

# 同尾酶技术在构建疟疾多价重组DNA疫苗中的应用\*

林澄涛 姜燕芳 阴彬 董敏 何湘云 王恒

(中国医学科学院基础医学研究所, 中国协和医科大学基础医学院, 北京 100005)

**摘要** 同尾酶是一类识别不同核苷酸序列但能酶切产生相同粘性末端的限制性内切酶, 依靠同尾酶的这种特性, 可以根据需要将不同的DNA片段进行灵活组合, 获得各种排列顺序的多价表位重组疫苗。将这种方法用于疟疾多价重组DNA疫苗的研制; BALB/c小鼠免疫实验对所得重组疫苗PU 286的免疫原性进行了测定。

**关键词** 疟疾, 多价重组疫苗, 同尾酶, 免疫

## Construction of Malaria Multivalent Recombinant DNA Vaccine with Isocaudamer Technique

L N Chengtao, JIANG Yanfang, YIN Bin, DONG Min, HE Xianguyun WANG Heng

(Institute of Basic Medical Sciences, CAMS & PUMC, Beijing 100005)

**Abstract** With the isocaudamers which have different recognition sequences and produce compatible cohesive ends, chimeric multi-epitope *Plasmodium falciparum* DNA vaccines including the multiplication of the single copy epitope and the tandem linkage of different kinds of epitopes were flexibly constructed. A specific B-cell response was detected by ELISA after the immunization of BALB/c mice with the chimeric antigen and demonstrated the usefulness of this strategy of constructing multi-epitope DNA vaccines.

**Key words** Malaria, Multi-epitope recombinant DNA vaccine, Isocaudamer, Immunization

基于基因工程技术的多价重组疫苗由于其巨大的发展潜力越来越受到重视, 疟疾重组疫苗的研究近年来也取得了较大进展。在将不同的抗原表位DNA片段进行组合以构建多价重组疫苗时, 常用的方法是, 在组合片段的两侧引入不同的限制性内切酶位点(非同尾酶), 然后进行定向组合。其明显的不足在于组合方式必须事先定好, 难以将抗原片段进行灵活的排布, 即要深入研究多表位间排列结构的变化对其表达产物抗原性的影响, 此方法难以实现。Khan在血吸虫疫苗的研制中曾应用同尾酶技术将同一抗原片段多拷贝化<sup>[1]</sup>, 我们借鉴了这一思路并发展了这一技术, 应用同尾酶技术将不同的抗原表位片段进行灵活地重组, 构建了不同组合形式的疟疾多价重组DNA疫苗, 并用小鼠免疫实验对所得疫苗PU 286的免疫原性进行了测定。

## 1 材料与方法

**1.1 菌株和质粒:** *E. coli* SK383 (dam<sup>-</sup> dcm<sup>-</sup>), 由中国科学院微生物研究所六室唐国敏研究员惠赠。

质粒VR 1012, DNA疫苗表达型质粒载体, 由美国Vical公司Robert H. Zaugg博士惠赠。

**1.2 合成抗原DNA片段:** 合成的DNA片段如下:

(1) 片段1 (P1, Bcl I -ATG-BcoR I -BamH I)

5'-GATCA CCA TGGAA TTCG  
TGGTACCTTAAGCCTAG-5'

(2) 片段2 (P2, Bcl I -2x N KND -BamH I)

5'-ACA TCA TGCCTGA TCAAACAAGAACGACAA  
TGTA GTA CGGACTA GTTGTCTCTTGCTGTT  
CAA GAACGACGGA TCCGCG  
GTTCTTGCTGCCTAGGCGC-5'

\* "863"项目资助(102-07-04-02)

联系人: 林澄涛, 男, 1965年10月生, 硕士, 助理研究员

Tel: (010) 65296440, Fax (010) 65296440

Email: lin357@cenpok.net

本文作者尚有: 毛映红, 徐蓓, 刘宝丰

收稿日期: 1998-12-29, 修回日期: 1999-05-04

(3) 片段6 (P6, *Bcl* I -M SA 1-*Bam* H I -*Nhe* I -TAA TAA -*Bgl* II)

```

5 -ACATCA TGCCTGATCACTGGACAACA TCAAGGACAA CGTGGGCAA GA TGGAGG
  TGTA GTACG GACTA GTGACCTGTTGTA GTTCCTGTTGACCCCGTTCTACCTCC
  ACTACA TCAAGAA GAACAAGAA GGGCCCCGGCCCCGGA TCCGCTA GCTAA TAAA GA TCTTCC
  TGA TGTAGTTCTTCTTGTCTTCCCGGGCCGGGGCCCTA GGCGA TCGA TTA TTTCTA GAA GG-5

```

(4) 片段8 (P8, *Bcl* I -CST3-*Bam* H I)

```

5 -ACATCA TGCCTGATCAAAA GAA GA TCGCCAA GA TGGAGAA GGCCA GCA GCGT GTTCAACG
  TGTA GTACG GACTA GTTTCTTCTA GCGGTTCTA CCTCTTCCGGTCTCGCACAA GTTGC
  TGGGCCCGGCCCGGGA TCC
  ACCCGGGGCCGGGGCCCTA GG-5

```

注: 划线部分为合成的序列. 合成片段1的目的在于往载体VR1012上引入起始密码; 片段2为疟原虫红内期B 细胞表位NKND 的两拷贝片段; 片段6为主要的裂殖子表面抗原(MSP1) 片段(片段末尾附带双拷贝终止密码TAA TAA); 片段8为Th 抗原表位CST3. 所有片段的两端分别为*Bcl* I、*Bam* H I 或*Bgl* II, 三者互为同尾酶. 片段1起始密码后加

入*EcoR* I 和片段6的终止密码前加入*Nhe* I 是为了方便进一步研究时使用. 片段6和片段8的抗原表位末尾引入GPGP 序列作为不同片段之间的空间结构间隔序列.

1.3 应用同尾酶技术进行片段的串联和组合: 应用同尾酶技术进行抗原片段的串联和组合的原理如图1所示:

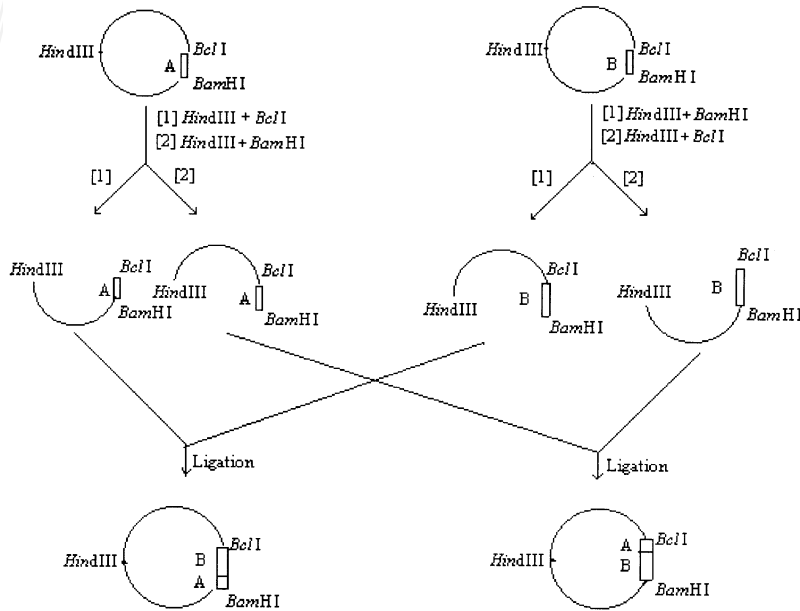


Fig 1 The mechanism of flexible epitope combination with isocaudamer technique

1.4 质粒的大量提取: 采用氯化铯-溴乙锭密度梯度平衡超速离心法和Q IAGEN 公司质粒纯化柱法大量提取质粒, 最后将质粒以1 mg/ml 溶于生理盐水中. 所得质粒测A<sub>260 nm</sub>/A<sub>280 nm</sub>, 以鉴定其纯度是否合格.

1.5 动物免疫和血清抗体测定: 采用四至六周龄的BALB/c 纯系小鼠(购自医科院药物所), 将以生理盐水配置成1 mg/ml 的质粒溶液从鼠尾皮下进行免疫注射, 每次100 μl, 0, 3, 7周分别免疫一次. 于每次

免疫前3~ 4 d 和末次免疫后两周经鼠尾动脉采血, 制备小鼠血清冻存储备用. 采用ELISA 方法测定小鼠血清抗体滴度, 用合成肽(NKND)<sub>36</sub> μg/ml 为包被抗原, 以HRP 标记的羊抗鼠 IgG/IgM 为二抗, TMB 为底物, 用酶标仪(EL 311s, Bro-TEK Inc) 检测A<sub>450 nm</sub> 光吸收值.

## 2 结 果

### 2.1 多价重组DNA 疫苗的构建

2.1.1 各合成片段的单独克隆: 将片段1的合成的两条链退火后直接插入载体VR1012的*Bcl*I和*Bam*H I之间, 得到含起始密码片段的克隆. 用T4 DNA聚合酶或PCR方法将片段2、6、8的各相应合成片段退火后进行延伸补平. 经*Bcl*I和*Bam*H I或*Bgl*II双酶切后插入载体VR1012, 得到含2、6、8片段的克隆.

2.1.2 抗原片段的多拷贝化和灵活组合: 借用同尾酶*Bcl*I和*Bam*H I, 将片段2和6的克隆分别进行重复克隆后得16拷贝NKND的8×P2/VR1012和4拷贝MSA1的4×P6/VR1012. 进而依据同尾酶组合的原理将上述各克隆片段按2-8-6的顺序串联构成[ATG-(NKND)16-CST3-(MSA1)4-TAA]/VR1012(简称PU286)重组DNA疫苗. 重组质粒以*Pst*I和*Bgl*II双酶切鉴定, 酶谱显示插入片段大小与组合片段长度674 bp相符(Fig. 2); 进一步的测序结果证实所构建的多价重组DNA疫苗序列完全正确.

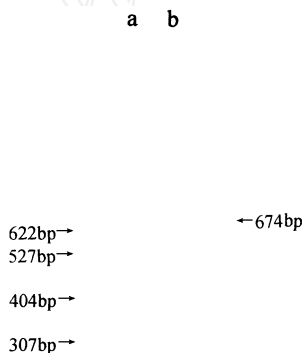


Fig 2 Digestion of PU 286 with *Pst*I and *Bgl*II

a: pBR322/*Msp*I Marker

b: PU 286/*Pst*I and *Bgl*II

## 2.2 动物免疫和血清抗体指标测定

将PU286和空白载体VR1012经皮下途径分别免疫BALB/c小鼠. 每次样品分别免疫5只小鼠, 收集的5只小鼠抗血清合并后用ELISA方法进行抗体水平的测定, 结果显示PU286诱导产生了相应的抗体, 测定值如图3所示:

## 3 讨论

由于疟原虫具有复杂的生活史, 其抗原性随不

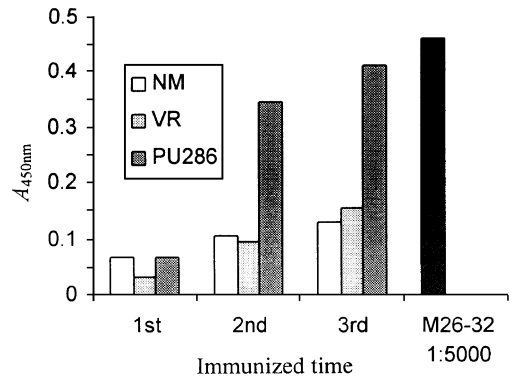


Fig 3 The comparison of sera antibody level in three times' immunization

NM: Normal serum; VR: Vector VR1012;

M26-32 (positive control): NKND monoclonal antibody, 1:5000 diluted

同的生活周期而变化. 因目前对疟疾疫苗的研制策略多采取选择疟原虫不同生活阶段的不同的抗原表位, 构建成多价表位重组疫苗. 本论文从恶性疟原虫抗原MSP1和CSP中选择了三个表位(MSA-1、NKND和CST3). NKND为我们课题组用单抗M26-32筛选恶性疟原虫中国海南株cDNA文库所获得的红内期抗原B表位<sup>[2]</sup>. 我们合成的P6表位(MSA-1)为疟原虫裂殖子表面抗原MSP1的N端20个氨基酸残基的DNA序列<sup>[3]</sup>. CST3是恶性疟原虫环孢子蛋白CSP378-398残基之间的序列, 仅将其中的384CYS和389CYS换成了ALA; CST3是一个普遍性的Th表位, 而且在不同的疟原虫中都是保守的, 是构建疫苗中经常使用的Th表位<sup>[4]</sup>.

将几种抗原片段进行组合, 常用的方法是将组合方式事先设计好再进行片段的合成, 或借助一系列不同的Linker进行连接. 但是要将几种片段进行灵活的组合和多拷贝化, 常用的方法就显得非常的烦琐. 而借助同尾酶技术, 仅需要在所有组合的片段的两侧分别加上一对同尾酶, 就可以非常方便地将各片段进行自串联多拷贝化和根据需要将各片段灵活地进行组合. 从而能够充分地对组合疫苗的各抗原组份的排布和结构对疫苗免疫效果的影响进行研究分析. 将同尾酶技术引入多价表位抗原的构建, 为重组疫苗的研制提供了一种有力的技术手段. 本实验将抗原表位2、6、8片段以2-8-6的方式进行组合(我们实验室同时也在进行其它方式的和其它抗原表位不同组合), 得到的多价重组DNA疫苗PU286经皮内免疫诱导小鼠产生了相应的抗

NKND 抗体,说明该人工抗原基因已经转录、表达,并且具有抗原性.不过免疫结果显示PU 286的免疫原性偏弱,这可能主要与抗原的选择和组合方式有关,有待进一步在实验中改进,以提高其免疫原性.

值得注意的是,借助同尾酶技术构建的重组疫苗,各抗原片段之间都引入了两个与同尾酶识别序列相应的氨基酸,而特定同尾酶的选用,会引入特定的氨基酸,从而可能改变插入片段的结构,进而影响疫苗的抗原性和免疫原性.因此在实验设计中应在疫苗抗原载体酶谱的基础上,从疫苗结构和功能关系的角度对所用的同尾酶进行分析的选择.在启发我们采用同尾酶技术进行不同抗原片段组合的Khan的实验中<sup>[1]</sup>,首先将一血吸虫抗原片段应用同尾酶技术多拷贝化,得到单拷贝、二拷贝、四拷贝和八拷贝的血吸虫抗原的几种拷贝片段,然后将这些抗原片段再与破伤风毒素的C片段进行组合,转入到减毒沙门氏菌SL 3261菌株表达体系中.小鼠免疫实验表明,重组疫苗同时诱导产生了针对破伤风毒素和血吸虫抗原的抗体,而且随着血吸虫抗原拷贝数的增加,抗血吸虫抗体的滴度也明显增加,八拷贝的抗体滴度最大.这说明合理地使用同尾酶技术将

抗原片段进行组合制备疫苗是可行的.

## References

- 1 Khan C M, Villarreal-Ramos B, Pierce R J, Demarco de Hormaeche R, McNeill H, Ali T, Chatfield S, Capron A, Dougan G, Hormaeche C E. Construction, expression, and immunogenicity of multiple tandem copies of the schistosoma mansoni peptide 115-131 of the P28 glutathione S-transferase expressed as C-terminal fusions to tetanus toxin fragment C in a live attenuated vaccine strain of salmonella *J Immunol*, 1994, **153**: 5634~ 5642
- 2 Cheng Q, Jones G, Liu E X, Kidson C, Saul A. Identification of a common plasmodium epitope (CPE) recognised by a pan-specific inhibitory monoclonal antibody. *Mol Biochem Parasitol*, 1991, **49**: 73~ 82
- 3 Kumar A, Arora R, Kaur P, Chauhan V S, Shama P. "Universal" T helper cell determinants enhance immunogenicity of a plasmodium falciparum merozoite surface antigen peptide *J Immunol*, 1992, **148**: 1499~ 1505
- 4 Sinigaglia F, Guttinger M, Kilgus J, Doran D M, Matile H, Etlinger H, Trzeciak A, Gillesen D, Pink J R. A malaria T-cell epitope recognized in association with most mouse and human MHC class II molecules *Nature*, 1988, **336**: 778~ 780