

食源性致病菌六联融合毒素的构建及免疫学特性研究

宫彬彬¹, 柳增善¹, 于师宇¹, 孟宪梅¹, 卢士英¹, 任洪林^{1,2}, 李兆辉¹, 王克坚²

摘要: [目的] 构建 4 种食源性致病菌融合毒素基因及重组表达载体, 制备六联融合毒素的血清抗体。[方法] 采用柔性 Linker 序列 (G-G-G-G-S) 对目的基因进行串联 (Hbl_A-VT_{1B}-SE_A-VT_{2B}-BoNTaHc-SE_B), 构建重组表达质粒 pET-22b (+)-F6 并在 E. coli BL21 中进行表达, 将表达蛋白纯化后免疫豚鼠制备血清抗体, 利用 ELISA 和琼脂扩散试验验证抗体的特异性与敏感性。[结果] 成功构建了重组表达质粒 pET-22b (+)-F6 并在 E. coli BL21 中成功表达, 37℃ 表达蛋白主要以包涵体形式存在 (表达量 10.2%), 基因序列全长 3 384bp, 编码 1 127 个氨基酸, 蛋白分子量为 127 205, 测序结果与设计序列一致性为 100%。ELISA 和琼脂扩散试验表明, 融合毒素 F6 与 4 种食源性致病菌有良好的反应原性, 与多种非目标菌不反应。[结论] 成功构建了多联融合毒素基因的表达质粒及制备了抗血清, 为利用融合毒素的方法检测食源性致病菌, 进而建立食源性致病菌广谱、快速的检测方法奠定基础。

关键词: 食源性致病菌; 基因串联; 融合毒素; 血清抗体; ELISA 检测

STUDY ON THE CONSTRUCTION AND IMMUNOLOGY CHARACTERISTICS OF SIX-VALENT FUSION TOXIN OF FOOD POISONING-BORNE BACTERIA GONG Bin-bin, LIU Zeng-shan, YU Shi-yu, et al. (Key Laboratory of Zoonosis, Ministry of Education, Institute of Zoonosis, Jilin University, Changchun 130062, China)

Abstract: [Objective] To construct toxin including fusion toxin gene from food poisoning bacteria and its recombinant expression vector, and then prepare serum antibody of Six-valent fusion toxin. [Methods] Six gene (Hbl_A-VT_{1B}-SE_A-VT_{2B}-BoNTaHc-SE_B) fragments were connected by SOE-PCR via linker sequence encoding five amino acids (G-G-G-G-S), the recombination expression plasmid pET-22b(+)-F6 was constructed and expressed in E. coli BL21. The expression proteinum was purified, and the blood serum was prepared by the immune cobaya, The specificity and sensitivity of antibody were verified by the ELISA and agar diffusion reaction. [Results] The fusion gene F6 (Hbl_A-VT_{1B}-SE_A-VT_{2B}-BoNTaHc-SE_B) and recombinant plasmid pET-22b(+)-F6 was successfully constructed. The most of the 37℃ expression proteinum showed to be cytorrhcytes (expreesion amounted to 10.2%). The sequence encoding the mature fusion protein of the F6 toxin gene was 3384bp, encoding 1127 amino acids. The molecular weight of recombinant fusion toxin protein was 127.205 ku. The result of sequencing was consistent with predicted gene sequences. The results of ELISA and agar diffusion reaction demonstrated that fusion gene F6 and other four kinds of food poisoning-born bacteria had favorable reactionogenicity and did not response to many other non-target bacteria. [Conclusion] The expression plasmid of multi-valent fusion toxin was successful constructed and antiserum was prepared, which laid the foundation for establishing broad spectrum and rapid detection method for food poisoning bacteria by utilization of fusion toxin detection methods.

Key words: Food poisoning bacteria; Gene linking; Fusion toxin; Serum antibody; ELISA detection

目前, 食源性致病菌检测方法主要有两种方式, 一个是精确快速检测技术, 二是广谱筛检技术。精确检测技术即是针对食品中的每种可疑污染菌或毒素进行单一检测, 具有非常好精确度和特异性, 缺点是繁琐, 不经济, 不能快速筛检大批量的待检物。广谱筛检技术能够对大批量样品判断是否含有一定的病原或毒素, 必要时再进行精确鉴定, 在检验大批量食品时具

有快速经济的优点。试验所用 4 种食源性致病菌的致病性及基因序列与功能方面均有较详尽的报道, 而且毒素基因的表达产物均具有较好的免疫原性^[1-4]。但是, 由于重组毒素并非自然界所固有的天然蛋白, 重组后是否还具有各自的免疫学特性, 特别是加入了编码 5 个氨基酸的 linker 是否破坏了 6 个毒素基因的抗原特性, 是我们最为关心的问题。本实验探寻以基因工程方法表达蛋白, 免疫动物后获取多克隆抗体的可行性, 为建立快速广谱的食物中毒菌筛检方法奠定理论和方法学基础。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30671762); 厦门市科技计划项目 (3502Z20055009)

作者简介: 宫彬彬 (1982-), 男, 在读博士

通讯作者: 王克坚, 教授, E-mail: wkjian@xmu.edu.cn

作者单位: 1. 吉林大学人兽共患病研究所, 人兽共患病教育部重点实验室, 长春, 130062; 2. 近海海洋环境科学国家重点实验室, 厦门大学海洋与环境学院

1 材料与方法

1.1 材料

蜡样芽孢杆菌 (ATCC14579, 主要引起腹泻) 由陈启军教授惠赠; 大肠杆菌 O157:H7 标准株 (济) 由本校周志江教授惠赠; 金黄色葡萄球菌菌种 26072 (A)、26075 (B) 购自 (北

京) 中国生物制品检定所; A 型肉毒梭菌 (62A) 为国际标准株, 购自中国兽医药品生物制品检定所; E.coli DH5α 由本室保存。其他 26 种非目标菌为本室保存。基因组 DNA 提取试剂盒购自 Vitagene 生物公司、DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒购自安捷优晶生物工程有限公司。Pfu、Taq plus 聚合酶、T₄ DNA 连接酶、pMD-18T 载体、限制性内切酶 BamHI、NdeI、XhoI 购自 TaKaRa 公司。次高蛋白 Marker, 羊抗豚鼠 IgG 抗体, PVDF 膜, 显影液, 定影液, 购自鼎国公司, DNA Marker 购自天为时代。ECLplus 试剂盒购自 pierce 公司。

1.2 6 个毒素基因片段克隆、鉴定及序列分析^[5]

根据文献报道的 6 种毒素的基因序列, 用 Premier 软件对每个毒素分别设计两条 PCR 引物。引物在此略。毒素基因片段克隆、鉴定及序列分析按分子克隆常规方法进行。

1.3 基因片段选取和基因串联、鉴定、序列分析^[5,6]

毒素基因序列选取: 蜡样芽孢杆菌的溶血毒素 A (Hbl_A) 1 032 bp, A 型肉毒毒素 C 片段的 C 末端 (BoNTaHc) 438 bp, O157:H7 大肠杆菌 veroto 毒素 1 的 B 亚基 (VT_{1B}) 207 bp, 金黄色葡萄球菌肠毒素 A (SEA) 699 bp, O157:H7 大肠杆菌 veroto 毒素 2 的 B 亚基 (VT_{2B}) 210 bp, 金黄色葡萄球菌肠毒素 B (SE_B) 720 bp。将 4 种细菌 6 种毒素基因片段采用重叠延伸 PCR 技术(SOE) 构建融合毒素基因。由上海 Sangon 公司合成基因串联 PCR 引物序列:

Hbl_A 上游: 5'-ggg CCA Tgg AgT gAA ATT gAA CAA Acg A-3'
Hbl_A 下游: 5'-AgA gCC ACC gCC ACC TTT TTg Tgg AgT

AAC AgT-3'
VT₁ 上游: 5'-CCA Tgg ATA CgC CTg ATT gTg TAA CTg g-3'
VT₁ 下游: 5'-CTg CTg CCA CCg CCA CCA CgA AAA ATA ACT TCg CTg AAT-3'
SE_A 上游: 5'-CgT ggT ggC ggT ggC AgC AgC gAg AAA AgC gAA gAA ATA-3'
SE_A 下游: 5'-AgA gCC ACC gCC ACC ACT TgT ATA TAA ATA TAT ATC AAT-3'
VT₂ 上游: 5'-Aag Tgg Tgg Cg gTgg CTC TgC ggA TTg TgC TAA Agg TAA-3'
VT₂ 下游: 5'-Tgg AgC CAC CgC CAC CgT CAT TAT TAA ACT gCA CTT CAg-3'
BoNTaHc 上游: 5'-gAC ggT ggC ggT ggC TCC AAT TCA AgT TTg TAT Agg gg-3'
BoNTaHc 下游: 5'-CTC ggA gCC ACC gCC ACC Cag Tgg CCT TTC TCC CCA TC-3'
SE_B 上游: 5'-ggg Tgg Cgg Tgg CTC CgA gAg TCA ACC A-gA TCC TAA AC-3'
SE_B 下游: 5'-CTC gAg TTA CTT TTT CTT TgT CgT Aag AT-3'

基因串联与 PCR 扩增方案见图 1 所示。Linker 选用甘氨酸 (Gly: G) 和丝氨酸 (Ser: S) 两种柔性氨基酸, 5 个氨基酸串联, 连接顺序为 G-G-G-G-S, Linker 序列长 15 bp。串联基因片段克隆、鉴定及序列分析按分子克隆常规方法进行。

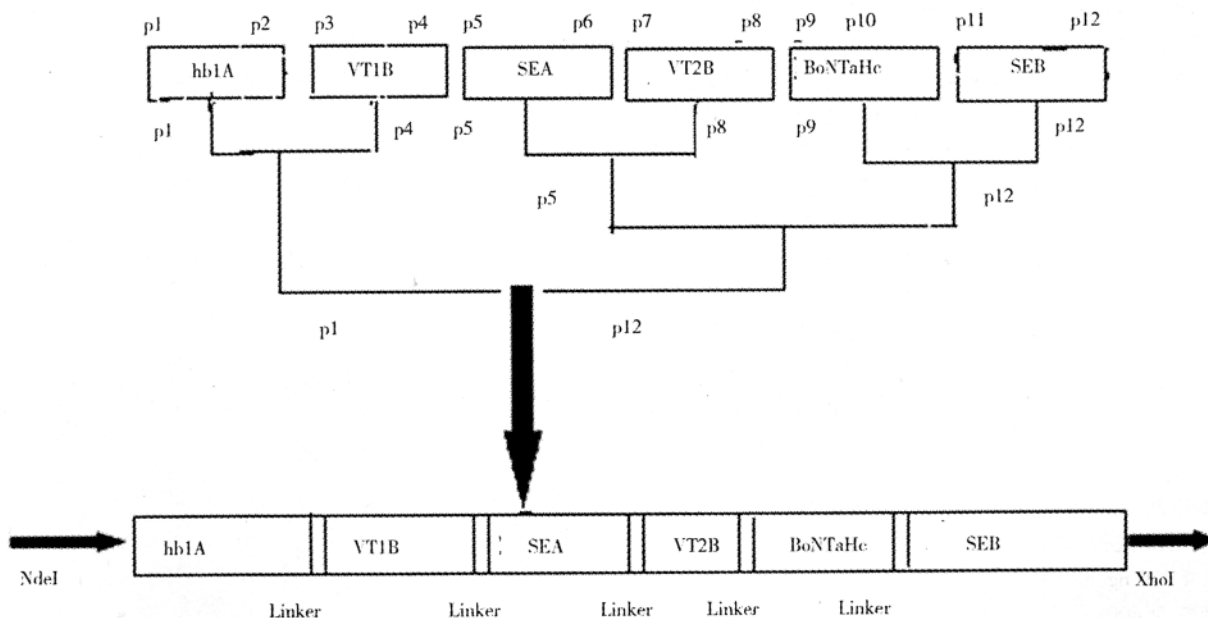


图 1 基因串联与 PCR 扩增方案

1.4 融合毒素 F6 重组表达质粒的构建与鉴定^[7]

大量提取重组质粒 pMD18-T-F6 与表达载体 pET-22b (+), 用 NdeI 和 XhoI 进行双酶切, 回收酶切后的融合毒素 F6 目的基因与表达载体 pET-22b(+), 用 T₄ 连接酶将两者构建重组质粒 pET-22b (+)-F6, 转化 DH5α, 经酶切及 PCR 鉴定为阳性克隆后进一步测序鉴定。

1.5 工程菌的诱导表达及产物的制备^[8]

大量提取重组质粒 pET-22b(+)-F6, 将其转化到表达宿主菌 E.coli BL21(DE3)中。鉴定为阳性克隆后, IPTG 诱导表达, 并对表达条件进行优化。根据 Novagen 的 pET 系统操作手册对表达蛋白表达形式及蛋白定位进行分析, 用 SDS-PAGE 电泳及薄层扫描分析检测。包涵体蛋白的洗涤处理: pET-22b

(+) -F6 表达菌 37℃大量诱导表达 (7 h) 后超声破碎离心取菌体沉淀, 2 mol/L 尿素洗涤包涵体沉淀蛋白两次, 再用 8 mol/L 尿素洗涤包涵体沉淀蛋白一次, -20℃保存。可溶性表达蛋白 (上清) 的提取与浓缩: pET-22b (+)-F6 表达菌 25℃大量诱导表达 (过夜) 后超声破碎离心取上清, 透析浓缩。

取洗涤处理过的包涵体与浓缩后的上清, 进行 SDS-PAGE 后, 从凝胶上切下目的蛋白带, 分别装入透析袋用电洗脱法洗脱目的蛋白, 浓缩后即初步纯化的融合毒素 F6 表达蛋白, SDS-PAGE 检测纯化效果, 用紫外分光光度计测定蛋白浓度, -20℃保存。

1.6 豚鼠抗融合毒素蛋白 F6 免疫血清的制备^[9]

用紫外分光光度计测定纯化的融合毒素蛋白的浓度, 复性的包涵体溶液平均浓度为 2.00 g/L, 纯化的可溶性表达蛋白平均浓度为 1.00 g/L。将制备的包涵体蛋白配成 1g/L 溶液作为抗原免疫健康豚鼠, 采取背部皮下多点注射法, 每次 1.0 ml/只, 共免疫 4 次, 每次免疫间隔 7 d。免疫结束后心脏采血, 制备的抗血清-20℃保存。同时制备健康豚鼠血清作阴性对照。

1.7 间接 ELISA 方法和琼脂扩散法检测血清效价^[10]

选用酶标抗体推荐的浓度 1 : 4 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗豚鼠 IgG 作为酶标抗体的工作浓度。选择不同抗原包被浓度 (0.5、1、2、4、8 mg/L) 的可溶性表达蛋白包被酶标板后, 用不同稀释倍数的被检血清 (100×、200×、400×、800×、1 600×、3 200×、6 400×、12 800×、25 600×、51 200×) 以方阵法确定最佳抗原浓度和抗体稀释倍数, 间接 ELISA 方法检测血清抗体效价。同时利用琼脂扩散试验检测血清抗体效价。

1.8 抗体特异性检测

利用间接 ELISA 方法和免疫印迹检测抗体的特异性: 利用 26 种非目标细菌活化后按 1%对接过夜培养, 取 1 ml, 离心收集菌体, 加入 1 ml 包被液稀释悬起菌体, 取 0.10 ml 包被。一抗豚鼠血清 3 200×稀释, 二抗辣根过氧化物酶标记的羊抗豚鼠 IgG 4 000×稀释, 对照阴性血清 400×稀释, 融合毒素 F6 和 VT₁ 毒素及 E.coliO157 : H7 菌作阳性对照。

对不同型的目标菌进行检测: 对蜡样芽孢杆菌、O157 : H7 大肠杆菌、金黄色葡萄球菌 A、B、E、C1、C2 型菌、肉毒梭菌 A、B、C 型菌进行检测, 毒素 Hbl_A、VT₁、VT₂、SE_A、SE_B、Hc 和融合毒素 F6 做对照, 检测抗体特异性。同时进行阴性对照试验。

按照 Western blot 试剂盒所述步骤进行免疫印迹, 用未免疫豚鼠血清作为对照。用 ECLplus 试剂盒进行显色。

1.9 敏感性测定

间接 ELISA 方法对 4 种细菌的 6 种毒素 Hbl_A、Hc、VT₁、SE_A、VT₂、SE_B 进行敏感性检测试验, Hbl_A、Hc、SE_A、SE_B 毒素浓度从 4 000 ng/ml 倍比稀释至 31.25 ng/ml, 对应一抗血清稀释倍数为 400×; VT₁、VT₂ 毒素浓度从 250 ng/ml 倍比稀释至 1.88 ng/ml, 对应一抗血清稀释倍数分别为 12 800×和 25 600×; 二抗辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗豚鼠 IgG 4 000×稀释。同时进行阴性对照试验, 阴性血清稀释倍数为 400×。

2 结果

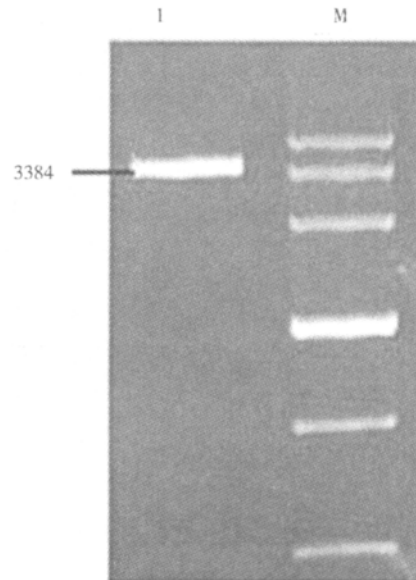
2.1 融合毒素基因片段的鉴定及序列分析结果

克隆的 4 种细菌 6 个毒素基因片段的大小与已报道的基因序列大小相符合: Hbl_A 1 302 bp, SE_A 702 bp, SE_B 717 bp, VT₁ 为 1 150 bp, VT_{2B} 为 210 bp, BoNTaHc 1 332 bp。用

DNAstar 软件分析, SE_A、SE_B、VT_{2B} 以及 BoNTaHc 的测序结果与文献报道的基因序列一致性达到 100%; VT₁ 测序结果与文献报道基因序列一致性达 99%, 但与 VT_{1B} (目的基因片段) 100% 同源

2.2 融合毒素 F6 基因串联扩增结果

采用重叠延伸 PCR 方法, 通过 Linker 将目的基因片段进行串联 (Hbl_A-VT_{1B}-SE_A-VT_{2B}-BoNTaHc-SE_B), 逐步扩增出融合毒素目的基因全长序列 3 384 bp。串联基因 PCR 产物电泳结果见图 2。

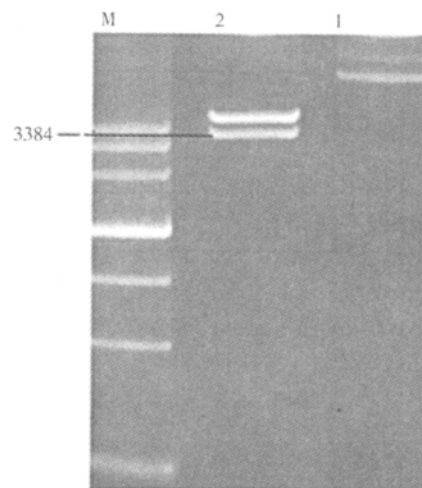


[注] 1: 融合毒素基因 F6 的 PCR 产物; M: DNAMarker III (4 500、3 000、2 000、1 200、800、500、200 bp)

图 2 重叠延伸 PCR 产物电泳结果

2.3 重组表达质粒 pET-22b(+)-F6 的鉴定结果

插入融合毒素基因的重组质粒 pET-22b(+)-F6 用 NdeI 和 XhoI 进行双酶切鉴定, 结果见图 3, 重组质粒中插入的目的 DNA 序列与构建的融合毒素基因序列相比较一致性达到 100%。

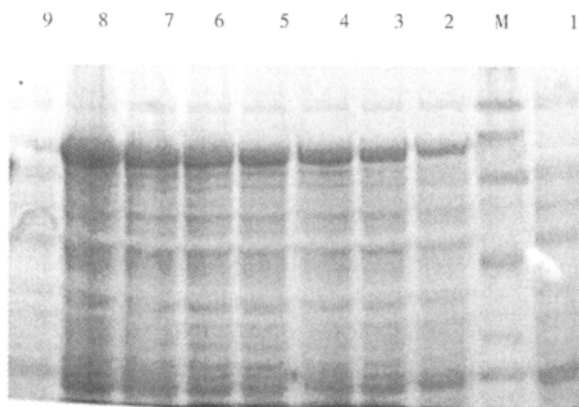


[注] 1.重组质粒 pET-22b(+)-F6; 2. 重组质粒 pET-22b(+)-F6 的酶切产物; M..DNAMarker III (4 500、3 000、2 000、1 200、800、500、200 bp)

图 3 pET-22b(+)-F6 重组质粒 Nde I 和 Xho I 双酶切鉴定

2.4 工程菌的诱导表达及产物的制备

SDS-PAGE 电泳结果显示, 37°C IPTG 诱导表达重组质粒 pET-22b (+)-F6 有明显的表达带, 其大小与理论预测分子量 127 205 相符, 且 1 mmol/L IPTG 诱导 7 h 表达量最高 (见图



[注] M. 标准蛋白 (200 000, 130 000, 97 400, 66 200, 43 000); 1. 未诱导 pET-22b (+)-F6 载体; 2-8. pET-22b (+)-F6 载体分别诱导 1-7 h; 9. 诱导 pET-22b (+) 空载体; 5-9. 重组质粒 pET-22b (+)-F3 (DE3) 分别诱导 1-5 h

图 4 重组质粒 pET-22b-F6(DE3)梯度诱导表达产物的 SDS-PAGE 电泳图

将 37°C 诱导表达的菌体超声破碎后提取包涵体, 纯化浓缩后, 进行 SDS-PAGE 电泳, 出现 1 条特异的蛋白带, 蛋白分子大小与预计 (127 205) 相符。将 25°C 诱导表达的菌体超声破碎后取可溶性表达蛋白 (上清), 经浓缩后进行 SDS-PAGE 电泳, 切下目的蛋白带电洗脱法洗脱, 纯化浓缩后, 进行 SDS-PAGE 电泳, 出现 1 条特异的蛋白带, 蛋白分子大小与预计 (127 205) 相符。

2.5 间接 ELISA 方法和琼脂扩散法检测血清效价结果

间接 ELISA 方法测定得知, 抗原 (可溶性目的蛋白) 浓度在 2 mg/L 时, 对应抗体最佳稀释倍数为 6 400× (倍)。琼脂扩散试验显示, 直至将抗血清稀释至 16 倍还可出现比较明显的特异性反应沉淀线。

2.6 间接 ELISA 方法特异性检测

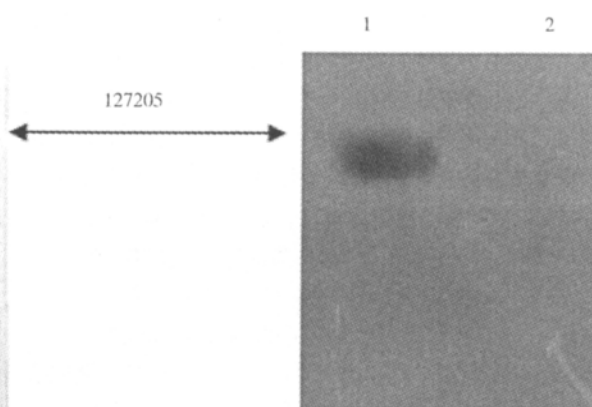
从表中数据可知, 制备的血清抗体 (3 200×稀释) 与融合毒素中对型毒素呈明显阳性反应 (P/N > 2.0), 对于 4 种细菌的其他型毒素也可见较明显阳性反应。与其他 26 种非目标菌不反应, 证明重组毒素具有良好的特异性。见表 1、表 2。

表 1 血清抗体对目标菌不同型特异性 ELISA 测定结果

菌或毒素	OD490nm	阴性对照	菌或毒素	OD490nm	阴性对照
Hbl _A	2.321	0.184	SE _A	2.145	0.607
O157	1.005	0.112	SE _B	2.978	0.431
VT ₁	2.402	0.642	A	0.675	0.329
VT ₂	2.146	0.585	E	0.804	0.324
Hc	2.917	0.514	C1	0.698	0.371
C. bA	1.058	0.313	C2	0.698	0.329
C. bB	1.008	0.369	B	0.674	0.591
C. bC	1.088	0.324	F6	2.412	0.625

[注] A、B、E、C1、C2 为产相应毒素型的金黄色葡萄球菌, C. bA、C. bB、C. bC 为产相应毒素型的肉毒梭菌

4)。薄层扫描结果显示表达的外源蛋白量占全菌体蛋白总量的 10.2%, 表达蛋白主要以包涵体形式存在; 用 1 mmol/L IPTG 25°C 过夜诱导表达, pET-22b(+)-F6 主要表达可溶性蛋白, 可溶性表达蛋白大部分定位在细胞质, 少部分分泌到细胞周间质。



[注] 1. 诱导 pET-22b (+)-F6; 2. 未诱导 pET-22b (+)-F6
图 5 多克隆血清抗体 Western 印迹分析

表 2 抗体特异性 ELISA 检测结果 (D₄₉₀)

非目的菌	阳性对照	非目的菌	阴性对照	非目的菌	阳性对照
0.393	0.309	0.478	0.288	0.548	0.278
0.917	0.303	0.810	0.301	1.681	0.278
0.362	0.287	0.340	0.272	0.447	0.281
0.414	0.302	0.472	0.281	0.459	0.277
0.467	0.297	0.269	0.291	0.536	0.260
0.509	0.270	0.301	0.287	0.355	0.264
0.271	0.279	0.342	0.262	0.288	0.282
0.578	0.308	0.489	0.317	0.510	0.308
0.472	0.298	0.529	0.292	0.395	0.302
0.350	0.283	0.365	0.282	0.516	0.297

[注] 特异性检测所用 26 种非目的细菌按从左至右顺序如下: 金葡菌 C、绿脓杆菌 1、绿脓杆菌 2、单核细胞增多性李氏杆菌 (1/2a)、单核细胞增多性李氏杆菌 (4a)、单核细胞增多性李氏杆菌 (4ab)、单核细胞增多性李氏杆菌 (1/2b)、单核细胞增多性李氏杆菌 (4c)、单核细胞增多性李氏杆菌 (4d)、52207 (耶氏菌)、Wf-26 (耶氏菌)、Ye-26 (耶氏菌)、P1 (耶氏菌)、鼠疫耶氏菌、亚利桑纳沙门氏菌、纽波特沙门氏菌、猪霍乱沙门氏菌、甲伤寒沙门氏菌、丙型伤寒沙门氏菌、肠炎沙门氏菌、阿伯丁沙门氏菌、伦敦沙门氏菌、鸡白痢沙门氏菌、弱毒炭疽、炭疽二苗、枯草杆菌。阴性对照以未免疫兔子血清做对照

2.7 敏感性测定结果

间接 ELISA 方法敏感性测定结果数据可知, 抗体对 5 种毒素的敏感性不同, 敏感度分别为 Hbl_A 78.3 ng/ml, Hc 31.25 ng/ml, VT₁ 3.75 ng/ml, SE_A 125.00 ng/ml, VT₂ 7.50 ng/ml, SE_B 62.50 ng/ml。

3 讨论

将 Linker 的编码序列分别设计在待扩增的引物中,并使这两个基因的引物中含有 9 或 15 个碱基以上的互补序列,将待融合的两个扩增产物做模板混合,通过所设计的两个扩增产物两端的引物进行 PCR,经变性、复性及 DNA 催化的延伸反应后,即可得到足够的基因产物,这个方法简便易行,而且在 Linker 两端不必因设计内切酶位点而引入不必要的氨基酸残基。目前,在寄生虫抗原、重组毒素等都有 Linker 成功连接的例子。Linker 必须使蛋白质能自由折叠,使抗原结合位点处于适当的构型,并不引起分子动力学变化。同时,Linker 应尽量减少蛋白酶攻击及防止两端蛋白序列的聚集,一般认为 Linker 的长度在 5~25 个氨基酸残基为适^[12],较长的 Linker 对蛋白的折叠及稳定性有益,但容易受到蛋白酶的攻击。在本实验中我们采用编码 5 个氨基酸的 linker (G-G-G-G-S) 成功构建了 F6 重组毒素。Linker 的氨基酸组成应使其具备亲水性,宜于折叠,不宜有过多侧链,以减少抗原性。在许多重组基因中其 Linker 多由甘氨酸和丝氨酸组成的活动度较好蛋白质接头序列,尽可能使得串联的基因折叠维持其天然三维结构,以适合与各自的受体结合点相互作用。

由于本实验采用了 5 个完全相同的 Linker,这在一定程度上降低了 PCR 的特异性,因此在最初的实验中,PCR 产物有几条非特异带,这可能是因为,尽管 Taq DNA 聚合酶的最佳延伸温度是 72℃,聚合酶在室温仍然有活性。因此,在进行 PCR 反应配制过程中,以及在热循环刚开始,保温温度低于退火温度时会产生非特异性的产物。这些非特异性产物一旦形成,就会被有效扩增。因此我们采用热启动 PCR 结合降落 PCR 来消除非特异性产物的扩增。热启动通过抑制一种基本成分延迟 DNA 合成,直到 PCR 仪达到变性温度。降落 PCR 通过在 PCR 的前几个循环使用严紧的退火条件提高特异性。循环在比估算的 T_m 高约 5℃ 的退火温度下开始,然后每个循环降低 1℃ 到 2℃,直到退火温度低于 T_m 5℃。只有同源性最高的目的模板会被扩增。这些产物在随后的循环中继续扩增,并将扩增的非特异性产物排挤出去。最终我们成功的减少非特异性产物的生成,提高了特异性扩增^[13]。

经 ELISA 检测制备的血清抗体能够与 4 种细菌的 6 种毒素及 4 种细菌所产的其他型毒素发生免疫学反应,而不与 26 种非目标菌和毒素发生反应,而且对 6 种毒素检测的敏感度达到纳克水平,证明融合毒素 F6 产生的多抗具有良好的特异性。说明在同样的条件下进行多基因串联至少可达 3 000 bp 能在原核载体表达,至少包含 5 个 Linker 而不影响串联基因的抗原结构特性和串联蛋白的抗原特性,所选择的 6 种毒素具有一定的代表性,所获抗体与有关或相近抗原起反应,而与无关的抗原不反应;在一定范围内有交叉,而与无关抗原没有交叉,这样就获得了真正意义上的广谱抗体。此外选取的基因片段不仅具有良好的免疫原性,而且在操作上十分安全。

一般认为,作为免疫制剂,只要抗原表位不发生改变,不会对其免疫原性发生影响^[14]。融合毒素产生的多抗效价不很理想且差异较大,这可能与融合毒素抗原的制备方法、不同毒素抗原原有的抗原性、基因的大小及连接顺序、表达产物的空间结构、免疫方案、动物个体差异和环境因素以及试验用 6 种毒

素的纯度等因素有关,这有待于今后的实验中进一步探讨。

虽然随着科学技术的进步,食源性致病菌快速检测方法已经得到长足发展,但是在卫生检验方面目前尚存在有时定性与精确定量难以兼顾状况。现在很多国家把一些致病菌定为不得检出,这使得有些时候对致病菌的定性检测比精确定量检测尤为重要。本实验利用基因工程的方法构建六联融合毒素,这不仅避免了单独制备 6 种天然毒素的繁琐并且较为经济,在此基础上获得能与 4 种细菌 6 种毒素发生特异性反应的多克隆血清抗体,这就为探索多基因串联表达的影响因素以及下一步建立食品广谱、快速、特异的免疫学检测新方法奠定了基础,进一步深入研究正在进行中。

参考文献:

- [1] Xu Jian-G, Quan Tais-S, Xiao Dong -L, et al. Isolation and Characterization of Escherichia coli. O157: H7 strains in China[J]. *Curr Microbiol*, 1990, 20 (3): 299-303.
- [2] 李海波. Vero 毒素及其检测 [J]. *国外医学临床生物化学与检验学分册*, 2001, 20 (4): 202-203.
- [3] Mahmood R, Khan SA. Role of upstream sequences in the expression of the staphylococcal enterotoxin B gene [J]. *Biol Chem*, 1990, 265 (8): 4652-4656.
- [4] Helgason E, Caugant DA, Olsen I, et al. Genetic structure of population of *Bacillus cereus* and *B. thuringiensis* isolates associated with periodontitis and other human infections [J]. *Clin Microbiol*, 2000, 38 (4): 1615-16221.
- [5] Thompson DE, Brehm JK, Oultram JD, et al. The complete amino acid sequence of the *Clostridium botulinum* type A neurotoxin, deduced by nucleotide sequence analysis of the encoding gene [J]. *Eur J Biochem*, 1990, 189: 73-81.
- [6] 李增山, 隋延仿, 姜永强. 人 CD80-Linker-SE_A 重组毒素设计及生物学特性预测 [J]. *中国免疫学杂志*, 2001, 17: 10-12.
- [7] 萨姆布鲁克, D.W.拉塞尔. 分子克隆实验指南 [M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 2002. 68-71.
- [8] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术 [M]. 北京: 科学技术出版社, 1993.
- [9] Pai L H, Pasan I. Clinical trials with *Pseudomonas* exotoxin immunotoxins [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1998, 243: 83-96.
- [10] 朱平, 冯书章. 抗体制备技术 [M]. 长春: 长春出版社, 1994. 102-115.
- [11] 王世若, 王兴龙, 韩文瑜. 现代动物免疫学 [M]. 长春: 吉林科学出版社, 2001. 183-19582.
- [12] Tang Y, Jiang N, Parakh C, et al. Selection of linkers for a catalytic single chain antibody using phage display technology [J]. *Biol Chem*, 1996, 271 (26): 15682-15686.
- [13] Nuovo GJ, Gorgove G, Maconell P, et al. In situ localization of human and viral cDNAs after PCR amplification [J]. *PCR Methods Appl*, 1992 (2): 123.
- [14] RM 康普. 蛋白质结构分析、制备、鉴定与微量测定 [M]. 北京: 科学出版社, 2000. 3-7.

(收稿日期: 2008-04-15)