39 卷 6 期
1999 年 12 月

微 生 物 学 报
Acta Microbiologica Sinica

Vol. 39 No. 6
December 1999

肠毒素源性定居因子 CS6 在减毒伤寒沙门氏菌中表达及免疫原性的研究*

滕家波[1] 芮贤良 张 毅[2] 张兆山 苏国富**

（军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071）

（[1] 卫生部长春生物制品研究所 长春 130062）

（[2] 白求恩医科大学 长春 130021）

提 要 将编码肠毒素源性大肠杆菌定居因子抗原 CS6 基因克隆至 pXL670，转化 *asd* 基因突变的 *E. coli* X6097，获得重组质粒 pSS64，再将后者转化至减毒的△aroA、△aroC、△asd 伤寒沙门氏菌，构建了无药物抗性且稳定的大肠杆菌和伤寒双价菌苗候选株。小鼠腹腔免疫和攻击实验表明，该菌株对伤寒沙门氏菌毒株的攻击具有良好的保护作用。家兔免疫实验证明，该菌株能产生抗 CS6 和伤寒菌 Vi 抗原的血清抗体。

关键词 肠毒素源性大肠杆菌，定居因子 CS6，伤寒沙门氏菌，双价活菌苗

分类号 R371.7 **文献标识码** A **文章编号** 0001－6209（1999）06－0533－38

人源肠毒素源性大肠杆菌（Enterotoxigenic *Escherichia coli*，ETEC）是发展中国家婴儿和旅游者腹泻的主要病原菌，病原菌的主要致病因素是定居因子（Colonization factor antigens，CFAs）和肠毒素（Enterotoxin），CS6 是 CFA/IV 的共有抗原成分，以往试验表明，定居因子抗原具有良好的免疫原性，是制备 ETEC 疫苗的重要组成部分[1,2]。

以减毒沙门氏菌作为载体构建双价活菌苗，是目前研制新型菌苗的重要途径之一。伤寒沙门氏菌 *Salmonella typhi* RS417 是由野生型伤寒沙门氏菌 Ty2 通过缺失突变构建的减毒株，既可用于预防伤寒，又可作为构建活菌苗的载体菌。本实验室已从人源肠毒素源性大肠杆菌 E519/66A 株中克隆出编码定居因子抗原 CS6 的基因，构建了重组质粒 pMG235，并在大肠杆菌中获得了表达。本文在此基础上，将定居因子抗原 CS6 基因导入减毒伤寒沙门氏菌菌苗候选株 RS417 中，观察其在减毒伤寒沙门氏菌中稳定表达情况及其免疫原性，为构建新型双价活菌苗打下基础。

1 材料和方法

菌株、质粒和培养基

伤寒沙门氏菌 *Salmonella typhi* Ty2 购自卫生部药品生物制品检定所，大肠杆菌 X6097 由美国华盛顿大学 Roy Curtiss Ⅲ教授惠赠，大肠杆菌 RRI（pMG235）、伤寒沙门氏菌△aroA、△aroC 双突变体 *S. typhi* RS406 和△aroA、△aroC、△asd 三突变体 *S. typhi*

* 国家自然科学基金资助项目（No. 39570662）

** 联系人

参加工作的还有军事医学科学院生物工程研究所杨晓

收稿日期：1998-03-18，修回日期：1998-06-05

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

RS417 由本实验室构建。本实验采用的培养基为 LB 或 BHI,必要时加二氨基庚乙酸或氨苄青霉素。

1.2 工具酶及化学试剂

限制性内切酶、T_4DNA 连接酶、RNA 酶、Taq 聚合酶均购自华美生物工程公司和 Promega 公司。对氨基苯甲酸(pABA)、2,3-二羟基苯甲酸(DHB)、二氨基庚乙酸(DAP)均为 Sigma 公司产品。辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 购自卫生部北京生物制品研究所,Vi 抗体购自卫生部药品生物制品检定所,抗 CS6 抗血清由本实验室制备。

1.3 重组质粒的构建和电穿孔法转化[3,4]

含目的基因的质粒 DNA 经相应的限制性内切酶消化后,采用低熔点琼脂糖法回收目的片段,与经酶切的载体混合后置 4℃ 连接过夜,用电穿孔法转化经氯化钙法制备的 *S. typhi* RS417 感受态细胞。

1.4 SDS-PAGE 和 Western Blotting 实验

按参考文献[3]进行。

1.5 稳定性实验[5]

重组菌分别接种有选择压力(无 DAP)和无选择压力(含 DAP)的 LB 培养基中,每隔 12h 转种新鲜培养基一次,连续传代 10d,再涂布含 DAP 的平板,随机挑取 100 个单菌落,分别点种在 LB 琼脂平板和加 DAP 的 LB 琼脂平板上,观察在不含 DAP 的平板上是否能生长,再通过提取质粒,Vi 抗原凝集实验及 Western Blotting 检测重组菌中的外源基因表达情况。

1.6 野生菌株 *S. typhi* Ty2 的 LD50 测定

选用体重为 14~16g 雌性昆明小鼠,实验前在动物房稳定一周,随机分五组,每组 6 只,所用剂量为 $2.88\times10^5\sim1.80\times10^8$CFU,腹腔注射含一定菌数的菌液 0.2mL/只,观察 3d,记录死亡及存活动物数。

1.7 小鼠腹腔免疫和攻击试验

选用雌性昆明小鼠,体重 14~16g,试验前在动物房稳定一周,随机分成八组,每组 6 只,其中对照为两组,免疫组为六组,以六个剂量 $5.44\times10^4\sim1.70\times10^8$ 腹腔免疫,对照组腹腔注射生理盐水。免疫 3 次,间隔 3d,最后一次免疫后的第 10d 以 $10\times LD_{50}$剂量的伤寒菌毒株 *S. typhi* Ty2 腹腔攻击,观察 7d,记录结果。

1.8 免疫原性试验

试验用雄性大耳白家兔,体重 2.5kg,耳缘静脉分别注射甲醛处理的菌体:*S. typhi* RS417(pSS64),*S. typhi* RS406,RRI(pMG235),剂量为 $1.6\times10^7\sim2.0\times10^8$ 或生理盐水 1mL/次,免疫 4 次,间隔 3~4d,分别在第 0,14,28,42,56d。耳动脉或耳静脉采血 1mL,待凝固后,吸取血清,用于效价测定。

2 结果和讨论

2.1 重组质粒的构建及在大肠杆菌和伤寒沙门氏菌中的表达

重组质粒的构建如图 1 所示。将质粒 pMG235 用 *Sma* I 和 *Sal* I 酶切,回收目的基因片段 CS6,用同样的酶对质粒 pXL670 酶切,回收 3.0kb 片段作载体,然后在 T_4DNA 连接

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

酶的作用下进行连接，转化 *E. coli* X6097，用不含 DAP 的琼脂平板筛选转化子。以质粒 pXL670 为对照，分别用 *Sma* I、*Sal* I、*Spe* I 和 *Sma* I、*Sal* I 酶切鉴定，结果表明构建正确（图略），含目的基因 *CS6* 的重组质粒命名为 pSS64。

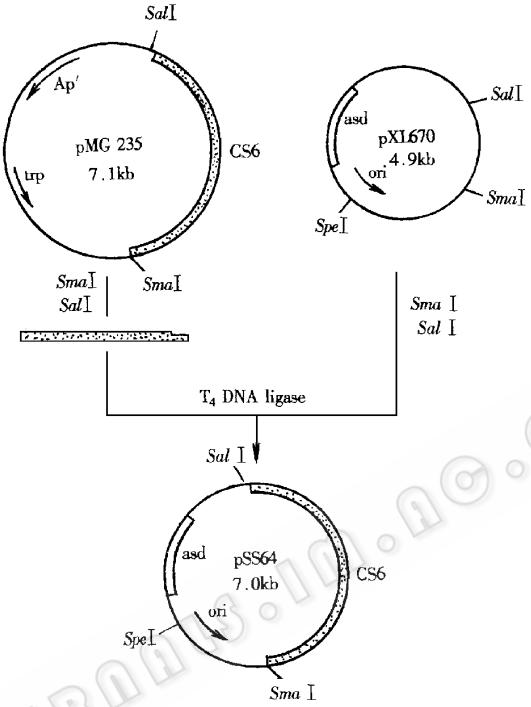

图 1　重组质粒 pSS64 的构建

Fig. 1　Construction of recombinant plasmid pSS64

为检测重组菌 X6097（pSS64）是否能表达 *CS6*，以含 *CS6* 基因的菌株 RRI（pMG235）为阳性对照，含空载体的菌株 X6097（pXL670）为阴性对照，分别制备样品，经 SDS-PAGE 电泳后，Western Blotting 分析，结果表明重组体 X6097（pSS64）与 RRI（pMG235）均表达 *CS6* 基因，见图 2。

为避免伤寒沙门氏菌对外源质粒的限制作用，提高转化效率，采用电穿孔法将含 *CS6* 基因的重组质粒 pSS64 转化△aroA、△aroC、△asd 三突变的受体菌 *S. typhi* RS417 中。Western Blotting 检测 *CS6* 在重组伤寒沙门氏菌 *S. typhi* RS417（pSS64）中的表达情况，结果表明 *CS6* 在大肠杆菌 X6097（pSS64）和伤寒沙门氏菌中的表达相同，见图 3。

2.2　重组菌株的稳定性实验

对于双价或多价口服菌苗，外源抗原基因表达的稳定性是一个十分重要的问题。因为工程菌必须在体内有一定时间的存活期，以便持续释放抗原才能有效地激活机体免疫系统的应答。我们将肠毒素源性表面抗原 CS6 克隆至带有 *asd* 基因的质粒后，导入△aroA、△aroC、△asd 伤寒沙门氏菌，体外连续传代 20 次，结果表明重组质粒在无任何抗生素存在的条件下，在受体菌内是稳定的，并且外源抗原基因 *CS6* 仍能稳定表达（图略）。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

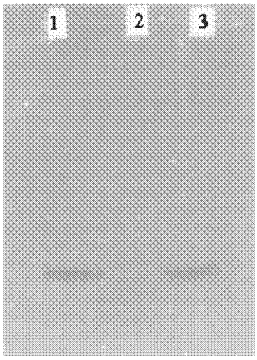

图 2 *CS6* **在大肠杆菌中表达的** Western Blotting **分析**

Fig. 2 Western Blotting analysis of the *CS6* expression in *E. coli*

1. *E. coli* X6097 harboring pSS64；
2. *E. coli* X6097 harboring pXL670；
3. *E. coli* RRI harboring pMG235.

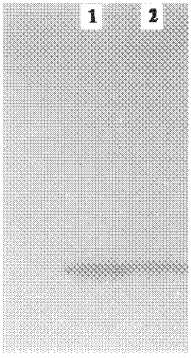

图 3 *CS6* **在伤寒沙门氏菌中表达的** Western Blotting **分析**

Fig. 3 Western Blotting analysis of the *CS6* expression in recombinant *S. typhi* strains

1. *E. coli* X6097 harboring pSS64；
2. Recombinant *S. typhi* RS417 strains.

2.3 重组菌对小鼠的保护性试验

以往试验证明，表面抗原 CS6 作为 CFA/IV 家族的共同抗原，当动物被 CS6 阳性的 ETEC 株感染后，可引起机体的免疫应答，使感染动物具有抵抗携带相同表面抗原的 ETEC 株在肠道内定居的能力，从而使机体免受此类致病菌的再感染，因而认为 CS6 是一种重要的保护性抗原[6]。由于小鼠模型对含 CS6 的人源野生菌株不敏感，无法进行 ETEC 毒株攻击试验。为检测重组菌对小鼠的保护性作用，我们首先测定了野生菌 *S. typhi* Ty2 的 LD_{50}，计算得野生菌 *S. typhi* Ty2 的 LD_{50} 为 9.24×10^6。用野生型伤寒菌攻击免疫小鼠，结果见表 1，存活率为 33.33%～100%，表明重组菌 *S. typhi* RS417(pSS64) 对伤寒毒株的攻击具有明显的保护作用。

表 1 ***S. typhi* RS417(pSS64)小鼠免疫保护性试验**

Table 1 The immune and proective results of *S. typhi* RS417(pSS64) in mice*

免疫原 Immungens	免疫剂量 Immune dose (CFU)	攻毒剂量 Challenge dose	存活/总数 Survial/Total	存活率/% Survial efficacy
S. typhi RS417(pSS64)	1.70×10^8	$10LD_{50}$	5/5	100
	3.40×10^7	$10LD_{50}$	6/6	100
	6.80×10^6	$10LD_{50}$	6/6	100
	1.36×10^6	$10LD_{50}$	5/6	83.33
	2.72×10^5	$10LD_{50}$	4/6	66.67
	5.44×10^4	$10LD_{50}$	2/6	33.33
Saline	0.2ml	$10LD_{50}$	0/12	0

* **攻毒菌株**：*S. typhi* Ty2

Challenge strain：*S. typhi* Ty2

2.4 重组菌免疫家兔后抗体效价的测定

减毒沙门氏菌携带外源抗原进入机体后，能激发机体对其自身和携带的外源保护性

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

抗原产生特异的免疫反应[7~10]。我们用重组菌对家兔进行了耳缘静脉免疫,采用 ELISA 方法检测免疫家兔血清中抗 CS6 抗体滴度,最高效价达 1:64000,并在初次免疫后第 56d 仍维持在 1:4000(表 2)。玻片凝集法检测抗 Vi 抗原的抗体效价,最高达 1:640(表 3)。从中可以看出,重组菌免疫家兔后,能诱发机体产生双重免疫应答。

表 2　重组菌免疫家兔后血清中抗 CS6 抗体效价

Table 2　The antibody titers of sera from rabbits immunized with recombinant strains *S. typhi* RS417(pSS64)

免疫原 Immunogens	免疫后时间/d The time after immunozation				
	0	14	28	42	56
S. typhi RS406	1:400	1:400	1:400	1:400	1:400
S. typhi RS417(pSS64)	1:400	1:4000	1:64000	1:16000	1:4000
RRI(pMG235)	1:400	1:4000	1:128000	1:64000	1:16000
Saline	1:400	1:400	1:400	1:400	1:400

* 攻毒菌株:*S. typhi* Ty2

Challenge strain:*S. typhi* Ty2

表 3　用玻片凝集试验测定兔血清中抗 Vi 抗体效价

Table 3　Detection of anti-Vi antibody titers of sera of rabbits by slide agglutination tests

免疫原 Immunogens	抗 Vi 抗体效价 Anti-Viantibody titers				
	0d	14d	28d	42d	56d
S. typhi RS406	0	1:160	1:1280	1:640	1:320
S. typhi RS417(pSS64)	0	1:80	1:640	1:160	1:40
RRI(pMG235)	No reaction				
Saline	No reaction				

采用减毒伤寒门氏菌作为受体构建双价或多价活疫苗,已成为新型疫苗研制的重要途径之一。本研究使用的受体菌为 *S. typhi* RS417,它是△aroA、△aroC 和△asd 三突变体,前两者使 *S. typhi* Ty2 充分减毒,后者使其在 LB 中生长依赖 DAP 的存在。为避免使用抗生素作为表达质粒的选择压,我们将 CS6 基因克隆至含 asd 基因的表达质粒 pXL670,然后转化 *S. typhi* RS417,结果表明菌苗候选株 *S. typhi* RS417(pSS64)能在无任何抗生素的条件下,稳定表达肠毒素源性定居因子抗原 CS6,小鼠腹腔免疫和攻击试验表明它对伤寒菌具有良好的保护作用,家兔免疫试验证明,该菌株能产生抗 CS6 和伤寒菌 Vi 抗原的血清抗体,为今后构建新型大肠杆菌/伤寒双价口服活疫苗打下了基础。

参　考　文　献

[1] Echeverria P J, Seriwatana J, Taylor D N *et al*. *Infect Immun*, 1986, **51**(2):626~630.

[2] Wolf M K, Andrews G P, Tall B D *et al*. *Infect Immun*, 1989, **57**(1):164~173.

[3] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning. A Laboratory Maunal, 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989. 880~897.

[4] Giron J A, Xu J G, Conzalez C R *et al*. Vaccine, 1995, **13**(10):939~946.

[5] Nakayama K, Kelly S M, Curtiss Ⅲ R. Bio/Technol, 1988, 6(6):693~697.

[6] Svenerholm A M, Vidal Y L, Holmgren S *et al*. *Infect Immun*, 1988, **56**(2):523~528.

[7] Curtiss R, Galan J E, Nakayama K *et al*. *Res Microbiol*, 1990, **141**(6):797~805.

[8] Dorman C J, Chatfield S, Higgins C F *et al*. *Infect Immun*, 1989, **57**(7):2136~2140.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

[9] Curtiss Ⅲ R, Nakayama K, Kelly S M. *Immunol Invest*, 1989, **18**(4): 583～596.
[10] Roberts M. Salmonella as carriers of heterologous antigens, Boca Raton, Fla CRC Press Inc, 1994. 27～36.

STABLE EXPRESSION AND IMMUNOGENICITY IN A ATTENUATED *SALMONELLA TYPHI* STRAIN OF COLI SURFACE ANTIGEN-6 OF ENTEROTOXIGENIC *ESCHERICHIA COLI* *

Teng Jiabo[1] Rui Xianliang Zhang Yi[2] Zhang Zhaoshan Su Guofu
(*Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing* 100071)
([1] *Changchun Institute of Biological Products, Changchun* 130062)
([2] *Bethune Medical University, Changchun* 130021)

Abstract A gene fragment encoding for surface antigen CS6 of enterotoxigenic of *Escherichia coli* has been cloned into the plasmid pXL670, a new recombinant plasmid pSS64 was obtained by transforming *E. coli* X6097 with asd gene deletion. A safe and effective *E. coli*/*S. typhi* bivalent candidate vaccine was constructed by introducing pSS64 into △aroA、△aroC、△asd *Salmonella typhi*. The vaccine strain is still stable in the absence of antibiotics. Animal tests demonstrated that this strain, when administered subcutaneously in mice, could provide significant protection against the intraperitoneal challenge from wild *S. typhi* Ty2. Immunization of rabbit with this strain raised specific antibody responses against CS6 and Vi antigen of *S. typhi*. This study lays the foundation for the construction of a new *E. coli*/*S. typhi* bivalent live oral vaccine.

Key words Enterotoxigenic *Escherichia coli*, Surface antigen CS6, *Salmonella typhi*, Bivalent live vaccine

* Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No. 39570662)

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn