

CS3 抗原基因的表达及纤毛装配元件的研究

董自正 张兆山* 李淑琴 黄翠芬

(北京生物工程研究所 北京 100871)

摘 要 在肠毒素大肠杆菌(ETEC)的已知定居因子中,CS3 是临床分离株中最常见的抗原之一。为了研究 CS3 纤毛装配的基本元件,绘制了 CS3 亚基结构基因和辅助蛋白编码区的限制酶谱。通过亚克隆的亚基基因和不同辅助蛋白基因之间的互补性表达结果,确定了 CS3 纤毛装配所需要的辅助蛋白的 DNA 功能片段。微细胞分析结果显示,CS3 基因的有效表达和纤毛的装配至少需要 6 条蛋白多肽分子量分别为 15kDa, 17kDa, 24kDa, 27kDa, 48kDa 和 90kDa。除了 15/17kDa 的蛋白多肽为 CS3 亚基外,其余的蛋白多肽参与 CS3 亚基的转运及纤毛的装配。根据以上结果初步确定了上述相关基因的相对位置。

关键词 肠毒素大肠杆菌,表面抗原 CS3,纤毛装配,基因克隆

学科分类号 Q78

ETEC 是引起婴幼儿和旅游者腹泻的主要病原菌。ETEC 的致病性依赖于两类毒性因子,即肠毒素和定居因子抗原(Colonization Factor Antigens, CFAs)。CFAs 的功能是介导 ETEC 对宿主小肠的粘附,使之在肠道中定居并繁殖增生^[1]。在已知的人源的 ETEC 的 CFAs 中, CFA/ I、CFA/ II 和 CFA/ IV 分布较广,是优势血清型。在上述三种主要 CFAs 中, CFA/ I 为单一抗原组分。而 CFA/ II 则有三种抗原组分,分别称为 CS1、CS2 和 CS3,临床分离株中常以 CS1/CS3, CS2/CS3 组合形式或单独以 CS3 的形式出现,CS3 是 CFA/ II 阳性菌株的共有抗原^[2]。CS3 为 60Md 的大质粒所编码。尽管 Boyan 等^[3]曾利用 Tn5 转座子插入灭活的方法,确定了 CS3 亚基结构基因在大质粒中所处的位置,Willshaw 等^[4]也克隆了 CS3 编码区,并在 *E. coli* K12 宿主菌中得以表达,但对 CS3 纤毛的装配没有进行详细系统的研究。本研究通过编码 CS3 及 CS3 纤毛装配相关的 DNA 区段进行限制性制图,亚克隆及互补性表达试验以及微细胞分析,初步提示了参与 CS3 纤毛装配所必需相关的基因,为研究 CS3 基因表达调控的机理奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

pMGD3 是带有 CS3 亚基结构基因和纤毛装配所需要的辅助蛋白基因的重组质粒,系本研究室构建^[5]。PACYC184 和 pUC19 为载体质粒,*E. coli* RR1 和 DH5 α 为受体菌,

本研究项目是国家“863”基金课题。

* 联系通讯人。

收稿日期:1997-04-30,修回日期:1997-11-14。

以上质粒和菌株均为本研究室保存。产生微细胞的 *E. coli* DS410 由爱尔兰 Trinity 学院 Symyth 教授惠赠。

1.2 培养基

LB 肉汤培养基。CFA 固体培养基:1% 水解酪蛋白,0.15% 酵母粉,0.005% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$,0.0005% $MnCl_2$,1.3% 琼脂粉(青岛水产品加工厂产品),pH 7.4。

1.3 限制酶及修饰酶

限制酶、T4 DNA 连接酶、DNA 聚合酶 I 大片段及序列分析试剂盒分别购自 Promega 公司、中国华美公司和瑞典 Pharmacia 公司。

1.4 放射性同位素

$[\alpha-^{32}P]dATP$ 、 $[\gamma-^{32}P]ATP$ 购自中国福瑞公司, ^{32}S -Methionine 购自 Dupont 公司。

1.5 DNA 体外重组、Southern 杂交、SDS-PAGE 和 Western 免疫印迹

质粒 DNA 提取、酶切、回收、连接和转化等按参考文献[6]进行。

1.6 全细胞酶联免疫吸附分析(Whole cell ELISA)

按参考文献[7]进行。

1.7 微细胞分析

微细胞的纯化、质粒表达蛋白的标记及检测按参考文献[8]进行。

1.8 电镜观察^[9]

将细菌接种在 CFA 琼脂板上,37℃ 培养 18~20h,用 PBS 悬浮并洗涤。用 2% 磷钨酸进行负染。

表 1 pMGD3 各种限制酶切后所产生的限制性片段
Table 1 The restriction fragments of the recombinant plasmid pMGD3

Restriction enzyme	DNA fragments/kb
BamHI	9.3
Cla I	9.3
PvuI	9.3
Hind III	9.3
XbaI	no site
XhoI	no site
PstI	1.3, 2.2, 5.8
EcoRI	1.8, 2.4, 5.1
Hinc II / Hind III	0.5, 0.6, 1.3, 3.3, 3.7
Hinc II / EcoRI	0.4, 0.5, 1.3, 1.4, 2.4, 3.3
Hinc II / PstI	0.3, 0.8, 1.0, 1.4, 2.8, 3.0
PstI / EcoRI	0.5, 0.7, 0.9, 1.2, 1.3, 4.6

2 结 果

2.1 限制性酶切分析

重组质粒 pMGD3 是用 pBR322 作载体与 5.0kb 左右的带有 CS3 亚基结构基因和 CS3 纤毛装配所需辅助蛋白编码区的 Hind III 外源片段构建而成。用 Hind III、BamHI、Hinc II 和 Xho I 等 10 余种限制酶进行单酶或双酶消化 pMGD3 DNA, 琼脂糖凝胶电泳分离 DNA 片段(结果见图 1)。并将各种条件下酶切所产生的 DNA 片段归纳如表 1。

根据以上限制酶酶切情况, 归纳出重组质粒 pMGD3 中 CS3 亚基结构基因和辅助蛋白编码区的酶切图谱(如图 2 所示)。

2.2 CS3 亚基结构基因区及辅助蛋白编码区的定位及其亚克隆

在纤毛抗原表达及装配过程中, 不仅需要 CS3 亚基蛋白, 而且还需要起运输、装配等

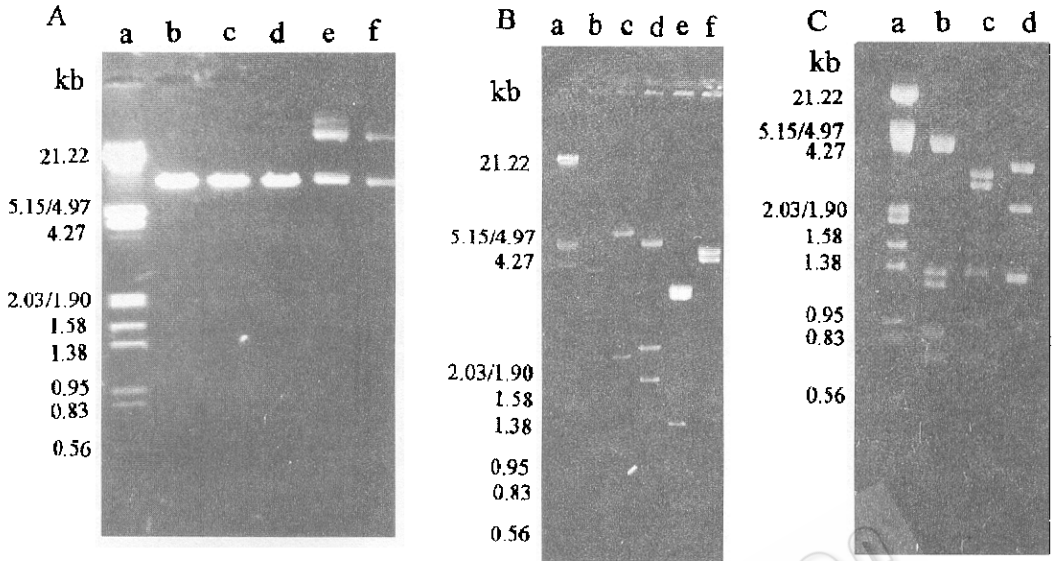


图 1 重组质粒的限制性酶切分析结果

Fig. 1 The restriction map of the recombinant plasmid pMGD3

A. The results of pMGD3 DNA digested by single enzyme

a. Marker (λDNA/HindIII/EcoRI); b. BamHI; c. ClaI; d. PvuI; e. XhoI; f. XbaI

B. The results of the plasmids digested by single or double enzymes

a. Marker; b. pMGD4/PstI; c. pMGD3/PstI; d. pMGD3/EcoRI; e. pMGD3/HindIII/HincII; f. pMGD3/HindIII

C. The results of pMGD3 digested by double enzymes

a. Marker; b. PstI/EcoRI; c. HincII/PstI; d. HincII/EcoRI

功能的辅助蛋白^[10]。为了便于亚克隆,首先以 CS3 亚基结构基因作为探针来定位其结构基因区。根据限制图谱,分别以 PstI、EcoRI 及 Hind III/Hinc II 消化 pMGD3 DNA,进行 Southern 印迹杂交。结果显示,EcoRI 单酶切 pMGD3 DNA 产生的 1.8kb 的 DNA 片段和 Hind III/Hinc II 双酶切产生的 1.3kb 的 DNA 片段上,含有完整的 CS3 亚基结构基因,而 PstI 则将 CS3 切成两部分。这一结果与核苷酸序列分析发现在 CS3 亚基结构基因中含有两个 PstI 切点的结果相一致^[11]。

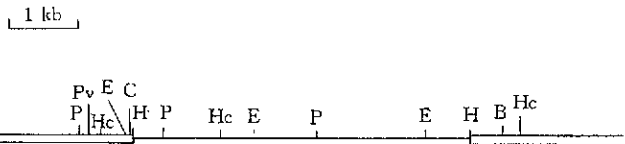


图 2 重组质粒 pMGD3 的限制酶谱示意图

Fig. 2 The restriction map of the recombinant plasmid pMGD3

P: PstI; B: BamHI; C: ClaI; E: EcoRI; H: Hind III; Hc: Hinc II; Pv: PvuI;

□: pBR322; "—": The genetic determinant of CS3 fimbriae

为了克隆 CS3 亚基结构基因及辅助蛋白编码区,用 Hind III/Hinc II、EcoRI 和 PstI 分别消化 pMGD3 质粒 DNA,回收纯化不同的 DNA 片段,分别克隆入 pUC19 中,构建的重组质粒分别命名为 pMGD5, pMGD6, pMGD11, pMGD32 和 pMGD33(见图 3)。在这些重

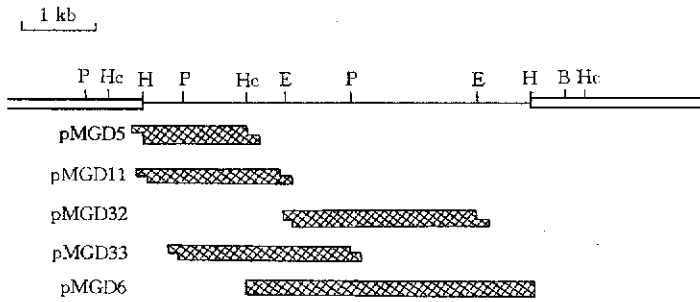


图3 用 pUC19 构建 CS3 结构基因和辅助蛋白编码区不同突变体的示意图

Fig. 3 Schematic construction of mutant plasmids containing the structural gene and auxillary genes of CS3 fimbriae using plasmid pUC19

亚基结构基因。以 pACYC184 为载体质粒,用 SphI 消化后,用 DNA 聚合酶大片段补平,再用 BamHI 消化,最后使之与 CS3 亚基结构基因连接,构建成重组质粒 pMGD8。

2.3 互补性表达分析

互补性表达结果用全细胞 ELISA 检测来判定。分别用 pMGD8/pMGD6、pMGD8/pMGD32、pMGD8/pMGD33 和 pMGD11/pMGD32 共转化 DH5 α ,并用氯霉素和氨苄青霉素双抗性培养基培养。在 CFA 琼脂培养基板上 37 $^{\circ}$ C 培养 18~20h 后,全细胞 ELISA 检测 CS3 纤毛抗原。

重组菌 DH5 α (pMGD8/pMGD6)经负染后,用电镜可以观察到细菌表面长有纤细浓密的菌毛(图 4)。

由以上结果可见,pMGD8 与 pMGD6 互补表达时,CS3 与野生株的表达水平相当。电镜下也观察到了菌毛。这些结果说明,上述两个重组质粒包含了 CS3 亚基结构基因和

重组质粒中,除 pMGD5 及后文提到的 pMGD8 含有 CS3 亚基结构基因自身的启动子外,其他重组质粒都是利用载体质粒的 lac 启动子。

进行互补性表达实验需要两个相容性质粒,以 pMGD5 为起始质粒,首先用 Hind III 切割,经 DNA 聚合酶大片段将粘性末端补平后,再用 BamHI 消化回收 CS 3

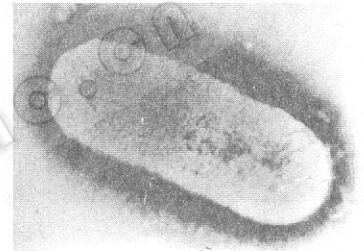


图 4 表达 CS3 纤毛的 DH5 α (pMGD8/pMGD6)的电镜观察

Fig. 4 Electron micrography of the recombinant bacteria DH5 α (pMGD8/pMGD6)

纤毛装配所需功能蛋白的基因,而且在构建过程中所用的内切酶未破坏这些基因的完整性。

2.4 重组质粒在微细胞中的表达

分别用重组质粒 pMGD3、pMGD6、pMGD8、pMGD32、pMGD33 转化 DS410 宿主菌。通过微细胞的纯化、蛋白标记、SDS-PAGE 及放射自显影观察重组质粒表达蛋白的情况。结果显示,(1)pMGD3 编码 15kDa, 17kDa, 24kDa, 27kDa, 48kDa 和

表 2 全细胞 ELISA 检测 CS3 抗原的结果

Table 2 The antigenicity of CS3 analyzed by whole cell ELISA

Strain	P/N*
DH5 α (pMGD8/pMGD6)	6.5
DH5 α (pMGD8/pMGD32)	1.4
DH5 α (pMGD8/pMGD33)	1.3
E44815(WT**)	6.7

* :P/N 值为三次测定平均值,<2 为阴性。

** :系 CS3 阳性野生株。

90kDa 等 6 条蛋白多肽(图 5);同时,当用乙醇处理标记培养混合液时,15kDa 蛋白量减少而 17kDa 的蛋白量增多;(2)pMGD8 编码 15kDa,17kDa 和 24kDa 三条蛋白多肽,当用乙醇处理标记培养液时,同样出现上述情况;(3)pMGD6 编码 90kDa,48kDa 和 27kDa 三条蛋白多肽;(4)pMGD32 编码 80kDa,38kDa 和 27kDa 三条蛋白多肽;(5)pMGD33 编码 24kDa 的蛋白多肽。Western 免疫印迹检测发现 15kDa 和 17kDa 的蛋白多肽均可与抗 CS3 血清反应。

综合以上结果,CS3 亚基结构基因和辅助蛋白基因的相对位置归纳在图 6 中。

3 讨 论

ETEC 细胞表面的纤毛是由成百上千个亚基蛋白在辅助蛋白的参与下装配而成,这些辅助蛋白位于胞浆、周质和细胞膜等部位参与亚基蛋白的分泌、输送及在细胞膜上纤

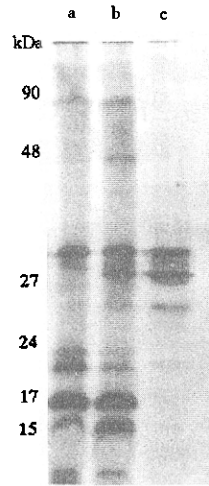


图 5 微细胞分析重组质粒 pMGD3 编码蛋白情况

Fig. 5 Mimicell analysis of polypeptides encoded by recombinant plasmid pMGD3

a. pMGD3, ³⁵S-labelling in the presence of 9.5% ethanol to inhibit processing; b. pMGD3; c. pBR322

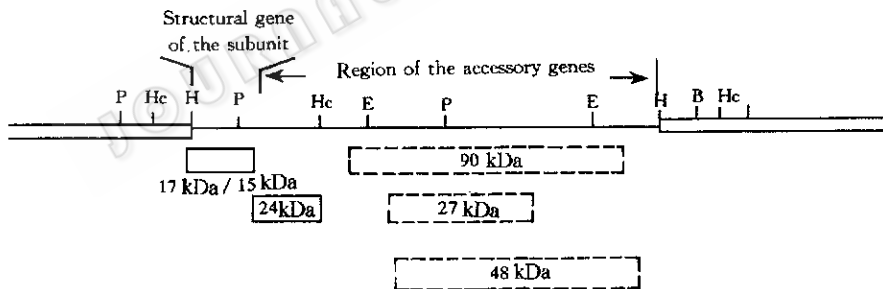


图 6 CS3 亚基结构基因及其辅助蛋白编码区的相对位置示意图

Fig. 6 Relative location of the genes in the genetic determinant encoding CS3 fimbriae

毛的装配过程。文献报道,K88、F41 和 1 型等纤毛抗原的亚基结构基因区可以和辅助蛋白编码区分开^[12]。当将这两部分分别克隆共转化时,可以表达并装配成菌毛。K88^[10]、CSI^[13]和 CFA/1^[14]等的功能蛋白编码区,亚基结构基因均位于编码区的 5' 端,并通过对称序列形成的茎环结构等衰减子,调节、限制辅助蛋白的表达,以协调亚基蛋白与辅助蛋白之间的表达比例。根据 CS3 编码区的限制酶图谱和 Southern 印迹杂交结果,CS3 亚基结构基因位于这组基因的最后 3' 末端的最后一个基因。这种结构上与 CFA/1 等的不同,可能意味着 CS3 亚基结构基因和辅助蛋白基因之间存在着一种特殊的调控方式。

微细胞分析表明,CS3 基因的有效表达及纤毛的装配至少需要六个基因所编码的六

种蛋白多肽,其分子量分别为 15kDa, 17kDa, 24kDa, 27kDa, 48kDa 和 90kDa。Western 免疫印迹试验及乙醇处理微细胞标记培养液抑制蛋白分泌试验结果表明 15kDa 蛋白多肽是由 17kDa 蛋白多肽经过分泌加工而来。本研究的互补表达结果表明, pMGD6 与 pMGD8 共转化宿主菌可以表达 CS3 并能装配成菌毛, 而 pMGD32 和 pMGD33 则不能。可见 90kDa 和/或 48kDa 的蛋白为 CS3 的表达和纤毛装配所必需。文献报道认为在纤毛的装配中最大的蛋白位于细菌细胞膜的外面, 可能参与纤毛的装配^[15]。本研究中的 90kDa 的蛋白质可能起同样的作用。至于各种蛋白质的确切功能有待于更深入的研究。

参 考 文 献

- 1 Seignole D, Mouricout M, DuvMouricout M, Duval-Iflah Y *et al.* J Gen Microbiol. 1991, **137**:1591
- 2 Mullaney P, Field A M, McConnell MM *et al.* J Gen Microbiol. 1983, **129**:359
- 3 Boylan M, Smyth C J, Scott J. Infect Immun, 1988, **56**:3297
- 4 Willshaw G A, Smith H R, McConnell MM *et al.* FEMS Microbiol Lett. 1988, **49**:473
- 5 董自正, 张兆山, 李淑琴等. 中华微生物学和免疫学杂志. 1994, **14**:84
- 6 Sambrook J, Fritch E F, Maniatis T. Molecular Cloning (second edition), NY, CSH Laboratory Press, 1989
- 7 Boylan M, Coleman D C, Smyth C J. Microb Pathog. 1987, **2**:195
- 8 黄培堂, 熊凌霄, 马清钧等. 中华微生物和免疫学杂志. 1984, **4**:98
- 9 Sommerfelt H, Grewal H M S, Svennerholm A *et al.* Infect Immun. 1992, **60**:3799
- 10 Hamers A M, Pel H J, Willshaw G A *et al.* Microb Pathog. 1989, **6**:297
- 11 董自正, 张兆山, 李淑琴等. 中华微生物学和免疫学杂志. 1993, **13**:345
- 12 Korth M J, Apostol J M J R, Moseley S L. Infect Immun. 1992, **60**:2500
- 13 Caron J, Coffield L M, Scott J R. Proc Natl Acad Sci USA. 1989, **86**:963
- 14 Gasstra W, Jordi B J A M, Mul E M A *et al.* Microb Pathog. 1990, **9**:285
- 15 Klemm P. Rev Infect Dis. 1985, **7**:321

Study on the Genetic Determinant for Expression and Assembly of CS3 Fimbriae

Dong Zizheng Zhang Zhaoshan Li Shuqin Huang Cuifen

(Beijing Institute of Biotechnology, Beijing 100071)

Abstract Colonization factor antigens (CFAs) are important toxic and protective antigens of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). Among the known CFAs, CS3 is a major fimbriae antigen. To study genes encoding CS3 subunit and auxillary proteins which are responsible for assembly of CS3 fimbriae, the restriction map of CS3 genetic determinant was made. Based on the map, the structural gene of CS3 subunit and the region encoding auxillary proteins were cloned respectively. Expression results of the recombinant plasmids in minicells showed that the genetic determinant of CS3 fimbriae encodes six polypeptides with the molecular weight 15, 17, 24, 27, 48 and 90kDa, respectively. Complementary expression analysis among the different mutant showed 15kDa/17kDa proteins are CS3 subunit and it's precursor, the others may be necessary for assembly of CS3 fimbriae. The relative location of various genes of CS3 genetic determinant was determined.

Key words Enterotoxigenic *Escherichia coli*, coli surface antigen 3, fimbriae assembly, gene cloning