

抗阿尔茨海默病重组真核表达载体的构建

何颖, 黄力, 章亚男, 黎怀星, 陈蕊雯, 孙树汉*

(第二军医大学基础医学部医学遗传学教研室, 上海 200433)

[摘要] **目的:** 将淀粉样蛋白 N 端的抗原表位基因以 4 种不同的组合与小鼠 IgG 重链区基因融合, 构建抗阿尔茨海默病的重组质粒。**方法:** 通过 RT-PCR 技术从小鼠脾组织中克隆 IgG 重链区 cDNA, 将柔性接头与抗原表位基因序列设计在 5' 端引物中, 然后以克隆出的小鼠 IgG 重链区 cDNA 为模板, 用 PCR 法克隆出由柔性接头将抗原表位和 IgG 重链区基因融合在一起的序列, 并插入到 pVAX 质粒载体中。**结果:** 扩增出来的 4 种不同组合的抗原表位基因和 IgG 重链区基因融合序列大小分别为 999、1 020、1 005、1 026 bp, 均与 GenBank 上登录的相符; pVAX 重组质粒酶切结果表明融合基因正确地插入到 pVAX 载体中, 全自动测序亦显示抗原表位基因和 IgG 重链区基因为所需基因, 接头序列也完全正确。**结论:** 成功构建了抗阿尔茨海默病的 4 种表位基因-IgG 重链区融合表达的重组质粒, 为探索防治阿尔茨海默病打下基础。

[关键词] 阿尔茨海默病; 表位; IgG 重链区; 重组真核表达载体

[中图分类号] R 745.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2004)01-0055-03

Construction of anti-Alzheimer disease recombinant plasmids

HE Ying, HUANG Li, ZHANG Ya-Nan, LI Huai-Xing, CHEN Rui-Wen, SUN Shu-Han* (Department of Medical Genetics, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To construct anti-Alzheimer disease recombinant plasmids by fusing N-terminal epitope gene of the amyloid β -peptide ($A\beta$) with mice IgG heavy chain gene in 4 ways. **Methods:** Mice IgG heavy chain cDNAs, prepared from mice spleen tissue using RT-PCR were used as template DNA for PCR of the sense primers containing a flexible adaptor and epitope sequences at their 5' ends. The resultant genes were then cloned into pVAX vector. All junction area of the recombinant DNAs were confirmed by endonuclease digestion and sequencing. **Results:** Endonuclease digestion of the recombinant plasmids indicated that all the 4 fusion genes (999, 1 020, 1 005, 1 026 bp) were inserted into pVAX vectors with correct directions. Sequence analyses suggested that the IgG heavy chain and the epitopes sequences were identical to those published in GenBank. **Conclusion:** Four recombinant plasmid candidates of anti-Alzheimer disease have been successfully constructed, and this may provide a basis for the prevention and treatment of the disease.

[KEY WORDS] Alzheimer disease; epitope; IgG heavy chain; recombinant plasmids

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(1): 55-57]

阿尔茨海默病 (Alzheimer disease, AD) 是老年期最为常见的神经系统病变。其研究发展较快, 但病因及病理机制至今仍不明了, 长期以来无有效的治疗措施^[1]。近年来, 对 AD 的治疗热点在于大脑内 $A\beta$ 斑块的清除^[2]。但以毒性 $A\beta$ 肽免疫可能导致自身积聚而产生毒性, 而被动免疫又担心产生抗抗体, 因此研究者们将目光转向小分子的 $A\beta$ 肽 N 端抗原表位的应用, 认为以此免疫动物能有效地清除斑块, 并能避免产生炎症反应^[3]。核酸疫苗作为新一代疫苗, 因其自身的优点而在多种疾病和肿瘤的防治中显示出巨大优势。故本研究将 IgG 重链与鼠 $A\beta$ 肽 N 端含 EFGH 四个氨基酸、DAEFGH 六个氨基酸的表位及其不同组合融合构建重组真核表达载体, 希望免疫动物后能在体内诱发较强的体液免疫, 从而达到有效防治阿尔茨海默病的目的。

1 材料和方法

1.1 菌种、质粒和动物 DH5 α 菌、pVAX 质粒由本室保存。BALB/c 小鼠购于本校实验动物中心。

1.2 引物 5 对引物分别用来扩增 IgG 重链和 4 种与 IgG 重链融合的抗原表位, 由上海市生工生物工程服务有限公司合成。4 种不同组合的表位的 5' 端引物含有柔性接头序列, 以利于表位之间以及表位与蛋白之间的融合, 反义引物序列与扩增 IgG 重链的反义引物序列一致。引物序列如下: IgG 正义引物: 5'-ccc aag ctt (*Hind* III) gcc aaa acg aca ccc-3', 反义引物: 5'-acg ctc gag (*Xho* I) tta ttt acc agg

[基金项目] 国家高新技术发展规划 ("863") 课题 (2001AA213111)。

[作者简介] 何颖 (1974-), 女 (汉族), 硕士生。

* Corresponding author. E-mail: shsun888@hotmail.com

aga-3'; mE1 正义引物: 5'-ccc aag ctt(*Hind* III) atg gaa ttc gga cat ggc ggc ggc tcc gcc aaa acg aca ccc cca tet g-3'; mE2 正义引物: 5'-ccc aag ctt(*Hind* III) atg gat gca gaa ttc gga cat ggc ggc ggc tcc gcc aaa acg aca ccc cca tet g-3'; mE3 正义引物: 5'-ccc aag ctt(*Hind* III) atg gaa ttc gga cat gcc gcc tac gaa ttc gga cat ggc ggc ggc-3'; mE4 正义引物: 5'-ccc aag ctt(*Hind* III) atg gaa ttc gga cat gcc gcc tac gat gca gaa ttc gga cat ggc gg-3'。

1.3 酶类及主要生物化学试剂 限制性内切酶、*Taq* 酶、T4 DNA 连接酶等购自 TaKaRa 公司; RNA 抽提试剂盒购自华舜生物工程公司。

1.4 PCR 获得 IgG 重链区 取 4~6 周龄 BALB/c 小鼠脾脏, 进行 RNA 抽提, 方法参见试剂盒说明。然后以 Oligo-dT 为引物, 以总 RNA 中的 mRNA 为模板, 在 M-MLV 的作用下进行逆转录反应, 合成 cDNA 第 1 链。以第 1 链为模板进行 PCR 反应, PCR 条件: 94℃ 预变性 5 min, 然后 94℃ 30 s, 65℃ 1 min, 72℃ 1 min, 30 个循环后 72℃ 延伸 7 min。

1.5 抗原表位基因的扩增 将不同组合的表位基因序列及接头序列(图 1)合成在 5' 端引物序列中, 3' 端引物序列与扩增 IgG 重链区基因相同, 以获得的 IgG 重链区 cDNA 为模板, 用 PCR 法扩增出融合的抗原表位和 IgG 重链。退火温度均为 65℃。

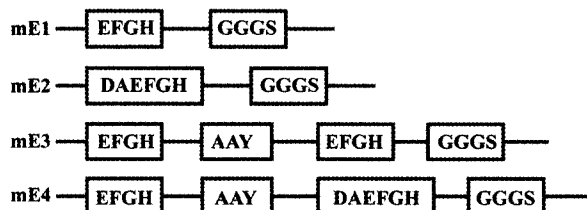


图 1 4 种不同组合的表位及接头序列
Fig 1 Sequences of 4 fusion epitopes of Aβ and IgG heavy chain

1.6 融合表达质粒的构建与鉴定 将 PCR 法获得的抗原表位和 IgG 重链的融合序列通过 T4 DNA 连接酶连接到 pVAX 真核表达载体中。4 种融合表达的质粒分别为 pVAX-mE1-IgG、pVAX-mE2-IgG、pVAX-mE3-IgG、pVAX-mE4-IgG, 插入片段的酶切位点均为 *Hind* III、*Xho* I。酶切鉴定后, 融合表达质粒由 TaKaRa 公司测序。

2 结果

2.1 IgG 重链区编码区的获取 PCR 扩增后, 扩增出一条 1 000 bp 左右的特异片段, 大小与 Gen-

Bank 中登录的相符。全自动测序也表明扩增出的 IgG 重链区基因序列正确。

2.2 抗原表位 cDNA 的扩增 经 PCR 反应后, 扩增出带有不同抗原表位组合和 IgG 重链的约 999、1 020、1 005、1 026 bp 左右的特异片段(图 2), 均与 GenBank 上登录的相符。

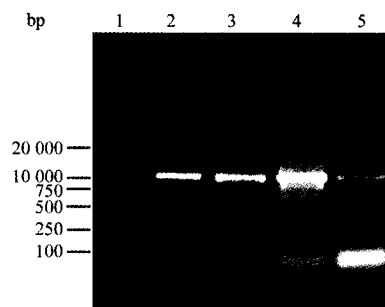


图 2 PCR 扩增产物的电泳分析

Fig 2 Electrophoretic analysis of PCR products

1: DL2000 marker; 2: mE1+IgG;
3: mE2+IgG; 4: mE3+IgG; 5: mE4+IgG

2.3 融合表达质粒阳性重组子的筛选与鉴定 pVAX-mE1-IgG、pVAX-mE2-IgG、pVAX-mE3-IgG、pVAX-mE4-IgG 经双酶切(*Hind* III、*Xho* I)后, 产生的片段与预期结果相符(图 3); 融合表达质粒经全自动测序, 抗原序列和接头序列正确。其核苷酸序列见表 1。

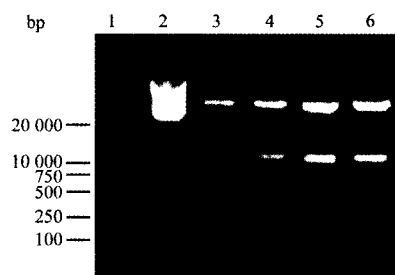


图 3 重组质粒 pVAX-mE1-IgG、pVAX-mE2-IgG、pVAX-mE3-IgG、pVAX-mE4-IgG 酶切鉴定结果

Fig 3 Endonuclease digestion and gel electrophoresis of recombinant plasmids pVAX-mE1-IgG, pVAX-mE2-IgG, pVAX-mE3-IgG and pVAX-mE4-IgG

1: DL2000 marker; 2: pVAX; 3: mE1+IgG;
4: mE2+IgG; 5: mE3+IgG; 6: mE4+IgG

3 讨论

AD 患者大脑内的主要病理学改变是老年斑和神经纤维缠结, Aβ 是老年斑的主要成分。Aβ 自发聚集或组装成 β 片层结构即具有激活神经元变性的毒性作用^[4]。因此能否清除大脑内 Aβ 斑块, 已成为防治阿尔茨海默病的关键。

表 1 4 种不同 A β 抗原表位组合及接头 cDNA 的测序结果
Tab 1 Sequencing of 4 epitopes of A β and adaptors cDNA

Name	Sequencing result
mGE1	atggaattcggacatggcgcggtctc
mGE2	atggatgcagaatcggacatggcgcggtctc
mGE3	atggaattcggacatgccgctacgaatcggacatggcgcggtctc
mGE4	atggaattcggacatgccgctacgatgcagaatcggacatggcgcggtctc

Schenk 等^[5]发现 A β 肽疫苗可阻止 AD 鼠的病理学改变,提高小鼠的智能,而且人和许多动物均对该疫苗具有耐受性。但该疫苗进入 I 期临床试验后,即有 1 例患者在使用了该蛋白疫苗后,出现了大脑炎症,并死于血栓^[6]。Bard 等^[7]发现直接用抗 A β 抗体免疫小鼠也能清除大脑内的斑块,并认为此种方法优于用 A β 肽疫苗。以化学合成的 A β 肽免疫治疗 AD 存在较多的局限性,如代价昂贵、纯度低、免疫原性低,在免疫时需添加佐剂,需重复给予抗原以获得高水平的抗 A β 抗体,更严重的是以毒性 A β 肽进行免疫也可能导致其自身的积聚而产生毒性。此外,尽管有报道认为抗体不必通过血脑屏障而起到清除脑内斑块的作用^[8],但是大分子抗体是否能通过血脑屏障仍然是 AD 疫苗需要考虑的一个重要的因素,因此基于小分子表位抗原的 AD 疫苗便成为了该领域的一个研究热点。Frenkel 等^[9]将携带有 A β 肽 N 端含 EFRH 四个氨基酸表位的丝状噬菌体展示肽免疫豚鼠,获得了高滴度的抗 A β P 特异性抗体。随后,McLaurin 等^[3]也发现,用 A β 肽 N 端含 7 个氨基酸的小片段肽段免疫转基因小鼠,可产生相应抗体且能识别整个 A β 肽。而且受试动物体内并没有发现 T 细胞被激活和出现炎症反应。

研究提示经过优化的表位疫苗不仅成本低、易控制,而且可能避免炎症的发生,是 AD 疫苗的一个重要的研究方向。DNA 疫苗被称为第 3 代疫苗,是 20 世纪 90 年代兴起的一种新的免疫接种剂。其在宿主的注射组织部位表达保护性抗原,从而激发免疫应答,该过程与胞内感染的病原体侵入宿主细胞的过程相似,兼有诱发体液免疫和细胞免疫应答的功能,且诱发的免疫应答较持久。而小分子抗原肽需与大分子载体蛋白相连构成融合蛋白才能有效地诱发机体产生免疫应答。一般认为,连上载体一方面可避免小分子抗原肽被降解,从而增加抗原的稳定性,另一方面是由于小分子抗原肽单独使用时因相对分子质量太小而无法有效地诱发机体产生免疫应答。由于自体免疫球蛋白在体内半衰期较长,重链 Fc 段上具抗原提呈细胞受体而易被抗原提呈细胞所摄取,并且安全无毒性,因而 IgG 重链与小分子蛋白

构成的融合蛋白的空间结构更有利于免疫系统的识别,同时提高了小分子的免疫原性,增加抗体效价^[10]。接头序列的选用对表位的呈递亦能够产生影响,所选的 AAY 序列可能通过增强蛋白酶在此处的切割,提高 N 端表位的稳定性及被 TAP 的转运来增强该表位的呈递,从而调节 DNA 疫苗的免疫效果。基于上述观点,本研究通过 RT-PCR 技术,克隆出小鼠 IgG 重链区 cDNA,随后将带有 A β 肽 N 端的 4 个或 6 个氨基酸的基因序列和柔性接头序列设计在 5' 端引物序列中,用 PCR 方法,以克隆出的 IgG 重链为模板,成功地扩增出 4 种不同组合的抗原表位基因与 IgG 重链区基因通过接头相融合的基因。PCR 反应中,用 Pyrobest™ DNA Polymerase 确保其高可信度,极大减少了融合基因突变的机率。融合基因的成功克隆,保证了下一步重组真核表达载体的成功构建。而构建好的重组真核表达载体为进一步动物实验打下了基础,也为阿尔茨海默病的防治提供新的思路。

[参考文献]

- [1] 陈丽敏,陈晓春. Alzheimer 病的生物学治疗概况[J]. 实用老年医学,2002,16(1):39-41.
- [2] Check E. Battle of the mind[J]. *Nature*,2003,422(6930):370-372.
- [3] McLaurin J, Cecal R, Kierstead ME, et al. Therapeutically effective antibodies against amyloid- β peptide target amyloid- β residues 4-10 and inhibit cytotoxicity and fibrillogenesis[J]. *Nat Med*,2002,8(11):1263-1269.
- [4] 李学坤,左萍萍. Alzheimer 病中 β 淀粉样蛋白的毒性作用[J]. 国外医学·生理、病理科学与临床分册,2001,21(5):363-365.
- [5] Schenk D, Barbour R, Dunn W, et al. Immunization with amyloid- β attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse[J]. *Nature*,1999,400(6):173-177.
- [6] Nicoll JA, Wilkinson D, Holmes C, et al. Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid- β peptide: A case report[J]. *Nat Med*,2003,9(4):448-452.
- [7] Bard F, Cannon C, Barbour R, et al. Peripherally administered antibodies against amyloid β -peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease[J]. *Nat Med*,2000,6(8):916-919.
- [8] Pfeifer M, Boncristiano S, Bondolfi L, et al. Cerebral hemorrhage after passive anti-A β immunotherapy[J]. *Science*,2002,298(5597):1379.
- [9] Frenkel D, Kariv N, Solomon B. Generation of auto-antibodies towards Alzheimer's disease vaccination[J]. *Vaccine*,2001,19(17-19):2615-2619.
- [10] Chan EWC, Wong HT, Cheng SCS, et al. An immunoglobulin G based chimeric protein induced foot-and-mouth disease specific immune response in swine[J]. *Vaccine*,2000,19(4-5):538-546.

[收稿日期] 2003-07-15

[修回日期] 2003-11-08

[本文编辑] 尹 茶