论著

文章编号:1000-5404(2007)19-1834-04

小鼠 FSH-Occludin 重组多价避孕疫苗的构建及表达

向延芳,何 畏,梁志清,史常旭 (第三军医大学西南医院妇产科,重庆 400038)

提 要:目的 构建 FSH 与 Occludin 重组基因的毕赤酵母分泌型表达载体。**方法** 利用 RT-PCR 技术,从小鼠新鲜脑组织中提取总 RNA 扩增获得 FSH-β 亚单位,同法从小鼠新鲜睾丸组织中提取总 RNA 扩增 Occludin,通过双重 PCR 扩增,获得含 FSH-β 亚单位特定基因序列和闭锁因子第 2 个胞外环序列的耦合片段,构建两种重组质粒 pPIC9K FSH-Occludin;经酶切鉴定后电转化毕赤酵母菌株 GS115,YPD-G418 平板筛选高拷贝转化子,甲醇诱导后 SDS-PAGE 电泳鉴定。**结果** 通过双酶切分析、DNA 测序鉴定明确特定的 FSH-β 亚单位和 Occludin 基因耦合片段序列与设计完全一致。目的蛋白相对分子质量分别约为 14×10^3 与 12×10^3,与理论预测值相吻合;Western blot 检测具有良好的免疫反应性。**结论** 耦合片段被成功克隆到巴氏毕赤酵母表达载体 pPIC9K 中并高效、正确的表达。

关键词:卵泡刺激素;闭锁因子;毕赤酵母

中图法分类号:R169.41;R392.13;R394-33 **文献标识码**:A

Construction of a mouse multivalent contraceptive vaccine based on follicle stimulating hormone and occludin genes

XIANG Yan-fang, HE-Wei, LIANG Zhi-qing, SHI Chang-xu (Department of Obstetrics and Gynecology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objectives To construct the recombinant plasmid pPIC9K FSH-Occludin for preparing a multivalent contraceptive vaccine, which interfering the function of Sertoli cells in the mouse testis. Methods After isolated the total RNA from mouse brain and testis tissues, the specific region of follicle stimulating hormone-b (FSH-b) subunit and the secondary extracellular domain of occludin were amplified by RT-PCR, respectively. The catenation fragments of FSH-occludin were obtained through double PCR amplification and cloned into the expression vector PPIC9K of *P. pastoris* to construct 2 different recombinant plasmids (pPIC9K FSH-occludin). The recombinant vector was introduced into *P. pastoris* strain GS115 by electroporation and selected with G418 for FSH-occludin gene integration 1. Super G418 resistant clones were selected and screened for FSH-occludin gene expression. The FSH-occludin gene was successfully cloned into pPIC9K. Results The recombinant plasmids (pPIC9K FSH-occludin) were identified by DNA sequencing and double enzymatic digestion with *Eco*R Ⅰ and *Not* Ⅰ. It was confirmed that the reconstruct plasmids containing the same sequences as the theoretical designing. The results of SDS-PAGE showed that the molecular weight of the expressed product was 1.4×10^3 and 1.2×10^3. Conclusion The results indicate successful construction of recombinant plasmids containing specific regions of FSH and occludin. It can be used for further study on the immune contraceptive effect *in vivo*.

Key words: follicle stimulating hormone; occludin; *Pichia pastoris*

在人类,每个睾丸支持细胞(Sertoli 细胞)与 10 个生殖细胞相联系,两者在生化和分子水平上存在着广泛的相互作用,调节精子发生的整个过程[1]。Sertoli 细胞之间接近基底水平的紧密连接是血睾屏障主要结构成分,在精子发生过程中,细线前期和细线期精母细胞必须不断从曲细精管上皮的基底部穿越血睾屏障向腺腔部分迁移,并分化为单倍体精细胞[2],生殖细胞的迁移过程包含了细胞间紧密连接和黏附连接精细的动力学变化:时相性"关闭"和"开放"[3]。如果生殖细

基金项目:国家自然科学基金(30300375)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30300375)
作者简介:向延芳(1973-),女,湖南省衡阳市人,博士,医师,主要从事生殖避孕方面的研究。电话:(023)62070597
通讯作者:何 畏,电话:(023)68754410
收稿日期:2007-01-10;修回日期:2007-05-20

胞运动受到阻碍,它们将"老化"而被 Sertoli 细胞吞噬清除导致不育。

闭锁因子是组成紧密连接的关键膜蛋白,其第 1 个胞外环发挥细胞黏附作用,第 2 个胞外环可干扰上皮细胞株中紧密连接屏障的装配[4]。本研究选择仅有受体结合活性,但无激素生物活性的 FSH-β 亚单位中的部分序列,与编码闭锁因子中发挥紧密连接功能的多肽相应基因序列进行基因重组,以期获得可靶向干扰 Sertoli 细胞功能的重组蛋白,从而干扰精子生成,达到避孕的目的。

1　材料与方法

1.1　菌株与质粒

大肠杆菌 DH5α 为本实验室保存;酵母宿主菌 GS115,酵母分泌型表达质粒 pPIC9K, 购于 Invitrogen 公司。

1.2　试剂及其他

昆明小鼠购于我校实验动物中心,引物由上海生工生物工程公司合成,胶回收试剂盒, 质粒抽提试剂盒、PCR 纯化试剂盒购于 Omega 公司,高保真 *Taq* 酶、dNTP、T_4 DNA 连接酶及各种限制性内切酶均为 TaKaRa 产品,其他常规化学试剂均为分析纯以上产品。

1.3　小鼠新鲜脑组织及睾丸组织总 RNA 提取

雄性成年小鼠新鲜脑组织及睾丸组织分离后迅速置于液氮中冷冻备用。采用 Tripure 试剂,按照操作说明抽提总 RNA,测定 $D(260)/D(280)$ 值用于 RNA 定量,甲醛变性琼脂糖凝胶电泳分析其完整性,溶于 DEPC 处理后的无菌水中 -70 ℃冰箱冷冻备用。

1.4　引物的设计

RT-PCR 引物的设计根据 FSH-β(NM_008045)、Occludin(NM_008756)基因序列用 Primer 5.0 序列分析软件进行设计;上游引物用 F 表示,下游引物用 R 表示。FSH F1 :5′-ATGATGAAGTTGATCCAGC-3′, R1: 5′-TTATTCCTTCATTTCACTG-3′; Occludin F2:5′-TCGTGTACATAATGGGAGTG-3′, R2:5′-GGGGCTGTTCATCATAA-3′。其中 F1 和 R1 扩增 FSH-β 第 63 ~ 455 基因片段,F2 和 R2 扩增 Occludin 第 745 ~ 1 049 位基因序列。以提取的总 RNA 为模板,先用 Olig$(dT)_{18}$进行逆转录,逆转录条件为 42 ℃ 60 min ,95 ℃ 5 min , 4 ℃ 5 min ,再以设计的引物进行 PCR 扩增,单位反应体积为 50 μl,循环条件 1: 94 ℃ 5 min, 94 ℃ 30 s,54 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,30 个循环后 72 ℃ 8 min, 扩增 FSH-β 部分基因;循环条件 2:94 ℃ 5 min,94 ℃ 30 s,57 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,30 个循环后 72 ℃ 8 min,扩增 Occludin 胞外区部分基因片段。

1.5　目的基因片段的 PCR 扩增和偶联

设计扩增编码 FSH-β 亚单位 33 ~ 100 aa(68 个 aa)区域的引物 F3:5′-GCCGAATTCAAGGAAGAGTCCCGTTTCTC-3′,将编码 36 及 39 位氨基酸上的 TGC(半胱氨酸)突变成 TCC(丝氨酸)(斜体表示),下划线部分含 *Eco*R Ⅰ酶切位点;引物 R3:5′-GCTGCCACCTCCGCCTGAACCGCCTCCACCTTCAGTGGCTACTGGATATG-3′, 下划线部分为 Linker 互补序列。设计扩增编码小鼠 Occludin 207 ~ 228 aa(22 个 aa)引物 F4:5′- GGTGGAGGCGGTTCAGGCGGAGGTGGCAGCGGCTCACAGATATATATGATCTGC-3′,下划线部分为 Linker 序列(GGGGSGGGGS);R4:5′-TAAGCGGCCGCATCCACGTAGAGACCAGTACC-3′, 下划线部分为 *Not* Ⅰ酶切位点。设计扩增编码小鼠 Occludin 197 ~ 241 aa (45 个 aa)引物 F5:5′-GGTGGAGGCGGTTCAGGCGGAGGTGGCAG-CCCGACGGCCCAGGCTTCTG-3′,下划线部分为 Linker 序列;R5: 5′-TAAGCGGCCGCCTCCTGGGGATCAAC-3′,下划线部分为 *Not* Ⅰ酶切位点。应用部分重叠双重 PCR 法,分别以含有 FSH-β 亚单位和闭锁因子基因序列为模板,通过双重 PCR 扩增,可获得 Linker 相连的 FSH-β 亚单位基因序列和闭锁因子第 2 个胞外环序列的耦合片段。产物于 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳鉴定。

1.6　酵母表达载体 pPIC9K6822 和 pPIC9K6845 的构建及酶切鉴定

电泳回收 PCR 扩增产物,用 *Eco*R Ⅰ和 *Not* Ⅰ对其和载体 pPIC9K 进行酶切,将酶切回收后的 PCR 产物与 pPIC9K 载体在 T_4DNA 连接酶作用下进行连接并转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,铺在加氨苄青霉素的 LB 平板上,37 ℃生长过夜。挑取数个克隆分别接种于含有氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,37 ℃振荡过夜,收集菌体,按照常规方法小量抽提质粒,经过酶切鉴定确定阳性克隆。

1.7　重组质粒 pPIC9K6822 和 pPIC9K6845 的线性化、转化 GS115、YPD-G418 及 PCR 筛选阳性转化子

将 *Sal* Ⅰ线性化的重组表达载体 pPIC9K6822 和 pPIC9K6845 分别电转化 GS115,将 80 μl 感受态 GS115 与10 μg 线性化 pPIC9K FSH-occludin 表达载体混匀,移入预冷电转杯中,冰浴 5 min,用 Bio-Rad Gene Pulse 电转仪进行电转化后(参数为 1.5 kV ,25 μF,200 Ω),立即加入 1 ml 1 mol/L 预冷的无菌山梨醇,混匀后移入无菌离心管中。将转化菌落涂布于 MD(1.34% 酵母氮碱, 0.000 04% 生物素, 2% 葡萄糖, 1.5% 琼脂)选择平板上,30 ℃培养 2 d,筛选出 His^-Mut^+ 表型转化子,在 MM(1.34% 酵母氮碱, 0.000 04% 生物素, 0.15% 甲醇, 1.5% 琼脂)选择平板上筛选, 选择在 MM 平板上生长缓慢而在 MD 平板上生长良好的菌株,然后挑选平板上转化子依次接种于不同 G418 浓度的 YPD 平皿。挑选 G418 高抗性克隆,提取基因组 DNA[5],以之为模板,利用 AOX1 基因两端引物进行 PCR 扩增,筛选插入外源基因的重组子,再用 PCR(用试剂盒自带 AOX 引物分别扩增出约 861、792 bp 的预期条带)鉴定。

1.8　插入片段及两侧序列的测序鉴定

重组质粒送上海生工生物工程公司双向测序,上游测序引物为:5′-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3′,下游测序引物为:5′-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3′。

1.9　目的蛋白的诱导表达和鉴定

YPD-G418 平板筛选出高拷贝转化子用甲醇诱导表达

(BMMY:酵母粉 1%、蛋白胨 2%、10×酵母氮碱 10%、500×生物素 0.2%、10×甲醇 10%),SDS-PAGE 蛋白电泳分析,以抗 FSH-β 及 Occludin 单克隆抗体为一抗,碱性磷酸酶标记的羊抗人 IgG 抗体为二抗,进行 Western blot 检测。

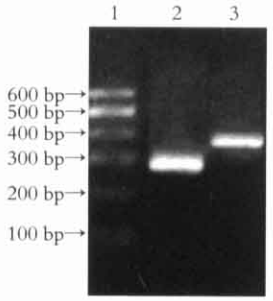
2 结果

2.1 总 RNA 的提取

分别提取的小鼠脑组织和睾丸组织总 RNA 经甲醛变性琼脂糖凝胶电泳分析,可以观察到 5S、18S、28S 3 条荧光带,且 28S:18S 约为 2:1,确定 RNA 的完整性;RNA 样品经紫外分光光度计测定 $D(260)/D(280)$ 值为 1.8~2.0,表明 RNA 纯度较高。

2.2 FSH-β 和 Occludin 基因 cDNA 的扩增

取纯度和完整性均较好的总 RNA 为模板,经反转录及高保真 *Taq* 酶 PCR 扩增后,取扩增产物 5 μl 电泳,可以观察到特异性扩增带,位置分别相当于 400 bp 和 300 bp,与预期的大小完全一致。用胶回收试剂盒回收该特异性条带,用于 PCR 产物的克隆。见图 1。

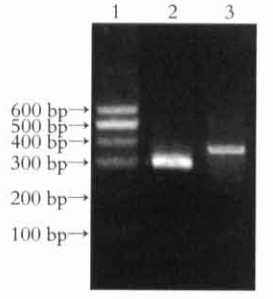


1:标准;2:PCR-Occludin;3:PCR-FSH-β

图 1 基因片段的 RT-PCR 结果

2.3 FSH-β 和 Occludin 基因片段的 PCR 扩增和偶联

胶回收试剂盒回收引物 F3 与 R3 的扩增产物(A 片段);回收引物 F4 与 R4 的扩增产物(B 片段);回收引物 F5 与 R5 的扩增产物(C 片段)。以 A、B 片段为模版,引物 F3、R4 的 PCR 扩增得耦合片段目的基因全长 300 bp,命名为 6822;以 A、C 片段为模版,引物 F3、R5 的 PCR 扩增得耦合片段目的基因全长 369 bp,命名为 6845。见图 2。

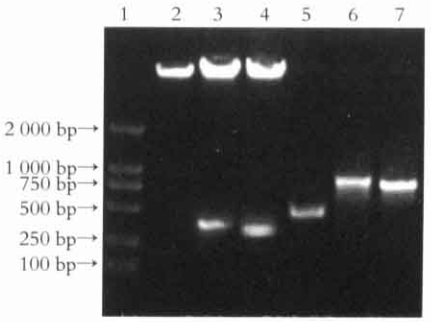


1:标准;2:6822;3:6845

图 2 基因片段的 PCR 结果

2.4 重组表达载体的构建和鉴定

回收的 PCR 产物与 pPIC9K 载体的连接产物转化感受态 *E. coli.* DH5α 后,在含氨苄的 LB 平板上筛选转化子后用 *Eco*R Ⅰ和 *Not* Ⅰ双酶切鉴定表明质粒构建正确。使用 5′-AOX-primer 及下游的 3′-AOX-primer 引物对,以分别提取的 pPIC9K FSH-Occludin 重组菌基因组 DNA 为模板,然后进行 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 扩增结果。结果显示,目的片段已整合到载体中。提取重组质粒测序结果与理论值完全一致,克隆片段确实为鼠 FSH-β 和 Occludin 基因编码区 cDNA 序列,FSH-β 亚单位编码 36 及 39 位氨基酸上的 TGC(半胱氨酸)已突变成 TCC(丝氨酸)(测序报告略)。见图 3。

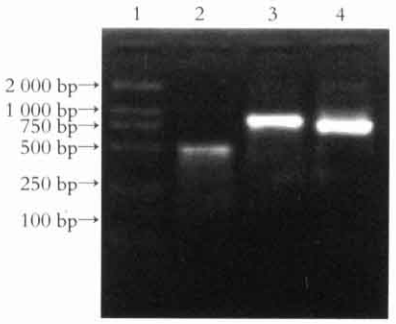


1:标准;2:pPIC9K 经 *Eco*R Ⅰ和 *Not* Ⅰ酶切鉴定;3:pPIC9K-6822 经 *Eco*R Ⅰ和 *Not* Ⅰ酶切鉴定;4:pPIC9K6845 经 *Eco*R Ⅰ和 *Not* Ⅰ酶切鉴定;5:5′-AOX1 和 3′-AOX1 引物扩增 pPIC9K;6:5′-AOX1 和 3′-AOX1 引物扩增 pPIC9K6845;7:5′-AOX1 和 3′-AOX1 引物扩增 pPIC9K6822

图 3 基因片段扩增及酶切鉴定

2.5 质粒载体转化 GS115 及转化子筛选

线性化处理 pPIC9K FSH-Occludin,电穿孔转化 GS115,用不同浓度的 G418 浓度筛选高拷贝克隆。随着浓度的升高,GS115 的数目减少,在 6.0 mg/ml 的 YPD-G418 平板上共得到 6 个生长较好的大菌落,经 PCR 鉴定是高拷贝整合菌株。见图 4。

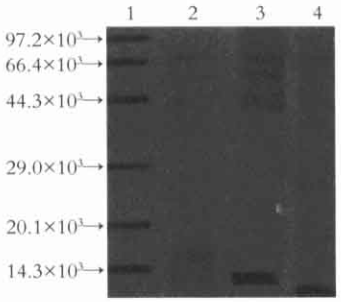


1:标准;2:5′-AOX1 和 3′-AOX1 引物扩增 pPIC9K(492 bp);3:5′-AOX1 和 3′-AOX1 引物扩增 pPIC9K6845(861 bp);4:5′-AOX1 和 3′-AOX1 引物扩增 pPIC9K6822(792 bp)

图 4 基因片段扩增结果

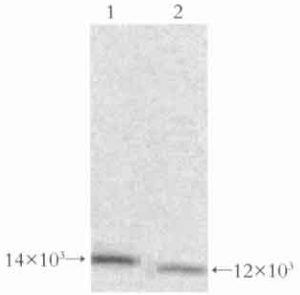
2.6 纯化产物的 SDS-PAGE 和 Western blot 检测

SDS-PAGE 结果显示目的蛋白相对分子质量分别约为 14×10^3 与 12×10^3,与预期目的蛋白相对分子质量相符。Western blot 检测结果表明,蛋白可分别与抗 FSH-β 单克隆抗体发生反应。暂未能检测到蛋白与 Occludin 抗体的反应,待后续试验通过免疫组化来检测。见图 5、6。



1:标准; 2:pPIC9K 表达蛋白上清; 3:pPIC9K6845 表达蛋白上清; 4:pPIC9K6822 表达蛋白上清

图 5　SDS-PAGE 鉴定目的重组蛋白



1: pPIC9K6845 表达蛋白; 2: pPIC9K6822 表达蛋白

图 6　目的蛋白的 Western blot 鉴定(抗-FSH-β)

3　讨论

对人 FSH-β 亚单位的研究表明:FSH 是男性精子发生必须的一种糖蛋白激素。在男性,FSH 受体仅存在于 Sertoli 细胞细胞膜上, FSH 与受体的相互作用似乎涉及多个不连续的结合区:hFSH-β 亚单位中 33 ~ 53 aa,以及 C-末端的第 80 ~ 100 aa 区域的合成肽具有受体结合活性;二硫键(Cys28-Cys82 和 Cys32-Cys84)在 FSH 与受体结合中的作用有重要作用。用丝氨酸替代 hFSH-β 亚单位上 33 ~ 53 aa 和 81 ~ 95 aa 中的半胱氨酸后,这两段合成肽与受体的结合不受影响,但减少了其生物激动剂的活性[6,7]。FSH 生物活性的保持依赖于两个亚单位间形成非共价键偶连,然而对受体的高亲和力无须二聚体存在。小鼠 FSH-β 亚单位含 130 个氨基酸(15×10^3),与人的同源性高达 86%,其中 31 ~ 63 aa、69 ~ 80 aa、88 ~ 98 aa、100 ~ 125 aa 等完全相同。本研究选择全长 FSH-β 亚单位上选择仅有受体结合活性,但无激素生物活性的基因序列(33 ~ 100 aa)为目的片段,并将编码 36 及 39 位氨基酸上的 TGT(半胱氨酸)突变成 TCT(丝氨酸)。

细胞间的 TJs 广泛存在于各类组织细胞中, 如果非靶向地干扰闭锁因子功能,可能导致机体其他组织细胞间 TJ 屏障的非特异性功能损害,出现严重副作用。为此,将对应闭锁因子的多肽与靶向作用于 Sertoli 细胞的特异性分子 FSH 耦合,通过特异性靶向干扰睾丸内 Sertoli 细胞间 TJs 蛋白的功能状态,才能特异性抑制或干扰精子发生和排放过程,达到可逆性避孕目的。而对应于大鼠闭锁因子第 2 个胞外环甘氨酸 209 和天冬氨酸 230 残基之间的一种 22 肽可显著降低 Sertoli 细胞 TJ 屏障,且呈剂量依赖性,去除该多肽可以使破坏的 TJ 屏障逐渐重新封闭[8]。该部分与小鼠 Occludin 的相似性达 94%。故分别选择小鼠 Occludin(207 ~ 228 aa)和第 2 个胞外环(197 ~ 241 aa)为目的片段。

本研究应用部分重叠 PCR 技术将 FSH-β 和 Occludin 连接在一起,然后插入载体质粒, 达到预期的目的,且含有 pPIC9K FSH-Occludin 的酵母菌经诱导和表达的蛋白分子量符合理论值并可被 FSH 抗体识别,为进一步研究重组蛋白的免疫原性奠定了实验基础。

参考文献:

[1] Cheng C Y, Mruk D D. Cell junction dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development[J]. Physiol Rev, 2002, 82(4): 825 - 874.

[2] Lui W Y, Lee W M. Regulation of junction dynamics in the testis--transcriptional and post-translational regulations of cell junction proteins [J]. Mol Cell Endocrinol, 2006, 250(1 - 2): 25 - 35.

[3] Xia W, Mruk D D, Lee W M, *et al*. Cytokines and junction restructuring during spermatogenesis——a lesson to learn from the testis[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2005, 16(4 - 5): 469 - 493.

[4] Feldman G J, Mullin J M, Ryan M P. Occludin: structure, function and regulation[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2005, 57(6): 883 - 917.

[5] 奥斯伯 F, 布伦特 R, 金斯顿 R E,等. 精编分子生物学实验指南[M]. 颜子颖, 王海林, 译. 北京: 科学出版社, 1998: 517 - 522.

[6] Roth K E, Dias J A. Scanning-alanine mutagenesis of long loop residues 33-53 in follicle stimulating hormone beta subunit[J]. Mol Cell Endocrinol, 1995, 109(2): 143 - 149.

[7] Grasso P, Rozhavskaya-Arena M, Reichert L E Jr.. Cysteine residues in a synthetic peptide corresponding to human follicle-stimulating hormone beta-subunit receptor-binding domain 81 - 95 [hFSH-beta-(81-95)] modulate the *in vivo* effects of hFSH-beta-(81 - 95) on the mouse estrous cycle[J]. Regul Pept, 1999, 81(1 - 3): 67 - 71.

[8] Chung P Y, Mruk D, Mo M Y, *et al*. A 22-amino acid synthetic peptide corresponding to the second extracellular loop of rat occludin perturbs the blood-testis barrier and disrupts spermatogenesis reversibly *in vivo*[J]. Biol Reprod, 2001, 65(5): 1340 - 1351.

(编辑　王小寒)