

网络出版时间:2014-02-28 13:13

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.03.035

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.03.035.html>

口服重组酵母(ApoB100 肽段)对小鼠产生特异性抗体的诱导作用

麻丽霞,张婷婷,张优优,周 罡,张智英

(西北农林科技大学 动物科技学院,陕西 杨凌 712100)

[摘 要] **【目的】**开发一种针对低密度脂蛋白成分 ApoB100 的新型重组酵母疫苗,为动脉粥样硬化(Atherosclerosis, AS)的防治提供一种思路。**【方法】**利用 PCR 得到包含编码 ApoB100 的 3 136—3 155 位氨基酸残基的目的片段,将其克隆到酵母表达载体 JMB88-HA-OVA-MCS 上,构建 JMB88-HA-OVA-hApoB 载体,用硫酸铜诱导表达后获得 HA-OVA-hApoB 融合蛋白。采用口服的方法对昆明小白鼠免疫成功表达 HA-OVA-hApoB 蛋白的酵母细胞 12 周,每周 1 次,每次 1×10^8 个酵母细胞,免疫结束后 4 周采血,用 Western blot 检测小鼠是否产生特异性抗体。**【结果】**PCR 扩增获得了 859 bp 的人 ApoB100 基因。成功构建了 JMB88-HA-OVA-hApoB 载体。口服免疫 12 周后,HA-OVA-hApoB 免疫组小鼠的血清中含有特异性 ApoB100 抗体。**【结论】**灌服表达人 ApoB100 肽段融合蛋白的重组酿酒酵母能诱导小鼠的免疫反应,使其产生特异性抗体。

[关键词] 昆明小白鼠;载脂蛋白 B;重组酵母疫苗;口服免疫

[中图分类号] S852.4⁺3

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2014)03-0034-05

Induction of mice specific antibody by oral administration of whole recombinant yeast vaccine (ApoB100)

MA Li-xia, ZHANG Ting-ting, ZHANG You-you, ZHOU Gang, ZHANG Zhi-ying

(College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】**The objective of this study was to develop a novel recombinant yeast vaccine which targets the low-density lipoprotein apolipoprotein B-100 (ApoB100) to induce a protective immune response, and could improve the prevention and cure of atherosclerosis (AS). **【Method】**PCR was used to amplify a target fragment from human genome containing apoB-100, and clone it to express vector JMB88-HA-OVA-MCS to construct JMB88-HA-OVA-hApoB vector. HA-OVA-hApoB fusion protein was obtained after induction using copper sulfate. Oral delivery of 1×10^8 recombinant yeasts with HA-OVA-hApoB protein to each mouse was conducted once a week for 12 weeks. Serum samples of immunized mice were collected 4 weeks after the immunization and analyzed using Western blot method to check if ApoB100-specific antibody presented. **【Result】**A 859 bp human ApoB100 fragment was obtained by PCR. JMB88-HA-OVA-hApoB vector was established successfully. Oral administration of apoB-100-specific recombinant yeast vaccine for 12 weeks had a specific immune response to ApoB100 peptide. **【Conclusion】**Oral administration of recombinant yeast with ApoB100 fusion protein induced mice to create specific antibody.

Key words: mice; apolipoprotein B; recombinant yeast vaccine; oral administration

[收稿日期] 2013-03-27

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31172186)

[作者简介] 麻丽霞(1986—),女,山西大同人,在读硕士,主要从事基因组操作及转基因动物研究。

[通信作者] 张智英(1958—),男,陕西兴平人,教授,博士生导师,主要从事动物基因组学、动物病毒及其在癌症治疗中的应用研究。

心脑血管疾病严重威胁着人类的健康,已成为人类死亡的头号杀手,而动脉粥样硬化(Atherosclerosis, AS)又是大多数心脑血管疾病发生的病理基础。目前,临床上已有多种药物能够有效地防治AS,但这些药物均在不同程度上存在一定的副作用,例如,他汀类药物能起到很好的稳定和减少动脉粥样硬化斑块的作用,但却可能会引起肝毒性和肌肉炎症等副作用^[1]。AS作为一种炎症性疾病已被大家熟知^[2],所以近年来有关疫苗作为最新发展的AS治疗方法的研究十分活跃,并且取得了很多人振奋的研究进展,其中一个思路是开发针对AS的危险独立因子ApoB100的疫苗^[3-4]。

有学者发现了一个针对氧化低密度脂蛋白(oxidized low-density lipoprotein, oxLDL)表位的动脉粥样保护免疫反应^[5],他们将ApoB100中具有特异免疫原性的3136-3155位氨基酸(命名为p210)组成的肽片段共价偶联到人类血清白蛋白上,与佐剂混合后制成疫苗CardioVax' lead product(CVX-210-H),与对照组相比,用其免疫小鼠后能够显著减少60%以上的动脉粥样硬化病变。Fredrikson等^[6]将p210与霍乱毒素B亚单位(CTB)融合在一起免疫小鼠,与对照组相比,用p210-CTB免疫12周后,小鼠主动脉病变减少了35%。

近几年的研究显示,表达外源蛋白的重组酿酒酵母能够靶向小肠树突状细胞,诱导其产生抗原特异性的细胞和体液免疫反应^[7-8],并且酵母繁殖容易,对人体没有致病性,这提醒人们可以利用酵母作为递呈抗原的载体^[9]。2011年,Zhang等^[10]研究发现,口服特异性表达MSTN的重组酿酒酵母疫苗后,小鼠体质量和肌肉明显增加。

本研究利用PCR体外扩增ApoB100上一段包含可编码p210肽段的目的片段,将其构建到酵母表达载体JMB88-OVA-HA(该载体是CUP1启动子)中,在硫酸铜诱导下表达HA-OVA-hApoB融合蛋白,从而开发一种针对ApoB100 p210肽段的新型重组酵母疫苗。利用酵母本身具有佐剂的作用和易于表达抗原蛋白并递呈抗原的特性,将诱导后的重组酵母用灌胃免疫的方法免疫昆明小白鼠,检测小鼠是否会产生针对外源蛋白的特异性抗体,以期对动脉粥样硬化的防治提供疫苗。

1 材料与方法

1.1 材料

免疫用昆明小白鼠购自西安交通大学繁殖研究

中心。原核表达载体pGEX-4T-1、酵母表达载体JMB88-HA-OVA-MCS、大肠埃希菌菌株DH5 α 和Rosseta(DE3)、酿酒酵母菌株JMY1,均由西北农林科技大学动物科技学院动物基因组学实验室保存。DNA限制性内切酶、T4 DNA连接酶,购自NEB公司;Easy Taq DNA聚合酶、Trans2K Plus DNA Marker、ProteinRuler II蛋白Marker和EasySee Western Marker,购自全式金生物技术有限公司;胶回收试剂盒购自Axygen公司;质粒提取试剂盒购自Omega公司;羊抗鼠 Goat Anti-Mouse IgG二抗购自康为世纪公司;Western blot用PVDF膜、ECL显色液,均购自Millipore公司;异丙基- β -D硫代半乳糖苷(IPTG),购自Promega公司。

1.2 人ApoB100基因原核表达载体pGEX-4T-1-hApoB的构建

根据GenBank中人ApoB100基因序列(GenBank登录号:NM_000384.2),设计能扩增包含编码p210目的片段的PCR引物hApoB-F和hApoB-R。引物由上海博尚生物技术有限公司合成,其序列如下, hApoB-F: 5'-GGGAGATCTATAGACT-TCCTGAATAACTATGCA-3', 下划线部分为Bgl II酶切位点; hApoB-R: 5'-GGGCTCGAGTTGGTATTTCAGTGTGATGACACTTG-3', 下划线部分为Xho I酶切位点。

以人基因组为模板,以hApoB-F和hApoB-R为引物,PCR扩增人ApoB100基因片段。50 μ L PCR反应体系为:模板1 μ L, hApoB-F和hApoB-R各1 μ L, dNTP 4 μ L, DNA聚合酶1 μ L, 10 $\times$ buffer 5 μ L, ddH₂O 37 μ L。PCR反应条件为:95 $^{\circ}$ C预变性5 min; 95 $^{\circ}$ C变性30 s, 56 $^{\circ}$ C退火30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸50 s, 30个循环;最后72 $^{\circ}$ C延伸10 min。PCR产物经10 g/L琼脂糖凝胶电泳检测后,用Bgl II/Xho I双酶切,胶回收纯化目的片段。用BamH I/Xho I双酶切原核表达载体pGEX-4T-1,将回收得到的851 bp的PCR目的片段(hApoB)定向克隆到原核表达载体pGEX-4T-1中,构建质粒pGEX-4T-1-hApoB,转化大肠埃希菌DH5 α 感受态细胞,涂LB/Amp平板,挑取单克隆在含100 μ g/mL氨苄青霉素(Amp)的LB液体培养基(LB/Amp)中培养8 h。提取质粒pGEX-4T-1-hApoB,经EcoR V/Xho I双酶切鉴定正确后,将阳性质粒送Invitrogen公司进行测序分析。

1.3 人ApoB100融合蛋白的诱导表达

用测序正确的pGEX-4T-1-hApoB重组原核表

达载体转化 Rosseta (DE3) 感受态细胞, 涂 LB/Amp 平板筛选阳性克隆。将筛选的阳性克隆接种于 2 mL 的 LB/Amp 液体培养基中, 37 ℃ 摇菌过夜后, 以 1 : 100 的体积比接种于 2 mL 新鲜的 LB/Amp 液体培养基中, 摇菌至 OD₆₀₀ 为 0.6~0.8 时, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG, 30 ℃ 诱导表达 3~4 h。将菌液于 4 ℃ 条件下 10 000 r/min 离心 2 min, 收集菌体沉淀。用 PBS 溶液重悬菌体沉淀, 冰浴超声波破碎 20 min(破碎 5 s, 间歇 5 s), 得到菌体破碎液。以未诱导的菌体为对照, 进行 SDS-PAGE 电泳检测, 确定融合蛋白是否诱导表达成功。

1.4 人 *ApoB100* 基因酵母真核表达载体 JMB88-HA-OVA-hApoB 的构建及诱导表达

将 1.2 中经 *Bgl* II / *Xho* I 双酶切并切胶回收纯化得到的目的片段, 与经同样双酶切后的酵母真核表达载体 JMB88-HA-OVA-MCS 连接, 构建 JMB88-HA-OVA-hApoB 载体, 转化大肠埃希菌 DH5 α 感受态细胞, 涂 LB/Amp 平板, 挑取单克隆并在 LB/Amp 液体培养基中 37 ℃ 培养 8 h。提取质粒 JMB88-HA-OVA-hApoB, 并经 *Bgl* II / *Xho* I 双酶切鉴定后送阳性质粒到 Invitrogen 公司进行测序分析, 保存测序正确的质粒备用。

将测序正确的酵母表达载体 JMB88-HA-OVA-hApoB 和空载体 JMB88-HA-OVA, 分别采用 LiAc 方法转化到酵母菌株 JMY1 中, 并在人工合成的基本 SD 固体培养基上进行筛选。将筛选到的阳性克隆接种到 SD 液体培养基中, 当菌液 OD₆₀₀ 达到 0.5 时加入 0.5 mmol/L 的硫酸铜溶液诱导表达 10 h。硫酸铜诱导表达后, 在 4 ℃、8 000 r/min 条件下离心 10 min 收集酵母细胞, 并用 PBS 溶液洗涤 3 次。将获得的酵母细胞于 56 ℃ 灭活 1 h, 然后置于 -70 ℃ 冰箱中备用。

冰浴中超声波裂解收集的酵母细胞, 然后在沸水中煮 10 min, 进行 SDS-PAGE 电泳, 并转到硝酸纤维素膜上。转膜后用 50 g/L 的脱脂奶粉室温封闭 1 h; 加入一抗 (HA 标签抗体, 1 : 2 000) 室温孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min; 加入二抗 (羊抗鼠 IgG, 1 : 5 000) 室温孵育 40 min, 室温下用 TBST 在脱色摇床上洗 3 次, 每次 10 min; 然后加入化学发光底物显像, 观察重组酵母是否能成功表达 HA-OVA-hApoB 和 HA-OVA 融合蛋白。

1.5 HA-OVA-hApoB 蛋白对小鼠的免疫

将 18 只昆明小白鼠随机均分为 3 组, 每组每周口服免疫 1 次。HA-OVA-hApoB 组小鼠每次口服

免疫大约 1×10^8 个表达 HA-OVA-hApoB 蛋白的酵母细胞, HA-OVA 组小鼠每次口服免疫大约 1×10^8 个表达 HA-OVA 蛋白的酵母细胞, 空白对照组小鼠给予等量 PBS, 整个免疫过程持续 12 周。免疫结束后 4 周对小鼠进行断尾采血, 采集各组小鼠血液, 分离血清, 将血清存放在 -70 ℃ 冰箱中以备后续 Western blot 检测。

1.6 小鼠特异性免疫反应的 Western blot 检测

用 Western blot 检测小鼠血清中是否存在 ApoB100 特异性抗体。超声波破碎 1.3 中经 IPTG 诱导后的细菌细胞, 并用 SDS-PAGE 分离细菌蛋白, 然后转移到硝酸纤维素膜上。转膜后用 50 g/L 的脱脂奶粉室温封闭 1 h; 加入一抗 (各组小鼠血清, 1 : 500) 室温孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min; 加入二抗 (羊抗鼠 IgG, 1 : 5 000) 室温孵育 40 min, 用 TBST 在室温下脱色摇床上洗 3 次, 每次 10 min; 然后加入化学发光底物显像。

2 结果与分析

2.1 人 *ApoB100* 基因的 PCR 扩增

由图 1 可知, PCR 扩增得到的 *ApoB100* 目的基因片段长度为 859 bp。

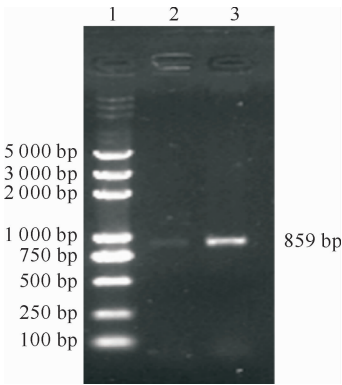


图 1 人 *ApoB100* 基因片段的 PCR 扩增

1. Trans2K Plus DNA Marker;

2,3. 人 *ApoB100* 基因片段的 PCR 扩增产物

Fig. 1 PCR product of human *ApoB100* gene fragment
1. Trans2K Plus DNA Marker; 2,3. PCR product of human *ApoB100* gene fragment

2.2 原核表达载体 pGEX-4T-1-hApoB 的双酶切鉴定与诱导表达

pGEX-4T-1-hApoB 阳性质粒经 *Eco*R V / *Xho* I 双酶切鉴定, 获得了 3 164 和 2 644 bp 的 2 条片段 (图 2), 与预期结果一致。

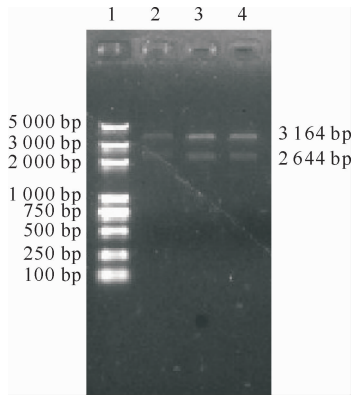


图 2 原核表达载体 pGEX-4T-1-hApoB 的双酶切鉴定

1. Trans15K DNA Marker;2,3,4. pGEX-4T-1-hApoB 经 *EcoRV*/*Xho* I 双酶切的产物

Fig. 2 Double digestion of prokaryotic expression vector pGEX-4T-1-hApoB

1. Trans15K DNA Marker;2,3,4. pGEX-4T-1-hApoB digested by *EcoRV*/*Xho* I

SDS-PAGE 电泳结果显示,从 IPTG 诱导的菌体破碎液中获得 57 ku 的 GST-ApoB100 融合蛋白,而在未诱导的菌体破碎液中未检测到明显的目的条带(图 3),说明目的蛋白诱导表达成功。

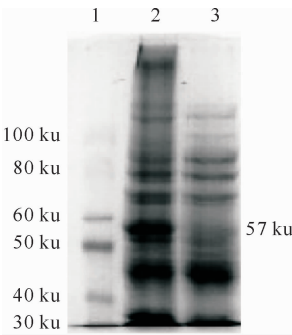


图 3 人 ApoB100 重组蛋白的原核表达

1. EasySee Western Marker;2. IPTG 诱导的转化了 pGEX-4T-1-hApoB 的重组菌破碎液;3. 未诱导的转化 pGEX-4T-1-hApoB 的重组菌破碎液

Fig. 3 Prokaryotic expression of ApoB100 recombinant protein

1. EasySee Western Marker;2. Whole cell lysate of IPTG-induced rosseta transformed with pGEX-4T-1-hApoB;
3. Whole cell lysate of non-induced rosseta transformed with pGEX-4T-1-hApoB

2.3 酵母真核表达载体 JMB88-HA-OVA-hApoB 的双酶切鉴定与诱导表达

JMB88-HA-OVA-hApoB 阳性质粒经 *Bgl* II/*Xho* I 双酶切鉴定,获得了 7 769 bp 的载体片段和 863 bp 的 *ApoB*100 基因片段(图 4),与预期结果一致。

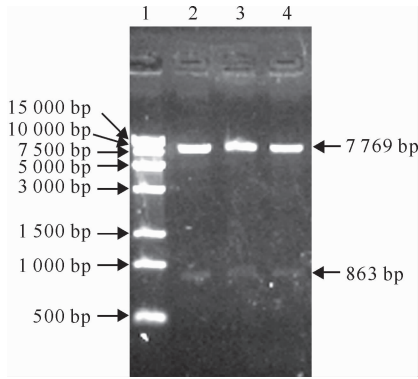


图 4 表达载体 JMB88-HA-OVA-hApoB 的双酶切鉴定

1. Trans15K DNA Marker;2,3,4. JMB88-HA-OVA-hApoB 经 *Bgl* II/*Xho* I 双酶切的产物

Fig. 4 Double digestion of prokaryotic expression vector JMB88-HA-OVA-hApoB

1. Trans15K DNA Marker;2,3,4. JMB88-HA-OVA-hApoB digested by *Bgl* II/*Xho* I

应用 HA 抗体标签,成功检测到转化了 JMB88-HA-OVA-hApoB 的酵母菌株 JMY1 经硫酸铜诱导后表达了约 83 ku 的 HA-OVA-hApoB 融合蛋白,而转化了 JMB88-HA-OVA 的酵母菌株 JMY1 在硫酸铜诱导后表达了约 53 ku 的 HA-OVA 蛋白(图 5)。

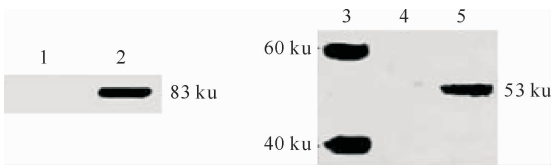


图 5 酵母菌株 JMY1 中 HA-OVA-hApoB、HA-OVA 融合蛋白表达的 Western blot 检测

1. 未诱导的转化 JMB88-HA-OVA-hApoB 的酵母菌破碎液;
2. 硫酸铜诱导的转化了 JMB88-HA-OVA-hApoB 的酵母菌破碎液;
3. EasySee Western Marker;4. 未诱导的转化 JMB88-HA-OVA 的酵母菌破碎液;5. 硫酸铜诱导的转化了 JMB88-HA-OVA 的酵母菌破碎液

Fig. 5 Western blot analysis of HA-OVA-hApoB and HA-OVA fusion proteins in JMY1

1. Lysate of non-induced JMY1 transformed with JMB88-HA-OVA-hApoB;2. Lysate of CuSO₄-induced JMY1 transformed with JMB88-HA-OVA-hApoB;3. EasySee Western Marker;
4. Lysate of non-induced JMY1 transformed with JMB88-HA-OVA;5. Lysate of CuSO₄-induced JMY1 transformed with JMB88-HA-OVA

2.4 小鼠血清中 ApoB100 特异性抗体的 Western blot 检测

本试验发现,HA-OVA-hApoB 免疫组小鼠血清中存在与原核表达的 ApoB 蛋白有特异性免疫反应的抗体,而 HA-OVA 免疫组小鼠和灌胃 PBS 组

小鼠血清中并未检测到特异性抗体(图 6)。

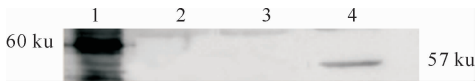


图 6 各免疫组小鼠血清中 ApoB100 抗体的 Western blot 检测

1. EasySee Western Marker;2. PBS 组小鼠血清;
3. HA-OVA 组小鼠血清;4. HA-OVA-hApoB 组小鼠血清

Fig. 6 Western blot detection of ApoB100-specific antibodies presented in mouse serum

1. EasySee Western Marker;2. Serum of mice immunized with PBS;
3. Mice serum of HA-OVA group;4. Mice serum of HA-OVA-hApoB group

3 讨 论

ApoB100 蛋白是低密度脂蛋白(LDL)颗粒的重要组成部分,并且是 LDL 合成必需的蛋白组分。LDL 主要负责将胆固醇运送到全身组织中,然后大部分 LDL 通过细胞表面的 LDL 受体进入组织,经代谢而被清除^[11]。血液中 LDL 含量的升高将增加循环单核细胞粘附在动脉内皮细胞上的数量,同时也增加了整个 LDL 颗粒进入内膜的比例。一旦 LDL 进入内皮细胞,就可能被内皮细胞、平滑肌细胞或者巨噬细胞氧化修饰,而 LDL 的氧化状态在 AS 病变的发展过程中起关键作用^[12-13]。所以保证 LDL 的非氧化状态和降低 LDL 的含量对防治 AS 具有重大意义。

本课题组提出了一个新颖的诱导动脉粥样硬化的免疫保护策略——利用酵母细胞具有的天然佐剂作用^[14-15]和易于表达抗原蛋白的特性,将表达含人 ApoB100 肽段融合蛋白的真核载体转化到酿酒酵母细胞中,制成重组酵母疫苗。机体免疫系统的抗原递呈细胞可以有效地摄取重组酵母,继而诱导强烈的免疫反应。本研究通过 PCR 获得了编码人 ApoB100 肽段的 目的片段,成功构建了表达 ApoB100 肽段的原核表达载体以及酵母真核表达载体。通过转化 Rosseta (D3)和 JMY1 菌株,成功诱导获得了目的蛋白及重组酵母疫苗。

本研究通过每周免疫灌服 1 次大约 2×10^8 个相应的诱导后的酵母细胞,空白对照组小鼠灌服等体积的 PBS 溶液,12 周后检测发现,HA-OVA-hApoB 免疫组小鼠的血清中能明显检测到 ApoB100 抗体存在,而在 HA-OVA 组和 PBS 组小鼠血清中并未检测到特异性抗体。这证明了酵母细胞可以很好地起到佐剂的作用,将外源蛋白运输并

呈递给小鼠免疫系统。本试验得到的 ApoB100 重组酵母疫苗能够有效地诱导小鼠产生 ApoB100 特异性抗体,为以后验证这种重组疫苗在防治人类心血管疾病上是否有效奠定了基础。

[参考文献]

[1] Jones P, Kafonek S, Lauroral I, et al. Comparative dose efficacy study of atorvastatin versus simvastatin, pravastatin, lovastatin, and fluvastatin in patients with hypercholesterolemia (the CURVES study) [J]. *Am J Cardiol*, 1998, 81(5): 582-587.

[2] Ross R. Atherosclerosis: An inflammatory disease [J]. *N Engl J Med*, 1999, 340(2): 115-126.

[3] Ameli S, Hultgardth-Nilsson A, Regnstrom J, et al. Effect of immunization with homologous LDL and oxidized LDL on early atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1996, 16(8): 1074-1079.

[4] Shah P K, Chyu K Y, Fredrikson G N, et al. Vaccination for atherosclerosis: A novel therapeutic paradigm [J]. *Expert Rev Vaccines*, 2004, 3(6): 711-716.

[5] Fredrikson G N, Hedblad B, Alm R, et al. Identification of immune responses against aldehyde-modified peptide sequences in apoB associated with cardiovascular disease [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23(5): 872-878.

[6] Fredrikson G N, Lindholm M, Dimayuga P, et al. Inhibition of atherosclerosis in apoE-null mice by immunization with apoB-100 peptide sequences [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23(5): 879-884.

[7] Stubbs A C, Martin K S, Coeshott C, et al. Whole recombinant yeast vaccine activates dendritic cells and elicits protective cell-mediated immunity [J]. *Nat Med*, 2001, 7(5): 625-629.

[8] Owais M, Masood A K, Agrewala J N, et al. Use of liposomes as an immunopotentiating delivery system: In perspective of vaccine development [J]. *Scand J Immunol*, 2001, 54(1/2): 125-132.

[9] Stubbs A C, Wilson C C. Recombinant yeast as a vaccine vector for the induction of cytotoxic T-lymphocyte responses [J]. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*, 2002, 4(1): 35-40.

[10] Zhang T T, Yang H J, Xu K, et al. Oral administration of myostatin-specific whole recombinant yeast *Saccharomyces cerevisiae* vaccine increases body weight and muscle composition in mice [J]. *Vaccine*, 2011, 29(46): 8412-8416.

[11] Brown M S, Goldstein J L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis [J]. *Science*, 1986, 232(4746): 34-47.

[12] 李素敏, 郭恒怡, 吴其夏. 弱氧化型低密度脂蛋白的致动脉粥样硬化作用 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2002, 10(3): 271-274.

Li S M, Guo H Y, Wu Q X. Proatherogenic effects of mm-LDL [J]. *Chinese Journal of Arteriosclerosis*, 2002, 10(3): 271-274. (in Chinese)