

表达毒素源性大肠杆菌定居因子抗原 CS6 的一组基因的克隆*

杨晓 张光山 刘纯杰** 张蓓宁 陈添弥 黄翠芬

(军事医学科学院生物工程研究所 北京 100850)

人源毒素源性大肠杆菌 (Enterotoxigenic *E. Coli* ETEC) 是引起婴幼儿及旅游者腹泻的主要致病菌。ETEC 的致病因子包括定居因子抗原 (Colonization factor antigens, CFAs) 和肠毒素。大多数 ETEC 菌株均能产生抗原特异的菌毛, 介导细菌与宿主小肠粘膜表面并在粘膜表面上受体的结合, 使得细菌能定植于粘膜表面并在粘膜的功能性清除中存活下来。已经报道的定居因子抗原包括 CFA/I、CFA/II、CFA/III、CFA/IV (PCF8775)、PCFO9 和 PCFO159 等。CFA/I 和 CFA/III 均由单一的菌毛亚基构成, CFA/II、CFA/IV 则由多种表面抗原 (colisurface antigen, CS) 复合而成。所有的 CFA/IV 阳性菌株均表达 CS6 抗原, 其中有些同时表达 CS4 或 CS5 抗原。CS4 和 CS5 都是直径 6~7nm 的菌毛, 能引起人和牛血红细胞的甘露糖抗性的凝集反应 (MRHA)。迄今为止, 没有观察到 CS6 明显的菌毛结构, CS6 也不能引起 MRHA 阳性反应。然而动物实验的结果表明, CS6 是 CFA/IV 复合抗原中一种对定居作用最重要的抗原^[1]。本研究组已经通过分子克隆的手段获得了能分别表达 CFA/IV^[2] 和 CS3^[3] 抗原的重组菌株, 用于人源 ETEC 疫苗的研究。本文报道了表达 CS6 菌毛抗原的 DNA 片段的克隆, 并用免疫吸附制备的 CS6 抗血清测定了重组菌株表达的菌毛蛋白。

1 材料和方法

1.1 细胞和培养基

实验中所用菌株及其特性详见表 1。细菌通常在 LB 培养基中生长。需检测菌毛抗原时, 细菌均在 CFA^[4] 平板上培养。

表 1 试验用菌株

菌株	血清型	定居因子	肠毒素
E519/66A	O148:H28	CS6	LT,ST
E11881A	O25:H42	CS4,CS6	LT,ST
E8775	O25:H42	CS4,CS6	LT,ST
E44813	O78:H11	CFA/I	LT,ST
E44815	O6:H16	CS1,CS3	LT,ST
E19449	O139:H28	CS3	LT,ST

1.2 CS6 免疫血清的制备

将 CFA 斜面培养的大肠杆菌 E519166A 用甲醛处理后, 肌注免疫家兔, 每次 $1.1 \times 10^8 \sim 3.7 \times 10^8$ 细菌, 每隔 3 日免疫一次, 共免疫七次, 至凝集效价 10^4 以上采血。制备的血清用 CFA 平板上 22℃ 培养的大肠杆菌 E11881A、E8775、E19449、E519166A、E44813 以及 37℃ 培养的 DH5 α 、RR1 反复

* 本课题为国家“863”资助项目。

** 中国人民解放军农牧大学。

本文于 1994 年 6 月 6 日收到。

吸附,直至抗血清不与这些细菌发生凝集反应。该血清用于筛选 CS6 抗原阳性的克隆以及 Western-blot 分析。

1.3 CS6 定居因子抗原的分子克隆

大质粒的提取、纯化, DNA 的连接和质粒的转化参照文献[4]方法进行。重组子在 CFA 培养基上 37℃ 培养,通过菌落原位 ELISA 方法筛选 CS6 抗原阳性的克隆。

1.4 菌落原位 ELISA (dot-ELISA)

将重组子点种于 CFA 培养基表面的硝酸纤维素膜上, 37℃ 培养 3h。揭下的膜在 TBST 缓冲液 [10mmol/L Tris-HCl (pH8.0), 150mmol/L NaCl, 0.05% Tween 20] 中漂洗后,在含 1% BSA 的 TBST 中封闭过夜,然后参照文献[5]方法进行测试。

1.5 重组质粒的限制性内切酶图谱分析

选择载体上具单酶切位点或双酶切位点的限制性内切酶对重组质粒进行完全酶解, 1% 琼脂糖凝胶电泳,以分子量 Marker 各片段长度 (bp) 的对数值和它们在凝胶上的迁移距离作标准曲线,通过分析不同内切酶作用后片段的大小,作出克隆片段的内切酶图谱。

1.6 菌毛蛋白的快速抽提(热休克法)

参照文献[8]进行。

1.7 SDS-PAGE 和 Western-blot

用热休克法获得的重组菌株的菌毛蛋白粗提物用硫酸铵分步沉淀,取 30%~50% 组分在 15% 分离胶上进行电泳分析。免疫印迹分析参照文献[4]进行。

2 结果

2.1 编码 CS6 抗原的 DNA 片段的克隆

纯化的野生株大肠杆菌 E519/66A 大质粒部分酶解后,与脱磷的载体 pBR322 连接,转化感受态的 RR1 细胞,在氨苄平板上获得 1920 个转化子,进一步用 Tc 抗性筛选出重组子 1154 个。用 CS6 抗血清通过菌落原位 ELISA 筛选到 2 个能表达 CS6 抗原的重组子。将两个阳性克隆中的重组质粒用碱变性法快速抽提后用 HindIII 作酶切分析,发现均含有一个 4.6kb 的外源 DNA 片段。

2.2 克隆的 CS6 片段的限制性内切酶图谱

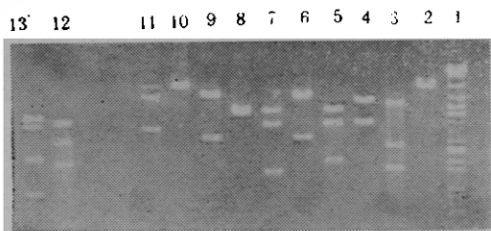


图 1 重组质粒 pMG233 的限制性内切酶分析

1, Marker (λ + HindIII, λ + EcoRI + HindIII); 2, Aval; 3, BamHI; 4, ClaI; 5, EcoRI; 6, EcoRV; 7, HincII; 8, HindIII; 9, PstI; 10, PvuI; 11, ScaI; 12, BamHI + PstI; 13, EcoRI + PstI.

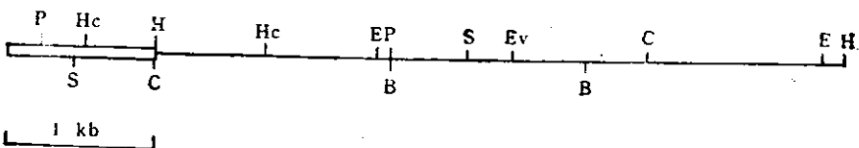


图 2 编码 CS6 抗原的 DNA 片段的限制性内切酶图谱

方框表示载体部分,实线表示克隆的 DNA 片段限制酶位点: B, BamHI; C, ClaI; E, EcoRI; Ev, EcoRV; Hc, HincII; H, HindIII; P, PstI; S, ScaI.

图 1 所示为重组质粒 (pMG233) 用不同限制性内切酶完全酶解的结果,通过分析得到克隆的 CS6 DNA 片段的限制性内切酶图谱(图 2)。

2.3 克隆的 CS6 片段表达的菌毛蛋白

重组菌株的菌毛蛋白粗提物用硫酸铵法分步沉淀后进行 SDS-PAGE 分析,而后用 CS6 抗血清进行 Western-blot, 硫酸铵浓度 30%~50%所沉淀的组分有两条明显的阳性带,分子量大小在 14k~16.9k 之间。

3 讨论

定居因子抗原 CFA/IV 最早发现于 1982 年^[6]。1985 年确定它有三种不同的抗原成分 (CS4、CS5CS6)^[11]。CS4 抗原的 N-末端氨基酸序列与 CFA/1、CS2、PCFO166 有极高的同源性,并受相同蛋白质的调节 (cfaD)^[12]。克隆的 CS5 基因集中在一段 7.0kb 的 DNA 片段中,它的 N-端序列不同于以往发现的许多菌毛抗原^[13]。至今没有 CS6 抗原基因序列和菌毛结构的报道。研究者用实验动物所做的实验显示,用 CS6 阳性菌株免疫动物,能引起肠道抗定居免疫反应,攻毒试验也证明 CS6 是 CFA/IV 三种抗原中最重要的保护性抗原^[11]。

我们通过构建 ETEC 野生株 E519/66A 大质粒的基因文库,成功地筛选出能表达 CS6 抗原的阳性克隆。CS6 的编码和调控基因集中在一段 4.6kb 的 DNA 区段中,它的限制性内切酶图谱与 Willshaw, G. A. 克隆自 E10703 (O167:H5) 的 CS6 基因的报道相似^[11],仅在一端很小的区域中(约 0.1kb)缺少了 Aval 和 PvuII 两个位点, EcoRI 和 PstI 的相对位置也不同,这也许是因为克隆的基因分别来自血清型不同的菌株所致。

实验显示克隆的 CS6 基因产生两种 CS6 抗血清特异的蛋白,分子量在 14k~16.9k 之间,这一结果与 Willshaw, G. A. 用小细胞法测定的结果很相似。其报道显示两个分子量分别为 15.6k 和 16.7k 的 CS6 菌毛蛋白拥有一个共同的前体蛋白(18k)^[11]。Wolf 用 Western-blot 测定 E8775 (O25:H42) 的菌毛抗原,CS6 菌毛蛋白显示为 16k 的单一条带^[14]。这是否意味着不同血清型的菌株会产生不同类型的 CS6 菌毛,其亚基来源于类似的前体,具有不同的分子量,但抗原具有明显的交叉反应,这些有待于基因结构和功能进一步的研究。

我们构建的重组菌株能在细胞表面表达 CS6 菌毛抗原,可望通过进一步改构提高 CS6 抗原的表达,用于人源 ETEC 疫苗的研究,克隆的基因片段也可作为研究 CS6 菌毛蛋白基因表达、调控及装配的基础。

致谢 本工作得到李淑琴老师和董自正博士有益的帮助,在此谨致谢意。

参 考 文 献

- [1] Svennerholm A, Vidal Y L, Holmgren J *et al. Inf Imm*, 1988, 56: 523~528.
- [2] 张兆山,李淑琴,卢建申,等. 中华微生物和免疫学杂志,1992,12: 157~160.
- [3] 董自正,张兆山,李淑琴,等. 中华微生物和免疫学杂志,1993,13: 354~349.
- [4] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning, a laboratory manual*. 2nd, USA; Cold spring harbor laboratory press, 1989.
- [5] Micrendorf R C, Percy C, Young R A. *Methods in Enzymology*, 1987, 152: 458~469.
- [6] Thomas L V, Rowe B. *Med Microb Immunol*. 1982, 171: 85~90.
- [7] Thomas L V, McConnell M M, Rowe B *et al. J Gen Microb*, 1985, 131: 2319~2326.
- [8] Sommerfelt H, Grewal H M S, Svennerholm A *et al. Inf Imm*, 1992, 60: 3799~3806.
- [9] Wolf M K, Anderws G P, Tall B D *et al. Inf Imm*, 1989, 57: 164~173.
- [10] Heuzenroeder M W, Neal B L, Thomas C J *et al. Mol Microb*, 1989, 3: 303~310.
- [11] Willshaw G A, Smith H R, McConnell M M *et al. FEBS Microb Lett*. 1988, 40: 473~478.

CLONING OF A CLUSTER OF GENES ENCODING COLI-SURFACE ANTIGEN 6(CS6) OF HUMAN ENTEROTOXIGENIC *E. coli*

Yang Xiao Zhang Zhaoshan Liu Chunjie

Zhang Beining Chen Tianmi Huang Cuifen

(Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850)

Abstract A gene library was constructed from large plasmid DNA of wild strain E519/66A of human enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). Positive colonies containing CS6 antigen were obtained. The CS6 gene fragment was identified by restriction endonuclease mapping. It was approximately 4.6 kb in length and responsible for encoding CS6 genes and regulating the CS6 antigen. Two forms of fimbriae protein with different molecular weight were produced by the selected clones. Both of them could react with the same CS6 antiserum. So we expect to use the recombinant strain as candidate for human ETEC vaccine development, and it is also useful for further research on the expression and regulation of genes encoding CS6 fimbriae protein.

Key words ETEC, Coli-surface antigen, CS6, Gene cloning