

肺炎克雷伯菌菌毛粘附素克隆表达及其对体外培养细胞的粘附活性

李扬, 韩文瑜*, 雷连成, 李志杰, 石蕾

(吉林大学畜牧兽医学院预防兽医学系, 长春 130062)

摘要 【目的】肺炎克雷伯菌(*K. pn*)与宿主细胞的粘附是致病的首要条件,粘附过程主要通过菌毛粘附素 MrkD 蛋白介导。为了进一步分析 MrkD 蛋白与宿主细胞间的粘附机制,进一步确定 MrkD 蛋白的粘附阻断作用。【方法】构建肺炎克雷伯菌菌毛粘附素融合蛋白原核表达质粒 pGEX-4T-mrkD,转入大肠杆菌 BL21,优化诱导表达条件,表达产物经亲和层析纯化、凝血酶切除融合蛋白 GST 标签后,进行 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定。激光共聚焦显微镜定位 MrkD 蛋白在宿主细胞上的结合部位,通过粘附活性试验与粘附动力学试验研究了 MrkD 蛋白的生物活性。【结果】试验得到了分子量为 35 kDa 的 MrkD 蛋白,定位了 MrkD 蛋白在宿主细胞上的结合部位,并证明了 MrkD 蛋白可以显著影响肺炎克雷伯菌对宿主细胞的粘附力。【结论】本试验首次证实了 MrkD 蛋白的粘附阻断作用并观察到其与宿主细胞的作用位点,为研究肺炎克雷伯菌的致病机制,寻找粘附素功能表位奠定了基础。

关键词:肺炎克雷伯菌,粘附素,融合表达,粘附力

中图分类号:R392 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2009)05-0638-05

肺炎克雷伯菌菌毛粘附素 MrkD 蛋白,是介导肺炎克雷伯菌粘附肾基底外层表面膜、肺支气管上皮细胞和其他组织基底膜的粘附蛋白^[1]。已证实肺炎克雷伯菌对宿主细胞的粘附是致病的首要条件^[2-4],如果失去粘附能力,细菌无法有效地侵袭宿主细胞,产生的毒素也会很快被酶和化学物质灭活,毒力会大大降低^[5-6],因此研究其致病粘附的分子机制,对肺炎克雷伯菌感染的诊断和防治具有重要意义^[7]。

目前,对 MrkD 蛋白与宿主细胞间的粘附机制尚不明确,为更深入的开展对肺炎克雷伯菌感染的防治,阻断肺炎克雷伯菌与宿主细胞的特异性受体结合。本文进行了 MrkD 蛋白的融合表达、纯化鉴

定以及粘附定位和粘附活性研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、表达载体与细胞株:肺炎克雷伯菌 *K. pn* 4 株(Ⅲ型菌毛),由本实验室分离鉴定和保存^[8];大肠杆菌 BL21 由本室保存;pMD-D 克隆质粒由本室构建;表达载体 pGEX-4T-1 为 Amersham Pharmacia 公司产品;永生化人支气管上皮细胞(BEP-2D)由军事医学科学院放射医学研究所惠赠。

1.1.2 主要试剂和仪器:Glutathione Sepharose-4B 为 Amersham Pharmacia 公司产品;凝血酶(thrombin)购自 Sigma 公司生产;苯甲脒琼脂糖凝胶 FF 1mL 预装柱

基金项目:国家自然科学基金(30671570)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-431-87836001; E-mail: hwanwy@jlu.edu.cn

作者简介:李扬(1981-),男,吉林长春人,博士研究生,从事人兽共患病病原微生物及分子免疫学研究。E-mail: myth0317@126.com

收稿日期:2008-12-12;修回日期:2009-01-31

购自北京天来生物医学科技有限公司;兔抗肺炎克雷伯菌阳性血清本室自制;HRP 标记羊抗兔 IgG 抗体、异硫氰酸荧光素标记(FITC)的羊抗兔 IgG 抗体和 DAB 显色试剂盒购自中杉金桥生物公司;无血清无抗生素 HCL-8 培养液为 GIBCO 公司产品;激光共聚焦显微镜(FV1000 + IX81 型号),日本 Olympus 公司。

1.2 融合蛋白的表达、纯化鉴定及 GST 标签的切除

根据 mrkDv3 基因序列(GenBank Accession No. AY225464)设计特异性引物 P1(5'-CGCGGATCCATGAAAAAAGTACGCTTTTAT-3')和 P2(5'-CCGCTCGAGTTAATCG TACGTCAGGTTAAAG-3') (下划线表示引入的 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点),以 pMD-D 重组载体的大肠杆菌为模板扩增 mrkDv3 基因。将 mrkDv3 基因及载体 pGEX-4T-1 经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切回收、连接、转化 BL-21。将阳性菌接种于 1 L LB 培养基(氨苄抗性),置 37℃、220 r/min 摇床培养至 OD_{600} 约 0.5,加 IPTG 至终浓度 0.4 mmol/L,诱导 4 h 后经超声离心,加入谷胱甘肽(GST)亲和层析柱纯化融合蛋白。纯化后的融合蛋白加入 50 μ L 凝血酶(100 U)切割 GST 标签,在 22℃ 条件下保持 16 h,用苯甲脒琼脂糖凝胶 FF 亲和层析柱回收凝血酶。SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定纯化的 MrkD 蛋白。Western blot 所用的一抗为兔抗肺炎克雷伯菌阳性血清,二抗为 HRP 标记羊抗兔 IgG 抗体。

1.3 MrkD 粘附活性检测

1.3.1 细菌培养:肺炎克雷伯菌经 LB 平板复苏,37℃ 培养 24 h,挑单菌落接种于 5 mL LB 液体培养基,37℃ 培养 18 h;再按 1% 比例接种于 LB 液体培养基,培养 12 h 后 10000 \times g 离心 1 min,用无抗生素的 HCL-8 无血清培养液洗涤 2 次,并制成 1×10^8 CFU/mL 的菌悬液。

1.3.2 细胞培养:BEP-2D 细胞,无血清无抗生素 HCL-8 培养液传代培养,置含 5% CO₂ 的饱和湿度细胞培养箱,37℃ 培养至对数期时,用 24 孔板传代培养,18 h 后即可长满单层,每孔 400 μ L 细胞悬液,约含 1×10^5 个细胞。

1.3.3 细胞吸附试验:参照 Charland^[9]的粘附计数法。用 HCL-8 培养液将 MrkD 稀释至蛋白含量分别为 50 μ g、25 μ g、12.5 μ g,对照组 PBS,分别取 10 μ L 与上述菌悬液 100 μ L 混匀,每个处理均设 3 个重复,37℃ 孵育 1 h。用 HCL-8 培养液洗 2 次,接入已

长满单层 BEP-2D 细胞的 24 孔培养板,置含 5% CO₂ 的饱和湿度细胞培养箱,37℃ 培养 2.5 h。PBS 洗 3 次,加入 0.5 mL 去离子水,37℃ 放置 1 h,反复吹打,悬液做 $10^{-1} \sim 10^{-6}$ 的递倍稀释,各稀释度取 100 μ L 接种 LB 平板,37℃ 培养 24 h,记录平均菌落数。

1.3.4 MrkD 蛋白对肺炎克雷伯菌粘附动力的影响:取 MrkD 蛋白 50 μ g 与上述菌悬液 100 μ L 混匀,37℃ 孵育 1 h,分别于接种细胞后 0.5、1、2、4、8 h 做细菌粘附计数,以相同细菌悬液作对照,每个处理均设 3 个重复,方法同上。

1.3.5 细胞吸附抑制试验:取上述蛋白含量分别为 50、25、12.5 μ g 的蛋白悬液各 10 μ L 加入到已长满单层细胞的培养孔中,置含 5% CO₂ 的饱和湿度细胞培养箱,37℃ 孵育 1 h,接入上述菌悬液 100 μ L,置细胞培养箱继续孵育 2.5 h。粘附计数方法同上。

1.3.6 统计分析:本试验所有测试结果采用 SPSS13.0 软件一维方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异显著,以 $P < 0.01$ 为差异极显著,以 $P > 0.05$ 为差异不显著。

1.4 免疫荧光双标记

1.4.1 细胞爬片孵育、固定:灭菌的盖玻片,在 75% 乙醇中浸泡,180℃ 干烤 2 h,把干燥的玻片放在 24 孔培养板的孔中,将悬浮的细胞放入组织培养皿中,培养至少 16 h,让细胞贴附在玻片上;细胞爬片与 MrkD 蛋白在 37℃ 孵育 1 h,之后用多聚甲醛固定,备用。

1.4.2 免疫荧光双标:固定的细胞爬片用 PBS 洗涤 3 次;蛋白酶 K(20 μ g/mL)室温消化 1 min;PBS 洗涤 3 次;5% Tween-20 室温作用 30 min;正常羊血清室温封闭 30 min;孵育用一抗为 0.1% Triton 稀释的兔抗肺炎克雷伯菌阳性血清,稀释度为 1:200,37℃ 孵育 1 h;0.1% Triton 洗涤 3 次,每次 2 min;加入 FITC 标记的羊抗兔 IgG,稀释度为 1:300,37℃ 孵育 1 h,二抗孵育及以后所有步骤都应避光;0.1% Triton 洗涤 3 次;PI(碘化丙啶)复染细胞核 5 min;0.1% Triton 洗涤 3 次,每次 2 min,甘油覆盖 4℃ 即可^[10]。

1.4.3 激光共聚焦显微镜观察:样品在激光共聚焦显微镜(OLYMPUS FLUOVIEW FV1000)下扫描,光源分别用 488 nm 和 561 nm 波长的激光器激发绿色(代表免疫荧光标记的肺炎克雷伯菌和 MrkD 蛋白)和红色荧光(PI 标记的 BEP-2D 细胞),扫描分辨率 1024 \times 1024 pixel,计算机数据采集,数字成像。激光共聚焦图片用 Olympus Fluoview Ver.1.6 Viewer 软件处理。

2 结果

2.1 MrkD 蛋白纯化

SDS-PAGE 表明,用亲和层析柱纯化,并使用凝血酶切割得到了约 35 kDa 的蛋白,与目的蛋白大小一致(图 1)。Western blot 结果显示,出现一条与 SDS-PAGE 上 35 kDa 对应的蛋白条带(图 1),说明兔抗肺炎克雷伯菌阳性血清能与原核表达系统表达的 MrkD 蛋白结合,原核表达的 MrkD 蛋白有反应原性。

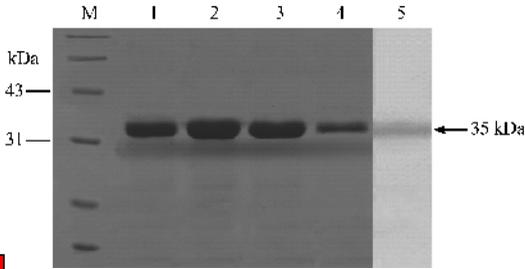


图 1 SDS-PAGE 及 Western blot 结果

Fig.1 The result of SDS-PAGE and Western blot. M, protein marker; 1-4, purified MrkD by SDS-PAGE; 5, purified MrkD by Western blot.

2.2 MrkD 在肺炎克雷伯菌粘附中的作用

2.2.1 上皮细胞粘附试验:试验结果表明,经过 MrkD 预处理的肺炎克雷伯菌再与 BEP-2D 细胞作用后,粘附菌数明显上升,且粘附菌数与 MrkD 浓度呈正相关。经 SPSS13.0 软件一维方差分析表明,各别间差异均极显著(图 2)。

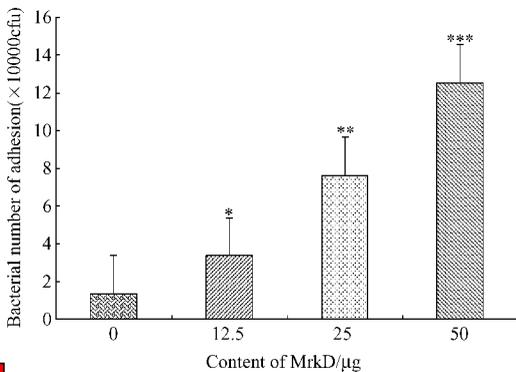


图 2 不同浓度 MrkD 蛋白孵育肺炎克雷伯菌后对其粘附力的影响

Fig.2 Adhering activity of *K. pn* with different MrkD level. Asterisk (*) indicates significant difference from control (MrkD 0 μg). Double asterisk (**) indicates significant difference both from control and MrkD 12.5 μg . Triple asterisk (***) indicates significant difference both from control and MrkD 12.5 μg and MrkD 25 μg .

2.2.2 肺炎克雷伯菌粘附动力学测定:试验结果表明(图 3),经过 MrkD 预处理的 *K. pn* 与 BEP-2D 细胞作用后,在 0.5 ~ 2 h 期间粘附菌数缓慢上升,之

后趋于平缓,经 SPSS13.0 软件一维方差分析, $P > 0.05$ 差异均不显著;未经 MrkD 预处理的 *K. pn* 与 BEP-2D 细胞作用后,在 0.5 ~ 2 h 期间粘附菌数迅速上升,之后趋于平缓,0.5 h 与 2 h 的粘附菌数经 SPSS13.0 一维方差分析, $P < 0.05$ 差异显著;同时, MrkD 预处理与对照组间 $P < 0.05$ 差异显著。结果表明 MrkD 不仅可以提高 *K. pn* 的粘附率,同时可以提高其粘附速度,但是两组均在 2 ~ 4 h 时达到粘附高峰。

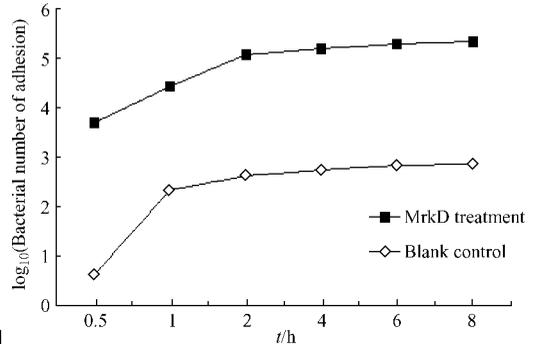


图 3 肺炎克雷伯菌粘附细胞的动力学曲线

Fig.3 Logarithmic curve of *K. pn* adhering activity.

2.2.3 上皮细胞吸附抑制试验:试验表明,经过 MrkD 预处理的细胞再同肺炎克雷伯菌孵育,粘附菌数明显下降,且粘附菌数与 MrkD 浓度呈负相关。经 SPSS13.0 软件一维方差分析表明,各组差异均极显著(图 4)。表明 MrkD 可以显著抑制肺炎克雷伯菌对宿主细胞的粘附。

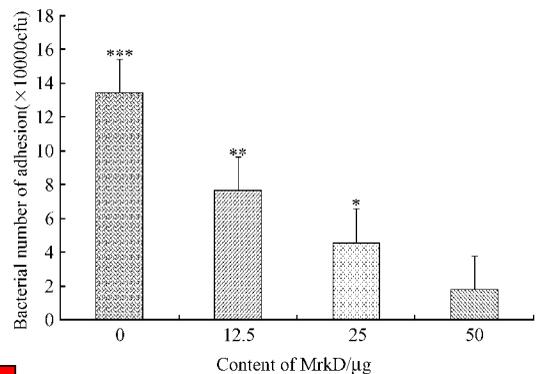


图 4 不同浓度 MrkD 蛋白孵育宿主细胞后对肺炎克雷伯菌粘附力的影响

Fig.4 Adhering activity of *K. pn* restrained by different MrkD level. Asterisk (*) indicates significant difference from MrkD 50 μg . Double asterisk (**) indicates significant difference both from MrkD 25 μg and MrkD 50 μg . Triple asterisk (***) indicates significant difference both from MrkD 12.5 μg and MrkD 25 μg and MrkD 50 μg .

2.3 激光共聚焦显微镜定位粘附蛋白

用 Olympus Fluoview Ver. 1.7a Viewer 软件处理

分析所采集到的图像,结果显示(图5)①肺炎克雷伯菌可以粘附到宿主细胞表面。②MrkD可以封闭细胞表面的肺炎克雷伯菌粘附受体,进一步证实MrkD可以阻断肺炎克雷伯菌对宿主细胞的粘附

(2.2 试验结果)。因此拮抗 MrkD 的粘附作用,可望阻断肺炎克雷伯菌对宿主的感染,对疫苗设计有重要参考价值。

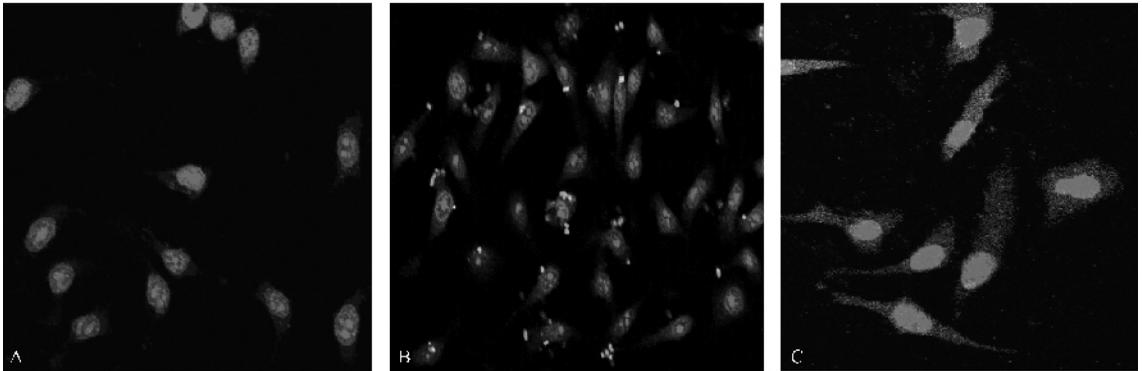


图5 激光共聚焦显微镜观察粘附定位

Fig.5 Laser confocal microscopy micrographs of BEP-2D cells after 30 min incubation with *K. pn* strain(B) and blank control(A). Micrographs of BEP-2D cells after 30 min incubation with MrkD protein(C). Cells were then stained with the anti-MrkD PAb and counterstained with FITC-conjugated anti-mouse.

3 讨论

肺炎克雷伯菌是重要的呼吸系统感染疾病,对缺乏抵抗力的个体来说有明显的发病率和死亡率^[11-12]。虽然抗生素仍然是处理肺炎克雷伯菌感染的最有效手段,但随着抗生素的滥用,肺炎克雷伯菌的多重耐药性使治疗其感染变成一个非常棘手的问题。因此,发现另一种控制肺炎克雷伯菌感染的方法是必要的。疫苗是另一种有效抵抗肺炎克雷伯菌感染的方法^[13]。

目前,报道的多数肺炎克雷伯菌感染疫苗是使用肺炎克雷伯菌菌体天然成分构成,如菌毛、荚膜多糖和 LPS^[14-15]。这类疫苗可以引起强大的体液免疫,但即使在有炎症的粘膜中检测出大量的特异性抗体,肺炎克雷伯菌感染却仍然无法消除,表明通过菌体天然成分激发的免疫应答并不是消除病原菌的方法。寻找有效的功能表位,进行新型表位疫苗的研究是一种可行的消除肺炎克雷伯菌感染的方法,前提是鉴定到合适的候选表位。细菌的粘附是决定病原菌能否感染的关键一步,肺炎克雷伯菌菌株能粘附于人畜组织细胞上,其中菌毛尖端的 35 kDa 粘附蛋白 MrkD 是主要的粘附素^[16]。国内外目前对 MrkD 蛋白与宿主细胞间的粘附机制尚不明确,为更深入的开展对肺炎克雷伯菌感染的防治,阻断肺炎克雷伯菌与宿主细胞的特异性受体结合。本试验通过原核表达、亲和层析纯化及融合标签的切割,得到了 MrkD 蛋白并采用同一菌株与 MrkD 蛋白作用后

进行细胞粘附试验的方法以及免疫荧光染色激光共聚焦显微镜观测,证实了 MrkD 蛋白可以阻断肺炎克雷伯菌粘附宿主细胞,可能富含粘附功能表位,可以对 MrkD 蛋白粘附功能表位进行分析,对新型表位疫苗的设计有重要的参考价值。

参考文献

- [1] Sebghati, Korhonen TK, Hornick, et al. Characterization of the type 3 fimbrial adhesins of *Klebsiella* strains. *Infection and Immunity*, 1998, 66(6): 2887 - 2894.
- [2] Hornick DB, Allen BL, Clegg S, et al. Adherence to respiratory epithelia by recombinant *Escherichia coli* expressing *Klebsiella pneumoniae* type 3 fimbrial gene products. *Infection and Immunity*, 1992, 60: 1577 - 1588.
- [3] Hornick DB, Thommandru J, Smits W, and Clegg S. Adherence properties of an mrkD-negative mutant of *Klebsiella pneumoniae*. *Infection and Immunity*, 1995, 63(5): 2026 - 2032.
- [4] Huang YJ, Wu CC, Peng HL, et al. Characterization of the type 3 fimbriae with different MrkD adhesins: Possible role of the MrkD containing an RGD motif. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2006, 350: 537 - 542.
- [5] Daoud Z, Hakime N. Prevalence and susceptibility patterns of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a general university hospital in Beirut, Lebanon. *Rev Esp Quimioter*, 2003, 16(2): 33 - 41.
- [6] Ofek I, Mesika A, Kalina M, et al. Surfactant protein D enhances phagocytosis and killing of unencapsulated phase variants of *Klebsiella pneumoniae*. *Infection and Immunity*,

- 2001, 69(1):24-33.
- [7] 葛新, 陈锦英, 吴庆刚, 等. 肺炎克雷伯菌表面成分对小鼠细菌感染的保护作用. 微生物学通报 (*Microbiology*) 2002, 29(6):55-61.
- [8] 贾艳, 雷连成, 韩文瑜, 等. 猪源肺炎克雷伯菌的分离与鉴定. 吉林农业大学学报 (*Journal of Jilin Agricultural University*) 2007, 29(2):196-199, 202.
- [9] Charland N, Nizet V, Rubens CE, et al. *Streptococcus suis* serotype 2 interactions with human brain microvascular endothelial cells. *Infection and Immunity*, 2000, 68(2):637-643.
- [10] 路菊, 孙玮, 陈德英. 免疫荧光双重染色的激光共聚焦显微镜样品制备及观察. 免疫学杂志 (*Immunological Journal*) 2007, 23(3):22-26.
- [11] Sahly H, Podschun R, Oelschlaeger TA, et al. Capsule impedes adhesion to and invasion of epithelial cells by *Klebsiella pneumoniae*. *Infection and Immunity*, 2000, 68(12):6744-6749.
- [12] Yu WL, Chuang YC, Walther-Rasmussen J. Extended-spectrum beta-lactamases in Taiwan: epidemiology, detection, treatment and infection control. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 2006, 39(4):264-277.
- [13] 郭强忠, 何林, 唐曙明. 117 株肺炎克雷伯菌的耐药性分析. 中华检验医学杂志 (*Chinese Journal of Laboratory Medicine*), 2006, 21(4):425-426.
- [14] Pichavant M, Delneste Y, Jeannin P, et al. Outer membrane protein A from *Klebsiella pneumoniae* activates bronchial epithelial cells: implication in neutrophil recruitment. *Journal of Immunology*, 2003, 171(12):6697-6705.
- [15] Yoshida K, Matsumoto T, Tateda K, et al. Role of bacterial capsule in local and systemic inflammatory responses of mice during pulmonary infection with *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Medical Microbiology*, 2000, 49(11):1003-1010.
- [16] Lavender H, Jagnow JJ, Clegg S. *Klebsiella pneumoniae* type 3 fimbria-mediated immunity to infection in the murine model of respiratory disease. *Journal of Medical Microbiology*, 2005, 295:153-159.

MrkD adhesin of *Klebsiella pneumoniae* expression, purification and analysis of adhesive activity

Yang Li, Wenyu Han*, Liancheng Lei, Zhijie Li, Lei Shi

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China)

Abstract [Objective] The mrkD gene encodes the adhesin which mediates *Klebsiella pneumoniae* to adhere human respiratory tissue. We aimed to analyze the adhesion mechanism and adhesion block function of MrkD adhesin. **[Methods]** The recombinant glutathione-S-transferase (GST)-tagged adhesive protein (MrkD) was expressed in *E. coli* and was purified to homogeneity using GST affinity chromatography. The GST tag was cut by thrombin to obtain the MrkD protein that was identified by SDS-PAGE and Western blot. The adhesive activity of MrkD was examined by adhesive experiments and the binding site was observed by laser confocal microscopy. **[Results]** The adherent activity of *Klebsiella pneumoniae* was significantly inhibited by the MrkD. These experimental data demonstrated that the MrkD inhibited the adhesion of *Klebsiella pneumoniae*. **[Conclusion]** Our results suggest that MrkD adhesin contains the adhesion epitopes. The future work will be carried out to identify the epitopes and characterize them, then to optimize the combination presentation of these epitopes to develop an efficient vaccine for *Klebsiella pneumoniae*.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*; adhesin; protein expression; adhesion

(本文责编: 张晓丽, 谷志静)

Supported by the Natural Science Foundation of China (30671570)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-431-87836001; E-mail: hanwy@jlu.edu.cn

Received: 12 December 2008/ Revised: 31 January 2009