

文章编号:1673-1689(2009)01-0127-04

蓖麻毒素 B 链的克隆表达与鉴定

邢丽杰^{1,2}, 罗小玲³, 马青原², 刘文森^{*2}

(1. 石河子大学 食品学院, 新疆 石河子 832000; 2. 军事医学科学院十一所, 吉林 长春 130062;
3. 新疆农垦科学院, 新疆 石河子 832000)

摘要:采用 PCR 法扩增出蓖麻毒素 B 链基因, 并将其与 PMD18-T 克隆载体相连接, 经序列分析正确后插入到表达载体 PET-28a 中, 构建重组表达质粒 pET-28a-RTB, 将构建好的重组质粒转化入 BL21 感受态中, 经 IPTG 于 37℃ 诱导表达后, 得到的融合表达的目的蛋白质经 SDS-PAGE 分析, 相对分子质量约为 31 000, 利用 Western 与间接 ELISA 鉴定证明, 其具有抗原性, 为制备 RTB 单克隆抗体及提高检测方法的敏感性打下基础。

关键词:蓖麻毒素 B 链; 融合表达; 抗原性

中图分类号:Q 756

文献标识码:A

Cloning and Expression of Ricin B Chain in *Escherichia coli*

XING Li-jie^{1,2}, LUO Xiao-ling³, MA Qing-yuan², Liu Wen-sen^{*2}

(1. School of Food Science, Shihezi University, Shihezi 832000, China; 2. Academy of Military Medical Sciences, Changchun 130062, China; 3. XinJiang Academy of Agricultural and Reclamation Science, Shihezi 832000, China)

Abstract: In this study, the DNA of RTB was cloned from the ricin DNA by PCR and inserted into the carrier pMD18-T. The fusion expression vector RTB-pET28 was constructed and transformed to *E. coli* BL21 after sequenced. The expressed fusion protein after induction with IPTG at 37℃. SDS-PAGE and Western blotting analysis showed that the 31 000 fusion protein was successful expressed in *E. coli*, and the bioactivity was detected by indirect ELISA. The results presented here provided a reliable basis for the specificity of ELISA detect ricin.

Key words: ricin B chain, fusion expression, antigenicity

蓖麻(*Ricinus communis*) 属大戟科植物, 蓖麻籽去油后的饼粕含有质量分数 2%~3% 的蓖麻毒素(ricin toxin, RT), 具有很强的抑制蛋白质合成的功能和细胞毒性^[1], 相对分子质量约为 65 000, 由两条多肽链 A 链、B 链通过二硫键连结。A 链为毒性链, 是一种糖苷酶, B 链有凝集素的活性, B 链(ri-

cin B chain, RTB) 上含有两个半乳糖结合位点, 能与细胞上含半乳糖的糖蛋白或糖脂结合^[2]。RTB 基因与病毒基因连接后进行融合表达, 得到的融合蛋白质即具有病毒的抗原性, RTB 蛋白又能与细胞上含半乳糖的糖蛋白或糖脂结合, 经口服免疫后可得到非常良好的免疫效果, 是蛋白质表达抗原非

收稿日期: 2007-11-01

作者简介: 邢丽杰(1983-), 女, 新疆石河子人, 工学硕士, 研究方向为食品安全与检测。

* 通讯作者: 刘文森(1967-), 男, 山东寿光人, 农学硕士, 副研究员, 主要从事预防兽医学方面的研究。

Email: Liuws85952@163.com

常良好的载体^[3]。蓖麻毒素毒性很强,对各种哺乳动物都有毒。兔(肌肉注射)半致死剂量 LD_{50} 为 $4.1 \mu\text{g/kg}$,小鼠 LD_{50} 为 $0.53 \mu\text{g}$,人经口致死量为 $0.15 \sim 0.2 \text{ g}$,静脉致死量为 20 mg ^[4-6]。其毒性是有机磷神经毒剂 VX 的 385 倍,是氰化物的 6 000 倍。目前还没有对人适用的有效解毒药或疫苗,临床上主要根据不同的症状采取对症治疗^[7]。因此,建立对 Ricin 快速有效的检测鉴定方法,对于中毒的提早防治具有重要意义。

RT 的检测方法国内外已有相应的研究报道,如美国已经建立了多种快速检测方法及车载、手持式毒素快速检测仪等,我国台湾地区也建立了 RT 快速检测方法^[8]。大多数检测方法使用的是抗全毒的抗体。但蓖麻毒素是由 A 链和 B 链通过二硫键连结的,如果使用抗 B 链的抗体作为捕获抗体包被酶标板,检测蓖麻毒素时可以使 A 链充分暴露,再以抗 A 链的单抗为检测抗体,有可能大大提高检测的灵敏度。据此,作者对 RTB 基因进行了克隆、表达及鉴定,旨在用其作为免疫抗原,为制备特异性抗体、建立高敏感性的检测方法奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒 *E. coli* DH 5- α 感受态细胞 (Competent Cell), BL21 感受态细胞, pET-28a, 为作者所在实验室保存; PMD 18-T, 购自 TaKaLa 公司。

1.1.2 酶和化学试剂 EX TaqTM DNA 聚合酶, 限制性内切酶 Sac I、Nde I, DNA Marker 2000 + 15000 等, 均购自 NEB 公司; 蛋白质 Marker, 购自 MBI 公司; RTB 多抗, 购自 Vector 公司。

1.1.3 培养基 LB 培养基用于大肠杆菌及转化学子培养。固体 LB 培养基添加 1.5 g/L 的琼脂, 固体和液体 LB 培养基在使用时按需要加入抗生素。

1.1.4 引物的设计与合成 利用 DNAMAN 软件, 由上海生工公司合成引物。

上游引物: CAT ATg gCT gAT gTT TgT ATg gAT CCT

下游引物: gAg CTC TCA AAA TAA Tgg TAA CCA TAT T

预计可扩增包括 801 bp 目的 DNA 片段。蓖麻毒素 B 链基因参考序列来自 GeneBank。

1.2 方法

1.2.1 蓖麻基因组 DNA 的提取 蓖麻种子 DNA 的提取按基因组提取试剂盒方法进行。

1.2.2 蓖麻毒蛋白基因的 PCR 扩增 蓖麻毒素基

因的 PCR 扩增反应体系为 $50 \mu\text{L}$, 其中基因组 DNA $2 \mu\text{L}$, $10 \times \text{EX Taq Buffer}$ $5 \mu\text{L}$, dNTP $4 \mu\text{L}$, 引物各 $2 \mu\text{L}$, EX Taq 酶 $0.5 \mu\text{L}$, 加灭菌蒸馏水至 $50 \mu\text{L}$, 在 DNA 扩增仪上进行 PCR 扩增, 95°C 预变性 5 min , 之后进行 30 个循环 (94°C 30 s , 60°C 30 s , 72°C 30 s), 72°C 延伸 10 min 。

1.2.3 PCR 产物的鉴定 按 TaKaLa 公司的 PMD 18-T 载体和 *E. coli* DH5 α 感受态细胞进行目的 DNA 片段的连接与转化, 划线接种培养于含 Amp 的 LB 琼脂平板后, 挑选白色菌落并接种于含 Amp ($50 \mu\text{g/mL}$) 的 LB 液体培养基中培养, 37°C 过夜收集菌体, 按质粒提取试剂盒说明书提取质粒, 进行 PCR 扩增和限制性内切酶 Sac I 和 Nde I 双酶切鉴定。

1.2.4 质粒的测序和序列分析 鉴定正确的质粒序列测定由上海生工公司完成。利用 NCBI 网站上的 BLAST 进行序列比较和同源性分析。

1.2.5 重组质粒的构建和鉴定 将测序正确的 RTB 基因与 pET-28a 载体相连接, 构建重组质粒 pET-28a-RTB。用 Sac I 和 Nde I 分别双酶切测序正确的含 RTB 的质粒和 pET-28a 载体, 按《分子克隆实验指南》方法, 在 T4 DNA 连接酶作用下于 16°C 过夜连接, 连接产物转化至 BL21 感受态细胞中, 阳性菌落经 PCR, Sac I 和 Nde I 双酶切鉴定。

1.2.6 BL21/pET-28a-RTB 表达工程菌的建立与表达 取重组质粒测序正确的菌对含 Kan ($50 \mu\text{g/mL}$) 抗性的 LB 平板划线, 从新鲜的划线平板中挑取单克隆, 接入 5 mL 含有适当抗生素的 LB 培养基中, 37°C 振荡培养至 OD 值达到 $0.6 \sim 1.0$ 。 4°C 保存过夜, 次日离心收集细胞。将细胞重悬于 5 mL 含适当抗生素的新鲜培养基中, 按比例接种入 50 mL 培养基, 37°C 摇床培养至 OD 到 $0.4 \sim 1$ 。加入 100 mmol/L IPTG 贮液, 继续培养 $2 \sim 3 \text{ h}$ 。同时用相同方法对空载体做空白诱导对照。诱导表达完后将摇瓶置于冰上 5 min , $5\,000 \text{ g}$ 4°C 离心 5 min 收集菌体。重悬细胞于预冷的 0.01 mol/L PBS 中, 超声波破碎, 离心取上清液。将上清液与 SDS-PAGE 的上样缓冲液混合后煮沸 5 min , 进行 SDS-PAGE 分析。

1.2.7 RTB 的 western blot 与间接 ELISA 鉴定

将表达处理后的菌体收集, 用超声波破碎, 离心取上清液进行 12 g/dL SDS-PAGE 电泳, 湿转至 $0.45 \mu\text{m}$ 的 PVDF 膜上, 用抗天然 RT 的小鼠多克隆抗体为一抗 ($1:5\,000$ 稀释), HRP 标记的羊抗小鼠 IgG 为二抗 ($1:1\,000$ 稀释), DAB 显色, 进行

western 印迹的检测。ELISA 是将破碎的上清液按 1 : 10, 1 : 40, 1 : 80, 1 : 160, 1 : 320, 1 : 640 稀释后包被酶标板, 并以未插入任何基因片段的空载体诱导表达菌的超声裂解液做为阴性对照, 以 1 g/dL 的 BSA 封闭, 用抗天然 RT 的小鼠多克隆抗体为一抗, HRP 标记的羊抗小鼠 IgG 为二抗, 进行间接 ELISA 检测。

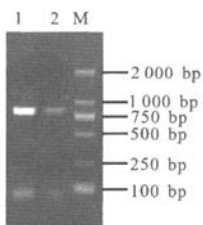
2 实验结果

2.1 蓖麻基因组 DNA 的提取

将提取的蓖麻籽基因组经 1.0 g/dL 琼脂糖凝胶电泳分析, 结果显示, 出现基因组 DNA 条带, 与预期的蓖麻基因组基因大小相一致。

2.2 RTB 基因的 PCR 扩增与序列分析

以提取的蓖麻籽基因组为模板, 采用引物 P1, P2 扩增出约 800 bp 的 DNA 片断, 与预期大小相符, 见图 1。



M. DL2000DNA marker; 1, 2. PCR 产物

图 1 PCR 电泳图

Fig. 1 Electrophoresis of RTB gene fragment amplified by PCR

以 PMD18-T-RTB 基因为模板, P1、P2 为引物, 经 PCR 扩增出约 800 bp 的 DNA 片断, 与目的片断大小一致。将 PMD18-T-RTB 基因进行 SacI 和 NdeI 双酶切后, 出现相对分子质量分别与目的片断和载体片断相同大小的 2 个 DNA 片断, 见图 2。目的片断经过序列分析, 结果显示 RTB 基因与来自 Gene Bank 的蓖麻毒素 B 链基因参考序列完全一致。

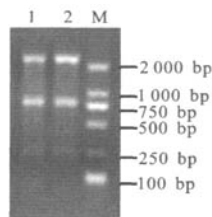
2.3 重组表达质粒 pET-28a-RTB 的构建和鉴定

将表达载体 pET-28a 与扩增出的 RTB 基因相连接后得到重组表达载体 pET-28a-RTB, 对其进行 ScaI 和 NdeI 双酶切鉴定与 PCR 鉴定, 都得到了预期大小的 DNA 片断, 证明 RTB 基因已经成功地插入了 pET-28a 表达质粒, 见图 3。

2.4 RTB 蛋白的诱导表达

将宿主菌 BL21 经 IPTG 诱导表达后, 与未经 IPTG 诱导的宿主菌相比, 在相对分子质量为 31 000 左右出现 6 × His-RTB 融合蛋白质特异性

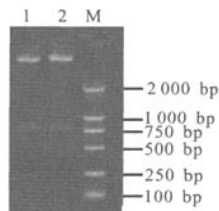
带, 与预计的重组蛋白质的大小相等, 见图 4。



M. DL2000 DNA marker; 1, 2. SacI/NdeI digested pMD18-T-RTB plasmid

图 2 pMD18-T-RTB 重组质粒的双酶切图

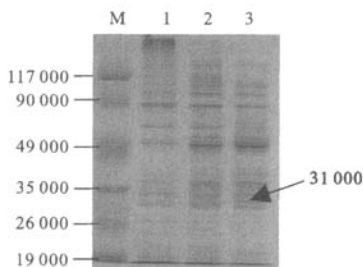
Fig. 2 Identification of recombinant cloning plasmid pMD18-T-RTB



M. DL2000 DNA marker; 1, 2. SacI/NdeI digested pET-28a-RTB plasmid

图 3 pET-28a-RTB 重组质粒双酶切电泳图

Fig. 3 Identification of recombinant cloning plasmid pET-28a-RTB

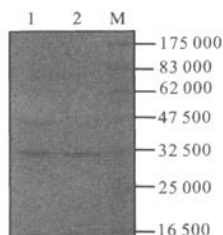


M. marker; 1. negative control; 2, 3. positive supernatant

图 4 超声裂解菌体上清液的 SDS-PAGE 分析图 Fig. 4 SDS-PAGE Analysis of expression product of recombinant strain BL21/pET-28-a-RTB

2.5 Western 与间接 ELISA 鉴定

重组蛋白质经 Western blot 分析表明, 表达出的融合蛋白质能够被 RTB 多抗特异性识别, 见图 5。间接 ELISA 显示, 1 : 10、1 : 40、1 : 80 为强阳性, 1 : 160、1 : 320 为阳性, 1 : 640 为弱阳性, 可知诱导表达出的 RTB 蛋白质可以被天然 RT 的小鼠多抗特异性识别, 说明 RTB 已经在建立的基因工程菌中获得正确的表达, 并且具备良好的抗原性。



M. Marker; 1. 阴性对照; 2,3. 阳性上清液

图5 Western 鉴定分析

Fig. 5 Identification of RTB by Western

3 讨论

蓖麻毒素(RT)是最具有威胁性的生物毒素之一。RTB作为蓖麻毒素的结合链,依靠其链上的半乳糖结合位点与细胞表面的半乳糖残基受体结合,

使蓖麻毒素以内吞方式进入细胞,并对细胞产生毒性作用,导致细胞死亡。

作为蓖麻毒素的凝集链,RTB在蓖麻毒素进入细胞的过程中起着举足轻重的作用,而国内外对于免疫毒素的蓖麻毒素A链研究较多,也较透彻,对B链的研究与了解相对有限。

作者从蓖麻毒素的基因组中扩增出RTB,并将其和T载体连接,通过双酶切方便地获得了RTB的基因,用于RTB的基因改造或分子学方面的研究。作者将其与PET-28a载体相连接,获得重组质粒,并正确表达出了带有6×His标签的融合蛋白质。RTB融合蛋白质带有6×His,非常易于纯化,并可用于大量生产,蛋白质经Western印迹与间接ELISA检测,证明具有良好的抗原性,这为免疫动物以获得多抗或者单抗打下了良好的基础。

参考文献(References):

- [1] Byung Ho Woo, Jung Tae Lee, Kang Choon Lee. Purification of sepharose-unbinding ricin from castor beans (*Ricinus communis*) by hydroxyapatite chromatography[J]. *Protein Expression and Purification*, 1998, 13:150-154.
- [2] Chris Winder. Toxicity of ricin[J]. *Journal of Toxicology*, 2004, 23(1):97-103.
- [3] Choa Nak-Won, Mary K. Mucosal immunization with a ricin toxin B subunit rotavirus NSP4 fusion protein stimulates a Th1 lymphocyte response[J]. *Journal of Biotechnology*, 2006, 121:272-283.
- [4] 赵青余,桂荣,那日苏. 蓖麻饼脱毒的研究进展[J]. *饲料工业*, 2002,23(11):35-39.
ZHAO Qing-yu, GUI Rong, NA Ri-su. Study progress on detoxicated castor bean meal[J]. *Feed Industry*, 2002,23(11):35-39. (in Chinese)
- [5] 贺永怀,陈兴. 一种快速简便的提取和纯化蓖麻毒素的方法[J]. *生物化学与生物物理进展*, 1987(6):64-66.
HE Yong-huai, CHEN Xing. A new purification method for ricin toxin[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 1987(6):64-66. (in Chinese)
- [6] 郑成,雷德柱,雷雨. 蓖麻毒蛋白提取[J]. *广东化工*, 2003,5:1-4.
ZHENG Cheng, LEI De-zhu, LEI Yu. Purification of ricin from castor beans (*Ricinus communis*) [J]. *Guang Dong Chem*, 2003,5:1-4. (in Chinese)
- [7] 阮冰,白雪玲. 生物恐怖[J]. *临床内科杂志*, 2005, 22(8):505-507.
RUAN Bing, BAI Xue-ling. Bioterrorism[J]. *J Clin Intern Med*, 2005, 22(8):505-507. (in Chinese)
- [8] Shyu R H, Shyu H F, Liu F W, et al. Colloidal gold-based immuno-chromatographic assay for detection of ricin[J]. *Toxicicon*, 2002, 40(3):255-258.
- [9] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂 译. 北京: 科学出版社, 1992.
- [10] Hussain K, Bowler C, Roberts L M, et al. Expression of ricin B chain in *Escherichia coli* [J]. *FEBS Lett*, 1989, 244(2):383-387. (in Chinese)
- [11] Wang L C, Kang L, Hu T M, et al. Abrine A chain expressed as soluble form in *Escherichia coli* from a PCR synthesized gene is catalytically and functionally active[J]. *Biochimie*, 2004, 86(4-5):327-333.
- [12] 张晓梅,唐雪明. 编码 1,3-丙二醇氧化还原酶同工酶基因 yqhD 的克隆与高效表达[J]. *食品与生物技术学报*, 2006,25(4):78-80.
ZHANG Xiao-mei, TANG Xue-ming. Cloning and over expression of gene yqhD encoding 1,3-propenediol oxidoreductase isoenzyme in *Escherichia coli* [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2006,25(4):78-80. (in Chinese)
- [13] 韩晋辉,施用晖. 多重 PCR 合成天蚕素基因及其在 *E. coli* 中的克隆[J]. *食品与生物技术学报*, 2006,25(4):109-112.
HAN Jin-hui, SHI Yong-hui. Synthesis and clone of cecropins' gene in *E. coli* [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2006,25(4):109-112. (in Chinese)

(责任编辑:李春丽)