

肠致病性大肠杆菌 O45 基因缺失疫苗菌株的构建及其免疫原性分析

胡奕*, 宋杰*, 赵宝华

河北师范大学生命科学学院, 石家庄 050016

摘要: 为得到肠致病性大肠杆菌 O45 弱毒疫苗候选菌株, 以肠致病性大肠杆菌 O45 为出发菌株, 利用自杀性载体 pCVD442 和同源重组的原理构建了 O45 的 *ler* 基因缺失突变菌株 PEPEC O45(Δ *ler*), 并对该菌株的 Vero 细胞毒性、小鼠模型的安全性以及乳鼠和乳猪的被动免疫保护作用进行了研究。结果表明, O45(Δ *ler*) 基因缺失突变菌株丧失了对 Vero 细胞的毒性作用, 并丧失了对实验小鼠的致病性, 具有良好的安全性。乳鼠和乳猪被动免疫保护性实验表明, 用该菌株分别免疫母鼠和母猪后, 乳鼠和乳猪均可通过吸吮母乳可以获得良好的被动免疫保护作用。因此本研究所构建的 O45(Δ *ler*) 基因缺失突变弱毒菌株可作为预防 PEPEC O45 感染的疫苗候选株, 为最终研制出 O45 的基因工程疫苗奠定基础。

关键词: 猪肠致病性大肠杆菌 O45, 基因缺失突变, 免疫接种, 弱毒疫苗

Construction and immunization of an attenuated vaccine candidate enteropathogenic *Escherichia coli* O45

Yi Hu*, Jie Song*, and Baohua Zhao

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

Abstract: In order to obtain an attenuated vaccine candidate for enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) O45, a *ler* deletion mutant of pig enteropathogenic *E. coli* (PEPEC) O45 was constructed by using the suicide vector pCVD442, termed as PEPEC O45(Δ *ler*). The culture supernatant of PEPEC O45(Δ *ler*) deletion mutant was inoculated in vero cell culture. PEPEC O45(Δ *ler*) deletion mutant lost the toxigenicity to vero cell. Test group and control group of mice were orogstrically inoculated with the PEPEC O45(Δ *ler*) deletion mutant and the virulent strain O45 respectively. Mice were observed daily for clinical signs and weight changes. Test group of mice inoculated with PEPEC O45(Δ *ler*) gained weight normally and experienced no clinical signs. In contrast, control group of mice inoculated with virulent strain O45 exhibited weight loss and all died in four days. In another experiment, pregnant mice and pig were orally vaccinated by PEPEC O45(Δ *ler*) twice at interval of 14 days respectively. Subsequently, the suckling mice and pig were orally challenged with O45 at 7 days of age respectively. The results showed that 80% of the sucking mice born by vaccinated mice and 75% of the sucking pig born by vaccinated pig were survival; 15% of the sucking mice born by non-vaccinated mice and 10% of the sucking pig born by non-vaccinated pig were survival. This study demonstrated that PEPEC O45(Δ *ler*) deletion mutant lost the toxigenicity to vero cell and to be safety to mice and pig. Oral immunization can induce specific immune responses in mice and pig, and this mutant strain could be used as an attenuated vaccine candidate against PEPEC O45.

Received: October 6, 2008; **Accepted:** November 26, 2008

Supported by: Natural Science Fund of Hebei (No. C2007000263).

Corresponding author: Baohua Zhao. Tel: +86-311-86268437; E-mail: zhaobaohua86178@sohu.com

* These authors contribute equally to this work.

河北省自然科学基金项目(No. C2007000263)资助。

Keywords: porcine enteropathogenic *Escherichia coli* O45, deletion mutant, immunization, attenuated vaccine

肠致病性大肠杆菌 (Enteropathogenic *Escherichia coli* EPEC) 是一种引起人或动物患腹泻病的病原菌^[1]。国内外许多猪厂均有不同程度的爆发流行, 并已在世界各地造成了严重的经济损失。目前, 国内对猪肠致病性大肠杆菌 (Pig enteropathogenic *E. coli*, PEPEC) 致病作用研究较少, 对其分子遗传学和基因工程弱毒疫苗研究也尚未开展。国外加拿大研究较多, 其致病机理已基本清楚, 确定了其致病岛的基因序列及其致病性和免疫作用的关系。特别是近 10 年来, 国内外学者致力于 PEPEC 分子遗传学、致病机理和免疫预防研究, 其研究结果达到世界领先水平。他们在 PEPEC 毒力基因结构、功能及其调节基因的作用方面取得了突破性进展^[2], 已经证实 PEPEC 在致病作用上引起典型的 A/E 病变, 从而导致仔猪的腹泻, PEPEC 的主要毒力因子定位于致病岛 (Pathogenicity island, PAIs) 和肠细胞脱落位点 (The locus of enterocyte effacement, LEE) 上, 其 DNA 长度为 43 359 bp, 分 LEE1、LEE2、LEE3、Tir/eae 和 LEE4 五个基因区, 有 41 个阅读框, 编码 III 型分泌系统的功能蛋白及其相关蛋白, 并且发现了 LEE 中心调节基因 *ler* (LEE-encoded regulator) 对 LEE 毒力基因群 (LEE1、LEE2、LEE3、Tir/eae 和 LEE4) 的表达起正调控作用, *ler* 基因对 EPEC 的致病性具有重要作用, *ler* 基因缺失可使 EPEC 的毒力丧失但仍具有很强的抗原性。如冯书章等^[3]研究发现 *ler* 基因缺失突变消除了兔致病性大肠杆菌 RDEC-1 和 REPEC O103 的 A/E 损伤作用, 该 *ler* 基因缺失突变株毒力完全丧失, 不具有致病性, 但仍具有很强的免疫原性, 这为 PEPEC 疫苗的研制提供了理论依据和技术支持。最近刘军等^[4]又完成了出血性大肠杆菌 (*Enterohemorrhagic E. coli*, EHEC) O157: H7 A/E 大肠杆菌疫苗, 也为 PEPEC 弱毒基因工程疫苗的构建提供了切实可行的技术路线。

研究基因工程弱毒疫苗的原则是使该疫苗具有安全性, 缺乏致病性且保留完全的免疫原性。本研究的总体设想是在前人的工作基础上, 以野生型 PEPEC O45 为始发菌株, 利用自杀性载体和同源重

组的原理, 敲除 LEE 致病岛的正调控基因 *ler* 基因, 构建 PEPEC O45 的 *ler* 基因缺失突变菌株, 研究在基因水平上对 LEE 致病岛的调节作用以及对 PEPEC O45 致病性的影响, 探讨这种突变菌株作为疫苗的可能性, 为最终研制出 PEPEC O45 的基因工程弱毒疫苗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究使用的寡核苷酸引物见表 1。菌株 PEPEC O45 和 SM10*pir* 以及质粒 pCVD442 由军事兽医研究所冯书章研究员惠赠, 菌株 DH5 α 和 Vero 细胞由本室保存, pGEM-T、限制性核酸内切酶、T4 DNA 连接酶、Ex *Taq* DNA 聚合酶、DL2000 DNA marker 购自大连 TaKaRa 公司, 萘啶酮酸 (Nalidixic acid, Nal) 购自 Sigma 公司, 丝裂霉素 C (Mitomycin C) 购自 Roche 公司。昆明鼠购自河北医科大学实验动物中心, 试验母猪来自栾城县某猪场。

表 1 本研究所使用的寡核苷酸引物

Table 1 Primers used in this study

Primers	Sequences(5'-3')	Location in the genome of EDL933
Primer f	gagctcttcgccgaatg	4620823-4620834
Primer g	ctctataagctgaatgta	4620104-4620121
Primer h	tacattcagcttatagaggacactgaagaagaa	4619810-4619824
Primer i	tctagattacgagtagaac	4619084-4619096
Primer d	ttaactaaatggaaa	4620448-4620462
Boed 751	agttcagttatcgttatcgtt	4619755-4619766

以上所有寡核苷酸引物都由大连 TaKaRa 公司合成。

1.2 方法

1.2.1 O45 菌株 Nal^R 的诱导

接种 100 μ L 过夜培养的 O45 到 5 mL 液体 LB 试管中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养到对数生长期, 加入萘啶酮酸 (Nalidixic acid) 至终浓度为 20 μ g/mL, 继续培养过夜。进行稀释后, 涂布于含 20 μ g/mL 萘啶酮酸的 LB 琼脂平板上, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜, 挑取单个菌落接种于 5 mL 液体 LB 试管中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养到对数生长期, 再加入萘啶酮酸至终浓度为 50 μ g/mL, 继续培

养过夜。进行稀释后,涂布于含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 萘啶酮酸的 LB 琼脂平板上,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。挑取单个菌落接种于 5 mL 液体 LB 培养基中,并加入萘啶酮酸至终浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养后保存菌种,此菌株即诱导出了 Nal^{R} ,记为 O45 (Nal^{R})。

1.2.2 重组自杀性质粒 pCVD442::Aler 的构建

根据报道的 EPEC O45 染色体上 LEE 致病岛中的调节基因 *ler* 及其两侧的 DNA 序列,设计合成了 2 对引物: Primer f, g 和 Primer h, i。通过 PCR 扩增出中间缺失 279 bp 的 *ler* 缺失基因片段 Δler 将之克隆到自杀性质粒 pCVD442 中,构建重组自杀性质粒 pCVD442:: Δler 。将重组质粒转化到大肠杆菌感受态细胞 SM10 中,构建重组菌株 SM10 (pCVD442:: Δler)。

1.2.3 重组自杀性质粒的接合转移

分别接种受体菌 O45(Nal^{R})和供体菌 SM10 (pCVD442:: Δler)到 5 mL LB(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Nal)和 LB(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Amp)液体培养基中,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养过夜。然后按 4:1 的比例分别取 SM10 (pCVD442:: Δler)和 O45(Nal^{R})的过夜培养物,混匀,用滤器过滤,细菌被收集在滤膜上。将滤膜放置于无抗性的 LB 琼脂平板上(滤膜有细菌的一面向上),于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜,注意不要倒置平板。然后用生理盐水洗下滤膜上的细菌,进行倍比稀释后分别涂布于 LB(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Amp , 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Nal)琼脂平板上,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜,挑取单个菌落进行 PCR 鉴定,得到既具有萘啶酮酸抗性又具有氨苄青霉素抗性的菌株,即可能是目的重组菌株 O45 (pCVD442:: Δler)。

1.2.4 基因缺失突变菌株 O45(Δler)的筛选与鉴定

将 O45 (pCVD442:: Δler)划线于 LB(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Amp , 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Nal)琼脂平板上,挑取单个菌落接种于 5 mL LB (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Nal)液体培养基中,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养过夜。对过夜培养物进行倍数稀释后分别涂于含蔗糖的 LB (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Nal , 5% Sucrose , 无 NaCl)琼脂平板,于 29 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。用牙签从过夜培养的 LB(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Nal , 5% Sucrose , 无 NaCl)琼脂平板上挑取单个菌落分别接种于 LB (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Nal)平板和 LB (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Amp)平板。对用蔗糖筛选的 Nal^{R} , Amp^{S} 的菌株进行 PCR 鉴定,筛选菌株 O45(Δler)。

以 O45(Δler)的染色体为模板,用引物 Boed751 和 Primer d 扩增 *ler* 基因片段,用 1%的琼脂糖凝胶和 DNA 回收试剂盒纯化回收 PCR 产物,然后将此

产物送大连 TaKaRa 公司进行序列测定,以鉴定所构建菌株 O45(Δler)缺失碱基的情况。

1.2.5 O45(Aler)菌株对 Vero 细胞毒性实验

细菌过滤上清的准备:分别接种 5 μL O45 和 O45(Δler)到 5 mL LB 中,37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 16~20 h,然后 4500 r/min 离心 10 min,上清用 0.22 μm 的滤膜过滤除菌,滤液 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

单层细胞的培养:Vero 细胞在 DMEM 营养液中,37 $^{\circ}\text{C}$,5%的 CO_2 浓度培养至细胞瓶中长满单层细胞,然后用胰酶消化下来,转移到 24 孔细胞培养板中,每孔加入 1 mL 细胞营养液,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%的 CO_2 浓度下培养至长满单层细胞,吸去陈旧营养液,换 1 mL 新鲜的 DMEM 营养液。

吸取上述 O45 和 O45(Δler)细菌上清滤液加到培养好的单层 Vero 细胞板中,同时加 LB 作为对照,加样量按 200、100、50、10、6、3、1、0.2 μL 的 8 个梯度依次递减。然后在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%的 CO_2 浓度下培养,24 h 后观察细胞的形态和生长情况。

1.2.6 O45(Aler)对小鼠模型的安全性实验

将 24 只断奶小鼠随机分为 4 组,每组 6 只。在接种细菌前,第 1、2、3 组每只小鼠按 2.5 mg/kg 腹腔注射丝裂霉素 C (Mitomycin C),第 4 组不注射。第 1 组小鼠灌胃接种 O45(Δler),第 2 组小鼠灌胃接种 O45,接种剂量都为 4×10^8 CFU/只,第 3 组作为用丝裂霉素处理小鼠对照,第 4 组作为空白对照,并在 4 组小鼠的饮水中都加入萘啶酮酸至终浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$,观察小鼠生长情况。并对第 1 组的实验组与第 2 组的阳性对照组脏器进行组织病理学检查。

1.2.7 O45(Aler)菌株的被动免疫保护性实验

乳鼠实验:成年昆明母鼠(平均体重约 30 g)分为 2 组,第 1 组 30 只,用 O45(Δler)经灌胃接种免疫,免疫剂量为 10^{10} CFU/只,7 d 后与小鼠混养交配,再过 7 d 后加强免疫;第 2 组 20 只,与第 1 组相同的方式用生理盐水灌胃后作为对照组。母鼠所生的乳鼠,可通过正常吸吮母乳获得母源抗体。利用 O45 强毒株对 7 日龄的乳鼠进行灌胃攻毒,攻毒剂量为 5×10^8 CFU/只,观察并记录乳鼠生长情况,评价被动免疫效果。

乳猪实验:选取产前 30 d 怀孕母猪 10 头分为 2 组,每组 5 头,第 1 组用 O45(Δler)经颈部肌肉注射接种免疫,免疫剂量为 4×10^9 CFU/只,14 d 后与加强

免疫;第2组与第1组相同的方式用生理盐水灌胃后作为对照组。母猪所生的乳猪,可通过正常吸吮母乳获得母源抗体。利用 O45 强毒株对 10 日龄的乳猪进行灌胃攻毒,攻毒剂量为 10^{10} CFU/只,隔离饲养观察 14 d,并记录乳猪生长情况,评价被动免疫效果。

2 结果

2.1 重组菌株 O45(Δler)的构建与筛选

以 PEPEC O45 染色体为模板,用 PCR 扩增 *ler* 基因两端 736 bp 和 745 bp 的片段,然后各取 5 μ L PCR 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳,分别得到了的片段(图 1),与设计扩增的片段长度相符合。

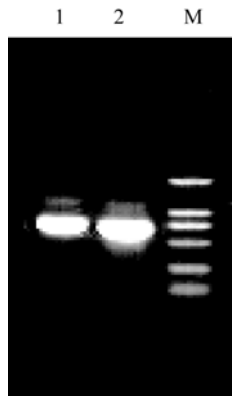


图 1 PEPEC O45 *ler* 基因左右臂片段的扩增结果

Fig. 1 Amplification of two arm fragments of *ler* gene for PEPEC by PCR. 1: 745 bp of specific bands corresponding to left right arm; 2: 736 bp of specific bands corresponding to left arm; 3: DNA marker DL2000.

2.2 *ler* 279 bp 缺失基因的扩增

设计引物时,引物 Primer g 与 Primer h 的 5'端设计了一段 18 bp 的互补序列,因此,PCR 扩增的 *ler* 基因左右臂片段在变性退火后有一段序列可以相互配对,互为模板,进行 PCR 扩增,取 5 μ L PCR 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳,得到了 1463 bp 的 Δler 缺失基因片段(图 2),与设计扩增的片段相符合。

2.3 Δler 片段的克隆及序列测定

将扩增后的 Δler 片段克隆到 pGEM-T 载体上,利用蓝白斑和氨苄青霉素抗性挑选重组子,进行 PCR 鉴定,并提取质粒进行酶切鉴定,PCR 产物和酶切产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳,结果均与预先设计的大小相符(图 3),测序结果也与 GenBank 上查得的序列一致。此质粒命名为 pGEM-T:: Δler 。

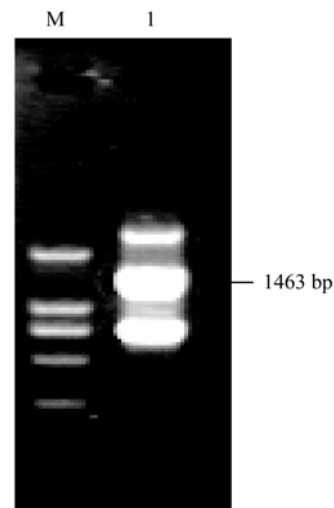


图 2 PEPEC O45 *ler* 279 bp 缺失片段的扩增结果

Fig. 2 Amplification of *ler* 279 bp deleted gene fragment for PEPEC by PCR. M: DNA marker DL2000; 1: *ler* 279 bp deleted gene fragment.

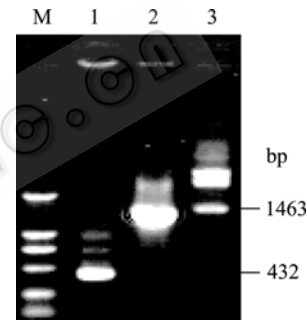


图 3 重组质粒 pGEM-T:: Δler 的酶切鉴定和 PCR 鉴定

Fig. 3 Identification of recombinant plasmid pGEM-T:: Δler by PCR and enzyme digestion. M: DNA marker DL2000; 1: amplification products by PCR with Primer d and Boed 751; 2: amplification products by PCR with Primer f and Primer i; 3: digested plasmid pGEM-T:: Δler with *Sac* I and *Xba* I.

2.4 含 Δler 片段自杀性载体的构建及转化

从上述构建的重组质粒 pGEM-T:: Δler 中酶切回收 Δler 片段,连接到自杀载体 pCVD442,转化到 SM10*pir*。从转化平板上挑取单个菌落进行 PCR 鉴定,再提取质粒进行酶切鉴定,PCR 产物和酶切产物进行电泳,结果均与预期的大小相同(图 4),说明菌株 SM10(pCVD442:: Δler)构建正确。

2.5 重组菌株 O45(Δler)的筛选与鉴定

从倍数稀释涂布的 LB(100 μ g/mL Amp, 50 μ g/mL Nal)琼脂平板上挑取单个菌落,用引物 Primer f 和 Boed 751 进行 PCR 鉴定,从中筛选出 *ler* 基因二倍体菌株,即 PCR 扩增 *ler* 基因能出现 2 条带,分别为

染色体上的 *ler* 基因和质粒上的 Δler 基因(图 5), 说明自杀质粒 pCVD442:: Δler 已通过转导进入菌株 O45 中。转导成功菌株命名为 O45(pCVD442:: Δler)。

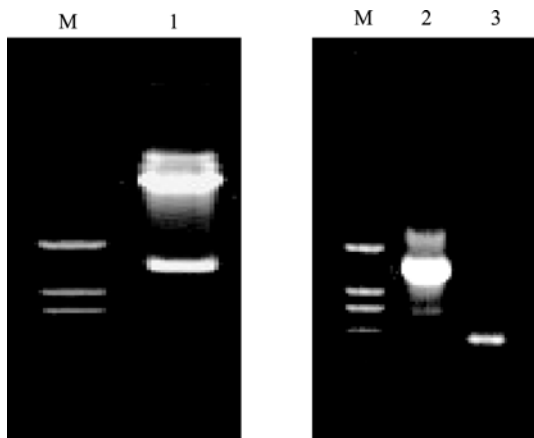


图 4 自杀质粒 pCVD442:: Δler 的鉴定

Fig. 4 Identification of suicide plasmid pCVD442:: Δler . M: DNA marker DL2000; 1: digested plasmid pCVD442:: Δler with *Sac* I and *Xba* I; 2: amplification products by PCR with Primer f and Primer I; 3: amplification products by PCR with Primer d and Boed 751.



图 5 转导后菌株 O45(pCVD442:: Δler)的 PCR 筛选

Fig. 5 Screening of the transduced strains by PCR with primer f and Boed 751. M: DNA marker DL2000; 1-4: PCR products of the negative strains; 5: PCR products of the positive strains; 6, 7: PCR products of the negative strains.

用引物 Primer f 和 Boed 751 对用蔗糖筛选的 NaI^R , Amp^S 的菌株进行 PCR 鉴定, 挑选只能扩增出一条 Δler 短片段的菌株(图 6), 说明此菌株是 Δler 单倍体菌株, 并且已丢失自杀质粒, 即染色体上的 *ler* 基因已与质粒上的 Δler 片段通过同源重组发生了交换, 并且质粒已从菌株丢失, 此菌株即 O45(Δler)。以构建的 O45(Δler)染色体为模板, 用引物 Boed751 和 Primer d 扩增 Δler 基因片段, 纯化回收后送大连 TaKaRa 公司测序, 结果与预期的结果一致(图 7、8), 证实所构建菌株的 *ler* 基因缺失了 279 bp 的碱基。

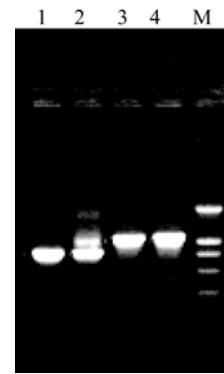


图 6 O45(Δler)PCR 鉴定结果

Fig. 6 Identification results of O45(Δler) by PCR. 1: PCR products of O45 (Δler); 2: PCR products of O45 (pCVD442:: Δler); 3: PCR products of O45 (NaI^R); 4: PCR products of O45; M: DNA marker DL2000.

2.6 O45(Δler)培养上清对 Vero 细胞毒性实验

用 8 个梯度量的 O45 和 O45(Δler)培养上清作用于培养的 Vero 细胞, 并用 LB 作为对照, 结果 O45 中 8 个加样量(最小 0.2 μL)的细胞均出现病变, 细胞变圆, 脱落。O45(Δler)和 LB 对照 8 个加样量(最大 200 μL)的细胞形态及生长均正常(图 7)。

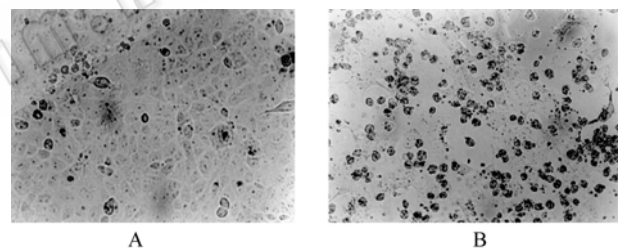


图 7 O45 和 O45(Δler)培养上清对 Vero 细胞的毒性实验

Fig. 7 The toxigenicity of O45 and its *ler* deletion mutant culture supernatants to Vero cell. (A) Vero cell adding culture supernatants of O45 (Δler). (B) Vero cell adding culture supernatants of O45.

2.7 O45(Δler)对小鼠安全性实验

结果没用丝裂霉素 C 处理的小鼠体重增加很快, 接种野生型 O45 的对照组小鼠体重逐渐减轻, 并于 4 d 内 6 只小鼠全部死亡。接种 O45(Δler)的实验组小鼠生长正常, 其体重与用丝裂霉素处理过的对照组小鼠一致(图 8)。

对照组死亡的小鼠和实验组小鼠 14 d 后捕杀, 对照组死亡小鼠剖检可见肺脏表面大面积淤血、充血; 肝脏颜色变黑、变暗, 轻度肿胀; 肾脏外观呈灰黄色, 肠道外观病理变化不明显。实验组小鼠剖检各脏器都没有明显病理变化。

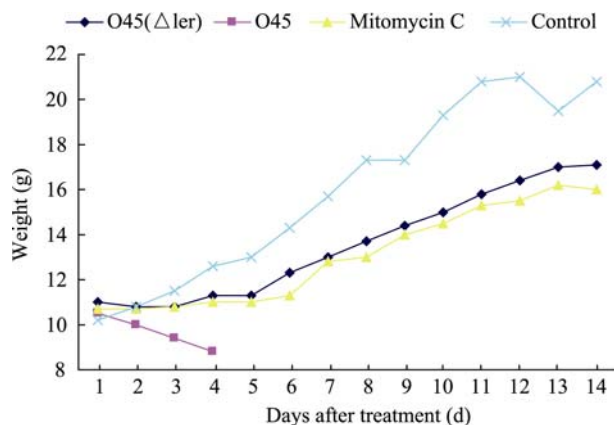


图 8 小鼠安全性实验体重曲线

Fig. 8 The weight curves of mice inoculated with bacteria cultures.

组织病理学检查结果见图 9。可见，对照组肝细胞紊乱，失去肝小叶固有结构；肝细胞内含有粉红色颗粒，呈重度颗粒变性；部分肝细胞肿胀如气球，肝细胞核悬浮于中央或一侧，呈重度的水泡变性(气球样变)；肺淤血、出血，伴发水肿；肺泡壁毛细血管高度屈曲扩张，含有大量红细胞，肺泡腔内含有粘性浆液；支气管周围可见较为典型的大肠杆菌肉芽肿，有大量上皮样细胞和炎性细胞浸润；肠组织呈卡他性肠炎，杯状细胞增多，肠腔内有炎性分泌物，固有层轻度出血和水肿。实验组肝细胞结构完整；肺脏肺泡壁毛细血管轻度充血，其他无异常；肠组织结构完整，也未见病理变化。

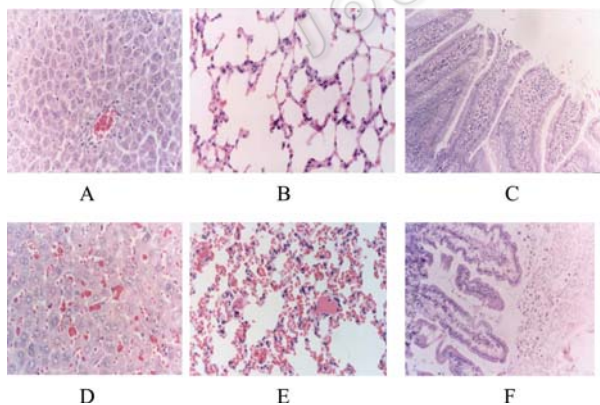


图 9 对照组(接种 O45)和实验组(接种 O45(Δler))小鼠组织病理学变化

Fig. 9 Mice tissue pathological lesions of control group (experimentally inoculated with O45) and test group (experimentally inoculated with O45(Δler)). (A) Hepatic tissue section of test group. (B) Lung tissue section of test group. (C) Intestinal tissue section of test group. (D) Hepatic tissue section of control group. (E) Lung tissue section of control group. (F) Intestinal tissue section of control group.

2.8 菌株 O45(Δler)免疫母鼠后对乳鼠的被动免疫保护性实验

用 O45 强毒株对 7 日龄乳鼠攻毒后，3~6 d 内陆续出现死亡。O45(Δler)菌株免疫组母鼠所生乳鼠 200 只，死亡 40 只，乳鼠存活率为 80%；未免疫对照组母鼠所生乳鼠 160 只，死亡 136 只，乳鼠存活率为 15%。说明 O45(Δler)菌株免疫母鼠后，乳鼠通过吸吮母乳而获得了良好的被动免疫保护作用。

用 O45 强毒株对 10 日龄乳猪攻毒后，5~8 d 内陆续出现死亡。O45(Δler)菌株免疫组母猪所生乳猪 60 头，死亡 15 头，乳猪存活率为 75%；未免疫对照组母猪所生乳猪 50 只，死亡 40 头，乳猪存活率为 10%。说明 O45(Δler)菌株免疫母猪后，乳猪通过吸吮母乳而获得了良好的被动免疫保护作用。

3 讨论

肠致病性大肠杆菌 PEPEC O45 感染是影响养猪业发展的一种重要的细菌性传染病，对 PEPEC O45 感染防治不建议使用抗生素治疗，因为使用抗生素治疗会引起耐药菌株的产生和肠道菌群失调，会引起更为严重的后果，因此对 PEPEC O45 感染应以预防为主。近年来，国内主要集中研究了猪肠致病性大肠杆菌(Pig enteropathogenic *E. coli*, PEPEC)的常规疫苗和基因工程亚单位疫苗，并取得了一定的成果，但单独使用该疫苗效果不理想。因此，应加强对高效 PEPEC 基因工程疫苗的研究。本研究以 PEPEC O45 为出发菌株，研制 PEPEC O45 弱毒疫苗，用于预防 PEPEC 的感染。该项目研制成功后，用于我国仔猪大肠杆菌腹泻病的防治，将有利于我国养猪业的发展，并将取得可观的经济效益和社会效益。而且还为其他动物疫苗的研制提供新的方法和技术路线。

PEPEC O45 最重要的毒力特征之一就是能在感染的人肠上皮细胞形成特征性的 A/E 损伤，通过对肠致病性大肠杆菌 EPEC 致病机理的研究发现编码 A/E 损伤的所有基因都位于染色体上的 LEE 致病岛内，进而通过比较分析研究发现能引起 A/E 损伤的肠细菌，包括 EHEC、EPEC 和 RDEC-1 等，都携带有 LEE 致病岛或其同源序列，而大肠杆菌 K-12，正常菌群的大肠杆菌及 ETEC 等菌株则没有。对 EPEC LEE 致病岛的全序列进行比较分析，发现 EPEC

LEE 致病岛所含有的所有 41 个开放性阅读框(ORF), Elliott 等研究了 EPEC 的 LEE 调节基因 *ler* 的调节机制, 结果表明 *ler* 对 EPEC 中 LEE 致病岛的表达具有重要的正调控作用^[5]。*ler* 对 III 型分泌系统, 分泌性蛋白质, Tir 和紧密素(Intimin)的编码基因具有正调节作用, 它还对定位于 LEE 致病岛上的其他一些与 A/E 损伤不相关基因(*rorf2*、*orf10*、*rorf10*、*orf19*)等起到上调节作用^[6,7]。因此认为 *ler* 是 EPEC 毒力因子表达重要的中心调节基因。有资料表明, *ler* 基因属于 H-NS (Histone-like nonstructural protein)调节因子家族^[8], 肠细菌的 H-NS 调节因子家族具有很高的保守性^[9], 它们在功能和结构上都属于 DNA 结合蛋白, H-NS 蛋白都能分为 2 个区域: N-末端的聚合区域和 C-末端的 DNA 结合区域。最近又有报道, H-NS 的这 2 个区域还可进一步划分, N-末端区域包括 2 个亚区, 中间被一个环状结构(Loop1)隔开, N-端又通过另一个环形结构(Loop2)与 C-末端区域相连, loop2 是一个蛋白酶敏感的连接肽。

冯书章等^[3]通过敲除 EPEC O103 和 RDEC-1 菌株的 *ler* 基因, 成功构建了免致病性大肠杆菌基因工程疫苗, 并对此 *ler* 基因缺失突变菌株的生长状态, 致病性和免疫原性等进行了研究。结果表明 *ler* 基因缺失突变消除了对 LEE 毒力基因的正调节作用, 导致该菌株毒力丧失。该 *ler* 基因缺失突变株不具有致病性但保留了免疫原性。动物免疫攻毒试验证实, 该突变菌株安全性好, 单剂量免疫即可提供完全的保护作用。这为本研究提供了研究方案和技术路线, 同时也为基因工程弱毒疫苗的研究提供了新的思路和方法。

基因敲除(Gene knockout)是在 80 年代后半期应用 DNA 同源重组原理发展起来的一门新技术。基因敲除是指对一个已知的基因, 从分子水平上设计实验, 将该基因去除, 或用其他基因取代, 然后对敲除后的个体进行研究, 通过其性状的变化而研究被敲除基因的功能^[10]。基因敲除的技术路线包括: 1) 首先构建重组基因载体; 2) 把重组的质粒 DNA 转入受体细胞中, 在受体细胞中, 载体上的 DNA 与宿主细胞染色体上的同源 DNA 发生重组交换; 3) 筛选出发生了重组并丢失了载体的细胞^[11]。基因敲除的技术路线虽不复杂, 但是由于外源 DNA 与宿主细胞 DNA 序列自然发生同源重组的机率非常低, 因此如

何筛选出基因敲除成功的宿主细胞是一件非常困难的工作。

本研究利用了自杀性载体 pCVD442 作为重组基因载体, 通过同源重组敲除野生型 O45 菌株的 *ler* 基因。首先将中间缺失了 279 bp 的 *ler* 基因片段插入到 pCVD442 中, 将重组质粒 pCVD442:: Δ *ler* 转入受体菌 O45, 自杀质粒 pCVD442:: Δ *ler* 在 O45 中发生了同源重组, 质粒上的 *ler* 缺失基因交换到了宿主菌染色体上, 而且质粒丢失, 宿主菌内已没有了完整的 *ler* 基因, 这就是本实验筛选的目的菌株, 此菌株与始发菌株 O45 的区别在于其 *ler* 基因发生了 279 bp 的缺失。

本实验所使用的自杀载体 pCVD442, 带有氨苄青霉素抗性基因、*sacB* 基因、R6K 复制起始位点和 RP4 基因, R6K 复制起始位点是依赖于 π 蛋白的起始位点, π 蛋白是由 *pir* 基因所编码, 因此自杀质粒 pCVD442 可以在受体菌 SM10 中复制; RP4 能够诱导细菌接合(Conjugation)而发生质粒在细菌间直接转移。在本研究中将缺失突变的 *ler* 基因插入到 pCVD442 的多克隆位点内, 然后将插入后的质粒 pCVD442:: Δ *ler* 转化到受体菌 SM10 中, 由于宿主菌 SM10 能够编码 π 蛋白, 因此带有 R6K 质粒复制起始位点的质粒 pCVD442:: Δ *ler* 能够进行复制, 从而能在宿主菌 SM10 中稳定存在。由于 O45 的转化效率非常低, 因此本研究采用接合性转导的方法将质粒 pCVD442:: Δ *ler* 转入受体菌 O45, 在宿主菌 O45 内, 质粒上缺失的 *ler* 基因与染色体上的 *ler* 基因通过同源重组发生交换, 然后自杀性质粒丢失, 通过蔗糖筛选, 挑选氨苄青霉素敏感的菌株, 用 PCR 的方法进行鉴定, 即可筛选出所需的 *ler* 基因缺失突变菌株。

Vero 细胞毒性实验证实, 0.2 μ L 野生型 O45 培养上清就能使培养的 Vero 细胞变圆, 脱落死亡, 而 200 μ L 基因缺失突变菌株培养上清作用于 Vero 细胞, 细胞仍能正常生长, 这说明所构建的基因缺失突变菌株已不具有毒力作用。本实验还建立了 O45 感染的小鼠模型, 用丝裂霉素 C 和萘啶酮酸处理过的小鼠接种 O45 后小鼠体重减轻, 并于 4 d 内 6 只小鼠全部死亡, 剖检及病理切片检查, 在肝脏、肾脏、肺和肠等器官均出现明显的病理变化。接种 O45(Δ *ler*)的小鼠生长正常, 其体重与用丝裂霉素处理过的阴性对照组小鼠生长一致, 捕杀后各脏器均未见明显

病理变化,组织切片检查也未见明显病理变化。这说明所构建的基因缺失突变菌株 O45(Δ ler)具有良好的安全性。乳鼠和乳猪被动免疫保护性实验表明,用该菌株分别免疫母鼠和母猪后,乳鼠和乳猪均可通过吸吮母乳可以获得良好的被动免疫保护作用。因此本研究所构建的 O45(Δ ler)基因缺失突变弱毒菌株可作为预防 PEPEC O45 感染的疫苗候选株,为最终研制出 O45 的基因工程菌苗提供了实验依据。

REFERENCES

[1] DebRoy C, Fratamico PM, Roberts E, *et al.* Development of PCR assays targeting genes in O-antigen gene clusters for detection and identification of *Escherichia coli* O45 and O55 serogroups. *Appl Environ Microbiol*, 2005, **71**(8): 4919-4924.

[2] Bidet P, Metais A, Mahjoub-Messai F, *et al.* Detection and identification by PCR of a highly virulent phylogenetic subgroup among extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* B2 strains. *Appl Environ Microbiol*, 2007, **73**(7): 2373-2377.

[3] Feng SZ, Boedeker EC, Zhu CR, *et al.* Construction and immunization of alerdeletionmutant of REPEC O103. *Chin J Zoonosess*, 2003, **19**(2): 5-9.
冯书章, Edgar CB, 朱承孺, 等. 大肠杆菌 REPEC O103 ler 基因缺失突变株的构建与免疫. *中国人兽共患病杂志*, 2003, **19**(2): 5-9.

[4] Liu J, Sun Y, Feng SZ, *et al.* Construction and immunization of a attenuated enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157. *Chin J Biotech*, 2007, **23**(2): 211-217.

刘军, 孙洋, 冯书章. 出血性大肠杆菌 O157 基因缺失疫苗株的构建及其免疫. *生物工程学报*, 2007, **23**(2): 211-217.

[5] Elliott SJ, O'Connell CB, Koutsouris A, *et al.* A gene from the locus of enterocyte effacement that is required for enteropathogenic *Escherichia coli* to increase tight-junction permeability encodes a chaperone for EspF. *Infect Immun*, 2002, **70**(5): 2271-2277

[6] Elliott SJ, Sperandio V, Giron JA. The locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator controls expression of both LEE- and non-LEE-encoded virulence factors in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun*, 2000, **68**: 6615-6126.

[7] An H, Fairbrother JM, Désautels C, *et al.* Presence of the LEE (locus of enterocyte effacement) in pig attaching and effacing *Escherichia coli* and characterization of eae, espA, espB and espD genes of PEPEC (pig EPEC) strain 1390. *Microb Pathog*, 2000, **28**(5): 291-300.

[8] Bidet P, Mahjoub-Messai F, Blanco J, *et al.* Combined multilocus sequence typing and O serogrouping distinguishes *Escherichia coli* subtypes associated with infant urosepsis and/or meningitis. *J Infect Dis*, 2007, **196**(2): 297-303.

[9] Bertin P, Benhabiles N, Krin E, *et al.* The structural and functional organization of H-NS-like proteins is evolutionarily conserved in gram-negative bacteria. *Mol Microbiol*, 1999, **31**: 319-329.

[10] Rajashekara G, Covert J, Petersen E, *et al.* Genomic island 2 of *Brucella melitensis* is a major virulence determinant: functional analyses of genomic islands. *J Bacteriol*, 2008, **190**(18): 6243-6252.

[11] Tamae C, Liu A, Kim K, *et al.* Determination of antibiotic hypersensitivity among 4 000 single-gene-knockout mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 2008, **190**(17): 5981-5988.



本期广告索引

企业	版位	企业	版位
东曹达(上海)贸易有限公司	封底	生物谷网站	内页
Roche 诊断产品有限公司	封二	上海国强生化工程装备有限公司	内页
赛默飞世尔科技有限公司	封三	镇江东方生物工程公司	内页
美国 Promega 公司	内页	泰州贝今生物技术有限公司	内页
杭州博日科技有限公司	内页		