

生物法合成肠炎沙门菌糖蛋白

李梦如[#], 刘恩[#], 张文芋, 罗洪艳, 李沛

西南大学 动物医学院, 重庆 400700

李梦如, 刘恩, 张文芋, 罗洪艳, 李沛. 生物法合成肠炎沙门菌糖蛋白. 生物工程学报, 2022, 38(6): 2377-2388.

LI MR, LIU E, ZHANG WY, LUO HY, LI P. Biosynthesis of *Salmonella enteritidis* O antigen-based glycoproteins. Chin J Biotech, 2022, 38(6): 2377-2388.

摘要: 肠炎沙门菌 (*Salmonella enteritidis*) 是一种重要的人兽共患病原菌, 在对该菌感染的预防与控制上一直存在困难, 而糖蛋白疫苗的出现为其预防提供了新的思路。对于糖蛋白的合成, 一般采用传统的化学交联方法, 该法制备流程烦琐、生产成本低。因此, 探索经济且稳定的生物合成方法非常必要。为了实现生物法合成肠炎沙门菌糖蛋白, 本研究利用 CRISPR/Cas9 方法构建肠炎沙门菌 *waaL* 基因缺失株 SE $\Delta waaL$, 使用银染的方法检测细菌外膜脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 的合成情况。使用环形 PCR 方法构建了表达寡糖转移酶 PglI、重组铜绿假单胞菌的外毒素 (recombinant *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A, rEPA) 和霍乱毒素 B 亚单位 (cholera toxin B subunit, CTB) 的表达质粒, 并分别在 rEPA 的 N 端和 CTB 的 C 端加入了 Pile^{S45-K73} 糖基化位点序列。将重组质粒转化到 SE $\Delta waaL$ 中, 诱导表达后通过 Western blotting 方法对糖蛋白的合成进行验证, 并通过镍柱 (Ni-NTA) 对糖蛋白进行纯化。结果表明, *waaL* 基因的缺失阻断了肠炎沙门菌 LPS 正常合成, 在该缺失株中 rEPA 和 CTB 蛋白均可成功表达。此外, 在表达寡糖转移酶 PglI 的情况下, rEPA 和 CTB 发生了明显的糖基化, 其糖基化部分为肠炎沙门菌 O 抗原多糖。本研究结果证明肠炎沙门菌缺失 *waaL* 基因后, 在寡糖转移酶 PglI 的作用下可以将自身 O 抗原多糖链共价连接到载体蛋白 rEPA 和 CTB 上, 形成糖蛋白, 为生物法合成肠炎沙门菌糖蛋白的研究奠定了基础。

关键词: 生物法; 糖蛋白; 肠炎沙门菌; CRISPR/Cas9 方法; PglI

Received: November 17, 2021; **Accepted:** March 2, 2022; **Published online:** March 8, 2022

Supported by: Natural Science Foundation of Chongqing, China (cstc2019jcyj-msxmX0532); National Natural Science Foundation of China (31902340)

[#]These authors contributed equally to this study

Corresponding author: LI Pei. Tel: +86-23-68251196; E-mail: lipei98989@swu.edu.cn

基金项目: 重庆市自然科学基金 (cstc2019jcyj-msxmX0532); 国家自然科学基金 (31902340)

Biosynthesis of *Salmonella enteritidis* O antigen-based glycoproteins

LI Mengru[#], LIU En[#], ZHANG Wenyu, LUO Hongyan, LI Pei

College of Veterinary Medicine, Southwest University, Chongqing 400700, China

Abstract: *Salmonella enteritidis* (SE) has been recognized as an important zoonotic pathogen, and the prevention and control of salmonellosis has long been a conundrum. However, glycoconjugate vaccines seem to be a promising solution. Glycoproteins are conventionally synthesized by chemical cross-linking which features complex procedure and cost-intensiveness. Therefore, a stable biosynthesis method at lower cost is in urgent need. For the biosynthesis of SE O-antigen-based glycoproteins, we used CRISPR/Cas9 to develop the *waaL*-deleted SE strain $\Delta waaL$. The synthesis of lipopolysaccharide (LPS) was detected based on silver staining. Circular polymerase extension cloning (CPEC) was employed to construct the plasmids expressing glycosyltransferase PglL, recombinant *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A (rEPA), and cholera toxin B subunit (CTB). Meanwhile, Pile^{S45-K73} glycosylation motif was added to the N-terminal and C-terminal of rEPA and CTB, respectively. The recombinant plasmids were transformed into SE $\Delta waaL$. After induction, the synthesis of glycoprotein was verified by Western blotting and the synthesized glycoprotein was purified by Ni-NTA column. The results showed that *waaL* deletion blocked the LPS synthesis of SE, and that rEPA and CTB proteins were expressed in SE $\Delta waaL$. In addition, obvious glycosylation occurred to rEPA and CTB when PglL was expressed, and the glycosylated part was SE O antigen polysaccharide. In summary, after *waaL* deletion in SE, PglL can transfer its own O antigen polysaccharides (OPS) to the carrier proteins rEPA and CTB, resulting in OPS-rEPA and OPS-CTB glycoproteins. The result lays a basis for the biosynthesis of SE glycoprotein.

Keywords: biosynthesis; glycoprotein; *Salmonella enteritidis*; CRISPR/Cas9; PglL

沙门菌是革兰氏阴性杆菌，兼性厌氧菌，能感染多种动物，是大部分脊椎动物肠道疾病的重要诱因^[1]。目前，已鉴定出超过 2 500 种不同血清型的沙门菌^[2]。沙门菌病是一种食源性人兽共患传染病，主要症状为胃肠炎^[3]，同时可能伴有恶心、呕吐和带血腹泻等。据统计，每年由沙门菌引起的人急性胃肠炎病例可达 9 300 万例，肠炎沙门菌 (*Salmonella enteritidis*) 在其中占比最大^[4]，已成为重要的公共卫生问题。肠炎沙门菌还可以引起多种动物发病死亡，

进而造成严重经济损失^[4-5]。预防肠炎沙门菌感染最有效的策略为疫苗免疫，该策略既可以保护人和动物健康，又可以降低抗生素的使用，从而减少多耐药、泛耐药菌株的产生。最可靠的疫苗是能够以最小的副作用唤起持久的免疫保护，而现有的灭活疫苗副作用大且免疫保护周期较短，减毒活疫苗又存在着毒力反强的潜在危险^[6]，因此，针对以上问题，新的疫苗预防策略仍待研发。

细菌外膜上的 O 抗原多糖是肠炎沙门菌的

主要致病因子之一,在细菌信号识别、粘附、免疫逃避等过程中发挥着重要作用,是机体良好的保护性抗原^[7]。然而,O抗原多糖是T细胞非依赖性抗原,只能激活B细胞产生亲和力低的IgM抗体。据已有文献报道,细菌的多糖抗原(O-多糖(O antigen polysaccharides, OPS)或荚膜多糖(capsular polysaccharide, CPS))能与适当的载体蛋白发生共价连接,形成糖蛋白^[8]。糖蛋白是T细胞依赖型抗原,能激活Th细胞并诱导B细胞产生特异性IgG、IgA等抗体,同时产生记忆性T细胞和B细胞^[8]。因此糖蛋白在预防沙门菌感染上具有潜在的应用开发价值。传统的糖蛋白结合疫苗制备方法主要是化学交联法^[9],可分为3个环节,其中多糖部分一般从致病病原菌中分离纯化而来,载体蛋白部分可从大肠工程菌中分离纯化得到,最后,在化学试剂的作用下将多糖链与载体蛋白混合发生交联,得到非均一性的糖蛋白^[10]。但是该方法存在制备流程烦琐、生产成本高以及反应过程不可控等缺点,导致很难做到大规模应用,而生物法合成糖蛋白可以弥补这方面的缺陷,正成为该领域的研究热点。

生物法合成糖蛋白需要将含有糖基化位点的载体蛋白、多糖和寡糖转移酶共表达于同一菌株中,在寡糖转移酶的作用下,细菌将多糖链转移到载体蛋白,并共价连接获得糖蛋白。本研究采用CRISPR/Cas9方法^[11-12]构建肠炎沙门菌(*Salmonella enteritidis*) *waaL*基因缺失株SE $\Delta waaL$ 。通过生物法将能表达O-糖基化系统的寡糖转移酶(PglI)^[13]和重组铜绿假单胞菌的外毒素A(rEPA)^[14]或霍乱毒素B亚单位(CTB)的质粒转入SE $\Delta waaL$ 中,使其自身O抗原多糖与rEPA或CTB载体蛋白进行共价结合产生糖蛋白。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒及主要试剂

肠炎沙门菌(*Salmonella enteritidis*)野生菌 wild type (SE wt)、大肠杆菌(*Escherichia coli*) 10-Beta、质粒 pACT3、pMAL4、p15a-T、pKDsgRNA-15a-Kan(温敏型质粒)和 pCas9-CR4-Cm,均为本实验室前期保存;胰蛋白胨、酵母提取物、氯化钠和琼脂粉购自英国OXOID公司;重组铜绿假单胞菌的外毒素A(rEPA)、霍乱毒素B亚单位(CTB)和O-糖基化系统的寡糖转移酶PglI的基因,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;2×Taq PCR Mastermix酶、DNA Molecule marker、DNA纯化试剂盒、胶回收试剂盒、质粒小提取试剂盒等购自天根生化科技(北京)有限公司,PrimerStar高保真酶购自大连宝生物公司。各类抗生素和阿拉伯糖购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.1.2 主要仪器

恒温培养摇床(181101003)购自上海智城分析仪器制造有限公司;台式高速离心机(JXN19E39)购自贝克曼库尔特商贸中国有限公司;恒温培养箱(180196)购自上海齐欣科学仪器有限公司;电穿孔仪(411BR11979)、电击杯和电泳仪(190716A)购自伯乐生命医学产品上海有限公司;立式自动压力蒸汽灭菌锅(BE1420524)购自ZEALWAY仪器有限公司。

1.1.3 PCR引物

本研究所用的PCR引物见表1。

1.2 方法

1.2.1 构建 pKDsgRNA-kan-*waaL*^{SE} 质粒

通过网站 <http://crispor.tefor.net/crispor.py> 设计 *waaL*^{SE} 基因的短重复序列 Spacer,然后将

表 1 本研究所用的 PCR 引物

Table 1 PCR primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'→3')
gRNA- SE-D <i>waaL</i> -F	ACGGAACCCAGGGCACC GCGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG
gRNA- SE-D <i>waaL</i> -R	C GCGGTGCCCTGGGTTCCGTGTGCTCAGTATCTCTACTACTGA
pair with F	TTTATAACCTCCTTAGAGCTCGA
pair with R	CCAATTGTCCATATTGCATCA
pKD_Seq5	CAGTGAATGGGGGTAAATGG
D <i>waaL</i> -SE-1F	TTGTTCGTATCGGTTGATAACCGG
D <i>waaL</i> -SE-1R	CAGCGCGTTTTTTCTTTTCTCCACAATAGGTTTGGG
D <i>waaL</i> -SE-2F	TTGTGGAGAAAAGAAAAACGCGCTGATACTTATTACG
D <i>waaL</i> -SE-2R	CTATCACCTCGCAGAACCTATG
P _{trc} -F	CCATTCTGAAATGAGCTGTTGAC
5ST1T2-R	CGTTTCACTTCTGAGTTCGGCATG
SE- <i>waaL</i> -F	CACAGGAAACAGACCATGCTAACCACATCATTAACG
SE- <i>waaL</i> -R	CACAGGAAACAGACCATGCTAACCACATCATTAACG
Vec- <i>waaL</i> -F	AGAAATAGATAAGGCTGTTTTGGCGGATGAGAGAAG
Vec- <i>waaL</i> -R	TGATGTGGTTAGCATGGTCTGTTTCCTGTGTGAAATTG

20 bp 的 Spacer 序列加入引物 gRNA-SE-D*waaL*-F 的 5'端。以质粒 pKDsgRNA-15a-Kan 为模板, gRNA-SE-D*waaL*-F/pair with F 和 gRNA-SE-D*waaL*-R/pair with R 为引物, 使用 PrimerStar 高保真酶 PCR 扩增片段 1 和片段 2。PCR 产物回收纯化后, 用环形 PCR (circular polymerase extension cloning, 简称 CPEC)^[15]方法进行连接, 并将连接产物电转化至 *E. coli* 10-Beta 感受态细胞中。提取阳性单克隆质粒, 测序鉴定。将构建好的质粒命名为 pKDsgRNA-kan-*waaL*^{SE}。

1.2.2 制备 *waaL*^{SE} 基因同源修复片段

以肠炎沙门菌基因组为模板, D*waaL*-SE-1F/D*waaL*-SE-1R 和 D*waaL*-SE-2F/D*waaL*-SE-2R 为引物, 使用 PrimerStar 高保真酶 PCR 扩增 *waaL* 基因的上同源臂和下游同源臂。PCR 产物经纯化回收后, 以 D*waaL*-SE-1F 和 D*waaL*-SE-2R 为引物, 用重叠延伸 PCR (gene splicing by overlap extension PCR, 简称 SOE-PCR) 法扩增获得同源修复片段。

1.2.3 构建肠炎沙门菌 *waaL* 基因缺失株

将质粒 pCas9-CR4-Cm 和 pKDsgRNA-kan-*waaL*^{SE} 电转化 SE wt 感受态细胞, 然后涂布含有氯霉素 (50 μg/mL) 和卡那霉素 (50 μg/mL) 的 LB 平板, 30 °C 培养。将鉴定正确的阳性克隆 30 °C 振荡培养至 OD₆₀₀=0.6, 然后加入终浓度 0.2% 的阿拉伯糖, 继续培养 30 min, 制成感受态细胞。然后将 *waaL* 基因同源修复片段电转该感受态细胞, 加入胰蛋白胍液体培养基, 30 °C 恢复培养 1 h, 梯度稀释后涂布含有氯霉素、卡那霉素和盐酸多西环素 (1 μg/mL) 的 LB 平板, 30 °C 培养。PCR 鉴定单克隆菌体。

将鉴定正确的 SE Δ*waaL* (pKDsgRNA-kan-*waaL*^{SE}, pCas9-CR4-Cm) 单克隆菌株接种至 LB 液体培养基中, 37 °C 培养过夜以消除 pKDsgRNA-kan-*waaL*^{SE} 温敏质粒。确认温敏质粒丢失后, 再次制备感受态细胞。由于 pCas9-CR4-Cm 质粒是 p15a 的复制子, 而 pKDsgRNA-15a-Kan 质粒上的 Spacer 是针对 p15a 的复制子, 因此将

pKDsgRNA-15a-Kan 质粒重新转入 SE $\Delta waaL$ (pCas9-CR4-Cm) 中, 置于 30 °C 含盐酸多西环素诱导剂的 LB 液体培养基中培养, 稀释后涂布只含卡那霉素和盐酸多西环素的 LB 琼脂平板, 30 °C 过夜培养。挑取单克隆菌株, 在氯霉素平板上划线培养, 若对氯霉素敏感, 则已消除 pCas9-CR4 质粒。随后 37 °C 培养过夜即可消除转入的 pKDsgRNA-15a-Kan 温敏质粒, 最终得到 SE $\Delta waaL$ 突变株。

1.2.4 构建肠炎沙门菌 SE 的 *waaL* 基因回补株

分别以引物 SE-*waaL*-F/SE-*waaL*-R 和 Vec-*waaL*-F/Vec-*waaL*-R 扩增 SE *waaL* 片段及载体 p15a-T 片段。通过 CPEC 方法连接两个片段, 连接产物电转 *E. coli* 10-Beta 感受态细胞。提取阳性单克隆质粒, 用 Ptrc-F/5ST1T2-R 引物双向测序鉴定, 得到 p15a-*waaL*^{SE} 回补质粒。将该质粒电转 SE $\Delta waaL$ 缺失株, 得到 SE $\Delta waaL$ (p15a-*waaL*^{SE}) 回补株。

1.2.5 LPS 银染

取过夜培养的菌液 1–2 mL, 12 000 r/min 离心, 收集菌体, PBS 重悬 3 次, 离心弃上清。加入裂解液 (0.5 mol/L pH 6.8 Tris-HCl 1 mL, 甘油 0.8 mL, 10% SDS 1.6 mL, β -巯基乙醇 0.4 mL, 超纯水 4.2 mL) 充分混匀, 煮沸 10 min, 12 000 r/min 离心 10 min。取上清 10 μ L 到 90 μ L 上样缓冲液 (0.5 mol/L pH 6.8 Tris-HCl 1 mL, 甘油 0.8 mL, 溴酚蓝 0.005 g, 超纯水 6.2 mL) 中, 加入 1 μ L 蛋白酶 K, 37 °C 消化 1 h。SDS-PAGE 后, 将胶放入玻璃器皿中准备银染。首先加入固定液固定 4 h, 然后进行氧化 (1.4 g 高碘酸溶于 200 mL 超纯水中), 超纯水洗涤后加入银染液 (A 液: 1 mol/L 氢氧化钠 2.9 mL, 氨水 2 mL, 超纯水 150 mL; B 液: 硝酸银 1 g 溶于 5 mL 超纯水中; 将 B 液缓慢加入摇动的 A 液中直至溶液变澄清), 最后加入显影液 (柠檬

酸 0.025 g 及甲醛 0.25 g, 溶于 500 mL 超纯水中) 进行显影。待出现条带后超纯水洗涤, 照相保存。

1.2.6 构建 pACT3-Kan-PglL、pMAL4-Amp-rEPA^{4573N} 和 pMAL4-Amp-CTB^{4573C} 质粒

通过 NCBI 查找 rEPA (GenBank 登录号 MH282864.1)、CTB (GenBank 登录号 AY475128.1) 及 PglL (GenBank 登录号 JN200826.1) 的基因序列。对获得的 rEPA 和 CTB 的 DNA 序列进行了再设计, 具体包括: 在 rEPA 蛋白的 N 端加入 DsbA 信号肽及 PglL 的糖基化位点序列 4573 (*Neisseria meningitidis* PilE^{S45-K73})^[16], C 端加入 His₆ 标签; 在 CTB 蛋白的 N 端加入 DsbA 信号肽, C 端加入 4573 糖基化位点序列及 His₆ 标签。最后, 将确认好的序列进行全基因合成 (南京金斯瑞生物科技)。合成基因分别克隆至 pMAL4 和 pACT3 质粒载体, 得到质粒 pMAL4-Amp-rEPA^{4573N}、pMAL4-Amp-CTB^{4573C} 和 pACT3-Cm-PglL。分别将上述质粒电转 SE $\Delta waaL$ 感受态细胞, 得到 SE $\Delta waaL$ (pMAL4-Amp-rEPA^{4573N}, pACT3-Cm-PglL) 和 SE $\Delta waaL$ (pMAL4-Amp-CTB^{4573C}, pACT3-Cm-PglL), 保存于 -80 °C 冰箱待用。

1.2.7 Western blotting 法检测糖基化结果

将 SE $\Delta waaL$ (pMAL4-Amp-rEPA^{4573N}, pACT3-Cm-PglL) 和 SE $\Delta waaL$ (pMAL4-Amp-CTB^{4573C}, pACT3-Cm-PglL) 接入 LB 液体试管中 37 °C、220 r/min 振荡培养 3 h, OD₆₀₀ 约为 0.6 时加入 0.4 mmol/L 的 IPTG, 25 °C 过夜诱导。离心收集菌体, 加入 5 \times 上样缓冲液制备样品, 煮沸裂解后离心, 取上清进行 SDS-PAGE。将糖蛋白转至 PVDF 膜, 以鼠源的 His 标记的单克隆抗体为一抗 (Bioworld, 1 : 8 000 倍稀释), 以 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 为二抗 (Bioworld, 1 : 20 000 倍稀释) 进行 Western blotting 分析, 判断蛋白

质及糖蛋白表达情况。

1.2.8 糖蛋白纯化

分别将过夜培养的 SE $\Delta waaL$ (pMAL4-Amp-rEPA^{4573N}, pACT3-Cm-PglI) 和 SE $\Delta waaL$ (pMAL4-Amp-CTB^{4573C}, pACT3-Cm-PglI) 菌液以 1:100 的比例转接至新鲜培养基中进行扩大培养。待 OD_{600} 在 0.6 左右时加入 0.4 mmol/L IPTG 诱导过夜。离心收集菌体, 用缓冲液 A (20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 10 mmol/L 咪唑) 30 mL 重悬。超声破碎, 12 000 r/min 离心 30 min, 收集上清液, 经 Ni 柱 (Ni-NTA Agarose, QIAGEN) 纯化。最后, 糖蛋白经缓冲液 B (20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 500 mmol/L 咪唑) 洗脱, 以肠炎沙门菌 O9 血清 (宁波天润生物药业有限公司) 为一抗 (1:500 倍稀释), 以 HRP 标记的羊抗兔 IgG 为二抗 (Bioworld, 1:20 000 倍稀释) 进行 Western blotting 分析, 检验各组蛋白糖基化结果。

1.2.9 蛋白质定量与糖定量

将 SE $\Delta waaL$ (pMAL4-Amp-rEPA^{4573N}, pACT3-Cm-PglI) 通过 Ni 柱粗提, 将粗提物进行蛋白质定量与糖定量, 并计算两者比值。

通过 BSA 蛋白定量试剂盒测定蛋白质浓度。分别取 BSA 标准品 1-8 号各 20 μ L 加到 96 孔板中, 取待测样品 20 μ L 加入到 96 孔板中, 各孔加入 200 μ L 显色工作液, 每组 3 个重复, 充分混匀, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 冷却至室温, 用酶标仪测定标准品的 A_{562} 的吸光度, 绘制标准曲线, 计算样品蛋白浓度。

通过蒽酮-硫酸比色法测定多糖含量。配制葡萄糖标准溶液 (1 mg/mL)、蒽酮溶液 (0.1 g 蒽酮溶于 80% 浓硫酸 100 mL 中), 将葡萄糖标准溶液稀释成 0.1 mg/mL、0.2 mg/mL、0.3 mg/mL、0.4 mg/mL、0.5 mg/mL 和 0.6 mg/mL。取葡萄糖稀释液 2 mL 加入蒽酮溶液 6 mL, 沸水浴 15 min,

取出再冰浴 15 min, 用酶标仪测定葡萄糖稀释液在 A_{625} 时的吸光度, 绘制标准曲线, 同时待测样品进行同样操作, 并计算样品总糖浓度。

2 结果与分析

2.1 pKDsgRNA-kan-waaL^{SE} 质粒的构建

以质粒 pKDsgRNA-15a-Kan 为模板, gRNA-SE-DwaaL-F/pair with F 和 gRNA-SE-DwaaL-R/pair with R 为引物, PCR 扩增片段 1 和片段 2 (图 1), 纯化回收的两个片段经 CPEC 法连接, 连接产物电转化至 *E. coli* 10-Beta 感受态细胞。提取阳性单克隆质粒, 测序鉴定正确。

2.2 野生菌株 waaL 基因的缺失及基因功能的回补

以 DwaaL-SE-1F/DwaaL-SE-1R 和 DwaaL-SE-2F/DwaaL-SE-2R 为引物扩增上游和下游同源臂, 以 DwaaL-SE-1F/DwaaL-SE-2R 为引物, 用 SOE-PCR 法扩增获得同源修复片段 (图 2), 将质粒 pCas9-CR4-Cm 和 pKDsgRNA-kan-waaL^{SE} 转入野生株后, 再电转入 waaL 基因同源修复 DNA 片段, 进行 waaL 基因缺失。通过 PCR 鉴定可

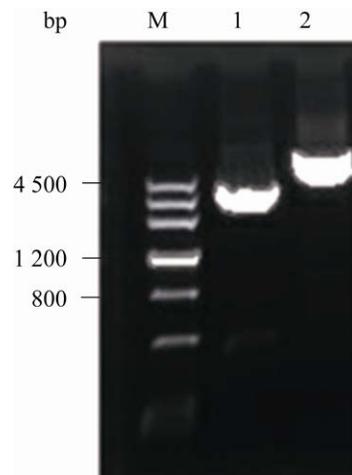


图 1 pKDsgRNA-kan-waaL^{SE} 质粒片段 1 和 2 的鉴定

Figure 1 Amplification results of pKDsgRNA-kan-waaL^{SE} plasmid fragments 1 and 2.

以看出缺失 *waaL* 基因的肠炎沙门菌条带小于野生株, 但与同源修复片段大小相符, 证实基因 *waaL* 已成功缺失 (图 3)。银染实验证实缺失了 *waaL* 基因的肠炎沙门菌相比野生株和回补株无法合成完整的 LPS (图 4)。

2.3 构建 pACT3-Cm-PglL、pMAL4-Amp-rEPA^{4573N} 和 pMAL4-Amp-CTB^{4573C} 质粒

通过全基因合成的方式, 获得能表达 rEPA、CTB 及 PglL 的重组表达质粒 pMAL4-Amp-rEPA^{4573N}、pMAL4-Amp-CTB^{4573C} 和 pACT3-Cm-PglL (图 5)。

2.4 Western blotting 检测糖基化结果

将 SE $\Delta waaL$ (pMAL4-Amp-rEPA^{4573N}) 与 SE $\Delta waaL$ (pMAL4-Amp-CTB^{4573C}) 诱导表达后, 离心, 取全菌制备样品。Western blotting 结果显示, 当使用鼠源的含有 his-tag 标签的抗体作为一抗, HRP 标记的羊抗鼠 IgG 为二抗时, 表达产物 rEPA (分子量为 69 kDa, 图 6A) 及 CTB (分子量为 14 kDa, 图 6B) 能够与之发生特异性结合, 条带大小与预期相符。相比之下 SE $\Delta waaL$ (pMAL4-Amp-rEPA^{4573N}, pACT3-Cm-PglL) 和 SE $\Delta waaL$ (pMAL4-Amp-CTB^{4573C}, pACT3-Cm-PglL) 在相应蛋白条带上面区域仍有明显条带 (图 6), 表明转入质粒 pACT3-Cm-PglL 的菌株发生了明显的糖基化。

2.5 糖蛋白纯化

将 SE $\Delta waaL$ (pMAL4-Amp-rEPA^{4573N}, pACT3-

Kan-PglL) 进行扩大培养, 超声破碎后取上清样品, 通过 Ni 柱纯化目标糖蛋白, 并将纯化过程中收集的各组样品进行 Western blotting (WB) 实验。结果表明, 诱导后全菌样品及上清液 (图 7A) 中有明显的糖蛋白, 通过对各组咪唑洗脱液处理后点样, 得到以下结果 100 mmol/L 和 200 mmol/L 的咪唑洗脱液中有明显的糖蛋白条带, 300 mmol/L 及以上的咪唑洗脱液未见明显条带。同时, 通过 O9 血清鉴定, 纯化的糖蛋白中所含的糖链与血清反应, 从而判定所获得的纯化产物为肠炎沙门菌 O 抗原多糖蛋白 (图 7B)。

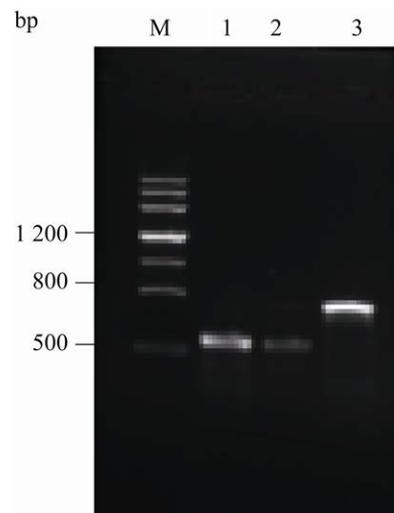


图 2 *waaL* 基因同源修复片段的 PCR 鉴定

Figure 2 Analysis of the PCR amplification results of homologous repaired DNA fragments of *waaL* gene. 1: upstream homologous arm; 2: downstream homologous arm; 3: homologous repair of DNA fragments.



图 3 SE *waaL* 基因缺失鉴定结果

Figure 3 Identification of *waaL* deletion in SE. 1–21: *waaL* gene deleted strains; 22: *Salmonella enteritidis* wild type; 23: positive control.



图4 *waaL* 基因缺失株与回补株的 LPS 图谱
Figure 4 LPS profiles of *waaL*-deleted *Salmonella enteritidis* strains and *waaL*-complemented strains by silver staining method. 1: *Salmonella enteritidis* wild type; 2: *waaL* gene deleted strain; 3: *waaL* gene restored strain.

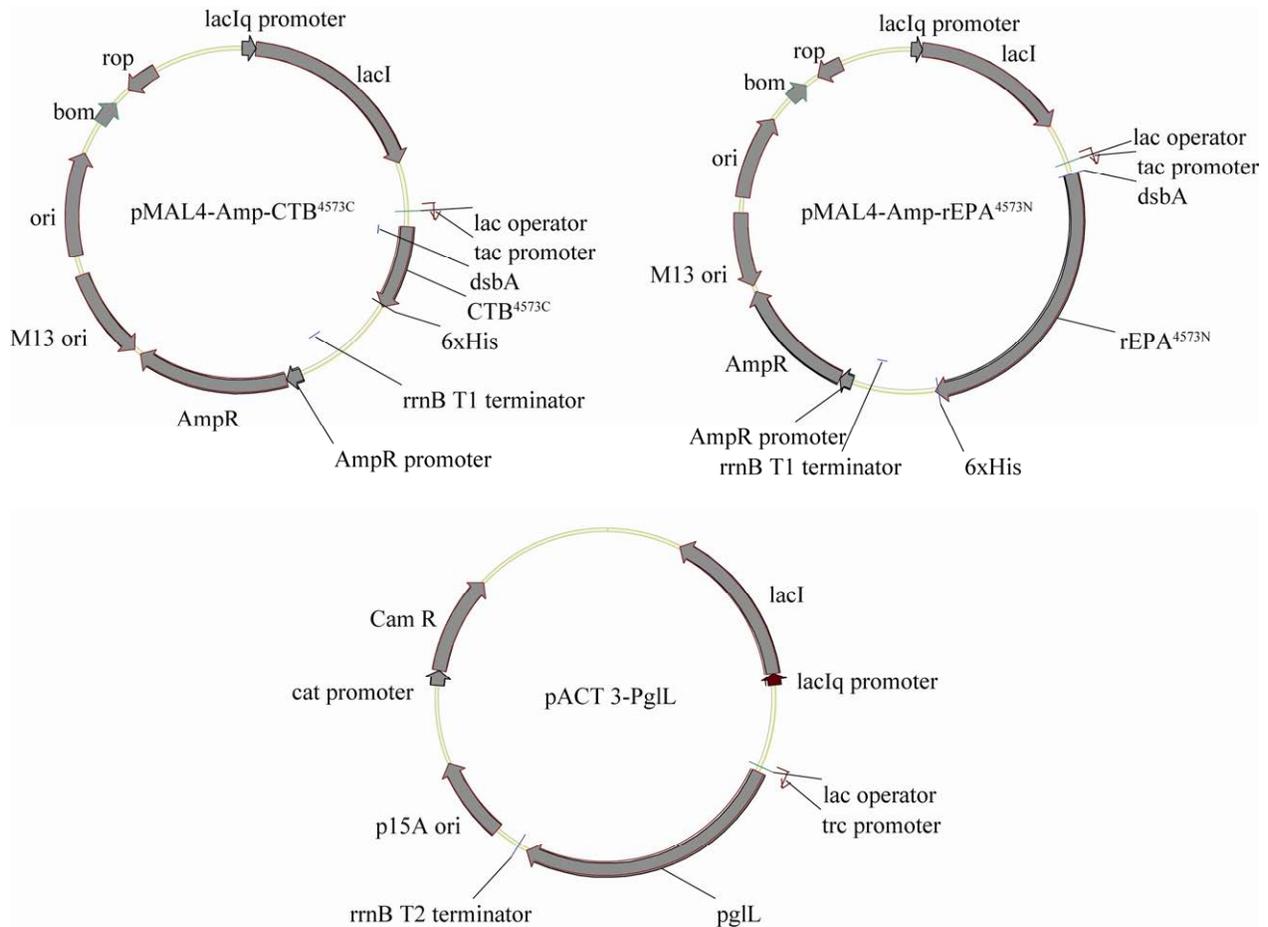


图5 pMAL4-Amp-rEPA^{4573N}、pMAL4-Amp-CTB^{4573C} 及 pACT3-Cm-PglL 质粒图谱
Figure 5 Maps of pMAL4-Amp-rEPA^{4573N}, pMAL4-Amp-CTB^{4573C} and pACT3-Cm-PglL.

2.6 蛋白定量及糖定量

通过 BSA 对样品中的蛋白质含量进行测定, 比对标准曲线, 测得 OPS-rEPA 蛋白质浓度为 0.50 mg/mL, 1 L 菌液获得 OPS-rEPA 蛋白质约为 5.06 mg。通过蒽酮-硫酸比色法获得样品总糖浓度为 0.04 mg/mL, 1 L 菌液获得总糖量约为 400 μ g, 蛋白量与糖的比为 12.65 : 1。

3 讨论

20 世纪 70 年代末和 80 年代初, 多糖疫苗首次进入市场, 其中最具代表的是 B 型流感嗜血杆菌荚膜多糖 (CPS) 疫苗和肺炎链球菌 14 价 CPS 疫苗^[8]。但是纯多糖疫苗通常只能诱导 B 细

胞产生低亲和力的 IgM 抗体, 无法产生高亲和力的 IgG 抗体^[17]。因此, 为弥补该类疫苗的缺点, 能激活机体特异性辅助性 T 细胞和 B 细胞免疫反应的糖蛋白疫苗逐渐成为了研究热点。其中针对流感嗜血杆菌 CPS、肺炎链球菌 CPS 和脑膜炎奈瑟菌 CPS 的商业化糖蛋白疫苗已成功研制, 具备了较高的免疫原性和安全性^[18-19]。然而, 目前糖蛋白的合成以化学交联法为主^[20], 该方法生产成本低、过程烦琐, 且无法保证均一性。因此, 本研究拟采用低成本的生物法合成肠炎沙门菌多糖蛋白, 具有一定的前瞻性和现实意义。

生物法合成糖蛋白需要寡糖转移酶、糖链供体和糖链受体 (即载体蛋白) 的共同协调完成^[21]。首先, 在寡糖转移酶的选择方面, 目前已发现的原核生物蛋白糖基化途径主要有两种, 一种是以空肠弯曲杆菌寡糖转移酶 PglB 为代表的 N 糖基化系统^[22-23], 另一种是以脑膜炎奈瑟菌寡糖转移酶 PglL 为代表的 O 糖基化系统^[24]。由于肠炎沙门菌的 O 抗原结构并不满足 PglB 的底物特异性要求, 因此本文采用了对多糖底物特异性要求更低的 PglL 来合成肠炎沙门菌 O 抗原多糖蛋白。

其次, 肠炎沙门菌作为本研究的宿主菌, 提供了自身 O 抗原多糖。我们采用 CRISPR/Cas9 方法构建肠炎沙门菌 *waaL* 基因缺失株 SE $\Delta waaL$, CPEC 方法构建回补质粒。通过银染实验证实相比野生株而言, SE $\Delta waaL$ 无法合成完整的 LPS (图 4), 且回补株 *waaL* 基因功能的成功回补, 进一步证实了本研究中 LPS 无法合成仅由该基因的缺失所造成。肠炎沙门菌的 O 抗原多糖是通过 Wzx/Wzy 途径合成的, 在正常情况下, 多糖转移酶 WaaL 会将 Und-PP-O units (lipid anchor undercaprenyl pyrophosphate-O units) 中的 O 抗原部分整体转移并连接至 lipid

A-核心寡糖上, 形成完整的 LPS 结构^[25-26]。SE $\Delta waaL$ 突变株因不能合成 WaaL 酶, 无法将周质内的 O 抗原多糖连接到 Lipid A-核心寡糖载体上, 出现了 Und-PP-O units 的积累, 而此 Und-PP-O units 即为糖蛋白生物合成途径中的多糖供体。本研究发现, 对肠炎沙门菌表达的糖蛋白进行 WB 鉴定时, 如果使用 O9 血清作为一抗, 则宿主菌 SE $\Delta waaL$ 中的 Und-PP-O units (O9) 会对 WB 结果产生背景干扰, 而使用 anti-His 标签的抗体作为一抗时, 则不会产生此背景干扰^[27], 因此, 在对肠炎沙门菌表达的糖蛋白进行 WB 鉴定时, 我们仅呈现了 anti-His 作为一抗时的 WB 结果 (图 6)。此外, 我们利用 Ni 柱对肠炎沙门菌表达的糖蛋白进行了纯化, 去除了 Und-PP-O units (O9) 的背景干扰, 此时, 当我们使用 O9 血清作为一抗, 再次对纯化后的糖蛋白进行 Western blotting 验证时, 我们发现了载体蛋白存在明显的糖基化现象 (图 7), 由于使用的一抗是 O9 血清, 所以, 我们可以判定其糖基化的多糖部分为肠炎沙门菌的 O 抗原多糖链。

最后, 在载体蛋白方面, 我们选择已被证实具有良好的免疫原性和安全性的 rEPA 和 CTB^[13-14], 为了使肠炎沙门菌的 O 抗原多糖链能成功地连接到 rEPA 和 CTB 载体蛋白上, 我们在 rEPA 的 N 端加入 DsbA 信号肽及糖基化位点序列 4573, C 端加入了 His₆ 标签; 在 CTB 的 N 端加入 DsbA 信号肽, C 端加入 4573 糖基化位点序列及 His₆ 标签。其中, N 端的 DsbA 信号肽能将 rEPA 和 CTB 载体蛋白定位到细菌周质空间, C 端 His₆ 标签有助于后续 Ni 柱纯化。Western blotting 结果表明, 糖基化位点序列无论是位于蛋白的 N 端, 还是 C 端, 目标载体蛋白都能发生明显的糖基化。本研究结果显示, rEPA 糖基化效果相对较好 (图 6), 所以我们后

期通过 Ni 柱对所合成的糖蛋白 O9-rEPA 进行了粗提, 将粗提物经超滤管 (截留分子量大小为 50 kDa) 浓缩后, 进行蛋白质定量及糖定量实验, 得到蛋白质与糖的比为 12.65 : 1, 与理论估值 (10 : 1, 10 个重复单元的 O 抗原分子量与 rEPA 分子量的比值) 有一定差距, 对比 Western blotting 结果, 通过 O9 血清组说明糖蛋白样品中糖链部分为肠炎沙门菌多糖 (图 7B), 而 anti-His 结果表明部分 rEPA 蛋白未能糖基化且残留有杂蛋白 (图 7A), 后续可考虑进一步提纯。此外, 考虑到肠炎沙门菌的培养具有潜在的生物安全因素, 不利于实际生产和推广, 我们后续将开展在环境友好型的生物工程菌中异源表达肠炎沙门菌多糖、寡糖转移酶及载体蛋白的研究, 同时, 生物法合成糖蛋白也存在产量低及纯化困难的问题, 后续我们将通过对比本体表达及异源表达多糖, 试图提高糖蛋白的产量, 进一步优化生物法合成糖蛋白这一技术。

综上所述, 本研究基于生物合成法, 在缺失了 *waaL* 基因的肠炎沙门菌内引入外源的寡糖转移酶及载体蛋白, 成功合成了含有肠炎沙门菌的 O 抗原多糖的糖蛋白, 为生物法合成肠炎沙门菌糖蛋白疫苗的研究提供依据。

REFERENCES

- [1] Haraga A, Ohlson MB, Miller SI. *Salmonellae* interplay with host cells. *Nat Rev Microbiol*, 2008, 6(1): 53-66.
- [2] Robertson S, Burakoff A, Stevenson L, et al. Notes from the field: recurrence of a multistate outbreak of *Salmonella enteritidis* infections linked to contact with Guinea pigs - eight states, 2015-2017. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2018, 67(42): 1195-1196.
- [3] Kehl A, Noster J, Hensel M. Eat in or take out? metabolism of intracellular *Salmonella enterica*. *Trends Microbiol*, 2020, 28(8): 644-654.
- [4] Castro-Vargas RE, Herrera-Sánchez MP, Rodríguez-Hernández R, et al. Antibiotic resistance in *Salmonella* spp. isolated from poultry: a global overview. *Vet World*, 2020, 13(10): 2070-2084.
- [5] Yang YC, Tellez G, Latorre JD, et al. *Salmonella* excludes *Salmonella* in poultry: confirming an old paradigm using conventional and barcode-tagging approaches. *Front Vet Sci*, 2018, 5: 101.
- [6] Guo RX, Jiao Y, Li ZY, et al. Safety, protective immunity, and DIVA capability of a rough mutant *Salmonella pullorum* vaccine candidate in broilers. *Front Microbiol*, 2017, 8: 547.
- [7] Lerouge I, Vanderleyden J. O-antigen structural variation: mechanisms and possible roles in animal/plant-microbe interactions. *FEMS Microbiol Rev*, 2002, 26(1): 17-47.
- [8] Weyant KB, Mills DC, DeLisa MP. Engineering a new generation of carbohydrate-based vaccines. *Curr Opin Chem Eng*, 2018, 19: 77-85.
- [9] Li QJ, Jaiswal M, Rohokale RS, et al. A diversity-oriented strategy for chemoenzymatic synthesis of glycosphingolipids and related derivatives. *Org Lett*, 2020, 22(21): 8245-8249.
- [10] Kuberan B, Linhardt R. Carbohydrate based vaccines. *Curr Org Chem*, 2000, 4(6): 653-677.
- [11] 卞晓萍, 刘青, 孔庆科, 等. 大肠杆菌 CRISPR/Cas9 基因编辑系统的建立及验证. *中国兽医学报*, 2021, 41(1): 110-116.
- [12] Bian XP, Liu Q, Kong QK, et al. Establishment and verification of *Escherichia coli* CRISPR/Cas9 gene editing system. *Chin J Vet Sci*, 2021, 41(1): 110-116 (in Chinese).
- [13] Reisch CR, Prather KLJ. The no-SCAR (Scarless Cas9 Assisted Recombineering) system for genome editing in *Escherichia coli*. *Sci Rep*, 2015, 5: 15096.
- [14] Sun P, Pan C, Zeng M, et al. Design and production of conjugate vaccines against *S. Paratyphi A* using an O-linked glycosylation system *in vivo*. *NPJ Vaccines*, 2018, 3: 4.
- [15] Hatz CFR, Bally B, Rohrer S, et al. Safety and immunogenicity of a candidate bioconjugate vaccine against *Shigella dysenteriae* type 1 administered to healthy adults: a single blind, partially randomized Phase I study. *Vaccine*, 2015, 33(36): 4594-4601.
- [16] Quan JY, Tian JD. Circular polymerase extension cloning for high-throughput cloning of complex and combinatorial DNA libraries. *Nat Protoc*, 2011, 6(2): 242-251.
- [17] Pan C, Sun P, Liu B, et al. Biosynthesis of conjugate vaccines using an O-linked glycosylation system. *mBio*, 2016, 7(2): e00443-e00416.

- [17] Yuseff MI, Pierobon P, Reversat A, et al. How B cells capture, process and present antigens: a crucial role for cell polarity. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13 (7): 475-486.
- [18] Halperin SA, Bettinger JA, Greenwood B, et al. The changing and dynamic epidemiology of meningococcal disease. *Vaccine*, 2012, 30(Suppl 2): B26-B36.
- [19] Vella M, Pace D. Glycoconjugate vaccines: an update. *Expert Opin Biol Ther*, 2015, 15(4): 529-546.
- [20] Dagan R, Poolman J, Siegrist CA. Glycoconjugate vaccines and immune interference: a review. *Vaccine*, 2010, 28(34): 5513-5523.
- [21] Kightlinger W, Warfel KF, DeLisa MP, et al. Synthetic glycobiology: parts, systems, and applications. *ACS Synth Biol*, 2020, 9(7): 1534-1562.
- [22] Wacker M, Linton D, Hitchen PG, et al. N-linked glycosylation in *Campylobacter jejuni* and its functional transfer into *E. coli*. *Science*, 2002, 298(5599): 1790-1793.
- [23] 马中瑞, 韩东雷, 赵骏菲, 等. 利用大肠杆菌生产 N-糖蛋白和糖蛋白疫苗的研究进展. *中国生物工程杂志*, 2013, 33(11): 7.
- [24] MA ZR, HAN DL, ZHAO JF, et al. Recent developments in N-linked glycoproteins production in *Escherichia coli* and glycoprotein vaccines. *China Biotechnol*, 2013, 33(11): 7 (in Chinese).
- [25] Feldman MF, Wacker M, Hernandez M, et al. Engineering N-linked protein glycosylation with diverse O antigen lipopolysaccharide structures in *Escherichia coli*. *PNAS*, 2005, 102(8): 3016-3021.
- [26] Whitfield C. Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. *Annu Rev Biochem*, 2006, 75: 39-68.
- [27] Whitfield C, Trent MS. Biosynthesis and export of bacterial lipopolysaccharides. *Annu Rev Biochem* 2014, 83: 99-128.
- [28] Knoot CJ, Robinson LS, Harding CM. A minimal sequon sufficient for O-linked glycosylation by the versatile oligosaccharyltransferase PglS. *Glycobiology*, 2021, 31(9): 1192-1203.

(本文责编 陈宏宇)