DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.14.022
第25卷第14期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 14
2003年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2003

文章编号:1000-5404(2003)14-1275-03

论著

大肠杆菌不耐热肠毒素B亚单位融合表达载体的构建及应用

鲁东水,毛旭虎,吴 超,邹全明 (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 构建大肠杆菌不耐热肠毒素B亚单位的融合表达载体。方法 PCR扩增LTB基因,并在其3′端去掉终止密码子,引入编码TAPI接头,通过*Eco*RⅠ和*Eco*RⅤ酶切位点重组于Pinpoint Xa-Ⅰ载体上,将幽门螺杆菌尿素酶B亚单位与之融合,转化*E. coli* JM109,SDS-PAGE及Western blotting分析其表达。结果 成功构建了LTB融合表达质粒,并获得了幽门螺杆菌尿素酶B亚单位与之融合表达。结论 LTB融合表达载体的成功构建为研究分子内佐剂疫苗奠定了实验基础。

关键词:不耐热肠毒素B亚单位;融合表达;载体
中图法分类号:R378.2+1;R394-33 文献标识码:A

Construction and application of a fusion expression vector containing subunit B of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin

LU Dong-shui, MAO Xu-hu, WU Chao, ZOU Quan-ming (Department of Clinical Microbiology and Immunology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct a fusion expression vector with subunit B of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. Methods Gene encoding LTB without stop codon obtained by PCR was introduced to a linker and was recombined on vector Pinpoint Xa-I through *Eco*RⅠ and *Eco*RⅤ sites and then fused with ureB. The recombinant was used to transform *E. coli* JM109. The expression of LTB was analyzed by SDS-PAGE and Western blotting. Results The fusion expression plasmid was successfully constructed. The subunit B of urease of *Helicobacter pylori* (Hp) fusogenic protein with LTB with the ability to bind GM_1 and the reactogenicity with polyclonal antibodies against Hp was harvested. Conclusion The successfully constructed vector provides experimental base for the studies of intramolecular adjuvant vaccine.

Key words: subunit B of heat labile enterotoxin; fusion expression; vector

大肠杆菌不耐热肠毒素(Heat-labile enterotoxin, LT)是由A和B两种亚单位组成的,其中A亚单位具有ADP-核糖基转移酶活性,能激活腺苷腺环化酶,B亚单位具有与神经节苷脂GM_1结合的能力。LTB亚单位在胞浆合成前体,切下21个氨基酸残基的信号肽后形成分子量约11.8×10^3的成熟单体分子分泌到胞周质与A亚单位按A∶B=1∶5比例组装成寡六聚体的LT全毒素分子。LT不仅是强烈的免疫原,也是一种强有力的粘膜免疫佐剂。LT与多种非相关的蛋白或非蛋白抗原经不同的免疫途径共免疫均能明显增强机体针对共服抗原的粘膜IgA和体疫IgG反应,同时还能消除机体对这些共免疫原的耐受,诱发针对它们的长期记忆反应[1]。但LT作为佐剂在应用时存在一个毒性问题。其B亚单位无毒性,也具有良好的辅佐功能。为了使LTB能与各种外源抗原基因融合表达分子内佐剂疫苗,我们构建了与LTB羧基末端融合表达的载体pLV2.0,并用它成功表达了幽门螺杆菌尿素酶B亚单位的分子内佐剂疫苗。

1 材料与方法

1.1 材料

菌株及质粒:DH5α、JM109 *E. coli*本室保种,Pinpoint Xa-Ⅰ为Promega公司产品,含有LT的产肠毒素大肠杆菌*E. coli* H44815(LT^+,ST^+)购自中国药品生物制品检定所;含有幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)尿素酶B亚单位(UreB)基因的质粒pBHP由本室构建。

工具酶:各种限制性内切酶、*Taq* DNA聚合酶、T_4 DNA连接酶、小牛肠碱性磷酸酶均购自华美生物工程公司;IPTG、GM_1神经节苷脂为Sigma产品,其它化学试剂均为分析纯。兔抗LT多抗血清购自上海市卫生防疫站,兔抗Hp多抗血清本室制备,HRP-羊抗兔IgG抗体(酶标二抗)购自武汉博士德生物科技有限公司。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30100161)
作者简介:鲁东水(1963-),男,江西省余干县人,实验师,主要从事幽门螺杆菌疫苗方面的研究。电话:(023)68752315
通信作者:毛旭虎,电话:(023)68752315, E-mail:mxh95xy@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2003-05-15;修回日期:2003-06-05

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.2 方法

1.2.1 细菌基因组DNA、质粒提取、DNA片段回收纯化 采用上海Sangon公司UNIQ10小量质粒抽提试剂盒和Silver Beads胶回收试剂盒，方法按说明书进行。

1.2.2 LTB融合表达质粒的构建 LTB DNA序列ATG上游约16 bp位置存在一个*Eco*RⅠ酶切位点，PCR产物经*Eco*RⅠ和*Eco*RⅤ双酶切并纯化后与同样*Eco*RⅠ和*Eco*RⅤ双酶切的Pinpoint Xa-Ⅰ载体相连接，构建LTB融合表达质粒pLV2.0，转化DH5α。

1.2.3 DNA酶切反应、连接、转化 按参考文献[2]进行。

1.2.4 PCR 根据GenBank公布的hLT基因序列[3]，设计了两条引物分别为：上游引物5′-agaggcagatattttcagactatcag-3′，下游引物5′-cagatatcggtgcgtagttttcatactg-3′。上游引物位于LTB DNA序列ATG上游64 bp位置，下游引物位于LTB 3′端终止子上游部分序列，同时引入*Eco*RⅤ酶切位点，并在LTB最后一氨基酸(Asn)残基密码子AAC与*Eco*RⅤ酶切位点之间设计增加了编码Tyr-Ala-Pro-Ile的12个核苷酸。以*E. coli* H44815基因组DNA为模板，按常规PCR方法进行扩增。反应条件：94 ℃预变性5 min，加入*Taq* DNA聚合酶，然后按如下参数循环：94 ℃，1 min，55 ℃，1 min，72 ℃，1 min，最后一个循环结束后72 ℃反应10 min。

1.2.5 DNA序列分析 用双脱氧法测序，由北京赛百盛生物公司完成。

1.2.6 蛋白表达分析 经筛选、鉴定的阳性重组子转化到*E. coli* JM109，1.0 mmol/L IPTG诱导9 h，用SDS-DAGE和Western blotting分析融合蛋白的表达。蛋白电泳采用Bio-Rad电泳系统，5%积层胶，12%分离胶，Tris-甘氨酸电泳缓冲液。电泳完后，一部分考马斯亮蓝染色，UVP扫描；另一部分电转移(40 mA，2 h)至硝酸纤维膜上，TBST封闭，4 ℃过夜；分别加入兔抗LT多抗血清/兔抗Hp多抗血清(一抗)，37 ℃温育1 h，TBST洗涤3次，每次10 min；再加入HRP-羊抗兔IgG抗体(酶标二抗)，37 ℃ 30 min，TBST洗3遍，最后加入底物显色。

1.2.7 GM_1-ELISA 以GM_1神经节苷脂包被聚乙烯塑料板，4 ℃过夜，加入细菌沉淀超声上清，37 ℃，30 min；TBST洗5次，10 min/次；加入抗LT多抗血清，37 ℃，30 min；TBST洗5次；再加羊抗兔HRP酶标二抗，TBST洗5次后加OPD底物显色。

2 结果

2.1 PCR扩增LTB基因

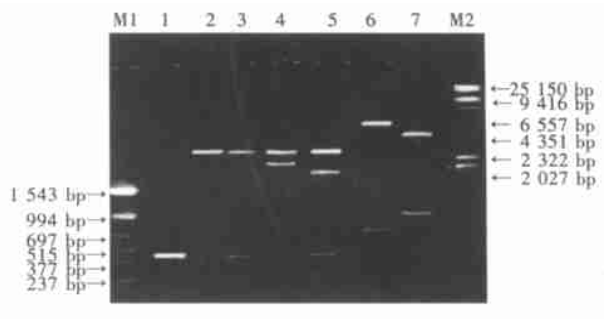
以*E. coli* H44815基因组DNA为模板进行PCR扩增，产物经1%琼脂糖凝胶电泳鉴定，得到了一条长约450 bp的DNA扩增产物，见图1。

2.2 LTB融合表达质粒的构建

将构建的LTB融合表达质粒pLV2.0转化*E. coli* DH5α，氨苄青霉素抗性LB平板筛选酶切鉴定阳性重组子，见图1、2。取阳性克隆测序，结果扩增的LTB基因序列与GenBank公布的完全一致。

2.3 LTB-UreB的融合表达

从pBHP中*Eco*RⅤ切下ureB基因片段与*Eco*RⅤ酶切的pLV2.0连接，利用ureB基因中*Bam*HⅠ酶切位点鉴定正、反向阳性重组子，构建LTB-UreB的重组质粒pLV2.1，见图1、2。同样的，正向重组子转化*E. coli* JM109，IPTG诱导，SDS-PAGE，分别以兔抗LT、兔抗Hp抗血清作免疫印迹证实在分子量约75×10^3位置表达了一特异蛋白带，重组蛋白表达量约19%，见图3。GM_1-ELISA亦证明重组蛋白具有与GM_1结合的能力。



M1. PCR Marker; 1: ltB PCR product (0.45 kb); 2: PinPiont Xa *Eco*RⅠ + *Eco*RV digestion (2.8 kb); 3: pLV2.0 *Eco*RⅠ + *Eco*RV digestion (2.8+0.45 kb); 4: pLV2.1 *Eco*RV digestion (2.8+2.2 kb); 5: pLV2.1 *Eco*RⅠ + *Eco*RV digestion (2.8+1.7+0.45 kb); 6: pLV2.1 sense recombinant *Bam*HⅠ digestion (4.0+1.0 kb); 7: pLV2.1 anti-sense recombinant *Bam*HⅠ digestion (4.3+0.7 kb); M2: λDNA/*Hind*Ⅲ Marker

图1 重组质粒的酶切鉴定

Fig 1 Detemination of the recombinant plasmid

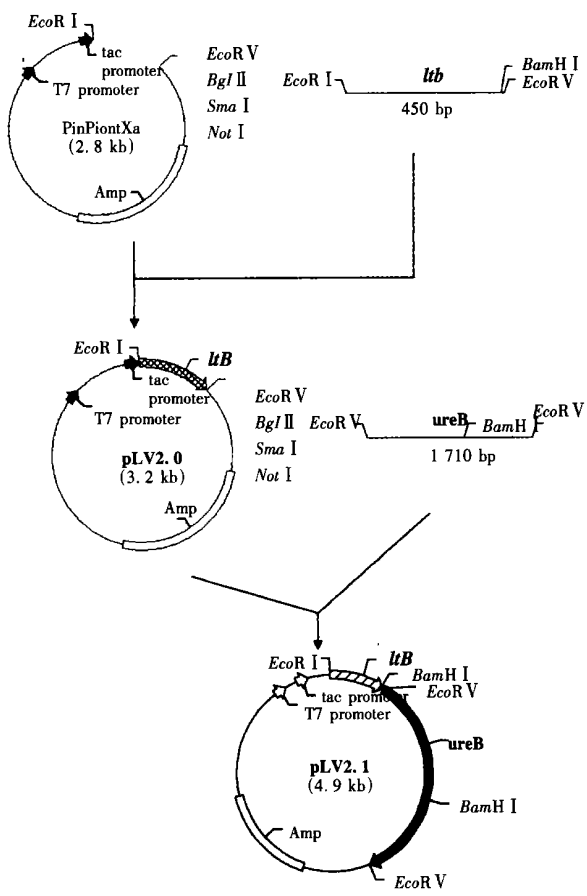
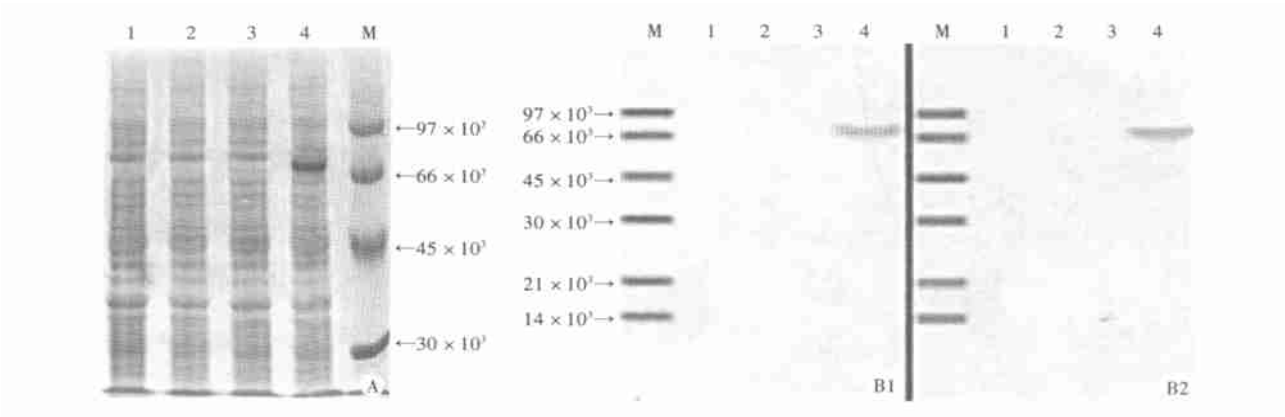


图2 重组质粒的构建示意图

Fig 2 Scheme of the construction of the recombinant plasmid

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



A: SDS-PAGE B: Western-blot (1: rabbit antiserum to LT; 2: rabbit antiserum to Hp); 1: JM109; 2: pLV2.0/JM109; 3: Untreated pLV2.1/JM109; 4: PLV2.1/JM109 treated with 1 mmol/L IPTG for 9 h; M: Low mass weight marker

图 3　融合蛋白的表达

Fig 3　Analysis of the expression of the fusion protein

3　讨论

LTB 亚单位缺乏 LT 全毒素分子的毒性, 但保留了作为粘膜免疫佐剂的作用。LTB 作为口服疫苗的抗原投递载体已引起人们的兴趣。Loregian 等[4] 将 LTB 与单纯疱疹病毒(HSV)DNA 聚合酶的 27 个氨基酸残基的多肽融合表达, 获得的重组蛋白显示具有抑制病毒 DNA 聚合酶活性进而影响病毒的复制, 表现出抗病毒能力。Rock 等[5] 报道, LTB 与人绒毛膜促性腺激素(hCG)β 亚基的羧基末端肽融合表达产物免疫小鼠, 产生了识别重组 hCGβ 亚基或天然 hCG 的抗体反应, 可能作为避孕疫苗使用。Jobling 等[6] 利用 LTB 基因与肺炎链球菌表面蛋白 A(PSPA)的基因融合表达了具有免疫活性的重组蛋白。

为了使 LTB 能与多种外源抗原基因融合表达, 我们构建了 LTB 通用融合表达载体 pLV2.0。该质粒具有如下特点: ①利用了高效表达载体 PinpointXa 的强大、可调节启动子和转录终止子; ②保留了 LTB 起始密码子 AUG 上游的 SD 序列; ③去掉了 LTB 的终止密码子, 在其后引入了多个专一限制性酶切的多克隆位点; ④在 LTB 与被融合蛋白之间设计了 4 个氨基酸 TAPI 的接头(Linker), 目的是干扰 α-螺旋的形成以最大保持 LTB 与被融合蛋白二者的天然构象; ⑤带有 LTB 的信号肽序列, 表达产物为分泌型蛋白。

以构建的 pLV2.0 为载体, 选择多克隆位点中的 *Eco*RV 酶切位点, 融合幽门螺杆菌尿素酶 B 亚单位全长基因, 构建了 Hp ureB 的分子内佐剂疫苗, GM_1-ELISA 及 Western blotTING 证实了其表达。

因此, 此融合表达载体的成功构建为研究以 LTB 作分子内佐剂之疫苗奠定了基础。

参考文献:

[1] de Haan L, Verweij W, Agsteribbe E, *et al*. The role of ADP-ribosylation and GM_1-binding activity in the mucosal immunogenicity and adjuvanticity of the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and *Vibro cholerea* cholera toxin[J]. Immun Cell Biol, 1998, 76(20): 270—279.

[2] J·萨姆布鲁克, EF·弗里奇, T·曼尼阿蒂斯著. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1992 34—55

[3] Tamura S, Yamanaka A, Shimohara M, *et al*. *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunits supplemented with a trace amount of the holotoxin as adjuvant for nasal influenza vaccine[J]. Vaccine, 1994, 12(12): 1083—1089

[4] Loregian A, Papini E, Satin B, *et al*. Intranuclear delivery of an antiviral peptide mediated by the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(6): 5221—5226

[5] Rock E P, Reich K A, Lyu D M, *et al*. Immunogenicity of a fusion protein linking the beta subunit carboxyl terminal peptide of human chorionic gonadotropin to the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin[J]. Vaccine, 1996, 14(16): 1560—1568

[6] Jobling M G, Palmer L M, Erbe J L, *et al*. Construction and characterization of versatile cloning vectors for the efficient delivery of native foreign proteins to the periplasm of *Escherichia coli*[J]. Plasmid, 1997, 38(3): 158—173

(编辑　薛国文)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net