

细菌内毒素对基因免疫小鼠存活率和产仔率的影响

张艳萍

青岛农业大学生命科学学院, 山东青岛 266109

摘要 作为第三代疫苗,核酸疫苗具有易操作、低成本等优点,但是其内在危险性还有待进一步研究和排除,在其制备过程中可能掺入的细菌内毒素就是影响因素之一。细菌内毒素是革兰氏阴性菌细胞壁外膜结构中的脂多糖,体内释放后会引发发热、休克等多种病理变化。国外已有体外实验证明内毒素会对小鼠的生殖系统产生影响,本研究旨在通过在体实验探讨内毒素对免疫小鼠的存活率和产仔率的影响。采用常规方法(碱裂解法)、试剂盒2种方法,提取2种pCR3.1-Sry质粒(2种质粒的区别在于是否去除内毒素,其浓度和纯度均经过琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度法分析和控制),作为核酸疫苗对小鼠进行免疫;全程统计免疫小鼠的存活率和产仔率,同时注射灭菌ddH₂O作为对照。分子生物学实验结果显示,所制备疫苗具有适宜的浓度和较高的纯度;免疫实验和统计结果显示,未去除内毒素实验组小鼠较去除内毒素组的存活率由93%下降到84%、产仔率由87.5%下降到35.7%,而去除内毒素组却与对照组没有明显差异。总之,核酸疫苗制备过程中掺入的细菌内毒素会对免疫小鼠造成较大不良影响,特别是生殖系统,体现在产仔率大幅降低。

关键词 基因疫苗;内毒素;存活率;产仔率

中图分类号 Q939.91

文献标识码 A

文章编号 1000-7857(2009)15-0044-04

Influence of Bacterial Endotoxin on Survival Rate and Birth Rate of Genetic Immunised Mice

ZHANG Yanping

Life Science College, Qingdao Agricultural University,
Qingdao 266109, China

Abstract As a third generation vaccine, the nucleic acid vaccine is easy to operate, and of low cost. However, there are some intrinsic risks involved, such as bacterial endotoxin, which should be studied and avoided. Bacterial endotoxin is contained in the outer layer surrounding cell wall of Gram negative bacteria. After being released *in vivo*, it can cause many pathological changes, such as fever and shock. Some previous *in vitro* studies show that endotoxin had bad effects on reproductive system of mice. This paper presents experimental studies on the effect of endotoxin on the survival rate and birth rate of immunised mice *in vivo*. In the experiment, two types of pCR3.1-Sry were extracted by two different methods and

used to immunise mice. One method uses the general method, and the other uses a reagent kit. Their difference lies in the fact whether the endotoxin is removed or not. And, their purity and concentration were analyzed and controlled by agarose gel electrophoresis and spectrophotometry. At the same time, sterile ddH₂O was injected into mice as control. Then, the immunising and mating tests of mice were carried out. Molecular biological results show that two types of nucleic acid vaccine were at proper concentration and high purity too. The immunity and statistical results show that compared with the group whose endotoxin was removed, the survival rate and the birth rate of the group with endotoxin were severally decreased from 93% to 84% and from 87.5% to 35.7%, respectively. At the same time, data for endotoxin-removed group is close to the control group. All the results indicate that endotoxin interfused in the nucleic acid vaccine has adverse effect on immunised mice, especially, on the reproductive system.

Keywords nucleic acid vaccine; endotoxin; survival rate; birth rate

0 引言

基因免疫或核酸免疫是应用基因工程技术,将编码某种抗原蛋白的外源基因与载体重组后直接导入动物体内,利用

收稿日期: 2009-04-08

作者简介: 张艳萍,研究方向为动物细胞工程,电子信箱: friend969@163.com

免疫原基因在宿主体内表达出的抗原蛋白引起机体的免疫应答,以达到预防和治疗疾病的目的。经外源基因重组的载体质粒称为核酸疫苗,它不存在像活苗那样的内在危险,又称为第三代疫苗,制作技术相对简单,符合最佳疫苗的条件。递送外源基因到哺乳动物组织或器官内的方法主要是肌肉注射,通常接种量为 50~200 $\mu\text{g}^{[1]}$,一般单剂量注射即可引起较强的细胞和体液免疫反应,加强免疫、大剂量注射 DNA 疫苗以及多点注射能增强免疫反应^[2]。

细菌内毒素是核酸疫苗中潜在的不安全因素,由于从细菌发酵产物中提取质粒 DNA 时可能会混入少量的细菌内毒素^[3]。细菌内毒素是革兰氏阴性菌细胞壁外膜结构中的脂多糖,细菌在生活状态时并不释放内毒素,只有当菌体自溶或用人工方法使细胞裂解后才释放出来,是革兰氏阴性菌(G-菌)引起发热、休克、器官损伤等多种病理变化和各种并发症的主要因子^[4]。微量的细菌内毒素一旦进入人(或动物)血液系统,就会在很短时间内导致昏迷和高烧,若不及时抢救,很可能危及生命^[5]。国外研究表明,卵子体外成熟培养液中存在的内毒素使得卵母细胞多精子入卵率明显上升^[6];体外培养卵母细胞时,热激会干扰细胞分裂时的细胞核形成和导致细胞凋亡,这很可能是导致卵细胞受精能力和受精后早期胚胎发育能力下降的机理^[7],而内毒素会引发动物机体的发热、休克等反应。国内研究多集中在内毒素的检测、去除及与疾病的关系,而体内实验和对核酸疫苗掺入的内毒素研究较少见。本实验使用常规碱裂解法、试剂盒 2 种方法制备了核酸疫苗并对小鼠进行免疫,全程统计小鼠的死亡数量和产仔数量,通过计算存活率和产仔率的变化探索内毒素对免疫小鼠的不良影响和影响程度,为进一步改进和推进核酸疫苗临床化提供一定参考。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂和仪器

普通成年昆明白雌性小鼠(2 月龄),购于北京大学医学部;大肠杆菌菌株 DH5a(实验室保存)、质粒 pCR3.1-Sry 和 pCR3.1(实验室保存);EndoFree Plasmid Mega Kit(QIAGEN)、Rnase(promega)、Sal I 和 Not I(MBI)、其他无机试剂为进口或国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 检测实验室保存 pCR3.1-Sry 的活性状态

经过质粒活化、转化和常规碱裂解法^[8]小量提取后,进行双酶切和 PCR 检验。根据 pCR3.1-Sry 的限制性内切酶图谱建立 20 μL 双酶切体系,依次加入 ddH₂O 15 μL 、Buffer 2 μL 、pCR3.1-Sry 2 μL 、Not I(10 U/ μL)和 Sal I(10 U/ μL)各 0.5 μL 。PCR 反应选择 50 μL 反应体系,依据多次 DNA 电泳和 PCR 实验的效果,控制模板 DNA 加入量为 1.0 μL ,其他试剂的比例按照 PCR 的标准反应体系^[9]加入;PCR 仪上的扩增程序是:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min 30 s,69 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min,共进行 30 个循环,最后于 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。由于 pCR3.1 是构建

pCR3.1-Sry 的来源,并且是商品化的质粒载体,所以实验中没有对它进行详细的检测,但后面质量控制部分中的电泳图可以显示质粒的基本活性。

1.2.2 核酸疫苗的制备和质量控制

采用常规碱裂解法、试剂盒 2 种不同方法分别对两种质粒进行大量提取,主要区别在于是否去除内毒素。常规碱裂解法没有去除内毒素;试剂盒使用 Qiagen 公司 EndoFree Plasmid Mega Kit 提取,具有去除内毒素步骤。核酸疫苗需要一定的浓度和纯度。本实验对核酸疫苗的质量控制包括电泳粗略测定和分光光度计测定,最后根据质粒在 260 nm 的吸光值 OD₂₆₀ 确定浓度,由 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 确定纯度。最后将多次提取的所有质粒混合并将其浓度稀释为适宜浓度。

1.2.3 小鼠的核酸免疫和交配实验

选择 2 月龄的雌鼠,注射质粒前 1 天在小鼠后趾处欲注射部位多点注射普鲁卡因(0.25%,100 μL)进行预处理以提高肌肉对质粒的吸收效率;1 d 后每只注射 100 μL (在两条后腿上分别注射 50 μL)质粒进行核酸免疫,即每只雌鼠注射 100 μg 质粒进行免疫;初次免疫以后,每隔 1 周加强免疫 1 次,共免疫 3 次。初次免疫之后第 4 周,以雌雄小鼠比例 4:1 开始交配实验,每天观察受精栓,直到所有受免疫雌鼠都接受交配并受孕。同时使用同剂量的灭菌 ddH₂O 对另一组母鼠采用同样的方法进行免疫,作为本实验的阴性对照。

1.2.4 核酸免疫后存活率和产仔率的统计

整个实验过程中全程统计免疫雌鼠的死亡数量和受孕后的产仔数量。

2 结果与分析

2.1 保存质粒的活性检测结果

对质粒 pCR3.1-Sry 进行 Sal I/Not I 双酶切,如图 1 中出现了约 1.3 kb 的 Sry 片段;同时该质粒也能准确地扩增出 Sry 基因片段,如图 2 所示。这说明实验室保存的真核生物表达

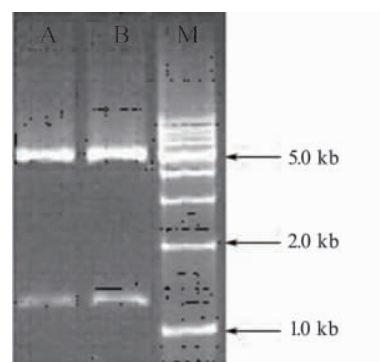


图 1 Sal I/Not I 酶切检测

Fig. 1 Restriction digest of pCR3.1-Sry by Sal I/Not I

注:A 和 B 为 pCR3.1-Sry 的 Sal I/Not I 双酶切片段,M 为 DNA 分子量标准

Notes: A and B are fragments of pCR3.1-Sry digested with Sal I and Not I, M is DNA ladder

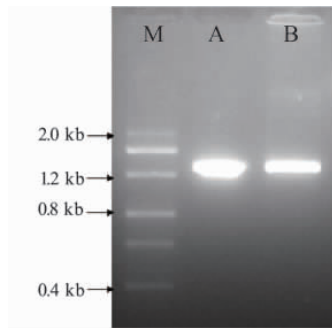


图 2 pCR3.1-Sry PCR 产物检测
Fig. 2 PCR result of pCR3.1-Sry

注:A 和 B 为 PCR 产物,M 为 DNA 分子量标准

Notes: A and B are PCR results of pCR3.1-Sry, M is DNA marker

质粒 pCR3.1-Sry 仍有较高的活性状态。

2.2 核酸疫苗的制备和质量控制结果

将两种方法制备的核酸疫苗分别混合后电泳,图3和图4的琼脂糖凝胶电泳图初步显示两种质粒状态均良好;之后的紫外分光光度计检测,OD₂₆₀/OD₂₈₀值均为1.9±0.1,说明纯度符合要求;碱裂解法提取的质粒260 nm的OD值约为12,即浓度约为0.6 μg/μL(对于双链DNA,1 OD相当于50 μg/mL),试剂盒提取的浓度约为4 μg/μL,稀释至1 μg/μL。

2.3 免疫小鼠存活率和产仔率统计结果

由表 1 可看出,无论是哪一种质粒,未去除内毒素的产仔率较去除内毒素的都出现了大幅的下降,分别由 87.5%降至 35.7%和由 85%降至 48%;而就存活率而言,未去除内毒素的仍然是最低的,但与去除内毒素的差异明显低于产仔率;同时平均每窝产仔量也有不同程度的下降。

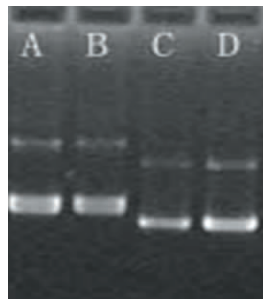


图 3 碱裂解法大量提取的 pCR3.1-Sry 和 pCR3.1
Fig. 3 pCR3.1-Sry and pCR3.1 largely extracted by
alkaline lysis

注:A 和 B 为 pCR3.1-Sry 质粒,C 和 D 为 pCR3.1 质粒

Notes: A and B are pCR3.1-Sry plasmids, C and D are pCR3.1 plasmids

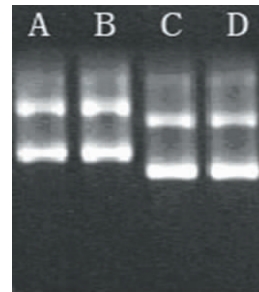


图 4 试剂盒大量提取的 pCR3.1-Sry 和 pCR3.1
Fig. 4 pCR3.1-Sry and pCR3.1 largely extracted by reagent kit

注:A 和 B 为 pCR3.1-Sry 质粒,C 和 D 为 pCR3.1 质粒

Notes: A and B are pCR3.1-Sry plasmids, C and D are pCR3.1 plasmids

表 1 比较免疫母鼠的存活率和产仔率
Table 1 Comparison of survival rate and birth rate for immunised mice

疫苗类型	注射母鼠	合笼母鼠	产仔窝数	平均每窝 产仔数	存活率/%	产仔率/%
试剂盒的 pCR3.1-Sry(去除内毒素)	40	40	35	10.4	100	87.5
常规碱裂解法的 pCR3.1-Sry(未去除内毒素)	50	42	15	6.5	84.0	35.7
试剂盒的 pCR3.1(去除内毒素)	20	20	17	11.5	100	85
常规碱裂解法的 pCR3.1(未去除内毒素)	60	50	24	9.9	83.3	48

3 讨论

核酸疫苗作为第3代疫苗,虽然具有较好的应用前景,但其安全性还需进一步验证才能认可,其中之一就是细菌内毒素的影响。本实验在核酸免疫的过程中发现内毒素对小鼠造成了不良的机体反应,降低了其存活率(pCR3.1-Sry组由100%降至84%,pCR3.1组由100%降至83.3%)和产仔率(pCR3.1-Sry组由87.5%降至35.7%,pCR3.1组由85%降至

48%)特别是产仔率,同时平均每窝产仔数也出现了不同程度的下降。产仔率的大幅下降和平均每窝产仔量的降低证明了内毒素会影响雌性哺乳动物的生殖系统,进而降低其生殖能力,同时使用两种不同的质粒得到相似的实验结果重复证明内毒素的危害。这与国外研究发现的内毒素影响雌性动物生殖内分泌系统结果一致^[6-7],施振旦等^[10]推断具体的机制包括抑制卵泡发育、成熟和排卵,抑制或干扰发情表现和排卵时

间,甚至抑制胚胎的发育,并通过影响体温和免疫系统分泌细胞因子对早期胚胎发育和排卵后黄体功能的建立产生不良影响。

本研究中虽然取得了预期的实验结果,但是核酸疫苗中的内毒素会不会对子代及雄性个体产生不良反应和影响程度,还有待进一步研究和验证;另外,虽然使用常规碱裂解法提取的核酸疫苗导致了较低的存活率和产仔率,但直接给与小鼠微量的内毒素是否也会产生同样的结果,这是值得思考的问题,也是本研究继续探究的方向之一。

4 结论

核酸疫苗制备过程中掺入的细菌内毒素会对小鼠机体造成较大不良反应,特别是雌性小鼠的生殖内分泌系统,体现在产仔率的大幅降低。

在核酸疫苗的临床化进程中,根除细菌内毒素是必不可少的步骤,目前出现了超滤和反渗透法^[1]等去除细菌内毒素的方法。随着各项生物技术的不断成熟和创新,相信核酸免疫这一低成本、易操作又安全有效(经过优化后)的免疫方法将会广泛应用于人类的疾病预防和治疗。

参考文献 (References)

- [1] 陈吉祥, 李广林, 薛飞群. 核酸免疫与核酸疫苗研究进展[J]. 中兽医医药杂志, 2000, 19(1): 42-44.
Chen Jixiang, Li Guanglin, Xue Feiqun. *Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine*, 2000, 19(1): 42-44.
- [2] Suarez D L, Cherry S. The effect of eukaryotic expression vectors and adjuvants on DNA vaccines in chickens using an avian influenza model [J]. *Avian Dis*, 2000, 44(4): 861-868.
- [3] 陈祖欢, 郭瀛军, 张亚男, 等. DNA 疫苗的细菌内毒素检测[J]. 中国生物工程杂志, 2004, 24(1): 27-28.

- Chen Zuhuan, Guo Yingjun, Zhang Yanan, *et al.* *China Biotechnology*, 2004, 24(1): 27-28.
- [4] 李生, 吕娟, 胡格, 等. 大肠杆菌内毒素多克隆抗体的制备与纯化[J]. 中国农学通报, 2007, 23(11): 16-19.
Li Sheng, Lu Juan, Hu Ge, *et al.* *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2007, 23(11): 16-19.
- [5] 王铮, 张惠新, 戴海平. 超滤法去除细菌内毒素[J]. 卫生研究, 2001, 30(5): 612-613.
Wang Zheng, Zhang Huixin, Dai Haiping. *Journal of Hygienere Search*, 2001, 30(5): 612-613.
- [6] Madison V, Greve T, Avery B, *et al.* The effect of endotoxin-contaminated medium on in vitro fertilization and development of bovine oocytes matured *in vitro*[J]. *Reprod Nutr Dev*, 1991, 31(2): 159-165.
- [7] Roth Z, Hansen P J. Disruption of nuclear maturation and rearrangement of cytoskeletal elements in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation[J]. *Reproduction*, 2005, 129: 235-244.
- [8] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南 [M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 1998: 19-20.
Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual*[M]. 2nd ed. Beijing: Science Press, 1989, 19-20.
- [9] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南 [M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 1998, 681.
Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual*[M]. 2nd ed. Beijing: Science Press, 1989: 681.
- [10] 施振旦, 李孝伟, 王允波, 等. 奶牛繁殖杀手——内毒素[J]. 中国奶牛, 2007(3): 29-32.
Shi Zhendan, Li Xiaowei, Wang Yunbo, *et al.* *China Dairy Cattle*, 2007(3): 29-32.
- [11] 王铮, 张惠新, 戴海平. 超滤法去除细菌内毒素 [J]. 卫生研究, 2001, 30(5): 612-613.
Wang Zheng, Zhang Huixin, Dai Haiping. *Journal of Hygienere Search*, 2001, 30(5): 612-613.

(责任编辑 吴晓丽)

·学术动态·

“第 2 届民间验方、诊疗技术学术研讨会”征文



民间确有不少一技之长的中医药人员,掌握着不少中医“绝活”,创造了疗效独特的中医诊疗技术,总结出行之有效的单方、验方,积累了比较丰富的临床经验。为此,中华中医药学会拟于 2009 年 11 月在北京召开“第 2 届民间验方、诊疗技术学术研讨会”,搭建一个交流与合作的平台。

征文内容包括:确有独特疗效的民间中医“绝活”的临床应用与推广研究,民间单方、验方的搜集整理与传承研究,中医诊疗技术、民间单方、验方的理论研究,中医诊疗技术、民间单方、验方的临床研究,民间单方、验方、中医诊疗技术的实验研究,保护民间验方与确有独特疗效的诊疗技术的思路、方法与政策建议等。论文截稿日期为 2009 年 7 月 30 日。

联系方式:北京市樱花街东大街甲 4 号中华中医药学会信息管理部(100029) 庄乾竹,康宁,孙中强;电话:010-84257895;传真:010-64214947;电子信箱:xinxibu102@126.com。