

出血性大肠杆菌 O157:H7 Stx2B-Tir-Stx1B 多价融合蛋白表达及免疫原性研究

张雪寒,何孔旺,卢维彩,赵攀登,温立斌,李彬,
郭容利,王小敏,倪艳秀,周俊明,俞正玉,茅爱华,吕立新

(江苏省农业科学院 兽医研究所,农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室,
国家兽用生物制品工程技术研究中心,江苏 南京 210014)

摘要: 为了更好防治由出血性大肠杆菌 O157:H7 引起的疾病,尝试研制基因工程疫苗,其中亚单位疫苗时具有很大优势。构建表达 *tir* 和 *stx1b* 的融合基因,将 *tir* 基因中间 295 个氨基酸残基(Tir295)与 *stx1b* 亚基基因 72 个氨基酸串联构建 pGEX-stx2b-tir-stx1b 重组质粒,将其转化于 BL21(DE3),用 IPTG 进行诱导表达,经 SDS-PAGE 电泳检测,该融合蛋白获得了高效表达,目的蛋白表达量占菌体总蛋白含量的 30% 左右。重组蛋白纯化后皮下途径免疫小鼠,能够诱导高滴度(10^5)的 IgG,鼻腔内途径免疫小鼠不仅能够诱导高滴度(10^4)的 IgG,还能诱导高达 10^2 的 IgA。二免后攻击 50LD50 的 EHEC O157:H7,相对于对照组,免疫组粪便中排菌量明显降低、排菌时间明显缩短。结果表明:该融合蛋白免疫原性良好,并且由 Tir、Stx2b 和 Stx1b 三部分抗原组成,可刺激机体产生针对转位紧密素受体(Tir)和志贺毒素(Stx)的抗体,在 EHEC O157 亚单位疫苗设计或单克隆抗体抗制备中具有重要价值。

关键词: EHEC O157:H7; 转位紧密素受体; 志贺毒素; 融合基因; 免疫原性

中图分类号: S852.61 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2010)04-0180-06

Expression of Fusion Protein Stx2B-Tir-Stx1B from *Enterohemorrhagic Escherichia coli* O157:H7 and Its Immunogenicity Analysis in BALB/c Mice

ZHANG Xue-han, HE Kong-wang, LU Wei-cai, ZHAO Pan-deng, WEN Li-bin, LI Bin,
GUO Rong-li, WANG Xiao-min, NI Yan-xiu, ZHOU Jun-ming, YU Zheng-yu, MAO Ai-hua, LU Li-xin
(Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory
of Animal Diseases Diagnostic and Immunology, Ministry of Agriculture National Center for
Engineering Research of Veterinary Bio-products, Nanjing 210014, China)

Abstract: In order to prevent and cure EHEC O157:H7, genetically engineering vaccine, especially subunit vaccine has significant dominance over others. To construct *tir-stx* fusion gene, the DNA fragments encoding middle 295 amino acids(Tir295) of *tir* and 72 amino acids(*stx*72) of *stx1b* and *stx2b* were fused in turn in frame with the multiple cloning sites of pGEX and the recombinant plasmid of pGEX-stx2b-tir-stx1b was transferred to host cells *E. coli* BL21 strain (DE3). Then the protein was induced and expressed with induction of IPTG. The expression quantities and style of fusion protein were determined by SDS-PAGE and thin layer scanning results showed that amount of expressed fusion protein was 30% in total of bacteria protein. Purified recombinant Stx2B-Tir-Stx1B protein can elicit high titer IgG (10^5) by subcutaneous immunization BALB/c mice also elicit high titer IgG (10^4) and IgA (10^2) by intra nasal immunization. Moreover compared to non-immunized mice still shed EHEC O157:H7 on 14th day, immunized mice shed no bacteria in the fecal samples 8 day later after challenged with O157:H7. All results shows that stx2b-tir-stx1b protein has good antigenicity and tir295 and stxb72 antigens can evoke immune responses against tir295 and stxb72 respectively. The tir-stxb fusion protein expressed in *E. coli* could offer an important ingredient that should be consider in construction of recombinant

收稿日期: 2010-06-11

基金项目: 国家支撑计划(2007BAD40B01); 江苏省农业自主创新资金(cx(09)106); 江苏省农业科学院后备人才基金(6510804)

作者简介: 张雪寒(1977-),女,河北高碑店人,助理研究员,硕士,主要从事人兽共患病原机理和防控技术研究。

通讯作者: 何孔旺(1963-),男,安徽枞阳人,研究员,硕士,主要从事人兽共患病原和重大家畜疾病的研究。

EHEC O157 vaccine or preparation of experimental material for the monoclonal antibody.

Key words: EHEC O157: H7; Tir; Stx; Fusion gene; Immunogenicity

食源性病原微生物是当今世界上不断增多的食品安全和突发性公共卫生事件的主要诱因。其中, 肠出血性大肠杆菌 (Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC) O157: H7 可致人腹泻、出血性结肠炎、还可在 5% ~ 10% 的病例中引发溶血性尿毒综合征及血栓性血小板减少紫癜等严重并发症, 严重者可致死亡。近 20 余年来, EHEC O157: H7 引发的食物中毒在世界各地包括我国都有不同规模的暴发流行^[1-4]。目前对其感染尚缺乏有效的防治方法。研究证明抗生素可促使 O157 菌释放致死性志贺毒素 (Stx), 从而使患者并发溶血性尿毒综合征 (Hemolytic uremic syndrome, HUS) 的危险性增加。因此, 研制出有效的针对性防治方法如疫苗对防治 O157: H7 的感染有着极其重要的意义。O157: H7 的致病性主要体现于细菌的粘附定植力和细菌毒素两个方面。转位紧密素受体 (Translocation intimin receptor, Tir) 是 O157: H7 一种重要的毒力蛋白, 与紧密素结合发挥作用。该蛋白通过 EHEC III 型分泌系统 (Type III Secretion System, TTSS) 分泌并转位至宿主细胞中^[5-6], 在 EHEC O157: H7 定植感染过程中起重要作用。Tir 全基因为 1 677 bp, 编码 559 个氨基酸。

EHEC O157: H7 可以产生两种毒素, 分别为志贺毒素 I 和志贺毒素 II。两种毒素均由 1 个 A 亚单位和 5 个 B 亚单位组成, 前者具有细胞内毒性, 能够与 28S rRNA 作用从而抑制蛋白质合成, 是大肠杆菌 O157: H7 引起临床表现的病理基础; 后者具有细胞结合特性, 能与具有特定糖鞘脂受体 (Gb3) 的细胞结合, 从而引导 A 亚单位发挥作用, 是志贺毒素致病的关键^[7-9]。*stxB* 作为靶受体结合区, 可以激发机体的免疫应答, 是开发疫苗可选择的重要靶分子。并且, 证实 *stxB* 单位因能与具有 Gb3 受体的抗原递呈细胞—树突细胞 (DC) 结合, 有助于疫苗抗原的递呈和诱导细胞及体液免疫应答, 显示了良好的免疫佐剂活性。

随着基因工程技术的发展和成熟, 研制亚单位疫苗, 尤其是多价融合亚单位疫苗是研究的主攻方向, 与单一抗原成分比较具有明显的优势, 既降低纯化蛋白成本, 又可以保证融合蛋白质量稳定, 批间差异小。

本试验中拟克隆表达 EHEC O157 *tir* 基因的 885 个核苷酸, 并与 *stx* 基因去除信号肽序列的核苷酸进行串联, 构建重组质粒, 获得重组蛋白, 并对其进行免疫原性研究, 为成功构建 EHEC O157 亚单位

疫苗和 EHEC O157 检测奠定基础。

1 材料和方法

1.1 菌种和质粒

EHEC O157: H7 EDL933 菌株, 南京农业大学惠赠; 质粒 p GEX-4T-1, Novagen 公司; *E. coli* Top10, 北京天为公司; *E. coli* BL21 (DE3), 本室保存。

1.2 试剂和仪器

ExTaqTM (5 U/μL, TaKaRa 公司), Agarose (Promega 公司); *Bam*H I、*Sal* I 和 *Xho* I (TaKaRa 公司); DNA 纯化试剂盒 (TaKaRa 公司); 质粒提取试剂盒 (Axygen 公司); DAB 显色试剂盒, 辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG、辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG (武汉博士德公司); 辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgA (Southern biotech 公司)。

1.3 试验动物

新西兰家兔 2 只, 2.0 kg, 用于制备高免血清; BALB/c 小鼠 49 只, 雄性, 16 ~ 18 g/只。

1.4 引物设计

根据 GenBank 中 O157: H7 EDL933 菌株 *tir* 基因序列 (AF125993)、*stx1* (AP000400) 和 *stx2* (AP000422) 基因序列分别设计引物。其中用于扩增 *stx2b* 片段的引物上下游分别加有 *Bam*H I 和 *Sal* I 酶切位点 (下划线处), 扩增 *tir* 和 *stx1b* 片段采用 SOE (Gene splicing by overlap extension) 方法进行 PCR 产物拼接, 其中 *tir* 上游和 *stx1b* 下游分别加有 *Sal* I 和 *Xho* I 酶切位点 (下划线处), 引物序列如下:

stx2b-P1: 5'-Atagaattcgcgcgcgattgtgctaag-3'

stx2b-P2: 5'-Acagtcgacattataaactgcacttca-3'

tir-P1: 5'-ggcgtcgcacactcttaacaggcagattgg-3'

tir-P2: 5'-atcaggcgtcgcagtttctgatgaagcgc-3'

stx1b-P1: 5'-gcgcttcacgaaaactggcgacgcctgat-3'

stx1b-P2: 5'-cgctcgcagaaacgaaaataacttcgct-3'

1.5 PCR 扩增及基因克隆

挑取 O157: H7 EDL933 单个菌落, 培养菌液离心收集菌体, TE 缓冲液重悬煮沸法制备 DNA 模板, 用于 3 个 PCR 片段的扩增。*stx2b*-P1 和 *stx2b*-P2 扩增 230 bp 的 *stx2b* 基因, 扩增循环参数为: 94℃ 预变性 5.0 min, 94℃ 变性 1.0 min, 54℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 30 个循环后 72℃ 延伸 5 min。*tir*-P1 和 *tir*-P2 扩增 *tir* 基因 3'端 891 bp, *stx1b*-P1 和 *stx1b*-P2 扩增 238 bp 的 *stx1b* 基因。*Tir*-P1 和 *Stx1b*-P2 以

获得的 *tir* 和 *stx1b* PCR 产物为模板进行串联扩增, 获得 1 129 bp 片段。扩增循环参数均为: 94℃ 预变性 5.0 min, 94℃ 变性 1.0 min, 60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1.0 min, 30 个循环后 72℃ 延伸 10 min。

PCR 产物分别在 1% 琼脂糖凝胶上电泳分离后, 紫外灯下切割目的条带, 用 DNA 纯化试剂盒回收 PCR 产物, 并用 *Bam*H I 和 *Sal* I 酶切 *stx2b* PCR 片段, *Sal* I 和 *Xho* I 酶切 *tir-stx1b* 串联 PCR 片段, 经过胶回收相应目的片段, 与 pGEX-4T-1 质粒载体依次进行连接, 转化大肠杆菌 Top10 感受态, 通过氨苄抗性和限制性内切酶酶切进行筛选和鉴定。

1.6 重组蛋白的诱导表达

将阳性克隆质粒 (pGEX-*stx2b-tir-stx1b*) 转化进入 BL21 (DE3) 感受态中, 获得重组阳性菌, 用于蛋白表达。将阳性菌落过夜培养物按 2% 的量接种于 5 mL 含有卡那霉素的 LB 中, 37℃ 振荡培养至 A = 0.6 ~ 0.8 时加入诱导剂 IPTG 至工作浓度为 0.5 mmol/L, 继续 30℃ 震荡培养 5 h。诱导菌液离心收集菌体重悬于 TE 缓冲液中, 超声裂解后, 10 000 g 离心 20 min, 收集上清和沉淀进行 SDS-PAGE, 鉴定目的蛋白是否表达和表达方式。

1.7 兔源抗血清制备

将上述表达 Stx2B-Tir-Stx1B 蛋白超声波破碎后, 免疫新西兰家兔, 1 mg/mL, 与 ISV50 佐剂 (Seppic 公司) 乳化后, 背部皮下接种 2 mL, 21 d 二免, 14 d 采集血清分装储存于 -20℃ 备用。

1.8 Western Blott 鉴定

将 EHEC O157: H7 过夜培养物离心收集沉淀, 重悬于 TE 缓冲液中, 超声波处理后离心收集上清进行 SDS-PAGE, 用硝酸纤维素膜 (NC) 将凝胶在 Tris-Gly 缓冲系统中进行转印, 0.65 mA/cm, 转印 90 min, 5% 脱脂奶封闭。Stx2B-Tir-Stx1B 蛋白免疫家兔制备多抗为一抗, HRP 标记羊抗兔 IgG 为二抗, DAB 显色试剂盒显色。

1.9 动物试验

1.9.1 试验前动物处理 离乳小鼠对 O157: H7 不易感, 本试验参考文献 [10] 的方法, 在攻毒前所有组均给予 5 g/L 链霉素溶液饮用 3 d, 3 d 后粪检肠道排菌少于 10^3 cfu/g, 灌胃攻菌后全部给予 0.5 g/L 的链霉素溶液饮用。以排除肠道正常菌群, 为 O157: H7 在小鼠体内驯化一个定居和生长的环境, 在肠道中成为优势菌群, 增加小鼠的易感性。并在攻毒前断水断食 12 h, 攻毒后 6 h 恢复饮水饮食, 防止攻毒后细菌快速排出动物肠道, 延长在其体内作用时间。

1.9.2 小鼠免疫和攻毒 将 49 只 BALB/c 小鼠随

机分为 2 个大组, 分别进行皮下免疫鼻腔内免疫。使用 ISV50 佐剂 (Seppic 公司), 按照蛋白与佐剂 4.6: 5.4 (V/V) 比例进行乳化, 制备皮下免疫用抗原。一免后 21 d 二免, 二免后 14 d 灌胃 O157: H7, 同时腹腔内注射丝裂霉素 2.5 mg/kg。皮下免疫组攻毒剂量为 10LD₅₀ (1.5×10^9 cfu/只); 鼻受苦内免疫组攻毒选用 2 个剂量, 分别为 10LD₅₀ 和 50LD₅₀ (1.7×10^9 cfu/只), 攻毒后连续 14 d 采集小鼠粪便检测排菌量和排菌时间的变化。

1.9.3 小鼠抗体检测 分别于一免和二免后采集小鼠血清测定 IgG 和 IgA 滴度, 并且也定期采集粪便测定分泌型 IgA 滴度。

1.9.4 毒素中和试验 Vero 细胞在 DMEM 营养液中, 37℃, 5% 的 CO₂ 浓度培养至细胞瓶中长满单层细胞, 然后用胰酶消化下来, 转移到 24 孔细胞培养板中, 每孔加入 1 mL 细胞营养液, 37℃, 5% 的 CO₂ 浓度下培养至长满单层细胞, 吸去陈旧营养液, 换 1 mL 新鲜的 DMEM 营养液。

分别接种 2% 的 O157: H7 到 5 mL LB 中, 37℃ 振荡培养 16 ~ 20 h, 然后 10 000 r/min 离心 10 min, 上清用 0.22 μm 的滤膜过滤除菌, 滤液 4℃ 保存备用。

将上述二免后小鼠血清与 16 ~ 20 h 的细菌培养过滤液按照 1: 1 (V/V) 预先在 37℃、5% CO₂ 条件下共感作 2 h, 这期间轻轻地混匀 3 次, 进行毒素中和。吸取上述 O157: H7 细菌上清滤液和经过用小鼠抗血清进行毒素中和后 O157: H7 细菌上清滤液分别加到单层 Vero 细胞板中, 同时加 LB 作为对照。然后在 37℃, 5% 的 CO₂ 浓度下培养 24 h 后观察细胞的形态和生长情况。

2 结果与分析

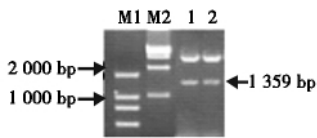
2.1 目的基因的扩增

通过 PCR 扩增, 分别获得 *tir*、*stx2b* 和 *stx1b* 特异性条带, 大小分别为 891, 210 和 207 bp, *tir-stx1b* 串联长度为 1 098 bp。PCR 产物经过琼脂糖凝胶电泳纯化后, 备用。

2.2 pGEX-*stx2b-tir-stx1b* 融合基因表达载体的构建

首先将经过 *Bam* H I 和 *Sal* I 酶切的 *stx2b* PCR 产物与同样酶切的 pGEX 载体连接, 成功获得阳性 Top10 (pGEX-*stx2b*) 重组菌。然后再将经过 *Sal* I 和 *Xho* I 酶切的 *tir-stx1b* PCR 产物与同样酶切的 pGEX-*stx2b* 重组质粒连接, 成功获得阳性重组菌 Top10 (pGEX-*stx2b-tir-stx1b*) (图 1)。将重组菌 Top10 (pGEX-*stx2b-tir-stx1b*) 送 TaKaRa 公司测序, *tir*、*stx1b* 和 *stx2b* 的测序结果与 GenBank 公布的

EDL933 菌株序列同源性均为 100%。



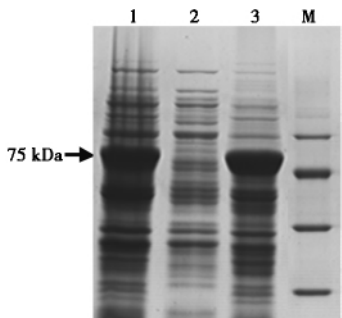
M1. DL-2000; M2. DL-45000; 1. *pGEX-stx2b-tir-stx1b* 重组质粒酶切。
M1. DL-2000M2. DL-450001. *pGEX-stx2b-tir-stx1b* 重组质粒酶切。
M1. DL-2000M2. DL-450001. *pGEX-stx2b-tir-stx1b* 重组质粒酶切。

图 1 *pGEX-stx2b-tir-stx1b* 重组质粒酶切

Fig.1 Enzyme digestion of *pGEX-stx2b-tir-stx1b* recombinant plasmid

2.3 基因重组菌的诱导表达

BL21 (*pGEX-stx2b-tir-stx1b*) 重组菌经过诱导 , 获得目的蛋白 ,SDS-PAGE 电泳结果显示 ,分子量大 小为 75 kDa ,主要以可溶性蛋白的形式存在。紫外 凝胶薄层扫描显示 ,诱导 4 ~ 5 h 培养物中 ,目的融 合蛋白表达量占菌体总蛋白的 30% 左右(图 2)。



M. 中分子量蛋白质 Marker; 1. 诱导后全菌蛋白;
2. 诱导前全菌蛋白; 3. 诱导后全菌超声上清蛋白。
M. Middle molecular weight marker; 1. Bacterial protein induced
by IPTG; 2. Bacterial protein uninduced by IPTG; 3. Ultrasonic
supernatant protein induced by IPTG.

图 2 BL21(*pGEX-stx2b-tir-stx1b*)

重组菌 SDS-PAGE 分析

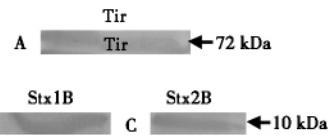
Fig.2 SDS-PAGE analysis of recombinant protein expressed by BL21(*pGEX-stx2b-tir-stx1b*)

2.4 重组蛋白 Western Blot 鉴定

将 EHEC O157: H7 过夜培养物离心收集沉淀 , 重悬于 TE 缓冲液中 ,超声波处理后离心收集上清 SDS-PAGE 后 ,进行免疫转印。结果表明 ,重组 Stx2B-Tir-Stx1B 融合蛋白制备抗体能够与 O157: H7 全菌自身的 Tir、Stx2B 和 Stx1B 蛋白反应 ,并且条 带清晰而特异(图 3)。

2.5 小鼠免疫试验

2.5.1 小鼠攻毒保护情况 免疫 S I 组(*pGEX-4T- Stx2B-Tir-Stx1B* 重组蛋白) 和对照 S I 组(*pGEX-4T- 1* 重组蛋白) 和对照 S II 组(PBS) 免疫途径为背部皮 下多点注射。二免后 14 d 攻毒保护情况 ,免疫 S I 组小鼠存活率为 90% (9/10) ;对照 S I 组和 S II 组 小鼠存活率分别为 33% (2/6) 和 50% (3/6) ,总体 存活率为 42% (表 1) 。



A. Stx2B-Tir-Stx1B 蛋白制备免源抗血清能够与 O157: H7 菌体内 Tir 蛋白产生特异性条带; B. Stx2B-Tir-Stx1B 蛋白制备免源抗血清能够与 O157: H7 菌体内 stx1b 蛋白产生特异性条带; C. Stx2B-Tir-Stx1B 蛋白制备免源抗血清能够与 O157: H7 菌体内 Stx2B 蛋白。

A. Rabbit antibody to Stx2B-Tir-Stx1B recombinant protein reacts to Tir protein produce by EHEC O157: H7; B. Rabbit antibody to Stx2B-Tir-Stx1B recombinant protein reacts to Stx1B protein produce by EHEC O157: H7; C. Rabbit antibody to Stx2B-Tir-Stx1B recombinant protein reacts to Stx2B protein produce.

图 3 *pGEX-4T-stx2b-tir-stx1b* 重组菌 Western Blot 鉴定

Fig.3 Western Blotting analysis of *pGEX-stx2b-tir-stx1b* recombinant protein

表 1 皮下免疫途径接种多价融合型重组蛋白攻毒保护情况

Tab.1 Protection of immunized mice against a lethal challenge of O157: H7 by subcutaneous immunization with multivalent recombinant protein of Stx2B-Tir-Stx1B

皮下免疫组 Subcutaneous immunization	S I 组 Group S I	对照 S I 组 Control group S I	对照 S II 组 Control group S II
数量 Number	12	6	9
抗原量/只 Dose/mouse	50 μ g/200 μ L	50 μ g/200 μ L	200 μ L
存活数/总数 The live/total	90% (9/10)	33% (2/6)	50% (3/6)
		42%	

免疫 N I 组(*pGEX-4T-Stx2B-Tir-Stx1B* 重组蛋白) 和对照 N I 组(*pGEX-4T-1* 重组蛋白) 和对照 N II 组(PBS) 免疫途径为鼻腔内免疫。二免后 14 d 攻毒保护情况 ,免疫 N I 组小鼠 10LD50 攻击的存活 率为 100% (5/5) ,50LD50 攻击的存活率为 60% (3/5) ;对照 N I 组和 N II 组小鼠 10LD50 攻击的存 活率分别为 33% (1/3) 和 66% (2/3) ,50LD50 攻击 的存活率分别为 0 和 33% (1/3) (表 2) 。

表 2 鼻腔内免疫途径接种多价融合型重组蛋白攻毒 保护情况

Tab.2 Protection of immunized mice against a lethal challenge of O157: H7 by intranasal immunization with multivalent recombinant protein of Stx2B-Tir-Stx1B

鼻腔内免疫 Intranasal immunization	I 组 Group I	对照 I 组 Control group I	对照 II 组 Control group II
免疫数量 Number	10	6	6
抗原量/只 Dose/mouse	20 μ g/30 μ L	20 μ g/30 μ L	20 μ g/30 μ L
攻毒剂量 Bacterial dose/mouse	10 LD50	10 LD50	10 LD50
存活数/总数 The live/total	100 (5/5)	60 (3/5)	33 (1/3)
		0 (0/3)	66 (2/3)
			33 (1/3)

2.5.2 小鼠抗体检测 免疫 SI 组一免和二免后抗 Stx2B-Tir-Stx1B 的 IgG 滴度明显上升 ,高达 10⁵ ,与对 照组相比差异显著 (*P* < 0.05) ;血清中和粪便中抗 Stx2B-Tir-Stx1B 的 IgA 滴度都没有明显升高(图 4) 。

免疫 N I 组二免后抗 Stx2B-Tir-Stx1B-zot 的 IgG

滴度明显上升,高达 10^4 ,见图 5;血清中抗 Stx2B-Tir-Stx1B 的 IgA 滴度明显上升,高达 10^2 ,但粪便中没有检测到 IgA 滴度没有明显升高(图 6)。

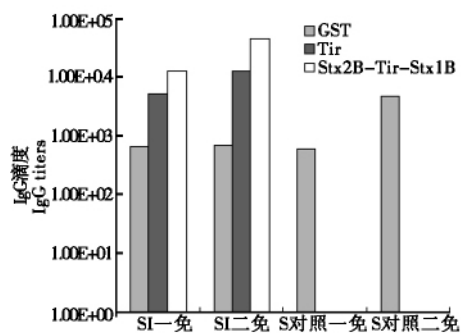


图 4 皮下免疫途径小鼠血清中 IgG 滴度测定
Fig. 4 Stx2B-Tir-Stx1B-specific serum IgG following subcutaneous immunization

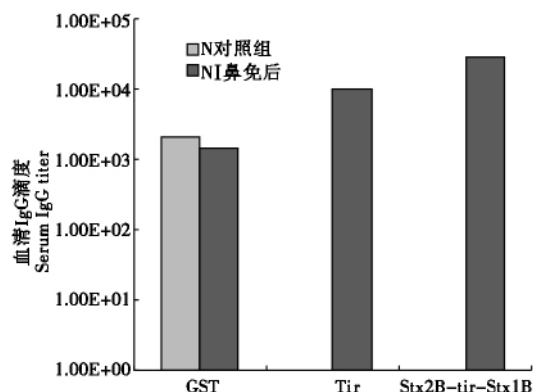


图 5 鼻腔内免疫血清中 IgG 滴度测定
Fig. 5 Stx2B-Tir-Stx1B-specific serum IgG following intranasal immunization

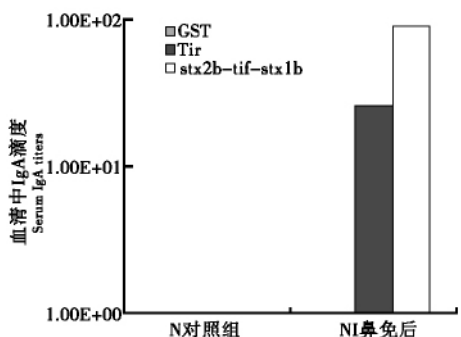


图 6 鼻腔内免疫途径小鼠血清中 IgA 滴度测定
Fig. 6 Stx2B-Tir-Stx1B-specific serum IgA following intranasal immunization

2.5.3 小鼠粪便排菌量和排菌时间检测 皮下途径免疫和鼻腔内途径免疫组和对照组同时在二免后 14 d 攻击 EHEC O157: H7,从攻毒后 3 d 开始采集粪便,经过适当处理后涂布筛选性麦康凯平板,37℃ 培养 24 h,取出平板计数,并对菌落用二重 PCR 进行鉴定,均为 O157: H7。免疫组排菌时间缩短,排菌量明显减少($P < 0.05$)(图 7)。

2.5.4 毒素中和试验 用 O157: H7 过滤培养液和经过小鼠抗血清中处理过的 O157: H7 培养上清作用

于培养的 Vero 细胞,并用 LB 作为对照。结果:单纯的 O157: H7 过滤培养液接种的细胞均出现病变,颗粒增多,颜色晦暗,有的细胞开始变圆和部分脱落,而小鼠抗血清中处理过的 O157: H7 培养上清作用的 Vero 细胞和 LB 对照的细胞形态及生长均正常(图 8)。

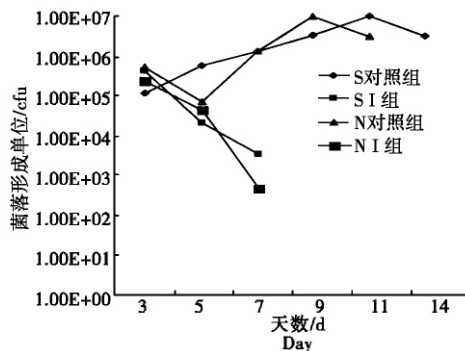
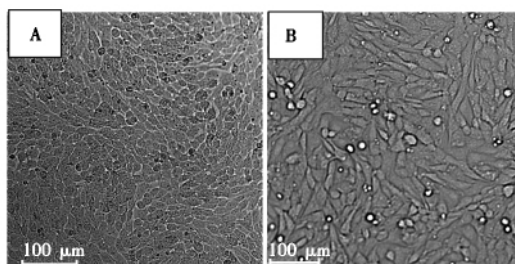


图 7 皮下和鼻腔内免疫途径免疫组和对照组小鼠攻毒排菌的变化

Fig. 7 *E. coli* O157: H7 shedding in feces following intranasal and subcutaneous administration in mice



A. EHEC O157: H7 毒素对 Vero 细胞影响; B. pGEX-4T-Stx2B-tir-Stx1B 制备小鼠抗血清中和毒素后对 Vero 细胞影响。
A. EHEC O157: H7 Shiga toxin to Vero cells; B. EHEC O157: H7 Shiga toxin neutralized by Stx2B-Tir-Stx1B-sera to Vero cells.

图 8 EHEC O157: H7 毒素中和试验

Fig. 8 EHEC O157: H7 toxin neutralization test

3 讨论

由于 O157: H7 的暴发流行和治疗上的困难,疫苗研究就显得极为紧迫。有效的疫苗研制是预防和治疗 O157: H7 感染最简单、经济、快捷的手段。近年来,随着基因工程技术、疫苗载体技术的发展以及 EHEC O157: H7 全基因组测序的完成,O157: H7 疫苗研究也取得长足进步。亚单位疫苗随着基因工程技术的成熟逐步应用到 EHEC O157: H7 疫苗的研究中。在细菌的感染过程中,由于宿主和致病菌之间有着复杂的作用机制,单一抗原组分构建的疫苗难以产生有效的保护作用,混合多抗原成分的疫苗可以激发机体更强的免疫应答,而以融合基因方式获得多组分疫苗与其他方式相比具有更多优势,既降低纯化成本,又可以保证融合蛋白质量、批间差异小。在融合蛋白疫苗的研制过程中,选择有效的保护性抗原亚单位是非常必要的。

肠出血性大肠杆菌 O157: H7 的致病因子主要有粘附素、毒素和溶血素等,它们都可作为保护性抗原。粘附因子粘附靶细胞是 O157: H7 菌致病的关键步骤,用特异的抗粘附素抗体阻断细菌的粘附是控制 O157: H7 菌感染的有效方法之一。Tir(Translocated intimin receptor) 即转位紧密粘附素受体,由 EHEC O157: H7 的 *tir* 基因编码合成,结合于宿主细胞膜上的紧密粘附素受体。紧密粘附素 - Tir 结合引发信号传导,并在其他致病因子的协同作用下产生粘附和擦拭性损伤。阻断紧密粘附素与 Tir 的结合对于避免粘附和擦拭性损伤的发生有重要意义,同时 Li Y 等^[7] 研究证明 Tir 具有很强的免疫原性, Tir 引起的抗体出现早,滴度高,持续时间长,是作为疫苗研究的良好抗原。在肠道中 Stx 能够杀伤上皮细胞,并引起严重的炎症反应和广泛的组织病理学损伤,从而导致血痢或无血性腹泻。有研究证实, Stx 可以被吸收进入血液,从而导致出血性结肠炎(HC) 或溶血性尿毒综合征(HUS) 等全身性并发症。大量研究表明, StxB 亚基在 O157 免疫中具有非常重要。StxB 刺激机体所产生的免疫反应能够保护其免受 Stx 毒素的攻击,而 Stx 毒素是引起出血性结肠炎和溶血性尿路综合征等全身性并发症的主要毒力因子之一。Wen 等利用基因工程脱毒方法表达获得了 Stx1(Y77S) 和 Stx2(R167Q) 的类毒素,免疫小鼠后产生了针对同型毒素的中和抗体,同时能起到保护毒素的攻击作用。易勇等利用基因重组技术构建了 Stx2B-ImiminC300 融合蛋白疫苗,以致死剂量的 O157: H7 菌超声破碎菌液对免疫小鼠进行攻毒试验,融合蛋白的免疫保护率为 65%^[9]。

本研究选取粘附因子 Tir 和 StxB 作为亚单位抗原,用基因工程的方法将 Stx2B、Tir 和 Stx1B 亚基连接起来体外表达融合蛋白。在该表达系统中,经 IPTG 诱导后目的蛋白的表达量达菌体蛋白总量的 30% ,且并以可溶性蛋白形式存在,免疫原性更加良好。本研究室在前期工作中以 pET28 为载体进行了上述三个基因的串联表达,重组蛋白以包涵体存在于全菌中^[11],并且表达不稳定,故又尝试用本研究中提到的 pGEX-4T-1 载体进行诱导表达,表达结果很理想,不仅表达稳定,而且以可溶性蛋白形式存在,利于纯化。选用国内外比较公认的 BALB/c 小鼠作为动物模型研究 Stx2B-Tir-Stx1B 串联表达多价蛋白的免疫原性,并且考虑到是否能够诱导更加强的粘膜免疫抗体,采取皮下免疫和鼻腔内免疫 2 个途径。结果显示,鼻腔内免疫的确能够增强 IgA 滴

度,但是分泌性 IgA(SIgA) 仍然是没有检测到。可喜的是,该 Stx2B-Tir-Stx1B 串联表达多价蛋白诱导出高滴度的 IgG(10^5) ,也能够明显减少 EHEC O157: H7 在肠道内的定植,具体机制不是很明确,可能是血清中的 IgG 能够通过一个未知的途径分泌到肠道中和细菌蛋白。所以,该融合蛋白 stx2B-tir-stx1B 的成功高效表达,为 EHEC O157: H7 疫苗的进一步研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] Centers for Disease Control and Prevention (CDC) . Preliminary FoodNet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food - 10 states , 2007 [J]. MMWR Morb Mortal Wkly Rep , 2008 , 57 (14) : 366 - 370.
- [2] Reinstein S , Fox J T , Shi X , *et al.* , Prevalence of *Escherichia coli* O157: H7 in the American bison (*Bison bison*) [J]. J Food Prot 2007 , 70(11) : 2555 - 2560.
- [3] Doyle M P , Erickson M C. Summer meeting 2007 - the problems with fresh produce: an overview [J]. J Appl Microbiol 2008 , 105: 317 - 330.
- [4] Marcus R. New information about pediatric foodborne infections: the view from FoodNet [J]. Curr Opin Pediatr , 2008 , 20(1) : 79 - 84.
- [5] Jiu H , Magoun L , Luperehio S , *et al.* The Tir-binding region of enterohemorrhagic *Escherichia coli* intimin is sufficient to trigger aaron condensation after bacterial-induced host cell signaling [J]. Mol Microbiol , 1999 , 34(1) : 67 - 81.
- [6] Li Y , Frey E , Mackenzie A M , *et al.* Human response to *Escherichia coli* O157: H7 infection: antibodies to secreted virulence factors. [J]. Infect Immun , 2000 , 68(9) : 5090 - 5095.
- [7] Ritchie J M , Thorpe C M , Rogers A B , *et al.* Critical roles for *stx2* , *eae* , and *tir* in enterohemorrhagic *Escherichia coli*-induced diarrhea and intestinal inflammation in infant rabbits [J]. Infect Immun 2003 , 71: 7129 - 7139.
- [8] Karmali M A. Infection by verocytotoxin producing *Escherichia coli* [J]. Clin Microbio Rev , 1989 , 2: 15 - 38.
- [9] Barrett T J , Kaper J B , Jerse A E , *et al.* Virulence factors in Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* isolated from humans and cattle [J]. J Infect Dis , 1992 , 165: 979 - 980.
- [10] Fujii J , Kita T , Yoshida S , *et al.* Direct evidence of neuron impairment by oral infection with verotoxin-producing *Escherichia coli* O157: H7 in mitomycin-treated mice [J]. Infect Immun , 1994 , 62(8) : 3447 - 3453.
- [11] 张雪寒,何孔旺,卢维彩,等. 出血性大肠杆菌 O157: H7 的 Tir 与 stx1/2B 融合基因的构建和表达 [J]. 内蒙古农业科技 2009(3) : 59 - 61.