

# C 型产气荚膜梭菌 $\alpha$ 、 $\beta_1$ 毒素基因的融合\*

许崇波<sup>1\*</sup> 许崇利<sup>2</sup> 刘庆平<sup>1</sup> 朱永宁<sup>1</sup> 曾 瑾<sup>2</sup> 王玉炯<sup>2</sup>

(1 大连大学生物工程学院 大连 116622 2 宁夏大学生命科学学院 银川 750021)

**摘要** 利用 PCR 技术,从 C 型产气荚膜梭菌染色体 DNA 中扩增出  $\alpha$  和  $\beta_1$  毒素基因,通过分离、纯化、内切酶酶切、连接和转化,构建了含  $\alpha$ - $\beta_1$  融合基因表达质粒重组菌株 BL21(DE3) (pETXAB1)。经酶切鉴定和核苷酸序列测定证实,构建的重组质粒 pETXAB1 含有  $\alpha$ - $\beta_1$  融合基因,且基因序列和阅读框架均正确。经 ELISA 检测,重组菌株表达的  $\alpha$ - $\beta_1$  融合蛋白能够被  $\alpha$ 、 $\beta_1$  毒素抗体识别。免疫实验结果表明, $\alpha$ - $\beta_1$  融合蛋白免疫的小鼠可以抵抗 IMLD 的 C 型产气荚膜梭菌 C59-44 毒素攻击,表明构建的重组菌株可以作为预防仔猪红痢基因工程亚单位苗的候选菌株。

**关键词** C 型产气荚膜梭菌  $\alpha$  毒素基因  $\beta_1$  毒素基因 基因融合

产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*, 又称魏氏梭菌) 是引起各种动物坏死性肠炎、肠毒血症和人创伤性气性坏疽的主要病原菌之一,该菌分为 A、B、C、D、E 5 型,其致病因子是菌体产生的外毒素,其中 C 型产气荚膜梭菌主要产生  $\alpha$  和  $\beta_1$  毒素。 $\alpha$  毒素是一种依赖于锌离子的多功能性金属酶,具有磷脂酶 C (PLC) 和鞘磷脂酶 2 种酶活性,能同时水解组成细胞膜的主要成分—磷脂酰胆碱和鞘磷脂,破坏细胞膜的完整性,导致细胞裂解,从而具有细胞毒性、溶血性和致死性。 $\beta_1$  毒素是一种坏死性和致死性毒素,它们是引起仔猪红痢的主要致病因子<sup>[1]</sup>。近年来,全国各地仔猪红痢的发病率呈上升趋势,严重地影响了我国养猪业的发展。本研究在克隆  $\alpha$  和  $\beta_1$  毒素基因基础上,进一步将  $\alpha$  毒素基因融合到  $\beta_1$  毒素基因的上游,构建了  $\alpha$ - $\beta_1$  融合基因,其表达产物具有良好的免疫保护性,这为下一步研制预防仔猪红痢基因工程亚单位苗奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株和质粒

受体菌 BL21(DE3) 和载体 pET-28c 由本室保存; C 型产气荚膜梭菌强毒菌 C59-44 购自中国兽医药品监察所。

### 1.2 试剂

限制性核酸内切酶 (*Nco*I、*Ban*HI、*Hind* III、*Eco*RI)、T4 DNA 连接酶、IPTG、Wizard PCR Preps DNA Purification System, 购自 Promega 公司; 溶菌酶购自 Sigma 公司; RNase A 购自 Calbiochem 公司; 卡那霉素购自 Boehringer Mannheim 公司;  $\alpha$ 、 $\beta_1$  毒素抗血清购自中国兽医药品监察所, HRP 驴抗羊二抗为自制。

### 1.3 PCR 引物的设计与合成

根据 Titball 等<sup>[2]</sup>报道的  $\alpha$  毒素基因序列, 设计并合成 1 对 PCR 引物: primer 1 为 5'-CATG CCA TGG CAATG AAA GAA AGATT TGT-3', primer 2 为 5'-CCG GAATTC TTTTATATTATAAGTTGAATT-3', primer 1 和 primer 2 分别含有 *Nco*I、*Eco*RI 酶切位点, 用这对 PCR 引物从染色体 DNA 中扩增  $\alpha$  毒素基因。

根据 Hunter 等<sup>[3]</sup>报道的  $\beta_1$  毒素基因序列, 设计并合成了 1 对 PCR 引物: primer 3 为 5'-CGC GGA TCC CCA ATG ATATAGT AAAAC-3', primer 4 为 5'-CCG GAATTC TTA ATAGCT GTT ACTTGTG-3', primer 3 和 primer 4 分别含有 *Ban*HI、*Eco*RI 酶切位点, 用这对 PCR 引物从染色体 DNA 中扩增  $\beta_1$  毒素基因。

根据上述克隆和测定的  $\alpha$  毒素基因序列, 设计并合成了 1 对 PCR 引物, 目的是为了调整阅读框架和去除  $\alpha$  毒素基因前面的毒性部分基因, primer 5 为 5'-CATG CCA TGG CAGATAATAATTCTCAAAG-3', primer 6 为 5'-CCG GGA TCC GATTTCCTGAAATCCA-3',

收稿日期: 2004-11-05 修回日期: 2005-03-07

\* 国家自然科学基金资助项目 (30360080)

\*\* 电子信箱: xdb921@sohu.com

primer5 和 primer6 分别含有 *Nco*I、*Bam*HI 酶切位点,用这对 PCR 引物从构建的含有  $\alpha$  毒素基因的克隆质粒 pETXA1 中扩增出  $\alpha$  毒素基因,用于构建  $\alpha$ - $\beta_1$  融合基因。

PCR 反应体系 100 $\mu$ L: 10 $\times$  buffer 10 $\mu$ L, 染色体 DNA 2 $\mu$ L, 200mmol/L dNTPs 10 $\mu$ L, 引物 P1 和 P2 (0.1 $\mu$ mol/L) 各 1 $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 75 $\mu$ L, Taq DNA 聚合酶 (3U/ $\mu$ L) 1 $\mu$ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5min; 94 $^{\circ}$ C 60s  $\rightarrow$  47 $^{\circ}$ C 60s  $\rightarrow$  72 $^{\circ}$ C 120s, 进行 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10min。

#### 1.4 染色体 DNA 提取、DNA 重组和质粒稳定性试验

染色体 DNA 的提取按文献[4]介绍的方法进行。质粒 DNA 的提取、酶切、琼脂糖凝胶电泳、DNA 体外连接、转化等均按文献[5]介绍的方法进行。质粒稳定性试验参照 Meacock 等<sup>[6]</sup>的方法进行。

#### 1.5 表达产物 SDS-PAGE 分析和 ELISA 检测

按文献[5]介绍的方法进行。

#### 1.6 蛋白表达含量的测定

用 CS-9000 型薄层凝胶扫描仪在 560nm 波长下的吸收值,测量表达产物占菌体总蛋白的相对含量。

#### 1.7 重组菌株毒性的测定

将重组菌株 BL21(DE3) (pETXAB1) 的培养上清、菌体及菌体裂解物以及 C 型产气荚膜梭菌强毒菌 C59-44 培养上清分别接种在卵黄琼脂平板上,观察有无磷脂酶 C 活性,然后再分别经口服或腹腔注射 50 亿重组菌株 BL21(DE3) (pETXAB1), 共计 40 只小白鼠,观察有无临床症状和病理变化。

#### 1.8 包涵体粗提物的制备和免疫保护性试验

将 IPTG 诱导 3h 的 50ml 重组菌株 BL21(DE3) (pETXAB1) 培养物离心收集菌体,然后重悬于 5ml 的 50mmol/L Tris $\cdot$ HCl 2mmol/L EDTA 中,加入溶菌酶至终浓度 100 $\mu$ g/ml,再加入 0.5ml 1% Triton X-100,于 30 $^{\circ}$ C 温育 15min。再用超声波处理 2 个 10s 后,12 000r/min 离心 15min,收集的沉淀物即为包涵体粗提物。

将重组菌株 BL21(DE3) (pETXAB1) 的包涵体粗提物或经甲醛灭活的重组菌株 BL21(DE3) (pETXAB1) 菌体,加入氢氧化铝胶至 10%,作为免疫用抗原。取 160 只小鼠,随机分为 4 组,每组 40 只,分别用上述制备的免疫用抗原进行腹腔免疫,

每只注射 0.2ml,间隔 14d 后,以上述方法进行第二次免疫,14d 后进行攻毒试验。同时设类毒素免疫对照组和生理盐水对照组。

将过夜培养的 C 型产气荚膜梭菌 C59-44 培养上清作倍比稀释,每个剂量腹腔注射小鼠 6 只,观察小鼠死亡情况;用 1MLD C 型产气荚膜梭菌强毒菌 C59-44 培养上清攻击免疫小鼠,观察小鼠的存活情况。

## 2 结 果

### 2.1 $\alpha$ 毒素基因的克隆

利用 PCR 技术,从提取的 C 型产气荚膜梭菌染色体中扩增出 1.2kb  $\alpha$  毒素基因片段,用 *Nco*I/*Eco*RI 酶切后,插入到事先经同样酶切处理的载体 pET-28c 中相应酶切位点,构建了克隆质粒 pETXA1,经 *Nco*I/*Eco*RI 和 *Bam*HI/*Eco*RI 双酶切鉴定(图 1)及核苷酸序列测定,证实该质粒含有  $\alpha$  毒素基因序列,与 Titball 等报道的序列一致<sup>[2]</sup>。

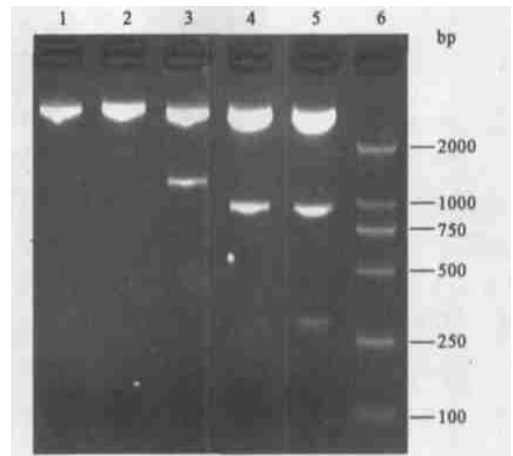


图 1 重组质粒 pETXA1 酶切鉴定

Fig.1 Identification of recombinant plasmid pETXA1

1: pET 28c+ *Eco*RI; 2: pETXA1+ *Eco*RI;

3: pETXA1+ *Nco*I/*Eco*RI; 4: pETXA1+ *Bam*HI/*Eco*RI;

5: pETXA1+ *Nco*I/*Bam*HI/*Eco*RI; 6: DL2000 DNA marker

### 2.2 $\beta_1$ 毒素基因的克隆

按照上述方法,扩增出 0.93kb  $\beta_1$  毒素基因片段,用 *Bam*HI/*Eco*RI 酶切后,插入到事先经同样酶切处理的载体 pET-28c 中相应酶切位点,构建了克隆质粒 pETXB1,经 *Bam*HI/*Eco*RI 双酶切鉴定(图 2)及核苷酸序列测定,证实该质粒含有  $\beta_1$  毒素基因序列,与 Hunter 等<sup>[3]</sup>报道的序列一致。

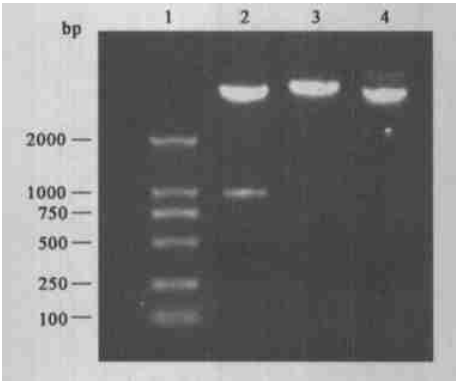


图 2 重组质粒 pETXB1 酶切鉴定

1: DL2000 DNA marker; 2: pETXB1/ *Bam*HI+ *Eco*RI;  
3: pETXB1/ *Bam*HI; 4: pET 28c/ *Bam*HI

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid pETXB1 by enzyme digestion

1: DL2000 DNA marker; 2: pETXB1/ *Bam*HI+ *Eco*RI;  
3: pETXB1/ *Bam*HI; 4: pET 28c/ *Bam*HI

2.3  $\alpha\beta_1$  融合基因重组质粒的构建

利用 PCR 技术, 从含有  $\alpha$  毒素基因的质粒 pETXA1 中扩增出 0.95kb  $\alpha$  毒素基因片段, 用 *Nco* I/ *Bam*HI 酶切后, 插入到事先经同样酶切处理的含  $\beta_1$  毒素基因的载体质粒 pETXB1 中相应酶切位点, 构建了重组质粒 pETXAB1。经 *Nco* I/ *Bam*HI、*Bam*HI/ *Eco*RI、*Nco* I/ *Eco*RI 酶切鉴定(图 3)和核苷酸序列测定, 证实该质粒含有  $\alpha\beta_1$  毒素融合基因, 而且基因序列和阅读框架均正确, 从而成功地构建了  $\alpha\beta_1$  毒素融合基因重组质粒 pETXAB1。

2.4 重组质粒的稳定性

重组质粒 pETXAB1 在受体菌 BL21( DE3) 中能稳定传代, 在无选择压力下, 经 20 细胞世代后, 含质粒率为 100%, 说明具有良好的稳定性。

2.5 融合基因表达产物 SDS PAGE 分析

重组菌株 BL21( DE3) ( pETXAB1) 经 IPTG 诱导 5h, 菌体经超声波处理后, 用 SDS- PAGE 分析, 结果表明,  $\alpha\beta_1$  融合基因可以在这种宿主菌中以包涵体形式表达, 其分子量约为 71kDa, 而含 pET- 28c 空载体的 BL21( DE3) 在该处无特异条带( 图 4),  $\alpha\beta_1$  融合蛋白的表达量占菌体总蛋白相对含量的 12.68%。经 ELISA 检测, 构建的重组菌株表达的  $\alpha\beta_1$  融合蛋白能够被  $\alpha$ 、 $\beta_1$  毒素抗体识别。

2.6 重组菌株毒性的测定

将重组菌株 BL21( DE3) ( pETXAB1) 的培养上清、菌体及菌体裂解物接种在卵黄琼脂平板上, 均



图 3 重组质粒 pETXAB1 酶切鉴定

1: DL2000 DNA marker; 2: pETXAB1+ *Bam*HI/ *Eco*RI;  
3: pETXAB1+ *Nco*I/ *Bam*HI; 4: pETXAB1+ *Nco*I/ *Eco*RI

Fig. 3 Identification of recombinant plasmid pETXAB1 by enzyme digestion

1: DL2000 DNA marker; 2: pETXAB1+ *Bam*HI/ *Eco*RI;  
3: pETXAB1+ *Nco*I/ *Bam*HI; 4: pETXAB1+ *Nco*I/ *Eco*RI

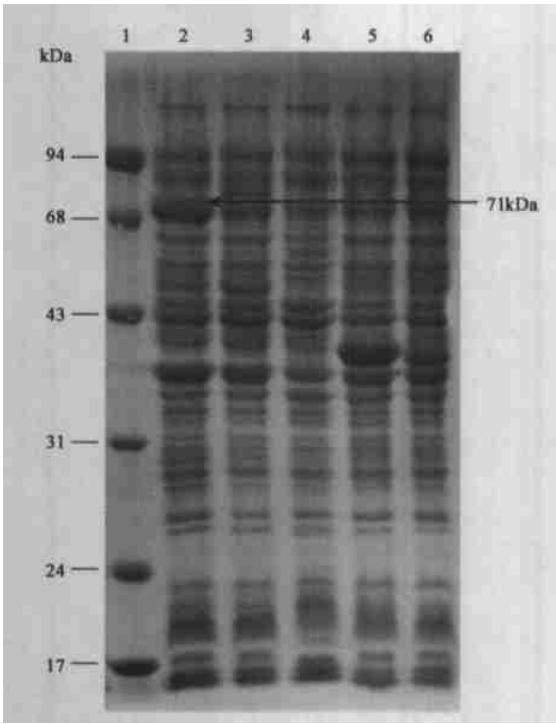


图 4 表达产物 SDS PAGE 结果

1: protein molecular marker; 2, 3, 4, 5, 6: Total cell lysate of BL21( DE3) ( pETXAB1), BL21( DE3) ( pETXBA1), BL21( DE3) ( pET 28c), BL21( DE3) ( pETXA1), BL21( DE3) ( pETXB1)

Fig. 4 SDS PAGE analysis of the expressed products

1: protein molecular marker; 2~ 6: Total cell lysate of BL21( DE3) ( pETXAB1), BL21( DE3) ( pETXBA1), BL21( DE3) ( pET 28c), BL21( DE3) ( pETXA1) and BL21( DE3) ( pETXB1), respectively

不出现特征性浑浊环,表明它们不能分解卵黄琼脂平板中的卵磷脂,而C型产气荚膜梭菌强毒菌C59-44培养上清在卵黄琼脂平板上出现了特征性浑浊环,这说明重组菌株BL21(DE3)(pETXAB1)已不具备 $\alpha$ 毒素的磷脂酶C活性。同时经腹腔注射或口服2种途径接种重组菌株BL21(DE3)(pETXAB1),结果3W后小鼠全部存活,每只小鼠无临床症状出现,经剖检后无病理变化,表明该菌株同时丧失了 $\alpha$ 和 $\beta_1$ 毒素活性,已无致病性,十分安全。

### 2.7 免疫保护性试验

经过筛选,确定最小致死量为4倍稀释的C型产气荚膜梭菌C59-44培养上清,以此攻击用包涵体粗提物或灭活菌体免疫的小鼠。结果表明,包涵体免疫组保护率为91.25%(73/80),灭活菌体免疫组保护率为95.0%(76/80),类毒素免疫对照组保护率为97.5%(78/80),而生理盐水对照组20只小鼠全部死亡。

## 3 讨论

C型产气荚膜梭菌属腐生性厌氧芽胞致病菌,在土壤中广泛存在,享有广泛的疫源地,因而对我国畜牧业生产构成严重威胁,全国各地仔猪红痢的发病率呈上升趋势,具有很高的发病率和死亡率,然而本病的主要致病因子为菌体产生的 $\alpha$ 和 $\beta_1$ 毒素。Guillouard等<sup>[7]</sup>报道了 $\alpha$ 毒素中第11、68、126、136、148位上的组氨酸残基对其具有活性至关重要,68位或148位组氨酸残基被其它氨基酸残基取代(如甘氨酸),即可丧失其全部的溶血性和致死性。Williamson等<sup>[8]</sup>报道了从247位至370位的 $\alpha$ 毒素就具有良好的免疫原性。另外Steinporisdottir等<sup>[9]</sup>将C型产气荚膜梭菌 $\beta_1$ 毒素与谷胱甘肽S转移酶基因融合,结果成功地表达出了融合蛋白,该融合蛋白能诱导小白鼠产生中和抗体,并不具有天然 $\beta_1$ 毒素活性。根据上述的研究报道,我们在克隆 $\alpha$ 和 $\beta_1$ 毒素抗原基因基础上,进一步构建了 $\alpha\beta_1$

融合基因,这种融合基因在含T7启动子载体pET-28c的宿主菌BL21(DE3)中得到了较高水平表达。另外,本研究构建的重组菌株BL21(DE3)(pETXAB1)已经丧失了 $\alpha$ 和 $\beta_1$ 毒素的毒性,同时具有较好的免疫保护性,这为下一步研制预防仔猪红痢 $\alpha$ - $\beta_1$ 毒素双价基因工程亚单位苗提供了理想基因工程菌株。

### 参考文献

- [1] Rood J I, Cole S T. Molecular genetics and pathogenesis of *Clostridium peفرingens*. Microbiol Rev, 1991, 55(4): 621~ 648
- [2] Titball R W, Hunter S E C, Martin K L, et al. Molecular cloning and nucleotide sequence of the  $\alpha$  toxin ( phospholipase C ) of *Clostridium peفرingens*. Infect Immun, 1989, 57( 2): 367~ 376
- [3] Hunter S E C, Brown J E, Oyston P F, et al. Molecular genetic analysis of betar toxin of *Clostridium peفرingens* reveals sequence homology with  $\alpha$  toxin,  $\gamma$  toxin, and leukocidin of *staphylococcus aureus*. Infect Immun, 1993, 61 ( 9 ): 3958~ 3965
- [4] Henrius L, Klaasen B M, Molkenboer J C H, et al. Detection of the  $\beta_2$  toxin gene of *Clostridium peفرingens* in diarrhoeic piglets in The Netherlands and Switzerland. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 1999, 24: 325~ 332
- [5] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [6] Meacock P A, Cohen S N. Partitioning of bacterial plasmids during cell division: a cis acting locus that accomplishes stable plasmid inheritance. Cell, 1980, 20( 2 ): 529~ 542
- [7] Guillouard I, Gamier T, Cole S T. Use of site directed mutagenesis to probe structure function relationships of  $\alpha$  toxin from *Clostridium peفرingens*. Infect Immun, 1996, 64( 7 ): 2440~ 2444
- [8] Williamson E D, Titball R W. A genetically engineered vaccine against the  $\alpha$  toxin of *Clostridium peفرingens* protects mice against experimental gas gangrene. Vaccine, 1993, 11( 12 ): 1253~ 1258
- [9] Steinporisdottir V, Fridriksdottir V, Gunnatsson R, et al. Expression and purification of *Clostridium peفرingens* betar toxin glutathione S transferase fusion protein. FEMS Microbiology Letters, 1995, 130: 273~ 278

(下转第84页)

## Study on Interaction Between Apolipoprotein AI and Scavenger Receptors Class B Type I by Yeast Two Hybrid

XIN Xue-lei CHEN Zhi-hui LI Wei-qi LIU Yur-ying Maidina ZHANG Yur-feng

(The Xinjiang Technical Institute of Physics & Chemistry, The Chinese Academy of Sciences Urumqi 830011, China)

**Abstract** Objective: To verify the interaction between apolipoprotein AI and scavenger receptors class B type I (SR-BI), a key process of reverse cholesterol transport, by yeast two hybrid method and to provide a new target for selecting active substance for reducing lipid in plasma. Method: Apolipoprotein AI and SR-BI gene cDNA from Wistar rat were cloned, and DNA/ apoAI and AD/ SR-BI were constructed, then co-transformed into yeast strain AH109. Transformants were selected on medium of SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/ X- $\alpha$ -Gal and the putative positive clones were identified by yeast mating. Result: Transformants can grow on medium of SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/ X- $\alpha$ -Gal and the colonies are blue.  $\alpha$ ,  $\beta$  galactosidase assays show that the activity of  $\alpha$ ,  $\beta$  galactosidase are 8~12U and 10~40U respectively. After yeast mating, blue colonies can still be seen on medium of SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/ X- $\alpha$ -Gal. Conclusion: It is true that there is interaction between apolipoprotein AI and SR-BI.

**Key words** Yeast two-hybrid Apolipoprotein AI SR-BI Interaction

(上接第 74 页)

## Fusion of Alpha toxin Gene and Beta toxin Gene from *Clostridium perfringens* Type C

XU Chong-bo<sup>1</sup> XU Chong-li<sup>2</sup> LIU Qing-ping<sup>1</sup> ZHU Yong-ning<sup>1</sup> ZENG Jin<sup>2</sup> WANG Yur-jiong<sup>2</sup>

(1 College of Bioengineering, Dalian University Dalian 116622, China)

(2 College of Life Science, Ningxia University Yinchuan 750021, China)

**Abstract** Alpha toxin gene and beta toxin gene from chromosomal DNA of *Clostridium perfringens* type C were amplified by PCR, and PCR products were cleaved with restriction endonucleases and recovered. The recombinant plasmid pETXAB1 containing  $\alpha\beta_1$  fusion gene was constructed by recombinant technique and then transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3). The  $\alpha\beta_1$  fusion protein was expressed in recombinant strain BL21(DE3) (pETXAB1), and the expression level of the  $\alpha\beta_1$  fusion protein was about 12.68% of total cellular protein by SDS-PAGE and three layer gel scanning analysis. More importantly, immunization in a mouse model with crude preparation containing the fusion protein inclusion bodies or inactivated recombinant strain induced protection against at least 1MLD of the toxin from *Clostridium perfringens* type C. Hence, the fusion protein has a good immunogenicity. The constructed recombinant strain BL21(DE3) (pETXAB1) could be used as a candidate of vaccine strain.

**Key words** *Clostridium perfringens* type C Alpha toxin gene Beta toxin gene Gene fusion