

DOI:10.13350/j.cjpb.230809

• 论著 •

# 含有 *bla*<sub>OXA-48</sub> 基因 BL21(DE3) 菌株的转录组测序与分析\*

潘亚菲<sup>1,2,3</sup>, 康宇婷<sup>2,3</sup>, 刘文森<sup>1,2,3</sup>, 贾伟<sup>1,2,3</sup>, 李刚<sup>1,2,3\*\*</sup>

(1. 宁夏医科大学总医院医学实验中心, 宁夏银川 750004; 2. 宁夏临床病原微生物重点实验室; 3. 宁夏医学检验临床研究中心)

**【摘要】** **目的** 了解含有 *bla*<sub>OXA-48</sub> 基因的 BL21(DE3) 菌株其细菌转录谱的变化, 探究 *bla*<sub>OXA-48</sub> 基因的引入对 BL21(DE3) 菌株代谢及耐药性的影响。 **方法** 采用高通量转录组测序的 RNA-seq 技术对 pET32a(+)-OXA-48-BL21(DE3) 与 pET32a(+)-BL21(DE3) 及 OXA-48 菌株进行检测, 测序数据处理后获得表达差异基因, 差异表达基因的筛选阈值为:  $|\log_2(\text{FoldChange})| > 1$  且  $q\text{value} < 0.005$ 。对差异表达基因进行聚类分析, 利用 GO 数据库和 KEGG 数据库对表达差异基因进行注释与富集性分析, 筛选部分差异表达关键基因进行分类整理。 **结果** pET32a(+)-OXA-48-BL21(DE3) 与 pET32a(+)-BL21(DE3) 相比有 1 201 个差异表达基因, 其中上调 592 个, 下调 609 个; GO 分析表明, 代谢过程、生物合成过程、分子功能、催化活性、离子结合等途径共同参与 OXA-48 菌株的生物过程。KEGG 富集分析表明差异基因主要与碳代谢、不同环境中的微生物代谢、抗生素的生物合成、嘌呤代谢、次生代谢物的生物合成等有关。对差异表达关键基因进行整理分析, 与耐药性、生物膜形成、及脂多糖合成代谢相关的差异基因有 *acrA*、*acrB*、*ompF*、*pedR*、*mcbR* 和 *LptD* 等。 **结论** *bla*<sub>OXA-48</sub> 在 BL21(DE3) 菌株中的表达能调控多种与细菌耐药性及代谢相关基因的表达, 这为研究耐药基因对于肠杆菌科细菌产生的影响奠定了基础, 可为 OXA-48 菌株的流行病学监测及其感染的预防控制提供参考。

**【关键词】** 碳青霉烯类肠杆菌科细菌; 细菌耐药性; 转录组

**【中图分类号】** R378

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1673-5234(2023)08-0917-05

[Journal of Pathogen Biology. 2023 Aug;18(8):917-921, 926.]

## Transcriptome sequencing and analysis of BL21 (DE3) strain containing *bla*<sub>OXA-48</sub> gene

PAN Yafei<sup>1,2,3</sup>, KANG Yuting<sup>2,3</sup>, LIU Wenmiao<sup>1,2,3</sup>, JIA Wei<sup>1,2,3</sup>, LI Gang<sup>1,2,3</sup> (1. Medical Experimental Center of General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China; 2. Ningxia Key Laboratory of Clinical Pathogenic Microbiology; 3. Ningxia Medical Laboratory Clinical Research Center)\*\*\*

**【Abstract】** **Objective** To investigate the changes of bacterial transcription profile of BL21(DE3) strain containing *bla*<sub>OXA-48</sub> gene, and to explore the effects of *bla*<sub>OXA-48</sub> gene introduction on the metabolism and drug resistance of BL21(DE3) strain. **Methods** The high throughput transcriptome sequencing RNA seq technology was used to detect pET32a(+)-OXA-48-BL21(DE3), pET32a(+)-BL21(DE3) and strains. After sequencing data processing, differential expression genes were obtained. The screening threshold of differential expression genes was as follows:  $|\log_2(\text{FoldChange})| > 1$  and  $q\text{value} < 0.005$ . After cluster analysis of differentially expressed genes, GO and KEGG databases were used for annotation and enrichment analysis of differentially expressed genes, and some key differentially expressed genes were selected for classification. **Results** There were 1201 differentially expressed genes in pET32a(+)-OXA-48-BL21(DE3) compared with pET32a(+)-BL21(DE3), of which 592 were up-regulated and 609 were down-regulated. GO analysis showed that metabolic process, biosynthesis process, molecular function, catalytic activity, ion binding and other pathways were involved in the biological process of OXA-48 strain. KEGG enrichment analysis showed that differential genes were mainly related to carbon metabolism, microbial metabolism in different environments, antibiotic biosynthesis, purine metabolism, biosynthesis of secondary metabolites and so on. After sorting out the key differentially expressed genes, we found that *acrA*, *acrB*, *ompF*, *pedR*, *mcbR* and *LptD* were related to drug resistance, biofilm formation and lipopolysis.

**Conclusion** The expression of *bla*<sub>OXA-48</sub> in BL21(DE3) strain can regulate the expression of multiple genes related to bacterial resistance and metabolism. Providing a foundation for studying the impact of drug resistance genes on Enter-

\* **【基金项目】** 宁夏自然科学基金项目(No. 2021AAC05020); 宁夏回族自治区重点研发项目(No. 2021BEG03090); 宁夏医科大学总医院“新入职硕士培养”项目。

\*\* **【通讯作者】** 李刚, E-mail: ligang@nyfy.com.cn

**【作者简介】** 潘亚菲(1996-), 女, 上海人, 硕士, 检验师, 主要研究方向为临床微生物感染与耐药性。E-mail: pyf9267131996@163.com

obacteriaceae bacteria, and provides a new reference for epidemiological monitoring and infection prevention and control of OXA-48 strain.

**【Key words】** carbapenem-like enterobacteriaceae bacteria; bacterial drug resistance; transcriptome

肠杆菌科细菌对碳青霉烯类抗生素耐药的主要机制是产碳青霉烯酶。根据其分子结构,碳青霉烯酶有三类 $\beta$ -内酰胺酶:A、B和D类<sup>[1-2]</sup>。其中OXA-48型碳青霉烯酶属于Ambler D类酶。OXA-48型碳青霉烯酶由 $bla_{OXA-48}$ 基因编码,含有 $bla_{OXA-48}$ 的质粒通常位于IncL/M质粒中。该质粒大小为60~70 kb,且不含其他耐药基因,为肠杆菌科最常见的质粒之一。OXA-48最早于2001年在土耳其伊斯坦布尔的肺炎克雷伯菌分离物中被发现,之后世界范围内的报道越来越多。由于产OXA-48菌株其活性可能低于临床检测下限,但仍足以产生耐药性,特别是在抗生素渗透性降低的菌株,因而在临床微生物实验中很容易对其忽视<sup>[3]</sup>。由于近年在全国乃至世界范围内呈现暴发流行趋势且其检测极具挑战性,因此耐药基因 $bla_{OXA-48}$ 逐渐成为关注的焦点。作为CRE耐药的重要分子机制之一,攻克携带 $bla_{OXA-48}$ 的耐药菌所致感染的治疗难题也变得刻不容缓。

RNA-seq(RNA sequencing),即RNA测序,又称转录组测序,是利用深度测序方法进行转录组分析的技术<sup>[4]</sup>。近年来,随着RNA测序技术的快速发展,原核生物转录组研究取得了多项技术的突破,在细菌基因表达对环境胁迫的响应机制、细菌耐药新机制、致病细菌的致病机制等方面的研究进展较为突出<sup>[5]</sup>。其中细菌生理机制的研究范围已逐渐拓展到分子层面,利用转录组分析可以挖掘出功能基因及其代谢通路,以及了解细菌耐药前后对抗生素的响应和调控机制。

目前对OXA-48的研究仅限于结构表型方面,鲜有关于对其参与的通路与基因功能的研究报道。本研究采用RNA-seq技术对OXA-48菌株进行测序,分析OXA-48对BL21(DE3)菌株的代谢及耐药的影响,为进一步了解耐药基因在细菌代谢通路中发挥的作用提供证据。

## 材料和方法

### 1 材料

**1.1 菌株** BL21(DE3)感受态购自天根生化科技有限公司。

**1.2 主要试剂和仪器** LB液体培养基和IPTG购于Solarbio(中国)公司。二氧化碳恒温培养箱为德国Eppendorf公司生产;Eppendorf移液器为德国Eppendorf公司生产;恒温摇床购于Bluepard(中国)公司;-80℃冰箱为日本Panasonic生产。

### 2 方法

**2.1 载体构建** 选择质粒pET32a(+ )作为载体并引入EcoRI和XhoI为酶切位点,交由南京金斯瑞公司构建pET32a(+)-OXA-48载体。将含有 $bla_{OXA-48}$ 的质粒转化至大肠埃希菌BL21(DE3)中。接合混合物在37℃下孵育过夜后,在选择性琼脂上形成接合子。筛选接合子,提取质粒DNA进行EcoRI和XhoI双酶切验证。将含有阳性重组子pET32a(+)-OXA-48-BL21(DE3)菌接种于含Amp 100  $\mu$ g/mL的LB液体培养基中,37℃培养过夜。

**2.2 样品处理** 将pET32a(+)、pET32(+)-OXA-48质粒分别转入BL21(DE3)感受态细胞中。将转化菌液接种在含氨苄西林(100  $\mu$ g/mL)的LB平板上,37℃培养箱培养过夜;分别挑取转化成功的pET32a(+)-OXA-48-BL21(DE3)菌株和pET32a(+)-BL21(DE3)对照菌株单菌落,37℃摇床180 r/min培养至对数生长期;以1:100比例分别接种于20 mL氨苄西林(100  $\mu$ g/mL)的LB液体培养基中,OXA-48组加IPTG,对照组不加IPTG,37℃均继续振荡培养;取菌液,4℃离心15 min,收集菌体,用5 mL PBS溶液清洗3次后委托北京奥维森公司进行RNA-seq分析。

**2.3 mRNA文库构建** 试验设pET32a(+ )为a组,pET32a(+)-OXA-48为b组,每组做3个生物学重复,分别为a1、a2、a3和b1、b2、b3。提取总RNA,使用Nanodrop检测RNA纯度,并采用Agilent 2100对RNA进行片段长度检测。mRNA富集之后加入fragmentation buffer,将mRNA打断成短片段,采用六碱基随机引物以mRNA为模板反转录合成一链cDNA,再加入缓冲液、dNTPs和DNA聚合酶I合成二链cDNA;利用AM Pure XP beads纯化双链cDNA,并对纯化后的双链cDNA进行末端修复、加A、加接头;通过AMPure XP beads对双链cDNA进行片段大小选择,然后进行PCR扩增以构建cDNA文库,同时检测构建的文库的质量。文库质检合格后采用Illumina平台测序。

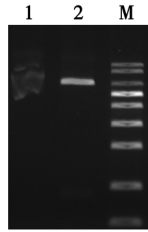
**2.4 RNA-seq数据处理** 对测序所得数据进行质控及过滤,确认测序数据质量符合预期。将过滤好的数据与参考基因组进行比对,然后通过软件HTSeq(v0.5.4 p3)基因表达水平分析。采集基因表达水平分析中得到的readcount数据,使用DESeq(1.10.1)软件分析差异表达基因。通过对比公共数据库,将基因及表达信息作为一个整体网络进行研究。以KEGG数

数据库中 Pathway 为单位,应用超几何检验在差异表达基因中找出与整个转录组背景相比显著性富集的 Pathway,对其进行进一步分析。

## 结果

### 1 重组质粒载体的鉴定

提取重组质粒,通过 EcoRI 和 XhoI 双酶切验证目的基因片段,结果如图 1。pET32a(+)-OXA-48 重组表达载体构建正确。



1 重组质粒 2 重组质粒双酶切 M DNA 标志物  
图 1 重组质粒 pET32a(+)-OXA-48 酶切鉴定

1 Plasmid before enzyme digestion 2 Plasmid after enzyme digestion M DNA marker

Fig. 1 Plasmid digestion diagram

表 1 样品总 RNA 检测结果  
Table 1 Total RNA detection results of samples

样品名称 Sample name	浓度(ng/ $\mu$ l) Concentration	体积( $\mu$ l) Volume	总量( $\mu$ g) Total	完整性值 Integrity value
a1	495	32	15.84	10
a2	489	32	15.648	9.9
a3	520	32	16.64	9.9
b1	202	32	6.464	10
b2	226	32	7.232	9.9
b3	220	32	7.04	10

### 2 转录组测序质量评估

样品测序统计结果显示,a组 pET32a(+)和 b 组 pET32a(+)-OXA-48 和 3 个生物学重复共 6 份样品 clean reads 数据均超过 1G,且 Q20 > 95%,Q30 > 89%。质粒的碱基质量分布、GC 含量分布、碱基质量混合分布、测序饱和度和均一化分布数据均合格(表 2,表 3)。

表 2 样品数据过滤情况  
Table 2 Data filtration by sample

样品 Sample	原始 读数 Raw reads	原始 碱基 Raw bases	过滤后 读数 Clean reads	过滤后 碱基数 Clean bases	Phred 值 >20 的碱 基占比 Q20(%)	Phred 值 >20 的碱 基占比 Q30(%)
a1	10696108	1.6G	10633638	1.6G	97.88	93.75
a2	8748782	1.31G	8694568	1.3G	98.05	94.08
a3	9211250	1.38G	9146900	1.37G	97.94	93.86
b1	9327702	1.39G	9240958	1.39G	97.96	93.81
b2	8941198	1.34G	8819424	1.32G	97.96	93.80
b3	8146538	1.22G	8050244	1.21G	97.91	93.70

表 3 差异表达基因归类分析表

Table 3 Differential expression gene classification analysis table

项目 Item	基因名称 Gene_name	差异倍数 log2FoldChange	P 值 P value	功能 Product	
耐药性	<i>acrB</i>	1.3936	3.81E-12	multidrug efflux RND transporter permease subunit	
	<i>acrA</i>	1.0492	0.001549	multidrug efflux RND transporter periplasmic adaptor subunit acrA	
	<i>ompF</i>	-4.8083	4.00E-141	porin OmpF	
	<i>eptC</i>	2.6556	6.17E-07	phosphoethanolamine transferase CptA	
	生物膜形成	<i>thrA</i>	1.4508	1.08E-06	bifunctional aspartate kinase/homoserine dehydrogenase I
<i>fumB</i>		1.8235	8.89E-28	class I fumarate hydratase	
<i>ilvN</i>		2.4134	0.002502	acetolactate synthase small subunit	
<i>mcbR</i>		3.6661	0.000139	colanic acid/biofilm transcriptional regulator McbR	
<i>pdeR</i>		1.5944	0.000741	cyclic di-GMP phosphodiesterase	
<i>fnr</i>		1.9753	1.77E-17	fumarate/nitrate reduction transcriptional regulator Fnr	
<i>malP</i>		1.7061	6.77E-08	maltodextrin phosphorylase	
脂多糖生物合成		<i>arnT</i>	3.471	5.91E-06	Lipid IV(A) 4-amino-4-deoxy-L-arabinosyltransferase
		<i>lptD</i>	2.1434	0.000121	LPS assembly protein LptD

### 3 差异表达基因(DEGs)数量统计

根据 a 组 pET32a(+)-BL21(DE3)与 b 组 pET32a(+)-48-BL21(DE3)基因表达水平进行差异基因的筛选,筛选阈值一般为:  $|\log_2(\text{FoldChange})| > 1$  且  $q\text{value} < 0.005$ 。DEGSs 火山图(图 2)显示,检测到的显著差异表达基因有 1 201 个,其中上调 592 个,下调 609 个。

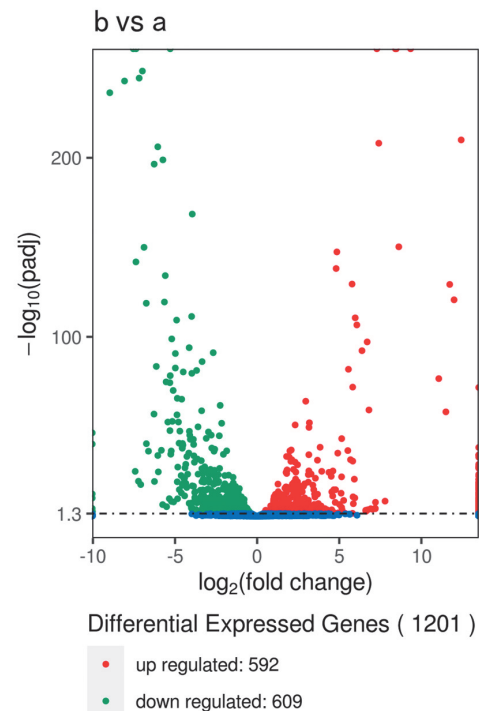


图 2 pET32a(+)-BL21(DE3)与 pET32a(+)-48-BL21(DE3)DEGs 火山图  
Fig. 2 Volcano plot analysis of Group a and Group b

#### 4 差异表达基因维恩图

a 组 pET32a(+)-BL21(DE3) 与 b 组 pET32a(+)-48-BL21(DE3) 相比较, 两组间的差异表达基因关联分析结果如图 3。该图展示了各组表达的基因个数及其重叠关系, 其中圆圈交叉部分为表达的共有基因。共有 3 219 个差异表达基因两组均表达, 260 个差异表达基因为 a 组所特有, 268 个差异基因为 b 组所特有。

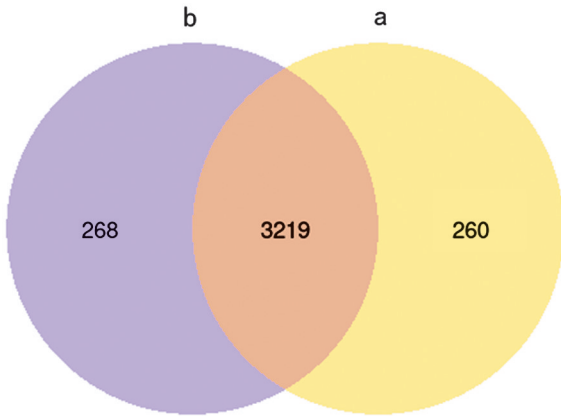


图 3 差异表达基因维恩图  
Fig. 3 Venn map of differentially expressed genes

#### 5 差异表达基因聚类分析

将差异基因的表达水平做层次聚类分析, 结果如图 4。每种颜色代表一种分组, 颜色相近说明基因表达模式也相近。每一行表示一个基因, 每一列表示一个样品。颜色从蓝到红表示  $\log_{10}(\text{FPKM} + 1)$  从小到大。通过基因 ID 在数据库中查找其功能, 在可查到基因中, b 组相较于 a 组与耐药性相关的外排泵基因、生物膜转录因子、及脂多糖组装蛋白相关等基因表达均显著上调。

#### 6 差异基因 GO 富集分析

为了能够直观反映差异表达基因在分子功能和生物过程的分布情况, 采用 GO 富集柱状图分析差异表达基因, 前 30 个富集最显著的 GO term 如图 5。GO 分析表明, 代谢过程、生物合成过程、分子功能、催化活性、离子结合等途径共同参与 OXA-48 菌株的生物过程。

#### 7 差异表达基因的信号通路富集分析

Pathway 显著性富集分析能确定差异表达基因参与的最主要生化代谢途径和信号转导途径。KEGG 是作为 Pathway 相关的主要公共数据库。对两组间差异表达基因的 KEGG 富集分析显示, b 组 pET32a(+)-48-BL21(DE3) 的 DGEs 主要富集到碳代谢、不同环境中的微生物代谢、抗生素的生物合成、嘌呤代谢、次生代谢物的生物合成等(图 6)。

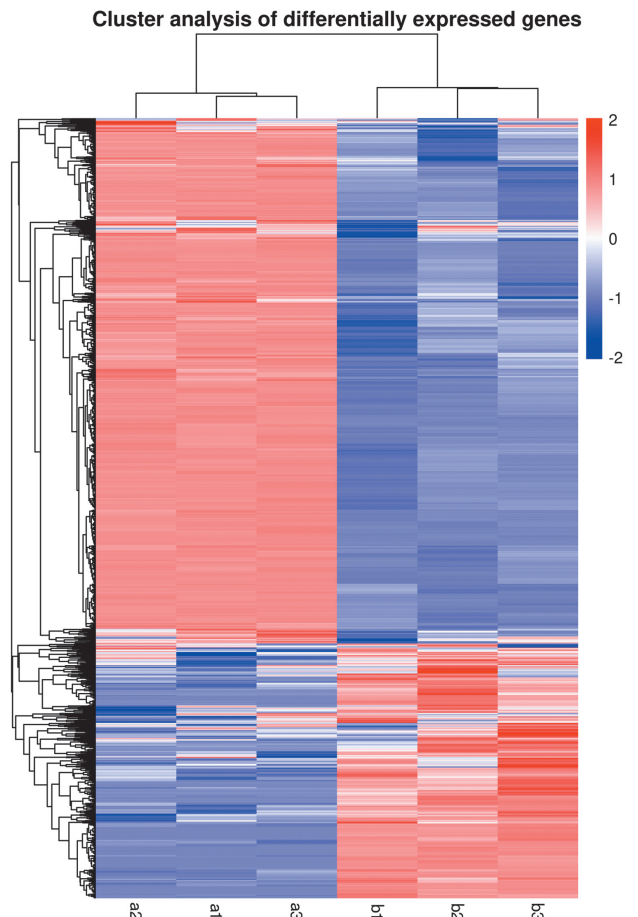


图 4 差异表达基因聚类分析图  
Fig. 4 Cluster analysis of differentially expressed genes

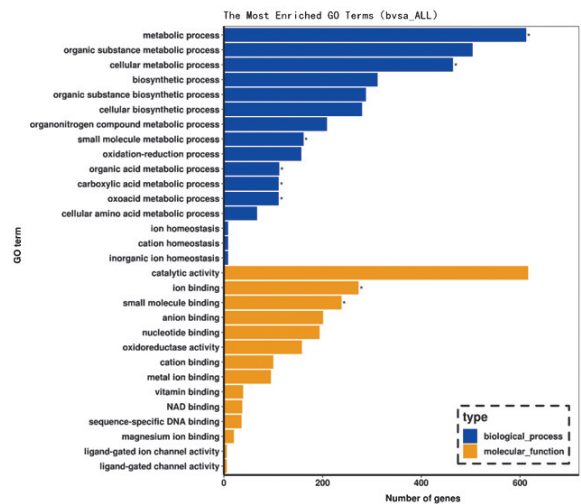


图 5 差异基因 GO 分类  
Fig. 5 GO classification of group b and group a

#### 8 差异表达关键基因分析

为了全面梳理 1201 个差异表达基因与耐药性、生物膜被膜形成及脂多糖生物合成等方面的相关性, 筛选部分相关基因并进行分类整理, 结果见表 3。

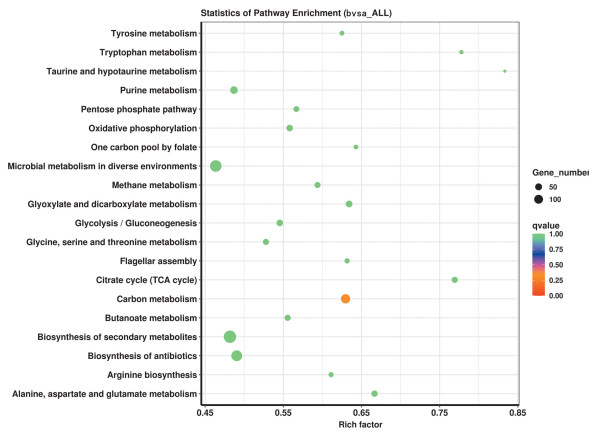


图 6 差异表达基因的 KEGG Pathway 富集  
Fig. 6 KEGG Pathway enrichment of group b and group a

## 讨论

为探究 OXA-48 对 BL21(DE3) 菌株的代谢及耐药性的影响,本研究采用转录组测序技术对 pET32a (+)-OXA-48-BL21 (DE3) 和 pET32a (+)-BL21 (DE3) 进行了转录组测序。测序结果表明, OXA-48 中 DEGs 有 1 201 个,其中上调 592 个,下调 609 个。对 DEGs 进行 GO 富集和 KEGG 富集,有助于探索 OXA-48 对 BL21 (DE3) 菌株耐药性和代谢的影响。结果表明, OXA-48 中的 DGEs 富集到碳代谢、不同环境中的微生物代谢、抗生素的生物合成、嘌呤代谢以及次生代谢物的生物合成。信号通路富集表明, OXA-48 对细菌的影响由众多信号通路共同参与。李会等<sup>[6]</sup>对空肠弯曲菌酰胺醇类诱导耐药株与敏感株进行了转录组分析,发现氯霉素和氟苯尼考耐药菌株中差异表达基因均参与代谢通路、次级生物合成代谢、不同环境中微生物的代谢、核糖体代谢和碳代谢等途径。对耐药菌株进行转录组分析,发现碳代谢直接影响细菌的生长特性。因此,微生物重要的代谢途径碳代谢可能与抗生素耐药性的演变有关。

本研究从  $\beta$ -内酰胺耐药性、生物膜形成、脂多糖生物合成等方面对差异表达关键基因进行分类整理。耐药性方面, *acrA* 和 *acrB* 基因在 OXA-48 组表达上调。有研究表明,由外排泵基因(*acrA*、*acrB*、*tolC*)编码的外膜蛋白 TolC、膜间质融合蛋白 AcrA 和内膜转运蛋白 AcrB 组成 AcrAB-TolC 药物外排泵。AcrAB-TolC 通过从细菌中排出抗生素和其他化合物赋予抗生素抗性,从而产生 MDR 细菌<sup>[7-8]</sup>。其赋予肠道细菌固有的和进化的耐药性,包括大肠埃希菌和鼠伤寒沙门菌。本研究结果显示在 OXA-48 组 BL21(DE3) 中,外排泵基因均表达上调,从而使细菌耐药性增强。多粘菌素能杀灭大多数革兰阴性菌,是治疗 MDR 革兰阴性菌感染的最后手段<sup>[9]</sup>。在革兰阴性菌中,多粘菌

素通过与脂质 A 的初始相互作用发挥其杀菌作用。然而染色体编码的 PEA 转移酶可通过修饰脂质 A 介导多粘菌素的抗性<sup>[10]</sup>。本研究结果显示在 OXA-48 组 BL21(DE3) 中, *EptC* 基因表达上调,从而使细菌耐药性增强。有研究发现在 IPM 治疗下,产 ESBLs 酶和/或 AmpC 酶的大肠埃希菌更能引起对碳青霉烯类抗生素 MIC 值的增高,主要是引起膜孔蛋白 *ompF* 基因表达下调所致。OmpF 是大肠埃希菌重要的外膜亲水性非特异孔道蛋白之一,通过改变外膜的通透性能够适应碳青霉烯类抗生素,导致临床抗感染治疗失败<sup>[11]</sup>。本研究结果显示在 OXA-48 组 BL21 (DE3) 中, *ompF* 表达下调,从而使细菌耐药性增强。

在生物膜形成方面, *pedR* 基因、*mcbR* 基因在 OXA-48 组表达上调。Yu 等<sup>[12]</sup>的研究表明,转录调控因子 McbR 通过抑制周质蛋白 YbiM 调节胞外多糖的产量,从而增加生物膜的形成和粘性。Serra 等<sup>[13]</sup>研究发现,磷酸二酯酶 PdeR 是细胞外基质局部异质性的关键成分,对于大肠埃希菌菌落生物膜的完整性和形态发生至关重要。本研究结果显示在 OXA-48 组 BL21(DE3) 中, *pedR* 和 *mcbR* 均表达上调,从而使细菌生物膜形成能力增强。

在革兰阴性菌中,脂多糖是外膜的重要组成部分,并参与构成细菌的固有免疫<sup>[14]</sup>。而在大多数革兰阴性菌中, Lpt 系统均是运输脂多糖的唯一途径。作为革兰阴性菌所独有的一种强有力的免疫激活剂<sup>[15-16]</sup>,脂多糖通过宿主的 Toll 样受体 4 (TLR4) 激活宿主的炎症反应信号通路,因此脂多糖也常作为主要诱因导致炎症和人体天然免疫反应。Ruiz 等<sup>[17]</sup>在 20 世纪初首次明确脂多糖从胞质到外膜的输出过程和膜上的组装过程需要脂多糖运输蛋白 (Lipopolysaccharide transport proteins, LptABCDEFG) 的参与。本研究结果显示, OXA-48 组 BL21(DE3) 的 *LptD* 基因表达上调,从而影响脂多糖的运输过程。

综上所述, *bla*<sub>OXA-48</sub> 在 BL21 (DE3) 菌株中的表达能调控多种与细菌耐药性及代谢相关基因的表达。对 RNA-seq 的结果作进一步分析,深入研究 *bla*<sub>OXA-48</sub> 耐药基因对于肠杆菌科细菌的影响,可为 OXA-48 菌株的流行病学监测及预防控制感染提供新的参考。

### 【参考文献】

- [1] Nordmann P, Carrer A. Les carbapenemases des enterobacteries [J]. Archives De Pediatrie, 2010, 17 (supp-S4): S154-S162.
- [2] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Vital signs: carbapenem-resistant Enterobacteria-ceae [J]. MMWR, 2013, 62 (9): 165-170.

(下转 926 页)

DOI:10.13350/j.cjpb.230810

• 论著 •

弓形虫钙依赖蛋白激酶 CDPK3 多克隆抗体的制备  
与初步应用\*

李丹, 韩萌, 都建, 安然\*\*

(安徽医科大学基础医学院生物化学教研室, 病原生物学安徽省重点实验室,  
人畜共患病安徽高校省级重点实验室, 安徽合肥 230032)

**【摘要】** 目的 制备抗弓形虫钙依赖蛋白激酶(TgCDPK3)多克隆抗体,为进一步探究 TgCDPK3 在弓形虫中的作用奠定基础。方法 将酶切鉴定正确的原核重组表达载体 pET28a-TgCDPK3 转化 BL21,使用 IPTG 诱导表达重组 TgCDPK3 蛋白,利用 His-Ni Beads 亲和层析法纯化重组 pET-28a-TgCDPK3 蛋白。取纯化蛋白用弗氏佐剂乳化后通过皮下多点注射免疫新西兰大白兔,一周后加强免疫,共 2 次。末次免疫后 1 周取血,分离血清,通过 ELISA 测定抗体效价,Western blot 检测抗血清与内源天然 TgCDPK3 蛋白以及重组表达蛋白 TgCDPK3 的反应性。同时以该抗血清为一抗采用免疫荧光法进行 TgCDPK3 蛋白的定位。结果 pET-28a-TgCDPK3 转化 BL21 后表达相对分子质量为  $59 \times 10^3$  的 His-TgCDPK3 蛋白,纯化后免疫新西兰大白兔,制备的抗血清抗体效价为 1 : 64 000。Western blot 检测该抗血清能识别来源于弓形虫 ME-49 株的 TgCDPK3 蛋白及外源重组 TgCDPK3 蛋白。免疫荧光检测显示 TgCDPK3 定位于弓形虫速殖子膜表面。结论 成功制备 TgCDPK3 多克隆抗体,该抗体效价高且特异性强,可用于相关基础实验,为进一步探究 TgCDPK3 在弓形虫中的作用奠定了基础。

**【关键词】** 弓形虫;TgCDPK3;多克隆抗体;免疫荧光

**【中图分类号】** R382.5

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1673-5234(2023)08-0922-05

[Journal of Pathogen Biology. 2023 Aug;18(8):922-926.]

Preparation and preliminary application of polyclonal antibodies against *Toxoplasma gondii* calcium dependent protein kinase CDPK3

LI Dan, HAN Meng, DU Jian, AN Ran (Department of Biochemistry, School of Basic Medicine, Anhui Medical University, Anhui Key Laboratory of Pathogen Biology, Anhui Provincial Key Laboratory of Zoonoses, Hefei 230032, China)\*\*\*

**【Abstract】** **Objective** to lay a foundation for further investigation of the role of TgCDPK3 in *Toxoplasma gondii*, prepare polyclonal antibodies against calcium dependent protein kinase (TgCDPK3). **Methods** The enzymatically identified prokaryotic recombinant expression vector pET28a-TgCDPK3 was transformed into BL21, and the recombinant TgCDPK3 protein was induced to be expressed in vitro using IPTG. After purification of the recombinant pET-28a-TgCDPK3 protein using His-Ni Beads affinity chromatography, and combined with Freund's adjuvant, New Zealand rabbits were immunized by subcutaneous injection of multiple sites Blood was collected afterwards. The prepared polyclonal antibodies were tested by ELISA to determine their potency and Western Blot to detect their ability to bind endogenous natural TgCDPK3 protein as well as recombinantly expressed TgCDPK3 protein, so as to evaluate the specificity of the polyclonal antibodies, and also applied to observe the localization of TgCDPK3 protein by immunofluorescence technique.

**Results** the pET-28a-TgCDPK3 was transformed into BL21 and expressed His-TgCDPK3 protein with a relative molecular mass of  $59 \times 10^3$ . pET-28a-TgCDPK3 was purified and immunized in New Zealand rabbits, and the antiserum was prepared with an antibody potency of 1 : 64 000. pET-28a-TgCDPK3 recognized TgCDPK3 protein from *Toxoplasma gondii* strain ME-49 and exogenous recombinant TgCDPK3 protein by Western blot. TgCDPK3 protein and exogenous recombinant TgCDPK3 protein. Immunofluorescence showed that TgCDPK3 was localized on the surface of *T. gondii* tachyzoites. **Conclusion** The TgCDPK3 polyclonal antibody was successfully prepared with high potency and specificity, which can be used in relevant basic experiments, laying the foundation for further investigation of the role of TgCDPK3 in *T. gondii*.

**【Key words】** *Toxoplasma gondii*; TgCDPK3; polyclonal antibody; immunofluorescence

\* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 81902084)。

\*\* **【通讯作者】** 安然, E-mail: enron90721@163.com

**【作者简介】** 李丹(2000-),女,河南驻马店人,硕士研究生。主要研究方向:弓形虫致病分子机制。E-mail: lidan00508@163.com

(6);543-550.

[7] Guerina NG, Hsu HW, Meissner HC, et al. Neonatal serologic screening and early treatment for congenital *Toxoplasma gondii* infection. The New England Regional *Toxoplasma* Working Group [J]. *New Eng J Med*, 1994, 330(26):1858-1863.

[8] Liu Q, Wang ZD, Huang SY, et al. Diagnosis of toxoplasmosis and typing of *Toxoplasma gondii* [J]. *Parasit Vect*, 2015, 8:292.

[9] Foroutan M, Ghaffarifar F. Calcium-dependent protein kinases are potential targets for *Toxoplasma gondii* vaccine [J]. *Clin Exp Vac Res*, 2018, 7(1):24-36.

[10] Huang SY, Chen K, Wang JL, et al. Evaluation of protective immunity induced by recombinant calcium-dependent protein kinase 1 (TgCDPK1) protein against acute toxoplasmosis in mice [J]. *Microb Pathogen*, 2019, 133:103560.

[11] Lima TS, Lodoen MB. Mechanisms of human innate immune evasion by *Toxoplasma gondii* [J]. *Front Cell Infect Microbiol*,

2019, 9:103.

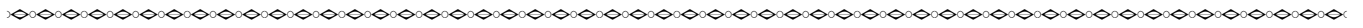
[12] Boudsocq M, Sheen J. CDPKs in immune and stress signaling [J]. *Trend Plant Sci*, 2013, 18(1):30-40.

[13] Lv L, Huang B, Zhao Q, et al. Identification of an interaction between calcium-dependent protein kinase 4 (EtCDPK4) and serine protease inhibitor (EtSerpin) in *Eimeria tenella* [J]. *Parasit Vect*, 2018, 11(1):259.

[14] Treeck M, Sanders JL, Gaji RY, et al. The calcium-dependent protein kinase 3 of *Toxoplasma* influences basal calcium levels and functions beyond egress as revealed by quantitative phosphoproteome analysis [J]. *PLoS Pathogen*, 2014, 10(6):e1004197.

[15] Wallbank BA, Dominicus CS, Broncel M, et al. Characterisation of the *Toxoplasma gondii* tyrosine transporter and its phosphorylation by the calcium-dependent protein kinase 3 [J]. *Molecular microbiology*, 2019, 111(5):1167-1181.

【收稿日期】 2023-02-19 【修回日期】 2023-05-02



(上接 921 页)

[3] Guo L, An J, Ma Y, et al. Nosocomial outbreak of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese Hospital: Clonal transmission of ST147 and ST383 [J]. *PLoS One*, 2016, 11(8): e0160754.

[4] Caicedo-Montoya C, Pinilla L, Toro L F, et al. Comparative analysis of strategies for de novo transcriptome assembly in prokaryotes: *Streptomyces clavuligerus* as a Case Study [J]. *High Throughput*, 2019, 8(4):20.

[5] Gong M, Han Y, Wang X, et al. Effect of temperature on metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* [J]. *Front Microbiol*, 2021, 12:681911.

[6] 李会. 空肠弯曲菌酰胺醇类诱导耐药株与敏感株的组学比较研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2015.

[7] Li X Z, Plesiat P, Nikaido H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2015, 28(2):337-418.

[8] Du D, Wang-Kan X, Neuberger A, et al. Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2018, 16(9):523-539.

[9] Velkov T, Roberts KD, Nation RL, et al. Pharmacology of polymyxins: New insights into an old class of antibiotics [J]. *Future Microbiol*, 2013, 8(6):711-724.

[10] Huang J, Zhu Y, Han M L, et al. Comparative analysis of phosphoethanolamine transferases involved in polymyxin resistance across 10 clinically relevant Gram-negative bacteria [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2018, 51(4):586-593.

[11] Gao J, Han Z, Li P, et al. Outer membrane protein f is involved in biofilm formation, virulence and antibiotic resistance in *Cronobacter sakazakii* [J]. *Microorganisms*, 2021, 9(11):2338.

[12] Yu L, Li W, Qi K, et al. McbR is involved in biofilm formation and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress response in avian pathogenic *Escherichia coli* X40 [J]. *Poult Sci*, 2019, 98(9):4094-4103.

[13] Serra DO, Hengge R. Ac-di-GMP-based switch controls local heterogeneity of extracellular matrix synthesis which is crucial for integrity and morphogenesis of *Escherichia coli* macrocolony biofilms [J]. *J Mol Biol*, 2019, 431(23):4775-4793.

[14] Bryant CE, Spring DR, Gangloff M, et al. The molecular basis of the host response to lipopolysaccharide [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2010, 8(1):8-14.

[15] May JM, Sherman DJ, Simpson BW, et al. Lipopolysaccharide transport to the cell surface; periplasmic transport and assembly into the outer membrane [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2015, 370(1679):20150027.

[16] Narita S, Tokuda H. Biochemical characterization of an ABC transporter LptBFGC complex required for the outer membrane sorting of lipopolysaccharides [J]. *FEBS Lett*, 2009, 583(13):2160-2164.

[17] Ruiz N, Kahne D, Silhavy TJ. Transport of lipopolysaccharide across the cell envelope; the long road of discovery [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2009, 7(9):677-683.

【收稿日期】 2023-02-17 【修回日期】 2023-05-06