

## 霍乱弧菌 *zot* 基因的克隆及其在大肠杆菌中的表达

何志勇<sup>1,2</sup> 陈哲宇<sup>1\*</sup> 王东宁<sup>1,2</sup> 杨冠珍<sup>1</sup> 张惟杰<sup>2</sup> 吴祥甫<sup>1\*\*</sup>

(中国科学院上海生物化学研究所 上海 200031)

(上海交通大学生物科学与技术系 上海 200240)

**摘 要** 从霍乱疫苗菌中抽提基因组 DNA,用 PCR 的方法扩增 *zot* 基因。序列分析表明,*zot* 基因编码 399 个氨基酸,其中 4 个氨基酸与文献报道有差异。将 *zot* 基因插入含 T7 启动子的质粒 pET-28(a+)构建表达质粒 pET-ZOT,转化大肠杆菌 BL21(DE3)筛选表达菌株 BLZOT。表达菌株经 1mmol/L IPTG 诱导表达 3~5h 后,表达大量 ZOT 蛋白,并形成包涵体。经 SDS-PAGE 分析重组 ZOT 蛋白分子量约为 47kD,凝胶自动扫描分析表明,重组 ZOT 约占菌体可溶性蛋白量的 15% 以上。本工作为进一步研究蛋白多肽类药物的口服奠定了良好的基础。

**关键词** 封闭带毒素,克隆,表达,大肠杆菌

中图分类号 Q789 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)05-0570-04

药物的口服途径始终是人们所向往的给药途径。口服不仅可以免除注射所带来的痛苦,减少因针头和药物等引起的感染,而且可以大大降低药物生产成本。但是至今为止,口服药物仅仅停留在小分子物质上。对于蛋白和多肽类药物,小肠上皮的吸收仍然是一个巨大的障碍。

近来美国学者 Fasano 等人发现霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)产生的一种称为封闭带毒素(zonula occludens toxin 简称 ZOT)的蛋白质<sup>[1]</sup>,能可逆地作用于小肠上皮细胞间的紧密连接,从而促使蛋白质、多肽类物质穿过小肠上皮细胞进入血液循环<sup>[2,3]</sup>。ZOT 通过对小肠上皮细胞细胞骨架系统修饰,使得肌动蛋白单体聚合成肌动蛋白丝并定位在特定的位置,经一系列的调控,最终引起紧密连接开放<sup>[4]</sup>。Fasano 等人的研究还发现 ZOT 对紧密连接的作用与时间、剂量有关,而且有选择性地作用于小肠上皮细胞间的紧密连接,而对回肠的通透性没有影响。

为了进一步研究 ZOT 的结构与功能的关系,进行口服疫苗、药物的开发,我们根据 Fasano 报道的 *zot* 基因序列<sup>[5]</sup>,从古典霍乱菌基因组 DNA 中克隆了 *zot* 基因序列,并在大肠杆菌中进行了表达。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

古典霍乱小川型(Classic *Vibrio cholerae* O139 简称 CVC)灭活疫苗菌由兰州生物制品所惠赠,大肠杆菌 TG1, BL21(DE3),质粒 pBS-SK(+), pET-28(a+)由本室保存;限制酶, T4 DNA 连接酶 Klenow 酶, Taq DNA 聚合酶为 GIBCO BRL 公司产品, X-gal, IPTG 为 Boehringer mannheim 公司产品。蛋白酶 K 为 E. MERCK 公司产品。

### 1.2 方法

**1.2.1 霍乱菌基因组 DNA 的提取:**取少量菌液,用 TE 洗涤 3 次,将菌悬浮于 570 $\mu$ L TE 中,加入 30 $\mu$ L 10% SDS 和 3 $\mu$ L 20mg/mL 的蛋白酶 K,混匀后于 37 $^{\circ}$ C 温浴 1h。加等体积氯仿:异戊醇(24:1)混匀,离心 4~5min,取上清再用等体积酚:氯仿:异戊醇(=25:24:1)抽提 1 次,上清液加 0.6 倍体积异丙醇沉淀 DNA,沉淀以 70% 乙醇洗 1 次,溶于 100 $\mu$ L TE Buffer 中,置于 4 $^{\circ}$ C 中备用。

**1.2.2 PCR 反应:**取前述基因组 DNA 2 $\mu$ L 按常规的 PCR 反应条件,先将基因组 DNA 预变性 5min,加入 2u 的 Taq 酶,按下列参数循环 35 次:94 $^{\circ}$ C 变性 1min 44 $^{\circ}$ C 退火 1min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2min,最后一个循环 72 $^{\circ}$ C 反应 10min。

**1.2.3 重组克隆, DNA 序列分析:**质粒抽提,酶切反应,电泳鉴定 DNA 片段回收,连接反应,大肠杆菌转化等参考文献[6]稍加修改进行。

收稿日期:1999-11-22,修回日期:2000-05-29。

该基因 GenBank 登录号为:AF123049。

\* 现工作单位:第二军医大学神经生物学教研室。

\*\* 联系人。Tel 86-21-64374430 Fax 86-21-64338357 E-mail xfwu@sun.sh.cn 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

1.2.4 SDS-PAGE SDS-PAGE 操作参照文献 [6] 以 10% 聚丙烯酰胺凝胶为分胶。菌体裂解蛋白电泳后,用 0.25% 考马斯亮蓝染色。经脱色液脱色后,计算机扫描灰度测定其蛋白表达量。另一部分 SDS-PAGE 后进行 Western-blot 分析。

2 结果

2.1 PCR 扩增 *zot* 基因片段

从霍乱疫苗菌抽提基因组 DNA ,用 0.7% 琼脂糖电泳检测,可见点样孔中有大片段 DNA ,说明抽提的基因组 DNA 无明显降解。根据 Fasano 等人报道的霍乱菌 *zot* 基因,我们设计一对引物:

引物 1 :A GGATCCATG AGTATCTTTA TTCATCACGG  
BamHI

引物 2 :A CTCGAGTCAAAATATACTATTTAGTCC  
XhoI

引物 1 为 ZOT N 端编码序列,引入 *Bam*HI 酶切位点。引物 2 为 ZOT C 端编码序列的互补序列,并引入 *Xho*I 位点。以霍乱菌基因组 DNA 为模板进行 PCR 反应,扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检查,可清晰见到约 1 200bp 长的扩增产物(图 1)。同时还得到一条 300bp 的 DNA 片段,经测序分析,其序列经 BLAST 同源序列搜索表明没有同源序列。该序列的全基因与编码序列及其功能我们正在研究之中。

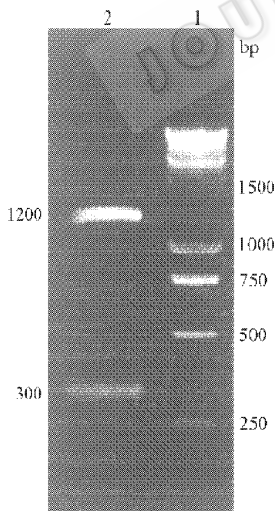


图 1 PCR 产物凝胶电泳分析

Fig.1 Analysis of PCR product by 2% agarose gel electrophoresis  
1. 1kb ladder marker 2. PCR product

2.2 ZOT 基因序列分析

将 PCR 产物与 pGEM-T 载体相连接,转化大肠杆菌 TG1,通过 *Bam*HI 和 *Xho*I 双酶切鉴定含有插入片段的重组质粒。挑取两个阳性克隆进行测

序。所测序列与文献报道的序列比较,有 14 处碱基序列差别,其中 4 处编码氨基酸发生变化,即 30 位 Ile 变为 Met,85 位,257 位和 266 位的 Ala 变为 Val。其余 10 处均为未改变编码的氨基酸。(图 2)



图 2 *zot* 基因序列及其与已报道序列的比较

Fig.2 Sequence of *zot* gene and its comparison to the reported sequence

\* Represent nucleotides different from that of reported ;  
\* \* \* Represent encode different amino acids residues from that of reported

2.3 zot 基因在大肠杆菌中的表达

将克隆在 pGEM-T 质粒中的 *zot* 基因片段用 *Bam*HI 和 *Xho*I 双酶切,低熔点胶电泳回收片段后,与经 *Bam*HI 和 *Xho*I 双酶切的 pET-28( a + )表达载体相连接,构建大肠杆菌表达质粒 pET-ZOT(图 3)。将此表达质粒转化大肠杆菌 BL21( DE3 ),筛选表达菌株。

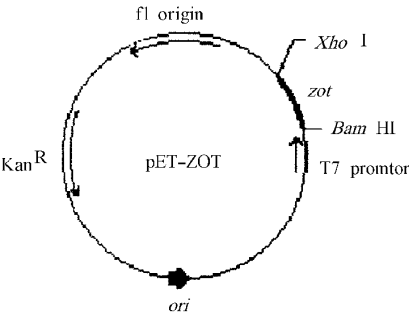


图 3 zot 表达质粒 pET-ZOT 构建图

Fig. 2 Construction of CVC *zot* expression plasmid pET-ZOT

BLZOT 含表达质粒的单菌落在 LB 培养液中(卡那霉素 70mg/mL)37℃摇床培养至  $A_{600}=0.4\sim 0.6$  加入终浓度为 1mmol/L 的 IPTG,诱导表达 3~5h,离心收集菌体,进行 SDS-PAGE 电泳。结果表明,经 IPTG 诱导后可表达分子量约为 47kD 的蛋白质(图 4A),与预期的 ZOT 蛋白分子相一致。经凝胶自动扫描分析表明,表达蛋白占菌体可溶性蛋白的 15%。表达产物以包涵体形式存在于大肠杆菌表达菌株中。用抗 His-Tag 单克隆抗体进行 Western-blot 分析表明 SDS-PAGE 中的特异条带确实为带 His-Tag 的 ZOT 蛋白(图 4B)。

3 讨论

小肠上皮是内环境和小肠腔之间的主要屏障,不仅是吸收营养物质的主要通道,而且是分泌物质的一个结构基础。小肠上皮的吸收有多种途径,其中细胞旁路途径是被动运输的主要方式。小肠上皮的穿透能力与细胞间紧密连接的调控紧密相关。紧

密连接曾经被认为是不可调控的固定的细胞间结构。经过近百年来的研究表明,紧密连接是一个受很多未知因素调控的动态结构。

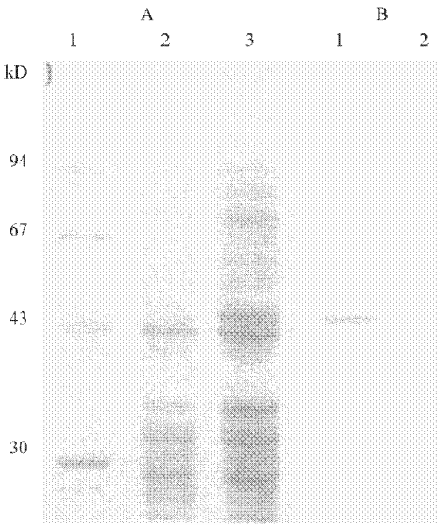


图 4 ZOT 蛋白凝胶电泳和 Western 印迹分析

Fig. 4 SDS-PAGE and Western-blot analysis of ZOT  
(A) 1. Protein marker; 2. Control; 3. Sample induced with 1mmol/L IPTG. (B) Western blot of ZOT

口服给药方式是一种安全、经济、无痛苦而倍受人们重视的给药方式。人们一直在试图克服这一给药方式的障碍,其中包括研究许多促进小肠吸收的药物,但因为具有很强的副作用而终止其进一步研究<sup>[7~10]</sup>。ZOT 已被证实在体内、体外均具有可逆地调节小肠上皮紧密连接的开放,而且具有时间和剂量效应特征。因此 ZOT 是一种到目前为止最具有应用前景的促进小肠上皮吸收的候选药物。

我们从古典霍乱弧菌中克隆了 *zot* 基因,经序列分析表明,编码框全长 1200bp,编码 399 个氨基酸残基,其中有 14 个碱基与国外文献报道不一致,共有 4 个氨基酸残基发生变异。我们将其在大肠杆菌中得到了表达。经 Western blot 抗原性分析,证明了在 SDS-PAGE 中所见的特异条带为表达的 ZOT 蛋白。本工作为进一步进行蛋白质、多肽类药物的口服研究提供了良好的基础。

参 考 文 献

[ 1 ] Fasano A ,Bbaudry B ,Pumplin DW *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA* ,1991 **88** 5242~5246  
[ 2 ] Fasano A , Uzzau S. *J Clin Invest* ,1997 **99**( 6 ) :1158~1164  
[ 3 ] Fasano A ,Uzzau S ,Fiore C *et al.* *Gastroenterology* ,1997 **122** 839~846  
[ 4 ] Fasano A ,Fiorentini C ,Donelli G *et al.* *J Clin Invest* ,1995 **96** 710~720  
[ 5 ] Baudry B ,Fasano A ,Ketley J M *et al.* *Infect Immun* ,1992 **60** 428~434  
[ 6 ] Sambrook J ,Fritsch E F ,Maniatis T. *Molecular Cloning :A Laboratory* ©1989 Cold Spring Harbor Laboratory Press ,1989

- [ 7 ] Lee VHL ,Yamaomoto A ,Kompella V B. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* ,1991 **8** :91~192
- [ 8 ] Muranishi S. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* ,1990 **7** :1~33
- [ 9 ] Hochman J ,Artusson P. *J Controlled Release* ,1994 **29** :253~267
- [ 10 ] Citi S. *J Cell Biol* ,1992 **117** :169~178

## Cloning of the *zot* Gene of *Vibrio cholerae* and Its Expression in *Escherichia coli*

HE Zhi-Yong<sup>1 2</sup> CHEN Zhe-Yu<sup>1</sup> WANG Dong-Ning<sup>1 2</sup> YANG Guan-Zhen<sup>1</sup>  
ZHANG Wei-Jie<sup>2</sup> WU Xiang-Fu<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>( Shanghai Institute of Biochemistry ,Chinese Academy of Sciences ,Shanghai 200031 )

<sup>2</sup>( Department of Bioscience and Biotechnology ,Shanghai Jiao-Tong University ,Shanghai 200240 )

**Abstract** The *zot* gene encoding Zonula occludens toxin was amplified from classic *Vibrio cholerae* genomic DNA by PCR. The result of sequencing indicated that *zot* gene encodes 399 amino acid residues. The sequence of *zot* gene was a little bit different from that of reported including 14 nucleotides and four amino acid residues. The expression plasmid pET-ZOT was constructed by inserting *zot* gene into plasmid pET-28a( + ) containing the T7 promoter. The expression plasmid was induced into *E. coli* BL21 ( DE3 ) and expression strain BLZOT was selected. SDS-PAGE analysis revealed that the ZOT protein was expressed and accumulated up to above 15% of bacterial soluble protein after induced by IPTG. A protein of 47kD was expressed as including body. Western blot analysis revealed that the expressed protein was ZOT.

**Key words** Zonula occludens toxin gene cloning gene expression *E. coli*