DOI:10.16016/j.2097-0927.202311041

类鼻疽菌Ⅲ型分泌系统 BipD 蛋白的重组表达及其免疫学特性研究

南栋琪[1],文 远[1],陈建高[1],饶承龙[1],吴 潘[1],张子元[1],王施韦[1],闫晶敏[1],李 倩[1],毛旭虎[1,2] 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学):药学与检验医学系临床微生物与免疫学教研室[1],创伤与化学中毒全国重点实验室[2]

[**摘要**] **目的** 重组表达类鼻疽菌Ⅲ型分泌系统 BipD 蛋白,制备多克隆抗体并鉴定其免疫学性质。**方法** 利用 pET-28a 表达系统在 *Eschericahia coli*(*E. coli*)BL21(DE3)中重组表达 BipD 蛋白,通过 His Trap 亲和层析纯化获得 rBipD 蛋白,免疫 BALB/c 小鼠获得 rBipD 多克隆抗体;分别用兔抗类鼻疽菌血清和类鼻疽菌感染阳性患者血清进行 Western blot 实验检测 rBipD 的免疫反应性;通过 Western blot 及免疫荧光染色检测鉴定 rBipD 的免疫原性;以 rBipD 建立间接 ELISA 检测临床类鼻疽患者血清抗体。**结果** 成功构建 pET-28a-BipD 重组质粒并转化至 *E. coli* BL21(DE3)中诱导表达、纯化获得了相对分子质量约为 36×10^3 的 rBipD 蛋白,纯度约为 95.4%。rBipD 蛋白具有良好的免疫原性和免疫反应性。免疫小鼠可产生特异性抗体,制备鼠抗 rBipD 多克隆抗体,效价达 1∶512 000。5.0 μg/mL rBipD 蛋白可与类鼻疽患者血清发生免疫反应,而不与结核患者血清发生免疫反应,差异有统计学意义($P<0.01$)。**结论** 成功制备了具有免疫学活性的 rBipD 蛋白及其多克隆抗体,为其用于临床免疫学诊断和类鼻疽菌感染免疫机制研究提供了良好的工具。

[**关键词**] 类鼻疽伯克霍尔德菌;BipD 蛋白;重组表达;抗体制备
[**中图法分类号**] R341;R378.99;R392.11 [**文献标志码**] A

Recombinant expression and immunological characterization of *Burkholderia pseudomallei* type Ⅲ secretion system protein BipD

NAN Dongqi[1], WEN Yuan[1], CHEN Jiangao[1], RAO Chenglong[1], WU Pan[1], ZHANG Ziyuan[1], WANG Shiwei[1], YAN Jingmin[1], LI Qian[1], MAO Xuhu[1,2] [1]Department of Clinical Microbiology and Immunology, Faculty of Pharmacy and Medical Laboratory, [2]State Key Laboratory of Trauma and Chemical Poisoning, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To express recombinant *Burkholderia pseudomallei* (*B. pseudomallei*) type Ⅲ secretion system BipD protein, prepare its polyclonal antibodies and verify their immunological traits. **Methods** The recombinant pET-28a-BipD plasmid was generated, and the pET-28a-BipD-carried *E. coli* BL21 (DE3) bacteria were induced with isopropyl-β-d-thiogalactoside (IPTG) to express recombinant BipD (rBipD) protein. The rBipD was obtained by affinity chromatography using His Trap column, then mixed with Fredrick's adjuvant to immunize BALB/c mice by intraperitoneal injection in order to obtain anti-rBipD polyclonal antibodies. The immunoreactivity of rBipD was detected by Western blot assay using rabbit anti-melioidosis serum and the serum from melioidosis patients. The immunogenicity of rBipD was evaluated using Western blotting and immunofluorescence staining. Finally, rBipD was used to establish an indirect ELISA to detect serum antibodies of clinical melioidosis patients. **Results** The recombinant plasmid pET-28a-BipD was successfully constructed and transformed into *E. coli* BL21 (DE3) to induce rBipD expression with IPTG treatment. The obtained rBipD had a relative molecular weight of 36×10^3 and a purity of 95.4%, and had

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(32270190)
[**通信作者**] 毛旭虎,E-mail:maoxh2012@hotmail.com

2097-0927/Copyright © 2024, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

good immunogenicity and immunoreactivity. It could induce the production of specific antibodies after immunizing mice, and mouse polyclonal antibodies against rBipD were prepared with the titer of 1∶512 000. rBipD of 5.0 μg/mL produced specific immune response with the serum of melioidosis patients, but had no specific reaction with the serum of tuberculosis patients, with statistical difference ($P<0.01$). **Conclusion** rBipD with immunological activity is successfully prepared and purified, and its polyclonal antibodies are also developed, which provide a good tool for clinical immunological diagnosis and study of immune mechanism of *B. pseudomallei* infection.

[**Key words**] *Burkholderia pseudomallei*; BipD protein; recombinant expression; polyclonal antibodies preparation

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (32270190). Corresponding author: MAO Xuhu, E-mail: maoxh2012@hotmail.com

类鼻疽伯克霍尔德菌(*Burkholderia pseudomallei*,简称类鼻疽菌)是一种环境革兰阴性杆菌,主要存在于热带与亚热带地区的水或土壤中,是一种人兽共患传染病类鼻疽的病原体[1-3]。类鼻疽疫区主要分布在南纬20°至北纬20°范围内,包括了我国海南、台湾、香港等地,其主要症状为肺炎、多器官组织脓肿等,临床症状无特异性,诊断困难,入院初诊误诊率高,死亡率高,且目前尚无临床可用的有效疫苗[4-5]。近年来类鼻疽的全球流行趋势日趋严峻,2006年美国疾控中心将类鼻疽菌列为B类生物恐怖剂,因此对于类鼻疽菌感染致病机制及其防治的研究十分必要[6]。

Ⅲ型分泌系统(type Ⅲ secretion system,T3SS)普遍存在于革兰阴性菌中,在细菌的感染致病过程中具有重要作用[7]。类鼻疽菌基因组可编码3个T3SS,分别为T3SS-1、T3SS-2、T3SS-3[8]。BipD(BPSS1529)位于T3SS-3基因座,是Bsa针尖处的一种哑铃形蛋白,与BipB、BipC共同组成转运平台,有研究表明BipD蛋白与类鼻疽菌感染后逃逸宿主免疫清除相关,但具体功能及作用机制尚不明确[9]。BipD作为T3SS的分泌蛋白可刺激宿主产生特异性抗体,是一个类鼻疽菌诊断及疫苗研发的新的潜在靶点[10-12]。本研究重组表达并纯化出具有免疫活性的BipD蛋白,并免疫小鼠制备其多克隆抗体,以期为以BipD蛋白为靶点的类鼻疽诊断方法的建立及疫苗的研发、后续对BipD蛋白功能与类鼻疽菌感染致病机制的研究提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、细胞及主要试剂 类鼻疽菌BPC006、BPC004、BPC011、BPC021、BPC022、Δ*bipd*菌株及RAW264.7细胞保存于本实验室;兔抗类鼻疽菌抗体、GST蛋白由本实验室制备并保存;*Bam*HⅠ及*Eco*RⅠ酶、T4 DNA Ligase购自NEB公司;*E. coli* BL21(DE3)、*E. coli* DH5α感受态细胞购自天根公司;弗氏佐剂购自Sigma公司;DMEM培养基及胎牛血清购自Gibco公司;DnaK抗体购自Abcam公司;GoldView购自艾科瑞生物公司;His tag抗体购自Zenbio公司;Protein lader、SuperSignal™ West Pico PLUS、山羊抗兔荧光二抗594、山羊抗鼠荧光二抗488、DAPI、SlowFade™ Glass软质抗淬灭封片剂、PCR仪购自Thermo Fisher公司;PVDF膜、Cell Counting Slides、电泳仪、Trans-Bio Turbo购自Bio Rad公司;山羊抗兔及山羊抗鼠二抗购自中杉金桥公司;10×10^3超滤管购自Millipore公司;His Trap亲和层析柱购自GE Healthcare公司;考马斯亮蓝R-250、DNA marker、BSA、脱脂奶粉购自生工生物公司;PrimeSTAR® Max DNA Polymerase购自TaKaRa公司;Leica SP8共聚焦显微镜购自Leica Microsystems公司。

1.1.2 血清样本 类鼻疽患者血清为海南省三亚市人民医院确诊的类鼻疽患者的临床血清。本研究共纳入12份年龄30~70岁的患者血清,临床诊断:类鼻疽菌感染。纳入标准:①在进行药物治疗前采集的分泌物、血液等标本经实验室分离培养鉴定为类鼻疽菌;②有疫区接触史及发热或组织器官脓肿等类鼻疽的典型临床症状和体征;③患者病历资料完整。排除标准:患者拒绝参与。

结核患者血清为海南省三亚市人民医院经实验室检验确诊结核患者的临床血清,共纳入12份血清,年龄30~70岁,临床诊断:结核分枝杆菌感染。纳入标准:①在进行药物治疗前采集的分泌物、血液等标本经实验室检验鉴定为结核分枝杆菌;②有低热盗汗或典型影像学改变等结核的典型临床症状和体征;③患者病历资料完整。排除标准:患者拒绝参与。本研究涉及的内容均已告知血清样本所属的患者,且获得其同意。本实验获得海南省三亚市人民医院伦理委员会的批准(批号为202125)。

1.1.3 实验动物 实验共用6~8周龄BALB/c小鼠8只,体质量16~18 g,购自重庆腾鑫比尔公司。本研究动物实验经过陆军军医大学实验动物福利伦理审查委员会审核(AMUWEC20223354),符合动物伦理和动物福利要求。

1.2 方法

1.2.1 pET-28a-BipD原核表达载体的构建 提取类鼻疽BPC006菌株的全基因组DNA作为PCR反应模板,使用上游引物:5′-GGATCCATGAACATGCATGT-CGACATGGGACG-3′(*Bam*HⅠ)及下游引物:5′-GAA-TTCTCAGATCTGCAGATAGCTCTTGGC-3′(*Eco*RⅠ)进行PCR扩增获得目的基因*bipd*(945 bp),将*bipd*片段与pET-28a质粒进行*Bam*HⅠ/*Eco*RⅠ双酶切,使用T4 DNA ligase在16 ℃条件下过夜,连接酶切产物,而后转化入*E. coli* DH5α感受态细胞,涂布于LB固体培养基37 ℃过夜培养,次日挑取阳性单克隆进行增菌培养,提取pET-28a-BipD质粒,进行*Bam*HⅠ/*Eco*RⅠ双酶切验证,将电泳结果中可见目的基因片段的相应质粒进行DNA测序。

1.2.2 rBipD蛋白的表达和纯化 将pET-28a-BipD质粒转化入*E. coli* BL21(DE3)感受态细胞中,37 ℃ 200 r/min摇菌培养至*D*(595)为0.6~0.8,使用1.0 mmol/L IPTG在16 ℃条件下分别诱导3、5、8 h后离心收集菌体,PBS重悬后超声裂解30 min,4 ℃ 12 000 r/min离心15 min,收集上清中的细菌蛋白,通过SDS-PAGE电泳、考马斯亮蓝染色及Western blot实验检测His-BipD蛋白(rBipD)表达情况。配制A液(20 mmol/L磷酸三钠、500 mmol/L NaCl、30 mmol/L咪唑,pH=8.0)及B液(20 mmol/L磷酸三钠、500 mmol/L NaCl、500 mmol/L咪唑,pH=8.0)并超声脱气。在最佳诱导条件下诱导制备菌液2 L,提取细菌蛋白,使用蛋白纯化仪及His Trap亲和层析柱纯化rBipD蛋白,梯度洗脱后以1 mL/管收集流穿峰及洗脱峰组分,SDS-PAGE及考马斯亮蓝染色检测各组分的蛋白组成,将仅含有单一目的条带的组分混合后使用超滤管将蛋白溶液中的洗脱液替换为PBS,SDS-PAGE及考马斯亮蓝染色检测rBipD蛋白最终纯度。rBipD蛋白冻干后长期保存于室温。

1.2.3 多克隆抗体的制备 取400 μg的rBipD蛋白溶解于灭菌PBS中,用0.22 μm滤头过滤后,与等体积弗氏完全佐剂振荡混合充分乳化,按照每只小鼠50 μg rBipD蛋白的用量腹腔注射免疫小鼠,对照组小鼠注射等体积PBS溶液,记为第0天。第14天与第21天取与第0天相同量rBipD蛋白溶液,与等体积弗氏不完全佐剂充分乳化,按初次免疫的相同操作进行腹腔注射加强免疫。第27天进行眼球采血,分离获得血清后置于-80 ℃保存。

1.2.4 间接ELISA实验 使用实验设计所需浓度的rBipD蛋白作为抗原4 ℃包被酶标板过夜,PBST洗板后使用1%BSA封闭,洗板后加入倍比稀释后的rBipD抗血清及对照组小鼠血清(1∶1 000~1∶1 024 000),或类鼻疽及结核患者血清,37 ℃孵育1 h,PBST洗板,加入山羊抗鼠二抗37 ℃孵育1 h,PBST洗板,加入显色液37 ℃避光孵育15 min,加入终止液终止反应,使用酶标仪测定光密度值[*D*(450)],实验组光密度值*D*(450)/对照组光密度值*D*(450)>2.1视为阳性结果,否则为阴性结果。

1.2.5 Western blot实验 超声提取菌液上清蛋白,加入上样buffer,金属浴100 ℃煮10 min,根据实验需求上样至10%或12% SDS-PAGE凝胶进行电泳,而后使用Trans-Bio Turbo半干转仪0.5 mA恒流转膜40 min,5%脱脂奶粉封闭2 h,根据实验目的加入DnaK抗体、His tag抗体、BipD多克隆抗体、兔抗类鼻疽血清4 ℃孵育过夜,TBST洗膜后加入相应二抗室温孵育2 h,洗膜后使用Bio-Rad化学发光仪观察蛋白条带。

1.2.6 免疫荧光染色实验 将RAW264.7细胞铺板于提前放置灭菌细胞爬片的24孔板中,37 ℃ 5%CO_2培养12 h,以10∶1的感染复数加入类鼻疽菌WT及Δ*bipd*菌液感染铺板细胞,感染1.5 h后加入终浓度为250 μg/mL的卡那霉素清除胞外菌,感染6 h后用PBS洗涤细胞2次,4%多聚甲醛固定10 min,0.3% Triton X-100处理10 min,1% BSA封闭。而后依次加入兔抗类鼻疽菌抗体、山羊抗兔荧光二抗594、rBipD多克隆抗体、山羊抗鼠荧光二抗488分别于室温避光孵育2 h。PBS洗涤细胞后,加入DAPI 37 ℃避光孵育30 min,PBS洗涤细胞后,将细胞爬片安装在滴有SlowFade™ Glass软质抗淬灭封片剂的载玻片上。使用Leica SP8共聚焦显微镜观察各组荧光情况。

1.3 统计学分析

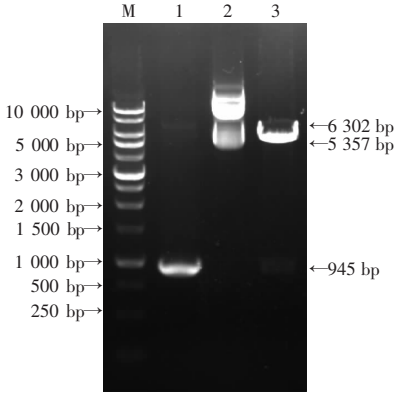
各实验均进行至少3次独立重复,使用GraphPad Prism 8软件进行Student's *t*检验,分析定量结果统计学差异并作图,$P<0.01$即为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BipD蛋白重组表达纯化

2.1.1 重组表达载体pET-28a-BipD构建 以类鼻疽菌BPC006菌株的全基因组DNA为模板,BipD-F/R为上

下游引物,PCR 扩增获得目的基因 *bipd* 片段(945 bp),重组原核表达载体 pET-28a-BipD 经 *Eco*RⅠ/*Bam*HⅠ双酶切及琼脂糖凝胶电泳实验鉴定目的片段与理论大小一致(图 1),且测序结果与 GenBank 数据库公布序列一致,表明原核表达载体 pET-28a-BipD 构建成功。



M:DNA 分子量标准;1:*bipd* 基因 PCR 扩增产物;2:重组质粒 pET-28a-BipD;3:重组质粒 pET-28a-BipD 经 *Eco*RⅠ/*Bam*HⅠ双酶切产物

图 1 pET-28a-BipD 重组质粒的构建

2.1.2 rBipD 蛋白诱导表达 含重组质粒 pET-28a-BipD 的 *E. coli* BL21(DE3)用 IPTG 诱导 rBipD 蛋白表达,分别取细菌上清及沉淀蛋白进行 SDS-PAGE 检测,结果显示 rBipD 蛋白多位于上清蛋白中(图 2A)。分别在 16 ℃经 IPTG 诱导 3、5、8 h 后,可观察到在大约 36×10^3 位置增加了一个蛋白条带,与 rBipD 蛋白预测相对分子量基本一致,各泳道条带灰度值分析结果显示 rBipD 蛋白表达量在 16 ℃诱导 3 h 条件下为 6.1%、16 ℃诱导 5 h 条件下为 7.3%、16 ℃诱导 8 h 条件下为 3.7%(图 2B)。使用 His-tag 抗体进行 Western blot 实验发现相应位置条带蛋白带有 His 标签,证明该条带为rBipD蛋白条带(图2C)。根据实验结果可知,rBipD 蛋白为可溶性表达,在 16 ℃经 IPTG 诱导 5 h 条件下表达效率较高。

2.1.3 rBipD 蛋白纯化 2 L 含 pET-28a-BipD 质粒的 *E. coli* BL21(DE3)菌液在 16 ℃,IPTG 诱导 5 h 后,提取细菌蛋白并通过 His Trap 亲和层析柱纯化后,收集蛋白液,将 SDS-PAGE 验证纯度较高的组分混合后超滤浓缩(图 3A),得到可溶性 rBipD 蛋白。SDS-PAGE 凝胶电泳结果表明,rBipD 蛋白相对分子质量约为 36×10^3(图 3B),与理论相对分子质量大小基本一致,纯化的 rBipD 蛋白纯度约 95.4%(图 3C)。本研究纯化共获得约 3 mL 蛋白溶液,浓度约为 1.96 mg/mL。

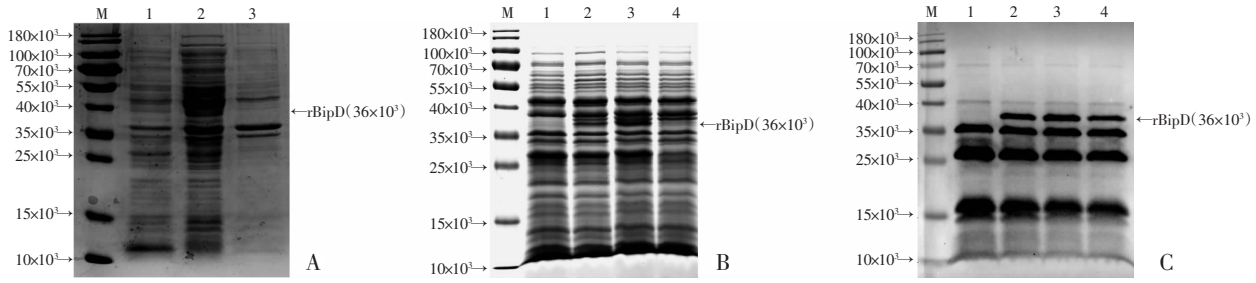
2.2 rBipD 蛋白免疫反应性鉴定

分别用兔抗类鼻疽菌血清和类鼻疽菌感染患者血清进行 Western blot 实验检测 rBipD 的免疫反应性,实验证明 rBipD 蛋白与兔抗类鼻疽菌血清和类鼻疽菌感染阳性患者血清均能产生特异的抗原抗体反应,表现出良好的免疫反应性(图 4)。

2.3 rBipD 蛋白免疫原性鉴定

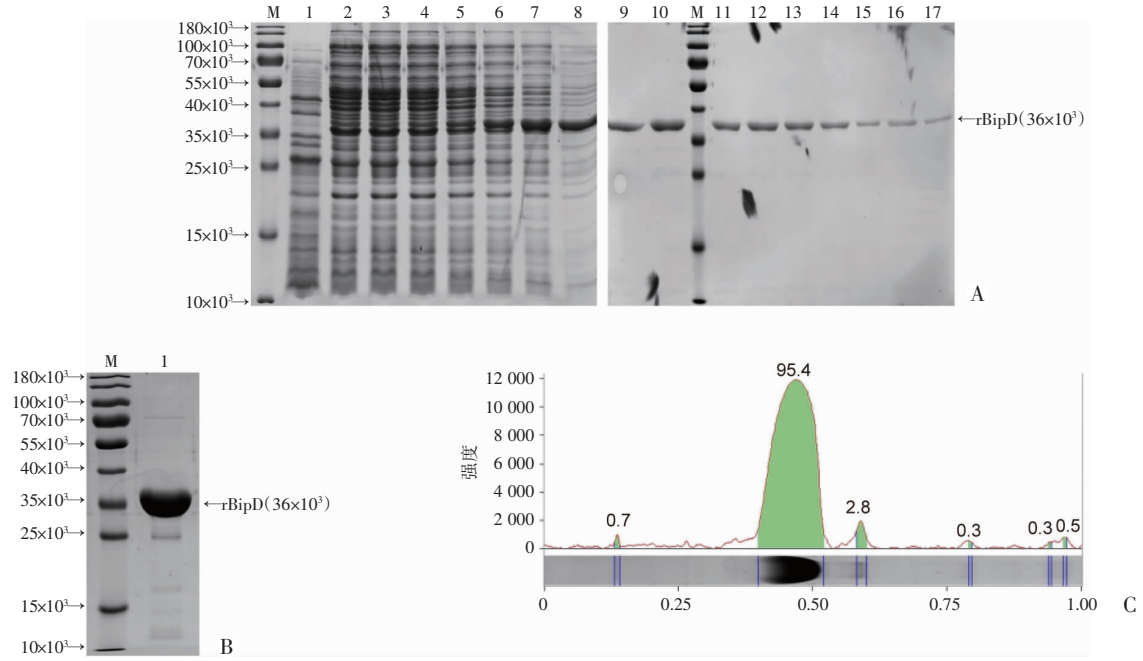
2.3.1 鼠抗 rBipD 蛋白多克隆抗体的制备及抗体效价测定 纯化的 rBipD 蛋白腹腔注射免疫小鼠,获得鼠抗 rBipD 的多克隆抗体,ELISA 检测结果显示抗体滴度达 1∶512 000(图 5)。

2.3.2 鼠抗 rBipD 蛋白多克隆抗体能特异识别类鼻疽菌天然 BipD 蛋白分子 制备野生型及 Δ*bipd* 类鼻疽菌的全菌蛋白样品,以 rBipD 蛋白为阳性对照,以鼠抗 rBipD 多克隆抗体为一抗进行 Western blot,分析 BipD 蛋白在 2 个菌株内的表达情况。结果如图 6A 所示,2 组细菌蛋白样品均在约 70×10^3 处可见亮度相似的 DnaK 蛋白条带,野生型类鼻疽菌蛋白样品及 rBipD 蛋白泳道中在约 36×10^3 处可见蛋白条带,与 BipD 蛋白理论相对分子质量基本一致,而 Δ*bipd* 类鼻疽菌全菌蛋白样品中未检测到 BipD 蛋白条带。



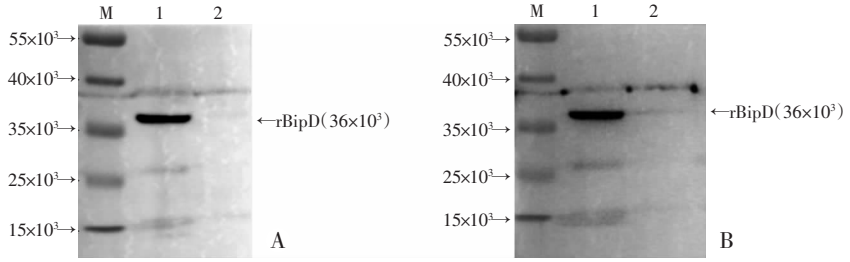
A:考马斯亮蓝染色检测 rBipD 蛋白表达 M:蛋白质分子量标准;1:BL21(DE3)上清蛋白;2:含 pET-28a-BipD 的 BL21(DE3)上清蛋白;3:含 pET-28a-BipD 的 BL21(DE3)沉淀蛋白;B、C:考马斯亮蓝染色及 Western blot 检测 rBipD 蛋白诱导表达最佳条件 M:蛋白质分子量标准;1:未诱导的含 pET-28a-BipD 的 BL21(DE3)上清蛋白;2:16 ℃诱导 3 h 的含 pET-28a-BipD 的 BL21(DE3)上清蛋白;3:16 ℃诱导 5 h 的含 pET-28a-BipD 的 BL21(DE3)上清蛋白;4:16 ℃诱导 8 h 的含 pET-28a-BipD 的 BL21(DE3)上清蛋白

图 2 rBipD 蛋白在 *E. coli* BL21(DE3)中的表达



A:考马斯亮蓝染色;M:蛋白质分子量标准;1~17:蛋白溶液通过 His Trap 亲和层析柱后收集的溶液组分 1~17;B:Western blot;M:蛋白质分子量标准;1:超滤浓缩后的 rBipD 溶液;C:B 中泳道 1 的蛋白纯度分析

图 3 rBipD 蛋白的纯化及纯度分析



M:蛋白质分子量标准;1:rBipD 蛋白;2:GST 蛋白

A:兔抗类鼻疽菌血清;B:类鼻疽菌感染阳性患者血清

图 4 rBipD 蛋白的免疫反应性鉴定

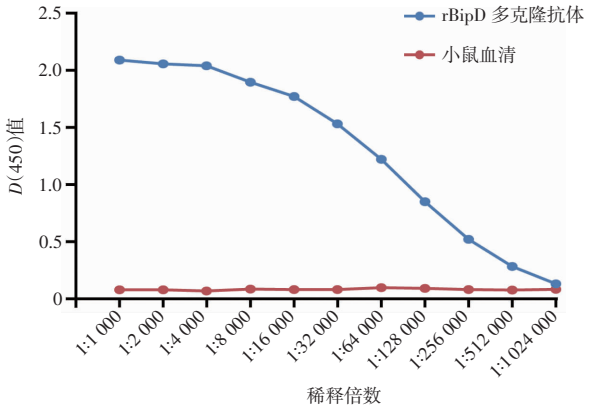
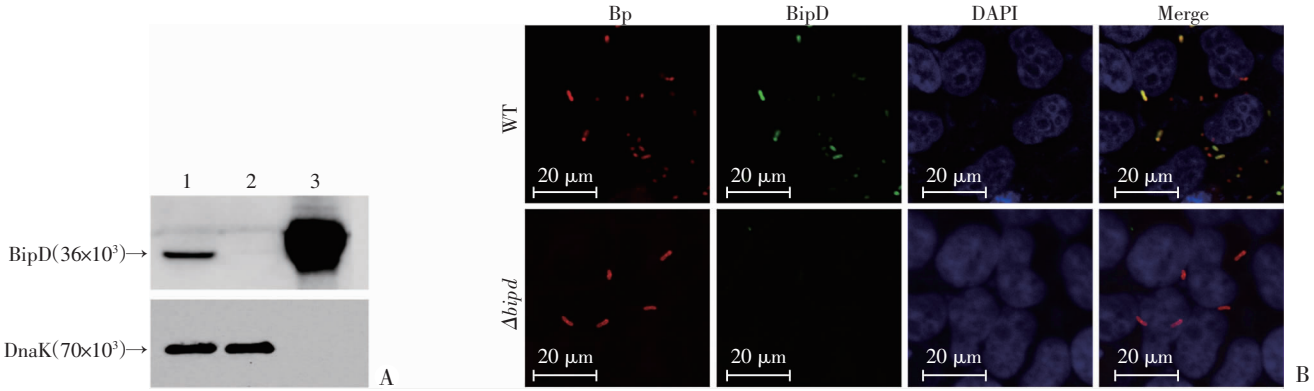


图 5 间接 ELISA 法检测 BipD 多克隆抗体效价

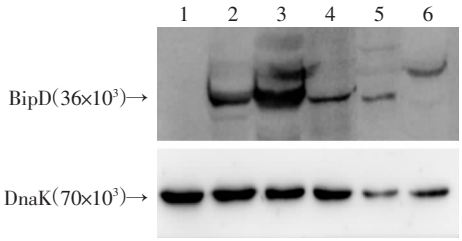
以兔抗类鼻疽菌多克隆抗体和鼠抗 rBipD 多克隆抗体为一抗,分别对野生型及 Δ*bipd* 类鼻疽菌感染的 RAW264.7 细胞进行免疫荧光染色,结果如图 6B 所示,鼠抗 rBipD 可使野生型类鼻疽菌产生绿色荧光信号,而 Δ*bipd* 类鼻疽菌无相应荧光信号。由此证明,rBipD 鼠多克隆抗体可与类鼻疽菌 BipD 蛋白特异性结合,用于鉴定类鼻疽菌中 BipD 的表达情况。

2.3.3 鼠抗 rBipD 蛋白多克隆抗体可特异识别不同类鼻疽菌株中的 BipD 蛋白 制备类鼻疽菌 BPC004、BPC006、BPC011、BPC021、BPC022 及 Δ*bipd* 菌株蛋白,使用鼠抗 rBipD 蛋白多克隆抗体进行 Western blot 实验,结果显示多克隆抗体可与不同类鼻疽菌株的 BipD 蛋白发生特异性抗原抗体反应,提示 rBipD 蛋白具有与天然 BipD 蛋白相同或相似抗原表位(图 7)。



A:Western blot 检测 BipD 蛋白表达　1:野生型类鼻疽菌全菌蛋白样品;2:Δ*bipd* 类鼻疽菌全菌蛋白样品;3:rBipD 蛋白;B:免疫荧光染色检测 BipD 蛋白表达　使用兔抗类鼻疽菌抗体将类鼻疽菌染为红色荧光;使用鼠抗 rBipD 多克隆抗体将类鼻疽菌中 BipD 蛋白染为绿色荧光;使用 DAPI 将 RAW264.7 细胞核染为蓝色荧光

图 6　Western blot 及免疫荧光染色检测鼠抗 rBipD 多克隆抗体与 BipD/rBipD 蛋白的抗原抗体反应



1:类鼻疽菌 Δ*bipd* 全菌蛋白样品;2:类鼻疽菌 BPC004 全菌蛋白样品;3:类鼻疽菌 BPC006 全菌蛋白样品;4:类鼻疽菌 BPC011 全菌蛋白样品;5:类鼻疽菌 BPC021 全菌蛋白样品;6:类鼻疽菌 BPC022 全菌蛋白样品

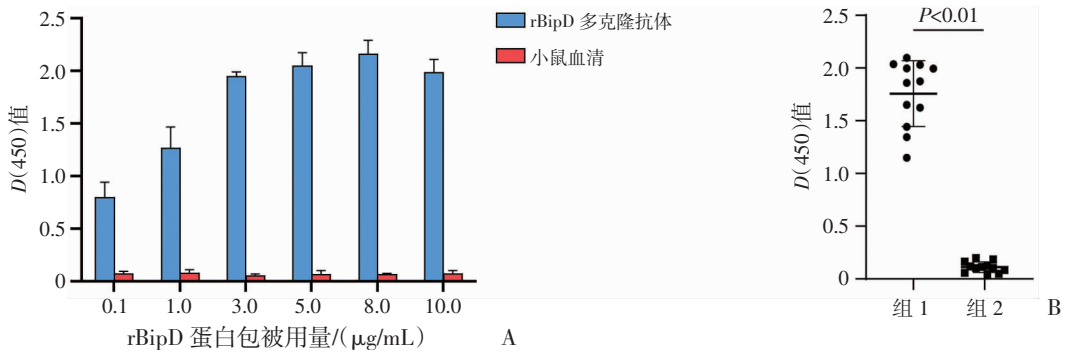
图 7　Western blot 检测鼠抗 rBipD 多克隆抗体与不同类鼻疽菌株的抗原抗体反应

2.4　rBipD 蛋白作为诊断抗原检测类鼻疽患者血清抗体

首先使用 rBipD 鼠多克隆抗体与不同包被浓度的 rBipD 进行间接 ELISA 实验,结果如图 8A 所示,0.1、1.0、3.0、5.0、8.0 及 10.0 μg/mL 的 rBipD 在检测中均可见阳性结果。筛选使用 5.0 μg/mL 的 rBipD 分别对 12 名类鼻疽菌患者血清及 12 名结核患者血清进行间接 ELISA 检测,结果如图 8B 所示,12 名类鼻疽菌患者血清均呈现阳性结果,而结核患者血清均呈现阴性结果,且 2 组之间差异具有统计学意义($P<0.01$)。

3　讨论

类鼻疽菌含有 2 条染色体的庞大基因组,可表达多种毒力因子,主要包括 T3SS、Ⅵ型分泌系统(type Ⅵ secretion system,T6SS)、荚膜多糖和脂多糖等[13-14]。T3SS 主要与细菌的效应蛋白分泌及其胞内生存和定殖相关[15],BipD 是类鼻疽菌 T3SS 的转运孔蛋白组成之一,由 310 个氨基酸组成,与 T3SS-3 基因座上的 BipB 和 BipC 蛋白组成转运平台,是类鼻疽菌效应蛋白分泌的通道[9]。在类鼻疽菌感染宿主过程中,BipD 与类鼻疽菌侵入非吞噬细胞的入胞率相关[16-17],且可介导类鼻疽菌从吞噬体逃逸及其感染后宿主细胞肌动蛋白重排导致的膜突起,在类鼻疽菌的胞内免疫逃逸中发挥重要作用[18-19]。因此,对 BipD 蛋白的功能研究具有重要意义。



A:间接 ELISA 法检测不同浓度 rBipD 对 rBipD 多克隆抗体的免疫反应性;B:间接 ELISA 法检测 rBipD 对类鼻疽菌抗血清的免疫反应性　组 1:类鼻疽患者血清;组 2:结核患者血清

图 8　rBipD 作为诊断抗原间接 ELISA 法检测类鼻疽患者血清抗体

本研究成功构建了 BipD 蛋白的重组表达质粒 pET-28a-BipD,转化入 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞后,使用 IPTG 在 16 ℃条件下处理 5 h 成功诱导表达,通过 His Trap 亲和层析柱纯化获得约 5.7 mg 相对分子质量约为 36×10^3 的 rBipD 蛋白,其纯度约 95.4%。经过 SDS-PAGE 及 Western blot 实验检测发现该蛋白为可溶性表达,表达量高,且易于纯化制备。ELISA 实验验证 rBipD 蛋白可与兔抗类鼻疽血清发生特异性免疫反应,具有天然 BipD 蛋白的抗原表位结构。而后将 rBipD 蛋白腹腔注射免疫 BALB/c 小鼠,制备了效价为 1∶512 000 的鼠抗 rBipD 多克隆抗体,免疫荧光实验证明该多克隆抗体可特异性识别类鼻疽菌,且对胞外及胞内的细菌菌体均有良好的结合能力。Western blot 实验证明该多克隆抗体可特异性识别本实验室保存的不同类鼻疽临床菌株的 BipD 蛋白,其中 BPC004、BPC006、BPC011、BPC021 菌株在 36×10^3 处可见特异性条带,而 BPC022 菌株在约 40×10^3 处可见特异性条带,这可能是由于不同菌株中 BipD 蛋白存在一定变异,导致蛋白质一级结构存在差异,或由于细菌状态等差异导致的细菌蛋白发生不同程度的翻译后修饰[20],从而在 Western blot 实验中呈现出不同位置的特异性条带。以上实验提示该多克隆抗体具有良好的免疫原性,可用于后续该蛋白功能机制的研究,为类鼻疽菌感染与宿主免疫清除机制研究提供方法学支持。此外,BipD 的同源蛋白耶尔森菌针尖蛋白 LcrV(V 抗原)已被人体临床试验验证可作为一种有效疫苗[21],BipD 蛋白也被证明可被类鼻疽菌减毒株感染的小鼠 $CD4^+$T 细胞特异性识别[22],本研究也证明 BipD 蛋白免疫小鼠可产生特异性抗体。因此,BipD 或可作为类鼻疽菌疫苗的潜在靶点。然而,BipD 蛋白抗体是否具有中和作用仍需进一步研究。

根据已有研究报道,类鼻疽患者病死率为 10%~40%[23-24],主要受患者本身的基础疾病、实验室诊断的耗时及准确性、临床治疗方案以及重症监护设备的先进程度等因素影响[25-26],因此类鼻疽的早期诊断十分必要。由于类鼻疽临床症状多样且无特异性,患者入院初诊误诊率可高达 100%,其中多数患者由于临床症状与结核类似,被误诊为结核分枝杆菌感染,影响患者早期治疗策略导致预后较差[27-28]。ELISA 实验验证本研究制备的 rBipD 蛋白对于类鼻疽患者及结核患者血清的鉴别具有较高的特异性,可作为类鼻疽菌诊断的潜在靶点。目前针对类鼻疽菌的检测主要有细菌分离培养、血清学检测和分子生物学检测等[29],但国内尚无报道以 BipD 蛋白为靶点的类鼻疽菌诊断方法,而该蛋白易于重组表达及纯化,且 rBipD 的免疫原性和免疫反应性良好,具有较好的临床应用前景。然而,BipD 抗体在患者感染过程中产生的时间尚不明确,因此,rBipD 是否可以作为诊断性抗原仍需进一步研究。

利用本研究制备的 rBipD 及其抗体,课题组对 BipD 蛋白在类鼻疽菌感染致病中的功能开展了探究,初步发现其可能与类鼻疽菌感染诱导的宿主细胞线粒体自噬的发生有关。具体分子机制正在研究之中。

综上,本研究成功制备了具有免疫学活性的 rBipD 蛋白及其多克隆抗体,为其用于临床免疫学诊断和类鼻疽菌感染免疫机制研究提供了良好的工具。

参考文献:

[1] LIMMATHUROTSAKUL D, WONGSUVAN G, AANENSEN D, *et al*. Melioidosis caused by *Burkholderia pseudomallei* in drinking water, Thailand, 2012[J]. Emerg Infect Dis, 2014, 20(2): 265-268. DOI: 10.3201/eid2002.121891.

[2] CHENG A C, JACUPS S P, GAL D, *et al*. Extreme weather events and environmental contamination are associated with case-clusters of melioidosis in the Northern Territory of Australia[J]. Int J Epidemiol, 2006, 35(2): 323-329. DOI: 10.1093/ije/dyi271.

[3] WIERSINGA W J, VIRK H S, TORRES A G, *et al*. Melioidosis[J]. Nat Rev Dis Primers, 2018, 4: 17108. DOI: 10.1038/nrdp.2017.108.

[4] SILVA E B, DOW S W. Development of *Burkholderia mallei* and *pseudomallei* vaccines[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2013, 3: 10. DOI: 10.3389/fcimb.2013.00010.

[5] CHAPARTEGUI-GONZÁLEZ I, BOWSER S, TORRES A G, *et al*. Recent progress in *Shigella* and *Burkholderia pseudomallei* vaccines[J]. Pathogens, 2021, 10(11): 1353. DOI: 10.3390/pathogens10111353.

[6] FISHER D A, HARRIS P N A. Melioidosis: refining management of a tropical time bomb[J]. Lancet, 2014, 383(9919): 762-764. DOI: 10.1016/s0140-6736(13)62143-1.

[7] GALÁN J E, LARA-TEJERO M, MARLOVITS T C, *et al*. Bacterial type Ⅲ secretion systems: specialized nanomachines for protein delivery into target cells[J]. Annu Rev Microbiol, 2014, 68: 415-438. DOI: 10.1146/annurev-micro-092412-155725.

[8] SUN G W, GAN Y H. Unraveling type Ⅲ secretion systems in the highly versatile *Burkholderia pseudomallei*[J]. Trends Microbiol, 2010, 18(12): 561-568. DOI: 10.1016/j.tim.2010.09.002.

[9] VANDER BROEK C W, STEVENS J M. Type Ⅲ secretion in the melioidosis pathogen *Burkholderia pseudomallei*[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2017, 7: 255. DOI: 10.3389/fcimb.2017.00255.

[10] 毛旭虎, 胡治强. 类鼻疽的实验室诊断方法及评价[J]. 第三军医大学学报, 2016, 38(11): 1200-1204. DOI:

10.16016/j.1000-5404.201602028.
MAO X H, HU Z Q. Progress of research on laboratory diagnosis of melioidosis[J]. J Third Mil Med Univ, 2016, 38(11): 1200-1204. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201602028.

[11] GASSIEP I, BAUER M J, PAGE M, *et al*. Comparative evaluation of Panther Fusion and real-time PCR for detection of *Burkholderia pseudomallei* in spiked human blood[J]. Access Microbiol, 2022, 4(3). DOI: 10.1099/acmi.0.000333.

[12] FAIRLEY L, SMITH S, MAISRIKROD S, *et al*. Systematic review and meta-analysis of diagnostic tests for diagnosis of melioidosis[J]. Acta Trop, 2021, 214: 105784. DOI: 10.1016/j.actatropica.2020.105784.

[13] ADLER N R L, STEVENS J M, STEVENS M P, *et al*. Autotransporters and their role in the virulence of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*[J]. Front Microbio, 2011, 2: 151. DOI: 10.3389/fmicb.2011.00151.

[14] PUAH S M, PUTHUCHEARY S D, WANG J T, *et al*. Molecular characterization of putative virulence determinants in *Burkholderia pseudomallei*[J]. Sci World J, 2014, 2014: 590803. DOI: 10.1155/2014/590803.

[15] ABBY S S, ROCHA E P C. The non-flagellar type Ⅲ secretion system evolved from the bacterial flagellum and diversified into host-cell adapted systems[J]. PLoS Genet, 2012, 8(9): e1002983. DOI: 10.1371/journal.pgen.1002983.

[16] STEVENS M P, WOOD M W, TAYLOR L A, *et al*. An Inv/Mxi-Spa-like type Ⅲ protein secretion system in *Burkholderia pseudomallei* modulates intracellular behaviour of the pathogen[J]. Mol Microbiol, 2002, 46(3): 649-659. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2002.03190.x.

[17] STEVENS M P, FRIEBEL A, TAYLOR L A, *et al*. A*Burkholderia pseudomallei* Type Ⅲ secreted protein, BopE, facilitates bacterial invasion of epithelial cells and exhibits guanine nucleotide exchange factor activity[J]. J Bacteriol, 2003, 185(16): 4992-4996. DOI: 10.1128/jb.185.16.4992-4996.2003.

[18] STEVENS M P, HAQUE A, ATKINS T, *et al*. Attenuated virulence and protective efficacy of a *Burkholderia pseudomallei* bsa type Ⅲ secretion mutant in murine models of melioidosis[J]. Microbiology, 2004, 150(8): 2669-2676. DOI: 10.1099/mic.0.27146-0.

[19] GONG L, CULLINANE M, TREERAT P, *et al*. The *Burkholderia pseudomallei* type Ⅲ secretion system and BopA are required for evasion of LC3-associated phagocytosis[J]. PLoS One, 2011, 6(3): e17852. DOI: 10.1371/journal.pone.0017852.

[20] MACEK B, FORCHHAMMER K, HARDOUIN J, *et al*. Protein post-translational modifications in bacteria[J]. Nat Rev Microbiol, 2019, 17(11): 651-664. DOI: 10.1038/s41579-019-0243-0.

[21] WILLIAMSON E D. Plague[J]. Vaccine, 2009, 27: D56-D60. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.07.068.

[22] TIPPAYAWAT P, PINSIRI M, RINCHAI D, *et al*. *Burkholderia pseudomallei* proteins presented by monocyte-derived dendritic cells stimulate human memory T cells *in vitro*[J]. Infect Immun, 2011, 79(1): 305-313. DOI: 10.1128/iai.00803-10.

[23] CURRIE B J, MAYO M, WARD L M, *et al*. The Darwin prospective melioidosis study: a 30-year prospective, observational investigation[J]. Lancet Infect Dis, 2021, 21(12): 1737-1746. DOI: 10.1016/S1473-3099(21)00022-0.

[24] CHANTRATITA N, PHUNPANG R, YARASAI A, *et al*. Characteristics and one year outcomes of melioidosis patients in Northeastern Thailand: a prospective, multicenter cohort study[J]. Lancet Reg Health Southeast Asia, 2023, 9: 100118. DOI: 10.1016/j.lansea.2022.100118.

[25] LIMMATHUROTSAKUL D, WONGRATANACHEEWIN S, DAY N P J, *et al*. Increasing incidence of human melioidosis in northeast Thailand[J]. Am J Trop Med Hyg, 2010, 82(6): 1113-1117. DOI: 10.4269/ajtmh.2010.10-0038.

[26] CURRIE B J. Melioidosis and *Burkholderia pseudomallei*: progress in epidemiology, diagnosis, treatment and vaccination[J]. Curr Opin Infect Dis, 2022, 35(6): 517-523. DOI: 10.1097/qco.0000000000000869.

[27] 吴华, 黄东良, 王旭明. 如何避免类鼻疽的漏诊和误诊[J]. 现代预防医学, 2013, 40(19): 3681-3683.
WU H, HUANG D L, WANG X M. How to avoid the misdiagnosis and missed diagnosis of meliodosis[J]. Mod Prev Med, 2013, 40(19): 3681-3683.

[28] 毛旭虎. 加强类鼻疽的研究[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(13): 1315-1317. DOI: 10.16016/j.1000-5404.2011.13.013.
MAO X H. Progress on melioidosis[J]. J Third Mil Med Univ, 2011, 33(13): 1315-1317. DOI: 10.16016/j.1000-5404.2011.13.013.

[29] 杨小敏, 方瑶, 顾江, 等. 特异引物 PCR 鉴定类鼻疽伯克霍尔德菌方法的建立和优化[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(14): 1427-1431. DOI: 10.16016/j.1000-5404.2011.14.001.
YANG X M, FANG Y, GU J, *et al*. Establishment and optimization of a method to identify *Burkholderia pseudomallei* based on primer-specific polymerase chain reaction[J]. J Third Mil Med Univ, 2011, 33(14): 1427-1431. DOI: 10.16016/j.1000-5404.2011.14.001.

(**收稿**:2023-11-08;**修回**:2024-01-17)
(编辑 邓强庭)