

淋球菌 *porB* 和大肠杆菌 *ltB* 融合基因的构建、表达及其免疫活性

戴志兵¹, 胡四海^{1*}, 陈敏¹, 陆春雪¹, 王玉峰¹, 刘清南², 张愉快¹, 余敏君¹, 朱翠明¹, 李忠玉¹

(南华大学,¹病原生物学研究所,²心血管疾病研究所,衡阳 421001)

摘要:【目的】构建融合基因原核表达载体 pET-30a/*ltB-porB*, 并表达重组融合蛋白 LTB-PorB, 鼻饲途径免疫雌性 BALB/c 小鼠, 分析重组融合蛋白的免疫活性, 为研制抗淋病蛋白疫苗提供实验依据。【方法】构建大肠杆菌不耐热肠毒素 B 亚单位 (LTB) 与淋球菌外膜孔蛋白 B (PorB) 融合基因及 LTB、PorB 单基因 pET-30a 原核表达载体, 在大肠杆菌 BL21 中表达重组蛋白; 鼻饲途径免疫雌性 BALB/c 小鼠, 检测体液免疫和细胞免疫水平。【结果】在大肠杆菌 BL21 中获得高效表达的重组蛋白; 经鼻饲免疫小鼠后, 重组融合蛋白 LTB-PorB 组生殖道黏膜产生的 PorB 特异性 sIgA 水平随免疫时间呈上升趋势, 第 42 天 A_{450} 值达 0.66, 明显高于对照组 ($P < 0.01$), 效价高达 1:1280; 血清中产生的 PorB 特异性 IgG 第 28 天达最高, A_{450} 值为 0.60, 明显高于 LTB 和蛋白溶解液 (Solution Buffer) 对照组 ($P < 0.01$), 效价高达 1:2560, 但与 PorB 对照组血清 IgG 水平 (A_{450} : 0.57) 无明显差异 ($P > 0.05$)。LTB-PorB 组脾淋巴细胞刺激指数明显高于 LTB 和 Solution Buffer 对照组 ($P < 0.05$), 但脾淋巴细胞诱生的 IFN- γ 水平与对照组无明显差异 ($P > 0.05$)。【结论】重组融合蛋白 LTB-PorB 通过鼻饲途径免疫雌性 BALB/c 小鼠后, 能诱导产生高水平的体液免疫和一定水平的细胞免疫。首次证实黏膜佐剂 LTB 可辅佐 PorB 诱导小鼠产生高水平的生殖道黏膜免疫。

关键词: 淋病奈瑟菌; 孔蛋白 B; 大肠杆菌不耐热肠毒素 B 亚单位; 基因融合; 原核表达; 免疫活性

中图分类号: R392 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 04-0517-07

淋病奈瑟菌俗称淋球菌, 是引起淋病的病原菌, 淋病是我国目前发病人数最多的性传播疾病, 感染淋球菌还可增加 HIV 传播的危险性^[1]。如何有效控制和预防淋病, 成为全世界普遍关注的公共卫生问题, 而研制出有效的疫苗, 是预防和控制淋病的关键。孔蛋白 (Porin) 是淋球菌的主要外膜蛋白, 分子量约为 32-40 kDa, 占外膜蛋白的 60% 以上, 孔蛋白 B (PorB) 为 Porin 的主要亚型。PorB 具有相对保守性, 抗 PorB 抗体具有杀菌作用^[2], 故 PorB 是目

前为止公认的最具潜力的淋病疫苗候选蛋白。大肠杆菌不耐热肠毒素 B 亚单位 (B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin, LTB) 是继霍乱弧菌肠毒素 B 亚单位 (*Cholera* toxin B-subunit, CTB) 之后发现的一种新型黏膜佐剂^[3]。抗淋病免疫主要靠体液免疫, 尤其是黏膜免疫, 目前尚未见将 LTB 和 PorB 融合表达, 促进 PorB 诱导黏膜免疫应答的报道。该研究构建了 *ltB* 与 PorB 融合基因的原核表达载体, 在大肠杆菌中高效表达, 将表达的 LTB-

基金项目: 国家自然科学基金 (30771931); 湖南省教育厅科研基金 (08C745)

* 通信作者。Tel: +86-734-8281540; E-mail: hhs518@163.com

作者简介: 戴志兵 (1980-), 男, 湖南益阳人, 硕士, 研究方向为抗感染免疫。E-mail: daizhibing1980@163.com

收稿日期: 2009-12-06; 修回日期: 2009-12-31

PorB 重组融合蛋白通过鼻饲途径免疫 BALB/c 小鼠,探讨黏膜佐剂 LTB 能否辅佐 PorB 诱导更加有效的粘膜免疫,为研制高效抗淋病蛋白疫苗提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和实验动物: pET-30a 载体、*E. coli* JM109、*E. coli* BL21、淋球菌 WHO 标准株 E 株和大肠杆菌 H44815 株由本室保存;SPF 级 4-6 w 雌性 BALB/c 小鼠购自南华大学实验动物学部。

1.1.2 主要试剂和仪器: 工具酶类购自 MBI 公司; Ni-NTA6 × His 亲和层析纯化试剂盒购自 Qiagen 公司;一抗:兔抗淋球菌血清和兔抗霍乱弧菌肠毒素 (CT) 血清分别购自 Abcam 和 Sigma 公司;二抗:HRP 标记羊抗鼠 IgG 和 sIgA 分别购自 Abcam 和 Sigma 公司;HRP 标记的羊抗兔 IgG 购自碧云天公司;Detoxi-Gel™ 内毒素去除胶购自 Thermo Scientific 公司;显色基质鲎试剂盒购自厦门鲎试剂公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天公司;IFN-γ 检测试剂盒购自晶美生物公司。PCR 仪, Eppendorf 公司;凝胶图像分析系统, 黑马公司;低温高速离心机, Hettich 公司。

1.2 淋球菌和大肠杆菌标准株基因组 DNA 的制备

分别获取淋球菌 WHO 标准株 E 株及大肠杆菌 H44815 株菌液,离心,弃上清,加入 DNA 提取液,充分混匀,煮沸,离心,取上清,-20℃ 保存备用。

1.3 ltB, porB 基因及 ltB-porB 融合基因的扩增

根据 GenBank 报道的 porB (gi:6643971)、ltB (gi:145830) 核苷酸序列,利用 primer5.0 软件设计 ltB 和 porB 基因的特异性扩增引物。ltB 基因引物序列:上游 L1 (*Bam*H I): 5'-GCCGGATCCATGGCTCCTCAGTCTATTACAGA AACTATG-3', 下游 L2 (*Hind* III): 5' - TCGCAAGCTTCTAGTTTCCAT ACTGAT-3'。porB 基因引物序列:上游 P1 (*Bam*H I): 5'-CGGGATCCATGCTGTACGGCACCATCAAAG-3', 下游 P2 (*Hind* III): 5'-CCCAAGCTTCTAACCG CCGACAGTCGCTAC-3'。ltB 和 porB 反应体系 50 μL。PCR 反应参数:94℃, 5 min; 94℃, 45 s; 53℃, 45 s (ltB)/65℃, 45 s (porB); 72℃, 45 s (ltB)/1 min (porB), 共计 30 个循环;72℃, 10 min。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。ltB-porB 融合基因扩增参考秦勇等^[4]融合基因的扩增方法,在 ltB 的下游和 porB 的上游同时引入一段编码 6 个氨基酸

(Asp-Pro-Arg-Val-Pro-Ser) 的特殊核苷酸序列 (GATCCGAGAGTACCGAGC), PCR 扩增得到 ltB-Linker (ltB-L) 和 Linker-porB (L-porB)。ltB-L 的引物序列:上游 L1 (*Bam*H I): 5'-GCCGGATCCATGGCTCCTCAGTCTATTACAGA AACTATG-3', 下游 L3: 5'-GCTCGGTA CTCTCGGATCGTTTCCATACTGATTGCC-3'。L-porB 的引物序列:上游 P3: 5'-GATCCGAGAGTACCGAGCATGCTGTACGGCACCATCAAAG-3', 下游 P2 (*Hind* III): 5'-CCCAAGCTTCTAACCGCCGACAGTCGCTAC-3'。ltB-L, L-porB 的 PCR 体系及反应参数同 ltB 和 porB。试剂盒纯化回收产物 ltB-L、L-porB 并调两者至等浓度,两者互为引物互为模板扩增获得融合基因 ltB-porB。反应体系 50 μL。PCR 反应参数:94℃, 5 min; 94℃, 45 s; 65℃, 45 s; 72℃, 1 min, 共计 15 个循环; 72℃, 10 min。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.4 原核表达质粒 pET-30a/ltB、pET-30a/porB、pET-30a/ltB-porB 的构建及鉴定

从 *E. coli* JM109 提取质粒 pET-30a, 将 PCR 产物 ltB、porB、ltB-porB 和质粒 pET-30a 经 *Bam*H I 与 *Hind* III 双酶切。纯化回收上述酶切产物并连接过夜,将此连接产物转化入 *E. coli* JM109。在卡那霉素抗性的 LB 平板上培养 14-18 h 后挑选菌落行 PCR 鉴定及提取质粒双酶切鉴定,筛选阳性菌落。挑选阳性单克隆菌落增菌培养并送上海生工测序,测序结果与 GenBank 的 porB (gi:6643971)、ltB (gi:145830) 核苷酸序列作 Blast 分析。

1.5 重组蛋白的制备及 Western blot 分析

将原核重组体转化入表达菌 *E. coli* BL21 扩增培养,对温度、IPTG 和时间等诱导表达条件进行系列的摸索优化后,大量诱导表达并获得包涵体蛋白, Ni-NTA 亲和层析纯化柱 pH 梯度洗脱法纯化蛋白并通过尿素梯度透析复性;去除重组蛋白内毒素后测定蛋白浓度并调整蛋白浓度为 1000 μg/mL,于 -70℃ 保存。对重组蛋白 PorB 和 LTB-PorB 的检测均用兔抗淋球菌血清为一抗,对重组蛋白 LTB 和 LTB-PorB 的检测均用兔抗 CT 血清 (LT 与 CT 具有 80% 以上的同源性且免疫学性质十分相似,可用兔抗 CT 血清代替兔抗 LT 血清^[5]) 为一抗;HRP 标记羊抗兔 IgG 为二抗,按文献^[6]操作,Western blot 分析蛋白抗原性。

1.6 动物免疫

将 60 只 4-6 w BALB/c 雌性小鼠随机分成 4 组:LTB-PorB 实验组、PorB、LTB 和蛋白溶解液

(Solution Buffer) 对照组, 每组 15 只, 适应性饲养 1 w 后, 将重组蛋白以鼻饲途径免疫 BALB/c 小鼠, 每只每次 50 μg , 于 0、14、28 d 共免疫 3 次。

1.7 免疫小鼠标本的收集

于 0、14、28、42 d 收集小鼠生殖道灌洗液 100 μL ; 收集小鼠尾静脉血 50 - 80 μL , 分离血清, 所有标本于 -20°C 保存。

1.8 重组蛋白的免疫活性测定

体液免疫水平检测: 取小鼠生殖道灌洗液和小鼠血清, 以羊抗鼠酶标二抗分别检测 PorB 特异性 sIgA 和 IgG 水平, 参照文献[6]。细胞免疫水平检测: 用 PorB 蛋白刺激免疫小鼠培养脾细胞, MTT 比色法检测脾淋巴细胞的增殖反应, 根据刺激指数 (SI) 大小来判断增殖程度, $\text{SI} = \text{试验组平均 } A_{570} \text{ 值} / \text{对照组平均 } A_{570} \text{ 值}$; 用 PorB 蛋白刺激免疫小鼠培养脾细胞诱导 IFN- γ , 间接 ELISA 法检测 IFN- γ 产生水平, 参照文献[7]。

1.9 统计学处理

运用 SPSS16.0 软件进行分析。抗体水平、脾细胞刺激指数及细胞因子水平以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间均数的比较采用方差分析, 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 目的基因的 PCR 扩增

将从标准菌株中提取的 DNA 模板行 PCR, 扩增出 ltB、porB 和 ltB-porB, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 扩增片段大小与预期值 (ltB 352 bp, porB 894 bp, ltB-porB 1264 bp) 一致。

2.2 原核重组质粒的 PCR、双酶切及测序鉴定

结果显示: PCR 和双酶切均能得到预期目的条带, 说明目的基因成功克隆至 pET-30a 原核表达载体中 (图 1)。对 DNA 测序结果进行 Blast 比对分析, 证实重组体基因无任何密码子缺失与突变, 读码框正确, 基因序列同源率为 100%。确认获得 pET-30a/ltB、pET-30a/porB、pET-30a/ltB-porB 原核表达载体。

2.3 重组蛋白 LTB、PorB、LTB-PorB 表达、纯化与复性

经一系列诱导表达条件摸索后, PorB、LTB、LTB-PorB 以包涵体形式表达。表达产物纯化复性后经 SDS-PAGE 分析 (图 2), 获得了重组蛋白 LTB (14.4 kDa)、PorB (33 kDa)、LTB-PorB (47.4 kDa) 的清晰条带。

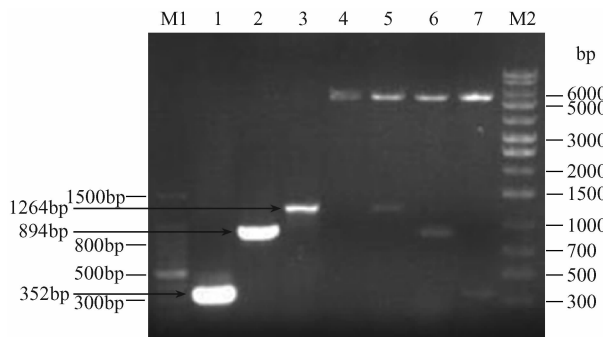


图 1 原核重组载体的 PCR 和酶切鉴定图谱

Fig. 1 PCR of Prokaryotic vector and digested products with *Bam*HI and *Hind*III. 1 - 3. The PCR products of pET-30a/ltB, pET-30a/porB, pET-30a/ltB-porB; 4 - 7. The digested products of pET-30a, pET-30a/ltB-porB, pET-30a/porB, pET-30a/ltB with *Bam*HI and *Hind*III; M₁, M₂. DNA ladder.

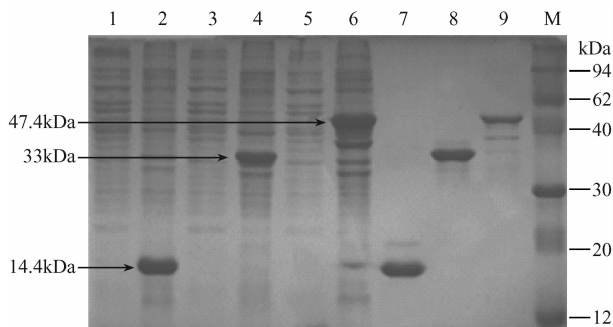


图 2 LTB、PorB、LTB-PorB 重组蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of LTB, PorB, LTB-PorB proteins. 1, 3, 5. Supernatant of broken from *Escherichia coli* BL21 with pET-30a/ltB, pET-30a/porB, pET-30a/ltB-porB induced by IPTG; 2, 4, 6. Precipitation of broken from *Escherichia coli* BL21 with pET-30a/ltB, pET-30a/porB, pET-30a/ltB-porB induced by IPTG; 7, 8, 9. Renatured protein LTB, PorB, LTB-PorB; M. Protein Marker.

2.4 重组蛋白 PorB、LTB、LTB-PorB 的抗原性分析

Western blot 结果显示, 重组质粒表达纯化产物与相应抗体发生特异性反应, 均在预期位置出现单一特异性目的条带, 而阴性对照组则没有特异性条带 (图 3)。

2.5 小鼠生殖道粘膜抗 PorB 特异性 sIgA 的检测

PorB 蛋白作为检测用抗原, 包被 ELISA 板, 间接 ELISA 法对 0、14、28、42 d 收集的小鼠生殖道灌洗液中的 sIgA 进行检测。结果显示: 在 3 次不同时间的免疫中, LTB-PorB 组 sIgA 水平呈上升趋势, 第 42 天 A_{450} 值达 0.66, sIgA 水平明显高于 PorB (A_{450} : 0.36)、LTB (A_{450} : 0.15)、Solution Buffer (A_{450} : 0.14)

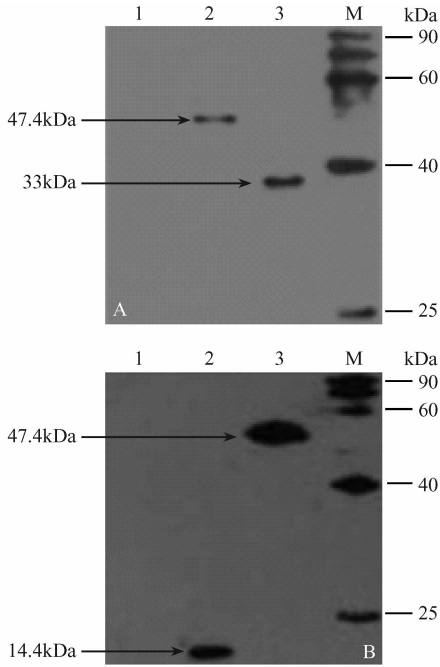


图3 重组蛋白的 Western blot 鉴定

Fig. 3 Analysis of proteins by Western blot. A: PorB, LTB-PorB; B: LTB, LTB-PorB. A: 1. pET-30a; 2. LTB-PorB (47.4 kDa); 3. PorB (33 kDa); M. EasySee Western Protein Marker. B: 1. pET-30a; 2. LTB (14.4 kDa); 3. LTB-PorB (47.4 kDa); M. EasySee Western Protein Marker.

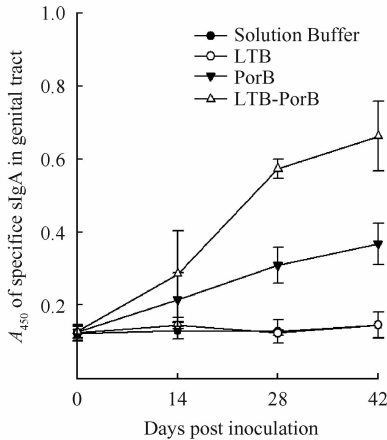


图4 鼻饲小鼠生殖道灌洗液抗 PorB 特异性 sIgA 水平

Fig. 4 SIgA levels of PorB in four intranasally immunized groups.

对照组 ($P < 0.01$, 图4), 效价高达 1:1280。

2.6 小鼠血清抗 PorB 特异性 IgG 的检测

PorB 蛋白作为检测用抗原, 包被 ELISA 板, 间接 ELISA 法对 0、14、28、42 d 收集的小鼠血清中的 IgG 进行检测。结果显示: 在 3 次不同时间的免疫中, LTB-PorB 组 IgG 水平第 28 天达最高, A_{450} 值为 0.60, 明显高于 LTB 对照组 (A_{450} : 0.21, $P < 0.01$) 和 Solution Buffer 对照组 (A_{450} : 0.15, $P < 0.01$), 效价高达 1:2560; 但 LTB-PorB 组与 PorB 对照组 (A_{450} :

0.57) 血清 IgG 水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 5。

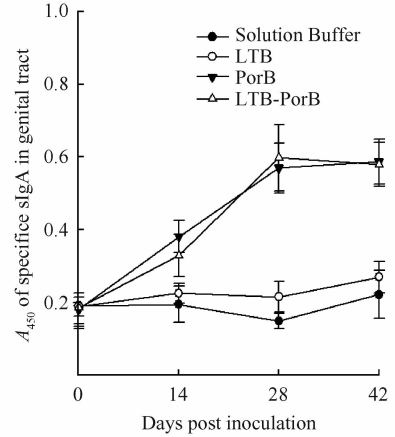


图5 鼻饲小鼠血清抗 PorB 特异性 IgG 抗体水平

Fig. 5 IgG levels of PorB in four intranasally immunized groups.

2.7 MTT 比色法检测脾淋巴细胞的增殖反应

小鼠脾淋巴细胞经 PorB 蛋白刺激后的结果表明: LTB-PorB 组刺激指数明显高于 LTB 和 Solution Buffer 对照组 ($P < 0.05$); 但 LTB-PorB 组与 PorB 对照组之间无显著性差异 ($P > 0.05$, 表 1)。

表 1 免疫小鼠脾淋巴细胞刺激指数 (SI) 及培养上清 IFN- γ 含量/(pg/mL)

Group	SI ($\bar{X} \pm S$)	IFN- γ ($\bar{X} \pm S$)
LTB-PorB	1.64 \pm 0.25 ^{ab}	44.75 \pm 1.54 ^c
PorB	1.58 \pm 0.24	44.75 \pm 1.05
LTB	1.06 \pm 0.15	43.48 \pm 1.75
Solution Buffer	1.10 \pm 0.12	47.28 \pm 1.91

a; compared with LTB, Solution Buffer controls ($P < 0.05$); b; compared with PorB control ($P > 0.05$); c; compared with PorB, LTB, Solution Buffer controls ($P > 0.05$).

2.8 免疫小鼠脾淋巴细胞培养上清中 IFN- γ 含量检测

按照说明书建立 IFN- γ 标准方程, 绘制标准曲线。检测结果显示: LTB-PorB 组与对照组之间无显著性差异 ($P > 0.05$, 表 1)。

3 讨论

粘膜免疫作为机体抗感染的第一道屏障, 在抵抗致病菌通过粘膜感染方面发挥重要作用。淋球菌主要通过人类泌尿生殖道感染并在粘膜细胞表面定植。有效的粘膜抗体可在感染早期起到保护作用, 对预防淋病感染有重要意义。

LTB 是目前所知最具潜力的粘膜佐剂之一, 通过与粘膜细胞表面的 GM1 神经节苷脂结合而发挥

粘膜佐剂作用。将 LTB 与目的抗原混合或偶联于目的抗原,通过鼻饲、生殖道等粘膜免疫途径免疫动物,可促进粘膜细胞对目的抗原的摄取,进而促进机体对抗原的免疫应答,特别是黏膜免疫^[8-9]。Sanchez 等^[10]将编码 LTB 的质粒载体 pltB 作为一种皮内基因佐剂,与表达 HPV16L1 的 DNA 疫苗一起免疫小鼠,在小鼠宫颈分泌物和粪便滤液中检测到了高水平的抗 HPV16L1 的 sIgA。LTB 同时也是一种粘膜载体分子,与半抗原或弱免疫原结合,可增强其免疫原性,促进体液免疫和细胞免疫应答。因此,以 LTB 作为粘膜佐剂,促进疫苗抗原产生有效的粘膜免疫应答,是研制经粘膜感染病原体疫苗的策略之一。

此外,选择合适的免疫途径也十分重要。Weiyan Zhu 等^[2]用淋球菌外膜囊泡抗原通过鼻粘膜途径免疫 BALB/c 小鼠,发现可在小鼠生殖道灌洗液中检测到较高水平的特异性 sIgA,血清及生殖道灌洗液中均可检测到特异性 IgG。Arko RJ 等^[11]将 PorB 经小鼠口服免疫,可诱导产生针对淋球菌 PorB 的系统免疫和生殖道局部免疫。由此可见,疫苗抗原经粘膜途径免疫能有效诱导粘膜免疫应答。常用的粘膜免疫方法主要包括胃肠道、鼻腔、生殖道等。鼻腔免疫因避免了胃肠道酸性环境及酶对抗原的破坏^[12]、操作简便易行而被广泛采用。

该研究选取淋球菌 PorB 蛋白作为免疫原,辅之以粘膜佐剂 LTB,经粘膜途径(鼻饲)免疫雌性 BALB/c 小鼠,探讨粘膜佐剂优化的 LTB-PorB 重组融合蛋白诱导的体液免疫及细胞免疫水平,尤其是粘膜 sIgA 水平。结果显示:LTB-PorB 组 sIgA 和 IgG 水平随免疫时间呈升高趋势,免疫后第 42 天抗淋球菌 PorB 的特异性 sIgA A_{450} 值达 0.66,明显高于 PorB、LTB 和 Solution Buffer 对照组 ($P < 0.01$);第 28 天特异性 IgG A_{450} 值达 0.60,明显高于 LTB 和 Solution Buffer 对照组 ($P < 0.01$),但与 PorB 对照组的差异无统计学意义 ($P > 0.05$),说明 LTB 能有效辅佐 PorB 在粘膜局部产生特异性 sIgA,但对诱导血清特异性 IgG 产生的作用不明显。

大量研究显示,蛋白疫苗能诱导较强的 Th2 型体液免疫应答,但其诱导的细胞免疫应答常显不足^[13-16]。为了更加全面地了解 LTB-PorB 重组融合蛋白的免疫效果,该研究同时进行了细胞免疫水平的检测,结果显示 LTB-PorB 组小鼠脾淋巴细胞刺激指数明显高于 LTB 和 Solution Buffer 对照组 ($P < 0.05$),但与 PorB 对照组间无明显差异 ($P > 0.05$)。

LTB-PorB 组小鼠脾淋巴细胞诱生的 IFN- γ 水平与对照组无明显差异 ($P > 0.05$)。上述结果表明 LTB-PorB 融合蛋白能促进小鼠脾淋巴细胞增殖,但诱生 IFN- γ 的作用不明显,这与普遍认为的外源性重组蛋白主要通过 MHC-II 类分子途径提呈、诱导体液免疫为主,而诱导的细胞免疫应答常显不足的报道基本一致。

综上所述,该研究成功构建了淋球菌 porB 和大肠杆菌 ltB 融合基因的原核表达载体,并能有效表达融合蛋白 LTB-PorB;初步探讨了融合蛋白的免疫活性:融合蛋白中黏膜佐剂 LTB 能有效辅佐 PorB 在小鼠生殖道粘膜诱导产生高水平的特异性 sIgA;LTB-PorB 融合蛋白也能诱导产生高水平的血清特异性 IgG 和一定水平的细胞免疫,这些结果为进一步研究高效抗淋病蛋白疫苗提供了部分实验依据。

参考文献

- [1] Unemo M, Palmer HM, Blackmore T, et al. Global transmission of prolyliminopeptidase-negative *Neisseria gonorrhoeae* strains: implications for changes in diagnostic strategies. *Sexually Transmitted Infections*, 2007, 83(1):47-51
- [2] Zhu W, Thomas CE, Chen CJ, et al. Comparison of immune responses to gonococcal PorB delivered as outer membrane vesicles, recombinant protein, or Venezuelan equine encephalitis virus replicon particles. *Infection and Immunity*, 2005, 73(11):7558-7568.
- [3] Pizza M, Giuliani MM, Fontana MR, et al. Mucosal vaccines: nontoxic derivatives of LT and CT as mucosal adjuvants. *Vaccine*, 2001, 19(17-19):2534 - 2541.
- [4] 秦勇,胡四海,张愉快,等. 淋球菌 nspA 和大肠杆菌 ltB 融合基因的构建、表达及鉴定. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2008, 48(2):197-201.
- [5] Spangler BD. Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Microbiological Reviews*, 1992, 56(4):622-647.
- [6] Sambrook J, Russell DW. 分子克隆实验指南. 黄培堂,等译. 第三版. 北京:科学出版社,2002.
- [7] 谢良伊,胡四海,唐湘云,等. 淋病奈瑟菌表面蛋白 A 基因疫苗的构建及其诱导小鼠的免疫应答. *中华传染病杂志 (Chinese Journal of Infectious Diseases)*, 2007, 25(7):392-397.
- [8] Verweij WR, de Haan L, Holtrop M, et al. Mucosal immunoadjuvant activity of recombinant *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and its B subunit: induction of systemic IgG and secretory IgA responses in mice by intranasal immunization with influenza virus surface antigen. *Vaccine*, 1998, 16(20):2069-2076.

- [9] O' Dowd AM, Botting CH, Precious B, et al. Novel modifications to the C-terminus of LT6 that facilitate sitedirected chemical coupling of antigens and the development of LT6 as a carrier for mucosal vaccines. *Vaccine*, 1999, 17(11-12): 1442-1453.
- [10] Sanchez AE, Aquino G, Ostoa-Saloma P, et al. Cholera toxin B-subunit gene enhances mucosal immunoglobulin A, Th1-type, and CD8⁺ cytotoxic responses when coadministered intradermally with a DNA vaccine. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 2004, 11(4):711-719.
- [11] Arko RJ, Smith S, Chen CY. *Neisseria gonorrhoeae*: vaginal clearance and its correlation with resistance to infection in subcutaneous chambers in orally immunized estradiol-primed mice. *Vaccine*, 1997, 15(12-13): 1344-1348.
- [12] Featherstone C. M cells: portals to the mucosal immune system. *Lancet*, 1997, 350(9086):1230.
- [13] 戴洋,朱荫昌,王晓婷,等. 日本血吸虫鸡尾酒式 DNA 疫苗与蛋白疫苗联合应用增强免疫保护作用的研究. 中国血吸虫病防治杂志 (*Chinese Journal of Schistosomiasis Control*), 2008, 20(1):1-7.
- [14] 张冉,易新元,曾宪芳,等. 日本血吸虫 Rho GTPase DNA 疫苗及重组蛋白疫苗免疫保护机制初探. 中国寄生虫病防治杂志 (*Chinese Journal of Parasitic Disease Control*), 2004, 17(5): 291-294.
- [15] 吴丹,王庆敏,陈蕊雯,等. 猪囊尾蚴抗原 cC1 DNA 疫苗和蛋白质疫苗联合诱导小鼠免疫应答. 第二军医大学学报 (*Academic Journal of Second Military Medical University*), 2004, 25(1):34-36.
- [16] Kang Y, Calvo PA, Daly TM, et al. Comparison of humoral immune responses elicited by DNA and protein vaccines based on merozoite surface protein-1 from *Plasmodium yoelii*, a rodent malaria parasite. *Journal of Immunology*, 1998, 161(8):4211-4219.

Construction, expression and immunocompetence of *Neisseria gonorrhoeae* porB and *Escherichia coli* ltb fusion gene

Zhibing Dai¹, Sihai Hu^{1*}, Min Chen¹, Chunxue Lu¹, Yufeng Wang¹, Qingnan Liu², Yukuai Zhang¹, Minjun Yu¹, Cuiming Zhu¹, Zhongyu Li¹

(¹Pathogenic Biology Institute, University of South China, Hengyang, 421001, China)

(²Cardiovascular Disease Institute, University of South China, Hengyang, 421001, China)

Abstract: [**Objective**] To construct prokaryotic fusion gene expression vector pET-30a/ltb-porB, express the recombinant fusion protein LTB-PorB and analyze the immunocompetence of the recombinant fusion protein in female BALB/c mice through intranasally immunization. [**Methods**] B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LTB) and *Neisseria gonorrhoeae* Porin B (PorB) fusion gene, LTB gene and PorB gene were cloned into prokaryotic vector pET-30a. The recombinants were identified by Polymerase Chain Reaction (PCR), enzyme digestion and DNA sequencing, and then expressed efficiently in *Escherichia coli* BL21 in the form of inclusion bodies. The renatured recombinant proteins had antigenicity, which was confirmed by Western blot. Female BALB/c mice were inoculated with renatured recombinant proteins without endotoxin through intranasally immunization at the days 0, 14, 28. Next, humoral immunoresponse and cellullar immunologic response were detected in female BALB/c mice by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) colorimetric assay. [**Results**] The level of PorB specific sIgA in genital tract and IgG in serum shown upward trend along with the days post inoculation in LTB-PorB group, A₄₅₀ of sIgA in LTB-PorB group was 0.66 at the day 42, which was significantly higher than controls ($P < 0.01$), and the titer was up to 1:1280. A₄₅₀ of serum IgG in LTB-PorB group was 0.60 at the day 28, which was significantly higher than the LTB and the Solution Buffer

controls ($P < 0.01$), and the titer was up to 1:2560. However, the IgG between LTB-PorB group and PorB control ($A_{450} : 0.57$) had no significant difference ($P > 0.05$). Stimulation index of the splenic lymphocyte in LTB-PorB group was significantly higher than the LTB and the Solution Buffer controls ($P < 0.05$). But the level of IFN- γ induced by splenic lymphocyte between LTB-PorB group and controls had no significant difference ($P > 0.05$). [**Conclusion**] The recombinant fusion protein LTB-PorB could induce high level of humoral immunoresponse and slightly cellular immunologic response in female BALB/c mice through intranasally immunization. For the first time to our knowledge, the mucosal adjuvant LTB could assist PorB to induce high level of mucosal immune response in the genital tract mucosa of mice.

Keywords: *Neisseria gonorrhoeae*; Porin B; B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin; gene fusion; prokaryotic expression; Immunocompetence

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China(30771931) and the Hunan Province Department of Education Foundation(08C745)

* Corresponding author. Tel: +86-734-8281540; E-mail: hhssh_518@163.com

Received: 6 December 2009/Revised: 31 December 2009

科学出版社书讯 (2010 - 1, 2)

堆肥微生物学原理

许修宏 李洪涛 张迪 编著

978-7-03-026451-0 ¥48.00 2010年1月出版

内容简介: 本书内容分为上、下两篇。上篇着重介绍堆肥的生物学原理, 包括堆肥的生化过程、堆肥动力学、堆肥过程中的物质与能量平衡、堆肥微生物学、堆肥中的微生物学研究方法、堆肥中物质的降解与转化、堆肥腐熟度方面的基本原理和研究进展; 下篇内容将堆肥技术与双孢蘑菇栽培技术结合起来, 在介绍食用菌生物学知识和菌种制作技术的基础上, 重点从培养料的堆制、发菌期管理、出菇期管理和病虫害防治四个方面介绍双孢蘑菇的栽培技术。

本书主要读者对象为环境科学、环境工程、生物工程、食用菌栽培等领域的科技人员、高等院校教师及学生。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)

邮购地址: 北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编: 100717

联系人: 李韶文(010-64000849) 周文宇(010-64031535)

网上订购: www.dangdang.com www.joy.com www.amazon.cn www.beifabook.com

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目