

婴儿利什曼原虫 *Pepck* 和 *Gp63* 优势表位的 真核与原核重组载体的构建与表达*

张建辉¹, 王玉洁², 何金蕾¹, 李焕卿¹, 陈劲宇¹, 陈达丽¹, 陈建平^{1△}

1. 四川大学华西基础医学与法医学院 病原生物学系寄生虫教研室(成都 610041); 2. 四川大学华西公共卫生学院/
四川大学华西第四医院 预防医学系(成都 610041)

【摘要】目的 选取婴儿利什曼原虫的 *Pepck* 和 *Gp63* 的优势表位基因, 构建 *Pepck-Gp63* 二联优势表位的原核与真核重组表达载体并表达蛋白。**方法** 用计算机分析预测磷酸烯醇丙酮酸羧基酶(phosphoenolpyruvate carboxylase, PEPCK)的二级结构及HLA表位, 筛选出优势表位。根据本实验室之前对表面蛋白63(glycoprotein of 63×10³, GP63)用相同的方法分析而筛选的表位结果, 把 *Pepck* 和 *Gp63* 的优势表位基因通过重叠PCR和酶切连接反应构建出重组原核表达质粒 pET32a-*Pepck-Gp63*, 并诱导其在大肠杆菌中表达; 构建出重组真核表达质粒 pVAX1-*Pepck-Gp63*, 用脂质体转染法把真核质粒转染到 NIH3T3 细胞中表达。**结果** *Pepck* 存在多个优势表位; 测序结果表明二联优势表位基因 *Pepck-Gp63* 连接成功; PEPCK-GP63 蛋白在大肠杆菌中以包涵体形式表达并在 SDS-PAGE 电泳-考马斯亮蓝染色的结果中呈现相对分子质量为 74×10³ 大小的条带; 细胞免疫荧光中被 pVAX1-*Pepck-Gp63* 转染的 NIH3T3 细胞呈阳性。**结论** 成功构建重组原核表达质粒 pET32a-*Pepck-Gp63* 和重组真核表达质粒 pVAX1-*Pepck-Gp63*, 并分别在大肠杆菌和 NIH3T3 细胞中验证重组质粒能表达相应目的蛋白, 为后续的免疫策略研究提供初步实验基础。

【关键词】 婴儿利什曼原虫 表位疫苗 *Pepck* 基因 *Gp63* 基因

Construction and Expression of Eukaryotic and Prokaryotic Recombinant Vectors of *Pepck* and *Gp63* Dominant Epitopes of *Leishmania infantum* ZHANG Jian-hui¹, WANG Yu-jie², HE Jin-lei¹, LI Huan-qing¹, CHEN Jin-yu¹, CHEN Da-li¹, CHEN Jian-ping^{1△}. 1. Parasitology Teaching and Research Center, Department of Pathogenic Biology, West China School of Basic Medical Sciences and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Department of Preventive Medicine, West China School of Public Health and West China Fourth Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: jpchen007@163.com

【Abstract】Objective To construct eukaryotic and prokaryotic recombinant vectors containing *Pepck-Gp63* and to achieve protein expression by selecting the dominant epitope genes of *Pepck* and *Gp63* of *Leishmania infantum*. **Methods** The secondary structure and HLA epitopes of phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPCK) were predicted by in silico analysis, and the dominant epitopes were picked out. According to the analysis results of glycoprotein of 63×10³ (GP63) epitopes identified by the same method in our laboratory, the dominant epitope genes of *Pepck* and *Gp63* were used to construct pET32a-*Pepck-Gp63* and pVAX1-*Pepck-Gp63* by overlapping PCR and enzyme reaction. Then, for protein expression, the prokaryotic vectors were transfected into *E. coli* while the eukaryotic vectors were transfected into NIH3T3 cells by liposome transfection. **Results** There were multiple dominant epitopes in *Pepck* and there were *Pepck-Gp63* sequences in the polyclonal site of expression vector. The expression of *Pepck-Gp63* in *E. coli* appeared in inclusion form and led to 74 kDa band in SDS-PAGE. The immunofluorescence results of NIH3T3 cells transfected by pVAX1-*Pepck-Gp63* were positive. **Conclusion** The recombinant prokaryotic expression plasmids pET32a-*Pepck-Gp63* and eukaryotic expression plasmids pVAX1-*Pepck-Gp63* were successfully constructed, and it was shown that the recombinant plasmids were able to express the corresponding target proteins in *E. coli* and NIH3T3 cells, respectively, providing a preliminary experimental basis for the subsequent study of immunization strategies.

【Key words】 *Leishmania infantum* Epitope-based vaccine *Pepck* gene *Gp63* gene

利什曼病是以白蛉为传播媒介, 由利什曼原虫引起的感染性疾病。利什曼原虫以无鞭毛体的形式存在于白蛉体内, 通过白蛉的叮咬入侵人类或脊椎动物, 并以无鞭

毛体的形式寄生在宿主的巨噬细胞。利什曼病有3种形式: 内脏利什曼病(visceral Leishmaniasis, VL)、皮肤黏膜利什曼病和皮肤利什曼病。其中VL由杜氏利什曼复合体即杜氏利什曼原虫(*Leishmania donovani*, *L. donovani*)和婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*, *L. infantum*)或恰氏利什曼原虫(*Leishmania chagasi*, *L. chagasi*)引起, 其

* 国家自然科学基金面上项目(No. 81672048、No. 31572240和No. 31872959)和大学生创新训练计划项目(No. C2020108116)资助

△ 通信作者, E-mail: jpchen007@163.com

特征是不规则发热、体质量减轻、肝脾肿大和贫血。如果VL患者不及时治疗,可因为利什曼原虫入侵肝脾,破坏肝脾功能最终导致脏器衰竭而危及生命。据世界卫生组织不完全统计,全球每年新发VL病例5万至9万例,2017年95%以上的新增病例分布在孟加拉国、巴西、中国、埃塞俄比亚、印度、肯尼亚、尼泊尔、索马里、南苏丹和苏丹等^[1]。目前,利什曼病的治疗主要依靠五价锑剂药、巴龙霉素和两性霉素B等,但这些治疗可能会引起利什曼原虫的耐药性、药物过敏、脏器毒性和昂贵的成本等问题^[2-3]。

虽然利什曼原虫能进攻未激活的巨噬细胞,寄生于胞内以躲避机体的免疫攻击^[4],但是患者经治疗痊愈后,将长时间获得针对该病原体的特异性免疫力^[5-6]。因此,研发有效的疫苗来预防该病,是一项长远持久的防治战略。然而,目前还没有研发出一种有效的可用于人类的VL疫苗^[7]。本实验选取婴儿利什曼原虫的磷酸烯醇丙酮酸羧基酶(phosphoenolpyruvate carboxylase, PEPCK)和表面蛋白63(glycoprotein of 63×10³, GP63)为疫苗候选抗原,因为这两种全氨基酸序列蛋白已被作为疫苗,通过动物攻毒实验初步表明它们有效的免疫原性和保护性,但还未有研究分析它们的氨基酸序列,构建成PEPCK和GP63的表位疫苗。因此本实验通过蛋白质二级结构分析和HLA表位预测筛选出优势表位,再融合Pepck和Gp63优势表位基因,构建成相应的真核与原核表达载体,并表达二联蛋白,为后续探索DNA疫苗初次免疫、蛋白质疫苗加强免疫的免疫策略打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 普通PCR酶T3 Mix与引物均购自成都擎科公司,高保真PCR酶购自TaKaRa公司;限制性内切酶HindⅢ、BamHⅠ、T4连接酶与脂质体Lipofectamine 2000购自Thermo公司;抗His-tag的鼠源性抗体购自SAB公司,抗myc-tag的鼠源性抗体购自Cell Signaling Technology公司,山羊抗鼠HRP抗体和山羊抗鼠FITC抗体购自北京中杉金桥公司;DNA胶回收试剂盒与无内毒素质粒提取试剂盒购自TIANGEN公司。

1.1.2 菌株、细胞与质粒 基因克隆的大肠杆菌DH5α与蛋白表达的大肠杆菌BL21均购自成都擎科公司,小鼠胚胎纤维细胞NIH3T3购自广州吉妮欧公司;质粒pET32a(+)与pVAX1均购自成都宝信公司。

1.2 方法

1.2.1 PEPCK蛋白二级结构分析与HLA表位预测 从

NCBI获取Pepck基因序列(Gene ID:12 982 771),在软件DNAStar里的Protein模块中,运用Garnier Robson和Chou fasman方案预测二级结构的α螺旋、β折叠和β转角;运用Karplus-Schulz方案分析蛋白的柔韧性;运用Jameson-Wolf方案分析抗原指数。用计算机在线分析软件NetCTL 1.2 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetCTL/>)、NetMHC 4.0 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/>)、Rankpep(<http://imed.med.ucm.es/Tools/rankpep.html>)和SYFPEITHI(<http://www.syfpeithi.de/bin/mhcserver.dll/epitopeprediction.htm>)预测HLA-A2和HLA-A24表位,用Rankpep预测HLA-DR1表位。综合二级结构的分析和HLA表位分布的预测结果,最后选出PEPCK的优势表位氨基酸序列。

1.2.2 Pepck-Gp63融合基因的构建 本实验室之前已采用与1.2.1部分相同的方法分析了GP63。现在结合已分析的GP63二级结构和HLA的表位筛选的结果,把Pepck和Gp63的优势表位基因序列通过重叠PCR构建出融合基因片段Pepck-Gp63。此外,在Pepck和Gp63基因间设计一条linker序列,有利于保持每个蛋白的独立性,避免在不同组分连接位点处相互影响产生新的抗原表位。构建真核重组载体时,需要在目的基因5'段引物中加入Kozak序列以便翻译起始因子结合进一步介导翻译的起始,Kozak序列见表1引物下划线序列。引物如表1所示。整个重叠PCR的步骤分为三个步骤。第一步:以本实验室现存提供的*L. infantum*基因组为模板,用引物PPGF和PL、LG和PPGR在高保真PCR酶Mix作用下,通过PCR反应分别得到Pepck-linker和linker-Gp63。第二步:以胶纯化回收的Pepck-linker和linker-Gp63为模板,在不加引物的普通PCR酶Mix里,以94℃预变性5 min,5个循环的94℃变性30 s,55℃退火40 s,72℃延申25 s,通过以上PCR反应得到Pepck-Gp63。第三步:在第二步反应已经得到Pepck-Gp63的普通PCR酶Mix里,加入引物PPGF和PPGR,正常PCR反应30个循环得到原核重组载体构建所需的融合基因片段Pepck-Gp63;或加入引物EPGF和ERGR得到真核重组载体构建所需的融合基因片段EPepck-Gp63。

1.2.3 原核与真核重组表达载体的构建 将融合基因Pepck-Gp63、EPepck-Gp63、pET32a(+)和pVAX1各自用HindⅢ、BamHⅠ37℃水浴2 h进行双酶切,胶纯化回收。再把酶切后的Pepck-Gp63和EPepck-Gp63分别与酶切后的pET32a(+)和pVAX1用T4连接酶室温过夜连接,得到连接产物。把连接产物转染大肠杆菌DH5α,再把原核和真核重组表达载体转染的大肠杆菌DH5α分别涂板到氨苄青霉素和卡那霉素的LB平板,37℃培养16 h。次日

表 1 用于构建原核与真核重组质粒的*Pepck-Gp63*基因引物Table 1 Primers of *Pepck-Gp63* gene for prokaryotic and eukaryotic recombinant plasmid construction

Plasmid	Gene name	Primer sequences (5'-3')	Size/bp	Restriction enzymes
	Linker	GGT GGC GGT GGA AGC GGC GGT GGC GGA AGC GGC GGT GGC GGC AGC	45	
pET32a(+)	<i>Pepck</i> -linker	PPGF: CGC GGA TCC GCG GCG AAG ACT GGC CGC TCG CCG AGA G PL: GCT GCC GCC ACC GCC GCT TCC GCC ACC GCC GCT TCC ACC GCC ACC GCGCGTGTCTTGCAGATGGACTCG	840	<i>Bam</i> H I
pET32a(+)	Linker- <i>Gp63</i>	LG: GGT GGC GGT GGA AGC GGC GGT GGC GGA AGC GGC GGT GGC GGC AGC GAG AAG CGC GAC ATC CTG PPGR: CCC AAG CTT GGG TTA CAG ATC CTC TTC TGA GAT GAG TTT TTG TTC GCT GAA GTC CGC CTG GTA G	726	<i>Hind</i> III
pVAX1	E <i>Pepck</i> - <i>Gp63</i>	EPGF: CCC AAG CTT GGC <u>GCC ACC ATGGGG ATG GCG</u> AAG ACT GGC CGC TCG CCG AGA G EPGR: CGC GGA TCC GCG TTA CAG ATC CTC TTC TGA GAT GAG TTT TTG TTC GCT GAA GTC CGC CTG GTA G	1 594	<i>Hind</i> III <i>Bam</i> H I

The bold fonts are restriction enzyme sites. Italic sequences are myc-tag. The underlined bases are kozak sequences. PPGF and PL are *Pepck*-linker primers. LG and PPGR are linker-*Gp63* primers. PPGF and PPGR are *Pepck-Gp63* primers. EPGF and EPGR are E*Pepck-Gp63* primers. PPGR and EPGR have termination codon in 5' end.

挑取平板菌落进行菌落PCR,把凝胶电泳阳性结果的菌落送至成都擎科公司测序,再挑含有原核载体或真核载体的菌落,分别接种于10 mL氨苄青霉素和卡那霉素的LB液体培养基中进行细菌扩增,次日回收大肠杆菌提取质粒。

1.2.4 原核重组表达载体的蛋白诱导表达 将pET32a-*Pepck-Gp63*质粒转染大肠杆菌BL21中,经药物筛选、菌落PCR和DNA测序后,把成功转染的大肠杆菌BL21进行接种扩大培养到光密度(OD)值为0.6~0.8。再设置IPTG浓度对大肠杆菌BL21进行6 h的摇床培养以诱导表达。诱导表达后收集菌体先在液氮冻存40 min,再马上37℃水浴10 min,如此循环3次。把反复冻融后的菌体用300 W功率,工作3 s、间歇10 s,共13 min的参数进行超声裂菌,再离心收集上清与包涵体。包涵体用包涵体洗涤液洗去包涵体表面的膜蛋白、酶、DNA和其他有机物,再进尿素溶解用于镍柱纯化以及SDS-PAGE和Western blot鉴定。

1.2.5 原核表达蛋白纯化、SDS-PAGE电泳及Western blot检测蛋白表达 用8 mol/L尿素溶解包涵体,待完全溶解后取上清液过镍柱进行挂柱,纯化洗脱液设置100、200、300和400 mmol/L咪唑浓度进行洗脱蛋白。把5 μL上清液和未纯化尿素变性的包涵体及10 μL各种不同咪唑洗脱纯化的蛋白用于SDS-PAGE电泳,再考马斯亮蓝染色以检测表达情况。将300 mmol/L咪唑洗脱的蛋白先SDS-PAGE电泳,再进行转膜,封闭,用小鼠抗His-tag抗体为一抗,以1:7 000稀释度于4℃孵育过夜,洗涤,用1:6 000稀释的山羊抗鼠为二抗室温孵育1 h,洗涤并用ECL液曝光。

1.2.6 NIH3T3细胞免疫荧光 将pVAX1-*Pepck-Gp63*用脂质体Lipofectamine 2000包裹转染NIH3T3细胞,设为实验组;将生理盐水与脂质体Lipofectamine 2000混合转染NIH3T3细胞作为阴性对照组。转染6 h后置换培

养液继续培养48 h。免疫荧光检测重组质粒在细胞中的表达情况,用体积分数为4%多聚甲醛固定细胞,-20℃甲醇穿透,一抗为鼠源性抗myc-tag抗体(1:8 000)4℃孵育过夜,二抗为山羊抗鼠FITC的IgG(1:100)室温避光孵育2 h,DAPI染细胞核。结果用荧光显微镜观察。

2 结果

2.1 PEPCK蛋白二级结构分析与HLA表位预测

PEPCK的二级结构分析见图1。抗原指数高于1.7的峰大约集中在氨基酸序列的20~320位,这段氨基酸范围集中了不规则卷曲和β转角,含有不连续分布的α螺旋与β折叠,也具有较高的亲水性和表明可及性。PEPCK的HLA表位见表2。在被2个以上的表位预测工具确认的氨基酸序列中,30~300位和301~500位各有2个HLA-A24表位;30~300位和301~500位分别有6个和5个的HLA-A2表位。在Rankpep的HLA-DR1算法模块中,30~300位和301~500位分别有8个和7个HLA-DR1表位。综合以上结果,本研究选取PEPCK的39~307位氨基酸序列包含2个HLA-A24、6个HLA-A2和8个HLA-DR1,作为候选疫苗,并用以研究它的原核与真核重组载体的表达。

2.2 融合基因*Pepck-Gp63*与E*Pepck-Gp63*的重叠PCR扩增结果

基因*Pepck*-linker、linker-*Gp63*、*Pepck-Gp63*和E*Pepck-Gp63*的PCR产物经琼脂凝胶电泳的结果见图2,*Pepck*-linker为840 bp,linker-*Gp63*为726 bp,*Pepck-Gp63*为1 521 bp,E*Pepck-Gp63*为1 536 bp。

2.3 pET32a-*Pepck-Gp63*和pVAX1-*Pepck-Gp63*的鉴定结果

结果见图3。pET32a-*Pepck-Gp63*的PCR产物大小为1 521 bp,pVAX1-*Pepck-Gp63*的PCR产物大小为

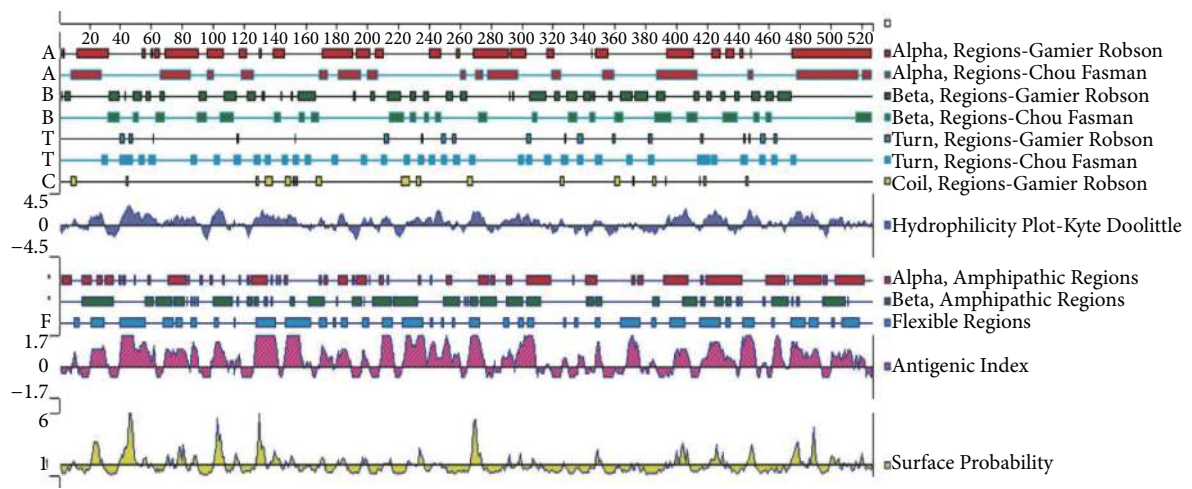


图 1 PEPCK的二级结构分析

Fig 1 Secondary structure analysis of PEPCK

表 2 PEPCK的HLA-A24、HLA-A2 和HLA-DR1识别表位预测

Table 2 HLA-A24, HLA-A2 and HLA-DR1 epitope prediction of PEPCK

MHC supertype	SYFPEITHI		Rankpep		NetCTL 1.2 server		NetMHC 4.0 server	
HLA-A24	103	<u>RYRLKVRVI</u>	103	<u>RYRLKVRVI</u>	103	<u>RYRLKVRVI</u>	103	<u>RYRLKVRVI</u>
	453	<u>VYPGWGLQI</u>	386	<u>PFLVRHATF</u>	160	<u>STTSVSLNF</u>	160	<u>STTSVSLNF</u>
	386	<u>PFLVRHATF</u>			386	<u>PFLVRHATF</u>	386	<u>PFLVRHATF</u>
					453	<u>VYPGWGLQI</u>	453	<u>VYPGWGLQI</u>
HLA-A2	237	<u>MLIGDDEHV</u>	118	<u>ALFMYNMLI</u>	118	<u>ALFMYNMLI</u>	118	<u>ALFMYNMLI</u>
	183	<u>EMKKGILTV</u>	187	<u>GILTVMFEL</u>	150	<u>SADPSVPGV</u>	187	<u>GILTVMFEL</u>
	187	<u>GILTVMFEL</u>	287	<u>TLDKVTHEI</u>	187	<u>GILTVMFEL</u>	237	<u>MLIGDDEHV</u>
	287	<u>TLDKVTHEI</u>	183	<u>EMKKGILTV</u>	237	<u>MLIGDDEHV</u>	287	<u>TLDKVTHEI</u>
	118	<u>ALFMYNMLI</u>	237	<u>MLIGDDEHV</u>	287	<u>TLDKVTHEI</u>		
	150	<u>SADPSVPGV</u>						
HLA-DR1			394	FYGEQLAKK				
			424	RGAKRMPLK				
			355	WFIMGYTAN				
			61	DWGSVNVKL				
			402	KMTEHNARV				
			103	RYRLKVRVI				
			258	CYAKAIGLN				
			354	FWFIMGYTA				
			456	GWGLQIPRG				
			219	FFGLSGTGK				
			261	KAIGLNPKT				
			195	LMPRQGHLC				

Sequences determined by more than two HLA epitope prediction tools are underlined.

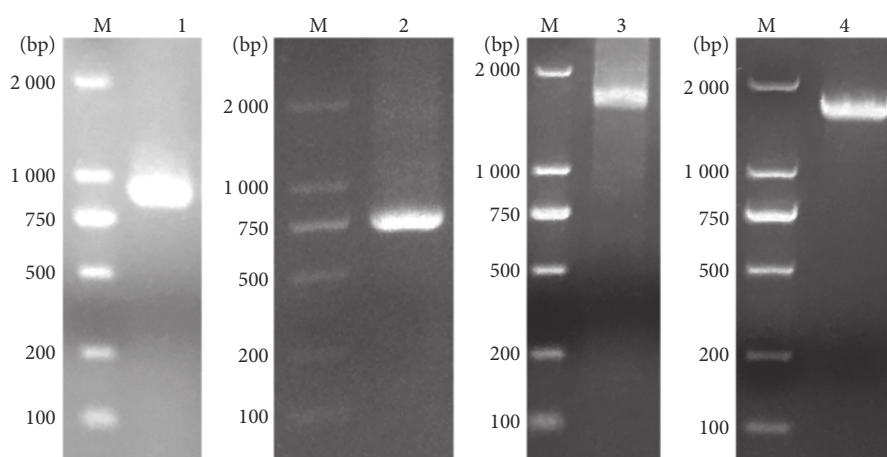


图 2 *Pepck*-linker、linker-*Gp63*、*Pepck*-*Gp63*和*EPepck*-*Gp63*基因的琼脂凝胶电泳

Fig 2 The PCR agar gel electrophoresis of *Pepck*-linker, linker-*Gp63*, *Pepck*-*Gp63* and *EPepck*-*Gp63* genes

M: DNA marker DL2000; 1: *Pepck*-linker (840 bp); 2: Linker-*Gp63* (726 bp); 3: *Pepck*-*Gp63* (1 521 bp); 4: *EPepck*-*Gp63* (1 536 bp).

1 536 bp。将原核与真核重组载体进行测序,其结果在NCBI的Blast工具进行比对,与婴儿利什曼原虫的*Pepck*和*Gp63*基因序列的符合率均达98%。综合以上结果,表明重组质粒构建成功。

2.4 SDS-PAGE鉴定原核表达、蛋白纯化及Western blot检测重组蛋白的表达

SDS-PAGE鉴定原核表达与蛋白纯化结果见图4。pET32a-*Pepck*-*Gp63*在大肠杆菌BL21里表达的蛋白主要存在于包涵体中(相对分子质量为 74×10^3),与泳道2相符合。此外发现泳道5和6洗脱蛋白较多,即在不同浓度的咪唑洗脱挂镍柱的蛋白质时,300 mmol/L和400 mmol/L咪唑对PEPCK-GP63重组蛋白洗脱效果好。Western blot结果见图5,泳道1在相对分子质量 74×10^3 处存在条带,与PEPCK-GP63重组蛋白相对分子质量相符。

2.5 pVAX1-*Pepck*-*Gp63*转染NIH3T3细胞的免疫荧光

结果见图6。细胞核被DAPI染成蓝色荧光,转染组

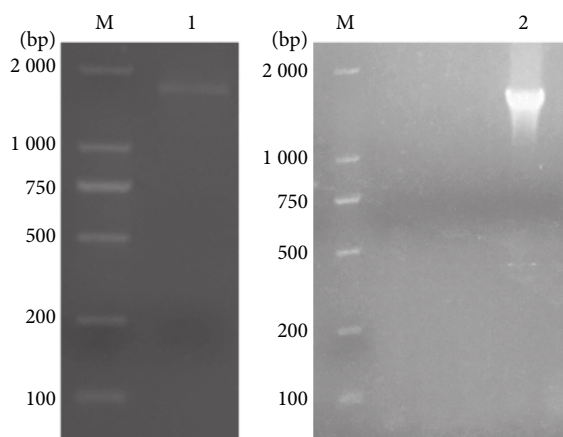


图 3 pET32a-*Pepck*-*Gp63*和pVAX1-*Pepck*-*Gp63*的菌落PCR琼脂凝胶电泳

Fig 3 The colony PCR agar gel electrophoresis of pET32a-*Pepck*-*Gp63* and pVAX1-*Pepck*-*Gp63*

M: DNA marker DL2000; 1: The PCR production (1 521 bp) of DH5α transfected by pET32a-*Pepck*-*Gp63*; 2: The PCR production (1 536 bp) of DH5α transfected by pVAX1-*Pepck*-*Gp63*.

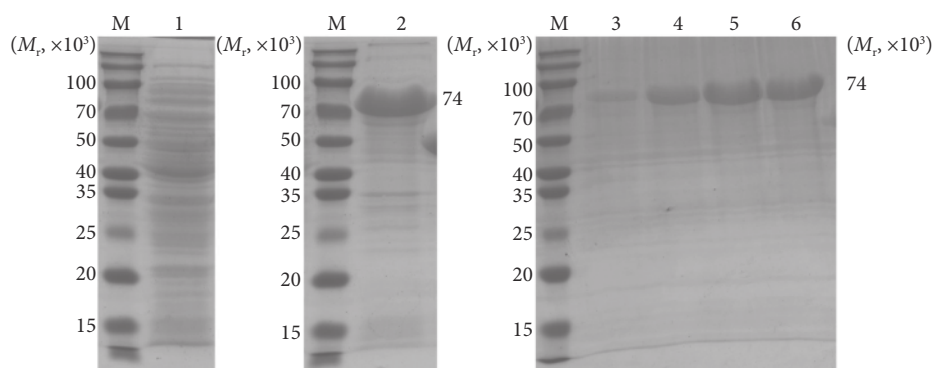


图 4 SDS-PAGE鉴定原核表达的上清、包涵体和经不同浓度咪唑洗脱纯化的蛋白

Fig 4 SDS-PAGE of prokaryotic expression supernatant, inclusion body and protein eluted and purified by different concentrations of imidazole

M: Protein marker; 1: Prokaryotic expression supernatant; 2: Inclusion body; 3-6: Purified protein eluted by 100, 200, 300, 400 mmol/L imidazole, respectively.

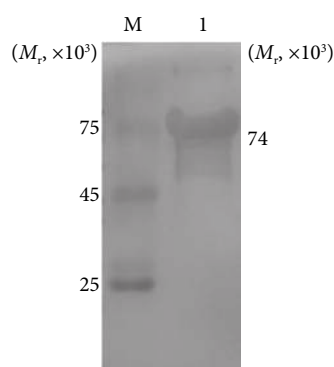


图5 纯化后PEPCK-GP63重组蛋白的Western blot

Fig 5 Western blot of PEPCK-GP63 recombinant protein after purification

M: Protein marker; 1: PEPCK-GP63 recombinant protein purified by affinity chromatography.

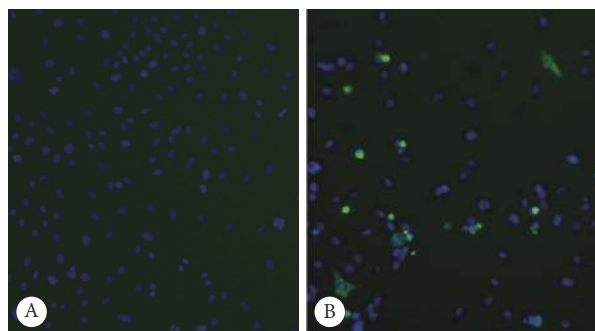


图6 pVAX1-*Pepck*-*Gp63*转染NIH3T3细胞的免疫荧光。×20

Fig 6 Immunofluorescence of NIH3T3 cells transfected with pVAX1-*Pepck*-*Gp63*. ×20

A: NIH3T3 cells without any transfection; B: NIH3T3 cells were transfected with pVAX1-*Pepck*-*Gp63*.

细胞核周围有绿色荧光, 为阳性; 未转染的对照组细胞只有细胞核被DAPI染成蓝色荧光, 为阴性, 综合以上结果表明pVAX1-*Pepck*-*Gp63*表达蛋白成功。

3 讨论

PEPCK是一种参与糖异生的蛋白酶, 在所有利什曼原虫的前鞭毛体和无鞭毛体状态均有表达。它的基因序列保守, 可刺激增殖特异性CD4⁺ T细胞达到全CD4⁺ T细胞的20%, 并且产生高水平的白细胞介素(interleukin, IL)-2、干扰素-γ(interferon-γ, IFN-γ)和肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor-α, TNF-α)等细胞免疫因子^[8]。此外由硕大利什曼原虫为基础研制的PEPCK蛋白疫苗可以在硕大利什曼原虫、杜氏利什曼原虫和墨西哥利什曼原虫的感染动物模型发挥保护性作用^[8]。LOUIS等^[9]用编码PEPCK的DNA疫苗皮内免疫小鼠并且产生特异性的T细胞, 使得小鼠具有抵抗利什曼原虫感染的保护能力。

GP63是一种相对分子质量为63×10³的保守蛋白糖蛋白, 在利什曼原虫前鞭毛体表面高度表达。它也是帮助利什曼原虫转移到巨噬细胞的毒力因子, 被认为是患者血清中抗体识别的重要抗原^[10-11]。研究表明, GP63作为DNA疫苗或重组蛋白疫苗与佐剂联合使用, 可引起较强的Th1应答和良好的免疫保护作用^[11]。所以本研究将PEPCK和GP63作为疫苗研究的候选蛋白。

表位是决定抗原特异性的特殊化学基团, 是免疫细胞识别的最小单位。多表位疫苗含有多种T细胞和B细胞特异性识别的表位, 可有效诱导较强的细胞免疫和体液免疫反应, 减少无关抗原引起的变态反应^[12]。研究多表位疫苗的最关键步骤是有效表位的筛选, 本研究中我们通过计算机表位预测方法, 分析PEPCK和GP63二级结构特征和HLA表位预测以筛选出优势表位。蛋白质二级结构的α螺旋和β折叠具有规则稳定的结构, 不易变形, 形成抗原概率小^[13]; β转角多为凸在蛋白表面, 有利于受体的识别, 较易形成表位; 另外二级结构的柔韧性可以预测到主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)-II类分子的表位^[14]。人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)-A2和HLA-A24分子属于人类MHC-I, 向CD8⁺ T细胞提呈抗原, 在人类健康维持中发挥重要作用。HLA-A2在包括亚洲人和高加索人在内的不同种族中的表达频率很高, 并且HLA-A24也广泛存在于人类, 尤其是亚洲人群中^[15]。HLA-DR是人类MHC-II中表达最多的分子, 它将微生物肽加工呈现在专业抗原呈递细胞的表面, 用于CD4 T细胞的激活^[15]。HLA-DR1分子可以结合其他DR分子也识别的肽, 包括DR4和DR7^[15-16]。HE等^[15]已利用二级结构分析和HLA表位预测的方法, 构建出利什曼原虫动基体膜蛋白11与钙调磷酸酶催化亚基A2的二联优势表位疫苗, 并且在动物实验中验证了其良好的免疫原性和免疫保护性。根据二级结构分析和HLA表位预测的结果, 本研究选取的PEPCK氨基酸序列可能具有较强的免疫原性, 适用于疫苗的研究。

本研究拟构建出基于PEPCK-GP63多表位的DNA疫苗和蛋白质疫苗。DNA疫苗所使用的真核表达载体是在pcDNA3.1载体的基础上改建而成的pVAX1, 一种被美国认证为唯一能用于人体疫苗研究的载体^[17]。pVAX1的抗卡那霉素基因替代了抗氨卞青霉素基因, 确保在诱导环境下细菌抗药性方面更加安全。此外pVAX1含有强的启动子CMV, 有牛生长激素基因的转录终止序列和多聚腺苷酸尾, 使得mRNA高效转录而且稳定存在, 有利于目的基因的高效表达。但是商业化的pVAX1中没有Kozak

序列,需要在所插入的目的基因5'端加入以提高真核表达效率。Kozak(GCCA/GCCAUGG)序列相当于原核质粒SD序列,存在于AUG两侧,通过与翻译起始因子结合以介导mRNA的翻译在真核蛋白表达中发挥着重要的作用。Kozak在胰岛素前体表达实验中(以AUG的A为+1,上游C为-1,下游U为+2),序列-3的A/G可以提高蛋白表达效率约20倍;在-3为嘌呤碱基时,Kozak的+4序列为G时可以上调荧光蛋白的表达效率^[18]。融合蛋白是将不同的蛋白结构域融合为一个分子的蛋白,广泛应用于科研和生产,如重组疫苗研究、蛋白的纯化、生物分子呈现、药物载体以及酶工程等^[19]。当不同的蛋白结构域直接连接合成一分子单位时,它们间将很可能相互影响空间的折叠或者被降解,而用linker序列来连接它们不仅能解决以上问题,还可能提高蛋白表达^[20]。Linker序列分为结构域间距离可放大缩小的柔性linker、结构域间保持不变距离的 α -螺旋刚性linker和体内可被凝血酶切割断裂的可剪切linker。在重组疫苗的研究中,柔性linker经常以甘氨酸(glycine, Gly)和丝氨酸(serine, Ser)按(GGGGS)₃方式进行组合,并且用于连接不同的抗原蛋白^[21-23]。因此,本研究通过重叠PCR成功利用柔性linker(GGGGS)₃将Pepck和Gp63基因串联在一起,最终表达出相应的重组蛋白。

疫苗的传统加强免疫方法无非就是同样的疫苗多次免疫,比如白喉、破伤风和百日咳疫苗^[24]。如今有研究表明同种抗原以不同递送方式进行增强免疫可以更好的发挥出疫苗的免疫保护性,KARDANI等^[25]认为先用DNA疫苗免疫然后用蛋白疫苗加强免疫方式就是最好的免疫策略。本研究中,我们成功构建了真核表达载体pVAX1-Pepck-Gp63和原核表达载体pET32a-Pepck-Gp63,并且真核载体成功在NIH3T3细胞中表达,原核载体在大肠杆菌BL21中表达重组蛋白并纯化。pVAX1-Pepck-Gp63和重组纯化的蛋白PEPCK-GP63分别可作为抗利什曼原虫的多表位DNA疫苗和蛋白疫苗,为多表位DNA疫苗初次免疫和蛋白疫苗加强免疫的动物实验打下基础。

参 考 文 献

- [1] World Health Organization. Leishmaniasis. (2019-03-14)[2019-08-19]. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>.
- [2] RAJASEKARAN R, CHEN Y P. Potential therapeutic targets and the role of technology in developing novel antileishmanial drugs. *Drug Discov Today*, 2015, 20(8): 958-968.
- [3] JAIN K, JAIN N K. Vaccines for visceral leishmaniasis: a review. *J Immunol Methods*, 2015, 422: 1-12.
- [4] GUPTA P, SRIVASTAV S, SAHA S, et al. *Leishmania donovani* inhibits macrophage apoptosis and pro-inflammatory response through AKT-mediated regulation of beta-catenin and FOXO-1. *Cell Death Differ*, 2016, 23(11): 1815-1826.
- [5] TASLIMI Y, ZAHEDIFARD F, RAFATI S. Leishmaniasis and various immunotherapeutic approaches. *Parasitology*, 2018, 145(4): 497-507.
- [6] ALVAR J, CROFT S L, KAYE P, et al. Case study for a vaccine against leishmaniasis. *Vaccine*, 2013, 31(Suppl 2): B244-B249.
- [7] MASOUD G, RAMIN F. Leishmaniasis in humans: drug or vaccine therapy? *Drug Des Devel Ther*, 2018, 12: 25-40.
- [8] MOU Z, LI J, BOUSSOFFARA T, et al. Identification of broadly conserved cross-species protective *Leishmania* antigen and its responding CD4⁺ T cells. *Sci Transl Med*, 2015, 7(310): 310ra167[2020-01-23]. <https://stm.sciencemag.org/content/7/310/310ra167.full>. doi:10.1126/scitranslmed.aac5477
- [9] LOUIS L, CLARK M, WISE M C, et al. Intradermal synthetic DNA vaccination generates *Leishmania*-specific T cells in the skin and protection against *Leishmania major*. *Infect Immun*, 2019, 87(8): pii: e00227-19[2020-01-23]. <https://iai.asm.org/content/87/8/e00227-19.long>. doi: 10.1128/IAI.00227-19.
- [10] ATAYDE V D, HASSANI K, DA SILVA LIRA FILHO A, et al. *Leishmania* exosomes and other virulence factors: impact on innate immune response and macrophage functions. *Cell Immunol*, 2016, 309: 7-18.
- [11] ZHANG J, HE J, LI J, et al. The immunogenicity and protective immunity of multi-epitopes DNA prime-protein boost vaccines encoding Amastin-Kmp-11, Kmp11-Gp63 and Amastin-Gp63 against visceral Leishmaniasis. *PLoS One*, 2020, 15(3): e0230381[2020-05-17]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230381>.
- [12] ZHANG L. Multi-epitope vaccines: a promising strategy against tumors and viral infections. *Cell Mol Immunol*, 2018, 15(2): 182-184.
- [13] SONG Q, ZHANG C D, WU X H. Therapeutic cancer vaccines: from initial findings to prospects. *Immunol Lett*, 2018, 196: 11-21.
- [14] 何金蕾, 彭冉, 张俊荣, 等. 嗜肺军团菌mip/flaA二联优势抗原表位基因融合表达载体的构建及表达. *四川大学学报(医学版)*, 2016, 47(1): 1-6.
- [15] HE J, HUANG F, ZHANG J, et al. DNA prime-protein boost vaccine encoding HLA-A2, HLA-A24 and HLA-DR1 restricted epitopes of CaNA2 against visceral Leishmaniasis. *Immunology*, 2019, 156(1): 94-108.
- [16] POS W, SETHI D K, CALL M J, et al. Crystal structure of the HLA-DM-HLA-DR1 complex defines mechanisms for rapid peptide selection. *Cell*, 2012, 151(7): 1557-1568.
- [17] MASAVULI M G, WIJESUNDARA D K, UNDERWOOD A, et al. A hepatitis C virus DNA vaccine encoding a secreted, oligomerized form of envelope proteins is highly immunogenic and elicits neutralizing antibodies in vaccinated mice. *Front Immunol*, 2019, 10: 1145[2020-01-23]. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01145>.
- [18] 杜明梅, 叶玲, 刘建伟, 等. Kozak序列+4G提高绿色荧光蛋白在HEK293细胞中的表达. *生物工程学报*, 2008, 24(3): 491-494.

- [19] SHAMRIZ S, OFOGHI H, MOAZAMI N. Effect of linker length and residues on the structure and stability of a fusion protein with malaria vaccine application. *Comput Biol Med*, 2016, 76: 24–29.
- [20] CHEN X, ZARO J L, SHEN W C. Fusion protein linkers: property, design and functionality. *Adv Drug Deliv Rev*, 2013, 65(10): 1357–1369.
- [21] HE J, ZHANG J, HE Y, *et al.* Construction of recombinant Mip-FlaA dominant epitope vaccine against *Legionella pneumophila* and evaluation of the immunogenicity and protective immunity. *Immunol Res*, 2016, 64(1): 272–279.
- [22] PATRA P, BHATTACHARYA M, SHARMA A R, *et al.* Identification and design of a next-generation multi epitopes bases peptide vaccine candidate against prostate cancer: an in silico approach. *Cell Biochem Biophys*, 2020, 78(4): 495–509.
- [23] WEN X, TONG X, WANG M, *et al.* Protective immunity following vaccination with a recombinant multiple-epitope protein of bovine herpesvirus type I in a rabbit model. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2020, 104(7): 3011–3023.
- [24] JUNG S Y, KANG K W, LEE E Y, *et al.* Heterologous prime-boost vaccination with adenoviral vector and protein nanoparticles induces both Th1 and Th2 responses against Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Vaccine*, 2018, 36(24): 3468–3476.
- [25] KARDANI K, BOLHASSANI A, SHAHBAZI S. Prime-boost vaccine strategy against viral infections: mechanisms and benefits. *Vaccine*, 2016, 34(4): 413–423.

(2020 – 02 – 02收稿, 2020 – 05 – 26修回)

编辑 余琳