 参与S-层蛋白折叠和结晶, 如从鸡肠道里分离出的卷曲乳杆菌(*L. crispatus* JCM5810)S-层蛋白*CbsA*(collagen-binding S-layer protein A)亚基, 能介导乳酸菌黏附在雏鸡的消化道组织上^[33]。含有S-层蛋白的细菌其粘附性有较大的差异可能与初级结构的同源性不高有关, 例如, 卷曲乳杆菌JCM 5810 和嗜酸乳杆菌JCM 1132中都含有表层蛋白, 但是JCM 5810能够粘附固定的 I 型、IV型和V型胶原、层粘连蛋白、纤粘连蛋白、Matrigel以及再生基底膜等, 而JCM 1132则不能表现出对上述细胞外基质的粘附性^[34]。

3.8 乳酸菌 S-层蛋白基因

乳酸菌S-层蛋白基因的克隆和特征描述对阐明该蛋白的生物学组装、通过细胞膜的转移等机制有着重要的意义, 所以表层蛋白基因的研究比较广泛。研究证明, 很多乳杆菌种类中存在着多个表面蛋白编码基因(*slp*)。如1996年Boot等人发现嗜酸乳杆菌、卷曲乳杆菌、嗜淀粉乳杆菌(*Lactobacillus amylophilus*)和鸡乳杆菌(*Lactobacillus gallinarum*)中存在两个保守性很高的*slp* 基因, 而且两个基因中只有一个具有活性, 另外一个处于沉默(silent)状态, 所以这几种菌株只表达一种S-层蛋白^[35]; Mii等人在2002年发现短乳杆菌ATCC 14869 中含有三个*slp* 基因*slpB*、*slpC* 和*slpD*, 在有氧和厌氧的不同条件下表达不同的S-层蛋白, 所以菌落形态也不同。有氧条件下, *SlpB*和*SlpD*两种蛋白质同时生成, 菌落呈现粗糙型(R-colony)和光滑型(S-colony)两种形态, 在厌氧条件下只有*SlpD*蛋白生成, 菌落也只呈现光滑型形态。*slpC* 基因从*slpB*基因中分离得到, 序列分析表明*slpC*基因具有完整的启动子和终止子, 具有编码*SlpC*的能力, 而且在有氧和厌氧的条件下都能从细菌基因组中检测到*slpC*基因的存在, 但是却没有相关蛋白质的表达, 推测, 可能是*slpB* 基因的产物限制了*slpC* 基因的表达。由此可以推测, 乳杆菌中之所以存在多个S-层蛋白基因, 可能是适应不同生活环境的需要, 同时也说明S-蛋白对细菌的重要性, 以至于存在多个基因从而确保S-层蛋白的有效表达。在含有多个S-层蛋白基因的乳酸菌菌株中, DNA重排或重组是造成S-蛋白表达发生变化的主要原因。例如, Boot等于1996年发现, 嗜酸乳杆菌中存在着两个S-层蛋白基因*slpA* 和*slpB*, 在某些菌株中, 它们同时位于一个6kb的染色体片段上, 但存在的方向相反, 这种反方向的排列在一定的条件下会导致两个基因的交流, 使原来的沉默基因(silent gene)交换到原来表达基因

(expressed gene)的启动子的后面,从而开始表达新的蛋白质^[36]。其它种类细菌的S-层蛋白基因中也有重排现象发生,例如Dworkin等1996年发现胎儿弯曲菌(*Campylobacter fetus*)菌株中含有单分子组成的S-层蛋白,但是其抗原性是变化的,产生这种变化的原因是菌株染色体上存在着8个S-层蛋白基因的编码框,它们分别启动后生成不同分子量的S-层蛋白,分子量范围在97-149kD之间,同时实验结果还证明这8个基因使用了相同的启动子,所以造成S-层蛋白变化的原因极可能是发生了基因的重组^[37]。Scholz等2001年通过实验发现,嗜热脂肪芽孢杆菌PV72 中S-层蛋白表达的变化是由染色体和大质粒上的DNA发生重排造成的^[38]。

发明内容

本发明的目的是:

提供一种嗜酸乳杆菌 S-层蛋白表面展示系统的构建,本发明在前期构建的 *ThyA*/红霉素双标记大肠杆菌-乳酸菌穿梭表达载体 pW425et 基础上,以乳酸菌表面存在的具有较强表达和分泌信号功能的 S-层蛋白基因为研究对象,克隆编码该蛋白的 *SlpA* 基因包括其中信号肽、锚定和终止序列,构建能高水平的表达和分泌插入的异源蛋白的乳酸菌 S-层蛋白表面展示系统 pW425et-S。利用该表面展示系统在细胞表面表达多种畜禽致病菌保护性抗原决定簇基因,并制成口服制剂,对人和动物的健康及畜牧业的发展具有重要意义。

本发明的技术方案是:

(一) 嗜酸乳杆菌 S-层蛋白 *SlpA* 基因的获得

1、 *SlpA* 基因的 PCR 扩增

将复苏的嗜酸乳杆菌菌种采用染色体提取试剂盒,按说明书操作提取染色体 DNA。根据已发表 S-层基因的序列,设计了一对引物,在引物的 5' 端和 3' 分别加有酶 *Sac* I 和 *Kpn* I 酶切位点。用 *Ex Taq* DNA 聚合酶以染色体 DNA 为模板进行 PCR 扩增目的基因。引物的设计:根据已发表的 S-层蛋白基因序列设计引物,并由宝生物工程大连有限公司合成。

P1: 5' GGCGAGCTCATGAAGAAAAATTT 3'

Sac I

P2: 5' GTGGGTACCTTATCTAAAGTTTG 3'

Kpn I

2、 *SlpA* 基因与 pMD18-T Vector 系统连接

将回收产物与载体初步定量,设计连接反应体系,在 0.5 mL 离心管中加入 PCR 纯化产物 4 μ L, pMD18-T Vector 1 μ L, Ligation Mix 5 μ L, 混匀, 16 $^{\circ}$ C 连接 2 h 后,转化大肠杆菌

JM109 感受态细胞。

3、克隆质粒 pMD18T-S 的鉴定

将转化后的细胞取100-200 μ l菌液涂布于准备好的LB-AMP琼脂平板(含200 μ g/ml AMP, 20% X-gal和40mmol/L IPTG) 37 $^{\circ}$ C培养过夜。蓝白斑筛选出转化子, 酶切及PCR鉴定后, 送至 TAKARA 公司测序, 序列测定后应用DNASar软件进行分析, 将阳性转化子命名为pMD18T-S。

(二) 表面展示系统 pW425et-S 的构建

1、目的基因 *SlpA* 和双标记表达载体 pW425et 的获得

将双标记表达载体 pW425et 和克隆质粒 pMD18T-S 质粒用 *SacI* 和 *KpnI* 限制性内切酶进行酶切, 以获取粘末端的 pW425et 载体及 *SlpA* 基因片段。酶切完毕后, 进行 1%琼脂糖凝胶电泳, 用维特洁回收纯化试剂盒回收纯化, 以用于下一步连接。

2、双标记表达载体 pW425et 与 *SlpA* 的连接转化

将回收纯化后具有粘末端的 *SlpA* 基因及 pW425et 载体片段, 按照一定的比例加入到 0.5 mL 离心管混匀后, 同时设空载体对照组(所加 *SlpA* 片段用双蒸水替代), 经 T4 DNA Ligase 在 16 $^{\circ}$ C 连接 2 h, 4 $^{\circ}$ C 过夜。将连接产物 10 μ L 转化到 100 μ L 感受态细胞 X13 中, 同时向另 100 μ L 感受态细胞中加入 10 μ L 灭菌双蒸水, 作为阴性对照, 加入 5 μ L 没有进行酶切的 pW425et 质粒作为阳性对照, 吸取 150 μ L 培养物涂布于 LB-EM (EM: 200 μ g/ml) 平板, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养。

3、表面展示载体系统 pW425et-S 鉴定

提取转化成功的细菌质粒, 分别用 *SacI* 和 *KpnI* 进行酶切鉴定, PCR 鉴定, 筛选出阳性重组子。

4、S-层蛋白在重组体 *E.coli* X13S8 表面锚定表达情况检测

(1) pW425et-S 表达产物的 SDS-PAGE 分析

挑取转化成功的单菌落, 分别接种于 10 mL LB-EM 培养液, 37 $^{\circ}$ C 振摇过夜, 取 5 mL 过夜培养物接种于 100 mL LB-Em 培养液, 37 $^{\circ}$ C 200 r/min 振摇培养使其 OD₆₀₀ 在 0.6~0.8 之间。添加 40mM DL-苏氨酸, 继续培养, 加入之前取菌一次, 之后每 2 h 取一次菌液, 至第 10 h, 最后统一调 OD₆₀₀ 值至 0.68, 样品处理好后, 取上清 15 μ L 按进行 12% 凝胶 SDS-PAGE 分析。

(2) 表达 S-层蛋白的 Western blotting 分析

表达产物经 SDS-PAGE 后,以 BIO-RAD 系统电转移至 PVDF 膜上,经牛血清白蛋白封闭后,依次加入乳杆菌 S-层蛋白多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG,最后在联苯胺(DAB)溶液中显色,并观察结果。

(3) 用全细胞 ELISA 检测 S-层蛋白在大肠杆菌的表面锚定情况

将大肠杆菌X13空载体和重组菌X13S8诱导8 h的细胞,再用PBS按梯度稀释到OD₆₀₀分别为0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25, 进行全细胞ELISA检测S-层蛋白在大肠杆菌的表面锚定情况。

(4) 免疫荧光检测

收集经诱导后培养8 h的重组菌大肠杆菌X13S8, PBS洗涤,用2%的甲醛固定于载玻片,以大肠杆菌X13为对照,在载玻片上滴加稀释的鼠抗S-层蛋白抗体,然后加入用异硫氰酸荧光素标记的兔抗鼠IgG血清(1:100),包埋载玻片,用荧光显微镜进行检测。

本发明的有益效果是:

1、本研究构建的表面展示载体 pW425et-S 是以红霉素/*ThyA* 为选择压力的双标记大肠杆菌-乳酸菌穿梭表达载体 pW425et 为基础,所构建的载体可以用于转化入 S-层蛋白基因缺陷的乳酸菌内来研究乳酸菌 S-层蛋白形成的机制,从而为揭示乳酸菌 S-层蛋白的形成及乳酸菌黏附特性机理的分子机制打下基础;

2、研究表面展示载体系统 pW425et-S 上的限制性酶切位点,以致病性病原微生物的保护性抗原为报告基因,利用 DNA 重组技术,将病原体的保护性抗原基因与该表面展示载体上的乳酸菌 S-层蛋白相融合,把保护性抗原展示在微生物细胞表面,不仅可以使抗原直接暴露于黏膜,便于免疫辅助成分的参与,也能够减弱抗原被蛋白酶或胃酸的降解作用,因而无需外加免疫佐剂就可诱发宿主产生免疫保护,进而开发新型安全、绿色的口服疫苗,将为人类和动物的健康及畜牧业的发展作出贡献。

附图说明

图1 *SlpA* 基因 PCR 扩增后电泳图 泳道 1-4 :*SlpA* 基因 PCR 产物 M1: DL2000 核酸分子量标准。

图2 *SlpA* 基因的克隆鉴定电泳图 (A)重组质粒 pMD18T-S 小量提取鉴定 (B)重组质粒 pMD18T-S 用 *SacI* 和 *KpnI* 酶切鉴定 泳道 1: pMD18T-S 用 *SacI* 和 *KpnI* 酶切鉴定 (C) 重组质粒 pMD18T-S PCR 鉴定: 泳道 1: 阴性对照, 泳道 2: 阳性对照, 泳道 3-5: 阳性质粒为模板的 PCR 产物: 泳道 M1: DL2000 核酸分子量标准, 泳道 M2: λ -Hind III digest 核酸分子量标准。

图3 重组质粒 pW425et-S 小提鉴定结果 泳道 1-8: 重组质粒 M1: λ -Hind III digest 核酸分子量标准。

图4 重组质粒 pW425et-S PCR 鉴定 泳道 1-3: 质粒 pW425et-S PCR 鉴定: 泳道 4: 阴性对照, 泳道 5: 阳性对照。

图5 重组质粒 pW425et-S 酶切鉴定电泳图 泳道 1-5: 质粒重组质粒 pW425et-S 用 *SacI* 和

Kpn I 酶切结果: M1: λ -Hind III digest 核酸分子量标准, M2: DL2000 核酸分子量标准。

图 6 SDS-PAGE 电泳检测 pW425et-S 表达产物 泳道 1-5: 重组菌 E.coli X13S8 分别在 2 h、4 h、6 h、8 h、10h 表达产物 泳道 6: L. acidophilus S-层蛋白提取物, C: 空载体 pW425et 在表达后 6 h 作阴性对照, M: 低分子量蛋白质标准。

图 7 Western blotting 检测表达 S-层蛋白 泳道 1: pW425et-S 在重组体 E.coli X13S8 表达 8 h 产物转印到 PVDF 膜的显色结果; C: 空载体表达产物转印到 PVDF 膜的显色结果即阴性对照; M: 低分子量蛋白标准转印后的染色结果。

图 8 S-层蛋白在重组菌 X13S8 表面锚定全细胞 ELISA 检测结果。

图 9 荧光显微镜下重组体 X13S8 和大肠杆菌 X13 菌体形态(A) 重组体 X13S8, (B) 大肠杆菌 X13。

图 10 阳性克隆通用引物进行测序的测序报告。

具体实施方式

实施例 1

(一) 嗜酸乳杆菌 S-层 SlpA 基因的获得

1 材料与试剂

(1) 菌株

嗜酸乳杆菌菌株 (*Lactobacillus acidophilus* 1.1878), 大肠杆菌(*E.coli* JM109)。

(2) 酶及主要生化试剂

pMD18-T Vector System, 限制性内切酶 *Sac* I、*Kpn* I, dNTP, *Ex Taq* DNA polymerase, RnaseA, λ -Hind III digest Marker, DL2000 Marker, 溶菌酶, DNA 凝胶回收与纯化试剂盒, IPTG, 琼脂糖。

2 SlpA 基因的 PCR 扩增

将复苏的嗜酸乳杆菌菌种 37°C 恒温厌氧培养过夜后挑取单个菌落接种于新鲜 MRS 液体培养基中进行培养, 待菌体 OD₆₀₀ 值为 0.6~0.8 时, 收集菌体, 采用染色体提取试剂盒, 按说明书操作提取染色体 DNA。根据已发表 S-层基因的序列, 设计了一对引物, 在引物的 5' 端和 3' 分别加有酶 *Sac* I 和 *Kpn* I 酶切位点, 并由宝生物工程大连有限公司合成。

(1) 引物的设计:

P1: 5' GGCGAGCTCATGAAGAAAATT 3'

Sac I

P2: 5' GTGGGTACCTTATCTAAAGTTG 3'

Kpn I

(2) 反应体系: 0.5 mL 灭菌 PCR 管内按下式加入各成分:

<i>Ex Taq</i> DNA polymerase buffer	5.0 μ L
dNTPs(10 m mol/L each)	2.5 μ L
Primer 1 (100 pm)	0.5 μ L
Primer 2 (100 pm)	0.5 μ L
嗜酸乳杆菌 DNA 模版	0.5 μ L
<i>Ex Taq</i> DNA 聚合酶(5 U)	0.5 μ L
<u>D.D.W.</u>	<u>40.5 μL</u>
总体积	50.0 μ L

混匀、瞬时离心后，再加 50 μ L 灭菌液体石蜡覆盖，PCR 仪上进行 94 $^{\circ}$ C 预变性 8 min，再进行下列反应，94 $^{\circ}$ C 变性 1 min，55 $^{\circ}$ C 退火 1 min，72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min，30 个循环，最后一个循环 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。反应结束后，取 3 μ L 用 1.0 % 琼脂糖凝胶电泳检测，结果见图 1。

3 *SlpA* 基因 PCR 产物回收

含有目的基因片断的 PCR 产物在 TAE 电泳液中进行 0.8 % 琼脂糖凝胶电泳，紫外灯下观察，切取目的条带，称重，采用 DNA 回收试剂盒回收纯化目的基因片断(按说明书操作)。

4 质粒 pMD18T-S 构建

将回收产物与载体初步定量，设计连接反应体系，在 0.5 mL 离心管中加入 PCR 纯化产物 4 μ L，pMD18-T Vector 1 μ L，Ligation Mix 5 μ L，混匀，16 $^{\circ}$ C 连接 2 h 后，4 $^{\circ}$ C 连接过夜，将 10 μ L 连接液加入 200 μ L 大肠杆菌 JM109 感受态细胞中，在 37 $^{\circ}$ C 摇床上培养 90 min(220 r/min)，取 200 L 用曲玻棒将其均匀涂布在氨苄青霉素平板上，置于 37 $^{\circ}$ C 温箱中过夜培养，蓝白斑筛选阳性重组体，将阳性菌落分别接种于 5 mL LB 液体培养基中，37 $^{\circ}$ C 200 r/min 过夜培养，各管中分别取出 1.5 mL 培养物置于 2.0 mL Eppendorf 管中，少量提取质粒，将提取的质粒取 3 μ L 进行 1.0 % 琼脂糖电泳结果见图 2A，选取其中滞后的质粒进行酶切和 PC 鉴定，反应体系及反应条件如下：

(1) 酶切鉴定反应体系：

质粒应用 *Sac* I 和 *Kpn* I 进行酶切，反应体系如下：

<i>Sac</i> I	1.0 μ L
<i>Kpn</i> I	1.0 μ L
10 \times L Buffer	1.0 μ L
质粒	4.0 μ L
D.D.W	3.0 μ l
<hr/>	
Total V	10.0 μ l

37 $^{\circ}$ C 水浴 2 h

反应结束后取 3.0 μ l 反应产物于 1.0 %琼脂糖凝胶上进行电泳，结果见图 2B。

(2) PCR 鉴定

以重组质粒为模板，用 *Ex Taq* DNA polymerase 进行 PCR 扩增，反应体系如下：

10 \times <i>Ex Taq</i> DNA polymerase Buffer	5.0 μ L
dNTP(2.5 m mol/L)	4.0 μ L
上游引物 Primer (50 p mol/L)	1.0 μ L
下游引物 Primer (50 p mol/L)	1.0 μ L
<i>Ex Taq</i> polymerase	0.5 μ L
质粒模板	0.5 μ L
D.D.W	38.0 μ L
液体石蜡	50.0 μ L
<hr/>	
Total V	100.0 μ L

PCR 反应条件为：

预变性：94 $^{\circ}$ C，8 min
 变性：94 $^{\circ}$ C，1 min
 退火：55 $^{\circ}$ C，1 min
 延伸：72 $^{\circ}$ C，1 min
 循环数：30 个
 延伸：72 $^{\circ}$ C，5 min
 保温：4 $^{\circ}$ C，10 min

反应结束后取 3.0 μ L PCR 产物于 1.0 %琼脂糖凝胶上进行电泳，结果见图 2C。

5 测序鉴定与序列分析

将鉴定出的阳性克隆送往大连宝生物公司用通用引物进行测序，测序报告如图 10 及

碱基序列:

TGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGATTGGCGAGCTCATG
 AAGAAAATTTAAGAATCGTTAGCGCTGCTGCTGCTGCTTTACTTGCTGTTGCTCCAGT
 TGCTGCTTCTGCTGTATCTACTGTTAGCGCTGCTACTACTATTAACGCAAGTTCATCAGC
 AATCAATACCAACACTAATGCTAAGTACGATGTTGATGTAACCTAGTGTTCCTGCAGT
 TGCTGCAAATACTGCTAACAACTCCAGCTATTGCCGGTAACCTTACTGGTACTATTTT
 AGCAAGTTACAATGGTAAGACTTATACTGCTAACTTAAAGGCAGATACTGAAAATGCC
 ACTATTACTGCTGCTGGTAGCACTACTGCCGTTAAACCTGCTGAATTAGCTGCAGGTGT
 GGCTTACACTGTAACGTGTTAACGATGTTTCATTTAACTTCGGTTCAGAAAATGCAGGTA
 AGACTGTTACCCTTGGTTCAGCTAACTCAAATGTAAAATTCACCGGTACAAACAGTGAT
 AATCAAACCTGAAACTAATGTTTCTACTTTGAAAGTTAAGTTAGACCCAAAACGGTGTTG
 CTTCACTTACTAATGTTTCAATTGCAAACGTATACGCAATTAACACTACTGATAACAGTA
 ACGTAAACTTCTACGACGTAAGTGGTGCTACTGTAACCTAACGGTGCCGTTTCAGTT
 AATGCTGATAACCAAGGTCAAGTTAATGTTGCAAACGTAGTTGCAGCAATTAATTCAA
 AACTTTGCAGCACATAACGCAAGTAAAGTAAATACTCGTACTGCTAATACTGAAG
 ATGCTATTAGGGCAGCCTTAAAGGACCCAAAAGATTGATGTAGACTCAGTAGGTTACTTC
 AAAGCACCTCATACTTTCCTGTTAACGTTAAAGCAACTTCAAATACTAATGGTAAGTC
 AGCTACTTTGCCAGTAGTTGTTACTGTTCCCTAATGTTGCTGAGCCAACCTGTAGCCAGCG
 TAAGCAAGAGAATTATGCACAACGCATACTACTACGACAAGGACGCTAAGCGTGTTGG
 TACTGACAGCGTTAAGCGTTACAACCTCAGTAAGCGTATTGCCAAACACTACTACTATCA
 ACGGTAAGACTTACTACCAAGTAGTTGAAAACGGTAAGGCTGTTGACAAGTACATCAA
 CGCTGTAAACATCGATGGTACTAAGCGTACTTTGAAGCACAACGCTTACGCTTACGCAT
 CATCAAAGAAGCGTGCTAACAAAGGTTGTATTGAAGAAGGGTGAAGTTGTAACCTACTTA
 CGGTGCTTCATACACATTCAAGAACGGCCAAAAGTACTACAAGATCGGTGACAACACT
 GACAAGACTTACGTTAAGGTTGCAAACCTTTAGATAAGGTACCCACAATCGTCGACCTG
 CAGGCATGCAAGCTGGCACTGC

(二) 表面展示系统 pW425et-S 的构建**1 材料****(1) 质粒及菌株**

质粒: *ThyA*/红霉素为选择压力的表达载体 pW425et, pMD18T-S;

菌株: 大肠杆菌 *E. coli* X13。

(2) 试剂

Ex Taq DNA polymerase, dNTPs, *Sac* I, *Kpn* I, T4 DNA ligase, 琼脂糖, 异硫氰酸荧光素标记的兔抗鼠IgG, PVDF转移膜, 质粒DNA提取试剂盒、DNA凝胶回收试剂盒。

(3) 培养基

普通 LB 培养基; 含有红霉素的 LB 培养基。

2 目的基因 *SlpA* 与 pW425et 的酶切、回收与纯化

将大量提取的双标记表达载体 pW425et 和 pMD18T-S 质粒用 *Sac*I 和 *Kpn*I 限制性内切酶进行酶切, 以获取粘末端的 pW425et 载体及 *SlpA* 基因片段, 反应体系如下:

<i>Sac</i> I	4.0 μ l
<i>Kpn</i> I	4.0 μ l
10 \times L Buffer	4.0 μ l
pW425et/pMD18T-S	15.0 μ l
D.D.W	13.0 μ l
<hr/>	
Total V	40.0 μ l

37 $^{\circ}$ C, 水浴作用 3h

酶切完毕后, 用维特洁回收纯化试剂盒回收纯化 *SlpA* 和 pW425et 的片断。

3 双标记表达载体 pW425et 与 *SlpA* 的连接转化

回收纯化 *SlpA* 基因及 pW425et 载体片段按照一定的比例加入到 0.5 mL 离心管混匀后, 同时设空载体对照组(所加 *SlpA* 片段用双蒸水替代), 经 T4 DNA Ligase 在 16 $^{\circ}$ C 连接 2 h, 4 $^{\circ}$ C 过夜。

连接反应体系如下:

pW425et	1.5 μ l
<i>SlpA</i>	6.0 μ l
10 \times T ₄ DNA Ligase Buffer	1.0 μ l
T ₄ DNA Ligase	1.0 μ l
D.D.W	0.5 μ l
<hr/>	
Total V	10.0 μ l

将连接产物 10 μ L 转化到 200 μ L 感受态细胞 *E. coli* X13 中, 同时向另 200 μ L 感受态细胞中加入 10 μ L 灭菌双蒸水, 作为阴性对照, 加入 5 μ L 没有进行酶切的 pW425et 质粒作为阳性对照, 冰浴 20 min, 42 $^{\circ}$ C 热休克 90 s, 加入 500 μ L 培养液, 37 $^{\circ}$ C, 220 r/min 振摇 90 min, 吸取 150 μ L 培养物涂布于 LB-EM (EM: 200 μ g/ml) 平板, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养。

4 重组表面展示载体 pW425et-S 的鉴定

将阳性菌落分别接种于 5 mL LB 液体培养基中, 37 °C 200 r/min 过夜培养, 各管中分别取出 1.5 mL 培养物置于 2.0 mL Eppendorf 管中, 小量提取质粒, 将提取的质粒取 3 μ L 进行 1.0 %琼脂糖电泳结果见图 3, 选取其中滞后的质粒进行酶切和 PCR 鉴定, 反应体系及反应条件如下:

(1) 酶切鉴定

选择可能含有目的片段的质粒分别用 *SacI* 和 *KpnI* 进行酶切鉴定, 反应体系如下:

<i>SacI</i>	1.0 μ L
<i>KpnI</i>	1.0 μ L
10 \times L Buffer	1.0 μ L
质粒	5.0 μ L
D.D.W	2.0 μ l
<hr/>	
Total V	10.0 μ l

37 °C 水浴 2 h

反应结束后取 5 μ l 酶切产物于 1%琼脂糖凝胶上进行电泳, 结果如图 4。

(2) PCR 鉴定

以重组质粒为模板, 用 *Taq* DNA polymerase 进行 PCR 扩增, 反应体系如下:

10 \times <i>Taq</i> polymerase Buffer	5.0 μ L
dNTPs(2.5 m mol/L)	4.0 μ L
上游引物(50 p mol/L)	0.5 μ L
下游引物(50 p mol/L)	0.5 μ L
MgCl ₂	4.0 μ L
<i>Taq</i> DNA polymerase	1.0 μ L
重组质粒模板	1.0 μ L
D.D.W	34.0 μ L
液体石蜡	50.0 μ L
<hr/>	
Total V	100.0 μ L

PCR 反应条件: 94 °C 8 min 预变性; 94 °C 1 min 变性, 55 °C 1min 退火, 72 °C 1 min 延

伸，共 30 个循环；72℃ 5 min 延伸。反应结束后取 5 μ l PCR 产物于 1%琼脂糖凝胶上进行电泳，结果如图 5。

5 S-层蛋白在重组体 E.coli X13S8 表面锚定表达情况检测

(1) pW425et-S 表达产物的 SDS-PAGE 分析

挑取转化成功的单菌落，分别接种于 10 mL LB-EM 培养液，37℃ 振摇过夜，取 5 mL 过夜培养物接种于 100 mL LB-EM 培养液，37℃ 200 r/min 振摇培养使其 OD₆₀₀ 在 0.6~0.8 之间。添加 40mM DL-苏氨酸，继续培养。加入之前取菌一次，之后每 2 h 取一次菌液，最后统一调 OD₆₀₀ 值至 0.68，空载体菌以同样方式诱导作为对照，取菌液 1.8 mL，4℃ 8000 r/min 离心 10 min，收集菌体。向菌体沉淀中加入去离子水 50 μ L，2 \times SDS 凝胶上样缓冲液 50 μ L 裂解细菌，于沸水中煮 10 min，12000r /min 离心 10 min，取上清 15 μ L 按进行 12% 凝胶 SDS-PAGE 分析，结果见图 6。

(2) 表达 S-层蛋白的 Western blotting 分析

表达产物经 SDS-PAGE 后，以 BIO-RAD 系统电转移至 PVDF 膜上，经牛血清白蛋白封闭后，依次加入乳杆菌 S-层蛋白多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG，最后在联苯胺(DAB)溶液中显色，并观察结果，结果见图 7，并将鉴定为阳性的重组菌命名为 X13S8。从图中可见 43.0 kD 处有一条明显的蛋白印迹带，而以含有载体 pW425et 作为阴性对照的大肠杆菌 X13 经蛋白印迹分析后无印迹带，表明所构建的表面展示载体 pW425et-S 在重组大肠杆菌 X13S8 内表达了 S-层蛋白，并且表达的蛋白具有与特异性抗体结合的活性，同时也证明即使大肠杆菌 X13 表面存在某些表面蛋白，该蛋白也不具有与该抗体结合的特性。

(3) 用全细胞 ELISA 检测 S-层蛋白在大肠杆菌的表面锚定情况

将大肠杆菌 X13 空载体和重组菌 X13S8 诱导 8h 的细胞，8000 r/min，离心 10 min 后，收集菌体用 PBS 洗两次，再用 PBS 按梯度稀释到 OD₆₀₀ 分别为 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25，进行全细胞 ELISA 检测 S-层蛋白在大肠杆菌的表面锚定情况。ELISA 颜色反应随着 X13S8 菌体浓度的增加而增加，但是 X13 的颜色反应始终保持在较低水平，见图 8。

(4) 免疫荧光检测

收集经诱导后培养 8 h 的重组菌大肠杆菌 X13S8，用 PBS 洗涤，用 2% 的甲醛固定于载玻片，以大肠杆菌 X13 为对照，在载玻片上滴加稀释的鼠抗 S-层蛋白抗体（用 PBS 将血清抗体稀释到 1:50），在 37℃ 温室作用 1 h，PBS 洗涤两次，最后加入用异硫氰酸荧光素标记的兔抗鼠 IgG 血清（1:100），37℃ 温室作用 1 h，用 PBS 洗涤两次后，包埋载玻片，用荧光显微镜进行检测，结果见图 9。

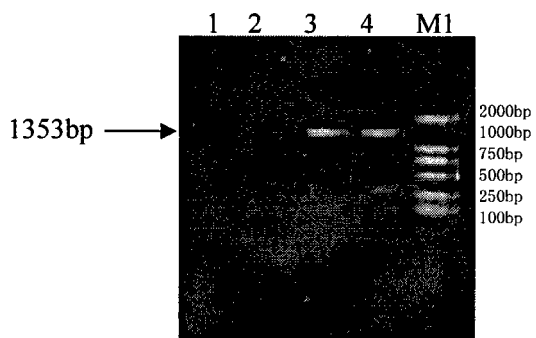


图 1

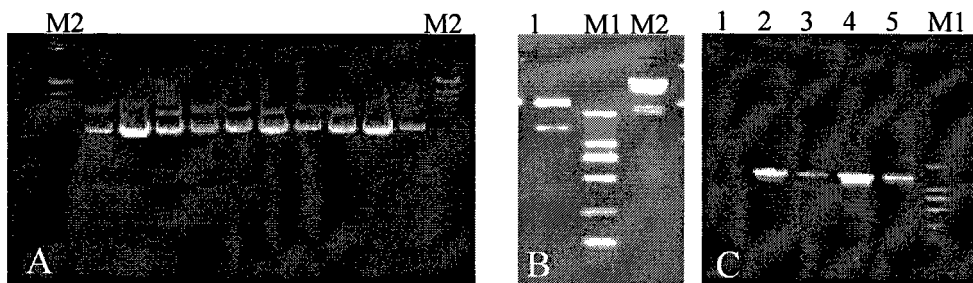


图 2

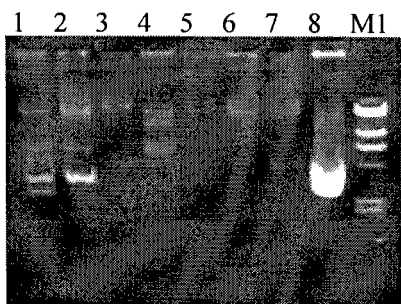


图 3

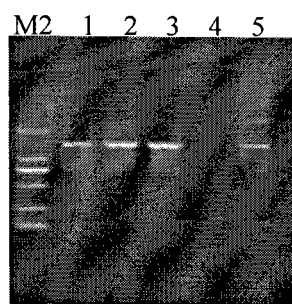


图 4



图 5

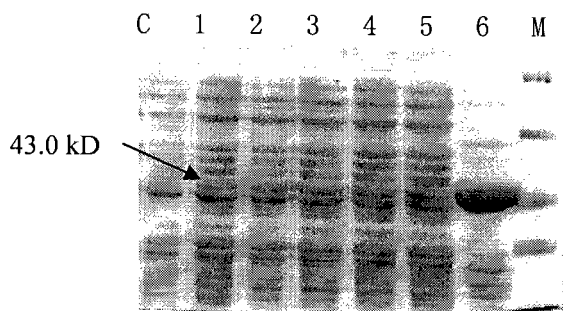


图 6

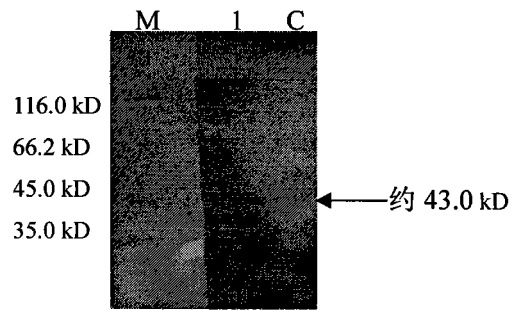


图7

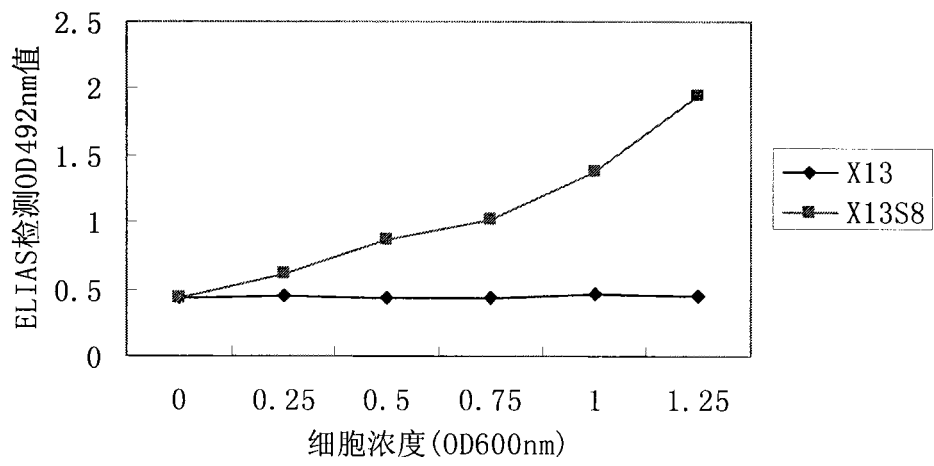


图8

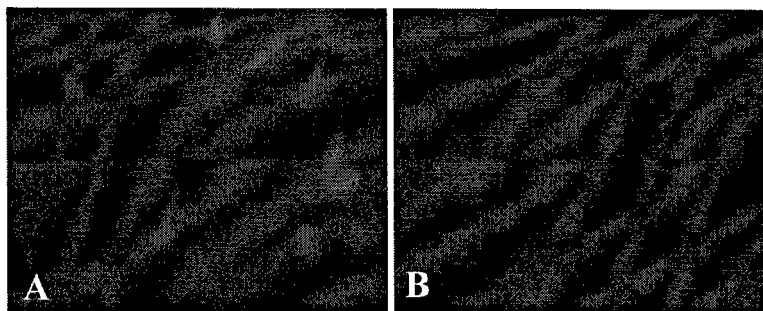


图9

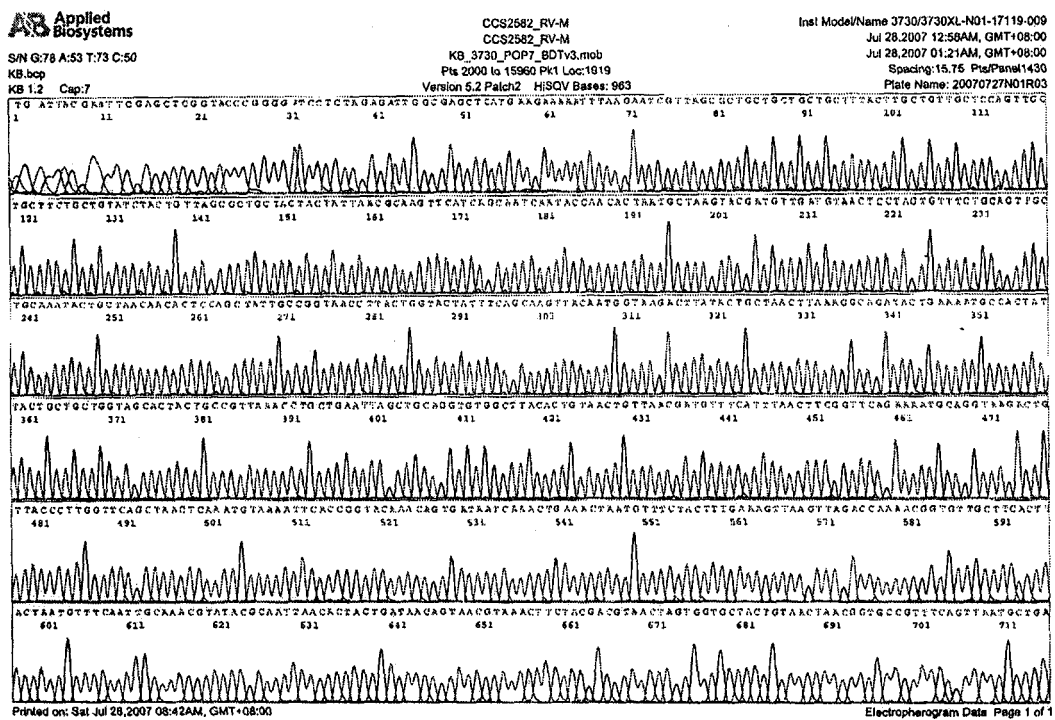


图 10

专利名称(译)	嗜酸乳杆菌S - 层蛋白表面展示系统的构建		
公开(公告)号	CN101638660A	公开(公告)日	2010-02-03
申请号	CN200810051044.1	申请日	2008-08-01
[标]申请(专利权)人(译)	长春理工大学		
申请(专利权)人(译)	长春理工大学		
当前申请(专利权)人(译)	长春理工大学		
[标]发明人	王春风 李景梅 刘琼 田坚		
发明人	王春风 李景梅 刘琼 田坚		
IPC分类号	C12N15/31 C12N15/70 G01N33/53 G01N21/64		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种嗜酸乳杆菌S - 层蛋白表面展示系统的构建,属于生物技术领域,其特征是:基因的获得,(1)PCR扩增,(2)SlpA基因与pMD18 - TVector系统连接,(3)克隆质粒pMD18T - S的鉴定。构建,(1)目的基因和双标记表达载体的获得,(2)双标记表达载体与SlpA的连接转化,(3)表面展示载体系统鉴定,(4)S - 层蛋白在重组体表面锚定表达情况检测。其有益效果是:1.所构建的载体可以用于转化入S - 层蛋白基因缺陷的乳酸菌内来研究乳酸菌S - 层蛋白形成的机制。2.利用DNA重组技术,将病原体的保护性抗原基因与该表面展示载体上的乳酸菌S - 层蛋白相融合。

