

科研、生产和教学服务办出它的特色,使它更有效地为振兴经济、服务四化发挥巨大的作用,做出更大的贡献。

1986.4.5.



用基因工程技术研究预防细菌性 腹泻疫苗的进展

黄 翠 芬

(军事医学科学院基础医学研究所)

引起腹泻的病原菌种类很多,包括细菌、病毒、原虫等等。引起腹泻的类型亦各不相同,有些细菌能定居于小肠粘膜、繁殖、产生毒素,使肠道电解质失去平衡而产生水样腹泻,如毒素性大肠杆菌和霍乱弧菌。另一些除粘附于胞壁粘膜外,尚能侵袭表皮细胞,由于细胞毒素和外毒素,侵袭因子等作用,使细胞坏死,发生急性炎症、细菌性肠炎,有脓血便,如痢疾和侵袭性大肠菌等。伤寒菌类的细菌,侵袭上皮细胞,穿透至粘膜固有层,亦引起严重的腹泻。此外,还有些腹泻病原菌,致病因子还不清楚。长期以来,腹泻是人畜共患的常见病和多发病,治疗方面已有一定成效,但更积极的办法,还是用疫苗预防为好。

20世纪医学的最大成就是使用有效的疫苗控制传染病,免疫接种成为现代预防医学强有力的工具。从疫苗的发展来看,17世纪 Jenner 用牛痘病毒预防天花是自动免疫的开始。约一个世纪后,巴斯德用弱毒病毒苗预防狂犬病是第二次突破。随后用鸡胚等组织培养技术制备较纯的病毒又是一个进展,随后许多病毒疫苗均用组织培养技术生产。

由于疫苗的发展,使许多传染病得以控制和消灭,但新的疾病或致病菌又不断发现,所以仍需继续研究。目前分子生物学的进展,合成技术的进展,疫苗的研究正面临一个新的突破。DNA重组技术、单克隆抗体技术、肽固相合成技术及DNA序列分析技术等等的迅速发展,促进了蛋白质序列分析,根据氨基酸序列,预测蛋白质的构象,可以鉴别与保护性抗体有关的特异结构,使合成技术更趋成熟可以有目的的合成特定区段、合成短肽、合成成长的蛋白质片段亚基,甚至全蛋白。这种新型疫苗的的优点应是:

(1) 疫苗不含致病性成份;(2) 减少其他成分的副反应;(3) 纯化蛋白或多肽易于贮存,稳定性更好;(4) 较经典制备疫苗技术可产生更大量的抗原。有理由相信,这数十年内,新型的疫苗将大大发展,可加强人类对疾病斗争的本领。

亚基肽苗在病毒方面研究较多,因为病毒结构较简单,可分离病毒外壳蛋白的抗原成分,或用DNA重组技术或合成技术制成疫苗。如流感病毒HA基因、狂犬病毒GP基

因, O型口蹄疫病毒VPI基因等, 可用DNA重组技术大量制备各有关抗原。但由于分子量较小等原因, 免疫原性或保护性不佳, 要加强佐剂的研究, 才能满足应用的要求。

重组技术对细菌致病性研究特别有用, 可逐一研究感染的过程, 在肠道菌方面是相当成功的, 但对有些微生物则不一定容易。理论上, 如果两个同源的细菌间只有致病性单个决定子的差异, 就可分析是否缺失该单一基因产物就影响致病作用, 如再引入该DNA序列后, 致病力是否就能恢复。一般方法是将致病菌染色体DNA或质粒DNA制成基因文库, 分析鉴定, 次级克隆, 寻找产生最小而尚能编码所需表型的DNA片段, 将该DNA片段酶切、插入载体, 克隆、表达、分离基因产物, 制成疫苗。并用体外翻译系统(如小细胞技术)检查其合成的蛋白质成分及抗原性, 最后检测基因序列, 推算基因产物的一般结构。要完成上述一系列研究的前提是基因应能忠实的转录和转译以及在受体菌中能表达。

DNA重组技术在研究致病机理方面取得成效后, 可将其保护性抗原成分进行DNA重组, 构成疫苗用于预算。这就是说, 只要遗传背景清楚, 制备“工程苗”就有了依据。由于腹泻主要是消化道感染, 因此, 制备口服活疫苗更为合理。其特点是疫苗进入特定部位后尚可繁殖, 与肠道直接接触, 可刺激机体产生IgA, 有局部免疫作用, 由于活疫苗, 免疫原性强, 可产生体液免疫, 细胞免疫, 生产容易, 成本低廉, 接种一次即可, 口服途径易被接受, 免疫力持久, 副作用少或无副作用等等。DNA重组活疫苗可能没有返祖的危险。

DNA重组技术用于疫苗研究尚有一个特点是适于制备多价疫苗, 简化免疫程序。例如目前研究以牛痘病毒为载体制备多价疫苗, 估计有如下优点: (1) 不只产生体液免疫, 尚可产生细胞免疫; (2) 成本低; (3) 可插入约25,000bp外源DNA (15~20个基因); (4) 牛痘苗免疫已有长期使用经验。用这种载体是一种组构多价疫苗的方式, 另外, 通过体外重组和体内重组技术将3—5种特异免疫原基因组合在一起, 构成多价疫苗株也不是困难的问题。

目前腹泻病原菌方面用DNA重组技术研制疫苗的有毒素源性大肠菌、霍乱弧菌、痢疾菌、伤寒菌等, 本文着重介绍这方面的进展。

一、毒素性大肠杆菌“工程苗”的研究

1945年Bray已指出大肠菌是腹泻病原菌之一, 分为三种。(1) 致病性大肠菌(EP-EC), 高度吸附于肠道, 在动物模型产生组织病变, 产生水样腹泻, 呕吐, 发烧(幼儿)。常见血清簇为O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128及O142。(2) 侵袭性大肠菌(EIEC), 能侵袭表皮细胞, 使豚鼠眼产生角膜炎, 病徵与痢疾类同, 发高烧, 严重腹痛, 里急后重, 腹泻, 随后稀便, 含脓血。常见血清簇为O28, O112, O124, O136, O143, O147, 及O152。(3) 毒素性大肠菌(EIEC), 是人畜共患病原菌, 发展中国家婴幼儿腹泻的主要病因, 从发达国家到这些国家由此菌引起的腹泻, 称旅行者腹泻。本症特徵是水样腹泻, 低烧腹痛, 恶心, 不适, 严重脱水。常见血清簇为O6, O8, O15, O20, O25, O63, O78, O80, O85, O15, O128, O148和O159。

EIEC大肠菌能产生菌毛, 对肠粘膜有粘附作用, 并定居其中。菌毛有种属特异性。

例如K88对仔猪, K99对牛、羊、猪, 987P对猪, CFAI/Ⅱ及E8778对人肠道有特异性吸附。K88、K99、CFAI/Ⅱ基因均为可转移质粒编码。这些抗原与肠粘膜上受体结合后则能免疫, 产生相应抗体, 使ETEC不能粘附于肠粘膜。以K88、K99或987P菌毛抗原免疫孕畜, 通过哺乳, 幼畜得以免疫, 证明保护作用与抗菌毛抗体有关。

ETEC对人的定居因子称CFA, 目前, 已知有两种, CFAI/Ⅱ, 还陆续发现新的型别。CFA与O血清簇也有密切关系, 如CFA/I常见的为015, 025, 063, 078和0128; CFAⅡ为06, 08, 080, 085; E8775为025, 0115, 0167。不致病的ETEC不含CFA。由于编码CFA的基因分散于质粒的不同部位, 克隆有些困难, 直到1985年才有成功的报道。

ETEC的菌毛粘附宿主肠道后, 定居繁殖, 产生肠毒素, 是腹泻的直接原因。肠毒素有两种, 一种称热敏肠毒素(LT), 65°C30分钟失活; 一种称耐热肠毒素(ST), 加热100°C30分钟仍基本保存毒性。

LT由A、B两种亚基组成, LT-A的分子量为28,000, LT-B的分子量为11,500, 整个毒素的分子组成是A₁B₅。B亚基的功能是与肠道细胞表面特异受体结合, 有免疫原性。B亚基与受体结合后, 分子的构象改构、重构而使A亚基通过脂质层进入内膜, 激活腺苷酸环化酶, 产生大量cAMP而发挥毒性作用。故LT-A是毒性部分。LT-A亚基经胰蛋白酶及巯基乙醇处理后可分成分子量为21,000及7,000的A₁和A₂两个片段, 这些特点与CT相似。CT和LT在免疫反应上有一定的交叉作用。1982年, LT-A基因和LT-B基因均已分别克隆成功。

ST有两类: 一是STI (STa), 可溶于甲醇, 对乳猪及乳鼠有活性, 但对仔猪无毒性, 另一是STⅡ (STb), 不溶于甲醇, 对乳鼠无活性, 但对仔猪和兔结扎肠段呈毒性反应。ST有种属特异性, 不同分离方法, 不同菌株来源所得的ST分子量不同, 在1,000~8,000之间, 由于分子简单, 结构清楚, 已能人工合成。基因克隆亦已成功。由于分子量小, 须偶联至蛋白质才能有较好的抗原性。在种属特异性中, 牛源ETEC多含ST, 人和猪源ETEC多含LT, ST或LT/ST。

决定型特异的抗原决定簇主要是O抗原, 位于细菌胞壁表面, 与大肠菌的致病力亦有关系。因此, 考虑组构预防大肠菌腹泻的疫苗, 应包括菌毛抗原, 肠毒素B亚基或ST及相应的O抗原: 例如对人大肠菌腹泻预防疫苗来说, 应含CFAI/Ⅱ、LTB或ST及O抗原; 对牛大肠菌腹泻预防疫苗来说, 应含K8、LTB、及O抗原; 对仔猪的预防疫苗, 应含K88、LTB、及O抗原。国外如荷兰、美、英、法等国均先后用DNA重组技术构建预防幼畜腹泻疫苗, 美国于1983年投放市场, 由于商业秘密, 未有详细报道。我国亦有多个单位1983年后陆续构建成功, 现以陈添弥等关于“预防仔猪黄痢、白痢”工程菌活疫苗为例说明构建过程及效果。

(一) ETEC K88抗原基因克隆。

ETEC K88抗原有三种血清型, 即K88ab、K88ac、K88ad, 在我国流行以K88ac为主。K88抗原一般为一个50Md的质粒DNA所编码, 三种血清型的质粒DNA至少有97%的核苷酸同源, 三者的酶切图谱也十分近似, 用HindⅢ酶解, 可切成13-14片段, 其中第二片段(约7-8 md)是编码K88抗原的, 克隆过程见图1: 图中的原始菌株为我国病猪的致病菌, 因此酶切的第二片段约6.5Md, 较文献报道的略小。

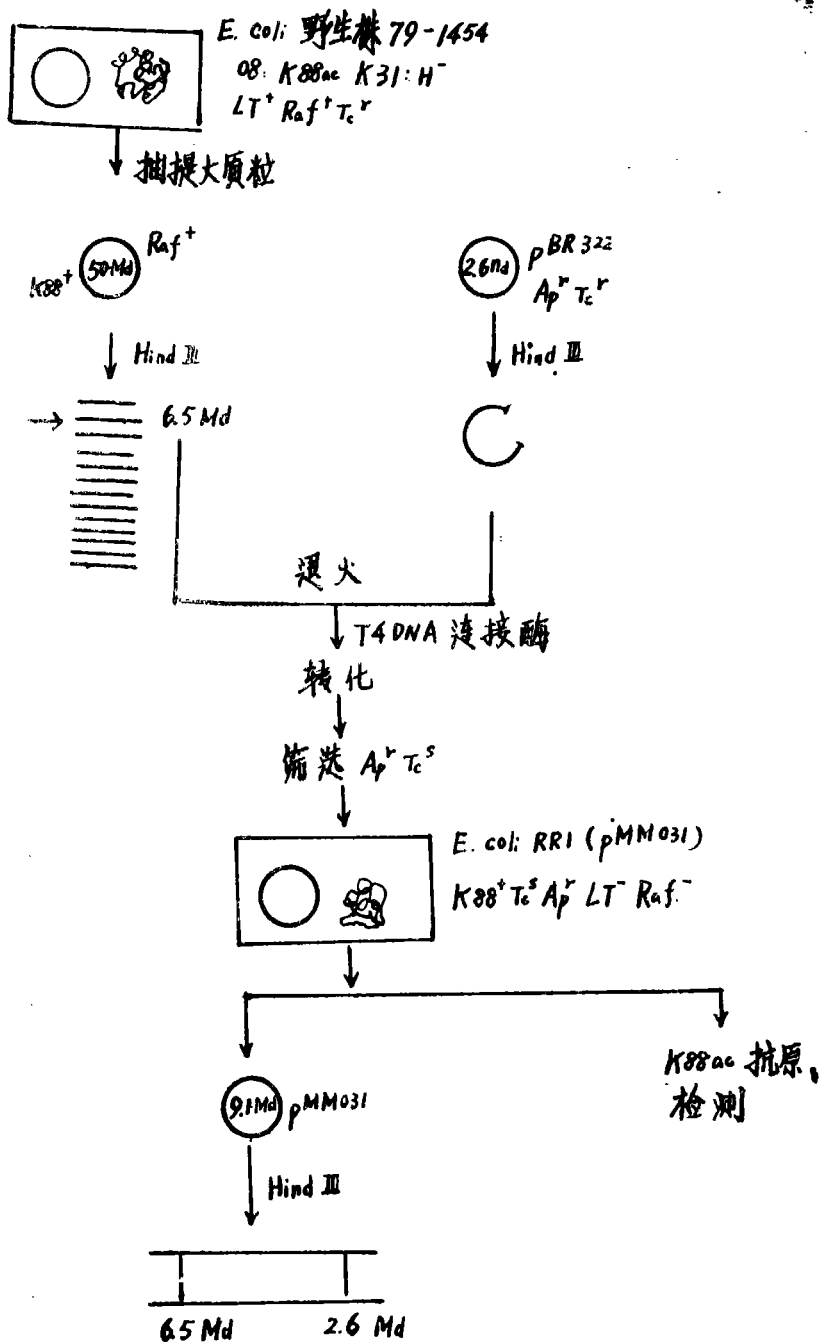


图1 ETEC K88ac 抗原基因克隆

(二) $LTA^{-}B^{+}$ 亚基因克隆

以含LT的pWM2988为材料, 用PvuI酶切, 与PBR322载体连接, 得四环素抗性质粒pPMC2。pPMC2只有一个XbaI位点在eltA基因上, 可用XbaI酶切, 用DNA多聚酶Klenow片段将4个核苷酸补入粘末端, 再用T4连接酶连接平端, 重新组成为环状质粒pPMC21。由于比pPMC2多了4对核苷酸, 密码阅读框发生移位, 使A亚基失去毒性, 而仍完整保存B亚基结构。为了使 $LTA^{-}B^{+}$ 质粒带氯霉素抗性以便于操作, 将pPMC21的PvuI Xho¹片段与pGA22的PvuI-XhoI片段定向连接得四环素与氯霉素双抗性的质粒pPMC4。然后用BamHI切pPMC4DNA, 与F因子派生质粒pED100的tra基因连接, 进行接合反应, 获高频率转移的重组质粒pPMC5, 此质粒含 $LTA^{-}B^{+}$ 可作为疫苗组构之用, 克隆过程见图2及图3。

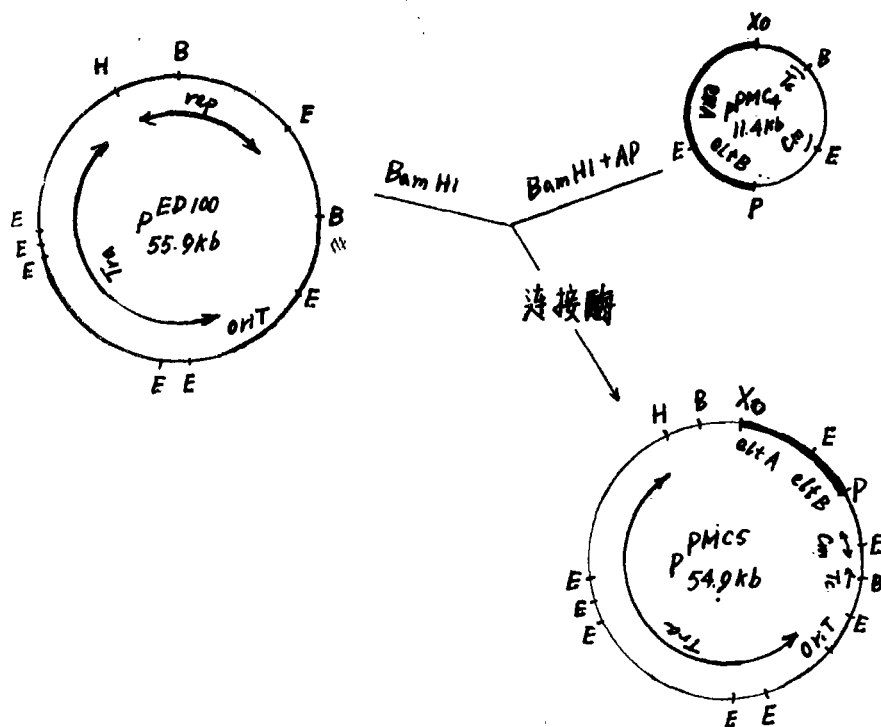


图3 $pPMC5$ 质粒的构建

利用上述K88ac抗原基因与 $LTA^{-}B^{+}$ 抗原的基因重组质粒构建成疫苗株, 使含O149, K88ac、 $LTA^{-}B^{+}$ 三种抗原, 所获产量比天然菌株高, 无毒, 适合免疫之用。

将构成的疫苗在不同地区, 不同猪场, 不同季节, 不同猪种的755头母猪及所产6128头仔猪作攻毒与自然免疫观察试验, 证明该工程苗安全、性能稳定, 测定血、乳中抗体, 证明机体对多种抗原都能产生应答反应。免疫后观察仔猪一个月, 其腹泻的发病率较对照降低约40%, 死亡率降低约15%, 用统计学显著性测验 $P < 0.001$, 差异非常显著。此种“工程苗”不但能预防早发的黄痢, 经加强免疫后, 能很有效地保护迟发的白

痢,这是以前各种制剂不具有的特性。

二、霍乱菌CTA⁻B⁺的研究

霍乱菌是引起霍乱流行的病原菌,粘附并定居于小肠,产生CT是腹泻的直接原因。CT也含A和B两种亚基,与LT相同。

早期研究CT是采用诱变剂处理后,分离影响毒素产生的突变株来进行的,这种方法能改变毒素产生的水平,但未能改变毒素分子的本质。

CT基因可以通过接合来转移,这个接合系统称其性因子为P,类似大肠菌的F因子,分子大小约为80Md,授与宿主细胞的致育性。P质粒可以高频率从供体株P⁺转移至受体株P⁻,但由于P质粒的碱基组成与霍乱菌染色体有很大区别,P不能牢固地整合至染色体上,形成Hfr供体,于是染色体基因从P⁺转移至P⁻细胞并形成重组体是低效的,因此,这种接合系统重组频率较低。

Tohnson等建立了一个促进重组的转座子系统,能将氨苄青霉素转座子Tn1引入至质粒和细菌染色体上,提供“可携带的同源区”构成Tfr供体,提高了接合效率,确定了CT结构基因位置在染色体上。后来,Johnson发现霍乱菌噬菌体VcA1能转座和插入至霍乱菌染色体很多不同的位点上,并报导了VcA1能诱导营养缺陷型突变。Mekalanos应用两个能诱导弧菌突变的噬菌体VcA1和VcA2ts1感染霍乱菌RV79ctx操纵区时,可使毒素基因的某些部分缺失,经过筛选,获得了CTA⁻B⁻,CTA⁻B⁺的突变株,但未见动物试验的报导。

近来Kaper和Mekalanos分别发表了他们结合细胞内重组和DNA体外重组的技术,获得了霍乱菌无毒株。方法是先在体外把部分缺失毒素基因与质粒重组,然后将其引入霍乱菌野生株,通过体内交换,产生CTA⁻B⁻或CTA⁻B⁺的无毒突变株。

马清钧等应用CT与LT核苷酸序列有76—78%同源的特点,用LT基因探针在霍乱菌569BDNA定位,确定了CT基因在染色体上EcoRI和PstI酶解的5.1和5.4kb片段。分离EcoRI和PstI酶解的4.5—6.0kb片段,与经EcoRI和PstI酶解的质粒pBR322,体外连接,克隆于大肠杆菌,经原位菌落杂交及原位放射免疫分析鉴定,证明获得了CT基因克隆。通过生物活性和抗原性测定及免疫原性试验,表明CT基因在大肠菌中得到表达。CT基因克隆见图4。

将含CT基因的重组质粒pMM-CT用XbaI酶解,切去CT基因的自身启动子和编码CTA的起始信号,可分离xbaI/EcoRI双酶解的含CT基因的DNA片段,进行克隆。载体为pUC19,含氨苄青霉素抗性基因与乳糖Lac启动子及β-半乳糖苷酶基因,在Lac启动子及β-半乳糖苷酶基因间有XbaI、EcoRI等多克隆位点。CTA⁻B⁺基因次克隆见图5。在组构的重组质粒pMM-CTB1中,由于保留了编码CTB亚基基因的核糖体结合位点和起始信号ATG,因此,在lac启动子作用下,能合成CT的B亚基多肽,能分泌至胞外,具CT抗原性,产量较高,CTA⁻B⁺如何与菌体抗原组合以获得良好的预防效果正在研究中。

三、预防伤寒症疫苗的研究

沙门氏伤寒杆菌侵袭上皮细胞,穿透至肠系膜固有层,引起的腹泻亦很严重,其致病作用远较霍乱及大肠菌肠胃炎为复杂,侵袭后的炎症反应是液体分泌的原因。

Germanjer等报道了伤寒沙门氏菌半乳糖差向异构酶突变株,(galE)Ty21a菌苗

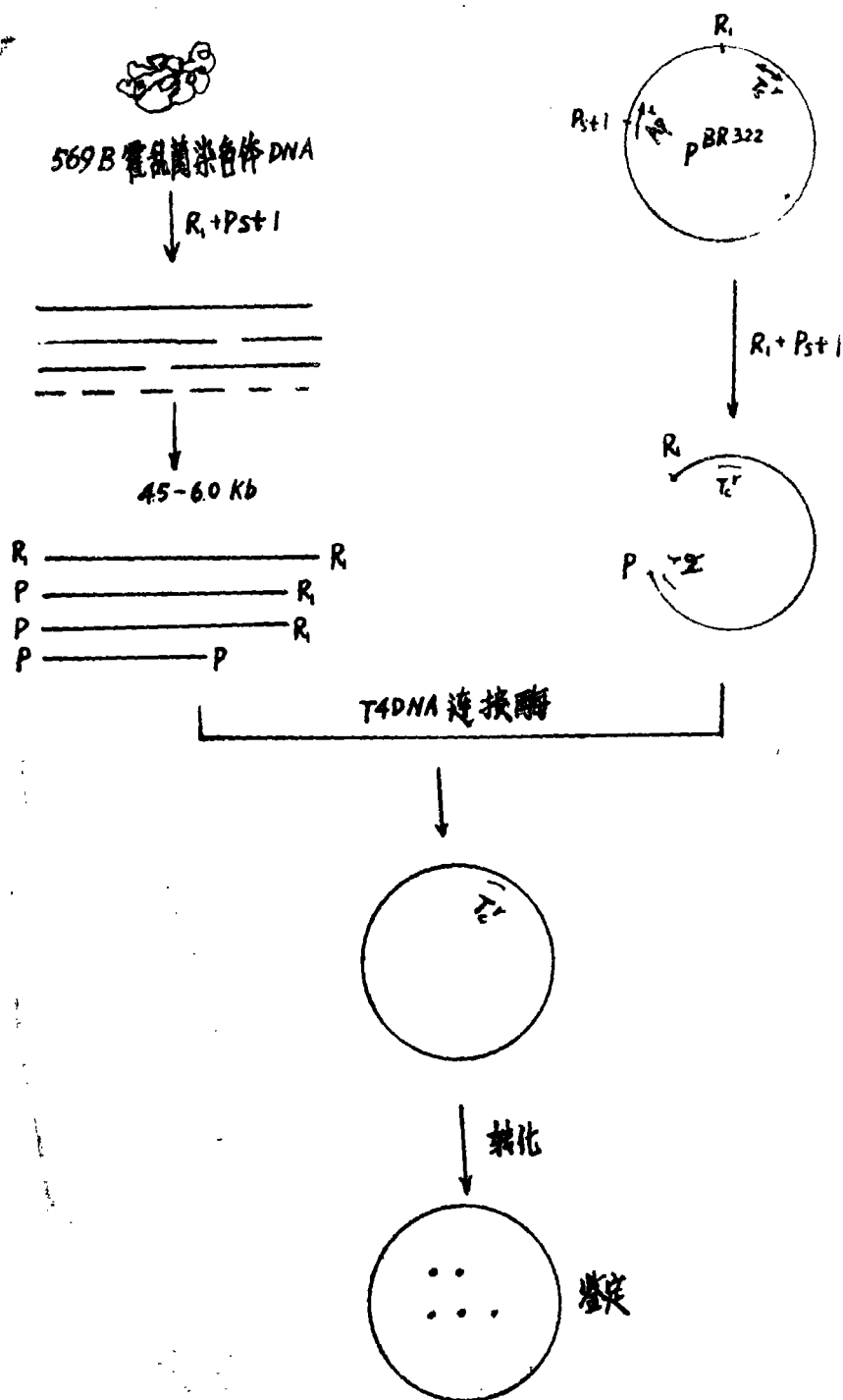


图4 CT基因克隆

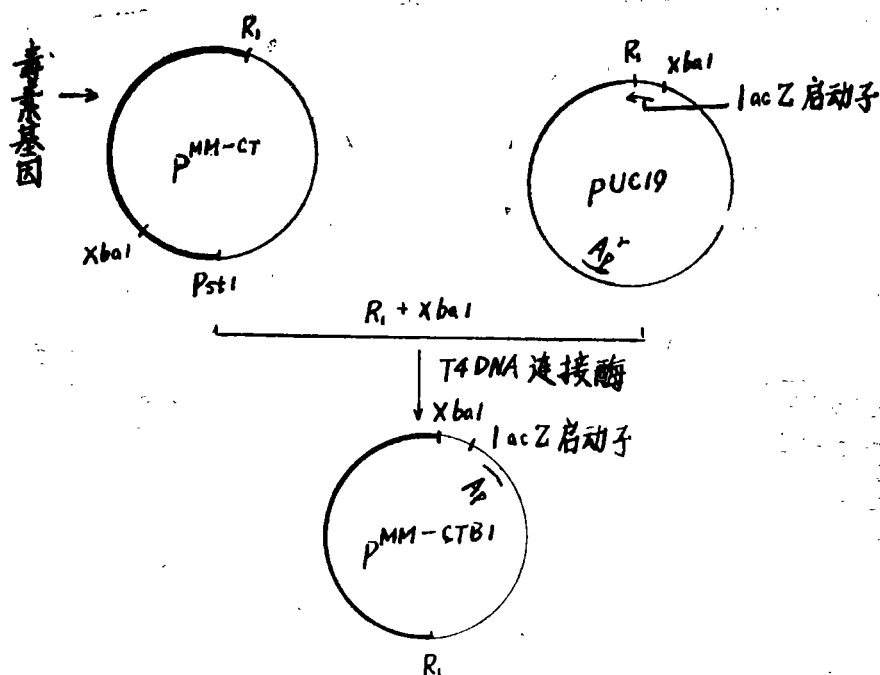


图5 CTA-B⁺ 基因克隆

株, 这个菌株缺UDP—4—gal—epimerase, 在没有半乳糖时不能生长, 提供半乳糖时, 可暂时生长, 然而由于半乳糖代谢产物, 半乳糖—1—P04和尿苷二磷酸半乳糖的累极, 不能形成正常的细胞壁而发生破裂致死。总的结果, galE Ty21a在体内有足够的时间生长, 刺激机体产生局部免疫, 有保护作用, 但不足以致病, 经人体试验证明安全和稳定。在155名美国志愿者服用 $3-10 \times 10^{10}$ 疫苗菌, 排菌不超过2—3天, 无返祖现象免疫效果达87%。埃及、智利及印度儿童现场试验, 免疫效果达96%。由于Ty21a能与免疫感受态细胞接触而不产生临床症状, 因此, 可作为载体以携带其他致病菌的抗原决定簇, 用于DNA重组技术, 制备多价疫苗。

四、预防痢疾疫苗的研究

痢疾发病主要是细菌对肠上皮细胞的穿透作用, 侵入肠粘膜固有层, 繁殖, 产生肠粘膜溃疡性损害。由于痢疾菌的菌型及血清型较多, 而致病因子又复杂, 包括肠毒素、细胞毒素、侵袭因子等等。至今尚未有理想的预防制剂。

罗马尼亚1964年用福氏F2a毒株在含胆盐的培养基上传32代获减毒的T32株, 丧失了侵入上皮细胞的能力, 而对动物和人没有致病力。在1976~1980年间T32株活疫苗已在12个国家, 32044名儿童和4734名成人中接种, 无副反应, 保护力达80%以上, 持续时间约为半年。在我国亦曾试用, 效果一般。

南斯拉夫1965年用福氏1型、2a、3a接种在3%普通脂琼上, 再转种在含400微克链霉素/毫升的培养基, 选出了弱毒链霉素依赖突变株, 称SD依链株。对同血清型菌的

感染有一定保护力,对其他血清型感染无保护力,本疫苗反应较轻,但稳定性不够好。

1980年Kopecko及Formal将宋内氏1型菌(光滑型)大质粒(120-140md)能转入无质粒的Ⅱ型菌,使后者获Ⅰ型菌的特征。

1981年Formal等用大肠菌K-12作为起始株,引入痢疾140md不质粒(与侵袭力有关),然后将F2a编码群抗原和型抗原的基因引入受体菌,再将痢疾染色体DNA的一些片段(染色体多个片段与毒力有关)引入,组建的菌苗株,在猴子动物试验模型中,能表达侵袭肠上皮细胞的能力,并不引起腹泻。

根据宋内氏Ⅰ型痢疾菌特异性体抗原为质粒所编码,并可转移至载体Ty21a,所获接合菌株具伤寒沙门氏菌及宋内痢疾菌的抗原性,能保护小鼠对毒菌腹腔攻毒试验,人体试验结果,对宋内菌有一定免疫力。这类研究在国内已有多个单位在积极进行中。

看来,痢疾免疫与型特异的体抗原的关系是很密切的。

小结

经过长期的医学实践,人们已肯定了疫苗在预防疾病方面的重要作用。从肠道菌腹泻预防疫苗的研究进展,我们可以看到,由于新技术在流行病学、微生物学、免疫学、生物化学、遗传学等等学科的应用,和各学科间密切的配合,才得以在短短十多年时间中获得了质的突破,正以更坚定的步伐向前发展。这就启示我们,在生物科学大变革的时代,各学科间一定要互相渗透,加强联系,掌握新技术,应用新技术,发展新技术,还要特别重视将实验室研究尽快用于实践。这样,可以展望向2000年进军的过程中,生物工程技术的发展,必将加速新一代疫苗的诞生。

一种引人注目的生物工程新技术

——重组RNA技术

赵惠智

(中科院生物物理所)

近十余年,由于重组DNA技术的问世和应用,迅速兴起和发展的生物工程已涉足于遗传工程、细胞工程、发酵工程、酶工程、工业、农业、医学、食品、化工及能源等各个方面,取得了长足的进展,并开始向第二代生物工程迈进,去开发应用人们曾经期望而又尚未实现的愿望。

重组DNA技术是第一代生物工程的支柱。利用这种技术,人们已开始可能以工业规模生产对人类有重要意义的蛋白质,如胰岛素、生长激素、干扰素、人降血钙素、某些酶类及疫苗等。而且它的强大能力一定会继续推动生物工程产生更大的飞跃。不过,目前的重组DNA技术也存在一些困难,如其产品质量不够稳定,生产成本昂贵,其生产的