

表达大肠杆菌LT-B抗原的减毒鼠伤寒沙门氏菌株的构建

杨晓 陈添弥 张蓓宁* 黄翠芬

(军事医学科学院生物工程研究所, 北京)

采用无毒的鼠伤寒沙门氏菌 SR-11 Δ Cya, Δ Crp, Δ asd 菌株作为宿主菌, 选择相应的 asd⁺ 表达载体构建了含大肠杆菌肠毒素B亚基基因 (tox_B) 的重组质粒, 并通过两次转化引入宿主菌, 构成了平衡致死的重组体。特异性的测定表明, 这种无抗药性的杂合菌株能较高水平地表达LT-B抗原, 可望成为预防 ETEC 腹泻和相应的沙门氏菌病双价口服活疫苗的研究基础。

关键词 毒素源性大肠杆菌; 热敏肠毒素B亚基; 鼠伤寒沙门氏菌; 重组

毒素源性大肠杆菌(ETEC)是发展中国家引起婴幼儿急性腹泻的主要病原菌, 也是成人急性腹泻和旅游者腹泻的重要病因。人源 ETEC的两种主要致病因子是定居因子和肠毒素, 它产生的肠毒素包括热稳定肠毒素(ST)和热敏肠毒素(LT), ST在自然状态是无免疫原性的。许多实验证明LT-B亚基无毒且具免疫原性, 是ETEC重要的保护性抗原, 而且所有人源 ETEC产生的LT在免疫学上是同一的。

近年来, 许多研究结果显示, 到用沙门氏菌遗传变异株作为ETEC抗原的载体研制ETEC疫苗有良好的前景^[1]。Roy Curtiss III等报道, 缺失腺苷酸环化酶基因(Δ cya)和环腺苷酸受体蛋白基因(Δ cya)的鼠伤寒沙门氏菌没有毒性, 通过口服途径能引起高水平的保护性免疫反应^[2]。我们用鼠伤寒沙门氏菌 Δ cya, Δ crp菌株中的天冬氨酸 β -半醛脱氢酶缺陷菌株(Δ asd)作为宿主, 选择相应的 asd⁺ 表达载体构建了含LT-B基因(tox_B)的重组质粒, 通过两次转化引入宿主菌, 转化的鼠伤寒沙门氏菌能较高水平地表达LT-B抗

原、

材料和方法

(一) 菌株和质粒

实验中所用菌株及其主要特征详见表1。

(二) 培养基及其它试剂

X3730、X4072在添加了二氨基庚二酸(DAP, Sigma, 50 μ g/ml)的培养基中培养, 其余菌株均采用LB培养基, 用作表达研究的转化子在产毒培养基^[5]中培养。DNA操作中所用限制酶和T4 DNA连接酶均购自美国New England Biolab公司。GM₁-ELTSA测定中所用抗CT血清由本室刘传喧惠赠。

(三) 重组质粒的构建和转化

CsCl/EtBr密度梯度离心纯化的DNA经酶切后, 采用低熔点胶法^[4]回收所需片

本文于1990年12月13日收到。

* 南京军区总医院

李淑琴、徐永强、刘传喧、芮贤良等同志对本工作提供帮助, 在此一并致谢。

表 1 实验用的菌株及主要特征
Table 1 Strains and relevant phenotypes

菌株或质粒 Strain (plasmid)	相关表型 Relevant phenotype	来源 Source
<i>Escherichia coli</i>		
JM83(pCH23)	Ap ^r , LT ⁻ B ⁺	This Institute
C600(pPMC4)	Ap ^r , Cm ^r , LT ⁻ A ⁻ B ⁺	This Institute
H10407	wild strain, LT ⁻ A ⁺ B ⁺	NICBPB
X6097(pYA248)	asd ⁺	Dr. Roy Curtiss ^{†31}
<i>Salmonella typhimurium</i>		
X3730	galE ⁻ , hsd ⁻ , asd ⁻	Dr. Roy Curtiss
X4072	cya ⁻ , crp ⁻ , asd ⁻	Dr. Roy Curtiss
Hybrid strain		
X4072(pMG207)	cya ⁻ , crp ⁻ , asd ⁺ , LT ⁻ B ⁺	This Institute

段, 将载体和目的基因片段混和进行连接, 16°C保温过夜。连接后的混和物用CaCl₂法^[41]转化受体菌X3730, 转化子在不加DAP的LB琼脂平板上筛选。然后, 从X3730中重新分离重组质粒, 用来转化Δcya, Δcrp宿主菌X4072, 转化子在不加DAP的LB琼脂平板上筛选。

(四) 重组质粒的酶切分析和 Southern-blot

随机引物法^[6]标记探针DNA进行菌落原位杂交, 挑取阳性菌落快速抽提其质粒, 并用于酶切分析。重组质粒酶切后, 1%琼脂糖凝胶电泳, 用真空转印装置(LKB, 2016 VACUGENE)将DNA片段全部转印到0.45μm的硝酸纤维素滤膜上, 转印后的膜80°C烤干, 用³²P标记的LT-B基因探针进行杂交反应, 然后在-30°C进行放射自显影。

(五) SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和 Western-blot

细菌在产毒培养基中振荡过夜, 离心收集菌体, 用热的样品裂解液悬浮并迅速煮沸5min, 置于-20°C保存。聚丙烯酰胺分离胶浓度为16%, 电流稳定在12mA, 电泳后用考马斯亮蓝R250染色。未染色的聚丙烯酰胺电泳凝胶在蛋白转移装置上进行电转移, 将蛋白条带转印吸附于0.45

μm硝酸纤维素滤膜上, 然后进行免疫杂交分析。抗LT血清和辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG分别作为第一抗体和第二抗体。

(六) GM₁-ELISA

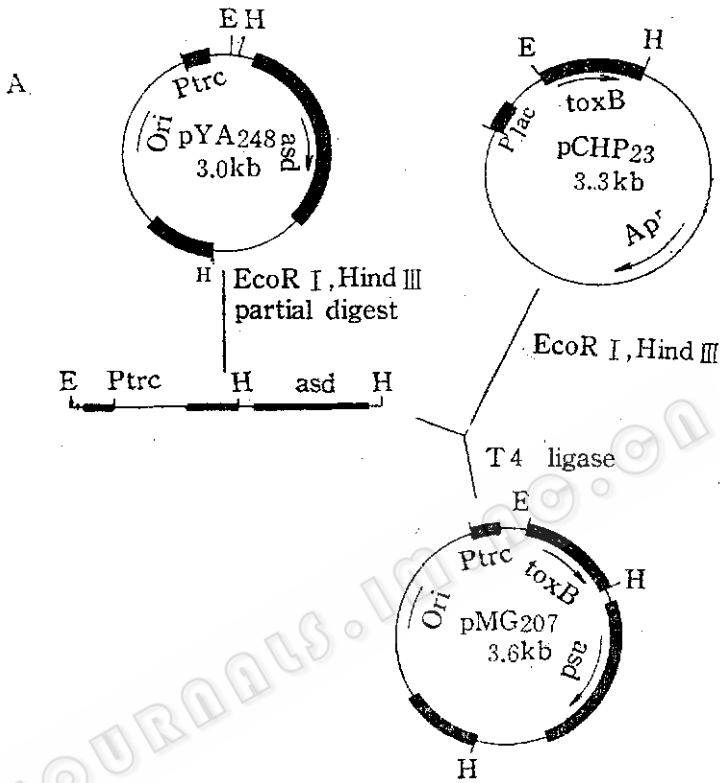
细菌在液体产毒培养基中37°C培养40h, 离心收集菌体, 生理盐水调OD_{600nm}至1.0, 用多粘菌素B(250μg/ml)37°C作用1h, 13000rpm离心5min, 取上清液参考文献[7]方法进行测试。

结 果

(一) 重组质粒的构建和酶切分析

重组质粒构建示意图见图1。我们控制Hind III的酶量, 用EcoR I对Hind III对质粒pYA248进行部分酶解, 回收最大的E-H片段作为载体。用同样的酶完全酶解pCHP23, 回收0.6kb的tox B片段, 将它与载体混和后, 用T4连接酶进行连接, 然后转化X3730, 转化子在不加DAP的LB琼脂平板上生长。

用碱变性快速法分离和鉴定了重组质粒DNA(见图版I-A), EcoR I、Hind III双酶切分析证实, 重组质粒含有0.6kb的外源基因片段。图版I-B是重组质粒双酶切后进行Southern-blot的实验结



JOURNALS.IM.AC.CN

B ATTCTGAAATGAGCTG ⁻³⁵ TTGACA ATTAATCATCCGGCTCG ^{-10.} TATAAT GTGT
 GGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAC ^{SD} AGGA AACAGACCATGCCGGAATTC ^{EcoR I}
 RBS
 GGAATGAATT ATG AAT AAA GTA AAA TGT TAT GTT TTA TTT
 toxB Met Asn Lys Val Lys Cys Tyr Val Leu Phe

图1 重组质粒pMG207的构建和DNA序列分析
 Fig.1 Construction and DNA sequence of recombinant plasmid pMG207

果,与LT-B基因探针杂交后,重组质粒和出发质粒pCHP23在0.6kb的条带位置均显示阳性,这进一步确证重组质粒pMG207含有0.6kb的tox B片段。

(二) 杂合菌株的构建

从X3730分离重组质粒,用CaCl₂法转化鼠伤寒沙门氏菌 ΔcyA Δcrp Δasd菌株X4072,转化子在不含DAP的LB琼脂平板上生长。用碱变性法快速分离和鉴定转化子中的质粒DNA,结果与图版I-A所示相同。

(三) LT-B 基因在杂合菌株中的表达

图版I-D, E显示的是杂合菌株X4072(pMG207)的SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和Western-blot分析结果,图中霍乱毒素B亚单位CT-B纯品(List Biological Laboratories, INC)的分子量为11200Da, H10407为ETEC国际标准野生株。从SDS-PAGE图中可以看出, X4072(pMG207)的蛋白电泳条带比X4072(pYA248)多出一条,位置如箭头所示,此条带即为重组菌株表达的LT-B抗原。Western-blot的结果显示在相应位置的蛋白条带能与抗LT血清结合。H10407没有相应的阳性带,也许是ETEC野生株表达太低的缘故,这也表明H10407 SDS-PAGE结果中相应位置的条带是非特异性蛋白。*E. coli*LT-B抗原报道的分子量为11500Da,杂合菌株表达的LT-B电泳也在相应的位置。这些结果证实重组的鼠伤寒沙门氏菌表达*E. coli*热敏肠毒素B亚基,而且表达水平较*E. coli*野生株为高。

(四) 杂合菌株表达的LT-B活性

LT-B活性用特异的GM₁-ELISA方法检测,实验结果见图版I-C, A₁、A₂是空白对照。表2所示为实验数据, X4072(pYA248)和X4072(pMG207)的

OD值分别为实测数据的算术平均值。表3所示为不同稀释度的细菌裂解液用GM₁-ELISA测得的LT-B活性。这些结果表明含有tox B重组质粒的杂合菌株能高水平地表达LT-B抗原,表达的LT-B能特异性地与GM₁受体和抗血清结合。

表2 GM₁-ELISA检测的LT-B活性
Table 2 LT-B activity was detected by GM-1 ELISA

	OD _{490nm}	P/N
control		
X4072(pYA248)	0.04	—
H10407	1.03	25.8
C600(pPMC4)	1.62	40.5
hybrid strain		
X4072(pMG207)	1.96	49.0

表3 细胞裂解液不同稀释度用GM₁-ELISA检测的LT-B活性
Table 3 LT-B activity of different dilution of splitted cell was detected by GM₁-ELISA

Strains	OD _{490nm}				
X4072(pYA248)	0.07	—	—	—	—
H10407	0.84	0.35	0.13	—	—
X4072(pMG207)	1.16	1.03	0.64	0.26	0.19
Dilution	1:1	1:4	1:16	1:64	1:256

讨 论

我们通过两次转化成功地将重组质粒引入了鼠伤寒沙门氏菌宿主。X3730是鼠伤寒沙门氏菌LT-2的galE突变型菌株,它的限制性作用缺失却具有修饰作用,用通常质粒转化的方法就能进行转化。而且由于它的修饰作用,质粒可获得鼠伤寒沙门氏菌的甲基化模式,所以我们从X3730中分离的重组质粒DNA,可通过转化引入宿主菌X4072而不受到限制。

我们构建的杂合菌株X4072(pMG207)同时表达鼠伤寒沙门氏菌抗原和LT-B抗原,可望成为预防ETEC腹泻和相应的沙门氏菌病双价工程活疫苗的研究基础。初步的动物实验已证实重组菌株具有

良好的安全性和免疫原性, 而且它的遗传 稳定性也有实验证明, 我们将另文报道。

参 考 文 献

- [1] Kaper, J.B. and Levine, M. M.: *Vaccine*, 6:197, 1988.
- [2] Curtiss, R. and Kelly, S. M.: *Infect., Immun.*, 55:3035, 1987.
- [3] Nakayama, K. et al.: *Bio/technol.*, 6:693, 1988.
- [4] Sambrook, J. et al.: *Molecular cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- [5] Honda, T. et al.: *J. Clin. Microbiol.*, 13:1, 1981.
- [6] 关雪妮等: 军事医学科学院院刊, 66:151, 1990.
- [7] 刘传喧等: 中华微生物和免疫学杂志, 9:62, 1989.
- [8] Yamamoto, T. et al.: *J. Bacteriol.*, 155:728, 1983.

Construction of Avirulent *Salmonella typhimurium* Strain Expression *Escherichia coli* LT-B Antigen

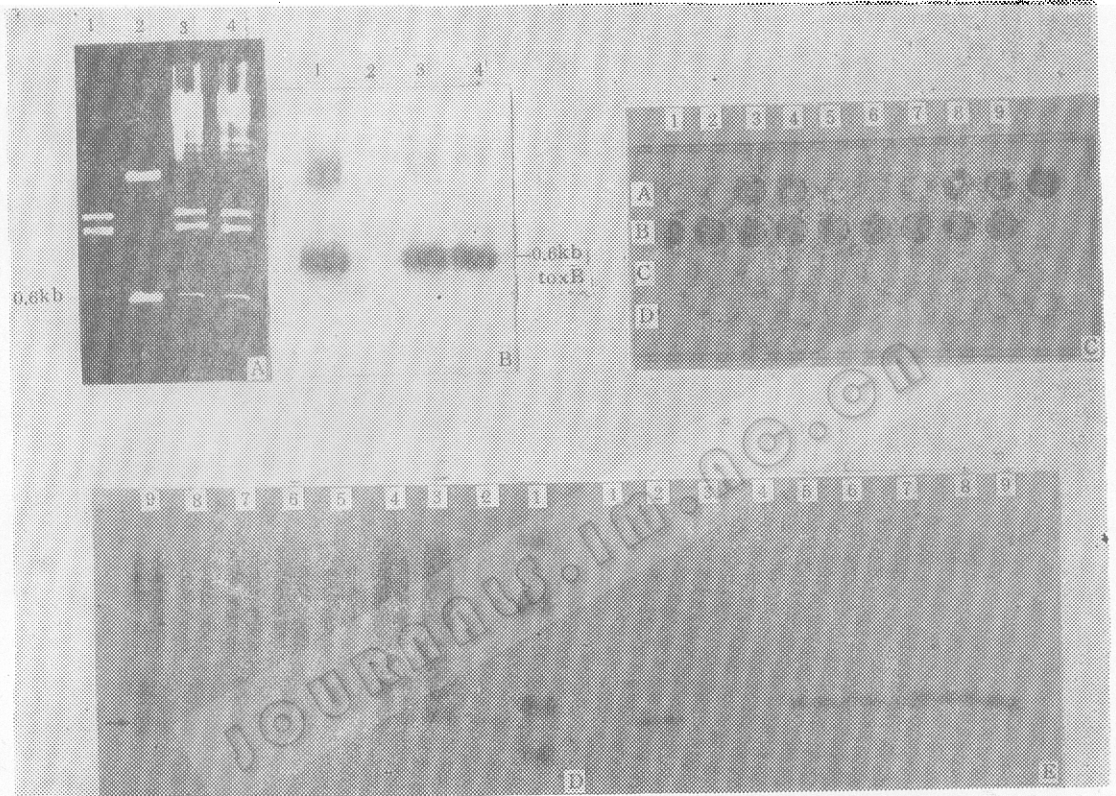
Yang Xiao Chen Tienmi Zhang Beining Huang Cuifen
(Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing)

A avirulent Δ cytA Δ crp Δ asd strain of *Salmonella typhimurium* SR-11 was used as host. The recombinant plasmid containing heat-labile enterotoxin B subunit gene and *asd*⁺ gene was constructed, and was introduced into the host by twice transformation. The hybrid strain is a balanced lethal recombinant. Detections by special methods showed that the hybrid strain having no drug resistance gene could express LT-B antigen at high level. The hybrid strain is worth considering as a foundation for studying on bivalent live oral vaccine strain against ETEC diarrhoea and relative *Salmonella* disease.

Key word

ETEC; Heat-labile enterotoxin B subunit; *S. typhimurium* recombination

Yang Xiao et al.: Construction of avirulent *Salmonella typhimurium* strain expression *Escherichia coli* LT-B antigen



A. 重组质粒DNA的限制酶EcoRI和HindIII酶切图谱

Restriction endonuclease analysis of recombinant plasmid DNAs with EcoRI and HindIII

1. pYA248; 2. pCHP23; 3 and 4. pMG207

B. 酶切后的质粒DNA进行Southern blot的放射自显影结果

Autoradiograph of Southern blot of restriction endonuclease digested plasmid DNAs

1. pCHP23(toxB); 2. pYA248; 3 and 4. pMG207(toxB)

C. GM₁-ELISA检测杂合菌株的LT-B活性

LT-B activity of the hybrid strains was detected by GM₁-ELISA A_{1,2}. Negative

Control; A₃. H10407; A₄. C600(pPMC4); A₅₋₇. X4072(pYA248); A_{8,9}. X4072(pMG207)

D and E. 考马斯亮蓝染色的SDS-PAGE电泳结果(D)和Western blot结果(E)

Coomassie blue-stained SDS-PAGE profiles(D) and Western blot(E) of whole cell proteins

1. MW standard(66000, 29000, 12000, 6500)

2. CT-B; 3. H10407; 4. X4072(pYA248); 5-9. X4072(pMG207)