

杆状病毒表达的 hZP3 B 细胞表位嵌合肽 的免疫活性研究^{*}

曹佐武¹, 杨 林², 郑 辉³, 刘穗玲⁴, 肖銮娟¹, 谢琪璇¹, 王自能⁵

(1. 暨南大学生殖免疫研究中心, 广东 广州 510632;

2. 中山大学生物医药中心, 广东 广州 510275;

3. 暨南大学医学院生理教研室, 广东 广州 510632;

4. 中山大学第三附属医院, 广东 广州 510630;

5. 暨南大学医学院妇产科, 广东 广州 510632)

摘 要: 为研究杆状病毒系统表达的人透明带 ZP3 的 B 细胞表位嵌合肽 (BCP) 的免疫原性及其抗血清与人透明带的免疫交叉反应, 重组 z3bcp 病毒用于感染 *sf9* 细胞以表达 BCP。Tricine SDS-PAGE 用于分离感染液中的小相对分子质量表达产物, 表达产物用于免疫小鼠制备抗血清, 免疫细胞化学试验用于检验抗血清与人卵透明带的交叉反应性。结果显示, *sf9* 细胞被 z3bcp 病毒感染后, 培养液中分离出一条相对分子质量约为 6 000 的特异带, 而正常 *sf9* 细胞中没有等同的带。免疫细胞化学试验结果显示, 该特异肽的抗血清能与人透明带特异结合, 表明人透明带 BCP 嵌合肽在杆状病毒系统中成功表达, 表达产物具有抗原性, 抗血清能与人透明带特异结合。

关键词: 人透明带 3; 嵌合肽; 免疫细胞化学试验; 杆状病毒

中图分类号: Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2003) 05-0070-04

卵透明带 (ZP) 是卵子外表的一层半透明的酸性糖蛋白基质。透明带在精卵识别和受精过程中有重要的作用。哺乳动物透明带由 3 种糖蛋白组成; 人透明带 (hZP) 的 3 种糖蛋白为 hZP1、hZP2、hZP3, 其中 hZP3 是 424 个氨基酸的糖蛋白, 含有初级精子受体, ZP3 的抗血清可阻止精卵结合和受精, 由于透明带是仅存在于卵泡组织中的非常特异的成分, 因此, 是发展透明带避孕疫苗的理想抗原。

但发展透明带避孕疫苗有两个主要的问题。一是人透明带来源很有限, 二是透明带主动免疫后会诱发卵巢的自身免疫反应。随着对人透明带基因结构和序列的认识, 用基因工程方法表达生产重组透明带蛋白可以解决透明带抗原的来源问题。

用透明带免疫后破坏卵泡的发生的副作用成为发展透明带避孕疫苗的一个致命的障碍。如用小鼠 ZP3 作同种免疫, 会诱发自身免疫疾病, 产生卵巢炎, 抑制卵泡发生^[1]。Paterson 等^[2]用在 CHO 细胞中表达的重组人 ZP3 (rhZP3) 免疫绒猴, 初次免疫产生 1:10 000 的抗体滴度, 一些猴强化免疫后滴度达 1:100 000。但 rhZP3 引的免疫反应也引起卵巢功能紊乱, 循环血液中的雌激素持续下降。这主要是

ZP3 上的 T 细胞表位激活了 T 细胞毒作用。

一种理想的透明带疫苗应该能诱发足够的抗体反应而不激活病理性的 T 细胞反应, 即能诱发足够滴度的抗透明带抗体并产生明显的避孕效果而又不至于引起卵巢自身免疫疾病。因此制备含有 ZP3 的 B 细胞表位而不带人 T 细胞表位的肽段, 对制备透明带疫苗至关重要。

Bagavant 等^[3]把合成的人透明带 ZP3 第 334 ~ 341 肽段 hZP3p 和外源辅助性 T 细胞表位串联组成嵌合肽 hCP1。用 50 nmol/L 的 hCP1 免疫两只猴, 单次注射后第 14 天血清出现抗 hCP1 和 hZP3p 抗体。这些抗体也结合人透明带, 表明天然 B 细胞表位也存在于 hZP3p 上。

Paterson 等^[4]用合成的 hZP3 341 ~ 360 肽段免疫猴, 获得滴度达 1:5 000 的抗体。强化后可维持在这一水平。抗血清也能识别 rhZP3。受免疫的 3 只猴分别导致 19、19 和 27 周的不育。由此可见, hZP3 的 334 ~ 360 肽段对精卵结合是重要的。

利用 hZP3 的 334 ~ 360 序列和外源辅助 T 细胞表位序列, 我们设计了人透明带 B 细胞表位嵌合肽 (BCP) 并合成了编码该肽段的 DNA^[4], 利用该 DNA 构建了重组基因和重组病毒 z3bcp^[5]。本研究

* 收稿日期: 2002-11-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30271370); 广东省自然科学基金资助项目 (010398)

作者简介: 曹佐武 (1963 年生), 男, 副研究员; E-mail: caozowu@yahoo.com.cn

将用该重组病毒感染昆虫细胞体外表达该嵌合肽, 并研究该表达产物的抗原性及其与人透明带的免疫交叉反应。为发展透明带避孕疫苗探寻既可能诱导特异抗体又可能排除卵巢自身免疫疾病的特异抗原。

1 材料和方法

1.1 主要材料

z3bcp 重组病毒前期工作制备, sf9 细胞由中山大学生物医药中心提供, 无血清昆虫细胞培养液为 Hyclone 公司产品, 免疫组化试剂盒是 Boster 公司产品。

1.2 方 法

1.2.1 人透明带的 B 细胞表位嵌合肽基因在杆状病毒中的表达 挑选密度适中, 状态良好的 sf9 细胞, 每瓶中加入 1 小滴重组病毒 (z3bcp) 液, 27℃培养。用重组病毒感染昆虫细胞一定时间后, 取细胞培养液上清, 加入蛋白酶抑制剂 PMSF, 5 000 g 离心取上清, 透析过夜, 冷冻干燥浓缩。取正常 sf9 细胞的培养液样品作对照。

1.2.2 表达产物的 Tricine SDS PAGE 分析 为了分离小分子的表达产物, 采用了改进的 Tricine SDS-PAGE 系统, 制作 3 层不连续的梯度胶。制胶方法为, 先注入小孔胶, 再覆盖以夹层胶, 然后铺浓缩胶。制备好的病毒感染的昆虫细胞培养液上清样品取 10 μL, 加入 10 μL 上样缓冲液, 沸水浴 5 min。在蛋白电泳装置 (Bio-Rad) 的上槽加入负极电泳液, 下槽加入正极电泳液, 按照设定的顺序点样, 进行恒流 (20 mA) 电泳。电泳结束后, 用去离子水洗 3~4 次, 加入 5 倍凝胶体积的 w=0.05% 考马斯亮蓝 R 250 水溶液, 室温染色 1 h。用脱色液洗脱至出现清晰的条带。

1.2.3 制备抗血清 PAGE 胶用纯水漂洗 3 次, 用手术刀切下含感染液特异肽的相应条带的胶条, 研磨成末。取 PAGE 胶上对照泳道的相应位置的胶条研磨成粉。与加入卡介苗 (BCG) 的完全弗氏佐剂混合, 用玻璃匀浆器混匀, 边滴入边研磨直至形成均一性的乳状液。

小鼠随机分两组。实验组: 5 只昆明鼠 (No. 1~5), 注射重组病毒感染液的特异肽的凝胶乳化剂。对照组: 5 只昆明鼠 (No. 6~10), 注射电泳对照泳道的等位凝胶条乳化剂。

免疫注射诱导抗血清。免疫开始当天 (第 0 天) 分别腹腔注射 0.2 mL 的完全弗氏佐剂乳化剂。第 14, 21, 28 及 35 天分别皮下注射感染液特异肽或空白凝胶条的不完全弗氏佐剂乳化液 1 次。第

35 天后继续每周强化注射一次, 每次强化注射的前一天眼眶取血制备血清。通过免疫扩散试验检验抗血清的产生。

1.2.4 免疫细胞化学试验 临床取卵泡组织, 固定, 脱水, 切片。取人卵巢组织切片进行酶标免疫细胞化学试验。用新配置的 $\varphi=2\%$ H₂O₂/PBS 溶液中处理切片 30 min, 抑制内源性的过氧化物酶。小鼠抗血清用 10 mg/mL BSA/PBS 液稀释 15 倍, 对照小鼠的血清也同样稀释 15 倍。试验组切片用经稀释的抗血清 (第一抗体) 孵育, 对照组切片用对照血清室温孵育 30 min, PBS 洗涤后, 用 10 mg/mL BSA/PBS 稀释辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG (IgG-HRP) 25 倍, 用经稀释的 IgG-HRP 室温孵育 30 min。PBS 洗涤后, 加入底物液 (DAB-H₂O₂) 显色 5~7 min, 蒸馏水洗涤终止反应, 再用 PBS 洗涤。封片后显微镜观察。

2 结 果

2.1 表达产物的分离

用重组病毒 z3bcp 感染 sf9 细胞后, 细胞停止分裂、变圆胀大、细胞内出现逐渐增大的病毒泡。取细胞培养液电泳分析表达产物。

由于 ZP3 嵌合肽相对分子质量很小, 用常规的 SDS PAGE 不能分辨出这种小分子肽, 采用特制的 Tricine-SDS PAGE 不连续胶电泳后, 用重组病毒 z3bcp 感染的实验组细胞培养液样品分离出相对分子质量约为 6 000 的条带 (图 1 剪头指示), 而正常细胞培养液中没有相对应的条带, 判断其为 ZP3 嵌合肽基因的表达产物。

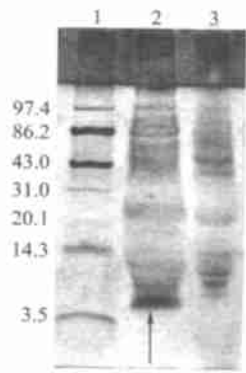


图 1 Tricine-SDS-PAGE 电泳图

Fig 1 Infection medium by Tricine-SDS-PAGE

- 1: 标准相对分子质量蛋白
- 2: 重组病毒 z3bcp 感染液
- 3: 正常 sf9 细胞培养液

2.2 特异肽的抗血清

用电泳分离出的小分子特异肽免疫小鼠, 7 周

后取血制备血清, 进行双向免疫扩散试验, 实验组 1、3 号鼠的血清出现一条沉淀线, 推测其已经产生抗体, 其它小鼠以及对照组小鼠未能形成沉淀线, 未发现抗体产生。

2.3 表达产物的免疫原性

分别用阳性血清和对照血清进行免疫细胞化学试验。人卵泡组织切片分别用对照血清和阳性抗血清孵育后, 经辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠 IgG 反应后显色, 发现经小鼠抗血清孵育后染色的切片, 在卵细胞和颗粒层细胞之间的透明带区有一条棕黄色的带包绕卵细胞, 而周围组织和卵细胞内很少或没有棕色 (图 2 箭头指示)。用对照血清孵育的切片同样方法染色, 没有发现卵泡透明带区域有特异的棕黄色 (图 3 箭头指示)。说明 1、3 号小鼠的抗血清与人卵泡的透明带有特异性结合, 即小鼠血清中产生了抗人透明带成分的抗体。

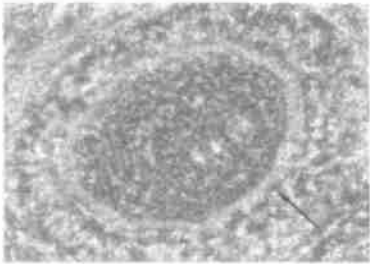


图 2 人透明带 (箭头指) 与抗 BCP 抗血清特异结合 (400×)

Fig. 2 Human zona pellucida (arrowhead) reacted with mouse anti-BCP antiserum (400×)

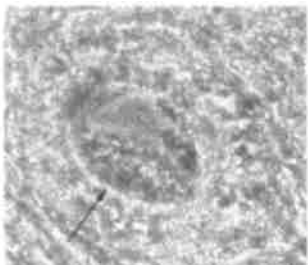


图 3 与对照血清孵育的人透明带 (箭头指) (200×)

Fig. 3 Human zona pellucida (arrowhead) incubated with control serum (200×)

3 讨 论

杆状病毒表达系统 (BEVS) 是真核表达系统, 用杆状病毒系统表达真核生物基因具有原核表达系统无可比拟的优越性, 如翻译后加工, 可使肽链产生 N-和 O-糖基化、磷酸化等, 还可进行精确的蛋白折叠, 更接近天然肽的结构, 合成的蛋白有与

天然蛋白相似的结构和活性^[9]。

PharMingen 公司的杆状病毒表达转移载体 pAcGP67 有一个杆状病毒多角体蛋白的强启动子。ACNPV 的多角体蛋白基因的强启动子可促进外源基因的高效表达。该启动子的最大活性在感染的特晚期, 即当病毒感染细胞后即将发生裂解时^[7]。所用的杆状病毒表达载体带有分泌信号肽序列, 表达产物可分泌到细胞外, 容易从细胞培养液中分离。

作者自行设计和合成的人 ZP3 的 B 细胞表位嵌合肽 (BCP) DNA 经 *Eco*RI 和 *Bam*HI 双酶切后, 与具有相同黏性末端的线形化转移载体 pAcGP67 连接, 形成重组质粒。重组质粒与线性化的 BaculoGold 基因组 DNA 共转染 *sf9* 昆虫细胞, 得到重组病毒 *z3bcp*。用该病毒进一步感染昆虫细胞可表达重组的 BCP。

由于所设计的人 BCP 嵌合肽只有 49 个氨基酸, 用常规定 SDS PAGE 难于有效分离该小分子肽。改用 Tricine SDS PAGE 系统后, 利用“小孔胶+夹层胶+浓缩胶”模式制作不连续的梯度胶, 对小分子肽的分辨率明显提高。

用重组病毒感染的昆虫细胞培养液和正常细胞培养液进行聚丙烯酰胺电泳, 通过相对分子质量大小和对比分析, 重组病毒感染的细胞培养显示一条特异带, 大小约为 6 000, 推断是重组基因的表达产物。但由于没有检测人透明带的免疫试剂盒, 不能用 Western blot 方法验证。本研究电泳分离重组病毒感染液的特异蛋白, 并利用该特异蛋白免疫动物制备抗血清, 通过与人卵巢切片的透明带的免疫细胞化学试验来证实其免疫活性, 并因此确定是否为透明带嵌合肽重组基因的表达产物。

酶免疫细胞化学技术是一种特异性强、灵敏度高、新兴技术, 特别是后来改进的标记第二抗体的方法已广泛用于免疫组化研究中, 其中辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的抗体应用最为普遍。HRP 是一种具有免疫原性的酶, HRP 与抗体结合成为具有免疫活性和酶催化活性的结合物, 结合物与相应抗原反应成为酶标记抗体抗原复合物, 这种复合物定位于组织细胞中的特异抗原所在的位置, 而复合物上的 HRP 与底物 H_2O_2 -二氨基联苯胺 (DAB) 反应能在光镜下呈鲜明而稳定的棕色沉淀物, 这样把组织细胞中的抗原位置显示出来^[8]。

当用阳性抗血清和对照血清分别孵育人卵巢组织切片进行免疫细胞化学试验时, 阳性血清能与人透明带发生反应, 使切片的透明带区域显示棕色, 其他区域没有明显的棕色。对照血清不能使人卵巢切片的透明带区域特异显色。

但免疫小鼠只是在强化免疫 5 次后才出现抗体,除了可能存在抗原分子内在结构的原因外,可能涉及以下原因:①抗原分子较小,有可能影响其免疫原性;②感染液经聚丙烯酰胺电泳后,分离出来的小分子蛋白质含量少,切下胶带研磨后,特别是与弗氏佐剂混合后粘附多,注射量难于控制;凝胶粉末与佐剂混合后很容易水油分离,不利于抗原量的掌握,达不到预想的免疫效果;③免疫小鼠的个体差异性。

不过,部分小鼠在强化注射免疫后产生了抗血清,免疫细胞化学试验结果表明,抗血清能与人透明带特异结合,说明该特异肽具有抗原性,能诱发抗血清与人透明带特异结合。因此可以判断,该小分子肽是所设计的嵌合肽的重组基因的表达产物。

参考文献:

[1] RHIM S h, MILLAR S E, ROBEY F, et al. Autoimmune disease of the ovary induced by a ZP3 peptide from the mouse zona pellucida[J] . J Clin Invest, 1992, 89: 28.

[2] PATERSON M, WILSON M R, MORRIS K D, et, al. Evaluation of the contraceptive potential of recombinant human ZP3 and human ZP3 peptides in a primate model: Their safety and efficacy[J] . Am J Reprod Immunol, 1998, 40: 198.

[3] BAGAVANT H, FUSI F M, BAISCH J, et al. Immunogenicity and contraceptive potential of a human zona pellucida 3 peptide vaccine[J] . Biol Reprod, 1997, 56(3) : 764.

[4] 曹佐武, 杨林, 潘善培, 等. 人 ZP3 的 B 细胞表位嵌合肽 DNA 的设计和合成[J] . 暨南大学学报(医学版), 2000, 21(4): 42.

[5] CAO Z W, YANG L, LIU S L, et al, The expression of a gene encoding a chimeric peptide of sperm receptor-associated B-cell epitope[J] . Dev Reprod Biol 2001, 10(suppl.): 60.

[6] KIDD I M, EMERY V C. The use of baculoviruses as expression vectors [J] . Applied Biochemistry and Biotechnology, 1993, 42: 137.

[7] 黎路林. 杆状病毒表达载体系统[M] . 武汉: 华中师范大学出版社, 1996: 45—53.

[8] 郑一守, 杨秀珍. 免疫细胞化学及其在生物学和医学上的应用[M] . 南京: 南京大学出版社, 1990: 125—184.

Studies on the Immunocytochemistry of hZP3 B-cell Epitope Chimeric Peptide Expressed by Baculovirus Expression System

CAO Zuo wu¹, YANG Lin², ZHENG Hui³, LIU Sui ling⁴, XIAO Luan j uan¹, XIE Qi xuan¹, WANG Zi neng⁵
(1. Center for Reproductive Immunology Research, Jinan University, Guangzhou 510632, China;
2. Biopharmaceutical Center, Sun Yat sen University, Guangzhou 510275, China;
3. Department of Physiology, College of Medicine, Jinan University, Guangzhou 510632, China;
4. 3rd Affiliated Hospital, Sun Yat sen University, Guangzhou 510630, China;
5. Department of Ob Gyn, College of Medicine, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: To produce the recombinant B cell epitope chimeric peptide (BCP) of human zona pellucida 3 (hZP3) and study its immunogenicity and cross reactivity with human zona pellucida, recombinant virus (z3bcp virus) containing hZP3 BCP DNA fragment was used to infect *sf9* cells to express BCP. Tricine SDS-PAGE was performed to resolve the specific product of small molecular mass. The antiserum against recombinant BCP was produced by immunization of mice. Immunocytochemical assay was performed to test the cross reactivity of BCP with human zona pellucida. After *sf9* cells were infected by the recombinant virus, a specific peptide band was separated from the medium of the z3bcp virus-infected cells by PAGE. The molecular weight of the specific peptide is about 6 000, as compared to the standard protein. No identical band was observed in the sample of the normal *sf9* cells. Immunocytochemical assay showed that antibody against the specific peptide is specifically bound to the zona pellucida on human's ovary sections. These results suggest that the hZP3 BCP gene was successfully expressed in the *sf9* cells. The recombinant BCP is antigenic in animals to induce antibody cross reacted with human zona pellucida.

Key words: hZP3; chimeric peptide; immunocytochemistry; Baculovirus