产肠毒素大肠杆菌的热敏肠毒素 B 亚基(LT-B)和耐热肠毒素(ST)基因融合及其表达*

徐 兵[1,2] 张兆山[1**] 李淑琴[1] 舒 东[2] 俞守义[2] 黄翠芬[1]

[1](北京生物工程研究所 北京 100071)

[2](第一军医大学流行病学教研室 广州 510515)

摘 要 采用基因重组技术构建了表达产肠毒素大肠杆菌(ETEC)的耐热肠毒素(ST)基因和热敏肠毒素 B 亚基(LT-B)基因融合抗原的疫苗候选株。将 ST 基因的 5′端与 LT-B 基因的 3′端连接,并置于同一阅读框。编码 ST 的基因是通过 PCR 从 pSLM004 质粒中扩增得到的,含有 ST 的 pro 序列(其编码 ST 前体的 pro 区域),并应用寡核苷酸定点突变技术将编码 ST 的第 14 位氨基酸残基发生突变,使 ST 的第 14 位氨基酸残基 Ala 突变为 Leu。在所构建的结构中,于 LT-B 和 pro-ST 之间分别插入了不同长度的氨基酸 Linkers。表达的融合多肽同时具有 ST 和 LT-B 的抗原性,并保留结合 GM-1 神经节苷脂的能力,且无 LT 和 ST 的生物毒性。表达的融合蛋白免疫动物,能诱导产生相应的特异性抗体。

关键词 产肠毒素大肠杆菌,肠毒素,基因融合,基因表达

分类号 Q789 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)04-0439-43

人源肠毒素性大肠杆菌(Enterotoxigenic *Escherichia coli*,ETEC)是婴幼儿及旅游者腹泻的主要病原菌[1]。ETEC 的致病因子包括两类毒性因子,即耐热肠毒素(Heat-stable toxin,ST)和热敏肠毒素(Heat-labile toxin,LT)两种。ST 有毒且几乎没有免疫原性,当其与载体蛋白共价偶联后,可表现出特异免疫原性。对 ST 结构的研究,显示其含有高度保守的 C-端 13 个氨基酸顺序,具有全部肠毒素活性,构成一个毒素域;而且同野生 ST 一样,具有同样结合受体蛋白的能力。ST 的 N-端 Asn-Ser-Ser-Asn-Tyr 氨基酸是 ST 生物活性不必需的,但却是重要的抗原决定簇[2]。我们采用寡核苷酸定点突变技术,改变编码 ST 第 14 位氨基酸的核苷酸,使 ST 的第 14 位氨基酸残基 Ala 突变为 Leu,同时引入 ST 的前导顺序 pro 作为与载体蛋白连接的 Linker。由于 LT-B 无毒且具有强的粘膜免疫原性,是理想的粘膜免疫载体蛋白。本研究将 pro-ST 基因片段置于 LT-B 基因的 3′端,并保证同一阅读框架,得到了表达 LT-B/pro-ST 融合蛋白的重组质粒;该重组质粒在 *E. coli* JM109 中表达的融合蛋白具有 LT 和 ST 双价免疫原性,动物试验证明无生物毒性。为构建安全的 ETEC 多肽疫苗提供了候选株。

* 国家高技术研究与发展计划项目(No.863-102-07-03-05)。

** 通讯联系作者。

收稿日期:1998-11-09,修回日期:1999-06-28。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

E. coli JM109，*E. coli* C600，HB101（本室保存）；*E. coli* H10407（078∶H11，ST^+ LT^+ CFA/1^+）购自中国药品生物制品检定所；质粒 pFS2.2 由 F. Schodel 博士赠送[3]。

1.2 培养基

LB 培养基；产毒培养基（g/L）：含酪蛋白水解物 20，酵母粉 10，NaCl 5，K_2HPO_4 15，葡萄糖 5，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.0025，$CoCl \cdot 6H_2O$ 0.001，$FeCl_3$ 0.0025。

1.3 核苷酸引物

为了降低 ST 的生物毒性，在本研究室化学合成的 ST 引物中，编码 ST 第 14 位氨基酸的核苷酸由 AAG 替代 AGC，这样将 ST 的第 14 位氨基酸由 Ala 突变为 Leu。为了方便连接，在设计的引物中都有相应的酶切位点。

引物 1：5′>CCGCGGATCCTCAGGATGCTAAACCA<3′

引物 2：5′>GCACCCGGTACAAAGAAGGATTACA<3′

1.4 DNA 操作技术

以引物 1，引物 2 扩增 pro-ST 基因：①引物 2 引入一个突变位点AGC→AAG（编码为互补的 CTT），则 ST 第 14 位氨基酸残基由 Ala 定点突变为 Leu；②引物 1 引入一个 *Bam*HI 酶切位点。PCR 条件：94℃ 1min，52℃ 1min，72℃ 1.5min，30 cycles；末轮循环：94℃ 1min，52℃ 1min，75℃ 1min。PCR 产物回收，寡核苷酸链退火，细菌质粒的分离纯化，DNA 的连接和转化，琼脂糖凝胶电泳等均按常规方法。DNA 序列分析采用 Sanger 双脱氧末端终止法[4]。

1.5 ELISA 测定

待测样本菌及对照（阴性及阳性各一株）分别接种于 0.6mL 产毒培养基中，37℃ 过夜振荡培养后，每管加 2 万单位多粘菌素 B 0.5mL，37℃ 温育 1h，4000r/min 离心 15min，取上清同时用于 LT、ST 检测，筛选出 LT 和 ST 均为阳性的克隆株。LT 检测方法根据双抗体夹心法设计，ST 检测方法根据竞争性 ELISA 设计。酶标试剂盒购自上海市卫生防疫站。为了检测融合蛋白是否具有与 GM-1 神经节甙酯结合的能力，在测定 LT 时，用 GM-1 试剂取代试剂盒中的‘Anti-LT’试剂。

1.6 融合蛋白的分离纯化

CT-B 与 LT-B 不仅有 70% 以上的同源顺序，而且有较强的免疫交叉。我们把抗 CT-B 抗体的 IgG 共价偶联到溴化氰活化的 Sepharose 4B 上，制成了亲和层析柱。应用此亲和层析柱纯化 LT-B/pro-ST 融合蛋白[5]。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和 Western blot 免疫印迹试验参照文献[6]。

1.7 生物毒性检测

乳鼠试验是检测 ST 生物毒性的经典方法[7]。新生 BALB/c 乳鼠（1～3d），随机分组，每组 3 只。每毫升纯化的融合蛋白中加入 2% 的伊文斯蓝 10μL；每只乳鼠灌饲 0.1mL，25℃ 静置 3h 后，腹部解剖取整个肠部，称量肠重和去肠鼠重；计算肠重/去肠鼠重的比值，比值大于 0.083 为阳性（肉眼观察肠部充满脓水）。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

1.8　动物免疫试验

选用4～6周龄的BALB/c雌性小鼠,每只小鼠腹腔注射0.1mg融合蛋白。隔周免疫,共免疫2次,第6周收集血清,测血清抗LT-B-IgG抗体和抗ST-IgG抗体。

2　实验结果

2.1　重组质粒的构建

重组质粒pFS2.2是含有LT-B基因的表达融合多肽的载体,无LT-B基因的终止密码子并在其3′端有一多克隆位点,外源基因很容易与其3′末端融合。在LT-B与ST基因融合时,由于二者之间的间隔距离不同,或接头序列的差异,会影响融合多肽的抗原性,甚至氨基酸种类的细微差异导致ST毒性的严重差别。本研究设计了两种方案,(a)用限制酶EcoRV消化pFS2.2质粒DNA,把经PCR扩增的pro-ST基因平端插入并置同一阅读框下,从而形成编码LT-B/Tyr-Pro-Gln-Asp-Pro-Ile-Ala-Asp-Pro/pro-ST的融合基因(图1),该重组质粒命名为pXZL01;(b)载体质粒pFS2.2 DNA用*Bam*HI和*Eco*RV双酶切,然后与经*Bam*HI消化的pro-ST基因定向连接,得到编码LT-B/Tyr-Pro-Gln-Asp-Pro/pro-ST的融合基因,命名为pXZL02(图略)。核苷酸序列分析证明重组质粒符合设计。

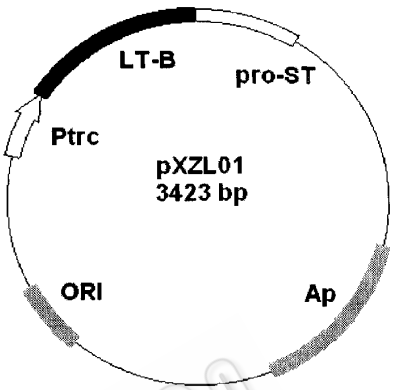

图1　重组质粒pXZL01的结构

Fig.1　The construction of recombinant plasmid pXZL01

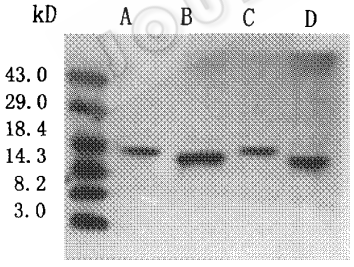

图2　LT-B/pro-ST融合蛋白的SDS-PAGE分析

Fig.2　SDS-PAGE of the affinity-purified LT-B/pro-STa fusion proteins.

Lane A and C: Products expressed by pXZL01 were boiled in SDS without (A) or SDS with dithiothrecitol(C)

Lane B and D: Products expressed by pXZL02 were boiled in SDS without (B) or SDS with dithiothrecitol(D)

2.2　LT-B/pro-ST融合多肽抗原性测定

采用夹心法ELISA测定融合蛋白的LT抗原性,结果见表1;采用竞争性ELISA测定融合蛋白的ST抗原性,结果表明融合蛋白能与野生ST竞争性结合抗ST抗体(表略)。上述结果证明,两种重组质粒表达的融合蛋白都同时具有LT和ST的抗原性。GM-1包被的ELISA检测结果表明融合蛋白仍保留了与GM-1神经节苷脂结合的能力。

2.3　融合蛋白的纯化及鉴定

应用亲和层析法纯化LT-B/pro-ST融合蛋白。SDS-PAGE显示*E. coli* JM109(pXZL01)和*E. coli* JM109(pXZL02)分别表达的融合蛋白都是一条单链多肽,表观分子量分别约为17kD和16kD左右(图2)。两种融合蛋白分别加SDS煮沸(图2A、B)和加SDS及二硫苏糖醇煮沸(图2C、D)后,电泳迁移率没有变化,没有多聚体形成的迹象。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

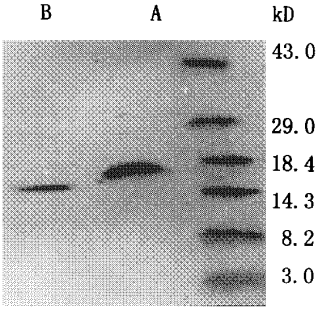

图 3 融合蛋白的 Western-blot 分析

Fig. 3 Western-blot hybridization of the affinity-purified LT-B/pro-ST fusion protein

Lane A: Fusion protein was expressed by JM109(pXZL01)

Lane B: Fusion protide was expressed by JM109(pXZL02)

2.4 Western blot 分析结果

经亲和层析分离纯化的融合蛋白，SDS-PAGE 电泳后，转移至硝酸纤维素滤膜上，与抗 ST 血清结合，二抗结合后显色。Western blot 结果显示两种融和蛋白都能同抗 ST 血清结合(图 3)。

2.5 融合蛋白的生物毒性测定

LT-B 蛋白原无任何生物毒性，ST 多肽具有生物毒性。LT-B 和 pro-ST 融合后，兔肠袢结扎试验表明仍无 LT 毒性(结果未列) 乳鼠肠重与去肠鼠重的比值大于 0.083 者为阳性，小于 0.083 为阴性，结果见表 2，证明融合蛋白无残留 ST 的生物毒性。

表 1 夹心法 ELISA 检测 LT 抗原性

Table 1 LT-B antigenicity of LT-B/pro-ST fusion peptide with ELISA

Samples	A_{492nm}	P/N
E. coli JM109	0.04	
E. coli H10407	0.93	23.2
E. coli JM109 (pXZL01)	0.95	23.8
E. coli JM109 (pXZL02)	0.96	24.0

表 2 乳鼠实验测定 ST 肠毒性

Table 2 The suckling mouse assay for ST toxicity

Strains	Mean ± SE
E. coli H10407	0.115 ± 0.022
E. coli JM109 (pXZL01)	0.059 ± 0.004
E. coli JM109 (pXZL02)	0.064 ± 0.005

2.6 融合蛋白免疫原性的测定

融合蛋白免疫小鼠，得抗血清。以此抗血清替代 ELISA 试剂中的单抗，测定血清效价。结果显示，免疫后小鼠血清中产生的抗 LT-B IgG，其滴度是免疫前的 1000 倍 抗 ST IgG，为 100 倍。

3 讨 论

人源肠毒性大肠杆菌(ETEC)是引起人类腹泻的重要病原菌。LT 和 ST 的存在是研制一种具有肠毒素 LT 和 ST 免疫原性的新型疫苗的重要课题。由于野生 ST 几乎没有免疫原性且具有强的生物毒性，增强免疫原性并降低其生物毒性就尤为重要。降低 ST 的生物毒性可通过两种方式，其一是去除或改变 ST 的毒性域结构，其二是在融合蛋白之间选择合适的 Linker，使部分 Linker 氨基酸参与 ST 的构象，从而改变 ST 毒性域结构。有研究表明，Linker 的长短及氨基酸属性的不同，可极大地改变甚至增强其生物毒性[8]。然而，不论何种改变，融合蛋白不仅要有 ST 的特异免疫原性，且其诱导的特异性抗体可与野生 ST 特异性地结合。我们构建并表达的融合蛋白具有 LT 和 ST 双价免疫原性，无

© 《生物工程学报》编辑部 http://journals.im.ac.cn

任何残留生物毒性,保持与GM1特异性结合的能力,为进一步构建安全的ETEC疫苗打下了基础。

参 考 文 献

[1] K.B.Sack. *Annu Rev Microbiol*,1975,**29**:333~340.

[2] J.Gariepy,L.Andrew, F.Felix *et al*. *Biochemistry*.1986,**25**:7854~7866.

[3] F.Schodel and W.Hans. *Infection and Immunity*. 1989,**57**:1347~1350.

[4] F.Sanger. *Proc Natl Acad Sci USA*,1977,**74**:54~64.

[5] D. John. *Infection and Immunity*. 1990,**58**:1159~1166.

[6] J.Sambrook,E.F.Fritsch,T.Maniatis. Molecular Cloning,A Laboratory Manual. 2nd ed,Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989.

[7] R. A Glannella. *Infection and Immunity*.1976,**6**:95~99.

[8] 张兆山,李淑琴,董自正等.中华微生物和免疫学杂志,1994,**14**:219~222.

Gene Fusion and Expression of Heat-labile and Heat-stable of Enterotoxigenic *Escherichia coli* *

Xu Bing　Zhang Zhaoshan　Li Shuqin　Shu Dong　Yu Shouyi　Huang Cuifen

(*Beijing Institute of Biotechnology*, *Beijing* 100071)

Abstract　The vaccine candidate comprising the genes that code for the B subunit of the heat-labile enterotoxin (LT-B) and the heat-stable enterotoxin (ST) of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) had been constructed by recombinant genetic techniques. The 5'terminus of the gene encoding pro-ST was genetically fused to the 3'terminus of the LT-B gene. The pro-ST gene contains mature ST sequence and pro sequence which codes for the pro region of ST precursors, and amplified by PCR from pSLM004. To reduce toxicity of the ST *in vitro* was substituted Leu for Ala residue at position 14 of ST by oligonucleotide-directed site mutagenesis. For this construction, the expression of ST antigenicity and LT antigenicity were obtained when a five-amino-acid or a nine-amino-acid linker were included between the LT-B and pro-ST moieties. The LT-B/pro-ST fusion peptides possessed no enterotoxic activity of *Escherichia coli* heat-stable and head-labile enterotoxins, and retained the ability to bind GM1 ganglioside. More importantly, these LT-B/pro-ST fusion peptides were immunogenic. The preparations containing the hybrid molecule elicited special antibodies that were able to recognize native toxin *in vitro*.

Key words　Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC), enterotoxin, gene fusion, gene expression

* Project of Chinese National Programs for High Technology Research and Development (No. 863-102-07-03-05)

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn