

## 炭疽杆菌保护性抗原 (PA) 重组腺病毒的构建及免疫效果分析\*

徐琳, 郭彦, 管洁, 于虹, 周育森, 李劲松\*\*

(军事医学科学院微生物流行病学研究所病原微生物生物安全国家重点实验室, 北京, 100071)

### Construction of Recombinant Adenovirus Expressing Protective Antigen of *Bacillus Anthracis* and Analysis of Immuno-responses

XU Lin, GUO Yan, GUAN Jie, YU Hong, ZHOU Yu-sen, LI Jin-song\*\*

(State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Beijing Institute of Microbiology and Epidemiology, Beijing 100071, China)

**Abstract:** In this study, we constructed recombinant adenovirus containing protective antigen gene of *Bacillus anthracis*. The PA gene was obtained from pcDNA3.1-PA vector by PCR, and cloned into plasmid pAdTrack-CMV. The positive clone was linearized with *PmeI* restriction enzyme and transformed into *E. coli* BJ5183 cells with the adenoviral plasmid pAdEasy-1. Then vAd-PA was generated by homologous recombination. After linearized with *PacI* restriction enzyme, vAd-PA was transfected into HEK-293 cell line by lipofection. Expression of PA in 293 cells was confirmed by SDS-PAGE and Western-blot. The BALB/c mice were intramuscularly inoculated with the recombinant adenovirus and the specific antibody was detected by ELISA. The induced antibody titer was  $2.8 \times 10^3$  (Geometric Mean).

**Key words:** *Bacillus anthracis*; Protective antigen; Recombinant adenovirus

**摘要:** 探讨利用腺病毒载体作为炭疽杆菌基因工程疫苗载体的可行性。从载体 pcDNA3.1-PA 上 PCR 扩增 PA 片段, 将该片段克隆入质粒 pAdTrack-CMV, 得到阳性克隆 pAdTrack-PA。PmeI 线性化的阳性克隆转化含有腺病毒骨架质粒 pAdeasy-1 的 BJ5183 感受态细胞, 经同源重组后得到重组腺病毒 vAd-PA。vAd-PA 经 PacI 线性化后, 脂质体介导转染 293 细胞, 经 Western-blot 检测表明 PA 在 293 细胞中得到表达。重组病毒肌肉注射免疫 BALB/c 小鼠, 用 ELISA 方法检测血清中产生了特异性抗体, 抗体滴度计算几何均数为  $1: 2800$ 。该研究为进一步研究以腺病毒为活载体的疫苗奠定了基础。

**关键词:** 炭疽杆菌; 保护性抗原; 重组腺病毒

中图分类号: Q78

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2006)03-0231-04

炭疽是一种人畜共患的烈性传染病, 可造成全身性感染, 病死率较高。炭疽杆菌是炭疽的病原菌, 其主要致病因子包括细菌荚膜和炭疽毒素, 后者由质粒 pXO1 编码, 包括三种成分: 保护性抗原 (protective antigen, PA)、致死因子 (LF) 和水肿因子 (EF), 其中 PA 能诱导机体的保护性免疫。因此针对 PA 的基因工程疫苗研究具有重要意义。

目前世界上人用炭疽疫苗主要有两种, 炭疽活芽孢疫苗和 PA 吸附苗 (AVA)。两种疫苗都有较好的免疫保护效果, 但是免疫接种的副反应都比较大, 尤其是有效免疫保护力的持续时间比较短, 需要每年进行加强性免疫接种, 而且对预防吸入型炭

疽效果差。

早在 20 世纪 80 年代初, 研究者就开始利用腺病毒重组子作为哺乳动物细胞表达载体。腺病毒 (Adenovirus, Ad) 安全性好、宿主范围广、感染效率高; 腺病毒载体疫苗稳定、容易操作、生产成本低而且纯化方法简便<sup>[1]</sup>。此外, 复制缺陷的腺病毒对其编码的抗原还有佐剂的作用, 刺激机体产生体液免疫、细胞免疫以及粘膜免疫<sup>[2,3]</sup>。

近年来, 其在动物基因转移领域的应用越来越广泛。研究者用腺病毒来表达 HIV-1 和 SIV 的 Env、Gag 抗原, 以及乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒的表面抗原等等<sup>[4-6]</sup>。有关炭疽保护性抗原重组腺病毒

收稿日期: 2005-11-2, 修回日期: 2006-01-16

\* 基金项目: 总后医学科重点基金课题 (01J005)

作者简介: 徐琳 (1981-), 女 (汉), 浙江金华籍, 硕士, 从事病原生物学及免疫学研究

\*\* 通讯作者. Corresponding author. Tel: 010-66948559, E-mail: lij-s@163.com

的研究, TAN Yadi 等人在 2003 年构建了炭疽杆菌保护性抗原的重组腺病毒(AdsechPA), 与炭疽重组 PA 疫苗的免疫效果进行比较。实验结果显示, AdsechPA 比重组 PA 蛋白免疫反应强, 中和抗体的滴度也高于后者, 攻毒实验结果也表明 AdsechPA 效果更显著<sup>[7]</sup>。

本研究以腺病毒作为载体, 构建了携带有炭疽杆菌保护性抗原(PA)基因的重组腺病毒, 探索利用腺病毒为载体制备炭疽基因工程疫苗的可行性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

重组质粒 pcDNA3.1-PA 为本室前期构建的含有密码子优化的编码炭疽 PA 的全长基因, 质粒重组宿主菌 *E. coli* BJ5183(recA-)、克隆载体 pAdTrack-CMV 和腺病毒骨架质粒 pAdeasy-1 均由 John-Hopkins 大学何童川博士惠赠; 含有腺病毒 E1 区的重组人胚胎肾 HEK-293 细胞由本室保存; 载体 pMD-18T 购自 TaKaRa 公司; 限制性内切酶 *Pme*I 和 *Pac*I 购自 Biolabs 公司; 限制性内切酶 *Sal*I 和 *Hind*III、T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司; 玻璃奶回收试剂盒购自博大泰克公司; DMEM 培养基购自 Gibco 公司、胎牛血清购自 Hyclone 公司; 脂质体 Lipofectamin 2000 购自 Invitrogen 公司; 纯化 PA 蛋白和鼠抗 PA 抗体由本所二室提供; 羊抗鼠-HRP 酶标二抗购自北京中杉金桥公司。

### 1.2 目的基因的扩增及克隆

用 DNASTAR 软件设计引物扩增 PA 片断, 分别添加 *Sal*I 和 *Hind*III 酶切位点, 送上海生工合成。  
PCR1: 5'-TAGTCGACACCATGGAGAAAAGGAA GGTGC TG-3'  
PCR2: 5'-GCAAGCTTTCAGTGGTGGTGATGGT GATGA TG-3'

以 pcDNA3.1-PA 质粒为模板, 扩增目的片断。扩增条件: 94℃ 预变性 5min, 94℃ 变性 30s, 55℃ 退火 50s, 72℃ 延伸 90s, 29 个循环, 72℃ 延伸 10min。

PCR 产物 1% 琼脂糖凝胶电泳, 切胶用玻璃奶法回收目的片段。与载体 pMD-18T 于 16℃ 连接过夜, 转化宿主菌 XL-1Blue, 酶切鉴定阳性克隆。再用 *Sal*I 和 *Hind*III 酶切阳性克隆, 酶切产物 1% 琼脂糖凝胶电泳, 切胶回收目的片段; 质粒 pAdTrack-CMV 用 *Sal*I 和 *Hind*III 双酶切, 两者在 16℃ 连接过夜, 转化 XL-1Blue, 挑选卡那霉素抗性克隆, 提取质粒酶切分析鉴定。

### 1.3 重组腺病毒的构建

用限制性内切酶 *Pme*I 37℃ 充分消化阳性克隆 pAdTrack-PA, 转化含有腺病毒骨架质粒 pAdeasy-1 的 BJ5183 感受态细胞, 根据抗性基因进行筛选, 产生的阳性克隆命名为 vAd-PA (图 1)。手工法提取阳性克隆质粒, 用限制性内切酶 *Pac*I 酶切鉴定<sup>[8]</sup>。

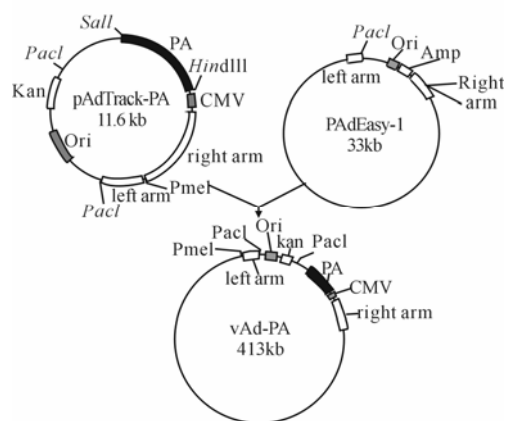


图 1 重组腺病毒构建示意图

Fig.1 Construction map of recombinant adenovirus

### 1.4 重组病毒的扩增及目的蛋白的表达

*Pac*I 酶切鉴定阳性的克隆子大量提取质粒, 取 5μgDNA *Pac*I 线性化, 脂质体介导转染 293 细胞, 转染按照说明书进行。7d 后收集细胞, 反复冻融 3 次, 离心收集上清, 进行下一代扩增, 连续扩增 3 代。取病毒上清 200μL 感染 293 细胞, 4d 后收集细胞, 用 PBS 洗涤后用细胞裂液裂解细胞, 样品经处理后 12% SDS-PAGE 电泳分离胞内蛋白, 4℃ 160mA 转膜 3 h, 以鼠抗 PA 多抗为一抗, HRP 一标记的羊抗鼠抗体为二抗, 本所二室提供的抗 PA 抗体为阳性对照, 未转染腺病毒的细胞样品为阴性对照, 进行 Western-blot 实验。电泳、转膜及杂交等参照资料进行<sup>[9]</sup>。

### 1.5 重组病毒免疫 BALB/c 小鼠

经过 3 轮扩增后的病毒用 96 孔板测定滴度。不含目的基因 PA 的腺病毒 (AdNull) 也按上述方法扩增并测定滴度。纯化的重组腺病毒和空载体 AdNull 分别经肌肉注射途径免疫 6 只 5 周龄的 BALB/c 雌性小鼠, 每只小鼠每次免疫 200μL 病毒液 (10<sup>8</sup>PFU/mL), 并设 PBS 溶液对照组, 每隔两周后加强, 连续免疫 4 次, 每次加强前采集血清, 测定抗体的产生情况。

用重组表达 PA 做包被抗原建立间接 ELISA 方法, 具体方法参照文献<sup>[10]</sup>, 简述如下: PA 抗原

200ng/孔, 4℃包被过夜, 次日用 2%BSA 37℃封闭 1h, 洗板后加入梯度稀释免疫血清, 37℃孵育 1h, 洗板后加入 1:5000 稀释的 HRP 标记羊抗鼠 IgG 37℃孵育 1h, 洗板后显色, 酶标仪测  $OD_{450}$ <sup>[10]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 PA 基因的扩增及克隆

PCR 产物与载体 pAdTrack-CMV 连接后产生的阳性克隆 pAdTrack-PA 经 *Sal*I 和 *Hind*III 双酶切, 得到目的带 (2.4kb) 和载体带 (9.2kb), 与理论推测结果一致 (图 2)。

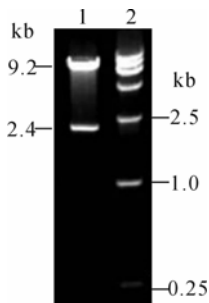


图 2 pAdTrack-PA 酶切鉴定图  
Fig.2 pAdTrack-PA digests with *Sal*I and *Hind*III  
1, Positive clone; 2. Marker (15000).

### 2.2 重组腺病毒的制备

pAdTrack-PA 与 pAdeasy-1 在同源区发生重组, 产生的 vAd-PA 经 *Pac*I 酶切可以得到两个片段: 一个片段为含有 PA 片段的腺病毒骨架, 大小为腺病毒骨架 (约 33Kb) 加上克隆片段 (2.4kb), 另一个片段包括 pAdTrack-CMV 上的复制子和 Kan 抗性基因, 为一约 3.5Kb 的片段 (图 3)。结果表明, PA 基因成功地重组入腺病毒骨架。手工法大量提取阳性克隆 vAd-PA 质粒, *Pac*I 线性化后, 脂质体介导转染 293 细胞进行重组腺病毒的制备。通过在荧光显微镜下检测 GFP 基因的表达判断转染是否成功 (图 4)。

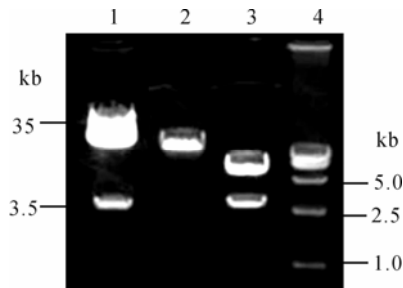


图 3 *Pac*I 线性化鉴定阳性克隆  
Fig.3 vAd-PA linearized with *Pac*I  
1, vAd-PA digested with *Pac*I; 2, pAdeasy-1 digested with *Pac*I; 3, pAdTrack-CMV digested with *Pac*I; 4. Marker (15000).

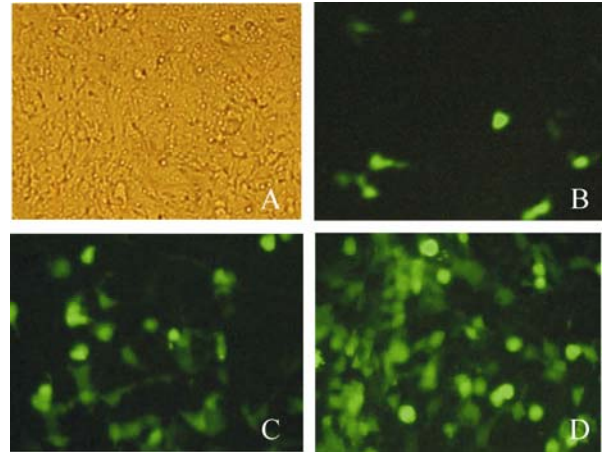


图 4 重组腺病毒转染 293 细胞后的荧光产生情况  
Fig.4 Recombinant Adenovirus producing fluorescence  
After transfection of 293 cells: A, Normal; B, 24 h; C, 48 h; D, 72 h.

### 2.3 Western-blot 检测目的蛋白的表达

Western-blot 方法检测目的蛋白在 HEK-293 细胞中的表达, 结果显示阳性 (图 5 箭头所示)。

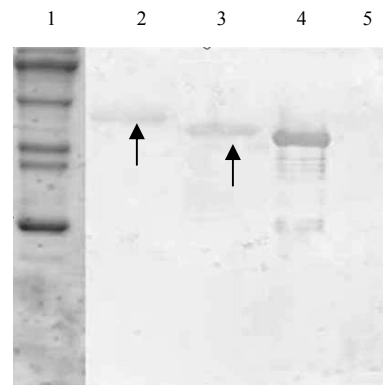


图 5 Western-blot 鉴定 PA 在 293 细胞中的表达  
Fig.5 Expression of PA in 293 cells identified by Western-blot  
1, Marker; 2, 293 cells Sample (before deglycosylation); 3, 293 cells Sample (after deglycosylation); 4, Antibody against PA; 5, 293 cell uninfected recombinant adenovirus.

### 2.4 动物实验结果

用 ELISA 方法检测免疫小鼠的血清中特异性抗体的产生情况。结果表明, 接种重组病毒的 6 只小鼠均产生了 PA 特异性抗体, 第四次免疫后 6 只动物的抗体滴度分别达到 1:4000, 1:2000, 1:4000, 1:500, 1:8000, 1:4000, 而空载体对照组 (AdNull) 和 PBS 对照组的結果均为阴性, 计算各组抗体滴度的几何均值, 将结果用图表表示 (图 6)。

## 3 讨论

在本研究中, 为了使 PA 在人体细胞内高表达, 并增加其稳定性, 目的基因是经过密码子优化后的

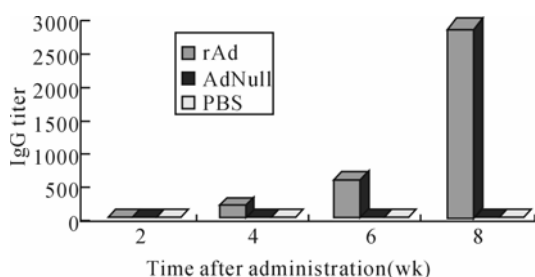


图6 各组小鼠血清中抗体变化情况  
Fig.6 Anti-PA antibodies in mouse serum

PA 片断, 优化前后基因碱基的变化较大 (68%吻合), GC 含量由 30%左右提高到 50%左右, 但优化前后的氨基酸基本保持不变 (96%吻合)。另外, 在 PA 基因的尾部加入组氨酸标签, 通过检测组氨酸的表达情况也能进一步验证蛋白的表达情况。

Western-blot 结果显示, 样品条带和阳性对照不在同一分子水平, 分析是由于本所二室提供的纯化 PA 是原核表达产物, 真核表达糖基化后使 PA 蛋白分子量增大。经 DNASTAR 软件分析, 在 PA 基因上确实存在多个糖基化位点, 用去糖基化酶处理样品后再用 WB 验证, 阳性条带分子量变小, 说明糖基化的推测正确 (见图 5)。

重组病毒免疫 BALB/c 小鼠, 均产生了特异性抗体, 说明重组腺病毒在机体内可产生针对炭疽 PA 的特异性免疫反应。但总体来说, 抗体效价偏低, 这可能是小鼠本身对 PA 不敏感所致; 另外, PA 在细胞内表达时是否正确糖基化和糖基化是否完全都有可能影响其免疫原性。

重组腺病毒载体对某些缺乏纤维受体的细胞, 如呼吸道上皮细胞等感染效率差, 可以通过增大腺病毒载体用量或/和延长载体与靶细胞及组织的接触时间来改善, 还可通过和非病毒载体的联合应用来增强<sup>[11]</sup>。另外, 针对腺病毒基因表达水平较低和时间较短的问题, 通过改造载体结构尽可能减少病毒蛋白质在宿主体内的合成、降低机体的免疫反应能力、调控 T 细胞的活化等措施来提高腺病毒载体的应用效果。

细胞免疫在机体对腺病毒载体的免疫反应中起着重要作用。它一方面通过产生 CTL 直接破坏损伤转染细胞及其邻近组织, 同时可促进各种特异性中和抗体的产生。另外, 腺病毒活载体的粘膜免疫受到越来越多重视。由于腺病毒能通过消化道和呼吸道途径感染, 在诱导产生粘膜免疫方面具有优势。在后续的工作中, 将进一步扩增腺病毒, 并探讨滴

鼻免疫途径诱导的粘膜免疫效果。

## References

- [1] Harvey B, Maroni J, O'Donoghue K A, *et al.* Safety of local delivery of low-and intermediate-dose adenovirus gene transfer vectors to individuals with a spectrum of morbid condition [J]. Hum. Gene Ther. 2002 (13) : 15-63.
- [2] Zhang Y, Chirmule N, Gao G P, *et al.* Acute cytokine response to systemic adenoviral vectors in mice is mediated by dendritic cells and macrophages [J]. Mol Ther, 2001, 3: 697-707.
- [3] Crystal R G, Harvey B, Wisnivesky J P, *et al.* Analysis of risk factors for local delivery of low-and intermediate-dose adenovirus gene transfer vectors to individuals with a spectrum of comorbid condition [J]. Hum Gene Ther, 2002 (13): 65-100.
- [4] Vinner L, Wee E G, Patel S, *et al.* Immunogenicity in Mamu-A\*01 rhesus macaques of a CCR5-tropic human immunodeficiency virus type 1 envelope from the primary isolate (Bx08) after synthetic DNA prime and recombinant adenovirus 5 boost [J]. J Gen Virol, 2003, 84: 203-213.
- [5] Shiver J W, Fu T M, Chen L, *et al.* Replication-incompetent adenoviral vaccine vector elicits effective anti-immunodeficiency-virus immunity [J]. Nature, 2002, 415 : 331-335.
- [6] Makimura M, Miyake S, Akino N, *et al.* Induction of antibodies against structural proteins of hepatitis C virus in mice using recombinant adenovirus [J]. Vaccine, 1996, 14 : 28-36.
- [7] Tan Y D, Hackett N R, Boyer J L, *et al.* Protective Immunity Evoked Against Anthrax Lethal Toxin After a Single Intramuscular Administration of an Adenovirus-Based Vaccine Encoding Humanized Protective Antigen [J]. Hum Gene Ther, 2003 (14) : 1673-1682.
- [8] He T C, Zhou S B, Costa L T. A simplified system for generating recombinant adenoviruses [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95 (5): 2509-2514.
- [9] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning. A laboratory manual [M], 3<sup>rd</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [10] Xu J J, Dong D Y, Song X H, (徐俊杰, 董大勇, 宋小红) *et al.* Expression, Purification and Characterization of the Recombinant Anthrax Protective Antigen [J]. Chin [J] Biotechnol (生物工程学报), 2004, 20 (5): 652-655.
- [11] Fasbender A, Zabner J, Chillon M, *et al.* Complexes of Adenovirus with Polycationic Polymers and Cationic Lipids Increase the Efficiency of Gene Transfer in Vitro and in Vivo [J]. J Biol Chem, 1997, 272 : 6479-6489.