

宋内 I 相抗原和霍乱 CT-B 共表达的免疫保护效果观察

李德玲 苏国富 芮贤良 黄翠芬

(军事医学科学院生物工程研究所 北京 100850)

摘要 将编码宋内氏痢疾菌 (*Shigella sonnei*) I 相 O 抗原的基因和霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) 的 CT-B 基因克隆至带 *asd* 基因的质粒 PYA248, 得重组质粒 PMGL105。将该重组质粒转入 *asd* 基因缺失的减毒伤寒沙门氏菌 X4072, 构成了一个不带抗药性基因的载体-宿主平衡致死系统。一系列实验表明, 该重组菌 X4072 (PMGL105) 能稳定地表达宋内 I 相 O 抗原和霍乱弧菌的 CT-B 抗原。小鼠免疫保护实验表明, 该重组菌对有毒的宋内氏 I 相痢疾杆菌及霍乱弧菌的攻击均具有良好保护作用。

关键词 宋内氏痢疾杆菌, LPS-O 抗原, CT-B 抗原, 鼠伤寒沙门氏菌, 免疫保护

痢疾、霍乱和伤寒是常见的肠道传染病, 研制多价苗迫在眉睫。已知宋内 I 相抗原是激发抗菌免疫的主要保护性抗原; 霍乱毒素 (CT) 是霍乱弧菌主要的致病因子, 而其 B 亚单位无毒且具有免疫原性, 是霍乱抗毒免疫的主要保护性抗原。本研究将编码宋内 I 相 O 抗原的基因和霍乱毒素 CT-B 基因克隆至带有 *asd* 基因的质粒 PYA248, 将它转化至减毒的 *asd*-鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) X4072, 研究宋内 I 相 O 抗原和 CT-B 在上述沙门菌中的表达, 并对它们的保护作用进行了观察。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

实验中所用菌株、质粒及其主要特性详见表 1。

表 1 实验用菌株及其主要特点

Table 1 Strains and relevant phenotypes

Strains	Relevant phenotypes	Source
<i>E. coli</i>		
JM101	Δ (<i>lac-proAB</i>)	This laboratory
X6097	$\Delta asd-4$	Curtiss II ⁽¹⁾
<i>S. typhimurium</i>		
X3730	<i>asd</i>	Curtiss II ⁽¹⁾
X4072	<i>cya crp asd</i>	Curtiss II ⁽¹⁾
<i>S. sonnei</i>		
Guang 101	Wild type	The first military medical university
48025-11	Wild type	The fifth institute of our academy
<i>V. cholerae</i>		
Bin 43	Wild type	The detectional institute of biological products

国家 863 基金资助项目。

本文于 1994 年 2 月 25 日收到。

续表 1

Strains	Relevant phenotypes	Source
Recombinant strains		
HB101 (pXU203)	Have I phase O antigen gene	This lab ⁽²⁾
HB101 (pCT332)	Have CT gene	This lab ⁽²⁾
HB101 (pSU203)	Have β -lactamase pr.	This lab ⁽²⁾

质粒 DNA 的制备、纯化, DNA 的酶切、回收及连接均按文献 [5] 进行。

1.2 感受态细胞的制备及其 DNA 转化实验

对于大肠杆菌 X6097 感受态细胞的制备及转化参照文献 [6]。其它受体菌感受态细胞的制备和转化按常规方法进行。

1.3 CT-B 抗原的酶联检测

参照 Maria⁽²⁾方法。

1.4 宋内氏痢疾杆菌 I 相 O 抗原的检测

玻片凝集实验按常规方法进行; 菌落原位免疫按文献 [6] 进行; 脂多糖的 SDS-PAGE 及其银染按下述方法进行: 取 5ml 培养过夜的菌液, 离心收集菌体。以生理盐水洗一次, 再悬于 0.3ml 生理盐水中。加等体积 LPS 样品处理液 (2% SDS, 20% 甘油, 5% 2-巯基乙醇, 0.8% 溴酚蓝), 沸水中煮 10min, 加蛋白酶 K 至终浓度 0.2mg/ml, 37℃ 消化 2.5h。取样品 20 μ l 进行 SDS-PAGE, 浓缩胶 4%, 分离胶 15%。银染按常规进行⁽²⁾。

1.5 重组质粒的稳定性实验

将待试的重组菌株分别在有选择压力 (不含 DAP) 和无选择压力 (有 DAP 存在) 下置 37℃ 培养过夜, 次日, 将过夜培养物分别用不含 DAP 和含 DAP 的 LB 稀释 1000 倍, 再 37℃ 过夜。重复上述过程 10 次。先铺含 DAP 平板, 再通过观察在 DAP 平板上生长的细菌能否在不含 DAP 平板上生长以及抽提质粒来判断重组质粒的稳定性。

1.6 动物实验

豚鼠眼结膜炎实验 (Sereny test) 按常规方法进行。做小鼠保护实验时, 将免疫小鼠的菌株培养过夜, 收集菌体。用生理盐水洗一次, 再配成 0.2ml 含 5×10^8 菌体浓度的菌液, 对小鼠进行皮下注射, 每只 0.2ml, 共注射 3 次, 间隔 2 d。末次免疫后一周进行腹腔攻击。连续观察 7d, 记录死亡情况。

2 结 果

2.1 重组质粒的构建

重组质粒构建过程见图 1、图 2。霍乱毒素 (CT) 的 B 亚单位表达时, 使用 A 亚单位启动子。为使其 B 亚单位单独表达, 在其前面加上 β -lactamase 启动子, 构建了 pMGL102。将 CT-B 基因连同启动子插入带有 asd 基因的质粒 pYA248, 得重组质粒 pMGL103 (图 1)。通过两次重组, 将 pXU203 中宋内氏 I 相 O 抗原基因, 插入 pMGL103, 得重组质粒 pMGL105 (图 2)。

2.2 宋内氏 I 相 O 抗原脂多糖分析

X4072 (pMGL105) 用宋内氏 I 相 O 抗原多克隆抗体作玻片凝集和菌落原位免疫实

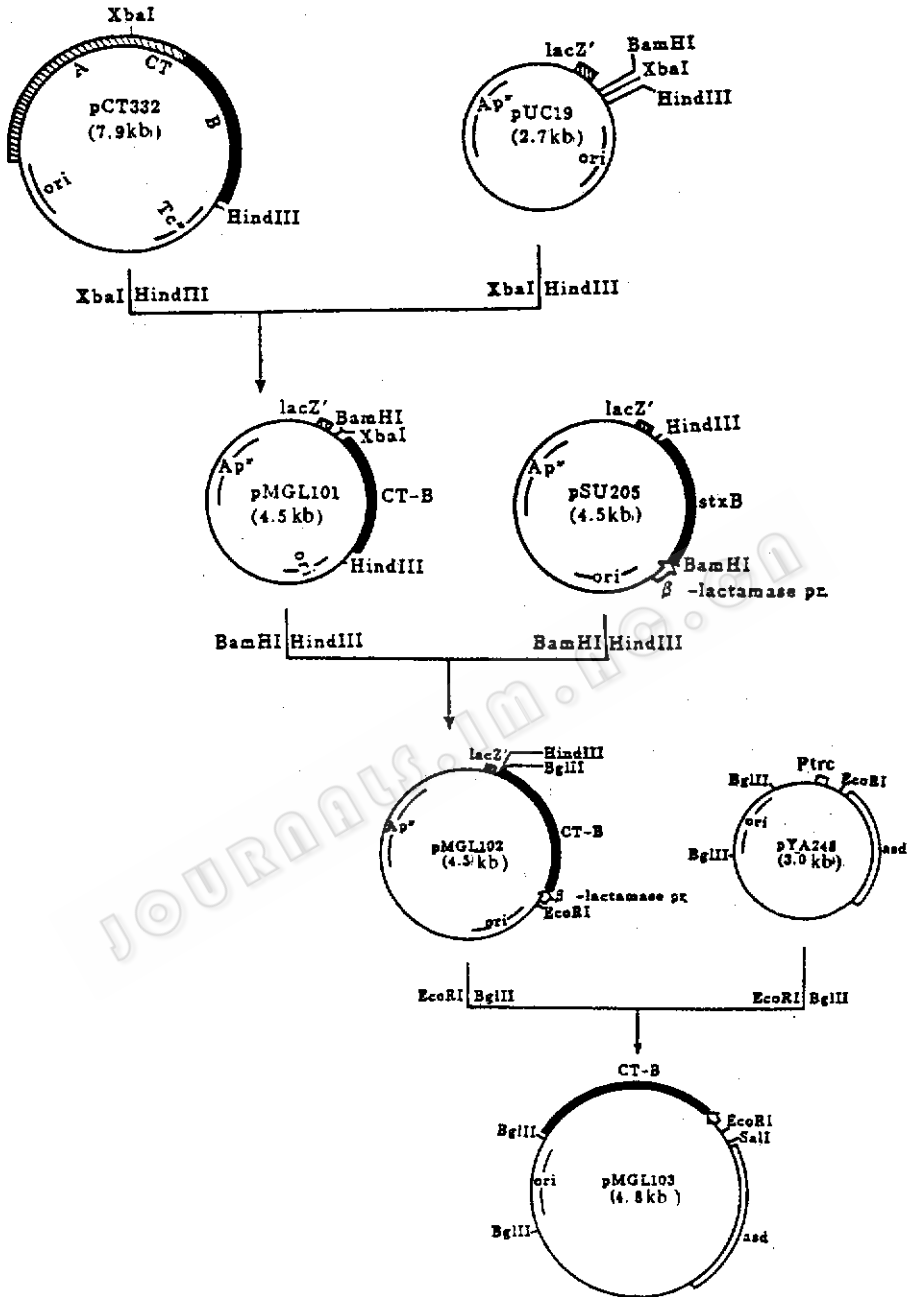


图 1 重组质粒 pMGL103 的构建

Fig. 1 Construction of the recombinant plasmid pMGL103

验时,为阳性反应。为进一步证明重组质粒 pMGL105 能表达宋内氏 I 相 O 抗抗原,我们按实验方法所述制备它们的 LPS,经 SDS-PAGE 后,进行银染。结果见图 3。从照片可见,重组菌除与其相应受体菌有共同的特征区带外,还可见其表达的宋内氏 I 相 O 抗原。

2.3 CT-B 在大肠杆菌和鼠伤寒沙门氏菌中的表达

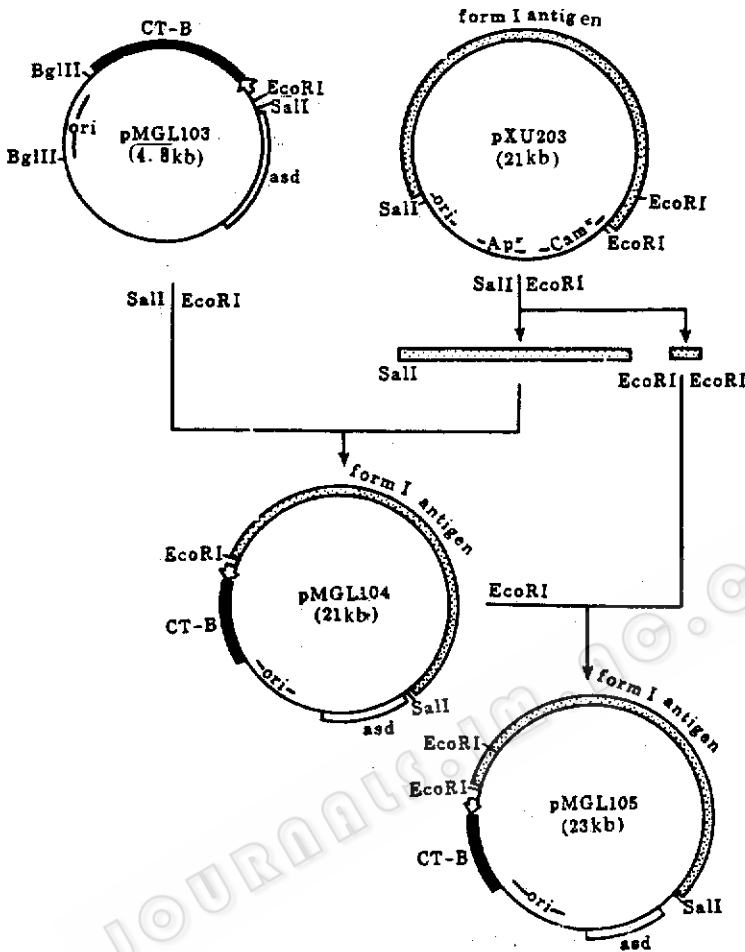


图 2 重组质粒 pMGL105 的构建

Fig. 2 Construction of the recombinant plasmid pMGL105

我们用 ELISA 测定 CT-B 在大肠杆菌 X6097 及鼠伤寒沙门氏菌 X4072 中的表达, 同时观察了宋内氏 I 相 O 抗原插入 pMGL103 后对 CT-B 表达的影响。结果表明, 沙门氏菌上清中 CT-B 含量比大肠杆菌略高。在 pMGL103 中插入宋内氏 I 相抗原基因后, 对 CT-B 表达无明显影响 (结果见表 2)。

表 2 GM₁-ELISA 检测 CT-B 在 *E. coli* 及 *S. typhimurium* 中的表达Table 2 The detection of CT-B expression with GM₁-ELISA

Strains	OD _{490nm}	
	Supernatant	Lysate
X6097 (pMGL103)	0.89	1.40
X4072 (pMGL103)	0.63	1.68
X6097 (pMGL105)	0.74	1.31
X4072 (pMGL105)	0.48	1.62
X6097	0.05	0.08
X6097 (pCT332)	0.52	1.22

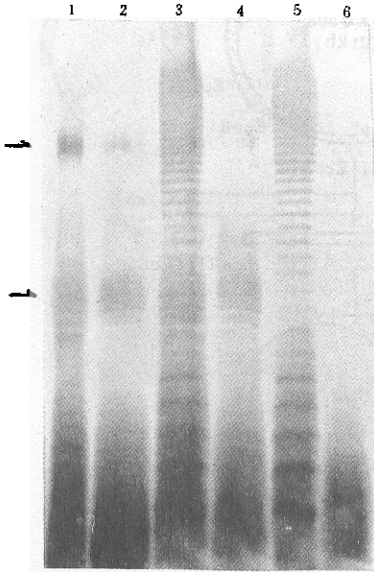


图 3 脂多糖的银染分析

Fig. 3 LPS analysis by silver staining

1. wild *S. sonnei* 48025-11, 2. HB101 (pXU203), (pMGL105), 沙门氏菌 X4072 和 X4072
3. X4072 (pMGL105), 4. X6097 (pMGL105), 5. *S.* (pMGL105) 按实验方法所述进行皮下免疫。
typhimurium X4072, 6. *E. coli* X6097

株 (Sereny 实验 ++++) 进行腹腔攻击, 结果表明, 重组菌株对宋内 I 相痢疾杆菌有毒株的攻击的保护率在 64% 以上。

2.5.2 X4072 (pMGL105) 对霍乱弧菌的保护作用: 小鼠免疫方法与上述过程相似。以霍乱弧菌滨 43 作为攻毒菌株, 攻毒剂量为 $5 \times LD_{50}$ 。实验结果表明, 重组菌株对霍乱弧菌毒株的攻击保护率在 60% 以上。

3 讨论

由以上实验可以发现, 在 β -内酰胺酶启动子控制下的 CT-B 基因, 不仅能在大肠杆菌中表达, 而且能在减毒鼠伤寒沙门氏菌中表达。X4072 (pMGL105) 能同时表达 CT-B 和宋内 I 相 O 抗原, 且宋内 I 相 O 抗原的表达没有明显影响 CT-B 的表达水平, 这为将来构建预防肠道腹泻的多价菌苗候选株提供了可能性。

小鼠保护实验也表明, X4072 (pMGL105) 不仅对霍乱弧菌的攻击有良好的保护作用, 而且对宋内毒株的攻击也有较好的保护作用。以前的实验已经证明, X4072 本身就是鼠伤寒沙门氏菌的安全菌苗株^[7]。所以, X4072 (pMGL105) 有希望作为伤寒、痢疾和霍乱的联合疫苗候选株, 这符合活菌苗的发展方向, 符合 FDS 对活菌苗的要求, 本实验为今后进一步构建预防腹泻的多价联合疫苗打下了基础。

2.4 重组质粒的稳定性

按实验方法所述, 重组菌在有和无选择压力条件下, 传代后铺在含 DAP 的 LB 平板上。从中分别挑选 200 个菌落, 点种于不含 DAP 的 LB 平板上。结果发现, 有选择压力组的 200 个菌落在不含 DAP 平板上全部生长。随机挑选其中 20 个菌落, 快速抽提质粒, 发现它们全部含有重组质粒 pMGL105。而无选择压力的 200 个菌落, 不含 DAP 平板上只生长 132 个菌落, 从这 132 个菌落中随机挑选 20 个抽提质粒, 结果同上。而从未生长的 68 个菌落中随机挑选 20 个抽提质粒, 均未发现 pMGL105 的存在。

2.5 X4072 (pMGL105) 对宋内 I 相痢疾菌及霍乱弧菌攻击的保护作用

2.5.1 X4072 (pMGL105) 对宋内 I 相痢疾菌的保护实验: 将 55 只上海小鼠分为 5 组, 每组 11 只。分别用生理盐水, 大肠杆菌受体菌 X6097, 大肠杆菌重组菌 X6097
X4072 (pMGL105), 沙门氏菌 X4072 和 X4072 (pMGL105) 按实验方法所述进行皮下免疫。在末次免疫后 7 d 用 $10 \times LD_{50}$ 的宋内氏毒

参 考 文 献

- (1) Koji Nakayama, Sandra M Kelly, Roy Curtiss III. *Biotechnology*, 1988, 6: 693.
- (2) 徐永强, 苏国富, 芮贤良等. 中华流行病学杂志. 待发表.
- (3) Maria L, Gennaro Peter, Greenaway J *et al.* *Nucleic Acid Res*, 1982, 10: 4883.
- (4) Su G F. *Microbial Pathogenesis*, 1992, 13: 465~476.
- (5) Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* 2nd. ed. Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- (6) Jagusztyn-krynicka E M, Smorawinska M, Curtiss III R. *J General Microbiology*, 1982, 128: 1153~1145.
- (7) Roy Curtiss III, Sandra M. Kelly, *Infect Immun*, 1987, 55: 3035~3043.

The Protective Effects of *Shigella sonnei* Form I Antigen and *Vibrio cholerae* CT-B Antigen

Li Deling Su Guofu Rui Xianliang Huang Cuifen

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

Abstract The genes encoding *S. sonnei* form I antigen and CT-B antigen of *V. cholerae* were inserted into *asd*⁺ vector pYA248. The resulting recombinant plasmid pMGL105 was transformed into an attenuated *S. typhimurium asd*⁻ strain X4072, and constituted a balanced-lethal host-vector system. In the system, the plasmid was stable and had no drug resistance gene. A series of tests showed that the recombinant strain could express both *S. sonnei* form I antigen and *V. cholerae* CT-B antigen stably. Immune protection experiments in mice indicated that the recombinant strain could provide good protections against the challenge of virulent *S. sonnei* and *V. cholerae*.

Key words *Shigella sonnei*, Lps-O antigen, CT-B antigen, *Salmonella typhimurium*, immunoprotection