

霍乱肠毒素基因克隆及A2-B亚单位基因 核苷酸序列分析

朱 棣 刘延清 金 奇* 刘汉明

(中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所, 北京)

(中国预防医学科学院病毒学研究所, 北京)*

霍乱弧菌是引起霍乱的病原菌。霍乱弧菌产生的分泌性毒素CT是致病的主要物质之一^[1]。CT是多聚蛋白体,由A、B两个亚单位组成,A亚单位是毒性部分^[2],B亚单位能刺激机体产生抗毒抗体,是CT的免疫原部分^[3]。霍乱免疫由抗毒免疫和抗菌免疫组成。肠道局部免疫机制在其中起主导作用^[4]。依靠口服免疫制剂,诱导粘膜局部的免疫反应,产生以分泌性IgA为主的抗体,是获得有效抗霍乱免疫的重要途径。利用基因工程技术,构建CT A亚单位缺失,保留B亚单位的A⁻,B⁺重组菌株,除去毒性,保留抗原性,可进一步构建霍乱抗毒免疫活菌苗。

材 料 和 方 法

(一) 材料

霍乱弧菌79004,埃尔特生物型,小川血清型(*Vibrio cholerae*, E1tor biotype, Ogawa serotype),噬菌体生物型1d,1979年自病人中分离,由中国微生物菌种保藏委员会霍乱弧菌专业实验室提供。*E. coli* K12 JM103,中国预防医学科学院病毒所侯云德教授惠赠。限制性内切酶,T4 DNA连接酶为中国医学科学院基础所产品。

链末端终止法DNA序列分析所用试剂,均为西德Boehringer Mannheim公司产品,聚丙烯酰胺凝胶DNA序列分析电泳所用试剂,为瑞典LKB公司产品。

放射性同位素(³²P)dATP为英国Amsharm公司产品。

(二) 方法

1. 质粒DNA提取,限制性内切酶消化,

琼脂糖凝胶电泳,DNA体外连接和转化,DNA片段回收,分子杂交:均按文献[8]进行。LT探针取自pJYL2299^[9]0.77kb的HindⅢ片段,按Amsharm说明书标记。

2. M13克隆,DNA序列分析反应,聚丙烯酰胺凝胶电泳:均按文献[10]进行。

实 验 结 果

(一) 霍乱肠毒素基因克隆与酶谱分析

1. 霍乱肠毒素全基因克隆:79004菌株的染色体DNA的CT基因克隆,经LT探针杂交,筛选出一株含CT的重组质粒p551。不同限制性内切酶消化p551 DNA,与LT探针作Southern杂交,结果见图1。p551的5.4kb Pst I片段,及1.8kb Xba I-Bgl I片段,与LT有同源关系。将5.4kb Pst I片段,插入pBR322的Pst I位点,转化入HB101菌。经抗性挑选和LT探针原位杂交,挑选出一株A⁺B⁺菌株pCT52。

2. 霍乱肠毒素基因的初步酶谱分析:p551和pCT52质粒DNA,经数种常用限制性内切酶作单,双酶消化,作p551和pCT52的酶位点图谱(图1)。与国外资料相比^[11],79004的CT相应基因片段的部分酶切位点与2125菌株相同。

根据酶切图谱和酶切电泳结果,确定pCT52的1.8kb Xba I-Bgl I之间有一个Cla I位点,在CT基因中,只有一个Cla I酶切位点。

3. 霍乱肠毒素B亚单位基因的克隆:从pCT52上取下1.35kb Cla I-Bgl I片段,插入到pBR322的Cla I-BamH I之间。转化后经抗性挑选,与LT探针杂交,选出一株pCB3。根据杂交

本文于1988年10月28日收到。

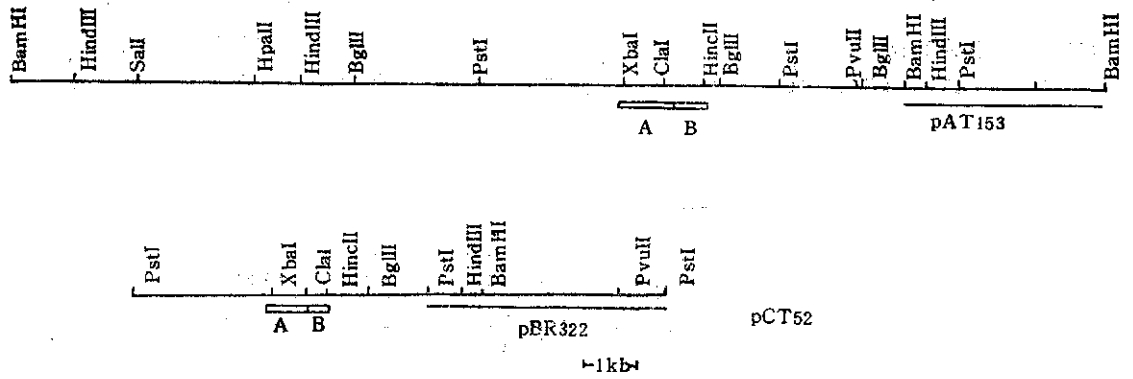


图 1 p551和pCT52的限制性内切酶图谱

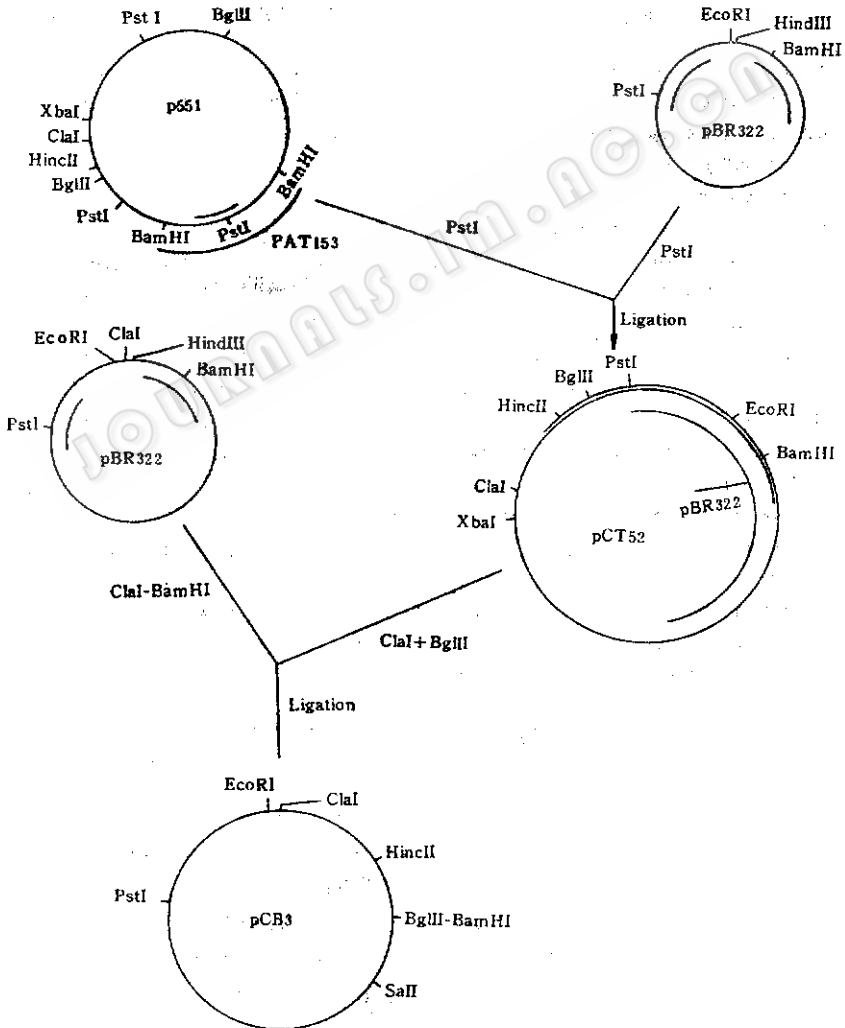


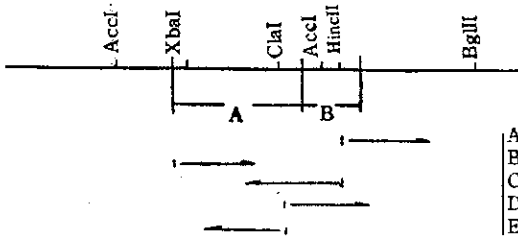
图 2 p551到pCT52的整个克隆过程

结果并与酶谱对照, 这株重组子是CT基因A⁻B⁺菌株(图2)。

(二) 核苷酸序列分析

根据杂交结果, 确认pCT52的1.85kb Xba I-

Bgl I 片段含部分 A 亚单位和全部 B 亚单位基因。回收该片段后, 按图3所示步骤, 进行M13克隆和序列分析反应, 聚丙烯酰胺凝胶电泳。最后经放射自显影后, 读出核苷酸序列结果(图4)。



CT片段	载体	测序方向
A BglII-HincII	mp18	HincII---BglII
B XbaI-HincII	mp19	XbaI---HincII
C XbaI-HincII	mp18	HincII---XbaI
D ClaI-BglII	mp18	ClaI---BglII
E ClaI-XbaI	mp18	ClaI---XbaI

图3 79004CT基因核苷酸序列分析的克隆步骤

```

AGA CCT CCT GAT GAA ATA AAG CAG TCA GGT GAT CTT ATG CCA AGA GGA CAG AGT GAG TAC
TTT GAC CGA GGT ACT CAA ATG AAT ATC AAC CTT TAT GAT CAT GCA AGA GGA ACT CAG ACC
GGA TTT GTT AGG CAG GAT GAT GGA TAT GTT TCC ACC TCA ATT AGT TTG AGA GAT GCC CAC
TTA GTG GGT CAA ACT ATA TTG TCT GGT CAT TCT ACT TAT TAT ATA TAT GTT ATA GCC ACT
GCA CCC AAG ATG TTT AAC GTT AAT GAT GTA TTA GGG GCA TAC AGT CCT CAT CCA GAT GAA
CAA GAG GTT TCT GCT TTA GGG GCA TAC AGT CCT CAT CCA GAT GAA CAA GAG GTT TCT GCT
TTA GGT GGG ATT CAA TAC TCC CAA ATA TAT GGA TGG TAT CGA GTT CAT TTT GGG GTG CTT
GAT GAA CAA TTA CAT CGT AAT AGG GGC TAC AGA GAT AGA TAT TAC AGT AAC TTA GAT ATT
GCT CCA GCA GCA GAT GGT TAT GGA TTG GCA GGT TTC CCT CCG GAG CAT AGA GCT TGG AGG
GAA GAG CCG TGG ATT CAT CAT GAC CCG CCG GGT TST GGG AAT GCT CCA AGA TCA TCG ATG
AGT AAT ACT TGC GAT GAA AAA ACC CAA AGT CTA GGT GTA AAA TTC CTT GAC GAA TAC CAA
TCT AAA GTT AAA AGA CAA ATT TTT TCA GGC TAT CAA TCT GAT ATT GAT ACA CAT AAT AGA
ATT AAG GAT GAA TTA TGATT AAA TTA AAA TTT GGT GTT TTT TTT ACA GTT TTA CTA TCT
TCA GCA TAT GCA CAT GGA ACA CCT CAA AAT ATT ACT GAT TTG TGT GCA GAA TAC CAG AAC
ACA CAA ATA TAT ACG CTA AAT GAT AAG ATA TTT TCG TAT ACA GAA TCA CTA GCT GGA AAA
AGA GAG ATG GCT ATC ATT ACT TTT AAG AAT GGT GCA ATT TTT CAA GTA GAA GTA CCA GGT
AGT CAA CAT ATA GAT TCA CAA AAA AAA GCG ATT GAA AGG ATG AAG GAT ACC CTG AGG ATT
GCA TAT CTT ACT GAA GCT AAA GTC GAA AAG TTA TGT GTA TGG AAT AAT AAA ACG CCT CAT
GCG ATT GCC GCA ATT AGT ATG GCA AAT TAA GAT ATA AAA AGC CCA CCT CAG TGG GCT TTT
TTG TGG TTC GAT GAT
  
```

图4 79004肠毒素A2及B亚单位基因核苷酸序列

从79004的染色体DNA中, 克隆出含CT的p551。又根据杂交结果, 克隆了CT基因A⁺B⁺的重组质粒pCT52和A⁻B⁻的质粒pCB3。并对这两个质粒作了初步酶谱分析。

从酶谱分析结果与国外资料相比, pCB3虽失去了A亚单位上游的基因启动序列, 但B亚单位的翻译信号——核蛋白结合位点(SD序列)仍是完整的。这株重组质粒能利用载体的启动子转录成mRNA, 而自身翻译出B亚单位。所以,

可进一步用于CT A⁻B⁺的表达研究。

根据本试验核苷酸序列分析结果, 79004肠毒素基因DNA水平上仍保留以下结构特征: A, B亚单位基因首尾重叠4个核苷酸, B亚单位基因有自己的SD序列和疏水性前导肽序列, 但无细菌DNA聚合酶结合位点的特征序列。CT的A, B亚单位转录在同一位置终止, 认为A, B亚单位是转录成一条mRNA, 再分别各自合成A, B亚单位前肽。

与国外资料的结果相比^[11], 79004的CT基因在以下位置有差别: 第249位(C-G), 第833位(A-C), 第958位(A-G)。与Kaper的结果比较^[12], 只有第249位不相同。从氨基酸序列来看, 第958位的差别(A-G)使Ser变成Glu, 但这一差别未发生在Lockman^[13]推断的四个同源保守区内, 也不会引起Yamamoto^[13]推断的可能与CT和LT共同功能有关的氨基酸共同序

列中发生改变。

根据国外资料^[14, 15], CT基因中C1a I位点正好位于CT的A1-A2亚单位基因交接处。经过比较(图5), C1a I位点的消失, 是因为缺失一个三联密码子, 是发生一个核苷酸交换的结果。我们认为, 此C1a I位点对于构建A⁻B⁺菌株有重要意义。

	chain coding sequence									
ct-1	CCA	AGA	TCA	TCG	ATG	AGT	AAT	ACT	TGC	GAT
ct-2		AGG	---	TCG	ATG	AGT	AAT	ACT	TGC	GAR
CT-1	Pro	Arg	Ser	Ser	Met	Ser	Asn	Thr	Cys	Asp
CT-2		Arg	---	Ser	Met	Ser	Asn	Thr	Cys	Asp

图5 CT A亚单位基因中C1a I位点的核苷酸序列比较

参 考 文 献

- [1] Finkelstein, R.A. et al., *J. Inf. Dis.*, 1215:563, 1970.
- [2] Gill, D.M.; In "ADP reboosylation reactions biology and medicine". Hayaishi, O. et al., eds. Acad. Pres N.Y., p. 593, 1982.
- [3] Finkelstein, R.A.; *J. Exp. Med.*, 130:189, 1969.
- [4] Pierce, N.F.; *J. Exp. Med.* 148:195, 1981.
- [5] Levin, M.M. et al., *Microbiol. Rev.*, 47:610, 1983.
- [6] Holmgren, J. et al.; In "Microbiological Toxin and Diarrheal Diseases". Ciba Foundation Sympo. (112). London, p. 234, 1985.
- [7] Glass, R.I. et al., *Inf. Imm.*, 13:735, 1976.
- [8] Maniatis, T. et al.; In "Molecular Cloning". Cold Spring Harbor, N.Y. 1982.
- [9] Yamamoto, T. et al., *J. Bact.*, 148:983, 1981.
- [10] M13 Cloning/Sequencing Kits Instruction Manual, BioRad, Richmond., 1986.
- [11] Mekalanose, J.J. et al., *Nature*, 306:551-557, 1983.
- [12] Sporecke, I. et al., *J. Bact.*, 157:252, 1984.
- [13] Yamamoto, T. et al., *J. Bact.*, 155:728, 1983.
- [14] Lockman, H. et al., *J. Bio. Chem.*, 258:13722, 1983.
- [15] Genaro, M.L. et al., *Nucl. Acid. Rev.*, 11:3895, 1983.

MOLECULAR CLONING OF THE A2 AND B SUBUNITS OF *VIBRIO CHOLERAE* ENTEROTOXIN IN *ESCHERICHIA* *COLI* K-12 AND THEIR SEQUENCING

Zhu Di Liu Yanqing Jin Qi* Liu Hanmin

(*Institute of Epidemiology and Microbiology, Chinese Academy
of Preventive Medicine, Beijing*)

(*Institute of Virology, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing*)*

This paper is to report the subcloning of CT gene from a recombinant plasmid carrying *V. cholerae* 79004 strain (Eltor biotype, isolated in China) CT DNA. The restriction mapping and nucleotide sequencing of the CT were performed. The cloned CT BamH I fragment of the plasmid p551 was 21kb in size. A CT Pst I fragment could be cloned from p551 into pBR322, the resulting recombinant plasmid was designated as pCT52. In an attempt to obtain the A⁻B⁺ in gene, Cla I - Bgl II fragment of pCT52 was inserted into the location between Cla I - BamH I sites of pBR322, such recombinant plasmids was pCB3. These clones, pCT52, pCB3 were homologous with LT-B gene. A restriction mapping of pCT52 were obtained using common enzymes.

Utilizing M13 cloning-chain termination sequencing method, the nucleotide of A2 and B subunits gene of 79004 was analysed. The sequencing data showed that there is one nucleotide different from the data published by Lockman, H. et al., but no significant difference in gene structure. There might be no alteration in CT amino acid sequence by deducing.

Key words

Cholera enterotoxin; gene cloning; DNA sequencing