

文章编号: 1673-1689(2006)05-0098-05

以减毒鼠伤寒沙门氏菌为载体的 重组 HBsAg 口服疫苗构建与鉴定

方希修^{1,2}, 乐国伟¹, 王冬梅², 刘建文¹, 施用辉¹

(1. 江南大学 营养与生物技术研究室、江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036; 2. 江苏畜牧兽医职业技术学院 营养与饲料研究所, 江苏 泰州 225300)

摘要: 采用大量培养含有 pcDNA3s 的大肠杆菌, 提取 pcDNA3s 质粒, 利用电转化方法将 pcDNA3s 质粒转化到感受态减毒鼠伤寒沙门氏菌, SDS-PAPG 检测到 930 bp 大小的条带, 基因序列分析到重组菌含有乙肝表面抗原(HBsAg)基因序列; 观察重组菌体外传代培养的稳定性和该重组菌株在体外能稳定地繁殖、生长和传代。试验结果表明, 携带 HBsAg 的重组减毒鼠伤寒沙门氏菌疫苗 X8786/pcDNA3s 已成功构建, 为研究和应用人和动物治疗用乙型肝炎病毒口服基因工程活疫苗奠定了基础。

关键词: 重组减毒鼠伤寒沙门氏菌; 电转化; 乙肝表面抗原; SDS-PAPG; 基因序列分析
中图分类号: Q 939.9 文献标识码: A

Construction and Identify of Recombinant Attenuated *Salmonella typhimurium* Orally HBsAg Vaccine

FANG Xi-xiu^{1,2}, LE Guo-wei¹, WANG Dong-mei², LIU Jian-wen¹, SHI Yong-hui¹

(1. Nutrition and Biotechnology Research Laboratory, Southern Yangtze University, Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Education Ministry Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 2. Institute of Nutrition and Feed Jiangsu Animal Husbandry and Veterinary College, Taizhou 225300, China)

Abstract: To construct recombinant attenuated *salmonella typhimurium* vaccine strain X8786/pcDNA3s expressing HBsAg, plasmid pcDNA3s from recombinant coli was distilled, electricity transformation method was used in plasmid pcDNA3s transforming to repected state *salmonella typhimurium*. SDS-PAPG examined 930 bp strip belt, gene sequence analyzed recombinant bacterium have Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg) gene sequence. The stability of recombinant bacterial cultured in vivo was observed. It showed that recombinant bacterium could stably reproduction, growth and hand down from generation to generation in vivo. The results confirmed that recombinant attenuated *salmonella typhimurium* vaccine strain X8786/pcDNA3s carryng HBsAg was constructed succeed. It established foundation of research and development in therapying humen and animal HBV orally gene engineering live vaccine.

Key words: recombinant attenuated *salmonella typhimurium*; electricity transformation method; HBsAg; SDS-PAPG; gene sequence analysis

减毒沙门氏菌已作为疫苗载体广泛用于病毒、细菌和寄生虫等口服疫苗的研究,多数重组疫苗株能获得针对相应病原体的免疫应答。最近的研究发现携带外源 DNA 的减毒沙门氏菌能通过肠壁上的 M 细胞达到 P 氏结。在被吞噬的过程中,菌体死亡释放出的 DNA 通过某些尚未明了的机制进入细胞核中,最后导致具有真核启动子的外源基因在宿主体细胞中的表达。这一发现使减毒沙门氏菌有可能成为口服基因治疗的载体^[1]。徐文忠(1993)将 SS 基因与 HBsAg 基因融合,再插入到痘苗病毒基因组中,构建重组痘苗病毒^[2-3]。DNA 疫苗是将编码某种蛋白质抗原的真核重组表达载体直接注射机体,在宿主细胞中表达外源基因,诱导特异性的体液免疫和细胞免疫应答,达到预防和治疗疾病的目的^[4]。DNA 疫苗具有亚单位疫苗的安全性和弱毒疫苗的高效性,其制备简单,免疫时间长。减毒的伤寒沙门氏菌作为抗原投递系统,是新型疫苗研制的重要途径之一,已引起人们极大的兴趣和关注,特别是近年来的研究取得一些令人鼓舞的结果。作者采用大量培养含有 pcDNA3s 的大肠杆菌,提取 pcDNA3s 质粒,通过电转化构建表达乙肝表面抗原的减毒沙门氏菌工程菌株,为发展治疗乙型肝炎的口服基因工程活疫苗奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 质粒与菌株

含有质粒 pcDNA3s 的大肠杆菌菌株 *E. coli* JM109,该菌株由中科院上海生物化学研究所提供;质粒 pcDNA3s 上在 *Bam*HI 和 *Eco*RI 位点之间重组有乙肝表面抗原 HBsAg 基因片段;HBsAg 基因片段 *Bam*HI 端与 T7 启动子相邻,*Eco*RI 末端紧接 SP6 启动子;减毒鼠伤寒沙门氏菌 X8786(Δ crp-27, Δ cya-27)由美国华盛顿大学 Roy Curtiss III 教授提供,江苏畜牧兽医职业技术学院营养与饲料研究所保存。

1.2 主要试剂

DNA 限制性内切酶(KpnI、BamHI 等);RnaseA 酶;T4DNA 连接酶:购自华美公司;琼脂糖,低熔点琼脂糖:购自美国 Sigma 公司;抗生素氨苄青霉素(Amp):齐鲁制药厂产品;一般化学试剂采用国产分析纯试剂。

1.3 试剂盒

柱式胶回收试剂盒,上海华舜公司产品;抗污染标准 PCR 扩增试剂盒,上海生工公司产品。

2 实验方法

2.1 质粒的少量提取

按碱裂解法进行酚氯仿抽提后乙醇沉淀^[3,4]。用 RNA 酶消化 RNA,经酚氯仿抽提去除 RNA 酶,无水乙醇沉淀后加适量的 TE 溶解,即得到纯化的 pcDNA3s 质粒。

2.2 电转化法转化减毒鼠伤寒沙门氏菌 X8786

挑取减毒沙门氏菌 X8786 菌种于 2 mL LB 液体培养基中,37℃ 250 r/min,振荡过夜。取 50 μ L 菌液,接种于 50 mL LB 液体培养基,37℃ 250 r/min,振荡培养至 λ_{590nm} 在 0.6~0.7(约 2~2.5 h)4℃、4 000 r/min 离心 5 min,3 次;最后悬浮于 2 mL 10% 甘油中,得到感受态菌株。取 200 μ L 感受态细菌液,加入 1 μ g 质粒 DNA(对照不加 DNA),冰浴 5 min,使 DNA 吸附到细菌上,然后移入电击杯中,电转化条件 2 000 V 电压、25 μ F 电容、200 Ω 放电时间 4 ms。电击后加入 400 μ L LB,37℃ 静止培养 2 h。涂布在含氨苄青霉素的平板上^[5-7]。

2.3 重组质粒的鉴定

挑取 2.2 平板中的数个菌落,在含有氨苄青霉素的 LB 液体培养基中发酵培养,用碱裂解法抽提并纯化质粒,制备出来的质粒经 PCR 扩增鉴定。于 PCR 反应管中加入 10 倍反应缓冲液(含 15 mmol/L MgCl₂)5 μ L,4 倍 dNTP 混合物(每种 2.5 mmol/L)4 μ L,上游引物 1 μ L(约 10~4 mol),下游引物 1 μ L(约 10~4 mol),Taq DNA 聚合酶(2~3U)1 μ L, DNA 模板(5 ng)2 μ L,无菌去离子水 36 μ L,液体石蜡 30 μ L。PCR 扩增参数为:第 1 循环 94℃ 变性 300s;第 2 循环 94℃、维持 45s,55℃、维持 45s,72℃、维持 45s,共 35 个循环;第 3 循环 72℃ 延伸 300s。取 10 μ L 反应液,用 2 g/dL 琼脂糖凝胶电泳检测,并以标准 DNA 作参照物分析结果。PCR 扩增按 PCR 试剂盒说明书进行。

2.4 DNA 序列分析

DNA 序列分析在 ABI PRISM™ 377XL DNA Sequencer 上进行。测序引物为:5'-TAATAC-GACTCTCTATAGGG-3'及 5'-CATACGATTAG-GTGACACTATAG-3'。对重组质粒进行 DNA 测序,以双脱氧链终止法测序,由上海皓嘉公司完成。

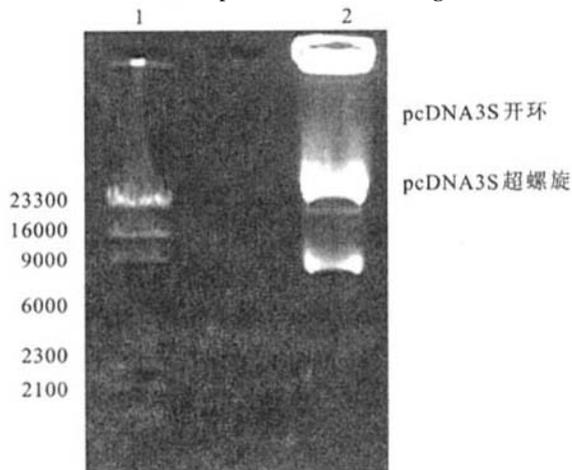
2.5 重组减毒鼠伤寒沙门氏菌的稳定性

将重组减毒鼠伤寒沙门氏菌 X8786/pcDNA3s,接种于 LB 培养液中,分别培养传代 50 次,每 10 代提取 1 次质粒。

3 结果

3.1 重组减毒鼠伤寒沙门氏菌 X8786/pcDNA3s 的酶切鉴定

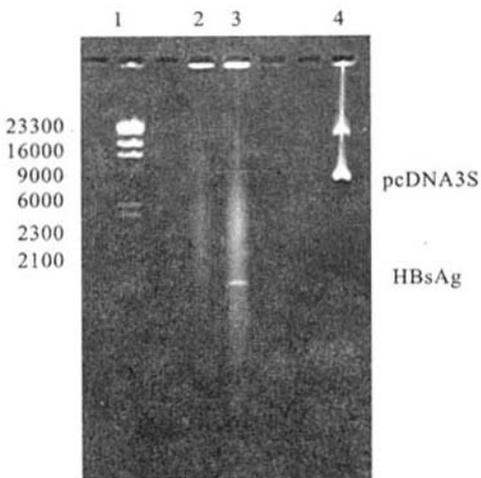
将碱裂解法抽提并纯化的质粒,采用 EcoRI 和 XhoI 双酶切鉴定重组质粒,同时进行 PCR 鉴定,琼脂糖凝胶电泳检测。可得到约 23 300 bp 和 930 bp 大小的两条带,分别为 pcDNA3s 与 HBsAg。



1 Marker 2 PcDNA3s 质粒

图 1 相关质粒鉴定图

Fig. 1 The relevant plasmids appraised



1 Marker 2 空载质粒 3 转化的菌种质粒,经 EcoRI 和 XhoI 双酶切片断 4 PcDNA3s

图 2 相关质粒与酶切鉴定图

Fig. 2 Relevant plasmid and enzyme cut appraising mapping

3.2 重组减毒鼠伤寒沙门菌株 X8786/pcDNA3s 中质粒 PcDNA3s 鉴定及序列测定

挑取数个 X8786/pcDNA3s 菌落在含有氨苄青霉素的 LB 液体培养基中发酵培养,用碱裂解法抽提并纯化质粒,制备出来的质粒经 PCR 扩增鉴定。

对重组质粒进行 DNA 测序,以双脱氧链终止法测序。

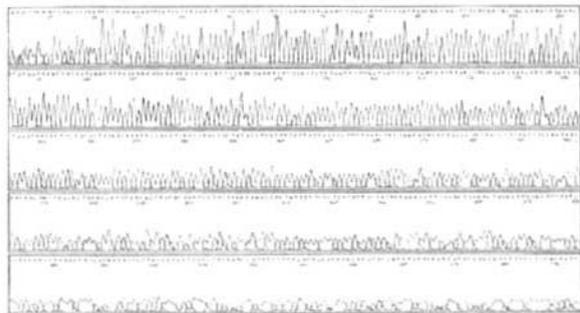


图 3 重组 X8786/pcDNA3s 沙门氏菌质粒核苷酸测序结果

Fig. 3 Check order of recombinant attenuated *salmonella typhimurium* plasmid nucleoside acid of SL8786

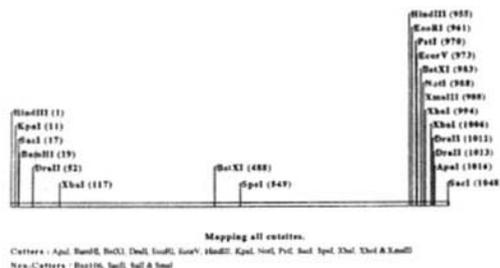


图 4 重组 X8786/pcDNA3s 酶切位点图

Fig. 4 Recombinant attenuated *salmonella typhimurium* SL8786 enzyme cutsites mapping

X8786/pcDNA3s 中质粒测序结果:

```

AAGCTTGGTACCGAGCTCCGATCCATGGA
GAGCACAACATCAGGATTCCTAGGACCCC
TGCTCGTGTTACAGGCGGGGTTTTTCTTG
TTGACAAGAATCCTCACAATACCACAGAG
TCTAGACTCGTGGTGGACTTCTCTCAATT
TTCTAGGGGAGCACCCACGTGTCCTGG
CCAAAATTCGCAGTCCCCAACCTCCAATC
ACTCACCAACCTCTTGTCTCCAATTTGT
CCTGTTATCGTTGGATGTGTCTGCGGC
GTTTTATCATATTCCTCTTCATCCTGCTG
CTATGCCTCATCTTCTTGTGGTTCTTCT
GGACTACCAAGGTATGTTGCCCGTTTGT
CCTCTACTTCCAGGAACATCAACTACCA
GCACGGGACCATGCAAGACCTGCACGA
TTCCTGCTCAAGGAACCTCTATGTTTCC
CTCTTGTGCTGTACAAAACCTTCGGAC
GGAAACTGCACTTGTATTCCCATCCCAT
CATCCTGGGCTTTTCGCAAGATTCCTATG
GGAGTGGGCCTCAGTCCGTTTCTCCTG
GCTCAGTTTACTAGTCCATTTGTTTCAG
    
```

TGGTTCGTAGGGCTTTCCCCCACTGTTT
 GGCTTTCAGTTATATGGATGATGTGTA
 TTGGGGCCCAAGTCTGTACAACATCTTG
 AGTCCCTTTTTACCTCTATTACCAATTTT
 CTTTTGTCTTTGGGTATACATTTGAACC
 CCAATAAAACCAAACGTTGGGGCTATT
 CCCTTAATTTTCATGGGATATGTAATTG
 GATGTTGGGGTACTTTACCGCAAGAA
 CATATTGTACTAAAAATCAAGCAATGT
 TTTGAAAACCTGCCTGTAATAGACCT
 ATTGATTGAAAAGTATGTCAGAGAATT
 GTGGGTCTTTTGGGCTTTGCTGCCCC
 TTTTACACAATGTGGCTATCCTGCCTT
 GATGCCTTTATATGCATGTATACAATC
 TAAGCAAGCTTGAATTCTGCAGATATC
 CATCACACTGGCGGCCGCTCGAGCAT
 GCATCTAGAGGGCCCTATTCTATAGTG
 TCACCTAAATGCTAGAGCTCGC

DNA 序列分析表明,所有基因顺序与原来设计完全一致,重组质粒的部分 DNA 序列中含有 HBsAg 基因序列。

3.3 重组减毒沙门氏菌株体外传代的稳定性分析

将重组减毒鼠伤寒沙门氏菌每 10 代提取 1 次质粒,每个菌落抽提质粒均含有重组质粒,可见质粒不会因无选择压力而丢失。

4 讨论

乙型肝炎病毒(HBV)所致的病毒性肝炎,具有感染性强、携带率高、流行面广、慢性化倾向严重的特点,属致癌性病毒。对乙肝的现患,目前尚无任何特效药物治疗,对人群中大量存在的 HBsAg 慢性携带者,亦无理想的消除措施。乙型肝炎病毒(HBV)属嗜肝 DNA 病毒,呈双层外壳的圆形颗粒,直径为 42 nm,外膜厚 7 nm,为病毒的包膜。包膜蛋白构成 HBV 表面抗原(HBsAg),在肝细胞内合成,大量释放于血液循环中,有抗原性,但无感染性,又能组装成颗粒。因而,它有很强的免疫原性,可利用它制备安全有效的乙型肝炎疫苗和抗体^[8-9]。HBsAg 基因位于 HBV 基因的 S 区,S 区基因分 3 段,从上游开始依次为前 S1 基因、前 S2 基因和 S 基因。S 基因区含有 3 个具有转录活性的启动子,分别位于 115、2848 和 3172 位核苷酸。

4.1 减毒伤寒沙门氏菌作为疫苗的载体

沙门氏菌株已经发展成为人类或动物防止沙门氏菌感染的活菌疫苗,因为口服活的重组沙门氏

菌抗原侵入内脏有关的淋巴组织(Peyer's patches)和内脏淋巴组织,引起黏液、体液与细胞免疫。目前减毒沙门氏菌已作为疫苗载体广泛用于病毒、细菌和寄生虫等口服疫苗的构建和研究。用以表达病毒抗原如流感病毒核蛋白或血凝素、HIV_{gV160} 的 V3 环、乙型肝炎病毒前 S1/前 S2 和核心抗原、登革热病毒 4 型囊膜糖蛋白、轮状病毒 VP7 和单纯疱疹病毒糖蛋白等;用以表达的细菌抗原有霍乱弧菌毒素亚单位、志贺毒素亚单位、破伤风毒素、大肠杆菌毒素等。这些研究目前正处于实验室研究阶段。以减毒沙门氏菌为载体构建的疫苗株可通过口服免疫,最近似于自然感染,能在体内稳定、持续的表达相应抗原,不仅刺激机体产生体液免疫和细胞免疫,还可刺激黏膜免疫^[8]。以沙门氏菌携带疫苗抗原进入机体后,除能激发机体产生针对沙门氏菌的免疫应答外,沙门氏菌还可作为免疫佐剂同时刺激和增强机体产生针对外源抗原的体液免疫、细胞免疫和黏膜免疫^[9-10]。Covone 等构建了能表达 LT 的鼠伤寒沙门氏菌,小鼠口服免疫此菌株后产生了高滴度的抗鼠伤寒沙门氏菌和 LT 的肠道分泌型 IgA 抗体,血清中产生相应的抗毒素应答^[11-12]。

4.2 生物安全性问题

以减毒胞内菌作为 DNA 疫苗运送载体利用基因工程减毒的某些侵袭性胞内菌作为载体运送 DNA 疫苗是一种新型的途径。常用的减毒胞内菌有鼠伤寒沙门氏菌、伤寒沙门氏菌、痢疾志贺氏杆菌、小肠结肠炎耶尔森氏菌、侵袭性大肠杆菌、分支杆菌(BC)及单核细胞增生症李斯特菌等。通过减毒胞内菌运送 DNA 疫苗的最大优势就在于其能够将 DNA 疫苗直接运送到专业性抗原提呈细胞(巨噬细胞和树突状细胞)内,细菌在 APC 中裂解后,将携带的质粒 DNA 释放出来。外源 DNA 随机整合入宿主基因组,可能会激活癌基因或者使肿瘤抑制物失活。此外,外源 DNA 被干细胞或生殖细胞摄取之后还可能将外源 DNA 传给后代。但是迄今为止尚未发现质粒 DNA 整合入基因组 DNA 的直接证据,仅有 Schubert 等的 1 篇报道表明在小鼠脾细胞、肝细胞及肠细胞中检测到降解的质粒 DNA 片段^[13-15]。

目前,基因工程微生物的应用及被释放到环境中后的安全性问题受到关注。抗药性病原菌的大量出现,许多药物,特别是抗生素已经不能抑制或杀死原来敏感的病原菌,这已不仅仅是基因突变可解释的,可能与抗药性基因的水平转移有关。已发现基因的转移不仅仅是发生在细菌之间,而且也发

生在细菌与高等生物之间,甚至是高等生物之间。目前对 DNA 疫苗的安全性考虑主要基于以下 4 个方面:1)质粒 DNA 低水平整合到宿主基因组的潜在危险性;2)DNA 疫苗载体携带的抗生素基因可能导致的生物学后果;3)产生针对双链 DNA 的抗体;4)引起免疫耐受。一般用作 DNA 疫苗的真核表达载体为了筛选方便都带有一个抗生素抗性基因,最常用的是氨苄青霉素和卡那霉素抗性基因,抗生素抗性基因的存在有可能导致致病菌的耐药性问题,但是如果能够对特定抗生素抗性基因的使用作出一个通用的规定,那么这个问题也应该可以解决。

4.3 表达 HBsAg 的减毒沙门氏菌疫苗株的构建

本实验利用电转化方法构建了表达乙肝表面抗原的重组减毒沙门氏菌工程菌株 X8786/peDNA3s,且在体外能稳定地繁殖、生长和传代。体外传代稳定性分析表明:在有和无选择压力的情况下,重组菌株的繁殖生长和传代都较稳定,特别是在有选择压力的条件下,质粒基本不丢失。研究结果表明,构建的重组减毒沙门氏菌株将可能作为 HBV 的口服活疫苗候选株用于预防和控制人和动物 HBV 的感染,进一步地还需动物实验观察效果和加以评价。

参考文献:

- [1] Urashima M , Suzuki H , Yuza Y , et al. An oral CD40 ligand gene therapy against lymphoma using attenuated *Salmonella typhimurium*[J] . **Blood** , 2000 , 95(4) : 1258 - 1263.
- [2] 徐文忠 . 促生长激素与乙肝表面抗原融合基因在痘苗病毒中的表达 [J] . **生物化学与生物物理学报** , 1993 , 25(2) : 119 - 126.
- [3] 徐文忠 . 促进动物生长的新型基因工程疫苗研究 [J] . **中国科学(B)** , 1993 , 23(12) : 1272 - 1277.
- [4] Curtiss R III , Doggett T , Nayak A. Strategies for the use of live recombinant avirulent bacterial vaccines for mucosal immunization. In : *Essentials of Mucosal Immunology*[M] . San Diego : Academic Press , 1996. 499 - 511.
- [5] Sambrook J , Fritsch D F , Maniatis T. *Molecular cloning : A laboratory manual* . 2nd ed[M] . New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1989. 16 - 19.
- [6] Eyal Raz. Intradermal gene immunization : The possible role of DNA uptake in the induction of cellular immunity to viruses[J] . **Proc Natl Acad Sci** , 1994 (91) : 9519 - 9523.
- [7] Medina E , Guzman CA. Use of live bacterial vaccine vectors for antigen delivery : potential and limitations[J] . **Vaccine** 2001 , 19 , 1573 - 1580.
- [8] Ho Young Kang 1 , Roy Curtiss III . Immune responses dependent on antigen location in recombinant attenuated *Salmonella typhimurium* vaccines following oral immunization[J] . **Immunology and Medical Microbiology** 2003 , 37 : 99 - 104.
- [9] 李校堃 , 袁辉 . 基因工程药物制备原理与应用 [M] . 北京 : 科学出版社 , 广州 : 暨南大学出版社 , 2003.
- [10] 张宜俊 , 章谷生 . 乙型肝炎生物治疗 [M] . 上海 : 上海科学技术出版社 , 2001.
- [11] 董德祥 . 疫苗技术基础与应用(第 1 版) [M] . 北京 : 化学工业出版社 , 2002. 175 - 194.
- [12] Covone M G , Brocchi M , Palla E , et al. Levels of expression and immunogenicity of attenuated *Salmonella enteritidis* typhimurium strains expressing *Escherichia coli* enterotoxin[J] . **Infect Immun** , 1998 , 66(1) : 224 - 231.
- [13] Schubert R , Renz D , Schmitz B , et al. Foreign(M13) DNA ingested by mice reaches peripheral leukocytes , spleen , and liver via the intestinal wall mucosa and can be covalently linked to mouse DNA[M] . USA : **Proc Natl Acad Sci** , 1997. 94 : 961 - 966.
- [14] 金冬雁 , 黎孟枫 . 分子克隆实验指南 [M] . 北京 : 科学出版社 , 1996. 16 - 66.
- [15] 卢圣栋 . 现代分子生物学实验技术 [M] . 北京 : 中国协和医科大学出版社 , 1999. 108 - 126.

(责任编辑 杨 萌)