

大肠杆菌 O157: H7 *eaeA* 基因的原核表达

龚霞, 郭霄峰

(华南农业大学兽医学院, 广东广州 510642)

摘要:将含广东分离株大肠杆菌 O157: H7 021210 *eaeA* 基因的克隆质粒双酶切后, 亚克隆至原核表达载体 pET-28a (+), 经 PCR 鉴定、酶切鉴定及核苷酸序列测定, 正确构建了原核重组表达质粒 pET-*eaeA*。再将该重组质粒转化 *E. coli* BL21 (DE3) pLysS, 经 IPTG 诱导, 进行 SDS-PAGE, 结果显示, 目的蛋白的相对分子质量约为 94 000, 与 *eaeA* 基因蛋白的理论值相符。破菌后电泳证实目的蛋白主要以包涵体形式存在。表达蛋白经初步纯化, 3 次免疫新西兰兔, 获得抗 *eaeA* 蛋白的多克隆血清。经琼脂扩散试验和 Western-blotting 试验, 表明该蛋白具有较好的免疫原性和反应原性。

关键词:大肠杆菌 O157: H7; *eaeA* 基因; 紧密素; 原核表达

中图分类号: R378.2

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2007)01-0109-05

Prokaryotic Expression of *eaeA* Gene of *E. coli* O157: H7

GONG Xia, GUO Xiao-feng

(College of Veterinary Medicine, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: The recombinant plasmid pMD-*eaeA* was digested by the restriction enzyme *Bam*H I and *Hind* III and then the extracted *eaeA* gene was subcloned into prokaryotic expression plasmid pET-28a(+). After identification by PCR, restriction enzyme digestion and sequencing, the positive recombinants (designated as pET-*eaeA*) were transformed into *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. The recombinant bacteria were induced with IPTG and the expression protein was analyzed by SDS-PAGE. The result showed that a unique band was detected with the relative molecular mass of approximately 94 000, and a majority of the recombinant protein was expressed as inclusion bodies in *E. coli*. This protein was purified primarily and then inoculated the New Zealand rabbit three times. The antiserum was obtained and demonstrated by agar-diffusion test and Western-blotting. Therefore, the expressed fusion protein of *eaeA* gene of *E. coli* O157: H7 had biological activity to some extent.

Key words: *E. coli* O157: H7; *eaeA* gene; intimin; prokaryotic expression

肠出血性大肠杆菌 (EHEC) O157: H7 是一种重要的新发现的危害严重的肠道致病菌, 它能引起人的出血性肠炎 (HC)、溶血性尿毒综合征 (HUS)、血栓性血小板减少性紫斑 (TTP) 等临床症状, 致病性强、对人体的健康造成很大的威胁, 已引起全世界的

广泛关注。我国自 1986 年首次检出 O157: H7 肠血性大肠杆菌以来^[1], 陆续在全国各地 10 多个省、市的食物、家畜 (禽) 和腹泻患者的粪便中分离出此病原菌^[2-5]。EHEC O157: H7 的感染具有暴发流行、强烈致病、高致死性和抗生素治疗可加剧病情等特点, 已

收稿日期: 2006-06-12

作者简介: 龚霞 (1976—), 女, 硕士, 现在韶关学院英东生物工程学院工作; 通讯作者: 郭霄峰 (1963—), 男, 教授, 博士;

E-mail: xfguo@scau.edu.cn

基金项目: 广东省科技计划项目 (2002B21406); 广州市农业局攻关项目 (GK0401001); 广东省自然科学基金团队项目 (5200638)

经成为全球性的公共卫生问题. *E. coli* O157: H7 的黏附定植能力是 EHEC O157: H7 毒力的重要体现, 其对上皮细胞的粘附作用与染色体上的 *eaeA* 基因有关. *eaeA* 基因位于LEE致病岛上的第22个开放性阅读框(ORF22), 是在肠道粘膜定居和引起黏附与消除反应(A/E损伤)所必需的, *eaeA* 突变菌株不产生A/E损伤, 也不能定居于肠道的任何部位^[6-7]. *eaeA* 基因是某些致腹泻大肠杆菌重要的毒力决定因子, 它编码一种相对分子质量为94 000的外膜蛋白即紧密素(intimin), 紧密素属于黏附分子家族, 介导细菌与肠上皮细胞进一步紧密黏附, 引起A/E损伤. EHEC O157: H7 主要依靠紧密素及其受体黏附于肠上皮细胞, 紧密素的特异性抗体均可以阻断细菌的黏附进而使其丧失致病力, 具有较强的免疫原性和免疫保护性, 是理想的疫苗备选抗原^[8-9]. 为此, 我们拟选择 *eaeA* 基因作为靶基因, 对 *eaeA* 基因进行基因克隆与原核表达, 为更廉价、简便的方式获取大量的诊断用抗原和制备基因工程疫苗提供技术积累和初步尝试.

1 材料与方法

1.1 菌株及质粒

广东分离菌株肠出血性大肠杆菌 O157: H7 021210 *eaeA* 基因克隆质粒(pMD-*eaeA*)、受体菌 BL21 (DE3) pLysS、质粒 pET-28a(+) 由华南农业大学兽医学院微生物教研室保存.

1.2 酶及相关试剂

限制性内切酶 *Hind* III、*Bam*H I、*Taq* Plus DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶购自大连 TaKaRa 公司; DNA marker III、IV 购自北京天为时代科技有限公司; 低相对分子质量蛋白质标准购自宝泰克生物科技公司; 蛋白质预染 marker 为 MBI 公司产品.

1.3 试验动物及抗体

清洁级新西兰兔(2.5~3.0 kg) 购自南方医科大学实验动物中心. 二抗羊抗兔 IgG-HRP 为北京鼎国生物技术发展中心产品.

1.4 目的基因 *eaeA* 重组表达载体的构建

用 *Bam*H I、*Hind* III 双酶切质粒 pMD-*eaeA*, 回收 *eaeA* 基因, 将其亚克隆到原核表达载体 pET-28a(+) 中, 构建重组表达载体, 命名为 pET-*eaeA*. 质粒的重组、转化及重组子的筛选和鉴定的具体方法按文献[10]的方法进行.

1.5 重组基因工程菌的诱导表达与 SDS-PAGE

将阳性重组表达质粒 pET-*eaeA* 接种于含有卡

那霉素、氯霉素的 LB 液体培养基, 37 °C 振荡培养至 $D_{600\text{ nm}}$ 约为 0.6 时加入不同浓度的诱导剂 IPTG, 继续培养 4 h. SDS-PAGE 参照 Laemmli^[11] 的方法进行: 将诱导的培养物 10 000 r/min 离心 1 min 后, 收集菌体, 加入 1/10 的 SDS-PAGE Loading Buffer, 煮沸 3~5 min 后, 立即作 SDS-PAGE.

1.6 表达产物的初步纯化、复性及含量测定

按卢圣栋^[12]、伍欣星等^[13]介绍的方法进行.

1.7 多克隆抗血清的制备

纯化的表达蛋白样品 1 mL (约含目的蛋白 100 μg) 与 1 mL 弗氏完全佐剂混合, 乳化制成油乳剂苗, 对 2 月龄新西兰雄兔背部皮下分多点注射免疫. 首免后 15 和 30 d 分别用纯化后的融合蛋白 1 mL (含目的蛋白 100 μg) 和 0.5 mL (含目的蛋白 50 μg) 进行第 2 和第 3 次加强免疫, 第 3 次免疫后第 10 d 经心脏采血处死兔, 按常规方法制备抗血清.

1.8 高免血清的琼脂扩散试验

参照刘胜旺等^[14]的方法进行. 将制备的高免血清按 1:5、1:25、1:50、1:100 和 1:200 的稀释度分别稀释, 以正常兔血清为对照, 与 1:10 稀释的纯化 pET-*eaeA* 融合蛋白按常规方法进行琼脂扩散试验, 同时设立阴性、阳性对照.

1.9 高免血清的 Western-blotting

表达产物的免疫印迹方法参照 Towbin 等^[15]方法. 电泳完毕, 将蛋白转移至硝酸纤维素膜上, 再与高免血清反应.

2 结果

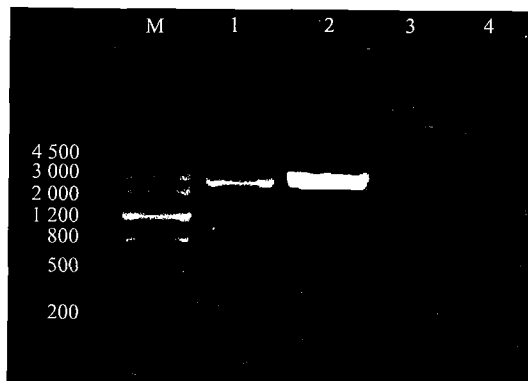
2.1 原核表达载体 pET-*eaeA* 的构建

经抗生素和蓝白斑初步筛选后的菌落, 少量制备所获质粒进行 PCR 扩增、*Bam*H I/*Hind* III 双酶切以及序列测定. 琼脂糖凝胶电泳显示, 重组质粒 pET-*eaeA* PCR 扩增产物及酶切插入片段长约 2 800 bp (图 1, 2). 本试验构建的原核表达载体 pET-*eaeA* 送上海博亚生物技术有限公司, 用 T7 通用引物测序, 结果显示目的基因以正确的方式插入了 pET-28a 载体中, 它并没有打断 *eaeA* 基因的 ORF, 目的片段大小及插入方向正确, 插入序列与预期完全一致.

2.2 重组表达菌的 SDS-PAGE 分析

SDS-PAGE 结果(图 3)显示, 诱导培养后的菌体蛋白与未诱导的对照菌、空载体转化菌相比较, 有一条非常明显的表达蛋白增生条带, 证实所构建的基因重组菌能够被诱导表达外源蛋白. 参照相对分子

量标准,诱导表达后 SDS-PAGE 初步测定目的蛋白的相对分子质量约 94 000,与预期相符.目的蛋白组分均主要集中于菌体沉淀中,破菌后电泳证实目的蛋白主要以包涵体形式表达.

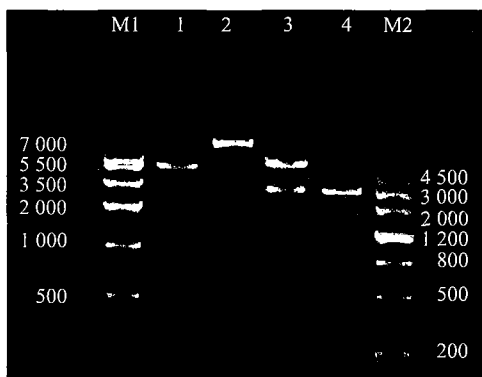


M: DNA marker III; 1: pET-eaeA 重组质粒 T7 启动子引物 PCR 扩增; 2: pET-eaeA 重组质粒特异引物 PCR 扩增; 3: pET-28a 空载体特异引物 PCR 扩增; 4: 灭菌双蒸水空白对照

M: DNA marker III; 1: PCR product of pET-eaeA by T7 primers; 2: PCR product of pET-eaeA by specific primers of *eaeA* gene; 3: PCR product of pET-28a by specific primers of *eaeA* gene; 4: ddH₂O control

图1 重组质粒 pET-eaeA 的 PCR 鉴定

Fig. 1 PCR analysis of recombinant plasmid pET-eaeA



M1/M2: DNA marker IV/III; 1: pET-28a 质粒 BamHI 单酶切; 2: pET-eaeA 重组质粒 BamHI 单酶切; 3: pET-eaeA 重组质粒 BamHI/HindIII 双酶切; 4: pET-eaeA 重组质粒 PCR 扩增

M1/M2: DNA marker IV/III; 1: pET-28a/BamHI; 2: pET-eaeA/BamHI; 3: pET-eaeA/BamHI + HindIII; 4: pET-eaeA PCR product of *eaeA* gene

图2 pET-eaeA 重组质粒酶切鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid pET-eaeA by enzymatic digestion

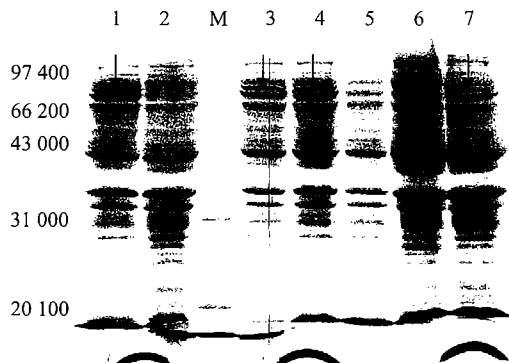
2.3 多克隆抗体的鉴定

用正常兔血清和三免后的抗血清与纯化的抗原进行琼脂扩散试验,发现正常兔血清与纯化的 pET-eaeA 融合蛋白、*E. coli* O157: H7 021210 菌液无反应性,而第3次免疫抗血清则与之发生特异性的抗原抗体反应,出现明显的沉淀线;正常兔血清和制备的抗血清与 pET-28a 空载体诱导产物、BL21 (DE3)

pLysS 宿主菌均无反应性(图4).

2.4 高免血清的 Western-blotting 鉴定

诱导后的 pET-eaeA 重组表达产物以及初步纯化的融合蛋白、021210 菌液经 SDS-PAGE 分离后,通过湿法电转印转移到硝酸纤维膜上,用制备的高免血清(稀释度为 1:100)和二抗与之反应,DAB 显色后,结果显示:在相对分子质量约为 94 000 处出现清晰的特异条带,而其他对照菌则无条带产生,与预期相符(图5).

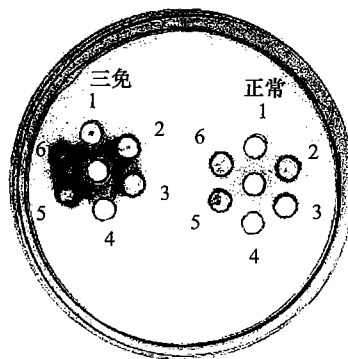


1,3,4,5: pET-eaeA 重组质粒 1,2,3, pET-28a 空载体在 BL21 (DE3) pLysS 中 1 mmol/L IPTG 诱导; 2: pET-eaeA 重组质粒 1 在 BL21 (DE3) pLysS 中未经 IPTG 诱导; M: 低相对分子质量蛋白质标准; 6: BL21 (DE3) pLysS 空菌对照; 7: pET-eaeA 重组质粒 1 在 BL21 (DE3) pLysS 中 0.6 mmol/L IPTG 诱导

1,3,4,5: expression products of BL21 (DE3) pLysS containing pET-eaeA 1,2,3 and pET-28a induced with 1 mmol/L IPTG; 2: pET-eaeA in BL21 (DE3) pLysS without induction; M: low relative molecular mass of protein marker; 6: BL21 (DE3) pLysS; 7: expression products of BL21 (DE3) pLysS containing pET-eaeA induced with 0.6 mmol/L IPTG

图3 pET-eaeA 重组质粒 IPTG 诱导 SDS-PAGE

Fig. 3 Analysis of the expression of *eaeA* gene by SDS-PAGE

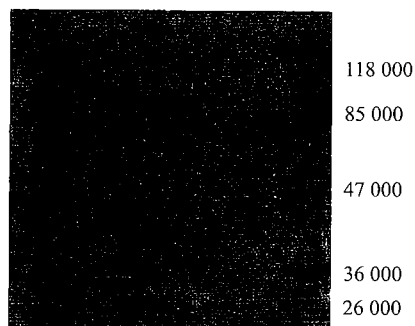


1: pET-28a 空载体诱导产物; 2: pET-eaeA 重组质粒 1 表达产物; 3: pET-eaeA 重组质粒 2 表达产物; 4: BL21 (DE3) pLysS 宿主菌; 5: 初步纯化的浓缩蛋白; 6: *E. coli* O157: H7 021210 菌液

1,2,3: expression products of BL21 (DE3) pLysS containing pET-28a, pET-eaeA 1, pET-eaeA 2 respectively; 4: BL21 (DE3) pLysS; 5: concentrated protein purified primarily; 6: lysate of *E. coli* O157: H7 021210

图4 高免血清的琼脂扩散试验

Fig. 4 Agar-gel diffusion test of the antiserum



1: pET-28a 空载体诱导产物; 2: BL21 (DE3) pLysS 宿主菌; 3: *E. coli* O157: H7 021210 菌液; 4: pET-eaeA 重组子 1 表达产物; 5: pET-eaeA 重组子 2 表达产物; 6: 初步纯化的融合蛋白; M: 低相对分子质量蛋白标准

1, 4, 5: expression products of BL21 (DE3) pLysS containing pET-28a, pET-eaeA 1, pET-eaeA 2 respectively; 2: BL21 (DE3) pLysS; 3: lysate of *E. coli* O157: H7 021210; 6: concentrated protein purified primarily; M: low relative molecular mass of protein mark

图5 高免血清的 Western-blotting 鉴定

Fig. 5 Analysis of the antiserum by Western-blotting

3 讨论

在基因工程中,用于表达外源基因的表达系统有原核表达系统和真核表达系统2类.在原核表达系统中,常用大肠杆菌表达系统,因其遗传背景清楚、基因操作相对简单、增殖与表达过程易于控制,故为许多研究者所喜用.本研究首先选择大肠杆菌表达系统,主要基于:来源于大肠杆菌的基因易于在大肠杆菌中表达,密码偏爱性小;选用价廉而快速的大肠杆菌表达系统进行预表达,可避免下一步在真核表达系统中表达的盲目性;尽管在大肠杆菌中表达的蛋白不具有天然活性,但往往具有免疫原性,能直接用于制备抗原(抗体),用于后期的ELISA等免疫学诊断和动物试验.

本研究对广东分离株 *E. coli* O157: H7 021210 *eaeA* 进行了基因克隆,并选用由 Studier 和 Moffat 于1986年始建的T7启动子系列的pET-28a进行原核表达.pET-28a载体不仅拥有强T7启动子,还有低的诱导前渗漏,快速、简便的诱导方式及能高效表达多种基因的特点,除此之外,在载体序列的N端有His-tag,利用His-tag与Ni离子的亲和作用,融合表达出的蛋白产物可以用Ni-NAT树脂进一步纯化^[16],而且引入的His-tag相对分子质量小,几乎不影响蛋白原有的功能,同时,融合表达方式还可以降低宿主对表达蛋白的降解.

外源基因在大肠杆菌中表达受诸多因素的影响,包括启动子强度、SD序列和转录终止序列反应、SD序列到ATG间距、密码子使用频率、表达产物的

稳定性的影响,同时外源基因的表达还受编码基因上游5'端及下游3'端侧翼区基因的调控.本文构建的pET-eaeA质粒虽然能在大肠杆菌中稳定表达,但表达量偏低.经分析认为:外源基因在大肠杆菌中能够正常表达,说明外源基因在大肠杆菌细胞中的转录和转译过程正常;所以排除相关因素,表达量偏低的原因可能存在以下几个方面:(1)细菌蛋白酶的降解作用.(2)表达载体的选择.(3)外源基因的长度.

一般地,外源小片段在大肠杆菌中易于表达,且表达量相对较高;而外源大片段往往受宿主菌表达能力阈值的限制,变得难于表达或低量表达.笔者认为,外源基因本身长度太长是本研究表达量偏低的主要原因.(4)寄主细胞的生理状态.在大肠杆菌中表达外源基因时,表达产物往往以包涵体的形式存在.细菌的培养温度和生长速度,是调节大肠杆菌生理状态以减少包涵体形成的两个重要的物理参数.有不少报道指出,降低培养温度、采用能够使细菌生长速率下降的培养基成分和pH值,应用分子伴侣同时表达,有利于减少包涵体的形成^[17].而本试验也从培养温度及培养基成分两方面进行了尝试:认为pET-eaeA重组蛋白二级培养3h后,加入1mmol/L IPTG在37℃诱导4~6h,即可获得最优表达;在培养基选择方面,DMEM、MEM培养基要优于LB培养基.

在免疫印迹时,蛋白质的凝胶电转移十分关键,转移的充分与否直接影响结果的好坏.本试验采用蛋白质预染marker对整个转膜过程进行了监控,同时还采用转移后的凝胶考马斯亮兰染色进一步检查转移效果.因本研究没有市售的特异性抗体,故采用高免血清对重组蛋白进行Western-blotting鉴定.在Western-blotting显色时,出现背景过高现象及显色后有非特异条带出现,这可能是因为高免血清与重组融合蛋白发生了非特异性的抗原抗体反应;或是因为诱导表达过程中产生了截短蛋白,从而导致非特异性条带的出现;还可能是由于C端1/3胞外功能区与高免血清发生了抗原抗体反应而致.

本研究利用大肠杆菌原核表达系统成功表达 *E. coli* O157: H7 021210 主要毒力基因——*eaeA* 基因,为下一步pET-eaeA重组蛋白的生物学性质及免疫学特性研究、O157疫苗和诊断试剂的研制奠定了一定基础.本研究表达的 *eaeA* 基因重组融合蛋白在作为免疫诊断试剂和基因工程疫苗的制备等方面具有潜在的应用价值.

参考文献:

- [1] 权太淑,徐建国,范天锐,等.首次从出血性结肠病人中分离到 *E. coli* O157: H7 大肠杆菌[J].中华流行病学杂志

- 志,1988,9(4):24-28.
- [2] 郭维植,程发稷. 福建省家畜、家禽 O157 大肠杆菌初查[J]. 中国人兽共患病杂志,1998,14(2):3-6.
- [3] 陈前进,曹春远,王炳发. 动物及食品中 O157 大肠杆菌的调查[J]. 中国人兽共患病杂志,2002,18(2):124.
- [4] 闫立群,陈家齐,侯在文,等. 宁夏地区家畜 O157: H7 大肠杆菌带菌调查[J]. 中国人兽共患病杂志,2002,18(3):101.
- [5] 朱文冠,薛素强,胥楚雄,等. 广东地区大肠杆菌 O157: H7 的分离与鉴定[J]. 中国人兽共患病杂志,2005,21(2):147-149.
- [6] CORNICK N A, BOOHER S L, MOON H W. Intimin facilitates colonization by *Escherichia coli* O157: H7 in adult ruminants[J]. Infect Immun, 2002, 70(5): 2704-2707.
- [7] FITZHENRY R J, PICKARD D J, HARTLAND E L, et al. Intimin type influences the site of human intestinal mucosal colonisation by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7[J]. Gut, 2002, 50(2): 180-185.
- [8] DEAN N E A, GANSHEROFF L J, MILLS M, et al. Vaccination of pregnant dams with intimin (O157) protects suckling piglets from *Escherichia coli* O157: H7 infection[J]. Infect Immun, 2002, 70(5): 2414-2418.
- [9] GANSHEROFF L J, WACHTEL M R, OBRIEN A D. Decreased adherence of entero-hemorrhagic *Escherichia coli* to Hep-2 cells in the presence of antibodies that recognize the C-terminal region of intimin[J]. Infect Immun, 1999, 47(12): 6409-6417.
- [10] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T, 等. 分子克隆实验指南[M]. 2 版. 金冬雁, 黎孟枫, 侯云德, 译. 北京: 科学出版社, 1992: 19-22.
- [11] LWAMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227: 680-685.
- [12] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999.
- [13] 伍欣星, 聂广, 胡继鹰. 医学分子生物学原理与方法[M]. 北京: 科学出版社, 2000.
- [14] 刘胜旺, 萨仁高娃, 孔宪刚, 等. 鸡白介素-2 基因在大肠杆菌中表达及多克隆抗体制备[J]. 农业生物技术学报, 2003, 11(4): 412-416.
- [15] TOWBIN H, STAHELIN T, GORDON J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some application[J]. Proc Natl Acad Sci, 1979, 76(9): 4350-4354.
- [16] HOCHULI E, BANNWARTH W, DOBELI H, et al. Genetic approach to purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbant[J]. Bio/Technology, 1988, 6: 1321-1325.
- [17] SON W G, GRAHAM T A, GANNON V P J, et al. Immunological characterization of *Escherichia coli* O157: H7 intimin gamma1[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2002, 9(1): 46-53.

[责任编辑 柴 焰]

喜 讯

《华南农业大学学报》荣获“中国高校精品科技期刊”

为及时交流高校科技期刊工作经验、树立榜样、进一步明确发展方向,打造一批精品期刊,教育部科技司委托中国高等学校自然科学学报研究会于2006年6~10月开展了“首届中国高校精品·优秀·特色科技期刊奖”评比活动。《华南农业大学学报》荣获“中国高校精品科技期刊”奖。

本次参加精品和优秀科技期刊评比的期刊共344种。评出中文精品科技期刊47种、英文精品科技期刊5种,优秀科技期刊98种。广东省同时获得精品科技期刊奖的还有《中山大学学报(自然科学版)》和《南方医科大学学报》。

华南农业大学学报编辑部