

霍乱弧菌肠毒素基因在大肠杆菌的表达*

马清钧 周建光 于秀琴 徐永强

(军事医学科学院生物工程研究所,北京)

霍乱毒素基因在大肠杆菌获得了表达,在大肠杆菌中产生的毒素,具有霍乱毒素同样的生物活性、抗原性和免疫原性。但它产生的霍乱毒素,90%是保持在胞内的,其毒性可被胰酶激活。

关键词 霍乱毒素;基因表达;大肠杆菌

由霍乱弧菌引起的霍乱,是一种烈性肠道传染病,致病性主要是由于其产生的霍乱毒素。近20多年来,关于霍乱毒素的理化性质、生物活性、毒素分子的结构和作用机理的研究,取得了重要进展。霍乱毒素由一个A亚单位与五个B亚单位组成,二者以非共价键形式结合,分子量分别为28000和11600。A亚单位是毒性的活性部分,B亚单位为毒素的抗原性部分。B亚单位与小肠粘膜上皮细胞受体(神经节苷脂GM1)结合,使A亚单位穿过细胞膜,与胞内膜的腺苷环化酶作用,促使细胞内ATP变成cAMP,以致cAMP在细胞内的浓度明显增加,促进肠粘膜细胞的分泌功能,结果肠液大量分泌,导致严重的呕吐腹泻。

霍乱肠毒素基因位于染色体上,我们应用遗传工程技术,分离了肠毒素基因,并在大肠杆菌克隆成功^[1]。本文报告在大肠杆菌中霍乱毒素基因克隆所产生霍乱毒素的毒性、抗原性和免疫原性,及其在大肠杆菌表达的特征。

材料和方法

(一) 细菌菌株

V. Cholerae 569B (经典生物型,稻叶血清型)由卫生部药品生物制品鉴定所供给。*E. Coli* RR1 (pMM-CT) 由本实验室构建的霍乱毒素基

因克隆菌株。

(二) 毒素与抗毒素血清

提纯的霍乱毒素为Sigma公司产品,抗霍乱毒素血清系本实验室应用Sigma公司的霍乱毒素制品免疫家兔获得的。

(三) 毒素的产生

细菌生长于LB肉汤培养基上,37℃振荡通气培养18h,将培养物离心取上清液即为无细胞培养液(S)的标本。收集细胞悬于25%蔗糖、50mmol/L Tris-HCl、0.12mmol/L EDTA (pH 7.5)的缓冲液中,经溶菌酶(1mg/ml)、NP₄₀(0.1%),裂解,离心取上清,即为细胞裂解提取液的标本(E)。

(四) 毒素的毒性分析

鼠Y1肾上腺细胞的检测参照文献[2,3]进行。家兔肠攀结扎试验参照文献[4]进行。

(五) 毒素的免疫原性分析

青紫蓝家兔(雄性,2kg)肌肉注射或经口免疫,肌肉注射采用弗氏佐剂,经口免疫在灌注抗原前先灌注0.1mol/L NaHCO₃。攻毒试验采用小肠肠攀结扎攻击,测定小肠肠段的积液反应。

(六) 毒素的抗原性分析

被动免疫溶血试验参照Serafim^[5]方法进行。GM1-ELISA试验参照Sack^[6]方法进行。

结 果

(一) 大肠杆菌产生的霍乱毒素的生物活性

本文于1987年1月5日收到。

* 国家自然科学基金资助的课题。

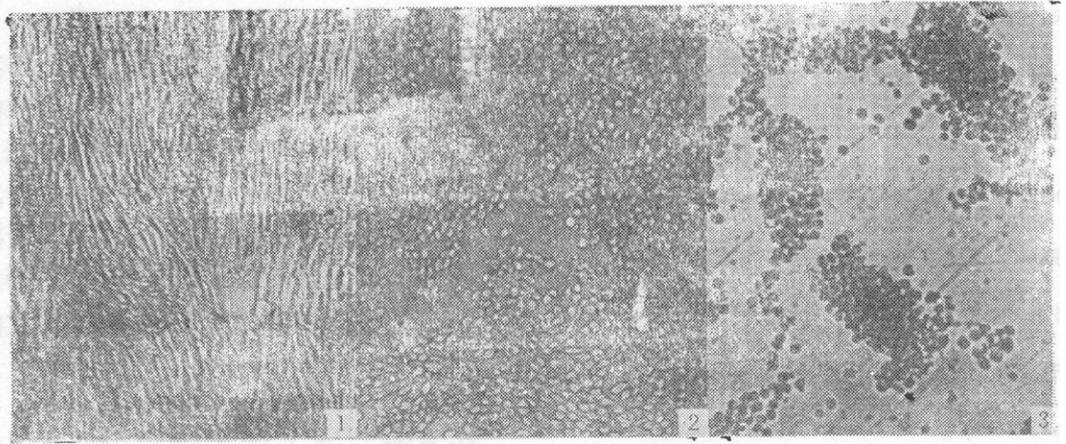


图1 Y1 肾上腺细胞对霍乱毒素的分析

1. 大肠杆菌 RR1 (pBR322) 2. 霍乱弧菌 569B 3. 大肠杆菌 RR1 (pMM-CT)

Fig. 1 Y1 adrenal cell assay of cholerae toxin

1. *E. coli* RR1 (pBR322) 2. *V. cholerae* 569B 3. *E. coli* RR1 (pMM-CT)

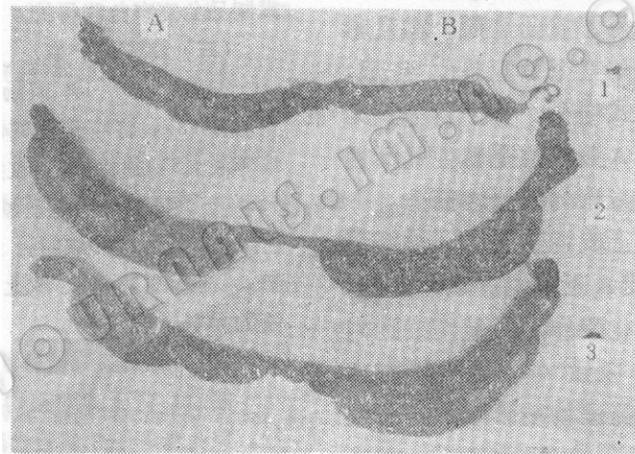


图2 家兔肠攀结扎反应的比较

1. 大肠杆菌 RR1 (pBR322) 2. 霍乱弧菌 569B 3. 大肠杆菌 RR1 (pMM-CT)

A: 培养上清液 B: 细胞裂解液

Fig. 2 Comparison of rabbit intestinal loop responses

1. *E. coli* RR1 (pBR322) 2. *V. Cholerae* 569B 3. *E. coli* RR1 (pMM-CT)

A: Supernatant B: Cell extracts

pMM-CT 克隆在大肠杆菌中产生的霍乱毒素,经鼠 Y1 肾上腺细胞的检测和家兔肠攀结扎试验表明,具有霍乱弧菌产生的霍乱毒素同样的生物活性,且这种毒性作用能特异地被抗霍乱毒素血清所中和。

1. Y1 肾上腺细胞的检测: Y1 肾上腺细胞对霍乱毒素的作用很敏感,能使细

胞产生形态变圆的病理变化。检测结果(图1)表明,大肠杆菌 RR1(pMM-CT)与霍乱弧菌 569B 的培养液,同样能使 Y1 细胞变圆,作为对照的大肠杆菌 RR1 (pBR322),则不能使 Y1 细胞的形态产生改变。

2. 家兔肠攀结扎试验: 应用家兔小肠肠攀结扎试验,结果(图2)显示,霍乱弧菌 569B 的无细胞培养液及细胞裂解液都含

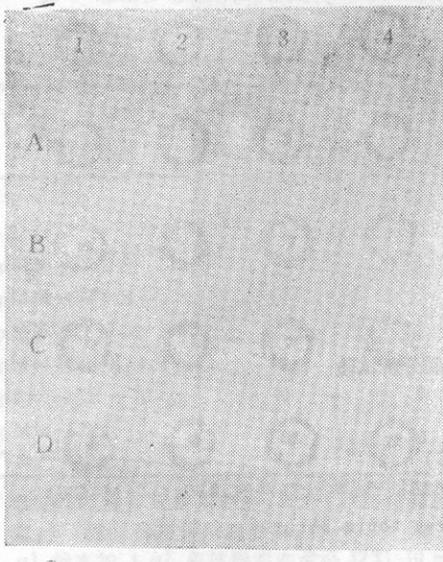


图3 霍乱毒素抗原的被动免疫溶血试验

- A: 1—2. 霍乱弧菌 569B: 1. (E); 2. (S)
 3—4. 产毒性大肠杆菌 44813: 3. (E); 4. (S)
 B—C: 大肠杆菌 RR1 (pMM-CT): 1, 3. (S);
 2, 4. (E)
 D: 1—2. 大肠杆菌 RR1 (pBR322): 1. (E); 2.
 (S)
 3—4. 大肠杆菌 RR1 (pMM-CT), 用霍乱抗毒
 素血清的抑制试验
 (E): 细胞裂解提取液。
 (S): 培养上清液。

Fig. 3 Passive haemolysis test for cholerae toxin antigen

- A: 1—2. *V. Cholerae* 569B: 1. (E); 2. (S)
 3—4. Enterotoxigenic *E. coli* 44813: 3,
 (E); 4, (S)
 B—C: *E. coli* RR1 (pMM-CT): 1, 3. (S);
 2, 4. (E)
 D: 1—2. *E. coli* RR1 (pBR322): 1. (E); 2,
 (S)
 3—4. *E. coli* RR1 (PMM-CT) inhibitory
 test with anti-CT serum
 (E) Represents bacterial extract
 (S) Represents supernatant

有霍乱毒素, 使肠腔产生积液达 1.5—1.8 ml/cm, 大肠杆菌 RR1(pMM-CT) 的无细胞培养液, 使肠腔产生积液 1.2ml/cm, 细胞裂解液为 1.5ml/cm, 而大肠杆菌 RR 1 (pBR 322) 无论是无细胞培养液或细胞裂解液, 都不产生积液。

(二) 大肠杆菌产生的霍乱毒素的抗

原性

1. 被动免疫溶血试验: 应用被动免疫溶血试验, 对霍乱弧菌和大肠杆菌 pMM-CT 克隆产生的霍乱毒素的抗原性进行测定。结果(图 3) 可见霍乱弧菌 569B 的无细胞培养液和细胞裂解提取液发生明显的溶血。大肠杆菌 pMM-CT 克隆的无细胞培养液仅轻度溶血, 而细胞裂解液发生明显溶血。带有质粒 pBR322 的大肠杆菌, 不论无细胞培养液和细胞裂解液都不产生溶血。若在发生溶血的标本中, 预先加入抗霍乱毒素的血清进行阻断试验, 结果转为阴性, 表明检测的霍乱毒素抗原反应是特异的。

2. 神经节苷脂 GM1-ELISA 测定: 应用神经节苷脂-酶联免疫分析, 对霍乱弧菌 569B 和大肠杆菌 pMM-CT 克隆株培养物的无细胞培养液, 和细胞裂解提取液进行霍乱毒素抗原测定, 结果(图 4) 为阳性, P/N 值均大于 2.4, 如在标本中预先加入含抗霍乱毒素的血清进行阻断试验, 测定结果转为阴性, 作为对照的含 pBR322 质粒的大肠杆菌为阴性。

从以上两试验说明 pMM-CT 克隆, 在大肠杆菌中产生的霍乱毒素, 具有霍乱毒素的抗原性。

(三) 大肠杆菌产生的霍乱毒素的免疫原性

将 pMM-CT 克隆株细胞裂解提取液的霍乱毒素抗原, 肌肉注射或经口免疫家兔, 基础免疫 3 次, 间隔 10 天, 每次剂量为 300ng, 肌肉注射首次加弗氏完全佐剂, 随后为弗氏不完全佐剂, 经口免疫在灌注抗原前先灌注 0.1 mol/L NaHCO₃ 溶液 10 ml。基础免疫后 1 月给予一次加强免疫; 加强免疫后 7 天, 以霍乱毒素 10ng 进行小肠肠攀结扎攻击, 结果(图 5) 可见, 肌肉注射或口服免疫的家兔都产生一定的免疫

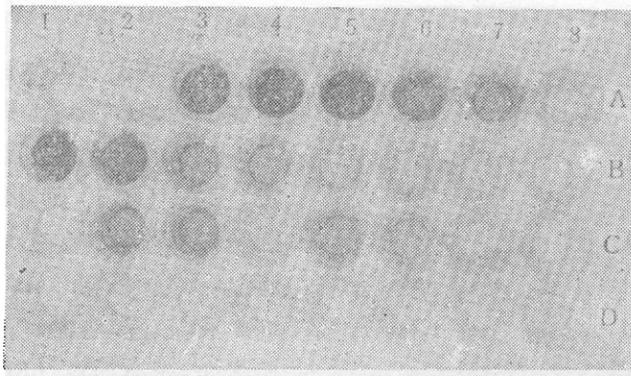


图4 霍乱毒素抗原的酶联分析试验

- A. 提纯的霍乱毒素
- B: 霍乱弧菌 569B. 1—4(S); 5—8(E)
- C. 大肠杆菌 RR1 (pMM-CT): 2—3(E);5—6(S)
- D. 抗霍乱毒素血清的抑制试验: 1—4 霍乱弧菌 569B; 5—8 大肠杆菌 RR1 (pMM-CT)

Fig. 4 ELISA test of cholerae toxin antigen

- A. Purified cholerae toxin
- B. *V. cholerae* 569B; 1—4(S); 5—8(E)
- C. *E. coli* RR1 (pMM-CT); 2—3(E); 5—6(S)
- D. Inhibitory test with anti-cholerae toxin serum, 1—4 *V. cholerae* 569B; 5—8 *E. coli* RR1(pMM-CT)

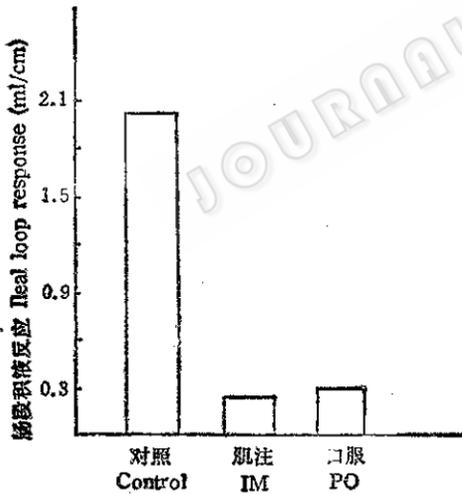


图5 RR1 (pMM-CT) 细胞裂解提取液免疫家兔后对霍乱毒素肠攀结扎攻击的反应

Fig. 5 Effect of immunization with RR1 (pMM-CT) extracts on ileal loop response to challenge with cholerae toxin

力,每个肠段能耐受 10ng 毒素的攻击,肠段平均积液为 0.2—0.3ml/cm,作为未免疫毒素抗原的家兔,肠段平均积液为 2.0ml/

cm,表明 pMM-CT 克隆株产生的霍乱毒素抗原具有免疫原性。

(四) 霍乱毒素基因在大肠杆菌中表达的特征

对大肠杆菌 RR1(pMM-CT) 和霍乱弧菌 569 B 培养物的无细胞培养液及细胞裂解提取液的毒性及抗原性进行了测定和比较,观察霍乱毒素基因在大肠杆菌中表达的特征(表 1)。从表 1 可见:

1. 霍乱毒素抗原基因在大肠杆菌中能产生霍乱毒素抗原,但 90% 保持在胞内,而霍乱弧菌产生的毒素抗原 90% 释放至细胞外培养液中。

2. 在大肠杆菌中霍乱毒素基因产生的毒素,其毒性可被胰酶激活,提示大肠杆菌产生的霍乱毒素是前体形式,需要另外的蛋白酶加工表达其全部毒力。

3. 在大肠杆菌 RR1(pMM-CT) 中,霍乱毒素基因拷贝数较霍乱弧菌 569B 要多,但表达的毒素抗原仅为霍乱弧菌产生的 1%。

表1 在液体培养中霍乱毒素的产生
Table 1 Production of cholera toxin in liquid culture

样品* Sample	毒素抗原** Toxin Anti- gen (ng/ml)	特异性毒力*** Specific Toxicity (ng/ml)
569B-S	1000	1000
569B-E	10	10
RRI(pMM-CT)-S	1	1
RRI(pMM-CT)-E	10	10
RRI(pMM-CT)E + Ab	0	0
RRI(pMM-CT)E + T	10	100
RRI(pBR322)E + T	0	0
RRI(pMM-CT) E + T + Ab	0	0

* 各菌株生长在 LB 培养基, S 为无细胞培养液标本, E 为细胞裂解提取液标本。E + Ab 为 100 μ l 标本加 1 μ l 兔抗毒素血清经 37 $^{\circ}$ C 30 min 处理的标本。E + T 为标本加胰酶 (最终浓度 200 μ g/ml) 37 $^{\circ}$ C 培育 15 min。

** ELISA 测定。

*** Y1 肾上腺细胞测定。

* Strains were grown in LB medium and supernatant(S) and cell extracts(E) were prepared. Extracts were treated with antibody (+Ab) by addition of 1 μ l of rabbit antitoxin per 100 μ l of Sample followed by incubation at 37 $^{\circ}$ C for 30 min. Extracts were treated with trypsin(+T) by addition of the enzyme to a final concentration of 200 μ g/ml followed by incubation at 37 $^{\circ}$ C for 15 min.

** Measured by ELISA.

*** Measured by Y1 adrenal cell assay.

讨 论

霍乱毒素基因在大肠杆菌中获得了表达, 它所产生的毒素的生物活性、抗原性与霍乱毒素一样, 能特异地被抗霍乱毒素血清所中和, 并具有免疫原性, 经肌肉注射或口服免疫家兔后, 产生一定的保护力。

霍乱毒素基因在霍乱弧菌中产生的毒素, 主要存在于细胞外, 而在大肠杆菌中表

达所产生的霍乱毒素, 主要是存在于细胞内。Person 与 Mekalanos^[7]认为大肠杆菌缺乏进行蛋白分泌的器官或不能识别霍乱毒素的分泌信号肽。我们将毒素基因 A⁺B⁺ 进行改造成 A⁻B⁺ 克隆, 在大肠杆菌中产生的毒素 B 亚单位抗原, 主要分泌在细胞外 (结果另文发表), 说明大肠杆菌能识别霍乱毒素多肽的分泌信号, 同时能对其加工输送至细胞外。因此蛋白分泌至胞外, 除了与分泌信号肽和宿主菌的分泌加工能力有关外, 还有其它的机制, 与结构蛋白的成分和分子大小也有关。

关于霍乱毒素基因在大肠杆菌表达低的原因, 与大肠杆菌不能有效识别霍乱毒素基因的启动子, 以及缺乏使毒素基因产生高表达的正调控因子有关^[8]。此外另一重要原因是大肠杆菌的蛋白酶对胞内毒素的降解破坏, 我们将大肠杆菌 RRI 的细胞裂解液加入霍乱弧菌所产生的毒素中, 于 37 $^{\circ}$ C 培育 30 min, 抗原活性丧失 90%, 因此蛋白酶对大肠杆菌胞内积聚的毒素之降解作用不可低估。

参 考 文 献

- [1] 马清钧等: 生物工程学报, 3: 24, 1987.
- [2] 唐红娣等: 家畜传染病, 3: 28, 1985.
- [3] Sack, D. A.: *Infect Immun.*, 11: 334, 1975.
- [4] Ahren, C. M.: *Infect. Immun.*, 38: 74, 1982.
- [5] Seraffim, M. et al.: *Infect. Immun.*, 24: 606, 1979.
- [6] Sack, D. A. et al.: *J. Clin. Microbiol.*, 11: 35, 1980.
- [7] Pearson, G. W. N. et al.: *PNAS, USA.*, 79: 2976, 1982.
- [8] Mekalanos, J. J.: *J. Bacteriol.*, 141: 570, 1980.

EXPRESSION OF GENE FOR THE *VIBRIO CHOLERAE* TOXIN IN *ESCHERICHIA COLI*

Ma Qingjun Zhou Jianguang Yu Xinqin Xu Yongqiang
(*Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing*)

The gene coding for cholerae toxin has been expressed in *E. coli*. The toxin is mostly cell-associated and has the same properties as cholerae toxin produced by *vibrio cholerae* in biological activity, antigenicity and immuno-

genicity. The toxicity can be activated by trypsin.

Key words

Cholerae toxin; Gene expression; *E. coli*