

## 表达霍乱 CT-B 和 LPS-O 抗原的鼠伤寒菌苗株的构建

陈东立 马清钧

(军事医学科学院生物工程研究所 北京 100850)

**摘 要** 将编码霍乱 CT-B 和 LPS-O 抗原的基因与载体质粒 pYA248 重组后, 转入  $\Delta cya \Delta crp \Delta asd$  减毒鼠伤寒疫苗株 x4072, 构建成无药物抗性、带双价抗原的工程菌株 x4072 (pMG306)。该菌株能分泌表达特异的霍乱 CT-B 抗原, 并且在菌体表面同时表达霍乱和鼠伤寒的 O 抗原。小鼠腹腔免疫和攻击试验表明该菌苗株对霍乱毒株的攻击具有良好的保护作用。本研究为新型霍乱/鼠伤寒双价口服活疫苗的构建打下了基础。

**关键词** 霍乱弧菌, CT-B 抗原, LPS-O 抗原, 鼠伤寒杆菌, 双价活疫苗

在许多发展中国家, 霍乱仍然是严重的威胁人们健康的重要传染病之一, 研制新型有效的霍乱疫苗仍为紧迫的问题。对霍乱有效的免疫反应应包括抗毒免疫和抗菌免疫, 它们分别主要由霍乱毒素 B 亚单位(CT-B)抗原和脂多糖 O(LPS-O)抗原激发, 当两者同时存在时能产生协同保护效应, 增强免疫效果。

采用减毒沙门氏菌作为载体构建双价活疫苗, 已成为新型疫苗研制的重要途径之一。这是由于沙门氏菌是侵袭性的肠道杆菌, 通过粘附、侵袭、定居肠相关淋巴组织(GALT), 并经肠系淋巴结到达肝、脾脏, 更有效地刺激机体产生局部、细胞和体液免疫反应。近年来利用沙门氏菌携带外源抗原的研究已有很多报道, 在沙门氏菌 TY21a 中表达了志贺氏痢疾杆菌 O 抗原、大肠杆菌不稳定肠毒素 B 亚单位、霍乱弧菌肠毒素 B 亚单位抗原, 在鼠伤寒杆菌  $\Delta aroA$  株中表达了大肠杆菌肠毒素 B 亚单位的抗原<sup>[1, 2, 3, 4]</sup>。

鼠伤寒沙门氏菌 x4072 是由野生型鼠伤寒 SR-11 株突变构建的减毒疫苗株, 可用于鼠伤寒的预防, 同时也是构建活菌苗株的载体菌之一, 具有以下特点: 1. *Cya* (编码 AMP 环化酶)和 *Crp* (编码 cAMP 受体蛋白)基因缺失突变后, 毒性大为降低, 但仍保持野生株粘附、侵袭和定居 GALT 的能力; 2. *asd* 基因缺失。asd (天冬氨酸  $\beta$ -半乳糖脱氢酶)是二氨基庚二酸(DAP)生物合成途径中必需的酶, *asd* 基因的缺失导致该突变株在无外源 DAP 的培养条件下溶菌死亡。该减毒疫苗株的载体质粒 pYA248 含有来自链球菌的 *asd*<sup>+</sup> 基因, 与宿主的 *asd*<sup>-</sup> 互补, 转化子能在无外源 DAP 的条件下生长。用 *asd*<sup>+</sup> 作为选择标记取代了常用的抗药性标记<sup>[5, 6, 7]</sup>。

本实验室已从霍乱弧菌 569B 株分别克隆了编码 CT-B 和 LPS-O 抗原的基因, 获得了高效表达, 并且将两者插入载体质粒 Bluescript M13<sup>+</sup>, 构建成重组质粒 pMG305, 在大肠杆菌中获得了表达<sup>[8, 9, 10, 11]</sup>。本文报告将 CT-B 和 LPS-O 基因导入鼠伤寒沙门氏菌疫苗

株 x4072 后,霍乱保护性抗原在鼠伤寒受体菌中的表达情况,及双价抗原菌苗株的初步保护实验结果。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌株和质粒

霍乱弧菌 569B(经典生物型、稻叶血清型):由卫生部药品生物制品检定所提供。鼠伤寒杆菌 x3730、x4072 和大肠杆菌 x6076(pYA248):由美国华盛顿大学 Roy Curtiss III 教授提供。大肠杆菌 HB1001(pMG305)和 HB101(pMMCT-B):由本实验室构建。

### 1.2 重组质粒的构建

按文献[12]进行。

### 1.3 CT-B 抗原的 GM1-ELISA 检测

参照文献[11]进行。

### 1.4 LPS-O 抗原的检测

1.4.1 热酚-水法提取脂多糖:参照文献[13]进行。

1.4.2 O 抗体的制备:用热酚-水法提取的霍乱弧菌 LPS 和鼠伤寒杆菌 LPS 分别加入福氏佐剂,对家兔进行背部皮下多点注射。LPS 免疫剂量 1mg/次/只。

1.4.3 菌体酶联和菌体凝集试验:参照文献[11]进行。

1.4.4 血凝抑制试验:参照文献[14,15]进行。

1.4.5 脂多糖 SDS-PAGE:参照文献[12]进行,采用 20% 分离胶和 5% 浓缩胶,20mA 恒流电泳 8~12h。

### 1.5 小鼠腹腔免疫和攻击试验

免疫组和对照组各 15 只 18~25g 的上海小鼠,免疫组腹腔注射活菌苗 3 亿/只,对照组注射 LB 培养基。间隔 3d 重复一次,共注射 3 次。第三次免疫后 7d,用霍乱毒株 569B 进行腹腔攻击。攻毒后连续观察 7d,记录小鼠存活数。

## 2 结果与讨论

### 2.1 重组质粒和菌苗候选株的构建和鉴定

霍乱弧菌保护性抗原 CT-B 和 LPS-O 基因来自重组质粒 pMG305,将 pMG305 用 Sal I 和 Pvu II 酶切,回收 11.2kb 目的基因片段;将载体质粒 pYA248 用 Hind III 部分酶切,回收 3.0kb 片段,用 Klenow 酶补平后 Sal I 酶切,回收 3.0kb 的载体片段。将制备的载体和目的基因片段用 T4 DNA 连接酶进行连接(图 1)。获得的重组 DNA 先转入修饰功能正常、限制功能缺陷的鼠伤寒 x3730 株,使重组质粒具备鼠伤寒菌的甲基化模式,再转入限制、修饰功能正常的终宿主疫苗株 x4072 中。在普通 LB 平板上培养后获得 70 个转化子。

随机挑选 10 个转化子,抽提质粒进行鉴定。根据设计,重组质粒有两个 Sac I 位点,将质粒切成 8.5kb 和 5.7kb 两个片段;具有 Sal I 和 Pvu II 单酶切位点,分别将重组质粒切为一个 14.2kb 的片段。酶切鉴定结果与设计完全一致,如图 2 所示,表明重组质粒的构建正确。命名该重组质粒为 pMG306。

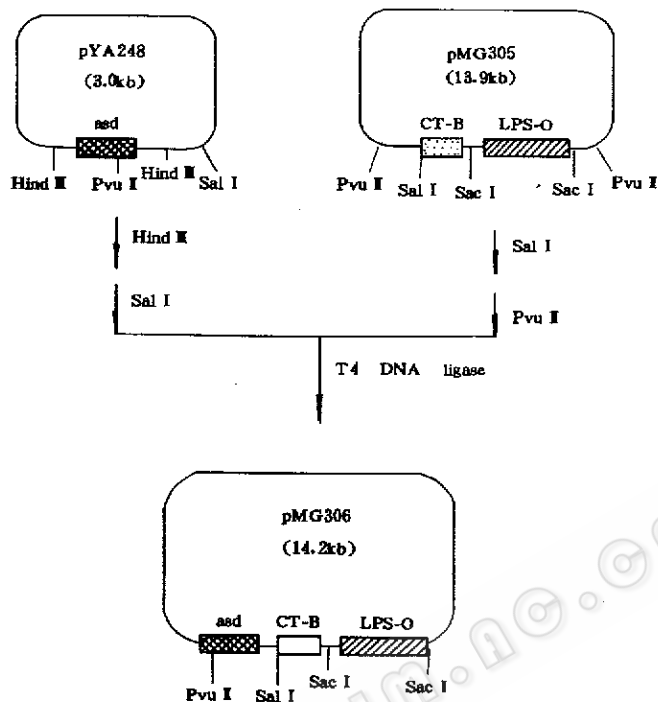


图 1 重组质粒的构建

Fig. 1 Construction of recombinant plasmid

2.2 CT-B 抗原在 x4072(pMG306)中的表达

将菌苗株 x4072(pMG306)、受体菌 x4072 和表达 CT-B 抗原的 HB101(pMMCT-B)进行 50ml LB 肉汤培养,然后对上清和经超声破碎菌体样品分别进行 CT-B 的 GM1-ELISA 分析。结果表明,受体菌 x4072 的培养上清和胞内都没有 CT-B 表达;菌苗株 x4072(pMG306)能很好地表达 CT-B 抗原,并且主要为分泌表达,见表 1。

表 1 x4072(pMG306)表达 CT-B 抗原的酶联分析  
Table 1 ELISA of CT-B expressed by x4072(pMG306)

Strain	OD <sub>492</sub>	
	Supernatant	Cell extract
x4072	0.16	0.12
x4072(pMG306)	1.19	0.42
HB101(pMMCT-B)	1.10	0.35

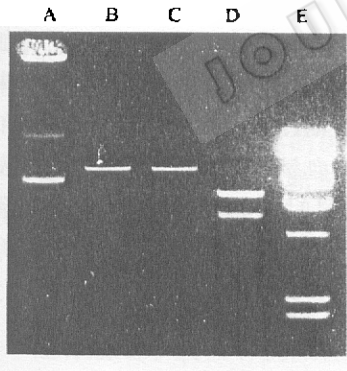


图 2 重组质粒 pMG306 的酶切鉴定

Fig. 2 Restriction analysis of recombinant plasmid pMG306

A: pMG306 B: pMG306 + Sal I  
C: pMG306 + Pvu II D: pMG306 + Sac I  
E: λDNA + Hind III

将 x4072、x4072(pMG306)和 HB101(pMMCT-B)培养物的上清液先用特异抗 CT 血清抑制,然后进行酶联检测。结果见表 2, x4072(pMG306)和 HB101(pMMCT-B)的上清

与抗 CT 血清预反应后,酶联 OD 值显著低于未与抗 CT 血清反应的阳性对照,表明 x4072(pMG306)表达的抗原确为特异的霍乱毒素 B 亚单位。

表 2 x4072(pMG306)表达 CT-B 抗原的酶联特异性分析

Table 2. ELISA identification of specific CT-B expressed by x4072(pMG306)

Strain	OD <sub>492</sub> value	
	Before inhibitim by anti-CT serum	After inhibitim by anti-CT serum
x4072	0.12	0.10
x4072(pMG306)	0.90	0.20
HB101(pMMCT-B)	0.82	0.21

2.3 霍乱 LPS-O 抗原在 x4072(pMG306)中的表达

2.3.1 菌体酶联分析: 菌体酶联的结果显示,569B 和 x4072(pMG306)的酶联 P/N 值大于 2.1,并且随着抗体浓度的稀释,酶联 OD 值随之下降;受体菌 x4072 的酶联 OD 值始终保持一个低值,不随抗体浓度的变化而改变(图 3),这表明在 x4072(pMG306)菌体表面有霍乱 O 抗原表达。

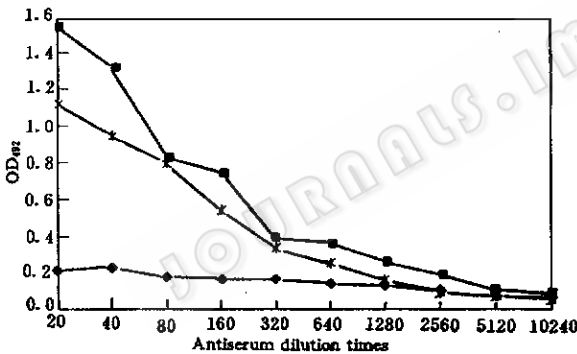


图 3 菌体酶联分析

Fig. 3 Whole cell ELISA

- ◆ - *S. typhimurium* x4072
- \* - *S. typhimurium* x4072(pMG306)
- ■ - *V. cholerae* 569B

2.3.2 菌体凝集试验: 用纯化的 LPS 免疫家兔所得霍乱 O 抗血清和鼠伤寒 O 抗血清,分别与经福尔马林灭活的菌体进行凝集试验。鼠伤寒 O 血清与霍乱弧菌 569B 菌体、霍乱 O 血清与鼠伤寒杆菌 x4072 菌体都没有发生明显的凝集反应,证明血清的特异性较好(见表 3)。菌苗株 x4072(pMG306)与鼠伤寒 O 血清和霍乱 O 血清都能发生凝集反应,表明它能同时表达鼠伤寒杆菌和霍乱弧菌的 O 抗原。根据凝集滴度推算两者的表达量分别约为亲本的 1/2 和 1/16。

表 3 抗体滴度的菌体凝集法测定

Table 3 Titer analysis by bacterial agglutination test

Strain	O-antibody titre	
	<i>S. typhimurium</i>	<i>V. cholerae</i>
x4072	1:32	No reaction
x4072(pMG306)	1:16	1:8
569B	No reaction	1:128

**2.3.3 血球凝集抑制(HIA)试验:** 根据预实验的结果,采用霍乱弧菌 569B 的 LPS(Sigma 公司产品)以  $6\mu\text{g/ml}$  致敏血球,1:400 的 O 血清进行血凝抑制试验。菌苗株 x4072 (pMG306)和霍乱弧菌 569B 能竞争抑制霍乱 O 抗血清与 569B LPS 的凝集反应,而鼠伤寒 x4072 则无抑制效应(见图 4)。这表明菌苗株 x4072(pMG306)确能表达霍乱 LPS-O 抗原。

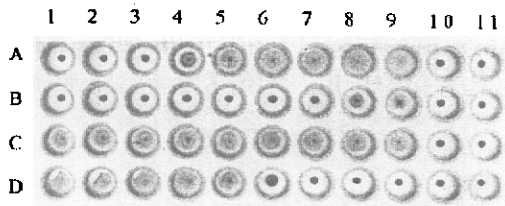


图 4 菌体表达霍乱 O 抗原的血凝抑制分析

Fig.4 Hemagglutination inhibition analysis of expression of *V. cholerae* O- antigen

- A. 1~9:569B cell was diluted equally from  $2 \times 10^8$  cells/ml  
B. 1~9:x4072(pMG306) cell was diluted equally from  $500 \times 10^8$  cells/ml  
C. 1~9:x4072 cell was diluted equally from  $500 \times 10^8$  cells/ml  
D. 1~9:Control, hemagglutination test with O-antiserum diluted equally from 1:50  
A~D. 10:Negative control A~D. 11:Negative control

征区带,又有 569B LPS 的电泳特征区带,表明它确能同时表达鼠伤寒杆菌和霍乱弧菌的脂多糖。

以上结果表明构建的菌苗株 x4072(pMG306)确能表达霍乱 CT-B 和 LPS-O 抗原,同时仍能表达鼠伤寒杆菌的脂多糖。通过免疫学方法由 x4072(pMG306)菌体表面检测到的霍乱 O 抗原量比 LPS 电泳显示的量低,可能是由于鼠伤寒表达的霍乱 LPS 受宿主菌本身的 O 抗原影响,不能有效地形成具有抗原性的空间构象。外源 LPS-O 抗原在宿主菌中的表达调控、结构装配以及影响其抗原性的机制尚待深入研究。

**2.4 菌苗株 x4072(pMG306)对霍乱的保护作用**

x4072(pMG306)菌苗免疫组和 LB 培养基对照组小鼠,用霍乱毒株 569B 以 22 亿活菌/只进行攻毒,观察攻毒后的存活情况。结果表明, x4072 (pMG306)对霍乱毒株的攻击确实具有保护作用(见表 4)。

抑制血球凝集所需菌苗株 x4072 (pMG306)的最低菌量为 7.8 亿,霍乱弧菌 569B 为 0.5 亿,由此推测, x4072 (pMG306)菌株表达的霍乱 LPS-O 抗原的活性约相当于霍乱弧菌 569B 的 1/15。

**2.3.4 LPS 的 SDS-PAGE 分析:**用热酚-水法提取鼠伤寒受体菌 x4072、霍乱 569B 和菌苗株 x4072(pMG306)的脂多糖,同时用 Sigma 的 569B LPS 作对照进行 SDS-PAGE 分析。电泳结果见图 5,霍乱 LPS 电泳后主要为一个区带,鼠伤寒 LPS 的电泳图谱则呈规则的梯状多条区带, x4072 (pMG306)的 LPS 电泳图谱既具有鼠伤寒受体菌 x4072 LPS 的电泳特

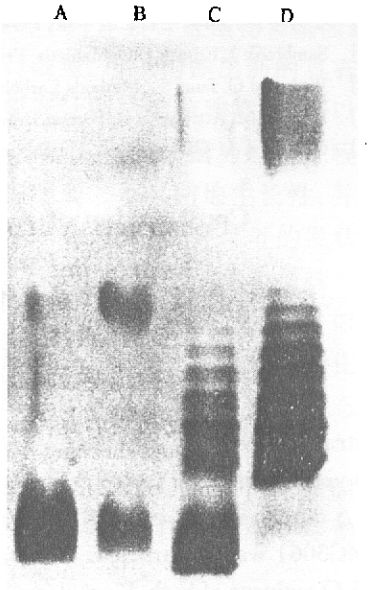


图 5 脂多糖 SDS-PAGE

Fig.5 SDS-PAGE analysis of LPS

- A:569B(Sigma), B:569B  
C:x4072(pMG306), D:x4072

表 4 菌苗株 x4072(pMG306)对霍乱的保护试验

Table 4 Protection of x4072(pMG306) against *V. cholerae* challenge

	Survivor/Total	Protective efficacy(%)
Immune group	13/15	86.7
Control group	0/15	0

本文报道的菌苗株 x4072(pMG306)能分泌表达霍乱毒素 B 亚单位,并且在菌体表面表达霍乱 LPS-O 抗原,小鼠保护试验表明它对霍乱弧菌具有良好的保护作用,同时,该菌株仍能表达鼠伤寒 LPS-O 抗原,对鼠伤寒杆菌也具有保护作用。本研究为新型霍乱/鼠伤寒双价口服活疫苗的构建打下了基础。

## 参 考 文 献

- [1] 马清钧,于秀琴,刘传喧:中国科学(B辑),1989,4:394.
- [2] Formal S B, Baron L S, Kopecko D J: Infect Immun, 1981, 34:746.
- [3] Clements J D, Sawsan E M. Infect Immun, 1984, 46:564.
- [4] Dougan G, Hormaeche C E, Maskell D J: Parasite Immunol, 1987, 9:151.
- [5] Curtiss III R, Goldschmidt R M, Flectchall N B: Vaccine, 1988, 6:155.
- [6] Curtiss III R, Nakayama K, Kelly S M. Immunol Invest, 1989, 18:583.
- [7] Nakayama K, Kelly S M, Curtiss III R. Bio/technology, 1988, 6:693.
- [8] 黄弘进,马清钧. 遗传学报,1992,19(4):378.
- [9] 马清钧,刘传喧,熊凌霄,中国科学(B辑),1990,7:726.
- [10] 马清钧,周建光,于秀琴,中国科学(B辑),1988,5:516.
- [11] 于秀琴,马清钧,生物工程学报,1994,10:289.
- [12] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: Molecular Cloning, 2nd edition, 1989.
- [13] Westphal O, Jann K. Methods Carbohydr Chem, 1965, 5:83.
- [14] Hone D M, Attridge S R, Forrest B. Infect Immun, 1988, 56:1326.
- [15] Crumpton M J, Davies D A, Hutchison A M. J Gen Microbiol, 1958, 18:129.

### Construction of A *Salmonella typhimurium* Vaccine Strain Expressing *Vibrio cholerae* CT-B and LPS-O Antigen

Chen Dongli      Ma Qingjun

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

**Abstract** The genes encoding *V. cholerae* CT-B and LPS-O antigen were simultaneously inserted into vector plasmid pYA248. The resulting recombinant plasmid pMG306 was transformed into  $\Delta cya \Delta crp \Delta asd$  attenuated *S. typhimurium* vaccine strain x4072, and the live vaccine strain x4072 (pMG306) was constructed. This vaccine strain could secrete specific CT-B antigen. Meanwhile, LPS-O antigens of both *V. cholerae* and *S. typhimurium* were expressed on the cell surface. Mouse intraperitoneal immunization and challenge trial indicated x4072(pMG306) provided good protection against virulent *V. cholerae*. This study laid foundation of the development of new cholera-typhoid bivalent live oral vaccine.

**Key words** *Vibrio cholerae*, CT-B antigen, LPS-O antigen, *Salmonella typhimurium*, bivalent live vaccine