

犬 CTLA-4 胞外区的分子克隆、表达和对犬细小病毒 VP2 的免疫佐剂作用

吴植, 孙怀昌*, 张鑫宇

(扬州大学兽医学院, 扬州 225009)

摘要:【目的】探索犬细胞毒性 T 细胞相关抗原-4(cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4, CTLA-4)胞外区作为免疫佐剂的可行性。【方法】根据已发表序列设计引物, 用 RT-PCR 扩增 CTLA-4 胞外区编码序列, 用 PCR 扩增犬细小病毒(canine parvovirus, CPV)VP2 蛋白主要抗原表位基因片段 VP2S, 将 VP2S 克隆入含和不含 CTLA-4 胞外区基因片段的原核表达质粒 pQE-31; 用获得的重组质粒 pQE-CTLA-4-VP2S 和 pQE-VP2S 转化大肠杆菌, 并进行诱导表达; 用相同剂量的重组蛋白 VP2S 和 CTLA-4-VP2S 免疫小鼠, 用间接 ELISA 和血凝抑制试验比较两个免疫组的抗体水平。【结果】经过 30 次循环 PCR 扩增后, 琼脂糖凝胶电泳显示预期大小的扩增产物; 序列测定结果显示, 克隆的毕格犬 CTLA-4 胞外区与已发表序列的核苷酸同源性为 99.2%, 氨基酸序列同源性为 98.4%, 结合 B7 分子的六肽基序(MYPPPY)无变化; VP2S 与已发表 CPV VP2 的核苷酸序列同源性为 99%, 氨基酸序列同源性为 98.6%; 经 IPTG 诱导后, 两种重组大肠杆菌表达预期的 29kDa VP2S 和 42kDa CTLA-4-VP2S 重组蛋白, 两者均能被 CPV 抗血清识别; 间接 ELISA 和血凝抑制试验结果显示, CTLA-4-VP2S 免疫组的抗体产生时间为初免后第 2 周, 抗体高峰期如初免后第 4 周, 而 VP2S 免疫组的抗体产生时间为初免后第 4 周, 抗体高峰期如初免后第 5 周, 两个试验组高峰期 ELISA 抗体效价和血凝抑制抗体效价分别相差 100 倍和 10 倍。【结论】犬 CTLA-4 胞外区可作为分子佐剂促进 CPV VP2 蛋白抗体的产生。

关键词: 犬 CTLA-4 胞外区; 犬细小病毒 VP2; 免疫佐剂作用

中图分类号: R392 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 03-0369-06

细胞毒性 T 细胞相关抗原-4 (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4, CTLA-4)属于免疫球蛋白超家族, 主要在活化的 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞以及激活的 B 细胞表面表达。CTLA-4 可与 CD28 分子竞争结合 T 细胞上的 B7 分子, 且其亲和力是 CD28 的 10~50 倍, 因此是免疫应答负调节的主要表面吸附分子。单体 CTLA-4 由特征性的 IgV 胞外区、跨膜区、胞内区构成, 其中 IgV 胞外区含有结合 B7 分子的六肽基序(MYPPPY), 可与巨噬细胞等抗原递呈细胞上

的 B7 分子结合但不传递负调节信号^[1,2]。Rohrbach 等^[3]将人 CTLA-4 胞外区编码序列与表皮生长因子受体相关的受体酪氨酸激酶 ErbB2 基因片段融合, 用重组菌表达的 CTLA-4-ErbB2 免疫小鼠, 结果证明不仅能诱导特异性 CD8⁺T 细胞应答, 而且能保护小鼠免受肿瘤细胞接种。Deliyannis 等^[4]将人 CTLA-4 胞外区编码序列与流感病毒血凝素基因融合, 用构建的基因疫苗免疫小鼠, 结果证明能诱导特异性体液和细胞免疫应答。这些研究资料显示, CTLA-4 胞外区可

*通讯作者。Tel: +86-514-87979335; Fax: +86-514-87972218; E-mail: sunh@yzu.edu.cn

作者简介: 吴植(1982-), 男, 江苏盐城人, 硕士研究生, 研究方向为兽医微生物学与免疫学。E-mail: yzwuzhi@163.com

收稿日期: 2007-07-11; 修回日期: 2007-11-09

作为抗原递呈细胞的靶向分子和新型分子佐剂。

犬细小病毒病由犬细小病毒(canine parvovirus, CPV)引起,目前主要用弱毒疫苗预防,但免疫效果不理想^[5,6]。CPV主要编码NS1、NS2、VP1、VP2 4种蛋白,其中VP2为主要衣壳蛋白,含主要中和抗原表位^[7]。Langeveld等^[8,9]用含VP2抗原表位的合成肽或表达VP2蛋白的重组植物病毒免疫犬,证明能诱导特异性中和抗体应答。但到目前为止,尚无用大肠杆菌成功表达CPV VP2全基因的报道。为了探索犬CTLA-4胞外区作为靶向分子佐剂的可行性,我们用RT-PCR从激活的犬淋巴细胞中扩增CTLA-4胞外区编码序列,将其与含CPV VP2主要抗原表位的VP2S基因片段融合,用大肠杆菌表达的非融合蛋白VP2S和融合蛋白CTLA-4-VP2S免疫小鼠,经ELISA和血凝抑制试验证明,CTLA-4-VP2S免疫组产生抗体的时间和水平均显著优于VP2S免疫组,提示犬CTLA-4胞外区可作为抗原递呈细胞的靶向分子。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂: 淋巴细胞分离液购自上海华精生物高科技有限公司;Omniscrypt RT kit购自QIAGEN公司;Wizard DNA Clean-up System、RNAgent Total RNA Isolation System、刀豆素A(ConA)购自美国Promega公司;T4 DNA连接酶、限制性内切酶和Taq plus DNA聚合酶购自TaKaRa公司;IRDyeTM-conjugated goat anti-mouse IgG购自美国Rockland公司;Ni⁺-NTA purification System购自Invitrogen公司;其他试剂为国产分析纯。

1.1.2 实验动物、质粒及菌株: 8周龄BALB/c小鼠由扬州大学比较医学中心提供,雌雄各半;pMD18-T载体购自TaKaRa公司;原核表达载体pQE-31、M15大肠杆菌购自QIAGEN公司;pcDNA3-VP2由本实验室构建;大肠杆菌(*E.coli*)DH5 α 感受态细胞由本实验室按常规方法制备。

1.2 犬淋巴细胞总RNA的提取

无菌采取犬抗凝血约20mL,按淋巴细胞分离液使用说明分离淋巴细胞。用10mL含有10mg/L ConA和10%小牛血清的RPMI 1640培养液,将分离的外周血淋巴细胞在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱中培养48~72h,按照RNAgent Total RNA Isolation System说明书提取犬淋巴细胞总RNA。

1.3 犬CTLA-4胞外区编码序列的扩增

根据GenBank中犬CTLA-4基因(AF143204)序列,参考文献^[10]确定犬CTLA-4胞外区,设计一对PCR引物,序列分别为5'-ACTGGATCCTGGGATGCATGCGGCTCAGCC-3'和5'-CTGGGTACCGTCA GAATCTGG -GCAAGGT-TC-3' (下划线为引入的Bam HI和Kpn I酶切位点),引物由上海生工合成。RNA反转录按Omniscrypt RT kit说明书进行,20 μ L反应体系为:2 μ L 10 \times buffer,2 μ L dNTP Mix,2 μ L 10pmol反向引物,1U Omniscrypt Reverse Transcriptase,1 μ L (1.2 μ g)总RNA,12 μ L RNase-free水,反应条件为37 $^{\circ}$ C 60min;50 μ L PCR反应体系为:4 μ L RT反应产物,5 μ L 10pmol正反向引物,4 μ L dNTP Mix,5 μ L 10 \times buffer,1 μ L (5U)rTaq,26 μ L ddH₂O;PCR程序为:94 $^{\circ}$ C 3min;94 $^{\circ}$ C 30s,57 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 30s,30次循环;72 $^{\circ}$ C 10min。扩增产物用1.0%琼脂糖凝胶电泳分析。

1.4 CPV VP2基因片段的扩增

用DNASTar软件包中的Protean程序进行CPV VP2蛋白亲水性和抗原指数分析,将对应于293-520位氨基酸的亲水性和抗原指数高的区域命名为VP2S。用Primer Premier 5.0软件设计正向引物F1、F2和反向引物R,序列分别为5'-TAGGTACCTTCTTTGCCTCAATCTGAAG-3'、5'-TAGGTACCTCTTTGCCTCATCTGAAG-3'和5'-GCAAGCTTTCTTGACATATTAGCAGATG-3' (下划线为引入的Kpn I和Hind III酶切位点),F1和R引物组合用于非融合表达VP2S基因片段的扩增,F2和R引物组合用于CTLA-4-VP2S融合基因片段的扩增。50 μ L PCR反应体系为:2 μ L pcDNA3-VP2,5 μ L 10pmol正反向引物,4 μ L dNTP Mix,5 μ L 10 \times buffer,1 μ L (5U)Ex Taq,28 μ L ddH₂O;PCR程序为:94 $^{\circ}$ C 3min;94 $^{\circ}$ C 30s,52 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 30s,30次循环;72 $^{\circ}$ C 10min。扩增产物用1.0%琼脂糖凝胶电泳分析。

1.5 PCR产物的克隆与序列分析

PCR产物的克隆按pMD18-T说明书进行。将转化的大肠杆菌在表面涂有40 μ L X-gal(20mg/mL)和4 μ L IPTG(200mg/mL)的琼脂平板上培养过夜,挑取白色菌落,在含100 μ g/mL氨苄青霉素(Amp)的LB中培养10~12h,按常规方法小量提取质粒DNA。用限制酶切法鉴定重组质粒,插入片段正确的重组质粒送TaKaRa公司进行序列测定,将所获序列与GenBank中的犬CTLA-4和CPV VP2基因序列进行比对分析。

1.6 重组表达质粒的构建

用限制酶 *Kpn* 和 *Hind* 将以 F1 和 R 引物组合扩增的 VP2S 基因片段从 pMD18-T 载体上切下, 琼脂糖凝胶电泳回收的目的片段与同酶消化的 pQE-31 载体连接, 转化大肠杆菌后获得的重组质粒命名为 pQE-VP2S。用限制酶 *Bam* H 和 *Kpn* 将 CTLA-4 胞外区基因片段从 pMD18-T 中切出, 琼脂糖凝胶电泳回收的目的片段与同酶消化的 pQE-31 载体连接, 转化大肠杆菌后获得的重组质粒命名为 pQE-CTLA-4。用限制酶 *Kpn* 和 *Hind* 将以 F2 和 R 引物组合扩增的 VP2S 基因片段从 pMD18-T 载体上切下, 琼脂糖凝胶电泳回收的目的片段与同酶消化的 pQE-CTLA-4 连接, 转化大肠杆菌后获得的重组质粒命名为 pQE-CTLA-4-VP2S。

1.7 重组菌的诱导表达

将重组质粒 pQE-VP2S 和 pQE-CTLA-4-VP2S 转化的 M15 大肠杆菌单菌落接种含有 100 μ g/mL Amp 和 25 μ g/mL 卡那霉素(Kan)的 2 \times YT 培养液, 37 培养 3h($OD_{600}=0.6$), 加入终浓度为 1mmol/L 的 IPTG, 30 诱导表达 4h。

1.8 重组蛋白的 Western blot 分析

将 IPTG 诱导前、后的空质粒 pQE-31、重组质粒 pQE-VP2S 和 pQE-CTLA-4-VP2S 转化菌进行超声波裂解, 12000r/min 离心后分别收集离心上清和沉淀, 按常规方法进行 SDS-PAGE 分离。按照仪器说明书将分离蛋白转移(350mA/20min)到 PVDF 膜上, 参考文献[11]进行 Western blot 分析, 封闭液为含 10% BSA 的 PBS, 洗涤液为含 0.1% Tween-20 的 PBS, 第一抗体为 1:100 稀释的鼠抗 CPV 血清, 第二抗体为 1:10000 稀释的 IRDye-conjugated goat anti-mouse IgG, 杂交信号用 Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR, Biosciences)在 800nm 波长下扫描。

1.9 重组蛋白免疫小鼠和抗体测定

鉴于目的蛋白 CTLA-4-VP2S 和 VP2S 均以包涵体形式存在, 按照 Invitrogen 公司的 Ni⁺-NTA purification System 说明书纯化 8M 尿素溶解的重组蛋白, 经过复性和 PEG20000 浓缩后, 用紫外分光光度计测定 OD_{280} 和 OD_{260} 值, 根据公式蛋白浓度(mg/mL)= $1.45 \times OD_{280} - 0.74 \times OD_{260}$ 计算蛋白质浓度。将 9 只 BALB/c 小鼠随机分成 3 组, 每组 3 只, 分别为 CTLA-4-VP2S 免疫组、VP2S 免疫组和 PBS 对照组, 每只小鼠腹部皮下 3 点注射 50 μ g 重组蛋白, 首免 3 周后用相同方法加强免疫 1 次。在初免后每周经眼眶后静脉

丛采血, 分离血清 20~25 μ L/只, 按常规的 ELISA 和 HI 方法检测血清中 CPV 抗体, ELISA 板包被抗原为大肠杆菌表达和经过尿素变性、复性的 VP2S, 浓度为 5 μ g/mL; HI 试验用 YZ 株 CPV 进行。

2 结果

2.1 犬 CTLA-4 胞外编码区的 RT-PCR 扩增与序列分析

将从 ConA 刺激 48h 的犬淋巴细胞提取的总 RNA 进行琼脂糖凝胶分析, 可见明显的 28S、18S、5S RNA 3 条带, 说明所提 RNA 的质量较好。紫外分光光度计测定 RNA 的 OD_{260}/OD_{280} 比值为 2.16, 计算得 RNA 浓度为 1200 μ g/ μ L。

将犬 CTLA-4 胞外编码区的 RT-PCR 扩增产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳分析, 可见预期的约 0.4kb 特异条带。将 3 次 RT-PCR 扩增产物克隆入 pMD18-T 中, 各随机挑取 1 个重组质粒进行序列测定, 结果显示从毕格犬淋巴细胞中克隆的 CTLA-4 胞外编码区由 375 个碱基组成, 编码 125 个氨基酸。将所得序列与 GenBank 中的犬 CTLA-4 胞外区核苷酸序列进行比对分析, 结果显示核苷酸序列同源性为 99.2%, 推导的氨基酸序列同源性为 98.4%, 仅 37 位的蛋氨酸替换为缬氨酸, 118 位的甘氨酸替换为天冬氨酸。

2.2 VP2S 基因片段的 PCR 扩增

用 DNASTar 软件包中的 Protean 程序进行 CPV (YZ 株)VP2 蛋白氨基酸序列的亲水性、抗原指数等二级结构分析, 结果显示 293~520 位氨基酸区域为亲水性和抗原指数较高的氨基酸集中区。以 pcDNA3-VP2 为模板, 分别以 F1、R 和 F2、R 组合引物进行 PCR 扩增, 琼脂糖凝胶电泳分析可见预期的 0.7kb 特异条带。

2.3 VP2S 表达载体的构建与鉴定

将 F1、R 引物组合扩增的 CPV VP2S 基因片段插入表达质粒 pQE-31, 获得的重组质粒 pQE-VP2S 用限制酶 *Hind* III 和 *Kpn* I 消化, 琼脂糖凝胶电泳后可见预期的 3.1kb 和 0.7kb 两条带, 分别对应于 pQE-31 载体和 VP2S 基因片段(图片未显示)。先将 RT-PCR 扩增的犬 CTLA-4 胞外编码区插入 pQE-31 质粒的 *Bam* HI 和 *Kpn* I 位点之间, 获得的重组质粒 pQE-CTLA-4 用限制酶 *Bam* HI 和 *Kpn* I 消化, 琼脂糖凝胶电泳后可见预期的 3.1kb 和 0.4kb 的两条带, 分别对应于 pQE-31 载体和 CTLA-4 胞外编码区(图片未显示); 将 F2、R 引物组合扩增的 VP2S 片段插入 pQE-CTLA-4 的 *Kpn* I 和 *Hind* III 位点之间, 获得的重

组表达质粒 pQE-CTLA-4-VP2S 用限制酶 *Kpn* 和 *Hind* 消化,琼脂糖电泳后可见预期的 3.5kb 和 0.7kb 的两带(图片未显示)。

2.4 重组菌的诱导表达

将空质粒 pQE-31、重组质粒 pQE-VP2S 和 pQE-CTLA-4-VP2S 转化的 M15 大肠杆菌在含 100μg/mL Amp 和 25μg/mL Kan 的 2×YT 培养液中培养至 $OD_{600}=0.6$ (约 3h),加入 1mmol/L IPTG, 30°C 诱导表达 4h 后进行超声波裂解,分别取离心上清和沉淀进行 SDS-PAGE 分析,结果与 pQE-31 转化菌相比, IPTG 诱导的 pQE-VP2S 转化菌有 1 条预期的 29kDa 额外条带(图 1),主要存在于细菌裂解物的离心沉淀中; IPTG 诱导的 pQE-CTLA-4-VP2S 转化菌裂解物有 1 条预期的 42kDa 额外条带,主要存在于细菌裂解的离心沉淀中(图 2)。

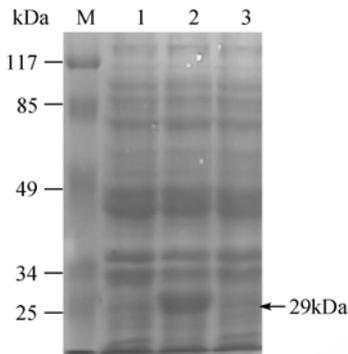


图 1 pQE-VP2S 转化菌的诱导表达分析
Fig. 1 SDS-PAGE of VP2S expressed in *E.coli*. 1. Transformant of empty vector pQE-31; 2. Transformant of pQE-VP2S after IPTG induction. 3. Transformant of pQE-VP2S without IPTG induction; M: Prestained protein molecular weight marker.

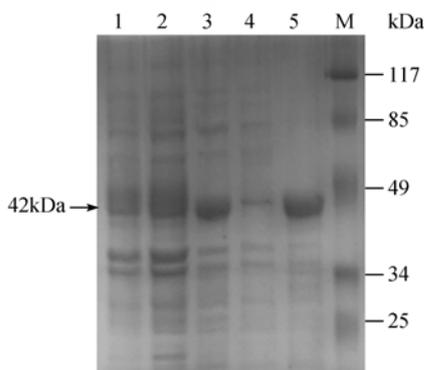


图 2 pQE-CTLA-4-VP2S 转化菌的诱导表达分析
Fig. 2 SDS-PAGE of CTLA-4-VP2S expressed in *E.coli*. 1.Transformant of empty vector pQE-31; 2.Transformant of pQE-CTLA-4-VP2S before IPTG induction; 3. Transformant of pQE-CTLA-4-VP2S after IPTG induction; 4.Supernatant of pQE-CTLA-4-VP2S-transformant after IPTG induction and centrifugation; 5. Pellet of pQE-CTLA-4-VP2S-transformant after IPTG induction and centrifugation; M: Prestained protein molecular weight marker.

2.5 重组 VP2S 的 Western blot 鉴定

将 IPTG 诱导前、后的 pQE-31、pQE-VP2S 和 pQE-CTLA-4-VP2S 转化菌裂解物进行 SDS-PAGE 分离,转印 PVDF 膜,以 CPV 免疫小鼠血清为第一抗体进行 Western blot 分析,结果在 IPTG 诱导的 pQE-VP2S 和 pQE-CTLA-4-VP2S 转化菌中分别检测到预期的 29kDa 和 42 kDa 的蛋白条带(图 3)。

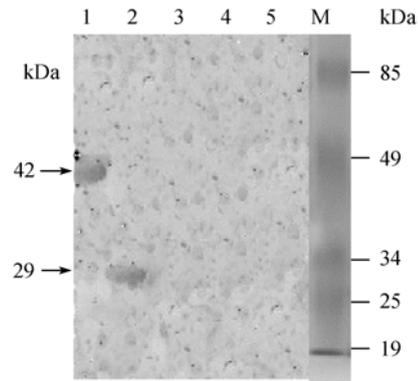


图 3 重组 VP2S 的 Western blot 分析
Fig. 3 Western blot of recombinant protein VP2S. 1. Transformant of pQE-CTLA-4-VP2S after IPTG induction; 2.Transformant of pQE-VP2S after IPTG induction; 3.Transformant of pQE-VP2S before IPTG induction; 4.Transformant of pQE-CTLA-4-VP2S before IPTG induction; M: Prestained protein molecular weight marker.

2.6 小鼠免疫及抗体测定

每只小鼠用 50μg 重组蛋白免疫 2 次,初免后每周采集眼眶血样分离血清,以变性和复性后的 VP2S 为包被抗原,用间接 ELISA 检测血清中的抗体效价,结果显示 CTLA-4-VP2S 免疫组初次免疫后第 2 周的抗体效价为 1:10,第 4 周抗体水平达到高峰期(1:100000),随后缓慢下降;VP2S 免疫组在初次免疫后第 3 周抗体检测仍为阴性,第 5 周抗体水平达到高峰期(1:1000),但仅是 CTLA-4-VP2S 免疫组的 1/100;在整个试验期中, PBS 对照组的抗体检测均为阴性(图 4)。

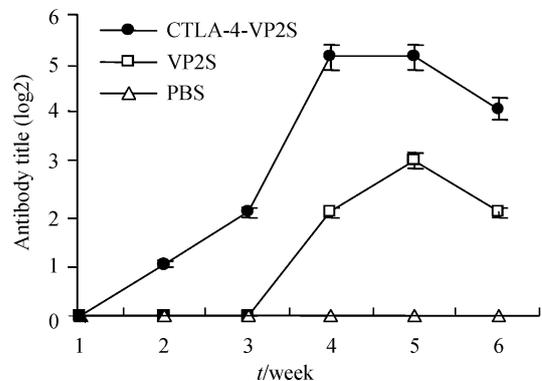


图 4 两种重组蛋白免疫小鼠的 ELISA 抗体检测
Fig. 4 Antibody responses in VP2S- and CTLA-4-VP2S-immunized mice detected by ELISA.

HI 抗体检测结果显示, CTLA-4-VP2S 免疫组初免后第 2 周的抗体效价为 1:8, 第 4 周抗体水平达到峰值(1:28); VP2S 免疫组初免后第 3 周 HI 抗体检测仍为阴性, 第 5 周抗体水平达到峰值(1:25), 但仅为 CTLA-4-VP2S 免疫组的 1/10; 在整个试验期中, PBS 对照组的 HI 抗体检测均为阴性(图 5)。

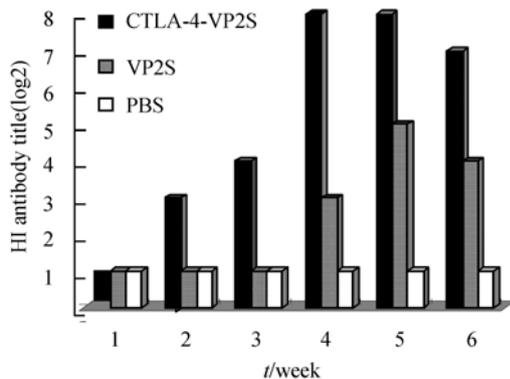


图 5 两种重组蛋白免疫小鼠的 HI 抗体检测
Fig. 5 Antibody responses in VP2S- and CTLA-4-VP2S-immunized mice detected by HI assay.

3 讨论

CTLA-4 分子仅在活化的 T 细胞表面表达, 特异性抗原和 conA 等促有丝分裂原可以刺激静止的 T 细胞活化和 CTLA-4 表达^[12]。为了激活犬外周血 T 淋巴细胞和促进 CTLA-4 mRNA 表达, 我们对 ConA 浓度和刺激时间进行了摸索, 结果显示以 10mg/L ConA 刺激 2~3d, 用 RT-PCR 能扩增到预期长度的 CTLA-4 胞外编码序列。对 3 次扩增产物进行的序列测定结果显示, 毕格犬 CTLA-4 胞外区编码序列与 GenBank 中的犬 CTLA-4 胞外区序列仅有 2 个氨基酸差异, 结合 B7 分子的六肽基序(MYPPPY)完全相同, 不仅说明不同品种犬的 CTLA-4 分子具有高度保守性, 个别碱基差异并非由 PCR 随机错误所致, 而且提示克隆的犬 CTLA-4 胞外区编码序列可以用于表达研究。

VP2 蛋白是 CPV 的主要衣壳蛋白, 其中和抗体能保护动物免受 CPV 感染^[7-9]。细小病毒 VP2 为非糖基化蛋白, 理应能在大肠杆菌中表达, 但到目前为止尚无成功表达 VP2 全基因的报道。本研究也曾尝试在大肠杆菌中表达 CPV VP2 全基因, 结果也未获成功, 可能原因是 VP2 蛋白存在疏水性氨基酸区域或使用大肠杆菌非偏爱密码子^[13]。为了使 VP2 基因能在重组大肠杆菌中表达, Bloom 等^[14]将貂阿留申病细小病毒的 5 个 VP2 基因片段克隆入原核表达载体, 结

果不仅获得成功表达, 而且表达的重组蛋白能被特异抗血清识别。本研究在 CPV VP2 蛋白亲水性和抗原指数等二级结构分析基础上, 选择对应于 CPV (YZ 株) 的 293-520 位氨基酸区域 VP2S 进行表达研究, 因为该区域不含明显的疏水性氨基酸区域且具有较高的亲水性和抗原指数。将 VP2S 基因片段单独或与犬 CTLA-4 胞外区编码序列融合方式插入原核表达质粒 pQE-31, 经 IPTG 诱导后, 两种重组大肠杆菌均能表达预期大小的重组蛋白, 尽管以包涵体形式表达, 但均能被 CPV 抗血清识别, 说明两种表达策略均能获得正确表达。

CTLA-4 能与 CD28 分子竞争结合巨噬细胞、树突状细胞、角化细胞等细胞表面的 B7 分子, 用重组 DNA 技术获得的 CTLA-4 胞外区保持 B7 分子结合特性但不传递负调节信号, 因此能向抗原递呈细胞靶向递呈抗原, 从而发挥分子佐剂作用^[3, 4]。本研究用大肠杆菌成功表达了含 CPV VP2 主要抗原表位的重组抗原 VP2S 及其 CTLA-4 胞外区融合蛋白, 在进行犬免疫试验之前, 有必要以小鼠为动物模型, 初步探索犬 CTLA-4 胞外区对 VP2S 抗原的靶向递呈能力, 试验的理论依据是犬和小鼠 CTLA-4 具有相同的结合 B7 分子 6 肽基序。试验结果显示, 在未使用其它佐剂情况下, 分别用 50 μ g VP2S 和 CTLA-4-VP2S 两次免疫后, 小鼠血清中的 ELISA 和 HI 抗体滴度较高, 尽管融合蛋白 CTLA-4-VP2S 中的 VP2S 抗原仅为非融合 VP2S 的 7/10, 但诱导抗体产生的时间显著早于 VP2S 免疫组, 应答高峰期的抗体水平也显著高于 VP2S 免疫组, 提示犬 CTLA-4 胞外区能将其融合抗原有效递呈给抗原递呈细胞, 从而发挥分子免疫佐剂作用。有研究资料^[15]表明, CPV 的 HI 抗体水平与中和抗体水平之间存在线性关系, 提示本研究表达的 CTLA-4-VP2S 融合蛋白可以作为 CPV 的重组亚单位候选疫苗进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Brunet JF, Denizot F, Luciani MF, *et al.* A new member of the immunoglobulin superfamily CTLA-4. *Nature*, 1987, 328 (6124): 267-270.
- [2] Magistrelli G, Jeannin P, Herbault N, *et al.* A soluble form of CTLA-4 generated by alternative splicing is expressed by non-stimulated human T cells. *Eur J Immunol*, 1999, 29 (11): 3596-3602.
- [3] Rohrbach F, Weth R, Kursar M, *et al.* Targeted delivery of the

- ErbB2/HER2 tumor antigen to professional APCs results in effective antitumor immunity. *J Immunol*, 2005, 174: 5481–5489.
- [4] Boyle JS, Brady JL, Lew AM. Enhanced responses to a DNA vaccine encoding a fusion antigen that is directed to sites of immune induction. *Nature*, 1998, 392(6674): 392–408.
- [5] Pollock RV, Carmichael LE. Use of modified live feline panleukopenia virus vaccine to immunize dogs against canine parvovirus. *J Vet Res*, 1983, 44 (2): 169–175.
- [6] Moore DJ. Canine parvovirus immunoprophylaxis: a review. *Am J Vet Res*, 1983, 54 (4): 259–264.
- [7] Tunso JAL, Cortes E, Ranz A, *et al.* Fine mapping of canine parvovirus B cell epitopes. *J Gen virol*, 1991, 251 (22): 2445–2456.
- [8] Langeveld JP, Casal JL, Osterhaus AD. First peptide vaccine protection against viral infection in the target animal: studies of canine parvovirus in dogs. *J Virol*, 1994, 68(7): 4506–4513.
- [9] Langeveld JPM, Brennan FR, Marty'nez-Torrecuadrada JL. Inactivated recombinant plant virus protects dogs from a lethal challenge with parvovirus. *Vaccine*, 2001, 19: 3661–3670.
- [10] Ohno K, Fujiki M, Khatlani TS, *et al.* Cloning of feline cDNA encoding the cytotoxic T lymphocyte-associated 4 (CTLA-4). *J Vet Med Sci*, 1999, 61(11): 1241–1244.
- [11] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册. 北京: 科学出版社, 2000.
- [12] Finn PW, He H, Wang Y, *et al.* Synergistic induction of CTLA-4 expression by costimulation with TCR plus CD28 signals mediated by increased transcription and messenger ribonucleic acid stability. *J Immunol*, 1997, 158 (9): 4074–4081.
- [13] Zhao JL, Chen HC, Lv JQ, *et al.* Study on clone, sequence analysis and expression of porcine parvovirus VP2 gene. *J Acta Veterinariae Zootechnica Sinica*, 2003, 34(2): 195–198.
- [14] Bloom ME, David A, Loie MK, *et al.* Expression of Aleutian mink disease parvovirus capsid proteins in defined segments: localization of immunoreactive site and neutralizing epitopes to specific regions. *J Virol*, 1996, 71(1): 705–714.
- [15] 邱薇, 夏咸柱, 范泉, 等. 犬细小病毒血凝抑制抗体和中和抗体的关系. *中国兽医科技(Chinese Journal of Veterinary Science and Technology)*, 2000, 30 (10): 3–5.

Immunoadjuvant effect of the extracellular domain of canine CTLA-4 on the VP2 protein of canine parvovirus

Zhi Wu, Huaichang Sun*, Xinyu Zhang

(College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: [Objective] Investigation into the adjuvant effect of the extracellular domain of canine cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4). [Methods] We first amplified the cDNA for the extracellular domain from blood lymphocytes using RT-PCR and then amplified the VP2S gene fragment for major antigenic epitopes of the VP2 protein of canine parvovirus (CPV) using PCR. After sequence analysis, we inserted the VP2S fragment into expression vector pQE-31 with or without the coding sequence for the extracellular domain of canine CTLA-4. After transformation of the two recombinant vectors into *E. coli*, we studied recombinant protein expression by isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) induction. Finally, we immunized BALB/c mice with the same dose of the purified protein VP2S or CTLA-4-VP2S and compared their antibody responses by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and haemagglutination inhibition (HI) assay. [Results] After 30 cycles of amplification, agarose gel electrophoresis revealed expected PCR products for both gene fragments. Sequence analysis showed that the amplified extracellular domain was 99.2% identical to previously published sequence without mutation in the hexapeptide motif (MYPPPY) for B7 molecule binding. After IPTG induction, the vector-transformed *E. coli* expressed expected 29-kDa VP2S protein and 42-kDa CTLA-4-VP2S protein. Western blotting showed that both VP2S and CTLA-4-VP2S proteins were recognized by CPV-specific antiserum. After two times of immunizations, the VP2S-specific antibody appeared from week 2 and reached the highest level at week 4 in CTLA-4-VP2S-immunized mice. In VP2S-immunized mice, however, the specific antibody appeared from week 4 and reached the highest level at week 5. The CTLA-4-VP2S-immunized mice had a 100-fold higher ELISA antibody and 10-fold higher HI antibody compared to VP2S-immunized mice. [Conclusion] The extracellular domain of canine CTLA-4 had strong immunoadjuvant effect on its fused protein.

Keywords: extracellular domain of canine CTLA-4; canine parvovirus VP2 protein; immunoadjuvant effect

*Corresponding author. Tel: +86-514-87979335; Fax: +86-514-87972218; E-mail: sunh@yzu.edu.cn

Received: 11 July 2007/ Revised: 9 November 2007