

大肠杆菌不耐热肠毒素的表达及其纯化保存策略

冯 强^{1,2} 蔡绍哲¹ 杨 珺^{1,2} 罗 萍² 张卫军² 邹全明^{2*}

¹(重庆大学生物工程学院,重庆 400044)

²(第三军医大学临床微生物学教研室,重庆 400038)

摘 要 编码完整大肠杆菌不耐热肠毒素(LT)的基因被引入 pET11c 形成 pET11-LT,该质粒在 *E. coli* BL21(DE3) 中得到较高效率的表达,约 46mg/L。用 IX +)-Immobilized galactose 柱可以在很宽的 pH 范围(pH7.3 ~ 10.4)内用多种方法对 LT 进行纯化且保持其结构完整。溶于 TEAN(pH7.3)或碳酸盐缓冲液(pH10.4)的 LT,冻干后保存于 4℃,可长久保持其完整结构,此为保存 LT 的较好策略。与 GM1 结合实验、CHO 细胞及 Patent-mouse 毒性检测实验证明纯化的 LT 具有生物学活性。

关键词 不耐热肠毒素,表达,纯化,保存

中图分类号 R378.99 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)05-0532-06

不耐热肠毒素(LT)是产毒性大肠杆菌(ETEC)产生的引起人及哺乳动物腹泻的主要因素之一,它从结构、功能和免疫活性上与产自霍乱弧菌的霍乱毒素(CT)相似。LT是由一个分子量约28kD的A亚基(LTA)和5个分子量约为12kD的B亚基(LTB)构成的六聚体($M_r \approx 90kD$)。LTA具有ADP-核糖基转移酶活性,可使胞内cAMP水平升高,细胞液体及电解质流失,进而导致腹泻。五聚体的B亚单位包含有细胞表面神经节苷脂(GM1)结合位点,通过LTB与GM1的结合,LT得以进入胞内并进而发挥毒性。野生型LT基因位于产毒性大肠杆菌的大质粒上,表达效率低下,因此人们尝试了多种方法以期提高其产率。但由于该基因的特殊性,在构建重组工程菌时,为了获得具有活性的LT,LT基因须以完整的形态插入表达载体。从已有的文献报道看,仅少数文献有关于LT表达产率的报道^[1,2],但都不够理想。因此获得大量、稳定、高纯度的LT或其突变体蛋白一直是许多研究者追求的目标。尽管LT的纯化有多种方法^[3-5],不过现在都采用Immobilized D-galactose即半乳糖亲和柱进行纯化^[1],用该柱对LT进行纯化有简单高效、纯度极高的优点。本文报道一种具有较高效率的LT表达系统及基于半乳糖亲和柱的LT纯化保存策略。

1 材料和方法

1.1 细菌和质粒

E. coli DH5 α 及*E. coli* BL21(DE3)本室保种,pMD18-LT本室构建^[6],pET11c购自Novagen公司(美国)。

1.2 工具酶及试剂

质粒抽提试剂盒购自Roche公司(德国),*Nde*I、*Bam*H I,PCR Recover Kit,DNA Ligation Kit,100bp DNA marker,蛋白质中分子Marker购自TaKaRa公司(大连), λ DNA/*Hind* III + *Eco*R I marker购自华美公司。

1.3 重组工程菌的构建

用*Nde*I、*Bam*H I从pMD18-LT切下LT基因,将之与经同样双酶切的pET11c连接,重组质粒转化*E. coli* DH5 α ,提取阳性质粒并转化*E. coli* BL21(DE3)。

1.4 重组工程菌的发酵

培养基:改良M9-CAA^[7]5L,抗生素浓度为Amp100 μ g/mL。补料20%葡萄糖8%胰蛋白胨8%酵母提取物2L。发酵罐:德国BIOSTAT10L自控发酵罐。细菌的培养方法:取新转重组质粒的*E. coli* BL21(DE3)单菌落于含4mL LB培养基的试管中培养8h,按50 μ L菌液接种500mL LB培养基在烧瓶中

继续培养 8h 至 $OD_{600nm} \approx 1.5$, 同时进行细菌质粒的鉴定, 取质粒正确的种子菌 500mL 接种。发酵 3h 后流加补料。 $OD_{600nm} \approx 30$ 时用终浓度为 0.5mmol/L 的 IPTG 诱导, 诱导 5h 后收菌。

1.5 LT 的纯化

离心收集的 485g 湿菌按 80g/份分成 6 份分别用 10 倍体积的不同缓冲液重悬(表 1), 高压均质机 (Invensys, 丹麦) 70MPa 破菌 3 次后, 细胞破碎液 16000g \times 30min 4 $^{\circ}$ C 离心收集上清液, 并以同样条件再重复一次。上清经 0.22 μ m 滤膜超滤后用 Lowery 法测定蛋白浓度后, 以 1.5 mL/min 的流速上 D (+) Immobilized galactose 柱 (Pierce, 美国), 该柱事先用对应缓冲液平衡。分两次等体积上样, 用对应缓冲液冲洗杂蛋白至基线, 再用含 0.3mol/L 半乳糖 (Galactose) 对应缓冲液或 0.1mol/L 甘氨酸 (Gly) 溶液 (pH 2.8) 洗脱。

1.6 SDS-PAGE 凝胶电泳

不同方法纯化的 LT 及置换缓冲液的 LT 约 10 μ g 分别行 15% SDS-PAGE 电泳, 电泳后, 蛋白条带用溶于 40% 甲醇和 7% 乙酸的 0.25% 考马斯亮蓝染色。

1.7 N 端氨基酸测定

纯化 LT 加上样缓冲液煮沸 5min 后行 15% SDS-PAGE 电泳, 转移至 PVDF 膜, 考马斯亮蓝 R250 染色后代表 LTb 及 Lta 的条带由中国医学科学院基础研究所中心实验室完成 N 端 5 个氨基酸测定。

1.8 纯化 LT 的保存

各种方式纯化的 LT 一部分通过 Lowery 法测定蛋白浓度后分 3 种方式保存: 马上用 Thermo Savant 冻干机 (Thermo, 美国) 冻干后保存于 4 $^{\circ}$ C; 直接存放于 -70 $^{\circ}$ C; 直接存放于 4 $^{\circ}$ C。另取一部分用 Sephadex G25 将原缓冲液置换为 TEAN (pH 7.3) 或碳酸盐缓冲液 (pH 10.4) 后按前述方法保存。过 2 月后用 HPLC 检测其稳定性差异。

1.9 HPLC

不同处理的 LT 用 OHPak SB-800 柱 (Shodex, 日本) 在 Agilent HPLC 系统 (美国) 上进行 HPLC 检测, 柱子先用 TEAN (pH 7.3) 在 0.25mL/min 流速下进行平衡, 上样后用相同 TEAN 洗脱, 记录 280nm 的吸收值 A_{280} 。

1.10 GM1 Elisa

96 孔板用 1.5 μ g/mL 的 GM1 (Sigma, 美国) 50 μ L 4 $^{\circ}$ C 包被过夜, 用含 0.05% Tween20 的 PBS 洗板后用 1% BSA 200 μ L 室温封闭 4h, 洗板, 将初始浓度为 1.28mg/mL 的 CT (Sigma, 美国) 及同浓度保存于不同

缓冲液的 LT 样品作倍比系列稀释后每孔加入 100 μ L, 同时设立空白对照, 并用 100 μ L 不同的缓冲液设立阴性对照, 37 $^{\circ}$ C 0.5h, 洗板后加入 1:200 兔抗 CTb 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 0.5h, 洗板后加入 1:20000 羊抗 IgG-HRP (武汉博士德) 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 0.5h, 洗板后 OPD 显色数分钟, 12.5% H₂SO₄ 终止显色。测定 A_{492nm} , 实验组 A_{492nm} /阴性对照 $A_{492nm} > 2.1$ 视为阳性结果。

1.11 毒性检测

取保存于不同缓冲液: TEAN (pH 7.3), 碳酸盐缓冲液 (pH 10.4), TEAN (pH 7.3) + 0.3mol/L galactose, 碳酸盐缓冲液 (pH 10.4) + 0.3mol/L galactose 的 LT 冻干粉按实验要求做相应稀释后进行如下实验。

CHO 细胞毒性检测试验: 将购自中国科学院上海生化细胞所细胞库的 CHO 细胞按参考文献 [8] 的方法进行毒性检测试验。即用含 10% 胎牛血清 (成都阿里公司) 的 DMEM 培养基培养 CHO 细胞, 在 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 下培养至铺成单层。细胞用 Hank's 液清洗一次, 然后 0.1% 胰酶消化 5min, 从培养瓶转至离心管。离心后, 用 Hank's 液清洗细胞一次, 然后用 DMEM 重悬。将同样数量的细胞 (每孔 200 μ L 细胞悬液含 10⁴ 个细胞) 加于 48 孔板。待细胞粘附 4h 后加入毒素并继续在 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 的环境中培养 24h。细胞用磷酸盐缓冲液 (PBS) 冲洗后, 用甲醇固定, 再用 0.04% 台盼蓝染色。染色后清洗细胞, 晾干, 显微镜下观察并照相。

Patent-mouse 毒性检测试验: 根据 Bowman 的方法 [9] 改进进行, 八组 (5 只/组) 6 周龄雌性 C57BL/6 小鼠断食不断水 24h, 先饲以 300 μ L 胃酸中和液 (4 \times D-Hank's + 1 \times 7.5% NaHCO₃), 10min 后, 4 组分别饲以 300 μ L TEAN (pH 7.3), TEAN (pH 7.3) + 0.3mol/L galactose, 碳酸盐缓冲液 (pH 10.4), 碳酸盐缓冲液 (pH 10.4) + 0.3mol/L galactose; 另四组分别饲以含 100 μ g LT 的前述缓冲液。继续断食不断水, 3h 后将动物处死, 小心从幽门至肛门取其肠段 (gut) 并称重, 同时称取剩下的畜体 (carcass) 重量, 算出每只小鼠的 G/C 值, 并求出每组的平均值及标准差。数据用 *t*-检验测定显著性差异, $P < 0.01$ 为极显著。

2 结 果

2.1 LT 的表达及纯化

从 5000mL 发酵菌液收获湿菌 485g, 每 80g 一组按不同的方法进行纯化实验。

表 1 LT 的不同纯化方法

Table 1 Different methods of LT purification

Method of purification	1	2	3	4	5	6
Bacteria dispersion buffer	pH7.3TEAN	pH7.3TEAN	pH8.5TEAN	pH9.7TEAN	pH10.4 Carbonate buffer	pH10.4 Carbonate buffer
Balance buffer	pH7.3TEAN	pH7.3TEAN	pH8.5TEAN	pH9.7TEAN	pH10.4 Carbonate buffer	pH10.4 Carbonate buffer
Volume of supernatant/mL	790	785	790	780	790	785
Concentration of proteins in supernatant(mg/mL)	2.22	2.20	2.31	2.21	2.16	2.18
Elution buffer	pH2.8 0.1mol/L Gly	0.3mol/L galactose + pH7.3TEAN	0.3mol/L galactose + pH8.5TEAN	0.3mol/L galactose + pH9.7TEAN	0.3mol/L galactose + pH7.3TEAN	0.3mol/L galactose + pH10.4 Carbonate buffer
Form of purified LT	LTB5 + LTA	Holotoxin	Holotoxin	Holotoxin	Holotoxin	Holotoxin
Purified LT/mg	40	37	38	36	35	41

总纯化蛋白 227mg, 每种纯化方法之间不存在产率的显著差异。480g 细菌的总上清蛋白 10449mg, 纯化蛋白占总上清蛋白的比率为 2.17%, 发酵产率约 46mg/L 培养液。

每种方法纯化所得 LT 的 SDS-PAGE 结果见图 1。

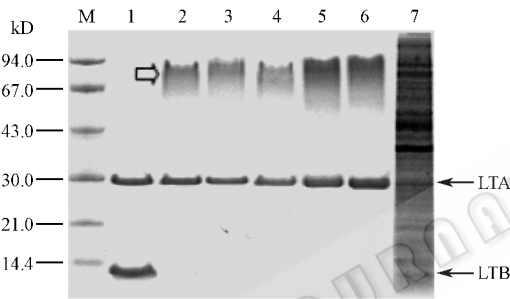


图 1 纯化 LT 的 SDS-PAGE 电泳结果

Fig. 1 SDS-PAGE of purified LT

M. Protein MW standard marker (M); 1-6. Samples purified using method 1 to 6 (Unboiled); 7. Whole cell sample of pET11c-LT/*E. coli* BL21(DE3) (Boiled)

在 pH2.8 的酸性环境下纯化的 LT, 通过 SDS-PAGE 电泳后变成 LTA 及 LTB 单体, 而其余几种方式纯化得到的 LT 则变成 LTA 单体及部分六聚体和 LTB 寡聚体(空心箭头所示)。

N 端氨基酸测序表明纯化产物代表 LTA 片段的 N 端 5 个氨基酸为 Asn Gly Asp Lys Leu, 代表 LTB 片段的 N 端 5 个氨基酸为 Ala Pro Gln Ser Ile, 与野生型的完全一致。

用 HPLC 对 LTB、pH2.8 0.1mol/L Gly 洗脱的 LT 及用含 0.3mol/L galactose 的 TEAN (pH7.3) 洗脱的 LT 进行检测得结果如图 2。

HPLC 分析发现 经 0.1mol/L Gly (pH2.8) 洗脱的 LT 出现两峰, 第一个峰代表 LT 六聚体, 第二个峰代表 LTB5 (与 LTB5 的峰形及出现时间一致) 及解离的一部分 LTA, 这与电泳中只出现 LTA 与 LTB 两单体条带不一样; 用纯化方法 2 (表 1) 获得的 LT 只见一代表 LT 六聚体的主峰, 用纯化方法 3~6 获得的 LT 其峰形与该峰形完全一致。

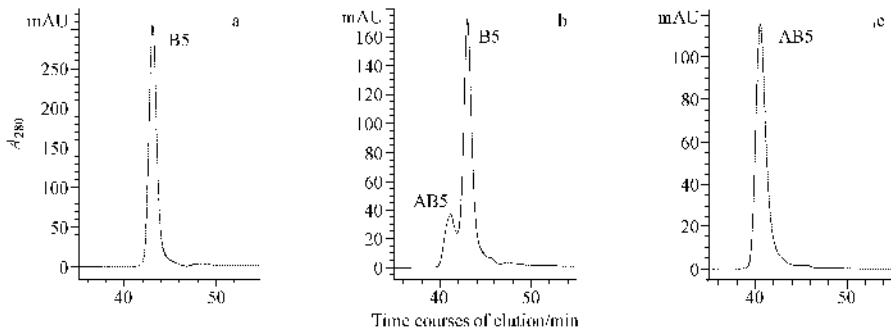


图 2 用不同方法洗脱的 LT 的典型 HPLC 图

Fig. 2 A typical HPLC chromatogram of LT eluted by different methods

(a) LTB (time to peak top 43.047) (b) LT eluted by 0.1mol/L Gly (pH2.8) (time to the first peak top: 41.175, time to the second peak top 43.022) (c) LT eluted by 0.3mol/L galactose in TEAN (pH7.3) (time to peak top 40.569); B5, LTB pentamer. AB5, LT hexamer

后 5 种方法纯化的 LT 经缓冲液置换后仍保持原来的六聚体状态,用 0.1mol/L Gly 溶液 (pH 2.8) 纯化出的 LTA 及 LTB 五聚体逐渐复性成六聚体,随着时间的延长复性也随之增加。

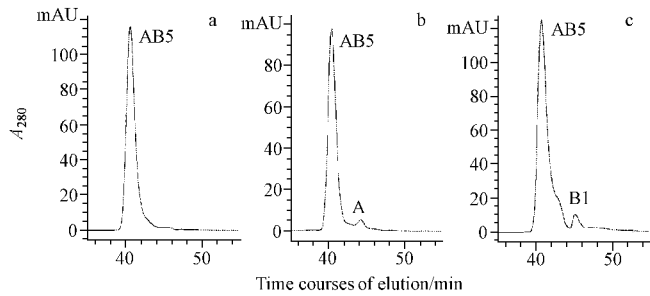


图 3 不同保存条件下 LT 的 HPLC $A_{280\text{nm}}$ 图形

Fig.3 HPLC chromatogram of absorbance at 280nm of LT samples stored under different conditions

(a) LT dried powder stored in carbonate buffer (pH10.4) at 4°C (a') LT dried powder stored in TEAN (pH7.3) at 4°C (b) LT stored in carbonate buffer (pH10.4) at -70°C (b') LT stored in TEAN (pH7.3) at -70°C (c) LT stored in carbonate buffer (pH10.4) at -4°C (c') LT stored in TEAN (pH7.3) at 4°C. AB5: LT hexamer; B5: LTB pentamer; A: LTA monomer; B1: LTB monomer

从图中看出,在冻干条件下,保存于 TEAN (pH 7.3) 或碳酸盐缓冲液 (pH 10.4) 的 LT 其 HPLC A_{280} 图形完全一致,均显示为单一峰,表明六聚体保存完好; -70°C 条件下,与保存于碳酸盐缓冲液 (pH 10.4) 的 LT 相比,保存于 TEAN (pH 7.3) 的 LT 非六聚体成分更多一些;而在 4°C 条件下,保存于 TEAN (pH 7.3) 的 LT 其非六聚体成分就更多。

实验表明,在不同保存条件下,LT 的稳定性依次为:纯化后马上冻干 4°C > 碳酸盐 (pH 10.4) - 70°C > TEAN (pH 7.3) - 70°C > 碳酸盐 (pH 10.4) 4°C > TEAN (pH 7.3) 4°C。

用 HPLC 还检测了在缓冲液中含有 0.3mol/L galactose 的情况下,用不同方法保存的 LT 的稳定性,所得结果与图 3 所示一致,表明缓冲液中是否含有 galactose 并不影响 LT 的完整性。

2.3 LT 的生物学活性

GM1 只与 LT 中 LTB 部分结合,因而 LT 是否解聚并不影响结合效率。实验结果表明不同缓冲液及不同条件保存的 LT 与 GM1 的结合能力并无差异,结果表明纯化产物具有与 CT 同样的 GM1 结合活性。纯化方法 2~6 得到的 LT 及通过缓冲液置换将其内的半乳糖去掉的 LT 之间并不存在与 GM1 结合能力的差别,LT 的含量达到 2ng/well 时就能显示出阳性结果,图 4 显示的是典型的纯化 LT 与 GM1 的结合情况。

CHO 细胞毒性实验表明,不管以哪种方式保存的冻干 LT,只要浓度达 20ng/mL 即可使 CHO 细胞变形超过 50%,而 LTB 即使达到 100 μ g/mL 也无变形

2.2 LT 的保存

放置 2 月后,对用不同条件保存在 TEAN (pH 7.3) 和碳酸盐缓冲液 (pH 10.4) 中的 LT 进行了 HPLC 检测,得结果如图 3。

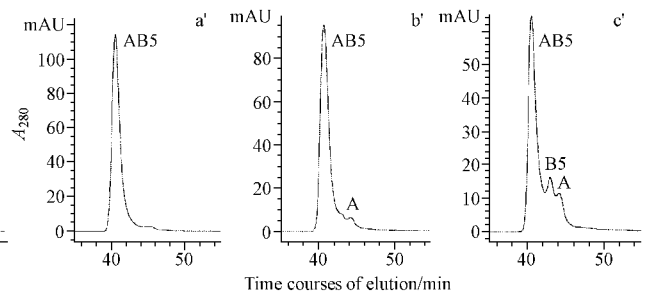


图 3 不同保存条件下 LT 的 HPLC $A_{280\text{nm}}$ 图形

Fig.3 HPLC chromatogram of absorbance at 280nm of LT samples stored under different conditions

(a) LT dried powder stored in carbonate buffer (pH10.4) at 4°C (a') LT dried powder stored in TEAN (pH7.3) at 4°C (b) LT stored in carbonate buffer (pH10.4) at -70°C (b') LT stored in TEAN (pH7.3) at -70°C (c) LT stored in carbonate buffer (pH10.4) at -4°C (c') LT stored in TEAN (pH7.3) at 4°C. AB5: LT hexamer; B5: LTB pentamer; A: LTA monomer; B1: LTB monomer

从图中看出,在冻干条件下,保存于 TEAN (pH 7.3) 或碳酸盐缓冲液 (pH 10.4) 的 LT 其 HPLC A_{280} 图形完全一致,均显示为单一峰,表明六聚体保存完好; -70°C 条件下,与保存于碳酸盐缓冲液 (pH 10.4) 的 LT 相比,保存于 TEAN (pH 7.3) 的 LT 非六聚体成分更多一些;而在 4°C 条件下,保存于 TEAN (pH 7.3) 的 LT 其非六聚体成分就更多。

实验表明,在不同保存条件下,LT 的稳定性依次为:纯化后马上冻干 4°C > 碳酸盐 (pH 10.4) - 70°C > TEAN (pH 7.3) - 70°C > 碳酸盐 (pH 10.4) 4°C > TEAN (pH 7.3) 4°C。

用 HPLC 还检测了在缓冲液中含有 0.3mol/L galactose 的情况下,用不同方法保存的 LT 的稳定性,所得结果与图 3 所示一致,表明缓冲液中是否含有 galactose 并不影响 LT 的完整性。

2.3 LT 的生物学活性

GM1 只与 LT 中 LTB 部分结合,因而 LT 是否解聚并不影响结合效率。实验结果表明不同缓冲液及不同条件保存的 LT 与 GM1 的结合能力并无差异,结果表明纯化产物具有与 CT 同样的 GM1 结合活性。纯化方法 2~6 得到的 LT 及通过缓冲液置换将其内的半乳糖去掉的 LT 之间并不存在与 GM1 结合能力的差别,LT 的含量达到 2ng/well 时就能显示出阳性结果,图 4 显示的是典型的纯化 LT 与 GM1 的结合情况。

CHO 细胞毒性实验表明,不管以哪种方式保存的冻干 LT,只要浓度达 20ng/mL 即可使 CHO 细胞变形超过 50%,而 LTB 即使达到 100 μ g/mL 也无变形

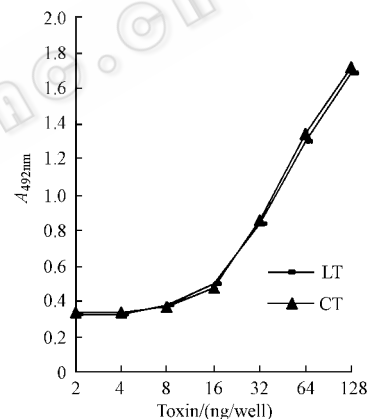


图 4 纯化 LT 的 GM1 结合能力

Fig.4 GM1 binding ability of purified LT

(图 5)。

Patent-mouse 毒性检测实验表明,饲以 LT 的小鼠肠段有明显的体液滞留 (图 6),与相应对照组相比差异极其显著 ($P < 0.01$) (图 7)。

由图 7 看出 LT 具有很强的毒性,碳酸盐缓冲液和 TEAN 保存的 LT 无毒性差异,缓冲液内有无 0.3mol/L galactose 也不影响 LT 毒性。

与 GM1 的结合能力实验及毒性检测表明,纯化的 LT 具有正常的生物学活性。

3 讨论

对于由携带 LT 基因的质粒与宿主菌构成的表达系统,报道的有很多。如 pBR322 和 *E. coli* HB101^[11], pEWD299 和 *E. coli* C600^[21], pBluescript II KS+ 和 *V. cholerae* 0395NT^[10], pPROFIT 和 *E. coli* MC1061^[12], pUC18 和 *E. coli* JM83^[12], pPROFIT 和

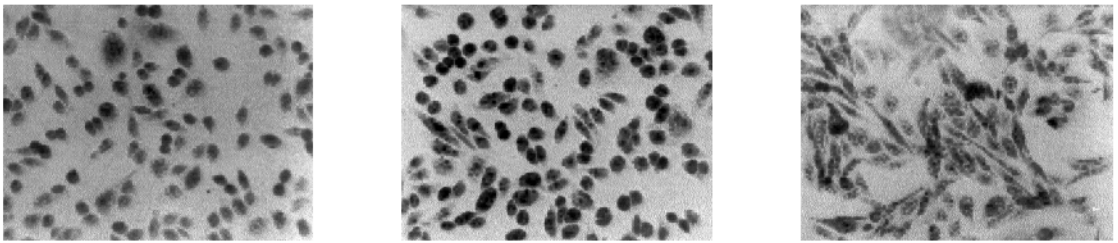


图 5 CHO 在不同处理下的形态变化。很低浓度的 LT 导致 CHO 细胞的严重变形

Fig. 5 CHO cell morphologies changed under different treatments

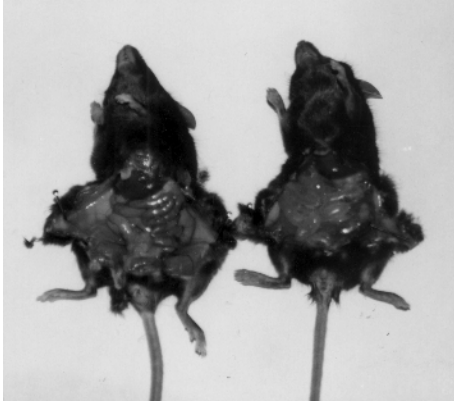


图 6 Patent mouse 活体毒性检测试验效果

Fig. 6 Effect of *in vivo* Patent-mouse toxicity assay

Three hours after treated by 100 μ g LT, gut of C57BL/6 was filled with fluid

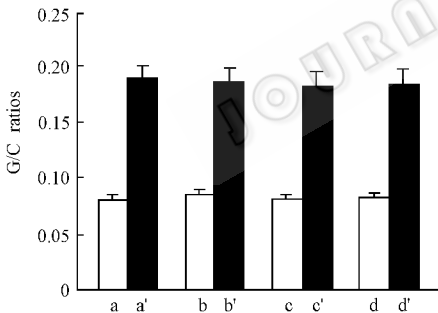


图 7 不同 LT 样品的 Patent-mouse 活体毒性检测结果

Fig. 7 Results of *in vivo* Patent-mouse toxicity assay of different LT samples

(a) Carbonate buffer (a') Carbonate buffer containing 100 μ g LT (b) Carbonate buffer containing 0.3mol/L galactose (b') Carbonate buffer containing 0.3mol/L galactose and 100 μ g LT (c) TEAN (c') TEAN containing 100 μ g LT (d) TEAN containing 0.3mol/L galactose (d') TEAN containing 0.3mol/L galactose and 100 μ g LT. Values are the mean gut/carcass weight ratios \pm SD for the groups at 3 h after inoculation

E. coli MC1061^[13]等。众多 LT 的研究中只有很少文献报道过产率,但产率都不够高,最高的仅为 30 mg/L 培养液^[2]。我们曾用携带 LT 基因的 pPROFIT 及 pET11c 分别转化 *E. coli* MC1061、*E. coli* TOP10、*E. coli* JM109, 表达效果都不理想;而我们用含 LT 基因的 pET11c 转化的 *E. coli* BL21(DE3) 大大地增

加了 LT 的产率(46mg/L 培养液),比报道的最高产率^[2]高出了 0.5~2 倍,表明这是 LT 表达较好的系统。该系统能较高效率表达 LT,可能因为目的基因克隆至 pET11c 后,直接受强噬菌体 T7 转录和翻译信号的控制,而 T7 启动子受 *lac* 操纵子的控制,在 IPTG 的诱导下,产率提高^[14];同时可能与 *E. coli* BL21(DE3) 是较好的表达宿主菌也有关系^[14]。

对 LT 的纯化,常用的洗脱液是含 0.3mol/L 半乳糖的 pH 7.4 的 TEAN^[11],从我们的结果中可看到至少在 pH 7.3~10.4 内,pH 值的变化并不影响 LT 的稳定性及纯化产率且生物学活性也无区别。用 0.1 mol/L Gly 溶液(pH 2.8)洗脱不能得到全毒素,而是变性成 LTA 及 LTB,该溶液只能用于清洗亲和层析柱;或用于分泌表达的 LTB 的纯化,该法比用半乳糖洗脱更经济。

LT 是一个由非共价键连接的六聚体组成,该六聚体在缓冲液中随着保存时间的延长,会部分解聚成 LTB 五聚体和 LTA 单体^[15]。因而用保存的 LT 做生物学实验时为了排除解聚因素的影响,需再将 LT 进行分子筛层析以去除 LTA 及 LTB 五聚体,但这是一个很费时很麻烦的事。我们用不同方法对 LT 进行了保存,并对保存了一定时间的 LT 进行鉴定后发现,如果 LT 刚纯化出来后马上冻干,然后保存于 4 $^{\circ}$ C,可以使 LT 几乎不解聚,而含 1mmol/L EDTA 的碳酸盐溶液似乎是保存 LT 更好的缓冲液。我们用 OHpak SB-800 柱进行的稳定性检测,结果直观,所需时间少(柱子平衡好后,从上样到测定结束到下一次上样只需 1h),需要的洗脱液也少(一个样品只需十几毫升洗脱液),是一种 LT 及类似多聚体蛋白结构稳定性检测的好方法。缓冲液置换实验表明,LT 保存液中的半乳糖对 LT 的保存与生物学活性都没有影响。

就 LT 的纯化及保存策略而言,可以根据以后实验的不同要求而选择不同的方法,如要用于细胞实验,用纯化方法 2 纯化 LT,并将纯化后的 LT 马上冻干后,4 $^{\circ}$ C 保存,因保存液 pH 接近 DMEM 的 pH,如

要用于口服免疫及毒性检测,用纯化方法 6 纯化 LT,并将纯化后的 LT 马上冻干后 4℃保存就更好,因用 LT 灌服动物时,高 pH 溶液可以有效中和胃酸从而减少在胃内被消化。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Uesaka Y, Otsuka Y, Lin Z *et al.* Simple method of purification of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and cholera toxin using immobilized galactose. *Microb Pathog*, 1994, **16**(1):71 - 76
- [2] Pronk S E, Hofstra H, Groendijk H *et al.* Heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* Characterization of different crystal forms. *J Biol Chem*, 1985, **260**(25):13580 - 13584
- [3] Dorner F. *Escherichia coli* enterotoxin purification and partial characterization. *J Biol Chem*, 1975, **250**(22):8712 - 8719
- [4] Clements J D, Finkelstein R A. Isolation and characterization of homogeneous heat-labile enterotoxins with high specific activity from *Escherichia coli* cultures. *Infect Immun*, 1979, **24**(3):760 - 769
- [5] Kunkel S L, Robertson D C. Purification and chemical characterization of the heat-labile enterotoxin produced by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun*, 1979, **25**(2):586 - 596
- [6] FENG Q (冯强), ZOU Q M (邹全明), CAI S X (蔡绍皙) *et al.* A new method of obtaining wild type heat-labile enterotoxin gene containing plasmid and construction of non-toxic mutated LTS63K gene and analysis of the nucleotide sequence. *Immunological Journal* (免疫学杂志), 2002, **18**(5):385 - 388
- [7] WANG F K (王缚鲲), ZHANG W J (张卫军), ZOU Q M (邹全明) *et al.* Fermentation of gene engineering *E. coli* of *Helicobacter pylori* heat shock protein A. *Chinese Journal of Biologicals* (中国生物制品学杂志) 2001, **14**(2):34 - 86
- [8] Park E J, Chang J H, Kim J S *et al.* Development of two novel non-toxic mutants of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Exp Mol Med*, 1999, **31**(2):101 - 107
- [9] Bowman C C, Clements J D. Differential biological and adjuvant activities of cholera toxin and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin hybrids. *Infect Immun*, 2001, **69**(3):1528 - 1535
- [10] Rodighiero C, Aman A T, Kenny M J *et al.* Structural basis for the differential toxicity of cholera toxin and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. Construction of hybrid toxins identifies the A2-domain as the determinant of differential toxicity. *J Biol Chem*, 1999, **274**(7):3962 - 3969
- [11] Verweij W R, de Haan L, Holtrop M *et al.* Mucosal immunoadjuvant activity of recombinant *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and its B subunit: induction of systemic IgG and secretory IgA responses in mice by intranasal immunization with influenza virus surface antigen. *Vaccine*, 1998, **16**(20):2069 - 2076
- [12] Ryan E T, Crean T I, John M *et al.* *In vivo* expression and immunoadjuvancy of a mutant of heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* in vaccine and vector strains of *Vibrio cholerae*. *Infect Immun*, 1999, **67**(4):1694 - 1701
- [13] Haan L, Verweij W R, Holtrop M *et al.* Nasal or intramuscular immunization of mice with influenza subunit antigen and the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile toxin induces IgA- or IgG-mediated protective mucosal immunity. *Vaccine*, 2001, **19**(20 - 22):2898 - 2907
- [14] Studier F W, Rosenberg A H, Dunn J J *et al.* Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol*, 1990, **185**:60 - 89
- [15] Magagnoli C, Manetti R, Fontana M R *et al.* Mutations in the A subunit affect yield, stability, and protease sensitivity of nontoxic derivatives of heat-labile enterotoxin. *Infect Immun*, 1996, **64**(12):5434 - 5438

Expression of Heat-labile Enterotoxin and the Strategy of Purification and Storage

FENG Qiang^{1,2} CAI Shao-Xi¹ YANG Jun^{1,2} LUO Ping² ZHANG Wei-Jun² ZOU Quan-Ming^{2*}

¹(College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400044, China)

²(Department of Clinical Microbiology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract Heat-labile enterotoxin (LT) from *Escherichia coli* is a bacterial protein toxin with an AB₅ hexamer structure. LT is a powerful mucosal adjuvant when co-administered with soluble antigens. However, its use in mucosal immunity is inconvenient because of its low yield and depolymerization during long-term storage under normal condition. In this study, we report an efficient expression system and optimized purification and storage strategy of LT. A gene encoding LT was cloned into the vector pET11c and transformed in *E. coli* BL21 (DE3). By growing this strain on modified M9-CAA medium, LT was expressed efficiently. About 46mg/L LT could be purified from the supernatant of bacteria lysate. Using (X +)-Immobilized galactose column, LT could be purified at a wide pH range with various elution buffers. The optimized elution buffers are TEAN (pH 7.3) containing 0.3mol/L galactose and carbonate buffer (pH 10.4) containing 0.3mol/L galactose. After dried by freeze and placed in 4℃, LT dissolved in TEAN (pH 7.3) and carbonate buffer (pH 10.4) were assayed by HPLC. The results indicated that the integrity of AB₅ hexamer was kept well. LT could undergo long-term storage under this condition. This was proved to be an optimized strategy of LT storage. The results of GM1 binding assay and toxicity assay showed that the purified recombinant LT has normal biological character.

Key words heat-labile enterotoxin, expression, purification, storage

Received: 04-01-2003.

* Corresponding author. Tel: 86-23-68752316; E-mail: qmzou@mail.tmmu.com.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>