

大肠杆菌生产的霍乱毒素 B 亚单位

马清钧 刘传暄 熊凌霜 于秀琴

(军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100850)

摘 要

应用遗传工程技术, 获得一株高效表达霍乱毒素 B 亚单位的工程大肠杆菌菌株, 该菌株在 50l 发酵罐培养, B 亚单位产量达 20—40 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 且能分泌至胞外。将工程菌产生的 B 亚单位经亲和层析纯化, 获得了电泳纯制品, 其分子量、N 端氨基酸末端分析、抗原性、与天然的 B 亚单位完全相同。工程菌产生的 B 亚单位具有很好的免疫原性, 可用于构建防治霍乱及毒源性大肠杆菌腹泻的制剂及半抗原的载体。

关键词: 大肠杆菌, 霍乱毒素

霍乱的发病主要由霍乱毒素 (CT) 引起, 霍乱毒素是分子量为 84000 的多聚体蛋白^[1,2], 它由 5 个 B 亚单位(分子量各为 11600)和 1 个 A 亚单位(分子量 27000)组成。A 亚单位是由 A₁(分子量 22000)及 A₂(分子量 5000)两个多肽, 通过二硫键连接组成, 是毒性活力部分, B 亚单位是无毒的霍乱免疫原, 结合至肠上皮细胞表面的受体神经节苷脂 GM₁, 刺激抗体的形成, 因此可应用 B 亚单位组构预防霍乱及毒源性大肠杆菌腹泻的疫苗^[3-9]。B 亚单位不仅是良好的免疫原, 也是有效的免疫佐剂, 当它与其它抗原一起免疫时, 可促进其它抗原的免疫反应^[10,11], 刺激消化道、呼吸道粘膜的 IgA 及血浆的 IgG 的产生, 因而可用作疫苗的佐剂。

我们应用 DNA 体外重组技术, 从霍乱弧菌染色体 DNA 分离毒素基因, 在大肠杆菌获得了克隆和表达^[12,13], 并对毒素基因进行了改造, 在大肠杆菌中获得了 B 亚单位的分泌性表达^[14]。本文报道经选育获得了一株大肠杆菌 MM₂(pMM-CTB) 高产菌株, 能高效表达 B 亚单位, 分泌至胞外, 并将大肠杆菌生产的 B 亚单位提纯, 获得了电泳纯制品, 具有与霍乱弧菌产生的 B 亚单位同样的抗原性和免疫原性。

一、材料和方法

1. 菌株 工程大肠菌 MM₂(pMM-CTB) 由本实验室构建, 带有 pMM-CTB 重组质粒。

2. 毒素与抗毒素血清 提纯的霍乱毒素为 Sigma 公司产品, 抗霍乱毒素血清及 IgG 系本实验室应用霍乱毒素免疫家兔经纯化获得的。

3. B 亚单位多肽的产生 MM₂ 细菌生长于 LB 肉汤培养基, 37℃振荡通气培养, 或于

501 MSJ-u, 发酵罐培养 24h, 离心除去菌体, 收集上清液即为 B 亚单位多肽的粗制品。

4. B 亚单位多肽的提纯 将 B 亚单位多肽粗制品经超滤浓缩, 然后参照 Parkhons 方法^[15], 于偶联抗霍乱毒素 IgG 的 CNBr-Sephrose 4B 柱, 进行亲和层析。

5. 高压液相胶滤层析 应用岛津 LC-5A, Diol-150 柱。

6. SDS-PAGE 电泳 参照 Laimmli 方法^[16], 含 0.1% SDS, 分离胶浓度为 15%, 浓缩胶为 3.5%, 电泳后用考马斯蓝或银染色。

7. B 亚单位多肽 N-末端测定 采用 DABITC/PITC 双偶合测序法。

8. B 亚单位多肽的抗原性分析 采用琼脂糖凝胶双扩散, 以 Sigma 公司提纯的天然 B 亚单位多肽为标准, 定量测定采用单向扩散按扩散圈直径进行。

9. B 亚单位多肽的免疫原性分析 家兔(雄性、2kg), 经口免疫, 在灌注抗原前先灌注 0.1mol/L NaHCO₃。攻毒试验采用小肠肠攀结扎攻击, 测定小肠肠段的积液反应。

二、结 果

1. 工程菌 B 亚单位多肽的产生

(1) 观察了工程菌 MM₂ 的生长和合成 B 亚单位多肽的增长曲线(图 1), MM₂ 菌株在 5% 接种量时, 生长至 12—14h 达高峰, 生长至 10h 后, 开始分泌 B 亚单位多肽到细胞外培养基中, 于 20h 后达高峰。

(2) MM₂ 菌株在 3l 摇瓶中振荡培养, 经 3 次试验, 每次 5 瓶, B 亚单位多肽的产量平均为 $16 \pm 2.8 \mu\text{g/ml}$ (表 1), 在 50l 发酵罐中培养, 产量也达到 20—40 $\mu\text{g/ml}$ (图 2)。

(3) MM₂ 菌株经连续传代, 分别对原代、5, 10, 15, 20 代的菌株, 进行 B 亚单位产量的稳定性比较, 酶联测定结果, P/N 值(表 2) 表明 20 代产量与原代相同, 说明 MM₂ 菌种生产 B 亚单位多肽是稳定的。MM₂ 产生的 B 亚单位多肽也是稳定的, 将 B 亚单位多肽粗制品保存于 4℃ 半年, 活性没有改变。

2. 工程菌 B 亚单位多肽的提纯

将 MM₂ 菌株生产的 B 亚单位多肽粗制品, 超滤浓缩后, 在偶联抗霍乱毒素 IgG 的 CNBr-Sephrose 4B 柱上进行亲和层析, 得到了纯的 B 亚单位多肽。

(1) SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(图 3), 没有显示出相当于 A 亚单位的区带, 仅显示 1 条 B 亚单位多肽的着色带, 其迁移位置与天然的 B 亚单位多肽相同, 表明获得的 B 亚单位是纯净的, 显示其分子量与天然 B 亚单位相同。

(2) HPLC 胶滤层析(图 4), 呈现单一峰, 表明是均一的, 并其胶滤行为与天然的 B 亚单位相同。

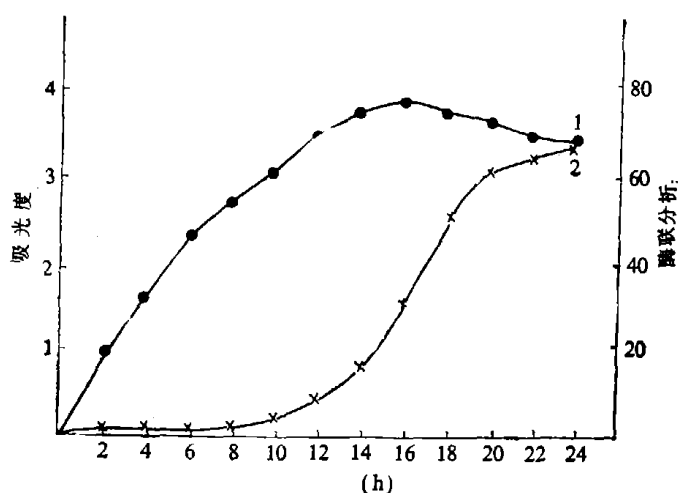
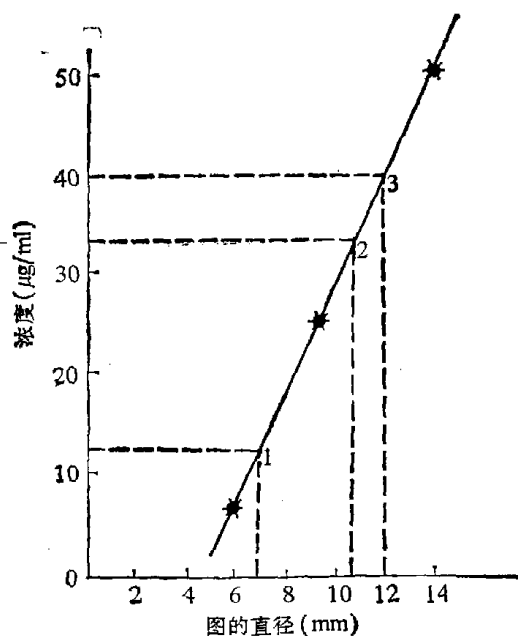
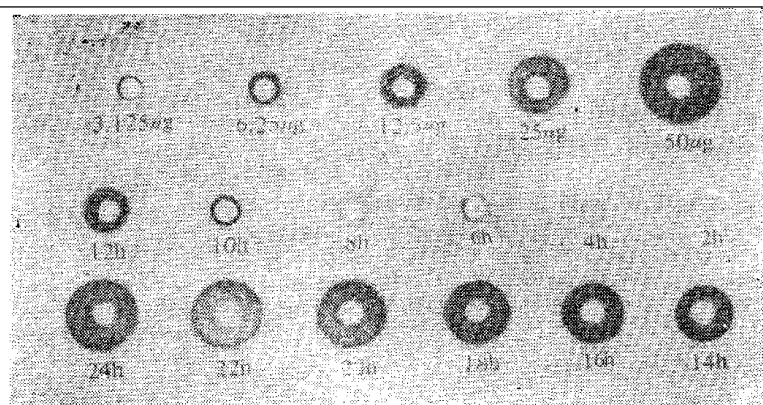


图 1 工程菌 MM₂ 生长及合成 CT-B 抗原的增长曲线
(1——吸光度 ($A_{600\text{nm}}$), 2——酶联分析 ($20 \times P/N$))

表 1 工程菌 MM₁ 在摇瓶培养中 CT-B 抗原的产量

批次	瓶 号	上清含量 ($\mu\text{g/ml}$)	平 均 ($\mu\text{g/ml}$)
I	1	13.6	14.3 ± 3.7
	2	14.8	
	3	11.4	
	4	20.4	
	5	11.4	
II	1	18.2	17.3 ± 2.2
	2	13.4	
	3	18.2	
	4	19.3	
	5	17.0	
III	1	19.1	16.7 ± 2.4
	2	16.4	
	3	17.3	
	4	17.7	
	5	12.9	

图 2 工程菌 MM₂ 在 50L 发酵罐培养中 CT-B 抗原产量的测定

(CT-B 抗原浓度通过辐射免疫单扩散测定, * 为已知浓度的标准, 1—12h 培养物, 2—18h 培养物, 3—24h 培养物)

(3) N 端氨基酸末端分析 经分析显示 B 亚单位多肽 N 端第一个氨基酸为苏氨酸, 第二个为脯氨酸, 序列与天然 B 亚单位完全相同。

3. 工程菌 B 亚单位多肽的生物活性

(1) 抗原性 工程菌 MM₂ 产生的 B 亚单位多肽和 Sigma 公司生产的天然 B 亚单位多

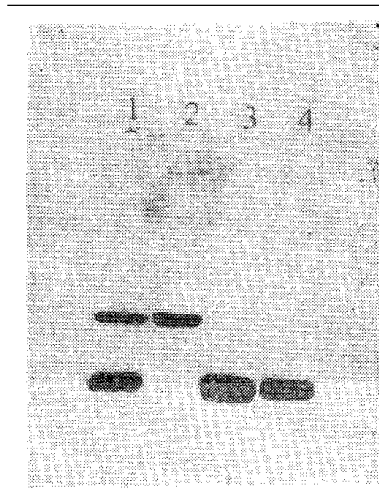


图 3 工程菌产生的霍乱毒素 B 亚单位的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析
(1——霍乱毒素, 2——霍乱毒素 A 亚单位, 3——霍乱毒素 B 亚单位, 4——工程菌产生的霍乱毒素 B 亚单位)

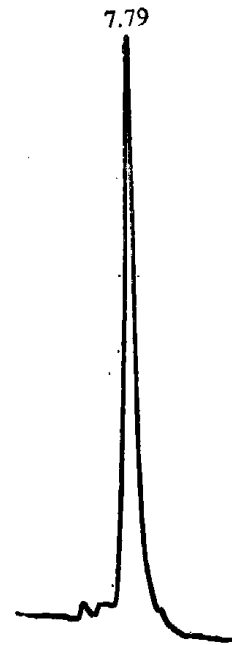


图 4 工程菌产生的霍乱毒素 B 亚单位的高压液相凝胶分析

表 2 工程菌 MM2 产生 CT-B 多肽的稳定性

传代代数	酶联分析 (P/N)
1	41
5	41
10	40
15	41
20	41

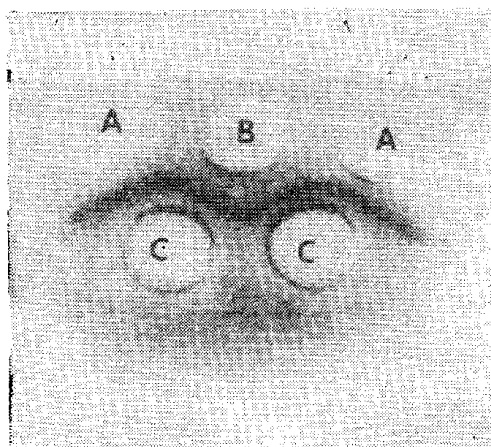


图 5 CT-B 亚单位抗原的免疫扩散试验
(A——霍乱弧菌的 CT-B 亚单位, B——工程大肠菌的 CT-B 亚单位, C——抗 CT 血清)

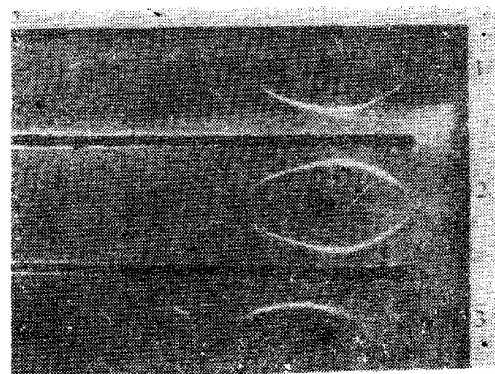


图 6 工程菌产生的 B 亚单位的琼脂糖凝胶免疫电泳分析
(1——工程菌产生的霍乱毒素 B 亚单位, 2——霍乱毒素 B 亚单位, 3——霍乱毒素)

肽,与家兔粗制抗毒血清进行琼脂糖双扩散试验和微量免疫电泳试验,结果(图 5; 6)显示在双扩散试验中,工程菌 B 亚单位产生一条沉淀线,与天然的 B 亚单位的沉淀线相连,在免疫电泳

中也呈现相同的电泳行为。试验表明了工程菌 B 亚单位多肽与天然的霍乱毒素 B 亚单位多肽的抗原性是一致的。

(2) 免疫原性 将工程菌 B 亚单位多肽,给家兔 3 次口服免疫,剂量为每次 $50\mu\text{g}$,间隔 1 月,第 3 次免疫后给予肠攀结扎进行攻击试验,结果(图 7)表明工程菌 B 亚单位多肽,具有很好的免疫原性,家兔免疫后,能产生保护力,不仅可抵抗霍乱毒素的攻击,也能抵抗霍乱弧菌毒株的攻击。

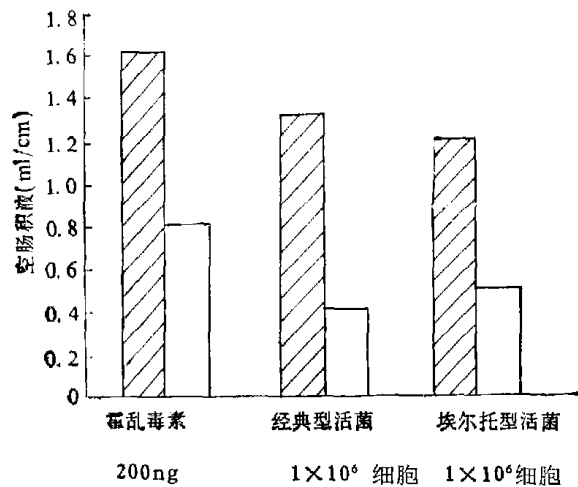


图 7 家兔经口免疫 CT-B 亚单位后对霍乱毒素和活菌攻击的保护性
(▨对照组 □免疫组)

三、讨 论

我们应用遗传工程技术,成功地构建了霍乱毒素 B 亚单位基因克隆,霍乱毒素 B 亚

单位多肽在工程大肠杆菌中获得了分泌性表达,经选育获得高产株,产量可达 $20-40\mu\text{g}/\text{ml}$,并经连续传代 20 代,菌株性能稳定。将工程菌产生的 B 亚单位多肽,经亲和层析纯化,获得了纯品,其分子量大小,肽的氨基末端氨基酸及抗原性,均与天然的霍乱毒素 B 亚单位多肽相同。获得这样水平的高产菌株和纯的工程菌 B 亚单位多肽,在文献中是首次报道。

试验表明了工程菌 B 亚单位多肽具有很好的免疫原性,我们已将它与灭活的霍乱弧菌菌体组合成死苗,经小鼠、豚鼠和家兔的免疫试验,获得了进一步的证实(资料未列,另文报道)。同时也正在进行利用 B 亚单位多肽,作为抗原的有效佐剂的研究。

参 考 文 献

- [1] Van Heyningen, S., *Science*, 183(1974), 656.
- [2] Richard, K. L. & Douglas, S. D., *Microbiol. Rev.*, 42(1978), 592.
- [3] Black, R. F. et al., *Infect. Immun.*, 55(1987), 1116.
- [4] Clemens, J. D. et al., *J. Infect. Dis.*, 158(1988), 372.
- [5] Kapar, J. B. et al., *Bio/Technology*, 2(1984), 345.
- [6] Mekalanos, J. J. et al., *Nature*, 306(1983), 551.
- [7] Levine, M. M. et al., *Absrt. 19th Joint Conf. Cholera*, 1983, 56.
- [8] Spira, W. et al., *ibid.*, 1983, 80.
- [9] 马清钧等,中国科学 B 辑,1989, 4: 394.
- [10] McKenzie, S. J. & Halsey, J. F., *J. Immun.*, 133(1984), 1818.
- [11] Tamura, S. et al., *Vaccine*, 6(1988), 409.
- [12] 马清钧等,生物工程学报,3(1987),24.
- [13] 马清钧等,微生物学报,28(1988),4: 307.
- [14] Ma Qing-jun et al., *Science in China, Series B*, 32(1989), 2: 187.
- [15] Parkhous, R. M. E., *English Med. Bulletin*, 40(1984), 297.
- [16] Laimmli, U. K., *Nature*, 227(1970), 668.