

重组恶性疟原虫 DNA 质粒免疫小鼠及抗原表达的调控

谢文凯¹ 陈启宇² 汪群斌² 潘卫庆³ 颜日辉² 陆德如⁴

¹(中国科学院上海植物生理研究所 上海 200032) ²(上海复星高科技集团有限公司 上海 200042)

³(第二军医大学寄生虫学教研室 上海 200433) ⁴(第二军医大学医学生物技术和分子遗传研究所 上海 200433)

摘 要 将恶性疟原虫 MSP1-31 基因序列,引入四环素(Tc)控制的真核表达载体 pTRE,获得重组质粒 pTRE-31。将 MSP1-31 的原核表达载体 pDS56T1 转化大肠杆菌表达 MSP1-31,亲和纯化后作检测用抗原。pTRE-31 与辅助质粒 pTet-off(tTA)肌肉注射 4 周龄 BALB/c 小鼠,观察 DNA 介导免疫情况。结果显示,四环素饲喂的小鼠 4 周时血清抗体阳转率为 7.1%(1/14),而不饲喂四环素组可达 100%(14/14),表明用 pTRE-31/pTet-off 重组质粒组合直接注射小鼠有效地引发了针对疟原虫 MSP1-31 抗原的体液免疫反应,且可受控于四环素。不饲喂四环素组小鼠在 12 周后仍能维持抗体阳性,倍比稀释 ELISA 显示血清抗体滴度在 4 周、8 周和 12 周内持续上升。饲喂四环素组小鼠 4 周后停止饲喂 Tc,第 8 周和第 12 周检测仍有部分(60%)小鼠血清抗体阳转,而继续饲喂 Tc 的小鼠未有抗体阳转,暗示重组质粒 DNA 在小鼠体内可持续存在至少 4 周并仍具备表达功能。

关键词 恶性疟原虫 DNA 疫苗 四环素 抗体阳转率

中图分类号 Q342 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)01-0013-04

近来,随着多种 DNA 疫苗被批准进行人体试验,其安全性始终受到关注^[1,2]。理论上,DNA 免疫导致的抗原持续表达可能诱导免疫耐受、自身免疫、过敏性反应、过度免疫或是自我免疫攻击^[3],而且一旦发生,其逆转将是十分困难的。Wolff 等的实验结果表明外源 DNA 质粒注射小鼠骨骼肌后无法在短期内清除,其残存和表达可长达 19 个月以上,而少量抗原在体内长期过度表达,可能引起针对该抗原的免疫耐受,遭遇病原体后反而导致严重感染^[4]。因此人们致力寻找更安全的基因免疫的疫苗。奥地利的 Mandl 等制备的 RNA 疫苗成功地诱导了小鼠对蜱传播脑炎的免疫,认为 RNA 疫苗可以避免 DNA 疫苗在体内的重组所引起的过度表达^[5]。

本研究探索通过 Tet-off 开关系统调控抗原的表达。Tet-off 基因表达系统是一套可调控高效真核基因表达系统^[6],调控质粒 pTet-off 产生调控蛋白,目的基因则存在于 pTRE 反应质粒。Tet 系统的基因调控是高度专一的,在 Tet-off 细胞中,当无四环素(Tc)时,基因表达打开,当四环素存在时,基因表达严格地受 Tc 的不同浓度调控。此外,由于经过适当的改造,Tet 表达系统的最大表达水平相

当高,甚至大大超过连续在哺乳动物细胞中强表达的启动子如 CMV 启动子^[7]。我们期望通过此真核表达系统控制质粒 DNA 在小鼠模型中表达抗原蛋白,以探讨对 DNA 介导免疫进行控制。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 DH5 α 、SG13009 和带目的基因 MSP1-31 的原核表达质粒 pDS56T1 由第二军医大学寄生虫学教研室提供,pTet-off 和 pTRE 购自 CLONTECH 公司。

1.2 酶和试剂

T4 DNA 连接酶和内切酶等工具酶及分子量标准购自 Promega 公司,亲和纯化 Ni-chelate 层析柱购自 QIAgen 公司,四环素(Tc)购自 Sigma 公司。

1.3 MSP1-31 抗原表达与纯化

质粒 pDS56T1 表达带 6 个组氨酸残基的 MSP1-31 融合蛋白,便于亲和纯化。以 pDS56T1 转化大肠杆菌 SG13009。将阳性菌落在 1 L 培养基中培养至对数期,IPTG 诱导 2h,破细胞,上清过 Ni-chelate 亲和层析柱,所获得 MSP1-31 为带(His)₆ 的融合蛋白,以无目的基因的 pDS56 转化 SG13009 为

对照进行 SDS-PAGE 电泳。

1.4 DNA 介导免疫质粒构建

原核表达质粒 pDS56T1 和 pTRE 经 *Bam*HI 酶切, 分别获得带 *Bam*HI 粘性末端的疟原虫 MSP1-31 抗原基因片段和 pTRE 载体片段, T4 DNA 连接酶连接后转化 DH5 α , 挑选阳性克隆, 酶切鉴定连接方向并测序。

1.5 重组疟疾质粒 DNA 免疫小鼠

雌性 BALB/c, 4 周龄, 第二组(四环素抑制组) 10 只和第四组(四环素关闭组) 4 只均以含四环素 Tc 10mg/g 的颗粒饲料预先饲喂 3d, 与第一组(不以四环素处理组) 14 只和第三组(对照组) 4 只分别注射小鼠股四头肌, 每只 50 μ L, 含 400 μ g 辅助质粒 pTet-off。第二天对第一组、第二组和第四组注射重组质粒 pTRE-31 100 μ g/50 μ L, 对照组注射不含目的基因的载体 pTRE 100 μ g/50 μ L。注射后第 4 周停止饲喂第二组 Tc, 而第四组仍继续以 Tc 饲喂(见表 1)。于第 4 周、第 8 周和第 12 周分别取所有小鼠尾尖血 1 μ L 以间接 ELISA 法测抗体。

表 1 重组疟原虫质粒 DNA 免疫小鼠及 Tc 处理方法

Table 1 Immunization of mice with recombinant plasmid DNA and treatment with Tc

Groups	Number	Tc treatment	Injection of DNA		
			pTet-off/ μ g	pTRE-31/ μ g	pTRE/ μ g
Group 1	14	-	400	100	-
Group 2	10	+	400	100	-
Group 3	4	-	400	-	100
Group 4	4	+	400	100	-

* Tc treatment was stopped in this group after 4 weeks

1.6 ELISA 法检测抗体

将 4 μ g/mL MSP1-31 重组蛋白以每孔 100 μ L 包被微孔板过夜、封闭, 吸干待用。鼠抗血清自 1:100 开始倍比稀释, 加入微孔板, 于 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min, PBS 冲洗 3 次后加酶标羊抗鼠二抗, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min, OPD 底物显色, 酶标仪读吸光度 A_{490} 。

2 结果

2.1 大肠杆菌中抗原表达及其纯化

pDS56T1 在大肠杆菌 SG13009 中可获得高表达的蛋白抗原, 由目的蛋白加 6 个组氨酸残基组成。MSP1-31-[His]₆ 融合蛋白经 Ni-Chelate 亲和层析柱纯化, 与大肠杆菌裂解物和对照一起进行 SDS-PAGE, 凝胶扫描分析表明纯度 > 90%, 见图 1。

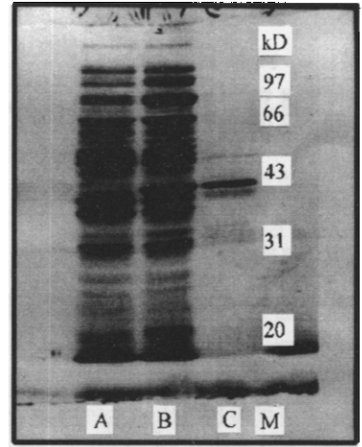


图 1 MSP1-31 融合蛋白亲和纯化的 SDS-PAGE 电泳结果
Fig. 1 SDS-PAGE analysis of recombinant protein MSP1-31 purified by Ni-chelate affinity chromatography

A. Extract liquid of SG13009 transfected with blank plasmid pDS56; B. Extract liquid before purification; C. Purified MSP1-31

2.2 真核表达载体的构建

原核表达质粒 pDS56T1 经 *Bam*HI 酶切, 电洗脱回收 MSP1-31 目的基因片段, 和 *Bam*HI 酶切的真核表达质粒 pTRE 用 T4 噬菌体 DNA 连接酶连接, 转化 DH5 α , 酶切电泳初步鉴定, 获正确连接的 pTRE-31(图 2)。测序结果显示连接正确。

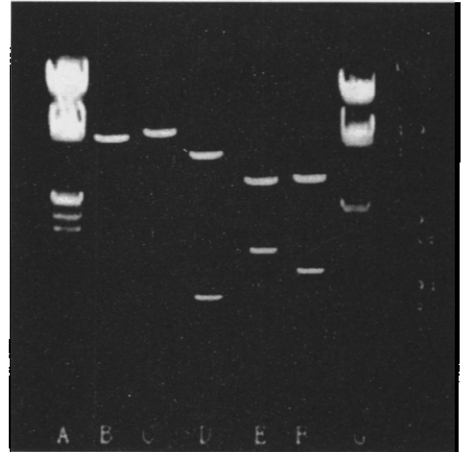


图 2 重组质粒 pTRE-31 酶切鉴定电泳图

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of recombinant plasmid pTRE-31 digested by restriction enzymes
A. λ DNA digested by *Eco*RI and *Hind*III; B. pTRE-31; C. pTRE-31 digested by *Sal*I; D. pTRE-31 digested by *Bam*HI; E. pTRE-31 digested by *Sca*I and *Sal*I; F. pTRE-31 digested by *Hind*III and *Sal*I; G. λ DNA digested by *Eco*RI and *Hind* III

2.3 重组疟疾质粒 DNA 免疫小鼠

经辅助质粒 pTet-off 和重组质粒 pTRE-31 免疫的小鼠第 4 周, 第 8 周和第 12 周的血清抗体 ELISA 结果如表 2。

表 2 四组小鼠血清抗体 ELISA 检测结果

Table 2 ELISA analysis of seroconversion rates in four groups of mice

Groups	Weeks after injection	Negative				Positive			
		<1:100	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400
Group 1	4		2/14	6/14	5/14	1/14			
	8			2/14	5/14	3/14	3/14		1/14*
	12				1/13	6/13	4/13	2/13	
Group 2	4	9/10	1/10						
	8	4/10	6/10						
	12	4/10	5/10	1/10					
Group 3	4	4/4							
	8	4/4							
	12	4/4							
Group 4	4	4/4							
	8	4/4							
	12	4/4							

* This highest-antibody-titer mouse was subjected to another test after 8 weeks.

第一组不以 Tc 处理的小鼠在第 4 周后血清抗体阳转率为 100% ,表明质粒 pTRE-31/pTet-off 作为 DNA 免疫质粒通过肌肉注射 ,有效地引发了体液免疫 ,且抗体滴度在第 8 周和第 12 周持续上升。对照组(第三组)注射空质粒后至 12 周末产生抗体 ,排除了抗体由质粒制备过程中非特异抗原诱导的可能。第二组和第四组在停止饲喂四环素前(4 周)血清抗体阳转率合计为 7.1%(1/14) ,显著低于不以 Tc 处理的第一组。第二组停止饲喂四环素后(8 周、12 周)抗体阳转率有所上升 ,分别为 60%(6/10) 60%(6/10) ,而继续饲喂 Tc 的第四组小鼠始终未有抗体阳转 ,显示质粒 DNA 在第 4 周后仍能诱导产生体液免疫反应。实验中第二组和第四组 4 周抗体阳转率合计为 7.1% ,表明仍有一定水平的表达未完全被 Tc 抑制 ,可能的原因有 (1)小鼠饲喂 Tc 在一段时间内未达作用浓度 1 μ g/mL (2)尽管 Tet-off 调控系统在 Tc>1 μ g/mL 时理论上可完全抑制表达 ,但若 pTet-off 未能先于 pTRE-31 整合入染色体 ,则会引发较高水平的基础表达 (3)目的基因质粒 pTRE-31 与辅助质粒 pTet-off 的注射量不适当。

3 讨论

与其他哺乳动物细胞中作用的调控型表达系统相比 ,Tet-off 系统有其独特的优势^[8,9]。首先 ,Tet-

off 的原核调控蛋白引入哺乳动物细胞后对目的基因的作用相当特异 ,因为这些调控性 DNA 序列在真核基因组中极少出现。其次 ,Tet-off 系统激活的是一个通常关闭的启动子而不是抑制一个高基础表达活性的启动子 ,因为完全关闭这类启动子的转录需高含量的阻遏物以 100% 地封闭调节位点。此外 ,Tet 系统的最高表达水平与其他强哺乳动物启动子相比要高得多。Yim 等^[7]报道与野生型 CMV 启动子/增强子相比 ,Tet-off 系统的 pTRE-Luc 转化的 Hela 细胞 ,其表达荧光素酶的最高活性要高 35 倍。

DNA 疫苗应用中如何避免外源抗原的持续表达是较难解决的问题之一^[1]。Bourne 等对注射部位肌肉 DNA 进行 PCR 分析 ,所有豚鼠 48~51d 后仍能检出质粒 DNA^[10]。而 Nichols 等以 PCR 检测 DNA 疫苗质粒序列则表明 DNA 疫苗分子存在时间至少 18 周^[11]。但可能只检测到无实际功能的残留 DNA 片段。Xu 和 Liew^[12]以利什曼原虫 DNA 疫苗免疫 BALB/c 小鼠 ,40d 后注射部位仍有稳定的抗原表达。Dixon 认为 DNA 免疫比传统免疫持续时间长得多 ,其原因是整合入宿主染色体^[13]。通过我们用四环素抑制表达的试验表明 ,至少 4 周后质粒 DNA 仍能显著表达抗原而引发体液免疫应答 ,暗示未分解的质粒 DNA 小鼠体内可持续存在 ,并具有表达抗原的功能。

由于所构建的疫苗不同及个体免疫应答的差异 ,DNA 介导免疫的结果可能完全不同。在长期表达抗原的情况下 ,可能产生正常的免疫 ,也可能发生免疫耐受 ,继发感染后病情加重 ,也可能过度激发导致自身免疫。低表达的免疫原被低水平的抗体清除可最终使免疫反应不足 ,若免疫原过高表达则会使免疫个体处于“免疫抑制”状态 ,或是引发过强的 CTL 反应而杀死表达抗原的细胞及其周围细胞。这些假设是 DNA 疫苗研究中必须考虑的 ,尝试对疫苗表达进行调控是办法之一。Selby 等利用 T4 RNA 聚合酶调控 T7 启动子激活 HIV DNA 疫苗 ,引发 CTL 活性 ,而无 T7 RNA 聚合酶时关闭疫苗^[14]。Zhou 等^[15]将重组 SFV RNA 疫苗包装进感染自杀型 SFV 颗粒 ,使其不能进一步感染新宿主细胞 ,并估计重组 RNA 会在一、二周内转移和降解 ,比 DNA 疫苗短得多而更安全。我们建立的 Tet-off 调控系统具有特异性好、诱导倍数高、诱导快速、可逆转以及诱导因子无细胞毒性的优点 ,有望成为调控 DNA 免疫抗原表达的理想途径和基因免疫治疗研究中调节治疗时间、治疗剂量的良好模型。

参 考 文 献

- [1] Robertson J S. *Vaccine* ,1994 ,**12** :1526~1528
- [2] Pisetsky D S. *Nature Med* ,1997 ,**3** :829~831
- [3] FDA. Points to Consider on Plasmid DNA Vaccines for Preventive Infectious Disease Indications ,1996 Oct
- [4] Dowty M E ,Wolff J A. *Gene Therapeutics* ,1994 ,pp. 82~98
- [5] Mandl C W ,Aberle J H ,Aberle S W *et al.* *Nat Med* ,1998 ,**4** (12) :1438~1440
- [6] Gossen M ,Bujard H. *Proc Natl Acad Sci USA* ,1992 ,**89** :5547~5551
- [7] Yin D X ,Zhu L ,Schimke R T. *Anal Biochem* ,1996 ,**235** :195~201
- [8] Gossen M ,Bonin A ,Bujard H. *Trends Biochem Sci* ,1993 ,**18** :471~475
- [9] Gossen M ,Borin A L ,Freundlieb S *et al.* *Curr Opin Biotechnol* ,1994 ,**5** :516~520
- [10] Bourne N ,Stanberry L R ,Bernstein D I *et al.* *J Infect Dis* ,1996 ,**173** :800~807
- [11] Nichols W W ,Ledwith B J ,Manam S V *et al.* *Ann NY Acad Sci* ,1995 ,**772** :30~39
- [12] Xu D ,Liew F Y. *Immunology* ,1995 ,**84** :173~176
- [13] Dixon B. *Bio/Tech* ,1995 ,**13** :420
- [14] Selby M J ,Doe B ,Walker C M. *J Virol* ,1997 ,**71** :7827~7831
- [15] Zhou X ,Berglund P ,Rhodes G *et al.* *Vaccine* ,1994 ,**12** :1510~1514

Immunization of Mice with Plasmid DNA Against Malaria and Regulation of Antigen Expression by Tetracycline-controlled Promoter

XIE Wen-kai¹ CHEN Qi-yu² WANG Qun-bin² PAN Wei-qing³ YAN Ri-hui² LU De-ru⁴

¹ Shanghai Institute of Plant Physiology ,The Chinese Academy of Sciences ,Shanghai 200032)

² Shanghai Fortune High Technology CO. ,Ltd ,Shanghai 200042)

³ Department of Parasitology ,The Second Military Medical University ,Shanghai 200433)

⁴ Institute of Medical Biotechnology & Molecular Genetics ,The Second Military Medical University ,Shanghai 200433)

Abstract Sequence of MSP1-31 of *Plasmodium falciparum* was constructed into eukaryotic expression vector pTRE , which could be repressed by tetracycline(Tc) and resulted in recombinant plasmid pTRE-31. The plasmid was injected into the quadriceps muscle of BALB/c mice with Tc responsive plasmid pTet-off to measure specific antibodies. The MSP1-31 prokaryotic expressed protein was used as antigen in ELISA. Result showed that mice orally administered by Tc had a seroconversion rate of 7.1% (1/14) 4 weeks after injection , whereas the contral mice had a seroconversion rate of 100% and the titers of antibody were raised continuously within 12 weeks. The study suggested that the recombinant plasmids pTRE-31/pTet-off could efficiently induce humoral response against MSP1-31 of malaria. Moreover this immune response was controlled by Tc and was reversible after withdrawal of Tc delivery. The induction of antibody by removing Tc at the fourth week after injection indicated that DNA vaccine could remain in mice and capable of expressing antigen for at least 4 weeks.

Key words *Plasmodium falciparum* , DNA vaccine , tetracycline , seroconversion rate