

NDV *F* 基因和胸腺五肽基因真核共表达质粒的构建及其免疫原性检测

贾红梅¹, 常维山¹, 宋文刚², 柴家前¹, 孙英峰¹

(1 山东农业大学 动物科技学院, 山东 泰安 271018; 2 泰山医学院 基础医学部, 山东 泰安 271000)

[摘要] 为了研究胸腺五肽基因的免疫增强作用, 根据 GenBank 收录的新城疫病毒(NDV) *F* 基因序列, 设计1对特异性引物, 其中上游引物含有胸腺五肽(Thymopentin, TP-5)的基因序列。以 NDV Z 株 *F* 基因的重组质粒为模板进行 PCR 扩增, 扩增产物与真核表达载体 pcDNA3.1/V5-His-TOPO 重组, 构建了真核共表达质粒 pcDNATP-5NDVZF。将重组质粒 pcDNATP-5NDVZF、pcDNANDVZF 分别以 100 μ g/只的剂量免疫小鼠, 用间接 ELISA 法和 MTT 法检测其免疫原性。结果表明, 重组质粒均能在小鼠体内诱导相应的体液免疫和细胞免疫, 其中 pcDNATP-5NDVZF 的作用较 pcDNANDVZF 更为显著。说明共表达胸腺五肽基因可增强机体对 DNA 疫苗的免疫反应。

[关键词] 新城疫病毒 *F* 基因; pcDNATP-5NDVZF; 免疫原性

[中图分类号] Q786

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)12-0021-04

Construction of eukaryotic expression plasmid of NDV *F* and thymopentin gene and detection of the immunogenicity

JIA Hong-mei¹, CHANG Wei-shan¹, SONG Wen-gang², CHAI Jia-qian¹, SUN Ying-feng¹

(1 Department of Animal Sciences and Technology, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China;

2 Department of Preclinical Medicine, Taishan Medical University, Tai'an, Shandong 271000, China)

Abstract: To study the immunopotential of thymopentin, according to the *F* gene sequence of newcastle disease virus published by GenBank, a pair of specific primers were designed, with up stream primers including the gene of TP-5. The NDV *F* gene DNA fragment was obtained by polymerase chain reaction (PCR) by using the recombination plasmid of NDVZF gene as the template. The PCR products were recombined into pcDNA3.1/V5-His-TOPO expression vector to construct eukaryotic expression plasmid pcDNATP-5NDVZF. The pcDNATP-5NDVZF and pcDNANDVZF were separately injected into muscles of mice at a dose of 100 μ g. The vaccinal immunogenicity was detected with indirect ELISA and MTT. The results showed that the recombination plasmid could induce humoral and cellular immunity. And the effect of pcDNATP-5NDVZF was more significant than pcDNANDVZF. This study indicated that the expression products of TP-5 gene could strengthen the immunogenicity of DNA vaccines.

Key words: newcastle disease virus *F* gene; pcDNATP-5NDVZF; immunogenicity

新城疫(Newcastle disease, ND)是由新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)引起的禽类的一

* [收稿日期] 2006-11-07

[基金项目] 山东省医药卫生科技发展计划重点项目(2005ZD05); 山东省自然科学基金项目(Y2005C21)

[作者简介] 贾红梅(1981—), 女, 山东淄博人, 在读硕士, 主要从事兽医微生物与免疫学研究。E-mail: jiahongmeidashan@163.com

[通讯作者] 常维山(1960—), 男, 山东泰安人, 教授, 硕士生导师, 主要从事兽医微生物与免疫学研究。

E-mail: wschang@sdaa.edu.cn

种急性、高度接触性传染病^[1],免疫接种是目前大多数国家控制新城疫的主要手段,但由于常规疫苗易受母源抗体干扰,常常造成免疫失败。核酸疫苗与常规疫苗不同,它能在自身细胞中产生外源性蛋白,其递呈过程与自然感染十分相似,因此核酸疫苗将诱导机体产生相当于对天然抗原的免疫应答反应,使用时不会受到母源抗体的影响^[2]。

胸腺五肽(TP-5)是胸腺生成素Ⅱ(Thymopoietin)第32~36位的氨基酸残基片断,其基本序列为H-Arg-Lys-Asp-Val-Tyr-OH,是由5种氨基酸组成的多肽,具有与胸腺生成素Ⅱ相同的全部生理功能,即有双向调节免疫系统的功能^[3]。胸腺五肽的主要生理作用是诱导T细胞的分化、增殖和成熟,增加T细胞的前体库。一方面,它可选择性地诱导Thy-1的前胸腺细胞转化为Thy-1'的T细胞,其作用机理是通过提升细胞内cAMP水平介导;另一方面,是它对成熟的外周血T细胞的作用,即通过激发其细胞内cAMP水平^[4],活化或调节不同T细胞亚群的数目和功能,实现对整个机体免疫系统的双向调节。

为提高DNA疫苗的免疫应答水平,基于胸腺五肽的免疫调节作用,本试验将胸腺五肽的基因序列与NDV F基因共同构建真核共表达质粒pcDNATP-5NDVZF,用该质粒免疫小鼠,探索共表达胸腺五肽基因是否能增强机体对DNA疫苗的免疫反应。现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 4周龄雌性昆明小鼠30只,质量(20±2)g,购自山东米歇尔生物制品有限公司。

1.1.2 菌种和质粒 NDV Z株F基因的重组质粒pcDNANDVZF(核酸序列号:GI:4929108),由山东农业大学动物科技学院微生物研究室保存;大肠杆菌DH5α菌株,由山东省畜禽疫病防治工程技术研究中心提供;真核表达载体pcDNA3.1/V5-His-TOPO,购自Invitrogen公司。

1.1.3 主要试剂 辣根酶标记山羊抗小鼠IgG(H+L),购自北京鼎国生物技术有限责任公司;RPMI1640,Invitrogen公司产品;四氮唑盐(MTT)、刀豆蛋白A(ConA)和二甲基甲酰胺(DMF),均为Sigma公司产品。

1.2 引物设计与合成

根据NDV F基因序列,设计1对引物,并在上

游引物5'端加胸腺五肽基因序列(5'-CGCAAAGACGTGTAC-3')。引物由上海生工生物工程有限公司合成,序列如下。

上游引物(P1):5'-GATATGCGCAAAGACGTGTACATGGGCTCC-3';

下游引物(P2):5'-CGGCTGCAGACTCTGTGTTTCAGATT-3'。

1.3 含NDV F基因重组质粒DNA的提取与扩增

将含有NDV Z株F基因的重组质粒pcDNANDVZF转化大肠杆菌DH5α菌株感受态细胞,增殖培养后提取质粒DNA。以上述质粒DNA为模板进行PCR扩增。PCR反应体系为50 μL: Model DNA 0.5 μL, 2.5 mmol/μL dNTPs 4 μL, 10×Buffer 5.0 μL, MgCl₂ 4.0 μL, 上、下游引物各2 μL, ddH₂O 32 μL, Taq enzyme 0.5 μL。反应程序为:95℃预变性5 min;95℃变性1 min, 50℃退火1 min, 72℃延伸2 min, 30个循环;72℃延伸10 min后,置4℃保存。

1.4 重组质粒pcDNATP-5NDVZF的构建

取4 μL回收纯化的PCR产物,与1 μL真核表达载体pcDNA3.1/V5-His-TOPO在22~23℃连接30 min,构建重组质粒pcDNATP-5NDVZF,然后转化大肠杆菌DH5α菌株感受态细胞。挑选阳性质粒,增殖培养后提取质粒,用Kpn I和Xho I双酶切,筛选阳性克隆,并将其送上海生工生物工程有限公司进行DNA序列测定,序列在GenBank网站([Http://www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov))进行比较。

1.5 重组质粒pcDNATP-5NDVZF免疫原性的初步检测

1.5.1 试验动物的免疫检测 取4周龄雌性昆明小鼠30只,分为3组,每组10只。先在小鼠后肢胫骨肌注射250 g/L灭菌蔗糖溶液100 μL,次日于相同部位注射质粒。第1组注射提取纯化的重组质粒pcDNATP-5NDVZF,剂量为100 μg/只;第2组注射提取纯化的重组质粒pcDNANDVZF,剂量为100 μg/只;第3组注射真核表达载体pcDNA3.1/V5-His-TOPO,剂量为100 μg/只。2周后加强免疫1次。

1.5.2 抗NDV抗体的间接ELISA法检测 分别于初免后2周(42日龄),加强免疫后2 d(44日龄)、7 d(49日龄)断尾采血,分离血清。将血清按体积比1:100进行稀释,利用间接ELISA法按常规步骤检测NDV抗体。包被抗原为NDV毒种接种9~10日龄鸡胚尿囊腔,于48~72 h后收集并经纯化的尿囊液。经间接ELISA反应后,用酶标仪检测各样品

孔的 OD_{450} 值,计算出 P/N(即样品孔 OD_{450} 值/阴性孔 OD_{450} 值),当 $P/N > 2.1$ 时判为阳性。

1.5.3 MTT 法检测淋巴细胞增殖功能 无菌采取加强免疫后 7 d 的小鼠脾脏,将制备好的脾脏淋巴细胞离心计数,用 RPMI1640 培养基配成 $2 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 细胞悬液。将上述已制备好的淋巴细胞加入 96 孔板中,每孔 95 μL ,每个样品 8 孔,其中 4 孔加 5 μL 质量浓度 100 $\mu\text{g/mL}$ ConA,使终质量浓度为 5 $\mu\text{g/mL}$;另 4 孔加培养液作对照组,每孔总量为 100 μL 。另设 4 孔为空白对照组。将培养板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5% CO_2 培养箱中培养 44 h 后,于各孔加入 10 μL 5 mg/mL MTT,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 4 h,每孔加入 100 μL 体积分数 50% DMF-200 g/L SDS,充分混匀,静置 30 min,待细胞代谢 MTT 形成的甲胺充分溶解,用自动酶标仪测定 OD_{570} 值,计算刺激指数(SI), $SI = \text{ConA 刺激孔 } OD_{570} \text{ 值} / \text{细胞对照孔 } OD_{570} \text{ 值}$ 。

1.6 数据分析

试验数据用 SAS 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 重组质粒 pcDNATP-5NDVZF 的构建

NDV Z 株 F 基因经 PCR 扩增后,得到的目的片段与预期结果相符(图 1)。取回收纯化的 PCR 产物,与真核表达载体 pcDNA3.1/V5-His-TOPO 连接,构建重组质粒 pcDNATP-5NDVZF,转化大肠杆菌 DH5 α 菌株感受态细胞,挑选阳性质粒,用 *Kpn* I 和 *Xho* I 进行双酶切,经琼脂糖凝胶电泳,结果表明有 2 条明显的条带出现,与目的片段(1.7 kb)和载体(5.5 kb)大小相符(图 2)。重组质粒 pcDNATP-5NDVZF 与 GenBank 中的源序列同源性超过 99%,起始密码和终止密码未出现变异,也无缺失突变,且目的基因两端为真核表达载体 pcDNA3.1/V5-His-TOPO 片段,5'端为胸腺五肽编码的序列,说明目的基因 NDV F 基因已与真核表达载体 pcDNA3.1/V5-His-TOPO 连接,并成功扩增了胸腺五肽编码的序列,真核共表达质粒构建成功。

图 1 NDV Z 株 F 基因 PCR 扩增产物电泳图
1. 2 000 bp DNA 标样;2~4. PCR 产物(1.7 kb)
Fig. 1 Electrophoresis result of PCR amplification products of NDVZ F gene
1. 2 000 bp DNA Marker;2-4. PCR products(1.7 kb)

2.2 重组质粒 pcDNATP-5NDVZF 的免疫原性检测结果

根据间接 ELISA 结果判定标准($P/N > 2.1$ 时判为阳性),由表 1 可以看出,第 1 组和第 2 组小鼠血清中抗体的阳性率为 100%,而第 3 组小鼠血清中抗体的阳性率为 0。于 44 日龄和 49 日龄采集的

图 2 重组质粒 pcDNATP-5NDVZF 双酶切和 PCR 鉴定结果
1. 15 000 bp+2 000 bp DNA 标样;2. 双酶切产物(5.5 kb+1.7 kb);
3. PCR 扩增产物

Fig. 2 Result of identification of recombinant plasmid by restriction enzyme and PCR of eukaryotic expression plasmid pcDNATP-5NDVZF
1. 15 000 bp+2 000 bp DNA Marker;2. Products of the recombinant plasmid DNA digested by restriction enzyme (5.5 kb+1.7 kb);
3. PCR amplification products

血清中,第 1 组的 P/N 值均显著高于第 2 组($P < 0.05$),表明在体液免疫方面,pcDNATP-5NDVZF 质粒的免疫原性显著高于 pcDNANDVZF 质粒。

由图 3 可以看出,小鼠在初免后 2 周经再次加强免疫后,体内抗体水平呈上升趋势,表明 pcDNATP-5NDVZF 可在小鼠体内持续表达。

表 1 小鼠 NDV 抗体的检测结果($\bar{X} \pm SD$)

Table 1 Result of NDV antibody in mice($\bar{X} \pm SD$)

组别 Groups	P/N		
	42 日龄 Forty-two-day	44 日龄 Forty-four-day	49 日龄 Forty-nine-day
第 1 组 The first group	2.24±0.03	2.45±0.03 *	2.78±0.03 *
第 2 组 The second group	2.19±0.02	2.35±0.01	2.65±0.02
第 3 组 The third group	1.03±0.03	1.11±0.02	1.08±0.02

注：* 表示与第 2 组相比差异显著($P<0.05$)。

Note: * means significant difference ($P<0.05$)compared with the second group.

胸腺五肽制剂已在临床上得到了广泛应用,在治疗恶性肿瘤、慢性肝炎、自身免疫性疾病等方面均表现出了显著的免疫增强疗效^[6]。胸腺五肽的免疫调节作用主要是^[7]:诱导 T 淋巴细胞分化并与成熟 T 淋巴细胞特异受体结合,使胞内环磷酸腺苷(cAMP)水平升高,从而诱发一系列胞内反应,达到调节免疫功能的作用。本试验将胸腺五肽的基因序列编码到 NDV F 基因中,构建出重组质粒 pcDNATP-5NDVZF,使胸腺五肽以基因水平对动物机体的免疫应答进行调控,较直接使用胸腺五肽制剂更为经济方便。

刘兆球等^[8]构建了新城疫病毒 F 基因的真核表达质粒,并对其免疫原性进行了检测。本试验为了增强新城疫核酸疫苗的免疫原性,在刘兆球等工作的基础上,将胸腺五肽和新城疫病毒 F 基因同时插入到真核表达载体 pcDNA3.1/V5-His-TOPO 中,构建了重组质粒 pcDNATP-5NDVZF,通过用其免疫小鼠,证明 NDV F 的真核表达质粒能在小鼠体内诱导相应的体液免疫和细胞免疫。其中在体液免疫方面,重组质粒 pcDNATP-5NDVZF 的免疫原性显著高于 pcDNANDVZF 质粒;在细胞免疫方面,pcDNATP-5NDVZF 质粒的免疫原性极显著高于 pcDNANDVZF 质粒,说明在免疫增强方面 pcDNATP-5NDVZF 质粒的细胞免疫强于体液免疫,原因可能与 TP-5 的免疫调节机制有关。由于病原体感染后具有胞内和胞外两种生长寄生和繁殖方式,因此需要机体产生不同的免疫应答来控制感染^[9]。本试验证明,胸腺五肽基因能诱导有效的细胞免疫应答,从而对控制细胞内增殖病原微生物感染的疾病具有重要意义。

本试验通过对小鼠体液和细胞免疫水平的检测可知,pcDNATP-5NDVZF 核酸疫苗可在小鼠体内表达并诱导相应的体液免疫和细胞免疫,从而为 NDV 核酸疫苗以小鼠作为试验动物模型提供了理论基础。但本研究仅对核酸疫苗 pcDNATP-5NDVZF 在小鼠体内的免疫原性作了初步探讨,对该核酸疫苗的保护作用及安全性还有待深入研究。

(下转第 29 页)

图 3 小鼠体内 NDV 抗体变化的柱形图

Fig.3 Changes of NDV antibody in the mice

由表 2 可知,3 组间的 SI 值差异均极显著($P<0.01$),说明质粒 pcDNATP-5NDVZF 和 pcDNANDVZF 均能诱导相应的细胞免疫应答,且第 1 组的细胞免疫应答极显著高于第 2 组($P<0.01$),进一步说明在细胞免疫方面,pcDNATP-5NDVZF 质粒的免疫原性极显著高于 pcDNANDVZF 质粒。

表 2 MTT 法脾脏淋巴细胞刺激指数的测定结果($\bar{X} \pm SD$)

Table 2 Result of splenic lymphocyte stimulation index with MTT($\bar{X} \pm SD$)

组别 Groups	SI
第 1 组 The first group	1.82±0.01 A
第 2 组 The second group	1.58±0.02 B
第 3 组 The third group	1.22±0.03 C

注:不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$)。

Note:Different capital letters show greatly significant difference ($P<0.01$).

3 讨 论

核酸疫苗的诞生,为基因治疗和免疫学领域带来了不可估量的前景。但核酸疫苗在诱导免疫应答时的效率相对较低,影响了它的实际应用。为了提高核酸疫苗的免疫应答水平,许多研究者将表达免疫调节因子的 DNA 质粒与含有病原的保护性抗原质粒共同免疫,或将二者克隆到同一载体中,取得了较好的试验结果^[5]。