

## 编码霍乱弧菌脂多糖O-抗原的基因 克隆及其保护作用的研究

刘延清 张树波 高庆申

(中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所, 北京)

经研究证明, 霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) 的脂多糖 (LPS) O-抗原-群特异性抗原是该菌的抗菌免疫中主要的保护性抗原, 其保护作用与用V.C全菌免疫所产生的保护作用接近。因此克隆编码该抗原的基因, 对构建霍乱弧菌工程菌苗有重要意义。以我国分离的V.C小川型霍乱弧菌79005为出发菌株, COS-装配质粒 pHC79 为载体, 大肠杆菌K-12 DH1为受体菌, 进行克隆。79005 染色体DNA按Meade的方法制备, pHC79 质粒DNA的制备按碱法裂解后氯化铯超离心方法。包装蛋白用U.PRIEFER方法制备, 79005染色体DNA用Sau 3A部分酶切, 获得40kb大小的片段。pHC79用 BamHI 完全消化后, 去磷酸化, 按分子比1:5混合, 4℃过夜连接。按U.PRIEFER方法包装到Lambda噬菌体中, 转染DH1在含氨苄青霉素LB平板上获得2000个克隆子。随机取15个克隆子, 快提质粒, 电泳检测分子量在35—55kb之间。用兔抗V.C 79004 全菌血清以酶免疫斑点法 Immun blot assay 筛选重组子, 有40株阳性反应, 用抗LPS O-抗原A的单克隆抗体检测有一株阳性。玻片凝集: 抗V.C LPS A抗原因子的McAb及抗小川型特异性单价血清均发生良好凝集, 而在稻叶型单价血清没有凝集, 用 Western blot 检查, 所获得的重组子含有编码 V.C LPS A及B抗原因子。试管凝集试验结果对重组子与对 V.C 的效价相同, 说明编码 V.C LPS 的基因在 DH1 株中得到良好的表达, 表达的 LPS 量与V.C大致相似。用重组

子免疫家兔制备血清, 该血清对重组子的凝集效价为 1:12800, 对受体菌DH1:为1:1600, 对V.C 79005株为1:3200, 对稻叶型V.C 805为1:1600。以上结果表明重组子表达的 LPS O-抗原具有良好的免疫原性。此克隆子编号 P795-1, 用碱法提取质粒分析, 其分子量为 30 Mdolton 45 kb, 用 Hind III、Pst I、EcoR I、Puv I、Puv II、Sma I、Ava I、Acc I、Hinc II 和Cla I 完全消化产生 8—12个片段, 用Sac I、Hpa I、Sal I、Kpn I、BamH I 和EcoR I 可产生5—7个片段, 切点较少, 正在进行次级克隆和酶谱分析工作。

保护性实验: 用杀弧菌试验及乳鼠保护试验测定P795-1免疫血清的被动保护作用, 并与 V.C 小川型免疫血清的保护作用进行比较。结果以 V.C 79005 (小川型) 和V.C 805 (稻叶型) 指示菌时, 重组子 P795-1 免疫血清的杀弧菌抗体滴度分别为1:32768和1:3192, V.C 小川型全菌免疫血清对 V.C 79005 的杀弧菌抗体滴度为 1:6400; 乳鼠保护试验, 以79005和805株为攻击菌时, 重组子免疫血清的滴度分别为6181和4455。PD50单位与 V.C 小川型免疫血清滴度相近。

以上结果表明, 所获得的编码V.C LPS O-抗原基因在大肠杆菌 DH1有高效表达。该重组子用作免疫原时, 其保护作用接近V.C全菌的保护作用, 说明获得的重组子 P795-1 适用于进一步构建霍乱基因工程菌苗的菌株。

本文于1988年10月7日收到。