

O₁₃₉霍乱弧菌质粒基因组文库的建立 及 O-抗原基因的筛选*

曲殿波 刘传暄** 张艳红 马清钧

(军事医学科学院生物工程研究所 北京 100850)

摘 要 :合成 O-抗原的基因是串联在一起的一个基因簇,提取 O₁₃₉霍乱弧菌基因组 DNA,限制性内切酶 *EcoR* I 酶切,电泳回收 4~20kb 的 DNA 片段,构建质粒基因组文库。随机筛选重组克隆,获得一株可与 O₁₃₉霍乱弧菌抗血清发生凝集反应的重组克隆,命名为大肠杆菌 DH5 α (pMG320)。经鉴定分析重组克隆所表达的 O-抗原具有良好的免疫原性及反应原性。酶切分析质粒 pMG320,推知其 O-抗原基因大小约 4.6kb。这为今后 O₁₃₉霍乱疫苗的研制及 O₁₃₉霍乱弧菌 O-抗原基因的结构和功能研究提供了条件。

关键词 :O-抗原,基因组文库,O₁₃₉霍乱弧菌

中图分类号 :Q785 文献标识码 :A 文章编号 :0001-6209(2001)01-0065-05

O-抗原决定着霍乱弧菌的血清学分类,并且 O-抗原具有免疫原性及反应原性。合成 O-抗原的基因是由霍乱弧菌基因组 DNA 的 *rfb* 区域编码,与 O₁群霍乱弧菌相比 O₁₃₉霍乱弧菌的 O-抗原基因大部分缺失,仅有 *rfbQ*、*rfbR* 和 *rfbS* 经修饰而保留下来^[1]。但研究又发现 O₁₃₉霍乱弧菌的 *rfb* 基因簇区域内有两个开放性阅读框架 *otnA* 和 *otnB*,它们与非 O₁群霍乱弧菌中的某些基因同源^[2]。由于这些遗传背景的改变,使得对 O₁群霍乱弧菌具有保护作用的疫苗对 O₁₃₉霍乱弧菌不起作用^[3]。因此本研究拟克隆 O-抗原基因,为今后针对 O₁₃₉霍乱疫苗的研制及 O-抗原基因的结构与功能的研究打下基础。

1 材料和方法

1.1 菌株

O₁₃₉霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)由中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所赠;大肠杆菌 DH5 α 为本实验室保存。

1.2 抗血清

兔抗 O₁₃₉霍乱弧菌抗血清购于卫生部药品生物制品检定所;羊抗兔 IgG-HRP 和羊抗鼠 IgG-HRP 购于军事医学科学院微生物学流行病学研究所;鼠源抗 O₁₃₉霍乱弧菌 LPS O-抗原单克隆抗体由预防医学科学院流行病学微生物学研究病所惠赠。

1.3 质粒基因组文库的构建

O₁₃₉霍乱弧菌的基因组 DNA 被提取后^[4],经限制性内切酶 *EcoR* I (Biolabs) 酶切后,

* 国家 863 资助项目(102-07-03-02)

** 联系人

作者简介:曲殿波(1972-),男,黑龙江哈尔滨人,军事医学科学院生物工程研究所硕士,从事基因工程药物研究。

收稿日期:1999-03-08,修回日期:2000-06-30 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

电泳回收 4~20kb 的 DNA 片段。同时 *Eco*RI 限制性酶切 pUC19, 并经 CIP(Promega)脱磷酸化处理, 回收处理过的 pUC19。T₄-DNA 连接酶(Promega)体外连接这两种 DNA, 转化感受态大肠杆菌 DH5 α 。

1.4 ELISA

1.4.1 Dot-ELISA^[5]: 点种细菌于平展在 LB 琼脂板上的硝酸纤维素膜上, 37℃ 培养 2~3h。取出硝酸纤维素膜 42℃ 干燥 30min, 经封闭处理后加经稀释的抗 O₁₃₉ 霍乱弧菌 O-抗原的抗血清, 37℃ 反应 2h, 洗膜后加入羊抗兔 IgG-HRP, 37℃ 反应 1h。洗膜, 加入显色液显色。

1.4.2 重组克隆全细胞 ELISA^[6]: 将重组克隆包被于酶联板后, 按顺序在不同的孔中加入倍比稀释的抗 O₁₃₉ 霍乱弧菌 O-抗原的抗血清。洗板后加入羊抗兔 IgG-HRP, 显色并测 A₄₉₂ 的值。

1.5 O-抗原的分析

热酚法^[7]提取 LPS O-抗原, SDS-PAGE 银染显带^[8]及 Western-blot^[9]实验分析 O-抗原的特异性。

1.6 兔抗重组克隆大肠杆菌 DH5 α (pMG320) 抗血清的制备及检测

以每次 1mL (8 亿菌/mL), 每周皮下多点注射免疫家兔, 两次皮下注射后, 第三次采用静脉免疫, 7 天后采血, 制备抗血清。

包被 O₁₃₉ 霍乱弧菌于酶联板, 加入经倍比稀释的兔抗重组克隆抗血清, 然后加入羊抗兔 IgG-HRP 反应 1h, 显色后测 A₄₉₂ 的值。

2 结果

2.1 重组克隆大肠杆菌 DH5 α (pMG320) 所表达 O-抗原的反应原性

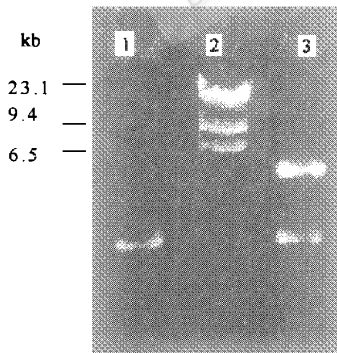


图 1 重组质粒 pMG320 的 *Eco*RI 酶切电泳图

Fig. 1 Agarose electrophoresis pattern of pMG320 digested with *Eco*RI

1. pUC19/*Eco*RI; 2. λ DNA/*Hind* III Marker; 3. pMG320/*Eco*RI.

随机挑取 200 个重组克隆, 进行玻片凝集试验^[10], 从中筛选获得 1 株可以与 O₁₃₉ 霍乱弧菌抗血清及抗 O₁₃₉ 霍乱弧菌 LPS O-抗原的单克隆抗体发生强凝集反应重组克隆。将此重组克隆命名为大肠杆菌 DH5 α (pMG320)。并进一步鉴定此重组克隆所表达 O-抗原的特异性。

首先提取质粒 pMG320, 用限制性内切酶 *Eco*RI 酶切分析插入的外源 DNA 片段, 其大小约为 4.6kb (图 1)。Dot-ELISA (图 2) 显示, 重组克隆和阳性对照 O₁₃₉ 霍乱弧菌的菌落均发生免疫印迹反应, 而阴性对照大肠杆菌 DH5 α (pUC19) 则无印迹反应。重组克隆的全细胞 ELISA (图 3) 表明重组克隆大肠杆菌 DH5 α (pMG320) 及 O₁₃₉ 的 ELISA A_{492nm} 的吸光值随抗血清的逐渐稀释而逐渐变小。ELISA 的实验结果证明, 重组克隆在大肠杆菌细胞的表面表达了 O₁₃₉ 霍乱弧菌

的 O-抗原。

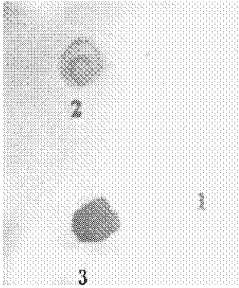


图 2 菌落固相 ELISA

Fig. 2 Dot-ELISA of *E. coli* DH5 α (pMG320)
 1. Negative control, *E. coli* DH5 α (pUC19); 2. Recombinant colony, *E. coli* DH5 α (pMG320); 3. Positive control, *V. cholerae* O₁₃₉.

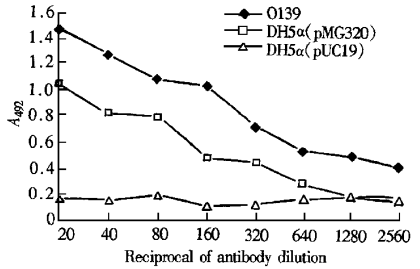


图 3 重组克隆 *E. coli* DH5 α (pMG320) 全菌体 ELISA

Fig. 3 The whole cell-ELISA of *E. coli* DH5 α (pMG320)

SDS-PAGE 银染(图 4)显示,阴性对照大肠杆菌 DH5 α (pUC19),重组克隆 DH5 α (pMG320)及阳性对照 O₁₃₉霍乱弧菌电泳带型无明显差异,但 Western-blot(图 4B)证明重组克隆及 O₁₃₉霍乱弧菌的 O-抗原部分有分子量相同的免疫印迹带,而阴性对照菌则无免疫印迹带。另外,其与粘粒文库中亚克隆筛选到 5.5kbO-抗原基因的质粒 pMG321 的印迹带也一致^[11]。这说明重组克隆大肠杆菌 DH5 α (pMG320)表达的 O-抗原与 O₁₃₉霍乱弧菌的 O-抗原有相同的特性,二者是一种 O-抗原。

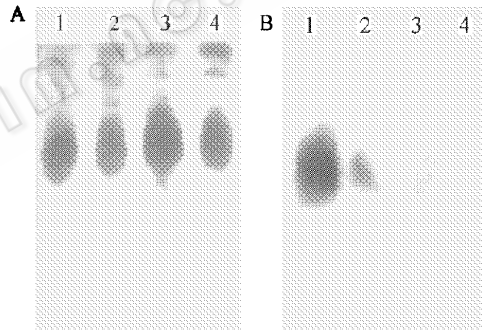


图 4 LPSO-抗原的 SDS-PAGE(A)及 Western-blot(B)

Fig. 4 SDS-PAGE of LPS O-antigen(A) and Western-blot of LPS O-antigen(B)

1. Positive control, LPS O-antigen of *V. cholerae* O₁₃₉; 2. Recombinant colony, LPS O-antigen of *E. coli* DH5 α (pMG321); 3. Recombinant colony, LPS O-antigen of *E. coli* DH5 α (pMG320); 4. Negative control, LPS of *E. coli* DH5 α (pUC19).

2.2 重组克隆表达的 O-抗原的免疫原性

重组克隆免疫家兔制备的抗血清经倍比稀释与 O₁₃₉霍乱弧菌进行全细胞 ELISA 结果(图 5)显示,抗大肠杆菌 DH5 α (pMG320)的抗血清与抗 O₁₃₉霍乱弧菌的抗血清一样,在与 O₁₃₉霍乱弧菌进行全细胞 ELISA 实验时都是随着抗血清的逐渐稀释,吸光值逐渐下降。阴性对照的抗大肠杆菌 DH5 α (pUC19)抗血清则在一个低的值附近波动。这个结果说明,抗大肠杆菌 DH5 α (pMG320)的抗血清与抗 O₁₃₉霍乱弧菌的抗血清有相同的性质,它们都能与 O₁₃₉霍乱弧菌的 O-抗原发生特异性反应。

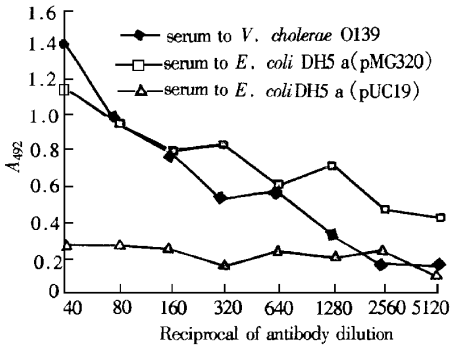


图5 重组克隆制备抗血清对 O139 霍乱弧菌倍比稀释 ELISA

Fig.5 The whole cell-ELISA of *V. cholerae* O139 with serum to *E. coli* DH5a(pMG320)

3 讨论

由于 O₁₃₉ 霍乱弧菌的 O-抗原基因是串联在一起的一个基因簇,因此这为我们建立质粒基因组文库筛选 O-抗原基因提供了可能和便利的条件。筛选文库时,我们获得一株可以在大肠杆菌中强表达 O₁₃₉ 霍乱弧菌 O-抗原的重组克隆即大肠杆菌 DH5a(pMG320)。酶切分析质粒 pMG320,克隆的 O-抗原基因大小约为 4.6kb,这为今后的 O-抗原基因的结构与功能研究提供了可能的 DNA 片段。并且此基因比文献^[10]报道的用插入突变分析出的 10kb 的 O-抗原基因片段大小相差很远。因此我们推测:①可能是大肠杆菌可以提供一些酶帮助 O-抗原的合成,

这样 4.6kb 的片段便可以合成 O-抗原具有抗原表位的部分。②可能是 O₁₃₉ 霍乱弧菌的 O-抗原基因不仅只一簇,或者可能存在 O-抗原合成的支路代谢基因簇,它的大小要比 rfb 编码的 O-抗原基因小。

ELISA 及 Western-blot 实验又说明重组克隆所表达的 O-抗原与 O₁₃₉ 霍乱弧菌的 O-抗原具有相同性质。由于抗原抗体反应是特异性的反应,只有重组克隆表达的 O-抗原与 O₁₃₉ 霍乱弧菌表达的 O-抗原具有相同的抗原表位或者二者相同时,重组克隆表达的 O-抗原才能与抗霍乱弧菌的抗血清发生反应,因此表达的 O-抗原至少与 O₁₃₉ 霍乱弧菌的 O-抗原有相同的抗原表位,这也说明重组克隆所表达的 O-抗原与 O₁₃₉ 霍乱弧菌 O-抗原一样具有相同的反应原性。

抗重组克隆血清的 ELISA 实验证明,大肠杆菌 DH5a(pMG320)表达的 O-抗原免疫动物后,可以刺激动物机体产生相应的抗体,而且此抗体可以与 O₁₃₉ 霍乱弧菌发生抗原抗体反应。这表明重组克隆表达的 O-抗原具有与 O₁₃₉ 霍乱弧菌 O-抗原相同的免疫原性。

综上所述,本研究利用建立质粒基因组文库的方法,从库中筛选获得可以表达 O₁₃₉ 霍乱弧菌 O-抗原的重组克隆株大肠杆菌 DH5a(pMG320)。重组克隆株所表达的 O-抗原具有良好的免疫原性及反应原性。这为今后 O₁₃₉ 霍乱疫苗的研制打下了基础。另外,O-抗原基因大小为 4.6kb,与文献的 10kb 相比,更便于我们今后对其结构和功能的研究。

参 考 文 献

- [1] Stroehner U H, Jedani K E, Dredge B K, et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**: 10374~10378.
- [2] Bik E M, Bunschoten A E, Gouw R D, et al. *EMBO Journal*, 1995, **14**(2): 209~216.
- [3] Cholera working group. *Lancet*, 1993, **342**: 387~390.
- [4] Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, et al. *Current protocols in molecular biology*. Vol 1, New York: John Wiley and Sons, Inc., 1987.
- [5] 刘纯杰,李淑琴,董自正,等. *生物技术通讯*, 1996, **7**(4): 187~189.
- [6] Cryz S J, Furer E, Germanier R J. *Clin Microbiol*, 1982, **16**: 111-115.

- [7] Westphal O Jann K. *Methods Carbohydr Chem* ,1965 **5** :83~91.
 [8] Tsai C M ,Frasch C R. *Anal Biochem* ,1982 **119** :115~119.
 [9] Jonson G Svennerholm A M Holmgren J. *Infect Immun* ,1989 **57** (6):1809~1815.
 [10] Comstock L E Maneval D J R Panigrahi P. *Infect Immun* ,1995 **63** (1) 317~323.
 [11] 曲殿波 ,刘传喧 ,马清钧. 高技术通讯 ,2000 ,24~27.

CONSTRUCTION OF PLASMID GENE BANK OF *V. CHOLERAE* O₁₃₉ AND DETECTION OF O-ANTIGEN GENES*

Qu Dianbo Liu Chuanxuan Zhang Yanhong Ma Qingjun

(Institute of Biotechnology , Academy of Military Medical Sciences , Beijing 100850 , China)

Abstract : Because O-antigen biosynthesis genes are a tandem gene cluster. Gnomonic fragments of 4~20 kilobases (kb) were obtained by digesting genomic DNA of *V. cholerae* O₁₃₉ with restriction endonuclease *EcoRI* , then plasmid gene bank was constructed. Recombinant colony *E. coli* DH5 α (pMG320) , expressing O-antigen of *V. cholerae* O₁₃₉ was detected from the bank by immunological agglutinative reaction. The further analysis showed O-antigen expressed by recombinant colony had both immunogenicity and reactogenicity and the size of O-antigen biosynthesis genes was about 4.6kb.

Key words : O-antigen , Plasmid gene bank , *V. cholerae* O₁₃₉

* Supported by project of Chinese National Programs for High Research and Development(102-07-03-02)

《微生物学报》第七届编辑委员会名单

顾 问 张树政

主 编 李季伦

副主编 陆德如 朱关福 李阜棣 王敖全 谭华荣

编 委 王修垣 邓子新 田 波 刘志恒 朱庆裴 孙志浩 李焕菱

陈世平 陈永青 杨苏声 周培瑾 范云六 范孝用 钱新民

钱世钧 诸葛健 徐怀恕 翟中和