

C 型产气荚膜梭菌 β_1 、 β_2 毒素基因的融合

许崇波¹ 曾 瑾² 许崇利² 王玉炯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 C 型产气荚膜梭菌染色体 DNA 中扩增出 β_1 和 β_2 毒素基因,构建了含 β_1 - β_2 融合基因表达质粒的重组菌株 BL21(DE3)(pETXB1-2)。经酶切鉴定和序列测定证实,构建的重组质粒 pETXB1-2 含有 β_1 - β_2 融合基因,且基因序列和阅读框架正确。经 ELISA 检测,重组菌株表达的 β_1 - β_2 融合蛋白能够被 β_1 、 β_2 毒素抗体识别。免疫实验结果表明,用 β_1 - β_2 融合蛋白免疫的小鼠可以抵抗 1MLD 的 C 型产气荚膜梭菌 C59-44 毒素攻击,表明构建的重组菌株可以作为预防仔猪红痢基因工程亚单位苗的候选菌株。

关键词 产气荚膜梭菌 β_1 毒素 β_2 毒素 融合基因 基因表达

中图分类号 S852.Q785 文献标识码 A 文章编号 0001-6209(2005)02-0205-04

产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)是引起多种动物坏死性肠炎和肠毒血症的主要病原菌,分为 A、B、C、D、E 5 个菌型,其致病因子主要是菌体产生的外毒素,其中 β 毒素是由 C 型产气荚膜梭菌产生的一种坏死性和致死性毒素^[1]。长期以来一直认为 C 型产气荚膜梭菌只产生一种 β 毒素(现称为 β_1 毒素),而且是主要的毒力因子。然而,直至 1997 年才确定该菌还可以产生另一种毒素(现称为 β_2 毒素)是更重要的毒力因子。业已证实, β_1 毒素与 β_2 毒素具有相似的生物学活性,但没有明显的基因序列和氨基酸序列的同源性,且分离峰也不同^[2]。本研究在克隆 β_1 和 β_2 毒素基因的基础上,进一步将 β_2 毒素基因融合到 β_1 毒素基因的上游,构建了 β_1 - β_2 融合基因,其表达产物具有良好的免疫原性,为下一步研制预防仔猪红痢基因工程亚单位苗奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 菌株和载体

受体菌大肠杆菌(*Escherichia coli*)BL21(DE3)和表达载体 pET-28c 由本室保存;C 型产气荚膜梭菌强毒菌 C59-44 购自中国兽药监察所。

1.2 试剂

限制性核酸内切酶(*Nco* I、*Bam* H I、*Eco* R I)、T4 DNA 连接酶、IPTG、Wizard PCR Preps DNA

Purification System 均购自 Promega 公司;PCR 试剂盒购自 TaKaRa(大连)有限公司;RNase A 购自 Calbiochem 公司;卡那霉素购自 Boehringer Mannheim 公司; β_1 、 β_2 毒素抗血清购自中国兽药监察所,HRP 驴抗羊二抗为自制。

1.3 PCR 引物的设计和合成

根据 Hunter 等^[3]报道的 β_1 毒素基因序列,设计并合成了 1 对 PCR 引物:primer1 为 5'-CGCGGATCCCAATGATATAGGTA AAAAC-3', primer2 为 5'-CCGGAATTC TTAATAGCTGTACTTTGTG-3', primer1 和 primer2 分别含 *Bam* H I、*Eco* R I 酶切位点和保护性碱基,用这对 PCR 引物从 C 型产气荚膜梭菌染色体 DNA 中扩增 β_1 毒素基因。根据 Gibert 等^[2]报道的 β_2 毒素基因序列设计并合成了 1 对 PCR 引物,Primer3 5'-CATG CCA TGG CAAAAGAAATCGACGCTTAT-3' 和 Primer4: 5'-CGCGGATCC GTGCACCA TACCCCTTAC -CAAA-3', primer3 和 primer4 分别含有 *Nco* I、*Bam* H I 酶切位点和保护性碱基,用这对 PCR 引物从 C 型产气荚膜梭菌染色体 DNA 中扩增 β_2 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,200mmol/L dNTPs 10 μ L,引物 P1 和 P2 (0.1 μ mol/L)各 1 μ L,ddH₂O 75 μ L, *Taq* DNA 聚合酶 (3U/ μ L)1 μ L。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 5min;94 $^{\circ}$ C 60s, 47 $^{\circ}$ C 60s,72 $^{\circ}$ C 120s,进行 30 个循环,72 $^{\circ}$ C 10min。

基金项目 国家自然科学基金资助项目(30360080)

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。Tel:86-411-87402327, Fax:86-411-87403834, E-mail: xcb921@sohu.com

收稿日期 2004-04-19, 修回日期 2004-12-27

1.4 染色体 DNA 的提取

染色体 DNA 的提取按文献 [4] 的方法进行。

1.5 DNA 的重组、转化和质粒稳定性试验

质粒 DNA 的提取、酶切、琼脂糖凝胶电泳、DNA 体外连接、转化等均按文献 [5] 的方法进行。质粒稳定性试验参照 Meacock^[6] 的方法进行: 将 37℃ 振荡培养过夜的菌体, 按 10% 接种于 100mL 含 30μg/mL Kan 的 LB 液体培养基中, 继续培养 12h 将上述培养物稀释 10⁶ 倍, 在无 Kan 的 LB 液体培养基培养 12h; 取 100μL 稀释液涂种于普通 LB 琼脂平板, 过夜培养后, 随机挑取 100 个单菌落, 转种在含 Kan 的 LB 琼脂平板上, 37℃ 过夜培养并进行菌落计数。

1.6 表达产物 SDS-PAGE 分析和 ELISA 检测

按文献 [5] 介绍的方法进行。

1.7 蛋白表达含量的测定

用 CS-9000 型薄层凝胶扫描仪在 560nm 波长下的吸收值, 测量表达产物占菌体总蛋白的相对含量。

1.8 重组菌株毒性的测定

将培养的重组菌株 BL21(DE3) (pETXB1-2) 分别经口服或腹腔注射共计 40 只小鼠, 观察有无临床症状和病理变化。

1.9 包涵体粗提物的制备和免疫原性试验

将 IPTG 诱导 3h 的 50mL 培养物离心收集菌体, 重悬于 5mL 的 50mmol/L Tris·HCl-2mmol/L EDTA 中, 加入溶菌酶至终浓度 100μg/mL, 再加入 0.5mL 1% Triton X-100, 于 30℃ 温育 15min。再用超声波处理 2 个 10s 后, 12000r/min 离心 15min, 收集的沉淀物即为包涵体粗提物。

将重组菌株 BL21(DE3) (pETXB1-2) 的包涵体粗提物或经甲醛灭活的菌体, 加入氢氧化铝胶至 10%, 作为免疫用抗原。取 80 只小鼠, 随机分为 2 组, 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。同时设生理盐水对照组。将过夜培养的 C 型产气荚膜梭菌 C59-44 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 C 型产气荚膜梭菌强毒菌 C59-44 培养上清攻击免疫小鼠, 观察小鼠的存活情况。

2 结果

2.1 β₁ 毒素和 β₂ 毒素基因克隆

利用 PCR 技术, 从 C 型产气荚膜梭菌染色体 DNA 中扩增出 β₁ 毒素基因, 然后用限制性核酸内切

酶 *Bam*H I 和 *Eco*R I 对其进行双酶切处理, 回收 0.95kb 的 β₁ 毒素基因片段, 将其定向克隆在事先经同样内切酶处理的载体 pET-28c 中的相应位点上, 转化至受体菌 BL21(DE3) 中, 最后涂种在卡那霉素琼脂平板上。从卡那霉素琼脂平板上挑取其中 3 个阳性的重组菌落, 经 37℃ 过夜培养后, 采用碱变性法快速抽提质粒, 然后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 结果重组质粒的迁移率比载体质粒慢, 表明已有外源 DNA 插入。把其中一个重组质粒命名为 pETXB1, 用 *Bam*H I / *Eco*R I 酶切该质粒, 经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 结果出现两条电泳带, 其中一条分子量大的电泳带与表达载体 pET-28c 位置相同, 另一条电泳带大小为 0.95kb, 并且经 DNA 序列测定证实, 表明这条电泳带为 β₁ 毒素基因片段, 与 Hunter 等^[3] 报道的 β₁ 毒素基因序列一致, 从而成功地构建了 β₁ 毒素基因克隆质粒 pETXB1。

按照上述方法, 扩增并回收了 0.72kb β₂ 毒素基因片段, 用 *Nco* I / *Bam*H I 进行双酶切处理后, 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, 涂种在卡那霉素琼脂平板上。卡那霉素阳性的菌落经碱变性法快速抽提质粒, 并用 *Nco* I / *Hind* III / *Bam*H I 和 *Nco* I / *Bam*H I 酶切该质粒, 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 结果表明, 构建的该质粒含有 β₂ 毒素基因, 并命名为 pETXB2。经 DNA 序列测定证实, 与 Gibert 等^[2] 报道的 β₂ 毒素基因序列一致, 从而成功地构建了 β₂ 毒素基因克隆质粒 pETXB2。

2.2 β₁ - β₂ 融合基因重组表达质粒的构建

用 *Nco* I / *Bam*H I 酶切含有 β₂ 毒素基因质粒 pETXB2, 回收 β₂ 毒素基因片段, 插入到经同样酶切处理的含 β₁ 毒素基因质粒 pETXB1 中相应酶切位点上, 构建了重组质粒 pETXB1-2。经 *Nco* I / *Bam*H I / *Eco*R I、*Nco* I / *Bam*H I、*Bam*H I / *Eco*R I、*Nco* I / *Eco*R I 酶切鉴定和核苷酸序列测定, 证实该质粒含有 β₁ - β₂ 毒素融合基因, 而且基因序列和阅读框架均正确, 从而成功地构建了 β₁ - β₂ 毒素融合基因重组表达质粒 pETXB1-2 (图 1)。

2.3 重组质粒的稳定性

重组质粒 pETXB1-2 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。

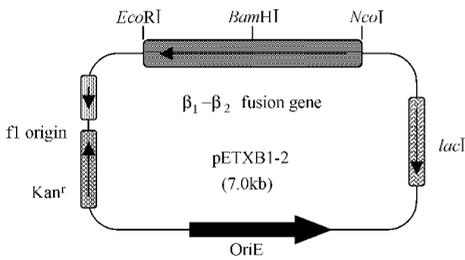


图 1 重组表达质粒 pETXB1-2 结构示意图

Fig.1 Structure of recombinant expression plasmid pETXB1-2

2.4 融合基因表达产物 SDS-PAGE 分析

重组菌株 BL21(DE3 χ pETXB1-2)经 IPTG 诱导 5h,菌体经超声波处理后,用 SDS-PAGE 分析,结果表明 $\beta_1 - \beta_2$ 融合基因可在这种宿主菌中得以表达,其相对分子量约为 62kD, $\beta_1 - \beta_2$ 融合蛋白的表达量占菌体总蛋白相对含量的 15.36%,而含 pET-28c 空载体的 BL21(DE3)在该处无特异条带(图 2),经 ELISA 检测,构建的重组菌株表达的 $\beta_1 - \beta_2$ 融合蛋白能够被 β_1 、 β_2 毒素抗体识别。

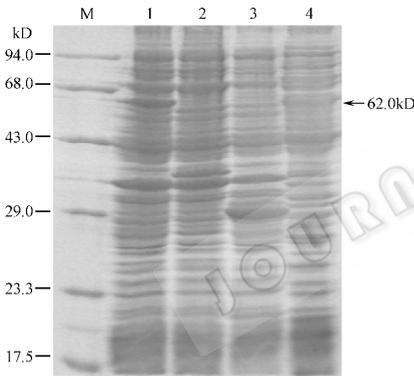


图 2 表达产物 SDS-PAGE 分析

Fig.2 SDS-PAGE analysis of the expressed products

M. Low molecular weight protein markers; 1. Total cell lysate of BL21 (DE3 χ pETXB1-2); 2. Total cell lysate of BL21(DE3 χ pETXB1); 3. Total cell lysate of BL21(DE3 χ pETXB2); 4. Total cell lysate of BL21 (DE3 χ pET-28c).

2.5 重组菌株毒性的测定

将培养的重组菌株 BL21(DE3 χ pETXB1-2)经腹腔注射或口服两种途径接种的小白鼠共计 40 只,每种途径 20 只,剂量为每只小白鼠 50 亿,结果 3 周后小白鼠全部存活,每只小白鼠无临床症状出现,经剖检后无病理变化,表明该菌株同时丧失了 β_1 、 β_2 毒素活性,已无致病性,十分安全。

2.6 免疫原性试验

经过筛选,确定最小致死量为 4 倍稀释的 C 型产气荚膜梭菌 C59-44 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 90%(36/40),灭活菌体免疫组保护率为 92.5%(37/40),而对照组 20 只小鼠全部死亡。

3 讨论

β_1 和 β_2 毒素是 C 型产气荚膜梭菌的两种重要的致死性毒素,能引起仔猪出血性坏死性肠炎。Hunter 等^[3]首先克隆了 β_1 毒素基因,大小为 1.0kb,分子量为 34kD。 β_1 毒素的 ORF 位于 333 ~ 1340 位之间,成熟的 β_1 毒素的 N-末端的氨基酸序列显示出信号肽序列的典型特征,该信号肽可以指导 β_1 毒素穿过细胞膜分泌到细胞外。 β_1 毒素的二级结构中 β -折叠占 48%,N-末端第 80 ~ 102 位及 146 ~ 148 位氨基酸及 C-末端 281 ~ 290 位的氨基酸是亲水性的,属于表位结构,第 159 ~ 167 位氨基酸是疏水性和隐蔽的。 β_1 毒素的 C-末端是疏水性的,可以形成一个跨膜区。Steinorsdottir 等^[7]将从 C 型产气荚膜梭菌中克隆的 β_1 毒素基因与谷胱甘肽 S 转移酶基因融合,成功地表达出了相应的融合蛋白。该表达产物免疫小鼠后,可诱发机体产生中和抗体。Gibert 等^[21]首先从来自仔猪坏死性肠炎病例的培养上清中分离纯化到 β_2 毒素,并克隆了 β_2 毒素基因, β_2 毒素的 ORF 位于 267 ~ 1065 位之间,在 β_2 毒素基因起始密码子 ATG 的上游 7 个核苷酸处为由 5 个连续的 G (GGGGG) 组成的核糖体结合位点(RBS),在 β_2 毒素基因的 3'端有一段能形成发卡环结构的反向重复序列,构成一个不依赖 ρ 因子的转录终止子。 β_2 基因产物编码 265 个氨基酸,其中 N-末端的 30 个残基构成疏水性区域(6 ~ 26 位残基),形成一跨膜区,这 30 个氨基酸为信号肽序列。成熟蛋白起自 31 位的赖氨酸(Lys)共编码 235 个氨基酸。 β_2 毒素基因与 β_1 毒素基因或其它已知的产气荚膜梭菌基因序列没有明显的同源性。免疫学实验表明,抗 β_2 毒素的抗体能识别纯化的 β_2 毒素,并能与 β_1 毒素发生弱反应。相反,抗 β_1 毒素的抗体只能与 β_1 毒素反应,而不能与 β_2 毒素发生反应,表明 β_1 毒素与 β_2 毒素的免疫相关性较差,其机理尚不清楚。我们现已克隆了 β_1 和 β_2 毒素基因,并且构建了 $\beta_1 - \beta_2$ 融合基因,其表达水平占菌体总蛋白相对含量的 15.36%,为进一步研制 β_2 毒素基因工程亚单位苗和多价基因工程亚单位苗提供了理想基因材料。

参 考 文 献

- [1] Rood J I , Cole S T. Molecular genetics and pathogenesis of *Clostridium perfringens*. *Microbiol Rev* ,1991 **55** (4) 621 – 648.
- [2] Gibert M , Jolivet-Renaud C , Popoff M R , *et al.* Beta2-toxin , a novel toxin produced by *Clostridium perfringens*. *Gene* ,1997 **203** 65 – 73.
- [3] Hunter S E C , Brown J E , Oyston P F , *et al.* Molecular genetic analysis of beta-toxin of *Clostridium perfringens* reveals sequence homology with alpha-toxin , gamma-toxin , and leukocidin of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* , 1993 , **61** (9) 3958 – 3965.
- [4] Henricus L , Klaasen B M , Molkenboer J C H , *et al.* Detection of the alpha-toxin gene of *Clostridium perfringens* in diarrhoeic piglets in the Netherlands and Switzerland. *FEMS Microbiol Letters* , 1999 , **24** 325 – 332.
- [5] Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T. *Molecular Cloning*. 2nd ed. Cold Spring Harbor ,New York :Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1989.
- [6] Meacock P A , Cohen S N. Partitioning of bacterial plasmids during cell division :a cis-acting locus that accomplishes stable plasmid inheritance. *Cell* , 1980 **20** (2) 529 – 542.
- [7] Steinporsdottir V , Fridriksdottir V , Gunnatsson R , *et al.* Expression and purification of *Clostridium perfringens* beta-toxin glutathione S – transferase fusion protein. *FEMS Microbiol Letters* , 1995 **130** 273 – 278.

Fusion of beta1-toxin gene and beta2-toxin gene from *Clostridium perfringens* type CXU Chong-bo^{1*} ZENG Jin² XU Chong-li² WANG Yu-jiong²^(1) College of Bioengineering ,Dalian University ,Dalian 116622 ,China)^(2) Life Science School ,Ningxia University , Yinchuan 750021 ,China)

Abstract : Beta1-toxin and beta2-toxin genes from chromosomal DNA of *Clostridium perfringens* type C were amplified by PCR , PCR products were cleaved with restriction endonucleases and recovered. The recombinant plasmid pETXB1-2 containing β_1 - β_2 fusion genes was constructed by recombinant technique and then transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3). The β_1 – β_2 fusion proteins were expressed in recombinant strain BL21(DE3)(pETXB1-2) , and the expression level of the β_1 – β_2 fusion proteins was about 15.36% of total cellular protein by SDS-PAGE and thin-layer gel scanning analysis. More importantly , immunization in a mouse model with crude preparation containing the fusion protein inclusion bodies or inactivated recombinant strain induced protection against at least 1MLD of the toxin from *Clostridium perfringens* type C. Hence the fusion proteins possess a good immunogenicity. The constructed recombinant strain BL21(DE3) (pETXB1-2) can be used as a candidate of vaccine strain.

Key words : *Clostridium perfringens* type C , Beta1-toxin gene , Beta2-toxin gene , Gene fusion , Fusion protein , Gene expression