

肠毒素大肠杆菌定居因子 CS6 抗原基因 在痢疾杆菌中的表达*

罗 刚²⁾ 李淑琴¹⁾ 王令春¹⁾ 赵 莹²⁾ 郑继平¹⁾ 段海清¹⁾ 张兆山¹⁾**

(¹⁾北京生物工程研究所, 北京 100071; ²⁾吉林大学生命科学学院, 长春 130023)

摘要 通过体外重组的方法, 将 *asd* 基因插入重组表达质粒, 使抗生素抗性失活, 并与弗氏志贺氏菌 FWL01 构成宿主-载体平衡致死系统. 通过蛋白质印迹结果表明, 在没有抗生素条件选择的情况下, 可稳定表达肠毒素大肠杆菌定居因子抗原 CS6. 重组菌通过口服和鼻饲免疫小鼠后, 可以诱生 CS6 血清 IgG 抗体; 同时可以检测到分泌型 IgA 产生, 表明重组菌可以诱导相应的黏膜免疫反应.

关键词 肠毒素大肠杆菌, CS6, 痢疾杆菌, 宿主-载体平衡致死系统, 活载体疫苗

学科分类号 R378. 21, Q786

据统计, 全球年腹泻病人达 30 亿左右, 我国年发病约 8 亿人次, 死亡率达 $2/10^5$, 严重影响人的健康和婴幼儿发育. 肠毒素大肠杆菌 (enterotoxigenic *Escherichia coli*, ETEC) 是细菌性腹泻的主要病原菌之一, 主要引起婴儿和旅游者腹泻. 根据 WHO 报告, 发展中国家腹泻者中由 ETEC 引起的约占 20%, 而在发达国家到发展中国家旅游者腹泻中由 ETEC 引起的约占 60% ~ 70%, 在特种灾害 (如地震、战争等) 时, 则绝大多数腹泻均由此引起^[1~3]. 由于抗药菌株的扩散, 特别是耐药菌株的不断出现, 构建有效的细菌性腹泻疫苗加强免疫预防日显重要. 研究表明, 肠毒素大肠杆菌 ETEC 菌毛抗原的相应抗体, 可以阻止相应的 ETEC 野生株在肠道的定居作用, 保护机体免受该菌的侵袭, 是主要的保护性抗原, 是制备 ETEC 疫苗的重要抗原成分^[4,5]. 然而, 灭活菌苗和纯化的纤毛抗原不能有效激发机体的免疫反应, 而载体活疫苗可以有效地诱导机体产生体液、细胞和粘膜免疫保护, 并且副反应小、成本低廉、应用前景广泛^[6]. 以减毒的伤寒沙门氏菌、痢疾志贺氏菌等肠道病原菌作为载体菌来表达外源抗原, 从而诱导产生针对数种病原体的多重免疫应答, 可以起到一苗多价的作用, 对于细菌性腹泻的预防很有意义. 本实验以 *asd* 基因缺失的减毒弗氏志贺氏菌 FWL01 为宿主, 利用宿主-载体平衡致死系统表达 ETEC 的定居因子抗原 CS6, 研究其免疫效果, 以期构建针对 ETEC 和痢疾杆菌的双价疫苗.

1 材料方法

1.1 材料

1.1.1 细菌菌株及质粒: 见表 1.

Table 1 Bacteria and plasmid used in this research		
Strains and plasmids	Characteristics	Source
<i>E. coli</i>		
E519/66 A	CS6 ⁺ , LT ST	Prof. Svennerhom
JM109		Authors' laboratory
<i>S. flexneri</i>		
FWL01	<i>asd</i> ⁻	Dr. Wang H L ^[7]
Plasmids		
pASD21	<i>asd</i> ⁺	Dr. Wang H L ^[8]
pMG235	CS6 ⁺ , Amp ⁺	Authors' laboratory
PZLG6	CS6 ⁺	This study

1.1.2 试剂: 限制性内切酶、修饰酶, T4DNA 连接酶均购自 TaKaRa 公司, 二氨基庚二酸 (DAP) 购自 Promega 公司, 其他试剂均为分析纯.

1.1.3 培养基: LB 液体和固体培养基按常规方法配制, 用时根据需要加入氨苄青霉素或 DAP 至终浓

* 国家高技术“863”计划 (2001AA215211) 和全军科研基金重点课题资助项目 (01Z026).

** 通讯联系人.

Tel: 010-63834140, Fax: 010-63833521

E-mail: Zhangzs@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2003-06-24, 接受日期: 2003-07-31

度 50 mg/L. CFA 固体培养基: 水解酪蛋白 10 g/L, 酵母粉 1.5 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g/L, MnCl_2 0.005 g/L, 调节 pH 值到 7.4, 添加 2% 琼脂粉.

1.1.4 抗体: HP 标记的羊抗鼠 IgA 和 HP 标记的羊抗鼠 IgG, 购自 Gibco BRL 公司. 免疫荧光 (FITC) 标记的羊抗鼠 IgG 购自北京中山生物技术公司.

1.1.5 CS6 纯化抗原抗 CS6 多克隆抗体: 由本室制备 (另文发表).

1.1.6 实验动物: 由军事医学科学院动物中心提供.

1.2 方法

1.2.1 质粒的提取和 DNA 片段的回收: 按 Promega 公司和上海华舜片段回收试剂盒说明书操作.

1.2.2 CS6 蛋白粗提物的制备: 用 PBS 洗脱 CFA 琼脂平板上的菌体, 3 000 g 离心 10 min, 用 PBS 洗两遍, 重悬于和菌体等体积的 PBS 中, 使菌体悬浮, 60℃ 水浴 30 min, 振荡约 30 min, 12 000 g 离心 20 min, 取上清液备用^[9].

1.2.3 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 和蛋白质印迹: 依据《分子克隆实验手册》方法进行^[10].

1.2.4 动物实验: 选用 6~8 周龄雌性 Balb/c 小鼠作为实验动物进行免疫实验, 收获在 CFA 平板上培养 18~20 h 的细菌, 用灭菌的生理盐水或者 PBS 洗 3 遍并重悬, 采用光密度法测定细菌数量. 每组 6 只, 分别以口服和鼻饲两种途径免疫. 口服免疫组, 过夜禁食后, 用饱和 100 μl NaHCO_3 灌饲小鼠, 20 min 后, 灌饲 200 μl FWL01 (pZLG6) 活菌 (2×10^9 cfu). 鼻饲免疫组, 鼻饲 20 μl FWL01 (pZLG6) 活菌 (2×10^8 cfu). 隔周免疫共 3 次. 每次免疫前和最后一次免疫后 14 天眼眶采血制备血清, 以免疫前小鼠的血清作为阴性对照.

1.2.5 sIgA 样本的制备: 取免疫前后小鼠的新鲜粪便, 每克悬浮于 4 ml 含有 0.05 mol/L EDTA 的 PBS 溶液中. 室温放置 15 min, 且不时振荡, 4℃ 8 000 g 离心 5 min. 取上清液, 于 -20℃ 冻存待用. 将小鼠处死后取小肠用 PBS 冲洗肠壁, 收集肠液储存于 -20℃ 备用.

1.2.6 酶联免疫吸附检测 (ELISA): 检测血清抗体和分泌型 IgA 抗体, 按文献 [11] 方法进行.

1.2.7 免疫荧光显微镜观察^[12, 13]: 收获重组菌并用 PBS 洗两遍, 重悬于 100 μl 含 1% BSA 的 PBS 中, 37℃ 温育 30 min. 5 000 r/min 离心 1 min, 弃

上清, 细菌重悬于 100 μl 适度稀释的抗 CS6 多克隆抗体中, 37℃ 温育 1 h, 用 PBS 洗三遍. 重悬于 100 μl 适度稀释的 FITC 标记的羊抗小鼠 IgG 中, 37℃ 温育 30 min. 同上洗三遍, 在荧光显微镜下观察并拍照.

2 结 果

2.1 重组菌株 FWL01 (pZLG6) 的构建

pASD21 是由 pUC19 和含有 *asd* 基因的一段 DNA 重组而成, 可以和 *asd* 基因缺失或失活的宿主形成互补, 从而可以使宿主在基本培养基上生长^[14]. pMG235 由于其含有氨苄抗性基因, 限制了其作为疫苗应用于人体的可能. 可考虑利用 *asd* 基因使氨苄抗性基因插入失活. 用 *Bam*H I 对 pASD21 进行酶切, 回收 1.7 kb 的含有 *asd* 基因的片段, 用 *Pvu* I 对 pMG235 进行单酶切, 回收其酶切片段. 用 T4DNA 聚合酶分别对回收片段补平后, 用 T4DNA 连接酶将两个片段进行连接, 电击转化 FWL01 (宿主菌 FWL01 是有弗氏志贺氏菌 T32 缺失 *asd* 基因衍生而来, T32 是被 WHO 推荐的一种安全有效的减毒口服疫苗^[15]), 涂布在 LB 平板上, 通过挑取的转化子单菌落进行 PCR, 可分别得到对应于 *asd* 基因的 1.7 kb 和对应于 CS6 基因的 3.1 kb 大小的片段. 通过质粒提取, 得到重组质粒 pZLG6 (图 1). 经检测, 转化子失去在氨苄青

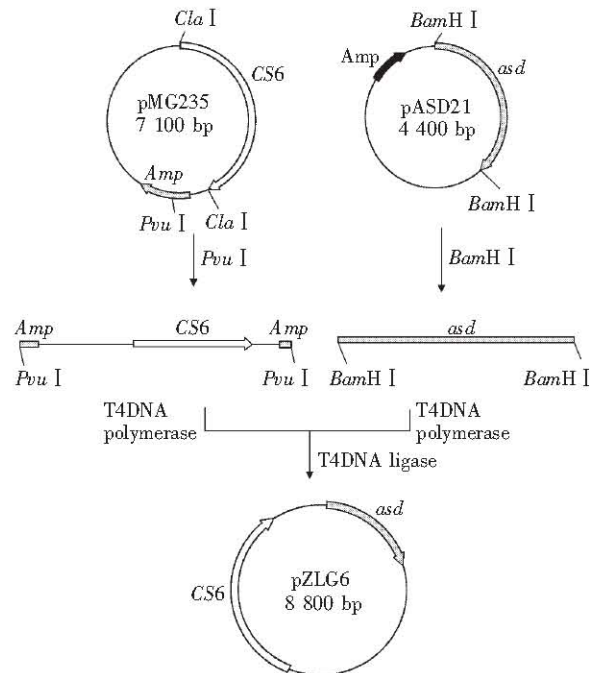


Fig. 1 Construction of the plasmid pZLG6

霉菌平板上的生长能力, 由此证明我们构建的重组菌株已不含抗生素抗性, 并且质粒与宿主在功能上可以很好地互补.

2.2 重组蛋白粗提物电泳和蛋白质印迹

热脱毛法收集 CS6 蛋白粗提物, 用硫酸铵法分级沉淀后, 以 15% 的分离胶进行 SDS-PAGE, 用考马斯亮蓝 (G-250) 染色 (图 2a). 结果显示, 构建的重组菌株 FWL01/pZLG6 在硫酸铵浓度 30% ~ 50% 之间所沉淀的组分均有两条明显的蛋白质带, 分子质量大小在 14 ~ 16.9 ku 之间, 与文献报道一致^[16]. SDS-PAGE 分离后, 转移至硝酸纤维素膜上, 以抗 CS6 多克隆抗体为一抗进行蛋白质印迹. 蛋白质印迹结果显示, 重组菌株 FWL01/pZLG6 产生的 CS6 抗原蛋白可以和抗 CS6 多克隆抗体结合 (图 2b).

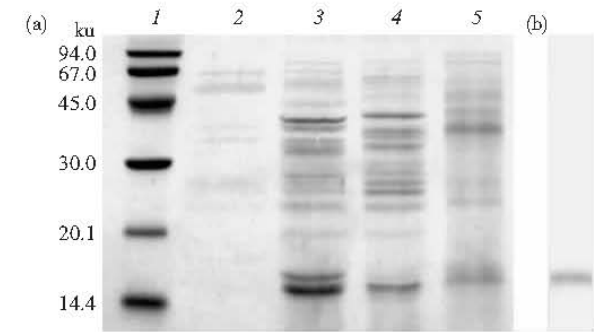


Fig. 2 SDS-PAGE and Western blot analysis of CS6 expressed in FWL01/pZLG6
(a) SDS-PAGE. 1: protein maker; 2: negative control of FWL01; 3: sample of FWL01/pZLG6; 4: sample of Jm109/pMg235; 5: positive control of E519/66A; (b) CS6 detected by Western blotting (FWL01/pZLG6).

2.3 重组菌株的免疫荧光检测结果

收获重组菌并用 PBS 洗两遍, 按材料和方法所述, 用抗 CS6 多克隆抗体进行免疫荧光检测, 结果如图 3 所示. 重组菌表面着染有荧光, 而阴性对照菌则看不到荧光着染, 表明重组蛋白是在重组菌表面表达, 并能够为抗 CS6 抗体所识别.

2.4 重组菌的动物免疫

ELISA 检测结果表明, 重组菌以口服和鼻饲的免疫方式均可以刺激机体血清中产生针对 CS6 抗原的特异性血清 IgG 抗体. 免疫之前实验小鼠的血清无特异性抗体的产生, 经过加强免疫之后, 抗体的滴度显著增加, 表明 FWL01 是良好的抗原载体, 可以把表达的外源抗原呈递到机体的免疫系统. 所

以表达的异源抗原仍保持良好的免疫原性 (图 4). 而且可以检测到针对载体菌 LPS 的特异性抗体 (结果未列出). 通过检测免疫小鼠粪便和肠液中的 sIgA, 结果证明口服和鼻饲都能产生明显的特异性分泌型 IgA (表 2, 3), 说明重组菌可以有效地刺激机体的粘膜免疫, 这对于大肠杆菌、痢疾志贺氏菌等肠道病原菌的预防来说有重要意义.

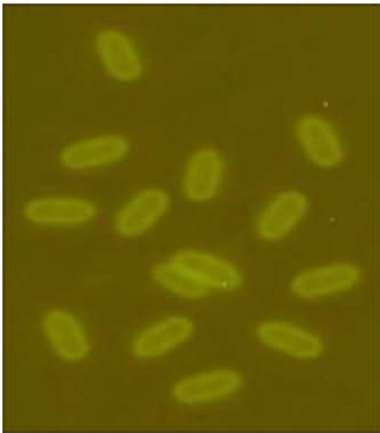


Fig. 3 Immunofluorescence analysis of the recombinant strain FWL01 (pZLG6)

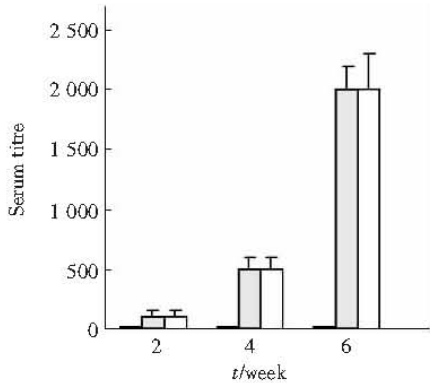


Fig.4 Titre of antibodies raised against CS6 immunized by oral route and nasal route with FWL01 (pZLG6) in mice
■:Fw101; □:Anti-CS6(oral); ▒:Anti-CS6(nasal).

Table 2 ELISA detection of sIgA in mice immunized by oral route (A_{492})

Antibody	Intestinal	Fecal
Blank	0.00	0.00
Negative control	0.04 ± 0.01	0.03 ± 0.01
Anti-CS6	0.87 ± 0.03	0.63 ± 0.03

Table 3 ELISA detection of sIgA in mice immunized by nasal route (A_{492})

Antibody	Intestinal	Fecal
Blank	0.00	0.00
Negative control	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.01
Anti-CS6	0.91 ± 0.07	0.76 ± 0.08

3 讨 论

人源肠毒素大肠杆菌是细菌性腹泻的重要病源体, 全世界每年因感染 ETEC 而腹泻的患者超过 10 亿人次, 有近 100 万儿童因 ETEC 腹泻而夭折. 利用抗生素, 以及临床采用补液、补电解质和营养补给的手段, 可以有效地控制细菌性腹泻的危害. 但是, 由于细菌抗药性业已成为临床上一个日益严峻的问题, 以及在战争和自然灾害时由于水源和食品的污染而容易引起腹泻的大规模爆发流行, 免疫预防就显得十分重要. 然而, 尽管 ETEC 疫苗的研制已有 20 余年的历史, 至今还没有一种可应用于人体. 早期的纯化菌毛抗原或类毒素疫苗免疫效果不理想. 目前正在进行的临床实验的福尔马林灭活全菌与霍乱毒素 B 亚基疫苗安全而且有一定的免疫保护效果, 但对 ETEC 疫苗免疫接种的主要目标人群——婴幼儿免疫效果不理想^[17]. 以生物性降解微球体包被菌毛抗原, 可免遭胃酸破坏, 适合口服途径免疫, 免疫动物效果比较理想, 但在志愿者实验中仅显示了一定的免疫保护效果^[18]. 有研究者用聚丙交酯和乙交酯微球体包被 CS6 菌毛抗原 (CS6-PLG) 采用鼻腔途径免疫小鼠, 再次证明聚酯类微球作为疫苗的缓释投递系统, 能显著提高抗原的免疫效果, 不仅能诱发体液免疫应答, 也能激发黏膜免疫应答^[19]. 目前, 载体疫苗日益受到特别关注, 载体联合疫苗是将所需的编码病原体免疫原遗传物质转入减毒的活细菌或病毒载体使之表达^[20]. 活菌除了介导细胞免疫外, 还能有效地激发体液和黏膜免疫应答. 本研究所采用的痢疾弗氏志贺氏菌和人源 ETEC, 是引起旅游者腹泻和婴幼儿腹泻两种最常见的细菌性腹泻的两种致病菌. FWL01 来源于弗氏志贺氏菌 T32, T32 是被 WHO 推荐的一种安全有效的减毒口服疫苗, 以减毒的弗氏志贺氏菌 FWL01 为宿主, 利用宿主-载体平衡致死系统, 表达人源肠毒素大肠杆菌优势血清型定居因子, 以期构建细菌性腹泻多价疫苗候选株, 对于预防这两种病原菌产生的腹泻是很有意义的.

我们实验室曾利用该系统构建了表达 ETEC 其他菌毛抗原 (如 CFA/I、CS3) 的疫苗候选株, 动物免疫结果表明重组菌株有良好的免疫效果^[21, 22]. 本研究构建的载体疫苗候选株表达的 CS6 是另一类优势血清型定居因子抗原. 通过实验表明, CS6 抗原基因不但可在大肠杆菌中很好的表达, 而且也可在痢疾杆菌中很好的表达. 通过口服和鼻饲两种途径对小鼠进行免疫, 结果表明都可以刺激机体产生相应的体液免疫和粘膜免疫应答. 综上所述, 痢疾杆菌疫苗株作为表达肠毒素大肠杆菌抗原的载体是可行的, 为进一步研制高效的细菌性腹泻多价疫苗打下了基础.

参 考 文 献

- 1 Levine M M. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. J Infect Dis, 1987, **155** (3): 377 ~ 389
- 2 Ralph A, Giannella M D. Pathogenesis of acute bacterial diarrheal disorders. Ann rev med, 1981, **32**: 341 ~ 357
- 3 Snyder J D, Merson M H. The magnitude of the global problem of acute diarrheal disease: a review of active surveillance data. Bull W H O, **60** (4): 605 ~ 613
- 4 Black R E. Epidemiology of diarrhoeal disease: implications for control by vaccines. Vaccine, 1993, **11** (2): 100 ~ 106
- 5 Kunkel S L, Robertson D C. Purification and chemical characterization of the heat-labile enterotoxin produced by enterotoxigenic *Escherichia coli*. Infect-Immun, 1979, **25** (2): 586 ~ 596
- 6 Autenrieth I B, Schmidt M A. Bacterial interplay at intestinal mucosal surfaces: implications for vaccine development. Trends Microbiol, 2000, **8** (10): 457 ~ 466
- 7 王恒樑, 冯尔玲, 林 云, 等. 痢疾福氏 2a asd 基因的克隆及其序列分析. 微生物学免疫学进展, 2000, **28** (1): 15 ~ 19
Wang H L, Feng E L, Lin Y, et al. Prog Microbiol Immunol, 2000, **28** (1): 15 ~ 19
- 8 王恒樑, 冯尔玲, 林 云, 等. 弗氏志贺氏菌株基因缺失突变体的构建. 军事医学科学院院刊, 2000, **24** (2): 81 ~ 87
Wang H L, Feng E L, Lin Y, et al. Bull Acad Mil Med Sci, 2000, **24** (2): 81 ~ 87
- 9 Evans D G, Evans D J Jr, Tjoa W S, et al. Detection and characterization of colonization factor of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from adults with diarrhea. Infect-Immun, 1978, **19** (2): 727 ~ 736
- 10 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 880 ~ 886
- 11 Ahren C, Wenneras C, Holmgren J, et al. Intestinal antibody response after oral immunization with a prototype cholera B subunit-colonization factor antigen enterotoxigenic *Escherichia coli* vaccine. Vaccine, 1993, **11** (9): 929 ~ 934
- 12 Francisco J A, Campbell R, Iverson B L, et al. Production and fluorescence-activated cell sorting of *Escherichia coli* expressing a functional antibody fragment on the external surface. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, **90** (22): 10444 ~ 10448
- 13 Schorr J, Knapp B, Hundt E, et al. Surface expression of malarial antigens in *Salmonella typhimurium*: induction of serum antibody

- response upon oral vaccination of mice. *Vaccine*, 1991, **9** (7): 675 ~ 681
- 14 Husband A J. Novel vaccination strategies for the control of mucosal infection. *Vaccine*, 1993, **11** (2): 107 ~ 712
 - 15 Orr N, Robin G, Cohen D, *et al.* Immunogenicity and efficacy of oral or intranasal *Shigella flexneri* 2a and *Shigella sonnei* proteosome-lipopolysaccharide vaccines in animal models. *Infect Immun*, 1993, **61** (6): 2390 ~ 2395
 - 16 杨晓, 张兆山, 刘纯杰, 等. 表达毒素源性大肠杆菌定居因子抗原 CS6 的一组基因的克隆. *微生物学报*, 1995, **35** (5): 390 ~ 393
Yang X, Zhang Z S, Liu C J, *et al.* *Acta Microbiologica Sinica*, 1995, **35** (5): 390 ~ 393
 - 17 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
 - 18 Brayden D J. Oral vaccination in man using antigens in particles: current status. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2001, **14** (3): 183 ~ 189
 - 19 Lorimier A J de, Byrd W, Hall E R, *et al.* Murine antibody response to intranasally administered enterotoxigenic *Escherichia coli* colonization factor CS6. *Vaccine*, 2003, **21**: 2548 ~ 2555
 - 20 李忠明. 当代新疫苗. 北京: 高等教育出版社, 2001. 400 ~ 401
Li Z M. A New Generation of Vaccine. Beijing, Higher Education Press, 2001. 400 ~ 401
 - 21 张波, 李淑琴, 陈冠军, 等. 肠毒素大肠杆菌定居因子抗原基因 CFA-1 在痢疾杆菌中的表达. *生物化学与生物物理学报*, 2001, **33** (3): 277 ~ 280
Zhang B, Li S Q, Chen G J, *et al.* *Acta Biochim Biophys Sin*, 2001, **33** (3): 277 ~ 280
 - 22 刘陶陶, 李淑琴, 张兆山, 等. 肠毒素大肠杆菌 CS3 定居因子抗原和融合肠毒素基因在减毒痢疾杆菌中的共表达. *生物化学与生物物理学报*, 2003, **35** (1): 49 ~ 54
Liu T T, Li S Q, Zhang Z S, *et al.* *Acta Biochim Biophys Sin*, 2003, **35** (1): 49 ~ 54

Expressing CS6 of Enterotoxigenic *Escherichia coli* by Attenuated *Shigella flexneri* 2a *

LUO Gang²⁾, LI Shu-Qin¹⁾, WANG Ling-Chun¹⁾, ZHAO Ying²⁾,
ZHENG Ji-Ping¹⁾, DUAN Hai-Qing¹⁾, ZHANG Zhao-Shan¹⁾ **

(¹⁾ Beijing Institute of Biotechnology, Beijing 100071, China; ²⁾ College of Life Science, Jilin University, Changchun 130023, China)

Abstract A host-plasmid lethal balancing system was constructed based on *asd* gene in an avirulent strain of *S. flexneri* to express coli surface antigen 6 of enterotoxigenic *Escherichia coli*. The results of Western-blotting demonstrated that avirulent strain of *S. flexneri* FWL01 expressed CS6 steadily. Immunofluorescence analysis showed that *S. flexneri* FWL01 carrying the plasmid pZLG6 can be excited fluorescence on its surface. Antibodies against CS6 and LPS of *Shigella* can be detected in sera of mice immunized with recombinant bacteria either orogastrically (o. g.) or intranasally (i. n.); simultaneously sIgA against CS6 can also be detected in the intestine. This is helpful for constructing multivalent recombinant vaccine for prevention of bacterial diarrhea.

Key words enterotoxigenic *Escherichia coli*, CS6, *Shigella flexneri*, host-plasmid lethal balancing system, live vector vaccine

* This work was supported by a grant from The State 863 High Technology R&D Project of China (2001AA215211) and The Main Research Project Foundation of Army (01Z026).

** Corresponding author. Tel: 86-10-63834140, E-mail: zhangzs@nic.bmi.ac.cn

Received: June 24, 2003 Accepted: July 31, 2003