

CTB/CS3 融合蛋白与 GM1 结合能力和免疫原性的分析*

米凯霞¹⁾ 李 勳²⁾ 张兆山²⁾ 方荣祥^{1)**}

(¹⁾中国科学院微生物研究所, 植物生物技术开放实验室, 北京 100080; ²⁾北京生物工程研究所, 北京 100071)

摘要 免疫霍乱毒素 B 亚单位 (CTB) 或肠毒素大肠杆菌 (ETEC) 定居因子 CS3 可使人体对 ETEC 的感染有保护作用. 为探索研制 ETEC 双组分亚单位疫苗的可行性, 利用大肠杆菌诱导表达系统表达了 CTB 与 CS3 的融合蛋白 (CTB/CS3). 蛋白质印迹结果表明, 诱导表达的 29 ku 蛋白具有 CTB 和 CS3 蛋白双重抗原性. 经 N₁NTA 亲和层析纯化获得重组蛋白 CTB/CS3. 复性的重组蛋白可以部分形成五聚体并保留了与神经节苷脂 GM1 的结合能力. 动物实验表明, 融合蛋白 CTB/CS3 具有 CTB 和 CS3 蛋白的双重免疫原性, 同时, CTB 的免疫载体作用提高了 CS3 的免疫强度.

关键词 肠毒素大肠杆菌, 霍乱毒素 B 亚单位 (CTB), 肠毒素大肠杆菌定居因子 CS3, 神经节苷脂 GM1, 免疫原性, 亚单位疫苗

学科分类号 Q78

肠毒素大肠杆菌 (enterotoxigenic *Escherichia coli*, ETEC) 是引起婴幼儿急性腹泻的主要病原菌, 也是到发展中国家旅行的游客腹泻的主要病因. 据估计, 每年因 ETEC 腹泻导致死亡的人数达 80 万, 其中大多数是 5 岁以下儿童^[1]. ETEC 的致病性依赖于肠毒素和定居因子 (colonization factors, CFs). ETEC 侵入人体后, 首先通过定居因子粘附到小肠表面, 一旦定居于小肠, ETEC 会释放热不稳定毒素 (heat-labile enterotoxin, LT) 和/或热稳定毒素 (heat-stable enterotoxin, ST), 引起水状腹泻. 理想的 ETEC 疫苗应该包括抗粘附免疫和抗毒素免疫; 另外, 由于 ETEC 的感染是通过小肠粘膜系统, 因此有效地启动小肠粘膜免疫应答对于开发有效的 ETEC 疫苗, 特别是使用方便的口服疫苗具有重要的意义.

但是迄今为止仍无一种理想的 ETEC 疫苗供人类使用. 目前, 对 ETEC 疫苗的研究主要集中在利用灭活全菌苗和口服减毒活菌苗, 虽然这些试验中的疫苗是有效的^[2], 但存在着不能忽视的潜在安全性问题. 例如, 减毒活菌苗毒性恢复的可能性、迟发型超敏反应对组织的损伤; 灭活全菌苗中可能存在的毒素等. 近年来亚单位疫苗由于安全性高的优点越来越受到人们的重视, 但是亚单位疫苗免疫效果较差, 因此需要通过调节抗原的基因组以增强抗原性或添加佐剂来加强其免疫原性, 提高免疫效果.

实验证明用定居因子免疫产生的抗体可阻止

ETEC 定居从而保护机体免受感染^[3]. 1997 年, Wolf 对全世界 18 个地区的 ETEC 患者的调查表明, CS3 是临床检测到的主要定居因子之一, 因此, 通过免疫 CS3 可望获得较广泛的免疫效果.

热不稳定毒素 B 亚单位 (LTB) 是 LT 的无毒亚单位, 其与霍乱毒素 B 亚单位 (CTB) 有高度的同源性 (氨基酸水平同源性达 82%). 实验证明 CTB 能激起机体免疫反应, 产生的特异性抗体可以保护机体免受 ETEC 侵害^[4]. 另外, CTB 是一个有效的免疫载体, 可以通过神经节苷脂 GM1 受体介导携带靶抗原进入与肠粘膜有关的免疫途径. 这种载体功能是由于 CTB 形成的五聚体具有和细胞表面神经节苷脂 GM1 结合的能力.

在本研究中首次将 CS3 结构蛋白 (15 ku) 融合在 CTB (11 ku) 的 C 端, 检测了融合蛋白 CTB/CS3 与 GM1 的结合能力和免疫原性, 并比较了融合蛋白 CTB/CS3 与 CTB 和 CS3 混合蛋白免疫小鼠后激起抗体的差别. 融合蛋白 CTB/CS3 包含肠毒素抗原和定居因子两种抗原, 这将为 ETEC 亚单位双价疫苗的研制提供有价值的参考依据.

1 材 料

1.1 质粒与菌株

pGEM-T 载体是 Promega 公司产品; pQE30

* 国家高技术“863”计划资助项目 (2002AA206611).

** 通讯联系人.

Tel: 010-62548243, E-mail: fangrx@sun.im.ac.cn

收稿日期: 2002-10-21, 接受日期: 2002-11-25

载体是 QIAGEN 公司产品. 含有霍乱毒素 B 亚基 (CTB) 基因的 pUC19-CTB 由军事医学科学院生物工程研究所刘传暄惠赠^[5]; pMGD3 是带有 ETEC 定居因子 CS3 基因的重组质粒^[6]; 大肠杆菌 XL1-Blue 菌株和 M15 菌株分别用于构建重组质粒和表达重组蛋白.

1.2 试剂

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶和 BCIP/NBT 购自 Promega 公司; Taq DNA 聚合酶和 Taq Plus DNA 聚合酶均购自上海生工生物工程技术有限公司; CTB 蛋白和抗体 (兔抗 CT 抗体、碱性磷酸酶标记羊抗鼠和羊抗兔 IgG, 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 和 IgA) 购自 Sigma 公司; CS3 单克隆抗体由瑞典 Goteborg 大学 Svennerholm 惠赠.

1.3 引物

利用以下 PCR 引物克隆 CTB 和 CS3 基因. P1: ACGGGATCCACCATGGCAGGGGCCCACTGTAA; P2: ATCTAGAGCAGCGGGGCCCACT; P3: A GTCGAC TTATTTAATTGTCGAAGTAATTG; P4: AGGATCCACACCTCAAAATATTAATTGATT; P5: AGTCGACGCGCTCTAGAGGGCCCCGGCC-ATTTGCCATACTAATTGCGG. 下划线部分为在引物中引入的限制性内切酶位点; 曲线部分是 12 bp 的铰链区编码序列.

1.4 实验动物

实验用 BABL/c 小鼠由军事医学科学院动物中心提供.

2 方 法

2.1 DNA 克隆操作

质粒提取所用的裂解煮沸法及酶切、连接, 大肠杆菌电击感受态细胞的制备等 DNA 重组技术参照文献 [7].

2.2 CTB/CS3 及 CS3 在大肠杆菌中的诱导表达

将 pQE-CTB/CS3、pQE-CS3 重组质粒转入大肠杆菌 M15 菌株, 分别挑取含以上质粒的单菌落接种于含 Kan (25 mg/L)、Amp (100 mg/L) 的 LB 培养基中, 37℃ 振荡培养过夜. 按 5% 接种量转接到含 Kan (25 mg/L)、Amp (100 mg/L) 的 LB 培养基中, 继续培养至 A_{600} 为 0.5~0.7, 取 1 ml 菌液, 做为对照. 加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 37℃ 振荡培养 4 h 收集 1 ml 菌液. 将诱导和未诱导的菌体用 $2 \times$ SDS 上样缓冲液 (0.125 mol/L Tris, pH 6.8; 20% 甘油; 4% SDS;

0.25% 溴酚蓝; 2% 巯基乙醇) 悬起, 煮沸 5 min 后离心, 上清液用 15% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析.

2.3 重组蛋白抗原性检测

将上述诱导和未诱导的菌体样品, 进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 采用半干式转移仪进行转印. 针对 CS3 蛋白和 CTB 蛋白, 分别以鼠源 CS3 单克隆抗体或兔源抗 CT 抗体为第一抗体, 以碱性磷酸酶标记的羊抗鼠、羊抗兔 IgG 为第二抗体, 进行蛋白质印迹检测. 氯化硝基四氮唑蓝和 5-溴-4-氯-3-吡啶-磷酸 (NBT/BCIP) 作为显色反应底物.

2.4 重组蛋白的纯化和复性

工程菌培养和诱导条件同上所述. 收获的菌体重悬于缓冲液 I (50 mmol/L NaH_2PO_4 , pH 8.0; 300 mmol/L NaCl; 10 mmol/L 咪唑), 在冰浴中超声波破碎细胞, 12 000 r/min 离心, 分别取上清和沉淀进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析.

沉淀用含 2 mol/L 尿素的 PBS (137 mmol/L NaCl; 2.7 mmol/L KCl; 4.3 mmol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1.4 mmol/L KH_2PO_4) 及 PBS 洗涤 2 次, 离心收集沉淀. 洗涤后的包涵体溶解在裂解缓冲液 (8 mol/L 尿素; 0.1 mol/L NaH_2PO_4 ; 0.01 mol/L Tris, pH 8.0), 离心, 取上清. 每 4 ml 裂解物加 1 ml 50% Ni-NTA 填料, 室温 200 r/min 振荡 60 min. 将裂解物与 Ni-NTA 的混合物上柱. 上样后用两倍裂解物体积的洗涤缓冲液 (8 mol/L 尿素; 0.1 mol/L NaH_2PO_4 ; 0.01 mol/L Tris, pH 7.3 或 6.5) 清洗. 最后用洗脱缓冲液 (8 mol/L 尿素; 0.1 mol/L NaH_2PO_4 ; 0.01 mol/L Tris, pH 4.5) 洗脱重组蛋白.

经 Ni-NTA 柱纯化的融合蛋白 CTB/CS3 装入透析袋以 1:40 比例置于含 0.1% NP40 和 2 mol/L 尿素的 10 mmol/L Tris (pH 8.0) 溶液中, 4℃ 透析 12 h; 加 10 mmol/L Tris (含 0.1% NP40) 至透析液中, 使尿素终浓度为 1 mol/L, 4℃ 透析 6 h. 如此连续稀释透析液直到尿素浓度为 0.1 mol/L 后结束透析, 然后用 CentriconYM-3 (Millipore) 浓缩, 用 PBS (pH 7.4) 溶液洗脱. 纯化的 CS3 蛋白直接用 CentriconYM-3 去除尿素, 用 PBS (pH 7.4) 洗脱重组蛋白.

2.5 CTB/CS3 的聚合体及与 GM1 结合能力

CTB/CS3 复性蛋白与等体积 $2 \times$ SDS 上样缓冲液混合, 加热 5 min 后或不加热直接上样, 用 15% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 进行分析; 另外,

以 CTB 蛋白加热和不加热样品作为对照, 进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳. 采用半干式转移进行转印, 以兔源抗 CT 抗体为第一抗体, 碱性磷酸酶标记的羊抗兔 IgG 为第二抗体, 进行蛋白质印迹检测.

利用 GM1-酶联免疫吸附 (ELISA) 方法, 测定加热和不加热的蛋白 CTB/CS3 与神经节苷脂 GM1 的结合能力, 以 CTB 作为阳性对照. 用每孔 100 μ l 含神经节苷脂 GM1 2 μ g 的碳酸盐缓冲液 (35 mmol/L NaHCO₃, 15 mmol/L Na₂CO₃) 包被 96 孔酶联板, 4 $^{\circ}$ C 过夜, PBST (含 0.1% Tween 的 PBS 溶液) 洗涤 3 次, 用 2% BSA 在 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h 后, 每孔加入含 12.5 ng 纯化的 CTB/CS3 或 CTB 蛋白, 37 $^{\circ}$ C 保温 2 h. 经 PBST 洗涤后, 加兔源抗 CT 抗体, 37 $^{\circ}$ C 保温 2 h. PBST 洗涤 3 次后, 加辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG, 37 $^{\circ}$ C 保温 1 h. 洗涤后加入 100 μ l 底物 (400 mg/L 邻苯二胺, 0.2% H₂O₂ 和 0.1 mol/L 磷酸-柠檬酸缓冲液, pH 5.0), 用等体积 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应, 测紫外 (490 nm) 吸光度值.

2.6 动物实验

重组抗原 CTB/CS3 免疫小鼠: 选用 6~8 周龄雌性 BALB/c 小鼠, 随机分成 3 组, 每组 5 只小鼠, 进行腹腔注射免疫. 融合蛋白 CTB/CS3 组, 每次每只注射含 25 μ g 融合蛋白 CTB/CS3 的 200 μ l PBS 溶液 (pH 7.4); 另一组注射 CTB 和 CS3 混合蛋白, 每次每只小鼠免疫含 CTB 蛋白和 CS3 蛋白各 12.5 μ g 的 200 μ l PBS 溶液 (pH 7.4); 对照组, 每次每只小鼠注射 200 μ l 的 PBS 溶液. 首次免疫时加等体积完全弗氏佐剂 (Sigma 公司), 加强免疫时改用不完全弗氏佐剂 (Sigma 公司). 隔周免疫, 共免疫 3 次. 末次免疫 10 天后, 分别收集每只小鼠的血清和粪便.

特异性抗体检测: 利用 ELISA 检测血清中抗 CS3 或抗 CTB 特异性 IgG 抗体和小鼠粪便中抗 CS3 或抗 CTB 特异性 sIgA 抗体. 用 100 μ l/孔 CS3 或 CTB (均为 1 mg/L) 的碳酸盐缓冲液 (35 mmol/L NaHCO₃, 15 mmol/L Na₂CO₃) 包被 96 孔微量滴定板, 4 $^{\circ}$ C 过夜. 加 2% BSA 在 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h 后, 加入 100 μ l 不同稀释倍数的小鼠血清或粪便样品, 以 PBS 组作为对照, 37 $^{\circ}$ C 保温 2 h. PBST 洗涤 3 次, 分别加入辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 或 IgA 37 $^{\circ}$ C 保温 1 h. 洗涤后加入 100 μ l 底物 (400 mg/L 邻苯二胺, 0.2% H₂O₂ 和

0.1 mol/L 磷酸-柠檬酸缓冲液, pH 5.0), 用等体积 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应, 测紫外 (490 nm) 吸光度值.

3 结 果

3.1 CS3 及 CTB 与 CS3 融合基因的构建和克隆

以 pMGD3 质粒为模板, 分别用引物 1 和引物 3、引物 2 和引物 3 进行 PCR 扩增, 得到 440 bp 左右的片段. 将这两种 PCR 产物分别克隆到 pGEM-T 载体上, 得到携带有 CS3 基因的 pGEM-CSa、pGEM-CSb; 同样, 利用引物 4 和引物 5, 获得 330 bp 左右 CTB 基因片段, 克隆到 pGEM-T 上, 命名为 pGEM-CTB. 经酶切和序列测序证明克隆的正确性.

在 pGEM-CSa 载体中, CS3 基因通过 PCR 在 5' 端引入了 *Bam*H I 酶切位点, 3' 端引入了 *Sal* I 酶切位点. 用 *Bam*H I 和 *Sal* I 酶切 pGEM-CSa, 获得 CS3 基因片段, 定向克隆到 pQE30, 命名为 pQE-CS3 (图 1a), 转化大肠杆菌 XLI-Blue, 挑选菌落. 在 pGEM-CSb 载体中, 利用引物引入的酶切位点 *Xba* I 和 *Sal* I, 双酶切回收 CS3 基因片段连接到 pGEM-CTB 的 CTB 基因下游的 *Xba* I 和 *Sal* I 切点间, CTB 与 CS3 两基因之间加入了一段编码铰链 (GPGP) 的 12 个核苷酸. 融合片段再用 *Bam*H I 和 *Sal* I 切出, 连接到 pQE30 载体上, 获得 pQE-CTB/CS3 (图 1b). 转化大肠杆菌 XLI-Blue, 用菌落 PCR 和酶切鉴定了重组质粒.

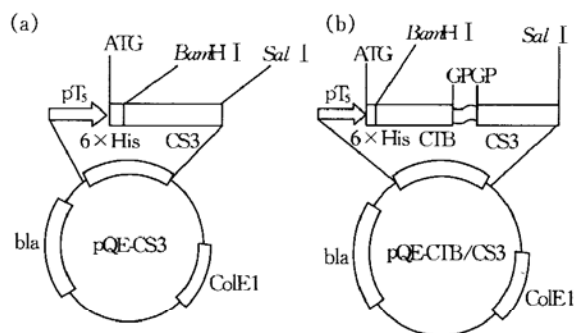


Fig 1 Maps of pQE-CS3 and pQE-CTB/CS3

pT₅: T₅ promoter; ATG: start codon; 6 × His: His tag sequence; ColE1: ColE1 origin of replication; bla: ampicillin resistance gene; CS3: CS3 coding sequence; CTB: CTB gene sequence; GPGP: coding sequence of the hinge peptide.

3.2 CTB/CS3 及 CS3 大肠杆菌中的诱导表达

带 6 × His 的 CTB/CS3 蛋白和 CS3 蛋白的分子

质量理论值分别是 28.9 ku 和 16.7 ku. pQE-CTB/CS3 和 pQE-CS3 在大肠杆菌 M15 诱导表达产物的大小经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析证实与预期结果一致. 表达产物以包涵体形式存在, 上清中未见表达 (图 2a, 图 3a).

3.3 表达产物的抗原性分析

获得的重组蛋白最重要的是需保持抗原性. 利用兔抗 CT 多克隆抗体和 CS3 单克隆抗体对融合蛋白 CTB/CS3 和蛋白 CS3 进行抗原性检测. 蛋白质印迹结果显示, pQE-CTB/CS3 在大肠杆菌 M15 诱导表达的条带, 与抗 CS3 和抗 CTB 的抗体均有特异性反应 (图 2b); pQE-CS3 在大肠杆菌 M15 诱导表达的蛋白质可与抗 CS3 的特异性抗体反应 (图 3b). 实验证明融合蛋白 CTB/CS3 具有 CTB 和 CS3 的双重抗原性, 含 pQE-CS3 在 M15 菌株中表达产物则具有 CS3 的抗原性.

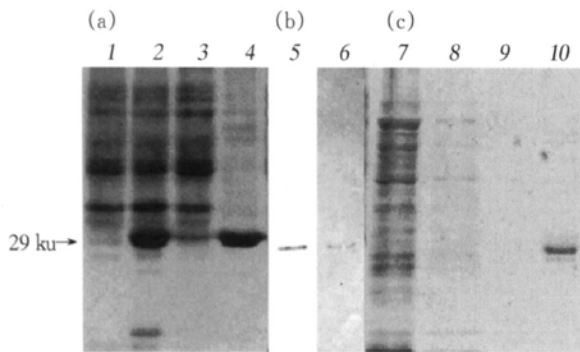


Fig 2 Expression and purification of *E. coli* - synthesized CTB/CS3 protein

(a) protein extracts of M15/pQE-CTB/CS3 analyzed by SDS-PAGE. 1: cell lysate of M15/pQE-CTB/CS3 before IPTG induction; 2: cell lysate of M15/pQE-CTB/CS3 induced by IPTG; 3: sonicate supernatant; 4: inclusion bodies; Proteins were visualized by Coomassie blue staining. (b) Western blot analysis. Cell lysate of M15/pQE-CTB/CS3 probed with anti-CT (5) and anti-CS3 antibody (6), respectively. (c) purification of expressed CTB/CS3 by Ni-NTA affinity chromatography. 7: the flow-through; 8, 9: wash fractions; 10: elute. Samples were analyzed by SDS-PAGE followed by Coomassie blue staining.

3.4 表达产物的纯化

提取包涵体, 用 2 mol/L 尿素洗涤去除部分杂蛋白, 获得较纯的包涵体以利于变性后过柱纯化.

由于不同蛋白质与镍柱的结合力不同, 因此在纯化 CTB/CS3 和 CS3 融合蛋白时, 对洗柱液的 pH 值进行了优化. 对于 CTB/CS3 蛋白, 在 pH 7.3 条件下, 没有目的蛋白被洗脱下来, 但当

pH 值再降低时, 有 CTB/CS3 洗脱下来; 而对于 CS3 蛋白, 在 pH 降低到 6.5 时, 也几乎不被洗脱; 因此, 在纯化 CTB/CS3 和 CS3 蛋白时, 洗柱液的 pH 值分别控制在 7.3 和 6.5. 经过柱纯化、透析复性、浓缩, 获得的蛋白质纯度达 90% 以上 (图 2c, 图 3c), 符合动物实验的要求.

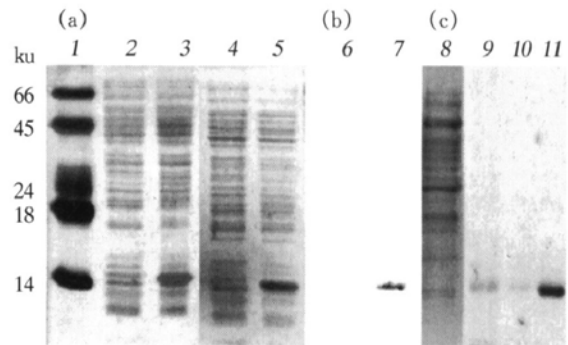


Fig 3 Expression and purification of *E. coli* - synthesized CS3 protein

(a) protein extracts of M15/pQE-CS3 analyzed by SDS-PAGE. 1: protein molecular mass marker; 2: from uninduced cells; 3: from induced cells; 4: sonicate supernatant; 5: inclusion bodies. Proteins were visualized by Silver staining. (b) Western blot analysis probed with the anti-CS3 antibody. 6: cell lysate of M15/pQE-CS3 before IPTG induction; 7: cell lysate of M15/pQE-CS3 induced by IPTG; (c) purification of urea-solubilized CS3 by Ni-NTA affinity column chromatography. 8: the flow-through; 9, 10: wash fractions; 11: the elute with elution buffer. Samples were analyzed by SDS-PAGE followed by Coomassie blue staining.

3.5 CTB/CS3 五聚体的形成和与 GM1 结合能力

CTB 的载体功能是因为其形成的五聚体具有与神经节苷脂 GM1 的结合能力, 而在热变性条件下, 可使五聚体解聚而丧失与 GM1 的结合能力. 因此, 鉴定融合蛋白 CTB/CS3 是否能形成五聚体, 并保留了与 GM1 结合能力是很必要的. 蛋白质印迹分析表明, 未加热的融合蛋白 CTB/CS3 有一部分可以形成五聚体 (图 4a4), 而加热后五聚体全部丧失 (图 4a3); GM1-ELISA 分析表明, 融合蛋白 CTB/CS3 保留了部分与 GM1 结合活性, 而同一浓度的样品在经过加热处理后, 其与 GM1 结合能力几乎丧失 (图 4b), 这与热处理使 CTB/CS3 五聚体解聚的结果一致. 作为阳性对照, 未加热的 CTB 蛋白可以形成五聚体 (图 4a2), 加热后的蛋白质只以单体形式存在 (图 4a1), 其与 GM1 的结合能力也几乎完全丧失 (图 4b).

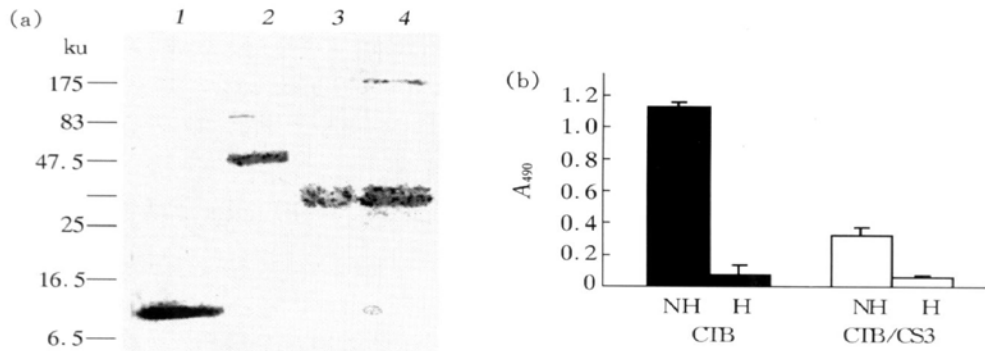


Fig. 4 Aggregation and GM1-binding ability of *E. coli*-expressed CTB/CS3 protein and native CTB protein

(a) comparison of CTB/CS3 and CTB with or without boiled by Western blot analysis. 1: CTB (boiled); 2: CTB (unboiled); 3: CTB/CS3 (boiled); 4: CTB/CS3 (unboiled). (b) GM1-ELISA assay of CTB and CTB/CS3 with or without boiled (H and NH). CTB and CTB/CS3 (each at 12.5 ng/well) were used in the assay. Data represent $\bar{x} \pm s$ ($n = 2$) for each treatment.

3.6 CTB/CS3 的免疫原性

将融合蛋白 CTB/CS3 免疫小鼠，同时以 CTB 和 CS3 的混合蛋白及 PBS 免疫小鼠作为对照。图 5 结果表明，融合蛋白 CTB/CS3 可以激起小鼠的免疫反应，产生特异的抗 CTB 和抗 CS3 的高滴度 IgG 抗体，PBS 对照组小鼠检测不到抗 CTB 和

CS3 蛋白的特异性抗体。另外，与 CTB 和 CS3 混合蛋白组比较，可以看到对于抗 CS3 特异性 IgG 抗体，融合蛋白 CTB/CS3 组高于 CTB 和 CS3 混合蛋白组 (图 5a)。对于抗 CTB 的 IgG 抗体，融合蛋白 CTB/CS3 组激起的 IgG 抗体与 CTB 和 CS3 混合蛋白组相近 (图 5b)。同时，测定了收集的粪

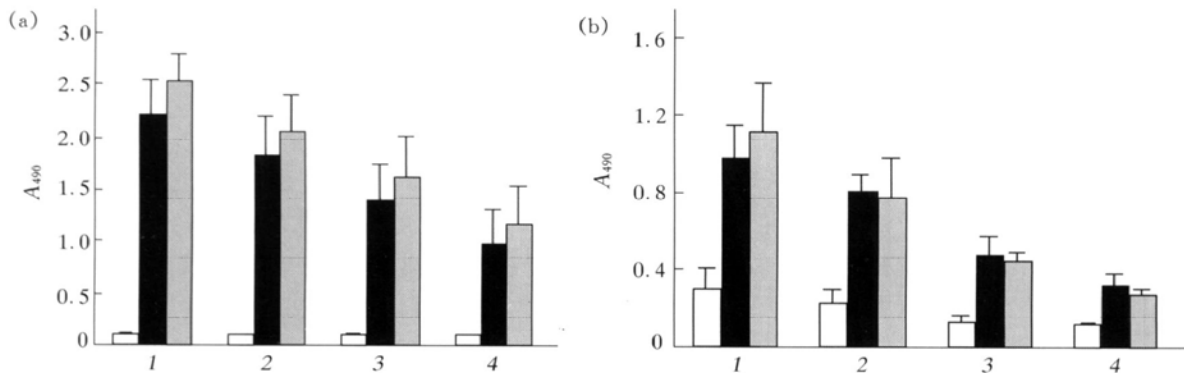


Fig. 5 Detection of serum IgG against CS3 (a) and CTB (b) in immunized mice

The immunogenicity of CTB/CS3 protein was tested in BALB/c mice. Mice injected with PBS were used as a control. Antibody responses were assessed by ELISA assays with purified CS3 or CTB as the capture antigen. Data represent $\bar{x} \pm s$ ($n = 5$) for each group of mice at various dilutions of serum samples. □: PBS; ■: CTB+CS3; ▨: CTB/CS3. 1: 1:2000; 2: 1:4000; 3: 1:8000; 4: 1:16000.

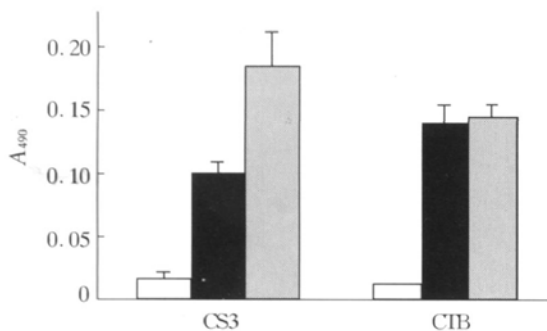


Fig. 6 Detection of sIgA against CS3 and CTB in feces from immunized mice

Data represent $\bar{x} \pm s$ for each material ($n = 5$). □: PBS; ■: CTB+CS3; ▨: CTB/CS3.

便中 sIgA。ELISA 分析结果表明，融合蛋白 CTB/CS3 组小鼠中存在一定量的抗 CS3 和 CTB 的 sIgA，特异性抗 CS3 的 sIgA 抗体高于 CTB 和 CS3 混合蛋白组，同系统免疫中 IgG 一样，特异性 CTB 的 sIgA 抗体与 CTB 和 CS3 混合蛋白组相近 (图 6)。

4 讨 论

CTB 载体功能的应用多集中在与小肽和抗原决定簇的融合，而对于融合大分子质量蛋白的研究

较少。1993年, Jagusztyn-Krynicka等^[8]报道了在LTB的C端融合大于100 ku蛋白, 融合蛋白依然保持与GM1的结合能力。Liljeqvist等^[9](1997年)系统地比较了CTB蛋白的N端、C端及两端融合大分子质量蛋白后, 分析融合对CTB蛋白与GM1结合能力的影响, 他们认为C端融合对于CTB蛋白保留GM1结合能力, 优于N端融合。但是在这些报道中, 他们未对融合蛋白的免疫原性和CTB免疫载体功能进行分析。

本实验首次将肠毒素大肠杆菌定居因子CS3蛋白融合到CTB蛋白的C端, 利用大肠杆菌表达CTB与CS3融合蛋白, 分析检测融合蛋白CTB/CS3与神经节苷脂GM1结合能力和免疫原性。我们参考Lipscombe等^[10](1991年)的方法, 将两个蛋白质以GPGP的铰链相连, 这样可以相对减少两者之间的相互干扰, 帮助分子正确的折叠。IPTG诱导表达后, 蛋白质印迹检测显示, 融合蛋白保留了CTB和CS3的抗原性。为了便于纯化, 在CTB蛋白的N端引入了6×His, 利用Ni-NTA亲和层析一步纯化, 获得重组蛋白, 利用这种方法可以避免神经节苷脂亲和层析纯化过程的低pH洗脱步骤(pH 3.0), 这种极端条件会对CTB融合蛋白的结构造成破坏。

复性后融合蛋白CTB/CS3的蛋白质印迹检测和GM1-ELISA实验表明, 融合蛋白CTB/CS3可以形成五聚体并保留了与GM1结合的能力, 但是其五聚体的形成比例和与GM1结合能力低于CTB蛋白。一方面, 可能是因为CTB蛋白N端在引入6×His时, 增加了包括载体序列在内的12个氨基酸。曾经有文献报道过在CTB蛋白N端引入氨基酸, 降低或丧失了GM1结合能力^[11]。Backstrom等^[12](1997年)认为CTB蛋白与GM1结合时, CTB蛋白N端更接近GM1结合位点, 对与GM1结合能力而言, CTB蛋白N端序列比C端序列更重要。另一方面, 也可能是由于融合的CS3蛋白较大, 因此在蛋白质的折叠上可能会影响到CTB的构象, 使融合蛋白与GM1的结合能力下降。

动物实验结果显示, 融合蛋白CTB/CS3具有CTB和CS3的双重免疫原性。与CTB和CS3混合免疫小鼠组比较, CTB作为增强免疫的载体, 提高了CS3激发机体系统免疫的能力。由于ETEC感染起始于粘膜, 阻断粘膜表面感染具有重要的意义。sIgA是粘膜表面主要和特有的抗体, 它可以有效阻止病原菌的粘附和入侵。因此, sIgA的分

泌是粘膜免疫反应的重要指标。融合蛋白CTB/CS3免疫小鼠后, 采集的粪便中可以检测到分别针对CTB和CS3的特异性sIgA。产生特异性抗CS3的sIgA高于CTB和CS3混合免疫小鼠组。结果表明, CTB作为粘膜免疫载体有效地提高了CS3激发粘膜免疫反应的能力。如果优化融合策略, 例如在保留免疫原性的条件下使用截短的CS3蛋白, 增加较长的铰链减少两者的空间干扰等, 有可能提高融合蛋白与GM1的结合能力, 更加充分发挥CTB的免疫载体功能。

本实验构建了CTB/CS3融合基因原核表达载体, 不仅利用CTB代替LTB作为疫苗中抗细菌毒素的有效组分, 并且利用CTB免疫载体的功能提高了CS3的免疫效力。本实验为进一步研制ETEC亚单位双价疫苗奠定了基础; 同时, 我们的实验也证明CTB融合较大的蛋白质也可以提高靶抗原的免疫原性。

参 考 文 献

- 1 Gastra W, Svennerholm A M. Colonization factors of human enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). *Trends in Microbiol*, 1996, **4** (11): 444~ 452
- 2 WHO. New frontiers in the development of vaccines against enterotoxigenic (ETEC) and enterohaemorrhagic (EHEC) *E. coli* infections. *Weekly Epidemiological Record*. 1999, (3): 98~ 101
- 3 Qadri F, Wenneras C, Ahmed F, et al. Safety and immunogenicity of an oral, inactivated enterotoxigenic *Escherichia coli* plus cholera toxin B subunit vaccine in Bangladeshi adults and children. *Vaccine*, 2000, **18** (24): 2704~ 2712
- 4 Sanchez J, Johansson S, Lowenadler B, et al. Recombinant cholera toxin B subunit and gene fusion proteins for oral vaccination. *Res Microbiol*, 1990, **141** (8~ 9): 971~ 979
- 5 Shi C H, Cao C, Zhig J S, et al. Gene fusion of cholera toxin B subunit and HBV PreS2 epitope and the antigenicity of fusion protein. *Vaccine*, 1995, **13** (10): 933~ 937
- 6 董自正, 张兆山, 李淑琴, 等. 人源肠毒素大肠杆菌CS3纤毛基因的克隆及表达. *中华微生物和免疫学杂志*, 1994, **14** (2): 84~ 88
- 7 Dong Z Z, Zhang Z S, Li S Q, et al. *Chin J Micr Immun*, 1994, **14** (2): 84~ 88
- 7 Sambrook J, Russell D W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3th. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 34~ 69
- 8 Jagusztyn-Krynicka E K, Clark-Curtiss J E, Curtiss R 3rd. *Escherichia coli* heat-labile toxin subunit B fusions with *Streptococcus sobrinus* antigens expressed by *Salmonella typhimurium* oral vaccine strains: importance of the linker for antigenicity and biological activities of the hybrid proteins. *Infect Immun*, 1993, **61** (3): 1004~ 1015
- 9 Liljeqvist S, Stahl S, Andreoni C, et al. Fusions to the cholera toxin B subunit: influence on pentamerization and GM1 binding. *J Immun Meth*, 1997, **210** (2): 125~ 135
- 10 Lipscombe M, Charles G I, Roberts M, et al. Intranasal

- immunization using the B subunit of the *Escherichia coli* heat-labile toxin fused to an epitope of the *Bordetella pertussis* P. 69 antigen. *Mol Microbiol*, 1991, **5** (6) : 1385~ 1392
- 11 Dertabaugh M T, Elson C O. Reduction in oral immunogenicity of cholera toxin B subunit by N-terminal peptide addition. *Infect Immun*, 1993, **61** (2) : 384~ 390
- 12 Backstrom M, Shahabi V, Johansson S, *et al.* Structural basis for differential receptor-binding of cholera and *Escherichia coli* heat-labile toxins: influence of heterologous amino acid substitutions in the cholera B subunit. *Mol Microbiol*, 1997, **24** (3) : 489~ 497

GM1-binding Ability and Immunogenicity of CTB / CS3 Fusion Protein Expressed in *E. coli**

MI Kai-Xia¹⁾, LI Ji²⁾, ZHANG Zhao-Shan²⁾, FANG Rong-Xiang^{1)**}

¹⁾Laboratory of Plant Biotechnology, Institute of Microbiology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China;

²⁾Beijing Institute of Biotechnology, Beijing 100071, China)

Abstract Enterotoxigenic *Escherichia coli* (EPEC) is a major pathogen that evokes acute diarrhea among children worldwide and travelers to developing countries. However, there is no ideal vaccine against it yet. In an effort to develop a subunit vaccine for EPEC, a translational fusion with cholera toxin B subunit (CTB) upstream of CS3 was constructed. The fusion protein synthesized in *E. coli* had a molecular mass of 29 ku, as expected and retained the antigenicity of both CTB and CS3 as confirmed by Western blot analysis with the polyclonal anti-CTX rabbit serum and the monoclonal anti-CS3 mouse serum, respectively. The 6 × His-tagged CTB/CS3 protein was purified by Ni-NTA affinity chromatography followed by renaturation. A fraction of the fusion protein could form pentamers and these pentamers retained the ability to bind GM1-ganglioside. Mice immunized by intraperitoneal injection with the fusion protein produced anti-CTB and anti-CS3 serum IgG and secretory IgA. Furthermore, it was shown that fusion to CTB increased the systemic and mucosal immune responses against CS3 to some extent.

Key words EPEC, CTB, coli surface antigen 3 (CS3), GM1, immunogenicity, subunit vaccine

* This work was supported by a grant from The State 863 High Technology R&D Project of China (2002AA206611).

** Corresponding author. Tel: 86-10-62548243, E-mail: fangrx@sun.im.ac.cn

Received: October 21, 2002 Accepted: November 25, 2002