

· 专栏论著 ·

抗龋基因疫苗 pcDNA3-gtfB 整合宿主细胞基因组 DNA 的可能性研究

杨锦波 刘天佳 李继遥

【摘要】目的 用基因疫苗 pcDNA3-gtfB 免疫大鼠,探讨基因疫苗整合入宿主细胞的可能性。**方法** 将 36 只 Wistar 大鼠分为两组,一组为 pcDNA3-gtfB 颌下腺免疫组,另一组为 PBS 缓冲液颌下腺对照组。取 Wistar 大鼠颌下腺、肾脏、肝脏、心脏、肺脏、脑组织,以对照组 6 种组织基因组 DNA 为模板,加入不同梯度拷贝数的 pcDNA3-gtfB,采用 Pyrobest 聚合酶 PCR 反应体系,确定 PCR 反应敏感性。以免疫组 6 种组织基因组 DNA 为模板,检测 pcDNA3-gtfB 的整合率。**结果** 本实验 PCR 体系的检测水平为在 10 000 个组织细胞核中能检测出一个 pcDNA3-gtfB 拷贝 (1 10 000),在此检测水平下,免疫组 6 种组织基因组 DNA 中未发现整合。**结论** pcDNA3-gtfB 整合入宿主细胞基因组 DNA 的概率不超过 1 10 000,尚未发现抗龋基因疫苗 pcDNA3-gtfB 整合入宿主细胞基因组 DNA 的证据。

【关键词】 龋病; 基因疫苗; 整合

Study on Potential Anti-caries DNA Vaccine pcDNA3-gtfB Integration into Host Cell Genome

YANG Jinbo, LIU Tianjia, LI Jiyao. (Key Lab. for Oral Biomedical Engineering Ministry of Education, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

【Abstract】Objective Gene vaccine security is of concern because of the possibility of insertion mutagenesis resulting in inactivation of tumor suppressor or activation of oncogene. The purpose of this study was to examine the potential of anti-carries DNA vaccine pcDNA3-gtfB integrating into the host cell genome. **Methods** Anti-carries DNA vaccine pcDNA3-gtfB was constructed by the previous study. The gtfB gene (904 ~ 4 578 bp, genebank M17361) was cloned from *Streptococcus mutans* GS-5. 36 Wistar rats were divided into 2 groups: submandibular gland-targeted injection (SGI) group and control group. Rats in SGI group were injected with 100 µg of plasmid pcDNA3-gtfB, rats in control group with PBS solution. Genomes from submandibular gland, kidney, heart, liver, lung, and brain tissues were isolated later in 12 weeks. Genomes from different tissues were purified by low-melting agarose electrophoresis. Using the purified genomes as template, plasmid integration were examined by PCR (upper primer: 5'-ATATGGTACCATGACCGAAGCGACATCTAAGCAAGA-3', lower primer: 5'-ACTACTCGAGTTAGAACCATTGACCCTGAGCATTGC-3'). The sensitivity level of PCR was determined by adding gradient plasmid copies into genomes in control group. **Results** The examination of 6 tissues failed in revealing any evidence of integration at the sensitivity level that could detect 1 copy integration in 10 000 nuclei. **Conclusion** The potential frequency of plasmid pcDNA3-gtfB integration into host cell genome would not exceed that of the spontaneous mutation. It was indicated that pcDNA3-gtfB was genetically safe as a promising anti-carious DNA vaccine.

【Key words】 caries; DNA vaccine; integration

基因疫苗是将外源抗原基因直接导入宿主细胞内,以诱导宿主免疫系统对抗原基因所表达的抗原蛋白发生免疫应答,达到预防和治疗疾病的目的^{1,2}。其特点为制作简便,只需对编码抗原基因进行设计和克隆,省去了在体外表达和蛋白纯化的繁琐过程。核酸接种后,抗原在细胞内的表达与病原体自然感染过程相似,能够使抗原以天然构象呈递给宿主免疫系

统,持续诱导有效的体液和细胞免疫应答。然而,基因疫苗将外源性抗原基因导入宿主细胞时,存在外源性抗原基因整合入宿主细胞基因组 DNA 的可能性,因此基因疫苗的生物安全性也倍受关注³。本实验将已构建的抗龋基因疫苗 pcDNA3-gtfB 免疫 Wistar 大鼠,探讨基因疫苗 pcDNA3-gtfB 整合到大鼠细胞基因组 DNA 的可能性。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

Wistar 大鼠 (四川大学华西实验动物中心), pcDNA3-gtfB (含

3.6 kb 的葡糖基转移酶 *gtfB* 基因,四川大学华西口腔医学院龋病研究室提供)⁴, *pistol*, *Pyrobest* 聚合酶 (TaKaRa 公司,大连), DNA 提取试剂盒、小量胶回收试剂盒 (Waston 公司,上海)。

1.2 动物免疫

将 36 只 Wistar 大鼠分为两组,一组为 pcDNA3-*gtfB* 颌下腺免疫组,另一组为 PBS 缓冲液颌下腺注射组,作为对照。免疫组采用双侧颌下腺注射质粒 pcDNA-*gtfB*,每次 100 μ g,1 次/周,共 3 次,对照组采用 PBS 缓冲液注射。

1.3 组织细胞基因组 DNA 提取⁵

第一次免疫 12 周后,取免疫组和对照组 Wistar 大鼠颌下腺、肾脏、肝脏、心脏、肺脏、脑组织,各组织经液氮冷冻后,经 *pistol* 捣碎棒捣碎,采用小量组织/细胞基因组 DNA 提取试剂盒,初步抽取基因组 DNA,其中免疫组大鼠组织细胞基因组 DNA 初提物,为防止抽提过程中胞浆 pcDNA3-*gtfB* 对基因组 DNA 的污染,采用小量胶回收试剂盒,经 1% 琼脂糖凝胶电泳,80 V,1 h,再次分离纯化,获得纯化的基因组 DNA。

1.4 PCR 敏感试验⁶

以对照组 6 种组织基因组 DNA 为模板,加入不同梯度拷贝数的 pcDNA3-*gtfB*。

上游引物:5'-ATATGGTACCATGACCGAAGCGACATCTAAGCAAGA-3'。

下游引物:5'-ACTACTCAGATTGAACCATTTGACCTGACCA TTGC-3'。

采用 *Pyrobest* 聚合酶,扩增条件为:94 $^{\circ}$ C,30 s,68 $^{\circ}$ C,8 min,30 次循环,PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,80 V,1 h,凝胶图像自动分析仪分析结果,直到经 PCR 能扩增检测出 pcDNA-*gtfB*。

1.5 免疫组 pcDNA3-*gtfB* 整合率检测

以 1% 琼脂糖凝胶电泳回收分离纯化的免疫组 6 种组织基因组 DNA 为模板,PCR 引物、反应条件、电泳条件和凝胶图像分析同对照组,检测免疫组大鼠组织细胞基因组 DNA 是否有质粒 pcDNA3-*gtfB* 整合。

2 结 果

在 PCR 敏感性实验中,当在对照组各组织细胞基因组 DNA 中加入 pcDNA3-*gtfB* 的拷贝数与组织细胞核之比约为 1:10 000 时,此 PCR 反应体系即能检出呈阳性,扩增产物为 3.6 kb (图 1)。在 pcDNA3-*gtfB* 整合各组织细胞基因组的检测中,在相同的 PCR 反应体系下,免疫组各组织的 PCR 检测均呈阴性 (图 2)。因此在 10 000 个组织细胞核中能检测出一个 pcDNA3-*gtfB* 拷贝的检测水平下,免疫组 6 种组织基因组 DNA 中未发现 pcDNA3-*gtfB* 整合,即质粒 pcDNA3-*gtfB* 的整合率不超过 1:10 000。

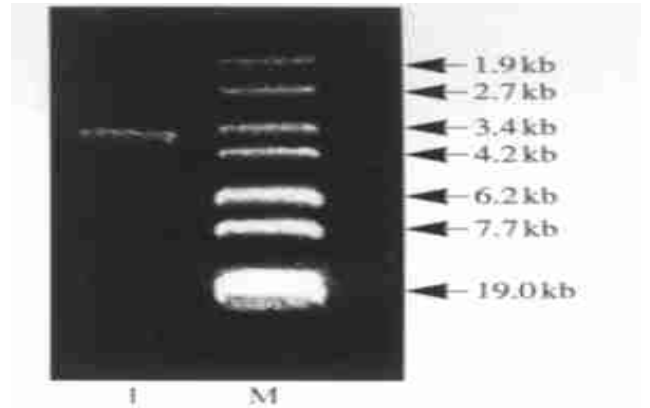


图 1 PCR 敏感性实验 PCR 阳性结果

M:DNA marker - EcoT14; 1:对照组组织 PCR 产物

Fig 1 PCR positive result of PCR sensitivity assay

M:DNA marker - EcoT14; 1:PCR product of control group

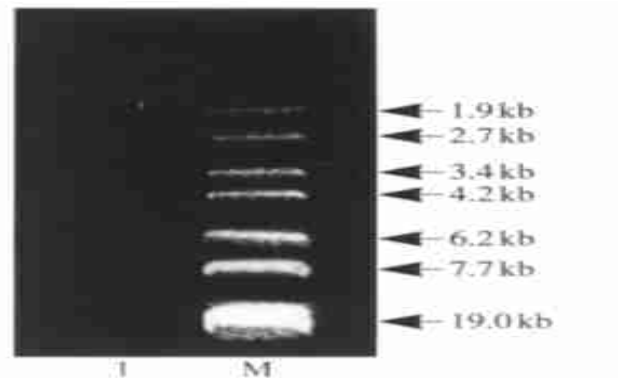


图 2 免疫组 PCR 阴性结果

M:DNA marker - EcoT14; 1:免疫组 PCR 产物

Fig 2 PCR negative result of immunization group tissues

M:DNA marker - EcoT14; 1:PCR product of immunization group tissues

3 讨 论

3.1 免疫组各组细胞基因组 DNA 的提取

质粒 DNA 主要通过宿主细胞膜上的浆膜小体介导的胞饮作用而进入宿主细胞,细胞的质粒 DNA 位于细胞浆中,完成外源性抗原基因的转录与表达,同时质粒 DNA 也存在进入细胞核,整合入宿主细胞基因组 DNA 的可能性,因此分离细胞浆中的质粒 DNA 与整合入宿主细胞基因组中的质粒 DNA 是本实验中的关键。实验中免疫组各组织基因组 DNA 经小量组织/细胞基因组 DNA 提取试剂盒初步提纯过程中,组织细胞胞浆中的 pcDNA3-*gtfB* 难免将混入组织细胞基因组 DNA 中,造成细胞基因组 DNA 的污染,以此污染的组织细胞基因组 DNA 为模板,经 PCR 检测出的假阳性整合率相当高。因此,将初提的基因组 DNA 经琼脂糖凝胶电泳再次回收提纯,避免细胞浆中的 pcDNA3-*gtfB* 对基因组的污染,保证了实验的准确性。

3.2 PCR 反应体系

PCR 反应体系的敏感性决定了质粒 DNA 可能的整合率,而 PCR 反应体系的敏感性与聚合酶、引物、模板、缓冲液、反应条件有关。基因疫苗 pcDNA3-gtfB 的构建、表达检测的前期实验均采用 Pyrobest 聚合酶反应体系,因此本实验也沿用了此反应体系^{7,8}。PCR 敏感性检测中,采用恒定的 Pyrobest 聚合酶量,引物浓度,而加入的 pcDNA3-gtfB 的拷贝递增,当 PCR 反应呈阳性时,获得此反应体系的敏感度,Pyrobest 聚合酶具有 3-5 核酸外切酶活性,可信度高,但扩增敏感性不强,若采用扩增敏感性强的聚合酶,如 Ex 聚合酶、Z 聚合酶,获得的 PCR 反应体系敏感性更高,检测出的 pcDNA-gtfB 整合率可能更低。

3.3 基因疫苗的生物安全性

关于基因疫苗的安全性最重要的是其是否具有致癌性。与致癌性相关的主要包括两方面:质粒 DNA 是否整合入宿主细胞基因组 DNA,因为整合可能导致原癌基因的激活或抑癌基因的失活。整合可分 3 类:随机插入、同源重组、逆转录病毒插入。后两者在质粒设计时均可避免,因而基因疫苗相关的以随机整合为主。应用 Southern 杂交发现,进入肌肉的质粒大部分很快被清除了;PCR 技术跟踪发现,残留质粒在肌肉内持续一个月以上。如此微量的质粒的存留,其整合机率微乎其微。研究表明,接受一次基因疫苗接种至少比一次流感病毒的感染安全得多,因为感染时进入人体细胞的病毒 DNA 量比接种时多得多。基因疫苗与基因治疗相比亦安全很多,因为目前的基因治疗常以逆转录病毒作为目的基因的载体,发生整合的危险性相对较高。抗原基因是否具有转化作用,在选择抗原蛋白时应尽量避免使用有转化功能的基因或癌基因,使用研究较透彻的抗原基因,若没有选择余地时,可终突变或形成融合蛋白灭活转化活性,从而保证使用基因的安全性。本实验检测的 pcDNA3-gtfB 整合宿主细胞基因组 DNA 的机率低于

1:10 000,且使用葡糖基转移酶 gtfB 是富含 T、B 淋巴细胞抗原表位基因,无转化功能,因此,生物安全性高。

到目前为止,虽然尚无因使用基因、核酸制剂引发肿瘤的报道,但是,最近发现运用了 20 多年的转基因植物中,出现了基因漂流现象(gene flow)⁹,即外源基因扩散到其他物种中,造成自然界基因库的混染或污染,已引起高度重视,因此虽然目前尚未发现基因疫苗整合到宿主细胞基因组的证据,但其生物安全性仍值得进一步探讨。

参考文献

- 1 Donnell JJ, Ulmer JB, Liu MA. DNA vaccine. Life Sci, 1997, 60 (3): 163-172
- 2 Davis HJ, Schirmbeck R, Reimann J, et al. DNA-mediated immunization in mice induces a potent MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocyte response to the hepatitis B envelop protein. Hum Gene Ther, 1995, 6(11): 1447-1456
- 3 Nichols WW, Ledwith BJ, Manam SV, et al. Potential DNA vaccine integration into host cell genome. Ann N Y Acad Sci, 1995, 772(27): 30-39
- 4 杨锦波,刘天佳,周学东. 变形链球菌葡糖基转移酶真核表达质粒 pcDNA3-gtfB 的构建. 华西口腔医学杂志, 2001, 19(8): 249-252
- 5 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning. 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 42-46
- 6 Dieffenbach CW, Dveksler GS. PCR Primer: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995
- 7 杨锦波,刘天佳,谭红. 重组质粒 pcDNA3-gtfB 在哺乳动物细胞中的表达. 华西口腔医学杂志, 2002, 20(5): 370-373
- 8 杨锦波,刘天佳,黄晓晶. 变形链球菌防龋基因疫苗 pcDNA3-gtfB 免疫 Wistar 大鼠的实验. 华西口腔医学杂志, 2002, 20(5): 374-376
- 9 Quist D, Chapela IH. Transgenic DNA introgressed into traditional maize landraces in Oaxaca, Mexico. Nature, 2001, 414(6863): 541-543

(2002-10-31 收稿, 2003-04-11 修回)

(本文编辑 刘怡)

全国第五届口腔色彩与新技术研讨会通知

经中华口腔医学会批准,由北京大学口腔医学院与兰州军区乌鲁木齐总医院承办的“全国第五届口腔色彩与新技术研讨会”,拟于 2003 年 8 月中旬在乌鲁木齐举办。凡有关口腔牙体、材料色彩的相关基础研究,以及近年来新技术、新材料方面的研究、经验总结均可投稿。来稿请寄论文全文及 500 字以内中、英文摘要各一份(以 word 格式 3.5 寸软盘投稿)。会议将邀请国内外著名专家教授进行专题报告,并举办国家级继续教育项目培训,授国家一类学分 10 分。欢迎参加。会务费:800 元(食宿自理)

截稿日期:2003 年 6 月 30 日(以当地邮戳为准)。

联系地址:新疆乌鲁木齐军区总医院口腔科 夏春明收,邮编:830000,电话:0991-4992702,0991-4992101 转 274, e-mail: wzkqk@hotmail.com

兰州军区乌鲁木齐总医院