

· 论著 ·

文章编号: 1007-8738(2013)09-0986-04

表达 HIV-1 gag 蛋白重组乳酸乳球菌株的建立及其在小鼠体内定植的研究

张彩荣, 吴玲玲, 侯向前, 马正海*

(新疆大学生命科学与技术学院, 新疆生物资源基因工程重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830046)

[摘要] 目的 构建表达 HIV-1 gag 的重组乳酸乳球菌, 并分析重组菌在小鼠体内的定植情况。方法 将 HIV-1 gag 克隆至原核表达质粒 pMG36e, 重组质粒 pMG36e-gag 电转乳酸乳球菌, SDS-PAGE 和 Western blot 法检测其在乳酸乳球菌中的表达。以 10^9 个重组菌给小鼠口服, 对照组口服 PBS。口服后第 1、3、5、7、9、11 天分别取小鼠的胃、小肠和大肠, 采用稀释滴种法测定小鼠胃、肠道内重组菌的数量。结果 酶切和 DNA 测序表明 gag 已克隆入 pMG36e。SDS-PAGE 在预期位置检测到蛋白条带, Western blot 分析证实其为 gag 蛋白。重组菌定植实验表明, 第 1、3 天在胃肠均有一定量重组菌, 且大肠中重组菌数量多于胃和小肠, 随后胃肠中重组菌均迅速减少, 仅在大肠中仍有一定量的重组菌, 第 11 天时胃肠仅分离到极少量的重组菌。结论 本研究获得胞内表达 HIV-1 gag 前体蛋白 Pr55 的重组乳酸乳球菌, 其可在胃肠中短期存活, 可作为预防 HIV-1 感染的候选疫苗。

[关键词] 乳酸乳球菌; HIV-1; gag; 定植; 黏膜免疫

[中图分类号] Q793, R392-33, R512.91 **[文献标志码]** A

Construction of the recombinant *Lactococcus lactis* expressing HIV-1 gag protein and its colonization in mice

ZHANG Cairong, WU Lingling, HOU Xiangqian, MA Zhenghai*

Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering, College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China

[Abstract] **Objective** To construct the recombinant *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) expressing HIV-1 gag and research its colonization in mice. **Methods** HIV-1 gag was cloned into prokaryotic expression plasmid pMG36e, then the recombinant plasmid (pMG36e-gag) was electrotransformed into *L. lactis*. The expression of gag in *L. lactis* was analyzed by SDS-PAGE and Western blotting, respectively. The experimental mice were administrated orally with the 1×10^9 *L. lactis*, and the control mice with PBS instead. At 1, 3, 5, 7, 9 and 11 d after administration, the mice were sacrificed, and then the stomach, small intestine and large intestine were taken from each mouse. The *L. lactis* number of colonization in these tissues were assayed by means of diluting and dripping. **Results** Restriction endonuclease analysis and DNA sequencing confirmed that gag had been cloned into the plasmid pMG36e. SDS-PAGE and Western blotting identified the gag antigen in *L. lactis* as we expected. At 1 and 3 d, there were some colonized recombinant *L. lactis* in the stomach and intestine, and the number of *L. lactis* colonized in the large intestine was higher than that in the stomach and small intestine. Thereafter, the number of *L. lactis* was rapidly reduced in the stomach and intestine, and finally only in large intestine a few still existed. At 11 d, only a few recombinant *L. lactis* was isolated from the stomach and intestine. **Conclusion** The recombinant *L. lactis* expressing HIV-1 gag precursor protein (Pr55) was constructed, and it can survive for a short time in the stomach and intestine, so it could act as a candidate vaccine to prevent HIV-1 infection.

[Key words] *Lactococcus lactis*; HIV-1; gag; colonization; mucosal immune

乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis*) 是人和动物胃肠道常见菌, 已用于发酵和食品工业, 被公认为食品级

微生物。乳酸乳球菌不具有侵染性和致病性, 经过修饰的乳酸乳球菌能够将外源蛋白有效地递呈给宿

收稿日期: 2013-03-19; 接受日期: 2013-06-10

基金项目: 新疆维吾尔自治区高技术研究发展项目 (2010016)

作者简介: 张彩荣 (1986-), 女, 陕西汉中, 硕士研究生

Tel: 13629911043; E-mail: zhangcairong1213@126.com

* Corresponding author, 马正海, E-mail: mzhxju@126.com

主黏膜免疫系统并激发免疫反应^[1],是一种安全性极高的细菌疫苗载体。*gag* 编码 HIV 的核心蛋白,其氨基酸序列相对保守,抗原变异较少,含有中和抗体的抗原决定簇,能够刺激机体产生病毒特异性细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)反应^[2-3],是研制艾滋病疫苗的重要靶分子。目前,*gag* 的核酸疫苗、痘病毒载体疫苗和腺病毒载体疫苗等多种形式的疫苗已见报道^[4-7]。本研究获得表达 HIV-1 *gag* 的乳酸乳球菌,并检测该重组菌在小鼠体内的定植情况,以期获得安全性高的细菌载体疫苗。

1 材料和方法

1.1 材料 大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 、乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*) NZ3900 均为本实验室保存,鼠源抗 HIV-1 P24 多克隆抗体及重组质粒 pMTBiP/His/*gag* 由上海巴斯德研究所周保罗研究员惠赠,带有红霉素抗性基因的质粒 pMG36e 购自长沙赢润生物技术有限公司。琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、*Taq* DNA 聚合酶、质粒小提试剂盒均购自 TIAN-GEN 公司;T4 DNA 连接酶、各种限制性内切酶购自 TaKaRa 公司;DNA marker、蛋白质相对分子质量(M_r) marker 购自北京全式金生物技术有限公司;蛋白预染 M_r marker 购自 Fermentas 公司;山羊抗小鼠二抗购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司;其他试剂均为国产分析纯。雌性昆明小白鼠(6~8 周龄)购自新疆医科大学实验动物中心。

1.2 方法

1.2.1 HIV-1 *gag* 重组质粒的构建 *Nco* I 酶切质粒 pMT-BiP/His/*gag*, 获得的线性化 DNA 片段经 Klenow 大片段补平,继后用 *Xba* I 酶切处理该片段,回收 1 600 bp DNA 片段,该片段与 pMG36e 的 *Sma* I/*Xba* I 双酶切片经 T4 DNA 连接酶连接,连接产物直接转化。转化获得的单克隆在 LB 液体培养基中过夜增菌培养。

1.2.2 重组质粒的鉴定 根据载体 pMG36e 多克隆位点的序列设计 1 对引物(PMGPI: 5'-CAATCTGCCCTCCTCATCCTC-3', PMGP2: 5'-CCGGTCATCACTACCAATTC-3'),并根据 *gag* 基因两侧序列设计 1 对引物(P1: 5'-AGATATCCACCATGGT-CGGAGAGCG-3', P2: 5'-AGTGGATCCTTATTGTGACGA-3'),引物由 TaKaRa 公司合成。菌液 PCR 鉴定 1.2.1 中转化克隆的培养物,扩增参数为:95 $^{\circ}$ C 5 min, 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 30 个循环,72 $^{\circ}$ C 7 min, 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。阳性克隆增菌培养后大量提取重组质粒,经酶切和 DNA 测序鉴定其正确。

1.2.3 重组质粒电穿孔转化乳酸乳球菌 按照文献[8-9]的方法制备乳酸乳球菌感受态细胞,电击参数为:2 kV, 25 F, 200 Ω , 脉冲时间 4.5~5.0 ms, 于 30 $^{\circ}$ C SGM17 培养基(含 0.5 mmol/L 蔗糖、5 g/L 葡萄糖、2 mmol/L CaCl₂ 和 20 mmol/L MgCl₂ 的 M17 培养基)中,恢复培养 2 h。取 200 μ L 培养物涂布于含 10 μ g/mL 红霉素和一定量溴甲酚紫的 EM 培养基平

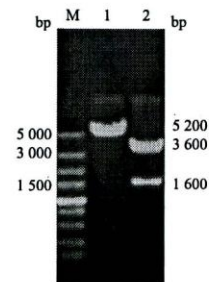
板上,30 $^{\circ}$ C 培养 24~72 h,挑取转化菌落于含 10 μ g/mL 红霉素的 GM17 培养基中增殖培养过夜,按任志娟等^[10]的方法提取质粒,PCR 筛选重组质粒,PCR 扩增参数同 1.2.2。

1.2.4 *gag* 在重组菌中的表达与鉴定 筛选获得的重组乳酸乳球菌在含红霉素的 GM17 培养基中 30 $^{\circ}$ C 过夜培养,离心(4 $^{\circ}$ C, 12 000 r/min, 5 min)收集细菌细胞;PBS 重悬细菌细胞后离心(4 $^{\circ}$ C, 12 000 r/min, 3 min)收集细菌细胞,重复 3 次;用细胞裂解液(1 mol/L PMSF, 1 g/L 溶菌酶, 100 mL/L Triton-X 100)重悬细菌细胞,37 $^{\circ}$ C 条件下于摇床中处理 2 h;超声裂解细菌细胞,取 100 μ L 细菌细胞裂解液按常规方法进行 SDS-PAGE 和染色。蛋白条带电转移至硝酸纤维素膜进行 Western blot 法检测,小鼠抗 HIV-P24(HIV-*gag*)抗体(1:1 000 稀释),室温孵育 1.5 h,辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG(1:3 000 稀释),室温孵育 1 h, DAB 避光显色并拍照。

1.2.5 重组乳酸乳球菌在小鼠体内的定植 用于定植研究的重组乳酸乳球菌于实验前 1 d 在 GM17 培养基中过夜培养,离心收集菌后用灭菌的 PBS 缓冲液洗 2 次,根据需要调整细菌细胞密度。以 10⁹ 个重组乳酸乳球菌口服接种 12 只 6~8 周龄昆明小白鼠,同时以口服 PBS 的小鼠为对照组。实验组和对照组分别于口服后 1、3、5、7、9、11 d 引颈处死 2 只小鼠,分别取小鼠的胃、小肠和大肠,称重,研磨后用灭菌 PBS 按 100 g/L 稀释^[11]。取 100 μ L 样品稀释液涂布含有红霉素的 EM 培养平板,置于 30 $^{\circ}$ C 培养箱中过夜培养,培养 2 d 后计数,每个样做 3 个重复。

2 结果

2.1 重组质粒 pMG36e-*gag* 的构建及鉴定 重组质粒经 *Xba* I 单酶切获得大小约为 5 200 bp 的 DNA 片段,经 *Sma* I 和 *Xba* I 双酶切获得大小约为 3 600 bp 和 1 600 bp 的 DNA 片段,与预期相符(图 1)。

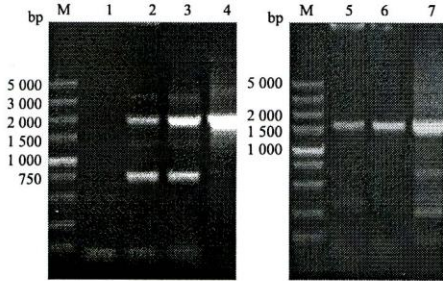


M: DL5000 DNA marker; 1: *Xba* I 单酶切鉴定; 2: *Sma* I 和 *Xba* I 双酶切鉴定。

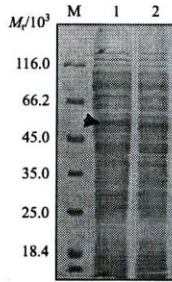
图 1 重组质粒 pMG36e-*gag* 的酶切分析

2.2 重组乳酸乳球菌的筛选及鉴定 提取转化菌株质粒 DNA 并进行 PCR 鉴定,第 1 对引物(PMGPI/PMGP2)和第 2 对引物(P1/P2)分别扩增得到约为 2 100 bp 和 1 600 bp 的 DNA 片段,与预计相符(图 2)。

2.3 乳酸乳球菌中 HIV-1 衣壳蛋白的表达 SDS-PAGE 检测结果表明, 重组菌中新增相对分子质量 (M_r) 约为 55 000 的蛋白条带, 与预期的 gag 蛋白大小相符 (图 3)。Western blot 结果表明 HIV-P24 抗体可特异性识别该蛋白 (图 4)。

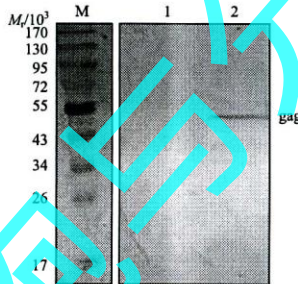


M: DL5000 DNA marker; 1: 阴性对照; 2-3: 以 PMGP1/ PMGP2 为引物的扩增产物; 5-6: 以 P1/ P2 为引物的扩增产物; 4, 7: 阳性对照。
图 2 PCR 扩增乳酸乳球菌表达载体 pMG36e-gag 中 HIV-gag 基因



M: 蛋白 M_r marker; 1: 重组乳酸乳球菌; 2: 含 pMG36e 空载的乳酸乳球菌。箭头处为目的蛋白。

图 3 重组乳酸菌中 HIV-1 gag 蛋白的 SDS-PAGE 鉴定



M: 蛋白 M_r marker; 1: 含 pMG36e 空载的乳酸乳球菌; 2: 重组乳酸乳球菌。

图 4 重组乳酸菌 HIV-1 gag 蛋白的 Western blot 分析

2.4 重组乳酸乳球菌在小鼠体内的定植 重组乳酸乳球菌在小鼠体内定植实验的结果见表 1。就实验中平行的 2 只小鼠分离重组菌的数量而言, 个体间差异较大, 但总体而言, 小鼠口服重组菌后, 第 1 天和第 3 天在胃、小肠和大肠中均有一定量的重组菌, 且大肠中重组菌的数量多于胃和小肠; 随时间延长,

胃肠中的重组菌均迅速减少, 第 5、第 7 和第 9 天在大肠中仍有一定量的重组菌, 第 9 天时大肠中重组菌的数量有所增加, 而胃和小肠中仅有少量重组菌, 第 11 天 3 种组织仅分离到极少量的重组菌。

表 1 重组乳酸乳球菌在小鼠体内的定植

时间(d)	胃		小肠		大肠	
	实验组	对照组	实验组	对照组	实验组	对照组
1	231	0	693	0	1515	2
	537	0	529	2	501	6
3	493	0	131	0	397	4
	83	55	331	0	738	8
5	89	2	97	2	138	3
	2	13	0	5	42	4
7	0	2	13	5	181	4
	12	1	3	0	33	2
9	0	0	4	2	406	5
	24	5	113	25	752	3
11	50	4	23	10	50	0
	13	3	2	1	20	4

3 讨论

自 1981 年发现 AIDS 以来, 该病已成为全球面临的重大公共卫生问题。目前, AIDS 的亚单位疫苗、DNA 疫苗、合成多肽疫苗、病毒样颗粒疫苗、多种病毒和细菌活载体疫苗以及不同类型疫苗联合使用的免疫策略等都被广泛用于 HIV 疫苗的研究中, 以期诱导产生广谱的中和抗体和 CTL 免疫应答, 从而有效清除体内的病毒及被病毒感染的细胞^[12-13], HIV Ad5 疫苗的研究结果提示有效的艾滋病疫苗在诱发保护性体液免疫和细胞免疫反应的同时还需要诱导有效的黏膜免疫^[14]。本文选择乳酸乳球菌作为疫苗载体, 构建能够表达 HIV-1 gag 的乳酸乳球菌, 以期获得能激发黏膜免疫反应的 HIV 疫苗。

本研究将 HIV-1 gag 基因构建至 pMG36e 载体, HIV-1 gag 以融合蛋白的形式表达, 由于不含信号肽, 表达的融合蛋白会在细胞内累积。研究中仅在重组乳酸乳球菌菌体沉淀中检测到 gag, 而重组菌培养物上清中未能检测到 gag, 也说明 gag 仅在菌体内表达。Akinobu 等^[15]以表达 HIV-1gag 蛋白的重组乳酸杆菌口服免疫小鼠, 激发小鼠产生特异性黏膜免疫反应。Elisa 等^[16]构建胞内表达肺炎双球菌抗原的重组乳酸乳球菌, 滴鼻免疫诱导小鼠产生黏膜免疫反应及系统免疫反应, 免疫反应在第 3 次免疫后持续 45 d。研究中 SDS-PAGE 的结果表明 gag 以前体蛋白 Pr55 的形式表达, Western blot 证实其可被 HIV-p24 抗体识别, 说明表达的 gag 蛋白具有免疫原性。已有学者用昆虫细胞表达的前体蛋白 Pr55^[17]免疫小

鼠, 可诱发机体产生 HIV-1 特异性的免疫反应。这为后续探讨该重组乳酸乳球菌的免疫效果奠定了基础。

本研究以口服红霉素抗性重组菌的小鼠为研究对象进行乳酸乳球菌定植实验, 选用乳酸乳球菌的选择性培养基检测小鼠胃肠中定植菌的数量, 且对照组小鼠仅分离到极少量的细菌, 以上确保了定植实验结果真实性。重组菌定植实验表明, 在胃肠第 1 天和第 3 日均有一定量的重组菌, 且大肠中重组菌数量多于胃和小肠, 随后重组菌均迅速减少, 仅在大肠中仍有一定量的重组菌, 第 11 天时胃肠中仅分离到极少量的重组菌, 表明该重组菌不能在胃肠中长期定植。唐丽杰等的研究表明乳酸乳球菌 NZ9000 在口服后第 1 天, 小鼠回肠及结肠黏膜表面检测到的阳性细胞数较多, 但随着时间的延长, 在第 7 天时存留在肠道黏膜表面的阳性细胞数都明显下降^[18], 这与我们研究结果相符。定植实验中发现, 平行的两只小鼠在同一时间点相同组织中分离重组菌的数量会因个体间差异而相差数倍, 这种个体差异可能也是导致大肠中第 7 天和第 9 天的重组菌数量多于第 5 天的原因。

本研究获得胞内表达 HIV-1 gag 前体蛋白 Pr55 的重组乳酸乳球菌, 小鼠口服该重组菌后, 其可在胃肠中短期存活。已有研究表明, 乳酸乳球菌虽然不能于胃肠中长期定植, 但其本身不具侵袭性、致病性, 反而具有佐剂效应, 能诱导黏膜免疫及系统免疫反应^[19]。所以其可作为预防 HIV-1 感染的候选疫苗, 后续的研究也将探讨该重组菌诱导免疫反应的能力。

参考文献:

- [1] Bahey-El-Din M. Lactococcus lactis-based vaccines from laboratory bench to human use: An overview[J]. Vaccine, 2012, 30(4): 685-690.
- [2] Kanagavelu SK, Snarsky V, Termini JM, et al. Soluble multi-trimeric TNF superfamily ligand adjuvants enhance immune responses to a HIV-1 gag DNA vaccine[J]. Vaccine, 2012, 30(4): 691-702.
- [3] Stephenson KE, Li H, Walker BD, et al. gag-specific cellular immunity determines *in vitro* viral inhibition and *in vivo* virologic control following simian immunodeficiency virus challenges of vaccinated rhesus monkeys[J]. J Virol, 2012, 86(18): 9583-9589.
- [4] Mehendale S, Thakar M, Sahay S, et al. Safety and immunogenicity of DNA and MVA HIV-1 subtype C vaccine prime-boost regimens: A phase I randomised trial in HIV-uninfected Indian volunteers [J/OA]. PLoS One, 2013, 8(2): e55831.
- [5] Barouch DH, Liu J, Li H, et al. Vaccine protection against acquisition of neutralization-resistant SIV challenges in rhesus monkeys[J]. Nature, 2012, 482(7383): 89-93.
- [6] Tomo N, Goto T, Morikawa Y. Trans-packaging of human immunodeficiency virus type 1 genome into gag virus-like particles in *Saccharomyces cerevisiae*[J/OA]. Microb Cell Fact, 2013, 12(1): 28.
- [7] Lai L, Kwa SF, Kozlowski PA, et al. SIVmac239 MVA vaccine with and without a DNA prime, similar prevention of infection by a repeated dose SIVsmE660 challenge despite different immune responses [J]. Vaccine, 2012, 30(9): 1737-1745.
- [8] 孙大庆, 姜毓君. 乳酸乳球菌高效电转化的方法[J]. 中国乳品工业, 2010, 38(7): 22-24.
- [9] 张玉兰, 柯晓静. 利用组成型表达载体 pMG36e 电转化乳酸乳球菌 ML23 的研究[J]. 河北农业大学学报, 2010, 33(4): 71-76.
- [10] 任志娟, 李铁杰, 马正海. 乳酸乳球菌质粒提取方法的改进与优化[J]. 新疆农业科学, 2011, 48(4): 734-738.
- [11] Kimura NT, Taniguchi S, Aoki K, et al. Selective localization and growth of *Bifidobacterium bifidum* in mouse tumors following intravenous administration[J]. Cancer Res, 1980, 40(6): 2061-2068.
- [12] Go EP, Hewawasam GS, Ma BJ, et al. Methods development for analysis of partially deglycosylated proteins and application to an HIV envelope protein vaccine candidate[J]. Int J Mass Spectrom, 2011, 305(2-3): 209-216.
- [13] Burton DR, Ahmed R, Barouch DH, et al. A Blueprint for HIV Vaccine Discovery[J]. Cell Host Microbe, 2012, 12(4): 396-407.
- [14] 邵继平, 姜世勃, 刘叔文. 基于 gp41 的 HIV 亚单位疫苗研究进展[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2011, 27(9): 1047-1051.
- [15] Kajikawa A, Zhang L, Long J, et al. Construction and immunological evaluation of dual cell surface display of HIV-1 gag and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium FliC in *Lactobacillus acidophilus* for vaccine delivery [J]. Clin Vaccine Immunol, 2012, 19(9): 1374-1381.
- [16] Vintiñi EO, Medina MS. Host immunity in the protective response to nasal immunization with a pneumococcal antigen associated to live and heat-killed *Lactobacillus casei*[J/OA]. BMC Immunol, 2011, 12: 46.
- [17] Tagliamonte M, Visciano ML, Tornesello ML, et al. HIV-gag VLPs presenting trimeric HIV-1 gp140 spikes constitutively expressed in stable double transfected insect cell line[J]. Vaccine, 2011, (29): 4913-4922.
- [18] 唐丽杰, 徐毅刚, 葛俊伟, 等. 乳酸乳球菌 NZ9000 在小鼠体内的定植研究[J]. 中国乳品工业, 2007, (35)7: 11-12.
- [19] Berlec A, Malovrh T, Zadavec P, et al. Expression of a hepatitis A virus antigen in *Lactococcus lactis* and *Escherichia coli* and evaluation of its immunogenicity [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2013, 97(10): 4333-4342.