

克隆毒素源性大肠杆菌K88ac抗原基因

张林元 于公义 潘莲宝 罗清华 李安丽
王光荣 李秀珍 周刊 黄翠芬

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京)

E. coli 79-1454(08:K88ac K31:H⁻) 是北京生物制品检定所从上海郊区腹泻的仔猪分离到的野生型毒素源性大肠杆菌, 该菌产生K88ac抗原, 产生热敏感毒素(LT)和热稳定毒素(ST)。发酵棉子糖, 抗四环素, 含有50Md的大质粒。用碱变性法提取, 以线性CsCl-EB密度梯度离心法纯化大质粒, 用Hind III酶消化, 回收6.5Md的片段, 与载体pBR322连接, 转化到*E. coli* RR1, 选出Ap^r Tc^r的转化子, 用玻片凝集, 琼脂扩散, K88ac抗血清致敏的绵羊红细胞反向间接血凝, 被动溶血, ELISA等方法检测K88ac抗原均为阳性的重组体, 其中一株命名为*E. coli* RR1(pMM031), 酶切图谱表明除含pBR322 DNA的片段外, 还含有约为6.5Md的片段, 此片段是Hind III酶消化大质粒DNA产生的第二条片段, 含有为K88ac抗原基因编码的遗传决定子。用LT基因探针菌落原位杂交, Y-1肾细胞试验等方法检测结果表明重组体不产生LT, 用乳鼠试验及Stb基因探针杂交均是阴性, 说明重组体不产生ST。由此可见重组体产生K88ac抗原, 但无毒性, 有可能用作疫苗株, 也可以与其他因子配伍构建成为更好的活疫苗株。

关键词 ETEC; 克隆K88ac抗原基因

有些大肠杆菌引起人、畜急性腹泻, 其原因是这些大肠杆菌能定居于小肠, 在该处繁殖, 产生肠毒素, 刺激体液分泌, 使电解质平衡失调, 发生水样腹泻, 这类菌称为毒素源性大肠杆菌。

毒素源性大肠杆菌表面有伞毛蛋白, 称定居因子。目前为止, 已发现的有六种免疫学上血清型不同的抗原, 即K88, K99, 987P, F41, CFA I 和 CFA II, 各有宿主特异性, 带前四种抗原的菌会引起幼畜腹泻(猪, 牛, 羊), 后两种能使菌定居于人的肠道中^[1,2],

K88抗原已有详细的研究, 至少有三种不同的抗原变种, 即K88ab, K88ac, K88ad。在我国以K88ac为主, 这三种定居因子均由大质粒携带, 以K88ac抗原免

疫幼畜, 或通过母畜乳使幼畜获得被动免疫可以得到保护。

Shipley最早提出K88抗原为一个分子量是50Md的大质粒携带^[3], 各种不同血清型的K88抗原基因至少存在97%的核苷酸序列同源, 三种抗原基因的酶切片段也近似, K88ac和K88ab的抗原基因分别位于8.2Md和7.7Md的Hind III片段, 把这个片段插到载体pBR322质粒中获得的重组体, 可以制成活菌苗免疫母猪, 能有效地预防仔猪对K88ac抗原阳性致病菌引起的腹泻。

本文于1985年1月29日收到。

本课题受中国科学院科学基金资助。

材料与方法

(一) 细菌菌株和质粒

E. coli RR1 是澳大利亚联邦科学院分子生物学实验室赠送。*E. coli* 79-1454 (08:K88acK31:H⁻) 是北京生物制品检定所, 从上海奉贤腹泻的仔猪分离出的毒素源性大肠杆菌。

(二) 培养基

LB 培养基: 1 l 的液体培养基含蛋白胨 10g, 酵母膏 5g, NaCl 5g, 用 NaOH 调至 pH 7.3, 高压灭菌。固体培养基加青岛产的琼脂粉 1.2%。药物培养基含 Ap 25 µg/ml, Tc 25 µg/ml。抗菌素是上海第四制药厂生产的。

(三) 分离质粒 DNA

粗制质粒 DNA 的提取用 0.4N NaOH 碱变性法^[2]略加修改, 对野生株用 0.4% 脱氧胆酸钠和 0.2% Triton X 100 的混和物裂解细菌, 在加 0.4N NaOH 后经 1.5 min, 加相当于 NaOH 体积的 3 M NaAc pH 4.8 中和, 放置 10 min, 加总体积的碱酚和 1/3 酚体积的氯仿-异戊醇处理, 以乙醇沉淀 DNA。pBR322 和重组体质粒的提取均经氯霉素扩增。粗制质粒 DNA 再用线性 CsCl-EB 密度梯度离心法纯化^[3]。

(四) 琼脂糖凝胶电泳

用水平有机玻璃电泳槽, 0.7% 的琼脂糖。电泳缓冲液: 40 mM Tris, 5 mM NaAc, 2 mM EDTA pH 8.0。低熔点琼脂糖按 Maniatics 等人的方法进行^[8]。

(五) 限制性酶消化与克隆

用 Hind III 酶完全消化大质粒 DNA, 从低熔点琼脂糖凝胶上回收 6.5 Md 的片段, 与同种酶消化的, 又用碱性磷酸胆脂酶处理的 pBR322 连接^[11], 0.5 µg 的 DNA 片段加 0.1 µg 的 pBR322 DNA, 加 2 u 的

T₄ DNA 连接酶 (BRL), 按 BRL 的方法进行连接, 反应总体积为 40 µl, 在 14°C 放置 48 h。按 Cohen 的方法把连接混和物转化到大肠杆菌 RR1^[6], 筛选 Ap^rTc^r 的转化子。

(六) K88ac 抗原的检测

1. 酶联吸附法 (ELISA)^[9] 抗原的制备: 斜面保存的菌种接种到 5 ml 的 LB 种子管, 在 37°C 振荡培养 16 h, 离心收菌, 悬菌于 50 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl pH 7.5, 0.01% Tween 20 溶液中, 调整菌浓度 A₆₀₀ ≈ 0.7, 取 5 ml 菌悬液用超声波 (MSE50W) 破碎 5 min, 离心除去细胞碎片, 上清液用作 ELISA 测定的抗原, 用时再稀释 10 倍检测 K88ac 抗原的含量。

2. 琼脂双扩散: 用 1.5% 的日本琼脂粉, 加巴比妥缓冲液, 在平皿中制胶, 胶厚 3 mm, 中央挖一小孔, 围绕四周挖 6 个小孔, 孔径 5 mm, 孔距 5 mm, 中央孔加纯的抗 K88ac 兔血清, 周孔加抗原 20 µl, 在 37°C 放置 20 h 再观察结果。

3. 反向间接血凝: 取 K88ac 抗血清致敏的绵羊红细胞, 与细菌抗原进行凝集反应, 致敏血球系中国兽药检测所惠赠^[5]。

实验结果

(一) 野生株 *E. coli* 79-1454 的质粒 DNA

用碱变性法提取的质粒 DNA 结果见图板 I-7, 可以看到有一个大质粒 (LP) 和几个小质粒 (SP), 以标准大质粒 p307 (60 Md), RP₄ (36 Md), N₃ (33 Md), Sa (23 Md) 为标准, 用琼脂糖凝胶电泳法测定带 K88ac 抗原的大质粒分子量约为

50Md。(图版 I-7)

(二) 重组质粒DNA的酶切图

提纯后的大质粒DNA,用HindⅢ酶消化,产生十三个片段,分子克隆的结果获得的转化子中检测K88ac抗原为阳性的有三个重组体,其重组质粒的分子量相似,只对其中的一株 *E.coli*RR1(pMM031)作进一步的研究。为了测定重组质粒的分子量,以EcoRⅠ和HindⅢ酶分别消化的ADNA形成的片段作标准,以HindⅢ酶消化的pMM031DNA形成二个片段,小片段是pBR322,大片段约为6.5Md,该片段是用HindⅢ酶消化大质粒产生的第二条片段,这个片段含有为K88ac抗原编码的遗传决定子。(详见图版 I-1)

(三) 检测K88ac抗原

1. 琼脂双扩散:由于中央孔加的是纯K88ac抗血清,与*E.coli*RR1(pBR322)的抗原不产生沉淀线,而与野生株及重组体形成一条相互连接的沉淀线,表明重组体产生与野生株相同的K88ac抗原(见图版 I-2)

2. 反向间接血凝:从图版 I-6 中可以看出用K88ac抗血清致敏的红细胞不与1%的健康兔血清和*E.coli*RR1(pBR322)的抗原发生凝集反应,而与野生型和重组体抗原发生凝集反应。凝集滴度在100—200倍之间。

3. 酶联吸附法:阴性对照用*E.coli*RR1(pBR322)的抗原, $A_{492nm} \leq 0.02$, 阳性对照用野生株制备的抗原, $A_{492} \geq 0.40$, 测定重组体的K88ac抗原 $A_{492} \geq 0.40$, 由此可见重组体产生的K88ac抗原量与野生株相似。

(四) 热敏感毒素的鉴定

1. LT基因探针的菌落杂交:从图版 I-3 中可以看出LT基因探针的菌落杂交试验的结果^[4], LT基因探针不与*E.*

*coli*RR1(pBR322)杂交,而与野生株和重组体杂交。

2. Y-1肾细胞试验:从图版 I-5 中看出只有野生株产生肠毒素,才使梭状的Y-1肾细胞变成圆形,而重组体与*E.coli*RR1(pBR322)均不能使Y-1肾细胞变成圆形,即都为阴性。

(五) 热稳定毒素的鉴定

1. 乳鼠试验:用细胞的培养物作乳鼠试验表明野生株为阳性,而*E.coli*RR1(pBR322)和重组体均为阴性。

2. STb基因探针杂交试验:用STb基因探针作菌落杂交试验(杨长告鉴定待发表),结果表明STb探针DNA只与野生株杂交而不与*E.coli*RR1(pBR322)和重组体杂交,表明重组体无STb基因。结果见图版 I-4。

讨 论

本文所用的野生株是我国引起仔猪腹泻的病菌中流行最广的血清型K88ac,与其他许多野生株比较,产生的K88ac抗原量较高,因而用作分子克隆的起始株是适宜的。在抽提质粒DNA时,制备的清亮裂解液中含的蛋白量较高,若用碱酚-氯仿异戊醇处理要7—8次才能除去蛋白,因此用碱变性法抽提较为方便。曾用过几种不同的方法纯化大质粒,发现大质粒DNA不同程度地被降解,可能是DNA样品中的细菌内源性核酸酶没被除尽,因此制备质粒DNA时要注意去蛋白这一操作,DNA样品也不宜放置太久,否则将影响DNA重组的成功率。

我们克隆的是大质粒的第二条HindⅢ片段,该片段的分子量是6.5Md, Shipsey^[10]和Mooi^[9]分别克隆了K88ac和K88ab的抗原基因,而且分别位于8.2

