文章编号:1000-5404(2005)23-2321-03

论著

pT-ureB及pT-hpaA核酸疫苗诱导小鼠免疫应答的实验研究

柏 杨,邹全明,曾韦锟 (第三军医大学医学检验系临床微生物学及免疫学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 观察并比较携带 *Hp* 不同抗原基因的质粒 pTCAE-ureB(pT-ureB)和 pTCAE-hpaA(pT-hpaA)肌注小鼠后诱导的体液免疫应答。**方法** 构建真核表达质粒 pT-ureB;与已成功构建的质粒 pT-hpaA 分别作为疫苗方案,肌肉注射免疫 BALB/c 小鼠并设置空质粒对照,末次免疫后第2、4、6周分别用间接 ELISA 法检测小鼠血清特异性 IgG 抗体滴度。**结果** 两免疫组在末次免疫后第2周均可出现特异性 IgG,抗体滴度随时间逐渐增高;末次免疫后第6周,两免疫组的抗体滴度与对照组相比较,差异极显著($P<0.01$);且 pT-ureB 免疫组抗体滴度显著高于 pT-hpaA($P<0.01$)。**结论** pT-ureB具有良好的免疫原性,诱导体液免疫应答的能力优于 pT-hpaA。

关键词: 幽门螺杆菌;ureB;hpaA;核酸疫苗
中图法分类号: R377;R392.13;R392.7 **文献标识码:** A

Immune response to pT-ureB and pT-hpaA DNA vaccine in mice

BAI Yang, ZOU Quan-ming, ZENG Wei-kun (Department of Clinical Microbiology, College of Medical Laboratory, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate and compare the humoral immune response induced by eukaryotic expression plasmid pTCAE-ureB (pT-ureB) and pTCAE-hpaA (pT-hpaA) injected intramuscularly in mice. **Methods** The ureB gene fragment was inserted into a eukaryotic expression vector pTCAE, and pTCAE-ureB was constructed. A total of 60 BALB/c mice were randomly assigned to be immunized by intramuscular injection of blank plasmid pTCAE, plasmid pT-ureB and pT-hpaA ($n=20$ in each group). Titers of specific IgG antibody in serum of each group were detected through ELISA respectively on week 2, 4, 6 after immunization. **Results** Specific IgG were observed in pT-ureB and pT-hpaA immunized groups and titers of antibody increased as time prolonged. IgG level was significantly higher in pT-ureB immunized group than in pT-hpaA group on week 6 after immunization. **Conclusion** Plasmid pT-ureB possesses good immunogenicity and induces a higher immune response than pT-hpaA.

Key words: *Helicobacter pylori*; ureB; hpaA; nucleic vaccine

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *Hp*)是定植于人胃黏膜上皮的一种 G^- 螺杆菌,可引起慢性胃炎、消化性溃疡,并与胃癌及黏膜相关淋巴组织瘤等疾病密切相关。世界卫生组织已将其列为一类致癌因子。采用疫苗形式预防 *Hp* 相关疾病的发生,具有重大意义。核酸疫苗是继全菌疫苗和亚单位疫苗之后的第3代疫苗,它能够全面激发机体的细胞和体液免疫应答,同时具有构建简单、存储方便等优点[1],但目前关于 *Hp* 核酸疫苗的报道并不多。疫苗抗原必须具有表面暴露、免疫原性强等特征或为重要致病因子,幽门螺杆菌尿素酶B亚单位(UreB)即符合上述条件,是 *Hp* 重要的抗原蛋白之一;编码蛋白 UreB 的基因可能为 *Hp* 核酸疫苗的一个较理想的候选基因。因此,本研究拟选用 ureB 基因作为抗原基因构建真核表达质粒,并与已构建完成的携带 hpaA 基因的真核表达质粒分别免疫 BALB/c 小鼠,观察诱发的体液免疫应答并比较其免疫原性,为进一步研制有效的 *Hp* 核酸疫苗提供一定实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 *Sal* Ⅰ、*BamH* Ⅰ、*Bgl* Ⅱ购自大连 Takara

基金项目: 国家"863"计划资助项目(2001AA215161)
Supported by the National "863" Key Research Project of China (2001AA215161)

作者简介: 柏 杨(1978-),女,重庆市人,硕士研究生,主要从事病原微生物及免疫学方面的研究。电话:(023)68753590,E-mail: davidann@mail.tmmu.com.cn
通讯作者: 邹全明,电话:(023)68752316, E-mail: qmzou@mail.tmmu.com.cn

收稿日期: 2005-10-24;**修回日期:** 2005-11-11

公司，DNA 抽提试剂盒、胶回收试剂盒、质粒抽提试剂盒购自 Omega 公司，λDNA/*Hind* Ⅲ + *Eco*R Ⅰ marker 购自北京鼎国公司，HRP 标记的羊抗小鼠 IgG 购自武汉博士德公司，rUreB 和 rHpaA 蛋白由本室基因工程重组并纯化，纯度分别为 98% 和 95%[2,3]。

1.1.2 质粒及菌株 质粒 pTCAE 由 IDEC Corp. 的 M. Reff 教授惠赠（质粒图谱见图 1），质粒 pMD18-ureB 含 ureB 编码基因由本室构建保存，真核表达质粒 pT-hpaA 由本室曾韦锟[4]博士构建，大肠杆菌 *E. coli* DH5α 为本室保存。

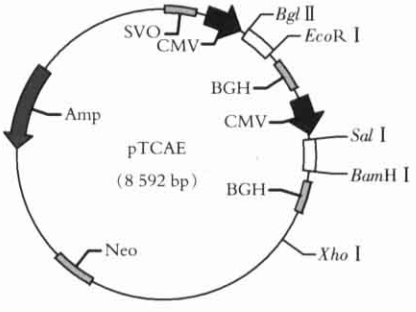


图 1 pTCAE 质粒图谱

Fig 1 Map of plasmid pTCAE

1.2 方法

1.2.1 重组真核表达质粒 pTCAE-ureB（pT-ureB）的构建与鉴定 将 pMD18-ureB 用 *Sal* Ⅰ、*Bgl* Ⅱ 双酶切，pTCAE 用 *Sal* Ⅰ、*Bam*H Ⅰ 双酶切，胶回收 ureB 片段及 pTCAE 载体大片段；将切下的 ureB 片段插入 pTCAE 载体并连接，构建 pT-ureB，并以 *Sal* Ⅰ、*Xho* Ⅰ 双酶切鉴定。

1.2.2 质粒的大量制备 用 Omega 质粒大抽试剂盒抽提质粒 pT-ureB、pT-hpaA，分光光度计分别测定 $D(260)/D(280)$ 值，计算质粒浓度。用灭菌的 PBS 调整质粒浓度为 1.0 mg/ml，作为肌注免疫的样品，-20 ℃冻存备用。

1.2.3 实验动物及分组 雌性 BALB/c 小鼠 60 只，6～8 周龄、体质量 18～22 g，由第三军医大学实验动物中心提供。将小鼠随机分为 3 组，每组 20 只。分别为 pT-ureB、pT-hpaA 免疫组，pTCAE 对照组。

1.2.4 免疫方法 将小鼠放入置有乙醚棉花的干燥器 2～3 min，待麻醉后取出，暴露股四头肌，先注射 25% 蔗糖溶液，15 min后在原注射部位注射质粒，每次质粒注射量为 100 μl/只。注射时针头垂直扎入股四头肌，并且在针头上加套一小管以保证针头扎入深度基本一致。注射完毕，针头原位保持 5～10 s。共免疫 3 次，免疫周期为第 0、2、4 周。

1.2.5 免疫后血清特异性抗体的检测 于末次免疫后第 2、4、6 周分别采集小鼠尾血，分离并收集血清，-20 ℃冻存备用。以本室重组并纯化的抗原蛋白 rUreB 及 rHpaA 包被酶标板，包被量为 0.4 μg/孔；从每组抗血清中各取 10 份样本，以 5 倍稀释为起点，进行 8 个稀释度的系列稀释（分别为 1∶5、1∶10、1∶20、1∶30、1∶40、1∶50、1∶60、1∶70），加入包被相应抗原的酶标板中，并设阳性对照（小鼠阳性血清）、阴性对照（无免疫小鼠血清）、空白对照（PBS）各两孔；再加入 1∶10 000 稀释的 HRP 标记的羊抗小鼠 IgG，测定各孔 $D(492)$ 值。检测结果以 $D(492)$ 值大于或等于阴性对照的 2.1 倍为阳性。阳性孔的最高稀释倍数为抗体效价。

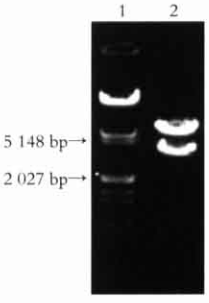
1.3 统计学处理

采用 Excel 进行完全随机设计资料样本均数的 t 检验。

2 结果

2.1 真核表达质粒 pTCAE-ureB 的酶切鉴定结果

ureB 基因片段插入 pTCAE 载体并连接后，构建为重组表达质粒 pTCAE-ureB；pT-ureB 经 *Sal* Ⅰ、*Xho* Ⅰ 双酶切后出现 5 798 bp 及 3 465 bp 两片段，片段长度与理论预测相符。酶切鉴定结果见图 2。



1：λ DNA/*Eco*R Ⅰ + *Hind* Ⅲ marker；2：pT-ureB digested with *Sal* Ⅰ and *Xho* Ⅰ

图 2 pT-ureB 的双酶切鉴定结果

Fig 2 Restriction enzyme digestion analysis of plasmid pT-ureB

2.2 质粒 pT-ureB、pT-hpaA 的检测结果

大量抽提质粒 pT-ureB 及 pT-hpaA，琼脂糖电泳显示带型完整；紫外分光光度计检测，pT-ureB 为 $D(260)/D(280)=1.834$，pT-hpaA 为 $D(260)/D(280)=1.865$。

2.3 血清特异性 IgG 水平的检测结果

各组血清特异性 IgG 的滴度随时间变化的检测结果见表 1。与空质粒对照组相比较，两免疫组在末次免疫后第 2、4、6 周，均可检测出特异性 IgG，抗体滴度随时间延长而升高（稀释倍数增加）。经 t 检验，在末次免疫后第 6 周，两免疫组的抗体滴度与对照组相比较，差异非常显著（$P<0.01$）；并且 pT-ureB 免疫组抗体滴度显著高于 pT-hpaA 免疫组（$P<0.01$）。

表 1 免疫后不同时间点小鼠血清特异性 IgG 滴度（稀释倍数，$n=10$，$\bar{x}\pm s$）

Tab 1 Titer of specific IgG in immunized mice at different time (dilution times, $n=10$, $\bar{x}\pm s$)

Groups	Time of blood collection (week)		
	2	4	6
pT-ureB	17.0±6.7	31.0±8.7	58.0±7.9*#
pT-hpaA	11.0±5.2	25.0±7.1	35.0±8.5*
pTCAE	8.5±4.7	10.5±5.5	9.5±4.4

*：$P<0.01$，*vs* pTCAE；#：$P<0.01$，*vs* pT-hpaA

3　讨论

Hp 是导致消化道溃疡和胃癌等疾病的重要病因。目前认为，研制有效的疫苗是预防和根治 *Hp* 感染最有前景的方法[5]。当前对于 *Hp* 全菌疫苗、重组亚单位疫苗的报道较多，但对核酸疫苗的报道则较少。Todoroki 等[6] 构建了分别编码 HspA、B 的裸质粒 DNA，经皮下免疫小鼠后，可有效降低攻毒实验中的细菌定植数目，显示 *Hp* 核酸疫苗免疫能产生一定的保护性效果。

本研究采用了具有双真核启动子的穿梭质粒 pTCAE，当抗原基因插入其中一个真核启动子之后，另一处仍空缺，其目的是为最终构建抗原基因和细胞因子基因共表达的核酸疫苗做准备。pTCAE 质粒是高效真核表达载体，含有氨苄青霉素抗性基因（AMPR）。两个启动子均为来源于巨细胞病毒的 CMV，目前已有研究报道[7]，并取得了较好结果。

疫苗的抗原性质也是影响疫苗效果的重要因素。*Hp* 保护性抗原包括尿素酶（Urease）、尿素酶 B 亚单位（UreB）、热休克蛋白（heat shock protein，HSP）、过氧化氢酶（Catalase）、hpaA 等。在这些抗原中，UreB 和 HpaA 因为其功能和保护性效果而备受关注[8,9]。因此本研究选用 *Hp* 的 ureB 基因构建表达质粒，并与携带有 hpaA 基因的表达质粒作比较，观察所诱导的免疫应答的强弱，从而为筛选理想的疫苗方案奠定基础。

肌肉注射是目前将质粒导入机体最常用和较简单的方法，骨骼肌则是常选择的注射部位[10]。在本实验中，我们采用了肌肉注射的免疫方式比较 pT-ureB、pT-hpaA 的免疫效果。注射前用蔗糖处理肌注部位是因为有研究表明[11]，在注射前 15 min，25% 蔗糖溶液处理注射部位能降低个体之间的差异，其可能原因是在高渗溶液存在的情况下，体液静水压升高，使肌纤维相互分离，有利于重组质粒均匀分散在肌纤维周围，便于肌细胞摄取质粒，从而获得理想效果。

疫苗注射免疫后，用包被相同量抗原的 ELISA 板检测血清特异性抗体水平，结果表明 pT-ureB、pT-hpaA 诱导的特异性 IgG 抗体滴度随时间延长而升高；免疫后第 6 周 pT-ureB 诱导的抗体水平滴度显著高于 pT-hpaA 免疫组，说明 pT-ureB 诱导体液免疫应答的能力优于 pT-hpaA。分析其原因可能是两种抗原蛋白自身抗原性差异造成的，比如 UreB 分子量大、含有的表位可能多于 HpaA 等。

综上所述，本研究通过动物实验对携带 *Hp* 不同抗原基因的两种真核表达质粒进行了免疫原性的比较，为下一步 *Hp* 核酸疫苗的研究奠定了基础。

参考文献：

[1] Srivastava I K, Liu M A. Gene vaccines[J]. Ann Intern Med, 2003, 138(7): 550 - 559.

[2] 鲁东水，毛旭虎，邹全明，等. 重组人幽门螺杆菌尿素酶 B 亚单位及其生物学性质[J]. 第一军医大学学报，2003，23(6)：549 - 552.

[3] 王缚鲲，邹全明，张卫军，等. 从包涵体中纯化重组人幽门螺杆菌热休克蛋白 A 亚单位[J]. 第三军医大学学报，2002，24(11)：1332 - 1335.

[4] 曾韦锟，邹全明，井申荣. 幽门螺杆菌 hpaA 真核表达质粒的构建及鉴定[J]. 第三军医大学学报，2005，27(6)：547 - 549.

[5] Corthesy Theulaz I. Vaccination against *Helicobacter pylori*[J]. Recent Results Cancer Res, 2000, 156: 55 - 59.

[6] Todoroki I, Joh T, Watanabe K, *et al*. Suppressive effects of DNA vaccines encoding heat shock protein on *Helicobacter pylori*-induced gastritis in mice[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 277(1): 159 - 163.

[7] Wu Y Z, Zhao J P, Wan Y, *et al*. Mimovirus: a novel form of vaccine that induces hepatitis B virus-specific cytotoxic T-lymphocyte responses *in vivo*[J]. J Virol, 2002, 76(20): 10264 - 10269.

[8] Corthesy Theulaz I, Porta N, Glauser M, *et al*. Oral immunization with *Helicobacter pylori* urease B subunit as a treatment against Helicobacter infection in mice[J]. Gastroenterology, 1995, 109(1): 115 - 121.

[9] Kim B O, Shin S S, Yoo Y H, *et al*. Peroral immunization with *Helicobacter pylori* adhesin protein genetically linked to cholera toxin A2B subunits[J]. Clin Sci (Lond), 2001, 100(3): 291 - 298.

[10] 聂青和. 基因疫苗的基础研究及应用现状[J]. 世界华人消化杂志，2003，11(2)：125 - 129.

[11] Davis H L, Whalen R G, Demeneix B A. Direct gene transfer into skeletal muscle *in vivo*: factors affecting efficiency of transfer and stability of expression[J]. Hum Gene Ther, 1993, 4(2): 151 - 159.

（编辑　冷怀明）

血压计量单位恢复 mmHg 表示法

根据国家质量技术监督局和卫生部联合发出的质技监局量函[1998]《关于血压计量单位使用规定的补充通知》的精神，血压计量单位恢复使用毫米汞柱（mmHg），但首次使用时应注明 mmHg 与千帕[斯卡]（kPa）的换算系数。

本刊编辑部