

生物科学

肠毒素大肠杆菌 LT—B 基因转基因 马铃薯口服免疫原性研究

王利¹ 赵凯² 陈琦¹ 姜丽丽³ 贾宇臣^{1*}

(内蒙古医学院分子生物学研究中心¹, 呼和浩特 010059; 内蒙古呼和浩特市第一医院小儿内科², 呼和浩特 010030;
内蒙古医学院分子病理学实验室³, 呼和浩特 010059)

摘要 探讨马铃薯表达的产肠毒素大肠杆菌热敏肠毒素 B 亚基口服免疫原性, 选择 4 周龄的昆明小白鼠。转基因马铃薯块茎经冷冻干燥后, 研磨成粉状, 以灌胃给药的方式对小鼠进行免疫。分 0.2 g、0.4 g 和 0.6 g 三个剂量组, 免疫三次, 每周一次。对照组用 5 μ g 细菌中表达的抗原蛋白腹腔注射免疫小鼠, 空白组小鼠饲喂普通鼠粮。利用 ELISA 方法对小鼠血清、粪便特异性抗体表达进行分析。结果有 45% 小鼠经转基因马铃薯口服免疫后可诱导特异性的免疫应答。与细菌表达的抗原免疫反应相比, 血清 IgG 反应和黏膜 sIgA 反应略强或相当。说明产肠毒素大肠杆菌转基因植物疫苗免疫动物可诱导特异的系统免疫应答和黏膜免疫应答。为利用植物生产预防大肠杆菌性腹泻可食用的口服疫苗, 保护儿童免受细菌性腹泻的侵袭奠定了基础。

关键词 植物疫苗 腹泻 产肠毒素大肠杆菌热敏肠毒素 B 亚基 免疫原性

中图分类号 Q789; **文献标志码** B

肠毒素大肠杆菌 (*Enterotoxigenic Escherichia coli*, ETEC) 是引起世界上发展中国家婴幼儿及到这些国家旅游者腹泻的主要致病菌。据统计每年可导致数亿人次腹泻, 数十万 5 岁以下儿童死亡。发病高峰为婴儿出生的第一年和旅游者旅游的第一周, 此后随时间增长而逐渐减少, 并与儿童后天生长迟缓相关^[1]。电解质失衡, 造成细胞吸收障碍, 产生水样、脱水性腹泻^[2]。在一些经济欠发达、卫生条件较差的地区, 预防接种是进行腹泻防治较为有效的措施, 但现有疫苗昂贵, 贮存、运输相当困难。因此, 研制成本低、使用简单、易于贮存运输的

新疫苗是当前疫苗研究的一大热点。亚单位疫苗是近年来疫苗研究的一个主流方向, 植物基因工程技术的不断发展为新型疫苗的研究提供了新思路。以转基因植物作为表达反应器的研制策略因其安全性好、经济廉价、便于运输和可以口服等特点而备受关注^[3], 是国际上植物基因工程研究领域的新趋势, 具有潜在的优势和广泛的发展前景^[4-6]。本研究探讨了转基因马铃薯表达的 LT—B 抗原的口服免疫原性, 为利用植物表达载体开发新一代的口服 ETEC 疫苗提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

产肠毒素大肠杆菌热敏肠毒素 B 亚基基因转基因马铃薯冻干粉, 由中国农科院生物技术所刘德虎研究员提供。将马铃薯冻干粉在液氮中研磨, 加入适量的磷酸缓冲液制成悬浊液保存在 4 $^{\circ}$ C 备用

2011 年 6 月 21 日收到

内蒙古医学院青年基金项目

(NY2006QN002) 资助

第一作者简介: 王利 (1981—), 男, 讲师, 内蒙古呼和浩特市人, 硕士, 研究方向: 分子生物学。E-mail: wangliwork@163.com。

* 通讯作者简介: 贾宇臣 (1978—), 女, 讲师, 硕士, 研究方向: 转基因植物口服疫苗与基因工程。E-mail: springxy2003@yahoo.com.cn。

(现用现制备)。

1.2 主要试剂

辣根过氧化物酶标记兔抗小鼠 IgG 购自北京赛驰生物科技有限公司,辣根过氧化物酶标记兔抗小鼠 IgA 购自研域(上海)化学试剂有限公司。

1.3 动物材料

6 周龄雌性昆明白小鼠 50 只(购于内蒙古大学动物中心),随机平均分为试验组、对照组和空白组 3 组

1.2 方法

1.2.1 免疫小鼠实验方案

50 只小鼠随机均分为 5 组,试验组 3 组,第 1 组剂量为 0.2 g 转基因马铃薯冻干粉(含目的蛋白约为 30 μg),第 2 组剂量为 0.4 g 转基因马铃薯冻干粉(含目的蛋白约为 40 μg),第 3 组剂量为 0.6 g 转基因马铃薯冻干粉(含目的蛋白约为 50 μg),均以灌胃给药的方式免疫小鼠;第 4 组为对照组,腹腔注射大肠杆菌表达的 LT-B 抗原蛋白 5 μg;第 5 组为空白组组,饲喂普通鼠粮。小鼠每周免疫一次,共 3 次。免疫前一天停止饲料,只供应水,次日早晨分笼免疫。

1.2.2 样本制备

末次免疫 14 d、28 d、42 d、56 d 和 70 d 尾部静脉取血、收集粪便。

(1) 血液制备:采集血液后室温放置 30 min,8 000 × g 离心 5 min,取上清液 -20 ℃ 保存备用;

(2) 粪便处理:收集小鼠新鲜粪便,以 4 mL/g 加含 0.05 mol EDTA 的 0.01 mol/L PBS 缓冲液悬浮,冰上不时震荡 15 min,4 ℃,8 000 × g 离心 5 min,上清液 -20 ℃ 冻存备用。

1.2.3 ELISA 检测小鼠血清 IgG、尿液和粪便提取物 sIgA 水平

血清 IgG 测定参照文献[7],粪便提取物 sIgA 抗体水平测定参照文献[8]。大肠杆菌中表达 LT—B 包被 96 孔板,每孔加 100 μL,4 ℃ 过夜,次日洗涤 3 次,每孔加稀释好的样本液 100 μL,37 ℃ 温育 1 h,按确定的稀释浓度稀释辣根过氧化物酶标记的兔抗小鼠的 IgG/IgA 抗体,100 μL/孔,37 ℃ 温育

1 h,洗涤,加入临时配制的底物溶液四甲基联苯胺(TMB),37 ℃ 30 min,每孔加入 50 μL 2 mol/L H₂SO₄ 震荡混匀,终止反应,设正常小鼠为空白为对照。

2 结果与分析

2.1 体液免疫应答抗体表达水平检测

为了评价转基因马铃薯口服免疫小鼠后体液免疫应答情况,对小鼠血清 IgG 进行了检测,试验组中有 45% 的小鼠和对照组中有 50% 的小鼠检测到 IgG,而空白组小鼠血清中未检测到任何抗 LT-B 特异性 IgG 抗体。抗体水平从免疫后开始随着免疫时间的延长而逐渐增加,末次免疫后 56 d 出现应答高峰,从 70 d 后略有下降(见图 1)。t 检验结果显示,高剂量组小鼠的体液免疫应答与低剂量组小鼠差异不显著。

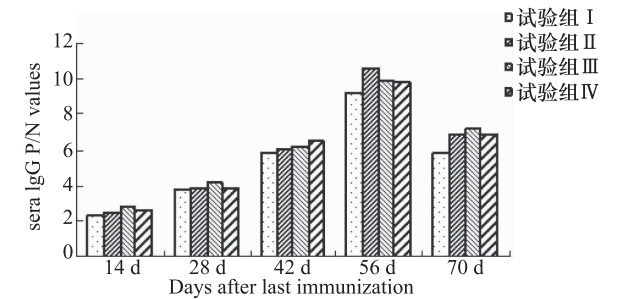


图 1 末次免疫后不同时相内小鼠血清抗 LT—B IgG 抗体检测

2.2 黏膜免疫应答抗体表达水平检测

为了评价转基因马铃薯口服免疫小鼠后黏膜免疫应答情况,对小鼠粪便 IgA 进行了检测,检测结果显示,试验组中 45% 的小鼠、对照组中 50% 的小鼠粪便中检测到 IgA,空白组小鼠粪便中未检测到任何抗 LT—B 特异性 IgA 抗体。抗体水平变化与血清抗体相似,末次免疫后 56 d 出现应答高峰,从 70 d 后出现下降(见图 2)。t 检验结果显示,高剂量组小鼠的黏膜免疫应答与低剂量组小鼠差异不显著。

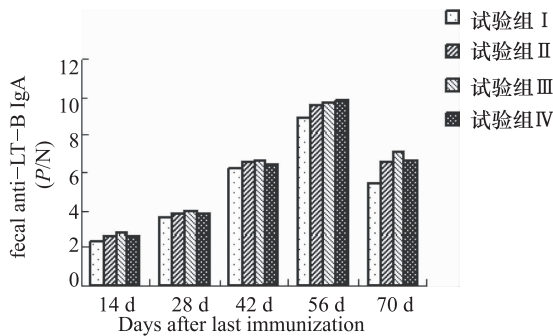


图2 末次免疫后不同时相内小鼠血清抗 LT-B IgA 抗体检测

3 讨论

疫苗一直是人类用于干预人和动物疾病的有力武器,随着各种疫苗的出现,曾经在地球上猖狂一时的某些感染性疾病已得到基本控制。细菌、酵母及哺乳动物细胞等是基因工程疫苗的主要表达系统,但这些系统存在设备复杂、成本高、免疫原性较差和易被外源微生物污染的缺陷。转基因植物作为一种新型的生物反应器近年来得到广泛应用,以马铃薯作为疫苗表达的反应器具有独特的优点:一旦获得转基因植株即可利用其块茎进行大量的无性繁殖,而无需进行有性繁殖,这样可以保证转化株的遗传稳定性;马铃薯易于栽培管理,且适应栽种的地域广;马铃薯便于储藏运输。基于上述优点,我们将产肠毒素大肠杆菌热敏肠毒素 B 亚基基因转入马铃薯基因组,获得转化植株。

产肠毒素大肠杆菌为肠道病原体,机体天然抗 ETEC 的防御机制不仅需要系统免疫应答,更需要黏膜免疫应答进行防御。口服疫苗到肠内黏膜诱导部位之前要进过胃内的不利环境,因此,有效的口服疫苗必须受到保护,否则会失去免疫原性。而植物细胞壁作为天然的生物胶囊可使细胞中的疫苗抗原通过胃内的不利环境时受到细胞壁的保护,直接到达肠内黏膜诱导部位,诱导黏膜和全身免疫应答^[9]。不仅如此,转基因植物口服疫苗还可以诱导消化道相关淋巴样组织产生分泌性的 IgA (sIgA),在病原体和宿主之间相互作用的起始部位直

接诱发免疫反应,从而大大提高其免疫有效性^[10]。sIgA 是黏膜免疫反应中的保护性抗体,由黏膜固有层浆细胞分泌入肠腔,作为机体黏膜屏障,抑制外源抗原分子侵入、中和保外病原微生物、结合抗原形成免疫复合物 (Immune complexes, Ics) 由吞噬细胞吞噬清除^[11]。本研究采用转基因马铃薯直接口服免疫小鼠,发现可以有效诱导系统免疫和局部黏膜免疫应答,证明了以转基因植物表达 LT-B 抗原基因可以作为一种候选疫苗形式。*t* 检验结果显示,高剂量组小鼠的免疫应答与低剂量组小鼠差异不显著,这表明试验三个剂量组抗原剂量逐级增加并没有引起更强的免疫应答,说明在一定剂量范围内,机体对该抗原免疫应答相当。三个剂量组与对照组相比诱导机体产生免疫应答水平相当或略强,这表明利用植物生产预防大肠杆菌性腹泻可食用的口服疫苗是可行的,这为保护儿童免受细菌性腹泻的侵染奠定了理论基础。

参 考 文 献

- [No author] New frontiers in the development of vaccine against enterotoxigenic (ETEC) and enterohaemorrhagic (EHEC) *E. coli* infections(part1). WklyEpidemiol Rec,1999;74(13):982
- Nataro J P, Kaper J B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. ClinMicrobio Rev,1998;11(1):142—201
- Haq T A, Mason H S, Clements J D, *et al*. Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. Science, 1995;268(5211): 714—716
- Mason H S, Ball J M, Shi J J, *et al*. Exp ression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice. Proc Natl Acad Sci USA,1996;93:5340—5353
- Tacket C O, Mason H S, Losonsky G, *et al*. Immunogenicity in humans of a recombinant bacterial antigen delivered in a transgenic potato. NatMed,1998;(4): 607—609
- Haq T A, Mason H S, Clements J D, *et al*. Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. Science, 1995; 268(5211):714—716
- Chargelegue D, Drake P M, Obregon P, *et al*. Highly immunogenic and protective recombinant vaccine candidate expressed in transgenic plants. Infect Immun,2005;73(9):5915—5922
- Widdowson M A, Bresee J S, Gentsch J R, *et al*. Rotavirus disease and its prevention. Curr Opin Gastroenterol,2005;21(1):26—31
- 郝浩永,张伟峰,陈莉,等. 转基因植物在疫苗研究. 云城学院

学报,2008;26(5):50

10 Yu J,Langridge W H. A plant-based multicomponent vaccine protects mice from enteric diseases. Nat Biotechnol, 2001; 19: 548—552

11 Kapusta J, Modelska A, Pniewski T, *et al* . Oral immunization of human with transgenic lettuce expressing hepatitis B surface antigen. Adv Exp Med Biol,2001;495:299—303

Study on Immune Responses by Oral Immunization with B Subunit of *Escherichia coli* Heat-labile Enterotoxin Expressed in Transgenic Potatoes

WANG Li¹, ZHAO Kai², CHEN Qi¹, JIANG Li-li³, JIA Yu-chen^{2*}

(Research Center of Molecular Biology, Inner Mongolia Medical College¹, Hohhot 010059, P. R. China;
Departments of Pediatric Medicine, Inner Mongolia Hohhot First Hospital², Hohhot 010030, P. R. China;
Lab of Molecular Pathology, Inner Mongolia Medical College³, Hohhot 010059, P. R. China)

[Abstract] To determine the oral immunogenicity of B subunit of *Escherichia coli* Heat-labile enterotoxin expressed in transgenic potatoes, transgenic potatoes were made into dry-frozen powder. Mice were administrated weekly with three doses 0.2 g, 0.4 g and 0.6 g powder containing about(30—50) μg LT—B for three time, comparing with the mice injected with 5 μg of LT—B from recombinant *E. coli*. After feeding the test animals, specific antibody in serum and fecal extract of the tested animals were detected by ELISA. It is resulted that experimental results demonstrated that 45% mices gavaged with transgenic plant had higher or equivalent levels of serum IgG response and fecal extracts IgA than those injected with bacterial LT—B. Systemic immune response and mucosal immune response have increased to approximately the highest values on 56 d and declined on 70 d after the last immunization. It is concluded this findings show that oral immunization with transgenic plant could induce LT—B specific mucosal and systemic immune responses. An edible plant vaccine against ETEC could provide a potential means to protect children from ever acute diarrhea.

[Key words] plant vaccine diarrhoeal disease enterotoxin LT-B immunogenicity