

用遗传工程技术构建含 *E. coli* K88ac 和 LT(A⁻B⁺) 两种抗原基因的菌株

李丰生 陈添弥 黄翠芬

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京)

利用我室克隆的含大肠杆菌K88ac抗原基因的pMM031质粒和含肠毒素LT(A⁻B⁺) 抗原基因的质粒pPMC4, 使用限制性内切酶 BamH I 酶解, 取得含 K88ac 抗原基因的片段, 再经和BamH I 消化的质粒pPMC4连接重组, 构建了同时具有这两种抗原基因的质粒 pMM085。经琼脂糖凝胶电泳分析, pMM085质粒的分子量约为14.6Md, 在宿主菌*E. coli* C600中, 经过ELISA和反向间接血凝等几种试验测定 K88ac 抗原, 结果都说明其抗原产量与亲本菌株基本相同。重组菌的抗甘露糖豚鼠红细胞凝集反应也是阳性。对肠毒素抗原用被动溶血试验测定, 结果说明其LT-B的产量和亲本菌的产量也基本相同。重组的工程菌株经兔肠结扎试验表明没有毒性反应, 因此重组菌株可以作为预防仔猪腹泻的活菌疫苗候选株。

关键词 ETEC; K88ac抗原; LT肠毒素抗原

存在于毒素源性大肠杆菌 (ETEC) 中的K88ac 抗原是一种重要的致病因子。它是组成细菌外周菌毛的成分, 这种菌毛不同于普遍存在于大肠杆菌中的 I 型菌毛。K88 菌毛具有粘附的种的特异性, 主要是使致病菌粘附定居到新生仔猪小肠的上皮细胞上, 从而细菌大量繁殖, 产生对热敏感的肠毒素 (LT) 和/或对热稳定的肠毒素 (ST), 造成腹泻的发生^[1, 2]。

K88ac 抗原具有较强的免疫原性, 自从被认识以来, 已经制成了许多种预防腹泻的疫苗, 业已收到了良好的效果。用LT免疫兔子和猪也做了许多实验, 证明具有一定的保护力^[2]。因为预防肠道菌引起的腹泻等病, 经口服免疫是一个合理、有效的免疫途径, 所以制备无毒的活菌疫苗株, 便成了众多实验室研究的目的, 以求能更好地预防疾病的发生。

本实验是利用通过体外改造获得的

LT A亚基基因 (即 LT 的毒性中心基因) 失活, 而B 亚基基因仍完好, 可以产生正常免疫活性多肽的重组质粒菌株^[3], 把 LT (A⁻B⁺) 基因同K88ac抗原基因^[4]重组于一起, 得到同时表达两种抗原的菌株, 从而可望得到预防仔猪腹泻的双价疫苗株。

材料和方法

(一) 菌株与质粒

E. coli C600 *leu* *thr* B1 F⁻

E. coli C600 (pPMC4) *leu* *thr* B1

F⁻ Tc^r Cm^r LT A⁻B⁺

(为本室陈添弥构建)

E. coli RR1 (pMM031) *ara pro lac*

本文于1986年4月28日收到。

赵立权同志摄制电镜照片, 张林元同志给予指导, 在此一并致谢。

gal Sm^r Ap^r K88ac⁺

(为本室张林元构建)

E. coli RR1 (pMM032) ara pro lac

gal Sm^r Ap^r K88ac⁺

(为本室张林元构建)

E. coli 79-1454 08:K88ac K31:H⁻

LT⁺ (为野生型菌株, 中国兽药监察所赠)

(二) 培养基

1. 常规 LB 培养基

2. 产毒培养基(HLT培养基)(g/L):

酪蛋白水解物20, 酵母膏 10, NaCl 2.5, K₂HPO₄ 15, 葡萄糖 5, MgSO₄·7H₂O 0.0025, CoCl₂·6H₂O 0.001, FeCl₃ 0.00025.

葡萄糖和上述微量盐分别灭菌, 使用时加入。

(三) 质粒DNA的抽提与纯化

质粒 DNA 的粗制品是参照 Birnboim^[5] 方法获得, 质粒 DNA 纯化根据需要分别采用酚法或CsCl密度梯度超离心法。

(四) DNA限制性内切酶消化和DNA片段连接

EcoR I 酶为本实验室自制产品, Hind III 酶和 λDNA 购自洛阳华美生物工程公司, BamH I, Xho I, T4DNA 连接酶为生物物理所生化试剂厂产品。酶切和连接条件按厂方说明书进行。连接反应中, pMM031质粒BamH I 消化的DNA 1.5μg, pPMC4质粒BamH I 消化的DNA 1.0μg, 加入 T4DNA 连接酶 5 单位, 12℃ 保温 20h, 用于细菌的转化。

(五) 细菌的转化

参照Kushner^[6] 的方法, 用Ca²⁺-Rb⁺ 处理受体菌得到感受态细胞。

(六) 琼脂糖凝胶电泳

用0.7%琼脂糖, 采用水平电泳装置, 用TAE电泳缓冲液(0.04M Tris-acetate,

pH8.2, 0.001MEDTA), 电压用100V, 电泳时间4h, 用含溴化乙锭 0.4mg/ml 的TAE缓冲液染色后, 紫外光下照像。

(七) K88ac抗原的测定

抗K88血清, 抗K88 IgG, 抗K88 IgG 酶标抗体, 均由本实验室制备, K88 抗血清致敏的绵羊红血球由农业部中国兽药监察所提供。测定 K88 抗原, 分别采用 ELISA^[7] 和反向间接血球凝集法^[8] 相比较而确定。

(八) 抗甘露糖豚鼠红细胞凝集反应(MRHA)

各取30μl 2%的豚鼠红细胞, 和含甘露糖0.5%的细菌悬液(30亿/ml) 混合于微孔板中, 4℃ 2h后观察结果。

(九) 被动溶血试验(PIH)^[9]

对在产毒培养基和普通 LB 培养基上生长的待测菌, 用生理盐水洗下, 调整 A₆₀₀ = 1.0, 然后加入多粘菌素 B 使终浓度为 25μg/ml, 37℃ 30min, 离心取上清和 2% 的绵羊红细胞混合, 37℃ 30min, 加入 LT 抗血清, 再保温 30min, 加入豚鼠补体, 30min后观察溶血反应。

(十) 兔肠结扎实验

对制备的 LT 毒素注入到成年兔的回肠结扎段内, 18h后观察结果。

(十一) 细菌菌毛的观察

细菌用磷钨酸负染色, 电镜下观察。

实验结果

(一) 质粒pMM085的构建

构建程序如图 1 所示。

采用超离心制备的 pMM031 和 pPMC4质粒 DNA, 分别经 BamH I 消化, 67℃ 加热 5min 使酶失活后混合到一起, 连接后转化 *E. coli* C600, 在含氯霉素的

平皿上筛选,共得到转化子 865 个,其中 67 个对四环素敏感,经鉴定有 18 株 K88 抗原是阳性,将其中一株纯化,抽提质粒 DNA,其质粒定名为 pMM085,做酶切实验,用 *EcoR* I 酶切后琼脂糖电泳出现四条 DNA 带,两条与其两亲本相同,两条是新组合的带,而用 *Bam*H I 酶切则产生两条分子量基本相同的 DNA 片段,在 0.7% 或 1.2% 琼脂糖电泳中都没能分开(图版 I-1)。为了确定 K88-BamH I 重组片段的插入方向,用 *Hind* III 和 *EcoR* I 对 pMM085 质粒双酶解,结果见图版 I-2,经比较推论可以得出, K88-BamH I 片段中的一个 *Hind* III 切点是位于图 1 pMM085 质粒图谱中所示的位置(载体 pPMC4 中的 *Hind* III 切点没标出)。pMM085 质粒仍只有一个 *Xho* I 切点。在电泳中和标准 λ DNA *Hind* III 酶解片段比较测知, pMM085 质粒的分子量在 14.6Md 左右。

(二) 重组菌株和亲本菌株 K88ac 抗原产量的比较

1. 在用 ELISA 法测定中,用下法制备抗原:对过夜振荡培养的细菌,离心收集菌体,用生理盐水悬浮至 $A_{600} = 1.0$,取 3ml 悬液超声波破碎 3min,离心收集上

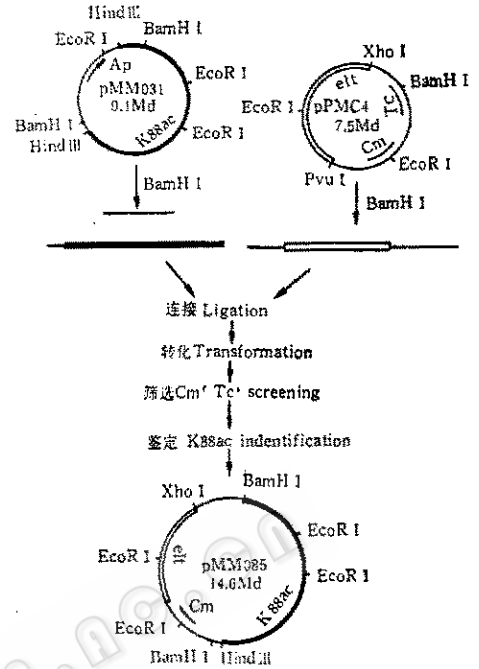


图 1 重组质粒 pMM085 的构建示意图
Fig.1 Scheme for construction of recombinant plasmid pMM085

清,即得 K88 粗抗原,用于测定。表 1 是用 ELISA 法测定中,不同菌株不同抗原稀释度时测得 A_{492} 数,可以看出,重组菌和亲本株及 K88ac 次级克隆株以及野生株其 K88ac 抗原产量基本没有差别。

表 1 用 ELISA 法测定不同菌株 K88ac 抗原时的 A_{492} 阅读值

Table 1 The A_{492} values of K88ac antigen of different strains in ELISA

菌 株 Strains	K 88ac 抗原稀释倍数 Dilution of K88ac antigen					
	10	50	100	200	500	1000
<i>E. coli</i> C600 (pMM085)	0.400	0.395	0.360	0.350	0.215	0.155
<i>E. coli</i> RR1 (pMM031)	0.390	0.350	0.350	0.310	0.215	0.170
<i>E. coli</i> RR1 (pMM032)*	0.395	0.385	0.370	0.330	0.255	0.160
<i>E. coli</i> 79-1454	0.34	0.325	0.300	0.260	0.180	0.120
<i>E. coli</i> C600 (pPMC4)*	0.046	0.035	0.055	0.046	0.055	0.046
<i>E. coli</i> C600*	0.055	0.035	0.035	0.050	0.040	0.035

* 为 K88ac 次级克隆菌株, * 为阴性对照

K88ac subclone strain(*), Negative control(#)

2. 反向间接血凝试验测定 K88ac 抗原水平：对过夜培养的细菌离心，生理盐水悬浮至A₈₀₀=1.0, 然后各取1ml菌液，65℃保温 20min，使菌毛脱离菌体，离心后，上清即是粗抗原，做不同稀释度的测定，结果也表明，重组菌和其它一些 K88ac 阳性菌 K88ac 抗原的产量基本没有差别。见图版 I -3。

(三) MRHA 反应及菌毛的观察

在有甘露糖 (0.5%) 存在的情况下，具有 K88ac 菌毛的菌可使豚鼠红细胞凝集，无 K88菌毛的菌则不引起凝集。但在无甘露糖的情况下，两者都能使豚鼠红细胞凝集，结果见图版 I -4、5，菌毛观察见图 2。



图 2 *E.coli*C600(pMM085)的K88ac菌毛
Fig.2 The K88ac pili of recombinant strain *E.coli* C600(pMM085)(25000×)

(四) 被动溶血试验测定 LT-B 含量

对在普通 LB 培养基和产毒培养基上生长的细菌的 LT-B 产量做了测定，不同的培养基对LT-B的释放产量有影响，但在同一培养基中，含质粒pMM085的重组菌和含质粒pPMC4的亲本菌，LT-B 的产量相同，结果见表 2。

(五) 肠结扎试验测定生物毒性

完整的 LT 毒素在成年兔的回肠结扎试验中能够引起肠段积水，而有免疫原性的 LT-B 亚基没有这种效应，实验中对含

表 2 PIH 试验测定菌株LT-B产量效价结果

Table 2 The LT-B titer of strains in PIH test

菌 株 Strains	LB培养基	HLT培养基
	LB medium	HLT medium
<i>E.coli</i> C600(pMM085)	8	16
<i>E.coli</i> C600(pPMC4)	8	16

有质粒pMM085 的重组菌做了测定证明没有生物毒性，结果见图 3。

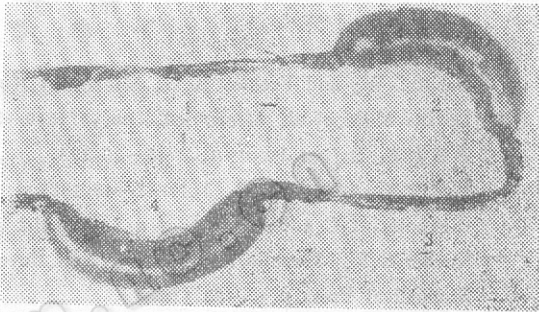


图 3 肠结扎试验测定结果
Fig.3 The result of the recombinant strain in ileal loop test.
1,3. *E.coli* C600(pMM085)
2,4. *E.coli* 79-1454

讨 论

从上述实验结果看来，新构建的带有 K88ac和LT(A⁻B⁺)基因的质粒pMM085，两基因都能表达，并且与其原亲本菌株表达量基本相同。K88ac 抗原是由多基因控制的，表达调控比较复杂。而本实验用为载体的带有LT(A⁻B⁺)基因的质粒，其LT毒素是由原克隆本身的启动子控制，其中 A 亚基基因由于已经在体外使其相位改变，所以表达的多肽失去生物毒性，而 B 亚基基因由于有自己的核糖体结合序列及起始密码，所以借助 LT 的启动子仍能产生正常的活性多肽，具有免疫原性。LT毒素主要存在于细菌内部和外周脂膜中，细胞壁通透性的改变可以影响到 LT 的释放，

从本实验看来带有 K88ac 菌毛的菌株和不带 K88ac 菌毛的菌株, 虽然细胞壁有所改变, LT 抗原的释放却基本一样。

由大肠杆菌 (ETEC) 引起的仔猪腹泻是新生仔猪死亡的重要因素, 因此目前国内外许多实验室都在从事 ETEC 疫苗的研究。具有 K88ac 粘附素的菌株可在体内定居繁殖, 刺激抗体的产生, 只有 LT 抗原无粘附素的菌定居繁殖能力甚差, 不能

够最大限度地刺激机体的免疫应答系统, 而本实验构建的菌株既具有定居作用的 K88ac 粘附素又具有 LT 抗原, 并且没有生物毒性, 从理论上说, 此菌株可以更好地刺激机体的免疫应答, 产生抗 K88 和 LT 两种抗体, 对抗引起腹泻的大肠杆菌, 因此可望此菌株做为一个预防仔猪腹泻的活菌疫苗候选株, 现在正准备做免疫效果, 保护能力的实验观察。

参 考 文 献

- [1] Gaastr, W. and Frosts, K.G., *Microbiol. Rev.*, 46:129—161, 1982.
- [2] Levine, M.M. et al., *Microbiol. Rev.*, 47:510—550, 1983.
- [3] 陈添弥等, *Infect. Immun.*, 47:5—10, 1985.
- [4] 张林元等, *生物工程学报*, 1(4):42—46, 1985.
- [5] Birnboim, H.C. and Doly, J., *Nucleic Acid Res.*, 7:1513—1517, 1979.
- [6] Kusher, S.R., *Genetic Engineering*, H.W. Boyer and S. Nicosia eds, Elsevier North-Holland Biomedical Press, p.17—23, 1978.
- [7] 李安丽, 罗清华, *家畜传染病*, (2):20—22, 1984.
- [8] 郭景煜, 潘松年, *畜牧兽医学报*, 13:261—266, 1982.
- [9] Evans, D.J. Jr. et al., *Infect. Immun.*, 16:604—609, 1977.

CONSTRUCTION OF A STRAIN CONTAINING *E. COLI* K88ac AND LT(A⁻B⁺) ANTIGEN GENES USING GENETIC ENGINEERING METHOD

Li Fengsheng Chen Tianmin Huan Cuifen

(Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military
Medical Sciences, Beijing 100800)

pMM031 and pPMC4 were the plasmids constructed in our laboratory previously. We use the restriction endonuclease BamHI to cleave the K88ac gene fragment from plasmid pMM031. Then we ligated it with the plasmid pPMC4 which contain the LT(A⁻B⁺) genes. After screening, we obtained a plasmid pMM085 containing the above antigen genes. The molecular weight of pMM085 is about 14.6 Md based on agarose electrophoresis using the λ -HindIII digested DNA as markers. The expressing level of K88ac antigen in strain *E. coli* C600 harbouring the plasmid pMM085 is not much different

from its host and other K88ac positive strains when analysed in ELISA and reverse indirect hemagglutination test. In PIH test the LT-B production level is also the same as its host. The MRHA reaction of the constructed strain is positive. And the rabbit ileal loop test for LT toxin activity is negative. So, it could be a good live vaccine candidate for prevention of piglet diarrhea caused by ETEC bacteria.

Key words

ETEC; K88ac antigen; LT enterotoxin antigen

图 版 说 明

1. 酶切鉴定质粒 pMM085

Identification of plasmid pMM085 by endonuclease digestion

2. 酶切鉴定质粒 pMM085

Identification of plasmid pMM085 by endonuclease digestion

3. 反向间接血凝试验测定 K88ac 抗原结果

The K88ac antigen level in reverse indirect hemagglutination

(1) *E. coli* C600(pMM085)

(2) *E. coli* RR1(pMM031)

(3) *E. coli* RR1(pMM032)

(4) *E. coli* 79-1454

(5) *E. coli* C600(pPMC4)

4. *E. coli* C600(pMM085) 的 MRHA 反应

The MRHA reaction of recombinant strain *E. coli* C600(pMM085)

(1) *E. coli* C600(pMM085)

(2) *E. coli* RR1(pMM031)

(3) *E. coli* C600(pPMC4)

↑ 为血球对照 Red cell control(↑)

5. 无甘露糖的豚鼠红细胞凝集反应

Hemagglutination without mannose

(1) *E. coli* C600(pMM085)

(2) *E. coli* RR1(pMM031)

(3) *E. coli* C600(pPMC4)

↑ 为血球对照 Red cell control(↑)

李丰生等：用遗传工程技术构建含*E.coli* K88ac 和LT(A⁻B⁺)
两种抗原基因的菌株

图版 I
Plate I

Li Fengsheng et al.: Construction of a strain containing *E. coli* K88ac
and LT(A⁻B⁺) antigen genes using genetic engineering method

