

带有K88与K99两种伞毛抗原基因的重组质粒的构建

张景六 蔡瑞珠 洪孟民

(中国科学院上海植物生理研究所, 上海)

产肠毒素大肠杆菌能引起仔猪、犊牛、羔羊等新生幼畜发生急性腹泻, K88与K99是这类产肠毒素大肠杆菌所产生的两种在免疫性质上不同的伞毛抗原。

质粒pTK8899-6和pTK8899-8是由来自K99质粒DNA的 4.5×10^6 道尔顿大小的BamHI片段与带有K88伞毛抗原基因的质粒pTK90DNA重组而构建成的; 带有pTK8899-6或pTK8899-8的大肠杆菌C600菌株均能同时产生K88与K99两种伞毛抗原。

限制性酶切图谱的研究表明, pTK8899-6与pTK8899-8 DNA的分子量均为 11.85×10^6 道尔顿, 但这两种重组DNA中所带K99伞毛抗原基因的片段连接在载体DNA上的方向彼此相反, 带有pTK8899-6或pTK8899-8的大肠杆菌C600菌株在产生K88或K99伞毛抗原的能力上没有明显的差别。

带有K88与K99两种伞毛抗原基因重组质粒的大肠杆菌菌株有可能用作预防仔猪、犊牛和羔羊急性腹泻的菌苗。

关键词: K88、K99伞毛抗原, 重组质粒

产肠毒素大肠杆菌能造成猪、牛、羊等新生幼畜发生急性腹泻, 并由此引起很高的死亡率, 对家畜饲养业的危害很大。

产肠毒素大肠杆菌的致病首先是依靠它所产生的专一性定居因子——伞毛的作用附着在新生幼畜的小肠上皮细胞上, 然后才能大量繁殖, 分泌出肠毒素, 使幼畜发生急性腹泻。根据菌株的不同, 此类产肠毒素大肠杆菌携带有不同的伞毛抗原类型, 如K88、K99与987p等。利用只带伞毛抗原基因而不带肠毒素基因的菌株就可以制备出安全可靠而又能有效预防产肠毒素大肠杆菌的菌苗。

本文报道携带有K88和K99两种伞毛抗原基因的重组质粒的构建, 并证明此两种基因在重组质粒中均能表达,

材料与方法

(一) 细菌菌株与质粒

见表1。

(二) 培养基及方法

培养基、质粒DNA的提取方法、DNA限制性内切酶的消化及DNA片段的连接、细菌的转化、琼脂糖凝胶电泳的分析、K88伞毛抗原的纯化及K88抗血清的制备, K88伞毛抗原的测定等均见以前报道¹⁾。

(三) K99伞毛抗原的纯化及抗K99伞毛抗原血清的制备

本文于1984年10月20日收到。

表 1 菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids

菌株或质粒 Strain or plasmids	性 状 Phenotype	来 源 Source
菌 株 Strain		
<i>E. coli</i> C600	leu ⁻ thr ⁻ B1 ⁻ F ⁻	Cohen等 ^[2]
<i>E. coli</i> K12-K99 ⁺	Tc ^r Nal ^r Sm ^r Hg ^r , K99 ⁺	上海市农科院 畜牧兽医研究 所提供
<i>E. coli</i> T90	<i>E. coli</i> C600/pT K90	洪孟民等 ^[1]
质 粒 Plasmid		
pTK90	Ap ^r , K88 ⁺	洪孟民等 ^[1]
pBR322	Ap ^r Tc ^r	
pTK56-1	Ap ^r , K99 ⁺	本文工作
pTK8899-1	Ap ^r , K88 ⁺ K99 ⁺	本文工作
pTK8899-6	Ap ^r , K88 ⁺ K99 ⁺	本文工作
pTK8899-8	Ap ^r , K88 ⁺ K99 ⁺	本文工作

将大肠杆菌K12-K99⁺菌株接种在M9-多肽培养基中, 37℃振荡培养过夜, 1.5%接种量转接入新鲜M9-多肽培养基中, 37℃振荡培养6h, A_{600nm}为1.0左右, 培养液冷却后, 离心收集菌体, 菌体混悬在100mM Tris-1M NaCl缓冲液(pH7.5)中, 4℃间歇用高速捣碎器脱伞毛, 离心收集上清液, 上清液中加入硫酸铵至60%饱和度, 4℃放置15h后, 收集沉淀, 溶解于少量100mM Tris-2M尿素(pH7.5)缓冲液中, 并对同样缓冲液透析, 样品然后通过Sephrose 4 B柱, 收集A_{280nm}吸收的流出物, 并用抗甘露糖马红血球凝集法测定流出液各分部中K99伞毛抗原的量, 将K99伞毛抗原含量较高的流出液分部合并, 浓缩后用SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳进行K99⁺抗原蛋白的纯度分析。

K99抗血清的制备: 除注射兔子用的伞毛抗原是用纯化过的K99伞毛抗原蛋白外, 其它方法同K88抗血清的制备^[1]。

(四) K99伞毛抗原的测定

1. 抗甘露糖马红血球凝集反应测定法: 新鲜马血1ml, 用生理盐水洗三次后, 混悬在20ml生理盐水中, 在微孔平板中将被测样品用0.5%甘露糖-生理盐水逐倍稀释后, 同等体积马红血球溶液混合, 室温放置1h以上, 有凝集反应者为阳性反应。

2. 抗甘露糖绵羊红血球凝集反应法: 方法同上, 用绵羊红血球代替马红血球进行测定, 但血球与样品混合后需放置在4℃, 1h以上观察凝集反应。

3. 反向间接红细胞凝集法测定: 方法同K88反向间接红细胞凝集法^[1], 但戊二醛醛化的绵羊红细胞需要用K99抗血清致敏。

结果与讨论

(一) K99质粒DNA的提取及K99伞毛抗原基因的克隆

将大肠杆菌K12-K99⁺菌株接种在M9-多肽培养基中, 37℃振荡培养18h, 按材料与方法中所述抽出质粒DNA, 此质粒DNA用限制性内切酶Hind III酶解后, 在1%琼脂糖凝胶上电泳可分离出至少13个片段(数据未列), 此结果同Van Embden等报道的pRI9901DNA的酶切图谱基本相同^[3], 用经Hind III酶解的K99 DNA片段同经Hind III酶解的pBR322DNA混合, 然后用T4-DNA连接酶连接, 转化大肠杆菌C600菌株, 在含50μg/ml氨苄青霉素的肉汤平板上选择转化子, 共得到950个氨苄青霉素抗性(Ap^r)的转化子, 经药物抗性鉴定, 其中61个转化子表现为对四环素敏感(Tc^s), 这表明在它们所含的pBR322质粒中, 在四环素基因上的Hind III切点上已经连接上了外源DNA片段, 在甘露糖的存在下, 用马红血球凝集法对61株

Ap^rTc^r 转化子逐一加以检验, 结果只有编号为T56-1的转化子有凝集作用, 接着将菌株T56-1的质粒DNA提取出来, 并用HindⅢ酶解后, 在1%凝胶上进行电泳分析, 结果表明此质粒是由pBR322 DNA与K99质粒DNA中的一个HindⅢ片段连接后形成的重组质粒(见图版I-1), 并将此质粒DNA命名为pTK56-1, 经进一步作限制分析, 表明pTK56-1 DNA上除了有2个HindⅢ切点外, 还有5个BamHI切点, 经计算得出pTK56-1 DNA的分子量约为 14.16×10^6 道尔顿。

(二) 携带K88、K99两种伞毛抗原基因的重组质粒的构建

我们实验室已经报道, 用基因工程的技术, 从国内流行的猪源性产肠毒素大肠杆菌中分离到带有K88ac伞毛抗原基因的质粒, 并将其中一段含有K88伞毛抗原基因的DNA片段克隆到pBR322质粒DNA上, 经过改建后, 获得了分子量为 7.32×10^6 道尔顿左右含有K88伞毛抗原基因的重组质粒pTK90, 带有pTK90的大肠杆菌菌株具有产生K88伞毛的能力^[1]。为了得到同时携带K88与K99两种抗原基因的重组质粒, 我们将pTK56-1 DNA与pTK90 DNA混合, 用限制性内切酶BamH I酶解, 再用T4-DNA连接酶连接, 转化大肠杆菌C600菌株, 从482株Ap^r转化子中挑选到定名为T8899-1的转化子, 经测定该菌株具有产生K88和K99两种伞毛的能力。抽提T8899-1菌株的质粒(定名为pTK8899-1) DNA, 用BamH I酶解后进行琼脂糖凝胶电泳分析, 证明pTK8899-1是由pTK90与pTK56-1上的3个BamH I片段重组而成的(图版I-1), 经用HindⅢ酶解后的电泳分析表明pTK8899-1中DNA片段的连接方向如图1所示。计算得它的分子量约为 15.45×10^6 道尔顿。Van·Embden

等已经证明K99抗原基因是在pRI9902 DNA中分子量为 4.5×10^6 左右的一个BamH I片段上^[3], 为了切去pTK8899-1质粒上与K99基因无关的DNA顺序, 我们将pTK8899-1 DNA重新用BamH I酶切, 再用T4-DNA连接酶连接, 转化至大肠杆菌C600菌株, 对所选得的464株Ap^r转化子逐一检验它们是否具有产生K99伞毛的能力, 结果其中7株转化子能产生K99伞毛, 进一步的检验证明它们也都能产生K88伞毛。

(三) pTK8899-6与pTK8899-8 DNA的酶切图谱比较

从理论上说pTK8899-1 DNA经BamH I酶切, 再用T4-DNA连接酶连接, 带有K99纤毛抗原基因DNA片段同载体的连接应当有二种方向, 用HindⅢ + BglⅡ双酶解后的凝胶电泳分析表明, 上述这7株转化子的质粒DNA确实可以分为二种类型。我们将这两种类型的重组质粒各取一株, 分别命名为pTK8899-6与pTK8899-8, 并进一步作酶切图谱比较。图版I-2是pTK8899-6与pTK8899-8 DNA分别用BamH I、EcoRI + HindⅢ及HindⅢ + BglⅡ酶解后在1%琼脂糖凝胶上的电泳结果, 可以看到这两种质粒DNA经HindⅢ + BglⅡ酶解后, 虽然都产生二个酶解片段, 但这些片段的分子大小各不相同, 除此之外, 这两种质粒DNA的其它各酶解片段的数目与分子量大小均相同。从这些结果可以看出, pTK8899-6与pTK8899-8质粒DNA所携带的含K99伞毛抗原基因的DNA片段与载体DNA的连接方向恰好相反(见图1)。根据计算, 这两种质粒DNA的分子量均约为 11.85×10^6 道尔顿。

(四) 携带不同质粒的大肠杆菌菌株产生K88与K99伞毛抗原能力的比较

将大肠杆菌T90, T56-1, T8899-6,

T8899-8等菌株分别接种在 M9- 多胨培养基中，37℃振荡培养，不同时间取样，在 72 型分光光度计上 A_{600nm} 测定其生长，并用二种方法测定其合成K88与 K99 伞毛抗原的量，初步试验结果见图 2 所示。从

这些结果可以看出：①带有重组质粒 pTK 8899-6或 pTK8899-8的大肠杆菌菌株具有同时合成K88与K99两种伞毛抗原的能力，虽然这两种重组质粒上含K99 伞毛抗原基因的DNA片段同载体 DNA 的连接方向彼

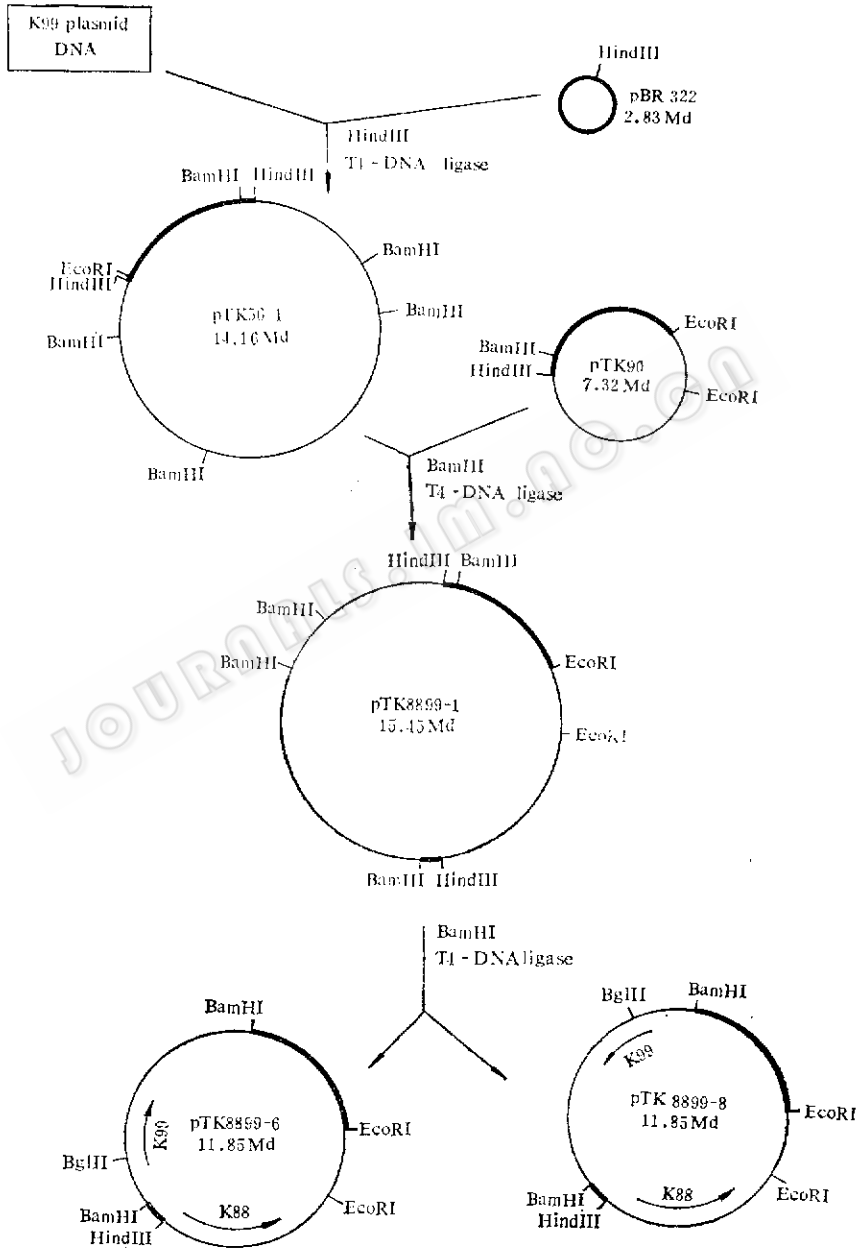


图 1 重组质粒 pTK8899-6和 pTK8899-8的构建图

Fig.1 Scheme for construction of recombinant plasmids pTK8899-6 and pTK8899-8

粗线表示pBR322DNA，箭头所示为K88或K99抗原基因的转录方向 [5]

The heavy line represents the pBR322 DNA.

The arrows show the transcription direction of K88 or K99 antigen gene

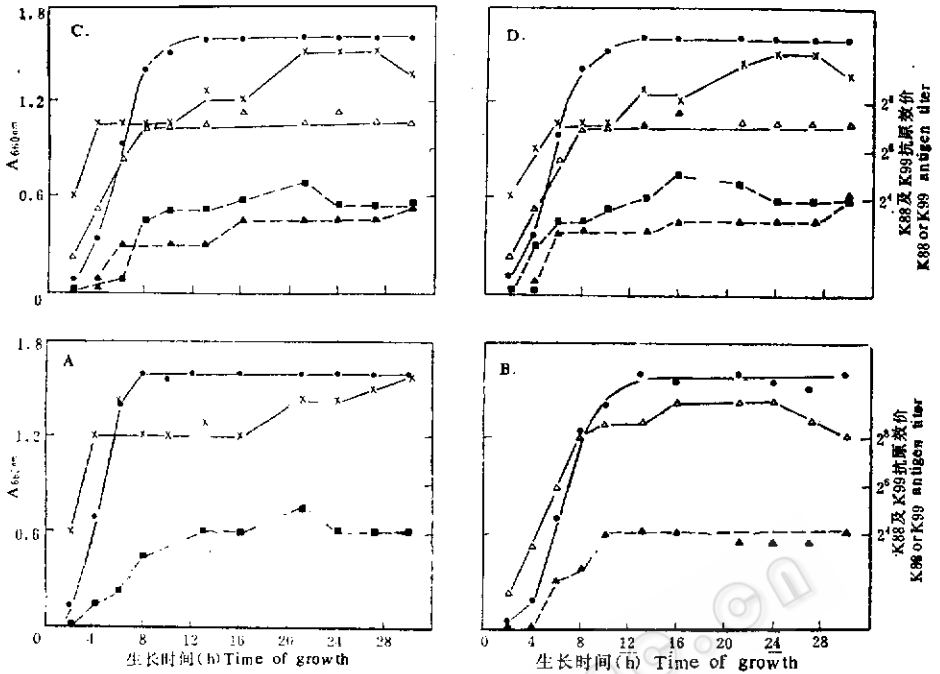


图2 带有不同重组质粒菌株产生K88与K99伞毛抗原能力比较

Fig.2 Levels of K88 and K99 antigen synthesized by different strains

- 细菌生长浊度
- △——△ 反向间接凝集法测定K99抗原量
- ▲——▲ 绵羊红血球凝集法测定K99抗原量
- ×——× 反向间接凝集法测定K88抗原量
- 豚鼠红血球凝集法测定K88抗原量
- — — Bacterial growth(A660nm)
- ×——× K88 antigen was quantified by reverse indirect agglutination method
- △——△ K99 antigen was quantified by reverse indirect agglutination method
- K88 antigen was quantified by agglutination of guinea pig erythrocytes method
- ▲——▲ K99 antigen was quantified by agglutination of sheep erythrocytes method
- A. *E. coli* C600/pTK90
- B. *E. coli* C600/pTK56-1
- C. *E. coli* C600/pTK8899-6
- D. *E. coli* C600/pTK8899-8

此相反，但它们在合成K88与K99伞毛抗原的能力上没有表现出有什么差异，这表明含K99基因的片段上有K99伞毛抗原基因的启动子，因此它的表达与载体DNA的连接方向无关。②带有pTK8899-6或pTK8899-8质粒的菌株与带有pTK90质粒的菌株相比，在合成K88亚基及K88伞毛的能力上几乎没有什么差别，但带有pTK8899-6或pTK8899-8质粒的菌株与带pTK56-1质粒的菌株相比，合成K99亚基及伞毛的能力略差一些，其原因尚需作进一步的研究。

我们以前的工作^[4]已经证明，携带

重组质粒pTK90的大肠杆菌菌株具有良好的免疫原性，用它制成的菌苗来免疫怀孕母猪后，所产的仔猪从母猪的初乳中可以得到K88抗体，从而可起到预防由于K88伞毛抗原型产肠毒素大肠杆菌的侵袭而引起的仔猪黄痢病，因此是一种很有前途的制备菌苗的工程菌株。现在携带K88与K99两种伞毛抗原基因的重组质粒的构建成功，将有可能对制备预防不同伞毛抗原型产肠毒素大肠杆菌引起的仔猪黄痢病菌苗提供工程菌株，这样的菌苗具有更广泛的预防作用和更大的应用价值。

参 考 文 献

- [1] 洪孟民等: 生物工程学报, 1 (1):36-45, 1985.
[2] Cohen, S.N. et al.: PNAS, USA, 72:1373, 1972.
[3] Van Embden, J.D.A. et al.: Infect. and Immun. 29:1125, 1980.
[4] 樊英远等: 上海畜牧兽医通讯, 1:23-26, 1985.
[5] Win Gaastra et al.: Microbiol. Rev. 46:129, 1982.

CONSTRUCTION OF RECOMBINANT PLASMID DNA CONTAINING GENETIC DETERMINANTS FOR THE K88 AND K99 TWO KIND OF PILI ANTIGENS

Zhang Jingliu Cai Ruizhu Hong Mengmin

(Shanghai Institute of Plant Physiology, Academic Sinica)

Two immunologically unrelated pili antigens, K88 and K99, are produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* strains, which are the pathogens of acute diarrheal disease in piglets, calves and lambs.

Plasmids pTK8899-6 and pTK8899-8 were constructed by ligating of 4.5 Md BamHI fragment from K99 plasmid to the plasmid pTK90 containing genetic determinant for the K88 antigen. The results of restriction analysis showed that pTK8899-6 is identical to pTK8899-8 in the molecular size of plasmid DNA (11.85 Md), but different in the orientation of inserted BamHI fragment. The amount of K88 and K99 antigens produced by *Escherichia coli* C600 either harboring pTK8899-6 or pTK8899-8 shows no apparent difference. These strains may be used as vaccine to prevent diarrheal disease in piglets, calves and lambs.

Key words

K88 K99 pili antigens; Recombinant plasmid

图 版 说 明

1. 质粒pTK56-1、pTK90和pTK8899-1 DNA酶解后的琼脂糖凝胶电泳图
2. 质粒DNA酶解后的琼脂糖凝胶电泳图
1. Agarose gel electrophoresis of restriction endonuclease-cleaved plasmids pTK56-1, pTK90 and pTK8899-1
 - (1) pTK56-1 DNA/HindIII, (2) pTK56-1 DNA/BamHI,
 - (3) pTK90 DNA/BamHI, (4) pTK8899-1 DNA/BamHI,
 - (5) pTK8899-1 DNA/HindIII.
2. Agarose gel electrophoresis of restriction endonuclease-cleaved plasmids
 - (1) λ DNA/EcoRI + BamHI, (2) pTK56-1 DNA/BamHI,
 - (3) pTK90 DNA/BamHI, (4) pTK8899-6 DNA/BamHI,
 - (5) pTK8899-8 DNA/BamHI, (6) pTK90 DNA/EcoRI,
 - (7) pTK90 DNA/HindIII + EcoRI,
 - (8) pTK8899-6 DNA/HindIII + EcoRI,
 - (9) pTK8899-8 DNA/HindIII + EcoRI,
 - (10) pTK90 DNA/HindIII + BglII,
 - (11) pTK8899-6 DNA/HindIII + BglII,
 - (12) pTK8899-8 DNA/HindIII + BglII.

张景六等：带有K88与K99两种伞毛抗原基因的重组质粒的构建

Zhang Jingliu et al.: Construction of recombinant plasmid DNA containing genetic determinants for the K88 and K99 two kind of pili antigens

图版 I
Plate I

