

痢疾志贺氏毒素B亚单位在大肠杆菌中的高效表达

苏国富 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 100850)

本文从痢疾志贺氏 I 型菌 W30864 的染色体克隆了编码志贺氏毒素 (Stx) 的基因, 表达 Stx 的基因位于约 4.5kb 的 EcoR1 片段内。一系列的生物学试验表明: 我们构建的杂种质粒 (pMGC001) 能产生 Stx, 产量为亲代株的 16 倍, 克隆株不仅有细胞毒和肠毒作用, 而且还有神经毒性。我们又从质粒 pMGC001 将志贺氏毒素的 B 亚单位 (Stx-B) 的基因克隆至表达载体 pJLA503, 获得了 Stx-B 在大肠杆菌中的高效表达, Stx-B 已被纯化, 其特异的多克隆和单克隆抗体也被制备。Western blot 表明它们能与 Stx-B 进行特异的抗原抗体反应。

关键词 痢疾志贺氏 I 型菌; 志贺氏毒素 B 亚单位; 基因克隆; 高效表达

痢疾是全世界范围内流行的疾病, 特别在发展中国家流行更盛。痢疾有 4 个种群, 其中以痢疾志贺氏 I 型菌引起的腹泻最为严重, 这主要是由于它能产生高水平的 Shiga toxin (Stx) [1,2]。Stx 由一个有毒性的 A 亚单位 (32000Da) 和 5 个无毒性的 B 亚单位 (7700Da) 组成, B 亚单位能与细胞表面受体相结合 [3]。Stx 除了像 CT 和 LT 那样有肠毒和细胞毒之外, 还有神经毒性 [4]。目前国内外还没有预防痢疾, 特别是预防志贺氏 I 型的有效菌苗株。为了构建预防痢疾的多价菌苗候选株, 我们从痢疾志贺氏 I 型菌染色体克隆了编码 Stx 的基因, 并将 Stx-B 亚单位的基因克隆至高表达载体, 获得了 Stx-B 亚单位在大肠杆菌中的高效表达。

材料和方法

(一) 材料

1. 培养基和细菌培养: 细菌用 LB 培养基在 37°C 培养。但重组子 S1001 (*E. coli* DH5/pSU108) 在 30°C 培养, 当需要

高表达 Stx-B 时, 置 42°C 热诱导 2—4h。对氨苄青霉素 (Ap) 抗性的菌, 加 Ap 至最终浓度 50—100 μg/ml。

2. 质粒、细菌菌株及细胞株: 本试验所用质粒、细菌和细胞株详见表 1。

3. 各种酶和化学试剂: 各种限制酶均购自华美公司; DNA 多聚酶 I、碱性磷酸单酯酶、T4 DNA 连接酶和 4 种脱氧核糖核苷酸 (dATP、dCTP、dGTP 和 dTTP) 均为 Boehringer Mannheim 产品; [α -³²P]dATP 由 Amersham 公司供应; 硝酸纤维素滤膜是北京化工学校产品; 脱氧核糖核酸酶 I、鲑鱼精子 DNA、SDS、牛血清白蛋白购自 Sigma 公司; 琼脂糖凝胶系 Serva 公司产品; 其余化学试剂均系分析纯级。

(二) 方法

1. DNA 操作技术: 细菌质粒和染色体 DNA 的分离纯化、限制酶酶解、碱性磷酸单酯酶去除 5' 磷、琼脂糖凝胶电泳、DNA 的连接、转化和 Southern blot 均按

本文于 1991 年 11 月 29 日收到。

表 1 实验用的菌株和质粒
Table 1 Strains and plasmids for experiments

Strains	Relevant characters	Source
<i>E. coli</i> K-12		
JM83	F-ara Δ (lac-proAB) rpsL(Str ^r) (ϕ 80 d Δ (LacZ) M15)	Stored in our Lab.
DH5	endA1, recA1, hsdR17, supE44 gyrA96, thi-1, relA1	Walker
933J	SLT ⁺ , wild type	Newland
L1001	JM83/pUC19	this study
L1002	RR1/pBR322	this study
L1003	JM83/pMGC001	this study
S1001	DH5/pSU108	this study
S0001	DH5/pJLA503	this study
<i>S. dysenteriae</i> I		
W30864	Wild type	Watanabe
502	Wild type	Hospital 302
Cell strain		
Hela-S3		stored in our Lab.
Plasmids		
pUC19	Ap ^r	stored in our Lab.
pJLA503	Ap ^r	Walker
pJN26	SLT-B ⁺ , Ap ^r	Newland
pJN37-19	SLT ⁺ , AP ^r	Newland
pMGC001	Stx ⁺ , Ap ^r	this study
pSU108	Stx-B ⁺ , Ap ^r	this study

常规方法^[5]。

2. 志贺氏类毒素(SLT)基因探针及其B亚单位(SLT-B)基因探针的制备:以Hind III酶切质粒pJN37-19,经琼脂糖凝胶电泳后,回收含SLT的1.2kb的DNA片段,此片段含90%的SLT-A和100%的SLT-B。经缺口翻译制成DNA探针,用菌落原位杂交筛选含编码整个Stx基因的克隆。Stx-B特异性基因探针制备如下:质粒pJN26^[6]包含SLT-1的部分A亚单位基因和全部B亚单位基因,根据酶切图谱,其AccI-Hinc II片段只含SLT-1的B亚单位基因,不包含任何A亚单位部分,故可利用AccI-Hinc II片段制备Stx-B亚单位特异的探针,因SLT-1的B亚单位和Stx-B亚单位有高度同源性^[7]。于是质

粒pJN26经Acc I和Hinc II酶解后,用2%琼脂糖凝胶电泳进行电泳,回收只含SLT-1的B亚单位部分177碱基对的DNA片段,经同位素标记后,可作为Stx-B亚单位的特异性探针。

3. 聚丙烯酰胺凝胶电泳: SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳按照Schägger等^[8]描述的方法进行,该系统可分离分子量为1—100kDa的蛋白质。SDS-聚丙烯酰胺凝胶由堆积胶,间隔胶和分离胶三部分组成;上样液由下列成分组成:60mmol/L Tris-HCl(pH6.8)、1%SDS、1%巯基乙醇、10%甘油和0.01%溴酚蓝。预先染色的蛋白分子量标准购于Bio-Rad公司。

4. Stx-B亚单位的分离纯化^[9]:将表达Stx-B亚单位的克隆株(S1001)在

30℃培养过夜,次日早晨将菌浓度稀释至 $OD_{600nm}=0.4$,再置30℃培养至 $OD_{600nm}=0.8$,然后42℃诱导4h,离心收集菌体,以10mmol/L Tris-HCl(pH8.0)洗菌体二次,悬浮菌体于25%蔗糖-1mmol/L EDTA-10mmol/L Tris-HCl(pH8.0),30℃轻轻振摇10min,离心收集菌体,将沉淀迅速悬浮于冰冷的蒸馏水中,再在4℃轻摇10min,离心收集上清(称为细胞周质部分),将沉淀悬浮于10mmol/L Tris-HCl(pH8.0)(称为细胞浆部分)。将细胞周质部分用快速蛋白液相层析(FPLC)进一步纯化,蛋白质浓度用Lowry法测定。

5. Stx-B亚单位的多克隆和单克隆抗体的制备:用上述方法纯化的Stx-B亚单位分别制备多克隆抗体^[10]和单克隆抗体^[11]。多克隆抗血清被用于包含质粒pJLA503的*E. coli* K-12(S0001)反复吸附以达到进一步纯化。

6. 总细胞抽提物的Western blot:总细胞抽提物的Western blot基本上参照Boulain等的方法^[12],在SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后,蛋白带用半干燥电转移器转移至硝酸纤维素滤膜,然后用预先吸附的对Stx-B亚单位有特异性的多克隆或单克隆抗体作为第一抗体,以¹²⁵I标志的A蛋白作为第二抗体。

7. 细胞毒性测定:克隆株的细胞毒性测定基本上参照Gentry等^[13]的方法,并加以改进。将待测菌株培养过夜,离心收集菌体,用生理盐水悬浮,超声破碎,离心(12000r/min 10min),除去沉淀物,上清用0.45μm的微孔滤膜过滤,然后用Hela细胞^[14]对它们的毒性进行测定。

8. 兔肠结扎试验:用兔肠结扎试验测定克隆株的肠毒素作用^[15]。

9. 神经毒测定:为了测定克隆株的神经毒性^[16],注射按方法8制备的0.2ml待测样品至10—16g小鼠后肢肌肉内,观察小鼠神经中毒情况。

10. 毒素的半定量测定:采用上述Hela细胞的测毒方法,将不同稀释度的样品加入Hela细胞,半定量地测定克隆株产生Stx的情况。

结果与讨论

(一) 质粒pMGC001的构建

从野生型志贺氏I型菌W30864分离纯化染色体DNA,用EcoRI酶解,琼脂糖凝胶电泳后,用SLT基因作探针进行核酸杂交,初步确定Stx基因在大约4—5kb的EcoRI片段内。于是以EcoRI大量酶解W30864的染色体DNA,电泳后从凝胶中切出含3—6kb DNA的凝胶,用电洗脱法从凝胶中回收DNA片段,与经EcoRI酶解并用CIP处理过的载体pUC19 DNA相连接,转化大肠杆菌JM83,在含有氨苄青霉素的麦康凯平板上挑选白色的转化子,再进一步用SLT基因探针做菌落原位杂交,筛选包含Stx基因的阳性菌落,将其中一个阳性克隆命名为pMGC001。再用EcoRI将其酶解,表明编码Stx的基因被包含在4.5kb的片段内。

(二) 重组子L1003(JM83/pMGC001)的生物测定

按“材料和方法”所述,用Hela细胞测定克隆株L1003的细胞毒性,结果表明克隆株L1003、阳性对照*S. dysenteriae*1(W30864、502)和*E. coli* 933J均能杀死Hela细胞,而阴性对照L1001和L1002不影响Hela细胞的生长(图1)。

用兔肠结扎试验测定了克隆株L1003的肠毒素作用。分别将克隆株L1003、阳

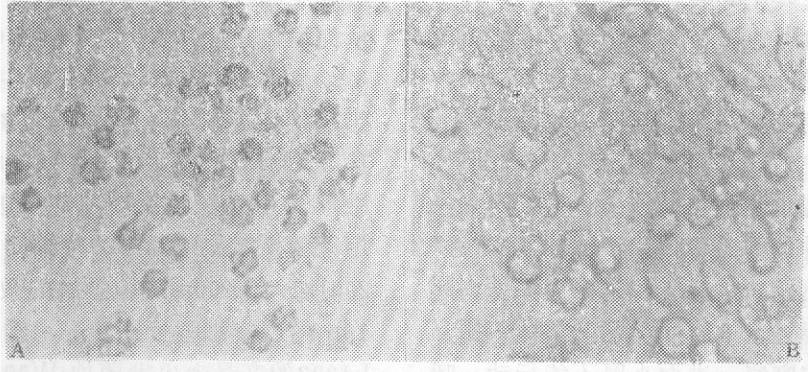


图 1 克隆株L1003的细胞毒作用

Fig.1 The cytotoxic effect of cloned strain L1003

- A. Cloned strain L1003
- B. Negative strain L1001

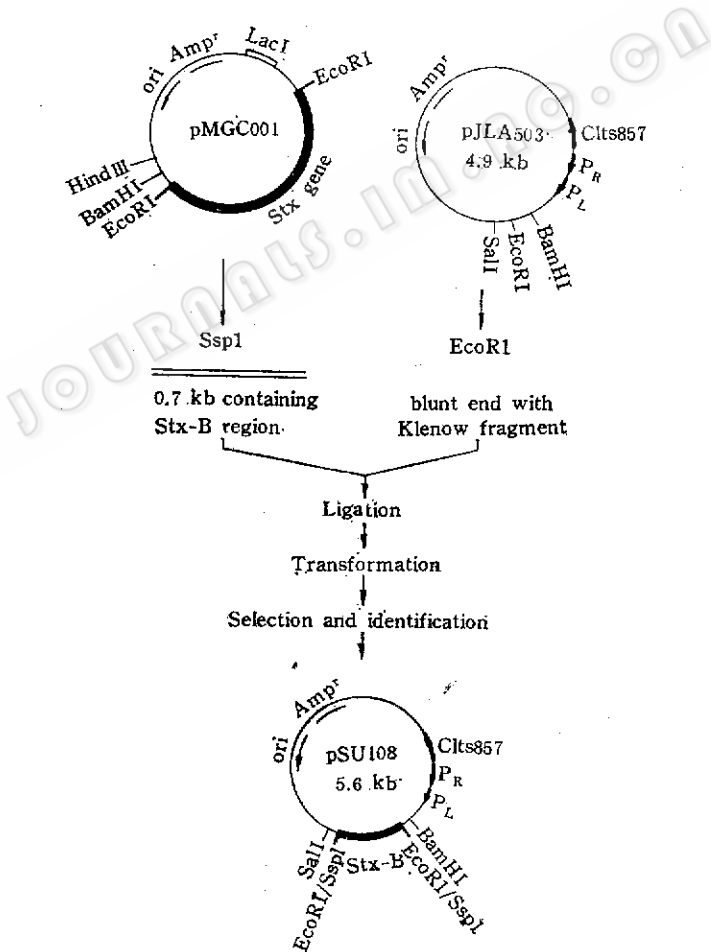


图 2 构建含Stx-B基因的质粒pSU108

Fig.2 Construction of the hybrid plasmid containing Stx-B region

性对照 *E. coli* 933J、*S. dysenteriae* 1 W30864 和阴性对照 L1001 的样品制备液注入结扎的小肠段内, 12h 后观察结果。结果表明克隆株与阳性对照株均能引起肠段积水、充血和轻微的组织坏死, 而阴性对照不出现上述现象。

克隆株的神经毒作用按“材料和方法”所述进行测定。结果表明, 由克隆株引起症状最为迅速, 3h 后小鼠就精神不振, 10h 后四肢麻痹, 进而小鼠不能行动、呼吸困难, 20h 后即死亡。阳性对照株 *E. coli* 933J 引起的症状类似于克隆株, 但

病情发展较缓慢, 而阴性对照株没有引起任何症状。

用Hela细胞对克隆株产生的Stx进行半定量测定。将各待测菌株的过夜培养物稀释至 $OD_{600nm} = 1$, 各取30ml, 离心后悬浮于3ml生理盐水中, 超声破碎, 除菌后用灭菌生理盐水稀释, 从不同稀释度各取20 μ l加入含200 μ l细胞悬液的微孔中, 12—18h内观察细胞致死情况, 结果表明克隆L1003的产量为出发菌株W30864的16倍。

(三) 编码 Shiga toxin B 亚单位 (Stx-B) 基因的克隆

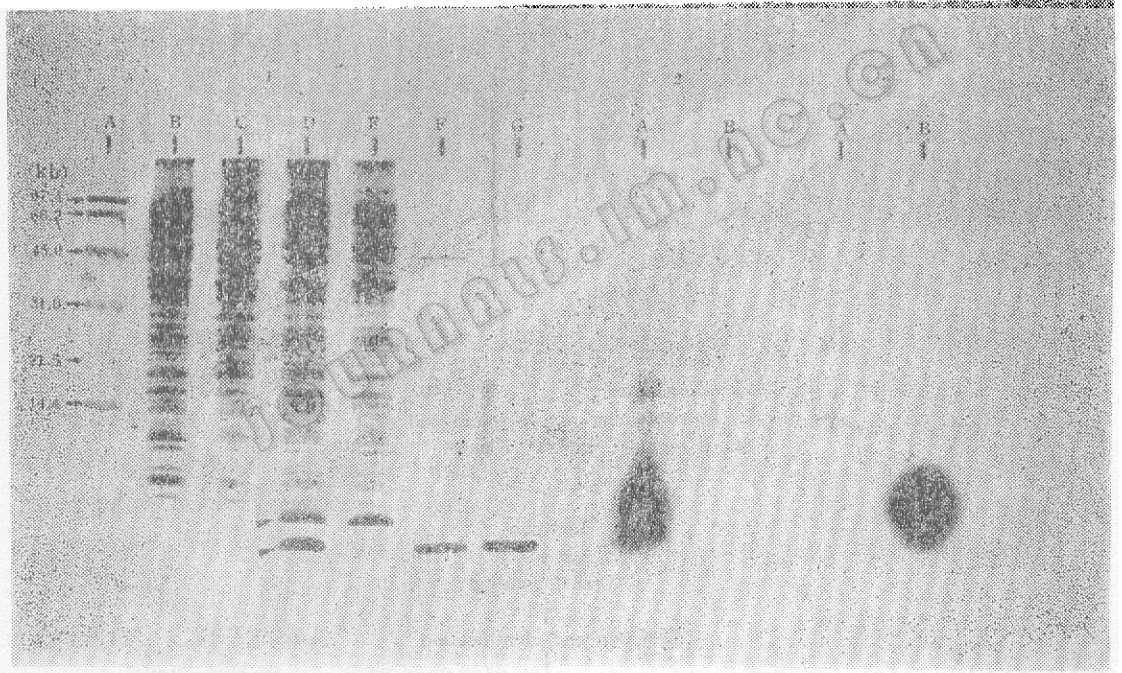


图 3 Stx-B亚单位的高表达和分离纯化及其SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和 Western blot 分析

Fig.3 SDS-PAGE and Western blot analysis of high level expression and purification of Stx-B subunit

1. SDS-PAGE analysis of high level expression and purification of Stx-B subunit
A. Molecular weight markers, B. S0001 (DH5/pJLA503) with heat induction, C. S1001 (DH5/pSU108), D. S1001 (DH5/pSU108) with heat induction, E. Pellet after cold shock, F. Supernatant after cold shock, G. After FPLC
2. Western blot with polyclonal antibody against Stx-B subunit
A. S1001 (DH5/pSU108) with heat induction, B. S0001 (DH5/pJLA503) with heat induction
3. Western blot with monoclonal antibody against Stx-B subunit
A. S0001 (DH5/pJLA503) with heat induction, B. S1001 (DH5/pSU108) with heat induction

从杂种质粒pMGC001大量制备 Ssp1 的0.7kb DNA片段, 同时以EcoR I 酶解表达载体pJLA503, 经DNA多聚酶 I 平末端后, 与含Stx-B亚单位的0.7kb Ssp1 片段相连接, 转化大肠杆菌DH5, 得重组质粒pSU108(图2)。

(四) Stx-B 亚单位在大肠杆菌的高效表达

为了对重组子 S1001(DH5/pSU108) 进行表达分析, 按“材料和方法”部分所述, 分别从阴性对照株 S0001(DH5/pJLA503) 和克隆株 S1001(DH5/pSU108) 制备样品, 进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 结果见图3。从图3-1可见, 克隆株 S1001在42℃诱导后能高效表达 Stx-B(图3-1中D)。从图3-1中D 可以看到存在很强的克隆株所特有的二条带(如箭头表示), 其中分子量较小的为成熟的 Stx-B, 分子量约为 7.7kDa, 与报道的相一致; 而分子量较大的那条带为成熟的 Stx-B的前体。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳表明克隆株S1001能高效表达Stx-B。

(五) Stx-B 亚单位的分离纯化和特异抗体的制备

按“材料和方法”所述, 对 Stx-B进行分离纯化。克隆株 S1001经42℃诱导后, 进行冷休克处理。因成熟的Stx-B位于细胞周质部分, 冷休克处理时能从细胞中释放出来, 而未成熟的Stx-B在细胞浆部分。通过冷休克处理可将成熟的Stx-B与未成熟的 Stx-B分开。图3-1中E是经冷休克处理后的沉淀部分, 包含Stx-B的前体; 而图3-1中F则为上清部分, 包含成熟的 Stx-B。由此可见经冷休克处理后成熟的 Stx-B已得到初步纯化。再用FPLC作进一步纯化后, 获得均一的 Stx-B, 见图3-1中G。

按“材料和方法”所述, 以纯化的 Stx-B分别制备多克隆和单克隆抗体, Western blot, 证明它们对Stx-B有特异的免疫反应, 结果见图3-2和图3-3。图3-2为多克隆抗体的 Western blot, 图3-3为单克隆抗体的 Western blot。从图3-2和图3-3可知, 无论多克隆抗体或是单克隆抗体, 对 Stx-B都有特异性, 这些多克隆抗体和单克隆抗体为以后对Stx-B的进一步研究提供了有利条件。

参 考 文 献

- [1] Jackson, M.P. et al.: *Microbiol. Path.*, 8:235, 1990.
- [2] Cantey, J.R. et al.: *J. Infect. Dis.*, 151:766, 1985.
- [3] Strockbine, N.A. et al.: *J. Bacteriol.*, 170:1116, 1988.
- [4] Eiklid, K. et al.: *J. Immunol.*, 130:380, 1983.
- [5] Maniatis, T. et al.: *Molecular cloning, A Laboratory Manual*, CSH Laboratory, CSH, N.Y., P.440, 1982.
- [6] Jackson, M.P. et al.: *Microbiol. Path.*, 2:350, 1987.
- [7] O'Brien, A.D. et al.: *Microbiol. Rev.*, 51:206, 1987.
- [8] Schägger, H. et al.: *Anal. Biochem.*, 166:338, 1987.
- [9] Donohue-Rolfe, A. et al.: *Infect. Immun.*, 39:270, 1983.
- [10] Muller, G.M., et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 79:569, 1982.
- [11] Harlow, E. et al.: *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, P.139, 1988.
- [12] Boulain, J.C. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, 205:339, 1986.
- [13] Gentry, M.K. et al.: *J. Clin. Microbiol.*, 12:361, 1980.
- [14] Timmis, K.N. et al.: *FEMS Microbiol. Lett.*, 30:301, 1985.
- [15] Formal, S.B. et al.: *Br. J. Exp. Pathol.*, 42:504, 1961.
- [16] Donohue, A. et al.: *J. Exp. Med.*, 160:1767, 1984.

Cloning of the Shiga Toxin Gene and High Level Expression of B Subunit in *Escherichia coli* K-12

Su Guofu Li Fengsheng Huang Peitang

Rui Xiangliang Huang Cuifen

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

In this study we have cloned the gene encoding the Shiga toxin(Stx) from the chromosomal DNA of *S. dysenteriae* type 1 (W30864). The Stx gene was located in a 4.5 kb EcoR1 fragment. A series of biological experiments showed that the hybrid plasmid pMGC001 containing Stx gene could produce Shiga toxin, and the amount of the Stx produced by pMGC001 was 16 fold more than that produced by its parent strain. The cloned strain had cytotoxic and enterotoxic activities, also neurotoxin. The gene for Stx-B subunit was subcloned into plasmid pJLA503 from plasmid pMGC001. We obtained the high level expression of Stx-B in *E. coli* K-12. The Stx-B has been purified in large quantities. The polyclonal and monoclonal antibodies against Stx-B were raised. Western blot showed that they can react specifically to the B subunit.

Key words *Shigella dysenteriae* 1; Shiga toxin B subunit; gene cloning; high level expression