

乙肝表面抗原 a 表位粘膜疫苗的构建及免疫原性检测

刘相国 杨 恭 邱并生* 田 波

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘要:利用 DNA 重组技术,构建霍乱毒素 B 亚单位与乙肝病毒表面抗原 a 表位的融合基因,并在大肠杆菌表达体系 pET-30a/BL21(DE3)中获得以包涵体形式的高效表达。免疫印迹表明表达产物具有免疫学活性,包涵体复性后,表达产物能够象 CTB 那样形成五体,以腹腔注射、灌胃、鼻饲形式免疫小鼠均能产生抗 HBsAg 抗体。

关键词:CTB, 乙肝病毒表面抗原 a 表位, 融合蛋白, ELISA

中图分类号:R37 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209 (2001) 05-0625-05

合成肽疫苗是新一代疫苗,由于它不含无用成分、安全、无毒副作用而日益受到人们的重视^[1]。乙型肝炎病毒(HBV)对人类的威胁巨大,对其免疫保护性抗原的研究逐渐深入,为研制乙型肝炎合成肽疫苗奠定了基础。乙肝表面抗原 a 表位是各 HBV 血清型的共同表位,也是重要的中和性抗原表位,因此利用其构建乙肝肽苗具有较大的理论意义和实用价值,但一般合成肽苗分子量小,免疫原性较低,需要其他手段提高其免疫原性,如与霍乱毒素 B 亚单位或大肠杆菌热敏肠毒素 B 亚单位构建融合蛋白。

霍乱毒素 B 亚单位(CTB)虽然不具毒性,但它具有很强的免疫原性,通过口服或鼻饲能产生很高的抗体效价,可以作为霍乱弧菌的保护性疫苗^[2]。同时,由于 CTB 可以和哺乳动物肠上皮细胞的 GM1(Monosialoganglioside GM1)结合,能辅佐其他抗原刺激机体产生分泌型 IgA(sIgA)和血清型 IgG,因此可以作为粘膜免疫佐剂或给药的导向分子(carrier protein)^[3]。用化学偶联的方法使 CTB 与抗原蛋白交联,口服或鼻饲都产生了有效的免疫应答^[4,5]。但是化学偶联法存在着反应条件剧烈、成本高、偶联效率低等缺点。通过融合蛋白的方式或许能够弥补化学偶联法的不足。已有的实验表明,CTB 的构象具有较强的稳定性,在 N 端和 C 端融合上某些短的多肽,不会影响 CTB 形成五体及与 GM1 结合的能力^[6],这可能与 CTB 的 N 端和 C 端暴露在表面有关^[7]。

本文构建了 CTB 与乙肝表面抗原 a 表位的融合基因,并在大肠杆菌中获得了高效表达,通过免疫小鼠,检测了该抗原的免疫原性,为研制实用的粘膜免疫疫苗提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

带 CTB 基因的质粒 pCT-332 由军事医学科学院苏国富教授惠赠。克隆载体 pGEM-3Zf(+),表达载体 pET-30a、菌株 DH5 α 和 BL21(DE3)为本室保存;工具酶类购自 TaKaRa

作者简介:刘相国(1971-),男,山东泰安人,中国科学院微生物研究所博士,现在北京大学医学部基础医学院做博士后。*联系人

收稿日期:2000-10-21, **修回日期:**2001-02-19

公司。Expand™ High Fidelity PCR System 购自 Boehringer Mannheim 公司。抗乙肝病毒表面抗原抗体及其 ELISA 检测试剂盒、HRP 标记羊抗鼠购自华美公司。

1.2 DNA 及引物合成

根据 GenBank 中编码乙肝病毒 (adr) 表面抗原 (HBsAg) a 表位 (124aa-147aa) 的核苷酸序列, 将正链与负链分成两段合成。序列如下:

正链 1, 5'-ATTGCACCATCCCGGCTCAGGGTACCT-3'

负链 2, 5'-CTATGTTTCCGTCTTGTGCTGTACCAAACCATCTGACGGCAACTGCTAAG-3'

负链 1, 5'-GATCCTTAGCAGTTGCCGTCAGATGGTTTGG-3'

正链 2, 5'-TACAGCAACAAGACGGAAACATAGAGGTACCCTGAGCCGGGATGGTGCAATT-3'

根据 GenBank (Accession: X76390) 报道的 CTB 成熟肽的核苷酸序列设计引物。

5'-端引物为: 5'-GGAATTCATATGACACCTCAAAATATTACTG-3';

3'-端引物为: 5'-TGCCATACTAATTGCCG-3'。5'-端引物内含有的大肠杆菌稀有密码子改成了最嗜密码子, 并加入了 *EcoRI* 和 *NdeI* 酶切位点。以上序列均由上海生工公司合成。

1.3 CTB 与 HBsAg a 表位融合基因的克隆与测序

从 PCT-322 中, PCR 扩增 CTB 基因。反应条件: 94 °C, 2 min; 94 °C, 45 s, 50 °C, 45 s, 68 °C, 1 min, 30 cycles; 68 °C, 7 min。PCR 产物经 *EcoRI* 酶切后电泳回收备用。合成的 HBsAg a 表位的四段 DNA 以终浓度 100 nmol/mL 混合后用磷酸激酶磷酸化, 然后加复性缓冲液, 65 °C, 10 min, 逐渐冷却到室温, 放置 2 h, 取适量复性 DNA 与经 *EcoRI* 酶切回收的 CTB 的 PCR 产物及经 *EcoRI* 和 *BamHI* 酶切的 pGEM-3Zf(+) 进行连接, 转化 DH5 α , 蓝白斑筛选阳性克隆, 命名为 pGEM-CH。双脱氧末端终止法测序鉴定。

1.4 表达质粒 pET-30a-CH 的构建及融合蛋白的表达

NdeI、*BamHI* 酶切 pGEM-CH, 回收目的片段, 与 *NdeI*、*BamHI* 酶切的 pET-30a 连接, 转化 DH5 α , 质粒经酶切鉴定, 获重组质粒 pET-30a-CH。将此质粒转入 BL21(DE3), 在含 100 μ g/mL 卡那霉素的 LB 培养液中, 37 °C 培养过夜, 按 1:100 放大培养至 $OD_{600} = 0.6 \sim 0.7$ 时, 加 IPTG 至终浓度 2 mmol/L, 37 °C 诱导 4 h。

1.5 Tricine-SDS-PAGE 电泳检测^[8]

1.6 Western blot 检测

按文献[9]操作。一抗为抗 HBsAg 抗体。二抗为 HRP 标记羊抗鼠。

1.7 包涵体的制备及纯化

收集诱导表达的菌液, 5 000 g 离心 5 min, 弃上清, 适量水重悬后超声波破碎, 12 000 g 离心 10 min, 2 mol/L NaCl 洗涤沉淀, 重悬 30 min, 12 000 g 离心 10 min, 0.5% TritonX-100 及 4 mol/L 尿素同上洗涤, 重悬于适量水中。

1.8 融合蛋白的复性

纯化的包涵体溶于变性缓冲液 (7 mol/L 尿素, 1% 巯基乙醇, 0.1 mmol/L PMSF, 0.1 mmol/L 甘氨酸盐酸, pH3.2) 中, 加少许 2 mmol/L NaOH 直至澄清, 室温放置 2 h, 然后转移到透析袋中, 在复性液 (200 mmol/L NaCl, 1 mol/L EDTA, 3 mmol/L N_3Na , 0.1 mmol/L PMSF, 50 mmol/L Tris-HCl) 中 4 °C 透析过夜, 然后再在 0.05 mol/L $NaHCO_3$ 或 0.1 \times PBS 中透析 24 h, 其间换几次透析液。复性后的融合蛋白在 LABCONCO 冻干机中冻干备用。

1.9 动物免疫

冻干的融合蛋白溶于适量水中,选用 4~6 周的昆明雄性小鼠,以腹腔、灌胃、鼻饲、耳部皮肤涂抹四种方式进行免疫,腹腔、灌胃每次 0.1 mg,鼻饲、耳部皮肤涂抹每次 0.05 mg,每个处理 5 只小鼠,因短肽的表达较为困难,以生理盐水作为阴性对照。第 0 d、14 d 和 24 d 免疫,0 d、21 d、31 d 和 45 d 尾部采血检测抗体。

1.10 抗 HBsAg 抗体 ELISA 检测

按试剂盒说明操作。酶标抗体换成 HRP 标记羊抗鼠。抗体水平按文献[10]法计算。

2 结果

2.1 CTB 与 HBsAg a 表位融合基因的克隆及表达质粒 pET-30a-CH 的构建

合成 HBsAg a 表位 DNA 的时候在 5'-端设计了一突出的 T 碱基,连接时恰好与 CTB PCR 产物 3'-端额外加上的 A 碱基相配对,利用 CTB PCR 产物 5'-端 *EcoRI* 位点和 HBsAg a 表位 DNA 3'-端的 *Bam*HI 粘性末端将融合基因克隆到 pGEM-3Zf(+)中,序列测定表明这样得到的融合基因恰好是两阅读框的直接相连物(387bp)。将测序证实的质粒 pGEM-CH 经 *Nde*I、*Bam*HI 酶切后回收目的片段,定向插入 pET-30a 多克隆位点 *Nde*I 和 *Bam*HI 之间,转化 DH5 α ,重组质粒用 *Nde*I 和 *Bam*HI 酶切,可获得 387bp 的插入片段。

2.2 融合基因的表达与包涵体的初步纯化

将酶切证实的表达质粒 pET-30a-CH 转入大肠杆菌 BL21(DE3)中,挑选转化子进行诱导表达,Tricine-SDS-PAGE 分析表明,含重组质粒的菌株在分子量 14 kD 处出现了一条特异的高效表达带,与预期分子量(14.2 kD)相符,Western blot 分析也表明特异的表达带正是融合基因的诱导表达产物,表达量占总蛋白的 20%左右(图 1,图 2)。

2.3 融合蛋白包涵体的复性

Tricine-SDS-PAGE 分析见图 1,煮沸 3 min 处理的复性融合蛋白分子量与包涵体的相同,表明复性过程没有导致蛋白降解;上样缓冲液中不加巯基乙醇、未经煮沸处理的复性融合蛋白的电泳位置在 67 kD 左右,表明复性融合蛋白形成了五体,五体结构是 CTB 与上皮细胞上的 GM1 结合必需的,这意味着复性融合蛋白也保留了 CTB 原有的特性。

2.4 融合蛋白的免疫原性检测

ELISA 检测腹腔注射、灌胃、鼻饲、耳部皮肤涂抹四种方式免疫的小鼠血清抗 HBsAg 抗体,结果见表 1。免疫前,所有小鼠均检测不到特异性抗 HBsAg 抗体, $P/N < 2.0$ 。腹腔注射免疫二次后 7 d,可检测到抗 HBsAg 抗体,腹腔注射免疫三次后 7 d,达到峰值,此后略有下降,但仍维持在较高水平;与腹腔注射免疫方式不同,灌胃和鼻饲免疫二次后 7 d,可检测到抗 HBsAg 抗体阳性,但 P/N 值较低,三次免疫后 7 d, P/N 值明显升高,达到峰值,此后有所下降,但仍呈阳性,由于鼻饲融合蛋白的量低于灌胃的,所以鼻饲免疫的效果比灌胃要好,这可能与鼻腔的蛋白酶活性比消化道的低有关;耳部皮肤涂抹方式免疫二次后 7 d,虽然检测到抗 HBsAg 抗体阳性,但 P/N 值较低,免疫三次后 7 d 未见 P/N 值提高,Gregory 等曾报道 CT 与牛血清白蛋白(BSA)混合后皮肤免疫小鼠能够诱导产生较强的抗-BSA IgG 抗体^[11],我们的结果显示单纯 CTB 也许不能有效地提高皮肤免疫的效果。

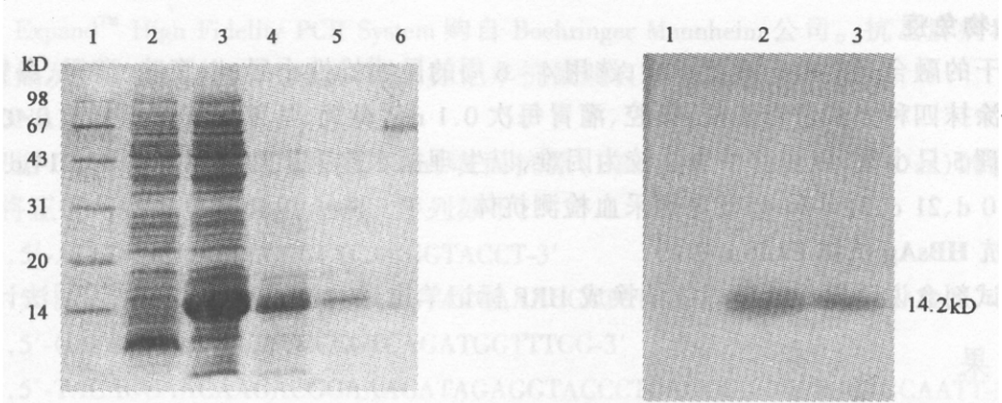


图1 CTB与HBsAg a表位融合蛋白在大肠杆菌中的表达(Tricine-SDS-PAGE,考马斯亮蓝染色)

Fig.1 Expression of pET-30a-CH in *E. coli* and analysis by Tricine-SDS-PAGE

1. Marker; 2. pET-30a/BL21(DE3); 3. pET-30a-CH/BL21(DE3); 4. Inclusion body from pET-30a-CH/BL21(DE3); 5. Renatured fusion protein, heat-treated before loading; 6. Renatured fusion protein, without heating and β -mercaptoethanol adding before loading.

图2 融合蛋白的Western Blot分析

Fig.2 Western Blot analysis of fusion protein.

1. pET-30a/BL21(DE3);
2. pET-30a-CH/BL21(DE3);
3. Inclusion body from pET-30a-CH/BL21(DE3).

表1 不同方式免疫后不同时间小鼠血清抗HBsAg抗体ELISA检测

Table 1 Anti-HBsAg antibodies analysis of four kinds of immunized mice with fusion protein of CTB and HBsAg antigen epitope

Time/d	Intraperitoneally	Orally	Intranasally	Skin immunization
0	1.5	1.2	1.2	1.4
21	5.0	2.3	2.6	2.3
31	7.2	5.0	6.4	2.6
38	5.1	3.4	4.3	2.2
45	4.9	3.1	4.1	1.8

Note: This data are average P/N of every group. $P/N \geq 2.0$ is positive; $P/N < 2.0$ is negative.

检测了45 d时腹腔注射、灌胃、鼻饲等免疫方式产生抗HBsAg抗体的效价,同时用融合蛋白包被酶标板检测了抗融合蛋白抗体的效价,结果见表2。融合蛋白经腹腔注射、鼻饲、灌胃三种方式免疫均能产生有效的免疫应答。腹腔注射

免疫方式抗HBsAg抗体效价和抗融合蛋白抗体效价相对较高,鼻饲方式次之,灌胃方式相对较差。这表明,用CTB作为载体蛋白进行粘膜免疫时,鼻饲是较好的方式。

表2 不同方式免疫后小鼠血清抗体ELISA检测

Table 2 Antibodies analysis of three kinds of mice immunized with fusion protein

	Titers of anti-HBsAg antibodies	Titers of anti-fusion protein antibodies
Intraperitoneally immunized mice	256	5 500
Orally immunized mice	32	1 500
Intranasally immunized mice	64	4 000

3 讨论

正常的 CTB 在 Cys⁹ 和 Cys⁸⁶ 之间形成二硫键,对 CTB 的构象至关重要^[7],我们在 CTB 的 C 端融合的乙肝病毒表面抗原 a 表位 24 个氨基酸中就有 5 个 Cys,但融合蛋白依然保留了形成五体的能力,这表明,CTB 的构象具有较高的稳定性,即使融合了含有较多 Cys 的多肽,也有可能不干扰融合蛋白正常二硫键的形成而阻碍五体的形成,融合蛋白中的 CTB 部分依然具有与 GM1 结合而成为导向分子的能力。

粘膜免疫疫苗因其方便简单的免疫方式,其研究已成为许多流行性疾病预防研究中的一个重要组成部分。CTB 不仅能提高肠道对蛋白的吸收率,而且可以激活免疫系统,提高机体对特定抗原产生的抗体效价,因此,通过基因融合的方法,把 CTB 作为粘膜疫苗的载体蛋白和导向分子,不失为研制粘膜疫苗的新途径。

参 考 文 献

- [1] Langeveld J P, Kamstrup S, Uttenthal A, et al. *Vaccine*, 1995, 13(11):1033 ~ 1037.
- [2] Czerkinsky C, Russek M W, Lycke N, et al. *Infect Immun*, 1989, 57(4):1072 ~ 1077.
- [3] Sun J B, Holmgren J, Czerkinsky C. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91:10795 ~ 10799.
- [4] Bergerot I, Ploix C, Petersen J, et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94:4610 ~ 4614.
- [5] Sun J B, Rask C, Olsson T, et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93:7196 ~ 7201.
- [6] Liljeqvist S, Christine A, Stefan S, et al. *J Immunol Methods*, 1997, 210:125 ~ 135.
- [7] Lhoir C, Renard A, Martial J A. *Gene*, 1990, 89:47 ~ 52.
- [8] Schagger H, Jagow G V. *Analytical Biochem*, 1987, 166:368 ~ 379.
- [9] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T(金冬雁等译). *分子克隆实验指南*. 第二版. 北京:科学出版社,1992.891.
- [10] 夏小滨,刘延清,祁国明,等. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2000, 20(2):142 ~ 148.
- [11] Gregory M, Rao G M, Gary R, et al. *Nature*, 1998, 391:851.

CONSTRUCTION OF MUCOSAL VACCINE DERIVED FROM HBV SURFACE ANTIGEN EPI TOPE A AND THE ASSAY OF ITS IMMUNOGENICITY

Liu Xiangguo Yang Gong Qiu Bingsheng* Tian Po

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: The fusion gene of HBV(adr) surface antigen epitope and B subunit of Cholera toxin was constructed and expressed successfully in *E. coli* at high yield. After denaturation-renaturation process, SDS-PAGE analysis showed that most of the renatured product reassociated in a pentameric form which was the same as natural CTB. Western blot analysis indicated that the immunogenicity of HBsAg antigen epitope was conserved. Moreover, ELISA analysis of the sera of orally, intranasally and intraperitoneally immunized mice showed that the circulating IgG antibodies to HBsAg were developed. The results may be helpful for constructing the novel mucosal vaccine with high efficacy.

Key words: CTB, HBsAg epitope a, Fusion protein, ELISA

* Author for correspondence