

大肠杆菌 Ee 株 SLT-IIeB 基因的 3 拷贝融合表达 及其生物学活性与免疫原性

刘国平^{1,2} 吴 斌^{1*} 林艺远¹ 金梅林¹ 陈焕春¹

(¹ 华中农业大学农业微生物学国家重点实验室 武汉 430070)

(² 长江大学动物科学学院 荆州 434025)

摘 要 根据大肠杆菌 Ee 株主要免疫原性片段 SLT-IIeB 的基因序列,设计合成两对引物,利用谷胱甘肽-S-转移酶(GST)表达系统将三拷贝 SLT-IIeB 的融合基因串联于 GST 下游,并在大肠杆菌中成功表达,获得了大小约为 45kDa 融合蛋白 GST-3B,表达产物以包涵体形式产生,Western blot 检测证实表达的融合蛋白具有良好的生物学活性。结合抑制试验表明,与单拷贝融合表达蛋白 GST-B 相比,GST-3B 与水肿毒素受体的亲和力更强。GST-3B 及 GST-B 与等量弗氏不完全佐剂乳化后制成亚单位疫苗,间隔两周两次皮下免疫小鼠。结果 GST-3B 疫苗组产生的抗体水平明显高于 GST-B 疫苗组,但两种疫苗组的抗体消长趋势相同。二免后两周用 $5 \times LD_{50}$ 的 Ee 株大肠杆菌进行腹腔攻毒。GST-3B 疫苗组保护率为 60.0%(6/10),明显优于 GST-B 疫苗组 40.0%(4/10)。研究结果表明 GST-3B 具有良好的生物学活性和免疫原性,可以作为疫苗添加成分,显示了良好的应用前景。

关键词: 大肠杆菌; SLT-IIeB 基因; 融合表达; 生物学活性; 免疫原性

中图分类号: Q78, Q939 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2007)04-0686-06

产毒素大肠杆菌(toxigenic *Escherichia coli*)是引起人和动物腹泻的重要病原体。通常分为 3 种类型:产肠毒素大肠杆菌(ETEC)、产类志贺氏毒素大肠杆菌(SLTEC)、产坏死性毒素大肠杆菌(NTEC)^[1-3]。SLTEC 主要血清型有 O138、O139、O157 等,又称肠出血性肠炎大肠杆菌。SLTEC 可产生 3 种类型毒素(SLT-I、SLT-II、SLT-IIe),SLT-I 和 SLT-II 是人出血性肠炎和溶血性尿毒综合征的重要致病因子,SLT-IIe 是猪水肿病的重要致病因子^[4-6]。

猪水肿病由特定血清型 SLTEC 引起,多发生于断奶后仔猪,它是危害规模化养殖业的重要疾病之一^[4-7]。猪水肿病的致病分为 3 个阶段,即致猪水肿病大肠杆菌 SLTEC 感染易感猪后,细菌以其 F18a1(F107)菌毛粘附于小肠上皮细胞,在肠道内定居和增殖的细菌产生志贺样毒素 II 型变异体(SLT-IIe)并被吸收,导致感染猪出现水肿和神经症状^[8]。F18ab 菌毛与类志贺毒素 II 型变异体(SLT-IIe)是致仔猪水肿病的产类志贺氏毒素大肠杆菌(SLTEC)的两个主要毒力因子^[9,10]。

SLT-IIe 制备的类毒素以及利用基因突变技术

构建的减毒突变体作为免疫原可有效的防止断奶仔猪水肿病的发生^[11,12]。SLT-IIe 的 B 亚单位(SLT-IIeB)与靶细胞特异性受体的结合是 A 亚单位发生细胞毒作用的必要条件,B 亚单位作为免疫原诱导的中和抗体可抑制其与受体的结合,从而抑制 A 亚单位进入细胞发挥细胞毒作用。这说明研制相应的毒素因子为免疫原来预防该病成为一种必要,而利用大肠杆菌的培养物上清来提取毒素的传统方法成本较高,而且由于水肿毒素 B 亚单位分子量小,分离与纯化比较困难,不适合大规模生产的需要。因此,我们利用谷胱甘肽-S-转移酶(GST)表达系统将三拷贝 SLT-IIeB 的融合基因串联于 GST 下游进行原核表达,并对重组蛋白的生物学活性、免疫原性进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒与阳性血清:大肠杆菌 Ee 株^[13],由本实验室分离鉴定和保存;表达载体 pGEX-KG(pK)重组质粒 pGEX-KG/SLT-IIeB(pKB)受体菌大

基金项目:国家“863 计划”(2006AA10A206);湖北省十一五公关计划资助项目(2006AA202)

* 通讯作者。Tel/Fax 86-27-87281795;E-mail: wub@mail.hzau.edu.cn

作者简介:刘国平(1974-),男,武汉人,讲师,在职博士研究生。主要从事人畜共患传染病细菌性病病原生态学及基因工程疫苗研究。E-mail: hhaaiieerr@163.com

其它作者:赵战勤,汤细彪,杨明柳

收稿日期:2006-11-21;接受日期:2006-12-27;修回日期:2007-06-07

肠杆菌 DH5 α 、表达菌大肠杆菌 BL21(DE3) 和大肠杆菌 Ee 株猪阳性血清及 Vero 细胞均为本实验室保存。

1.1.2 酶及主要试剂: T4 DNA 连接酶、限制性内切酶及 PCR 试剂、DNA Marker 为大连 TaKaRa 公司产品, UNIT-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒购自上海生物工程公司, IPTG 为 Promega 产品, 蛋白质 Marker 购自 NEB 公司, HRP 标记的羊抗猪 IgG 抗体、底物 DAB 购自华美公司。GST-4 B 融合蛋白纯化试剂盒为 Amersham Bioscience 公司产品。

1.2 大肠杆菌 Ee 株 SLT-IIeB 基因的克隆

1.2.1 SLT-IIeB 编码蛋白的跨膜区预测: 利用 TMHMM Server v. 2.0 软件^[14]对 GenBank 上公布的 SLT-IIeB(M21534) 序列编码的氨基酸序列进行跨膜性预测。

1.2.2 引物设计: 参考 GenBank 上公布的 SLT-IIeB 基因序列(M21534) 设计了两对特异性引物用于构建重组质粒 pGEX-KG/SLT-IIeB3(pK3B), 如表 1 所示, 引物 P1、P2 和引物 P3、P4 分别扩增不含信号肽 B 亚基结构序列, 称为 SLT-IIeB1 和 SLT-IIeB2, 扩增大小为 204bp。引物由北京博奥公司合成。

表 1 表达载体构建引物序列

Table 1 Primers used to construct recombinant plasmid pK3B		
Gene	Primer	Sequence(5'→3')
SLT-IIeB1	P1	TTGGATCCGGGATTGTGCTAAAGG
	P2	CCCAAGCTTGTAAAACCTTCACCTGG
SLT-IIeB2	P3	CCCAAGCTTGGGATTGTGCTAAAGG
	P4	CCCGAATTCTCAGTTAAACTTCACCTGGG

1.2.3 PCR 扩增: PCR 模板制作参照文献 [13], PCR 反应体系为 50 μ L, PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 4min, 94 $^{\circ}$ C 30s, 56 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 1min, 28 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10min。PCR 产物用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测, 并用 UNIT-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒回收。

1.3 重组表达质粒的构建及序列测定

将回收的 PCR 产物 SLT-IIeB1(引物 P1/P2) 和 SLT-IIeB2(引物 P3/P4) 和 pK 载体, 分别选择 BamH I / Hind III、Hind III / EcoR I 和 BamH I / EcoR I 酶切位点进行消化, 按常规方法进行电泳及 DNA 回收, 按 6:6:5 的量将回收产物 SLT-IIeB1、SLT-IIeB2 和 pK 载体混合, 用 T4 DNA 连接酶连接并转化 DH5 α 感受态细胞, 筛选阳性克隆, 并对重组质粒进行酶切及测序鉴定。

1.4 重组质粒的诱导表达及 SDS-PAGE 分析

将阳性菌落过夜培养物按 2% 的量接种于 LB 中, 振荡培养至 OD₆₃₀ 值在 0.4~0.6, 加 IPTG 至终浓

度 0.8mmol/L, 继续振荡培养 3h。收集菌体, 加上样缓冲液进行 SDS-PAGE(12% 分离胶、5% 浓缩胶)。

1.5 融合蛋白的纯化与复性

将诱导表达 3h 的细菌培养物 4 $^{\circ}$ C、8000r/min 离心 5min, 弃上清, 沉淀用缓冲液 A(1/10 体积)重悬, 超声波破碎。4 $^{\circ}$ C、8000r/min 离心 10min, 弃上清, 沉淀用 PBS 洗涤 2 次, 加 19.7mL 缓冲液 A 及 0.3mL 20% N-月桂酰胺肌钠盐(SKL)贮存液, 剧烈搅动, 使其缓慢溶解, 静置 30min 至 2h, 4 $^{\circ}$ C、12000r/min 离心 10min, 弃沉淀, 取上清, 加 20% PEG4000 至终浓度为 0.2%, 加 50mmol/L 的氧化型谷胱苷肽至终浓度为 1mmol/L, 加 100mmol/L 的还原型谷胱苷肽至终浓度为 2mmol/L, 静置 30min 至 2h, 以 PBS 透析 3d, 复性蛋白以 GST-4B 柱纯化, 纯化蛋白测定浓度后 -80 $^{\circ}$ C 冻存备用。

1.6 蛋白活性的分析

1.6.1 Vero 细胞的培养和收集: 细胞培养条件为: RPMI-1640 液体培养基, 10% 胎牛血清, 5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C 孵箱培养; 在细胞生长至对数期后, 收集细胞 2 \times 10⁶ 个。

1.6.2 VT 毒素受体蛋白的制备: 将上述收集的细胞用 PBS 缓冲液洗两次, 细胞重悬于 0.8mL 的 PBS(含 0.05% NaN₃, 1mmol/L EDTA)中, 冻融 2 次, 14000r/min 离心 60min, 弃上清。沉淀重悬于 0.8mL 的 PBS(含 0.05% NaN₃, 1mmol/L EDTA)中, 超声破碎细胞, 输出功率 \leq 50%, 脉冲 20%~30% 40s, 间隔超声)至溶液清亮。12000r/min 离心 30min, 取上清, 作为 VT 毒素受体蛋白抗原, 测定蛋白浓度, 储存待用。

1.6.3 结合抑制试验: 将上述提取的 VT 毒素受体蛋白包被 96 孔 ELISA 板, 100 μ g/mL/well 4 $^{\circ}$ C 过夜, 用 4% 的脱脂奶粉封闭各包被孔 2h, 同时在另一块 ELISA 板中每一行孔中加入 50 μ L 含 4% 脱脂奶粉的 PBS, 并从第 3 孔对多抗进行倍比稀释到第 12 孔, 留下第 1 和第 2 孔; 于第 2 到第 12 孔中加入 50 μ L GST-3B 或 GST-B 并使其终浓度为 1 μ g/mL, 留下第一孔, 并用含 4% 脱脂奶粉 PBS 补足到 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 保温 2h。将第二块板各孔中的反应液转入包被板的对应的各孔中, 37 $^{\circ}$ C 保温 1h, PBST 洗涤包被板 3 次, 每次 1min, 于每孔中加入 100 μ L HRP 标记的羊抗鼠 IgG(1:5000), 37 $^{\circ}$ C 保温 1h; PBST 洗板 5 次, 每次 1min, 于每孔中加入 100 显色液, 室温避光显色到满意为止; 于每孔中加入 50 μ L 2mol/L 的 H₂SO₄ 终止反应, 利用酶标仪读取每孔在 630nm 的吸收值 OD₆₃₀, 根据以下的公式计算抗体在不同浓度下的抑制率和 IC₅₀。

上述试验每个浓度做双复孔。抑制率的计算公式为 $[(OD_{Ag} - OD_{Ag/Ab}) / (OD_{Ag} - OD_{Ag-ODPBS})] \times 100\%$

1.6.4 Western blot 分析:对空白载体、重组菌菌体诱导后的裂解物,以及复性后获得的融合蛋白进行 Western blot 分析,检测融合蛋白免疫学活性。一抗为大肠杆菌 Ee 株感染猪所制的高免血清,二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗猪 IgG。

1.7 表达蛋白对小鼠的免疫原性

取 6 周龄雌性 SPF 昆明系小鼠,共 56 只,随机分成 4 组,每组 14 只。其中每组 4 只用于抗体水平检测,其余 10 只用于攻毒试验。实验分组如下:第一组为免疫纯化 GST-SLT-IleB3B(GST-3B)蛋白组,25 μ g/只;第二组为免疫纯化 GST-SLT-IleB(GST-B)组,25 μ g/只;第三组为灭菌生理盐水空白对照;第四组为 GST 对照,25 μ g/只。蛋白免疫剂量参考 MacLeod 等^[15]文中所用免疫剂量。免疫方式采用皮下免疫。一免后隔周采集血清,每次采集血清后,将同一组血清等量混合,采用间接 ELISA 检测该组的平均抗体水平。

1.8 实验动物的攻毒

本试验于二免后 2 周,以 1.3×10^9 CFU ($5 \times OD_{50}$) 剂量的大肠杆菌 Ee 株对小鼠进行腹腔攻毒。攻毒后 15d 内定期观察实验鼠的临床表现并记录。

2 结果

2.1 重组质粒 pK3B 的构建和特性分析

2.1.1 大肠杆菌 Ee 株的 SLT-IleB 基因的克隆:将 PCR 产物进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测,扩增出 204bp 左右大小的清晰条带,与预期的 DNA 片段大小相符。

2.1.2 重组质粒 pK3B 的构建及鉴定结果:重组质粒 pK3B 结构如图 1 所示,将重组质粒 pK3B 分别由 BamHI、HindIII 及 EcoRI 酶切鉴定。BamHI 单酶切后,得到两条带,大小为 5400bp 和 204bp 左右;

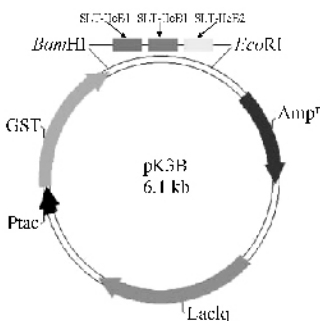


图 1 重组质粒 pK3B 结构图

Fig.1 The construction of recombinant plasmid pK3B.

HindIII 单酶切后,得到两条带,大小为 5400bp 和 204bp 左右;EcoRI 单酶切后得到一条带,大小为 5600bp 左右。

SLT-IleB 编码区全长 261bp,编码 87 个氨基酸, TMHMM 软件对 SLT-IleB 编码的氨基酸序列的跨膜区进行跨膜性分析(图 2-A),结果表明,SLT-IleB 编码的氨基酸序列存在 1 个跨膜区,位于第 3~23 个氨基酸之间,对应于猪水肿毒素 SLT-IleB 的信号肽序列位置。测序结果(图 3)表明,筛选得到三拷贝的 SLT-IleB 基因,命名为 SLT-IleB3B。分析表明,该重组质粒中含有 3 个完整的 SLT-IleB 基因,并没有缺失、插入终止突变。与国外报道的 E. coli S1191 菌相比,只有第 536 处的点突变,由 C 变成 T(C→T),相应氨基酸序列由脯氨酸突变为亮氨酸(P→L)。

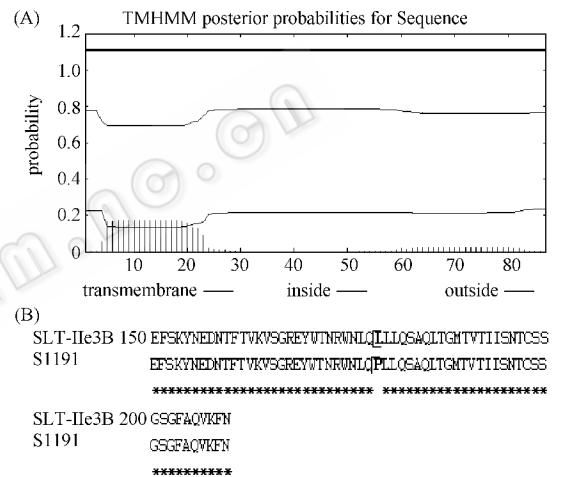


图 2 SLT-IleB 蛋白跨膜区的预测 (A) 和 SLT-IleB3B 与 S1191 氨基酸序列同源性比较 (B)

Fig.2 Prediction of transmembrane helices in SLT-IleB protein (A) and levels of identity of the amino acids homologs (B).

2.2 SLT-IleB 和 SLT-IleB3B 基因编码蛋白的抗原表位分析

利用 EMBOSS 软件 antigenic 程序(Parker JMR et al., 1986)对 SLT-IleB、SLT-IleB3B 基因编码的蛋白进行抗原性位点分析。结果表明 SLT-IleB 编码的蛋白有 3 个抗原位点,分别为抗原位点 1 (Site1) 位于 SLT-IleB 的第 35~43 位氨基酸;抗原位点 2 (Site2) 位于 SLT-IleB 的第 20~26 氨基酸;抗原位点 3 (Site3) 位于 SLT-IleB 的第 49~59 氨基酸。

SLT-IleB3B 编码的蛋白有 14 个抗原位点。除了上述 SLT-IleB 的 3 个主要抗原位点,即抗原位点 1 (Site1) 分别位于 SLT-IleB3B 的第 179~187、37~45 和 109~117 氨基酸;抗原位点 2 (Site2) 分别位于 SLT-IleB3B 的第 164~170、22~28 和 94~100 氨基酸;抗原位点 3 (Site3) 位于 SLT-IleB3B 的第 123~133、193~

203 和 51 ~ 61 氨基酸。还增加了 2 个抗原性位点, 抗原位点 4 (Site4) 位于 SLT-IIe3B 的第 74 ~ 80 氨基酸, 抗原位点 5 (Site5) 分别位于 SLT-IIe3B 的第 144 ~ 150 氨基酸。

2.3 GST-B 及 GST-3B 的表达和检测

SDS-PAGE 结果表明: 含 pK3B、pKB 重组质粒的 *E. coli* BL21 (DE3) 分别在约 45kDa、35kDa 处有明显的表达带, 是 SLT-IIe3B、SLT-IIeB 与 GST 表达的融合蛋白。空载体对照在约 27kDa 有明显的表达带, 相当于 GST 蛋白的分子量(图 3-A)。利用提纯的包涵体进行 Western blot 分析, 结果表明 GST-3B、GST-B 与猪水肿病的阳性血清发生了特异性的免疫反应, 证实表达产物具有很好的反应原性(图 3-B)。

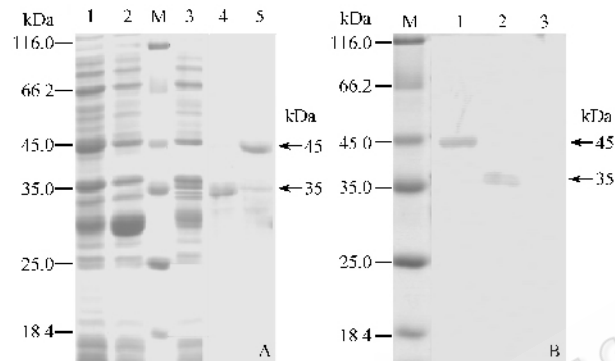


图 3 (A) 重组质粒 pK3B 及 pKB 的 SDS-PAGE 检测; (B) 融合蛋白 GST-3B 及 GST-B 的免疫印迹

Fig.3 (A) SDS-PAGE analysis of expression of recombinant plasmid pK3B/B in *E. coli* BL21 (DE3); (B) Western blot analysis of products of pK3B/B expression. M: Protein marker; A: 1. Lysate of pK3B induced with IPTG for 3h; 2. Lysate of pK induced with IPTG for 3h; 3. Lysate of pKB induced with IPTG for 3h; 4. Purified GST-B; 5. Purified GST-3B. B: 1. Proteins expressed by pK3B; 2. Proteins expressed by pKB; 3. GST.

2.4 GST-B 及 GST-3B 的生物学活性

本试验从 Vero 细胞中提取水肿毒素受体蛋白, 并用固相 ELISA 的方法检测了水肿毒素高免血清对 GST-B 及 GST-3B 与受体结合的抑制效应。结果抑制 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 GST-B 及 GST-3B 与水肿毒素受体的结合 50% 的抑制率时 (IC_{50}) 高免血清 (ELISA 效价为 1:2048) 的稀释度分别为约 1:42 及 1:48。

2.5 融合蛋白对小鼠的免疫原性试验

2.5.1 小鼠抗体消长规律: 表达产物纯化 GST-3B 蛋白免疫组和纯化 GST-B 蛋白组于首免后 2 周的平均值分别达到 0.82 和 0.63, 二免疫后 2 周 (首免后 4 周) 其抗体水平达到最高值。二免疫后 4 周其体内的抗体水平较加强免疫后 2 周有所下降。GST-3B 疫苗组抗体水平明显高于 GST-B 疫苗组 (T-Test, $P < 0.05$), 对照免疫组在整个实验期间针对 SLT-IIeB

的 ELISA 抗体为阴性(图 4)。

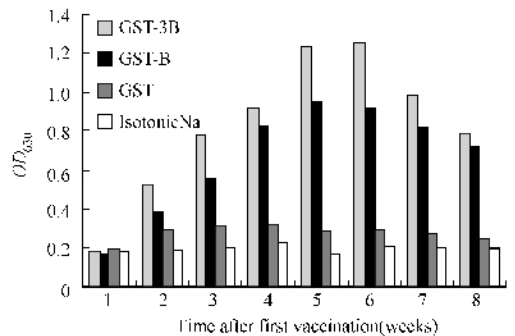


图 4 免疫后不同时间小鼠体内 SLT-IIe ELISA 抗体水平

Fig.4 Antibody titers against SLT-IIe by ELISA at different time of post-vaccination in mice

2.5.2 保护性试验结果: 二免两周后试验组和对照组分别用 50D_{50} 进行攻毒。第三、四组 (生理盐水对照组及 GST 对照组) 的小鼠于 12h 内全部死亡, 死亡时口流血性泡沫, 剖检死亡小鼠可见肺部有出血点、肝脾肿大并有出血点, 肠胀气, 并从死亡小鼠全部内脏器官均能分离到感染菌。第一组为 GST-3B 蛋白免疫组, 攻毒的 10 只小鼠中 3 只攻毒后 6h 内死亡, 另外 1 只于攻毒后 12h 内死亡, 其余小鼠攻毒后 24h 精神沉郁, 不食, 扎堆, 之后逐步恢复正常, 保护率为 60.0% (6/10)。第二组 GST-B 蛋白免疫组, 死亡六只, 1 只攻毒后 6h 内死亡, 另 5 只于攻毒后 12h 内死亡, 其余小鼠攻毒后 24h 精神沉郁, 不食, 扎堆, 之后逐步恢复正常, 保护率为 40.0% (4/10)。

3 讨论

致猪水肿病大肠杆菌 Ee 株是本实验室从湖北武汉分离的地方菌株, 动物致病性试验表明该菌对小鼠很较强的致病性, 引起小鼠死亡, 肉汤培养物无菌滤液能致死小鼠且剖检见相关脏器水肿, 引起 Vero 细胞死亡。静脉注射断奶仔猪能复制典型水肿病症状^[3]。

本研究从 Ee 株中克隆出 SLT-IIeB 基因, 并将其融合后构建了 SLT-IIe3B, 序列分析表明, 所克隆 SLT-IIeB 基因全长 204bp, 编码 68 个氨基酸, 未发生任何碱基突变, 与 NCBI 上所发表的 12 个序列的核苷酸的同源性都是 100%。SLT-IIe3B 基因全长 630bp, 编码 210 个氨基酸, 测序结果显示第 536 处碱基由 C 变成 T (C→T), 相应的氨基酸序列由脯氨酸突变为亮氨酸 (P→L)。Ling 等^[16] 利用点突变技术表明, SLT-IIeB 的第 65 位的谷氨酰胺 (Gln) 和第 67 位赖氨酸 (Lys) 与靶细胞上的受体 Gb4 结合的特异性有关, 因此重组 SLT-IIe3B 并不涉及结合位点

的突变。

采用 TMHMM 软件对猪水肿病毒毒素(SLT-IIeB) B 亚基进行跨膜螺旋分析,结果表明跨膜区位于第 3 ~ 23 个氨基酸之间,对应于信号肽序列。Sylvia F 等 SLT-IIeB 全基因构建成的重组菌 H146(α pSF1),未能实现表达,而去掉信号肽的基因片断得到高效融合表达。主要原因可能是信号肽序列所编码的 18 个氨基酸多是疏水性氨基酸,而导致带有信号肽的 B 亚单位呈不溶状态^[17];也可能是外源蛋白以融合蛋白的形式存在,外源基因的信号肽影响重组质粒的表达。Leung P H 等^[18]将 SLT 基因 A 亚基的 N 端信号肽和 C 端跨膜区缺失后,高效表达了 GST-SLT 融合蛋白。因此,本试验引物 P1 的设计避开了其 N 端跨膜区和信号肽序列,实现了 SLT-IIeB 的 3 拷贝融合高效表达。

我们用 EMBOSS (Parker JMR et al, 1986; Kolaskar AS et al, 1990)软件对 SLT-IIeB、SLT-IIe3B 基因编码的蛋白进行抗原性位点分析,结果表明,SLT-IIe3B 蛋白除了保留 SLT-IIeB 蛋白的 3 个主要抗原位点(Site1、Site2 和 Site3)外,还增加了 2 个抗原位点。其中包含两个保守的抗原表位^[16]。因此 SLT-IIe3B 抗原表位数除倍比增加外,同时还增加了新的分值高的表位。

并非所有融合蛋白都发挥出其预想的协同效应,这是由于相连的两种分子在肽链折叠过程中相互干扰,不一定能形成天然空间构型,或者出现非中和表位对中和表位的覆盖,从而影响了其生物学活性^[19]。利用 Ee 株感染猪血清为一抗进行 Western blot 反应,可见特异性条带,这说明融合蛋白具有较好的免疫学活性。水肿毒素是通过与它的受体结合来发挥生理功能的,中和性的抗体能够结合 SLT-IIeB 并阻断 SLT-IIeB 与其受体的结合。毒素结合抑制试验结果表明多抗抑制 SLT-IIe3B 及 SLT-IIeB 与受体结合的 IC50 前者大于后者,因此 SLT-3B 与受体的亲和力大于 GST-B。这既说明重组蛋白具备天然蛋白的生物学活性,而且 3 拷贝融合能增强表达蛋白的生物学活性。

将重组 GST-3B 和 GST-B 融合蛋白分别免疫 SPF 昆明小鼠,利用 SLT-IIe3B-ELISA 方法检测免疫小鼠的抗体消长规律。两组抗体消长趋势相同,但各时期平均抗体水平 GST-3B 免疫组明显高于 GST-B。攻毒试验表明,GST-3B 组相对于 GST-B 组来说对水肿病强毒株的攻击具有较好的保护力。

总之,本研究首次利用致猪水肿病大肠杆菌(SLTEC)的主要免疫原性基因 SLT-IIeB 进行 3 拷贝

融合表达,并对融合蛋白的生物学活性、免疫原性及其免疫效力进行了检测。证实 3 拷贝一定程度地解决了 SLT-IIeB 免疫原性弱的难题,这为今后多基因的表达策略及研制新型大肠杆菌疫苗提供了新的思路和研究基础,也对人产 SLT-I 和 SLT-II O157:H7 的防治提供新的思路,具有一定的公共卫生学意义。

参 考 文 献

- [1] Kehl KS, Haven P, Behnke CE, et al. Evaluation of the premier EHEC assay for detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol*, 1997, **35**(8): 2051 - 2054.
- [2] Gannon VPJ, Rashed M, King RK, et al. Detection and characterization of the eae gene of shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, 1993, **31**(5): 1268 - 1274.
- [3] Blanco JE, Blanco M, Mora A, et al. Production of toxin (enterotoxins, verotoxins, and necrotoxins) and colicins by *Escherichia coli* strains isolated from septicemic and healthy chickens relationship with vivo pathogenicity. *J Clin Microbiol*, 1997, **35**(11): 2953 - 2957.
- [4] Karch H, Meyer T. Single primer pair for amplifying segments of distinct Shiga-like-toxin genes by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, 1989, **27**(12): 27512 - 27571.
- [5] Ludwig K, Bitzan M, Zimmermann S, et al. Immune response to non-O157 Vero toxin-producing *Escherichia coli* in patients with hemolytic uremic syndrome. *J Infect Dis*, 1996, **174**(5): 1028 - 1039.
- [6] Karch H, Russmann H, Schmidt H, et al. Long-term shedding and clonal turnover of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 in diarrheal diseases. *J Clin Microbiol*, 1995, **33**(6): 1602 - 1605.
- [7] Linggood MA, Thompson JM. Verotoxin production among porcine strains of *Escherichia coli*. *J Med Microbiol*, 1987, **24**(4): 359 - 362.
- [8] Imberechts H, De Greve H, Lintermans P. The pathogenesis of edema disease in pigs. A review. *Vet Microbiol*, 1992, **31**(2 - 3): 221 - 233.
- [9] Bertschinger HU, Nief V, Tschäpe H. Active oral immunization of suckling piglets to prevent colonization after weaning by enterotoxigenic *Escherichia coli* with fimbriae F18. *Vet Microbiol*, 2000, **71**(3 - 4): 255 - 267.
- [10] De Grandis S, Law H, Brunton J, et al. Globotetraosylceramide is recognized by the pig edema disease toxin. *J Biol Chem*, 1989, **264**(21): 12520 - 5.
- [11] Austin PR, Hovde CJ. Purification of recombinant shiga-like toxin type II B subunit. *Protein Expr Purif*, 1995, **6**(6): 771 - 779.
- [12] Ling H, Pannu NS, Boodhoo A, et al. A mutant Shiga-like toxin IIe bound to its receptor Gb3: structure of a group II Shiga-like toxin with altered binding specificity. *Structure Fold Des*, 2000, **8**(3): 253 - 264.
- [13] 刘国平, 吴 斌, 刘梦元, 等. 致猪水肿病大肠杆菌的分离鉴定及生物学特性. *中国兽医学报*, 2005, **31**(25): 3115 - 3118. ac.cn

- [14] Krogh A , Larsson B , Heijne G , *et al.* Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model : Application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology* , 2001 , **305**(3) : 567 - 580.
- [15] MacLeod DL , Gyles CL. Immunization of pigs with a purified Shiga-like toxin II variant toxoid. *Vet Microbiol* , 1991 , **29**(3 - 4) : 309 - 318.
- [16] Ling H , Pannu NS , Boodhoo A , *et al.* A mutant Shiga-like toxin IIe bound to its receptor Gb3 : structure of a group II Shiga-like toxin with altered binding specificity. *Structure Fold Des* , 2000 , **8**(3) : 253 - 264.
- [17] Sylvia F , Florian G , Lothar HW , *et al.* Construction of recombinant Shiga-like toxin- II v (SLT- II v) and its use in monitoring the SLT- II v antibody status of pigs. *Vet Microbiol* , 1995 , **43**(1) : 41 - 52.
- [18] Leung PH , Peiris JS , Ng WW , *et al.* Polyclonal antibodies to glutathione S-transferase-verotoxin subunit a fusion proteins neutralize verotoxins. *Clin Diagn Lab Immunol* , 2002 , **9**(3) : 687 - 92.
- [19] Garrity RR , Rimmelzwaan G , Minassian A , *et al.* Refocusing neutralizing antibody response by targeted dampening of an immunodominant epitope. *J Immunol* , 1997 , **159**(1) : 279 - 289.

Expression of GST-3B fusion protein of *Escherichia coli* of Ee strain producing SLT-IIe toxin and study on its biological activities and immunogenicity

LIU Guo-ping^{1,2} , WU Bin^{1*} , LIN Yi-yuan¹ , JIN Mei-lin , CHEN Huan-chun¹

(¹ State Key Laboratory of Agricultural Microbiology , Huazhong Agriculture University , Wuhan 430070 , China)

(² College of Animal Science , Yangtze University , Jingzhou 434025 , China)

Abstract : Three copies of DNA fragment encoding the truncated SLT-IIeB of Ee strain which was responsible for the edema disease in piglets in Hubei province were fused to the downstream of glutathione S-transferase (GST) of pGEX-KG expression vector , resulting in the fusion expression plasmid pK3B. After transformed into *E. coli* BL21(DE3) and induced by IPTG , the results of SDS-PAGE showed that the GST-3B fusion protein was expressed in high level. Western blot was performed to confirm that the expressed fusion protein could specifically react with antiserum against diseases of edema of swine. The fusion protein was further purified and used as an antigen for receptor-binding inhibition assay. The receptor-binding inhibition assay showed GST-3B fusion protein had more strong biological activities than GST-B. The fusion protein of GST-3B or GST-B was purified and emulsified with Freund 's incomplete adjuvant in equal volumes to get subunit bacterin. Groups of SPF KM mice were vaccinated subcutaneously at 0 week with 25 micrograms and at 2 weeks with 25 micrograms of purified GST-3B or GST-B and challenged intraperitoneally with volume of $5 \times OD_{50}$ Ee strain. Serological tests were performed one week interval with ELISA. The IgG titres against SLT-IIeB in the sera collected at the same period from the Group GST-3B were higher than in the Group GST-B and the immune protection rate against Ee strain was respectively 60% and 40% . These results show the fusion protein GST-3B had more strong biological activities , immunogenicity and better protection against Ee strain , which built a good foundation for the further research of high efficacy vaccine against porcine edema disease.

Keywords : SLTEC , SLT-IIeB , fusion expression , biological activities , immunogenicity

Foundation item : Chinese National Programs for High Technology Research and Development (2006AA10A206) ; 11th Five- year Scientific Breakthrough Fund of Hubei province (2006AA202)

* Corresponding author. Tel/Fax 86-27-87281795 ; E-mail : wub@mail.hzau.edu.cn

Other authors : ZHAO Zhan-qin¹ , TANG Xi-biao¹ , YANG Ming-liu¹

Received 21 November 2006 / Accepted 27 December 2006 / Revised : 7 June 2007 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>