

## 重组炭疽保护性抗原的表达、纯化与生物活性分析

徐俊杰 董大勇 宋小红 葛 猛 李冠霖 付 玲 庄汉澜 陈 薇\*

(军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京 100071)

**摘 要** 构建分泌型表达质粒, 在大肠杆菌中实现了重组炭疽保护性抗原(rPA)的分泌型表达。重组蛋白位于细菌外周质, 表达量约占菌体总蛋白的 10%。以离子交换、疏水层析和凝胶过滤为基础, 建立了 rPA 的纯化工艺, 每升培养物可获得约 15 mg rPA, 纯度可达 95% 以上。体外细胞毒性试验显示 rPA 具有较好的生物学活性。用 rPA 免疫家兔产生的抗血清在体外可抑制炭疽致死毒素的活性, 表明 rPA 可诱导机体产生保护性免疫。以上结果为今后发展新一代炭疽疫苗打下基础。

**关键词** 炭疽杆菌, 炭疽毒素, 保护性抗原, 表达, 纯化

**中图分类号** R37 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2004)05-0652-04

炭疽杆菌的主要致病因子包括细菌荚膜和炭疽毒素, 后者由质粒 pXO1 编码, 包括三种蛋白质成分: 保护性抗原(protective antigen, PA)、致死因子(lethal factor, LF)和水肿因子(edema factor, EF)。PA 能诱导机体的保护性免疫, 是美国 FDA 批准的人用炭疽疫苗(anthrax vaccine adsorbed, AVA)的主要免疫活性成分。目前 AVA 的生产仍沿用传统工艺, 从炭疽减毒株的培养物中吸附 PA, 因此含有微量的其他炭疽成分, AVA 使用中的一些副作用可能与此有关<sup>[1-2]</sup>。此外, 疫苗生产时需要较高的生物安全设施, 也加大了其生产成本。因此, 目前各国都在发展基于重组 PA(rPA)的基因工程疫苗<sup>[3-5]</sup>。

在本实验中, 我们构建了分泌型的表达载体, 在大肠杆菌中成功实现了 rPA 的分泌表达, 获得的重组蛋白具有良好的生物活性和免疫原性, 为今后发展新一代炭疽疫苗打下基础。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

含 PA 基因的质粒 pT-PA, *E. coli* DH5 $\alpha$ , 原核表达载体 pAS20, 小鼠巨噬细胞 J774A.1 由本实验室保存。限制酶, Pyrobest DNA 聚合酶, T4 DNA 连接酶, T4 DNA 聚合酶等购自 TaKaRa 公司。质粒提取试剂盒购自 Qiagen 公司。DNA 片段回收试剂盒购自上海华舜生物工程公司。层析仪器及介质为

Pharmacia 公司产品。重组炭疽致死因子(rLF)由本室在 *E. coli* 中表达纯化而得, 纯度 95% 以上, -70℃ 保存备用(待发表)。

#### 1.2 表达质粒构建

用 PCR 从质粒 pT-PA 上扩增出 PA 基因片段(从第 4 密码子到终止密码子序列), 用 *Sac* I 酶切, 形成 5' 平末端 3' 粘末端; 载体 pAS20 用 *Pst* I 切后, 用 T4 DNA 聚合酶处理成平末端, 再用 *Sac* I 酶切, 也形成 5' 平末端 3' 粘末端。载体和片段连接后常规转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ , PCR 筛选阳性克隆, 提质粒进行酶切鉴定和序列测定。DNA 测序由大连宝生物工程公司完成。

PA 5' 端引物: 5'-AGGAGAACCGGTTATTAATG-AATC-3'

PA 3' 端引物: 5'-CGC GAGCTC TTATCCTATCT-  
*Sac* I

. CATAGCCTTTTTAG-3'

#### 1.3 rPA 的表达

带有表达质粒的 DH5 $\alpha$  菌株在含 100  $\mu$ g/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基中 37℃ 250r/min 培养至 OD<sub>600</sub> 0.7 ~ 0.8, 加入 IPTG 至 0.5 mmol/L, 28℃ 250 r/min 诱导表达 5 h, 离心收集细菌沉淀。

#### 1.4 细菌外周质的分离

1L 诱导培养物离心后的菌体, 用 100 mL 20% 蔗糖溶液(20 mmol/L Tris pH8.0, 1 mmol/L EDTA, 1

收稿日期: 2004-02-26, 修回日期: 2004-05-20。

基金项目: 国家高科技研究发展计划(863)项目资助(No. 2003AA002004)。

\* 通讯作者。 Tel: 86-10-66948565; Fax: 86-10-63815273; E-mail: cw789661@yahoo.com

mmol/L PMSF)重悬,冰上放置 5 min,4℃ 8000 g 离心 20 min。沉淀用 100 mL 5 mmol/L MgSO<sub>4</sub> (1 mmol/L PMSF)重悬,冰上放置 10 min,4℃ 10000 g 离心 10 min,收集上清用于纯化 rPA。

### 1.5 rPA 的纯化

先用 Q Sepharose 进行粗纯化。以平衡缓冲液 (20 mmol/L Tris pH8.0)平衡柱,调节样品盐浓度至 20 mmol/L Tris pH8.0 后上样。用含 0.5 mol/L NaCl 的平衡缓冲液进行洗脱。分部收集洗脱液,进行 12% SDS-PAGE 分析。

含 rPA 的管合并后用 Source 30Q 进行下一步纯化。以平衡缓冲液(同上)平衡柱,样品稀释 5 倍后上样。用含 0~0.25 mol/L NaCl 的平衡缓冲液梯度洗脱。含 rPA 的管合并后用 phenyl sepharose 疏水柱进一步纯化。

以含 1.0 mol/L 硫酸胺的缓冲液(20 mmol/L Tris pH8.0)平衡柱,调节样品液至同样盐浓度后上样,用含 1.0~0 mol/L 硫酸胺的同样缓冲液梯度洗脱。

含 rPA 的管合并后用 Centriplus YM-30 超滤管 (Millipore)浓缩,再过 Superdex 200 凝胶柱,用 PBS 洗下 rPA, -70℃ 保存。

将各步纯化样品进行 12% SDS-PAGE,观察纯化效果。用抗-PA 单克隆抗体 B<sub>10</sub> (本室制)为一抗,HRP 标记羊抗鼠 IgG (Sigma) 1:2000 稀释为二抗,进行 Western blot 分析。

### 1.6 rPA 的 N 端测序

将纯化后的 rPA 经 10% SDS-PAGE 后,电转移至 PVDF 膜上,交由军事医学科学院仪器中心进行蛋白 N 端测序。

### 1.7 体外细胞毒性实验

小鼠巨噬细胞 J774A.1 以 10<sup>5</sup>/mL 接种于 96 孔培养板,长至 90% 满,不同浓度的 rPA 与 rLF 加入细胞孔中,37℃ 孵育 3 h,加入 20 μL MTT (5 mg/mL),37℃ 孵育 30 min,吸取上清,每孔加入 100 μL 盐酸异丙醇,振荡溶解沉淀后测 OD<sub>540</sub>。结果取 3 个复孔的平均值。细胞存活率的计算:(加重组蛋白孔 OD<sub>540</sub> 值/未加蛋白孔 OD<sub>540</sub> 值) × 100%。

### 1.8 抗血清制备

用纯化的 rPA 免疫健康的家兔 (2 kg),采用背部皮下分点注射,免疫时间为第 0、3、6 周,第 4、8 周采血。免疫剂量为 0.5 mg/只/次,首次免疫使用完全弗氏佐剂,后二次使用不完全弗氏佐剂。

用 ELISA 测定抗血清中抗 rPA 抗体的滴度。rPA 以 2 μg/mL 包被酶联板,4℃ 过夜,次日用 2% BSA 37℃ 封闭 1 h,洗板后加入梯度稀释的抗血清

37℃ 孵育 1 h,洗板后加入 1:20000 稀释的 HRP 标记羊抗兔 IgG (Sigma) 37℃ 孵育 1 h,洗板后显色,酶标仪测 OD<sub>450</sub>。

### 1.9 细胞毒性中和试验

将梯度稀释的抗血清与 1 μg/mL 或 5 μg/mL rPA 37℃ 孵育 1 h,再与 1 μg/mL rLF 一起加入 J774A.1 细胞培养孔中,37℃ 孵育 3 h 后加入 MTT,检测细胞存活率。

## 2 结果

### 2.1 表达质粒的构建

将 PA 基因片段插入 pAS20 载体,获得了表达质粒 pAS-PA (图 1)。pAS20 为分泌型的原核表达载体,在多克隆位点前融合了大肠杆菌外膜蛋白 A (Omp A) 的信号序列,可携带外源蛋白进入大肠杆菌周质腔。由于该载体上 Omp A 信号序列切割位点后的 3 个氨基酸与 PA 前 3 个氨基酸相同,而多克隆位点从第 4 个氨基酸处开始,因此将 PA 基因从第 4 个密码子开始插入载体,这样得到的表达质粒包含完整的 PA 编码区 (2208bp, 编码 435aa),并且重组蛋白在分泌过程中切去信号序列后与天然 PA 序列可完全一致 (图 2)。经测序证实,获得的表达质粒 pAS-PA 序列与设计一致。

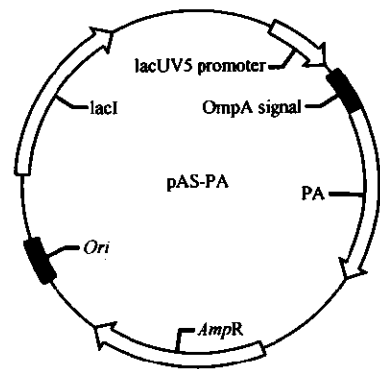


图 1 表达质粒 pAS-PA 示意图

Fig.1 Expression plasmid pAS-PA

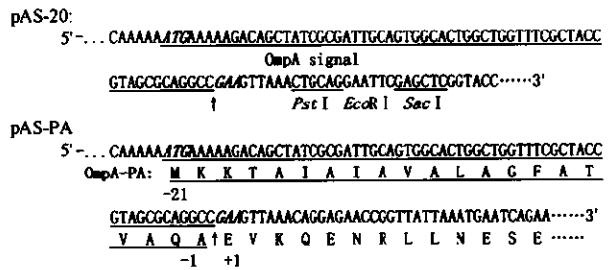


图 2 表达质粒 pAS-PA 的构建

Fig.2 Construction of expression plasmid pAS-PA

### 2.2 rPA 的表达

工程菌株在 28℃ 用 0.5 mmol/L IPTG 诱导 5h, 获得 rPA 的表达, 表达量约占菌体总蛋白的 10%。分别收集外周质蛋白和细胞质蛋白进行电泳分析, 发现 rPA 主要位于外周质中, 约占外周质蛋白的 60%。分子量约 83 kD, 与预期相符(图 3)。

### 2.3 rPA 的纯化和鉴定

rPA 等电点约 5.6, 我们选择用阴离子交换介质进行初步纯化。含 rPA 的细菌外周质先用 Q

Sepharose 进行快速粗纯, 再用 Source 30Q 离子交换柱梯度洗脱后, rPA 纯度可达 80% 以上。根据 rPA 的疏水性, 我们用 phenyl sepharose 进行下一步纯化, 最后经 Superdex 200 柱凝胶过滤, 蛋白纯度可达 95% 以上, SDS-PAGE 在 83kD 处显示为单一条带, Western blot 分析进一步证实重组蛋白为 rPA(图 3)。

将重组蛋白进行 N 端测序, 结果前 5 个氨基酸为 EVKQE..., 与天然 PA 一致, 表明信号序列已被正确切去。1 L 培养物经纯化后可获得约 15 mg rPA。

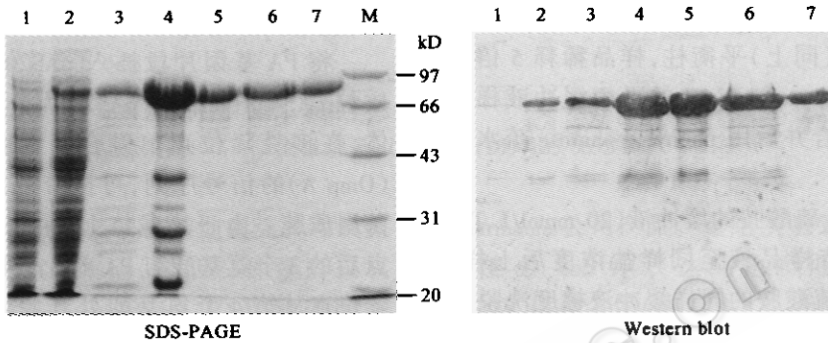


图 3 重组 PA 的表达与纯化  
Fig.3 Expression and purification of rPA

1: uninduced cells; 2: cells induced with IPTG; 3: periplasmic profile of cells expressing rPA; 4: protein after passing through Q Sepharose column; 5: rPA after purification on Source 30Q column; 6: rPA after purification on phenyl Sepharose column; 7: rPA after passing through Superdex 200 column; M: molecular weight marker

### 2.4 体外细胞毒性试验

PA 与 LF 结合称为致死毒素 (lethal toxin, LT), 在体外可导致敏感细胞 (如小鼠巨噬细胞 J774A.1) 的死亡<sup>[6]</sup>。本试验将不同浓度的 rPA 与 rLF 一起作用于 J774A.1 细胞, 用 MTT 法观察细胞存活率。结果显示, 当固定 rPA 与 rLF 其中的一种, 增加另一种蛋白的浓度时, 细胞存活率明显下降; 而只加入 rPA 或 rLF 的细胞孔无明显变化(图 4)。当 rLF 为 1 μg/mL, 可导致 50% 细胞死亡的 rPA 浓度 (EC<sub>50</sub>) 为 0.08 μg/mL; 当 rPA 为 1 μg/mL, rLF 的 EC<sub>50</sub> 为 0.03 μg/mL。以上结果表明 rPA 在体外有较好的生物学活性。

### 2.5 抗血清滴度

用 rPA 免疫健康家兔, 免疫 4 周后 (2 次) 血清中抗 rPA 抗体滴度达 1 × 10<sup>6</sup>, 免疫 8 周后 (3 次) 抗体滴度达 2 × 10<sup>6</sup>, 表明 rPA 具有良好的免疫原性。

### 2.6 细胞毒性中和试验

天然 PA 可诱发机体的保护性免疫, 产生的中和性抗体可在体外使细胞免受致死毒素的作用<sup>[7]</sup>。我们用 rPA 免疫家兔获得的抗血清进行细胞毒性中和试验, 结果显示当抗血清以 1:10 000 稀释时, 就能明显抑制 1 μg/mL 的 rPA 与 rLF 对细胞的毒性作

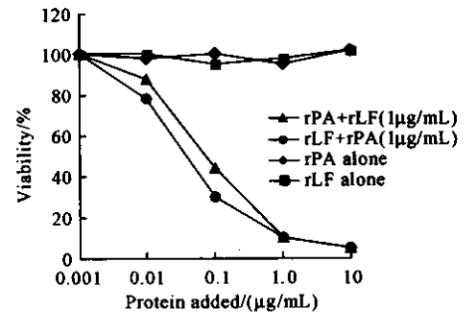


图 4 rPA 与 rLF 对 J774A.1 细胞的毒性作用  
Fig.4 Cytotoxicity produced in J774A.1 cells by rPA and rLF

用, 1:1000 稀释时细胞存活率在 90% 以上(图 5), 表明我们获得的 rPA 与天然 PA 一样, 可诱导机体产生对炭疽致死毒素 (LT) 的保护性免疫。

## 3 讨论

接种炭疽疫苗是预防炭疽的有效手段。目前世界上人用炭疽疫苗主要有二种: 炭疽活芽孢苗和 PA 吸附苗 (AVA)。前者由炭疽杆菌减毒株活芽孢制成, 仅在我国和俄罗斯等少数国家使用; 后者是用 Al(OH)<sub>3</sub> 吸附炭疽杆菌减毒株培养物的无菌上清制成, 主要在欧美国家使用。

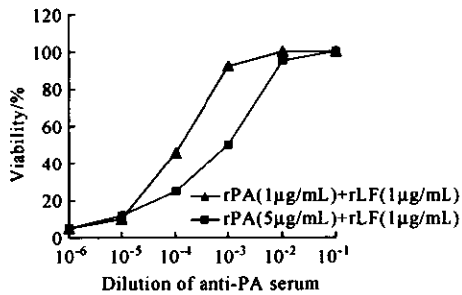


图5 抗PA血清对炭疽致死毒素细胞毒性的抑制作用

Fig.5 Inhibition of LT cytotoxicity by anti-PA serum

上述两种疫苗虽被证明对预防炭疽有效,但都存在一些缺点和不足。芽孢苗需划痕接种,操作较难掌握;副反应大;对呼吸道感染保护效果欠佳;并且由于使用的是活芽孢,在欧美国家禁止人用。AVA成分复杂,存在一些副作用;生产设施安全性要求高;免疫程序繁琐,需18个月内免疫6针,其后每年还需加强免疫一次。为了提高炭疽疫苗的有效性、安全性,减少副作用及免疫次数,目前各国都在大力发展新型疫苗。其中基于重组PA的基因工程疫苗最受关注<sup>[3,4]</sup>。动物实验显示,与AVA相比,重组PA疫苗达到有效免疫所需的免疫次数及免疫引起的副作用均较少<sup>[8,9]</sup>,有可能在短期内投入使用<sup>[5]</sup>。

本实验中,我们成功地在大肠杆菌中实现了rPA的分泌型表达。其优点是一方面使rPA以可溶形式表达保持其正确构象;另一方面防止rPA被胞内蛋白酶降解。在对表达和纯化条件进行初步优化

后,每升培养物可获得约15 mg纯化的rPA,蛋白N端测序表明rPA序列与天然PA完全一致。体外细胞毒性试验显示rPA具有较好的生物学活性。用rPA免疫家兔产生的抗血清在体外可抑制炭疽致死毒素的活性,表明rPA可诱导机体产生保护性免疫。以上结果为发展新一代炭疽疫苗打下基础。

## REFERENCES(参考文献)

- [1] Swanson-Biearman B, Krenzelok EP. Delayed life-threatening reaction to anthrax vaccine. *J Toxicol Clin Toxicol*, 2001, 39(1): 81-84
- [2] Demicheli V, Rivetti D, Deeks JJ *et al*. The effectiveness and safety of vaccines against human anthrax: a systematic review. *Vaccine*, 1998, 16(9-10): 880-884
- [3] Baillie L. The development of new vaccines against *Bacillus anthracis*. *J Appl Microbiol*, 2001, 91:609-613
- [4] Leppla SH. Development of an improved vaccine for anthrax. *J Clin Invest*, 2002, 110(2):141-144
- [5] Enserink M, Marshall Eliot. New anthrax vaccine gets a green light. *Science*, 2002, 296:639-640
- [6] Singh Y, Leppla SH, Bhatnagar R *et al*. Internalization and processing of lethal toxin by toxin-sensitive and -resistant cells. *J Biol Chem*, 1989, 264(19):11099-11102
- [7] Kobiler D, Gozes Y, Rosenberg H *et al*. Efficiency of protection of guinea pigs against infection with *Bacillus anthracis* spores by passive immunization. *Infect Immun*, 2002, 70(2):544-550
- [8] Ivins BE, Pitt ML, Fellows PF *et al*. Comparative efficacy of experimental anthrax vaccine candidates against inhalation anthrax in rhesus macaques. *Vaccine*, 1998, 16: 1141-1148
- [9] Singh Y, Ivins BE, Leppla SH *et al*. Study of immunization against anthrax with the purified recombinant protective antigen of *Bacillus anthracis*. *Infect Immun*, 1998, 66: 3447-3448

## Expression, Purification and Characterization of the Recombinant Anthrax Protective Antigen

XU Jun-Jie DONG Da-Yong SONG Xiao-Hong GE Meng LI Guan-Lin FU Ling  
ZHUANG Han-Lan CHEN Wei\*

(Institute of Microbiology and Epidemiology, Beijing 100071, China)

**Abstract** An expression plasmid carrying anthrax protective antigen (PA) gene was constructed, which has an OmpA signal sequence attached to the 5' end of PA gene. The plasmid was transformed into *E. coli* and induced to express recombinant PA (rPA). The recombinant protein, about 10% of the total bacterial protein in volume, was secreted to the periplasmic space of the cell. After a purification procedure including ion-exchange, hydrophobic interaction chromatography, and gel filtration, about 15 mg of 95% pure rPA was obtained from 1-liter culture. The bioactivity of rPA was proved by *in vitro* cytotoxicity assay. The polyclonal antiserum from rabbits immunized with rPA could inhibit the action of anthrax lethal toxin *in vitro*, which suggests that antibodies against rPA can provide high passive protection against anthrax. The results reported here may be helpful to develop a safe and efficacious recombinant PA vaccine against anthrax.

**Key words** *Bacillus anthracis*, anthrax toxin, protective antigen, expression, purification

Received: 02-26-2004

This work was supported by the national high technology research and development program of China (863 Program) (No. 2003AA002004).

\* Corresponding author. Tel: 86-10-66948565; Fax: 86-10-63815273; E-mail: cw789661@yahoo.com