DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.06.019

论著

文章编号:1000-5404(2004)06-0520-03

表达人受精素β去整合素结构域的重组沙门菌疫苗株的构建

张 军,靳风烁,江 军,李彦锋 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所泌尿外科,重庆 400042)

提 要:目的 构建表达人受精素β去整合素结构域的重组沙门菌疫苗株。方法 应用PCR方法获得人受精素β去整合素结构域的cDNA片断,将其插入高拷贝表达载体pYA3339中,构建重组质粒pYA3339/hf279,将该重组质粒转入鼠沙门菌疫苗株X4550,获得重组菌株X4550(pYA3339/hf279)。结果 该重组疫苗株可稳定表达能被抗人受精素β多克隆抗体识别的重组蛋白HF93,其分子量约为16×10³。结论 该疫苗株的构建为进一步研究以人受精素β为靶抗原的免疫避孕疫苗打下了基础。

关键词:受精素;去整合素;沙门菌;基因重组
中图法分类号:R378.22;R392.7;R394-33 文献标识码:A

Construction of recombinant *Salmonella* strain expressing the disintegrin domain of human fertilin β

ZHANG Jun, JIN Feng-shuo, JIANG Jun, LI Yan-feng (Department of Urology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To construct a recombinant *Salmonella* vaccine strain expressing the disintegrin domain of human fertilin β. Methods The cDNA fragment expressing the disintegrin domain of human fertilin β was obtained by PCR, and then inserted into the high copy number plasmid pYA3339 to get recombinant plasmid pYA3339/hf279, which was then transformed into murin *Salmonella* vaccine strain X4550 to get the recombinant *Salmonella* vaccine strain X4550 (pYA3339/hf279). Results The vaccine strain could express stably the recombinant protein HF93 recognized by polyclonal antibody of human fertilin β. The molecular weight of the protein was about 16×10³. Conclusion The construction of the recombinant vaccine strain X4550 (pYA3339/hf279) has laid a foundation for further studies of immunocontraceptive vaccines based on human fertilin β as the target antigen.

Key words: fertilin; disintegrin; *Salmonella* typhimurium; genetic recombination

随着基因重组技术的发展和人类生殖生物学知识的不断进步,开发安全有效的免疫避孕疫苗逐渐成为避孕药物研究的热点。应用于开发免疫避孕疫苗的精子抗原均需具有睾丸/精子特异性和阻断受精过程关键环节的能力。受精素β即是符合靶抗原条件的精子表面膜蛋白,其参与了哺乳动物受精过程中精卵细胞的结合和融合。近年来已有研究证实,受精素β的去整合素结构域是其发挥生理作用的最主要的功能区[1],该结构域通过与卵细胞膜上的同源配体——整合素的相互作用介导精-卵结合和融合。

本研究以人受精素β去整合素结构域蛋白作为靶抗原,应用基因重组技术将编码人受精素β去整合素结构域的cDNA序列插入高拷贝质粒pYA3339,并利用沙门氏菌 asd^+/asd^- 平衡致死系统,构建了能稳定表达人受精素β去整合素结构域蛋白的重组沙门菌疫苗株。本研究为开发可能应用于人类的口服免疫性避孕疫苗提供重要的靶抗原和载运系统选择依据,还为进一步进行蛋白质功能鉴定和动物实验奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

表达质粒pYA3399(asd^+)、大肠杆菌X6212(Δasd,NA抗性)、伤寒杆菌X3730(Δasd)及X4550由美国华盛顿大学Roy Curtiss Ⅲ博士惠赠;质粒pT7-7/hf、兔抗人受精素β多克隆抗体及兔抗GST抗体由上海计划生育研究所申庆祥研究员惠赠;大肠杆菌DH5α菌株由第三军医大学大坪医院野战外科研究所分子生物学实验室提供。主要分子生物学试剂分别购自大连宝生物工程公司和美国SIGMA公司。PCR引物由大连宝生物工程公司合成:

正向引物(P1):5′-CTAGAATTCAGCAAGCAGTGTGTGGTAAT-3′
*Eco*RⅠ

反向引物(P2):5′-AGAGGATCCTTAATGCCCAGTCTGAACATAG-3′
*Bam*HⅠ

作者简介:张 军(1975-),男,四川省武胜县人,硕士,医师,主要从事男性学方面研究。电话:(023)68757344
通信作者:李彦锋,电话:(023)68757344
收稿日期:2003-08-11;修回日期:2003-10-10

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.2　研究方法

1.2.1　PCR 扩增目的 cDNA 片段　　通过 PCR 扩增含有目的基因的质粒 pT7-7/hf 获得编码人受精素β 去整合素结构域的 cDNA 序列(第 1 215～1 493 bp)。反应条件为: 94 ℃变性 1 min, 50 ℃退火 1 min, 72 ℃延长 1 min 30 s, 35 个循环, 最后 72 ℃延伸 10 min。

1.2.2　PCR 产物和 pMD18-T 载体的连接及亚克隆　　连接、转化、质粒抽提、酶切和鉴定均按《分子克隆实验指南》操作, 得到重组 pMD18-T 质粒, 对 hf279 cDNA 测序。

1.2.3　重组质粒 pYA3339/hf279 的构建　　重组 pMD18-T 质粒及 pYA3339 经 *Eco*RⅠ/*Bam*HⅠ 双酶切后胶回收, 连接后电穿孔转化大肠杆菌 X6212, 挑选平皿中阳性菌落, 小量扩增, 提取质粒后酶切鉴定, 得到重组质粒 pYA3339/hf279, 测序。

1.2.4　重组疫苗株 X4550 的构建　　先将重组质粒 pYA3339/hf279 用化学转化法转入沙门菌株 X3730, 提取重组质粒后再用电穿孔法转入终宿主 X4550, 构建重组疫苗株 X4550(pYA3339/hf279)。

1.2.5　重组蛋白的表达　　含有重组表达载体及质粒 pYA3339 的 X4550 菌株经 1 mmol/L IPTG 化学诱导培养后上样进行 12% SDS-PAGE 电泳, 并通过凝胶薄层扫描测定其表达量。

1.2.6　表达产物的鉴定　　将表达蛋白转移至硝酸纤维素膜上, 用 3% BSA 封闭过夜, 加兔抗人受精素β 多抗反应 2 h, 以 10 mmol/LPBS (pH 7.2)洗涤后, 加 HRP 标记的羊抗兔 IgG 作用 1 h, 进行 Western blot 检测。

2　结果

2.1　受精素β 去整合素结构域 cDNA 的 PCR 扩增和亚克隆

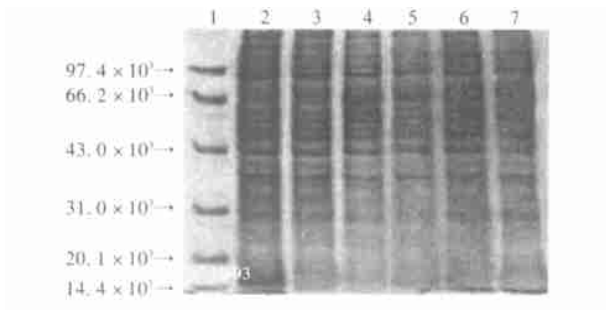
应用质粒 pT7-7/hf 为模板, PCR 扩增去整合素结构 cDNA 序列, 电泳显示目的条带清晰。胶回收后与 pMD18-T 载体连接, 转化 DH5α 感受态菌, 挑选阳性菌落小量扩增后提取质粒, 酶切鉴定结果符合预期。测序结果显示插入片段序列与在 GenBank 发表的序列一致。

2.2　重组表达载体 pYA3339/hf279 和重组 X4550(pYA3339/hf279)疫苗株构建

pYA3339 表达载体行 *Eco*RⅠ/*Bam*HⅠ 双酶切后, 与上述回收目的片段相连接, 电转化大肠杆菌 X6212, 挑选阳性菌落小量扩增后提取质粒, 酶切后鉴定与预期一致, 证实该菌落含有重组质粒。经测序结果显示读框正确, 重组质粒 pYA3339/hf279 构建成功。将该重组质粒用化学转化法转入沙门菌株 X3730, 提取质粒后再用电穿孔法转入终宿主 X4550, 构建重组疫苗株 X4550(pYA3339/hf279)。扩增提取的质粒经酶切鉴定为重组质粒 pYA3339/hf279。

2.3　重组蛋白 HF93 在重组菌 X4550(pYA3339/hf279)中的表达和鉴定

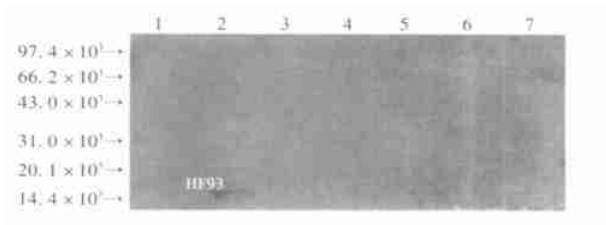
应用抗人受精素β 多克隆抗体作为免疫识别标志, 对重组菌 X4550(pYA3339/hf279)所表达的重组 HF93 蛋白进行了免疫学检测。考马斯亮蓝染色后可见目的条带位于约 16×10^3 水平。在应用 IPTG 诱导后可见重组蛋白表达增加, 凝胶薄层扫描分析显示重组蛋白表达量约占菌体总蛋白的 6%; 而阴性对照菌 X4550(pYA3339)显示在 IPTG 诱导前后均无 HF93 蛋白的免疫印迹条带出现(图 1); 另一电泳凝胶蛋白带形电转印至 PVDF 膜, 利用化学发光法曝光 X 光胶片, 获得重组蛋白的免疫印迹条带, 呈较清晰的单一条带(图 2)。因该多克隆抗体系采用 GST 融合蛋白免疫家兔获得, 其中可能含有抗 GST 成分, 因而实验设计应用抗 GST 抗体与重组菌 X4550(pYA3339/hf279)蛋白行免疫印迹分析作为对照, 结果为阴性, 提示 Western blot 所得免疫印迹条带对应于重组 HF93 蛋白。



1: Protein molecular weihght marker; 2: The recombinant bacteria X4550 (pYA3339/hf279) after induction; 3: The bacteria X4550 (pYA3339) after induction; 4: The empty bacteria X4550 after induction; 5: The recombinant bacteria X4550 (pYA3339/hf279) before induction; 6: The bacteria X4550 (pYA3339) before induction; 7: The empty bacteria X4550 before induction

图 1　重组菌 **X4550**(**pYA3339/hf279**)的考马斯亮蓝染色分析

Fig 1　SDS-PAGE analysis of the recombinant bacteria X4550 (pYA3339/hf279)



1: Protein molecular weihght marker; 2: The recombinant bacteria X4550 (pYA3339/hf279) after induction; 3: The bacteria X4550 (pYA3339) after induction; 4: The empty bacteria X4550 after induction; 5: The recombinant bacteria X4550 (pYA3339/hf279) before induction; 6: The bacteria X4550 (pYA3339) before induction; 7: The empty bacteria X4550 before induction

图 2　重组菌 **X4550**(**pYA3339/hf279**)的 **Western blot** 分析

Fig 2　Western blot analysis of the recombinant bacteria X4550 (pYA3339/hf279)

3　讨论

编码人受精素β 去整合素结构域的 cDNA 序列位于全基因序列第 1 215～1 493 bp 基因片段[2], 本研究结合文献方法及表达载体的多克隆位点情况, 选择 *Eco*RⅠ 和 *Bam*HⅠ 酶切位点分别设计于引物 1 和 2 的 5′端, 通过 PCR 方法可准确获得受精素β 去整合素结构域 cDNA 序列, 并使目的基因以正确读框定向克隆于表达载体 pYA3339 中。

asd^+/asd^- 平衡致死系统是 Curtiss 等[3,4] 成功构建的一种载体-宿主平衡致死系统。

该系统的主要原理是将沙门菌中的天冬氨酸β 半

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. http://www.cnki.net

醛脱氢酶基因(asd)进行缺失突变,并将该基因插入一种表达质粒中。由于该 asd 基因编码的天冬氨酸β半醛脱氢酶是二氨基庚二酸(DAP)生物合成途径中的必需酶,而 DAP 是革兰阴性细菌细胞壁肽聚糖的基本组成成分,因而 asd 基因的突变引起 DAP 合成的缺乏,导致该突变株在无外源性 DAP 的培养条件下发生溶菌死亡。如果该菌株中转入 asd^+ 的表达质粒,则该菌株可稳定携带质粒传代表达。由于在哺乳动物组织中不存在 DAP,这一系统保证细菌进入宿主后能够稳定表达外源抗原。在筛选过程中避免了在活疫苗中有潜在危险性的抗性基因的应用,对研制人用疫苗具有实用价值。

pYA3339 即是一种 asd^+ 表达载体,由质粒 pYA3148 衍生而来。该载体在细胞内具有高拷贝数,并存在 trc 强启动子,因而可较高水平地表达外源基因。用于表达外源基因的重组质粒可先在大肠杆菌 X6212 中进行构建并鉴定后,再转入转化效率极低的沙门氏菌疫苗株中。X6212 菌成为构建重组沙门菌疫苗株的一个极为重要的桥梁。由于沙门菌具有有效的宿主限制系统,对于转化的质粒 DNA 有明显的限制作用。本实验选择一种限制功能缺陷、修饰功能正常的沙门菌 X3730 作为质粒的中间宿主,可对转入的质粒 DNA 进行甲基化修饰。由于该中间宿主也是 Δasd,因而同样通过上述平衡致死系统进行了阳性克隆的筛选。在将从重组 X3730 菌中提取的重组质粒转入终宿主 X4550 菌时,该菌株具有的野生型宿主限制系统将不再限制重组质粒的转化。

沙门氏伤寒杆菌 X4550 是腺苷酸环化酶(cya)和腺苷酸受体蛋白(crp)基因缺失突变体。这种突变体保持沙门菌在人和动物肠道淋巴结定居的能力和其抗原性,但因以上基因的缺失而失去致病性成为减毒株。应用该类菌株构建应用于人类的疫苗具有极大的优势,表现在:①该类菌株中 asd 基因缺失,可与 asd^+ 质粒构成载体-宿主平衡致死系统[4];②减毒沙门菌载体具有培养简便、繁殖迅速等优越性;③可口服或鼻饲接种,方法简单;④该疫苗株在体内产生的靶抗原的传送无需附加任何免疫佐剂;⑤该类菌株可较长时间定居于肠相关淋巴组织,持续表达外源抗原,增强免疫原性,并可在生殖道产生强大的粘膜免疫反应[5];⑥通过分子生物学技术便于构建成多价疫苗,易被接种人群接受;⑦一次免疫后在相当长时间内有效,并且可逆;⑧免疫用蛋白无需在体外产生、分离、纯化和鉴定;⑨对抗生素敏感,如发生严重副作用可以用常用抗生素控制。

动物实验研究已经显示,直接应用纯化的重组受精素抗原注射免疫动物可以在血清中产生高滴度的特异性 IgG 抗体,但是并不能引起明显的避孕效应[6,7],其中不能激发生殖道粘膜产生分泌型 IgA (SIgA)抗体是一个重要原因。口服给予该类减毒株后,在激发机体产生抗沙门菌免疫反应的同时,还能诱导产生针对重组蛋白的抗原特异性粘膜、体液和细胞免疫,尤其是可产生高水平的粘膜免疫。已有报道将表达乙肝病毒 core-pre-S 蛋白的沙门氏伤寒菌在成年妇女志愿者体内进行试验,结果表明:该菌株能激发机体全身性和粘膜性免疫应答,并且在肠道和泌尿生殖道产生特异的分泌型抗体[8]。该减毒沙门菌技术为开发安全、方便和廉价的多价疫苗提供了希望,使得口服活菌苗的研制及应用前景非常广阔。

构建表达外源蛋白的重组菌,其基本要求是获得与天然蛋白相同或相似的免疫原性的重组蛋白表达。虽然天然受精素β是高度糖基化的,在原核系统表达的重组蛋白的空间构象与真核系统可能也存在较大差异,然而已有研究显示,原核系统表达的重组精子蛋白仍然具有相似的免疫原性,免疫动物后产生的抗体也显示出一定的抗生育效应。由于 HF93 分子量较小,免疫原性相对较弱,直接用于免疫产生的抗体效价较低,另外根据 HF93 本身的结构特点(富含半胱氨酸),直接纯化重组蛋白用于主动免疫也存在较大难度。本研究中构建的表达 HF93 的重组沙门菌疫苗株可以通过口服免疫激发机体产生较强的特异性体液免疫、细胞免疫和生殖道粘膜免疫应答,为进一步的实验研究奠定了基础。

参考文献:

[1] Evans J P, Schultz R M, Kopf G S, *et al*. Roles of the disintegrin domains of mouse fertilins α and β in fertilization[J]. Biol Reprod, 1998, 59(1): 145-152.

[2] Gupta S K, Alves K, Palladino L O, *et al*. Molecular cloning of the human fertilinβ subunit[J]. Biochem Biophy Res Commun, 1996, 224(2): 318-326.

[3] Curtiss R III, Goldschmidt R M, Fletchall N B, *et al*. A virulent salmonella typhimurium Δ cya Δ crp oral vaccine strains expressing a streptococcal colonization and virulence antigen[J]. Vaccine, 1988, 6(2): 155-160.

[4] Nakayama K, Kelly S M, Curtiss R III. Construction of an asd+ expression-cloning vector: stable maintenance and high level expression of cloned genes in a Salmonella vaccine strain[J]. Biotechnol, 1988, 6: 693-697.

[5] Curtiss R III, Kelly S M. Salmonella typhimurium delition mutants lacking adenylate cyclase and cyclic AMP receptor protein are avirulent and immunogenic[J]. Infect Immun, 1987, 55(12): 3035-3043.

[6] Ramarao C S, Myles D G, White J M, *et al*. Initial evaluation of fertilin as an immunocontraceptive antigen and molecular cloning of the cynomolgus monkey fertilinβsubunit[J]. Mol Reprod Dev, 1996, 43(1): 70-75.

[7] Hardy C M, Clarke H G, Nixon B, *et al*. Examination of the immunocontraceptive potential of recombinant rabbit fertilin subunits in rabbit[J]. Biol Reprod, 1997, 57(4): 879-886.

[8] Nardelli-Haefliger D, Kraehenbuhl J P, Crutiss R III. Oral and rectal immunization of adult female volunteers with a recombinant attenuated Salmonella typhi vaccine strain[J]. Infect Immun, 1996, 64(12): 5219-5224.

(编辑 陈聪连)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net