

# C 型产气荚膜梭菌 $\alpha$ 毒素基因的克隆与表达\*

许崇波<sup>1\*\*</sup> 许崇利<sup>2</sup> 刘哲<sup>1</sup> 陈永燕<sup>1</sup> 王仁军<sup>1</sup>

(大连大学生物工程学院 大连 116622)<sup>1</sup> (宁夏大学生命科学学院 银川 750021)<sup>2</sup>

**摘要:** 利用 PCR 技术, 从 C 型产气荚膜梭菌染色体基因组中扩增了 1.2 kb 的  $\alpha$  毒素基因, 将纯化的 PCR 产物与载体 pGEM-T 连接, 转化至受体菌 JM109 中, 经 *NcoI/EcoRI* 和 *BamHI/EcoRI* 酶切鉴定及核苷酸序列测定证实, 重组质粒 pXCPA1 中含有  $\alpha$  毒素全基因。随后用 *NcoI/EcoRI* 酶切质粒 pXCPA1, 回收  $\alpha$  毒素基因片段, 插入到事先经同样酶切处理的载体 pET-28c 中相应酶切位点, 构建了表达质粒 pETXA1, 经 *NcoI/EcoRI* 和 *BamHI/EcoRI* 酶切鉴定及核苷酸序列测定证实, 表达质粒含有  $\alpha$  毒素基因且基因序列和阅读框架正确。重组菌株 BL21 (DE3) (pETXA1) 表达产物经 ELISA 检测和 SDS-PAGE 分析, 重组菌株表达的  $\alpha$  毒素蛋白能够被  $\alpha$  毒素单抗识别, 其表达量占菌体总蛋白相对含量的 16.28%。

**关键词:** C 型产气荚膜梭菌,  $\alpha$  毒素基因, 基因克隆, 基因表达

**中图分类号:** Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 01-0062-05

## Cloning and Expression of Alpha-Toxin Gene from *Clostridium perfringens* Type C

XU Chong-Bo<sup>1\*\*</sup> XU Chong-Li<sup>2</sup> LIU Zhe<sup>1</sup> CHEN Yong-Yan<sup>1</sup> WANG Ren-Jun<sup>1</sup>

(College of Bioengineering, Dalian University, Dalian 116622)<sup>1</sup>

(Life Science School, Ningxia university, Yinchuan 750021)<sup>2</sup>

**Abstract:** Alpha-toxin gene was amplified from chromosomal DNA of *Clostridium perfringens* type C by polymerase chain reaction (PCR). PCR product was inserted into vector pGEM-T directly. The cloned recombinant plasmid pXCPA1 possesses positive nucleotide sequence of alpha-toxin. A 1.2 kb alpha-toxin gene fragment was cleaved with restriction endonucleases *NcoI/EcoRI* from plasmid pXCPA1, and then inserted into an expression vector pET-28c which cleaved with *NcoI/EcoRI* by blunt-end ligation. The recombinant expression plasmid pETXA1 was studied in detail by restriction endonucleases analysis and nucleotide sequencing. The results showed that the recombinant expression pETXA1 possessed a positive alpha-toxin gene sequence and reading frame. BL21 (DE3) (pETXA1) could produce alpha-toxin and the expressed products were recognized by alpha-toxin monoclonal antibodies, and the expression level of the alpha-toxin proteins were about 16.28% of total cellular protein by SDS-PAGE and thin-layer gel scanning analysis.

**Key words:** *Clostridium perfringens* type C, Alpha-toxin gene, Gene cloning, Gene expression

C 型产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*, 又称魏氏梭菌) 是引起仔猪红痢的主要病原菌, 其毒力因子是菌体产生的外毒素  $\alpha$  和  $\beta$  毒素。 $\alpha$  毒素是由 370 个氨基酸组成的单链多肽, 分子量约 43 kD, 它是一种依赖于锌离子的多功能性金属酶, 具有磷脂酶 C (PLC) 和鞘磷脂酶 2 种酶活性, 能同时水解组成细胞膜的主要成分—磷脂酰胆碱

\* 国家自然科学基金资助项目 (No. 30360080)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No. 30360080)

\*\* 联系人 Tel: 0411-87402327, E-mail: xcb921@sohu.com

收稿日期: 2004-04-06, 修回日期: 2004-06-10

和鞘磷脂,破坏细胞膜的完整性,导致细胞裂解,从而具有细胞毒性、溶血性、致死性和皮肤坏死性等特性<sup>[1]</sup>。我们克隆和表达了 C 型产气荚膜梭菌  $\alpha$  毒素全基因,并明确了其核苷酸序列和连接方向,为下一步研制  $\alpha$  毒素基因工程亚单位疫苗提供了理想的基因材料。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株与载体

受体菌 JM109,载体 pET-28c 由本室保存;载体 pGEM-T 购自 Promega 公司;C 型产气荚膜梭菌强毒菌 C59-44 购自中国兽药监察所。

### 1.2 试剂与仪器

限制性核酸内切酶 (*Bam*HI、*Eco*RI、*Nco*I)、PCR 试剂盒、RNaseA、T4 DNA 连接酶、氨苄青霉素购自 Sigama 公司;Wizard PCR preps DNA Purification System、X-gal、IPTG 和低熔点琼脂糖购自 Promega 公司;PCR 仪购自德国 EPPENDORF 公司。

### 1.3 $\alpha$ 毒素基因的扩增

根据 Titball 等<sup>[2]</sup>报道的  $\alpha$  毒素基因序列设计并合成了 1 对 PCR 引物,Primer 1: 5'-CATGCCATGGCAATGAAAAGAAAGATTGT-3' 和 Primer 2: 5'-CCGGAATTCTTTTATAT-TATAAGTTGAATT-3'。该引物包括了  $\alpha$  毒素全基因,在 2 条引物上分别设计了限制性内切酶位点 (*Nco*I 和 *Eco*RI),便于鉴定。在 50  $\mu$ L 的反应体系中,加引物 1、2 各 0.2  $\mu$ mol/L, dNTPs 各 200  $\mu$ mol/L、 $MgCl_2$  1.5 mmol/L, Taq 酶 3 U 和 10 ng 模板 DNA,按“94  $^{\circ}C$  1 min $\rightarrow$ 47  $^{\circ}C$  1 min $\rightarrow$ 72  $^{\circ}C$  2 min”的温度转换模式,共进行 30 个循环,扩增产物在 1.0% 琼脂糖凝胶上进行检测。

### 1.4 染色体 DNA 的提取

染色体 DNA 的提取按文献[3]介绍的方法进行。

### 1.5 DNA 的重组和转化

质粒 DNA 的提取、酶切、琼脂糖凝胶电泳、DNA 体外连接、转化等均按文献[4]方法进行。

### 1.6 质粒的稳定性试验

参照 Meacock 的方法进行<sup>[5]</sup>。将 37  $^{\circ}C$  振荡培养过夜的菌体,按 10% 接种于 100 mL 含 Kan 30  $\mu$ g/mL 的 LB 液体培养基中,继续培养 12 h。将上述培养物稀释  $10^6$  倍,在无 Kan 的 LB 液体培养基培养 12 h。取 100  $\mu$ L 稀释液涂种于普通 LB 琼脂平板,过夜培养后,随机挑取 100 个单菌落,转种在含 Kan 的 LB 琼脂平板上,37  $^{\circ}C$  过夜培养并进行菌落计数。

### 1.7 表达产物 SDS-PAGE 分析和 ELISA 检测

按文献[6]方法进行。

## 2 结果与分析

### 2.1 $\alpha$ 毒素基因克隆质粒的构建

经过 30 个循环后,扩增出了 1.2 kb  $\alpha$  毒素基因片段,利用 Wizard PCR preps DNA Purification System 回收  $\alpha$  毒素基因片段,然后将其与 pGEM-T 载体经 T4 DNA 连接酶连接,转化至受体菌 JM109 中,涂种于含 IPTG/X-gal/Amp 的 LB 琼脂平板上,过夜培养。

挑取其中 3 个 IPTG/X-gal/Amp 阳性的重组菌落, 经 37℃ 过夜培养后, 采用碱变性法快速抽提质粒, 然后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 结果重组质粒的迁移率比载体 pGEM-T 慢, 表明已有外源 DNA 插入。把其中一个重组质粒命名为 pXCPA1, 用 *NcoI*/*EcoRI* 和 *BamHI*/*EcoRI* 双酶切该质粒, 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 结果表明, 构建的重组质粒 pXCPA1 含有  $\alpha$  毒素全基因 (见图 1), 经 DNA 序列测定证实, 与 Titball 等报道的  $\alpha$  毒素基因序列一致<sup>[2]</sup>, 从而成功地构建了  $\alpha$  毒素基因克隆质粒 pXCPA1。

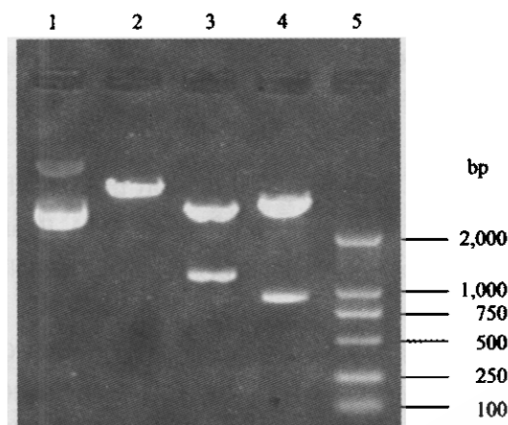


图 1 重组质粒 pXCPA1 酶切电泳结果

1 pXCPA1 plasmid, 2 pXCPA1/*EcoRI*, 3 pXCPA1 + *NcoI*/*EcoRI*, 4 pXCPA1 + *BamHI*/*EcoRI*, 5 DL2000 DNA markers

## 2.2 $\alpha$ 毒素基因表达质粒的构建

用 *NcoI*/*EcoRI* 酶切克隆质粒 pXCPA1, 回收  $\alpha$  毒素基因片段, 插入到事先用同样酶切处理过的载体 pET-28c, 然后转化至受体 BL21 (DE3) 中, 涂种在卡那霉素琼脂平板上。经过夜培养后, 从卡那霉素琼脂平板上挑取其中 3 个阳性的重组菌落, 经 37℃ 过夜培养后, 采用碱变性法快速抽提质粒, 然后进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 结果重组质粒的迁移率比载体质粒慢, 表明已有外源 DNA 插入。把其中一个重组质粒命名为 pETXA1, 用 *NcoI*/*EcoRI*、*BamHI*/*EcoRI*、*NcoI*/*BamHI*/*EcoRI* 酶切该质粒, 经 1.5%

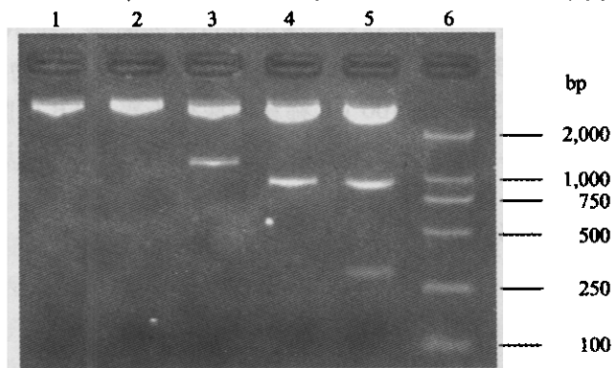


图 2 重组质粒 pETXA1 酶切鉴定

1 pET-28c + *EcoRI*, 2 pETXA1 + *EcoRI*, 3 pETXA1 + *NcoI*/*EcoRI*, 4 pETXA1 + *BamHI*/*EcoRI*, 5 pETXA1 + *NcoI*/*BamHI*/*EcoRI*, 6 DL2000 DNA markers

琼脂糖凝胶电泳, 结果表明, 构建的重组表达质粒 pETXA1 含有  $\alpha$  毒素基因 (图 2)。经 DNA 序列测定证实, 与 Titball 等报道的  $\alpha$  毒素基因序列一致<sup>[2]</sup>, 从而成功地构建了  $\alpha$  毒素基因表达质粒 pETXA1, 其结构如图 3 所示。

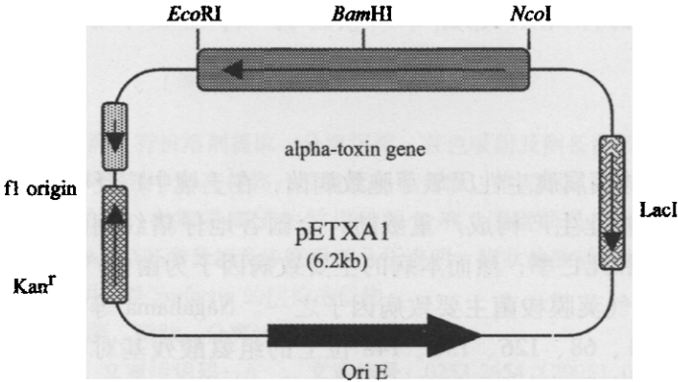


图 3 重组表达质粒 pETXA1 结构示意图

2.3 重组质粒的稳定性

重组质粒 pETXA1 在受体菌 BL21 (DE3) 中能稳定传代, 在无选择压力下, 经 20 细胞世代后, 含质粒率为 100%, 说明具有良好的稳定性。

2.4  $\alpha$  毒素基因表达产物 SDS-PAGE 分析

将用于表达 T7 启动子的 BL21 (DE3) 菌株作为  $\alpha$  毒素基因的表达宿主菌, 经转化挑取单个菌落培养, 菌体经处理后, 用 SDS-PAGE 分析, 结果表明,  $\alpha$  毒素基因可在这种宿主菌中得以表达。经 IPTG 诱导后的重组菌株 BL21 (DE3) (pETXA1) 于 0、1、2、3、4、5 h 取样, 然后进行 SDS-PAGE 分析  $\alpha$  毒素基因的表达情况。结果表明, IPTG 诱导 1 h 后,  $\alpha$  毒素基因表达量明显增加, 至 3~4 h 后, 表达量不再增加, 所以 IPTG 诱导 3~4 h, 表达量可达最高 (见图 4)。经薄层电泳扫描分析, IPTG 诱导后的重组菌株中, BL21 (DE3) (pETXA1) 中的  $\alpha$  毒素表达量占菌体总蛋白相对含量的 16.28%。

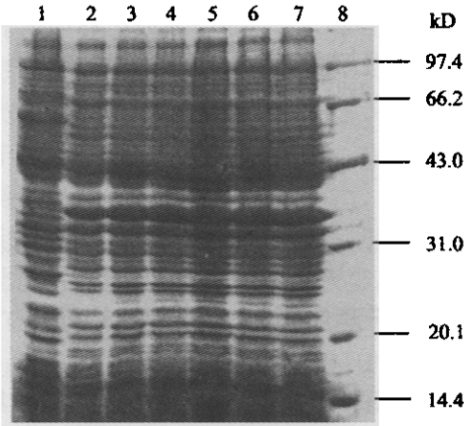


图 4  $\alpha$  毒素基因表达产物 SDS-PAGE 结果

1 BL21 (DE3) (pET-28c), 2~7 IPTG 诱导 BL21 (DE3) (pETXA1) 0、1、2、3、4、5 h 的产物, 8 低分子量蛋白 Marker

## 2.5 ELISA 检测 $\alpha$ 毒素蛋白

为了观察重组菌 BL21 (DE3) (pETXA1) 表达蛋白情况, 将 BL21 (DE3) (pETXA1) 菌体用超声波裂解, 裂解物及阴性对照和阳性对照 ( $\alpha$  毒素强毒菌 C59-44), 采用 ELISA 检测, 结果表明, BL21 (DE3) (pETXA1) 所表达的蛋白能被  $\alpha$  毒素单抗识别。

## 3 讨论

C 型产气荚膜梭菌属腐生性厌氧芽胞致病菌, 在土壤中广泛存在, 享有广泛的疫源地, 因而对我国畜牧业生产构成严重威胁, 全国各地仔猪红痢的发病率呈上升趋势, 具有很高的发病率和死亡率, 然而本病的主要致病因子为菌体产生的  $\alpha$  和  $\beta$  毒素, 其中  $\alpha$  毒素是 C 型产气荚膜梭菌主要致病因子之一。Nagahama 等<sup>[7]</sup> 和 Guillouard 等<sup>[8]</sup> 报道了  $\alpha$  毒素中第 11、68、126、136、148 位上的组氨酸残基对其具有活性至关重要, 68 位或 148 位组氨酸残基被其它氨基酸残基取代 (如甘氨酸或丝氨酸), 即可丧失其全部的溶血性和致死性。Williamson 等<sup>[9]</sup> 报道了从 247 位至 370 位的  $\alpha$  毒素就具有良好的免疫原性, 但却具有良好的免疫原性。我们克隆表达了  $\alpha$  毒素全基因, 其表达水平占菌体总蛋白相对含量的 16.28%, 为进一步研制  $\alpha$  毒素基因工程亚单位苗提供了理想基因材料。

## 参考文献

- [1] Rood J I, Cole S T. *Microbiol Rev*, 1991, 55 (4): 621 ~ 648.
- [2] Titball R W, Hunter S E C, Martin K L, *et al.* *Infect Immun*, 1989, 57 (2): 367 ~ 376.
- [3] Henricus L. Klaasen B M, Molkenboer J C H, *et al.* *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 1999, 24: 325 ~ 332.
- [4] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning*, 2nd Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [5] Meacock P A, Cohen S N. *Cell*, 1980, 20 (2): 529 ~ 542.
- [6] 赵宝华, 许崇波. *微生物学通报*, 2002, 29 (2): 8 ~ 13.
- [7] Nagahama M, Okagawa Y, Nakayama T, *et al.* *J Bacteriol*, 1995, 177 (5): 1179 ~ 1185.
- [8] Guillouard I, Garnier T, Cole S T. *Infect Immun*, 1996, 64 (7): 2440 ~ 2444.
- [9] Williamson E D, Titball R W. *Vaccine*, 1993, 11 (12): 1253 ~ 1258.