

表达 K_{99} 和 F_{41} 双价保护性抗原工程菌株的构建及免疫效果研究

黄培堂 李丰生 王叙甫 钟 声* 徐秀英
张群伟 王焕金 陈 明 黄翠芬

(军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100850)

摘 要

本文应用基因重组技术, 将引起犊牛、羔羊大肠菌腹泻的主要致病因子的保护性抗原基因 K_{99} 和 F_{41} 从野生株先分别克隆, 然后组构成同时表达两种抗原的工程菌疫苗候选株。研究了该工程菌表达的两种抗原的性质, 影响表达的条件。同时经过免疫怀孕母羊然后进行人工攻毒及田间大面积免疫羊群, 证明该工程疫苗候选株能有效诱发机体的免疫应答, 对羔羊有显著地保护作用。

关键词 基因克隆、ETEC、疫苗

中国是一个农业大国, 牛、羊是重要的经济家畜。为了大力发展畜牧业生产, 预防传染病是重要环节。毒素源性大肠杆菌 (ETEC) 所致的犊牛、羔羊腹泻发病率及死亡率很高。据统计一般发病率和死亡率均在 40% 左右。幸免于难的幼畜往往发育迟缓、生长不良, 结果给畜牧业造成巨大经济损失。虽有一定药物治疗, 但效果并不理想; 而且许多致病菌具有抗药性, 使抗生素治疗无效。因此解决的根本途径在于应用有效疫苗进行免疫预防。

近来年的研究发现, ETEC 引起犊牛、羔羊腹泻的主要因子为粘附因子 K_{99} 和 F_{41} , 以及热稳定肠毒素 (ST) 和/或热不稳定肠毒素 (LT)。病原菌借助粘附因子定居于肠粘膜细胞表面而大量繁殖产生肠毒素, 从而导致腹泻。因此可以看出, 致病菌定居于肠细胞是其致病的始动和主要因素。如果能防止 ETEC 定居, 则有可能预防避免腹泻的发生。经研究发现 K_{99} 基因位于致病菌所携带的大质粒上, 而 F_{41} 基因则位于染色体上。国外对这两种抗原基因均已分别克隆, 但无构建双价菌株; 两种菌毛型抗原在同一重组质粒同一受体菌中是否影响产物表达、影响菌毛的装配, 并且能否应用于免疫预防等, 均无报道。

本研究首先从致病野生菌株中分别克隆了编码 K_{99} 和 F_{41} 抗原的基因, 进而又将两种抗原基因组构到同一载体表达双价抗原, 研究了工程菌表达产物的性质, 影响表达的条件, 以及免疫动物后的保护效果。

1992-11-30 收稿, 1993-03-15 收修改稿。

* 现工作单位: 佳木斯医学院, 佳木斯 154600。

1 材 料 和 方 法

1.1 菌株

致犊牛、羔羊腹泻的大肠杆菌 C_{83919} 和 C_{83912} , 分别为 F_{41} 和 K_{99} 阳性株, 用于 K_{99} 和 F_{41} 抗原基因克隆; 人工攻毒为 C_{83644} 和 C_{83919} 强毒株, 均为中国兽药监察所惠赠。研究中所用表达载体及受体菌, 为本室保存。

1.2 试剂

DNA 限制性内切核酸酶, T4 DNA 连接酶, DNA 聚合酶 I 等均为美国 Biolabs 公司及中国华美生物工程公司产品。

1.3 DNA 操作

质粒 DNA 的提取纯化、酶切、重组转化、探针杂交等均按文献[1]进行。

1.4 抗原表达测定

采用玻片凝集法和 ELISA 法略加修改。即在直接以菌培养液测定时, 先将菌液稀释至相同浓度, 然后以 ELISA 阳性值的最高稀释度为标准判断。

1.5 人工攻毒保护试验

选取健康怀孕绵羊设免疫组和对照组。免疫组在预产期前 6 周左右颈部皮下接种 100 亿菌或 0.5mg 蛋白的菌毛抗原, 4 周后再以同样剂量和途径加强免疫一次; 对照组接种菌稀释液生理盐水, 时间和途径同免疫组。产后羔羊吮吮初乳后与母羊分开, 隔离 2h 后用棉杆肛门取样进行细菌培养检查是否有试验菌感染。隔离后的羔羊均经口服攻毒液, 每只 250 亿活菌, 1h 后与母羊放在一起, 观察羔羊的临床表现等。

1.6 现场免疫效果观察

每个试验点在同一羊群中设免疫组和对照组。免疫途径分为口服免疫和注射免疫均为活菌。口服免疫将小苏打 2g 与含 500 亿活菌、制剂一起拌在少量饲料中空腹喂养, 在产前 6 周、2 周各一次; 注射免疫途径、剂量和免疫时间同人工攻毒试验。产羔后观察 14 天, 记录羔羊腹泻及死亡情况。

2 结 果

2.1 表达 K_{99} 和 F_{41} 双价保护性抗原工程菌株 MM-7 的构建

根据文献[2]的报道, 编码 K_{99} 抗原的基因位于野生致病菌的约 52Md 大质粒上。我们从野生株 C_{83912} 中分离纯化大质粒, 然后用限制性内切酶 BamHI 完全消化大质粒, 经琼脂糖凝胶电泳后, 采用电洗脱法回收约 7.6kb 的 K_{99} 抗原基因片段。为便于筛选, 先将该 7.6kb 的 DNA 片段克隆于 pUC18 载体上。经鉴定, 获得含 K_{99} 抗原基因的重组质粒 pMGC106。然后从 pMGC106 中分离出 K_{99} 抗原基因片段并将其重组于 pBR325 载体上, 构建成表达质粒 pMGK₉₉, 经鉴定 pMGK₉₉ 表达特异的 K_{99} 抗原。

与 K_{99} 抗原基因不同, F_{41} 抗原基因位于染色体上^[3]。从 C_{83919} 菌株制备高分子量染色体 DNA 后, 用 Sau3A 限制性内切核酸酶部分降解 DNA 样品, 电洗脱回收 35—45kb 大小的 DNA 片段, 并将此 DNA 片段和经 BamHI 降解的 pJB8 载体 DNA 连接, 进行体外包装后感染受体菌。经探针杂交(探针为美国 Mosely 博士赠送)、凝集反应等, 从基因库中获得一株含有

F_{41} 基因的重组质粒, 命名为 pMM104. 经酶切鉴定表明外源插入的基因片段约为 40kb. 为便于构建双价抗原重组体, 对 pMM104 进行了次级克隆. 回收 15kb 大小的 pMM104 的 BamHI 片段并连接载体 pBR322 BamHI 位点. 经酶切分析、Western-blot 分析证明, 该重组体含有 F_{41} 完整抗原基因并表达与野生株发生免疫反应的 F_{41} 抗原. 该重组质粒为 pMGF₄₁.

从上述构建的 pMGK₉₉ 和 pMGF₄₁ 表达结果可以推断, 两个重组 DNA 中分别携带 K₉₉ 和 F_{41} 基因片段及其自身的调控序列, 并不利用载体的启动子. 在构建表达双价抗原菌株时, 将 pMGK₉₉ 质粒经 BamHI 部分酶切 (含两个 BamHI 位点) 回收单一切点的片段, 然后从 pMGF₄₁ 中回收的 F_{41} 基因片段插入, 转化大肠杆菌 HB101 受体菌, 经筛选鉴定获得 pMG611 重组 DNA.

2.2 影响 pMG611 中两种抗原表达的因素

K₉₉ 和 F_{41} 均为菌毛抗原, 位于菌体表面^[9]. 将它们重组后在一个受体菌中表达, 能否协同表达, 表达产物能否正确装配成完整菌毛, 又在何种条件下获得高效表达, 对此我们进行了研究.

2.2.1 培养基对两种抗原表达的影响 据文献[5]报道, 在野生菌中, 培养基对菌毛表达的位置及菌毛形成装配有较大影响. 在有些培养基中仅有少量或没有菌毛形成. 我们选择了实验室常用的丰富培养基 LB, 基础培养基 Minca 和本室自制的玉米浆培养基. 将 HB101 (pMG611) 分别接种上述三种培养基, 37°C 培养 18h 后, 制成相同浓度的菌液, 超声破碎后进行 ELISA 测定, 结果 (表 1) 表明丰富培养基 LB 并不利于两种抗原的表达, 而 Minca 和玉米浆培养基可提高表达水平 10—100 倍. 特别是玉米浆培养基, 来源方便, 成本低、配制简单, 为以后大规模发酵生产创造了条件.

2.2.2 温度对抗原表达的影响 有些菌毛型抗原在较低的温度条件下 (25°C) 可有利表达和菌毛装配^[9]. 将 HB101(pMG611) 接种 Minca 培养基后, 分别置 25°C, 28°C, 30°C, 34°C, 37°C 和 42°C 培养, 然后测定抗原表达水平. 从结果可以看出, 在所实验的温度条件下, F_{41} 表达水平略高于 K₉₉; 但 K₉₉ 和 F_{41} 的表达水平均是 37°C 最高, 这一点不同于它们在野生菌中的表达情况. 关于 F_{41} 表达水平高于 K₉₉ 可能因为尽管两种抗原基因位于同一表达载体, 基因拷贝数相同、其 5' 端调控区有较高同源性、其转录及转译效率相似, 表达的蛋白分子数应是相似的, 但 F_{41} 分子量较大, 故 F_{41} 的蛋白量可能较高.

2.2.3 受体菌对两种抗原表达的影响 为了寻找易于培养、产菌量高且两种抗原表达水平均高的受体菌, 为以后大规模发酵培养创造条件, 将重组质粒 pMG611 分别转化大肠杆菌受体菌 RRI 和 C₆₀₀, 得到 RRI(pMG611) 和 C₆₀₀(pMG611) 菌株. 分别将它们和原菌株 HB101 (pMG611) 在 Minca 培养基中培养. 分别用加热法和超声破碎法制备抗原, 用 ELISA 法测两种

表 1 培养基对工程菌 MM-7 表达的影响

培养基	ELISA 阳性的最高稀释度	
	K ₉₉ 抗原	F_{41} 抗原
LB	2 ⁶	2 ⁶
Minca 培养基	2 ⁷	2 ⁷
玉米浆培养基	2 ⁷	2 ⁸

表 2 受体菌对两种抗原表达水平的影响

菌 株	K ₉₉ 抗原 O.D. ₄₉₂		F_{41} 抗原 O.D. ₄₉₂	
	加热法	超声法	加热法	超声法
HB101(pMG611)	1.00	1.25	1.13	1.40
RRI(pMG611)	1.48	0.97	1.10	1.62
C ₆₀₀ (pMG611)	0.82	0.67	0.82	0.57

抗原表达水平, 结果见表 2. 从表 2 可以看出, 两种抗原在 RRI 和 HB101 受体菌中的表达水平均显著高于 C_{600} 受体菌. 另外, 两种方法制备的抗原量有差别. 这可能是因为加热方法制备的抗原代表形成菌毛的量, 而超声破碎法却代表全部抗原 (包括尚未装配成菌毛的亚单位) 的量, 可能两者在抗原表达和菌毛装配方面有差别.

通过上述实验, 将 HB101(pMG611) 命名 MM-7 工程菌, 做了进一步研究.

2.3 MM-7 表达的两种蛋白的抗原性及免疫原性

为进一步鉴定构建的工程菌株表达的两种抗原性质, 用 Sephadex-G100 柱层析纯化了两种抗原. 从琼脂糖免疫双扩散沉淀线可以看出, MM-7 产生的抗原和野生菌产生的抗原是同一的. 用 SDS-PAGE 电泳测定分子量的结果也表明与野生菌中纯化的两抗原的分子量也是相同的. 用抗野生菌抗体进行的 Western-blot 分析结果也表明 (图 1) 野生菌和工程菌均呈现一致的单一免疫反应带, 而且 K_{99} 和 F_{41} 不发生任何免疫交叉反应. 但在工程菌裂解物样品中, 对于 F_{41} 抗原除了一条主要免疫反应带外, 尚有一条弱反应带.

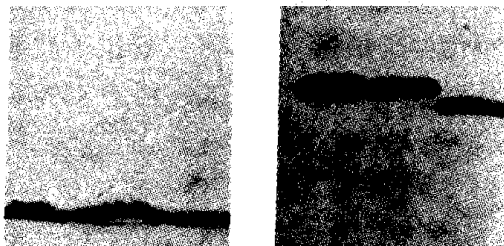


图 1 重组的 K_{99} 和 F_{41} 抗原 Western-blot 分析

(a) K_{99} 抗原; (b) F_{41} 抗原; 1——标准野生株, 2——纯化的重组抗原, 3——重组菌株的裂解物

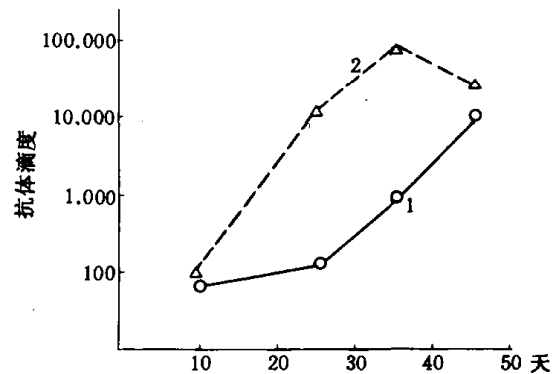


图 2 MM-7 表达的两种抗原在家兔体内诱发抗体的动力学

1—— K_{99} 抗体, 2—— F_{41} 抗体

为了测定 MM-7 产两种抗原刺激机体免疫应答反应, 将纯化的重组抗原 (含 K_{99} 和 F_{41} 抗原各 0.5mg) 免疫家兔两次间隔 3 周, 并于末次免疫后 14 天、28 天、38 天和 45 天, 采集血清, 测定两种抗体效价. 结果表明 38 天时琼扩效价 K_{99} 达 1:16, F_{41} 达 1:32. 而从 SPA-ELISA 检测抗体效价的动态变化结果 (图 2 为三只家兔滴度平均值) 看出 F_{41} 抗体滴度上升较快, 38 天时达高峰, 45 天时仍无明显下降; 而 K_{99} 抗体上升较缓慢, 但 45 天时也无已达高峰, 这可能系 K_{99} 抗原单位分子量 F_{41} 为小的原因.

2.4 MM-7 免疫本动物的人工攻毒保护效果

MM-7 能否通过免疫怀孕母羊, 而羔羊经吸吮初乳而被动保护野生强毒菌的攻击, 是 MM-7 能否作为工程菌疫苗株的关键. 我们分别用 MM-7 活菌和 MM-7 的菌毛抗原免疫了怀孕母羊, 产下的羔羊用强毒菌进行攻毒, 观察免疫组和对照组死亡情况. 从表 3 结果可以看出无论用活菌 (仅用 K_{99} 强毒株攻毒) 或菌毛抗原免疫 (用两种强毒株攻毒), 对照组和免疫死亡率差异非常显著, 对 K_{99} 阳性或 F_{41} 阳性的强毒株攻击都有较好的保护效果, 对死亡的保护率

表 3 免疫后人工攻毒保护效果

攻毒菌株	组 别	试 验 羔羊数	腹泻发病情况		腹泻死亡情况		腹泻发病 保护率(%)	腹泻死亡 保护率(%)
			羔羊数	(%)	羔羊数	(%)		
K ₉₉ 抗原阳 性强毒株 C ₈₃₆₄₄	免疫组	104	16	15.38	3	2.88	84.62	96.34
	对照组	33	33	100	26	78.79		
F ₄₁ 抗原阳 性强毒株 C ₈₃₉₁₉	免疫组	47	8	17.02	0	0	82.98	100
	对照组	18	18	100	15	83.33		

均在 95% 以上。从结果(未显示)也可以看出攻毒后活存羔羊的腹泻和排菌天数,免疫组分别为 1.78 天和 2.94 天。对照组分别为 4.75 天和 6.75 天,两组差异也均非常显著。这些攻毒结果表明用 MM-7 的活菌或菌毛抗原免疫怀孕母羊后,使羔羊被动获得的免疫力对强毒株的致病细菌攻击有明显保护作用。

2.5 MM-7 现场保护效果观察

用 MM-7 连续三年(1989—1991)分别在河南、内蒙和陕西等 20 多个试验点进行了较大规模的现场免疫效果观察,共免疫怀孕母羊近 5000 头,观察羔羊近 10000 头(其中大部分为春羔,900 余头为冬羔),同群未免疫对照观察羔羊 2500 余头,结果见表 4。可以看出不同地区不同羊种用 MM-7 免疫母羊后对羔羊腹泻及死亡均有显著保护作用,保护率分别为 85% 以上和 90% 以上;同时也可以看出注射免疫和口服免疫的保护效果没有明显差别。但地区、环境不同差别较明显。凡发病率高的地区效果更为显著。如 1991 年春季在内蒙赤峰地区免疫 893 只,腹泻发病率仅为 0.56%,无一例死亡;而同群未免疫对照组发病率高达 89.65%,后虽经药物治疗其死亡率仍达 13.43%。

表 4 MM-7 现场免疫保护效果

试验组别	观察羔羊数	腹泻发病		腹泻死亡		腹泻发病 保护率(%)	腹泻死亡 保护率(%)
		羔羊数	(%)	羔羊数	(%)		
口服免疫	2725	86	3.16	21	0.77	90.69	93.89
注射免疫	6364	268	4.21	44	0.69	87.60	94.52
对 照	2504	850	33.95	242	12.60		

3 讨 论

毒素源性大肠杆菌是幼畜腹泻的主要致病因子^[7,9]。预防该病的发生是发展畜牧业的关键,也是各国研究的热点。传统方法是将致病菌灭活制成灭活疫苗。这不但有可能产生较严重的副反应,而且效果不理想。基因重组技术的问世,为基因工程疫苗的发展,奠定了技术基础和理论基础,相继分离和克隆了各因子基因。但对于引起犊牛、羔羊腹泻病,如何组构安全有效的多价广谱疫苗,国内外未见本动物的试验报道。本研究证明应用致病菌致病始动因子 K₉₉ 和 F₄₁ 构建的双价基因工程疫苗候选株不但安全,而且经过大量的本动物攻毒及免疫效果观察获得了较好的预防效果。

K_{99} 和 F_{41} 为两种菌毛型定居因子。有些致病菌携带 K_{99} 基因, 有些携带 F_{41} 基因, 有些兼而有之。将两种无毒但却为致病关键因子的基因重组并在一个受体菌中高效表达, 使其适应性更广, 预防效果更好。

参 考 文 献

- [1] Sambrook, J. *et al.*, in *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Printed in the United States of America, 1989.
- [2] Okerman, L., *Veterinary Microbiology*, 1987, 14: 33.
- [3] Van Embden, J. D. A. *et al.*, *Infect. Immun.*, 1980, 29: 1125.
- [4] Moseley, S. L. *et al.*, *J. Bacteriol.*, 1986, 167: 799.
- [5] De Graaf, F. K. *et al.*, *Infect. Immun.*, 1981, 33: 877.
- [6] Klemm, P., *Review of Infectious Disease*, 1985, 7: 321.
- [7] 陈添弥等, 中国科学, B 辑, 1989, (12): 1281.
- [8] 黄培堂等, 生物工程学报, 1990, 6(1): 11.