

志贺毒素 B (ShT-B) 在 *E. coli* 中的融合表达 及特异性抗体制备

喻华英^{1,2}, 王景林¹, 高丰², 康琳¹, 赵金红³, 吴东林²

(1. 军事医学科学院微生物流行病学研究所, 中国北京 100071; 2. 解放军军需大学动物科学系, 中国吉林 长春 130062; 3. 解放军第 208 医院检验科, 中国吉林 长春 130062)

摘要: 用 *Kpn* I、*Hind* III 酶切克隆载体 pGEM-ShTB₃, 然后亚克隆入带有二氢叶酸还原酶 (DHFR) 的融合表达载体 pQE40, 构建重组质粒 pQE40-ShTB。转化到 *E. coli* M15 中, 经 IPTG 诱导, 实现了 ShTB-DHFR 融合蛋白的高表达, 表达量约占菌体总蛋白的 21.9%, 为包涵体形式。在变性条件下, 包涵体蛋白经整合镍离子的次氨基三乙酸 (Ni-NTA) 亲和柱一步纯化, 得到了纯度为 90.5% 的重组 ShT-B。以纯化的 ShTB-DHFR 融合蛋白免疫昆明鼠, 并结合腹腔注射 S180 细胞, 成功制备了抗 ShTB 腹水多克隆抗体, 效价达 1: 1 × 10⁶。间接 ELISA 和 Western 印迹结果表明, 抗 ShT-B 多抗与重组蛋白和天然 ShT 均有特异性结合。本试验结果为毒素检测方法的研究奠定了基础。

关键词: 痢疾志贺菌; 志贺毒素 B; 融合表达; 抗体制备

中图分类号: R392

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2004)01-0058-05

Fusion Expression of Shiga Toxin B Subunit of *Shigella dysenteriae* Type I in *E. coli* and its Generation of Specific Antibody

YU Hua-ying^{1,2}, WANG Jing-lin¹, GAO Feng², KANG Lin¹,
ZHAO Jin-hong³, WU Dong-lin²

(1. Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China;
2. Department of Animal Sciences, Quartermaster University of PLA, Changchun 130062, Jilin, China;
3. Department of Detection, No. 208 Hospital of PLA, Changchun 130062, Jilin, China)

Abstract: pGEM-ShTB₃ cloning vector and prokaryotic pQE-40 expression vector were digested respectively with the endonucleases *Kpn* I and *Hind* III, and the recombinant vector named as pQE40-ShTB was obtained. The resulting expression vector pQE40-ShTB was transformed into *E. coli* M15 competent cells, and highly expressed an ShTB-DHFR fusion protein induced by IPTG. The target fusion protein occupied 21.9% of total cell protein and in inclusion body form. The fusion protein was used for immunizing Kunming mice, and ascitic polyclonal antibodies raised against recombinant ShT-B were generated by using sarcoma 180 cells and the antibody titer of ascites was up to 1: 1 × 10⁶ by the indirect ELISA. Western blot analysis showed that the recombinant ShT-B had a specific affinity for polyclonal antibody against ShT-B. The results laid the foundation

收稿日期: 2003-11-04; 修回日期: 2004-01-13

作者简介: 喻华英 (1967-), 女, 新疆阿苏尔人, 硕士研究生, 现为新疆塔里木农垦大学病理教研室副教授; 王景林 (1964-), 男, 吉林白城人, 副教授, 微生物学博士, 通讯作者, 从事生物毒素研究, Tel: +86-010-66948532, E-mail: wangjl6481@hotmail.com.

for the detection of toxin and genetic vaccine development.

Key words: *Shigella dysenteriae*; Shiga toxin B; fusion expression; antibody generation

(*Life Science Research*, 2004, 8(1): 058 ~ 062)

细菌性痢疾是人群中常见的肠道传染病, 广泛流行于世界各地, 特别是在发展中国家. 志贺菌属 (*Shigella spp.*) 是细菌性痢疾的重要致病菌群之一, 全球每年有 60 万人死于志贺菌属引起的急性血性痢疾^[1]. 志贺菌属有 4 个种群: A 群痢疾志贺菌 (*Sh. dysenteriae*)、B 群福氏志贺菌 (*Sh. flexneri*)、C 群鲍氏志贺菌 (*Sh. boydii*) 和 D 群宋内志贺菌 (*Sh. sonnei*); 其中, 以 I 型痢疾志贺菌引起的痢疾最为严重, 主要是它能产生高水平的志贺毒素 (Shiga toxin, ShT). ShT 具有神经毒、细胞毒和肠毒等 3 种生物活性, 与临床上的中毒性腹泻、出血性肠炎、溶血性尿毒症等严重并发症密切相关^[2, 3]. ShT 是一种毒性极强的外毒素, 小鼠 LD₅₀ 为 0.002 μg/kg, 近年来已被国际社会列入生物武器核查清单剂中, 成为潜在的生物毒素战剂和生物恐怖病原^[4]. 因此, 开展重组 ShT 和诊断抗体的研究, 具有十分重要的医学和军事意义.

ShT 是由 1 个 A 亚单位和 5 个 B 亚单位组成的“1A + 5B”结构, 其中, ShT-A 亚单位为生物活性的单体, 具有 N-糖苷脂酶的活性; ShT-B 亚单位是一种多聚体, 负责与细胞膜糖脂受体 Gb₃ 结合, 介导 ShT-A 进入细胞发挥生物活性^[3, 5, 6]. 本研究利用已构建的含 *ShT-B* 基因的克隆质粒 pGEM-ShTB₃^[7], 与原核融合表达载体 pQE40 构建了重组表达质粒 pQE40-ShTB, 并在 *E. coli* M15 得到高效表达, 从而为 ShT 诊断抗体的研制奠定了基础.

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒

宿主菌 *E. coli* XL1-blue 为本室保存. 表达宿主菌 *E. coli* M15 (含带 Kan 抗性的质粒 pREP4) 购自德国 Qiagen 公司. 克隆质粒 pGEM-ShTB₃ 系作者构建. 原核融合表达载体 pQE40 由本所王希良博士惠赠.

1.2 实验动物、细胞株

6~8 周龄昆明鼠 (♀), 22 g, 由北京军事科学院实验动物中心提供. 人纤维肉瘤 (S180) 细胞购自中国预防医学科学院肿瘤研究所.

1.3 主要酶和试剂

Taq plus DNA 聚合酶, 溶菌酶, dNTPs 均购自

上海 Sangon 公司. 限制性内切酶 *Kpn* I、*Hind* III 购自美国 NEB 公司. T4DNA 连结酶、IPTG、X-Gal 和质粒 DNA 提取试剂盒购自 Promega 公司. DL2000 DNA Marker 为大连 Takara 公司. 上海产的低分子量蛋白 Marker. DNA 片段玻璃奶回收试剂盒为北京博大泰克公司. 福氏完全和不完全佐剂均购自 Sigma 公司. 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗鼠 IgG 华美生物工程公司生产. 其他化学试剂均为分析纯.

1.4 原核表达载体的构建及鉴定^[8]

用 *Kpn* I 和 *Hind* III 分别双酶切 pGEM-ShTB₃ 和 pQE40. 电泳观察酶切结果, 切胶以玻璃奶回收试剂盒纯化目的片段及线性化 pQE40, 按插入 DNA 片段与载体片段 3: 1 的摩尔数, 取纯化的目的片段与 pQE40, 在 T4DNA 连结酶的作用下, 于 16 °C 进行连接反应 12 ~ 18 h. 将连接产物转化到 CaCl₂ 法制备的 XL1-blue 感受态细胞中, 涂含 Amp 的 LB 琼脂平板, 37 °C 培养过夜. 随机挑取 10 个菌落, 进行 PCR 鉴定. 挑取一个 PCR 阳性克隆的菌落划线涂板 (LB + Amp), 然后单菌落接种 5 ml 含 Amp (100 g/L) 的 LB 培养基, 37 °C 200 r/min 振荡过夜培养. 以质粒 DNA 提取试剂盒提取质粒 DNA, 行 *Kpn* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定, 并于 1% 的琼脂糖凝胶电泳观察. 对菌落 PCR 和双酶切鉴定正确的重组质粒, 命名为 pQE40-ShTB.

1.5 pQE40-ShTB 重组蛋白表达及表达形式鉴定^[8]

将重组质粒 pQE40-ShTB 转化到表达宿主菌 *E. coli* M15 中, 进行工程菌 M15/pQE40-ShTB 的诱导表达. 挑取新鲜单菌落, 接种 5 ml 含 Amp + Kan 的 LB 培养液中, 37 °C 200 r/min 振荡过夜, 次日按 1: 100 的比例重新转接同样的 LB 培养液中, 37 °C 200 r/min 振荡培养至 A₆₀₀ 为 0.5 ~ 0.7 时, 吸取 1 ml 培养液作为诱导前对照, 然后加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 继续培养并收集诱导 1、2、3、4 h 的菌液 1 ml, 然后取 50 ml 诱导表达菌液, 于 4 °C 4 000 g 离心 10 min, 收集菌体, 用 pH 7.2 PBS 漂洗 3 次, 加 10 ml 裂解缓冲液 (50 mmol/L NaH₂PO₄, 300 mmol/L NaCl, pH 8.0) 和

100 μ l 溶菌酶 (1 g/L), 冰浴 30 min, 采用宁波产 KS-150 超声波破碎仪破碎菌体 (条件为 200 W、处理 40 s、间隔 30 s、25 次), 于 4 $^{\circ}$ C 10 000 g 离心 20 min, 分别收集上清和沉淀, 并用 8 mol/L 尿素溶解沉淀, 各取 30 μ l, 加入等量的 2 \times SDS 凝胶上样缓冲液, 于 100 $^{\circ}$ C 煮沸 5 min, 并短暂离心, 吸取 15 μ l 样品, 行 15% SDS-PAGE 电泳与染色。

1.6 ShTB 特异性抗体制备

用经 Ni-NTA 亲和层析柱纯化的融合蛋白 ShTB-DHFR 与福氏佐剂混合成油包水的乳剂, 免疫昆明鼠, 背部皮下多点注射, 剂量为每只鼠每次 20 ~ 30 μ g, 间隔 15 ~ 20 d, 共免疫 4 次 (第 4 次采用腹腔直接注射抗原加强免疫)。免疫后 5 d, 测定抗体效价。然后腹腔注射 S180 细胞, 待腹腔膨胀, 皮毛无光泽, 活动困难时, 开始收集腹水。

1.7 Western 印迹检测^[8]

SDS-PAGE 电泳后将胶通过半干电泳仪 (大连竞迈生物科技公司生产) 转移至硝酸纤维素膜上, 以鼠抗 ShT-B 多抗为一抗, HRP 标记的羊抗鼠 IgG 为二抗, 行 Western 印迹检测。

1.8 抗 ShTB 多克隆抗体特性分析

用间接 ELISA 分析抗 ShT-B 多抗对重组 ShT-B、天然 ShT 粗提物的识别 (ShT-B 粗提物为适当稀释的产毒菌过夜培养物上清)。同样以鼠抗 ShT-B 多抗为一抗, HRP 标记的羊抗鼠 IgG 为二抗, 进行间接 ELISA 检测 A_{450} , 以测定孔与阴性对照孔 $A_{450} > 2.1$ 判为阳性。

2 结果

2.1 pQE40-ShTB 重组表达质粒鉴定

用 *Kpn* I 和 *Hind* III 双酶切 pQE40-ShTB 重组质粒, 吸取适量酶切产物, 行琼脂糖凝胶电泳。结果如图 1 所示, 切出的目的片段大小约为 225 bp, 与 PCR 扩增结果相符, 说明重组表达质粒构建成功。

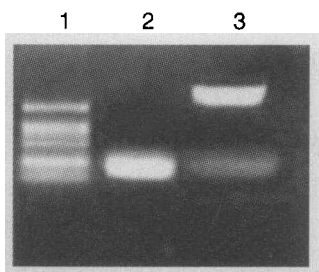


图 1 pQE40-ShTB 重组表达质粒的鉴定

Fig. 1 Identification of recombinant pQE40-ShTB

1. DL2000 DNA marker (2 000, 1 000, 750, 500, 250, 100 bp); 2. PCR product of ShT-B; 3. *Kpn* I/ *Hind* III-digested pQE40-ShTB.

2.2 pQE40-ShTB 重组蛋白表达及表达形式鉴定

pQE40 是一种融合表达载体, 本身携带一段分子量为 26 kDa 的 DHFR。工程菌 M15/pQE40-ShTB 经 IPTG 诱导后, 收集菌体以及超声破碎后的沉淀和上清行 SDS-PAGE。结果表明在 34.4 kDa 处有一条表达很强的蛋白区带, 与预计的融合蛋白分子量 (0.84 kDa ShT-B + 26 kDa DHFR) 基本相符, 主要以包涵体形式存在 (图 2)。经 TotalLab v2.01 凝胶分析软件确定表达产物约占菌体总蛋白的 21.9%。

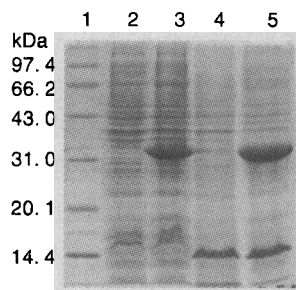


图 2 重组载体 pQE40-ShTB 在 *E. coli* M15 中表达的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of expressed product of recombinant plasmid in *E. coli* M15

1. low molecular weight protein marker; 2. total cellular lysate without induction; 3. total cellular lysate with induction; 4. cell supernatant of recombinant strain with induction; 5. cell pellet of recombinant strain with induction.

2.3 重组 ShT-B 的抗原性

亲和纯化的重组 ShT-B 蛋白与抗 ShT-B 鼠多抗的 Western 印迹分析结果表明, 表达的 ShT-B 蛋白与鼠抗 ShT-B 多抗发生了明显的抗原抗体反应 (图 3)。

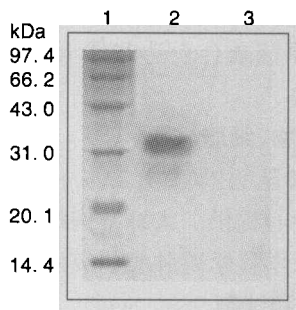


图 3 重组 ShT-B 蛋白的 Western 印迹结果

Fig. 3 Western blot of recombinant protein using polyclonal antibody against ShT-B

1. low molecular weight protein marker; 2. total cellular lysate of recombinant strain with induction; 3. total cellular lysate of transgenic strain without induction.

2.4 抗重组 ShT-B 腹水多抗的特性

间接 ELISA 结果证实, 以重组 ShTB-DHFR 为抗原制备的抗 ShT-B 腹水多抗, 既可识别 ShTB-DHFR 融合蛋白, 也可识别天然 ShT 粗提物, 且其效价高达 $1:1 \times 10^6$ (表 1). 这表明该腹水多抗具有良好的特异性.

表 1 抗 ShT-B 腹水多抗的特异性

Table 1 Specificity of ascitic polyclonal antibodies against recombinant ShT-B

抗原 Antigen	稀释倍数 Dilution ratio					Negative control
	1×10^{-3}	1×10^{-4}	1×10^{-5}	1×10^{-6}	1×10^{-7}	
ShTB-DHFR	1.27	1.18	0.77	0.36	0.08	0.021
Native ShT	0.97	0.77	0.63	0.44	0.06	0.020

注: 每个值均为 3 个检测孔 A_{450} 的平均值.

Note: Each value of A_{450} represents the mean of triplicate determination wells.

3 讨论

无论是在发达国家还是发展中国家, 痢疾志贺菌均可引起胃肠炎的食源性暴发和肠道传染病的地方性流行, 而且, 临床上志贺菌痢疾及其并发症多发生在儿童, 特别是 5 岁以下幼儿, 死亡率为 3% ~ 5%. 目前表达外源蛋白的系统有 *E. coli*、酵母、哺乳动物细胞、昆虫细胞等, 其中大肠杆菌因成本低、表达量高、易于操作等特点, 仍是许多外源蛋白首选的表达系统. 关于 ShT-B 在 *E. coli* 中表达及其保护性抗原的特性, 国外已有一些相关的研究报道^[9]. 国内仅有苏国富等开展了 ShT-B 在 *E. coli* 中的表达研究, 但表达量低^[10]. 本文将 ShT-B 克隆到 pQE40 融合表达载体上, 并实现了 ShT-B 融合蛋白在 *E. coli* M15 中的高效表达, 表达量占细胞总蛋白的 21.9% 左右, 这是目前国内关于重组 ShT-B 在 *E. coli* 中表达量最高的报道^[9,10].

本研究使用的 pQE40 表达载体特点为: N 端带有 6 × His 标签和一个鼠源的 DHFR 基因. 特别是德国 Qiagen 公司的试验结果证明, 表达载体中的 DHFR 缺乏对鼠本身的免疫原性, 但有增强目的蛋白免疫原性的功能; 而 6 × His 标签便于通过金属螯合作用, 快速纯化和制备重组抗原

ShT-B, 方便了 ShT 的诊断抗体的制备. 鉴于表达的重组蛋白以包涵体形式存在, 对它的变性与复性条件进行了研究(另文发表).

利用 S180 细胞可以在鼠腹腔内迅速繁殖, 刺激机体产生大量腹水的特性^[11], 成功制备了鼠抗 ShT-B 的腹水多克隆抗体, 并可特异性识别天然 ShT, 可作为检测用抗体. 该方法制备抗体的腹水量大、成本低、抗体效价明显高于血清抗体的效价. 一只昆明鼠可收集腹水 10 ~ 15 ml, 3 ~ 4 只鼠的腹水抗体量就相当于一只兔血清抗体的量, 所以, 这是一种实验室中大量制备抗体的实用方法.

参考文献 (References):

- [1] LUDWIG K, KARMAL M A, SARKIN V, *et al.* Antibody response to Shiga toxins stx2 and stx1 in children with enteropathic hemolytic-uremic syndrome [J]. *J Clin Microbiol*, 2001, 39: 2272-2279.
- [2] BARTLETT A V, PRADO D, CLEARY T G, *et al.* Production of Shiga toxin and other cytotoxins by serogroups of *Shigella* [J]. *J Infect Dis*, 1986, 154: 996-1002.
- [3] SANDVIG K. Shiga toxin [J]. *Toxicon*, 2001, 39: 1629-1635.
- [4] Comparative lethality of selected toxins and chemical agents in laboratory mice [EB/OL]. Source from: <http://www.usamriid.army.mil/education/defense.html>.
- [5] BROWN J E, GRIFFIN D E, ROTHEMAN S W, *et*

- al.* Purification and biological characterization of Shiga toxin from *Shigella dysenteriae* type I[J]. *Infect Immun*, 1982, 36: 996-1005.
- [6] O' LOUGHLIN E V, ROBINS-BROWNE R M. Effect of Shiga toxin and Shiga-like toxins on eukaryotic cells[J]. *Microb Infect*, 2001, 3: 493-507.
- [7] 喻华英, 王景林, 高丰, 等. 志贺毒素 A/B(ShT-A/B)亚单位基因的克隆与序列分析 [J]. 微生物学杂志 (YU H Y, WANG J L, GAO F, *et al.* Cloning and sequence analysis of Shiga toxin A, B gene subunits from *Shigella dysenteriae* type I [J]. *Chin J Microbiol*), 2003, 23(4): 1-3.
- [8] 颜子颖, 王海林. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社(YAN Z Y, WANG H L. *Short Protocols in Molecular Biology*[M]. Beijing: Scientific Publishing House), 1998, 22-23, 105-111, 366-371.
- [9] McEWEN J, Leitner M, HARRARI I, *et al.* Expression of Shiga toxin epitopes in *E. coli*, immunological characterization [J]. *Immunol Lett*, 1989, 21: 157-163.
- [10] 苏国富. 痢疾志贺毒素 B 亚单位在大肠杆菌中的高效表达 [J]. 生物工程学报 (SU G F. High expression of Shiga toxin B subunit of *Shigella dysenteriae* in *E. coli*[J]. *Chin J Biotechnol*), 1993, 9(1): 36-42.
- [11] LU R Z, CHEN C F, LIN H F, *et al.* Preliminary validation of tumor cell attachment inhibition assay for developmental toxicants with mouse S180 cells[J]. *Biomed Environ Sci*, 1999, 12: 253-259.