

DOI:10.13350/j.cjpb.231203

• 论著 •

乳酸乳球菌介导日本血吸虫重组 LL-Sj26GST 疫苗的构建、鉴定及表达^{*}

李文桂^{**}, 欧兴坤, 何爱琳

(重庆医科大学附属第一医院传染病寄生虫病研究所, 重庆 400016)

【摘要】 目的 构建以乳酸乳球菌(LL)为载体的日本血吸虫(Sj)rLL-Sj26GST 疫苗,并研究其表达效率。方法 以 pGEX-Sj26GST 为模板 PCR 扩增 Sj26GST 基因片段,经 Xba I 和 Hind III 双酶切后插入 pMG36e,构建重组质粒 pMG36e-Sj26GST,转化大肠埃希菌 BL21(DE3)感受态细胞。抽提质粒,经双酶切鉴定正确后电穿孔转化乳酸乳球菌 MG1363 株,构建日本血吸虫 rLL-Sj26GST 疫苗,抽提质粒进行 PCR 鉴定。结果 pMG36e-Sj26GST 经双酶切获得预期大小的目的片段,重组质粒构建正确。提取具有罗红霉素抗性的 rLL 质粒进行 PCR,扩增出 676 bp 的 Sj26GST 基因片段;SDS-PAGE 分析显示 rLL 可表达 26 ku 的 Sj26GST 蛋白,表达蛋白约占菌体总蛋白的 18%;Western blot 检测表达蛋白可被 Sj 感染者血清识别。结论 成功构建日本血吸虫 rLL-Sj26GST 疫苗,表达的 Sj26GST 蛋白具有反应原性。

【关键词】 乳酸乳球菌;日本血吸虫;Sj26GST;疫苗

【中图分类号】 R378.1

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2023)12-1375-06

[Journal of Pathogen Biology. 2023 Dec;18(12):1375-1380.]

Construction, identification and expression of *Lactococcus lactis*-based recombinant LL-Sj26GST vaccine of *Schistosoma japonicum*

LI Wengui, OU Xingkun, HE Ailin (Institute of Infections and Parasitic Diseases, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

【Abstract】 **Objective** To construct *Lactococcus lactis* (LL)-based recombinant LL-Sj26GST vaccine of *Schistosoma japonicum* and observe its expression efficiency. **Methods** Sj26GST gene was obtained by PCR from the template of pGEX-Sj26GST, the gene was cloned into pMG36e to construct pMG36e-Sj26GST and transformed into *E. coli* BL21 (DE3) competent cell, the recombinant plasmid was identified by restriction endonuclease digestion, then was electroporated into LL to construct rLL-Sj26GST vaccine, the vaccine was identified by PCR. **Results** The products of restriction endonuclease digestion were the same as expected; PCR showed that 676 bp Sj26GST gene was amplified when the extracted plasmid from rLL as template; the relative molecular mass (*M_r*) of the expressed Sj26GST protein was approximately 26 ku by SDS-PAGE, the amount of the expressed protein was 18% of the total bacterial proteins; western blotting suggested that the expressed protein could be recognized by sera from Sj patients. **Conclusion** The rLL-Sj26GST vaccine was successfully constructed, and the expressed protein shows specific antigenicity.

【Key words】 *Lactococcus lactis*; *Schistosoma japonicum*; Sj26GST; vaccine

^{***}日本血吸虫(*Schistosoma japonicum*, Sj)引起的血吸虫病是国家卫健委重点防治的寄生虫病之一。该病常用吡喹酮等药物进行化疗,但易产生抗药性^[1], Von Lichtenberg 等^[2]认为人类和鼠类感染血吸虫后可产生部分抵抗力,提示血吸虫能在宿主体内诱导保护性免疫应答。Dunne 等^[3]证明降低感染后的成虫负荷可减轻其病理损伤和疾病的传播,这为研制血吸虫疫苗提供了理论依据。Sj26GST 抗原具有谷胱甘肽-S 转移酶 (Glutathione-S-transferase, GST) 的活性,与 Sj 的生长发育密切相关。用重组的 Sj26GST 蛋白或 DNA 疫苗接种小鼠,尾蚴攻击后可产生一定的减虫和减卵效果,表明该蛋白可作为有效的疫苗候选分

子^[4-5]。

乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*, LL)是乳制品工业发酵的重要菌类,具有加速食品酸化、增加食物营养及改善食物品质的作用,是一种成熟的疫苗载体。这些重组乳球菌苗具有下述优点:它是一种发酵工业长期使用的食品级益生菌,是一种公认为安全的微生物;

^{*} **【基金项目】** 国家自然科学基金项目 (No. 30801052, 30671835, 30500423, 30200239)。

^{**} **【通讯作者(简介)】** 李文桂 (1967-), 男, 湖北郧县人, 博士, 研究员, 主要从事病原微生物的分子生物学和分子免疫学研究。E-mail: cqliwengui@163.com

易培养,基因操作简便可靠,转化效率高,重复性好;乳球菌是一种革兰阳性菌,不分泌内毒素,表达的外源蛋白不需纯化,可连同菌体直接服用;乳球菌通常不产生胞外蛋白酶,不会在细胞外对分泌的外源蛋白进行降解;乳球菌通常较少分泌自身蛋白,减少了载体自身蛋白对分泌的外源蛋白的干扰;外源蛋白既可在胞内表达,也可在细胞壁进行表达,还可以分泌到胞外进行表达;乳球菌具有免疫佐剂作用、固有免疫原性和对胆汁酸的抵抗力;乳酸菌能在消化道定植,对维持微生态的平衡具有重要作用;乳酸菌与微颗粒疫苗的大小相似,可将抗原递呈给肠粘膜组织的M细胞,诱导免疫应答;可准确定位外源蛋白在乳酸菌中的表达位置;乳酸菌可直接口服,模仿自然感染的途径,能保证大部分黏膜的表面区域接触疫苗,开启由sIgA介导的第一道防线;乳酸菌口服后可在肠上皮和肠道相关淋巴组织(gut-associated lymphoid tissue, GALT)黏附、侵入和增殖,单剂口服后可在体内生存数周并稳定表达目的蛋白;目的蛋白被GALT的微皱折细胞吞噬,经抗原提呈细胞处理后进入小肠黏膜下的集合淋巴结中致敏T和B淋巴细胞,产生免疫应答;致敏的T和B淋巴细胞还可经黏膜共刺激系统转移至全身各处的相关黏膜组织,产生sIgA;sIgA分泌至肠腔后,发挥阻止病原体黏附、免疫清除、溶解细菌和中和病毒等作用;每天产生大量的抗体,超过60%的抗体蛋白分泌至胃肠道中,使病原体很难通过黏膜表面进入宿主组织中;可产生群体免疫;可诱导全身耐受,因而能抵抗T细胞引起的迟发性炎症反应^[6]。本研究在已制备的重组质粒pGEX-Sj26GST^[7]基础上,将该质粒采用电转染技术转化LL,制备rLL-Sj26GST疫苗,观察其免疫效果,为血吸虫病的免疫预防提供一条新途径。

材料与方 法

1 材料

1.1 菌株和质粒 乳酸乳球菌MG1363株和BL21(pMG36e)菌株遵义医科大学周必英教授提供,BL21(pGEX-Sj26GST)重组菌株由本所构建并保存。

1.2 主要试剂 高效感受态细胞制备试剂盒,质粒提取试剂盒,高保真即用PCR扩增试剂盒,N,N-亚甲基双丙烯酰胺,丙烯酰胺,联苯二胺和考马斯亮蓝购于上海生工公司;DNA标志物为立陶宛Fermentas公司产品;蛋白分子质量标准购于北京鼎国兴盛生物技术公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗人抗体购于北京鼎今生物科技公司;Sj感染的患者血清由武汉市疾控中心王家刚教授提供;LB培养基和MRS培养基由本所制备。

2 方法

2.1 引物设计与合成 根据GenBank上登录的日本血吸虫Sj26GST的cDNA序列及pMG36e载体的特点自行设计1对引物,P1为Sj26GST上游引物,引物序列为:5'-GCTCTAGAATGTCCCCTATACTAGGTTAT-3';P2为Sj26GST下游引物,引物序列为:5'-GCAAGCTTTTACAATCGTTTGTAAATCCG-3'。在上、下游引物的5'端分别引入Xba I和Hind III酶切位点(下划线部分)和2个保护性碱基(GC)。引物委托上海生工公司合成。

2.2 Sj26GST 抗原基因的扩增

2.2.1 pGEX-Sj26GST 质粒的扩增 将保存的BL21-Sj26GST重组菌用接种环挑取后划线接种含50 μg/mL氨苄青霉素的LB固体培养基,在CO₂培养箱培养48~72 h;用接种环挑取上述筛选培养基上的单个菌落,加入含50 μg/mL氨苄青霉素的LB培养液中,用细菌振荡器在37℃和200 r/min转速下培养48~72 h,通过质粒抽提试剂盒抽提目标质粒。

2.2.2 Sj26GST 基因的PCR扩增及鉴定 以重组质粒pGEX-Sj26GST为模板PCR扩增Sj26GST抗原基因。扩增体系:PCR master 25 μL,P1引物2 μL,P2引物2 μL,重组质粒模板2 μL,去离子水19 μL。上述试剂加入PCR反应管中后再加入25 μL的石蜡油进行密封。扩增条件:96℃预变性4 min;94℃变性1 min,56℃退火1 min,72℃延伸2 min,共35个循环;72℃再延伸10 min。吸取3 μL PCR产物进行1.2%琼脂糖凝胶电泳分析。

2.3 pMG36e 载体的提取 用接种环挑取保存的BL21(pMG36e)菌株,划线接种于含5 μg/mL罗红霉素的LB固体培养基上,37℃孵育48~72 h;挑选单个菌落至含5 μg/mL罗红霉素的LB培养液中,37℃、250 r/min振荡培养48~72 h,按照UNIQ-10柱式质粒小量抽提试剂盒说明书抽提质粒pMG36e。

2.4 重组质粒 pMG36e-Sj26GST 的构建及鉴定

2.4.1 目的基因和载体的酶切 Sj26GST基因PCR产物和载体pMG36e分别用Xba I和Hind III进行双酶切。酶切体系均为60 μL:9.4 μL灭菌去离子水,6 μL 10×Tango Buffer,42 μL PCR产物或载体,1.3 μL Xba I,1.3 μL Hind III L。上述酶切体系混匀后以5 000 r/min(离心半径18 cm)离心15 s,置37℃水浴2 h。

2.4.2 酶切产物的纯化 按照UNIQ-10柱式PCR产物纯化试剂盒的说明书进行操作。

2.4.3 连接 按照酶切后载体与目的基因约1:5的摩尔比及T4 DNA连接酶的说明建立20 μL的连接体系:4 μL目的基因,12 μL载体大片段,2 μL的10×T4 Buffer,2 μL的T4 DNA连接酶。连接体系混匀

后以 5 000 r/min 离心 15 s, 4 °C 过夜后置 70 °C 10 min 灭活 T4 DNA 连接酶。

2.4.4 连接产物转化 BL21 感受态细菌 将连接产物转化 BL21 感受态细菌,用细菌振荡器在 37 °C 和 1 500 r/min 转速下培养 1 h,随即接种在含 5 μg/mL 罗红霉素的 LB 固体培养基上,37 °C 孵育 48~72 h。

2.4.5 重组质粒 pMG36e-Sj26GST 的酶切鉴定 挑取上述筛选培养基上单个菌落至含 5 μg/mL 罗红霉素的 LB 培养液中,用细菌振荡器在 37 °C 和 200 r/min 转速下培养 48~72 h,用质粒抽提试剂盒提取重组质粒 pMG36e-Sj26GST。然后用上述相同的酶切体系进行 Xba I 和 Hind III 双酶切鉴定。

2.5 乳酸乳球菌 MG1363 感受态的制备 用接种环挑取保存的乳酸乳球菌,划线接种在 MRS 固体培养基上,37 °C 孵育 48~72 h;挑选单个菌落加至 100 mL 的 MRS 液体培养基(含 0.5 mol/L 蔗糖)中,37 °C 厌氧培养 24~72 h,冰浴 2.5 h,4 °C、5 000 r/min 条件下离心 10 min,弃上清;加入 50 mL 预冷的 10% 甘油,4 °C 在离心转速 3 000 r/min 离心 10 min,弃上清;加入 25 mL 预冷的 10% 甘油混悬菌体,4 °C、2 000 r/min 离心 10 min,弃上清;加入 10 mL 预冷的 10% 甘油混悬菌体,4 °C、1 500 r/min 离心 10 min,弃上清;加入 1.5 mL 预冷的 10% 甘油,混匀后用于电转化。

2.6 rLL-Sj26GST 疫苗的构建与鉴定 将直径 1 cm 的电穿孔杯冰浴 10 min,加入 20 μL 的重组质粒 pMG36e-Sj26GST 和 80 μL 的乳酸乳球菌 MG1363 株感受态,混匀,静置 10 min 后放入电穿孔仪的槽中进行电转化,设置电压 0.5~2.5 kv,时间常数 5 ms 和转化次数 1~10 次,根据转化效果确定最适转化条件。电击后在电穿孔杯中加入 1 mL 的 MRS 培养基,用细菌振荡器在 37 °C 和 150 r/min 转速下培养 2 h,用接种环挑取菌悬液,划线接种含罗红霉素 5 μg/mL 的平板上,在 CO₂ 培养箱培养 48~72 h;挑选单个菌落,加入 MRS 培养基(含 0.5 mol/L 蔗糖和 5 μg/mL 的罗红霉素)中增菌培养 48~72 h,用质粒抽提试剂盒提取质粒进行 PCR 鉴定。PCR 扩增体系和反应条件同上。

2.7 rLL-Sj26GST 疫苗的表达与鉴定

2.7.1 rLL 疫苗的表达 用接种环挑取鉴定正确的重组 rLL 菌接种 MRS 选择培养基(含 0.5 mol/L 蔗糖和 5 μg/mL 的罗红霉素),用细菌振荡器在 37 °C 和 200 r/min 转速下振荡培养,分别于培养后 1、2、3、4 和 5 d 收集 1 mL 菌液,以 5 000 r/min 离心 2 min,留取菌体沉淀,煮沸裂解后进行 10% SDS-PAGE 电泳,通过凝胶成像仪进行扫描分析。

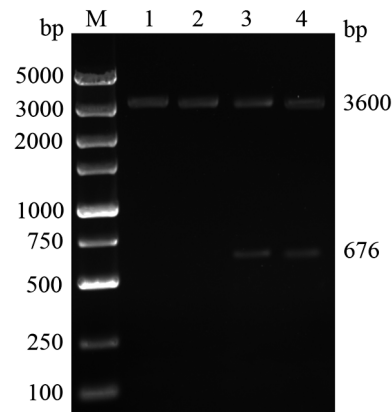
2.7.2 rLL 疫苗的 Western blot 分析 取 rLL-

Sj26GST 疫苗和空载体 LL(pMG36e)疫苗分别进行 SDS-PAGE 电泳,然后通过半干法将凝胶蛋白转移至硝酸纤维素膜,在 150 mA 恒流条件下转膜 2 h,用封闭 2 h,磷酸盐缓冲液洗涤 3 次;加入 1:100 稀释的 Sj 感染者血清 100 μL,4 °C 孵育 2 h,磷酸盐缓冲液洗涤 3 次;加入 1:1 000 稀释的 HRP 标记羊抗人 IgG 抗体 100 μL,4 °C 孵育 2 h,磷酸盐缓冲液洗涤 3 次;加入底物联苯二胺显色并成像。

结果

1 重组质粒 pMG36e-Sj26GST 的双酶切鉴定

取重组质粒进行双酶切,得到大小约 3 600 bp 的载体片段和 676 bp 的 Sj26GST 基因片段;空载体对照无 676 bp 的基因片段(图 1)。



M DNA 标志物 1,2 pMG36e 空载体对照 3,4 pMG36e-Sj26GST 双酶切

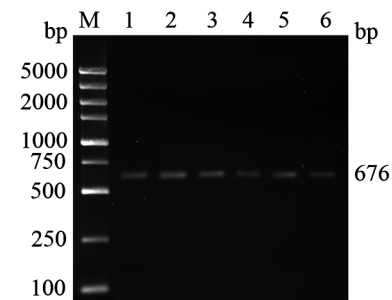
图 1 重组质粒 pMG36e-Sj26GST 双酶切鉴定

M DNA marker 1,2 pMG36e vector 3,4 Endonuclease products of pMG36e-Sj26GST

Fig. 1 Restriction endonuclease identification of pMG36e-Sj26GST

2 rLL-Sj26GST 疫苗的 PCR 鉴定

将抽提的目标质粒作为底物进行 PCR 克隆,1.2% 琼脂糖凝胶电泳分析显示克隆出大小约 676 bp 的目的基因片段(图 2),与预期 Sj26GST 基因片段大小相符。



M DNA 标志物 1~6 pMG36e-Sj26GST 的 PCR 产物

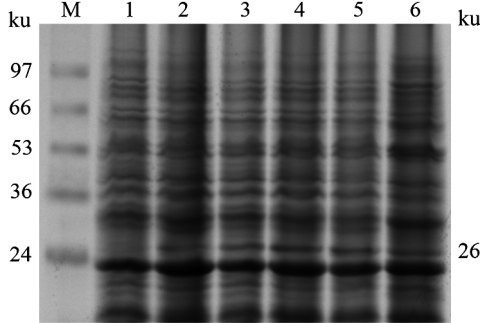
图 2 rLL-Sj26GST 疫苗的 PCR 鉴定

M DNA marker 1-6 PCR products of pMG36e-Sj26GST

Fig. 2 PCR identification of rLL-Sj26GST vaccine

3 rLL-Sj26GST 疫苗的 SDS-PAGE 分析

rLL-Sj14-3-3 疫苗培养 0~5 d 后, SDS-PAGE 检测表达产物, 结果如图 3。表达蛋白分子质量约为 26 ku, 与预期相符。目的蛋白在培养 2~3 d 时表达量较高, 约占菌体总蛋白的 18%。未培养的重组 LL 不表达该蛋白。



M 蛋白分子质量标准 1 未培养的 rLL-Sj26GST 2~6 分别为培养 1、2、3、4、5 d 的 rLL-Sj26GST 疫苗

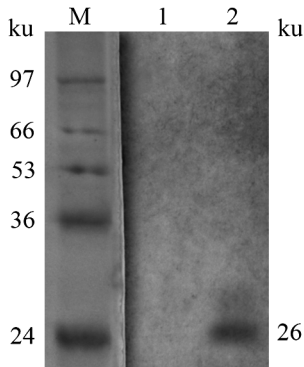
图 3 rLL-Sj26GST 疫苗表达产物的 SDS-PAGE 分析

M Protein marker 1 rLL-Sj26GST without culture 2-6 rLL-Sj26GST with culture for 1, 2, 3, 4 and 5 d, respectively

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of rLL-Sj26GST vaccine

4 rLL-Sj26GST 疫苗的 Western blot 鉴定

分别取 rLL-Sj26GST 疫苗和空载体 LL (pMG36e) 疫苗培养、裂解后进行 SDS-PAGE 电泳, 转膜后以 Sj 感染者血清为一抗进行 Western blot, 结果如图 4。目的蛋白可被 Sj 感染者血清识别, 反应条带位于 26 ku 处。空质粒对照无此反应条带。



M 蛋白分子质量标准 1 空载体对照组 2 Sj26GST 蛋白与 Sj 感染者血清反应条带

图 4 rLL-Sj26GST 表达产物的 Western blot 分析

M Protein marker 1 Control 2 Sj26GST protein

Fig. 4 Western blotting identification of Sj26GST protein expressed in rLL-Sj26GST vaccine

讨论

本研究前期先后以 BCG、粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*, Efs) 和两歧双歧杆菌 (*Bifidobacteria bifidum*, Bb) 为载体构建了重组 BCG-Sj26GST 疫苗、重组 Efs-Sj26GST 疫苗以及 Bb-Sj26GST/Sj26GST-Sj32 疫苗。其中用重组 BCG-Sj26GST 疫苗皮下注射

BALB/c 鼠, 在注射后 8 周用 Sj 尾蚴进行攻击, 6 周后小鼠肝组织的减虫率和减卵率分别为 16.64%~46.20% 和 55.75%~60.50%, 血清 IgG 和 IgG2a 水平升高; Western blot 显示重组 Efs-Sj26GST 疫苗表达的融合蛋白能被 Sj 感染者血清识别; 重组 Bb-Sj26GST/Sj26GST-Sj32 疫苗皮下注射和滴鼻接种 BALB/c 鼠均可产生有效的 T_{H1} 应答^[8-14]。Li 等^[15]以枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*, Bs) 为载体构建了重组 Bs-Sj26GST 疫苗, 将其经口灌胃免疫 BALB/c 鼠, 可诱导有效的体液免疫应答。Chen 等^[16]以鼠伤寒沙门菌 (*Salmonella typhimurium*, St) 为载体构建了重组 St-Sj23LHD-GST 疫苗, 经口灌胃免疫 BALB/c 鼠后用尾蚴攻击, 显示该疫苗可诱导 41.69% 的肝组织减虫率和 57.71% 减卵率。Wei 等^[17]以伪狂犬病毒 (*Pseudorabies virus*, PRV) 为载体构建了重组 PRV-Sj26GST 疫苗, 肌肉注射绵羊后用尾蚴攻击, 结果表明该疫苗可诱导 48.5% 的肝组织减虫率和 62.0% 减卵率。上述资料表明这些载体疫苗可诱导宿主产生有效的免疫应答, 从而对抗 Sj 尾蚴的攻击感染。但现有研究提示重组 BCG 疫苗生长缓慢, 转化效率低, 外源基因的表达需特殊载体等; 重组粪肠球菌和重组 Bb 疫苗长期低剂量口服可导致宿主体内的正常生理菌群紊乱, 破坏肠道的微生态平衡; 重组 Bs 菌苗含有大量胞内和胞外的蛋白水解酶, 使外源蛋白无法稳定存在; 重组沙门菌苗的表达产物与天然蛋白存在差异, 表达水平较低; PRV 的载体自身具有潜在的致癌和致病性, 人群普遍具有抗病毒的抗体, 影响其免疫效果。因此, 亟待研制新型载体疫苗。

为了将外源 DNA 有效引入乳酸乳球菌, 需构建大肠埃希菌-乳球菌穿梭表达载体。这类载体常分为组成型和诱导型, 其中 pMG36e 和 pNZ8148 是其中的模式载体^[18-21]。pMG36e 质粒大小为 3.6 kb, 通常含有 p32 启动子及其下游部分的开放阅读框、来自 pUC18 的多克隆位点、乳酸乳球菌乳脂亚种蛋白酶 (PrtP) 基因的转录终止子、pWV01 的复制子和源自 pE194 质粒的罗红霉素抗性基因 (Em^R) 等。p32 启动子是 RNA 聚合酶结合的区域, 在该启动子的作用下, 结构基因的表达大体恒定在一定水平上, 在不同组织部位表达水平大致相似。开放阅读框是一段在 mRNA 的起始密码子与终止密码子之间的序列, 是编码目的蛋白的基因。pMG36e 使用罗红霉素作为筛选标记。pNZ8048 质粒在 ATG 起始密码子的附近引入 NcoI 位点, 可以对靶基因进行扩增, 从而直接克隆与 nisA 起始密码子融合的基因。pNZ8148 质粒是在 pNZ8048 质粒的基础上除去了枯草芽孢杆菌残余的 60 bp DNA 片段, 使其符合自克隆指南, 改进的

pNZ8148 质粒避免了专用 NcoI 位点的缺点。pNZ8148 是一种食品级的表达载体,常使用乳菌肽作为筛选标记。食品级的表达载体 pMG36e-NisI 和 pMG36e-aga 分别利用乳菌肽和木糖作为筛选标记。

乳酸乳球菌 NCD0712 株经过紫外线照射可得到 MG1363 株,将 nisin 调控基因 nisR 和 nisK 插入 MG13673 株的氨基肽酶 N 基因 (pepN) 可得到 NZ9000 新菌株。乳酸乳球菌的细胞壁厚而且复杂,摄取外源 DNA 较为困难。Weaver 等^[22]证实电场强度为 kV/cm 和持续时间为 ms 级的电脉冲刺激会使细胞膜发生电穿孔 (electroporation, EP) 现象。现在认为 EP 技术是一种高效的物理转染方法,它利用高于某一阈值的外加电脉冲刺激细胞膜,导致细胞的膜磷脂双分子结构发生重排,形成瞬时性空洞,从而使外源性大分子通过空洞进入细胞,具有作用机制相对明确和转化效率高等优点。

不同乳酸乳球菌菌株具有不同的电转染条件,需要进行优化。许多因素影响 EP 的转化效率^[23-25],如脉冲场电压、电容、脉冲时间、脉冲次数,细胞生长期、细胞密度、细菌培养温度、细胞电击前后冰浴时间,质粒大小、浓度、构象和纯度,以及电穿孔缓冲液和电穿孔后培养液等。脉冲场电压和脉冲次数是影响转染效率的主要因素,电压太小和脉冲次数少,转染效率低;若电压太大和脉冲次数多,则电击后细胞不能存活。脉冲时间过短或脉冲次数过少,可能影响细胞膜上瞬时空洞的形成;脉冲时间过长或脉冲次数过多,电穿孔时产生的热量过多,导致细菌死亡率增加或后续培养时失去生物学功能。将 pMG36e 电转化乳酸乳球菌 ML23 株时,在所用 MRS 培养基中加入 2% 甘氨酸和 0.5 mol/L 蔗糖,设置电压 1.1 kv/cm 和电容 25 μ F 可获得较好的转化效率;将 pNZ8148 电转化乳酸乳球菌 NZ9000 株时,在所用 MRS 培养基中加入 2.5% 甘氨酸,设置电压 2.5 kv/cm,在电击后恢复培养 1.6 h 也可获得较高的转化效率。质粒的大小也影响转染效果,质粒愈大,电转效率和细菌存活愈低,一般认为质粒浓度在 10~100 ng/ μ L 范围时不影响转化效率。超螺旋质粒的转染效率高于线形或开环质粒,高纯度的质粒转染效率显著增加。细菌密度、细菌培养温度以及细菌的生长周期也影响转染,细菌密度愈高,转化效率就愈高;细菌的培养温度影响其增殖速度,当细菌达到对数生长期时,有丝分裂旺盛,容易接纳外源 DNA。本研究将对数生长期的细菌制成感受态,采用 1.6 kV/cm 的电压和 2 次脉冲即可获得较高的转染效率,转化效率可达 $10^4\sim 10^8/\mu$ g 的 DNA。

近期报道以 LL 为载体的疫苗^[26-32]有:表达猪带绦虫 (*Taenia Solium*) TSOL18 蛋白的重组 LL-

TSOL18 疫苗,表达柔嫩艾美耳球虫 (*Eimeria tenella*) 3-1E 蛋白的重组 LL-3-1E-CWA 疫苗,表达恶性疟原虫 (*Plasmodium falciparum*) Pf48/45 蛋白的重组 LL-Pf48/45 疫苗,表达硕大利什曼原虫 (*Leishmania major*) PPsp15 的重组 LL-PPsp15 疫苗,表达溶藻酸弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) VscO 蛋白的重组 LL-VscO 疫苗,表达流产布鲁氏菌 (*Brucella abortus*) BLS 蛋白的重组 LL-BLS 疫苗,以及表达猪流行性腹泻病毒 (*porcine epidemic diarrhea virus*) S1 蛋白的重组 LL-S1 疫苗。这些疫苗的接种剂量为 5×10^8 CFU 或 2×10^9 CFU,接种次数为 1 次、3 次或连续多次,接种途径有经口灌胃或皮下注射等,结果表明疫苗多次经口灌胃或皮下注射免疫 BALB/c 鼠均能诱导产生混合型的 T_H1 和 T_H2 应答,可部分对抗柔嫩艾美耳球虫卵囊的口服攻击或硕大利什曼原虫前鞭毛体的皮下注射攻击,但均未诱导完全的保护力。LL 是一种常见的口服益生菌,以 LL 为载体的疫苗也应该采取经口接种为最佳选择,但现有以 LL 为载体的疫苗保护力尚不理想,需要通过探索疫苗口服接种的剂量、次数、每次接种后的间隔时间以及可否加入佐剂等以提高疫苗的免疫效果,也需要摸索病原体的攻击途径、次数和能否对抗病原体的连续或联合攻击,进一步阐明疫苗诱导的免疫应答机制,这对于开拓该类疫苗的应用市场具有一定意义。

本实验将抽提的 pMG36e-Sj26GST 质粒采用电转染技术转化 LL 感受态,筛选和诱导培养后从重组 LL 抽提目标质粒,将其作为底物通过 PCR 克隆出 676 bp 的 Sj26GST 基因,初步制备的重组 LL 疫苗为下一步的疫苗实验提供了新材料。经 SDS-PAGE 分析,rLL-Sj26GST 疫苗培养 2~3 d 后可表达 26 ku 的 Sj26GST 蛋白,借助薄层扫描显现重组菌的表达效率达到 18%,Western blot 显示 rLL 表达的 Sj26GST 蛋白能被 Sj 感染者血清识别,表明 rLL 表达的目的蛋白能够正确折叠,具有反应原性,为 rLL 疫苗的保护力研究奠定了基础。

【参考文献】

- [1] Ismail M, Botros S, Metwally A, et al. Resistance to praziquantel: direct evidence from *Schistosoma mansoni* isolated from Egyptian villagers[J]. Am J Trop Med Hyg, 1999, 60(6): 932-935.
- [2] Von Lichtenberg F, Correa-Oliveira R, Sher A, et al. The fate of challenge schistosomula in the murine anti-schistosome vaccine model[J]. Am J Trop Med Hyg, 1985, 1(1): 96-106.
- [3] Dunne DW, Hagan P, Abath FGC. Prospects for immunological control of schistosomiasis[J]. Lancet, 1995, 345 (8963): 1488-1492.
- [4] Zhang JY, Gao WJ, Guo QR, et al. Helminth protein vaccine induced follicular T helper cell for enhancement of humoral

- immunity against *Schistosoma japonicum* [J]. Biomed Res Int, 2013, ID798164.
- [5] Zhu Z, Liu HF, Lu MB, et al. Construction, purification, and evaluation of multivalent DNA vaccine against *Schistosoma japonicum* [J]. Parasitol Res, 2011, 108(1):115-121.
- [6] Bahey-El-Din M, Gahan CG, Griffin BT. *Lactococcus lactis* as a cell factory for delivery of therapeutic proteins as live vaccines [J]. Curr Gen Ther, 2010, 10(1):34-45.
- [7] 张丽,李文桂. 日本血吸虫重组质粒 pGEX-Sj26GST 的构建及其在大肠埃希菌 BL21(DE3)中的表达[J]. 中华地方病学杂志, 2013, 32(6):608-611.
- [8] 李文桂,石佑恩,刘国元,等. 血吸虫重组 BCG-Sj26GST 疫苗接种后保护力的观察[J]. 同济医科大学学报, 1999, 28(1):13-16.
- [9] 李文桂,欧兴坤,何爱琳. 粪肠球菌介导的日本血吸虫重组疫苗的构建、鉴定及表达[J]. 中华地方病学杂志, 2023, 42(3):173-177.
- [10] 张丽,李文桂,向进平. 日本血吸虫重组两歧双歧杆菌(pGEX-Sj26GST)疫苗的构建及鉴定[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(21):2795-2797, 2800.
- [11] 张丽,李文桂,谭建蓉. 日本血吸虫重组 Bb 疫苗不同途径免疫 BALB/c 小鼠不同时间诱导的免疫应答作用[J]. 吉林大学学报(医学版), 2015, 41(1):69-76.
- [12] 向进平,李文桂. 日本血吸虫重组 Bb(pGEX-Sj26GST-Sj32)疫苗的构建及鉴定[J]. 中国病原生物学杂志, 2012, 7(10):762-766.
- [13] 向进平,李文桂,张丽. 日本血吸虫重组 Bb(pGEX-Sj26GST-Sj32)疫苗免疫小鼠后脾细胞增殖、亚群及凋亡的动态观察[J]. 细胞和分子免疫学杂志, 2013, 29(11):1129-1132.
- [14] 罗广旭,李文桂,覃婷. 日本血吸虫两歧双歧杆菌疫苗的构建及其表达[J]. 中华地方病学杂志, 2017, 36(4):257-260.
- [15] Li L, Hu XC, Wu ZD, et al. Immunogenicity of self-adjuvant oral vaccine candidate based on use of *Bacillus subtilis* spore displaying *Schistosoma japonicum* 26kDa GST protein [J]. Parasitol Res, 2009, 105(6):1643-1651.
- [16] Chen G, Dai Y, Chen JX, et al. Oral delivery of the Sj23LHD-GST antigen by *Salmonella typhimurium* type III secretion system protects against *Schistosoma japonicum* infection in mice [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2011, 5(9):e1313.
- [17] Wei F, Zhai Y, Jin H, et al. Development and immunogenicity of a recombinant *Pseudorabies virus* expressing Sj26GST and SjFABP from *Schistosoma japonicum* [J]. Vaccine, 2010, 28(32):5161-5166.
- [18] 丁寅寅,马会勤,左芳雷,等. 乳酸菌载体 pMG36e 的应用现状[J]. 中国生物工程杂志, 2009, 29(11):106-111.
- [19] 罗立新,王成. 乳酸乳球菌 NisI 的克隆及作为筛选标记[J]. 微生物学报, 2009, 49(9):1229-1233.
- [20] 王慧,劳晓,黄琳琳,等. 乳酸乳球菌表达系统及其启动子的研究进展[J]. 食品科学, 2022, 43(11):330-336.
- [21] Gu XX, Tan JX, Tian HT, et al. Construction of a food_grade expression vector based on pMG36e by using an α -galactosidase gene as a selectable marker[J]. J Integrative Agr, 2014, 13(8):1802-1808.
- [22] Weaver JC, Barnett A. Progress towards a theoretical model of electroporation mechanism: membrane electrical behavior and molecular transport [M]. Orlando, Florida: Academic Press, 1992, 91-117.
- [23] Nikyar A, Bolhassan A. Electroporation; an effective method for in vivo gene delivery[J]. Drug Delivery Lett, 2022, 12(1):35-45.
- [24] 王巧惠,王光强,宋馨,等. 不同质粒电转三种乳酸乳球菌的比较研究[J]. 工业微生物, 2016, 46(1):36-41.
- [25] 刘亚欣,王宇,杨诺,等. 乳酸乳球菌电击转化方法的优化[J]. 热带生物学报, 2020, 11(2):245-250.
- [26] Zhou BY, Sun JC, Li X, et al. Analysis of immune responses in mice orally immunized with recombinant pMG36e-SP-TSO18/*Lactococcus lactis* and pMG36e-TSO18/*Lactococcus lactis* vaccines of *Taenia solium* [J]. J Immunol Res, 2018, 2018:9262631.
- [27] Li GH, Ma CL, Wang D, et al. Recombinant *Lactococcus lactis* co-expressing dendritic cell target peptide and *E tenella* 3-1E protein: immune response and efficacy against homologous challenge[J]. Food Agri Immunol, 2020, 31(1):379-392.
- [28] Singh SK, Roeffen W, Mistarz UH, et al. Construction design, production and characterization of *Plasmodium falciparum* 48/45 RO. 6C subunit protein produced in *Lactococcus lactis* as candidate[J]. Microb Cell Fact, 2017 May 31;16(1):97.
- [29] Davarpanah E, Seyed N, Bahrami F, et al. *Lactococcus lactis* expressing sandfly PSp15 salivary protein confers long-term protection against *Leishmania major* in BALB/c mice[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2020, 14(1):e0007939.
- [30] Yang SP, Wu YZ, Huang YC, et al. Construction and evaluation of recombinant *Lactococcus lactis* expressing the vscO gene as a safe live oral vaccine against *Vibrio alginolyticus* [J]. Aquaculture Res, 2023, doi.org/10.1155/2023/7226451.
- [31] Fatehi Z, Doosti A, Jami MS, et al. Oral vaccination with novel *Lactococcus lactis* mucosal live vector-secreting brucella lumazine synthase (BLS) protein induces humoral and cellular immune protection against *Brucella abortus* [J]. Arch Microbiol, 2023, 205:122.
- [32] Wang LP, Han XH, Wang XB, et al. Construction and immunogenicity of recombinant *Lactococcus lactis* expressing diarrhea virus S1 protein of *porcine epidemic diarrhea virus* (PEDV)[J]. Ani Husb Feed Sci, 2018, 10(2):115-119, 125.

【收稿日期】 2023-05-22 【修回日期】 2023-08-06