

利用苏云金芽胞杆菌细胞表面展示系统表达禽流感病毒 NP 蛋白

刘 梅^{1,2} 李淑云¹ 赵昌明² 孙 明² 毕丁仁^{1,2*}

(¹ 华中农业大学动物医学院 ² 农业微生物学国家重点实验室 武汉 430070)

摘 要 :首次利用苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt) S-层蛋白 CTC 表面展示系统研究在 Bt 细胞表面展示禽流感病毒 NP 蛋白的可行性和最佳方案,为研制能常温长期保藏和运输的禽用口服疫苗奠定基础。用全长 *np* 基因或部分 *np* 基因(*npp*)代替 S-层蛋白 *ctc* 基因的 3'-端或中部,构建了 4 个重组质粒 pSNP(含 *ctc-np*)、pCSA-SNP(*csa-ctc-np*)、pCTC-NP(*ctc-npp*)和 pCSNP(*csa-ctc-npp*)。将重组质粒分别电转化入 Bt 受体菌株 BMB171 中,获得了 5 个重组菌株 BN、BCN、C-S、BCCN 和 CN。用 5 个重组菌株的营养细胞做玻片凝集试验,结果显示 5 个重组菌株均成功地在细胞表面展示了 NP 蛋白。用 5 个重组菌株的营养细胞免疫小鼠,ELISA 测定血清抗体效价,结果显示 5 个重组菌株均具有免疫原性,其中重组菌株 CN 的免疫原性最高,其含融合基因 *csa-ctc-npp*,证明该种融合基因的构建方式最佳。这为利用 S-层蛋白 CTC 表面展示系统构建展示其它禽类病原体抗原的重组菌株以研制禽用热稳定性口服疫苗奠定了基础。

关键词 :苏云金芽胞杆菌;S-层表面展示;禽流感病毒 NP 蛋白;热稳定性口服疫苗

中图分类号 S852.65, Q93 文献标识码:A 文章编号 1001-6209(2007)03-0486-06

目前,用于防制家禽传染病的传统减毒活疫苗和基因工程活疫苗均需要低温保藏和运输,而且绝大多数疫苗需要通过劳动强度大、操作技术性强的注射途径进行免疫接种,这给疫苗的销售和广泛使用带来不便。因此,研制出能长期常温保藏和运输的口服疫苗是社会发展的迫切需要。

苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)能形成芽胞,芽胞具有很强的热稳定性^[1]。由于 Bt 能产生由质粒编码的对昆虫具有特异性杀虫活性的伴胞晶体,故其主要被研制成微生物杀虫剂用于生物防制^[2]。Bt 菌株 BMB171 为无质粒不形成伴胞晶体的突变株^[3],其对小鼠和雏鸡安全无毒且能在鸡肠道中暂时定殖以发挥作用(另文发表)。S-层蛋白(Surface layer protein)是细菌表面蛋白的一种,其定位于细菌细胞壁的外部,并能结为薄层晶格状结构而包裹住整个细胞壁,从而形成细菌的表面层即 S-层(S-layers)^[4]。将外源抗原基因与 S-层蛋白基因融合后,外源抗原蛋白便可展示到受体菌株细胞表面,从而能开发为活菌疫苗^[5]。本研究组以 BMB171 为受体菌株利用 Bt 菌株 CTC 的 S-层蛋白 CTC(基因 *ctc*)初步建立了 Bt 细胞表面展示系统^[6]。本文欲利

用该系统展示禽流感病毒 NP 蛋白,通过设计多种 S-层融合基因构建方式,构建多个重组菌株,检测重组菌株的表面展示可行性和免疫学活性,以寻找到能使外源抗原表现出最高免疫学活性的构建方式,从而为研制热稳定性禽用口服疫苗奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株:所用的质粒和菌株见表 1 所示。苏云金芽胞杆菌于 30℃ 用 BH(Difco)培养基培养,大肠杆菌(*Escherichia coli*)于 37℃ 用 LB 培养基培养。培养菌体时添加相应的抗生素,氨苄青霉素 100μg/mL,红霉素 25μg/mL,新霉素 10μg/mL。

1.1.2 主要试剂和仪器:SG 缓冲液(272mmol/L 蔗糖,15%(V/V)甘油);PBS(KH₂PO₄ 1.47mmol, Na₂HPO₄ · 12H₂O 10mmol, KCl 2.7mmol, NaCl 137mmol, pH7.4);禽流感琼脂扩散试验标准阳性血清和阴性血清(购于中国农业科学院哈尔滨兽医研究所);辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG(购于武汉博士德生物工程有限公司);ELISA 包被抗原 GST-NP(制备方法见 1.6.4);电脉冲转化仪(Bio-Rad 公

基金项目:国家自然科学基金(30080036)湖北省科技攻关重大专项(2006AA202A05)农业微生物学国家重点实验室开放课题(AML02004)

* 通讯作者。Tel 86-27-87280208, Fax 86-27-87280408, E-mail bidingren@mail.hzau.edu.cn

作者简介:刘梅(1968-),女,四川人,硕士,副教授,主要从事禽用基因工程疫苗的研究。E-mail liumei@mail.hzau.edu.cn

其他作者:胡思顺

收稿日期:2006-09-14 接受日期:2006-10-18 修回日期:2007-02-12

司产品 GenePulser II)

1.2 PCR 扩增

本研究使用了两对引物,表 2 为它们的序列、用途及扩增程序。

表 1 实验所用质粒和菌株

Table 1 Plasmids and strains used in this study

Plasmids or strains	Characteristics	Sources
pBMB982-304	Ap ^r ,Erm ^r ,containing full length of <i>ctc</i> gene,10.6kb	[6]
pBMB-CSA	Ap ^r ,Tc ^r ,containing full length of <i>csaAB</i> operon 9.8kb	[6]
pBE2	Ap ^r ,Neo ^r ,shuttle vector of <i>E. coli</i> and G ⁺ strain 6.3kb	[7]
pMIL-CSA	Ap ^r ,Neo ^r ,full length of <i>csaAB</i> operon in pBE2,10.4kb	This study
pKG-NP	Ap ^r ,full length of <i>np</i> gene in pGEX-KG 6.5kb	Stored in this lab
pSNP	Ap ^r ,Erm ^r ,full length of <i>np</i> gene replacing <i>Xba</i> I- <i>Sph</i> I fragment of <i>ctc</i> gene in pBMB982-304 9.6kb	This study
pCSA-SNP	Ap ^r ,Erm ^r ,full length of <i>csaAB</i> operon inserting in <i>Eco</i> R I site of pSNP,12.6kb	This study
pCTC-NPP	Ap ^r ,Erm ^r ,part length of <i>np</i> gene replacing <i>Xba</i> I- <i>Hinc</i> II fragment of <i>ctc</i> gene in pBMB982-304,10.3kb	This study
pCSNPP	Ap ^r ,Erm ^r ,full length of <i>csaAB</i> operon inserting in <i>Eco</i> R I site of pCTC-NPP,13.4kb	This study
DH5 α	<i>E. coli</i> , <i>rec</i> ⁻ , <i>F</i> ⁻ , <i>endA</i> I, <i>gyr</i> 96, <i>thi</i> ⁻ , <i>hsdR</i> 13(<i>rk</i> ⁻ , <i>mk</i> ⁻), <i>sup</i> 44, <i>relA</i> I	Stored in this lab
BL21 (DE3, codon plus)pKG-NP	<i>E. coli</i> codon plus strain for expressing heterologous gene harboring pKG-NP	Stored in this lab
BMB171	Plasmid-free derivative of <i>B. thuringiensis</i> Serotype H3abc	[3]
BN	BMB171 harboring pSNP	This study
BCN	BMB171 harboring pSNP and pMIL-CSA	This study
C-S	BMB171 harboring pCSA-SNP	This study
BCCN	BMB171 harboring pCTC-NPP and pMIL-CSA	This study
CN	BMB171 harboring pCSNPP	This study

表 2 本研究所涉及的 PCR 引物

Table 2 Primers involved in this study

Primers	Sequence(5'→3')	Linkers	Usage	PCR program
Np-up	GGCTCTAGACATGGCGCTTCAAGGCACCAA	<i>Xba</i> I	Cloning full length <i>np</i> gene (1500bp) pKG-NP as template.	94°C 5min; 94°C 1min, 55°C 1min, 72°C 2min, 30 cycles; 72°C 10min.
Np-down	CGCTGCATGCTTAATTGTCGFACTCTCTCTG	<i>Sph</i> I		
Npp-up	GAATTCAGACTCCATGGCGCTTC	<i>Xba</i> I	Cloning part length <i>np</i> gene (975bp) pKG-NP as template.	
Npp-down	CCAGGTCAACCTTATGTCTGGATTCTC	<i>Hinc</i> II		

1.3 DNA 操作

DNA 的酶切、电泳、连接和转化大肠杆菌以及质粒的提取均按文献 [8] 所述方法进行。

1.4 质粒电脉冲转化苏云金芽胞杆菌

受体菌株用 BHI 培养基于 30°C 培养至 OD₆₀₀ 为 0.2~0.3, 收集菌体, 用 SG 缓冲液洗涤菌体 4 次, 用 1/20 体积的 SG 缓冲液悬浮菌体, 即得到感受态细胞。取 100 μ L 的感受态细胞于 0.2cm 电击杯中, 加 1~3 μ L 质粒, 混匀, 在 2.5kV、25 μ F 和 200 Ω 条件下进行电击。然后, 加 1mL BHI 培养基于电击杯中, 混匀, 将杯中液体转入 1.5mL Eppendorf 管中, 30°C 150r/min 恢复培养 2h。然后, 取培养好的菌液涂布相应的抗性平板, 筛选阳性转化子。

1.5 重组菌株的玻片凝集试验

1.5.1 凝集素的来源: 凝集素为禽流感琼脂扩散试验标准阳性血清和阴性血清, 使用之前用 PBS (pH7.4) 作系列倍比稀释。

1.5.2 凝集原的制备: 抗性 BHI 培养液接种重组菌

株于 30°C 200r/min 培养 16h, 收集菌体, PBS 洗涤菌体 3 次, PBS 重悬菌体, 调整菌液浓度至 OD₆₀₀ 为 3.0, 作为凝集原。

1.5.3 方法: 取 25 μ L 凝集原于一洁净玻片上, 再取 25 μ L 凝集素滴于凝集原液上, 随即用灭菌牙签充分混匀。于 35~37°C 环境中, 将玻片不断作回旋倾斜摇动, 使凝集原与凝集素充分接触。3min 内观察结果。如在 3min 内出现絮片状或颗粒状凝集, 混合悬液由混浊变为澄清透明者为阳性, 记录为“+”; 如仍呈均匀混浊状者则为阴性, 记录为“-”; 仅出现小的颗粒状凝集, 菌悬液仍混浊者, 可判为疑似反应, 记录为“±”。

1.6 重组菌株免疫小鼠实验

1.6.1 实验动物: 6~8 周龄 SPF 级雌性 BALB/c 小白鼠, 购自湖北省预防医学科学院实验动物中心, 购回后在隔离环境下饲养, 预饲 3d 后开始实验。

1.6.2 免疫抗原的制备: 抗性 BHI 培养液接种重组菌株于 30°C 200r/min 培养 16h, 收集菌体, PBS

(pH7.4)洗涤菌体3次, PBS重悬菌体, 调整菌液浓度至 1×10^8 CFU/mL, 作为免疫抗原。

1.6.3 免疫程序 将小鼠随机分为7组, 每组8只, 分别为BMB171组、BN组、BCN组、C-S组、BCCN组、CN组和空白对照组。于第0、14和28天腹腔注射抗原 $200 \mu\text{L}/\text{只}$ (即 2×10^7 CFU/只), 空白组注射PBS。于第0、13、27和41天采集血液, 分离血清。

1.6.4 ELISA测定 采用间接ELISA法检测小鼠血清IgG抗体效价。具体方法见文献[9]所述。其中, 用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠IgG作为酶标二抗, GST-NP蛋白作包被抗原。GST-NP由大肠杆菌BL21(DE3, codon plus) pKG-NP所产生。抗性LB培养基接种BL21(DE3, codon plus) pKG-NP经IPTG诱导, 表达融合蛋白GST-NP(84kDa), 表达蛋白形成包

涵体, 菌体经超声波破碎后, 离心收集包涵体, 先用0.3% SKL使包涵体变性溶解, 再用0.2% PEG4000、1mmol/L 氧化型谷胱甘肽和2mmol/L 还原型谷胱甘肽将包涵体还原为有反应活性的GST-NP蛋白, PBS(pH8.0)透析复性, 测定蛋白浓度, -20°C 保存作为ELISA测定的包被抗原。

2 结果

2.1 重组菌株的构建

苏云金芽胞杆菌 *ctc* 基因和 *csaAB* 操纵元的结构见图1-A所示(根据[10]和[6]修改)。其中, *slh* (S-layer homology, S-层同源模体)是 *ctc* 基因的表面锚定序列; *slh* 之后有两个单一酶切位点 *Xba*I 和 *Hinc*II, 它们可作为 *slh* 与外源抗原基因的连接位

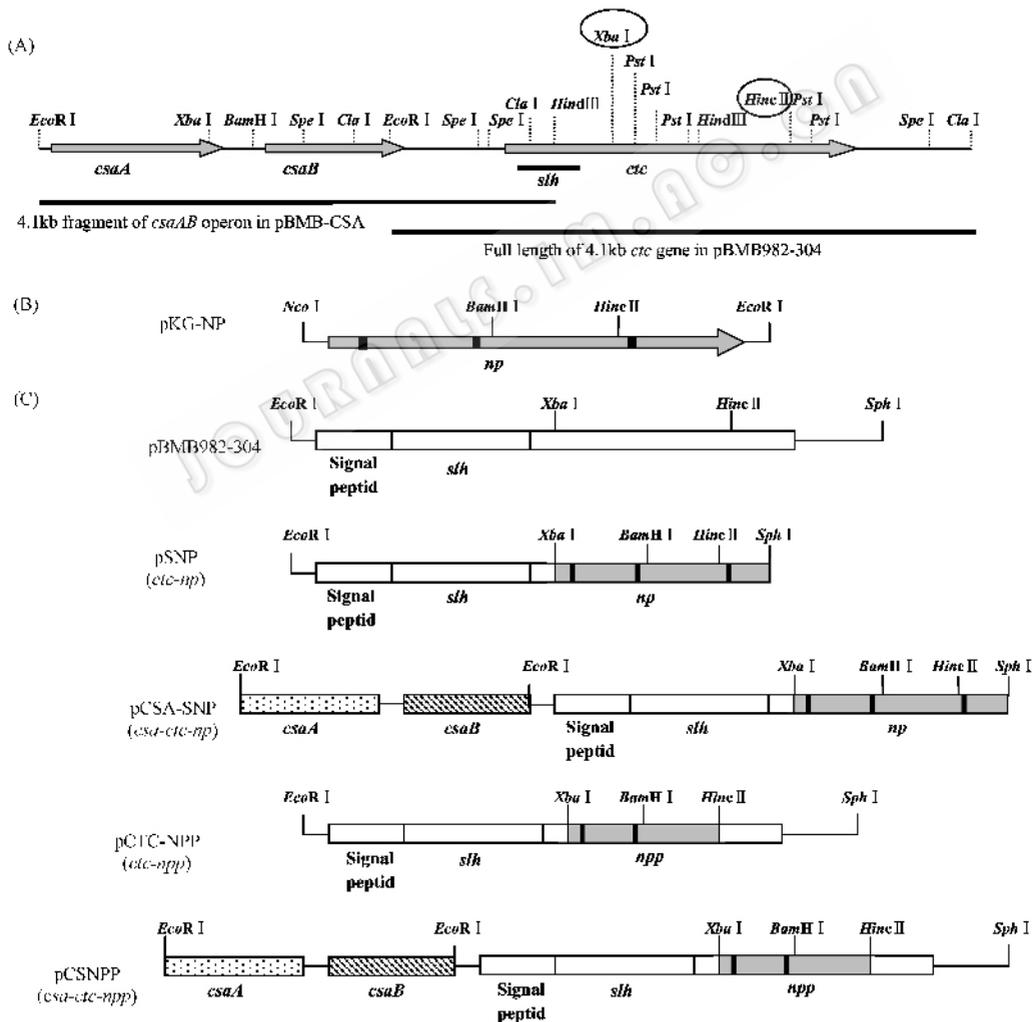


图1 (A) 苏云金芽胞杆菌 *ctc* 基因和 *csaAB* 操纵元示意图 (B) 全长 *np* 基因示意图; (C) *ctc-np*、*csa-ctc-np*、*ctc-npp* 和 *csa-ctc-npp* 融合基因构建示意图

Fig. 1 (A) Gene map of S-layer protein gene *ctc* and its upstream operon *csaAB*; (B) Full length of *np* gene in pKG-NP; (C) Schematic representation of the fusion gene *ctc-np*, *csa-ctc-np*, *ctc-npp* and *csa-ctc-npp*. (The white rectangle represents *ctc* gene, *slh* means S-layer homology domain, the small dark rectangle represents *np* epitope gene.)

点, *csaAB* 操纵元与 S-层蛋白在细胞表面的锚定密切相关^[11]。

本研究设计了 4 种融合基因的构建方式(图 1-B,C)。其中,质粒 pSNP 是将全长 *np* 基因通过 *ctc* 基因 *Xba* I 位点替换 *ctc* 基因 *slh* 之后的 3'-端,于是构成融合基因 *ctc-np*;质粒 pCSA-SNP 是在 pSNP 的基础上于 *ctc* 基因的前面插入 *csaAB* 操纵元,于是构成融合基因 *csa-ctc-np*;质粒 pCTC-NPP 是将部分 *np* 基因(*npp*,即全长 *np* 序列中 *Hinc* II 位点之前的序列,其包含 2 个表位(图 1-B))通过 *ctc* 基因中部的 *Xba* I - *Hinc* II 位点替换 *ctc* 基因中部片段,于是构成融合基因 *ctc-npp*;质粒 pCSNPP 是在 pCTC-NPP 的基础上于 *ctc* 基因的前面插入 *csaAB* 操纵元,于是构成融合基因 *csa-ctc-npp*。

将重组质粒电脉冲转入 Bt 受体菌株 BMB171 中。其中,在转化 pSNP 和 pCTC-NPP 时,要同时将 pMIL-CSA 转入 BMB171 中,以提供 *csaAB* 操纵元。从而获得 5 个展示 NP 蛋白的重组菌株 BCN(含 pSNP 和 pMIL-CSA,即含融合基因 *ctc-np + csaAB*)、C-S(含 pCSA-SNP,即含融合基因 *csa-ctc-np*)、BCCN(含 pCTC-NPP 和 pMIL-CSA,即含融合基因 *ctc-npp + csaAB*)、CN(含 pCSNPP,即含融合基因 *csa-ctc-npp*)和 BN 只含 pSNP,即含融合基因 *ctc-np*,未转入 pMIL-CSA,目的是为了考察无 *csaAB* 操纵元时,重组菌株的展示情况。对所构建的重组菌株抽提质粒进行酶切验证,结果均与预计的相符(图略)。

2.2 重组菌株的玻片凝集试验

用玻片凝集试验检测重组菌株中 NP 蛋白在细胞表面的展示情况。结果表明,受体菌株 BMB171 和 5 个重组菌株在 PBS 和阴性血清中,菌悬液均匀混浊,不透明,其凝集反应均为阴性;受体菌株

BMB171 在阳性血清中无凝集块出现,凝集反应为阴性,而 5 个重组菌株在阳性血清中均出现了明显的凝集块,均发生了凝集反应(图 2),说明 *np* 基因在 5 个重组菌株中均得到了表达并展示于细胞表面。从 5 个重组菌株的玻片凝集效价测定实验结果(表 3)可以看出,5 个重组菌株的表面展示状况不均,其中 C-S(*csa-ctc-np*)和 CN(*csa-ctc-npp*)的凝集效价最高;BCN(*ctc-np + csaAB*)和 BCCN(*ctc-npp + csaAB*)居中;BN(*ctc-np*)的最低,初步说明 *csa-ctc-np* 和 *csa-ctc-npp* 这两种融合基因的构建方式更有利于外源抗原在细胞表面的展示。

表 3 展示 NP 蛋白的重组菌株 BN、BCN、C-S、BCCN 和 CN 的玻片凝集效价

Table 3 Slide agglutination titer of recombinant strains BN, BCN, C-S, BCCN and CN which displayed NP protein

Recombinant strains	Negative serum dilution		Positive serum serial dilution			
	1:2	1:4	1:2	1:4	1:8	1:16
BMB171 (as control)	-	-	-	-	-	-
BN	-	-	+	+	-	-
BCN	-	-	+	+	±	-
C-S	-	-	+	+	+	±
BCCN	-	-	+	+	±	-
CN	-	-	+	+	+	±

"+" represents positive result; "-" represents negative result; "±" represents doubtful result.

2.3 重组菌株免疫小鼠结果

小鼠免疫结果显示,5 个重组菌株均能诱导小鼠产生针对 NP 的特异抗体,随着免疫次数的增加,其抗体水平不断提高,与对照受体菌株 BMB171 相比,其差异极显著($P < 0.01$),说明 5 个重组菌株具有一定的免疫原性。其中,CN 的免疫效果最佳;其次是 C-S;再次是 BCN 和 BCCN;最差的是 BN(图 3)。这个结果与重组菌株的玻片凝集效价测定实验结果基本吻合,从而,寻找到了能使外源抗原表现出最高免疫学活性的融合基因构建方式 *csa-ctc-npp*(重组菌株 CN,含 pCSNPP),即外源抗原基因替换 *ctc* 基因的中部,并且 *csaAB* 操纵元位于 *ctc* 基因的上游与 *ctc* 基因存在于同一个重组质粒中。

3 讨论

在已初步构建的 Bt S-层蛋白 CTC 表面展示系统中,*csaAB* 操纵元与 *ctc* 基因分别位于两个重组质粒中,重组菌株中包含两个重组质粒^[6],而在原始菌株(CTC 菌株)中,*csaAB* 操纵元紧位于 *ctc* 基因的上游(图 1-A)。本研究将 *csaAB* 操纵元构建到了 *ctc* 融合基因的上游,这样,重组菌株中只需包含一个重组质粒,如重组菌株 C-S(含 pCSA-SNP)和 CN(含 pCSNPP),结果表明,只包含一个质粒的重组菌株

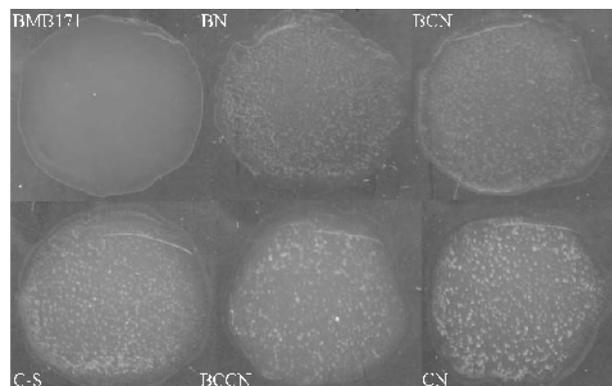


图 2 展示 NP 蛋白的重组菌株 BN、BCN、C-S、BCCN 和 CN 玻片凝集试验

Fig.2 Slide agglutination test of recombinant strains BN, BCN, C-S, BCCN and CN which displayed NP protein. (positive serum dilution 1:4)

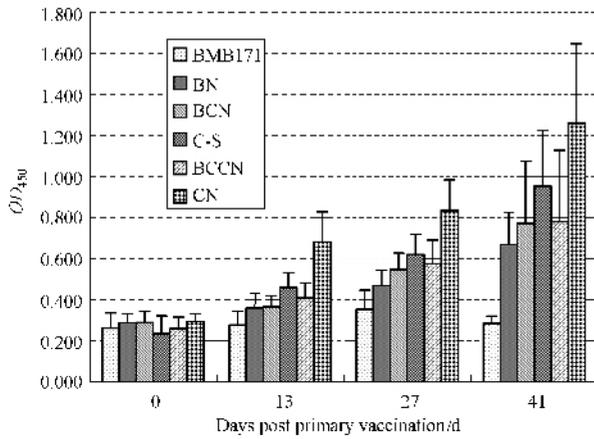


图3 展示 NP 蛋白的重组菌株 BN、BCN、C-S、BCCN 和 CN 免疫小鼠前后血清 IgG 抗体水平变化

Fig. 3 Variation of mice sera IgG pre- and post-immunization with recombinant strains BN, BCN, C-S, BCCN and CN which displayed NP protein.

的免疫原性高于包含两个质粒的重组菌株,如 C-S 比 BCN(含 pSNP 和 pMIL-CSA)和 CN 比 BCCN(含 pCTC-NPP 和 pMIL-CSA)。由此可见, *csaAB* 操纵元与 *ctc* 融合基因连锁更有利于 S-层融合蛋白在细菌细胞表面的展示,因为这样的排列方式与原始菌株中基因的排列方式一致。另外,由两个重组质粒变为一个重组质粒可减少一个抗性基因的存在。

在构建重组菌株时,本研究发现了一个有趣的现象, *csaAB* 操纵元与 *ctc* 基因连锁的重组菌株 C-S 和 CN 的菌落形态与不含 *csaAB* 操纵元的重组菌株 BN 以及 *csaAB* 操纵元与 *ctc* 融合基因分别位于两个质粒的重组菌株 BCN 和 BCCN 的菌落形态相比具有明显的不同,后 3 个重组菌株的菌落形态与受体菌株 BMB171 的没有区别,均呈典型的 Bt 样菌落。以重组菌株 BN 和 C-S 为例,在相同的培养条件下,肉眼所见, BN 的菌落较大、表面粗糙无光泽,菌落平坦,而 C-S 的菌落较小、表面光滑且有光泽,菌落隆起;在低倍(40×)显微镜下观察, C-S 的菌落并不像 BN 那样呈卷发状,而是呈棉絮状(图 4);通过显微镜油镜(100×)观察, C-S 的菌体形态与 BN 的没有区别(图略)。重组菌株 C-S 和 CN 菌落形态的变化是否与在受体菌株 BMB171 中 *csaAB* 操纵元与 *ctc* 基因连锁有关呢?这还有待进一步探索。

本研究设计了两种 S-层融合基因的构建方式,一种是外源抗原基因替换 *ctc* 基因的 3'-端(如 pSNP 和 pCSA-SNP),另一种是外源抗原基因替换 *ctc* 基因的中部(如 pCTC-NPP 和 pCSNPP)。结果表明,中部替换法优于 3'-端替换法(如 CN 比 C-S)。中部替换法保留了 *ctc* 基因的终止子,也许这对融合基因的表达更有利。

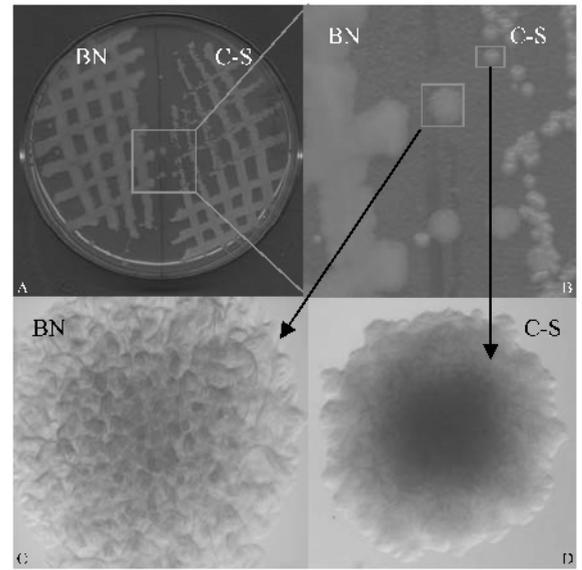


图4 重组菌株 BN 菌落形态与重组菌株 C-S 菌落形态比较

Fig. 4 Colony shapes of recombinant strains BN and C-S. A and B: Photographs of strains BN and C-S on plate, the strains were cultured for 30°C 15h on the LB solid medium; C and D: Micrographs of strains BN and C-S colony, magnification 40×.

完整的禽流感病毒 NP 蛋白(nucleoprotein, 核衣壳蛋白)具有 3 个独立的表位(图 1-B)。本研究在采用 *ctc* 基因中部替换法构建融合基因时,为了利用 *Hinc* II 位点,将全长 *np* 基因中 *Hinc* II 位点以后的序列去除掉,保留了 NP 蛋白的 2 个表位(图 1-C)。结果表明,包含 2 个表位的部分 NP 蛋白亦能表现出免疫学活性(如 BCCN 和 CN)。

研究结果显示,不含 *csaAB* 操纵元的重组菌株 BN 亦表现出了一定的免疫学活性,但活性低于包含 *csaAB* 操纵元的重组菌株(如 BCN 和 C-S),这说明 *csaAB* 操纵元的确与 S-层蛋白牢固地锚定在细胞表面密切相关,但是,当重组菌株不含 *csaAB* 操纵元时,受体菌株 BMB171 中似乎存在某种机制能促进 S-层融合蛋白锚定在细胞表面,只是其作用不如 *csaAB* 操纵元强,这一点还有待进一步研究。

本文在国内外首次利用 Bt S-层蛋白表面展示系统在 Bt BMB171 菌株表面成功展示了禽流感病毒 NP 蛋白,所构建的 5 个重组菌株均具有免疫学活性,其中,重组菌株 CN(含融合基因 *csa-ctc-npp*)表现出了最高免疫学活性。通过本研究,寻找到了 S-层融合蛋白的最佳构建方式,从而为利用 Bt S-层表面展示系统构建展示其它禽类病原体抗原的重组菌株以开发成禽用热稳定性口服疫苗奠定了基础。

致谢 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所的蒋良丰研究生和华中农业大学动物医学院的许青荣老师在

小鼠免疫实验中给予了大量的帮助,在此表示感谢。

参 考 文 献

- [1] Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, et al. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol.2. Baltimore: Williams and Wilkins, 1986, 1105 - 1139.
- [2] Schnepf E, Crickmore N, van Rie J, et al. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1998, 62(3): 775 - 806.
- [3] 李 林, 喻子牛. 苏云金芽胞杆菌无质粒突变株 BMB171 的转化和表达性能. *应用与环境生物学报*, 1999, 5(4): 395 - 399.
- [4] Sleytr UB, Beveridge TJ. Bacterial S-layers. *Trends in Microbiology*, 1999, 7(6): 253 - 260.
- [5] Lee SY, Choi JH, Xu ZH. Microbial cell-surface display. *Trends in Biotechnology* 2003, 21(1): 45 - 52.
- [6] Wang L, Sun M, Yu ZN. Capacity of *Bacillus thuringiensis* S-layer

- protein displaying polyhistidine peptides on the cell surface. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2004, 119(2): 133 - 143.
- [7] 郭兴华, 熊占周, 民等. 枯草杆菌-大肠杆菌多功能穿梭载体的构建. *生物工程学报*, 1991, 7(3): 224 - 229.
- [8] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [9] 朱立平, 陈学清. *免疫学常用实验方法*. 北京: 人民军医出版社, 2000, 352 - 356.
- [10] 孙 明, 朱晨光, 喻子牛. 类似 S-层蛋白的苏云金芽胞杆菌伴胞晶体蛋白基因的克隆. *微生物学报*, 2001, 41(2): 141 - 147.
- [11] Mesnage S, Fontaine T, Mignot T, et al. Bacterial SLH domain proteins are non-covalently anchored to the cell surface via a conserved mechanism involving wall polysaccharide pyruvylation. *The EMBO Journal* 2000, 19(17): 4473 - 4484.

Display of Avian influenza virus nucleoprotein on *Bacillus thuringiensis* cell surface

LIU Mei^{1,2}, LI Shu-yun¹, ZHAO Chang-ming², SUN Ming², BI Ding-ren^{1,2*}

(¹ College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University; ² State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Wuhan 430070, China)

Abstract S-layer protein CTC surface display system of *Bacillus thuringiensis* (Bt) was used to test the possibility of displaying avian influenza virus nucleoprotein (NP) on Bt cell surface. Four recombinant plasmids were constructed by replacing 3'-terminal or central part below the surface anchor sequence *slh* of S-layer protein gene *ctc* with full length of *np* gene or part *np* gene (*npp*). The four resulting plasmids were pSNP (harboring fusion gene *ctc-np*), pCSA-SNP (harboring fusion gene *csa-ctc-np*, *csa* represents *csaAB* operon which is very important to the anchoring of S-layer protein on the bacterial cell surface), pCTC-NPP (harboring fusion gene *ctc-npp*) and pCSNPP (harboring fusion gene *csa-ctc-npp*). Five recombinant Bt strains were constructed by electro-transferring recombinant plasmids to Bt plasmid-free derivative strain BMB171. The resulting strains were BN (harboring pSNP), BCN (harboring pSNP as well as the plasmid pMIL-CSA which carried *csaAB* operon), C-S (harboring pCSA-SNP), BCCN (harboring pCTC-NPP and pMIL-CSA) and CN (harboring pCSNPP). The vegetative cells of five recombinant strains were used as agglutinogens of slide agglutination assay. Slide agglutination assay showed recombinant NP proteins were successfully displayed on the surface of five recombinant strains, respectively. After immunizing mice with vegetative cells of five recombinant strains respectively, five recombinant strains all elicited humoral responses to NP and exhibited immunogenicity as assayed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Meanwhile these assays showed recombinant strain CN (harboring fusion gene *csa-ctc-npp*) exhibited the highest immunogenicity among five recombinant strains. That means the best way of constructing S-layer fusion gene is *csa-ctc-** (* denotes heterologous antigen gene) which means the central part of S-layer protein gene *ctc* replaced by the heterologous antigen gene and *csaAB* operon located on the upstream of fusion gene. The strategy developed in this study gives a possibility to generate heat stable, oral, veterinary vaccine with Bt S-layer protein CTC surface display system.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*; S-layer surface display; avian influenza virus nucleoprotein; heat-stable oral vaccine

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (30080036); The Major Program for Science and Technology Development of Hubei Province of China (2006AA202A05); Opening Study Program of State Key Laboratory of Agricultural Microbiology of China (AML02004)

* Corresponding author. Tel 86-27-87280208; Fax 86-27-87280408; E-mail bidingren@mail.hzau.edu.cn

Other author. HU Si-shun

Received: 14 September 2006/ Accepted: 18 October 2006/ Revised: 12 February 2007