

融合蛋白 VP4 SII 的免疫效果观察

武军元², 陈快^{2*}, 王智超, 李有文 (1. 新疆兵团塔里木畜牧科技重点实验室, 新疆阿拉尔 843300; 2. 石河子大学新疆地方与民族高发省部共建教育部重点实验室, 新疆石河子 832003)

摘要 为了研究融合蛋白 VP4 SII 的免疫效果。将 40 只小鼠随机分为实验疫苗组 (30 μg VP4 SII + 0.6 μg LTB)、铝胶疫苗组 (30 μg VP4 SII + Al(OH)₃ 胶)、纯化蛋白 VP4 SII 疫苗组 (30 μg VP4 SII) 和 PBS 对照组, 通过鼻腔滴入进行免疫, 测定其抗体水平。用大肠杆菌强毒株 C83902 进行攻毒试验, 观测各免疫组小鼠的保护效果。除 PBS 对照组外, 其余各组均有抗 VP4 SII 抗体产生, 第 6 周最高, 铝胶疫苗组的抗体水平略高于实验疫苗组, 纯化蛋白 VP4 SII 免疫组较低, 与实验疫苗组差异极显著 ($P < 0.001$)。实验疫苗组和铝胶疫苗组小鼠对大肠杆菌强毒株 C83902 均有较好的免疫保护效果, 与对照 PBS 组有明显差异。该研究为进一步提高 SII 的免疫原性提供了依据。

关键词 大肠杆菌; VP4 SII; 疫苗

中图分类号 Q936 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)21-06436-02

Observation of the Immune Effect of Fusion Protein VP4 SII

WU Jun yuan et al (Key Laboratory of Animal Husbandry Science and Technology of Xinjiang Production & Construction Corps, Alar, Xinjiang 843300)

Abstract The aim of the study was to investigate the immune effect of fusion protein VP4 SII. 40 mouse randomly divided into 4 groups of test bacterin group (30 μg VP4 SII + 0.6 μg LTB), aluminium hydroxide vaccine group (30 μg VP4 SII + Al(OH)₃ gel), pure protein VP4 SII vaccine group (30 μg VP4 SII) and PBS control group were immunized by rhinal dipping. And then, the antibody levels of the mouse were determined. The protection effects of mouse in all immune groups were observed after the toxicity test with strong virulent strain C83902 of *E. coli*. Except PBS control group, anti-VP4 SII antibodies were produced in other groups with the highest at the 6th week. The antibody level in aluminium hydroxide bacterin group was higher than that in test vaccine group. The antibody level in pure protein VP4 SII bacterin group was lower, being extremely significantly different with that in test vaccine group ($P < 0.001$). Mouse in test vaccine group and aluminium hydroxide bacterin group had better immunoprotection effect on strong virulent strain C83902 of *E. coli*, obviously different with that in PBS control group. The research provided a basis for further the immunogenicity of SII.

Key words *E. coli*; VP4 SII; Bacterin

研究显示, 肠毒素是 ETEC 致幼畜腹泻的根本原因, 由 ETEC 产生的肠毒素包括热敏感肠毒素 (LT) 和热稳定肠毒素 (ST), 其中 ST 又包括 SII 和 SIII。调查表明, 几乎所有的腹泻幼畜只要分离到 ETEC 大部分都产生 SII^[1-2], 但是, 由于 SII 的分子量太小, 几乎没有免疫原性, 因此, 通过基因融合的方式借助大分子物质提高 SII 的免疫原性是当前国内外学者致力于 ETEC 疫苗开发的重点^[3-5]。轮状病毒系呼肠孤病毒科 (Reoviridae) 轮状病毒属 (*Rotavirus*) 的成员, 是导致幼畜病毒性腹泻最主要的病原体^[6], 其中, 外膜蛋白 VP4 不仅是轮状病毒血清学分型的依据, 而且是主要的保护性抗原^[7-9]。基于此, 笔者运用基因工程技术构建了表达融合蛋白 VP4 SII 的工程菌株 BL21 (DE3) (pTHoHsB-VP4-SII)^[10], 并报道该表达蛋白的免疫效果。

1 材料与试验方法

1.1 材料

1.1.1 菌株。工程菌株 BL21 (DE3) (pTHoHsB-VP4-SII) 和已知能表达热敏肠毒素 LTB 的工程菌株 BL21 (DE3) (pTHoHsC-LTB) 由实验室保存, 大肠杆菌强毒株 C83902 (K88ac⁺ST⁺LTB⁺) 购自中国兽药研究所。

1.1.2 实验动物。昆明系小白鼠 (18~22 g) 购自新疆医科大学实验动物中心。

1.1.3 相关试剂。鼠抗 VP4 多克隆抗体由军事医学科学院孙茂盛老师惠赠, 以免疫前采集的血清作为 ELISA 的阴性对照, 羊抗鼠 IgG HRP 和显色剂 OPD 购自北京鼎国公司。其

他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 免疫抗原的制备。过夜培养的重组菌株 BL21 (DE3) (pTHoHsB-VP4-SII) 按 1% 的比例接种于 100 ml 的 LB 培养基中, 37℃ 培养至 OD₆₀₀ 达 0.4~0.6, 加 IPTG 使得终浓度为 1 mmol/L, 收集 5 h 的诱导培养物离心收集菌体, 重悬菌体于 5 ml 50 mmol/L Tris·Cl - 2 mmol/L EDTA, 加溶菌酶至终浓度为 100 μg/ml, 加入 5 ml 1% TritonX-100 后于 30℃ 温育 15 min, 再在液氮中速冻 2 min, 溶化后超声波处理 2 个 10 s, 然后 12 000 r/min 离心 20 min, 将收集的包含体粗提物溶于 5 ml 0.01 mol/L 的 PBS, 取 15 μl 加入等量的 Loading Buffer 进行 SDS-PAGE。适当长度 (7 cm) 的透析袋用 50% 的乙醇浸泡 5 min, EDTA 溶液和蒸馏水各冲洗 2 遍后装入从 SDS-PAGE 凝胶上切割下的目的蛋白条带, 透析袋中装入 4 ml SDS-PAGE 电泳缓冲液 (pH=8.3)。将准备好的装有目的条带的透析袋放入盛有预冷 SDS-PAGE 电泳缓冲液 (pH=8.3) 的水平电泳槽中, 150 V 电泳 1.5 h, 电泳完全后弃透析袋中的凝胶, 将透析袋放入预冷的 0.01 mol/L 的 PBS 溶液中, 4℃ 过夜, 期间换液 2~4 次, 用 PEG 8000 浓缩纯化, 用分光光度计调整定量蛋白浓度为 1 ng/ml, 加入热敏肠毒素 LTB 至 20 μg/ml 作为实验疫苗。另取调整好浓度的纯化蛋白加入 Al(OH)₃ 胶至 10% 作为铝胶疫苗。

1.2.2 动物免疫。40 只昆明系雌性小白鼠随机分为 4 个组, 每组 10 只。第 1 组用实验疫苗免疫, 30 μl/只 (含纯化蛋白 VP4 SII 30 μg, LTB 0.6 μg); 第 2 组用铝胶疫苗免疫, 33 μl/只 (含纯化蛋白 VP4 SII 30 μg); 第 3 组用纯化蛋白 VP4 SII 免疫, 30 μl/只 (含纯化蛋白 VP4 SII 30 μg); 第 4 组为 PBS 对照, 30 μl/只。分别于第 1、7、14 天进行基础免疫, 第 35 天加强免疫 1 次, 免疫途径均为鼻腔滴入 (免疫前先用乙醚将小鼠轻轻麻醉)。初次免疫后的第 14 天开始各免疫组小鼠

基金项目 新疆生产建设兵团博士基金 (兵博 02, NKBCSHZ08)。

作者简介 武军元 (1980-), 男, 甘肃武威人, 硕士, 讲师, 从事病原分子生物学研究。* 通讯作者, 博士生导师, 教授, E-mail: cf-xb@163.com。

收稿日期 2007-03-25

均眼眶静脉取血用于抗体效价的测定。

1.2.3 免疫小鼠抗体水平测定。纯化蛋白 VP4-SII 以 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度包被 96 孔酶标板, 100 μl /孔, 4 过夜(12 h)。用含 1% 胎牛血清的 PBST 进行封闭, 以含有 BL21(DE3) 裂解上清 2% 的 PBST 稀释待检血清 40 倍, 羊抗小鼠 IgG HRP 的工作浓度为 1 800。封闭、加入待检血清和酶标二抗的作用条件均为 37 $^{\circ}\text{C}$ 1.5 h, 加入底物后室温避光作用 15 min。以此间接 ELISA 条件测定 20 份阴性血清和各组免疫小鼠针对共免抗原 VP4-SII 的抗体效价, 所得数据采用软件 SPSS 12.0 进行方差分析, 通过各组抗体水平的比较, 来评价表达蛋白作为免疫抗原以及 LTB 作为免疫佐剂的效果。血清阳性的临界值 = 阴性血清 OD₄₉₀ 的平均值 + 2S (S 为标准方差)。

1.2.4 攻毒实验。过夜培养的大肠杆菌强毒株 C83902 (K88ac⁺SII⁺LTB⁺) 以 0.1、0.2、0.3 ml 的注射剂量分别口腔

注射小白鼠各 5 只(麦氏比浊法测定其含菌量为 18 亿/ml), 以确定的 2 个 MLD 细菌数的剂量攻毒各免疫组小鼠。攻毒之后每天观察各组小鼠的免疫保护情况, 连续观察 10 d, 以免疫小鼠不死亡视为有保护效果。

2 结果与分析

2.1 免疫小鼠抗体水平测定 以该实验建立的间接 ELISA 方法测得 20 份阴性血清 OD₄₉₀ 的平均值为 0.185, 标准方差为 0.019, 血清阳性的临界值为 0.223。小鼠免疫 2 周后, 除 PBS 对照组外, 其余各组均有抗 VP4-SII 抗体的产生。第 6 周检测时抗体水平达到峰值, 其中, 铝胶疫苗组的抗体水平略高于实验疫苗组 ($P > 0.05$); 只给予纯化蛋白 VP4-SII 的免疫组也有抗 VP4-SII 抗体的产生, 但是水平较低, 与实验疫苗组相比, 差异极显著 ($P < 0.001$), 结果见表 1。

2.2 免疫攻毒保护结果 分别以不同剂量的 C83902 注射小

表1 免疫小鼠抗VP4-SII 的产生及强毒株 C83902 的攻毒保护结果

免疫各组	检测时间 周						保护率
	2	4	6	10	12	14	
实验疫苗组	0.483 0 \pm 0.035 4	0.638 1 \pm 0.072 0	0.861 1 \pm 0.074 9	0.823 3 \pm 0.068 6	0.814 7 \pm 0.073 2	0.799 1 \pm 0.052 0	9/10
铝胶疫苗组	0.544 0 \pm 0.069 9	0.840 8 \pm 0.076 5	0.861 5 \pm 0.075 3	0.698 8 \pm 0.011 2	0.538 5 \pm 0.092 1	0.461 3 \pm 0.036 7	8/10
VP4-SII 组	0.238 2 \pm 0.076 7	0.248 1 \pm 0.044 3	0.296 0 \pm 0.017 4	0.249 8 \pm 0.032 5	0.242 5 \pm 0.050 0	0.198 0 \pm 0.072 0	1/10
PBS 组	0.186 3 \pm 0.015 6	0.192 6 \pm 0.011 5	0.198 6 \pm 0.013 2	0.211 9 \pm 0.064 3	0.197 1 \pm 0.012 4	0.167 2 \pm 0.063 3	0/10

注: 保护率 = 存活率 / 免疫数。

鼠, 确定其实验条件下的最小致死剂量含菌数约 5.4 亿/ml, 以 2 MLD 数的细菌攻击免疫各组小鼠, 结果见表 1。结果显示, 实验疫苗组和铝胶疫苗组小鼠对大肠杆菌强毒株 C83902 均起到了很好的保护效果, 与对照 PBS 组有明显的差别。

3 讨论

目前, 国内市场应用的重组大肠杆菌性腹泻疫苗多为 K88、K99 和 K88-LTB 双价苗, 其免疫效果仍不理想, 一个重要的原因就是没有从致腹泻的根本——毒素的角度去考虑。随着分子生物学研究的不断深入, 现在不但明确了肠毒素是 ETEC 致病的根源, 而且进一步表明, SII 肠毒素几乎可以导致各种幼畜腹泻。因此, 尝试从毒素的角度去解决 ETEC 性腹泻将是今后吸引科研工作者的焦点。但是, 由于分子量极小的 SII 几乎没有免疫原性, 因此, 必须借助大分子物质来解决 SII 的免疫原性问题。Klipstein 等^[1] 曾经用化学方法使合成的 SII 多肽分别与 LTB 亚单位和牛血清白蛋白偶联, 动物实验证明偶联产物可以提高 SII 的免疫原性, 但是, 人工合成的多肽价格昂贵, 不可能规模化应用。因此, Oenerts 等^[2] 采用基因重组技术将 SII 基因与热稳定肠毒素 LT 基因融合, 借助细菌自身的蛋白表达机制来完成对 SII 大量表达的同时提高其免疫原性, 取得了较好的效果, 国内也有人作了类似的研究。轮状病毒也可以致幼畜腹泻, 其外膜蛋白 VP4 是具有免疫原性的大分子保护性蛋白, 基于此, 笔者等将大肠杆菌热稳定肠毒素 SII 基因与轮状病毒外膜蛋白 VP4 基因通过基因重组技术进行融合, 构建了表达融合蛋白 VP4-SII 的重组菌株 BL21(DE3) (pTHoHsB-VP4-SII)。研究表明, 大肠杆菌不耐热肠毒素 LT (heat-labile enterotoxin) 不但具有免疫原性, 还可以作为一种良好的黏膜免疫佐剂, LT 与多种蛋白抗原或非蛋白抗原经不同的免疫途径共同免疫后可以诱导机体的系统以及黏膜免疫应答, 同时能够消除机体对免疫抗

原的耐受, 尤其作为一种黏膜免疫原可以诱导多处黏膜的长效记忆^[13], 但是, 由于天然 LT 的毒性而大大限制了其在疫苗研究中的应用。近年部分研究表明, 从全毒素中分离的 LTB 亚单位同样具有黏膜免疫佐剂的功能^[14]。基于此, 笔者将基因工程表达的融合蛋白 VP4-SII 混合实验剂量的 LTB 作为实验疫苗免疫小鼠, 观察以 LTB 作为免疫佐剂条件下 VP4-SII 的免疫保护效果, 结果, 该实验疫苗能很好地诱导小鼠产生针对 VP4-SII 的抗体, 免疫小鼠可以抵抗 2 MLD 细菌数的大肠杆菌强毒株 C83902 (K88ac⁺SII⁺LTB⁺) 的攻击。该研究只是将实验疫苗通过鼻腔途径给予免疫, 没有检测其他免疫途径(如: 灌胃)条件下 LTB 的佐剂功效, 因此, 尚需补充更多的实验研究。该实验疫苗是否也能有效抵抗轮状病毒的攻击, 需进一步实验观察。

参考文献

- [1] SVENERHOLM A M, WIKLUND G. Rapid GM-enzymelinked immunosorbent assay with visual reading for identification of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin[J]. *Clin Microbiol*, 1983, 17: 596-600.
- [2] JERIBORN M, ARING HREN C, HOLMGREN J, et al. Safety and immunogenicity of an oral inactivated enterotoxigenic *Escherichia coli* [J]. *Vaccine*, 1998, 16: 255-260.
- [3] GUZMAN VLM. Export and processing analysis of a fusion between the enterocellular heat-stable enterotoxin and the periplasmic B-subunit of the heat-labile enterotoxin in *E. coli* [J]. *Mol Microbiol*, 1990, 4(2): 253-264.
- [4] LAWRENCE R M, HUANG P T, GUCK J, et al. Expression of the cloned gene for enterotoxin Stb of *Escherichia coli* [J]. *Infect Immun*, 1990, 58(4): 970-977.
- [5] 许崇波, 冯书章, 刘子, 等. 大肠杆菌耐热性肠毒素基因核苷酸序列分析与免疫原性研究[J]. *中国兽医学报*, 1996, 16(4): 327-332.
- [6] BISHOP RF. Development of candidate rotavirus vaccine [J]. *Vaccine*, 1993, 11: 247-254.
- [7] GREENBERY H B, VALDESUSO J, VAN WYKE K, et al. Production and preliminary characterization of monoclonal antibodies directed at two surface proteins of Rhesus rotavirus [J]. *Virology*, 1983, 127: 267-275.

(上接第6437 页)

- [8] 孙茂盛. 重组杆状病毒表达轮状病毒SA11 毒株VP4 蛋白[J]. 中国医学科学院学报,1997,19(1) :48- 53.
- [9] 陈元鼎, 刘名英, 赵玮, 等. 重组轮状病毒SA11 VP4 抗原表位诱导广泛交叉中和抗体反应[J]. 中国病毒学,1998,13(1) :57- 63.
- [10] 王鹏雁, 陈创夫, 余兴龙, 等. 轮状病毒VP4 蛋白与肠产毒性大肠杆菌热稳定肠毒素蛋白的融合表达[J]. 中国人兽共患病杂志,2003,19(1) :76- 81.
- [11] KLIPSTEIN F A. Development of a vaccine of crosslinked heat-stable and heat-labile enterotoxins that protects against E. coli producing either enterotoxin

[J]. Infect Immun,1982,37:550- 557.

- [12] CLEMENS J D. Construction of a non-toxic fusion peptide for immunization against Escherichia coli strains that produce heat-stable and heat-labile enterotoxins[J]. Infect Immun,1990,58:1159- 1166.
- [13] HOLMGREN J, CZERKINSKY C, ERIKSSON K, et al. Mucosal immunization and adjuvants: a brief overview of recent advances and challenges[J]. Vaccine, 2003,21(Suppl 2) :89- 95.
- [14] MILARD G, HIRST T R, SNIDER D P. Escherichia coli heat-labile enterotoxin B subunit is a more potent mucosal adjuvant than its closely related homologue, the B subunit of cholera toxin[J]. Infect Immun,2001,69(5) :3476- 3482.