

## 肠毒素性大肠杆菌 CS6 菌毛抗原与霍乱毒素 B 亚基在痢疾菌中的表达及其免疫学效果

应天翼<sup>1,2</sup> 韩照中<sup>1</sup> 冯尔玲<sup>1</sup> 王恒樑 张兆山<sup>1</sup> 苏国富<sup>1\*</sup> 黄翠芬<sup>1</sup>

<sup>1</sup>(北京生物工程研究所,北京 100071)

<sup>2</sup>(北京药物化学研究所,北京 100205)

**摘 要** 构建了携带 *asd*、霍乱毒素 B 亚基(CTB)基因的表达质粒 pYX201,与福氏 2a 痢疾菌 T32 的  $\Delta asd$  突变株 FaD 构成宿主-质粒平衡致死系统,用于在没有抗生素选择压力的情况下,稳定表达 CTB 抗原基因。以此为基础,构建了单独表达肠毒素性大肠杆菌 CS26 菌毛抗原基因的重组质粒 pYX202,以及同时表达 CS6 和 CTB 的共表达质粒 pYX203。Western blotting 和 ELISA 检测结果证实 CS6 及 CTB 在痢疾菌 FaD 中可以有效表达。重组菌免疫家兔后可诱生相应的血清抗体,特别是 CTB 的抗体效价较高,并持续较长时间。本研究为细菌性腹泻疫苗的研究提供了候选株。

**关键词** 疫苗,平稳致死系统,CS6,CTB,痢疾菌

中图分类号 Q503 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)01-0029-05

细菌性腹泻是人群中常见的肠道传染病,广泛流行于世界各地。据统计,全球年腹泻病人达 30 亿左右,我国年发病约 8 亿多人次,死亡率达 0.02%,严重影响成人健康和婴幼儿发育<sup>[1]</sup>。引起细菌性腹泻的主要病原体是肠道致病菌,其中尤以大肠杆菌、痢疾杆菌、伤寒沙门氏菌和霍乱弧菌对人类健康构成最大威胁。由于细菌对抗生素的抗性在逐渐增加,临床耐药菌株不断产生,用抗菌素治疗的效果越来越不理想,所以研制有效的疫苗加强免疫预防是迫切需要解决的卫生问题。在细菌性腹泻中,以肠毒性大肠杆菌(ETEC)为代表的大肠杆菌感染是造成我国乃至世界传染性腹泻的主要病因之一,对婴幼儿发育及成人健康造成严重影响,而目前尚没有适于人用的 ETEC 疫苗。ETEC 的致病过程包括细菌依赖其表面的定居因子(CFs)在肠道内定居、繁殖,并释放细菌毒素(主要是耐热肠毒素 ST 和不耐热肠毒素 LT)引起肠细胞坏死和肠道功能紊乱。目前已经鉴定出 20 种不同的 CFs,但在 50%~80% 临床分离出的 ETEC 中仅大约 7 种是常见的(CFA/I,CS1,CS2,CS3 复合物,CS4,CS5,CS6 复合物)<sup>[2]</sup>。CFA/I 由单一组分构成,CFA/II 由表面抗原 CS1、CS2 和 CS3 以不同方式构成,CFA/IV 则由 CS4、

CS5 与 CS6 组成。其中 CS6 是 CFA/IV 的共有抗原组分。试验证明,定居因子抗原(CFA)免疫可以有效地阻止大肠杆菌在小肠上皮的粘附,对于预防感染有积极意义<sup>[3]</sup>。另外,由于霍乱毒素(CT)和大肠杆菌不耐热肠毒素(LT)在结构上有很大程度的相似性,且它们的 B 亚基有免疫交叉反应,所以用 CTB 代替 LTB 制备联合疫苗的研究愈来愈受到重视。目前临床试验的几株单价腹泻疫苗只针对个别病原菌的个别血清型,难以预防大多数腹泻病原菌的感染。因此,构建多价疫苗是十分必要的,其中以一种病原菌的减毒株或疫苗株为抗原载体所构建的多价疫苗具有更大的优势。为此,本研究以福氏 2a 痢疾菌 T32 的  $\Delta asd$  突变株 FaD<sup>[4]</sup>为载体,表达肠毒素性大肠杆菌定居因子 CS6 菌毛抗原和霍乱毒素 B 亚基(CTB),以期评价其作为多价腹泻疫苗的可行性。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 材料

1.1.1 细菌与质粒:见表 1。

1.1.2 试剂:限制酶、T4DNA 连接酶购自华美生物工程公司,其余试剂为分析纯。

1.1.3 动物:由军事医学科学院动物中心提供。

收稿日期 2000-04-04,修回日期 2000-08-05。

基金项目:军队重点基金(96-25-2-25)。

\* 联系作者。Tel: 86-10-66948835; Fax: 86-10-63833521; E-mail: susg@pic.bi.ac.cn 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

## 1.2 方法

1.2.1 DNA 片段的体外重组 :按文献 [5] 方法进行。

1.2.2 CS6 抗血清制备及其免疫检测 :按文献 [6] 方法进行。

1.2.3 CTB 抗血清制备及其免疫检测 :按文献 [7] 方法进行。

1.2.4 动物免疫 :免疫程序参照中国药品生物制品检定所 1993 年制定的“生物制品检定标准操作细则”进行。

1.2.5 细菌的微量凝集实验 :将 37℃ 过夜培养后用作抗原的液体菌( T32 )6000r/min 离心 5min 收集菌体 ,PBS( pH7.4 )洗涤 3 次 ,以适量 PBS( pH7.4 )重悬菌体 ,调整其  $OD_{600} = 2$ 。在凝集板上每孔加入 100 $\mu$ L 液体菌 ,再加入 100 $\mu$ L 系列稀释的免疫后动物血清 ,混匀 ,置于 37℃ 过夜后观察结果。

表 1 研究中涉及的细菌菌株、质粒及其特性

Table 1 Bacterial strains and plasmids used in the research

Strains and plasmids	Characteristic	Source
<i>E. coli</i>		
DH5 $\alpha$		Our lab.
X6097	<i>asd</i> <sup>-</sup>	Curtiss III R
<i>S. flexneri</i> 2a		
FaD	<i>asd</i> <sup>-</sup> Sm <sup>r</sup> (Based on T32)	[4]
T32	Vaccine candidate strain Sm <sup>r</sup>	Our lab.
Plasmids		
pCB27	Expression vector <i>CTB</i> <sup>+</sup> <i>asd</i> <sup>+</sup>	[7]
pYX102	Expression vector <i>asd</i> <sup>+</sup>	[4]
pMG235	Expression vector <i>CS6</i> <sup>+</sup> <i>amp</i> <sup>r</sup>	[6]
pYX201	Expression vector <i>CTB</i> <sup>+</sup> <i>asd</i> <sup>+</sup>	This work
pYX202	Expression vector <i>CS6</i> <sup>+</sup> <i>asd</i> <sup>+</sup>	This work
pYX203	Expression vector <i>CTB</i> <sup>+</sup> <i>CS6</i> <sup>+</sup> <i>asd</i> <sup>+</sup>	This work

## 2 实验结果

### 2.1 重组质粒的构建

用 *Bgl* II 和 *Hind* III 双酶切 pCB27 ,回收带有 CTB 编码基因和 *asd* 基因的片段 ;同时用 *Bgl* II 和 *Hind* III 进行双酶切 pYX102 ,回收带有 *trc* 启动子 ( $P_{trc}$ ) 和多克隆位点的片段 ,将此二片段连接 ,得到可用于平衡致死系统的重组质粒 pYX201( 见图 1A )。pMG235 是 CS6 的高效表达质粒 ,包含 CS6 的结构基因片段 ,用 *Hind* III 酶切 pMG235 ,回收含有 CS6 基因的片段 ,分别插入 pYX102、pYX201 上的 *Hind* III 位点 ,挑选正向插入的重组质粒 ,得到可用于平衡致死系统的 CS6 单一表达质粒 pYX202 与 CS6、CTB 共表达质粒 pYX203( 见图 1-B、C )。在以上表达质粒中 ,CS6 的表达受控于  $P_{trc}$  ,而 CTB 的表达受  $ProI$  ( $P_{\beta-lac}$ ) 和  $Pro\alpha$  自身启动子 ) 的双重调控。

### 2.2 CS6 与 CTB 在大肠杆菌 X6097 及痢疾菌 FaD 中的表达

用  $CaCl_2$  法将 pYX201、pYX202、pYX203 转化至 *asd* 缺陷型大肠杆菌菌株 X6097 ,发现以上重组质粒均可恢复 X6097 在 LB 培养基上的生长能力。利用 Western blotting 方法测定了 CS6、CTB 在 X6097 中的表达状况 ,结果如图 2。结果显示 pYX202、pYX203 在 X6097 中表达的分子量与预期结果相符 ;pYX201、pYX203 在 X6097 中表达的 CTB 分子量也与预期结果一致 ,并均可以与相应抗体发生结合反应。说明所构建的重组质粒能够表达目的抗原基因 CS6、CTB ,可以用于重组菌株的构建。分别将重组质粒 pYX201、pYX202、pYX203 转化至痢疾菌 FaD ,各重组菌均可以在基础培养基上正常生长。利用 ELISA 法检测 CS6、CTB 在大肠杆

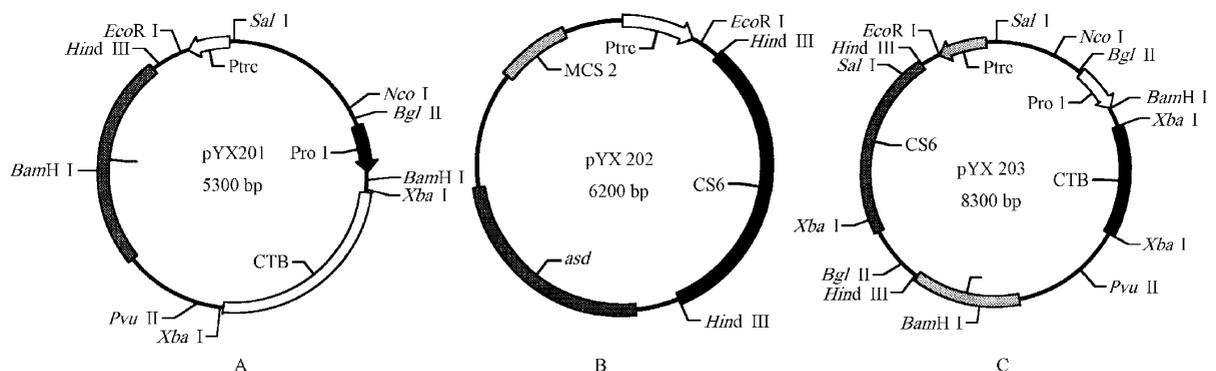


图 1 重组质粒的物理图谱

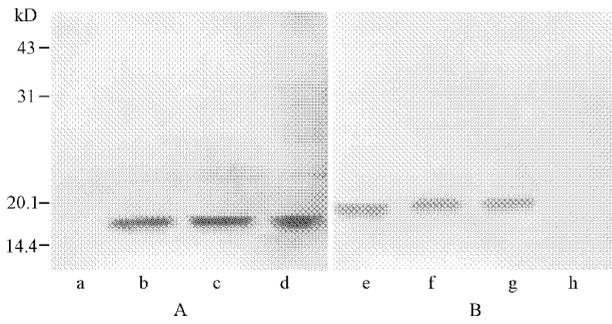


图2 Western blotting 检测 CS6 及 CTB 在大肠杆菌中的表达

Fig. 2 Western blotting analysis of CS6 (A) and CTB (B) expressed in *E. coli* X6097 strain.

a. X6097/pYX201 (negative control); b. X6097/pYX202; c. 6097/pYX203; d. DH5 $\alpha$ /pMG235 (positive control); e. X6097/pYX104 (positive control); f. X6097/pYX201; g. X6097/pYX203; h. X6097/pYX202 (negative control)

表 2 ELISA 法测定 CS6 在不同宿主菌中的表达\*

Table 2 Detection of CS6 in different host cells

Recombinant plasmid	X6097 ( $OD_{492}$ )	FaD ( $OD_{492}$ )
pYX201	0.104 $\pm$ 0.003	0.124 $\pm$ 0.009
pYX202	0.652 $\pm$ 0.008	0.809 $\pm$ 0.006
pYX203	0.667 $\pm$ 0.024	0.712 $\pm$ 0.037

\* All assay were conducted in triplicates

表 3 ELISA 法测定 CTB 在不同宿主菌中的表达\*

Table 3 Detection of CTB in different host cells.

Recombinant plasmid	X6097 ( $OD_{492}$ )	FaD ( $OD_{492}$ )
pYX201	1.179 $\pm$ 0.077	1.272 $\pm$ 0.112
pYX202	0.172 $\pm$ 0.030	0.341 $\pm$ 0.033
pYX203	1.008 $\pm$ 0.072	1.105 $\pm$ 0.019

\* All assay were conducted in triplicates

菌和痢疾菌中的表达状况。结果(见表 2、3)显示, CS6 和 CTB 在 FaD 中的表达水平与在 X6097 中表达水平相当。单一表达 CTB、CS6 的重组菌 FaD/pYX201、FaD/pYX202 表达水平与共表达菌株 FaD/pYX203 的表达水平无明显差别。

作为活菌疫苗候选株,具有良好的生长特性,可以高密度发酵培养是一至关重要的菌株特性。对包含不同重组质粒的 FaD 菌株的生长特性研究结果(图 3)表明,随着质粒包含的基因数目增加,相应重组菌株的生长速度也减慢,但各重组菌株的生长曲线基本一致,经过一定时期的培养,各重组菌株均可以培养至高密度,说明构建的各菌株满足疫苗候选株对生长特性的要求。

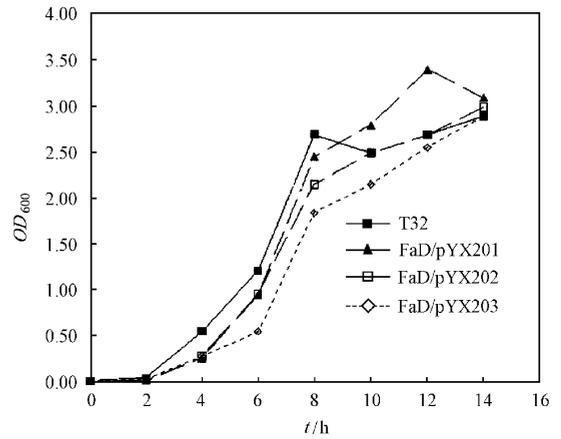


图 3 包含不同重组质粒的 FaD 菌株生长特性

Fig. 3 Growth curves of recombinant FaD harboring different recombinant plasmids

### 2.3 重组菌的免疫学效果评价

免疫动物的方法参照“生物制品检定标准操作细则”(中国药品生物制品检定所 1993),对家兔耳缘静脉注射活菌,间隔 4d,免疫 7 次,免疫剂量为第一次 6 亿菌(CFU),第二次 12 亿,第三次 24 亿,第四次 48 亿,第五次 96 亿,第六次 192 亿,第七次 192 亿。分别在起始免疫的第 0、2、4、6、8、10、12、14 周由耳动脉采血 1.5mL,4 $^{\circ}$ C 放置过夜,离心吸取血清,分别用于 CS6 及 CTB 抗体的 ELISA 效价测定和载体菌 FaD 的菌体抗原(主要是 O 抗原)抗体的液相凝集效价测定。

2.3.1 FaD 菌体抗原抗血清的凝集效价:以痢疾菌 T32 作凝集原,用微量凝集的方法检测免疫后血清的凝集效价。结果显示(见图 4),各重组痢疾菌所

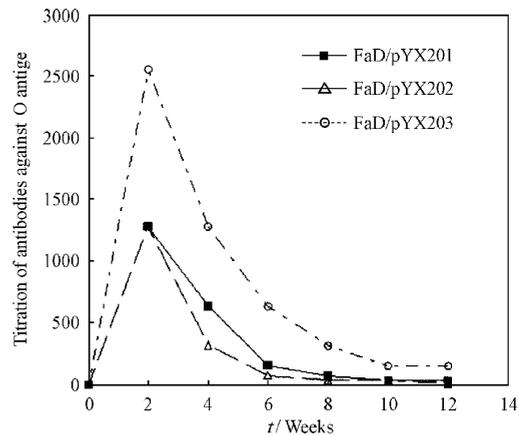


图 4 三株重组 FaD 菌诱生的菌体抗原抗血清的凝集效价

Fig. 4 Titration of antibodies against O antigen elicited by three recombinant *Shigella flexneri* 2a strain FaD.

诱生的血清凝集效价上升迅速,然后急剧下降。FaD/pYX201和FaD/pYX202诱生的抗体凝集效价及抗体滴度的消长状况基本一致,FaD/pYX203诱生的抗体效价较高。总体而言,各重组菌株在第三次免疫(2周)后诱生的抗血清凝集效价最高,即便有后续加倍剂量的抗原免疫,仍未见血清凝集效价的升高。在我们其它类似的研究中也发现相似现象,对此现象的合理解释需要进行进一步的探讨。

**2.3.2 抗CS6、CTB血清抗体的ELISA效价测定:**图5A的结果显示,单表达CS6的重组菌株所诱生的CS6抗体滴度,在免疫结束(第4周)后升至1:640,而后逐步下降,但可以在1:80的效价水平以上维持较长时间。相对而言,同时表达CS6和CTB的共表达重组菌株所诱生的抗体效价则一直徘徊于低水平。图5B显示,单表达CTB的重组菌株、共表达CS6和CTB的重组菌株在免疫后,所诱生的CTB抗体效价均迅速升高到1:2560的水平,而后则缓慢下滑,在1:1280效价水平上维持较长时间,至第14周时CTB抗体效价仍为1:640。

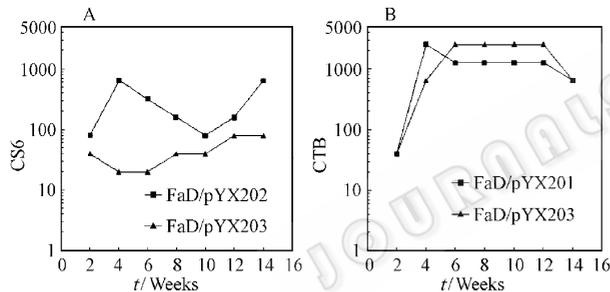


图5 重组菌诱生的CS6(A)、CTB(B)抗体消长状况分析  
Fig.5 Titration of antibodies against CS6(A) and CTB(B) elicited by recombinant *Shigella flexneri* 2a.

### 3 讨 论

以减毒的肠道菌或疫苗菌为抗原载体,表达其它肠道菌的优势保护性抗原,制备基因工程多价口服活疫苗是预防肠道细菌感染的理想途径之一。福氏2a痢疾菌T32株是临床分离出的痢疾菌减毒株,研究表明T32具有较好的安全性。国内外的疫苗工作者以T32为载体菌,已经构建了具有较好免疫效果的多价疫苗菌株<sup>[8]</sup>。因此,本研究选用T32为抗原载体,利用基于*asd*基因功能互补的宿主染色体-质粒平衡致死表达系统<sup>[9]</sup>,实现了在没有抗菌素选择压力的条件下,肠毒性大肠杆菌菌毛抗原CS6和霍乱弧菌毒素B亚基(CTB)在T32菌中的稳定表达,并对其生物学特性和免疫学特性

进行了分析。研究结果表明,CS6和CTB在T32痢疾菌中均可以有效地分别单独表达或共表达,各种重组菌株的生长特性良好,免疫家兔后均诱生相应抗体。从诱生的抗体效价和持续时间来看,具有较好的免疫原性、表达水平较高的CTB诱生的抗体效价较高,并可以在高效价水平持续较长时间。相对而言,由于CS6的表达水平较低,诱生的抗体效价不高,且在高效价水平持续时间较短。因此,利用基于宿主染色体-质粒平衡致死表达系统的T32痢疾菌为抗原载体菌,构建基因工程多价活疫苗时,需要考虑增强外源抗原基因的表达水平,或者加入有效的免疫佐剂,以便达到较好的免疫保护效果。

### REFERENCES(参考文献)

- [1] RUAN L(阮力),WANG Y(汪垣),QIANG B Q(强伯勤). Status and Prospect for New Generation Vaccine Development. Beijing Science Press, 1992, pp. 171~183
- [2] Gaastra W, Svennerholm A M. Colonization factors of human enterotoxigenic *Escherichia coli*(ETEC). *Trends Microbiol*, 1996, **4**(11):444~452
- [3] Svennerholm A M, Wenneras C, Holmgren J. Roles of different coli surface antigens of colonization factor antigen II in colonization by and protective immunogenicity of enterotoxigenic *Escherichia coli* in rabbits. *Infect Immun*, 1990, **58**(2):341~346
- [4] HAN Z Z(韩照中),YING T Y(应天翼),CAO Y(曹勇) et al. Expression of CS3 from Enterotoxigenic *Escherichia coli* in *Shigella flexneri* 2a and Immunogenicity of the Recombinant Strain. *Chin J Biochem Mol Biol*(中国生物化学和分子生物学学报), 1999, **15**(5):719~723
- [5] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning, A laboratory manual. 2nd ed. New York: CSH, 1989
- [6] YANG X(杨晓),ZHANG Z S(张兆山),LIU C J(刘纯杰) et al. Cloning of a cluster of genes encoding coli-surface antigen 6 (CS6) of human enterotoxigenic *E. coli*. *Acta Microbiol Sin*(微生物学报), 1995, **35**(5):390~393
- [7] QIAN R(钱锋),RUI X L(芮贤良),SU G F(苏国富) et al. Expression of *S. sonnei* form I antigen gene and *V. cholerae* toxin B subunit gene in *S. flexneri* 2a strain and investigation of their immunoprotective response in mice. *Acta Genet Sin*(遗传学报), 1996, **23**(4):322~328
- [8] WANG B R(王秉瑞),SONG S Z(宋树珍),CHEN J R(陈锦荣) et al. A bivalent strain with the characters of *Shigella flexneri* 2a and *Sonnei*. *Chin J Microbiol Immunol*(中华微生物学和免疫学杂志), 1987, **7**:373
- [9] Curtiss R 3d, Nakayama K, Kelly S M. Recombinant avirulent *Salmonella* vaccine strains with stable maintenance and high level expression of cloned genes *in vivo*. *Immunol Invest*, 1989, **18**(1~4):583~596

## Immunologic Properties of coli Surface Antigen (CS6) of Enterotoxigenic *Escherichia coli* and Cholera Toxin Subunit B Expressed in *Shigella flexneri* 2a Strain T32

YING Tian-Yi<sup>1,2</sup> HAN Zhao-Zhong<sup>1\*</sup> FENG Er-Ling WANG Heng-Liang  
ZHANG Zhao-Shan<sup>1</sup> SU Guo-Fu<sup>1</sup> HUANG Cui-Fen<sup>1</sup>

<sup>1</sup>( Institute of biotechnology ,Beijing 100071 ,China )

<sup>2</sup>( Institute of Pharmaceutical Chemistry ,Beijing 100205 ,China )

**Abstract** A host-plasmid balancing system composed with a  $\Delta asd$  mutant (FaD) of an avirulent strain (T32) of *Shigella flexneri* 2a and plasmid harboring *asd* gene was used to express enterotoxigenic *E. coli* surface antigen (CS6) and *V. cholerae* toxin subunit B (CTB). The results of Western blotting and ELISA showed that all of recombinant plasmids (pYX201, pYX202 and pYX203) could be maintained stably and expressed CS6 and CTB respectively in T32 without any antibiotic selection. All the recombinant bacterial strains could elicit the corresponding antibodies in rabbits. The antibodies against CTB elicited by both FaD/pYX201 and FaD/pYX203 showed to be high level and had long prolongation time, in otherwise, the antibodies against CS6 showed to be low level, indicating that higher expression level of foreign antigen may be benefit for construction of genetic multivalent vaccine.

**Key words** vaccine, host-plasmid balancing system, CS6, CTB, *Shigella flexneri*

Received: April 4, 2000

This work was supported by Grant from Military Important Subject (96-25-2-25).

\* Corresponding author. Tel 86-10-66948835; Fax 86-10-63833521; E-mail sugf@nic.bmi.ac.cn

## 天然食品防腐剂—乳链菌肽投入工业化生产

中国科学院微生物研究所和浙江天台银象生物化工厂经过数年努力,联合攻关,已将一种天然食品防腐剂—乳链菌肽投入工业化生产。

乳链菌肽(Nisin)又称之为乳酸链球菌素,是乳酸链球菌(现定名为乳酸乳球菌)产生的一种小肽,对引起食物腐败的许多革兰氏阳性菌,如梭菌、金黄色葡萄球菌、利斯特氏菌、嗜热脂肪芽孢杆菌等有强烈抑杀作用,是一种高效、无毒的天然食品防腐剂,已被包括我国大陆、台湾和香港在内的世界许多国家和地区广泛应用于乳制品、罐头食品、植物蛋白食品、肉制品和饮料的防腐保鲜。

中科院微生物所的科研人员在国家自然科学基金委和中国科学院“八五”重点科研项目的资助下,从1989年开始,开展了对乳链菌肽的基础研究,在完成了高产菌株的选育、探索了发酵条件和提取工艺后,于1992年底与浙江天台银象生物化工厂和中国食品发酵工业研究所协作,完成了中试及中试产品的应用试验。从1996年起,在国家科技部的支持下,该项目被列为国家“九五”科技攻关项目,在浙江天台建立了我国第一条乳链菌肽工业化生产线,将中试结果在此生产线上进行大规模工业化生产试验并获得成功。目前已正式投入生产,其产品已销往国内外市场。

最近,乳链菌肽的工业化生产已通过中国科学院主持的专家鉴定。以中国食品添加剂生产应用协会、清华大学、北京大学、北京师范大学、卫生部食品卫生监督检验所和中国食品发酵工业研究所等单位的著名专家教授组成的鉴定委员会一致认为,乳链菌肽是一种天然食品防腐剂和食品品质改良剂。该攻关项目的完成,填补了我国不能工业化生产乳链菌肽的空白,必将为我国现代食品工业的发展带来良好的经济效益和社会效益。

(还连栋 供稿)