DOI:10.12441/spyswjs.20240327002 [文章编号] 1673-1689(2025)04-0072-09

大肠杆菌O157:H7外膜蛋白C重组表达及免疫原性研究

陈 鹏[1] 卢帅臣[1] 韩迎珊[1] 王文彬[1,2,3*]

(1. 江苏海洋大学海洋食品与生物工程学院,江苏 连云港 222005; 2. 江苏海洋大学江苏省海洋生物技术重点实验室,江苏 连云港 222005; 3. 江苏海洋大学江苏省海洋生物产业技术协同创新中心,江苏 连云港 222005)

摘要:【目的】探究大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*) O157:H7外膜蛋白C(OmpC)的免疫原性。**【方法】**分别构建pET-28a-*ompc*、pET-22b-*ompc*-SUMO重组质粒,表达纯化重组蛋白OmpC,并验证大肠杆菌O157:H7菌体免疫制备的2G12抗体的识别抗原是否为OmpC。**【结果】**作者成功构建了2种重组质粒,其中pET-28a-*ompc*在*E. coli* BL21中成功表达;重组蛋白OmpC的最佳诱导表达条件为:0.2 mmol/L IPTG、37 ℃诱导12 h;在800 mmol/L咪唑洗脱时得到含有His标签的包涵体OmpC,通过尿素梯度复性结合Ni-NTA柱纯化,在500 mmol/L咪唑洗脱时获得可溶性OmpC。**【结论】**可溶性OmpC和包涵体OmpC均能与单克隆抗体2G12发生特异性反应。该研究为后续利用OmpC制备高亲和力的大肠杆菌O157:H7单克隆抗体奠定了基础。

关键词:大肠杆菌O157:H7;外膜蛋白C;抗体;重组表达;免疫检测;靶点

Recombinant Expression and Immunogenicity of the Outer Membrane Protein C of *Escherichia coli* O157:H7

CHEN Peng[1] *LU Shuaichen*[1] *HAN Yingshan*[1] *WANG Wenbin*[1,2,3*]

(1. School of Ocean Food and Biological Engineering, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China; 2. Jiangsu Provincial Key Laboratory of Marine Biotechnology, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China; 3. Co-innovation Center of Jiangsu Marine Bio-industry Technology, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China)

Abstract: [**Objective**] This study aims to investigate the immunogenicity of the outer membrane protein C (OmpC) of *Escherichia coli* (*E. coli*) O157: H7. [**Method**] The recombinant plasmids pET-28a-*ompc* and pET-22b-*ompc*-SUMO were constructed, and the recombinant protein OmpC was expressed and purified. Then, whether the target antigen of the 2G12 antibody prepared by *E. coli* O157: H7 cells was OmpC was determined. [**Result**] Two recombinant plasmids were successfully constructed and pET-28a-*ompc* was successfully expressed in *E. coli* BL21. The optimal induction conditions for expression of recombinant OmpC were 0.2 mmol/L IPTG, 37 ℃, and 12 h. The OmpC inclusion bodies containing His tags were obtained through elution with 800 mmol/L imidazole. The soluble OmpC was renatured by urea gradient dialysis and then eluted from the Ni-NTA column with 500 mmol/L imidazole. [**Conclusion**] OmpC in both the soluble form and the inclusion body form specifically react with the monoclonal antibody 2G12. The findings lay a foundation for the further preparation of high-affinity *E. coli* O157:H7 monoclonal antibodies with OmpC.

基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(31701680);国家自然科学基金面上项目(32172284);江苏省自然科学基金项目(SBK2017041308)。

通信作者:王文彬(1990—),男,博士,副教授,硕士研究生导师,主要从事微生物免疫检测及微生物安全控制研究。E-mail: wenbin66@jou.edu.cn

收稿日期:2024-03-27 **修回日期:**2024-04-24

Keywords: *Escherichia coli* O157: H7; outer membrane protein C; antibody; recombinant expression; immunoassay; target

大肠杆菌O157:H7是肠出血性大肠杆菌的典型代表，对人类具有致病性，而对牛等反刍动物无致病性，这使得该菌在牛及牧场其他动物中的检出率较高[1]。此外，大肠杆菌O157:H7在环境中分布广泛，易通过水、土壤、动物粪便等途径传播至食物链，进入人体后可产生志贺毒素并导致疾病暴发，典型症状包括肠胃炎、出血性腹泻及溶血性尿毒症等[2-7]。研究表明，大肠杆菌O157:H7存在于多种受污染和未煮熟的食物中，如牛肉、猪肉、鸡肉、海鲜、野生动物、多叶蔬菜、夏季泡菜、水果、牛奶等[8-9]。其中牲畜肉类、生禽肉类、凉拌类、海产类、蔬菜类食品中致泻性大肠杆菌检出率分别为38.89%、45.00%、5.00%、10.00%、4.55%[10]。

作者前期通过菌体免疫结合单克隆抗体筛选，基于单克隆抗体2G12和12B1建立了一种快速检测大肠杆菌O157:H7的双抗体夹心ELISA方法。通过双向电泳、免疫印记、免疫亲和层析、生物质谱等技术鉴定发现，单克隆抗体2G12可识别大肠杆菌O157:H7 OmpC（相对分子质量为40 480），而检测抗体12B1可特异性识别O157脂多糖的O特异性侧链[11]。OmpC是大肠杆菌O157:H7的主要外膜蛋白，属于三聚体结构的非特异性孔道蛋白质[12]，呈β桶状结构，参与渗透压调节等生理功能。其表达丰度高，可激发机体的体液免疫和细胞免疫，从而抵抗大肠杆菌对机体的感染[13]，是潜在的候选疫苗蛋白质。

目前，含单克隆抗体2G12的细胞株制备腹水后，纯化的抗体浓度和效价较低，亚克隆后仍无阳性克隆，推测可能是杂交瘤细胞的部分染色体丢失所致。因此，制备重组蛋白OmpC并验证其是否可与2G12抗体识别具有重要意义，可为后续通过OmpC免疫小鼠制备高亲和力、高特异性的单克隆抗体奠定基础。大肠杆菌原核表达系统是蛋白质重组表达的常用体系，具有遗传背景清楚、表达效率高、发酵成本低、操作简便、培养迅速等优点[14-16]。但其缺点是蛋白质表达量高、合成速度快，可能导致表达产物无法正确折叠并造成蛋白质堆积，进而生成包涵体蛋白质[17-18]。包涵体蛋白质虽具有结构紧密、不易降解、表达量高等特点[19]，但与正确折叠的蛋白质在结构和活性上可能存在差异。研究中常用的解决方案包括增加促溶标签（SUMO）蛋白质或通过尿素等试剂进行蛋白质复性。基于此，作者采用普通His标签和SUMO这2种策略表达大肠杆菌O157:H7 OmpC，并通过尿素梯度复性制备可溶性OmpC，进而验证可溶性OmpC及包涵体OmpC与单克隆抗体2G12的结合能力。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与试剂

大肠杆菌O157:H7（CICC21530）：中国工业微生物保藏管理中心；pET-28a、pET-22b-*ompk*-SUMO：作者所在实验室保存；*E. coli* DH5α、*E. coli* BL21（DE3）、*E. coli* Rosetta：武汉淼灵生物科技有限公司。

基因组DNA提取试剂盒、质粒DNA提取试剂盒、胶回收试剂盒、TAE缓冲液、DNA Marker、琼脂糖、6×甘油凝胶上样缓冲液、Redred核酸染色剂、硫酸卡那霉素、氨苄青霉素钠、TrueColor蛋白预染Marker、2×SDS-PAGE上样缓冲液、过硫酸铵、三氯乙酸、尿素、考马斯亮蓝G-250：生工生物工程（上海）股份有限公司；核酸限制性内切酶*Bam*H Ⅰ、*Xho* Ⅰ、*Hin*d Ⅲ、T4 DNA连接酶、*Taq* PCR Mix：宝日医生物技术（北京）有限公司；乙二醇、明胶、柠檬酸、四甲基联苯胺（TMB）：上海阿拉丁生化科技股份有限公司；甘氨酸、SDS、丙烯酰胺、三羟甲基氨基甲烷（Tris）、氯化钙、氯化钠、冰乙酸、无水乙醇：中国医药集团有限公司；2G12抗体：江南大学生物界面与生物检测研究中心提供；Ni柱填料：美国通用电气公司。

1.1.2 仪器与设备

细胞超声破碎仪：JY92-IIN型，上海领成生物科技有限公司；振荡培养箱：IS-2102C型，哈尔滨市东联电子技术开发有限公司；单人净化工作台：SW-CJ-1D型，苏州净化设备有限公司；电泳仪：041BR75963型，北京六一仪器厂；PCR仪：T100 Thermal Cycler型，伯乐生命医学产品（上海）有限

公司；凝胶成像系统：GelDoc Go型，伯乐生命医学产品（上海）有限公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成

从美国国家生物技术信息中心（NCBI）网站下载大肠杆菌O157：H7 *ompc*（GeneID：916811）的核苷酸序列。以该序列为模板在Primer 5软件中设计引物。根据pET-28a和pET-22b质粒的多克隆位点，选择不会切割*ompc*基因的2个酶切位点，并在引物的5′端添加保护碱基。质粒测序采用T7启动子通用引物，具体引物信息见表1，引物由上海生工生物工程有限公司合成。

表1 引物序列

Table 1 Sequences of primers

序号	引物名称	引物序列（5′—3′）
1	28a-*ompc*-F	CGGGATCCATGAAAGTTAAAGTACTGTCCCTCC
2	28a-*ompc*-R	CCGCTCGAGTTAGAACTGGTAAACCAGACCC
3	22b-*ompc*-F	CGGGATCCATGAAAGTTAAAGTACTGTCCCTCC
4	22b-*ompc*-R	CCCAAGCTTTTAGAACTGGTAAACCAGACCC
5	T7-F	TAATACGACTCACTATAGG
6	T7-R	GCTAGTTATTGCTCAGCGG

注：下划线为酶切位点。

1.2.2 *ompc*基因扩增

按照基因组DNA提取试剂盒说明书提取大肠杆菌O157：H7的基因组DNA。使用扩增引物分别扩增2种带有限制性内切酶识别位点的*ompc*基因片段。PCR反应体系为：100 ng/μL DNA模板1.0 μL、100 nmol/L上下游引物各1.0 μL、*Taq* PCR Mix 12.5 μL，加灭菌后的超纯水补至25.0 μL。PCR程序为：98 ℃预变性3 min；98 ℃变性15 s、64 ℃退火30 s、72 ℃延伸1 min，30个循环；最后72 ℃终延伸10 min。扩增产物经核酸限制性内切酶双酶切后，获得OmpC的基因片段。

1.2.3 重组质粒的构建

将pET-28a（宿主菌*E. coli* DH5*α*）和pET-22b-*ompk*-SUMO（宿主菌*E. coli* BL21）载体进行过夜培养，按质粒DNA提取试剂盒说明书提取质粒，并使用核酸限制性内切酶进行双酶切（其中pET-22b-*ompk*-SUMO质粒需切除*ompk*基因片段），获得双酶切后的空质粒。将双酶切后的空质粒与*ompc*基因片段按摩尔比1∶3~2∶3混合，添加T4 DNA连接酶后，于16 ℃恒温培养箱中连接16 h。取5 μL连接产物，上样至10 g/dL的琼脂糖凝胶进行电泳验证。

1.2.4 重组质粒的转化与鉴定

参照$CaCl_2$法制备*E. coli* DH5*α*和*E. coli* BL21感受态细胞[20]。将10 μL连接产物加到100 μL *E. coli* DH5*α*感受态细胞中，轻轻混匀后冰浴35 min，于42 ℃水浴锅中热激90 s，再冰浴5 min。随后加入900 μL无菌LB液体培养基（胰蛋白胨1.0 g/dL、NaCl 1.0 g/dL、酵母提取物0.5 g/dL），于37 ℃恒温振荡培养箱中复苏50 min。于6 000 r/min离心10 min后，取100 μL上清液吹吸混匀沉淀，涂布于含50 μg/mL硫酸卡那霉素或氨苄青霉素钠的LB固体平板（胰蛋白胨1.0 g/dL、NaCl 1.0 g/dL、酵母提取物0.5 g/dL、琼脂粉3.0 g/dL）上，于37 ℃倒置培养16 h。挑取单菌落置于30 μL裂解液中，80 ℃水浴裂解15 min，以此为模板，分别用*ompc*、质粒通用引物与*ompc*扩增引物，交叉进行PCR验证。验证正确的单菌落经摇菌抽提质粒后进行双酶切验证，送至生工生物工程（上海）股份有限公司测序。测序正确的重组质粒按相同方法转入*E. coli* BL21（DE3）感受态细胞，鉴定方法同上。

1.2.5 重组蛋白的诱导表达与纯化

将测序正确的2种重组质粒接种于含有抗生素的LB液体培养基中，在37 ℃、180 r/min条件下振荡培养至OD_{600}值为0.6~0.8，加入IPTG诱导过夜。诱导后的菌液以5 000 r/min离心20 min，然后加入1×PBS缓冲液重悬，于冰浴中用细胞破碎仪以300 W的功率超声破碎（开3 s、停6 s）1 h。破碎液于12 000 r/min离心20 min后，收集上清液和沉淀，分别进行SDS-PAGE验证。

用8 mol/L尿素将沉淀溶解，于5 000 r/min离心5 min去除沉淀，上清液采用Ni柱纯化。先用5倍柱体积的超纯水清洗，再用5倍柱体积平衡缓

冲液平衡。将蛋白质溶液重复过柱2次，然后分别用 20、40、60、80、100、200、300、500、600、800 mmol/L的咪唑进行洗脱，收集各洗脱液。洗脱后用3倍柱体积的8 mol/L尿素洗涤，最后用5倍柱体积的纯水冲洗柱子，并用体积分数20%的乙醇密封保存Ni柱。可溶性OmpC纯化过程为：首先对包涵体进行复性，依次在6、4、2、1、0 mol/L的尿素溶液中透析，透析液经0.45 μm滤膜过滤后，按上述Ni柱纯化步骤处理上清液。

1.2.6　直接ELISA法和免疫印迹法检测

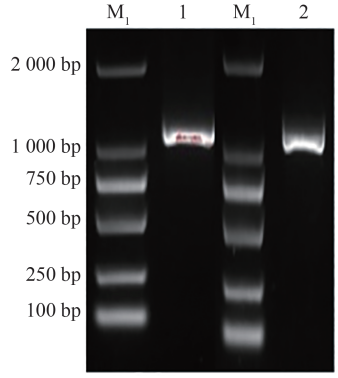
采用直接ELISA法和免疫印迹法检测纯化后的OmpC[21]与作者所在实验室前期制备的单克隆抗体2G12-HRP的免疫原性。直接ELISA法检测过程为：用包被缓冲液将蛋白质分别稀释至1.0 μg/mL和0.5 μg/mL，按100 μL/孔加入96孔酶标板，37 ℃包被2 h。弃去包被液，拍干后每孔加入250 μL洗涤液，于水平摇床上振荡3 min，重复3次。每孔加入200 μL封闭液，37 ℃封闭2 h，洗板3次。用抗体稀释液将抗体2G12-HRP稀释100倍后进行3倍梯度稀释，按100 μL/孔加入抗体，37 ℃孵育30 min，洗板4次。将底物显色液A液和B液按体积比5∶1混合，每孔加入100 μL，37 ℃反应15 min后加入50 μL终止液，用酶标仪测定450 nm处的吸光度。当待测抗原某稀释梯度的OD_{450}值大于阴性对照OD_{450}值的2.1倍时，该稀释度即为抗原的血清效价，吸光度与效价呈正相关。

免疫印迹法的方法参考文献[11]进行，由于2G12-HRP已带HRP，无需额外添加羊抗鼠二抗。将2G12-HRP酶标抗体用Western blot抗体稀释液稀释1 000倍，置于水平摇床上室温孵育1 h，随后用PBST洗涤液洗涤5次，加入TMB沉淀型底物显色，5~10 min出现清晰条带后水洗以终止反应。

2　结果与讨论

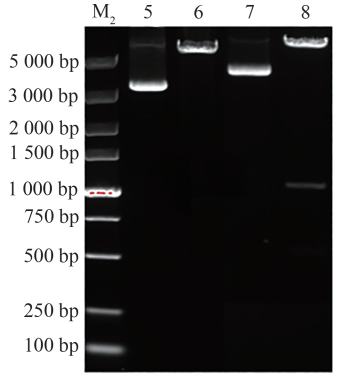
2.1　大肠杆菌O157:H7 *ompc*基因扩增及质粒双酶切结果

使用针对pET-28a和pET-22b-SUMO质粒的多克隆位点设计的2对扩增引物均成功扩增出*ompc*片段，见图1(a)。条带在1 000 bp上方，与预期片段1 104 bp基本一致。抽提得到的pET-28a质粒经*Bam*H Ⅰ、*Xho* Ⅰ双酶切，pET-22b-*ompk*-SUMO质粒经*Bam*H Ⅰ、*Hin*d Ⅲ双酶切后，切胶回收5 000 bp以上的质粒条带，见图1(b)。由于pET-22b-*ompk*-SUMO质粒携带*ompk*基因片段，双酶切后会出现2个条带，回收5 000 bp以上的pET-22b-SUMO质粒条带。



M_1—DNA Marker；
1—pET-28a质粒所用的*ompc*片段；
2—pET-22b-SUMO质粒所用的*ompc*片段。

(a) 片段扩增



M_2—DNA Marker；
5—pET-28a质粒；6—pET-28a质粒双酶切；
7—pET-22b-*ompk*-SUMO质粒；
8—pET-22b-*ompk*-SUMO质粒双酶切。

(b) 质粒双酶切

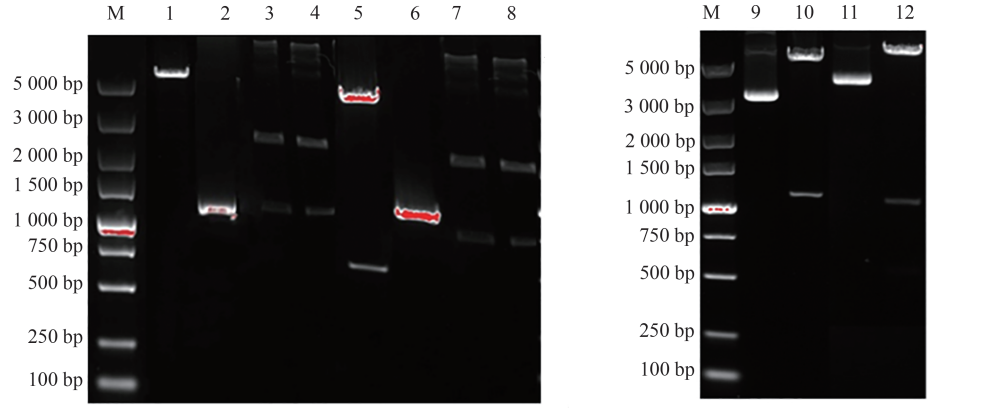
图1　*ompc*片段扩增和pET-28a、pET-22b-*ompk*-SUMO质粒双酶切结果

Fig. 1　Amplification of *ompc* and double digestion of pET-28a and pET-22b-*ompk*-SUMO

2.2　重组质粒构建

将双酶切后的目的基因片段与双酶切后的质粒片段用T4 DNA连接酶连接，琼脂糖凝胶电泳验证结果见图2(a)。双酶切后的pET-28a质粒(5 318 bp)和pET-22b-SUMO质粒(5 759 bp)条带均位于5 000 bp上方，双酶切后的*ompc*条带位于1 000 bp上方，连接产物在质粒双酶切条带上方均出现新的条带(泳道3、4、7、8)，与理论值一致。将疑似重组质粒转

化至抗性平板后获得单菌落，提取质粒经双酶切后出现质粒条带和*ompc*条带，条带位置均与理论值接近，见图2(b)。重组质粒经T7启动子通用引物测序得到的测序结果与*ompc*核酸序列完全一致。



M—DNA Marker；
1—pET-28a质粒双酶切；2—*ompc*双酶切；
3—pET-28a与*ompc*摩尔比1∶3；
4—pET-28a与*ompc*摩尔比2∶3；
5—pET-22b-*ompk*-SUMO双酶切；
6—*ompc*片段双酶切；
7—pET-22b-SUMO与*ompc*摩尔比1:3；
8—pET-22b-SUMO与*ompc*摩尔比2:3。
(a) 构建验证

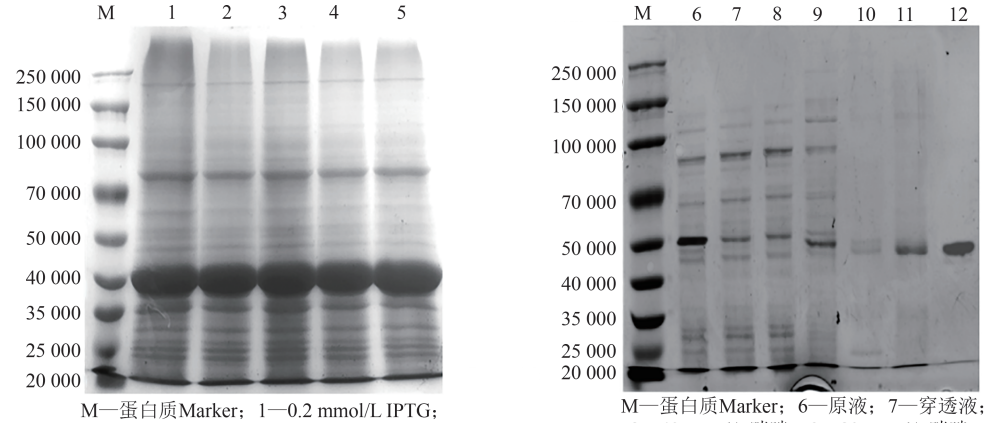
M—DNA Marker；
9—疑似pET-28a-*ompc*质粒；
10—疑似pET-28a-*ompc*质粒双酶切；
11—疑似pET-22b-*ompc*-SUMO质粒；
12—疑似pET-22b-*ompc*-SUMO质粒双酶切。
(b) 双酶切验证

图 2　*ompc*重组质粒构建验证及转化后双酶切验证

Fig. 2　Construction and transformation verification of recombinant plasmids carrying *ompc*

2.3　重组蛋白的诱导与纯化

将pET-28a-*ompc*重组质粒转化至*E. coli* BL21(DE3)后，用IPTG诱导过夜并超声破碎，SDS-PAGE结果见图3(a)。随着IPTG浓度从0.2 mmol/L增加至1.0 mmol/L，所有样品沉淀中均存在目的蛋白质，且条带深浅不随浓度变化而变化。因此后续试验选择0.2 mmol/L作为IPTG的诱导浓度。由图3(b)可知，通过尿素梯度透析复性结合Ni柱纯化成功制备出纯度较高的可溶性OmpC，包涵体OmpC则通过超声破碎、尿素溶解后直接经Ni柱纯化制备。pET-22b-*ompc*-SUMO重组质粒测序结果显示，*ompc*基因在质粒内的插入方向与翻译方向一致。然而，将其转入*E.coli* BL21(DE3)和*E.coli* Rosetta表达菌株后，经不同浓度IPTG诱导均未成功实现OmpC表达。



M—蛋白质Marker；1—0.2 mmol/L IPTG；
2—0.4 mmol/L IPTG；3—0.6 mmol/L IPTG；
4—0.8 mmol/L IPTG；5—1.0 mmol/L IPTG。
(a) IPTG诱导

M—蛋白质Marker；6—原液；7—穿透液；
8—40 mmol/L咪唑；9—80 mmol/L咪唑；
10—200 mmol/L咪唑；11—300 mmol/L咪唑；
12—500 mmol/L咪唑。
(b) 重组蛋白纯化

图 3　重组蛋白的诱导与纯化结果

Fig. 3　Induced expression and purification of the recombinant protein

2.4　直接ELISA法和免疫印迹法检测结果

直接ELISA结果显示，包涵体OmpC和可溶性OmpC均能与2G12-HRP发生反应，且效价相当，见图4。当包被质量浓度为1.0 μg/mL时，包涵体OmpC和可溶性OmpC与2G12的效价均为8 100；当包被质量浓度为0.5 μg/mL时，包涵体OmpC和可溶性OmpC与2G12的效价均为900。免疫印迹结果表明，包涵体OmpC和可溶性OmpC与稀释1 000倍的2G12-HRP孵育后，在相对分子质量40 000左右均出现反应条带，条带位置与理论值一致，见图5。上述结果证实，前期通过大肠杆菌O157∶H7菌体免疫制备的2G12抗体可识别重组蛋白OmpC，确定2G12的识别抗原为OmpC。

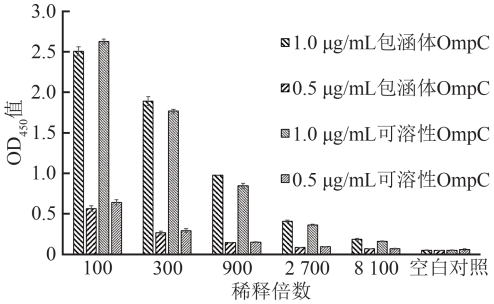
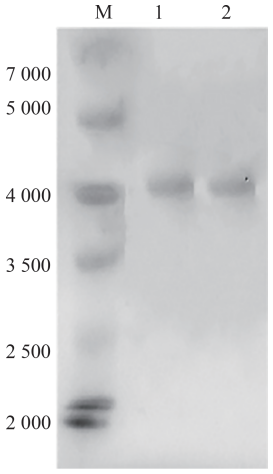


图4　ELISA试验结果

Fig. 4　ELISA results



M—蛋白质Marker；
1—可溶性OmpC；
2—包涵体OmpC。

图5　免疫印迹试验结果

Fig. 5　Western blot results

2.5　讨论

OmpC作为大肠杆菌O157∶H7主要的外膜蛋白[11]，表达丰度高，具有调节细胞内外渗透压平衡等作用。OmpC的表达受渗透压胁迫、pH、温度、营养水平和肠道环境的调节[22-24]。其三聚体空间结构在细胞膜上形成的孔径，使其在菌体上能够被抗体识别[25]。有研究表明，大肠杆菌O157∶H7在低温和营养水平较低的环境下长期培养时，OmpC表达丰度下降[26]；而作者所在课题组前期研究发现，大肠杆菌O157∶H7在低pH和低营养环境下生长时，OmpC的表达及与单克隆抗体2G12的识别反应相对稳定，与Sleator等[27]和Thomas等[28]的研究结果一致，即大肠杆菌在较低pH和饥饿环境中，OmpC表达较为稳定，说明OmpC适用于免疫磁分离、免疫分析等多种场景的广泛应用。

在构建重组质粒过程中常面临转化后抗性平板无菌落、T4 DNA连接酶连接效果未知、抗性平板出现假阳性菌落等问题。以往研究鉴定重组质粒时，通常采用目的片段扩增引物进行菌落PCR验证、测序验证和诱导验证[29-31]，但这些方法假阳性的概率较高，且试验周期较长。为此，作者在质粒和目的基因经T4 DNA连接酶连接后，先通过琼脂糖凝胶电泳验证再进行转化。从图中可明显观察到重组质粒条带，表明转入感受态细胞的连接产物中存在成功连接的重组质粒，有效提高了试验效率。针对转化后在抗性板上长出假阳性菌落的问题（即*ompc*引物扩增出现目的条带，但双酶切后仅出现空载体条带），采用载体的T7启动子通用引物与*ompc*引物进行交叉PCR验证，有效提升了筛选效率。

本研究中表达出的重组蛋白OmpC是以包涵体的形式存在于超声破碎后的沉淀中，这与其他外膜蛋白的重组表达情况一致[32-35]。不同于其他研究使用2 mmol/L尿素的包涵体洗涤液[36]，作者采用8 mol/L尿素溶解超声破碎后的沉淀，使His标签充分暴露以利于与Ni结合[37]，经低速离心去除细胞碎片等难溶杂质[38]，0.45 μm滤膜过滤后通过Ni柱纯化[39]。在Ni柱纯化重组蛋白时，通常用250 mmol/L咪唑即可获得高纯度的重组蛋白[40]，而本研究中600 mmol/L咪唑洗脱未能得到目的蛋白质，800 mmol/L咪唑洗脱时才获得纯净的包涵体OmpC，这可能是由于GE公司的Ni柱填料对包涵体蛋白的结合力更强。本研究中，通过8 mol/L

尿素溶解并离心去除杂质后，先经尿素溶液梯度复性，再通过Ni柱纯化，在500 mmol/L咪唑洗脱时可获得纯净的可溶性OmpC。

直接ELISA法和免疫印迹法是评价抗体对目标蛋白质特异性识别的常用技术[41]。直接ELISA法操作简便、敏感度高，且测定时目标蛋白质结构无显著变化[42]。免疫印迹法结果直观，但操作复杂、耗时长、影响因素较多，测定时目标蛋白质的空间结构会因SDS的变性作用发生改变。本研究中，2G12-HRP在ELISA和免疫印记中均能识别可溶性和包涵体形式的OmpC，进一步证实其识别抗原为OmpC，且识别表位在OmpC中具有良好的暴露性。

3 结论

作者成功构建了pET-28a-*ompc*重组质粒，经诱导表达、尿素梯度复性及Ni柱纯化后获得了可溶性OmpC和包涵体OmpC。2种重组蛋白在ELISA和免疫印迹中均可与大肠杆菌O157:H7菌体免疫筛选的单克隆抗体2G12特异性结合，表明OmpC是大肠杆菌O157:H7的免疫检测靶点。该研究为后续探究大肠杆菌O157:H7 OmpC的免疫原性及制备高亲和力单克隆抗体奠定了基础。

参考文献

[1] ISLAM M Z, MUSEKIWA A, ISLAM K, et al. Regional variation in the prevalence of *E. coli* O157 in cattle: a meta-analysis and meta-regression[J]. PLoS One, 2014, 9(4): e93299.

[2] HUANG W C, HSU B M, KAO P M, et al. Seasonal distribution and prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in different aquatic environments in different aquatic environments in Taiwan[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2016, 124: 37-41.

[3] SAXENA T, KAUSHIK P, KRISHNA MOHAN M. Prevalence of *E. coli* O157: H7 in water sources: an overview on associated diseases, outbreaks and detection methods [J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2015, 82(3): 249-264.

[4] 郭如惠. 尿路感染并发革兰阴性杆菌败血症者的病原菌分布及耐药性分析[J]. 当代临床医刊, 2015, 28(6): 1781.
GUO R H. Distribution and drug resistance of pathogens in patients with urinary tract infection complicated with gram-negative bacilli septicemia[J]. The Medical Journal of the Present Clinical, 2015, 28(6): 1781.(in Chinese)

[5] PREMJANI V, TILLEY D, GRUENHEID S, et al. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* OmpT regulates outer membrane vesicle biogenesis[J]. FEMS Microbiology Letters, 2014, 355(2): 185-192.

[6] OBAID J M A S, MANSOUR S R, ELSHAHEDY M S, et al. Uropathogenic *Escherichia coli* isolates with different virulence genes content exhibit similar pathologic influence on vero cells[J]. Polish Journal of Microbiology, 2014, 63(1): 43-49.

[7] WAN L, GUO Y, HUI C Y, et al. The surface protease ompT serves as *Escherichia coli* K1 adhesin in binding to human brain micro vascular endothelial cells[J]. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences, 2014, 27(Suppl. 3): 617-624.

[8] SEO J, SEO D J, OH H, et al. Inhibiting the growth of *Escherichia coli* O157: H7 in beef, pork, and chicken meat using a bacteriophage[J]. Korean Journal for Food Science of Animal Resources, 2016, 36(2): 186-193.

[9] PARK J Y, LIM M C, PARK K, et al. Detection of *E. coli* O157: H7 in food using automated immunomagnetic separation combined with real-time PCR[J]. Processes, 2020, 8(8): 908.

[10] 王萍霞，钟煌培，周芳芳. 泉州市某区食品中致泻性大肠埃希菌的检测情况[J]. 中国卫生标准管理, 2024, 15(4): 24-27.
WANG P X, ZHONG H P, ZHOU F F. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* in food in a district of Quanzhou City[J]. China Health Standard Management, 2024, 15(4): 24-27.(in Chinese)

[11] WANG W B, ZHOU X Y, SANG Y N, et al. Identification of a specific surface epitope of OmpC for *Escherichia coli* O157: H7 with protein topology facilitated affinity mass spectrometry[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2021, 105(18): 6819-6833.

[12] VOSTRIKOVA O P, ISAEVA M P, LIKHATSKAYA G N, et al. OmpC-like porin from outer membrane of *Yersinia enterocolitica*: molecular structure and functional activity[J]. Biochemistry. Biokhimiia, 2013, 78(5): 496-504.

[13] 俱雄，陈春琳，刘祥，等. 大肠埃希菌外膜蛋白OmpC的原核表达与免疫保护作用研究[J]. 生命科学研究, 2015, 19(2): 131-136.
JU X, CHEN C L, LIU X, et al. Prokaryotic expression and immunoprotection potential of *E. coli* outer membrane protein OmpC[J]. Life Science Research, 2015, 19(2): 131-136.(in Chinese)

[14] NARAYAN G, AGRAWAL A, JOSHI N, et al. Protein production and purification of a codon-optimized human NGN3 transcription factor from *E. coli*[J]. The Protein Journal, 2021, 40(6): 891-906.

[15] 何伟. 重组大肠杆菌表达包涵体药物蛋白的复性与纯化研究[D]. 上海：华东理工大学，2017.

[16] 赵喜红，何小维，李文美，等. 大肠杆菌表达包涵体蛋白体外复性研究进展[J]. 食品工业科技，2010，31(6)：379-383.
ZHAO X H, HE X W, LI W M, et al. Development of *in-vitro* refolding of inclusion body proteins in *E. coli*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2010, 31(6): 379-383.(in Chinese)

[17] 熊嘉琦，贾梦乐，杨领弟，等. 猴痘病毒A5L蛋白的原核表达及其免疫原性评价[J]. 中国畜牧兽医，2024，51(1)：365-372.
XIONG J Q, JIA M L, YANG L D, et al. Prokaryotic expression and immunogenicity evaluation of monkeypox virus A5L protein[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 51(1): 365-372.(in Chinese)

[18] 刘晓飞，裴剑竹，杜国俊，等. 蛇毒蛋白原核表达包涵体复性研究进展[J]. 中国生物工程杂志，2011，31(3)：113-119.
LIU X F, PEI J Z, DU G J, et al. Recent progress in renaturation of inclusion bodies of prokaryotically expressed snake venom proteins[J]. China Biotechnology, 2011, 31(3): 113-119.(in Chinese)

[19] UPADHYAY V, SINGH A, JHA D, et al. Recovery of bioactive protein from bacterial inclusion bodies using trifluoroethanol as solubilization agent[J]. Microbial Cell Factories, 2016, 15: 100.

[20] WANG W B, LIU D D, GAO Y S, et al. Identification of twelve *Aeromonas* spp. species with monoclonal antibody-based immunoassay in water and fish samples[J]. Aquaculture, 2020, 516: 734646.

[21] WANG W, SANG Y, LIU J, et al. Identification of novel monoclonal antibodies targeting the outer membrane protein C and lipopolysaccharides for *Escherichia coli* O157:H7 detection[J]. Journal of Applied Microbiology, 2021, 130(4): 1245-1258.

[22] LI H, YE M Z, PENG B, et al. Immunoproteomic identification of polyvalent vaccine candidates from *Vibrio parahaemolyticus* outer membrane proteins[J]. Journal of Proteome Research, 2010, 9(5): 2573-2583.

[23] HAMNER S, MCINNERNEY K, WILLIAMSON K, et al. Bile salts affect expression of *Escherichia coli* O157:H7 genes for virulence and iron acquisition, and promote growth under iron limiting conditions[J]. PLoS One, 2013, 8(9): e74647.

[24] DOMÍNGUEZ-MEDINA C C, PÉREZ-TOLEDO M, SCHAGER A E, et al. Outer membrane protein size and LPS O-antigen define protective antibody targeting to the *Salmonella* surface[J]. Nature Communications, 2020, 11: 851.

[25] KOJIMA S, NIKAIDO H. High salt concentrations increase permeability through OmpC channels of *Escherichia coli*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2014, 289(38): 26464-26473.

[26] ÖZKANCA R, FLINT K P. The effect of starvation stress on the porin protein expression of *Escherichia coli* in lake water[J]. Letters in Applied Microbiology, 2002, 35(6): 533-537.

[27] SLEATOR R D, HILL C. Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2002, 26(1): 49-71.

[28] THOMAS A D, BOOTH I R. The regulation of expression of the porin gene ompC by acid pH[J]. Journal of General Microbiology, 1992, 138(9): 1829-1835.

[29] 李垚熹，袁艳秋，巨倩，等. β-伴大豆球蛋白α-亚基核心区的基因克隆、表达及纯化[J]. 食品与机械，2020，36(5)：15-19，38.
LI Y X, YUAN Y Q, JU Q, et al. Cloning, expression and purification of β-conglycin in α-subunit core region[J]. Food & Machinery, 2020, 36(5): 15-19, 38.(in Chinese)

[30] 蔡琴，张文举，陈沁. 花生过敏原Ara h2.02原核表达方法条件的研究[J]. 食品与机械，2015，31(2)：43-46，156.
CAI Q, ZHANG W J, CHEN Q. Studies on prokaryotic expression conditions of peanut allergen Ara h2.02[J]. Food & Machinery, 2015, 31(2): 43-46, 156.(in Chinese)

[31] 段珂，段作营，金坚. 骨形态发生蛋白10及其突变体在CHO细胞中的表达[J]. 食品与生物技术学报，2024，43(1)：106-112.
DUAN K, DUAN Z Y, JIN J. Expression of bone morphogenetic protein 10 and its mutants in CHO cells[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2024, 43(1): 106-112.(in Chinese)

[32] REDDY V S, BARRY M A. Structural organization and protein-protein interactions in human adenovirus capsid[J]. Sub-Cellular Biochemistry, 2021, 96: 503-518.

[33] 刘建欣，刘蕾，郭珊珊，等. 副溶血性弧菌外膜蛋白BamA重组表达及其免疫原性分析[J]. 江苏农业科学，

2022，50(15)：43-50.
LIU J X，LIU L，GUO S S，et al. Recombinant expression and immunogenicity of outer membrane protein BamA of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Jiangsu Agricultural Sciences，2022，50(15)：43-50.(in Chinese)

[34] 刘蕾，周欣悦，朱桢，等. 副溶血弧菌外膜铁蛋白受体*pvuA*基因的原核表达及产物的诱导条件优化[J]. 生物技术进展，2022，12(3)：396-404.
LIU L，ZHOU X Y，ZHU Z，et al. Prokaryotic expression of outer membrane ferritin receptor *pvuA* gene of *Vibrio parahaemolyticus* and optimization of induction conditions for product[J]. Current Biotechnology，2022，12(3)：396-404.(in Chinese)

[35] 袁倩云，梁夏夏，刘蕾，等. 副溶血性弧菌外膜蛋白VP1008的原核表达及诱导条件的优化[J]. 化学与生物工程，2021，38(9)：50-53.
YUAN Q Y，LIANG X X，LIU L，et al. Prokaryotic expression of outer membrane protein VP1008 of *Vibrio parahaemolyticus* and optimization in induction conditions[J]. Chemistry & Bioengineering，2021，38(9)：50-53.(in Chinese)

[36] 李振东，谷华玮，王海鹰，等. 人甲胎蛋白AFP在大肠杆菌中表达和鉴定[J]. 现代食品科技，2013，29(10)：2415-2419.
LI Z D，GU H W，WANG H Y，et al. Expression and identification of human alpha fetoprotein in *E. coli*[J]. Modern Food Science and Technology，2013，29(10)：2415-2419.(in Chinese)

[37] 夏祯. 重组大肠杆菌克隆、表达豹蛙酶及其分离纯化的研究[D]. 上海：华东理工大学，2020.

[38] MIDDELBERG A P J. Preparative protein refolding[J]. Trends in Biotechnology，2002，20(10)：437-443.

[39] 焦明，罗玉霞，陈亚男，等. 乳酸片球菌R-4细菌素PA-1原核表达及其理化特性[J]. 食品与生物技术学报，2023，42(11)：98-105.
JIAO M，LUO Y X，CHEN Y N，et al. Prokaryotic expression and physicochemical properties of bacteriocin PA-1 from *Pediococcus acidilactici* R-4[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2023，42(11)：98-105.(in Chinese)

[40] 王昌博，黄东彦，胡文锋，等. 植物甜蛋白Mabinlin II在大肠杆菌中的表达[J]. 现代食品科技，2011，27(4)：384-389.
WANG C B，HUANG D Y，HU W F，et al. Expression of plant sweet protein Mabinlin II in *Escherichia coli*[J]. Modern Food Science and Technology，2011，27(4)：384-389.(in Chinese)

[41] WANG X，LU R，LIU Q F，et al. Production and immunoanalytical application of 32 monoclonal antibodies against metacestode somatic antigens of *Echinococcus multilocularis*[J]. Parasitology Research，2010，107(1)：177-185.

[42] 李燕，何燕琴. 核酸检测联合ELISA检测在献血者血液筛查中的应用价值研究[J]. 江西医药，2021，56(12)：2343-2344，2356.
LI Y，HE Y Q. Study on the application value of nucleic acid detection combined with ELISA in blood screening of blood donors[J]. Jiangxi Medical Journal，2021，56(12)：2343-2344，2356.(in Chinese)

（责任编辑：刘冬梅）