

# 减毒沙门氏菌介导的小鼠肝炎病毒 S1 基因 DNA 疫苗的免疫特性分析

焦红梅, 焦新安\*, 殷月兰, 潘志明, 孟松树

(扬州大学生物科学与技术学院 江苏省人兽共患病学重点实验室 扬州 225009)

**摘 要** 根据 GenBank 公开序列自行设计一对引物, 通过 RT-PCR 扩增出小鼠肝炎病毒的全长 S1 基因, 并将其插入真核表达质粒 pVAX1 中, 构建出重组真核表达质粒 pVAX1-S1。将重组质粒转染 COS-7 细胞, 采用间接免疫荧光检测出 S1 蛋白的体外表达。将重组质粒转入减毒鼠伤寒沙门氏菌 SL7207 中, 构建出运送 DNA 疫苗的重组沙门氏菌 SL7207(pVAX1-S1)。分别以  $5 \times 10^8$  CFU、 $1 \times 10^9$  CFU、 $2 \times 10^9$  CFU 剂量的重组菌口服接种 6 周龄 BALB/c 小鼠, 试验结果表明, 重组菌对小鼠具有良好的安全性。以  $1 \times 10^9$  CFU 剂量的重组菌口服免疫小鼠, 抗体检测结果显示, 在二免后两周和三免后两周, 重组菌免疫组的血清抗体水平与 SL7207(pVAX1) 空载体免疫组间分别存在显著性差异 ( $P < 0.05$ ) 和极显著性差异 ( $P < 0.01$ )。在三免后两周重组菌免疫组出现了较高水平的肠黏膜抗体。

**关键词**: 小鼠肝炎病毒; S1 基因; 减毒沙门氏菌; 安全性; 免疫特性

中图分类号: S852.65 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2007)01-0131-05

小鼠肝炎病毒(Mouse hepatitis virus, MHV) 又称小鼠冠状病毒(mouse coronavirus)。MHV 为有囊膜的 RNA 病毒, 与其他冠状病毒不同, MHV 组织趋向性广泛, 可感染呼吸道、胃肠道、神经系统和肝脏<sup>[1]</sup>。MHV 主要有 3 种结构蛋白: S 蛋白、M 蛋白和 N 蛋白。S 蛋白构成冠状病毒表面的囊膜, 具有调节冠状病毒与靶细胞的吸附, 促进细胞融合并影响细胞病变效应<sup>[2]</sup>以及激活体液免疫和细胞免疫应答的重要生物学特性; S 蛋白的变异在冠状病毒致病性方面起着重要的作用<sup>[3]</sup>。

DNA 免疫可将免疫原基因在宿主体内表达出抗原蛋白从而引起机体免疫应答。特异性的 DNA 免疫已广泛的在病毒性、细菌性和寄生虫性疾病的动物模型中得到证实<sup>[4]</sup>。但直接用 DNA 免疫存在需要制备大量的纯化质粒、DNA 摄取效率低或需特殊设备等缺点。减毒沙门氏菌作为运送真核表达质粒的载体已得到广泛研究。减毒沙门氏菌可通过黏膜途径如口服或滴鼻等免疫, 激发机体产生有效的全身和局部的保护性免疫。重组沙门氏菌能激发机体产生针对载体和外源抗原的免疫应答<sup>[5, 6]</sup>。

为了从分子水平上探讨 MHV S1 基因的免疫机制, 本研究利用 RT-PCR 技术, 先获得 MHV S1 基因,

再将 S1 基因与真核表达质粒 pVAX1 进行连接, 构建出重组真核表达质粒 pVAX1-S1, 并进行了真核表达, 然后将其转入减毒鼠伤寒沙门氏菌 SL7207 中, 构建出运送 S1 基因 DNA 疫苗的重组减毒沙门氏菌 SL7207(pVAX1-S1), 并对其诱导机体产生免疫应答的情况进行了初步探讨, 为进一步研究冠状病毒功能基因的作用奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 病毒、细胞、质粒和菌株**: 小鼠肝炎病毒(MHVA59)由中国医学科学院实验动物研究所提供; pMD18-T 购自大连宝生物公司; 真核表达质粒 pVAX1 购自 Invitrogen 公司; DH 5 $\alpha$  为本室保存; 减毒鼠伤寒沙门氏菌 SL7207[2337-65(WRAY)hisG46 $\Delta$ aroA407(TC<sup>S</sup>aroA544:Tn10)]由美国斯坦福大学 Stocker 博士惠赠。

**1.1.2 酶和试剂**: Trizol<sup>®</sup> Reagent 购自 Invitrogen 公司; M-MLV 反转录酶、RNase 抑制剂 Rnasin 购自 Promega 公司; 限制性内切酶(BamH I、Xho I)、T<sub>4</sub> DNA 连接酶和 Pyrobest<sup>®</sup> DNA polymerase 购自大连宝生物公司; 转染试剂 lipofectamine 2000 购自 Invitrogen

基金项目: 国家自然科学基金(30425031); 江苏省重点实验室开放课题(02738960314)

\* 通讯作者。Tel: 86-514-7971136; Fax: 86-514-7311374; E-mail: jjiao@yzu.edu.cn

作者简介: 焦红梅(1973-), 女, 内蒙海拉尔人, 讲师, 博士研究生, 主要从事病原微生物分子免疫学研究。E-mail: jjiaohm2005@126.com

其他作者: 王禹, 蒋金金

收稿日期: 2006-07-04; 接受日期: 2006-09-05; 修回日期: 2006-09-01

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

公司,沙门氏菌 A-F 单因子血清购自卫生部成都生物制品研究所;小鼠 MHV 阳性血清自制;FITC 标记羊抗鼠 IgG 荧光二抗、HRP 标记羊抗鼠 IgG、IgM 和 IgA 酶标二抗购自 Sigma 公司。

**1.1.3 实验动物:** 6 周龄 BALB/c 雌性小鼠(清洁级)购自扬州大学比较医学中心。

## 1.2 MHV S1 基因的克隆

参照 GenBank 中的小鼠肝炎病毒 S1 基因序列设计合成一对引物:上游引物(P1) 5'-TAAGGATCCC ATAATCTAAACATGCTGTCGT-3' 含有 *Bam*H I 酶切位点;下游引物(P2) 5'-TTTCTCGAGGCTAATTAAC CTCATTAAGAATGG-3' 含有 *Xho* I 酶切位点。上下游引物跨幅 2.2kb, 包含整个 S1 基因, 由上海英骏生物技术公司合成。以 Trizol<sup>®</sup> Reagent 提取经扩增的 MHV 的基因组 RNA, 按 M-MLV 反转录酶说明书进行反转录。用 Pyrobest<sup>®</sup> DNA polymerase 扩增出 S1 基因。将鉴定正确的 PCR 产物回收后克隆入 pMD18-T 载体, 具体方法参照说明书进行。连接产物转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞中。利用 LB 培养基(含氨苄青霉素、X-gal 和 IPTG) 筛选阳性菌。碱裂解法少量提取质粒, 用 *Bam*H I、*Xho* I 酶切鉴定重组质粒, 将重组阳性质粒命名为 pMD18-TS1。阳性克隆送上海英骏生物技术有限公司测序。

## 1.3 重组真核表达质粒 pVAX1-S1 的构建及鉴定

用限制性内切酶 *Bam*H I、*Xho* I 将 S1 基因从质粒 pMD18-TS1 中切出, 重组到同样酶切处理的真核表达载体 pVAX1 中, 构建重组真核表达质粒。以 *Bam*H I、*Xho* I 双酶切分析和 PCR 鉴定重组质粒。

## 1.4 质粒的转染及鉴定

**1.4.1 质粒的转染:** 按常规方法进行质粒 DNA 的大量制备。采用脂质体转染技术, 具体方法参照 lipofectamine 2000 产品说明书进行。**1.4.2 表达产物间接免疫荧光法鉴定:** 于转染后 48h, 将培养皿内液体弃去, 0.01mol/L PBS 洗两次, 置冷的 100% 甲醇固定 5min 后, 一抗为抗鼠 MHV 阳性血清, 二抗为 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 荧光抗体。荧光显微镜下观察、拍照。

## 1.5 运送 S1 蛋白的减毒鼠伤寒沙门氏菌的构建

用电穿孔法分别将 pVAX1 空载体质粒、重组真核表达质粒 pVAX1-S1 0.1 $\mu$ g 转化减毒鼠伤寒沙门氏菌 SL7207 感受态。电穿孔条件如下: 电压 1.8kV, 电击时间为 5~6s。鉴定阳性重组菌: 以少量提取的质粒为模板, PCR 扩增重组质粒中的 S1 基因; 沙门氏菌 A-F 单因子血清做玻板凝集试验鉴定为

SL7207。阳性重组菌命名为 SL7207(pVAX1-S1)。

## 1.6 重组菌对小鼠的安全性试验

将重组细菌 SL7207(pVAX1-S1) 分别以  $5 \times 10^8$  CFU、 $1 \times 10^9$  CFU、 $2 \times 10^9$  CFU 口服接种 6 周龄 BALB/c 小鼠, 每剂量组 4 只, 同时设立口服 PBS 对照组。观察试验鼠的健康状况, 2 周后扑杀所有试验鼠, 检查是否出现眼观病变。

## 1.7 重组菌对小鼠的免疫试验

**1.7.1 免疫:** 6 周龄 BALB/c 雌性小鼠随机分为 3 组, 每组 5 只, 分别为 SL7207(pVAX1-S1)、SL7207(pVAX1) 和空白(PBS) 对照组。每只口服免疫  $1 \times 10^9$  CFU 的重组菌。共免疫 3 次, 每次间隔两周。

**1.7.2 样品采集及处理:** 血清样品的采集: 各免疫组分别在免疫前、首免后 2、4、6 周经眼眶静脉采血, 室温静置, 分离血清,  $-20^\circ\text{C}$  保存备用。肠道黏膜样品的采集: 于首免后 6 周剖杀小鼠, 采集完整的小肠黏膜样品,  $-20^\circ\text{C}$  保存备用。

**1.7.3 抗体测定:** 以间接 ELISA 方法测定 S1 蛋白特异性血清抗体效价和黏膜抗体效价。ELISA 参考文献 [7, 8] 进行。

## 1.8 统计学分析

利用 SPSS 2.0 软件包按单因素方差分析法 (one-way ANOVA) 对抗体效价进行统计学的处理,  $P < 0.05$  时差异显著;  $P < 0.01$  时差异极显著。

## 2 结果

### 2.1 S1 基因的 RT-PCR 扩增结果

提取 MHV 基因组 RNA, 反转录合成第一链 cDNA, 应用设计的特异性引物, 经 PCR 扩增后, 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳显示约为 2.2kb 单一条带(图 1)。与预计的 S1 基因大小相符。

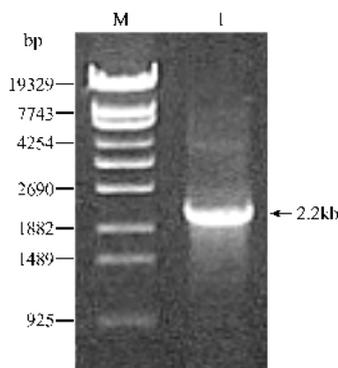


图 1 S1 基因的 RT-PCR 扩增结果

Fig.1 RT-PCR amplification of MHV S1 gene. M.  $\lambda$ -EcoT14 digest Marker 1. PCR product.

## 2.2 重组真核表达质粒 pVAX1-S1 的构建及鉴定

用限制性内切酶 *Bam*H I、*Xho* I 将 S1 基因从质粒 pMD18-TS1 中切出,重组到真核表达载体 pVAX1 相应的位点中,所获得的重组真核表达质粒 pVAX1-S1 用 *Bam*H I、*Xho* I 双酶切后,可切出目的片段 2.2kb 和载体 3.0kb,符合预期结果(图 2)。说明 S1 基因已被正确插入真核表达载体中。

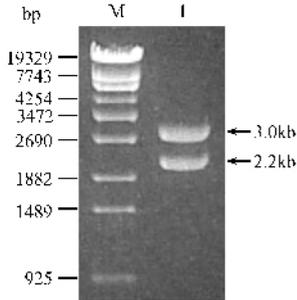


图 2 重组质粒 pVAX1-S1 的酶切鉴定

Fig.2 Restriction enzyme analysis of pVAX1-S1. M.  $\lambda$ -EcoT14 digest Marker; I. pVAX1-S1/*Bam*H I + *Xho* I.

## 2.3 表达产物测定

通过间接免疫荧光试验鉴定转染质粒的 COS-7 细胞 S1 基因的表达,结果 pVAX1-S1 转染细胞出现黄绿色荧光,而对照组(pVAX1)未见特异性荧光,说明 S1 基因在 COS-7 细胞中获得表达(图 3)。

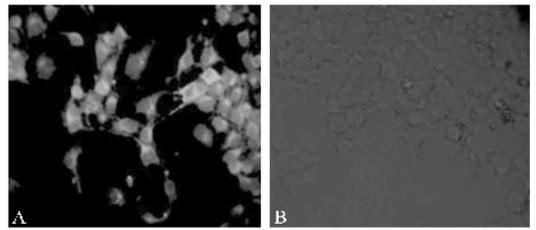


图 3 重组质粒在 COS-7 细胞中的表达

Fig.3 Expression of recombinant plasmid in COS-7 cells. A: COS-7 cells transfected with pVAX1-S1; B: COS-7 cells transfected with pVAX1.

## 2.4 运送 S1 蛋白的减毒鼠伤寒沙门氏菌的构建及鉴定

用电穿孔法将 pVAX1-S1 转化减毒鼠伤寒沙门氏菌 SL7207。PCR 扩增及沙门氏菌 A-F 单因子血清玻板凝集试验结果与预期相符,表明重组质粒 pVAX1-S1 已被成功导入减毒鼠伤寒沙门氏菌 SL7207 中。

## 2.5 重组菌对小鼠的安全性试验

在观察的 2 周内所有试验鼠均无任何不良反应,剖检在肝脏、脾脏等实质脏器上未发现有眼观病变。试验结果初步表明重组减毒沙门氏菌具有良好的安全性。

## 2.6 小鼠免疫试验结果

采用间接 ELISA 法检测不同免疫时间小鼠血清

表 1 以减毒鼠伤寒沙门氏菌运送的 S1 蛋白对 BALB/c 小鼠的免疫原性试验结果

Table 1 The results of immunogenicity assay of S1 protein delivered by *Salmonella typhimurium* in BALB/c mice

Group	GM antibody titers in ELISA			
	Serum antibodies			Small intestinal mucosa antibodies
	2w post-priming	2w post-boosting	2w post-three immunization	2w post-three immunization
SL7207(pVAX1-S1)	18.0 ± 13.0	46.7 ± 16.3*	96.0 ± 35.7**	25.6 ± 8.76**
SL7207(pVAX1)	10.0	10.0	10.0	3.5 ± 1.0
Control	10.0	10.0	10.0	2.5 ± 1.0

\*  $P < 0.05$  SL7207(pVAX1-S1) group versus SL7207(pVAX1) group; \*\*  $P < 0.01$  SL7207(pVAX1-S1) group versus SL7207(pVAX1) group.

中 S1 特异性抗体水平。血清抗体测定结果表明(表 1),一免两周后部分重组菌免疫鼠即能产生针对 MHV 的特异性抗体,但抗体平均滴度较低,与 SL7207(pVAX1)空载体免疫组相比差异不显著。再次免疫后抗体水平上升明显,在二免后两周和三免后两周,重组菌免疫组血清抗体水平与 SL7207(pVAX1)空载体免疫组之间分别存在显著性差异( $P < 0.05$ )和极显著性差异( $P < 0.01$ )。小肠黏膜抗体 sIgA 测定结果表明,在三免后两周重组菌免疫组黏膜抗体 sIgA 水平与 SL7207(pVAX1)空载体免疫组之间存在极显著性差异( $P < 0.01$ )。这表明,运送 MHV S1 蛋白的重组减毒菌能诱导小鼠产生针对 S1 蛋白的特异性体液免疫应答和黏膜免疫应答。

## 3 讨论

S1 蛋白是冠状病毒中与致病性相关的主要结构蛋白,也是主要的保护性抗原。研究发现,携带 MHV S1 蛋白表位的烟草花叶病毒(TMV)可诱导产生针对 MHV 的免疫应答,可刺激机体产生体液免疫和黏膜免疫,抵抗 MHV 的攻击<sup>[9]</sup>。携带 MHV CD8<sup>+</sup> T 细胞表位的产单核细胞李斯特菌和被动输入 MHV 特异性的 CD8<sup>+</sup> T 细胞表位可有效的降低 MHV 诱导的急性中枢神经系统炎症和脱髓鞘<sup>[10]</sup>。含有 B 细胞表位和 T 细胞表位的合成肽激发的抗体能保护小鼠抵抗 MHV 急性致死性感染<sup>[11]</sup>。这些研究提示我们,有关 S1 蛋白的研究是冠状病毒免疫学研究

的重要靶点。

本研究通过 RT-PCR 扩增 MHV 的全长 S1 基因, 然后将其插入到真核表达载体 pVAX1 中, 构建出重组真核表达质粒 pVAX1-S1。在体外通过脂质体介导, 将重组质粒 pVAX1-S1 转染 COS-7 细胞, 通过间接免疫荧光试验进行表达产物检测, 结果显示转染重组质粒的 COS-7 细胞有绿色荧光。这表明构建的重组真核表达质粒 pVAX1-S1 可以在体外表达 S1 蛋白抗原。这些结果为进一步研究 MHV S1 蛋白的功能作用奠定了基础。

S 蛋白在决定组织嗜性方面发挥重要作用。Gruslin 等<sup>[12]</sup>研究 MHV 感染后的小鼠中枢神经系统的基因组的应答发现, 病毒在脑内和肝脏内复制, 在感染 7 天就开始清除, 髓磷脂特异性的 T 细胞活化。免疫应答的程度在决定宿主存活方面起着重要的作用。因为免疫应答控制病毒的复制和扩散, 从而不能诱发广泛的免疫病理现象。免疫细胞以其特有的方式控制病毒的急性感染, 体液免疫在阻止病毒复制中具有重要作用, 尽管多种分子机制已明确, 但有关免疫病理的调节和 CNS 内病毒持续性存在机制还需进一步研究, 如持续存在的 T 细胞亚群在脱髓鞘中的作用, 调控 T 细胞渗入因子和效应因子的功能, CD4<sup>+</sup> T 细胞的抗病毒作用和抗体或 B 细胞抑制病毒复制的机制等<sup>[1]</sup>。

近年来发现沙门氏菌、志贺氏菌、耶而森氏菌、李斯特菌等可运送真核表达质粒到哺乳动物细胞。细菌运送的编码疫苗抗原和(或)治疗性分子的质粒已在传染性疾病、肿瘤、基因缺陷等试验动物模型中显示出巨大的潜能。减毒细菌运送核酸疫苗是一种新型、高效的途径, 减毒鼠伤寒沙门氏菌具有特异的组织趋向性, 能将携带的 DNA 疫苗运送到机体特定的组织和器官。研究发现, 口服鼠伤寒沙门氏菌后, 细菌紧密吸附于肠道派伊尔氏结(PPs), 并通过 M 细胞摄取进入机体内。

减毒鼠伤寒沙门氏菌 SL7207 因 *aroA* 基因缺陷从而其毒力明显降低。将重组细菌分别以  $5 \times 10^8$  CFU、 $1 \times 10^9$  CFU、 $2 \times 10^9$  CFU 口服接种 6 周龄 BALB/c 小鼠, 所有试验鼠均无任何不良反应, 试验结果表明重组减毒沙门氏菌对小鼠具有良好的安全性。

减毒鼠伤寒沙门氏菌进入宿主细胞后裂解释放出携带的编码外源基因的重组质粒。以构建的运送 MHV S1 蛋白的减毒沙门氏菌 SL7207 免疫 BALB/c 小鼠后, 在三免后两周, 重组菌免疫组血清抗体水平

及黏膜抗体水平与 SL7207(pVAX1) 空载体免疫组之间均存在极显著性差异( $P < 0.01$ )。结果表明 MHV S1 基因在小鼠体内得到了表达, 能分别诱导机体产生特异性地体液免疫应答和黏膜免疫应答。这将有助于进一步研究冠状病毒与宿主细胞之间的相互作用, 为设计有效的疫苗提供理论依据。

## 参 考 文 献

- [1] Norman W Marten, Stephen A Stohlman, Cornelia C Bergmann, et al. Mhv Infection Of The Cns: Mechanisms Of Immune-Mediated Control. *Viral Immunology*, 2001, **14**(1): 1-18.
- [2] Collins AR, Knobler RL, Powel H, et al. Monoclonal antibodies to murine hepatitis virus-4 (strain JHM) define the viral glycoprotein responsible for attachment and cell-cell fusion. *Virology*, 1982, **119**: 358-371.
- [3] Leparo-Goffart I, Hingley ST, Chua MM, et al. Targeted recombination within the spike gene of murine coronavirus mouse hepatitis virus-A59: Q159 is a determinant of hepatotropism. *J Virol*, 1998, **72**: 9628-9636.
- [4] Davis HL, McCluskie MJ. DNA vaccines for viral diseases. *Microbes and Infection*, 1999, **1**: 7-21.
- [5] Staats HF, Jackson RJ, Marinaro M, et al. Mucosal immunity to infection with implications for vaccine development. *Curr Opin Immuno*, 1994, **6**: 572-583.
- [6] Medina E, Guzman CA. Use of live bacterial vaccine vectors for antigen delivery: potential and limitations. *Vaccine*, 2001, **19**: 1573-1580.
- [7] 郭玮, 贺争鸣, 卫礼, 等. 小鼠肝炎病毒抗体检测试剂盒的标准化研究. *中国实验动物学报* 2000 **4**(4): 241-245.
- [8] 潘志明, 焦新安, 黄金林, 等. 携带新城疫病毒 DNA 疫苗的鼠伤寒沙门氏菌及其安全性与免疫效力. *微生物学报* 2005 **6**: 937-941.
- [9] Koo M, Bendahmane M, Lettieri GA, et al. Protective immunity against murine hepatitis virus (MHV) induced by intranasal or subcutaneous administration of hybrids of tobacco mosaic virus that carries an MHV epitope. *Proc Natl Acad Sci*, 1999, **96**: 7774-7779.
- [10] Chua MM, MacNamara K, San Mateo L, et al. Effects of an epitope specific CD8<sup>+</sup> T cell response on murine coronavirus CNS disease: protection from virus replication and antigen spread and selection of epitope escape mutants. *J Virol*, 2004, **78**: 1150-1159.
- [11] Koolen MJ, Borst MA, Horzinek MC, et al. Immunogenic peptide comprising a mouse hepatitis virus A59 B-cell epitope and an influenza virus T-cell epitope protects against lethal infection. *J Virol*, 1990, **64**: 6270-6273.
- [12] Gruslin E, Moisan S, St-Pierre Y, et al. Transcriptome profile within the mouse central nervous system and activation of myelin-reactive T cells following murine coronavirus infection. *Journal of Neuroimmunology*, 2005, **162**: 60-70.

## Immunogenicity of S1 gene DNA vaccine of mouse hepatitis virus delivered by attenuated *Salmonella typhimurium*

JIAO Hong-mei, JIAO Xin-an\*, YIN Yue-lan, PAN Zhi-ming, MENG Song-shu

(The Jiangsu Key Laboratory of Zoonosis, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

**Abstract:** The complete S1 gene from mouse hepatitis virus (MHV) was amplified by RT-PCR and cloned into the pMD18-T vector. After confirmed by the restriction endonuclease analysis and PCR amplification, the positive clone of S1 gene was sequenced and then was transferred into eukaryotic expressing vector pVAX1. The recombinant plasmid pVAX1-S1 was transfected into COS-7 cells. The expressed S1 protein was successfully detected with indirect immunofluorescent assay. Finally, The recombinant plasmid pVAX1-S1 was transformed by electroporation into attenuated *Salmonella typhimurium* strain SL7207 and confirmed by PCR and *Salmonella* agglutination test. The recombinant was named as SL7207 (pVAX1-S1). 6-week-old BALB/c mice were inoculated orally with SL7207 (pVAX1-S1) at dosage of  $5 \times 10^8$  CFU,  $1 \times 10^9$  CFU and  $2 \times 10^9$  CFU respectively. The immunized mice showed no clinic symptom. The results suggested that SL7207 (pVAX1-S1) was safe for mice after oral immunization at dosage of  $2 \times 10^9$  CFU or below. BALB/c mice were immunized orally with SL7207 harboring recombinant plasmid at the dosage of  $10^9$  and boosted two weeks later with the same dose, for a total of three times. The recombinant *Salmonella* SL7207 (pVAX1-S1) could induce significant humoral immune response in mice compared with the control ( $P < 0.05$  or  $0.01$ ) at 2 w post-boosting and 2 w post-three immunization. The antibodies against MHV were also detected in small intestinal mucosal samples from immunized mice at 2 w post-three immunization. These results indicated that recombinant SL7207 (pVAX1-S1) induced both systemic and local mucosal immunity.

**Keywords:** Mouse hepatitis virus; S1 gene; Attenuated *Salmonella typhimurium*; Safety; Immunogenicity

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (30425031); Open Foundation of Key Laboratory of Jiangsu Province (02738960314)

\* Corresponding author. Tel: 86-514-7971136; Fax: 86-514-7311374; E-mail: jjiao@yzu.edu.cn

Other authors: WANG Yu, JIANG Jin-jin

Received 4 July 2006/Accepted 5 September 2006/Revised: 1 September 2006