



基于明尼苏达沙门氏菌 Re595 脂多糖低毒改造的外膜囊泡佐剂活性研究

张嘉雯^{1,2}, 尹文竹¹, 王海燕¹, 张金秋¹, 邓碧华¹, 卢宇^{1,3}, 周明旭^{1,3*}, 马芳^{1,3*}

- 江苏省农业科学院动物免疫工程研究所, 江苏省食品质量安全重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地, 国家兽用生物制品工程技术研究中心, 江苏 南京 210014
- 南京农业大学 动物医学院, 江苏 南京 210095
- 兽用生物制品(泰州)国泰技术创新中心, 江苏 泰州 225300

张嘉雯, 尹文竹, 王海燕, 张金秋, 邓碧华, 卢宇, 周明旭, 马芳. 基于明尼苏达沙门氏菌 Re595 脂多糖低毒改造的外膜囊泡佐剂活性研究[J]. 微生物学报, 2024, 64(9): 3269-3281.

ZHANG Jiawen, YIN Wenzhu, WANG Haiyan, ZHANG Jinqiu, DENG Bihua, LU Yu, ZHOU Mingxu, MA Fang. Adjuvant activity of outer membrane vesicles from *Salmonella minnesota* Re595 with lipopolysaccharides modified for attenuating toxicity[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(9): 3269-3281.

摘要: 【目的】外膜囊泡(outer membrane vesicles, OMVs)是由革兰氏阴性菌和某些革兰氏阳性菌生成和分泌的球形双层膜结构, 含有丰富的细菌表面抗原, 因此在疫苗相关领域具有重要的研究价值。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)作为 OMVs 的主要结构, 在诱导免疫活性的同时, 也成为影响 OMVs 安全性的主要因素。因此, 通过基因工程改造细菌 LPS 以生产安全高效的 OMVs, 是促进其生产应用的有效途径之一。【方法】以 O 抗原和大部分核心抗原缺失的明尼苏达沙门氏菌(*Salmonella minnesota*) Re595 为研究对象, 通过缺失酰基链编码基因 *msbB* 和导入新凶手弗朗西丝氏菌(*Francisella novicida*)磷酸酶基因 *lpxE*, 减少类脂 A 上的酰基链和磷酸基团, 从而获得低毒 LPS; 提取亲本株与改造株 LPS 与 OMVs, 比较其刺激免疫细胞的炎性反应, 以 OMVs 作为免疫增强剂制备口蹄疫灭活疫苗, 评价免疫活性。【结果】Re595 经 LPS 低毒改造成功降低该菌 OMVs 的内毒素活性和炎性反应, 进一步评价亲本株 Re595 与低毒改造株的 OMVs 免疫活性发现, LPS 低毒改造虽降低了 OMVs 的炎性反应, 但其免疫增强活性显著提高。【结论】本研究说明 LPS 低毒改造后可降

资助项目: 国家自然科学基金(31902243); 江苏省农业科技自主创新项目[CX(22)3030]

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31902243) and the Agriculture Science and Technology Innovation Fund of Jiangsu Province (CX(22)3030).

*Corresponding authors. E-mail: ZHOU Mingxu, zhoumingxu@outlook.com; MA Fang, 20180042@jaas.ac.cn

Received: 2024-02-15; Accepted: 2024-04-19; Published online: 2024-05-10

低细菌 OMVs 毒性, 并提高其免疫增强活性, 该结果将为 OMVs 作为免疫佐剂的应用提供理论依据。

关键词: 外膜囊泡; 免疫佐剂; 脂多糖; 内毒素活性; 基因编辑

Adjuvant activity of outer membrane vesicles from *Salmonella minnesota* Re595 with lipopolysaccharides modified for attenuating toxicity

ZHANG Jiawen^{1,2}, YIN Wenzhu¹, WANG Haiyan¹, ZHANG Jinqiu¹, DENG Bihua¹, LU Yu^{1,3}, ZHOU Mingxu^{1,3*}, MA Fang^{1,3*}

1 National Research Center of Engineering and Technology for Veterinary Biologicals, Key Laboratory of Food Quality and Safety of Jiangsu Province-State Key Laboratory Breeding Base, Institute of Veterinary Immunology & Engineering, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, Jiangsu, China

2 College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China

3 GuoTai (Taizhou) Center of Technology Innovation for Veterinary Biologicals, Taizhou 225300, Jiangsu, China

Abstract: [Objective] Outer membrane vesicles (OMVs) are spherical bilayer membrane structures secreted by Gram-negative and some Gram-positive bacteria. OMVs contain abundant surface antigens and are of great research significance in vaccine development. However, the presence of lipopolysaccharides (LPS), which is the primary component of OMVs, arouses safety concern. Therefore, genetically modifying bacterial LPS to produce safe and efficient OMVs is a viable approach to enhance the production and application of OMVs. [Methods] We modified *Salmonella minnesota* Re595 with O antigen and most core antigen deletions by deleting the acyl chain coding gene *msbB* and inserting the phosphatase coding gene *lpxE* from *Francisella novicida* to reduce acyl chains and phosphate groups on lipid A, thus obtaining less toxic LPS. LPS and OMVs were extracted from the starting strain and modified strain, and their pro-inflammatory activities were compared between the two strains. In addition, inactivated foot-and-mouth disease virus vaccines were prepared with OMVs to assess the immune adjuvant activity of OMVs. [Results] The modification of LPS reduced the endotoxin activity and pro-inflammatory responses while significantly increasing the immune adjuvant activity of OMVs. [Conclusion] This study demonstrates that the modification of LPS can attenuate the toxicity and enhance the immune adjuvant activity of bacterial OMVs. These findings provide a theoretical foundation for utilizing OMVs as immune adjuvants in the future. **Keywords:** outer membrane vesicles; immune adjuvant; lipopolysaccharide; endotoxin activity; gene editing

外膜囊泡(outer membrane vesicles, OMVs)是细菌特有的一种生理结构, 革兰氏阴性菌的膜结构分为内膜(inner membrane, IM)层、外膜(outer membrane, OM)层和肽聚糖(peptidoglycan,

PG)层, OM层和PG层两者间为周质间隙。IM和OM均由膜蛋白和磷脂组成, 只有OM的外小叶含有脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)^[1]。从OM中可以形成小突起, 并成为细胞外囊泡

OMVs, 其直径在 10–300 nm 之间, 由脂质、蛋白质、LPS、磷脂、脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA)、核糖核酸(ribonucleic acid, RNA)等组成; OMVs 中含有病原相关分子模式, 能够刺激免疫系统, 具有作为疫苗制剂、佐剂应用的潜力^[2]。OMVs 无活性, 在体外不复制增殖且具有免疫原性, 所以被认为是最具潜力的亚单位疫苗^[3]。使用 OMVs 作为主要抗原成分的疫苗已上市, 其中首先报道出来的是 B 群脑膜炎奈瑟菌疫苗; 新西兰、挪威、古巴等国家针对当地流行株生产的单价疫苗和诺华(中国)生物医学研究有限公司研发的多价 B 群脑膜炎奈瑟菌疫苗均使用 OMVs 作为主要抗原或者主要抗原之一, B 群脑膜炎奈瑟菌 OMVs 疫苗的保护率为 83%–85%, 并通过了 I 期、II 期临床研究^[4]。在临床研究中, 为婴儿接种 4 剂多组分 B 群脑膜炎奈瑟菌 OMVs 疫苗, 为青少年接种 2 剂多组分 B 群脑膜炎奈瑟菌 OMVs 疫苗都很好地预防了脑膜炎奈瑟菌感染^[5]。这些疫苗的成功上市与推广表明, OMVs 在 B 群脑膜炎奈瑟菌疫苗领域已得到了广泛的应用。OMVs 发挥佐剂活性主要通过其组分如 LPS、鞭毛、核酸等均为病原体相关分子模式(pathogen associated molecular pattern, PAMP), 可被模式识别受体如 Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)识别并刺激抗原提呈细胞^[6]。OMVs 在其他疫苗未被广泛应用, 主要原因是其携带了一些毒力因子如 LPS, LPS 能导致机体发炎, 严重时会导致败血性休克, OMVs 应用于疫苗时, 降低 OMVs 的致炎性至关重要。因此在 OMVs 疫苗研发早期, 常使用去污剂(如脱氧胆酸钠)处理 OMVs, 以减少 LPS 的含量^[7]。

LPS 是革兰氏阴性菌细胞壁外壁的组成成分, 又被称为内毒素, 表现出较强的毒性作用, 但 LPS 可激活 T 细胞和 B 细胞, 对体液免疫和

细胞免疫均具有佐剂作用^[8]。LPS 由 3 个部分构成, 包括 O-特异性侧链、核心多糖和类脂 A^[9]。LPS 中的类脂 A 结构是其发挥佐剂效应的主要成分, 可以被宿主体内免疫细胞(如单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞和树突状细胞)上的病原体识别受体 TLR4 识别, 为 TLR4 激动剂^[10]。在酸性条件下, 类脂 A 水解掉一个磷酸基团获得单磷酸脂质 A (monophosphoryl lipid A, MLA), 该复合物保持了类脂 A 的免疫刺激活性并降低了毒性作用, 已商品化的佐剂 AS04 是一种结合铝盐和 MPLTM (Corixa 公司)的佐剂系统, 可诱导短暂的局部固有免疫, 从而增强适应性免疫^[11]。

基于 OMVs 的疫苗领域存在诸多挑战, 如 OMVs 产量低和 LPS 所致的潜在内毒素效应等。然而, 随着研究的深入, 如今已有许多解决方案, 如使用乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)萃取以增加囊泡产量或通过基因改造既增加产量又减少 LPS。目前, 金黄色葡萄球菌、结核分枝杆菌的 OMVs 疫苗处于研发阶段, 霍乱弧菌和幽门螺杆菌的 OMVs 疫苗已经处于研发后期^[12-13]。OMVs 作为细菌疫苗研究比较多, 近年来发现 OMVs 具有较好的佐剂效力, 同时可以插入外源抗原, 因此作为佐剂和载体具有广泛的应用前景。

猪口蹄疫病毒(foot-and-mouth disease virus, FMDV)作为免疫评价抗原, 商品化口蹄疫疫苗主要以灭活疫苗为主, 存在免疫效力参差不齐、成本高等问题, 亟需新的佐剂提升口蹄疫灭活疫苗的效果。本研究中以商品化 MPLTM 来源菌株明尼苏达沙门氏菌(*Salmonella minnesota*) Re595 为研究对象, 以商品化 MPLTM 结构为参考, 通过同源重组技术将 Re595 LPS 的类脂 A 上一条酰基链编码基因 *msbB* 缺失达到 LPS 减毒作用, 从而提高 OMV 的安全性。同时, 导入携

带新凶手弗朗西斯氏菌(*Francisella novicida*)的 *lpxE* 基因的质粒, 该基因编码的磷酸酶可以选择性地降解类脂 A 分子 C1 位上的磷酸基团, 使 LPS 成为 MLA, 进一步降低 LPS 毒性、提高 OMV 的佐剂活性。本研究还利用灭活口蹄疫抗原, 通过小鼠模型检测了低毒改造菌 OMV 的佐剂活性, 研究结果将为进一步提高现有猪口蹄疫疫苗的免疫效果, 和以 OMV 作为免疫佐剂或载体疫苗应用提供重要的参考。

1 材料与方法

1.1 材料

明尼苏达沙门氏菌 Re595, pKD3、pKD4、pCP20 质粒均由本实验室保存; *F. novicida* 基因组 DNA 由中国农业大学苏敬良教授惠赠; pSTV28 质粒购自 TaKaRa 公司; 巨噬细胞 RAW264.7 细胞(ATCC® TIB71)购自美国菌种保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC), 该细胞培养在含有 10%胎牛血清的 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基(Dulbecco's modified eagle medium, DMEM)中。

无特殊病原菌癌症研究所(Institute for Cancer Research, ICR)雌性小鼠购自扬州大学实验动物中心, 所有动物实验在中国动物保护委员会的指导方针政策和江苏省农业科学院福

利委员会规定(SYXK(苏)2020-0024)的原则指导下进行。小鼠在标准实验室条件下饲养, 以干木屑作为垫料, 每 2 天更换 1 次保持垫料的干燥和清洁, 小鼠可自由摄取食物和水。

1.2 构建同源重组 DNA 片段

根据 GenBank 上发布的 Re595 菌株的 *msbB* 基因, 利用引物 P1 和 P2 (表 1), 以 pKD3 为模板 PCR 获得含有 *msbB* 基因序列上、下游同源臂与氯霉素(chloramphenicol, Cm)抗性 *cat* 基因的重组 DNA 产物, 并通过胶回收获得纯化的 DNA 片段。

1.3 制备电转化感受态

将过夜培养的细菌以 1:100 转接于 100 mL 新鲜的 LB 液体培养基中, 37 °C、180 r/min 振荡培养至 OD_{600} 达到 0.6–0.8。将培养物冰浴 30 min, 冰浴结束后, 4 °C、4 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 用预冷的 10%甘油洗涤 3 次, 充分洗净菌体, 用 10%甘油重悬, 分装为 100 μ L/管。

1.4 导入 pKD46 质粒

将 pKD46 质粒与感受态细胞充分混合后, 将混合物加入 0.1 cm 电击杯(Bio-Rad 公司)中, 设置电压 1.8 kV、脉冲 25 μ F、电阻 200 Ω 的参数进行电转化, 将电转化产物加入 1 mL LB 液体培养基, 30 °C、180 r/min 振荡培养 1 h 后离心收集菌体, 涂布于含 100 μ g/mL 氨苄青霉素

表 1 本研究所用引物

Table 1 Oligonucleotide primers used in this study

Primer name	Sequence (5'→3')
P1	TCGCTACACTATTCACAATTCCTTTTCGCGTCAGCAGACCCTGG AAAAGCTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG
P2	AGGTAGTACAGGGTTTGTCAGCATAAAGCCTCTCTTACGAGAGG CTTTATCATATGAATATCCTCCTTAG
P3	CGTCAGCAGACCCTGGAAA
P4	GGTTTGTTCAGCATAAAGCCTCT
P5	CGGAATTCGATGCTCAAACAGAC
P6	CCAAGCTTCTAAATAATCTCTC

(ampicillin, Amp)的 LB 平板上, 30 °C 静置培养过夜, 次日挑取阳性克隆菌落为 Re595+pKD46, 并按照 1.3 步骤制备感受态细胞。

1.5 导入同源重组 DNA 片段

将 1.2 中制备的同源重组 DNA 片段与 Re595+pKD46 感受态细胞充分混合, 按照 1.4 电转化步骤将同源重组 DNA 片段导入含 pKD46 质粒的 Re595 中, 30 °C、180 r/min 振荡 1 h 后收集菌体, 涂布含有 100 µg/mL Amp 和 34 µg/mL Cm 的 LB 平板上, 30 °C 静置培养过夜。

1.6 *msbB* 敲除菌株筛选及 pKD46 质粒移除

挑取 1.5 平板上的单菌落, 于 30 °C、180 r/min 培养 2 h, 以菌液作为模板, 利用引物 P3 和 P4 进行 PCR 并对其产物进行测序, 鉴定 *msbB* 目的片段是否被 *cat* 基因片段替换。将测序正确的菌株置于 42 °C、180 r/min 培养 12 h, pKD46 为温敏型质粒, 在高温条件下不能复制而被移除。将菌液倍比稀释涂布于 LB 固体培养基上, 37 °C 静置培养过夜, 挑取单菌落于 LB 液体培养基中培养至对数期, 取部分菌液至含有 50 µg/mL Amp 的 LB 固体培养基上, 于 30 °C 静置培养验证 pKD46 质粒是否移除。

1.7 *cat* 基因片段移除

将 1.6 中获得的移除 pKD46 的菌株作为受体菌株并通过电转化导入 pCP20 质粒。将电转化产物涂布于含 Amp 和 Cm 双抗性的 LB 平板, 在 30 °C 培养箱中培养过夜, 挑取单菌落于 30 °C、180 r/min 培养 2 h, 以其菌液作为模板, 利用引物 P3 和 P4 进行 PCR 并对其产物进行测序。测序正确的菌株置于无抗的 LB 液体培养基中, 42 °C、180 r/min 培养 12 h, pCP20 质粒为温敏型质粒, 在高温条件下不能复制而被移除, 获得 *msbB* 基因缺失突变菌株为 $\Delta msbB$ 。

1.8 pSTV28-*lpxE* 表达载体构建

以 *F. novicida* 基因组 DNA 为模板, 用引

物 P5 和 P6 通过 PCR 扩增两端分别带有 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切位点的 *lpxE* 片段。利用胶回收 *lpxE* 片段并测序。将 *lpxE* 片段与表达载体 pSTV28 分别用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III 于 37 °C 作用 2 h, 通过胶回收纯化酶切后的 *lpxE* 片段与 pSTV28 载体片段。利用 T4 连接酶将 *lpxE* 与 pSTV28 载体片段置于 16 °C 连接 1 h。连接片段采用 CaCl_2 化学转化法转化入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中, 37 °C、180 r/min 孵育 1 h, 收集菌体涂布含有 Amp 的 LB 平板上, 置于 37 °C 培养过夜。挑取单菌落于 37 °C、180 r/min 培养 2 h, 以其菌液作为模板, 用引物 P5 和 P6 通过 PCR 鉴定 pSTV28-*lpxE* 表达质粒构建是否成功。

1.9 Re595 $\Delta msbB$ -*lpxE* 重组株的构建

制备 $\Delta msbB$ 电转化感受态细胞, 将 1.8 中 pSTV28-*lpxE* 表达质粒电转化导入 $\Delta msbB$ 中, 将电转化产物涂布于含 Amp 的 LB 平板上, 在 37 °C 培养过夜, 挑取单菌落于 LB 液体培养基中 37 °C、180 r/min 培养 2 h, 以其菌液作为模板, 利用引物 P5 和 P6 检测 $\Delta msbB$ 中是否成功导入 pSTV28-*lpxE* 表达质粒。

1.10 脂多糖提取和纯化和检测

将过夜培养的 Re595 与 Re595 $\Delta msbB$ -*lpxE* 菌株转接于 500 mL LB 液体培养基中, 37 °C、180 r/min 振荡培养, 当 Re595 $\Delta msbB$ -*lpxE* 菌株 OD_{600} 达到 0.6 时加入 IPTG, 继续培养 6 h 后, 6 000 r/min 离心 30 min, 弃掉上清, 收集菌体沉淀, 加入 50 mL 无菌 ddH₂O 重悬菌体。在低温条件下用高压均质细胞破碎仪以压力为 1 000 Pa 处理细菌悬液至清透状态。将上述菌液与等体积 90% (体积分数) 苯酚溶液 68 °C 上下振荡混合 30 min, 冰上冷却 15 min。将混合液于 4 °C、3 000 r/min 离心 30 min, 收集上层水相。将水相移至透析袋中, 在 ddH₂O 中充分透析 48 h 以去除苯酚。将透析袋中的 LPS 冻干, 得到 LPS 粗提的样品。

将 LPS 粗提的样品溶于 9 mL 的 ddH₂O, 加入 1 mL 10×反应缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 50 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L CaCl₂), 加终浓度为 100 μg/mL 的 DNase I 和 50 μg/mL 的 RNase A, 37 °C 孵育过夜。处理后 LPS 溶液中加入终浓度为 100 μg/mL 的蛋白酶 K, 55 °C 作用 2 h 后置于 98 °C 金属浴作用 10 min 灭活酶。混合溶液中加入 2 倍体积的丙酮, 立即有白色絮状 LPS 析出, 4 °C 静置过夜。将此混合溶液以 5 000 r/min 离心 10 min, 去除上清, 将沉淀在通风橱中充分风干, 加入 10 mL 无菌 ddH₂O 复溶, 冻干, 称重, 加入无菌 ddH₂O 复溶, 配制 1 mg/mL 的 LPS 纯品。分别用 BCA 检测试剂盒、琼脂糖凝胶电泳、苯酚硫酸法检测其蛋白、核酸和多糖含量。

1.11 细菌 OMVs 的提取及检测

用 1 L LB 液体培养基培养 Re595 和 Re595 *ΔmsbB-lpxE* 菌株至 OD₆₀₀ 为 0.6 时加入 IPTG, 继续培养 6 h 后, 6 000 r/min 离心 50 min, 收集上清并过滤, 利用超滤浓缩法提取 OMVs。过滤后的上清用截留相对分子质量 100 kDa 的膜浓缩, 超滤后的液体用 0.22 μm 过滤除菌, 利用 BCA 法定量 OMVs。分别用 Zeta 电位仪检测 OMVs 的粒径。将提取的 OMVs 悬液滴加到碳包覆铜网上, 滴加 2% 醋酸双氧铀, PBS 漂洗 3 遍, 室温干燥, 利用生物透射电镜(transmission electron microscope, TEM)检测 OMVs 形态。

1.12 LPS/OMVs 刺激 RAW264.7 细胞因子检测

RAW264.7 细胞用 DMEM 高糖培养基加 10% 胎牛血清, 37 °C、5% CO₂ 培养。待细胞生长至 25 cm² 细胞培养瓶底部表面积 90% 时, 弃去细胞培养瓶中的培养液, 用 2 mL 细胞培养液吹打细胞 20–30 次, 吹散成单个细胞, 补充 10 mL 细胞培养液, 吹匀后, 铺至 24 孔板, 500 μL/孔(约

1.9×10⁵ 细胞/孔)。分别用 1 ng/mL Re595 和 Re595 *ΔmsbB-lpxE* 的 LPS 或 1 000、500、100、10 ng/mL 的 OMVs 刺激细胞, 对照组加入 500 μL 的 DMEM, 孵育 12 h。细胞用 PBS 洗 3 次, 加入 500 μL/孔 TRIzol 试剂裂解细胞, 收集至 RNase-free EP 管, 向裂解液中加入 200 μL 体积 RNase-free Water, 上下颠倒 EP 管, 混匀后室温静置 5 min, 12 000×g 室温离心 15 min, 离心后吸取上层水相至一个新的 RNase-free 离心管中, 加入等体积异丙醇, 上下颠倒混匀, 室温静置 10 min, 12 000×g 室温离心 10 min, 沉淀用 75% 乙醇洗 3 次, 室温放置 2–3 min 晾干, 加入 50 μL RNase-free Water 溶解 RNA 沉淀, 用 NanoDrop 2000 核酸蛋白微量定量仪测定产物浓度与纯度。利用反转录试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)将 RNA 反转录为 cDNA。以 cDNA 为模板, 利用实时荧光定量 PCR 检测细胞因子肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)-α、白细胞介素(interleukin, IL)-1β 的 mRNA 的表达水平。

1.13 OMVs 佐剂活性检测

猪 FMDV 灭活抗原由金宇集团提供, FMDV 抗原、FMDV 抗原+亲本株 OMVs、FMDV 抗原+改造株 OMVs 3 组与 Montanide ISA206 佐剂(Seppic 公司)以质量比 1:1 充分混匀乳化配置为疫苗, 其中 3 组 FMDV 抗原的免疫量为 24 μg/只^[14], 2 组添加 OMVs 的疫苗中, OMVs 的免疫量为 3.4 μg/只。小鼠经颈背部皮下免疫 200 μL/只, 14 d 后加强免疫 1 次。分别于初免 1 周、2 周、4 周收集小鼠血清, 按照口蹄疫 O 型抗体液相阻断酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immuno sorbent assay, ELISA)检测试剂盒(中国农业科学院兰州兽医研究所)说明书, 将倍比稀释的待检血清、阴阳性血清和抗原分别 37 °C 温育 90 min 后, 转移至试剂盒中包被口蹄疫 O 型兔抗的 ELISA 板上, 37 °C 温育

90 min, 完全清洗拍干后加入 O 型豚鼠抗体工作液, 37 °C 温育 30 min, 利用试剂盒中兔抗豚鼠 IgG-HRP 工作液和 TMB 显色液进行显色, 加入终止液后使用酶标仪检测 OD_{450} 值, 根据试剂盒要求判定其抗体阴阳性并计算抗体效价。

1.14 数据处理

采用 GraphPad Prism 5 软件进行绘图和数据分析, 试验结果以平均值±标准偏差表示。两组之间通过 Student's *t* 检验进行比较, $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 改造菌株 Re595 $\Delta msbB-lpxE$ 鉴定

采用引物 P1 和 P2, 以 pKD3 质粒为模板, PCR 获得含有氯霉素基因的同源重组片段(图 1A), 对照亲本株 Re595 扩增片段为 1 030 bp, 一次同源重组菌为 1 070 bp, 经测序鉴定 *msbB* 目的片段被 Cm 抗性片段 *cat* 替换, 命名为 Re595 $\Delta msbB::cat$ 。将温敏型质粒 pCP20 导入 Re595 $\Delta msbB::cat$ 菌株, 利用引物 P3 和 P4 进行 PCR, 鉴定 *cat* 基因片段被 pCP20 表达的 Flp 重组酶切除, 获得无抗性的基因缺失株 $\Delta msbB$, 同源臂为 120 bp (图 1B)。将表达 *F. novicida* 单磷酸水解酶 *lpxE* 基因的质粒 pSTV28-*lpxE* 电转化导入 $\Delta msbB$ 中, 利用引物 P5 和 P6 PCR 检测发现, $\Delta msbB$ 中成功导入 pSTV28-*lpxE* 表达质粒(图 1C)。通过基因编辑技术获得改造菌株 $\Delta msbB-lpxE$, 其产生的 LPS 缺失 *msbB* 基因编码的一条酰基链, 且 1-磷酸基团被 *lpxE* 基因编码的单磷酸水解酶水解(图 1D)。研究结果说明利用基因编辑技术可对明尼苏达沙门氏菌 Re595 LPS 中类脂 A 结构改造, 通过 λ -Red 同源重组的方法缺失酰基链合成基因 *msbB*, 导入编码磷酸酶 *lpxE* 基因, 水解掉类脂 A 的 1-磷酸基团。

2.2 MLA 刺激 RAW264.7 炎性因子转录水平检测

从 Re595 及 Re595 $\Delta msbB-lpxE$ 改造菌株提取的 LPS 经纯化后用于刺激小鼠巨噬细胞 RAW264.7 细胞, 通过实时荧光定量 PCR 测定细胞被刺激后炎性细胞因子 TNF- α 和 IL-1 β 的转录水平, 研究结果发现与亲本株明尼苏达沙门氏菌 Re595 相比, Re595 $\Delta msbB-lpxE$ 菌株的 MLA 诱导 RAW264.7 表达 IL-1 β 和 TNF- α mRNA 水平显著降低(图 2)。该研究结果提示在基因水平改造 LPS 为 MLA 是降低其毒性的有效措施, LPS 为 OMV 的主要成分之一, 因此低毒改造 LPS 也为 OMV 的应用发展提供了理论基础。

2.3 OMV 形态观察

提取亲本株 OMVs 悬液进行负染电镜观察, 发现电镜下 OMVs 具有典型的膜泡结构, 完整性好, 并且 OMVs 大小不均一(图 3A)。进一步通过 Zeta 电位仪检测 OMVs 粒径分布发现, 亲本株明尼苏达沙门氏菌 Re595 的 OMVs 粒径峰值为 24.58 nm 的比例为 16.5%, 峰值为 149.90 nm 的 OMVs 的比例为 83.5%, 平均粒径为 182.20 nm; LPS 低毒改造株 Re595 $\Delta msbB-lpxE$ OMVs 粒径峰值为 20.11 nm 的比例为 6.0%, 粒径峰值为 152.00 nm 的 OMVs 比例为 94.0%, 平均粒径为 122.27 nm (图 3B)。明尼苏达沙门氏菌 Re595 分泌 OMVs 为完整囊泡状结构, 大小不均一, 粒径分布在 10.00–500.00 nm, 作为纳米囊泡具有广泛的应用前景。

2.4 Re595 $\Delta msbB-lpxE$ OMVs 的内毒素水平检测

分别提取亲本株 Re595 和 LPS 低毒改造株 Re595 $\Delta msbB-lpxE$ 的 OMVs, 分别利用 BCA 蛋白定量试剂盒(南京诺唯赞生物科技有限公司)和内毒素微板定量试剂盒(湛江安度斯生物有限公司)定量 OMVs 中蛋白和内毒素的含量, 如图 4 所

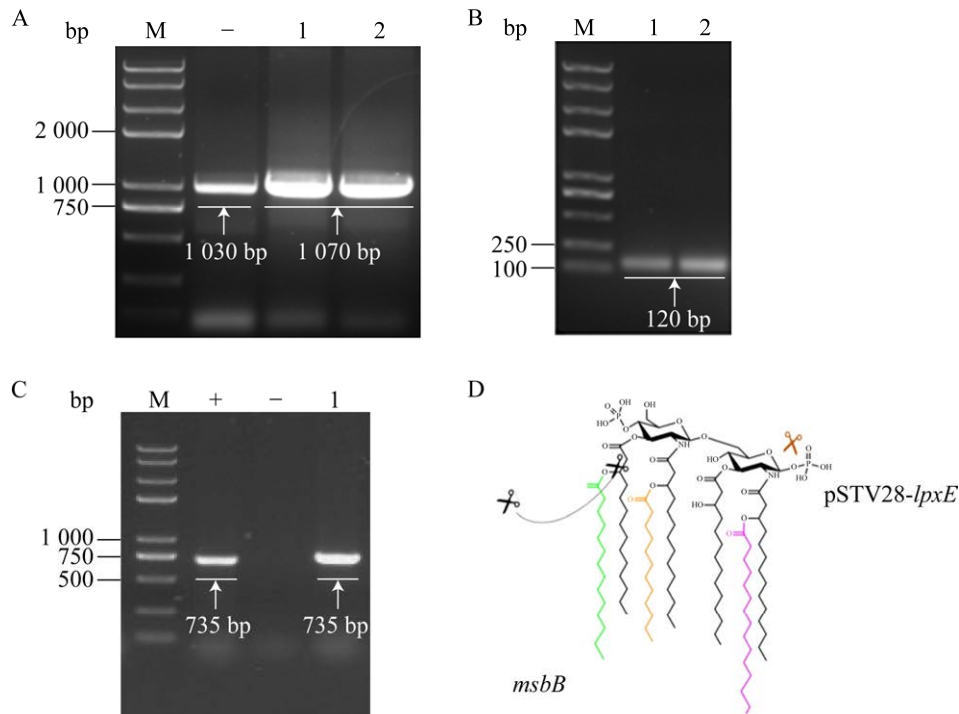


图 1 Re595 $\Delta msbB$ -*lpxE* 重组株 PCR 鉴定

Figure 1 Identification of Re595 $\Delta msbB$ -*lpxE* by PCR. A: *msbB* gene replaced by *cat* gene. M represents Trans 2 K plus II DNA Marker; - represents wild type strain Re595; 1 and 2 represent two mutant strains Re595 $\Delta msbB$::*cm*. B: *cat* gene deletion. M represents Trans 2 K plus II DNA Marker; 1 and 2 represent two mutant strains, respectively. C: Identification of *lpxE* insertion. M represents Trans 2 K plus II DNA Marker; + represents plasmid pSTV28-*lpxE*; - represents *msbB* gene deletion strain Re595 $\Delta msbB$; 1 represent mutant strain Re595 $\Delta msbB$ -*lpxE*. D: Schematic of Re595 lipid A modification. *cm*, chloramphenicol.

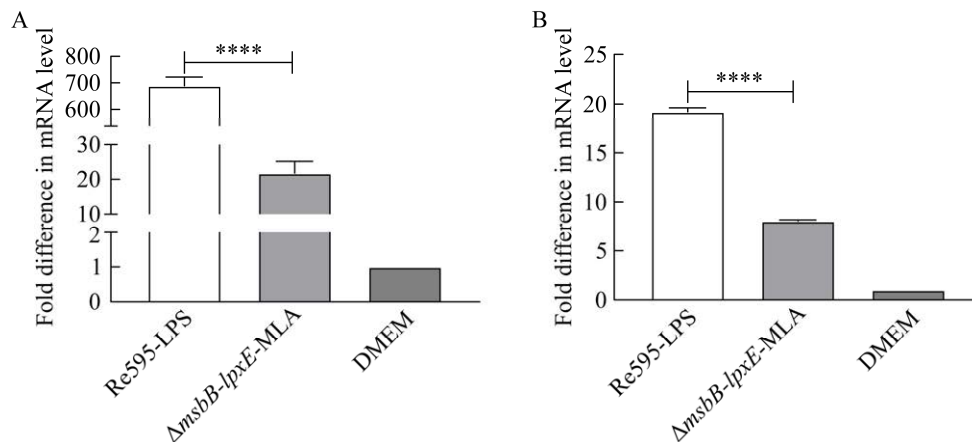


图 2 LPS 刺激 RAW264.7 的细胞因子表达

Figure 2 LPS-stimulated cytokine expression of RAW264.7. A: IL-1 β . B: TNF- α . The results are depicted as the mean \pm SEM ($n=3$). ****: $P<0.0001$. The results shown are representative of three independent experiments.

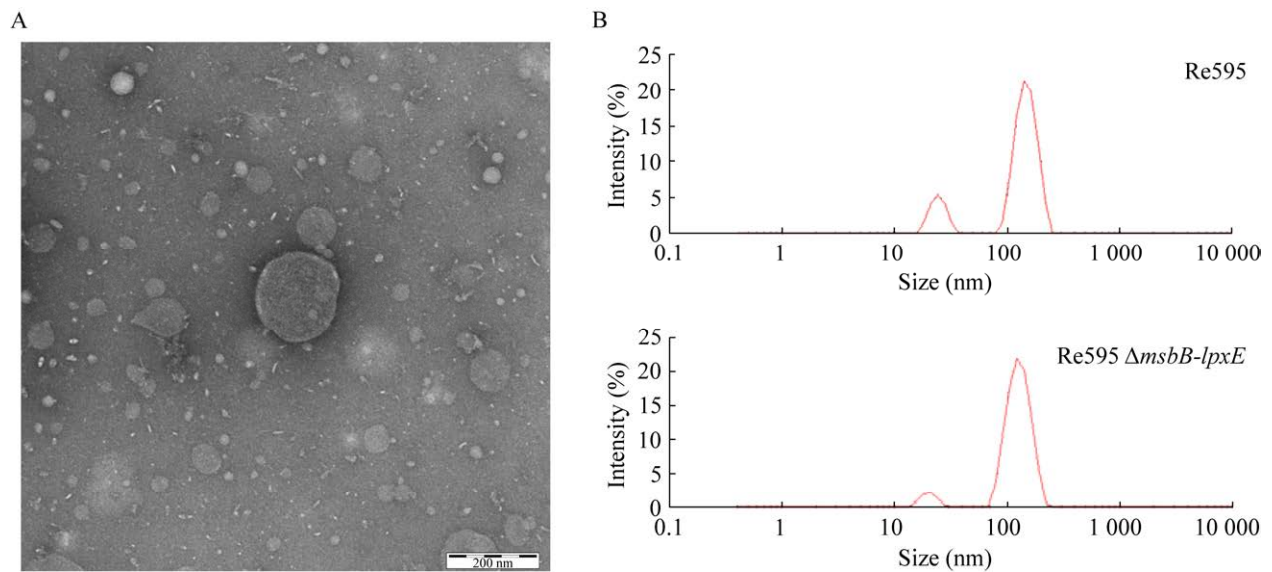


图 3 OMVs 形态及粒径

Figure 3 Morphology and size analysis of OMVs. A: TEM of Re595 OMVs. B: Particle sizes of OMVs isolated from Re595 and Re595 $\Delta msbB-lpxE$.

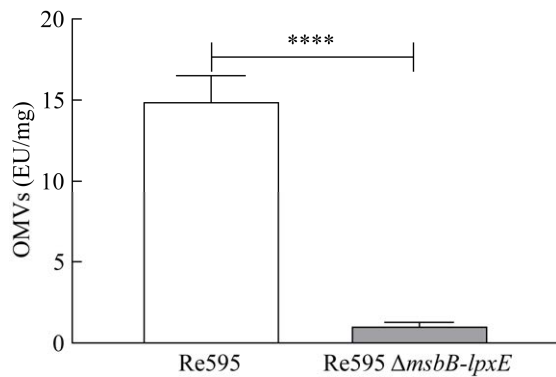


图 4 OMVs 的内毒素含量

Figure 4 Endotoxin content of OMVs. The results are depicted as the mean \pm SEM ($n=3$). ****: $P<0.0001$. The results shown are representative of three independent experiments.

示, 亲本株 Re595 提取的 OMVs 中内毒素的含量为 14.980 EU/mg 蛋白, 而 LPS 低毒改造的 Re595 $\Delta msbB-lpxE$ 菌株的 OMVs 中的内毒素含量为 1.122 EU/mg 蛋白, 改造后 OMVs 的内毒素活性显著下降。研究结果表明通过对 LPS 类脂 A 结构的改造降低了 OMVs 中内毒素含量,

为提高 OMVs 应用的安全性提供了有效途径。

2.5 Re595 $\Delta msbB-lpxE$ OMVs 诱导 RAW264.7 炎性因子转录水平检测

用 OMVs 刺激小鼠巨噬细胞 RAW264.7 12 h 后收集细胞 RNA, 通过实时荧光定量 PCR 测定细胞炎性因子的转录水平。如图 5 所示, Re595 改造株 $\Delta msbB-lpxE$ 诱导细胞的 IL-1 β 和 TNF- α 的 mRNA 显著低于亲本株 Re595。该研究结果与 LPS 诱导 RAW264.7 炎性因子 mRNA 表达结果一致, 说明将细菌 LPS 低毒改造为 MLA 后 OMV 导致细胞炎性因子水平显著下降, 降低细胞毒性。

2.6 OMV 促进体液免疫水平

FDMV 分别与亲本株 Re595 及 LPS 低毒改造菌株 Re595 $\Delta msbB-lpxE$ 的 OMVs 混合, 进而与 ISA206 佐剂乳化制备稳定的疫苗, 其中 FDMV 与 ISA206 佐剂乳化所得稳定溶液作为阳性对照。利用中国农业科学院兰州兽医研究所生产的 FDMV O 型抗体液相阻断 ELISA 检测

试剂盒检测免疫小鼠血清的抗体效价，如图 6 所示，在免疫后 LPS 低毒改造菌株的 OMVs 显著提高小鼠血清口蹄疫特异性抗体水平，而亲本株 Re595 的 OMVs 诱导小鼠体液免疫水平与 ISA206 阳性对照相当。在免疫后第 1 周，Re595 Δ msbB-lpxE 的 OMVs 可显著诱导口蹄疫特异性抗体产生，说明 OMVs 具有免疫增强活性，可在免疫早期提高体液免疫水平。

3 讨论与结论

OMVs 主要由革兰氏阴性菌及少量革兰氏阳性菌产生的球形的双层纳米结构^[15]。OMVs 的直径在 10–300 nm 之间，由脂质、蛋白质、LPS、磷脂、DNA、RNA 等组成^[1]。研究发现 OMVs 作为细菌疫苗、疫苗佐剂、药物载体等具有应用前景，在古巴等拉美国家广泛使用的 B 群

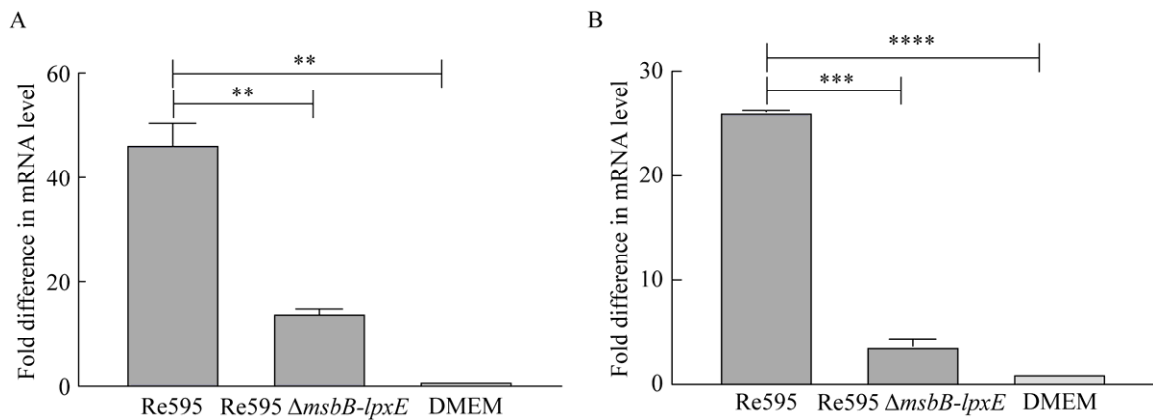


图 5 OMV 诱导 RAM264.7 炎症因子转录水平

Figure 5 OMVs-stimulated cytokine expression of RAW264.7. A: IL-1 β . B: TNF- α . The results are depicted as the mean \pm SEM ($n=3$). **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$; ****: $P<0.0001$. The results shown are representative of three independent experiments.

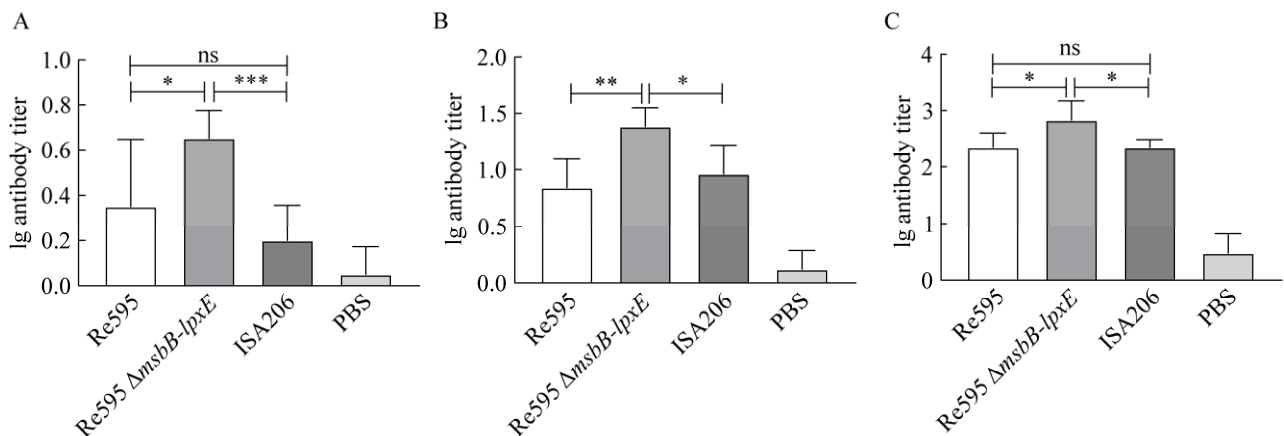


图 6 OMVs 促进小鼠血清口蹄疫特异性抗体产生

Figure 6 Levels of FMDV-specific antibodies promoted by OMVs. A: 1 week. B: 2 weeks. C: 4 weeks. The results are depicted as the mean \pm SEM ($n=3$). *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$; ns: No differences between groups. The results shown are representative of three independent experiments.

和 C 群脑膜炎奈瑟菌疫苗 VA-MENGOC-BC 为基于 OMVs 主要成分的疫苗, 以 OMVs 为基础的疫苗研发具有巨大潜力^[16-17]。

OMVs 的天然成分包括各种 TLRs 激活剂, 如鞭毛、LPS 等具有免疫增强效应, 使 OMVs 具有佐剂特性。1998 年 Haneberg 等首次提出将 OMVs 作为脑膜炎球菌病鼻疫苗的载体和佐剂^[18]。然而, OMVs 存在毒性高等问题限制其应用发展^[19]。MLA 是一种高效免疫增强剂, 是细菌 LPS 的类脂 A 水解掉 1-磷酸(或 1-焦磷酸)形成的脱毒产物。目前在美国已实现商品化的 MPLTM 是明尼苏达沙门氏菌 Re595 的 LPS 经过一系列复杂的化学处理制备的缺少 C1 位磷酸和 C3 位十四碳酰基链的 MLA 产物, 能激活 TLR4-TRAM-TRIF 信号转导途径, 而不能激活 TLR4-Mal-MyD88 信号转导途径, 其毒性较 LPS 下降到原来的千分之一; MPLTM 与铝胶佐剂联合, 已批准用于乙肝疫苗和宫颈癌疫苗, 提示 MPLTM 结构在应用中的安全性^[20]。类脂 A 磷酸基团的个数是影响 LPS 毒性的关键因素之一, 沙门氏菌减毒活疫苗的开发是利用 *F. novicida* 的 *lpxE* 产生的类脂 A 缺少 1-磷酸, 使其在小鼠中的毒力降低了 5 个数量级^[21]。本研究在明尼苏达沙门氏菌中导入 *F. novicida* 的 *lpxE* 基因, 可在细菌生长过程中水解 LPS 类脂 A 的 1-磷酸基团。大肠杆菌 K12 和鼠伤寒沙门氏菌 *msbB* 基因缺失株表现出诱导免疫细胞活性或毒性降低的表型^[22]。Lee 等为获得低毒性的 OMVs 构建了鼠伤寒沙门氏菌 *msbB* 基因缺失株, 并发现其具有作为外源抗原疫苗载体的潜力^[23]。本研究中以商品化的 MPLTM 结构为依据, 在基因水平上对 LPS 类脂 A 结构进行低毒改造, 以生产低毒安全的 OMVs, 比较 Re595 和 Re595 $\Delta msbB-lpxE$ 提取的 LPS 与 MLA 诱导小鼠巨噬细胞炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 转录水平, 发现

Re595 $\Delta msbB-lpxE$ 菌株的 MLA 诱导 RAW264.7 表达 IL-1 β 和 TNF- α 转录水平显著降低, 进一步提取亲本株 Re595 和改造株 Re595 $\Delta msbB-lpxE$ 的 OMVs 并对其内毒素活性定量研究, 发现每毫克 OMVs 蛋白中的内毒素含量显著下降, 并且改造株 Re595 $\Delta msbB-lpxE$ 的 OMVs 诱导 RAW264.7 炎症因子转录水平显著降低, 以上研究结果均说明通过对细菌合成 LPS 相关基因进行改造可获得减毒 OMVs, 为 OMVs 的应用提供基础。

敲除 *lpxL1* 基因的脑膜炎球菌制成的 OMVs 疫苗处于 I 期试验阶段, 该 OMVs 刺激炎症因子水平低于亲本株 OMVs, 但其免疫原性显著高于亲本株 OMVs, 说明通过基因编辑改变细菌 LPS 结构, 降低 LPS 毒力并不影响 OMVs 的免疫活性^[19]。亲本株 Re595 的 OMVs 对 ISA206 的免疫效果无增强作用, 而提取改造株 Re595 $\Delta msbB-lpxE$ 的 OMVs 对 ISA206 的免疫效果具有显著增强作用, 并且在初次免疫早期可有效增强针对口蹄疫病毒的特异性抗体产生, 这可能由于 Re595 $\Delta msbB-lpxE$ 的 OMVs 中病原相关分子模式有效地激活适量的先天性免疫反应并通过先天性免疫反应通过树突状细胞调控适应性免疫^[24-25]。其中 TLRs 激活的炎症反应可控制多种树突状细胞的功能和适应性免疫反应的启动^[26]。将 LPS 改造为低毒性 MLA, 进而促进 OMVs 的免疫增强活性可能与 TLR4 激活信号相关, 但其相关的树突状细胞、信号分子等仍需要进一步地研究。灭活抗原初次进入体内时会有一段潜伏期, 在此期间产生浆细胞并合成和分泌抗体, 然而, 抗体的含量可能较低。因此初次免疫时缩短抗体产生时间, 提高抗体水平在疾病防控中具有重要的意义。

本研究中以商品化 MPLTM 的来源菌株为研究对象, 在基因水平上对 LPS 的结构进行改造,

获得缺失一条脂肪酸链的单磷酸 MLA。进一步通过细胞试验发现, Re595 $\Delta msbB-lpxE$ 突变株的 MLA 与 OMVs 诱导炎性因子转录水平降低, 其 OMVs 诱导炎性因子产生水平降低可能与其下降的内毒素活性相关。虽然 Re595 $\Delta msbB-lpxE$ 的 OMVs 诱导炎性反应能力下降, 但其免疫增强活性显著增强, 以上研究结果说明在基因水平上低毒改造 LPS 是获得安全高效的 OMVs 的有效途径之一, 为 OMVs 在口蹄疫等疫苗的提质增效应用上提供理论依据。

参考文献

- [1] FURUYAMA N, SIRCILI MP. Outer membrane vesicles (OMVs) produced by Gram-negative bacteria: structure, functions, biogenesis, and vaccine application[J]. *BioMed Research International*, 2021, 2021: 1490732.
- [2] SCHETTERS STT, JONG WSP, HORREVORTS SK, KRUIJSSEN LJW, ENGELS S, STOLK D, DALEKE-SCHERMERHORN MH, GARCIA-VALLEJO J, HOUBEN DE, UNGER WWJ, den HAAN JMM, LUIRINK J, van KOOYK Y. Outer membrane vesicles engineered to express membrane-bound antigen program dendritic cells for cross-presentation to CD8⁺ T cells[J]. *Acta Biomaterialia*, 2019, 91: 248-257.
- [3] 姚崧源, 孙述学. 细菌外膜囊泡在疫苗领域的研究进展[J]. *微生物学免疫学进展*, 2021, 49(1): 78-82.
YAO SY, SUN SX. Advances in research on bacterial outer membrane vesicles in vaccine[J]. *Progress in Microbiology and Immunology*, 2021, 49(1): 78-82 (in Chinese).
- [4] COMMITTEE ON INFECTIOUS DISEASES. Recommendations for serogroup B meningococcal vaccine for persons 10 years and older[J]. *Pediatrics*, 2016, 138(3): e20161890.
- [5] HOLST J, OSTER P, ARNOLD R, TATLEY M, NÆSS L, AABERGE I, GALLOWAY Y, McNICHOLAS A, O'HALLAHAN J, ROSENQVIST E, BLACK S. Vaccines against meningococcal serogroup B disease containing outer membrane vesicles (OMV): lessons from past programs and implications for the future[J]. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 2013, 9(6): 1241-1253.
- [6] SHEN Y, TORCHIA M, LAWSON G, KARP C, ASHWELL J, MAZMANIAN S. Outer membrane vesicles of a human commensal mediate immune regulation and disease protection[J]. *Cell Host & Microbe*, 2012, 12(4): 509-520.
- [7] CHRISTODOULIDES M, HECKELS J. Novel approaches to *Neisseria meningitidis* vaccine design[J]. *Pathogens and Disease*, 2017, 75(3): ftx033.
- [8] WANG XY, QUINN PJ. Lipopolysaccharide: biosynthetic pathway and structure modification[J]. *Progress in Lipid Research*, 2010, 49(2): 97-107.
- [9] GNAUCK A, LENTLE RG, KRUGER MC. The characteristics and function of bacterial lipopolysaccharides and their endotoxic potential in humans[J]. *International Reviews of Immunology*, 2016, 35(3): 189-218.
- [10] KAWAI T, AKIRA S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors[J]. *Nature Immunology*, 2010, 11(5): 373-384.
- [11] DIDIERLAURENT AM, MOREL S, LOCKMAN L, GIANNINI SL, BISTEAU M, CARLSEN H, KIELLAND A, VOSTERS O, VANDERHEYDE N, SCHIAVETTI F, LAROCQUE D, van MECHELEN M, GARÇON N. AS04, an aluminum salt- and TLR4 agonist-based adjuvant system, induces a transient localized innate immune response leading to enhanced adaptive immunity[J]. *The Journal of Immunology*, 2009, 183(10): 6186-6197.
- [12] PRADOS-ROSALES R, BAENA A, MARTINEZ LR, LUQUE-GARCIA J, KALSCHUEER R, VEERARAGHAVAN U, CAMARA C, NOSANCHUK JD, BESRA GS, CHEN B, JIMENEZ J, GLATMAN-FREEDMAN A, JACOBS WR Jr, PORCELLI SA, CASADEVALL A. Mycobacteria release active membrane vesicles that modulate immune responses in a TLR2-dependent manner in mice[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2011, 121(4): 1471-1483.
- [13] CHOI SJ, KIM MH, JEON J, KIM OY, CHOI Y, SEO J, HONG SW, LEE WH, JEON SG, GHO YS, JEE YK, KIM YK. Active immunization with extracellular vesicles derived from *Staphylococcus aureus* effectively protects against staphylococcal lung infections, mainly via Th1 cell-mediated immunity[J]. *PLoS One*, 2015, 10(9): e0136021.
- [14] YIN WZ, DENG BH, XU ZY, WANG HY, MA F, ZHOU MX, LU Y, ZHANG JQ. Formulation and evaluation of lipidized imiquimod as an effective adjuvant[J]. *ACS Infectious Diseases*, 2023, 9(2): 378-387.

- [15] BALHUIZEN MD, VELDHUIZEN EJA, HAAGSMAN HP. Outer membrane vesicle induction and isolation for vaccine development[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 629090.
- [16] SOTOLONGO F, CAMPA C, CASANUEVA V, FAJARDO EV, CUEVAS IE, GONZÁLEZ N. Cuban meningococcal BC vaccine: experiences & contributions from 20 years of application[J]. *MEDICC Review*, 2007, 9(1): 16-22.
- [17] YOO JW, IRVINE DJ, DISCHER DE, MITRAGOTRI S. Bio-inspired, bioengineered and biomimetic drug delivery carriers[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2011, 10(7): 521-535.
- [18] HANEBERG B, DALSEG R, OFTUNG F, WEDEGE E, HØIBY EA, HAUGEN IL, HOLST J, ANDERSEN SR, AASE A, NAESS LM, MICHAELSEN TE, NAMORK E, HAAHEIM LR. Towards a nasal vaccine against meningococcal disease, and prospects for its use as a mucosal adjuvant[J]. *Developments in Biological Standardization*, 1998, 92: 127-133.
- [19] DOWLING DJ, SANDERS H, CHENG WK, JOSHI S, BRIGHTMAN S, BERGELSON I, PIETRASANTA C, van HAREN SD, van AMSTERDAM S, FERNANDEZ J, van den DOBBELSTEEN GPJM, LEVY O. A meningococcal outer membrane vesicle vaccine incorporating genetically attenuated endotoxin dissociates inflammation from immunogenicity[J]. *Frontiers in Immunology*, 2016, 7: 562.
- [20] QURESHI N, MASCAGNI P, RIBI E, TAKAYAMA K. Monophosphoryl lipid A obtained from lipopolysaccharides of *Salmonella minnesota* R595. purification of the dimethyl derivative by high performance liquid chromatography and complete structural determination[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1985, 260(9): 5271-5278.
- [21] KONG QK, SIX DA, ROLAND KL, LIU Q, GU L, REYNOLDS CM, WANG XY, RAETZ CRH, CURTISS R III. *Salmonella* synthesizing 1-monophosphorylated lipopolysaccharide exhibits low endotoxic activity while retaining its immunogenicity[J]. *The Journal of Immunology*, 2011, 187(1): 412-423.
- [22] SOMERVILLE JE Jr, CASSIANO L, DARVEAU RP. *Escherichia coli msbB* gene as a virulence factor and a therapeutic target[J]. *Infection and Immunity*, 1999, 67(12): 6583-6590.
- [23] LEE SR, KIM SH, JEONG KJ, KIM KS, KIM YH, KIM SJ, KIM EK, KIM JW, CHANG KT. Multi-immunogenic outer membrane vesicles derived from a *msbB*-deficient *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* mutant[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2009, 19(10): 1271-1279.
- [24] IWASAKI A, MEDZHITOV R. Control of adaptive immunity by the innate immune system[J]. *Nature Immunology*, 2015, 16(4): 343-353.
- [25] PALGEN JL, TCHITCHEK N, RODRIGUEZ-POZO A, JOUHAULT Q, ABDELHOUAHAB H, DEREUDDRE-BOSQUET N, CONTRERAS V, MARTINON F, COSMA A, LÉVY Y, le GRAND R, BEIGNON AS. Innate and secondary humoral responses are improved by increasing the time between MVA vaccine immunizations[J]. *npj Vaccines*, 2020, 5: 24.
- [26] IWASAKI A, MEDZHITOV R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses[J]. *Nature Immunology*, 2004, 5(10): 987-995.