

A 型产气荚膜梭菌 α 毒素基因表达及其 免疫保护作用的初步研究

许崇波^{1*}, 许崇利², 赵志军²

(¹ 大连大学生物工程学院 大连 116622)

(² 宁夏大学生命科学学院 银川 750021)

摘 要 利用 PCR 技术,从 A 型产气荚膜梭菌标准株染色体 DNA 中扩增出 α 毒素基因,构建了含 α 毒素基因的重组菌株 BL21(DE3) pXETA02。经酶切鉴定和序列测定证实,构建的表达质粒 pXETA02 含有 α 毒素基因序列。经 SDS-PAGE、Western blot 分析和 ELISA 检测,重组菌株表达的 α 毒素蛋白能够被 α 毒素单抗识别。表达优化结果表明,以 IPTG 为诱导剂诱导 α 毒素表达的优化条件是:培养基 pH 7.5,培养温度 37℃,IPTG 浓度 0.8 mmol/L,菌体生长密度 OD_{600} 达到 0.8 时加入 IPTG,诱导时间 5 h,此时 α 毒素蛋白表达量为 34.83%。以乳糖为诱导剂诱导 α 毒素表达的优化条件是:培养基 pH 7.5、培养温度 37℃,乳糖浓度 0.1 g/L,菌体生长密度 OD_{600} 达到 0.8 时加入乳糖,诱导时间 5 h, α 毒素蛋白表达量为 23.82%。动物实验结果表明,用重组菌株 α 毒素蛋白免疫的小鼠可以抵抗 1 ML 的 A 型产气荚膜梭菌标准株 C57-1 毒素攻击。

关键词: A 型产气荚膜梭菌; α 毒素; 基因表达; 免疫保护作用

中图分类号: S852.0785 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2006)04-0624-05

A 型产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens* type A)是引起人畜创伤性气性坏疽和人类食物中毒的主要病原菌之一,其致病因子是该菌产生的 α 毒素(CPA)。 α 毒素是由 370 个氨基酸组成的单链多肽,分子量约 43 kDa,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^[1]。本文克隆和表达了 A 型产气荚膜梭菌 α 毒素基因,其表达产物免疫动物后产生的抗体,具有良好的免疫保护作用,为下一步研制 α 毒素基因工程亚单位疫苗奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、载体和实验动物:受体菌大肠杆菌(*Escherichia coli*) JM109、BL21(DE3)和载体 pET-28c 由本室保存;载体 pGEM-T 购自 Promega 公司;A 型产气荚膜梭菌标准株 C57-1 购自中国兽药监察所。ICR 小鼠购自宁夏医学院实验动物中心,16~18 g,雌雄各半,动物合格证号 SCXK(宁)2005-0001 号。

1.1.2 主要试剂:限制性核酸内切酶(*Bam*H I、*Eco*R I、*Nco* I) PCR 试剂盒均购自宝生物工程(大连)有限公司;RNaseA、T4 DNA 连接酶、Wizard PCR preps DNA Purification System、X-gal、IPTG 均购自 Promega 公司;氨苄青霉素、卡那霉素购自 Sigma 公司;抗 A 型产气荚膜梭菌 α 毒素单抗(作为一抗)和 HRP 标记兔抗鼠免疫球蛋白(作为二抗)为自制^[2]。

1.2 α 毒素基因的扩增

根据 Titball 等^[3]报道的 α 毒素基因序列设计并合成了 1 对 PCR 引物,primer1: 5'-CATGCCATGCAATGAAAAGAAAGATTTGT-3' 和 primer2: 5'-CCGGAATTCCTTTTATATTATAAGTTGAATT-3', primer1 和 primer2 分别含有 *Nco* I 和 *Eco*R I 酶切位点识别序列,用这对 PCR 引物从染色体 DNA 中扩增 α 毒素基因。PCR 反应体系(100 μ L): 10 \times buffer 10 μ L, 染色体 DNA 2 μ L, 200 mmol/L dNTPs 10 μ L, 引物(0.1 μ mol/L) 各 1 μ L, ddH₂O 75 μ L, *Taq* DNA 聚合酶(3 U/ μ L) 1 μ L。PCR 反应条件: 94℃ 5 min; 94℃ 60 s, 47℃ 60 s, 72℃ 120 s, 进行 30 个循环, 72℃ 10 min。

1.3 DNA 操作和质粒稳定性试验

染色体 DNA 的提取按文献[4]的方法进行。DNA 操作按文献[5]的方法进行。质粒稳定性试验

基金项目: 国家自然科学基金(30360080)

* 通讯作者。Tel 86-411-87402327 Fax 86-411-87403834 E-mail: xcb921@sohu.com

作者简介: 许崇波(1968-)男,山东五莲人,博士,教授,主要从事微生物学、分子生物学及基因工程等领域的研究工作。

收稿日期: 2005-10-09 接受日期: 2005-11-18 修回日期: 2006-01-22

参照 Meacock^[6]的方法进行。

1.4 SDS-PAGE、ELISA 和 Western blot 测定

表达产物 SDS-PAGE、ELISA 和 Western blot 检测按文献 5 介绍的方法进行。

1.5 IPTG 诱导 α 毒素基因表达条件的优化^[7]

1.5.1 不同 pH 值的培养基对 α 毒素基因表达的影响 将 LB 液体培养基的 pH 值分别调为 7.0、7.5 和 8.0,然后分装于 200mL 锥形瓶中,每瓶 50mL,按 1% 的接种量接种重组菌株 BL21(DE3 χ pXETA02),于 37℃ 160r/min 培养,待菌体密度 OD_{600} 达到 0.8 时,加入终浓度 1mmol/L 的 IPTG,继续培养 5h 后,进行蛋白表达检测。

1.5.2 不同培养温度对 α 毒素基因表达的影响 将 LB 液体培养基的 pH 值调整至 7.5,然后分装于 200mL 锥形瓶中,每瓶 50mL,按 1% 的接种量接种重组菌株 BL21(DE3 χ pXETA02),分别于 28℃、32℃、37℃ 和 42℃ 160r/min 培养,待菌体密度 OD_{600} 达到 0.8 时,加入终浓度为 1mmol/L 的 IPTG,继续培养 5h 后,进行蛋白表达检测。

1.5.3 不同菌体密度对 α 毒素基因表达的影响 按 1.5.2 方法培养,分别于菌体密度 OD_{600} 达到 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.5 和 2 时,加入终浓度 1mmol/L 的 IPTG,继续培养 5h 后,进行蛋白表达检测。

1.5.4 不同 IPTG 诱导浓度对 α 毒素基因表达的影响 按 1.5.2 方法培养,待菌体密度 OD_{600} 达到 0.8 时,加入终浓度分别为 0.2、0.4、0.6、0.8 和 1.0mmol/L 的 IPTG,再培养 5h 后,进行蛋白表达检测。

1.5.5 不同诱导时间对 α 毒素基因表达的影响 按 1.5.2 方法培养,待菌体密度 OD_{600} 达到 0.8 时,加入终浓度为 0.8mmol/L 的 IPTG,分别于 1、2、3、4、5 和 6h 取样,进行蛋白表达检测。

1.6 乳糖诱导 α 毒素基因表达条件的优化

1.6.1 不同菌体生长密度对 α 毒素基因表达的影响 按 1.5.2 方法培养,分别于菌体密度 OD_{600} 达到 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 时,加入终浓度为 0.1g/L 的乳糖,37℃ 继续培养 5h 后,进行蛋白表达检测。

1.6.2 不同乳糖诱导浓度对 α 毒素基因表达的影响 按 1.5.2 方法培养,待菌体密度 OD_{600} 达到 0.8 时,加入终浓度分别为 0.05、0.1、0.2、0.5、1g/L 的乳糖,37℃ 继续培养 5h 后,进行蛋白表达检测。

1.6.3 不同诱导时间对 α 毒素基因表达的影响 按 1.5.2 方法培养,待菌体密度 OD_{600} 达到 0.8 时,加入终浓度为 0.1g/L 的乳糖,分别于 1、2、3、4、5 和 6h 取样,进行蛋白表达检测。

1.7 重组菌株毒性的测定

将重组菌株 BL21(DE3 χ pXETA02)的培养上清、菌体及菌体裂解物以及 A 型产气荚膜梭菌标准株 C57-1 培养上清分别接种卵黄琼脂平板上,观察有无磷脂酶 C 活性,然后再分别经口服或腹腔注射 5×10^9 个重组菌株 BL21(DE3 χ pXETA02),共计 40 只小鼠,观察和剖检有无临床症状和病理变化。

1.8 重组菌株包涵体粗提物免疫攻毒试验

按文献 8 的方法制备包涵体粗提物和免疫用抗原。取 160 只小鼠,随机分为 2 组,每组 80 只,一组用包涵体抗原腹腔免疫 0.2mL/只,另一组用灭活菌体抗原腹腔免疫 0.2mL/只,间隔 14d 后,以上述方法进行第二次免疫,14d 后进行攻毒试验。按文献 9 的方法制备 A 型产气荚膜梭菌标准株 C57-1 类毒素免疫用抗原,腹腔注射含 10% 氢氧化铝胶的标准株 C57-1 类毒素 0.5mL,作为免疫对照组,同时设立生理盐水对照组。将过夜培养的标准株 C57-1 培养上清作倍比稀释,每个剂量腹腔注射小鼠 6 只,观察小鼠死亡情况;用 1MLD 标准株 C57-1 培养上清攻击免疫小鼠,观察小鼠的存活情况。

2 结果

2.1 α 毒素基因表达质粒的构建

利用 PCR 技术,从提取的 A 型产气荚膜梭菌标准株 C57-1 染色体中扩增出 1.2kb α 毒素基因片段,将纯化回收的 α 毒素基因片段克隆至 pGEM-T 载体上,转化至受体菌 JM109 中,构建了克隆质粒 pXCPA02,经 *Nco* I / *Eco* R I 和 *Bam* H I / *Eco* R I 酶切鉴定和序列测定证实,构建的克隆质粒 pXCPA02 含有 α 毒素全基因,与 Titball 等^[3]报道的 α 毒素基因序列一致。随后,用 *Nco* I / *Eco* R I 酶切克隆质粒 pXCPA02,回收的 α 毒素基因片段插入到事先用同样酶切处理过的载体 pET-28c 上,然后转化至受体 BL21(DE3)中,构建表达质粒 pXETA02,经 *Nco* I / *Eco* R I、*Bam* H I / *Eco* R I、*Nco* I / *Bam* H I / *Eco* R I 酶切鉴定和序列测定证实,构建的重组表达质粒 pXETA02 含有的 α 毒素基因序列和阅读框架正确,从而成功地构建了 α 毒素表达质粒 pXETA02(图 1)。

2.2 重组质粒的稳定性

重组质粒 pXETA02 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。

2.3 α 毒素基因表达产物 SDS-PAGE、Western blot 分析和 ELISA 检测

重组菌株 BL21(DE3 χ pXETA02)经 IPTG 诱导
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

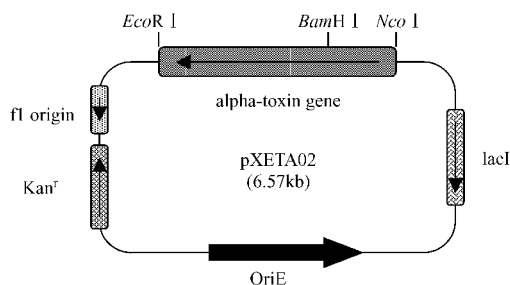


图1 重组表达质粒 pXETA02 结构示意图

Fig.1 Structure of recombinant expression plasmid pXETA02.

5h,菌体经超声波处理后,用 SDS-PAGE 分析,结果表明 α 毒素基因可以在这种宿主菌中以包涵体形式表达,其分子量约为 43kDa,而含 pET-28c 空载体的 BL21(DE3)在该处无特异条带, α 毒素蛋白的表达量占菌体总蛋白相对含量的 34.83%。经 ELISA 检测和 Western blot 分析(图2),构建的重组菌株表达的 α 毒素蛋白能够被 α 毒素单抗识别。

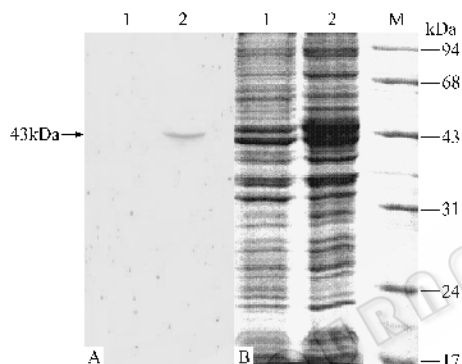


图2 α 毒素基因表达产物 Western blot (A) 和 SDS-PAGE (B) 分析

Fig.2 Western blot (A) and SDS-PAGE (B) analysis of the expressed products. A: Western blot of products of BL21(DE3) X pXETA02; B: SDS-PAGE of products. 1. Total cell lysate of BL21(DE3) X pET-28c; 2. Total cell lysate of BL21(DE3) X pXETA02; M. Lower molecular weight protein marker.

2.4 IPTG 诱导 α 毒素基因表达条件的优化

2.4.1 不同 pH 值对蛋白表达的影响 :不同 pH 值的培养基对 α 毒素蛋白表达水平有明显影响,其中培养基 pH 值为 7.5 时, α 毒素蛋白表达量最高,约占全菌体总蛋白相对含量的 29.62%。

2.4.2 不同温度对蛋白表达的影响 :不同的培养温度对 α 毒素蛋白表达量也有较大的影响,当培养温度为 37℃ 时, α 毒素蛋白表达量最高,占全菌体总蛋白相对含量的 21.38%。

2.4.3 不同菌体生长密度加入 IPTG 对蛋白表达的影响 :当培养的菌体密度 OD_{600} 达到 0.6 时, α 毒素蛋白表达量开始显著增加,当菌体密度 OD_{600} 达到 0.8 时, α 毒素蛋白表达量最高,约占全菌体总蛋白

相对含量的 28.89%。

2.4.4 不同 IPTG 浓度对蛋白表达的影响 :当 IPTG 浓度为 0.8mmol/L 时, α 毒素蛋白表达量最高,约占全菌体总蛋白相对含量的 32.67%。

2.4.5 不同诱导时间对蛋白表达的影响 :随着 IPTG 诱导时间的增加, α 毒素蛋白表达量也逐步增加,当 IPTG 诱导时间为 5h 时, α 毒素蛋白表达量最高,约占全菌体总蛋白相对含量的 34.83%。

2.5 乳糖诱导 α 毒素基因表达条件的优化

2.5.1 不同菌体生长密度加入乳糖对蛋白表达的影响 :在菌体密度 OD_{600} 达到 0.8 时, α 毒素蛋白表达量最高,约占全菌体总蛋白相对含量的 17.89%。

2.5.2 不同乳糖浓度对蛋白表达的影响 :当乳糖终浓度为 0.1g/L 时, α 毒素蛋白表达量最高,约占全菌体总蛋白相对含量的 19.45%。

2.5.3 乳糖诱导不同时间对蛋白表达的影响 : α 毒素蛋白表达量随着时间延长而增加,当达到 5h 时, α 毒素蛋白表达量最高,约占全菌体总蛋白相对含量的 23.82%。

2.6 重组菌株毒性的测定

将重组菌株 BL21(DE3) X pXETA02 的培养上清、菌体及菌体裂解物涂布于卵黄琼脂平板上,均不出现特征性浑浊环,表明它们不能分解卵黄琼脂平板中的卵磷脂,而 A 型产气荚膜梭菌标准株 C57-1 培养上清在卵黄琼脂平板上出现了特征性浑浊环,这说明重组菌株 BL21(DE3) X pXETA02 已不具备 α 毒素的磷脂酶 C 活性。同时经腹腔注射或口服两种途径接种重组菌株 BL21(DE3) X pXETA02,结果 3 周后小鼠全部存活,无异常表现,经剖检观察无病理变化,表明该菌株丧失了 α 毒素活性,已无致病性。

2.7 免疫攻毒试验

经过筛选,确定最小致死量为 4 倍稀释的 A 型产气荚膜梭菌标准株 C57-1 培养上清,以此攻击用包涵体粗提物或灭活菌体免疫的小鼠。结果表明,包涵体免疫组保护率为 91.25(73/80),灭活菌体免疫组保护率为 95%(76/80),类毒素免疫对照组保护率为 97.5%(78/80),而生理盐水对照组 20 只小鼠全部死亡。

3 讨论

α 毒素是 A 型产气荚膜梭菌主要致病因子,是引起人畜创伤性气性坏疽和人类食物中毒的主要病原菌之一。Nagahama 等^[10]利用位点突变技术,研究了组氨酸残基在 α 毒素中的作用,他们将第 68 位组氨酸残基突变成甘氨酸残基,结果突变的 α 毒素完

全丧失了 α 毒素本身的磷脂酶 C 活性、鞘磷脂酶活性、溶血活性和致死性。随后他们将 56 位的天门冬氨酸突变成丝氨酸、天门冬酰氨、谷氨酸或谷氨酰氨之后,突变的毒素同样丧失了 α 毒素的溶血活性、磷脂酶 C 活性和鞘磷脂酶活性。研究还表明,56 位的天门冬酰氨对毒素的酶催化作用是必需,而 130 位天门冬酰氨对其结构的维持是必需的^[11]。尽管上述不同位点的氨基酸发生突变之后,对毒素的生物活性有着不同程度的影响,甚至可使其生物活性完全丧失,但仍然保持着天然毒素的部分或全部抗原性。Williamson 等^[12]又对 CPA1-249 和 CPA247-370 进行了免疫原性研究,结果 CPA1-249 免疫小鼠后产生的抗体能中和 α 毒素的磷脂酶 C 活性,但不能中和 α 毒素的溶血活性。CPA247-370 免疫小鼠后产生的抗体既能中和 α 毒素的磷脂酶 C 活性,又能中和 α 毒素的溶血活性,同时能抵抗致死量 α 毒素的攻击和至少 10LD₁₀₀ 剂量的 A 型产气荚膜梭菌攻击。上述这些试验结果表明, α 毒素可能由 2 个功能区组成,氨基端具有磷脂酶 C 活性,羧基端具有鞘磷脂酶活性,而且只有两者协同作用,才具有溶血活性和致死活性。但尚不清楚这种 α 毒素是存在 2 个活性位点,还是单一活性位点,这有待于进一步研究。

乳糖(lac)操纵子是研究得最为详尽的大肠杆菌基因操纵子,利用其调控机理为基础设计和构建的表达系统已得到了广泛的应用。Novagen 公司的 pET 系列大肠杆菌表达体系利用 IPTG 诱导 lacUV5 启动子来过量表达 T7RNA 聚合酶,从而产生大量的目的蛋白。IPTG 是 lac 操纵子最有效的诱导剂,但它并不适合于大规模制备重组蛋白,其原因在于它本身具有毒性。根据 lac 操纵子的调控机理,乳糖也可以对 lac 操纵子控制的基因产生诱导作用^[13]。乳糖是一种二糖,没有毒性,价格低廉,其本身作为一种碳源,可以被菌体代谢所利用。乳糖和 IPTG 对 lac 操纵子的诱导机理有明显的差别: IPTG 可以直接进入大肠杆菌细胞内部而发挥诱导作用,且它是一种非代谢性的诱导物,不会被菌体所消耗,只需极少量的存在就能稳定地诱导出目的蛋白的大量产生,而乳糖本身并不能直接进入菌体内部,只有在细胞本底水平表达的 β -半乳糖苷透过酶的作用下,才能进入细胞,在 β -半乳糖苷酶的作用转化为异乳糖后,才发挥诱导剂的作用。因此乳糖的诱导过程及其对菌体的影响比 IPTG 复杂的多,诱导效率也不如 IPTG,但乳糖具备无毒和价廉的优点。

本实验从 A 型产气荚膜梭菌标准株 C57-1 染色

体中克隆出 α 毒素基因,并在 pET-28c 大肠杆菌表达体系中获得了高效表达,其表达产物以包涵体形式存在,目的是获得较大量的目的蛋白表达,以期研制 A 型产气荚膜梭菌 α 毒素基因工程亚单位疫苗。包涵体的形成是外源蛋白高效表达的普遍现象,在大肠杆菌的胞内、周质和酵母等其他系统均有报道^[14]。目前普遍认为,包涵体的形成起源于肽链折叠过程中部分折叠中间态之间特异性的错误聚合,而不是形成成熟的天然态或完全解链的蛋白,即不能形成成熟蛋白的天然结构。所以,包涵体是一种非活性蛋白,只有经过变性和复性等处理时才能部分恢复其天然活性^[15,16]。虽然包涵体不具有天然的生物学活性,但它却是非常好的免疫原,即包涵体本身具有很好的免疫原性^[8,9]。所以构建的重组菌株表达产物以包涵体形式存在,不具有磷脂酶 C 活性。同时,本实验以 IPTG 为诱导剂诱导 α 毒素表达,其优化的表达条件是:培养基 pH7.5,培养温度 37℃,IPTG 浓度 0.8mmol/L,菌体生长密度 OD₆₀₀ 达到 0.8 时加入 IPTG,诱导时间 5h;以乳糖为诱导剂诱导 α 毒素表达,其优化的表达条件是:培养基 pH7.5,培养温度 37℃,乳糖浓度 0.1g/L,菌体生长密度 OD₆₀₀ 达到 0.8 时加入乳糖,诱导时间 5h。将二者诱导情况比较后发现,以 IPTG 为诱导剂诱导 α 毒素蛋白表达, IPTG 用量少, α 毒素蛋白表达量高达 34.83%,以乳糖为诱导剂诱导 α 毒素表达,乳糖用量多, α 毒素蛋白表达量为 23.82%,但因乳糖价格低廉且无毒,使得其在重组蛋白的大规模发酵生产中,仍具有优于 IPTG 的潜在价值和优势。本文所采用的实验设备和培养条件是实验室小试规模,对于在规模化生产条件下利用乳糖进行诱导的尝试,我们将做进一步的研究。上述研究,为下一步研制 α 毒素基因工程亚单位疫苗奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Rood JI, Cole ST. Molecular genetics and pathogenesis of *Clostridium perfringens*. *Microbiol Rev*, 1991 **55**(4): 621 - 648.
- [2] 许崇波,朱平,马从林,等.抗 A 型产气荚膜梭菌 α 毒素单克隆抗体杂交瘤细胞系的建立与鉴定. *细胞与分子免疫学杂志*, 1999, **15**(1): 62 - 63.
- [3] Titball RW, Hunter SEC, Martin KL, et al. Molecular cloning and nucleotide sequence of the alpha-toxin (phospholipase C) of *Clostridium perfringens*. *Infect Immun*, 1989 **57**(2): 367 - 376.
- [4] Henricus L, Klaasen BM, Molkenboer JCH, et al. Detection of the β 2-toxin gene of *Clostridium perfringens* in diarrhoeic piglets in The Netherlands and Switzerland. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 1999 **24**: 325 - 332.

- [5] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [6] Meacock PA, Cohen SN. Partitioning of bacterial plasmids during cell division: a cis-acting locus that accomplishes stable plasmid inheritance. *Cell*, 1980, **20**(2): 529 – 542.
- [7] 赵宝华, 许崇波. 不同培养条件对抗 α 毒素 ScFv 基因表达的影响. *微生物学通报*, 2002, **29**(2): 8 – 13.
- [8] 许崇波, 曾瑾, 许崇利, 等. C 型产气荚膜梭菌 β 1, β 2 毒素基因的融合. *微生物学报*, 2005, **45**(2): 205 – 208.
- [9] 蒋玉文, 杨京岚, 许崇波, 等. CTB-CPA 融合基因构建、表达及其产物的免疫原性. *中国兽药杂志*, 2002, **36**(3): 22 – 26.
- [10] Nagahama M, Okagawa Y, Nakayama T, *et al.* Site-directed mutagenesis of histidine residues in *Clostridium perfringens* alpha-toxin. *J Bacteriol*, 1995, **177**(5): 1179 – 1185.
- [11] Nagahama M, Nakayama T, Michiue K, *et al.* Site-specific mutagenesis of *Clostridium perfringens* alpha-toxin: replacement of Asp-56, Asp-130 or Glu-152 causes loss of enzymatic and hemolytic activities. *Infect Immun*, 1997, **65**: 3489 – 3492.
- [12] Williamson ED, Titball RW. A genetically engineered vaccine against the alpha-toxin of *Clostridium perfringens* protects mice against experimental gas gangrene. *Vaccine*, 1993, **11**(12): 1253 – 1258.
- [13] 吴一凡, 张双全, 高秀玉, 等. 乳糖诱导 pET 载体表达重组蛋白的研究. *南京师大学报(自然科学版)*, 2002, **25**(1): 89 – 93.
- [14] Singh SM, Eshwari AN, Garg LC, *et al.* Isolation, solubilization, refolding, and chromatographic purification of human growth hormone from inclusion bodies of *Escherichia coli* cells: a case study. *Methods Mol Biol*, 2005, **308**: 163 – 176.
- [15] Gong Pingsheng, Luo Guimin. Recent progress in renaturation of inclusion bodies. *China Biotechnology*, 2003, **23**(12): 73 – 77.
- [16] 冯小黎. 重组包涵体蛋白质的折叠复性. *生物化学与生物物理进展*, 2001, **28**(4): 11 – 14.

Expression of alpha-toxin gene of *Clostridium perfringens* type A and its primary immunological protective function

XU Chong-bo^{1*}, XU Chong-li², ZHAO Zhi-jun²

(¹ College of Bioengineering, Dalian University, Dalian 116622, China)

(² Life Science School, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

Abstract: Alpha-toxin gene was amplified from chromosomal DNA of *Clostridium perfringens* type A by polymerase chain reaction (PCR). PCR product was inserted into vector pGEM-T directly. The cloned recombinant plasmid pXCPA02 possesses positive nucleotide sequence of alpha-toxin. A 1.2kb alpha-toxin gene fragment was cleaved with restriction endonucleases Nco I /EcoR I from plasmid pXCPA02, and then inserted into an expression vector pET-28c which cleaved with Nco I /EcoR I by blunt-end ligation. The recombinant expression plasmid pXETA02 was studied in detail by restriction endonucleases analysis and nucleotide sequencing. The results showed that the recombinant expression pXETA02 possessed a positive alpha-toxin gene sequence and reading frame. BL21(DE3)(pXETA02) could produce alpha-toxin and the expressed products were recognized by alpha-toxin monoclonal antibodies with ELISA and Western blot. The expression optimization result indicated that the alpha toxin gene expression optimized condition with IPTG induction is culture medium pH 7.5, culture temperature 37°C, joining IPTG to final concentration 0.8mmol/L when the recombinant strain growth density OD₆₀₀ achieved 0.8, and induction time 5h. The expression level of the alpha-toxin proteins were about 34.28% of total cellular protein with IPTG induction by SDS-PAGE and thin-layer gel scanning analysis. The alpha toxin gene expression optimized condition with lactose induction is culture medium pH 7.5, culture temperature 37°C, joining lactose to final concentration 0.1g/L when the recombinant strain growth density OD₆₀₀ achieved 0.8, and induction time 5h. The expression level of the alpha-toxin proteins were about 23.82% of total cellular protein with lactose induction by SDS-PAGE and thin-layer gel scanning analysis. More importantly, Immunization in a mouse model with crude preparation containing the alpha-toxin protein inclusion bodies or inactivated recombinant strain induced protection against at least 1MLD of the toxin from *Clostridium perfringens* type A.

Keywords: *Clostridium perfringens* type A; Alpha-toxin; Gene expression; Immunological protective function

Foundation item: Chinese National Natural Science Fund(30360080)

* Corresponding author. Tel 86-411-87402327; Fax 86-411-87403834; E-mail xcb921@sohu.com

Received 9 October 2005/Accepted: 18 November 2005/Revised: 22 January 2006