

乙脑 E 蛋白与结核杆菌 HSP70 的融合蛋白对 BALB/c 小鼠特异性免疫的影响

葛菲菲¹ 邱亚峰¹ 杨耀武² 陈溥言^{1*}

(¹ 南京农业大学动物医学院 农业部动物疫病诊断与免疫重点实验室 南京 210095)

(² 中国预防医学科学院病毒研究所 北京 100052)

摘 要 研究酵母表达的乙脑病毒 (Japanese Encephalitis virus) E 蛋白主要抗原片段与结核杆菌热休克蛋白 70 (hsp70) 形成的融合蛋白对小鼠细胞免疫和体液免疫的影响。采用腹腔内注射蛋白的方法免疫小鼠,以直接免疫 E 蛋白主要抗原片段和以 E 蛋白主要抗原片段和单独表达的 hsp70 两者均以 50 μ mol 的量进行混合后的蛋白免疫的小鼠作为对照,用半定量 RT-PCR 检测细胞免疫因子 IL-2mRNA 的水平,IL-2 是细胞介导的免疫反应和巨噬细胞激活中的关键分子,MTT 法检测淋巴细胞的增殖情况以及通过 ELISA 检测抗体水平,从这 3 个方面来评价融合与未融合蛋白以及等量混合后的免疫效果。结果 E 蛋白主要抗原片段与结核杆菌 hsp70 重组后,mIL-2 淋巴细胞的增殖以及抗体水平均较重组前明显升高,因此,以乙脑 E-HSP70 融合蛋白免疫能增强小鼠针对 E 蛋白主要抗原片段的细胞免疫和体液免疫。

关键词 乙脑病毒 E 蛋白主要抗原片段 结核杆菌热休克蛋白 70 mIL-2 淋巴细胞的增殖 抗体水平

中图分类号:R373.3 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2005)03-0441-05

流行性乙型脑炎(简称乙脑)是由蚊虫传播引起人类或马的中枢神经系统感染的病毒性疾病^[1],JEV 基因组为单股正链 RNA,长约 11kb,含单一开放阅读框^[2],编码一个全长 3432 个氨基酸的多蛋白前体,该多蛋白前体经蛋白酶切割加工,产生 3 个结构蛋白:核衣壳蛋白(C)、膜蛋白(PeM/M)、包膜糖蛋白(E);7 个非结构蛋白(NS1、NS2a、NS2b、NS3、NS4a、NS4b、NS5)^[2,3]。在许多亚洲国家使用的第一代疫苗是乙脑病毒的灭活苗和弱毒苗,都取得了很大的成就^[4],但是鼠脑来源的乙脑疫苗在过敏问题上越来越突出,使用灭活疫苗的一个主要问题是缺乏长效免疫^[5],由于需要多次重复免疫,使得免疫程序繁琐。因此国际上对改善发展新的乙脑疫苗的要求很迫切^[6]。E 蛋白上有特异性抗体的中和表位,可诱导免疫动物产生中和抗体,本试验选取了根据计算机软件分析出 E 蛋白上抗原决定簇比较集中的区域作为融合表达中的抗原肽^[7]。本文旨在研究酵母表达的乙脑 E-HSP70 融合蛋白是否能增强小鼠针对 E 蛋白主要抗原片段的特异性细胞免疫和体液免疫,为进一步研制乙脑的诊断抗原和基因工程疫苗打基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 DNA 和菌株 人结核杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*) H37Rv 标准株的基因组,大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 酵母菌株 X-33, PET-E 原核表达载体为本实验室杨耀武构建^[7] pMD18-T SK, pPICZ α -A。

1.1.2 动物 BALB/c 小鼠 6~8 周龄,由南京医科大学实验动物中心提供,均为雌性。

1.1.3 主要试剂和仪器 EcoRI, BamHI, XbaI 和 SacI 内切酶, T4 DNA 连接酶, Taq 酶及 LA Taq 酶均购自大连 TaKaRa 公司;PCR 引物由上海博亚公司合成;DNA 凝胶回收试剂盒为上海华舜生物工程有限公司产品;中分子量标准蛋白购自创瑞公司;Western 印迹试剂盒, HRP-SPA 及酶标羊抗鼠二抗均为武汉博士德生物工程有限公司产品;其它试剂均为国产或进口分析纯试剂。电穿孔仪、电泳仪、电转仪均为 BioRad 公司产品;PCR 扩增仪为 Gene 公司产品。

1.2 酵母表达载体 pPICZ α -E, pPICZ α -HSP70 和 pPICZ α -E-HSP70 的构建和表达

1.2.1 酵母表达载体的构建 设计扩增单独表达 E 蛋白基因主要抗原片段的引物, pI(5') : 5'-GAAT-

* 通讯作者。Tel : 86-25-84396028 ; E-mail : aid@njau.edu.cn

作者简介 葛菲菲 (1980 -) 女, 江苏泰州人, 博士研究生, 主要研究方向为分子病毒学与免疫学。E-mail : gffqyf@njau.edu.cn

收稿日期 2004-10-12, 修回日期 2005-12-20

TCATCCTCTGCTGTTGGTC-3'; p2 (3'): 5'-TCTA-GAACGAAGGGTTCACTGTCAC-3', 5'端带有 *EcoR* I 位点, 3'端带有 *Xba* I 位点。设计扩增单独表达 hsp70 的引物, p1 (5'): 5'-GAATTCATGGCTCGTGC GGTCGGGATCGACC-3'; p2 (3'): 5'-TCTAGAACTTG-GCCTCCCGGCCGTCGTCG-3', 5'端带有 *EcoR* I 位点, 3'端带有 *Xba* I 位点。设计扩增融合 E 蛋白基因的引物, 其 5'端引物与上同; 3'端引物为 5'-GGATC-CGAAGGGTTCACTGTCAC-3', 3'端带有 *Bam*H I 位点。设计扩增融合 hsp70 基因的引物, p1 (5'): 5'-GGATCCATGGCTCGTCCGGTCCGGATCGACC-3'; p2 (3'): 5'-TCTAGAACTTGGCCTCCCGGCCG TCGTCG-3', 5'端带有 *Bam*H I 位点, 3'端带有 *Xba* I 位点。

这 3 种载体构建完毕后, 质粒中外源基因的序列测定由上海博亚生物公司完成。

1.2.2 酵母载体的表达:将重组质粒及载体对照 pPICZ α -A 线性化后电穿孔转化, 用 PCR 鉴定重组子, 检测引物为: p1 (5') 5'-GACTGGTCCAATT-GACAAGC-3' (5'-Pichia primer); p2 (3') 5'-GCAAAT-GGCATTCTGACATCC-3' (3' Pichia primer)。PCR 反应体系 (25 μ L): 重组子基因组 1 μ g, 2.5 μ L 10 \times LA PCR Buffer, 1.25 μ L DMSO, 10pmol 的检测引物, 2 μ L 25mmol/L MgCl₂, 0.625U LA *Taq* 酶, 20mmol dNTP。PCR 条件: 95 $^{\circ}$ C 5min; 94 $^{\circ}$ C 1min, 54 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 4min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10min。阳性重组子经甲醇诱导后, E 蛋白主要抗原片段, hsp70 和 E-HSP70 融合蛋白在毕赤酵母中表达, 进行 SDS-PAGE 分析和免疫印迹检测。

1.3 蛋白质的制备

由于本试验中, 酵母表达的外源蛋白较纯, 自体蛋白极少而且不需考虑 LPS 的影响, 所以在免疫小鼠之前, 将表达的蛋白用 PBS 进行透析, 在 GeneQuant pro RNA/DNA Calculator 定量后就可直接进行免疫。

1.4 免疫小鼠

分为 3 组, 每组 10 只; 用 2.2 μ g (50pmol) E 蛋白主要抗原片段, 2.2 μ g (50pmol) 的 E 蛋白主要抗原片段和 3.5 μ g (50pmol) 的 hsp70 混合, 5.7 μ g (50pmol) E-HSP70 融合蛋白进行腹腔内注射, 3 周后进行第二次免疫。

1.5 脾淋巴细胞的获取

第二次免疫后 2 周处死小鼠, 在超净台内无菌操作取出脾脏, 制备成单个脾细胞悬液, 取淋巴细胞分离液入离心管管底, 沿管壁小心加入两倍体积的

脾细胞悬液, 1200r/min 水平离心 20min, 沿管壁小心吸出界面层细胞, PBS 洗涤 3 次, 计数细胞, 使达到 1 \times 10⁶/mL, 接种入六孔板, 用终浓度为 18 μ g/mL 的 E 蛋白主要抗原片段同时加进板内刺激。

1.6 细胞免疫因子 mL-2 的半定量 RT-PCR 检测

IL-2 是细胞介导的免疫反应和巨噬细胞激活中的关键分子, 以小鼠的 β -actin 作为内标, 其引物为: p1 (5'): 5'-CCCATCTACGAGGGCTAT-3', p2 (3'): 5'-CTGGAAGGTGGACAGTGAG-3', PCR 产物长度为 570bp。IL-2 的引物为: p1 (5'): 5'-AAGCTCTA-CAGCGGAAGCAC-3', p2 (3'): 5'-ATCCAGAACATGC-CGCAGAG-3', PCR 产物长度为 231bp。

用 TRIzol 法提取细胞 mRNA, 用无 RNA 酶水溶解后, 定量, 每份样品取 2 μ g 进行 RT, 首先在 PCR 管内加入 0.8pmol oligdT, 2 μ g mRNA, 直接在 PCR 仪上进行, 70 $^{\circ}$ C 5min; 随后在同一管内加入 0.8mmol dNTP, 5 μ L 5 \times RT-Buffer, 1 μ L M-MLV (200U/ μ L), 1 μ L RNA 抑制剂 (5U/ μ L), 最后用水补足到 25 μ L, 在 PCR 仪上进行, 37 $^{\circ}$ C 1h, 95 $^{\circ}$ C 5min; 在 cDNA 合成后, 取出 4 μ L RT 产物进入 PCR 系统, 5 μ L 10 \times PCR Buffer, 3 μ L DMSO, 0.4pmol IL-2 的引物, 0.4pmol β -actin 的引物, 4 μ L 25mmol/L MgCl₂, 2U *rTaq* 酶, 0.4mmol dNTP, 用水补足到 50 μ L 体系, 进行如下程序: 95 $^{\circ}$ C 3min, 94 $^{\circ}$ C 30s, 50.3 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 30s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10min。0.8% 琼脂糖凝胶电泳, 读灰度值并进行数值分析。

1.7 MTT 分析

在分离脾细胞后, 接种到 96 孔板内, 使达到 2 \times 10⁴/孔, 每孔加入细胞的体积为 100 μ L, 同时加入终浓度为 18 μ g/mL 的 E 蛋白, 将细胞板培养 48h, 提前 4h 取出, 加 MTT (原始浓度 5mg/mL) 20 μ L/孔, 继续培养 4h, 取出后弃上清, 加 DMSO 100 μ L/孔, 使结晶溶解, 在微量振荡器震荡, 测 OD₅₇₀ 值。

1.8 抗体滴度的测定

以 10pmol 的 E 蛋白主要抗原片段包被, 4 $^{\circ}$ C 过夜, PBS 洗涤, 37 $^{\circ}$ C 封闭 2h, PBS 洗涤, 加小鼠血清样作用 1h, 洗涤, 加入羊抗鼠的酶标二抗 1h, PBS 洗涤, 加入 OPD 显色, 反应 15min 后, 加入 2mol/L H₂SO₄ 终止反应。以 OD₄₉₀ 大于 0.2 的血清最高稀释度作为抗体滴度。

2 结果

2.1 重组载体的构建及表达

图 1 为重组表达载体的构建, 经测序, 这 3 个重组载体中外源基因的阅读框和方向正确, 经甲醇诱

导后, pPICZα-E 表达出 44kD 和 50kD 两种糖基化程度不同的蛋白, 表达量较高, 约为 290mg/L, pPICZα-HSP70 表达的蛋白分子量为 70kD, 表达量为 178mg/L, pPICZα-E-HSP70 表达出 114kD 的蛋白, 表达量为 33mg/L, 由于该蛋白分子量较大, 采用次高分子量蛋白质 Marker 作参照, 电泳效果不理想, 但从图中可

得出该融合蛋白分子量大约在 114kD, 这是根据未重组的空载体表达的蛋白大小推出, 经过改进, 使用中分子量蛋白质 Marker 使得电泳效果大大改善, 经 Western blot 分析, E 蛋白和 E-HSP70 融合蛋白均具有较好的抗原性 (图 2)。

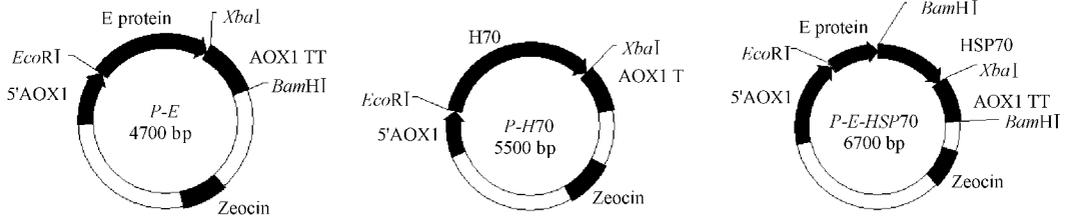


图 1 重组表达载体 pPICZα-E, pPICZα-HSP70 和 pPICZα-E-HSP70 的构建

Fig.1 Construction of recombinant expression vector pPICZα-E, pPICZα-HSP70 and pPICZα-E-HSP70

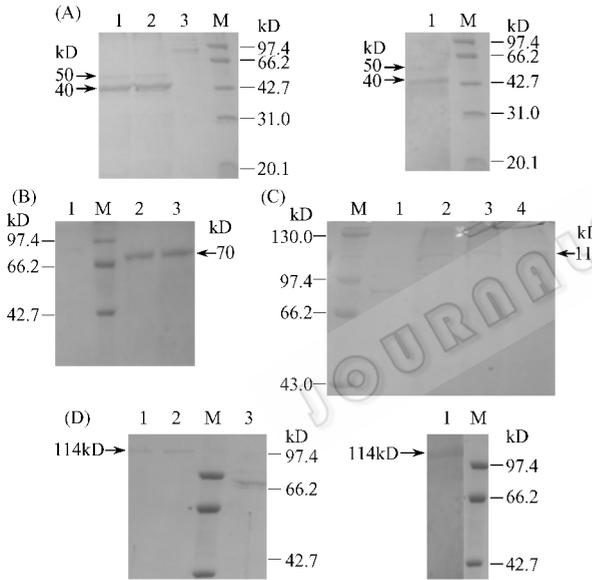


图 2 (A) E 蛋白主要抗原片段的 SDS-PAGE 和 Western blot (B) hsp70 蛋白的 SDS-PAGE (C) E-HSP70 融合蛋白的 SDS-PAGE (D) 经过改进后 E-HSP70 融合蛋白的 SDS-PAGE 和 Western blot

Fig.2 (A) SDS-PAGE and Western blot analysis of major antigenic segment of E protein; (B) SDS-PAGE analysis of hsp70; (C) SDS-PAGE analysis of E-HSP70 fusion protein; (D) Improved SDS-PAGE and Western blot analysis of E-HSP70 fusion protein

A: The left is SDS-PAGE analysis of supernatant of pPICZα-E/X-33, the right is Western blot analysis. 1, 2, pPICZα-E; 3, pPICZα-A; M, Marker.
 B: SDS-PAGE analysis of supernatant of pPICZα-H70/X-33. M, Marker; 1, pPICZα-A; 2, 3, pPICZα-H70.
 C: SDS-PAGE analysis of supernatant of pPICZα-E-H70/X-33. M, Marker; 1, pPICZα-A; 2, 3, pPICZα-E-HSP70;
 D: Improved SDS-PAGE and Western blot analysis of pPICZα-E-HSP70/X-33. M, Marker; 1, 2, pPICZα-E-HSP70; 3, pPICZα-A.

2.2 细胞免疫因子 mIL-2 的半定量 RT-PCR 检测结果

每只小鼠取相同量的 mRNA 进行逆转录 (反应体系相同), 取等量的 RT 产物进行 PCR, 用同体积的 PCR 产物进行核酸琼脂糖电泳, 以了解这 3 组 IL-2 mRNA 水平的差异。经分析, β-actin 的量大致相同, 表明试验结果可靠 (图略), 免疫 E 蛋白组中 IL-2 灰度值的平均值为 1.375 ± 0.0212^b , E + HSP70 蛋白组中 IL-2 灰度值的平均值为 1.01 ± 0.0141^b , 免疫 E-HSP70 融合蛋白组中 IL-2 灰度值的平均值为 2.23 ± 0.212^a , 融合蛋白组与其它两组差异显著, 而 E 蛋白组和 E + HSP70 蛋白组两者之间差异不显著 ($P < 0.05$) (图 3-A)。

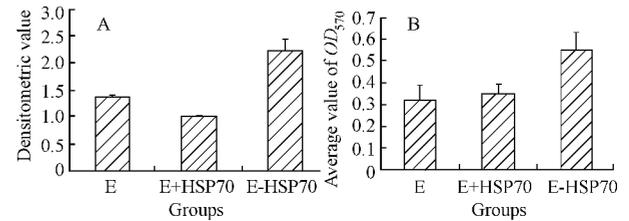


图 3 (A) E 蛋白, E + HSP70 蛋白和 E - HSP70 融合蛋白分别免疫小鼠后 mIL-2 产生数量的比较 (B) E 蛋白, E + HSP70 混合蛋白和 E - HSP70 融合蛋白分别免疫小鼠后淋巴细胞增殖的比较

Fig.3 (A) Comparison of mIL-2 produced by mice immunized with E protein, E + HSP70 and E - HSP70 fusion protein; (B) Comparison of proliferation of lymphocytes in mice immunized with E protein, E + HSP70 and E - HSP70 fusion protein

Data marked different letters differentiated significantly ($P < 0.05$).

2.3 MTT

免疫 E 蛋白的小鼠组 OD570 平均值为 0.32 ± 0.068^b , E 蛋白主要抗原片段和 HSP70 混合蛋白组

为 0.35 ± 0.042^b , E-HSP70 融合蛋白组为 0.55 ± 0.0812^a 这 3 组经统计学分析, E 蛋白组和 E + HSP70 混合蛋白组差异不显著, 而这两组均与 E-HSP70 融合蛋白组差异显著 ($P < 0.05$) (图 3-B)。

2.4 ELISA 结果

经测定 E 蛋白组产生的抗 E 蛋白主要抗原片段的抗体滴度为 $10^{3.2}$, E + HSP70 蛋白组产生的抗 E 蛋白主要抗原片段的抗体滴度为 $10^{3.2}$, E-HSP70 蛋白组产生的抗 E 蛋白主要抗原片段的抗体滴度为 $10^{3.5}$, 这一结果表明与 hsp70 融合后的蛋白引起的体液免疫效果比单独表达的效果好。

3 讨论

目前在动物疫苗中我们使用的佐剂常常制作烦琐, 使用不方便而且有些佐剂的价格较贵, 阻碍了其在临床上的广泛使用, 另外有可能导致过敏反应。结核杆菌热休克蛋白 70 具有分子佐剂和载体效应^[2,3], 是结核杆菌的主要抗原成分之一, 可诱导和增强机体体液免疫和细胞免疫的发生, 因此用该基因与一些传染病或寄生虫病原体的抗原基因融合表达以制备疫苗, 借助它的载体分子效应和佐剂作用, 以提高病原体抗原的免疫原性和疫苗的免疫预防效果。有关 hsp70 能增强与其融合表达的抗原肽的免疫反应涉及到 hsp70 自身也含有多个 T 细胞表位, 所以就增加了 T 细胞表位的数目; 另外当机体遇到病原体时, 会产生大量的 hsp70 分子, 这样免疫系统就会生成许多针对 hsp70 的 T 细胞前体, 因此当机体暴露于许多感染性物质时总会检测到针对 hsp70 的免疫反应; 此外, hsp70 与抗原提呈细胞 (APC) 表面的受体结合从而提高抗原肽在 APC 中内化的效率加速其进入 MHC I 类分子提呈通道。

目前国内外的报道主要是将 hsp70 融合到人类的一些病毒病 (如 HIV, HPV) 的抗原肽上, 乙型脑炎

是一种人畜共患病, 本研究将乙型脑炎 E 蛋白上抗原性较好的区域与 hsp70 基因融合, 并在酵母中进行表达, 避免了大肠杆菌中形成的包含体, 表达的有活性的外源蛋白就在酵母上清中, 离心后就能获得, 自体蛋白极少而且不需考虑 LPS 的影响, 我们从细胞免疫和体液免疫两方面来评价与 hsp70 融合后的蛋白其免疫效果如何, 结果表明与 hsp70 融合后的蛋白其免疫效果比未融合的 E 蛋白主要抗原片段免疫效果好, 此外通过以 E 蛋白和 hsp70 等量混合后免疫小鼠, 其免疫效果与以单独的 E 蛋白免疫基本相似, 说明 hsp70 只有与抗原肽以融合表达方式才能具有一定的免疫增强作用, 是因为 hsp70 蛋白的功能而不是分子量的增加提高了免疫效果, 这为我们在选择免疫佐剂时提供了一个新的选择。

参 考 文 献

- [1] 吴玉水, 马文煜, 朱忠勇. 日本脑炎病毒基因疫苗研究进展. 细胞与分子免疫学杂志, 2002, 18(5): 512-514.
- [2] Chambers T J, Halm C S, Galler R, et al. Flavivirus genome organization, expression and replication. *Annu Rev Microbiol*, 1990, 44: 649-688.
- [3] Venugopal K, Gould E A. Towards a new generation of flavivirus vaccines. *Vaccine*, 1994, 12: 966-975.
- [4] Tsai T F, Chang G F, Yu Y. Japanese encephalitis vaccines. In: Stanley A P, Oreustein W A. *Vaccines*. 3rd ed. Philadelphia: Saunders, 1999, 672-710.
- [5] Poland J D, Cropp C B, Craven R B, et al. Evaluation of the potency and safety of inactivated *Japanese encephalitis* vaccine in US inhabitants. *J Infect Dis*, 1990, 161: 817-821.
- [6] Wu H H, Chen C T, Lin Y, et al. Sub-fragments of the envelope gene are highly protective against the *Japanese encephalitis* virus lethal infection in DNA priming-protein boosting immunization strategies. *Vaccine* 2004, 22: 793-800.
- [7] 杨耀武, 齐香荣, 陈德胜, 等. 流行性乙型脑炎病毒 SA14-14-2 株 E 蛋白基因在原核细胞中的高效表达及其表达产物的抗原性分析. 中国人兽共患病杂志, 2003, 19(5): 31-35.

Influence of JEV E-HSP70(*Mycobacterium tuberculosis*) fusion protein on immune response in BALB/c mice

GE Fei-fei¹ QIU Ya-feng¹ YANG Yao-wu² CHEN Pu-yan^{1*}

(¹ Key Laboratory of Animal Disease Diagnosis and Immunology, Ministry of Agriculture at Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

(² Institute of Virology, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing 100052, China)

Abstract: JEV infection can cause severe central nerve system disease which result in high mortality or developing permanent neurological sequelae in more than half of the survivors. The envelope (E) protein of JEV is the major antigen to elicit neutralizing antibodies and protection in hosts. Hsp70 can potentiate specific immune response to some antigenic

peptide fused to it. A recombinant hsp70 protein expression vector pPICZ α -E-HSP70 in methylotrophic yeast *Pichia pastoris* was developed that permits major antigenic segment of JEV E protein fused to the amino terminus of *M. tuberculosis* hsp70. This core vector avoided inclusion bodies formed in *Escherichia coli* and complex purification. Moreover, it ruled out contamination of LPS. Two other vectors pPICZ α -E and pPICZ α -HSP70 were also constructed. The two vectors were constructed by routine molecular technique. All vectors were transformed into yeast X-33 by electroporation. Expression of the fusion protein in yeast was induced by the addition of methanol every 24 hours and analysed by SDS-PAGE and western blot. Major antigenic segment of E protein was produced at a yield of 290 mg per liter of culture, hsp70 protein at a yield of 178 mg per liter of culture and E-HSP70 fusion protein at a yield of 33 mg per liter of culture in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. To examine cell and body immune response after BALB/c mice were immunized with E-hsp70 fusion protein expressed in *Pichia pastoris*, there were three groups with ten mice in each group. 5.7 μ g (50pmol) of E-hsp70 fusion protein, 2.2 μ g (50pmol) major antigenic segment of E protein and a mixture of hsp70 and major antigenic segment of E protein (1:1) including 3.5 μ g (50pmol) Hsp70 and 2.2 μ g (50pmol) major antigenic segment of JEV E protein were used per mouse i. p. on day 0 and day 21. The production of mIL-2 was quantitated by semi-quantitative RT-PCR. Besides, proliferation of lymphocytes was measured by MTT and titers of antibody was determined by ELISA. These data show that the fusion protein is a more powerful antigen than major antigenic segment of JEV E protein. So it also illustrates the effectiveness of hsp70 in eliciting a humoral and cellular response to an attached molecule in the absence of adjuvant and affirms the potential utility of hsp70 in vaccine development.

Key words : Japanese Encephalitis virus, *Mycobacterium tuberculosis* hsp70, mIL-2, Proliferation of lymphocytes, Ab titers

* Corresponding author. Tel : 86-25-84396028 ; E-mail : aid@njau.edu.cn