

稳定、无抗药的痢疾福氏 2a 和 宋内双价菌苗候选株的构建

芮贤良 徐永强 王红* 苏国富 黄翠芬

(军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071)

摘要 通过体内外基因重组, 将大肠杆菌粘附因子 *cs3* 基因定位整合到痢疾杆菌福氏 2a 疫苗株 T32 菌染色体的 *asd* 基因内, 使 *asd* 基因灭活, 将宋内 O 抗原基因克隆至无抗药性表达载体 pXL378, 获得重组质粒 pXL390, 将其转化 *asd*⁻ 的 T32 受体菌, 构建成福氏 2a 和宋内双价菌苗株 FS01。实验表明: 重组质粒 pXL390 在不带任何抗菌素基因的情况下, 在 *asd*⁻ 的 T32 受体菌内是稳定的。FS01 株遗传稳定, 能表达两种痢疾菌的 PLS-O 抗原, 无明显毒性作用。动物试验表明, 以 FS01 株皮下免疫的小鼠对福氏 2a 和宋内有毒株的腹腔攻击有 100% 的保护。

关键词 志贺氏痢疾杆菌, 基因工程活菌苗, 重组及表达

痢疾是我国常见和多发传染病, 年发病超过 200 万人次⁽¹⁾。由于卫生条件一时难以改善, 再加上临床抗药性菌株及慢性病例不断增多, 因此控制痢疾的发病及流行主要靠有效的免疫预防手段。到目前为止, 世界上研制的痢疾菌苗候选株不下 15 种, 但都不令人满意, 因为它们多数是单价的, 而且有的安全性不够, 有的保护效果不稳定⁽²⁻⁶⁾。为了克服这些缺点, 本试验将宋内 I 相 O 抗原基因克隆到以 *asd* 基因为选择标记的表达载体, 并将它转化 *asd*⁻ 的 T32 受体菌, 构建成福氏 2a 和宋内双价活菌苗株。小鼠皮下免疫保护试验显示, 重组菌能同时有效地保护福氏 2a 和宋内两种野生型痢疾菌的腹腔攻击。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细菌菌株和质粒: 见表 1。

1.1.2 培养基: 细菌普通培养基为 LB⁽⁷⁾。蔗糖选择培养基为: 10% 蔗糖, 1% 蛋白胨, 0.5% 酵母粉, pH7.2。必要时加 ($\mu\text{g/ml}$) 卡那霉素 (Km) 50, 氯霉素 (Cm) 30, 链霉素 (Sm) 100, 氨苄青霉素 (Ap) 100, 二氨基庚二酸 (DAP) 50。

1.1.3 工具酶及化学试剂: 限制酶、DNA 连接酶、DNA 聚合酶 I 大片段等均为 Promega 公司产品。同位素为福瑞公司产品。其它试剂为国产分析纯试剂。

1.1.4 实验动物: 由军事医学科学院实验动物中心供给。

1.2 方法

1.2.1 DNA 操作技术: 质粒 DNA 制备、酶切、琼脂糖凝胶电泳、DNA 连接和转化均

本工作为国家“863”生物高技术资助项目。

* 广州第一军医大学流行病学教研室。

本文于 1994 年 9 月 26 日收到。

表 1 菌株和质粒
Table 1 Bacterial strains and plasmids

Strains and plasmids	Relevant characteristics	Sources
Strains		
T32	Sm ^r , <i>S. flexneri</i> 2a vaccine strain	Formal S. B.
SM10λpir	Km ^r , thi-1 thr leu tonA lacY supE recA::RP4-2-Tc::Mu, λpir	Cornelis G. R.
X6097	araΔ (pro-lac) rpsLΔasd-4Δ (zhf-2::Tn10) thiØ80 lacZ ΔM15	Curtiss R. ■
2457T	Virulent <i>S. flexneri</i> 2a strain	Maurelli A. T
S9	Virulent <i>S. sonnei</i> strain	This lab.
Plasmids		
pKNG101	Sm ^r , suicide vector, R6K ori, RK2 mob, <i>B. subtilis</i> sacBR gene	Cornelis G. R.
pXL261	Km ^r , Cm ^r , Cm ^r gene in pOK12	This lab.
pMGD3	Ap ^r , 5.1kb cs3 gene in pBR322	This lab.
		(Dong Z Z and Zhang Z S)
pXU203	Ap ^r , Cm ^r , 16kb O antigen gene of <i>S. sonnei</i> in pBR325	This lab.
pXL281	Km ^r , 1.7kb T32 asd gene in pOK12	This lab.
pXL378	asd ⁺ expression vector, <i>S. mutans</i> asd gene	This lab.

按文献〔7〕方法进行, 染色体 DNA 提取参照文献〔8〕。探针标记采用随机引物方法(按 Promega 公司产品说明)。Southern 杂交按文献〔7〕方法进行。

1.2.2 细菌交配: 采用固相滤膜杂交方法〔9〕。

1.2.3 质粒稳定性试验: 按文献〔10〕将待检菌在 LB 培养液内传代 5d 后, 检测重组质粒的存在。

1.2.4 细菌 LPS 分析: 细菌 LPS 提取、SDS-PAGE 及银染参照文献〔11〕进行。

1.2.5 小鼠免疫保护试验: 雌性上海小鼠(16~18g), 随机分组。用 1ml 注射器进行皮下免疫, 共 3 次, 间隔为 0、3、6d。每次每鼠 0.2ml, 内含活菌苗 5×10^8 , 对照组以生理盐水代替。末次免疫后 10d, 用野生型痢疾菌腹腔攻毒, 观察死亡情况。

2 结 果

2.1 T32 株 asd 基因的体外突变

质粒 pXL281 包含 1.7kb 的 T32 asd 基因片段, 在其编码区内有一个 Hind III 位点。将 5.1kb 大肠杆菌粘附因子 cs3 基因插入该位点, 使 asd 基因灭活, 并使基因两端分别带有 0.5kb 及 1.2kb 的 asd 基因片段, 构成含 asd-cs3-asd 突变基因盒的重组质粒 pXL301。

能接合转移的自杀载体 pKNG101 带 Sm^r, 为便于交配时的反选择, 以质粒 pXL261 的氯霉素抗性 (Cm^r) 基因取代 pKNG101 上的 Sm^r 基因, 获得带 Cm^r 的自杀质粒 pXL275。再将完整的 asd-cs3-asd 突变基因盒从 pXL301 克隆到载体 pXL275, 转化大肠杆菌 SM10λpir, 即获得重组的转移质粒 pXL312 (图 1)。

2.2 asd⁻T32 受体菌的构建

以 SM10λpir (pXL312) 作为供体菌, 与受体菌 T32 进行固相滤膜交配。质粒 pXL312 含有 R6K 的复制子及 RK2 的 mob 位点, 是一个可诱动的“自杀”质粒, 可被 RP4 的诱动系统转移到 T32 菌内, 但并不能自主复制。这种复制缺陷迫使质粒通过同源重组整合

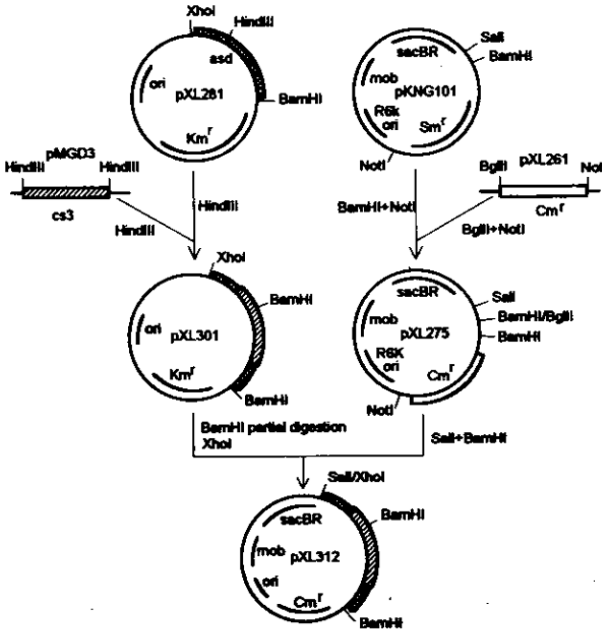


图1 含 *asd*-*cs3*-*asd* 突变基因的自杀转移质粒 pXL312 的构建
 Fig. 1 Construction of the suicide transfer plasmid pXL312 containing the *asd*-*cs3*-*asd* mutant gene

内有 *cs3* 基因整合, 且 *cs3* 基因内也有一个 *Bam*HI 位点, 因此出现 2 条杂交阳性带。这两条带的分子量与体外 *asd*-*cs3*-*asd* 突变基因的酶切结果完全相符 (图 2 A)。

2.3 克隆宋内 O 抗原基因至无抗药性表达载体 pXL378

质粒 pXU203 为本室构建的含宋内 O 抗原基因的亚克隆, 在 O 抗原基因的一端有位于载体上的单一的 *Sal*I 位点, 但另一端缺乏合适的单酶切位点。为便于 O 抗原基因的酶切回收, 首先将这一质粒进行改造, 构建成质粒 pMM801, 使整个 O 抗原基因可用 *Sal*I 单酶切或 *Sal*I + *Bam*HI 双酶切回收。将完整 O 抗原片段克隆到 *asd⁺* 表达载体 pXL378, 获得无抗药性并能表达宋内 O 抗原的重组质粒 pXL390 (图 3)。

2.4 福氏 2a 和宋内双价菌苗候选株 FS01 的生物学检定

将重组质粒 pXL390 转化受体菌 FT01, 获得

到 T32 染色体的 *asd* 基因位点。用含 *Cm*、*Sm* 及 DAP 的 LB 平板选择共整合接合子, 其出现频率约为 10^{-4} 。随机挑数十个接合子, 合并接种于蔗糖选择培养基 (含 *Sm* 和 DAP)。质粒 pXL312 携带 *secBR* 反选择基因, 受蔗糖诱导表达时对 T32 有致死效应。借此可诱导接合子发生第二次重组, 消除共整合质粒, 在选择平板上产生野生型和突变型两种菌落。筛选出其中的 DAP 依赖 *Cm^r* 菌, 即获得 *asd⁻* 的 T32 受体菌, 定名为 FT01。该菌在 LB 培养基中不生长, 而在 LB+DAP 培养基中生长良好。为进一步鉴定突变位点, 以 ^{32}P 标记的 *asd* 基因作探针进行染色体 Southern 杂交分析, 结果见图 2: T32 出发菌表现为 1.7kb *Bam*HI 杂交阳性片段 (图 2 C)。而 FT01 株由于在 *asd* 基因

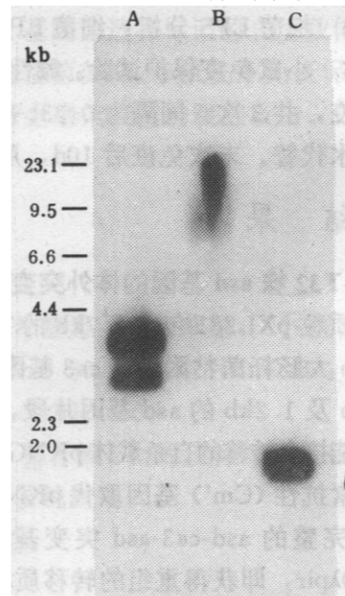


图2 染色体 DNA 的 Southern 杂交分析
 Fig. 2 Southern-blot analysis of the chromosomal DNA
 A: FT01 chromosomal DNA digested by *Bam*HI
 B: FT01 chromosomal DNA
 C: T32 chromosomal DNA digested by *Bam*HI

福氏 2a 和宋内双价疫苗候选株 FS01。

2.4.1 FS01 株的活菌计数: 将 FS01 及 T32 过夜培养物稀释至相同 OD 值, 分别进行活菌计数, 两者活菌数基本一致。表明外源宋内 I 相 O 抗原的表达对 T32 菌存活没有影响。

2.4.2 重组质粒 pXL390 的检测及其稳定性试验: 提取 FS01 及 T32 的质粒, 并进行凝胶电泳, 结果显示 FS01 除多出了 pXL390 质粒带之外, 其它质粒带型与 T32 完全相同。

将 FS01 在 LB 培养液中连续转种 5d 后, 随机挑 100 个菌落, 用宋内 O 抗原血清进行玻片凝集试验以检测重组质粒, 结果 100% 呈凝集阳性。说明重组质粒在 *asd*⁻ 的 T32 菌内十分稳定, 因为质粒上的



图 4 细菌 LPS-O 抗原的银染分析
Fig. 4 Silver staining of bacterial LPS-O antigen

A: *S. sonnei* S9, B: *E. coli* DH5a (pXU203), C: *E. coli* χ 6097 (pXL390), D: *S. flexneri* 2a T32, E: *E. coli* χ 6097, F: *S. flexneri* 2a 和 *S. sonnei* bivalent vaccine candidate FS01.

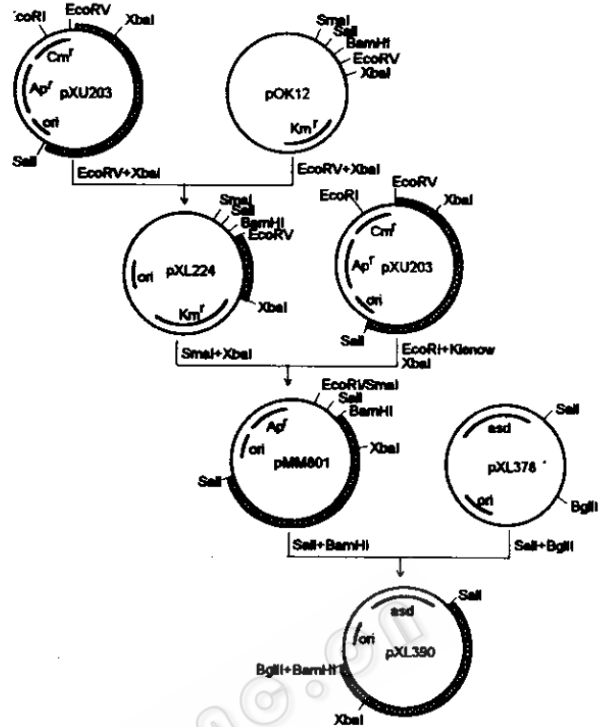


图 3 宋内 O 抗原无抗药性表达质粒 pXL390 的构建
Fig. 3 Construction of the non-resistant *S. sonnei* O antigen expression plasmid pXL390

asd 基因是受体菌在 LB 培养液中生存必不可少的互补因子。

2.4.3 FS01 株的毒性试验: 分别测定 FS01 株与 T32 株的小鼠半数致死量 (LD_{50}), 两者没有明显差别。

2.4.4 FS01 株的血清学检定及 O 抗原表达分析: 用痢疾菌分型血清对 FS01 及 T32 分别进行玻片凝集试验。FS01 不仅能与宋内 S 血清凝集, 而且能与福氏 2a I 型及群 3, 4, 血清凝集, 表明它能表达福氏 2a 和宋内两种 O 抗原, 而 T32 只表达福氏 2a O 抗原。

进一步对 FS01 株和各对照菌的 LPS 进行 SDS-PAGE 及银染分析。结果显示重组质粒 pXL390 在大肠杆菌中表达宋内 O 抗原的水平虽不及野生型宋 9 菌, 但比出发质粒 pXU203 略高 (图 4 C, A, B); 重组双价疫苗候选株 FS01 除表达与 T32 株基本相同的福氏 2a O 抗原之外, 还同时表达宋内 O 抗

原 (图 4 F, D)。

2.5 重组双价菌苗候选株 FS01 的小鼠免疫保护试验

由表 2 可见,以 FS01 株免疫的小鼠无论用 $10 \times LD_{50}$ 野生型宋内菌还是用 $5 \times LD_{50}$ 野生型福氏 2a 菌攻击时,存活率均为 100%。而以 T32 株免疫的小鼠只对福氏 2a 菌攻击有明显保护,存活率为 100%;用宋内氏毒株攻击时,存活率仅 22.2%。表明双价菌苗候选株 FS01 在本试验的小鼠模型中分别对宋内和福氏 2a 都有明显的保护作用。

表 2 FS01 株的小鼠免疫保护试验

Table 2 Immune protection test of FS01 in mice

Immunogens	Challenge strains	Challenge dose ($\times LD_{50}$)	Survival/Total	Survival efficacy/%
FS01	S9	10	9/9	100
	2457T	5	10/10	100
T32	S9	10	2/9	22.2
	2457T	5	10/10	100
Physical	S9	10	0/9	0
Saline	2457T	5	1/10	10

3 讨 论

志贺氏痢疾杆菌分为四群,根据流行病学调查,在我国主要以福氏 2a 和宋内氏流行为主^[12]。因此,选择现有的福氏 2a 疫苗株作为出发株,将它改造成双价或多价苗是解决目前急需痢疾苗的有效途径之一。尽管国内已有类似的痢疾双价菌苗候选株,但它们是直接将宋内 I 相大质粒诱动至福氏 2a T32 株构建成的,存在质粒不稳定和带有抗药性等问题^[5,6]。

为了克服现有痢疾双价疫苗株的缺点,构建质粒上不带抗药基因且稳定的双价或多价痢疾菌苗候选株,我们构建了痢疾菌的宿主-载体平衡致死系统。即将外源基因插入 T32 株的 *asd* 基因,使之产生定点插入突变,这比用转座子进行诱变更为精确^[13,14],*asd*⁻ T32 株在 LB 上生长依赖于 DAP 的存在。与此同时,将链球菌的 *asd* 基因克隆至表达质粒,将它转化 *asd*⁻ T32 株后,恢复了它在 LB 上的生长能力。由于链球菌的 *asd* 基因功能上可互补痢疾菌的 *asd* 基因,但在 DNA 水平上是不同源的,在体内不可能发生同源重组^[10],因此,*asd*⁺ 表达质粒可恒定地保留在 *asd*⁻ 的 T32 株内。本文将编码宋内 I 相 O 抗原的基因克隆至带 *asd* 基因的表达载体,并将它转化 *asd*⁻ 的 T32 株,获得了可预防福氏 2a 和宋内的二价菌苗株。该菌苗株的质粒不带抗药性基因,但能恒定地保持在 *asd*⁻ 的受体菌内。而且重组表达载体不含与宋内 O 抗原表达无关的基因,因而不会与 T32 株内的大质粒发生同源重组,这进一步确保了该菌苗株的稳定性。

一系列的生物学试验证明: *cs3* 基因的染色体整合和宋内 O 抗原基因的表达并没有对 T32 菌产生毒副作用。免疫保护试验表明,重组株 FS01 在小鼠模型中能够产生对两种野生型痢疾菌的免疫保护作用,目前正在进行猴体试验加以证实。因此本试验为今后构建多价痢疾基因工程菌苗株打下了基础。

参 考 文 献

- (1) 阮力, 汪垣, 强伯勤. 新型疫苗研究的现状与展望, 北京: 学苑出版社, 1992, p171~183.
- (2) Lindberg A A, Pal T. *Vaccine*, 1993, 11: 168~179.
- (3) Meitert T, Pencu E, Ciudin L *et al.* *Arch Roum Path Microbiol*, 1984, 43: 251~278.
- (4) Venkatesan M, Fernandez-Prada C, Buysee J M *et al.* *Vaccine*, 1991, 9: 358~363.
- (5) 王秉瑞, 宋素珍, 陈锦荣等. 中华微生物和免疫学杂志, 1987, 7: 373~377.
- (6) 牟兆钦, 杨素雅, 邢丽等. 军事医学科学院院刊, 1986, 10: 269~273.
- (7) Maniatis T, Fritsch E F, Sambrook J. *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982.
- (8) Ausubel F M, Brent R, Kingston R E *et al.* *Current Protocols in Molecular Biology*, New York, 1987.
- (9) Herrero M, Lorenzo V, Timmis K N *et al.* *J Bacteriol*, 1990, 172: 6557~6567.
- (10) Nakayama K, Kelly S M, Curtiss R. *Bio/Technology*, 1988, 6: 693~697.
- (11) Pepler M S. *Infect Immun*, 1984, 43: 224~232.
- (12) 耿峪, 夏光明, 王丽等. 中华预防医学杂志, 1989, 23: 372~373.
- (13) Curtiss R, Kelly S M. *Infect Immun*, 1987, 55: 3023~3043.
- (14) Nerma N K, Lindberg A A. *Vaccine*, 1991, 9: 6~9.

Construction of Stable and Non-resistant Bivalent Vaccine Candidate Strain Against *Shigella flexneri* 2a and *Shigella sonnei*

Rui Xianliang Xu Yongqiang Wang Hong Su Guofu Huang Cuifen

(Institute of Biotechnology, Beijing 100071)

Abstract The *E. coli* cs3 gene coding for CFA/II antigen was site-specifically integrated into the *asd* gene locus of *S. flexneri* 2a vaccine strain T32, resulting in the *asd* gene inactivated. Meanwhile, the *S. sonnei* O antigen gene was cloned into a non-resistant expression vector pXL378 to construct the plasmid pXL390. By transforming the *asd* minus T32 strain with pXL390, the bivalent vaccine candidate strain FS01 against *S. flexneri* 2a and *S. sonnei* was finally obtained. Experiments showed that the recombinant plasmid pXL390 was very stable in the *asd* minus T32 strain without the use of any antibiotics; FS01 strain was genetically stable and expressed two kinds of *Shigella* LPS-O antigens with no enhancement of its toxicity. Animal test demonstrated that FS01 strain, when administered subcutaneously in mice, could confer 100% protection against the intraperitoneal challenges of virulent *S. flexneri* 2a and *S. sonnei*.

Key words *Shigella* spp, genetic engineered live vaccine, recombination and expression