

预防幼畜腹泻双价工程菌苗株的构建及表达

钟 声* 李丰生 芮贤良
吕学洗* 王庆元* 黄培堂

(军事医学科学院生物工程研究所, 北京)
(佳木斯医学院生物教研室, 佳木斯)*

Bam HI部分酶切表达K99抗原的重组质粒pMGK99, 将其与相同酶切的含有F41菌毛基因的片段相连接, 构建了载有两种抗原基因的质粒pMG611。通过转化大肠杆菌K12HB101、RRI和C600, 得到HB101(pMG611)、RR1(pMG611)和C600(pMG611)菌株。经甘露糖抗性血凝试验、玻片凝集试验和Western blot分析证明K99和F41两种菌毛抗原在每株菌中均获表达。SDS-PAGE结果表明所表达K99和F41菌毛亚单位的分子量与其各自野生株所产生的相同, 分别是17200和29800Da, ELISA测定HB101(pMG611)菌株表达K99和F41菌毛抗原的水平与相应出发菌株相同, 而高于其野生株。本实验对质粒pMG611表达K99和F41菌毛抗原的影响因素也进行了研究。

关键词 双价菌苗株; K99菌毛; F41菌毛

毒素源性大肠杆菌(ETEC)引起的牛、羊、猪等新生幼畜发生的急性腹泻, 是幼畜死亡的重要病因之一。近年来免疫预防该病的发生得到人们的重视, 已有纯化菌毛抗原和活疫苗作为免疫制剂应用成功的报道^[1,2]。引起犊牛及羔羊腹泻的ETEC病原菌其致病因子为粘附因子K99、F41和肠毒素。其中K99和F41为致病的首要因素, K99和F41菌毛抗原又具有较强的免疫原性, 刺激宿主所产生的抗体能够有效抑制携带有K99和F41的ETEC病原菌定居, 从而达到预防该病发生的目的。

本实验将K99和F41抗原的基因重组于一个质粒上, 得到能够同时表达两种抗原的菌株, 从而可望成为预防牛、羊等动物幼畜腹泻的双价疫苗候选株。

材料方法

(一) 菌株与质粒

实验中所用的菌株及其主要特性列于

表1。其中HB101(pMGK99)、HB101(pMGF41)为实验室所存, 是本实验出发菌株。

(二) 培养基及其他试剂

菌株培养采用LB肉汤和LB平板。DNA操作所用工具酶购自华美生物工程有限公司。放射性同位素(α -³²P)dATP购自Amersham公司。随机引物为西德Boehringer公司产品。DAB为Sigma公司产品。其余试剂为国产分析纯试剂。HRP酶标SPA为兰州生物制品研究所产品。HRP酶标K99、F41的IgG为本室程度胜同志和中国兽药监察所陈惠珠教授惠赠。

(三) DNA重组及细菌转化

DNA一般操作技术参照《分子克隆》标准方法^[3]进行。由于本实验构建的质粒较大, 为提高其转化率, 细菌转化采用Cohen等人的方法^[4]。

(四) 抗原表达的测定

本文于1990年10月25日收到。

1. 抗甘露糖血凝试验MRHA: 将用KTM缓冲液洗过的新鲜羊、豚鼠红细胞悬成1%(v/v)的悬浮液,取此液以KTM缓冲液洗过并悬成OD_{500nm}为0.5,将菌液在血凝板上倍比稀释。4℃静置4h后观察结果。(KTM缓冲液为NaCl 7.5g, KCl 0.38g, MgSO₄·7H₂O 0.404g, CaCl₂·2H₂O 0.404g, 甘露糖5g, 溶于1L 0.01 mol/L Tris-HCl, pH7.4)。

2. 玻片凝集法: 参考文献〔5〕进行, 样品为LB固体培养的菌落。

3. ELISA方法: 参考文献〔5〕进行。样品的准备: 将细菌在液体培养基上培养18h, 用0.01mol/L磷酸缓冲液, 0.01% Tween80 (pH7.4)悬浮菌体, 使其

表 1 实验所用菌株及主要特征

Table 1 Strains and their phenotypes

菌株 Strains	表型 Phenotype	来源 Source
HB101		Lab. store
RRI		Lab. store
C600		Lab. store
JM83		Lab. store
<i>E. coli</i> 83549	H-LT ⁺ ST ⁺	Lab. store
<i>E. coli</i> 83919	0101:K30 F41 ⁺ :H-ST ⁺	Lab. store
HB101(pMGK99)	K99 ⁺ Ap ⁺ Cm ^r	Lab. construction
HB101(pMGK41)	F41 ⁺ Ap ^r	Lab. construction

表 2 HB101(pMG611)K99和F41菌毛表达水平与出发菌株及野生株的比较

Table 2 Comparison of K99 and F41 fimbriae expression level of HB101(pMG611) with its parental strains and wild strain

菌株 Strains	最高阳性滴度 The highest positive titer	
	K99 fimbriae	F41 fimbriae
HB101(pMG611)	2 ⁸	2 ⁸
HB101(pMGK99)	2 ⁸	—
HB101(pMGF41)	—	2 ⁸
<i>E. coli</i> 83919	—	2 ⁶

OD_{500nm} 值为 0.25。超声破碎后测定抗原。

4. SDS-PAGE 电泳和 Western

blot分析: SDS-PAGE 电泳参照Oaks方法〔6〕。样本全细胞裂解物处理按Hale方法进行〔7〕。蛋白电泳电转移, 利用Bio-Rad电转移装置。转移电泳液采用25 mmol/L Tris, 192mmol/L甘氨酸 pH 8.2, 20%甲醇, 0.1% SDS。转移条件是30V转移12h。免疫显色主要过程为: 转移后的硝酸纤维素膜用封闭液(0.05mol/L Tris-HCl pH7.4, 0.5mol/L NaCl, 3% BSA)室温封闭40min。适当稀释度的抗血清(1:100)室温结合6h, (稀释液为0.01 mol/L Tris-HCl pH7.4, 0.5mol/L NaCl, 0.5% Tween 200, 0.5% BSA)。用洗液0.01mol/L Tris-HCl, pH7.4, 0.5 mol/L NaCl, 0.5% Tween 20洗3次, 每次洗4min, HRP酶标SPA用稀释液1:60稀释。洗3次, 每次4min。放入底物液(0.05mol/L Tris-HCl, 0.5mol/L NaCl, 0.05% DAB), 用前加入10μl过氧化氢, 显色大约10min, 2mol/L H₂SO₄终止反应, 然后清水漂洗。

(五) 肠结扎试验测定肠毒性

取家兔一只(2kg左右), 乙醚麻醉后, 手术打开腹腔, 在回肠部位双线结扎8段肠段, 注入待测样品, 缝合并保持家兔术后存活18h以上, 观察结果。

结果与讨论

(一) 质粒pMG611的构建

采用碱变性方法提取 pMGK99 质粒并经BamHI部分酶切, 回收 BamHI 单酶切片段。pMGF41 质粒经 BamHI 完全酶切, 回收含F41基因的大片段。用T4连接酶连接这两个片段, 取连接物转化HB101受体菌, 在含氨基青霉素和氯霉素的平板上涂布、过夜。转化子以(α-³²P)dATP 随机引物法标记的 pMGF41 BamHI大片段为

探针, 原位杂交筛选转化子, 得到 7 株杂交阳性菌株。用同一探针进行 DNA 点杂交进一步鉴定, 其中只有一株阳性。抽提杂交阳性的重组质粒 DNA, 琼脂糖凝胶电泳结果表明其分子量较大。将该质粒定名为 pMG611。用 BamHI 酶切质粒 pMG611 在琼脂糖凝胶电泳上出现 3 条带, 其中两条与亲本 pMG99 BamHI 位置一致, 第三条与 pMGF41 BamHI 大片段位置相同。其 Southern blot 分析证明第三条带与 F41 大片段同源(图版 I-1 所示)。为确定片段的插入位置和方向, 选择了 HindIII 单酶切, 及 HindIII 加 BamHI 双酶切重组质粒 pMG611。HindIII 单酶切出现 1kb 和 27kb 两个片段; HindIII 加 BamHI 双酶切出现 4 个片段, 仍出现 1kb 的片段, 另在 pMG611 BamHI 最小的片段前出现一条带, 另外两条带位置与 pMG611 BamHI 两条较大片段的位置一致。质粒 pMG611 的构建过程和其结构如图 1 所示。

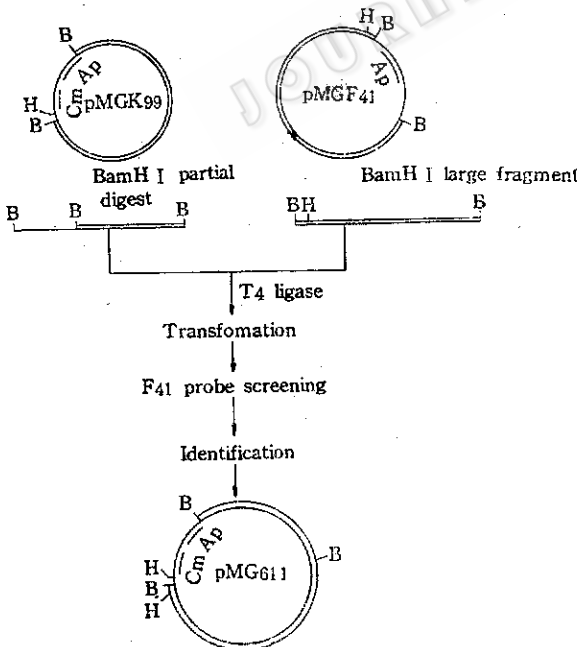


图 1 重组质粒 pMG611 的构建

Fig.1 Scheme for construction of recombination plasmid pMG611

(二) K99和F41菌毛抗原的表达

1. 玻片凝集试验: 用质粒 pMG611 转化受体菌 HB101、RRI 和 C600, 得到 HB101(pMG611)、RRI(pMG611) 和 C600(pMG611)。将 3 个菌株平板培养 18h, 做玻片凝集实验, 结果表明 3 株细菌均能与 K99 和 F41 抗血清发生凝集反应。这表明 3 株细菌均能同时表达 K99 和 F41 两种菌毛抗原, 并可以认为表达的 K99 和 F41 抗原位于细菌表面。

2. 甘露糖抗性血凝试验 (MRHA): MRHA 能够证实 II 型菌毛的存在。K99 能够使羊红细胞凝集而不能使豚鼠红细胞凝集。F41 既能够使羊又能使豚鼠红细胞凝集。为检验 II 型菌毛的存在及观察细菌是否获得了产生 F41 菌毛抗原的能力, 进行了甘露糖血凝试验。将 HB101(pMG611) 在 LB 肉汤中培养 18h, 悬浮于 KTM 缓冲液中, 调整 OD_{550nm} 值为 0.5。在 U 血凝板上倍比稀释。4℃, 4h 后可见 HB101 (pMG611) 能使羊及豚鼠红细胞凝集, 羊细胞最高阳性稀释倍数是 16 倍, 豚鼠红细胞是 64 倍, 如图版 I-2 所示。这表明双价菌株产生的 K99 和 F41 菌毛抗原具有 II 型菌毛的特性, 双价菌株也获得了表达 F41 抗原的特性。

3. 双价菌株 K99 和 F41 菌毛抗原的表达水平: 为了比较双价菌株和出发菌株 K99 和 F41 菌毛抗原的表达水平, 以及探索影响双价菌株表达的各种因素, 我们将菌株 HB101(pBR325)(对照)、HB101(pMG611)、HB101(pMGK99)、HB101(pMGF41)、*E. coli* 83919(F41 野生株) 37℃ 振荡培养 18h, 用 0.01mol/L PBS, 0.01% Tween80 洗菌, 重新悬浮细胞, 使其 OD_{550nm} 值为 0.25, 超声破碎后, ELISA 测定, 结果如表 2。

通过 ELISA 方法我们还对影响双价

菌株K99和F41抗原表达的因素进行了研究。结果显示K99和F41两种抗原在HB101和RRI中较在C600中表达水平高;在Minca和玉米浆培养基中较在LB培养基中表达水平高。丙氨酸对K99和F41抗原有明显抑制作用。K99和F41两种抗原表达的最适温度是37℃,在温度为42℃和25℃时,菌毛抗原的表达受到严重抑制(详细结果另文发表)。由此看来双价菌株的K99和F41抗原表达特性与各自野生菌株的表达特性相似^[8-10],这说明调控K99和F41抗原表达的元件在重组质粒上。玉米浆培养基是表达K99和F41抗原的良好培养基,其成本是极其低廉的,故在大量培养时可以使用以降低成本。HB101(pMG611)和RRI(pMG611)表达K99和F41两种抗原的水平较高,可选做菌苗株。

4. SDS-PAGE和Western blot分析:为了分析双价菌株产生的菌毛抗原的性质,我们取野生K99和F41菌毛抗原、HB101(pMG611)菌体和标准分子量蛋白一起经样本缓冲液处理后做SDS-PAGE。结果显示菌体泳道上K99和F41野生抗原对应位置的带并不十分明显,估计其所含K99和F41抗原的量占菌体总蛋白的极少部分。

Western blot分析结果如图版I-3。结果显示双价菌株HB101(pMG611)产生的K99和F41抗原分子量与野生菌产生的K99和F41抗原的分子量完全相同。与标准分子量蛋白电泳迁移率比较,计算K99和F41菌毛亚单位分子量分别是17200和

29800Da。菌体泳道上除K99或F41抗原位置出现阳性深染带之外,无杂带出现。这说明重组双价菌株产生的K99和F41抗原之间无交叉免疫反应出现。

(三) 肠结扎试验

为了排除双价菌株可能出现的肠毒性,我们对HB101(pMG611)和RRI(pMG611)做了肠结扎试验以观察其生物毒性。将OD_{600nm}值为1的细菌悬液(约含菌10⁵/ml)超声破碎,与对照一起各取0.5ml注入结扎的肠管内,18h后观察结果,如图版I-4所示。可见LB培养基和RRI及JM83所在肠段无积液和淤血,*E. coli* 83549和*E. coli* 83919分别出现积液和淤血,而HB101(pMG611)和RRI(pMG611)所在肠段无积液或淤血出现。这表明双价菌株HB101(pMG611)和RRI(pMG611)无肠毒性。

从上述结果中可以看出,重组双价菌能够有效地同时表达K99和F41两种菌毛抗原,菌毛抗原的位置在菌体表面。K99和F41两种菌毛抗原在双价菌株中的表达性质与其各自在野生株中表达性质相似,这可能有利于双价菌株适应外界环境。重组双价菌产生的K99和F41抗原在亚单位分子量、血凝性质以及免疫学性质方面均与野生型的相似。肠结扎试验证明HB101(pMG611)和RRI(pMG611)无肠毒性。所以我们认为建成的HB101(pMG611)和RRI(pMG611)菌株,可作为预防幼畜大肠杆菌腹泻工程菌苗的候选株。

参 考 文 献

- [1] Klemm, P.: *Reviews of Infectious Disease*, 7:321, 1985.
- [2] 陈添弥等: *中国科学(B辑)*, (12):1281, 1989.
- [3] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y., 1982.
- [4] Cohen, S. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. US.*, 69:2110, 1984.
- [5] 杜平等: *医用实用病毒学*, 人民军医出版社, 北京, 1985.

- [6] Oaks, E. V. et al.: *Infect Immun.*, 53:57,1986.
[7] Hale, T. L. et al.: *Infect Immun.*, 50:620,1985.
[8] Guinee, P. A. M. et al.: *Infect. Immun.*, 23:700,1979.
[9] Frits, de Graaf et al.: *Infect. Immun.*, 27:216,1980.
[10] Frits, de Graaf et al.: *Infect. Immun.*, 30:125,1980.

Construction and Expression of Divalent Vaccine Strain for the Prevention of Baby Animal Diarrhea

Zhong Sheng* Li Fengsheng Rui Xianliang Lu Xuexian*

Wang Qingyuan* Huang Peitang

(Molecular Genetics Center, Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing)

(Department of Biology, Jiamusi Medical College, Jiamusi)*

The F41 gene was isolated, and then inserted into K99 gene-carrying plasmid pMGK99 and was partially digested by the same enzyme BamHI. The transformants were screened by F41 gene probe that was labeled with (α - 32 P) dATP by random primer method. One of the positive transformants was tested by dot blot and Southern-blot assay. The results have shown that the recombinant plasmid carried K99 and F41 gene fragments. The recombinant plasmid was designated as pMG611. By transformation of *E. coli* K12 strains HB101, RRI and C600, we got three strains HB101(pMG611), RRI(pMG611) and C600(pMG611).

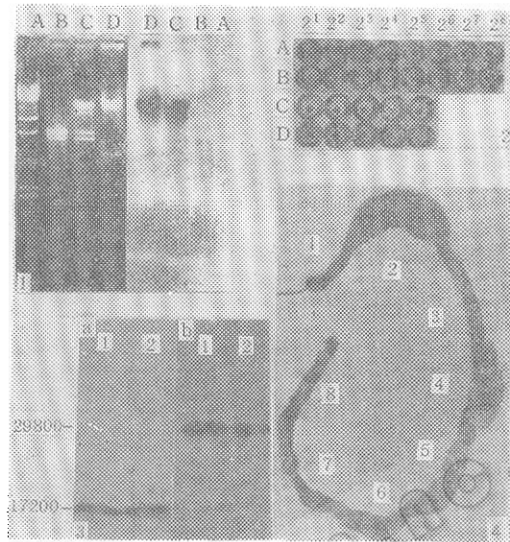
These strains can produce two kinds of antigens which were proved by using MRHA, slide agglutination and Western-blot assays. The molecular weight of K99 and F41 protein subunits were estimated by SDS-PAGE and they are the same as wild fimbriae subunits, 17200 and 29800 Da, respectively.

Double antibody sandwich ELISA was established for detecting the expression levels of both K99 and F41 antigens. The levels of K99 and F41 fimbriae expressed by HB101(pMG611) were higher than their corresponding parent strains. Expression conditions of both antigens were studied. The results of rabbit ileal loops test have indicated that HB101(pMG611) and RRI(pMG611) have no enterotoxigenicity.

We concluded that the recombinant vaccine strains can express both K99 and F41 antigens effectively and can be used for the vaccine candidate of the prevention of the neonatal animal diarrhea caused by ETEC,

Key words

Divalent vaccine strains; K99 fimbriae; F41 fimbriae



1. 重组质粒pMG611的Southern blot分析
Southern blot assay of recombinant plasmid pMG611
A. λ DNA + Hind III, B. pMGK99 + BamHI,
C. pMG611 + BamHI, D. pMGF41 + BamHI
2. HB101(pMG611)菌株的甘露糖抗性血凝试验
MRHA reaction of HB101(pMG611)strain
A, C. Sheep erythrocytes; B, D. Duinea pig erythrocytes;
C and D. Blank and negative control
3. 重组菌毛抗原K99和F41多克隆抗体Western blot分析
Western blot assay of recombinant fimbriae antigens with K99 and F41 polyclonal antibodies
3a. Treatment with K99 antiserum. 1. Wild K99 fimbriae;
2. HB101(pMG611)
3b. Treatment with F41 antiserum. 1. Wild F41 fimbriae;
2. HB101(pMG611)
4. 兔肠结扎试验
Test of ribbit ileal loops
1. LB; 2. *E. coli* 83549; 3. HB101(pMG611); 4. *E. coli* 83549;
5. *E. coli* 83919; 6. RRI(pMG611); 7. JM83; 8. RRI