维普资讯 http://www.cqvip.com

第19卷1期 中国病毒学 19（1）：73—75
2004年2月 VIROLOGICA SINICA February 2004

插入CpG序列的汉坦病毒*S*基因真核表达载体的构建及表达*

郑兰艳[1]，罗恩杰[1**]，李新鸣[1]，牟 玲[2]，张小棠[2]，鲁润铭[2]

（1. 中国医科大学基础医学院病原生物教研室，辽宁沈阳 110001；2. 沈阳市传染病院中心研究室，辽宁沈阳 110003）

Construction and Expression of Eukaryotic Expression vector containing Hantaan Virus *S* gene and CpG motif

ZHENG Lan-yan[1], LUO En-jie[1**], LI Xin-ming[1], MOU Ling[2], ZHANG Xiao-tang[2], LU Run-ming[2]

(1. Department of Microbiology & Parasitology, China Medical University, Shenyang 110001,China; 2. The Municipal Hospital of Infectious Disease, Shenyang 110003, China)

Abstract: To improve the effect of the gene immunization against *Hantaan virus*, we constructed the eukaryotic expression vector pTARGET-hans(ISS) containing Hantaan Virus S gene coding region and CpG motif by cloning S gene segment with CpG motif into eukaryotic expression vector pTARGET^{TM}. After conformed by enzyme analysis, the recombinant expression vector pTARGET-hans(ISS) was transferred into Vero-E6 cells by electroporation and the transient expression of Hantaan virus nucleocapsid protein was detected by indirect immunofluorescence assay(IFA). In some transferred Vero-E6, the green fluorescence was showed, thus we can conclude that the eukaryotic expression vector pTARGET-hans(ISS) was successfully constructed and expressed *in vitro*, which will lay a foundation for further animal vaccination.

Key words: *Hantaan virus*; Eukaryotic expression vector; Electroporation; Transient expression

关键词：汉滩病毒；真核表达载体；电穿孔；瞬间表达

中图分类号：Q786 **文献标识码**：A **文章编号**：1003-5152(2004)01-0073-03

肾综合征出血热(HFRS)是一类由汉坦病毒引起的以发热、出血和急性肾功能损伤为特征的急性病毒性传染病。我国的发病人数居世界首位，尤其是汉坦病毒中的Ⅰ型(HTV 型)和Ⅱ型(SEO 型)所引起的 HFRS，在中国的流行和造成的危害最为严重[1-2]。目前临床尚缺乏特异有效的治疗药物，免疫预防成为防治本病的重要手段。国内外学者对汉坦病毒核蛋白的基因免疫做了大量的研究工作，但目前免疫检测结果表明，基因免疫刺激机体产生的抗体滴度较低。CpG 为基元的免疫刺激序列（Immunostimulatory Sequence,ISS）是以非甲基化胞嘧啶鸟嘌呤二核苷酸为基元构成的特定结构。CpG 能活化机体的先天免疫防御系统，激活巨噬细胞，诱导 B 细胞增生和 Th1 免疫反应增强，免疫增强效果显著，可达到与福氏完全佐剂相似的效果，且具有耐受性好、稳定、制造成本低的优点，是一种很有希望的候选疫苗佐剂[3~5]。为了提高基因免疫的效果，本研究拟选择 CpG 为基元的免疫刺激序列作为佐剂，通过设计 PCR 引物，将 ISS 加入到真核细胞表达载体 pTARGET^{TM}，改建汉坦病毒基因疫苗，为今后探索优化汉坦病毒基因疫苗的研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

质粒 pGEX-6P-1-hans 为含汉坦病毒（76-118 株）S 片段编码区基因的原核表达载体，由沈阳市

收稿日期：2003-07-07，修回日期：2003-09-18
* 基金项目：沈阳市科委课题（沈科发 2001-38 号）
作者简介：郑兰艳（1970-）女，辽宁沈阳籍，讲师，博士生，从事病毒基因免疫研究。
** 通讯作者。Corresponding author. Tel: 024-23256666-5315, E-mail: enjie359@yahoo.com.cn

传染病院中心实验室提供；真核表达载体 pTARGET™ 由 Promega 公司购进；宿主菌 TG1 由本室保存。非洲绿猴肾细胞（Vero-E6）由沈阳市传染病院中心实验室提供。各种限制性内切酶、PCR 扩增试剂盒、连接试剂盒、DNA 琼脂糖胶上回收试剂盒均从 Takara 公司购进。本实验所需引物也由 Takara 公司合成。

1.2 **汉坦病毒 76-118 株 *S* 基因的扩增、克隆**

参照文献设计合成一对引物，引物 1:CT AACgTTACTATggCAACTATggAg,gAA;引物 2: AC AACgTTTAATTAgAgTTTCAAAgg CTC, AACGTT 为含 CpG 基元的 ISS。以质粒 pGEX-6P-1-hans 为模板，应用常规 PCR 方法，扩增 *S* 基因；PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳证实为所要的目的基因片段后，回收目的基因片段，并将纯化的 *S* 基因片段和 pTARGET™ 载体按一定比例用连接酶进行连接，然后将重组质粒转化 TG1，选取阳性菌落，酶切鉴定。并将重组质粒命名为 pTARGET-hans(ISS)，（以上操作均按各试剂盒的操作说明书进行）。pTARGET-hans(ISS)的构建模式图见图 1。

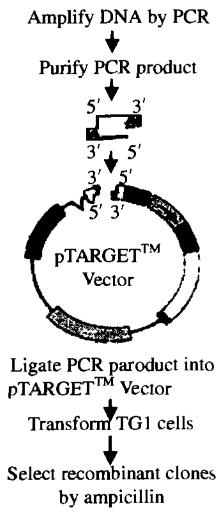

图 1 重组载体 pTARGET-hans（ISS）的构建图

Fig.1 Diagram of preparation and cloning of DNA using the pTARGET™ Vector

1.3 **pTARGET-hans(ISS)中 *S* 基因插入方向的鉴定**

Pst Ⅰ 酶切质粒 pTARGET-hans(ISS)，*S* 基因若正向插入可酶切成 3674，1874，1470 三个片段；*S* 基因若反向插入可酶切成 3674, 2600, 744 三个片段，酶切产物经琼脂糖凝胶电泳分析即可判断出 *S* 基因插入方向正反。

1.4 **闭环空载体 pTARGET 的构建**

用 *Eco*R Ⅰ 酶切质粒 pTARGET-hans(ISS)，可酶切成 5.6kb 和 1.3kb 左右两个片段，酶切产物琼脂糖凝胶电泳，回收 5.6kb 左右的大片段，用连接酶连接，使其自身环化，成为闭环空载体 pTARGET，转化 TG1，选取阳性菌落，酶切鉴定。

1.5 **pTARGET-hans(ISS)的体外转染**

用含 10%小牛血清的 MEM 培养基，在 37℃，5%CO_2 的条件下培养 Vero-E6 细胞，待细胞长至对数生长期，电穿孔转染质粒（同时设闭环空载体 pTARGET 对照）。操作按常规方法进行，穿孔条件为：电容 960μF,电压 0.25kv，时间 31msec。待转染后 72h，收获细胞，检测核蛋白的瞬时表达。

1.6 **间接免疫荧光法检测核蛋白的瞬时表达**

将合适浓度的细胞涂于细胞片上，晾干后 4℃ 丙酮固定 30min，用 PBS 稀释的出血热病人的阳性血清（同时设阴性血清对照）作为一抗，用 Evans blue 稀释的 FITC-羊抗人 IgG 作为二抗，按常规免疫荧光法操作，荧光显微镜下观察并拍照。

2 结果

2.1 ***S* 基因的克隆及其在真核表达载体中插入方向的鉴定**

经 PCR 扩增获得了 1.3kb 的 *S* 基因片段，插入 *S* 基因片段的重组质粒经 *Pst* Ⅰ 酶切后琼脂糖凝胶电泳，在 3674bp, 1874bp, 1470bp 处可见三条带，电泳分析结果与预期结果完全相同，表明 *S* 基因片段被正向地插入到 pTARGET™ 真核表达载体（见图 2）。

2.2 **对照 pTARGET 空载体的构建**

回收经 *Eco*R Ⅰ 酶切 pTARGET-hans(ISS)后的 5.6kb 左右的大片段，自身环化形成闭环质粒，用 *Eco*R Ⅰ 再酶切该质粒，可在 5.6kb 处见一条带，该质粒即为空载体 pTARGET (见图 2)。

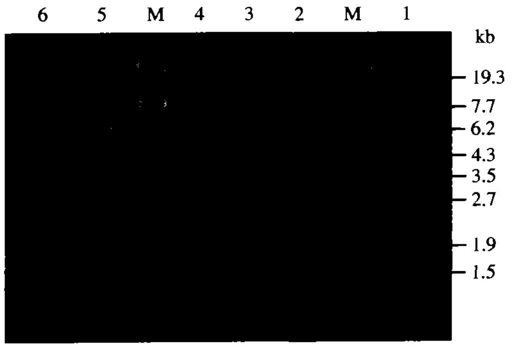

图 2 重组载体的酶切鉴定结果

Fig.2 Identification of recombinant vector by restriction endonuclease analysis

Lane1, S segment of PCR product; 2, pTARGET-hans(ISS)/*Pst* Ⅰ; 3, pTARGET- hans(ISS)plasmid;4, pTARGET-hans(ISS)/*Eco*R Ⅰ; 5, pTARGET/*Eco*R Ⅰ; 6, pTARGET plasmid;M, λ-*Eco*T14 digest DNA Marker.

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.3 核蛋白在 Vero-E6 细胞中的瞬时表达结果

转染后 72h，对转染细胞进行间接免疫荧光染色，在转染重组质粒的部分细胞中观察到特异性荧光颗粒（彩版I图3）。

3 讨论

汉坦病毒核蛋白（NP）是汉坦病毒最主要的结构蛋白，在宿主体内的表达量最高，且 NP 在引起 HFRS 病毒的型与型间、亚型与亚型间的同源性比包膜糖蛋白（G1，G2）要高[6]。因此，推测 NP 产生的免疫保护作用较 G1，G2 产生的免疫保护作用更为广谱，所以核蛋白可认为是 HFRS 基因疫苗比较理想的侯选抗原。由于诸多因素可影响核酸疫苗的免疫效应，如载体的大小、其 DNA 序列中 CpG 基元、核酸疫苗的导入方法、佐剂及多种形式的联合使用等。免疫刺激序列（ISS）是细菌 DNA 等中含有的以非甲基化胞嘧啶、鸟嘌呤二核苷酸（CpG）为基元构成的具有免疫学活性的短核苷酸序列，它对动物体的免疫激活功能主要体现在两个方面，一是刺激 B 细胞增殖，增强体液免疫，二是激活单核细胞分泌细胞因子，进而导致自然杀伤细胞的 Th1 辅助 T 细胞激活，引发 Th1 特征的体液和细胞免疫反应[4]。目前认为载体中的 CpG 序列和单独的 CpG 寡核苷酸序列一样，都可作为佐剂刺激机体产生免疫应答。由于 ISS 的免疫刺激作用有明显的种属特异性[7]，因此，在本课题中我们选用了最适作用于啮齿类的CpG即 AACGTT 作为ISS，通过设计PCR 引物，将 ISS 加入到真核细胞表达载体 pTARGET™，构建了真核表达载体 pTARGET-hans(ISS)，为下一步的动物（小白鼠）的基因免疫奠定了基础。

由于真核表达载体的选择不同，可致基因免疫效果不同。在本实验中，我们选择了 pTARGET™ 真核表达载体。pTARGET™ 载体以 pCI-neo 哺乳动物细胞表达载体系统为基础，用 *Eco*RV 酶切，并加 3'-T。pTARGET™ 载体用于克隆 PCR 产物，并将克隆的产物在哺乳细胞中表达。载体带有 CMV 的早期增强子/启动子，SV40 增强子/早期启动子。CMV 的早期增强子/启动子可保证目的基因在多种细胞类型中获得高的表达。SV40 晚期 polyA 信号区在转录 RNA 的下游形成 polyA，增加 RNA 的稳定并维持 RNA 的量，提高蛋白的表达水平。设计 pTARGET 载体是为了目的基因在哺乳动物细胞中可获得高效表达[8]。在本实验中，我们成功地构建了真核表达载体 TARGET-hans(ISS)，并在体外进行了瞬间表达，结果显示，在转染重组质粒的部分细胞中可检测到目的基因的表达产物，证明该重组质粒可在哺乳动物细胞中表达，为下一步的优化基因免疫奠定了物质基础。

参考文献

[1] 杨为松. 肾综合征出血热［M］. 北京：人民军医出版社, 1999.

[2] 陈化新, 罗成旺, 陈 富, 等. 中国肾综合征出血热检测研究[J]. 中国公共卫生, 1999, 15(7): 616-623.

[3] Sato Y, Roman M, Tigheh, *et al.* Immunostimulating DNA sequences necessary for eddective untrademal gene immunization[J]. Science, 1996, 273: 352-354.

[4] Chu R S, Targoni O S, Krieg A M, *et al.* CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1(Th1) immunity[J]. J Exp Med, 1997, 186: 1623-1631.

[5] Klinman D M, Conver J, Coban C. Repeated administration of sythetic oligodeoxynucleotides expressing CpG motifs provides long-term protection against bacterial infection [J]. Indection Immunity[J].1999, 11: 5658.

[6] 陈晓湘, 杨占秋.汉坦病毒基因工程技术及其应用[J]. 国外医学病毒学分册, 2000, 7（6）: 185-187.

[7] Johes T R, Obaldia N, Gramzinski R A, *et al.* Synthetic oligodeoxynuckeotides containing CpGs enhance immunogenicity of a peptide malaria vaccine in Aotus monkeys [J].Vaccine, 1999, 17: 3065.

[8] Brondyk B.pTARGET™ Vector: A new Mammalian Expression T-Vector [J]. Promege Notes Magzine, 1996, 58: 22.