

O2血清型肺炎克雷伯氏菌多糖结合疫苗的生物合成

张璐璐¹, 潘超¹, 冯尔玲¹, 华孝挺², 俞云松², 王恒樑¹, 朱力¹

1 军事科学院军事医学研究院 生物工程研究所, 北京 100071

2 浙江大学医学院附属邵逸夫医院 浙江省微生物技术与生物信息研究重点实验室, 浙江 杭州 310016

张璐璐, 潘超, 冯尔玲, 等. O2血清型肺炎克雷伯氏菌多糖结合疫苗的生物合成. 生物工程学报, 2020, 36(9): 1899–1907.

Zhang LL, Pan C, Feng EL, et al. Biosynthesis of polysaccharide conjugate vaccines against *Klebsiella pneumoniae* serotype O2 strain. Chin J Biotech, 2020, 36(9): 1899–1907.

摘要: 本研究旨在利用微生物体内合成肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*, *Kp*) 多糖结合疫苗并研究其保护效果。通过敲除 *Kp* O 抗原连接酶基因 *waaL* 阻断其 LPS 合成, 再向缺失株中导入糖基工程载体, 使细菌能够在体内合成糖蛋白, 并将该糖蛋白免疫小鼠后评价其保护效果。结果表明, 在构建的 *Kp waaL* 缺失株中导入糖基工程载体后, 底物蛋白重组霍乱毒素 B 亚单位 rCTB (Recombinant cholera toxin B subunit) 能够被 O 糖化, 从而得到糖蛋白; 动物实验结果显示该疫苗能刺激小鼠产生较高的抗体效价, 试验组小鼠攻毒后一周存活率可达 75%。这种生物合成方法制备的多糖结合疫苗有望成为针对肺炎克雷伯氏菌的新型候选疫苗。

关键词: 肺炎克雷伯氏菌, 生物合成, O-糖基化, 多糖结合疫苗, 免疫评价

Biosynthesis of polysaccharide conjugate vaccines against *Klebsiella pneumoniae* serotype O2 strains

Lulu Zhang¹, Chao Pan¹, Erling Feng¹, Xiaoting Hua², Yunsong Yu², Hengliang Wang¹, and Li Zhu¹

1 State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Beijing Institute of Biotechnology, Beijing 100071, China

2 Key Laboratory of Microbial Technology and Bioinformatics in Zhejiang, Sir Run Run Shaw Hospital of College of Medicine of Zhejiang University, Hangzhou 310016, Zhejiang, China

Abstract: The main purpose of this research is to synthesize and evaluate a new glycoconjugate vaccine against *Klebsiella pneumoniae* (*Kp*). First, the gene (*waaL*) responsible for the expression of O antigen ligase was deleted to block the synthesis of bacterial LPS. Then the vector that encodes a glycosyltransferase (PglL) was transferred into the mutant. The enzyme PglL could catalyze the transfer of OPS units to recombinant cholera toxin B subunit (rCTB) to form glycoproteins *in vivo*. The protective effects of the glycoproteins were studied by the mice models with acute bacteremia that were induced by

Received: January 7, 2020; **Accepted:** March 23, 2020

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 81871314, 81930122, 31700802).

Corresponding author: Li Zhu. Tel: +86-10-66948835; E-mail: jewly54@126.com

国家自然科学基金 (Nos. 81871314, 81930122, 31700802) 资助。

网络出版时间: 2020-06-02

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20200601.1507.001.html>

intraperitoneal injection of wildtype *Kp* bacteria. The results were as followings: A *Kp waaL* mutant was obtained and the rCTB protein could be successfully glycosylated in the mutant. The vaccine can stimulate a high antibody titer in the mice sera with or without adjuvant. It can also protect mice from the lethal dose injection of *Kp*. The survival rate of vaccine candidate groups could reach 75%. The glycoconjugate vaccine candidate prepared by this biosynthetic method is expected to become a novel effective vaccine against *Klebsiella pneumoniae*.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, biosynthesis, O-glycosylation, conjugate vaccines, immune evaluation

肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*, *Kp*) 是一种普遍存在于环境中、人和动物皮肤表面和黏膜上的革兰氏阴性菌。它是条件致病菌, 可引起肺炎、眼内炎、肝脓肿以及菌血症等疾病, 容易感染幼儿以及年老体弱者, 已成为目前医院和社区获得性感染的最主要致病因素之一^[1]。*Kp* 常常具有耐药性, 为其治疗带来了巨大的困难。近年来报道的能够产生超广谱 β -内酰胺酶 (Extended-spectrum β -lactamase, ESBL) 的 *Kp* 病例逐渐增加, 临床上几乎面临无药可用的局面。另外, 高毒力 *Kp* 的出现, 使得健康的成年人也极易感染该病原菌; 而且由于耐药菌和高毒力菌株越来越具有交叉和重叠的趋势^[2], 迫切需要研制出一种能够有效预防其感染的疫苗。

Kp 的胞外多糖包括荚膜多糖和 O 特异多糖。荚膜多糖有 77 种^[3], 其中 K1 血清型流行性较高, 有研究者曾制备过荚膜多糖疫苗^[4], 该疫苗虽能够刺激机体产生较高的 IgG 抗体效价, 但由于生产工艺复杂, 难以进一步扩大生产。而 *Kp* O 特异多糖只有 8 种, 其中 O1 和 O2 血清型是主要流行型^[5], 因此制备 O 抗原多糖疫苗比荚膜疫苗更具备可行性。目前大部分针对 *Kp* O 多糖结合疫苗的研究主要集中在化学交联法制备的疫苗上^[6], 其免疫原性强, 能够增强细胞吞噬作用, 但缺点是过程繁琐、成本高昂并且产品质控困难。

同化学交联法相比, 多糖结合疫苗的生物法制备是在构建工程菌株的基础上, 利用细菌在周间质酶促合成糖蛋白, 省去了对多糖和底物蛋白的多次纯化, 因此降低了生产成本, 更有利于产品质控, 并且不存在复杂的环保排放问题。据报

道已有研究者利用生物法成功制备了 *Kp* K1/K2 型荚膜多糖结合疫苗^[7]。

相对于荚膜多糖结合疫苗, *Kp* O 血清型种类少, 因此制备 O 血清型疫苗更具有经济性。本文以临床分离株 *Kp355* 为研究对象, 通过生物法制备多糖结合疫苗。*Kp355* 由浙江大学医学院附属邵逸夫医院馈赠, 经验证其血清型为 O2 型。*Kp355 waaL* 基因编码 O 抗原连接酶, 能够将自身的 O 多糖转移到核心寡糖上形成脂多糖 LPS, 敲除该基因后细菌无法合成完整的脂多糖, 毒力明显降低且周间质中出现大量游离的 O 多糖。脑膜炎耐瑟氏菌编码的糖基转移酶 PglL 具有非常宽松的底物特异性, 可以识别并催化 O 多糖转移到含 29 个糖化位点的重组霍乱毒素 B 亚单位 (rCTB) 上。将具有上述两种蛋白 (PglL 和 rCTB) 编码基因的糖基工程载体导入构建的 *Kp355 waaL* 缺失株 (*Kp355 Δ waaL*) 中后, PglL 可催化游离的 O 多糖转移到 rCTB 上, 从而能够在突变株细菌周间质中合成带有 *Kp355* O 抗原结构的糖蛋白 (C-OPS_{*Kp*})。这种多糖蛋白缀合物有望成为新型多糖结合疫苗。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株与实验动物

Kp355 由浙江大学医学院附属邵逸夫医院分离并保存, 大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 感受态购自江苏康为世纪生物科技有限公司; SPF 级 BALB/c 小鼠, 5-6 周龄, 雌性, 购自斯贝福 (北京) 生物技术有限公司。

1.1.2 质粒与试剂

糖基工程载体 pET28a-PglL-CTB 以及质粒 pET28a-CTB、pKOBEG、pET-Kan、pCP20 等均为军事医学研究院生物工程研究所保存。质粒提取试剂盒、胶回收与 PCR 产物回收试剂盒均购自江苏康为世纪生物科技有限公司。蛋白亲和纯化树脂购自罗氏公司。Superdex200 分子排阻色谱树脂购自 GE 公司。引物由北京天一辉远公司合成。

1.2 实验方法

1.2.1 *Kp355 O* 抗原连接酶基因 *waaL* 的敲除

利用 λ -Red 重组系统^[8]敲除 *Kp355 waaL* 基因。根据 *Kp355 waaL* 基因及其上下游序列, 设计构建基因打靶片段所需引物, 具体引物名称及序列见表 1。其中引物 *waaL*-up-F、*waaL*-up-R 扩增 *waaL* 基因上游同源臂, *waaL*-dw-F、*waaL*-dw-R 扩增下游同源臂; 同时为了验证突变体构建是否成功, 设计了基因组上 *waaL* 基因上下游同源臂以外的一对引物 *waaL*-out-F 和 *waaL*-out-R, 内部检测引物 *waaL*-in-F 和 *waaL*-in-R。将上下游同源臂通过酶切连接的方式, 分步连接到载体 pET-Kan 上; 之后以含有靶基因上下游同源臂的载体 pET-Kan 为模板, 利用引物 *waaL*-up-F 和 *waaL*-dw-R 扩增 *waaL* 基因打靶片段, 将扩增产物进行回收得到打靶片段。

通过电击转化将质粒 pKOBEG 导入 *Kp355* 中, 其中 pKOBEG 编码合成 3 种与同源重组相关的酶 Exo、Beta、Gam; 在打靶片段存在下, 可以将宿主基因组上的目的基因片段置换下来从而实现基因的敲除。将含有该质粒的 *Kp355* 阳性克隆在试管中转接两代后再接种至 50 mL 低盐 LB 培养基中, 置于 30 °C 摇床培养, 在细菌培养到 600 nm 紫外吸收峰 (OD_{600}) 为 0.5 前的 1 h 加入终浓度为 1 mmol/L 的阿拉伯糖; 1 h 后将菌液置于冰上 30 min, 之后 8 000 r/min 离心 8 min 收菌, 并用预冷的 10% 甘油洗 3 次制备 *Kp355/pKOBEG* 感受态细胞, 最后电转打靶片段到制备好的 *Kp355/pKOBEG* 感受态中, 30 °C 复苏 1–2 h 后涂布于卡那霉素终浓度为 50 μ g/mL 的抗性平板, 次日利用内外部引物进行 PCR 筛选阳性克隆。由于筛选到的重组菌株含有 Kan 筛选基因及两侧的 FRT 位点, 因此将其培养于 42 °C 摇床并转接 3 代去除 pKOBEG 后, 再导入另一温敏质粒 pCP20, pCP20 编码 Flp 重组酶可诱导两侧 FRT 位点重组从而去除 Kan 片段, 最终得到不含筛选标记的缺失株 *Kp355 Δ waaL*。对野生株 *Kp355* 以及缺失株 *Kp355 Δ waaL* 进行表型鉴定, 即通过银染观察敲除前后细菌 LPS 结构的差异, 并用梅里埃 API 50 CH 试剂条检测糖代谢差异。

表 1 基因敲除引物

Table 1 Primers for gene-knockout experiments

Primer name	Sequence (5'–3')	Size (bp)	Restriction sites
<i>waaL</i> -up-F	CGGGATCCCGGATGTGCTTTCATCCTCAG	29	<i>Bam</i> H I
<i>waaL</i> -up-R	GCGTCGACGTCTTGGCCATAGCGGCCGCGGTACCAGCGACAGCAATAG	48	<i>Sal</i> I
<i>waaL</i> -dw-F	CCCAAGCTTGGGCTACAGTCTGGCGATCCT	30	<i>Hind</i> III
<i>waaL</i> -dw-R	CCGCTCGAGCGGCGACAGCACCATCAACTC	30	<i>Xho</i> I
<i>waaL</i> -in-F	CCTGTGGACGCTGATTATCG	20	
<i>waaL</i> -in-R	TCGCCGCTGTAGTTGATGA	19	
<i>waaL</i> -out-F	CATTATCCGCGCCATTGT	18	
<i>waaL</i> -out-R	AAGTGGCCCCGCTTGCTTT	18	
<i>khe</i> -F	CCGACGATGCTACTTATCC	19	
<i>khe</i> -R	GTGTGGACCGAAGAACTG	18	

* The underlined “GGATCC”, “GTCGAC”, “AAGCTT” and “CTCGAG” represent *Bam*H I, *Sal* I, *Hind* III and *Xho* I restriction sites respectively.

1.2.2 底物蛋白 rCTB 的表达及其糖基化水平的检测

将 *Kp355* 以及 *Kp355*△*waaL* 制成感受态, 均导入实验室保存的糖基工程质粒 pET28a-PglL-CTB 以及对照质粒 pET28a-CTB, 加入液体 LB 培养基在 37 °C 摇床复苏 1–2 h, 涂布到抗性平板上, 37 °C 温箱培养过夜。第 2 天挑选 PCR 验证正确的阳性单克隆, 将其在试管中转接两代; 第 2 代 37 °C 摇床培养到对数生长期后, 加入终浓度为 1 mmol/L 的异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside, IPTG) 诱导剂, 置于 30 °C 摇床过夜诱导目的蛋白表达。第 2 天将每组样品各取 1 mL, 13 000 r/min 离心 1 min, 弃上清收集菌体沉淀, 加入 100 μL 蒸馏水重悬菌体, 再加入等体积的 2×SDS 上样缓冲液, 沸水浴 10 min 后进行 SDS-PAGE; 待电泳结束后用半干转印仪将胶上的蛋白转至 PVDF 膜上, 15 V 恒压转印 65 min, 用鼠源 HRP-Anti-His tag 单克隆抗体检测不同菌株中底物蛋白的表达情况。

1.2.3 *Kp355* C-OPS_{Kp} 的纯化与糖定量

将携带糖基工程载体 pET28a-PglL-CTB 的 *Kp355*△*waaL*, 以 1 : 100 的比例接种于 2 L 三角瓶中, 37 °C 摇床培养至对数生长期后加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 诱导剂, 30 °C 诱导表达过夜。第 2 天 8 000 r/min 离心 8 min 收集菌体沉淀, 以溶液 A1 (0.5 mol/L NaCl, 10 mmol/L 咪唑, 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5) 重悬菌体后, 经过匀浆机充分破碎直至菌悬液澄清, 离心取上清; 将上清通过 A1 平衡过的镍离子亲和层析柱, 之后洗脱非特异性结合的杂蛋白, 用高浓度咪唑溶液 B1 (0.5 mol/L NaCl, 500 mmol/L 咪唑, 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5) 洗脱目的蛋白; 将得到的样品浓缩后经过凝胶过滤层析 (Superdex200 分子排阻色谱树脂) 进一步纯化, 根据蛋白质在 280 nm 处吸收值的变化收集样品, 样品经 SDS-PAGE 后用考马斯亮蓝染色和蛋白免疫印迹检测蛋白表达情况, 蒽酮浓硫酸法检测其糖含量。

1.2.4 候选疫苗的实验动物免疫评价

将 *Kp355* 培养至 OD_{600} 为 2.0 时的菌液进行梯度稀释涂布, 计算每毫升菌液所含有的菌落形成单位 (Colony forming unit, CFU)。根据 *Kp355* OD_{600} 为 2.0 时的菌液浓度, 预先设置 3 个梯度, 即分别以 10^6 CFU/只、 10^7 CFU/只、 10^8 CFU/只的菌量腹腔注射小鼠, 每组 5 只; 再根据攻毒后小鼠一周的存活率, 将致死剂量的范围进一步缩小; 每组设置 10 只, 每组的活菌注射量相差不超过 0.5×10^7 CFU, 攻毒后观察小鼠一周存活情况, 确定小鼠攻毒实验的半数致死剂量 (LD_{50})。

将 5–6 周龄雌性 BALB/c 随机分为 5 组, 每组 8 只, 分别是 PBS 组、糖蛋白组、糖蛋白+铝佐剂 ($Al(OH)_3$) 组、糖蛋白+角鲨烯 (Squalene) 组以及糖蛋白+Poly(I:C)^[9]组。每只小鼠按照 2.5 μg 多糖含量分别于第 0、14、28 天进行腹腔免疫, 第 3 次免疫后 10 d 断尾取血, 分离血清; 以 *Kp355* LPS 为抗原包被酶标板, 间接 ELISA 法测定血清抗体效价, 三免后第 14 天进行腹腔攻毒, 观察各组小鼠存活率。通过测定的抗体效价以及存活曲线, 评价该糖蛋白疫苗的保护效果以及不同佐剂之间保护效果的差异。

1.2.5 数据处理与分析

间接 ELISA 法测定小鼠血清抗体效价时, 以阴性血清值的 2.1 倍为阳性标准判断; 两组比较采用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 *Kp355* O 抗原连接酶基因 *waaL* 的缺失

通过 λ-Red 重组技术敲除了 *Kp355* *waaL* 基因, 缺失株 PCR 验证结果如图 1A 所示, 用内部引物 PCR 扩增后, 缺失株结果为阴性, 而野生株为阳性; 外部引物扩增后缺失株和野生株产物的条带大小均符合理论值 1.4 kb 和 2.2 kb, 并且外部引物扩增产物测序结果与理论序列结果一致; *khe* 引物为验证 *Kp* 种属特征性引物^[10], 以排除杂菌污染。结果表明我们在基因层面成功敲除了 *waaL* 基因, 得到缺失株 *Kp355*△*waaL*。之后将蛋白酶 K 消化后的野

生株和缺失株全菌蛋白样品经 SDS-PAGE 分离后进行银染, 结果如图 1B 所示, 由于野生株 LPS O 侧链重复单位的数量并不相同, 因此呈现分子量差异相对固定的典型梯状 LPS 条带^[5], 而缺失株由于 *waaL* 基因缺失糖链无法转移到脂质 A 核心, 因此无 LPS 典型条带。接着, 又对 *Kp355* 和 *Kp355*Δ*waaL*

的生长状态和生理生化特性进行了探究。结果如图 1C 所示, 两株菌生长曲线无明显差异, 通过参考 API 50CH 试验条成分 (表 2) 发现其糖代谢能力除 D-塔格糖以及 2-酮基-葡萄糖酸盐代谢有略微差异外, 其他种类糖代谢未见明显差异 (图 1D), 表明 *waaL* 基因的缺失对菌株的生长和代谢无明显影响。

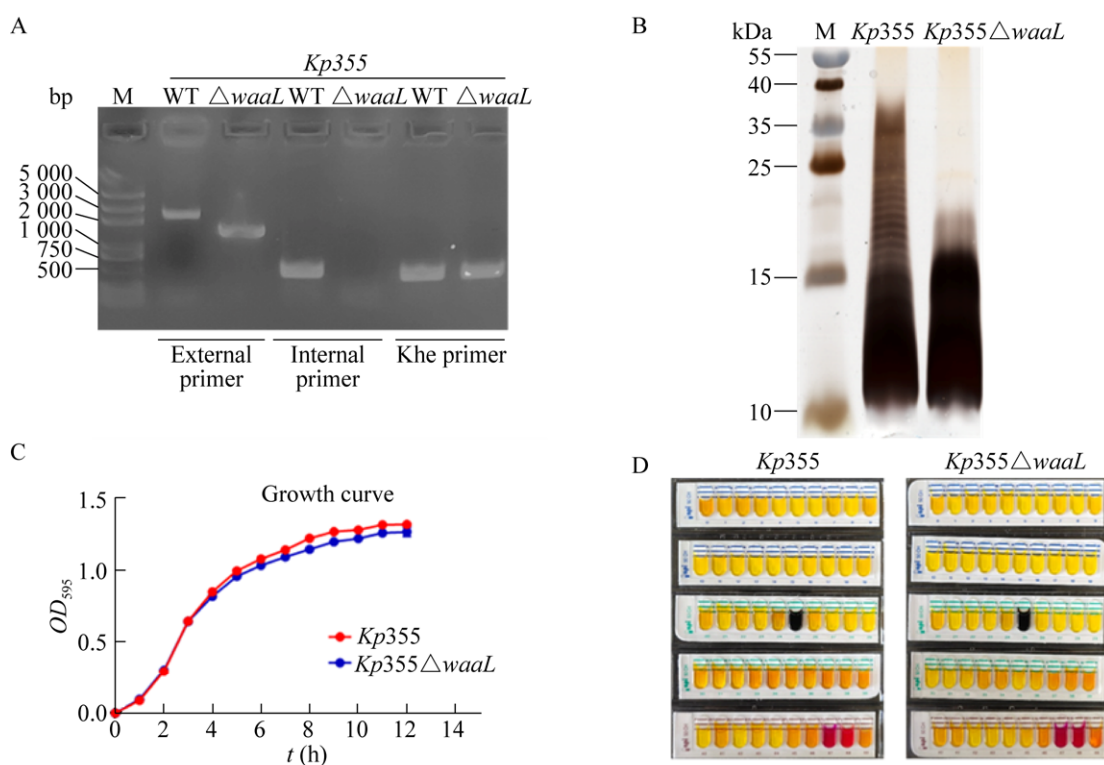


图 1 *Kp355 waaL* 基因缺失株的构建及鉴定

Fig. 1 The construction of *Kp355 waaL* gene deletion mutants. (A) Identification of *Kp355 waaL* gene deletion by PCR. (B) Silver staining of *Kp355* wild type and *waaL* mutant. (C) Growth curves of *Kp355* wild type and *waaL* mutant strain. (D) Carbohydrate metabolism tests of *Kp355* wild type and *waaL* mutant strain using API 50 CH kits.

表 2 API 50CH 试验条成分

Table 2 Components of API[®] 50 CH kit

Substrate of test strip (Row 1)	Substrate of test strip (Row 2)	Substrate of test strip (Row 3)	Substrate of test strip (Row 4)	Substrate of test strip (Row 5)
0 Control	10 Galactose	20 α -Methy-d-mannoside	30 Melibiose	40 Turanose
1 Glycerin	11 Glucose	21 α -Methyl-d-glucoside	31 Sucrose	41 D-Lyxose
2 Trichophyton	12 Fructose	22 N-acetyl-glucosamine	32 Trehalose	42 D-Tagatose
3 D-arabinose	13 Mannose	23 Amygdalin	33 Synanthrin	43 D- rock sugar
4 L-arabinose	14 Sorbitan	24 Arbutin	34 Melezitose	44 L- rock sugar
5 Ribose	15 Rhamnolipid	25 Esculin	35 Raffinose	45 D-Arabinitol
6 D-Xylose	16 Dulcitol	26 Salicin	36 Starch	46 L-Arabinitol
7 L-Xylose	17 Inositol	27 Cellobiose	37 Glycogen	47 Gluconate
8 Adonite	18 Mannitol	28 Maltose	38 Xylitol	48 2-Keto-gluconate
9 β -Methyl-d-xyloside	19 Sorbitol	29 Lactose	39 Geraniol	49 5-Keto-gluconate

2.2 底物蛋白 rCTB 的表达及其糖基化水平的检测

在 *Kp355* 和 *Kp355*Δ*waaL* 中均导入质粒 pET28a-PglL-CTB 以及 pET28a-CTB 后, 将其全菌蛋白样品经过 SDS-PAGE 分离后, 通过蛋白免疫印迹 (Western blotting, WB) 检测 rCTB 的表达, 其中质粒 pET28a-PglL-CTB 表达的 PglL 和 rCTB 分别定位于细菌内膜上和周间质中。结果如图 2 所示, 在 *Kp355*Δ*waaL* 中共表达 PglL 和底物蛋白 rCTB 时, 细菌本身游离的 O-抗原多糖在糖基转移酶 PglL 催化下转移到载体蛋白 rCTB 上, 因此 WB 条带上呈现了底物蛋白条带向高分子量区域迁移的现象; 同时, 由于细菌多糖为串联重复单位, 因此呈现出典型的梯状条带, 表明蛋白与细菌多糖成功偶联, 得到了带有 *Kp355* O 多糖的糖蛋白 (C-OPS_{Kp}); 而对照组在无 PglL 的情况下只有底物蛋白的表达。

2.3 *Kp355* C-OPS_{Kp} 的纯化

通过对表达 *Kp355* O 抗原糖蛋白工程菌的大量培养和发酵纯化, 得到了纯度较高的糖蛋白。由于底物蛋白 rCTB 带有 6 个组氨酸标签, 通过

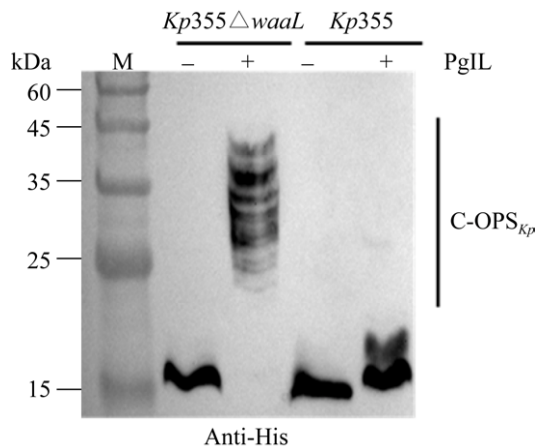


图 2 rCTB 蛋白糖基化鉴定

Fig. 2 Identification of glycosylated rCTB.

镍柱亲和层析进行第一步纯化, 可用低浓度咪唑溶液 A1 洗脱杂蛋白, 高浓度咪唑溶液 B1 洗脱目的蛋白; 再根据目的蛋白与杂蛋白分子大小的差异将样品通过凝胶过滤层析进一步纯化, 以尽可能地除去杂蛋白。图 3A 为将样品注入分子排阻色谱柱后, OD_{280} 值随流经色谱柱缓冲液体积的变化, 箭头所示为样品收集峰, 约为上样后 80 mL 处。通过考马斯亮蓝染色检测糖蛋白样品 (图 3B) 可以看出, 纯化得到的 C-OPS_{Kp} 糖蛋白纯度较高, 样品中几乎没有杂蛋白, 说明镍柱亲和层析以及凝胶过滤层析两步足以去掉绝大多数杂蛋白。经计算每升 LB 培养基得到的糖蛋白中糖含量约为 120 μg 左右。

2.4 *Kp355* LD50 测定与疫苗保护效果评价

将 *Kp355* 培养至 OD_{600} 为 2.0 时, 对其进行计数, 经计算每毫升菌液约含有 1×10^9 CFU。通过观察不同活菌剂量组小鼠一周存活率的变化, 得出其 LD_{50} 为 2.0×10^7 CFU。

随后, 我们通过糖蛋白疫苗刺激小鼠产生的抗体效价、抗体亚型效价以及攻毒后不同佐剂组小鼠一周存活率的差异, 来探究该疫苗的保护效果^[11]。如图 4A-E 所示, 各组小鼠血清抗体效价以 10 为底做对数变换后的结果为纵坐标, 横坐标为不同试验组以及 PBS 组, 试验组的总体 IgG 抗体效价均与 PBS 组差异明显, 无佐剂组、角鲨烯佐剂组以及 Poly(I:C) 佐剂组的抗体效价均高于铝佐剂组; 按照上述 *Kp355* 两倍半数致死剂量腹腔攻击小鼠, 结果如图 4F 所示, 同总体 IgG 抗体效价测定结果一致, 无佐剂组、角鲨烯佐剂组以及 Poly(I:C) 佐剂组小鼠的存活率均可达 75%, 与 PBS 组差异明显, 表明本研究制备的糖蛋白疫苗能够保护小鼠免于 *Kp355* 致死剂量的攻击。

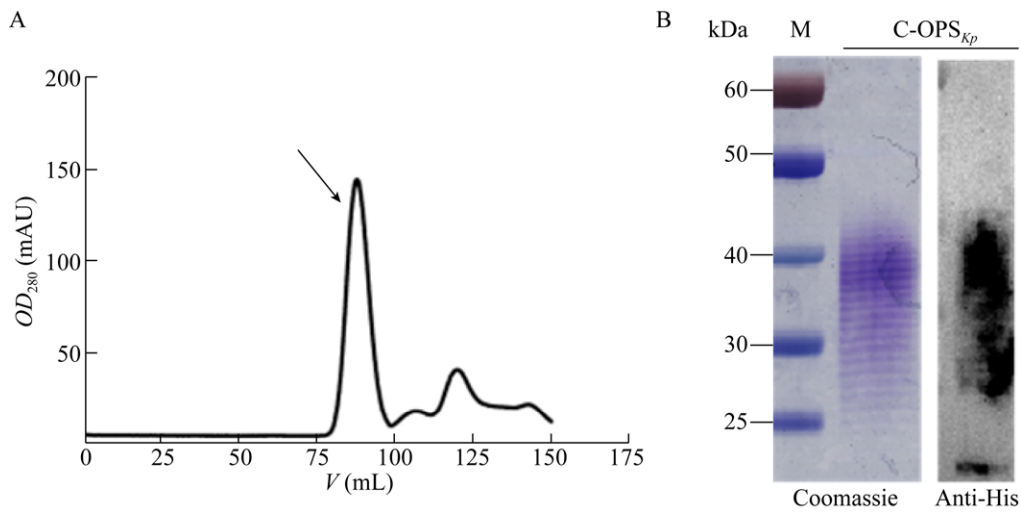


图 3 糖蛋白 C-OPS_{Kp} 的纯化

Fig. 3 Purification of glycoprotein C-OPS_{Kp}. (A) The optical density at 280 nm changes with PBS elution after sample injection. The arrow points to the appearance peak of C-OPS_{Kp}. (B) Detection of the purified glycoprotein by coomassie stain and Western blotting.

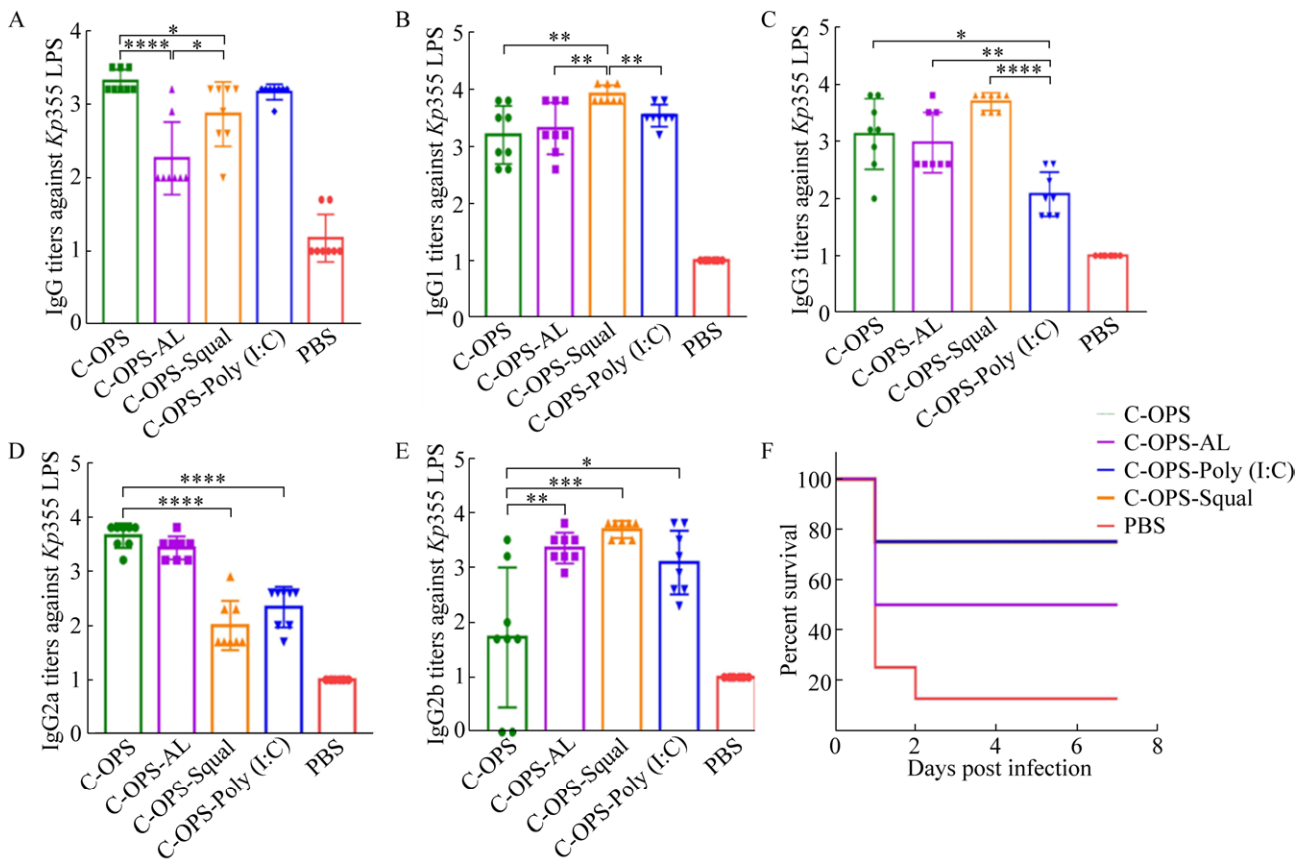


图 4 C-OPS_{Kp} 的保护效果

Fig. 4 Protective effect of C-OPS_{Kp}. Serum anti-LPS IgG (A), IgG1 (B), IgG3 (C), IgG2a (D), IgG2b (E) antibody titers were detected by ELISA. (F) Survival rate of different groups in one week after injection with Kp355 lethal dose at 4.0×10^7 CFU. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$.

3 讨论

来自脑膜炎奈瑟球菌的糖基转移酶 PglL 具有非常宽松的底物特异性^[12], 能够催化多种糖单位转移到底物蛋白的丝氨酸、苏氨酸残基上, 使底物蛋白发生 O 糖基化修饰。本研究所用糖基工程载体编码合成的糖基转移酶 PglL 可在细菌周间质将多糖转移到底物蛋白上, 目前已实现在多个菌种的底物蛋白糖基化, 如志贺菌、鲍曼不动杆菌以及霍乱弧菌等。在本研究中, 该载体在 *Kp waaL* 缺失株中也能将细菌 *Kp* 的 O 多糖转移到底物蛋白上, 说明 PglL 也能够识别此类型的 O 糖结构, 拓展了 O-连接多糖体系的应用。

本研究制备的 *Kp* O2 血清型糖蛋白能够刺激小鼠产生较高的抗体效价、保护 75% 的小鼠免于致死剂量的攻击, 且配伍不同佐剂糖蛋白疫苗组的抗体亚型效价之间存在一定的差异。聚肌苷酸 Poly(I:C) 是一种双链 RNA、干扰素诱导剂, 能够激活 TLR3, 可在抵抗病毒感染中发挥重要作用, 其主要介导粘膜免疫; 配伍角鲨烯佐剂糖蛋白疫苗组小鼠产生的 IgG1 抗体效价高达 1 : 10 000, 与其他试验组差异明显 ($P < 0.05$), 并且 IgG3 和 IgG2b 的抗体效价均不低于 1 : 1 000。

根据相关流行病学调查研究, *Kp* O1 和 O2 属于主要流行株, 其中 O2 血清型多糖由于其较低的免疫原性不能有效激发机体的免疫反应^[13], 感染后难以被人体免疫系统清除, 因此最近流行性呈上升趋势, 而单独的多糖制备的疫苗由于这种较低的免疫原性, 无法作为有效的疫苗产品。本研究制备的 *Kp* 多糖结合疫苗携带的多糖属于 O2 型, 通过简单的糖基转移反应, 一步将多糖连在载体蛋白 rCTB 上, 成功制备多糖结合疫苗。此候选疫苗能够刺激小鼠产生较高的抗体效价, 并且攻毒后试验组小鼠具有较高的存活率, 能够保护小鼠免于 *Kp355* 致死剂量的攻击, 有望成为针对肺炎克雷伯氏菌的新型候选疫苗, 对预防医

院和社区获得性感染具有重要的意义^[14]。

另有研究表明 *Kp* O1 血清型抗体的被动免疫能够保护小鼠免受致死剂量的攻击^[15]。已有研究表明通过将 O2 多糖基因簇与 *Kp* 的 *wbbY* 和 *wbbZ* 基因共表达可得到 O1 多糖, 因此理论上我们的技术可以进一步制备 O1 血清型多糖结合疫苗, 从而实现针对 *Kp* 不同血清型更为广泛的保护。

REFERENCES

- [1] Ahmad TA, El-Sayed LH, Haroun M, et al. Development of immunization trials against *Klebsiella pneumoniae*. *Vaccine*, 2012, 30(14): 2411–2420.
- [2] Paczosa MK, Mecsas J. *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2016, 80(3): 629–661.
- [3] Follador R, Heinz E, Wyres KL, et al. The diversity of *Klebsiella pneumoniae* surface polysaccharides. *Microb Genom*, 2016, 2(8): e000073.
- [4] Alcántar-Curiel MD, Martínez-Ramos A, García-Latorre E. Capsular polysaccharide of *Klebsiella pneumoniae*. II. immunogenic properties. *Rev Latinoam Microbiol*, 1993, 35(1): 109–115.
- [5] Pennini ME, de Marco A, Pelletier M, et al. Immune stealth-driven O₂ serotype prevalence and potential for therapeutic antibodies against multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Nat Commun*, 2017, 8: 1991.
- [6] Chhibber S, Bajaj J. Polysaccharide-iron-regulated cell surface protein conjugate vaccine: its role in protection against *Klebsiella pneumoniae*-induced lobar pneumonia. *Vaccine*, 1995, 13(2): 179–184.
- [7] Feldman MF, Bridwell AEM, Scott NE, et al. A promising bioconjugate vaccine against hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(37): 18655–18663.
- [8] Huang TW, Lam I, Chang HY, et al. Capsule deletion via a λ -Red knockout system perturbs biofilm formation and fimbriae expression in *Klebsiella pneumoniae* MGH 78578. *BMC Res*

- Notes, 2014, 7: 13.
- [9] Ichinohe T, Watanabe I, Ito S, et al. Synthetic double-stranded RNA poly (I:C) combined with mucosal vaccine protects against influenza virus infection. *J Virol*, 2005, 79(5): 2910–2919.
- [10] Ching YC, Su JH, Lin CN, et al. Cloning of a gene encoding a unique haemolysin from *Klebsiella pneumoniae* and its potential use as a species-specific gene probe. *Microb Pathogen*, 2002, 33(1): 1–6.
- [11] Hegerle N, Choi M, Sinclair J, et al. Development of a broad spectrum glycoconjugate vaccine to prevent wound and disseminated infections with *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS ONE*, 2018, 13(9): e0203143.
- [12] Faridmoayer A, Fentabil MA, Haurat MF, et al. Extreme substrate promiscuity of the *Neisseria* oligosaccharyl transferase involved in protein *O*-glycosylation. *J Biol Chem*, 2008, 283(50): 34596–34604.
- [13] Hsieh PF, Wu MC, Yang FL, et al. D-galactan II is an immunodominant antigen in O1 lipopolysaccharide and affects virulence in *Klebsiella pneumoniae*: implication in vaccine design. *Front Microbiol*, 2014, 5: 608.
- [14] Clarke BR, Ovchinnikova OG, Kelly SD, et al. Molecular basis for the structural diversity in serogroup O₂-antigen polysaccharides in *Klebsiella pneumoniae*. *J Biol Chem*, 2018, 293(13): 4666–4679.
- [15] Cohen TS, Pelletier M, Cheng L, et al. Anti-LPS antibodies protect against *Klebsiella pneumoniae* by empowering neutrophil-mediated clearance without neutralizing TLR4. *JCI Insight*, 2017, 2(9): e92774.

(本文责编 郝丽芳)