

霍乱毒素 B 亚单位与胰岛素原融合基因的克隆、表达及重组蛋白特性分析 Cloning of *CTB-PROIN* Fusion Gene and its Expression in *Escherichia coli*

陈 丽^{1,2}, 欧阳凤秀³, 钱炳俊⁴, 任 宏³, 王 强⁵, 姜庆五³, 王玉炯¹, 刘静波³, 梁婉琪², 张大兵^{2*}

CHEN Li^{1,2}, OUYANG Feng-Xiu³, QIAN Bing-Jun⁴, REN Hong³, WANG Qiang⁵, JIANG Qing-Wu³, WANG Yu-Jiong¹, LIU Jing-Bo³, LIANG Wan-Qi² and ZHANG Da-Bing^{2*}

1. 宁夏大学生命科学学院, 银川 750021

2. 上海市农业科学院农业生物技术研究中心, 上海市农业遗传育种重点实验室, 上海 201106

4. 复旦大学生命科学学院, 上海 200433

5. 南京大学生命科学学院, 南京 210093

1. Life Science School of Ningxia University, Yinchuan 750021, China

2. Shanghai Key Laboratory of Agricultural Genetics and Breeding, Agro-biotech Research Center, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China

3. School of Public Health, Fudan University, Shanghai 200032, China

4. School of Life Science, Fudan University, Shanghai 200433, China

5. School of Life Science, Nanjing University, Nanjing 210093, China

摘 要 构建了霍乱毒素 B 亚单位(Cholera toxin B subunit, CTB)与胰岛素原(Proinsulin)的融合基因 *CTB-PROIN*, 将该融合基因克隆到大肠杆菌表达载体 pET-30a(+) 中, 获得重组质粒 pETCPI, 并将该质粒转入大肠杆菌菌株 BL21(DE3) 中; 重组菌株经 IPTG 诱导后, 其表达产物经过 15% SDS-PAGE 分析表明该菌株可以表达融合蛋白, 其分子量约为 21.6 kD, 且主要以包涵体形式存在, 约占全菌蛋白的 25%。含 CTB-PROIN 重组蛋白的包涵体经过变性和复性后, CTB-PROIN 可以在体外自组装成五聚体结构。Western blotting 分析结果表明重组 CTB-PROIN 蛋白可分别被霍乱毒素的抗体和胰岛素的抗体识别, 说明该蛋白具有霍乱毒素和胰岛素的双重抗原性。同时在体外, CTB-PROIN 蛋白可与神经节苷脂 GM1(monosialoganglioside) 特异性结合, 表明了该融合蛋白在体外具有生物活性。这些研究结果为利用原核生物表达系统研制廉价、高效的 I 型糖尿病口服疫苗奠定了基础。

关键词 霍乱毒素 B 亚单位, 胰岛素原, 融合基因 *CTB-PROIN*, 神经节苷脂 GM1

中图分类号 Q78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2005)02-0204-07

Abstract A fusion gene *CTB-PROIN*, in which Proinsulin gene was fused to the 3' end of *CTB* gene by a hinge peptide 'GPGP', was constructed and cloned into pET-30a(+) to obtain a prokaryotic expression vector pETCPI. Subsequently the recombinant plasmid pETCPI was transformed into *E. coli* strain BL21(DE3). After induced by IPTG, the expression product was

Received: August 2, 2004; Accepted: December 11, 2004.

This work was supported by Grant from the National Natural Science Foundation of China(No. 30170818).

* Corresponding author. Tel: 86-21-62208750; E-mail: zdb30@vip.sina.com

国家自然科学基金资助项目(No. 30170818)。

analyzed by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel (15%) electrophoresis (SDS-PAGE), and its result indicated that the recombinant protein CTB-PROIN was expressed and accumulated as inclusion bodies. The recombinant CTB-PROIN protein accumulated to the level of 25% of total bacterial proteins. After inclusion bodies was denaturalized and refolded *in vitro*, significant assembly of monomers had occurred, and the recombinant protein represented assembled pentamers. The results of western blotting analysis also demonstrated that the fusion protein could be recognized by the anti-CT and anti-insulin antibody, respectively. In addition, the result of the CTB-PROIN-GM1 binding assay, that the protein could bind to monosialoganglioside specifically, showed it possessed biological activity *in vitro*. These results provided the possibility of developing a cheaper and more efficient oral vaccine for type I diabetes using such constructs.

Key words Cholera toxin B subunit, proinsulin, fusion gene CTB-PROIN, monosialoganglioside

胰岛素依赖性糖尿病(insulin dependent diabetes mellitus)是一种自身免疫性疾病,它的发生是由于机体对胰岛多种抗原成分免疫丧失耐受能力,导致了针对胰腺 β 细胞的自身免疫性破坏。口服胰岛特异的自身抗原可诱导免疫耐受,防止自发性自身免疫糖尿病的发生^[1-5]。黏膜诱导的耐受(如口服耐受)已应用于包括 I 型糖尿病在内的许多自身免疫性疾病实验模型^[2,3,6]。这种口服耐受需要长期反复口服大剂量(毫克级)抗原来维持^[1,3,7],而抗原的生产成本往往很高,因此这种治疗技术的广泛应用受到限制。

CTB 是一个有效的载体分子,抗原分子与 CTB 结合后,与肠相关淋巴组织(Gut-associated lymphoid tissues, GALT)细胞表面的神经节苷脂 GM1 具有较强的亲和力,这就更利于抗原的传递和免疫识别,引起口服耐受^[8,9]。目前 CTB 载体分子在预防与治疗自身免疫性疾病的实验动物模型中显示了巨大的作用^[10,11],研究表明,将胰岛素通过化学方法与 CTB 融合后,其作用可以提高 100 倍以上^[12]。

对于 CTB 增强口服耐受的临床应用来说,基因工程融合蛋白较化学合成融合蛋白更具优越性。首先,操作更为简便。其次,基因工程合成的融合蛋白分子是一个组成单一的蛋白;而化学融合蛋白往往是一个成分混杂的 CTB 融合物群体^[13,14]。Sadeghi 等将人胰岛素 B 链与 CTB 融合表达,能增强体外抗原递呈,有效诱导体内旁路抑制反应^[14]。

本文构建了 CTB 与胰岛素原的融合基因 CTB-PROIN,并在大肠杆菌中获得表达;同时对表达产物进行了 SDS-PAGE 电泳分析、Western blotting 检测以及神经节苷脂 GM1 结合分析,结果表明融合蛋白具有霍乱毒素和胰岛素的双重抗原性,且可与神经节苷脂 GM1 特异结合,说明融合蛋白可组装成类似于 CTB 五聚体的大分子生物活性物质。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒:大肠杆菌菌株 DH5 α 、BL21 (DE3)由本实验室保存;含有霍乱毒素 B 亚基基因的质粒 pET-30CTB 由本实验室王强博士提供;含有胰岛素原基因的质粒 pPINS 由复旦大学刘静波老师提供;表达载体 pET-30a(+)购自 Novagen 公司; pMD18-T 载体购自 TaKaRa 公司。

1.1.2 主要生化试剂:Taq DNA 聚合酶, dNTPs, 限制酶,核酸分子量标准等均购自 TaKaRa 公司;引物由上海生工生物工程技术有限公司合成; pfu DNA 聚合酶、IPTG(异丙基硫代- β -D-半乳糖苷)、BCIP(5-溴-4-氯-3-吡啶磷酸二钠盐)、NBT(氯化氮蓝四唑)等为 Promega 公司产品;硝酸纤维素膜为 Amersham 公司产品;蛋白质分子量标准购自 Ferman-tas GmbH 和 NEB 公司。

1.2 方法

1.2.1 CTB-胰岛素原融合基因 CTB-PROIN 的克隆及序列测定:依据 CTB 的基因序列(GenBank GI: 847821),设计了扩增该基因的引物,上游引物 CT-Bin-s: 5'-AAAAAGCTTCATATGACACCTCAAAATAT-TACTGATTG-3', 5'端添加了 Hind III 和 Nde I 限制酶位点;下游引物 CTBin-a: 5'-ATGGTCCAGGC-CCATTGCCCATACTAATTGCGG-3', 5'端添加了编码连接小肽'GPGP'的 12 个核苷酸"TTGGTCCAGGCCCC", 用于连接靶基因。

按照胰岛素原的基因序列(GenBank GI: 4557670),设计了扩增该基因的引物,上游引物 In-s: 5'-CAAATGGGCCTGGACCATTTGTGAACCAACACCTG-TG-3', 5'端添加了与引物 CTBin-a 中 5'-ATGGTC-CAGGCCCCATTG-3' 互补配对 5'-CAAATGGGCCTG-GACCAT-3', 使 CTB 基因 3' 端与胰岛素原基因 5' 端有一段互补配对序列,便于扩增融合基因;下游引物

Inpro-a: 5'-AAGAATTCTTATTAGTTGCAGTAGTTCTCC AGC-3', 5'端添加了两个终止密码子 TAA 和 *EcoR* I 酶切位点。

用引物 CTBin-s、CTBin-a, 以质粒 pET-30CTB 为模板扩增 CTB 基因; 用引物 In-s、Inpro-a, 以质粒 pPINS 为模板扩增胰岛素原基因。PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 56℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 30 循环; 72℃ 延伸 5 min。取上述 CTB 基因和胰岛素原基因的 PCR 产物各 1 μL 为模板, 用引物 CTBin-s 和 Inpro-a, 在同样的反应条件下扩增融合基因 *CTB-PROIN*。

将 *CTB-PROIN* 融合基因片段克隆到 pMD18-T 载体中, 构建重组质粒 pMDCPI, 克隆方法参照 TaKaRa 公司的 pMD18-T 使用说明, 并进行融合基因的核苷酸序列分析(由上海博亚生物技术有限公司完成)。

1.2.2 *CTB-PROIN* 融合基因原核表达载体构建: 将 *Nde* I / *EcoR* I 双酶切重组质粒 pMDCPI 获得的 600 bp 左右的片段克隆入表达载体 pET-30a(+) 的 *Nde* I / *EcoR* I 多克隆位点间, 得到重组表达载体 pETCPI。然后利用 PCR、酶切及核苷酸序列分析方法对重组质粒 pETCPI 进行鉴定。DNA 片段的回收、连接、质粒提取、转化等采用常规基因操作方法, 方法参照文献[15]。

1.2.3 *CTB-PROIN* 融合基因的诱导表达及表达量测定: 挑取含 pETCPI 的单克隆(BL21(DE3)为宿主菌)于 LB 液体培养基(含 50 mg/L 卡那霉素)中, 37℃ 振荡培养 12~14 h, 然后按 1:100 比例接种入相同培养基, 37℃ 振荡培养至 $OD_{600} = 0.5 \sim 0.6$, 加 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 分别于 0、1、2、3、4、5 h 时取样, 同时培养并诱导含有 pET-30a(+) 的受体菌 BL21(DE3) 作为对照。4℃、12000 r/min 离心 1 min 收集菌体细胞, 菌体用 1×SDS 凝胶上样缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl(pH6.8), 100 mmol/L 二硫苏糖醇, 2% (m/V) SDS(电泳级), 0.1% 溴酚蓝, 10% (V/V) 甘油)重悬, 100℃ 处理 10 min, 使菌体裂解, 裂解物进行 SDS-PAGE 分析, 方法参照文献[15]。利用 UMAX Astra 3450 扫描分析仪对 SDS-PAGE 上的蛋白条带进行扫描, 利用 Gel-Pro analyzer Ver. 4.0(Media Cybernetics, USA)软件分析融合蛋白在菌体总蛋白中的相对含量。

1.2.4 *CTB-PROIN* 融合蛋白的 Western blotting 检测: 将含有重组质粒 pETCPI 的表达菌株接种于 500 mL LB 中做大量表达, 诱导表达后的菌体用适量

PBS 重悬, 经超声破碎后, 离心的沉淀即为包涵体, 用 PBS 反复洗涤 3 次后重悬, 然后用梯度透析的方法^[14]进行复性。用 Bradford 比色法^[16]测定所得蛋白浓度, 取 5 μg 经过包涵体变性和复性的部分纯化蛋白进行 SDS-PAGE, 电泳结束后进行电转移至硝酸纤维素(NC)膜, 分别以兔抗 CT 血清(Sigma C-3062)和豚鼠抗人胰岛素血清(Biomed V2024)作为第一抗体, 以碱性磷酸酶偶联的羊抗兔 IgG 抗体(Promega S3731)和羊抗豚鼠 IgG 抗体(Sigma A-5062)作为第二抗体, 进行 Western blotting 分析, 方法参照文献[10]。CT 抗体、胰岛素抗体、羊抗兔抗体、羊抗豚鼠抗体分别以 1:3000, 1:2000, 1:5000, 1:2000 用 1×封闭液稀释。

1.2.5 *CTB-PROIN* 的体外生物活性分析: 为了检测 *CTB-PROIN* 融合蛋白的生物学活性, 我们进行了 GM1-ELISA 分析。参考文献[12, 17, 18], 我们采用以下方法: 用 GM1(Sigma G-7641)包被 96 孔酶标板(Nalge Nunc international, Denmark), 每孔 2 μg(PBS 稀释, 每孔 100 μL); 同时用半乳糖(Gal)、BSA、PBS 作为对照, 每个样品做 3 个重复, 4℃ 过夜。弃尽包被物, 重蒸水连续冲洗 4 次; 1% BSA(1 g BSA 溶于 100 mL PBS, pH7.4)封闭, 室温下放置 2.5 h。弃尽封闭液, 重蒸水冲洗 4 次; 将 0.085 μg *CTB-PROIN* 融合蛋白包被于已结合有 GM1 的酶标板上; 37℃ 温育 2 h; 弃尽包被物, 重蒸水冲洗 4 次; 加入 300 μL 封闭缓冲液(0.05% Tween-20, 0.05% NaN_3 , 1 mmol/L EDTA, 0.25% BSA, 0.17 mol/L H_3BO_3 , 0.12 mol/L NaCl, pH8.5), 25℃ 封闭 30 min, 用重蒸水冲洗 3 次, 再加入 50 μL 用封闭缓冲液稀释的 CT 抗体, 室温 2 h; 用重蒸水冲洗 3 次后, 加入封闭缓冲液封闭 10 min, 再用重蒸水冲洗 3 次, 加入 50 μL 用封闭缓冲液稀释(1:7500)的碱性磷酸酶偶联的第二抗体, 室温 2 h; 重蒸水冲洗 3 次后, 加入 75 μL NPP 溶液[5 mg NPP 溶于 50 μL 重蒸水, 用 NPP 缓冲液(0.1 mol/L Glycine, 1 mmol/L MgCl_2 , 1 mmol/L ZnCl_2 , pH10.4)以 1:100 比例稀释]; 室温显色 1 h 后, 加入 25 μL 0.5 mol/L NaOH 终止反应; 对照作相同处理。用酶标仪(ELx800UV, Bio-TEK)测定各孔溶液的光吸收值, 激发光波长为 405 nm。

2 结 果

2.1 *CTB-PROIN* 融合基因的克隆及其序列测定

为了将 CTB 和胰岛素原融合, 我们设计引物扩增获得了利用连接肽 GPGP 将胰岛素原融合到 CTB

羧基端的融合基因 *CTB-PROIN*, 并将其克隆到表达载体 *pET-30a(+)* 中, 使融合基因在 T7 启动子控制之下进行表达(图 1)。

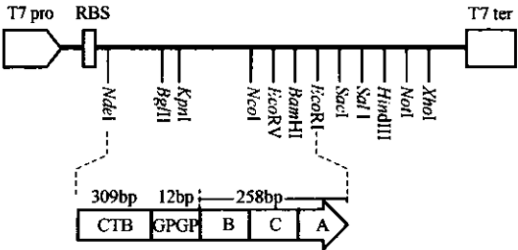


图 1 融合基因 *CTB-PROIN* 在表达载体 *pET-30a(+)* 中的示意图

Fig. 1 The schematic diagram of fusion gene *CTB-PROIN* in *pET-30a(+)* expression vector

T7pro: T7 promoter; RBS: ribosome binding site; T7ter: T7 terminator; CTB, Cholera toxin B subunit; GPGP, hinge peptide; B, C and A represent B, C and A chain of proinsulin, respectively.

分别利用引物 CTBin-s、CTBin-a 和 In-s、Inpro-a, 从质粒 *pET-30CTB* 中扩增出 CTB 基因; 从质粒 *pPINS* 中扩增出胰岛素原基因。再用引物 CTBin-s、Inpro-a, 以 CTB 和胰岛素原 PCR 产物的混合物为模板扩增出融合基因 *CTB-PROIN*; PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳分析表明扩增的片段(含限制酶位点及保护碱基等)与预期大小一致, CTB 为 338 bp, 胰岛素原为 287 bp, 融合基因为 613 bp, 结果见图 2 (a)。将融合基因 *CTB-PROIN* 的 PCR 产物克隆到 *pMD18-T* 载体中, 经测序证明序列及读码框均正确。

2.2 *CTB-PROIN* 融合基因原核表达载体的构建与鉴定

将 *Nde I* / *Eco R I* 双酶切重组质粒 *pMDCPI* 获得的 *CTB-PROIN* 融合基因片段克隆入 *pET-30a(+)* 载体中的 *Nde I* 和 *Eco R I* 之间, 获得表达载体 *pETCPI*。重组质粒 *pETCPI* 的 *Nde I* / *Eco R I* 组合限制酶酶切图谱显示, *pETCPI* 酶切后可得到 590 bp 左右的片段, 与预期一致; 而对照 *pET-30a(+)* 酶切得到的片段只有 150 bp 左右(图 2 (b))。这表明 *CTB-PROIN* 融合基因已经正确地克隆入 T7 启动子启动的阅读框中。经测序证明序列及读码框均正确, 融合基因在 T7 启动子控制之下进行表达。

2.3 *CTB-PROIN* 融合基因的诱导表达

含重组质粒 *pETCPI* 的表达宿主菌经 1 mmol/L IPTG 诱导培养 5 h, 菌体裂解物进行 SDS-PAGE 分析。与对照相比, 经过诱导的重组菌株裂解物在 21.6 kD 处出现明显的高水平表达的外源蛋白条带, 该蛋白分子量与预期的 *CTB-PROIN* 融合蛋白的分

子量一致(图 3)。这表明 *CTB-PROIN* 融合蛋白可在大肠杆菌中表达且 *CTB-PROIN* 融合蛋白表达量约占菌体总蛋白的 25%。表达菌超声裂解后收集的沉淀中存在 *CTB-PROIN* 融合蛋白, 说明表达蛋白以包涵体形式存在。包涵体经洗涤、裂解后, 用梯度透析的方法进行复性, 得到纯度较高的 *CTB-PROIN* 融合蛋白。

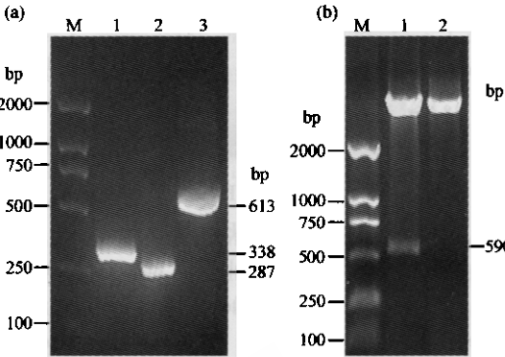


图 2 PCR 扩增的 *CTB*、胰岛素原、融合基因 *CTB-PROIN* 2% 琼脂糖凝胶电泳(a)及重组质粒 *pETCPI* 酶切鉴定(b)图谱

Fig. 2 Agarose gel (2%) analysis of *CTB*, proinsulin and *CTB-PROIN* fusion gene's PCR amplified fragments (a)

and restriction endonuclease analysis of recombinant plasmid *pETCPI* (b)

(a) Agarose gel (2%) analysis of *CTB*, proinsulin and *CTB-PROIN* fusion gene's PCR amplified fragments. M: DNA marker DL2,000; 1: *CTB*, 338 bp; 2: proinsulin, 287 bp; 3: fusion gene *CTB-PROIN*, 613 bp. (b) Restriction endonuclease analysis of recombinant plasmid *pETCPI* with restriction endonuclease *Nde I* and *Eco R I*; 1: digested products of plasmid *pETCPI* with restriction endonuclease *Nde I* and *Eco R I*; 2: digested products of plasmid *pET-30a(+)* with restriction endonuclease *Nde I* and *Eco R I*.

2.4 *CTB-PROIN* 融合蛋白的 Western blotting 检测

取经纯化的 *CTB-PROIN* 融合蛋白进行 Western blotting 检测。分别以霍乱毒素的抗体和胰岛素的抗体作为第一抗体, 进行免疫印迹检测。结果表明, *CTB-PROIN* 融合蛋白在分子量 108.0 kD 处和 21.6 kD 处能分别与胰岛素的抗体(图 4(a)) 和霍乱毒素的抗体(图 4(b)) 发生特异性反应, 说明该融合蛋白具有霍乱毒素和胰岛素的双重抗原性。在 Western blotting 分析中, 分子量 108.0 kD 处的蛋白条带与预期的五聚体 *CTB-PROIN* 融合蛋白的分子量一致, 是含有 *CTB-PROIN* 融合蛋白的包涵体在变性、复性之后形成的具有五聚体高级结构的融合蛋白; 分子量 21.6 kD 处的蛋白条带与单体 *CTB-PROIN* 融合蛋白分子量一致, 是未能复性形成五聚体结构的单体融合蛋白; 此外, 还有少量二聚体出现, 这一结果表明

融合蛋白没有完全复性,其复性效率大概为 50%。

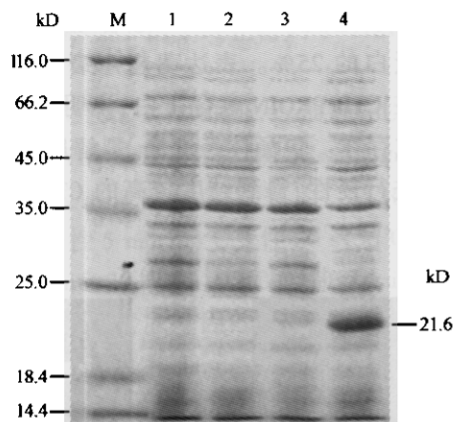


图3 融合蛋白 CTB-PROIN 诱导表达后经 15% SDS-PAGE 分离的图谱

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of fusion protein expressed in *E. coli* after induced by IPTG

M: protein molecular weight standard; 1 and 2: total proteins of control bacteria stain with plasmid pET-30a(+) non-induced and induced; 3: total proteins of control bacteria stain with plasmid pETCPI non-induced; 4: total proteins of bacteria stain with plasmid pETCPI induced.

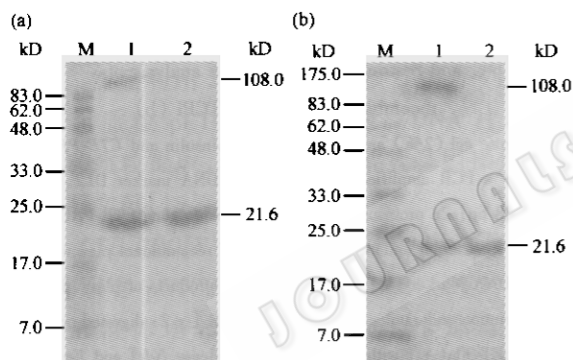


图4 融合蛋白 CTB-PROIN 的 Western blotting 图谱

Fig. 4 Western blotting analysis of CTB-PROIN fusion protein (a) incubated with the anti-insulin antibody as the primary antibody. M: protein molecular weight standard; 1: CTB-PROIN protein non-boiled; 2: CTB-PROIN protein boiled at 100°C for 10 min. (b) incubated with the anti-CT antibody as the primary antibody. The lane numbering is the same as in (a).

2.5 CTB-PROIN 融合蛋白的生物学活性

为了检验经变性复性之后的大肠杆菌表达的 CTB-PROIN 融合蛋白是否具有生物学活性,我们检测了该重组蛋白与 GM1 神经节苷脂受体在体外结合的能力。神经节苷脂 GM1 是体内与 CTB 蛋白结合的受体^[19],与该受体结合的蛋白需要具有五聚体结构^[20]。GM1 神经节苷脂受体的结合实验常用于检验重组 CTB 或 CTB 融合蛋白的五聚体结构形式^[12]。我们用 ELISA 方法分析了大肠杆菌表达的 CTB-PROIN 融合蛋白与 GM1 神经节苷脂受体结合

的能力。将 CTB-PROIN 融合蛋白包被于已结合有 GM1、Gal、BSA 或 PBS 的酶标板上,用 CTB 特异的抗体进行检验。结果表明,CTB-PROIN 融合蛋白与 GM1 有较强的亲和性,而与 Gal、BSA 或 PBS 并没有亲和性(图 5)。这说明在大肠杆菌中表达的 CTB-PROIN 融合蛋白具有与 GM1 神经节苷脂特异结合的能力,也说明 CTB-PROIN 融合蛋白包涵体在经变性、复性之后,可折叠成五聚体结构,这就可能使其融合的胰岛素原易于被肠道吸收,增强免疫力^[8,9]。经过 100°C 加热处理的 CTB-PROIN 融合蛋白和含有 CTB-PROIN 融合蛋白的包涵体不能在 GM1-ELISA 中用霍乱毒素的抗体检测出来,这可以解释为单体融合蛋白不能结合 GM1 神经节苷脂,或单体融合蛋白的抗原性比寡聚体弱(数据未列出)。与 GM1 神经节苷脂受体的结合是 CTB-PROIN 融合蛋白体外活性的例证。

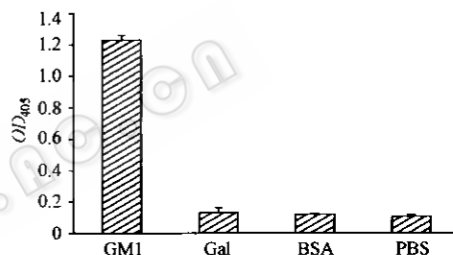


图5 融合蛋白 CTB-PROIN 与 GM1 神经节苷脂的结合

Fig. 5 GM1 binding assay of CTB-PROIN fusion protein

3 讨论

尽管通过口服胰岛素预防糖尿病在一些动物模型中已取得成功^[21-24],但至今为止,临床实验中还没有成功的例子报道^[25,26]。一个可能的原因是口服的胰岛素的剂量太低^[27]。口服耐受的产生和维持,必须尽早和长期口服大量抗原,如果抗原的来源有限或成本过高,都将限制其广阔的应用前景。因此,对于胰岛素治疗来说,必须选用一定的佐剂,以减少诱导口服耐受所需胰岛素的剂量^[28]。据报道,当胰岛素与 CTB 通过化学方法融合后,采用少剂量抗原,就可在 NOD 小鼠(nonobese diabetic mouse)中预防 I 型糖尿病^[11]。虽然与 CTB 融合的自身抗原可增强免疫耐受,但化学融合过程可能会影响抗原的免疫原性;而且化学融合过程会产生一个成分混杂的 CTB 融合物群体^[13,14],只有一小部分保持了形成五聚体的能力,可以与 GM1 受体结合^[13]。因此,融合蛋白的重组策略可能更利于生产适于临床应用的安全免疫原。

本文设计胰岛素原通过一个由 4 个氨基酸组成的灵活的连接肽 GPGP 与 CTB 融合。GPGP 分子结构简单,结构较小,能减少 CTB 与胰岛素原半分子之间的空间位阻,且非常灵活,有助于 CTB 与胰岛素原之间的分子运动^[29,30],利于融合蛋白包涵体 CTB-PROIN 在变性、复性之后重折叠为五聚体结构。我们成功构建了含有 CTB-PROIN 融合基因的重组表达质粒 pETCPI,并在大肠杆菌中获得表达;Western blotting 检测以及神经节苷脂 GM1 结合分析结果表明融合蛋白具有霍乱毒素和胰岛素的双重抗原性,且可与神经节苷脂 GM1 特异结合,能够形成类似 CTB 五聚体的高级结构,因为只有具有五聚体构象的 CTB 可与 GM1 受体结合。在以霍乱毒素的抗体作为第一抗体的 Western blotting 分析还可看出,所纯化的 CTB-PROIN 融合蛋白,除了五聚体和单体分子之外,还有少量二聚体,其复性效率大概为 50%,而这一复性效率在以胰岛素的抗体作为第一抗体的 Western blotting 分析中似乎相对较低,这主要是因为形成的五聚体中 CTB 的抗原表位主要呈现在五聚体表面。含 CTB-PROIN 融合蛋白的包涵体变性之后复性形成五聚体的过程是一个比较复杂的过程,受变性复性条件影响较大,我们得到的五聚体 CTB-PROIN 融合蛋白的相对量总是比较少,对其变性复性条件有待进一步优化。CTB-PROIN 融合蛋白的五聚体结构不仅可便利融合蛋白向肠相关淋巴组织的运输,也可增加每个 CTB 五聚体分子所携带的抗原的摩尔浓度^[31]。这种在肠相关淋巴组织抗原浓度的增加,可以减少传统有效疫苗生产中所需合成抗原蛋白的量^[31]。这说明通过基因重组方法生产 CTB 与胰岛素原融合蛋白是一种有效方法,有望成为将来治疗 I 型糖尿病的一个重要工具。我们将用 CTB-PROIN 融合蛋白免疫 NOD 小鼠,通过进一步的动物实验验证该蛋白在预防与治疗 I 型糖尿病中的作用。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Zhang ZJ, Davidson L, Eisenbarth G *et al.* Suppression of diabetes in non-obese diabetic mice by oral administration of porcine insulin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88**:10252 - 10256
- [2] Trentham DE, Dynesius-Trentham RA, Orav EJ *et al.* Effects of oral administration of type II collagen on rheumatoid arthritis. *Science*, 1993, **261**:1727 - 1730
- [3] Weiner HL, Mackin GA, Matsui M *et al.* Double-blind pilot trial of oral tolerization with myelin antigens in multiple sclerosis. *Science*, 1993, **259**:1320 - 1324
- [4] Weiner HL, Friedman A, Miller A *et al.* Oral tolerance: Immunologic mechanisms and treatment of animal and human organ-specific autoimmune diseases by oral administration of autoantigens. *Annu Rev Immunol*, 1994, **12**:809 - 837
- [5] Hancock WW, Polanski M, Zhang J *et al.* Suppression of insulinitis in non-obese diabetic (NOD) mice by oral insulin administration is associated with selective expression of interleukin-4 and-10, transforming growth factor-beta, and prostaglandin-E. *Am J Pathol*, 1995, **147**:1193 - 1199
- [6] Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J *et al.* Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: Suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science*, 1994, **265**:1237 - 1240
- [7] Ma SW, Zhao DL, Yin ZQ *et al.* Transgenic plants expressing autoantigens fed to mice to induce oral immune tolerance. *Nat Med*, 1997, **3**:793 - 796
- [8] Sun JB, Holmgren J, Czerkinsky C. Cholera toxin B subunit: An efficient transmucosal carrier-delivery system for induction of peripheral immunological tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**:10795 - 10799
- [9] Weiner HL. Oral tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**:10762 - 10765
- [10] Sun JB, Rask C, Olsson T *et al.* Treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis by feeding myelin basic protein conjugated to cholera toxin B subunit. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**:7196 - 7201
- [11] Bergerot I, Ploix C, Petersen J *et al.* A cholera toxoid-insulin conjugate as an oral vaccine against spontaneous autoimmune diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**:4610 - 4614
- [12] Arakawa T, Chong DK, Merritt JL *et al.* Expression of cholera toxin B subunit oligomers in transgenic potato plants. *Transgenic Res*, 1997, **6**:403 - 413
- [13] McGhee JR, Mestecky J, Dertzbaugh MT *et al.* The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development. *Vaccine*, 1992, **10**:75 - 88
- [14] Sadeghi H, Bregenholt S, Wegmann D *et al.* Genetic fusion of human insulin B-chain to the B-subunit of cholera toxin enhances in vitro antigen presentation and induction of bystander suppression in vivo. *Immunology*, 2002, **106**:237 - 245
- [15] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [16] Bradford, MM. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72**:248 - 254
- [17] Kim TG, Langridge WH. Assembly of cholera toxin B subunit full-length rotavirus NSP4 fusion protein oligomers in transgenic potato. *Plant Cell Rep*, 2003, **21**:884 - 890
- [18] Jani D, Meena IS, Rizwan-ul-Haq QM *et al.* Expression of cholera toxin B subunit in transgenic tomato plants. *Transgenic Res*, 2002, **11**:447 - 454
- [19] de Haan L, Verweij W, Agsteribbe E *et al.* The role of ADP-ribosylation and GM1-binding activity in the mucosal immunogenicity and adjuvanticity of the *Escherichia coli* heatlabile enterotoxin and

- Vibrio cholerae* cholera toxin. *Immunol Cell Biol*, 1998, **76**:270 - 279
- [20] Tsuji T, Watanabe K, Miyama A. Monomer of the B subunit of heat-labile enterotoxin from enterotoxigenic *Escherichia coli* has little ability to bind to GM1 ganglioside compared to its coligenoid. *Microbiol Immunol*, 1995, **39**:817 - 819
- [21] Polanski M, Melican NS, Zhang J *et al*. Oral administration of the immunodominant B-chain of insulin reduces diabetes in a co-transfer model of diabetes in the NOD mouse and is associated with a switch from Th1 to Th2 cytokines. *J Autoimmun*, 1997, **10**:339 - 346
- [22] Ramiya VK, Maclaren NK. Insulin in diabetes prevention. *Horm Res*, 1997; **48 Suppl 4**:67 - 70
- [23] von Herrath MG. Bystander suppression induced by oral tolerance. *Res Immunol*, 1997, **148**:541 - 554
- [24] Ramiya VK, Lan MS, Wasserfall CH *et al*. Immunization therapies in the prevention of diabetes. *J Autoimmun*, 1997, **10**:287 - 292
- [25] Chaillous L, Lefevre H, Thivolet C *et al*. Oral insulin administration and residual beta-cell function in recent-onset type 1 diabetes: a multicentre randomised controlled trial. *Diabete Insuline Orale group. Lancet*, 2000, **356**:545 - 549
- [26] Pozzilli P, Pitocco D, Visalli N *et al*. No effect of oral insulin on residual beta-cell function in recent-onset type 1 diabetes (the IMDIAB VII). IMDIAB Group. *Diabetologia*, 2000, **43**:1000 - 1004
- [27] Pozzilli P, Gisella Cavallo M. Oral insulin and the induction of tolerance in man: reality or fantasy? *Diabetes Metab Res Rev*, 2000, **16**:306 - 307
- [28] Chatenoud L. Restoration of self-tolerance is a feasible approach to control ongoing beta-cell specific autoreactivity: its relevance for treatment in established diabetes and islet transplantation. *Diabetologia*, 2001, **44**:521 - 536
- [29] Lipscombe M, Charles, IG, Roberts M *et al*. Intranasal immunization using the B subunit of the *Escherichia coli* heat-labile toxin fused to an epitope of the *Bordetella pertussis* P.69 antigen. *Mol Microbiol*, 1991, **5**:1385 - 1392
- [30] Clements JD. Construction of a nontoxic fusion peptide for immunization against *Escherichia coli* strains that produce heat-labile and heat-stable enterotoxins. *Infect Immun*, 1990, **58**(5):1159 - 1166
- [31] Arakawa T, Yu J, Chong DK *et al*. A plant-based cholera toxin B subunit-insulin fusion protein protects against the development of autoimmune diabetes. *Nat Biotechnol*, 1998, **16**:934 - 938