



痢疾福氏2a菌抗原基因的体内克隆及在鼠伤寒沙门氏菌中的表达

戴秀玉 王敖全

(中国科学院微生物研究所, 北京)

牟兆钦

(军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京)

痢疾在我国仍是发病率很高的流行病, 其主要病原菌是志贺氏痢疾菌。构建安全有效的口服活疫苗是预防和控制痢疾及其它肠道传染病的重要途径。有关这方面工作已有些报道^[1-3]。

Mu噬菌体为转座子。它可插入到寄主染色体的许多位点, 当两个拷贝的Mu以相同方向插入某一目的基因两侧时, 可使该目的基因发生转

座^[4]。利用Mu的这一特性, 我们将福氏2a菌O抗原基因克隆到F质粒上, 进而转移到作为抗原载体菌的鼠伤寒沙门氏菌。

材料和方法

(一) 材料

1. 细菌菌株和质粒: 见表1。

表1 细菌菌株

菌株	基因型和表型	来源
<i>S. typhimurium</i>		
G30	galE表达04, 05抗原	军事医科院微生物流行病学研究所免疫室
G30-1	his pro Str ^r	本工作
G30-2	his pro Str ^r /pXD43	本工作
<i>E. coli</i>		
CSH26	F ⁻ ara Δ (lac pro) thi	J.H. Miller
CSH26-1	F ⁻ ara Δ (lac pro) thi his	本工作
CSH26-2	F ⁻ ara Δ (lac pro) thi his/pXD43	本工作
CSH26-3	F ⁻ ara Δ (lac pro) thi his Nal ^r	本工作
CSH26-4	F ⁻ ara Δ (lac pro) thi his Nal ^r /pXD43	本工作
WR2051	F' lac ⁺ , ::Mucts	L.S. Baron
<i>S. flexneri</i> 2a		
24570	nad asp表达3, 4群和II型抗原	军事医科院微生物流行病学研究所免疫室
24570-1	nad asp Str ^r	本工作
24570-2	nad asp Str ^r /F' lac ⁺ , ::Mucts	本工作

2. 培养基和氨基酸、维生素、抗生素浓度

(1) 培养基: LB培养基^[5]用于细菌培养和保存。M63培养基^[6]用于营养缺陷型的检出和转移接合子的选择。Mac Conkey培养基(补加0.5%乳糖)用于检测F' lac⁺质粒的消除。

(2) 氨基酸浓度: 组氨酸、脯氨酸为40μg/ml, 天冬氨酸为1000μg/ml。

(3) 维生素浓度: 尼克酸为1000μg/ml,

(4) 抗生素浓度: 链霉素 100μg/ml, 萘啶酮酸40μg/ml。

(二) 方法

1. 亚硝基胍诱变: 按Silhavy的方法^[6]。

2. 接合转移: 将供体菌和受体菌在LB液, 37℃或30℃(带有Mucts的菌)振荡培养至对数

本文于1991年4月19日收到。

期,取2ml供体培养物与2ml受体培养物于无菌空试管内混合,37℃或30℃静止培养6h左右,离心,生理盐水洗一次,适当稀释后涂布M63基础培养基平板选择转移接合子。

3. Mucts 噬菌体裂解液的制备:见文献[7]。

4. Mucts噬菌体的转座:按Fealen等人描述的方法[8]。

5. 血清学检测:抗福氏2a菌3、4群I型血清和抗鼠伤寒沙门氏菌04、05血清由卫生部生物制品检定所和兰州生物制品研究所提供。按常规玻片凝集试验检测各抗原的表达。

6. 质粒消除:按Miller的方法[5]。

7. 大质粒DNA的分离和琼脂糖凝胶电泳:大质粒DNA的分离按改良的Casse法[9]。电泳用0.7%凝胶浓度,TBE缓冲液,120V电泳3h,EB染色后紫外灯下观察。

结果和讨论

(一) 福氏2a菌O抗原基因的体内克隆

福氏2a菌的O抗原是由a抗原,也称3、4群抗原和I型抗原组成。遗传学和免疫学研究证明这两种抗原分别由位于染色体44min的组氨酸(his)附近的基因和6min的脯氨酸(pro)附近的基因所编码[10]。为了将这两个基因片段在一次实验中克隆到同一载体(F'质粒),我们采用Mu噬菌体夹着目的基因转座的方法。噬菌体不能直接感染痢疾杆菌,为克服这一障碍,通过F因子将Mucts从大肠杆菌转移到痢疾杆菌。在补加乳糖和链霉素的基础培养基平板上选择转移接合子。痢疾杆菌无乳糖基因不能利用乳糖为碳源生长,而供体菌为链霉素敏感,因此,只有获得了F' lac⁺::Mucts的痢疾杆菌才能在选择平板上生长。取10个上述得到的转移结合子进行纯化后制备Mu噬菌体裂解物,并以对Mu噬菌体敏感的大肠杆菌(CSH26)为指示菌检测,结果表明每个裂解物均含有Mu噬菌体,证明这些转移结合子为Mu溶源化的痢疾杆菌。将一株Mucts溶源化的痢疾杆菌24570/F' lac⁺::Mucts为供体与组氨酸和脯氨酸双重营养缺陷的大肠杆菌CSH26-1为受体进行杂交来检测O抗原基因片段的体内克隆。由于转座过程发生在复制之后,适当提高温

度,能够诱导Mu的复制以提高转座频率,促使Mu转座到目的基因两侧。在杂交实验中供体和受体细胞混合之前,先将对数期的供体细胞(~10⁸细胞/ml)于37℃进行部分诱导,然后与等体积的受体细胞混合,于37℃培养过夜,同时分别作供体和受体对照。离心洗涤细胞后分别取样涂布于M63基础培养基。在上述条件下,获得His⁺Pro⁺转移接合子的频率约为10⁻⁷/供体细胞。随机挑取12个转移接合子纯化并作血清学检测。通过与特异的F2a 3、4抗血清、I型抗血清的玻片凝集试验表明所测定的12株His⁺Pro⁺转移接合子均能表达这两种抗原。说明这两个抗原基因通过Mu噬菌体从痢疾杆菌24570菌株的染色体转座到F' lac⁺质粒,并随F'质粒转移到大肠杆菌。所构建的带有F2a菌O抗原基因的F' lac⁺质粒被命名为pXD43。

(二) 克隆基因在鼠伤寒沙门氏菌G30中的表达

选择一株CSH26-2为给体与组氨酸和脯氨酸双重缺陷的G30作杂交,在含有链霉素的M63培养基上选择His⁺Pro⁺,纯化后测定血清凝集反应。结果表明所测定的G30-2转移接合子均能表达来自F2a菌的3、4群、I型抗原。为证明所克隆片段位于pXD43质粒上,进行了如下实验。

1. 质粒pXD43的再转移:将G30-2与另一大肠杆菌突变株CSH26-3作杂交,在含萘啶酮酸的M63基础培养基上选择His⁺Pro⁺NaI^r的转移接合子,然后测定血清凝集反应。结果表明这些转移接合子都能够表达3、4群、I型抗原,证明抗原基因位于pXD43质粒上。

2. 质粒pXD43的消除:将G30-2和CSH26-4培养在含吡啶橙(100μg/ml)的LB液(pH7.6)中,37℃振荡培养过夜,经适当稀释后涂布在含乳糖的MacConkey平板上,选择白色菌落(Lac⁻),测定它们的血清凝集反应。从表2可见G30-2和CSH26-4的pXD43质粒消除后,3、4群、I型抗血清凝集反应为阴性,进一步证明抗原基因位于pXD43质粒上。从表2结果还可看出在引入F2a 24570菌株抗原基因的G30-2中,3、4群和I型抗原均能表达,但04、05抗原却没有表达。

表2 质粒pXD43的消除及其抗原基因在*E.coli*和
*S.typhimurium*中的表达

未经吡啶橙 处理菌株	经吡啶橙 处理菌株	乳糖发酵	抗血清		
			3,4	I	04 05
G30-2		+	+	+	- -
	G30-2-1	-	-	-	+ +
	G30-2-2	-	-	-	+ +
	G30-2-3	-	-	-	+ +
	G30-2-4	-	-	-	+ +
	G30-2-5	-	-	-	+ +
CSH26-4		+	+	+	- -
	CSH26-4-1	-	-	-	- -
	CSH26-4-2	-	-	-	- -
	CSH26-4-3	-	-	-	- -
	CSH26-4-4	-	-	-	- -
	CSH26-4-5	-	-	-	- -

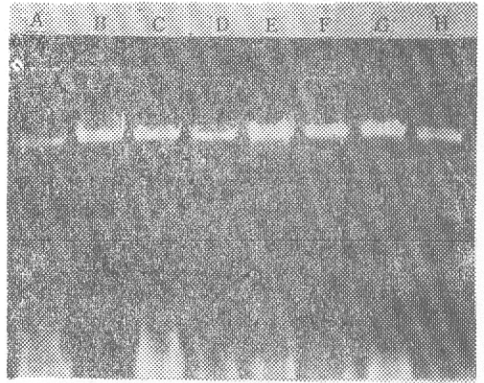


图1 质粒pXD43的琼脂糖凝胶电泳

A.*S.sonnei* 48025-11的I相大质粒(180kb);
B.*S.flexneri* 2a 24570的大质粒(220kb);
C.CSH26-2; D-G.G30-2; H.G30-1

而消除了pXD43质粒的G30-2, 3、4群和I型抗原不表达时, 04、05抗原则恢复表达。原因是由于外来抗原基因和载体菌自身抗原基因的表达存在着某种竞争机制^[3]。

3. 质粒pXD43的电泳分析: 提取G30-2的质粒DNA, 进行琼脂糖凝胶电泳分析。照片1

显示G30-2除含已知G30菌株90kb的质粒^[11]带外, 还含有一条明显大于90kb的质粒带, 其分子量比已知的志贺氏F2a菌的大质粒(220kb)和宋内氏工相大质粒(180kb)要小(确切的分子量未定, 但与CSH26-2的质粒带吻合, 同样证明G30-2所表达的抗原基因确由pXD43质粒所携带

参 考 文 献

- [1] Germanier, R., et al.; *J.Infect.Dis.*, 131:53-58, 1975.
- [2] Formal, S.B., et al.; *Infect.Immun.*, 34:746-750, 1981.
- [3] Baron, L.S., et al.; *Infect.Immun.*, 55:2797-2801, 1987.
- [4] van Gijsegem, F., et al.; In N.Symond^o, et al (eds), Phage Mu pp.215-250. CSHL, CSH, N. Y., 1987.
- [5] Miller, J.H.; *Experiments in Molecular Genetics* CSHL, CSH, N.Y., 1972.
- [6] Silhavy, T.J., et al.; (eds) *Experiments with gene fusions* CSHL, CSH, N.Y., 1984.
- [7] Bukhari, A.I., et al.; (eds) *DNA Insertion Elements, Plasmids and Episomes* CSHL, CSH, N.Y., pp.749-756, 1977.
- [8] Fealen, M., et al.; *J.Mol.Biol.*, 104:525-539, 1976.
- [9] Casse, F., et al.; *J.Gen.Microbiol.*, 113:229-242, 1979.
- [10] Formal, S.B., et al.; *Infect.Immun.*, 1:279-287, 1976.
- [11] Ou, J.T., et al.; *Microbial Pathogenesis*, 8:101-107, 1990.

Cloning of *Shigella flexneri* 2a Group and Type Antigen Gene *in vivo* and Expressing in *Salmonella typhimurium* Vaccine Strain G30

Dai Xiuyu Wang Aoquan

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

Mu Zhaoqin

(Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing)

A recombinant plasmid pXD43 with genes specifying the *S. flexneri* group and type antigens located near the pro (6min) and his (44min) chromosomal markers, respectively, was *in vivo* constructed and transferred to the gale *S. typhimurium* strain G30. Plasmid re-transferring, curing and DNA electrophoresis analyses confirmed that the *S. flexneri* antigen genes were carried on plasmid pXD43.

Key words

Shigella flexneri 2a O antigen genes; *Salmonella typhimurium* vaccine strain; Mu phage transposition; F plasmid transfer