

新型生长抑素原核表达质粒的构建及表达鉴定

梁爱心, 冯细钢, 韩丽, 滑国华, 桑雷, 刘兴斌, 刘耘, 杨利国

华中农业大学动物科技学院, 武汉 430070

摘要: 将生长抑素(SS)与乙肝表面抗原(S)融合基因插入平衡致死系统原核表达质粒 pYA3493 中, 转化至缺失 *asd* 基因的减毒猪霍乱沙门氏菌 C500, 经酶切、测序筛选得到非抗性的目的克隆, 命名为 pYA-SS。应用 SDS-PAGE 和 Western blotting 技术分离并检测融合蛋白在宿主菌中的表达活性。结果表明, 本试验构建的非抗性筛选生长抑素原核表达质粒可以在宿主菌 C500 中稳定、正确表达。此研究为开发新型、高效、安全的促生长疫苗提供了可靠的研究材料。

关键词: 生长抑素, 原核表达, 平衡致死系统

Construction and Characterization of a Novel Somatostatin Prokaryotic Expression

Aixin Liang, Xigang Feng, Li Han, Guohua Hua, Lei Sang, Xingbin Liu, Yun Liu, and Liguang Yang

College of Animal Science & Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract: In the current work, the fusion gene including somatostatin (SS) and the hepatitis B surface antigen gene was cloned into a balanced lethal system plasmid (pYA3493), and then transformed into *asd*⁻ attenuated *Salmonella choleraesuis* C500 strain, the positive transformant without antibiotic resistance gene was confirmed by restriction analysis and DNA sequencing, designated as pYA-SS. The expression and immunogenicity of fusion protein were detected by SDS-PAGE and Western blot analysis. These results show that the recombinant prokaryotic expression plasmid pYA-SS could express the SS fusion protein with good immunogenicity in C500 strain. In above all, this study could provide reliable materials to develop novel, good and safe vaccine in enhancing the growth of animals.

Keywords: somatostatin, prokaryotic expression, balanced lethal system

生长抑素(somatostatin, SS)是下丘脑释放的 14 肽激素, 在动物体内具有广泛的抑制作用, 特别是对生长及免疫反应具有明显的影响, 应用生长抑素主动或被动免疫动物, 所产生的抗体与 SS 结合, 能阻断 SS 与受体作用; 同时在肝脏的作用下, 加速循环中 SS 的清除, 从而促进 GH 等多种激素的释放,

加快动物的生长。国外已报道应用 SS 抗血清被动免疫或化学合成 SS 制成免疫原主动免疫牛、绵羊等家畜, 可以显著提高增重效果^[1-4]。国内杜念兴等已完成了在大肠杆菌中表达的基因工程亚单位苗、痘苗病毒表达的活载体苗等 SS 基因工程苗的制备, 其中由痘苗病毒表达的 SS 基因工程苗已开发成为激生 I

Received: March 13, 2008; **Accepted:** April 7, 2008

Supported by: the National Natural Science Foundation of China(No. 30771549) and National Programs for High Technology Research and Development of China(No. 2007AA10Z152).

Corresponding author: Liguang Yang. Tel: +86-27-87281813; Fax: +86-27-87281813; E-mail: yangliguo2006@yahoo.com.cn

国家自然科学基金项目(No.30771549)和国家高技术研究发展计划项目(863 计划, No. 2007AA10Z152)资助。

号、激生 II 号等商品化产品。激生 I 号苗对肉猪、肉羊、肉牛均有一定的增重效应,可使肉猪增重提高 5%~10%,饲料报酬提高 5%~20%,肉羊平均体重提高 10%~12%^[5,6]。然而,以上合成肽及活载体苗都存在免疫持续时间短,生产成本低,基因工程表达产物纯化繁杂等不足,此外痘苗病毒还有可能产生毒力回升,造成极大的安全隐患。

由于生长抑素分子量小(1658 kD),免疫原性弱,生长抑素常规免疫时都要与蛋白载体偶联或与蛋白基因等重组以增强生长抑素的免疫原性。近来,大量的研究证实乙肝表面抗原(HbsAg)S 区的第 112 与 113 氨基酸密码之间可以插入 10~20 个氨基酸残基的 DNA 片段,S 区的 3' 末端也可以嵌合外源基因片段,都不影响多聚体颗粒的形成,并且能将外源抗原决定簇呈现在颗粒外表面^[7,8]。鉴于此,曹少先等构建了双拷贝生长抑素 DNA 疫苗 pcS/2SS,免疫大鼠后,抗体阳性率达到 60%^[9]。但是该表达载体中存在抗性基因(氨苄青霉素),有可能导致临床抗药菌株的传播,对家畜和人体健康带来威胁。

基于以上研究的不足,本试验将平衡致死体系引入生长抑素疫苗,构建了非抗性筛选的生长抑素原核表达质粒 pYA-SS,并转化至缺失 *asd* 基因的减毒猪霍乱沙门氏菌 C500 中,最终证明生长抑素融合表达蛋白可以在 C500 中正确表达,为开发高效、安全的促生长疫苗提供了新颖的研究思路及可靠的研究材料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株

$\Delta crp \Delta asd$ 双缺失减毒猪霍乱沙门氏菌菌株 C500,无抗性原核表达质粒 pYA3493 及其宿主菌 x6097 均由郭爱珍教授(国家微生物重点实验室)惠赠,编码生长抑素(SS)与乙肝表面抗原 S 融合基因的重组质粒 pcS/2SS 由本室保存。

1.1.2 工具酶及主要试剂

Taq DNA 聚合酶, *EcoR* I 和 *Hind* III 限制性内切酶, T4 DNA 连接酶, DNA Marker 均购自 TOYOBO 公司;胶回收试剂盒购自上海生工生物公司;蛋白 Marker 购自晶美公司, DAP(2, 6-二氨基庚二酸)购自 Sigma 公司;兔抗 SS 多抗,羊抗兔

HRP-IgG 均购自武汉博士德生物公司,其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 沙门氏菌属的 PCR 鉴定

参照鼠伤寒沙门氏菌 *invA* 基因序列(GenBank Accession No. M90846)设计特异性引物(p1: 5' -CA GGATACCTATAGTGCTGC-3'; p2: 5' -CGCACCGT CAAAGGAACCGT-3'),直接从培养过夜的 C500 菌液中扩增 *invA* 基因(约 580 bp),同时用 ddH₂O 替代菌液作为空白对照。

1.2.2 原核表达质粒的构建与鉴定

酶切、连接、感受态制备、转化及质粒提取等常规技术均按文献[10]描述的方法进行。将少量培养后提取得到的 pYA3493 质粒和 pcS/2SS 质粒同时用 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切,参照胶回收试剂盒说明书相应地回收载体基因(pYA3493)和目的基因(S/2SS),16°C 过夜连接,转化至 x6097 感受态宿主菌中,涂布于不加任何外源物质的 LB 平板上,过夜培养。挑单菌培养后提取质粒, *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切、测序鉴定其正确性,并命名重组质粒为 pYA-SS。

1.2.3 重组质粒在沙门氏菌中的表达与鉴定

将鉴定正确的 pYA-SS 重组质粒电转化 C500,电转条件为 1.8 kV,约 10 s。挑单菌落在不含任何外源物质的 LB 培养液中 37°C 培养 3~4 h 后,离心收集菌体,加入 100 μ L 上样缓冲液,煮沸 5 min,取 20 μ L 进行 12% SDS-PAGE 电泳,之后将分离后的蛋白采用半干法转印硝酸纤维素膜上。用含 5%脱脂奶粉 TBST 封闭 1 h;加入 1:200 稀释的兔抗生长抑素(SS)多克隆抗体,室温孵育 2 h, TBST 洗膜 3 次,各 5 min;再加入 1:2000 稀释的 HRP 标记羊抗兔 IgG,室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次,各 5 min;最后用 DAB 试剂盒显色 1~15 min,一旦出现蛋白带,立即用去离子水终止,观察结果。

2 结果

2.1 宿主菌的 PCR 鉴定

PCR 检测 C500 菌株的属性是开展本研究的前提与保证,从图 1 可以看出泳道 2 和 3 在 500 bp 和 750 bp 之间出现了特异性条带,与设计的扩增基因 *invA* 的大小一致(580 bp),而对照泳道 1 没有相应条带出现。

2.2 生长抑素原核表达质粒的酶切鉴定

图 2 描述了生长抑素与乙肝表面抗原融合基因 (S/2SS) 从含抗性基因(氨苄青霉素)的载体酶切克隆到不含抗性基因 pYA3493 载体的过程。新构建生长抑素原核表达质粒 pYA-SS 经 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切后可见两条片段(图 3), 大片段为空载体 pYA3493, 小片段为 S/2SS 融合基因, 约 792 bp。经上海生工生物公司测序证明 pYA-SS 中 S/2SS 融合基因的插入位点、方向、序列完全正确。

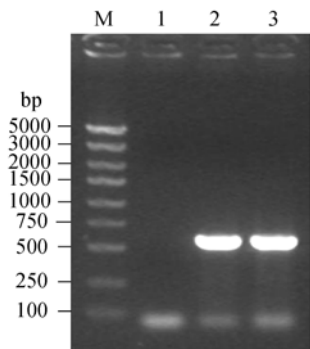


图 1 PCR 扩增 *invA* 基因电泳图谱

Fig. 1 Electrophoresis of PCR product of *invA*
1: control; 2, 3: PCR products of *invA*; M: DNA marker

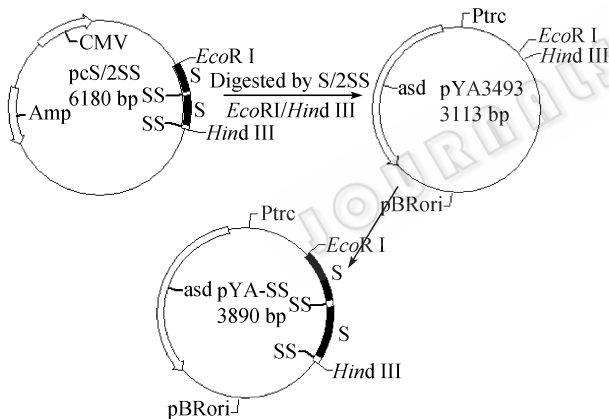


图 2 生长抑素原核表达质粒 pYA-SS 的构建图谱

Fig. 2 Construction of SS prokaryotic expression plasmid pYA-SS

2.3 重组蛋白的免疫印迹分析

将构建好的生长抑素表达质粒电转化缺失 *asd* 基因的宿主菌 C500, 小量培养后, 表达产物经 SDS-PAGE 胶分离, 再经转膜、封闭、一抗孵育、二抗孵育、显色后, Western blotting 结果表明在 27 kD 处有一条明显的杂交带出现, 与目标蛋白分子量大小完全吻合, 表明重组质粒可以在重组菌中稳定表达, 且表达产物具有特异免疫活性。

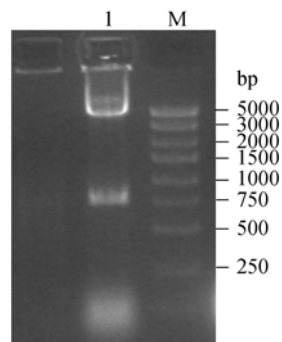


图 3 pYA-SS 质粒的双酶切鉴定图

Fig. 3 Identification of pYA-SS by double restriction endonucleases digestion

1: pYA-SS plasmid digestion by *EcoR* I and *Hind* III;
M: DNA marker

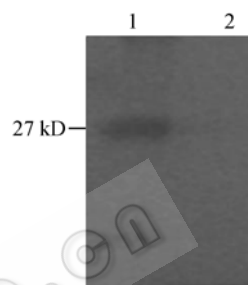


图 4 重组蛋白表达产物的 Western blotting 图

Fig. 4 Western blotting analysis of S/2SS fusion protein

1: product after cultivation with pYA-SS; 2: product after cultivation with pYA3493 (negative control)

3 讨论

将生长抑素配成疫苗用以接种动物, 动物体内就会产生相应的抗体, 在一定时期, 抗体会中和大量的 SS, 降低 SS 水平, 使体内生长激素整体水平相对提高, 从而促进动物的生长。本研究在实验室现有的生长抑素重组质粒 pcS/2SS 基础上引入了无抗性标记的 *asd* 宿主载体平衡致死系统。Asd 基因编码天冬氨酸β-半乳糖脱氢酶, 该酶是二氨基庚二酸 (DAP) 生物合成途径中的必需酶, DAP 是革兰氏阴性菌细胞壁主要化学成分肽聚糖的一种必需成份, 而哺乳动物体内不能合成 DAP, 因此, *asd* 缺失株在无外源 DAP 条件下不能形成完好的细胞壁, 最终溶菌死亡^[11,12]。虽然利用 *asd* 平衡致死系统构建高效基因工程二价疫苗已有较多报道, 但至今还未发现将其应用于促生长疫苗的相关报道。本试验将生长抑素与乙肝表面抗原融合基因 (S/2SS) 插入到 pYA3493 质粒的多克隆位点, 转化至缺失 *asd* 菌株 x6097 后, 两者构成互补, 在不添加任何抗生素及外源物质的前提下, 筛选得到阳性克隆, 避免了使用

抗生素筛选带来的潜在危害。

外源基因表达质粒 pYA3493 中含有来源于鼠伤寒沙门氏菌的 *asd* 基因(GenBank Accession No. AF015781), 与猪霍乱沙门氏菌 C500 的 *asd* 基因 100%同源, 因此质粒 pYA3493 完全能与缺失 *asd* 基因的宿主菌 C500 互补, 从而维持宿主菌的存活及外源基因的稳定表达^[13]。本研究表明, 融合蛋白可以在宿主菌 C500 中稳定表达, 且表达产物具有免疫活性。徐引弟等将增强型绿色荧光蛋白突变体 4 基因(GFP), 克隆到带有 *asd* 基因的原核表达载体 pYA 3493 中, 电转化 C500 *asd* 缺失株, 转化子在 LB 中生长, 并激发强的绿色荧光。将重组菌 *asd*⁻ C500 (pYA GFP) 盲传 50 代, 每一代菌落肉眼、荧光显微镜下均呈亮绿色, 进一步证明质粒在 *asd*⁻ C500 中稳定存在, 并且持续表达 GFP 基因^[14]。此外, 由于沙门氏菌不存在像大肠杆菌一样的 P_{tac} 的阻遏蛋白, 因此不需要诱导, 是一种组成型表达, 随着沙门氏菌在体内的增殖而持续稳定的表达外源基因, 从而持续的刺激机体产生针对沙门氏菌和外源基因的免疫应答。无论体内外在无选择压力的情况下质粒都不会丢失, 载体无抗性, 对机体更加安全。另外, pYA 3493 含有信号肽, 能进行分泌表达, 能更好的递呈抗原, 增强免疫效果^[13,15]。

本研究从酶切与测序两方面均已证实成功地构建了新型生长抑素原核表达质粒, 通过 Western blotting 分析进一步证明编码生长抑素与乙肝表面抗原蛋白的融合基因(S/2SS)可以在缺失 *asd* 基因的宿主菌 C500 中稳定表达, 表达产物具有免疫活性。此无抗性筛选新型疫苗的构建为开发安全、高效的生长抑素口服疫苗奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Spencer GSG, Garssen GJ, Hart IC. A novel approach to growth promotion using auto-immunization against somatostatin. I.Effects on growth and hormone levels in lambs. *Livest Prod Sci*, 1983, **10**: 25-37.
- [2] Buonomo FC, Sabacky MJ, Della-Fera MA, Baile CA. Effects of somatostatin immunoneutralization on growth and endocrine parameters in chickens. *Domest Anim Endocrinol*, 1987, **4**: 191-200.
- [3] Dawson JM, Soar JB, Buttery PJ. The effect of immunization against somatostatin and P-agonist administration alone and in combination on growth carcass composition in young steers. *Anim Sci*, 1997, **64**: 37-51.
- [4] Mears GJ. Immunization of lambs against somatostatin improve growth rate. *Can J Anim Sci*, 1990, **70**: 1091-1097.
- [5] Zeng YX, Du NX. Expression of somatostatin gene in *E. coli*. D29A1. *Acta Genetica Sinica*, 1991, **18**(3): 282-288. 曾义祥, 杜念兴. 生长抑制激素基因在大肠杆菌中的表达. *遗传学报*, 1991, **18**(3): 282-288.
- [6] Xu WZ, Du NX, Li GD, Wang Y. The construction and expression of somatostatin-hepatitis B surface antigen fusion gene recombinant vaccinia virus. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 1992, **15**(3): 74-80. 徐文忠, 杜念兴, 李光地, 汪垣. 生长抑素与乙肝表面抗原融合基因重组痘苗病毒的构建及其表达. *南京农业大学学报*, 1992, **15**(3): 74-80.
- [7] Xu WZ, Du NX, Li GD, Wang Y, Li ZP. A novel gene engineering vaccine to promote animal growth. *Science in China Series B*, 1993, **23**(12): 1272-1278. 徐文忠, 杜念兴, 李光地, 汪垣, 李载平. 促进动物生长的新型基因工程疫苗研究. *中国科学 B 辑*, 1993, **23**(12): 1272-1278.
- [8] Delpyroux F, Chenciner N, Lim A. A poliovirus neutralization epitope expressed on hybrid hepatitis B surface antigen particles. *Science*, 1986, **233**(4762): 472-475.
- [9] Cao SX, Zhang WW, Mao DG, Guan F, Yang LG. Construction, expression and immunization of somatostatin DNA vaccine pcS/2SS. *Journal of Agriculture Biotechnology*, 2005, **13**(4): 477-481. 曹少先, 张文伟, 茆达干, 管峰, 杨利国. 生长抑素基因疫苗质粒 pcS/2SS 的构建、表达及免疫. *农业生物技术学报*, 2005, **13**(4): 477-481.
- [10] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 2001.
- [11] Galan JE, Nakayama K, Curtiss R 3rd. Cloning and characterization of the *asd* gene of *Salmonella typhimurium*: use in stable maintenance of recombinant plasmids in *Salmonella* vaccine strains. *Gene*, 1990, **94**(1): 29-35.
- [12] Huang W. The construction and application of chromosome-plasmid balanced-lethal system. *Letters in Biotechnology*, 2002, **13**(5): 378-382. 黄维. 染色体-质粒平衡致死系统的构建和应用. *生物技术通讯*, 2002, **13**(5): 378-382.
- [13] Kang HY, Srinivasan J, Curiss R 3rd. Immune responses to recombinant pneumococcal PspA antigen delivered by live attenuated *Salmonella enterica* serovar typhimurium vaccine. *Infect Immun*, 2002, **70**(4): 1739-1749.
- [14] Xu YD, Guo AZ, Liu WH, Jia AQ, Chen HC. GFP expression in *asd*-mutant host-vector balanced lethal system of *Salmonella choleraesuis* C500 strain. *Chin J Vet Sci*, 2007, **27**(4): 493-502. 徐引弟, 郭爱珍, 刘维红, 贾爱卿, 陈焕春. 绿荧光蛋白基因在猪霍乱沙门氏菌 C500 株 *asd* 缺失株平衡致死载体系统中的表达. *中国兽医学报*. 2007, **27**(4): 493-502.
- [15] Xu YD, Guo AZ, Liu WH, Jia AQ, Chen HC. Construction and characterization of $\Delta crp \Delta asd$ mutant host-vector balanced lethal system of *Salmonella choleraesuis* C500 strain. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2006, **22**(3): 366-372. 徐引弟, 郭爱珍, 刘维红, 贾爱卿, 陈焕春. 猪霍乱沙门氏菌 C500 株 $\Delta crp \Delta asd$ 缺失株平衡致死载体系统的构建及鉴定. *生物工程学报*, 2006, **22**(3): 366-372.