中 国 科 学
1992年5月 B 辑 第5期

新型小肽疫苗的设计
——I. 多联体生长激素释放抑制因子基因的化学合成、克隆与表达

张 鹰 袁汉英 杨宝华* 王启松

(复旦大学遗传学研究所，上海 200433)

摘 要

小分子多肽制备抗体效率很低. 我们设计了一种新的制备小肽疫苗的方法——小肽自连疫苗. 这种新疫苗无需用其它蛋白质作载体，因此纯度高，单一性强，无其它杂抗原. 尤其在需要进行自身免疫时这种疫苗效率较高. 根据这种设计，我们合成并克隆了一个多联的生长激素释放抑制因子的基因，经过筛选、鉴定，得到了一个最大为六联体的生长激素释放抑制因子基因. 该基因放到大肠杆菌中表达，并做 Western 检测，得到六联体生长激素释放抑制因子的表达菌株，该菌株的表达产物能与生长激素释放抑制因子的抗体发生免疫反应.

关键词：生长激素释放抑制因子，免疫，基因工程

利用生长激素释放抑制因子(SRIF)的自身免疫作用可以调节动物体内生长激素的水平，进而促进动物的生长[1, 2]. 这种方法绕过各种动物体在生长激素中的种族差异，而将目标对准在各种动物中均相同的调节因子，因此应用前景十分广泛. 但目前用于自身免疫的 SRIF 疫苗均采用将 SRIF 与一个大分子蛋白质载体连接的方法来制备，这样的疫苗 SRIF 含量少，抗原决定簇很杂，产生自身免疫的效率很低[2]，因此我们设想用 SRIF 自我多联的方法来增强 SRIF 的免疫原性，以得到一个纯度好，含量高，单一组成的 SRIF 纯疫苗，用这种疫苗可以增强自身免疫的效率.

根据以上设想，设计了一个基因自我多聚的方法，我们合成了一个多聚体 SRIF 的基因，并将六联体 SRIF 基因放到大肠杆菌中表达，表达产物具有与 SRIF 抗体反应的抗原性.

一、材 料 与 方 法

1. 载体与菌种 M13 mp 18 噬菌体载体及 pBV220 表达载体从实验室保存菌种中制备. 大肠杆菌 JM103, JM105 为本实验室保存菌种. 大肠杆菌 JF1125 为中国科学院生物化学研究所赠送.

本文 1991 年 1 月 14 日收到，1991 年 7 月 22 日收到修改稿.

* 南京农业大学，南京 210014.

2. 试剂　兔抗人SRIF抗血清为中国人民解放军第二军医大学赠送，辣根过氧化物酶偶联的蛋白质A为上海生物制品研究所产品；合成DNA寡聚核苷酸片段所用试剂及溶剂为美国Appfied, Biosystem公司产品；γ-^{32}P-ATP及α-^{32}P-dATP为英国Amersham公司产品；DNA小分子量标准，限制性内切酶EcoRI和PstI以及T4-DNA连接酶为华美生物工程公司产品；T4-DNA多聚核苷酸激酶为德国Boahringer Mannhein公司产品，5-溴-4-氯-3-吲哚-D半乳糖苷(X-gal)，异丙基硫代β-D-半乳糖苷(IPTG)及蛋白质电泳标准样品和染色剂Ponceau S为美国Sigma公司产品；硝基纤维素膜为上海医药工业研究院高东药用器材厂产品；3,3′-二胺基联苯胺四盐酸盐(DAB)为进口分装试剂；其余试剂均为国产分析纯试剂.

3. 基因设计　首先采用大肠杆菌密码子[3]对SRIF的14个氨基酸残基进行编码，并在单体基因的两两之间加入一定长度的接头，再设计两个寡聚核苷酸片段使其能反复自聚，设计的另两个寡聚核苷酸片段用来终止基因的多聚异在基因两头加上限制性内切酶接头，便于进行下一步克隆.

4. 寡聚核苷酸片段的合成、纯化和纯度鉴定　所用方法参见文献[4].

5. 基因的拼接与多聚　将所有片段按SR1:SR2:SR3:SR4:SR5=1:5:8:5:1的摩尔比混合，退火，并加T4-DNA连接酶连接缺口，连接基因经10%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)分离，根据放射自显影条带，从胶上切下大于200bp的DNA样品，将切下的胶条按步骤4同样方法浸泡出基因，并进行纯化脱盐.

6. 基因的克隆及筛选　将纯化的DNA片段与EcoRI和PstI双酶切AM13mp18载体连接. 重组DNA转化大肠杆菌JM103，转化菌在含X-gal和IPTG的半固体培养基中37℃培养过夜. 从平板上挑取无色噬菌斑感染JM103进行培养. 离心后取含有噬菌体的培养液上清点在硝酸纤维素酶上，以SR2片段标^{32}P为探针进行杂交，放射自显影检测，具体方法见文献[5].

7. 酶切鉴定基因大小　取杂交阳性噬菌体上清感染JM103进行培养，碱法抽取RFDNA，用限制性内切酶EcoRI和PstI水解后，用6%PAGE检测基因大小.

8. 序列测定　取含所需大小基因的噬菌体上清感染JM103培养，按Messing的方法[3]提取单链模板，用双脱氧终止法测定基因序列.

9. 表达菌株的构建　从6%PAGE的胶上切取基因片段，与EcoRI和PstI双酶切的pBV220载体重组，重组DNA转化大肠杆菌JM105和JF1125，原位杂交鉴定，方法见文献[5].

10. 表达产物鉴定——Western blot　取表达的菌种在3ml LB中(含100μg/ml Ap)，30℃培养过夜，转接1%到5ml LB中(含50 μg/ml Ag)，30℃培养至O.D.$_{590}$=0.4左右，取出2ml留做鉴定用，其余升温至42℃培养，分别培养1, 2, 3h，并个别取出1ml培养液留做鉴定. 各管鉴定的培养液经离心后，取菌体在相应量的1%SDS中(均为100ml/g湿菌)加热破菌后，取5μl点于硝基纤维素膜上，后续步骤按Western blot的方法[6]，用SRIF抗体检测表达产物. 再取20μl破菌液上15% SDS-PAGE，转移到硝基纤维素膜上，用Western blot[6]显示表达产物位置，确定表达产物分子量.

二、结果与讨论

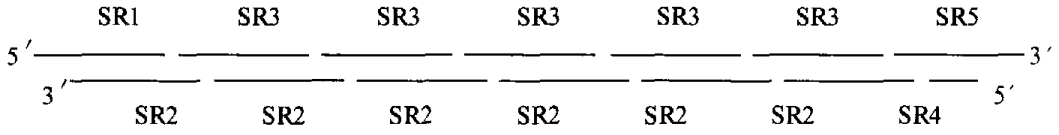
1. 基因的设计

基因序列见图1(a)，基因的分片段见图1(b). SR2, SR3为稍有交错的单体基因互补片

```
                    |----------------------生长激素---------------
   EcoR I    MET Ala Gly Cys Lys Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe
   ------
5' AATT CCT ATG GCT GGT TGT AAA AAC TTC TTC TGG AAA ACC TTC
3'      GGA TAC CGA CCA ACA TTT TTG AAG AAG ACC TTT TGG AAG

-----------|                                                |---
Thr Ser Cys Gly Pro MET  -(    生长激素    -Gly-Pro-Met)n-   Ala

ACC TCT TGT GGT CCT ATG          repe重复顺序uence          GCT
TGG AGA ACA CCA GGA TAC                                     CGA

----------------生长激素-----------------------------|
Gly Cys Lys Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Thr Ser Cys Gly Stop

GGT TGT AAA AAC TTC TTC TGG AAA ACC TTC ACC TCT TGT GGT TGA
CCA ACA TTT TTG AAG AAG ACC TTT TGG AAG TGG AGA ACA CCA ACT

Stop Stop

 TAA TAG CTG CA 3'
 ATT ATC G      5'
         ------
         Pst I
```

(a)

```
     SR1      SR3      SR3      SR3      SR3      SR3      SR5
5'------------------------------------------------------------3'
3'------------------------------------------------------------5'
     SR2      SR2      SR2      SR2      SR2      SR2      SR4
```



(b)

图1 多聚体SRIF基因设计

((a)氨基酸序列与核苷酸序列，(b)六聚体SRIF基因的片段设计示意图)

段，它们所组成的带有粘性末段的双链可以两两头尾相连从而组成多聚体. SR1和SR5这两个片段的一端可以与SR3竞争同SR2的互补位置，而它们的另一头却不能与SR2互补. 因此这两个片段是用来终止多聚基因继续延长的，这两个片段还能组成限制性内切酶位点的粘性头以利于下一步的克隆，SR4这个片段是用来补齐SR5片段中终止密码区域的互补序列的. 图1(b)显示了一个六聚体SRIF基因的片段组成和连接情况.

由于多聚体的数目分布由SR3同SR1, SR5间的随机竞争来控制，因此调节SR3与SR1, SR5之间的摩尔比就能大致控制基因大小. 假设SR3:SR1:SR5=K:1:1，则出现n聚体的几率为:

$$P_n=2\times(n-1)\times\left(\frac{1}{K+2}\right)^2\times\left(\frac{K}{K+2}\right)^{n-2}.$$

本实验中我们取摩尔比SR1:SR2:SR3:SR4:SR5=1:5:8:5:1，这样的几率分布见表1，可以看到最大出现几率在四聚体和五聚体之间.

2. 片段的合成、分离和纯化

由于化学合成每一步的产率不可能是百分之百，因此我们需要除去合成粗产品中比设计

表 I　几率分布（$K=8$）

多聚体数	1	2	3	4	5	6	7	8
几率 ×100	2.0	3.2	3.8	4.1	4.1	3.9	3.7	3.4

要求短些的寡聚核苷酸副产品，多聚 SRIF 基因的 5 个片段 SR1—SR5 经分离纯化后，放射自显影表明，全部片段均显示一条带型，纯度达到实验要求.

3. 基因的拼接与大小控制

纯化的片段按预定的摩尔比退火连接；上 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离. 根据放射自显影条带，割取大于 200 bp 的 DNA 片段，可以看到退火连接的 DNA 90% 以上符合设计大小.

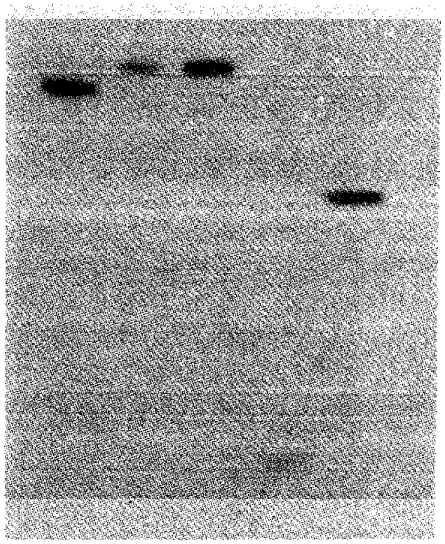


图 2　SR1—SR5 上 16%PAGE 放射自显影

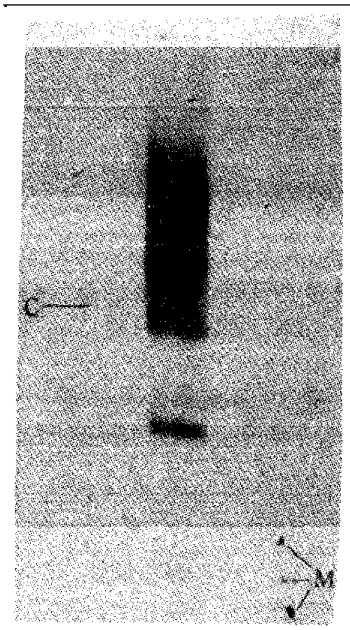


图 3　合成片段连接物上10%PAGE 放射自显影
（C——约 200 bp 处，M——tRNA 标记点）

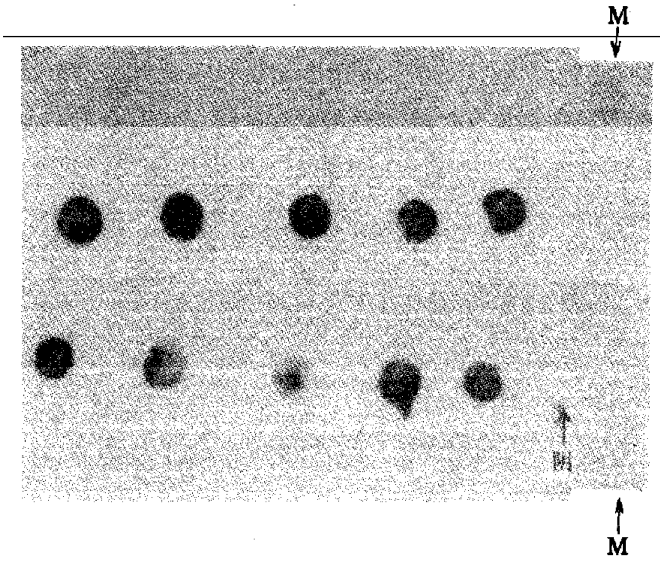


图 4　Dot blot 放射自显影
（序号从左至右为 11→20 号. 阴为野生型 M13 噬菌体，M 为定位标记）

4. 基因的克隆及筛选

纯化的基因与 M13mp18 载体重组后转化JM103，首先通过蓝白噬菌体斑的初步筛选，挑取无色噬菌斑用 Dot ，blot 杂交检测，放射自显影结果见图 4，10 个斑全部为阳性克隆，再用碱法抽提 M13mp18 /pSRIF 的 RFDNA，用 EcoRI 和 PstI 双酶切，走 6%PAGE 电泳鉴定基因大小（图 5），可以看到 14 号为四聚体基因，17 号为五聚体基因，19 号为六聚体基因. 共做了 16 个 RFDNA 的酶切，其中 12 个显示了基因的大小，多聚体数的分布见表 2.

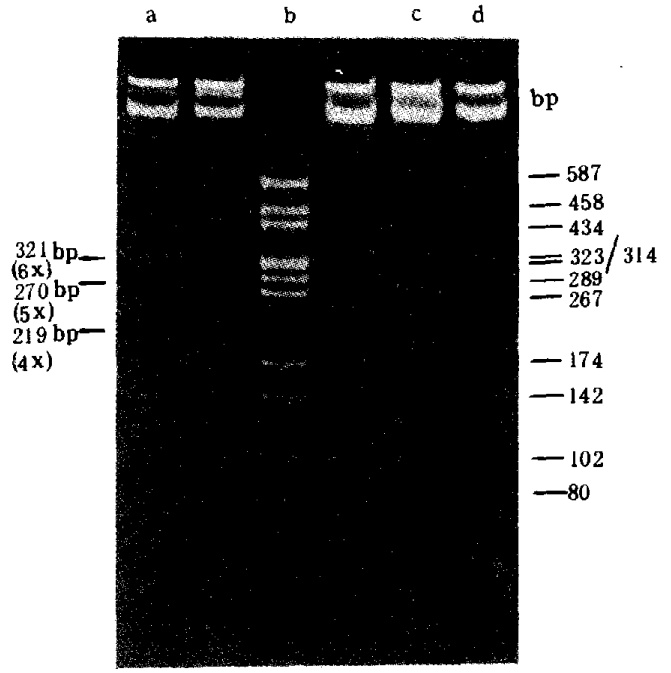


图5 RFDNA用EcoRI和PstI酶切上6%PAGE
(a—— M13mp18/pSRIF19, b—— DNA Marker, c—— M13mp18/pSRIF17, d—— M13mp/pSRIF14)

表2 多聚体大小分布

多聚体数	1	2	3	4	5	6
筛到克隆数	1	1	1	6	2	1

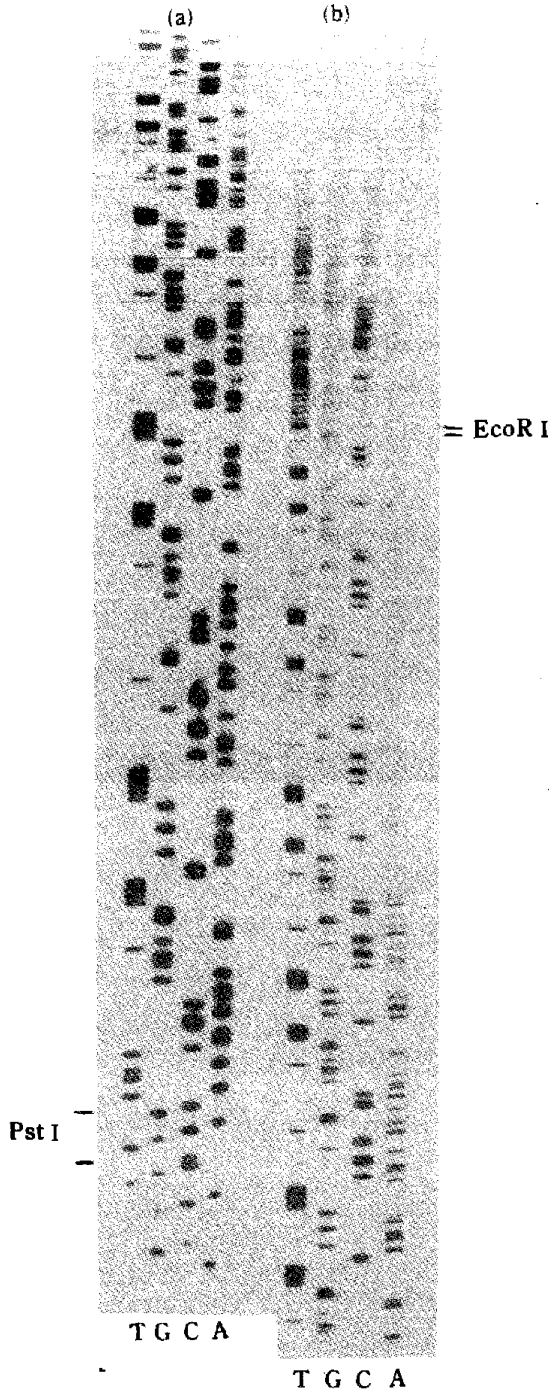


图6 M13mp18/pSRIF19基因的全序列测定结果
((a)为第二轮上样, (b)为第一轮上样. EcoRI和PstI分别为基因两端的两个酶切位点)

5. 序列的测定

由于化学合成的基因在克隆中会发生序列被宿主菌修饰突变的情况,需对克隆的基因进一步进行序列分析来加以验证,取最大的六联体基因M13mp18/pSRIF19抽取单链DNA模板,用双脱氧终止法测序,结果说明M13mp18/pSRIF19中克隆六联体SRIF基因序列与设计完全一致(图6).

6. 表达菌株的构建

取M13mp18/pSRIF19的RFDNA酶切并分离六聚体基因的EcoRI-PstI片段,与pBV220表达质粒重组,重组DNA经转化JM105和JF1125,挑取菌落进行原位杂交,结果见图7.

7. 表达产物鉴定

挑取原位杂交为阳性的菌落,先进行少量发酵试验,用改进的Western检测法对表达产物进行快速鉴定,改进后的方法其优点是速度快,只需将破菌液点膜后,取膜与抗体进行反应.这种不必经过Western方法的电泳和和转移电泳,另外也不需要ELISA的各种仪器,在只需要定性的快速检测中比较实用. 我们称这种方示为抗体的Dot blot,对pBV220-pBSRIF表达

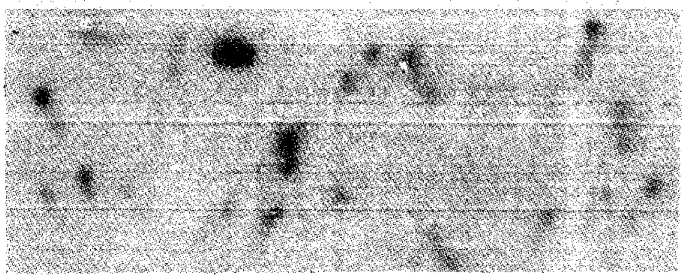


图 7　pBV220-pSRIF 克隆的原位杂交、放射自显影

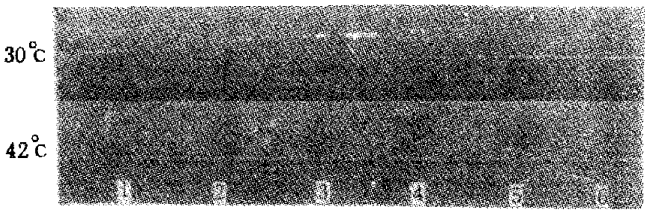


图 8　抗体的Dot blot 上排为菌种在30°C 培养的破菌液. 下排为菌种经40°C 诱导2h后的破菌液

(1—— JM105 /pBV220-pSRIF-1, 2—— JM105 /pBV220-pSRIF- 5, 3—— JF1125 /pBV220-pSRIF-1, 4—— JF1125 /pBV220-pSRIF-3, 5—— JM1125 /pBV220-pSRIF-4, 6——JF1125 /pBV220)

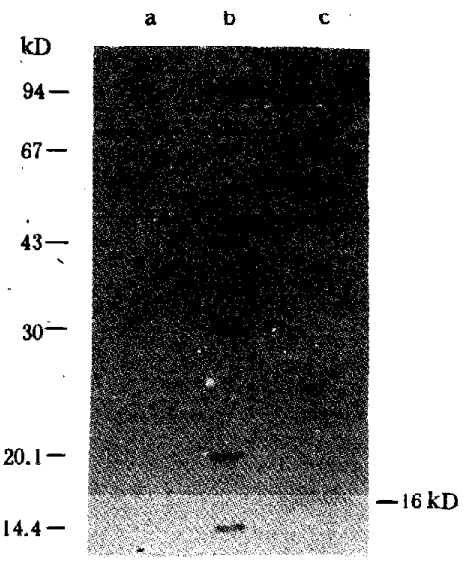


图 9　Western blot

(a —— JF1125 /pBV220-pSRIF-1 30°C 培养破菌液，b —— 蛋白质分子量标准，c —— JF1125 /pBV220-pSRIF-1 经 42°C 诱导 2h 后的破菌液)

菌的 SRIF 抗体Dot blot，实验结果见图 8. 可以看到 SRIF 抗体能与经 42°C 诱导的表达产物发生特异性反应，而且这种产物的表达量与选取的宿主菌无很大关系. 为检测表达产物的分子量，再取表达破菌液上 15% PAGE，转移到硝酸纤维素膜上后 Western 检测(图 9)，与 SRIF 抗体发生特异性反应的六聚体SRIF只显示一条带，分子量大小在 16kD 左右，比估计值 11kD稍大，这可能是由于六联体SRIF 含半脱氨酸较多，因此挂上了较多的巯基乙醇，另外六联体 SRIF 只含有碱性的氨基酸残基而不含酸性氨基酸残基，碱性氨基酸残基侧链上的正电荷可能也中和了一部分SDS 的电荷，从而引起六联体 SRIF 表观分子量比实际的分子量稍大一点.

综上所述，我们合成了六联体 SRIF 基因，并成功地在大肠杆菌中得到表达，该基因的表达产物具有与 SRIF 抗体发生免疫反应的抗原性，这种新疫苗的免疫原性及用于自身免疫中的效率尚在实验和检测中.

作者对给予本实验以支援和帮助的各位老师和同事表示感谢.

参　考　文　献

[1] Spencer, G.S.G. et al., *Animal Prod.*, **32**(1981), 376.

[2] Chaplin, R.K. et al., *Canadian J. Animal Sci.*, **64**(1984), suppl. 312.

[3] Gouy, M. & Gautier, C., *Nucleic Acids Res.*, 1982, 10 :7055.

[4] 张　鹰等，自然科学进展——国家重点实验室通讯，**1**(1990)，3 :236.

[5] Missing, J., in *Methods in Enzymology* (Eds. Grossman, L. & Moldare, K.), Vol. 101 (Part C), Acadmic Press, New York, 1983. 20.

[6] Talbot, P.V. et al., *J. Immunol. Meth.*, **73**(1984), 177.