论著

文章编号:1000-5404(2014)19-2006-04

表达嵌合体蛋白 PAcP/CTB 的转基因番茄防龋疫苗口服免疫大白兔的研究

白国辉[1,2],刘建国[1],田 源[1],陈 筑[1,3],顾 瑜[1],管晓燕[1],白朋元[1],韩 琪[1],钱昱霏[1] (563000 贵州 遵义,贵州省高等学校口腔疾病研究特色重点实验室[1];563000 贵州 遵义,遵义医学院医学与生物学研究中心[2];550002 贵阳,贵阳市口腔医院[3])

[摘要] **目的** 观察表达嵌合体蛋白 PAcP/CTB 转基因番茄防龋疫苗的免疫原性和免疫反应性。**方法** 用 PAc 标准蛋白制作标准曲线,ELISA 法检测番茄果实 PAcP/CTB 蛋白的浓度。实验动物按完全随机分组法分为 3 组,实验组喂食 3 个剂量(PAcP/CTB 蛋白量相差 1.5 倍)的转基因番茄汁,阴性对照组喂食非转基因番茄汁,阳性对照组喂食变异链球菌灭活全菌疫苗。每周免疫 1 次,免疫 4 周,ELISA 法检测大白兔唾液和血液样品中抗变异链球菌 PAc 的 IgA、IgG 抗体效价水平。**结果** 转基因番茄中 PAcP/CTB 嵌合蛋白的浓度为 9.37 μg/mL。疫苗免疫动物后实验组与阳性对照组大白兔唾液和血液中的特异性抗 PAc 抗体升高,抗体水平可维持数周,而阴性对照组抗体水平变化不明显。**结论** 表达嵌合体蛋白 PAcP/CTB 的转基因番茄免疫新西兰大白兔后,能有效的诱导唾液和血液中特异性抗体的产生,其具有较好的免疫原性。

[关键词] 防龋疫苗;龋病;转基因番茄;变异链球菌;大白兔
[中图法分类号] R-332; R392.7; R781.101 [文献标志码] A

Oral immunization with transgenic tomato anti-caries vaccine expressing chimeric PAcP/CTB protein in rabbits

Bai Guohui[1,2], Liu Jianguo[1], Tian Yuan[1], Chen Zhu[1,3], Gu Yu[1], Guan Xiaoyan[1], Bai Pengyuan[1], Han Qi[1], Qian Yufei[1] ([1]Special Key Laboratory of Oral Diseases Research, Higher Education Institution of Guizhou Province, Zunyi, Guizhou Province, 563000; [2]Medical and Biological Research Center, Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou Province, 563000; [3]Stomatological Hospital of Guiyang, Guiyang, Guizhou Province, 550002, China)

[**Abstract**] **Objective** To observe the immunogenicity and immunoreactivity of the transgenic tomato anti-caries vaccine expressing chimeric protein of proline-rich region of *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) surface protein PAc (PAcP) and cholera toxin B subunit (CTB) *in vivo*. **Methods** The standard curve of PAc was made from the standard protein, and the concentration of chimeric protein PAcP/CTB was detected by ELISA. A total of 20 New Zealand white rabbits (6 to 8 weeks old) were randomly divided into 3 groups, that is, experiment group ($n=12$, including 3 subgroups, fed with the 3 different doses of transgenic tomato juice which corresponding for PAcP at 65.6, 93.7 and 121.87 μg respectively), negative group ($n=4$, fed with non-transgenic tomato juice) and positive group ($n=4$, fed with inactivated whole cell vaccine of *S. mutans*). All rabbits were immunized once a week, for 4 consecutive weeks. ELISA was used to measure the titers of immunogenic antibodies IgG and IgA against PAc of *S. mutans* in the saliva and serum in 1 d before and in 1 to 12 weeks after the first immunization respectively. **Results** The concentration of chimeric PacP/CTB protein was 9.37 μg/mL. The PAc-specific antibodies were increased in both the saliva and serum of the rabbits from the experimental group and the positive group, and their levels were maintained for several weeks. But the antibodies of negative group had no significant change. **Conclusion** After the rabbits are orally immunized with the transgenic tomato expressing chimeric PAcP/CTB protein, the anti-PAcP antibodies are effectively

[基金项目] 国家自然科学基金(30160086,81260164);贵州省科学技术基金(黔科合J字LKZ[2011]41号);贵州省卫生厅科学技术基金(gzwkj2011-1-068);贵州省科技创新团队项目([2013]93号);贵州省重点学科建设资助项目和遵义医学院优秀科研团队培育项目([2012]12号)
[通信作者] 刘建国,电话:(0852)8609238,E-mail:13087891001@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140116.1057.009.html(2014-01-16)

induced in the saliva and serum. The transgenic tomato anti-caries vaccine has better immunogenicity.

[**Key words**] anti-caries vaccine; dental caries; transgenic tomato; *Streptococcus mutans*; white rabbits

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30160086, 81260164), the Science and Technology Fund of Guizhou Province (LKZ [2011] 41), the Science and Technology Fund From Health Department of Guizhou Province (gzwkj2011-1-068), the Project of Science and Technology Innovation Team of Guizhou Province ([2013]93), the Key Discipline Project of Guizhou Province and the Cultivation Project for Excellent Scientific Research Team of Zunyi Medical College ([2012]12). Corresponding author: Liu Jianguo, Tel: 86-852-8609688, E-mail: 13087891001@163.com

变异链球菌(*S. mutans*)是重要致龋菌之一,表面蛋白PAc在细菌的蔗糖非依赖性粘附过程中起到了非常重要的作用,被认为是*S. mutans*主要的毒力因子和粘结素。在PAC的结构中,富含脯氨酸的P区(PAcP)在介导*S. mutans*与牙齿表面获得性膜结合中发挥了重要的作用,此区域富集T、B细胞表位[1],被认为是研制防龋疫苗的主要候选抗原。有研究表明,当*S. mutans*毒力因子PAc作为抗原免疫动物后,能激发机体体液免疫和黏膜免疫应答产生特异性的抗体,初步证明利用PAc免疫动物后能够有效地抑制细菌对牙面的粘附作用,从而降低患龋率[2]。

在课题组前期构建了携带表面蛋白PAc粘附相关肽段基因pacP与霍乱毒素B亚单位(CTB)基因ctxB的转基因番茄防龋疫苗的基础上[3],观察转基因番茄植株及非转基因番茄植株栽培后的各项农艺性状的变化,发现本课题组培养的转基因番茄植株在株高、茎粗和最大叶宽等农艺性状上发生了不同程度的改变[4-5];并对外源目的基因的拷贝数进行检测,证明本课题组构建的转基因番茄植株属低拷贝的转基因植物,具有较好的稳定性[6]。通过对小鼠、大鼠的免疫实验已证实其可以激发机体的体液免疫和黏膜免疫应答产生特异性的抗体[7],本研究观察课题组构建的转基因番茄防龋疫苗免疫新西兰大白兔是否会激发动物产生体液免疫和黏膜免疫应答,从而产生特异性的抗体,旨在为新型防龋疫苗的研制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

转基因番茄防龋疫苗(含PAcP/CTB蛋白)[3],红抗219番茄(山西豪丰种苗有限公司)。

1.2 实验动物与菌株

满6~8周龄新西兰大白兔20只,体质量2 000 g(第三军医大学野战外科研究所实验动物中心),重庆市实验动物质检中心质检[许可证号为SCXK(渝)2007-0005]。*S. mutans* UA159(血清c型)由四川大学华西口腔医学院口腔疾病研究国家重点实验室提供。

1.3 主要试剂

*S. mutans*表面蛋白PAc抗原(本课题组前期制备)、辣根过氧化物酶标记羊抗兔IgA、IgG(美国Genetex公司)、牛血清白蛋白(美国Amresco公司)、植物蛋白提取液[聚乙烯吡咯烷酮6 g,1 mol/L Tris-HCl 45 mL(pH=8),甘油75 mL,定容300 mL]、抗原包被液(Na_2CO_3 0.32 g, $NaHCO_3$ 0.586 g, NaN_3 0.04 g, ddH_2O 定容至200 mL,pH 9.5)。

1.4 灭活全菌体疫苗的鉴定及制备

TPY液体培养基加入UA159菌种,37 ℃恒温培养18 h;MSB固体培养基划板,37 ℃培养18 h。菌落革兰染色后常规镜下形态学鉴定;将培养后的菌液离心后收集沉淀,0.9%生理盐水洗去残留培养基,加入100 mL 0.5%福尔马林生理盐水液(体积比),37 ℃恒温24 h灭活;离心收集沉淀,加入0.1%福尔马林生理盐水液后紫外分光光度计上比浊,使菌液浓度达8×10^8 CFU/mL时$D(600)$为1.0。

1.5 转基因番茄果实PAcP/CTB蛋白含量检测

1.5.1 转基因植物总蛋白的提取 取番茄果肉1 g加入液氮研磨成粉,加入预冷的植物蛋白提取液3.5 mL,冰上静置4 h。4 ℃,14 000 r/min×15 min离心后取上清液,-20 ℃保存备用。

1.5.2 目的蛋白浓度检测 用抗原包被液、转基因番茄/非转基因番茄蛋白提取液和PAc标准蛋白浓度梯度液包被酶标板,4 ℃冰箱过夜;加入抗原包被液,室温3 min;加入封闭液,37 ℃温育2 h;洗板后加入一抗(自制兔抗),37 ℃温育2 h;洗板,加入IgG抗体(二抗),37 ℃温育1 h;洗板,加入底物反应液37 ℃暗反应15 min,加终止液;全波长酶标仪上读取490 nm处样本的光密度值[$D(490)$]。

1.6 动物分组与免疫

20只大白兔按完全随机分组法分为A、B、C 3组:A组为实验组(转基因番茄组,$n=12$),包括3个剂量组,每组4只。A1组:7 mL/kg剂量喂食(含PAcP蛋白65.6 μg);A2组:以10 mL/kg剂量喂食(含PAcP蛋白93.7 μg);A3组:以13 mL/kg剂量喂食(含PAcP蛋白121.87 μg)。B组为阴性对照组,$n=4$,以10 mL/kg剂量喂食红抗219番茄果汁;C组为阳性对照组,$n=4$,喂食UA159灭活全菌疫苗(2 mL/次)。免疫前所有实验动物禁食、禁水12 h,经口灌服0.2 mol/L $NaHCO_3$中和胃酸,30 min后免疫。每周1次,连续免疫4周。

1.7 样本采集

免疫前1 d和免疫后第1、2、3、4、5、6、7、8、10、12周收集实验动物的血清和唾液。2%硝酸毛果芸香碱(0.2 mg/100 g)通过颈部皮下注射入动物体内,收集全唾液后于高速离心机上4 ℃,12 000 r/min×10 min,收集上清,-20 ℃保存。采用耳缘静脉取血法取血、离心后收集上清液,硝酸毛果芸香碱注射后收集唾液,样本-80 ℃冰箱保存备用。

1.8 唾液和血清中特异性抗体的检测

ELISA法检测血清和唾液中特异性IgA、IgG抗体。10 μg/mL的纯化抗原rPAc包被酶标板,30 mL/L牛血清白蛋白封闭,加入100 μL待测血清(1∶40稀释)或唾液(1∶1稀释),分别加入羊抗兔IgA或IgG,加底物反应液和终止液后酶标仪上测D(450)值,观察实验动物体内特异性抗体水平的变化。

1.9 统计学方法

特异性抗体检测的数据用SPSS 13.0统计软件进行分析。

2 结果

2.1 转基因番茄混合果汁中外源蛋白的浓度

根据PAc标准蛋白浓度梯度D(490)的数据,得线性方程Y=0.001 7X+0.148 0,相关系数0.990 8,光密度值随蛋白浓度增加而增大,呈线性关系。转基因番茄样本光密度值为0.164,根据线性方程外源蛋白浓度为9.37 μg/mL。

2.2 唾液中IgA型抗PAcP抗体水平

实验组与阳性对照组在初次免疫后1周抗体开始出现上升趋势,2~7周抗体水平较高,7周后逐渐下降。阴性对照组抗体变化不明显(图1)。

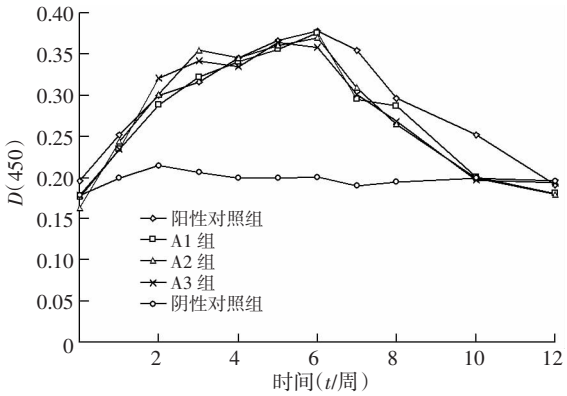


图1 免疫后各周大白兔唾液中IgA型抗PAcP抗体水平

2.3 血清中IgA型抗PAcP抗体水平

实验组与阳性对照组在初次免疫后2周抗体开始出现上升趋势,3~7周抗体水平逐渐升高,7周后逐渐下降。阴性对照组抗体变化不明显(图2)。

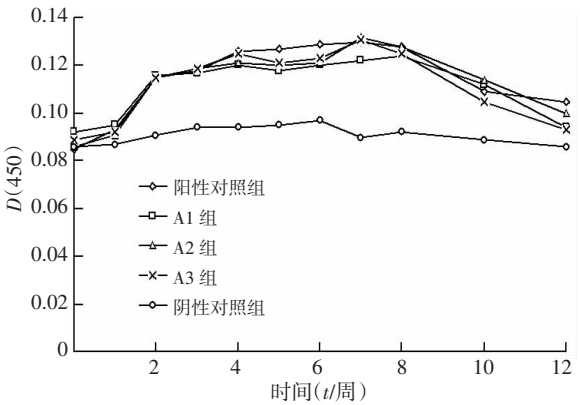


图2 免疫后各周大白兔血清中IgA型抗PAcP抗体水平

2.4 唾液中IgG型抗PAcP抗体水平

实验组与阳性对照组在初次免疫后2周抗体开始明显上升,3~7周抗体水平逐渐升高,但较平缓,8周后逐渐下降。阴性对照组抗体变化不明显(图3)。

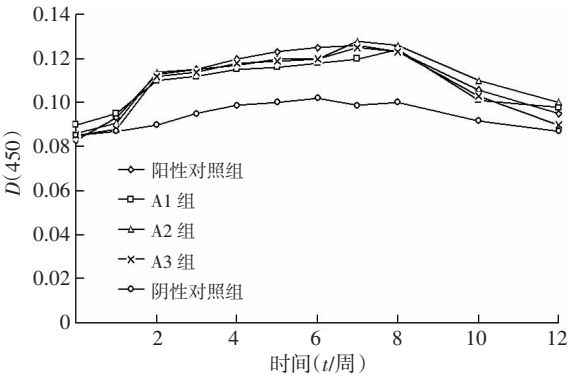


图3 免疫后各周大白兔唾液中IgG型抗PAcP抗体水平

2.5 血清中IgG型抗PAcP抗体水平

实验组与阳性对照组在初次免疫后1周抗体开始出现上升趋势,2~7周抗体水平较高,10周后明显下降。阴性对照组抗体变化不明显(图4)。

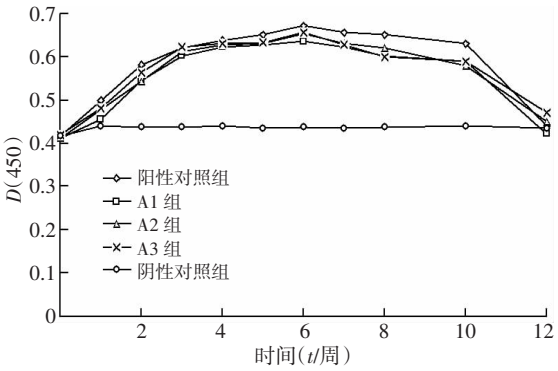


图4 免疫后各周大白兔血清中IgG型抗PAcP抗体水平

3 讨论

20世纪70年代就有通过免疫手段预防龋病的报道,龋病的主动免疫研究经过了灭活死疫苗、减毒活疫苗、纯化抗原亚单位疫苗、重组抗原疫苗、基因重组疫苗以及核酸疫苗几个阶段,但是从研究结果来看,每种方式都存在弊端,所以这些年研究进展很慢,有的途径已经被放弃尝试。

随着生物技术的发展,通过基因工程改造的转基因植物不断完善,比如对密码子进行优化、构建含MARs的表达载体、建立位点特异的重组体系等方法可以提高外源蛋白的表达量;选择特异性启动子不但提高植物中抗原的表达量,而且可以使重组蛋白在植物中特定的器官或组织中表达。另外,用番茄作为的生物反应器生产药用蛋白本身就具有很多优点,比如南北方都可种植,产量高,是人民日常生活常吃的果

蔬;植物表达系统可对表达产物进行翻译后加工使其具有良好的免疫原性和生物活性;番茄中的药用蛋白可以长期稳定的存在于植物组织中,这就便于运输和保存;口服防龋的形式方便,易被人群接受等[8]。这些优势使利用转基因番茄作为廉价的疫苗生产系统生产防龋的药用蛋白成为可能,

国外很多研究表明,转基因植物疫苗作为抗原能够有效地激发动物的体液免疫和黏膜免疫应答,并且没有对实验动物产生不良副作用[9-10]。McGarvey等[11]用转基因番茄表达狂犬病抗原并证实构建成功。郑雨燕等[12]用表达 *S. mutans* 表面蛋白唾液粘附区蛋白的转基因番茄口服免疫 BALB/c 小鼠,观察到小鼠产生免疫反应。本课题组前期对小鼠、大鼠的口服试验观察到了特异性抗体产生,田源等[13]用含 PAcA 的转基因番茄口服免疫大白兔后也检测到了特异性的抗体,这些研究基础说明利用口服植物疫苗预防龋病一个可行的、有潜力的研究方向。

在本实验中,口服免疫大白兔后 2~3 周,血液和唾液中都检测到了特异性抗 PAcP 的 IgA 和 IgG 抗体,并且能高水平维持一段时间,这就提示转基因植物表达的表面蛋白 PAcP 具有免疫原性。该研究结果说明转基因番茄作为一种口服疫苗的形式可以有效地诱导黏膜免疫反应,但是口服免疫的最佳剂量、免疫时间间隔和疫苗安全性等问题有待于进一步研究。

参考文献:

[1] Crowley P J, Brady L J, Piacentini D A, *et al*. Identification of a salivary agglutinin-binding domain within cell surface adhesin P1 of Streptococcus mutans[J]. Infect Immun, 1993, 61(5): 1547-1552.

[2] Brady L J, Cvitkovitch D G, Geric C M, *et al*. Deletion of the central praline-rich repeat domain results in altered antigenicity and lack of surface expression of the Streptococcus mutans P1 adhesin molecule[J]. Infect Immun, 1998, 66(9): 4274-4282.

[3] 唐琳. 变形链球菌表面蛋白P区与霍乱毒素B亚单位融合基因植物表达载体的构建及转化番茄研究[D]. 遵义: 遵义医学院, 2005.

[4] 白国辉, 刘建国, 田源, 等. 表达嵌合体蛋白 PacP/CTB 的转基因番茄生物学性状的差异分析[J]. 医学信息, 2014, 27(3): 210-211.

[5] 白国辉, 刘建国, 田源, 等. 防龋用转基因番茄农艺性状的变异[J]. 遵义医学院学报, 2014, 37(2): 178-180.

[6] 白国辉, 刘建国, 田源, 等. 转基因番茄防龋疫苗中外源目的基因拷贝数的检测[J]. 上海口腔医学, 2013, 22(6): 613-617.

[7] 顾瑜, 刘建国, 关薇薇, 等. 表达嵌合体蛋白 PAcP/CTB 的转基因番茄免疫 BABL/c 小鼠的实验研究[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2014, 24(2): 72-75, 108.

[8] Han M, Su T, Zu Y G. Research advances on transgenic plant vaccines[J]. Acta Genetica Sinica, 2006, 33(4): 285-293.

[9] Mett V, Lyons J, Musiychuk K, *et al*. A plant-produced plague vaccine candidate confers protection to monkeys[J]. Vaccine, 2007, 25(16): 3014-3017.

[10] Huang Z, LePort K, Elkin G, *et al*. High-yield rapid production of hepatitis B surface antigen in plant leaf by a viral expression system[J]. Plant Biotechnol J, 2008, 6(2): 202-209.

[11] McGarvey B P, Hammond J, Dienelt M M, *et al*. Expression of the rabies virus glycoprotein in transgenic tomatoes[J]. Biotechnology (N Y), 1995, 13(13): 1484-1487.

[12] 郑雨燕, 凌均棨, 麦穗. 转基因番茄可食用防龋疫苗免疫 BALB/c 鼠的实验初探[J]. 口腔医学研究, 2007, 23(1): 7-9.

[13] 田源, 刘建国, 白国辉, 等. 表达嵌合体蛋白 PAcA/CTB 的转基因番茄口服免疫大白兔的实验研究[J]. 口腔医学研究, 2013, 29(3): 201-204.

(**收稿**:2013-11-21;**修回**:2013-12-11)
(编辑 张 维)

参考文献类型及标识

根据 GB 3469 规定,以单字母方式标识以下各种参考文献类型:

参考文献类型	专著	论文集	报纸文章	期刊文章	学位论文	报告	标准	专利
文献类型标识	M	C	N	J	D	R	S	P

对于专著、论文集中的析出文献,其文献类型标识建议采用单字母"A";对于其他未说明的文献类型,建议采用单字母"Z"。

对于数据库(database)、计算机程序(computer program)及电子公告(electronic bulletin board)等电子文献类型的参考文献,建议以下列双字母作为标识:

电子参考文献类型	数据库	计算机程序	电子公告
电子文献类型标识	DB	CP	EB

本刊编辑部