

霍乱毒素B亚单位基因在鼠伤寒沙门氏菌中的表达*

田京慧 陆德如

(第二军医大学,上海 200433)

本工作成功地将霍乱毒素B亚单位(ctx B)基因插入到带有天门冬氨酸 β -半醛脱氢酶基因(asd⁺)的pYA248质粒中,并将它转化至天门冬氨酸 β -半醛脱氢酶突变(asd⁻)鼠伤寒沙门氏菌中。实验结果表明,ctx B亚单位基因能在鼠伤寒沙门氏菌中高效表达,并且表达的蛋白能分泌到细胞外。动物实验结果也表明:该疫苗菌株能在肠粘膜细胞定居;口服及全身免疫均能产生较高的抗体,并能增强动物细胞的免疫功能;对伤寒、霍乱有毒株的攻击有良好的保护效果。该系统的应用为疫苗基因工程提供了一个新的途径。

关键词 霍乱B亚单位(ctx B); 天门冬氨酸- β -半醛脱氢酶(asd); 鼠伤寒沙门氏菌

由于基因工程的发展,人们可将病原体的抗原基因克隆到大肠杆菌或其它常用的微生物遗传系统中,并使之高效表达^[1-3],大大改进了疫苗制备的方法。但利用这些微生物来制备疫苗,必须把表达的抗原蛋白纯化,然后加工成疫苗,这样制备的疫苗成本较高,免疫效果也不理想。最近发展起来的沙门氏菌系统,由于该菌是一种兼性细胞内寄生菌,它不仅能在肠道粘膜定居刺激局部及全身的体液免疫,而且可在吞噬细胞中生存,直接将抗原递呈给免疫细胞引起细胞免疫,所以利用该菌的弱毒株作为异源抗原携带者,为多种病原生物,特别是与细胞免疫有关的疫苗,如疟疾、麻风、爱滋病等^[4-6]疫苗的研制创造了条件。而且可通过口服免疫,其效果大大优于大肠杆菌系统,这是疫苗基因工程的一个突破,也是当前疫苗遗传工程的发展方向之一。

我们选用一株带有环腺苷酸合成酶缺失、环腺苷酸受体蛋白缺失(Δ cya Δ cyp)无毒的鼠伤寒沙门氏菌作为受体菌,将霍乱毒素B亚单位(ctx B)基因插入到带有天门冬氨酸- β -半醛脱氢酶(asd⁺)野生型基因pYA248表达质粒中,并将其转化至asd⁻鼠伤寒沙门氏菌。该菌株能高效表达ctx B亚单位,并能分泌到细胞外。动物实验结果表明:该疫苗菌株能在肠粘膜细胞定居;口服及全身免疫均能产生较高的抗体并能增强动物的免疫功能;对伤寒、霍乱有毒株的攻击有良好的保护效果。是一种有较好应用前景的口服疫苗株。

材 料

1. 酶及生化试剂:限制性内切酶、T4 DNA连接酶、脱氧核酸DNaseI和DNA多聚酶I均购自华美及BioLabs公司。

本文于1991年3月7日收到。

* 本工作由中国人民解放军总后卫生部资助。

本工作得到了中国科学院微生物研究所戴秀玉、王敦全同志的热情帮助,特此致谢。

2. 菌株: 鼠伤寒沙门氏菌 *Salmonella typhimurium* X3730 (leu hsdLT gaLE trp-D2rpsL120ΔasdA1Δ(Zhf-4::Tn10) metE551 metA22 hsdSA hsdSB ilv) 4072 (pStSR-100DG⁺ gyrA1816 Δcya-1 Δcyp-1 ΔasdA1 Δ(zja-4::Tn10), 上述菌株均由美国华盛顿大学 R. Curtiss III 教授赠送。

3. 霍乱弧菌 569B (*Vibrio cholerae*) 毒株由上海生物制品研究所提供。鼠伤寒杆菌标准毒株由第二军医大学微生物学教研室供给。

4. 质粒: pCT332 由英国 D. Greenaway 赠送; pYA248 由美国 R. Curtiss III 教授赠送

5. P22 噬菌体及 LT2 菌由中国科学院微生物研究所王敖全教授惠赠。

6. 抗霍乱毒素的 CT 血清由北京军事医学院惠赠。

7. 动物: 小鼠 (SMM C/B) 由第二军医大学动物中心培育。家兔(新西兰)约 2kg, 由第二军医大学动物中心提供。

结 果

(一) pYA-ctx B 重组质粒的构建

为了使 ctx B 基因能在鼠伤寒沙门氏菌中表达,我们选用 pYA248^[2] 质粒作为运载体(结构见图 1),该质粒含有 trc 启动子、核糖体结合位点、起始密码、多克隆位点转录终止区、asd 基因等。由于 asd⁺ 基因的存在可与 asd⁻ 宿主菌互补,这样质粒就可稳定地存在宿主菌中。首先在 pYA248 质粒的多克隆酶切位点处用 SmaI 完全酶解,然后用 BamHI 部分酶解,即得到一端为 SmaI 的平末端,另一端为 BamHI 的粘性末端的 DNA 片段。与此同时用 XbaI 酶解含有霍乱毒素基因 (ctx) 的 pCT332 质粒^[2],酶解完全后加 dNTP 及 DNA 聚合酶修补使两端成平末端,再用 BamHI 酶解,得到一个仍保留 A2 片段及全部 ctx B 的目的基因。将分离的目的基因及载体 DNA 片段分别经电泳洗脱、酚抽提、乙醇沉淀处理后,取 500ng DNA 加 20 单位的 T4 DNA 连接酶,在 16℃ 连接反应条件下连接过夜,然后将该质粒转化至 *S. typhimurium* X3730 中。在无二氨基庚二酸 (DAP) 的 LB 琼脂平皿上得到约 300 个转化子,经电泳及酶切分析确定其中 10 个含有重组质粒 (pYA-ctx B)。

(二) ctx B 基因在鼠伤寒沙门氏菌中的表达

为了确定我们所构建的重组质粒的 ctx B 基因是否能在鼠伤寒沙门氏菌中表达,将带有质粒的 *S. typhimurium* X3730 在 LB 培养液中振荡培养过夜后,分别收集菌体及上清液,用冷丙酮沉淀上清液中的蛋白,用超声波及溶菌酶破碎菌体后,采用不同的方法对表达的产物进行检测。

1. 免疫酶斑点法检测: 将培养上清液及培养物分别点在硝酸纤维素膜上,置 37℃ 烘干, PBS 漂洗后,加抗 CT 兔血清 37℃ 作用 1 小时,用 PBS 再次漂洗后,与标有碱性磷酸酶的羊抗兔血清作用半小时,漂洗后,加底物显色,同时设标准 CT (sigma 公司) 为阳性对照,未带质粒的 *S. typhimurium* X3730 菌为阴性对照,阳性显示蓝色,阴性不显色。结果所检测的十个标本分别显出不同深浅的蓝斑,而对照不显色。表明重组质粒在 *S. typhimurium* X3730 中能表达 ctx B 抗原(图 2)。

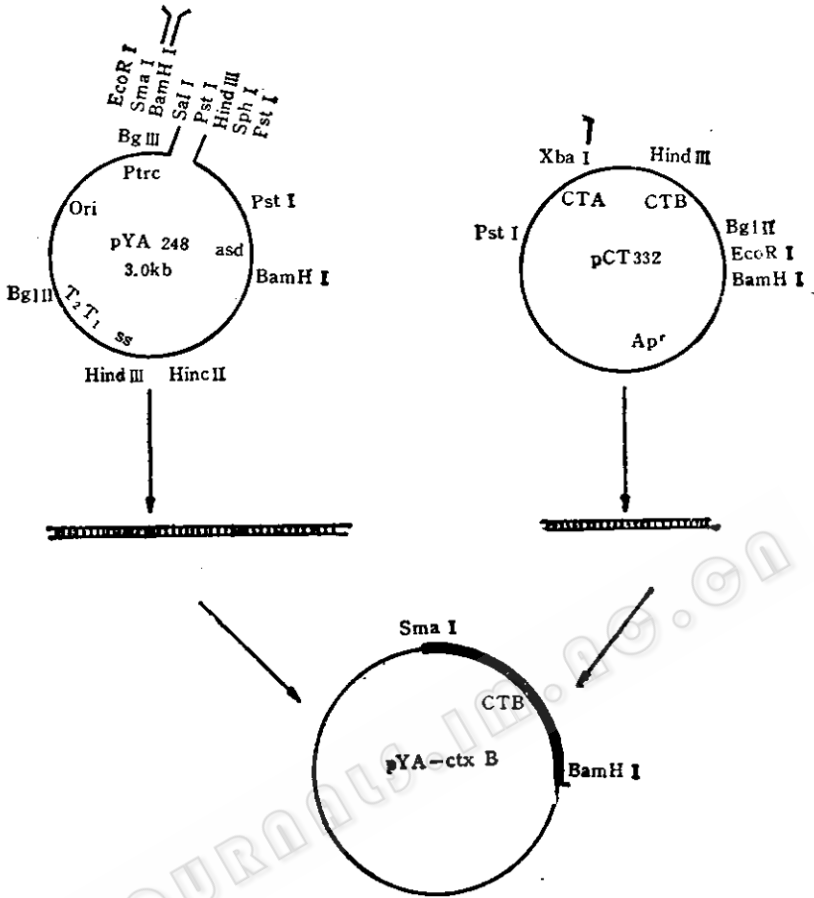


图 1 pYA-ctx B 重组质粒的构建

Fig. 1 The construction of pYA-ctx B recombinant plasmid

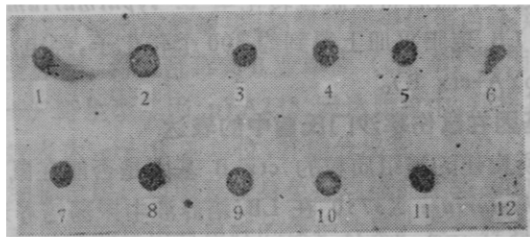


图 2 免疫酶斑点法检测结果

Fig. 2 The result of immunoenzymatic spot assay

1. 阳性对照 Positive control; 2-6. 培养物 The culture; 7-11. 上清液 The supernatants; 12. 阴性对照 Negative control

2. P22 噬菌体快速转导试验: 虽然上述构建的质粒在 *S. typhimurium* X3730 中能较稳定的表达 ctx B 抗原,但由于该菌是一种半乳糖糖苷酶缺陷性菌株 (gal E) 不能合成正常的 LPS 为粗糙型菌落,缺乏免疫原性,所以必须把表达的质粒通过 P22 噬菌体转导到具有正常 LPS 的 *S. typhimurium* X4072 菌中。实验是这样进行的: 首先将

P22 噬菌体在 LT2 (野生型沙门氏菌) 中增殖。然后取 4ml 增殖的噬菌体与 1ml 带有 ctx B 的 *S. typhimurium* X 3730 过夜菌混合。培养 6 小时后加氯仿, 离心收集上清液, 得到 P22 噬菌体原液, 然后取 50 μ l 原液与 100 μ l *S. typhimurium* X4072 过夜菌混合涂于 E 平皿上, 37 $^{\circ}$ C 过夜。长出的菌落即为带有重组质粒的转导子, 为了进一步证实, 我们进行了质粒电泳鉴定及 SPS-PAGE 分析, 结果证实该转导子带有重组质粒。

3. 被动免疫溶血试验检测 ctx B 抗原: 为了证实 pYA-ctx B 重组质粒在 *S. typhimurium* X4072 菌中也能表达 ctx B 抗原, 用被动溶血试验检测 *S. typhimurium* X4072 的培养物及培养上清液。根据 ctx B 抗原能与羊红细胞表面神经节苷脂 (GM1) 结合的原理, 当有相应的抗体存在时, 即能与红细胞表面抗原形成复合物, 在补体的作用下使羊红细胞出现溶血。结果表明, 阳性对照 (sigma 公司) 的 CT, *S. typhimurium* X4072 (pYA-ctx B) 的培养物及培养上清液均可出现溶血, 而未带质粒的 *S. typhimurium* X4072 阴性对照未溶血。由此可见, 培养物及培养上清液均存在着表达的 ctx B 抗原。为了进一步确定该菌对 ctx B 的表达量, 用被动溶血抑制试验测定菌细胞内和细胞外的 ctx B 抗原量。结果可见, 纯毒素 250ng/ml 可使绵羊红细胞完全不溶血, 并以此作为判断标准, 推算在培养上清液中约有 500ng/ml ctx B, 在菌细胞内约有 250ng/ml ctx B 抗原。表明 *S. typhimurium* X4072 (pYA-ctx B) 菌能高效表达 ctx B 抗原并能分泌到菌细胞外。

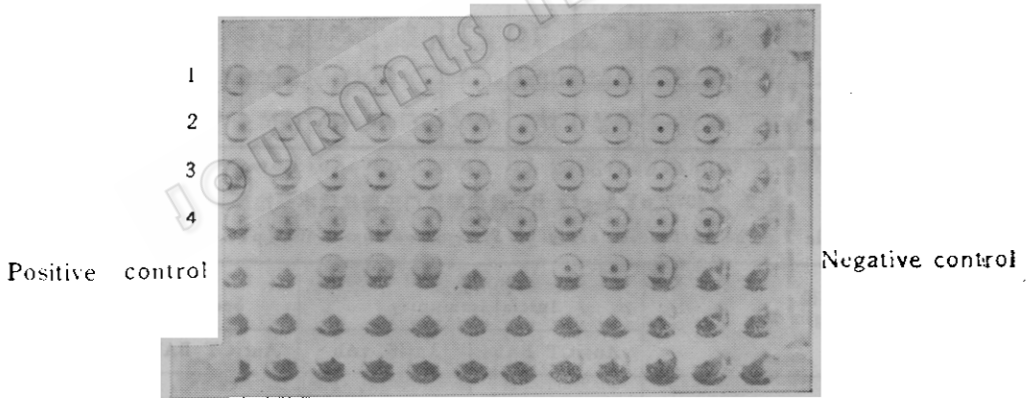


图 3 被动免疫溶血试验检测结果

Fig. 3 The result of passive immunity hemolysis assay
1—2. 培养物 The culture; 3—4. 上清液 The supernatant

(三) *S. typhimurium* X4072 (pYA-ctx B) 免疫力的检测

为了弄清我们构建的疫苗菌的免疫性及对鼠伤寒、霍乱有毒株的攻击的保护效果, 我们分别进行了以下几个试验。

1. *S. typhimurium* X4072 [pYA-ctx B] 在肠道的定居试验: 选两只家兔经口免疫, 在免疫前先灌注 5% NaHCO₃ 15ml, 30 分钟后给予 15ml 10⁸ 个菌/ml, 口服后连续五天检测家兔粪便, 并从粪便中分离细菌, 进行生化鉴定及血清学检查。结果见表 1 (表中 D = day)。口服后未引起家兔腹泻。前三日均能从家兔的粪便中不同程度的分离到

活菌,经生化反应及血清鉴定证实为鼠伤寒沙门氏菌。此结果说明,鼠伤寒疫苗菌能在家兔的肠粘膜上皮细胞定居,并未引起家兔腹泻及其它毒性反应。

表 1 X4072(pYA-ctx B) 鼠伤寒沙门氏菌定居试验

Table 1 The intestinal colonization test of *S. typhimurium* X4072 (pYA-ctx B)

项 目 Items		编号 No. 1					编号 No. 2				
		D1	D2	D3	D4	D5	D1	D2	D3	D4	D5
粪 便 Stools	稀 opaque 成形 forme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
可疑菌落 Suspicious colonies		3	3	3	0	0	3	2	1	0	0
生 化 试 验 Exp.	葡萄糖 Glucose	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
	乳糖 Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	麦芽糖 Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	甘露糖 Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	蔗糖 Sucrose	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
血清学试验 Serological test		+++	+++	++	-	-	+++	+++	++	-	-

表 2 X4072(pYA-ctx B) 鼠伤寒沙门氏菌抗体水平检查

Table 2 The antibodies assay of *S. typhimurium* X4072(pYA-ctx B)

免疫途径 Immunologic way	初次免疫 Initial Immunity		再次免疫 Secondary Immunity	
	AntiCT BAb	AntiS. tAb	AntiCT BAb	AntiS. tAb
口服 Oral 1	1:16	1:64	1:10240	1:2560
口服 Oral 2	1:32	1:320	1:10240	1:2560
注射 Inject 3	1:8	1:1280	1:10240	1:20480
注射 Inject 4	1:64	1:1280	1:10240	1:20480

CT BAb = ctx B antibody S. tAb = *S. typhimurium* antibody

2. *S. typhimurium* 4072 (pYA-CT B) 抗体水平的检测: 经口免疫的家兔休息两周后,再次重复免疫,方法同上。同时选用两只家兔进行全身免疫,先给予 0.1ml 3×10^8 /ml 腹腔注射,以倍增浓度隔天 1 次,连续五次,休息三周后检测血清效价。血清抗体

水平增高不明显, 故休息一周后用上述方法再次加强免疫。以反向被动溶血试验检测抗 ctx B 的抗体, 试管凝集试验检测抗鼠伤寒沙门氏菌的抗体, 结果见表 2。

3. 小鼠保护性试验: *S. typhimurium* X4072 (pYA-ctx B) 疫苗菌在 LB 培养增殖后用生理盐水洗二次, 配制成每毫升含菌 1×10^8 、 1×10^7 、 1×10^6 和 1×10^5 四个稀释度, 分别免疫 10—20g 小鼠, 每种稀释度为 12 只小鼠, 雌雄各半, 每只鼠的口服量为 $100 \mu\text{l}/10\text{g}$, 口服前先给予 5% NaHCO_3 $30 \mu\text{l}$, 5 分钟后给予上述菌液。七天后再次口服同样量, 方法同上。同时设口服生理盐水作为阴性对照, 一个月后分别用霍乱菌 (*V. cholerae*) 569 B 有毒株及鼠伤寒菌 (*S. typhimurium*) 有毒株进行腹腔注射攻击, 每只鼠的腹腔注射量分别为 5×10^7 , 结果当 *V. cholerae* 569 B 攻击量为 5000 万个菌时, 口服 1×10^8 的 *S. typhimurium* X4072 (pYA-ctx B) 菌可全部被保护, 1×10^7 的保护率为 84%、 1×10^6 的为 67%、 1×10^5 的为 50%。而对鼠伤寒沙门氏菌的有毒株攻击保护率均在 70% 以上。表明 *S. typhimurium* X4072 (pYA-ctx B) 疫苗菌对两株有毒株的攻击均有较好的免疫力。

4. 兔肠攀结扎保护性试验: 同上述方法经口免疫家兔, 基础免疫两次, 每次间隔半个月, 休息一月后, 耳静脉加强免疫, 十天后进行肠攀结扎攻击。先给予 20% 尿脂静脉麻醉, 等家兔处于昏迷麻醉状态时, 切开腹腔取出小肠, 用丝线将小肠结扎成六段, 每段约长 4—5cm, 间隔 1cm。每段肠腔分别给予 250ng/ml 标准 CT、100ng/ml 标准 CT、 1×10^8 *V. cholerae* 669 B、 1×10^8 *S. typhimurium* 有毒株、生理盐水 1ml 的悬液。然后缝合腹腔, 16 小时后将家兔处死, 取出结扎的肠段。根据每厘米肠平均积液 1.0ml 为阳性反应, 作为判断结果的标准, 结果见图 4。从图中结果可见看出, 除 250ng/ml 标准 CT 攻击量时肠腔积液在 $1.5\text{ml}/4 \sim 5\text{cm}$ (a) 外, 其它肠腔积液均在 $0.5\text{ml}/4 \sim 5\text{cm}$ 以下。这表明 *S. typhimurium* X4072 (pYA-ctx B) 菌能在肠道局部产生较强的保护力。

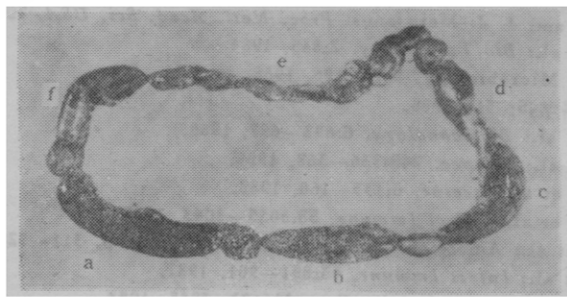


图 4 兔肠攀结扎试验

Fig. 4 The rabbit ligatid loop test

a = CT; b = CT; c = *V. cholerae*; d = *S. typhimurium*;
e = *S. typhimurium* X4072 (pYA-CT B)

5. 细胞免疫功能测定: 为了证实 *S. typhimurium* X4072 (pYA-ctx B) 不但可刺激机体的体液免疫, 而且还可以增强机体的细胞免疫功能。分别对口服及全身免疫的家兔用 H^3 -胸腺嘧啶核苷掺入法进行了淋巴细胞转化试验的测定。

表 3 结果显示, 家兔经口及注射 *S. typhimurium* X4072 (pYA-ctx B) 免疫后, 淋巴细胞转化率比免疫前均能提高一倍以上。可见, 该疫苗菌可显著的增加机体的细胞免

疫力。

表 3 淋巴细胞转化试验结果

Table 3 The result of lymphocyte transformation test

编号 No.	免疫前 Before imm.	免疫后 After imm.	倍数 Times
1	172.07	268.71	1.56
2	119.18	506.78	4.24
3	125.36	253.36	2.05
4	130.07	271.04	2.08

讨 论

我们选用 *S. typhimurium* (Δcya , Δcyp) 突变株作为霍乱毒素 B 亚单位的表达载体, 它的优越性在于: 首先由于该菌 *cya*、*cyp* 的缺失, 在寄生细胞内不能合成生物代谢中所需的蛋白, 以至不能造成对机体的毒性反应。其次它仍保持着免疫原性及可携带病原的基因而作为多价疫苗, 刺激机体的体液免疫和细胞免疫。再则该菌以细菌生物合成途径中 (二氨基庚二酸 PAP) 作为筛选克隆株的标记, 避免了以往抗菌素的标记而造成对人体的危害等。实验结果表明, 我们获得的带有 *V. cholera ctx B* 基因的 *S. typhimurium* 疫苗菌能高效表达 *ctx B* 抗原并能分泌到细胞外, 该菌能在动物体内定居, 口服及全身免疫均能产生较高的抗体。对鼠伤寒沙门氏菌及霍乱有毒株的攻击有良好的保护效果。

参 考 文 献

- [1] Gennaro, M. L. et al.: *Nucl Acids Res.*, 10(16): 4883, 1982.
- [2] Pearson, G. D. and J. J. Mekalanos: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79: 2976, 1982.
- [3] Kaper, J. B. et al.: *Bio/Technology*, 2:345, 1984.
- [4] Manning, P.A.: *Microbiology*, 5(7): 196, 1988.
- [5] 马清钧等: *中国科学*, 5: 516, 1988.
- [6] Nakayma, K. et al.: *Biotechnology*, 6:693-697, 1988.
- [7] Sadoff, J. J. et al.: *Science*, 240:336-368, 1988.
- [8] Curtiss, R. III. et al.: *Vaccine*, 6:155-160, 1988.
- [9] Curtiss, R. III. et al.: *Infect Immune*, 55:3055-3043, 1987.
- [10] Curtiss R III. et al.: *American Society for Microbiology*, p. 311-328, Washington DC., 1988.
- [11] Cwlig, P. A. et al.: *Infect Immune*, 55:891-901, 1987.
- [12] Gennaro, M. L. et al.: *Nucl Acids Res.*, 11(12): 3855, 1983.
- [13] Schmeiger, H.: *Mol. Gen. Genes.*, 119:75-88, 1972.

VIBRIO CHOLERAE TOXIN B SUBUNIT GENE EXPRESSED IN A SALMONELLA VACCINE STRAIN

Tian Jinghui Lu Deru

(The Second Military Medical University, Shanghai 200433)

This paper reports that the *V. cholerae* toxin B subunit (ctx B) gene was inserted into pYA 248 plasmid with the aspartate β -semialdehyde dehydrogenase (asd) gene and the recombinant plasmid was transformed into *S. typhimurium* deleting asd gene. Results showed that ctx B gene was highly expressed and secreted into medium. This strain was able to colonize in the intestinal epithelium. Oral immunity and general immunity could produce antibodies at high level and enhance cellular immune responses. The animals orally inoculated with *S. typhimurium* \times 4072 (pYA-ctx B) vaccine had remarkable protection against virulent *V. cholerae* 569B strain and *S. typhimurium* strain. Use of such system provides useful method for oral vaccine.

Key words *Vibrio cholerae* toxin B subunit gene ctx B; Aspartate β -semialdehyde dehydrogenase (asd); *Salmonella typhimurium*