

人毒素源性大肠杆菌热敏感肠毒素基因的 克隆和表达

程新波¹ 陈添弥¹ 马贤凯² 黄翠芬¹

(军事医学科学院生物工程研究所, 北京)¹

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京)²

用限制酶Pst I 完全消化毒素源性大肠杆菌H10407的热敏感肠毒素(LT)质粒 DNA, 酶切片经电泳分离后, 用Southern分子杂交技术定位LT基因。回收5.3kb的LT DNA 片段并将它与经Pst I 完全酶解的pUC8DNA混合, 体外连接后用于转化感受态*E.coli* JM83细胞。筛选后获得了一株能有效表达LT的重组子。免疫学及生物学测定表明, 此克隆株所产生的LT与亲本株H10407所产生者具有相同的免疫原性和生物活性, 且其产量为亲本株的16倍。

关键词 毒素源性大肠杆菌; 热敏感肠毒素; 克隆和表达

毒素源性大肠杆菌 (ETEC) 是引起婴儿及旅游者腹泻的重要致病菌。其毒力因子主要有粘附素和肠毒素。ETEC 侵入人体后首先定居于小肠上段, 再分泌肠毒素, 引起腹泻。

ETEC的热敏感肠毒素 (LT) 由一个具有腺苷酸环化酶激活作用的A亚单位及5个具有结合作用的B亚单位组成^[1]。已经证明, 不同地区分离的ETEC致病菌株产生的LT之免疫原性完全相同, 人源, 猪源ETEC的LT基因间也有广泛的同源性^[2,3]。

日本学者 Yamamoto 等于1980年率先报道了人源ETEC LT基因的克隆, 并对其结构作了研究^[1,4], 但在国内, ETEC的分子遗传学及流行病学研究却有待深入。我们在分离纯化*E.coli* H10407 LT编码质粒的基础上, 克隆并表达了其LT基因。所得到的毒素基因克隆, 不仅有助于ETEC的流行病学调查, 也为旅游者腹泻的免疫预防打下基础。

材 料 和 方 法

(一) 材料

1. 菌株: *E.coli* JM83(ara, Δ lac-pro, strA, thi, ϕ 80dlacZ Δ M15) 为大肠杆菌K12受体菌。*E.coli* 20SO (pJY11) 为带有 *E.coli* H10407 LT 编码质粒的菌株, 由日本顺天堂大学 Yamamoto, T 博士惠赠。*E.coli* H10407 为国际公认的人ETEC标准株。*E.coli* JM83 (pUC8) 为载体质粒pUC8携带株。

2. 细菌培养基: 普通 LB 培养基; 产毒培养基, 按文献〔5〕配制, 乳糖 MacConkey培养基为军事医学科学院五所产品。

3. 限制性内切酶等: EcoRI, Hind III, PstI, XbaI I T4DNA连接酶等为华美生物工程公司产品。低熔点琼脂糖,

本文于1987年9月10日收到。

南丽等同志在细胞学试验中给予大力协助, 张兆山等同志对本工作给予有益指导, 在此一并致谢。

IPTG为Sigma公司产品。LT抗血清购自上海卫生防疫站。 ^{32}P 标记的猪源ETEC LT基因探针由第一军医大学俞守义副教授提供。

(二) 方法

1. DNA的制备及重组质粒的构建和分析: 质粒DNA的提取按改进的Birnboim的碱变性法进行^[6], 限制性内切酶酶解, DNA体外连接及琼脂糖凝胶电泳等参照文献〔3〕的方法。DNA转化按Mandel及Higa(1970)的方法进行。Southern核酸印迹术参照Southern, E.的方法进行^[7]。DNA片段回收采用低熔点琼脂糖法。

2. LT粗制品的制备及被动免疫溶血试验(PIH test): 参照文献〔8〕进行。

3. 毒素的生物活性检测: 家兔肠袢结扎试验、中国地鼠卵巢细胞试验(CHO cell assay)分别参照文献〔9〕、〔10〕进行。

结 果 和 讨 论

(一) LT基因的定位

将纯化的LT编码大质粒pJY11用限制酶PstI完全酶解后, 负载于0.7%的琼脂糖凝胶上, 采用Tris-硼酸缓冲系统, 电压10V/cm, 电泳3h分离DNA片段。用0.5mol/L的NaOH将琼脂糖凝胶上的DNA片段变性后, 用Southern, E.法将其转移至硝酸纤维素滤膜上, 然后与猪源ETEC的LT基因探针^[11](含部分A亚单位及全部B亚单位编码序列)杂交。结果表明(图版I-1): pJY11的第三条PstI带能与探针杂交。进一步实验证明此片段约为5.3kb。表明LT基因位于pJY11质粒上一个5.3kb的PstI片段上。

(二) LT基因的克隆

用PstI将带有LT基因的pJY11质粒完全酶解后, 负载于0.7%的低熔点琼脂糖凝胶上进行电泳分离。0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 溴化乙锭染色后长波紫外灯下切取第三条PstI DNA带, 65 $^{\circ}\text{C}$ 凝胶完全溶解后, 酚抽提, 酒精沉淀。将0.3 μg 回收的DNA与0.5 μg 预先用PstI完全酶切的pUC8DNA混合, 于14 $^{\circ}\text{C}$ 用T4DNA连接酶连接18h。连接混合物用于转化感受态*E. coli* JM83细胞。在乳糖麦康凯(MacConkey)培养基平板上(含氨苄青霉素100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 并用0.1mol/L IPTG溶液10 μl 涂于平板表面)挑选出100株具有外源DNA插入的抗氨苄青霉素白色菌落。随机抽取其中42株进行被动免疫溶血试验(PIH test), 结果有23株为PIH试验阳性。SPA协同凝集结果与PIH试验一致。从23株PIH阳性菌株中抽取10株进行质粒分析表明, 各菌株所带质粒均大于载体PUC8, 说明确有外源DNA的插入。纯化重组子*E. coli* JM83(pCHP21)的质粒, PstI完全酶切后证明能产生5.3kb及2.7kb的二个片段。将此琼脂糖凝胶上的DNA变性后用Southern法转移至硝酸纤维素滤膜上, 只有5.3kb的片段能与猪源ETEC LT基因探针杂交。说明pCHP21确为插入了5.3kb LT片段的重组质粒, 酶切所产生的另一片段为载体pUC8, 故不能与LT探针杂交。此外, 对pCHP21还进行了EcoRI, PstI, XbaI等酶的单一和交叉酶切分析, 以 λ DNA经EcoRI及Hind III酶切产生的DNA片段为分子量标准, 测定了所产生的各片段的大小, 结果见图版I-1。质粒pCHP21构建示意图请见图1。

(三) LT基因的表达

限制性内切酶分析及Southern核酸印迹术结果表明, pCHP21确为带有LT基因

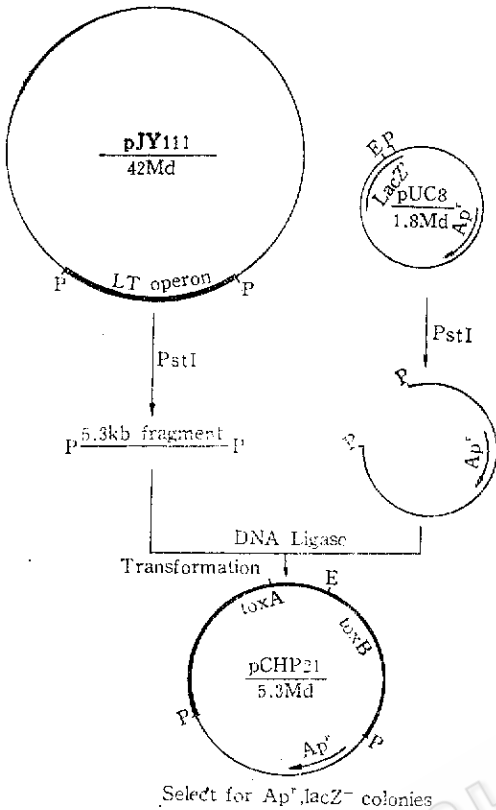


图 1 重组质粒pCHP21 构建示意图

Fig.1 Schematic diagram for the construction of pCHP21

E: EcoRI, P: PstI, X: XbaI

片段的重组质粒。但是pCHP21 在宿主菌中表达 LT 的情况究竟如何呢？为此，对重组子 *E.coli* JM83 (pCHP21) 所生产的 LT 进行了半定量测定，被动免疫溶血试验的结果（表 1）表明：此克隆株的 LT 产量为亲本株 *E.coli* H10407 产量的 16 倍。

利用中国地鼠卵巢细胞试验及家兔肠祥结扎试验对 LT 克隆株产生的 LT 进行了生物活性检测。有活性的 LT 将使中国地鼠卵巢细胞发生明显变长的形态学变化，在兔肠结扎试验，有活性的 LT 使注入该毒素的肠段产生明显积液（积液量大于 1ml/cm）。检测结果（图版 I -2,3）表

明，*E.coli* JM83(pCHP21) 的粗制毒素或培养物上清与 *E.coli* H10407 者一样，均能使细胞产生阳性形态学变化，同时使注入毒素制品的肠段明显积液，而作为对照的 *E.coli* JM83(PUC8) 培养物上清则不能引起上述变化。进一步试验表明，上

表 1 PIH法测定各菌株LT产量结果
Table 1 The LT titers of strains in PIH test

菌 株 Strains	滴度 (Titer)	
	粗制毒素 Crude toxin preparation	培养物上清 Culture sup- ernatant
<i>E.coli</i> JM83 (pCHP21)	1:128	1:32
<i>E.coli</i> H10407	1:8	ND*
<i>E.coli</i> 20SO (PJY11)	1:8	ND
<i>E.coli</i> JM83 (pUC8)	ND	ND

ND*: Not detectable (未测到)

述毒性作用可以被 LT 抗血清特异性中和或经 100℃ 煮沸 10min 灭活。说明细胞形态学变化确由热敏感肠毒素引起。

我们利用体外 DNA 重组技术，从 *E.coli* H10407 的 LT 编码质粒 pJY11 中分离了 LT 基因，并将之插入载体 pUC8 的单一 PstI 位点上。所得到的重组子产生的 LT 与亲本株 H₁₀ 所产生者具有相同的免疫原性和生物活性，且其表达水平为亲本株的 16 倍。由于重组质粒中 LT 基因片段本身带有启动子 (IPTG 对克隆株 LT 表达无诱导作用)，因此，我们推测，LT 表达水平的提高是重组质粒拷贝数增加所致。我室构建的表达 K88ac 及 LT-B 两种抗原的猪痢疫苗株，已经大规模试验证明具有相当好的保护作用^[12]。因此，人源 LT 基因克隆的获得，必将为 ETEC 的免疫预防以及流行病学研究提供有效的工具。我们已经构建了 LTA⁻B⁺ 的重组质粒 pCHP22 (带有 2.0kb 的 LT-B 基因片段，见图版 I -1)，并达到与 *E.coli* JM83 (pCHP21) 相近的

表达水平,同时,由于表达水平的提高,分泌到胞外的 LT-B 抗原量也相应增多,

因此,可望用于构建有效的类毒素疫苗株。

参 考 文 献

- [1] Yamamoto, T. et al.: *J. Bacteriol.*, 143:652, 1980.
- [2] Svennerholm, A. M. et al.: *Acta. Path. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. C*, 90:1, 1982.
- [3] Yamamoto, T. et al.: *J. Bacteriol.*, 152:506, 1982.
- [4] Yamamoto, T. et al.: *J. Bacteriol.*, 145:850, 1981.
- [5] 李丰生等: 生物工程学报, 3:102, 1987.
- [6] Birnboim, H. C. et al.: *Nucleic Acid Res.*, 7:1513, 1979.
- [7] Southern, E. et al.: *J. Mol. Biol.*, 98:503, 1975.
- [8] 李淑琴等: 军事医学科学院院刊, 10:255, 1986.
- [9] Evans, D. G. et al.: *Infect. Immun.*, 7:873, 1973
- [10] Guerrant, R. L. et al.: *Infect. Immun.*, 10:320, 1974
- [11] 陈锦光等: 微生物学报, 25:119, 1985.
- [12] 陈添弥等: 中国兽医杂志, 14:2, 1988.

CLONING AND EXPRESSION OF THE HEAT-LABILE ENTEROTOXIN GENE OF AN ENTEROTOXIGENIC *ESCHERCHIA COLI* HUMAN STRAIN

Cheng Xingbo¹ Chen Tianmi¹ Ma Xiankai² Huang Cuifeng¹

(Institute of Biotechnology¹, Institute of Basic Medical Sciences², Academy of
Military Medical Sciences, Beijing)

DNA of the heat-labile enterotoxin (LT) plasmid pJY11 originating from H10407, an enterotoxigenic *Escherchia coli* human strain, was digested to completion with PstI. The location of the LT region on this plasmid was determined by means of Southern hybridization after eletrophoretically separating the resulting fragments. The 5.3kb LT-encoding fragment determined in the above hybridization experiment was then recovered and subsequently ligated to pUC8 DNA predigested with PstI. After transformation and selection, a clone that efficiently expressed LT was obtained. Biological and immunological assays showed that LT produced by this clone was biologically and immunologically identical to that by the parental strain, and LT production level of this recombinant strain was 16 times higher.

Key words

ETEC; heat-labile enterotoxin; cloning and expression

图 版 说 明

Explanation of plate

1. Southern分子杂交及重组质粒pCHP₂₁的酶切分析结果

Results of Southern hybridization and restriction analysis of recombinant plasmid pCHP₂₁

A. 溴化乙锭染色的凝胶 Ethidium bromide stained gel

a. PstI-digested pCHP₂₁ DNA b. PstI-digested pJY₁₁ DNA

B. 同一凝胶的分子杂交结果 Results of Southern hybridization of the same gel

C. 重组质粒pCHP₂₁的酶切分析结果 Result of restriction analysis of recombinant plasmid pCHP₂₁

a. pCHP₂₁ + PstI b. pCHP₂₁ + XbaI c. pCHP₂₁ + EcoRI + PstI d. pUC8 + PstI

e. pCHP₂₂ + EcoRI + PstI f. pCHP₂₁ + PstI + XbaI g. Lambda DNA + EcoRI + HindIII

2. 中国地鼠卵巢细胞试验结果 Results of Chinese hamster ovary cell assay

A. CHO cells treated with *E.coli* JM83(pUC8) culture supernatant

B. CHO cells treated with *E.coli* JM83(pCHP₂₁) culture supernatant

C. CHO cells treated with LT-antitoxin neutralized *E.coli* JM83(pCHP₂₁) culture supernatant

3. 家兔肠袢结扎试验结果 Results of adult rabbit intestinal ligated loop assay

A&E. Intestinal segments injected with *E.coli* JM83(pCHP₂₁) culture supernatants

B. Intestinal segment injected with *E.coli* JM83(pUC8) culture supernatant

C. Intestinal segment injected with *E.coli* 20SO(pJY₁₁) culture supernatant

D&F. Intestinal segments injected with *E.coli* JM83(pCHP₂₂) culture supernatants

