

# 破伤风毒素C基因的克隆及重组C蛋白的表达和免疫原性研究

蒋会婷<sup>1,2</sup>, 于三科<sup>1</sup>, 冯平<sup>1</sup>, 江海燕<sup>2</sup>, 王希良<sup>2</sup>

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100;

2 军事医学科学院 微生物流行病学研究所, 北京 100071)

**[摘要]** 对破伤风毒素C基因(TTC)进行了克隆,在大肠杆菌中构建了C基因-硫氧还蛋白融合表达系统并对其进行了重组表达,对表达后蛋白进行了纯化和rTTC的免疫原性初步研究。结果表明,该系统可高水平表达可溶性rTTC, rTTC表达量占可溶性蛋白的28.19%,纯化后纯度为96.92%;所获得的rTTC具有良好的免疫原性,可为开发新一代破伤风亚单位疫苗奠定基础。

**[关键词]** 破伤风毒素; C基因; 免疫原性; C蛋白

**[中图分类号]** Q784; Q785

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-9387(2006)04-0019-04

破伤风毒素是一种神经毒素,由破伤风梭菌分泌产生,分子质量为150 ku,由一个大质粒编码,整个毒素基因包括3 945个核苷酸。毒素经菌体释放后,在蛋白水解酶的作用下,被“裂开”成一条轻链(50 ku)和一条重链(100 ku),但轻链和重链之间仍有二硫键相连<sup>[1]</sup>。轻链是锌依赖蛋白酶,通过水解突触囊泡蛋白-II来阻断神经抑制性介质的释放。C蛋白是重链的一部分,分子质量为50 ku,不具备神经毒素的活性,却保留了完整毒素与神经节苷脂结合等许多性质,是毒素的保护性抗原<sup>[2]</sup>。C蛋白还能将小分子蛋白靶向传递到运动神经元,所以也可作为蛋白载体促进低免疫原性抗原的免疫反应。由于C蛋白是破伤风毒素的非毒性片段,且有较高的免疫原性,因此用其作为亚单位疫苗是现代破伤风疫苗的理想选择<sup>[3]</sup>。

虽然对破伤风毒素C基因克隆后表达的研究比较多,但是大多数表达的蛋白是非可溶性的,而且产量比较低,纯化也很困难。为了克服表达的C蛋白的上述缺点,本试验通过pET32a(+)载体,在大肠杆菌中建立了C基因-硫氧还蛋白融合表达系统,以便高水平地表达易于纯化的可溶性重组破伤风毒素C蛋白(rTTC),并进一步对其进行了纯化和免疫原性研究,以期破伤风亚单位疫苗的研制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌种与试剂 破伤风梭状芽孢杆菌产毒株(Na. 64008)由中国生物制品研究所李岩教授惠赠;菌株DH5 $\alpha$  BL 21(DE3)、载体pET32a(+)均由军事医学科学院微生物流行病学研究所免疫室保存;克隆载体PGEM-T购自Promega公司;Taq DNA聚合酶,限制性内切酶,DL 2 000, DL 15 000 DNA marker, T4 DNA连接酶和IPTG,均购自大连宝生物公司;DNA纯化回收试剂盒购自博大泰克公司;低分子量标准蛋白为中科院上海生物化学研究所产品;蛋白纯化层析介质为Pharmacia公司产品;其余试剂均为进口或国产分析纯。

1.1.2 试验动物 6~8周的雌性Balb/c小鼠,由军事医学科学院实验动物中心提供。

1.1.3 引物 根据GenBank中登陆号为AF154828的序列,利用Primer 5.0软件设计引物,由博亚生物技术有限公司合成。上、下游引物分别设有BamH I和HindIII酶切位点。引物序列如下:

P1: 5'-CGC GGA TCC AAA AAT CTG GAT TGT TGG GTT G-3';

P2: 5'-CCC AAG CTT TTA ATC ATT TGT CCA TCC TTC ATC-3'。

\* [收稿日期] 2005-12-16

[作者简介] 蒋会婷(1981-),女,北京市人,在读硕士,主要从事动物疫病防制的研究。E-mail: jianghuiting1981@163.com

[通讯作者] 于三科(1957-),男,陕西扶风人,教授,主要从事动物疫病防制的研究。E-mail: yusanke15@sohu.com

## 1.2 方法

### 1.2.1 破伤风毒素C片段基因(TTC)的PCR扩增

用上海生工生物公司试剂盒提取破伤风梭状芽孢杆菌总DNA。取上述总DNA 1  $\mu$ L 为模板,上下游引物各1  $\mu$ L, *Taq* DNA 聚合酶0.25  $\mu$ L, dNTP 2.5  $\mu$ L, 10  $\times$  *Taq* DNA 聚合酶2.5  $\mu$ L, 去离子水16.75  $\mu$ L, 反应体系共25  $\mu$ L, 进行PCR扩增。反应条件为: 94 预变性5 min; 94 变性1 min, 56 退火1 min, 72 延伸2 min, 共30个循环; 最后72 延伸10 min。PCR产物经10 g/L 琼脂糖电泳, 按纯化试剂盒提供的方法回收DNA片段。

### 1.2.2 破伤风毒素C基因的克隆与序列分析

PCR产物回收后与克隆载体pGEM-T连接, 构建克隆载体pGEM-T-TTC, 4 过夜, 转化大肠杆菌DH5 $\alpha$ , 37 培养12~16 h, 有蓝白相间菌落出现时, 挑取白色菌落进行菌落PCR和*Bam*H I、*Hind* III双酶切鉴定, 阳性克隆送北京三博公司测序。

1.2.3 破伤风毒素C基因的重组表达 将质粒pGEM-T-TTC和质粒pET32a(+ )分别用*Bam*H I和*Hind* III双酶切, 并回收纯化的pET32a(+ )和TTC, 16 连接16 h, 构建表达载体pET32a-C 转化BL21感受态细胞, 提取质粒, 酶切鉴定筛选出阳性菌。培养阳性菌至菌液OD<sub>600</sub>为0.4~0.6, 按体积比1:100的比例接种于氨苄抗性LB培养基中, 37

培养过夜, 再取2 mL 过夜培养的菌液接种于200 mL LB培养基中继续培养至菌液OD<sub>600</sub>为0.4~0.6, 取出1 mL 菌液作为诱导前的对照, 其余菌液加IPTG至终浓度为0.8~1.0 mmol/L 诱导表达, 37

培养3 h, 4 12 000 r/min 离心15 min 后收集菌体。菌体经超声裂解液洗涤悬浮, 冰浴中超声破碎细菌, 10 000 r/min 离心25 min, 对上清液、沉淀及全菌体取样进行SDS-PAGE分析。

1.2.4 rTTC的纯化 取15 mL 超声离心后的上清液, 经0.45  $\mu$ m 滤膜过滤后缓慢通过结合镍的HiTrap chelating 5 mL  $\times$  1 柱子, 用50, 100, 150, 200, 300, 400和500 mmol/L 不同浓度的咪唑进行洗脱, 收集洗脱液进行SDS-PAGE, 薄层扫描。将含有rTTC的洗脱液透析浓缩后, 用Bandford法测蛋白浓度。

1.2.5 动物免疫 向rTTC中加入等体积的弗氏完全佐剂混合乳化, 200  $\mu$ g/只皮下多点免疫Balb/c小鼠。加强免疫采用与弗氏不完全佐剂等体积混合

乳化液, 剂量为100  $\mu$ g/只, 分别于第3周和第5周各加强免疫1次, 全程免疫共3次。同时设立类毒素标准品(TT)对照组和PBS对照组。

1.2.6 rTTC免疫印迹分析 用SDS-PAGE分离得到rTTC后, 切胶, 采用半湿法电转移到PVDF膜上。转移条件: 电流低于300 mA, 时间2 h。一抗为马抗破伤风毒素多抗, 二抗为辣根过氧化物酶标记的兔抗马IgG, DAB染色。以含空载体的菌体作为阴性对照。

1.2.7 间接ELISA法检测血清抗体水平 用碳酸盐缓冲液(pH 9.6)稀释标准类毒素, 使其终浓度为10  $\mu$ g/mL, 加入96孔ELISA板中, 每孔100  $\mu$ L, 4 过夜, 用50 g/L的脱脂奶于37 包被2 h, 然后加入一抗(待检血清), 将待检血清按1/100, 1/200, 1/400, ..., 1/12 800倍比稀释, 37 孵育1 h, PBST洗3次, 每次2 min, 再加入二抗(辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠IgG), 37 孵育0.5 h, PBST洗板, TMB显色后, 用2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止反应, 用酶标仪于450 nm波长处测定A<sub>450</sub>值, 并利用SPSS 11.0软件进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 TTC的扩增及pGEM-T-TTC双酶切鉴定结果

PCR产物经电泳鉴定扩增出约1 356 bp的片段, 与预期产物大小相同(图1); pGEM-T-TTC经PCR和双酶切鉴定为阳性(图2)。测序结果显示阳性菌的序列与原序列完全一致。

### 2.2 表达载体的构建

pET32a(+)-C转化BL21感受态细胞后, 对菌落进行PCR鉴定得到1 400 bp左右的片段, 双酶切鉴定得到5 900 bp和1 400 bp左右的片段(图3), 表明目的片段插入正确。

### 2.3 rTTC的表达与纯化

重组BL21转化菌经IPTG诱导后, 进行SDS-PAGE, 结果显示, 诱导表达样品在M<sub>r</sub>为62 ku(包括rTTC 50 ku和硫氧还蛋白12 ku)处可见明显条带, 表明rTTC以可溶形式高表达; 而pET32a(+ )空载体对照在该处则无特异条带; 未诱导的样品在该处条带不明显(图4)。经薄层扫描分析, 目的蛋白的表达量占可溶性总蛋白的28.19%。表达产物经镍柱亲和层析纯化后得到蛋白纯度为96.92%。

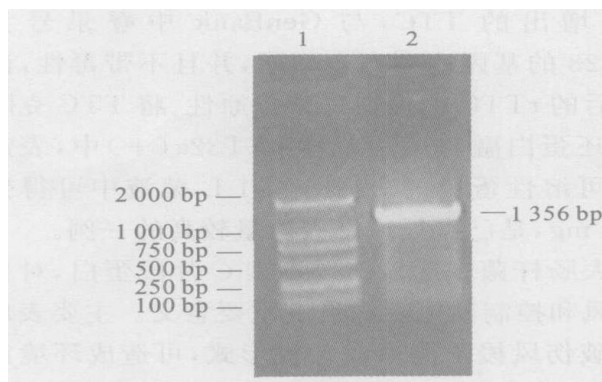


图1 C 片段PCR 产物扩增图谱

1 DL 2 000 标准分子量; 2 PCR 产物

Fig 1 PCR amplification of C fragment

1 DL 2 000 marker; 2 PCR product

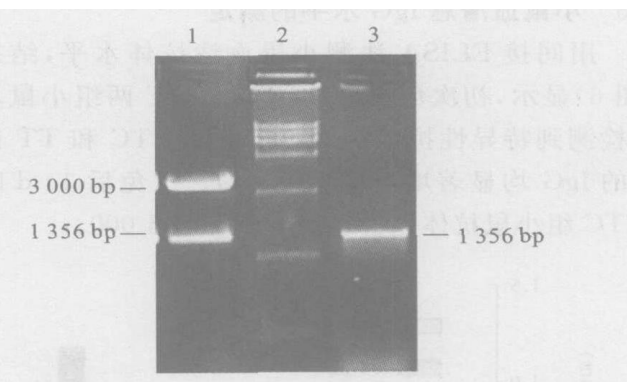


图2 pGEM-T-TTC 的PCR 和载体酶切鉴定图谱

1 pGEM-T-TTC 经 *Bam*HI 和 *Hind*III 双酶切产物;

2 DL 15 000 标准分子量; 3 PCR 产物

Fig 2 Restriction enzyme digestion of pGEM-T-TTC

1 pGEM-T-TTC digested with *Bam*HI and *Hind*III;

2 DL 15 000 marker; 3 PCR product

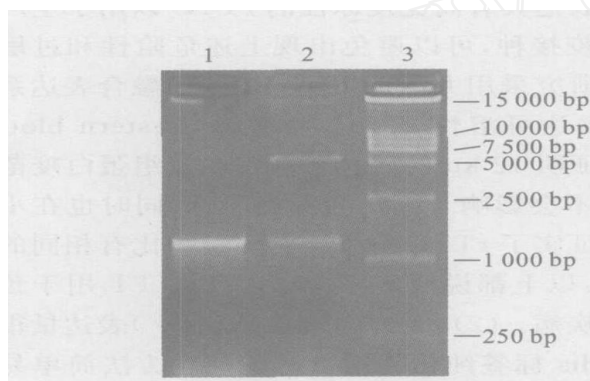


图3 pET32a-C 的PCR 和双酶切图谱

1 PCR 产物; 2 pET32a-C 经 *Bam*HI 和 *Hind*III 双酶切;

3 DL 15 000 标准分子量

Fig 3 Restriction enzyme digestion of pET32a-C

1 PCR product; 2 pET32a-C digested with

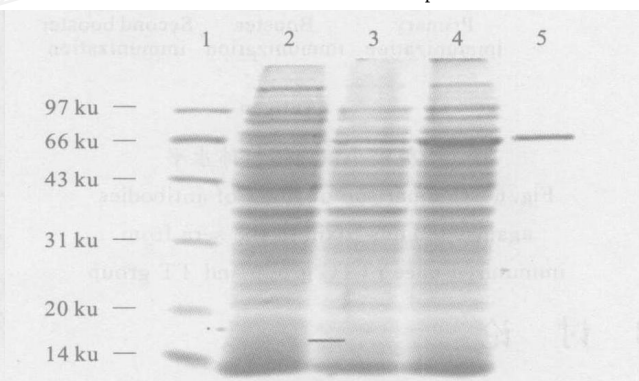
*Bam*HI and *Hind*III; 3 DL 15 000 marker

图4 rTTC 表达及纯化电泳图

1 低分子量标准蛋白; 2 空载体pET32a 菌体裂解液样; 3 pET32a-C 未经IPTG 诱导样; 4 pET32a-C 经IPTG 诱导后的超声裂解样; 5 纯化后的rTTC

Fig 4 SDS-PAGE analysis of the recombinant

fragment-C-thioredoxin fusion protein in *E. coli*1 Standard protein marker; 2 Lysate of *E. coli* cells carrying plasmid pET32a;3 Sample before IPTG induction; 4 Supernatant of lysate of *E. coli* after

sonication and centrifugation; 5 Purified rTTC fusion protein

## 2.4 免疫印记分析

由图5可以看出, 经IPTG 诱导的样品, 在62 ku 附近有一阳性特异条带, 而空载体对照没有。可见表达的rTTC 与破伤风毒素抗体有免疫反应, 而空载

体对照则说明硫氧还蛋白在重组蛋白中的存在不影响rTTC 的免疫原性, 表明rTTC 有很好的免疫原性。

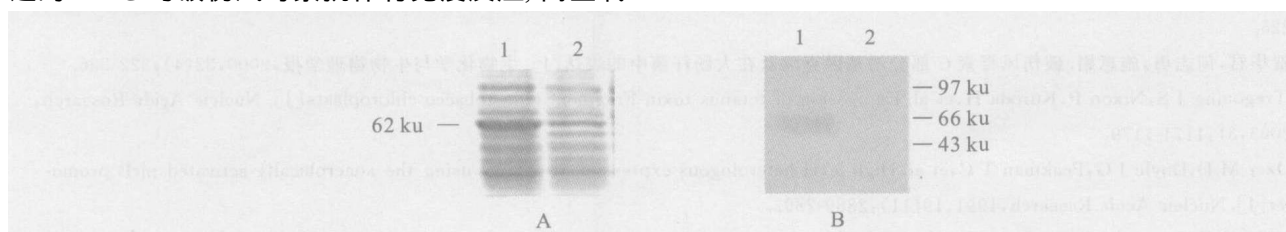


图5 重组蛋白免疫印迹分析

A. 考马斯亮蓝染色SDS-PAGE 胶; B. Western blotting 结果; 1 pET32a-C 经IPTG 诱导超声后离心上清液; 2 pET32a 空载体

Fig 5 Analysis of tetanus toxin fragment C in *E. coli* BL 21 (DE3)A. Coomassie Brilliant Blue-stained gel; B. Result of Western blotting; 1 Supernatant of lysate of *E. coli*

after sonication and centrifugation; 2 Sample carrying plasmid pET32a

## 2.5 小鼠血清总 IgG 水平的测定

用间接 ELISA 法测小鼠血清抗体水平, 结果(图6)显示, 初次免疫后, rTTC 和 TT 两组小鼠均可检测到特异性抗体; 3 次免疫后, rTTC 和 TT 诱发的 IgG 均显著增高( $P < 0.05$ )。三免后 14 d 时 rTTC 组小鼠抗体效价仍能达到  $1:16\,000$ 。

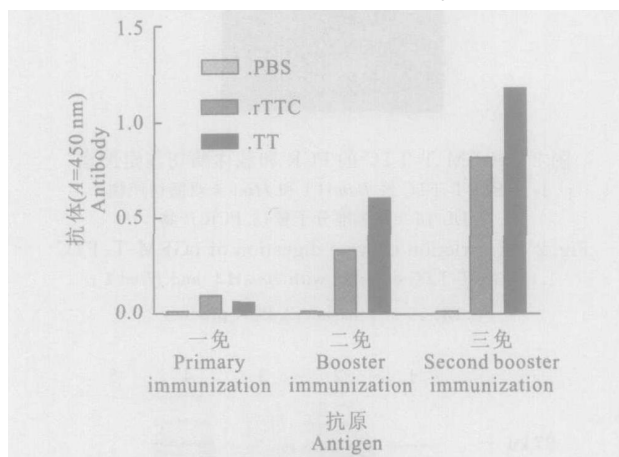


图6 免疫小鼠血清抗体水平

Fig 6 Comparison of titers of antibodies against tetanus toxin in the sera from immunized mice rTTC group and TT group

## 3 讨论

TTC 含有大量稀有密码子, 一般诱导后表达的蛋白比较少, 且多以包涵体形式存在<sup>[4-8]</sup>, 因此利用实验室常用的仪器和试验设备纯化蛋白十分困难。所以本研究提取破伤风梭菌基因组总DNA, 经PCR

扩增出的TTC, 与GenBank中登录号为AF154828的基因序列完全相同, 并且不带毒性, 诱导表达后的rTTC仍保留完整抗原性。将TTC克隆到硫氧还蛋白融合表达载体pET32a(+ )中, 表达产物占可溶性蛋白的28.19%, 1L菌液中可得到rTTC 4mg, 是已有报道中表达量较高的一例。

用大肠杆菌表达破伤风毒素C片段蛋白, 对预防破伤风和控制其他疾病具有重要意义。主要表现在: (1) 破伤风梭菌能形成芽孢形式, 可造成环境污染, 同时因其分泌具有较强神经毒性的外毒素, 在生产类毒素疫苗时对工作人员存在危险性; 另一方面, 用甲醛处理后制成的类毒素, 常因含有甲醛以及大量无关蛋白, 易引起被接种人员的过敏反应。而采用原核细胞表达具有高免疫原性的rTTC以用于生产疫苗及免疫接种, 可以避免出现上述危险性和过敏反应。本研究采用大肠杆菌硫氧还蛋白融合表达系统, 高效表达可溶性rTTC, 并通过Western blotting试验证明12 ku的硫氧还蛋白在重组蛋白疫苗中的存在不会影响rTTC的免疫原性, 同时也在小鼠试验中证实了rTTC与TT对照组相比有相同的免疫原性, 以上都说明rTTC可以替代TT用于预防破伤风疾病。(2) 大肠杆菌pET32a(+ )表达量很高, 利用His标签纯化重组蛋白的纯化方法简单易行, 适合大批量蛋白的生产, 可用于低免疫原性蛋白及蛋白靶向传递运动神经元的载体。可见, 在pET32a(+ )表达宿主中表达的破伤风毒素C片段蛋白, 作为亚单位疫苗和促进抗原免疫反应的蛋白载体, 将具有广阔的开发前景。

## [参考文献]

- [1] 翁心华, 潘孝彰, 王岱明. 现代感染病学[M]. 上海: 上海医科大学出版社, 1997: 445-448
- [2] 杨东亮, 叶嗣颖. 感染免疫学[M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 1998: 100-101
- [3] Ribas A V, Ho P L, Tanizaki M M, et al. High-level expression of tetanus toxin fragment C-thioredoxin fusion protein in *Escherichia coli*[J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2000, 31: 91-94
- [4] 谭亚军, 雷殿良, 张庶民. 破伤风毒素C片段的基因克隆、表达、纯化及免疫原性分析[J]. *中华微生物与免疫学杂志*, 2004, 24(3): 222-225
- [5] 贺华君, 何志勇, 施惠娟. 破伤风毒素C部分的基因克隆及在大肠杆菌中的表达[J]. *生物化学与生物物理学报*, 2000, 32(4): 322-326
- [6] Tregoning J S, Nixon P, Kuroda H, et al. Expression of tetanus toxin Fragment C in tobacco chloroplasts[J]. *Nucleic Acids Research*, 2003, 31: 1174-1179
- [7] Oxe M D, Doyle J G, Peakman T C, et al. High level heterologous expression in *E. coli* using the anaerobically-activated *nirB* promoter[J]. *Nucleic Acids Research*, 1991, 19(11): 2889-2892
- [8] Makoff A J, Oxe M D, Romanous M A, et al. Expression of tetanus toxin fragment C in *E. coli* high level expression by removing rare codons[J]. *Nucleic Acids Research*, 1989, 17(24): 10191-10202

(下转第27页)

## Effect of *Lactobacillus* on growth performance, nutrient digestibility and digestive enzyme activities of weaned piglets

WANG Zhi-xiang<sup>1</sup>, QIAO Jia-yun<sup>1</sup>, WANG Zi-heng<sup>2</sup>, QI Xin<sup>1</sup>

(1 College of Animal Husbandry and Veterinary, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002, China;

2 Qingfeng County Food Bureau, Qingfeng, Henan 457300, China)

**Abstract:** Seventy-two 8-day-old weaned piglets (Duroc × Yorkshire × Landrace) were divided into three groups of four repeats. An experiment was conducted to study the effects of the supplementation of *Lactobacillus* agents and the combination of *Lactobacillus* and flavomycin in the basic diet on growth performance, nutrient digestibility and digestive enzyme activity of weaned piglets. The results showed that *Lactobacillus* increased average daily feed intake ( $P < 0.05$ ), average daily gain and decreased the feed/gain ratio ( $P < 0.01$ ). *Lactobacillus* increased apparently the digestibility of ether extract ( $P < 0.05$ ) and the activities of amylase and lipase in pancreatic gland and duodenum chyme ( $P < 0.01$ ) most significantly. The combination of *Lactobacillus* and flavomycin decreased the performance of piglets and the activities of amylase and lipase in pancreatic gland and duodenum chyme ( $P < 0.01$ ) comparing with the single use of *Lactobacillus*. The results indicated that adding of *Lactobacillus* in the diet could promote the performance of weaned piglets and the activity of lipase and digestibility of ether extract apparently.

**Key words:** weaned piglet; *Lactobacillus*; digestibility; digestive enzyme

(上接第22页)

**Abstract ID:** 1671-9387(2006)04-0019-EA

## Study on cloning, expression and immunogenicity of the fragment C of tetanus toxin

JIANG Hui-ting<sup>1,2</sup>, YU San-ke<sup>1</sup>, FENG Peng<sup>1</sup>, JIANG Hai-yan<sup>2</sup>, WANG Xi-liang<sup>2</sup>

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medicine, Beijing 100071, China)

**Abstract:** To clone, express, purify protein and analyse the immunogenicity of the fragment C of tetanus toxin, the fragment C gene of tetanus toxin was amplified from *Clostridium tetani* genomic DNA by PCR. It was inserted into the high-expression vector pET32a, and expression of this plasmid in *Escherichia coli* BL 21 (DE3) resulted in the production of a fusion protein. The recombinant fragment-C-thioredoxin proteins were purified significantly in one step by affinity chromatography, and then used to immunize mice and test the antibody titers. The result of SDS-PAGE showed that a specific recombinant protein was expressed, accounting for 28.19% of the soluble protein. Western blot analysis indicated that this product had certain antigenicity, and the final purity was 96.92%. 14 days after the third immunization the anti-tetanus antibody titers of the mice of the group rTTC were detected. The recombinant protein is an immunogenicity antigen of tetanus toxin and thus constructs a basis for the development of vaccine in the future.

**Key words:** tetanus toxin; fragment C; immunogenicity; protein C