

霍乱 CT-B 和 LPS-O 双价抗原工程菌苗株的构建

于秀琴 马清钧

(军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100850)

摘要 作者将霍乱弧菌 O 抗原及毒素 B 亚单位基因片段, 经 DNA 体外重组技术, 得到了能表达双价抗原的工程菌株 1046 (pMG305)。经 GM1-ELISA 分析表明该菌株能够表达特异的霍乱 CT-B 抗原, 且能分泌到胞外, 通过菌体凝集, 全细胞 O 抗原酶联分析和血凝抑制试验表明在 1046 (pMG305) 菌体表面表达了霍乱的 O 抗原, 它的脂多糖 O 抗原通过 SDS-PAGE 电泳分析, 显示它表达了霍乱 LPS 的特征区带。小鼠腹腔免疫后用霍乱弧菌毒株攻击表明, 有良好的保护作用, 因此 1046 (pMG305) 可望成为霍乱活疫苗的候选株。

关键词 毒素 B 亚单位, 霍乱弧菌, 脂多糖 O 抗原

霍乱是危害严重的传染病。霍乱保护性抗原主要为菌体抗原和毒素 B 亚单位抗原, 菌体抗原较为复杂, 其中脂多糖是主要的菌体保护性抗原^[1-3]。霍乱弧菌肠毒素 (CT) 由 A、B 两个亚单位组成, A 亚单位是毒素的毒性部分, B 亚单位能与细胞受体 GM1 结合, 是毒素的免疫原, 它产生的抗体能很好地中和毒素^[4-6], 构建有效的霍乱疫苗, 应包含两种保护性抗原, 已证明两者抗原免疫将产生相加的作用。我们已成功地分别获得了表达的霍乱弧菌 O 抗原^[7]和毒素 B 亚单位基因克隆^[8-9], 它们能产生很好的抗原性和免疫原性。本文报道应用基因重组技术将霍乱的脂多糖 O 抗原、毒素 B 亚单位基因重组在一个载体质粒上, 获得了表达双价抗原的工程菌株。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株: 霍乱弧菌 569B (经典型、稻叶血清型): 由卫生部药品生物制品所提供。大肠杆菌 1046: 为本实验室保存菌株。大肠杆菌 HB101 (pMG301) 为本实验室构建的工程菌株。大肠杆菌 MM2 (pMM-CTB): 为本实验室构建的工程菌株。大肠杆菌 HB101 (BS. M13⁻): 为本实验室保存菌株。

1.1.2 抗血清: 霍乱弧菌 O 多价抗血清: 购于卫生部药品生物制品鉴定所。辣根过氧化物酶标羊抗兔 IgG 抗体: 购于本院五所。

1.1.3 实验动物: 上海小白鼠 16—20g, 本院动物中心提供。

1.1.4 工具酶: 限制酶、连接酶购于华美生物工程公司。

1.1.5 培养基: LB 培养基每升含蛋白胨 10g, 酵母粉 5g, 氯化钠 10g, pH7.4。

1.2 方 法

本文于 1993 年 8 月 24 日收到。

1.2.1 质粒 DNA 的抽提、酶切、连接、转化：均按文献〔10〕进行。

1.2.2 B 亚单位检测：应用 GM1-ELISA 方法〔11〕。

1.2.3 热酚-水法提取脂多糖：按文献〔12〕进行。

1.2.4 脂多糖 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳及银染：(A) SDS-PAGE：采用 15% 分离胶与 5% 浓缩胶，凝胶配制参看文献〔13〕进行。各取 15 μ l 脂多糖 (1 μ g/ μ l) 与等体积的脂多糖样品处理液混合，100 $^{\circ}$ C 水浴 5 分钟后上样电泳，20—30mA 恒流电泳 6—8 小时。(B) 银染：将电泳完毕的凝胶取下，浸泡在固定液中，室温过夜，置氧化液中 5 分钟，用蒸馏水漂洗 30 分钟，置银胺溶液 10 分钟后，再用蒸馏水漂洗，最后用甲醛显色液显色，当能看到 LPS 电泳区带后立即用蒸馏水漂洗，终止显色反应。

1.2.5 菌体试管凝集试验：将 1046 (pMG305)、阴性对照 1046、阳性对照 569B 培养物、灭活后制成 15 \times 10⁸/ml 菌悬液。将 O 多价血清用生理盐水从 1:80 开始倍比稀释，每管留 0.25ml，然后加入已制备好的菌悬液 0.25ml，摇匀，放 45 $^{\circ}$ C 水浴过夜，观察结果，以凝集颗粒“+”为最终效价。

1.2.6 菌体全细胞酶联试验：按文献〔7〕进行。

1.2.7 血凝抑制试验：按文献〔14, 15〕进行。

2 结 果

2.1 菌苗株的构建

为构建含有双价抗原的基因克隆，将含有毒素 B 亚单位基因的重组质粒 MM2 (pMM-CTB) 及载体质粒 B. S 分别用 EcoR I、Sal I 酶切，(图 1) 经电泳分离回收 CT-B 亚单位基因 2.4kb 的片段，及载体质粒 2.9kb 片段，用 T4 DNA 连接酶将两者连接，获得含有 CT-B 亚单位的重组质粒。然后用 Sac I 限制酶对该重组质粒进行酶切，并将含有霍乱弧菌脂多糖 O 抗原的重组质粒 HB101 (pMG301) 同样用 Sac I 酶切，电泳分离回收 8.5kb 之 LPS-O 抗原基因的片段，再以 T4 DNA 连接酶将 LPS-O 抗原基因的片段与重组质粒片段连接，转化至大肠杆菌 1046 获得转化子 116 个。

2.2 重组质粒的鉴定

2.2.1 探针杂交鉴定：探针以霍乱毒素 CT 片段基因，经 α -³²P 同位素标记后，将转化子点种于硝酸纤维素滤膜进行菌落原位杂交，结果显示 13 个转化子为杂交阳性斑点。

2.2.2 酶切鉴定：随机挑出一个杂交阳性转化子进行培养，抽提质粒 DNA 经 Sac I 酶切分析 (图 2)，重组质粒酶切后被切成两个片段，其中一个片段为含有 O 抗原的基因片段 (8.5kb)，另一片段为 B 亚单位与载体质粒的质粒片段 (5.3kb)，结果显示与原设计完全一致，表明重组质粒的构建是正确的。将该重组质粒命名为 1046 (pMG305)。

2.2.3 表达抗原鉴定：以抗霍乱 O 抗原血清，对转化的重组质粒克隆株进行玻片凝集试验，结果表明克隆株与阳性对照的 569B 菌株相同，显示阳性凝集，而阴性受体菌则不产生凝集反应。从以上鉴定表明获得了霍乱 LPS-O 及 CT-B 双抗原的基因克隆株为大肠杆菌 1046 (pMG305)。

2.2.4 应用 GM1-ELISA 法对 CT-B 亚单位分析：将重组克隆株 1046 (pMG305)、大肠杆菌 1046、霍乱弧菌 569B 分别接种于 LB 肉汤，于 37 $^{\circ}$ C 振荡培养，离心取上清进行 CT-

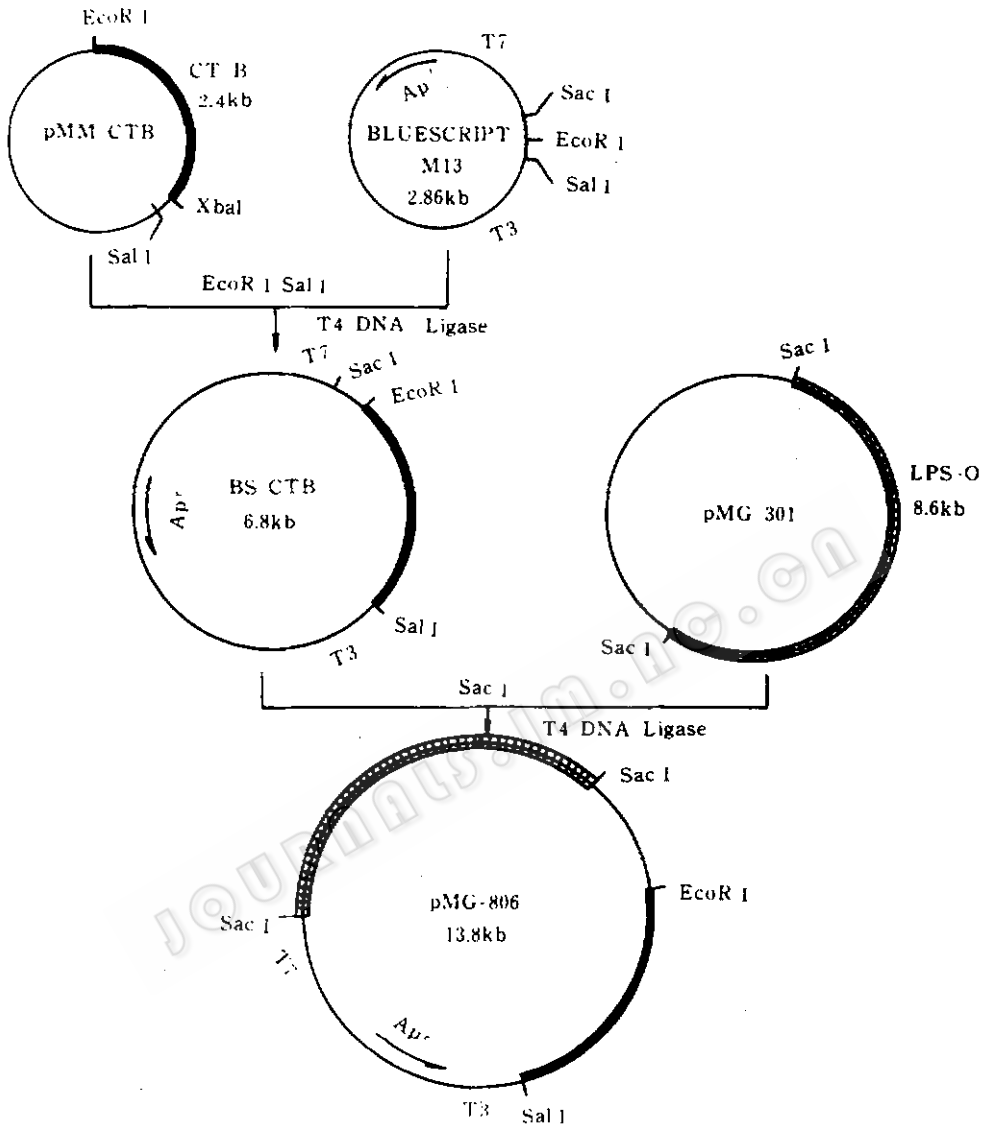


图 1 LPS-O 及 CT-B 双价抗原基因克隆的结构

Fig. 1 Construction of clone of LPS-O and CT-B bivalent antigen

B 酶联分析, 结果显示 (表 1) 受体菌 1046 培养上清和胞内均无 CT-B 表达, 而 1046 (pMG305) 上清和胞内酶联值 (P/N) 分别为 85—90% 和 10—15%, 与阳性对照相比, 均能产生较好的表达, 并且主要分泌到细胞外。

表 1 1046 (pMG305) 产生 CT-B 的酶联分析
Table 1 ELISA test of CT-B produced by *E. coli* 1046 (pMG305)

	ELISA (100×P/N)
1046 supernatant	<1.0
1046 cell extract	<1.0
1046 (pMG305) supernatant	12.3
1046 (pMG305) cell extract	<2.0

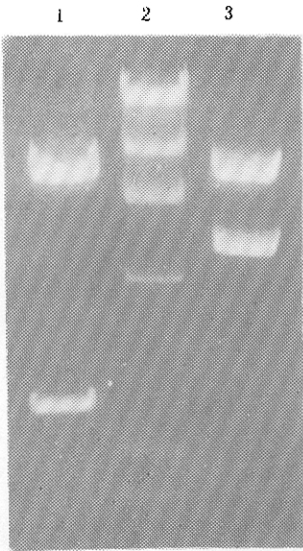


图2 pMG305重组质粒酶切分析

Fig. 2 Restriction analysis of recombinant plasmid pMG305
 1. pMG301+Sac I
 2. λDNA+Hind III
 3. pMG305+Sac I

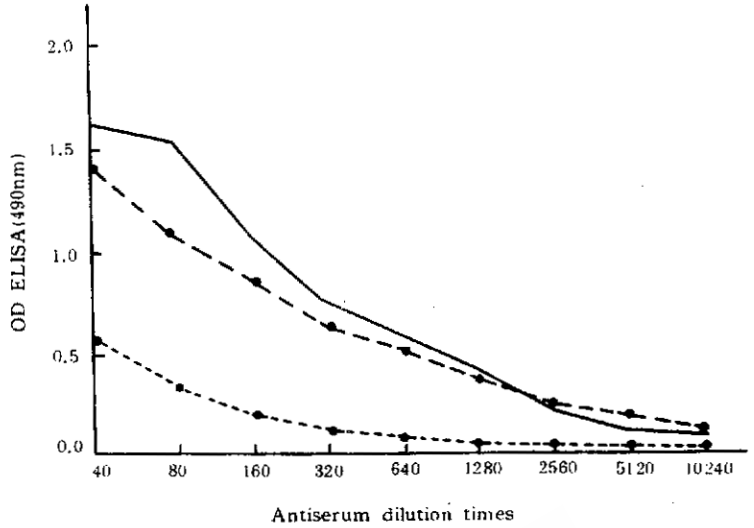


图3 菌体酶联分析

Fig. 3 Whole cell ELISA

— *E. coli* 1046 (pMG305). --- *V. cholerae* 569B *E. coli* 1046

2.3 霍乱弧菌脂多糖O抗原在1046(pMG305)中的表达

2.3.1 菌体酶联分析: 为了确定1046(pMG305)菌株LPS-O抗原基因能否表达, 用菌体酶联的方法对其表达进行检测, 结果可见(图3)569B与1046(pMG305)的菌体能与霍乱O多价血清产生阳性凝集反应, 能随着血清稀释倍数的增加, 酶联OD值随着下降, 呈典型的抗原抗体反应曲线, 而阴性对照1046因不能与O多价血清产生凝集反应, OD值一直处于低值, 并没有随着血清浓度的变化而变, 表明1046(pMG305)确能表达霍乱O抗原。

2.3.2 O抗原血清凝集抑制试验: 应用霍乱弧菌569B的LPS致敏血球, 以1:200倍的O多价血清对霍乱弧菌569B、大肠杆菌1046(pMG305)进行凝集抑制试验, 结果显示(图4)大肠杆菌1046(pMG305)及霍乱弧菌569B能产生抑制霍乱弧菌O血清与569B LPS的凝集反应, 使血球沉积于管底, 而1046无抑制效应, 呈现致敏血球与抗体间凝集反应, 表明了大肠杆菌1046(pMG305)确能表达霍乱LPS-O抗原。

2.3.3 菌体凝集试验: 将经甲醛灭活的569B、1046(pMG305)、1046洗涤后分别制备成菌悬液, 与等体积的倍比稀释的霍乱O血清混合, 45℃水浴后观察结果(表2), 可见569B与1046(pMG305)均产生明显的凝集菌团沉积管底, 凝集滴度均为1:640, 阴性对照则不出现凝集, 表明1046(pMG305)能表达霍乱O抗原, 表达水平已达到亲本霍乱弧菌569B的水平。

表2 霍乱O抗原的菌体凝集试验

Table 2 Cell agglutination test for *V. cholerae* O antigen

	Serum dilution times						
	160	320	640	1280	2560	5120	control*
569B	+	+	+	-	-	-	-
1046 (pMG305)	++	+	+	+	-	-	-
1046	-	-	-	-	-	-	-

* Saline

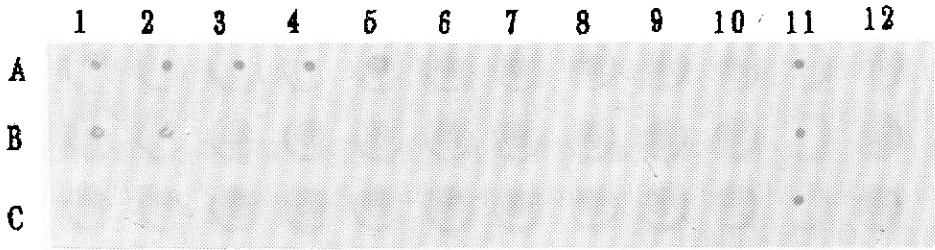


图 4 菌体血球凝集抑制实验

Fig. 4 Hemagglutination inhibition test of whole cell

- A. 1—10 *V. cholerae* 569 B cell was diluted equally from 2×10^8 cells/ml
 B. 1—10; *E. coli* 1046 (pMG305) cell was diluted equally from 1000×10^8 cells/ml
 C. 1—10; *E. coli* 1046 cell was diluted equally from 1000×10^8 cells/ml
 11. Positive control, 12. Negative control.

2.3.4 LPS-O 抗原 SDS-PAGE 分析: 为了检测表达的霍乱弧菌 LPS-O 抗原, 以热酚-水法提取了大肠杆菌 1046 (pMG305)、霍乱弧菌 569B, 阴性对照 1046 的脂多糖, 进行 SDS-PAGE 分析, 经银染结果显示 (图 5), 大肠杆菌 1046 (pMG305) 具有 569B LPS 的特征性区带, 而 1046 则没有, 表明 1046 (pMG305) 确能产生霍乱弧菌 LPS-O 抗原。

2.4 大肠杆菌 1046 (pMG305) 菌体对霍乱的保护作用

以上试验表明 1046 (pMG305) 确实含有 CT-B 和 LPS-O 两基因片段, 能特异地表达 B 亚单位和 O 抗原。为了解对霍乱菌的保护作用, 进行了小鼠免疫力试验, 同时设安慰剂组为对照, 将 1046 (pMG305) 活菌以 1×10^8 /次给小鼠腹腔接种免疫, 每次间隔为 3 天, 于第三次免疫后一周采用霍乱弧菌毒株攻击, 以 1.2×10^8 /只活菌攻击保护率为 92%, 以 1.8×10^8 /只活菌攻击保护率为 63% (表 3)。表明 1046 (pMG305) 具有良好的免疫原性, 对霍乱毒株的攻击具有保护作用。

表 3 *E. coli* 1046 (pMG305) 表达的
霍乱弧菌 LPS-O 抗原的免疫原性

Table 3 The immunogenicity of *V. cholerae* LPS-O antigen expressed by *E. coli* 1046 (pMG305)

T	Challenge cells number	Survivor Total	Protective efficacy
(pMG305)	1.8×10^8	10/16	63
Immune group	1.2×10^8	11/12	92
Control group	1.8×10^8	0/16	0
	1.2×10^8	0/12	0

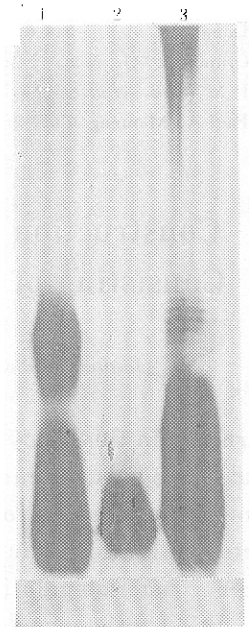


图 5 脂多糖 SDS-PAGE 分析

Fig. 5 SDS-PAGE of LPS

1. *V. cholerae* 569B
 2. *E. coli* 1046
 3. *E. coli* 1046 (pMG305)

3 讨 论

为了有效地防治烈性传染病霍乱, 研制新型疫苗已开展了大量的研究工作, 文献报道表明菌体脂多糖 O 抗原与毒素抗原为主要保护性抗原^[16,17], 我们先后获得了在大肠杆菌中表达霍乱毒素 B 亚单位和霍乱弧菌 O 抗原的克隆株, 毒素基因片段与文献报道的 16kb 为小, 基因结构也不尽相同, 但通过本文的试验进一步证实所克隆的基因片段确定为编码霍乱 O 抗原基因的片段。

参 考 文 献

- [1] Holmgren J *et al.* J Infect Dis, 1977, 136 : 105.
- [2] Otto Luderitz *et al.* J Infect Dis, 1973, 128 (suppl) : 17.
- [3] Syed, Raziuddin *et al.* Infect Immun, 1980, 27 (1) : 211.
- [4] Black R F *et al.* Infect Immun, 1987, 55 : 1116.
- [5] Clemens J D *et al.* J Infect. Dis, 1988, 158 : 372.
- [6] Levine, M M *et al.* Abstr, 19th Joint Conf Cholera, 1983, pp56.
- [7] 黄弘进等. 遗传学报, 1992, 19 (4) : 378—384.
- [8] 马清钧等. 中国科学 B 辑, 1990, 7 : 378—384.
- [9] 马清钧等. 中国科学 B 辑, 1988, 5 : 516—521.
- [10] 彭秀玲等. 基因工程实验技术, 长沙: 湖南科学技术出版社, 1987, pp5—83.
- [11] 刘传璋等. 中华微生物学和免疫学杂志, 1989, 9 (1) : 62—64.
- [12] Westphal O, *et al.* Methods Carbohydr Chem, 1965, 5 : 83.
- [13] J Sambrook *et al.* Molecular cloning, 1989, 18. 51—18. 54.
- [14] Hone DM *et al.* Infect Immun, 1988, 56 : 1326
- [15] Crumpton MJ. *et al.* J Gen Microbiol, 1958, 18 : 129.
- [16] H M Ward. *et al.* Gene, 1987, 55 : 194.
- [17] Paul A. Manning *et al.* Infect Immun, 1986, 53 (2) : 272.

Construction of An Engineered Bivalent Vaccine Strain Consisting of *Vibrio cholerae* CT-B and LPS-O Antigens

Yu Xiuqin Ma Qingjun

(Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850)

Abstract In this study, the engineered *E. coli* strain 1046 containing *V. cholerae* LPS-O and CT-B bivalent antigen genes has been successfully obtained by using DNA recombinant techniques. *E. coli* 1046 (pMG305) could not only express CT-B antigen but also secrete CT-B into medium as shown by GM1-ELISA. Meanwhile, whole cell O antigen-ELISA, bacterial agglutination test and hemagglutination inhibition assay demonstrated that LPS-O antigen could be expressed on the cell surface by *E. coli* 1046 (pMG305) and shown LPS bands specific for *V. cholerae* by SDS-PAGE assay. Mouse intraperitoneal immunization and challenge trial indicated that the *E. coli* 1046 (pMG305) provided good protection against virulent *V. cholerae*. The engineered strain reported here is expected to be a live oral vaccine candidate for *V. cholerae*.

Key words Toxin subunit B, *V. cholerae*, LPS-O antigen