维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)07-0814-03

产肠毒素大肠杆菌定居因子Ⅰ基因克隆与表达

黄雪萍,王 勇,罗耀玲,冉丹霞,马永平,宋方洲

(重庆医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:在大肠杆菌 DH5α 中表达产肠毒素大肠杆菌(Enterotoxigenio escherichia coli,ETEC)定居因子 CFA/Ⅰ,检测重组表达的 ETEC CFA/Ⅰ。方法:以质粒 pBV220 为基础,构建 pBV220-CFA/Ⅰ重组载体,表达产物用 SDS-PAGE 鉴定,免疫原性实验验证。结果:成功构建了 pBV220-CFA/Ⅰ重组载体,表达产物的分子量与天然蛋白相同,动物免疫试验表明重组菌具有免疫原性。结论:CFA/Ⅰ基因的成功克隆为今后的 ETEC CFA/Ⅰ候选疫苗研制奠定了基础。

【关键词】产肠毒素大肠杆菌;质粒 pBV220;定居因子抗原Ⅰ

【中国图书分类法分类号】Q78;R378.2+1 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-10-31

Cloning and expression of *escherichia coli* colonization factor antigen CFA/Ⅰ in *escherichia coli* DH5α

HUANG Xue-ping,et al

(*Department of Biochemistry and Molecular Biology,College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*:To clone and express colonization factor antigen Ⅰ(CFA/Ⅰ) of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in E. coli DH5α. *Methods*:CFA/Ⅰ gene was cloned by PCR from H10407 and recombined to a expression vector pBV220.This vector was designated pBV220- CFA/Ⅰ and transformed into E. coli DH5α. The product was tested by SDS-PAGE and immunogenesis test. *Results*:The CFA/Ⅰ gene could be expressed in E. coli and contained strong immunogenesis by immune test. *Conclusion*:This study paved the way for using ETEC CFA/Ⅰ recombinant as a vaccine candidate in future.

【Key words】 ETEC;pBV220;CFA/Ⅰ

ETEC 是婴幼儿腹泻和旅游者腹泻的重要致病菌。现已知 ETEC 的 2 种抗原—定居因子抗原(Colonization factor antigens,CFA)和肠毒素(Enterotoxins)参与了腹泻过程[1]。ETEC 菌体表面的菌毛(又称定居因子抗原)是重要的致病因子,ETEC 感染宿主后,正是靠定居因子粘附于宿主小肠上皮细胞,经定居、繁殖产生肠毒素而致病。迄今为止,了解得比较清楚的菌毛抗原包括定居因子抗原Ⅰ(CFA/Ⅰ、定居因子抗原Ⅱ(CFA/Ⅱ)和定居因子抗原Ⅳ(CFA/Ⅳ)[1]。其中 CFA/Ⅰ是一种优势血清型定居因子,其相应抗体在阻止病原体在宿主小肠定居而引起腹泻方面起重要作用。在大多数情况下,该质粒同时编码耐热肠毒素(ST)[2]。定居因子吸附到肠粘膜上皮是 ETEC 致病的先决条件。因此,ETEC 菌体表面的定居因子(菌毛)是一种很理想的免疫原,是构建疫苗的重要组分。

作者介绍:黄雪萍(1980-),女,硕士,研究方向:生物化学与分子生物学。

通讯作者:宋方洲,男,教授,E-mail:fzsongcq@163.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30200244)。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒 大肠杆菌 DH5α 由本室保存,ETEC H10407 CFA/Ⅰ质粒由国家疾病控制中心卫生部细菌学重点实验室徐建国教授惠赠。pBV220 由武汉大学曹军卫教授惠赠。

1.1.2 试剂 各种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶和 TaqDNA 聚合酶均购自 TAKARA 公司;质粒小量快速抽取试剂盒和小量胶回收试剂盒购自上海申能博彩生物科技有限公司;氨苄青霉素为 Sigma 公司产品;引物由上海生工合成。

1.1.3 实验动物 由重庆医科大学动物中心提供。

1.1.4 主要仪器 基因导入仪(宁波新芝 SCIENTZ-2C)。

1.2 方法

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.2.1 pBV220 的改造 pBV220 改造方法是以 pBV220 为模板,用高保真 Taq DNA 聚合酶通过 PCR 扩增,以删除 cI857ts 片段,便于在活体内表达目的基因。引物 pR1 为 cI857ts 下游序列,pF1 为 cI857ts 上游序列,引物序列如下:pR1:GCCAAACGTCTCTTCAGGCCAC;pF1:TGTACTAAGGAGGTTGTATGGAACAACGCATAAC,PCR 反应条件为 94℃,5min;接着以 94℃、45s,56℃、45s,72℃、2min,30 个循环反应扩增;最后 72℃延伸 10min。PCR 扩增产物经 1.0%琼脂糖凝胶电泳鉴定,然后纯化回收,自连接环化后转化大肠杆菌 DH5α 即可。

1.2.2 PCR 扩增 CFA/Ⅰ基因 以菌株 ETEC H10407 质粒为模板,PCR 扩增 CFA/Ⅰ基因,CFA/Ⅰ的引物是根据 GeneBank (U55661)报道序列设计,上游引物引入 *Sac*Ⅰ酶切位点,即 P1:TGGGAGCTCAGGAGGAAATATGCA;下游引物引入 *Xho*Ⅰ的酶切位点,并去掉终止密码,即 P2:TGGCTCGAGCTAGAGTGTTTGACT。PCR 反应条件:94℃,45s;55℃,30s;72℃,5min,30 个循环反应扩增。PCR 扩增产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定,然后纯化回收。

1.2.3 pBV220-CFA/Ⅰ重组载体的构建和测序 分别用 *Sac*Ⅰ和 *Xho*Ⅰ双酶切纯化后的 CFA/Ⅰ和改造的 pBV220 质粒,胶回收,连接产物转化大肠杆菌 DH5α,用氨苄青霉素(100μg/ml)筛选阳性克隆并提取质粒,然后进行酶切鉴定和序列测定。重组质粒命名为 pBV220-CFA/Ⅰ。

1.2.4 CFA/Ⅰ基因在大肠杆菌中的表达及检测 将测序正确的阳性克隆菌落接种于 2ml LA 培养基中(含 100μg/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基),37℃ 150r/min 振荡过夜。以 1:20 比例接种于盛有 LA 培养基的试管中[3],37℃继续培养,在 4、5、6、7、8、9、10 和 11h 取样,离心收集菌体,用 PBS 洗 1 次,煮沸法提蛋白作 SDS-PAGE 分析,以确定最佳表达时间。

1.2.5 重组 CFA/I 的免疫原性试验 分别在 1d、7d 和 21d 用重组 CFA/Ⅰ免疫大鼠,28d 腹腔注射 ETEC H10407 进行攻毒试验,24h 后观察保护效果。

2 结 果

2.1 穿梭载体 pBV220- CFA/Ⅰ的鉴定

将 LB 平板上的 DH5α 菌落培养扩增,提取质粒,PCR 鉴定,得到 1 条与以 ETEC H10407 为模板扩增的相同大小的长约 5 014bp 的目的 DNA 片段(图 1),对质粒进行测序证明 PCR 结果与 GeneBank 的序列一致。

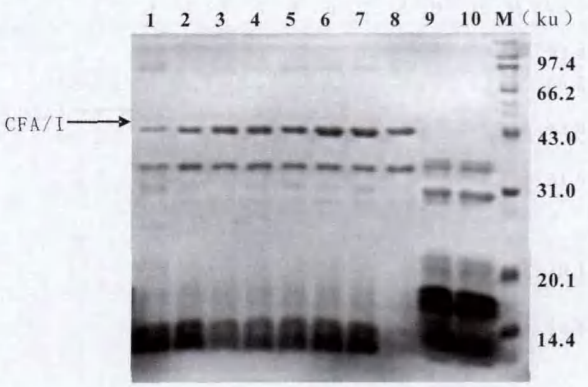
2.2 目的蛋白在大肠杆菌中的表达条件的优化

pBV220-CFA/Ⅰ转化大肠杆菌 DH5α 后,不同培养时间的 SDS-PAGE 分析(图 2)。结果显示,相对分子质量在 43 000 处有一明显的新生蛋白质,与预期的目的蛋白质的分子量一致,空质粒菌无此蛋白带。培养时间 9~10h,可得到最大的表达量。



M. DNA Marker(1kb ladder); 1. pBV220- CFA/Ⅰ质粒; 2. pBV220-CFA/Ⅰ PCR 产物; 3. H10407 PCR 产物

图 1 pBV220-CFA/Ⅰ PCR 产物的电泳结果



M. Protein marker; 1~8. pBV220- CFA/Ⅰ质粒(4、5、6、7、8、9、10 and 11h); 9. pBV220 质粒;Lane10:DH5α

图 2 蛋白表达不同时间的测定

2.3 重组 CFA/Ⅰ的免疫原性实验

攻毒 24h 后观察试验结果,发现免疫组(阳性对照)有明显的保护作用,大鼠生存状态正常,解剖发现,免疫组大鼠的脏器没有明显变化,而未免疫组(阴性对照)大鼠生活状态极不正常,出现懒动、少食等行为,解剖发现,未免疫组大鼠的脏器有明显病理变化,肝脏有严重的充血点,胃和小肠严重充气[4](图 3)。说明重组 CFA/Ⅰ保存了天然的免疫原性特性。

3 讨 论

维普资讯 http://www.cqvip.com



A B C

A. 正常大鼠；B. 未免疫大鼠的腹腔攻毒图；C. 免疫后腹腔攻毒的大鼠图

图 3 CFA/Ⅰ的免疫原性试验

要研制出一种安全、稳定、高效的 ETEC 疫苗尚有几个问题需要解决：①新的 ETEC 定居因子仍在发现，②不可能将所有的定居因子和肠毒素克隆在同一菌株共表达，③人肠道粘膜免疫机制没有完全搞清楚。目前认为，只有具备长期抗定居和抗毒素能力的疫苗才能有效预防 ETEC 腹泻[5]。载体疫苗是利用活的疫苗株做载体，通过重组菌在机体内繁殖产生保护性抗原，刺激机体产生持久的特异性免疫应答，其效果优于死菌苗。因此，克隆和表达 CFA/Ⅰ是研究 ETEC 载体疫苗的先决条件。

ETEC 致腹泻原因是定居因子抗原和肠毒素，只有联合使用多种不同血清型的定居因子和具有抗原性的减毒肠毒素一起使用才能有效预防 ETEC 腹泻。肠毒素分为热敏感肠毒素和热稳定肠毒素。CFA/Ⅰ基因往往与这两种毒素基因或其中的一种毒素基因位于同一质粒上。CFA/Ⅰ基因重组的目的，一方面为了提高其表达产量，另一方面则希望从根本上去除其生物毒性，探索研制活疫苗的可能性。本文初步的动物实验表明，攻毒后大鼠的脏器改变证实重组菌株免疫后的大鼠对野生株产生抗定居作用，显示出重组菌株的免疫保护性[6]。证明重组的 CFA/Ⅰ作为载体疫苗的候选抗原是可行的，为下一步工作打下了良好的基础。

参 考 文 献

[1] Zheng JP, Zheng ZS. Progress towards a vaccine against enterotoxigenic Escherichia coli(ETEC)[J]. Prog Microbiol Immmunol, 2003;31(1):51-54.

[2] Willshaw GA, Smith HR, Rowe B. CIoning of regions encoding colonization factor antigen Ⅰ and heat-stable enterotoxin in Escherichia coli[J]. FEMS Microbiol Lett, 1983;16(2):101.

[3] 邓建川，陈 耀，孙 航，等.重组原核表达载体 pQE30-hALRIP 的构建及鉴定[J]. 重庆医科大学学报，2007;32(3):229-231,235.

[4] 房 海，主编.大肠埃希氏菌[M]. 河北科学技术出版社，1997. 143.

[5] 郑继平，王令春，王 凡，等. 共表达 ETEC CFA/I、CS6 福氏痢疾减毒株与单独表达 CFA/Ⅰ及 CS6 混合疫苗株的免疫原性比较[J]. 中华微生物学和免疫杂志，2004;24(3):209-212.

[6] 罗 刚，杨 晓，李淑琴，等. 肠毒素大肠杆菌定居因子 CS6 抗原基因在大肠杆菌中的高效表达[J]. 军事医学科学院院刊，2004;28(3):232-234.

(责任编辑：谭乐勤)

(上接第 806 页)

[8] 薛峰杰，代志军，王西京，等.抑癌基因 PTEN 在乳腺癌中的表达及其临床意义[J]. 实用医技杂志，2004;11(10):2114-2116.

[9] Tamura M, Gu J, Matsumoto K, et al. Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN [J]. Science, 1998;280(5369):1614-1617.

[10] Polyak K, Lee MH, Erdjument-Bromage H, et al. Cloning of P27kipl: a cyclin dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals[J]. Cell, 1994;78(1):59-66.

[11] De Paola F, Vecci AM, Granato AM. P27kipl expresion in normal epithelium, benign and neoplastic breast lesions[J]. J Pathol, 2002;196(1):26-31.

[12] Yamada KM, Araki M. Tumor suppressor PTEN: modulator of cell signaling, growth, migration and apoptosis[J]. J Cell Sci, 2001;114(13):2375-2382.

(责任编辑：谭乐勤)