维普资讯 http://www.cqvip.com

第12卷第2期 中国病毒学 Vol.12 No.2
1997年6月 VIROLOGICA SINICA Jun. 1997

表达轮状病毒SA11株Vp4的抗原表位诱导病毒中和抗体生成*

陈元鼎[1,2] 刘名英[1] 邹永健[1] 彭 梅[1] 戴长柏[1]
Francisco E. Baralle[2]
[1](中国医学科学院 中国协和医科大学医学生物学研究所,昆明 650107)
[2](International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, Trieste 34012, Italy)

提 要 以昆虫病毒 Flock house virus (FHV) 外壳蛋白为载体的外源抗原表位表达系统(FHV-RNA2 载体系统),在重组杆状病毒和重组 pET 系统中构建和表达了 SA11 Vp4 胰酶切割位点两侧和重叠切割位点 3 个抗原表位氨基酸序列(抗原表位 A, aa223~242;抗原表位 B, aa243~262;抗原表位 C, aa234~251),并对其免疫原性进行了研究。结果表明:这 3 个抗原表位能诱导动物产生抗同源氨基酸序列的抗体和抗同源病毒(SA11)感染性的血清中和抗体。研究结果提示:RV Vp4 胰酶切割位点区氨基酸序列除了具有胰酶切割增强病毒感染力外,还具有诱导动物机体产生血清中和抗体的能力,是 RV 重组抗原表位亚单位疫苗研究中重要的抗原表位氨基酸序列。

关键词 轮状病毒 Vp4,胰酶切割位点,抗原表位,中和抗体,FHV-RNA2 载体系统

轮状病毒(RV)是人类、哺乳类及鸟类胃肠炎的主要病原体。迄今,发展 RV 疫苗仍然是研究预防和控制 RV 胃肠炎的主要策略[1,2]。RV 外壳蛋白 Vp4 和 Vp7 是最重要的抗原蛋白,可与病毒中和抗体反应,抗 Vp4 和 Vp7 的单克隆抗体也能中和 RV 的感染性[3]。

RV Vp4 位于病毒颗粒的表面,并形成脊状突起(Spikes)。研究表明,Vp4 有许多功能,包括病毒血凝素、细胞附着和穿入、毒力、蛋白酶增强感染性和中和抗原等[4]。进一步研究证实,Vp4 是病毒主要的交叉中和抗原,并推测该高水平的交叉中和抗原位点位于保守的 Vp4 抗原表位区。氨基酸序列测定发现,Vp4 胰酶切割位点(aa247 和 aa241)及附近的氨基酸序列是高度保守的,并且其保守性在无毒力的 RV 中比在有毒力者中更高。此外,在一些人 RV 株中可能还存在另一个切割位点(aa246 后面),该位点与病毒毒力有关。此结果提示,Vp4 胰酶切割位点区的氨基酸序列除了具有蛋白酶增强感染性外,还可能在病毒感染的发病机制及诱导机体产生中和抗体方面都具有重要作用。

为了评价 Vp4 胰酶切割位点区的氨基酸序列在诱导中和抗体生成及其在研制重组亚单位疫苗中的意义,运用我们最近构建的以昆虫病毒 Flock house virus (FHV, Nodaviridae 科)外壳蛋白为载体的外源抗原表位表达系统 (FHV-RNA2 载体系统)[5],在 pET-3 和杆状病毒系统中构建和表达了 Vp4 胰酶切割位点区上游、下游和重叠区 3 个氨基酸片段,并对其抗原性和诱导动物产生血清中和抗体的能力进行了研究。

收稿日期:1996-05-27,修回日期:1996-10-23
* 本课题部分受云南省科委研究基金资助

维普资讯 http://www.cqvip.com

材料与方法

1 细胞,重组质粒DNA及病毒

大肠杆菌DH5α用于重组质粒pBluescript Ⅱ KS+/-(pBS),pET-3和pVL1393 DNA的扩增。质粒DNA转化的DH5α细胞在含量200 μg/mL氨苄青霉素的LB或TB培养液中培养。大肠杆菌细胞BL21(DE3)含有一个LacUV5启动子控制的T7多聚酶基因考贝,用于重组质粒pET-3 DNA(Novagen, Madison, WI)的表达,培养液为含200 μg/mL的TB液。重组杆状病毒在Sf21(*Spodoptera frugiperda*)细胞中增殖和表达,培养液为含10%胎牛血清和50 μg/ml庆大霉素的TC100。轮状病毒SA11在MA104细胞中增殖,培养液为含10%胎牛血清,2 mmol/L谷氨酰胺和50 μg/mL庆大霉素的Dulbecco MEM培养液。

2 携带有SA11 Vp4抗原表位的重组质粒pET-3和重组杆状病毒的构建

本研究使用我们最近构建的以昆虫病毒FHV外壳蛋白为载体的外源抗原表位表达系统(FHV-RNA2载体系统)。该系统的构建详见前文[5]。成熟的FHV外壳蛋白的三维结构已为其晶体的X-光衍射所揭示[6]。图1A示构建的FHV外壳蛋白分子的三维结构及其分子上可供选择的外源抗原表位插入位点。人工合成了3个编码SA11 Vp4胰酶切割位点上游(aa223~242,命名为抗原表位A,REA),下游(aa243~262,命名为抗原表位B,REB)及重叠(aa234~251,命名为抗原表位C,REC)氨基酸的寡核苷酸片段,用遗传工程技术分别构建到HFV RNA2基因的3个位点(图1B)。携带Vp4抗原表位基因及FHV-RNA2的pBluescript(pBS-FHV-RE)质粒DNA,经内切酶和DNA原位杂交及聚合酶链式反应(PCR)筛选和DNA序列测定其核苷酸序列准确无误后,将载体和Vp4抗原表位基因重组到质粒pET-3(pET-FHV-RE)和pVL1393(pVL-FHV-RE)中。

3 重组pET-FHV-RE系统

在重组pET-EHV-RE系统中,嵌合蛋白的表达受T7启动子控制。BL21(DE3)经重组pET-FHV-RE质粒DNA转化后,在TB培养液中37 ℃长至OD_{600}=0.4时,加入1 mmol/L IPTG并继续培养3~4 h;或不加IPTG,继续培养过夜。细胞经4000 r/min 10′(Sorvall)离心沉淀,用超声裂解缓冲液(200 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris, 5%甘油, 1 mmol/L PMSF, 5% Triton X-100, 2 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT)悬浮,超声裂解。裂解液经离心,弃上清,沉淀(包含体)用8 mol/L尿素溶解。

在杆状病毒系统中,嵌合蛋白的表达受杆状病毒多角体蛋白启动子的控制。重组杆状病毒的构建和表达过程见前文[5]。

4 动物免疫

pET-FHV-RE系统中表达的嵌合蛋白经部分纯化后,在还原缓冲液(10 mmol/L还原型谷胱甘肽(GSH), 1 mmol/L氧化型谷胱甘肽(GSSG), 50 mmol/L DTT, 100 mmol/L Tris-Cl, pH 8.0, 2 mmol/L EDTA)中室温还原24 h,转透析液(100 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 50 mmol/L Tris-Cl, pH 8.0)中透析。取透析液250 μL(约含30 μg嵌合蛋白)与等体积弗氏不完全佐剂一起后腿注射豚鼠,隔两星期,豚鼠用与第一次免疫等量的嵌合蛋白和弗氏不完全佐剂混合作第二、第三次加强免疫。第三次免疫后两星期,采取动物免疫血清。

vBac-FHV-RE系统中表达的嵌合蛋白经超声分散后,直接免疫豚鼠。每只豚鼠后腿肌肉注射300 μL蛋白液(约含20 μg嵌合蛋白,与等量弗氏完全佐剂混合)。隔三星期,用等量嵌合蛋白和弗氏不完全佐剂作第二次、第三次加强免疫。第三次免疫后两星期,采取动物免除血清。

5 Western blot分析

方法见前文[5,7]。

6 血清中和试验

按常规微量方法进行。免疫血清中和抗体滴度用保护50%细胞不出现CPE的血清稀释度的倒数表示。

维普资讯 http://www.cqvip.com

7　ELISA

固相 ELISA 检测如前文所述[8]，稍作改变。包被抗原为人工合成肽，其氨基酸序列与嵌合蛋白中 SA11 Vp4 抗原表位的相同，每孔包被 100 μL。血清抗体滴度以检测血清 OD 值减去酶－底物对照 OD 值除以酶－底物对照 OD 值大于 2.0 时血清稀释度的倒数表示。

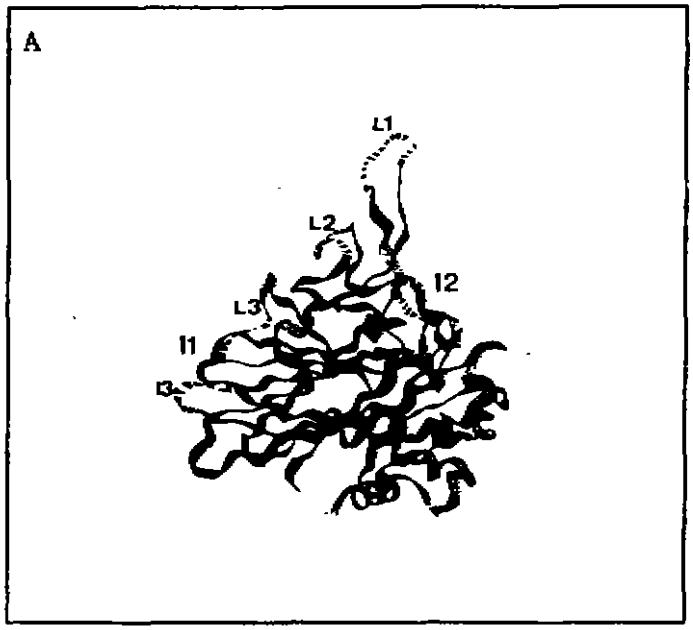
8　过氧化物酶细胞染色试验

病毒感染细胞后，细胞质中合成的 SA11 抗原的过氧化物酶免疫染色方法同前文所述[9]。

结　果

1　携带 Vp4 抗原表位 REA, REB, REC 及其组合 REA + REB + REC 的嵌合蛋白的表达

BL21(DE3)细胞经携带有 Vp4 抗原表位 REA, REB, REC 或其组合 REA + REB + REC 基因的重组质粒 pET－FHV－RE 转化后，高水平地表达了携带有这些抗原表位的嵌合蛋白(图 2)。这些嵌合蛋白在细胞质中表达，并以包含体形式存在，经 SDS－PAGE 分离及 Coomassie



B

Positions (Epitopes)	aa deleted	aa insertion
I_3(REA)	305(0)	GLPPIQNTRNVVPLSLTARD
I_1(REB)	109(0)	VIHY*AQANEDIVISKTSLM
L_3(REC)	131-134(4)	VILSLTARDVIHYRAQAN

图 1　FHV 外壳蛋白的三维结构：示可供选择的外源抗原表位系列插入点位 L_1, L_2, L_3, I_1, I_2 和 I_3，(A)和 SA11 Vp4 抗原表位的氨基酸序列[12]及其在 FHV 中的插入点位(L_3, I_1, 和 I_3)和氨基酸位置(B)。

Fig. 1　3D ribbon structure of FHV capsomer protein showing the positions of L_1, L_2, L_3, I_1, I_2 and I_3 sites can be chosen for the insertion of foreign epitope sequences (A) and the amino acid positions in FHV and the modifications done for inserting the SA11 Vp4－specific sequences[12] in the different sites: L_3, I_1, and I_3.

维普资讯 http://www.cqvip.com

蓝染色，其分子量等于 FHV 外壳(载体)蛋白的分子量(43 kDa)加上 RV 抗原表位的分子量，例如携带有 REA 的嵌合蛋白的分子量约为 45 kDa(图 2 中柱 2)。在 Western blot 分析中，这些嵌合蛋白均能被抗 FHV 外壳(载体)蛋白的动物免疫血清所识别(资料未显示)。

图 2 在 pET－3 系统中表达的携带 SA11Vp4 特异性抗原表位的嵌合蛋白 SDS－PAGE(10%)分析

Fig.2 SDS－PAGE (10%) of chimeric proteins carrying SA11 Vp4－specific epitopes onFHV capside protein expressed in pET－3 system.

Lane 1: size molecular markers (in kDa); Lane 2～8: chimeric proteins carrying SA11 Vp4－specific epitope(s)－REA(2), REB(3), REC(4), REA＋REB(5), REA＋REC(6), REB－REC(7), and REA＋REB＋REC (8)

昆虫细胞 Sf21 经携带有 Vp4 抗原表位的重组杆状病毒(vBac－FHV－RE)感染后 3～4 d，所表达的嵌合蛋白的分子量与在 pET－FHV－RE 系统中表达的相同(图 3)，在 Western blot 分析中同样能被抗 FHV 外壳(载体)蛋白的动物免疫血清识别(资料未显示)。

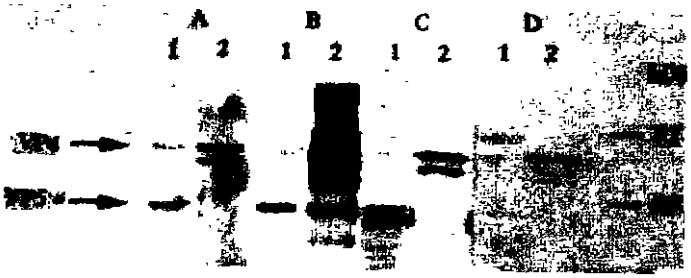


图 3 SA11 病毒 Vp4(柱 1)和杆状病毒系统中表达的嵌重组 SA11 Vp4 蛋白(柱 2)免疫印迹分析

Fig.3 Immuno－blot of Vp4 of SA11 virus(lane 1) and recombinant SA11 Vp4 expressed in baculovirus system (Lane2)

A：豚鼠抗携带 REA＋REB＋REC 嵌合蛋白(pET－3 系统中表达)血清；B：豚鼠抗 SA11 Vp4(重组杆状病毒系统中表达)血清；C：豚鼠 SA11 抗病毒血清；D：山羊抗 SA11 病毒血清。

Panel A: guinea pig antiserum against the chemric protein carrying REA＋REB＋REC expressed in pET system(1:100); Panel B: guinea pig antiserum against SA11 Vp4 expressed in baculovirus system(1:100); Panel C: guainea pig antiserum against SA11 Virus(1:100); Panel D: Goat antiserum against SA11 virus(1:200).

2 嵌合蛋白诱导豚鼠产生病毒(SA11)特异性血清中和抗体

血清中和试验和 ELISA 试验结果显示携带不同 RV 抗原表位的嵌合蛋白可诱导豚鼠产

维普资讯 http://www.cqvip.com

生抗病毒血清中和抗体(表 1)和产生能与相同氨基酸序列(合成肽)反应的血清抗体(表 2)。

表 1　携带 SA11 Vp4 特异性抗原表位的嵌合蛋白豚鼠免疫血清中和抗体滴度

Table1　Neutralizing antibody titers in guinea pig antisera produced against the chimeric proteins carrying SA11 Vp4 - specific epitope(s)

抗血清 Antisera	中和抗体滴度 antibody titers
pre - imm*	<10
anti - HCV**	<10
- SA11	5120
- REA	80
- REB	160
- REC	80
- REA + REB + REC	160

* 感染前血清对照;** 携带丙肝病毒抗原表位(20aa)豚鼠免疫血清对照

* Pre - immune serum control; ** guinea pig antiserum against a hepatits C virus core protein epitope (20aa) as a control

表 2　携带 SA11 Vp4 特异性抗原表位的嵌合蛋白豚鼠免疫血清中 ELISA 抗体滴度

Table 2　ELISA antibody titers in guinea pig antisera produced against chimeric proteins carrying SA11 Vp4 - specific epitope (s)

抗血清 Antisera	抗体滴度 Antibody titers		
	pA**	pB**	pC**
pre - imm*	<40	<40	<40
Anti - SA11	5120	2560	2560
- REA	2560	80	640
- REB	<40	2560	640
- REC	2560	1280	2560
- REA + REB + REC	2560	1280	2560

* 感染前豚鼠血清对照;** 合成肽(包被抗原)的氨基酸序列与相应重组抗原表位相同:pA 与 REA 同,pB 与 REB 同,pC 与 REC 同。

* Pre - immune guinea pig serum control; ** The amino acid sequence of the systhetic peptide pA is as the same as that of REA, and pB is as REB, pC is as REC.

从表 2 中还可看出,抗含 REA 嵌合蛋白的免疫血清可与合成肽 pA(氨基酸序列同 REA)或 pC(氨基酸序列同 REC)反应;抗含 REB 嵌合蛋白免疫血清可与合成肽 pB(氨基酸序列同 REB)或 pC 反应;抗含 REC 嵌合蛋白的免疫血清和抗含 REA + REB + REC 嵌合蛋白的免疫血清可与 pA、pB 和 pC 反应。这是因为 REA 和 REB 氨基酸序列间没有同源性,而分别与 REC 有一半的同源。

3　Western blot 和细胞免疫酶检测

Western blot 分析发现,携带 REA + REB + REC 的嵌合蛋白(单一分子)免疫的豚鼠血清抗体可识别 SA11 病毒 Vp4 和杆状病毒系统中表达的重组 SA11 Vp4 蛋白(图 3)。

细胞免疫酶染色检测发现,用 pET 系统中表达的含 REA + REB + REC 的嵌合蛋白和杆状病毒系统中表达的含 REC 和含 REA + REB + REC 的嵌合蛋白免疫的豚鼠血清抗体,可识别 SA11 感染的 MA104 细胞中表达的病毒抗原(滴度为 1:2560)。

携带有 REC 的嵌合蛋白免疫的豚鼠血清具有较高的 ELISA 抗体滴度和/或能识别 SA11 感染的 MA104 细胞中的病毒抗原,表明 REC 比 REA 或 REB 具有更强的免疫原性。

讨　论

以前的研究表明,重组杆状病毒系统中表达的 FHV 外壳蛋白经纯化可自然组装成病毒样颗粒[5,10]。我们用遗传工程技术构建了一个以 FHV 外壳蛋白为载体的外源蛋白表达系统。在此系统中,可以将外源抗原表位基因插入 FHV - RNA 2 cDNA 的特定部位,使其所表达的外源抗原表位位于嵌合蛋白结构的表面,以充分展示其抗原性和免疫原性而最小程度地

维普资讯 http://www.cqvip.com

影响载体蛋白的立体分子结构。我们成功地表达了人免疫缺陷病毒(HIV－1)外膜蛋白抗原表位(V3)氨基酸序列,并使其位于表达的嵌合蛋白所形成的病毒样颗粒的表面,保持了病毒特有的空间构象及其抗原性和免疫原性[5,8]。本研究用此载体系统在重组 pET－3 和重组杆状病毒系统中构建和表达了 RV SA11 Vp4 胰酶切割位点区(抗原表位)的氨基酸序列,并对其抗原性和免疫原性进行了研究。

RV 疫苗研究主要可分为两个方面,首先是对不引起临床症状的减毒动物病毒株和人－动物病毒重组株作疫苗进行了研究[1],这些研究是不令人满意的[2],因该单价疫苗很难保护不同血清型病毒的感染。其次是用基因工程方法表达的一个或多个病毒抗原蛋白或抗原表位作亚单位疫苗,保留了其抗原表位的空间构象并能被宿主免疫系统识别。本研究的目的就是为了评价 Vp4 胰酶切割位点区的氨基酸序列在诱导中和抗体生成及其在研制重组亚单位疫苗中的意义。

结果表明,携带有 SA11 Vp4 特异的氨基酸序列 aa223～242(REA)、aa243～262(REB)和 aa234～251(REC)的嵌合蛋白能诱导动物产生病毒特异性血清抗体。该抗体能识别抗原表位特异的氨基酸序列,并能特异地中和 SA11 在 MA104 细胞上的感染性。携带 REC 和 REA＋REB＋REC 的嵌合蛋白免疫的动物血清抗体,能识别 SA11 感染的 MA104 上表达的病毒特异性抗原和变性的 SA11 Vp4 抗原(Western blot 结果)。由于该表达载体可将所表达的病毒抗原表位暴露在嵌合蛋白结构的表面,使其抗原性和免疫原性得到充分体现,故它在 RV 重组亚单位疫苗的设计和研制中具有重要的意义。它所诱导的动物血清抗体是否具有交叉中和异源病毒的感染性,是否能保护动物免受同源和异源病毒的攻击,现正在进一步研究中。

参考文献

1 Bishop RF. Development of candidate rotavirus vaccines. Vaccine, 1993, 11:247～254

2 Estes MK and Cohen J. Rotavirus gene structure and function. Microbiol Rev, 1989;53:410～449

3 Matsui SM, Mackow ER, Greenberg HB *et al*. Molecular determinant of rotavirus neutralization and prodction. Adv Virus Res, 1989;36:181～214

4 Muttion NM, Cohen J, Estes MK *et al* In: Kapikian AZ ed. The rotavirus proteins. viral infections of the enterointestinal tract. New York: Marcel Dekker Inc, 1994, 169～249

5 Scodeller EA, Tisminetzky SG, Porro F *et al*. A new epitope presenting system displays a HIV－1 V3 loop sequence and induces neutralizing antibodies. Vaccine, 1995, 13:1233～1239

6 Fisher AJ, Johnson JE. Ordered duplex RNA controls the capsid architecture of an icosahedral animal virus. Nature (London), 1993, 361:176～179

7 Towbin H, Staehelin T, and Gorden J *et al* Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76:4350～4353

8 Tisminetzeky SG, Scodeller EA, Evangelisti P *et al*. Immunoreactivity of chimeric proteins carrying the HIV－1 epitope IGPGRAF, correlation between predicted conformation and antigencity. FEBS Letters, 1994, 353:1～4

9 Shaw RD, mackow ER, Dyall－Smith ML *et al*. Serotype analysis of Vp3 and Vp7 neutralization escape mutants of rhesus rotavirus. J Virol, 1988, 62:3509～3512

10 Schneeman A, Dasgupta R, Johnson JE *et al* Use of recombinant baculoviruses in synthesis of morphorlogically distinct virus－like particles of Flock House Virus, a Nodavirus. J Virol, 1993, 67:2756～2763

维普资讯 http://www.cqvip.com

Induction of Neutralizing Antibodies by SA11 Vp4 – Specific Epitopes

Chen Yuanding[1,2]　Liu Mingying[1]　Zou Yongjian[1]
Peng Mei[1]　Dai Changbai[1] Francisco E Baralle[2]

[1](*Institute of Medical Biology, CAMS and PUMC, Kunming* 650107)
[2](*International Centre for Genetic Engineering and Biotchnology, Trieste* 34012, *Italy*)

In the present study, with a new foreign epitope – presenting system, FHV – RNA2 carrier system, on the precursor capsid protein of an insect virus, flock house virus (FHV) as a carrier, in recombinant baculovirus system and in pET system three epitopes derived from the amino acid residues surrounding the trypsin cleavage site(s) of SA11 Vp4 (epitope A, aa 223 to 242; epitope B, aa 243 to 262; and epitope C, aa 234 to 251) was constructed and expressed. The ability of the three epitopes inducing neutralizing antibodies in animals was studies. The results showed that these three epitopes induced production of seral antibodies and neutralizing anbodies in guinea pigs. These findings suggested that the amino acid sequences surrounding the trypsin cleavage site (s) on SA11 Vp4 have great significance in the development of epitope – based recombinant rotavirus subunit vaccines.

Key words　Rotavirus Vp4, Trypsin cleavage site, Epitopes, Neutralizing antibodies, FHV – RNA2 carrier system