

重组真核质粒 pCMV4-rZP3' 构建及在 小鼠体内的表达*

周 飞 杨 颖 彭景棟**

(中国科学院动物研究所生殖生物学国家重点实验室 北京 100080)

摘要: 选取兔透明带 ZPC 基因序列的部分片段(编码 263-415 位的氨基酸, rZP3')作为靶抗原, 构建兔 ZP3' 基因疫苗, 研究其阻断受精的效果。提取成熟雌兔卵巢的总 RNA, RT-PCR 克隆兔透明带 ZPC 的 cDNA, 直接插入到克隆质粒 PCR \oplus 2.1 中, 构建克隆质粒 PCR \oplus 2.1-rZP3', 再将靶片段用 *Hind* III、*Xba*I 双酶切从克隆质粒 PCR \oplus 2.1-rZP3' 切下, 1% 的低熔点琼脂糖电泳回收, 亚克隆到真核表达质粒 pCMV4 中, 构建真核表达质粒 pCMV4-rZP3'。将质粒直接注射到活体小鼠的大腿内侧肌肉中, 在 mRNA 水平上观察到质粒能在肌肉细胞中正确表达, 并且其表达可以维持 12 周以上。

关键词: DNA 疫苗; 卵透明带; ZPC; RT-PCR

中图分类号: Q789 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2001)03-22-06

* 中科院创新工程资助;

** 通讯作者;

第一作者介绍 周飞, 女, 26 岁, 硕士研究生; 研究方向: 生殖免疫学;

收稿日期: 2001-03-03, 修回日期: 2001-04-18

Construction of the Plasmid pCMV4-rZPC' DNA Vaccine and Analysis of Its Expression in Mouse

ZHOU Fei YANG Ying PENG Jing-Pian

(State Key Laboratory of Reproductive Biology, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences Beijing 100080, China)

Abstract: Selecting the partial sequence of rabbit zona pellucida protein C (Amino Acid No. 263-415, rZPC') as the target, the pCMV4-rZPC' gene vaccine was constructed. The total-RNA was extracted from the ovary of sexually matured healthy female rabbit (New Zealand) and the rZPC' cDNA was amplified by RT-PCR. The product of RT-PCR was directly inserted into the cloning vector PCR® 2.1 and constructed the PCR® 2.1-rZPC'. Then the vector was digested by *Hind* III, *Xba*I and the inserts were subcloned into plasmid pCMV4 to construct pCMV4-rZPC' DNA vaccine. Analysis by RT-PCR demonstrated that intramuscular injection of mouse with pCMV4-rZPC' vector resulted in an expression in mice muscle and the expression could be up to 12 weeks.

Key words: DNA vaccine; Zona pellucida; ZPC; RT-PCR

兔透明带(zona pellucida, ZP)是覆盖在卵母细胞外的一层基质,由三种不同的糖蛋白(ZP1, ZP2 和 ZP3)组成^[1]。由于抗 ZP3 抗体能与包括人、猴和小鼠在内的许多动物的 ZP 发生交叉反应,因此 ZP3 被认为是研究抗生育疫苗的潜在抗原之一^[2]。但是以往的研究证明 ZP 蛋白疫苗几乎都不可避免地造成了对滤泡发育和卵巢正常生理过程不同程度的影响^[1,3]。为了避免或减少 ZP 疫苗对卵巢功能的干扰,更准确地评价它的抗生育功效和可能的副作用,所以寻找一种特异的 ZP 蛋白或一个特异的抗原表位,其抗体可以抑制受精而又不影响卵巢正常生理功能,已经成为目前 ZP 疫苗研究的一个热点。

DNA 疫苗是新型免疫技术,它将编码特异靶抗原的基因片段克隆到特定的表达载体中,构建成能够在真核细胞中表达的质粒 DNA。用这种质粒 DNA 接种免疫机体,可以在自体细胞中表达抗原蛋白,模拟抗原蛋白自然状态下的三维空间构象,在体内表达具有生物活性的蛋白,激活机体的体液免疫和细胞免疫应答^[4]。我们把 DNA 疫苗技术应用于生殖领域,选择兔透明带 ZPC 蛋白部分片段(编码 263-415 位的氨基酸, rZPC')作为靶抗原,构建了 pCMV4-ZP3'

真核表达质粒,并在分子水平上观察质粒在小鼠肌肉中的表达,为进一步的抗生育实验做准备,同时为将来利用异体抗原的 DNA 疫苗来控制人类生育和防治有害动物(如虫、鼠等)探索一条新途径。

1 材料与方 法

1.1 质粒和受体菌 PCR® 2.1 克隆质粒及感受态菌 DH5 α 购自美国 Invitrogen 公司, pCMV4 质粒由美国宾西法尼亚大学王宾教授馈赠。

1.2 实验动物 18~22 g 性成熟的 BALB/C 小鼠,购自中科院遗传所,常规实验动物饲养方法饲养。

1.3 工具酶和试剂 限制性内切酶、总 RNA 提取试剂盒、RT-PCR 试剂盒及质粒提取试剂盒(Promega 公司),其余试剂为分析纯。

1.4 总 RNA 的提取 用 Promega 公司 RNA-gents Total RNA Isolation System 从兔卵巢中提取总 RNA。取成熟雌性兔两侧卵巢,加 3 ml 预冷的变性液,混合后冰浴 15 min,加入 300 μ l 醋酸钠,混合均匀,再加入等体积的酚:氯仿:异戊醇(25:24:1),混合均匀,冰浴 15 min,10 000 g 4 $^{\circ}$ C 离心 20 min 后将上清转移至另一个 DEPC 处理

过的离心管中,加入等体积的异丙醇, - 20℃ 30 min, 10 000 g 4℃ 离心 15 min 沉淀 RNA, 75% 的乙醇洗涤两次, 真空干燥, 沉淀用 100 μl 的无 Rnase 的水溶解, - 20℃ 保存。

1.5 引物设计 根据已发表的兔卵透明带 ZPC 基因 cDNA 顺序合成引物^[5]:

上游引物 A: 5'-CGATGCACTTCGCTAATGACTCC-AGGC-3';

下游引物 B: 5'-CGTTAAGCCACAGCCAGGAACA-CAATG-3'。

引物 A 带有起始密码子, 引物 B 带有终止密码子。引物由赛百盛公司合成。

1.6 兔 ZPC' 基因 cDNA 合成 以反向引物 B 为 cDNA 合成引物, 2 μl 的总 RNA, 1 μl 的反向引物 (50 pmol), dNTP's (25 mmol/L) 1 μl 及 5 × AMV/Tfl 缓冲液 10 μl, 终体积为 50 μl, 42℃ 保温 1 h, 用引物 B 扩增 ZP3' 基因片段。反应结束后, 95℃ 2 min 灭活反转录酶, 产物 - 20℃ 保存。

1.7 兔 ZPC' 基因 cDNA 的 PCR 扩增 取兔 ZPC' 基因 cDNA 4 μl、引物 A 1 μl、引物 B 0.5 μl、5 × 的 AMV/Tfl 缓冲液 5 μl、Tfl DNA 聚合酶 (5 U/μl) 1 μl、dNTP's (25 mmol/L) 1 μl, 终体积为 25 μl。反应条件为: 95℃ 5 min、95℃ 1 min、65℃ 1 min、68℃ 2 min 30 个循环 (每个循环降 0.5℃, 一直降到 50℃), 然后在 55℃ 2 min 10 个循环, 68℃ 10 min。扩增产物取 15 μl 电泳观察结果。

1.8 克隆质粒 PCR® 2.1-rZPC' 的构建 用低熔点胶回收取新鲜的 PCR 产物, 2 μl PCR® 2.1 克隆质粒 (50 ng) 加入新鲜的 PCR 产物 6.4 ng, 加入 T4 连接酶 1 μl、dNTP 1 μl, 14℃ 过夜。在冰上解冻一小管感受态菌, 加入 2 μl 反应物混匀, 冰上保存 30 min, 42℃ 热休克 30 s, 置于冰上 2 min, 加入 250 μl SOC 溶液、37℃ 水平振荡 1 h, 涂在 LB 琼脂平板 (含有氨卞青霉素、IPTG、X-gal) 37℃ 培养过夜。挑白色菌落培养以小量法提取质粒 DNA, 用酶切鉴定。取酶切阳性质粒进行序列测定, 由北京赛百盛公司进行。

1.9 真核表达质粒的构建 取含有 ZPC' 基因的 PCR® 2.1-rZPC' 克隆质粒经 Hind III、X-bal 酶切, 1% 低熔点琼脂糖电泳纯化回收 550 bp 左

右的含有 ZPC' 基因的 DNA 片段。取 pCMV4 质粒做同样酶切处理、电泳回收 4.9 kb 的 DNA 片段。pCMV4 质粒 50 ng, ZPC' 基因 5 ng 片段加入 T4 连接酶 1 μl, dNTP 1 μl, 14℃ 过夜, 转化感受态菌, 涂平板培养过夜, 挑菌培养以小量法提取质粒 DNA, 用 Hind III、X-bal 酶切鉴定, 选出 500 bp 左右的重组质粒。阳性克隆以 Nae I, Kpn I + X-bal, Hind III + Sma I, Kpn I + Nae I、Sma I + Nae I 鉴定。

1.10 在小鼠体内的表达 用盐酸普鲁卡因 (Bupivacaine-HCl) 作为药物诱导剂, 将 pCMV4-rZPC' 肌肉多点注射到 BALB/c 小鼠中。每只小鼠于接种质粒 DNA 前在右侧大腿肌肉分 3 点注射 50 μl 0.5% Bupivacaine-HCl, 24 h 后在相同部位分 3 次注射 pCMV4-rZPC' 质粒 DNA, 并在 2 周后加强一次。10 周后提取小鼠右侧大腿肌肉的总 RNA, 用相同的条件扩增, 在分子水平上观察质粒的表达情况, 扩增产物由上海博亚公司测序。

2 结果

2.1 兔 ZPC' 基因的 RT-PCR 扩增 以兔卵巢总 RNA 为模板, RT-PCR 扩增到一条约为 470 bp 的 DNA 带, 其分子量与目的基因片段一致。Nae I 酶切得到 310 bp + 160 bp 的 DNA 条带 (图 1), 初步确定为目的基因。

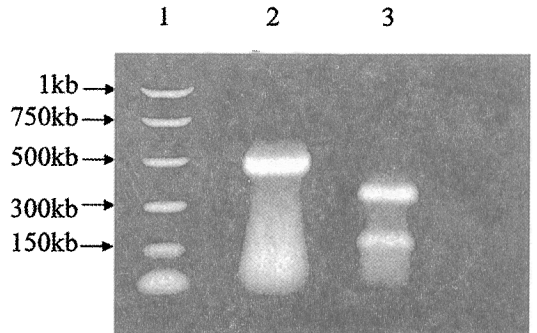


图 1 RT-PCR 产物及其酶切结果

Fig.1 RT-PCR results

1. PCR marker; 2. RT-PCR 产物 (RT-PCR result);

3. Nae I 酶切 (Digested by Nae I)

2.2 克隆质粒 PCR® 2.1-rZPC' 的构建和鉴定 新鲜的 RT-PCR 产物直接与 PCR® 2.1 克

隆质粒用 T4 连接酶连接,转化感受态菌 DH5 α , 随机挑取 8 个菌落小量提取质粒,用 *Hind* III + *X-bal* 酶切,选取含有 500 bp 条带的质粒,用 *Bam* HI + *Nae* I, *Nae* I, *Pvu* II 进一步酶切鉴定(图 2)。从图 2 可以看出重组质粒经 *Bam* HI + *Nae* I 酶切后共有四条带,根据 PCR \otimes 2.1 质粒和 rZPC' 基因的酶切图谱可以确定,含有 300 bp + 540 bp 条带为正向插入,有 700 bp + 150 bp 条带是反向插入,正向插入的质粒命名为 PCR \otimes 2.1-rZPC' 做进一步的酶切鉴定。PCR \otimes 2.1-rZPC' 质粒经 *Nae* I 酶切得到 540 bp + 1 250 bp, *Pvu* II 酶切 360 bp + 380 bp + 540 bp + 700 bp(其中 360 bp 和 380 bp 的条带在图上重合,所以条带比较亮),与 *Nae* I, *Pvu* II 位点相符。通过以上酶切分析可以初步肯定已将兔 rZPC' 基因 cDNA 克隆到 PCR \otimes 2.1 克隆质粒中。

2.3 rZPC' 基因片段的序列测定 用 T7、M13

1 CTAANNCAAC AAGCNGGTAC GAGCTCGGAT CCACTAGTAA CGGCCGCCAG TGTGCTGGAA
61 TTCGGCTTCG ATGCACTTCG CTAATGACTC CAGGCACACG GTCTACATCA CGTGTACCT
上游引物 5'-CG ATGCACTTCG CTAATGACTC CAGGC-3'

121 GAGGGTCATT CCTGCCAGC AAGCCCCGGA CCGGCTCAAC AAGGCTTGT CTITCAACCA
181 GTCCTCCAGC AGCTGGGCC CGGTGGAAGG CAGTGCAGAC ATCTGTGAGT GTTGCGGCAA
241 CCGTGACTGT GACCTCATCG CAGGCTCCCC CATGAACCAG AACCATGCTG CCCGGTCCTC
301 TCTGCGAAGC CGCAGGCACG TGACGAAGA AGCAGACGTC ACCGTGGGCC CGCTGATCTT
361 CCTGGGGAAG GCTGGTGACC CTGCCGCA CAGAGGGGCT GGCCTCTGCT GCGCAGGCGA
421 CCCTGGTGCT GGGCCTTCGC ATGCCACCA TTGTGTTCTT GCCTGTGGCT GCTGTGGTCC
481 TGGGCCTCAC CAGGGGGCGC CACGCTGCTT CCCACCCAG GTCTGCTTCC CAATAAAAAA

下游引物 3'-GTC CAGACGAAGG GTTATTTT-5'

541 GCCGAATTCT GCAGATATCC ATCACACTGG CGGCCGCTCG AGCATGCATT AGAGGCCNNG

2.4 pCMV4-rZPC' 真核质粒的构建和鉴定

PCR \otimes 2.1-rZPC' 质粒用 *Hind* III、*X-bal* 酶切,低熔点胶回收 550 bp 左右的 DNA 带,与同样处理的真核表达质粒 pCMV4 连接,转化感受态菌 DH5 α ,共得 4 个菌落,小量提取质粒,用 *Hind* III + *X-bal*, *Kpn* I + *X-bal*, *Hind* III + *Sma* I, *Kpn* I (*Nae* I, *Sma* I + *Nae* I 酶切鉴定。从图 3 可以看出 pCMV4-rZPC', PCR \otimes 2.1-rZPC' 用 *Hind* III + *X-bal* 酶切得到的片段大小一致,

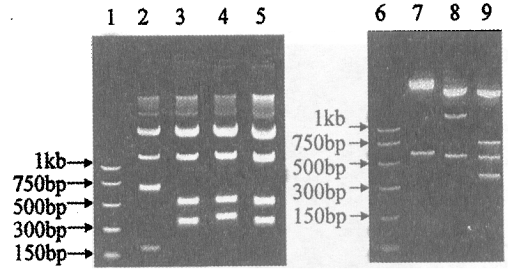


图 2 PCR \otimes 2.1-rZPC' 重组克隆质粒的酶切鉴定

Fig.2 Recombinant PCR \otimes 2.1-rZPC' vector identified by digesting with *Bam* HI + *Nae* I, *Nae* I, *Pvu* II

1. PCR marker; 2 ~ 5. *Bam* HI + *Nae* I 酶切结果,其中 3 ~ 5

为正向插入(Digested by *Bam* HI + *Nae* I); 6. PCR marker; 7. *Hind* III + *X-bal* 酶切(Digested by *Hind* III + *X-bal*); 8. *Nae* I 酶切(Digested by *Nae* I); 9. *Pvu* II 酶切(Digested by *Pvu* II)

引物进行双向序列测定,测序结果与已知的兔 ZPC' 序列完全一致,证明基因片段的确是靶片段,克隆质粒构建成功。测序序列如下:

说明为同一插入基因 rZPC'。pCMV4-rZPC' 经 *Kpn* I + *X-bal*, *Hind* III + *Sma* I 酶切均得到 550 bp 左右的条带,而 *Kpn* I + *Nae* I, *Sma* I + *Nae* I 酶切则没有 550 bp 左右的条带,说明已将 rZPC' 正向插入到真核质粒 pCMV4 中,重组真核质粒 pCMV4-rZPC' 构建成功。

2.5 pCMV4-rZPC' 真核质粒在小鼠肌肉中的表达 以正常小鼠肌肉作为对照,在相同的条件下扩增小鼠肌肉的总 RNA,扩增产物用

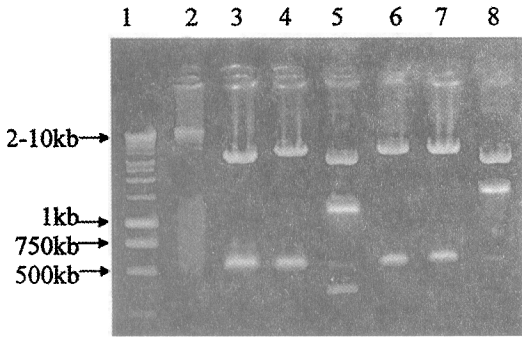


图3 pCMV4-rZPC'真核质粒的鉴定

Fig.3 Recombinant plasmid pCMV4-rZPC' identified by digesting with *Hind* III + *X-bal*, *Kpn* I + *Nae* I, *Kpn* I + *X-bal*, *Hind* III + *Sma* I, *Sma* I + *Nae* I

1.1kb marker;2.pCMV4; 3~8.重组质粒酶切结果 (3.Digested by *Hind* III + *X-bal* (PCR@ 2.1-rZPC');4. Digested by *Hind* III + *X-bal*; 5. Digested by *Kpn* I + *Nae* I; 6. Digested by *Kpn* I + *X-bal*; 7. Digested by *Hind* III + *Sma* I; 8. Digested by *Sma* I + *Nae* I)

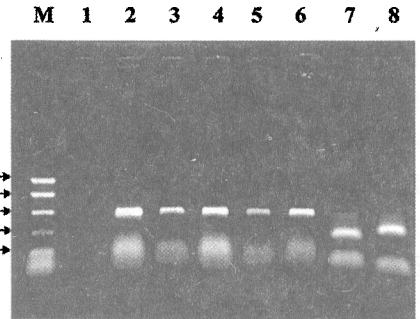


图4 RT-PCR 鉴定 pCMV4-rZPC'真核质粒表达产物

Fig.4 Analysis of expression products of pCMV4-rZPC' by RT-PCR

1.1kb marker; 2.对照组 (Control); 3~6. RT-PCR 产物 (Product of RT-PCR); 7. *Pst* I 酶切 (Digested by *Pst* I); 8. *Nae* I 酶切 (Digested by *Nae* I)

Nae I, *Pst* I 酶切, 1% 琼脂糖电泳鉴定。图4 说明在 mRNA 水平上在正常小鼠中检测不

到 rZPC' 的表达,而在实验组小鼠中可以检测到 rZPC' 在小鼠肌肉中的表达,酶切结果与 *Nae* I, *Pst* I 位点相符。扩增产物由上海博亚公司进行测序,测序结果与靶片段一致,证明质粒 DNA 能在小鼠肌肉中表达。测序结果如下:

1 TCGATGCACC TTCGCTAATG ACTCCAGGCCA CACGGTCTAC ATCACGTGTC

上游引物 5'-CG ATGCACTTCG CTAATGACTC CAGGC-3'

51 ACCTGAGGGT CATTCTGCC CAGCAAGCCC CGGACCGGCT CAAGGCTTGT TCTTTCAACC
111 AGTCTCCAG CAGCTGGGCC CCGTGGAAG GCAGTGCAGA CATCTGTGAG TGTTGCGGCA
171 ACGGTGACTG TGACCTCATC GCAGGCTCCC CCATGAACCA GAACCATGCT GCCCGTCTCT
231 CTCTGCGAAG CCGCAGGCAC GTGACGAAG AAGCAGACGT CACCGTGGGC CCGCTGATCT
291 TCCTGGGGAA GGCTGGTGAC CCTGCCGGC ACAGAGGGGC TGGCCTCTGC TGCGCAGGCG
351 ACCCTGGTGC TGGGCCTTCG CATGGCCACC ATTGTGTTCC TGGCTGTGGC TGCTGTGCTC
411 CTGGGCCTCA CCAGGGGGCG CCACGC

3 讨论

DNA 疫苗技术是 90 年代以来发展起来的一种新兴的基因治疗技术,其原理是将选定的目的外源基因克隆到表达质粒,直接注入动物体内,使外源基因在活体内表达,产生抗体从而激活体液免疫和细胞免疫应答。透明带蛋白 ZP 作为一个不影响激素水平的特异性的抗生育阻断位点,目前国内外已开始对 ZP 避孕疫苗进行多层次的研究。Kerr 等人^[6]用 Myxoma 病毒作载体构建兔全长 ZPB 的病毒疫苗 (VV-ZPB) 来免疫兔,在兔体内产生相当高的抗体滴

度,产生的抗体可以和兔的 ZP 蛋白结合,使 80% 的兔子不孕;但是它同时引起了卵巢结构变化和功能紊乱。Jackson^[7]等选取小鼠全长 ZPC,构建了 ECTV-ZPC 重组病毒疫苗,发现其抗体可以与 ZP 蛋白结合,但是同样也影响小鼠卵巢的正常结构和功能。作者所在的实验室曾与澳大利亚 Lyn Hinds 博士的实验室合作进行兔 ZPB 的 DNA 疫苗的研究,发现能产生较高滴度的抗体,其对卵巢也有一定影响。从目前的研究来看无论是蛋白疫苗还是全长基因疫苗都会引起卵巢结构变化和功能紊乱,这就限制了 ZP 作为抗生育疫苗的应用。寻找一个最小、最

简单的 ZP 免疫源,例如一个表位,它能产生抗体阻断精卵相互作用而抑制受精,而且几乎没有副作用已经成为当前的一个研究热点。Hinsch 博士^[8]发现用小鼠的 ZP3 蛋白的保守序列的合成多肽(AA151-165, AA360-369),其抗体可以识别包括人和猴在内多种动物的 ZP 蛋白。在本实验中我们没有克隆兔 ZPC 的全长基因,而是有选择地选取兔 ZPC 基因的 153 个氨基酸(编码 263 ~ 415 位),其中既保留了 ZP 家族的保守序列片段,也含有兔的特异序列片段,目的是为寻找一个既能产生抗受精作用,又不影响卵巢结构和功能的靶抗原位点。用特异抗原决定簇构建基因疫苗,研究克隆 ZP 部分片段达到阻断精卵相互作用的可能性,这是一个新的探索。从内切酶鉴定和序列测定可以确定,我们已经扩增得到靶片段,在分子水平上可以观察到真核质粒在活体小鼠肌肉中较高表达,导入的基因疫苗 10 周后在小鼠肌肉中仍有高效表达。我们用盐酸普鲁卡因(Bupivacaine-HCl)^[4,9]作为导入后表达辅助药物,加速局部肌肉对质粒基因的吸收,并使基因在体内的表达水平提高 20 ~ 30 倍。动物实验证明 pCMV4-rZPC' DNA 疫苗有一定的抗生育效果,卵巢的病理实验正在进行中。

参 考 文 献

- [1] Dunbar, B.S., S. Avery, V. Lee *et al.* The mammalian zona pellucida: its biochemistry, immunochemistry, molecular biology, and developmental expression. *Reprod. Fertil. Dev.*, 1994, **6**: 331 ~ 347.
- [2] Aitken, R.J., M. Paterson, M. V. Duin. The potential of the zona pellucida as a target for immunocontraception. *American Journal of Reproductive Immunology*, 1996, **35**: 175 ~ 180.
- [3] 潘善培, 谢琪璇, 陈海铃. 用猪卵透明带 55 kDa 糖蛋白抗原(ZP3)免疫恒河猴的初步研究. *暨南大学学报*, 1995, **16**(1): 90 ~ 97.
- [4] Wang, B., J. Boyer, V. Srikanth *et al.* Nucleic acid-based immunization against HIV-1 induction of protective *in vivo* immune responses. *AID*, 1995, **9**: 159 ~ 170.
- [5] Harris J. D., D. W. Hibler, C. K. Fontenot *et al.* Cloning and characterization of zona pellucida genes and cDNA from a variety of mammalian species: the ZPA, ZPB and ZPC gene families. *DNA Sequence*, 1994, **4**: 361 ~ 393.
- [6] Kerr, P.J., R.J. Jackson, A.J. Robinson *et al.* Infertility in female rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) alloimmunized with the rabbit zona pellucida protein ZPB either as a purified recombinant protein or expressed by recombinant Myxoma Virus. *Biol. Reprod.*, 1999, **61**: 606 ~ 613.
- [7] Jackson, R. J., D. J. Maguire, L. A. Hinds *et al.* Infertility in mice induced by a recombinant ectromelia virus expressing mouse zona pellucida glycoprotein. *Biol. Reprod.*, 1998, **58**: 152 ~ 159.
- [8] Hinsch, K. D., E. Hinsch, B. Meinecke *et al.* Identification of mouse ZP3 protein in mammalian oocytes with antisera against synthetic ZP3 peptides. *Biol. Reprod.*, 1994, **51**: 193 ~ 204.
- [9] Wang, B., M. Merva, K. Dang *et al.* Immunization by DNA inoculation induces tumor rejection. *Hum. Gene Ther.*, 1995, **6**: 407 ~ 418.