DOI:10.3969/j.issn. 1673-1689.2018.05.005

新型 Kdo_2-lipid A 合成菌株构建及其免疫生化活性研究

王碧雯[1,2]，李颜颜[*1,2]，王小元[1,2]

(1. 食品科学与技术国家重点实验室，江南大学，江苏 无锡 214122；2. 食品安全国际联合实验室，江南大学，江苏 无锡 214122)

摘要：脂多糖(LPS)是革兰氏阴性细菌外膜的主要组成部分，由疏水的 Kdo_2-lipid A 和亲水的多糖长链组成，能激活先天性免疫系统。Kdo_2-lipid A 是 LPS 的生物活性中心，能被开发为新型疫苗佐剂。本研究在前期菌株基础上敲除与 LPS 庚糖合成相关 *waaC-waaF* 基因，构建了直接合成特殊结构 Kdo_2-lipid A、不含多糖长链的突变株 BW003。通过薄层层析和电喷雾电离质谱技术鉴定了 BW003 合成的 Kdo_2-lipid A 结构；HEK-Blue hTLR4 细胞和 THP-1 细胞刺激实验证实突变株及其合成的 Kdo_2-lipid A 的细胞毒性均明显减弱；生化表型分析结果表明 BW003 较野生型呈现出更高的外膜渗透性、抗生素敏感性、疏水性及自凝集能力。本研究为后续新型疫苗佐剂开发和产业化利用奠定了理论基础。

关键词：脂多糖；Kdo_2-lipid A；免疫生化活性；*waaC-waaF* 基因；疫苗佐剂

中图分类号：Q 939.91　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1673—1689(2018)05—0479—08

Construction of *Escherichia coli* Mutant Producing Novel Kdo_2-Lipid A and Study of Its Immunological and Biochemical Activities

WANG Biwen[1,2]，*LI Yanyan*[*1,2]，*WANG Xiaoyuan*[1,2]

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;
2. International Joint Laboratory on Food Safety, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Lipopolysaccharides (LPS) is the major component of the outer membrane of Gram-negative bacteria. It's composed of a hydrophobic Kdo_2-lipid A and a hydrophilic polysaccharide chain, and can activate the innate immune system. Kdo_2-lipid A is the bioactive centers of LPS, which has the potential to be developed as vaccines or vaccine adjuvants. In this study, we constructed a novel Kdo_2-lipid A producing mutant BW003 by deleting *waaC-waaF* genes in the chromosome of a laboratory *Escherichia coli* strain. The Kdo_2-lipid A structure of BW003 was confirmed by TLC and ESI/MS. Compared with wild type *E. coli* W3110 and LPS, BW003 and

收稿日期：2015-09-02

基金项目：国家重点研发计划“食品安全关键技术研发”专项(2017YFC1600102)；国家轻工技术与工程一流学科自主课题(LITE2018-10)。

***通信作者**：李颜颜(1984-)，女，河北保定人，副教授，工学博士，硕士研究生导师，主要从事细菌内毒素免疫生化性质研究。

E-mail：yanyanli1123@hotmail.com

引用本文：王碧雯，李颜颜，王小元. 新型 Kdo_2-lipid A 合成菌株构建及其免疫生化活性研究[J]. 食品与生物技术学报，2018，37(05)：479-486.

Kdo_2-lipid A showed lower cytotoxicity when stimulating HEK-Blue hTLR4 cells and THP-1 cells. In addition,BW003 presented higher outer membrane permeability,sensitivity to antibiotics, hydrophobicity and auto-aggregation ability,which is safe and efficient for large-scale industrial fermentation and vaccine adjuvants development.

Keywords: LPS,Kdo_2-lipid A,immunological and biochemical activities,*waaC –waaF*,vaccine adjuvant

脂多糖（Lipopolysaccharides,LPS），俗称内毒素,是大多数革兰氏阴性细菌细胞外膜的主要组成部分[1-2]。LPS 的结构分为 2 部分:疏水的 Kdo_2–lipid A 和亲水的多糖长链(Polysaccharides,PS),其在维持细胞外膜渗透性和稳定性上起到重要作用[3]。LPS 能被哺乳动物细胞表面的 Toll 样受体 4（TLR4)识别而激活先天性免疫系统、诱导促炎性细胞因子的释放。毒性高的 LPS 可引起促炎症细胞因子过量释放,引发热休克甚至死亡,而低毒性的 LPS 或其衍生物能有效激活先天性免疫系统但不会产生过量炎症分子,可作为免疫系统激活剂而被开发成疫苗或疫苗佐剂[4-5]。由于 LPS 提取工艺复杂、提取中需要用到大量的有机溶剂,如苯酚等,同时 LPS 分子量大、多糖长链部分结构各异,难以直接检测或定量，在生物免疫学研究及临床试验中有较大局限性。因此,降低 LPS 毒性、优化 LPS 结构、简化 LPS 提取检测步骤成为开发利用细菌内毒素的关键。

Kdo_2–lipid A 是 LPS 的生物活性中心和毒性中心,是细菌维持正常生长的最小 LPS 结构[5]。野生型大肠杆菌(*Escherichia coli*,*E. coli*)的 LPS 结构如图 1 所示，包含双磷酸、6 条脂肪酸链的 Kdo_2–lipid A 和一条多糖长链。Kdo_2–lipid A 与多糖长链的连接是由 LPS 合成途径中的 *waaC–waaF* 基因编码的 2 个庚糖转移酶 WaaC 和 WaaF 催化完成[6],前人研究利用四环素抗性基因插入 *waaC–waaF* 基因簇而使之失活,得到只合成短链 LPS,即 Kdo_2–lipid A 的菌株 WBB06。Kdo_2–lipid A 相对分子质量小,具有双亲性,可通过三氯甲烷/甲醇体系简易萃取,并通过薄层层析的方法定量分析,在定性的质谱检测中更易电离、有高灵敏度,在水相体系中也有一定溶解度。因此，在疫苗或疫苗佐剂的开发应用中,Kdo_2–lipid A 较 LPS 更有优势。

本实验室前期构建了一株外源基因组成型表达菌 HW003[7],该菌在 *E. coli* W3110 的染色体上敲除 *lacI* 基因,并 *lacZ* 位点中插入 Kdo_2–lipid A 外源修饰基因 *lpxE*(来自弗朗西斯菌株,编码的磷酸基团转移酶 LpxE,能够特异性地去除 Kdo_2–lipid A 的 C1 位磷酸基团[8])和 *pagL*(来自沙门氏菌,编码的脱酰基酶 PagL 能够特异性地去除 Kdo_2–lipid A 的 C3 棕榈酸脂肪酸链[9]),其合成的 LPS 包含特殊结构 Kdo_2–lipid A 及多糖长链，较野生型 W3110 的 LPS 毒性降低。本研究在 HW003 菌株的基础上进一步精简 LPS 结构,敲除与糖链中庚糖合成相关 *waaC–waaF* 基因,构建了一株无抗性标记、能够直接合成不含多糖长链的、特殊结构 Kdo_2–lipid A 的突变株 BW003。随后研究了 BW003 菌株合成的 Kdo_2–lipid A 的结构、菌株及其 Kdo_2–lipid A 的细胞毒性及菌株相关生化表型,为进一步开发为疫苗佐剂及工业生产菌株奠定基础。

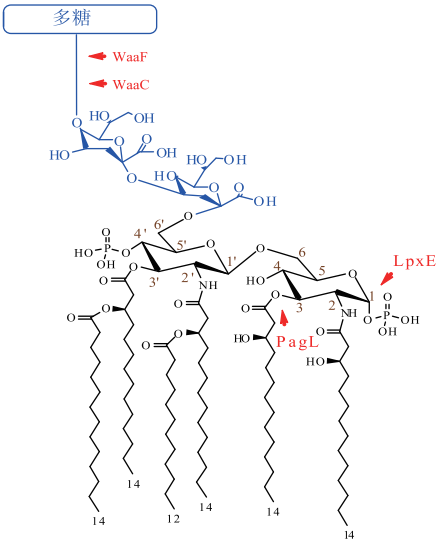


图 1　*E. coli* LPS 的结构及相关合成、修饰酶

Fig. 1　Structure of *E. coli* LPS and relative synthetic or modify enzymes

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验菌株、质粒和引物 所涉及的实验大肠杆菌和辅助质粒列于表 1,所涉及的引物列于表 2。

1.1.2 培养基和培养条件 培养 *E. coli* 时均用 LB 培养基(蛋白胨 10 g/L,酵母膏 5 g/L,氯化钠 10 g/L,调 pH 到 7.4);含pKD46 或 pCP20 质粒的菌株在 30 ℃下培养,筛选时需加入 50 mg/L 氨苄霉素;敲除片段同源重组转化子筛选时需加入 30 mg/L 卡那霉素;其它菌株均在 37 ℃培养。

1.1.3 工具酶和主要试剂 PCR 试剂盒,购买于广州东盛生物科技有限公司;Ex Taq 聚合酶,购买于 TaKaRa 公司。

表 1 本研究所使用的菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids in this research

菌株	特征描述	来源
W3110	Wild type *E. coli*, *F-rph-1 IN*(*rrnD-rrnE*)*1* λ^-	实验室菌株
HW003	W3110 Δ*lacI lacZ::pagL-lpxE*	[9]
WBB06	*E. coli* mutant with deletion of *waaC* and *waaF*	实验室菌株
BW003	W3110 Δ*lacI* Δ*waaC -waaF lacZ::pagL-lpxE*	本研究
质粒	**特征描述**	**来源**
pKD46	P_{araB}γ β exo, Rep^{ts},Amp^R	[10]
pCP20	FLP^+, λ cI857$^+$, $\lambda p_R Re^{ts}$, Cam^R, Amp^R	[10]
pBS-CFkan	Plasmid for deleting *waaC* and *waaF* in *E. coli*	实验室质粒

表 2 本研究用到的引物

Table 2 Primers in this research

引物	核苷酸序列 (5′-3′)	酶切位点
waaC-U-F	CCGCTCGAGTAAATCAAGCAAGC-CTAT	*Xho I*
waaF-D-R	AAAACTGCAGTGCTACGCTGGCT-TATC	*Pst I*
lacZ-F	CCATTCAGGCTGCGCAACTGTT	/
lacZ-R	TTAATGCAGCTGGCACGACAGG	/

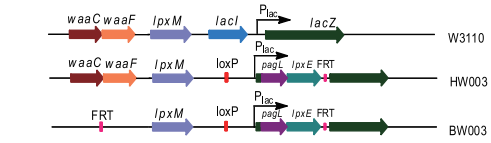
核酸染料:GoldView,购买于上海赛百盛基因技术有限公司;核酸电泳 Marker,购买于 Fermentas 公司。DNA 水解酶 I、RNA 水解酶 A 和蛋白水解酶 K,购买于上海生工生物工程有限公司。酵母膏干粉和蛋白胨,购买于英国 OXIOID 公司;Ampicillin 和 Kanamycin 抗生素、L-阿拉伯糖、琼脂糖、琼脂粉,均购买于上海捷瑞生物有限公司;硅胶 60 薄层层析板,购买于德国默克公司;分析纯级别的氯化钠、三氯甲烷、甲醇等常规试剂,购买于国药集团。DMEM 高糖培养基、RPMI-1640 培养基、2.5 g/L 胰酶、青霉素-链霉素溶液,购买于 GIBCO 公司;胎牛血清,购买于 Thermo-Hyclone 公司;PMA、DMSO,购买于 Sigma-Aldrich 公司;细胞培养瓶、细胞培养板,购买于 Corning 公司;HEK-Blue hTLR4 细胞、Normocin 多效抗生素、HEK-Blue 筛选液及 HEK-Blue 检测液,购买于 Invivogen 公司;THP-1 细胞,购买于中国科学院细胞库;所有细胞因子 ELISA 试剂盒,购买于 R&D 公司。

1.2 方法

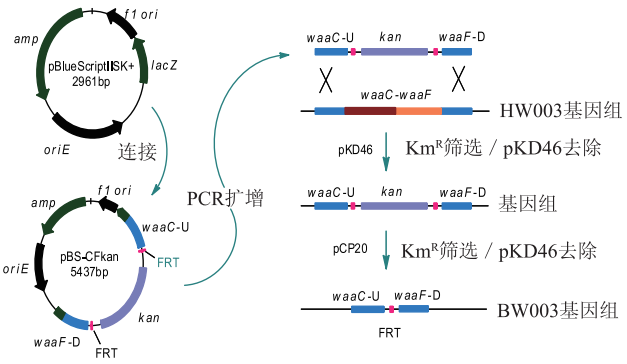
1.2.1 BW003 菌株的构建 基于同源重组和位点特异性重组原理,*waaC-waaF* 基因的敲除采用 Datsenko[10]和 Cherepanov 等[11]报道的方法,敲除过程如图 2 所示。首先,在 *E. coli* JM109 中构建 *waaC-waaF* 基因的敲除质粒 pBS-CFkan,再由 PCR 从敲除质粒上将敲除片段扩增出来、纯化、回收。在已构建好 *lpxE-pagL* 组成型表达的菌株 HW003(W3110 △*lacI lacZ*::*lpxE-pagL*)中转入 pKD46 辅助质粒。HW003/pKD46 菌株在 L-阿拉伯糖诱导培养、制备成感受态后将敲除片段转入,使其发生同源重组从而敲除目的基因。筛选出正确转化子后,通过高温 42 ℃培养去除 pKD46 质粒,再在转化子中转入 pCP20 质粒促使位于 *kan* 片段两端的 FRT 位点发生位点特异性重组,从而去除 *kan* 片段。最后通过高温 42 ℃培养去除 pCP20 质粒,进而得到无抗突变株 BW003。*E. coli* 感受态细胞制备方法和转化方法参照 Han 等[12]报道的方法。

1.2.2 Kdo_2-lipid A 与 LPS 的提取与纯化制备 Kdo_2-lipid A 粗样采用 Bligh-Dyer 萃取法[13]。200 mL 过夜培养菌液离心以收集菌体,所得菌体双蒸水洗涤一次后用 38 mL 三氯甲烷/甲醇/水一相体系(1:2:0.8,体积比)重悬菌体,磁力搅拌破碎 1 h,离心分相,弃下相固体碎片、取上清液再加入 10 mL 三氯甲烷和 10 mL 水,配成三氯甲烷/甲醇/水二相体系(2:2:1.8,体积比);再次离心以分相,将下相液体移至旋蒸瓶,旋转蒸干溶剂,所得粗样-20 ℃保存。Kdo_2-lipid A 样品的纯化制备参照 Zhou 等[14]的 DEAE-纤维素阴离子交换层析方法:将 BW003 的 Kdo_2-lipid A 粗样溶于 5 mL 三氯甲烷/甲醇/水(2:3:

1,体积比)溶液,上样于一个事先用 6 倍体积三氯甲烷/甲醇/水 (2:3:1, 体积比) 溶液平衡的、10 mL DEAE-纤维素阴离子交换柱; 用三氯甲烷/甲醇/240 mmol/L 醋酸铵(2:3:1,体积比)溶液洗脱磷脂等杂质,再用三氯甲烷/甲醇/480 mmol/L 醋酸铵(2:3:1,体积比)溶液将 Kdo_2-lipid A 进行洗脱并收集;收集洗脱液配成三氯甲烷/甲醇/水二相体系 (2:2:1.8,体积比);离心取下相,旋蒸除去溶剂,得 Kdo_2-lipid A 纯品,-20 ℃保存。



(a)W3110, HW003, BW003菌株染色体基因型对比



(b)*waaC-waaF*基因敲除质粒的构建及染色体组*waaC-waaF*敲除过程

图 2 W3110,HW003,BW003 菌株染色体基因型比对和 *waaC-waaF* 敲除示意图

Fig. 2 Diagrams of chromosomes genotype alignment of strains W3110,HW003,BW003 and the deletion of *waaC-waaF*

LPS 样品的提取采用热酚法[13]。离心菌液收集约 5 g 湿菌体,用双蒸水洗涤菌体一次后加入 18 mL 水和 22 mL 体积分数 90%苯酚,68 ℃震荡 1 h;冷却后 4 ℃离心分相, 取上相透析 24 h 以去除苯酚;透析后的溶液经真空冷冻干燥得到 LPS 粗样。LPS 粗样按照 Karow 等[15]方法,复溶后添加 DNA 水解酶 I、RNA 水解酶 A 和蛋白水解酶 K 处理去除核酸及蛋白质, 真空冷冻干燥后再用三氯甲烷-甲醇混合溶液洗涤以去除磷脂,最后复溶于双蒸水中真空冷冻冻干,得 LPS 纯品,4 ℃保存。

1.2.3 Kdo_2-lipid A 的薄层层析(TLC)分析及电喷雾电离质谱(ESI/MS)分析 薄层层析(TLC)分析及电喷雾电离质谱(ESI/MS)分析均按照 Wang 等[16]的方法,Kdo_2-lipid A 粗样溶于三氯甲烷/甲醇(2:1,体积比),TLC 分析时将样品点于硅胶 60 TLC 板上,在三氯甲烷/甲醇/冰醋酸/水(25:15:2:1,体积比)的展层剂中层析, 层析结束后吹干板上残留展层剂,用乙醇/硫酸(1:9,体积比)溶液进行碳化,最后加热至 180 ℃显色;ESI/MS 分析时, 进样于 WATERS SYNAPT Q-TOF Mass Spectrometer 质谱仪,在 120 V 锥孔电压、负离子扫描模式下检测 *m/z* 1 000~2 500 范围的离子,所得数据用 MassLynx V4.1 software 软件处理分析。

1.2.4 HEK-Blue hTLR4 细胞毒性分析 HEK-Blue hTLR4 细胞是经转染改造的人肾上皮细胞,是在 HEK293 细胞中表达了人 TLR4 及 NF-kB 诱导分泌的胚胎碱性磷酸激酶报告基因,能特异性识别 LPS 或含有 LPS 的细菌、实时监测 LPS 诱导的 TLR4 免疫通路的强弱, 通过显色反应检测出对应样品的 TLR4 的刺激能力和对细胞的毒性。HEK-Blue hTLR4 细胞培养参照 Needham 等[17]的方法和细胞使用说明书。细菌菌体收集后用无热源磷酸缓冲液(PBS)洗 2 次后梯度稀释,先加入 96 孔板,无菌 PBS 作为空白对照;HEK-Blue hTLR4 细胞收集计数后用 HEK-Blue™ 检测液重悬再接种至 96 孔板; 细菌和细胞混合培养 12 h 后检测 OD_{650} 的吸光度,吸光度与 TLR4 信号通路激起的强度成正比。

1.2.5 THP-1 细胞的毒性分析 细胞培养参照 Li 等[18]的方法。细胞收获计数后,按终质量浓度 20 ng/mL 添加 PMA 并将细胞悬液接种至 96 孔板,培养 12 h 后细胞分化贴壁,倒弃旧培养基,更换新鲜培养基,同时加入质量浓度分别为 100、10、1、0.1 ng/mL 的 Kdo_2-lipid A 或 LPS 纯化样品, 以不添加样品的新鲜培养基作空白对照。细胞再培养 24 h 后离心取培养上清液,保存于 -80 ℃。用于 ELISA 试剂盒测定细胞培养上清液中细胞因子 TNF-α、IL-8 和 RANTES 的刺激释放量。

1.2.6 菌株生化表型分析

1) 菌株细胞表面疏水性的测定。参照 Del Re 等[19]的方法,用 PBS 洗涤菌体一次并重悬,控制菌悬液 OD_{600}=0.5;取 3 mL 菌悬液置于试管中,再加入 1 mL 二甲苯,剧烈震荡 2 min 后静置 0.5 h,取下相液体测 OD_{600}。

$$细胞表面疏水性=(0.5-OD_{600\ 下相液体})/0.5 \quad (1)$$

2) 菌株外膜渗透性的测定。菌株外膜渗透性测

定采用 NPN(N-Phenyl naphthylamine)方法[20]。离心收集菌体,用 PBS 洗涤菌体一次并重悬,控制菌悬液 OD_{600}=0.5;取 1.92 mL 菌悬液与 80 μL 1 mmol/L 的 NPN 溶液混匀于石英比色皿中,测定激发波长 350 nm、发射波长 420 nm、缝宽 5 mm 条件下的荧光吸收值。外膜渗透性与荧光吸收强度成正比。

3)菌株自凝集能力的测定。参照 Rahman 等[21]的方法,离心过夜培养菌液以收集菌体,用 PBS 洗涤菌体一次并重悬,控制菌悬液 OD_{600}≈2.0(记为 A_0,保留三位有效数字)。取 10 mL 菌液转移至刻度管,22 ℃静置 24 h,测定菌液 OD_{600} 值(记为 A_i,保留三位有效数字)。

自凝集百分数 $A_{Ag}\%=[(A_0-A_i)/A_0]\times100$

4)菌株抗生素 MIC 值的测定。将新生霉素(Novobiocin)用 LB 液体培养基倍比稀释,使质量浓度分别为 1 000、500、250、125、62.5、31.3、15.6、7.80、3.90 μg/mL,加入 96 孔板中,留一排新型 LB 培养基作生长对照;另将等体积 OD_{600}=0.01 的稀释菌液加入 96 孔板中,盖上盖子,37 ℃静置培养 12 h,用酶标仪测定菌液 OD_{600}。将 OD_{600} 小于 0.15 的点对应的抗生素浓度定义为菌株对新生霉素的 MIC值。

2 结果与讨论

2.1 BW003 菌株的构建

首先,对出发菌株 HW003 进行 PCR 鉴定(图 3(a))。以 lacZ-F/R(*lacZ* 位点中间位置设计的一对引物)为引物,W3110 基因组 *lacZ* 位点 PCR 产物大小为 300 bp 左右(图 3(a)的 1 泳道);HW003 基因组 PCR 产物则为 1 996 bp(图 3(a)的 2 泳道),电泳结果验证表明出发菌株 HW003 的 *lacZ* 位点中成功插入 *lpxE-pagL* 基因。随后,通过同源重组的方法开始敲除 *waaC-waaF* 基因,成功敲除后,PCR 验证图如图 3(b)所示。图 3(b)1 泳道是以 *waaC-waaF*-F/R 为引物,对 HW003 菌株基因组 PCR 得到的产物,大小为 2 495 bp,是 *waaC-waaF* 基因未敲除的大小。泳道图 3 (b)2 泳道是敲除片段同源重组后转化子基因组 PCR 所得产物,大小为 1 668 bp。图 3(b)3 泳道则是去除 *kan* 片段后,BW003 菌株基因组 PCR 产物,大小为 635 bp,表明 *waaC-waaF* 基因敲除成功。

2.2 BW003 菌株合成的 Kdo_2-lipid A 结构鉴定

用已知 Kdo_2-lipid A 生产菌 WBB06(W3110 *waaC-waaF*::*tet6*)作为对照[6,22],根据 Bligh-Dyer 萃取法分别提取 WBB06 和 BW003 菌株合成的 Kdo_2-lipid A,样品分别点在硅胶 60 TLC 板上,层析显色,得图 4(a)。根据展层剂性质,样品迁移速度与疏水性成正比,即磷酸基团越少、脂肪酸链越多迁移速度越快。磷脂相对分子质量小、疏水性最强,迁移速度最快,显色于 TLC 板上方。Kdo_2-lipid A 则集中于 TLC 板中部。WBB06 粗样只含有单一的、双磷酸、6 条脂肪酸链的 Kdo_2-lipid A,在 TLC 板上只有 1 个显色点;而 BW003 的粗样则呈现出上中下 3 个显色点,可见 BW003 合成了 3 种不同结构的 Kdo_2-lipid A。根据亲疏水性,推测中间一点为 LpxE 与 PagL 共同作用修饰后生成的目标产物-单磷酸、5 条脂肪酸链的 Kdo_2- penteacyl-monophosphate-lipid A(Kdo_2-P-MPLA);而目标产物下方的点与 WBB06 显色点平齐,则推测同为野生型双磷酸、6 条脂肪酸链的 Kdo_2-lipid A;上方点则推测为 LpxE 作用,但 PagL 未作用而生成的单磷酸、6 条脂肪酸链的 Kdo_2-monophosphate-lipid A(Kdo_2-MPLA)。

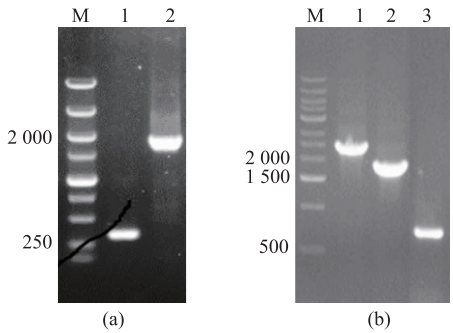


图 3 各菌株 *lacZ* 位点和 *waaC-waaF* 基因段染色体 PCR 验证电泳图

Fig. 3 Verification of *lazZ* site and *waaC-waaF* gene by PCR

通过电喷雾电离质谱(ESI-MS)对菌株 BW003 的粗样进一步进行结构鉴定。质谱结果与 TLC 分析相符合,BW003 菌株粗样在质谱中检测出 3 个主要的$[M-H]^-$负离子峰,分别是 *m/z* 1 930、2 156 和 2 236,与平均相对分子质量为 1 931、2 157 和 2 237 的 Kdo_2-P-MPLA、Kdo_2-MPLA 和 Kdo_2-lipid A 相对应。结果表明 BW003 菌株能够直接合成不含多糖长链的、特殊结构的 Kdo_2-P-MPLA,但同时混有部分 Kdo_2-lipid A 和 Kdo_2-MPLA。

2.3 活菌刺激 HEK-Blue hTLR4 细胞的毒性分析

活菌直接刺激 HEK-Blue hTLR4 细胞后细胞液 Abs650 的吸光度正比于 TLR4 信号通路激起的

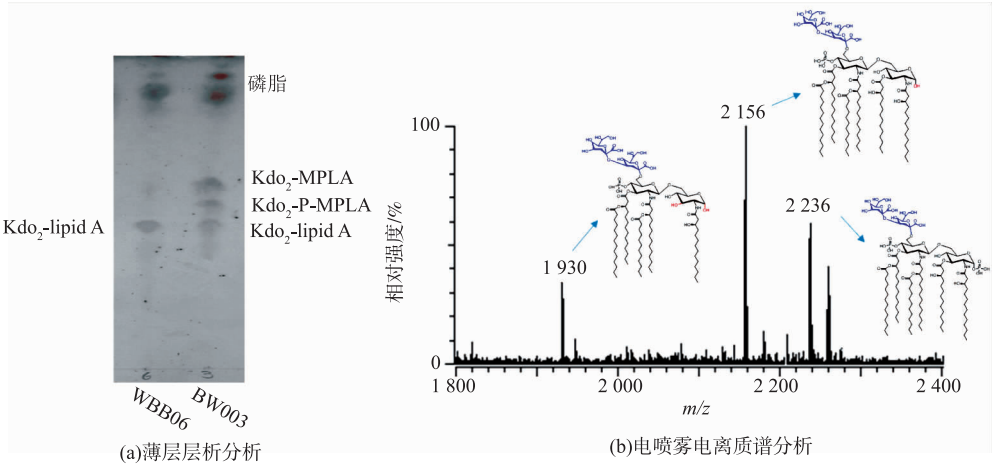


图 4　BW003 合成的 Kdo_2–lipid A 薄层层析分析与电喷雾电离质谱分析

Fig. 4　TLC analysis and ESI/MS analysis of Kdo_2–lipid A from BW003

强度。如图 5 所示,W3110,HW003 及 BW003 活菌体都能有效激起 TLR4 信号通路；在菌浓度为 10^3~10^6 CFU/mL 范围内,三者激起的 TLR4 信号强弱有明显差别:W3110 最高,HW003 适中,BW003 最低；尤其在 104 CFU/mL 时,W3110 的 OD_{650} 高达 1.02,HW003 的 OD650 降低为 0.66，而直接合成特殊结构 Kdo_2–lipid A 的 BW003 菌株的 OD_{650} 只有 0.48,较 W3110 降低 53%。研究结果表明 BW003 菌株 LPS 结构改变后,刺激细胞的毒性比野生型 W3110 菌株明显下降。

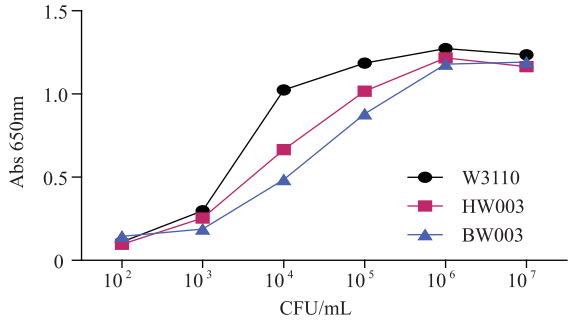


图 5　*E. coli* W3110,HW003 及 BW003 活菌体对 TLR4 信号通路激起的强度比较

Fig. 5　Comparison of TLR4 stimulation of whole bacterial cells of *E. coli* W3110,HW003 and BW003

2.4　Kdo_2–lipid A 刺激 THP–1 细胞的毒性分析

为进一步研究 LPS 分子结构的改变对免疫细胞的毒性的影响，纯化后的 W3110 LPS、HW003 LPS 及 BW003 Kdo_2–lipid A 样品被梯度稀释用于刺激人的 THP–1 巨噬细胞,并刺激后测定 TLR4 下游 MyD88 通路及 TRIF 通路的促炎症细胞因子 TNF–α、IL–8 和 RANTES 的释放量，细胞因子释放量越大说明细胞毒性越高。如图 6 所示,细胞因子释放量与样品质量浓度成正比,W3110 LPS 诱导 TNF–α、IL–8 及 RANTES 的分泌量在 4 个浓度下最高,其毒性最强。而 HW003 LPS 与 BW003 Kdo_2–lipid A 二者免疫活性接近,细胞毒性均较 W3110 有明显减弱。在样品质量浓度为 100 ng/mL 时,W3110 LPS 诱导 TNF–α、IL–8 及 RANTES 的分泌量分别为 2 202,19 347,7 261 pg/mL；而 BW003 则只有 1 563,14 175,5 621 pg/mL，分别降低了 29%、27%和 22%,说明 BW003 合成的特殊结构 Kdo_2–P–MPLA,虽然混合了其他 2 个结构,但较野生型的 LPS 能够明显减毒,同时也保持了一定的免疫活性,具有开发为新型疫苗佐剂的潜力。

2.5　菌株生化表型分析

以 W3110 和 HW003 作为对照，对 BW003 菌株的表型进行分析测定。由图 7(a)可见,表达 *lpxE–pagL* 基因后 HW003 的疏水性较 W3110(40%)略有提升,而表达 *lpxE–pagL* 基因并敲除 *waaC–waaF* 的 BW003 菌株由于其 LPS 同时缺失 C1 位磷酸基团、C3 位脂肪酸链和多糖长链,菌株的外膜渗透性则明显升至 W3110 菌株的 3 倍,而对照的 HW003 菌株的外膜渗透性是 W3110 菌株的 1.23 倍。更高的外膜渗透性也使得抗生素更容易进入细菌细胞内部发生作用，因此 BW003 也表现出对抗生素的高度敏感,由图 7(b)可见,W3110 对新生霉素的 MIC 为 1 000 μg/mL,HW003 略低,为 500 μg/mL,而BW003 对新生霉素的 MIC 则骤降为 15.6 μg/mL。另一方

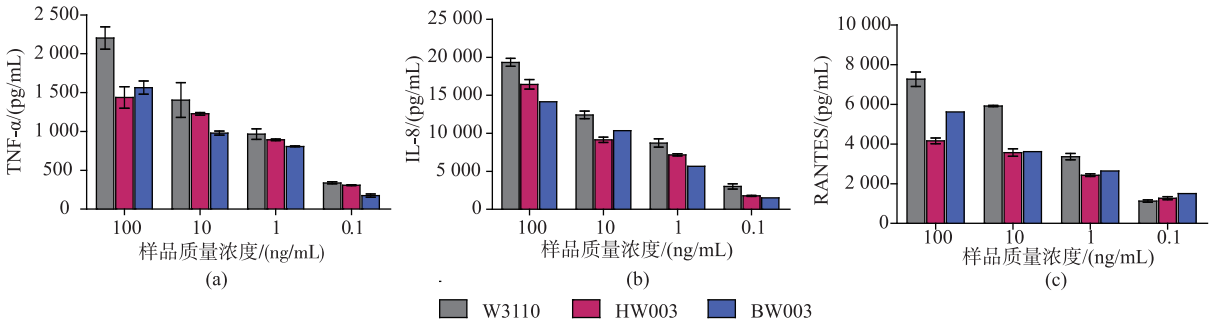


图 6　W3110 LPS、HW003 LPS 及 BW003 Kdo_2–lipid A 对 THP–1 细胞毒性的比较

Fig. 6　Cytotoxicity comparison of purified LPS or Kdo_2–lipid A samples from W3110, HW003 and BW003, respectively.

面,LPS 结构的改变使得 BW003 菌株的细胞表面疏水性提升至 83%(图 7(c))。疏水性的增加使得菌株在液体培养体系中更容易聚团、凝集,在静置 24 小时后,BW003 的自凝集比例为 93%,而 W3110 和 HW003 仅为 23%和 22%(图 7(d))。

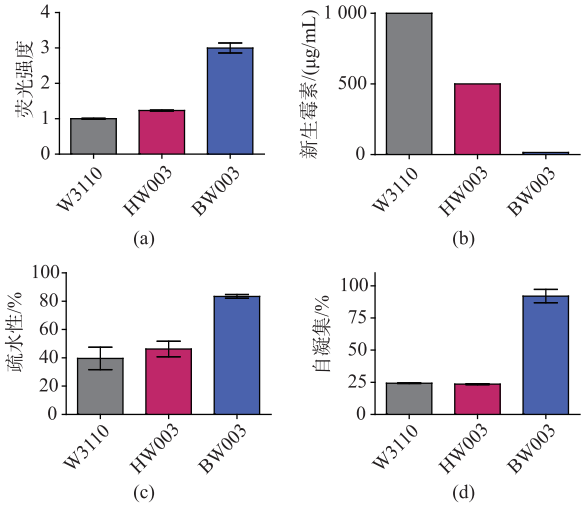


图 7　W3110、HW003 及 BW003 菌株、外膜渗透性、新生霉素 MIC、疏水性、自凝集能力的比较

Fig. 7　Comparison of membrane permeability, Novobiocin MIC, hydrophobicity and auto–aggregation of *E. coli* strains W3110, HW003 and BW003

3　结　语

LPS 能被哺乳动物细胞表面的 TLR4 受体识别激活先天性免疫反应,具有被进一步发展成为新型疫苗或疫苗佐剂的潜力。但 LPS 前期提取工艺复杂,消耗大量的苯酚,纯化步骤也相对繁琐,且由于 LPS 相对分子质量大、多糖长链部分结构各异,难以直接检测或定量,在生物免疫学研究及临床试验中有较大局限性。

本研究通过敲除 HW003 菌株中与多糖长链合成相关的 *waaC–waaF* 基因,使得多糖长链无法与 Kdo_2–lipid A 相连接,成功构建一株直接合成新型、特殊结构的 Kdo_2–lipid A 的突变株 BW003。该菌株合成的 LPS 结构发生变化,其合成的新型 Kdo_2–lipid A 可由三氯甲烷/甲醇/水体系简易快速萃取得到,不用消耗苯酚;其纯化步骤也较为便捷可行,通过 DEAE 离子交换柱梯度洗脱便可实现。Kdo_2–lipid A 可用 TLC 和 ESI/MS 直接分析、便于进行实时定量与检测,能够更好的应用于实验室或临床研究中。

BW003 菌株合成的 LPS 结构定向改变后,菌株的外膜渗透性、抗生素敏感性、细胞表面疏水性及菌体自凝集能力较野生型 W3110 与 HW003,均有一定程度的提高。外膜渗透性的改变加速了细胞内外物质的交换,菌体自凝集能力的增强简化了菌体收集的步骤,为后续在工业化发酵生产菌株的制备奠定了良好基础。

BW003 菌株合成的 Kdo_2–lipid A 具有多样性,共包括 3 种结构:Kdo_2–P–MPLA(单磷酸、5 条脂肪酸链)、Kdo_2–MPLA(单磷酸、6 条脂肪酸链)和 Kdo_2–lipid A(双磷酸、6 条脂肪酸链);其合成产物的多样性是由 LpxE 和 PagL 2 个结构修饰酶作用效果不完全所致。新型特殊结构 Kdo_2–lipid A 的存在,使得 BW003 菌体的毒性显著下降。HEK–Blue hTLR4 细胞刺激实验结果表明 BW003 较野生型 W3110 的 TLR4 信号强度降低 53%。纯化后 BW003 合成的 Kdo_2–lipid A 分子刺激 THP–1 细胞后产生的炎症细胞因子 TNF–α、IL–8 和 RANTES 的浓度明显降低,表明 Kdo_2–lipid A 分子较 W3110 的 LPS 而言,内毒素毒性减弱。研究结果为进一步探究不同结构内毒素的生物免疫活性、开发相关的新型疫苗及其疫苗佐剂奠定了基础。

参考文献:

[1] RAETZ C R,WHITFIELD C. Lipopolysaccharide endotoxins[J]. **Annu Rev Biochem**,2002,71:635-700.

[2] WANG X,QUINN P J. Endotoxins:lipopolysaccharides of gram-negative bacteria[J]. **Subcell Biochem**,2010,53:3-25.

[3] NIKAIDO H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited[J]. **Microbiol Mol Biol Rev**,2003,67(4):593-656.

[4] MILLER S I,ERNST R K,BADER M W. LPS,TLR4 and infectious disease diversity[J]. **Nat Rev Microbiol**,2005,3(1):36-46.

[5] WANG X,QUINN P J,YAN A. Kdo_2 -lipid A:structural diversity and impact on immunopharmacology[J]. **Biol Rev Camb Philos Soc**,2015,90(2):408-427.

[6] BRABETZ W. Deletion of the heptosyltransferase genes *rfaC* and *rfaF* in *Escherichia coli* K-12 results in an Re-type lipopolysaccharide with a high degree of 2-aminoethanol phosphate substitution[J]. **Eur J Biochem**,1997,247(2):716-724.

[7] 韩雅宁. 合成不同结构类脂 A 分子的大肠杆菌的构建[D]. 无锡:江南大学生物工程学院,2013.

[8] WANG X. MsbA transporter-dependent lipid A 1-dephosphorylation on the periplasmic surface of the inner membrane:topography of Francisella novicida LpxE expressed in *Escherichia coli*[J]. **J Biol Chem**,2004,279(47):49470-49478.

[9] TRENT M S. A PhoP/PhoQ-induced Lipase (PagL) that catalyzes 3-O-deacylation of lipid A precursors in membranes of *Salmonella typhimurium*[J]. **J Biol Chem**,2001,276(12):9083-9092.

[10] DATSENKO K A,WANNER B L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products[J]. **Proc Natl Acad Sci U S A**,2000,97(12):6640-6645.

[11] CHEREPANOV P P,WACKERNAGEL W. Gene disruption in *Escherichia coli*:TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant[J]. **Gene**,1995,158(1):9-14.

[12] HAN Y. Construction of monophosphoryl lipid A producing *Escherichia coli* mutants and comparison of immuno-stimulatory activities of their lipopolysaccharides[J]. **Mar Drugs**,2013,11(2):363-376.

[13] BLIGH E G,DYER W J. A rapid method of total lipid extraction and purification[J]. **Can J Biochem Physiol**,1959,37(8):911-917.

[14] ZHOU Z. Lipid A modifications characteristic of *Salmonella typhimurium* are induced by NH_4VO_3 in *Escherichia coli* K12. Detection of 4-amino-4-deoxy-L-arabinose,phosphoethanolamine and palmitate[J]. **J Biol Chem**,1999,274(26):18503-18514.

[15] KAROW M,GEORGOPOULOS C. Isolation and characterization of the *Escherichia coli msbB* gene,a multicopy suppressor of null mutations in the high-temperature requirement gene *htrB*[J]. **J Bacteriol**,1992,174(3):702-710.

[16] WANG J. Construction and characterization of an *Escherichia coli* mutant producing Kdo_2-lipid A[J]. **Mar Drugs**,2014,12(3):1495-1511.

[17] NEEDHAM B D. Modulating the innate immune response by combinatorial engineering of endotoxin[J]. **Proc Natl Acad Sci U S A**,2013,110(4):1464-1469.

[18] LI Y. Influence of lipid A acylation pattern on membrane permeability and innate immune stimulation[J]. **Mar Drugs**,2013,11(9):3197-3208.

[19] DEL R B. Adhesion,autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*[J]. **Letters in Applied Microbiology**,2000,31(6):438-442.

[20] HELANDER I M,MATTILA-SANDHOLM T. Fluorometric assessment of gram-negative bacterial permeabilization[J]. **J Appl Microbiol**,2000,88(2):213-219.

[21] RAHMAN M. In vitro effects of bovine lactoferrin on autoaggregation ability and surface hydrophobicity of *bifidobacteria*[J]. **Anaerobe**,2008,14(2):73-77.

[22] RAETZ C R. Kdo2-Lipid A of *Escherichia coli*,a defined endotoxin that activates macrophages via TLR-4[J]. **J Lipid Res**,2006,47(5):1097-1111.