

- in mapping cosmids and YACs. *Nucl Acids Res*, 1990; **18**:3097
- 18 Pavan W J, Hiéter P, Reeves R H. Generation of deletion derivatives by targeted transformation of human-derived yeast artificial chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990;**87**:1300
- 19 Wada M, Little R D, Adidi F *et al.* Human Xq24-q28: Approaches to mapping with yeast artificial chromosomes. *Am J Hum Genet*, 1990;**46**:95
- 20 Brown W R A. Molecular cloning of human telomeres in yeast. *Nature*, 1989;**338**:774
- 21 Cheng J-F, Smith C L, Cantor C R. Isolation and characterization of a human telomere. *Nucl Acids Res*, 1989; **17**:6109

## 卡介苗载体及其在疫苗研究中的应用\*

张大军 皇甫永穆

(同济医科大学实验医学研究中心, 武汉 430030)

### 提 要

卡介苗是发展多价疫苗最好的载体之一。把外源基因导入卡介苗有3种途径:一是分枝杆菌噬菌体衍生的基因转移系统;二是分枝杆菌质粒衍生的基因转移系统;三是同源重组基因转移系统。重组卡介苗多价疫苗的研制为各种疾病的预防开辟了广阔的前景。

**关键词** 卡介苗载体, 基因转移系统, 重组多价疫苗, 分枝杆菌

目前,国内外报道了沙门氏杆菌、牛痘、脊髓灰质炎病毒等多种多价疫苗载体,引起了疫苗领域的大变革。最近,美国二个研究小组报道,他们能在卡介苗(BCG)中表达外来抗原基因<sup>[1]</sup>;虽然工作尚属开端,但由于BCG是全世界应用最广泛的疫苗,是目前所知最强的免疫佐剂之一,因此在国内对分枝杆菌(*Mycobacteria*, M.)疾病的研究受到疫苗学界重视。令人遗憾的是,由于本世纪20年代以来在BCG的应用中,人们忽视了对分枝杆菌的深入研究;很少进行使BCG成为疫苗载体的分子生物学研究,近年国内外专家才开始重视,相信不久将取得硕果。

### 1 卡介苗的主要分子生物学特征

重组DNA和MAb技术的运用,使分枝杆菌的研究进入了分子生物学时代。在过去的6年里,结核杆菌(*M. tuberculosis*)、麻风杆菌(*M. leprae*)和BCG等分枝杆菌的基因组,通过质粒和噬菌体载体在大肠杆菌(*E. coli*)中

得到克隆<sup>[2-4]</sup>。到目前为止,采用MAb和单一T细胞克隆作探针,已从分枝杆菌基因组文库中筛选出十多种蛋白抗原编码基因<sup>[5]</sup>,如表1所示,这些基因已进行了全核苷酸序列和抗原决定簇分析等深入研究。其它分枝杆菌抗原也正在纯化、基因克隆和定序<sup>[6-8]</sup>。目前对分枝杆菌基因组也有重要发现。在DNA定序后将提高我们对分枝杆菌尤其是致病性分枝杆菌之间种属联系的认识。研究表明,BCG基因组中仅存在一个或两个rRNA顺反子<sup>[9]</sup>;相反快生长类分枝杆菌(如耻垢分枝杆菌,*M. smegmatis*)基因组常包含6个以上的rRNA顺反子,并且常用RNA合成装置中的一半来合成rRNA,这些可解释分枝杆菌维持慢生长能力的部分原因,对于在致病机制中要求维持慢生长能力的分枝杆菌来说更是重要。另外,由于分枝杆菌培养费时费力,故找到早期诊断分

\* 国家自然科学基金资助课题。

收稿日期:1992-04-13 修回日期:1992-06-11

枝杆菌的方法一直是研究的重要课题。对分枝杆菌基因组的研究，找到种类特异的 DNA 序列，采用分子杂交或 PCR 技术将提高分枝杆菌的鉴别力及改进流行病学方面的研究。

表 1 一些已定序的分枝杆菌基因及其蛋白产物<sup>1)</sup>

基因序号	抗原	命名	参考文献
<i>M. tuberculosis</i> :			
MSGTCWPA	65 kD antigen (hsp60, groEL)	TB 65k	Shinnick. <i>J Bacteriol</i> , 1987; 169: 1080
MTDNAJ	dnaJ analogue	TB dnaJ	Lathigra <i>et al. Nucleic Acids Res</i> , 1988; 16: 1636
MSGANT19	19—22 kD antigen	TB 19—22k	Ashbridge <i>et al. Nucleic Acids Res</i> , 1989; 17: 1249
MSG10KAG	10—12 kD antigen (groES)	TB 10—12k	Baird <i>et al. J Gen Microbiol</i> , 1989; 135: 931
MTBCGA	10—12 kD antigen (groES)	TB 10—12k	Shinnick <i>et al. Nucleic Acids Res</i> , 1989; 17: 1254
M30046	38 kD antigen (pstS analogue)	TB 38k	Andersen, Hansen. <i>Infect Immun</i> , 1989; 57: 248
M27016	32 kD antigen	TB 32k	Borremans <i>et al. Infect Immun</i> , 1989; 57: 3123
<i>M. bovis</i> :			
X15803	19—22kD antigen	MB 19—22k	Collins <i>et al. FEMS Microbiol Lett</i> , 1987; 43: 53
BCG:			
MSGBCG	64 kD antigen (hsp60, groEL)	BCG 64k	Thole <i>et al. Infect Immun</i> , 1987; 55: 1466
MSGBCGA	alpha antigen (30/31 kD)	BCG alpha	Matsuo <i>et al. J Bacteriol</i> , 1988; 170: 3847
MBMPB57	10—12 kD antigen (MPB57)	BCG 10—12k	Yamaguchi <i>et al. FEBS Lett</i> , 1988; 240: 115
- (待编)	18 kD antigen	BCG MPB70	Terasaka <i>et al. FEMS Microbiol Lett</i> , 1989; 58: 273
- (待编)	23 kD antigen	BCG MPB64	Yamaguchi <i>et al. Infect Immun</i> , 1989; 57: 283
<i>M. leprae</i> :			
MSGANTM	65 kD antigen (hsp60, groEL)	ML 65k	Mehra <i>et al. Proc Natl Acad Sci USA</i> , 1986; 83: 7013
MSGANT18k	18 kD antigen	ML 18k	Booth <i>et al. J Immunol</i> , 1988; 140: 597
MLEPSOD	28 kD antigen (a) (superoxide dismutase)	SOD	Thangaraj <i>et al. Nucleic Acids Res</i> , 1989; 17: 8378
MSG28KDAG	28 kD antigen (b) (hypothetical iron transport protein)	IRG	Cherayil Young, <i>J Immunol</i> , 1988; 141: 4370
- (待编)	36 kD antigen	ML 36K	Thole <i>et al. Infect Immun</i> , 1990; 58: 80

1) MSG 是 Gen Bank 号码, MT, MB, ML 是 EMBL 号码。

令人振奋的是在分枝杆菌中建立了与 *E. coli* 类似的基因转移系统. 目前, 分枝杆菌已被重组 DNA 稳定转化<sup>[10]</sup>; 已组建了数个能使重组 DNA 在 *E. coli* 中操作, 然后转化分枝杆菌, 通过自动复制, 或同源整合与基因组进行基因交换, 从而在分枝杆菌中稳定表达外源基因的穿梭载体. 这些方法和工具不仅为我们提供了全新的手段来研究分枝杆菌的分子生物学和病理学, 而且更重要的是提供了一种方法把 BCG 改造成为活的重组多价疫苗载体, 为分枝杆菌新疫苗和其它致病菌疫苗的发展开辟了新途径.

## 2 卡介苗表达载体构建的基本原理及外源基因在卡介苗载体中表达的研究

发展基因转移系统的前提是找到有效地把 DNA 引入分枝杆菌的方法. 许多学者致力于这方面的研究, 但直至 1987 年 Jacobs 等<sup>[11]</sup>采用与转化链霉菌相似的方法, 先制备原生质体, 加入聚乙二醇促进 DNA 进入菌体, 才首次成功地完成重组分枝杆菌噬菌体转染, 建立了噬菌体衍生的基因转移系统. 其它两种基因转移系统也相继建立. 现叙述如下.

### 2.1 分枝杆菌噬菌体衍生的基因转移系统

Jacobs 等<sup>[11]</sup>首次构建一个在 *E. coli* 和数种分枝杆菌中都能复制和扩增的噬菌体. 他们使用从鸟分枝杆菌 (*M. avium*) 中分离到的 53 kb 大小的温和噬菌体 TM4, 先把它们连接成串联体, 接着用 *Sau*3A 消化使其成为 30—50kb 大小的片段; 然后把这些片段连接到 *E. coli* 粘尾质粒上, 经体外包装和转导 *E. coli*, 筛选出所有克隆有 TM4 噬菌体 DNA 的重组质粒. 用重组质粒转染 *M. smegmatis* 原生质体; 凡是能形成噬菌斑的质粒表明其中粘尾质粒插在 TM4 DNA 的非必需区, 属穿梭质粒. 从中选出 *phAE1* 质粒作进一步研究, 发现它能重新被引入 *E. coli*, 而且完整的 *phAE1* 噬菌体颗粒可以通过感染而被引入 *M. smegmatis* 和 BCG 中. 虽然 *phAE1* 能在 *M. avium* 中形成稳定的溶源状态, 但在 *M. smegmatis* 或 BCG 中

由于相应转导子易被其它常见温和噬菌体再感染, 造成假溶源状态, 而使重组分子在宿主中不稳定. Snapper 等<sup>[12]</sup>改进了这一转移系统, 用能在各分枝杆菌株中形成稳定溶源状态的噬菌体 L1 代替 TM4, 其构建过程同上述 TM4 型穿梭质粒; DNA 印迹法分析表明, 转导子中 L1 型穿梭质粒以位点特异整合的形式存在. 他们把在 *E. coli* 编码氨基糖苷磷酸转移酶的 Tn903 基因克隆入 L1 型穿梭质粒中, 再转染 *M. smegmatis* 和 BCG, 首次在分枝杆菌中表达了选择性标志即抗卡那霉素 (kanamycin, Kan<sup>r</sup>) 特性, 且穿梭质粒以稳定溶源状态存在, 给分枝杆菌基因转移系统研究带来了革命. 本基因转移系统在穿梭质粒构建完成后, 先转染快生长类分枝杆菌原生质体获得完整噬菌体颗粒, 仅通过直接感染即可达到把重组 DNA 引入 BCG 的目的; 而且重组分子在宿主中保持稳定都是该系统具有的独特优势. 另外, 噬菌体 DNA 可为外源基因在分枝杆菌中的表达提供可调控的强启动子, 为质粒衍生的基因转移系统提供复制基因.

### 2.2 分枝杆菌质粒衍生的基因转移系统

许多分枝杆菌如鸟胞内瘰癧复合型分枝杆菌 (*M. avium-intracellulare-scrofulaceum complex*, MAIS) 及偶然分枝杆菌 (*M. fortuitum*) 都含有质粒, 但 *M. smegmatis*, 结核杆菌和 BCG 中至今没有分离到典型的质粒. 发展质粒衍生的基因转移系统, 也需要建立有效的转化方法. 上述噬菌体转染原生质体的程序不能应用于质粒转化; 但用高电压电穿孔成功转化干酪乳杆菌的报道给本研究带来了希望. 另外, Snapper 等<sup>[5]</sup>分离出高效转化突变株, 使转化效率提高了两个数量级. 在所有分枝杆菌质粒中, 研究最清楚的是从 *M. fortuitum* 中分离到的 *pAL5000* 质粒. 其大小为 4837 bp, 核苷酸序列已被测定<sup>[13]</sup>; 是所有分枝杆菌染色体外复制单位中最小的成员. 用计算机分析质粒序列共发现 5 个开放阅读框 (open reading frames, ORFs) 和一个复制起始点 (Ori). Ori 由 500 bp 组成, 含有数个顺向或反向的重

复序列. ORF1 和 ORF2 有一个碱基对的重叠, 可能共同组成一个操纵子. 根据 ORF2 推导的氨基酸序列含有 DNA 结合蛋白所特有的螺旋-转折-螺旋片段, 且离 Ori 很近, 表明它与质粒复制有关. ORF3 翻译产物 N 端含有信号肽, 可能是一种分泌蛋白; ORF4 则可能编码一种表面抗原. Ranes 等<sup>[14]</sup>对 pAI.5000 质粒进行了功能性分析, 以利于外源基因的克隆和表达. 他们选择与质粒复制无关的 ORF3 或 ORF4 作为 *E. coli* 质粒以及外源基因的插入位点. 结果表明 ORF1, ORF2, Ori 区甚至 ORF5 的完整是质粒能在宿主中复制的前提. 用 pAI.5000 中 2.5kb 片段 (从 1625 到 3874 bp) 构建的质粒 pRR3, 不仅能更有效地转化 *M. smegmatis*, 而且使转化宿主表现 Kan<sup>r</sup> 表型. 用 pRR3 质粒转化 BCG, 在其中表达 Tn903 基因也获得成功. 质粒衍生的基因转移系统, 具有拷贝数多, 克隆基因容量大, 操作方便, 便于分离和进一步分析等优点, 象 *E. coli* 系统一样, 质粒载体将是应用最广泛的分子克隆工具.

**2.3 同源重组基因转移系统** Husson 等<sup>[15]</sup>建立了分枝杆菌的同源重组系统. 他们使用的是 PyrF (或写成 Ura) 营养选择性标志 (类似的标志还有 Asd); PyrF 基因编码 5-磷酸乳清酸核苷脱羧酶, 可使宿主细胞生长在无尿嘧啶的基础培养基中, 但在 5-氟乳清酸存在的情况下细胞会被致于死地; 反之如果细胞中缺乏该基因或发生突变失活, 却对 5-氟乳清酸有抵抗力, 所以 PyrF 是阴性和阳性两种选择性标志. 先将 *M. smegmatis* 基因组中的 PyrF 基因克隆到 pUC19 质粒中, 构建成重组质粒 pY6001; 进而把 Tn903 (或写成 aph) 基因插入到 PyrF 基因中, 得到质粒 pY6002. 用重组质粒电穿孔转化 *M. smegmatis*, 经过筛选 (PyrF 和 Kan 两种选择标记), 发现转化子分为两类: I 类转化子含有一个完整的和另一个由于 Tn903 基因的插入而失活的突变 PyrF 基因; II 类转化子中仅含一个突变 PyrF 基因. 两类转化子都非常稳定, 是两种同源重组的结果, 其机制均有重要的价值: I 类同源重组是把质

粒单纯插入到宿主基因组中, 该机制可用于通过该途径稳定表达外源基因; II 类同源重组主要是质粒序列与宿主基因组之间发生同源序列交换, 该机制可用来制备分枝杆菌营养缺陷型, 而后者是重组质粒的良好宿主. 他们在 pY6002 质粒中克隆入 *M. leprae* 的 65 kD 抗原编码基因, 转化 *M. smegmatis*, 用相应 MAbs 可检测到该抗原的表达.

以上各个基因转移系统都有需要进一步完善的地方: 需要多种有效的营养缺陷性标志; 发展更有效的转化方法; 了解更多分枝杆菌基因的转录翻译信号; 在 BCG 中建立与 *M. smegmatis* 类似的同源重组系统使外源基因在其中稳定表达, 以上均是该领域研究的焦点.

### 3 卡介苗载体在疫苗研究中的应用及其前景

**3.1 卡介苗载体在分枝杆菌疫苗研究中的应用** 目前, 分枝杆菌仍是人类的重要病原菌. 由于 BCG 的广泛应用, 结核病的预防取得了明显的效果, 但在世界各地差异很大<sup>[16]</sup>, 从 0 到 80%, 且对其它分枝杆菌病无效, 因此开发新的分枝杆菌疫苗日益受到重视. 分枝杆菌基因转移系统的建立为征服分枝杆菌病带来了希望. 首先, 选用合适的可识别基因标志, 采用上述基因转移系统, 通过下列两条途径来阐明影响分枝杆菌致病的关键因素: 方案一是从某一基因发生插入失活的结核杆菌突变株中筛选出那些不能使小鼠致死的突变株; 方案二是把来自毒性结核杆菌 (如 H37Rv) 的 DNA 片段导入无毒结核杆菌 (如 H37Ra 或 BCG) 中, 筛选出那些导入后使无毒株转变成能导致动物疾病乃至死亡的毒性基因. 然后, 把这些影响细菌致病能力的基因进行定序等深入研究; 这些基因将是用来发展更有效的 BCG 疫苗的候选蛋白编码基因. 因为数种分枝杆菌蛋白共同的保护作用要较单纯的亚单位疫苗更有效, 需要采用基因转换系统, 使许多候选抗原共同在 BCG 中表达, 在动物模型中通过筛选得到更理想的分枝杆菌疫苗.

### 3.2 把卡介苗发展成为多价疫苗载体

BCG 作为多价疫苗载体, 具有以下突出的优点: a. 并发症少; b. 和脊髓灰质炎疫苗是 WHO 所推荐的、出生时预防接种的两种疫苗, 不象沙门氏菌或痘苗载体, 本身就是最强的非特异性免疫刺激剂之一; c. 能应用于血清 HIV 阳性的新生儿; d. 单次免疫接种能诱导长期细胞介导的免疫力; e. 价廉、热稳定性强, 适宜于广大农村; f. 全世界已建立了 BCG 预防接种网, 便于推广. 图 1 是设想的重组 BCG 多价疫苗的模式. 各种病原菌的保护性抗原编码基因, 被克隆在数个含有野生型营养性标志基因

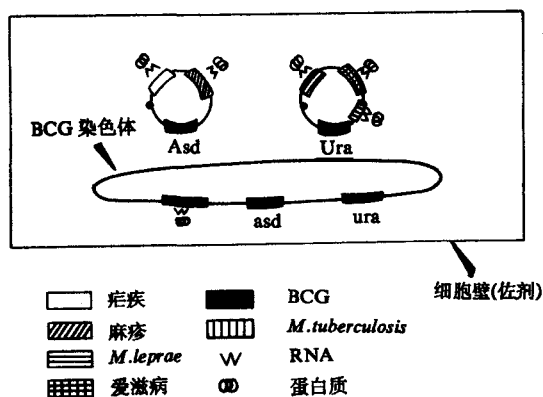


图 1 重组 BCG 多价疫苗模式图<sup>[5]</sup>

的表达载体上; 这些标志基因能与 BCG 染色体上相应的缺陷基因互补. 这样, 各种抗原可同时在 BCG 细胞壁上稳定表达. BCG 的免疫佐剂特性将刺激机体对各病原菌产生保护性免疫. 分枝杆菌的分子生物学能提供所有纠正重组 BCG 多价疫苗缺陷的方法, 这在其它疫苗载体中也是不可能办到的. 总之, BCG 多价疫苗具有广阔的应用前景; 世界上用途最广泛的疫苗的基因工程菌不久将问世!

### 参 考 文 献

1 余帼华. 多价 BCG 菌苗可望问世. 国外医学预防诊断治疗用生物制品分册, 1991; 14(6): 259

2 Young R A, Mehra V, Sweetser D *et al.* Genes for the major protein antigens of the leprosy parasite *Mycobacterium leprae*. *Nature*, 1985; 316: 450

3 Young R A, Bloom B R, Grosskinsky C M *et al.* Dissection of *Mycobacteria tuberculosis* antigens using recombinant DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985; 82: 2583

4 Thole J E R, Dauwerse H G, Das P K *et al.* Cloning of *Mycobacteria bovis* BCG DNA and expression of antigens in *E. coli*. *Infect Immun*, 1985; 50: 800

5 McFadden J, Young R A, Jacobs W R Jr *et al.* *Molecular biology of the mycobacteria*. London: Surrey University Press, 1990: 177-217

6 Fifis T, Costopoulos C, Radford A J *et al.* Purification and characterization of major antigens from a *Mycobacterium bovis* culture filtrate. *Infect Immun*, 1991; 59(3): 800

7 Andersen P, Askgaard D, Ljungqvist L *et al.* Proteins released from *Mycobacterium tuberculosis* during growth. *Infect Immun*, 1991; 59(6): 1905

8 Collins F M, Lamb J R, Young D B. Biological activity of protein antigens isolated from *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate. *Infect Immun*, 1988; 56: 1260

9 Suzuki Y, Yoshinaga K, Ono Y *et al.* Organization of rRNA genes in *Mycobacterium bovis* BCG. *J Bacteriol*, 1987; 169: 839

10 Lugosi L, Jacobs W R Jr, Bloom B R. Genetic transformation of BCG. *Tubercle*, 1989; 70(3): 159

11 Jacobs W R Jr, Tuckman M, Bloom B R. Introduction of foreign DNA into *Mycobacteria* using a shuttle plasmid. *Nature*, 1987; 327: 532

12 Snapper S B, Lugosi L, Jekkel A *et al.* Lysogeny and transformation in *Mycobacteria*; stable expression of foreign genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988; 85: 687

13 Rauzier J, Moniz-Pereira J, Gicquel-Sanzey B. Complete nucleotide sequence of pAL 5 000, a plasmid from *Mycobacterium fortuitum*. *Gene*, 1988; 71: 315

14 Ranes M G, Rauzier J, Lagrandier M *et al.* Functional analysis of pAL5 000, a plasmid from *Mycobacterium fortuitum*; construction of "mini" *Mycobacterium-E. coli* shuttle vector. *J. Bacteriol*, 1990; 172(5): 2793

15 Husson R N, James B E, Young R A. Gene replacement and expression of foreign DNA in *Mycobacteria*. *J Bacteriol*, 1990; 172(2): 519

16 Luelmo F. BCG vaccination. *Am Rev Respir Dis*, 1982; 125: 70