

猪大肠杆菌耐热肠毒素和热敏肠毒素基因的融合及表达*

王嘉福^{1,2} 陆承平¹

(¹ 南京农业大学动物医学院 南京 210095)

(² 贵州大学生物与环境科学学院 贵阳 550025)

摘 要 :用聚合酶链反应扩增出猪源大肠杆菌编码 ST 前体(pro-ST)和 LT 的 B 亚单位(LTB)成熟多肽的序列 ,再通过套式 PCR 将 pro-ST 编码序列 3' 端和 LTB 编码序列 5' 端融合 ,并置于同一阅读框内 ,得到 ST 和 LTB 的融合基因 ,将此序列克隆到 pGEM-T 质粒中 ,序列分析后 ,亚克隆到表达载体 pQE30 中 ,在大肠杆菌细胞中得到表达 ,表达的融合蛋白同时具有 ST 和 LTB 的抗原性 ,且无 ST 和 LT 的生物毒性。

关键词 :猪大肠杆菌 肠毒素 基因融合

中图分类号 S852.61 文献标识码 :A 文章编号 1001-6209(2003)01-0043-05

肠毒素大肠杆菌(Enterotoxigenic *Escherichia coli*, ETEC)是幼畜腹泻的主要病原菌,幼畜感染后常导致严重的腹泻和死亡,给畜牧业生产特别是养猪业带来重大的损失^[1,2]。ETEC 致病的原因是产生热敏肠毒素(heat-labile toxin, LT)和耐热肠毒素(heat-stable toxin, ST)^[3,4]。LT 由一个约 28 kD 的 A 亚基和 5 个 11.5 kD 的 B 亚基组成,A 亚基具有 ADPR-转移酶和 NAD 糖基水解酶活性,其作用是活化腺苷酸环化酶(AC),使细胞内 cAMP 增加,导致水与电解质的平衡失调,从而产生腹泻^[5];B 亚基可与靶细胞上的神经节苷酯(GM1)受体结合,介导 A 亚基的进入,全 LT 分子及无毒性的 B 亚基均具有很好的抗原性^[6]。ST 毒性活性部分仅为 18 或 19 个氨基酸的小肽,18 氨基酸的 ST 主要由牛、猪等的 ETEC 中检出,称 ST_{Ia},而 19 氨基酸的 ST 只在人源的 ETEC 中检出,称 ST_{Ib};他们都能够与靶细胞膜上的特异性受体结合,活化鸟苷酸环化酶,通过 cGMP 途径影响细胞生理功能,导致腹泻^[7,8]。ST 在致病中起着非常重要的作用,几乎所有重症腹泻的患畜中,只要分离到 ETEC,大都产生 ST。单一的 ST 无免疫原性,当 ST 与载体蛋白共价偶联时,可呈现免疫原性。LT 的 B 亚单位无毒性,且具有很好的免疫原性,可作为制备 LT 的抗原和 ST 的载体蛋白。

1 材料和方法

1.1 菌株与质粒

大肠杆菌 DH5 α 、M15(pREP4)、A4815-3(LT⁺ST⁺)等由本实验室保存;质粒 pRX-LTB^[3]和 pTS139^[6]由本实验室构建;pGEM-T 购自 Promega 公司、pQE30 为 QIAGEN 公司产品。

* 国家自然科学基金资助(39660003)

作者简介:王嘉福,男(1962-),贵州纳雍人,在职博士生,教授,研究方向:原核生物基因表达调控, E-mail: jiaff@hotmail.com

收稿日期:2002-03-26,修回日期:2002-07-26

1.2 主要试剂

限制性内切酶、*pfu*-Taq DNA 聚合酶、T4-DNA 连接酶、dNTP 为 Promega 公司产品 ; 四色荧光 DNA 测序试剂盒为 PE 公司 Applied Bio-systems 产品 ; Plasmid Miniprep kit I 和 Gel Extraction kit 为 Omega 产品 ; 生物素标记碱性磷酸酶试剂盒购于华美生物工程公司 ; LT 和 ST 检测试剂盒购于上海市卫生防疫站 ; 其他试剂为国产分析纯试剂。寡核苷酸引物委托上海 Sangon 生物工程公司合成。

1.3 DNA 操作

PCR 扩增 , PCR 产物的回收 , 质粒 DNA 的分离纯化 , DNA 的连接和转化 , 琼脂糖凝胶电泳等参照文献^[1,3,6,9,10]方法及试剂盒说明程序。DNA 序列分析 , 采用双脱氧末端终止法 , 参照试剂盒说明书程序进行。

1.4 融合基因的表达及包涵体的分离纯化

重组质粒转化大肠杆菌 , 挑取单菌落接种 LB 培养基 , 培养过夜后按 1% 比例接于 LB 培养基 , 37℃ 培养至菌液的 OD_{600} 达到 0.4 ~ 0.6 时 , 加 IPTG 至终浓度为 0.5 ~ 1 mmol/L , 37℃ 诱导表达后 , 离心菌体 , 重悬于 pH7.4 20mmol/L Tris-HCl 中 , 超声波破菌 , 然后于 4℃ , 13 000r/min 离心 15 min , 分别收集上清和沉淀 , 沉淀再用 20 g/L Triton-X100 0.5 mol/L NaCl 及双蒸水洗涤 , 得到的包涵体用双蒸水重悬。

1.5 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和免疫印迹

参照文献 9 , 10 方法和生物素标记试剂盒说明书程序进行。

1.6 ST 和 LT 的检测

按试剂盒程序进行 , ST 用竞争性 ELISA , LT 用双抗夹心法。

1.7 生物活性测定

应用乳鼠试验测定 ST 生物学活性 , 应用兔回肠袢结扎试验测定 LT 生物学活性 , 按文献 4 方法进行。

2 结果

2.1 ST 基因和 LTB 基因的融合

编码 pro-ST 和成熟多肽 LTB 的 DNA 序列通过 PCR 扩增获得 , ST 引物为 P1 和 P2 , LTB 引物为 P3 和 P4 :

P1 5'GGAATTCAACATGACGGGAGG3'

P2 5'TAGTCTGGGGAGCATAACATGGAGCACAGGC3'

P3 5'GCTCCCCAGACTATTACAGAAC3'

P4 5'GAAGCTTCTAGTTTTTCATACTGATTGC3'

P1 为 ST 5' 端起始引物 , 包括 ST 前体序列 5' 端非编码区 (含核糖体结合位点) 的 15 个碱基 , 一个 *Eco*R I 识别位点 ; P2 为反向引物 , 包括与 ST 基因 3' 末端互补的 18 个碱基及与编码 LTB 成熟多肽 5' 端互补的 13 个碱基 , 即在 ST 的扩增产物中 , 3' 端带有 13 bp 的 LTB 序列。P3 为 LTB 5' 端成熟多肽区的核苷酸序列 , P4 为终止引物 , 含 18 bp 的 LTB 3' 端互补序列、终止密码 TAG 和一个 *Hind* III 识别序列。用 P1、P2 为引物 , 质粒 pTS139 为模板 , 经 PCR 扩增得到一条约 269 bp 的片段 ; 用 P3、P4 为引物 , 质粒 nRX-LTB 为模板 , PCR 扩增

得到一条约 320 bp 的片段(图 1),扩增片段经琼脂糖凝胶电泳分离后,用胶回收试剂盒回收,等量混合 ST 和 LTB 扩增片段后,以 P1 和 P4 为引物进行扩增,得到约 576 bp 的 pro-ST/LTB 融合 DNA 片段(图 1)。

2.2 重组质粒的构建

将扩增得到的 576 bp ST/LTB 融合 DNA 片段与 pGEM-T 载体连接,转化大肠杆菌 DH5 α 随机挑取 10 个转化子,用引物 P1 和 P4 进行检测,阳性克隆再用 *EcoR* I/*Hind* III 双酶切和电泳分析,证实重组质粒含有 576 bp 的插入片段(图 1);用双脱氧末端终止法测定了其中 3 个重组质粒插入片段的 DNA 序列(正向用 T7 通用测序引物,反向用 SP6 通用测序引物),结果证实 DNA 序列和读码框正确(图 2)。将其中一个命名为 pGEM/SL4。将 pGEM/SL4 用 *Eco*RI 和 *Hind* III 双酶切割后,胶回收融合基因片段插入表达载体 pQE30 *Eco*RI/*Hind* III 酶切位点上,转化大肠杆菌 M15 后得到重组质粒 pQE30/SL5(图 1)。

2.3 重组 pro-ST/LTB 融合基因的表达

重组质粒 pQE30/SL5 转入大肠杆菌 M15(pREP4)后,细胞诱导物用 15% SDS-PAGE 凝胶电泳,考马斯亮蓝 G250 染色。结果表明(图 3),重组质粒 pQE30/SL5 在大肠杆菌 M15 细胞中经 IPTG 诱导 4~7 h,在 20 kD 处有一条表达蛋白带,经免疫印迹显示,该蛋白带能

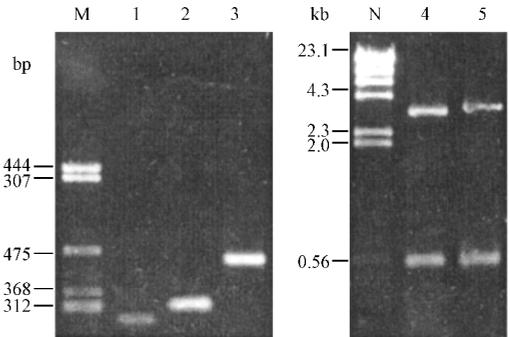


图 1 前体 ST 基因和 LTB 基因的扩增及重组质粒分析

Fig.1 Analysis of the amplified pro-ST/LTB genes and the recombinant plasmids

M. pBR322/Taq I marker 1. The amplified fragment of pro-ST gene 2. The amplified fragment of LTB gene 3. The fusion fragment of pro-ST/LTB genes 4. λ DNA/*Hind* III 5. pGEM/SL4/*Eco*RI/*Hind*III 5. pQE30/SL5/*Eco*RI/*Hind* III.

Met Lys Lys Leu Met Leu Ala Ile Phe Ile Ser Val Leu Ser Phe Pro Ser Phe Ser Gln Ser Thr Glu Ser Leu Asp
ATG AAA AAG CTA ATG TTG GCA ATT TTT ATT TCT GTA TTA TCT TTC CCC TCT TTT AGT CAG TCA ACT GAA TCA CTT GAC
Ser Ser Lys Gln Lys Ile Thr Leu Glu Thr Lys Lys Cys Asp Val Val Lys Asn Asn Ser Glu Lys Lys Ser Glu Asn
TCT TCA AAA GAG AAA ATT ACA TTA GAG ACT AAA AAG TGT GAT GTT GTA AAA AAC AAC AGT GAA AAA AAA TCA GAA AAT
Met Asn Asn Thr Phe Tyr Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Ala Gly Cys Tyr Ala Pro Gln Glu Ile Thr
ATG AAC AAC ACA TTT TAC TGC TGT GAA CTT TGT TGT AAT CCT GCC TGT GCT CCA TGT TAT GCT CCC CAG ACT ATT ACA
Glu Leu Cys Ser Glu Tyr Arg Asn Thr Gln Ile Tyr Thr Val Asn Asp Lys Ile Leu Ser Tyr Thr Glu Ser Met Ala
GAA CTA TGT TCG GAA TAT CGC AAC ACA CAA ATA TAT ACG GTA AAT GAC AAG ATA CTA TCA TAT ACG GAA TCG ATG GCA
Gly Lys Arg Glu Leu Val Ile Ile Thr Phe Lys Gly Gly Ala Thr Phe Gln Val Glu Val Pro Gly Ser Gln His Ile
GGC AAA AGA GAA TTG GTT ATC ATT ACA TTT AAG GGC GGC GCA ACA TTT CAG GTC GAA GTC CCG GGC AGT CAA CAT ATA
Asp Ser Gln Lys Lys Ala Ile Glu Arg Met Lys Asp Thr Leu Arg Ile Thr Tyr Leu Thr Glu Thr Lys Ile Asp Lys
GAC TCC CAG AAA AAA GCC ATT GAA AGG ATG AAG GAC ACA TTA AGA ATC ACA TAT CTG ACC GAG ACC AAA ATT GAT AAA
Leu Cys Val Try Asn Asn Lys Thr Pro Asn Ser Ile Ala Ala Ile Ser Met Lys Asn stop
TTA TGT GTA TGG AAT AAT AAA ACC CCC AAT TCA ATT GCG GCA ATC AGT ATG AAA AAC TAG AAGCTTC

图 2 ST 前体/LTB 融合基因的核苷酸序列及推测的氨基酸序列

Fig.2 Sequence of pro-ST/LTB fusion gene and its deduced amino acids

与特异的 LT 抗体反应,证明表达蛋白为含 LT 的融合蛋白。

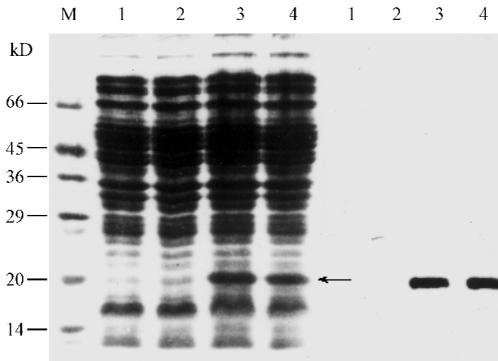


图 3 ST/LTB 融合蛋白的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(左)和 Western 印迹(右)

Fig. 3 SDS-PAGE of fusion protein of pro-ST/LTB (left) and western blot (right)

The arrows show the fusion protein and the signals of western blot

M. Protein molecular weight marker ;

1. *E. coli* M15 pREP4 ;

2. *E. coli* M15 harboring pQE30/SL5 ;

3 4. *E. coli* M15 harboring pQE30/SL5 induced with IPTG.

2.4 pro-ST/LTB 融合多肽抗原性测定

采用夹心法 ELISA 测定融合蛋白的 LT 抗原性,竞争性 ELISA 测定融合蛋白的 ST 抗原性,三次平均结果见表 1 和表 2。表达产物同时具有 LT 和 ST 的抗原性。经兔回肠祥结扎试验和乳鼠生物学试验也表明,融合的 pro-ST/LTB 蛋白无 LT 和 ST 的生物学毒性。

表 1 pro-ST/LTB 融合蛋白的 ST 抗原性检测

Table 1 ST antigenicity of the pro-ST/LTB by competitive ELISA in *OD*₄₉₀

Strains	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320
<i>E. coli</i> 44815-3	0.035 (+)	0.061 (+)	0.071 (+)	0.100 (+)	0.129 (-)	0.122 (-)
M15-pQE30/SL5	0.032 (+)	0.056 (+)	0.061 (+)	0.092 (+)	0.124 (-)	0.115 (-)
<i>E. coli</i> M15	0.21 (-)					

E. coli 44815-3 positive control ; *E. coli* M15 negative control.

表 2 pro-ST/LTB 融合蛋白的 LT 抗原性检测

Table 2 LT antigenicity of the pro-ST/LTB by sandwich ELISA in *OD*₄₉₀

Strains	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320
<i>E. coli</i> 44815-3	0.48 (+)	0.23 (+)	0.19 (+)	0.10 (-)	0.08 (-)	0.07 (-)
M15-pQE30/SL5	0.8 (+)	0.35 (+)	0.28 (+)	0.16 (-)	0.09 (-)	0.11 (-)
<i>E. coli</i> M15	0.06 (-)					

E. coli 44815-3 positive control ; *E. coli* M15 negative control.

3 讨论

ETEC 所导致的仔猪腹泻是危害养猪业的重要原因之一。长期以来,对该病的预防主要以猪大肠杆菌多价油佐剂灭活菌苗,由于野生的 ST 几乎没有免疫原性且具有很强的生物毒性,因此不能有效预防仔猪腹泻。理想的 ETEC 疫苗不仅要包含定居因子抗原,同时也应该包含 LT_B 和 ST 抗原。如何增强 ST 的免疫原性,成为制备 ETEC 疫苗的关键。本研究用 PCR 方法将 pro-ST 基因和 LT_B 基因融合,并在大肠杆菌细胞中表达。实验证明,用这种方法进行基因融合是可行的。在基因表达过程中,产生的融合蛋白主要以包涵体的形式存在,易于分离纯化。

参 考 文 献

- [1] 王嘉福,冉雪琴. 应用聚合酶链反应技术克隆猪大肠杆菌耐热肠毒素基因. 中国兽医杂志, 1997, 23(4) 3 ~ 4.
- [2] Schultsz C, Pool G J, van Ketel R, et al. Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in stool samples by using non radioactively labeled oligo-nucleotide DNA probes and PCR. *J Clin Microbiol*, 1994, 32: 2393 ~ 2397.
- [3] 王嘉福,冉雪琴,吴拥军,等. 猪大肠杆菌耐热肠毒素基因的分克隆. 畜牧兽医学报, 1998, 29(1) 60 ~ 65.
- [4] Sack R B. Enterotoxigenic *Escherichia coli*: identification and characterization. *J Infect Dis*, 1980, 142: 279 ~ 286.
- [5] Bely M J, Miller V L, Mekalanos J J. Genetics of bacterial enterotoxins. *Ann Rev Microbiol*, 1986, 40: 577 ~ 605.
- [6] 王嘉福,冉雪琴,吴拥军,等. 猪大肠杆菌耐热肠毒素 B 亚基基因的克隆及高效表达. 畜牧兽医学报, 1998, 29(3) 221 ~ 226.
- [7] Jerthorn M, Aring ; hrén C, Holmgren J, et al. Safety and immunogenicity of an oral inactivated enterotoxigenic *Escherichia coli* vaccine. *Vaccine*, 1998, 16: 255 ~ 260.
- [8] Svenerholm A M, Wiklund G. Rapid GM1-enzyme-linked immunosorbent assay with visual reading for identification of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *J Clin Microbiol*, 1983, 17: 596 ~ 600.
- [9] 卢圣栋,马清钧,刘德培,等. 现代分子生物学实验技术. 第 2 版. 北京:中国协和医科大学出版社, 1999.
- [10] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory Manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory press, 1989.

The Fusion and Expression of Genes Encoding Heat-stable and Heat-labile Enterotoxins of *Escherichia coli* from Porcine Origin

Wang Jiafu^{1, 2} Lu Chengping¹

(¹ College of Veterinary medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

(² School of life sciences and biotechnology, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract: The genes encoding precursor heat-stabile (pro-ST) and mature peptide of B unit of heat-labile (LT) enterotoxins of *Escherichia coli* from piglet were amplified by polymerase chain reaction (PCR). The 3' terminus of gene encoding pro-ST was genetically fused to the 5' terminus of the LT_B subunit gene in nest-PCR. The fusion genes encoding pro-ST and LT_B were cloned into pGEM-T vector and subcloned into the pQE30. The recombinant plasmid was expressed in *E. coli* by IPTG induction. The fusion protein possessed both ST and LT_B antigenicity, as well as it had lost the biological toxicity of ST or LT toxin.

Key words: ETEC, Enterotoxin, Gene fusion and expression