

O139 霍乱弧菌 LPS 基因在大肠杆菌中的克隆和表达

曲殿波 刘传喧 马清钧

(军事医学科学院生物工程研究所 北京 100850)

摘 要 利用粘粒载体 pCOS5 构建了国内分离的 O139 霍乱弧菌的基因组文库,并从文库中筛选获得可以表达 O139 霍乱弧菌脂多糖的重组克隆株 *E. coli* JM109(pMG310)。重组粘粒 pMG310 经酶切分析,所克隆的外源 DNA 片段大小为 37kb。实验证明,重组克隆株 *E. coli* JM109(pMG310)所表达的脂多糖具有良好的免疫原性及反应原性。

关键词 脂多糖 O139 霍乱弧菌

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)06-0699-04

自从 1992 年发现 O139 霍乱弧菌以来,人们担心 O139 霍乱将取代 O1 群霍乱而引发第八次霍乱大流行,因而引起世界各国的高度重视^[1-3]。又加之对 O1 群霍乱弧菌有保护作用的疫苗对 O139 霍乱弧菌没有保护作用,所以对 O139 霍乱弧菌特异性疫苗的研究成了当务之急。脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)是一种很好的刺激机体产生抗菌抗体的抗原,克隆此抗原的基因,并让其在^①大肠杆菌中表达,可以为今后的疫苗研制打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 O139 霍乱弧菌由中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所提供;大肠杆菌 JM109 由葛伟文博士赠,大肠杆菌 DH5 α 为本实验室保存。

1.1.2 粘粒 pCOS5 由美国纽约州立大学巴佛罗分校微生物学系 Connell T D 博士惠赠^[4]。

1.1.3 抗血清及单克隆抗体 兔抗 O139 霍乱弧菌血清购于卫生部药品生物制品检定所,鼠源抗 O139 霍乱弧菌单克隆抗体由预防医学科学院微生物流行病学所惠赠;酶标羊抗兔 IgG-HRP,羊抗鼠 IgG-HRP 购于军事医学科学院微生物流行病学研究所。

1.1.4 实验动物 大耳白家兔购于军事医学科学院实验动物中心。

1.1.5 工具酶 限制酶 *Sau*3A, *Bam*HI 购于 Promega 公司,其它内切酶均购于 New England Biolabs 公司;小牛肠碱性磷酸酶, T4-DNA 连接酶购于 Promega 公司;RNase 溶菌酶购于华美生物公司。

1.1.6 包装蛋白 包装蛋白 GigapackIIplus 购于 Stratagene 公司。

1.2 方法

1.2.1 O139 霍乱弧菌基因组 DNA 的制备 按文献^[5]所描述的方法进行。

1.2.2 粘粒基因组文库的构建 用限制酶 *Sau* 3A 不完全酶切 O139 霍乱弧菌基因组 DNA^[6]。同时酶切载体 DNA 并用碱性磷酸酶脱磷酸化处理。连接两种 DNA 并用包装蛋白包装感染宿主菌,操作按包装蛋白使用说明书进行。

1.2.3 菌体全菌 ELISA 菌体 37℃ 培养过夜,离心收集菌体用生理盐水洗 2 次,菌体悬于包被缓冲液(1000mL 含:Na₂CO₃ 1.60g, NaHCO₃ 2.90g, pH9.6),调整菌体浓度为 10 亿/mL 后,取 200 μ L 菌悬液包被酶连板,37℃ 放置过夜。洗涤液(1000mL 含:Tris 2.42g, 1mol/L HCl 13.0mL, Tween-20 0.5mL, pH7.5)洗板 3 次。O139 霍乱弧菌抗血清用稀释液 PBS-Tween-20(1000mL 含:NaCl 8.00g, KCl 0.20g, Na₂HPO₄ 1.15g, KH₂PO₄ 0.20g, Tween-20 0.5mL, pH7.5)从 20 倍开始倍比稀释,不同稀释倍数的抗血清分别按 100 μ L/孔加入相应的孔中,37℃ 反应。用洗涤液洗酶连板 3 次后,加入用稀释液稀释 500 倍的羊抗兔 IgG-HRP 100 μ L,37℃ 反应,洗板 3 次后,加入 100 μ L 底物反应液[10mL 磷酸盐-柠檬酸缓冲液(1000mL 含:NaH₂PO₄ 0.73g, C₆H₈O₇·H₂O 0.51g)含 4mg 邻苯二胺, 8 μ L 30% H₂O₂]室温反应至适当颜色时用 50 μ L 2mol/L H₂SO₄ 终止反应,测 A₄₉₂ 值。

1.2.4 菌落固相 ELISA 按文献 7 进行。

1.2.5 LPS 的检测 :将用热酚水法 [8] 提取的 LPS 超离心纯化后进行 LPS 的免疫印迹实验 ,其方法参照《分子克隆指南》中蛋白质的电泳、银染及蛋白质的免疫印迹检测章节进行。提取的 LPS 同时也进行 ELISA 检测 ,方法同全细胞 ELISA ,但包被物以 LPS 取代全细胞。

1.2.6 抗重组克隆血清的制备及抗血清反应性的分析 按文献 [9] 中提供的方法制备免抗重组克隆菌血清 ,制备的血清用 ELISA 检测其活性 ,检测时包被菌为 O139 霍乱弧菌 ,其它步骤同菌体全细胞 ELISA。

2 结果

2.1 O139 霍乱弧菌 LPS 基因的克隆

O139 霍乱弧菌的 LPS 基因是由多基因串联在一起组成的一个基因簇^[10,11]。为了克隆完整的 LPS 基因 ,不完整酶切 O139 霍乱弧菌的基因组 DNA ,回收一定大小的 DNA 片段与 pCOS5 粘粒体外重组 ,包被并感染 *E. coli* JM109 宿主菌后 ,获得约 600 个重组克隆株。玻片凝集法对重组克隆株进行筛选 ,得到一株可与 O139 霍乱弧菌血清发生强凝集反应的阳性克隆株命名为 *E. coli* JM109 (pMG310) 。经对 O139 霍乱弧菌 LPS 特异性的单克隆抗体重复玻片凝集实验 ,重组克隆 JM109 (pMG310) 可与之发生强凝集反应。菌落固相 ELISA (图 1) 显示重组克隆 JM109 (pMG310) 和阳性对照 O139 霍乱弧菌可与 O139 特异性的抗血清发生免疫印迹反应 ,而阴性对照 JM109 (pCOS5) 则无此反应发生。这两个实验初步证明重组克隆株 JM109 (pMG310) 表达了 O139 霍乱弧菌的 LPS。

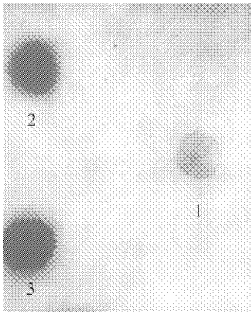


图 1 菌落固相 ELISA

Fig.1 Dot-ELISA

1. Negative control :*E. coli* JM109(pCOS5)
2. Recombinant clone :*E. coli* JM109(pMG310)
3. Positive control :*V. cholerae* O139

另外 ,将重组粘粒 DNA 经酶切分析 ,计算出重组粘粒 pMG310 的大小约为 52kb (图 2) 。由于 pCOS5 的大小为 7.32kb ,所以克隆的含 LPS 基因的外源 DNA 片段约为 37kb。

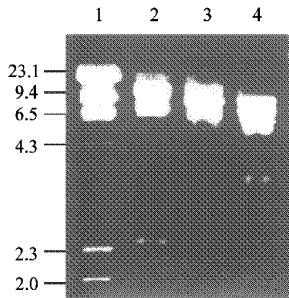


图 2 重组粘粒 pMG310 DNA 的酶切鉴定

Fig.2 Analysis of pMG310 with restriction endonucleases

1. λ -HindIII (marker) 2. pMG310/*Eco*RI
3. pMG310/*Nco*I 4. pMG310/*Hinc*II

2.2 *E. coli* JM109 (pMG310) 表达的 LPS 反应原性的鉴定

为了进一步证明 JM109 (pMG310) 所表达的 LPS 具有 O139 霍乱弧菌的 LPS 的特异反应原性 ,我们进行了菌体全细胞 ELISA (图 3) 及 LPS 的 ELISA (图 4) 和免疫印迹分析 (图 5) 。ELISA 的结

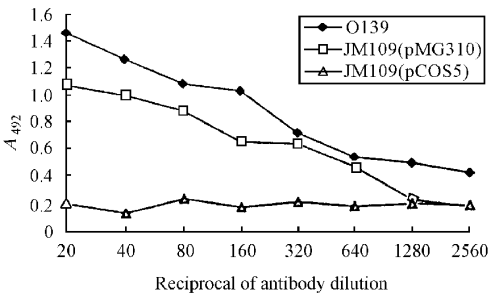


图 3 重组克隆 JM109 (pMG310) 菌体全细胞 ELISA

Fig.3 Whole cell-ELISA of recombinant clone *E. coli* JM109 (pMG310)

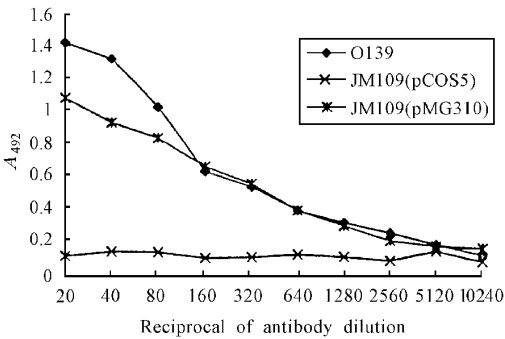


图 4 LPS 的倍比稀释 ELISA

Fig.4 ELISA of LPS extracted from recombinant clone

E. coli JM109 (pMG310)

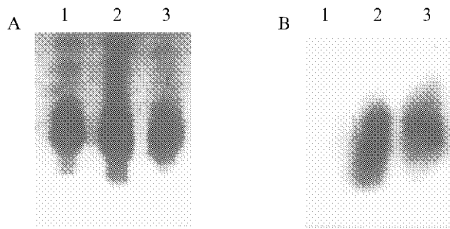


图5 LPS 的 SDS-PAGE(A) 和 Western-blot(B)
Fig.5 SDS-PAGE(A) of LPS and its Western-blot(B)
1. LPS of *E. coli* JM109(pCOS5)
2. LPS of *E. coli* JM109(pMG310)
3. LPS of *V. cholerae* O139

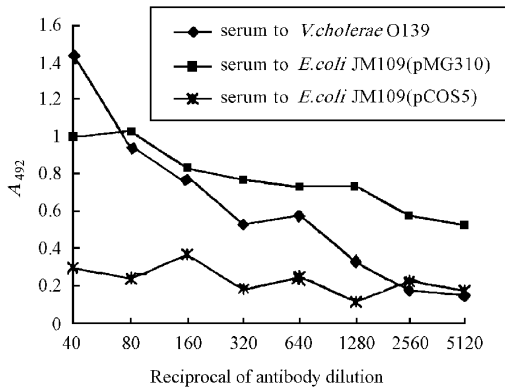


图6 重组克隆制备抗血清对
O139 霍乱弧菌倍比稀释 ELISA

Fig.6 The whole cell-ELISA of *V. cholerae* O139 with
serum to *E. coli* JM109(pMG310)

果显示阳性对照 O139 霍乱弧菌与重组克隆 JM109 (pMG310) 的 A_{492} 值随着抗 O139 霍乱弧菌血清的逐渐稀释而呈现下降的趋势 , 而阴性对照 JM109 (pCOS5) 的 A_{492} 值则在某一固定值附近波动。这是由于阳性对照及重组克隆表面的 LPS 所结合的抗体随着抗 O139 的抗血清被逐渐稀释而逐渐变少。当加入二抗后 , 阳性对照及重组克隆所结合的二抗也呈相应的逐渐变少的趋势 , 因此当显色后 A_{492} 值便也呈下降趋势。而阴性对照表面的 LPS 不能与对 O139 特异的抗血清发生反应 , 因此不能结合抗 O139 的抗体于其细胞表面 , 这样当加入二抗时也就不结合二抗 , 因此其 A_{492} 值相对比较恒定。LPS 的 ELISA 也是由于这个原理。上述结果不但说明重组克隆很好地表达了 O139 霍乱弧菌的 LPS , 而且表达的 LPS 与 O139 的 LPS 一样具有与 O139 抗血清

发生抗原抗体反应的特异性 , 即重组克隆表达的 LPS 具有与 O139 的 LPS 相同的反应原性。同时 , LPS 的免疫印迹实验更加直观地支持了上述的分析。

2.3 *E. coli* JM109(pMG310) 表达的 LPS 的免疫原性分析

为了鉴定表达的 LPS 是否具有免疫原性 , 首先用重组克隆免疫家兔制备抗血清 , 然后用此血清与 O139 霍乱弧菌进行菌体全细胞 ELISA 实验 (图 6)。结果显示制备的抗血清与阳性对照的抗 O139 霍乱弧菌血清一样 , 与 O139 霍乱弧菌的反应都是特异性的。而阴性对照抗 JM109(pCOS5) 的血清与 O139 霍乱弧菌的反应很弱。这是因为重组克隆所表达的 LPS 具有很好的免疫原性 , 它可以刺激动物的机体产生特异性的抗体 , 而且此抗体可以与 O139 霍乱弧菌的 LPS 发生特异的抗原抗体反应。

3 讨 论

抗原和抗体反应属于特异性的反应。本研究所克隆表达的 LPS 采用免疫学的方法进行分析鉴定 , 结果证明 , 克隆株 *E. coli* JM109(pMG310) 不但表达 O139 霍乱弧菌的 LPS 而且所表达的 LPS 具有与 O139 霍乱弧菌 LPS 相同的免疫原性及反应原性。为今后疫苗的研制及 LPS 基因结构与功能的研究打下了基础。

脂多糖是二级基因产物 , 它是在脂多糖基因簇编码的一系列酶的有序作用下 , 利用细胞内的糖、脂肪酸、磷酸等物质进行合成反应最终装配成脂肪 A-核心寡糖-O 抗原(多糖链) 的形式。这种体内的生化反应非常复杂。本研究所获 pMG310 含 37kb 外源 DNA 片段 , 其内含 O139 霍乱弧菌 LPS 合成、装配所需酶基因较完整 , 但对构建活疫苗显然过长。霍乱弧菌脂多糖表达于 *E. coli* 表面 , 有可能利用大肠杆菌 LPS 装配的酶系统。如 O1 群霍乱弧菌的 LPS 国外曾报道需 16kb 的 DNA 序列 , 而我国从 Inaba 及 Ogawa 血清型菌株中分离的 7~8kb DNA 片段在 *E. coli* 及 *S. typhimurium* 中也获得很好表达。因此 , 对于 O139 霍乱弧菌的 LPS , 有希望分离到较短表达片段 , 这将在进一步的亚克隆实验中加以探讨。

参 考 文 献

[1] Swerdlow D L , Ries A A. *Lancet* , 1993 , 342 : 382~383
[2] Mandal B K. *J Infect* , 1993 , 27 : 115~117
[3] Rivas M , Toma C , Milivdebsky E. *Lancet* , 1993 , 342 : 926~927

- [4] Connell T D ,Martone A J ,Holmes R K. *Gene* ,1995 ,**153** 85~87
- [5] Ausubel F M ,Brent r ,Kingston R E. *Current Protocol in Molecular Biology* ,1987 ,Vol. 1. John Wiley & Sons ,Inc ,Brooklyn ,N Y
- [6] Sambrook J ,Fritsch E F ,Maniatis T. *Molecular Cloning a Laboratroy Manual* (2nd ed). Cold Spring Habor Laboratory Press ,1989
- [7] 黄弘进 ,马清钧. *遗传学报* ,1992 ,**19** (4) 378~384
- [8] Westphal O ,Jann K. *Methods carbohydr chem* ,1965 **5** 83~91
- [9] Hall R H ,Vial P A ,Kaper J B. *Microb Pathog* ,1988 **4** 257~265
- [10] Stroeher U H ,Jedani K E ,Dredge B K. *Pro Natl Acad Sci. USA* ,1995 **92** :10374~10378
- [11] Bik E M ,Bunschoten A E ,Gouw R D. *The EMBO Journal* ,1995 **14** 209~216

Cloning and Expression of Lipopolysaccharide Gene of *Vibrio cholerae* O139 in JM109

QU Dian-Bo ,LIU Chuan-Xuan ,MA Qing-Jun

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

Abstract The gene cluster that determines the biosynthesis of the lipopolysaccharide(LPS) of *V. cholerae* O139 was cloned and expressed in *E. coli* JM109 by constructing genomic library of *Vibrio cholerae* O139. A colony that expressed LPS of *Vibrio cholerae* O139 was detected and designated *E. coli* JM109(pMG310). Restriction analysis of the recombinant cosmid pMG310 demonstrated that the DNA fragment was 52kb. The LPS gene of *Vibrio cholerae* O139 that was linked to Vector pCOS5 was about 37 kb. Immunochemical assays demonstrated that LPS expressed by *E. coli* JM109 (pMG310) had the same immunogenicity and reactogenicity as LPS of *Vibrio cholerae* O139.

Key words LPS ,*Vibrio cholerae* O139