

应用乙肝核心抗原增强肌肉抑制素免疫原性的研究

马 毅¹,陈小强²,王文杰¹,李 晴³,关 宏³,安晓荣³,陈永福³

(1.天津市畜牧兽医研究所,天津 300112;2.天津农学院,天津 300384;

3.中国农业大学,农业生物技术国家重点实验室,北京 100094)

摘要:为提高肌肉抑制素(Myostatin, MSTN)免疫原性,进行了乙肝核心抗原(HBcAg)作为分子佐剂可能性的研究。利用PCR方法获得了MSTN的C端片段,并分别在乙肝核心抗原的N端、C端及中间位点融合,构建了3个融合表达克隆:pET-30a-MSTN/ HBcAg(N)、pET-30a-MSTN/ HBcAg(C)和pET-30a-MSTN/ HBcAg(M),转化大肠杆菌后IPTG诱导表达,然后利用Ni²⁺亲和层析纯化融合蛋白。应用重组蛋白免疫小鼠后利用间接ELISA法检测抗血清效价。结果表明:融合蛋白免疫效果要显著优于MSTN($P < 0.05$);融合蛋白MSTN/ HBcAg(M)的免疫效果最佳。乙肝核心抗原可以作为分子佐剂以增强肌肉抑制素免疫原性。

关键词:肌肉抑制素;乙肝核心抗原;融合蛋白;免疫原性

中图分类号:S852.4⁺4 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2009)05-0197-04

Study on the Improvement of Immunogenicity of Myostatin with Hepatitis B Core Antigen

MA Yi¹, CHEN Xiao-qiang², WANG Wen-jie¹, LI Qing³, GUAN Hong³, AN Xiao-rong³, CHEN Yong-fu³

(1. Tianjin Institute of Animal Science and Veterinary, Tianjin 300112, China; 2. Tianjin Agricultural

University, Tianjin 300384, China; 3. State Key Laboratory for Agrobiotechnology, China Agricultural

University, Beijing 100094, China)

Abstract: Myostatin is a member of the TGF β superfamily that functions as a negative regulator of skeletal muscle development in mammals. Targeting the myostatin pathway may be an effective strategy for increasing muscle growth. To improve immunogenicity of myostatin, the possibility of hepatitis B core antigen as molecular adjuvant was studied. First, myostatin C-domain was amplified by PCR and fused to the gene of hepatitis B core antigen at the position of N-terminal, C-terminal and internal respectively. Then three expression vector pET-30a-MSTN/ HBcAg(N), pET-30a-MSTN/ HBcAg(C) and pET-30a-MSTN/ HBcAg(M) was constructed. The fused proteins were expressed in *E. coli*, and were purified by Ni²⁺ affinity chromatography. Then male Kunming white mice were immunized with single fused protein or recombinant C-domain. The indirect ELISA assay was used to detect the titer of antiserum against myostatin. The results shown: The immune effect of fused proteins was significantly better than that of recombinant C-domain ($P < 0.05$); The immune effect of fused protein MSTN/ HBcAg(M) was the best in three fused protein. These results proved that HBcAg could be used as molecular adjuvant to improve the immunogenicity of myostatin.

Key words: Myostatin; HBcAg; Fused protein; Immunogenicity

1997年美国John Hopkins大学的McPherron等^[1]从小鼠骨骼肌cDNA文库中克隆出一个新基因肌肉抑制素(Myostatin, MSTN)。MSTN是调控肌肉生长的重要负调控因子,可抑制肌肉细胞的增殖和分化^[2,3],甚至导致个体严重消瘦^[4]。利用基因敲除技术获得的MSTN缺失小鼠表现出肌肉肥大和肌

纤维增多等症状^[1]。体外注射抗MSTN单克隆抗体可有效改善Duchenne型肌营养不良小鼠模型的症状,并恢复其肌肉功能^[5,6]。这提示,阻断MSTN的作用途径后,可以有效促进肌肉的生长和发育。

乙肝核心抗原(HBcAg)具有很强的免疫原性,能以T细胞依赖及T细胞非依赖作用方式产生免疫

收稿日期:2009-04-22

基金项目:天津市自然科学基金(08JCYBJC04500)

作者简介:马毅(1976-),男,天津人,博士,副研究员,主要从事动物基因工程研究。

反应。HBcAg 作为分子佐剂,同自身免疫原性不强的抗原决定簇融合后可增强其免疫原性。近年已有一些这方面的成功例子:如口蹄疫病毒、脊髓灰质炎病毒、人绒毛膜促性腺激素等^[7-9]。但遗憾的是,尚未有 HBcAg 同 MSTN 融合后增强 MSTN 免疫原性的报道。已有研究证实,不同蛋白同 HBcAg 融合时,在不同的融合位点所获得融合蛋白的免疫原性不尽相同^[10]。为此,本研究以 HBcAg 为分子佐剂,构建 MSTN 在 HBcAg 不同位点融合的表达结构,确定 MSTN 同 HBcAg 的最佳融合位点,为进一步研制抗 MSTN 基因工程肽苗奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

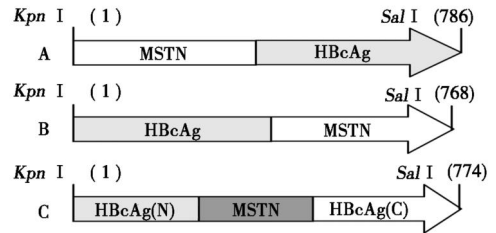
pMD18-T、pET-30a-c (+)、克隆有 HBcAg 的 pMD18-T-HBcAg 质粒载体为本实验室冻存。MSTN 的重组 C 端蛋白由本实验室冻存。高效感受态 BL21 细菌细胞购于北京博大泰克生物基因技术有限公司。RNase、限制性核酸内切酶、T4DNA 连接酶均购于大连 Takara 生物公司。绵羊基因组为本实验室自备。成年雄性昆明白小鼠购自协和医科大学。完全弗氏佐剂,弗氏不完全佐剂购自 Sigma 公司。PCR 引物由北京三博公司合成。

1.2 方法

1.2.1 MSTN 在 HBcAg 氨端融合克隆的构建 根据 GeneBank 中 MSTN 序列 (AF019622),应用 primer5.0 软件设计引物 P1 (5'-TCCAGGTACC-GATTTTGGCCTTGATTGTGATG-3') 和 P2 (3'-CATC-TAGCGACACCC ACGAGTGGTACCTAAC-5'),从绵羊基因组 DNA 中扩增 MSTN。根据 GeneBank 中 HBcAg 序列 (AF517488) 设计引物 P3 (5'-TCTAC-CATGGCTTGGGTGGCTTTAGGCCA-3') 和 P4 (3'-ATAGG-ATAGTTGCGA AGGCACTCAGCTGTAGA-5'),从 pMD18-T-HBcAg 中扩增 HBcAg。以 Nco 分别酶切 MSTN 和 HBcAg,经连接后利用 P1 和 P4 进行再扩增。利用 Kpn 和 Sal 酶切扩增产物与表达载体 pET-30a-c (+),经连接后获得 MSTN 在 HBcAg 的 N 端融合克隆 pET-30a-c (+)-MSTN/ HBcAg(N) (图 1)。完成后进行酶切和测序鉴定。

1.2.2 MSTN 在 HBcAg 羧端融合克隆的构建 根据 MSTN 序列设计引物 P5 (5'-AAGCG GTACC ATG-GACATTG ACCCTTATAA-3') 和 P6 (3'-GATAG-GATAGITCGGAAGCGGTACCTTAG-5'),从绵羊基因组 DNA 中扩增 MSTN。根据 HBcAg 序列设计引物 P7 (5'-TCCACCATGGGATTTTGGCCTTGATTGTGATG-

3') 和 P8 (3'-TAGCGACACCCACGAGTACTCAGCTGTAGA-5'),从 pMD18-HBcAg 中扩增 HBcAg。以 Nco 分别酶切 MSTN 和 HBcAg,经连接后再扩增。用 Kpn 和 Sal 酶切扩增产物与 pET-30a-c (+),连接后获得 MSTN 在 HBcAg 的 C 端融合克隆 pET-30a-MSTN/ HBcAg(C) (图 1)。



A. MSTN/ HBcAg (N); B. MSTN/ HBcAg (C); C. MSTN/ HBcAg (M).

图 1 MSTN 与 HBcAg 融合基因的构建策略图

Fig.1 Schematic diagram of the construction of the fused gene of MSTN and HBcAg

1.2.3 MSTN 在 HBcAg 中间位点融合克隆的构建

根据 MSTN 序列设计引物 P9 (3'-CATCTACCGA-CACCCACGAGTCTTAAGATCA-5'),应用 P7 和 P9 从绵羊基因组 DNA 中扩增 MSTN。根据 HBcAg 序列设计引物 P10 (3'-CCACCCATGATTAAATCTTCTAGG-TACCTACG-5') 和 P11 (5'-AGATGAATTC CCAGCATC-TAGGGACCTAGTAG-3'),应用 P1 和 P10 从 pMD18-HBcAg 中扩增 HBcAg 的 N 端,用 P11 和 P4 扩增 C 端。以内切酶切割相应片段,经连接后进行再扩增。利用 Kpn 和 Sal 酶切扩增产物与 pET-30a-c (+),经连接后获得 MSTN 在 HBcAg 中间位点的融合克隆 pET-30a-MSTN/ HBcAg(M) (图 1)。

1.2.4 融合蛋白的表达和纯化 将表达载体分别转化宿主细胞 BL21 (DE3) 后,从对照菌和重组菌分别挑取 1 个菌落,接入 1 mL 含卡那霉素 (100 μg/mL) 的 LB 培养基,37 培养过夜。取出 50 μL 过夜培养物接入 5 mL LB 培养基,37 震荡培养至对数中期 ($A_{550} = 0.6$) 时加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L,37 继续通气培养 4 h 后收集菌液进行 15 % SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 以检测其诱导表达情况。确定融合蛋白表达后收集诱导后菌液,10 000 r/min 离心 15 min 后进行超声波破碎处理,Triton X-100 提取包涵体后应用 8 mol/L 尿素溶解,然后进行 Ni^{2+} 亲和层析,纯化融合蛋白,并进行 15 % SDS-PAGE 分析纯化效果。用 PBS 对纯化的融合蛋白进行透析处理以去除尿素并进行蛋白复性,然后应用 Bradford 法对复性后的融合蛋白进行定量分析。

1.2.5 MSTN 与 HBcAg 融合蛋白免疫原性的分析

选取体重 20 ~ 25 g 成年健康昆明白雄性小鼠在交替光照 (12 h 光照,12 h 黑暗),22 条件下饲养。

将 40 只小鼠随机分为 5 组 ($N=8$), 第一组为空白对照组, 采用 PBS 免疫; 第二组为试验组, 采用 PBS + MSTN 免疫; 第三组为试验组, 采用 PBS + MSTN/ HBcAg(N) 免疫; 第四组为试验组, 采用 PBS + MSTN/ HBcAg(C) 免疫; 第五组为试验组, 采用 PBS + MSTN/ HBcAg(M) 免疫。

将重组蛋白用 PBS 稀释成 1.5 mg/mL, 与等体积弗氏完全佐剂混合后注射昆明白小鼠。分多点背部皮内注射, 每只抗原注射量约 200 μ g。初次免疫 28 d 后开始加强免疫, 以后 14 d 进行 1 次, 共 3 次。加强免疫时采用弗氏不完全佐剂, 抗原量减半。第 3 次加强免疫 7 d 后眼底静脉丛采血, 间接 ELISA 法测抗血清效价。

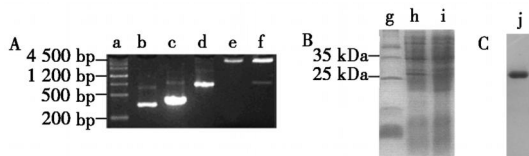
1.3 数据统计

试验结果以平均值 \pm 标准误表示, 利用 SPSS 软件进行 t 检验, 显著性水平设置为 0.05。间接 ELISA 法测抗体效价时每个样品重复测量 3 次取平均值。

2 结果与分析

2.1 融合蛋白的构建、表达及纯化

2.1.1 *MSTN* 与 *HBcAg* 的 N 端融合克隆的构建
为了证明所构建表达载体的正确性, 首先对 pEF-30a-MSTN/ HBcAg(N) 质粒进行单酶切, 获得了 6 000 bp 的目的片段; 经 *Kpn* 和 *Sal* 双酶切后获得 2 个片段, 大小分别约为 790 bp 和 5 300 bp。进一步测序表明该载体构建正确。IPTG 诱导后得到约 28 kDa 大小的蛋白条带, 符合预期结果。纯化效果良好 (图 2)。



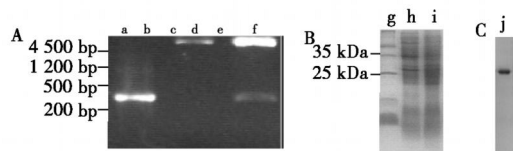
A. pEF-30a-MSTN/ HBcAg(N) 的酶切鉴定; B. 蛋白的表达; C. 蛋白的纯化; a. 核酸 Marker; b. *MSTN* 的 PCR 产物; c. *HBcAg* 的 PCR 产物; d. 融合片段 *MSTN/ HBcAg*(N) 的 PCR 产物; e. *Kpn* 单酶切; f. *Kpn* 和 *Sal* 双酶切; g. 蛋白 Marker; h. IPTG 诱导表达; i. 阴性对照; j. 纯化后蛋白。
A. Restriction enzyme identification of pEF-30a-MSTN/ HBcAg(N); B. Expression of protein pEF-30a-MSTN/ HBcAg(N); C. Purification of pEF-30a-MSTN/ HBcAg(N); a. DNA Marker; b. PCR products of *MSTN*; c. PCR products of *HBcAg*; d. PCR products of *MSTN/ HBcAg*(N); e. Single restriction of *Kpn*; f. Double restriction of *Kpn* and *Sal*; g. Protein marker; h. Inducing expression of IPTG; i. Negative control; j. Protein after purification.

图 2 *MSTN/ HBcAg*(N) 的构建、表达及纯化

Fig. 2 Construction, expression and purification of *MSTN/ HBcAg*(N)

2.1.2 *MSTN* 与 *HBcAg* 的 C 端融合克隆的构建
pEF-30a-MSTN/ HBcAg(C) 进行 *Kpn* 单酶切后获得了 6 000 bp 的片段; 经 *Kpn* 和 *Sal* 双酶切后获得

2 个片段, 2 片段大小分别约为 770 bp 和 5 300 bp。进一步测序分析表明, 该载体构建正确。IPTG 诱导后得到约 28 kDa 大小的蛋白条带, 符合预期结果。纯化效果良好 (图 3)。

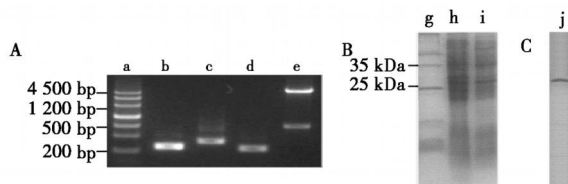


A. pEF-30a-MSTN/ HBcAg(C) 的酶切鉴定; B. 蛋白的表达; C. 蛋白的纯化; a. 核酸 Marker; b. *MSTN* 的 PCR 产物; c. *HBcAg* 的 PCR 产物; d. 融合片段 *MSTN/ HBcAg* 的 PCR 产物; e. *Kpn* 单酶切; f. *Kpn* 和 *Sal* 双酶切; g. 蛋白 Marker; h. IPTG 诱导表达; i. 阴性对照; j. 纯化后蛋白。
A. Restriction enzyme identification of pEF-30a-MSTN/ HBcAg(C); B. Expression of protein pEF-30a-MSTN/ HBcAg(C); C. Purification of pEF-30a-MSTN/ HBcAg(C); a. DNA Marker; b. PCR products of *MSTN*; c. PCR products of *HBcAg*; d. PCR products of *MSTN/ HBcAg*(C); e. Single restriction of *Kpn*; f. Double restriction of *Kpn* and *Sal*; g. Protein marker; h. Inducing expression of IPTG; i. Negative control; j. Protein after purification.

图 3 *MSTN/ HBcAg*(C) 的构建、表达及纯化

Fig. 3 Construction, expression and purification of *MSTN/ HBcAg*(C)

2.1.3 *MSTN* 与 *HBcAg* 中间融合克隆的构建
对 pEF-30a-MSTN/ HBcAg(M) 经 *Kpn* 和 *Sal* 双酶切获得 2 个片段, 两片段大小分别约为 780 bp 和 5 300 bp。进一步测序分析表明, 该载体构建正确。IPTG 诱导后得到约 28 kDa 大小的蛋白条带, 符合预期结果。纯化效果良好 (图 4)。



A. pEF-30a-MSTN/ HBcAg(M) 的酶切鉴定; B. 蛋白的表达; C. 蛋白的纯化; a. 核酸 Marker; b. *HBcAg* 的 N 端 PCR 产物; c. *MSTN* 的 PCR 产物; d. *HBcAg* 的 C 端 PCR 产物; e. *Kpn* 和 *Sal* 双酶切; f. 蛋白 Marker; g. IPTG 诱导表达; h. 阴性对照; i. 纯化后蛋白。
A. Restriction enzyme identification of pEF-30a-MSTN/ HBcAg(M); B. Expression of protein pEF-30a-MSTN/ HBcAg(M); C. Purification of pEF-30a-MSTN/ HBcAg(M); a. DNA Marker; b. PCR products of *MSTN*; c. PCR products of *HBcAg*; d. PCR products of *MSTN/ HBcAg*(M); e. Double restriction of *Kpn* and *Sal*; f. Protein marker; g. Inducing expression of IPTG; h. Negative control; i. Protein after purification.

图 4 *MSTN/ HBcAg*(M) 的构建、表达及纯化

Fig. 4 Construction, expression and purification of *MSTN/ HBcAg*(M)

2.2 融合蛋白的免疫原性

将 MSTN 的重组 C 端以 2 mg/L 浓度包被聚苯乙烯反应板, 应用间接 ELISA 测抗血清滴度, 以 P/N 2.0 判定为阳性。检测结果显示, 重组蛋白免疫小鼠后的抗血清滴度均达到 1 250 000 以上, 同空白对照组相比差异极显著 ($P < 0.01$) (图 5)。重组蛋白的免疫效果也有所差异, 融合蛋白的免疫效果优

于 MSTN 组,其中 MSTN/ HBcAg(M) 组的免疫效果最佳,在滴度为 1 250 000 时的 A_{450} 吸光度为 $0.062\ 1 \pm 0.002\ 3$,而 MSTN 组仅为 $0.036\ 8 \pm 0.001\ 9$,存在显著差异 ($P < 0.05$)。

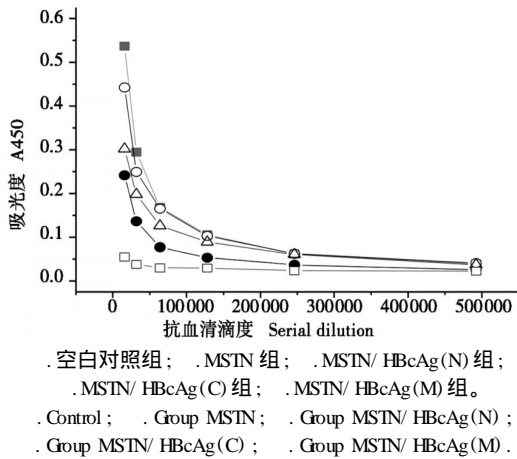


图 5 间接 ELISA 分析重组蛋白抗血清滴度

Fig. 5 Indirect ELISA analysis of antiserum of recombinant protein

3 讨论

自 1997 年发现 MSTN 以来,人们已经对 MSTN 的来源、结构、功能等进行了大量研究,并证实 MSTN 不仅参与正常生理活动,还同肌肉萎缩、爱滋病等疾病相关^[2,4]。在这些疾病中都发现了 MSTN 表达的显著增高。利用基因敲除技术所获得的转基因小鼠中,肌肉质量显著增加^[5]。利用将 MSTN 的抗体注射 mdx 模型小鼠后也观察到了肌肉生长状况的改善^[1]。这提示通过特异性抗体阻断 MSTN 的作用通路可以有效地促进肌肉的生长发育。本研究分析了 HBcAg 的融合位点对 MSTN 免疫原性的影响,为进一步研发可增加家畜肌肉产量的 MSTN 疫苗提供理论依据。

HBcAg 具有较强的免疫原性,能以 T 细胞依赖和非依赖方式产生抗体。目前已有许多以 HBcAg 为分子佐剂,提高目的蛋白抗原性的成功报道^[7-9],但对目的蛋白插入 HBcAg 的部位仍有不同的见解。有些学者认为外源蛋白插入 HBcAg 中间或者 C 端合适,但也有报道插入 HBcAg 的 N 端可以使外源蛋白更好的暴露,产生高滴度的抗体,同时也不影响 HBcAg 颗粒的形成^[10]。但对 MSTN 而言,尚未有关于最佳融合位点的报道。因此,本研究中将 MSTN 的 C 端片段分别融合与 HBcAg 的 N 端,C 端和中间,

大肠杆菌中获得了成功表达并进行了纯化。应用重组蛋白免疫小鼠后发现,MSTN 的 C 端在 HBcAg 的中间位点融合后的免疫效果优于仅用 MSTN 免疫后的效果,也优于在 N 端或 C 端融合后的免疫效果,这为研制抗 MSTN 基因工程肽苗,通过主动免疫途径使动物产生中和抗体,进而阻断内源性 MSTN 的作用通路并增加动物肌肉产量奠定了基础。

参考文献:

- [1] Mcpherron A C, Lawler A M, Lee S - J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF β superfamily member [J]. Nature, 1997, 387 (6628) : 83 - 90.
- [2] Thomas M, Langley B, Berry C, et al. Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation [J]. J Biol Chem, 2000, 275 (51) : 40235 - 40243.
- [3] Joulia D, Bernardi H, Garandel V, et al. Mechanisms involved in the inhibition of myoblast proliferation and differentiation by myostatin [J]. Exp Cell Res, 2003, 286 (2) : 263 - 275.
- [4] Gonzalez-Cadavid N F, Taylor W E, Yarasheski K, et al. Organization of the human myostatin gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95 (2) : 14938 - 14943.
- [5] Bogdanovich S, Krag T O, Barton E R, et al. Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade [J]. Nature, 2002, 420 (6914) : 418 - 421.
- [6] Whittmore L A, Song K, Li X, et al. Inhibition of myostatin in adult mice increases skeletal muscle mass and strength [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 300 (4) : 965 - 971.
- [7] Clarke B E, Newton S E, Carroll A R, et al. Improved immunogenicity of a peptide epitope after fusion to hepatitis B core protein [J]. Nature, 1987, 330 (6146) : 381 - 384.
- [8] Clarke B E, Brown A L, Grace K G, et al. Presentation and immunogenicity of viral epitopes on the surface of hybrid hepatitis B virus core particles produced in bacteria [J]. J Gen Virol, 1990, 71 (Pt 5) : 1109 - 1117.
- [9] Beesley K M, Francis M J, Clarke B E, et al. Expression in yeast of amino-terminal peptide fusions to hepatitis B core antigen and their immunological properties [J]. Biotechnology, 1990, 8 (7) : 644 - 649.
- [10] Guo Y H, Hao Z M, Luo J Y, et al. Construction of prokaryotic expression system of TGF β beta1 epitope gene and identification of recombinant fusion protein immunity [J]. World J Gastroenterol, 2005, 11 (40) : 6389 - 6394.