论著

文章编号:1000-5404(2006)15-1582-03

肠出血性大肠杆菌O157:H7志贺样毒素Ⅱ毒素亚单位Stx2A的表达与纯化

马 颖,毛旭虎,邹全明,张卫军 (第三军医大学医学检验系临床微生物学及免疫学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 克隆表达肠出血性大肠杆菌(*Enterohemorrhagic Escherichia coli*,EHEC)O157:H7志贺样毒素A亚单位(Shiga-like toxin,Stx2A),并对其初步纯化。**方法** 设计引物采用PCR法自EHEC O157:H7基因组扩增Stx2A的编码基因stx2a,T-A克隆后构建原核表达质粒pET-11c(+)-stx2a,经测序鉴定后转化*E. coli.* BL21(DE3),IPTG诱导表达,以SDS-PAGE和Westen blot分析目的蛋白的表达,并采用固相镍离子亲和层析纯化重组蛋白。**结果** 扩增的stx2a基因约950 bp;原核表达质粒pET-11c(+)-stx2a经酶切和测序鉴定与预期序列一致;并在*E. coli.* BL21(DE3)中得到高效表达,蛋白表达率约30%;PAGE初步测定目的蛋白的相对分子质量约31×10^3;经固相镍离子亲和层析纯化后,蛋白纯度可达92.3%。**结论** EHEC O157:H7 Stx2A的高效表达与初步纯化,为探讨O157:H7菌的感染机制奠定基础。

关键词:肠出血性大肠杆菌O157:H7;毒素A亚单位;表达;纯化

中图法分类号:Q503;R378.21;R394.3 **文献标识码**:A

Expression and purification of Shiga-like toxin 2A from EHEC O157:H7

MA Ying, MAO Xu-hu, ZOU Quan-ming, ZHANG Wei-jun (Department of Clinical Microbiology and Clinical Immunology, College of Medical Laboratory, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To clone the gene and identify the activity of Shiga like toxin 2A of EHEC O157:H7. Methods The gene of stx2a was amplified from EHEC O157:H7 chromosome by PCR and then cloned into pMD18-T vector. Thereafter, the genes were cut from pMD18-T vector and cloned into prokaryotic expression plasmid pET-11c (+), and recombinant plasmids were transformed into *E. coli.* BL21(DE3). The protein of Stx2A was analyzed and purified with polyacrylamide gel electrophoresis and nickel-affinity chromatography colomn. Results The gene of stx2a was successfully cloned into pET-11c (+). The molecular relative mass (Mr) of the expressed products was 31×10^3, the expression rate were about 30%, and the rate of purified protein was 92.3%. Conclusion Stx2A was successfully expressed in prokaryotic expression system.

Key words: EHEC O157:H7; Stx2A; expression; purification

肠出血性大肠杆菌(*Enterohemorrhagic Escherichia coli*,EHEC)O157:H7的致病性体现于细菌的黏附定植和细菌毒素2个方面。O157:H7主要产生2种毒素,分别称为志贺毒素Ⅰ(Stx1)和志贺毒素Ⅱ(Stx2)[1]。在细菌体内,Stx2为分泌型表达,Stx1为胞内表达。2种毒素均由1个A亚单位和5个B亚单位组成,A亚单位具有细胞内毒性,能与28S rRNA作用导致蛋白质合成停止,是EHEC O157:H7引起临床表现的病理基础;B亚单位具有细胞结合特性,能与具有特定受体(Gb3)的细胞结合,从而引导A亚单位发挥作用[2]。多数O157:H7细菌产生Stx2,而且Stx2毒性强于Stx1,与溶血性尿毒综合征(HUS)及血栓形成性血小板减少性紫癜(TTP)等严重并发症的相关性更为密切[3,4]。因此,Stx2是该菌致病性的重要物质基础。本研究克隆表达Stx2A,为进一步研究其生物学性质奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株 EHEC O157:H7来自中国医学菌种保藏中心(CMCC,id44828);宿主菌*E. coli.* DH5α及BL21(DE3)由本室保存;质粒pET-11c购自Novagen公司;pMD18-T购自TaKaRa公司。

1.1.2 试剂 限制性内切酶*Nde*Ⅰ、*Bam*HⅠ、*Taq* DNA聚合酶、T_4 DNA连接酶均购自TaKaRa公司;质粒抽提试剂盒、DNA回收纯化试剂盒购自Omega公司;鼠抗Stx2单克隆抗体1C5由本室制备(另文报道)。

作者简介:马 颖(1972-),女,天津市人,博士,讲师,主要从事抗体工程方面的研究。电话:(023)68752315

通讯作者:邹全明,电话:(023)68752316,E-mail:qmzou@mail.tmmu.com.cn

收稿日期:2005-12-05;修回日期:2006-01-17

1.2　方法

1.2.1　目的基因 stx2a 的扩增　　根据 GenBank 公布的 Stx2A 基因(stx2a)核苷酸序列(登录号:AB_030484)、酶切位点检索和引物设计原则,设计 1 对引物,去掉信号肽和终止密码子,上游引物 5′端引入 *Nde* Ⅰ酶切位点,下游引物 3′端引入 *Bam*H Ⅰ酶切位点和 6 个组氨酸的 His 纯化标签。引物 P1:5′-CATATGCGAGAGTTTACGATAGACTTTTCGACCCAA-3′,引物 P2:5′-GGATCCGTGGTGGTGATGATGGTGTTTACCCGTTGTATATA-3′,Premier 5.0 软件设计和分析评价,并由大连 TaKaRa 公司合成,PAGE 纯。收集 EHEC O157: H7 过夜,培养菌液 1 ml,离心后去上清,加入 0.1 ml 双蒸水重悬细菌,煮沸 10 min,再次离心后取上清作模板。PCR 扩增反应条件为:94 ℃预变性 5 min,94 ℃变性 1.5 min,60 ℃退火 1 min,72 ℃延伸 1.5 min,35 个循环,72 ℃完全延伸 10 min。1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测并回收。

1.2.2　目的基因 stx2a 与 pMD18-T 连接、转化和酶切鉴定　　stx2a PCR 回收产物与 pMD18-T 于 16℃连接过夜,连接产物转化感受态细菌 *E. coli.* DH5α,以含有氨苄及 X-gal/IPTG 的 LB 琼脂平板筛选,挑取白色菌落增菌后提取质粒,经 *Nde* Ⅰ、*Bam*H Ⅰ双酶切鉴定。

1.2.3　重组质粒 pET-11c-stx2a 的构建　　pMD18-stx2a 质粒经 *Nde* Ⅰ、*Bam*H Ⅰ双酶切回收 950 bp 片段后,与同样酶切回收的 pET-11c 载体相连接,22 ℃连接 1 h,65 ℃灭活 10 min。连接产物转化感受态细菌 *E. coli.* DH5α,以含有氨苄及 X-gal/IPTG 的 LB 琼脂平板筛选,挑取白色菌落增菌后提取质粒,经 *Nde* Ⅰ、*Bam*H Ⅰ双酶切鉴定。酶切鉴定无误的重组质粒 pET-11c-stx2a 采用 T_7 启动子和终止子通用引物测定碱基序列,由上海申友生物工程公司完成。通过 Wdnasis 软件对测序结果与 GenBank 公布序列进行比对分析。

1.2.4　pET-11c-stx2a 在 *E. coli.* BL21(DE3)中的诱导表达及鉴定　　将阳性重组子 pET-11c-stx2a 转化至感受态细菌 BL21(DE3)中,双酶切鉴定,确认重组质粒成功转入 BL21(DE3)中。将重组工程菌接种于 Amp^+ LB 培养液中,37 ℃摇床培养(200 r/min)待 $D(600) \approx 0.8$ 时,加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L开始诱导,于诱导 0、2、4、6、8 h 取样并在酶标仪上测定其吸光度值[$D(600)$],同时诱导空载体菌作对照。超声波裂解菌体,功率 300 W 超声 30 s,间歇 30 s,工作 30 次。取样染色后于显微镜下观察破菌效果,未破细菌 <2 个/油镜视野为裂菌完全。750 × *g* 离心 30 min 去掉未破细菌,上清经 12 000 × *g* 高速离心 30 min 后,分离上清和沉淀。取上清及沉淀进行 SDS-PAGE,鉴定目的蛋白的表达及表达形式。重组蛋白 Stx2A N 端 5 个氨基酸序列的测定委托北大生命科学院完成。

1.2.5　包涵体洗涤与溶解　　上述高速离心沉淀样本以含 1% Tritone X-100 的 PBS 重悬,4 ℃搅拌洗涤 20 min。12 000 × *g* 离心 20 min,弃上清,重复洗涤 1 次。上述沉淀以含 2 mol/L 尿素的 PBS 重悬,4 ℃搅拌洗涤 20 min。12 000 × *g* 离心 20 min,弃上清,重复洗涤 1 次。上述沉淀以含 8 mol/L 尿素的 PBS 重悬,4 ℃搅拌溶解过夜。12 000 × *g* 离心 20 min,上清即为重组蛋白包涵体溶液。

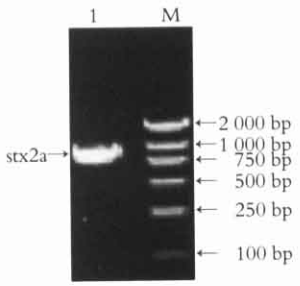
1.2.6　采用固相镍离子亲和层析对重组蛋白 Stx2A 进行初步纯化　　0.1 mol/L $NiSO_4$ 填充柱,4 ~ 5 个柱体积,去离子水洗去未能结合于柱上的游离 Ni^{2+}。缓冲液 A(20 mmol/L PBS,5 mmol/L二巯基乙醇,0.5 mol/L NaCl,8 mol/L 尿素,pH 7.5)平衡柱,4 ~ 5 个柱体积,上样,流速 0.5 ml/min,样品 40 ml(0.5 mg/ml),缓冲液 B(20 mmol/L PBS,5 mmol/L 二巯基乙醇,0.5 mol/L NaCl,0.5 mol/L 咪唑,8 mol/L 尿素,pH 7.5)洗脱目的蛋白,使 B 液浓度在 40 min 内达到 100%,收集洗脱峰。

1.2.7　检测重组蛋白 Stx2A 的免疫反应性　　以鼠抗 Stx2 单克隆抗体作一抗,羊抗鼠 IgG^{-HRP} 为二抗,进行 Western blot。

2　结果

2.1　目的片段的 PCR 扩增

电泳结果显示所扩增的目的片段大小约为 950 bp,与预期 stx2a 片段大小相符,初步证实扩增产物为所需目的片段。见图 1。



1: PCR 扩增的 stx2a 基因; M: DL2 000 DNA 标准

图 1　目的片段的 PCR 扩增产物电泳图

2.2　重组质粒 pET-11c-stx2a 的鉴定

重组质粒 pET-11c-stx2a 经 *Nde* Ⅰ、*Bam*H Ⅰ双酶切后,电泳结果显示酶切产物包含约 950 bp 的目的条带及 1 条与 pET-11c 空质粒酶切片段大小相符的片段。见图 2。



1:PCR 扩增的 stx2a 基因; 2: *Nde* Ⅰ, *Bam*H Ⅰ双酶切 pET-11c-stx2a; 3: *Nde* Ⅰ, *Bam*H Ⅰ双酶切 pET-11c; M:DL2 000 DNA 标准

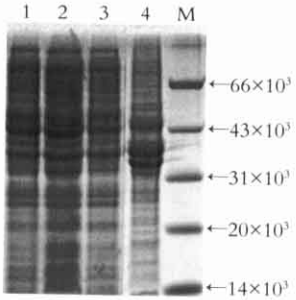
图 2　重组质粒 pET-11c-stx2a 的酶切鉴定

2.3　stx2a 基因序列分析

重组质粒 pET-11c-stx2a 中 stx2a 基因测序结果显示,stx2a 的序列与 GenBank 检索序列一致性为 100%。

2.4　重组蛋白的表达及表达形式鉴定

重组子转入 *E. coli.* BL21,构建重组工程菌。经 IPTG 诱导,收集诱导前后的重组工程菌及超声破菌上清与沉淀,SDS-PAGE 检测可见在相对分子量约为 31×10^3 处出现 1 条新的蛋白表达带。电泳凝胶经 UVP 扫描分析,诱导表达蛋白表达量约占全菌蛋白的 30%。目的蛋白 Stx2A 存在于超声裂解沉淀中,超声上清中不含目的蛋白,说明 Stx2A 蛋白在大肠杆菌细胞内以包涵体形式表达。见图 3。

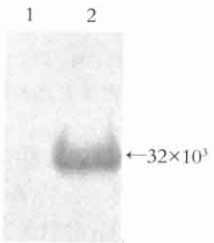


1：空载体菌 pET-11c/BL21；2：pET-11c-stx2a/BL21（诱导前）；3：pET-11c-stx2a/BL21 超声上清（诱导后）；4：pET-11c-stx2a/BL21 超声沉淀（诱导后）；M：蛋白标准

图3 Tricine 电泳检测 Stx2A 蛋白表达

2.5 重组蛋白的免疫学活性检测

Western blot 检测结果显示重组蛋白 Stx2A 与鼠抗 Stx2 单克隆抗体有良好的免疫反应性，见图4。



1：空载体菌 pET-11c/BL21；2：pET-11c-stx2a/BL21（诱导后）

图4 Western blot 检测 Stx2A 的免疫学活性

2.6 重组蛋白 N 端氨基酸序列的测定

测序结果分别为谷氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸、异亮氨酸、天门冬氨酸，与推定的氨基酸序列及 GenBank 所公布的 Stx2A N 端5个氨基酸相一致。

2.7 重组蛋白 Stx2A 的初步纯化

经固相镍离子亲和层析，凝胶成像分析系统扫描分析重组蛋白纯度为90.1%。

3 讨论

自 EHEC O157：H7 于1982年被确认为致病菌以来，其引发的食物中毒在世界各地包括中国均发生了暴发流行[7]。该菌的感染已经成为一个全球性的公共卫生问题，无论在发达国家还是发展中国家，都受到广泛关注。我国已将肠出血性大肠杆菌列为21世纪可能对国人卫生健康有重大影响的12种病原微生物之一。O157：H7 菌培养容易、繁殖迅速、感染力强、感染途径广泛[8]，使之极有可能作为未来军事斗争中的细菌战剂和生物恐怖战剂。美国疾病控制中心（CDC）已将 O157：H7 菌列为 B 类生物恐怖病原体严加防范。然而目前对其感染尚缺乏有效的治疗方法，临床上针对 O157：H7 菌的感染主要采用抗生素治疗及相应的对症治疗。新近的研究表明，抗生素使菌体破裂，导致 O157：H7 菌 Stx 的释放水平大大提高，使得抗生素对病程无明显影响甚至导致病程的延长，从而可能增加发生并发症的危险并引起死亡[9]。

Stx2 与 O157：H7 菌引起的严重并发症的发生、发展密切相关，是其主要的致病因子。Stx2 可以进入血液循环，引起目标组织器官，如肾小球和胃肠道内皮细胞的损伤，与溶血性尿毒综合征（HUS）及血栓形成性血小板减少性紫癜（TTP）等严重并发症的相关性更为密切。

本研究对 Stx2A 进行了基因克隆和原核表达，并引入6个组氨酸的 His 纯化标签，经固相镍离子亲和层析对其进行了初步纯化，获得了纯度较高的重组蛋白有 Stx2A，且 Westen blot 检测结果显示重组蛋白 Stx2A 与鼠抗 Stx2 单克隆抗体有良好的免疫反应性，为进一步研究 StxA 的生物学性质，发展预防、诊断和治疗 EHEC O157：H7 感染的免疫制剂奠定基础。

参考文献：

[1] ALEKSIC S, KARCH H, BOCKEMUHL J. A biotyping scheme for Shiga-like (Vero) toxin-producing *Escherichia coli* O157 and a list of serological cross-reactions between O157 and other gram-negative bacteria[J]. Zentralbl Bakteriol, 1992, 276(45): 221-230.

[2] STEIN P E, BOODHOO A, TYRRELL G J, *et al*. Crystal structure of the cell-binding B oligomer of verotoxin-1 from *E. coli*[J]. Nature, 1992, 355(6362): 748-750.

[3] MARCATO P, MULVEY G, READ R J, *et al*. Immunoprophylactic potential of cloned Shiga toxin 2 B subunit[J]. J Infect Dis, 2001, 183(3): 435-443.

[4] BELL B P, GRIFFIN P M, LOZANO P, *et al*. Predictors of hemolytic uremic syndrome in children during a large outbreak of *Escherichia coli* O157: H7 infections[J]. Pediatrics, 1997, 100(1): E12.

[5] HAICHEUR N, BENCHETRIT F, AMESSOU M, *et al*. The B subunit of Shiga toxin coupled to full-size antigenic protein elicits humoral and cell-mediated immune responses associated with a Th1-dominant polarization[J]. Int Immunol, 2003, 15(10): 1161-1171.

[6] HAICHEUR N, BISMUTH E, BOSSET S, *et al*. The B subunit of Shiga toxin fused to a tumor antigen elicits CTL and targets dendritic cells to allow mhc class I-restricted presentation of peptides derived from exogenous antigens[J]. J Immunol, 2000, 165(6): 3301-3308.

[7] National Institute of Health and Infectious Disease Control Division, Ministry of Health and Welfare of Japan. Verocytotoxin-producing Escherichia coli (enterohemorrhagic *E. coli*) infections, Japan, 1996-June 1997[J]. Infectious Agents Surveillance Report, 1997, 18(7): 153-154.

[8] 李升团，韩光红. 大肠杆菌 O157：H7 感染的病原学与流行病学[J]. 解放军预防医学杂志，1997，15(5)：387-389.

[9] CIMOLAI N, CARTER J E, MORRISON B J, *et al*. Risk factors for the progression of Escherichia coli O157: H7 enteritis to hemolytic-uremic syndrome[J]. J Pediatr, 1990, 116(4): 589-592.

（编辑 周 芳）