

霍乱弧菌脂多糖基因在大肠杆菌中的克隆

邵 煌 马清钧

(军事医学科学院生物工程研究所, 北京)

利用柯斯质粒 pHC 79 为载体, 构建了霍乱弧菌 178 (埃尔托生物型, 小川血清型) 染色体基因文库。经血清凝集试验及菌落固相 ELISA 检测, 从基因文库中筛选到 13 株能够表达霍乱弧菌脂多糖 O 抗原的阳性克隆。经热酚水法从转化子中提取并纯化的脂多糖能与霍乱弧菌抗血清发生特异性结合。针对重组柯斯质粒 PMM-VO 38 进行了多种酶切分析, 测定其分子量为 46kb。

关键词 霍乱弧菌; 基因文库; 脂多糖; O 抗原

在霍乱多种菌体成分中, 脂多糖是明确的保护性抗原^[1]。它作为细胞壁外膜的结构成分, 包括类脂 A-核心多糖-O 抗原三个组成部分。其中, O 抗原决定血清特异性, 在霍乱的诊断、分型及特异性免疫等方面起着重要作用。脂多糖抗血清能够抑制霍乱弧菌对小肠粘膜的粘附, 并具有破坏霍乱弧菌的能力。目前认为编码脂多糖的基因是以基因簇的形式存在于染色体上^[2], 但对其结构、表达调控仍缺乏了解。1986 年, Manning 等首次将霍乱弧菌脂多糖 O 抗原在大肠杆菌中克隆并表达成功^[3], 为在分子水平上研究脂多糖开辟了道路。本文报道霍乱弧菌 178 染色体基因文库的构建及脂多糖 O 抗原克隆株的鉴定。

材 料 和 方 法

(一) 材料

1. 菌株: 霍乱弧菌 178 (埃尔托生物型, 小川血清型), 由卫生部药品生物制品检定所提供; *E. coli* HB 101; *E. coli* RR1 (pHC 79); *E. coli* BHB 2688 及 *E. coli* BHB 2690 均由中国医学科学院基础医学研究所提供。

2. 工具酶: 限制性内切酶 BamHI、

Hind III、Sau 3A、SalI、XhoI、EcoRI、SstI、PstI 和 XbaI 为华美生物工程公司产品。CfoI、AluI、AvaI、HhaI、HpaI、Hinc II、Hac III 和 Hae III 为 Biolab 公司产品。牛肠碱性磷酸酶是 Boehringer 公司产品。T4 DNA 连接酶为华美生物工程公司产品。

3. ELISA 有关试剂: 霍乱 O 多价抗血清为卫生部药品生物制品检定所产品。羊抗兔酶标抗体 (辣根过氧化物酶标记的 IgG), 卫生部北京生物制品研究所产品。硝酸纤维素膜为上海第十制药厂产品。TMB (3,3',5,5'-4 甲基联苯胺) 为 Sigma 公司产品。牛血清白蛋白为 Serva 公司产品。

(二) 方法

1. DNA 的制备:

(1) 质粒 pHC 79 的提取和纯化: 采用碱法裂解提取质粒, 并按照 CsCl/EB 密度梯度离心法进行纯化。

(2) 染色体 DNA 的提取: 离心收集 200 ml 霍乱弧菌培养物 (OD \approx 0.3—0.4) 中的菌体, 悬浮于 4ml Tris-EDTA 溶液 (50 mmol/L Tris·Cl, 1mmol/L EDTA)

本文于 1989 年 1 月 1 日收到。

加 8mg 溶菌酶冰浴 10 分钟。加 10% SDS 0.4 ml, 置室温 20 分钟, 然后用 RNase A 500 μ g 经 50℃ 水浴 1 小时。经饱和酚 (Tris pH 7.4) 及氯仿抽提后, 乙醇沉淀, 用玻棒缠出胶状染色体。

2. 包装蛋白的制备: 参照 Scalengh^[4] 方法, 采用大肠杆菌 BHB 2688 和 BHB 2688 分别制备了超声处理提取物 (SA) 和冻融裂解液 (FTL)。

3. 连接和包装反应:

(1) 连接反应: 0.6 μ g CIP 处理后的 pHC 79 加入 1 μ g 30—50 kb 霍乱染色体片断, 10 倍连接缓冲液 2 μ l, 补充灭菌水至总体积 20 μ l, 加入 T4 DNA 连接酶 5 u, 12℃ 作用 12 小时。

(2) 包装反应: 取 15 μ l 冻融裂解物, 待融解后加至尚未融解的超声处理物中, 再加入 5 μ l 已连接的底物 DNA, 混匀后置 22℃ 2 小时, 加入 0.5—0.8 ml SM 溶液及 20 μ l 氯仿, 4℃ 保存。

4. 玻片凝集试验: 将霍乱 O 多价抗血清用生理盐水 1:20 倍稀释, 滴 10 μ l 于载玻片上, 用灭菌牙签或接种环沾少许菌体与抗血清混匀, 1—2 分钟内出现凝集颗粒者为阳性, 超过 3 分钟仍无凝集颗粒出现, 呈均匀状者为阴性。

5. 菌落固相 ELISA: 用灭菌牙签将待检菌点种于硝酸纤维素膜上, 置膜于含琼脂 LB 培养基的平皿上, 37℃ 培养 2—3 小时后取出。将霍乱 O 多价抗血清用 3% 牛血清白蛋白生理盐水溶液稀释至 1:2000, 加于膜上, 37℃ 作用 1 小时, 用 20 mmol/L Tris-Tween 20 缓冲液冲洗 3 分钟。将酶标抗体作 1:100 倍稀释, 加在膜上, 37℃ 作用 1 小时, 再用 20 mmol/L Tris-Tween 20 缓冲液冲洗 3 分钟。将硝酸纤维素膜 (菌落面) 贴在含底物 TMB 的凝胶上, 室温放置 20 分钟后可见显色反

应, 阴性者无色, 阳性者呈蓝色斑。

6. 脂多糖提取及斑点免疫酶标分析: 基本参照 Westaphal^[5] 方法进行脂多糖的提取。将提取的脂多糖悬液 2 μ l 滴在硝酸纤维素膜上, 加 1:100 稀释的霍乱 O 多价血清, 37℃ 作用 2 小时后, 用 20 mmol/L Tris-Tween 20 冲洗两遍。将 1:100 稀释的酶标抗体加在膜上, 37℃ 作用 2 小时, 再以 20 mmol/L Tris-Tween 20 冲洗两遍。配制 TMB 底物凝胶进行显色反应。

结 果

(一) 基因文库的构建

以柯斯质粒 pHC 79 为载体构建基因文库的主要过程如图 1。

1. 30—50 kb 染色体片断的制备: 用限制性内切酶 *Sau* 3A 对霍乱弧菌 178 染色体 DNA 进行部分酶切, 以获得 30—50 kb 范围的 DNA 片断。结果 (图略) 显示, 采用酶量 0.015—0.03 u/ μ g DNA 为佳。在此基础上进行大量部分酶切, 电泳后回收片断。

2. 载体 pHC 79 的制备: pHC 79 经限制性内切酶 *Bam*HI 消化后, 用 CIP 处理脱去 5' 端磷酸以防自身环化。结果 (图 2) 表明脱磷效果较为完全。

3. 连接、包装及感染: 将分离到的 30—50 kb 染色体片断与经过脱磷的 pHC 79 连接重组, 通过体外包装形成噬菌体颗粒, 感染大肠杆菌 HB 101 后获得 644 个转化子。经随机快速质粒抽提鉴定, 表明这些转化子确实含有大小不等的大质粒。所获得的重组子数超过理论值 (2.86×10^3)^[6], 达到了构建霍乱弧菌染色体基因文库的要求。

(二) 霍乱弧菌脂多糖 O 抗原基因克隆的鉴定和分析

1. 玻片凝集试验: 利用这一方法对

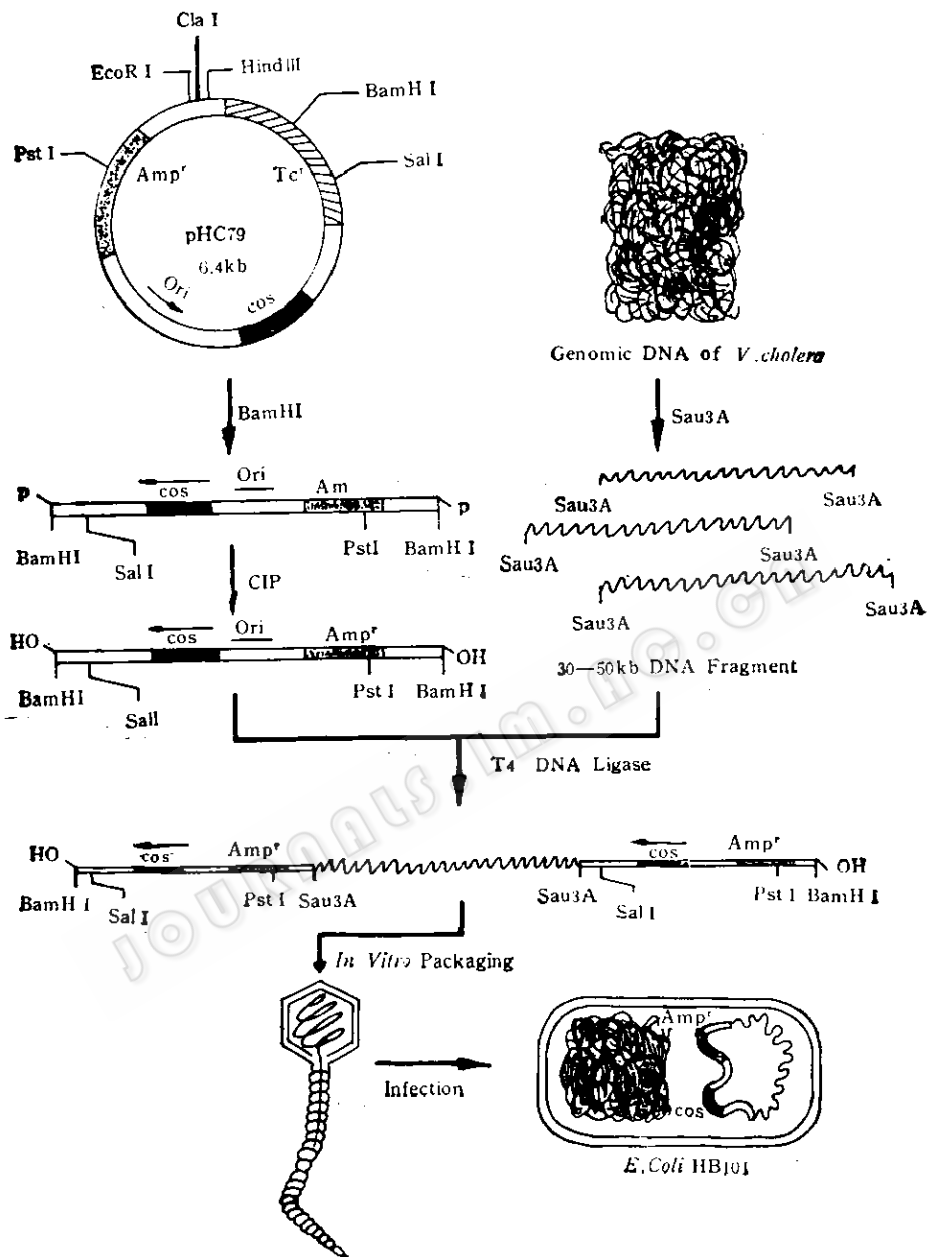


图1 基因文库的构建过程

Fig. 1 Construction of genomic library

644 个转化子进行了筛选。选择霍乱弧菌 178 为阳性对照, 大肠杆菌 HB101 为阴性对照, 与重组克隆的各菌株同时检测。凡阳性者加设生理盐水作凝集对照试验, 以排除自凝的可能。结果获 13 个阳性菌株。

2. 菌落固相 ELISA: 对凝集阳性的菌株用此方法作进一步鉴定。结果发现阳性对照霍乱弧菌 178 及凝集试验阳性的克隆株呈蓝色斑点, 阴性对照大肠杆菌 HB101 不显色。



图2 鉴定脱磷效果

1. BamHI 消化未经 CIP 脱磷的 pHC79 与 T4 DNA 连接酶作用下发生重组; 2. BamHI 消化未经 CIP 脱磷的 pHC 79; 3. 脱磷后 pHC 79 与 BamHI 消化的 DNA 在 T4 DNA 连接酶作用下重组; 4. 脱磷后 pHC 79 与 BamHI 消化的 DNA; 5. 脱磷后 pHC 79 在 T4 DNA 连接酶作用下未见重组; 6. 脱磷后 pHC 79

Fig. 2 Test of dephosphorylation

4. pHC 79 cleaved with BamHI but not treated with CIP + T4 DNA ligase; 2. pHC 79 cleaved with BamHI but not treated with CIP; 3. CIP-treated pHC 79 + DNA cleaved with BamHI + T4 DNA ligase; 4. CIP-treated pHC 79 + DNA cleaved with BamHI; 5. CIP-treated pHC 79 + T4 DNA ligase; 6. CIP-treated pHC 79

3. 限制酶的酶切分析: 从经过鉴定的以上菌株中随机选择一株, 定名为 PMM-VO 38, 分离重组质粒, 采用 Bam HI、Hind III、Sall、SstI、XbaI Aval、HhaI EcoRI、PstI、CfoI、AluI、HpaI、Hinc II 和 Hae III 等限制性内切酶进行酶切分析。结果表明, 除 Bam HI 和 SstI 具有三个酶切位点及 XbaI 存在四个酶切位点

外, 其它酶均呈现五个以上酶切位点。此外 BamHI 酶切后无法获得 6.4kb 的 pHC 79 片断。在此基础上, 根据电泳图, 运用 Southern^[7] 的公式计算, 确定重组柯斯质粒 PMM-VO 38 的分子量为 46kb。

4. 脂多糖斑点免疫酶标分析: 将脂多糖悬液滴于硝酸纤维素膜上进行固相 ELISA。结果(图 3)显示, 霍乱弧菌 178 及含重组柯斯质粒的 PMM-VO 38 和 PMM-VO 40 克隆株的脂多糖呈蓝色斑, 大肠杆

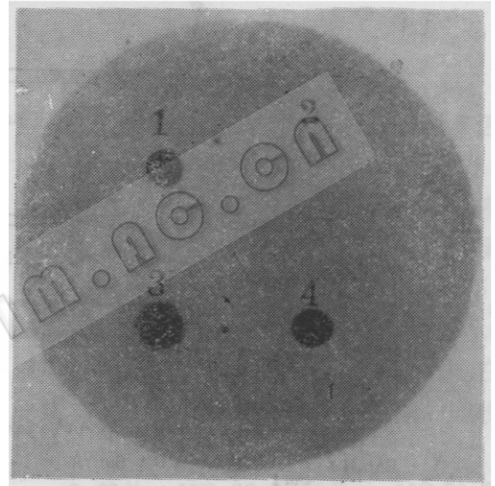


图3 脂多糖斑点免疫酶标分析

1. 霍乱弧菌 178; 2. 大肠杆菌 HB 101; 3. 重组质粒 PMM-VO 38; 4. 重组质粒 PMM-VO 40,

Fig. 3 LPS solid phase ELISA

1. *V. Cholera* 178; 2. *E. coli* HB 101; 3. PMM-VO 38; 4. PMM-VO 40.

菌 HBI01 脂多糖不显色。进一步证明了阳性克隆株能够表达霍乱弧菌特异的菌体 O 抗原。

讨 论

通过对脂多糖合成不同步骤发生障碍的一些突变体的分析, 推测脂多糖基因簇是在一定条件下编码了一系列酶, 这些酶利用细胞内糖、脂肪酸、磷酸等物质合成并装配成终产物。因此脂多糖实际是二级基

因产物^[8], 推测其结构及表达调控系统较为复杂。我们为了更为有效地进行脂多糖基因结构的研究, 以高容量的柯斯质粒 pHC 79 为载体, 通过体外包装的途径构建基因文库。通常应用 DNA 探针对重组基因克隆进行杂交鉴定, 在缺乏合适特异的探针情况下, 若重组克隆能够表达, 则可采用免疫探针对其产物进行鉴定。根据 Manning 等的实验结果^[3], 在大肠杆菌中, 霍乱弧菌脂多糖基因能够依靠自身启动子获得表达。因此我们采用了免疫探针对重组克隆进行筛选。由于免疫探针是间接分析, 故应选择敏感性高、特异性强的方法, 并设置对照, 严格控制试验条件以防假阳性的出现。本实验采用凝集试验, 菌落固相酶联及脂多糖斑点免疫酶标分析三个试验配合, 从基因文库中筛选到含霍乱弧菌脂多糖基因组的克隆, 在大肠杆菌中确能表达脂多糖抗原。另外对重组质粒 PMM-VO 3 的酶切分析发现, BamHI 酶切后不能产生 6.4 kb 的载体 pHC 79, 这是由于同裂酶效应引起。因为在构建基因文库的过程中, 染色体 DNA 是用 Sau 3A 进行

部分酶切的, 此酶识别四核苷酸序列 ↓GATC, 而载体 pHC 79 用 BamHI 消化, 它可识别六核苷酸序列 G↓GATCC, 当两种末端连接重组后, 形成的新位点不一定能被 BamHI 所识别。

本实验获得的表达霍乱弧菌脂多糖 O 抗原的重组克隆, 为研究脂多糖基因的结构和功能及未来霍乱新型疫苗的构建奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Osborn, M. J. et al.: *Annu. Rev. Microbiol.*, 34: 369—422, 1980.
- [2] Park, C. et al.: *Genetics*, 91: 191—214, 1979.
- [3] Manning, P. A. et al.: *Infect Immun.*, 53: 272—276, 1986.
- [4] Becker, A. et al.: *Pro. Natl. Acad. Sci. USA*, 72: 581—585, 1975.
- [5] Westphal, O.: *Methods in Carbohydrate Chemistry*, (ed. R. C. Whistler), Academic Press, New York, p. 83, 1965.
- [6] Svennerholm, A. M. et al.: *Infect Immun.*, 13: 735—740, 1976.
- [7] Southern, E.: *Methods in Enzymology* (ed. R. Wu), Academic Press, New York, 68: 152, 1979.
- [8] Hitchcock, P. J. et al.: *J Bacteriol.*, 166: 699—750, 1986.

MOLECULAR CLONING OF LIPOPOLYSACCHARIDE GENES OF THE *VIBRIO CHOLERA*E IN *E. COLI* HB101

Shao Huang Ma Qingjun

(Institute of Biotechnology, Academy of Military

Medical Sciences, Beijing)

A genomic library of the *V. cholerae* 178 (Eltor biotype, Ogawa serotype) was constructed by using cosmid pH79 as a cloning vector. We screened the library with immune agglutination test and colonies solid phase ELISA. 13 positive recombinants which could express the O antigen of the *V. cholerae* lipopolysaccharide (LPS) were acquired. The LPS was then extracted from a positive recombinant PMM-VO38 by using hot phenol-water method. It was found that purified LPS

specifically reacted to antiserum against the *V. cholerae*. The restriction endonuclease analysis showed that the molecular weight of the recombinant cosmid PMM-VO38 was about 46kb.

Key words

Vibrio cholerae; Genomic library; Lipopolysaccharide; O antigen