

研究报告

表达 ST1-LTB- α - β 融合蛋白基因工程菌株的构建及其免疫原性分析

宋杰, 钱明明, 柏佳宁, 赵宝华

河北师范大学生命科学学院, 石家庄 050016

摘要: 采用分子生物学技术构建了含有 ST1-LTB- α - β 融合基因的重组菌株 BL21(DE3)(pETST3LTB $\alpha\beta$), SDS-PAGE 和 Western blotting 分析表明 ST1-LTB- α - β 融合基因在大肠杆菌中得到了高效表达, 融合蛋白分子量约为 110 kD; 20 L 发酵罐培养得到的最佳诱导条件为: 重组菌株以 1%接种量、5 L/min 通气量培养 3 h 后加终浓度为 0.03 mol/L 的乳糖诱导, 通气量升至 12.5 L/min 继续培养 6 h, 表达量占菌体总蛋白的 38.53%; 表达的 ST1-LTB- α - β 融合蛋白无毒性但具有免疫原性, 可以抵抗大肠杆菌和产气荚膜梭菌的感染; 构建的重组菌株 BL21(DE3)(pETST3LTB $\alpha\beta$)有望作为预防仔猪腹泻基因工程疫苗的候选生产菌株。

关键词: 仔猪腹泻, 保护性抗原, 基因工程菌株, 免疫原性

Construction and Immunogenicity of a Genetic Engineered Strain Expressing Nontoxic ST₁-LT_B- α - β Fusion Protein Against Diarrhea of Piglet

Jie Song, Mingming Qian, Jianing Bai, and Baohua Zhao

College of Life Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016, China

Abstract: We constructed a recombinant strain BL21 (DE3) (pETST3LTB $\alpha\beta$) including ST₁-LT_B- α - β fusion gene via molecular technology. The SDS-PAGE and Western blotting indicated that the ST₁-LT_B- α - β fusion protein was highly expressed in *Escherichia coli* and the molecular weight of the fusion protein was about 110 kD. The recombinant strain was induced in different concentrations of lactose and different aeration rate. The optimal culture conditions in 20 L fermentor were 1% inoculation (V/V), initial aeration 5 L/min, 0.03 mol/L lactose addition 3 hours after inoculation, and increased the aeration to 12.5 L/min for the following 6 hours. The fusion protein was about 38.53% of total cellular protein. It was nontoxic, immunogenic and protective against enterotoxigenic *E. coli* and *Clostridium perfringens* infection. The constructed recombinant strain BL21 (DE3) (pETST3LTB $\alpha\beta$) could serve as a candidate vaccine strain against diarrhea of piglet.

Keywords: diarrhea of piglet, protective antigen, gene engineering strain, immunogenicity

Received: January 8, 2008; **Accepted:** March 2, 2008

Supported by: the Natural Science Fund of Hebei Education Office (No. 2001240) and the Hebei Province Tackle Key Problems in Science and Technology Funds (No. 012201130).

Corresponding author: Tel: +86-311-86268434; Fax: +86-311-86268313; E-mail: zhaobaohua86178@sohu.com

河北省教育厅自然科学基金项目(No. 2001240), 河北省科技攻关项目(No. 012201130)资助。

仔猪黄白痢是由产肠毒素型大肠杆菌(*Enterotoxigenic E. coli*, ETEC)引起的仔猪肠道疾病, 该病可严重影响仔猪的存活率和出栏率, 其主要症状为仔猪发生局部性肠道炎症而发生下痢, 病猪排出灰白色或灰黄色浆状粪便, 严重的呈糊状且带有腥臭味, 身体迅速消瘦。ETEC 主要有 2 种致病因子: 一类为菌毛蛋白(或称粘着素、定居因子), 已知的粘着素有 K88、K99、987P、CFA、PCF0166、F41 等; 另一类为肠毒素, 分为耐热性肠毒素(Heat-stable enterotoxin, ST)和不耐热性肠毒素(Heat-labile enterotoxin, LT), ST 和 LT 是导致幼龄动物腹泻的直接致病因子^[1]。ETEC 借助粘着素寄生于宿主肠道粘膜的上皮细胞, 从而大量繁殖, 产生大量肠毒素, 由肠毒素造成肠粘膜上皮细胞的病理性变化, 导致幼畜腹泻^[2]。仔猪红痢由产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*, 又称魏氏梭菌)引起, 此细菌是引起各种动物坏死性肠炎、肠毒血症和人创伤性气性坏疽的主要病原菌之一^[3]。该菌分为 A、B、C、D、E 五型, 其致病因子是菌体产生的外毒素^[4]。其中 α -毒素和 β -毒素分别是 A 型魏氏梭菌和 C 型产气荚膜梭菌产生的坏死性和致死性毒素^[5]。

目前对仔猪腹泻的主要防治途径有疫苗免疫预防和抗生素治疗。母猪可在分娩前 1 天注射长效抗菌剂, 仔猪初生后立即口服抑菌药物, 也可用微生态制剂口服, 调节肠道消化机能, 抑制有害菌的生长, 防止疾病的发生^[6], 但药物治疗会造成药物残留, 影响肉质, 对人类的健康构成潜在的危害, 而且由于耐药菌株的产生, 治疗效果不理想。现有的疫苗主要有灭活疫苗和双价基因工程疫苗如 K88-K99、K88ac-LT_B、K99-F41、ST-LT 等^[7]; 灭活疫苗针对性强, 但特异性抗原含量少, 不能产生足够的母源抗体, 免疫效果差; 双价基因工程疫苗均取得了较好的免疫效果, 但主要是针对黄白痢的, 本研究室的柏佳宁等构建了预防红痢的 α - β 基因工程菌株, 获得了比较理想的免疫效果^[8]。

中国是养猪大国, 仔猪腹泻是目前影响养猪业的主要疾病之一, 给养猪业带来了巨大的经济损失。为达到“一苗三防”的免疫效果, 本实验扩增得到了 ST₁、LT_B 与 α - β 毒素保护性抗原基因, 构建了含有 4 个融合基因质粒的重组菌株, 对该菌株的反应原性和免疫原性进行了初步研究, 并优化了诱导

表达条件, 为今后研制预防仔猪腹泻的基因工程疫苗奠定了坚实的基础。

1 材料与方法

1.1 菌株及载体

产肠毒素性大肠杆菌和含有 α - β 融合基因的基因工程菌株(BL21(DE3)(pET $\alpha\beta$))由本实验室保存; 大肠杆菌强毒株 C83905 和 A 型产气荚膜梭菌 NCTC64609 由吉林大学柳增善教授惠赠; 菌株 *E. coli* DH5 α 、BL21(DE3)及表达质粒 pET-28b 由本实验室保存; pUCm-T 载体购自上海生工生物技术有限公司。

1.2 主要试剂及工具酶

限制性内切酶 *Hind* III、*Nde* I、*Eco*R I、*Bam*H I、*Not* I、*Nco* I、*Sal* I 与 *Taq* 酶等工具酶均购自 TaKaRa 公司; 凝胶回收试剂盒购自北京鼎国生物技术有限公司。

1.3 ST₁、LT_B 和 α - β 基因的克隆与序列分析

根据 GenBank 公布的猪源 ST₁、LT_B 和产气荚膜梭菌 α 、 β 毒素基因的核苷酸序列, 利用 Primer Primer 5.0 软件, 设计一系列引物(见表 1)用于原核表达质粒的构建。引物 R1、R2、R3 中含有的 ST₁ 基因是将 3'端含有 2 个编码半胱氨酸残基(Cys)的 TGT 和 TGC 突变成编码丝氨酸残基(Ser)的 AGT 和 AGC 的突变基因, 以去除 ST₁ 的毒性。

以大肠杆菌基因组和 pET $\alpha\beta$ 质粒为模板, 利用 F1、R1; F2、R2; F3、R3; F4、R4; F6、R6 为引物, 扩增 ST₁、LT_B 与 α - β 融合基因片断。将 ST₁、LT_B 与 α - β 融合基因 PCR 产物分别连接到 pUCm-T 载体上, 得到重组质粒 pUC-ST₁-1、pUC-ST₁-2、pUC-ST₁-3、pUC-LT_B 和 pUC- $\alpha\beta$ 。将连接产物转化到感受态细胞 DH5 α 中, 经 IPTG/X-gal 琼脂平板蓝白斑筛选, 随机挑选白色菌落, 提取质粒后进行双酶切鉴定。将克隆的阳性质粒送上海生工生物技术有限公司进行序列测定。

1.4 融合基因 ST₁-LT_B- α - β 原核表达载体的构建

将质粒 pUC-ST₁-2、pUC-ST₁-3 和 pUC-LT_B 进行双酶切, 回收后用 T4 DNA 连接酶将 2 个 ST₁ 和 1 个 LT_B 基因依次连接在 pUC-ST₁-1 上得到重组质粒 pUC-ST₃LT_B; 核苷酸序列分析正确后, 用 F5、R5 引物 PCR 扩增 ST₁-LT_B 基因片段, 限制性内切酶 *Nco* I 和 *Sal* I 分别酶切扩增产物和表达质粒 pET-28b, 回

表 1 本研究所用 PCR 扩增基因的引物
Table 1 Primers used for gene amplification by PCR in the study

Gene name	Primer sequence (5'-3')	Enzyme digestion site
ST_1	F1: CCCAAGCTTCATCTTTCTTCAAAAAGAAAAA R1: GCATATGCCAATAGCTCCCGGTACTAGC	<i>Hind</i> III <i>Nde</i> I
	F2: GCATATGCATCTTTCTTCAAAAAGAAAAA R2: CCGGAATTCCCAATAGCTCCCGGTACTAGC	<i>Nde</i> I <i>Eco</i> R I
	F3: CCGGAATTCCATCTTTCTTCAAAAAGAAAAA R3: CGCGGATCCCAATAGCTCCCGGTACTAGC	<i>Eco</i> R I <i>Bam</i> H I
	F4: CGCGGATCCATGACCATGATTACGAATTCG R4: ATAAGAATGCGGCCGCTAGTTTTTCATACTGATT	<i>Bam</i> H I <i>Not</i> I
LT_B	F5: CCATGGGATCTTTCTTCAAAAAGAAAAA R5: GCGTCGACCATGTTTTTCATACTGAT	<i>Nco</i> I <i>Sal</i> I
ST_3-LT_B	F6: GCGTCGACGATAATAATTTCTCAAAG R6: ATGCGGCCGCTAAATAGCTGTTACTTT	<i>Sal</i> I <i>Not</i> I

收后将 ST_1-LT_B 融合基因与 pET-28b 连接, 得到重组表达质粒 pETST₃LT_B; 用限制性内切酶 *Sal* I 和 *Not* I 分别酶切质粒 pUC- $\alpha\beta$ 和 pETST₃LT_B, 回收后将 $\alpha\beta$ 融合基因连接在 ST_1-LT_B 融合基因的下流, 得到重组质粒 pETST₃LT_B $\alpha\beta$, 转化大肠杆菌 BL21(DE3), 得到重组菌株 BL21(DE3)(pETST₃LT_B $\alpha\beta$)。

1.5 含融合基因重组菌株的诱导表达

重组菌 BL21(DE3)(pETST₃LT_B $\alpha\beta$)接种于 5 mL 含卡那霉素的 LB 液体培养液中, 37°C 活化过夜后, 按 1%(VPV)接种于含卡那霉素的新鲜 LB 液体培养液中, 培养至对数生长期(OD_{600} 为 0.4~0.6), 加不同浓度的 IPTG 或乳糖诱导表达重组蛋白, 另一试管作为对照, 于 37°C 下继续培养 6 h。收集菌体, 重悬于 TE(pH8.0)中, 并加入等量的 2×蛋白 buffer, 沸水浴 5 min 后, 进行 SDS-PAGE 分析。用 GelPro4.5 软件进行分析, 测量表达产物占菌体总蛋白的相对含量。

1.6 表达产物在大肠杆菌细胞中的分布

取诱导的菌液 1 mL, 在冰浴中进行超声波破菌, 每次超声 30 s, 间隔 30 s, 共超声 8 次。裂解后的菌液于 4°C、5000 r/min 离心 5 min, 分别收集上清和沉淀, 取样进行 SDS-PAGE 分析, 确定表达产物在大肠杆菌细胞中的分布。

1.7 表达产物的 Western blotting 分析

将重组菌 BL21(DE3)(pETST₃LT_B $\alpha\beta$)和粗提包涵体经 SDS-PAGE 分析后转印硝酸纤维素膜, 分别以标准 LT_B 抗血清和标准 α 抗血清为一抗, HRP 标记的兔抗鼠 IgG 为二抗进行 Western blotting 分析。

1.8 基因工程菌株诱导表达条件的优化

1.8.1 乳糖诱导条件的筛选

以 1%接种量接种 BL21(DE3)(pETST₃LT_B $\alpha\beta$)

菌株的二级种子液, 37°C 发酵罐通气培养, 培养 3 h 时分别添加终浓度为 0.01 mol/L、0.02 mol/L、0.03 mol/L、0.04 mol/L 的乳糖进行诱导, 开始诱导及诱导后每 1 h 取样 1 次, 分别进行活菌计数, 并按常规方法进行 SDS-PAGE 分析, 对比目的蛋白表达量, 筛选最佳诱导条件。

1.8.2 通气培养条件的筛选

制备 LB 培养基, 每罐 1.2×10^4 mL, 以 1%接种二级种子液; 加入乳糖诱导剂后, 分别以 5 L/min、7.5 L/min、10 L/min、12.5 L/min、15 L/min、17.5 L/min、20 L/min 的通气量诱导培养 6 h; 活菌计数, 并进行 SDS-PAGE 分析。重复 3 次, 确定最佳通气量。

1.9 重组菌株基因工程灭活疫苗的初步制备

重组菌株 BL21(DE3)(pETST₃LT_B $\alpha\beta$)诱导 6 h 后, 加入终浓度为 0.2% 的甲醛 37°C 灭活 48 h; 12 000 r/min 离心 20 min, 生理盐水洗涤 3 次, 稀释至约 2×10^9 CFU/mL, 最后加入 20%的氢氧化铝胶, 充分混匀。

1.10 重组菌株基因工程灭活疫苗的安全性测定

取生理盐水重悬后的灭活包涵体液接种 5 只小鼠, 每只腹腔接种 0.3 mL, 对照组腹腔注射 0.3 mL 生理盐水, 观察 2 周, 观察小鼠存活情况。

1.10.1 小鼠致病菌最小致死剂量(MLD)的确定

将大肠杆菌强毒株 C83905 和 A 型产气荚膜梭菌 NCTC64609 分别用培养基分别稀释成含菌量 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^8 、 5×10^8 、 1×10^9 、 5×10^9 CFU/mL 的菌液, 每个浓度接种 5 只健康小鼠, 每只腹腔注射 0.2 mL; 另设培养基对照组小鼠 5 只。接种后观察 1 周, 确定最小致死剂量。

1.10.2 小鼠保护性实验

将 6~8 周龄雌性健康昆明系小鼠随机分成 6 组, 每组 10 只, 每组分别进行皮下注射免疫制剂或对照用空载体灭活苗和生理盐水、氢氧化铝佐剂混合物。第 1 组注射灭活基因工程疫苗; 第 2 组注射 0.1 mL 含氢氧化铝的灭活基因工程疫苗; 第 3 组注射 0.2 mL 含氢氧化铝的灭活基因工程疫苗; 第 4 组注射 0.3 mL 氢氧化铝重悬的灭活基因工程疫苗; 第 5 组注射空载体灭活苗; 第 6 组注射生理盐水和氢氧化铝佐剂的混合物作为对照; 注射量为 0.3 mL, 2 周后加强免疫 1 次。从最后 1 次免疫结束算起, 2 周后每组同时接种最小致死剂量的大肠杆菌强毒株 C83905 和 A 型产气荚膜梭菌 NCTC64609。观察 1 周统计其发病和死亡情况, 并进行组织病理学观察。

1.10.3 重组菌株基因工程灭活疫苗的猪场初步试验

在石家庄市栾城县某猪场选择 10 头实验用母猪, 在产前 45 d 和 15 d 分别颈部肌肉注射灭活基因工程疫苗各 5 mL; 另取 10 头母猪注射生理盐水和氢氧化铝胶佐剂的混合物作为对照组, 观察 60 d。

2 结果

2.1 ST_I、LT_B 和 α - β 基因的克隆与序列分析

首先以产肠毒素性大肠杆菌基因组 DNA 为模板, 利用设计的引物, 成功扩增出了约 150 bp 和 400 bp 的特异性片断(图 1、图 2); 测序完成后, 利用 DNA Star 软件与 GenBank 报道的基因序列进行同源性比较, 发现所得 LT_B 基因序列与 M17873(猪源 ETEC 的 LT_B 基因)序列同源性为 100%。在每一个 ST_I 基因的 3'端有 2 处发生了 T \rightarrow A 的置换, 与实验设计相符。以 pET α β 质粒为模板, 扩增出了约 1.9 kb 的 α - β 保护性抗原基因(图 3)。经 DNA 序列分析证实为 α - β 毒素保护性抗原基因。

2.2 融合基因 ST_I-LT_B- α - β 原核表达载体的构建和表达

2.2.1 原核表达载体的构建和 SDS-PAGE 分析

质粒 pUC-ST_I-2、pUC-ST_I-3 和 pUC-LT_B 进行酶切后, 将 2 个 ST_I 基因及 LT_B 基因片段依次连接至 pUC-ST_I-1 载体中。经 DNA 序列分析证实, 结果表明构建的重组质粒 pUC-ST₃LT_B 中含有 3 个突变的 ST_I 基因和 1 个 LT_B 基因, 融合基因全长为 828 bp

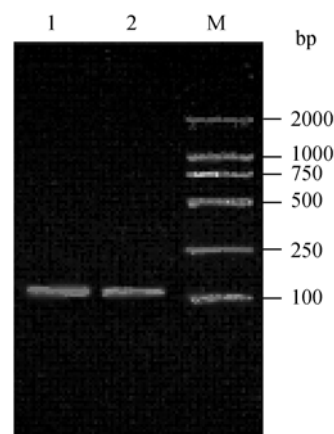


图 1 ST_I 基因 PCR 扩增结果

Fig. 1 Amplification of ST_I gene by PCR
1, 2: PCR products of ST gene; M: DNA marker DL2000

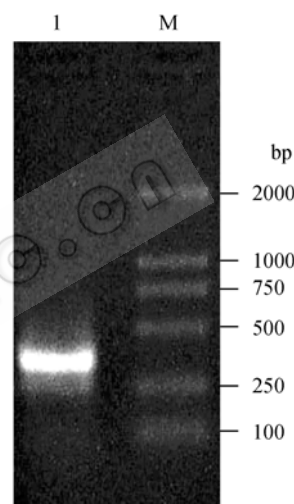


图 2 LT_B 基因 PCR 扩增结果

Fig. 2 Amplification of LT_B gene by PCR
1: PCR products of LT_B gene; M: DNA marker DL2000

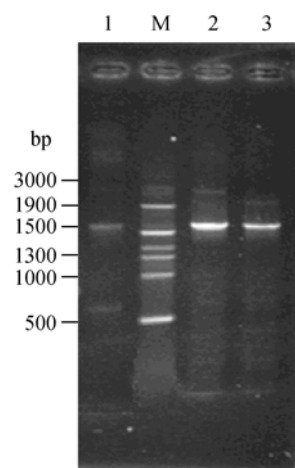


图 3 α - β 保护性抗原基因的 PCR 结果

Fig. 3 Amplification of α - β protective antigen gene by PCR
1, 2, 3: amplified α - β protective antigen gene by PCR;
M: DNA marker

(图 4)。重组表达质粒 pETST₃LT_Bαβ 酶切鉴定和 PCR 电泳条带中, 均出现了 1 条约 3 kb 左右的片段(图 5), 转化 BL21(DE3) 得到重组菌株 BL21(DE3) (pETST₃LT_Bαβ)。挑取单个菌落培养, 用 0.5 mmol/L IPTG 诱导培养 5 h 后, 进行 SDS-PAGE, 结果表明 ST_I-LT_B-α-β 融合基因可在这种宿主菌中得以表达, 表达蛋白分子量约 110 kD(图 6)。

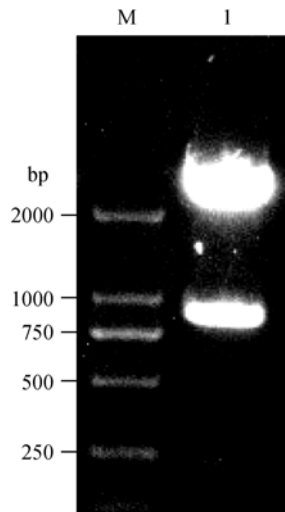


图 4 pETST₃LT_B 重组质粒的酶切图谱

Fig. 4 Identification of recombinant plasmid pETST₃LT_B
1: recombinant plasmid pETST₃LT_B digested with *Not* I and *Hind* III; M: DNA marker DL2000

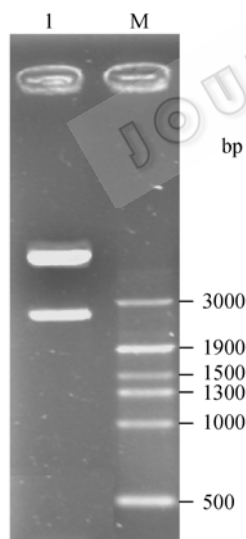


图 5 重组质粒 pETST₃LT_Bαβ 酶切图谱

Fig. 5 Identification of recombinant plasmid pETST₃LT_Bαβ digested by *Not* I and *Nco* I

1: recombinant plasmid pETST₃LT_Bαβ digested with *Not* I and *Nco* I; M: DNA marker

2.2.2 表达产物在大肠杆菌中的分布

将重组菌株 BL21(DE3)(pETST₃LT_Bαβ)超声破

碎后, 将上清液(可溶性蛋白)和沉淀(包涵体)分别经 SDS-PAGE 鉴定, 结果证明表达蛋白主要以包涵体的形式存在。

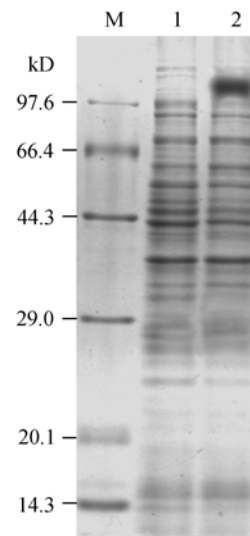


图 6 SDS-PAGE 分析重组蛋白在 *E. coli* 中的表达

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of the expression of the recombinant protein in *E. coli*

M: low molecular weight protein markers; 1: the total proteins of the recombinant strain BL21 (DE3)(pET28b) induced with 0.5 mmol/L IPTG; 2: the total proteins of the recombinant strain BL21 (DE3)(pETST₃LT_Bαβ) induced with 0.5 mmol/L IPTG

2.2.3 表达产物的 Western blotting 检测

将重组菌 BL21(DE3)(pETST₃LT_Bαβ)粗提包涵体经 SDS-PAGE 分析后转印硝酸纤维素膜, 进行 Western blotting 分析, DAB 显色后, 仅在 110 kD 左右出现特异性阳性带(图 7), 证实 110 kD 为特异性表达产物并具有反应原性。

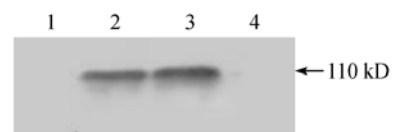


图 7 重组蛋白的 Western blotting 分析

Fig. 7 Western blotting analysis of expressed products

1: the reaction of the total proteins of the recombinant strain BL21(DE3)(pET28b) and anti-α toxin antibody; 2: the reaction of the expressed proteins of the recombinant strain BL21(DE3)(pETST₃LT_Bαβ) and anti-α toxin antibody; 3: the reaction of the expressed proteins of the recombinant strain BL21(DE3)(pETST₃LT_Bαβ) and anti-LT toxin antibody; 4: the reaction of the total proteins of the recombinant strain BL21(DE3)(pET28b) and anti-LT toxin antibody

2.3 基因工程菌株诱导表达条件的优化

2.3.1 乳糖最佳诱导条件的筛选

该基因工程菌株以 1%接种量接种二级种子液,

37℃ 发酵罐通气培养, 培养 3 h 时分别添加终浓度为 0.01 mol/L、0.02 mol/L、0.03 mol/L、0.04 mol/L 的乳糖进行诱导, 结果如图 8 所示, 在乳糖浓度为 0.03 mol/L 时目的蛋白表达量最高, 约为总蛋白含量的 38.53%。

2.3.2 通气培养条件的筛选结果

通气培养条件实验表明, 该基因工程菌株以 1.2×10^4 mL LB 培养基通气培养, 在 12.5 L/min 的通气培养条件下, 其培养菌数高于 5 L/min、7.5 L/min、10 L/min 的通气培养条件, 略低于 15 L/min、17.5 L/min、20 L/min 的通气培养条件; 而目的蛋白表达量明显高于 5 L/min、7.5 L/min、10 L/min、15 L/min、17.5 L/min、20 L/min 的通气培养条件, 其中 5 L/min、17.5 L/min、20 L/min 通气培养条件下几乎没有目的蛋白的表达。

2.4 基因工程灭活疫苗的制备及其免疫原性研究

2.4.1 疫苗安全性测定

包涵体粗体物疫苗静置后, 上层为淡黄色澄明液体, 下层为灰白色沉淀, 振荡后呈均匀混悬液。经无菌检验和甲醛检验后经皮下注射小鼠, 3 周后全部存活, 均无临床症状出现, 剖检无病理变化。

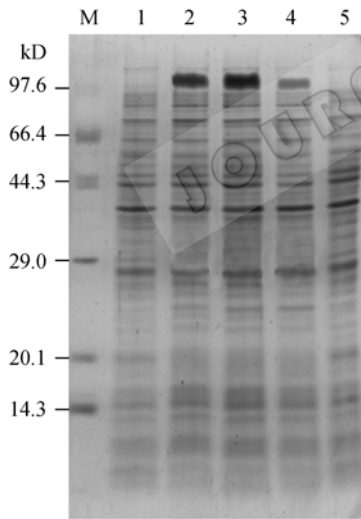


图 8 乳糖浓度对表达量的影响

Fig. 8 Effects of lactose on the expression of the fusion protein
M: low molecular weight protein markers; 1: the total proteins of the recombinant strain BL21(DE3) (pET28b) induced with 0.04 mol/L lactose for 5 h; 2: the total proteins of the recombinant strain BL21(DE3) (pETST3LTB α β) induced with 0.04 mol/L lactose for 5 h; 3: the total proteins of the recombinant strain BL21(DE3) (pETST3LTB α β) induced with 0.03 mol/L lactose for 5 h; 4: the total proteins of the recombinant strain BL21(DE3) (pETST3LTB α β) induced with 0.02 mol/L lactose for 5 h; 5: the total proteins of the recombinant strain BL21(DE3) (pETST3LTB α β) induced with 0.04 mol/L lactose for 5 h

2.4.2 最小致死剂量(MLD)的确定

小鼠接种后, 对实验小鼠和对照小鼠观察 1 周, 记录致死情况, 确定大肠杆菌 C83605 最小致死剂量为 1×10^9 CFU/mL, A 型产气荚膜梭菌 NCTC64609 最小致死剂量为 1×10^8 CFU/mL。

2.4.3 小鼠保护性实验结果

小鼠分别经过 2 次免疫后, 用最小致死剂量的大肠杆菌强毒株 C83905 及 A 型产气荚膜梭菌 NCTC64609 攻毒; 结果见表 2, 可以看出对照组 2 天后开始死亡, 1 周内全部死亡; 灭活疫苗免疫组保护率为 80%(8/10), 中草药+灭活疫苗免疫组保护率可达 90%(9/10)。攻毒后, 将病死的小鼠和健康小鼠解剖, 取小肠和肾制作组织石蜡切片, HE 染色结果见图 9。从图上可以看出, 病死的小鼠小肠绒毛上皮细胞松散, 基底层排列不紧密, 健康小鼠的小肠绒毛上皮细胞排列紧密整齐; 病死小鼠肾有出血点, 健康小鼠肾正常。

2.5 猪场初步试验结果

结果如表 4 所示, 可以看出免疫基因工程菌株

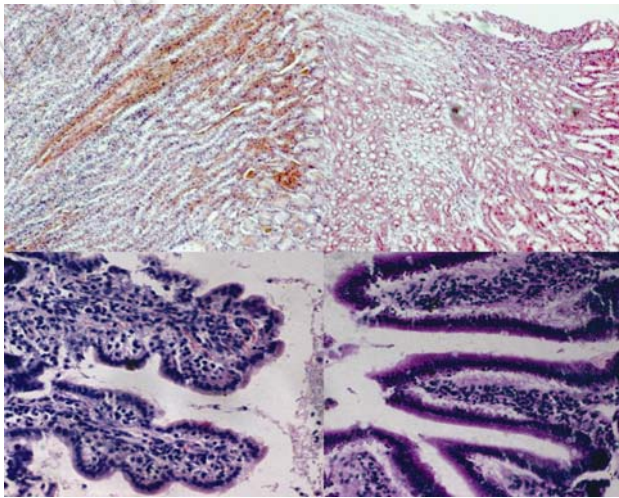


图 9 小鼠组织切片 HE 染色结果

Fig. 9 The observed results of HE stain with histological technology
A: the nephridium of died mice; B: the nephridium of survived mice; C: the intestine of died mice; D: the intestine of survived mice

表 3 小鼠免疫保护结果测定

Table 3 The protective rate of the vaccine for the immunized mice						
Groups	Group1	Group2	Group3	Group4	Group5	Group6
Died mice/total mice	2/10	2/10	1/10	3/10	10/10	10/10
Protective rate (%)	80	80	90	70	0	0

制剂后,仔猪发病率明显降低。未免疫对照组发病率较高(多在 50%以上,甚至高达 100%),存活率多在 65%以下;而免疫组只有个别窝仔猪(星号部分)可能因为实验猪自身免疫力低下等原因发病率较高,其余发病率均在 40%以下,出栏率在 65%以上。免疫组仔猪普遍比对照组猪舍的仔猪健壮,即使发病也表现出发病时间后延、病程短的特点。利用 STSTISTICA 6.0 软件对表 4 数据进行统计分析: T 检验 $P=0.0027 (<0.01)$, 差异显著。疫苗免疫组与对照组仔猪存活率存在显著差异,表明本实验所构建的基因工程疫苗可以显著提高仔猪的存活率。

表 4 疫苗的猪体免疫实验结果
Table 4 The results of pig immune experiment

	Experiment group			Control group		
	No. of offspring	No. of sick	No. of survived	No. of offspring	No. of sick	No. of survived
1	12	4	9	13	4	9
2	15	6	10	10	5	6
3	13	5	10	12	7	7
4	11	4	8	11	7	7
5	10	7*	6*	13	9	5
6	12	2	11	12	4	9
7	13	1	13	11	11	0
8	12	0	12	10	5	6
9	10	5	7	10	6	4
10	11	4	9	12	6	6

3 讨论

由产肠毒素型大肠杆菌(ETEC)引起的幼畜腹泻在我国普遍流行,每年死亡的仔猪中约有 50%与 ETEC 有关,造成养殖业巨大经济损失。目前研制的 ETEC 菌苗多着眼于特定的菌毛(如 K88, K99),但由于菌毛型较多,所研制菌苗往往由于菌毛型不符而无效。而肠毒素只有 ST、LT 二个型,制成的双价苗可通用于各种菌型。国外曾经将 ST₁ 成熟肽融合在 LT_B 亚单位基因的上游或下游,取得了一些结果。国内重复了类似试验,但并没有获得成功,原因在于构建的 ST₁-LT_B 融合基因表达产物仍具有 ST₁ 毒性。ST₁ 肠毒素本身含有 6 个半胱氨酸残基 Cys,这 6 个 Cys 可形成 3 对链内二硫键,对 ST₁ 生物毒性至关重要,如果将二硫键破坏,就可以使 ST₁ 失去生物毒性^[10,11]。

产气荚膜梭菌属腐生性厌氧芽孢致病菌,在土壤中广泛存在,具有广泛的疫源地,因而对我国畜牧业生产构成严重威胁,全国各地仔猪红痢的发病率呈上升趋势^[9],具有很高的发病率和死亡率,本病的主要致病因子为菌体产生的 α -毒素和 β -毒素。 α -毒素是 A 型产气荚膜梭菌最主要的致病因子,Nagahama 等和 Guillourd 等分别报道了 α -毒素中第 11、68、126、136、148 位上的组氨酸残基对其具有活性至关重要,68 位或 148 位组氨酸被其他氨基酸残基取代,即可丧失其全部的溶血性和致死性,但却具有良好的免疫原性。另外,Williamson 等也报道了 247-370 位的 α -毒素片段具有良好的免疫原性^[12]。

目前研制的基因工程疫苗只是针对其中一种病原菌,给仔猪注射防疫后效果不十分明显,所以多价疫苗的研制成为趋势。因而本试验在实验室前人工作的基础上,根据 ST₁ 的理化性质,利用基因突变技术,在基因水平上将编码 Cys 的 TGT 突变成编码 Ser 的 AGT,这样的 ST₁ 突变基因的表达产物就失去了 2 个链内二硫键,结果导致 ST₁ 突变体不具有 ST₁ 生物毒性。对于 ST₁ 存在免疫原性弱的问题,本研究将 3 个 ST₁ 基因连接在一起,表达的产物增加了 2 个抗原决定簇,提高了 ST₁ 的免疫原性。LT 含有 1 个分子量为 25 KDa 的 A 亚单位和 5 个分子量 11 KDa 的 B 亚单位,它们以非共价键形成四级结构而形成全毒素,A 亚基能催化真核细胞中与调控腺苷酸环化酶有关的一种膜蛋白腺苷二磷酸糖基化,是毒素的毒力活性部分。B 亚基与靶细胞膜的组成部分 GM1 结合,介导 A 亚基进入,是毒素主要的免疫原性部分。本试验克隆扩增了 LT 分子的 B 亚基基因,从而使表达的蛋白具有良好的免疫原性且无毒性。

基因工程菌株 BL21(DE3)(pETST₁LT_B $\alpha\beta$)经 IPTG 或乳糖诱导后均可获得高效表达,表达的 ST₁-LT_B- α - β 融合蛋白以包涵体形式存在于菌体内,且 LT_B 在保留原有抗原性基础上,赋予了原本不具有抗原性的 ST₁ 具有了抗原性,克隆的 α - β 保护性抗原融合基因使表达的融合蛋白丢失毒性。石振华^[11]和柏佳宁^[8]等分别证明 ST₁-LT_B 及 α - β 融合蛋白均具有原来蛋白的活性;Western blotting 分析也表明所表达的融合蛋白能分别与标准 LT_B 抗血清和标准 α 抗血清产生极强的免疫反应,证明该融合蛋白具有 4 种蛋白各自的良好免疫原性。经薄层凝胶

电泳扫描分析, 目的蛋白的表达量占 38.53%。附以中草药为佐剂免疫小鼠, 进行保护性实验, 对小鼠的保护率可达 80%, 同时中草药对于提高免疫力有一定的效果; 田间试验结果也表明该菌株制剂对仔猪具有较高的保护效果, 受免仔猪发病率明显降低, 均在 40%以下, T 检验存活率 $P=0.0027$, 差异显著; 即使发病也表现出发病时间后延, 病程短的特点。通过 20 L 发酵罐发酵培养, 在接种 1%二级种子液 5 L/min 通气培养 3 h 后, 加入终浓度为 0.03 mol/L 的乳糖、12.5 L/min 通气量培养 6 h 即可得到最高的目的蛋白生产率。证明构建的基因工程菌株可用于生产 ST₁-LT_B- α - β 四价基因工程疫苗的候选菌株。

REFERENCES

- [1] Ana CP, Luiz FM, Iniguez R, *et al.* Outbreaks of cholera-like diarrhoea caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* in the brazilian amazon rainforest. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg*, 2005, **99**(9): 669–674.
- [2] Karina NL, Randa B, Maria BH, *et al.* The role of bacterial and non-bacterial toxins in the induction of changes in membrane transport: implications for diarrhea. *Toxicon*, 2003, **42**(7): 687–707.
- [3] Sheedy SA, Ingham AB, Rood JJ, *et al.* Highly conserved alpha-toxin sequences of avian isolates of *Clostridium perfringens*. *J Clin Microbiol*, 2004, **42**: 1345–1347.
- [4] Schotte U, Truyen U, Neubauer H. Significance of beta-toxigenic *Clostridium perfringens* infections in animals and their predisposing factors—a review. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 2004, **51**: 423–426.
- [5] Bacciarini LN, Boerlin P, Straub R, *et al.* Grone A. Immunohistochemical localization of *Clostridium perfringens* beta-toxin in the gastrointestinal tract of horses. *Vet Pathol*, 2003, **40**: 376–381.
- [6] Akemi Y, Rika I, Rie H. Rapid and sensitive detection of heat-labile I and heat-stable I enterotoxin genes of enterotoxigenic *Escherichia coli* by loop-mediated isothermal amplification. *J Microbiol Methods*, 2007, **68**(2): 414–420.
- [7] Åsa S, Firdausi Q, Matilda N, *et al.* In vivo expression of the heat stable (estA) and heat labile (eltB) toxin genes of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). *Micro Infect*, 2006, **8**(12-13): 2797–2802.
- [8] Bai JN, Zhang Y, Zhao BH. Cloning of α - β fusion gene from *Clostridium perfringens* and its expression. *World J Gastroenterol*, 2006, **12**(8): 1229–1234.
- [9] Xu CB, Xu CL, Zhao ZJ. Expression of alpha-toxin gene of *Clostridium perfringens* type A and its primary immunological protective function. *Acta Microbiol Sini*, 2006, **46**(4): 624–628.
许崇波, 许崇利, 赵志军. A 型产气荚膜梭菌 α 毒素基因表达及其免疫保护作用的初步研究, 微生物学报, 2006, **46**(4): 624–628.
- [10] Xu CB, Wei GS. Construction of recombinant strain expressing enterotoxigenic *Escherichia coli* K88ac-ST1-LTB fusion protein. *Chin J Biotech*, 2002, **18**(2): 216–220.
许崇波, 卫广森. 表达大肠杆菌 K88ac-ST1-LTB 融合蛋白基因工程菌株的构建, 生物工程学报, 2002, **18**(2): 216–220.
- [11] Shi ZH, Li SB, Su G, *et al.* Construction of genetic engineering strain expressing nontoxic *E. coli* heat stable enterotoxin I and heat labile enterotoxin B subunit fusion protein. *Chin J Prev Vet Med*, 2003, **25**(5): 341–344.
石振华, 李尚波, 苏钢, 等. 表达无毒性大肠杆菌 ST1-LTB 融合蛋白基因工程菌株的构建, 中国预防兽医学报, 2003, **25**(5): 341–344.
- [12] Williamson ED, Titball RW. A genetically engineered vaccine against the alpha-toxin of *Clostridium perfringens* protects mice against experimental gas gangrene. *Vaccine*, 1993, **11**(12): 1253–1258.

我单位《生物工程学报》等 4 种期刊论文数据库制作完成并上网

为提高期刊的显示度, 加强对历史文档的整理、保护和利用, 更好地为科研人员提供信息服务, 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部历时近 1 年, 将包括《生物工程学报》、《微生物学报》、《菌物学报》、《微生物学通报》等 4 种期刊自第 1 卷第 1 期开始, 全部逐页扫描、分类检索, 进行数字化制作, 建成了回溯文档全文数据库, 共计 130 卷 620 余期, 约 1 万多篇论文。由于年代久远, 很多版本已成孤本, 搜集整理及制作工作耗时半年多, 目前已全部完成, 并已上传至各编辑部网页供所有读者免费浏览下载。读者只要输入题目、关键词、年卷期、作者、单位等信息, 就可以方便地检索出四刊发表过的全部相关文章。

此外, 2008 年起, 我所四刊将采用 Open Access(开放存取)模式出版, 各刊当期新发表的文章将先于印刷版在网上全文发布, 以利信息的更快传播, 提高文章的阅读量和被引频次。

欢迎浏览下载, 欢迎投稿。请登录期刊联合编辑部网址: <http://journals.im.ac.cn>。