

## 预防仔猪腹泻无抗性基因工程菌株的构建

黄培堂 程 军 李丰生 徐 香  
张群伟 陈添弥 黄翠芬

(军事医学科学院生物工程研究所, 北京)

以原来含热不稳定肠毒素B亚单位基因质粒DNA为载体, 插入 lacZ基因, 构建了一个既能表达 LT-B 亚单位又能表达  $\beta$ -半乳糖苷酶的含四环素抗性基因的重组体。在该重组 DNA 的四环素抗性基因内再插入 K88 粘附因子抗原基因, 从而灭活了四环素抗性基因。经测定该重组体能表达 LT-B 和 K88 两种抗原; lacZ 基因取代四环素抗性基因, 成为良好筛选标记。所构建的重组质粒能稳定存在。

**关键词** 腹泻; 抗性基因; 基因表达

目前国内外发展了多种预防新生仔猪腹泻制剂, 但安全及效果均有待改进<sup>[1]</sup>。我们应用基因工程技术先后研制出 K88 和 LT-B 亚单位工程菌苗——单价的及双价的菌苗。现场试验表明双价工程菌苗株 MM-3 有较好的免疫预防效果, 可做为预防新生仔猪大肠杆菌腹泻的活菌苗株<sup>[2]</sup>。然而, 目前在遗传工程研究中所用的表达载体的筛选标记均为抗生素抗性基因, 从而导致后来所构建的菌苗株均含有一个以上的抗性基因。这也许在今后应用该类工程菌株后, 将给治疗带来一些问题。美国于 1976 年发表并于 1980 年再次修订的《DNA 重组实验规则》, 规定非病原微生物的生物公害应包括抗药基因问题<sup>[3]</sup>。但是目前尚未见无抗药基因工程菌苗株的报道。为了将我们先前构建的 MM-3 疫苗株抗性可能带来的危害减小至最低限度, 我们灭活了 MM-3 所携带的抗性基因, 同时引入一个非抗性筛选标记, 重新构建了无抗性基因菌苗株 MM-6。

### 材 料 和 方 法

#### (一) 菌株和质粒

实验中所用菌株及其主要特性列于表 1。其中 C600 (pPMC21)、C600 (pM-M031) 和 C600 (pMM085) 为本实验室构建。C600 (pPMC21) 表达热不稳定肠毒素 LT-B 亚单位, C600 (pMM031) 表达粘附因子 K88 抗原。C600 (pMM085) 表达 LT-B 和 K88 两种抗原<sup>[2]</sup>。实验中新引入的非抗生素抗性标记基因来源于质粒 pUC8<sup>[4]</sup>。

#### (二) 培养基及其他试剂

一般菌株培养均采用 LB 肉汤及 LB 琼脂平板。当将重组 DNA 引入受体后和某些鉴定转化子的实验采用我们自己改进的选择性培养基, 即含  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.6%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.3%,  $\text{NaCl}$  0.05%,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.1%,  $\text{MgSO}_4$  0.024%,  $\text{CaCl}_2$  0.01%, 乳糖 0.2%、脯氨酸 40  $\mu\text{l}/\text{ml}$  和中性红 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。DNA 操作中所用的限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶购自美国的 New England Biolabs 公司。

#### (三) DNA 的重组及转化

CsCl/EB 密度梯度离心纯化的 DNA 制

本文于 1988 年 11 月 24 日收到。  
广州军医所陈焕勇, 本院基础所赵强同志参加了部分工作, 特此致谢。

表 1 实验用的菌株及主要特性  
Table 1 Strain and phenotype

菌株Strain	表型Phenotype	来源Source
JM83	LacZ <sup>-</sup> , pro <sup>-</sup>	本实验室保存
JM109	LacZ <sup>-</sup> , pro <sup>-</sup>	本实验室保存
JM83(pUC8)	Ap <sup>r</sup> , LacZ <sup>+</sup>	本实验室保存
C600(pPMC21)	Tc <sup>r</sup> , LT-A <sup>-</sup> B <sup>+</sup>	本实验室构建
C600(pMM031)	Ap <sup>r</sup> , K88ac <sup>+</sup>	本实验室构建
C600(PMM085)	Cm <sup>r</sup> , LT-A <sup>-</sup> B <sup>+</sup> , K88ac <sup>+</sup>	本实验室构建
83549	wild strain, LT-A <sup>+</sup> B <sup>+</sup> ,	本实验室保存
JM83(pMM101)	Tc <sup>r</sup> , LT-A <sup>-</sup> B <sup>+</sup> , K88ac <sup>-</sup> , LacZ <sup>+</sup>	本研究
JM109(pMM103)	Ap <sup>s</sup> , Tc <sup>s</sup> , LT-A <sup>-</sup> B <sup>+</sup> , K88ac <sup>+</sup> , LacZ <sup>+</sup>	本研究

品经酶切后,用 DEAE NA-45 膜回收所需片段,以外源 DNA 和载体1:1的末端比例进行粘性或平末端连接,于14℃保温过夜。连接后按CaCl<sub>2</sub>法转化受体菌<sup>[6]</sup>。

#### (四) 抗原表达测定

用简单快速的玻片凝集试验检测转化子的K88抗原。待获得K88阳性转化子后再用LT-SPA协同凝集法测定LT-B表达情况。经筛选获得候选菌株后,分别用ELISA和被动溶血试验测定K88和LT-B两种抗原的表达水平。

## 结果和讨论

### (一) 含lacZ标记和elt-B基因重组体构建

先前构建的表达LT-B亚单位的重组质粒pPMC21除携带elt-B基因外,尚含有四环素抗性基因(Tc<sup>r</sup>)<sup>[7]</sup>。为了在灭活Tc抗性基因后有合适的筛选重组体的标记,同时也为了能在以后使用该菌株时便于追踪,第一步我们先将一个表达β-半乳糖苷酶的lacZ基因插入到pPMC21质粒中。将pPMC21质粒DNA用限制性核酸内切酶消化成具有粘性末端的线性DNA,然后用大肠杆菌聚合酶I的大片段酶在四种核苷酸存在时补平粘性末端。用HaeII消化携带有lacZ基因的pUC8质粒DNA,用电泳回收约800bp的lacZ基因片段,同样也用

大肠杆菌聚合酶I大片段酶将该800bp的片段两端补平。将上述两个片段(载体及外源DNA)混合后,用T4DNA连接酶进行平末端连接。然后转化lacZ<sup>-</sup>的受体菌JM83,并在含有乳糖、四环素及中性红的上述改造的选择培养基平板上筛选含有lacZ基因的重组体。在600多个红色菌落中,挑选了20个转化子,用被动溶血试验测定了LT-B抗原,结果全部阳性。

用碱变性快速方法分离和鉴定了质粒DNA,结果表明它们的电泳迁移率全部比pPMC21为慢(见图版I-A)。因为来自pUC8的lacZ基因上和pPMC21质粒的Tc<sup>r</sup>基因上均含有一个BamHI切点,我们对所获得的重组DNA又作了BamHI的酶切分析。结果表明(图版I-B)我们所得到的重组DNA由于lacZ的插入方向不同而有两种,分别定名为pMM101和pMM102。pMM101 DNA构建情况如图1所示。

### (二) 无抗生素抗性基因重组质粒pMM103的构建

上述构建的pMM101和pMM102均表达LT-B毒素亚单位,并且因为lacZ有它本身的启动子,所以pMM101和pMM102也均含有lacZ筛选标记并表达β-半乳糖苷酶活性。但是它们仍携带有Tc<sup>r</sup>抗性基因。同时因为从我们原先构建的MM-3菌株情况看,可以将K88和LT-B亚单位两种抗原基因组到一个重组质粒中且能表

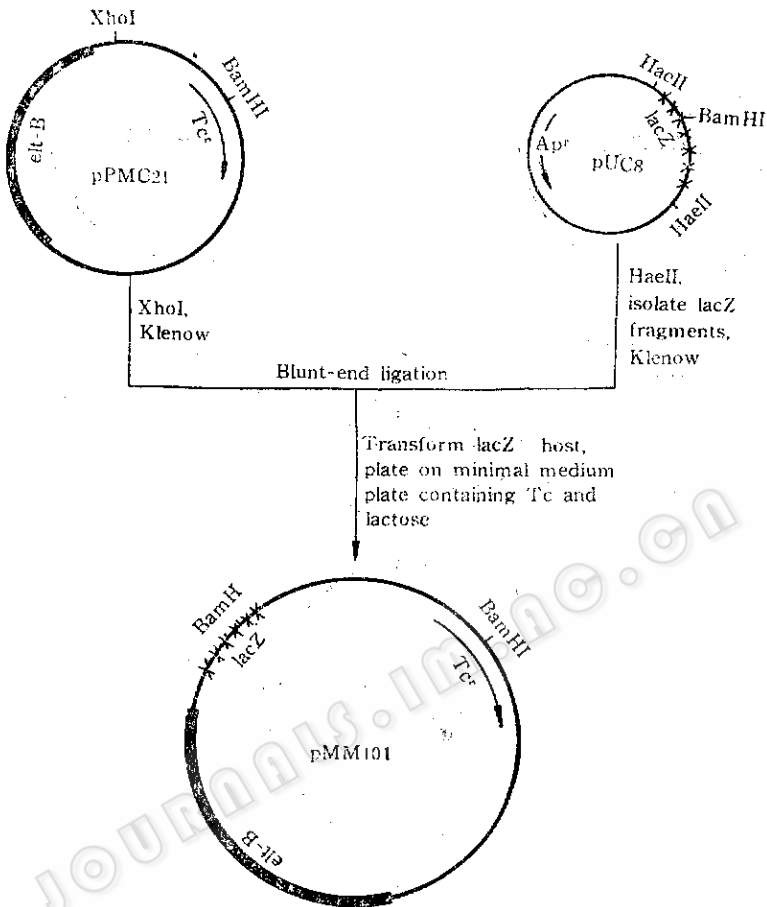


图 1 含lacZ标记和elt-B基因重组DNA pMM101的构建

Fig.1 Construction of pMM101 carrying lacZ and elt-B genes

达两种保护性抗原。所以我们为了灭活  $Tc^r$  抗生素抗性基因,也同时为了插入 K88 抗原基因,我们又构建了 pMM103 重组质粒。将 pMM101 用 BamHI 酶部分消化,然后电泳回收单一 BamHI 切口的大片段 DNA。为了提高连接重组效率,将回收的大片段 DNA 用牛肠碱性磷酸单脂酶处理,使其两端脱去  $5'-P$ ,不能自身连接环化。同时用 BamHI 消化携带 K88 基因的质粒 pMM031,电泳回收 11.5kb 左右的 K88 基因片段。将回收的两种 DNA 片段连接后,同时转化  $lacZ^-$  的受体菌 JM109,然

后在不含任何抗生素的选择培养基平板上筛选重组体。对在含基本培养基的选择平板上生长的红色菌落进行 K88 抗血清玻片凝集检测,获得了 K88 阳性的转化子。对其中一株, JM109(pMM103),作了进一步的分析。

用抗 LT-SPA 所作的协同凝集实验结果表明, JM109 (pMM103) 也能表达 LT-B 肠毒素亚单位。

将 JM109 (pMM103) 所含的重组质粒纯化,然后用 BamHI 消化,酶切分析结果表明该质粒同时含有 K88 基因片段和

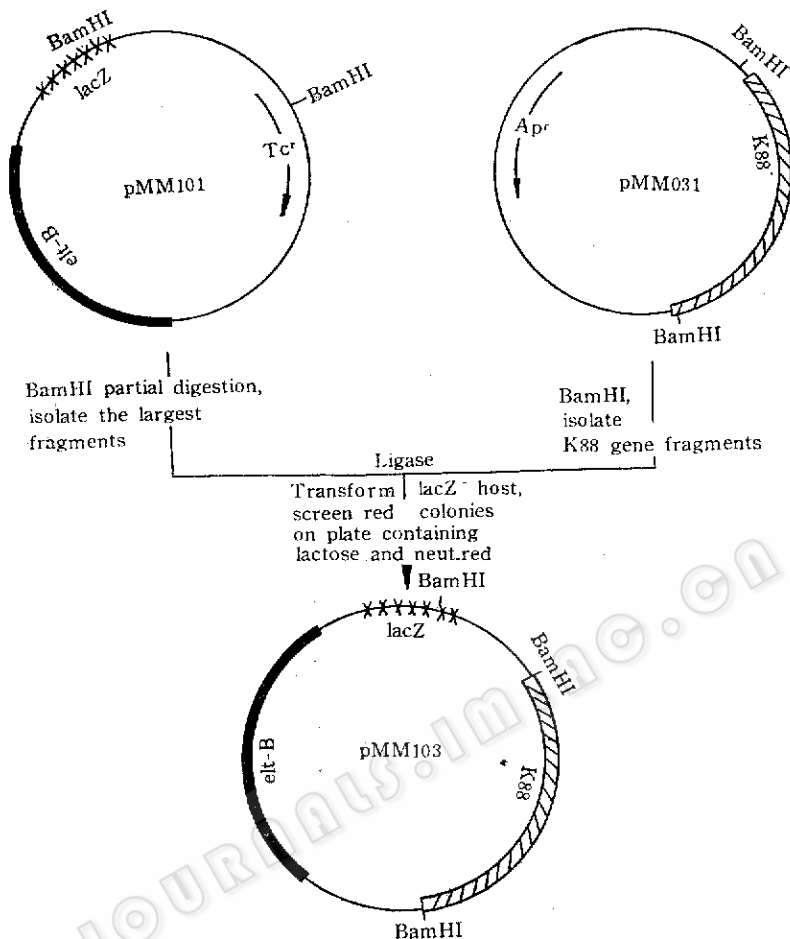


图 2 无抗性基因重组质粒 pMM103 的构建

Fig.2 Construction of pMM103 without antibiotic resistant gene

pMM101 的 DNA 片段 (图版 I -B)。该株定名为 MM-6。pMM103 重组 DNA 的构建示意图如图 2 所示。

### (三) MM-6 的抗生素抗性实验

如上所述, K88 基因插入 pMM101 的  $Tc^r$  基因的 BamHI 位点, 灭活了  $Tc$  抗性基因。为了证实这一点, 我们将 MM-6 按 1% 浓度接种于含不同浓度的四环素 (Tc) 或氨苄青霉素 (Ap) 的 LB 液体培养基中, 于 37°C 振荡培养 24h; 或者将 MM-6 的过夜培养物以约 1000 个菌/平皿的量分别接种于同样含不同浓度的 Tc 或 Ap 的 LB

琼脂平板上, 于 37°C 培养 48h。结果表明, 在实验的四环素浓度为 5—10  $\mu\text{g/ml}$ 、氨苄青霉素浓度 5—60  $\mu\text{g/ml}$  的范围内, MM-6 菌株均是敏感的 (表 2)。因为 MM-6 的亲代菌株 C600 (pPMC21) 含四环素抗性基因, C600 (pMM031) 和 JM83 (pUC8) 含有氨苄青霉素抗性基因, 故上述结果表明 MM-6 不含有任何抗生素抗性基因。

### (四) MM-6 株的肠毒素生物毒性试验

热不稳定肠毒素 LT 由 A 和 B 两种亚单位组成, 其中 B 亚单位不具有生物毒性而

有免疫原性; 而A亚单位能刺激兔肠液分泌, 也能使Y-1细胞产生病变。pPMC21质粒构建时已灭活了A亚单位基因, 仅表达B亚单位, 实验表明该菌株不使Y-1细胞产生病变。为了进一步证明加入lacZ基因和K88基因后仍不产生生物毒性反应, 我们分别用Y-1细胞和兔肠结扎进行了检测<sup>[8]</sup>。将培养的单层Y-1细胞分别按菌种上清液或菌体裂解液, 然后继续培养24h观察结果。另外将培养的MM-6菌液1ml接种于结扎兔肠段, 24h后解剖观察及测量肠段液体分泌情况。两种方法均表明MM-6既不能使Y-1细胞产生病变, 也不能引起兔肠积液产生, 表明MM-6不具有肠毒素生物毒性反应。图版I-C为肠结扎试验结果。

表 2 MM-6株抗生素抗性实验

Table 2 Assay of antibiotic resistance level of MM-6 strain

菌株 Strain	Tc concn. ( $\mu\text{g/ml}$ )					Ap concn. ( $\mu\text{g/ml}$ )				
	5	10	20	30	40	5	10	20	40	60
JM109 (pMM103) (MM-6)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C600(pPMC21)	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
JM83(pUC8)	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
C600(pMM031)	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+

"+" : Resistant; "-" : Sensitive

### (五) 两种抗原表达水平

从构建情况可以看出, MM-6除了含有K88和elt-B两种保护性抗原基因外, 尚插入一个作为筛选标记的lacZ基因。三个基因均含有各自的启动子, 各自进行独立的转录和转译。为了试验插入lacZ基因后, 对K88和elt-B两者表达有无影响, 或它们之间有无抑制表达情况发生, 我们采用ELISA和免疫被动溶血试验(PIH)分别测定K88和LT-B表达水平, 并且与其亲代株C600(pPMC21)和C600(PMM031), 以及C600(pMM085)(MM-3)作

了比较。从表3的结果可以看出, MM-6株的两种抗原表达水平不低于其亲代株及MM-3。说明了插入lacZ基因后对K88和elt-B两种基因的表达没有影响。

### (六) MM-6株质粒稳定性试验

MM-6株所携带的质粒pMM103不含有任何抗生素抗性基因。在没有抗生素等的选择压力条件下, 在菌株传代保存及大量生产的过程中, 质粒能否稳定存在是关键问题。按照Nasri等方法<sup>[9]</sup>我们实验了MM-6在不含抗生素的LB培养基及选择培养基中质粒稳定性。将MM-6以1%接种浓度接种于不含抗生素的LB液体培养基中, 于37°C振荡培养16h, 然后以同样方法再传至第5代。每传代一次后将菌液稀释, 涂布于不含抗生素的LB琼脂平板, 检测100个左右的单菌落的质粒存在情况。也按照同样方法平行传代MM-3菌株。当MM-6在选择培养基中传代时, MM-3在含抗生素的LB培养基中传代。结果表明, 在无抗生素的LB液体培养基中连续传5代后, MM-6质粒丢失为3—9%, MM-3质粒丢失为5—10%; 在选择性培养基传代MM-6和在抗生素培养基中传代MM-3时, 质粒丢失情况基本一致, 均为0—2%。这说明, 在没有抗生素选择压力的条件下, MM-6和MM-3质粒丢失的情况没有明显差别, MM-6基本是稳定的。同时也可以看出, 用我们改进的选择培养基保存及传代MM-6菌株是可行的。

### (七) MM-6的免疫效果

从抗原测定结果可以看出, MM-6能表达K88和LT-B两种抗原。我们用培养的MM-6菌液免疫了家兔。基础免疫肌肉注射10亿活菌, 此后间隔两周口服免疫加强两次, 每次50亿活菌。口服免疫前两个小时, 肌肉注射西咪替丁50mg, 以抑制家兔胃酸分泌。最后一次免疫后10天, 解剖

家兔,取肠段结扎用野生强毒菌株 C83549 攻击,攻毒剂量分别为0.1亿,1亿、10亿和25亿。24h 后取出肠段,测量肠段长度(L)和肠液体积(V)。结果表明,没有免疫的对照组V/L值是免疫组V/L值的1.5—2.0倍,可以看出有较好的保护效果。

MM-3和MM-6同样能表达两种抗原,且后者表达水平不低于前者。从MM-3现场使用的免疫效果看,免疫后对仔猪黄痢有很好的保护效果。我们在昌平两个猪场曾对MM-6株作了小量仔猪保护效果观察。从表4的结果可以看出,MM-6和MM-3比较同样具有较好的保护效果。

家兔的免疫攻毒效果表明,MM-6能

刺激机体产生较好的免疫应答,且不具有肠毒素生物毒性反应。其现场免疫效果观察结果将另文发表。

目前国内外尚未见去抗生素抗性基因工程菌株构建的报道。从我们的实验结果看,MM-6可作为预防仔猪腹泻的候选菌株。

表 3 三个菌株的抗原水平比较  
TABLE 3 Antigen level of three vaccine strains

菌株 Strain	质粒 Plasmid	K88		LT
		ELISA	Antigen unit	PIH
MM-1	pPMC5 and large plasmid	0.30	NT	16
MM-3	pMM085	0.40	64—72	16
MM-6	pMM103	0.60	128	16

表 4 MM-6株的免疫效果  
TABLE 4 Immunization effectiveness in field test

组别 Groups	窝数 Number of litters	仔猪数 Number of piglets	腹泻 Diarrhea		死亡 Death	
			Number	(%)	Number	(%)
MM-3	3437	33060	4226	12.78	416	1.26
Control	1839	17689	11207	63.36	2440	13.79
MM-6	135	1233	101	8.19	47	3.81
Control	16	108	51	47.22	46	42.59

## 参 考 文 献

- [1] Evine, M.M. et al., *Microbiol. Rev.*, 47:510, 1983.
- [2] 李丰生等: 生物工程学报, 3:102, 1987.
- [3] 刘 遑: 遗传工程理论与方法, 黄翠芬主编, 科学出版社, p.160—167, 1987.
- [4] Messing, J. and Vieira, J., *Gene*, 19:269, 1982.
- [5] Ish-Horowitz, D. and Burke, J.F., *Nucleic Acids Res.* 9:2989, 1981.
- [6] Maniatis, T. et al., *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, p.250—251, 1982.
- [7] Chen, T.M. et al., *Infect. Immun.*, 47:5, 1985.
- [8] Gyles, C.L. and Barnum, D.A., *J. Infect. Dis.*, 120:419, 1969.
- [9] Nasri, M. et al., *J. Biotechnology*, 6:147, 1987.

## CONSTRUCTION OF A NONE-ANTIBIOTIC RESISTANT ETEC VACCINE CANDIDATE STRAIN EXPRESSING K88ac AND LT-B ANTIGENS

Huang Peitang Cheng Jun Li Fengsheng Xu Xiang Zhang Qiuwei  
Chen Tianmi Huang Cuifen

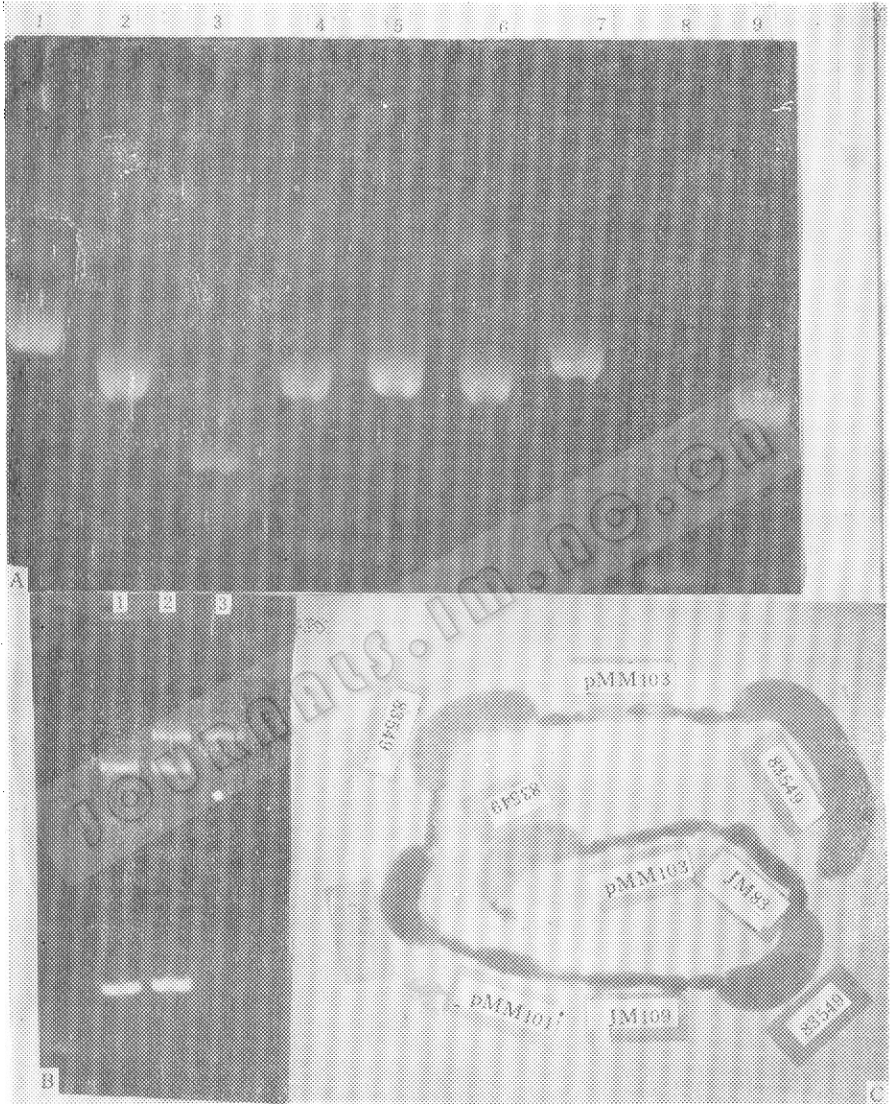
*(Molecular Genetics Center, Institute of Biotechnology, Academy of Military  
Medical Sciences, Beijing)*

By inserting the *lacZ* gene into a plasmid pPMC21 containing ETEC LT-B gene a recombinant plasmid pMM101 was obtained, which could express  $\beta$ -galactosidase and LT-B antigen. But pMM101 has still Tc resistant gene. K88ac gene was then inserted into BamHI site of Tc resistant gene region in pMM101. The final recombinant plasmid, pMM103, has not carried any antibiotic resistance gene but can stably express both LT-B and K88ac antigens, and also the  $\beta$ -galactosidase as a tracking marker. The strain carrying plasmid pMM103 (MM-6) was used to immune the animal. The results have indicated that MM-6 can effectively protect the animal from the attack of the ETEC bacteria, and can be used as candidate of live vaccine strain.

### Key words

Diarrhea; antibiotic resistant gene; gene expression

Huang Peitang et al.: Construction of a none-antibiotic resistant ETEC vaccine candidate strain expressing K88ac and LT-B antigens



A. 部分重组子的琼脂糖凝胶电泳

Electrophoresis of recombinant DNA on 0.7% agarose gel

1. pMM085 3. pPMC21 8. pUC8 2, 4-7, 9. recombinant DNA

B. 重组质粒pMM103的BamH I酶切分析

Analysis of restriction enzyme of pMM103 with BamH I

1. pMM101, BamH I; 2. pMM103, BamH I; 3. K88-BamH I fragments

C. MM-6株肠毒素肠结扎实验

Test of rabbit ileal loops