

VT2-B 亚单位的重组表达及单克隆抗体的制备*

梅明珠¹ 严亚贤^{2**} 陆承平^{1,2}

(南京农业大学动物医学院 南京 210095) (上海交通大学农业与生物学院 上海 201100)

摘要 以大肠杆菌 O157 DNA 为模板扩增 VT2-B 亚单位,纯化后经 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切,连入表达载体 pGEX_{4T-2},构建重组表达质粒 pGEX_{4T-2}-VT2-B。转化到大肠杆菌 BL21 中,经 IPTG 诱导,实现了 VT2-B-GST 融合蛋白的可溶性表达,表达量约占菌体总蛋白的 35%。重组蛋白纯化后,免疫 BALB/C 小鼠制备单克隆抗体,得到 2 株融合细胞,制备了腹水单抗,测得单抗的 ELISA 效价为 10⁴。Western blot 表明,该单抗能与重组蛋白特异性的结合。特异性单抗的获得为 VT2 毒素检测方法的建立奠定了基础。

关键词 大肠杆菌 O157, Vero 毒素, 重组质粒, 融合表达, 单克隆抗体

中图分类号 S852.43 Q78 文献标识码 A 文章编号 0253-2654(2007)03-0475-04

Prokaryotic Expression of Vero Toxin II B Subunit from *Escherichia coli* O157 and Preparation of Monoclonal Antibodies*

MEI Ming-Zhu¹ YAN Ya-Xian^{2**} LU Cheng-Ping^{1,2}

(College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

(School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 201100)

Abstract The segment of VT2-B subunit was amplified by PCR, then purified and digested with the endonucleases *EcoR* I and *Xho* I. The digested segment was inserted into the double-cleaved expression vector pGEX_{4T-2}. The recombinant expression vector was named as pGEX_{4T-2}-VT2-B. The expression vector was transformed into *E. coli* BL21 competent cells, and highly expressed a VT2B-GST fusion protein after IPTG inducing. The target fusion protein occupied 35% of total cell protein and in soluble form. The high-purified fusion protein was obtained by GSH-Sepharose Resin. The BALB/C mice were immunized with the purified recombinant protein. Two strains of monoclonal antibody 4B × F10 × D4 and 4B × 8G × 11F were obtained. Ascitic monoclonal antibodies were generated by using cells 4B × 8G × 11F. Western blot analysis showed that the recombinant protein had a specific affinity for monoclonal antibody, while not for vector protein. The results showed that the McAb generated was against the VT2-B subunit, not against the GST.

Key words *E. coli* O157, Vero toxin, Recombinant plasmid, Fusion expression, Monoclonal antibody

1982 年美国亚特兰大疾病控制与预防中心首次报道了由一种罕见的大肠杆菌血清型即 O157:H7 引起的出血性肠炎^[1], 此后的 20 多年中由 O157 所致的疾病在全世界范围内都有散发和暴发, 尤其以 1996 年在日本的暴发流行最为大家熟知, 我国也有从患者、畜禽及肉制品中分离到该菌的报道^[2]。而 Vero 毒素(Vero toxin, VTs)为该菌的主要毒力因子之一, 具有神经毒、细胞毒和肠毒 3 种生物活性, 与临床上的中毒性腹泻、出血性肠炎、溶血性尿毒症

等严重并发症密切相关^[3]。

Vero 毒素又称志贺样毒素(SLT), 在生物学活性上酷似志贺毒素(Stx)。而国内外有时也将志贺样毒素和志贺毒素通用, 目前还没有一致的命名法。根据能否被志贺抗毒素中和分为能被志贺抗毒素中和的志贺样毒素 1(Stx1)和不能被志贺抗毒素中和的志贺样毒素 2(Stx2)。

Vero 毒素(VT)是由 1 个 A 亚单位和 5 个 B 亚单位组成的“1A+5B”结构, 其中 A 亚单位发挥 RNA

* 上海市科技兴农重点攻关项目(No. 沪农科攻字(2004)第 11-4 号)

** 通讯作者 Tel 021-64789734, E-mail yanyaxian@shtu.edu.cn

收稿日期 2006-08-04, 修回日期 2006-09-28

N-糖苷酶的活性,特异性裂解真核细胞 28S rRNA,从而抑制细胞蛋白合成过程中的肽链的延伸,致使细胞死亡。B亚单位是一种多聚体,能与细胞膜糖脂受体结合,介导A亚单位进入细胞发挥生物活性。研究发现,B亚单位无毒且具有保护性抗原的作用。针对B亚单位的免疫原性,国内外学者已经开展了B亚单位在大肠杆菌和酵母中的表达^[4,5]。本试验将VT2-B基因插入到原核表达载体 pGEX_{4T2}中,使VT2-B亚单位在大肠杆菌 BL21 中的表达,并制备了单克隆抗体,为VT诊断抗体的研制奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

克隆宿主菌 *E. coli* DH5 α 、表达宿主菌 *E. coli* BL21 和筛选菌株 *E. coli* MC1601(VT2⁻)及 *E. coli* O157:H7(VT2⁺)为本实验室保存。表达质粒 pGEX_{4T2}由南京军事医学研究所唐家琪研究员所赠。

1.2 实验动物、细胞株

BALB/C 雌性小鼠,6~8周龄,购自上海西普尔必开凯实验动物公司。骨髓瘤细胞系 Sp2/0 细胞由本实验室保存。

1.3 引物设计与合成

根据 GenBank 上 VT2 的 DNA 序列(登陆号为 NC-002655),设计两条引物 P1:5'-cccgaattccgg-cggattgcgcta-3'、P2:5'-ccgctcgagg-cctcagtcattatt-3',分别在 5'端插入限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Xho* I 的酶切位点,扩增删除信号肽的 VT2-B 亚单位的基因序列。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.4 原核表达载体的构建及鉴定

以大肠杆菌 O157 DNA 为模板扩增 VT2-B 亚单位。取适量的 PCR 产物和载体质粒 pGEX_{4T2}经 *EcoR* I 和 *Xho* I(购自 TaKaRa 公司)酶切,用胶回收试剂盒(购自上海天根公司)纯化回收 PCR 片段和载体质粒,加入 T4DNA 连接酶(购自 FERMENTS 公司),16℃连接 12h~18h。将连接产物转化到 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中,转化子在含 Amp(100g/L)的 LB 琼脂平板上 37℃培养 12h~16h。随机挑取 14 株个菌落,进行 PCR 鉴定。选 1 株阳性菌落进行平板划线,然后挑取单菌落接种 5mL 含 Amp 的液体

LB,37℃ 200r/min 培养 16h~18h。以质粒提取试剂盒提取质粒 DNA,经 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定,于 1.5%的琼脂糖凝胶电泳观察。对 PCR 和双酶切鉴定正确的重组质粒命名为 pGEX_{4T2}-VT2-B。

1.5 VT2-B 亚单位的核苷酸、氨基酸序列及抗原性的比较

鉴定为阳性的菌株送到上海 TaKaRa 公司进行测序后,在 BLAST 上进行碱基及氨基酸序列的比较。然后在 DNASTar Protean 上进行抗原性比较。

1.6 重组蛋白的表达及表达形式的鉴定

将重组质粒和空载体质粒分别转化到 *E. coli* BL21 中,取 100 μ L 涂平板,12h~16h 后挑取单个菌落接种到 5mL LB(Amp⁺)液体培养基中,150r/min 培养 12h 后转接到 50mL LB(Amp⁺)液体培养基中,37℃振摇培养 2h~3h,加入 IPTG 至终浓度为 1mmol/L,继续培养 4h 后 12000r/min 离心 15min 收集菌体。用 pH7.2 PBS 漂洗 3 次,重悬于 2mL PBS 中,加入溶菌酶至终浓度为 1mg/mL,冰上放置 30min 后,加入 5mL 0.2% 的 Triton X-100,然后采用超声波破碎仪破碎菌体(条件为 400W、处理 10s、间隔 10s、10min)。4℃ 10000r/min 离心 20min,收集上清,沉淀用 8mol/L 的尿素溶解,离心取上清,分别进行 SDS-PAGE。

1.7 单克隆抗体的制备

用 GST 重组蛋白亲和层析柱纯化的融合蛋白,与等量弗氏完全佐剂混合成油包水的乳剂后,皮下多点注射 BALB/C 小鼠,间隔 14d,共免疫 4 次。免疫后 5d 测血清效价进行融合。参照免疫学常用实验技术^[6]制备单克隆抗体。其中在筛选的时候分别用纯化的融合蛋白和饱和硫酸铵法提取的 *E. coli* MC1601(VT2⁻)及 *E. coli* O157:H7(VT2⁺)的培养上清中的粗毒素同时进行。

1.8 腹水制备及效价测定

每只 BALB/C 小鼠注射 0.3mL 弗氏不完全佐剂,2 周后腹腔注射 5×10^5 个杂交瘤细胞,待小鼠腹部膨大后,收集腹水离心取上清备用。用 ELISA 方法测定效价。

1.9 Western blot 检测^[7]

SDS-PAGE 电泳后通过半干电泳仪转移至硝酸纤维素膜上后,进行蛋白质免疫印迹反应,一抗为制备的阳性单抗,二抗为 HRP 标记的羊抗鼠 IgG,以

DAB 显色。

2 结果

2.1 pGEX_{4T2}-VT2-B 重组表达质粒鉴定

重组质粒(pGEX_{4T2}-VT2-B)用 *Eco*R I 和 *Xho* I 酶切和 PCR 鉴定,琼脂糖电泳显示在 230bp 处都有一条条带,大小与目的基因相符(图 1),说明重组质粒的构建成功。

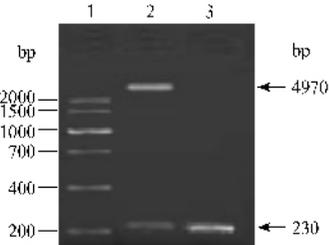


图 1 质粒鉴定图谱

1 Marker λ , 2 *Eco*R I/*Xho* I -digested pGEX_{4T2}-VT2-B, 3 PCR product of VT2-B

2.2 核苷酸、氨基酸和抗原性的比较结果

测序后分别进行核苷酸和氨基酸序列的比较,与登录号为 AB168110.1、AF291819、AB071845.1 等多株大肠杆菌 O157:H7 的 VT2-B 亚单位的核苷酸同源率为 99%,且都是在同一位置上的一个 A 碱基变为 T。氨基酸的同源率为 98%,其中的谷氨酰胺(Q)变为了亮氨酸(L),但抗原性比较结果显示抗原性基本相似。

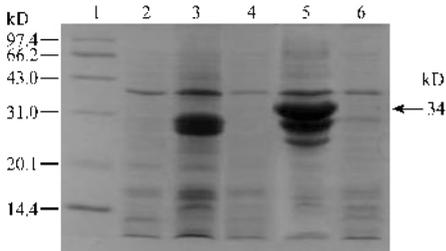


图 2 重组载体在 *E. coli* BL21 中表达的 SDS-PAGE 分析

1 low molecular weight protein marker, 2 total cellular lysate of vector uninduced, 3 supernatant of vector induced, 4 total cellular lysate of recombinant strain uninduced, 5 cell supernatant of recombinant strain induced, 6 cell pellet of recombinant strain induced

2.3 重组蛋白表达及表达形式的鉴定

含有 VT2-B 亚单位的重组质粒 pGEX_{4T2}-VT2-B 和空质粒 pGEX_{4T2} 的菌株经 IPTG 诱导后,全菌蛋白的提取物经 SDS-PAGE 显示:含重组质粒的宿主菌的裂解上清中在相对分子量约 34kD 处出现一条明

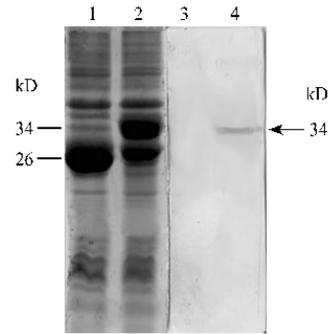


图 3 SDS-PAGE 和免疫印迹检测 VT2B 的单克隆抗体 1,2 cell supernatant of recombinant strain induced, 3 Western blot analysis of supernatant of vector induced, 4 Western blot analysis of recombinant strain induced

显新带与预计的融合蛋白的分子量(8kD VT2-B + 26kD GST)基本相符(图 2),说明该蛋白是可溶性蛋白。含空载体的菌株在 26kD 处有一条明显的蛋白带,与载体大小一致。经 TotalLab v2005 蛋白分析软件分析,重组融合蛋白的表达量约占菌体总蛋白的 35%。

2.4 单克隆抗体的制备及效价测定

两轮筛选后获得两株分泌单克隆抗体细胞株:4B \times F10 \times D4 和 4B \times 8G \times 11F。测得小鼠腹水单抗的 ELISA 效价为 10⁴。

2.5 免疫印迹结果

Western blot 结果表明此单抗仅与融合蛋白反应,而与载体菌蛋白不反应(图 3),说明此单抗是针对 VT2-B 亚单位的单抗。

3 讨论

产生 Vero 毒素是大肠杆菌 O157 致病的先决条件,特别是 VT2。大多数情况下只产生 VT2 的菌株比只产生 VT1 或产生 VT1 和 VT2 混合型菌株毒力强^[8]。VT2 对人的肾脏的微血管内皮细胞细胞毒性作用比 VT1 强 1000 倍,产 VT2 的大肠杆菌与 HUS 相关性反映了 VT2 更容易损害肾小球血管。这是因为肾脏的微血管内皮细胞是 VT 的靶细胞,VT2 对肾脏微血管内皮细胞的强毒力可能与 VT2 为优势产物有关。因此对 VT2 的研究更具有意义。

VT2-B 亚单位是受体结合蛋白,介导与靶细胞膜的结合,致使毒素分子内化。所以从理论上讲,VT2-B 亚基可以封闭敏感细胞上的受体,从而阻止毒素 A 亚基进入细胞。VT2-B 亚基与载体结合,可以

使机体产生特异性抗体,起到预防大肠杆菌 O157 的感染的作用;另外 VT2-B 亚基还可以作为肠出血性大肠杆菌的诊断指标,所以 VT2-B 亚基可用于肠出血性大肠杆菌诊断、预防、治疗用生物制品,应该加以充分的重视。但是由于 VT2 分泌到胞外且量比较少,若再将全毒素裂解以得到 VT2-B 亚基则更加困难。

目前表达外源蛋白的系统有大肠杆菌、酵母、哺乳动物细胞、昆虫细胞等,而大肠杆菌因成本低、表达量高、易于操作等特点,仍是许多外源蛋白首选的表达系统。关于 VT2-B 在大肠杆菌中表达及其保护性抗原的特性,国外已有一些相关的报道。国内喻华英^[9]、郑峰^[10]、刘军^[11]等也进行了相关研究,但其表达的融合蛋白为包涵体,不利于纯化且对抗原性也有影响。此外苏国富^[5]等人的研究,表达量低也不利于进一步的实验。本实验中所获得的融合蛋白的表达量占菌体总蛋白的 35%,表达量高,具有一定的优势。

BLAST 比较本实验中的 VT2-B 亚单位的与 GenBank 中许多 VT2-B 亚单位的核苷酸同源性高,免疫原性相似,且融合蛋白为可溶性蛋白,因此所表达蛋白的免疫原性与天然毒素 B 亚单位的免疫原性应该相似,这将具有更广泛的检测和应用价值。

本实验选择了无毒免疫原性好的 VT2-B 亚单位作为免疫原,既保证了安全性,又获得了良好的免疫效果。筛选出的 2 株分泌 VT2-B 亚单位单克隆抗体的细胞株,经过 Western blot 鉴定说明所分泌的单抗是针对 VT2-B 亚单位的单抗。目前国内 VT2-B

亚单位单克隆抗体制备的报道甚少,只有姜连连^[13]等制备了致猪水肿病的 VT2e A 亚单位的单克隆抗体,但由于 VT2e 与 VT2 的抗原性不完全相同,所以此两种单克隆抗体不能等同应用。由于产 VT2 毒素的菌株更多,因此相对而言本实验所得单克隆抗体的应用范围更广,这为进一步建立检测 VT2 毒素提供了充足的单抗来源。

参考文献

- [1] Riley L W ,Remis R S ,Helgeson S D ,et al . N Engl J Med ,1983 , 308 :681 ~ 683 .
- [2] Iwasa M ,Makino S ,Asakura H ,et al . J Med Entomol ,1999 ,36(1) :108 ~ 112 .
- [3] Sandvig K . Toxin 2001 ,39 :1629 ~ 1635 .
- [4] Cheson D ,Caldewood S B ,Boyko S A ,et al . Infect Immun ,1993 ,61 : 1098 ~ 1110 .
- [5] 苏国富 . 中国科学 ,B 辑 ,1993 ,23 :61 ~ 68 .
- [6] 朱立平 ,陈学清 . 免疫学常用实验方法 . 北京 :人民军医出版社 , 2000 ,24 ~ 29 .
- [7] 颜子颖 ,王海林 . 精编分子生物学实验指南 . 北京 :科学出版社 , 1998 ,pp.22 ~ 23 ,105 ~ 111 ,366 ~ 371 .
- [8] Boerlin P ,McEwen S A ,Boerlin Z ,et al . J Clin Microbiol ,1999 ,37 : 497 ~ 503 .
- [9] 喻华英 ,王景林 ,高 丰 ,等 . 生命科学研究 ,2004 ,8(1) :58 ~ 61 .
- [10] 郑 峰 ,周志红 ,刘建青 . 中国人兽共患病杂志 ,2005 ,21(2) :115 ~ 118 .
- [11] 刘 军 ,冯书章 ,齐 翀 ,等 . 中国兽医学报 ,2005 ,25(1) :28 ~ 30 .
- [12] SU G F . Chin J Biotechnol ,1993 ,9(1) :36 ~ 42 .
- [13] 姜连连 ,陈 雷 ,严振龙 ,等 . 中国预防兽医学报 ,2003 ,25(2) : 118 ~ 120 .