

猪流产嗜性衣原体 omp-1 基因的重组质粒与重组蛋白免疫组合效果

杨琪¹ 李建平² 杨建民¹ 李军¹ 杨利¹ 何诚¹

(1. 中国农业大学 动物医学院, 北京 100094; 2. 中央民族大学 体育系, 北京 100086)

摘要 为增强猪流产嗜性衣原体 *omp-1* 基因的免疫措施进而筛选出高效新型分子疫苗, 本实验将猪流产嗜性衣原体 *omp-1* 基因克隆入 pcDNA3.1 (+) 载体构建 DNA 疫苗, 初次和二次免疫分别以核酸/重组蛋白 (DNA/r-MOMP)、重组蛋白/核酸 (r-MOMP/DNA)、重组蛋白 + 核酸/重组蛋白 + 核酸 (r-MOMP + DNA/r-MOMP + DNA)、核酸 + 核酸 (DNA/DNA) 和重组蛋白 + 重组蛋白 (r-MOMP/r-MOMP) 5 种组合接种 BALB/c 小鼠, 同时以载体和弱毒为对照。二次免疫后 14 d 以 ELISA 和 T 淋巴细胞增殖实验检测特异性体液免疫和细胞免疫应答水平。结果显示核酸与重组蛋白同时免疫可以诱导产生较高的体液免疫和细胞免疫水平, 而 DNA/r-MOMP 组合的细胞免疫和体液免疫水平高于 r-MOMP/DNA 组合, 单独免疫 DNA 组或 r-MOMP 都不能获得好的细胞和体液免疫。

关键词 猪流产嗜性衣原体; *omp-1* 基因; 重组质粒; 重组蛋白; 免疫; 小鼠

中图分类号 S 852.76

文章编号 1007-4333(2007)03-0009-05

文献标识码 A

Evaluation of immune response of different combinations of swine *Chlamydomphila abortus omp-1* and its recombinant protein

Yang Qi¹, Li Jianping², Yang Jianmin¹, Li Jun¹, Yang Li¹, He Cheng¹

(1. College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

2. Sport Faculty, Central University for Nationalities, Beijing 100086, China)

Abstract The *omp-1* DNA is known to be a strong immunogen and codes the 40 ku major outer-membrane protein (MOMP), an immunodominant antigen of the Chlamydiaceae surface membrane. A reliable and efficient molecular vaccine against swine *Chlamydomphila abortus* Cp. *abortus* can be developed if a new approach for increasing immune response can be found. In the current study, the *omp-1* of CP12 strain of Cp. *abortus* was amplified by PCR and cloned into pcDNA3.1 (+) to construct recombinant eukaryotic expression vector. BALB/c mice were randomly divided into five groups and inoculated twice weekly with different combinations such as DNA/r-MOMP, r-MOMP/DNA, DNA-r-MOMP, DAN/DNA and r-MOMP/r-MOMP. Two weeks post inoculation, the antibodies against MOMP were assessed by ELISA, and proliferation of T lymphocytes was monitored by Lymphocyte Transformation Test. Results showed that significantly higher immunoreactions could be induced in mice inoculated simultaneously with DNA and r-MOMP. Mice group primed with DNA and then boosted with r-MOMP exhibited higher level antibody and lymphocytes stimulation index as than that inoculated with r-MOMP, then with DNA. Reliable and efficient immunoreactions cannot be achieved either by inoculation with naked DNA or with recombinant MOMP. Nevertheless, a better immune response can be obtained if mice are administered with both DNA and its corresponding recombinant protein simultaneously.

Key words swine *Chlamydomphila abortus*; *omp-1* gene; recombinant plasmid; recombinant protein; immunization; mice

猪流产嗜性衣原体是一种与革兰氏阴性细菌, 产嗜性衣原体所引发的动物和人的感染, 导致了在许多传统分类法中属于鹦鹉热衣原体血清学型。流 多国家的畜牧业蒙受巨大经济损失^[1]。几十年来,

收稿日期: 2006-07-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30370070); 北京市自然科学基金资助项目 (6052014)

作者简介: 杨琪, 硕士研究生; 何诚, 副教授, 通讯作者, 主要从事家禽疫病防治研究, E-mail: hecheng@cau.edu.cn

一直使用甲醛灭活疫苗和温度诱变的弱毒疫苗进行预防接种,可以控制流产衣原体的流行。近年来在欧洲发现使用这种疫苗接种的畜群中又发生了衣原体感染^[2-3],因此,传统疫苗已经不能控制家畜流产衣原体,促使人们去探索开发更有效、更安全的新疫苗和新途径去控制该疾病。

猪流产嗜性衣原体 *omp-1* 基因所编码的 MOMP 蛋白 (major outer membrane protein, MOMP) 是衣原体重要的膜抗原之一,分子质量为 40 ku,占衣原体外膜蛋白的 60% 以上,具有重要的生物学功能,其保护性抗原的特点使 MOMP 成为衣原体外膜蛋白复合物中的研究热点^[4-5]。越来越多研究报道证明提纯主要外膜蛋白和重组主要外膜蛋白 (recombinant MOMP, r-MOMP) 都可诱发绵羊产生特异性抗体^[6],而利用编码 MOMP 蛋白的 *omp-1* 基因免疫火鸡具有模拟细胞抗原的递呈过程,诱发特异性 Th1 型细胞免疫应答,可以抵抗衣原体的攻击^[7]。因此,根据 r-MOMP 和 *omp-1* 基因不同免疫应答特点,以不同组合免疫动物达到诱导高水平的细胞免疫和体液免疫成为疫苗研究的新思路。本实验旨在扩增和构建猪流产嗜性衣原体的 *omp-1* 基因的真核表达载体,与 r-MOMP 以不同组合免疫小鼠,探讨其在诱导衣原体特异性体液免疫和细胞免疫应答,从而探索预防猪流产嗜性衣原体性感染的新途径。

1 材料与方法

1.1 主要材料及试剂

猪流产嗜性衣原体 Cp/12 株,其感染的鸡胚卵黄囊膜由军事医学科学院微生物流行病学研究所馈赠,本实验室保存。

BALB/c 小鼠,18~22 g 健康雄性 48 只,购自北京大学医学部实验动物中心。

r-MOMP,溶于 pH8.5 的 Tris-HCl 溶液,本实验室并纯化保存,质量浓度为 245 μg/mL^[8]。

Enzovax 嗜流产衣原体弱毒苗 1B 株,购自 Intervet 公司,批号为 041143。

pcDNA3.1(+) 真核表达载体,购自 Invitrogen 公司,本室保存。

Ex-Taq DNA 聚合酶,含反应用缓冲液、dNTP 混合液, *EcoR*, *Xho* 限制性内切酶 (含缓冲液); DNA Ladder 2000、15000, 6 × DNA Loading Buffer;

DNA 连接试剂盒,均购自大连 TaKaRa 宝生物工程有限公司。琼脂糖和细菌 DNA 提取试剂盒,购自北京天为时代科技有限公司。DNA 片段回收试剂盒,购自北京鼎国生物技术有限公司。Costar96 孔细胞培养板, Costar 96 孔酶标板,购自北京欣经科生物技术公司。IMAGENTM CHLAM YDIA 间接荧光试剂盒,购自 DakoCytomation, U.K.

1.2 方法

1.2.1 *omp-1* 基因的扩增 将感染的鸡胚卵黄囊膜加 PBS(pH7.4) 于冰浴中研磨成 20 g/100 mL 的悬液;取出 100 μL, 4℃, 3 000 r/min 离心 10 min, 弃沉淀保留上清即为衣原体菌液,将上清于 4℃, 14 000 r/min 离心 20 min, 弃上清留沉淀;按细菌 DNA 提取试剂盒的操作步骤提取其 DNA;根据 GenBank 中登录的序列设计引物 P1: 5'-CG GAAT TC A TGA AAA AAC TCT TGA AAT CGG3', P2: 5'-CCG CTC GAG CGG TTA GAA TCT GAA TTG AGC ATT-3', 下划线处分别为 *EcoR*, *Xho* 限制性内切酶位点;以提取的衣原体 DNA 为模板, P1, P2 为引物,通过常规 PCR 扩增, 55℃;然后以 1 g/100 L 琼脂糖电泳观察并回收片段。

1.2.2 重组真核表达载体的构建和鉴定 对回收的 *omp-1* 基因和 pcDNA3.1(+) 质粒建立了 20 μL 的酶切体系,反应结束后回收片段并按 DNA 连接试剂盒的操作程序连接 *omp-1* 基因和 pcDNA3.1(+) 载体;转化大肠杆菌 DH5 后,摇菌,小提质粒,以 PCR 和酶切鉴定重组质粒并送阳性克隆测序。使用细胞培养液 (含 0.04 mmol/L 碳酸氢钠、1 mmol/L-谷氨酸、10% (体积分数) 胎牛血清) 培养 COS7 细胞 (本室保存),在细胞培养板加入适量的二乙氨基葡聚糖 (DEAE-dextran), 37℃ 5% (体积分数) 的 CO₂, 转染 48 h 后收集细胞培养物,使用间接荧光试剂盒检测转染和未转染成功的 COS7 细胞^[9]。按分子克隆中的碱裂解法进行大量提取,溶于 0.5 g/100 L 的左旋咪唑液中。

1.2.3 实验动物的分组与免疫 具体情况见表 1 所示。

1.2.4 抗体效价的检测^[10] 第二次免疫后的第 14 天采血分离血清,采用 iELISA 方法,以 r-MOMP 包被酶标板 (2 μg/孔), 4℃ 过夜,一抗、二抗的稀释度分别为 1:100 和 1:500,按常规方法洗板,显色后

表 1 实验小鼠的免疫程序

Table 1 Immunization strategy in experimental mice

处 理	小鼠数	首次免疫抗原	剂量/(μg /只)	二次免疫抗原	剂量/(μg /只)
1	6	pcDNA3.1- <i>omp-1</i>	100	pcDNA3.1- <i>omp-1</i>	100
2	6	r-MOMP	10	r-MOMP	10
3	6	pcDNA3.1- <i>omp-1</i>	100	r-MOMP	10
4	6	r-MOMP	10	pcDNA3.1- <i>omp-1</i>	100
5	6	pcDNA3.1- <i>omp-1</i> + r-MOMP	100 10	pcDNA3.1- <i>omp-1</i> + r-MOMP	100 10
对照 1(弱毒苗)	6	弱毒疫苗	10	弱毒疫苗	10
对照 2(质粒)	6	空质粒	100	空质粒	100
对照 3(佐剂)	6	弗氏佐剂	100(μL /只)	弗氏佐剂	100(μL /只)

注:2次免疫间隔7d,DNA免疫采取大腿肌肉注射,重组蛋白用弗氏佐剂乳化后多点皮下注射。

Table 1 indicates that mice were vaccinated 7 days later between the prime and booster. DNA vaccines were administrated intramuscularly into leg muscle while r-MOMP emulsified in Freund's incomplete adjuvants were injected into mice by different body sites.

于酶标仪中 450 nm 波长下读取其 OD 值;结果判定中,以样品血清 $D_{450\text{ nm}}$ /阴性对照 $D_{450\text{ nm}}$ 平均值 2 判为阳性,此时血清的最高稀释倍数为该血清的效价。

1.2.5 T 淋巴细胞增殖能力的检测^[10] 第二次免疫后的第 14 天各组处死 3 只小鼠,取脾分离淋巴细胞,调整细胞数至 10^6 数量级于 96 孔细胞培养板中(100 μL /孔),每只小鼠设 4 个处理,包括培养液空白对照、BSA 阴性对照、ConA 刺激阳性对照和 r-MOMP 刺激,各刺激物的质量浓度均为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$,每个处理设 3 个重复;37 $^{\circ}\text{C}$ 二氧化碳培养箱中培养 48 h 后,每孔加入 MTT 溶液(5 mg/ mL) 20 μL ,继续培养 4 h;加入 150 μL 预热到 37 $^{\circ}\text{C}$ 的二甲基亚砜(DMSO),充分振荡混匀;用酶标仪测定波长 570 nm 的 OD 值,以 630 nm 波长处的 OD 值为本底值;结果判定中,以刺激指数(SI)判定淋巴细胞转化程度($\text{SI} = (\text{样品孔 OD 值} - \text{空白对照孔 OD 值}) / (\text{阴性对照孔 OD 值} - \text{空白对照孔 OD 值})$)。

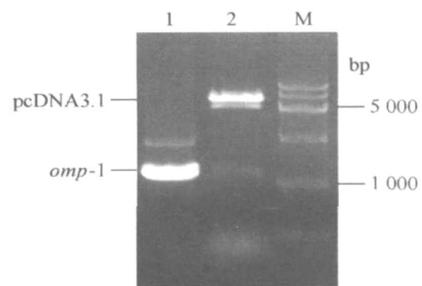
2 结 果

2.1 *omp-1* 基因的扩增结果

根据 GenBank 中报道的序列,设计了引物 P1/P2,进行 PCR 扩增,经琼脂糖凝胶电泳后扩增出约 1 100 bp 的特异性的片段,与 GenBank 中收录的序列大小基本一致(图 1)。

2.2 重组真核表达载体的构建和鉴定

通过酶切,PCR 和测序鉴定证明 *omp-1* 基因和 pcDNA3.1(+)载体正确连接。间接荧光染色显示大量 r-MOMP 表达在 COS7 细胞浆内,对照组未见



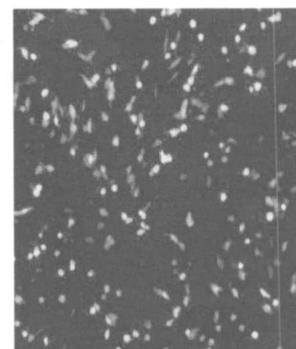
1 为质粒 PCR; 2 为酶切鉴定; M 为 Marker 15 000

图 1 pcDNA3.1-*omp-1* 重组质粒的 PCR 与酶切鉴定

Fig. 1 Identification of pcDNA3.1-*omp-1* with PCR and enzyme digestion

The fig. 1 illustrated *omp-1* gene was cloned successfully into pcDNA3.1 vector and identified by enzyme digest

荧光反应(图 2)。大量提取质粒后,溶于 0.5 g/100 L)左旋咪唑中,紫外分光光度计测定其质量浓度为 8.24 mg/ mL 。



转染阳性细胞,可见蓝绿色荧光反应

图 2 免疫荧光检测重组质料在 COS7 细胞中的表达

Fig. 2 Recombinant plasmid in transfected COS7 cells by immunofluorescent staining

The Fig. 2 indicated the recombinant plasmid expressed in COS7 cell culture monolayers and reacted against the specific antibody of *Chlamydomonas psittaci* in microimmunofluorescence test.

2.3 不同免疫组合免疫小鼠后的抗体效价

由表2所示,处理2、3、4和5的血清抗体效价在2次免疫后均达到1 12 800以上,其中处理4与处理2、3、5在各血清稀释浓度上的OD值比较均差

异显著($P < 0.05$),处理3与处理2、5相比差异不显著($P > 0.05$),处理2与处理5相比差异不显著($P > 0.05$)。

表2 免疫小鼠特异性 MOMP 抗体的检测结果

Table 2 MOMP-specific antibody titres post inoculation in mice serum

抗体稀释度	处理 1	处理 2	处理 3	处理 4	处理 5	对照 1	对照 2	对照 3
1 100	0.482	2.322	2.461	2.322	2.566	0.288	0.176	0.127
1 200	0.348	2.246	2.437	2.297	2.481	0.274	0.126	0.114
1 400	0.242	2.212	2.335	2.250	2.474	0.222	0.098	0.108
1 800	0.190	2.208	2.322	2.233	2.342	0.203	0.091	0.097
1 1 600	0.150	2.205	2.284	2.183	2.319	0.196	0.087	0.088
1 3 200	0.125	2.069	2.192	2.167	2.286	0.194	0.080	0.087
1 6 400	0.085	1.760	2.103	1.967	2.215	0.191	0.078	0.086
1 12 800	0.086	1.715	1.662	1.609	1.965	0.184	0.044	0.079

注:每列中抗体滴度以450 nm测定的光密度表示。

Table 2 indicated that the mean MOMP specific antibody titers changed greatly post administration 14 days with diverse combination. Each column represented the antibody titers as mean optical density (OD) measured at a 450 nm.

2.4 不同免疫组合免疫小鼠后 T 淋巴细胞增殖能力

2次免疫后,各处理及对照组的SI均显著低于ConA刺激对照($P < 0.01$)。在处理组中,第5组显著高于其他各处理组($P < 0.01$),第1组略高于第3组($P > 0.05$),而第2、4组间差异不显著(图3)。

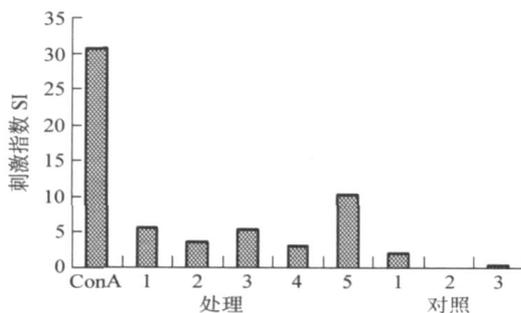


图3 小鼠免疫后 T 淋巴细胞增殖试验结果

Fig. 3 Post inoculation proliferative response of spleen lymphocytes in mice

The Fig. 3 illustrated that co-inoculation with both DNA and r-MOMP were significantly higher than the titers in other groups. The stimulation index of group 3 was significantly higher than the stimulation index of group 1, group 2 and group 4.

3 讨论

3.1 核酸和重组蛋白不同免疫组合诱导产生的应答反应

基因疫苗由于可以诱发产生良好的细胞免疫,有望开发出高效预防流产衣原体的新型疫苗。另外通过检测基因疫苗所产生的抗体,可以区分免疫动物群和感染动物群体,因此,人们寄希望开发基因疫

苗来控制动物衣原体病^[11]。

本研究结果显示 DNA/r-MOMP 效果好于 r-MOMP/DNA、DNA/DNA,试验证实了 DNA/r-MOMP 组合可以提高动物的体液免疫和细胞免疫水平^[12]。近期报道也证实核酸免疫后,重组蛋白强化免疫可达到保护沙眼衣原体感染^[13]。其内在原因在于 DNA 免疫后诱导产生细胞内抗原,持续产生的内源性抗原模拟自然感染,从而激发细胞介导的免疫应答缓慢释放抗原刺激机体产生应答反应,激活 T 淋巴辅助细胞而获得高水平的细胞免疫反应。同时重组蛋白的强化免疫,刺激机体产生持续的循环抗体,保护机体免受感染^[14]。

本实验中同时免疫重组蛋白和核酸疫苗(DNA-r-MOMP),小鼠不但诱导产生了较高水平的特异性抗体,同时诱导产生了高水平的细胞免疫。这归功于同时免疫有利于刺激 T 淋巴细胞的增殖,加速机体产生特异性抗体,从而提高了小鼠的体液免疫和细胞免疫水平,提高了机体的抗感染能力。但本结果与同时免疫口蹄疫病毒核酸和重组蛋白(VPI-DNA)获得的研究结论不一致^[10]。后者认为在同一注射位点同时免疫核酸和蛋白可以抑制 T 淋巴细胞的增殖,降低机体的 CTL 功能并抑制了机体对再次免疫抗原的反应能力,从而产生免疫抑制作用。如果免疫不在同一注射点,DNA 疫苗免疫效果不受影响。本实验中核酸和重组蛋白同时免疫是分别通过颈部、胸部肌肉进行,这可能是未受免疫抑制影响

的主要因素。此外免疫未受到抑制与 MOMP 基因和重组蛋白的结构有关。有实验证明 MOMP 表达质粒具有高效的细胞递呈性,重组蛋白具有抗原表位,容易被淋巴细胞识别^[15]。上述组合免疫后,细胞免疫水平升高除与激发 T 淋巴细胞增殖外,是否还与激发其他 T 淋巴细胞功能增强有关,仍需要重复试验进行验证。

3.2 提高核酸及重组蛋白免疫水平的策略

从目前的研究看,MOMP 蛋白虽然是衣原体表面最重要的功能性蛋白,但其他很多膜蛋白也具有很强的免疫原性,例如 Pmps 蛋白质家族、LPS、OMP-2、OMP-3、dna K 等,虽然很多在具体功能上并不为人所知,但有证据表明它们都在衣原体对宿主细胞的侵入过程中起作用^[16]。也有免疫研究表明,单独免疫一种蛋白很难使机体建立起有效的抗衣原体感染的体液免疫^[17-18],因此,更有效的免疫策略倾向于联合使用多种有潜力衣原体抗原,或者配合各种细胞因子佐剂及蛋白抗原强化等方式增强核酸免疫的效果^[19]。

高效持久的衣原体特异性免疫水平最重要的功能就是抵抗和清除衣原体的感染,而 *omp-1* 基因及其重组蛋白的免疫所带来的体液与细胞免疫水平能否有效抵抗和清除衣原体的感染,这还需要后续攻毒保护试验的进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 于恩庶,李子华. 新发现和再肆虐的传染病续编[M]. 香港:亚洲医药出版社,2000:169-170
- [2] Linklater K A, Dyson D A. Field studies on enzootic abortion of ewes in south-east Scotland[J]. Vet Rec, 1979, 45: 384-394
- [3] 杨琪,何诚,朱虹,等. 动物鹦鹉热衣原体疫苗研究进展[J]. 动物医学进展,2004,25(5):8-11
- [4] Nicholas R T, Corin Y, Kenneth B, et al. The Chlamydia abortus genome sequence reveals an array of variable proteins that contribute to interspecies variation[J]. Genome Res, 2005(15):629-640
- [5] Su H, Feilzer K, Caldwell H D, et al. Chlamydia trachomatis genital tract infection of antibody-deficient gene knockout mice[J]. Infect Immun, 1997, 65: 1993-1999
- [6] Longbottom D, Coulter L J. Animal chlamydioses and zoonotic implications[J]. J Comp Path, 2003, 128: 217-244
- [7] Vanrompay D, Cox E, Volchaert G, et al. Turkeys are protected from infection with Chlamydia psittaci by plasmid DNA vaccination against the major outer membrane protein[J]. Clin Exp Immunol, 1999, 118: 49-55
- [8] 杨琪,何诚,雷鸣,等. 猪流产衣原体 CP/12 株 *omp-1* 基因的克隆与表达[J]. 中国农业大学学报,2005,10(3):56-59
- [9] Vanrompay D, Cox E, Mast J, Goddeeris B and Volckaert G. High-level expression of Chlamydia psittaci major outer membrane protein in COS cells and in skeletal muscles of turkeys[J]. Infection and Immunity, 1998, 66: 5494-5500
- [10] Jin H L, Kang Y M, Zheng G X, et al. Induction of active immune suppression by co-immunization with DNA- and protein-based vaccines[J]. Virology, 2005, 337: 183-191
- [11] Hechard C, Grepinet O, Rodolakis A. Evaluation of protection against chlamydia abortus challenge after DNA immunization with the major outer-membrane protein-encoding gene in pregnant and non-pregnant mice[J]. Journal of Medical Microbiology, 2003, 52: 35-40
- [12] Verminnen K, Loock M V, Cox F, et al. Protection of turkeys against Chlamydia psittaci challenge by DNA and rMOMP vaccination and evaluation of the immunomodulating effect of 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D(3)[J]. Vaccine, 2005, 23: 4509-4516
- [13] Zhang D J, Yang X, Shen C X, et al. Priming with Chlamydia trachomatis major outer membrane protein DNA followed by MOMP ISCOM boosting enhanced protection and is associated with increased immunoglobulin A and Th1 cellular immune responses[J]. Infection and Immunity, 2000, 68: 3074-3078
- [14] 孙树汉. 核酸疫苗[M]. 上海:第二军医大学出版社,2000:110-120
- [15] Igietsme J U, Black C M, Caldwell H D, et al. Chlamydia vaccines: strategies and status[J]. BioDrugs, 2002, 16: 19-35
- [16] Hechard C, Grepinet O, Rodolakis A. Protection evaluation against chlamydia abortus challenge by DNA vaccination with a *dnaK*-encoding plasmid in pregnant and non-pregnant mice[J]. Vet Res, 2002, 33: 313-326
- [17] Krieg A M. Immune effects and mechanisms of action of CpG motifs[J]. Vaccine, 2000, 19: 618-622
- [18] Stephens R S. Chlamydial genomics and vaccine antigen discovery[J]. J Infect Dis, 2000, 181: S521-S523
- [19] Gurunathan S, Klinman D M, Seder R A. DNA vaccines: immunology, application, and optimization [J]. Annu Rev Immunology, 2000, 18: 927-974