

表达大肠杆菌 K88ac-ST₁-LT_B 融合蛋白基因工程菌株的构建

许崇波^{1*} 卫广森²

¹(宁夏大学生物工程系,银川 750021)

²(辽宁省益康生物制品厂,辽阳 111000)

摘 要 利用 PCR 技术,从大肠杆菌 C83902 质粒中扩增出 K88ac 基因、ST₁ 突变基因和 LT_B 基因,通过分离、纯化、内切酶酶切、连接和转化,构建了含 K88ac-ST₁-LT_B 融合基因表达载体的重组菌株 BL21(DE3) pXKST3LT5。经酶切鉴定和 DNA 序列分析证实,构建的重组质粒 pXKST3LT5 中含有 K88ac-ST₁-LT_B 融合基因,且基因序列和阅读框架均正确。经 ELISA 检测,重组菌株表达的 K88ac-ST₁-LT_B 融合蛋白能够被 ST₁ 单抗、LT_B 和 K88ac 抗体识别。经乳鼠灌胃试验证实,表达的融合蛋白已丧失天然 ST₁ 肠毒素的活性。免疫实验结果表明,K88ac-ST₁-LT_B 融合蛋白能够诱发小白鼠产生抗体,该抗体具有中和天然 ST₁ 肠毒素的毒性作用,表明构建的重组菌株可以作为预防仔猪黄、白痢基因工程菌苗的候选菌株。

关键词 K88ac 基因, ST₁ 基因, LT_B 基因, 融合基因, 融合蛋白, 基因表达

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)02-0216-05

引起仔猪黄、白痢的致病菌为产肠毒素性大肠杆菌(ETEC),其致病因子主要为菌毛和菌体产生的肠毒素——耐热性肠毒素和不耐热性肠毒素,耐热性肠毒素分为 ST₁ 和 ST₂,其中 ST₁ 是最主要的直接致病因子,不耐热性肠毒素由毒性亚单位 LT_A 和结合亚单位 LT_B 组成。目前,市场上流行的菌苗为传统的灭活菌、K88-K99 和 K88-LT_B 基因工程菌苗,这 2 类菌苗存在的主要问题,一是没有较好地解决仔猪黄、白痢的最主要致泻因子 ST₁ 的免疫原性,二是现有菌苗针对的致病性 ETEC 血清型范围较小。正是由于现有菌苗未能解决上述问题,故免疫效果不是十分理想,常常导致免疫失败,致使仔猪发病,甚至导致死亡。我们在原来研究工作基础上^[1-5],进一步构建了一种能表达大肠杆菌 K88ac-ST₁-LT_B 融合蛋白的基因工程菌株,为更有效地预防仔猪黄、白痢提供一种新型基因工程菌苗的候选菌株。

1 材料和方法

1.1 菌株与质粒

大肠杆菌 C83902 购自中国兽药监察所;受体菌

JM109 和 BL21(DE3)由本室保存;质粒 pUC19 和 pBluescriptII 购自 TaKaRa 公司;pET-28b 购自 Novagen 公司。

1.2 试剂

限制酶(*Nco*I, *Hind*III, *Nde*I, *Eco*RI, *Bam*HI, *Not*I)购自 TaKaRa 公司;T4 DNA 连接酶、dNTPs、Taq DNA 聚合酶、Wizard PCR Preps DNA Purification System 购自 Promega 公司;ST₁ 和 LT_B ELISA 检测试剂盒,购自上海市卫生防疫站;K88ac 抗血清为本实验室制备。

1.3 PCR 引物设计与合成

根据许崇波等报道的 ST₁、LT_B 基因序列^[1,2]和 Dykes 等报道的 K88ac 基因序列^[6],设计并合成了如下 PCR 引物:

3 对 ST₁ PCR 引物,上游引物 P1 为 5'-CCCAAGCTTAACAACACATTTTACTGC-3', P2 为 5'-GGAATTC-CATATGAACAACACATTTTACTGC-3', P3 为 5'-CCGGAATTCAACAACACATTTTACTGC-3', 下游引物 P4 为 5'-GGAATTCATATGATAACTTCCAGCACTGGC-3', P5 为 5'-CCGGAATTCATAACTTCCAGCACTGGC-3', P6 为

5'-CGCGGATCCATAACTTCCAGCACTGGC-3', 其中 P1、P2、P3 引物中分别含有 *Hind*III、*Nde*I、*Eco*RI 酶切位点, P4、P5、P6 引物中分别含有 *Nde*I、*Eco*RI、*Bam*HI 酶切位点, 且这 3 条引物中含有的部分 ST₁ 基因是将 3' 端含有 2 个编码半胱氨酸残基(Cys)的 TGT 被突变成编码丝氨酸残基(Ser)的 AGT 的突变基因, P1 和 P4、P2 和 P5、P3 和 P6 分别为配对的引物, 然后用这 3 对引物分别从大肠杆菌 C83902 质粒中扩增出 3 个 ST₁ 突变基因。

1 对 K88ac PCR 引物, 上游引物 P7 为 5'-CATGCCATGGCATTACTGACTATGAAGAA-3', 下游引物 P8 为 5'-CCCAAGCTTGAGAATATCATTCTTGATAG-3', 其中 P7、P8 引物中分别含有 *Nco*I、*Hind*III 酶切位点, 然后用这对引物从大肠杆菌 C83902 质粒中扩增出 K88ac 抗原基因。

1 对 LT_B PCR 引物, 上游引物 P9 为 5'-CGCGGATCCCCAGACTATTACAGAACTA-3', 下游引物 P10 为 5'-ATAAGAATGCGGCCGCAAGCTTGCCCTCCAGCCTAGC-3', 其中 P9、P10 引物中分别含有 *Bam*HI 和 *Not*I 酶切位点, 然后用这对引物从大肠杆菌 C83902 质粒中扩增出 LT_B 抗原基因。

上述 PCR 操作程序为: 总体积为 100 μ L, 其中 10 μ L 10 \times 反应缓冲液, 10ng 质粒 DNA, 200 μ mol/L dNTPs, 引物各 250ng, 3u Taq DNA 聚合酶, 按“94 $^{\circ}$ C 60s \rightarrow 50 $^{\circ}$ C 60s \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 90s”的温度转换模式, 共进行 30 个循环。

1.4 DNA 的操作

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 [7] 介绍的方法进行。

1.5 质粒的稳定性试验

参照 Meacock 叙述的方法进行 [8]。将 37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜的菌体, 按 10% 接种于 100mL 含 Kan 30 μ g/mL 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 100 μ L 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 $^{\circ}$ C 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 [7] 介绍的方法进行。

1.7 重组菌株的毒性测定

将重组菌株 BL21(DE3) (pXKST3LT5) 的培养上清及菌体裂解物分别进行乳鼠灌胃试验, 计算 G/C (肠重/剩余尸重) 值, G/C 值 \geq 0.09 为 ST₁ 毒素阳

性, G/C 值 \leq 0.083 为 ST₁ 毒素阴性 [9]。

1.8 免疫原性试验

将重组菌株 BL21(DE3) (pXKST3LT5) 的包涵体或经甲醛灭活的菌体, 辅以氢氧化铝胶, 制备成实验用菌苗。用该菌苗免疫小白鼠, 然后分别用 1MLD 和 2MLD 大肠杆菌强毒菌 C83902 攻击免疫过小白鼠, 观察小白鼠的存活情况 [5]。

1.9 乳鼠灌胃中和试验

取 1 个鼠活性单位的 ST₁ 肠毒素, 加入等体积的免疫鼠血清, 用生理盐水稀释至 0.1mL, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h, 采用乳鼠灌胃试验测定混合物中 ST₁ 肠毒素的活性, 对照组于同样条件下进行测定, 计算 G/C (肠重/剩余尸重) 值, G/C 值 \geq 0.09 为 ST₁ 毒素阳性, 而中和试验结果被判定为阴性; G/C 值 \leq 0.083 为 ST₁ 毒素阴性, 而中和试验结果被判定为阳性, 进而评价免疫鼠血清中抗体的中和效果 [9]。

2 结果

2.1 重组菌株 BL21(DE3) (pXKST3LT5) 的构建

如图 1 所示, 构建了基因工程菌株 BL21(DE3) (pXKST3LT5)。采用 PCR 和基因定点突变技术, 用设计并合成的 3 对 ST₁ PCR 引物分别从大肠杆菌

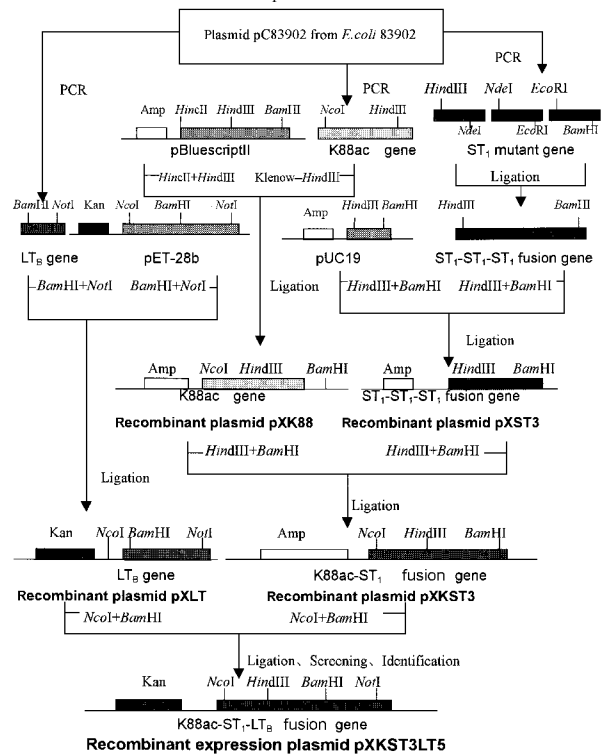


图 1 重组表达质粒 pXKST3LT5 构建策略图

Fig.1 A schematic diagram showing construction of

recombinant plasmid pXKST3LT5

C83902 质粒中扩增出 3 个 ST_1 突变基因, P1 和 P4 引物扩增的产物用 *Hind*III 和 *Nde*I 双酶切, P2 和 P5 引物扩增的产物用 *Nde*I 和 *Eco*RI 双酶切, P3 和 P6 引物扩增的产物用 *Eco*RI 和 *Bam*HI 双酶切, 然后分别通过 3% 琼脂糖凝胶电泳分离、纯化双酶切的 PCR 产物即 ST_1 突变基因, 再通过 T4 DNA 连接酶连接反应, 将 3 个 ST_1 突变基因串联在一起, 克隆至质粒 pUC19 相应酶切位点上, 构建了重组质粒 pXST3。随后用 1 对 K88ac PCR 引物从大肠杆菌 C83902 质粒中扩增出 K88ac 抗原基因, 扩增的产物用 Klenow larger fragment 处理后, 再用 *Hind*III 酶切, 然后通过 2% 琼脂糖凝胶电泳分离、纯化酶切的 PCR 产物即 K88ac 抗原基因, 并将其克隆至 pBluescriptII 中 *Hinc*II 和 *Hind*III 酶切位点上, 构建了重组质粒 pXK88。最后用 1 对 LT_B PCR 引物从大肠杆菌 C83902 质粒中扩增出 LT_B 抗原基因, 扩增的产物用 *Bam*HI 和 *Not*I 双酶切, 然后通过 2% 琼脂糖凝胶电泳分离、纯化双酶切的 PCR 产物即 LT_B 抗原基因, 并将其克隆至 pET-28b 相应酶切位点上, 构建了重组质粒 pXLT。

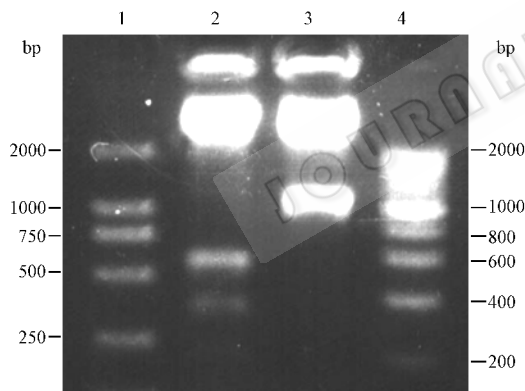


图 2 重组表达质粒 pXKST3LT5 的酶切鉴定

Fig.2 Identification of recombinant expression plasmid pXKST3LT5 by restriction endonucleases-digested DNAs

1. DL2000 DNA markers; 2. pXKST3LT5 digested by *Nco*I/*Hind*III/*Bam*HI/*Not*I; 3. pXKST3LT5 digested by *Nco*I/*Not*I; 4. DNA markers ladder 200bp

在构建上述 3 个中间质粒之后, 用 *Hind*III 和 *Bam*HI 从重组质粒 pXST3 切下并回收 3 个串联在一起的 ST_1 突变基因, 将其融合在重组质粒 pXK88 中 K88ac 基因的下游, 构建了重组质粒 pXKST3; 然后再用 *Nco*I 和 *Bam*HI 从已构建的重组质粒 pXKST3 中切下 K88ac- ST_1 - ST_1 - ST_1 融合基因, 并将其融合在重组质粒 pXLT 中 LT_B 抗原基因的上游, 构

建了重组表达质粒 pXKST3LT5, 通过氯化钙转化法转入到受菌体 BL21(DE3)中, 构建成含 K88ac- ST_1 - LT_B 融合基因表达质粒的重组菌株 BL21(DE3) (pXKST3LT5)。用碱性裂解法从构建的重组菌株中提取质粒, 分别用 *Nco*I/*Hind*III/*Bam*HI/*Not*I 和 *Nco*I/*Not*I 酶切该质粒, 经 2.0% 琼脂糖凝胶电泳检查, 可见 329bp 的 K88ac 抗原基因片段, 182bp 的 3 个串联在一起的 ST_1 突变基因片段, 504bp 的 LT_B 抗原基因片段和 1.02kb 的 K88ac- ST_1 - LT_B 融合基因片段(见图 2)。经 DNA 序列分析证实, 所构建的重组质粒 pXKST3LT5 中含有 K88ac- ST_1 - LT_B 融合基因, 且基因序列和阅读框架均正确。

2.2 重组质粒的稳定性

重组质粒 pXKST3LT5 在受体菌 BL21(DE3)中能稳定地传代, 在无选择压力下培养 20 代时, 重组质粒率依然保持为 100%。

2.3 K88ac- ST_1 - LT_B 融合蛋白的 SDS-PAGE 分析和 ELISA 检测

将构建的重组菌株 BL21(DE3) (pXKST3LT5)在 37°C 下培养, 用 1mmol/L IPTG 诱导 4h 后, 可以获得高效表达, 经 SDS-PAGE 和薄层凝胶电泳扫描分析(见图 3 A), 目的蛋白的表达量占菌体总蛋白相对含量的 73.53%。经 ST_1 、 LT_B 和 K88ac ELISA 检测试剂盒检测, 构建的重组菌株表达的 K88ac- ST_1 - LT_B 融合蛋白能够被 ST_1 单抗、 LT_B 和 K88ac 抗体识别。

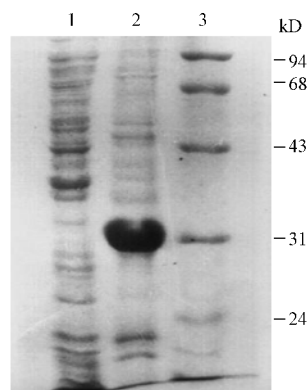


图 3 表达产物 SDS-PAGE 结果

Fig.3 SDS-PAGE analysis of the expressed products

1. Total cell lysate of BL21(DE3) (pET-28b); 2. Total cell lysate of BL21(DE3) (pXKST3LT5); 3. Low molecular weight markers

2.4 重组菌株 BL21(DE3) (pXKST3LT5)的毒性测定

将重组菌株 BL21(DE3) (pXKST3LT5)的培养上清和菌体裂解物, 分别进行乳鼠灌胃试验, 结果均为

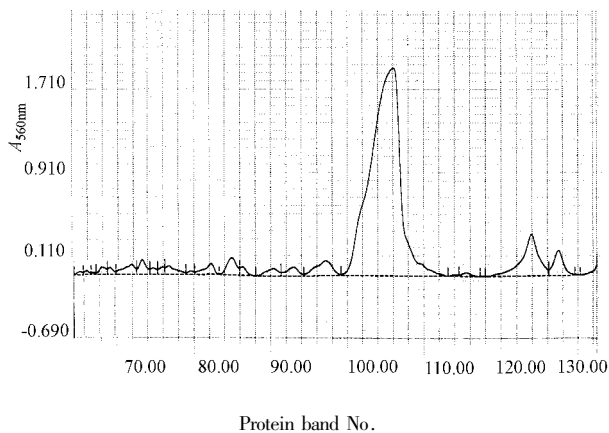


图4 IPTG 诱导 BL21(DE3) pXKST3LT5 4h 薄层凝胶扫描分析

Fig.4 Thin-layer gel scan analysis of SDS-PAGE of the expressed products of BL21(DE3) pXKST3LT5 induced by IPTG for 4h

阴性 (G/C 值 ≤ 0.083), 这表明该菌株已无 ST₁ 肠毒素活性。同时经腹腔注射或口服两种途径接种小白鼠共计 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, 表明该重组菌株无致病性, 十分安全。

2.5 免疫原性试验

用包涵体粗提物或重组菌株灭活苗免疫小白鼠, 用大肠杆菌强毒株 C83902 (K88ac⁺, ST₁⁺, LT_B⁺) 攻毒, 均获得了较好的免疫保护 (见表 1)。

表 1 免疫原性试验结果

Table 1 Result of immunogenicity assay

Challenge dose	Immunogen	
	Inclusion bodies	Inactivated vaccine
1MLD	19/20*	20/20
2MLD	17/20	19/20

* Survival numbers/experimental numbers

2.6 乳鼠灌胃中和试验

取 1 个鼠活性单位的 ST₁ 肠毒素 15 μ L, 加入免疫鼠血清 15 μ L, 用生理盐水稀释至 0.1mL, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h, 连同对照组进行乳鼠灌胃试验, 结果表明 (见表 2) 对照组的 ST₁ + 生理盐水和 ST₁ + 健康鼠血清各组, 其乳鼠灌胃试验均为阳性 (G/C 值 ≥ 0.09), 而试验组的 ST₁ + 免疫鼠血清的 G/C 值接近于单独加 LB 培养基和健康鼠血清的 G/C 值 (≤ 0.083), 这表明融合蛋白所诱发的抗体在体内能够中和病原菌所产生的 ST₁ 肠毒素。

表 2 乳鼠灌胃中和试验结果

Table 2 Results of suckling mouse neutralization assay

Treatment	Numbers of nude mice	Average value of G/C
Saline	6	0.062
LB medium	6	0.063
Sera of healthy mice	6	0.067
ST ₁ + Saline	6	0.097
ST ₁ + Sera of healthy mice	6	0.104
ST ₁ + Sera of immunized mice	6	0.068

3 讨论

由产肠毒素性大肠杆菌引起的仔猪腹泻一直是国内外学者研究的重点和难点, 其难点在于如何消除 ST₁ 的生物学毒性。Cardenas 等^[10] 构建了含 ST₁-LT_B 融合基因的重组菌株, 在 2 个基因之间插入 21bp 的 linker 基因, 结果表达的 ST₁-LT_B 融合蛋白丧失了 ST₁ 肠毒素活性, 而且具有较好的免疫原性。张兆山等^[11] 利用类似的途径也构建了 ST₁-LT_B 融合基因, 结果表达产物仍具有 ST₁ 肠毒素活性。Aitken 等^[12] 将编码 ST₁ 前体蛋白的 pro-ST₁ 基因融合在 LT_B 基因的 3' 末端, 结果表达的 LT_B-pro-ST₁ 融合蛋白具有较好的免疫原性, 且丧失了 ST₁ 肠毒素活性。许崇波等^[1,4,5] 也将用 pro-ST₁ 基因融合在 LacZ 或 LT_B 基因的 5' 端上, 结果表达的 pro-ST₁-LT_B 融合蛋白同样具有较好的免疫原性, 且丧失了 ST₁ 肠毒素活性。

ST₁ 肠毒素本身含有 6 个半胱氨酸残基 (Cys), 这 6 个 Cys 可形成 3 对链内二硫键, 这 3 对二硫键对 ST₁ 具有生物毒性至关重要, 如果将二硫键破坏, 就可以使 ST₁ 失去生物毒性。根据 ST₁ 这一特性, 我们采用 PCR 和基因定点突变技术, 从大肠杆菌 C83902 质粒中扩增出 K88ac 基因、ST₁ 突变基因和 LT_B 基因, 构建了含有 K88ac-ST₁-LT_B 融合基因的重组菌株 BL21(DE3) pXKST3LT5, 该重组菌株表达的有效抗原 K88ac-ST₁-LT_B 融合蛋白以包涵体形式存在于菌体内部, 且 K88ac 和 LT_B 在保留原有抗原性基础上, 赋予了原本不具有抗原性的 ST₁ 具有了抗原性。通过免疫试验证实, K88ac-ST₁-LT_B 融合蛋白能够诱发小白鼠产生抗体, 该抗体具有中和天然

ST₁ 肠毒素的毒性作用。

REFERENCES (参考文献)

- [1] XU C B (许崇波), WEI G S (卫广森), FENG S X (冯书章) *et al.* Construction of fusion gene for enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin I and its immunization. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences* (畜牧兽医学报), 1997, **28**(4) : 330 ~ 335
- [2] XU C B (许崇波), WEI G S (卫广森), WU G M (吴广谋) *et al.* Cloning and nucleotide sequencing of heat-labile enterotoxin B subunit gene of *Escherichia coli*. *Chinese Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine* (畜牧与兽医), 1997, **29**(4) : 154 ~ 156
- [3] XU C B (许崇波), WEI G S (卫广森), WANG Z (王卓) *et al.* High-level expression of fusion gene of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin I (ST₁) and heat-labile enterotoxin B subunit (LT_B). *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences* (畜牧兽医学报), 1998, **18**(5) : 463-465
- [4] XU C B (许崇波), YU F Q (于凤芹), WEI G S (卫广森) *et al.* Construction of fusion gene of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin I (ST₁) and heat-labile enterotoxin B subunit (LT_B). *Chinese Journal of Veterinary Science* (中国兽医学报), 1998, **18**(5) : 463 ~ 465
- [5] XU C B (许崇波), WEI G S (卫广森), WANG Z (王卓) *et al.* Immunogenicity of the genetic engineering strain expressing *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin I and heat-labile enterotoxin B subunit fu-

sion protein. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine* (中国预防兽医学报), 1999, **21**(1) : 43 ~ 45

- [6] Dykes C W, Halliday I J, Read M J *et al.* Nucleotide sequences of four variants of the K88 gene of porcine enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun*, 1985, **50**(1) : 279 ~ 283
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*. 2nd Ed, New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [8] 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
- [9] Giannella R A. Suckling mouse model for detection of heat-stable *E. coli* enterotoxin : characteristics of the model. *Infect Immun*, 1976, **14** : 95 ~ 99
- [10] Cardenas L, Clements J D. Development of mucosal protection against the heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli* by oral immunization with a genetic fusion delivered by a bacterial vector. *Infect Immun*, 1993, **61**(11) : 4629 ~ 4636
- [11] ZHANG Z S (张兆山), LI S Q (李淑琴), DONG Z X (董自正) *et al.* Fusion of genes encoding *Escherichia coli* heat-labile and heat-stable enterotoxins. *Chinese Journal of Microbiology and Immunology* (中华微生物学和免疫学杂志), 1994, **14**(1) : 219 ~ 222
- [12] Aitken R, Hirst T R. Recombinant enterotoxins as vaccines against *Escherichia coli*-mediated diarrhoea. *Vaccine*, 1993, **11**(2) : 227 ~ 233

Construction of Recombinant Strain Expressing Enterotoxigenic *Escherichia coli* K88ac-ST₁-LT_B Fusion Protein

XU Chong-Bo^{1*} WEI Guang-Sen²

¹(Department of Biotechnology , Ningxia University , Yinchuan 750021 , China)

²(Yikang Manufactory of Biological Products in Liaoning , Liaoyang 111000 , China)

Abstract K88ac genes , heat-stable enterotoxin I (ST₁) mutant genes and heat-labile enterotoxin B subunit (LT_B) genes from plasmids of *Escherichia coli* C83902 were amplified by PCR. The recombinant expression plasmid pXKST3LT5 containing K88ac-ST₁-LT_B fusion gene was constructed by recombinant DNA technique and then transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3). The K88ac-ST₁-LT_B fusion protein was highly expressed in recombinant strain BL21 (DE3) (pXKST3LT5) and the expression level of the K88ac-ST₁-LT_B fusion protein was about 75.53% of total cellular protein by SDS-PAGE and thin-layer gel scanning analysis. More importantly , mice immunized with crude preparation containing the fusion protein inclusion bodies or inactivated recombinant strain produced antibodies that were able to recognize ST₁ *in vitro* . These sera antibodies were able to neutralize the biological activity of native ST₁ in the suckling mouse assay. Hence the fusion protein was nontoxic and immunogenic , the constructed recombinant strain could be used as a candidate of vaccine strain.

Key words K88ac gene , heat-stable enterotoxin I gene , heat-labile enterotoxin B subunit gene , fusion gene , fusion protein , gene expression