

甲型副伤寒杆菌外膜蛋白 X 基因分布及其重组表达产物免疫保护作用的研究

李明雷 方海俊 范兴丽 张佳 严杰 孙爱华

【摘要】 目的 了解甲型副伤寒沙门菌临床菌株外膜蛋白(*ompX*)基因分布、序列保守性及其产物免疫原性和免疫保护性。方法 采用 PCR 扩增甲型副伤寒沙门菌临床菌株 *ompX* 基因。利用大肠埃希菌表达系统表达 rOmpX, 产物采用 Ni-NTA 亲和层析法提纯。采用免疫扩散法、ELISA 和 Western blot 鉴定 rOmpX 抗原性和免疫反应性。采用小鼠感染模型了解 rOmpX 对甲型副伤寒沙门菌感染的免疫保护作用, 微量肥达试验检测 rOmpX 免疫小鼠血清抗体凝集伤寒和副伤寒沙门菌效价。结果 所有甲型副伤寒沙门菌临床菌株均有 *ompX* 基因, 其核苷酸和氨基酸序列相似性分别高达 99.2% ~ 100.0% 和 98.4% ~ 100.0%。rOmpX 免疫家兔可产生高效价抗体, 利用该抗体与甲型副伤寒患者血清标本进行 ELISA 试验, 95.6% (65/68) 的标本呈阳性。100 μ g 和 200 μ g rOmpX 对感染小鼠的免疫保护率分别为 93.3% (14/15) 和 100.0% (15/15)。rOmpX 免疫小鼠血清对甲型副伤寒和伤寒沙门菌 H 抗原凝集效价为 1:10 ~ 1:40。结论 *ompX* 基因重组表达产物可作为甲型副伤寒沙门菌基因工程疫苗候选抗原。

【关键词】 甲型副伤寒杆菌; 外膜蛋白 X 基因; 免疫原性

Distribution of *Salmonella paratyphi* A outer membrane protein X gene and immune-protective effect related to its recombinant expressed products Li Ming-lei¹, FANG Hai-jun¹, FAN Xing-li², ZHANG Jia^{2,3}, YAN Jie⁴, SUN Ai-hua^{2,3}. 1 Yiwu Central Hospital of Zhejiang Province, Yiwu 322000, China; 2 Zhejiang Medical College; 3 School of Laboratory Medical Science and Life Science, Wenzhou Medical University; 4 School of Medicine, Zhejiang University

Corresponding author: SUN Ai-hua, Email: sunah123@126.com

This work was supported by grants from the Zhejiang Provincial Program for the Cultivation of High-level Innovative Health Talents (No. [2012] 241) and the Science and Technical Research Project of the Health Bureau of Zhejiang Province (No. 2011KYB006).

【Abstract】 **Objective** To determine the distribution and sequence conservation of outer membrane protein X (*ompX*) gene in *Salmonella paratyphi* A isolates as well as the immunogenicity and immuno-protection of *ompX* gene products. **Methods** *OmpX* gene in *Salmonella paratyphi* A isolates was detected by PCR and the amplification products were sequenced after the T-A cloning process. *OmpX* gene product was expressed with *E. coli* expression system and the expressed rOmpX was extracted by Ni-NTA affinity chromatography. SDS-PAGE and Bio-Rad Gel Image Analyzer were applied to examine the expression and yield of rOmpX. Both antigenicity and immune-reactivity of rOmpX were detected by immune-diffusion test, ELISA and Western blot assay. The immune-protective effect of rOmpX against infection of *Salmonella paratyphi* in mice was determined and the agglutinative titers of sera from rOmpX-immunized mice was measured by micro-Widal's test. **Results** All the tested *Salmonella paratyphi* A isolates had *ompX* gene with high nucleotide or amino acid sequence identity (99.2%–100.0% or 98.4%–100.0%). When rOmpX was induced to rabbits to produce high level antibody and combined with antiserum against whole cell of *Salmonella paratyphi* A, the results displayed a positive Western hybridization signal. Results from ELISA demonstrated that 95.6% (65/68) of the serum samples from paratyphoid-A patients were positive on rOmpX antibody. Mice that were immunized with 100 μ g or 200 μ g rOmpX displayed an immune-protective rate of

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2013.012.015

基金项目:浙江省卫生高层次创新人才培养工程项目([2012] 241); 医药卫生科学研究基金项目(2011KYB006)

作者单位:322000 浙江省义乌市中心医院(李明雷、方海俊); 浙江医学高等专科学校(范兴丽、张佳、孙爱华); 温州医学院检验医学院和生命科学学院(张佳、孙爱华); 浙江大学医学院病原生物学系(严杰)

通信作者:孙爱华, Email: sunah123@126.com

93.3% (14/15) or 100.0% (15/15). Sera from those rOmpX-immunized mice provided 1 : 10–1 : 40 agglutination titers in both H antigens of *Salmonella paratyphi* A and *Salmonella typhi*. **Conclusion** The recombinant expression product of *ompX* gene could be used as a candidate antigen for developing genetic engineering vaccines against *Salmonella paratyphi* A infection.

【Key words】 *Salmonella paratyphi* A; Outer membrane protein X gene; Immunogenicity

甲型副伤寒沙门菌至少有 20 个外膜蛋白 (Omp) 编码基因^[1]。本研究重组并表达 rOmpX, 采用 Western blot 和小鼠感染模型分别检测 rOmpX 免疫原性和免疫保护性, 同时还检测甲型副伤寒杆菌临床菌株 *ompX* 基因携带率及其序列保守性, 为 rOmpX 作为甲型副伤寒沙门菌基因工程疫苗候选抗原提供依据。

材料与方法

1. 菌株与血清标本来源: 甲型副伤寒沙门菌参考标准株 50001 及其抗血清、35 株分离自甲型副伤寒患者并经系统细菌学鉴定的临床菌株及 68 份恢复期甲型副伤寒患者血清及 6 份正常人血清(全部由浙江大学医学院病原生物学系提供)。

2. *ompX* 基因扩增及测序: 采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒 (GeneRay) 提取 50001 及 35 株临床菌株基因组 DNA, 紫外分光光度法测定其浓度^[2]。根据 *ompX* 基因 (GenBank 号: CP000026) 核酸内切酶位点及 pET42a 质粒多克隆位点序列设计引物, 上游序列: 5' -CG GGA TCC (BamH I) ATG AAG AAA ATT GCA TGT CTT TCA -3'; 下游序列: 5' -GCG AAG CTT (Hind III) GAA GCG GTA ACC TAC GCC -3', 由上海 Invitrogen 公司合成。PCR 总体积 100 μ l, 内含 dNTP 各 2.5 mol/L、上下游引物各 250 nmol/L、Ex-Taq 酶 2.5 U、DNA 模板 100 ng 和 1 \times PCR 缓冲液。PCR 程序: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 52 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 7 min。然后采用 T-A 克隆试剂盒 (TaKaRa) 将 *ompX* 基因扩增片段克隆入 pMD-19T 形成重组质粒 pMD-19T^{ompX}, 并由上海 Invitrogen 公司进行测序。

3. *ompX* 基因原核表达及产物提纯: 将含有甲型副伤寒沙门菌 50001 株 *ompX* 基因的 pMD-19T^{ompX} 与原核表达载体 pET42a (Novagen) 用 BamH I 和 Hind III 双酶切, 回收的 *ompX* 基因片段与线性化 pET42a 用 T4 DNA 连接酶 (TaKaRa) 连接形成 pET42a^{ompX}, 转入 *E. coli* BL21DE3 (Novagen)。获得的工程菌株 *E. coli* BL21DE3^{pET42a-ompX} 在含卡那霉素 (Sigma) 的 LB 培养液 (Oxoid) 中扩增, 用质粒提取试剂盒 (Axygen) 提取 pET42a^{ompX} 后再次测序。 *E. coli*

BL21DE3^{pET42a-ompX} 接种于含 5 mmol/L IPTG (Sigma) 的 LB 培养液中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 4 h 诱导目的重组蛋白 rOmpX 表达, 产物采用 Ni-NTA 亲和层析柱 (BioColor) 提纯。采用 SDS-PAGE 及 Bio-Rad 凝胶图像分析系统检查表达及提纯效果, 紫外分光光度法测定蛋白浓度^[2]。

4. 免疫原性检测: 将 1 mg rOmpX 与弗氏完全佐剂混合后皮内注射免疫家兔 4 次, 每次间隔 1 周, 末次免疫 2 周后采集心血并分离血清, 采用免疫双扩散法和 ELISA 检测抗血清效价。分别以 1 : 1000 稀释的兔抗 rOmpX 血清及 50001 株全菌抗血清、1 : 500 稀释的 5 份甲型副伤寒患者血清为一抗, 1 : 3000 稀释的 HRP 标记羊抗兔 IgG (Jackson ImmunoResearch) 为二抗, 采用 Western blot 检测 rOmpX 的抗原性和免疫反应性^[2]。采用 1 μ g rOmpX 包被 96 孔酶标板, 4 $^{\circ}$ C 过夜, 用 0.01 mol/L PBS (pH 7.4) 洗板 3 次, 以 1 : 1000 稀释的 68 份甲型副伤寒患者血清为一抗、1 : 5000 稀释的 HRP 标记羊抗人 IgG (Jackson ImmunoResearch) 为二抗, 采用 ELISA 检测各血清标本 A_{450} 值, 判定方法参见文献^[3]。

5. 小鼠保护试验: 将含不同浓度的甲型副伤寒沙门菌 50001 株培养物 0.5 ml 腹腔注射体重 (20 \pm 2) g 健康雄性 BALB/C 小鼠, 观察 7 d, 以获得 100% 最低致死量 (MLD)。将 100 或 200 μ g rOmpX 与 0.7 mg 氢氧化铝 (Sigma) 混匀, 间隔 1 周后颈背部皮下注射免疫小鼠 2 次^[4]。末次免疫 2 周后, 用 2 倍 MLD 甲型副伤寒沙门菌 50001 株注射小鼠腹腔进行攻击, 观察 7 d 内动物死亡情况, 以 200 μ g BSA (Sigma) 与 0.7 mg 氢氧化铝混合物免疫小鼠为对照。

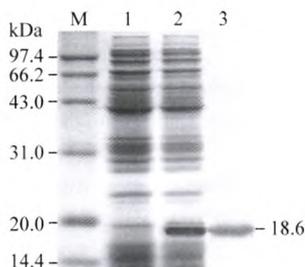
6. 微量肥达试验: 参见小鼠保护试验免疫小鼠 2 周后, 采用眼球摘除法采集抗凝血, 3000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min 后取上清, 采用微量肥达试验检测血清凝集效价^[4]。

结 果

1. PCR 及测序: 从参考标准株 50001 及 35 株甲型副伤寒沙门菌临床菌株基因组 DNA 中均扩增出

预期大小的 *ompX* 片段(513 bp)。测序及 Blast 软件分析结果显示, 36 株甲型副伤寒沙门菌株 *ompX* 基因与 GenBank 中公布的 *ompX* 基因(GenBank 号: CP000026)核苷酸和氨基酸序列相似性分别为 99.2% ~ 100.0% 和 98.4% ~ 100.0%。

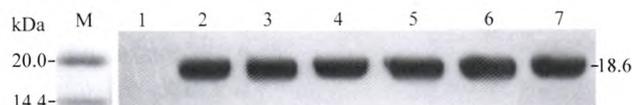
2. rOmpX 表达和纯化: Western blot 结果显示, 重组的 BL21DE3^{pET42a-ompX} 能有效表达 rOmpX, Ni-NTA 亲和层析法提纯的 rOmpX 经 SDS-PAGE 后显示单一蛋白条带(图 1)。



注: M: 蛋白质 Marker; 1: 野生型 pET42a 对照; 2: 重组表达 rOmpX; 3: Ni-NTA 亲和层析法提纯 rOmpX

图 1 rOmpX 表达和提纯

3. rOmpX 抗原性和免疫反应性: rOmpX 免疫家兔后免疫双扩散和 ELISA 效价分别为 1:4 和 1:8000。Western blot 结果显示, 提纯的 rOmpA 与其兔抗血清、50001 株全菌兔抗血清、5 份甲型副伤寒患者血清产生阳性杂交信号(图 2)。甲型副伤寒患者血清标本 ELISA 经检测, 结果显示, 95.6% (65/68) 阳性 (cut-off 值 = 0.27)。



注: M: 蛋白质 Marker; 1: 空白对照; 2: rOmpX 与兔抗 rOmpX 血清阳性杂交条带; 3~7: rOmpX 与 5 份甲型副伤寒患者血清阳性杂交条带

图 2 rOmpX 与不同甲型副伤寒患者血清标本 Western blot 杂交结果

4. 小鼠保护试验: 50001 株对小鼠的 MLD 为 5×10^7 CFU。100 μ g 和 200 μ g rOmpX 对 2 倍 MLD 50001 株感染小鼠的免疫保护率分别为 93.3% (14/15) 和 100.0% (15/15) (表 1)。

表 1 rOmpX 对甲型副伤寒沙门菌感染小鼠的免疫保护效果

免疫原	免疫剂量 (μ g)	动物只数	存活只数/死亡只数	免疫保护率 (%)
rOmpX	100	15	14/1	93.3
	200	15	15/0	100.0
BSA	200	8	0/8	0

5. 微量肥达试验: rOmpX 免疫小鼠血清对伤寒沙门菌 O 抗原的凝集效价为 0 ~ 1:10, 对伤寒和甲型副伤寒沙门菌 H 抗原凝集效价为 1:10 ~ 1:40 (表 2)。

表 2 rOmpX 免疫小鼠微量血清肥达试验效价

血清标本	免疫剂量 (μ g)	动物只数	凝集效价(1:)				
			TO	TH	PA	PB	PC
rOmpX 免疫小鼠	100	8	0~5	10~20	10~20	5~10	0~5
	200	8	5~10	20~40	20~40	5~10	5~10
BSA 免疫小鼠	200	8	0	0	0	0	0

注: TO、TH、PA、PB 和 PC 分别为伤寒沙门菌 O 和 H 抗原以及甲、乙和丙型副伤寒沙门菌 H 抗原

讨 论

接种疫苗是预防和控制传染病最为有效的措施。早年使用的伤寒/副伤寒三联全菌灭活疫苗, 因其免疫力维持时间较短、脂多糖(LPS)引发的毒副作用严重且发生率较高, 已停止使用^[5]。目前普遍采用伤寒疫苗荚膜多糖(聚-N-乙酰-D-半乳糖胺糖醛酸)为抗原的 Vi 疫苗进行预防接种。由于甲型副伤寒沙门菌不产生多糖荚膜, Vi 疫苗不能预防甲型副伤寒^[4,6,7]。而且甲型副伤寒沙门菌对临床常用抗生素耐药率较高^[8-10]。因此, 有必要开展针对甲型副伤寒菌株开发疫苗, 以重组蛋白为抗原的基因工程疫苗是一个可行的途径, 筛选并确定保护性外膜蛋白将为甲型副伤寒基因工程疫苗开发奠定基础。

基因工程疫苗候选抗原的基本条件之一是该抗原在同种细菌不同菌株中广泛分布且序列保守, 此外还要求该抗原具有较强的免疫原性(抗原性和免疫反应性)。PCR 和测序结果显示, 35 株甲型副伤寒沙门菌临床菌株中均检出 *ompX* 基因, 其核苷酸和氨基酸相似性分别高达 99.2% ~ 100.0% 和 98.4% ~ 100.0%, 提示 *ompX* 基因在不同甲型副伤寒沙门菌株中分布广泛且序列保守。本研究中, 免疫双扩散试验结果显示, rOmpX 免疫家兔后能产生高效价的特异性抗体, Western blot 结果显示, rOmpX 不仅能与其兔抗血清结合, 也能与甲型副伤寒沙门菌全菌抗血清发生免疫反应。ELISA 结果显示, 95.6% (65/68) 甲型副伤寒患者血清标本中存在 rOmpX 抗体, 提示在甲型副伤寒沙门菌感染过程中, OmpX 可作为一个有效抗原, 诱导宿主产生特异性抗体。

动物保护试验是确定任何抗原分子能否作为基因工程疫苗候选抗原的关键步骤。小鼠免疫保护试验结果显示, 100 μ g 和 200 μ g rOmpX 对感染小鼠的

免疫保护率分别高达 93.3% 和 100.0%，明显高于重组外膜蛋白 rOmpA 的 41.7% 和 58.3%、重组外膜蛋白 rNmpC 的 41.7% 和 66.7%^[11,12]。在肥达试验中，伤寒、副伤寒沙门菌 H 抗原是未经加热处理的活菌抗原，加热后蛋白抗原被破坏，LPS 耐热仍保持活性，称之为 O 抗原，由于伤寒、副伤寒沙门菌 LPS 完全相同，故肥达试验中仅使用伤寒沙门菌 O 抗原^[11,12]。微量肥达试验结果显示，rOmpX 免疫小鼠血清对伤寒沙门菌和甲型副伤寒沙门菌 H 抗原凝集效价均高达 1:10 ~ 1:40。检索后发现，伤寒沙门菌基因组中也有 *ompX* 基因 (GenBank 号: NC_003198)，且其氨基酸序列与甲型副伤寒沙门菌 *ompX* 基因相似性极高，这可能是甲型副伤寒沙门菌 rOmpX 免疫小鼠血清对伤寒沙门菌 H 抗原具有较高凝集效价的原因。综上所述，rOmpX 具有良好的免疫原性和免疫保护性，可作为甲型副伤寒基因工程疫苗候选抗原。

参 考 文 献

- [1] McClelland M, Sanderson KE, Clifton SW, et al. Comparison of genome degradation in Paratyphi A and Tphi, human-restricted serovars of *Salmonella enterica* that cause typhoid. *Nat Genet*, 2004, 36(12): 1268-1274.
- [2] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [3] Zhang L, Zhang CL, Ojcius DM, et al. Identification of Mce as a critical outer membrane protein of pathogenic *Leptospira* species responsible for RGD motif-dependent adherence and host-cell invasion. *Mol Microbiol*, 2012, 83(5): 1006-1023.
- [4] Ruan P, Xia XP, Sun D, et al. Recombinant SpaO and H1a as immunogens for protection of mice from lethal infection with *Salmonella paratyphi* A: implications for rational design of typhoid fever vaccines. *Vaccine*, 2008, 26(51): 6639-6644.
- [5] Parry CM, Hien TT, Dougan G, et al. Typhoid fever. *N Engl J Med*, 2002, 347(22): 1770-1782.
- [6] Brooks GF, Butel JS, Morse SA. *Medical Microbiology*. 22 ed. New York: McGraw-Hill, 2001: 217-228.
- [7] Yan J. *Medical Microbiology*. 2nd ed. Beijing: Higher Education Press, 2012: 109-112. (in Chinese)
严杰. 医学微生物学. 2 版, 北京: 高等教育出版社, 2012: 109-112.
- [8] Yan MY, Liang WL, Li W, et al. Epidemics of typhoid and paratyphoid fever from 1995 through 2004 in China. *Dis Surveil*, 2005, 20(8): 401-403. (in Chinese)
闫梅英, 梁未丽, 李伟, 等. 1995-2004 年全国伤寒、副伤寒的流行分析. *疾病监测*, 2005, 20(8): 401-403.
- [9] Gupta SK, Medalla F, Omondi MW, et al. Laboratory-based surveillance of paratyphoid fever in the United States: travel and antimicrobial resistance. *Clin Infect Dis*, 2008, 46(11): 1656-1663.
- [10] Raza S, Tamrakar R, Bhatt CP, et al. Antimicrobial susceptibility patterns of *Salmonella typhi* and *Salmonella paratyphi* A in a tertiary care hospital. *J Nepal Health Res Council*, 2012, 10(22): 214-217.
- [11] Jiang JQ, Ruan P, Yan J, et al. Distribution of *Salmonella paratyphi* A *ompA* gene and immunological identification of the recombinant expressed product. *Chin J Microbiol Immunol*, 2010, 30(1): 1-5. (in Chinese)
蒋锦琴, 阮萍, 严杰, 等. 甲型副伤寒杆菌 *ompA* 基因分布及重组表达产物的免疫学鉴定. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2010, 30(1): 1-5.
- [12] Wu Y, Wang YF, Yan J, et al. Recombinant expressed of *Salmonella paratyphi* A *nmpC* gene and immunoprotective effect of its recombinant expressed product. *Chin J Microbiol Immunol*, 2010, 30(12): 1118-1123. (in Chinese)
吴颖, 王艳芳, 严杰, 等. 甲型副伤寒杆菌 *nmpC* 基因原核表达及表达产物免疫保护作用. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2010, 30(12): 1118-1123.

(收稿日期: 2013-07-06)

(本文编辑: 万玉立)

中华流行病学杂志第六届编辑委员会通讯编委名单

- | | | |
|---------------------|-------------------|------------------------|
| 陈 曦(湖南省疾病预防控制中心) | 窦丰满(成都市疾病预防控制中心) | 高 婷(北京市疾病预防控制中心) |
| 姜宝法(山东大学公共卫生学院) | 李 杰(北京大学医学部) | 李十月(武汉大学公共卫生学院) |
| 李秀央(浙江大学医学院公共卫生学院) | 廖苏苏(中国医学科学院基础医学院) | 林 玫(广西壮族自治区疾病预防控制中心) |
| 林 鹏(广东省疾病预防控制中心) | 刘爱忠(中南大学公共卫生学院) | 刘 刚(四川省疾病预防控制中心) |
| 刘 静(北京安贞医院) | 刘 莉(四川省疾病预防控制中心) | 刘 玮(军事医学科学院微生物流行病学研究所) |
| 鲁凤民(北京大学医学部) | 欧剑鸣(福建省疾病预防控制中心) | 彭晓旻(北京市疾病预防控制中心) |
| 邱洪斌(佳木斯大学) | 赛晓勇(解放军总医院) | 苏 虹(安徽医科大学公共卫生学院) |
| 汤 哲(首都医科大学附属宣武医院) | 田庆宝(河北医科大学公共卫生学院) | 王 蓓(东南大学公共卫生学院) |
| 王素萍(山西医科大学公共卫生学院) | 王志萍(山东大学公共卫生学院) | 谢 娟(天津医科大学公共卫生学院) |
| 徐爱强(山东省疾病预防控制中心) | 徐慧芳(广州市疾病预防控制中心) | 严卫丽(新疆医科大学公共卫生学院) |
| 阎丽静(中国乔治中心) | 杨春霞(四川大学华西公共卫生学院) | 余运贤(浙江大学医学院公共卫生学院) |
| 曾哲淳(北京安贞医院) | 张 波(宁夏回族自治区卫生厅) | 张宏伟(第二军医大学) |
| 张茂俊(中国疾病预防控制中心传染病所) | 张卫东(郑州大学公共卫生学院) | 赵亚双(哈尔滨医科大学公共卫生学院) |
| 朱 谦(河南省疾病预防控制中心) | 祖荣强(江苏省疾病预防控制中心) | |