

## 脊髓灰质炎病毒 C3 表位和 C-myc 十肽表位在细菌表面的表达

高荣凯\*\* 张兆山\* 李淑琴 黄翠芬

(军事医学科学院生物工程研究所,北京 100071)

**摘 要** 为了进一步验证载体 pCSB136 和 pCSX72 作为表面呈现载体的可行性,化学合成脊髓灰质炎病毒 C3 表位和 C-myc 十肽表位的基因片段,并插入到上述载体的相应位点间,采用全菌 PCR 筛选到正向插入的重组子,全细胞 ELISA 和电镜观察显示,重组蛋白以杂和菌毛的形式得到了表达,并保持 CS3 和外源表位的抗原性,表明脊髓灰质炎病毒 C3 表位和 C-myc 十肽表位在细菌表面得到了表达,证实载体 pCSB136 和 pCSX72 可用于外源表位的呈现,为构建基因工程活菌疫苗奠定了基础。

**关键词** 表位,表面呈现,CS3 菌毛

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)05-0539-04

CS3 是人源肠毒素大肠杆菌(Enterotoxigenic *Escherichia coli*, ETEC)的主要血清型抗原蛋白,在野生菌株它通常与 CS1 或者 CS2 共同组装成菌毛,它自身也能以多聚体形式组装成菌毛<sup>[1]</sup>。CS3 由一个 60Md 的大质粒编码,完整的操纵子位于一个 4.7kb 的 *Hind* III 片段上,其表达受控于自身启动子,含完整操纵子的重组质粒可提供完成菌毛装配的所有组分<sup>[2]</sup>。通过对 CS3 作为外源抗原决定簇呈现载体的研究证实,CS3 亚基蛋白中有多个位点可用于外源抗原表位的插入并实现表面呈现<sup>[3-5]</sup>。本文是基于构建了 CS3 菌毛呈现载体 pCSX72 和 pCXB136 的基础上,用脊髓灰质炎病毒 C3 表位和 C-myc 的十肽表位进一步验证用于呈现外源抗原表位的可行性。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒:** *E. coli* DH5 $\alpha$  由本室保存;质粒 pCSX72 和 pCSB136 为本室构建的菌毛呈现载体<sup>[5]</sup>。

**1.1.2 试剂:** 各种限制酶、T4 DNA 连接酶为 New England Biolabs 公司产品;CS3 单克隆抗体由瑞典 Gobeourgs 大学的 A.M. Svennerholm 教授惠赠;抗脊髓灰质炎病毒单抗由法国巴斯德研究所赠送;针对 C-myc 十肽表位(410-419aa)的 9E10 单克隆抗体,购自 Invitrogen 公司。

#### 1.2 方法

**1.2.1 细菌的培养:** 一般情况下采用 LB 培养基进行培养;制备带菌毛的细菌时采用 CFA 琼脂平板。

**1.2.2 基因片段的合成:** 采用 DNA 自动合成仪分别合成目的基因片段的编码链和互补链,并在其两端加上相应的酶切点。将合成的寡核苷酸链分别溶解在水中,使其浓度为 10 $\mu$ g/mL。各取 10 $\mu$ L 混匀后于 90 $^{\circ}$ C 水浴加热 10min,自然冷却至室温退火。

**1.2.3 基因操作:** 酶切、连接等操作按常规方法。

**1.2.4 全菌 PCR:** 用于重组子的快速筛选。连接产物转化宿主菌 *E. coli* DH5 $\alpha$ ,在相应抗性培养基平板上培养过夜。以上游引物(P5)和插入的基因片段的互补链作为配对引物,用牙签从平板上直接挑取少量细菌混入 PCR 反应液中作为模板来源进行 PCR 扩增,反应条件为:94 $^{\circ}$ C 变性 30s,55 $^{\circ}$ C 退火 30s,72 $^{\circ}$ C 延伸 45s,进行 30 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。

**1.2.5 全细胞 ELISA:** 将细菌重悬于 0.05mol/L 的 NaHCO<sub>3</sub> 缓冲液(pH9.6),调整细菌悬液的浊度,使 OD<sub>600</sub> = 1.0,用细菌悬液包被酶联板,每孔 100 $\mu$ L,于 4 $^{\circ}$ C 包被过夜;PBS 洗 2 遍;3%的 BSA 封闭,湿盒内 37 $^{\circ}$ C 1h;PBS 洗 1 遍;每孔加 100 $\mu$ L 适度稀释的相应单抗,湿盒内 37 $^{\circ}$ C 1h;同上洗 3 遍;加入适度稀释的羊抗小鼠酶标二抗,湿盒内 37 $^{\circ}$ C 1h;同上洗 3 遍;加入 100 $\mu$ L 底物液显色,至阴阳性对照差别明显,每孔

收稿日期:2001-01-18,修回日期:2001-06-13。

基金项目:国家自然科学基金资助(39570408)和国家“863”计划资助课题(102-07-03-05)。

\* 通讯作者。Tel:86-10-66948834;E-mail:zhangzs@nic.bmi.ac.cn

\*\* 现在工作单位:海军总医院中心实验科。

加 50  $\mu$ L 2 mol/L 的  $H_2SO_4$  终止。酶联仪测  $OD_{490nm}$ 。

**1.2.6 电镜观察:**参照文献[6]方法进行。

## 2 结 果

### 2.1 杂和蛋白表达载体的构建

**2.1.1 脊髓灰质炎病毒 C3 表位呈现载体的构建:**为了探讨脊髓灰质炎病毒 C3 表位在细菌表面的呈现情况,化学合成 C3 表位(93 ~ 103aa)的基因片段,并在两端加上相应的酶切位点,其编码链和互补链为:

Px + :5'-CTAGA GAT AAC CCG GCG TCG ACC ACC AAC AAA GAT AAA T-3'

Px - :5'-CTAGA TTT ATC TTT GTT GGT GGT CGA CGC CGC GTT ATC T-3'

Pb + :5'-GATCC GAT AAC CCG GCG TCG ACC ACC AAC AAA GAT AAA G-3'

Pb - :5'-GATCC TTT ATC TTT GTT GGT GGT CGA CGC CGC GTT ATC G-3'

Px + 与 Px - 配对退火后插入到载体 pCSX72 的 *Xba* I 位点间,Pb + 与 Pb - 配对退火后插入到载体 pCSB136 的 *Bam* H I 位点间,采用全菌 PCR 方法筛选到正向插入的阳性克隆。提取质粒 DNA,用 DNA 自动测序仪测定其核苷酸序列,证实插入的脊髓灰质炎病毒 C3 表位的序列和读码框完全正确,分别命名为 pCSX72P 和 pCSB136P。

**2.1.2 C-myc 十肽表位呈现载体的构建:**为构建 C-myc 十肽表位的呈现载体,化学合成 C-myc 十肽表位(410 ~ 419aa)的基因片段,并在其两端加上相应的酶切位点,其编码链和互补链为:

Mx + :5'-CTAGA GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAA GAT CTG T-3'

Mx - :5'-CTAGA CAG ATC TTC TTC TGA GAT GAG TTT TTG TTC T-3'

Mb + :5'-GATCC GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAA GAT CTG G-3'

Mb - :5'-GATCC CAG ATC TTC TTC TGA GAT GAG TTT TTG TTC G-3'

以 Mx + 与 Mx - 配对退火后插入到载体 pCSX72 的 *Xba* I 位点(载体 pCSX72 的图谱见图 1),以 Mb + 与 Mb - 配对退火后插入到载体 pCSB136 的 *Bam* H I 位点。载体 pCSB136 的图谱与 pCSX72 基本相同,不同之处在于:在 pCSX72 中是在 CS3 基因编码第 72 位氨基酸的序列后引入了一个 *Xba* I 位点,而在 pCSB136 中是在 CS3 基因编码第 136 位氨基酸的序列后引入了一个 *Bam* H I 位点。采用全菌 PCR 方法筛选到正向插入的阳性克隆(图 2),提取质粒 DNA,用 DNA 自动测序仪测定其核苷酸序列,证实插入的

C-myc 十肽表位的序列和读码框完全正确,分别命名为 pCSX72M 和 pCSB136M。

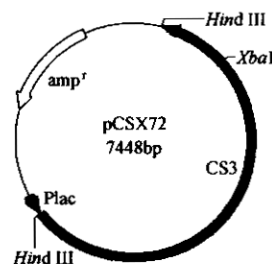


图 1 载体质粒 pCSX72 的图谱

Fig.1 Map of plasmid pCSX72

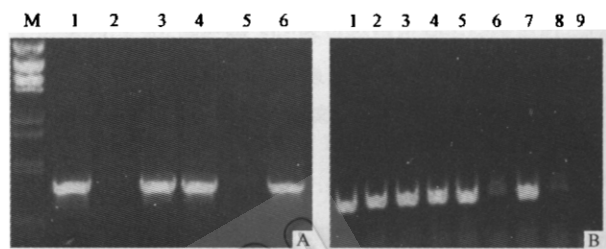


图 2 采用全菌 PCR 检测含有 C-myc 表位序列的重组子

Fig.2 Whole-strain PCR screening of recombinants

carrying C-myc

A. Screening of Plasmid pCSB136M; M.  $\lambda$ DNA/EcoR I + *Hind* III marker; 1 ~ 6. Transformants;

B. Screening of plasmid pCSX72M; 1 ~ 9. Transformants

### 2.2 脊髓灰质炎病毒 C3 表位的表面呈现

将构建的重组质粒 pCSB136P 和 pCSX72P 分别转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,挑取单菌落并在 CFA 琼脂平板上培养 18 ~ 20h,经 PBS 洗涤 2 遍后包被微量酶联板,分别使用抗 CS3 单抗和抗脊髓灰质炎病毒单抗作为一级抗体进行全细胞 ELISA 来检测杂合蛋白的表达情况,结果(见表 1)显示杂合蛋白可以被抗 CS3 单抗和抗脊髓灰质炎病毒 C3 表位单抗所识别,表明杂合蛋白得到了表达并保持 CS3 本身和脊髓灰质炎病毒 C3 表位的抗原性,脊髓灰质炎病毒 C3 表位在细菌表面得到了表达。

表 1 全细胞 ELISA 检测含有 C3 表位杂合蛋白的抗原性

Table 1 Whole-cell ELISA detecting CS3-C3

Strains	$A_{490nm}$	
	Anti-CS3	Anti-C3
DH5 $\alpha$ (pCSX72P)	0.57 $\pm$ 0.03	0.27 $\pm$ 0.015
DH5 $\alpha$ (pCSB136P)	0.21 $\pm$ 0.01	0.24 $\pm$ 0.005
DH5 $\alpha$ (pCSB136)	0.63 $\pm$ 0.04	0.11 $\pm$ 0.01
DH5 $\alpha$ (pUC19)	0.08 $\pm$ 0.00	

进一步采用电子显微镜技术观察重组子菌毛的形成情况,结果(图 3)显示两种重组菌表面均有许

多根菌毛形成,表明重组蛋白以杂合菌毛的形式得到了表达。

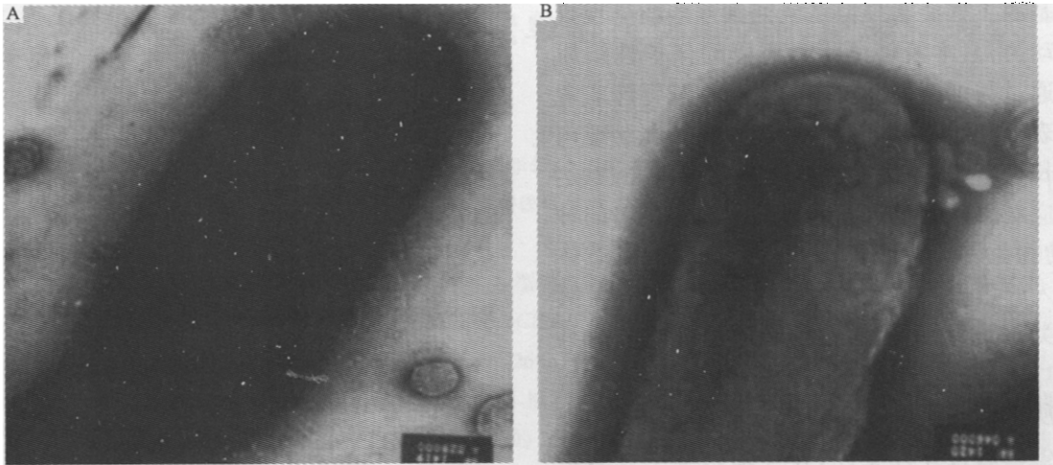


图 3 呈现 C3 表位的重组细菌的电镜观察

Fig.3 Electronic microscopy of recombinant bacteria displaying C3 epitopes

A. DH5α(pCSB136P), (28000 × ); B. DH5α(pCSX72P), (46000 × )

2.3 C-myc 十肽表位的表面呈现

将重组质粒 pCSB136M 和 pCSX72M 分别转化大肠杆菌 DH5α,收获在 CFA 琼脂平板上培养的细菌,以抗 CS3 单抗和抗 C-myc 十肽表位单抗分别作为一级抗体进行全细胞 ELISA 来检测杂合蛋白的表达情况,结果(见表 2)显示杂合蛋白可以被抗 CS3 单抗和抗 C-myc 十肽表位单抗所识别,表明杂合蛋白得到了表达并保持 CS3 本身和 C-myc 十肽表位的抗原性,C-myc 十肽表位在重组菌表面得到了表达。采用电子显微镜技术检测菌毛的形成情况,发现两种重组菌表面均有许多根菌毛形成(图 4),说明重组

蛋白以杂合菌毛的形式得到了表达。

表 2 全细胞 ELISA 检测含有 C-myc 表位杂合蛋白的抗原性

Table 2 Whole-cell ELISA detecting CS3-M

Strains	A <sub>490nm</sub>	
	Anti-CS3	Anti-myc(9E10)
DH5α(pCSX72M)	0.53 ± 0.025	0.22 ± 0.015
DH5α(pCSB136M)	0.24 ± 0.02	0.17 ± 0.02
DH5α(pCSB136)	0.61 ± 0.035	0.06 ± 0.005
DH5α(pUC19)	0.08 ± 0.01	

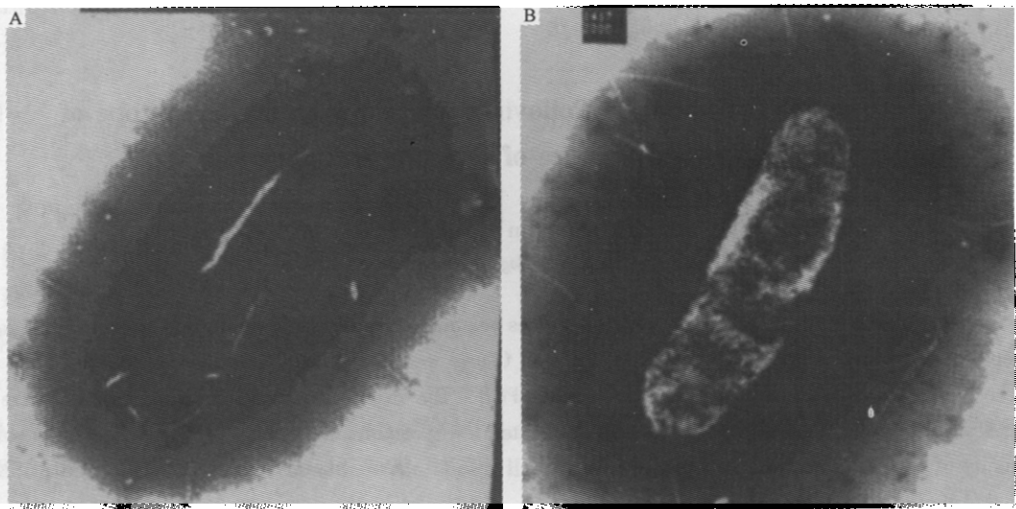


图 4 电镜观察呈现 C-myc 表位的重组菌

Fig.4 Electronic microscopy of recombinant bacteria displaying C-myc

A. DH5α(pCSB136M), (22000 × ); B. DH5α(pCSX72M), (22000 × )

### 3 讨 论

构建基因工程活菌疫苗是研究细菌表面呈现技术的最初动因,基本策略是将病原体的保护性抗原或其表位通过与细菌表面蛋白的融合在减毒株或者非病原菌表面表达,经口服途径,使重组菌在肠道内局限性生长繁殖,从而诱导机体产生免疫应答,以达到预防相应病原体感染致病的目的。载体蛋白的种类繁多,动物免疫试验证实机体均能产生针对载体蛋白和插入的蛋白或多肽的免疫应答反应<sup>[7]</sup>。与其它蛋白种类相比,菌毛蛋白作为表面呈现载体更具有优势:(1)菌毛位于细菌的表面,更易于为机体的免疫系统所识别和捕捉;(2)在小肠上皮细胞表面存在有菌毛蛋白的特异性受体,介导细菌粘附在肠道上皮细胞上,一是更利于机体免疫系统的识别和捕捉,再者使重组菌在肠道内存留时间较长,繁殖传代更多,以诱发更强、更长时间的免疫应答反应;(3)菌毛在细菌表面数目众多,而且每根菌毛由多个拷贝(500~1000)的菌毛蛋白亚基构成,适合于外源表位的高拷贝呈现,对于构建疫苗而言则保证提供足够大量的抗原;(4)菌毛蛋白本身没有毒性,而且具有较强的免疫原性,大多是保护性抗原。因此,菌毛表面呈现系统可谓是构建基因工程活菌疫苗的优选载体系统。

CS3 是人源肠毒素性大肠杆菌菌毛抗原中的优势血清型抗原蛋白,我们前期的工作证实它也能作为外源表位的呈现载体,并以口蹄疫病毒(FMDV)的 MA18 表位为例验证了突变体 pCSX72 和 pCSB136 作为呈现载体的可行性。本研究以脊髓灰质炎病毒的 C3 表位(11 肽)、C-myc 的一个十肽表位为例进一步

验证上述载体作为外源表位呈现载体的可行性,结果证实脊髓灰质炎病毒的 C3 表位(11 肽)和 C-myc 的一个十肽表位在重组菌表面得到了表达,而且 72 位插入时表达水平明显高于 136 位。但在插入外源表位后 CS3 表达水平下降近 50%,可能由于外源表位的插入对 CS3 的构象造成一定的影响,从而导致菌毛装配能力下降。总之,上述结果表明载体 pC-SX72 和 pCSB136 能够用于外源表位的呈现,为构建基因工程活菌疫苗提供了一种新的载体系统。

### REFERENCES(参考文献)

- [1] Mullany P, Field AM, McConnell MM *et al.* Expression of plasmids coding for colonization factor antigen II (CFA/II) and enterotoxin production in *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol*, 1983, 129(12): 3591~3601
- [2] GAO R K(高荣凯), ZHANG Z S(张兆山), LI S Q(李淑琴) *et al.* Comparison of the expression of CS3 fimbriae in different vector systems. *Bulletin of the Academy of Military Medical Sciences* (军事医学科学院院刊), 2001, 25(1): 1~4
- [3] Yakhchali B & Manning PA. Epitope analysis of the CS3 fimbrial subunit of human enterotoxigenic *Escherichia coli* and the construction of novel CS3::ST and CS3::LT immunogens. *Behring Inst Mitt*, 1997, 98(2): 124~134
- [4] Dong Z Z(董自正), Zhang Z S(张兆山), Li S Q(李淑琴) *et al.* CS3 fimbriae of enterotoxigenic *Escherichia coli* as chimeric expression carriers of heterologous antigenic determinants. *Science of China (Series C)*(中国科学-C 辑), 1998, 28(60): 501~507
- [5] Gao R K(高荣凯), Zhang Z S(张兆山), Li S Q(李淑琴) *et al.* Construction of a display vector based on the CS3 pili of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Chinese Journal of Microbiology and Immunology* (中华微生物学和免疫学杂志), 2000, 20(6): 485~488
- [6] Bakker D, FG Van Zijderfeld, S Van der Veen *et al.* K88 fimbriae as carriers of heterologous antigenic determinants. *Microb Pathog*, 1990, 8: 343~352
- [7] Stahl S & Uhlen M. Bacterial surface display: trends and progress. *TiB Tech*, 1997, 15(5): 185~192

## Expression of C3 Epitope of Poliovirus and a Ten-peptides Epitope of C-myc on the Surface of Recombinant Bacteria

GAO Rong-Kai ZHANG Zhao-Shan\* LI Shu-Qin HUANG Cui-Fen

(Beijing Institute of Biotechnology, Beijing 100071, China)

**Abstract** To confirm the possibility of pCSB136 and pCSX72 as vectors for displaying heterologous epitopes, the gene fragments coding for C3 epitope of poliovirus and a ten-peptides epitope of C-myc were synthesized and inserted into pCSB136 and pCSX72 respectively. The recombinants were screened by whole-strain PCR. The expression of recombinant proteins were detected by whole-cell ELISA and electronic microscopy. The results indicated the recombinant proteins were expressed as hybrid fimbriae, and the antigenicity of both CS3 and inserted epitopes kept. All results above showed vectors pCSB136 and pCSX72 could be used to display the foreign epitopes.

**Key words** epitope; surface display; CS3 fimbriae

Received: January 18, 2001

This work was supported by Grant from the National Natural Scientific Foundation(39570408) and "863" High-tech Foundation(102-07-03-05)

\* Corresponding author. Tel: 86-10-66948834; E-mail: zhangzs@nic.bmi.ac.cn