

# 志贺氏福氏 5 型菌外膜蛋白 ipa BC 基因的高效表达及其免疫保护作用的研究

芮贤良 徐永强 苏国富 黄培堂  
李丰生 罗素英 黄翠芬

(军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100850)

本文从一次克隆重组质粒 pMG488 中酶切回收了 3.3kb 的 ipa BC 结构基因, 将它在不同的位点插入带有  $P_{\text{rPL}}$  启动子的载体 pBV220 中, 构建了两种高表达重组质粒 pMG501 及 pMG601。在大肠杆菌 DH5 $\alpha$  和无毒性福氏 5M90TA 菌中均获得了 b, c 多肽的高水平表达, 初步的小鼠免疫攻毒试验显示 b, c 多肽可能有一定的免疫保护作用。

**关键词** 志贺氏福氏 5 型菌; 外膜蛋白; 高效表达; 免疫保护

志贺氏痢疾杆菌是引起肠腹泻的主要病原菌之一, 至今对此仍无广谱有效的预防措施。早期的毒力遗传研究表明, 志贺氏菌致病有多种毒力因子参与, 它们的编码基因广泛分布在染色体和一个 120MDa—140MDa 的大质粒上<sup>[1-4]</sup>。志贺氏菌大质粒编码的毒力因子主要是外膜蛋白, 包括外膜蛋白 a、b、c、d 4 条多肽<sup>[5]</sup>, 它们与志贺氏菌最重要的侵袭毒力直接相关, 是菌体内 4 种最主要的蛋白质抗原, 其中 b、c 两条多肽的抗原性最强<sup>[6-9]</sup>。所有这些都提示这 4 条多肽, 尤其 b、c 多肽很可能与免疫保护作用有关。我们曾用柯斯质粒 pJB8 构建了福氏 5M90T 株大质粒的基因文库<sup>[10]</sup>, 并对外膜蛋白 b、c、d 多肽的编码基因进行 3 次克隆(文章在准备中)。本文在此基础上, 首次对外膜蛋白 ipa BC 基因进行了高效表达, 对其免疫保护作用也作了初步试验。

## 材料与方 法

### (一) 菌种与质粒

受体菌为大肠杆菌 DH5 $\alpha$  和无毒福氏

5M90TA 株(野生型菌福氏 5M90T 株丢失 140MDa 的大质粒); 攻毒菌用野生型福氏 5M90T 株<sup>[10]</sup>; 质粒 pMG488 包含 ipa BCD 编码基因, 为本室构建; 载体 pBV-220 含  $P_{\text{rPL}}$  串联启动子, 由中国预防医学科学院病毒研究所构建<sup>[11]</sup>。

### (二) 限制酶与主要试剂

限制酶、T4 DNA 连接酶、大片段 DNA 聚合酶、CIP 等分别购自美国 New England Biolabs 公司, 西德 Boehringer 公司以及华美生物技术公司; 酶标 SPA 为兰州生物制品研究所产品; 人恢复期抗血清由 302 医院提供, 为临床确诊病后一周左右采集的混合血清。

### (三) DNA 体外重组操作

质粒 DNA 的提取、转化、酶切以及 DNA 片段的末端填平, 连接等操作均按文献<sup>[12]</sup>方法进行。

### (四) 探针标记及菌落原位杂交

探针 DNA 片段经低融点琼脂糖回收后, 取大约 100ng 片段用 20 $\mu$  Ci 的  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-

本文于 1991 年 12 月 20 日收到。

dATP 进行随机引物法标记, 反应混合物变性后直接用于杂交。菌落原位杂交按文献[12]方法。

### (五) 重组质粒高效表达检测

1. 温度诱导表达及样品制备: 含重组质粒的转化细菌接种于 5ml LB 培养基中, 30℃ 振荡培养过夜, 按 20% 转种 50ml LB 培养基, 30℃ 继续培养 2h, 然后 42℃ 诱导 4—5h。收集菌体, 用预热的样品裂解液悬浮并煮沸 10min, 置 -20℃ 保存。

2. SDS-PAGE 及 Western-blotting: SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳参照 Oaks 方法<sup>[13]</sup>, 分离胶浓度为 14% (w/v), 电泳后用考马斯亮蓝染色, 薄层扫描确定各条带的含量。未经染色的样品胶通过电转移将蛋白质从凝胶中转印到硝酸纤维素膜上, 进行免疫杂交分析, 以人的恢复期混合血清作为第一抗体, 酶标 SPA 显色。

### (六) 小鼠免疫保护试验

雄性上海小鼠, 16—18g 随机分组, 每组 10 只。每次每只小鼠的腹腔免疫剂量约为  $5 \times 10^7$  菌, 生理盐水作对照组, 共免疫 4 次, 间隔时间为 3 天。末次免疫后 10 天用 2LD<sub>50</sub> 野生菌福氏 5M90T 进行腹腔攻毒, 观察小鼠存活情况。

## 结 果 与 讨 论

### (一) 高效表达重组质粒的构建及酶切分析

质粒 pMG488 为本室以前构建的一个次级克隆, 它是由 4.7kb Hind III 片段与载体 pBR325 重组而成, 包含 ipa BCD 基因, 能在大肠杆菌及无毒志贺氏菌中表达完整的 b、c 多肽, 但表达量不高, 未超过野生株水平, 因此要进行小鼠免疫保护试验首先必须提高 b、c 多肽的表达量。

质粒 pMG488 DNA 经 EcoRV 完全酶

解之后, 电泳可产生 3 个片段。回收中间的 3.3kb 片段, 根据文献报道的基因结构及我们的酶切图谱分析<sup>[14]</sup>, 这一片段应包含完整的 ipa BC 结构基因, 可置于不同的强启动子下进行表达。我们选用了高表达载体 pBV220, 在其 pUC8 多克隆位点上分别用限制酶 SmaI 和 EcoRI 切开, EcoRI 酶切产生的粘末端用 Klenow 大片段酶补平。将上述两种载体片段进行 CIP 处理后与回收的 3.3kb ipa BC 基因片段分别进行平端连接, 使外源 DNA 分别插入 pBV220 的 EcoRI 及 SmaI 位点。转化受体菌 DH5 $\alpha$ , 得到的转化子以 4.7kb Hind III 片段为探针分别进行菌落原位杂交筛选, 结果各获得 10 多个杂交阳性重组子。质粒快速提取和凝胶电泳显示杂交阳性质粒都比载体大, 说明都有片段插入。

片段插入的方向用 PstI 完全酶切鉴定, 两种重组质粒如为正向插入, 则都可产生 5.8kb 和 1.1kb 两个片段; 如为反向插入则产生 4.8kb 和 2.2kb 两个片段。酶切电泳的结果见图版 I-A。我们从两种重组质粒中各选出一个正向插入的重组质粒, 分别定名为 pMG501 (SmaI 位点插入) 和 pMG601 (EcoRI 位点插入)。这两个重组质粒的结构差别很小, 仅在 SD1 与 SD2 序列之间的距离各不相同 (见图 1)。同时构建这两种重组质粒是为了防止这种差别会影响到 ipa BC 基因的表达水平, 因为 SD 序列区是蛋白质翻译起始的重要调节元件之一<sup>[15]</sup>。

### (二) 重组质粒 pMG501 和 pMG601 的高效表达分析

由于载体 pBV220 除了带有很强的 P<sub>R</sub>P<sub>L</sub> 串联启动子外, 还具有温度敏感的抑制基因 CIts857, 这不仅增加了重组质粒的稳定性, 还使得我们所构建的高表达重组质粒 pMG501 及 pMG601 能转化不同

的受体菌进行温度诱导表达。图版 I -B 和 I -C 展示了它们在受体菌 DH5 $\alpha$  中的表达情况。重组菌 DH5 $\alpha$  (pMG501) 和 DH5 $\alpha$  (pMG601) 经温度诱导后在相当于 62kDa 和 43kDa 处均有两条较浓的蛋白带, 与受体菌 DH5 $\alpha$  以及重组菌自身在温度诱导前的蛋白电泳带有明显差别 (位置如箭头所示)。根据文献报道的结果, 这两条带与 b、c 多肽的分子量相符, 很可能就是我们所需表达的产物<sup>[6]</sup>。进一步对此进行 Western-blotting 分析, 以人的恢复期血清作为第一抗体, 用酶标 SPA 显色, 结果见图 I -D, 重组菌所表达的两条带都能被人的恢复期血清抗体特异地结合, 证明它们确实是 b、c 多肽, 抗原性没有明显改变。只是 c 带的显色稍淡, 似乎与表达量不符, 其原因可能在于抗血清。文献报道中所用的血清都是病后 2 周的人血清或猴血清<sup>[6]</sup>, 而我们所用的血清实际上都是病后一周内采集的, 也许此时 c 多肽

的抗体产生仍不高。我们用这些血清检测有毒力的野生型菌株时也同样发现 c 肽显色淡 (结果未展示)。

将这两个重组质粒分别转化受体菌 M90TA, 获得的转化子按相同的条件进行温度诱导、SDS-PAGE 及 Western-blotting 分析, 显示 b、c 多肽的表达产量、分子量以及抗原性与它们在 DH5 $\alpha$  中的情形基本上是一致的。

以上结果不仅说明了 P<sub>R</sub>P<sub>L</sub> 启动子是一个很强的诱导启动子, 它能够同时带动两个较大的结构基因在一个操纵子中都获得高水平表达; 而且证明了两个不同的高表达重组质粒在 SD 序列区的差别对其后 b、c 多肽基因的表达并没有多大影响。但是比较 b 多肽与 c 多肽在同一受体菌中的表达水平, 可以看出 c 多肽的表达比 b 多肽高 (分别约占细胞总蛋白的 15% 和 10%), 原因不十分清楚。推测一方面是因为在 c 结构基因前还有一个较弱的启动子存在<sup>[14]</sup>, 增加了部分 c 多肽的表达量; 另一方面 b 多肽可能有一部分被降解。按照文献报道, 温度诱导和大量的外源蛋白积累, 都有可能造成某些蛋白酶的合成增加, 从而使细胞内的蛋白质, 尤其外源蛋白质被降解或部分降解<sup>[16]</sup>。表现在本试验中, 重组菌除了 b、c 多肽与受体菌有明显差别外, 其他一些区带也有细微的不同之处; 另外在进行免疫杂交时, b、c 多肽之间还有一些模糊的条带被特异地显色 (图版 I -D), 也许这些条带就是 b 多肽的降解产物所致。

### (三) b、c 多肽的小鼠免疫保护作用观察

小鼠免疫攻毒试验是目前研究免疫保护作用最简便的动物模型。根据上述高效表达分析结果, 重组质粒 pMG501 和 pMG601 在受体菌 DH5 $\alpha$  以及福氏 5M90TA 中经简单的温度诱导后均可获得 b、c 多肽的高

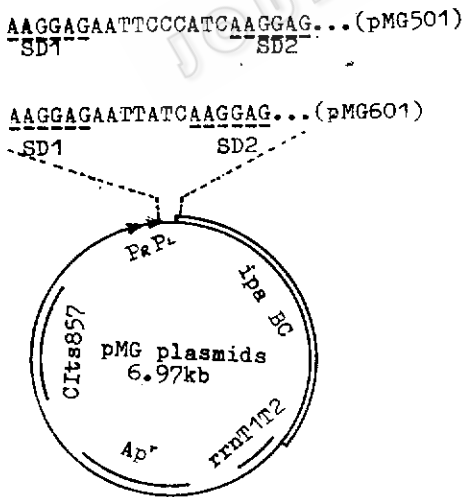


图 1 高表达重组质粒的结构

Fig.1 Structure of the high-level expression plasmids

SD1: Synthesized SD sequence of pBV220  
SD2: SD sequence of the ipaB gene

水平表达,因此足以采用全菌进行免疫。免疫时将小鼠随机分为6组,分别用M90TA (pMG601)活菌、M90TA (pMG601)死菌、M90TA活菌, DH5 $\alpha$ (pMG601)活菌以及DH5 $\alpha$ (pMG601)死菌进行腹腔免疫,生理盐水为对照组。攻毒菌采用野生型福氏5M90T株,攻毒菌量为2LD<sub>50</sub>( $5 \times 10^8$ 菌),结果见表1。M90TA(pMG601)活菌组,死菌组以及M90TA活菌组的保护率均为100%,三者没有差别,这是因为

它们都具有与攻毒菌相同的O抗原,而O抗原已被证实具有较强的型特异性免疫保护作用<sup>[17,18]</sup>,因此外膜蛋白b、c的保护作用被掩盖没有显示出来。但从另一组数据来看,DH5 $\alpha$ (pMG601)活菌组保护率为100%,死菌组保护率为80%;对照生理盐水死亡率为100%,说明b、c多肽确实很可能有一定的保护作用,且活菌免疫比死菌免疫效果更好。对此我们正进行更为深入的研究。

表 1 b、c多肽的小鼠免疫保护试验

Table 1 Immunoprotection test of peptide b and c in mice

Immunogen	Dose (CFU/per time)	Survival/total	Protection efficacy (%)
DH5 $\alpha$ (pMG601) (Live strain)	$5.6 \times 10^7$	10/10	100
DH5 $\alpha$ (pMG601) (Sonicated strain)	$5.5 \times 10^7$	8/10	80
M90TA(pMG601) (Live strain)	$5.0 \times 10^7$	10/10	100
M90TA(pMG601) (Sonicated strain)	$5.0 \times 10^7$	10/10	100
M90TA (Live strain)	$5.5 \times 10^7$	10/10	100
Physical saline	0.2ml	0/10	0

## 参 考 文 献

- [1] Labrec, E. H. et al.: *J. Bacteriol.*, 88:1503—1518, 1964.
- [2] Sansonetti, T. L. et al.: *Infect. Immun.*, 34:75—83, 1981.
- [3] Sansonetti, T. L. et al.: *Infect. Immun.*, 35:852—806, 1982.
- [4] Watanabe, H. et al.: *Infect. Immun.*, 48:260—262, 1985.
- [5] Hale, T.L. et al.: *Infect. Immun.*, 50:620—629, 1985.
- [6] Maurelli, A. T. et al.: *Infect. Immun.*, 49:164—171, 1985.
- [7] Kato, J. et al.: *Infect. Immun.*, 57:1391—1398, 1989.
- [8] Sasakawa, C. et al.: *Infect. Immun.*, 54:32—36, 1988.
- [9] Watanabe, H. et al.: *J. Bacteriol.*, 172:619—629, 1990.
- [10] 苏国富等:遗传学报, 16(4):305—311, 1989.
- [11] 张智清等:病毒学报, 6(2):111—116, 1990.
- [12] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Lab., 1982.
- [13] Oaks, E. V. et al.: *Infect. Immun.*, 53:57—63, 1986.
- [14] Venkatesan, M. M. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:9317—9321, 1988.
- [15] Bieker, K.L. et al.: *TIG*, 6:329—334, 1990.
- [16] 蔡仕英等:中国科学(B辑), 12:1284—1288, 1991.
- [17] Black, R. E. et al.: *J. Infect. Dis.*, 155:1260—1265, 1987.
- [18] Lindberg, A. A. et al.: *Vaccine*, 6:146—149, 1988.

## High Level Expression of ipaBC Gene from *Shigella flexneri* 5M90T and Investigating Their Immunoprotective Response in Mice

Rui Xianliang Xu Yongqiang Su Guofu Huang Peitang

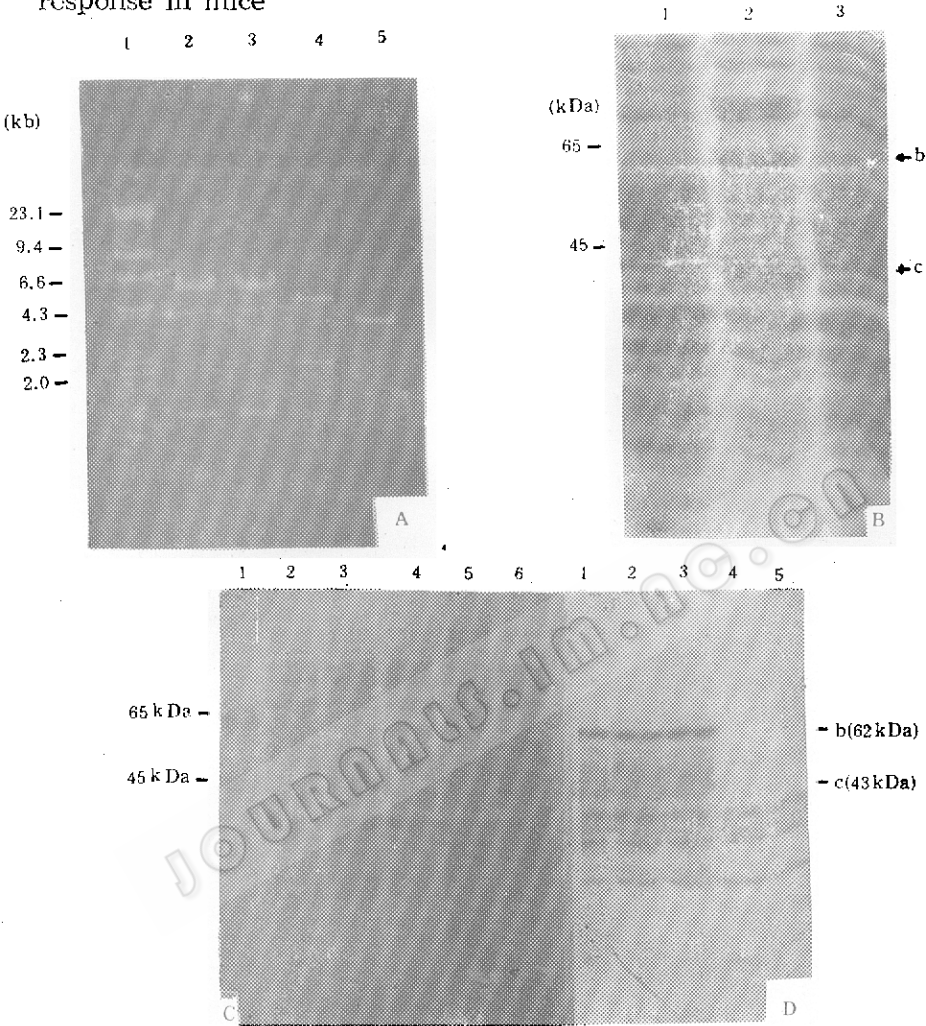
Li Fengsheng Luo Suying Huang Cuifen

(Institute of Biotechnology, Academy of Military Sciences, Beijing 100850)

In this report, we recovered the 3.3kb ipaBC structure gene fragment from a subclone plasmid pMG488 and inserted it into the EcoRI and SmaI cloning sites of high level expression vector pBV220, which made the expression of ipaBC gene under the control of P<sub>R</sub> P<sub>L</sub> tandem promoter. Two kinds of recombinant plasmids were constructed (pMG501 and pMG601). They effectively expressed high levels of peptide b and c both in *E.coli* DH5a and in avirulent *S.flexneri* 5M90TA. Preliminary experiment in mice showed that peptide b and c were of some immune protection against the challenge with virulent *S.flexneri* 5M90T.

**Key words** *S. flexneri* 5M90T; out membrane protein; high level expression; immune protection

Rui Xianliang et al.: High level expression of ipa BC gene from *Shigella flexneri* 5M90T and investigating their immunoprotective response in mice



A. 重组质粒DNA的Pst I 酶切电泳结果

Electrophoresis of the recombinant plasmid DNAs digested by Pst I  
1.  $\lambda$  DNA + Hind III; 2. pMG501; 3. pMG601; 4. pMG607; 5. pBV220

B. 重组质粒pMG601在DH5 $\alpha$ 中表达产物的SDS-PAGE分析

SDS-PAGE assay of protein products expressed by pMG601 in DH5 $\alpha$

1. DH5 $\alpha$ (pMG601) without heat induction; 2. DH5 $\alpha$ (pMG601) with heat induction at 42 $^{\circ}$ C; 3. DH5 $\alpha$  with heat induction at 42 $^{\circ}$ C

C. 重组质粒表达产物的SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

SDS-PAGE assay of protein products expressed by the recombinant plasmids

1. Molecular weight markers; 2—3. DH5 $\alpha$ (pMG501) with and without heat induction; 4—5. DH5 $\alpha$ (pMG601) with and without heat induction; 6. DH5 $\alpha$  with heat induction

D. 重组质粒经42 $^{\circ}$ C热诱导后表达产物的Western-blotting检测

Western-blotting detection of protein products expressed by the recombinant plasmids with heat induction at 42 $^{\circ}$ C.

1. DH5 $\alpha$ (pMG501); 2. DH5 $\alpha$ (pMG601); 3. M90TA(pMG601); 4. DH5 $\alpha$ ; 5. M90TA