

猪囊尾蚴抗原与猪白细胞介素-4 基因 融合DNA 疫苗载体的构建

吴丹 郭瀛军 孙树汉

上海第二军医大学医学遗传学教研室 上海 200433

摘要 目的: 为增强猪囊尾蚴抗原 cC1 的免疫保护作用而构建一表达猪白细胞介素-4(L-4)与 cC1 抗原融合蛋白的DNA 疫苗载体。方法: 通过聚合酶链反应(PCR), 分别扩增猪 L-4cDNA 和 cC1cDNA 片段并进行融合, 获得的嵌合基因 L-4cC1 中含有 10 个氨基酸的中间接头序列, 同时对其 5' AUG 侧翼序列进行翻译优化突变。结果: 经酶切鉴定, 证实有一 1.5 kb 的片段插入载体, 其 DNA 序列分析结果与文献报道和实验设计完全一致。结论: 表达猪 L-4 与猪囊尾蚴抗原 cC1 融合蛋白的 DNA 疫苗载体构建成功。

关键词 囊尾蚴病 白细胞介素-4 基因融合 DNA 疫苗

抗原 cC1 是从猪囊尾蚴 cDNA 文库中以囊虫病、病猪血清为探针筛选出的抗原蛋白, 经免疫学检测证实为具有较高特异性的诊断用抗原^[1], 但其对机体的保护性免疫作用却不尽理想。L-4 主要由 Th2 细胞经抗原刺激后产生, 可以作用于 T 细胞、B 细胞、胸腺细胞、肥大细胞、巨噬细胞等多种靶细胞, 激活 B 细胞产生的抗体主要为 IgG1 和 IgE, 是机体体液免疫的重要调节因子^[2]。我们希望通过 L-4 诱导体液免疫, 促进抗体应答, 进而加强 cC1 抗原的免疫保护作用。作为此项实验的首步工作, 我们通过基因重组技术构建了猪 L-4 与 cC1 抗原融合表达的 DNA 疫苗载体。

材料与方 法

质粒、菌种和试剂

质粒 pUC-cC1 含有 cC1 抗原 cDNA 序列, 质粒 pUC-pL-4 含有猪 L-4cDNA 序列, 质粒 pUC119 和大肠杆菌 DH5 α 均为本实验室保存, 质粒 pcDNA3 购自 Invitrogen 公司; 高保真 Taq 酶: UL Tm aTM DNA polymerase 购自 PE 公司; T4DNA 连接酶及限制性内切酶均购自 Promega 公司; DNA 片断凝胶回收 kit 购自华舜公司。其它试剂均为国产分析纯。

引物

共设计了 2 对 4 条引物。引物 1 含有猪 L-4 信号肽起始密码子 ATG, ATG 侧翼的翻译优化序列 5' CCACCA TGG3', 优化序列上游引入 Hind III 酶切位点; 引物 2 去除了猪 L-4 的终止密码子 TGA, 加上部分中间接头及 BamH I 酶切位点; 引物 3 去除了 cC1 的起始密码子 ATG, 并加上另一部分中间接头及 BamH I 酶切位点; 引物 4 中引入了 EcoR I 酶切位点。

引物 1: 5' CGAA GCTTCCACC ATGGGTCT-CAVV TCCCCACT3'

引物 2: 5' CGGGA TCCGCCGCCA CCA CA CT-TTGAGTA TTTCTCCTTCA3'

引物 3: 5' CGGGA TCCGGTGGCGGTGTTCTGCCTACTGTCGCTCCCTGGTTC3'

引物 4: 5' GCGAA TTCTTA TGCA GGGCC-GA TGAGTTTC3'

引物 1 和引物 3 的划线部分分别与猪 L-4cDNA 和 cC1cDNA 5' 端序列一致。引物 2 和引物 4 的划线部分分别为猪 L-4cDNA 和 cC1cDNA 3' 端序列的互补序列。

PCR 反应

猪 L-4cDNA 的 PCR 扩增条件为: 94 1 m in, 56 40 s, 72 40 s, 30 个循环, 末次反应于 72 保温 10 m in。cC1cDNA 的 PCR 扩增条件为: 94 1 m in, 66 40 s, 72 40 s, 30 个循环, 末次反应于 72 保温 10 m in。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分析, 然后用 DNA 凝胶回收 kit 回收目的条带。

融合表达载体的构建

质粒 DNA 的制备、片段回收、酶切、连接、转化参照文献^[3]进行。

结 果

1 PCR 产物的凝胶电泳鉴定

PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳可见分别在约 0.4 kb 和 1.0 kb 处有特异性扩增条带(图 1)。

2 融合表达质粒的构建与测序

猪 L-4cDNA 的 PCR 扩增产物经 Hind III、BamH I 双酶切后产生一 432 bp 的片段, cC1cDNA 的 PCR 扩增产物经 BamH I、EcoR I 双酶切后产生

— 1 061 bp 的片段, 两段同时定向插入经HindIII和EcoRI双酶切的质粒pcDNA3(图2)。转化子pcL-4cC1经HindIII、BamHI和EcoRI酶切后可见有0.4 kb和1.0 kb的插入片段。将连接转化子经

HindIII酶切, 见一约0.8 kb的片段, 本结果与文献^[2]报道cC1dNA 0.42 kb处有一HindIII酶切位点相符(图3)。对重组子进行测序, 结果显示扩增序列与文献报道和实验设计一致。

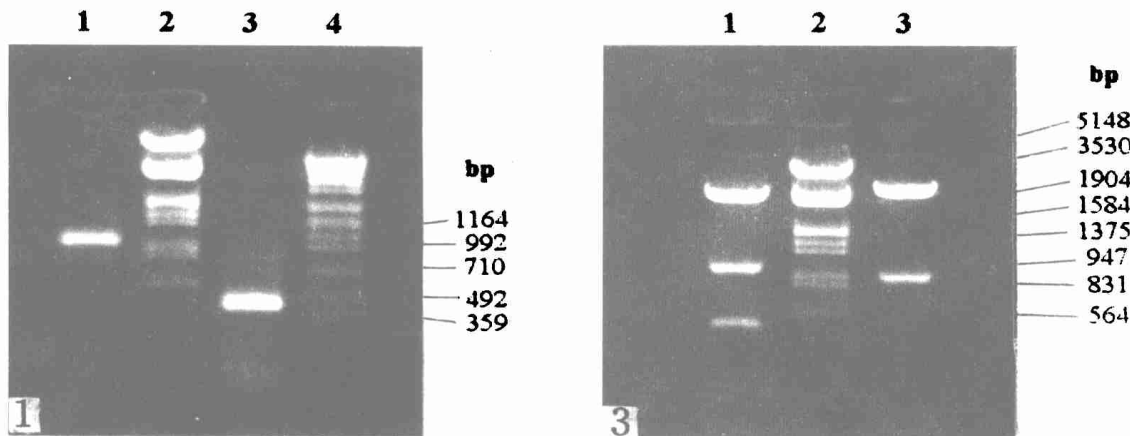


图1 PCR产物的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR product

1 cC1dNA的PCR产物 2 λDNA/EcoRI+HindIII片段长度标准物 3 猪L-4dNA的PCR产物 4 宝灵曼公司VII号片段长度标准物
1 PCR product of cC1dNA 2 λDNA/EcoRI+HindIII 3 PCR product of porcine L-4dNA 4 Marker VII(Boehringer)

图3 重组质粒pcL-4cC1的酶切分析

Fig. 3 Restriction enzyme analysis of recombinant plasmid pcL-4cC1

1 质粒pcL-4cC1的HindIII、EcoRI和BamHI酶切结果 2 λDNA/EcoRI+HindIII片段长度标准物 3 质粒pcL-4cC1的HindIII酶切结果
1 pcL-4cC1/HindIII+ EcoRI+ BamHI 2 λDNA/EcoRI+HindIII 3 pcL-4cC1/HindIII

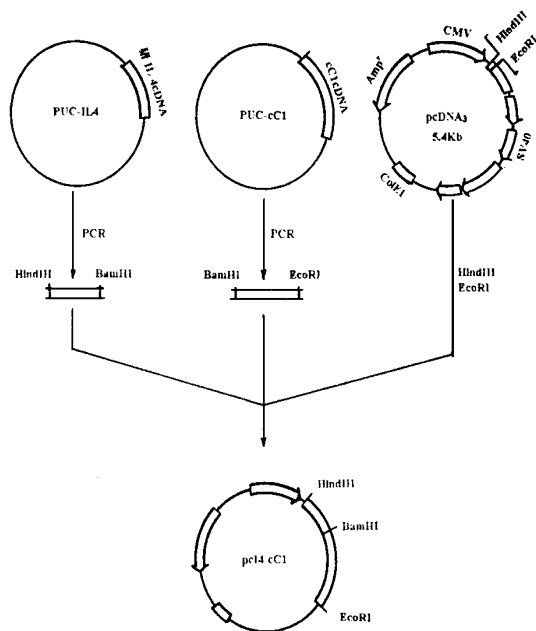


图2 融合表达质粒pcL-4cC1的构建

Fig. 2 Construction of the fusion expression plasmid pcL-4cC1

讨 论

与蠕虫感染有关的嗜酸性细胞、肥大细胞和IgE反应被普遍认为是宿主抵御多细胞寄生虫的一

部分^[4]。而L-4可以刺激肥大细胞和B细胞的增殖, 促进嗜酸性细胞的富集和浸润^[5], 同时L-4还是CD4⁺Th幼稚前体细胞(Thp细胞)分化发育成Th2细胞的重要信号^[6]。有实验表明Th2应答与小鼠对某些蠕虫的驱虫效应和抗再感染密切相关^[7,8], 因此可以推论在抗蠕虫感染以及激发机体免疫保护方面, L-4必定有其重要作用。

Raz等^[9]曾将L-2、L-4插入到RSV LTR表达载体, 以DNA免疫的形式与钥孔蠔血蓝蛋白(KLH)注射小鼠。结果, 注射L-2和L-4表达载体的小鼠抗体应答明显高于对照组, 且L-4有选择性地刺激IgG1的作用, 这说明肌肉注射细胞因子表达载体可以调节机体的细胞或体液免疫。Chow等^[10]利用L-2的免疫佐剂性能构建了乙肝病毒(HBV)前S2、S包膜蛋白和L-2融合表达的DNA疫苗载体, 并发现用融合表达载体免疫后小鼠血清中抗HBs水平是单独用前S2、S包膜蛋白DNA疫苗免疫的2~4倍。在抗蠕虫感染中, 还未见有利用细胞因子的免疫佐剂效应与抗原蛋白融合表达增强其免疫效果的报道。在本课题中, 我们采用含CMV启动子和增强子的真核表达载体, 将重组猪L-4与

猪囊尾蚴保护性抗原 cC1 进行融合, 以融合蛋白形式在体内表达, 可以增加抗原的免疫原性, 通过 L-4 的作用更可促进抗原提呈和抗体应答, 增强机体的保护性免疫效应。

通过基因重组技术将不同的基因人为地连接, 从而表达具有复合功能的融合蛋白, 应尽可能不影响两端蛋白的自然折叠, 以保证其天然活性。在设计接头的过程中, 我们对两端蛋白的构型进行了分析, 采用多个结构简单又不易形成折叠的甘氨酸作为接头。为提高载体的表达量, 根据 Kozak^[11]的研究, 我们将猪 L-4 5'端 AUG 侧翼序列突变为 5'CCAC-CAU GG 3', Kozak 认为此序列是哺乳动物细胞翻译起始的优化序列。修饰优化的重组猪 L-4 与 cC1 融合表达载体的构建, 可为今后以该载体作为 DNA 疫苗进行抗猪囊尾蚴感染的保护性实验奠定基础。

参 考 文 献

- 1 孙树汉, 王俊霞, 陈蕊雯, 等 囊虫病诊断用抗原编码 cDNA 分子克隆 中国寄生虫学与寄生虫病杂志 1997; 15 15~ 20
- 2 周廷冲主编 多肽生长因子基础与临床 第 1 版 北京: 中国科学

技术出版社, 1992: 296~ 316

- 3 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 分子克隆实验指南 第 2 版 北京: 科学出版社, 1995 16~ 69
- 4 Finkelman FD, Pearce EJ, Urban JF, et al Regulation and biological function of helminth induced cytokine responses Parasitology Today 1991; 7 A 62~ A 65
- 5 Mochizuki M, Bartels J, Mallet A I, et al L-4 induces eotaxin: a possible mechanism of selective eosinophil recruitment in helminth infection and atopy. J Immunol 1998; 160 60~ 68
- 6 Pearce EJ, Vasconcelos JP, Brunet LR, et al L-4 in schistosomiasis Exp Parasitol 1996; 84 295~ 299
- 7 Hemanek J, Goyal PK, Wakelin D. Lymphocyte, antibody and cytokine responses during concurrent infections between helminths that selectively promote T-helper-1 or T-helper-2 activity. Parasite Immunology 1994; 16 111~ 117
- 8 Tagboto SK. Interleukin-5, eosinophils and the control of helminth infections in man and laboratory animals J Helminthology 1995; 69 271~ 278
- 9 Raz E, Watanabe A, Baird SM, et al Systemic immunological effects of cytokine genes injected into skeletal muscle. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90 4523~ 4537
- 10 Chow YH, Huang WL, Chi WK, et al Improvement of hepatitis B virus DNA vaccines by plasmids coexpressing hepatitis B surface antigen and interleukin-2 J Virol 1997; 71 169~ 178
- 11 Kozak M. An analysis of vertebrate mRNA sequences: intimations of translational control J Cell Biol 1991; 115 887~ 903

1998 年 7 月 24 日收稿 1998 年 12 月 14 日修回

(编辑: 富秀兰)

CONSTRUCTION OF DNA VACCINE INCLUDING A CHIMERIC GENE ENCODING CYSTICERCUS CELLULOSAE ANTIGEN AND PORCINE INTERLEUKIN-4

WU Dan, GUO Yingjun, SUN Shuhan

Department of Medical Genetics, Second Military Medical University, Shanghai 200433

ABSTRACT

AM: To construct a fusion expression vector for DNA vaccine including porcine interleukin-4 (L-4) and antigen cC1 to enhance the protective immunity of *Cysticercus cellulosae* antigen cC1. **METHODS:** The cDNA fragments encoding porcine L-4 and cC1 were amplified respectively by PCR and then fused. The obtained chimeric gene L-4cC1 contained a synthetic linker of ten amino acids and the sequence surrounding its 5' AUG initiatory codon was changed to optimized translational initiation. **RESULTS:** Identified by restriction enzyme analysis, an insert fragment of 1.5 kb was demonstrated. It had the same sequence as reported and designed by DNA sequencing analysis. **CONCLUSION:** A fusion expression plasmid containing porcine L-4 and cC1 was constructed.

Key Words: Cysticercosis, interleukin-4, gene fusion, DNA vaccine