

表达具有热稳定肠毒素 II 免疫原性

融合蛋白菌株的构建

黄培堂

(军事医学科学院生物工程研究所, 北京)

W. K. Maas

(美国纽约大学医学院)

将热稳定肠毒素 I (ST I) 基因的SfaNI-Fnu4HI的限制性片段经进一步加工, 插入到一个“open reading frame”载体的合适位点中, 形成一个阅读框架正确的ompF-est-lacZ杂种结构基因。该杂种基因在ompF启动子的控制之下, 产生一种具有 β -半乳糖苷酶活性的杂种融合蛋白。我们获得了一些具有酶活性、DNA杂交阳性的转化子。对其中一个, TK1046 (pPH 14), 作了进一步研究。经限制性内切酶分析和DNA序列分析, 证明STII基因在重组DNA中连接方向是正确的, 其连接处的碱基排列序列, STII基因及其相对于lacZ的阅读框架也是正确的。我们还纯化了该重组体表达的融合蛋白, 并获得了高滴度的抗融合蛋白抗体。动物实验结果表明, 该抗体能显著中和天然STII肠毒素的毒性作用。

关键词 肠毒素; 热稳定肠毒素 I; 基因克隆; 疫苗

肠毒素源性大肠杆菌是仔猪腹泻的重要病因。它主要产生两类肠毒素: 一类为热不稳定肠毒素, 称为LT。它有A和B两个亚单位构成。其B亚单位具有免疫原性^[1]; 另一类是热稳定肠毒素, 称为ST。根据抗原性差别及宿主不同, ST又分为STI (STa) 和STII (STb) 等。STII是仔猪腹泻主要致病因子之一。

对LT肠毒素已作了较详细的研究, 而且我们实验室已构建了预防该毒素的疫苗株^[2]。然而, 即使有了有效预防LT肠毒素的疫苗, 但对某些毒素源性的大肠杆菌株可能是无效的, 因为有些大肠杆菌菌株仅产生ST或产生ST和LT两者。

对STI所作的研究表明, 该毒素是一个18或19个氨基酸的多肽, 为弱抗原。虽然至今没有研究STII的抗原性, 但据推

测它类似于STI, 也是弱抗原, 因为由其核苷酸序列推测它的分子量约为5000d^[3]。因此, 如果要使STII成为一种强抗原, 就须将其连接到一个大的具强抗原性的蛋白分子上。Klipstein等人^[4]最近将合成的ST毒素偶联到LT-B亚单位或牛血清白蛋白上, 结果表明ST具有免疫原性和保护作用。用重组DNA技术产生融合蛋白, 使ST多肽能诱发抗体产生, 从而使免疫动物产生保护作用, 也许是更为有效的途径。

到目前为止, 几种STI和STII基因已被克隆, 已测定了其序列^[5, 6]。我们将STII的大部分结构基因插入到一个

本文于1987年6月29日收到。

“open reading frame”载体——特别为构建融合蛋白而设计的表达载体 pORF-I^[7], 使STII的基因片段融合到β-半乳糖苷酶的lacZ基因上。我们获得了含有STII基因的重组体, 能产生具有β-半乳糖苷酶活性的融合蛋白, 该融合蛋白诱发的抗体能识别天然的STII肠毒素。

材 料 和 方 法

(一) 材 料

1. 菌株和质粒: *E. coli* 菌株 MH 3000:araD139 (ara, leu) 7697 (lac) x74 galK rpsL(strR)ompR101和TK1046 :araD139 (arg-lac) U 169 rpsL 150 (strR) relA1 flb B531 deo是由Siihavy博士赠送的。这两个菌株用于克隆DNA的宿主。用于本研究的质粒及其有关的遗传性状列于表1。

表 1 实验中所用的质粒

Table 1 Plasmids used in this study

质粒 Plasmids	表型 Relevant phenotype	参考文献或来源 Reference or source
pCHL6	Apr ^r , ST	800bp STII HindIII-PstI fragment from p307 cloned in pBR 322 (18)
pORF1	Apr ^r	Cloning vector (13)
pPH1	Apr ^r , B-gal ⁺	Stick ligation of BamHI Large fragment of pORF1 (this study)
pPH14	Apr ^r , B-gal ⁺ , ST	125 bp STII SfaNI-FnuFHI fragment cloned in pORF1 (this study)

2. 酶及其他试剂: 限制性内切核酸酶、T4DNA连接酶、*E. coli* DNA聚合酶 I 大片段分别为 New England Biolabs、Boehriner Mannheim Corp. 产品。Pansorbin (提供 A 蛋白的金黄色葡萄球菌悬液) 和抗β-半乳糖苷酶家兔抗血清 IgG 分别购于 Calbiochem 和 Cooper Biomedical

公司。³⁵S-甲硫氨酸为 New England Nuclear 产品。

(二) 方 法

1. DNA 的操作: 用 Brij58 方法裂解, 然后再用 CsCl/EB 密度梯度离心法纯化质粒 DNA^[8]。用琼脂糖凝胶电泳分离酶切后的 DNA 片段, 然后根据 Schleicher & Schuel 公司推荐的方法在 DEAE 膜上回收 DNA 片段。酶切、粘性末端的补平及 DNA 的连接根据各厂家所推荐的方法或按 Maniatis 等人方法操作^[8]。DNA 转化采用 CaCl₂/RbCl 处理感受态细胞, 除了在转化 TK1046 菌株时为了保持 ompR⁻表型而省略 42°C 加热步骤外, 其他均按文献[8]。采用 R. Maas 等人^[9]所述的方法制备 DNA 探针及进行菌落原位杂交。

2. β-半乳糖苷酶活性测定: 采用 Miller 方法^[10]测定培养液内及在融合蛋白纯化时各分部的β-半乳糖苷酶活性。将一定体积的细胞培养液加入测定缓冲液内, 经 SDS 及氯仿裂解后, 加入 ONPG, 在 28°C 保温, 待其充分反应后, 根据细胞的光密度、反应后液体的光密度、细胞培养物的体积及反应时间, 可计算出酶活单位数。在测定纯化融合蛋白各种制品的酶活性时, 省略加 SDS 及氯仿步骤。

3. 融合蛋白标记及免疫沉淀: 将 TK1046 (pPH14) 菌株在基本培养基中用 ³⁵S-甲硫氨酸标记, 然后将菌体裂解。加入抗β-半乳糖苷酶抗体及 Pansorbin 悬液于裂解上清中沉淀融合蛋白。离心分离后, 加热沉淀复合物使标记的融合蛋白与抗体及 Pansorbin 细胞分离。其上清经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳及放射自显影, 观察抗体特异性的融合蛋白带。对于天然的 STII 肠毒素, 经标记后, 用抗融合蛋白抗体从细胞培养上清液中沉淀 STII 肠毒素。

4. TK1046 (pPH 14) 的肠毒素生物活性测定：融合蛋白中含有STII的除信号肽外的大部分结构基因。为了实验产生融合蛋白的重组体TK1046 (pPH 14) 是否有生物毒性作用，我们将该菌的培养物上清液及菌体裂解后的上清液分别作了猪肠环结扎实验，其方法按Gyles所述^[11]。

5. 融合蛋白的纯化及免疫：用亲和层析及FPLC离子交换层析纯化 ompF-ST II-β-半乳糖苷酶融合蛋白。将10L的TK 1046 (pPH14) 培养物，收集菌体后，用超声波破碎细胞，离心得上清。将40%的硫酸胺沉淀物悬浮于 20mmol/L Tris-HCl pH7.4-10mmol/L MgCl₂-10mmol/L β-巯基乙醇缓冲液内，经充分透析后进行TPEG-Sepharose 亲和层析^[11]。将亲和层析后所得酶活性峰合并和浓缩，再经

FPLC 离子交换层析，得到电泳为一条带的纯融合蛋白。

将纯化后的融合蛋白150—200μg与等体积的福氏完全佐剂充分混匀免疫家兔。类似的方法间隔10天加强免疫两次。最后一次免疫14天后采血。

6. 中和实验：将抗融合蛋白血清与天然的STII肠毒素制品混合并保温后，用猪肠环结扎法测定混合物中STII肠毒素的生物活性。由猪肠积液的体积 (V) 和结扎的猪肠段的长度 (L) 求出 V/L 的比值。

结果和讨论

(一) pPH14重组质粒的构建

如图1所示，pORF1 表达载体含有

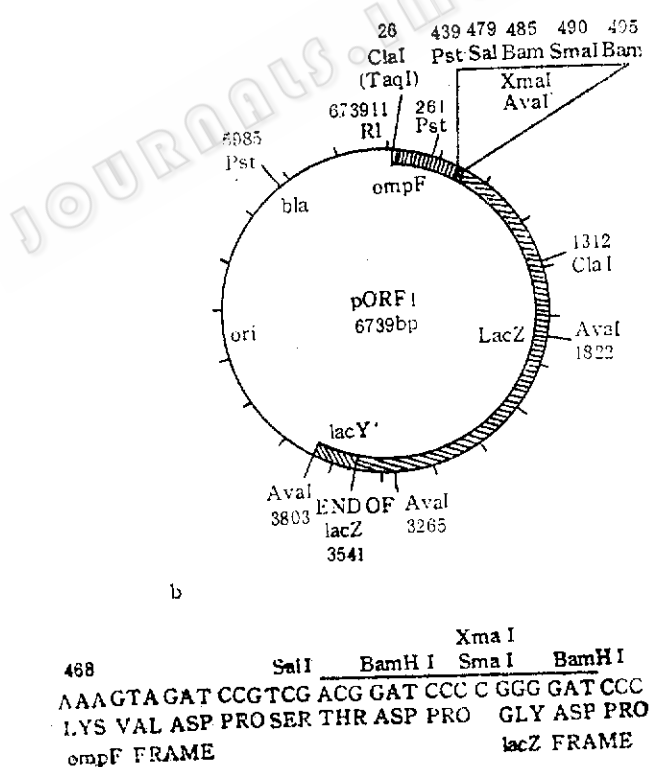


图1 表达载体pORF1的结构及OmpF-lacZ区的序列
 Fig.1 Structure of pORF1 expression vector with 5' end of the ompF gene and sequence in the region of the ompF-lacZ fusion joint

ompF 的 5' 端。该 5' 端提供一个可调控的强的启动子及转译起始位点，含有编码 21 个氨基酸的信号序列和成熟的 ompF 蛋白 N 端 12 个氨基酸序列。该序列被融合到大肠杆菌 lacZ 基因上。然而因为 lacZ 相对于 ompF 来说其阅读框架是错位点，故含 pORF1 质粒的菌株表型为 LacZ⁻。如果当一个大小合适的外源基因插入该载体后，所形成的 ompF-外源 DNA-LacZ 杂合基因将编码一种具有 β-半乳糖苷酶活性的融合蛋白。这种载体一方面 LacZ⁺ 表型可提供一个鉴定表达 ORF 外源基因克隆的标记，另一方面对于 STII 这样的弱抗原经融合到 β-半乳糖苷酶上可使其具有免疫原性。

如图 2 和图 3 所示，我们用 HindIII 和 PstI 双酶解 pCHL6^[12] 质粒 DNA 后，获得约 800bp 的含有编码整个 STII 基因的片段。然后再用 Fnu4HI 和 SfaNI 酶解 800 bp 的 DNA 片段，分离出 125bp 的含有 STII 大部分结构基因的片段。为了使该片段与 pORF1 载体连接后形成阅读框架正确的重组 DNA，将 pORF1 用 BamHI 酶解，并用大肠杆菌聚合酶 I 大片段同时将 BamHI 酶解后的 pORF1 和 125bp 的 STII 基因片段处理，使其均成平末端。进行平末端连接后，转化受体菌 MH3000，在氨苄青霉素 (Ap) 和 X-gal 平板上筛选蓝色菌落。在这种培养基上可见白色、浅蓝和深蓝色三种菌落。如前所述，白色菌落并不含有 LacZ⁺ 融合。对其中 10 个深蓝色和 9 个浅蓝色菌落作了进一步鉴定。酶切分析和探针杂交结果表明，9 个浅蓝色菌落均含有 ST 基因，而深蓝色菌落仅含有载体 DNA 而不含有 ST 基因。其原因可能有两个。它们可能是 pORF1-BamHI 片段自身连接所引起，因为从图 1 的序列资料可以看出 pORF1 经 BamHI 酶解后（两个切点），大片段的两端如果没有形成平末端，则

可连接成阅读框架正确的 ompF-LacZ 融合，从而呈现 LacZ⁺ 表型；另一种可能是有 ST 基因片段插入且高效表达融合蛋白，但这种结构十分不稳定，在此后的细胞分裂过程中缺失了 ST 片段。其他作者也遇到类似现象 (Silhavy, 个人通信)。我们将其中一个深蓝色所含的质粒命名为 pPH1，而其中一个浅蓝色菌落所含的质粒命名为 pPH14。

```

ATG AAA AAG AAT ATC GCA TTT CTT CTT TTG GCA TCT ATG TTC
GTT TTT TCT ATT GCT ACA AAT GGC TAT GCA TGT ACA CAA TCA
AAT AAA AAA GAT CTG TGT CAA CAT TAT ACA CAA ATA GCC AAG
GAA AGT TCT AAA AAA GGT TTT TTA CCG GTT AGA CAT GGT ACT
GCT GGA GCA TGC TTT GGC GGC CAA ATA ATG GTT GCA GCA AAA
CGA TGT TAA

```

图 2 STII 结构基因的序列
Fig.2 Sequence of STII DNA and some of restriction enzyme site

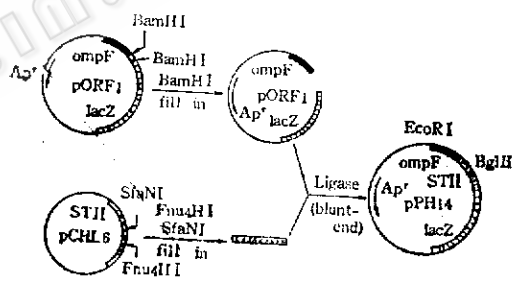


图 3 重组质粒 pPH14 的构建
Fig.3 Scheme for construction of hybrid plasmid pPH14

为了确定 ST 基因片段插入 pORF1 载体的方向，纯化杂种重组质粒 pPH14。经 EcoRI, BglII, 以及 EcoRI 和 BglII 的单个及双酶解，该质粒产生一个 6.8kb 的片段（分别经 EcoRI 或 BglII 酶切）和 0.5 及 6.3kb 两个片段（经 EcoRI 和 BglII 双酶切）。这一结果表明 ST 基因的插入方向是正确的，酶切电泳结果见图版 I-3。为了进一步证明 ST 基因和载体连接处的序列，我们合成了与 ST 片段两端互补的引物并作了序列分析，结果表明 ST 基因

和lacZ基因连接处的序列及阅读框架也是正确的。(结果未显示)。

(二) TK 1046 菌株的转化和融合蛋白表达水平测定

因为在受体 MH 3000 中, ompF 启动子是关闭的, 而且因为 TK 1046 受体菌株的转化频率仅为 MH3000 的 1%, 所以需要首先用 MH3000 受体菌获得含有重组 DNA 的克隆, 然后将候选者再引入 TK 1046 受体中, 从而有可能获得高水平的融合蛋白表达。在转化 TK1046 时省略 42°C 加温步骤; 并在室温下培养。将 pPH14 和 pPH1 分别转化 TK1046 受体后, 我们测定了在 28°C、32°C 和 28°C 先培养然后再升温至 42°C 时 β -半乳糖苷酶的活性。发现在 32°C 培养时, 其酶活性约为 28°C 时的 1.5—2.0 倍, 同时发现 TK1046 (pPH14) 的融合蛋白酶活性低于阳性对照 TK1046 (pPH1) 约 3 倍。而 Silhavy 在他的实验中 42°C 则高于 28°C 的表达结果, 这在我们的实验中没有见到。表 2 为 32°C 时测量结果。

表 2 培养物中 β -半乳糖苷酶活性
Table 2 Activity of β -galactosidase in culture

菌株 Strain	β -半乳糖苷酶活性 β -galactosidase activity
TK1046 (pORF1)	4.5
TK1046 (pPH1)	1463.3
TK1046 (pPH14)	555.9

为了进一步观察 TK1046 (pPH 14) 所表达的融合蛋白情况, 将 20ml 的培养物于 32°C 培养过夜, 然后将菌体悬于裂解缓冲液内 (125mmol/L Tris-HCl pH6.8—2% SDS—9% 甘油—0.7 mol/L β -巯基乙醇—0.0025% 溴酚蓝), 加热裂解, 离心后的上清进行 10% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。结果表明 TK1046 (pPH14)

株所表达的融合蛋白 ompF-STII-LacZ 分子量略大于 β -半乳糖苷酶和 TK1046 (pPH-1) 株表达的 ompF-LacZ 蛋白 (结果未显示)。但在同样条件下, 融合蛋白的量低于 ompF-LacZ 蛋白量。

(三) 融合蛋白的免疫沉淀

为了证实抗 β -半乳糖苷酶抗体能够识别融合蛋白中的部分序列, 将 TK 1046 (pPH 14) 菌株用 35 S-甲硫氨酸标记。将标记后的菌体裂解液上清与抗 β -半乳糖苷酶抗体保温, 然后用 Pansorbin 沉淀抗原-抗体复合物。将沉淀物加热, 离心后上清进行 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。放射自显影的结果 (图版 I-1) 表明, 融合蛋白中的 β -半乳糖苷酶部分序列能被抗 β -半乳糖苷酶抗体识别并结合。而 TK1046 受体株和 TK1046 (pORF1) 载体株在同样条件下没有特异性的沉淀带出现。

为了进一步证实融合蛋白中 ST II 部分能够诱发特异性的抗 ST II 抗体, 纯化了融合蛋白并获得了抗融合蛋白抗体。将产生天然 ST II 全毒素的菌株 C600 (pCHL 6) 标记。因为该菌株表达的 ST II 全毒素分泌到培养物上清液内, 用上述同样方法使抗融合蛋白抗体从上清液中沉淀了 ST II 毒素。结果表明抗融合蛋白抗体能够识别并沉淀天然的 ST II 肠毒素 (图版 I-2)。

(四) TK1046 (pPH14) 菌株的毒性试验

因为在重组质粒 pPH14 中, 含有 ST II 的大部分结构基因, 而该基因片段来源于产生具有 ST II 肠毒素生物活性的引起猪肠段液体分泌的 C600 (pCHL6), 我们用猪肠环结扎法测定了 TK1046 (pPH14) 表达产物的生物活性。结果该菌株并不引起猪肠段积液产生, 表明该菌株有可能用

和lacZ基因连接处的序列及阅读框架也是正确的。(结果未显示)。

(二) TK 1046 菌株的转化和融合蛋白表达水平测定

因为在受体 MH 3000 中, ompF 启动子是关闭的, 而且因为 TK 1046 受体菌株的转化频率仅为 MH3000 的 1%, 所以需要首先用 MH3000 受体菌获得含有重组 DNA 的克隆, 然后将候选者再引入 TK 1046 受体中, 从而有可能获得高水平的融合蛋白表达。在转化 TK1046 时省略 42°C 加温步骤; 并在室温下培养。将 pPH14 和 pPH1 分别转化 TK1046 受体后, 我们测定了在 28°C、32°C 和 28°C 先培养然后再升温至 42°C 时 β -半乳糖苷酶的活性。发现在 32°C 培养时, 其酶活性约为 28°C 时的 1.5—2.0 倍, 同时发现 TK1046 (pPH14) 的融合蛋白酶活性低于阳性对照 TK1046 (pPH1) 约 3 倍。而 Silhavy 在他的实验中 42°C 则高于 28°C 的表达结果, 这在我们的实验中没有见到。表 2 为 32°C 时测量结果。

表 2 培养物中 β -半乳糖苷酶活性
Table 2 Activity of β -galactosidase in culture

菌株 Strain	β -半乳糖苷酶活性 β -galactosidase activity
TK1046 (pORF1)	4.5
TK1046 (pPH1)	1463.3
TK1046 (pPH14)	555.9

为了进一步观察 TK1046 (pPH 14) 所表达的融合蛋白情况, 将 20ml 的培养物于 32°C 培养过夜, 然后将菌体悬于裂解缓冲液内 (125mmol/L Tris-HCl pH6.8—2% SDS—9% 甘油—0.7 mol/L β -巯基乙醇—0.0025% 溴酚蓝), 加热裂解, 离心后的上清进行 10% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。结果表明 TK1046 (pPH14)

株所表达的融合蛋白 ompF-STII-LacZ 分子量略大于 β -半乳糖苷酶和 TK1046 (pPH 1) 株表达的 ompF-LacZ 蛋白 (结果未显示)。但在同样条件下, 融合蛋白的量低于 ompF-LacZ 蛋白量。

(三) 融合蛋白的免疫沉淀

为了证实抗 β -半乳糖苷酶抗体能够识别融合蛋白中的部分序列, 将 TK 1046 (pPH 14) 菌株用 35 S-甲硫氨酸标记。将标记后的菌体裂解液上清与抗 β -半乳糖苷酶抗体保温, 然后用 Pansorbin 沉淀抗原-抗体复合物。将沉淀物加热, 离心后上清进行 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。放射自显影的结果 (图版 I-1) 表明, 融合蛋白中的 β -半乳糖苷酶部分序列能被抗 β -半乳糖苷酶抗体识别并结合。而 TK1046 受体株和 TK1046 (pORF1) 载体株在同样条件下没有特异性的沉淀带出现。

为了进一步证实融合蛋白中 ST II 部分能够诱发特异性的抗 ST II 抗体, 纯化了融合蛋白并获得了抗融合蛋白抗体。将产生天然 ST II 全毒素的菌株 C600 (pCHL 6) 标记。因为该菌株表达的 ST II 全毒素分泌到培养物上清液内, 用上述同样方法使抗融合蛋白抗体从上清液中沉淀了 ST II 毒素。结果表明抗融合蛋白抗体能够识别并沉淀天然的 ST II 肠毒素 (图版 I-2)。

(四) TK1046 (pPH14) 菌株的毒性试验

因为在重组质粒 pPH14 中, 含有 ST II 的大部分结构基因, 而该基因片段来源于产生具有 ST II 肠毒素生物活性的引起猪肠段液体分泌的 C600 (pCHL6), 我们用猪肠环结扎法测定了 TK1046 (pPH14) 表达产物的生物活性。结果该菌株并不引起猪肠段积液产生, 表明该菌株有可能用

参 考 文 献

- [1] Gyles, C.L. and Barnum, D.A.: *J. Infect. Dis.*, 120:419—426, 1969.
 [2] Chen, T-M. et al.: *Infect. Immun.*, 47:5—10, 1985.
 [3] Picken, R.N. et al.: *Infect. Immun.*, 42:269—275, 1983.
 [4] Klipstein, F.A. et al.: *Infect. Immun.*, 40:888—893, 1983.
 [5] Moseley, S.J. et al.: *Infect. Immun.*, 39:1167—1174, 1983.
 [6] So, M. and McCarthy, B.J.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 77:4011—4015, 1980.
 [7] Weinstock, G.M. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 80:4432—4436, 1983.
 [8] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, p113—116, 252—253, 1982.
 [9] Maas, R. et al.: *Infect. Immun.*, 49:46—51, 1985.
 [10] Miller, J.H.: *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, p352—356, 1972.
 [11] Ullmann, A.: *Gene*, 29:27—31, 1984.
 [12] Lee, C.H. et al.: *Infect. Immun.*, 42:264—268, 1983.
 [13] Fower, A.V. and Zabin, I.: *J. Biol. Chem.*, 258:14354—14356, 1983.

CONSTRUCTION OF PLASMID EXPRESSING FUSION PROTEIN WITH POTENTIAL USE IN VACCINE AGAINST HEAT-STABLE Ⅱ ENTEROTOXIN

Huang Peitang

(Molecular Genetics Center, Institute of Biotechnology,
 Academy of Military Medical Sciences, Beijing)

Werner K. Maas

(New York University School of Medicine)

A 125bp DNA fragment containing most of STII structure gene was inserted into a expression vector, pORF1, by blunt-end ligation. The recombinant plasmid, pPH14, was studied in detail by restriction enzyme analysis, STII gene probe and DNA sequencing. The results of bioassay in ligated pig jejunal loops have indicated that this strain, TK1046 (pPH 14), was non-toxic to piglets.

The fusion protein from TK1046 (pPH-14) was purified. The antiserum against fusion protein was made in rabbits. The immunoprecipitation experiments by labelling fusion protein have shown that the antibody against β -galactosidase can not only recognize the partial sequence in fusion protein, but also the anti-fusion protein antibody can precipitate specifically natural STII entero toxin from the supernatant of culture.

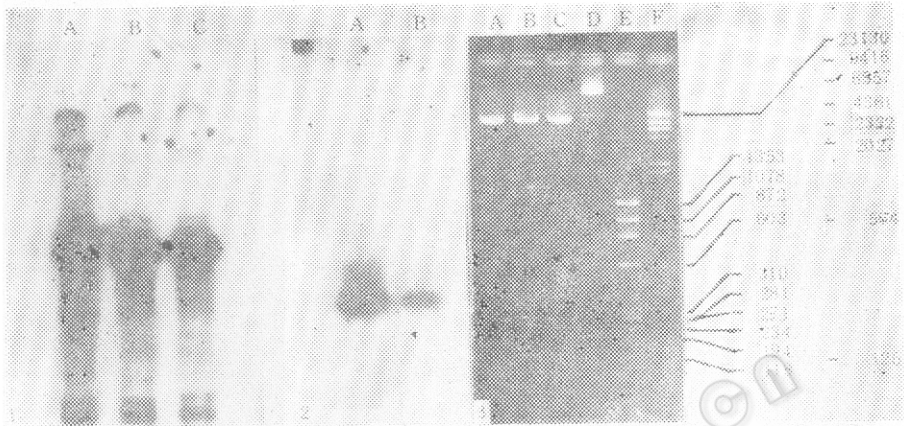
To test the neutralization of antiserum to fusion protein, both the antiserum and ST II enterotoxin samples were mixed and incubated, and then the mixture was injected into pig jejunal loops. The results have shown that there was not liquid secretion in ligated jejunal loops and ST II enterotoxin was strongly neutralized by this antiserum.

According to above experiments, it is considered that TK1046 (pPH-14) strain expressing fusion protein may be useful for vaccine against ST II.

Key words

Enterotoxin; heat-stable enterotoxin II; gene cloning; vaccine

Huang Peitang et al.: Constructure of plasmid expressing fusion protein Plate I with potential use in vaccine against heat-stable Ⅱ enterotoxin



1. 抗β-半乳糖苷酶抗体沉淀标记融合蛋白的结果

Immunoprecipitation of labelling fusion protein by antiserum against β-galactosidase

A. 32°C B. 28°C C. 42°C

2. 抗融合蛋白抗体沉淀标记的天然STⅡ肠毒素结果

Immunoprecipitation of labelling natural STⅡ enterotoxin by antiserum against fusion protein

A. C₆₀₀ (pPHL6), 10µl B. C₆₀₀ (pPHL6) 40µl

3. 重组DNA pPH14酶切鉴定结果

A. EcoRI-BglII B. EcoRI C. BglII D. BamHI E. MW marker, φX174-HaeIII
F. MW marker, λDNA-HindIII