

致谢 本工作为中国科学院“九五”重大基础支持项目。

参 考 文 献

- 1 Karsten R, Valerie F, Eric W, et al. Alternating d(G₂A₂) sequences from a parallel-stranded DNA homoduplex. The EMBO Journal, 1992, 11: 3 777~ 3 786
- 2 Pilch D S, Levenson C, Shafer R H, et al. Structure, stability and thermodynamics of a short intermolecular purine-purine-pyrimidine triple helix. Biochem, 1991, 30: 6 081~ 6 087
- 3 Williamson J R, Raghuraman M K, Ceth T R, et al. Monovalent cation-induced structure of telomeric DNA: The G-quartet model. Cell, 1989, 59: 871~ 880
- 4 郭尧君主编. 生物化学仪器指南(光谱仪器). 第一册. 北京: 科学出版社, 1988. 38~ 49
- 5 Yujian He, Enhua Cao, Bo Zhou, et al. CD spectra on triple stranded structure of λ -DNA. Chin Sci Bull, 1995, 40: 477
- 6 Vincent P A, Donald M G, Robert L R, et al. CD of six different conformational rearrangements of poly [d(A-G)d(C-T)] induced by low pH. Nucleic Acid Res, 1988, 2: 719~ 738
- 7 Yujian H, Scaria P V, Sharfer R H. Studies on Formation and Stability of the d[G(AG)₅]•d[G(AG)₅]•d[C(TC)₅] and d[G(TG)₅]•d[G(AG)₅]•d[C(TC)₅] triple helices. Biopolymers, 1997, 41: 431~ 441
- 8 Pulm G E, Park Y W, Singleton S F, et al. Thermodynamic characterization of the stability and melting behavior of a DNA triplex: A spectroscopic and calorimetric study. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87: 9 436~ 9 440
- 9 Scaria P V, Will S, Levenson C, et al. Physicochemical studies of the d(G₃T₄G₃)•d(G₃A₄G₃)•d(C₃T₄C₃) triple helix. J Biol Chem, 1995, 270: 7 295~ 7 303
- 10 Daniel S P, Roland B, Richard H S, et al. Thermodynamics of helix formation: spectrophotometric studies on the d(A)₁₀•2d(T)₁₀ and d(+(C₃T₄+C₃)•d(G₃A₄G₃)•d(C₃T₄C₃) triple helices. Nucleic Acid Res, 1990, 18: 5 743~ 5 750
- 11 James R W. G-quartet structure in telomeric DNA. Ann Rev Biophys Biomol Struct, 1994, 23: 713~ 720
- 12 Balagurumoorthy P, Brahmachari S K, Mohanty D B, et al. Hairpin and parallel quartet structures for telomeric sequences. Nucleic Acids Res, 1992, 20: 4 061~ 4 067

(1997-09-26 收稿, 1998-01-21 收修改稿)

恶性疟原虫 DNA 疫苗的初步研究

钟 辉 曹 诚 李 平 李杰之 马清钧

(军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100850)

摘要 采用遗传工程技术克隆了编码含有恶性疟原虫子孢子期及红内期表位的基因片段, 与霍乱毒素 B(CTB) 亚基基因或白介素 2(IL2) 基因融合基因的重组质粒. 将纯化的质粒免疫 Bal b/c 纯系小鼠, 3 次免疫后诱导机体产生了体液免疫和细胞免疫, 抗 CTB 抗体滴度平均为 1: 1 280, 抗 NANP 及抗 AWTE 抗体平均滴度为 1: 1 000, 免疫的小鼠进行疟原虫子孢子攻击实验, 保护率在 50% 左右.

关键词 恶性疟原虫 霍乱毒素 B 亚基 DNA 疫苗

疟疾是世界上严重危害人类健康和生命的一种寄生虫病, 每年有几百万人因疟疾而死亡^[1]. 研制有效疫苗, 是预防和控制疟疾流行的重要措施. DNA 疫苗, 确切地说叫做 DNA 介导的免疫, 是指通过注射或轰击等手段, 将携带有抗原基因的表达载体导入到宿主有机体中,

产生具有免疫原性的蛋白质^[2~4].

本研究以霍乱毒素B亚基(CTB)基因为载体,构建了含有不同抗原表位的恶性疟原虫的融合基因CTB-AWTE,CTB-NANP以及CTB-IL2-AWTE,前者除含有恶性疟原虫裂殖子表面主要抗原表位杂合多肽基因SPf66外,还含有很强的T辅助细胞表位CST3和Tc细胞表位.初步证明,它们免疫小鼠后均能诱导机体产生有效的免疫应答,为发展恶性疟原虫的DNA疫苗打下了一定基础.

1 材料与方法

() 细胞株与质粒. 细胞株P815由军事医学科学院基础医学研究所李树森提供. 质粒pCMV-S由美国Pennsylvania大学王宾教授惠赠. 携带融合抗原基因CTB-SPf66-(NKND)g-CSTED(AWTE)的重组质粒pMC05^[5]由本所袁清安等人构建. 携带融合抗原基因CTB-CST3-(NANP)₁₀的重组质粒pMC055^[6]由本室李杰之等人构建. pET22b(+)-IL2由本室梁龙惠赠. PRSV购自Invitrogen公司.

() 酶与其他试剂. Taq Polymerase及PCR系统由本所张京生提供. 各种限制性内切酶均为New England Biolabs公司产品. RPMI 1640培养基购自Gibco BRL公司. 各种抗生素均为本国产品. 小牛血清由杭州四季青公司出品. 化学试剂基本使用国产分析纯试剂.

() DNA重组. 按文献[7]进行.

() 目的基因DNA片段的PCR扩增. 上游引物P1与CTB基因的5'端互补,并引入Xba iv位点. 下游引物与空载体pMC的一段互补.

引物设计如下:

P1: 5'-GCTCTAGATGACACCTCAAAATATTACTG-3',
Xba iv

P2: 5'-GCTGCAGTTGCTTCTCATCGAAC-3',

PCR条件参考文献[5].

() 动物免疫及攻击实验. 所有实验动物均为纯系Bal b/c小鼠,年龄4~5周. 将纯化后的质粒肌肉注射,免疫接种3次,每次100 µg/只,免疫间隔时间为0,2,4周,第3次免疫后14 d,进行约氏疟原虫子孢子腹腔接种攻击. 低剂量攻击为12 500/只,高剂量攻击为25 000/只. 从接种后第9 d起每隔3 d取每只小鼠尾静脉血涂薄片检查有无疟原虫,连续观察12 d,并观察记录小鼠感染和死亡数.

() 小鼠抗CTB抗体酶联检测(ELISA). 应用提纯的CTB亚单位500ng在碳酸盐缓冲液中(pH=9.6)包被酶联板,4℃过夜,用3%的BSA于37℃封闭2h,加入每孔100 µL经适当稀释的待检血清,37℃孵育1 h,用PBST溶液清洗4次后,加入羊抗鼠IgG-HRP,37℃孵育30 min,洗涤后OPD显色,测A_{492 nm}. 详见参考文献[8].

() 小鼠抗CS,AWTE抗体间接免疫荧光法检测(IFAT). 体外培养的恶性疟原虫,涂薄血片,丙酮固定10 min,加入不同稀释度的待测抗体,室温于湿盒中孵育30 min. 加入荧光标记的第二抗体,避光湿盒中室温30 min,甘油封片,荧光显微镜镜检. 根据荧光的强度来判定血清中抗体的滴度. 详见参考文献[9].

() 细胞毒杀伤细胞的检测. 按文献[10]进行. 基本步骤:最后一次免疫后2周,处死小鼠,收获脾细胞计数后,与刺激细胞共同孵育4~6 d,然后作用p815靶细胞(提前4~12 h

与相关肽作用),通过 LDH 的显色反应来确定 CTL 对于靶细胞的裂解程度.

2 结果与讨论

2.1 质粒构建

(1) pCMV-CTB-SPf66-(NKND)₈-CSTE (pCMV-AWTE) 重组质粒的构建(图1). 以 pCMC05 为模板,进行 PCR 扩增,结果在琼脂糖凝胶上可见 1 条 DNA 扩增带,其大小约 600 bp,与设计一致.回收目的基因片段,以 Xba I 酶切,与经过 Xba I 处理并去磷酸化的真核表达载体 pCMV-S 相连接,重组子鉴定如图 2.

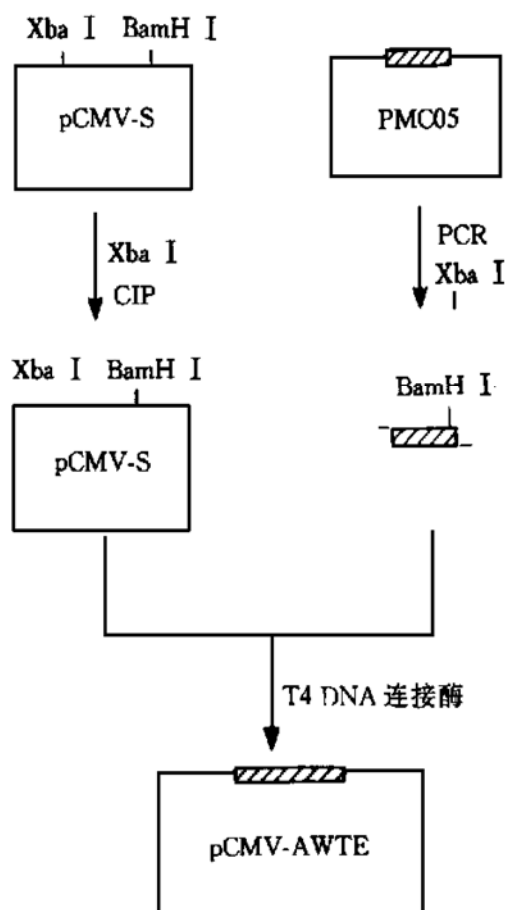


图1 pCMV-AWTE 重组质粒的构建

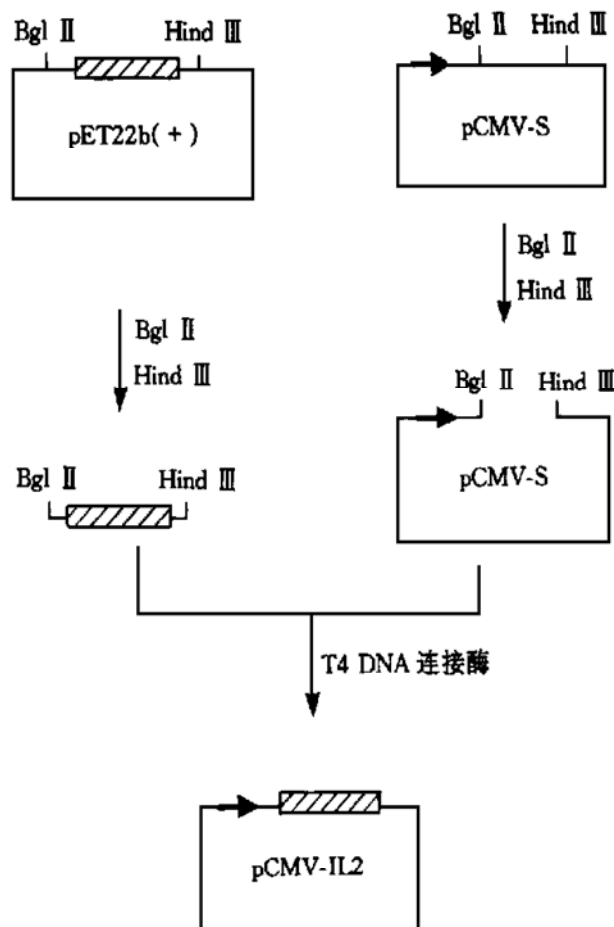


图3 pCMV-IL2 重组质粒的构建

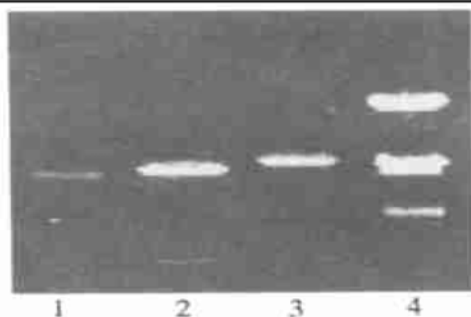


图2 pCMV-AWTE 重组质粒的酶切鉴定

1——pCMV-S (BamH I), 2——pCMV-AWTE (BamH I),
3——pCMV-AWTE (Sma I), 4——λDNA (Hind Ⅲ + EcoR I)



图4 阳性克隆 IL2 基因的 PCR 扩增

1——质粒 pCMV-IL2 的 PCR 产物, 2——λDNA (Hind Ⅲ + EcoR I), 3——质粒 pCMV-AI 的 PCR 产物

(2) pCMV-IL2 及 pCMV-IL2-AWTE (pCMV-AI) 重组质粒的构建(图3). 用 Bgl Ⅲ与 Hind Ⅳ酶切 pET22b(+) 质粒, 电泳回收 IL2 酶切片段, 定点插入表达质粒 pCMV-S 与 pCMV-AWTE 的 Bgl Ⅲ及 Hind Ⅳ位点之间, IL2 基因无终止密码子且与融合的 AWTE 基因处于同一个阅读框架, 从而得到重组质粒 pCMV-IL2 及 pCMV-IL2-AWTE(图4).

(3) pRSV-AWTE 重组质粒的构建. AWTE 基因的 PCR 产物以 Xba Ⅰ酶切, 与经过 Xba Ⅰ处理并去磷酸化的真核表达载体 pRSV 相连接, 重组子酶切鉴定正确(图5), 从而获得 pRSV-AWTE 表达质粒. pRSV 质粒的酶切位点请参照 Invitrogen 公司产品目录.



图5 pRSV-AWTE 的酶切鉴定

1——pBR322(BstN Ⅰ), 2——pRSV(BamH Ⅰ), 3——pRSV-AWTE(BamH Ⅰ), 4——λDNA(EcoR Ⅰ+ Hind Ⅳ)

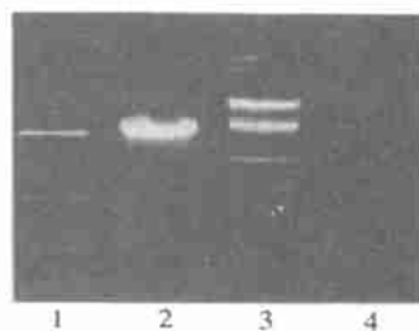


图6 pCMV-NANP 的酶切鉴定

1——pCMV-NANP(BamH Ⅰ), 2——pCMV-NANP, 3——λDNA(EcoR Ⅰ+ Hind Ⅳ), 4——pCMV-S/BamH Ⅰ

(4) pCMV-CTB-CST3-(NANP)₁₀(pCMV-NANP) 重组质粒的构建. 以 pMC055 为模板进行 PCR 扩增, 扩增的 NANP 基因的 PCR 产物以 Xba Ⅰ酶切, 与经过 Xba Ⅰ酶切并去磷酸化的真核表达载体 pCMV-S 相连接, PCR 产物末端有一个 BamH Ⅰ位点, 重组子酶切鉴定如图6.

2.2 抗 CTB 抗体

将 pCMV-NANP 与 pCMV-AWTE 纯化后, 注射于 Bal b/c 小鼠的大腿肌肉, 分3次注射, 10 d 之后再次免疫, 2 周后采血并全部杀死. 从 ELISA 结果可以看出, pCMV-AWTE 与 pCMV-NANP 的质粒免疫都诱导产生了抗体, 抗体滴度平均为 1:1280.

2.3 抗 NANP 及抗 AWTE 抗体

用间接免疫荧光法测定免疫后小鼠血清中抗 NANP 及抗 AWTE 抗体, 抗体平均滴度为 1:1000.

2.4 细胞毒杀伤细胞的活性

从图7可以看出, 免疫组的 CTL 活性要明显高于对照组, 对照组不能裂解用合成抗原多肽刺激的 P815 靶细胞, 说明抗原刺激

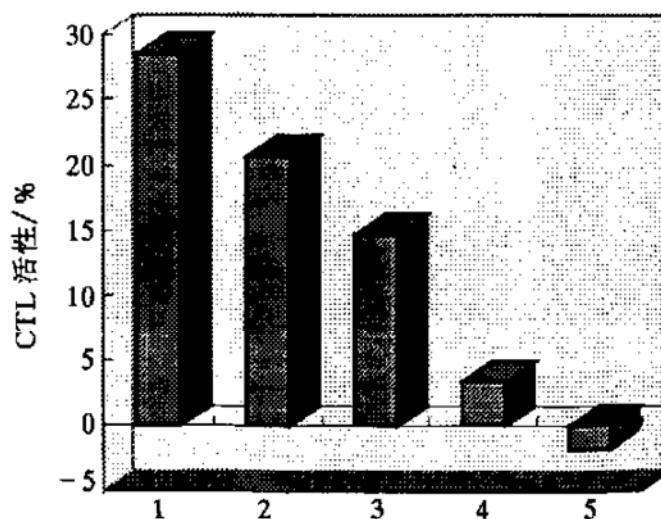


图7 不同抗原克隆的细胞毒杀伤细胞的活性

1——CMV-AWTE + CMV-IL2, 2——RSV-AWTE + 蔗糖, 3——CMV-AWTE + IL2, 4——RSV-AWTE, 5——对照. 效靶细胞比 50:1

了机体特异性的 T 细胞反应. 将抗原基因与 IL2 分别克隆于 CMV 启动子的双质粒免疫效果要远远好于融合基因的单质粒注射的免疫效果, 可能是因为融合的抗原与 IL2 之间缺少柔韧结构从而使其高级结构受到影响. 蔗糖与质粒的联合免疫效果要好于单质粒的免疫效果, 说明高渗溶液可以促进质粒在肌肉中的分散与吸收, 从而提高抗原基因的持续表达和抗原提成能力.

2.5 攻毒与攻毒结果

200 只 Bal b/c 4~6 周小鼠, 雌雄各半, 分为 5 组, 第 1 组为 pRSV-AWTE 低剂量 (25 μ g/只), 第 2 组为 pRSV-AWTE 高剂量 (100 μ g/只), 第 3 组为混合 (pRSV-AWTE, pCMV-NANP, pCMV-IL2) 低剂量, 第 4 组为混合高剂量, 第 5 组为对照组 (图 8).

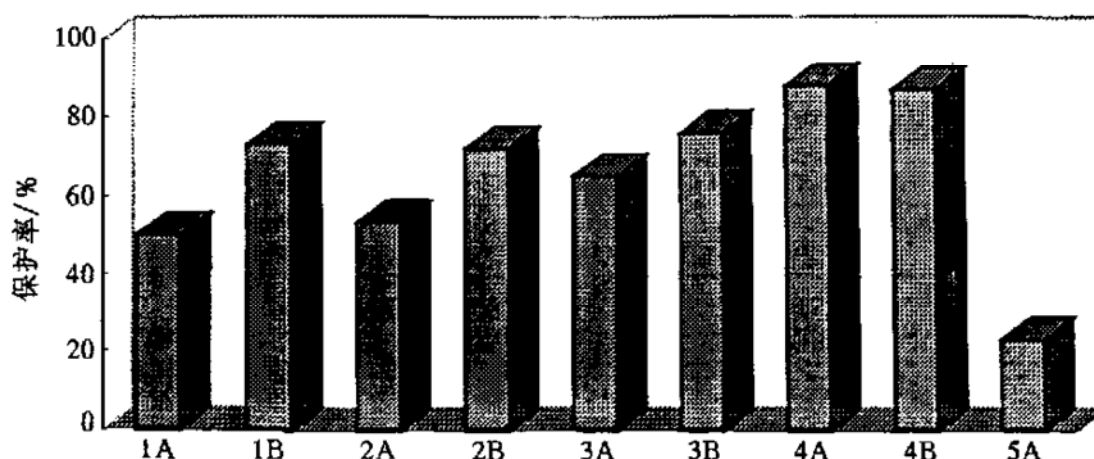


图 8 质粒免疫接种后的约氏疟原虫子孢子攻毒结果

A ——高剂量攻毒, B ——低剂量攻毒

从图 8 可以看出, 保护率最高的为混合高剂量组 (85% $\pm$ 3%), 明显高于对照组和 pRSV-AWTE 单质粒注射, 说明 IL2 作为共刺激因子的协同作用和多抗原免疫在 DNA 疫苗中的优势. 混合高剂量组的 CTL 活性最高 (数据未列), 说明 CTL 活性对于疟原虫感染的免疫保护至关重要. 其他 3 个组低剂量攻毒保护率要高于高剂量攻毒保护率的 10%~20%. 混合高剂量注射的保护率要高于低剂量注射保护率的 10%~20%, 而另 2 个组并没有显示出明显的剂量效应, 可见注射剂量是影响 DNA 疫苗的一个因素, 但可能更加值得研究的是 DNA 的吸收效率, 因为用基因枪只需注射纳克水平 DNA 就可以引起足够高的免疫反应. 在实验中还发现免疫组的感染时间比对照组推迟了 3 d 左右, 说明免疫后诱导产生的抗体在疟原虫感染的最初阶段具有一定的保护作用. 利用恶性疟原虫基因以小鼠为模型研究 DNA 疫苗, 不同的抗原基因都诱导机体产生了体液免疫和细胞免疫, 这种诱导产生的免疫反应对恶性疟原虫具有较好的交叉保护作用. 以恒河猴为模型的恶性疟原虫的 DNA 疫苗还在实验之中. 对于 DNA 疫苗的免疫途径、免疫佐剂以及粘膜免疫也正在研究之中.

参 考 文 献

- 1 Shodel F, Aguado M T, Lambert D H, et al. Nucleic acid vaccines. Vaccine, 1994, 12(16): 1 491~1 492

- 2 Ellen F F, Reobert G W, Deborah H F, et al. DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene gun inoculations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 11 478~ 11 482
- 3 Heather L D, Bernard J J. Direct gene transfer into mouse diaphragm. *FEBS Letters*, 1993, 332(1_2): 146~ 150
- 4 Vahlsing H L, Yankauckas M A, Sawdey M, et al. Immunization with plasmid DNA using a pneumatic gun. *Journal of Immunological Methods*, 1994, 175: 11~ 22
- 5 Yuan Q A, Shi C H, Cao C, et al. Fusion and expression of multiple epitopes of malaria plasmodium falciparum. *Letters in Biotechnology*. 1996. 7(2): 54~ 58
- 6 Li J Z, Ma Q J, Cao C, et al. Expression and biological activities of plasmodium falciparum circumsporozoite fusion gene in *E. coli*. *J Chinese Biochemical*, 1997, 13(1): 14~ 18
- 7 Sambrook J. *Molecular Cloning*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory, 1989
- 8 Shi C H, Cao C, Zhi J S, et al. Gene fusion of cholera toxin B subunit and HBV PreS2 epitope and the antigenicity of fusion protein. *Vaccine*, 1995, 13(10): 933~ 937
- 9 Zhi Q X, Steve L S, Jun C, et al. Immune response to nucleic acid vaccines to rabies virus. *Virology*, 1995, 209: 569~ 579
- 10 John J D, Jeffery B U, Margaret A L, et al. DNA vaccines. *Life Sciences*, 1977, 60(3): 163~ 172

(1997-10-21 收稿, 1998-03-02 收修改稿)

小鼠胸腺基质细胞诱导早期 T 细胞株分化的研究

余青 王宏* 陈慰峰

(北京医科大学免疫学系, 卫生部医学免疫学重点实验室, 北京 100083. *联系人)

摘要 利用 1 株处于 CD3⁻CD4⁻CD8⁻ 阶段的病毒转化早期 T 细胞株 C320 研究了体外胸腺基质细胞系对早期 T 细胞 TCR-CD3 复合体表达的诱导作用, 并对参与此作用的细胞表面信号分子进行了初步鉴定. 结果显示: 在体外胸腺基质细胞系通过与 C320 细胞-细胞间相互作用, 诱导其表面 TCR-CD3 分子的表达. 进一步的研究表明, 对 TCR 的诱导主要作用于其转录后阶段; 对 CD3 的诱导涉及转录前后两个阶段. 单抗阻断实验显示, 抗基质细胞单抗 RS21-C6 对 C320 的上述分化表达有明显阻断作用, 说明其识别分子参与诱导分化过程. 免疫共沉淀和蛋白印迹杂交鉴定此分子为 42 ku, 是否为新型分子有待氨基酸序列分析予以确定.

关键词 细胞表面分子 胸腺基质细胞 早期 T 细胞 TCR-CD3 复合体

早期 T 细胞发育指胸腺细胞在 CD4⁺CD8⁺ (简称 DP) 阶段前的发育, 其中从 CD3⁻CD4⁻CD8⁻ (简称 TN) 阶段进入到 DP 阶段这一过程是 $\alpha\beta$ T 细胞发育中的关键阶段^[1]. 在此阶段, 完整的 T 细胞抗原识别受体 CD3 (简称 TCR-CD3) 复合体的组装和表面表达是一个重要的分化步骤. 调控这一分化的细胞表面信号分子及作用机制尚不清楚, 已知 pre-TCR 复合体是其中主要的分子之一^[2], 但是它的具体作用尚不十分清楚, 有人认为它仅仅促进早期 pre-T 细胞的存活和增殖, 进一步的细胞分化很可能与基质细胞产生的其他信号有关.

本工作旨在研究诱导 TN 细胞表达 TCR β 及 CD3 分子的细胞表面信号分子及其作用机制. 本工作利用 1 株正好处于 TN 阶段晚期的内源性逆转录病毒转化的 C320 细胞, 目的是在