

人表皮生长因子融合蛋白在干酪乳杆菌中的表达

汪舒庆 葛向阳 陈正军

华中农业大学农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070

摘要 以干酪乳杆菌作为传递载体, 构建表达人表皮生长因子的重组干酪乳杆菌, 探讨原位表达特定蛋白的可行性。采用 SOE PCR 合成人表皮生长因子序列, 克隆到干酪乳杆菌表达载体 pELWH, 构建 pELWH-hEGF 重组质粒, 将该质粒电转化干酪乳杆菌宿主, 采用 Western blot 及间接免疫荧光检测目的蛋白的表达, 并通过细胞增殖实验验证目的蛋白的生物学活性。结果表明: 在重组菌的细胞表面及培养液上清中均检测到 SlpA-hEGF 融合蛋白, 分子质量约 55 ku; 细胞增殖实验显示 SlpA-hEGF 融合蛋白及干酪乳杆菌上清均能显著促进 NIH/3T3 细胞的增殖。

关键词 干酪乳杆菌; 人表皮生长因子; SlpA-hEGF 融合蛋白; 细胞增殖

中图分类号 Q 939.9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2018)04-0070-08

肠道微生物群在调控营养吸收、抑制病原菌定植及刺激粘膜免疫等方面对宿主健康有重要影响。作为人及哺乳动物胃肠道的优势菌群, 乳酸菌 (LAB) 能抑制病原菌对肠道上皮的粘附, 预防炎症^[1], 因此能有效预防肠道疾病。乳酸菌能降低患某些感染性疾病的风险, 如腹泻及呼吸道感染^[2-3]。研究表明干酪乳杆菌可刺激动物天然免疫^[4], 或作为佐剂以增强疫苗的免疫效果^[5]。

干酪乳杆菌群有 3 类: 干酪乳杆菌、副干酪乳杆菌及鼠李糖乳杆菌^[6]。大量的临床研究证实, 对于肠道功能紊乱的病人, 饮用含干酪乳杆菌的饮品后, 能带来显著的益生效果, 如预防抗生素相关性腹泻 (AAD) 及艰难梭菌所引起的感染^[7-9]。此外, 对于主要由轮状病毒引起的儿童急性腹泻, 干酪乳杆菌处理组能显著缩短恢复时间^[10]。干酪乳杆菌具有耐受胃酸及胆汁、能通过消化道到达肠道并定植存活^[11]的特性, 因此, 是肠道蛋白原位表达的理想载体^[12]。

以乳酸菌作为宿主的蛋白表达系统是近年来的研究热点, 包括乳酸乳球菌的 NICE 系统^[13], 植物乳杆菌^[14]、干酪乳杆菌的整合表达系统^[15]。某些病毒抗原已在乳酸菌中成功表达, 如轮状病毒 VP8

蛋白^[16]、乳头瘤病毒 16 型 E7 抗原^[17], 这些重组抗原能有效刺激免疫反应。乳酸菌在传递病原抗原、小分子活性肽等方面展现出重要研究意义和应用价值。笔者所在实验室前期构建的干酪乳杆菌窄宿主表达系统 pELX 质粒因其特定的宿主范围, 如干酪乳杆菌及副干酪乳杆菌, 保证了目标基因表达的定向性和良好的基因安全性^[18], 因此, 可通过该表达系统表达特定蛋白以增强粘膜免疫的治疗效果。

表皮生长因子是一种广泛存在于人或其他动物体内的小分子多肽, 在调控细胞生长、增殖及分化方面发挥着重要作用^[19]; 应用于外伤治疗及辅助肠道感染修复中, 效果显著^[20]。

随着基因工程技术的发展, 表皮生长因子已经在多种宿主菌中得到表达。目前研究较多的是大肠杆菌表达系统和巴斯德毕赤酵母表达系统, 但大肠杆菌表达系统易形成包涵体、内毒素去除困难, 巴斯德毕赤酵母不是肠道定植菌^[21], 乳酸菌表达系统的优势逐渐显现出来^[22]。

本研究将 hEGF 基因克隆到 pELWH 中, 该载体以 pELX 为基础, 以 SlpA 蛋白作为信号进行表面展示^[23], 重组质粒转化干酪乳杆菌后, SlpA-hEGF 融合蛋白在细胞表面表达并分泌到培养液上

收稿日期: 2017-05-09

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项 (2662015PY038)

汪舒庆, 硕士研究生. 研究方向: 乳酸菌分子生物学. E-mail: wangsq2011@126.com

通信作者: 陈正军, 副教授. 研究方向: 乳酸菌基因工程. E-mail: Zhengjun.chen@gmail.com

清,通过细胞实验验证融合蛋白的生物学活性,旨在为重组干酪乳杆菌应用于粘膜免疫活菌疫苗传递载体提供依据和方法。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1)菌株、质粒和培养基。研究中用到的菌株和质粒见表 1。干酪乳杆菌菌株在 MRS 培养基中 37℃ 静置培养,大肠杆菌在 Luria-Bertani(LB)培养基中 37℃ 振荡培养。选择培养基添加 100 μg/mL 的氨苄青霉素或 100 μg/mL 的红霉素。

2)NIH/3T3 细胞。来源于中国科学院武汉病毒所。

3)主要试剂和仪器。限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DNA Marker 和 Protein Marker 购自美国 Fermentas 公司;Pfu DNA 聚合酶和 dNTPs 购自

北京全式金生物技术有限公司;小量质粒 DNA 提取试剂盒和小量 PCR 酶切/产物回收试剂盒购自美国 Omega 公司;抗 EGF 抗体购自 Proteintech 中国分公司;抗 His-tag 抗体购自碧云天生物技术研究 所;辣根过氧化物酶底物显色试剂盒购自美国 Bio-Rad 公司;EGF 蛋白标准品购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;MTS 购自美国 Promega 公司;细胞电转仪购自德国 Eppendorf 公司,高压细胞破碎仪购自德国 Siemens 公司;酶标仪购自美国 Bio-Tek 公司。

1.2 引物设计

用 Primer 5.0 软件设计 *hEGF* 基因(GenBank No.AF274587.1)引物对,目的基因的系列引物及载体 pELWH 的上下游引物见表 2,目的基因采用 *Nco* I、*Kpn* I 双酶切位点。

表 1 本研究所用的菌株和质粒

Table 1 Bacterial strains, plasmids utilized in this study

菌株或质粒 Strain or plasmid	用途 Application	来源 Source
菌株 Strains		
<i>L. casei</i> MCJΔ1	转化表达宿主 Transformation/Expression host	[18]
<i>E. coli</i> JM109	转化表达宿主 Transformation/Expression host	TaKaRa
质粒 Plasmids		
pELWH	克隆表达载体 Cloning/Expression vector	[23]
pELWH-hEGF	重组质粒 Recombinant plasmid	本研究 This work

表 2 本研究所用的引物

Table 2 Primers sequence utilized in this study

引物名称 Primer name	序列 Sequence(5'→3')
F1	CATGCCATGGA <u>ACTCTGATTCCGAATGTCTTTGTCACATGACGGTTACTGTTTACACG</u>
R1	CAGGCGTATTTGTCCAAAGCCTCGATATACATACAGACTCCATCGTGAAACAGTAACC
R2	ACGATATTGGCATCTTTCACCAATGTAGCCGACAACGCAATTACAGGCGTATTTGTCCA
R3	GCGGGGTACCTTATCTCAACTCCCACCACTTAAGATCACGATATTGGCATCTT
<i>Eco</i> R I -PslpA-F	CCGGGAATTCAAGCGGTAGGTGAAATATTAC
<i>Bam</i> H I -T-R	GGCCGATCCAGCTTGCGTTTGATTTTC

1.3 重组质粒的构建与转化子的获得

1)*hEGF* 基因的合成。用 F1、R1、R2、R3 引物经 3 轮 SOE PCR^[24] 扩增得到 *hEGF* 片段。SOE PCR 扩增如下:第 1 轮 PCR,以 F1、R1 引物进行链延伸反应;第 2 轮 PCR,用 F1、R2 引物,以第 1 轮 PCR 产物为模板进行链延伸反应;最后,用 F1、R3 引物,以第 2 轮 PCR 产物为模板进行链延伸反应,获得重组 *hEGF* 目的片段。PCR 反应条件为:94℃ 5 min,94℃ 30 s,50℃,30 s,72℃ 1 min,30 个循环;72℃ 延伸 10 min。

2) pELWH-hEGF 载体的构建。用 *Nco* I、*Kpn* I 双酶切 *hEGF* 片段后与同样双酶切的质粒载体 pELWH 酶连构建重组质粒 pELWH-hEGF,转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞。阳性克隆子抽取质粒经过测序鉴定无误后,按照文献[18]的方法制备 *L. casei* MCJΔ1 感受态细胞及进行 *L. casei* MCJΔ1 的电转化。

1.4 SIpA-hEGF 融合蛋白在干酪乳杆菌的表达鉴定

1) Western blot 鉴定。重组质粒 pELWH-

hEGF 转化 *L. casei* MCJ Δ 1 感受态细胞,挑取阳性克隆转接至 5 mL MRS 培养基中,培养过夜。以 *L. casei* MCJ Δ 1 及携带空载 pELWH 的重组菌 *L. casei*/pELWH 为阴性对照,菌体培养至相同 D_{600} ,分别收集 2 mL 培养液用于压力破碎、提取表层蛋白^[23]、培养液上清,取 15 μ L 样品进行 SDS-PAGE 和 Western blot 分析^[18]。pELX 表达系统是低拷贝质粒表达系统,在 SDS-PAGE 凝胶上无法直接看到目标条带。用抗 EGF 抗体及抗 His-tag 抗体检测融合蛋白的表达。

2) 间接免疫荧光检测。培养 *L. casei* MCJ Δ 1、*L. casei*/pELWH、*L. casei*/pELWH-hEGF 至 $D_{600}=3.0$,取 500 μ L 菌液,3 000 r/min 离心 5 min,用无菌 PBS 洗涤菌体沉淀,3 000 r/min 离心 5 min,弃上清,重复 3 次。用含 5% BSA 的 PBS 溶液封闭 1 h,无菌 PBS 重复洗涤菌体沉淀 3 次。加入 2.5% BSA 稀释的抗 EGF 抗体,稀释比例为 1 : 200,重悬混匀,37 $^{\circ}$ C 水浴 3 h,3 000 r/min 离心 5 min,PBS 洗涤 3 次,弃上清。加入 200 μ L 2.5% BSA 稀释的 FITC 标记的山羊抗兔荧光二抗,稀释比例为 1 : 200,重悬混匀后,37 $^{\circ}$ C 水浴 1 h,无菌 PBS 重复洗涤菌体沉淀 3 次。菌体沉淀用 200 μ L PBS 溶液重悬,取适量进行涂片,避光使其自然干燥,在共聚焦显微镜下观察菌体的荧光反应。

1.5 SlpA-hEGF 的最佳分泌表达量测定

收集不同生长时期的 *L. casei*/pELWH-hEGF 培养液上清,取 15 μ L 样品进行 Western blot 分析。

1.6 融合蛋白的细胞活性测定

MTT 法用于测定 SlpA-hEGF 的生物活性。*L. casei* MCJ Δ 1、*L. casei*/pELWH、*L. casei*/pELWH-hEGF 培养至 $D_{600}=3.0$,取不同稀释倍数的培养液上清用于细胞增殖实验。样品均以 2 倍梯度稀释,EGF 标品制备成 40 ng/mL 至 0.6 ng/mL 的系列浓度梯度。培养液上清从 10 倍稀释开始,形成 10~1 280 倍的系列稀释梯度。取对数生长期的 NIH/3T3 细胞,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养液配制成 7.0×10^4 /mL 的细胞悬液,接种于 96 孔细胞培养板,每孔 100 μ L,培养 24 h 后弃去上清;加入 100 μ L 含 0.4% 胎牛血清的 DMEM 维持培养液,培养 24 h 后弃去上清;依次加入用维持培养液稀释的标准品和供试品,培养 72 h 后每孔加 20 μ L MTS 培养 4 h,在酶标仪上于 490 nm 处测

D 值。

1.7 统计学分析

实验数据采用 Graphpad 进行多重 t 检验。

2 结果与分析

2.1 干酪乳杆菌转化子的获得

构建的 pELWH-hEGF 重组质粒结构如图 1 所示,经测序鉴定确保无误。重组质粒电转化干酪乳杆菌后,转化子经 PCR 及测序鉴定确保质粒的导入后,成功构建重组干酪乳杆菌菌株 *L. casei*/pELWH-hEGF。

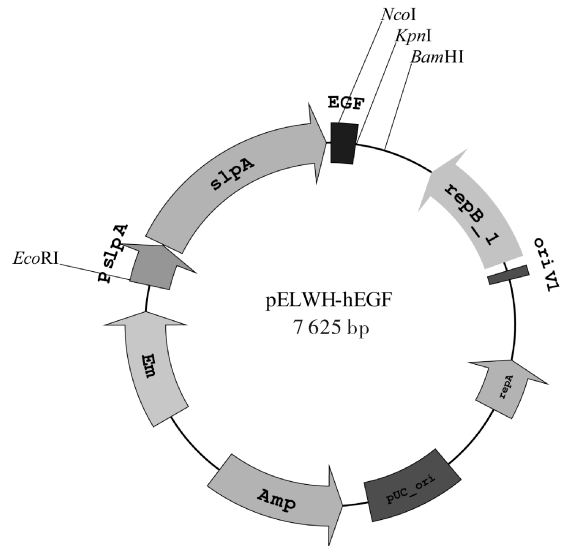


图 1 pELWH-hEGF 的基因图谱

Fig.1 Gene map of pELWH-hEGF

2.2 Western blot 检测 SlpA-hEGF 融合蛋白的表达

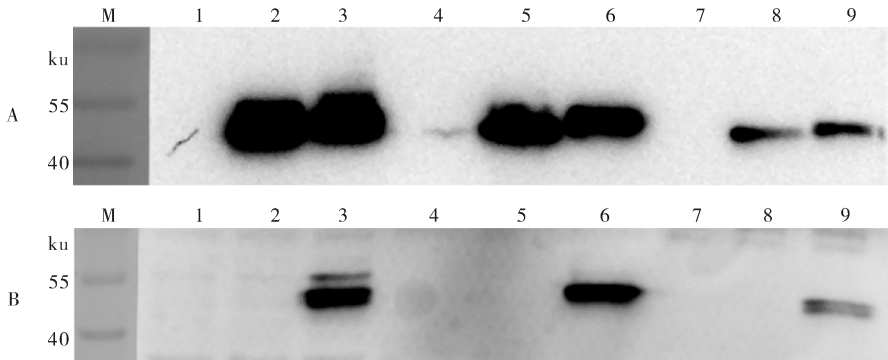
在 *L. casei*/pELWH 培养液上清中可检测到 SlpA 蛋白的特异性条带^[23](图 2A)。转化子 *L. casei*/pELWH-hEGF 在细胞总蛋白、表层蛋白及培养液上清中均能检测到 SlpA-hEGF 融合蛋白,分子量约 55 ku(图 2),表明 SlpA-hEGF 融合蛋白成功表达并分泌到培养液上清中。

用 His-tag 抗体检测胞内总蛋白得到 2 条条带(图 2A),推测分子量较大的蛋白条带是前体蛋白,分子量较小的是切除信号肽的蛋白。用抗 EGF 抗体检测胞内总蛋白,推测分子量较大的蛋白为杂带(图 2B),培养液上清蛋白量少但是因为蛋白种类少,推测为目的蛋白条带。

Western blot 检测结果表明,分泌蛋白表达量

随细胞的生长而逐渐增加,在细胞 $D_{600} = 2.5$ 时达到高峰,并持续到 $D_{600} = 4.8$,到稳定期后蛋白积累

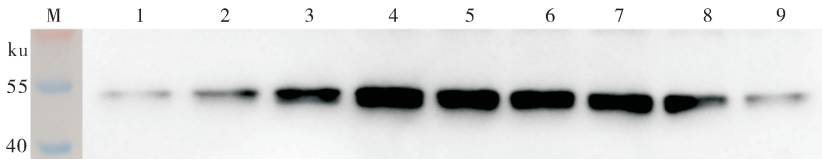
量下降(图 3),这与 β -1,4-甘露聚糖酶的表达模式相似。



A: His-tag 抗体检测。M: 蛋白 marker; 1-3: *L. casei*、pELWH、pELWH-hEGF 细胞总蛋白; 4-6: *L. casei*、pELWH、pELWH-hEGF 表层蛋白; 7-9: *L. casei*、pELWH、pELWH-hEGF 培养液上清蛋白。B: 抗 EGF 抗体检测。M: 蛋白 marker; 1-3: *L. casei*、pELWH、pELWH-hEGF 细胞总蛋白; 4-6: *L. casei*、pELWH、pELWH-hEGF 表层蛋白; 7-9: *L. casei*、pELWH、pELWH-hEGF 培养液上清蛋白。A: His-tag antibody detection. M: Protein marker; 1-3: Whole cell protein of *L. casei*, pELWH and pELWH-hEGF; 4-6: Surface layer protein of *L. casei*, pELWH and pELWH-hEGF; 7-9: Supernatant of *L. casei*, pELWH and pELWH-hEGF. B: Anti-EGF antibody detection. M: Protein marker; 1-3: Whole cell protein of *L. casei*, pELWH and pELWH-hEGF; 4-6: Surface layer protein of *L. casei*, pELWH and pELWH-hEGF; 7-9: Supernatant of *L. casei*, pELWH and pELWH-hEGF.

图 2 His-tag 抗体(A)和抗 EGF 抗体(B)检测 SlpA-hEGF 在干酪乳杆菌 MCJΔ1 中的表达

Fig.2 Expression of SlpA-hEGF in *L. casei* MCJΔ1/pELWH-hEGF detected by His-tag antibody (A) and anti-EGF antibody (B)



M: Marker; 1-9: $D_{600} = 0.9, 1.3, 1.9, 2.5, 3.4, 4.1, 4.8, 5.4$ and 6.1.

图 3 SlpA-hEGF 在干酪乳杆菌 MCJΔ1 的分泌表达(抗 EGF 抗体)

Fig.3 Secretory expression of SlpA-hEGF in *L. casei* MCJΔ1 (Anti-EGF antibody)

2.3 间接免疫荧光检测 SlpA-hEGF 融合蛋白的表达

在重组干酪乳杆菌 *L. casei*/pELWH-hEGF 中检测到菌体表面的绿色荧光,在宿主菌 *L. casei* MCJΔ1 及空载菌 *L. casei*/pELWH 中未检测到绿色荧光。结果表明,SlpA-hEGF 融合蛋白在干酪乳杆菌中得到表达(图 4G, D)。

2.4 融合蛋白对 NIH/3T3 细胞的增殖效果

随着 hEGF 标准品质量浓度的增加,细胞增殖效果越明显,在 10 ng/mL 时达到饱和,更高的质量浓度下细胞数量不再继续上升(图 5A)。

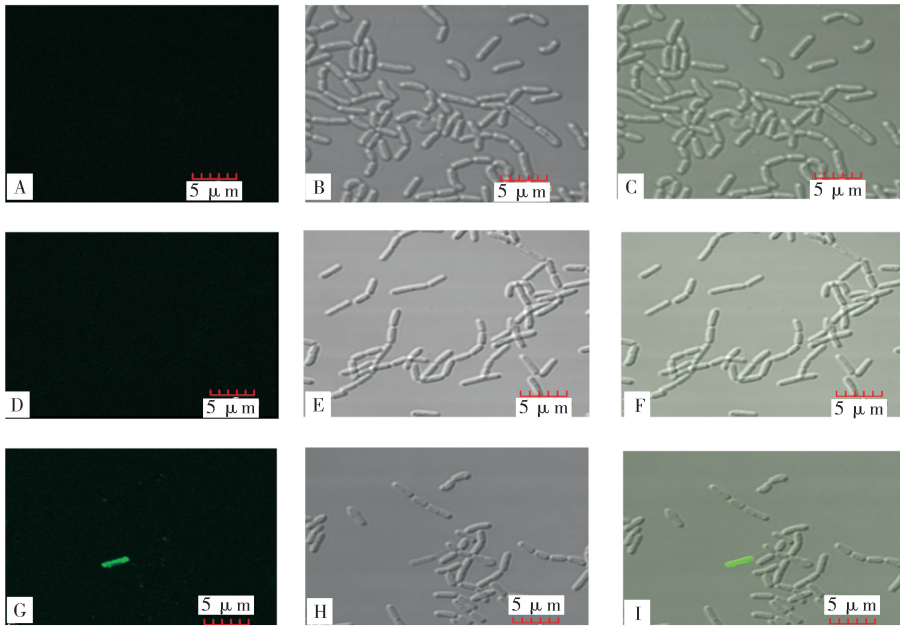
未稀释的培养基酸度太高,直接加入后细胞无法生长,故用维持培养液以 2 倍稀释得到不同稀释倍数的上清液。结果表明,表达的融合蛋白能促进

细胞增殖(图 5B),稀释 10 倍的 *L. casei*/pELWH-hEGF 上清的增殖效果与 10 ng/mL 的 EGF 标品效果相同。

在 *L. casei* MCJΔ1 和 *L. casei*/pELWH 中也观察到了显著的促细胞增殖现象,且两者没有差别(图 5C),推测 *L. casei* MCJΔ1 菌株的代谢产物能促进细胞的增殖。

3 讨论

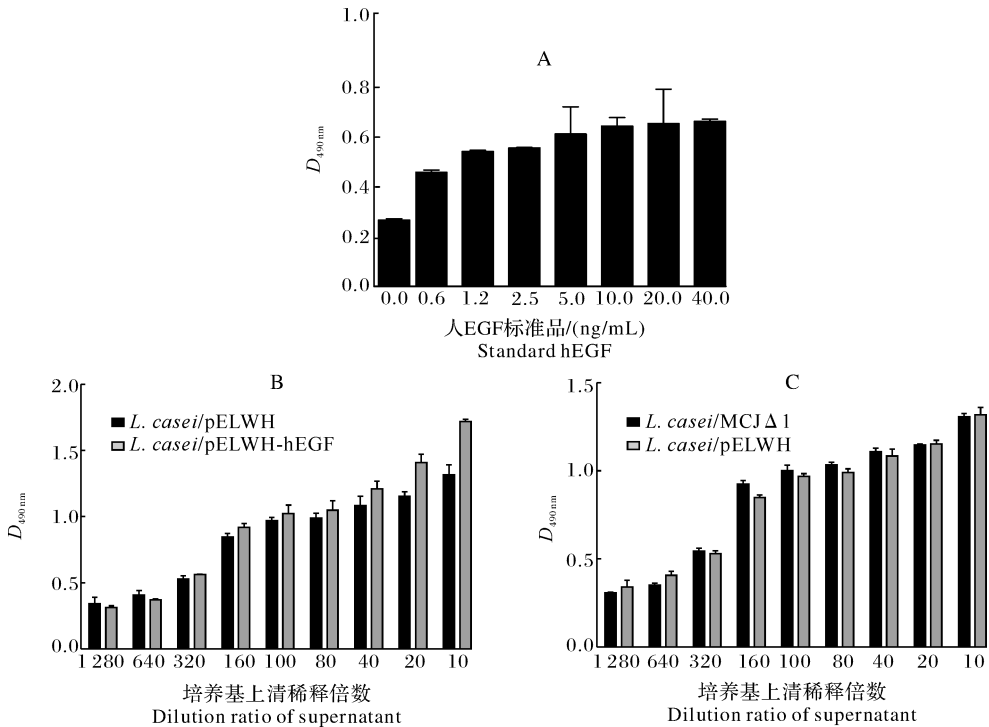
小肠及结肠的上皮细胞是营养吸收主要场所,也是抵御病原入侵的重要防线。肠道感染通常会造造成上皮细胞的损伤,是导致感染性腹泻的重要原因。研究表明,干酪乳杆菌、嗜酸乳杆菌能有效缓解或治愈这类疾病^[25],其机制包括微生态位的竞



A,B,C: *L. casei* MCJ Δ 1 荧光图、明场图、叠加图; D,E,F: pELWH 荧光图、明场图、叠加图; G,H,I: pELWH-hEGF 荧光图、明场图、叠加图。A,B,C: Fluoro, bright and overlay image of *L. casei* MCJ Δ 1; D,E,F: Fluoro, bright and overlay image of *L. casei*/pELWH; G,H,I: Fluoro, bright and overlay image of pELWH-hEGF.

图 4 融合蛋白间接免疫荧光图

Fig.4 Indirect immunofluorescent assay of fusion protein



A: EGF 标品的增殖效果; B: *L. casei*/pELWH-hEGF 的增殖效果; C: *L. casei* MCJ Δ 1 及 *L. casei*/pELWH 增殖效果比较。A: Proliferative effect of standard hEGF; B: Proliferative effect of *L. casei*/pELWH-hEGF; C: Comparison of the supernatant of *L. casei* MCJ Δ 1 and *L. casei*/pELWH.

图 5 NIH/3T3 的细胞增殖效果

Fig.5 Cell poliferation on NIH/3T3

争、产生的乳酸及蛋白等代谢产物激活表皮生长因子受体(EGFR)^[26]。EGF与嗜酸乳杆菌一起服用能降低实验动物艰难梭菌感染^[20],但过量EGF刺激会增加细胞癌变的风险^[27],因此,适量的EGF是配合治疗的关键。

表层蛋白(surface layer protein, SLP)是古菌及革兰氏阳性菌细胞的外表面蛋白,在革兰氏阳性菌中,表层蛋白还介导了细菌对宿主细胞的粘附^[28]。借助于SlpA蛋白作为信号,可以将目标蛋白定位表达于细胞表面和上清中。本研究在重组干酪乳杆菌中进行了人表皮生长因子的表达,利用SlpA将重组人表皮生长因子同时定位在干酪乳杆菌细胞表面并有效分泌,融合蛋白在体外具有良好的生物活性。Lee等^[29]将SARS-CoV S基因通过多聚谷氨酸合成酶A蛋白(pgsA)锚定到干酪乳杆菌细胞表面进行展示表达,在血清中产生明显的免疫应答,检测到高水平的抗SARS的特异性IgG抗体。同样的,SlpA-hEGF融合蛋白显著促进细胞增殖。此外,*L. casei*/pELWH-hEGF上清能刺激小鼠肠道绒毛的发育(数据未显示)。

干酪乳杆菌的培养液上清也能显著促进底物细胞的增殖。Wang等^[26]研究表明来源于鼠李糖乳杆菌的p40蛋白,能激活肠道上皮细胞的EGFR受体。除p40外,p75也被证实是鼠李糖乳杆菌的益生因子,p40及p75均存在干酪乳杆菌、副干酪乳杆菌及鼠李糖乳杆菌中^[30]。这些细胞外蛋白有可能对底物细胞的增殖起促进作用。本研究结果表明嗜酸乳杆菌表层蛋白SlpA对调节细菌的免疫刺激活动具有重要作用,具有帮助宿主抵御病原菌和响应感染的作用。Sergey等^[31]研究了SlpA蛋白对树突状细胞及T细胞功能的调节,证实SlpA能够直接或间接地消除病原体在宿主免疫系统引起的不利影响。Sahay等^[32]报道了SlpA蛋白能用于治疗人体肠道紊乱。但本研究发现干酪乳杆菌表达的SlpA蛋白对上皮细胞的生长并没有促进作用。笔者所在实验室构建的pELWH载体有很高的分泌效率,空载SlpA蛋白表达量很高,但本研究中细胞实验的结果表明,高表达的SlpA蛋白并不能刺激细胞的生长,这可能是因为干酪乳杆菌表达的SlpA蛋白结构发生了某种变化导致其益生作用减弱或消失,或者是干酪乳杆菌缺少嗜酸乳杆菌的某种特异性因子,该因子能够与SlpA蛋白结合,发挥SlpA的益

生作用^[33],又或者是我们所用的干酪乳杆菌的代谢产物对刺激细胞生长效果显著,由于饱和效应的存在,掩盖了SlpA蛋白的益生作用。

本研究中干酪乳杆菌表达的SlpA未被证实有益生功能,但SlpA有作为干酪乳杆菌表面展示传递介质的潜能。Lin等^[34]用*ManB*作为报告基因验证了SlpA作为干酪乳杆菌表面展示传递介质的有效性,可能由于*ManB*蛋白分子质量较大导致SlpA蛋白的空间结构的改变,遭到了宿主细胞的降解,导致SlpA-*ManB*融合蛋白表达量较低。本研究中SlpA-hEGF融合蛋白与对照的表达量几乎相当,说明SlpA在介导小分子蛋白的表面展示方面可能会更具有优势。用SlpA的信号肽构建的pELSPH载体也可完成蛋白的分泌表达,但并不高效^[34]。有理由推测SlpA蛋白中还存在与蛋白识别、转运和分泌相关的模体,找出这个模体,或许能实现异源蛋白在干酪乳杆菌中的高效表达,这是我们下一步要研究的方向。

致 谢 感谢中国科学院武汉病毒研究所及华中农业大学动物医学院对细胞实验的支持与帮助。

参 考 文 献

- [1] CARDILE S, ALTERIO T, ARRIGO T, et al. Role of prebiotics and probiotics in pediatric diseases[J]. *Minerva pediatrica*, 2016, 68(6): 487-497.
- [2] MARAGKOUKAKIS P A, CHINGWARU W, GRADISNIK L, et al. Lactic acid bacteria efficiently protect human and animal intestinal epithelial and immune cells from enteric virus infection[J]. *International journal of food microbiology*, 2010, 141(S1): 91-97.
- [3] MAJAMAA H, ISOLAURI E, SAXELIN M, et al. Lactic acid bacteria in the treatment of acute rotavirus gastroenteritis[J]. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 1995, 20(3): 333-338.
- [4] GALDEANO C M, PERDIGON G. The probiotic bacterium *Lactobacillus casei* induces activation of the gut mucosal immune system through innate immunity[J]. *Clinical and vaccine immunology*, 2006, 13(2): 219-226.
- [5] VITINI E, ALVAREZ S, MEDINA M, et al. Gut mucosal immunostimulation by lactic acid bacteria[J]. *Biocell: official journal of the Sociedades Latinoamericanas de Microscopia Electronica et al*, 2000, 24(3): 223-232.
- [6] SATO H, TORIMURA M, KITAHARA M, et al. Character-

- ization of the *Lactobacillus casei* group based on the profiling of ribosomal proteins coded in S10-spc-alpha operons as observed by MALDI-TOF MS[J]. *Syst Appl Microbiol*, 2012, 35 (7): 447-454.
- [7] DOUILLARD F P, KANT R, RITARI J, et al. Comparative genome analysis of *Lactobacillus casei* strains isolated from Actimel and Yakult products reveals marked similarities and points to a common origin[J]. *Microbial biotechnology*, 2013, 6 (5): 576-587.
- [8] ALMEIDA C C, LORENA S L S, PAVAN C R, et al. Beneficial effects of long-term consumption of a probiotic combination of *Lactobacillus casei* shirota and bifidobacterium breve Yakult may persist after suspension of therapy in lactose-intolerant patients[J]. *Nutr Clin Pract*, 2012, 27(2): 247-251.
- [9] MCFARLAND L V. Evidence-based review of probiotics for antibiotic-associated diarrhea and *Clostridium difficile* infections[J]. *Anaerobe*, 2009, 15(6): 274-280.
- [10] ISOLAURI E, JUNTUNEN M, RAUTANEN T, et al. A human *Lactobacillus* strain (*Lactobacillus casei* sp strain GG) promotes recovery from acute diarrhea in children[J]. *Pediatrics*, 1991, 88(1): 90-97.
- [11] SEEGER S J, F M L. Lactobacilli as live vaccine delivery vectors: progress and prospects[J]. *Trends Biotechnol*, 2002, 20(12): 508-515.
- [12] ADACHI K, KAWANA K, YOKOYAMA T, et al. Oral immunization with a *Lactobacillus casei* vaccine expressing human papillomavirus (HPV) type 16 E7 is an effective strategy to induce mucosal cytotoxic lymphocytes against HPV16 E7[J]. *Vaccine*, 2010, 28(16): 2810-2817.
- [13] KUIPERS O P, BEERTHUYZEN M M, DE RUYTER P G, et al. Autoregulation of nisin biosynthesis in *Lactococcus lactis* by signal transduction[J]. *The journal of biological chemistry*, 1995, 270(45): 27299-27304.
- [14] SUN Z, KONG J, KONG W. Characterization of a cryptic plasmid pD403 from *Lactobacillus plantarum* and construction of shuttle vectors based on its replicon[J]. *Molecular biotechnology*, 2010, 45(1): 24-33.
- [15] AN H Y, MIYAMOTO T. Cloning and sequencing of plasmid pLC494 isolated from human intestinal *Lactobacillus casei*: construction of an *Escherichia coli*-*Lactobacillus* shuttle vector[J]. *Plasmid*, 2006, 55(2): 128-134.
- [16] MARELLI B, PEREZ A R, BANCHIO C, et al. Oral immunization with live *Lactococcus lactis* expressing rotavirus VP8 subunit induces specific immune response in mice[J]. *Journal of virological methods*, 2011, 175(1): 28-37.
- [17] CORTES-PEREZ N G, BERMUDEZ-HUMARAN L G, LE LOIR Y, et al. Mice immunization with live lactococci displaying a surface anchored HPV-16 E7 oncoprotein[J]. *FEMS microbiology letters*, 2003, 229(1): 37-42.
- [18] CHEN Z, LIN J, MA C, et al. Characterization of pMC11, a plasmid with dual origins of replication isolated from *Lactobacillus casei* MCJ and construction of shuttle vectors with each replicon[J]. *Applied microbiology and biotechnology*, 2014, 98 (13): 5977-5989.
- [19] GREGORY H. Isolation and structure of urogastrone and its relationship to epidermal growth factor[J]. *Nature*, 1975, 257 (5524): 325-327.
- [20] KAUR S, VAISHNAVI C, PRASAD K K, et al. Effect of *Lactobacillus acidophilus* & epidermal growth factor on experimentally induced *Clostridium difficile* infection[J]. *The Indian journal of medical research*, 2011, 133: 434-441.
- [21] 钟泽民, 赖强, 余希尧, 等. 猪表皮生长因子在植物乳杆菌中的表达及其活性检测[J]. *生物工程学报*, 2015, 31(9): 1325-1334.
- [22] 王定越. 重组猪 EGF 乳酸乳球菌的构建及其对早期断奶仔猪肠道健康的影响[D]. 雅安: 四川农业大学, 2013.
- [23] LIN J, ZOU Y, MA C, et al. Heterologous expression of mannanase and developing a new reporter gene system in *Lactobacillus casei* and *Escherichia coli*[J]. *PLoS One*, 2015, 10(11): e0142886.
- [24] HORTON R M, HUNT H D, HO S N, et al. Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension[J]. *Gene*, 1989, 77(1): 61-68.
- [25] GUANDALINI S. Probiotics for prevention and treatment of diarrhea[J]. *Journal of clinical gastroenterology*, 2011, 45(Sup): 149-153.
- [26] WANG L, CAO H, LIU L, et al. Activation of epidermal growth factor receptor mediates mucin production stimulated by p40, a *Lactobacillus rhamnosus* GG-derived protein[J]. *The journal of biological chemistry*, 2014, 289(29): 20234-20244.
- [27] WANG Y, TIAN T, HU Z, et al. EGF promoter SNPs, plasma EGF levels and risk of breast cancer in Chinese women[J]. *Breast cancer research and treatment*, 2008, 111(2): 321-327.
- [28] JAKAVA-VIJANEN M, PALVA A. Isolation of surface (S) layer protein carrying *Lactobacillus* species from porcine intestine and faeces and characterization of their adhesion properties to different host tissues[J]. *Vet Microbiol*, 2007, 124(3/4): 264-273.
- [29] LEE J S, POO H, HAN D P, et al. Mucosal immunization with surface-displayed severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein on *Lactobacillus casei* induces neutralizing antibodies in mice[J]. *Journal of virology*, 2006, 80(8): 4079-4087.
- [30] BAUERL C, PEREZ-MARTINEZ G, YAN F, et al. Functional analysis of the p40 and p75 proteins from *Lactobacillus casei* BL23[J]. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 2010, 19(4): 231-241.
- [31] SERGEY R K, SMIDT H, DE-VOS W M, et al. S layer protein A of *Lactobacillus acidophilus* NCFM regulates immature dendritic cell and T cell functions[J]. *Proceedings of the Na-*

tional Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(49): 19474-19479.

[32] SAHAY B, GE Y, COLLIUO N, et al. Advancing the use of *Lactobacillus acidophilus* surface layer protein A for the treatment of intestinal disorders in humans[J]. Gut microbes, 2015, 6(6): 392-397.

[33] BUCK B L, ALTERMANN E, SVINGERUD T, et al. Function-

al analysis of putative adhesion factors in *Lactobacillus acidophilus* NCFM[J]. Applied and environmental microbiology, 2005, 71(12): 8344-8351.

[34] LIN J, ZOU Y, MA C, et al. Construction and characterization of three protein-targeting expression system in *Lactobacillus casei*[J]. FEMS microbiology letters, 2016, 363(7): fnw041. doi: 10.1093/femsle/fnw041.

Expression of human epidermal growth factor fusion protein in *Lactobacillus casei*

WANG Shuqing GE Xiangyang CHEN Zhengjun

State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract *Lactobacillus casei* is a probiotic that can colonize in animal intestines. The recombinant *L. casei* was constructed to express human epidermal growth factor (hEGF) and to test if the bacterium has the potential of being used as live bacterial vector to express specific protein *in situ* to stimulate mucosal immunity. The hEGF was synthesized through splicing overlapping extension PCR (SOE PCR), and cloned into the LAB surface exhibition vector pELWH, yielding pELWH-hEGF. The plasmid resulted was electroporated into *L. casei* MCJ Δ 1. Transformants were then analyzed by Western blot and indirect immunofluorescent assay. Cell proliferation assay was used to investigate the bioactivity of hEGF expressed in *L. casei*. SlpA-hEGF fusion protein on the cell surface and in the supernatant was detected. The molecular weight of the SlpA-hEGF fusion protein was estimated to be approximately 55 ku. The result of cell proliferation assay showed that the SlpA-hEGF fusion protein and the supernatant can stimulates the proliferation of NIH/3T3 cells dramatically. It will lay the foundation for *L. casei* having the potential of being an excellent live vector for protein delivery.

Keywords *Lactobacillus casei*; hEGF; SlpA-hEGF fusion protein; cell proliferation

(责任编辑:张志钰)