

# 鼠伤寒沙门菌 *pagC* 启动子的克隆与活性分析

王宏卫 赵 平 张 珉 朱诗应 戚中田\*

(第二军医大学微生物学教研室 上海 200433)

**摘 要:**从鼠伤寒沙门菌中克隆出 *pagC* 启动子( $P_{pagC}$ ),构建体内激活的表达质粒 pZW,插入庚型肝炎病毒(HGV)NS3 基因,构建出表达质粒 pZWNS3。以其转化减毒鼠伤寒沙门菌 SL7207 观察  $P_{pagC}$  的启动活性。结果表明: $Mg^{2+}$  可抑制  $P_{pagC}$  的启动活性, $Mg^{2+}$  浓度小于 50mmol/L 时培养的重组菌经 SDS-PAGE 和 Western blot 检测能高水平表达 HGV NS3 蛋白。 $Mg^{2+}$  浓度升至 50mmol/L 时,NS3 蛋白表达量明显降低。收集以 50mmol/L  $Mg^{2+}$  的培养基扩增的重组菌,灌胃接种 C57 小鼠,检测小鼠的血清抗体、T 细胞增殖和 CTL 反应。结果显示  $P_{pagC}$  是一个强的宿主体内激活的启动子,为构建以伤寒沙门氏菌为载体的高效免疫口服疫苗提供了一个新的途径。

**关键词:**伤寒沙门菌,启动子,*pagC*,镁离子,庚型肝炎病毒

中图分类号:Q378.2 文献标识码:A 文章编号:1006-6179(2003)03-0308-07

伤寒沙门菌是细胞内致病菌,可通过肠道粘膜侵入粘膜相关淋巴组织,并被抗原递呈细胞如巨噬细胞摄取,在其中增殖。由于其感染的细胞靶向性,伤寒沙门菌作为口服疫苗载体很有发展潜力,可在多种哺乳动物体内诱导出体液、细胞及粘膜免疫应答。但外源基因表达的蛋白对伤寒沙门菌可有毒性作用,同时,在缺乏选择条件的体内环境中,菌体内的外源质粒可逐渐丢失。因此构建营养缺陷配套系统、将外源基因插入减毒菌的基因组 DNA、引入四环素诱导表达系统或使用体内激活的启动子<sup>[1]</sup>等已成为改进减毒伤寒沙门菌载体的关键。已经证明,使用体内激活的启动子是最有效的策略,这是因为该启动子在伤寒沙门菌中的转录活性极低,而在被摄入的宿主细胞内高水平表达。故这种宿主体内激活的启动子不仅可减少表达产物对细菌的毒性,而且也有助于防止重组质粒的丢失。目前常用的体内激活的启动子有: $P_{nirB}$ 、 $P_{pagC}$ 、 $P_{katG}$ 、 $P_{htrA}$ 、 $P_{groE}$ 、 $P_{osmC}$ 、 $P_{spv}$  和  $P_{dps}$  等,其中以  $P_{pagC}$  为启动子的表达系统在减毒沙门菌为载体的疫苗应用上最具潜力<sup>[2]</sup>。本研究拟从鼠伤寒沙门菌基因组 DNA 中克隆出 *pagC* 启动子,以庚型肝炎病毒(HGV)非结构蛋白 3(NS3)为靶基因,转化减毒鼠伤寒沙门菌 SL7207,在体内、体外研究  $P_{pagC}$  的活性,为该启动子用于以减毒伤寒沙门菌为载体的口服疫苗打下了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

鼠伤寒沙门菌 LB5000 和减毒鼠伤寒沙门菌 SL7207 由美国 Stanford 大学 Bruce Stocker

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30170514)

\* 通讯作者。Tel 86-21-25070312;E-mail:qizt@smmu.edu.cn

作者简介:王宏卫(1970-)男,河南省人,博士生,研究方向为分子病毒学。E-mail:smmuwhw@yahoo.com.cn

收稿日期:2002-09-23,修回日期:2003-01-14

教授惠赠。HGV 克隆质粒 pHGV18-10 由本实验室构建<sup>[3]</sup>。原核表达质粒载体 pQE 为 Qiagen 产品。表达绿色荧光蛋白的质粒 pEGFPN1 购自 Clontech 公司。非放射性细胞增殖检测试剂盒和非放射性细胞杀伤检测试剂盒均为 Promega 产品。小鼠黑色素瘤细胞 B16 为本室保存。高保真 *Pfu* DNA 聚合酶、各种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自上海 Sangon 生物工程公司。雌性、6 周龄 C57 小鼠购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司。HGV-NS3 蛋白由本室表达并纯化<sup>[4]</sup>。HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG、G418、丝裂霉素 C 为 Sigma 公司产品。

### 1.2 含 *pagC* 启动子表达质粒的构建

提取减毒鼠伤寒沙门菌 DNA, 合成引物以高保真 *Pfu* DNA 聚合酶扩增 *pagC* 启动子。上游引物为 5'-CTCGAGGTTAACCACCTCTTAATAATAATGG-3', 下游引物为 5'-AAGCTTG-GATCCGAATTCATAGATTAACCTCCTTAATACTAC-3'。在上游引物中引入 *Xho* I 酶切位点, 下游引物中引入 *Hind* III、*Bam* H I、*Eco* R I 酶切位点。产物连入 T 载体, 测序正确后, 以 *Xho* I、*Hind* III 酶切插入原核表达质粒载体 pQE, 得到表达质粒 pZW。

### 1.3 HGV-NS3 蛋白重组表达质粒的构建

以 pHGV18-10 质粒为模板, 高保真 *Pfu* DNA 聚合酶扩增 HGV-NS3 基因。上游引物为 5'-GAATTCCTACTGCCAGTTGTC-3', 下游引物为 5'-AAGCTTATGTCACCACCACTATTG-3', 上下游引物中分别引入 *Eco* R I、*Hind* III 酶切位点, 连入 T 载体测序正确后, 以 *Eco* R I、*Hind* III 酶切后插入 pZW, 得到重组表达质粒 pZWNS3。

### 1.4 重组表达质粒转化减毒鼠伤寒沙门菌

氯化钙法将质粒 pZW、pZWNS3 分别转化鼠伤寒沙门菌 LB5000, 提取质粒, 用电穿孔仪转化减毒鼠伤寒沙门菌 SL7270, 获得重组菌( SL7207/pZWNS3 )和对照菌( SL7207/pZW )。电转化条件 2500V 电压、25  $\mu$ F 电容、200  $\Omega$  电阻。

### 1.5 HGV-NS3 蛋白在减毒鼠伤寒沙门菌内的表达

将重组菌和对照菌分别接种于 3mL( 含 100  $\mu$ g/mL 氨苄青霉素 )LB 培养基, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜, 次日取 20  $\mu$ L 接种于 3 mL 含 100  $\mu$ g/mL 氨苄青霉素及 50mmol/L MgCl<sub>2</sub> 的 LB 培养基, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养至对数生长期, 用含不同 Mg<sup>2+</sup> 浓度( 0.1 ~ 50mmol/L )的 LB 培养基重悬, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 3h, 离心收集细菌。细菌分别用 2  $\times$  SDS 上样缓冲液裂解, 煮沸后进行 SDS-PAGE 和 Western blot 分析。检测抗体为 1:25 稀释的 anti-HGV IgG 阳性的慢性 HGV 感染者血清, 用二氨基联苯胺( DAB )H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 显色。

### 1.6 表达 HGV-NS3 及 GFP 融合蛋白的 B16 细胞株的建立

以 pHGV18-10 质粒为模板, 高保真 *Pfu* DNA 聚合酶扩增 HGV-NS3 部分基因片段, 上游引物为 5'-AAGCTTACCATGACTGAGCCAGTTGTCA-3', 下游引物为 5'-GAATTCGGGTT-GAGTACGTCAGGG-3', 上、下游引物分别引入 *Hind* III、*Eco* R I 酶切位点, 扩增后连入 T 载体, 测序正确后, 以 *Hind* III、*Eco* R I 酶切后插入 pEGFPN1, 得到重组表达质粒 pEGFPNS3/2。用第 2 代脂质体转染试剂( Lipofectamine )将表达 GFP-HGVNS3 融合蛋白的质粒 pEGFPNS3/2 转染 B16 细胞 3d 后, 用 800  $\mu$ g/mL G418 筛选抗性细胞克隆。以毛细吸管转移数个发出绿色荧光的细胞克隆进行培养, 作为检测小鼠 CTL 应答的刺激细胞或靶细胞。

### 1.7 重组减毒鼠伤寒沙门菌的小鼠接种

将重组菌和对照菌分别接种于 3mL 含抗生素的 IR 中, 振荡培养过夜, 次日各取 20  $\mu$ L

接种于 5mL 含抗生素及 50mmol/L  $MgCl_2$  的 LB, 于 37℃ 振荡 16h, 再接种于 50mL 含抗生素及 50mmol/L  $MgCl_2$  的 LB, 于 37℃ 振荡 4 ~ 5h 至  $OD_{600}$  达 0.5 ~ 0.6, 离心收集细菌, 以 PBS 悬浮, 调整细菌浓度为  $1 \times 10^7$  个/mL。C57 小鼠分为两组, 每组 10 只, 禁水、禁食 4h, 每只小鼠灌胃口服接种 100 $\mu$ L 5%  $NaHCO_3$  以中和胃酸, 30min 后分别口服接种重组菌和对照菌菌液 100  $\mu$ L, 每 3 周 1 次, 接种 3 次。

1.8 小鼠体液免疫应答的检测

首次免疫后第 2、5、8、11 周从各组小鼠眼眶取血, 离心分离血清, 以 ELISA 法检测小鼠血清抗 HGV-NS3 IgG。检测抗体为 1:10 000 稀释的 HRP 标记山羊抗小鼠 IgG, 用四甲基联苯胺 (TMB)  $H_2O_2$  显色。重组菌组小鼠血清的  $OD_{450}/OD_{630}$  大于对照组血清平均值的 2.1 倍确定为抗体阳性。

1.9 小鼠 T 细胞增殖反应的检测

首次免疫后第 11 周处死小鼠, 无菌取脾脏制备脾细胞悬液 ( $5 \times 10^5$  细胞/mL), 每孔 100  $\mu$ L 接种至 96 孔细胞培养板, 加入 HGV-NS3 蛋白, 设刀豆蛋白 A (ConA) 对照孔、牛血清白蛋白 (BSA) 对照孔和阴性对照孔。抗原和 BSA 终浓度为 10 $\mu$ g/mL, ConA 终浓度为 5 $\mu$ g/mL, 每组均设 3 孔。培养 72 h 后, 以 MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium inner salt] 20 $\mu$ L 处理 1h, 测  $OD_{590}$  值并计算刺激指数 (SI)。SI = 抗原刺激孔平均  $OD_{590}$ /阴性对照孔平均  $OD_{590}$ 。

1.10 小鼠细胞毒 T 细胞 (CTL) 效应的检测

以表达 GFP-HGV NS3 融合蛋白的 B16 细胞为刺激细胞, 以免疫小鼠的脾细胞为效应细胞。结果以杀伤率表示, 操作参照文献 [5]。

1.11 统计学分析

实验数据的统计学分析用 *t* 检验。

2 结果

2.1  $P_{pagC}$  的克隆与 DNA 序列

以 PCR 扩增出  $pagC$  启动子,  $P_{pagC}$  的 DNA 测序结果与 GenBank (NO. M55546) 中的序列完全符合。

2.2 含  $PagC$  启动子表达质粒的构建

克隆产物以 *Xho* I、*Hind* III 酶切插入原核表达质粒载体 pQE, 得到表达质粒 pZW。以 PCR 扩增 HGV-NS3 片段, 以 *Eco*R I、*Hind* III 酶切后插入 pZW, 得到重组表达质粒 pZWNS3。用酶切法鉴定, 如图 1 所示, 插入片段与预期的相符。

2.3  $Mg^{2+}$  浓度对  $pagC$  启动子活性的影响

将重组菌在不同  $Mg^{2+}$  浓度的 LB (0.1 ~ 50mmol/L) 中培养, 收集细菌以 SDS-PAGE 分析。结果表明, 当  $Mg^{2+}$  升到 50 mmol/L 时, NS3 表达受到明显抑制 (NS3 蛋白分子量约为 69kD)。Western blot 分析表明, 重组菌的表达产物能与抗 HGV IgG 阳性血清反应, 而对照菌的表达产物无相应条带, 当 LB 中  $Mg^{2+}$  浓度达 50 mmol/L 时, 重组菌的表达产物亦未检出相应条带 (图 2)。

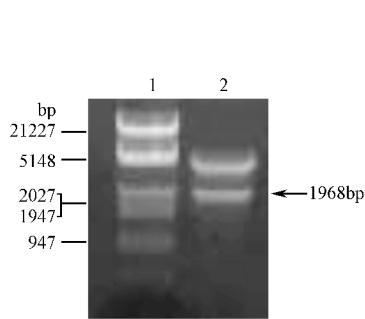


图1 质粒 pZWNS3 酶切鉴定

Fig.1 Restriction endonuclease digestion of pZWNS3  
1.  $\lambda$ DNA/*Hind*III + *Eco*R I ; 2. pZWNS3 digested with *Hind*III and *Eco*R I .

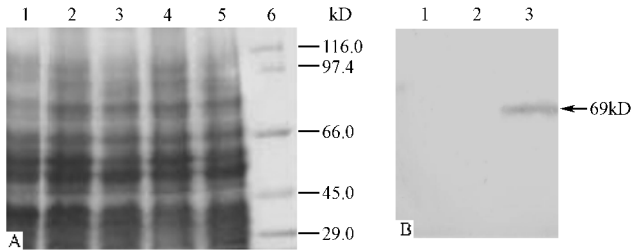


图2 SDS-PAGE 和 Western blot 分析

Fig.2 SDS-PAGE and Western blot analysis of  $P_{pagC}$  driven expression  
A SDS-PAGE. 1 ~ 5. Expression of SL7207/pZWNS3 in different concentrations of  $Mg^{2+}$  (50mmol/L, 0.1mmol/L, 1mmol/L, 10mmol/L, 20mmol/L) ; 6. Molecular mass marker of high range protein.  
B Western blot. 1. Expression of SL7207/pZW in LB containing 50mmol/L  $Mg^{2+}$  ; 2. Expression of SL7207/pZWNS3 in LB containing 50mmol/L  $Mg^{2+}$  ; 3. Expression of SL7207/pZWNS3 in LB containing 10mmol/L  $Mg^{2+}$  .

2.4 HGV-NS3 及 GFP 融合蛋白在 B16 细胞的表达

以含 GFP 和部分 HGV-NS3 基因的质粒 pEGFPNS3/2 转染 B16 细胞并经 G418 筛选后 , 在荧光显微镜下可见绿色荧光( 图略 ) 。该转染的细胞株以 GFP 为报告基因 , 表达 GFP-NS3/2 融合蛋白 , 可作为检测小鼠 CTL 应答的刺激细胞或靶细胞。

2.5 小鼠血清抗体的检测

分别于首次免疫后第 2、5、8、11 周检测重组菌 SL7207/pZWNS3 和对照菌 SL7207/pZW 口服免疫的小鼠血清抗 HGV-NS3 , 4 次检测结果证明 SL7207/pZWNS3 免疫组小鼠 IgG 抗体的阳性率分别为 70%、100%、100% 和 100% , 抗体滴度最高为 1:1 600。抗体水平的变化趋势见图 3。

2.6 小鼠 T 细胞增殖反应的检测

用 BSA 刺激 , 两组小鼠的 T 细胞均无增殖反应。用重组 HGV-NS3 蛋白刺激后 , SL7207/pZWNS3 免疫组小鼠的脾细胞发生明显增殖反应 , 与 SL7207/pZW 免疫组比较有显著性差异 (  $p = 0.0001$  ) 略高于 ConA 刺激的增殖效果( 见表 1 )。

2.7 小鼠 CTL 反应的检测

检测免疫小鼠脾细胞对稳定表达 GFP-HGV-NS3 融合蛋白的 B16 细胞的杀伤反应 , 当效应细胞( E )靶细胞( T )比为 20:1 或 100:1 时 , 如表 2 所示 , SL7207/pZWNS3 口服免疫组的杀伤率与各对照组相比均有显著性差异 (  $p$  分别为 0.001、0.0003 )。

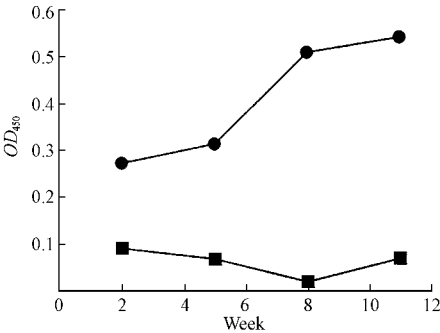


图3 免疫小鼠血清抗 HGV NS3 的检测 ( 1:100 稀释 )

Fig.3 Anti-HGV NS3 in serum of orally immunized mice( 1:100 dilution )  
● : pZWNS3/SL7207 immunized mice ; ■ : pZW/SL7207 immunized mice .

表 1 免疫小鼠 T 细胞增殖反应的检测( SI )

Table 1 Proliferative response of T lymphocytes from immunized mice( SI )

Group Stimulator	SL7207/pZWNS3			SL7207/pZW		
	BSA	NS3	ConA	BSA	NS3	ConA
SI	1.01 ± 0.09	2.13 ± 0.13	2.08 ± 0.16	1.05 ± 0.10	1.06 ± 0.12	2.01 ± 0.15

表 2 免疫小鼠 HGV-NS3 特异性 CTL 反应

Table 2 HGV-NS3 specific CTL responses

E:T	SL7207/pZWNS3 group	SL7207/pZW group
20:1	63.06 ± 9.38 %	4.19 ± 1.43 %
100:1	81.12 ± 8.76 %	4.87 ± 1.32 %

Note E:T = effector cells : target cells

3 讨论

伤寒沙门菌的 *phoP/phoQ* 系统为伤寒沙门菌的双成分调节子, *phoQ* 可感受巨噬细胞中某些因子的变化,显示组氨酸激酶活性,使 *P<sub>hoP</sub>* 氨基端特定的残基磷酸化。磷酸化的 *P<sub>hoP</sub>* 结合于特定的启动子,诱导或抑制一系列基因的表达,这些基因称 *P<sub>hoP</sub>* 激活的基因( *pag* )和 *P<sub>hoP</sub>* 抑制的基因( *prg* )。 *P<sub>hoP</sub>* 激活的基因位点,被依次命名为 *pagA* ~ *pagP*<sup>[6,7]</sup>。伤寒沙门菌侵入巨噬细胞后, *pag* 基因的转录可提高 50 ~ 70 倍<sup>[8]</sup>。改变伤寒沙门菌培养的条件,如改变  $Mg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$  离子浓度或降低培养基营养成分,可调控 *pag* 基因的表达。 $Mg^{2+}$  参与许多生理过程并且是包括 ATP 在内的磷酸转移反应中的重要辅助因子,可作为一种特殊信号分子调控 *P<sub>hoP</sub>/P<sub>hoQ</sub>* 系统。已经证明,增加  $Mg^{2+}$  浓度可抑制 *P<sub>hoQ</sub>* 的激酶活性<sup>[9]</sup>,使磷酸化的 *P<sub>hoP</sub>* 减少,从而降低外源蛋白的表达。*pagC* 基因的编码区长 567bp,编码 188 个氨基酸,是伤寒沙门菌外膜蛋白的成员之一。*pagC* 基因 5' 端非编码区长约 700bp,转录起始点在起始密码子上游约 490bp 处,3' 非编码区近终止密码子有一茎环结构,为转录终止序列<sup>[9]</sup>。低  $Mg^{2+}$  环境会诱导 *pagC* 启动子起始蛋白表达<sup>[10]</sup>。

减毒伤寒沙门菌作为口服疫苗的运载体已得到广泛应用,缺点是外源质粒极易丢失,且表达的外源蛋白对伤寒沙门菌有毒性作用。使用宿主体内激活的 *pagC* 启动子可使外源基因在接种宿主前在细菌中不表达,从而避免了外源基因过早表达对重组细菌的影响。重组菌进入宿主细胞后, *pagC* 启动子能迅速启动外源基因表达<sup>[11,12]</sup>,表达的抗原经宿主细胞内加工、递呈后,激发宿主产生体液和细胞免疫应答。*pagC* 基因在人或鼠伤寒沙门菌中存在,但不存在于其他肠道菌中,故 *pagC* 启动子在减毒伤寒沙门菌为载体的疫苗研究中有很好的前景。

本研究应用 PCR 方法从鼠伤寒沙门菌中扩增出 *pagC* 启动子序列,以其置换原核表达载体 pQE 中 T5 噬菌体的乳糖杂合启动子,得到以 *P<sub>pagC</sub>* 为启动子的体内激活的表达质粒,命名为 pZW。该质粒引入了酶切位点 *Xho* I、*Hind* III、*Bam* HI、*Eco* R I,为构建口服疫苗提供了便利。在酶切位点 *Xho* I / *Hind* III 间插入 HGV NS3 基因,证明 HGV-NS3 蛋白在  $Mg^{2+}$  浓度低于 50mmol/L 的 LB 中表达较高,当  $Mg^{2+}$  浓度接近或高于 50mmol/L 时, HGV-NS3 蛋白表达被明显抑制,故我们选择含 50mmol/L  $Mg^{2+}$  的 LB 培养基进行 SL7207/pZWNS3

的体外扩增培养,以尽量减少体外扩增的重组菌中 NS3 蛋白的表达。另外,由于动物或人体消化道中镁离子浓度(如人体肠液镁含量约为  $483\mu\text{g/L}$ ,胃液镁含量为  $25 \sim 590\mu\text{g/L}$ )相对于可抑制  $P_{\text{pagC}}$  活性的镁离子浓度而言是极低的,故以  $P_{\text{pagC}}$  起始抗原的口服疫苗可不必考虑消化道中镁离子对  $P_{\text{pagC}}$  活性的影响。本文使用的鼠伤寒沙门菌 SL7207 为 *aroA* 基因缺陷的减毒菌<sup>[13]</sup>,不能合成自身增殖所必需的分枝酸。以重组菌 SL7207/pZWNS3 口服接种小鼠,两次免疫后小鼠的抗体阳转率即达到 100%,抗体滴度最高可达 1:1 600。同时鼠伤寒沙门菌的基因组 DNA 和脂多糖等成分还可刺激 APC 上调 MHC II 分子和 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  等细胞因子的表达,是有效的 Th1 型免疫佐剂,可诱导出强的脾细胞增殖反应和 CTL 反应。

本实验室已建立了全长 HGV-cDNA 转基因小鼠品系,口服以伤寒沙门菌为运载体的 DNA 疫苗可望消除转基因小鼠的免疫耐受状态,从而产生针对转基因编码抗原的免疫反应<sup>[14]</sup>。该项研究为以后的工作打下基础,同时也为口服疫苗的改进提供了新的思路。

## 参 考 文 献

- [1] Medina E, Paglia P, Rohde M, *et al.* Modulation of host immune responses stimulated by *Salmonella* vaccine carrier strains by using different promoters to drive the expression of the recombinant antigen. *Eur J Immunol*, 2000, **30**: 768 ~ 777.
- [2] Dunstan S J, Simmons C P, Strugnell R A. Use of in vivo-regulated promoters to deliver antigens from attenuated *Salmonella enterica* var. *Typhimurium*. *Infect Immun*, 1999, **67**(10): 5133 ~ 5141.
- [3] Qi Z T, Ren H, Zhu F L, *et al.* Construction and identification of a single stranded cDNA clone containing full-length genome of hepatitis G virus. *Ross Gastroenterol Zh*, 2001, (2): 46 ~ 56.
- [4] 朱分禄,任浩,宋燕斌,等. 庚型肝炎病毒 NS3 蛋白在大肠杆菌中的表达. 中华微生物学与免疫学杂志, 1999, **19**(6): 475 ~ 478.
- [5] 赵平,赵兰娟,曹洁,等. 信号肽和辅助性 T 细胞表位增强 HBV 核心抗原 DNA 疫苗诱导的免疫应答. 生物化学与生物物理学报, 2002, **34**(3): 341 ~ 346.
- [6] Kier L K, Weppleman R M, Ames B N. Regulation of nonspecific acid phosphatase in *Salmonella*: *phoN* and *phoP* genes. *J Bacteriol*, 1979, **138**: 155 ~ 161.
- [7] Miller S I, Kurkal A M, Mekalanos J J. A two-component regulatory system ( *phoP* *phoQ* ) controls *Salmonella typhimurium* virulence. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, **86**: 5054 ~ 5058.
- [8] Groisman E A, Parra-Lopez C, Salcedo M, *et al.* Resistance to host antimicrobial peptides is necessary for *Salmonella* virulence. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**(24): 11939 ~ 11943.
- [9] Pulkkinen W S, Miller S I. A *Salmonella typhimurium* virulence protein is similar to a yersinia enterocolitica invasion protein and a bacteriophage lambda outer membrane protein. *J Bacteriol*, 1991, **173**(1): 86 ~ 93.
- [10] Garcia Vescovi E, Soncini F C, Groisman E A.  $\text{Mg}^{2+}$  as an extracellular signal: environmental regulation of *Salmonella* virulence. *Cell*, 1996, **84**: 165 ~ 174.
- [11] Hohmann E L, Oletta C A, Iomnis W P, *et al.* Macrophage-inducible expression of a model antigen in *Salmonella typhimurium* enhances immunogenicity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **28** 92(7): 2904 ~ 2908.
- [12] Chen H Q, Schifferli D M. Enhanced immune responses to viral epitopes by combining macrophage-inducible expression with multimeric display on a salmonella vector. *Vaccine*, 2001, **19**: 3009 ~ 3018.
- [13] Newton S M, Jacob C O, Stocker B A D. Immune response to cholera toxin epitope inserted in *Salmonella flagellin*. *Science*, 1989, **244**: 70 ~ 72.
- [14] Niethammer A G, Primus F J, Rong Xiang, *et al.* An oral vaccine against human carcinoembryonic antigen(CEA) prevents growth and dissemination of Lewis lung carcinoma in CEA transgenic mice. *Vaccine*, 2002, **20**: 421 ~ 429.

# Cloning and Functional Analysis of Promoter *pagC* from Attenuated *Salmonella typhimurium*

Wang Hongwei Zhao Ping Zhang Min Zhu Shiyong Qi Zhongtian\*

( Department of Microbiology , Second Military Medical University , Shanghai 200433 , China )

**Abstract :** This study describes the cloning and function of promoter *pagC* (  $P_{pagC}$  ) from *Salmonella typhimurium* . The expression plasmid containing the in vivo-inducible promoter *pagC* and HGV-NS3 gene was introduced into the attenuated *Salmonella typhimurium* SL7207 to investigate the function of  $P_{pagC}$  . The expressed HGV-NS3 protein was detectable by SDS-PAGE and Western blotting in the recombinant bacteria in the presence of low concentration of  $Mg^{2+}$  (  $< 50\text{mmol/L}$  ). When the concentration of  $Mg^{2+}$  reached to  $50\text{mmol/L}$  , the amount of expressed HGV-NS3 was decreased significantly. The recombinant bacteria were multiplied in LB medium containing  $50\text{mmol/L}$  of  $Mg^{2+}$  and used as a DNA vaccine to orally inoculate C57 mice for three times. The results of serum antibodies , T lymphocyte proliferative response and cytotoxic T lymphocyte response of immunized mice showed that the oral vaccine could induce strong humoral and cellular immune responses in mice , which indicates that the  $P_{pagC}$  is a strong in vivo-inducible promoter and can be used in attenuated *Salmonella typhimurium* to construct an effective oral vaccine.

**Key words :** *Salmonella typhimurium* , Promoter , *pagC* ,  $Mg^{2+}$  , Hepatitis G virus

Foundation item : Chinese National Natural Science Fund ( 30170514 )

\* Corresponding author. Tel 86-21-25070312 E-mail : qizt@smmu.edu.cn

Received date 09-23-2002

## 《微生物学报》真诚欢迎刊登广告

《微生物学报》(双月刊)创刊于1953年,由中国微生物学会和中国科学院微生物研究所主办,是我国微生物学领域唯一的综合性学报级期刊和国家自然科学基金核心期刊,被国内外多家重要的文摘刊物和数据库收录。曾多次被评为优秀科技期刊。

本刊历史悠久,发行量大,内容涵盖面广,主要报道普通微生物学、工业、农业、医学和兽医微生物学、免疫学以及与微生物学有关的生物工程等方面的研究成果和科研进展。一直受到国内外科研工作者、高等院校师生和相关企业界的欢迎。

本刊可以为您定期发布与微生物学相关的试剂、药品、仪器、设备及生物技术等方面的产品信息,可为您开拓在微生物学领域新的发展空间。本刊科学严谨,信守协议,由中国科学院科学出版社广告部代理广告业务(广告经营许可证:京东工商广字第0034号),编辑部备有最新的期刊简介和报价单,欢迎与我们联系。

通讯地址:北京海淀中关村 中国科学院微生物研究所内

《微生物学报》编辑部

邮政编码:100080

电 话:(010)62630422;62554303

传 真:(010)62554303

电子信箱:actamicro@sun.im.ac.cn; cjb@sun.im.ac.cn

联 系 人:武 文 王晋芳