

高华义, 刘堃, 张璐, 等. 重组 CRM<sub>197</sub>-4GnRH 去势疫苗抗原分子的原核表达及免疫效果评价 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (3): 69-76.  
GAO H Y, LIU K, ZHANG L, et al. Prokaryotic expression and immunological evaluation of recombinant CRM<sub>197</sub>-4GnRH castration vaccine molecules [J].  
Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (3): 69-76.

## 重组 CRM<sub>197</sub>-4GnRH 去势疫苗抗原分子的原核表达 及免疫效果评价

高华义<sup>1,2</sup>, 刘堃<sup>2</sup>, 张璐<sup>2</sup>, 王永芳<sup>3</sup>, 任东兴<sup>2</sup>, 郭钰洁<sup>2</sup>, 武毅<sup>4</sup>,  
申雁冰<sup>1</sup>, 付旭彬<sup>2\*</sup>, 王敏<sup>1\*</sup>

1. 天津科技大学 生物工程学院, 天津 300457;
2. 天津瑞普生物技术股份有限公司, 天津 300308;
3. 天津海关动植物与食品检测中心, 天津 300461;
4. 南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095)

**摘要:** 通过大肠杆菌表达系统对 CRM<sub>197</sub>-4GnRH 重组去势疫苗抗原进行表达, 采用不同种类佐剂制备疫苗, 研究其对大鼠的免疫去势作用, 为获得 1 种免疫效果好、有效期长、生产成本低的促性腺激素释放激素 (GnRH) 免疫去势基因工程疫苗提供借鉴。采用白喉毒素无毒突变体 (CRM<sub>197</sub>) 与 4 拷贝 GnRH 串联, 将 CRM<sub>197</sub>-4GnRH 基因与表达载体连接, 并通过优化试验确定大肠杆菌的最优表达条件, 用 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定目标蛋白的表达情况。将融合蛋白与不同佐剂乳化, 制备成 9 种测试疫苗后分别免疫大鼠, 测定血清中 GnRH 抗体滴度和睾酮浓度。结果显示, 重组大肠杆菌的最优表达条件为诱导时间表达 5 h, 培养基为 LB 液体培养基, IPTG 诱导浓度为 0.5 mmol/L; 通过 SDS-PAGE 和 Western blot 试验, 表明目标融合蛋白已成功表达; 动物试验结果表明, 重组疫苗水包油包水佐剂组、重组疫苗油包水佐剂组、GnRH+Th 抗原 (辅助型 T 细胞抗原) 表位 (G1 抗原) 油包水佐剂组测试疫苗免疫大鼠较其他组 GnRH 抗体滴度显著升高、睾酮浓度显著下降 ( $P<0.05$ ), 表明这 3 种疫苗具有良好的免疫去势作用。研究结果为 GnRH 免疫去势疫苗的研制奠定了基础。

**关键词:** CRM<sub>197</sub>; GnRH; 大鼠; 免疫去势

**中图分类号:** S852.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-5130(2024)03-0069-08

## Prokaryotic expression and immunological evaluation of recombinant CRM<sub>197</sub>-4GnRH castration vaccine molecules

GAO Huayi<sup>1,2</sup>, LIU Kun<sup>2</sup>, ZHANG Lu<sup>2</sup>, WANG Yongfang<sup>3</sup>, REN Dongxing<sup>2</sup>, GUO Yujie<sup>2</sup>, WU Yi<sup>4</sup>,  
SHEN Yanbing<sup>1</sup>, FU Xubin<sup>2\*</sup>, WANG Min<sup>1\*</sup>

1. College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China;
2. Tianjin Ringpu Bio-technology Co., Ltd, Tianjin 300308, China;
3. Tianjin Customs Animal and Plant and Foodstuffs Inspection Center, Tianjin 300461, China;
4. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** The CRM<sub>197</sub>-4GnRH antigen was expressed using an *Escherichia coli* expression system and vaccines were prepared with different adjuvants for immunization of rats to determine their immunocastration effects, aiming to provide insights for the development of a genetically engineered GnRH-based vaccine with optimal immunogenicity, prolonged efficacy, and cost-effectiveness for immunocastration in animal models. The CRM<sub>197</sub>-4GnRH gene was linked to the expression vector using Diphtheria toxin CRM<sub>197</sub> (Corynebacterium Diphtheriae Antigen, CRM197-Conjugate) in series with four copies of GnRH (gonadotropin releasing hormone), and the optimal expression conditions of *Escherichia coli* were determined by optimization test. The expression of the target protein was identified by SDS-PAGE and Western blot.

收稿日期: 2023-05-16; 修回日期: 2023-12-05

基金项目: 国家科学技术部资助项目 (2014DFA31180); 天津市科技支撑重点项目 (20YFZCSN00120)

第一作者: 高华义, 男, 博士, 兽医师

\* 通信作者: 王敏, 教授, 研究方向为微生物制药技术, E-mail: minw@tust.edu.cn; 付旭彬, 研究员, 研究方向为微生物制药技术, E-mail: fxb@ringpu.com。

Nine vaccines utilized for testing purposes were prepared by emulsifying the fusion protein with different adjuvants, and were then immunized with GnRH antibody titers and testosterone concentration in the serum of rats. The results showed that the optimal expression conditions of *Escherichia coli* were determined as follows: induction time, 5 h; LB liquid, medium; IPTG induction concentration, 0.5 mmol/L. The target fusion protein was successfully expressed through SDS-PAGE and Western blot analysis. The results of the animal experiments showed that the group immunized with the recombinant vaccine formulated with water-in-oil-in-water (W/O/W) adjuvant, the group immunized with the recombinant vaccine formulated with oil-in-water (O/W) adjuvant, and the group immunized with the GnRH+Th (Helper T cells) epitope (G1) formulated with oil-in-water (O/W) adjuvant, all exhibited a significant increase in GnRH antibody titer and a significant decrease in testosterone concentration, compared with the other groups ( $P < 0.05$ ). The present results indicate that the above three vaccines exhibited significant immunocastration effects, laying the foundation for the development of GnRH immunocastration vaccines.

**Keywords:** CRM<sub>197</sub>; GnRH; rats; immune castration

公猪生长过程中,体内会积聚大量雄性激素,使猪肉产生膻味,不仅影响口感、风味,还影响生猪饲养效率,因此公猪往往需要阉割去势。该过程耗费大量人力、物力,还容易导致阉割应激及外伤感染。自欧盟发布自愿中止公猪手术阉割宣言,免疫去势替代家畜、宠物的手术阉割已成必然。

促性腺激素释放激素(gonadotropin releasing hormone, GnRH)也被称为黄体生成素释放激素,由下丘脑神经细胞分泌<sup>[1]</sup>。该激素形式多种多样,目前至少已经发现24种,主要源自哺乳动物、鱼、鸟等动物的神经组织,GnRH可以通过刺激垂体合成和分泌促性腺激素,对动物的生长和生殖有重要的作用<sup>[2-3]</sup>。通过对GnRH进行改造修饰,不仅可以解决免疫系统不能识别自身激素的问题,还可以提高GnRH的免疫原性,从而可以起到免疫去势作用。在此过程中,还要特别注意其应用场景的需求,公猪免疫去势需要维持一定的免疫有效期,以便可以通过调控体系发挥其免疫去势作用<sup>[4-5]</sup>。

Ladd等<sup>[6]</sup>为了提升GnRH免疫去势疫苗的免疫原性,分别将GnRH的第1、6、10位氨基酸与破伤风类毒素进行偶联结合,通过免疫犬、兔子和大鼠,测定其血清中的抗体效价,与第6、10位氨基酸链接点疫苗相比,GnRH通过第1位氨基酸与破伤风类毒素进行的偶联免疫效果最佳。Oonk等<sup>[7]</sup>通过用D型氨基酸Lys取代GnRH第6位氨基酸,并将经过修饰后的GnRH进行连接形成二聚体,与载体蛋白OVA相连,免疫公猪后,其免疫有效率达到100%;同时,通过用Ala依次替换GnRH的每个氨基酸,并与载体蛋白偶联后免疫公猪,发现不同位置的氨基酸被取代后,其免疫原性受到的影响不同。作为全球唯一一个用于公猪免疫去势的商业化产品,美国硕腾生产的异普克去势疫苗是在GnRH的基础上去掉了第1位的氨基酸,具有一定的免疫活性<sup>[8]</sup>。除了上述提到的通过进行氨基酸的替代以提升免疫去势疫苗的效果,还可以通过增加抗原分子量,使其抗原表位增多,以多聚体的形式提升其刺激机体产生免疫反应的

能力<sup>[9]</sup>。Oonk等<sup>[7]</sup>通过用BSA载体与单个GnRH连接,之后通过测定动物血清中睾酮浓度以验证免疫有效率;并且通过同样的方式将BSA与串联的GnRH进行偶联结合,进行睾酮浓度的测定;最后结果表明,串联的GnRH与载体蛋白偶联之后形成的新分子免疫有效率可以达到100%,显著高于单个GnRH发挥的效用。Xu等<sup>[10]</sup>通过使用-hinge-MVP作为载体蛋白与单个GnRH和3个串联的GnRH进行连接,通过测试其对大鼠免疫应答反应,发现3个串联的GnRH与载体蛋白偶联后所发挥的免疫应答反应显著强于单个GnRH。

基于化学合成疫苗存在合成工艺复杂、生产成本高、批次间质控难度高等难题,国内外学者尝试使用基因工程方法制备GnRH免疫去势疫苗,其自身作为10个氨基酸的半抗原,半衰期较短,且无免疫原性,往往需要使用载体蛋白偶联修饰。而载体蛋白与单个GnRH分子的结合,其结构不稳定,免疫动物后,动物机体往往难以有效识别并将之通过抗原递呈细胞开展免疫应答,而GnRH多聚体偶联载体蛋白后可以很好的产生免疫去势作用。目前通过基因工程获取的免疫去势疫苗抗原因其表达量、免疫效果、纯化工艺和生产成本等因素,难以大规模的商业化应用。因此,开发一种适合公猪免疫去势、生产工艺简单的免疫去势基因工程疫苗,对我国生猪养殖行业意义重大。本研究采用白喉毒素无毒突变体(CRM<sub>197</sub>)与4拷贝GnRH串联,制备重组CRM<sub>197</sub>-GnRH,并分析了其免疫去势效果。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

Taq DNA聚合酶、T4 DNA连接酶、限制性核酸内切酶、dNTPs、DNA Marker、异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)、DNA纯化试剂盒,购自于TaKaRa公司;SDS-PAGE Marker,购于北京全式金生物技术股份有限公司;His Band Purification Kit,购于Novagen公司;BCG购于上海瑞楚生物科技有限公司;多肽抗

原 G1 (GnRH+Th 抗原表位)、GnRH 阳性血清来源于天津瑞普生物技术股份有限公司; Montanide ISA 61 VG (油包水佐剂)、Montanide ISA 206 VG (水包油包水佐剂)、Montanide ISA 02 VG (水溶性佐剂)、Montanide IMS 1313 VG (纳米水溶性佐剂), 购自于法国 SEPPIC 公司; A8 佐剂由南京农业大学提供; Sim-01 佐剂和 Bis-01 佐剂由清华大学提供; 酵母提取物、蛋白胨, 购于 OXOID 公司 (英国); 饱和平衡酚 (pH=8.0) 购于生工生物工程 (上海) 股份有限公司; DAB 显色试剂盒购于南京生兴生物技术有限公司; 鞣酐放免试剂盒购于北京北方生物技术研究所有限公司。

## 1.2 菌株、质粒和试验动物

菌株: 大肠杆菌 BL21-DE3、大肠杆菌 DH5 $\alpha$  来源于天津瑞普生物技术股份有限公司。

质粒: pET22b (+) (氨苄青霉素抗性, Amp<sup>r</sup>), pMD18-T (卡那霉素抗性, Kan<sup>r</sup>) 来源于天津瑞普生物技术股份有限公司。

动物: 未去势的 12 周龄健康雄性大鼠 100 只, 体重在 240~260 g 之间, 由天津瑞普生物技术股份有限公司提供, 经检查不存在隐睾和睾丸发育问题。将大鼠随机分成 10 组, 每组 10 只, 试验在天津瑞普生物技术股份有限公司空港经济区分公司动物房开展, 常规适应性饲养 1 周, 自由饮水和采食, 饲料为不含任何抗生素和抗菌药的全价鼠粮, 至第 13 周龄开始做试验。

## 1.3 重组 CRM<sub>197</sub>-4GnRH 的表达载体构建

### 1.3.1 构建表达系统

CRM<sub>197</sub>-4GnRH 基因由深圳华大基因股份有限公司合成, 在合成过程中与 pMD18-T 载体进行了连接, 从而得到重组质粒 pMD18-T-CRM<sub>197</sub>-4GnRH。用 *EcoR* I 和 *Xho* I 对 pMD18-T-CRM<sub>197</sub>-4GnRH 质粒和 pET22b (+) 载体进行双酶切。采用大肠杆菌 BL21 按照感受态细胞的制备方法予以制备, 24 h 内使用。按照《分子克隆实验指南》进行质粒的提取: 在 LB 平板中挑取 5 个单菌落, 在 LB 液体培养基 (Amp) 中 37 °C 培养。取菌液离心, 分别加入溶液 I 和溶液 II, 用等体积碱性饱和平衡酚/氯仿混合, 将上清液与等体积氯仿混匀, 将沉淀用 2 倍体积无水乙醇轻轻混匀沉淀烘干, 用 20  $\mu$ L 含有 RNA 酶的 TE (TER) 溶解质粒, 37 °C 温育 0.5 h, 仅余 DNA 片段。对质粒进行 *EcoR* I、*Xho* I 双酶切鉴定, 送深圳华大基因股份有限公司测序。将所测序的质粒以 BL (pET22b-CRM<sub>197</sub>-4GnRH) 命名。

将重组菌 BL (pET22b-CRM<sub>197</sub>-4GnRH) 置于 4 mL 含 Amp 的 LB 液体培养基内, 37 °C 过夜培养。

用超声破碎仪将所重悬的菌液处理, 取上述所得的上清液 80  $\mu$ L, 进行 SDS-PAGE 分析其是否有所需目的蛋白。

### 1.3.2 优化表达系统条件

挑取重组菌 BL 单菌落于含有 Amp 的 LB 液体培养基中, 37 °C 培养 8 h。将所取得的菌液按 1% 接种量接种到含 Amp 的 LB 液体培养基中, 37 °C, 200 r/min 培养 2~3 h, 当 OD<sub>600</sub> 值处于 0.4~0.6 时, 加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG, 37 °C 诱导培养, 在第 0、1、2、3、4、5、6、8、10 h 分别吸取 1 mL 菌液, 通过 SDS-PAGE 观察蛋白表达量, 确定最佳诱导时间。

将所取得的菌液按 1% 接种量分别接种到含 Amp 的 LB、TB、SOB、TSB 液体培养基内, 37 °C, 200 r/min 培养 2~3 h, 当 OD<sub>600</sub> 值处于 0.4~0.6 之间时, 以终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导 5 h, 吸取 1 mL 培养的菌液。通过 SDS-PAGE 观察蛋白表达量, 从而确定表达所用的最佳培养基。

将重组菌 BL 按上述方法培养后, 将其分装到 5 个试管内, 分别用终浓度 0、0.1、0.25、0.5、0.75 mmol/L IPTG 进行诱导表达, 37 °C 作用 5 h, 吸取 1 mL 培养的菌液。通过 SDS-PAGE 观察蛋白表达量, 从而确定最佳 IPTG 诱导浓度。

## 1.4 疫苗的配比与免疫

CRM<sub>197</sub>-4GnRH + Bis-01 组疫苗的制备: 称取 10.0 mg CRM<sub>197</sub>-4GnRH, 溶于 90 mL 的 PBS 中, 除菌过滤, 取 50 mL 抗原溶液加入至 50 mL 高压灭菌的 Bis-01 佐剂中, 充分乳化, 疫苗检验合格后分装于西林瓶中, 浓度为 50  $\mu$ g/mL。

CRM<sub>197</sub>-4GnRH + 02 VG 组疫苗的制备: 称取 10.0 mg CRM<sub>197</sub>-4GnRH, 溶于 90 mL 的 PBS 中, 除菌过滤, 取 50 mL 抗原溶液加入至 50 mL 高压灭菌的 Montanide ISA 02 VG 佐剂中, 充分乳化, 疫苗检验合格后分装于西林瓶中, 浓度为 50  $\mu$ g/mL。

CRM<sub>197</sub>-4GnRH + Sim-01 组疫苗的制备: 称取 10.0 mg CRM<sub>197</sub>-4GnRH, 溶于 90 mL 的 PBS 中, 除菌过滤, 取 50 mL 抗原溶液加入至 50 mL 高压灭菌的 Sim-01 佐剂中, 充分乳化, 疫苗检验合格后分装于西林瓶中, 浓度为 50  $\mu$ g/mL。

CRM<sub>197</sub>-4GnRH + 206 VG 组疫苗的制备: 称取 10.0 mg CRM<sub>197</sub>-4GnRH, 溶于 90 mL 的 PBS 中, 除菌过滤, 取 50 mL 抗原溶液加入至 50 mL 高压灭菌的 Montanide ISA 206 VG 佐剂中, 充分乳化, 疫苗检验合格后分装于西林瓶中, 浓度为 50  $\mu$ g/mL。

CRM<sub>197</sub>-4GnRH + A8 + 02 VG 组疫苗的制备: 称取 10.0 mg CRM<sub>197</sub>-4GnRH, 溶于 90 mL 的 PBS 中, 除

菌过滤, 将 A8 和 Montanide ISA 02 VG 按 1 : 1 比例配制组合佐剂, 取 50 mL 抗原溶液加入至 50 mL 高压灭菌的组合佐剂中, 充分乳化, 疫苗检验合格后分装于西林瓶中, 浓度为 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

CRM<sub>197</sub>-4GnRH+BCG+02 VG 组疫苗的制备: 称取 10.0 mg CRM<sub>197</sub>-4GnRH, 溶于 90 mL 的 PBS 中, 除菌过滤, 将 BCG 和 Montanide ISA 02 VG 按 1 : 1 比例配制组合佐剂, 取 50 mL 抗原溶液加入至 50 mL 高压灭菌的组合佐剂中, 充分乳化, 疫苗检验合格后分装于西林瓶中, 浓度为 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

CRM<sub>197</sub>-4GnRH+BCG+1313 VG 组疫苗的制备: 称取 10.0 mg CRM<sub>197</sub>-4GnRH, 溶于 90 mL 的 PBS 中, 除菌过滤, 将 BCG 和 Montanide IMS 1313 VG 按 1 : 1 比例配制组合佐剂, 取 50 mL 抗原溶液加入至 50 mL 高压灭菌的组合佐剂中, 充分乳化, 疫苗检验合格后分装于西林瓶中, 浓度为 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

CRM<sub>197</sub>-4GnRH+61 VG 组疫苗的制备: 称取 10.0 mg CRM<sub>197</sub>-4GnRH, 溶于 90 mL 的 PBS 中, 除菌过滤, 取 50 mL 抗原溶液加入至 50 mL 高压灭菌的 Montanide ISA 61 VG 佐剂中, 充分乳化, 疫苗检验合格后分装于西林瓶中, 浓度为 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

G1+61 VG 组疫苗的制备: 称取 10.0 mg 多肽抗原 G1, 溶于 90 mL 的 PBS 中, 除菌过滤, 取 50 mL 抗原溶液加入至 50 mL 高压灭菌的 Montanide ISA 61 VG 佐剂中, 充分乳化, 疫苗检验合格后分装于西林瓶中, 浓度为 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

### 1.5 抗体有效性的效果分析

将动物分为空白对照 (A 组)、CRM<sub>197</sub>-4GnRH+Bis-01 (B 组)、CRM<sub>197</sub>-4GnRH+02 VG (C 组)、CRM<sub>197</sub>-4GnRH+Sim-01 (D 组)、CRM<sub>197</sub>-4GnRH+206 VG (E 组)、CRM<sub>197</sub>-4GnRH+A8+02 VG (F 组)、CRM<sub>197</sub>-4GnRH+BCG+02 VG (G 组)、CRM<sub>197</sub>-4GnRH+BCG+1313 VG (H 组)、CRM<sub>197</sub>-4GnRH+61 VG (I 组) 和 G1+61 VG (J 组) 共 10 组。在大鼠第 13 周龄之时进行首免, 间隔两周后加强注射 1 次, 每次免疫剂量为 50  $\mu\text{g}/\text{只}$ , 注射体积为 1 mL/只; 其中空白对照用等体积的 PBS 进行注射。于第 13 周龄首免前, 眼眶取血法采血 0.75 mL, 从首免开始每隔两周采血 1 次直至第 31 周龄试验结束。将采集的血样首先置于室温条件下 0.5 h, 之后放置于 4  $^{\circ}\text{C}$  保存过夜, 3 500 r/min 离心 10 min 后, 将所得血清置于 -20  $^{\circ}\text{C}$  保存。所有组的免疫注射方式均为背部皮下注射, 每组 10 只。

### 1.6 统计学分析

把数据输入 IBM SPSS Statistics 21 统计学软件进行处理, 通过方差检验、多重比较分析其显著性与否。

## 2 结果

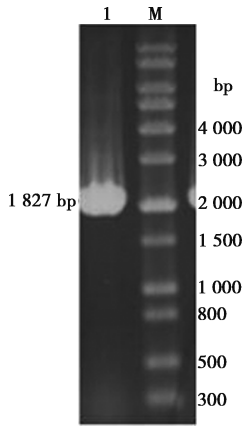
### 2.1 重组 CRM<sub>197</sub>-4GnRH 蛋白的纯化

为了构建 CRM<sub>197</sub>-4GnRH 重组表达载体, 通过将 CRM<sub>197</sub>-4GnRH 基因连接到了 pMD18-T 载体, 得到了质粒 pMD18-T-CRM<sub>197</sub>-4GnRH; 用 *EcoR* I、*Xho* I 将 pMD18-T-CRM<sub>197</sub>-4GnRH 和 pET22b (+) 载体进行了双酶切, 然后通过使用 Agarose Gel DNA Purification Kit 将目的片段 CRM<sub>197</sub>-4GnRH 与酶切后 pET22b (+) 载体的回收; 以片段 : 载体 = 5 : 1 (摩尔比) 将目的片段 CRM<sub>197</sub>-4GnRH 与 pET22b (+) 载体的连接; 然后将连接载体通过转化进入了感受态细胞 DH5 $\alpha$  中, 并通过碱裂解法提取了质粒 pET22b-CRM<sub>197</sub>-4GnRH。经过 *EcoR* I 和 *Xho* I 的双酶切鉴定, 结果表明双酶切有一个 1 827 bp 左右的片段 (图 1), 与目的片段预期大小一致, 经过测序表明确为所需目的片段。

通过挑取重组菌 BL 及宿主菌 BL pET-22b (+) 单菌落, 加入 IPTG 诱导其蛋白表达。经表达条件的优化, 确定最优的表达条件为: 诱导表达时间 5 h, 培养基为 LB 液体培养基, IPTG 诱导浓度为 0.5 mmol/L。经过最优表达条件的诱导, 将沉淀物用原培养基 1/10 体积的无菌 PBS 重悬, 将其进行了超声破碎, 经 SDS-PAGE 分析, 发现重组菌表达产物在 65 kDa 左右有 1 条明显的条带, 与预期结果相符合 (图 2)。

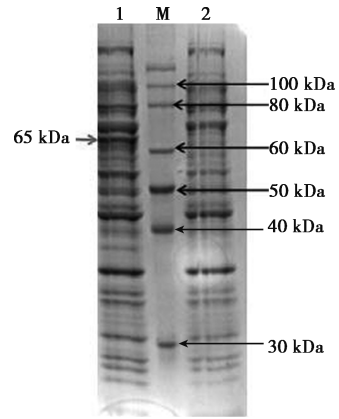
将诱导表达重组菌进行超声裂解, 用 0.5% TritonX-100 洗涤后, 用 8 mol/L 的尿素进行溶解, 将溶解后的融合蛋白 CRM<sub>197</sub>-4GnRH 过 His 镍柱, 将之前和之后的洗脱液分别用离心管收集, 中间 5 mL 洗脱液所进行的洗脱作为所需目的蛋白。将经洗脱后的样品经 SDS-PAGE 分析, 发现在 65 kDa 处有明显条带 (图 3), 与预期一致, 说明成功表达了融合蛋白。

Westem blot 分析发现, 所表达的蛋白可以与大鼠 GnRH 特异性抗血清发生反应, 经显色后发现仅有 1 条清晰条带 (图 4), 表明所获得的融合蛋白免疫学活性较好。



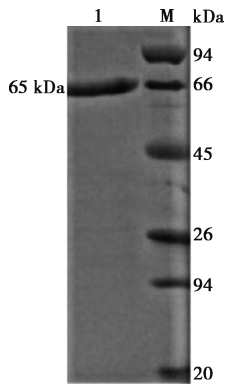
1. 双酶切片段；M. DNA Marker。

图1 重组表达载体酶切鉴定



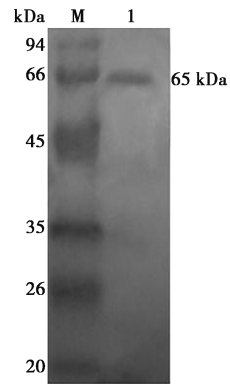
1. 重组菌蛋白；M. 蛋白 Marker；2. 原始菌蛋白对照。

图2 表达蛋白的 SDS-PAGE 分析



1. 纯化后的蛋白；M. 蛋白 Marker。

图3 纯化后蛋白的 SDS-PAGE 分析



M. 蛋白 Marker；1. 纯化后的表达蛋白。

图4 表达蛋白纯化后的 Western blot 分析

## 2.2 CRM<sub>197</sub>-4GnRH 的免疫原性

通过间接 ELISA 法测定大鼠免疫后不同时期血清中 GnRH 抗体水平，发现所有的试验组都有较高的、不同水平的抗体滴度值，免疫组抗体滴度与空白对照组相比较，免疫组大鼠血清抗体滴度均显著升高 ( $P < 0.05$ )，说明各疫苗组均产生了免疫应答，与预期一致 (图 5)。同时，发现不同佐剂免疫组在二免后 4 周左右达到稳定峰值，大概持续 10 周维持较高水平，然后呈现缓慢下降趋势。其中水包油包水佐剂组 (E 组)、油包水佐剂组 (I 组)、抗原 G1 油包水佐剂组 (J 组) 免疫去势大鼠 GnRH 抗体滴度显著高于其他组，但 3 者内部之间差异不大 ( $P > 0.05$ )；此 3 组自 17 周龄至 27 周龄，抗体维持在较高的水平，说明水包油包水佐剂和油包水佐剂可以作为免疫去势

疫苗佐剂。

## 2.3 免疫大鼠睾酮浓度的测定

通过采用放射免疫法测定大鼠血清中睾酮浓度，以免疫后血清中睾酮浓度  $< 0.1 \text{ ng/mL}$  作为疫苗有效与否的判定指标 (表 1 和图 6)。结果发现，在第 19~31 周龄时，免疫组血清睾酮浓度显著低于空白对照组 ( $P < 0.05$ )，这说明各免疫组均对免疫去势疫苗产生了免疫应答；其中，水包油包水佐剂组 (E 组)、油包水佐剂组 (I 组)、抗原 G1 油包水佐剂组 (J 组) 在第 17~27 周龄时血清睾酮浓度低于  $0.1 \text{ ng/mL}$ ，其有效率均可达到 100%，维持时间持续 10 周时间，显著低于其他组 ( $P < 0.05$ )，但 3 组之间相比差异不显著 ( $P > 0.05$ ) (图 6)。

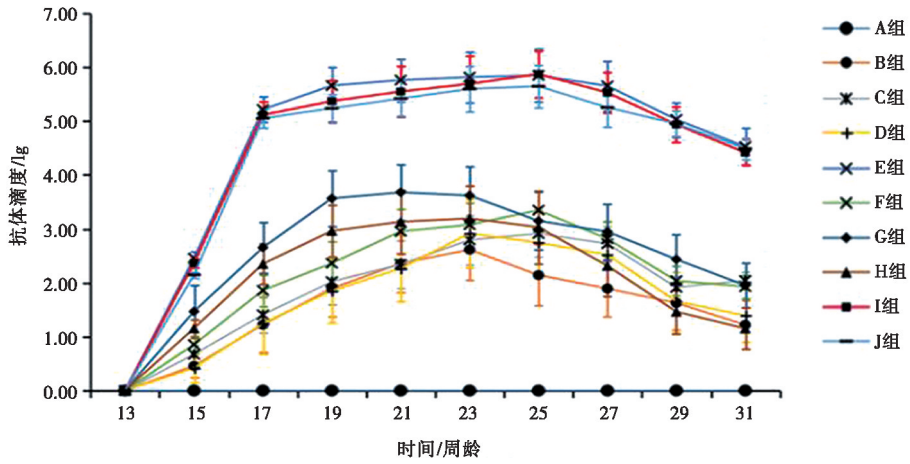


图5 大鼠血清 GnRH 抗体滴度测定

表1 免疫后不同时期有效率统计

%

组别	动物周龄									
	13	15	17	19	21	23	25	27	29	31
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E	0	40	100	100	100	100	100	100	90	0
F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
I	0	0	100	100	100	100	100	100	80	0
J	0	30	100	100	100	100	100	100	90	0

注：有效率=有效只数/免疫只数×100%，有效只数为血清中睾酮浓度<0.1 ng/mL 的大鼠数量。

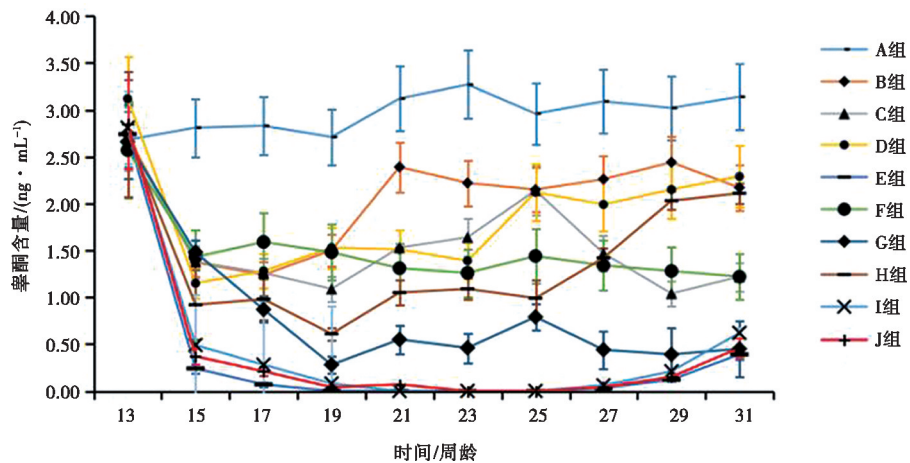


图6 免疫后不同时期对照组和免疫组血清中睾酮浓度

### 3 讨论

本文通过大肠杆菌表达系统对 CRM<sub>197</sub>-4GnRH

抗原进行了表达，采用不同种类佐剂制备疫苗进行大鼠的免疫，研究了其对大鼠的免疫去势作用。自从 Stewart 发现 GnRH 之后，朱杰青<sup>[11]</sup>和 Jung 等<sup>[12]</sup>都曾

利用大肠杆菌表达系统进行 GnRH 及其类似物的研究, 其中 Jung 等<sup>[12]</sup> 分别把犬瘟热病毒的 p35 蛋白作为载体蛋白与 GnRH 六聚体基因相连接, 同时将轮状病毒 VP6 蛋白作为载体蛋白, 将其与 6 个串联的 GnRH 基因连接, 表达后的产物对犬的免疫去势作用显著, 与研究预期一致。本研究中, 在预试验阶段尝试了将 CRM<sub>197</sub> 蛋白与抗原 G1 基因进行连接表达, 但表达量较低, 分析有可能是该质粒的稳定性差或者新型融合蛋白结构受到了空间影响, 难以有效表达<sup>[13]</sup>。这需要在蛋白的空间结构方面进行进一步的研究。

为了降低免疫去势疫苗批次间质控难度, 获得生产工艺简单的疫苗产品, 对免疫去势抗原分子进行了精确设计, 采用白喉毒素突变体 CRM<sub>197</sub> 与 4 拷贝 GnRH 串联, 以基因工程方法进行免疫去势抗原的制备; 将 CRM<sub>197</sub>-4GnRH 基因与表达载体连接, 酶切鉴定得到了 1 条 1 827 bp 的片段, 与预期一致; 优化了大肠杆菌表达条件, 优选表达条件为: 诱导时间表达 5 h、培养基为 LB 液体培养基、IPTG 诱导浓度为 0.5 mmol/L; 将纯化后的融合蛋白进行 SDS-PAGE, 发现在 65 kDa 处有明显条带, 与预期一致; 融合蛋白经过 Western blot 鉴定, 在 65 kDa 处出现 1 条较为清晰的目的条带, 表明融合蛋白具有良好的免疫学活性。

根据报道, 血清中睾酮浓度 < 0.1 ng/mL 可能是判定疫苗有效与否的指标<sup>[14]</sup>。本试验中, B 组所用佐剂为清华大学所供, 为针对新型通路的新颖亲油性疫苗佐剂, 试验中有效率偏低, 不能判定为对雄性大鼠去势免疫增效作用, 在该疫苗中其未能达到免疫增效作用, 分析其原因可能是该佐剂特异性针对新型特定通路, 其免疫机制、激活方式等存在一定的特异性, 比如其仅对特定结构或相应受体与之结合, 影响抗原产生免疫应答反应。C 组为重组疫苗水溶性佐剂组, 未能对雄性大鼠去势有免疫增效作用, 分析可能是水包油佐剂一般在注射后缓慢形成油包水乳液, 可以提供良好的水溶性, 便于制备和稳定抗原, 免疫应答反应相对温和, 其一般针对脂溶性好的抗原或需要更温和的免疫刺激抗原更加适用, 这也是常规动物疫苗往往采取油包水佐剂的原因。D 组所用佐剂为清华大学所供, 是针对于新型通路的新颖疫苗佐剂, 为亲水性佐剂, 其未能对雄性大鼠去势有免疫增效作用, 可能是由于新型特定通路的免疫机制、激活方式在不同动物个体中存在差异, 或者是其作为水溶性佐剂, 在机体内发挥免疫应答反应更加温和, 需要更高浓度抗原参与。E 组为重组疫苗水包油包水佐剂, 该种佐剂有利于疫苗在体内的吸收, 不易造成溃烂、鼓包等副作用, 17~27 周龄期间免疫有效率达到 100%, 免

疫有效期 10 周以上, 在试验过程中发现其更易于乳化, 制成的疫苗黏度小, 且水包油包水更易于吸收, 可以作为备选佐剂配比重组疫苗应用于公猪免疫去势。为了得到更好、更优良的佐剂, 通过设计了水包油佐剂、纳米水溶性佐剂, 并从清华大学、南京农业大学等取得最新实验室研究的针对于新型通路佐剂, 并分别尝试与 BCG、A8 佐剂等共用, 旨在寻找免疫效果好、安全性好、副作用少的市场化佐剂, F、G 和 H 组分别为重组疫苗水溶性佐剂与 A8 佐剂共用组、重组疫苗水溶性佐剂与 BCG 共用组和重组疫苗纳米水溶性佐剂与 BCG 共用组, 设计原则旨在既发挥免疫增效功能, 又能发挥其亲水特性, 降低油性物质对动物产生的鼓包、溃烂等问题, 在本研究中, 3 种配比佐剂结果均不理想, 未能对雄性大鼠产生免疫去势增效功能。分析可能是水包油佐剂、油包水佐剂共用乳化过程中发生相互作用或不相容现象, 导致佐剂的结构或功能发生改变, 影响其在疫苗中的性能, 使得乳化后的疫苗无法提供充分的免疫刺激或抗原的稳定性受损。I 组为重组疫苗油包水组, 其在 17~27 周龄期间时对雄性大鼠免疫有效率达 100%, 有效期可以持续 10 周以上, 可以满足公猪免疫去势有效期时长要求, 其原因是油包水佐剂作为常规使用最为广泛的佐剂, 在提供强免疫刺激、促进抗原递呈和处理、诱导免疫记忆以及稳定疫苗等方面具有优势。J 组作为阳性对照组, 为 G1 多肽抗原 (GnRH+Th 抗原表位) 油包水组, 17~27 周龄期间免疫有效率达到 100%, 至 29 周龄时降至 90%, 是目前针对公猪免疫去势研究最多的疫苗制备方法, 但其往往容易对动物接种区域造成鼓包、溃烂等副作用, 甚至引起动物死亡。总体来说, E 组、I 组作为重组 GnRH 疫苗, 可以有效对雄性大鼠进行去势, 可以作为潜在的公猪用免疫去势基因工程疫苗。

综上, 本研究在大鼠体内考察了重组去势疫苗 CRM<sub>197</sub>-4GnRH 的免疫去势效果, 将融合蛋白分别与不同佐剂乳化, 制备了 CRM<sub>197</sub>-4GnRH+Bis-01 疫苗、CRM<sub>197</sub>-4GnRH+02 VG 疫苗、CRM<sub>197</sub>-4GnRH+Sim-01 疫苗、CRM<sub>197</sub>-4GnRH+206 VG 疫苗、CRM<sub>197</sub>-4GnRH+A8+02 VG 疫苗、CRM<sub>197</sub>-4GnRH+BCG+02 VG 疫苗、CRM<sub>197</sub>-4GnRH+BCG+1313 VG 疫苗、CRM<sub>197</sub>-4GnRH+61 VG 疫苗和 G1+61 VG 疫苗, 测定了免疫后大鼠体内 GnRH 抗体滴度和睾酮水平, 发现水包油包水佐剂组 CRM<sub>197</sub>-4GnRH+206 VG、油包水佐剂组 CRM<sub>197</sub>-4GnRH+61 VG 疫苗和油包水佐剂组 G1+61 VG 疫苗可以显著提升大鼠体内 GnRH 抗体滴度, 并抑制大鼠体内睾酮水平, 显著优于其他组。通过重组去势疫苗对大鼠免疫作用的研究, 为

GnRH 免疫去势基因工程疫苗的进一步开发奠定了基础。

### 参考文献:

- [1] TSANEVA-ATANASOVA K, MINA P, CAUNT C J, et al. Decoding GnRH neurohormone pulse frequency by convergent signaling modules [J]. *J R Soc Interface*, 2012, 9 (66): 170-182.
- [2] LINAN-JIMENEZ M, RUBIN B S, KING J C. Examination of guinea pig luteinizing hormone-releasing hormone gene reveals a unique decapeptide and existence of two transcripts in the brain [J]. *Endocrinology*, 1997, 138 (10): 4123-4130.
- [3] IWAKOSHI E, TAKUWA-KURODA K, FUJISAWA Y, et al. Isolation and characterization of a GnRH-like peptide from *Octopus vulgaris* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 291 (5): 1187-1193.
- [4] TURKSTRA J A, OONK H B, SCHAAPER R H, et al. The role of the individual amino acids of a GnRH-tandem-dimer peptide used as an antigen for immunocastration of male piglets determined with systematic alanine replacements [J]. *Vaccine*, 2001, 20 (3/4): 406-412.
- [5] JUNCO J A, PESCHKE P, ZUNA I, et al. Immunotherapy of prostate cancer in a murine model using a novel GnRH based vaccine candidate [J]. *Vaccine*, 2007, 25 (50): 8460-8468.
- [6] LADD A, TSONG Y Y, PRABHU G, et al. Effects of long-term immunization against LHRH and androgen treatment on gonadal function [J]. *J Reprod Immunol*, 1989, 15 (2): 85-101.
- [7] OONK H B, TURKSTRA J A, SCHAAPER W M, et al. New GnRH-like peptide construct to optimize efficient immunocastration of male pigs by immunoneutralization of GnRH [J]. *Vaccine*, 1998, 16 (11/12): 1074-1082.
- [8] MCNAMARA M K. Immunogenic LHRH compositions and methods relating thereto: United States, 8741303 [P]. 2014-06-03.
- [9] ZANDAWALA M, TIAN S, ELPHICK M R. The evolution and nomenclature of GnRH-type and corazonin-type neuropeptide signaling systems [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2018, 264: 64-77.
- [10] XU J, LIU J, PENG D, et al. The immunogenicity of recombinant and dimeric gonadotrophin-releasing hormone vaccines incorporating a T-helper epitope and GnRH or repeated GnRH units [J]. *J Immunol Methods*, 2004, 289 (1/2): 111-122.
- [11] 朱杰青. 促黄体素释放激素在大肠杆菌中的融合表达及抗原性鉴定 [D]. 南京: 南京农业大学, 2002.
- [12] JUNG M J, MOON Y C, CHO I H, et al. Induction of castration by immunization of male dogs with recombinant gonadotropin-releasing hormone (GnRH) - canine distemper virus (CDV) T helper cell epitope p35 [J]. *J Vet Sci*, 2005, 6 (1): 21-24.
- [13] HICKEY J M, TOPRANI V M, KAUR K, et al. Analytical comparability assessments of 5 recombinant CRM<sub>197</sub> proteins from different manufacturers and expression systems [J]. *J Pharm. Sci*, 2018, 107 (7): 1806-1819.
- [14] 陈文娟, 魏冰, 吕传忠, 等. GnRH 二聚体和 GnRH 并列二聚体合成肽疫苗对大鼠的免疫去势效果 [J]. *中国兽医杂志*, 2017, 53 (6): 14-17.