

pCR3.1-bvLDH-C₄' 的构建及 在体内外的表达*

常建军 杨颖 彭景樵**

(中国科学院动物研究所, 计划生育生殖生物学国家重点实验室 北京 100080)

摘要: 精子特异性乳酸脱氢酶(LDH-C₄) 在精子的运动和存活等生理活动中起着重要的作用。研究表明, LDH-C₄ 接种鼠、兔等能够降低动物的生育率。通过 RT-PCR 方法从布氏田鼠睾丸总 RNA 中克隆出编码抗原决定簇的 LDH-C₄ 基因片断; 采用 T-A 克隆的方法将其插入到 pCR3.1 载体中构建重组载体 pCR3.1-bvLDH-C₄' , 测序结果表明克隆的基因片断与已知小鼠相应片断有 83% 的序列同源。通过质脂体法转染 HeLa 细胞, RT-PCR 证实其在 mRNA 水平有效表达; 通过肌肉接种 BALB/c 小鼠, RT-PCR 结果表明其在体内也可有效表达。

关键词: LDH-C₄; 布氏田鼠; 基因疫苗; 质脂体转染法

中图分类号: Q784 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2003)01-28-06

Construction of pCR3.1-bvLDH-C₄' and Its Expression *in Vivo and in Vitro*

CHANG Jian-Jun YANG Ying PENG Jing-Pian

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

Abstract: Sperm-specific lactate dehydrogenase (LDH-C₄) is important in providing energy for the motility and survival of spermatozoa. There is abundant evidence in the literature that immunization with purified LDH-C₄ reduces the fertility of mice, rabbits and baboons. To study the immunological infertility of a recombinant vector of the wild mouse LDH-C₄ gene, the cDNA sequence coding for the LDH-C₄ fragment containing the antigen epitope C₅₋₁₅ was amplified from total testis RNA of *Microtus branditi radde* by reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR). Then the cDNA fragment was inserted into the plasmid pCR3.1 to construct the recombinant vector pCR3.1-bvLDH-C₄' by T-A cloning. Sequencing revealed 83% homology with the known mouse LDH-C₄ gene. Furthermore, when the recombinant plasmid was transfected into HeLa cells with lipofectamine, RT-PCR suggests that these could efficiently express the mRNA of bvLDH-C₄'. BALB/c mice intramuscularly injected with the recombinant plasmid also expressed the mRNA of LDH-C₄' at a relatively efficient level.

* 国家自然科学基金资助项目(No. 39870100);

** 通讯作者, E-mail: pengjp@panda.ioz.ac.cn;

第一作者介绍 常建军, 男, 29, 硕士; 研究方向: 分子免疫学。

收稿日期: 2002-08-02, 修回日期: 2002-10-29

Key words: LDH-C₄; Gene vaccine; Lipofection transfection

每年,鼠及其它小型有害哺乳动物对全球的农林牧业造成严重损失,传播的出血热、鼠疫等疾病对人类健康甚至生命造成严重威胁。灭鼠药剂杀伤力虽强但严重污染环境且在实施过程中须投入大量的人力和物力。如何既能长期有效地控制鼠害,又能维持生态平衡,降低环境污染,成为人类在鼠害控制研究过程中追求的目标。由于基因疫苗具有的持久性、低成本、少污染等特点,近年来利用免疫不育技术控制鼠害成为国际上一个新的研究热点^[1]。

精子特异性乳酸脱氢酶(sperm-specific lactate dehydrogenase, LDH-C₄)特异地存在于鸟类和哺乳类动物的睾丸和精子中,在精子运动和存活等生理功能中发挥作用^[2,3]。由于其特异性的细胞分布,LDH-C₄自1963年发现以来引起许多学者的兴趣。用LDH-C₄或部分肽段等免疫鼠^[4,5]、兔^[6,7]、狒狒^[8,9]等,在血清中都检测到抗LDH-C₄的抗体,动物的生育率明显降低,并且认为肽段5~15、211~220是其两个重要的抗原决定簇^[10,11]。1998年Bird等将狐的完整LDH-C₄基因与载体连接并通过沙门氏菌感染狐后在唾液中也检测到抗LDH-C₄的抗体^[12]。但有关野生鼠LDH-C₄基因的克隆及用编码抗原决定簇的基因片段作为基因疫苗研究LDH-C₄的免疫不育还未见报道。

为此,作者从布氏田鼠睾丸中克隆出编码LDH-C₄抗原决定簇的基因片段,构建pCR3.1-bvLDH-C₄重组载体,研究其在体内外的表达。为研究抗原决定簇基因片段作为基因不育疫苗提供一定的参考,为将来利用基因免疫不育技术进行人类避孕和鼠害控制打下一定的基础。

1 材料与方 法

1.1 实验材料 布氏田鼠(来自内蒙古大草原);BALB/c鼠(购自中科院遗传所);HeLa细胞(本实验室保存);感受态菌Top10F'(Invitrogen公司)。

pCR3.1载体(Invitrogen公司);总RNA提取试剂盒、RT-PCR试剂盒、限制性内切酶(Pro-mega公司);DMEM培养基、胎牛血清(GIBCO公司);其它试剂均为分析纯。

1.2 引物设计 根据GenBank中小鼠、狐等的基因序列及蛋白免疫不育的研究,设计克隆布氏田鼠LDH-C₄目的基因片段的引物如下。

上游引物:5' AACATGCCACCGTCAAGGAGC 3'

下游引物:5' ACCCAGCTTCTCCCAATCAGTTA
ACG3'

其中上游引物中包含ATG起始密码子,下游引物包含TTA终止密码子。

1.3 布氏田鼠睾丸总RNA的提取 取成熟布氏田鼠睾丸,根据总RNA提取试剂盒提供的方法提取睾丸总RNA。将变性液500 μl加入灭菌处理的1.5 ml离心管中,冰浴5 min;取布氏田鼠的两个睾丸放入变性液后匀浆;加入70 μl 2 mol/L 醋酸钠,颠倒混匀后再加入700 μl的酚:氯仿:异戊醇(比例为25:24:1),颠倒混匀后冰浴15 min;4℃、10 000 g离心20 min后将上清液转移至另一无菌离心管中,加入500 μl 异丙醇,-20℃静置30 min;4℃、10 000 g离心10 min后弃去上清液,加入1 ml冰浴的75%乙醇,用灭菌的玻璃棒搅拌沉淀;4℃、10 000 g离心10 min后倒去上清液,自然干燥10 min;加入50 μl无核酸酶的水溶解RNA,-20℃保存备用。

1.4 RT-PCR克隆布氏田鼠LDH-C₄基因(bv-LDH-C₄) 在50 μl RT-PCR反应体系中加入无核酸酶的水30 μl、缓冲液10 μl、dNTP 1 μl、上下游引物各1.5 μl、AMV反转录酶和TF1 DNA聚合酶各0.5 μl;然后再加入2 μl布氏田鼠睾丸总RNA溶液作为模板、阴性对照则加入2 μl无核酸酶的水,阳性对照用试剂盒提供的上下游引物和总RNA。RT-PCR反应条件:48℃、45 min一个循环;94℃、2 min一个循环;94℃、30 s,60℃、2 min,68℃、1 min共40个循环;68℃、7 min一个循环。1.5%琼脂糖电泳检测结果。

1.5 pCR3.1-bvLDH-C₄的构建和鉴定 根据

pCR3.1 载体试剂盒的说明将克隆的基因片段与 pCR3.1 质粒进行连接,用连接反应液转化感受态细胞 Top10F',取 80 μ l 转化的菌液涂布 LB (含氨苄青霉素)平板,37 $^{\circ}$ C 培养过夜。挑取其中 7 个菌落摇菌过夜,常规方法提取小量质粒进行酶切鉴定并对阳性重组质粒进行测序。

1.6 pCR3.1-bvLDH-C₄ 在 HeLa 细胞中的表达 用 DMEM 培养基(10% 胎牛血清、100 U 的氨苄青霉素/卡那霉素)在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下培养 HeLa 细胞。转染前一天将细胞接种至 4 个 60 mm 培养皿中,调整细胞至 50% ~ 70% 满。在试管中制备脂质体/重组质粒 DNA 复合体和脂质体/空质粒 DNA 复合体,加入培养皿中转染细胞。分别在转染后 24、48、72 h 提取细胞总 RNA,RT-PCR 检测布氏田鼠 LDH-C₄ 在 mRNA 水平的表达。

1.7 pCR3.1-bvLDH-C₄ 在 BALB/c 小鼠体内的表达 2 只成熟雌性 BALB/c 鼠分成对照组和实验组,多点肌肉注射^[13] 100 μ l 0.25% 普鲁卡因,24 h 后分别多点肌肉注射空质粒(对照组)和重组质粒(实验组)各 20 μ g,1 周后提取两组小鼠的肌肉、脾、子宫、肝脏总 RNA。RT-PCR 检测 pCR3.1-bvLDH-C₄ 在小鼠体内的表达。

2 结 果

2.1 RT-PCR 克隆布氏田鼠 LDH-C₄ 基因片段 选择编码 LDH-C₄ 抗原决定簇的部分保守基因序列作为靶基因,据此设计上游引物和下游引物,以成熟布氏田鼠睾丸总 RNA 作为模板,通过 RT-PCR 的方法克隆出 516 bp cDNA 片段,结果如图 1。其中条带 2 为克隆的预期目的基因片断。

2.2 pCR3.1-bvLDH-C₄ 构建及鉴定 将克隆的基因片段与 pCR3.1 质粒连接后转化感受态细胞 Top10F',涂平板,挑取 7 个克隆,用常规方法小量提取质粒进行酶切鉴定。用 *Xba* I 和 *Bam*h I 双酶切,插入目的基因的质粒可以切下一 602 bp 的片断,结果如图 2。2、3 为没有插入基因的空质粒,1、4 ~ 8 为重组质粒。用 *Hind*

III + *Hpa* I 进行酶切,正向重组质粒可以切下一含有 568 bp 的片断,图 3 说明 1、4 ~ 8 可能为正向重组质粒,2、3 为空质粒。

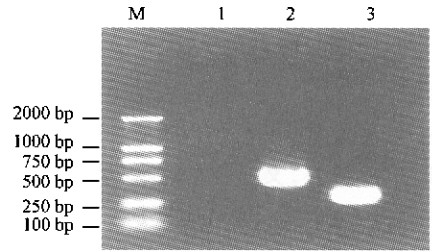


图 1 RT-PCR 克隆 bvLDH-C₄ cDNA

Fig.1 cDNA of bvLDH-C₄ by RT-PCR

M. 标准 DNA(DNA marker); 1. 阴性对照(negative control); 2. 实验组(bvLDH-C₄ cDNA); 3. 阳性对照(positive control)

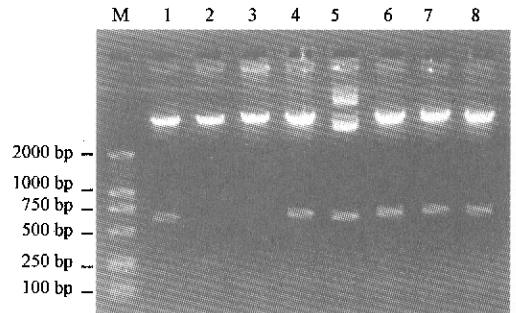


图 2 pCR3.1-bvLDH-C₄ 重组鉴定

Fig.2 Identification of Recombinant Plasmid

M. 标准 DNA(DNA marker); 2、3. pCR3.1; 1、4 ~ 8. 重组质粒(recombinant plasmid)

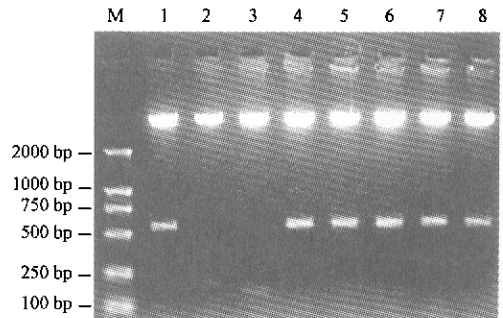


图 3 pCR3.1-bvLDH-C₄ 正反插入酶切鉴定

Fig.3 Identification of Recombinatnt Clone Vector

M. DNA marker; 2、3. 空质粒(pCR3.1); 1、4 ~ 8 正向重组质粒(pCR3.1-bvLDH-C₄)

取第 7 泳道对应质粒进行测序(上海博亚 公司),结果如下:

```

CTGGCTAGCGTTTAAACTTAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTCCAGTGTG
GTGGAATTCGGCTTAAACATGGCCACCGTCAAGGAGCAGCTAATTCAGAACCTAACTC
AAGAAGATAAAAACCTCCCCTGTAAGATCACCGTGGTTGGAGTTGGAAATGTTGGCA
TGGCGTGTGCTATTAGTATCTTACTGAAGGATCTGGCTGATGAACTCGCTCTTATTG
ACGCTGATGCAGACAAAACCTGAAGGGAGAGACCCTGGATCTTCTGCACGGCAGCCTTT
TCTTCAACACTCCAAAAATCGTTTCTGGGAAAAGATTACAGTGTCTCTGCCAACTCCA
AGTTAGTTATCATCACAGCTGGCGCCAGGCAGAAGGTGGGAGAGACGGCCTTGACC
TGGTCCAGCGCAACGTTGTTATCATGAAATCCATCGTTCCCAGCATAGTCCAAAAACA
GCCCCGACTGTAAAATCCTGATTTTCAAACCCAGTGGATATTTTACTTACGTGG
TATGGAAGATAAGTGGCCTCCCTGCGACTCGCGTAATTGGGAGCGGCTGTAACCTAG
ACTCTGCCCCGTTTCCGTTAACTGATTGGGGAGAAGCTGGGTAAAGCC
  
```

其中包含有预期的上游和下游引物(下划线部分)。这些酶切和测序结果说明目的基因片段正向插入到 pCR3.1 载体中。

2.3 pCR3.1-bvLDH-C₄ 在 HeLa 细胞中的表达 用脂质体法转染细胞,分别在 24、48、72 h 提取细胞总 RNA,RT-PCR 检测布氏田鼠 LDH-C₄ 在 mRNA 水平的表达。图 4 说明转染后 48 h 对照组 HeLa 细胞中没有 LDH-C₄ mRNA 的表达,而实验组细胞在 24、48、72 h 都有 LDH-C₄ mRNA 表达。

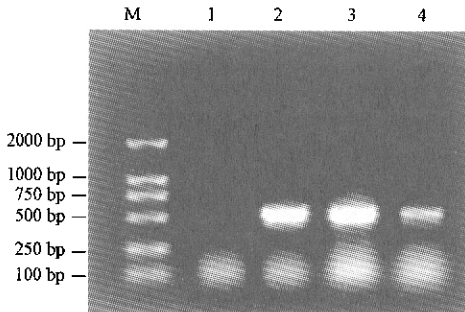


图 4 pCR3.1-bvLDH-C₄ 在 HeLa 细胞中的表达

Fig.4 Expression of bvLDH-C₄ mRNA in HeLa Cells

Transfected by pCR3.1-bvLDH-C₄

M. 标准 DNA(DNA marker); 1. pCR3.1 转染 HeLa 细胞 48 h 后没有 bvLDH-C₄ mRNA 表达(no bvLDH-C₄ mRNA expressed by HeLa cells transfected by pCR3.1 at 48 h);

2~4. 分别为 pCR3.1-bvLDH-C₄ 转染 HeLa 细胞后 24、48、72 h 的表达(bvLDH-C₄ mRNA expressed by HeLa cells transfected by pCR3.1-bvLDH-C₄ respectively at 24,48,72 h)

2.4 pCR3.1-bvLDH-C₄ 在 BALB/c 小鼠体内的表达 两只成熟雌性 BALB/c 小鼠分别接种空质粒(对照组)和重组质粒(实验组),1 周后提取两组小鼠的肌肉、脾、子宫、肝脏总 RNA,RT-PCR 检测 pCR3.1-bvLDH-C₄ 在小鼠体内的表达,如表达可扩增出一条 516 bp 的基因片断。结果如图 5,接种空质粒的小鼠体内没有 LDH-C₄ 表达;接种重组质粒的小鼠肌肉、脾、子宫、肝脏中均有一定表达。

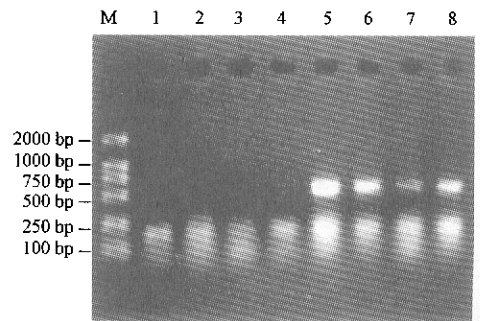


图 5 pCR3.1-bvLDH-C₄ 在 BALB/c 小鼠体内的表达检测

Fig.5 Determination of bvLDH-C₄ mRNA Expression in BALB/c Mice

M. 标准 DNA(DNA marker); 1~4. 对照组小鼠的肌肉、脾、子宫、肝脏(respectively muscle, spleen, uterus, liver of BALB/c mice inoculated by pCR3.1); 5~8. 实验组小鼠的肌肉、脾、子宫、肝脏(respectively muscle, spleen, uterus, liver of BALB/c mice inoculated with pCR3.1-bvLDH-C₄)

3 讨论

LDH-C₄是由四个C亚单位组成的同源四聚体,每个C亚单位包含332个氨基酸,由一个1 kb的基因编码。LDH-C₄具有能够诱导免疫反应的抗原表位以及细胞特异性和剂量依赖性免疫抑制决定簇,能够作为免疫原诱导产生抗体^[14,15]。将肽段5~15、211~220与白喉类毒素等连接后接种兔、狒狒等能够引起免疫应答,降低生育率。这表明将编码LDH-C₄抗原决定簇的基因片段与真核表达载体连接构建免疫不育基因疫苗可能是可行的。

为了进行LDH-C₄抗原决定簇基因疫苗的免疫不育研究,作者通过RT-PCR的方法从野生的布氏田鼠睾丸总RNA中克隆出一段LDH-C₄基因而非完整基因。蛋白作为抗原须具有一定的分子大小及空间结构等,作者从布氏田鼠睾丸中克隆出含有516 bp一段基因,其编码包含5~15抗原决定簇在内的171个氨基酸蛋白片段,该蛋白片段可能具有抗原的作用,能够引起机体的免疫应答^[16];另外,由于不具有完整的亚单位结构这一蛋白片段可能不形成具有酶活性的四聚体而减少了对机体的酶副作用,有利于进一步进行人类基因免疫不育的研究。将这一基因片段的碱基序列与目前已知家鼠LDH-C₄相应基因片段进行比较,结果表明二者有83%的同源序列,其编码的171个氨基酸中有24个氨基酸位点不同。基因疫苗须在体内有效表达抗原才能刺激机体的免疫系统,本研究的体内外实验结果表明,将布氏田鼠LDH-C₄与pCR3.1连接构建的pCR3.1-bvLDH-C₄能够在mRNA水平进行体内外的有效表达。推测用pCR3.1-bvLDH-C₄接种动物引起免疫应答是可能的,对此作用作者将做进一步的研究。

随着粘膜免疫及基因疫苗研究等的发展,科学工作者开始研究如何将基因免疫不育技术更好地应用于有害生物的控制,澳大利亚和新西兰等国家的科研人员已经开展这方面的研究工作^[17~19]。作者的结果表明用编码抗原决定

簇的部分基因片断bvLDH-C₄作为免疫不育基因疫苗具有一定的可行性,对利用基因疫苗控制鼠害的理论和实践均有一定的参考价值。

参 考 文 献

- [1] 常建军,彭景榭.精子特异性乳酸脱氢酶的免疫学特性及其应用.动物学杂志,2002,37(2):85~88.
- [2] Meistrich M L, Trostle P K, Frapart M, et al. Biosynthesis and localization of lactate dehydrogenase X in pachytene spermatocytes and spermatids of mouse testis. *Dev Biol.* 1977, 60:428~441.
- [3] Burgos C, Maldonado C, Gerez de Burgos N M, et al. Intracellular localization of the testicular and sperm-specific lactate dehydrogenase isozyme C₄ in mice. *Biol Reprod.* 1995, 53: 84~92.
- [4] Shelton J A, Goldberg E. Local reproductive tract immunity to sperm-specific lactate dehydrogenase-C₄. *Biol Reprod.* 1986, 35: 873~876.
- [5] Gupta G S, Syal N. Immune responses of chemically modified homologous LDH-C₄ and their effect on fertility regulation in mice. *Am J Reprod Immunol.* 1997, 37(2):206~211.
- [6] Goldberg E. Infertility in female rabbits immunized with lactate dehydrogenase-X. *Science.* 1973, 181:458~459.
- [7] O'Hern P A, Liang Z C, Bamba C S, et al. Collinear synthesis of an antigen-specific B-cell epitope with a promiscuous tetanus toxin T-cell epitope: a synthetic peptide immun contraceptive. *Vaccine.* 1997, 15(16):1761~1766.
- [8] O'Hern P A, Bamba C S, Isahakia M, et al. Reversible contraception in female baboons immunized with a synthetic epitope of sperm-specific lactate dehydrogenase. *Biol Reprod.* 1995, 52:331~339.
- [9] Goldberg E, Wheat T E, Powell J E, et al. Reduction of fertility in female baboons immunized with lactate dehydrogenase C₄. *Fertile Steril.* 1981, 35(2):214~217.
- [10] Hogrefe H H, Kaumaya P T, Goldberg E. Immunogenicity of synthetic peptides corresponding to flexible and antibody-accessible segments of mouse lactate dehydrogenase(LDH)-C₄. *J Boil Chem.* 1989, 264(18):10513~10519.
- [11] Thomas E. Wheat, Erwin Goldberg. Antigenic domains of the sperm-specific lactate dehydrogenase C₄ isozyme. *Molecular Immunology.* 1985, 22(6):643~649.
- [12] Bird P, Kayes C, de Jersey J, et al. Construction and immunological assessment of *Salmonella typhimurium* expressing fox sperm LDH-C₄. *Reprod Fertil Dev.* 1998, 10: 225~231.
- [13] Chen Y, Liu Z, Yang Y, et al. Infertility in mice induced by the rhesus monkey chorionic gonadotropin β -subunit glycopro-

- tein (mCG β) using DNA immunization. *Mol Cell Biochem*, 2002, **213**: 89 ~ 96.
- [14] Gupta G S, Chaturvedig Joshi A. Sex dependent immune responses by allogenic LDH isozymes. *Mol Cell Biochem*, 1996, **158**(2): 115 ~ 119.
- [15] Gupta G S, Chaturvedi G. Regulation of immune functions by sperm-specific LDH and its differences with somatic isozyme in primary and secondary lymphocyte cultures. *Am J Reprod Immunol*, 2000, **44**(3): 160 ~ 169.
- [16] 周飞, 杨颖, 彭景榷. 重组真核质粒 pCMV4-rZP3' 构建及在小鼠体内的表达. *动物学杂志*, 2001, **36**(3): 22 ~ 27.
- [17] Jerry R, McGhee, Jiangchun Xu' Amano, *et al*. The common mucosal immune system: from basic principles to enteric vaccines with relevance for the female reproductive tract. *Reprod Fertil Dev*, 1994, **6**: 369 ~ 379.
- [18] Jay Srinivasan, Steven Tinge, Richard Wright, *et al*. Oral immunization with attenuated Salmonella expressing human sperm antigen induces antibodies in serum and the reproductive tract. *Biol Reprod*, 1995, **53**: 462 ~ 467.
- [19] Cowan P E, Tyndale-Biscoe C H. Australian and New Zealand mammal species considered to be pests or problems. *Reprod Fertil Dev*, 1997, **9**: 27 ~ 36.