

人类轮状病毒基因 DNA 免疫的初步研究*

彭世勇, 王健伟**, 温乐英, 何金生, 洪涛

(中国预防医学科学院病毒学研究所, 北京 100052)

Primary Studies on DNA Immunization of Human Rotavirus

PENG Shi-yong, WANG Jian-wei**, WEN Le-ying, HE Jin-sheng, HONG Tao

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

Abstract: The probability of DNA vaccine against human rotavirus was studied, by constructing three recombinant plasmid clones, pCI/vp7, pCI/vp4, and pCI/vp6, and transferring into TA muscle (quadriceps) of BALB/C mouse with intramuscular inoculation. The sera were collected and antibody activity was evaluated with ELISA and neutralizing test. pCI/vp7, pCI/vp4, and pCI/vp6 have been successfully Constructed, moreover, pCI/vp7 has transfected 293 cells and the vp7 gene could express thoroughly. Intramuscular inoculation of these plasmids induced efficient immunization, and the antibody induced by pCI/vp7 presents some definite protective of a strain of rotavirus Wa. As the results showed, DNA vaccine will be a helpful means to protect children from severe acute diarrhea caused by Group A rotaviruses.

Key words: Recombinant plasmid; DNA vaccine; Human rotavirus

摘要: 本文研究人类轮状病毒基因 DNA 免疫及应用。通过构建重组质粒 pCI/vp7, pCI/vp4 及 pCI/vp6, 以肌注法导入 BALB/c 小鼠肌肉组织, 其中 pCI/vp7 及 pCI/vp4 能有效引起机体免疫应答, 而且对轮状病毒 Wa 株有一定中和效应。从本次试验的结果来看, 人类轮状病毒 DNA 疫苗能作为预防病毒性小儿腹泻的一种手段。

关键词: 重组质粒; DNA 免疫; 人类轮状病毒

中图分类号: R373 **文章标识码:** A **文章编号:** 1003-5125(2002)01-0038-04

对于少年儿童, A 组轮状病毒是引起其急性腹泻的主要病因, 世界上每年约有百万儿童死于此种疾病^[1]。尽管目前有些口服活疫苗已有了很大的改进, 但是仍不理想, 进一步研制有效的疫苗来防治这类疾病很必要。

我们借鉴 DNA 疫苗的研究成果, 重组质粒 DNA 被宿主细胞吸收后, 可表达免疫原并被免疫系统加工提呈发生免疫应答^[2]。这个过程能模仿病毒的天然感染途径, 但又不对机体产生致病作用, 可以成为抵抗病毒感染的重要疫苗。

DNA 疫苗的保护作用在流感病毒及狂犬病毒的动物实验有极好的抵抗效果^[2]。国外对鼠轮状

病毒的 DNA 疫苗实验也有成功报道^[1]。我们较成功构建了人类轮状病毒的表面抗原基因 vp7, vp4 以及衣壳抗原基因 vp6 的 3 种克隆, 分别单一免疫 BALB/c 小鼠, 并观察其免疫的效果, 为制备人类轮状病毒 DNA 疫苗作准备。

1 材料与方法

1.1 基因与病毒

轮状病毒 vp7, vp4 及 vp6 基因 cDNA 由本室徐倏棠博士提供。轮状病毒为本室传代的 Wa 株毒种。

1.2 质粒, 菌种与细胞株

收稿日期: 2001-05-28, 修回日期: 2001-09-29

* 基金项目: 国家 863 计划生物技术领域资助课题(2001AA215011)。

作者简介: 彭世勇(1968-), 男, 主管技师, 硕士, 进修生, 现工作单位: 北京 262 医院实验科。

** 通讯作者。Correspondence author.

本次实验所用质粒为 pCI, 购自 Promega 公司细胞株 MA104 和 293 传代细胞及菌株 DH5 α 本室提供。

1.3 试剂

兔抗轮状病毒 IgG 多克隆抗体和鼠抗轮状病毒 IgG-HKP 由本室提供; 羊抗兔 IgG-HRP, 羊抗鼠 IgG-HRP 均购自邦定生物制品公司; 实验用限制性内切酶购自 TaKaRa 公司和 Promega 公司; T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司; 脂质体转化试剂盒购自美国 GIBCO 公司; Qiagen mega/giga 质粒提取试剂盒购自德国 Qiagen 公司; 其他为分子克隆常规应用试剂。

1.4 实验方法

1.4.1 构建 pCI/vp7, pCI/vp4, 及 pCI/vp6 质粒
三种基因的 cDNA 分别来自于经 RT-PCR 克隆的 7zf/vp7, PGKu/vp4 (+), 及 7zf/vp6。质粒小提按文献^[3]进行。

将小提的质粒按设计进行双酶切, 以低熔点琼脂糖凝胶回收 vp7, vp4, vp6, 及载体 pCI 线性片段。将 pCI 载体与相应的基因片段进行连接并分别转化入大肠杆菌 DH5 α 中, 以相应的酶切鉴定重组质粒

克隆, 并且酶切鉴定插入的基因片段与 PCI 质粒的 CMV 启动子方向一致。重组质粒路线按图 1, 图 2 方法, 其中 pCI/vp4 同 pCI/vp7 路线。

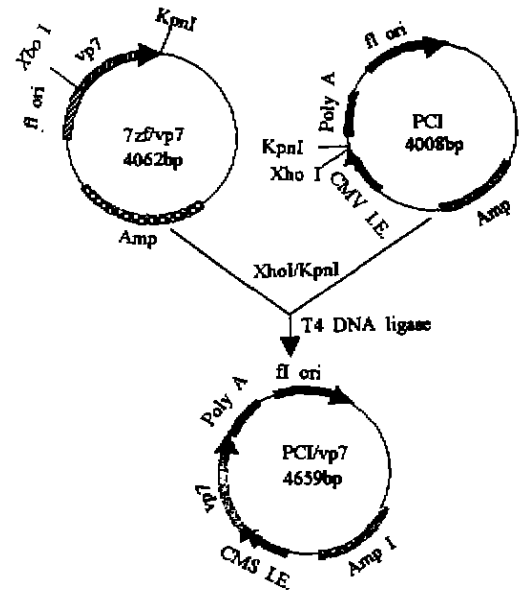


图 2 pCI/vp7 的构建

Fig. 2 Illustration of construction of pCI/vp7

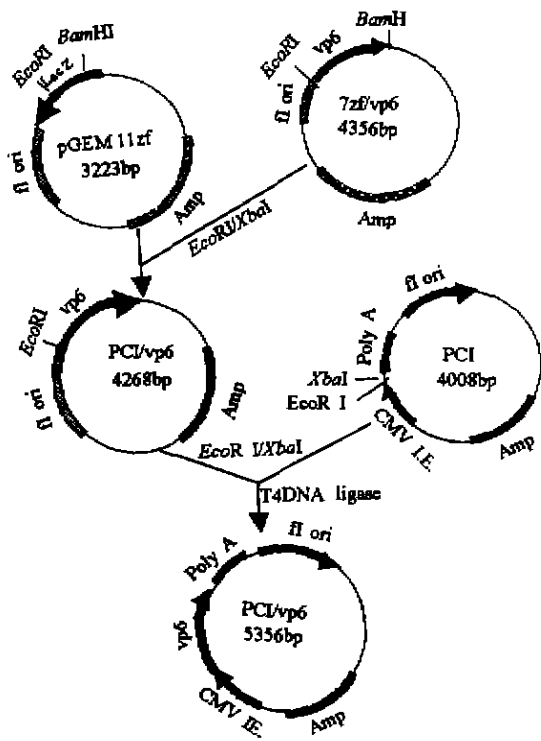


图 1 pCI/vp6 的构建

Fig. 1 Illustration of construction of pCI/vp6

1.4.2 重组质粒克隆的大量制备 挑取一个新鲜菌落加入含氨苄青霉素的 5mL 培养基中, 于恒温摇床剧烈摇动培养 8h。取出 1mL 菌液加入 500mL 含氨苄青霉素的选择培养基, 培养瓶容积为 2000mL, 同样剧烈摇动培养 16h。在 4 $^{\circ}$ C 6000 \times g 离心收获菌体。以 QIAGEN mega/giga kit 提纯重组质粒^[4]。冷乙醇清洗核酸, 最后其沉淀溶于 1.5mL~1.8mL 的 0.05mol/L pH8.0 的 PBS 溶液。4 $^{\circ}$ C 短期存放或 -20 $^{\circ}$ C 长期存放备用。

1.4.3 转染 复苏一支 293 细胞(第 43 代), 待其长满后立即 1:2 传代于一新塑料方瓶, 培养 18h 后约 50% 形成单层, 以无血清培养基洗细胞面三次进行转染。

转染按 lipofectin 使用说明书操作。转染后补加 4mL 无血清培养基后继续培养过夜。隔日换 5mL 培养液继续保育 3d。

收集上清液于一支 5mL 离心管, 8000r/min 离心 2min 收集脱落细胞并与刮下细胞一起溶于 0.5mL 上清液, 在 -30 $^{\circ}$ C 反复冻融 4 次。再以 vortex 高速振动破碎细胞, 12000r/min 离心 30s, 收集此上清液供测定。

1.4.4 检测 用ELISA夹心法检测 pCI/vp7 的表达。以免抗轮状病毒 IgG 1:100 稀释后包被 96 孔板,以小牛血清封闭。设置轮状病毒 Wa 株为阳性对照,正常细胞破碎物为阴性对照,表达 VP7 抗原进行适当稀释后,按酶标基本操作加入抗轮状病毒多抗酶标抗体,孵育,加酶标底物,测 OD 值($e/N \geq 2 - 1$ 为阳性)。

1.4.5 DNA 免疫 4~6 周龄纯种 BALB/c 雌性小鼠,随机分组,每组 4 只。A 组为 pCI/vp7, B 组为 pCI/vp4, C 组为 pCI/vp6, H 组为 pCI 质粒对照(共 3 只小鼠)并设一组正常对照 G 组。小鼠两只后腿胫骨前肌(TA 肌)部位在正式注射前,分别用无菌注射器推入 50 μ L 蔗糖溶液(25%),第二天正式注射 50 μ L 质粒 DNA 溶液,标明日期。隔一个月后,再次注射同样体积质粒溶液。第二个月仍在同一部位加强注射一次。DNA 免疫为长程免疫。为保证小鼠存活,本实验采小鼠部采尾血方法:切除一小截,可获得 100 μ L 左右全血,悬于 400 μ L 无菌生理盐水中,4 $^{\circ}$ C 保存过夜,10000r/min 离心 5min~10min,取出即为 10 倍稀释血清。最后一次采血为小鼠眼球放血。用 ELISA 方法测定抗体水平。

1.4.6 中和实验^[5] 首先测定病毒滴度:复苏一支 MA104 细胞,第三天传代于 96 孔细胞培养板,每孔 0.1mL,放二氧化碳培养箱培养 24h。取出一瓶人轮状病毒 Wa 株毒种,以维持液从 10^{-1} 到 10^{-7} 进行系列稀释,按照常规方法每孔接种 50 μ L 病毒液,每个稀释度接种 4 孔。继续在维持液中培养观察 7~14d,计数每种稀释度正常孔和出现 CPE 病变孔个数,根据公式计算出该株的 TCID₅₀ 滴度。

血清中和作用测定:将大方瓶 MA104 细胞传代于两块 12 孔板中,于二氧化碳培养箱培养 24h 备用。在 1:10, 1:50 及 1:500 的待测血清中各加入 1/10 的双抗,充分混匀后放 4 $^{\circ}$ C 保存作用过夜,第二天与等量 2×100 TCID₅₀ 胰酶处理过的病毒液充分混匀后放 37 $^{\circ}$ C 保育 1h,同样未与血清作用的病毒液也放 37 $^{\circ}$ C 保育。作用完成后分别加入 0.1mL 到细胞孔,每组接种 4 孔(注:接种前细胞面用适量 Hank's 液清洗)。然后于 37 $^{\circ}$ C 吸附 1.5h,补加 0.9mL 维持液后放二氧化碳培养箱,观察 7~14d。期间视情况调节 pH 或换液。

2 结果

2.1 重组质粒的酶切鉴定

图 3 所示,由 pCI/vp7, pCI/vp4 及 pCI/vp6 的酶切片段大小可推断克隆成功:pCI 为 4 008bp; vp6 为 1 365bp; vp7 为 1 062bp; vp4 为 2 359bp。由于 pCI 多克隆位点 1 298bp 处有一 BamH I 切点及 vp4 片段内部有 EcoR I 切点,所以图 3 中 pCI/vp4, 5 列和 6 列酶切片段大小不一。

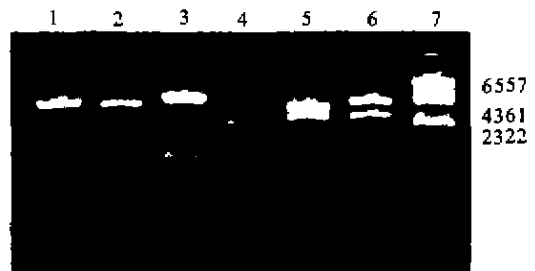


图 3 酶切电泳图谱

Fig. 3 Analysis of recombinant plasmids by enzyme digestion

1. pCI: EcoR I; 2. pCI/vp6: EcoR I + Xba I; 3. pCI/vp7: Xho I + Kpn I; 4. Marker: DL2000 (2 000, 1 000, 750, 500, 250, 100bp); 5. pCI/vp4: BamH I + EcoR I; 6. pCI/vp4: Kpn I + Sal I; 7. Marker: λ DNA/Hind III.

2.2 重组质粒瞬时表达试验

用 ELISA 夹心法检测 pCI/vp7 的表达。将 vp7 表达产物用 PBS 1:10 稀释,ELISA 酶标检测的结果(P/N 值大于 4.5)为阳性,表明重组质粒能在动物细胞中正常表达。而作为对照的 pCI 质粒为阴性反应。

2.3 免疫效果测定

免疫一个月后所取血清,用以 Wa 株轮状病毒全抗原包被酶标板进行间接 ELISA 检测,结果所有免疫小鼠体内并无明显的抗轮状病毒抗体产生。

经第一次加强免疫后一周再次取血清,然后以 ELISA 方法检测血清中抗体水平。经测定发现 A 组, B 组有明显的抗体产生,最大 OD 值为 0.19,比正常小鼠对照 0.04(四只平均数),高约 4.8 倍(即 P/N 值)。但 C 组没有检出抗体反应。

四周后第二次加强免疫,制备出血清后,以 ELISA 方法对各分血清标本进行检测。酶标板上设置免抗人轮状病毒多抗为阳性对照,以正常小鼠对照组(即 G 组)的 OD 值为阴性对照组(四只的平均数)。每份标本 P/N 值的计算方法按参考文献^[5]的介绍进行(P/N ≥ 2.1 为阳性)结果如表 1 所

示, vP7 和 vP4 免疫均引起抗体阳转。

2.4 中和实验

100TCID₅₀ 轮状病毒液与不同浓度抗血清进行中和实验测试, 结果 1:10 稀释度有 3 孔无 CPE(中

和效价 0.75), 1:50 有 2 孔无 CPE(中和效价 0.5), 1:500 与病毒液各孔在 14d 的观察中先后均出现 + - - + + + 的细胞病变。由此可以看出 1:50 以下的抗血清对非同源的 Wa 株有一定的中和能力。

表 1 轮状病毒基因 cDNA 免疫小鼠血清抗体检测

Table 1 ELISA assays of mice serum antibody induced by rotavirus cDNA immunization

Group	Numer	A				B				C				H		Normal	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		15
OD value	1:50	0.28	0.23	0.24	0.25	0.13	0.12	0.17	0.09	0.04	0.04	0.06	0.05	0.05	0.04	0.04	0.04
(P/N)		7.0	5.6	6.0	6.2	3.4	3.2	4.4	2.4	1.0	1.0	1.4	1.2	1.2	1.0	1.0	
	1:100	0.18	0.18	0.10	0.20	0.12	0.12	0.13	0.08	0.04	0.04	0.03	0.06	0.04	0.04	0.02	
		4.5	4.5	2.75	5.0	3.0	3.0	3.25	2.0	1.0	1.0	0.75	1.5	1.0	1.0	0.5	

3 讨论

人类轮状病毒同鼠轮状病毒形态结构一样, 具有内外双层衣壳, 外层衣壳包括有 vp7 基因编码的外壳糖蛋白, 其为病毒的中和抗原, 以及 vp4 基因编码的血凝素抗原。内层衣壳为 vp6 基因编码的组抗原。经过两个月三次前腿肌肉注射人类轮状病毒基因重组质粒 DNA 在一定程度上引起了动物机体对于人类轮状病毒免疫应答, 证实 PCINB 确能诱导中和抗体的产生。

本文用肌肉注射方法直接将重组质粒 DNA 导入肌肉组织细胞。通过机械损伤局部肌肉组织, 一方面引起炎症细胞浸润如 APC 细胞等, 另一方面肌肉细胞本身也可能吸收裸露的 DNA 分子, 除大部分胞质降解, 小部分才能转录并翻译为蛋白质抗原, 释放到组织间被 B 淋巴细胞识别, 最后产生中和抗体。这是 DNA 免疫产生体液免疫的基本过程。在本次实验中我们经过两次加强免疫, 但只有 pCI/vp7 的免疫效果比较突出, pCI/vp4 的免疫作用比预期的小, 这可能由于 vp7 为病毒的主要中和抗原, 其 cDNA 基因能够在机体细胞内较大量地表达, 产生的抗原强烈刺激免疫系统, 因而引起免疫应答产生中和抗体。而 vp4 蛋白不稳定, 表达后在机体细胞组织中分解成较小的多肽片段, 有些片段彻底降解,

这样不会在机体引起较强的免疫应答。另外 DNA 免疫的剂量, 免疫的方式(例如基因枪和注射器导入产生效果不同)以及免疫的时间间隔也可能是其中的影响因素^[6,7]。

本实验编码 vp6 基因质粒没有引起可以检测到的体液免疫其原因还不清楚。也有报道认为 vp6 基因只引起细胞免疫反应或仅为 IgA 型体液免疫反应^[1], 所以我们目前仅仅在病毒全抗原包被的酶标实验可能不能对其有效检测。我们在下一步的实验中将进行深入探讨。

参考文献

- [1] Shing C C, Ellen F F, Harriet L R, *et al.* Protective immunity induced by rotavirus DNA vaccines[J]. *Vaccine*, 1997, 15:899-902.
- [2] Lindsay Whitton, Fernando Rodriguez, Jie Zhang, *et al.* DNA immunization: mechanistic studies[J]. *Vaccine*, 1999, 17:1612-1619.
- [3] 金冬雁, 黎孟枫. 分子克隆实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1992.
- [4] QIAGEN kit menu.
- [5] 黄祯祥. 医学病毒学基础及实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 1990, 213.
- [6] 周志红, 段明星, 郑昌学. 核酸疫苗的研究进展[M]. 畜禽重大疫病生物技术防治研究. 1996, 123-133.
- [7] Harriet L Robinson. Nucleic acid vaccines: An overview[J]. *Vaccine*, 1997, 15(8):785.