

艰难梭菌鞭毛帽蛋白的功能研究

王德慧^{1,2}, 谭林林², 王琴², 陈芳红², 李涛², 王慧²

摘要 目的 验证艰难梭菌鞭毛帽蛋白 FliD 的黏附细胞活性以推测其在艰难梭菌感染中的作用,并鉴定其抗原性以测试其应用于候选艰难梭菌疫苗组分的可能性。方法 PCR 获取 VPI 10463 全长 *fliD* 基因,构建 pET-22b-*fliD* 原核表达质粒,转化至 BL21 (DE3) 中,诱导表达, Ni²⁺ 亲和层析纯化,进行 N 端测序验证。蛋白 3 次皮下免疫大耳白兔后间接 ELISA 法检测其血清特异 IgG 水平并鉴定抗原性。间接免疫荧光染色后流式细胞术检测黏附 Vero 细胞能力。结果 VPI10463 的 *fliD* 基因均克隆成功,与 GenBank 公布的其他 9 株艰难梭菌的 *fliD* 基因相似度在 89% ~ 100%。pET-22b-*fliD* 表达质粒构建成功,表达蛋白大小为 56 ku, N 端测序序列为 MSSIS,与预期一致。一步纯化得到的蛋白纯度为 99% 以上。ELISA 检测 3 次免疫后效价达到 10⁵。用流式细胞术检测其可以黏附在 Vero 细胞表面。结论 构建的 pET-22b-*fliD* 表达质粒成功表达 FliD,具有黏附细胞活性,在艰难梭菌感染过程中起黏附因子作用,其具有较高的抗原性可以作为预防艰难梭菌感染的候选抗原之一。

关键词 艰难梭菌;鞭毛帽蛋白 FliD;重组表达;流式细胞术;黏附因子

中图分类号 R 378.8;Q 812

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)11-1582-05

艰难梭菌是 25% 抗生素相关性腹泻 (antibiotics associated diarrhea, AAD) 的病因,也是发病率第二的肠道感染菌^[1]。抑制艰难梭菌的黏附是控制感染的有效手段。鞭毛的黏附作用增强细菌的致病性^[2],但其在艰难梭菌中的作用还不明确。Baban et al^[3] 的研究认为鞭毛的结构而不是运动性是艰难梭菌黏附所需。鞭毛帽蛋白 FliD 是鞭毛钩状体的亚单位蛋白 2 (flagellar hook-associated protein 2, HAP2), Tasteyre et al^[4] 采用 Dot blot 和放射性标记方法, Dingle et al^[5] 采用诱导突变株方法获得了

FliD 黏附功能的证据,同时还认为 FliD 在不同艰难梭菌株中的黏附能力不等,使细菌的毒力液发生了变化。笔者构建了重组质粒,在大肠杆菌中表达 FliD 蛋白,证明其具有良好抗原性,并首次利用流式细胞技术验证其黏附细胞活性,证明 FliD 参与了艰难梭菌的黏附,为艰难梭菌感染提供一个可能策略。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒、细胞和动物 艰难梭菌 VPI 10463 (ATCC 43255) 购自美国模式菌种保藏中心 (American Type Culture Collection, ATCC), 大肠杆菌菌株 DH 5 α 和 BL21 (DE3) 及 pEASY-T1 Simple 克隆载体购自北京全式金生物技术公司;质粒 pET-22b (+)、非洲绿猴肾细胞 (Vero) 均由本实验室保存;新西兰大耳白兔 (雌性 2.5 kg) 购自军事医学科学院实验动物中心。

1.1.2 主要试剂和仪器 脑心浸液 (干粉) 购自美国 BD 公司;LB 培养基 (干粉) 购自英国 OXOID 公司;抗生素和 DMEM 培养基购自美国 Thermo Scientific 公司;限制性核酸内切酶和 T4 DNA 连接酶购自美国 New England Biolab 公司;TransTaq High Fidelity DNA 聚合酶、TMB 显色试剂盒、Goat Anti-Rabbit IgG (HRP Conjugate) 均购自北京全式金生物技术或北京康为世纪生物科技公司;Wizard 基因组 DNA 纯化试剂盒购自北京 Promega 公司;质粒提取试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司;琼脂糖凝胶回收试剂盒购自北京博迈德生物技术公司;完全弗氏佐剂和不完全弗氏佐剂购自德国 Sigma 公司;胎牛血清购自德国 Biochorm 公司;His-Tag Rabbit mAb 购自美国 Cell Signalling 公司;Goat anti-Rabbit IgG-PE 购自美国 Santa Cruz 公司;HisTrap FF crude 5 ml 蛋白层析柱购自美国 GE (北京) 公司。厌氧培养箱购自上海康华生化仪器公司;PCR 仪购自美国 Thermo Scientific 公司;凝胶图像分析仪购自美国 BIO-RAD 公司;超声波细胞破碎仪购自宁波新芝公司。

1.2 方法

1.2.1 目的基因的获得 艰难梭菌 VPI 10463 接种于脑心浸液培养基中,37 °C 厌氧培养过夜。按照

2014-05-19 接收

基金项目: 北京自然科学基金 (编号:7122134); 国家重大科技专项 重大新药创制 (编号:2013ZX09304101)

作者单位:¹ 安徽医科大学军事医学科学院微生物流行病学研究所微生物组学与生物信息学研究室,合肥 230032

² 军事医学科学院微生物流行病学研究所病原微生物生物安全国家重点实验室,北京 100071

作者简介:王德慧,女,硕士研究生;

王慧,女,研究员,博士生导师,责任作者, E-mail: gene0109@vip.sina.com

Wizard 基因组 DNA 纯化试剂盒说明书提取基因组 DNA。参考 GenBank 收录的艰难梭菌 630 的 *fliD* 基因序列 利用 Primer premier 5.0 软件设计引物,上游引物 *fliD*-F: 5'-CATATGTC AAGTATAAGTCCAGTA-AGAGTT-3' (下划线标注 Nde I 酶切位点),下游引物 *fliD*-R: 5'-CTCGAGATTACCTTGTGCTTGTGAG-3' (下划线标注 Xho I 酶切位点),引物由北京天一辉远生物公司合成。PCR 扩增条件:94 °C 5 min,94 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 1 min,35 个循环;72 °C 终延伸 10 min。琼脂糖凝胶回收试剂盒回收扩增产物。

1.2.2 重组质粒的构建 将纯化回收的目的基因 30 ng 与 1 μl pEASY-T1 Simple 克隆载体混合 25 °C 反应 15 min 转化 DH 5α。PCR 鉴定的阳性克隆送上海生工公司测序。测序正确的质粒用 Nde I 和 Xho I 37 °C 双酶切,回收的目的基因片段与同样双酶切并回收的 pET-22b (+) 用 T4 连接酶 16 °C 连接过夜,转化 DH 5α,PCR 鉴定阳性的克隆提取质粒进行双酶切鉴定和测序。

1.2.3 重组质粒的表达 将测序正确的表达质粒转入 BL21 (DE3),挑取 PCR 鉴定阳性的克隆接种 LB 培养基(含终浓度 100 μg/ml 氨苄青霉素),37 °C 200 r/min 培养至 OD₆₀₀ 为 0.8,加入终浓度 0.1 mmol/L 的 IPTG 37 °C 诱导 3 h,4 °C、13 000 r/min 离心 5 min 富集菌体,10 mmol/L PBS (pH 7.2) 重悬,15% 分离胶,5% 浓缩胶,SDS-PAGE 鉴定全菌体蛋白表达情况。超声破碎细胞,4 °C、13 000 r/min 离心 5 min,分别收集上清液沉淀,SDS-PAGE 分析蛋白表达形式。

1.2.4 目的蛋白的纯化和保存 大量提取蛋白时采用 30 °C 过夜培养,其他条件不变。4 °C、8 000 r/min 离心 15 min 收集菌体,用结合缓冲液 Buffer A (含 20 mmol/L 磷酸钠,40 mmol/L 咪唑,500 mmol/L 氯化钠,pH 7.4) 重悬后超声破碎细胞,离心后的上清液上 HisTrap FF crude 5 ml 预装柱纯化,Buffer A 平衡,洗脱缓冲液 Buffer B (含 20 mmol/L 磷酸钠,400 mmol/L 咪唑,500 mmol/L 氯化钠,pH 7.4) 洗脱。SDS-PAGE 分析目的蛋白的纯度,收集合并含目的蛋白的洗脱液透析至 20 mmol/L PB (pH 7.2) 中,-20 °C 保存。

1.2.5 目的蛋白的 N 端测序 纯化的蛋白送军事医学科学院仪器测试分析中心对 N 端 5 个氨基酸测序。

1.2.6 目的蛋白抗原性的鉴定 第 0 天,将 0.5 mg FliD (透析于 10 mmol/L PBS) 与完全弗氏佐剂充分乳化后进行首次免疫,采用皮下多点注射方式

(后同)。第 20 天和第 40 天,分别将 1.0 mg FliD 与不完全弗氏佐剂充分乳化后免疫,第 47 天耳缘静脉采血 ELISA 检测抗体水平,第 48 天心脏采血。

1.2.7 流式细胞术检测 FliD 的细胞黏附活性 将 0.25% 胰酶消化后的 Vero 细胞离心去培养基,PBS 清洗两次并重悬;将 20 μg FliD (透析于 10 mmol/L PBS 并过滤除菌) 与 10⁶ 个 Vero 细胞 (总体积 500 μl) 混匀后于 4 °C 孵育 1 h;离心沉淀用含 2% BSA 的 PBS (以下简称 PBA) 洗涤 3 次;加入 PBA 稀释的 His-Tag Rabbit 单抗 (稀释比例 1:400) 500 μl 吹打混匀,室温孵育 25 min;离心沉淀用 PBA 洗涤 3 次;加入 PBA 稀释的 Goat anti-Rabbit IgG-PE (稀释比例 3:1 000) 500 μl 吹打混匀,室温避光孵育 25 min;离心沉淀用预冷 PBS 洗涤 3 次,PBS 重悬,同时设置多组对照 (空白对照指空白 Vero 细胞,空白对照 + PE 为 Vero 细胞与实验组等量 Goat anti-Rabbit IgG-PE 孵育,空白对照 + His + PE 为 Vero 细胞与实验组等量 His-Tag Rabbit 和 Goat anti-Rabbit IgG-PE 孵育) 送北京茂扬生物技术有限公司流式细胞仪检测,检测 5 × 10⁴ 个细胞。

2 结果

2.1 目的基因 *fliD* 的提取 PCR 扩增得到了 VPI 10463 的 *fliD* 基因,产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,可见 1 530 bp 的明亮条带,见图 1,与预期大小 (含酶切位点碱基) 一致。连接 pEASY T1 Simple 载体后测序结果显示 ORF 通读,与 GenBank 公布全 FliD 序列的 9 株菌 Blast 比对,碱基相似度在 89% ~ 100%,见表 1。

2.2 重组质粒 pET-22b-*fliD* 的构建 pET-22b-*fliD* 质粒双酶切鉴定结果见图 2,酶切出大小分别为 1 530 bp 的 *fliD* 片段和 5 370 bp 的 pET-22b 黏性片段,酶切的 *fliD* 与 pET-22b-*fliD* 质粒 PCR 产物大小一致。测序结果显示,与 pEASY-T1 Simple 载体上的连接片段序列完全一致。

2.3 重组蛋白 FliD 的表达 含有重组质粒的 BL21 (DE3) 经 IPTG 诱导后,与诱导之前相比有明显蛋白表达,见图 3A。用 Bio-Rad 的 1D 凝胶分析软件 Quantity One 分析得到蛋白分子为 56.3 ku,与预期大小基本一致,预测等电点为 4.88,与 Genbank 中的 FliD 氨基酸相似度为 88% ~ 100%,见表 1。超声后 FliD 主要在上清液中存在,即以可溶的天然活性状态存在,见图 3B。

2.4 重组蛋白 FliD 的纯化 诱导后富集的表达细胞经超声破碎获得含目的蛋白的上清液,再进一步

表1 目的基因序列及翻译后氨基酸序列 Blast 结果

菌株	序列号		相似度		蛋白质性质	
	基因	蛋白	碱基序列	氨基酸序列	MW(ku)	pI(预测)
ATCC43593	AF297026.1	AAK18786.1	1 521/1 521(100%)	507/507(100%)	56.4	4.88
ATCC43594	AF297025.1	AAK18785.1	1 521/1 521(100%)	507/507(100%)	56.4	4.88
EX482	AF297028.1	AAK18788.1	1 507/1 521(99%)	502/507(99%)	56.3	4.93
BII	12216079	YP_006197421.1	1 504/1 521(98%)	501/507(99%)	56.3	4.93
R20291	8469766	YP_003216746	1 504/1 521(98%)	501/507(99%)	56.3	4.93
CD196	8466117	CBA60504.1	1 504/1 521(98%)	501/507(99%)	56.3	4.93
630	4916755	YP_001086705	1 363/1 521(89%)	449/507(89%)	56.1	5.13
ATCC43596	AF297027.1	AAK18787.1	1 365/1 521(89%)	449/507(89%)	56.1	5.13
79-685	AF297024.1	AAK18784.1	1 362/1 521(89%)	446/507(88%)	56.0	5.73

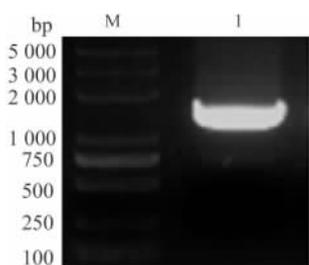


图1 *fliD* 片段 PCR 扩增产物
M: 2 000 bp DNA Marker;1:目的基因 PCR 片段

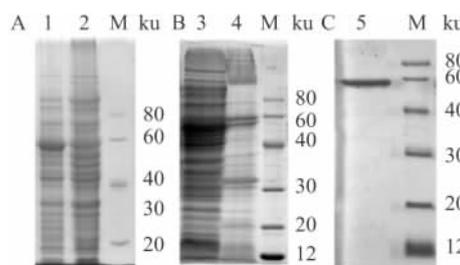


图3 FliD 的表达和纯化

A:FliD 的全菌表达鉴定;B:重组 FliD 表达的可溶性鉴定形式;C:FliD 纯化;1:诱导后全菌;2:未诱导全菌;3:诱导超声破碎后上清;4:诱导超声破碎后沉淀;5:纯化并透析后的蛋白;M:Marker

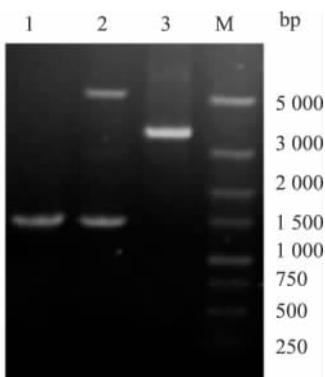


图2 pET-22b-*fliD* 质粒双酶切鉴定

1:pET-22b-*fliD* 质粒 PCR 产物;2:pET-22b-*fliD* 质粒双酶切产物;3:pET-22b-*fliD* 质粒未酶切对照;M:5 000 bp DNA Marker

镍柱亲和纯化,最后用 20 mmol/L PB(pH 7.2)透析后浓度为 0.3 mg/ml。用凝胶分析软件 Quantity One 分析得到透析后的蛋白纯度达 99% 以上,见图 3C。

2.5 目的蛋白的 N 端测序 将纯度 99% 以上、浓度 0.3 mg/ml 透析在 20 mmol/L PB 中的重组蛋白进行 N-端氨基酸序列分析,测得 N 端 5 个氨基酸顺序为 MET-Ser-Ser-Ile-Ser,与预期一致,这在所有艰难梭菌 FliD 蛋白中都是保守的,未发现变异性。

2.6 目的蛋白抗原性的鉴定 按照制备兔多克隆抗体的方法鉴定 FliD 的抗原性,ELISA 法检测 3 次免疫后兔血清中特异抗 FliD 的 IgG 效价为 10^5 ,证明 FliD 具有较高的抗原性,能激发机体的免疫应答。

2.7 目的蛋白黏附功能鉴定 流式细胞仪检测结果显示,与空白对照相比,间接荧光标记细胞表面的 FliD 后,荧光强度有显著增强,表明 FliD 可以黏附在细胞表面,见图 4。

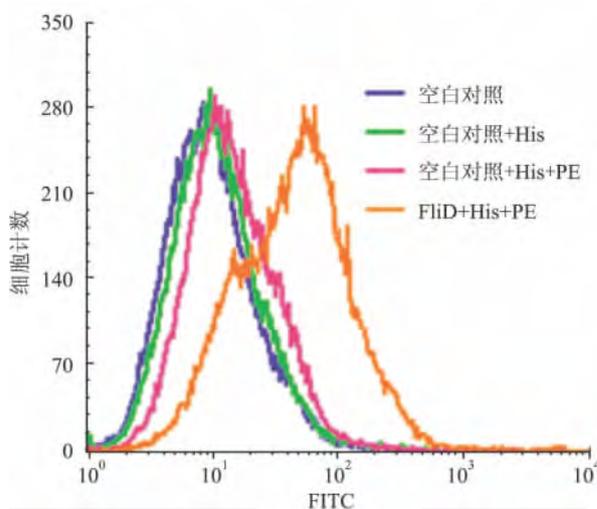


图4 流式细胞术检测 FliD 黏附细胞能力

3 讨论

艰难梭菌感染已经成为一个引人注目的严重的公共卫生问题,每年造成大量的经济损失,成为沉重

的医疗负担^[6],AAD 治疗难^[7]、复发率高^[8],严重时发展成伪膜性肠炎 (pseudomembranous colitis, PMC) 具有一定的致死性。近年来新型强致病株和多重耐药株的出现使其发病率、严重程度和死亡率都在上升^[9],变异的艰难梭菌芽孢形成更多,传染性更强^[10]。因此艰难梭菌感染的预防工作显得更为紧迫和重要。

艰难梭菌的黏附和定植是造成感染的前提,从抑制细菌的黏附寻找突破口可以直接杜绝之后的定植和毒素分泌过程。鞭毛增强了细菌的运动性,使之更容易适应环境,黏附作用还能帮助细菌黏附在黏膜表面而增加致病性,这在某些细菌如空肠弯曲杆菌 (*Campylobacter jejuni*)、霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) 等中已得到确认^[2]。细菌鞭毛蛋白可与 Toll 样蛋白受体 5 结合,进一步激活多种炎症因子,启动炎症级联反应^[11]。

但艰难梭菌鞭毛与其致病性的关系还不能统一而论,通过研究其结构成分鞭毛蛋白 FliC 和鞭毛纤丝远端的帽状结构 FliD 的功能是分析艰难梭菌鞭毛功能的主要方法。多种研究^[12]显示 FliD 可能具有特殊的保守序列,使之发挥吸附特异细胞或黏液受体的作用。艰难梭菌不是侵袭性细菌,只是依靠各种黏附因子黏附在结肠表面,通过毒素侵袭和破坏肠黏膜。与其他细菌不同的是,艰难梭菌的 FliD 蛋白的序列和理化性质在不同菌株中变异很大,最新研究^[4]显示其在不同菌株中的作用不同,如流行株 R20291 缺失 *fliD* 的突变株黏附能力减弱,但普通株 630 的缺失 *fliD* 株黏附能力反而增强。

本研究将经典双产毒艰难梭菌 VPI 10463 的全分子 *fliD* 基因连接到原核表达载体上,利用大肠杆菌表达系统重组表达了 FliD 蛋白,镍亲和层析获得高纯度蛋白用于体外功能实验研究,流式细胞术检测了 FliD 与细胞的黏附能力,显示 FliD 与艰难梭菌的黏附相关。此外获得的蛋白可以稳定保存并具有良好的抗原性,为后续开展以 FliD 为抗原的免疫保护实验,如与毒素抗原混合作为疫苗或作为免疫佐

剂使用等奠定基础,也为艰难梭菌感染的预防工作提供参考。

参考文献

- [1] 田旭,梁兴梅,傅思武. 艰难梭菌相关性腹泻的治疗进展及对我国的启示[J]. 中国微生态学杂志, 2012, 24 (3): 283 - 5.
- [2] Duan Q, Zhou M, Zhu L, et al. Flagella and bacterial pathogenicity[J]. J Basic Microbiol, 2013, 53(1): 1 - 8.
- [3] Baban S T, Kuehne S A, Barketi-khai A, et al. The role of flagella in *Clostridium difficile* pathogenesis: comparison between a non-epidemic and an epidemic strain[J]. PLoS ONE, 2013, 8(9): 1 - 12.
- [4] Tasteyre A, Barc M C, Collignon A, et al. Role of FliC and FliD flagellar proteins of *Clostridium difficile* in adherence and gut colonization[J]. Infect Immun, 2001, 69(12): 7937 - 40.
- [5] Dingle T C, Mulvey G L, Armstrong G D. Mutagenic analysis of the *Clostridium difficile* flagellar proteins, FliC and FliD, and their contribution to virulence in hamsters[J]. Infect Immun, 2011, 79(10): 4061 - 7.
- [6] McGlone S M, Bailey R R, Zimmer S M, et al. The economic burden of *Clostridium difficile* [J]. Clin Microbiol Infect, 2012, 18(3): 282 - 9.
- [7] 刘黎黎,王吉耀. 艰难梭菌相关性腹泻的治疗进展[J]. 中国临床医学, 2010, 17(1): 66 - 8.
- [8] Johnson S. Recurrent *Clostridium difficile* infection: causality and therapeutic approaches [J]. Int J Antimicrob Agents, 2009, 33 Suppl: S33 - 6.
- [9] 曲芬,汤一苇. 艰难梭菌感染的流行状况及诊治进展[J]. 传染病信息, 2010, 23(1): 8 - 10.
- [10] Cairns M D, Stabler R A, Shetty N, et al. The continually evolving *Clostridium difficile* species [J]. Future Microbiol, 2012, 7(8): 945 - 57.
- [11] Means T K, Hayashi F, Smith K D, et al. The Toll-like receptor 5 stimulus bacterial flagellin induces maturation and chemokine production in human dendritic cells[J]. J Immunol, 2003, 170(10): 5165 - 75.
- [12] Tasteyre A, Karjalainen T, Avesani V, et al. Molecular characterization of *fliD* gene encoding flagellar cap and its expression among *Clostridium difficile* isolates from different serogroups [J]. J Clin Microbiol, 2001, 39(3): 1178 - 83.

Study on function of *Clostridium difficile* flagellar cap protein

Wang Dehui^{1,2}, Tan Linlin², Wang Qin², et al

(¹Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032; ²State Key Laboratory of Pathogens and Biosecurity, Beijing Institute of Microbiology and Epidemiology, Beijing 100071)

Abstract Objective To identify the adherence capability and antigenicity of *Clostridium difficile* (*C. difficile*)

^{18}F -FDG PET-CT 显像评估大鼠 C6 胶质瘤放疗早期疗效实验研究

张 雨 徐慧琴 汪 会 余文静 薛杨央 岳 峤

摘要 目的 了解大鼠 C6 胶质瘤放疗前后 ^{18}F -脱氧葡萄糖正电子发射体层显像-X 线计算机断层成像 (^{18}F -FDG PET-CT) 显像特点, 探讨 ^{18}F -FDG PET-CT 评估大鼠 C6 胶质瘤早期放疗疗效价值。方法 建立荷 C6 胶质瘤 SD 大鼠模型, 按随机数字表法分成对照组及放疗组, 两组分别于放疗前及放疗后 24 h、7 d 行 ^{18}F -FDG PET-CT 显像, 采集不同时期大鼠肿瘤最大标准摄取值 ($\text{SUV}_{\text{max-T}}$)、对侧脊柱旁肌肉最大标准摄取值 ($\text{SUV}_{\text{max-M}}$), 计算两者比值 (T/M) 并观察肿瘤体积变化。放疗结束, 取两组肿瘤, 常规 HE 染色, 免疫组织化学法测定肿瘤细胞增殖指数 Ki-67 及微血管密度 (MVD) 表达情况。结果 ① 放疗 24 h T/M 值较放疗前降低 ($t = 5.991$, $P < 0.01$)。对照组 24 h T/M 值较首次显像增高 ($t = 5.196$, $P < 0.01$)。② 放疗 7 d T/M 值较放疗后 24 h ($t = 3.082$,

$P < 0.05$)、放疗前 ($t = 4.822$, $P < 0.01$) 显著降低 ($F = 5.902$, $P < 0.01$)。对照组 7 d T/M 值较 24 h 明显增高 ($t = 3.621$, $P < 0.05$)。③ HE 染色示放疗组较对照组坏死明显, 放疗组 Ki-67 与 MVD 表达水平较对照组明显减低 ($t = 7.201$, 2.986 , $P < 0.01$)。④ T/M 值与 Ki-67 表达呈明显正相关 ($r = 0.824$, $r^2 = 0.679$, $P < 0.05$); T/M 值与 MVD 表达呈正相关 ($r = 0.779$, $r^2 = 0.606$, $P < 0.05$)。结论 ^{18}F -FDG PET-CT 可评估大鼠 C6 胶质瘤放疗早期疗效, 并可反映胶质瘤的增殖活性和血管生成情况。

关键词 脱氧葡萄糖; 发射型计算机体层显像; Ki-67; 微血管密度; C6 胶质瘤; 放射线疗法

中图分类号 R 445.6; R 825.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)11-1586-06

2014-06-30 接收

基金项目: 2013 年卫生部核医学重点实验室江苏省分子核医学重点实验室开放课题 (编号: KF201301)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院核医学科, 合肥 230022

作者简介: 张 雨, 男, 硕士研究生;

徐慧琴, 女, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: hfx-uhuiqin@163.com

放射治疗是脑胶质瘤主要治疗方法之一^[1], 早期有效的疗效评估与胶质瘤预后密切相关。近年来新型分子影像学显像方法正电子发射计算机断层显像 (positron emission computed tomography, PET-CT) 已广泛应用于肿瘤的早期诊断、分期、疗效评估及监测复发等^[2]。 ^{18}F -脱氧葡萄糖 (fluorine-18 fluorodeox-

flagellar cap protein FliD and to investigate its role in *C. difficile* infection and its potentiality to be a candidate vaccine component. **Methods** The full-length *fliD* was amplified by PCR from *C. difficile* strain VPI 10463. The product was cloned into pET-22b, and the recombinant plasmid was transformed into *E. coli* BL21 (DE3) strains, positive clones were induced by isopropyl- β -thio- β -galactopyranoside (IPTG) to express. Recombinant protein with His-tag its was purified using Ni^{2+} NTA Sephrose and confirmed by N-terminal sequencing. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was applied to detect specific IgG against FliD in serum of a rabbit which was immunized by three subcutaneous injections. Vero incubated with FliD were detected in a Flow Cytometer (FCM) after indirect immunofluorescence stain to check out adhesion of FliD. **Results** The complete *fliD* gene was amplified from strain VPI10463 with sequence of 89% ~ 100% identity between nine other *C. difficile* strains published in GenBank. The pET-22b-*fliD* recombinant plasmid expressed successfully a protein of 56 ku with the N-terminal sequence MSSIS which exhibited up to 100% identity as predicted. FliD with purity of 99% was obtained by one-step expression. The rabbit developed a titer of 10^5 prominent anti-FliD immunoglobulin G in serum after three immunization. FCM provided the proof for FliD's function as a cell surface-adherence factor. **Conclusion** The recombinant protein FliD of VPI10463 has been expressed by pET-22b-*fliD* plasmid in *E. coli*. The phenomenon that FliD can adhere to Vero *in vitro* confirms its role as an adherence factor in *C. difficile* infection. FliD is high antigenic, in addition, which makes it one of the possible candidate antigen in preventing *C. difficile* infection.

Key words *Clostridium difficile*; flagellar cap protein FliD; recombinant expression; flow cytometry; adherence factor