

doi: 10.3969/j.issn.1008-0589.2013.01.15

M 细胞靶向肽对 FaeG 抗原的免疫增强作用

高 菲, 崔 文, 姜艳萍, 唐丽杰, 葛俊伟*, 李一经*

(东北农业大学 动物医学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘 要: 为研究 M 细胞靶向肽 co1 的免疫增强作用, 本研究从肠产毒性大肠杆菌 (ETEC) 全基因组中扩增 FaeG 基因, 通过重叠延伸 PCR 的方法将人工合成的 co1 靶向肽编码序列连接到 FaeG 基因的 3' 端, 获得 FaeG-co1 融合基因。并分别将 FaeG 和 FaeG-co1 基因克隆到 pET-30b 表达载体中, 转化于大肠杆菌 BL21(DE3) 进行表达。SDS-PAGE 和 western blot 分析显示, FaeG 和 FaeG-co1 基因在大肠杆菌中均获得了高效表达, 表达产物主要以包涵体形式存在。分别用两种重组菌表达的包涵体免疫昆明鼠, 测定特异性 IgG、sIgA 抗体水平, 并用 ETEC 强毒株对免疫鼠进行攻毒。结果表明, FaeG-co1 重组蛋白免疫小鼠诱导机体产生的特异性 IgG 和 sIgA 抗体水平均显著高于 FaeG 组; FaeG-co1 组两次免疫后即可对 ETEC 致死剂量的攻毒保护率达到 100%。这些结果表明 M 细胞靶向肽对抗原具有免疫增强作用, 是一种极具应用前景的免疫增强分子。

关键词: 靶向肽; 免疫增强; 免疫保护

中图分类号: S852.6

文献标识码: A

文章编号: 1008-0589(2013)01-0062-05

Immune-enhancement effect of the M cell-targeting ligand to FaeG antigen

GAO Fei, CUI Wen, JIANG Yan-ping, TANG Li-jie, GE Jun-wei*, LI Yi-jing*

(College of Veterinary Medicine, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: To study the immune-enhancement effect of the M cell-targeting ligand co1, FaeG gene was amplified from chromosomal DNA of Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) by PCR, and fused with the synthesized co1 gene on 3' terminal of the FaeG gene by SOE-PCR. The gene of FaeG or FaeG-co1 was inserted into pET-30b and transformed into BL21 (DE3) for expression, respectively. The SDS-PAGE and western blot analysis showed that FaeG and FaeG-co1 gene was highly expressed in *E.coli* and mainly in the form of inclusion body. Furthermore, Kunming mice were twice immunized with the inclusion body of the recombinant proteins, respectively, and challenged with the ETEC at a dose of 1 LD₅₀. The results showed that the mice in FaeG-co1 group were completely protected against ETEC challenge, but only 80% protection in FaeG group. In addition, the specific IgG and sIgA antibody titers in FaeG-co1 group were significantly higher than that of FaeG group. These results suggest that the M cell-targeting peptide of co1 has immune-enhancing activity to the antigen, which is a promising immune-enhancing molecule.

Key words: targeting ligand; immune enhancement; immune protection

产肠毒素大肠杆菌 (Enterotoxigenic *Escherichia coli*, ETEC) 是新生仔猪和断奶仔猪腹泻的 (Porcine

post-weaning diarrhea, PWD) 主要原因之一, ETEC 引起腹泻主要是通过其表面的菌毛黏附素 (F4、F5、

*Corresponding author

收稿日期: 2012-10-22

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31101845)

作者简介: 高 菲 (1986-), 女, 黑龙江哈尔滨人, 硕士研究生, 主要从事动物新型疫苗研究。

* 通信作者: E-mail: yijingli@163.com; gejunwei@gmail.com

F6 和 F41 等)吸附于肠道上皮细胞, 然后产生肠毒素而致病。ETEC 的菌毛和肠毒素被认为是最主要的致病因素, 其中菌毛与小肠上皮结合是感染及致病的关键环节。阻止 ETEC 定殖, 将有可能预防 PWD 的发生。

FaeG 是黏附素蛋白 F4 的主要蛋白的亚基, 位于菌毛的顶端, 直接参与易感宿主肠上皮细胞大分子受体的特异性结合^[1], 已成为预防 PWD 的疫苗候选抗原。

肠道内大多数抗原是通过 M 细胞转运, 其胞吞转运作用是 Peyer's 结获取抗原的主要来源。研究表明, 将抗原靶向传递至 M 细胞, 可以提高 Peyer's 结的抗原摄取量, 激活更多的 T、B 细胞参与免疫反应。靶向肽 co1 能够有效的将融合蛋白传递给 M 细胞, 增强免疫反应, 与 LTB、CTB 相比, co1 对融合蛋白的大小没有限制, 不会影响抗原蛋白的正常组装, 可以重复用于免疫^[2,3]。

本实验通过 PCR 的方法扩增 FaeG-co1 融合基因, 通过原核表达制备融合蛋白, 免疫小鼠后, 经 *E.coli* 强毒株攻毒, 通过对比 M 细胞靶向修饰组和未修饰组 IgG、sIgA 抗体水平的变化及其对小鼠的免疫保护情况, 检测 M 细胞靶向肽 co1 对 FaeG 疫苗免疫原性的影响, 为进一步研究其基因工程疫苗提供了实验依据。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒 ETEC cvcc230 菌株购自中国兽药监察所; *E.coli* BL21 (DE3) 和表达载体 pET-30b 由本实验室保存; 感受态 JM109 和 pMD18-T 载体购自 TaKaRa 公司。

1.2 主要试剂 限制性核酸内切酶, Taq DNA 聚合酶、dNTP、T4 DNA 连接酶、Protein Marker 购自 TaKaRa 公司; 小量质粒纯化及胶回收试剂盒购自中科瑞泰(北京)生物科技有限公司; 氢氧化铝胶购自哈药集团生物疫苗有限公司; FaeG 多克隆抗体由刘文鑫博士惠赠^[4]; 羊抗鼠 HRP-IgG、HRP-IgA、羊抗鸡 HRP-IgG 购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 实验动物 体质量为 18 g~20 g, 6 周龄~8 周龄昆明鼠, 清洁级, 购自哈尔滨兽医研究所, 饲养于 P2 实验室的动物感染室 IVC 中。

1.4 目的基因的克隆与鉴定 根据已发表的 ETEC

基因序列(CP002732), 设计并合成 PCR 扩增 FaeG 基因的上下游引物, 引物序列分别是 P1: 5'-GGATCCATGGATGACTGGTGA-3' (*Bam*H^I); P2: 5'-CTCGAGGTAATAAGTAATTGCT-3' (*Xho*I); 根据报道^[2], 设计合成一条编码 M 细胞靶向肽 co1 基因序列作为引物 P3: (*Sal*I) 5'-GTCGACCGGCAGAGGC GACCGCGCCGGCAGCTGATGAAACGACTCGAG-3' (*Xho*I), 用于扩增 FaeG-co1 融合基因。以 ETEC 全基因组 DNA 为模版, 以 P1 和 P2 扩增 FaeG 基因, 将 FaeG 胶回收并将其作为模版, 以 P1 和 P3 作为引物扩增 FaeG-co1 基因。扩增条件为: 95 °C 5 min; 94 °C 40 s、53 °C 40 s、72 °C 60 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。分别将 FaeG 和 FaeG-co1 的胶回收产物克隆于 pMD18-T 中构建重组质粒 pMD-FaeG 和 pMD-FaeG-co1, 并进行测序鉴定。

1.5 重组菌的构建、诱导表达及鉴定 采用 *Bam*H^I 和 *Xho*I 对 pMD-FaeG 和 pET30b 进行双酶切, *Bam*H^I 和 *Sal*I 对 pMD-FaeG-co1 进行双酶切, 回收目的片段, 将目的基因亚克隆于 pET-30b 表达载体中, 转化至受体菌, 构建重组菌株 pET-FaeG/BL21 (DE3)、pET-FaeG-co1/BL21 (DE3)。将重组菌扩大培养, 当 OD_{600nm} 约为 0.4 时, 加 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 37 °C 摇床 180 r/min 诱导 4 h, 离心收集菌体进行超声破碎, 离心后收集上清与沉淀, 进行 SDS-PAGE 分析, 确定表达蛋白的存在形式。将重组菌经 SDS-PAGE 分析后转印于硝酸纤维素膜, 5% 脱脂乳 4 °C 封闭过夜。以 FaeG 多抗作为一抗, 羊抗鸡 HRP-IgG 为二抗, 通过二氨基联苯胺(DAB) 显色进行 western blot 鉴定。

1.6 包涵体制备 经 IPTG 诱导的重组菌培养物离心收集菌体, 重悬于 50 mmol/L Tris·HCl 22 mmol/L EDTA 中, 加入溶菌酶至终浓度 100 μg/mL, 再加入 0.5 mL 1% Triton X-100, 于 30 °C 温育 30 min。经超声波裂解 10 min 后, 12 000 r/min 离心 15 min, 收集沉淀物, 重悬后备用。以提取的包涵体为材料, 按 Biotek 说明书纯化蛋白。

1.7 小鼠最小致死剂量(MLD)的确定 用 LB 培养基将 ETEC cvcc230 菌液分别稀释为 1.0×10⁷ cfu/mL、5.0×10⁷ cfu/mL、1.0×10⁸ cfu/mL、5.0×10⁸ cfu/mL、1.0×10⁹ cfu/mL、5.0×10⁹ cfu/mL 6 个不同浓度, 分别口服接种 6 组小白鼠, 每组 5 只, 每只 0.2 mL, 接种后观察小鼠的死亡状况, 确定 MLD。

1.8 免疫保护性试验 将 FaeG、FaeG-co1 包涵体悬液，分别加等量的氢氧化铝胶混均后通过腹腔途径免疫小鼠，每组 10 只，每只 50 μ g，设立注射生理盐水对照组。14 d 后以相同剂量和接种途径进行加强免疫；在第二次免疫 14 d 后，口服接种 1 ML D 的 *E.coli* 强毒株进行攻毒试验。攻毒后对小鼠进行监测，统计其发病和死亡情况。

1.9 免疫小鼠特异性 IgG、sIgA 测定 分别采集免疫前、初次免疫后第 7 d、21 d 以及攻毒后第 7 d 血液及小鼠粪便，制备血清，每 0.1 g 粪便加入 0.5 mL 提取液，振荡 30 min，10 000 r/min 离心 5 min，收集上清，采用间接 ELISA 方法检测抗体效价。方法如下，以 FaeG 蛋白包被 ELISA 反应板 0.1 μ g/孔，4 $^{\circ}$ C 反应过夜；洗涤 3 次后用含有 5% 脱脂乳的 PBST 液 37 $^{\circ}$ C 封闭 2.5 h；洗涤后分别加入 1:6 400 稀释的小鼠血清、处理好的粪便上清，37 $^{\circ}$ C 反应 1 h；分别加入 1:5 000 稀释的羊抗鼠 HRP-IgG、HRP-IgA，37 $^{\circ}$ C 反应 1 h；加 OPD-H₂O₂ 底物显色液，避光显色 10 min，加终止液测定 OD_{490nm}。

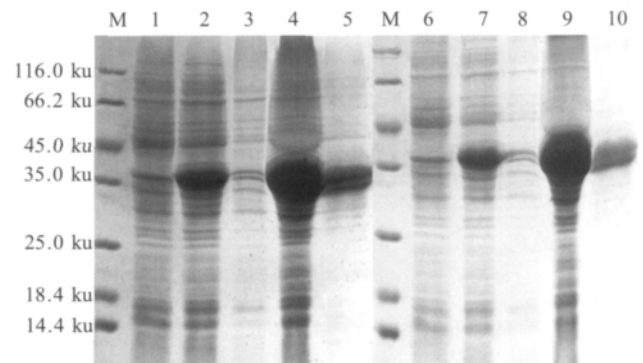
2 结果

2.1 FaeG 及 FaeG-co1 基因的克隆与鉴定 以 ETEC 全基因组 DNA 为模板，P1、P2 为引物，经 PCR 扩增获得约 813 bp 的 FaeG 基因，以 FaeG 基因胶回收产物为模版，P1 和 P3 (co1 基因序列) 为引物，通过重叠延伸 PCR (EOS-PCR) 扩增获得约 846 bp 的 FaeG-co1 基因，经过比对与 GenBank 上已发表的序列的核苷酸同源率为 98%~100%。

2.2 重组菌的构建、诱导表达与鉴定 分别构建重组表达质粒 pET-FaeG、pET-FaeG-co1，其重组菌诱导后，经 SDS-PAGE 分析，表达的重组蛋白分子量分别约为 34.6 ku 和 36.8 ku (图 1)。两种重组菌表达的蛋白均主要以包涵体形式存在。Western blot 鉴定结果显示，目的蛋白可被阳性血清识别，显示其具有良好的免疫反应性(图 2)。

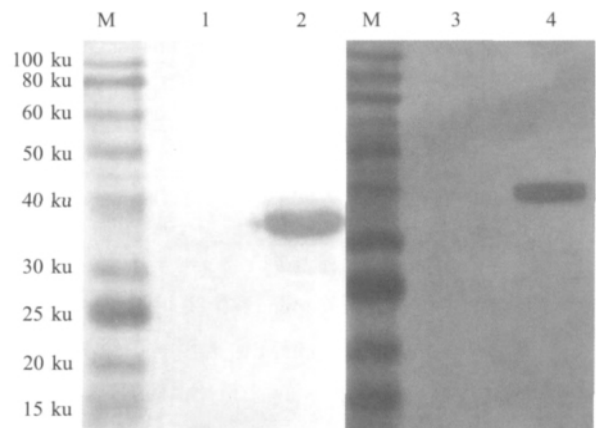
2.3 免疫保护性试验 测定用于攻毒的 ETEC cvcc230 菌株 LD₅₀ 为 1.0 \times 10⁹ cfu/mL。攻毒后对各组小鼠进行连续监测，结果表明，非免疫攻毒对照组小鼠在第 2 d 全部死亡；FaeG 组小鼠在攻毒后第 2 d 出现临床症状，有 2 只小鼠分别在第 4 d、5 d 死亡，从 7 d 开始临床症状减轻，第 12 d 恢复正常；

FaeG-co1 组小出现轻度的临床症状，第 7 d 恢复正常。最终统计保护率：FaeG 组为 80% (8/10)、FaeG-co1 组为 100% (10/10)。结果显示 co1 靶向肽能够增强 FaeG-co1 融合蛋白的免疫原性(图 3)。



M: Protein Marker; 1: pET-FaeG/BL21 non-induced; 2: Induced pET-FaeG/BL21; 3: Supernatant of induced pET-FaeG/BL21 lysate; 4: Sediment of induced pET-FaeG/BL21 lysate; 5: Crude inclusion body; 6: Non-induced pET-FaeG-co1/BL21; 7: Induced pET-FaeG-co1/BL21; 8: Supernatant of induced pET-FaeG-co1/BL21 lysate; 9: Sediment of of induced pET-FaeG-co1/BL21 lysate; 10: Crude inclusion body

图 1 pET-FaeG 和 pET-FaeG-co1 表达产物的 SDS-PAGE 分析
Fig.1 SDS-PAGE analysis of FaeG and FaeG-co1 gene expression in *E.coli*



M: Prestained Protein Marker; 1, 3: Negative control; 2: Lysate of pET-FaeG/BL21 induced; 4: Lysate of pET-FaeG-co1/BL21 induced

图 2 pET-FaeG 和 pET-FaeG-co1 表达产物的 western blot 分析
Fig.2 Western blot identification of FaeG gene and FaeG-co1 gene expression with positive serum

2.4 免疫小鼠抗 ETEC 特异性 IgG、sIgA 水平对比 ELISA 结果显示，各组小鼠均可在第 7 d 检测到有特异性 IgG、sIgA 抗体产生，与对照组相比差异极显著 ($p < 0.01$)，并且 FaeG-co1 组与 FaeG 组抗体水平差异显著 ($p < 0.05$)。FaeG-co1 组在第 21 d 与 FaeG 组间抗体水平差异极显著 ($p < 0.01$)。攻毒后抗体水平明显上升，FaeG-co1 组与 FaeG 组间抗体水平差异

极显著($p < 0.01$)。表明 co1 靶向肽修饰组的可提高抗体产生水平明显(图 4 和图 5)。

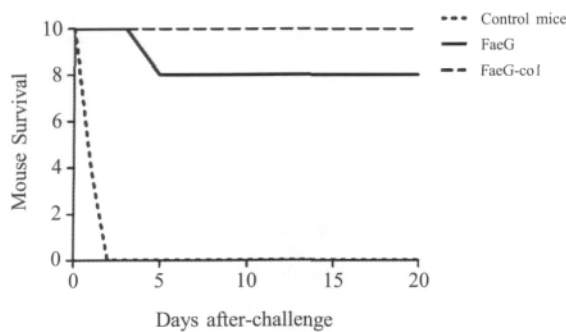


图 3 ETEC 攻毒后各组小鼠的存活情况

Fig.3 The survival rates of immunized mice challenged with ETEC

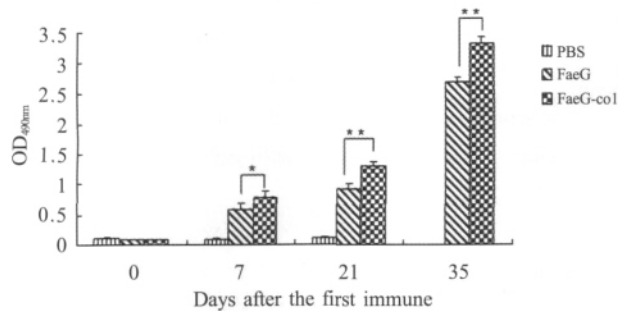


图 4 各组小鼠血清中特异性 IgG 的动态变化

Fig.4 Comparison of specific IgG level in serum of different mice groups

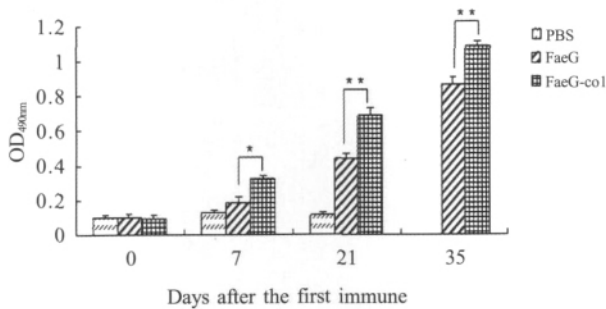


图 5 各组小鼠粪便中特异性 sIgA 的动态变化

Fig.5 Comparison of specific sIgA level in fecal material of different mice groups

3 讨 论

目前, 控制 PWD 主要依靠抗生素, 然而长期依赖抗生素最终导致多重耐药菌株的出现以及生产成本过高等问题。到目前为止, 全球范围内还没有十分有效的 PWD 疫苗, 所以如何有效的预防幼畜腹泻成为了亟待解决的问题。

F4⁺ ETEC 感染能够引起新生仔猪和断奶仔猪的腹泻和死亡。F4 可以介导 ETEC 与小肠上皮细胞刷

状缘上的受体结合, 从而使 ETEC 在肠道内定植并大量繁殖, 引起水样腹泻^[5]。研究表明, 对母猪进行免疫可以保护初生仔猪免受感染, 但这种被动免疫力在断奶后并不能有效的抵抗病原微生物的侵袭。因此, 通过疫苗免疫建立仔猪主动免疫应答对预防 PWD 等多发性传染病具有重要的意义。

M 细胞主要存在于派伊尔氏集合淋巴结(Payer's patches)中的滤泡相关上皮细胞、孤立淋巴结、胃肠道外的黏膜相关淋巴组织, 是一种特殊的抗原转运细胞, 是启动黏膜免疫应答的第一步^[6-7]。通过将抗原靶向至 M 细胞可以提高抗原提呈细胞对抗原的摄取量, 从而激活更多的 T 细胞参与免疫反应, 诱导仔猪动物更早、更快的产生更强的免疫应答。

F4 菌毛是 F4⁺ ETEC 黏附于肠道上皮细胞的关键性致病因子, 也是抗 F4⁺ ETEC 腹泻基因工程疫苗研制中广泛使用的靶抗原。以纯化 F4 菌毛蛋白^[8]、重组 FaeG 蛋白^[9]、F4 蛋白肠溶微丸^[10]、植物反应器表达的 FaeG 蛋白作为免疫原免疫哺乳仔猪^[11-12], 可以诱导一定程度黏膜免疫应答和系统免疫应答, 虽不能完全阻止感染的发生, 但产生的抗体具有抗 F4⁺ ETEC 黏附作用。

本研究表达的 FaeG 和 FaeG-co1 融合蛋白的包涵体分别免疫昆明鼠并进行攻毒试验。结果表明, FaeG-co1 融合蛋白可以有效诱导小鼠产生的特异性 IgG、sIgA 抗体水平, 并显著高于 FaeG 免疫组; 而且 FaeG-co1 组两次免疫后对 *E.coli* 强毒株致死剂量攻毒保护率达到 100%, 明显高于 FaeG 免疫组的 80%。结果表明, M 细胞靶向肽 co1 在肠道外免疫也同样具有免疫增强作用, 可使动物在短时间内产生更高水平的抗体, 提高免疫应答的水平, 是一种极具应用前景的免疫增强分子。

蛋白的提纯物可激发小鼠产生高水平保护性抗体的免疫应答, 但其提纯工艺较为复杂、损失率较大, 不适用于大规模生产。而包涵体蛋白由于不具有天然蛋白的构象, 不具有相应的蛋白生物活性, 但它却是有效的免疫原^[15], 而且更利于对其进行纯化^[13]。实验结果表明, 用提取的包涵体直接免疫小鼠同样获得了理想的免疫效果。

本实验通过 co1 对 F4 菌毛的主要亚单位 FaeG 进行融合表达, 用氢氧化铝作为佐剂, 包涵体直接免疫动物, 两次免疫即可获得 100% 的攻毒保护率, 有效的提高了免疫效果, 并降低了生产成本。本研

究为制备防治 PWD 的基因工程疫苗奠定了基础, 也为研究疾病的早期免疫提供了新思路。

参考文献:

- [1] Verdonck F, Cox E. F4 fimbriae expressed by porcine enterotoxigenic *Escherichia coli*, an example of an eccentric fimbrial system [J]. *Mol Microbiol Biotechnol*, 2004, 7: 155-169.
- [2] Kim S H, Seo K W, Kim J, et al. The M Cell-targeting ligand promotes antigen delivery and induces antigen-specific immune responses in mucosal vaccination [J]. *J Immunol*, 2010, 185: 5787-5795.
- [3] Huy N X, Kim S H, Yang M S, et al. Immunogenicity of a neutralizing epitope from porcine epidemic diarrhea virus: M cell targeting ligand fusion protein expressed in transgenic rice calli [J]. *Plant Cell Rep*, 2012, 31: 1933-1942.
- [4] 刘文鑫, 冯瑜菲, 杨旭东, 等. 重组大肠杆菌 K88ab 和 K99 蛋白制备的鸡卵黄抗体的效力评价 [J]. *中国预防兽医学报*, 2010, 32(12): 968-971.
- [5] Fairbrother J M, Nadeau E, Gyles C L. *Escherichia coli* in post-weaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies [J]. *Animal Health Res Rev*, 2005, 6: 17-39.
- [6] Farstad I N, Halstense T S, Fausa O, et al. Heterogeneity of M-cell-associated B and T cells in human Peyer's patches [J]. *Immunology*, 1994, 83: 457-464.
- [7] Clark M A, Jepson N L, Simmons N L, et al. Selective binding and transcytosis of *Ulex europaeus* 1 lectin by mouse Peyer's patch M cells *in vivo* [J]. *Histochemistry*, 1993, 100: 441-447.
- [8] Verdonck F, Joonas J J, Stuyvena E, et al. The polymeric stability of the *Escherichia coli* F4 (K88) fimbriae enhances its mucosal immunogenicity following oral immunization [J]. *Vaccine*, 2008, 26: 5728-5735.
- [9] Verdonck F, Cox E, Van der Stede Y, et al. Oral immunization of piglets with recombinant F4 fimbrial adhesin FaeG monomers induces a mucosal and systemic F4-specific immune response [J]. *Vaccine*, 2004, 22(31-32): 4291-4299.
- [10] Snoeck V, Huyghebaert N, Cox E, et al. Enteric-coated pellets of F4 fimbriae for oral vaccination of suckling piglets against enterotoxigenic *Escherichia coli* infections [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2003, 96(3-4): 219-227.
- [11] Joensuu J J, Verdonck F, Ehrstrom A, et al. F4 (K88) fimbrial adhesin FaeG expressed in alfalfa reduces F4⁺ enterotoxigenic *Escherichia coli* excretion in weaned piglets [J]. *Vaccine*, 2006, 24(13): 2387-2394.
- [12] Shen Hui-feng, Qian Bing-jun, Chen Wei-wei, et al. Immunogenicity of recombinant F4 (K88) fimbrial adhesin FaeG expressed in tobacco chloroplast [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2010, 42(8): 558-567.
- [13] Farstad I N, Halstense T S, Fausa O, et al. Heterogeneity of M-cell-associated B and T cells in human Peyer's patches [J]. *Immunology*, 1994, 83: 457-464.

(本文编辑: 赵晓岩)