

大肠杆菌 SLT-II_vB 基因的克隆和表达*

倪振亚 焦新安** 高 崧 张如宽 刘秀梵

(扬州大学畜牧兽医学院动物医学系 扬州 225009)

摘 要 采用聚合酶链式反应(PCR)从大肠杆菌 O₁₃₈ 基因组 DNA 中分别扩增出志贺菌样毒素 II 型变体 B 的结构序列和包括信号肽的全序列两段基因,定向克隆进表达载体质粒 pYA3334(*asd*⁺)的 *Eco*RI、*Bam*HI 位点之间,构建成重组表达质粒。在大肠杆菌 X6212 (Δ *asd*)筛选出重组质粒 pB₀ 和 pB₁ 后,经中间宿主 X3730 转化过渡,再导入 Δ *asd* Δ *cya Δ *crp* 减毒鼠伤寒沙门氏菌 X4550 构建成宿主和载体之间具有平衡致死结构的 SLT-II_vB 重组菌。SDS-PAGE 和 Western-blot 分析重组菌 X4550(pB₀) 在 7.6kD 左右处有一条特异性蛋白条带。动物免疫试验表明该重组菌能刺激机体产生针对 SLT-II_vB 和沙门氏菌的特异性抗体。这为进一步研制相应的抗猪水肿病及相应沙门氏菌病的双价活疫苗奠定了重要基础。*

关键词 大肠杆菌,志贺样毒素 II 型变体(SLT-II_v),SLT-II_vB 基因,鼠伤寒沙门氏菌,重组疫苗载体

中图分类号:Q786 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2000)06-0591-97

仔猪水肿病是多年来困扰我国养猪业的问题之一,且缺少有效的免疫预防手段。随着几十年的深入研究,现已经明确 SLT-II_v 是引起水肿病的主要致病因子,它由 1 个分子量为 33kD 的 A 亚基和 5 个 7.6kD 的 B 亚基共同组成的聚合体,其中 B 亚基无毒且具有抗原性^[1]。

以减毒沙门氏菌作为异源抗原载体构建双价活疫苗,已成为新型疫苗研制的重要途径之一^[2]。近年来,国内外在鼠伤寒沙门氏菌中成功地表达产肠毒素大肠杆菌(ETEC)和 LT-B 抗原基因、霍乱 CT-B 和 LPS-O 抗原基因、人乳头瘤病毒 HPV10E7 蛋白基因^[3-5],并能提供一定的免疫保护作用。

本研究应用 PCR 方法扩增出 SLT-II_vB 亚单位基因,与表达载体 pYA3334(*asd*⁺)构建成重组质粒,通过两次转化引入减毒鼠伤寒沙门氏菌 X4550(*asd*⁻)构建成减毒沙门氏菌的宿主-载体平衡致死表达系统,较高水平地表达了 SLT-II_vB 亚单位,且重组菌能使小鼠产生特异性免疫应答,这为进一步研制抗仔猪水肿病及鼠伤寒的双价疫苗候选株奠定了重要基础。

* 农业部九五攻关项目(95 牧-01-03-05)和江苏省“青蓝工程”基金资助

作者简介:倪振亚(1972-),女,江苏靖江人,研究生,现在上海家畜寄生虫研究所工作,主要从事分子生物学研究

** 联系作者

刘文博、彭大新同志亦参加了部分研究工作

收稿日期:1999-07-16,修回日期:1999-12-23

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

实验中所用菌株及主要特征见表 1。

表 1 实验用的菌株及主要特征

Table 1 Strains and relevant phenotype

Strain or plasmid	Relevant phenotype	Source
<i>Escherichia coli</i>		
O ₁₃₈	wild type	Our lab.
X6212	Asd ⁻ Lac ⁻ Nal ⁺ Tel ⁻	Dr. Roy Curtiss III
<i>Salmonella typhimurium</i>		
X3730	GalE ⁻ Hsd ⁻ Asd ⁻ R ⁻ M ⁺	Dr. Roy Curtiss III
X4550	Cya ⁻ Crp ⁻ Asd ⁻ R ⁺ M ⁺	Dr. Roy Curtiss III
pYA3334	Asd ⁺	Dr. Roy Curtiss III
pSF2	Amp ⁺	Prof Lu Chengping

1.2 培养基及其他试剂

X6212、X3730、X4550 在含有二氨基庚二酸(DAP, Sigma 公司产品, 50 μ g/mL)的 LB 培养基或平板上生长; pYA3334 及其重组质粒转化菌, 在 LB 培养基或平板上筛选和生长。T₄DNA 连接酶、限制性内切酶等购自华美生物工程公司, DIG 标记试剂盒、PCR 核心试剂盒、PCR 模板 DNA 制备试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒购自 Boehringer Mannheim 公司。抗 SLT-IIvB 单克隆抗体由南京农业大学兽医微生物学与免疫学教研室惠赠, 辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG 为 Sigma 公司产品。

1.3 实验动物

6 周龄 ICR 小鼠由扬州大学畜牧兽医学院实验动物教研室提供。

1.4 引物设计与合成

SLT-IIvB DNA 序列参见文献[6], B 亚单位基因位于 1214~1474bp, 其中 1214~1270bp 为信号肽序列, 根据该序列设计三条引物 P1、P2、P3, 5'端引物加上 *Eco*RI 酶切位点, 3'端引物上加 *Bam*HI 酶切位点, 其中 P1、P2 扩增 B 亚单位结构序列, 称为 B₀; P3、P2 扩增包含信号肽的基因序列, 称为 B₁。引物由中国科学院上海细胞生物学研究所合成。

P1 5' - CCCGAATTCCGCGGATTGTGCTGCTAA - 3' 28mer

P2 5' - CCCGATCCTCAGTTAAACTTCACC - 3' 25mer

P3 5' - CCCGAATTCAGAAGATGTTTATATGC - 3' 26mer

1.5 重组 DNA 的常规技术

质粒的转化、感受态细胞的制备、质粒的提取与纯化、质粒的酶切消化、连接均参考文献[7]的方法进行。

1.6 大肠杆菌 O₁₃₈ 染色体 DNA 的制备

按照 PCR 模板 DNA 纯化试剂盒说明书进行操作, 制得 DNA 供 PCR 扩增使用。

1.7 SLT-IIvB 基因的扩增及纯化

两个 0.5mL Ependoff 管中分别加入引物 P1、P2 和 P3, P2 各 2 μ L (0.05nmol/L),

dNTR (10mmol/L) 2 μ L, 10 倍缓冲液(含 Mg²⁺) 10 μ L, 模板 15 μ L(约 0.3 μ g), 超纯水加至 100 μ L 稍振混合, 作短时离心, 加入灭菌饱和石蜡油 100 μ L, 于 94 $^{\circ}$ C 预变性 3min, 然后加入 Taq DNA 聚合酶 1 μ L(3.6U), 短时间离心后, 在 DNA Thermal Cycle(PE Cetus 公司) 进行如下 30 次循环: 94 $^{\circ}$ C 40s(变性); 53 $^{\circ}$ C 60s(退火); 72 $^{\circ}$ C 60s(延伸), 最后一次延伸时间为 10min。反应结束后, 扩增产物用 Agarose Gel DNA Extraction Kit(BM 公司产品)回收纯化, 于 4 $^{\circ}$ C 保存备用。取 10 μ L 样品作 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 检测 PCR 扩增效果。

1.8 重组质粒及重组菌的构建

取适量体积的 PCR 产物 B₀、B₁ 和载体质粒 pYA3334 分别用 *Eco*RI 和 *Bam*HI 双酶消化, 用 Agarose Gel DNA Extraction Kit 回收 PCR 片段 B₀、B₁ 及 pYA3334 载体质粒, 分别以 2:1(PCR 片断:pYA3334 摩尔比)混合, 加入 T₄DNA 连接酶, 16 $^{\circ}$ C 保温过夜, 连接混合物用 CaCl₂ 法转化大肠杆菌 X6212, 转化子在不含 DAP 的 LB 平板上筛选。用菌落原位杂交技术^[7]初选出两种阳性克隆, 从中提取质粒酶切鉴定, 并将质粒 pSF2 中 SLT-IIvB 片段制成 DIG 标记的特异性探针, 用于检测重组质粒中的外源片段。重组质粒则分别命名为 pB₀、pB₁。然后从 X6212 转化子中分离提取重组质粒, 转化沙门氏菌中间宿主 X3730, LB 平板筛选鉴定后, 再提取重组质粒, 最终导入沙门氏菌终末宿主 X4550, 同样用 LB 平板筛选转化子, 提取质粒, 酶切鉴定分析。同时对重组质粒中的外源片段进行序列分析, 测序工作在中国科学院上海植物生理研究所进行。

1.9 重组蛋白的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和 Western blot 分析

重组菌 X4550(pB₀)、X4550(pB₁) 菌体蛋白的提取参照文献^[5]方法进行。取蛋白样品各 12 μ L 在 15% 的分离胶上电泳, 80V, 3h。用考马斯亮蓝 R-250 染色。另一块未染色凝胶用半干电转仪(Bio-Rad 公司产品), 15V, 2.2h, 将蛋白条带转移到 0.2 μ m 硝酸纤维素膜上(Sigma 公司产品), 将膜晾干后置于封闭液(含 10% FCS 缓冲液 PBS)中封闭过夜, 并分别与抗 SLT-IIvB 单克隆抗体、羊抗鼠 IgG 抗体反应, 最后用二氨基联苯胺(Sigma 公司产品)显色液显色, 待特异性蛋白条带清晰可见, 蒸馏水漂洗终止反应。

1.10 免疫动物试验

免疫和对照组各 6 只 6 周龄 BALB/c 小鼠, 免疫组口服活菌 X4550(pB₀) 2 \times 10⁸/只, 阴性对照口服活菌 X4550(pYA3334), 空白组口服生理盐水, 口服前用 NaHCO₃ 处理。两周后加强免疫一次。加强免疫后第二、三周眼眶采血, 离心收集血清。用表达 SLT-IIvB 基因的重组菌以及疫苗菌株 X4550 的新鲜培养物以 10⁸CFU/0.2mL 分别包被酶标板, 检测血清中抗 SLT-IIvB 及抗沙门氏菌 O 抗原的抗体滴度。

2 结果

2.1 大肠杆菌 O₁₃₈ SLT-IIvB 基因 PCR 扩增

用设计的引物 P1、P2 及 P3、P2, 以大肠杆菌 O₁₃₈ 基因组 DNA 为模板, 按照设定的扩增程序扩增出 SLT-IIvB 基因片段 B₀ 和 B₁, 产物大小分别为 221、275bp, 与预期设计相符。

2.2 重组表达质粒的构建与鉴定

在表达质粒 pYA3334 的 P_{trc} 启动子下游带一个起始密码子和一个多克隆酶切位点。

将双酶消化的 PCR 产物定向插进载体质粒启动子下游 *EcoRI*、*BamHI* 两酶切位点之间 构建成重组质粒 pB_0 、 pB_1 (图 1)。重组质粒的转化在大肠杆菌 X6212 上进行,待转化子长出,用菌落原位杂交法挑出阳性克隆,提取重组质粒 pB_0 、 pB_1 ,并用 *EcoRI*、*BamHI* 双酶消化,载体质粒 $pYA3334$ 同样用双酶消化,结果从重组质粒 pB_0 、 pB_1 分别能切出一条 200bp 及 270bp 左右的条带,与 PCR 产物 B_0 、 B_1 大小相等,另一条带则与载体质粒大小相等,约 3.36kb (图 2)。将 DNA 目的片段转印到硝酸纤维膜上,与特异性探针杂交后,重组质粒 pB_0 和 pB_1 以及 PCR 片段 B_0 、 B_1 显示阳性条带。表明载体质粒中已克隆进 B_0 、 B_1 基因片段,且与已知基因片段具有同源性。对 pB_1 、 pB_1 的 *EcoRI*、*BamHI* 位点间进行核苷酸序列分析,结果表明克隆片段的序列与已知序列一致^[6],且编码基因读框未发生改变。

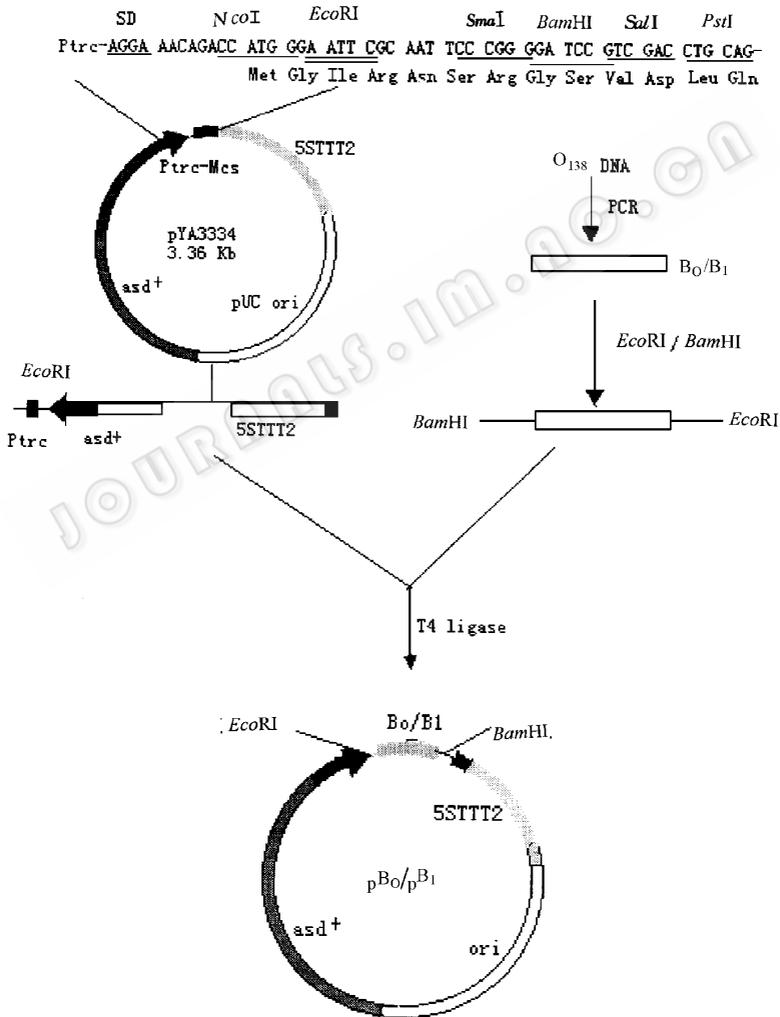


图 1 pB_0 、 pB_1 重组表达质粒的构建

Fig. 1 Construction of recombinant expression plasmids pB_0 、 pB_1

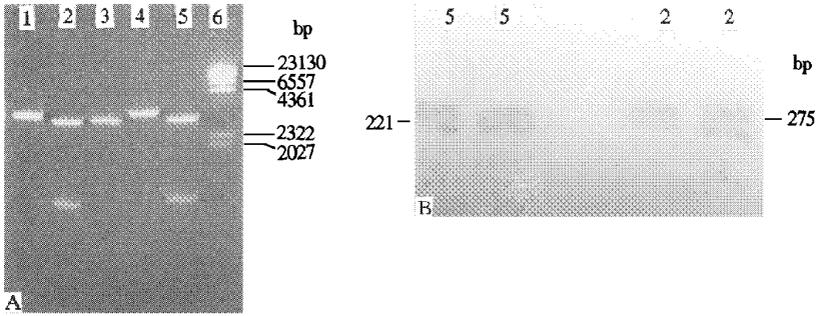


图 2 重组质粒酶切分析电泳结果(A)及 Southern 杂交结果(B)

he Restriction endonuclease analysis of recombinant plasmids pB₀ pB₁(A) and Southern blot assay(B)

- 1. pB₀/EcoRI ; 2. pB₀/EcoRI + BamHI ; 3. pYA3334/EcoRI ;
- 4. pB₁/EcoRI ; 5. pB₁/EcoRI + BamHI ; 6. λDNA/HindIII.

进一步从大肠杆菌 X6212 中提取重组质粒,转化沙门氏菌中间宿主 X3730,利用其 DNA 修饰作用使质粒获得鼠伤寒沙门氏菌的甲基化模式,从 X3730 中提取经修饰的重组质粒再转化沙门氏菌终末宿主 X4550。用碱变性法快速分离和鉴定转化子中的质粒 DNA,结果与图 2 所示相同。

2.3 SLT-IIvB 基因在重组载体中的表达

挑取 X4550(pB₀) X4450(pB₁)重组菌和对照细菌 X4550(pYA3334),过夜培养后的裂解体,进行 PAGE 和 Western blot 分析。从图 3A 中可以看出,X4550(pB₀)重组菌在 7.6kD 左右处出现一条蛋白条带,而 X4550(pB₁)重组菌及阴性对照细菌 X4550(pYA3334)和 X4550 在此处则没有相应条带,Western blot 免疫转印(图 3B)发现,X4550(pB₀)重组疫苗细菌在相应大小的位置上有一条特异性蛋白反应条带,X4550(pB₁)重组菌、阴性对照细菌 X4550(pYA3334)以及 X4550 均未检出此特异蛋白带。结果表明所构建的 X4550(pB₀)重组菌能特异表达 SLT-IIvB 蛋白。

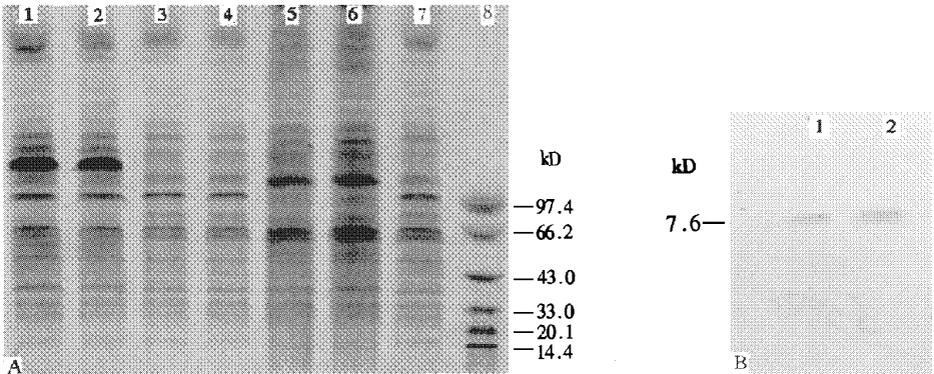


图 3 考马斯亮蓝染色的 SDS-PAGE 电泳结果(A)及抗 SLT-IIvB 单抗检测的 Western-blot 结果(B)

Fig. 3 Coomassie blue-stained SDS-PAGE profiles(A) and Western blot detection of SLT-IIvB protein

from whole cell proteins(B)

- 1. 2. Recombinant strain X4550(pB₀); 3. 4. Vector strain X4550(pYA3334); 5. 6. Vaccine strain X4550;

- 7. Recombinant strain X4550(pB₁); 8. Standard protein molecular weight marker.

2.4 免疫动物试验结果

对免疫小鼠的血清,测定针对 SLT-II_vB 抗原及沙门氏菌菌体 O 抗原 IgG 抗体滴度。结果见表 2,可以看出,重组疫苗株 X4550(pB₀)能刺激机体产生针对 SLT-II_vB 抗原及沙门氏菌 O 抗原的特异性抗体,而 X4550(pYA3334)仅产生抗沙门氏菌特异抗体,空白对照组未测出特异性抗体。

表 2 间接 ELISA 检测抗血清中抗 SLT-II_vB 抗体滴度

Table 2 ELISA titers of specific antibodies in mice antisera

Group	Antibodies against SLT-II _v B		Antibodies against O antigen of salmonella typhimurium	
	2 weeks*	3 weeks	2 weeks	3 weeks
X4550(pB ₀)	1:160	1:320	1:1280	1:2560
X4550(pYA3334)	0	0	1:1280	1:2560
Blank	0	0	0	0

* Indicate the time point after one boosting

3 讨论

随着人们对仔猪水肿病致病机理的深入了解,有学者提出预防水肿病的发生,理想的疫苗不仅应保护仔猪抵抗大肠杆菌的附着,同时也应保护仔猪免受其产生的 SLT-II_v 的攻击^[8]。而目前国内用于预防该病的主要是灭活菌苗,实践证明不能达到有效保护作用,研制相应的毒素因子为免疫原来预防该病成为一种必要。考虑 SLT-II_v 主要作用于机体的小肠上皮细胞,其相应疫苗研制所需载体应具有粘膜趋向性的特点,有鉴于此,我们试用减毒沙门氏菌 X4550 作载体表达 SLT-II_v 毒素的抗原性部位 B 亚基,研制成重组疫苗候选株。这在目前尚未见报道。

采用 PCR 方法从大肠杆菌 O₁₃₈ 中分离出 SLT-II_vB 基因,将其与 pYA3334 连接后,构建成重组质粒 pB₀、pB₁,通过中间菌株 X3730 的转化过渡,成功地将重组质粒引入鼠伤寒沙门氏菌减毒疫苗菌株 X4550 构建宿主和载体之间具有平衡致死结构的 SLT-II_v 重组菌苗。该宿主菌 X4550 特点在于是 $\Delta asd\Delta cya\Delta crp$ 基因缺陷型,细菌自身不能产生 DAP,它只有在含有 DAP 的培养基中才能生长。而重组质粒 pB₀ 上有一个结构不同而功能完整的互补基因,在没有 DAP 的选择压下,疫苗细菌的存活有赖于重组质粒保持存在。这就保证了在动物体内无 DAP 的环境中 SLT-II_vB 抗原基因能够持续表达,以有足够的抗原量刺激机体产生免疫应答。我们构建的重组菌 X4550(pB₀)能刺激机体产生较高滴度的针对 SLT-II_vB 以及沙门氏菌 O 抗原特异性抗体,亦证明了这一点。另一方面由于该表达系统用 asd^+ 作为选择标记取代了常用的抗药性标记^[9],克服了重组活菌苗带有抗性基因的问题,为疫苗的下游研究和应用提供了有利条件。

试验中,我们注意到带有信号肽的扩增基因片段所构成的重组菌 X4550(pB₁)并未能检测出特异性蛋白条带。这可能的主要原因是信号肽序列所编码的 18 个氨基酸多是疏水性氨基酸,带有该信号肽 B 亚单位呈不溶状态^[1],也可能宿主菌的分泌机制能够识别 B 亚基的信号肽序列,从而将其分泌至细胞外^[10],这一有趣现象还有待进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] Sylvia F, Florian G, Lothar H W, *et al.* *Vet Microbiol*, 1995, **43**: 41~52.
- [2] 杨 晓, 陈添弥, 张蓓宁, 等. 中华微生物学和免疫学杂志, 1993, **13**(3):155.
- [3] 陈东立, 马清钧. 生物工程学报, 1997, **13**(1):47~52.
- [4] 金顺钱, 陆士新, 彭 琼, 等. 病毒学报, 1988, **14**(1):38~44.
- [5] Nakayama K, Sandra M K, Curtiss III R, *et al.* *Bio/Technology*, 1988, **6**: 693~697.
- [6] Debra L W, Matthew P J, James E S, *et al.* *J Bacteriol*, 1988, **170**(9):4223~4230.
- [7] 萨姆布克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T(金冬雁, 黎孟枫译). 分子克隆实验指南. 第二版. 北京: 科学出版社, 1992.
- [8] 宋秉生. 国外兽医学 畜禽传染病, 1996, **2**: 96.
- [9] Curtiss III R, Goldschmidt R M, Flectchall N B. *Vaccine*, 1988, **6**: 155.
- [10] 马清钧, 周建光, 于秀琴, 等. 中国科学(B辑), 1988, **5**: 512~521.

CLONING AND EXPRESSION OF SHIGA-LIKE TOXIN TYPE II VARIANT B GENE OF *E. COLI*

Ni Zhenya Jiao Xinan Gao Song Zhang Rukuan Liu Xiufan

(Department of Veterinary Science, College of Animal Husbandry & Veterinary Medicine,
Yangzhou University, Yangzhou 225009)

Abstract: A structure sequence and a DNA fragment including the signal peptide sequence and structure sequence of Shiga-like toxin II variant B subunit gene were amplified from *E. coli* strain O₁₃₈ by PCR. After digested with restriction endonuclease *Eco*RI and *Bam*HI, the two genes were orientally inserted into the polycloning site of expression vector pYA3334 (*asd*⁺) respectively. Recombinant plasmids pB₀ and pB₁ were constructed and amplified in *E. coli* X6212(*asd*⁻). pB₀ and pB₁ were then introduced into avirulent *Salmonella typhimurium* vaccine strain X4550 (*asd*⁻) by serial transformation through intermediate strain X3730 (*asd*⁻) to construct recombinant SLT-IIvB strain. Results of nucleotide sequencing of the cloned fragments in pB₀ and pB₁ revealed that they were in correct ORF of SLT-IIvB. The results of SDS-PAGE and Western-blot showed that 7.6 kD protein of SLT-IIvB antigen was expressed at pretty high level in recombinant strain X4550(pB₀). The results of mice immunization indicated X4550(pB₀) could initiate the host to produce specific antibodies to SLT-IIvB and LPS-O antigen of X4550. So the recombinant strain X4550(pB₀) is worth considering as a candidate vaccine strain against porcine edema disease and *Salmonella typhimurium* infections.

Key words: *E. coli* O₁₃₈, Shiga-like toxin II variant, SLT-IIvB gene, *Salmonella typhimurium*, Recombinant vaccine vector