

人产肠毒素大肠杆菌 ST、LT-B 肠毒素基因融合的研究

汪 江 陈添弥

(军事医学科学院生物工程研究所 北京 100850)

摘 要 将人产肠毒素大肠杆菌(ETEC),编码耐热肠毒素(ST)的基因片段与编码不耐热肠毒素 B 亚基(LT-B)的基因进行融合,并在此基础上进行不同数目 ST 基因的串联,ELISA 检测融合基因表达蛋白产物观察到 ST 与 LT-B 之间存在着相互影响,ST 的检测滴度随基因串联个数增加而逐渐升高,而 LT 的 ELISA 滴度则减弱。说明了 ST 可以通过基因串联提高表达产物抗原活性,这为产肠毒素大肠杆菌多价疫苗的研制提供了重要的研究基础。

关键词 产肠毒素大肠杆菌,ST,LT-B,基因融合,重组疫苗

产肠毒素(Enterotoxigenic)大肠杆菌(*Escherichia coli*,ETEC)是发展中国家及旅游者腹泻的主要病因^[1,2]。ETEC 借助定居因子定居于肠粘膜后,所产生的肠毒素导致病理性腹泻。肠毒素包括不耐热肠毒素(Heat-Labile enterotoxin,LT)和耐热肠毒素(Heat-Stable enterotoxin,ST)。ST 为分子量约 2.5kDa 的小蛋白分子,无免疫原性,常为重复感染的病因^[2,3]。LT 完整分子由一个分子量为 2.8kDa 的 A 亚基结合 5 个分子量为 11.5kDa 的 B 亚基蛋白分子所组成^[4],全 LT 及其无毒性的 B 亚基均具有良好的免疫原性^[5]。

流行病学资料表明 LT 及 ST 在人群致泻中均占一定比例。因此本研究进行了 ST 与 LT-B 基因融合的研究,作为构建多价疫苗的基础。本文还进行了 ST 基因串联融合的研究,以了解融合各部分之间影响的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:*E. coli*130 为 ST⁺LT⁻野生标准株,*E. coli*142 为 ST⁻LT⁺野生标准株,均购自上海卫生防疫站。*E. coli*44815 为 ST⁺LT⁺野生标准株系本室保存。pCHP23 为 LT⁻B⁺重组质粒,本室构建^[6]。pSLM004 为 ST1b⁺重组质粒,Dr. Moseley, S. L 惠赠^[7]。pUC18 为本实验用质粒载体,JM101(F⁺ traD36 lacI^q△(lac Z)M15 proAB/supE thi △(lac-proAB))为本实验用受体菌。pMG226-pMG230 为本工作构建。

1.1.2 培养基及化学试剂:用 LB 培养基,在检测表达时用 CAYE 产毒培养基。工具酶及化学试剂购自 Biolab、BRL、Boehringer、Pharmacia 公司。

ST 检测试剂盒购自上海市卫生防疫站,LT ELISA 检测用的抗血清为本室制备,辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG 购自军事医学科学院微生物流行病学研究所。

1.1.3 寡聚核苷酸片段由本室合成。

1.2 方法

1.2.1 质粒 DNA 制备与纯化、片段回收、酶切、连接、转化:均按“分子克隆”^[8]操作,插入 pUC18 的重组子在 X-gal 平板上挑取阳性克隆,ST 串联融合体通过快抽质粒 DNA 酶切筛选鉴定。

1.2.2 PCR 扩增获得目的基因片段:PCR 扩增及产物处理按《PCR 技术的原理与应用》介绍方法进行^[9]。循环条件:变性 94℃ 1 分钟,退火 55℃ 1 分钟,延伸 72℃ 30 秒。经 30 个循环后最后 72℃ 延伸 7 分钟。

1.2.3 Southern blot 杂交:按“分子克隆”^[8]进行,转移所用滤膜为 BRL0.45μm 尼龙膜,基因探针用随机引物法进行标记^[10]。

1.2.4 酶联检测:将已活化的细菌按 1%接种于 CAYE 培养基中,37℃ 培养至 OD₄₉₀ 值 1.0,用多粘菌素 B20 000u/ml 37℃,作用半小时裂解细菌,上清即为样液。

LT 用 GM₁ ELISA 进行检测^[11],结果判定以样品的 OD 值,是阴性对照的 2 倍或 2 倍以上为阳性。ST 竞争抑制 ELISA 结果判定根据说明书规定,样品 OD 值是阴性对照的 50%或 50%以下为阳性。

1.2.5 质粒稳定性试验^[12]:测定含质粒细菌在没有选择压力情况下经 100 细胞世代的含质粒率来观察细菌质粒稳定性。

1.2.6 序列测定:用 Sanger 双脱氧末端终止法测定 DNA 序列^[13]。

2 结果与讨论

2.1 ST1b 目的基因片段的获得

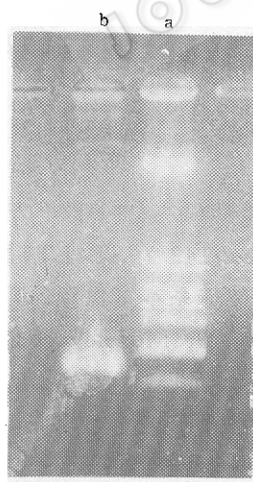


图 1 ST1b 基因 PCR 扩增产物电泳分析

Fig. 1 Electrophoresis analysis of PCR amplification product of ST1b gene

a. pBR322. Hinf I marker

b. 184bp ST1b fragment

ST 全长包括 ST 前蛋白、原蛋白及成熟 ST 三部分(即 pre-pro-ST),由于 ST 原蛋白部分(pro-ST)对 ST 活性无明显影响且对降低 ST 毒性具有一定作用^[14,15],故本研究采用包含 ST 第 20—72 氨基酸的基因片段去进行融合。此片段用 PCR 方法获得,在引物设计中将扩增片段 5'-端引入 BamHI 位点,3'-端引入 Sac I 及 Bgl I 位点。primer 1 及 primer 2 的 5'-端加上合适的保护碱基,合成引物序列如下:

primer 1:5'-CGG GAT CCC AGG ATG CTA
AAC CAG TAG-3'

primer 2:5'-GGA CGA ACA TGG CCC ACG
ATA CCT CAG GCT TCT AGA
AG-3'

以 pSLM004 为模板,经 PCR 扩增得到了 184bp 的 ST1b 基因片段(电泳分析见图 1)。

2.2 ST、LT-B 不同重组体克隆的构建与鉴定

2.2.1 ST 与 LT-B 基因融合克隆的构建:用 BamH I -Sac I 酶切消化的 PCR ST I b 片段与 pCHP23 经 Sac I -Hind III 消化切下的 LT-B 片段连接到经 BamH I -Hind III 酶切处理的 pUC18 载体上,转化 *E. coli* JM101,X-gal 平板上挑取阳性克隆,经快抽质粒 DNA 用 BamH I -Hind III 双酶切鉴定。能切下一条 670bp 的 DNA,此即中间克隆 pMG221。(图 2)。

2.2.2 插入多个 ST I b 基因的串联 ST 与 LT-B 基因融合克隆的构建:经 BamH I -Bgl II 消化的 ST I b 片段,插入到 pMG221 BamH I 位点,转化 *E. coli* JM101, LB 平板上挑取单菌落,抽取质粒 DNA 用 BamH I -Hind III 酶切鉴定。由于 ST I b 的 Bgl II 与 pMG221、BamH I 连接后位点消失,只有上游 BamH I 位点可被切开,故用 BamH I -Hind III 消化得到 840bp 片段的克隆即为含两个 ST 串联基因并与 LT-B 基因融合且正向连接的克隆,此为 ST 基因串联的中间克隆 pMG222 (图 3)。

同样方法依次得

到插入外源基因片段大小约 1000bp、1170bp、1350bp 的 pMG223-pMG225 等一系列含 3、4、5 个 ST I b 基因串联的中间克隆体。

2.2.3 合适阅读框架克隆的获得:由于 pMG221-pMG225 插入的外源片段不符合载体上表达正确蛋白产物的阅读框架,因此为了调整并得到合适阅读框架的克隆,将 pMG221-pMG225 BamH I 位点切开,经 klenow 酶补平末端后自身连接环化,转化 *E. coli* JM101,经 BamH I 酶切鉴定不能切开的克隆即为阅读框架正确的克隆。分别含有 1—5

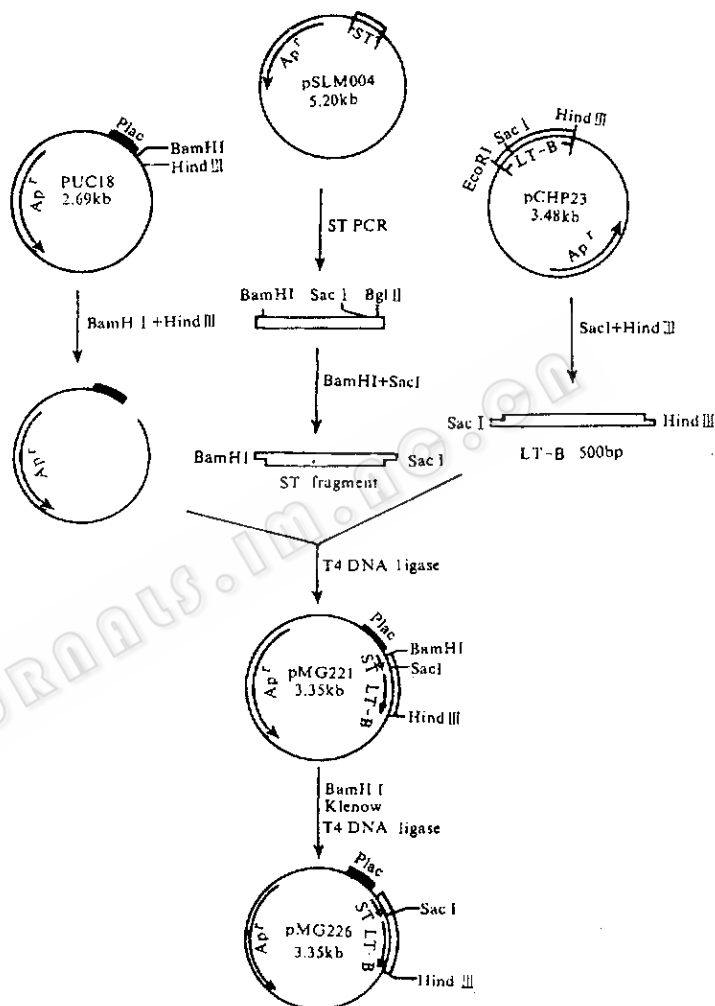


图 2 pMG226 重组质粒构建图

Fig. 2 Construction of the recombinant plasmid pMG226

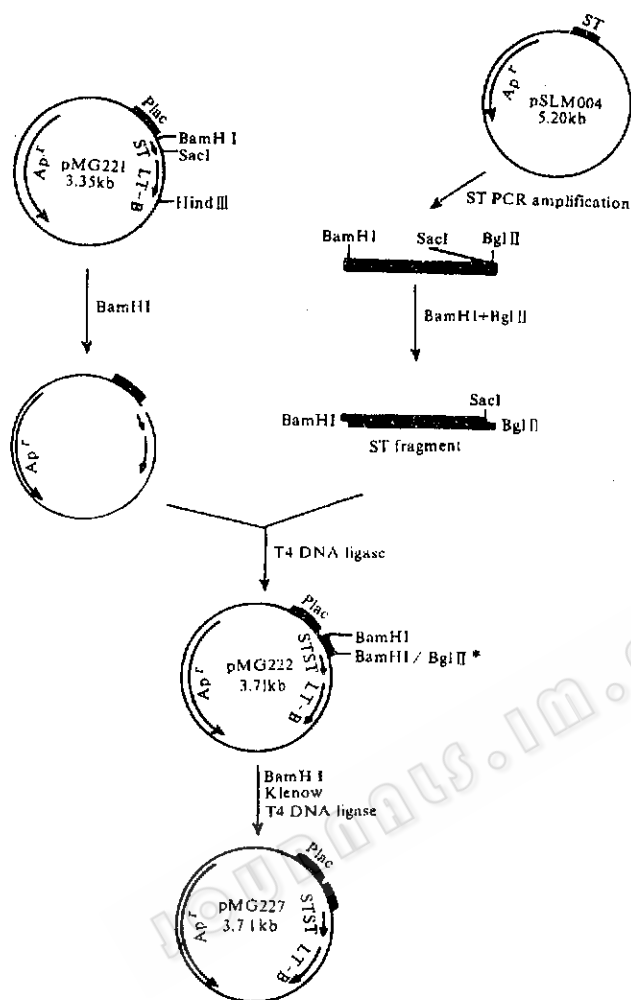


图 3 pMG227 重组质粒构建图

Fig. 3 Construction of the recombinant plasmid pMG227

* The site was destroyed after the ligation

LT GM₁ ELISA 检测三次结果平均见表 1。

由上可见,在 ST 单体与 LT-B 基因融合后 ELISA 能检测到 LT 的活性,而在进行 ST 串联后克隆产物 ELISA 检测 LT 活性逐渐减弱;而 ST 活性则逐渐随 ST 串联数目的增加而增加,这两点可以从测得的 OD 值上看到,说明在基因融合后蛋白产物之间存在着相互的影响,因此二者在 ELISA 检测中发生一些相关联的变化。这除了可能存在的基因表达影响外,通过对融合蛋白的二级结构用计算机进行分析,推测可能在蛋白折叠过程中直接相连的 ST 与 LT-B 妨碍了相互抗原部位的表露亦有关。对进一步减弱其相互间的影响作用尚需进一步探讨。

ST 与 LT-B 基因融合是 ETEC 腹泻多价疫苗研制工作中一项重要的基础性工作,ST 为小分子蛋白无免疫原性,通过证实 ST 与 LT-B 的融合可使 ST 获得免疫原性。但诸

个 ST 基因,相应地命名为 pMG226-pMG230。酶切鉴定及相应的标记 ST 基因探针 Southern blot 杂交,见图 4 及图 5,图 4 中可见 pMG226-pMG230 不完全消化质粒电泳带随质粒大小递增而呈现的迁移距离递减;标记 LT-B 基因探针 Southern blot 杂交结果与标记 ST 基因探针的结果相似。

2.3 DNA 序列测定

为进一步鉴定重组体,进行序列测定。所用引物是 LT-B 结构基因 Sac I 位点后 11bp 的一段寡聚核苷酸片段,其序列为 5'-CCG AAC ATA GTT CTG T-3' 延伸反应向上游延伸,结果表明 ST 与 LT-B 基因间连接处序列正确(电泳图略)。

2.4 质粒稳定性

经 100 细胞世代后,含质粒率 100%,说明具有良好的稳定性。

2.5 ELISA 检测克隆表达情况

ST 竞争抑制酶联与

多研究发现二者在融合后的相互影响使融合后各部分抗原活性均较融合前有不同程度的下降^[16,17]。

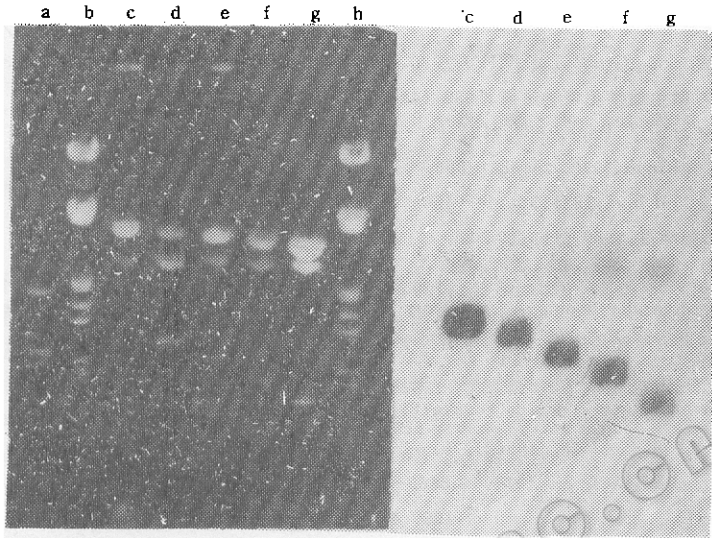


图 4 pMG226—pMG230 酶切分析

Fig. 4 Restriction analysis of recombinant plasmids
b, h: λ DNA. EcoRI + HindIII marker
a: pBR322. BstNI marker
c-g: pMG226—pMG230. EcoRI + HindIII

图 5 标记 ST 基因探针 Southern blot 杂交结果

Fig. 5 The result of Southern blot by labelled ST probe

表 1 ST 与 LT 酶联免疫检测结果

Table 1 Result of ST and LT ELISA detection

Sample	ST(OD ₄₉₀) ⁽¹⁾	Result of ST ⁽²⁾	LT(OD ₄₉₀) ⁽³⁾	Result of LT ⁽⁴⁾
Positive control	0.02	+	0.57	+
Negative control	0.24	—	0.15	—
pMG226	0.28	—	0.47	+
pMG227	0.19	—	0.22	—
pMG228	0.12	+	0.17	—
pMG229	0.07	+	0.15	—
pMG230	0.02	++ ⁽⁴⁾	0.16	—

(1)It was detected by competitive ELISA. The positive control was *E. coli* 130 strain, and the negative control was *E. coli* JM101 harbouring pUC18.
(2)The decision of the result see the 'methods'.
(3)It was detected by GM₁ ELISA. The positive control was *E. coli* 142 strain, and the negative control was *E. coli* JM101 harbouring pUC18.
(4)Titer of the sample corresponded with the positive control when the sample was diluted into two folds.

使用能降低 ST 毒性而不影响其抗原活性的 pro-ST 基因片段与 LT-B 基因融合,并在国内外首次进行了 ST 基因的串联融合探索,各融合子可表达融合蛋白产物,ELISA 检测 ST 与 LT 抗原活性有所不同。以上结果说明 ST 与 LT-B 基因融合使产物分子增大成

为完全抗原的途径是可行的;ST 基因串联后可使其产物活性提高,ST 与 LT-B 间存在的相关性,这些对于基因融合的研究与 ETEC 多价疫苗株的构建是很有价值的。

参 考 文 献

- [1]WHO Scientific Working Group. Bull WHO, 1980, **58**(1):23-36.
- [2]WHO/CDD/IMV. 微生物学免疫学进展, 1989, (4):36-40.
- [3]Svennerholm A M *et al.* Vaccine, 1989, **7**(3):196-198.
- [4]Kunkel S L *et al.* Inf Imm, 1979, **25**:586-596.
- [5]Klipstein F A *et al.* Inf Imm, 1981, **31**:144-150.
- [6]程新波等. 生物工程学报, 1989, **5**(1):19-23.
- [7]Moseley S L *et al.* Inf Imm, 1983, **39**:1167-1174.
- [8]Sambrook J *et al.* Molecular cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab. Press, Second edition. 1989.
- [9]黄培堂等. PCR 技术的原理和应用. 北京: 中国科学技术出版社, 1990.
- [10]Feinberg A P *et al.* Anal Biochem, 1984, **137**:266.
- [11]刘传喧等. 中华微生物学和免疫学杂志, 1989, **9**(1):62-65.
- [12]Abeles A L *et al.* J Mol Biol, 1985, **185**(2):261-272.
- [13]Sanger F *et al.* Proc Natl Acad Sci, 1977, **74**:5463-5467.
- [14]Guzman-verduzco L M *et al.* Mol Microbiol, 1990, **4**(2):253-264.
- [15]Aitken R *et al.* Vaccine, 1993, **11**:227-232.
- [16]Clements J D *et al.* Inf Imm. 1990, **58**:1159-1166.
- [17]Guzman-verduzco L M *et al.* J Bacteriol, 1987, **169**:5201-5208.

Study on the Genetic Fusion of Heat-stable and Heat-labile B Subunit of the Enterotoxin of Enterotoxigenic *Escherichia coli*

Wang Jiang Chen Tianmi

(Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850)

Abstract The gene encoding pro-ST of heat-stable enterotoxin(ST) of enterotoxigenic *Escherichia coli*(ETEC)was fused to the gene encoding the B subunit of heat-labile enterotoxin(LT-B). And based on this clone, a series of plasmids harbouring 2-5 tandem copies of ST gene plus LT-B gene were constructed. The expression of ST and LT-B fusion gene were detected by ELISA technique. The ELISA titers of ST increased but LT-B decreased with the increase of the ST gene copy number. It showed that the ST antigenicity could be improved and provide theoretical basis for developing a divalent vaccine against ETEC.

Key words Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC), heat-labile enterotoxin (LT), heat-stable enterotoxin(ST), gene fusion, recombinant vaccine