

①

两种分泌型人谷氨酸脱羧酶 65 片段 DNA 疫苗的构建与鉴定

张松,周鹏程,黄干,孙意,周智广

(中南大学湘雅二医院代谢内分泌研究所,中南大学糖尿病中心,长沙 410011)

[摘要] 目的:构建和鉴定分泌型人谷氨酸脱羧酶(glutamic acid decarboxylase, GAD)65 片段 DNA 疫苗。方法:从人 GAD65 质粒中扩增出 GAD₁₉₀₋₃₁₅ 和 GAD₄₉₀₋₅₇₀ 两个片段的 cDNA,分别与 hIL-2 信号肽 cDNA 基因拼接,将拼接后的片段克隆入 pBudCE4.1 真核表达载体,测序鉴定,并用 Western 印迹检测融合基因的表达。结果:核酸序列测定表明克隆的融合基因序列与报告序列一致,开放阅读框正确,Western 印迹检测显示这两种人 GAD65 片段分泌表达。结论:两种分泌型人 GAD65 片段 DNA 疫苗均成功构建,为 1 型糖尿病的预防提供了实验基础。

[关键词] GAD65; 克隆; 融合基因; DNA 疫苗; 1 型糖尿病

[中图分类号] R587.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-7347(2007)06-0997-05

Construction and identification of 2 secreted human GAD65 fragment DNA vaccines

ZHANG Song, ZHOU Peng-cheng, HUANG Gan, SUN Yi, ZHOU Zhi-guang

(Institute of Metabolism and Endocrinology, Diabetes Center, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China)

Abstract: **Objective** To construct and identify 2 secreted human GAD65 fragment DNA vaccines. **Methods** The GAD₁₉₀₋₃₁₅, GAD₄₉₀₋₅₇₀ cDNA and hIL-2 signal peptide cDNA were linked through overlapping PCR, respectively. The fusion gene was cloned into eukaryotic expression vector pBudCE4.1. After the DNA vaccine being determined to contain the correct target nucleotide sequence, the expression of fusion proteins was detected by Western blot. **Results** The nucleotide sequence of the cloned gene was the same as the reported sequence, and their open reading fragment was correct. The products of these DNA vaccines were expressed and secreted in eukaryotic cell using Western blot. **Conclusion** The pBudCE4.1/SGAD₁₉₀₋₃₁₅ and pBudCE4.1/SGAD₄₉₀₋₅₇₀ secreted human GAD65 fragment DNA vaccines were successfully constructed, which is a foundation for immune prevention of type 1 diabetes.

Key words: GAD65; cloning; fusion gene; DNA vaccine; type 1 diabetes

[J Cent South Univ (Med Sci), 2007,32(6):0997-05]

1 型糖尿病是一种在遗传和环境因素的共同作用下,由 T 细胞介导的导致分泌胰岛素的胰岛 β 细胞特异性损伤的自身免疫性疾病^[1]。自身抗

原诱导免疫耐受是目前治疗自身免疫疾病的重要途径之一,由于该策略无非特异性免疫抑制而成为耐受诱导研究的方向^[2]。近年来,随着基因工

①收稿日期(Date of reception) 2007-01-20

作者简介(Biography) 张松(1975-),男,贵州福泉人,博士,主治医师,主要从事自身免疫糖尿病预防研究。

通讯作者(Corresponding author) 周智广,E-mail:zhouzg@hotmail.com

基金项目(Foundation items) 国家自然科学基金(30177440, 30670991) This work was supported by National Science Foundation of China (30177440, 30670991)

程等新技术的发展,编码胰岛自身抗原,如谷氨酸脱羧酶(glutamic acid decarboxylase, GAD)、胰岛素的质粒(DNA 疫苗)为 1 型糖尿病的免疫干预提供了新的方法。我们也成功构建了人 GAD65 DNA 疫苗^[3],并在动物模型 NOD(non-obese diabetic)鼠的糖尿病预防中取得了一定的疗效^[4],但尚不甚理想。鉴于此,本研究试图选择 GAD65 保护性表位、添加信号肽等方法,构建新的分泌性人 GAD65 片段 DNA 疫苗以增强疗效,为人类 1 型糖尿病的预防和治疗奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 质粒、菌株和细胞 含人全长 GAD65 cDNA 的 pcDNA3.1(+)/hGAD65 质粒由我中心保存,pBudCE4.1 真核表达载体由比利时布鲁塞尔 WIV-Pasteur 研究所 Kris Huygen 教授馈赠。*E. coli* 菌株 JM109,COS-7 细胞由医学遗传学国家重点实验室保存。PGEM-T 载体购自 Promega 公司。

1.1.2 主要试剂 高保真 Pyrobest,LA DNA 聚合酶,dNTP,DNA marker,T4 连接酶,限制性内切酶 *SalI* 和 *XbaI* 购自 Takara 公司,质粒提取试剂盒(QIAGEN tip 100,QIAprep Spin Miniprep kit) 购自 QIAGEN 公司,筛选抗菌素 Zeocin、脂质体转染试剂盒(Lipofectamine 2000)、ECL 显色试剂购自 Invitrogen 公司,所有一抗均购自 Sigma-Aldrich 公司。

1.2 方 法

1.2.1 引物的设计和合成 根据 pcDNA3.1(+)/hGAD65 质粒测序结果^[3]及 hIL-2 cDNA 序列(NM000586),结合真核表达载体 pBudCE4.1 的特点,设计 7 条特异性引物(表 1)。P1,P2 为 GAD₁₉₀₋₃₁₅ 上下游引物,P3,P4 为 GAD₄₉₀₋₅₇₀ 上下游引物,P5 为 hIL-2 信号肽共用上游引物,P6,P7 为 hIL-2 信号肽 2 条下游引物(分别与不同的 GAD 片段匹配)。P5 在 5' 端引入 Kozak 序列、*SalI* 酶切位点(加粗斜体字部分),外侧加有保护性碱基;P2 和 P4 在 5' 端引入 *XbaI* 酶切位点(加粗斜体字部分),外侧加有保护性碱基;P4 在 5' 端引入终止密码子。其中 P1 和 P3 的下划线部分为 22 bp 的 linker,分别与 P6 和 P7 的下划线部分反向互补。引物由 Invitrogen 公司合成。

1.2.2 SGAD₁₉₀₋₃₁₅,SGAD₄₉₀₋₅₇₀ 融合基因的扩增

1.2.2.1 GAD₁₉₀₋₃₁₅,GAD₄₉₀₋₅₇₀ 基因的扩增 以

pcDNA3.1(+)/hGAD65 质粒为模板,分别用 P1,P2 和 P3,P4 两对上下游引物,PCR 扩增出 GAD₁₉₀₋₃₁₅ 和 GAD₄₉₀₋₅₇₀ 基因,扩增条件:95 ℃ 5 min,94 ℃ 30 s,65 ℃ 30 s,72 ℃ 40 s,72 ℃ 7 min,共 30 个循环。PCR 产物行 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Sequence of PCR primers

引物名称	序列
P1	5'-CAAAGAAAACAGGATTAGCAGCAGACTGGCTGACA-3'
P2	5'-TGCTCTAGAAAGATCAGATGGAATCATTT-3'
P3	5'-CAAAGAAAACAGGATATGAGATGGTGTTTGATGGG-3'
P4	5'-TGCTCTAGATTAGTCTTGGTGAGTTGCCG-3'
P5	5'-ACGCGTCGACGCCACCATGTACAGGATGCAACT-3'
P6	5'-GCTGCTAATCCTGTTTCTTTGTAGAACTTGAAGT-3'
P7	5'-ATCTCATATCCTGTTTCTTTGTAGAACTTGAAGT-3'

1.2.2.2 hIL-2 信号肽基因的扩增 以人 gDNA 为模板(hIL-2 信号肽 cDNA 在同一外显子),分别用 P5,P6 和 P5,P7 两对上下游引物,PCR 扩增出 hIL-2sp-1 和 hIL-2sp-2 基因,扩增条件:95 ℃ 5 min,94 ℃ 30 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 45 s,72 ℃ 7 min,共 30 个循环。PCR 产物行 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳。

1.2.2.3 GAD₁₉₀₋₃₁₀,GAD₄₉₀₋₅₇₀ 和 hIL-2 信号肽基因的拼接 Overlap PCR 法分别将 GAD₁₉₀₋₃₁₅ 和 hIL-2sp-1(P5 和 P2 为上下游引物)、GAD₄₉₀₋₅₇₀ 和 hIL-2sp-1(P5 和 P4 为上下游引物)进行拼接,分别得到 SGAD₁₉₀₋₃₁₅,SGAD₄₉₀₋₅₇₀ 融合基因,PCR 产物行 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳。

1.2.3 SGAD₁₉₀₋₃₁₅,SGAD₄₉₀₋₅₇₀ 融合基因的克隆及其鉴定 参照文献[5]的方法,将 SGAD₁₉₀₋₃₁₅,SGAD₄₉₀₋₅₇₀ 融合基因 PCR 产物和 PGEM-T 载体在 T4 连接酶的作用下,4 ℃ 过夜得到重组 T 载体,连接产物转化感受态 *E. coli* 菌株 JM109,蓝白筛选,挑取阳性克隆培养,抽提质粒后进行双酶切(*SalI* 和 *XbaI*)和测序鉴定,得到 PGEM-T/SGAD₁₉₀₋₃₁₅,PGEM-T/SGAD₄₉₀₋₅₇₀ 载体。测序正确的重组质粒,双酶切后分别定向克隆入表达载体 pBudCE 4.1 中,根据该载体所含的 Zeocin 抗性,转化后用含 Zeocin 的低盐 LB 培养皿筛选,挑取阳性克隆培养,得到 pBudCE 4.1/SGAD₁₉₀₋₃₁₅ 和 pBudCE 4.1/SGAD₄₉₀₋₅₇₀ 两个质粒(DNA 疫苗)。质粒双酶切鉴定后,对其进行正、反双向测序鉴定(由 Invitro-

gen 公司完成)。

1.2.4 SGAD₁₉₀₋₃₁₅, SGAD₄₉₀₋₅₇₀ DNA 疫苗在细胞中的分泌表达及鉴定 测序鉴定正确的 pBudCE4.1/SGAD₁₉₀₋₃₁₅ 和 pBudCE4.1/SGAD₄₉₀₋₅₇₀ 质粒,用含 Zeocin 的低盐 LB 液体培养基大量扩增,质粒提取试剂盒(QIAGEN tip 100 kit)抽提质粒,按脂质体转染试剂盒说明书进行转染。转染 COS-7 细胞 48 h 后,用胰酶消化并收集细胞,Western 印迹检测细胞裂解产物及上清液中的蛋白质表达。

2 结 果

2.1 SGAD₁₉₀₋₃₁₅, SGAD₄₉₀₋₅₇₀ 融合基因的获取 以 pcDNA3.1(+)/hGAD65 质粒为模板,分别用 P1, P2 和 P3, P4 两对上下游引物,特异性扩增出 GAD₁₉₀₋₃₁₅ (398 bp) 和 GAD₄₉₀₋₅₇₀ 基因(266 bp);以人 gDNA 为模板,分别用 P5, P6 和 P5, P7 两对上下游引物,特异性扩增出 hIL-2sp-1 (117 bp) 和 hIL-2sp-2 基因(117 bp);GAD₁₉₀₋₃₁₅ 基因与 hIL-2sp-1 基因、GAD₄₉₀₋₅₇₀ 基因和 hIL-2sp-2 基因拼接后也分别扩增出 SGAD₁₉₀₋₃₁₅ (493 bp), SGAD₄₉₀₋₅₇₀ (361 bp) 融合基因。所有电泳条带清晰,与预期长度一致(图 1)。

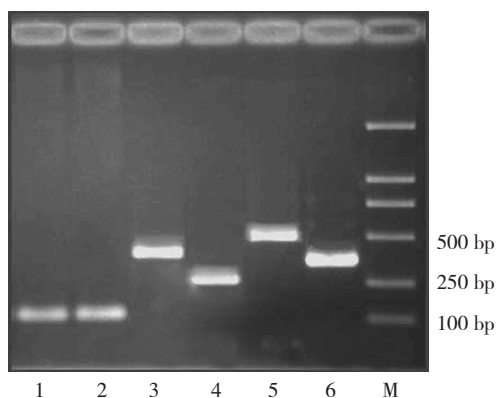


图 1 Overlap PCR 拼接 GAD 片段与 IL-2 信号肽 cDNA

Fig. 1 Linkage of GAD fragment and IL-2 signal peptide cDNA by overlap PCR 1: hIL-2sp-1; 2: hIL-2sp-2; 3: GAD₁₉₀₋₃₁₅; 4: GAD₄₉₀₋₅₇₀; 5: SGAD₁₉₀₋₃₁₅; 6: SGAD₄₉₀₋₅₇₀; M: DNA marker (DL2000)

2.2 SGAD₁₉₀₋₃₁₅, SGAD₄₉₀₋₅₇₀ 融合基因的克隆及其鉴定

2.2.1 SGAD₁₉₀₋₃₁₅, SGAD₄₉₀₋₅₇₀ 融合基因重组 T 载体的构建与鉴定 两个重组 T 载体经 *Sal* I 和 *Xba* I 双酶切后均可见两条带,一条为 3 kb 的 T 载体,另外一条分别为 480 bp 和 348 bp 的 SGAD₁₉₀₋₃₁₅, SGAD₄₉₀₋₅₇₀ 条带,测序结果亦表明与已知核苷酸序列一致,PGEM-T/SGAD₁₉₀₋₃₁₅, PGEM-T/SGAD₄₉₀₋₅₇₀ 载体构建成功(图 2)。

2.2.2 pBudCE4.1/SGAD₁₉₀₋₃₁₅ 和 pBudCE4.1/SGAD₄₉₀₋₅₇₀ 质粒的构建与鉴定 pBudCE4.1/SGAD₁₉₀₋₃₁₅ 和 pBudCE4.1/SGAD₄₉₀₋₅₇₀ 质粒经 *Sal* I 和 *Xba* I 双酶切后均可见两条带,一条为 4.6 kb 的 pBudCE4.1 载体,另一条分别为 480 bp 和 348 bp 的 SGAD₁₉₀₋₃₁₅, SGAD₄₉₀₋₅₇₀ 条带(图 2)。测序结果亦表明与报告序列完全相同,开放阅读框正确,SGAD₁₉₀₋₃₁₅, SGAD₄₉₀₋₅₇₀ DNA 疫苗均构建成功。

2.3 SGAD₁₉₀₋₃₁₅, SGAD₄₉₀₋₅₇₀ DNA 疫苗在 COS-7 细胞中的分泌表达 经 pBudCE4.1/SGAD₁₉₀₋₃₁₅ 和 pBudCE4.1/SGAD₄₉₀₋₅₇₀ 重组质粒转染的 COS-7 细胞生长情况良好,Western 印迹检测结果显示转染的 COS-7 细胞裂解产物及上清液中均可见一条特异性条带,蛋白质分子量约为 18 kD 和 10 kD(图 3, 4),表明构建的 SGAD₁₉₀₋₃₁₅ 和 SGAD₄₉₀₋₅₇₀ DNA 疫苗均可在 COS-7 细胞中分泌表达。

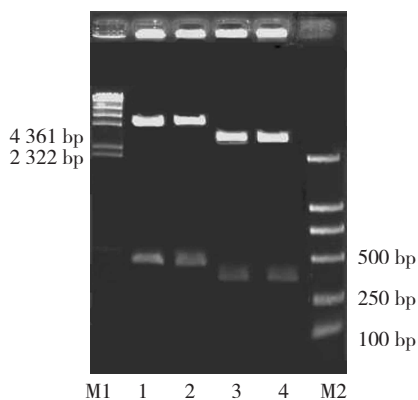


图 2 SGAD₁₉₀₋₃₁₅, SGAD₄₉₀₋₅₇₀ 融合基因的双酶切鉴定

Fig. 2 Identification of SGAD₁₉₀₋₃₁₅ and SGAD₄₉₀₋₅₇₀ fusion gene by restriction enzyme double digestion 1: pBudCE4.1/SGAD₁₉₀₋₃₁₅; 2: pBudCE4.1/SGAD₄₉₀₋₅₇₀; 3: PGEM-T/SGAD₁₉₀₋₃₁₅; 4: PGEM-T/SGAD₄₉₀₋₅₇₀; M1: DNA marker 1(λ *Hin* dIII); M2: DNA marker 1(DL2000)

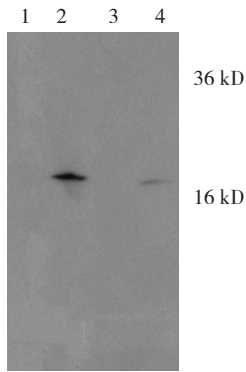


图3 pBudCE4.1/SGAD₁₉₀₋₃₁₅在COS-7细胞中的表达

Fig. 3 Expression and secretion of pBudCE4.1/SGAD₁₉₀₋₃₁₅ in COS-7 cells 1: Cell lysates of COS-7 cells transfected with pBudCE4.1 vector; 2: Cell lysates of COS-7 cells transfected with pBudCE4.1/SGAD₁₉₀₋₃₁₅; 3: Culture media of COS-7 cells transfected with pBudCE4.1 vector; 4: Culture media of COS-7 cells transfected with pBudCE4.1/SGAD₁₉₀₋₃₁₅

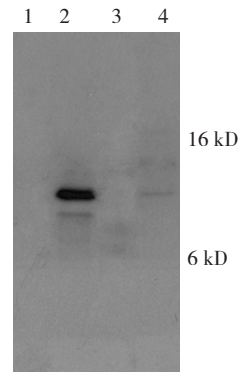


图4 pBudCE4.1/SGAD₄₉₀₋₅₇₀在COS-7细胞中的表达

Fig. 4 Expression and secretion of pBudCE4.1/SGAD₄₉₀₋₅₇₀ in COS-7 cells 1: Cell lysates of COS-7 cells transfected with pBudCE4.1 vector; 2: Cell lysates of COS-7 cells transfected with pBudCE4.1/SGAD₄₉₀₋₅₇₀; 3: Culture media of COS-7 cells transfected with pBudCE4.1 vector; 4: Culture media of COS-7 cells transfected with pBudCE4.1/SGAD₄₉₀₋₅₇₀

3 讨 论

DNA 疫苗是近年应用基因工程等新技术研制的一种新型疫苗。它是指将能够诱发保护性免疫应答的抗原的编码基因插入质粒载体,以裸 DNA 的形式免疫机体,利用宿主的细胞系统体内转录表达抗原基因,从而激发机体产生保护性免疫应答。DNA 疫苗具有安全性高、制作简单、经济、易于储存运输等优点,并已经在肿瘤、移植、自身免疫病的实验中取得较好的疗效^[6-7]。GAD65 是 1 型糖尿病发生发展的关键抗原。研究表明,GAD65 分子不同的抗原表位对 1 型糖尿病的发生发展有着不同的影响,GAD₂₀₆₋₂₂₀,GAD₂₈₆₋₃₀₀,GAD₂₉₀₋₃₀₉,GAD₅₀₉₋₅₂₈,GAD₅₂₄₋₅₄₃,GAD₅₄₆₋₅₅₄ 抗原表位肽段或其特异性 T 细胞克隆能减轻自身免疫性胰岛炎,降低发病率,对 1 型糖尿病有预防作用^[8-10]。此外,近年研究认为胞内和胞外的 GAD65 蛋白可能诱发不同的免疫反应,加上信号肽的分泌型 GAD65 质粒,可提高 GAD65 DNA 疫苗对 NOD 鼠糖尿病的预防效果^[8,11],可能机制为改良后的 GAD 质粒在转染体细胞后,翻译的分泌型 GAD 泌出胞外,更容易被抗原递呈细胞摄取和递呈,从而增加免疫疗效。本研究中,我们采用加上信号肽、选择保护性表位(主要位于中段的 190-315 和 C 端的

490~570 两个 GAD65 片段)构建 DNA 疫苗,以期使 DNA 免疫更为专一和精确,增加其对 1 型糖尿病的预防作用。

本研究采用 Overlap PCR 的方法,成功地将 GAD₁₉₀₋₃₁₅ 和 GAD₄₉₀₋₅₇₀ 两个 GAD65 片段基因与 hIL-2 信号肽基因进行拼接,经高保真的 DNA 聚合酶扩增后,先与 PGEM-T 载体相连,再进行表达载体 pBudCE4.1 克隆,避免了 PCR 产物直接克隆效率低及假阳性克隆多使筛查和鉴定工作繁重的缺点。pBudCE4.1 既是测序载体,又是真核表达载体,用其构建 DNA 疫苗十分方便。测序表明,克隆的 SGAD₁₉₀₋₃₁₅ 和 SGAD₄₉₀₋₅₇₀ 融合基因序列与公布的序列完全相同。同时 Western 印迹结果证明 pBudCE4.1/SGAD₁₉₀₋₃₁₅ 和 pBudCE4.1/SGAD₄₉₀₋₅₇₀ 两个 DNA 疫苗均能在体外真核细胞中分泌表达,证明这两种分泌型 GAD65 片段 DNA 疫苗已成功构建。我们正进行动物实验以检验其预防效果。

致谢 感谢医学遗传学国家重点实验室谭洁琼、谭志平博士和张宗磊硕士等的热情指导和帮助。

参考文献:

- [1] Tish R, McDevitt H. Insulin-dependent diabetes mellitus [J]. Cell, 1996, 85(3):291-297.
- [2] Steinman L. Immune therapy for autoimmune diseases [J]. Sci-

- ence, 2004, 305(5681): 212-216.
- [3] 蒋铁建,周智广,苏恒,等. 人谷氨酸脱羧酶 DNA 疫苗的构建与鉴定[J]. 中国免疫学杂志, 2004, 20(2): 125-126.
- JIANG Tie-jian, ZHOU Zhi-guang, SU Heng, et al. Construction and identification of human glutamic acid decarboxylase DNA vaccine [J]. Chin J Immunol, 2004, 20(2): 125-126.
- [4] 罗建华,周智广,蒋铁建,等. 人谷氨酸脱羧酶 65DNA 疫苗预防非肥胖鼠糖尿病小鼠糖尿病的机制探讨[J]. 中华医学杂志, 2004, 84(21):1791-1795.
- LUO Jian-hua, ZHOU Zhi-guang, JIANG Tie-jian, et al. Mechanisms of human glutamic acid decarboxylase 65 DNA vaccine preventing diabetes in non-obese diabetic mice [J]. Natl Med J Chin, 2004, 84(21):1791-1795.
- [5] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW. 分子克隆实验指南[M]. 第3版. 北京:科学技术出版社,2002:68-76.
- Sambrook J, Russell D W. Molecular cloning: A laboratory manual[M]. 3rd ed. Beijing: Science & Technology Press, 2002:68-76.
- [6] Robinson H L, Torres C A. DNA Vaccines [J]. Semin Immunol, 1997, 9(5):271-283.
- [7] Fynan E F, Webster R G, Fuller D H, et al. DNA vaccines: a novel approach to immunization[J]. Int J Immunopharmacol, 1995, 17(2):79-83.
- [8] Tisch R, Wang B, Atkinson M A, et al. A glutamic acid decarboxylase 65-Specific Th2 cell clone immunoregulates autoimmune in nonobese diabetic mice [J]. J Immunol, 2001, 166(11): 6925-6936.
- [9] Quinn A, McInerney M F, Sercarz E E, et al. MHC Class I-restricted determinants on the glutamic acid decarboxylase 65 molecule induce spontaneous CTL activity [J]. J Immunol, 2001, 167(3): 1748-1757.
- [10] Kim S K, Tarbell K V, Sanna M, et al. Prevention of type I diabetes transfer by glutamic acid decarboxylase 65 peptide 206-220-specific T cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(39): 14204-14209.
- [11] Glinka Y, De Pooter R, Croze F, et al. Regulatory cytokine production stimulated by DNA vaccination against an altered form of glutamic acid decarboxylase 65 in nonobese diabetic mice [J]. J Mol Med, 2003, 81(3): 175-184.

(本文编辑 彭敏宁)