

猪瘟病毒 E2 基因真核表达载体表达效率和免疫效果的比较

涂亦娴¹ 张馨玉¹ 金华利² 杨福² 刘明羽² 张富春¹ 王宾^{1,2}

(1. 新疆大学 生命科学与技术学院/新疆生物资源基因工程重点实验室, 乌鲁木齐 830046;

2. 中国农业大学 农业生物技术国家重点实验室, 北京 100094)

摘要 比较猪瘟病毒 E2 基因的真核表达质粒 proVAX- E2n 和 pVP22- E2n 体外表达效率以及体内的免疫效果, 以从中选出高效的猪瘟病毒核酸疫苗。将上述表达载体转染 HeLa 细胞进行体外表达后, 用 RT-PCR 和间接 ELISA 法检测 HeLa 细胞体内和体外表达产物; 免疫 6~8 周龄昆明白小鼠, 用间接 ELISA 法和 MTS 法检测小鼠血清中 CSFV 特异性 IgG 抗体水平以及脾脏中淋巴细胞增殖功能。结果表明 2 种 E2 重组质粒均能在 HeLa 细胞中正确表达, 且 proVAX- E2n 的 E2 蛋白表达量 (OD 值为 0.575 4) 明显高于 pVP22- E2n (OD 值为 0.306 05) ($P < 0.05$); proVAX- E2n 刺激机体产生的抗体水平 (最高抗体滴度为 1 2 200) 显著高于 pVP22- E2n 免疫组 (最高抗体滴度 1 1 600); 淋巴细胞增殖结果显示 proVAX- E2n (刺激指数 4.073) 与 pVP22- E2n (刺激指数 2.205) 相比, 能诱发小鼠产生更强的 CSFV 的特异性淋巴细胞增殖反应。本研究表明 proVAX 真核表达载体对 E2 基因体外表达效率和小鼠免疫效果均高于 pVP22 真核表达载体。

关键词 真核表达; 猪瘟病毒; E2n 基因; 抗体; 淋巴细胞增殖

中图分类号 R 392.11; S 852.4; S 852.65

文章编号 1007-4333(2005)06-0037-05

文献标识码 A

Comparisons of the expression efficiencies and immune effects of two eukaryotic vectors encoding CFSV E2 gene

Tu Yixian¹, Zhang Xinyu¹, Jin Huali², Yang Fu², Liu Mingyu², Zhang Fuchun¹, Wang Bin^{1,2}

(1. Key Laboratory for Bioresources and Bioengineering, College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, Xinjiang, China; 2. State Key Laboratory for Agrobiotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract In order to get a high efficiency CSFV DNA vaccine, the expression efficiencies in vitro and immune effects in vivo of proVAX-E2n and pVP22-E2n were compared. After transfected into HeLa cells, both expressed products in vitro were accessed by indirect ELISA and RT-PCR. The results showed that proVAX-E2n (OD = 0.575 4) expressed significantly higher E2 protein than pVP22-E2n (OD = 0.306 05). To investigate their immune effects the KunMing White mice were immunized with both plasmids intramuscularly. The specific antibody of CSFV in serum of mice was detected by indirect ELISA, and the lymphocytes proliferation in spleen was detected by MTS. The results showed that the antibody level (the highest titer = 1 2 200) and the lymphocytes proliferation (the stimulation index = 4.073) of the group immunized with the proVAX-E2n were significantly higher than that with pVP22-E2n (the highest titer = 1 1 600, the stimulation index = 2.205). This study demonstrated that efficiency of in vitro expression and immune responses in mice of proVAX was better than that of pVP22.

Key words eukaryotic expression; CSFV; E2 gene; antibody; lymphocytes proliferation

猪瘟是由猪瘟病毒(classical swine fever virus, CSFV, 或 hog cholera virus, HCV)引起的猪的接触性烈性传染病,给世界养猪业造成了巨大的经济损

失^[1,2]。疫苗接种是控制猪瘟的重要手段^[3]。猪瘟兔化弱毒疫苗(C株)从20世纪60年代开始对我国猪瘟的防治起了决定性作用,有效控制了猪瘟在

收稿日期: 2005-03-04

基金项目: 国家高技术研究发展计划资助项目(2003AA241110 和 2004AA213102); 国家自然科学基金资助项目(30271220)

作者简介: 涂亦娴, 硕士研究生; 王宾, 教授, 通讯作者, 主要从事分子免疫学研究, E-mail: bwang3@cau.edu.cn

我国大规模流行。但是,由于弱毒疫苗特有的对保存及运输过程中的温度要求,以及采用弱毒疫苗对猪免疫后很难区分被免疫和自然感染的猪,这就为疾病的检测带来很大的不便,影响了猪瘟防治^[4]。

DNA 疫苗能够同时诱导机体产生体液和细胞免疫反应,因不存在活疫苗毒力反强的潜在危险,且易构建、保存和运输^[5-7],已广泛应用于抗病毒、抗细菌、抗寄生虫和抗肿瘤疫苗等研究。将 DNA 疫苗技术应用于猪瘟病毒疫苗国内已有报道。王宁等以猪瘟病毒 E2 基因为目的基因构建的真核表达载体 pRCSE2、免疫小鼠动物模型能够诱导小鼠产生针对猪瘟病毒抗原的特异性抗体^[4];余兴龙等构建了 4 种 E2 基因的 DNA 疫苗,免疫动物后,发现只能诱导产生较低水平的抗体^[8]。

载体的表达效率是制约 DNA 疫苗免疫效果的关键因素之一^[9-11]。本研究利用 2 种不同的真核表达载体 proVAX 和 pVP22 构建了猪瘟病毒 E2 基因的 DNA 疫苗,并进行了表达效率和免疫效果的比较,为选择合适的猪瘟病毒基因疫苗表达载体提供了实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1) 试剂。所用 M-MLV 购自 Promega 公司, pMD18-T 载体、Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、dNTPs 和各种限制性内切酶均为 Takara 公司产品;Trizol 购自北京鼎国生物技术有限责任公司;lipofectamine 试剂盒为美国 Invitrogen 公司产品;猪瘟活疫苗()购自北京市兽医实验诊断所,由中牧实业股份有限公司生产。猪瘟病毒(CSFV)来源于猪瘟活疫苗() (猪瘟免化弱毒苗)。

2) 质粒和菌种。proVAX 真核表达载体由本实验室在 pGEM-T 载体基础上构建,它具有 CMV 启动子、BGH polyA 和卡那霉素抗性基因,并携带有人绒毛膜促性腺激素信号肽序列和 CpG 序列。pVP22 真核表达载体携带有编码 I 型单纯疱疹病毒壳膜蛋白 VP22 的基因序列,VP22 具有独特的“蛋白转导”功能^[12],可以将与其融合的蛋白迅速传递给周围相邻的细胞,能显著增强 DNA 疫苗的免疫效果^[13]。proVAX-E2n 和 pVP22-E2n 是将猪瘟病毒 E2 核心基因(该 E2 核心基因片段位于猪瘟病毒 Shimen 株基因组 2 431 bp ~ 3 502 bp 处,命名为 E2n)分别克隆至 proVAX 和 pVP22 两种表达载体

后得到的,并序列分析鉴定正确。

3) 试验动物。6~8 周龄昆明小白鼠购自北京医科大学试验动物研究所。

1.2 方法

1) 重组质粒在真核细胞中的瞬时表达。

大量提取、纯化 4 种质粒 proVAX, pVP22, proVAX-E2n 和 pVP22-E2n, 利用脂质体方法转染 Hela 细胞,按 Lipofectamine 试剂盒说明书进行操作。将转染 proVAX, pVP22 质粒和未转染任何质粒的 Hela 细胞设为对照组。在转染后 48~96 h, 收获细胞。用 Trizol(一步法)提取细胞总 RNA, 反转录得到 cDNA, 然后用 E2n 特异性引物进行 PCR 检测 Hela 细胞中 E2 基因的表达。上游引物中加入了 EcoR 酶切位点与翻译起始密码子 ATG, 在下游引物中加上了酶切位点 Xba 与翻译终止密码子 TGA, 引物由北京奥科生物技术有限责任公司合成。上下游引物分别为:

P1: 5'-CGGAATTCA TGGCACAA GCACAA GGCCGGCTA GCCTG-3'

P2: 5'-CGTCTAGA TCACTTCTCCTAACAGTGCTAC-3'

同时,在转染后 48~96 h, 收集实验组与对照组的细胞培养液上清液与 ELISA 包被液按 1:16 的体积比例混合,包被 96 孔板,用 ELISA 的方法检测细胞培养液上清中的 E2n 蛋白表达量。

2) 重组质粒免疫小鼠。

将纯化的 proVAX、pVP22、proVAX-E2n 和 pVP22-E2n 质粒 DNA 分别溶于含有 1% (体积分数)左旋咪唑的生理盐水,调整为 1 mg/mL。昆明小白鼠分为 4 组,每组 8 只(6~8 周龄),分别免疫上述 4 种质粒,每只后腿肌肉处注射 100 μ L, 设空载体免疫组为对照,并于初免 14 d 后加强免疫 1 次。分别于初免后 2、4、6、8 和 10 周采血并分离血清,ELISA 检测血清中 CSFV 特异性抗体效价。

3) 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测抗体。

将灭活的猪瘟活疫苗() 100 μ L (含猪瘟病毒抗原 500 μ g/mL) 与 10 mL 0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液(pH 9.6)混合后包被 96 孔 ELISA 板,每孔加 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 4 包被过夜;弃去孔内液体,用 0.01 mol/L pH 7.4 PBST(=0.05%的 Tween 20) 冲洗 3 次后,用 3% (体积分数)BSA 于 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h; 0.01 mol/L PBST(pH 7.4) 洗涤 3 次后,按每孔 100 μ L 加入不同稀释度的待测血清,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h;

洗涤 3 次后,按每孔 100 μ L 加入 HRP 标记的羊抗小鼠 IgG 二抗,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h;洗涤 5 次后,每孔加入底物 TMB 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 避光显色 5~15 min,加入终止液 2 mol/L H_2SO_4 ,每孔 50 μ L,终止显色,置于酶标仪中读取 OD 值(450 nm/620 nm)。

血清稀释度从 1:100~1:3200,设免疫前的血清为阴性血清。实验组血清各稀释度的 OD 值与阴性血清 OD 值之比 ≥ 2.1 倍时为该小鼠血清的抗体滴度。

4) 淋巴细胞增殖实验。

小鼠加强免疫后第 7 天,断颈处死小鼠,无菌条件取小鼠脾脏,研碎,裂解液去除红细胞,获得单个淋巴细胞悬液。按 2×10^6 /mL 加入 96 孔细胞培养板。分别以猪瘟灭活病毒抗原(终质量浓度为 10

μ g/mL)、ConA(10 μ g/mL)、BSA(10 μ g/mL)刺激每组淋巴细胞,培养 48~72 h 后,加入 20 μ L/孔 MTS(1 mL MTS 中加入 50 μ L PMS)显色 2~3 h,于酶标仪中检测 492 nm 处 OD 值。

5) RT-PCR 检测细胞因子。

用 Trizol(一步法)提取上述 T 细胞增殖实验剩余的各组淋巴细胞的总 RNA,取 6 μ L RNA 进行逆转录。随后取 5 μ L 各组 cDNA 进行特异引物 PCR 扩增,取 9.5 μ L PCR 扩增产物进行 2%(体积分数)琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色,用凝胶成像系统照相,AlphaEaseFC 软件进行亮度分析。在检测各种细胞因子之前,通过 PCR 检测持家基因 HPRT 的表达,来调节各组 cDNA 的含量。PCR 反应条件和引物序列见表 1^[14]。

表 1 细胞因子引物序列和 PCR 反应参数

Table 1 Primers sequence of cytokine genes and parameters of PCR reaction

目的基因	引物	PCR 反应参数			
HPRT	5 - GTTGGATACA GCCA GACTTTGTTG, 3 - GAGGGTAGGCTGCGCTATGCGT	94	for 30 s, 60	for 30 s, 72	for 40 s
IL-2	5 - TCCACTTCAA GCTCTACAG, 3 - GAGTCAAA TCCA GAACATGCC	94	for 30 s, 55	for 30 s, 72	for 40 s
IFN-	5 - CATTGAAA GCCTA GAAA GTCTG, 3 - CTCA TGGAA TGCATCCTTTTTCG	94	for 30 s, 58	for 30 s, 72	for 40 s
IL-4	5 - GAAA GAACCTT GACACA GCTG, 3 - GAACTCTT GCA GGTAA TCCA GG	94	for 30 s, 54	for 30 s, 72	for 40 s

6) 数据处理。

求出各组数据的平均值和标准偏差,然后用单尾 t 检验来检测各组组间差异。实验重复 2 次。

2 结果

2.1 重组质粒 proVAX- E2n 和 pVP22- E2n 在真核细胞中的瞬时表达

为证明重组质粒 proVAX- E2n 和 pVP22- E2n 能否在真核细胞中表达,脂质体法转染 HeLa 细胞后,分别采用 RT-PCR 和 ELISA 的方法检测到 E2n 在 HeLa 细胞中能够在基因水平(图 1)和蛋白水平(图 2)成功的表达。同时,ELISA 的结果表明 proVAX- E2n 的表达效率明显高于 pVP22- E2n,且有显著性差异($P < 0.05$)。

2.2 酶联免疫吸附实验(ELISA)检测 E2n 的特异性抗体

由图 3 可以看出,用 proVAX- E2n 和 pVP22-

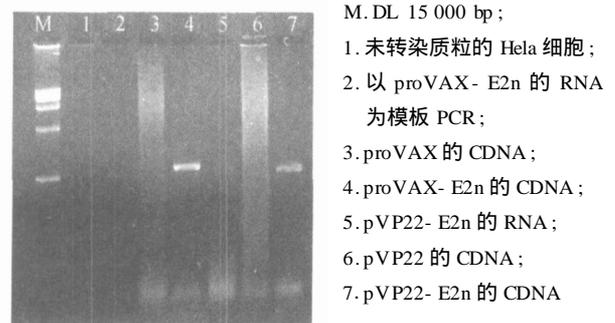
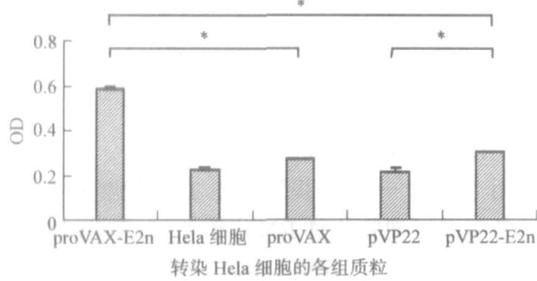


图 1 RT-PCR 检测 E2n 基因的体外表达

Fig. 1 RT-PCR assay for E2n gene expression *in vitro*

E2n 免疫的昆明白小鼠,2 周后均产生了针对 E2n 的特异性抗体,且在 4 和 8 周时 proVAX- E2n 免疫组的抗体水平显著高于 pVP22- E2n 组($P < 0.05$);同时,proVAX- E2n 免疫组抗体水平高峰的出现迟于 pVP22- E2n,但抗体的总体水平要高于 pVP22- E2n。



差异显著 ($P < 0.05$) 图 3、4 同。

图 2 ELISA 检测 proVAX-E2n 和 pVP22-E2n 在 HeLa 细胞上清中的表达水平

Fig. 2 Determination of expression product of proVAX-E2n and pVP22-E2n in HeLa cell supernatant by ELISA

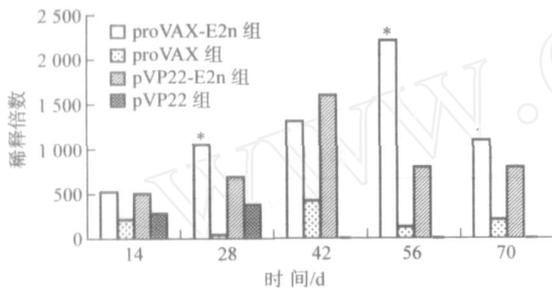


图 3 ELISA 检测小鼠血清中抗 CSFV 的特异性 IgG

Fig. 3 ELISA detection anti-CSFV antibody in the sera of mice vaccinated with proVAX-E2n and pVP22-E2n (差异显著 * $P < 0.05$)

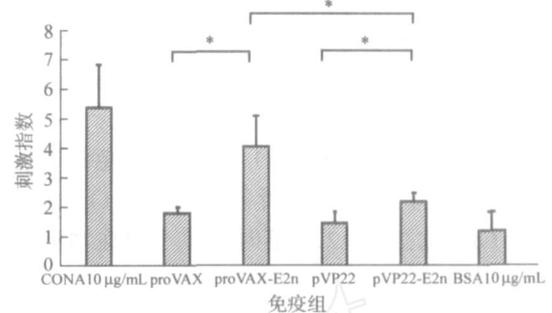
2.3 淋巴细胞增殖实验

为证明重组质粒免疫后能够诱导小鼠产生抗原特异性的细胞免疫反应,加强免疫后第 7 天,取实验组和对照组小鼠的脾脏单细胞进行淋巴细胞增殖实验。图 4 表明,用 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 猪瘟灭活病毒作为特异性抗原刺激淋巴细胞后,与对照组 proVAX 和 pVP22 相比,重组质粒 proVAX-E2n 和 pVP22-E2n 免疫后均能诱导昆明小白鼠产生 CSFV 特异性淋巴细胞增殖反应 ($P < 0.05$),并且 proVAX-E2n 的刺激指数要显著高于 pVP22-E2n ($P < 0.05$)。

2.4 半定量 RT-PCR 检测细胞因子

细胞因子在免疫调节中起着重要的作用,细胞因子表达量的多少是衡量免疫效果的重要指标之一。在第二次免疫后 7 d,从实验组和对照组小鼠的脾脏中提取总 RNA,用半定量 RT-PCR 方法检测 IFN- γ 、IL-2 和 IL-4 等细胞因子的表达量。图 5 结果显示,在各免疫组中,均能检测到 IFN- γ 、IL-2 和 IL-4 的表达,与空质粒免疫组相比,proVAX-E2n 和 pVP22-E2n 免疫组的各种细胞因子的表达量均明显提高,且 proVAX-E2n 组 IL-2 的表

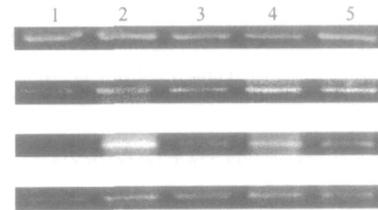
达量明显高于 pVP22-E2n 组。



CONA 为阳性对照组,BSA 为阴性对照组

图 4 proVAX-E2n 和 pVP22-E2n 免疫小鼠脾脏组织淋巴细胞增殖结果

Fig. 4 Results of lymphocytes proliferation in spleen of mice vaccinated with proVAX-E2n and pVP22-E2n



1. 对照组(未免疫小鼠); 2. proVAX-E2n 组;
3. proVAX 组; 4. pVP22-E2n 组; 5. pVP22 组

图 5 RT-PCR 检测细胞因子

Fig. 5 RT-PCR detection of cytokine gene expression

3 讨论与结论

1) 上述实验显示,体外表达效率和体内免疫效果,proVAX-E2n 均高于 pVP22-E2n,这可能是由 proVAX 载体的结构决定的,它携带有人绒毛膜促性腺激素信号肽序列和 CpG 序列。本研究表明,信号肽序列可以介导抗原蛋白分泌到胞外,用 ELISA 可以在细胞培养上清中检测到 proVAX-E2n 的表达产物。最近的研究证明,分泌型的蛋白是诱导体液免疫的最佳抗原形式^[15]。构建分泌型表达质粒 pcDNA3/sVP1 的实验显示,所产生的中和抗体效价明显高于非分泌型的,这提示分泌型基因疫苗的免疫效果比相应的非分泌型的基因疫苗强^[16]。本实验也证明分泌型 proVAX-E2n 的抗体水平高于非分泌型的 pVP22-E2n。由此可见,DNA 疫苗中的信号肽序列协助抗原蛋白进入分泌途径,能增强机体的体液免疫应答能力^[17]。

2) CpG 序列又称免疫刺激序列 (ISS),可以增加非特异性免疫反应,可诱导产生大量的 IFN- γ 、IL-2 及 IL-12 等细胞因子,促进 Th1 型免疫应答,

是一种能够增强核酸疫苗免疫效果的基因佐剂^[18-20]。用 CpG 序列作为 HBV S 蛋白基因疫苗的基因佐剂, 免疫接种 Balb/c 小鼠的结果显示含有 CpG 的质粒 DNA 与不含 CpG 的对照相比, 细胞免疫应答显著增强^[21]。这与本实验结果一致。本研究用 proVAX- E2n 与 pVP22- E2n 免疫小鼠, 淋巴细胞增殖实验结果显示, 含有 CpG 基序列的 proVAX- E2n 组的淋巴刺激指数高于无 CpG 基序列的 pVP22- E2n 组。细胞因子检测表明, proVAX- E2n 在小鼠体内诱导产生 IL-2 的表达量要明显高于 pVP22- E2n 免疫组(图 5)。

研制基因疫苗中, 选择高效表达载体是提高免疫效果的关键因素^[9-11]。真核表达载体 proVAX 引入人绒毛膜促性腺激素信号肽序列和 CpG 序列, proVAX- E2n 基因疫苗在小鼠模型中激发的体液和细胞免疫应答都明显高于 pVP22- E2n, 说明 proVAX 是一种高效的真核表达载体。笔者筛选出免疫效果良好的 CSFV 核酸疫苗 proVAX- E2n, 为猪瘟病毒核酸疫苗的研究和应用提供了实验依据。

参 考 文 献

- [1] Lin M, Lin F, Mallory M, et al. Deletions of structural glycoprotein E2 of classical swine fever virus strain alfort/187 resolve a linear epitope of monoclonal antibody WH303 and the minimal N-terminal domain essential for binding immunoglobulin G antibodies of a pig hyperimmune serum[J]. J Virol, 2000, 74(24):11619-11625
- [2] Uttenthal A, Storgaard T, Oleksiewicz M B, et al. Experimental infection with the Paderborn isolate of classical swine fever virus in 10-week-old pigs: determination of viral replication kinetic by quantitative RT-PCR, virus isolation and antigen ELISA[J]. Vet Microbiol, 2003, 92: 197-212
- [3] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1985. 517-518
- [4] 王宁, 张楚瑜, 付烈振, 等. 猪瘟病毒囊膜糖蛋白 DNA 疫苗的研制[J]. 中国预防兽医学报, 1999, 21(3):201-203
- [5] Wolff J A, Malone R, Williams P, et al. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo* [J]. Science, 1990, 247:1465-1468
- [6] 孙树汉. 核酸疫苗[M]. 第 2 版. 上海: 第二军医大学出版社, 2000. 4-6
- [7] 周鹏程, 陆宇, 陈建国, 等. 猪瘟病毒 E2(gp55)基因的克隆表达及其 DNA 疫苗的初步研究[J]. 微生物学报, 2000, 40(3):243-250
- [8] 余兴龙, 涂长春, 李红卫, 等. 猪瘟病毒 E2 基因真核表达质粒的构建及基因疫苗的研究[J]. 中国病毒学, 2000, 15(3):264-271
- [9] Helen S G, Katherine A B, Richard W T. DNA vaccines: improving expression of antigens [J]. Genetic Vaccines and Therapy, 2003, 1(1):2
- [10] Whitton J L, Rodriguez F, Zhang J, Hassett D E. DNA immunization: mechanistic studies[J]. Vaccine, 1999, 17: 1612-1619
- [11] Babiuk L A. Broadening the approaches to developing more effective vaccines[J]. Vaccine, 1999(17): 1587-1595
- [12] 孔北华, 王文霞, 刘春生, 等. 病毒蛋白 22 增强单纯疱疹病毒胸苷激酶/更昔洛韦基因治疗系统杀伤卵巢癌细胞的体内研究[J]. 中华妇产科杂志, 2003, 38(14): 195-198
- [13] Hung C F, He L M, Juang J, et al. Improving DNA Vaccine potency by linking Marek's disease virus type 1 VP22 to an antigen[J]. J Virol, 2002, 76(6): 2676-2682
- [14] Jin H L, Li Y J, Ma Z H, et al. Effect of chemical adjuvants on DNA vaccination[J]. Vaccine, 2004 (22): 2925-2935
- [15] 秦天莺, 郝葆青, 尹光福. 基因疫苗研究与进展[J]. 西南民族大学学报(自然科学版), 2004, 30(4):482-487
- [16] 方艳辉, 金玉怀, 王永祥, 等. 人 IL22 信号肽基因增强柯萨奇病毒 B3 型 VP1 DNA 疫苗诱导的中和抗体应答[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2004, 24(3):202-205
- [17] 赵平, 赵兰娟, 曹洁, 等. 信号肽和辅助性 T 细胞表位增强 HBV 核心抗原 DNA 疫苗诱导的免疫应答[J]. 生物化学与生物物理学报, 2002, 34(3):341-346
- [18] Klinman D M. Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides[J]. Nature Reviews Immunol, 2004, 4: 1-10
- [19] 罗雯, 张芳琳, 刘勇. CpG 序列的免疫激活作用研究进展(综述)[J]. 西安联合大学学报, 2002, 5(4): 5-8
- [20] 赵渝, 赵冰, 陆苹. DNA 疫苗的分子佐剂应用研究进展[J]. 生物技术通报, 2002, 5:10-16
- [21] 李文波, 张修礼, 姚志强. 含 CpG 基序的寡核苷酸对乙型肝炎病毒基因疫苗的细胞免疫效应的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2004, 14(10):104-112