论著

文章编号:1000-5404(2005)01-0024-04

βhCG-CTP/pcDNA3重组真核表达载体的构建及表达

张 力,吴玉章 (第三军医大学基础医学部全军免疫学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 克隆并表达βhCG-CTP基因片端,探讨采用βhCG-CTP基因片段免疫小鼠进行免疫避孕的可能性。**方法** 采用化学合成法得到含有βhCG-CTP基因片段,亚克隆至真核表达载体pcDNA3中,然后转化大肠杆菌DH5α,利用脂质体介导将pcDNA3/βhCG-CTP重组质粒表达载体转染到COS-7细胞,免疫组化法检测βhCG-CTP基因在哺乳动物细胞中的表达情况。**结果** 重组质粒经*Eco*RⅠ、*Bam*HⅠ双酶切和测序证实插入序列与预期设计完全一致;利用脂质体介导将pcDNA3/βhCG-CTP重组质粒表达载体导入COS-7细胞,获得了βhCG-CTP的瞬时表达。**结论** 成功构建了βhCG-CTP真核表达载体pcDNA3/βhCG-CTP,该载体能在哺乳动物细胞中正确表达,表达产物βhCG-CTP能够被抗βhCG抗体所识别。

关键词: 人绒毛膜促性腺激素β亚基羧基末端37肽;重组真核表达质粒

中图法分类号: Q782; R392.11; R394-33 **文献标识码:** A

Construction and eukaryotic expression of recombinant plasmid βhCG-CTP/pcDNA3

ZHANG Li, WU Yu-zhang (Institute of Immunology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To clone and express the gene fragment of human chorionic gonadotrophin-β carboxyl terminal peptide (βhCG-CTP) and to explore the possibility of mouse immunocontraception with βhCG-CTP gene fragment. **Methods** βhCG-CTP gene fragment was chemically synthesized. βhCG-CTP DNA fragment was digested with *Eco*RⅠ and *Bam*HⅠ together, and then ligated to eukaryotic expression vector pcDNA3 which was also digested under the same condition. Product of ligation reaction was transformed into *Escherichia coli* DH5α. Recombinant plasmid pcDNA3/βhCG-CTP was then transfected into COS-7 cells with liposome. The expression of βhCG-CTP gene fragment in mammalian animal cells was detected by immunohistochemistry. **Results** Double restriction enzyme digestion and subsequent sequencing of recombinant plasmids confirmed the correctness of the recombinant plasmids. Recombinant plasmid pcDNA3/βhCG-CTP was transfected into COS-7 cells with liposome, and transient expression of βhCG-CTP protein was obtained. **Conclusion** Recombinant plasmid pcDNA3/βhCG-CTP which can express βhCG-CTP gene in mammalian animal cells has been constructed correctly. The expressed product βhCG-CTP can be recognized by antibody against βhCG.

Key words: human chorionic gonadotrophin-β carboxyl terminal peptide; pcDNA3/βhCG-CTP recombinant plasmid

基因疫苗是当前研究的热点[1,2]。所谓基因疫苗,就是把外源基因克隆到真核表达质粒载体上,然后将重组的质粒DNA直接注射到动物体内,使外源基因在活体内表达,产生的抗原激活机体的免疫系统,引发免疫反应[3]。人绒毛膜促性腺激素β亚基(human chorionic gonadotrophin β subunit, hCGβ)是一种理想的避孕疫苗的靶抗原,而hCGβ亚基羧基端109~145残基组成的37肽(human chorionic gonadotrophin-β carboxyl terminal peptides, βhCG-CTP)是hCG分子所特有的片段,并存在hCG的特异表位,其抗体具有更好的hCG抗原特异性,不会与促黄体生成激素(luteinizing hormone, LH)发生交叉反应。采用抗βhCG羧基末端37肽单克隆抗体可以进一步提高hCG检测的敏感性和特异性并为避孕疫苗的研制奠定基础。为了探讨使用基因疫苗这种新型的免疫方法来进行免疫避孕的可能性,我们选用编码βhCG-CTP cDNA序列,并克隆到真核表达载体pcDNA3,构建重组质粒pcDNA3/βhCG-CTP,证明在真核系统可以表达。这为hCG避孕疫苗的研制提供了线索;同时,也为利用基因疫苗方法制备单克隆抗体奠定了实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 载体与工程细胞 质粒pcDNA3、大肠杆菌DH5α及COS-7细胞株由云南大学单克隆抗体工程技术中心提供。

1.1.2 主要试剂 限制性核酸内切酶*Eco*RⅠ、*Bam*HⅠ及T4DNA连接酶:BioLabs公司;PCR体系:宝生物(大连)有限公

作者简介:张 力(1965-),女,云南省昆明市人,硕士研究生,主治医师,主要从事妇科肿瘤免疫方面的研究,发表论文5篇,现在成都军区昆明总医院妇产科。电话:(0871)4074716

通讯作者:吴玉章,电话:(023)68752680

收稿日期:2004-07-28;修回日期:2004-10-13

司；小量及大量质粒提取纯化试剂盒、胶回收试剂盒：QIAGEN 公司；琼脂糖、氨苄青霉素：购自基因有限公司；Lipofectin 2000 Regent：GIBCO 公司；酶联羊抗兔 IgG(HRP-GARIgG)、酶联羊抗鼠 IgG(HRP-GAMIgG)、Avidin-HRP、：Pierce 公司产品；邻苯二胺(OPD)、DAB：Sigma 公司产品；牛血清白蛋白(BSA)：Randox 公司产品；兔抗 hCG 多克隆抗体：本实验室自制。

1.2　方法

1.2.1　重组质粒 pcDNA3/βhCG-CTP 的构建与鉴定　　见图 1。

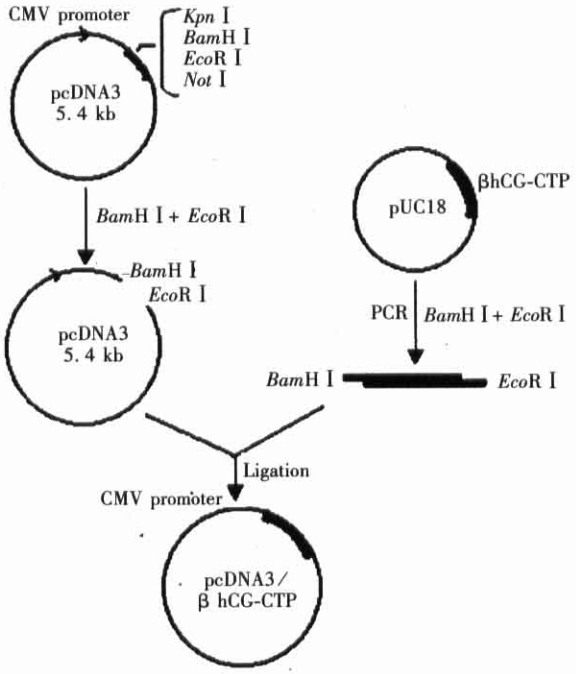


图 1　pcDNA3/βhCG-CTP 表达载体的构建流程

Fig 1　Construction of expression plasmid pcDNA3/βhCG-CTP

1.2.1.1　目的序列的人工合成　　根据 Genebank 报道的 βhCG cDNA 序列，由宝生物公司合成编码 βhCG 羧基端 109～145 残基的基因片段，并克隆到 pUC18 载体上。基因片段全长 117 bp。

1.2.1.2　PCR 扩增目的片段　　以合成的含有 βhCG-CTP DNA 片段的 pUC18 质粒为模板，PCR 扩增 βhCG-CTP DNA 片段。设计一对引物 P1/P2，其中 P1 引入 *Eco*R Ⅰ酶切位点、启始密码子 ATG 及相应保护碱基；P2 引入 *Bam*H Ⅰ酶切位点及相应保护碱基，使 PCR 扩增的目的 DNA 片段两端分别带有 *Eco*R Ⅰ和 *Bam*H Ⅰ酶切位点及起始密码子，用于与真核表达载体 pcDNA3 的连接。

P1：5′-CGGATCC ATG GGTACCGATTCGAGACTG-3′

P2：5′-CG GAATTC TTA TTGTGGGAGGAATAGAG-3′

其中，带下划线部分分别为 *Eco*R Ⅰ和 *Bam*H Ⅰ酶切位点，阴影部分为保护碱基，带方框部分分别为起始密码和终止密码。

PCR 体系(25 μl 体系)：

10× PCR Buffer	2.5 μl
dNTP Mixture	2 μl
模板	1 μl
引物 1	2 μl
引物 2	2 μl
Taq	0.2 μl
水	15.5μl

扩增条件：94 ℃，2 min

↓

94 ℃，30 s

↙　↖

55 ℃，30 s —30 cycles→ 72 ℃，1 min ——→ 72 ℃，10 min

1.2.1.3　PCR 产物的回收及纯化　　参照试剂盒操作说明。

1.2.1.4　酶切目的片段与 pcDNA3　　分别用 *Eco*R Ⅰ、*Bam*H Ⅰ双酶切质粒 pcDNA3 及目的基因片段。

1.2.1.5　目的片段与 pcDNA3 的连接　　采用 T4DNA 连接酶将经酶切的目的片段及经相同酶切的质粒载体 pcDNA3 连接。

1.2.1.6　转化　　将连接产物转化大肠杆菌 DH5α，在含有氨苄青霉素的 LB 培养基中培养 16 h。

1.2.1.7　重组质粒 pcDNA3/βhCG-CTP 的鉴定　　分别用 *Eco*R Ⅰ、*Bam*H Ⅰ双酶切所提取的重组质粒，取 5 μl 酶切反应液以 1%琼脂糖凝胶电泳初步判定重组质粒构建是否正确。之后将经酶切鉴定构建正确的重组质粒进行测序，用 T7 引物进行核苷酸序列测定。测序工作由宝生物(大连)有限公司完成。

1.2.2　重组质粒在体外哺乳动物细胞中的表达与检测

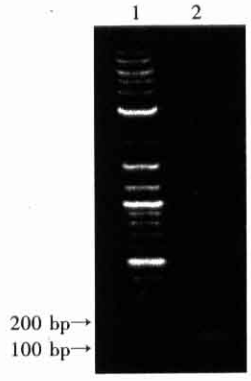
1.2.2.1　重组质粒 pcDNA3/βhCG-CTP 通过脂质体转染 COS-7 细胞　　具体操作参考文献[4]。

1.2.2.2　组织化学法检测转染细胞 βhCG-CTP 蛋白的表达　　以封闭液(含 1% BSA 的 0.05% Tween-20-PBS 溶液)按 1∶100 稀释兔抗 hCG 多抗，并设阴性对照孔(不加 hCG 多抗)。具体操作参考文献[5]。

2　结果

2.1　重组质粒 pcDNA3/βhCG-CTP 的构建与鉴定

2.1.1　βhCG-CTP 序列的 PCR 产物　　PCR 扩增产物在 2%琼脂糖凝胶电泳图谱上呈现一条与分子量吻合的主条带，该片段位于 100 bp 与 200 bp DNA marker 之间(图 2)，推断所得产物为 βhCG-CTP DNA 片段(117 bp)。



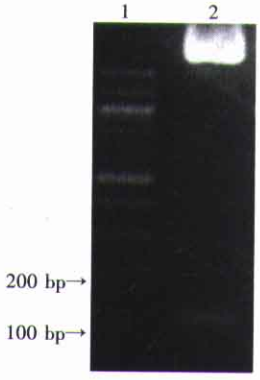
1：2-Log DNA marker；2：PCR product

图 2　PCR 产物电泳结果

Fig 2　Agrose gel electrophoresis of PCR product

2.1.2 PCR产物在pcDNA3中的定向克隆及鉴定 结果表明，感受态细菌状态良好，pcDNA3与目的基因βhCG-CTP连接效果很好，自连比率极低，重组质粒转化成功。

2.1.3 重组质粒pcDNA3/βhCG-CTP的双酶切及测序鉴定 经1%琼脂糖凝胶电泳，电泳图谱呈现大小相应于载体质粒pcDNA3的条带和相应于βhCG-CTP DNA片段的条带(图3)，表明βhCG-CTP cDNA已克隆入载体pcDNA3中。对所得重组质粒进行测序证实插入片段的序列与预期的βhCG-CTP DNA片段序列完全一致，插入位置及方向都正确。



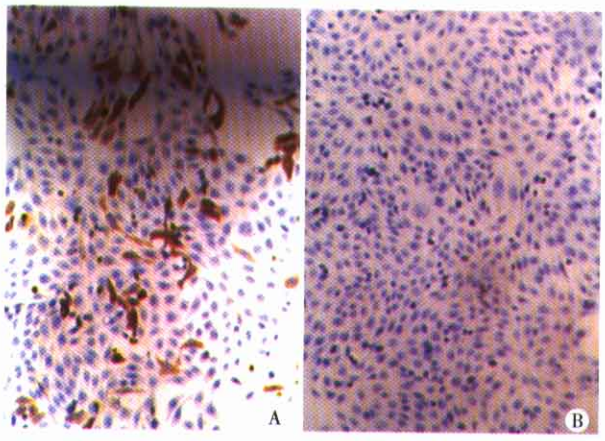
1: DNA marker (1 000 bp); 2: pcDNA3/βhCG-CTP digested with *Eco*RⅠ and *Bam*HⅠ

图3 重组真核表达质粒pcDNA3/βhCG-CTP酶切鉴定

Fig 3 Restriction enzyme digestion of the recombinant plasmid

2.2 重组质粒在体外哺乳动物细胞中的表达与检测

将重组质粒pcDNA3/βhCG-CTP通过脂质体转染至COS-7细胞，然后用免疫组织(细胞)化学法检测转染细胞βhCG-CTP蛋白的表达。pcDNA3/βhCG-CTP转染COS-7细胞48 h后，细胞组化检测发现，COS-7细胞胞质中可见明显的棕色物质(图4)。表明pcDNA3/βhCG-CTP片段在COS-7细胞中得到了有效表达。



A: Brown substance could been seen in the COS-7 cells transfected with pcDNA3-βhCG-CTP, but not in the cytoplasm of the untransfected cells; B: Brown substance could not been seen in the COS-7 cells transfected with pcDNA3

图4 βhCG-CTP片段转染COS-7细胞结果 (免疫组化×100)

Fig 4 βhCG-CTP fragment expression in transfected COS-7 cells (Immunohistochemical staining×100)

3 讨论

目前避孕疫苗的抗原研究主要集中在3类靶抗原上，即激素抗原、透明带抗原和精子抗原。其中对激素抗原的研究较为深入，现已进入临床实验阶段的6种抗原都是激素抗原：3种hCG疫苗，2种促黄体激素释放激素疫苗，1种卵泡刺激素(follicle-stimulating hormone, FSH)疫苗。hCG疫苗是近年来研究得最为成熟的1种，已发展到了DNA疫苗阶段[6]。

本研究试图采用基因免疫法这种新型的免疫方法来制备针对βhCG-CTP的单克隆抗体，以达到免疫避孕的目的。基因疫苗的实质是抗原编码基因及载体的质粒DNA组成。通过注射或粒子轰击等途径将基因疫苗导入活体后，目的基因可在活体细胞中合成抗原蛋白，经过适当的加工和递呈过程，从而引起机体免疫反应[7]。利用基因免疫法制备抗体，它不需要制备大量抗原，只需将编码抗原的cDNA克隆至真核表达载体上，用重组质粒进行免疫，免疫动物即可产生针对该抗原的抗体[8~10]。于是我们考虑利用基因免疫法，只选用编码抗原特异表位的序列与真核表达载体相连构建基因疫苗，以此重组质粒免疫小鼠，则可以获得针对该特异抗原表位的单克隆抗体，可克服蛋白免疫法难以获得针对某一特异表位单克隆抗体的缺陷。为探讨利用基因免疫法制备单克隆抗体以及使用βhCG-CTP的基因片段研制hCG基因避孕疫苗的可能性，本研究应用分子生物学技术，将含有编码βhCG-CTP的cDNA(117 bp)序列插入真核表达载体pcDNA3中，构建重组质粒pcDNA3/βhCG-CTP。重组质粒经相应酶切鉴定，得到了约110 bp的DNA片段，DNA测序证实，整个插入片段读码框架正确，内无提前出现的终止密码，成功地构建了真核表达载体pcDNA3/βhCG-CTP[11~14]。一般来说，基因转移的载体以真核表达质粒为主。通常，表达载体表达抗原蛋白的能力越强，诱发宿主产生的免疫应答越强(并非线性关系)。其表达能力的大小取决于许多因素，包括载体所含启动子/增强子的强弱，以及许多增强表达的辅助成分等等。

在成功地构建了重组质粒pcDNA3/βhCG-CTP之后，我们将重组质粒pcDNA3/βhCG-CTP通过脂质体转染至COS-7细胞中以检测βhCG-CTP基因在哺乳动物细胞中的表达情况。其结果表明将重组质粒pcDNA3/βhCG-CTP转染至COS-7细胞后获得了有效表达，表达产物βhCG-CTP能够被抗βhCG抗体所识别。为下一步基因免疫法制备单克隆抗体作了一定的准备，也为hCG基因避孕疫苗的研制奠定了基础。

参考文献：

[1] Donnelly J J, Ulmer J B, Liu M A. DNA vaccines[J]. Life Sci, 1996, 60

(3): 163 - 172.
[2] Wang R, Doolan D L, Le T P, *et al*. Induction of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in humans by malaria DNA vaccine[J]. Science, 1998, 282(5388): 476 - 480.
[3] 孙树汉. 核酸疫苗[M]. 上海: 第二军医大学出版社, 2000. 154 - 181.
[4] 郭葆玉. 细胞分子生物学实验操作指南[M]. 上海: 第二军医大学出版社, 1998. 1 - 56.
[5] 倪灿荣,宋亚贵. 免疫组织化学实验新技术及应用[M]. 北京: 北京科学技术出版社, 1993. 23 - 53
[6] Delves P J, Lund T, Roitt I M. Antifertility vaccines[J]. Trends Immunol, 2002, 23(4): 213 - 219.
[7] 姜 新. 核酸疫苗——一种新型疫苗[J]. 生物技术通报, 1998, 3(1): 76 - 79.
[8] 孙建民, 毛 宁, 刘荷中, 等. DNA 免疫法制备抗人 Flt3-ligand 单克隆抗体及其鉴定[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2000, 16(3): 275 - 276.
[9] 李作生, 余兴龙, 李 敏, 等. 应用 DNA 疫苗制备猪瘟病毒单克隆抗体的研究[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2001, 17(1): 76 - 77.
[10] Ulivieri C, Burroni D, Telford J L, *et al*. Generation of a monoclonal antibody to a defined portion of the Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin by DNA immunization[J]. Biotechnol, 1996, 51(2): 191 - 194.
[11] 李伟涛, 潘善培, 谢琪旋, 等. 重组质粒 pPIC9K-pZP3α-hCGβCTP109-145 的构建[J]. 暨南大学学报(自然科学版), 2002, 23(3): 100 - 106.
[12] 张富春, 王 妮, 陈幼珍, 等. hCGβ 真核表达载体的构建和瞬时表达筛选[J]. 生物技术, 2002, 12(5): 3 - 5.
[13] 王明雁, 李 磊, 李大全, 等. hCGβ-C3d 融合蛋白在 CHO 细胞中的表达[J]. 上海免疫学杂志, 2003, 23(1): 13 - 15.
14] 郭 虹, 陈观今, 周永安, 等. 弓形虫 ROP1 基因真核表达重组质粒 DNA 免疫小鼠的研究-Ⅰ pcDNA3-ROP1 真核表达重组质粒的构建[J]. 中国人兽共患病杂志, 1999, 15(1): 3 - 5.

(编辑 冷怀明)

文章编号:1000-5404(2005)01-0027-01

个案与短篇

2 型糖尿病患者视网膜中央动静脉血流超声研究

Study of the blood flow of central retina artery and central retina vein in general population and patients with type 2 diabetes mellitus using Doppler color flow imaging

喻 林 (湖北民族学院医学院附属医院功能科,恩施 445000)

糖尿病视网膜病变是糖尿病的主要并发症之一,可严重影响患者视力。我们利用彩色多普勒血流显像(CDFI)技术对糖尿病患者的视网膜中央动、静脉流速进行测定,探讨糖尿病患者的视网膜中央动、静脉血流动力学变化。结果报告如下。

1 资料与方法

1.1 资料

正常组 40 例健康人(无心血管疾病和眼科疾病),男 28 例,女 12 例,年龄 32~72 岁,平均 52 岁,按不同年龄分组。糖尿病组,均由内分泌科按 WHO 标准确认为 2 型糖尿病患者,并排除伴有其他影响眼血流动力学改变的疾病,32 例按直接散瞳检查眼底有无典型糖尿病性视网膜病变分:无糖尿病视网膜病变者 8 例,男 6 例,女 2 例,年龄 46~72 岁,平均 58 岁;糖尿病性视网膜病变者 24 例,男 18 例,女 6 例,年龄 52~72 岁,平均 61 岁,并按标准分期[1],将 DRP 眼底病变程度分为Ⅰ~Ⅵ,DM 不伴 DRP 者记为 DRP(0)期。

1.2 方法

用德国西门子中狮子王彩色多普勒超声诊断仪,探频率 7.5 MHz。受检者平卧,双眼轻闭,探头不加压放置在眼睑上作眼球纵横切扫描,在筛板后区水平线与视神经暗区垂直相交处可见红、蓝色二条短条状血流束,将取样容积置于此,获得视网膜中央动、静脉清晰血流频谱,测量 CRA 的收缩期峰值血流速度(V_s),舒张末期血流速度(V_D),CRV 的最高流速(V_{max}),最低流速(V_{min}),CRA、CRV 平均血流速度(V_m)及 S/D 比值。流速单位 cm/s。

1.3 统计学处理

采用 t 检验。

2 结果

2.1 正常组 CRA、CRV 流速测定

表 1 各项血流参数显示,不同年龄比较不存在显著性差异($P>0.05$)。血流速度随着年龄增长 CRA 有逐渐减慢趋势,CRV 有轻微增加趋势,CRA/CRV 比值逐渐减小,但各年龄组间无显著性差异。

表 1 正常人 CRA、CRV 不同年龄组各项血流参数 ($\bar{x} \pm s$)

分组	眼数(只)	CRA			CRV		
		V_s	V_D	V_m	V_{max}	V_{min}	V_m
正常组	80	14.31±2.44	4.14±0.76	9.36±3.96	8.92±1.51	6.11±0.84	7.64±1.29
≤40 岁	16	15.52±1.02	4.89±0.88	10.5±2.08	8.41±1.47	6.01±1.36	7.47±1.13
40~55 岁	88	14.43±2.41	4.35±0.81	9.41±2.94	9.03±1.39	5.93±1.01	7.68±1.06
55 岁以上	36	13.12±1.12	3.21±0.66	8.36±1.62	9.52±1.50	6.80±1.91	7.85±1.25

(下转 35 页)

作者简介:喻 林(1961-),女,湖北省随州市人,主治医师,主要从事小器官超声方面的研究。电话:0718-8221215

收稿日期:2004-03-17;修回日期:2004-06-11