

王进军, 薛 藩. 虾过敏 DNA 疫苗的设计和构建[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(15): 34-37.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.15.009

# 虾过敏 DNA 疫苗的设计和构建

王进军, 薛 藩

(扬州大学环境科学与工程学院, 江苏扬州 225127)

**摘要:**通过“一珠一化合物”方法筛选虾过敏的抗原表位, 加上免疫元件构建重组真核表达质粒。取对虾过敏患者的血清, 纯化抗体。用所得抗体从耦联氨基酸多肽库中筛选出不同长度的多肽 20 个。在每个多肽前后加入免疫元件(KOZAK 序列、Th - PADRE、CpG1、Th - P18mm、CpG2、tPA 前导序列、多肽加尾信号), 根据密码子表和 JCAT 网站选出适宜在小鼠内表达的 DNA 序列。按重叠 PCR 的方法设计 6 个 20 bp 的核苷酸链, 通过 PCR 获得全长片段, 双酶切连接入真核表达载体, 构建重组表达质粒。经测序分析, 证明成功构建虾抗原表位的重组表达质粒 pCIneo - TM。本研究为虾过敏抗原表位在真核系统的表达以及已建立的虾过敏小鼠动物模型奠定了良好基础, 可为虾过敏的治疗提供新的方法。

**关键词:** 虾过敏; 抗原表位; 克隆; 真核表达质粒; DNA 疫苗

**中图分类号:** R392.7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)15-0034-04

虾作为海产品的主力军, 其味道鲜美闻名于世, 但不少人因对虾过敏而无法享用。目前, 还没有针对虾过敏的治疗方法。虾过敏的主要原因是虾中存在过敏原。随着免疫学、临床医学和食品生物化学等学科和分子生物学技术的发展, 不同品种的虾过敏原的性质被研究, 结果表明不同品种的虾主要过敏原均为分子量 36 ku 组分, 而且其氨基酸的组成和顺序很相似, 都是肌肉中的原肌球蛋白<sup>[1-2]</sup>。这种蛋白质存在

于肌原纤维中, 和肌钙蛋白一起, 结合在 F - 肌动蛋白上, 形成细丝。进一步研究表明, 虾过敏原的抗原表位, 即能引起过敏反应的最小单位, 通常为几个氨基酸的多肽或者肽段, 如棕虾的抗原表位为 9 个肽段, 这 9 个肽段有两大重叠区域<sup>[3-7]</sup>。

DNA 疫苗即基因疫苗, 是在分子生物学技术基础上发展起来的第 3 代新型疫苗, 指的是将编码外源性抗原的基因插入到含真核表达系统的质粒上, 然后将质粒直接导入人或动物体内, 让其在宿主细胞中表达抗原蛋白, 诱导机体产生免疫应答。抗原基因在一定时限内的持续表达, 不断刺激机体免疫系统, 使之达到防病的目的<sup>[8-9]</sup>。

本研究通过基因克隆技术构建虾过敏原抗原表位的 DNA 疫苗, 通过“一珠一化合物”的分析方法获得虾过敏抗原表位的多肽的氨基酸序列, 通过真核表达载体 pCI neo 为骨

收稿日期: 2017-03-06

基金项目: 教育部留学回国人员科研启动基金(编号: 20151098); 江苏省扬州市基础研究计划(编号: YZ2015098); 扬州大学高层次人才科研启动基金。

作者简介: 王进军(1979—), 男, 江苏海安人, 博士, 副教授, 主要从事微生物学的相关研究。Email: wangjinjun@yzu.edu.cn。

## 参考文献:

[1] Ostojić J, Panozzo C, Bourand - Plantefol A, et al. Ribosome recycling defects modify the balance between the synthesis and assembly of specific subunits of the oxidative phosphorylation complexes in yeast mitochondria[J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(12): 5785 - 5797.

[2] Gouget K, Verde F, Barrientos A. *In vivo* labeling and analysis of mitochondrial translation products in budding and in fission yeasts[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2008, 457: 113 - 124.

[3] Henze K, Martin W. Evolutionary biology: essence of mitochondria[J]. *Nature*, 2003, 426(6963): 127 - 128.

[4] Wang C, Youle R J. The role of mitochondria in apoptosis[J]. *Annual Review of Genetics*, 2009, 43(1): 11 - 22.

[5] Vo T D, Palsson B O. Building the power house: recent advances in mitochondrial studies through proteomics and systems biology[J]. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 2007, 292(1): C164 - C177.

[6] Foury F, Roganti T, Lecrenier N, et al. The complete sequence of the

mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *FEBS Letters*, 1999, 440(3): 325 - 331.

[7] Birsoy K, Wang T, Chen W W, et al. An essential role of the mitochondrial electron transport chain in cell proliferation is to enable aspartate synthesis[J]. *Cell*, 2015, 162(3): 540 - 551.

[8] 张 颖, 胡国华. 线粒体呼吸链功能异常在帕金森病中作用的研究进展[J]. *中风与神经疾病*, 2010, 27(1): 89 - 91.

[9] Herrmann P C, Gillespie J W, Lu C, et al. Mitochondrial proteome: altered cytochrome c oxidase subunit levels in prostate cancer[J]. *Proteomics*, 2003, 3(9): 1801 - 1810.

[10] Oliva C R, Markert T, Gillespie G Y, et al, Nuclear - encoded cytochrome c oxidase subunit 4 regulates BMI1 expression and determines proliferative capacity of high - grade gliomas[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(6): 4330 - 4344.

[11] Meisinger C, Pfanner N, Truscott K N. Isolation of yeast mitochondria[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2006, 313: 33 - 39.

[12] Boldogh I R, Pon L A. Purification and subfractionation of mitochondria from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Methods in Cell Biology*, 2007, 80(9): 45 - 64.

架,加上免疫相关的因子,从而构建完整针对刀额新对虾过敏的DNA疫苗<sup>[10-11]</sup>,为后续的动物试验打下坚实基础,也为探索新的海产品,尤其虾过敏的治疗提供良好方案。

## 1 材料与方法

### 1.1 虾过敏蛋白抗体的纯化

虾过敏蛋白主要是原肌球蛋白特异性抗体,收集虾过敏史的患者血清,用结合重组蛋白 Metel 的溴化氰活化亲和层析凝胶 4B (CNBr - activated Sepharose 4B, GE Healthcare, Piscataway, NJ) 进行纯化获得。

### 1.2 多肽链文库的筛选

1.2.1 封闭 从4个(氨基酸肽链长度分别为8、9、12、15个氨基酸)“一珠一化合物”随机任意组合的氨基酸文库中取25 000~30 000珠子,装入小层析柱。用含有0.1%吐温-20的5%封闭液进行封闭。

1.2.2 非特异性珠子的去除 用碱性磷酸酶耦联的抗人的二抗(1:5 000 IgG-AP或1:3 000 IgE-AP)4℃孵育1h, PBST洗3遍,用碱性磷酸酶反应底物 BCIP 显色,非特异性反应的珠子会呈现出蓝色,挑出去除,层析柱留下无色的珠子。

1.2.3 特异性珠子的初筛 用患者血清纯化的抗体作为一抗(IgG为1:50或IgE为1:20)4℃过夜孵育, PBST洗3遍,二抗用IgG-AP(1:2 000)或IgE-AP(1:300)4℃孵育1h, PBST洗3遍,将珠子与低熔点琼脂糖胶(NuSieve GTG Agarose, Cambrex Bio Science Rockland, Inc, Rockland, MN)混合后转入平皿中,冷却10~15 min后,加入BCIP,用平板扫描仪扫1遍。2h后用1 mol/L盐酸终止反应,再用扫描仪扫1遍。前后2次所得的图片通过软件分析,比较前后2次颜色的差异。分离出颜色差异较大的珠子(即第1次扫描无颜色或浅颜色的,第2次扫描深颜色)。

1.2.4 特异性珠子的确认 为进一步确认阳性结果,将所得珠子用盐酸胍去除颜色后按“1.2.3”节方法重复1遍,然后将含有不同多肽的珠子送至Edman公司进行测序。

1.2.5 氨基酸序列的获得 从测序公司获得最终的多肽链的氨基酸序列。

### 1.3 DNA疫苗的构建

1.3.1 DNA序列的获得 根据“1.2.5”节获得的氨基酸序列,按照遗传密码子推导出DNA的序列。

1.3.2 盒式片段DNA的设计 该DNA疫苗设计考虑到免疫学的需要,既要能保证正常有效地表达,又要能促进同源抗原递呈细胞有效地识别,并发挥TH<sub>1</sub>免疫识别效应。在原核和真核穿梭表达载体pCIneo作为骨架,其中包含了SV40晚期poly(A)加尾信号,在此基础上加入了促进氨基酸分泌的组织型纤溶酶原激活剂(tPA信号序列)、T肽P18mn(CKRKHIGPGQAFYT)、在T肽的两侧加上2个CpG序列(GACGTT和GAACGTCG)、泛DR辅助T细胞表位(PADRE)和有助于翻译起始的Kozak序列<sup>[12-16]</sup>。

1.3.3 重叠PCR获得盒式片段 根据“1.3.2”设计获得全长的氨基酸序列,根据网站JCAT(<http://www.jcat.de/>)优化表达的DNA序列,并检测有无稀有密码子。总序列长198 bp,利用重叠PCR的方法,依次设计6段60 bp左右,每段两侧各有20 bp的重叠序列,在第1个片段外侧加上Xho I

和最后1个片段加上Xba I的酶切位点。合成各核苷酸链后,按相同的浓度加入PCR运行10循环(94℃ 10 s, 60℃ 15 s, 72℃ 10 s)。然后用2个共同的引物(GCTAGCCTCGA-GGCCACCATG和GCCCCGGTTCGACTCTAGA)在常规PCR条件下扩增30循环(94℃ 10 s, 60℃ 15 s, 72℃ 10 s),获得盒式片段全长。

1.3.4 DNA疫苗的获得 用“1.3.3”获得的DNA片段,用Xho I和Xba I酶切后连接到pCIneo表达载体,转化进大肠杆菌感受态DH5α,涂含氨苄青霉素的LB平板,37℃过夜培养,挑选阳性克隆提取质粒,送测序公司测序确认。

## 2 结果与分析

### 2.1 “一珠一化合物”法获得多肽

根据图1试验过程,运用“一珠一化合物”的方法进行筛选。由表1可知,阳性结果氨基酸测序,获得不同长度的多肽,共20个,肽链长度为8个氨基酸的多肽4个,肽链长度为9个氨基酸的多肽5个,肽链长度为12个氨基酸的多肽7个,肽链长度为15个氨基酸的多肽4个。

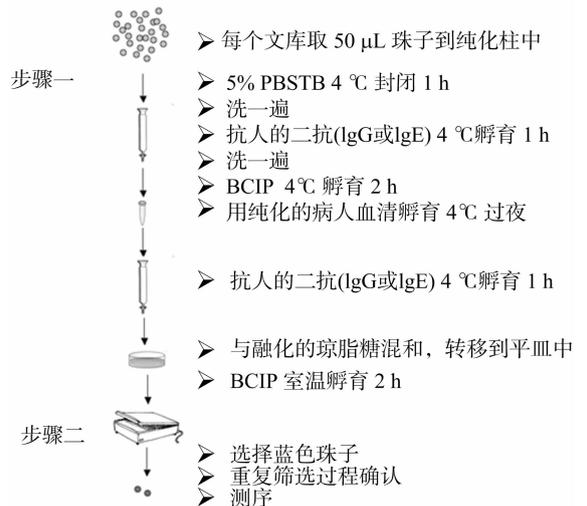


图1 虾过敏抗原表位“一珠一化合物法”筛选过程

### 2.2 DNA疫苗关键盒式片段的获得

所得20个多肽,以及相关的有助于DNA疫苗发挥更好作用的元件的氨基酸序列,到JCAT网站上按照表达模型偏好选择正确的DNA序列,设计引物,用重叠PCR(图2)后获得完整片段(表2、图3)。

### 2.3 DNA疫苗完整质粒构建

将PCR产物和pCIneo质粒分别酶切后过夜连接获得完整的DNA疫苗质粒,由表3、图4可知,该疫苗质粒包含了Kozak序列、Th-PADRE、CpG1、Th-P18mn、CpG2、tPA信号序列、虾抗原表位和SV40晚期poly(A)加尾信号,获得20个虾过敏抗原表位的DNA疫苗质粒。

## 3 讨论

虾过敏蛋白主要是原肌球蛋白特异性抗体,该蛋白能引起患者的过敏反应,常见的是皮肤反应,如荨麻疹和血管性水肿,也有的引起胃肠道的不适反应,如恶心、呕吐、腹痛和痉挛。过敏的症状因不同个体而有不同的差异,一般过敏的同

表1 筛选所得的抗原表位氨基酸序列

序号	多肽序列	来源库
1	YQHHTAL	8-mer
2	FHWHIAVA	8-mer
3	QFPSSWRK	8-mer
4	QFPKSWRK	8-mer
5	RIWVGHFML	9-mer
6	FFEAGFGNK	9-mer
7	HDCIPDWSM	9-mer
8	KLAYMHVRV	9-mer
9	YKTPHQVFW	9-mer
10	NTMDRKNHARG	12-mer
11	FQAMVAYHRDRY	12-mer
12	VLYKSGPPYTG	12-mer
13	YPRHYKDDWRTM	12-mer
14	RRHYIKTYMYQE	12-mer
15	AHLYPTMMKYWI	12-mer
16	IQKKRWVFKMVE	12-mer
17	IKKKMQAMKLEKDNA	15-mer
18	KMQAMKLEKDNAMDR	15-mer
19	DNAMDRADTLEQQNK	15-mer
20	MDRADTLEQQNKEAN	15-mer

时,患者血清中的IgE水平也跟着升高。如果研制出虾过敏的疫苗,很多人不会因为过敏而望虾却步。

DNA疫苗作为一种新型的疫苗,克服了传统疫苗的成本高、安全性差、效果不理想、适用范围不广等不足,其关键是抗

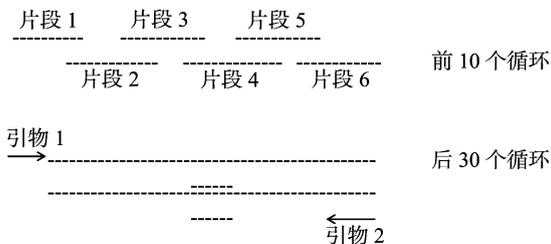


图2 重叠PCR原理

原表位的获得和合适的载体。本研究采用的“一珠一化合物”化学筛选方法,特异性强、灵敏度高,能利用虾过敏病人的血清纯化所得的抗体,从库中筛选出与其反应的抗原表位多肽。

为了促进免疫反应的效果,在抗原表位的前后加入了KOZAK序列、Th-PADRE、CpG1、Th-P18mn、CpG2、tPA信号序列、SV40多肽加尾信号等序列,使得DNA疫苗更有效地表达<sup>[8]</sup>。KOZAK序列是在起始密码子ATG上下游的一串DNA序列,可增强抗原表位多肽的翻译效率,提高表达效率<sup>[12]</sup>。Th-PADRE为根据主要组织相容性复合物的结合特性而人工合成的,辅助T细胞表位特性的多肽,全长约为13个氨基酸,有助于γ干扰素的高效分泌<sup>[16]</sup>。CpG1和CpG2作为新型佐剂的一种,属于非特异性免疫增强剂,是核酸疫苗的重要组成部分,具有强大的免疫刺激作用,促进Th<sub>1</sub>型免疫应答<sup>[14]</sup>。Th-P18mn是T细胞辅助多肽,无主要组织相容性复合物的限制,可在小鼠体内高效分化半抗原。组织型纤溶酶原激活剂可以促进抗原表位多肽的分泌<sup>[15]</sup>。SV40晚期poly

表2 盒式片段完整序列

CASSETTE (*Xho* I + KOZAK + Th - PADRE + CpG + Th - P18mn + CpG + tPA + TM + *Xba* I )

CTCGAGGCCACCATGGTAGCCAAGTTCGTGCGCCGCTGGACCCTGAAGGCCGCGCCGACGTTTGCAAGAGGAAGATCCACATCGGCCCCGCGCCAG-GCCTTCTACACCGAACCTCGTATGAAGAGGGAGCTGCTGTGCGTGTCTGCTGTGCGGCTGGCCTTCCCCCTGCCGACCAGGGCATCCACGGCA-GGTTTCAGGAGGTTMTCTAGA

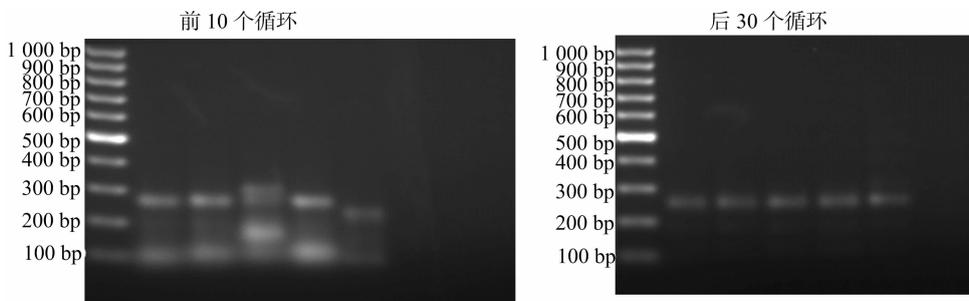


图3 重叠PCR获得虾过敏抗原表位盒式元件

表3 盒式片段重叠PCR所用引物

编号	重叠PCR所用引物的核酸序列(5'→3')
片段1	AGCCTCGAGGCCACCATGGTGGCAAAGTTCGTGCGCCGCTGGACTCTCAAAGCCGCGCC
片段2	CTGTCCGGGTCCAATATGAATCTTCCGTTTACAAACGTCGGCGGGCTTTGAGAGTCCA
片段3	ATTGATATTGGACCCGACAGGCCTTCTACACCGAACGTCGAATGAAGCGGGAAGTCTGCTG
片段4	GTCTGGCAGGGGAAAAGCGAGTCCGCACAGGAGCAGCACGAGCAGTTCCTCCGCTTCAT
片段5	TTCGTTTCCCCCTGCCAGACCAGGGGATTCACGGAAGGTTTCAAGA
片段6	GCCCGGTCGACTCTAGACAGCGGTGTAGTGATGCTGTTCTTCTGAACCTTCCGTGAA
引物1	GCTAGCCTCGAGGCCACCATG
引物2	GCCCGGTCGACTCTAGA

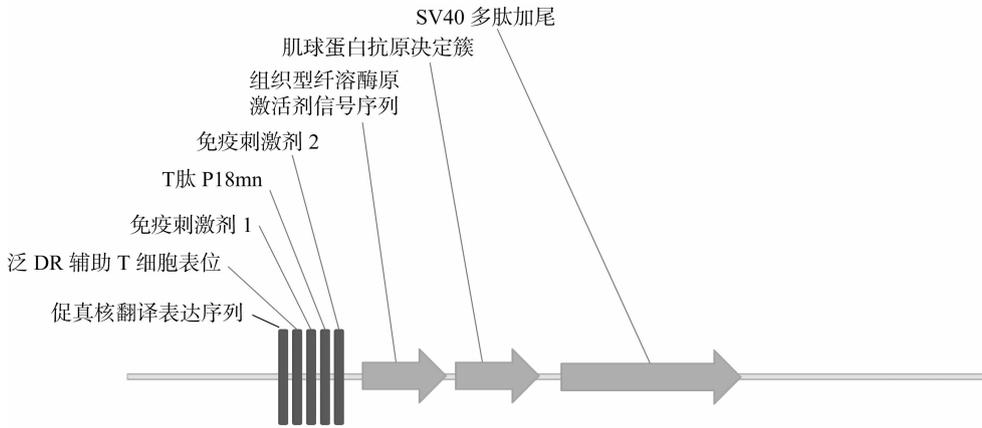


图4 DNA疫苗完整示意图

(A)加尾信号,对上游的虾过敏原表位的表达有一定的调控作用<sup>[17]</sup>。

选用的 pCI neo 载体属于真核表达载体,有助于将虾过敏的抗原表位多肽在小鼠的动物模型中高效地表达<sup>[18]</sup>。该 DNA 疫苗的成功构建,为下一步动物试验提供了很好的试验基础,也为虾过敏的治疗提供了一种新的方法。

#### 参考文献:

- [1] Hoffman D R, Day E D Jr, et al. The major heat stable allergen of shrimp[J]. *Annals of Allergy*, 1981, 47(1): 17-22.
- [2] Jiang D L, Ji J, An L, et al. Mast cell - based electrochemical biosensor for quantification of the major shrimp allergen Pen a 1 (tropomyosin) [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2013, 50(50): 150-156.
- [3] Shanti K N, Martin B M, Nagpal S, et al. Identification of tropomyosin as the major shrimp allergen and characterization of its IgE - binding epitopes[J]. *Journal of Immunology*, 1993, 151(10): 5354-5363.
- [4] Ayuso R, Lehrer S B, Reese G. Identification of continuous, allergenic regions of the major shrimp allergen Pen a 1 (tropomyosin) [J]. *International Archives of Allergy and Immunology*, 2002, 127(1): 27-37.
- [5] Fernandes J, Reshef A, Patton L, et al. Immunoglobulin E antibody reactivity to the major shrimp allergen, tropomyosin, in unexposed Orthodox Jews[J]. *Clinical and Experimental Allergy*, 2003, 33(7): 956-961.
- [6] Reese G, Viebranz J, Leong - Kee S M, et al. Reduced allergenic potency of VR9 - 1, a mutant of the major shrimp allergen Pen a 1 (tropomyosin) [J]. *Journal of Immunology*, 2005, 175(12): 8354-8364.
- [7] Liu G M, Huang Y Y, Cai Q F, et al. Comparative study of in vitro digestibility of major allergen, tropomyosin and other proteins between grass prawn (*Penaeus monodon*) and Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2011, 91(1): 163-170.
- [8] Iurescia S, Fioretti D, Rinaldi M. A blueprint for DNA vaccine design [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2014, 1143: 3-10.
- [9] Ghaemi B M, Bassami M R, Hashemi T R, et al. A bioinformatic

approach to check the spatial epitope structure of an immunogenic protein coded by DNA vaccine plasmids [J]. *J Theor Biol*, 2015 (380): 315-320.

- [10] Leung N Y, Wai C Y, Ho M H, et al. Screening and identification of mimotopes of the major shrimp allergen tropomyosin using one - bead - one - compound peptide libraries [J]. *Cellular & Molecular Immunology*, 2017, 14(3): 308-318.
- [11] Leung P S, Chu K H, Chow W K, et al. Cloning, expression, and primary structure of metapenaeus - ensis tropomyosin, the major heat - stable shrimp allergen [J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 1994, 94(5): 882-890.
- [12] Kim B, Sasaki Y, Egawa T. Restriction of nonpermissive RUNX3 protein expression in T lymphocytes by the kozak sequence [J]. *Journal of Immunology*, 2015, 195(4): 1517-1523.
- [13] Kupper J H, Muller M, Burkle A. Trans - dominant inhibition of poly (ADP - ribosyl) ation potentiates carcinogen induced gene amplification in SV40 - transformed Chinese hamster cells [J]. *Cancer Research*, 1996, 56(12): 2715-2717.
- [14] Li J Y, Li J Y, Aipire A, et al. The combination of *Pleurotus ferulae* water extract and CpG - ODN enhances the immune responses and antitumor efficacy of HPV peptides pulsed dendritic cell - based vaccine [J]. *Vaccine*, 2016, 34(31): 3568-3575.
- [15] Ahlers J D, Dunlop N, Pendleton C D, et al. Candidate HIV type 1 multideterminant cluster peptide - P18MN vaccine constructs elicit type 1 helper T cells, cytotoxic T cells, and neutralizing antibody, all using the same adjuvant immunization [J]. *AIDS Res Hum Retroviruses*; 10. 1089/aid, 1996, 12(4): 259-272.
- [16] Correia - Pinto J F, Csaba N, Schiller J T, et al. Chitosan - Poly (I: C) - PADRE based nanoparticles as delivery vehicles for synthetic peptide vaccines [J]. *Vaccines (Basel)*, 2015, 3(3): 730-750.
- [17] Salem T Z, Seaborn C P, Turney C M, et al. The influence of SV40 polyA on gene expression of baculovirus expression vector systems [J]. *PLoS One*, 2015, 10(12): 0145019.
- [18] Li S W, He C, Ling Y, et al. Protective effect of pCI - neo vector - mediated DNA vaccine against *Chlamydomophila abortus* in mice [J]. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 2008, 52(2): 217-222.