

出血性大肠杆菌 O157 基因缺失疫苗株的构建及其免疫

Construction and Immunization of a Attenuated Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157

刘 军, 孙 洋, 冯书章*

LIU Jun, SUN Yang and FENG Shu-Zhang*

军事医学科学院军事兽医研究所, 长春 130062

Institute of Animal Science, The Academy of Military Medical Science, Changchun 130062, China

摘 要 出血性大肠杆菌 O157 感染是重要的新发食物源性传染病, 主要致病特征之一是能引起人肠上皮细胞特征性的 A/E 损伤, A/E 损伤主要是由 LEE 致病岛所编码的毒力因子所引起, *ler* 是 LEE 致病岛毒力基因群的中心调节基因, 对 LEE 致病岛所编码的毒力因子有正调控作用。O157:H7 另一个毒力因子是由整合到染色体上的原噬菌体编码的 Stx 毒素。以 O157:H7 86-24 为始发菌株, 利用自杀性质粒 pCVD442 和同源重组的原理构建了 O157:H7 的 *ler* 基因缺失突变菌株(缺失了 *ler* 基因中第 73-351 位的碱基, 共 279bp), 并利用噬菌体消除技术筛选到消除了编码 Stx 的原噬菌体 DNA 的菌株, 构建出了 O157:H7 *ler/stx* 基因缺失突变弱毒菌株, 并对该菌株的 Vero 细胞毒性、小鼠模型的安全性以及乳鼠的被动免疫保护作用进行了研究。结果表明, O157:H7 *ler/stx* 基因缺失突变菌株丧失了对 Vero 细胞的毒性作用, 并丧失了对实验小鼠的致病性, 具有良好的安全性。乳鼠被动免疫保护性实验表明, 用该菌株免疫母鼠后, 乳鼠通过吮吸母乳可以获得良好的被动免疫保护作用。因此本研究所构建的 O157:H7 *ler/stx* 基因缺失突变弱毒菌株可作为预防 EHEC O157:H7 感染的疫苗候选株, 为最终研究制出 O157 的基因工程菌苗奠定基础。

关键词 出血性大肠杆菌 O157, 基因缺失突变, 免疫接种, 弱毒疫苗

中图分类号 Q754 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)02-0211-07

Abstract Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7 is an important pathogen. One of the important virulence traits of EHEC O157:H7 is the capacity to produce attaching and effacing (A/E) lesions on enterocyte. This property encoded by a pathogenicity island termed the locus of enterocyte effacement (LEE). LEE contains *ler* (LEE-encoded regulator) gene. The product of *ler* is a central up-regulator of many virulence genes of the LEE. Another important virulence factor of EHEC O157:H7 is Shiga toxin (Stx), encoded by a prophage integrated into the chromosome of O157:H7. In order to obtain an attenuated vaccine candidate, a *ler* deletion mutant of O157:H7 was constructed by use of suicide vector pCVD442. Meanwhile, due to potential instability of the prophage carrying the *stx* gene, the prophage was cured with serial passages of bacteria and confirmed by PCR and DNA sequencing. A *ler/stx* deletion mutant of EHEC O157:H7 was constructed, termed as O157:H7(Δ *ler*/ Δ *stx*). The cultural supernatant of O157 *ler/stx* deletion mutant was inoculated in vero cell culture, and the result indicating that O157 *ler/stx* deletion mutant lost the toxigenicity to vero cell. Test group and control group of mice were orogstrically inoculated with the O157 *ler/stx* deletion mutant and the virulent strain O157:H7 EDL933, respectively. Mice were observed daily for clinical

Received: September 28, 2006; Accepted: November 20, 2006.

This work was supported by the grant from National Natural Sciences Foundation of China (No. 30270985).

* Corresponding author. E-mail: shuzhangf@yahoo.com

国家自然科学基金资助(No. 30270985).

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

signs and weight changes. After inoculation of the deletion mutant, test group of mice (inoculated with O157:H7($\Delta ler/\Delta stx$)) gained weight normally and experienced no clinical signs. In contrast, control group of mice (inoculated with O157:H7) exhibited weight loss and all died in four days. In another experiment, pregnant mice were orally vaccinated by O157:H7($\Delta ler/\Delta stx$) twice at interval of 14 days. Subsequently, the suckling mice were orally challenged with O157:H7 EDL933 at 7 days of age. The results showed that 78.34% of the suckling mice born by vaccinated mice were survival and 12.73% of the suckling mice born by non-vaccinated mice were survival. This study demonstrated that O157 *ler/stx* deletion mutant lost the toxigenicity to vero cell and to be safety to mice. Oral immunization can induce specific immune responses, and this mutant strain could be used as an attenuated vaccine candidate against EHEC O157.

Key words EHEC O157, deletion mutant, immunization, attenuated vaccine

出血性大肠杆菌(Enterohemorrhagic *E. coli*, EHEC)O157:H7感染是一种新发的食物源性传染病,是一个世界性的公共卫生问题。O157:H7感染主要引起婴幼儿腹泻、出血性结肠炎(HC)和溶血性尿路综合症(HUS)。近十多年来,EHEC O157:H7感染在日本、美国、英国、加拿大、澳大利亚等国屡有暴发,尤其是在1996年5~8月间,日本发生了大肠杆菌O157:H7感染引起的出血性肠炎流行,有9000余人受到感染,近10个府县都有发病。我国自1986年徐州首次报道以来,福建、甘肃、浙江、安徽等省市先后自人畜以及其它动物中分离出O157:H7大肠杆菌。江苏和安徽于2001年发生了EHEC O157:H7感染性腹泻暴发流行,患者超过2万例,死亡177例,由此可见,我国也受到此病的威胁。从O157:H7的世界流行情况来看,如日本、美国等都是先散发病例,继而小规模爆发,然后可发生流行,因此我们应该对O157:H7感染有足够的认识和警惕。

近年来,对O157:H7毒力基因的结构、功能及其调节基因的作用研究取得了突破性进展。已经完成了两个O157:H7分离株的全基因组测序工作。研究表明O157:H7的主要毒力因子包括两部分,一部分是染色体上的肠细胞脱落位点(The locus of enterocyte effacement,LEE)致病岛编码的毒力因子群,LEE致病岛编码的毒力因子是引起肠粘膜粘附与脱落(attaching and effacing,A/E)损伤所必需的。

ler(LEE-encoded regulator)基因位于LEE致病岛内^[1],其编码产物Ler是LEE致病岛的转录活化因子,可以激活LEE致病岛毒力因子的表达^[2]。通过对肠致病性大肠杆菌的研究表明,*ler*基因的缺失可导致细菌毒力大大降低^[3]。O157:H7另一个主要的毒力因子是志贺毒素(Shiga toxin,Stx)^[4]。Stx是由整合到细菌染色体上的一段原噬菌体DNA编码^[5]。本研究以野生型O157:H7 86-24为始发菌株,利用自杀性质粒和同源重组的原理,敲除LEE致病岛的正调控基因*ler*,并利用原噬菌体消除技术消除编码Stx毒素的原噬菌体DNA,目的是构建EHEC O157:H7的*ler/stx*基因缺失突变菌株,并对该突变菌株的致病性和免疫原性进行研究,探讨这种突变菌株作为疫苗的可能性,为最终研究制出EHEC O157的基因工程菌苗奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

本研究所使用的寡核苷酸引物和质粒与菌株分别见表1和表2所示。Vero细胞由本室保存,限制性核酸内切酶、T4 DNA连接酶、Ex Taq DNA聚合酶、DL2000 DNA Marker购自大连TaKaRa公司,萘啶酮酸(Nalidixic acid, Nal)购自Sigma公司,丝裂霉素C(Mitomycin C)购自Roche公司。本研究用小鼠均为昆明鼠,购自卫生部长春生物制品研究所。

表1 本研究所使用的寡核苷酸引物
Table 1 Primers used in this study

Primers	Sequences(5'-3')	Location in the genome of EDL933
Primer f	gagctctttcgccgaatg	4620823-4620834
Primer g	ctctataagctgaatga	4620104-4620121
Primer h	tacattcagcttatagaggacactgaagaagaa	4619810-4619824
Primer i	tctagattacgagtagaac	4619084-4619096
Primer d	ttaactaatggaaa	4620448-4620462
Boed 751	agttcagttatcgttatcgtt	4619755-4619766

表 2 本研究所使用的质粒和菌株
Table 2 Plasmids and strains used in this study

Plasmids and strains	Characteristics	Source
pCVD442	Suicide vector	CVD , University of Maryland
pCVD442 : Δler	A suicide vector with deleted <i>ler</i> gene	This study
O157 :H7 EDL933	Wild type , virulence strain	CVD , University of Maryland
O157 :H7 86-24	Wild type , <i>stx1</i> ⁻	CVD , University of Maryland
SM10	A host cell of suicide vector.	CVD , University of Maryland
SM10(pCVD442 : Δler)	SM10 carrying the recombination suicide vector	This study
O157 :H7 86-24 (pCVD442 : Δler)	O157 :H7 carrying the recombination suicide vector	This study
O157 :H7 ($\Delta ler/\Delta stx$)	<i>ler/stx</i> deletion mutant of EHEC O157 :H7 86-24	This study

1.2 重组自杀性质粒 pCVD442 : Δler 的构建

根据 EHEC O157 :H7 染色体上 *ler* 基因及两侧序列 ,设计两对引物 :Primer f、Primer g 和 Primer h、Primer i。通过 PCR 扩增出中间缺失 279bp 的 *ler* 缺失基因片段 Δler (缺失了 *ler* 基因中第 73-351 位的碱基 ,共 279bp) ,将之克隆到自杀性质粒 pCVD442 中 ,构建重组自杀性质粒 pCVD442 : Δler 。将重组质粒转化到大肠杆菌感受态细胞 SM10 中 ,构建重组菌株 SM10(pCVD442 : Δler)。

1.3 O157 :H7 菌株萘啶酮酸抗性的诱导

将 O157 :H7 86-24 菌株分别在含有从低到高不同浓度萘啶酮酸的 LB 中进行培养 ,至萘啶酮酸的终浓度为 50 μ g/mL ,即诱导出具有萘啶酮酸抗性的菌株 ,命名为 O157 :H7 (Nal^R)。

1.4 重组自杀性质粒的接合转移

自杀性质粒可通过接合 (conjugation) 在不同菌株间直接转移 ,将受体菌 O157 :H7 86-24 (Nal^R) 和供体菌 SM10(pCVD442 : Δler) 分别在 LB 中过夜培养 ,然后取这两个菌株的过夜培养物混匀 ,过滤 ,细菌被收集在滤膜上。将滤膜置于无抗性的 LB 琼脂平板培养过夜。然后收集滤膜上的细菌 ,倍比稀释后涂布于 LB 琼脂平板 (内含 Amp 100 μ g/mL , Nal 50 μ g/mL) 。重组自杀质粒可在这两个菌株之间通过接合而从供体菌转移到受体菌 ,利用抗性标志筛选既具有萘啶酮酸抗性又具有氨苄青霉素抗性的菌株 ,即可能是目的重组菌株 O157 :H7 86-24 (pCVD442 : Δler)。由于目的重组菌株基因组上有一个完整的 *ler* 基因 ,质粒上有一个缺失了 279bp 的 *ler* 基因 ,因此通过 PCR 扩增 *ler* 基因进一步鉴定 ,应能扩增出两条带。

1.5 O157 :H7 86-24 *ler* 基因缺失菌株的筛选与鉴定

重组菌株 O157 :H7 86-24 (pCVD442 : Δler) 中含有一个重组自杀性质粒 pCVD442 : Δler ,由于该质

粒中有一个缺失了 279bp 的 *ler* 基因片段 ,该片段与 O157 :H7 基因组中 *ler* 基因两端的序列完全相同 ,这两个片段可通过同源重组发生交换 ,即重组菌株 O157 :H7 86-24 (pCVD442 : Δler) 基因组中完整的 *ler* 基因片段与质粒 pCVD442 : Δler 中的缺失了 279bp 的 *ler* 基因片段发生交换。由于自杀性质粒在 O157 :H7 菌中不稳定 ,容易丢失 ,且带有自杀性质粒的 O157 :H7 细菌在含蔗糖的平板上不能生长。因此可利用含蔗糖的平板筛选发生了同源重组并丢失了重组自杀性质粒的菌株即目的菌株 O157 :H7 86-24 *ler* 基因缺失突变菌株。

具体操作程序 :将重组菌株 O157 :H7 86-24 (pCVD442 : Δler) 于 LB 中过夜培养。培养物 10 倍梯度稀释后涂布于含 5% 蔗糖和 50 μ g/mL 萘啶酮酸的 LB 琼脂平板 ,29 $^{\circ}$ C 培养过夜。用含蔗糖和萘啶酮酸以及氨苄青霉素和萘啶酮酸的琼脂平板进行筛选 ,并对筛选出的菌株通过 PCR 扩增 *ler* 基因进行鉴定 ,筛选只能扩增出一个缺失了 279bp 的 *ler* 基因的菌株 ,该菌株即是发生了同源重组且丢失了重组自杀质粒的目的菌株 O157 86-24 *ler* 基因缺失突变菌株。用引物 Boed751 和 Primer d 扩增该菌株的 *ler* 基因片段 ,纯化回收 PCR 产物 ,进行序列分析 ,进一步确认目的菌株 O157 86-24 *ler* 基因缺失突变菌株的基因缺失突变。

1.6 O157 :H7 86-24 *ler/stx* 基因缺失突变菌株的筛选与鉴定

由于编码 Stx 毒素的原噬菌体本身具有潜在的不稳定性 ,因此将 O157 :H7 86-24 *ler* 基因缺失突变菌株在 LB 中进行传代培养 ,并用丝裂霉素进行诱导 ,用 PCR 筛选消除了编码 Stx2 原噬菌体序列的菌株 ,该菌株也就不能编码志贺毒素 ,即 O157 :H7 ($\Delta ler/\Delta stx$)。根据 GenBank 报道的 O157 :H7 基因组中编码志贺毒素的两个原噬菌体 DNA 序列及其旁侧序列设计引物 ,通过 PCR 和序列分析对 O157 :H7

($\Delta ler/\Delta stx$)菌株中编码志贺毒素的原噬菌体 DNA 序列消除进一步鉴定。

1.7 O157:H7($\Delta ler/\Delta stx$)菌株对 Vero 细胞毒性分析

将强毒株 O157:H7 EDL933、O157:H7($\Delta ler/\Delta stx$)和对照菌株 DH5 α 接种到 LB 中培养过夜,培养上清过滤除菌。将这 3 株细菌的滤液按 $10 \times$ 梯度稀释,将原液及各稀释度的滤液分别取 $10 \mu\text{L}$ 加入到培养好的 Vero 细胞孔中(每孔的细菌培养上清原液加入量范围为 $10 \sim 10^{-6} \mu\text{L}$),继续培养 72h。按文献报道改进方法^[6],倒掉培养液,用 PBS 轻轻冲洗 3 次,在各孔中分别加入 $100 \mu\text{L}$ 结晶紫染色液,常温下作用 10min,倒掉染色液,流水轻轻冲洗,甩干,加入脱色液(33% 醋酸溶液),于 570nm 波长下用酶标仪测定吸光度值。以未加细菌培养上清的细胞孔作为阴性对照,计算细菌培养上清滤液对细胞的抑制率。计算公式为:抑制率 = (阴性对照组 OD 值 - 实验组 OD 值) / 阴性对照组 OD 值 $\times 100\%$ 。重复实验 3 次,对结果进行比较,观察 O157:H7($\Delta ler/\Delta stx$)培养上清对 Vero 细胞的毒性情况。

1.8 O157:H7($\Delta ler/\Delta stx$)菌株对小鼠模型的安全性分析

离乳昆明小鼠(约 10g 左右)随机分为 3 组,每组 6 只。首先对所有小鼠按 2.5mg/kg 体重腹腔注射丝裂霉素 C,以增加小鼠对 O157:H7 的敏感性。第 1 组小鼠灌胃接种 O157:H7($\Delta ler/\Delta stx$),第 2 组小鼠灌胃接种野生型强毒株 O157:H7 EDL933,接种剂量均为 4×10^9 CFU/只,第 3 组小鼠以相同体积的生理盐水灌胃作为阴性对照。观察小鼠生长情况,并对实验小鼠进行组织切片镜检分析。

1.9 特异性抗体及抗体消长规律检测

成年昆明母鼠(平均体重约 28g)分为 2 组,每组 6 只。一组用 O157:H7($\Delta ler/\Delta stx$)经灌胃接种免疫 2 次,免疫剂量为 10^{10} CFU/只,免疫间隔为 2 周,另一组用相同剂量的生理盐水以相同方式灌胃,作为对照组。第 2 次灌胃后 14d、30d、60d、90d 分别采集血液和粪便样品。以 O157:H7 菌体超声波裂解后作为包被用抗原,用 ELISA 的方法检测血液和粪便样品中的 IgG 和 IgA 水平。

1.10 O157:H7($\Delta ler/\Delta stx$)菌株的被动免疫保护性实验

成年昆明母鼠(平均体重约 28g)分为 2 组,第 1 组 30 只,用 O157:H7($\Delta ler/\Delta stx$)经灌胃接种免疫,免疫剂量为 10^{10} CFU/只,7d 后与公鼠混养交配,再过

7d 后加强免疫,第 2 组 20 只,与第 1 组相同的方式用生理盐水灌胃后作为对照组。母鼠所生的乳鼠,可通过正常吸吮母乳获得母源抗体。利用 O157:H7 EDL933 强毒株对 7 日龄的乳鼠进行灌胃攻毒,攻毒剂量为 4.6×10^8 CFU/只,观察并记录乳鼠生长情况,评价被动免疫效果。

2 结果

2.1 重组自杀性质粒 pCVD442: Δler 的构建

将中间缺失了 279bp 的 *ler* 缺失基因片段与自杀性质粒 pCVD442 连接,转化到 SM10,从重组菌株中提取质粒,进行 *Sac* I / *Xba* I 双酶切鉴定,并用引物 Boed 751/Primer d 进行 PCR 鉴定,酶切产物和 PCR 鉴定产物电泳,结果与预期的大小一致(图 1),证实重组菌株 SM10(pCVD442: Δler)构建正确。

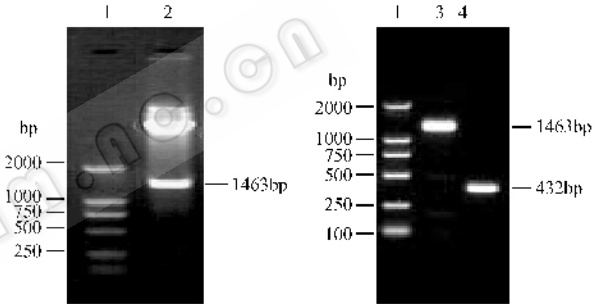


图 1 重组自杀性质粒 pCVD442: Δler 的酶切鉴定和 PCR 鉴定

Fig. 1 Restriction enzyme digestion and PCR identification of pCVD442: Δler

1: DL2000 DNA marker; 2: pCVD442: Δler digested by *Sac* I / *Xba* I; 3: PCR amplification by primer f/primer I; 4: PCR amplification by Primer d/Boed 751.

2.2 O157:H7 86-24 *ler/stx* 基因缺失突变菌株的构建与鉴定

重组自杀质粒的供体菌 SM10(pCVD442: Δler)与受体菌 O157:H7 86-24(Nal^R)进行接合转导,转导后的菌株即 O157:H7 86-24(pCVD442: Δler)。将该菌株培养以后,用蔗糖筛选 Nal^R 、 Amp^S 的菌株进行 PCR 鉴定,挑选只能扩增出一条 Δler 片段的菌株(图 2)此菌株即 O157:H7 86-24 *ler* 基因缺失突变菌株。对该菌株的 *ler* 基因进行序列比较分析,结果证实所构建菌株的 *ler* 基因缺失了 279bp。

将 O157:H7 86-24 *ler* 基因缺失突变菌株在 LB 中传代培养以后,通过 PCR 筛选消除了编码 *Stx2* 的原噬菌体 DNA 的菌株,序列分析证实所构建的菌株已消除了带有编码志贺毒素基因的原噬菌体 DNA 序列,该菌株即 O157:H7 86-24 *ler/stx* 基因缺失突

变菌株,命名为 O157:H7($\Delta ler/\Delta stx$)。

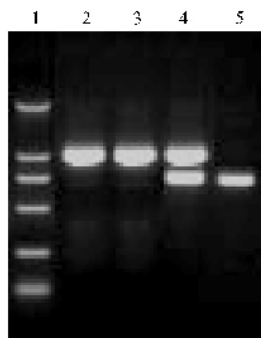


图 2 O157:H7 野生株及突变株的 *ler* 基因鉴定

Fig. 2 Identification of *ler* gene from wildtype

O157:H7 or mutants

1: DL2000 DNA marker; 2: *ler* gene from O157:H7 86-24; 3: *ler* gene from O157:H7 86-24 (Nal^R); 4: *ler* gene from O157:H7 86-24 ($pCVD442:\Delta ler$); 5: *ler* gene from O157:H7 86-24 *ler* gene deletion mutant.

2.3 O157:H7($\Delta ler/\Delta stx$) 培养上清对 Vero 细胞毒性分析

Vero 细胞加入 O157:H7 野生株及基因缺失突变株培养上清过滤液 72h 后,按实验所述方法测量计算不同细菌各个稀释度对 Vero 细胞生长的影响,结果见图 3 所示。野生株 O157:H7 EDL933 有很强的 Vero 细胞毒性作用,镜检可见细胞变圆、脱落、死亡,加入 $10^{-3} \sim 10^{-4} \mu L$ EDL933 菌株的培养上清滤液即可抑制约 50% 的细胞生长。而 O157:H7($\Delta ler/\Delta stx$) 与 DH5 α 的培养上清滤液对 Vero 细胞的生长无影响,证实 O157:H7($\Delta ler/\Delta stx$) 对 Vero 细胞无毒性作用。

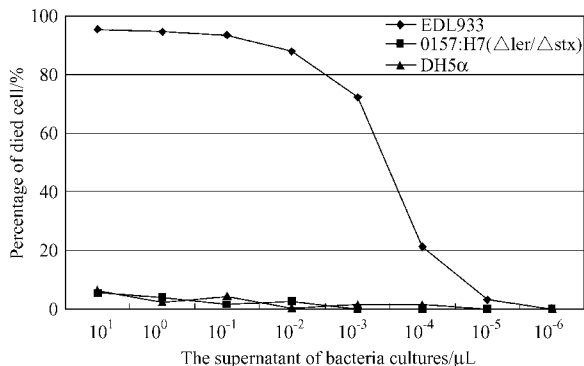


图 3 O157:H7 及其突变体对 Vero 细胞的毒性实验

Fig. 3 The toxigenicity of O157:H7 and its *ler/stx* deletion mutant culture supernatants to Vero cell

2.4 O157:H7($\Delta ler/\Delta stx$) 菌株对小鼠模型的安全性

接种 O157:H7($\Delta ler/\Delta stx$) 的实验组小鼠生长正常,无可见临床症状,体重变化与用生理盐水灌胃的阴性对照组小鼠一致(图 4);接种野生型强毒株

O157:H7 EDL933 的对照组小鼠体重减轻,4 天内 6 只小鼠全部死亡。组织病理学镜检结果见图 5 所示。接种强毒株的对照组小鼠肝细胞紊乱,失去肝小叶固有结构,肝细胞内含有粉红色颗粒,呈重度颗粒变性,部分肝细胞肿胀如气球,肝细胞核悬浮于中央或一侧,呈重度的水泡变性(气球样变);肠组织呈卡他性肠炎,杯状细胞增多,肠腔内有炎性分泌物,固有层轻度出血和水肿。而实验组小鼠各脏器未见明显组织病理学变化。证实 O157:H7($\Delta ler/\Delta stx$) 对实验小鼠丧失了致病性,具有良好的安全性。

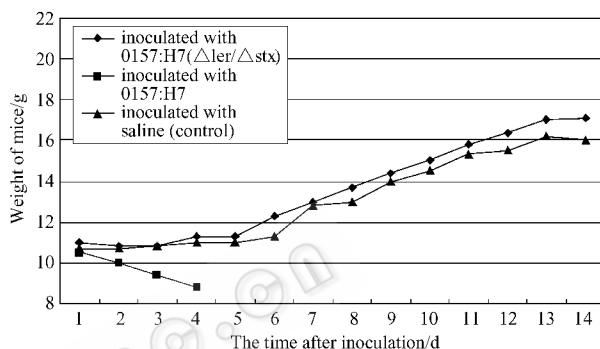


图 4 小鼠安全性实验体重曲线

Fig. 4 The weight curves of mice inoculated with bacteria cultures

2.5 免疫鼠血清和粪便特异性抗体及抗体消长规律结果

二次免疫后第 14 天,采集免疫组和对照组的粪便和血清样品,用 ELISA 检测其中的 IgG 和 IgA 水平,结果见表 3 所示。粪便中 IgA 水平较高,血清中 IgG 水平较高。

二次免疫后第 14、30、60、90 天分别采集免疫鼠的血液和粪便样品,ELISA 检测其 IgG 和 IgA 消长规律,结果见图 6 所示。粪便中 IgA 和血清中 IgG 水平在免疫后第 14 天最高,然后逐渐下降,但直到 90d 后仍能从粪便和血液中检测到相应抗体。

以上两个实验证实 O157:H7($\Delta ler/\Delta stx$) 能够有效激发机体系统免疫和粘膜免疫应答,并且抗体的分泌能够持续较长时间。

2.6 菌株 O157:H7($\Delta ler/\Delta stx$) 免疫母鼠后对乳鼠的被动免疫保护性实验

用 O157:H7 EDL933 强毒株对 7 日龄乳鼠攻毒后 3~6 天内陆续出现死亡。O157:H7($\Delta ler/\Delta stx$) 菌株免疫母鼠所生乳鼠 217 只,死亡 47 只,乳鼠存活率为 78.34%;未免疫对照组母鼠所生乳鼠 165 只,死亡 144 只,乳鼠存活率为 12.73%。说明 O157:H7($\Delta ler/\Delta stx$) 菌株免疫母鼠后,乳鼠通过吸

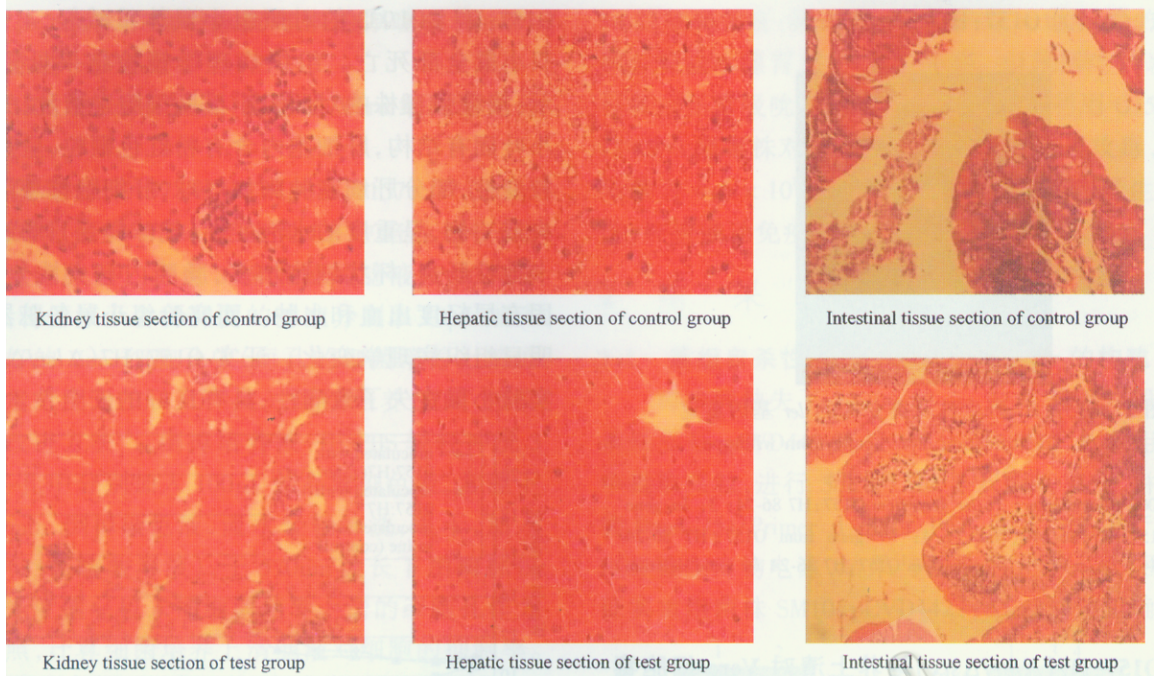


图5 对照组(接种 O157:H7 EDL933)和实验组(接种 O157:H7 $\Delta ler/\Delta stx$)小鼠组织病理学变化
Fig. 5 Mice tissue pathological lesions of control group (experimentally inoculated with O157:H7 EDL933) and test group (experimentally inoculated with O157:H7 $\Delta ler/\Delta stx$)

吮母乳而获得了良好的被动免疫保护作用。

表3 免疫后第14天免疫组和对照组抗体应答水平 ELISA 结果比较(492nm OD 值 $x \pm s$)

Table 3 The comparison of OD values by ELISA detecting IgA and IgG at 14 days after immunization (OD 492nm $x \pm s$)

Groups	IgA		IgG	
	Fecal	Serum	Fecal	Serum
Immune group	1.931 \pm 0.336	0.872 \pm 0.195	0.742 \pm 0.228	2.779 \pm 0.217
Control group	0.365 \pm 0.162	0.244 \pm 0.071	0.194 \pm 0.017	0.25 \pm 0.042

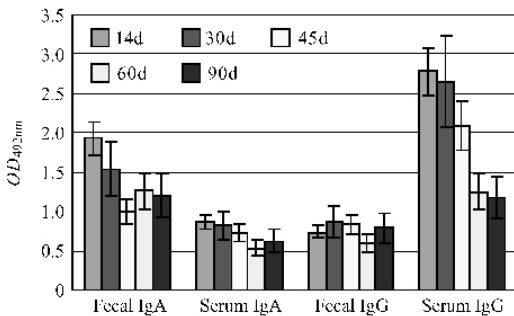


图6 免疫鼠抗体消长 ELISA 测定结果

Fig. 6 The results of ELISA assay for detecting flowing values of IgA and IgG

3 讨论

肠出血性大肠杆菌 O157:H7 感染是一种新发食物源性传染病。对 O157 的感染不建议使用抗生素治疗,因为使用抗生素治疗至少会引起三方面的不良后果(1)可能导致耐药菌株的产生(2)会引起

肠道菌群失调(3)会引起菌体裂解,从而导致志贺毒素(*Stx*)的大量释放,引起更为严重的后果。因此对 O157 的感染应以预防为主。目前正在研究中的疫苗主要是针对 O157:H7 的 LPS、紧密素(Intimin)或志贺毒素 B 亚基(*StxB*)等组分构建的亚单位疫苗,但目前临床上还缺乏有效的 O157 疫苗。阻碍 O157 疫苗研究的因素主要有两个方面,一方面是由于常用的实验动物对 O157:H7 都不易感,还没有一个合适的动物模型来对构建的 O157 疫苗进行免疫学评价;另一方面尽管 O157:H7 的 LPS、紧密素或志贺毒素 B 亚基等组分虽都具有一定的免疫原性,但其免疫保护效果都不够理想^[7]。因此本研究的目的是通过基因工程的方法,敲除 O157:H7 的毒力编码基因或毒力基因的调节基因,以构建一个 O157:H7 基因缺失突变弱毒疫苗菌株。

EHEC O157:H7 最重要的致病特征之一是肠上皮细胞特征性的 A/E 损伤。研究发现编码 A/E 损

伤的所有基因都位于染色体上的 LEE 致病岛内。Elliott 等的研究结果表明 *ler* 基因对 EPEC 和 EHEC 中 LEE 致病岛毒力因子的表达具有正调控作用^[8,9], *ler* 是 EPEC 和 EHEC 毒力因子表达的中心调节基因。冯书章等通过实验敲除 EPEC O103 和 RDEC-1 两个菌株的 *ler* 基因,成功构建了免致病性大肠杆菌基因工程菌苗,结果表明细菌的 *ler* 基因缺失突变可导致细菌致病性的丧失,但保留细菌的免疫原性^[10,11]。这为本研究提供了研究方案和技术路线。

本研究所使用的自杀性质粒 pCVD442,带有 R6K 复制起始位点, *sacB* 基因和 RP4 基因, R6K 是依赖于 π 蛋白的复制起始位点,本实验所使用的自杀质粒宿主菌 SM10 能够表达 π 蛋白,因此 pCVD442 可以在 SM10 中复制; *sacB* 基因编码果聚糖蔗糖酶,含有 *sacB* 基因的革兰氏阴性菌在含 5% 蔗糖的培养基上不能生长,这就提供了一种筛选质粒丢失菌株的方法; RP4 能够诱导细菌接合(conjugation)而发生质粒在细菌间直接转移。本研究利用基因组特定基因定点敲除技术,为基因缺失突变弱毒菌株的构建提供了技术支持。

本研究以 O157:H7 86-24 菌株为始发菌株,利用上述自杀性质粒技术敲除了 O157:H7 的 *ler* 基因,继而利用噬菌体消除技术消除了细菌基因组中的原噬菌体序列^[12],从而成功构建出 O157:H7 *ler/stx* 基因缺失突变菌株。*ler* 基因是 LEE 致病岛毒力基因群的正调控基因, *stx* 是编码志贺毒素的基因,这两个基因的缺失将导致 O157:H7 的致病性大大降低。研究表明 O157:H7 *ler/stx* 基因缺失突变菌株仍可在小鼠肠道内定居一定时间(该数据另文发表),细菌的一些表面抗原、LPS 以及其它分泌性蛋白抗原可刺激机体产生有效的免疫应答反应,阻止野生型 O157:H7 感染后在机体内的定居,从而达到预防 O157:H7 感染的目的。

本研究对 O157:H7 *ler/stx* 基因缺失突变菌株的细胞毒性、致病性和免疫原性进行了研究,探讨 *ler* 和 *stx* 基因缺失对细菌致病性的影响,以及这种突变菌株作为疫苗的可能性。结果表明 O157:H7 *ler/stx* 基因缺失突变菌株丧失了对 Vero 细胞的细胞毒性作用,并丧失了对实验小鼠的致病性,具有良好的安全性。乳鼠被动免疫保护性实验表明,该菌株免疫母鼠后,乳鼠通过吸吮母乳可以获得良好的被动免疫保护作用。因此本研究所构建的 O157:H7

ler/stx 基因缺失突变弱毒菌株有可能作为预防 EHEC O157 感染的基因工程弱毒疫苗候选株,为最终研究制出 EHEC O157 的基因工程菌苗奠定基础。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Elliott SJ, Wainwright LA, McDaniel TK, et al. The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. *Mol Microbiol*, 1998, **28**(1):1-4.
- [2] Ogierman MA, Paton AW and Paton JC. Up-regulation of both intimin and eae-independent adherence of Shiga toxicogenic *Escherichia coli* O157 by *ler* and phenotypic impact of a naturally occurring *ler* mutation. *Infect Immun*, 2000, **68**(9):5344-5353.
- [3] Feng SZ (冯书章), Boedeker EC, Zhu CR, et al. Construction and immunization of a *ler* deletion mutant of REPEC O103. *Chinese Journal of Zoonoses* (中国人兽共患病杂志), 2003, **19**(2):5-9.
- [4] Perna NT, Mayhew GF, Elliott S, et al. Molecular evolution of a pathogenicity island from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun*, 1998, **66**(8):3810-3817.
- [5] Bertin P, Benhabiles N, Krin E, et al. The structural and functional organization of H-NS-like proteins is evolutionarily conserved in gram-negative bacteria. *Mol Microbiol*, 1999, **31**:319-329.
- [6] Gillies RJ, Dider N, Denton M. Determination of cell number in monolayer cultures. *Analytical Biochemistry*, 1986, **159**(1):109-113.
- [7] Nataro JP and Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*, 1998, **11**(1):142-201.
- [8] Elliott SJ, Sperandio V, Giron JA, et al. The locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator controls expression of both LEE- and non-LEE-encoded virulence factors in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun*, 2000, **68**(11):6615-6126.
- [9] Frankel G, Phillips AD, Rosenshine I, et al. Enteropathogenic and enterohaerorrhagic *E. coli*: more subversive elements. *Mol Microbiol*, 1998, **30**:911-921.
- [10] Zhu CR, Agin TS, Elliott SJ, et al. Complete nucleotide sequence and analysis of the locus of enterocyte effacement from rabbit diarrheagenic *Escherichia coli* RDEC-1. *Infect Immun*, 2001, **69**(4):2107-2115.
- [11] Zhu CR, Feng SZ, Thate TE, et al. Towards a vaccine for attaching/effacing *Escherichia coli*: a LEE encoded regulator (*ler*) mutant of rabbit enteropathogenic *Escherichia coli* is attenuated, immunogenic, and protects rabbits from lethal challenge with the wild-type virulent strain. *Vaccine*, 2006, **24**(18):3845-3855.
- [12] Liu J (刘军), Feng SZ (冯书章), Sun Y (孙洋), et al. Identification and analysis of prophage curing mutant of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Chinese Journal of Zoonoses* (中国人兽共患病杂志), 2005, **12**(1):45-48.