



霍乱基因工程菌苗的研究

陈正道 朱嘉庸

(卫生部上海生物制品研究所, 上海)

如何估价现有霍乱基因工程菌苗? 为什么要制备、怎样制备、又何以要这样或那样制备一个基因工程菌苗? 要了解这些问题, 首先必须对霍乱弧菌的免疫、菌苗制备等作一概略回顾。

霍乱弧菌中保护性抗原研究

霍乱疾病自身是一个免疫过程^[1]。用同源或异源霍乱弧菌毒株对有霍乱病史的志愿者攻击时发现, 其明显的保护作用至少存在三年; 被攻击者粪便或空肠分泌液中很少能分离到弧菌; 血清中 IgG 或肠内 SIgG 抗体显著上升^[2,3]。这表明:

(1) 合适的预防制剂对霍乱作免疫控制是有希望的。(2) 霍乱弧菌及其代谢产物中确有有效抗原存在。

但诸如霍乱弧菌鞭毛鞘及鞭毛抗原^[4]、膜表面组分^[5]、脂多糖菌体抗原^[6]、凝集素^[7]、酶及霍乱肠毒素(CT)等物质中仍不能肯定哪一个是最重要的抗原^[8], 有人认为抗菌免疫在人体霍乱免疫中起重要作用^[2,9], 也有人认为菌体抗原和 CT 起协同保护作用^[6], 还有人则注重 CT 免疫功能的研究。

CT 分子量 84000, 由 A、B 两亚基组成。A 亚基以单拷贝存在, 它包含有 A₁,

A₂ 两多肽。B 亚基有 5—6 个拷贝。A₁ 通过 A₂ 与 B 亚基相连。当 B 亚基与肠上皮细胞膜上表面受体 GM₁ 结合后, A₁ 便激活肠上皮细胞中腺苷酸环化酶活性来刺激水分与电解质等的分泌而引起腹泻^[9]。CT 作为引起腹泻的主要因子早为人们公认, 并吸引了人们对抗毒免疫的注意^[2], 但它在免疫中的作用仍在争论中^[10]。有人认为 CT 很少^[11]或几乎没有^[2]保护作用。Svennerholm 等实验则表明 B 亚基是一有前途的免疫原^[11]。Finkelstein 也认为 B 亚基是主要免疫原, A 亚基是一相当差的抗原, 但可作为免疫调节佐剂提供免疫应答^[12], 而 Pierce 等认为纯化 CT 有明显保护作用, B 亚基保护作用差, 粘膜 A 亚基抗体应答可增加保护力^[13], 甚至有人发现用 A 亚基免疫的动物有比用 CT 免疫还要高的保护作用^[14]。

霍乱菌苗制备概况

自 1883 年 Koch 发现细菌引起霍乱以来, 制备霍乱菌苗的研究一直持续到今天。一般认为, 非经肠道免疫的、加有佐剂的灭活全细胞菌苗维持其效力在 70% 左右的时间为 12—18 个月^[1], 而福马林或

本文于 1985 年 7 月 1 日收到。

戊二醛处理的类毒素无论是否经肠道途径免疫均无效^[2]，纯化的B亚基^[11]、A亚基^[14]、前类毒素原^[13]的免疫效果结论不一。而根据抗毒免疫可能与抗菌免疫起协同保护作用的观点制备的口服类毒素，和灭活全菌体的结合菌苗仅有中等程度的保护力^[15]。由此可见，非霍乱活菌苗仅在一短时间内产生有限的保护作用^[9]。在此情况下，减毒活菌苗的研究受到了广泛的重视。

远在1885年就有人提出霍乱减毒口服活菌苗。最近，一些动物试验指出活的霍乱细胞抗原的优越性，这问题才又被人们重新研究。前面提到的志愿者感染能激起高水平的保护免疫至少三年^[2,3]，这一事实增强了人们对口服活菌苗研究的兴趣。

用作活菌苗的菌株除天然分离得到的无毒 *V. cholerae* 01 株外^[16]，尚有应用化学诱变剂 NTG 或噬菌体等分离得到的一些变株，如 ME-6、ME-7、链霉素依赖株，以及一系列其他减毒株^[17]。但实验表明，这些变株或者免疫原性不足，或在粪便中有回复突变，或表现出不稳定的毒性，或在体内增殖能力差，或未见进一步的报道^[10]。其中唯一值得注意的是由 Honda 和 Finkelstein 用 NTG 诱变分离得到的 Texas Star-SR 株^[18]，该变株产生 CT 的 B 亚基但无 CT-A。志愿者试验表明^[12,19]，24% 有轻度腹泻，近一半志愿者的粪培养中可检测到该菌，但未发现有产 CT 的菌株。一次剂量不仅对同源血清型毒性菌（小川），而且对异源血清型（稻叶）的攻击有显著保护作用。

一般认为 Texas Star 是霍乱口服活菌苗有希望的候选株。但它有 24% 的致泻。已知无论在体内、体外，CT 的产生均受到培养和生长条件，细菌和宿主基因等大量

遗传因素及生物因素的影响与控制^[20]，因此在某些场合不产毒的菌株不一定是产毒基因的缺失。由于与 Texas Star 减毒相关的精确的遗传缺失是不知道的，因此 24% 的腹泻不能排除毒力回复的可能。Texas Star 系经 NTG 诱变而来，NTG 为多位点突变剂，由于经 NTG 诱变后的 Texas Star 的精确的基因变化不清楚，也就不能排除在 Texas Star 上存在有某些非人们所需要而又尚未被认识到的有害突变的可能^[21]。显而易见，Texas Star 株所存在的问题生动地展示出基因工程技术进入霍乱活菌苗研究的必要性与必然性。

基因工程技术应用于 霍乱活菌苗的研究

基因工程技术应用于霍乱活菌苗的研究是在其对 *E. coli* 不耐热肠毒素 (LT) 研究的基础上发展起来的。人们从 *E. coli* 中的 LT 与 *V. cholerae* 中的 CT 在分子结构上和作用方式上的相似性^[22]、相同的活化腺苷环化酶的活性^[23]、彼此的免疫交叉反应所表现出的一定程度的免疫同源性^[24]等方面推断，尽管 LT 的编码基因是在质粒上，而 CT 的则位于染色体上^[17]，但两者在核酸编码序列上亦应有同源性^[25]。

1980 年，随着 LT 基因探针的制备^[26]，Moseley 等应用 LT 探针去检查 *V. cholerae* 中 DNA 的序列，证实 LT 基因的序列与 CT 的之间确有显著的核酸序列同源性^[25]。

1981 年，Kaper 等人把 *V. cholerae* 染色体 DNA 用 Hind III 酶解后，以 LT 探针检测，制备了 CT、CT-A、CT-B 基因探针^[27]。

1982 年，Mekalanos 等人用 LT 探针针对

被噬菌体 Vcal 等转染后的 *V.cholerae* DNA 作探测, 筛选到了 CT 基因缺失变株。并把 *V.cholerae* 569B 染色体上一个 5.1kb 的 EcoRI-PstI 片段插入于 pBR322 且转化到 *E.coli* [10] 中。Kaper 等已报道由 *V.cholerae* ELTOR 62746 与 N16961 株染色体分离到 CT 基因片段, 经插入 pBR325 后转化到 *E.coli* HB101 中, 并把 CT 两亚基的 A⁺B⁻ 和 A⁻B⁺ 基因分别克隆于 *E.coli* 中, 其 B 基因在一强的外源启动子控制下生效, 产生超产量的 B 亚基 [28]。Broadbent 等把 *V.cholerae* 中与 LT 基因探针同源的片段插入于 pAT153, 经转化进入 *E.coli* HB101 且分离到产 CT 及产 CT-B 的菌株。作者还设想, CT 基因编码序列与 LT 的基因在启动区 A、B 排列顺序方面相似, 并推测在 *E.coli* 中 CT 的加工和转移与 *E.coli* 产毒株中 LT 的加工和转移的机制也相似 [29]。Pearson 和 Mekalanos 用 LT-A、LT-B 的探针分析 *V.cholerae* 569B CT 序列, 其 Southern blot 的结果证实了 Moseley 和 Falkon [25] 的看法, 即在 569B 中有两个拷贝的 A、B 亚基的编码基因。他们把其中之一 5.1kb DNA 插入到 pBR322, 构建成重组质粒 pJM 17, 经转化进入 *E.coli* MS371, 得到产 CT 的 *E.coli* 变株。继而, 他们通过体外重组, 在 pJM17 编码 A 亚基基因序列上的 Xba I 位点产生一个插入变异, 而得到一个不产生 A 亚基仍产 B 亚基的变株 *E.coli* MS371(pJM18) [30]。上述工作作为制备霍乱基因工程菌苗打下了基础。

1983 年, Lockman 和 Kaper [31] 等人分析了位于 pCVD002 质粒上来自 *V.cholerae* ELTOR 62746 的 CT-A₂ 和 CT-B 的核酸编码序列。差不多同时, Mekalanos 等人 [32] 发表了来自 *V.cholerae* 2125 株, 包括单个 CT DNA 的 2020 个碱基的序列。

在该序列中, 从 516-1292 系形成 A 亚基的片段, 1293-1663 系形成 B 亚基的相应 DNA 片段, 这两个片段中的碱基顺序与 Lockman 和 Kaper [31] 等人报道的一致。Mekalanos 等人依据这些实验结果又进一步制备了霍乱弧菌变株, 缺失大部分 CT 基因的 0395-NT 和仅有 B 亚基结构基因的 0395-N1 [32]。而 Kaper 等人也随之报道了霍乱基因工程菌苗 JBK70 的构建 [2, 23]。

1984 年 Kaper 等人又继 JBK70 霍乱弧菌变株之后构建了 CVD101, 现正在志愿者中对菌苗的效力与安全性能作考核 [34]。

上述基因工程菌苗在构建的具体细节方面各有特色, 但在构建的思路方面颇为一致。他们均是以基因工程技术为手段, 通过对霍乱弧菌染色体上 CT 基因的改造来达到霍乱弧菌自身的减毒。另一与之截然不同的思路是把霍乱弧菌染色体上的 CT 基因或其它有效抗原通过载体克隆到伤寒口服活菌苗 *Salmonella Typhi* galE 变株 Ty21a 中去。最近, Clements 等人便是依照这一思路, 构建了 Ty21a.SE12 变株。他们希望该变株能成为抗伤寒和霍乱及大肠杆菌引起的腹泻的双价口服活菌苗 [35]。

以下分别扼要介绍上述各变株的构建。

霍乱弧菌减毒变株 JBK70 的构建 [21, 33]

构建该菌苗的第一步是把编码霍乱毒素的基因克隆于 *E.coli* 中并绘制 CT-A、CT-B 基因图及酶切图谱, 以便精确地进行后一步的体外重组。体外重组的要点是在 CT 基因部位克隆一个编码有汞抗性的 DNA 片段, 从而构成一属于不相容性 P 组 (Inc, P) 的重组质粒。在该质粒中, 大

约包含有 7 kb 的 *V. cholerae* 染色体序列。该质粒由 *E. coli* 经结合转移进入 *V. cholerae* ELTOR Inaba N16961 株, 并在该菌中进行染色体外复制^[21] (图 1A)。该质

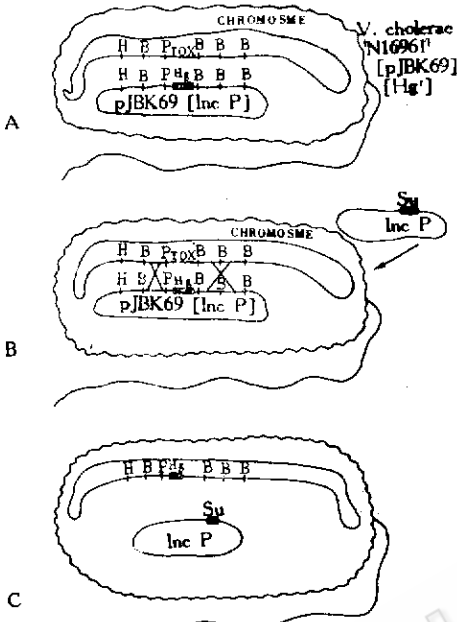


图 1 *V. cholerae* 减毒菌苗候选株 JBK70 的构建
TOX—CT 基因, H—Hind III,
B—Bgl II, P—Pst I.

粒因具有与染色体同源的 DNA 片段而向染色体相应部位靠近, 并在那儿以很低的频率进行体内重组。其结果, 质粒上汞抗性基因置换了染色体上的毒素基因。可见, CT 基因的替换与缺失的专一性为其两侧同源的染色体序列所决定 (图 1B)。此后, 又引入了第二个 Inc.P 组质粒, 该质粒还编码有氨磺酰抗性因子。因为属于相同不相容性组的两个质粒在同一细胞中不能稳定地共存, 所以这表明在一个同时具有氨磺酰和汞双抗性的 *V. cholerae* 变株中, 编码有氨磺酰抗性的 Inc.P 质粒已稳定地存在于染色体外; 汞抗性因子已整合到染色体上; 染色体上原先编码的毒素基因及 pJBK 69 复制子已失去。作者报道筛选获得了这样一个双抗性变株, 并定名

为 JBK70 (图 1C), 且当用霍乱毒素基因探针作 DNA 杂交试验时发现, 该变株中的霍乱毒素基因确已完全地缺失。与之同时, 作者又构建了一个在强启动子 *trp* 控制下, 仅含 CT-B 基因的质粒, 并把它引进无肠毒素产生源的 JBK70 变株中, 而构成一能生成 B 亚基的 *V. cholerae* 减毒株。

(按相似程序构建且 AP' 的 JBK56^[33] 实用性小, 故不介绍)。

霍乱弧菌减毒变株 CVD101 的构建^[34]

CVD101 系 Kaper 等人应用基因工程技术使 *V. cholerae* Ogawa395 株染色体上 CT-A₁ 编码基因缺失而形成的减毒变株。*V. cholerae* Ogawa 395 株系经过精心选择, 志愿者中试验证明, 它能提供很高的免疫原性^[3]。395 株染色体上含有两个 CT 基因拷贝^[36]。CT 的基因结构大体如图 2。他们通过染色体片段分离, 基因体外重组把这两个拷贝单独地克隆于 pBR 325 中, 而得到一个重组质粒 pCVD15。该质粒中插入有 12kb 的 Hind III *V. cholerae* 395 染色体片段, 该片段上有一个如图 2 所示的 CT 操纵子 (如图 3)。已经知道, pCVD15 上一个 Xba I 位点包含了编码有 A₁ 亚基第 10 和第 11 个氨基酸残基的序列, 而一个 Cla I 位点跨越了编码 A₁ 最后一个氨基酸残基和 A₂ 的第一个残基的碱基序列 (图 4A)。为了删除这 550bp 的 Xba I-Cla I 片段, 先用 Cla I 酶对 pCVD 15 作部分酶解使之线性化, 再应用 DNA 多聚酶 I 把 Cla I 位点末端单链补齐, 随后在补齐的 Cla I 位点连上合成的八聚体 Xba I 接头, 并经进一步修剪最后得到一重组质粒 pCVD30。该质粒仅缺失编码 A₁ 基因的 Xba I-Cla I 片段, 且该 Cla I 位点经修饰转变为 Xba I 位点

(图3)。这样,该质粒分子仅含有CT-A₂、CT-B基因片段(图4B)。这一变动的结果是缺失了A₁多肽194个氨基酸残基中的183个,仅留下A₁的前11个氨基酸残基和所有的A₂与B多肽。因为CT-A₁ DNA序

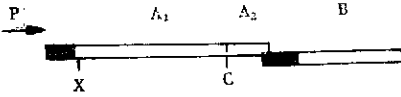


图2 霍乱肠毒素结构基因 [34]
P——启动区, X——Xba I, C——Cla I,
A₁、A₂、B为CT-A₁、CT-A₂、CT-B
结构基因位置

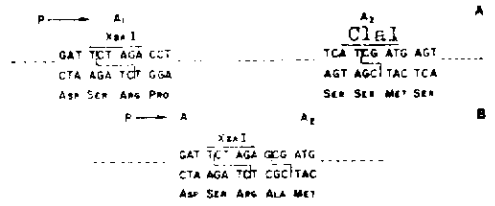


图4 A. 未变化前的CT操纵子中Xba I与Cla I位点附近DNA序列及相应氨基酸残基
B. 删除550bp的Xba I-Cla I片段后,用DNA多聚酶I把Cla I末端补齐,接入合成的Xba I接头后的序列 [34]

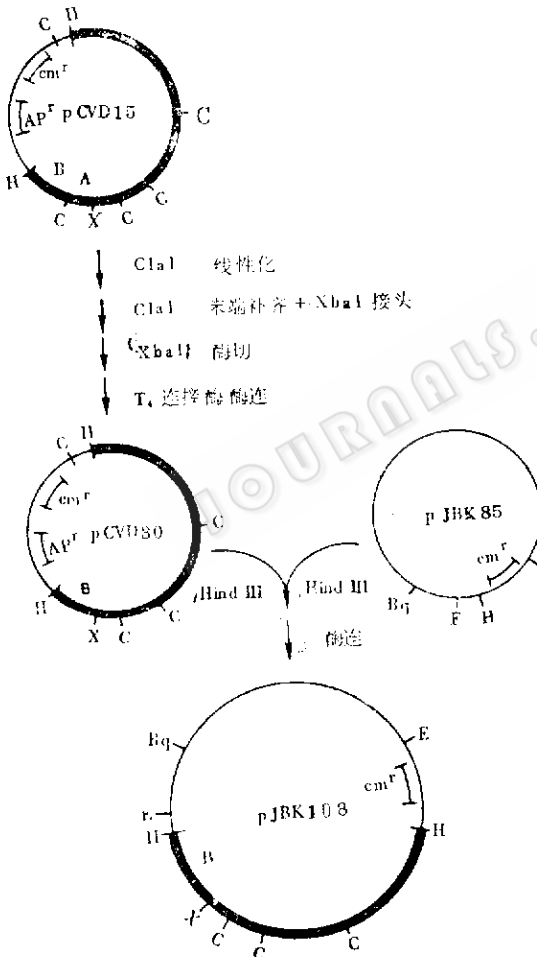


图3 编码有CT-A₁550个碱基对的Xba I-Cla I DNA片段的删除 [34]
粗线表示被克隆的*V. cholerae*染色体DNA, 细线表示载体DNA, X——Xba I, C——Cla I, E——EcoR I, Bg——Bgl I

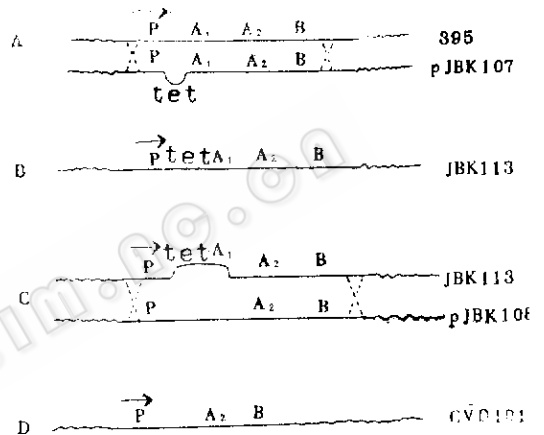


图5 把CT基因缺失引入*V. cholerae* 395染色体 [34]

列中94%是缺失的,所以,有活性的全毒素不会形成。这一结果不仅为CT-A₁和CT-B探针的杂交试验得到核实,而且通过Y-1肾上腺细胞试验的阴性结果和用于检测B亚基的GM₁-ELISA阳性结果得到验证。为了下一步的工作,他们又把含A₁缺失的Hind III片段克隆到属于Inc.P组的载体pJBK85中,而建成pJBK108(如图3)。

为了把在质粒pJBK108上带有CT-A₁缺失的CT基因引入到*V. cholerae*395染色体上, Kaper等又首先构建了一个插入变异的质粒pJBK107。他们把pCVD15上含有CT基因和其侧翼基因序列的Hind III片段克隆进入属于Inc.P组质粒pJBK85中,

且其中的 CT-A₁ 已通过插入一四环素抗性基因于 CT-A₁ 序列的XbaI 位点上而被灭活 (图5A)。

pJBK107通过接合质粒 pBR2013被推进 *V. cholerae*395, 并以很低的频率与染色体相应部位发生同源重组 (图5A), 导致位于质粒上的, 含有四环素抗性基因的CT序列与位于染色体上 CT 序列发生重组易位 (图5B)。这一重组易位事件通过引入属于 Inc.P 组的第二个质粒pR751 来确定。pR751不能与另一个也属于 Inc.P 组的质粒, 如 pJBK107 稳定地共存于同一细胞内。如果能筛选到一个四环素和三甲氧苄二氢嘧啶双抗性的细胞, 便表明决定三甲氧苄二氢嘧啶抗性的 pR751已稳定地在染色体外存在, 原属 pJBK107上的四环素抗性基因已被移位于染色体上 CT-

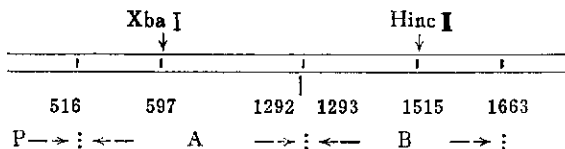
A₁ 的部位, 而 pJBK107 已失去。一个如此分离得到的变株被定名为 JBK113 (图 5 B)。

在 *V. cholerae* JBK113中的四环素抗性基因又提供了一个选择标记以确定随后发生的 CT-A₁ 序列缺失的重组事件。带有CT-A₁ 缺失的pJBK108被转入 *V. cholerae* JBK113, (此前pR751已自发地消除) 并与 JBK113 染色体上相应部位发生同源重组 (图 5 C), 而产生一新的变株, 定名为 CVD101。该变株的染色体上已失去 Xba I -Cla I 的 A₁ 片段和四环素抗性序列 (图 5 D)。该变株与 A₁ 探针无同源性, 表明其染色体上的两个CT-A₁ 拷贝已完全失去。而B亚基的DNA杂交结果指出 CT-B 两个基因拷贝均保留着。蛋白检测进一步证实这一结果。

表 1 CVD101与0395-NI构建的主要差异

菌株	CVD101	0395-NI
构建内容		
编码CT的质粒	pCVD15	pJM17
抗性基因克隆于CT基因上的位置、类别*		
CT-A ₁ 基因缺失部位 (Xba I接头连接部位)*		
CT-A ₁ 基因缺失部位的 Cla I 线性化→DNA多聚酶 I 补齐Cla I单链→Xba I 接头装配	加Xba I 人工接头→Xba I 酶切→酶连	Xba I 线性化→Bal31 外切酶处理→Xba I 人工接头→用Xba I 酶切→酶连
所用Inc.P质粒对及衍生质粒	pR751 (三甲氧苄二氢嘧啶抗性) ↓ pJBK85 { pJBK107 (四环素抗性) pJBK108 (含CT-A ₂ , CT-B)	pH I (庆大霉素抗性) ↓ pRK290 { pJM290.211 (卡那霉素抗性) pJM290.2 (含CT-A ₂ , CT-B)

* 所用编码CT的基因图取自Mekalanos [32], 其参考图如下:



霍乱弧菌减毒变株 395-NI与CVD101构建的主要差异

0395N1 (及0395-NT) 由Mekalanos 等人构建^[32]。其构建思路及所得变株的主要缺失等方面均与Kaper等人^[21, 34]的相似, 本文仅把两者构建过程中主要差异简略归纳于表 1。

基因工程技术应用于 伤寒-霍乱等多价菌苗的构建

Germanien 等所筛选的 Salmonella Typhi galE变株Ty21a 是安全、有效、减毒口服伤寒活菌苗^[37, 38]。该菌株决定

性的特征是缺乏 UDP-半乳糖-4-差向异构酶活力。由于该酶的缺失, 当外源有半乳糖供应时, 在免疫上起重要作用的平滑型细胞壁脂多糖被合成。同时, 半乳糖在胞内以半乳糖-1-磷酸及 UDP-半乳糖形式积累而又促成细胞溶菌^[39]。其主要特征综合于图6。实际上, 0.1%的半乳糖添加到处于对数生长期的Ty21a 培养液时将产生完全的细胞裂解^[38, 39](图7)。该特征表明口服后的Ty21a 在肠道内培养繁殖一两代左右后便因半乳糖的积累而自行裂解, 这就是 Ty21a 能产生足够量的免疫原、低毒性, 不滞留体内、不播散入环境的原因。

对Ty21a 的上述特征的兴趣, 主要是考虑到用 Ty21a可作为其它肠道菌的有效抗原受体菌。Formal 等通过接合转移已把编码有宋氏痢疾杆菌 I 型表面抗原的一

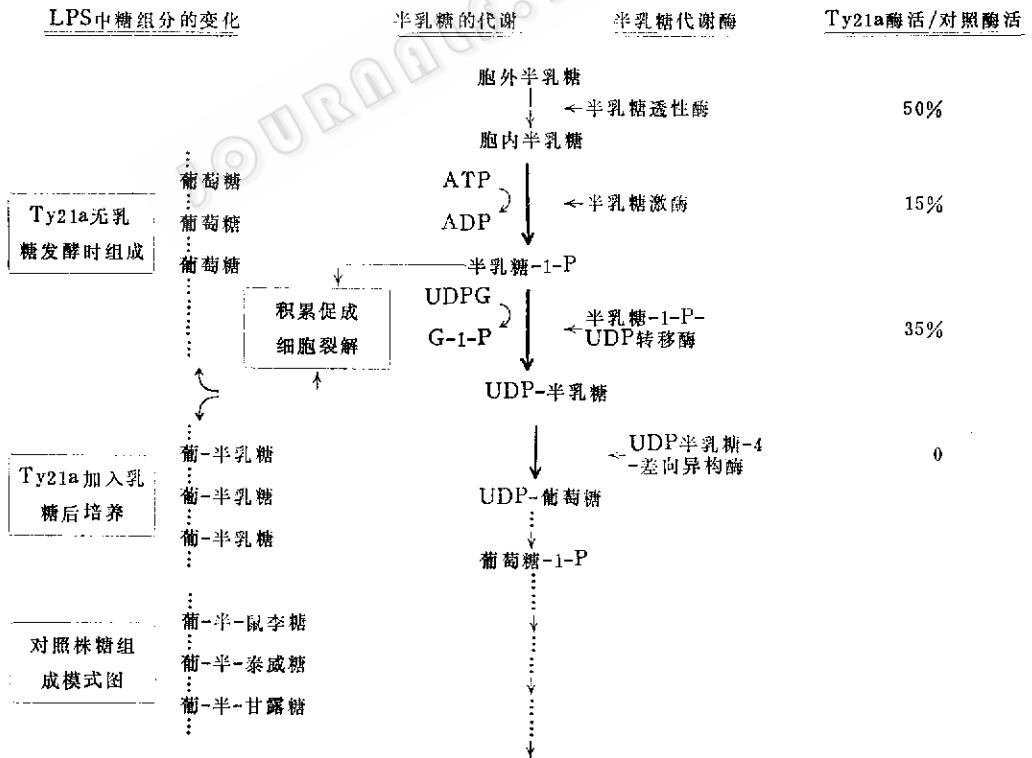


图 6 Ty21a中与半乳糖代谢及细胞裂解有关的生化变化简图 (文献 [38, 43]等)综合)

个大质粒引入Ty21a 组成一潜在的双价口服菌苗^[40]。在志愿者中的试验表明,该菌苗是安全的、有痢疾杆菌抗原性的^[41]。这工作对应用基因工程技术开发Ty21a 作为受体菌的研究有很大启发作用。又由于 *V. cholerae* 或 *E. coli* 仅在肠上皮粘膜表面感染^[42], 而 *Salmonella* 则能通过肠粘膜进入深层组织^[40], 因此应用Ty21a 作为载体菌, 将有可能把 CT 或其它抗原带入比粘膜表层更深的淋巴组织, 设想这可能增强其抗原性^[35, 40], 因而人们对以 Ty21a 为受体菌的多价基因工程菌苗颇寄希望。

1984年, Clements等^[35]应用基因工

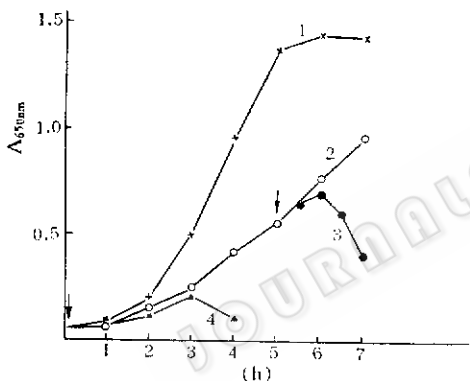


图 7 半乳糖对Ty21a生长的影响^[35]

1. 对照株Ty2
2. Ty21a培养时无半乳糖
3. Ty21a培养5h后加半乳糖
4. Ty21a 0时加入0.1%半乳糖

程技术把包含有*E. coli* LT-B 基因的重组质粒克隆到Ty21a中, 产生了SE12变株。其构建过程的第一步是把自人肠道分离得到的*E. coli* H10407菌中产LT-B的基因片段克隆于 pBR322, 得到重组质粒 pDF 87^[44, 45] 然后把该质粒上 LT-B DNA 片段再克隆于一个M₁₃衍生的克隆载体 pUC 8^[35] 的单个 Hind III 位点上, 并经转化进入 *E. coli* JM83, 得到产 LT-B 的阳性菌 JM83 (pJC217)。该阳性菌中的质粒 pJC217 上仅含有 2.7kb 的克隆载体 pUC 8

和 0.8kb 的 LT-B 片段二部分。且 pUC 8 上的 Lac 启动子有效地控制 LT-B DNA 的转录, 此外 pUC 8 上还编码有青霉素抗性基因。他们把 pJC217 经转化进入有链霉素抗性的 Ty21a 变株中, 并通过双抗性的筛选和 ELISA 试验, 而得到一变株 S. Typhi Ty21a, SE12。经一系列试验表明, 该变株仍具有 Ty21a 的特性而又含有 pJC217 质粒, 并能产生 LT-B。动物试验表明, 口服是安全的。非经肠道免疫能产生显著的抗毒抗体。基于在 CT 与 LT 两个不同的毒素操纵子中, A、B 两顺反子的同源性分别为 75% 与 77% 左右^[31, 32], 以及由此而产生的, 在 CT 与 LT 之间一系列的相似性^[22, 23]; 更基于 Klipstein 等人最近发现^[46] LT-B 的免疫应答不仅能提供对 LT 或 CT 的保护作用, 而且可能比应用 CT-B 免疫更有效, Clements 等人认为, SE12 可用作为抗伤寒, 霍乱及引起腹泻的大肠杆菌的双价菌苗。

对现有霍乱基因工程菌苗的评价

以上, 我们已论述了为什么要制备, 怎样制备, 又何以要这样或那样制备一个霍乱基因工程菌苗的问题。现在, 我们试图对现有霍乱基因工程菌苗做一评价。

现有基因工程活菌苗均用作口服, 除须有效外, 低毒、稳定、安全是必不可少的^[12]。Kaper^[21, 23, 33] Mekalanos^[32] 等对霍乱弧菌 0395 株进行毒素的结构基因改造产生了 0395 的衍生变株 CVD 101 和 395-NI。由于 0395 株在感染后能提供完全的免疫性保护作用^[3]。因此, 由它衍生出的 CVD101 与 395-NI 亦应有有效的保护作用^[47]。由于两者的 CT-A 基因几乎完全缺失, 因而也就无毒性回复的可能。

在这一点上,两菌苗也应当是安全的^[4]。但它们是否低毒仍是有疑问的。Finkelstein认为,除CT外,口服菌苗在小肠粘膜良好地吸附与克隆也将导致腹泻^[12]。若确实如此,那么,以吸附克隆增殖不受影响为前提的基因工程菌苗将难以保证无腹泻。最近,人们又发现一种在生化特征和免疫特征方面不同于CT,但能引起腹泻的新的肠毒素存在于霍乱弧菌中^[4,8],现有菌苗仅以改造CT结构基因为目标,而没有涉及对这一新的肠毒素基因的处置,因而也难以保证其低毒与安全。广而言之,霍乱弧菌中除各种肠毒素等引起腹泻外,是否尚有未被人们认识的其它致病因子,对此人们尚难断言。因而,仅以CT基因改造为出发点的基因工程菌苗似嫌不足。

而以Ty21a为受体菌的伤寒-霍乱双价菌苗却无此后顾之忧。当克隆基因的遗传背景清楚时,该菌苗的低毒,安全稳定性基本由Ty21a自身所决定^[37,38]。然而,由于CT或CT-B抗毒免疫在霍乱免疫中的地位仍未定^[10,14],因而像SE12那

样^[35],仅克隆LT-B基因片段是否能产生高效的抗霍乱的免疫保护作用也是值得怀疑的。

可见,现有两类霍乱基因工程菌苗各有利弊。尚待实践作最后的决定。上面讨论的两类菌苗所存在的问题不是基因工程技术引入而造成的,也不能仅靠基因工程技术本身去解决。进一步加强对霍乱弧菌免疫、致病机制的基础理论研究仍是迫在眉睫的重要问题。一旦确切知道了霍乱免疫的有效抗原,就能把这些抗原的编码基因克隆到Ty21a中去而制成对霍乱免疫有效的双价或多价菌苗。一旦无遗漏地知道了霍乱致病各种因子,就能通过Kaper、Mekalanog等人的方法,把它们逐一从霍乱弧菌染色体上删除掉,这样就能确保菌苗的低毒与安全。

基因工程技术正快速进入霍乱免疫研究的各个方面,最近人们正应用基因重组技术研究霍乱外膜抗原^[49]和溶血素^[50]等。这些工作也终将汇集到制备有效霍乱菌苗上来。霍乱菌苗制备研究的新局面正在形成。

参 考 文 献

- [1] Cash, R.A. et al., *J. Infect. Dis.*, 130:325, 1974.
- [2] Levine, M.M. et al., *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 73:3, 1979.
- [3] Levine, M.M. et al., *J. Infect. Dis.*, 143:818, 1981.
- [4] Attridge, S.R. and Rowley, D., *J. Infect. Dis.*, 147:864, 1983.
- [5] Sears, S.D. et al., *Infect. Immun.*, 44:439, 1984.
- [6] Kabir, S., *Infect. Immun.*, 39:452, 1983.
- [7] Holmgren, J., et al., *Infect. Immun.*, 39:147, 1983.
- [8] Finkelstein, R.A. et al., *Develop. Biol. Standard*, 53:89, 1982.
- [9] Finkelstein, R.A., *Crit. Rev. Microbiol.*, 2:553, 1973.
- [10] Mekalanos, J.J. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 79:151, 1982.
- [11] Svennerholm, A.M. and Sack, D.A., *Lancet*, 8267:305, 1982.
- [12] Levine, M.M., et al., *Develop. Biol. Standard*, 53:59, 1982.
- [13] Pierce, N.F. et al., *Infect. Immun.*, 40:1112, 1983.
- [14] Peterson, J.W., *Infect. Immun.*, 26:594, 1979.
- [15] Resnick, I.G. et al., *Infect. Immun.*, 30:375, 1980.
- [16] Levine, M.M. et al., *J. Infect. Dis.*, 145:296, 1982.
- [17] Mekalanos, J.J. et al., *J. Bacteriol.*, 139:859, 1979.
- [18] Honda, T. and Finkelstein, R.A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 76:2052, 1979.

- {19} Levine, M.M. et al., *Infect. Immun.*, 43:515, 1984.
- {20} Callahan, L.T. and Richarason, S.H., *Infect. Immun.*, 7:567, 1973.
- {21} Levine, M.M. et al., *Microbiol. Rev.*, 47:510, 1983.
- {22} Clements, J.D. et al., *Infect. Immun.*, 29:91, 1980.
- {23} Evans, D.J. et al., *Nature*, 236:137, 1972.
- {24} Smith, N.W. et al., *J. Infect. Dis.*, 127:164, 1973.
- {25} Moseley, S.L. and Falkow, S., *J. Bacteriol.*, 144:444, 1980.
- {26} Dallas, W.S. et al., *J. Bacteriol.*, 139:850, 1979.
- {27} Kaper, J.B. et al., *Lancet*, 8256:1162, 1981.
- {28} Kaper, J.B. et al., *Develop. Biol. Standard*, 53:81, 1982.
- {29} Broadbent, D.A. et al., *Develop. Biol. Standard*, 53:85, 1982.
- {30} Pearson, D.N. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 79:2976, 1982.
- {31} Lockman, H. and Kaper, J.B., *J. Biol. Chem.*, 258:13722, 1983.
- {32} Mekalanos, J.J. et al., *Nature*, 306:551, 1983.
- {33} Kaper, J.B. et al., *Nature*, 308:655, 1984.
- {34} Kaper, J.B. et al., *Biotechnology*, 2:345, 1984.
- {35} Clemmets, J.D. and Morsshidy, S.E., *Infect. Immun.*, 46:564, 1984.
- {36} Mekalanos, J.J., *Cell*, 35:253, 1983.
- {37} Wahden, M.H. et al., *J. Infect. Dis.*, 145:292, 1982.
- {38} Germanier, R. and FÜRER, E., *Develop. Biol. Standard*, 53:3, 1982.
- {39} Germanier, R. and FÜRER, E., *J. Infect. Dis.*, 131:553, 1975.
- {40} Formal, S.B. et al., *Infect. Immun.*, 134:746, 1981.
- {41} Tramont, E.C. et al., *J. Infect. Dis.*, 149:133, 1984.
- {42} Carpenter, C.C., *J. Infect. Dis.*, 126:551, 1972.
- {43} Nikaido, H., *Biochem. Biophys. Acta.*, 48:470, 1961.
- {44} Clements, J.D. et al., *Infect. Immun.*, 40:653, 1982.
- {45} Clements, J.D. et al., *Infect. Immun.*, 38:806, 1982.
- {46} Klipstein, F.A. et al., *Infect. Immun.*, 43:811, 1984.
- {47} Bialy, H., *Bio/technology*, 2:334, 1984.
- {48} Climpse ICDDR, *B Newsletter*, 5:1, 1983.
- {49} Manning, P.A. et al., The 20th joint conference US-Japan cooperative medical science program cholera panel p17, 1984.
- {50} Manning, P.A. et al., The 20th joint conference US-Japan cooperative medical science program cholera panel p29, 1984.