

莫超迪, 覃呈欢, 戴龙喜, 韩鹏夫, 纪月鑫, 韦友传. 黄喉拟水龟肺炎克雷伯菌外膜蛋白 A 的原核表达与纯化 [J]. 广东农业科学, 2023, 50 ( 3 ) : 137–143.

# 黄喉拟水龟肺炎克雷伯菌外膜蛋白 A 的原核表达与纯化

莫超迪, 覃呈欢, 戴龙喜, 韩鹏夫, 纪月鑫, 韦友传

(广西大学动物科学技术学院, 广西 南宁 530005)

**摘要:**【目的】克隆黄喉拟水龟肺炎克雷伯菌外膜蛋白 A (*KpOmpA*) 基因, 构建重组质粒并诱导其表达, 纯化获取重组蛋白 *KpOmpA*, 为黄喉拟水龟抗肺炎克雷伯菌的相关疫苗研究奠定基础。【方法】以黄喉拟水龟肺炎克雷伯菌 DNA 为模板, 克隆获得 *KpOmpA* 基因后与 pET-32a 表达载体连接; 将构建的重组质粒 pET-32a-*KpOmpA* 转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞, 经异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导, 通过 SDS-PAGE 电泳检测 *KpOmpA* 重组蛋白的表达情况, 并对重组蛋白进行可溶性分析; 经 Ni-IDA 琼脂糖纯化树脂柱纯化 *KpOmpA* 重组蛋白, 应用 Western blot 方法鉴定纯化蛋白。【结果】*KpOmpA* 基因 CDS 序列全长为 1 071 bp, 推定编码 356 个氨基酸, 与其他肺炎克雷伯菌的 OmpA 氨基酸序列同源性超过 99%, 高度保守。重组质粒 pET-32a-*KpOmpA* 经双酶切、测序确认基因序列无移码或突变, 表明重组质粒成功构建。转化后的 BL21 感受态细胞经终浓度为 1 mmol/L IPTG 在 37 ℃下诱导 4 h 后进行 SDS-PAGE 检测, 结果表明, *KpOmpA* 重组蛋白大量表达, 以包涵体形式存在, 分子量约为 57 kD。经 Ni-IDA 琼脂糖纯化树脂柱纯化, 获得较高纯度的重组蛋白。Western blot 检测结果显示有 57 kD 的条带, 表明 *KpOmpA* 重组蛋白能被小鼠抗 His-tag 单克隆抗体识别。【结论】成功构建了重组质粒 pET-32a-*KpOmpA*, 在大肠杆菌表达系统中诱导其表达, 并纯化得到较高纯度的 *KpOmpA* 重组蛋白, 为制备预防肺炎克雷伯菌感染的疫苗奠定基础。

**关键词:** 黄喉拟水龟; 肺炎克雷伯菌; 外膜蛋白 A; 原核表达; 重组蛋白; 蛋白纯化

中图分类号: S947.1

文献标志码: A

文章编号: 1004-874X (2023) 03-0137-07

## Prokaryotic Expression and Purification of OmpA of *Klebsiella pneumoniae* Isolated from *Mauremys mutica*

MO Chaodi, QIN Chenghuan, DAI Longxi, HAN Pengfu, JI Yuexin, WEI Youchuan

(College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530005, China)

**Abstract:**【Objective】The study was conducted to clone the outer membrane protein A (*KpOmpA*) gene of *Klebsiella pneumoniae* isolated from *Mauremys mutica*, construct the recombinant plasmid and induce its expression, purify and obtain the recombinant protein *KpOmpA*, which would lay a foundation for preparing the vaccine to prevent *K. pneumoniae* infection.【Method】Using the DNA as the template, *KpOmpA* gene was cloned and connected with pET-32a expression vector, and the constructed recombinant plasmid pET-32a-*KpOmpA* was transformed into the competent cells of *E. coli* BL21 (DE3). After induction by IPTG, the expression of recombinant protein *KpOmpA* was detected by using SDS-PAGE

收稿日期: 2023-01-01

基金项目: 国家自然科学基金 (31860736); 广西创新驱动发展专项 (20171286); 广西大学横向课题 (20160284)

作者简介: 莫超迪 (1996—), 男, 壮族, 在读硕士生, 研究方向为水产动物免疫与病害防控, E-mail: 422513622@qq.com

通信作者: 韦友传 (1971—), 男, 壮族, 博士, 副教授, 研究方向为水产动物免疫与病害防控, E-mail: weiyyc@gxu.edu.cn

and the dissolubility was analyzed. Then the KpOmpA was purified by Ni-IDA agarose resin column. In addition, purified recombinant protein was identified by Western blot. [Result] The CDS sequence of *KpOmpA* was 1 071 bp in length with presumptive encoding 356 amino acids. The OmpA was highly conserved which shared more than 99% sequence homology with those from other *K. pneumoniae* strains. The pET-32a-KpOmpA was identified and confirmed by double enzyme digestion and sequencing. The sequencing result confirmed that there was no code shift or mutation, indicating that the recombinant plasmid was successfully constructed. The transformed competent cells of *E.coli* BL21 were induced by IPTG with the final concentration of 1 mmol/L at 37 °C for 4 h, SDS-PAGE assay showed that KpOmpA was expressed abundantly in the form of inclusion bodies, with a molecular weight of about 57 kD. The recombinant protein was purified and obtained by Ni-IDA agarose resin column. Western blot results show that there was a 57 kD band, indicating that recombinant protein KpOmpA could be recognized by His-tag mouse monoclonal antibody. [Conclusion] The recombinant plasmid pET-32a-KpOmpA was successfully constructed and expressed in *E. coli* expression system. The recombinant protein KpOmpA with high purity was obtained, laying a foundation for preparing the vaccine to prevent *K. pneumoniae* infection.

**Key words:** *Mauremys mutica*; *Klebsiella pneumoniae*; outer membrane protein A; prokaryotic expression; recombinant protein; protein purification

**【研究意义】**黄喉拟水龟 (*Mauremys mutica*) 属地龟科 (Geoemydidae) 拟水龟属 (*Mauremys*)，具有较高的食用、药用和观赏价值，从 20 世纪 80 年代以来已成为我国重要的养殖龟类。随着人们生活水平的提高以及对高质量食品蛋白需求的增加，黄喉拟水龟的养殖受到广泛关注，已成为广东、广西及海南等南方地区重要的龟类养殖品种<sup>[1]</sup>。但随着养殖规模不断扩大和养殖环境恶化，由肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 引起的白眼病和肺炎时有发生<sup>[2-3]</sup>。肺炎克雷伯菌通常分布于土壤和水生环境中，可感染人和动物，引起肺炎、肠炎、肝脓肿、脑膜炎及败血症等呼吸道和消化道疾病<sup>[4-5]</sup>。可见，肺炎克雷伯菌可对黄喉拟水龟养殖业造成严重的经济损失，而且存在传染给人的风险<sup>[6]</sup>。生产中常用抗菌药物和抗生素治疗黄喉拟水龟肺炎克雷伯菌病，但易产生耐药菌株或药物残留，引起肉龟食用安全等问题<sup>[7-9]</sup>。注射疫苗是防控动物疫病的有效手段<sup>[10-11]</sup>。开展肺炎克雷伯菌外膜蛋白 A 的原核表达与纯化，可为黄喉拟水龟肺炎克雷伯菌病的疫苗研发奠定基础。

**【前人研究进展】**目前针对肺炎克雷伯菌的疫苗种类主要有灭活疫苗、多糖疫苗以及蛋白疫苗等，均具有优良的保护力<sup>[5]</sup>。但灭活疫苗成分复杂，可能存在不良反应；荚膜多糖的血清型众多，制备的疫苗易出现无效保护。肺炎克雷伯菌表面的荚膜、脂多糖、菌毛蛋白、外膜蛋白 (Outer membrane proteins, KpOmp) 等具有一定的免疫原性，可用于疫苗研发<sup>[5]</sup>。其外膜蛋白或菌

毛蛋白在各菌株之间非常保守，具备广谱保护潜力，用于制备蛋白疫苗成分单一，副作用小。肺炎克雷伯菌外膜蛋白为该菌细胞膜的主要成分，主要包括 KpOmpA、KpOmpK17、KpOmpK35、KpOmpK36 和 KpOmpK37 等，参与物质转运、信号传导、粘附、增强毒力和阻碍抗菌药物进入等生理活动，在感染宿主和诱导免疫反应中起重要作用<sup>[12-14]</sup>。其中，OmpA 在肠杆菌科中高度保守，具有介导细菌对真核细胞的粘附和侵袭<sup>[15-16]</sup>以及抵抗血清补体的杀伤能力<sup>[17]</sup>。此外，KpOmpA 作为病原相关分子模式 (Pathogen-associated Molecular Patterns, PAMP)，能被先天免疫系统识别从而清除肺炎克雷伯菌的感染<sup>[18]</sup>。研究表明，KpOmpA 可增强肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 多糖免疫原性，并保护小鼠抵御细菌的攻击<sup>[19]</sup>。Kurupati 等<sup>[20]</sup>应用含有 *KpOmpA* 基因的 DNA 疫苗接种小鼠，可以诱导其产生抗体，并表现出良好的攻毒保护率。这些研究结果为应用 *KpOmpA* 作为疫苗的候选分子预防黄喉拟水龟肺炎克雷伯菌病提供借鉴。**【本研究切入点】**目前肺炎克雷伯菌疫苗的研究主要针对哺乳动物与人类，而黄喉拟水龟抗肺炎克雷伯菌的相关疫苗研究缺乏，表达纯化 KpOmpA 对研发肺炎克雷伯菌疫苗具有重要意义。**【拟解决的关键问题】**本研究克隆黄喉拟水龟肺炎克雷伯菌 *KpOmpA* 基因，构建重组质粒并诱导其表达，纯化获取重组蛋白 KpOmpA，可为黄喉拟水龟抗肺炎克雷伯菌相关疫苗的研发提供依据。

# 1 材料与方法

## 1.1 试验材料

黄喉拟水龟源肺炎克雷伯菌 GXNN1 菌株、大肠杆菌 TOP10、BL21(DE3) 感受态细胞及 pET-32a 表达载体由广西大学动物科学技术学院水产免疫病害实验室保存。限制性内切酶 (*EcoR I*、*Xho I*) 和 T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa ( 宝日生物技术有限公司 )；PCR 产物胶回收试剂盒、质粒抽提试剂盒、蛋白分子量标准、SDS-PAGE 凝胶制备试剂、Ni-IDA 琼脂糖纯化树脂柱以及 PVDF 膜均购自生工生物工程 ( 上海 ) 股份有限公司；异丙基 - $\beta$ -D- 硫代半乳糖昔 ( IPTG ) 、苯甲磺酰氟 ( PMSF ) 、脱脂奶粉以及 ECL 超敏发光液均购自北京索莱宝科技有限公司；小鼠抗 His-tag 单克隆抗体和辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体购自上海碧云天生物技术有限公司。

## 1.2 试验方法

**1.2.1 *KpOmpA* 基因扩增、序列分析与原核表达载体的构建** 根据 *KpOmpA* 基因序列 ( NCBI 登录号：KP728941.1 )，设计带酶切位点引物。上游引物 ( 划线部分为 *EcoR I* 酶切位点 )：5'-CCGGAATTCATGAAAAAGACAGCTATCGC-3'，下游引物 ( 划线部分为 *Xho I* 酶切位点 )：5'-CCGCTCGAGTTAACGCCGGCTGAGTTA-3'。以黄喉拟水龟源肺炎克雷伯菌 DNA 作为模板扩增 *KpOmpA* 基因，PCR 扩增程序为：94 °C 4 min；94 °C 30 s、68 °C 30 s、72 °C 90 s，35 个循环；72 °C 10 min。PCR 产物按照胶回收试剂盒说明书进行目的片段纯化并由生工生物工程 ( 上海 ) 股份有限公司测序。应用 SeqMan 软件拼接测序序列，在线 BLAST 搜索同源氨基酸序列，运用 MegAlign 软件对氨基酸序列进行多重比对和同源性分析。

运用 *EcoR I*、*Xho I* 对 pET-32a 空载体和目的片段进行双酶切，将纯化后的双酶切产物用 T4 连接酶于 16 °C 下连接 8 h ( 目的片段 : 载体的摩尔比为 3 : 1 )，连接产物转化到大肠杆菌 TOP10 感受态细胞中，于 37 °C 下摇床 ( 220 r/min ) 震荡培养 3 h 后将菌液涂板于含氨苄的固体培养基，37 °C 培养 14~16 h。挑选单克隆进行阳性检测，引物选用通用引物 ( T7、T7ter )，将阳性克隆菌液进行扩大培养后抽提重组质粒 pET-

32a-*KpOmpA*，双酶切鉴定后送去生工生物工程 ( 上海 ) 股份有限公司测序。

**1.2.2 重组蛋白表达和可溶性鉴定** 重组质粒 pET-32a-*KpOmpA* 转化至 BL21(DE3) 感受态细胞中，挑选单克隆接种至含 100 μg/mL 氨苄的 10 mL LB 培养基中，37 °C 过夜培养。取过夜培养的菌液按照 1 : 100 接种于含氨苄的 10 mL LB 培养基中，37 °C 振荡培养 3 h。当菌液 OD<sub>600</sub> 约为 0.6 时，取出 1 mL 作为对照，剩余菌液加入 IPTG 使终浓度为 1 mmol/L，37 °C 诱导 4 h 后取 1 mL 菌液进行 SDS-PAGE 检测。

为确定重组蛋白的可溶性，取 8 mL 诱导后的菌液以 10 000 g 离心 3 min 收集菌体并称重。每克湿重菌体加入 10 mL pH 为 8.0 的细菌裂解液 ( 50 mmol/L Tris HCl、500 mmol/L NaCl、0.1 mmol/L PMSF、1 mg/mL 溶菌酶、5 mmol/L EDTA ) 进行重悬，于冰上进行超声破碎细胞 30 min ( 30 W，超声 5 s，间歇 8 s )，4 °C 10 000 g 离心收集上清和沉淀进行 SDS-PAGE 检测。

**1.2.3 重组蛋白纯化** 为纯化 *KpOmpA* 重组蛋白，扩大培养转化后的 BL21 重组菌，诱导表达、收集菌体、超声破碎及收集沉淀 ( 包涵体 ) 方法见 1.2.2。收集沉淀后，为了去除少量脂类、核酸和其他杂蛋白等，应用 10 mL 洗涤液 A ( 50 mmol/L Tris HCl、500 mmol/L NaCl、2% Tween-20 和 2 mol/L 尿素 ) 洗涤沉淀，涡旋震荡，4 °C 9 000 g 离心 10 min，收集沉淀并重复操作 3 次；应用 10 mL 洗涤液 B ( 50 mmol/L Tris HCl 和 500 mmol/L NaCl ) 洗涤沉淀，去除样品中的 EDTA，4 °C 9 000 g 离心 10 min，收集沉淀并重复操作 3 次；加入 10 mL 结合缓冲液 ( 20 mmol/L Tris HCl、500 mmol/L NaCl、20 mmol/L 咪唑、1 mmol/L β-巯基乙醇和 8 mol/L 尿素 )，应用磁力搅拌器于 4 °C 下溶解包涵体 8 h。将上述液体以 4 °C 10 000 g 离心 10 min 后收集上清，上清流经 Ni-IDA 琼脂糖纯化树脂柱，收集过柱液。分别用 4 mL 不同浓度 ( 5、10、25、50 mmol/L ) 的咪唑溶液洗脱 Ni-IDA 琼脂糖纯化树脂柱，分别收集各过柱液，通过 SDS-PAGE 检测分析。

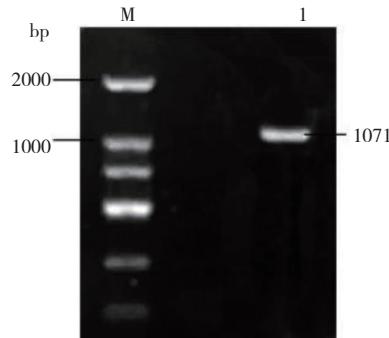
**1.2.4 Western blot 鉴定重组蛋白** 纯化后的重组蛋白经 SDS-PAGE 电泳后，通过 WIX 迷你转印仪将样品转至经 TBST 漂洗的 PVDF 膜，室温下用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h，加入小鼠抗 His-tag 单

克隆抗体（1：3 000），在4℃下孵育过夜。之后用TBST洗膜3次（8 min/次），再加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠IgG抗体（1：2 000），在室温下孵育1 h后再次用TBST洗膜3次（8 min/次），避光滴加8~10滴ECL超敏发光液于膜表面，用ImageQuant LAS 500成像仪拍照。

## 2 结果与分析

### 2.1 *KpOmpA* 基因扩增、序列分析及原核表达质粒的构建与鉴定

*KpOmpA*的PCR扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳分析，在1 000 bp附近出现电泳条带，与预期结果相符（图1）。测序结果表明，该基因CDS序列大小为1 071 bp，推定编码356个氨基酸。将本研究的龟源*KpOmpA*与牛源*KpOmpA*（GenBank登录号：AKN20218.1）、人源*KpOmpA*（GenBank登录号：MCM5720863.1）的氨基酸序列进行多重比对（图2），结果表明



M: DNA Marker; 1: PCR amplification fragment  
M: DNA Marker; 1: PCR amplification fragment

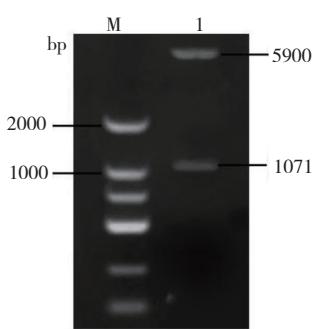
图1 *KpOmpA*基因的PCR扩增产物电泳结果  
Fig. 1 Electrophoresis result of PCR amplification products of *KpOmpA* gene

*KpOmpA*氨基酸序列高度保守，同源性分别为99.4%和99.7%。

重组质粒pET-32a-*KpOmpA*经EcoR I和Xho I双酶切，酶切产物电泳后出现两条电泳带（图3）。DNA测序结果证实，pET-32a-*KpOmpA*包含*KpOmpA*基因，且基因序列和阅读框正确，表

龟源 <i>KpOmpA</i>	<code>MKKTAIAIAVALAGFATVAQAAFKDNTWYAGGKLGWSQYHDTGFYGNQFQNNNGPTRNDQLGAGAFGGYQVNPFYLGFEMGYDWLGRMAYI</code>	90
牛源 <i>KpOmpA</i>	<code>MKKTAIAIAVALAGFATVAQAAFKDNTWYAGGKLGWSQYHDTGFYGNQFQNNNGPTRNDQLGAGAFGGYQVNPFYLGFEMGYDWLGRMAYI</code>	90
人源 <i>KpOmpA</i>	<code>MKKTAIAIAVALAGFATVAQAAFKDNTWYAGGKLGWSQYHDTGFYGNQFQNNNGPTRNDQLGAGAFGGYQVNPFYLGFEMGYDWLGRMAYI</code>	90
龟源 <i>KpOmpA</i>	<code>GSDVNGAFKAQGVQLTAKLGYPITDDLDIYTRLGGMVWRADSKGNYASTGVSRSSEHTDGVSPVFAGGVWEAVTRDIATRLEYQWVNNIGI</code>	180
牛源 <i>KpOmpA</i>	<code>GSDVNGAFKAQGVQLTAKLGYPITDDLDIYTRLGGMVWRADSKGNYASTGVSRSSEHTDGVSPVFAGGVWEAVTRDIATRLEYQWVNNIGI</code>	180
人源 <i>KpOmpA</i>	<code>GSDVNGAFKAQGVQLTAKLGYPITDDLDIYTRLGGMVWRADSKGNYASTGVSRSSEHTDGVSPIFAGGVWEAVTRDIATRLEYQWVNNIGI</code>	180
龟源 <i>KpOmpA</i>	<code>AGTVGTRPDNGMLSLGVSYRFGQEDAAFPVAPAPAPAPAPEVATKHFTLKSDFLVNFNKATLKFEGQQALDQLYTQLSNMDPKDGSAVVGLY</code>	270
牛源 <i>KpOmpA</i>	<code>AGTVGTRPDNGMLSLGVSYRFGQEDAAFPVAPAPAPAPAPEVATKHFTLKSDFLVNFNKATLKFEGQQALDQLYTQLSNMDPKDGSAVVGLY</code>	270
人源 <i>KpOmpA</i>	<code>AGTVGTRPDNGMLSLGVSYRFGQEDAAFPVAPAPAPAPAPEVATKHFTLKSDFLVNFNKATLKFEGQQALDQLYTQLSNMDPKDGSAVVGLY</code>	270
龟源 <i>KpOmpA</i>	<code>TDRIGSEAYNQQLSEKRAQSVDYLVAKGIPAGKISARGMGESNPVTGNTCDNVKARAALIDCLAFDRRVEIEVKGYKEVVTQPAA</code>	356
牛源 <i>KpOmpA</i>	<code>TDRIGSEAYNQQLSEKRAQSVDYLVAKGIPAGKISARGMGESNPVTGNTCDNVKARAALIDCLAFDRRVEIEVKGYKEVVTQPAA</code>	356
人源 <i>KpOmpA</i>	<code>TDRIGSEAYNQQLSEKRAQSVDYLVAKGIPAGKISARGMGESNPVTGNTCDNVKARAALIDCLAFDRRVEIEVKGYKEVVTQPAA</code>	356

图2 不同来源 *KpOmpA* 的氨基酸序列比对  
Fig. 2 Alignment of amino acid sequences of *KpOmpA* from different sources



M: DNA Marker; 1: Result of double enzyme digestion  
M: DNA Marker; 1: 双酶切结果

图3 双酶切鉴定重组质粒 pET-32a-*KpOmpA*  
Fig. 3 Identification of recombinant plasmid pET-32a-*KpOmpA* by double enzyme digestion

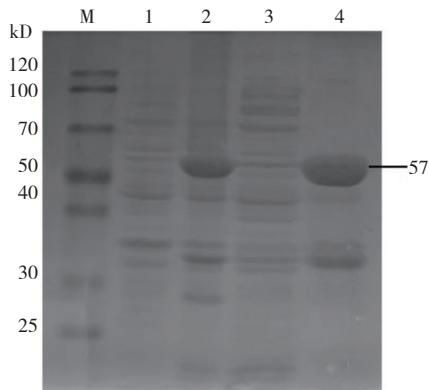
明重组质粒pET-32a-*KpOmpA*构建成功。

### 2.2 重组蛋白表达和可溶性鉴定

将构建好的质粒pET-32a-*KpOmpA*转化至大肠杆菌BL21感受态细胞，IPTG诱导蛋白表达，SDS-PAGE检测发现，经诱导的样品在57 kD处出现明显条带，与预期结果相符。诱导后经超声破碎，对上清和沉淀进行SDS-PAGE检测，结果显示，*KpOmpA*重组蛋白在沉淀中含量高，以包涵体的形式存在（图4）。

### 2.3 重组蛋白纯化

目的蛋白在大肠杆菌BL21感受态细胞诱导

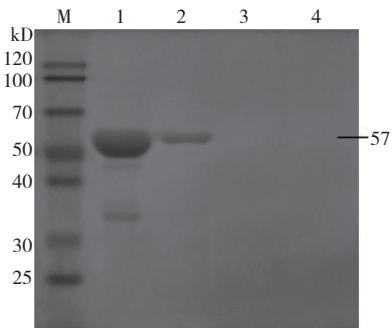


M: 蛋白 Marker; 1: 未诱导的 pET-32a-KpOmpA; 2: IPTG 诱导的 pET-32a-KpOmpA; 3: 上清; 4: 沉淀  
M: Protein marker; 1: Uninduced pET-32a-KpOmpA; 2: pET-32a-KpOmpA induced by IPTG; 3: Supernatant; 4: Sediment

图 4 KpOmpA 重组蛋白的诱导表达与可溶性分析

Fig. 4 Analysis of induced expression and dissolvability of KpOmpA recombinant protein

表达后,利用Ni-IDA琼脂糖纯化树脂柱进行过柱,用不同浓度的咪唑洗脱缓冲液进行梯度洗脱,并将收集的样品进行SDS-PAGE检测。结果显示,用5、10 mmol/L咪唑洗脱缓冲液能洗脱大量杂蛋白并收集到较纯的重组蛋白KpOmpA(图5)。



M: 蛋白 Marker; 1~4: 分别为 5、10、25、50 mmol/L 咪唑洗脱液  
M: Protein marker; 1~4: 5, 10, 25, 50 mmol/L imidazole eluate, respectively

图 5 KpOmpA 重组蛋白的纯化

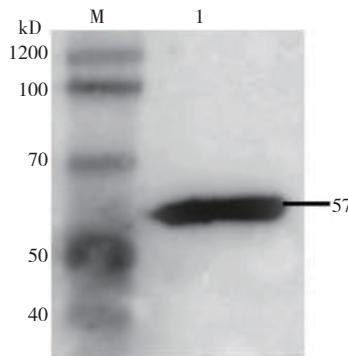
Fig. 5 Purification of KpOmpA recombinant protein

## 2.4 Western blot 鉴定重组蛋白

纯化的蛋白样品经SDS-PAGE电泳后转至PVDF膜进行Western blot鉴定。结果(图6)显示,57 kD处有明显的条带,与重组蛋白的大小一致,证明重组蛋白成功表达。

## 3 讨论

肺炎克雷伯菌隶属于肠杆菌科(Enterobacteriaceae)克雷伯菌属,是一种具有包膜、兼性厌氧等特性的革兰氏阴性菌<sup>[21]</sup>,主要感染人和动物的消化道、呼吸道和泌尿生殖道等。近年来主要



M: 蛋白 Marker; 1: 纯化的 KpOmpA 重组蛋白  
M: Protein marker; 1: Purified KpOmpA recombinant protein

图 6 KpOmpA 重组蛋白的 Western blot 鉴定

Fig. 6 Western blot identification of KpOmpA recombinant protein

以抗生素防治该菌引起的疫病<sup>[22]</sup>,然而抗生素的滥用导致肺炎克雷伯菌耐药性加强,该菌逐渐威胁黄喉拟水龟养殖业的安全生产<sup>[23]</sup>。接种疫苗是控制疫病的有效措施,KpOmpA已被证实具有较好的免疫原性<sup>[20]</sup>,且序列高度保守,可作为疫苗研制的候选靶标基因,因此本研究表达纯化KpOmpA蛋白为肺炎克雷伯菌疫苗制备提供参考。

### 3.1 原核表达系统

与真核表达系统比较,大肠杆菌原核表达系统具有背景清晰、操作便捷和成本低廉等优点<sup>[24-25]</sup>,因此被广泛用于蛋白表达。pET系统为大肠杆菌中克隆和表达重组蛋白最强大的系统之一,最初由Dubendorff等<sup>[26]</sup>利用该系统表达外源基因,随后许多研究也使用其表达外源目的基因<sup>[27-28]</sup>。pET-32a表达载体除具有pET系列高效表达重组蛋白的特性外,还具备His-Tag,便于重组蛋白的检测与纯化。本研究成功构建pET-32a-KpOmpA表达质粒,并转化大肠杆菌BL21感受态细胞,经IPTG诱导,重组蛋白KpOmpA高效表达,表明pET-32a适合表达KpOmpA。研究表明,用pET系列表达的重组蛋白免疫哺乳类<sup>[28]</sup>、鱼类<sup>[29]</sup>以及禽类<sup>[30]</sup>,均表现出良好的免疫保护力,这些研究结果验证了pET系统可用于疫苗研制。

### 3.2 重组蛋白 KpOmpA 的存在形式

重组蛋白在37℃、IPTG诱导的条件下高效表达,产物大量堆积,蛋白质因未能进行正确折叠与二硫键配对而形成包涵体沉淀<sup>[31]</sup>。包涵体为稳定的蛋白质聚集体,具有高密度、高纯度和

蛋白不易降解的优点，但也存在一些局限性，如折叠错误、不具备生物活性、复性程序较复杂等。包涵体中的重组蛋白含量一般为 50% 以上，其余成分主要为核酸、脂多糖、肽聚糖和其他杂蛋白等<sup>[32]</sup>，纯化前通常需要洗涤分离去除杂质。本研究可溶性分析结果显示，重组蛋白 KpOmpA 主要存在于沉淀中，以包涵体形式存在，经 Ni-IDA 琼脂糖纯化树脂柱纯化后获得较高纯度的重组蛋白。由于重组蛋白错误折叠形成包涵体，其不具有天然结构而失去生物活性，为制备疫苗后续需进行复性实验以恢复其活性<sup>[33]</sup>。

## 4 结论

本研究克隆黄喉拟水龟肺炎克雷伯菌外膜蛋白 A 基因 *KpOmpA*，构建 pET-32a-KpOmpA 原核表达载体，经双酶切鉴定、测序确认基因序列，重组质粒成功构建，将其转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞，经 IPTG 诱导表达得到分子量约为 57 kD 的重组蛋白，并对该重组蛋白进行了可溶性分析，结果表明 KpOmpA 重组蛋白以包涵体形式存在。为去除其含有的少量脂类、核酸和其他杂蛋白等杂质，对其进行分离洗涤后使用 Ni-IDA 琼脂糖纯化树脂柱进行纯化，最终收集到较高纯度的 KpOmpA 重组蛋白。Western blot 鉴定结果表明，该重组蛋白可被小鼠抗 His-tag 单克隆抗体识别，证实重组蛋白正确表达。

### 参考文献 ( References ) :

- [1] 牟超盛, 齐旭明, 钱天宇, 周正彦, 莫燕妮, 李丕鹏. 黄喉拟水龟人工养殖技术现状及产业发展对策 [J]. 水产养殖, 2021, 42(1): 1-4. DOI:10.3969/j.issn.1004-2091.2021.01.001.
- [2] MOU C S, QI X M, QIAN T Y, ZHOU Z Y, MO Y N, LI P P. Current status and development countermeasures for culture industry of Asian Yellow Pond Turtle (*Mauremys mutica*) [J]. *Journal of Aquaculture*, 2021, 42(1): 1-4. DOI:10.3969/j.issn.1004-2091.2021.01.001.
- [3] 陆专灵, 钟一治, 赵忠添, 雷燕, 韦友传, 张益峰. 黄喉拟水龟白眼病病原菌分离鉴定及药敏试验 [J]. 南方农业学报, 2016, 47(11): 1974-1978. DOI:10.3969/j.issn.2095-1191.2016.11.1974.
- [4] LU Z L, ZHONG Y Z, ZHAO Z T, LEI Y, WEI Y C, ZHANG Y F. Isolation, identification and drug sensitivity test of pathogen causing with eye disease of *Mauremys mutica* [J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2016, 47(11): 1974-1978. DOI:10.3969/j.issn.2095-1191.2016.11.1974.
- [5] 胡舒, 黎江, 徐腾, 谢业扬, 雷坤, 王邦杰, 陆专灵, 韦友传. 黄喉拟水龟肺气肿病病原菌的分离鉴定及其药敏特性分析 [J]. 南方农业学报, 2018, 49(12): 2566-2572. DOI:10.3969/j.issn.2095-1191.2018.12.31.
- [6] CLEGG S, MURPHY C N. Epidemiology and virulence of *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Microbiology Spectrum*, 2016, 4(1). DOI:10.1128/microbiolspec.UTI-0005-2012.
- [7] 吴广喜, 石学银, 何斌. 肺炎克雷伯菌疫苗的研制进展 [J]. 上海交通大学学报 (医学版), 2018, 38(4): 458-462. DOI:10.3969/j.issn.1674-8115.2018.04.020.
- [8] WU G X, SHI X Y, HE B. Development of vaccines for prevention of *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Journal of Shanghai Jiaotong University (Medical Science)*, 2018, 38(4): 458-462. DOI:10.3969/j.issn.1674-8115.2018.04.020.
- [9] 程家海, 殷娟斌, 白珊泽, 田泽淳, 庞红红, 包世俊. 肺炎克雷伯菌榆中分离株 OmpK17 基因的克隆、生物信息学分析及免疫原性研究 [J]. 中国畜牧兽医, 2019, 46(5): 1456-1465. DOI:10.16431/j.cnki.1671-7236.2019.05.024.
- [10] CHENG J H, YIN J B, BAI S Z, TIAN Z Y, PANG H H, BAO S J. Cloning, bioinformatics and immunogenicity analysis of OmpK17 gene of *Klebsiella pneumoniae* YZ strain [J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2019, 46(5): 1456-1465. DOI:10.16431/j.cnki.1671-7236.2019.05.024.
- [11] 潘苑霞, 王文基, 陈庆涛, 呼高伟. 1 株大黄鱼源肺炎克雷伯菌的分离鉴定与致病性分析 [J]. 水产科学, 2023, 42(2): 268-278. DOI:10.16378/j.cnki.1003-1111.21041.
- [12] PAN Y X, WANG W J, CHEN Q T, HU G W. Isolation, identification, and pathogenic analysis of *Klebsiella pneumoniae* from Large Yellow Croak [J]. *Fisheries Science*, 2023, 42(2): 268-278: 1-15. DOI:10.16378/j.cnki.1003-1111.21041.
- [13] 付霞丽, 郑紫芳, 肖书奇, 李爽. 1 株猪源肺炎克雷伯菌的分离与鉴定 [J]. 中国兽医学报, 2021, 51(8): 999-1006. DOI:10.16656/j.issn.1673-4696.2021.0140.
- [14] FU X L, ZHENG Z F, XIAO S Q, LI S. Isolation and identification of *Klebsiella pneumoniae* from swine [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2021, 51(8): 999-1006. DOI:10.16656/j.issn.1673-4696.2021.0140.
- [15] 孙国荣, 马少鸿, 韦光平, 张依琳, 谭慧明, 蔡双虎. 哈维氏弧菌 glyA 基因的克隆及原核表达分析 [J]. 广东农业科学, 2020, 47(6): 84-90. DOI:10.16768/j.issn.1004-874X.2020.06.012.
- [16] SUN G R, MA S H, WEI G B, ZHANG Y L, TAN H M, CAI S H. Cloning and prokaryotic expression analysis of glyA gene of *Vibrio harveyi* [J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2020, 47(6): 84-90. DOI:10.16768/j.issn.1004-874X.2020.06.012.
- [17] GHATTAS M, DWIVEDI G, LAVERTU M, ALAMEH M G. Vaccine technologies and platforms for infectious diseases: Current progress, challenges, and opportunities [J]. *Vaccines (Basel)*, 2021, 9(12): 1490. DOI:10.3390/vaccines9121490.
- [18] 张璞, 陈建凯, 赖月辉, 林德锐, 李复坤, 周晓敏, 侯高伟, 齐冬梅. 猪瘟病毒检测和猪瘟疫苗研究进展 [J]. 广东农业科学, 2022, 49(4): 106-115. DOI:10.16768/j.issn.1004-874X.2022.04.013.
- [19] ZHANG P, CHEN J K, LAI Y H, LIN D R, LI F K, ZHOU X M, HOU G W, QI D M. Research progress in classical swine fever virus detection and classical swine fever vaccines [J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2022, 49(4): 106-115. DOI:10.16768/j.issn.1004-874X.2022.04.013.
- [20] ZHU J, WANG T, CHEN L, DU H. Virulence factors in Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12:

642484. DOI:10.3389/fmicb.2021.642484.
- [13] LI B, ZHAO Y L, LIU C T, CHEN Z H, ZHOU D S. Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Future Microbiology*, 2014, 9(9): 1071–1081. DOI:10.2217/fmb.14.48.
- [14] 鱼艳荣, 刘希成, 张彦明, 王晶钰. 革兰氏阴性菌外膜蛋白研究进展[J]. 动物医学进展, 2000(2): 35–39. DOI:10.16437/j.cnki.1007-5038.2000.02.009.
- YU Y R, LIU X C, ZHANG Y M, WANG J Y. Research progress of outer membrane protein vaccine of fish gram-negative pathogenic bacteria [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2000(2): 35–39. DOI:10.16437/j.cnki.1007-5038.2000.02.009.
- [15] GUAN Q, BHOWMICK B, UPADHYAY A, HAN Q. Structure and functions of bacterial outer membrane protein A, A potential therapeutic target for bacterial infection [J]. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2021, 21(13): 1129–1138. DOI:10.2174/1568026621666210705164319.
- [16] NIE D, HU Y, CHEN Z, LI M K, HOU Z, LUO X X, MAO X G, XUE X Y. Outer membrane protein A (OmpA) as a potential therapeutic target for *Acinetobacter baumannii* infection [J]. *Journal of Biomedical Science*, 2020, 27(1): 26. DOI:10.1186/s12929-020-0617-7.
- [17] PRASADARAO N V, BLOM A M, VILLOUTREIX B O, LINSANGAN L C. A novel interaction of outer membrane protein A with C4b binding protein mediates serum resistance of *Escherichia coli* K1 [J]. *The Journal of Immunology*, 2002, 169(11): 6352–6360. DOI:10.4049/jimmunol.169.11.6352.
- [18] JEANNIN P, MAGISTRELLI G, GOETSCH L, HAEUW J F, THIEBLEMONT N, BONNEFOY J Y, DELNESTE Y. Outer membrane protein A (OmpA): a new pathogen-associated molecular pattern that interacts with antigen presenting cells—impact on vaccine strategies [J]. *Vaccine*, 2002, 20: A23–A27. DOI:10.1016/s0264-410x(02)00383-3.
- [19] LIBON C, HAEUW J F, CROUZET F, MUGNIER C, BONNEFOY J Y, BECK A, CORVAIA N. *Streptococcus pneumoniae* polysaccharides conjugated to the outer membrane protein A from *Klebsiella pneumoniae* elicit protective antibodies [J]. *Vaccine*, 2002, 20(17/18): 2174–2180. DOI:10.1016/s0264-410x(02)00149-4.
- [20] KURUPATI P, RAMACHANDRAN N P, POH C L. Protective efficacy of DNA vaccines encoding outer membrane protein A and OmpK36 of *Klebsiella pneumoniae* in mice [J]. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2011, 18(1): 82–88. DOI:10.1128/CVI.00275-10.
- [21] BENGOCHEA J A, PESSOA J S. *Klebsiella pneumoniae* infection biology: living to counteract host defences [J]. *Fems Microbiology Reviews*, 2019, 43(2): 123–144. DOI:10.1093/femsre/fuy043.
- [22] 马永驰. 肺炎克雷伯菌耐药研究进展 [J]. 中国卫生标准管理, 2020, 11(19): 166–168. DOI:10.3969/j.issn.1674-9316.2020.19.066.
- MA Y C. Research progress on *Klebsiella pneumoniae* resistance [J]. *China Health Standard Management*, 2020, 11(19): 166–168. DOI:10.3969/j.issn.1674-9316.2020.19.066.
- [23] 陶锦华, 李康然, 韦平. 石龟肺炎克雷伯氏菌感染的诊断与防治 [J]. 广西畜牧兽医, 2002(6): 20–21. DOI:10.3969/j.issn.1002-5235.2002.06.011.
- TAO J H, LI K R, WEI P. Diagnosis and prevention of *Klebsiella pneumoniae* infection in stone turtle [J]. *Guangxi Journal of Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2002(6): 20–21. DOI:10.3969/j.issn.1002-5235.2002.06.011.
- [24] 解庭波. 大肠杆菌表达系统的研究进展 [J]. 长江大学学报(自科版)医学卷, 2008(3): 77–82. DOI:10.3969/j.issn.1673-1409-B.2008.03.034.
- XIE T B. Research progress of *Escherichia coli* expression system [J]. *Journal of Yangtze University (Natural Science Edition)*, 2008(3): 77–82. DOI:10.3969/j.issn.1673-1409-B.2008.03.034.
- [25] 杨萌, 高爽爽, 谢业扬, 段家文, 陆专灵, 韦友传. 卵形鲳鲹 JAK3 蛋白的原核表达与纯化 [J]. 广东农业科学, 2020, 47(1): 137–142. DOI:10.16768/j.issn.1004-874X.2020.01.019.
- YANG M, GAO S S, XIE Y Y, DUAN J W, LU Z L, WEI Y C. Prokaryotic expression and purification of JAK3 protein in golden pompano (*Trachinotus ovatus*) [J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2020, 47(1): 137–142. DOI:10.16768/j.issn.1004-874X.2020.01.019.
- [26] DUBENDORFF J W, STUDIER F W. Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1991, 219(1): 45–59. DOI:10.1016/0022-2836(91)90856-2.
- [27] DOBRIJEVIC D, NEMATOLLAHI L A, HAILES H C, WARD J M. PET expression vector customized for efficient seamless cloning [J]. *Biotechniques*, 2020, 69(5): 384–387. DOI:10.2144/btn-2020-0101.
- [28] LI G, WUBSHET A K, DING Y, LI Q, DAI J, WANG Y, HOU Q, CHEN J, MA B, SZCZOTKA-BOCHNIARZ A, SZATHMARY S, ZHANG Y, ZHANG J. Antigenicity and immunogenicity analysis of the *E. coli* expressed FMDV structural proteins: VP1, VP0, VP3 of the South African territories type 2 virus [J]. *Viruses*, 2021, 13(6). DOI:10.3390/v13061005.
- [29] SILVARAJ S, MD YASIN I S, Karim M M A, SAAD M Z. Elucidating the efficacy of vaccination against vibriosis in lates calcarifer using two recombinant protein vaccines containing the outer membrane protein K (r-OmpK) of *Vibrio alginolyticus* and the DNA chaperone J (r-DnaJ) of *Vibrio harveyi* [J]. *Vaccines (Basel)*, 2020, 8(4): 660. DOI:10.3390/vaccines8040660.
- [30] GUO X, SUN W, WEI L, WANG X, ZOU Y, ZHANG Y, LI S, WANG N, JIANG M, ZHAO H, QU E, PANG Y, YIN J, REN G. Development and evaluation of a recombinant VP2 neutralizing epitope antigen vaccine candidate for infectious bursal disease virus [J]. *Transbound and Emerging Diseases*, 2021, 68(6): 3658–3675. DOI:10.1111/tbed.13974.
- [31] 包义风, 应莲芳, 蒋琳. 包涵体蛋白复性技术研究进展 [J]. 微生物学免疫学进展, 2012, 40(2): 84–88. DOI:10.13309/j.cnki.pmi.2012.02.007.
- BAO Y F, YING L F, JIANG L. Research progress in renaturation of inclusion body protein [J]. *Progress in Microbiology and Immunology*, 2012, 40(2): 84–88. DOI:10.13309/j.cnki.pmi.2012.02.007.
- [32] CARRIO M M, VILLAVERDE A. Construction and deconstruction of bacterial inclusion bodies [J]. *Journal of Biotechnology*, 2002, 96(1): 3–12. DOI:10.1016/s0168-1656(02)00032-9.
- [33] 郑钰超, 李佳萌, 沈万鹏, 吴帆, 王弼君, 李玉萍, 宗利强, 庄素素, 李越希. VZV 外膜蛋白 E 胞外区的原核表达及其免疫特性研究 [J]. 药物生物技术, 2020, 27(3): 189–194. DOI:10.19526/j.cnki.1005-8915.20200301.
- LI Y C, LI J M, SHEN W P, WU F, WANG B J, LI Y P, ZONG L Q, ZHUANG S S, LI Y X. Prokaryotic expression of VZV outer membrane protein E extracellular domain and study of immune characteristics [J]. *Pharmaceutical Biotechnology*, 2020, 27(3): 189–194. DOI:10.19526/j.cnki.1005-8915.20200301.