

# 嗜肺军团菌 *mip*/*ctxB* 融合基因体外表达与动物免疫试验的免疫原性研究\*

王涛<sup>1)</sup> 陈建平<sup>1)</sup>\*\* 鄧克谦<sup>2)</sup> 陶大昌<sup>3)</sup> 杨春蕾<sup>4)</sup> 张雷<sup>5)</sup>

(<sup>1)</sup> 四川大学华西医学中心基础医学与法医学院寄生虫学教研室, 成都 610041;

<sup>2)</sup> 西安交通大学口腔医学院颌面外科, 西安 710004; <sup>3)</sup> 四川大学华西医院, 成都 610041;

<sup>4)</sup> 四川大学生命科学院医学细胞生物学教研室, 成都 610041; <sup>5)</sup> 大理学院微生物学教研室, 大理 671000)

**摘要** PCR 扩增嗜肺军团菌 *mip* 基因和霍乱弧菌 *ctxB* 基因, 克隆入载体 pcDNA3.1 (+), 重组子经限制性酶切分析、PCR、序列分析鉴定正确后, 命名为 pcDNA3.1-*mip*/*ctxB*。脂质体法将重组质粒 pcDNA3.1-*mip*、pcDNA3.1-*mip*/*ctxB* 转染 NIH3T3 细胞, 用免疫荧光法和蛋白质印迹鉴定瞬时表达和稳定表达产物, 结果发现: 重组质粒成功转入细胞并获得短暂表达, 稳定转染细胞分别在 24 ku 和 35 ku 处检测到阳性杂交信号。将 pcDNA3.1-*mip*、pcDNA3.1-*mip*/*ctxB* 作为 DNA 疫苗免疫 BALB/c 小鼠, 检测免疫小鼠体内抗原特异性抗体水平、脾淋巴细胞增殖活性、IFN- $\gamma$  产生水平、细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 杀伤活性等体液免疫和细胞免疫反应的指标, 评价疫苗的免疫原性。结果发现: 各实验组均检测到免疫原性, pcDNA3.1-*mip*/*ctxB* 免疫组的免疫原性高于 pcDNA3.1-*mip* 免疫组, 有显著性差异 ( $P < 0.01$ )。研究结果为 *mip*/*ctxB* 融合基因 DNA 疫苗的研制提供了初步的实验依据。

**关键词** 嗜肺军团菌, 霍乱弧菌, *mip*/*ctxB* 融合基因, 体外表达, 免疫原性

**学科分类号** R378

军团菌是广泛存在于天然水和土壤中的一种兼性胞内寄生菌, 能侵入人类肺泡巨噬细胞及其他巨噬细胞、肺泡上皮细胞寄生<sup>[1]</sup>。人类因吸入含有军团菌的气溶胶而感染后, 可引起以非典型性肺炎和庞蒂亚克 (Pontiac) 热为主的疾病。本文研究的 *mip* 基因在军团菌属中具有高度保守性, 它编码军团菌巨噬细胞感染增强蛋白 (microphage infectivity potentiator, Mip)。Mip 蛋白是军团菌明确的毒力因子之一, 在嗜肺军团菌抵抗宿主细胞内杀灭机制中发挥重要作用<sup>[2]</sup>。由 *ctxB* 基因编码的霍乱肠毒素 B 亚基 (cholera toxin subunit B, CTB) 是霍乱弧菌主要的保护性抗原, 研究发现: CTB 可作为免疫佐剂和其他抗原共同使用<sup>[3]</sup>。作为一类新型的免疫佐剂, CTB 近年来已成为国内外研究的热点。本文拟构建 *mip*/*ctxB* 融合基因真核表达重组质粒, 在 NIH3T3 细胞中进行表达, 并将其免疫实验动物 BALB/c 小鼠, 检测其免疫原性, 为 *mip*/*ctxB* 融合基因 DNA 疫苗的研制提供研究基础。

## 1 材料

### 1.1 质粒、细胞与实验动物

质粒 pcDNA3.1 (+) 由四川大学华西医学中心微生物教研室惠赠, 原核表达重组质粒 pLpmip 和 pCTB、真核表达重组 pcDNA3.1-*mip* 由作者在

以往的研究中构建。NIH3T3 细胞由四川大学华西医学中心生物医学工程研究室惠赠。BALB/c 小鼠购自四川大学华西医学中心实验动物中心。

### 1.2 试剂

嗜肺军团菌兔血清抗体、霍乱弧菌兔血清抗体由中国疾病预防控制中心传染病预防控制所惠赠, 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔第二抗体、FITC 标记的第二抗体购自北京中山生物公司, DMEM 培养基、MTT、G418 购自 Sigma 公司, T4DNA 连接酶购自基因公司, Taq DNA 聚合酶、*Bam*H I、*Xho* I、*Apa* I 购自 Takara 公司, 去内毒素大量提取质粒 DNA 的试剂盒购自 QIAGEN 公司, 小鼠 IFN- $\gamma$  定量 ELISA 检测试剂盒购自博瑞克公司, 其他试剂均购自天泰生命科技有限公司。

## 2 方法

### 2.1 *mip* 基因和 *ctxB* 基因的克隆与鉴定

以重组质粒 pLpmip 和 pCTBDNA 为模板, 根据引物 P1、P2 扩增 *mip* 基因, 根据引物 P3、P4

\* 国家自然科学基金资助项目 (30300302)。

\*\* 通讯联系人。

Tel: 028-85501248, E-mail: jpchen007@163.com

收稿日期: 2004-03-16, 接受日期: 2004-05-30

扩增 *ctxB* 基因. P1 为 5' TTT GGA TCC ATG ATA GCT TAT GAC TG 3'; P2 为 5' TTT CTC GAG AGA TGA TTT TTT CAC TG 3'; P3 为 5' TTT CTC GAG ATG ATT AAA TTA 3'; P4 为 5' TTT GGG CCC TTA ATT TGC CAT ACT 3'. 划线部分为在引物上游和下游 5'端引入的限制性内切酶位点. 以 *Bam*H I 和 *Xho* I 消化以 P1 和 P2 为引物扩增的 *mip* 基因, 以 *Xho* I 和 *Apa* I 消化以 P3 和 P4 为引物扩增的 *ctxB* 基因, 以 *Bam*H I 和 *Apa* I 消化载体 pcDNA3.1 (+), 回收酶切片段并纯化后, 用 T4DNA 连接酶将目的片段与载体在 16℃ 连接过夜, 连接反应物转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞, 菌悬液涂布在预先涂有 IPTG 和 X-gal 的含氨苄青霉素的 LB 平板上, 37℃ 培养过夜. 次日, 挑取白色菌落, 接种于含有氨苄青霉素的 LB 培养液中, 37℃ 振荡培养过夜, 少量碱裂法提取质粒 DNA, 用限制性酶切、PCR 扩增和序列测定对阳性重组克隆进行鉴定, 鉴定正确后, 将重组质粒命名为 pcDNA3.1-*mip/ctxB*.

## 2.2 重组质粒转染 NIH3T3 细胞

制备并纯化重组质粒 DNA pcDNA3.1-*mip*、pcDNA3.1-*mip/ctxB*, 将 1.5 μg 质粒 DNA 加入 50 μl 转染用缓冲液中, 5 μl 脂质体加入 50 μl 转染用缓冲液中, 将两种溶液混合, 轻柔混匀, 室温放置 15 min, 使 DNA 与脂质体形成复合物. 在复合物中加无血清 DMEM 培养液轻柔混匀, 将稀释的复合物溶液加入 NIH3T3 细胞, 加含血清无抗生素的 DMEM 培养液, 37℃、5% CO<sub>2</sub> 孵箱培养.

## 2.3 检测重组质粒在细胞中的瞬时表达

制作细胞爬片, 从加入 DNA-脂质体复合物开始计时, 转染后 72 h 检测瞬时表达. 嗜肺军团菌抗体工作浓度为 1:100, 霍乱弧菌抗体工作浓度为 1:200, FITC 标记的第二抗体工作浓度为 1:100.

## 2.4 检测重组质粒在细胞中的稳定表达

转染孔细胞换用含 G418 (300 mg/L) 的 DMEM 完全培养液继续培养, 每 3 天更换 1 次培养液至空白对照孔细胞完全死亡. 加含 G418 (150 mg/L) 的 DMEM 完全培养液继续培养, 出现阳性细胞克隆时转至培养瓶中扩大培养. 细胞生长至完全融合时, 分别收集细胞和培养液. 培养液以 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清. 细胞用 PBS 清洗, 加冰预冷的裂解液, 冰浴 20 min, 将裂解液和细胞碎片移至 EP 管中, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清. 取制备好的蛋白质样品, 加 2 × SDS 上样

缓冲液, 混匀, 100℃ 处理 5 min, 取 25 μl 进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (分离胶浓度为 15%), 电泳后转印到硝酸纤维素膜上, 进行蛋白质印迹鉴定. 嗜肺军团菌兔血清抗体浓度为 1:100, 霍乱弧菌兔血清抗体浓度为 1:200, 酶标第二抗体工作浓度为 1:1 000.

## 2.5 动物免疫

大量提取质粒 pcDNA3.1 (+) 和重组质粒 pcDNA3.1-*mip/ctxB*、pcDNA3.1-*mip*, 在紫外分光光度计上测量质粒 DNA 在 260 nm 和 280 nm 处的光吸收值. 根据公式计算 DNA 的含量, 并分析其纯度. DNA 含量 (mg/L) =  $A_{260} \times 50 \times$  样品稀释倍数. 6~8 周龄、体重 25 g 左右的 BALB/c 雌性小鼠 27 只, 随机分为 3 组, 每组 9 只. 每只小鼠股四头肌肌肉注射质粒 DNA (溶于 200 μl 无菌生理盐水中) 进行免疫接种. 第一组每只小鼠注射 pcDNA3.1-*mip/ctxB* 50 μg, 第二组每只小鼠注射 pcDNA3.1-*mip* 50 μg, 第三组每只小鼠注射 pcDNA3.1 (+) 50 μg 作为阴性对照. 各组在初次免疫 2 周后用相同剂量的质粒加强免疫 1 次.

## 2.6 检测小鼠体内血清中抗原特异性抗体

取保种的嗜肺军团菌 L1 菌株, 接种于 BCYE 固体培养基, 37℃ 烛缸培养 3~7 天, 用无菌 PBS 洗下平板上的菌落, 充分混匀以形成菌悬液, 用比浊管测定细菌浓度. 超声破碎 10 min, 离心取上清抽滤除菌, 即为制备的混合抗原. 用包被缓冲液将抗原稀释至最佳工作浓度, 包被酶标板. 加强免疫后第 7 天、第 14 天和第 21 天, 每组各取 3 只小鼠, 眼部内眦采血, 4℃ 放置过夜分离血清, 将血清混合后用间接 ELISA 法测定血清中抗原特异性抗体水平. 辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠 IgG 工作浓度为 1:1 000. 测定酶标板各孔 490 nm 处的光吸收值, 确定阳性反应和抗体的效价或滴度. 阳性反应为样品孔  $A_{490}$  > 阴性对照孔平均  $A_{490} + 3 \times s$ . 以出现阳性反应的待测血清最高稀释度为抗体的效价或滴度.

## 2.7 检测细胞免疫效应

加强免疫后第 7 天、第 14 天和第 21 天, 每组各取 3 只小鼠, 无菌分离免疫小鼠脾淋巴细胞, 将细胞悬液滴加至细胞计数板中计数, 调整细胞浓度为  $5 \times 10^6$ /ml 备用.

**2.7.1 MTT 法检测淋巴细胞的增殖活性:** 取制备的小鼠脾淋巴细胞悬液 100 μl, 接种 96 孔细胞培养板, 每只小鼠脾细胞各接种 3 个复孔, 并设空白

对照孔. 37℃、5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养 20 h, 每孔加 20 μl MTT (5 g/L) 继续培养 4 h. 培养板以 2 000 r/min 离心 5 min, 弃培养液, 加 100 μl 二甲基亚砷充分混匀, 37℃ 放置 30 min, 使形成的暗蓝色甲臍颗粒完全溶解, 测量 A<sub>490</sub>. 计算刺激指数 (SI) 作为判断淋巴细胞增殖程度的指标. 刺激指数 (SI) = 实验孔 A<sub>490</sub> / 阴性对照孔 A<sub>490</sub> 均值. 用单因素方差分析比较各免疫组 SI 值有无显著性差异.

**2.7.2 检测细胞因子 IFN-γ:** 取制备的小鼠脾淋巴细胞悬液 100 μl, 接种至 96 孔细胞培养板, 每只小鼠各接种 3 个复孔, 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的 CO<sub>2</sub> 孵箱培养 72 h, 收集培养液以 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清检测 IFN-γ. 根据小鼠 IFN-γ 定量 ELISA 检测试剂盒操作说明进行操作, 用双抗体夹心 ABC-ELISA 法检测 IFN-γ 含量. 用单因素方差分析比较各免疫组之间有无显著性差异.

**2.7.3 细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 杀伤活性检测:** 以质粒 pcDNA3.1-mip 转染并筛选出的阳性细胞克隆作为检测 CTL 杀伤活性的靶细胞. 取新鲜制备的小鼠脾淋巴细胞作为效应细胞. 用 1640 完全培养液调整所收获的效应细胞与靶细胞的浓度, 使其细胞数之比为 10:1. 两种细胞各取 100 μl 加至同一培养孔中, 并设效应淋巴细胞对照孔、靶细胞对照孔及空白对照孔. 用 MTT 法检测 37℃、5% CO<sub>2</sub> 孵箱培养 20 h, 每孔加 20 μl MTT 继续培养 4 h, 培养板以 2 000 r/min 离心 5 min. 弃培养液, 加 100 μl 二甲基亚砷充分混匀, 37℃ 放置 30 min, 使形成的暗蓝色甲臍颗粒完全溶解, 测量 A<sub>490</sub>. 计算 CTL 的杀伤活性, CTL 的杀伤活性 = [1 - (实验孔 A<sub>490</sub> - 对照效应细胞 A<sub>490</sub>) / 对照靶细胞 A<sub>490</sub>] × 100%. 用单因素方差分析比较各免疫组之间有无显著性差异.

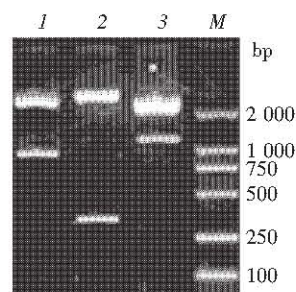
### 3 结 果

#### 3.1 重组质粒 pcDNA3.1-mip/ctxB 的酶切鉴定

用 BamH I 和 Apa I 进行双酶切, 得到一个大片段和 1 200 bp 的小片段; 用 Xho I 和 Apa I 进行双酶切, 得到一个大片段和 300 bp 的小片段; 用 BamH I 和 Xho I 进行双酶切, 得到一个大片段和 800 bp 的小片段 (图 1).

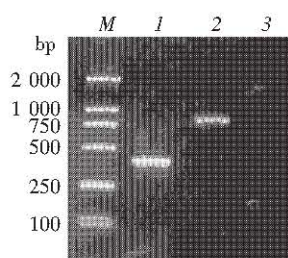
#### 3.2 重组质粒 pcDNA3.1-mip/ctxB 的 PCR 鉴定

以酶切鉴定正确的重组质粒 DNA 为模板, 分别以引物 P1 和 P2、P3 和 P4 进行 PCR 扩增, 分别得到大小约 800 bp 和 300 bp 的片段 (图 2).



**Fig. 1 Restriction enzyme analysis of recombinant plasmid pcDNA3.1-mip/ctxB**

M: Marker (DL2 000); 1: pcDNA3.1-mip/ctxB digested by BamH I and Apa I; 2: pcDNA3.1-mip/ctxB digested by Xho I and Apa I; 3: pcDNA3.1-mip/ctxB digested by BamH I and Xho I.



**Fig. 2 PCR identification of recombinant plasmid pcDNA3.1-mip/ctxB**

M: Marker (DL2 000); 1: PCR product of pcDNA3.1-mip/ctxB with P3 and P4; 2: PCR product of pcDNA3.1-mip/ctxB with P1 and P2; 3: Negative control.

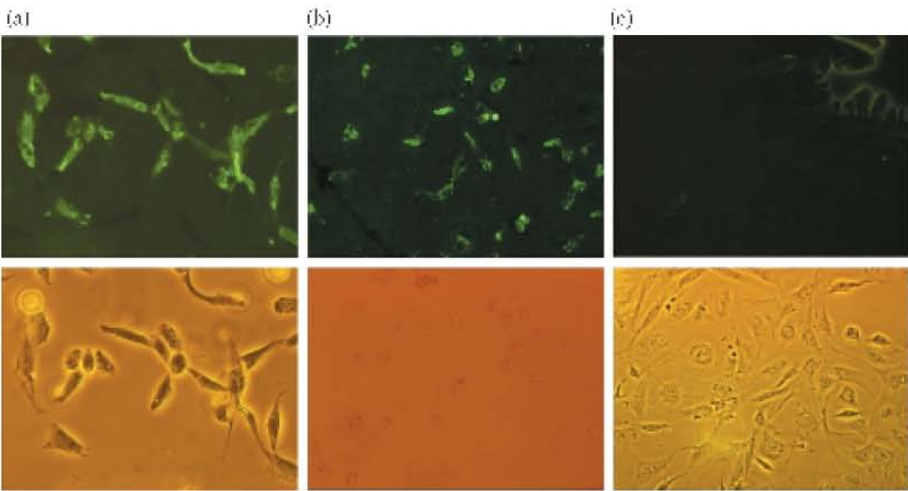
#### 3.3 mip/ctxB 融合基因序列测定结果

本文克隆 mip/ctxB 融合基因全长为 1 207 bp, 其中 mip 基因长度为 825 bp, ctxB 基因长度为 376 bp, 二者之间为 6 bp 的限制性内切酶识别序列. 与 GenBank 中 mip 基因和 ctxB 基因序列相比较, 一致性为 99%, 表明所克隆的 mip 基因和 ctxB 基因序列正确.

#### 3.4 检测重组质粒在细胞中的瞬时表达

pcDNA3.1-mip 转染的 NIH3T3 细胞用嗜肺军团菌兔血清抗体检测, pcDNA3.1-mip/ctxB 转染的 NIH3T3 细胞分别用嗜肺军团菌和霍乱弧菌兔血清抗体检测, 加 FITC 标记的第二抗体后, 均可在细胞膜和细胞内观察到较强的绿色荧光, 表明 pcDNA3.1-mip 或 pcDNA3.1-mip/ctxB 成功转入细胞, 并在细胞膜和细胞内获得短暂表达. 空质粒 pcDNA3.1 (+) 转染的细胞未检测到绿色荧光 (图 3).





**Fig. 3** Immunofluorescence analysis the expression product of recombinant plasmid pcDNA3.1- mip or pcDNA3.1-mip/ctxB in NIH3T3 cell

(a) NIH3T3 cells transfected with plasmid pcDNA3.1-mip or pcDNA3.1-mip/ctxB (with rabbit serum antibody of *Legionella pneumophila*); (b) NIH3T3 cells transfected with plasmid pcDNA3.1-mip/ctxB (with rabbit serum antibody of *Vibrio cholerae*); (c) NIH3T3 cells transfected with plasmid pcDNA3.1(+).

3.5 检测重组质粒在细胞中的稳定表达

收集 pcDNA3.1-mip 转染的细胞和培养液上清, 用嗜肺军团菌兔血清抗体检测, 细胞总蛋白在大约 24 ku 处检测到阳性杂交信号. 收集 pcDNA3.1-mip/ctxB 转染的细胞和培养液上清, 分别用嗜肺军团菌和霍乱弧菌兔血清抗体检测, 细胞总蛋白在大约 35 ku 处检测到阳性杂交信号. Mip 蛋白和 CTB 蛋白大小分别为 24 ku 和 11 ku, 表明 pcDNA3.1-mip/ctxB 在细胞内表达的 Mip/CTB 融合蛋白大小与预期结果一致. 空质粒 pcDNA3.1(+ ) 转染的

细胞样品未检测到杂交信号 (图 4).

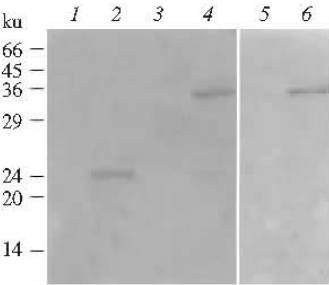
3.6 小鼠体内抗原特异性抗体的滴度

在加强免疫后第 7 天、第 14 天、第 21 天, 两个实验组均检测到抗体, 而空质粒对照组未检测到抗体. pcDNA3.1-mip/ctxB 免疫组抗体滴度高于 pcDNA3.1-mip 免疫组, 有显著性差异 ( $P < 0.01$ ) (表 1).

**Table 1** Titer of the specific antibody of mice immunized with DNA vaccine against *Legionella pneumophila*

| Day after<br>the second<br>immunization | Titer of the specific antibody IgG |                                      |
|-----------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|
|                                         | pcDNA3.1-mip<br>immunized group    | pcDNA3.1-mip/ctxB<br>immunized group |
| 7                                       | 1:4                                | 1:16 *                               |
| 14                                      | 1:32                               | 1:128 *                              |
| 21                                      | 1:16                               | 1:64 *                               |

\*  $P < 0.01$ , multiple comparison.



**Fig. 4** Western blot analysis the expression product of recombinant plasmid pcDNA3.1- mip or pcDNA3.1-mip/ctxB

M: Protein mass marker; 1: The culture supernant of plasmid pcDNA3.1-mip transfected NIH3T3 cells; 2: Plasmid pcDNA3.1-mip transfected cells lysate; 3: The culture supernant of plasmid pcDNA3.1-mip/ctxB transfected NIH3T3 cells; 4: Plasmid pcDNA3.1-mip/ctxB transfected cells lysate; 5: The culture supernant of plasmid pcDNA3.1-mip/ctxB transfected NIH3T3 cells (with rabbit serum antibody of *Vibrio cholerae*); 6: Plasmid pcDNA3.1-mip/ctxB transfected NIH3T3 cells lysate (with rabbit serum antibody of *Vibrio cholerae*).

3.7 细胞免疫水平检测

检测淋巴细胞增殖活性、IFN- $\gamma$  产生、CTL 杀伤活性等细胞免疫反应的指标发现: 加强免疫后第 7 天、第 14 天和第 21 天, pcDNA3.1-mip 免疫组、pcDNA3.1-mip/ctxB 免疫组淋巴细胞增殖活性、IFN- $\gamma$  含量和 CTL 杀伤活性均高于对照组, pcDNA3.1-mip/ctxB 免疫组淋巴细胞增殖活性高于 pcDNA3.1-mip 免疫组, 均有显著性差异 ( $P < 0.01$ ) (表 2, 表 3 和表 4).

**Table 2** The proliferative response of spleen-derived lymphocytes from mice immunized with DNA vaccine against *Legionella pneumophila*

| Day after the second immunization | pcDNA3.1 ( + ) immunized group | pcDNA3.1-mip immunized group |           | pcDNA3.1-mip/ctxB immunized group |           |
|-----------------------------------|--------------------------------|------------------------------|-----------|-----------------------------------|-----------|
|                                   | <i>A</i> <sub>490</sub>        | <i>A</i> <sub>490</sub>      | <i>SI</i> | <i>A</i> <sub>490</sub>           | <i>SI</i> |
| 7                                 | 0.17 ± 0.008                   | 0.32 ± 0.016                 | 1.83      | 0.45 ± 0.001                      | 2.62 *    |
| 14                                | 0.20 ± 0.015                   | 0.47 ± 0.010                 | 2.43      | 0.70 ± 0.015                      | 3.61 *    |
| 21                                | 0.18 ± 0.037                   | 0.29 ± 0.010                 | 1.59      | 0.46 ± 0.029                      | 2.53 *    |

\* *P* < 0.01, multiple comparison.

**Table 3** IFN-γ production by lymphocytes of mice immunized with DNA vaccine against *Legionella pneumophila*

| Day after the second immunization | IFN-γ production               |                              |                                   |
|-----------------------------------|--------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|
|                                   | pcDNA3.1 ( + ) immunized group | pcDNA3.1-mip immunized group | pcDNA3.1-mip/ctxB immunized group |
| 7                                 | 19.05 ± 4.811                  | 54.03 ± 6.108                | 130.12 ± 27.701                   |
| 14                                | 10.02 ± 4.503                  | 98.24 ± 2.015                | 520.35 ± 31.552                   |
| 21                                | 10.33 ± 3.449                  | 85.14 ± 2.891                | 220.43 ± 57.684                   |

#*P* < 0.01, compare with control; \* *P* < 0.01, multiple comparison.

**Table 4** Cytotoxicity of spleen-derived lymphocytes from mice immunized with DNA vaccine against *Legionella pneumophila*

| Day after the second immunization | The specific cytotoxicity      |                              |                                   |
|-----------------------------------|--------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|
|                                   | pcDNA3.1 ( + ) immunized group | pcDNA3.1-mip immunized group | pcDNA3.1-mip/ctxB immunized group |
| 7                                 | 1.80 ± 0.011                   | 34.78 ± 0.014                | 59.78 ± 0.030                     |
| 14                                | 5.43 ± 0.037                   | 69.02 ± 0.010                | 80.43 ± 0.012                     |
| 21                                | 8.70 ± 0.013                   | 24.46 ± 0.019                | 53.26 ± 0.016                     |

4 讨 论

Mip 蛋白在细菌表面表达, 影响肺巨噬细胞的有氧化与胞浆膜去极化, 在抵抗宿主细胞杀伤机制中发挥重要作用<sup>[4,5]</sup>. 编码 Mip 蛋白的基因为 mip 基因, 对 35 种军团菌的 mip 基因与 Mip 蛋白的研究发现: mip 基因核苷酸序列同源性为 69% ~ 97%, Mip 蛋白氨基酸序列同源性为 82% ~ 99%<sup>[6,7]</sup>, 表明 mip 基因和 Mip 蛋白在军团菌属中保守性较高. Mip 蛋白和 mip 基因自被报道以来, 有诸多研究将 mip 基因应用于军团菌的检测和诊断, 而应用于研制 DNA 疫苗尚未见报道. 因此, 本研究将嗜肺军团菌 mip 基因作为构建 DNA 疫苗的候选基因.

CTB 作为 DNA 疫苗的免疫佐剂主要有两种方式, 一种是联合免疫, 另一种是构建融合基因. 采用基因融合方式, 构建 ctxB 基因与乙型肝炎病毒 Pres2 的融合基因 (ctxB-Pres2), 获得了融合蛋白

的有效表达<sup>[8]</sup>. 将 ctxB 基因与 A 组轮状病毒地方株 T114 VP6 全基因融合, 也获得了融合蛋白的表达, 表达的融合蛋白具有两者的抗原性<sup>[9]</sup>. CTB 的 C 端与人胰岛素 β 链的基因融合, 表达产物可诱导 CTB 和胰岛素的特异性抗体反应, 诱导的 IL-2 产量比单独的胰岛素高 300 倍, 表明融合基因有效增强了抗原表达<sup>[10]</sup>. 由既往研究来看, 构建 CTB 与致病基因的融合基因在加强免疫效果方面似乎更有优势, 本研究构建 mip/ctxB 融合基因以期得到较好的免疫效果.

本文构建了重组质粒 pcDNA3.1-mip/ctxB, 将 pcDNA3.1-mip、pcDNA3.1-mip/ctxB 体外转染 NIH3T3 细胞后, 用免疫荧光法检测到有效的瞬时表达, 用蛋白质印迹检测到, 转染的阳性细胞克隆稳定表达出 24 ku 的 Mip 蛋白和 35 ku 的 Mip/CTB 融合蛋白. 将 pcDNA3.1-mip、pcDNA3.1-mip/ctxB 作为 DNA 疫苗免疫 BALB/c 小鼠, 检测免疫小鼠体内抗原特异性抗体水平、脾淋巴细胞增殖活性、

IFN- $\gamma$  产生水平、CTL 杀伤活性等指标, 评价疫苗的免疫原性。结果发现: 与阴性对照组相比, 各免疫组均检测到免疫原性; pcDNA3.1-mip/ctxB 免疫组的免疫原性高于 pcDNA3.1-mip 免疫组 ( $P < 0.01$ )。本文的研究表明 mip 基因 DNA 疫苗具有较强的免疫原性, 加入佐剂分子 CTB 的疫苗免疫原性较单独的 mip 基因 DNA 疫苗高。该结果为 mip/ctxB 融合基因 DNA 疫苗的研制提供了初步的实验依据。

### 参 考 文 献

- 1 Cianciotto N P. Pathogenicity of *Legionella pneumophila*. Int J Med Microbiol, 2001, **291** (5): 331 ~ 343
- 2 Bumbaugh A C, McGraw E A, Page K L, et al. Sequence polymorphism of dotA and mip alleles mediating invasion and intracellular replication of *Legionella pneumophila*. Curr Microbiol, 2002, **44** (5): 314 ~ 322
- 3 Jackson R J, Kohtaro F, Jiangchun X A. Optimizing oral vaccines: induction of systemic and mucosal B cell and antibody responses to *Tetanus Toxoid* by use of *Cholera Toxin* as an adjuvant. Infection Immunity, 1993, **61** (10): 4272 ~ 4280

- 4 Riboldi T A, Konig B, Jessen S. Crystal structure of Mip, a prolyl isomerase from *Legionella pneumophila*. Nat Struct Biol, 2001, **8** (9): 779 ~ 783
- 5 Helbig J H, Luck P C, Steinert M, et al. Immunolocalization of the Mip protein of intracellularly and extracellularly grown *Legionella pneumophila*. Lett Appl Microbiol, 2001, **32** (2): 83 ~ 88
- 6 Riffard F, van Deneshe F, Reyoue M, et al. Distribution of mip-related sequence in 39 species (48 serogroups) of *Legionellaceae*. Epidemiol Infect, 1996, **117**: 501 ~ 506
- 7 Doyle R M, Steele T W, McLennan A M, et al. Sequence analysis of the mip gene of the soilborne pathogen *Legionella longbeachae*. Infect Immun, 1998, **66** (4): 1492 ~ 1499
- 8 林旭, 石成华, 曹诚, 等. 大肠杆菌脂蛋白与 CTB-Pres2 抗原基因的融合及表达. 生物化学杂志, 1997, **13** (3): 276 ~ 280
- 9 Lin X, Shi C H, Cao C, et al. Chin J Biochem, 1997, **13** (3): 276 ~ 280
- 9 郭婷夏, 方荣祥, 李国华, 等. A 组轮状病毒 VP6 与霍乱毒素 B 亚基融合蛋白在大肠杆菌中的表达及生物活性分析. 生物工程学报, 2001, **17** (6): 621 ~ 625
- 10 Guo T X, Fang R X, Li G H. Chin J Biotech, 2001, **17** (6): 621
- 10 Sadeghi H, Bregenholt S, Wegmann D, et al. Genetic fusion of human insulin B-chain to the B-subunit of cholera toxin enhances *in vitro* antigen presentation and induction of bystander suppression *in vivo*. Immunology, 2002, **106** (2): 237 ~ 245

## Study of Expression *In vitro* and Immunogenicity of mip/ctxB Fusion Gene of *Legionella pneumophila*\*

WANG Tao<sup>1)</sup>, CHEN Jian-Ping<sup>1)</sup>\*\*, ZHI Ke-Qian<sup>2)</sup>, TAO Da-Chang<sup>3)</sup>, YANG Chun-Lei<sup>4)</sup>, ZHANG Lei<sup>5)</sup>

<sup>1)</sup> Department of Parasitology, West China Medical Center, Sichuan University, Chengdu 610041, China;

<sup>2)</sup> Department of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Stomatology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China;

<sup>3)</sup> West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China;

<sup>4)</sup> Department of Medical Cell Biology, Life Science College of Sichuan University, Chengdu 610041, China;

<sup>5)</sup> Department of Microbiology, Dali College, Dali 671000, China)

**Abstract** Mip gene of *Legionella pneumophila* and ctxB gene of *Vibrio cholerae* were PCR amplified respectively. The amplified fusion DNA was ligated to pcDNA3.1 (+) vector. The recombinant plasmid, which was named pcDNA3.1-mip/ctxB, was identified by restriction analysis, PCR and further confirmed by sequence analysis. NIH3T3 cell was transfected by recombinant plasmid pcDNA3.1-mip or pcDNA3.1-mip/ctxB with Lipofection strategy. Transient and stable products of mip/ctxB fusion gene was detected by immunofluorescence and Western blot. The results showed that NIH3T3 cell was transfected successfully and stable products can be detected in the transfected cell. To evaluate immunogenicity of pcDNA3.1-mip and pcDNA3.1-mip/ctxB, BALB/c female mice were immunized intramuscularly with them and antigen specific antibodies, lymphocyte proliferative response, IFN- $\gamma$  production and cytotoxic T-lymphocyte response of immunized mice were detected. The results showed that immunogenicity of pcDNA3.1-mip or pcDNA3.1-mip/ctxB immunized mice were higher than control and immunogenicity of pcDNA3.1-mip/ctxB immunized mice were higher than pcDNA3.1-mip immunized mice. Statistic analysis by one way ANOVA showed that there was significantly difference between groups ( $P < 0.01$ ). The results provide experimental proof to study of mip/ctxB fusion gene DNA vaccine.

**Key words** *Legionella pneumophila*, *Vibrio cholerae*, mip/ctxB fusion gene, expression *in vitro*, immunogenicity

\* This work was supported by a grant from The National Natural Sciences Foundation of China (30300302).

\*\* Corresponding author. Tel: 86-28-85501248, E-mail: jpchen007@163.com

Received: March 16, 2004 Accepted: May 30, 2004