

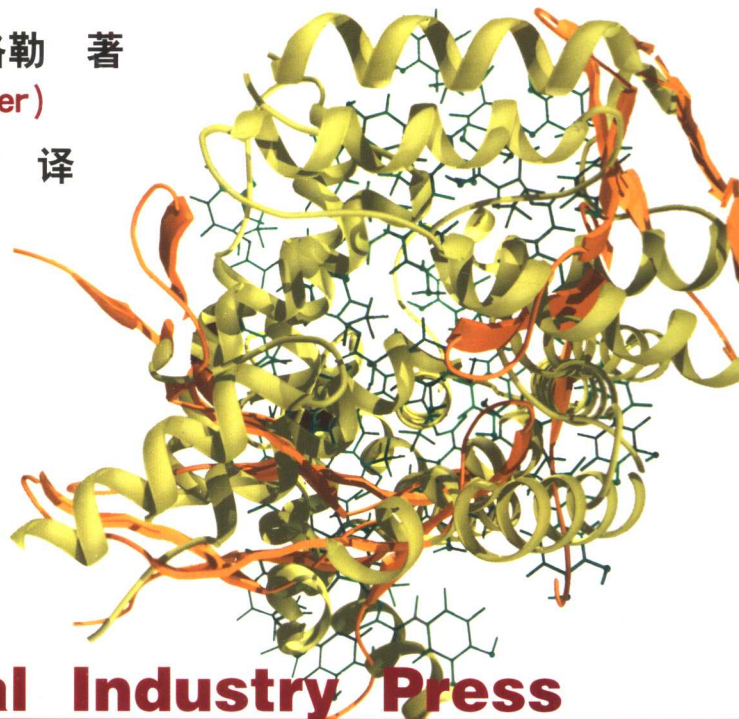
生物实验室系列

分子生物学与蛋白质化学 实验方法

**Methods in Molecular Biology and
Protein Chemistry**

[美] 布伦达 D.斯潘格勒 著
(Brenda D. Spangler)

茹炳根 韩铁钢 茹强 译



Chemical Industry Press



化学工业出版社
现代生物技术与医药科技出版中心

生物实验室系列

分子生物学与蛋白质化学 实验方法

[美] 布伦达 D. 斯潘格勒 著

茹炳根 韩铁钢 茹强 译

茹炳根
陈一友 校



化学工业出版社

现代生物技术与医药科技出版中心

· 北 京 ·

图书在版编目 (CIP) 数据

分子生物学与蛋白质化学实验方法/[美] 斯潘格勒 (Spangler, B. D.) 著; 茹炳根等译. —北京: 化学工业出版社, 2005. 12

书名原文: Methods in Molecular Biology and Protein Chemistry: Cloning and Characterization of an Enterotoxin Subunit

ISBN 7-5025-8092-1

生物实验室系列

I. 分… II. ①斯…②茹… III. ①分子生物学-化学实验②蛋白质-化学实验 IV. ①Q7-33②Q51-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2005) 第 154906 号

Methods in Molecular Biology and Protein Chemistry:

Cloning and Characterization of an Enterotoxin Subunit/by Brenda D. Spangler

ISBN 0-470-84360-8

Copyright © 2002 by John Wiley & Sons, Ltd. All rights reserved.

Authorized translation from the English language edition published by John Wiley & Sons, Ltd.

本书中文简体字版由 John Wiley & Sons, Ltd. 授权化学工业出版社独家出版发行。

未经许可, 不得以任何方式复制或抄袭本书的任何部分。

北京市版权局著作权合同登记号: 01-2003-8469

生物实验室系列

分子生物学与蛋白质化学实验方法

[美] 布伦达 D. 斯潘格勒 著

茹炳根 韩铁钢 茹 强 译

茹炳根 陈一友 校

责任编辑: 郎红旗 周 旭 李 丽

责任校对: 周梦华

封面设计: 胡艳玮

*

化 学 工 业 出 版 社 出版发行
现代生物技术与医药科技出版中心

(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)

购书咨询: (010)64982530

(010)64918013

购书传真: (010)64982630

<http://www.cip.com.cn>

*

新华书店北京发行所经销

大厂聚鑫印刷有限责任公司印刷

三河市延风装订厂装订

开本 720mm×1000mm 1/16 印张 12 字数 204 千字

2006 年 3 月第 1 版 2006 年 3 月北京第 1 次印刷

ISBN 7-5025-8092-1

定 价: 25.00 元

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责退换

出版者的话

21 世纪是生命科学的世纪，这已成为人们的共识。

生命科学随着人类对自身和自然的认识、探索而萌芽，随着人类生产和科学实践的进步而发展。现代生命科学包括生物学、医学、农学等传统学科领域，以及生物学、生物技术与环境科学乃至社会科学等其他学科相互渗透、交叉而产生的新型学科体系。20 世纪后叶现代生物科学尤其是分子生物学取得了一系列突破性成就，使得生命科学在自然科学体系中的位置发生了革命性的变化，成为 21 世纪的带头学科。人们对生命科学也寄予了无限的期望，希望能够解决人类社会所面临的人口膨胀、资源匮乏、疾病危害、环境污染和生态破坏等一系列重大问题。

回顾生命科学的发展历程，实验技术一直起着非常重要的促进作用。如 17 世纪 Leeuwenhoek 等人发明并应用显微镜技术，直接催生了“细胞学说”的建立和发展；1973 年 Cohn 和 Boyer 完成了 DNA 体外重组实验，标志着基因工程的肇始；1988 年 Kary Mullis 发明的 PCR 技术甚至使生命科学产生了飞跃性的发展。可以说，生命科学无时无刻离不开实验，实验是开启神奇的生命王国大门的钥匙。没有实验技术的不断进步，也就没有生命科学今天的巨大发展；同时，生命科学的发展又对实验技术提出了更高的要求，进一步刺激了后者的不断进步。生命科学正是在“实验催生和验证着基础理论，理论指导和发展的实验技术”的不断循环中从必然王国走向自由王国。

工欲善其事，必先利其器。为了有助于生命科学工作者更多地了解相关实验技术和仪器设备，更好地设计实验方案，更有效地开展实验过程，更合理地处理实验结果，化学工业出版社组织出版了“生物实验室系列图书”。系列图书在整体规划的基础上，本着“经典、前沿、实用，理论与技术并重”的原则组织编写，分批出版。

在题材上，系列图书涵盖综合实验技术和单项实验技术两个方面。其中综合实验技术既有以实验目的为题，如“蛋白质化学分析技术”，内容纵向覆盖多项实验技术；也有以某一生命学科领域的综合实验技术为题，如“发酵工程实验技术”、“生物化学实验技术”等。而单项实验技术则以深入介绍某一专项技术及其应用为主，在阐述其基本原理的基础上，横向介绍该项技术在多个领域的应用，如“双向电泳技术”、“流式细胞术”等。

在内容上，系列图书主要有以下两个显著特点。一是强调先进性——除了系统介绍常用和经典实验技术以外，特别突出了当前该领域实验手段的新理论、新技术、新发展，为国内专业人员起到借鉴和引导作用。二是强调可操作性——对于每一项实验技术，系统介绍其原理方法、设备仪器和实验过程，让读者明了实验的目的、方案设计以及具体步骤和结果处理，以期起到实验指南的作用。

本系列图书坚持质量为先，开拓国内和国际两个出版资源。一方面，约请国内相关领域兼具理论造诣和丰富实验室工作经验的专家学者编著；另一方面，时刻关注国际生命科学前沿领域和先进技术的进展，及时引进（翻译或影印）国外知名出版社的权威力作。

“生物实验室系列图书”的读者对象设定为国内从事生命科学及生物技术和相关领域（如医学、药学、农学）的专业研究人员，企业或公司的生产、研发、管理技术人员，以及高校相关专业的教师、研究生等。

我们殷切希望“生物实验室系列图书”的出版能够服务于我国生命科学的发展需要，同时热忱欢迎从事和关心生命科学的广大科技人员不仅对已出版图书提供宝贵意见和建议，也能对系列图书的后续题目设计贡献良策或推荐作者，以便我们能够集思广益，将这一系列图书沿着可持续发展的方向不断丰富品种，推陈出新。

谨向所有关心和热爱生命科学，为生命科学的发展孜孜以求的科学工作者致以崇高的敬意！

祝愿我国的科技事业如生命之树根深叶茂，欣欣向荣！

化学工业出版社
现代生物技术与医药科技出版中心

前 言

越来越多的学生希望选修这样一门课程——既能指导他们贯通现代分子生物学和分析生物化学，又能提供给他们独立规划和开展研究课题的相关工具和手段。为了实现这个目标，Montana 州立大学化学与生物化学系在过去五年里已开设了一门为时半学年的实验/讲座课程。在这一课程里，学生要完成一个研究课题，并给出一个简短的阅读研究报告，其题目应结合其研究课题，写出一个中期研究方案和一篇适于发表的最终研究文章。希望学生所做的这个课题是一个不断延伸和完善的课题——可用以阐明科学研究的本质。其内容应适合攻读生物化学、生物学和微生物学的高年级本科生，作为主修课和选修课，同时它也应兼作化学工程、化学、生物医学研究以及动物或植物科学的主修课。本实验教学被设计为 3 个学分的课程，当然最好是每周完成 2 个学时的实验/讲座，因为分子生物学的内容特别适合于每周 2.5 小时的学时。

这个课题需要依赖于该领域的大量原始文献，以求使学生熟悉利用图书馆和网络作为研究工具。每个实验不能保证都能成功：试剂可能不合适，实验方案可能不完善，仪器可能未按预期工作——其实，通常的研究工作就是这样的。该课题的主要目的是教会学生通过老师的指导，如何去解决困难、弥补损失，或在必要时重做实验，以及如何使得研究向既定的目标发展。提供质粒可以作为启动分子生物学环节的一个后备计划，以便在重组蛋白时由于构建质粒过程中的问题而不能有效表达的情况下，可以由起始质粒直接表达蛋白，而使蛋白质化学的研究得以继续进行。

一、大肠杆菌热不稳定肠毒素结合亚基的克隆和鉴定

本课题的任务是通过大肠杆菌热不稳定的肠毒素亚基 (LTB) 来系统地研究它如何识别膜结合受体的结构因子，已知 LTB 是专一地结合于膜受体从而进入靶细胞的。利用其相互作用，可提供一些关于操纵天然多聚蛋白质 (multimeric protein) 投递系统的结合专一性的资料，并确定与分子识别有关的某些结构特点。

霍乱毒素和与其紧密相关的大肠杆菌热不稳定肠毒素两者的结合五聚体 (pentamers) 都是天然的投递载体，它们能够被工程化来运载几种类型的大分子。它们的免疫原性和功能使得其在重组疫苗中可用作黏膜疫苗 (mucosal

vaccine) 的佐剂。在神经生物学研究中, 已有文献报道, 结合五聚体具有潜在的逆运输能力, 并已被应用。任何一个关于产生重组蛋白质疫苗的研究课题, 都必须应用晶体学的方法作为一种分析工具, 所以本课题这部分是关键内容。已有许多关于 X 射线结晶学的研究, 以及近来一些关于如何通过特殊的氨基酸替代来改变霍乱毒素和与之紧密相关的同源性的*大肠杆菌热不稳定肠毒素*之间的结合位点的尝试。所以近来研究课题致力于结晶重组 LTB, 至少是阐明蛋白质结构测定的方法。

二、近期研究课题的目标

- ① 执行和完善有关获得和检验重组 LTB 的方案。
- ② 测验 LTB 与系列神经节苷脂 (ganglioside) 受体类似物的结合。
- ③ 获得重组 LTB 晶体, 用于三维立体结构研究。
- ④ 利用基础资料, 结合有关文献所报道的结果, 设计两个新的突变体引物。

后续课程包括制备和分析突变体及结构变化, 随后为接下来的课程进行选择应用方面的实验设计引物。

学生们对于这个课题的主要贡献是确定最终的研究目标。近来无数的文献报告描述了*大肠杆菌热不稳定肠毒素*结合亚基的各种应用。学生们被鼓励去检索这些报告, 目的是选择一种应用方法以改进应用或更好地设计该重组蛋白的一种新应用。通过这样做, 学生们致力于研究工作的内在本质。例如, 通过修改方案, 除去基因上的一个亲和靶序列; 利用起始克隆框架和鉴别的方法, 就能为扩展研究范围并进入新的研究方向而提供可能。

最后要说明一点, 如果我们总是知道我们在做什么并总是能够预测到结果, 这虽可能有助于新的研究者获得信息和为他们提供一些经验, 但这不应被称之为“研究”。或更确切地说, 可引述 Carlos Bustamonte (University of California-Berkeley) 在《Time》杂志上的话: “作为一位科学家, 意味着你生活在胜任和不可胜任之间的两可界限之中, 如果你总是觉得自己胜任的话, 那么你就不是正在做你的工作。”

三、致谢

我要热忱地感谢 Dmitri Kazmin 和 Deborah Hyman 的帮助, 他们作为教学助手, 验证了实验方案, 提出了变动的建议, 提供了替代试剂, 并帮助设计该研究课题的引物; 现就职于 Montana 大学的 Michelle McGurl 博士帮助设计了课程的原始框架, Montana 州立大学的 X 射线结晶研究人员 Martin Lawrence 博士和 Ray Larsen 先生讲述了 X 射线结晶学技术, 使课程获得了成功;

Montana 州立大学的化学和生物化学系指定并支持作者承担本课程，来自 Montana 州立大学的 Bradley Elmore 和 Jerrod Einerwold，来自 Novagen 公司的 Paige Weiss 和 Barbara Morris 以及来自 New England BioLabs 公司的 William Jack 提供了技术指导。来自 Jr. Corixa 药物公司的 Witold Cieplak 博士及国家卫生研究所（NIH）美国公共卫生服务处 Rocky Mountain 实验室的 Ronald Messer 博士提供了质粒 pTZLT18 和 pTZΔSA2B，以及许多有益的建议。我特别要感谢好几个班级学生的帮助，他们试验并评估了许多实验，指出了大量的错误，意见非常宝贵，从而使我在研究方法上达到了令人满意的专业水准。本工作也得益于我的丈夫 Charles W. Spangler 的贡献——没有他的耐心和鼓励，也就不可能完成此项工作。

Brenda Spangler

目 录

引言和背景	1
第一部分 分子生物学	9
实验一	11
微量移液器使用指南	11
实验二	17
质粒 DNA 模板的制备	17
实验三	24
(1) 测定质粒 DNA 浓度	24
(2) PCR 扩增质粒 DNA 的 LTB 基因	24
实验四	36
(1) 琼脂糖凝胶电泳	36
(2) PCR 产物回收	36
实验五	43
(1) 限制性内切酶酶切 LTB 插入基因和载体	43
(2) 平板制备	43
实验六	50
(1) 琼脂糖凝胶电泳法纯化酶切后的插入基因片段和载体	50
(2) 酶切后插入基因片段和载体的回收	50
实验七	56
(1) DNA 浓度测定	56
(2) 插入基因与载体的连接	56
实验八	63
重组体转化宿主细胞	63
实验九	70
(1) 挑取菌落, PCR 检测插入片段	70
(2) 用可能的重组子划线平板	70
(3) 接种培养物/PCR 反应/分离质粒	70

实验十	75
(1) 琼脂糖凝胶电泳检测插入基因	75
(2) 用质粒少量制备试剂盒纯化 pET28LTB	75
实验十一	80
(1) DNA 浓度检测	80
(2) 乙醇沉淀质粒 DNA	80
(3) 测序反应	80
实验十二	87
(1) 纯化延伸反应产物	87
(2) 测序凝胶示范	87
实验十三	91
(1) 分析序列数据	91
(2) 验证插入序列	91
实验十四	98
(1) 基因表达	98
(2) 表达宿主的转化	98
实验十五	104
诱导 LTB 基因表达: 测定最大表达的时间	104
第二部分 蛋白质化学	109
实验十六	111
(1) SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析诱导时间过程	111
(2) 用 Western blot 将蛋白质转移至膜上	111
实验十七	120
Western Blot 的显像	120
实验十八	125
大规模培养物的制备	125
实验十九	130
亲和层析法分离 LTB	130
实验二十	134
(1) 柱层析分段物的 SDS-PAGE 鉴定	134
(2) 免疫印迹检验 LTB 的存在	134
实验二十一	140
蛋白质浓缩和结晶	140

实验二十二	147
准备 ELISA 微量滴定板来分析系列神经苷脂配体	147
实验二十三	153
用 ELISA 分析系列神经节苷脂配体	153
实验二十四	161
蛋白质结构测定：X 射线衍射技术	161
实验二十五	168
用 X 射线衍射分析蛋白质晶体的特征（可任选）	168
实验二十六	169
引物设计	169
索引	173

引言和背景

一、历史

众所周知的传染性疾病霍乱是由一种霍乱弧菌 (*Vibrio Cholera*) 引起的。其引起的严重腹泻在南印度大范围流行大约已有几千年了。该病在 18 世纪晚期到 19 世纪早期通过土耳其、俄国和波兰传入欧洲；在 19 世纪 30 年代又通过法国马赛船坞的水手传到西欧，接着从西欧又传至巴黎，在那里它得到繁衍，成为一种主要的传染病，甚至扩散到整个欧洲大陆、大不列颠、北美及南美。肆虐的霍乱如同过去发生过的淋巴腺鼠疫那样，引起欧洲人民极大的恐怖和反感。霍乱的受害者迅速发展为严重的腹泻和脱水，导致中毒休克，以致丧命，尸体皱缩呈蓝黑色。由于感染程度的不同，这一过程有时快达 4~6 小时。这种疾病是一种由 *Vibrio* 分泌的细菌蛋白毒素，即霍乱毒素 (CT) 的生物活性所造成的。今天，霍乱在一些环境恶劣的地区仍得以蔓延而留存下严重的问题。与 20 世纪 60 年代该疾病传染有关的菌株已被培养，并在商业上作为可供毒素的来源。在 20 世纪 90 年代产生了一种较新的菌株，它兼具病毒毒力和迅速复制的特性，因此要比以前的传染菌株更具危险性。然而，其死亡率（死亡速度）是目前能引起疾病的致病株的 10%~20%。发病率（疾病发展）取决于细菌吸入的数目和它们被暴露的生理状态两个因素。发现于海岸城市 (Gulf Coast) Louisiana 和 Texas 的一种天然菌株 *Vibrio cholerae* 与在美国偶然发生的瘟疫蔓延有关。

众所周知大肠杆菌的某种血清型 (serotypes) 是引起猪腹泻的原因，猪的“霍乱”流行于 19 世纪晚期，20 世纪初期在美国已很普遍。与猪“霍乱”有关的分泌毒素是在 1969 年从 *E. coli* 菌株中分离出来的 (Gyles 和 Barnum, 1969)，并被称为大肠杆菌热不稳定肠毒素，因为它在热条件下迅速失活（热不稳定），是一种肠毒素，影响到肠（小肠）系统。它也称为 LT，是“labile toxin”的缩写。在印度 Calcutta 发生的一种主要为腹泻的瘟疫期间，研究者们 (Gorbach 等人, 1971; Sack 等人, 1971) 从受害者的肠中分离出一种单一而特殊的大肠杆菌血清型，而不是预知的 *Vibrio cholerae*。英国《柳叶刀》杂志 (*The Lancet*) 于 1970 年报道了该流行性腹泻的流行病学研究 (Rowe、

Taylor 和 Bettelheim, 1970), 他们指出大肠杆菌 O148K/H28 与腹泻有关, 该腹泻有多种命名, 诸如近东和远东的 “travelers’ diarrhea”, “Aden trot”, “Hong Kong dog”, “Delhi belly” 和 “Gypsy tummy”, 以及美洲的 “tourista” “Aztec two-step” 和 “Montezuma’s revenge”。病原性的血清型分泌的一种毒素具有非常类似于从霍乱弧菌获得的 CT 的活性。事实上, 霍乱抗毒素具有能制止由 LTp (猪的肠毒素) 和 LTh (人衍生的肠毒素) 引起兔离体小肠中体液积累的能力。在酶联免疫吸附分析 (enzyme-linked immunosorbent assays, 缩写为 ELISA) 中抗 LTP 或抗 LTh 抗体与霍乱毒素的反应, 和抗 CT 抗体与 LT 肠毒素的反应仅略轻于与它们各自相应的同源性抗原产生的抗体反应。



由 X 射线同晶置换法测出大肠杆菌肠毒素 (ILTS. pdb) 的结构图

来自 Molscript (Kraulis, 1991) 的蛋白质数据库

(WWW. rcsb. org/pdb), 由 Melanie Rogers 博士馈赠图像

CT 和大肠杆菌热不稳定肠毒素 LT 是极其相似的。两者在结构和功能上可被认为是具有紧密的进化关系。它们都是在结构上相似而在功能上有差异的细菌蛋白毒素家族成员, 包括百日咳毒素、白喉毒素、假单胞菌外毒素 A、内毒杆菌毒素、炭疽毒素、破伤风毒素、志贺毒素和类志贺毒素及 *Bacillus*

thuringiensis 毒素。这些细菌蛋白毒素被统称为 A-B 毒素，是因为它们都含有两个功能性的部分——“A”组分具有酶的功能，而具有识别靶细胞功能的“B”组分是毒素蛋白酶促部分的投递运载工具。CT 和 LT 两个完整的全毒素分子质量约为 85620u^①，可因来源而异。CT 和 LT 都属于 ADP-核糖基转移酶的 AB₅ 家族，它们包含一个 A 亚基，被分别称为 CTA 或 LTA（分子质量为 27234u），被 5 个较小亚基（CT 为每个 11600u，LT 为每个 11800u）形成的一个平面环所分开。A 亚基具有将 ADP-核糖（衍生自 NAD⁺）不可逆地接到 G-蛋白的 α 亚基的作用。被分别称为 CTB 或 LTB 的呈五聚体的 B 亚基，与识别和接触到专一膜的结合受体（Spangler, 1992）有关，该结合的五聚体 CTB 或 LTB 本身不具细胞毒性。

携带有 CT 或 LT 基因的细菌被摄取并通过哺乳动物宿主的小肠，之后被细菌释放进入肠膜，毒素的 B 五聚体结合小肠上皮细胞膜上的神经节苷脂（ganglioside）GM₁，或其他在膜上含有 GM₁ 的细胞，例如神经元、脑细胞和泪腺细胞（Finkelstein 等, 1974；King 和 Heyningen, 1973）。肠毒素化作用包括全毒素与受体有关的胞吞作用及向高尔基体的转移作用。A 亚基的主要部分，A1 已通过还原二硫键从毒素的其余部分中分离出来。A1 亚基通过内织网膜被转移至细胞浆。霍乱是一种比“Montezuma's revenge”更具进攻性的疾病（Cieplak, Jr. 等），因为霍乱弧菌通过肽的蛋白裂解来预先活化 CT，而大肠杆菌并不是这样。此外，大肠杆菌不会积极主动地将其有毒产物分泌进小肠腔内，相反，大肠杆菌能将毒素隔绝于细菌的细胞浆和细胞壁之间，只有细胞融解才释放毒素。

二、酶功能

CT 和 LT 将 NAD⁺（烟酰胺腺嘌呤二核苷酸）的 ADP-核糖转移至 G 蛋白的 α 亚基，Gs 与激活膜结合信号传导酶腺苷酸环化酶有关。G 蛋白是三聚体，周质膜蛋白具有被称之为 α 、 β 和 γ 的三种亚基。在 Gs（被激活的）三聚体中的 α 亚基被结合到鸟苷二磷酸（guanosine diphosphate，缩写为 GDP）分子上。当邻近的膜结合受体被一种激活剂所结合时，Gs α -GDP 被磷酸化而导致 Gs α -GTP（鸟苷三磷酸）复合物从三聚体解离下来。Gs α -GTP 与腺苷酸环化酶反应，形成活性酶复合物。由腺苷酸环化酶和 Gs α -GTP 构成的活性三元复合物转化 ATP 为环化 AMP（cAMP）。众所周知，环化 AMP 是一种“第二信使”，因为外部信号启动它的产生，随后环化 AMP 活化激酶，后者启动内

① 1u=1Da，u 为原子质量单位。——译者注

部细胞酶活化的连锁反应，它导致分泌细胞内盐和水的分泌，在短时间后， $G_{s\alpha}$ 水解 GTP 为 GDP，由腺苷酸环化酶解离的 $G_{s\alpha}$ -GDP 和酶就不再能够活泼地催化 cAMP 的形成。当 $G_{s\alpha}$ 通过共价修饰，引入 ADP-核糖，它也不再能水解 GTP 成 GDP。该三元复合物将保留活性构象，并继续产生 cAMP。高水平的 cAMP 抑制钠的再吸收和活性氯的分泌 (Field, 1993)。该因素和其他因素导致盐和水的过量分泌，速度达每小时数升，这就造成 CT 和 LT 肠毒素具有严重的“稀粥状”腹泻和急性腹痛的特征。

三、遗传学

CT 的 A 亚基和 B 亚基被霍乱弧菌 (*V. Cholerae*) 的 *ctxAB* 操纵子编码 (Mekalanos 等, 1983)，该操纵子与 6kb 的染色体 DNA 侧翼序列结合在一起，最初被认为是一个基因组元件。然而近来的研究表明，CTX 毒力元件相当于被霍乱弧菌所携带的一个溶源性的丝状噬菌体 CTX ϕ 的基因组。(Waldoc 和 Mekalanos, 1996)。此外，还发现霍乱弧菌 E1 Tor 菌株 CTX 的染色体元件能被转染到另一霍乱弧菌菌株并作为一种质粒（一种易变的遗传元件）回收。CTX 毒力元件整合到 E1 Tor 菌株染色体，但在另一种霍乱弧菌菌株却是在染色体外。在大肠杆菌中，基因 *eltA* 和 *eltB* 被装载在质粒里 (Dallas, Gill 和 Falkow, 1970; So, Dalls 和 Falkow, 1978) 因而怀疑该基因可能从霍乱弧菌转染至大肠杆菌。序列比较显示，CTA 仅与 LTA 有略微差异 (93% 同源性)，但 CTB 与猪 LTB 之间的差异更为显著 (近 80% 同源性)。看来，大肠杆菌是外来宿主，因为在霍乱弧菌中由 A2 断裂成 A1 的蛋白酶是内切的，但是在大肠杆菌 O148 中并不存在，最可能的是 LTB 在它的新大肠杆菌宿主中是从 CTB 分支出来的。这两种毒素亚基的基因被发现要么是各自独立的，要么 A 亚基是一种有序的重复单元。它们都被转录为单链 mRNA。B 亚基基因 *eltB* 的过度表达量为 A 亚基表达量的 5 倍 (Mekalanos 等, 1983)。

四、结合专一性

尽管 CTB 和 LTB 的结构相似，但它们在受体结合专一性上有显著的差异 (Fukuta 等, 1988)。这两个毒素对神经节苷脂 GM_1 具有高度的结合亲和性，特别是对半乳糖，即神经节苷脂寡聚糖部分的末端 (参见图 22.2)。CTB 和 LTB 也取决于唾液酸残基，因为两者都明显地不结合脱唾液酸- GM_1 。然而，LT 以适度的亲和力接合于其他鞘糖脂，包括 GM_2 和副红细胞糖苷。最近的工作表明，LT 识别复合物糖脂，其包含的糖链超过 30 个糖基 (Backstrom 等,

1997, Fukuta 等 1988)。这种非-GM₁受体可能具有更大的 LT 结合活性。对存在和不存在各种不同受体类似物的 CTB 和 LTB 结构的研究, 为结合识别作用中的结构因子提供了细节信息 (Merritt 等; 1994a, b, 1995, 1997; Sixma 等, 1991, 1992; Zhang 等, 1995 a, b); 受体结合位点定位于五聚体 (pentamer) 内的单体亚基之间的界面上, 而且包括一个单亚基上的 Trp88 和邻近单体上的 Gly33。近来, 关于 LT 和 CT 的 GM₁ 结合位点的结构基础研究 (Minke 等, 1999) 显示, 被 LT 识别的一组配基是多种多样的。在 CTB 和 LTB 结合专一性之间的差异可能涉及一个以上的氨基酸。这种观察是基于 CTB 突变体的研究, 该突变体含有有效地使 CTB 转化为 LTB 的氨基酸替代物 (Backstrom 等, 1997)。

五、更多背景

从一些评论 (Spangler, 1992; Salyers 及 Whitt, 2002) 中可发现关于结构与功能的更进一步的细节, 如有关微生物信息的广泛讨论。N. A. Williams 和 T. R. Hirst 近来已发表几篇有关肠毒素 B 亚基的免疫原性性质方面的评论性文章, 它可能有助于对修饰 LTB 的应用感兴趣的人们 (Millar 等, 2001; Williams, 2000)。

参 考 文 献

- 1 Backstrom, M., Shahabi, V., Johansson, S., Tenneberg, S., Kjellberg, A., Miller-Podraza, H., Holmgren, J. and Lebens, M. (1997). Structural basis for differential receptor binding of cholera and *Escherichia coli* heatlabile toxins; influence of heterologous amino acid substitutions in the cholera toxin B-subunit. *Mol. Microbiol.* 24, 489–497.
- 2 Cieplak, W. Jr, Messer, R. J., Konkel, M. and Grant, C. C. R. (1995). Role of potential endoplasmic reticulum retention sequence (RDEL) and the Golgi complex in the cytotonic activity of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Mol. Microbiol.* 16, 789–800.
- 3 Dallas, W. S., Gill, D. M. and Falkow, S. (1979). Cistrons encoding *Escherichia coli* heat-labile toxin. *J. Bacteriol.* 139, 850–858.
- 4 Field, M. (1993). Intestinal electrolyte secretion: history of a paradigm. *Arch. Surg.* 128, 273–275.
- 5 Finkelstein, R. A., Boesman, M., Neoh, S. H., LaRue, M. K. and Delaney, R. (1974). Dissociation and recombination of the subunits of the cholera enterotoxin (cholera toxin). *J. Immunol.* 113, 145–150.
- 6 Fukuta, S., Twiddy, E. M., Magnani, J. L., Ginsburg, V. and Holmes, R. K.

- (1988). Comparison of the carbohydrate binding specificities of cholera toxin and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins LTH-I, LT-IIa, and LT-IIb. *Infect. Immun.* 56, 1748–1753.
- 7 Gorbach, S. L., Banwell, J. G., Chatterjee, B. D., Jacobs, B. and Sacks, R. B. (1971). Acute undifferentiated human diarrhea in the tropics. 1. alterations in intestinal microflora. *J. Clin. Invest.* 50, 881–889.
- 8 Gyles, C. L. and Barnum, D. A. (1969). A heat-labile enterotoxin from strains of *Escherichia coli* enteropathogenic for pigs. *J. Infect. Dis.* 120, 419–426.
- 9 King, C. A. and Heyningen, W. E. v. (1973). Deactivation of cholera toxin by a sialidase resistant monosialosylganglioside. *J. Infect. Dis.* 127, 639–647.
- 10 Kraulis, P. J. (1991). MOLSCRIPT: A program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J. of Appl. Crystallography* 24, 946–950.
- 11 Mekalanos, J. J., Swartz, D. J., Pearson, G. D. N., Harford, N., Groyne, F. and deWilde, M. (1983). Cholera toxin genes: nucleotide sequence, deletion analysis and vaccine development. *Nature (Lond.)* 306, 551–557.
- 12 Merritt, E. A., Sarfaty, S., Akker, F. v. d., L'Hoir, C., Martial, J. A. and Hol, W. G. J. (1994a). Crystal structure of cholera toxin B-pentamer bound to receptor GM₁ pentasaccharide. *protein Sci.* 3, 166–175.
- 13 Merritt, E. A., Sixma, T. K., Kalk, K. H., Zanten, B. A. M. v. and Hol, W. G. J. (1994b). Galactose binding site in *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LT) and cholera toxin (CT). *Mol. Microbiol.* 13, 745–753.
- 14 Merritt, E. A., Sarfaty, S., Chang, T.-t., Palmer, L. M., Jobling, M. G., Holmes, R. K. and Hol, W. G. J. (1995). Surprising leads for a cholera toxin receptor-binding antagonist: crystallographic studies of CTB mutants. *Structure* 3, 561–570.
- 15 Merritt, E. A., Sarfaty, S., Jobling, M. G., Chang, T., Holmes, R. K., Hirst, T. R. and Hol, W. G. (1997). Structural studies of receptor binding by cholera toxin mutants. *Protein Sci.* 6, 1516–1528.
- 16 Millar, D. G., Hirst, T. R. and Snider, D. P. (2001). *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin subunit is a more potent mucosal adjuvant than its closely related homolog the B subunit of cholera toxin. *Infect. Immun.* 69, 3476–3482.
- 17 Minke, W. E., Roach, C., Hol, W. G. J. and Verlinde, C. L. M. J. (1999). Structure-based exploration of the ganglioside GM₁ binding sites of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and cholera toxin for the discovery of receptor antagonists. *Biochemistry* 38, 5684–5692.
- 18 Rowe, B., Taylor, J. and Bettelheim, K. A. (1970). An investigation of travellers' diarrhoea. *Lancet* 1, 1–5.