

【论著】

文章编号: 1000-7423(2001)-05-0298-02

猪囊尾蚴副肌球蛋白 cDNA 中 CpG 序列的免疫激活作用

孙树汉 郭瀛军 王庆敏 陈蕊雯

【摘要】 目的 探讨猪囊尾蚴副肌球蛋白(又称为 Antigen B, AgB) cDNA 中 CpG 序列的免疫激活作用。方法 以 pcDNA3-AgB 质粒疫苗、CpG 序列突变的 pcDNA3-AgB' 质粒疫苗、pcDNA3 载体质粒和 AgB 蛋白质分别免疫 C57BL/6 小鼠, 2 wk 后开始用 ELISA 检测小鼠血清中 IgG 和 IgG_{2a} 的效价。结果 免疫接种的第 2 周起实验组 IgG 与 IgG_{2a} 效价开始升高, 至第 4 周达到峰值。其中以 pcDNA3-AgB 组升高最为显著 ($P < 0.05$)。结论 pcDNA3-AgB 核酸疫苗所诱导的小鼠免疫反应, 不仅具有其表达产物 AgB 蛋白的抗原作用, AgB cDNA 中的 CpG 序列也具有免疫激活作用。

【关键词】 囊尾蚴; 副肌球蛋白; 核酸疫苗; CpG 序列

中图分类号: R383.34

文献标识码: A

Immunostimulatory Activity Elicited by CpG Sequences in *Cysticercus Cellulosae* Paramyosin cDNA

SUN Shu-han, GUO Ying-jun, WANG Qing-min, CHEN Rui-wen

(Department of Medical Genetic, Second Military Medical University, Shanghai 200433)

【Abstract】 **Objective** To analyse the immunostimulatory activity of CpG sequences in cysticercus cellulosae paramyosin (also named Antigen B, AgB) cDNA. **Methods** C57BL/6 mice were immunized with pcDNA3-AgB plasmid, pcDNA3-AgB' (CpG sequences were mutated), pcDNA3 or AgB protein and two weeks later, immune response was assayed by ELISA. **Results** IgG and IgG_{2a} were detectable at week 2 after immunization and continually increased until week 4. The antibody levels elicited by pcDNA3-AgB were significantly higher ($P < 0.05$) than those elicited by others. **Conclusion** After pcDNA3-AgB plasmid inoculation, the immune response of mouse was elicited not only by the AgB protein but also by the CpG immunostimulatory sequences in the AgB cDNA.

【Key words】 *Cysticercus cellulosae*, paramyosin, DNA vaccine, CpG sequence

Supported by Grant from Hi-Tech Research and Development Program of China (No. 101-06-05-05)

一系列的研究证实, 原核生物核酸分子中普遍存在着以非甲基化 CpG 为基元 (motif) 的免疫刺激序列 (immunostimulatory sequence, ISS)。ISS 可作用于多种免疫活性细胞, 非特异性地诱导体液与细胞免疫反应^[1]。由于这一作用类似佐剂的免疫刺激过程, 故又称 ISS 为免疫佐剂序列。近年来, ISS 的免疫佐剂作用机理也逐步揭示^[2], 但均局限于就质粒等载体核酸内 ISS 佐剂作用分析^[3]。本文就目的基因内 CpG 序列在抗原免疫诱导过程中的增强作用进行了初步探讨。将疫苗质粒 pcDNA3-AgB、疫苗质粒 pcDNA3-AgB' (以 pcDNA3-AgB 为基础, 突变其中 AgB cDNA 中的 CpG 序列, 使 AgB cDNA 变为不含 CpG 序列的 AgB' cDNA)、AgB 蛋白及 pcDNA3 质粒空载体分别免疫小鼠, 进而观察抗体 IgG 和 IgG_{2a} 的变化。

材料与方 法

1 质粒菌株与抗原

核酸疫苗 pcDNA3-AgB, CpG 突变的核酸疫苗

质粒 pcDNA3-AgB', 载体质粒 pcDNA3 及 AgB 蛋白由本室构建、表达和纯化^[4]。大肠杆菌 DH5α 由本室保存。

2 实验动物

雄性 4~6 周龄 C57BL/6 小鼠购自第二军医大学实验动物中心^[5]。

3 主要试剂

HRP-羊抗小鼠 IgG 购自华美生物工程公司; HRP-羊抗小鼠及羊抗小鼠 IgG_{2a} 购自晶美公司; BSA 购自华舜生物公司。

4 AgB 诱导小鼠理想免疫反应的用量分析

雄性小鼠 20 只, 随机分为 5 组, 以每只肌注 AgB 0、2、4、8 和 10 μg 分别免疫 5 组小鼠, 并于初次免疫 1 wk 后按同量加强免疫 1 次。

5 免疫接种

雄性鼠 24 只, 随机等分为 4 组。分别肌注

基金项目: 国家“863”资助项目 (No. 101-06-05-04)

作者单位: 第二军医大学医学遗传学教研室, 上海 200433

pcDNA3-AgB、pcDNA3-AgB'、AgB 蛋白和 pcDNA3 空载体。质粒的注射用量为每鼠 50 μg (100 μl 体积), 初次接种 1 wk 后, 同量加强免疫 1 次。

6 小鼠血清抗体 IgG 和 IgG_{2a} 的测定

于各组小鼠加强免疫后第 2、第 4、第 6、第 8 和第 10 周尾静脉取血, 分离血清, 并 1:50 稀释后待用。以间接 ELISA 法检测 IgG 水平 (包被 AgB 蛋白, 加入血清, 再结合 HRP-羊抗小鼠 IgG)。以双抗夹心法检测 IgG_{2a} 水平 (包被羊抗小鼠 IgG_{2a}, 加入血清, 再结合 HRP-羊抗小鼠 IgG_{2a})。

结果与讨论

以 ELISA 法测定 C57BL/6 小鼠血清中 IgG 和 IgG_{2a} 的结果显示, AgB 诱导理想免疫应答反应的最终用量为 4 μg /只 (抗体测曲线图略)。以此用量免疫小鼠, 作为 pcDNA3-AgB 及 pcDNA3-AgB' 疫苗质粒诱导免疫应答反应的对照。结果表明, 在各实验组中 pcDNA3-AgB 核酸疫苗组诱发的 IgG 和 IgG_{2a} 水平升高最为显著 ($P < 0.05$)。同时, pcDNA3-AgB 核酸疫苗具有比 AgB 蛋白质更强的免疫诱导作用。而 pcDNA3-AgB' 组诱发的抗体水平比 pcDNA3-AgB 组低得多 (pcDNA3-AgB 组诱发的 IgG 水平仅与 AgB 蛋白质免疫组相当; IgG_{2a} 水平则略高 ($P < 0.05$)。pcDNA3 重组质粒对照免疫组则未引发有意义的 IgG 和 IgG_{2a} 水平的升高 (图 1 和图 2)。

上述结果提示, pcDNA3-AgB' 由于缺乏 cDNA 中的 CpG 序列, 造成 IgG 及 IgG_{2a} 水平的大幅下降。表明疫苗质粒 pcDNA3-AgB 除其目的基因表达产物 AgB 蛋白是诱导免疫反应的抗原物质外, 重组质粒中目的基因 cDNA 的 10 个 CpG 序列也在免疫激活过程中起作用^[4], 核酸疫苗 pcDNA3-AgB 的免疫激活作用可能部分是由于 cDNA 中 CpG 序列产生的免疫刺激作用所致。同时, pcDNA3-AgB' 诱发的 IgG 水平与 AgB 蛋白相当而 IgG_{2a} 水平则略高 ($P < 0.05$), 可能是由于

CpG 序列主要增强体液免疫的缘故。因

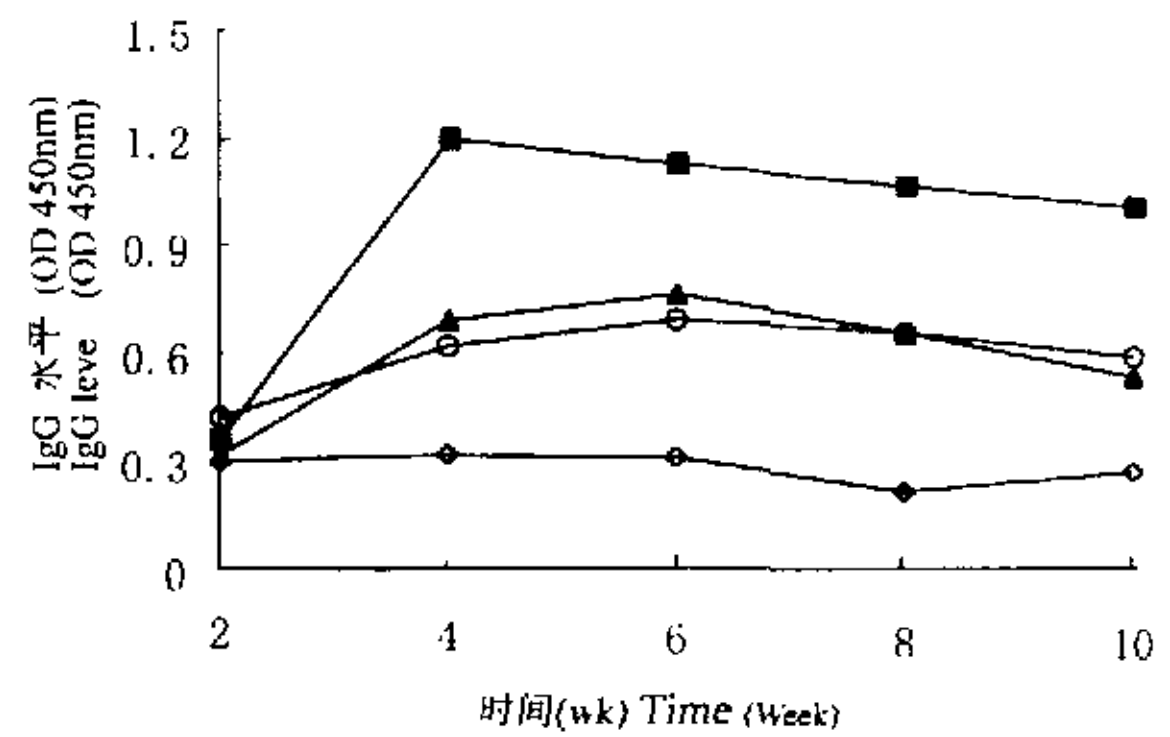


图 1 pcDNA3-AgB 核酸疫苗免疫 C57BL/6 小鼠后血清中 IgG 水平 —■— 疫苗质粒 pcDNA3-AgB 组 —○— 疫苗质粒 pcDNA3-AgB' 组 —▲— AgB 蛋白组 —◇— pcDNA3 空载体组
Fig. 1 IgG variable curve of C57BL/6 mice serum immunized with pcDNA3-AgB —■— Group of plasmid pcDNA3-AgB —○— Group of plasmid pcDNA3-AgB' —▲— Group of AgB —◇— Group of plasmid pcDNA3

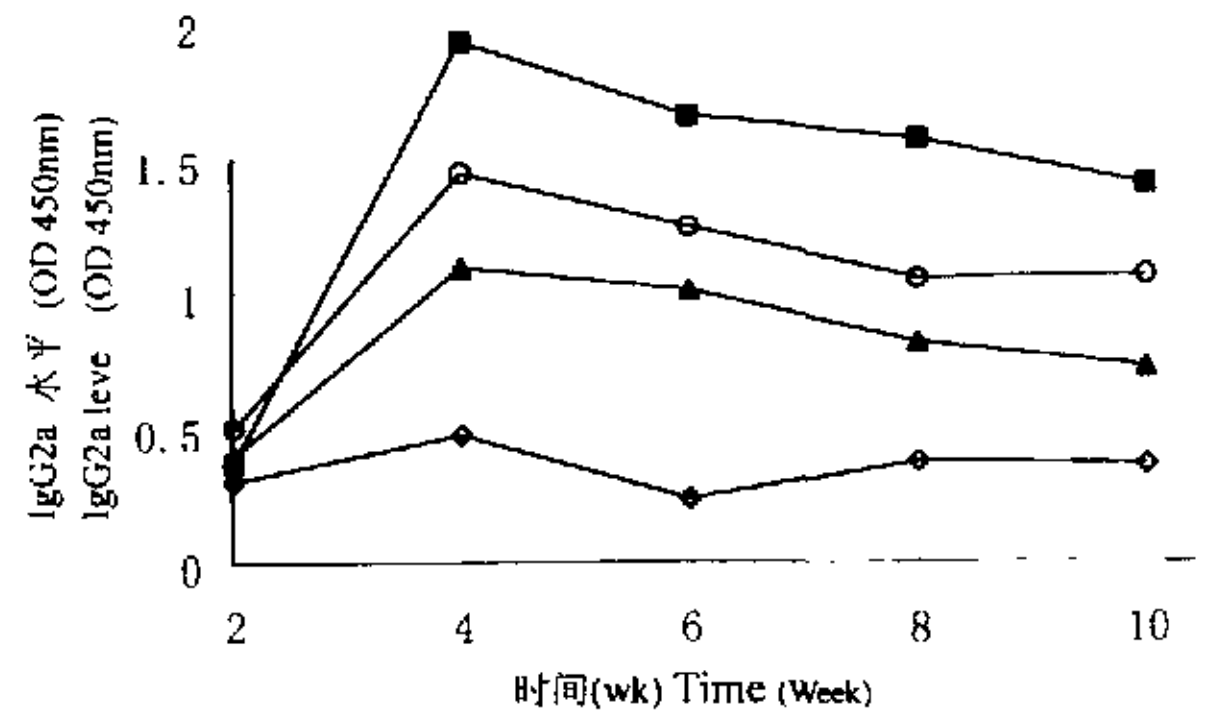


图 2 pcDNA3-AgB 核酸疫苗免疫 C57BL/6 小鼠后血清中 IgG_{2a} 水平 —■— 疫苗质粒 pcDNA3-AgB 组 —○— 疫苗质粒 pcDNA3-AgB' 组 —▲— AgB 蛋白组 —◇— pcDNA3 空载体组
Fig. 2 IgG_{2a} variable curve of C57BL/6 mice serum immunized with pcDNA3-AgB —■— Group of plasmid pcDNA3-AgB —○— Group of plasmid pcDNA3-AgB' —▲— Group of AgB —◇— Group of plasmid pcDNA3

此, CpG 序列的有或无对 IgG_{2a} 的影响则相对较小。

参 考 文 献

- [1] Klinman DM, Yi AK, Beaucage SL, et al. CpG motifs present in bacterial DNA rapidly induced lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon γ . Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93: 2879 - 2883.
- [2] 陆军, 严维耀, 郑兆鑫. CpG 序列的免疫激活机理及应用. 生物技术通报, 1999, 5: 30 - 33.
- [3] Yi AK, Tuetken R, Redford T, et al. CpG motifs in bacterial DNA activate leukocytes through the pH-dependent generation of reactive oxygen species. J Immunol, 1998, 160: 4755 - 4761.
- [4] 王庆敏, 戴建新, 张平武, 等. 猪囊尾蚴抗原 B 基因 cDNA 编码区的克隆. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2000, 18: 73 - 75.
- [5] 陈蕊雯, 林懿, 戴建新, 等. 乙肝核心抗原 DNA 疫苗的构建及其免疫原性分析. 第二军医大学学报, 2000, 21: 501 - 503.

(收稿日期: 2000-07-1 编辑: 李雅卿)