

# *Clostridium difficile* 细胞毒素 B 羧基末端功能区的克隆与表达

刘红升, 姜泊, 陈村龙, 陈学清

刘红升, 姜泊, 陈村龙, 陈学清, 广州南方医科大学南方医院消化病研究所 广东省广州市 510515  
广州市科技攻关计划资助项目, No. 026G2434  
通讯作者: 刘红升, 510515, 广东省广州市, 广州南方医科大学南方医院消化病研究所. liuhs325@163.com  
电话: 020-61365830  
收稿日期: 2005-02-14 接受日期: 2005-03-22

## 摘要

**目的:** 克隆并表达 *Clostridium difficile* (*C. difficile*) 细胞毒素 B 羧基末端功能区基因, 为探索高效的防治 *C. difficile* 感染的疫苗和诊断抗原奠定基础。

**方法:** 提取 *C. difficile* 染色体基因, 用 PCR 方法扩增 Toxin B<sub>3</sub> 基因, 将其克隆至表达载体 PET22b(+), 用重组质粒转化大肠杆菌[E.coli BL21(DE3)], 并在大肠杆菌 BL21(DE3)中表达. 用 SDS-PAGE 方法对表达产物进行分析。

**结果:** 从 *C. difficile* 基因组 DNA 中成功地克隆了毒素 B 的羧基末端重复区域的 1 848 bp 基因, 经过双酶切、PCR 和测序鉴定分析, 插入到载体的基因与 GenBank 中公布的 *C. difficile* VPI10463 的 Toxin B<sub>3</sub> 基因序列的同源性为 99%。SDS-PAGE 显示, 目的基因表达产物的分子质量为 71.3 ku, 利用表达载体 PET22b(+)表达出蛋白质, 重组蛋白表达量占菌体总蛋白的 34.8%。

**结论:** 含 *C. difficile* Toxin B<sub>3</sub> 基因的 PET22b(+)重组质粒能高效表达目的基因. 该重组子的构建为 *Clostridium difficile* 相关性疾病的诊断及后期制备疫苗, 提供了有力的保障。

刘红升, 姜泊, 陈村龙, 陈学清. *Clostridium difficile* 细胞毒素 B 羧基末端功能区的克隆与表达. 世界华人消化杂志 2005;13(9):1136-1138  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1136.asp>

## 0 引言

*C. difficile* 是肠道感染中仅次于弯曲杆菌的常见致病菌, 现已被公认为发达国家中最重要的院内感染源之一<sup>[1]</sup>. 已论证约 25% 的抗生素相关性腹泻 (AAD)、75% 的抗生素相关性结肠炎以及近 90% 假膜性结肠炎 (PMC) 均与他的感染有关<sup>[2-3]</sup>. 尤其是患严重的或多种基础性疾病而长期住院治疗老年人、或是使用广谱抗生素以及免疫功能抑制者更易感染 *C. difficile*, 导致艰难梭菌相关性疾病 (CDAD), 从而延长住院时间、增加医疗费用, 有时甚至因该病引起的严重并发症而死亡. 虽然以口服甲硝唑或万古霉素治疗可取得较好的疗效, 但目前依然存在因对甲硝唑、万古霉素耐药问题及停药后的复发等问题<sup>[3]</sup>. 疫苗接种可使高危人群获得持久和较强的免疫力, 是预防与控制感染的有

效措施. 随着分子生物学技术的发展, 有关 *C. difficile* 重组抗原的研究已见较多的报道, 但多数是集中在毒素 A 上<sup>[4-5]</sup>, 而对毒素 B 的研究则相对较少. 我们根据 Genth *et al*<sup>[6]</sup> 的文章将毒素 B 分成 3 个氨基酸片段: CDB1 (氨基酸 1-546, 包含接触反应区), CDB2 (氨基酸 901-1750, 含有假定的跨膜区), CDB3 (氨基酸 1751-2366, 被认为是受体结合区), 发现抗毒素 B 抗体与毒素 B 羧基末端 (氨基酸 1751-2366) 可以发生强烈反应, 说明该段很有可能成为制备疫苗和诊断抗原的重要候选蛋白. 故我们选取了毒素 B 羧基末端 CDB3 (氨基酸 1751-2366) 进行克隆与表达, 为以后的疫苗和抗原鉴定的研究建立基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒 用于本实验的 *C. difficile* VPI10463 从兰州生物制品研究所购买. 大肠杆菌菌株 BL21 (DE3) 及质粒 PET22b(+) 系南方医科大学消化研究所存。

1.1.2 工具酶 *Eco*RI 与 *Xho*I 限制性核酸内切酶, T<sub>4</sub>DNA ligase 酶均为 New England Biolab 公司产品。

1.1.3 试剂 厌氧发生剂、脑心浸液 (干粉) 购自生物梅里埃公司 (BioMerieux). 细菌基因组 DNA 提取试剂盒、PCR 扩增试剂盒购自北京赛百胜生物制品公司, 琼脂糖、DNA Marker4 由天为时代生物科技公司提供, 质粒小量提取试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒、IPTG、SDS-PAGE 低分子量标准蛋白质购自上海博彩生物科技有限公司. 引物合成及 PCR 产物、重组质粒测序由上海博亚生物科技公司完成. 其他试剂为国产分析纯。

### 1.2 方法

1.2.1 *C. difficile* 标准株的培养 *C. difficile* VPI 10463 接种于脑心浸液 (BHI) 培养基中, 传种后按 5% 接种于含有生理盐水的透析袋内, 置 BHI 培养基中 37℃ 厌氧环境中透析培养 72 h.

1.2.2 细菌基因组 DNA 和质粒的提取 分别采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒与质粒小量提取试剂盒中的方法提取。

1.2.3 目的基因 (CDB<sub>3</sub>) 扩增 参考 GenBank 收录的 *C. difficile* VPI 10463 基因序列, 应用 Omega 2.0 和 primer 5.0 设计引物, 并在其 5' 端加上合适的限制性核酸内切酶的酶切位点<sup>[7]</sup>, 由上海博亚公司合成序列表 1. 反应条件: 采用 50 μL 反应体系, 按照常规 PCR 条件进行扩增, 热启动法, 94℃ 变性 45 s, 60℃ 退火 60 s, 72℃ 延伸 150 s, 39 个循环后再延伸 10 min. 10 g/L 琼脂

表1 目的基因引物序列及酶切位点

正义链: 5' -TCCGAATTCGCTTATGTCAACTAGTGAA-3',
<i>EcoRI</i>
反义链: 5' -GCACTCGAGTTCACCTAATCACTAATTG-3',
<i>XhoI</i>

糖凝胶电泳观察扩增结果. PCR产物送上海博亚生物科技公司测序. 目的基因DNA经 *EcoRI* 与 *XhoI* 双酶切, DNA凝胶回收试剂盒回收酶切片段.

1.2.4 质粒PET22b(+)的酶切鉴定和纯化 用 *EcoRI* 与 *XhoI* 限制性核酸内切酶对质粒进行双酶切后, 将酶切产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 计算产物条带分子质量, 然后用DNA凝胶回收试剂盒回收.

1.2.5 重组质粒的构建与鉴定 将经酶切纯化的目的基因、质粒PET22b(+)按10:1(摩尔数)进行连接, 反应体系为20  $\mu$ L, 在 *T<sub>4</sub>* DNA ligase 酶作用下16 $^{\circ}$ C连接12 h, 取100  $\mu$ L常规方法制备的(大肠杆菌菌株BL21(DE3)感受态细胞, 加入10  $\mu$ L的连接产物, 于冰上放置30 min, 于42 $^{\circ}$ C水浴中热休克90 s, 置冰上5 min, 加入600  $\mu$ L的SOC培养基, 37 $^{\circ}$ C摇床上180次/min摇动1 h, 5 000 r/min离心1 min, 弃上清液约600  $\mu$ L, 将细菌重悬后, 取100  $\mu$ L培养物涂于含氨苄青霉素(100 mg/L) LB固体培养基平板中, 37 $^{\circ}$ C孵育约16 h. 挑取单个菌落, 接种在含氨苄青霉素(100 mg/L) LB液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C摇床上200次/min摇菌致  $A_{600}$  值达0.6, 然后提取重组质粒. 重组质粒的鉴定: 将重组质粒用 *EcoRI* 与 *XhoI* 双酶切鉴定; 以重组质粒为模板, 用前述已合成的引物进行PCR反应; 重组质粒送上海博亚生物科技公司测序.

1.2.6 目的基因表达 将经过鉴定的阳性克隆菌落接种到2 mL LB培养液(含200 mg/L氨苄青霉素)中37 $^{\circ}$ C摇床上180次/min摇菌8 h致  $A_{600}$  值达0.6, 4 $^{\circ}$ C过夜, 然后按2%转接至(含200 mg/L氨苄青霉素) LB培养液中, 继续培养3 h至  $A_{600}$  值为0.8, 加IPTG至终浓度为1 mmol/L, 诱导后按1 h间隔, 进行取样, 共取样4次.

1.2.7 基因表达产物的SDS-PAGE分析 将菌液样品2 mL 5 000 r/min离心, 5 min, 用500  $\mu$ L的PBS将细菌重悬后, 加入同等量的2XSDS-PAGE样品缓冲液, 于100 $^{\circ}$ C水浴5 min, 10 000 g离心, 10 min, 取上清加样. 采用5 g/L的浓缩胶和8 g/L的分离胶, 电泳2.5 h. 凝胶用考马斯亮兰R250染色.

## 2 结果

2.1 *C. difficile* 细胞毒素B羧基末端基因片段(CDB<sub>3</sub>)的序列 *C. difficile* 细胞毒素B基因经PCR扩增结果电泳分析发现在1 800 bp左右有一条带, 大小与预计相符(图1).

2.2 重组载体的酶切鉴定与测序 将PCR产物经 *EcoRI* 与 *XhoI* 双酶切后, 定向插入经同样双酶切的PET22b(+)载体中, 获得重组质粒命名为PET22b(+)CDB3. 重组质粒

经 *EcoRI* 与 *XhoI* 双酶切后电泳初步鉴定结果与预期相符. 直接以重组质粒PET22b(+)CDB3为模板进行测序, 得到了克隆片段的DNA序列, 与GenBank记录的 *C. difficile* VPI10463的ToxinB3基因序列的同源性为99%.

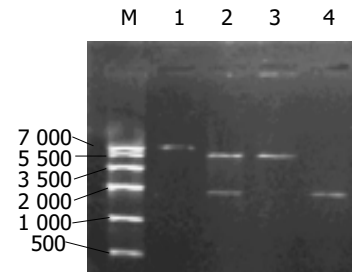


图1 CDB3基因的PCR产物、重组质粒和PET22b(+)载体用 *EcoRI* 单酶切的图谱. M: marker; 1: 重组质粒用 *EcoRI* 单酶切; 2: 重组质粒用 *EcoRI* 与 *XhoI* 双酶切; 3: PET22b(+)载体用 *EcoRI* 单酶切; 4: PCR产物.

2.3 诱导产物的SDS-PAGE 阳性克隆子在IPTG的诱导下, 表达出的蛋白相对分子质量为71.3 ku, 与预期的蛋白大小一致(图2), 凝胶自动扫描分析, 其PET22b(+)CDB3重组蛋白占菌体总蛋白的34%, 其中分泌表达占菌体总蛋白的22.7%, 可溶性表达占上清的14%, 包涵体占沉淀的82.7%.

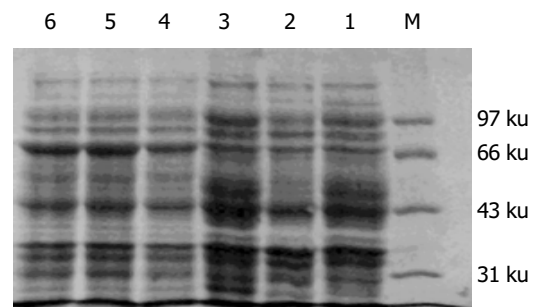


图2 CDB3基因诱导表达产物的SDS-PAGE分析. M: 低分子质量的标准蛋白(97、66、43、31、20 ku); 1: 空大肠杆菌(BL21)经诱导作用的蛋白; 2: 空含PET22b(+)载体的BL21经诱导的蛋白; 3: 阳性克隆大肠杆菌在未诱导时的蛋白; 4、5、6: 阳性克隆大肠杆菌在IPTG诱导下1、3、4 h的蛋白.

## 3 讨论

目前, 在艰难梭菌相关性疾病(CDAD)的研究中发现, 艰难梭菌产毒株主要产生的两种外毒素: 毒素A(为分子质量308 ku的肠毒素), 毒素B(为分子质量270 ku的细胞毒素)<sup>[8]</sup>. 毒素A具有弱细胞毒作用, 毒素B有极强的细胞毒性, 为毒素A的10倍. 动物模型已证明毒素A与B就是导致腹泻与肠炎症的原因, 多数的 *C. difficile* 产毒株均可以合成这两种毒素, 而非产毒株艰难梭菌在临床上不具有致病性. 但在动物模型中, 毒素B必须在有小量的毒素A提前给予的情况下才具有致死性, 因为毒素A必须和肠上皮细胞刷状缘上的受体相结合才能改变肠黏膜上皮细胞的电阻抗, 进而改变其完整性, 从而导致上皮细胞膜

破坏,毒素B可进入肠上皮细胞,然而长期没有发现人类毒素B的受体<sup>[9]</sup>.故上世纪90年代初以前一直认为毒素B仅在毒素A损伤肠黏膜细胞基础上而致病,因此对CDAD的诊断、预防的研究主要是针对*C difficile*毒素A.但近十多年来在一些大的综合性医院出现的爆发性的CDAD流行中,经鉴定发现毒素A阴性而毒素B阳性的*C difficile*造成的,证实以前观点是不正确的<sup>[10-11]</sup>.近年研究发现,人肠黏膜细胞表面上,葡萄糖基变位受体是毒素B的受体,并据此假设毒素B无须毒素A先致人上皮细胞膜损害,即可进入细胞,并引起肠局限性炎症,致中性粒细胞聚集以及从中性粒细胞、巨噬细胞释放炎症递质<sup>[12-13]</sup>.分子生物学研究表明,毒素B的氨基酸序列有3个显著结构:(1)位于毒素中央由疏水氨基酸组成并且具有高度保守性的序列,起跨膜、转运的作用.(2)位于C端的重复序列,起结合膜受体作用.(3)N端序列为毒素酶的作用及毒性作用区<sup>[14]</sup>.Fred *et al*分别克隆并在大肠杆菌内表达了毒素B基因的3个氨基酸片段aa1-900, aa901-1750, aa1751-2366,发现毒素B酶活性作用和细胞毒性作用位于N'端.Genth *et al*<sup>[6]</sup>通过将毒素B分成3个片段CDB1、CDB2、CDB3,发现抗毒素B抗体与CDB3可以发生强烈反应,而与CDB1反应微弱,抗*C difficile*抗体既与CDB1又能与CDB3反应,CDB2则与两抗体均不反应,说明CDB3是良好的抗原.进一步实验发现,只有抗受体结合区域的抗体(抗CDB3抗体)才能保护完整细胞免受毒素B的细胞毒性攻击,而抗接触反应区的抗体(抗CDB1抗体)只有进入细胞内才能起保护作用.现有的研究表明,*C difficile* Toxin B3是一种理想的疫苗候选抗原.

目前,在*C difficile*感染的诊断中,传统实验室诊断的方法有细菌培养和组织培养检测毒素.细菌培养敏感,但时间长,缺乏特异性.组织培养敏感度、特异性都很高,但是受设备与技术水平的限制.而酶联免疫检测法则是缺乏组织培养条件的实验室首选方法,可以与组织培养相媲美.其优点是灵敏度和特异度高,并且几乎接近组织培养,快速、准确<sup>[15]</sup>.*C difficile*抗毒素B抗体与CDB3可以发生强烈反应,故本研究为*C difficile*感染诊断抗原的研究也奠定了一定的基础.

我们参考*C difficile*国际标准株VPI 10463基因序列,用自行设计的CDB3引物在PCR反应中表现出较高的特异性,为理想的引物序列.在上、下游引物中分别加入*Eco*RI与*Xho*I酶切位点,保证了读码方向的正确性.为便于下一步的表达和纯化工作又将其装入了末端带

有His标签的融合表达载体,酶切鉴定和测序结果显示获得了带有特异的*C difficile* CDB3基因.蛋白电泳分析表明获得了高效表达的*C difficile* ToxinB3克隆株,ToxinB3重组蛋白占菌体总蛋白的34%,定位分析显示分泌表达占周质总蛋白的22.7%,可溶性表达占上清的14%,包涵体占沉淀的82.7%,为进一步研究*C difficile*相关性疾病的诊断和免疫保护作用奠定了重要的实验基础.

#### 4 参考文献

- 1 Bartlett J G. Clinical practice Antibiotic-associated diarrhea. *N Engl J Med* 2002;346:334-339
- 2 Kelly CP, Pothoulakis C, LaMont JT. Clostridium difficile colitis. *N Engl J Med* 1994;330:257-262
- 3 齐锡位,刘世琴,许晓.抗生素相关性腹泻患者艰难梭菌的鉴定和敏感药物治疗.第一军医大学分校学报 2002;25:88
- 4 Kink JA, Williams JA. Antibodies to recombinant Clostridium difficile toxin A and B are an effective treatment and prevent relapse of *C. difficile* associated disease in a hamster model of infection. *Infect Immun* 1998;66:2018-2025
- 5 Ward SJ, Douce G, Figueiredo D, Dougan G, Wren BW. Immunogenicity of a salmonella typhimurium aroA aroD vaccine expressing a nontoxic domain of Clostridium difficile toxin A. *Infect Immun* 1999;67:2145-2152
- 6 Genth H, Selzer J, Busch C, Dumbach J, Hofmann F, Aktories K, Just I. New Method to generate enzymatically deficient clostridium difficile toxin B as an antigen for immunization. *Infect Immun* 2000;68:1094-1101
- 7 杨晓强,姜泊,孙勇,王继德.艰难梭菌毒素基因3'末端重复区域基因片段的PCR克隆.第一军医大学学报 2002;22:791-793
- 8 von Eichel-Streiber C, Laufenberg-Feldmann R, Sartingen S, Schulze J, Sauerborn M. Comparative sequence analysis of the clostridium difficile toxins A and B. *MolGen Genet* 1992;233:260-268
- 9 Neunlist M, Barouk J, Michel K, Just I, Oreshkova T, Schemann M, Galmiche JP. Toxin B of Clostridium difficile activates human VIP submucosal neurons, in part via an IL-1beta-dependent pathway. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;285:G1049-1055
- 10 Moncrief JS, Zheng L, Neville LM, Lysterly DM. Genetic characterization of toxin A-negative, toxin B-positive Clostridium difficile isolates by PCR. *J Clin Microbiol* 2000;38:3072-3075
- 11 Limaye AP, Turgeon DK, Cookson BT, Fritsche TR. Pseudomembranous colitis caused by a toxin A (-) B (+) strain of Clostridium difficile. *J Clin Microbiol* 2000;38:1696-1697
- 12 Mitty RD, LaMont JT. Clostridium difficile diarrhea: pathogenesis, epidemiology and treatment. *Gastroenterologist* 1994;2:61-69
- 13 Miller PD, Pothoulakis C, Baeker TR, LaMont JT, Rothstein TL. Macrophage-dependent stimulation of T cell depleted spleen cells by Clostridium difficile toxin A and calcium ionophore. *Cell Immunol* 1990;126:155-163
- 14 Hofmann F, Busch C, Prepens U, Just I, Aktories K. Localization of the Glucosyltransferase activity of Clostridium difficile Toxin B to the N-terminal part of the holotoxin. *J Biol Chem* 1997;272:11074-11078
- 15 Wilkins TD, Lysterly DM. Clostridium difficile testing:after 20 years, still challenging. *J Clin Microbiol* 2003;41:531-534