

DOI:10.13350/j.cjpb.230105

• 论著 •

内蒙古地区牛乳腺炎致病性粪肠球菌表面蛋白 esp 基因的克隆、表达及抗原性分析*

石竟楠^{1,2,3}, 锡林高娃^{1,2,3}, 吴金花^{1,2,3}, 布日额^{2,3***}, 王金良⁴, 陈金龙⁴, 王赞嘉^{1,2,3}

(1. 内蒙古民族大学生命科学与食品学院, 内蒙古通辽 028043; 2. 内蒙古自治区乳源性致病菌防控工程技术研究中心 3;
3. 内蒙古民族大学乳源性致病菌研究所; 4. 山东省滨州畜牧兽医研究院)

【摘要】 目的 克隆、表达内蒙古地区奶牛乳腺炎临床分离粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)的表面蛋白 esp 基因, 对表达产物进行抗原性鉴定及生物信息学分析。方法 以 Genbank 公布的序列号为 CP045045.1 粪肠球菌 esp 基因 DNA 为模板设计 1 对引物, 对 esp 基因进行克隆、测序, 构建重组表达载体 pET-30a(+)-esp 后进行原核表达, 对表达蛋白进行 Western blot 鉴定。利用 DNA Star 生物信息软件对表达蛋白的空间构象, 理化特性, 跨膜区, 抗原性等进行预测分析。结果 测序显示, 克隆的 esp 基因序列长度为 776 bp, 与 NCBI 公布的 esp 序列(CP045045.1)相似度为 100%。经 PCR 及酶切鉴定, 重组表达质粒 pET30a(+)-esp 构建正确。将其转化至原核表达工程菌 BL21 后经 IPTG 诱导表达, SDS-PAGE 显示该蛋白的相对分子质量约 28×10^3 。Western blot 分析显示, 纯化的重组蛋白能够被相应小鼠抗血清识别。DNASar 生物信息学软件分析显示, 该蛋白相对分子质量为 37×10^3 , 等电点为 4.33, 带负电荷残基总数 54 个, 带正电荷残基总数 30 个, 分子式为 $C_{1190} H_{1899} N_{309} O_{438}$, α 螺旋占 6.98%, β 折叠占 1.94%, 无规则折叠占 68.6%; 其二级结构以无规则卷曲为主, 表面存在较多抗原表位; 6-25 位氨基酸之间存在跨膜区域, 推测该蛋白具有跨膜特性。抗原性分析显示, esp 基因编码蛋白在 14-55、59-170、186-197、206-255 位氨基酸残基区段存在良好的抗原可及性, 以 59-170 位区间抗原可及性较为集中。结论 内蒙古地区分离的牛乳腺炎致病性粪肠球菌 esp 基因编码蛋白具有良好的抗原性, 可作为该菌感染检测靶标候选抗原。

【关键词】 奶牛乳腺炎; 粪肠球菌; esp 基因; 抗原理化特性分析

【中图分类号】 R378

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2023)01-0023-07

[Journal of Pathogen Biology. 2023 Jan;18(1):23-29.]

Cloning, expression and antigenicity analysis of surface protein esp gene of pathogenic *Enterococcus faecalis* of bovine mastitis in Inner Mongolia

SHI Jing-nan^{1,2,3}, XI Lingao-wa^{1,2,3}, WU Jin-hua^{1,2,3}, BU Ri-e^{1,2,3}, WANG Jin-liang⁴, CHEN Jin-long⁴, WANG Zan-jia^{1,2,3} (1. College of Life Science and Food Engineering, Inner Mongolia University for Nationalities, Tongliao, Inner Mongolia 028000, China; 2. Inner Mongolia Autonomous Region Engineering Technology Research Center of Prevention and Control the Pathogenic Bacteria in Milk; 3. Research Institute for Pathogenic in Milk of Inner Mongolia University for Nationalities; 4. Shandong Province Binzhou Animal Husbandry and Veterinary Research Institute)***

【Abstract】 **Objective** Cloning and expression of the surface protein esp gene from *Enterococcus faecalis*, a clinical isolate of mastitis in dairy cows in Inner Mongolia, antigenicity identification and bioinformatics analysis of the expressed product. **Methods** One pair of primers was designed using the Genbank published sequence number CP045045.1 *Enterococcus faecalis* esp gene DNA as a template, The esp gene was cloned, sequenced, and the recombinant expression vector pET-30a(+)-esp was constructed for prokaryotic expression, and the expressed protein was identified by Western blot. DNA Star bioinformatics software was used to predict the spatial conformation, physicochemical properties, transmembrane region, and antigenicity of the expressed proteins. **Results** Sequencing showed that the cloned esp gene sequence was 776 bp in length, with 100% similarity to the NCBI published esp sequence (CP045045.1). The recombinant expression plasmid pET30a(+)-esp was identified by PCR and enzyme digestion, and was correctly constructed. It was transformed into the prokaryotic expression bacterium BL21 and then induced by IPTG, and SDS-PAGE showed that the relative molecular mass of the protein was about 28×10^3 . Western blot analysis showed that the purified recombinant

* **【基金项目】** 内蒙古自治区科技计划项目。

** **【通讯作者】** 布日额, E-mail: wjhbre@aliyun.com

【作者简介】 石竟楠(1998-), 女, 内蒙古赤峰人, 硕士, 食源性人畜共患致病菌防控及其生物制品研究。E-mail: 1546462757@qq.com

protein was recognized by the corresponding mouse antiserum. Analysis by DNASTar bioinformatics software showed that the protein had a molecular mass of 37×10^3 , an isoelectric point of 4.33, a total of 54 negatively charged residues, a total of 30 positively charged residues, a molecular formula of $C_{1190}H_{1899}N_{309}O_{438}$, 6.98% α -helix, 1.94% β -fold and 68.6% irregular fold. Its secondary structure is dominated by irregular convolutions and the presence of more antigenic epitopes on the surface. A transmembrane region exists between amino acids 6-25, and the protein is presumed to have transmembrane properties. The antigenicity analysis showed that the esp gene encoded proteins had good antigenic accessibility in the amino acid residue regions of 14-55, 59-170, 186-197 and 206-255, with more concentrated antigenic accessibility in the region of 59-170. **Conclusion** The protein encoding the esp gene of *Enterococcus faecalis*, a pathogenic bovine mastitis isolated in Inner Mongolia, has good antigenicity and can be used as a candidate antigen for the detection target of this bacterium infection.

【Key words】 Dairy mastitis; *Enterococcus faecalis*; esp gene; physical and chemical analysis of antigens

奶牛乳腺炎(Diary mastitis)病原微生物种类多达150余种,且以致病菌为主^[1]。在内蒙古地区,以往以无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠埃希菌(*Escherichia coli*)等引起的牛乳腺炎为多见^[2]。但是自2016年以来的跟踪筛查发现,在内蒙古东部地区70%以上的奶牛乳腺炎是由粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)引起的。

粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)又叫粪链球菌,根据兰氏(Lancefield)血清学分类,该菌属于D群^[3-4],属于新发现的院内感染及牛乳源性致病菌,其感染人群主要为重症患者、严重基础疾病人员、老人、幼儿,以及免疫功能低下者。上述人群恰恰也是牛乳消费量高的群体,可引起败血症、心内膜炎、盆腔感染、腹腔感染、尿路感染、牙根炎、动脉炎、新生儿败血症^[5-7]等。粪肠球菌是人和动物肠道内常驻菌群之一,在人畜生活环境土壤、人畜排泄物、机体肠道、上呼吸道、口腔、泌尿生殖道中广泛存在。有报道显示从7名中国儿童粪便中分离的粪肠球菌携带多种毒力因子,其中包括esp等毒力基因(66.4%),属于机会性感染致病菌^[8-9]。近年来不断有粪肠球菌引起的食源性感染和院内感染的报道^[10]。在美国,粪肠球菌是血液感染的第三大因素,在我国也有相关报道。牛乳源粪肠球菌致病基因筛查结果表明,携带esp、agg、gel、efaA等致病基因粪肠球菌注射小鼠后在72 h内死亡^[11]。esp基因与该致病菌的吸附、感染及形成生物膜直接相关,生物膜的形成将显著提高细菌的抗药性和耐药性。粪肠球菌表面蛋白ESP是一种具有黏附作用的表面蛋白,在生物膜的形成过程中重要的作用^[12]。粪肠球菌生物被膜的形成受多种因素调控,esp基因的表达能促进细菌对无机表面黏附及生物被膜中细菌间的黏附,从而使生物膜更加稳定和增强,因此esp基因被认为是致病性粪肠球菌所独有的特征。

本实验拟克隆内蒙古地区牛乳源粪肠球菌esp基因,构建重组质粒,转化DE3后进行诱导表达和纯化,

并进行抗原性分析和生物信息学分析,为相应基因工程疫苗的研制及抗原快速检测试剂盒的制备奠定实验基础。

材料与方法

1 材料

1.1 菌株 实验用牛乳源粪肠球菌菌株,大肠埃希菌感受态细胞DH5 α 和BL21由内蒙古自治区乳源致病菌防控工程技术研究中心提供。

1.2 主要试剂及载体 胰蛋白胨,酵母浸粉,氯化钠和琼脂粉购于北京奥博兴生物技术有限公司;2 \times Taq PCR MasterMix,溶菌酶,细菌DNA提取试剂盒,琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒,质粒小量提取试剂盒,DNAMarker,RNaseA和蛋白酶K均为北京索莱宝科技有限公司产品;pMD-18-T载体,限制性核酸内切酶BamH I和EcoR I,T₄连接酶及线状空载体pET-30a(+)为宝生物工程(大连)有限公司产品。

1.3 主要仪器与设备 超净工作台(DL-CJ)为北京东联哈尔仪器制造有限公司产品;高速离心机(TGL-6C)为上海安亭科学仪器厂产品;高速冷冻离心机(HC-2518R)为上海一恒科学仪器有限公司产品;核酸凝胶电泳仪(DY Y-6C型)为北京六一仪器厂产品;PCR仪(Mastercycler)为德国Eppendorf公司产品。

2 方法

2.1 牛乳腺炎粪肠球菌的活化与鉴定 从-80 $^{\circ}$ C冰箱取出粪肠球菌菌株,置于冰上缓慢解冻,解冻后的菌液在LB培养基上连续培养3代进行活化,再经LB液体培养基扩繁,革兰染色后作形态学鉴定。

2.2 牛乳腺炎粪肠球菌esp基因的克隆

2.2.1 引物的设计及合成 利用Primer 5.0生物信息学软件,根据GenBank上公布的粪肠球菌esp基因序列(CP045045.1)为模板,设计、合成克隆引物,在上游引物及下游引物序列中分别引入BamH I和EcoR I限制性酶切位点。

上游引物 ESP-F: 5' CGCGGATCCGATGTTA-CTCCTGGTGGT-3'; 下游引物 ESP-R5'-CCGGAA-TTCAACTTGAGGTTTATTCGGC-3' (下划线部分为酶切位点)。扩增片段长度约为 776 bp, 引物由哈尔滨博士生物科技有限公司合成。

2.2.2 粪肠球菌细菌总 DNA 的提取 取活化培养的粪肠球菌菌液, 按照细菌 DNA 提取试剂盒操作说明提取总 DNA, 经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分析提取效果。

2.2.3 esp 基因的 PCR 扩增 以提取的临床粪肠球菌菌株总 DNA 为模板, 利用引物 ESP-F/ESP-R PCR 扩增 esp 基因。PCR 反应体系: 2 × Taq PCR MasterMix 10 μl, 模版 DNA 2 μl, 上游引物 1 μl, 下游引物 1 μl, ddH₂O 6 μl, 总体积 20 μl。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 45 min; 95 °C 变性 30 s, 57 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 30 个循环; 72 °C 终延伸 10 min。

2.2.4 PCR 产物的纯化与胶回收 取 PCR 产物进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 验证扩增片段长度是否与目的基因片段一致, 再按照琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒将 PCR 扩增产物进行回收纯化。

2.2.5 重组克隆载体 pMD18-T-esp 的构建 将 esp 基因纯化回收产物与 pMD18-T Vector 连接, 构建重组克隆载体 pMD18-T-esp。连接反应体系: PCR 纯化产物 4.5 μl, pMD18-T Vector 0.5 μl, Solution I 5 μl。反应总体积为 10 μl, 4 °C 静置反应过夜, 使 esp 基因片段与 pMD-18-T 载体连接。

2.2.6 重组克隆载体 pMD18-T-esp 的酶切及 PCR 鉴定 将 pMD 18-T-esp 重组克隆载体转入 DH5α 感受态细胞, 于 LB 固体培养基上进行培养 12 h, 挑取单个菌落接种到含有 Amp^r 抗性的 LB 液体培养基中, 37 °C、180 r/min 振荡培养 12 h, 以菌液为模板进行 PCR, PCR 体系与条件同方法 2.2.3。取菌液 PCR 鉴定阳性菌液, 按照质粒小量提取试剂盒操作说明提取重组质粒, 进行双酶切及 PCR 鉴定, PCR 体系与条件同方法 2.2.3。双酶切体系: 重组质粒 pMD18-T-esp 4 μl, 10 × H Buffer 1 μl, BamH I 0.5 μl, EcoR I 0.5 μl, ddH₂O 4 μl。反应总体积为 10 μl。双酶切鉴定正确的菌液交由哈尔滨博仕生物科技有限公司测序。

2.3 原核表达载体 pET-30a(+)-esp 的构建 将重组克隆载体 pMD 18-T-esp 经 Bam H I 和 Eco R I 酶切处理, 纯化后的目的基因与经同样酶处理的空载体 pET-30a(+) 在 T₄ 连接酶作用下连接。连接体系 (10 μl): 线性空载体 pET-30a(+) 1 μl, esp 基因片段 4 μl, T₄ DNA Ligase 0.5 μl, 10 × T₄ DNA Ligase Buffer 1 μl, ddH₂O 3.5 μl。16 °C 过夜连接后, 转入 BL21 (DE3) 宿主感受态细胞。提取重组质粒 DNA, 经 Bam

H I 和 Eco R I 双酶切鉴定筛选阳性重组质粒并测序。

2.4 重组蛋白 esp 基因的诱导表达 将含有重组质粒 pET-30a(+)-esp 的 BL21 单菌落接种于 LB 液体培养基中, 37 °C 过夜摇动培养, 次日将培养的菌液以 1:100 的比例转接于含有卡那霉素 (50 mg/L) 的 LB 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 振荡培养至 A₆₀₀ 值约为 0.6, 添加 0.2 mmol/L IPTG, 180 r/min 诱导表达 5 h 后收集菌。同时设 pET-30a(+) 空载体为阴性对照。将收获的菌体用蛋白缓冲液吹打悬浮, 超声波裂解后于 4 °C 以 10 000 r/min (离心半径 11.2 cm) 离心 10 min, 取上清, 用镍耦合亲和层析柱进行纯化, 然后进行 SDS-PAGE 电泳分析。

2.5 抗 ESP 蛋白小鼠血清的制备 取纯化的重组蛋白 ESP 与等体积完全弗氏佐剂 (FCA) 混合, 充分乳化后经皮下多点注射免疫 6 周龄雌性 BALB/c 小鼠, 剂量为每只 50 μg。之后每隔两周取与相同剂量的抗原和等体积不完全弗氏佐剂 (FIA) 充分乳化后皮下注射加强免疫 2 次。末次免疫后将小鼠摘眼球取血, 分离血清, 冻存于 -20 °C 备用。

2.6 重组 ESP 蛋白的 Western blot 鉴定 纯化的重组蛋白经定量后分别稀释至 1:2、1:4、1:8、1:16, 经 SDS-PAGE 电泳后电转印至硝酸纤维素膜上。用 5.0% 的脱脂乳 37 °C 封闭 2 h, 取出后用 TBST Buffer 洗涤 3 次, 分别以制备的小鼠抗血清为一抗, 以 HRP 标记羊抗鼠抗体为二抗进行 Western blot, 分析 ESP 的抗原性。

结果

1 粪肠球菌的鉴定

取连续培养 3 代的粪肠球菌进行革兰染色, 光学显微镜下观察为紫色球菌, 菌体呈圆形或者椭圆, 或呈单个或短链状 (图 1)。

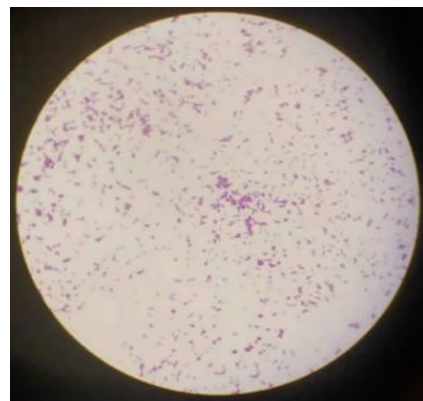
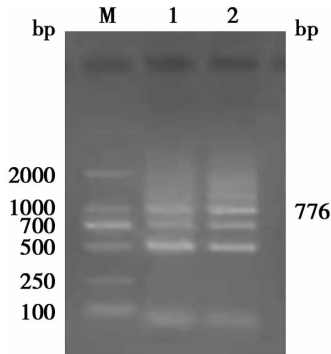


图 1 粪肠球菌形态 (革兰染色, 2000 ×)
Fig. 1 Gram staining of *E. faecalis* (2000 ×)

2 牛乳源粪肠球菌 esp 基因的 PCR 扩增

PCR 扩增 *esp* 基因经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 扩增片段长度约 776 bp(图 2), 与克隆基因预期片段长度相符。



M DNA 标志物(2000 bp) 1、2 *esp* 基因 PCR 产物

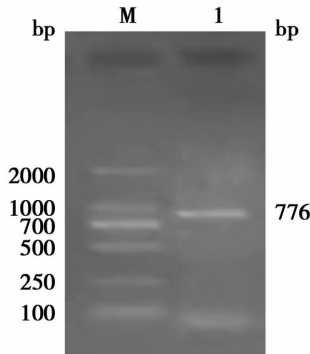
图 2 *esp* 基因 PCR 扩增产物 1% 琼脂糖凝胶电泳分析

M DNA maker(2000bp) 1、2 *esp* gene PCR product

Fig. 2 Electrophoretic identification of PCR amplification products of *esp* Gene

3 重组克隆载体 pMD18-T-*esp* 的构建与鉴定

esp 基因扩增片段与 pMD-18-T 克隆载体连接后转化至 DH5 α 感受态细胞进行扩增。取菌液进行 PCR 鉴定, 结果如图 3。提取重组质粒进行质粒 PCR 鉴定, 结果如图 4。重组克隆载体 pMD18-T-*esp* 用 *Bam* H I 和 *Eco* R I 酶切, 得到约 776 bp 的酶切目的基因片段(图 5), 重组质粒 pMD18-T-*esp* 构建正确。



M DNA 标志物(2000 bp) 1 重组菌液 PCR 产物

图 3 *esp* 基因菌液 PCR 扩增产物 1% 琼脂糖凝胶电泳分析

M DNA maker(2000 bp) 1 Bacterial liquid PCR product

Fig. 3 Agarose Gel Electrophoresis Identification of PCR Amplified Products of *esp* Gene in Bacteria

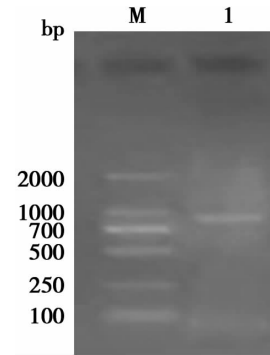
4 重组表达载体 pET-30a(+)-*esp* 的构建及鉴定

重组克隆载体酶切纯化后的目的片段与质粒 pET-30a(+) 连接, 转化入大肠埃希菌 BL21 感受态细胞, 筛选出的重组表达质粒 pET-30a(+)-*esp* 经双酶切鉴定, 得到约 776bp 的目的基因片段(图 6)。测序结果表明重组表达载体 pET-30a(+)-*esp* 构建正确。

5 重组蛋白 ESP 的 SDS-PAGE 分析

将含有重组表达质粒 pET-30a(+)-*esp* 的 BL21 用 IPTG 进行诱导培养。收集菌体, 超声裂解后收集

裂解上清, 经柱层析纯化后进行 SDS-PAGE 分析, 结果如图 7。表达蛋白相对分子质量约为 37×10^3 , 与预期相符。ESP 蛋白主要以可溶形式表达, pET-30a(+) 未诱导菌不表达该蛋白。

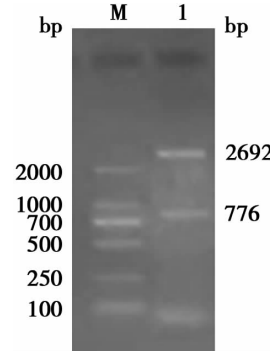


M DNA 标志物(2000 bp) 1 重组质粒 PCR 产物

图 4 重组质粒 pMD18-T-*esp* PCR 产物 1% 琼脂糖凝胶电泳分析

M DNA maker(2000 bp) 1 Recombinant plasmid PCR product

Fig. 4 Recombinant plasmid pMD18-T-*esp* PCR product identification by agarose gel electrophoresis

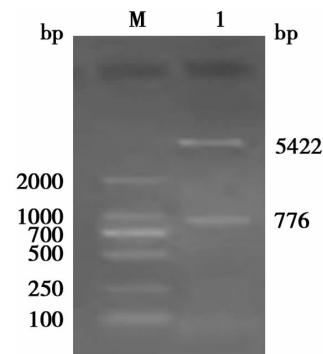


M DNA 标志物(2000 bp) 1 重组质粒双酶切

图 5 重组质粒 pMD18-T-*esp* 双酶切鉴定

M DNA maker(2000 bp) 1 Recombinant plasmid double digestion

Fig. 5 Recombinant plasmid pMD18-T-*esp* double restriction digestion identification



M DNA 标志物(2000 bp) 1 重组表达质粒 pET-30a(+)-*esp* 双酶切

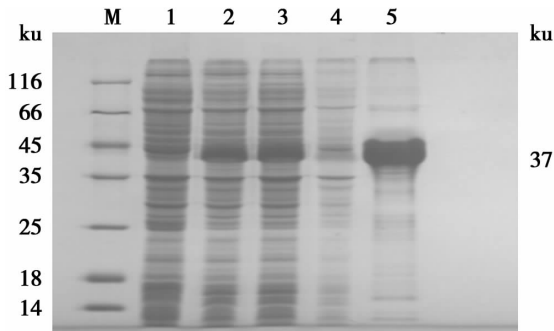
图 6 重组表达质粒 pET-30a(+)-*esp* 双酶切鉴定

M DNA maker(2000 bp) 1 Double restriction digestion of recombinant expression plasmid pET-30a(+)-*esp*

Fig. 6 Recombinant expression plasmid pET-30a(+)-*esp* double restriction digestion identification

6 重组蛋白 ESP 的 Western blot 分析

以纯化的重组 ESP 蛋白免疫小鼠血清为一抗,以 HRP 标记羊抗鼠抗体为二抗进行 Western blot,结果如图 8。重组 ESP 蛋白可被小鼠抗血清识别,反应条带位于 37 ku 处出。表明重组 ESP 蛋白既具有免疫原性,又具有反应原性。

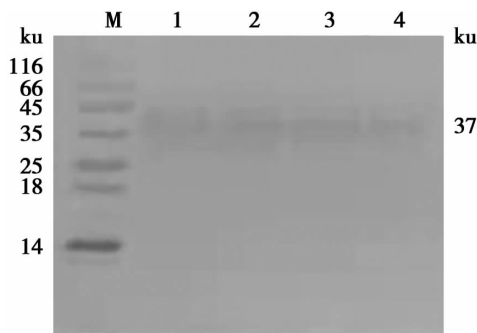


M 蛋白分子质量标准(116~14ku) 1 BL21(DE3)/pET-30a(+)-空载体对照 2 IPTG 诱导 BL21(DE3)/pET-30a(+)-*esp* 全菌体裂解产物 3 IPTG 诱导 BL21(DE3)/pET-30a(+)-*esp* 诱导菌体裂解上清 4 IPTG 诱导 BL21(DE3)/pET-30a(+)-*esp* 菌体裂解沉淀 5 BL21(DE3)/pET-30a(+)-*esp* 表达蛋白纯化产物

图 7 表达产物 ESP 蛋白的 SDS-PAGE 分析

M Low molecular weight protein Marker(116~14 ku) 1 BL21(DE3)(pET-30a(+)) empty vector induction product 2 BL21(DE3)/pET-30a(+)-*esp* induction product whole bacteria 3 BL21(DE3)/pET-30a(+)-*esp* induction product supernatant 4 BL21(DE3)/pET-30a(+)-*esp* induces product precipitation 5 BL21(DE3)/pET-30a(+)-*esp* purified product

Fig. 7 SDS-PAGE analysis of the expression product ESP protein



M 蛋白分子质量标准(116~14 ku) 1 纯化的重组 ESP 蛋白 2 倍稀释 2 纯化的重组 ESP 蛋白 4 倍稀释 3 纯化的重组 ESP 蛋白 8 倍稀释 4 纯化的重组 ESP 蛋白 16 倍稀释

图 8 ESP 重组蛋白 Western blot 鉴定

M Low molecular weight protein Marker(116-14 ku) 1 BL21(DE3)(pET-30a(+)-*esp*) purified product diluted 2 times 2 BL21(DE3)(pET-30a(+)-*esp*) purified product diluted 4times 3 BL21(DE3)(pET-30a(+)-*esp*) purified product diluted 8 times 4 BL21(DE3)(pET-30a(+)-*esp*) purified product diluted 16 times

Fig. 8 ESP identification of recombinant protein Western blot

7 表面蛋白 *esp* 基因序列生物信息学分析

7.1 表面蛋白 *esp* 基因序列的克隆及同源性分析

对重组质粒测序,经与 CP045045.1 序列比对,同源性为 100%(图 9)。构建粪肠球菌 *esp* 基因序列进化树,结果如图 10。表面蛋白 *esp* 目的基因序列与 CP040898.1、CP085291.1 的同源性为 97.0%,与

CP045045.1 的同源性为 100%,与粪肠球菌 CP045045.1 株亲缘关系最近。通过 NCBI 对 CP045045.1 分析,分离的粪肠球菌为乳源性粪肠球菌。

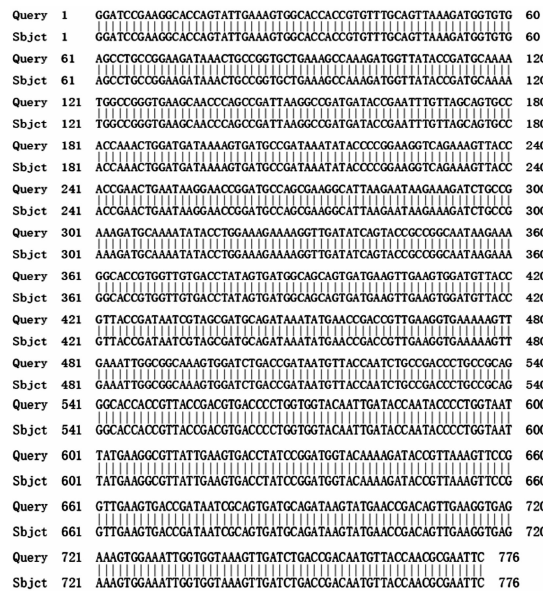


图 9 *esp* 基因克隆序列与序列(CP045045.1)BLAST 比对分析

Fig. 9 Comparison of *esp* cloned sequence with BLAST with sequence (CP045045.1)

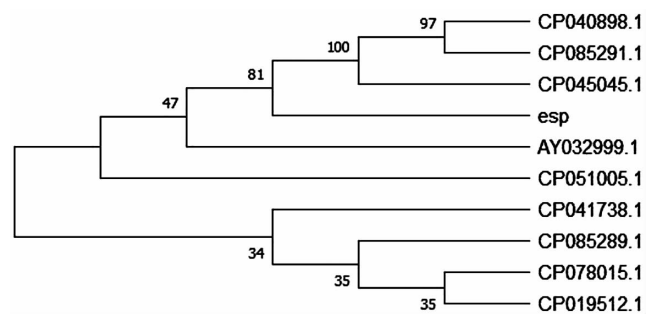


图 10 粪肠球菌 *esp* 基因序列进化树

Fig. 10 Evolutionary tree analysis

7.2 *esp* 基因编码蛋白的二维结构及三维结构 利用在线工具 SOPMA 对 *esp* 基因编码蛋白的二级结构进行预测,结果如图 11。其中 C 代表无规卷曲,占比 68.6%;H 代表 α 螺旋,占比 6.98%;E 代表延长链,占比 22.48%;T 代表 β 转角,占比 1.94%。利用在线软件 SWISS-MODEL 预测 *esp* 基因编码蛋白的三维结构模型,结果与二级结构预测大致相同,构成以无规卷曲为主,结构松散,易于形变,多位于蛋白质分子表面(图 12),有利于与抗体结合,而形成抗原表位,可作为检测试剂和疫苗抗原。

7.3 *esp* 基因编码蛋白的理化性质 利用 ExPasy 生物信息学在线软件分析 ESP 蛋白的理化性质。结果显示,该蛋白含 258 个氨基酸残基,带负电荷的残基总数 54 个,带正电荷的残基总数 30 个。该蛋白的原子

由 C、H、N、O 组成,分子式为 C₁₁₉₀H₁₈₉₉N₃₀₉O₄₃₈。相对分子质量为 27.542 98 × 10³,等电点为 4.33,原子总数为 3 836,消光系数在 280 nm 处,外部系数为 22 920,绝对值 0.832,半衰期为 30 h,亲水性总平均值为-0.818。不稳定系数为 14.90,不稳定系数较小,表明该蛋白质性质稳定(图 13)。



图 11 ESP 蛋白二级结构预测
Fig. 11 protein of peptide ESP secondary structure

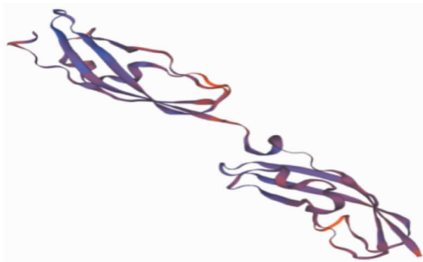


图 12 ESP 蛋白三级结构预测
Fig. 12 Prediction of tertiary structure of ESP protein

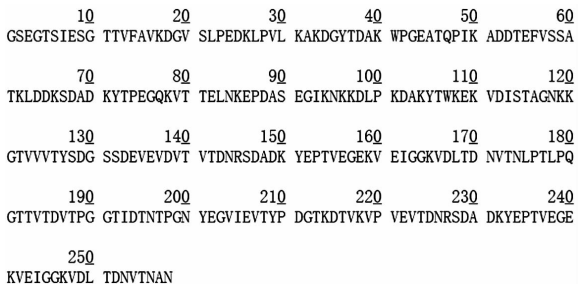


图 13 ESP 蛋白理化性质分析
Fig. 13 Physicochemical properties analysis of ESP protein

7.4 跨膜领域 利用在线生物信息学软件 TMHMM 分析其跨膜结构,结果如图 14。ESP 蛋白序列中存在的跨膜区域在 6-25 位氨基酸之间,可推测该蛋白具有跨膜分泌性质。

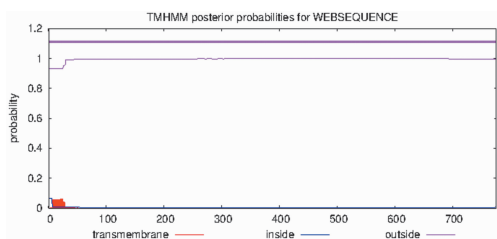


图 14 ESP 蛋白序列跨膜区分析
Fig. 14 Analysis of the transmembrane domain of ESP protein sequence

7.5 抗原性预测分析 利用 DNA Star 生物信息学软件对 *esp* 基因编码蛋白进行抗原表位预测分析。结果显示,在 14-55、59-170、186-197、206-255 位氨基酸区段存在良好的抗原可及性,以 59-170 位区间抗原可及性较为集中,连续的波峰即是抗原表位区,表明 *esp* 存在多点抗原表位,且大部分位于 *esp* 表面(图 15)。

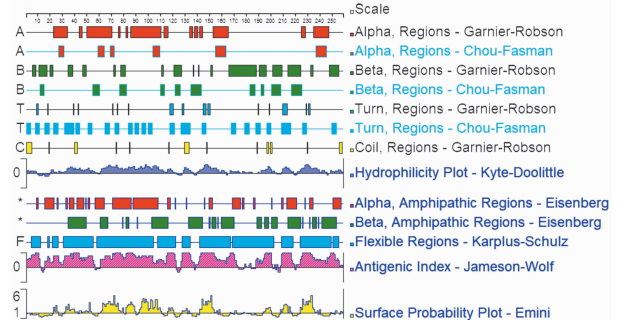


图 15 表面蛋白 ESP 基因抗原性分析
Fig. 15 Antigenicity analysis of surface protein ESP gene

讨论

粪肠球菌是一种条件致病菌,当机体的稳态受到破坏时,自身系统发生紊乱,该菌立即转化为致病菌,产生对机体有害的致病因子,使人和动物机体发生疾病^[13-14]。粪肠球菌生物被膜的形成受多种因素调控,虽然肠球菌表面蛋白基因 *esp* 不是生物被膜形成的唯一因素,但 *ESP* 能促进细菌对无机表面黏附及生物被膜中细菌间的黏附,从而使生物膜更加稳定和增强,因此认为表面蛋白 *esp* 基因是形成生物膜的重要因素之一。

为了明确内蒙古地区牛乳腺炎致病性粪肠球菌 *esp* 基因编码蛋白的抗原可及性及潜在利用价值,本实验在成功克隆、表达表面蛋白 *esp* 基因的基础上,对其编码蛋白的理化性质,抗原性等进行分析。克隆 *esp* 基因时,在生物信息软件上出现引物与模板存在一定的错配可能,从而在目标基因扩增后,在目标片段外出现 2 条相对小的非特异性片段,该结果预先明确,在实验中对相对较大的 776 bp 的片段进行胶回收作为目标片段,测序显示其序列正确。克隆、表达的表面蛋白 *ESP* 具有较稳定的性质和抗原可及性,动物免疫及 Western blot 分析表明该蛋白具有抗原性,为相应基因工程疫苗的研制奠定了基础^[15],对粪肠球菌致病机制的研究和检测抗原的开发具有重要意义。

【参考文献】

[1] 赵小红. 奶牛乳腺炎主要致病菌的综合防治[J]. 中国畜禽种业, 2016, 12(08):107-108.
[2] 战佩泉. 奶牛乳房炎病原及有效防治[J]. 畜牧兽医科技信息, 2019(08):70.
[3] 李金钟. 肠球菌分类与鉴定新进展[J]. 临床检验杂志, 2006, 24

- (3):228-230.
- [4] 吕娜,高原. 粪肠球菌致病因子的研究进展[J]. 内蒙古民族大学学报(自然科学版)2015,30(4):323-326.
- [5] Raza T, Vllah SR, Mehmood K, et al. Vancomycin resistant *Enterococci*: A brief review[J]. J Pak Med Assoc, 2018, 68(5): 768-772.
- [6] Harada T, Tsuji N, Otsuki K, et al. Detection of the esp gene in high-level gentamicin resistant *Enterococcus faecalis* strains from pet animals in Japan[J]. Vet Microbiol, 2005, 10(6): 139-143.
- [7] Larsen J, Schonheyder HC, Lester CH, et al. Hammerum AM; Porcine-origin gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis* in humans, Denmark[J]. Emerg Infect Dis, 2010, 16(4): 682-684.
- [8] Kateete DP, Kabugo U, Baluku H, et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility patterns of bacteria from milkmen and cows with clinical mastitis in and around Kampala, Uganda[J]. PLoS One, 2013, 8(5): e63413.
- [9] Wang J, Da R, Tuo X, et al. Probiotic safety properties screening of *Enterococcus faecalis* from healthy Chinese infants [J]. Probiotics Antimicrob Proteins, 2020, 12(3): 1115-1125.

- [10] Saffari F, Sobhanipoor MH, Shahravan A, et al. Virulence Genes, antibiotic resistance and capsule locus polymorphisms in *Enterococcus faecalis* isolated from canals root-filled teeth with periapical lesions[J]. Infect Chemother, 2018, 50(4): 340-345.
- [11] 周霞. 肠球菌性羔羊脑炎的发现及其病原特性和诊断方法研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2007.
- [12] 王晓禹, 马维武, 周学章. 两株牛源致病性肠球菌的分离鉴定及生物学特性分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2018, 13(8): 809-813.
- [13] Ira P, Sujatha S, Chandra PS. Virulence factors in clinical and commensal isolates of *Enterococcus* species[J]. Indian J Pathol Microbiol. 2013, 56(1): 24-30.
- [14] Ahmadrabji R, Dalfardi MS, Farsinejad A, et al. Distribution of Ebp pili among clinical and fecal isolates of *Enterococcus faecalis* and evaluation for human platelet activation [J]. APMIS, 2018, 126(4): 314-319.
- [15] 布日额, 吴金花, 锡林高娃, 等. 牛乳腺炎粪肠球菌溶血素 CylA 基因编码多肽的理化特性及抗原性分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2021, 16(9): 1020-1024.

【收稿日期】 2022-08-24 【修回日期】 2022-11-09

(上接 22 页)

本实验表达了淋球菌 MlaA 蛋白, 纯化后免疫小鼠, 制备了多克隆抗体。将制备的抗体血清作为一抗进行 Western blot, 结果显示该抗体可识别淋球菌中的 MlaA 蛋白而不与其他不同类菌株反应。IFA 及 FCM 检测均表明该抗体与淋球菌 MlaA 有良好的反应性, 为淋球菌的基础及应用研究提供了实验基础。

【参考文献】

- [1] Costa-Loureno APRD, Barros Dos Santos KT, Moreira BM, et al. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: history, molecular mechanisms and epidemiological aspects of an emerging global threat[J]. Braz J Microbiol, 2017, 48(4): 617-628.
- [2] Quillin SJ, Seifert HS. *Neisseria gonorrhoeae* host adaptation and pathogenesis[J]. Nat Rev Microbiol, 2018, 16(4): 226-240.
- [3] Sun J, Rutherford ST, Silhavy TJ, et al. Physical properties of the bacterial outer membrane[J]. Nat Rev Microbiol, 2022, 20(4): 236-248.
- [4] Powers MJ, Trent MS. Intermembrane transport: Glycerophospholipid homeostasis of the Gram-negative cell envelope[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2019, 116(35): 17147-17155.
- [5] Abell n-Ruiz J, Kaptan SS, Basl A, et al. Structural basis for maintenance of bacterial outer membrane lipid asymmetry[J]. Nat Microbiol, 2017, 2(12): 1616-1623.
- [6] Zhao L, Gao X, Liu C, et al. Deletion of the vacJ gene affects the biology and virulence in *Haemophilus parasuis* serovar 5 [J]. Gene, 2017(603): 42-53.
- [7] Ferreira RJ, Kasson PM. Antibiotic uptake across Gram-negative outer membranes: better predictions towards better antibiotics

[J]. ACS Infect Dis, 2019, 5(12): 2096-2104.

- [8] Cama J, Henney AM, Winterhalter M. Breaching the barrier: quantifying antibiotic permeability across Gram-negative bacterial membranes[J]. J Mol Biol, 2019, 431(18): 3531-3546.
- [9] Hughes GW, Hall SCL, Laxton CS, et al. Evidence for phospholipid export from the bacterial inner membrane by the Mla ABC transport system[J]. Nat Microbiol, 2019, 4(10): 1692-1705.
- [10] Chong ZS, Woo WF, Chng SS. Osmoporin OmpC forms a complex with MlaA to maintain outer membrane lipid asymmetry in *Escherichia coli* [J]. Mol Microbiol, 2015, 98(6): 1133-1146.
- [11] Yeow J, Tan KW, Holdbrook DA, et al. The architecture of the OmpC-MlaA complex sheds light on the maintenance of outer membrane lipid asymmetry in *Escherichia coli* [J]. J Biol Chem, 2018, 293(29): 11325-11340.
- [12] Kamischke C, Fan J, Bergeron J, et al. The *Acinetobacter baumannii* Mla system and glycerophospholipid transport to the outer membrane[J]. Elife, 2019(8): e40171.
- [13] Powers MJ, Trent MS. Phospholipid retention in the absence of asymmetry strengthens the outer membrane permeability barrier to last-resort antibiotics[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018, 115(36): E8518-E8527.
- [14] Powers MJ, Simpson BW, Trent MS. The Mla pathway in *Acinetobacter baumannii* has no demonstrable role in anterograde lipid transport[J]. Elife, 2020(9): e56571.
- [15] Baarda BI, Zielke RA, Le Van A, et al. *Neisseria gonorrhoeae* MlaA influences gonococcal virulence and membrane vesicle production[J]. PLoS Pathog, 2019, 15(3): e1007385.

【收稿日期】 2022-09-30 【修回日期】 2022-12-05