

简报

# 猪毒素源性大肠杆菌K88ac抗原基因表达的研究

吴雅旭 石成华 黄翠芬

(军事医学科学院生物工程研究所, 北京)

由毒素源性大肠杆菌(ETEC)引起的仔猪腹泻是一种发病迅速, 发病率和死亡率均很高的传染病, 其表面的纤毛定居因子K88抗原和菌体分泌的肠毒素是两个重要的致病因子。目前国外已用遗传工程方法将K88抗原基因和几个与其表达相关的多肽基因重组到载体pBR322上, 制备出预防仔猪腹泻的活疫苗。我们室也针对国内流行性较广的K88ac亚型, 生产出相应的疫苗。显然, 如果能用分子遗传学方法提高伞毛抗原的表达效率, 从而制备出高效活疫苗, 无疑地将会给仔猪细菌性腹泻的预防带来深刻的影响。为此, 爱尔兰的Kehol等曾用trp强启动子代替pBR322上的P1启动子, 以试图提高K88ac抗原的表达水平, 但未能成功<sup>[1]</sup>。本实验中采用lac强启动子代替P1启动子表达K88ac抗原基因, 获得了稳定高产的表达株, 其表达效率为原株的16倍。另外我们还观察了受体菌等对表达的影响。

## 材料与 方法

### (一) 材料

1. 菌株和质粒: *E. coli* RRI和*E. coli* JM 101为受体菌。pUC19(Ap<sup>r</sup>, LacZ<sup>+</sup>)为克隆载体。pMM032为本室构建的重组质粒, 由pBR322载体和K88ac抗原基因组成。

2. 培养基: 为含氨苄青霉素(40μg/ml)的LB培养基。

3. 酶制剂及其他试剂: 限制酶EcoR I和Hind III分别购自华美生物工程公司和协和医科大学基础部友谊科技开发公司。T4 DNA连接酶为Boehringer Mannheim公司产品。T4多核苷酸激酶为Biolabs公司产品。IPTG为Sigma公司产品, K88ac抗血清为本室制备。

### (二) 方法

1. DNA的操作: 采用温和裂解法制备pUC19质粒<sup>[2]</sup>, Birnboim的碱裂解法制备pMM032<sup>[3]</sup>。酶切片段用低熔点琼脂糖方法回收, DNA片段的连接及转化按文献<sup>[4]</sup>进行。

2. 玻片凝集实验<sup>[5]</sup>: 将K88ac抗血清用生理盐水稀释至1:256, 取5μl滴在玻璃板上, 挑取重组子涂在上面观察凝集情况。以RRI受体菌作阴性对照, RRI(pMM032)作阳性对照。

3. K88ac探针的合成及末端标记: 应用Applied Biosystems Model 381A DNA合成仪, 合成一个序列为5' TAG ATG GAA TTC CTC ATA 3'的K88ac抗原基因片段, 将该片段从DNA合成柱上切下后, 低温真空干燥, 溶于10mmol/L Tris-Cl-1mmol/L EDTA(pH8.0)缓冲液中。过Sephadex G50柱后, 用[γ-<sup>32</sup>P]ATP标记其5'-OH<sup>[6]</sup>。

4. 菌落原位杂交: 参照文献<sup>[7,8]</sup>。

5. K88ac抗血清的纯化及酶标抗体的制备: 按文献<sup>[9,10]</sup>。

6. ELISA方法检测K88ac抗原量: 将LB固体斜面上(含Ap 40μg/ml)生长18h的重组子用PBS-Tween 20缓冲液洗下, 于56℃加热3min使菌体灭活并释放出K88ac伞毛抗原。菌悬液由OD<sub>600</sub> = 1.0起做二倍连续稀释, 用ELISA方法检测K88ac抗原的表达水平<sup>[11]</sup>。当P/N值大于2.1时, 判断为阳性[P/N = (OD<sub>测</sub> - OD<sub>空白</sub>) / (OD<sub>阴对</sub> - OD<sub>空白</sub>)]。

## 结果与 讨论

(一) 重组表达质粒pMM087-I的构建(见图1)。

本文于1989年4月24日收到。

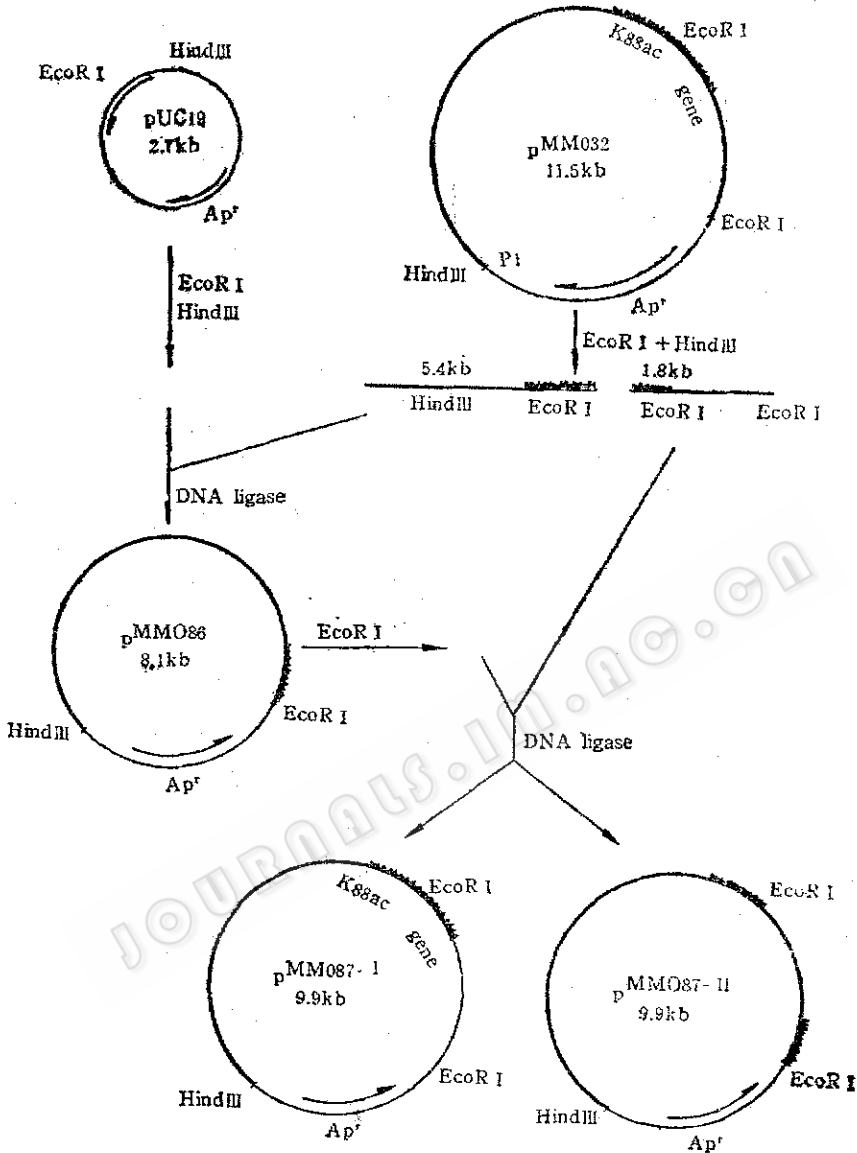


图 1 质粒pMM087-I的构建

(二) 重组表达质粒pMM087-I的鉴定

1. 重组质粒的电泳：将连接物转化至大肠杆菌RRI中，涂布于LB(含Ap 40μg/ml)固体平板上，一次涂板获得 200 多个转化子。随机挑取 32个转化子，抽提质粒DNA。经电泳观察，有 18个菌株的质粒DNA相当于 10kb 大小。用限制酶EcoR I和Hind III酶切，产生5.4kb、2.7kb和 1.8kb DNA三条带，表明确有K88ac抗原基因片段的插入。

2. 菌落原位杂交：用化学合成的寡核苷酸探针5' TAGATGGAATTCCTCATA 3'对这 18个转化子进行菌落原位杂交。当 1.8kb DNA正向插入时，与探针序列 100% 同源；反向插入得到的重组质粒 pMM087-I 只与 66.7% 的探针序列同源，分子间杂交很不稳定。寡核苷酸探针的特异性很强，能够检出不匹配的单碱基突变。因此，用提高杂交或洗涤温度的办法，就能筛出正向插入的重组质粒。我们采用 1 × SSC、0.1%

SDS作洗涤液, 44℃洗涤2h, 结果作为阴性对照的RRI(pUC19)、RRI(pMM086)及4个转化子不打点, 阳性对照RRI(pMM032)和14个转化子打点, 表明14个杂交阳性菌株含有正向插入的重组质粒。

3. 玻片凝集实验: 将14个杂交阳性菌株做玻片凝集实验, 重复进行两次, 均为阳性。证明获得了K88ac抗原基因的重组表达质粒。

4. ELISA分析: 对14个凝集反应阳性的重组子进行ELISA测定, 结果全为K88ac阳性。选出一株稳定高表达的菌株, 其重组质粒命名为pMM087-I。

### (三) 重组质粒pMM087-I的表达

1. pMM087-I的表达水平: 用ELISA方法比较RRI(pMM087-I)和RRI(pMM032)的K88ac抗原表达水平(前者的LB培养基中, 含1mmol/L IPTG)。由图2结果可见, 重组质粒pMM087-I获得了较高水平的表达, 为pMM032的16倍。

2. pMM087-I在不同受体菌中的表达: 将重组质粒pMM087-I分别转化到RRI和JM101受体菌中, 如上培养并测其表达。结果发现pMM087-I在两个受体菌中的表达情况具有很大的差异。在RRI中获得了较高水平的表达(1:8192), 为JM101(pMM087-I)表达量(1:8)的1024倍。

3. 不同生长时间对抗原表达的影响: 见表1。

以上实验结果表明, 用lac强启动子代替P1启动子后, K88ac抗原获得了稳定高产表达, 为原来的16倍。而Kohoe用trp强启动子表达K88ac抗原, 却未能提高其产量。分析原因可能是lac启动子的启动效率比P1启动子强, 所以提高了

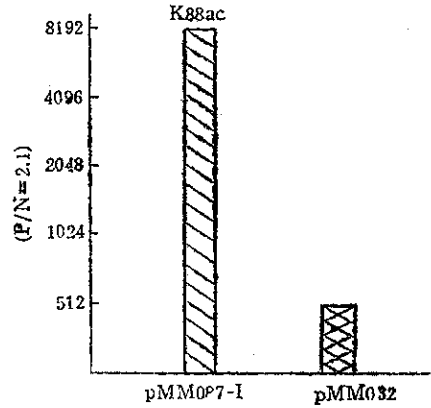


图2 重组质粒pMM087-I的表达水平

表1 不同培养时间对不同菌株K88ac抗原量的影响

| 大肠杆菌菌株          | 在37℃培养时间(h) |        |        |        |        |
|-----------------|-------------|--------|--------|--------|--------|
|                 | 6           | 9      | 12     | 15     | 18     |
| RRI(pMM032)     | 1:512       | 1:512  | 1:512  | 1:512  | 1:512  |
| RRI(pMM087-I)   | 1:2048      | 1:2048 | 1:8192 | 1:8192 | 1:8192 |
| JM101(pMM087-I) | 1:32        | 1:32   | 1:8    | 1:8    | 1:8    |

K88ac抗原基因的表达水平; lac启动子又不像trp启动子那么强, 所表达的蛋白量为宿主细胞所能承受, 因此重组质粒能够稳定存在。另外我们也看到, 不同的受体菌和不同的生长时间对表达产量的影响也是很大的。这可能与质粒的稳定性和受体菌中蛋白酶的作用有关。一方面由表1结果可见, 随着培养时间延长, JM101(pMM087-I)的K88ac抗原量有所下降; 另一方面我们在实验过程中也发现, 该重组子原代细胞于4℃放置数天, 或连续传几代后, 虽在氨苄青霉素抗性培养基上生长, 表达水平却明显降低了。

### 参 考 文 献

- [1] Kehoe, M. et al.: *J. Bacteriol.*, 155:1071—1077, 1983.
- [2] Kahh, M. et al.: *Methods in Enzymology*, Vol. 68, p. 268, 1979.
- [3] Birnboim, H.C. et al.: *Nucleic Acid Res.*, 7:1513—1523, 1979.
- [4] Pühler, A. et al.: *Advanced Cloning Genetics*, p. 180, 1984.
- [5] Qrskov, I. et al.: *Acta Pathol Microbiol Scand Sect B*, 53:404—422, 1961.
- [6] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, CSH. New York, 1982.
- [7] Suggs, S.V. et al.: *ICN-UCLA Symp. Mol. Cell Biol.*, Vol. 23, p. 682, 1981.

- [8] Lathe, R. et al.: *J.Mol.Biol.*, 183:1—12, 1985.  
 [9] 阳及平等：临床免疫与实验免疫，1:18—19, 1980。  
 [10] 骆加里等：生物化学与生物物理学报，13:1—18, 1981。  
 [11] 李安丽等：家畜传染病，(2):20—22, 1984。

## Expression of the Gene Encoding K88ac Antigen OF Porcine Enterotoxigenic *Escherichia coli*

Wu Yaxu Shi Chenghua Huang Cuifen

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

The plasmid pMM032 was completely digested with restriction endonuclease EcoR I and Hind III. The resulting two fragments of K88ac gene were recovered and sequentially inserted down stream of the lac promoter of vector pUC19 which was then transformed into *E. coli* RRI. Thirty-two of transformants were screened at random for K88ac production by using slide agglutination assay, restriction endonuclease analysis, in situ colony hybridization test and ELISA. Fourteen transformants showed K88ac positive and the expression levels of K88ac were 16-fold higher than that of pMM032.

### Key words

Expression; ETEC; K88ac gene; adhesion

## 书 讯

“中国生物技术机构和人员名录”一书已由科学出版社出版。这本工具书收录了我国272个生物技术机构及3450名从事生物技术工作的高中级人员的简介。

欲购本书者，请将书款25元及邮寄费2.50元共27.50元汇至北京中关村中国科学院文献情报中心“生物工程进展”编辑部(邮编100080)。银行帐号：北京中国工商银行海淀分理处891586-22。汇款时请注明单位、地址、邮编及联系人，以便寄书和发票。