

痢疾志贺氏 I 型菌毒素基因的克隆与表达

李丰生 黄培堂 芮贤良 黄翠芬

(军事医学科学院生物工程研究所, 北京)

从痢疾志贺氏 I 型菌 W30864 株中提取染色体 DNA, 用 EcoRI 完全酶解, 电泳回收 3—7kb 的片段, 与载体 pUC19 质粒连接重组, 用大肠杆菌痢疾样毒素 (SLT) 基因探针进行筛选, 得到了阳性重组子。实验表明志贺氏毒素基因是位于约 4.5kb 的 EcoRI 片段上, 包含毒素的 A 亚单位基因和 B 亚单位基因。在对克隆株的毒性测定中, 采用 HeLa-S3 细胞试验, 证明所产生的痢疾毒素具有杀死细胞的能力。此毒素可引起肠积水和充血, 可使小鼠肢体麻痹并致死, 克隆重组株的痢疾毒素产量是亲本野生株 W30864 的 16 倍。此外, 实验中还对克隆株和产生 SLT 的菌株的毒素产量做了比较。

关键词 痢疾志贺氏菌; 痢疾毒素; 基因克隆

痢疾毒素 (Shiga-Toxin, ST)^[1] 是由志贺氏 I 型菌产生的一种强烈的蛋白毒素。此毒素由 A、B 两亚单位组成, A 亚单位的分子量约为 32000, B 亚单位的分子量约为 7700, 它们的作用不同, B 的功能是与受体结合, 而 A 则是直接的毒性活力中心, 可破坏细胞内的 28s rRNA, 从而抑制蛋白质的合成, 使细胞致死。与 ST 相关的具有高度同源性的是痢疾样毒素 (Shiga-Like-Toxin, SLT)^[2], 主要是由一些致病的大肠杆菌产生, 其基因携带者是一些温和的噬菌体。此外某些痢疾弗氏菌 (*S. flexneri*) 也产生 SLT。到目前为止, 对 ST 的毒性机理已经了解的比较深入, 但对其在临床上引起疾病所占的地位还不很明确, 因为临床中的痢疾菌和产生 SLT 的大肠菌一般都带有强烈的侵入细胞的能力, 从而在一定程度上掩盖了毒素的致病作用, 所以目前还需对 ST 的致病地位做进一步的研究。ST 具有较强的免疫性, 但是否具有免疫保护作用现在还没有定论。国外在 80 年代用从野生株提纯的痢疾毒素做了许多生化及毒理方面的实验,

发现 ST 与 SLT 基本类同, J. W. Newland 等在 1986 年首先克隆 SLT 基因成功, 以后用此基因做探针, 也相继从不同的志贺氏菌株克隆了痢疾毒素基因^[3,4]。本实验主要是利用 ST 与 SLT 有很大的同源性这一特点, 用 SLT 的部分基因片段做为探针, 对野生痢疾志贺氏 I 型菌 W30864 的染色体酶解, 用 pUC19 做为载体, 克隆了 ST 的基因片段, 并获得了表达, 从而为进一步研究 ST 的作用, 组建痢疾菌苗, 以及其它的一些相关研究打下了基础。

材料和方法

(一) 菌株、细胞株及质粒

E. coli JM83 (pUC19)

E. coli RRI (pBR322)

E. coli H19 SLT (kindly provided by J. W. Newland)

E. coli 933 SLT (kindly provided by J. W. Newland)

本文于 1990 年 3 月 15 日收到。

E. coli JM83 (pJN37-19) (kindly provided by J. W. Newland, containing part of SLT gene)

S. dysenteriae W30864 (kindly provided by H. Watanabe, starting strain for ST gene cloning)

S. dysenteriae 502 (clinical strain from 302 army hospital)

E. coli JM83 (recipient strain)

Hela-S3 (stored in our laboratory)

(二) 培养基

常规细菌培养都用 LB 培养基, Hela 细胞培养采用 DMEM 培养基。

(三) DNA 的抽提与纯化

质粒 DNA 的粗制品是参照 Birnboim^[5]的方法获得, 质粒 DNA 的纯化采用 CsCl 密度梯度超离心法, 染色体 DNA 的提取参照 T. J. Silhavy^[6]的方法。

(四) 限制性内切酶消化和 DNA 片段的连接

所用各种酶均购自华美生物工程公司, 酶切及连接均按厂方说明书进行。连接反应中, 染色体经 EcoRI 酶切后回收 DNA 片段 2.0 μg, 经 CIP 处理的载体 pUC19 1.0 μg, T4 DNA 连接酶 5 单位, 12℃ 下过夜, 用于细菌的转化。

(五) 细菌的转化

参照 S.N. Cohen^[7]的方法, 用 Ca²⁺处理受体菌得到感受态细胞。

(六) SLT 基因探针的制备

对质粒 pJN37-19 用 Hind III 酶解后, 琼脂糖凝胶电泳回收约 1.2kb 的 SLT 基因片段, 此片段含 SLT A 基因 90%, B 基因 100%, 参照陈锦光等介绍的方法制备基因探针。

(七) Hela 细胞测定 ST

参照 M. K. Gentry 和 J.M. Dalrymple^[8]的方法加以改进。首先将待测菌用

LB 培养基过夜培养, 4℃ 离心后, 收集菌体, 用生理盐水悬浮后, 超声波破碎三次, 每次 30 秒, 破碎混合物在 4℃ 下, 12 000 r/min 离心 10 分钟, 弃去沉淀物, 收集上清, 然后用孔径为 0.45 μm 的微孔滤器过滤, 这种无菌上清液即做为 Hela 细胞毒性测定的样品液, 以及下述兔肠结扎试验和小鼠神经毒试验的样品液。Hela 细胞测定时, 首先用含小牛血清 10% 的 DMEM 培养基将 Hela 细胞复苏, 传代培养良好后, 调整细胞浓度在 5000—10000 个/ml 后, 各取 200 μl 加入到 40 孔或 96 孔的细胞培养板中, 同时加入各待测样品 20 μl, 用透明胶带封好后, 置于普通 37℃ 温箱培养 12—18 小时, 在倒置显微镜下观察细胞被杀死的情况, 以 50% 细胞被杀死做为判定有毒的标准。

(八) 兔肠结扎试验

对 2—3kg 的成年健康大耳白兔, 首先用葡萄糖水喂二天, 使其肠道粪便排空, 然后做腹腔切开手术, 取出其回肠段用线结扎, 每段 3—5cm, 两结扎段间隔 1—2 cm, 在其结扎段内注入待测样品 1ml, 腹腔缝合后, 饲养 15—20 小时, 取出结扎肠段, 观察肠积水、充血和组织坏死等症状。

(九) ST 对小鼠的神经中毒作用的测定

取体重 10—16g 的小鼠, 在后肢上部肌肉内注入待测样品 0.2ml, 饲养并观察小鼠中毒的发展情况。

(十) 不同菌株 ST 产量的比较

采用上述 Hela 细胞测毒的方法, 将不同稀释度的样品, 加到微孔板中的 Hela 细胞液中, 做 ST 产生的半定量测定。

结 果

(一) 质粒 pMGC001 的构建

构建程序如图 1 所示。

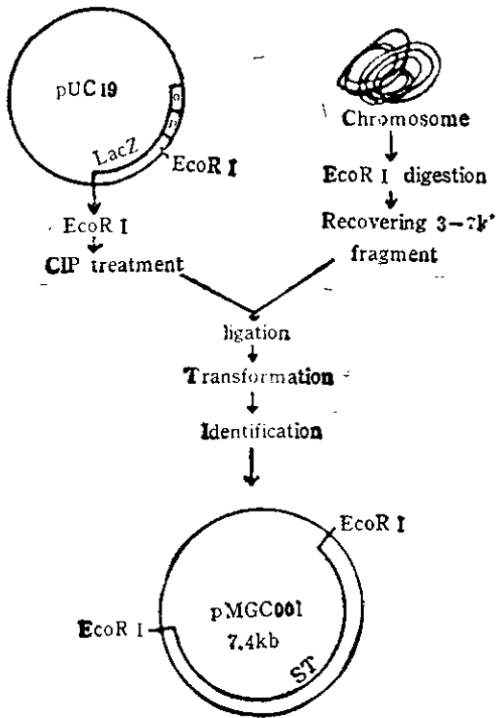


图1 重组质粒 pMGC001 的构建示意图

Fig. 1 The stratagem for the cloning of shiga-toxin gene

野生志贺氏 I 型菌 W30864 的染色体 DNA 经 EcoRI 酶解后, 进行琼脂糖凝胶电泳, 经用 SLT 基因探针做 Southern 杂交, 确定含有 ST 的基因片段大小约为 4—5kb, 然后对染色体 DNA 进行大规模酶解, 电泳回收 3—7kb 的 DNA 片段, 与 CIP 处理的 pUC19 的 EcoRI 酶解片段连接重组, 转化大肠杆菌 JM83, 挑选白色的转化子 (用麦康凯氨苄青霉素平板筛选), 做进一步的 SLT 探针菌落杂交筛选和 Hela 细胞的毒性测定, 得到了阳性的重组子, 其重组质粒定名为 pMGC001。电泳测定插入的含有 ST 基因的 DNA 片段约为 4.5kb, 对此重组子进一步抽提其质粒 DNA 做 DNA 点杂交, 也证实含有 ST 基因片段。此外对质粒 pMGC001 还做了 Hind III、Bgl II 和 EcoRI 的单双酶切实验。

(二) 克隆菌产生 ST 具有细胞毒作用

按照上述方法, 采用相同的处理步骤, 同时对获得的克隆株、亲本野生株 W30864、志贺氏 I 型菌 502 和产生 SLT 的大肠杆菌致病株, 做细胞毒试验测定, 阴性对照采用含 pUC19 质粒的大肠杆菌 JM83 和含质粒 pBR325 的大肠菌 RRI, 结果克隆株 *E. coli* JM83 (pMGC001) 和阳性对照 *S. dysenteriae* W30864、*S. dysenteriae* 502 和 *E. coli* 033 菌的样品可杀死 Hela 细胞, 为细胞毒阳性, 上述阴性对照菌的样品不影响 Hela 细胞的生长, 为细胞毒阴性, 见图 2。

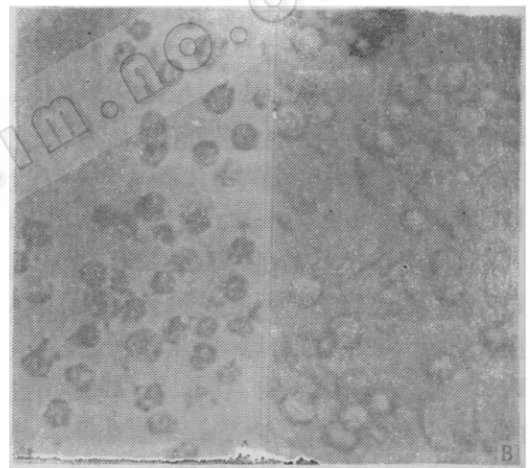


图2 ST 克隆株 *E. coli* JM83 (pMGC001) 的细胞毒作用

Fig. 2 The cytotoxic effect of cloned ST strain *E. coli* JM83 (pMGC001)

- A: Tested with the sample of *E. coli* JM83 (pMGC001)
 B: Tested with the sample of *E. coli* JM83 (pUC19) (Negative control)

(三) 克隆菌产生 ST 具有肠毒作用

按上述的兔肠结扎试验方法, 将克隆菌 *E. coli* JM83 (pMGC001) 和阳性对照 *S. dysenteriae* W30864、*E. coli* 933 以及阴性对照 *E. coli* JM83 (pUC19) 的样品制备液, 注入结扎的小肠段内, 12 小

时后观察结果,证明含有 ST 的克隆菌可引起肠段积水、肠充血和轻微的组织坏死(图 3),在重复的实验中,表明此 ST 毒素引起肠积水的能力低于大肠菌热敏毒素(LT),而造成肠充血,组织坏死的能力大于 LT 毒素。

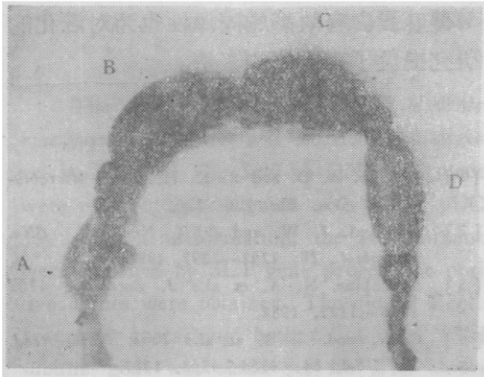


图 3 兔肠结扎实验结果

Fig. 3 The results of rabbit ileal loop test

- A: Sample of *E. coli* JM83 (pUC19)
(Negative control)
B: Sample of *E. coli* 933 (Positive control)
C: Sample of *E. coli* JM83 (pMGC001)
(ST cloned strain)
D: Sample of *S. dysenteriae* W30864 (Origin strain)

(四) 克隆菌产生 ST 的神经毒效应

按材料和方法中所述步骤制备样品液,克隆菌 *E. coli* JM83(pMGC001),阴性对照 *E. coli* JM83 (pUC19) 以及阳性对照 *E. coli* 933 的 50ml 过夜培养物,离心后用生理盐水悬浮至 3ml,超声波破碎后,用小滤器过滤除菌,然后各取 0.2ml 注入小鼠的后肢肌肉内,克隆菌 *E. coli* JM83 (pMGC001) 的样品引起的症状最迅速(因为含有较多的 ST),约 3 小时后使小鼠精神不振,10 小时后引起小鼠后肢麻痹,进一步小鼠不能行动,呼吸困难,约 20 小时后小鼠致死。阴性对照 *E. coli* JM83 (pUC19) 的样品不引起任何异常症

状。*E. coli* 933 的样品引起的症状类似于克隆菌 *E. coli* JM83 (pMGC001),但病情的发展缓慢一些。

(五) 克隆菌产生 ST 的产量测定

采用 HeLa 细胞进行半定量测定,对各测定菌的过夜培养物 50ml 调整 $OD_{600} \approx 1$,取相同的体积 20ml 离心后,用生理盐水悬浮到 3ml,用超声波破碎,经除菌后,用无菌生理盐水稀释,各取不同的稀释度样品 20 μ l 加入到含 200 μ l 细胞悬浮液的微孔中,37 $^{\circ}$ C 培养 12—18 小时,在显微镜下观察细胞致死情况。实验中测定了克隆株 *E. coli* JM83 (pMGC001)、亲本株 *S. dysenteriae* W30864,另一产毒株 *S. dysenteriae* 502 和 *E. coli* 933,阴性对照菌采用 *E. coli* JM83 (pUC19) 和 *E. coli* RRI (pBR325),图 4 说明克隆株比亲本株的 ST 产量提高了 16 倍。

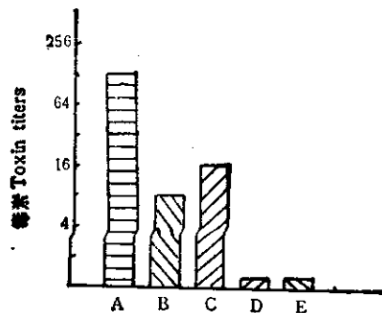


图 4 不同菌株毒素产量的比较

Fig. 4 The comparison of toxin production of different strains

- A: *E. coli* JM83 (pMGC001)
B: *S. dysenteriae* W30864
C: *S. dysenteriae* 502
D: *E. coli* 933
E: *E. coli* JM83 (pUC19)
F: *E. coli* RRI (pBR325)

讨 论

志贺氏毒素主要是由志贺氏 I 型菌产生的一种蛋白毒素,由于毒性作用的广泛

和强烈,因此一直倍受人们注意,从本世纪初发现痢疾杆菌后不久,就怀疑志贺氏 I 型菌能产生一种毒素,但一直未证实,直到 80 年代初由于提纯技术的发展,才在其化学组成、性质和作用机理方面有了较深入的认识,并且发现其 A 亚单位与一种蓖麻蛋白 (*ricin*) 的 A 亚单位结构及作用机理很相似,都具有切断真核细胞内 28s rRNA 的酶活力,从而使蛋白合成系统破坏,导致细胞死亡。ST 在这一方面与常见的腹泻大肠菌的毒素,如热敏肠毒素(LT)和热稳定肠毒素(h-ST)不同,这些毒素是由于激活细胞的 cAMP 或 cGMP 系统,而导致细胞电解质平衡的破坏,所以临床上的症状主要是水样腹泻,而 ST 因为具有的毒性更为广泛,所以推测其致病作用可能要大于大肠杆菌毒素,但以前由于缺乏 ST 单效应的菌株,所以在这一方面没有更深入的研究,对其致病地位也还未做定论,我们得到的克隆株可为在这一领域的研究提供基本材料。

本实验克隆的 ST 基因片段主要通过核酸水平的分子杂交和通过测定各种已知的 ST 的生物活性而得以确定,由于其在菌体蛋白中所占比例较小,所以还未从蛋

白水平上通过电泳直观的证实,目前这一提纯工作尚在进行中,用提纯的毒素可在蛋白及免疫学性质方面做进一步的研究。此外还可以对克隆株引入大肠杆菌粘附素基因,从而观察这两种成分的协同致病作用。进一步也可研究 ST 是否在免疫保护、构建疫苗方面可能占有一席之地。ST 与蓖麻蛋白有效高的同源性也为对进化的研究提供了有价值的实例。

参 考 文 献

- [1] O'Brien, A. D. and R. K. Holmers: *Microbiological Rev.*, 51: 206—220, 1987.
- [2] Newland, J. W. and R. T. Neill: *J. Clin. Microbiol.*, 26: 1292—1297, 1988.
- [3] Strockbine, N. A. et al.: *J. Bacteriol.*, 170: 1116—1122, 1988.
- [4] Calderwood, S. B. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 4364—4368, 1987.
- [5] Birnboim, H. C. and J. Doly: *Nucleic Acid Res.*, 7: 1513—1517, 1979.
- [6] Silhavy, T. J. et al.: *Experiments with Gene Fusion*, CSH Laboratory, CSH, NY, 1984.
- [7] Cohen, S. W. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69: 2110, 1973.
- [8] 陈锦光、李淑琴: *微生物学报*, 25: 119—123, 1985.
- [9] Gentry, M. K. and J. M. Dalrymple: *J. Clin. Microbiol.*, 12: 361—366, 1980.

CLONING AND EXPRESSION OF SHIGA-TOXIN GENE FROM *SHIGELLA DYSENTERIAE* TYPE I

Li Fengsheng Huang Peitang

Rui Xianliang Huang Cuifen

(*Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing*)

The chromosomal DNA of *S. dysenteriae* type I W30864 was isolated and digested by *EcoRI*. The 3—7 kb DNA fragments were recovered and ligated with vector pUC-19. After transformation, the recombinants were screened by SLT gene probe. The positive clones were obtained. The cloned *EcoRI* fragment containing both ST-A and ST-B subunit gene was about 4.5 kb. The cloned ST strain was also detected by Hela-S3 cell for cytotoxicity, and detected by rabbit ileal loop test for enterotoxicity. Besides, the clo-

ned strain showed the neurotoxic activity when experimented with mouse. The production of shiga toxin in the cloned strain was 16 times of that of its parent strain *S. dysenteriae* W30864. The production differences between ST producing stains and SLT producing strain was also tested in our experiment.

Key words

Shigella dysenteriae; Shiga-Toxin; Gene cloning