

DOI:10.13350/j.cjpb.240203

• 论著 •

乳鼠志贺杆菌分泌蛋白 GroEL 多克隆抗体的制备与鉴定*

刘梦琦, 贾雪娇, 刘洋, 刘长城, 李小凤, 胡屹硕, 赵微**

(锦州医科大学基础医学院病原生物学实验室, 辽宁锦州 121000)

【摘要】 目的 制备志贺杆菌分泌蛋白 GroEL 多克隆抗体, 为探究乳鼠志贺杆菌上清蛋白 GroEL 在乳鼠肠道内的功能奠定基础。方法 利用分子克隆技术构建原核表达蛋白质粒 Pet28a(+)-GroEL, 转化 *Escherichia coli* BL21(DE3) 后采用不同浓度 IPTG 诱导表达, 优化诱导时间和温度, 确定最佳蛋白表达条件; 利用 His 标签亲和层析法纯化 GroEL 蛋白。将纯化蛋白与佐剂按照等比例充分混合后免疫 C57BL/6 小鼠, 制备多克隆抗体血清, 采用 ELISA 检测血清抗体的效价、灵敏度及特异性。构建真核表达质粒 pcDNA3.1(+)-GroEL 并转染 293T 细胞, 48 h 后采用制备的 GroEL 多克隆抗体进行 Western blot 验证。结果 Pet28a(+)-GroEL 转化 *E. coli* BL21(DE3) 菌在 28 °C、0.4 mmol/L IPTG 诱导 12h 获得最佳蛋白表达, 表达的重组蛋白分子质量约为 63 ku, 纯化后的蛋白浓度为 0.735 mg/mL。Western blot 检测显示该蛋白能被抗 His 标签鼠单克隆抗体识别。ELISA 检测显示制备的抗 GroEL 多克隆抗体血清效价为 1 : 128 000; Western blot 检测显示该抗体可识别 GroEL 蛋白。结论 重组表达的 GroEL 蛋白具有抗原性, 制备的鼠抗 GroEL 多克隆抗体血清具有特异性且效价高, 为研究乳鼠志贺杆菌 GroEL 蛋白与肠道病毒之间的作用机制奠定了基础。

【关键词】 志贺菌; GroEL 蛋白; 蛋白纯化; 多克隆抗体制备; 轮状病毒

【文献标识码】 A **【文章编号】** 1673-5234(2024)02-0137-07

[*Journal of Pathogen Biology*. 2024 Feb;19(2):137-143.]

Preparation and characterization of a polyclonal antibody to the secreted protein GroEL of *Shigella lactis*

LIU Mengqi, JIA Xuejiao, LIU Yang, LIU Changcheng, LI Xiaofeng, HU Yishuo, ZHAO Wei

(*Laboratory of Pathogenic Biology, School of Basic Medical Sciences, Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000, China*)

【Abstract】 **Objective** Preparation of polyclonal antibodies to the *Shigella* secretory protein GroEL to lay the foundation for the investigation of the function of the supernatant protein GroEL in the intestine of the suckling rat.

Methods The prokaryotic expression protein pellet Pet28a(+)-GroEL was constructed using molecular cloning technique, and the plasmid was transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3) using different concentrations of IPTG to induce expression, and the induction time and temperature were optimized to determine the best protein expression conditions. The purity and concentration of GroEL protein were obtained by His-tag affinity chromatography. C57BL/6 mice were immunized with the purified protein and adjuvant according to the same proportion, and the polyclonal antibody serum was prepared. The titer, sensitivity and specificity of the antibody were detected by ELISA. The eukaryotic expression plasmid pcDNA3.1(+)-GroEL was constructed and transfected into 293T cells, and the prepared GroEL polyclonal antibody was used for Western Blot detection after 48 h. **Results** The optimal expression of Pet28a(+)-GroEL transformed *E. coli* BL21 (DE3) was obtained at 28 °C and 0.4 mmol/L IPTG for 12 h. The molecular weight of the expressed recombinant protein was about 63 ku and the purified protein concentration was 0.735 mg/mL. Western blot detection showed that the protein could be recognized by anti-His tagged mouse monoclonal antibody. ELISA detection showed that the titer of the prepared anti-GroEL polyclonal antibody was 1 : 128 000; Western blot showed that the antibody could recognize GroEL protein. **Conclusion** The recombinant GroEL protein has antigenicity, and the prepared mouse anti-GroEL polyclonal antibody serum has specificity and high titer, which will lay a foundation for in-depth study of the interaction mechanism between *Shigella* GroEL protein and enterovirus.

【Key words】 *Shigella*; GroEL protein; protein purification; polyclonal antibody preparation; rotavirus

***志贺菌属于革兰阴性菌, 其分泌蛋白包括侵袭相关蛋白 Ipa(A-D) 以及热休克蛋白等^[1-2]。Ipa(A-D) 蛋白由志贺菌毒力质粒 III 型分泌系统 (T3SS) 分泌, T3SS 主要存在于革兰阴性菌, 通过将分泌蛋白跨越细菌及宿主膜直接分泌到宿主细胞从而破坏宿主屏障

* **【基金项目】** 2021 年度辽宁省自然科学基金项目 (No. 2021-MS-334); 辽宁省教育厅基金面上项目 (No. LJKMZ20221243)。

** **【通讯作者】** 赵微, E-mail: zhaowei-v@jzmu.edu.cn

【作者简介】 刘梦琦 (1999-), 女, 山东淄博人, 在读硕士研究生, 主要从事病毒基础方面的研究。E-mail: llmqqqqq@163.com

功能^[3]。热休克蛋白有助于新合成蛋白质的折叠、修复损伤或错误折叠的蛋白质以及防止热休克期间蛋白质的聚集等作用。GroEL 是志贺菌主动分泌的蛋白之一,除伴侣蛋白功能外还有助于粘蛋白的黏附,从而利于病原体的侵袭和定居^[2]。近年来菌群调节成为治疗肠道病毒感染新的研究方向^[4-5]。研究证明肠道微生物群对病毒的感染是双向的^[6-7],例如包括鼠李糖乳杆菌、布拉氏酵母菌在内的益生菌具有缩短腹泻持续时间,消除与 RV 相关症状的作用^[8],而呼肠孤病毒(*Reovirus*)^[9]、诺如病毒(*Norovirus*)^[10]可利用细菌代谢产物或分泌蛋白增强其感染力。

16s 检测表明感染 RV 后的乳鼠肠道菌群发生改变,其中志贺菌载量大幅升高,证实 RV 感染能改变肠道菌群的组成。从该乳鼠粪便中分离得到一株新型非致病性鼠志贺菌,经鉴定后命名为 *Shigella*: No. PRJNA804371^[11]。进一步的实验证明这株新型鼠志贺菌培养上清可影响轮状病毒的复制。有研究表明鼠轮状病毒(*Mouse Rotavirus*, MRV)通过诱导杯状细胞分泌粘蛋白使回肠微生物群发生显著变化,促进病毒感染^[12],表明肠道微生物群中的某些成分对肠道病毒的感染有一定影响。但鼠志贺菌上清中的成分是否会影响 RV 的复制尚不清楚。GroEL 蛋白是通过质谱法筛选出的志贺菌高表达的蛋白质之一,也是志贺菌最丰富的组成性表达和应激诱导伴侣蛋白,在原核和真核生物中普遍存在^[2]。有研究表明,乳酸杆菌上清中的 GroEL 蛋白通过影响促炎因子(如 IL- β 、IFN- α 、TNF- α)的表达预防结肠炎的发生^[13]。有研究表明鼠志贺菌 GroEL 蛋白的同系物 HSP60 对病毒感染有一定影响^[14-15],然而关于 GroEL 蛋白与病毒之间的关系研究尚少。

本实验利用分子克隆的方法构建 GroEL 重组表达载体,并对原核表达条件进行优化,表达的重组蛋白纯化后免疫小鼠,制备多克隆抗体并进行验证,为研究鼠志贺菌 GroEL 蛋白的结构、对 RV 复制影响的体内外分子机制以及肠道菌群与肠道病毒的关系提供实验基础。

材料与方法

1 材料

1.1 菌株、细胞、载体及实验动物 鼠志贺菌(No. PRJNA804371)由本课题组分离自 RV 感染的乳鼠粪便,由锦州医科大学病原生物学实验室保存。人肾上皮细胞(293T)由锦州医科大学病原生物学实验室保存。原核表达载体 Pet28a(+)购于丰晖生物科技有限公司;真核表达载体 pcDNA3.1/His A 载体购自美国 Invitrogen 公司。C57BL/6 小鼠购自辽宁长生生物技术股份有限公司,实验动物生产许可证号:SCXK

(辽)2020-0001。实验动物伦理学审批号:2021014。

1.2 主要试剂 细菌 DNA 基因组提取试剂盒购自无锡百泰克生物技术有限公司;KOD-pLus-Neo 酶购自日本 TOYOBO 公司;限制性内切酶 sal I、Xho I、HindIII 购自日本 TaKaRa 公司;DNA 连接酶购自宝日生物技术有限公司(大连)有限公司;2 × Taq PCR MasterMix 购自北京艾德莱生物科技有限公司;DNA 凝胶回收试剂盒和 DNA 产物纯化试剂盒均购自北京 TIANGEN 公司;氨苄青霉素钠,硫酸卡那霉素,IPTG,PMSF 及溶菌酶均购自北京 Solarbio 公司;His 标签蛋白纯化试剂盒购自常州天地人和科技有限公司;弗氏(补)完全佐剂购、BCA 蛋白浓度测定试剂盒以及 NP-40 裂解液购自上海 Beyotime 生物技术有限公司;MEM 培养基,DMEM 培养基,胎牛血清均购自美国 Gibco 公司;Mouse β -actin mAb、Mouse Anti-His mAb 及 HRP-goat Anti-mouse IgG(H+L)购于北京中杉金桥生物技术有限公司。

2 方法

2.1 引物设计与合成 根据志贺菌分离株(No. PRJNA804371)设计引物并经 BLAST 检测其特异性,测序检测其准确性。引物信息见表 1。

表 1 志贺菌蛋白 GroEL 原核及真核表达引物
Table 1 GroEL prokaryotic and eukaryotic expression primers

构建质粒名称 Construction plasmid name	引物序列 Sequences of primer	限制性内切酶 Restriction endonuclease	产物长度 Product length (bp)
Pet28a(+) -GroEL	F:CGCTCGACATGGCAGCTAAAGACGTAA R:CCGCTCGAGCATCATGCCGCCATGCCA	sal I Xho I	1644
pcDNA3.1(+) -GroEL	F:CCCAAGCTTGCCACCATGGCAGCTAAAGA CGTAA R:CCGCTCGAGCATCATGCCGCCATGCCACC	Xho I HindIII	1644

注:下划线部分为酶切位点。

2.2 志贺菌 DNA 提取及 GroEL 基因扩增 从志贺杆菌中提取 DNA,经过 PCR 反应获得特异性 GroEL 基因片段。反应体系及成分:10 × PCR buffer for KOD-Plus-Neo 酶 5 μ L,2 mmol/L dNTPs 5 μ L,25 mmol/L MgSO₄ 3 μ L,10 mmol/L 上、下游引物各 1 μ L,KOD-Plus-Neo 1 μ L,用 ddH₂O 补足至 50 μ L。反应条件:94 °C 预变性 2 min;变 98 °C 性 10 s,65 °C/67 °C 退火 30 s,68 °C 延伸 45 s,共 30 个循环。PCR 产物经 0.7% 琼脂糖凝胶电泳后切胶,纯化回收 GroEL 基因片段。

2.3 重组质粒的构建和鉴定 取纯化的 GroEL 片段、原核表达载体 Pet28a(+)及真核表达载体 pcDNA3.1(+)分别进行双酶切,条件为 37 °C 3 h。纯化回收酶切片段,电泳验证大小相符的载体片段分别与目的基因片段按照 1 : 7 的比例混合,总体积为

10 μL ,在连接酶的作用下 16 $^{\circ}\text{C}$ 连接 30 min。取连接产物转化 DH5 α 感受态细胞,第 2 d 挑取单克隆菌落进行 PCR 验证,阳性者提取质粒进行双酶切验证,验证正确的重组质粒委托上海杰李公司测序。

2.4 GroEL 目的基因的原核表达及鉴定

2.4.1 重组蛋白的表达及条件优化 将构建的 Pet28a(+)-GroEL 重组质粒转化到 *E. coli* BL21 (DE3) 宿主菌中。第 2 d 取单菌落接种于 150 mL 含 Kana 的新鲜 LB 培养基中(Kana: LB 培养基 = 1 : 1000),37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 摇床振荡培养直至 A_{600} 值为 0.6~0.8 时,设置不同变量对蛋白诱导表达条件进行优化:IPTG 浓度分别为 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mmol/L,诱导温度分别为 20、28、37 $^{\circ}\text{C}$ 、诱导时间分别为 2、4、6、8、10、12 h。

2.4.2 重组 GroEL 蛋白的纯化与鉴定 取最佳诱导条件下培养的重组菌于冰浴环境下超声破碎,每次 4 s、间歇 6 s,总共 2×70 次(功率 200 W,振幅 35%~40%)。然后于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min(离心半径 7.39 cm)离心 10 min,保存上清液,冰浴条件下用 500 μL PBS 吹打沉淀。吸取相同体积的上清、沉淀进行变性,SDS-PAGE 电泳分析 GroEL 蛋白的可溶性表达情况。重组菌经大量诱导表达后根据 His 纯化树脂说明进行亲和层析纯化,收集洗脱液,SDS-PAGE 电泳分析 GroEL 蛋白纯化情况,并进行 Western blot 检测。

2.4.3 纯化重组 GroEL 蛋白的浓度 检测取 25mg/mL 蛋白标准品用 PBS 稀释至终浓度为 0.5 mg/mL,按照 0、4、8、12、16、20 μL 依次加到 96 孔板,再补足 PBS 至 20 μL ,每个浓度 3 个复孔,每孔再加入 200 μL BCA 工作液(试剂 A : B = 50 : 1),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min 后用酶标仪检测 A_{570} 值,以每孔的蛋白含量为横坐标,以每孔对应的 A_{570} 值为纵坐标绘制标准曲线。将 20 μL GroEL 纯化蛋白洗脱液加入 96 孔板孔后同法处理,测定 A_{570} 值,根据标准曲线确定纯化蛋白的浓度。

2.4.4 鼠抗 GroEL 多克隆抗体的制备 取 100 μg 纯化的 Pet28a(+)-GroEL 重组蛋白与弗氏完全佐剂按 1 : 1 混合,乳化后皮下多点注射免疫 C57BL/6 小鼠,2 周后将蛋白与等量不完全弗氏佐剂混合乳化后进行加强免疫,共 3 次,每次间隔 2 周,免疫剂量均为 100 μg /只。末次免疫后经心脏采血,分离血清,-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。同时制备未免疫鼠血清作为阴性对照。

2.4.5 多克隆抗体效价测定 采用 ELISA 法棋盘滴定多克隆抗体的效价。GroEL 蛋白包被浓度分别为 5、0.5、0.05、0.005 $\mu\text{g}/\text{mL}$,免疫鼠血清稀释度依次为 1 : 1000、1 : 2 000、1 : 4000、1 : 8000、1 : 16000、1 :

32000、1 : 64000、1 : 128000,二抗为 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG,显然液为 TMB 显色液。反应结束后加终止液终止反应,在酶标仪 450 nm 处读取吸光度 A 值。将 A 值大于阴性对照 A 值 2.1 倍的最大稀释度为该多克隆血清的抗体效价。

2.4.6 GroEL 多克隆抗体的灵敏度检测 用 PBS 将纯化的 GroEL 蛋白梯度稀释为 8、4、2、1、0.5、0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$,用 1 : 3000 的 GroEL 多克隆抗体血清以及 HRP 标记山羊抗小鼠二抗进行 Western blot;用 PBS 将纯化的 GroEL 蛋白稀释为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$,将制备的 GroEL 多克隆抗体梯度稀释为 1 : 1000、1 : 2000、1 : 3000、1 : 4000、1 : 5000、1 : 6000,然后以 1 : 3000 稀释的 HRP 标记的山羊抗小鼠二抗进行 Western blot,通过以上两种方法验证多克隆抗体识别 GroEL 蛋白的灵敏度。

2.4.7 GroEL 多克隆抗体特异性检测 分别用重组真核表达载体 pcDNA3.1(+)-GroEL 和 pcDNA3.1(+)-Dnak 转染 293T 细胞,使其表达相应的 GroEL、Dnak 蛋白。使用 1 : 3000 鼠源 His 单克隆抗体和鼠抗 GroEL 多克隆抗体进行 Western blot 检测,以验证多克隆抗体的特异性。

2.5 PCDNA3.1(+)-GroEL 真核质粒细胞转染及检测

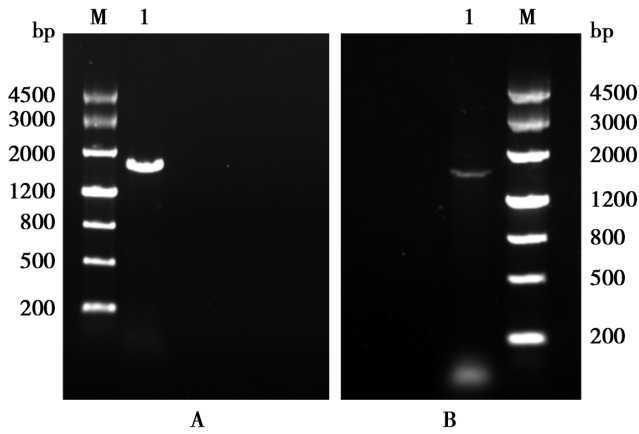
2.5.1 293T 细胞的培养及转染 将 293T 细胞按照每孔 6×10^5 个加入到 6 孔板中培养过夜。待细胞长满至孔底面积的 60%~70%。分别配制 A、B 液。A 液:每孔 200 μL Opti-MEM,8 μL PEI;B 液:200 μL Opti-MEM,每孔 4 μg 重组质粒 PCDNA3.1(+)-GroEL,轻轻混合,室温孵育 5min。将上述两液体混合,室温孵育 15 min 后加入细胞孔中,每孔 400 μL ,再补充 1.6 mL DMEM 培养 48 h。

2.5.2 转染细胞表达蛋白的 Western blot 验证 pcDNA3.1(+)-GroEL 转染 293T 细胞培养后吸弃上清液体,每孔加入 300 μL NP40 裂解,样品经变性、离心后进行 8% SDS-PAGE 分离,15 V 半干转 15 min 至 NC 膜,5%脱脂奶粉封闭 2 h;然后分别以 5%脱脂奶粉 1 : 3000 稀释的鼠抗 β -actin 抗体和 1 : 3000 稀释的鼠抗 His 抗体为一抗,以 1 : 3000 稀释的 HRP 标记山羊抗小鼠 IgG 为二抗进行 Western blot,ECL 显影拍照。

结 果

1 原核、真核 GroEL 基因的扩增及鉴定

采用特异性引物 PCR 扩增原核、真核 GroEL 基因,0.7%琼脂糖凝胶电泳检测扩增片段大小均为 1 644 bp,与理论目标片段大小相一致(图 1)。



A 原核 GroEL 基因 PCR 扩增 M DNA 标志物(DNA Maker III) 1 原核 GroEL 基因 PCR 产物; B 真核 GroEL 基因 PCR 扩增 M DNA 标志物(DNA Maker III) 1 真核 GroEL 基因 PCR 产物。

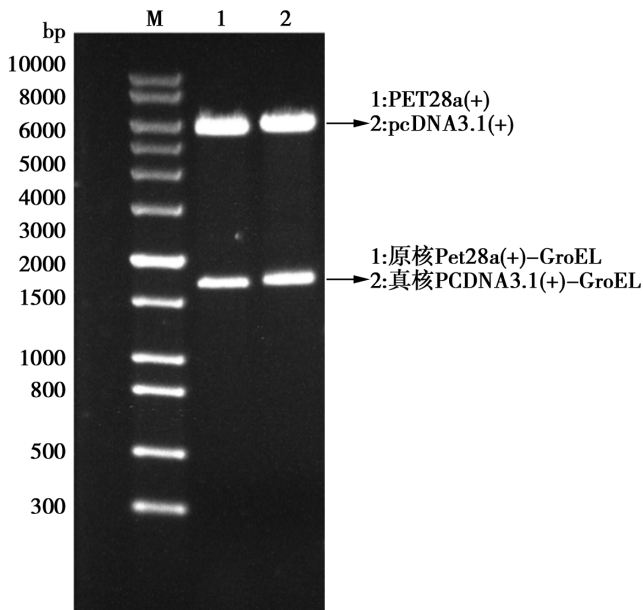
图 1 原核 GroEL 基因和真核 GroEL 基因的 PCR 扩增

A Prokaryotic GroEL gene PCR amplification M DNA Maker III 1 Prokaryotic gene; B Eukaryotic GroEL gene PCR amplification M DNA Maker III 1 eukaryotic gene

Fig. 1 PCR amplification of prokaryotic GroEL gene and eukaryotic GroEL gene

2 重组载体的构建与鉴定

分别以原核、真核 GroEL 基因 PCR 产物构建重组质粒 Pet28a (+)-GroEL 和 pcDNA3. 1 (+)-GroEL, 经双酶切得到的酶切片大小与预期相符(图 2)。经测序, 所得序列与志贺菌 GroEL 蛋白基因序列相一致(图 3、4), Pet28a (+)-GroEL 和 pcDNA3. 1 (+)-GroEL 重组质粒构建正确。



M DNA 标志物 1 原核 Pet28a(+)-GroEL 重组质粒双酶切 2 真核 pcDNA3. 1(+)-GroEL 重组质粒双酶切

图 2 原核、真核重组质粒双酶切验证

M 1kb plus DNA Ladder 1 Pet28a (+)-GroEL double digestion product 2 pcDNA3. 1(+)-GroEL double digestion product

Fig. 2 Verification of recombinant plasmid by double enzyme digestion

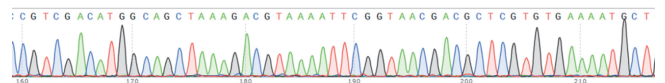


图 3 Pet28a (+)-GroEL 测序鉴定图(部分截图)

Fig. 3 Sequencing identification map of Pet28a (+)-GroEL (partial screenshot)

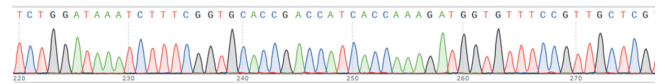
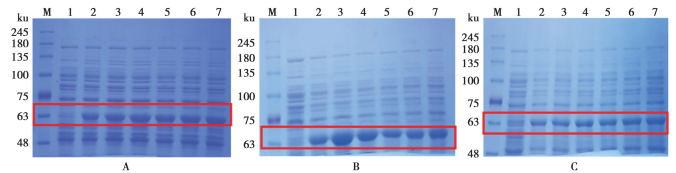


图 4 pcDNA3. 1 (+)-GroEL 测序鉴定图(部分截图)

Fig. 4 Sequencing identification map of pcDNA3. 1 (+)-GroEL (partial screenshot)

3 Pet28a (+)-GroEL 重组蛋白的表达及条件优化

重组蛋白表达条件的优化如图 5 和图 6, 其最适表达条件为终浓度 0. 4 mmol/L IPTG 28 °C 诱导 12 h。将表达菌超声破碎, 分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE, 结果见图 7, 重组蛋白主要以可溶性形式表达。

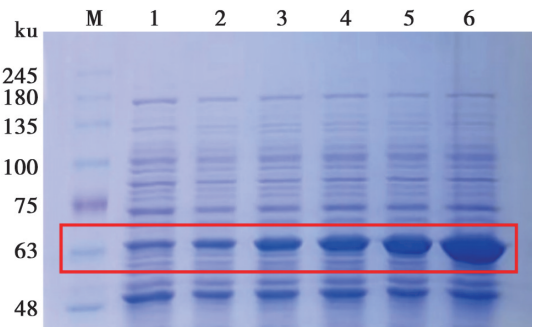


A 诱导温度为 20°C B 诱导温度为 28°C C 诱导温度为 37°C M 蛋白质分子质量标准 1~7 IPTG 诱导浓度依次为 0、0. 2、0. 4、0. 6、0. 8、1. 0、1. 2 mmol/L

图 5 不同温度、不同 IPTG 浓度诱导 12 h Pet28a (+)-GroEL 转化菌目的蛋白表达量

A Induction temperature was 20°C B Induction temperature was 28 °C C Induction temperature was 37 °C M CoolorMixed protein marker1-7Concentration of IPTG induction followed by 0. 0. 2, 0. 4, 0. 6, 0. 8, 1. 0, 1. 2 mmol/L

Fig. 5 12 h, different temperature, different IPTG concentration Pet28a (+)-GroEL mycoprotein expression quantity

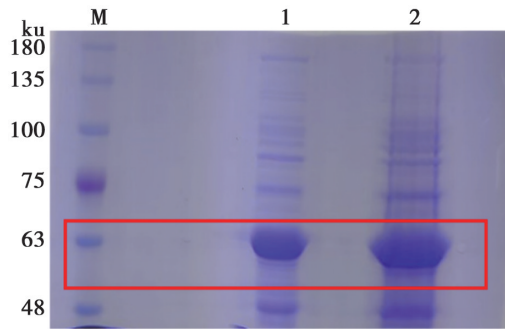


M 蛋白质分子质量标准 1~6 分别为 IPTG 诱导 2、4、6、8、10、12 h

图 6 28 °C、0. 4 mmol/L IPTG 诱导不同时间 Pet28a (+)-GroEL 转化菌目的蛋白表达量

M CoolorMixed protein marker 1-6 Whole bacterial protein induce at 28°C for 2, 4, 6, 8, 10, 12 h

Fig. 6 28 °C, IPTG tendency for 0. 4 mmol/L, different time all bacteria Pet28a (+)-GroEL mycoprotein expression quantity



M 蛋白质分子质量标准 1 GroEL-PET28a(+)重组表达菌超声破碎上清 2 GroEL-PET28a(+)重组表达菌超声破碎沉淀

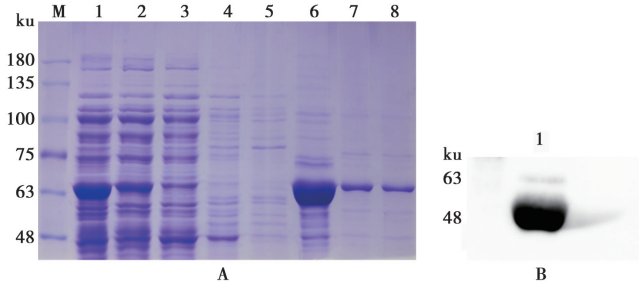
图7 GroEL-PET28a(+)转化菌表达蛋白的可溶性分析

M CoolorMixed Protein Marker 1 Supernatant 2 Precipitate

Fig. 7 Expression of soluble GroEL-PET28a(+)

4 重组蛋白的纯化

取重组表达菌超声破碎上清液进行 HisPurNi NAT Column 柱层析纯化,收集所有组分进行 SDS-PAGE 检测,结果见图 8A,目的蛋白主要存在于分段洗脱液 6 中。经 Western blot 检测,纯化融合蛋白能被鼠抗 His 单抗识别,反应条带位于 63 ku 处(图 8B)。



A 纯化 GroEL 重组蛋白的 SDS-PAAGE 分析 M 蛋白质分子质量标准 1 过柱前上清液 2 过柱后流出液 3~5 洗杂液 6~8 分段洗脱液; B 纯化 GroEL 蛋白的 Western blot 鉴定 M 蛋白质分子质量标准 1 纯化蛋白与相应抗体反应条带

图8 纯化 Pet28a(+)-GroEL 重组蛋白的 SDS-PAGE 分析及 Western blot 验证

A Purification of recombinant protein M CoolorMixed Protein Marker 1 Pre-column supernatant 2 Post-column effluent 3-5 Cleaning solution 6-8 Elution Liquid; B Western blot validation of GroEL purified proteins 1 Elution Liquid

Fig. 8 Purification of Pet28a(+)-GroEL recombinant protein and Western blot verification

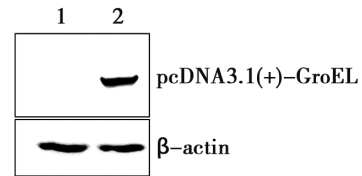
5 重组真核表达质粒的验证

将 pcDNA3.1(+)-GroEL 转染至 293T 细胞后使用鼠抗 His 单克隆抗体进行 Western blot 检测,结果如图 9,表达的 GroEL 蛋白能被相应抗体识别,反应条带位于 63 ku 处。pcDNA3.1 空载体无此反应条带。

6 GroEL 纯化蛋白浓度测定

采用 BCA 方法对系列浓度的标准蛋白进行检测,根据对应的 A_{570} 值绘制从 0.025 至 0.5 mg/mL 的标

准曲线,获得的曲线函数方程为 $y = 0.9244x + 0.1073$ (y 为蛋白浓度, x 为洗脱液吸光度 A 值; $R^2 = 0.9955$)。 R^2 大于 0.99 表明线性化好(图 10)。纯化蛋白采用 BCA 方法测定蛋白含量,即将酶标仪测定的 GroEL 洗脱液的 A_{570} 平均值代入曲线函数方程,计算相应的蛋白浓度。其中分段洗脱液 6 的蛋白浓度为 0.735 mg/mL。



1 真核载体 pcDNA3.1(+)对照 2 重组真核质粒转染细胞表达产物与相应抗体反应条带

图9 重组真核表达质粒 GroEL 转染 293T 细胞的验证

1 Eukaryotic vector pcDNA3.1(+) 2 Recombinant eukaryotic plasmid pcDNA3.1(+)-GroEL

Fig. 9 Validation of recombinant eukaryotic expression plasmid GroEL transfected with 293T cells

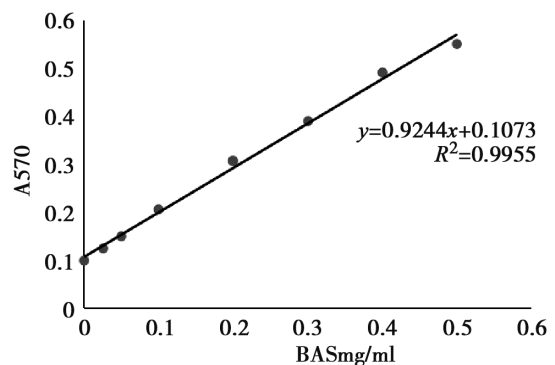


图10 蛋白洗脱液吸光度-浓度曲线

Fig. 10 Absorbance-concentration curve of protein eluent

7 鼠抗 GroEL 蛋白多克隆抗体的鉴定

7.1 GroEL 多抗效价 将制备的多克隆抗体血清按比例梯度稀释,采用 ELISA 检测不同稀释度的免疫血清及对照血清的 A_{450} 值,计算两者比值,以能保证比值大于 2.1 的最低血清稀释度作为终点效价,结果如图 11。当 GroEL 包被浓度为 0.05 $\mu\text{g/mL}$ 时,多克隆抗体效价为 1 : 128000。

7.2 GroEL 多抗的灵敏度 以 GroEL 重组蛋白为抗原采用 Western blot 检测 GroEL 多克隆抗体的灵敏度,结果如图 12 和图 13。GroEL 多克隆抗体在 1 : 3000 稀释度时识别 GroEL 重组蛋白的最低浓度为 0.25 $\mu\text{g/mL}$;在 GroEL 蛋白浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ 时,可被最低稀释度 1 : 6000 的 GroEL 多克隆抗体识别。

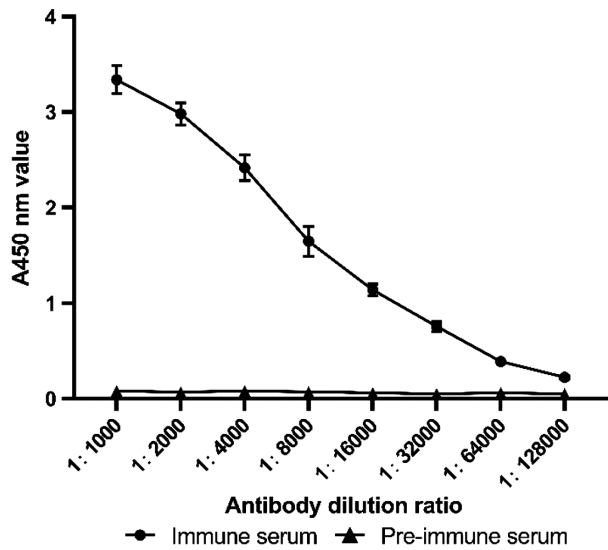
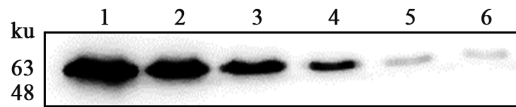


图 11 重组蛋白免疫鼠血清抗体效价
Fig. 11 Serum antibody titer of mice immunized with recombinant protein

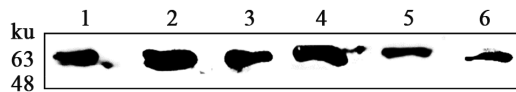


1~6 GroEL 蛋白浓度依次为 8.4、2.1、0.5、0.25 µg/mL

图 12 基于 GroEL 多克隆抗体的 Western blot 检测纯化 GroEL 蛋白的灵敏度

1-6 GroEL protein concentrations were in the order of 8.4, 2.1, 0.5, 0.25 µg/mL

Fig. 12 Sensitivity of Western blot detection of purified GroEL proteins based on GroEL polyclonal antibodies



1~6 GroEL 多克隆抗体稀释度分别为 1:1000, 1:2000, 1:3000, 1:4000, 1:5000, 1:6000

图 13 不同稀释度 GroEL 多克隆抗体的 Western blot 检测

1-6 GroEL polyclonal antibody dilution gradients of 1:1000, 1:2000, 1:3000, 1:4000, 1:5000, 1:6000

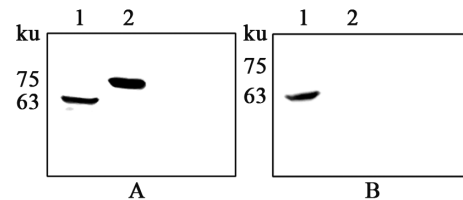
Fig. 13 Western blot detection of GroEL polyclonal antibodies at different dilutions

7.3 GroEL 多克隆抗体的特异性 采用 Western blot 检测 GroEL 多克隆抗体的特异性。图 14A 显示, pcDNA3.1(+)-GroEL 和 pcDNA3.1(+)-Dnak 表达的蛋白均能被鼠抗 His 单克隆抗体识别。图 14B 显示, pcDNA3.1(+)-GroEL 表达蛋白能被 GroEL 多克隆抗体识别, 而 Dnak 蛋白(70 ku)不被该抗体识别(图 14B)。

讨论

腹泻是全球性健康问题, RV 是引起儿童腹泻的常见病原体。近年来由于 RV 感染的减少及疫苗的使用, 志贺菌在致腹泻病原体中的比例增加^[16]。志贺菌

由于具有动态的基因组使其能在不同的宿主及环境中存活, 因其入侵结肠上皮从而导致严重的肠道炎症反应和肠上皮细胞破坏的发生^[17]。肠道益生菌通过竞争性结合阻断病毒与靶细胞的结合、稳定病毒粒子、代谢产物与病毒结合等几种机制影响病毒感染。RV 是由三层蛋白质衣壳层组成的无包膜 dsRNA 病毒, 基因组由 11 个基因组片段组成, 编码 6 种结构蛋白 (VP1-VP4、VP6、VP7) 和 6 种非结构蛋白 (NSP1-NSP6)^[18]。RV 侵入细胞是一个复杂的多步骤过程, 涉及病毒与细胞间的反应机制^[19]。RV 后天通过阻断干扰素的信号转导、蛋白泛素化增强结合亲和力等许多策略来逃避宿主的先天免疫反应^[20], 这使有效防控和下一代疫苗的开发难度增加。



A 基于 His 单克隆抗体的 Western blot 1 pcDNA3.1(+)-GroEL 表达蛋白与 His 单克隆抗体反应条带 2 pcDNA3.1(+)-Dnak 表达蛋白与 His 单克隆抗体反应条带; B 基于 GroEL 鼠多抗的 Western blot 1 pcDNA3.1(+)-GroEL 表达蛋白与 GroEL 鼠多抗反应条带 2 pcDNA3.1(+)-Dnak 对照

图 14 GroEL 多克隆抗体特异性检测

A Western blot based on His monoclonal antibody 1 Strips of pcDNA3.1(+)-GroEL-expressed protein reacting with His monoclonal antibody 2 Strips of pcDNA3.1(+)-Dnak-expressed protein reacting with His monoclonal antibody B Western blot based on GroEL mouse multi-antibody 1 pcDNA3.1(+)-GroEL-expressed protein reacts with GroEL mouse multi-antibody bands 2 pcDNA3.1(+)-Dnak control

Fig. 14 GroEL polyclonal antibody specific assay

GroEL 是细菌的代谢产物, 其核心功能在于促进和加速蛋白质的折叠, 对细胞内蛋白质的运输有重要作用, 并且是细菌感染以及自身免疫性疾病的重要分子^[21]。GroEL 由细菌主动分泌, 作为细胞外信号分子对宿主的免疫系统产生影响^[22]。有研究认为 GroEL 通过 NF-κB 和 JNK/MAPK 通路刺激成骨细胞, 促进明胶酶的分泌^[23]。GroEL 在布鲁氏菌、无乳链球菌等有着较好的免疫保护效果^[24-25], 新型鼠志贺菌的 GroEL 蛋白是否具有此类作用尚不清楚, 因此研究鼠志贺菌 GroEL 蛋白对 RV 复制的影响有助于进一步完善肠道微生物群与病毒之间的相互作用关系。

本次研究采用原核表达体系中的 PET 载体构建 GroEL 重组质粒, 表达的 GroEL 主要富集在重组菌超声破碎上清中, 与 Dias 等^[12]通过原核表达系统表达蛋白的结果相一致。将 GroEL 蛋白纯化后免疫 C57BL/6 小鼠, 制备的多克隆鼠血清具有较高的抗体效价及 Western blot 检测灵敏度, 能识别真核表达的

GroEL 蛋白,为进一步探究鼠志贺菌 GroEL 蛋白与 RV 的相互作用机制和对于肠道微环境变化的影响,以及志氏菌亚单位疫苗的研发奠定了基础。

【参考文献】

- [1] Schnupf P, Sansonetti PJ. *Shigella* pathogenesis: New insights through advanced methodologies [J]. Microbiol Spectr, 2019, 7 (2).
- [2] Fourie KR, Wilson HL. Understanding GroEL and DnaK stress response proteins as antigens for bacterial diseases [J]. Vaccines (Basel), 2020, 8(4):773.
- [3] Hotinger JA, Pendergrass HA, May AE. Molecular targets and strategies for inhibition of the bacterial type III secretion system (T3SS); inhibitors directly binding to T3SS components [J]. Biomolecules, 2021, 11(2):316.
- [4] Shi Z, Zou J, Zhang Z. Segmented filamentous bacteria prevent and cure rotavirus infection [J]. Cell, 2019, 179 (3): 644-658. e13.
- [5] Alamdary SZ, Bakhshi B, Soudi S, et al. The anti-apoptotic and anti-inflammatory effect of *Lactobacillus acidophilus* on *Shigella sonnei* and *Vibrio cholerae* interaction with intestinal epithelial cells; A comparison between invasive and non-invasive bacteria [J]. PLoS One, 2018, 13(6):e0196941.
- [6] Desselberger U. Significance of the gut microbiome for viral diarrheal and extra-intestinal diseases [J]. Viruses, 2021, 13(8): 1601.
- [7] Domínguez-Díaz C, García-Orozco A, Riera-Leal A, et al. Microbiota and its role on viral evasion: is it with us or against Us? [J] Front Cell Infect Microbiol, 2019, 9:256.
- [8] Kim AH, Hogarty MP, Harris VC, et al. The complex interactions between rotavirus and the gut microbiota [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021, 10:586751.
- [9] Berger AK, Yi H, Kearns DB, et al. Bacteria and bacterial envelope components enhance mammalian reovirus thermostability [J]. PLoS Pathog, 2017, 13(12):e1006768.
- [10] Bhar S, Zhao G, Bartel JD, et al. Bacterial extracellular vesicles control murine norovirus infection through modulation of antiviral immune responses [J]. Front Immunol, 2022, 13: 909949.
- [11] 于美玲, 陆恒章, 陶晓莉. 轮状病毒感染致腹泻乳鼠模型粪便中志贺杆菌的分离、鉴定及其对人克隆结肠腺癌细胞中紧密连接蛋白表达的影响[J]. 吉林大学学报(医学版), 2021, 47 (05): 1221-1228.
- [12] Pea-Gil N, Santiso-Bellon C, Gozalbo-Rovira R, et al. The role of host glyco-biology and gut microbiota in rotavirus and norovirus infection, an update [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(24):13473.
- [13] Dias AMM, Douhard R, Hermetet F, et al. *Lactobacillus* stress protein GroEL prevents colonic inflammation [J]. J Gastroenterol, 2021, 56(5):442-455.
- [14] Perez C, Rico J, Guerrero C, et al. Role of heat-shock proteins in infection of human adenocarcinoma cell line MCF-7 by tumor-adapted rotavirus isolates [J]. Colomb Med (Cali), 2021, 52 (1):e2024196.
- [15] Rico J, Perez C, Guerrero R, et al. Implication of heat shock proteins in rotavirus entry into Reh cells [J]. Acta Virol, 2020, 64(4):433-450.
- [16] Baker S, The HC. Recent insights into *Shigella* [J]. Curr Opin Infect Dis, 2018, 31(5):449-454.
- [17] Raso MM, Arato V, Gasperini G, et al. Toward a *Shigella* vaccine: Opportunities and challenges to fight an antimicrobial-resistant pathogen [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(5):4649.
- [18] Amimo JO, Raev SA, Chepngeno J, et al. Rotavirus interactions with host intestinal epithelial cells [J]. Front Immunol, 2021, 12:793841.
- [19] Arias CF, Lopez S. Rotavirus cell entry; not so simple after all [J]. Curr Opin Virol, 2021, 48:42-48.
- [20] Antia A, Pinski AN, Ding S. Re-Examining rotavirus innate immune evasion; Potential applications of the reverse genetics system [J]. mBio, 2022, 13(4):e0130822.
- [21] Ranford JC, Henderson B. Chaperonins in disease: mechanisms, models, and treatments [J]. Mol Pathol, 2002, 55(4):209-13.
- [22] Shin H, Jeon J, Lee JH, et al. *Pseudomonas aeruginosa* GroEL stimulates production of PTX3 by activating the NF- κ B pathway and simultaneously downregulating MicroRNA-9 [J]. Infect Immun, 2017, 85(3):e00935-16.
- [23] Zhang L, Cheng L, Cui Y, et al. The virulence factor GroEL directs the osteogenic and adipogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells through the involvement of JNK/MAPK and NF- κ B signaling [J]. J Periodontol, 2021, 92 (11):103-115.
- [24] Abbassi-Dalooi T, Yousefi S, Sekhavati MH, et al. Impact of heat shock protein 60KD in combination with outer membrane proteins on immune response against *Brucella melitensis* [J]. APMIS, 2018, 126(1):65-75.
- [25] Li W, Li Y, Hu YZ, et al. GroEL, a novel vaccine candidate of piscine *Streptococcus agalactiae* identified by immunoproteome [J]. Fish Shellfish Immunol, 2019, 84:377-383.

【收稿日期】 2023-08-29 【修回日期】 2023-11-14