

大肠杆菌 Ee 株 SLT-IIeB 与 FedF 基因的融合表达 及表达产物的免疫原性研究

刘国平^{1,2}, 吴 斌^{1*}, 林艺远¹, 刘梦元³, 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) (³ 湖北大学生命科学学院 武汉 430062)

摘 要 根据猪水肿病大肠杆菌 Ee 株主要免疫原性片段 SLT-IIeB 和 FedF 的基因序列, 利用 PCR 技术克隆目的片段, 将 SLT-IIeB 和 FedF 基因依序串联于谷胱甘肽-S-转移酶(GST)表达系统的 GST 下游, 在大肠杆菌中成功获得了大小约为 63kDa 融合蛋白 GST-SF, Western blot 检测证实表达的融合蛋白具有良好的生物学活性。以纯化的融合蛋白为抗原免疫新西兰兔制备血清, 体外活性试验表明, 所制备的抗血清能中和 Ee 株水肿毒素对 Vero 细胞的病变效应; 黏附抑制试验证实抗血清能抑制 Ee 株对猪小肠刷状缘细胞的黏附。将融合蛋白免疫小鼠, 结果表明, GST-SF 能够诱发较好的免疫反应, 并能提供对 Ee 株 5LD50 致死剂量的 70% 保护率。研究表明 GST-SF 融合蛋白具有良好的免疫原性, 具有良好的应用前景。

关键词: Ee 株, SLT-IIeB, FedF, 融合表达, 免疫原性

中图分类号: Q786.R392 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2007)06-1044-06

产毒素大肠杆菌(*toxigenic escherichia coli*)是引起人和动物腹泻的重要病原菌。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 或 VTEC)、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产 SLT-IIe 大肠杆菌引起, 多发生于断奶后仔猪, 是危害规模化养猪业的重要疾病之一^[4-7]。致猪水肿病大肠杆菌 SLTEC 感染易感猪后, 细菌以其 F18a(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)是致仔猪水肿病产 Vero 细胞毒素大肠杆菌(SLTEC)的 2 个主要毒力因子^[9,10]。

传统的仔猪水肿病疫苗的研制, 只是以致水肿病大肠杆菌菌株的 O 抗原为基础, 并没有考虑水肿

毒素 SLT-IIe 和菌毛 F18ab, 其免疫保护率不高, 对猪水肿病至今还没有较为有效的疫苗。

在猪水肿病大肠杆菌的免疫原性片段中, SLT-IIe 由 1 个分子质量为 33 kDa 的 A 亚基和 5 个分子质量为 7.6kDa 的 B 亚基共同组成的聚合物。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。F18ab 由 5 个亚单位组成, FedF 为 F18ab 的黏附素, 因为 FedF 抗血清能抑制 F18⁺ *E. coli* 对小肠上皮细胞的黏附。近年来有些学者用提纯的 F18ab 的菌毛免疫鸡, 制备针对 F18ab 菌毛的卵黄抗体, 在体外能抑制 F18 菌株对猪肠道黏膜上皮细胞的吸附, 口服免疫则可对攻毒提供保护^[9]; 以 Stx-2e 抗毒素被动免疫和用其类毒素主动免疫后攻毒, 取得了令人满意的免疫效果^[11]。鉴于 Anti-SLT-IIeB 及 Anti-FedF 的抗黏附作用, 因此, 我们利用分子克隆技术, 将 SLT-IIeB 及 FedF 构建融合基因 SF, 利用谷胱甘肽-S-转移酶(GST)表达系统将融合基因 SF 串联于 GST 下游进行原核表达, 并对重组蛋白的生物学活性、免疫血清中和特性及免疫原性进行了研究。

基金项目: 国家 863 计划(2006AA10A206)、国家科技支撑计划(2006BAD06A07)

* 通讯作者。Tel/Fax: 86-27-87281795

作者简介: 刘国平(1974-), 男, 湖北武汉人, 讲师, 在职博士研究生, 主要从事致病性大肠杆菌病原学及其基因工程疫苗研究。E-mail: hhaaiieerr@163.com

其他作者: 胡长敏¹

收稿日期: 2007-01-14; 接受日期: 2007-07-03; 修回日期: 2007-09-03

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒与阳性血清：猪水肿病大肠杆菌鄂 E 株 (Ee : O139, F18⁺ SLTEC), 由本实验室分离鉴定和保存^[12]；对照质粒 pGEX-KG/SLT-IIeB (pKB)^[13]、pGEX-KG/FedF (pKF) 由本室构建并保存^Δ 表达载体 pGEX-KG (pK) 受体菌 *E. coli* DH5 α 、表达菌 *E. coli* BL21(DE3) λ 鼠抗 SLT-IIeB 抗血清、鼠抗 FedF 抗血清猪水肿病大肠杆菌阳性血清均为本实验室保存, 鼠抗 GST 单克隆抗体购自 Sigma。

1.1.2 主要试剂和仪器：各种限制性内切酶及 PCR 试剂、T4 DNA 连接酶等均为大连 TaKaRa 产品, UNIT-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒购自上海生工, IPTG 为 Promega 产品, 蛋白质 Marker 购自 NEB 公司, HRP 标记的羊抗猪 IgG 抗体购自华美公司。GST 融合蛋白纯化试剂盒为 Amersham Bioscience 公司产品。核酸蛋白分析仪是美国贝克曼公司产品, 型号是 Du800, 蛋白纯化分离仪是美国 Amersham 公司产品, 型号是 upc-900。

1.2 融合基因的克隆

1.2.1 引物设计：参考 GenBank 上公布的 SLT-IIe 基因序列 (M21534) 及 FedF (Z26520) 基因序列, 分别设计了两对特异性引物。引物扩增范围为去掉信号肽和跨膜区的水肿毒素 B 亚单位结构序列及去掉信号肽和跨膜区的 F18 菌毛的 F 亚单位结构序列, 扩增大小分别为 204bp 及 897bp。其中引物 P1、P2 分别含有 BamHI 及 SacI 酶切位点, P3、P4 分别含有 SacI 及 HindIII 酶切位点, 引物序列如表 1 所示, 引物由北京博奥合成。

表 1 表达载体构建引物序列

Table 1 Primers used to construct recombinant plasmid pKSF		
Gene	Primer	Sequence(5'→3')
SLT-IIeB	P1	CCC GGATCCTCAGTAAACTTCACC
	P2	CCC GAG CTCGGCGATTGTGCTAAAGG
FedF	P3	TTT GAGCTCAGCTACTACAAGTAGAC
	P4	TT A AGCITTGGTCTACTATTACGCCA G

1.2.2 PCR 扩增：PCR 模板制作参照文献^[12]；PCR 反应体系为 50 μ L, 下游引物各 1.0 μ L, 扩增 SLT-IIe 基因及 FedF 基因的 PCR 反应条件分别为：94 $^{\circ}$ C 4min, 94 $^{\circ}$ C 30s, 56 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 1min, 28 个循环, 72 $^{\circ}$ C 10min, 94 $^{\circ}$ C 5min, 94 $^{\circ}$ C 1min, 58 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C

1min, 30 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 重组表达质粒的序列测定及诱导表达

按常规方法对 PCR 产物及 pK 载体进行酶切消化及回收, 并按 4 : 2 : 1 的量将 PCR 扩增产物 SLT-IIeB、FedF 和 pK 载体混合, 用 T4 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。

将阳性菌落过夜培养物按 2% 的量接种于 LB 中, 振荡培养至 OD 值在 0.4 ~ 0.6, 加 IPTG 至终浓度 0.8 mmol/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)。

1.4 Western blot

按文献^[14]的方法进行。一抗分别为鼠抗 SLT-IIeB 抗血清、鼠抗 FedF 抗血清及鼠抗 GST 单克隆抗体, 二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG。

1.5 融合蛋白抗血清的制备

按常规方法对重组蛋白进行提取与复性^[15], 并将复性蛋白以 GST-4B 柱纯化, 纯化蛋白测定浓度后 -80 $^{\circ}$ C 冻存储用。将纯化蛋白 GST-SF 浓度为 450 μ g/mL 1mL 与等体积弗氏不完全佐剂混合, 采取多点注射的方式, 接种 4 周龄实验兔, 隔 2 周以浓度为 890 μ g/mL 加强免疫 2 次, 首免后第 7 周以浓度 740 μ g/mL 不加佐剂, 从耳静脉缓慢推注, 于免疫后一周耳缘静脉采血, 取血清, 通过琼脂扩散试验测定血清抗体的效价 (抗原为 GST-SF 融合蛋白), 血清效价达 1 : 32, 捕杀采血, 提取血清, 22 μ m 滤膜过滤除菌, 分装, 置 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

1.6 抗血清的体外活性试验

1.6.1 抗血清对 SLT-IIe 的细胞毒性中和试验：参照文献^[12]进行水肿毒素粗提, 并以文献^[15, 16]所述方法进行猪水肿病毒素对 Vero-E6 细胞半数致死量 (CD50) 的测定及细胞毒性中和试验。以不产生毒素的 DH5 α 菌株的培养物上清 (用 DMEM 稀释相同倍数) 作对照。

1.6.2 黏附试验及抗血清黏附抑制试验 参照文献^[17, 18]进行刷状缘细胞的制备, 刷状缘细胞的终浓度为 10⁶ 个每毫升, 参照文献^[19]进行细菌悬液的制备, 细菌悬液的终浓度为 10⁹ cfu/mL, 并按文献^[19]的方法进行黏附及黏附抑制试验, 反应液用 PBS 洗涤, 离心取细胞液涂片, 瑞吉氏染色 10 min 后

于镜下观察结果。

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70只,随机分成5组,每组14只,其中4只用于免疫抗体水平检测,其余10只用于免疫攻毒保护试验。第一组为纯化GST-SLT-FedF(GST-SF)蛋白组;第二组为纯化GST-SLT-IIeB(GST-B)组;第三组为纯化GST-FedF蛋白组;第四组为GST蛋白组;第五组为生理盐水对照组。免疫方式采用皮下注射免疫,免疫剂量为 $25\mu\text{g}$ ($0.2\text{mL}\cdot\text{只}$)。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。

于首免两周后各组分别以同样剂量加强免疫一次,并于二免后2周,以 $5\times\text{LD}_{50}$ ($1.3\times 10^9\text{CFU}$)的大肠杆菌Ee株对小鼠进行腹腔攻毒。攻毒后15天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 pKSF 的构建及序列测定

以重组质粒为模板,以P1及P4为引物进行PCR鉴定,扩增大小约为1200bp,为克隆片段大小,进一步序列测定结果表明,SF克隆片段序列分析与猪水肿病大肠杆菌Ee菌株相对应SLT-IIeB基因及FedF基因核苷酸序列同源性为100%。该重组质粒中含有1个完整的SLT-IIeB基因片段及FedF基因片段,证实重组质粒构建正确,命名为pKSF。

2.2 GST-SF 的表达及检测

SDS-PAGE结果表明:含pKSF重组质粒的大肠杆菌BL21在约63kDa处有明显的表达带,为SLT-FedF蛋白与GST蛋白融合表达的产物(GST-SF),在IPTG诱导4h后表达量最高。空载体对照pK的BL21(DE3)在约27kDa有明显的表达带。利用纯化

的包涵体进行Western blot分析,GST-SF分别与鼠抗FedF抗血清、鼠抗SLT-IIeB抗血清及鼠抗GST单抗发生了特异性的免疫反应(图1)。

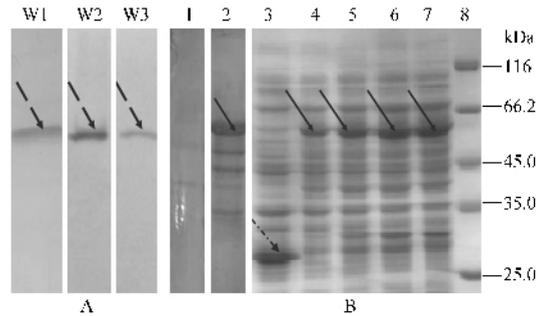


图1 重组质粒 pKSF SDS-PAGE 及 Immunoblot 检测

Fig.1 SDS-PAGE and Western-blotting analysis of the constructs. (A) Western blot identification of the constructs. Lane W1, W2, W3 desired GST-SF reaction with mouse anti-SLT-IIeB polyclonal antibody, mouse anti-FedF polyclonal antibody, mouse anti-GST monoclonal antibody, respectively. (B) SDS/PAGE analysis of the expression characteristic of the constructs. The arrows indicates the band of desired GST-SF(63kDa) and GST control(27kDa). lane 1, supernatant of *E. coli* cells harboring pKSF; lane 2, inclusion body of *E. coli* cells harboring pKSF; lane 3, pellet of *E. coli* cells harboring pK; lane 4, 5, 6, 7 pellet of *E. coli* cells harboring pKSF induction by IPTG after 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, respectively; line 8, the molecular mass standards (kDa).

2.3 表达产物抗血清体外活性试验

2.3.1 表达产物抗血清的体外细胞毒性抑制试验:试验结果表明,当抗血清稀释度为1:256的时候,能够完全中和 $40\times\text{CD}_{50}$ 量的SLT-IIe毒素,从而抑制毒素对Vero-E6细胞致死效应(图2A)。无抗血清的对照细胞,水肿毒素对Vero-E6细胞发生变性、脱落、死亡和溶解(图2B)。无毒素产生的对照菌株DH5a的培养物上清对Vero-E6细胞无细胞毒性作用(图2C),正常细胞对照如图2D。

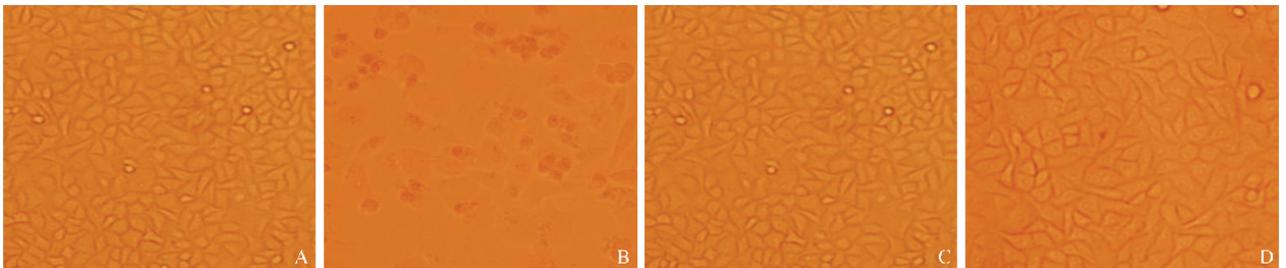


图2 水肿毒素对Vero细胞的病变效应抗血清对水肿毒素中和和试验

Fig.2 Toxicity of SLT-IIe to Vero cells and the ability of the antiserum to restrain the toxicity of SLT-IIe to Vero cells. A: The antiserum 100% restraining the toxicity of SLT-IIe to Vero cells; B: Toxicity of SLT-IIe from the supernatant of the culture of Ee strain to Vero cells; C: No toxicity of Supernatant of the culture of DH5a; D: Normal Vero cells as control.

2.3.2 菌毛黏附及黏附抑制实验:Ee株与小肠刷

状缘细胞反应液推片经瑞吉染色后油镜下观察,大

肠杆菌非常紧密地黏附在刷状缘上皮细胞上;当免疫血清进行 1:40 稀释时,可见大肠杆菌游离在刷状缘细胞周围而不黏附,这说明免抗 GST-SF 抗血清能明显抑制 Ee 株对刷状缘细胞的黏附。

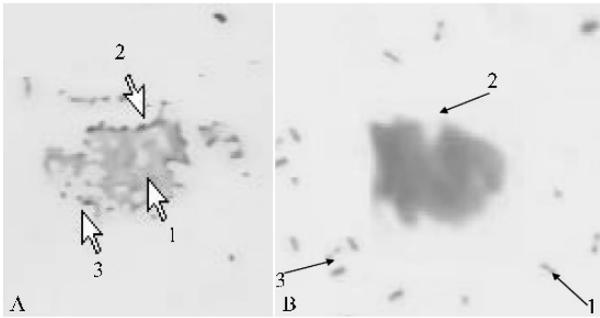


图3 菌毛黏附及黏附抑制实验结果

Fig.3 Adhesion of F18-positive *E. coli* strain to brush borders from a piglet and the ability of the antiserum to restrain the adhesion of Ee strain to brush borders from the same piglet as that referred to in fig3A. (A) 1: brush borders; 2, 3: bacterial adhesion to brush borders (B) 1, 3: bacteria without adhesion to brush borders; 2: brush borders.

2.4 融合蛋白对小鼠的免疫原性试验

2.4.1 小鼠抗体消长情况:纯化 GST-SF、GST-F、GST-B 蛋白免疫组分别于首免后第 5 周、第 5 周及第 4 周其体内的抗体水平达到最高。而且 GST-SF 疫苗组抗体水平明显高于 GST-F 及 GST-B 疫苗组 (t -Test, $p < 0.05$),GST 及生理盐水对照免疫组在整

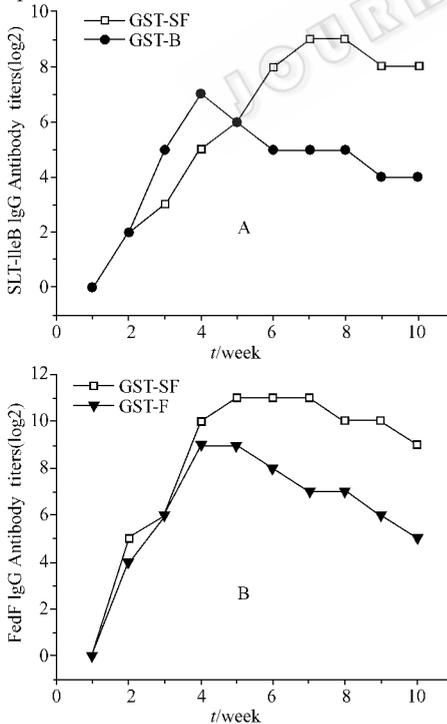


图4 免疫后不同时间小鼠体内的 ELISA 抗体水平

Fig.4 IgG antibody titers against SLT-IIe or FedF by ELISA at different time of post-vaccination in mice. (A) SLT-IIeB; (B) FedF.

个实验期间针对 SLT-IIeB 及 FedF 的 ELISA 抗体为阴性(图4)。

2.4.2 免疫保护性试验结果:试验结果表明,第4和第5组 GST 蛋白空白对照组及灭菌生理盐水对照组的小鼠于 12h 内全部死亡,死亡时口中流出血性泡沫,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攻毒菌。第1组为3只小鼠死亡,保护率为 70.0%(7/10)。第2组死亡8只,保护率为 20.0%(2/10)。第3组4只小鼠存活,保护率为 40.0%(6/10)。

3 讨论

致猪水肿病大肠杆菌鄂 E 株 (*Ee*)是本实验室从武汉分离的地方菌株,动物致病性试验表明该菌对小鼠有较强的致病性,该菌肉汤培养物的无菌滤液能致死小鼠且剖检见相关脏器水肿,并可引起 Vero 细胞死亡。静脉注射断奶仔猪能复制典型水肿病症状^[12]。在对 *Ee* 株的 FedF、SLT-IIeB 及 SLT-IIeA 基因克隆、序列分析、原核表达及表达产物的生物学特性研究的基础上^[12-14],笔者将 SLT-IIeB 与 FedF 融合串联后实现了在大肠杆菌中的表达。

随着人们对仔猪水肿病致病机理的深入了解,有学者提出预防水肿病的发生,理想的疫苗不仅应保护仔猪抵抗大肠杆菌的附着,同时也应保护仔猪免受其产生的 SLT-IIe 的攻击。而目前国内用于预防该病的主要是灭活菌苗,其主要考虑的是 O 抗原,免疫效果并不稳定。因此,考虑两种抗黏附作用,通过串联表达重组蛋白 S-F,探讨研制新一代亚单位疫苗的可能性,以解决现有疫苗的局限。

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^[22]。因此,有必要对融合蛋白的生物学活性进行证实。首先我们用?网站在线对 SF 基因编码的蛋白进行抗原性位点分析。SF 基因编码的蛋白进行抗原性位点分析,结果表明,融合蛋白 35~70 和 96~140 两个连续表位区与已证实的位于 SLT-IIeB 及 FedF 抗原表位一致^[18,23]。分别用鼠抗 SLT-IIeB 抗血清、鼠抗 FedF 抗血清及鼠抗 GST 单抗为一抗进行 Western blot 反应,均可见特异性条带,这初步说明融合蛋白具有较好的反应原性,可能分别具有 SLT-IIeB 及 FedF 的中和表位。并且制备的免疫血清在

体外活性检测中也表现出理想的中和活性,能抑制猪水肿毒素对 Vero 细胞细胞毒效应以及 Ee 株对小肠刷状缘细胞的黏附。这些实验结果均表明,融合蛋白 GST-SF 具有 SLT-IIeB 及 FedF 的中和表位,并有可能成为猪水肿病疫苗的良好候选。

将重组 GST-SF、GST-F、GST-B 融合蛋白分别免疫 SPF 昆明小鼠,抗体效价检测表明,平均抗体效价 GST-SF 免疫组明显高于 GST-B 免疫组或 GST-F 免疫组,而且 GST-SF 免疫组持续保持高效价的时间明显延长。攻毒试验表明,GST-SF 组相对于 GST-B 组或 GST-F 来说对水肿病强毒株的攻击具有较好的保护力。这说明 SLT-IIeB 与 FedF 进行融合表达后,与二者单独表达相比,SF 融合蛋白的免疫原性得到了增强。利用 SOPMA 软件(1995)对 SF 融合蛋白的二级结构进行预测,发现 SF 融合蛋白存在 50.57% 无规卷曲结构,并且有研究证实,SLT-IIeB 和 FedF 蛋白的部分中和表位就在这些无规卷曲区域内^[19,22],SF 融合蛋白免疫原性的增强是否是由于这些中和表位得到了充分的展示而导致的呢?还是由于二者存在协同作用呢?这还需要进一步的探索和证实。

总之,本研究首次利用致猪水肿病大肠杆菌(SLTEC)的两种主要免疫原性进行融合表达,并对其生物学活性进行了分析与证实。同时,鉴于重组蛋白的良好免疫原性及其抗血清的中和特性,SF 有可能成为猪水肿病疫苗的良好候选基因,这也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。

参 考 文 献

[1] Kehl KS, Haven P, Behnke CE, et al. Evaluation of the premier EHEC assay for detection of Shiga toxin2-producing *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol*, 1997, **35** :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** :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 viropathogenicity. *J Clin Microbiol*, 1997, **35** :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** :27512 - 27511.

[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** :1028 - 1039

[6] Linggood MA, Thompson JM. Verotoxin production among porcine strains of *Escherichia coli*. *J Med Microbiol*, 1987 Dec, **24** (4) :359 - 362.

[7] 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** :1602 - 1605.

[8] Imberechts H, De Greve H, Lintermans P. The pathogenesis of edema disease in pigs. A review. *Vet Microbiol*, 1992, **31** :221 - 233.

[9] Bertschinger HU, Nief V, Tsch pe H. Active oral immunization of suckling piglets to prevent colonization after weaning by enterotoxigenic *Escherichia coli* with fimbriae F18. *Vet. Microbiol*. 2000, **71** :255 - 267.

[10] DeGrandis S, Law H, Brunton J, et al. Globotetraosylceramide is recognized by the pig edema disease toxin. *J Biol Chem*. 1989, **264** (21) :12520 - 12525.

[11] Bosworth BT, Samuel JE, Moon HW, et al. Vaccination with genetically modified Shiga-like toxin IIe prevents edema disease in swine. *Infect Immun*. 1996, **64** (1) :55 - 60.

[12] 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, **25** :31 - 33.

[13] 林芝远,刘国平,吴斌,等.致猪水肿病大肠杆菌鄂 E 株 SLT-IIeB 基因的克隆、序列分析及原核表达.华中农业大学学报. 2006, **25** (5) :474 - 478.

[14] 刘国平,吴斌,刘梦元,等.猪大肠杆菌水肿毒素 SLT-IIeA 基因的克隆和序列分析.动物医学进展, 2004, **25** (1) :122 - 125.

[15] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

[16] Boyd B, Tyrrell G, Maloney M, et al. Alteration of the glycolipid binding specificity of the pig edema toxin from globotetraosyl to globotriaosyl ceramide alters in vivo tissue targeting and results in a verotoxin-like disease in pigs. *J Exp Med*, 1993, **177** :1745 - 1753.

[17] Schmitt C K, McKee M L, O'Brien A D. Two copies of Shiga-like toxin II-related genes common in enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains are responsible for the antigenic heterogeneity of the O157:H7 strain E32511. *Infect Immun*, 1991, **59** :1065 - 1073.

[18] Sellwood R, Gibbons RA, Jones GW, et al. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to pig intestinal brush borders: The existence of two pig phenotypes. *J Med Microbiol*, 1975, **8** (3) :405 - 411.

[19] Parry SH, Porter P. Immunological aspects of cell membrane adhesion demonstrated by porcine enteropathogenic *Escherichia coli*. *Immunology*, 1978, **34** (1) :41 - 49.

[20] Smeds A, Pertovaara M, Timonen T, et al. Mapping the Binding Domain of the F18 Fimbrial Adhesin. *Infect Immun*, 2003, **71** (4) :2163 - 2172.

[21] 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.

[22] Garrity RR, Rimmelzwaan G, Minassian A, et al. Refocusing neutralizing antibody response by targeted dampening of an immunodominant epitope. *J Immunol* 1997, **159** :279 - 289.

Fusion expression of SLT-IIeB gene and FedF gene of Ee in *Escherichia coli* and its immunogenicity

LIU Guo-ping^{1,2}, WU Bin^{*}, LIN Yi-yuan¹, LIU Meng-yuan, CHEN Huan-chun^{1*}

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

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

(³ College of Science and Technology, Hubei University, Wuhan 430062, China)

Abstract The DNA fragment encoding the truncated SLT-IIeB and FedF of Ee strain were fused to the downstream of glutathione S-transferase (GST) of pGEX-KG expression vector, resulting in the fusion expression plasmid pKSF. After transformed into *E. coli* BL21 (DE3) and induced by IPTG, the results of SDS-PAGE showed that the GST-SF fusion protein was expressed in high level. Western blot was performed to confirm that the expressed fusion protein could specifically react with mouse anti-SLT-IIeB antiserum, mouse anti-FedF antiserum and mouse anti-GST monoclonal antibody respectively. The fusion protein was further purified and used as an antigen for preparation of immune serum. The anti-sera of GST-SF were able to restrain the toxicity of SLT-IIe to Vero-E6 cells and inhibit the adhesion of F18 fimbriae to brush borders of swine in vitro. Groups of SPF KM mice were vaccinated subcutaneously at 0 week with 25 micrograms and at 2 weeks with 25 micrograms of purified GST-SF, GST-B, GST-F and challenged intraperitoneally with volume of 5 LD₅₀ Ee strain. The results show the fusion protein GST-SF had more strong immunogenicity and better protection against Ee strain.

Keywords : Ee strain ; SLT-IIeB ; FedF ; fusion expression ; immunogenicity

Foundation item : National Programs for High Technology Research and Development of China (2006AA10A206) ; National Key Technologies R&D Program (2006BAD06A07)

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

Other author : HU Chang-min¹

Received : 14 January 2007 / Accepted : 3 July 2007 / Revised : 3 September 2007

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>