

A 型肉毒毒素保护性抗原的基因修饰及高效表达

王 慧* 荫 俊

(军事医学科学院微生物流行病学研究所,北京 100071)

摘 要 在 A 型肉毒毒素保护性抗原基因初步表达的基础上,为提高表达水平,依据 EMBL 的 DNA 数据库中 A 型肉毒毒素基因全序列,重新设计上游引物,通过修饰基因片段 N 端,保持氨基酸序列不变,从已获得的 A 型肉毒毒素与靶细胞起结合作用的重链 C 端基因中,扩增小的突变基因,克隆入 pGEM-T 载体进行测序,并以 pBV220 为表达载体构建重组表达质粒,在大肠杆菌中实现高效表达。结果表明,重组表达产物占全菌蛋白的 40%,酶联检测重组表达产物具有特异结合活性。A 型肉毒毒素保护性抗原基因的高效表达,为下一步基因工程抗毒素和疫苗的研制奠定了基础。

关键词 A 型肉毒毒素,保护性抗原,基因修饰,高效表达

中图分类号 Q786;Q936;R392.11 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2004)04-0544-04

肉毒毒素(BoNT)是由肉毒梭状芽孢杆菌在厌氧环境中产生的外毒素,能引起严重的神经性麻痹。临床观察表明,在肉毒毒素的 7 个血清型(A-G)中,A 型肉毒毒素相比其它型可引起更严重的症状和导致更高的死亡率。结构功能研究表明,肉毒毒素重链 C 端(BoNTaHc)是毒素的保护性抗原^[1]。

天然基因 BoNTaHc 在大肠杆菌中表达相对困难,表达量很低^[2~4]。分析认为,限制 A 型肉毒毒素重链 C 端基因表达的原因可能有两个:一是 BoNTaHc 基因富含高达 >70% 的 A-T,高频 A-T 在转录中易产生转录终止子;二是 BoNTaHc 基因的氨基酸密码子在大肠杆菌中多为低频密码子,受限于大肠杆菌稀有 tRNA 的动员,尤其在翻译起始端的低频密码子的对应稀有 tRNA 的动员受限,造成整条肽合成受阻。

针对第一种可能的原因,1995 年,Clayton 全基因合成了 BoNTa 的 Hc,降低基因中的 A-T 含量(76%降至 56%),在大肠杆菌中表达,免疫印迹检测到了表达产物^[2],未提及表达水平。本研究则主要针对第二种可能,在保持基因编码的氨基酸不改变的情况下,通过对 Hc 片段基因 N 端进行改造,选择宿主细胞高利用频率密码子对起始端低频密码子进行替换,提高毒素基因在原核系统中的表达水平,

并对表达产物进行 ELISA 鉴定。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和载体: pBlue-BoNTaHc 为本人构建的重组质粒^[5]; *E. coli* DH5 α 为本室保存;克隆载体 pGEM-T 为 Promega 公司产品;质粒 pBV220 为含有 P_RP_L 串联启动子的温控诱导表达载体。

1.1.2 试剂: 限制酶 *Eco*R I 和 *Bam*H I, T4 DNA 连接酶、DNA 和蛋白标准分子量、质粒提取试剂盒为 Promega 公司产品;PCR 试剂为宝生物公司产品;PCR 产物和酶切产物回收采用玻璃奶 DNA 快速回收纯化试剂盒(博大公司)。

1.2 方法

1.2.1 A 型肉毒毒素重链 C 端片段(BoNTaHc468)基因的 PCR 扩增: 以 EMBL 的 DNA 数据库中 A 型肉毒毒素基因全序列为标准,对 A 型肉毒毒素重链 C 端片段基因的 N 端,通过设计引物进行基因修饰,替换个别碱基,对起始密码子后的 4 个氨基酸密码子进行纠偏。在引物 5' 端引入限制性酶切位点 *Eco*R I 和 *Bam*H I,引物由赛百盛公司合成。

以 pBlue-BoNTaHc 为模板,进行 PCR,50 μ L 反应体系 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min,再按 94 $^{\circ}$ C 40 s,55 $^{\circ}$ C 60 s,

72℃ 60 s 25 个循环 ,最后 72℃ 延伸 7 min。

1.2.2 重组表达质粒 pBV-BoNaHc468 的构建 :利用 *EcoR* I 和 *Bam* H I 双酶切 ,将表达载体 pBV220 进行消化 ,回收纯化 ,与用相同酶切消化的目的片段 BoNTaHc468 在体外连接 ,并转化感受态细胞 *E. coli* DH5 α ,经酶切电泳鉴定 ,确定阳性重组子。

1.2.3 诱导表达^[6] 接种单菌落于 5mL 2 \times YT 培养基(含 Amp 100mg/L) 37℃ 培养过夜。按 1 :50 转接于新鲜 2 \times YT 培养基(含 Amp 100mg/L) ,30℃ ,250 r/min 培养至菌液 OD₆₀₀ = 0.5 ~ 0.7 ,迅速升温至 42℃ ,继续培养 5h ,离心收集菌体 , - 20℃ 保存。修饰基因表达水平与毒素天然基因 BoNTaHc417 的表达结果(已另文发表) 进行比较。

1.2.4 表达产物的复性与活性测定(ELISA) :超声破碎菌体细胞 ,收集沉淀 ,8mol/L 尿素溶解蛋白 ,以梯度尿素透析法复性蛋白质。ELISA :用包被液稀释 A 型肉毒毒素抗毒素血清(马血清购自卫生部中国药品生物制品检定所) ,按 100 μ L/孔 包被酶联板 ,4℃ 过夜 ,洗涤后分别加入 100 μ L 的 BoNTaHc468 蛋白(浓度为 10mg/L) 和相同量的破伤风毒素(Tet) ,并同时以生理盐水作为对照 ,用双抗夹心法测定表达产物的特异结合活性。

Ala(A)	10	2.4%	Arg(R)	19	4.5%
Cys(C)	4	0.9%	Gln(Q)	15	3.5%
His(H)	4	0.9%	Ile(I)	48	11.3%
Met(M)	9	2.1%	Phe(F)	16	3.8%
Thr(T)	14	3.3%	Trp(W)	9	2.1%
Asx(B)	0	0.0%	Glx(Z)	0	0.0%

其中带负电荷的氨基酸(Asp + Glu)有 41 个 ,带正电荷的氨基酸(Arg + Lys)有 51 个。

通过计算机 protparam tool 软件分析 ,BoNTaHc468 基因序列编码的蛋白分子量为 17kD ,理论等电点为 pI 9.57 ,此蛋白的不稳定系数为 31.96 ,被归类为稳定蛋白质。在体外哺乳类网状细胞中的半衰期为 1.4h ;在体内 ,酵母中的半衰期为 3min ,大肠杆菌中的半衰期大于 10h。这一特点为研究中选择大肠杆菌做为表达系统 ,尝试实现 A 型肉毒神经毒素重链 C 端的稳定表达提供了理论依据。

2.3 重组表达质粒(pBV-BoNaHc468)的构建

重组表达质粒经 *EcoR* I 和 *Bam* H I 双酶切 ,得到与外源目的片段 BoNTaHc468 和 pBV220 酶切片段

2 结果

2.1 基因修饰与 BoNTaHc468 基因的 PCR 扩增

通过基因修饰 ,起始密码子后的 1 ~ 7 个氨基酸的密码子在大肠杆菌中均有较高的频数(0.46 ~ 0.72) ,相比较修饰前原有的密码子在大肠杆菌中的频数(0.08 ~ 0.14)有了很大的提高。

扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳 ,以 λ DNA/ *Hind* III 酶切片段(Promega 公司)为标准分子量确定 PCR 产物大小。获得了大小约为 500bp 的扩增带(见图 1)。

2.2 BoNTaHc468 测序载体的构建与序列分析

将 PCR 产物在体外直接连接 pGEM-T 载体 ,一步转化法导入感受态细胞 *E. coli* DH5 α ,通过 α -互补的蓝白筛选 ,挑选重组子。经酶切电泳鉴定后 ,选出重组质粒 ,以 T7 启动子引物进行测序。

序列分析结果表明 ,克隆基因序列长度为 468bp ,其中 A + T 的比例高达 71.4% ,经与已知 A 型肉毒毒素重链 C 端的亚片段基因序列对照分析 ,一致性高达 99% ,可以认为此基因序列即为 BoNTaHc468。

这一基因序列可编码 156 个氨基酸 ,氨基酸组成为 :

Asn(N)	57	13.4%	Asp(D)	24	5.6%
Glu(E)	17	4.0%	Gly(G)	23	5.4%
Leu(L)	32	7.5%	Lys(K)	32	7.5%
Pro(P)	9	2.1%	Ser(S)	33	7.8%
Tyr(Y)	27	6.4%	Val(V)	23	5.4%
Xaa(X)	0	0.0%			

大小相同的两条带(见图 1)。

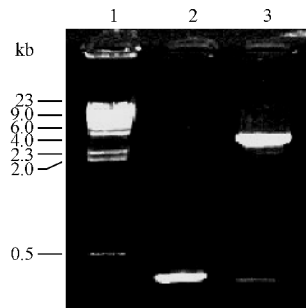


图 1 表达重组质粒 pBV-BoNTaHc468 的鉴定

Fig. 1 Analysis of recombinational express plasmid pBV-BoNTaHc468 digested by *EcoR* I 和 *Bam* H I

1 :DNA molecular weight marker λ DNA/ *Hind* III 2 :PCR product of BoNTaHc468 3 : product of pBV-BoNTaHc468 digested by *EcoR* I and *Bam* H I

2.4 BoNTaHc468 基因在大肠杆菌中的温控诱导表达和可溶性分析

筛选鉴定的阳性单克隆经过夜培养,以 1:50 转接新鲜的培养基 2 × YT。30℃ 培养至 $OD_{600} = 0.5$, 迅速升温至 42℃,诱导 5h,离心收集菌体。诱导与未诱导的全菌裂解物进行 SDS-PAGE 分析,在蛋白质相对分子量大小为 17kD 处多一条诱导表达的蛋白带,与预期的分子量一致(见图 2)。薄层扫描结果显示,全菌体中目的蛋白的表达量占菌体总蛋白量的 40%(见图 3)。超声打碎细胞,离心分为上清和沉淀两部分。上清和沉淀进行 SDS-PAGE 分析,结果显示诱导表达的蛋白存在于沉淀部分,表明目的蛋白为不溶性表达,在菌体中以包涵体形式存在(图未显示)。

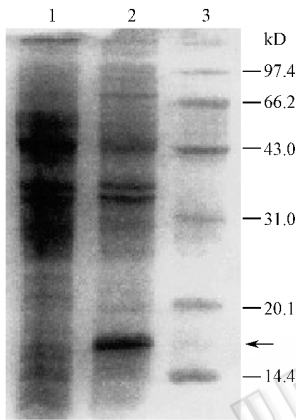


图 2 含 pBV-BoNTaHc468 菌株的诱导表达结果
Fig. 2 Analysis of BoNTaHc468 expressed in *E. coli* DH5 α harboring the plasmid pBV-BoNTaHc468 by SDS-PAGE
1 :Preinduced pBV-BoNTaHc468/ DH5 α ; 2 :Induced pBV-BoNTaHc468/ DH5 α ; 3 :Relative molecular weight (Mr) marker (97.4 , 66.2 , 43.0 , 31.0 , 20.1 , 14.4kD)

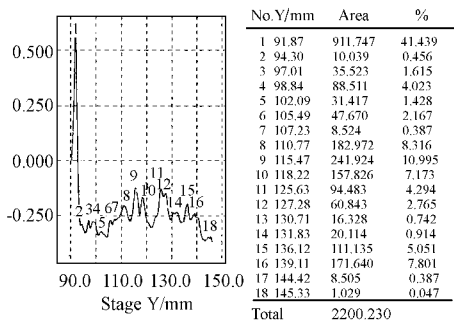


图 3 诱导表达产物全菌蛋白薄层扫描(波长 595nm)
Fig. 3 Results of scan for induced *E. coli* . DH5 α harboring plasmid pBV-BoNTaHc468 at the wavelength of 595nm

2.5 诱导表达蛋白的活性测定(ELISA)

经酶联免疫检测,复性的 BoNaHc468 蛋白与 A 型肉毒毒素抗毒素具有特异结合活性,而结构相似

的破伤风类毒素与 A 型肉毒毒素抗毒素不具有结合活性,结果见表 1。

表 1 重组表达产物 BoNaHc468 蛋白的特异结合活性的测定
Table 1 Identification of the specific activity of recombinant BoNaHc468 to antiserum

antigens	BoNTaHc468	Tet	Control
A ₄₅₀	1.059	0.078	0.042

3 讨论

研究中自行设计一对引物,通过改造基因 N 端个别碱基,对起始密码子后的 4 个氨基酸(第 2、4、5、6 位的氨基酸)的密码子的偏性进行纠正,选取在大肠杆菌中的可利用的高频密码子,提高翻译起始端的密码子在大肠杆菌的利用率,扩增重链近 C 末端的 468bp 的基因,保证基因的准确性和提高表达的可能性,克隆的基因对应的表达产物理论上具有介导保护性免疫的作用^[4,7]。

在表达载体的选择上,我们选择了国内构建的高效表达载体 pBV220^[5],它具有强启动子 PRPL,而且 pBV220 本身已具有经优化的 SD 序列,我们设计的引物紧接所要表达的基因序列,有利于高效表达。

结果表明,我们应用原核高效表达载体构建了重组表达质粒 pBV-BoNTaHc468,在大肠杆菌中,实现了肉毒毒素的保护性抗原(其中包含 BoNTa 两个保护性抗原表位^[1])在原核系统中的高效表达,表达的目的蛋白占全菌蛋白的 40%,且表达稳定。经基因修饰后,A 型肉毒毒素重链 C 端片段(保护性抗原)在大肠杆菌中的表达水平,相比较未做基因修饰的原天然基因 BoNTaHc417 的表达^[8](已另文发表)有非常大的提高(从 7% 升至 40% 以上),这一结果与理论上认为的,基因序列起始密码子后 1~5 个氨基酸的正确翻译是整条肽链合成的关键,以及 SD 序列与插入基因的距离会影响基因表达的观点是一致的。提示基因修饰对基因在表达系统中的表达会产生影响,适应宿主环境的基因修饰可能会起到提高基因表达可能性或表达水平的作用。这为解决某些基因在某些表达系统的不表达或低表达的问题提供了新的思路。

A 型肉毒毒素重链 C 端片段(保护性抗原)在大肠杆菌中的高水平表达使得进一步的抗毒素和安全疫苗的研制成为可能。

REFERENCES(参考文献)

tive antigenic determinants of type A botulinum neurotoxin. *Vaccine* , 1998 ,**16** (19) :1850 – 1856

[2] Michael A ,Clayton ,Jennifer M ,Clayton *et al* . Protective vaccination with a recombinant fragment of Clostridium botulinum neurotoxin serotype A expressed from a synthetic gene in *Escherichia coli* . *Infection and Immunity* ,1995 ,**63** (7) :2738 – 2742

[3] Mark T , Dertzbaugh , Michael W West . Mapping of protective and cross-reactive domains of the type A neurotoxin of *Clostridium botulinum* . *Vaccine* , 1996 ,**14** (16) :1538 – 1544

[4] Vertiev I V , Zdanovskii A G , Borinskaia S A *et al* . Effective expression of fragments of a botulinum neurotoxin type A gene ,coding for the L-chain and H-chain in *E. coli* , with formation of products causing protective immunity to administration of the toxin . *Mol Gen Mikrobiol Virusol* , 2000 ,**23** (4) :3 – 7

[5] Wang H(王慧) ,Yin J(荫俊) ,Yuan B(袁斌) *et al* . Cloning and structure analysis of protective antigenic gene of botulinum neurotoxin serotype A . *Life Science Research(生命科学研究)* ,2001 ,**3** (4) :325 – 328

[6] Zhang Z(张智清) ,Yao LH(姚立红) ,Hou YD(侯云德) *et al* . Construction and application of a high level expression vector containing P_RP_L promoter . *Chinese J Virology(病毒学报)* ,1990 ,**6** (2) :111 – 116

[7] Atassi MZ , Minako Oshima . Structure , activity and immune (T and B cell) recognition of botulinum neurotoxins . *Immunology* , 1999 , **19** :219 – 260

[8] Wang H(王慧) ,Yin J(荫俊) ,Hou X(侯晓军) *et al* . Expression and identification of protective antigenic gene of botulinum neurotoxin serotype A . *Chinese J Microbiology and Immunology(中华微生物学和免疫学杂志)* 2002 ,**22** (4) :453 – 454

Modification and High Level Expression of Protective Antigen
Fragment of Botulinum Neurotoxin Serotype A

WANG Hui* YIN Jun

(Institute of Microbiology and Epidemiology ,Academy of Military Medical Sciences ,Beijing 100071 ,China)

Abstract Designed a pair of primers through modifying N-terminal bases(5bps) of gene after ATG but not changing amino acid , and amplified a smaller mutated gene sequence (468bp) containing two protective antigenic determinants from pBlue-BoN-TaHc , N-terminal codon of mutated gene fragment is changed from low to high frequency in *E. coli* . Mutated gene was ligated into pGEM-T vector and sequenced , then , cloned into a expression plasmid pBV220 . As a result , cloned gene was expressed in insoluble form by temperature inducing (from 30℃ to 42℃) in *E. coli* . Expression product is 40% of total proteins and is of specific binding activity to antibody in ELISA . The successful modification and high level expression of protective fragment of botulinum neurotoxin serotype A (BoNTaHc468) gene is conducive to further study on antitoxin and vaccine .

Key words botulinum neurotoxin serotype A , protective antigen , modification , expression

Received : 11-26-2003
This work was supported by Grant from Medicine and Health Research for Army Fund(No. 98M136 and 01MB059).
* Corresponding author. Tel 86-10-66948532 ; E-mail :wanghui_71@hotmail.com