

pcDNA3.1/ SjDLC 和 pcDNA3.1/mIFN- γ 重组质粒构建及表达

高勇强¹, 阳青兰¹, 胡 丽^{1,2}, 梁 瑜^{1,3}, 刘 彦^{1,3}, 张愉快¹, 王可耕¹, 肖建华^{1*}

(1.南华大学医学院病原生物学研究所 湖南 衡阳 421001; 2.南华大学
护理学院内护教研室; 3.南华大学医学院寄生虫学教研室)

摘 要: **目的** 构建日本血吸虫动力蛋白轻链 DNA 疫苗和小鼠干扰素真核表达质粒, 研究其在 HeLa 细胞及动物体内的表达。 **方法** 设计特异性引物, PCR 扩增获取动力蛋白轻链(SjDLC)与干扰素- γ (IFN- γ)基因, 克隆于 pcDNA3.1 真核质粒, 经双酶切及测序鉴定。将两种重组质粒分别转染至 HeLa 细胞, Western blot 鉴定其表达。真核质粒经左腿股四头肌免疫小鼠, 在末次免疫 2 周后, PCR 法检测小鼠肌肉组织内 SjDLC 和 IFN- γ 基因, 免疫组织化学法检测基因的表达, MTT 法检测 T 细胞增殖水平。 **结果** PCR 和双酶切能检测到 280 bp 的 SjDLC 基因及 480 bp 的 IFN- γ 基因; Western blot 显示在 12 kDa 和 19 kDa 处有阳性反应条带, 与 SjDLC 和 IFN- γ 分子量大小一致, 两种基因能在 HeLa 细胞中表达。PCR 及免疫组化显示两种基因能在小鼠肌肉组织中存在和表达。MTT 法显示两种质粒均能刺激 T 细胞增殖。 **结论** 成功构建 pcDNA3.1/SjDLC 和 pcDNA 3.1/ mIFN- γ 真核质粒, 两种质粒能在 HeLa 细胞和动物体内表达。

关键词: DNA 疫苗; 动力蛋白轻链; 干扰素- γ

中图分类号: R383.24 文献标识码: A

Construction and expression of the pcDNA3.1/SjDLC and pcDNA 3.1/mIFN- γ

GAO Yongqiang, YANG Qinglan, HU Li, et al

(Institute of Pathogenic Biology, Medical College, University of South China, Hengyang 421001, Hunan, China)

Abstract: **Objective** To construct the dynein light chain of *Schistosoma japonicum* DNA vaccine and IFN- γ recombinant plasmid of mice, so as to investigate their expression in HeLa cells and mouse. **Methods** A pair of primers designed by PRIMER5.0 software was synthesized; the gene fragments of SjDLC and mIFN- γ were amplified by PCR, and inserted into eukaryotic expression plasmid pcDNA3.1, where the recombinant plasmids were identified with restrictive enzymes and sequenced. The recombinant vectors pcDNA3.1/SjDLC and pcDNA3.1/mIFN- γ were transfected into HeLa cells; the expressed proteins were identified by Western blot. These plasmids were injected into BALB/c mice too, the gene of SjDLC and IFN- γ in quadriceps femoris were identified by PCR. The expression of SjDLC, IFN- γ were observed with immunohistochemistry. The proliferation of splenic lymphocytes in mice was detected by MTT. **Results** The 280 bp of SjDLC gene and 480 bp of IFN- γ gene were observed through PCR and double enzyme digestion; Western blot displayed that positive response bands in 12 kDa and 19 kDa which is consistent with the molecular weight of SjDLC and IFN- γ were successfully expressed in HeLa cells. PCR and immunohistochemistry showed that two genes expressed in mouse muscle tissue. MTT showed that two plasmids could stimulate the proliferation of T cells. **Conclusion** The pcDNA/SjDLC DNA vaccine and recombinant plasmid pcDNA/mIFN- γ were successfully constructed and then expressed in HeLa cells and mouse.

Key words: DNA vaccine; SjDLC; IFN- γ

收稿日期: 2016-07-20; 修回日期: 2017-08-28

基金项目: 湖南省教育厅科学研究项目(编号: 13C824); 湖南省研究生科研创新项目(CX2015B415); 湖南省分子靶标新药研究协同创新中心资助项目(NO.2015-351); 特殊病原体防控湖南省重点实验室资助项目(NO.2014-5)。

* 通讯作者, E-mail: jhxiao223@163.com.

在血吸虫病防治方面,寻找疫苗候选抗原分子和加强疫苗的保护效果是血吸虫病研究工作的热点。本课题组前期通过构建日本血吸虫 cDNA 文库,发现了日本血吸虫新基因即动力蛋白轻链(dynein light chain of *Schistosoma japonicum*, SJDLC) 基因,并对其进行了初步的生物学特性研究^[1]。细胞因子具有增强免疫应答及调节免疫应答类型的作用,目前已作为佐剂广泛应用,如 IFN- γ 具有刺激 Th1 细胞增殖及抑制 Th2 细胞作用,应用 IFN- γ 能调节细胞免疫向 Th1 型极化,从而减轻 Th2 型细胞免疫所致疾病^[2]。为进一步研究日本血吸虫 pcDNA3.1/SJDLC DNA 疫苗及 IFN- γ 在日本血吸虫感染中的保护作用,本研究通过构建 pcDNA3.1/ SJDLC 及 pcDNA3.1/ mIFN- γ 真核质粒并鉴定其在小鼠体内的表达情况,为疫苗研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 6~8 周雌性 BALB/C 小鼠购自长沙斯莱克景达实验动物有限公司,pcDNA3.1, DH5 α 由本研究所保存。Trizol 购于 Invitrogen 公司,逆转录试剂盒购于大连宝生物工程有限公司,T4DNA 连接酶、BamH I、Hind III、EcoR I 限制性内切酶购于 NEB 公司,PCR 产物纯化试剂盒、质粒去内毒素大量提取试剂盒购于 OMEGA 生物技术公司,MTT 购于 Sigma 公司。

1.2 pcDNA3.1/SJDLC 和 pcDNA3.1/mIFN- γ 真核质粒的构建及鉴定 根据 DLC 基因和 mIFN- γ 基因序列使用 PRIMER5.0 软件设计特异性引物,在上游引物中引入 BamH I 酶切位点(GGATCC),在下游引物中分别引入 Hind III 酶切位点(AAGCTT)和 EcoRI 酶切位点(GGATCC),其中 DLC 基因上游引物: 5'-CGCGGATCCAGAATGAATGAACGTAAAGCCG-3',下游引物: 5'-CCC AAGCTTTTATCCTGATTTAAATAGTAGAA ATGC-3',mIFN- γ 基因上游引物: 5'-CGCGGATCCACAATGAACGCTACACACTGCA-3',下游引物: 5'-CCGGA ATTCTCAGCAGCGACTCCTTTTCC-3',上述引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。

DLC 基因扩增方法如下,新西兰兔腹部敷贴法感染尾蚴,42 天后取成虫,使用 Trizol 提取成虫 RNA,逆转录为 cDNA。mIFN- γ 基因扩增方法如下,健康 8 周龄 BALB/c 小鼠,无菌取脾脏后,剪碎放入 70 μ m 细胞筛孔中,加 PBS 研磨洗涤;加 2mL 红细

胞裂解液裂解 10 min,1 700 rpm,离心 5 min,弃上清;加入 2 mL 含 10 μ L/mL ConA 的完全 RPMI 1640 培养基于 5% CO₂ 37 $^{\circ}$ C 培养箱中诱导 3 天;然后收集细胞提取 RNA,逆转录为 cDNA,以两者 cDNA 为模板,PCR 条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 60 s,58 $^{\circ}$ C 退火 60 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s,共 35 个循环后 72 $^{\circ}$ C 保温 10 min,4 $^{\circ}$ C 终止反应。1%琼脂糖凝胶鉴定后,纯化 PCR 产物。纯化后的产物与 pcDNA3.1 常规连接方法连接后,转化至 DH5 α ,筛选阳性克隆菌,同时进行 BamH I 和 Hind III 双酶切,鉴定后测序。

1.3 真核质粒在 HeLa 细胞中的表达 HeLa 细胞分别接种到细胞培养板中(每孔 2 mL,5.0 $\times$ 10⁵ 个细胞/孔),生长达 90%时,按照 Lip2000 说明书将质粒转染细胞,培养 48 h,收集细胞,加入 5 倍细胞体积的 RIPA 裂解液,悬浮细胞,冰上裂解半小时,13 000 rpm 4 $^{\circ}$ C 离心 5 min,收集蛋白,SDS-PAGE 电泳,用半干式电转移法将蛋白电泳条带转移至 PVDF 膜,进行 Western blot 分析。一抗为日本血吸虫感染兔血清(1:1 000 稀释),4 $^{\circ}$ C 反应过夜;TBST 液洗膜 5 min,重复 3 次,加 HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗(1:1000 稀释)4 $^{\circ}$ C 反应 2 h。洗膜同上,ECL 化学发光显影。

1.4 真核质粒在小鼠体内的接种及表达 15 只雌性 BALB/c 小鼠随机分为 3 组:pcDNA3.1 组、pcDNA3.1 / SJDLC 组及 pcDNA3.1 / mIFN- γ 组,分别经左腿股四头肌注射重组质粒,每 2 周免疫 1 次,共免疫 3 次。末次免疫后 2 周,麻醉后断颈处死小鼠,取腿部肌肉提取总 DNA,PCR 法检测小鼠肌组织内 SJDLC 和 mIFN- γ 基因。另取每组小鼠的股四头肌用 4%多聚甲醛固定 4 h 后,常规制作石蜡切片,免疫组化法检测 SJDLC 和 IFN- γ 基因在小鼠体内的表达。

1.5 MTT 法检测 SJDLC 和 mIFN- γ 刺激 T 细胞增殖情况 末次免疫后 2 周,麻醉后断颈处死小鼠,分离小鼠脾淋巴细胞,调整细胞浓度为 6 $\times$ 10⁶/mL,接种于 96 孔板,每组分别用 RPMI1640 培养液、SWA(10 μ g/mL)和 Con A(10 μ g/mL)作为刺激物进行刺激,于 5% CO₂ 37 $^{\circ}$ C 培养箱培养 72 h 后,每孔加入 MTT 溶液(5 mg/mL) 20 μ L 培养 4 h,800 rpm 离心 15 min 弃上清,每孔加入 150 μ L DMSO,振荡 10 min,检测每孔 OD570nm 值。

1.6 统计分析 计量数据用均数+标准差表示,

统计学分析采用 SPSS 18.0 软件进行 t 检验分析,以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 pcDNA3.1/ SjdLc 及 pcDNA3.1/mIFN- γ 真核质粒的构建及鉴定

2.1.1 SjdLc 和 mIFN- γ 基因 PCR 扩增结果

1%琼脂糖胶电泳后在 280 bp 处可见目的条带,与 SjdLc 基因大小相符(图 1 A);在 480 bp 处可见目的条带,与 mIFN- γ 基因大小一致(图 1 B)。

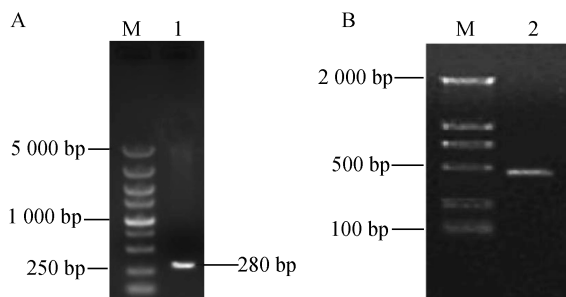


图 1.SjdLc 基因(A)和 mIFN- γ 基因(B)PCR 的扩增
M:Marker;1:SjdLc 基因扩增产物;2:mIFN- γ 基因扩增产物

2.1.2 重组质粒 pcDNA3.1/SjdLc 及 pcDNA3.1/mIFN- γ 双酶切鉴定 利用 BamH I 和 Hind III 双酶切方法检测到重组质粒的两条目的条带,条带大小与 PCR 检测结果一致(图 2)。

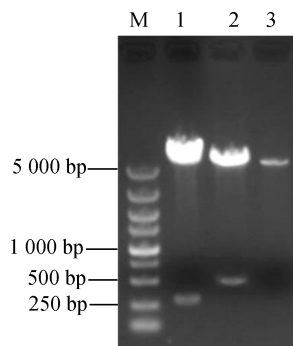


图 2 重组质粒的双酶切鉴定
M:Marker;1:双酶切验证 pcDNA3.1/ SjdLc 质粒;
2:双酶切验证 pcDNA3.1/mIFN- γ 质粒;
3:双酶切验证 pcDNA3.1 质粒

2.2 pcDNA3.1/SjdLc 及 pcDNA3.1/mIFN- γ 在 HeLa 细胞中的表达 HeLa 细胞分别接种到细胞

培养板中,按照 Lip2000 说明书将质粒转染细胞,培养 48 h,收集细胞,进行 Western blot 分析。Western blot 显示在 12 kDa(图 3A)和 19 kDa(图 3B)处有阳性反应条带,与 SjdLc 和 IFN- γ 分子量大小一致。

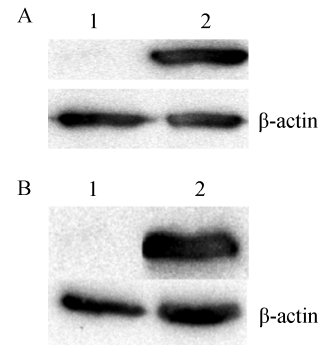


图 3 pcDNA3.1/SjdLc 和 pcDNA3.1 / IFN- γ 在 HeLa 细胞中的表达

A:1:pcDNA3.1; 2:pcDNA3.1/ SjdLc;
B:1:pcDNA3.1;2:pcDNA3.1/IFN- γ

2.3 pcDNA3.1/ SjdLc 及 pcDNA3.1 / mIFN- γ 真核质粒在动物体内的表达

2.3.1 PCR 法检测小鼠肌肉组织中 SjdLc 和 mIFN- γ 基因 取腿部肌肉组织提取总 DNA,使用 SjdLc 及 mIFN- γ 特异性引物,扩增各基因,结果可见从小鼠肌肉组织中扩增出 280 bp 的 SjdLc 基因及 480 bp 的 mIFN- γ 基因(图 4)。

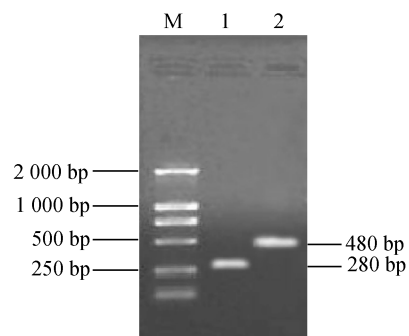


图 4 PCR 法检测小鼠肌肉组织中 SjdLc 及 mIFN- γ 基因
M:DNA Maker;1:pcDNA3.1/ SjdLc;2:pcDNA3.1/ mIFN- γ

2.3.2 免疫组化法检测 pcDNA3.1/SjdLc 和 pcDNA3.1/mIFN- γ 在小鼠肌肉组织中的表达 免疫组化结果显示各组肌细胞区域可见 pcDNA3.1/SjdLc 和 pcDNA3.1/mIFN- γ 在肌肉组织中表达的棕黄色阳性反应颗粒(图 5)。

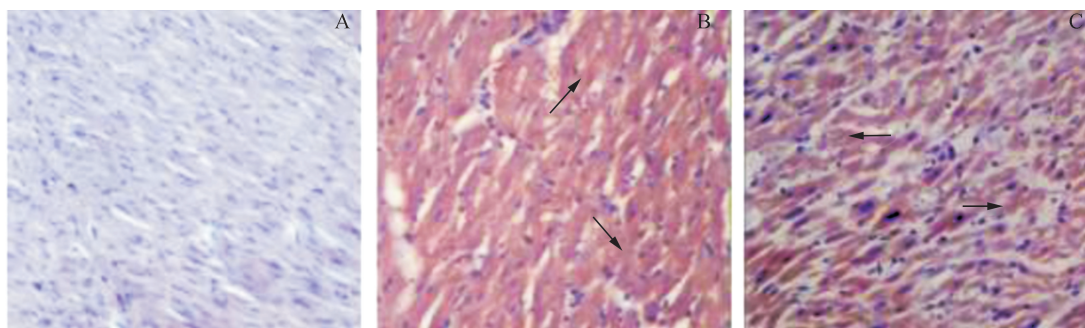


图 5 免疫组化法检测小鼠肌肉组织内重组质粒的表达(200×)

A:pcDNA3.1; B:pcDNA3.1/ SjDLC; C:pcDNA3.1/ mIFN-γ

2.4 MTT 法检测淋巴细胞体外增殖试验 MTT 法结果显示:用 SWA 刺激后 SjDLC 组和 IFN-γ 组 T 细胞增殖水平均显著性高于 pcDNA3.1 对照组, $P < 0.05$, IFN-γ 组高于 SjDLC 组, $P < 0.05$ 。Con A 刺激组与 SWA 刺激组比较, $P > 0.05$ 。RPMI1640 刺激后各组 T 细胞均不增值,与 SWA 刺激组比较, $P < 0.05$ 。见图 6。

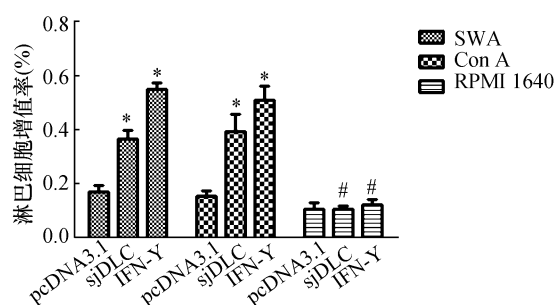


图 6 MTT 检测免疫后小鼠脾淋巴细胞增值率

与 pcDNA3.1 比较, *: $P < 0.05$, 与 SWA 组比较, #: $P < 0.05$

3 讨 论

核酸疫苗是近年来快速发展的新型疫苗,将编码抗原基因或基因片段插入质粒载体中构成重组质粒,直接免疫后,机体内的细胞表达这一抗原,刺激机体免疫系统,产生细胞免疫和体液免疫,达到抗感染的目的^[3]。核酸疫苗能诱导有效的适应性免疫应答,也没有死疫苗、减毒疫苗的致病作用,并且生产简单,成本低廉,因此受到广泛青睐。

目前血吸虫病的疫苗研究仍未得到令人满意的结果^[4],因此,寻找有效的候选疫苗抗原分子仍然是日本血吸虫疫苗研究工作的重要基础。血吸虫抗原作为疫苗常常免疫效果有限,为了加强疫苗的免

疫效果联合佐剂十分重要,运用细胞因子作为佐剂也是目前血吸虫病疫苗研究的方向。

本研究通过构建日本血吸虫 SjDLC DNA 疫苗及 mIFN-γ 真核质粒,初步研究其在真核细胞及小鼠体内表达状况,为寻找有效的候选疫苗抗原分子及应用 IFN-γ 作为佐剂加强血吸虫疫苗免疫接种效果奠定基础。

日本血吸虫动力蛋白轻链基因(SjDLC)是由本课题组前期发现的新基因,已获得 GenBank 登录号(AY225851),该基因序列与曼氏血吸虫 DLC 基因序列同源性较高,相似性为 86%^[1]。该蛋白位于血吸虫体被,介导其与“外界分子”的相互识别,可结合血吸虫体被需要转运的物质通过微管进行运输,是血吸虫生存和发挥免疫逃逸的重要基因之一^[5-6]。

IFN-γ 主要是由 Th1 细胞分泌,具有抗感染、抗肿瘤及免疫调节作用的细胞因子,能抑制 Th2 型细胞免疫,有利于减轻由血吸虫虫卵抗原诱导的 Th2 型细胞免疫介导的免疫病理损伤^[7-8]。

本研究构建了 pcDNA3.1/SjDLC 及 pcDNA3.1/mIFN-γ 真核质粒,通过 PCR 和双酶切方法检测到 280 bp 的 SjDLC 基因及 480 bp 的 mIFN-γ 基因,测序结果显示这两个基因的核苷酸序列与 GenBank 中的序列完全一致。Western blot 显示在 12 kDa 和 19 kDa 处有阳性反应条带,与 SjDLC 和 IFN-γ 分子量大小一致,说明两种基因能在 HeLa 细胞中表达。PCR 能从小鼠肌肉组织中扩增出 280 bp 的 SjDLC 基因及 480 bp 的 mIFN-γ 基因,免疫组化结果显示小鼠肌组织中出现两种蛋白的阳性反应颗粒。说明 pcDNA3.1/SjDLC 及 pcDNA3.1/mIFN-γ 能在小鼠肌肉组织中存在和表达,这是疫苗发挥作用的免疫学基础。MTT 法检测到 SjDLC 和 IFN-γ 能显著性诱导 T 细胞增殖和活化。(下转第 579 页)

- 2013,92(4):372-377.
- [4] Kumru P, Demirci O, Erdogan E, et al. The Bakri balloon for the management of postpartum hemorrhage in cases with placenta previa [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2013, 167(2):167-170.
- [5] 苏春宏, 陈敦金, 王天红, 等. 紧急子宫切除在难治性产后出血中的应用 [J]. *广东医学*, 2011, 32(18):2430-2432.
- [6] Chen J, Cui H, Na Q, et al. Analysis of emergency obstetric hysterectomy: the change of indications and the application of intraoperative interventions [J]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*, 2015 50(3):177-182.
- [7] Portilla D, Hernández-Giraldo C, Moreno B, et al. A local hemostatic agent for the management of postpartum hemorrhage due to placenta previa and placenta accreta: a cross-sectional study [J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2013, 288(3):543-549.
- [8] Cheng KK, Lee MM. Rising incidence of morbidly adherent placenta and its association with previous caesarean section: a 15-year analysis in a tertiary hospital in Hong Kong [J]. *Hong Kong Med J*, 2015, 21(6):511-517.
- [9] Kathryn E, Fitzpatrick, Susan Sellers, et al. Incidence and risk factors for placenta accreta/increta/percreta in the UK: a national case-control study [J]. *PLoS One*, 2012, 7(12):e52893.
- [10] Matsubara S. Reply: cesarean hysterectomy for placenta previa accreta; extrapolating measures may have merits for ordinary obstetricians [J]. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2013, 92(12):1431-1432.
- [11] 高羽, 王子莲, 张建平, 等. Bakri 止血球囊治疗产后出血的有效性和安全性 [J]. *中华妇产科杂志*, 2014, 49(9):670-675.
- [12] Xu JQ. Effectiveness of embolization of the internal iliac or uterine arteries in the treatment of massive obstetrical and gynecological hemorrhages [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2015, 19(3):372-374.
- [13] Akihiro Takeda, Sanae Imoto, Hiromi Nakamura. Abruptio placenta in subsequent pregnancy after conservative management of hemorrhagic cesarean scar pregnancy by transcatheter arterial chemoembolization [J]. *Clin Med Insights Case Rep*, 2013, 6:137-140.
- [14] 余琳, 胡可佳, 杨慧霞. 2008-2014 年凶险性前置胎盘的回顾性临床研究 [J]. *中华妇产科杂志*, 2016, 51(3):169-173.

(本文编辑:秦旭平)

(上接第 561 页)

综上所述,本研究成功构建的 pcDNA3.1/SjDLC 和 pcDNA 3.1/mIFN- γ 真核表达质粒,能在小鼠体内良好表达,为进一步研究其在本血吸虫感染中的保护性作用奠定了实验基础。

参考文献:

- [1] 刘彦,肖建华,廖力,等.日本血吸虫肌动蛋白轻链基因的获得和分析 [J]. *中国人兽共患病杂志*, 2004, 20(11):960-962.
- [2] de Carvalho PG, de Oliveira Rodrigues R, Ribeiro da Silva SF, et al. CD38+CD8+ and CD38+CD4+ T cells and IFN Gamma (+874) polymorphism are associated with a poor virological outcome [J]. *Immunol Invest*, 2016, 45(4):312-327.
- [3] Kumar A, Samant M. DNA vaccine against visceral leishmaniasis: a promising approach for prevention and control [J]. *Parasite Immunol*, 2016, 38(5):273-281.
- [4] Attallah AM, El-Far M, Omran MM3, et al. Levels of schistosoma mansoni circulating Antigen in chronic hepatitis C patients with different stages of liver fibrosis [J]. *J Immunoassay Immunochem*, 2016, 37(3):316-330.
- [5] Argiro L, Henri S, Dessein H, et al. Induction of a protection against *S. mansoni* with a MAP containing epitopes of Sm37-GAPDH and Sm10-DLC. Effect of coadsorption with GM-CSF on alum [J]. *Vaccine*, 2000, 18(19):2033 - 2038.
- [6] Diniz PP, Nakajima E, Miyasato PA, et al. Two SmDLC antigens as potential vaccines against schistosomiasis [J]. *Acta Trop*, 2014, 140:193-201.
- [7] Yao H, Pan J, Qian Y, et al. Enhanced effect of soluble transforming growth factor-beta receptor II and IFN-gamma fusion protein in reversing hepatic fibrosis [J]. *Eur J Med Res*, 2010, 15(4):152-161.
- [8] Ramalingam TR, Gieseck RL, Acciani TH, et al. Enhanced protection from fibrosis and inflammation in the combined absence of IL-13 and IFN- γ [J]. *J Pathol*, 2016, 239(3):344-354.

(本文编辑:蒋湘莲)