

汉滩病毒囊膜糖蛋白 G1、G2 腺病毒载体的表达及免疫分析*

罗保君, 张强, 杨茜, 丁美, 刘树玲, 杭长寿, 王海涛, 周育森**

(军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京 100071)

Expression and Immunogenic Study of the Hantaan Virus Glycoprotein
G1 and G2 by Using the Adenoviral VectorLUO Bao-jun, ZHANG Qiang, YANG Qian, DING Mei, LIU Shu-ling, HANG Chang-shou,
WANG Hai-tao, ZHOU Yu-sen**

(Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

Abstract: In order to study the immune responses of *Hantaan virus* envelope glycoproteins G1 and G2 in adenovirus expression system, G1 and G2 gene were amplified from *Hantaan virus* 76-118 and cloned to the plasmid pAdTrackCMV. Positive clones pAdTrackCMV-G1 and G2 were determined with restriction enzyme digestion. The recombinant adenovirus rAdeasy-G1 and rAdeasy-G2 were generated by bacterial homologous recombination with adenoviral plasmid pAdeasy-1 in *E.coli* BJ5183. After amplification in the 293 cell, the recombinant viruses were immuned to the Balb/c mice. The antibody reaction were detected by ELISA and Immunofluorescence Assay. Six rAdeasy-G1 immuned mice and four rAdeasy-G2 immuned mice produce antibody which can specifically react with the *Hantaan virus*. These results suggested a possible application of adenovirus expression system.

Key Words: Expression; *Hantaan virus*; G1 and G2; Adenovirus expression system

摘要: 为了研究利用腺病毒载体表达汉滩病毒囊膜糖蛋白 G1、G2 的可行性及免疫原性。通过克隆 76-118 株 G1、G2 基因至腺病毒表达载体 pAdTrackCMV, 得到阳性克隆 pAdTrackCMV-G1、G2。PmeI 线性化的阳性克隆与腺病毒骨架载体 pAdeasy-1 共转化 BJ5183 宿主菌, 经同源重组后得到重组病毒 rAdeasy-G1、rAdeasy-G2。重组病毒经 PacI 线性化后, 脂质体介导转染 293 细胞, 使重组病毒得到扩增。将重组病毒免疫 Balb/c 小鼠, 并通过 ELISA 和间接免疫荧光对免疫小鼠血清进行了分析。结果表明, rAdeasy-G1 组六只免疫小鼠、rAdeasy-G2 组 4 只免疫小鼠均产生了能与汉滩病毒抗原发生反应的特异抗体。该研究为进一步研制以腺病毒为活载体的汉坦病毒工程疫苗奠定了基础。

关键词: 表达; 汉滩病毒; G1 和 G2; 腺病毒载体

中图分类号: R373

文献标识码: A

文章编号: 1003-5152(2004)03-0224-04

肾综合征出血热(Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome 简称 HFRS)是一类以发烧、出血和急性肾功能损害为特征的急性传染病, 由布尼亚病毒科(Bunyaviridae)汉坦病毒属(*Hantavirus genus*)病毒引起^[1]。汉滩病毒 76-118 株是汉坦病毒的代表

株, 为单股、分三节段(L、M、S)的负链 RNA 病毒, 其中 M 片段编码包膜糖蛋白 G1 和 G2。研究证明汉坦病毒的中和抗原决定簇主要位于包膜糖蛋白上, 体外实验表明, G1、G2 的单抗具有中和活性, 而针对核心蛋白的单抗不能抑制病毒感染

收稿日期: 2003-12-02, 修回日期: 2004-02-10

* 基金项目: 总后杰出人才基金项目(01J005)

作者简介: 罗保君(1969-), 女, 河南省籍, 博士, 病毒分子生物学研究方向。

** 通讯作者: 周育森(1966-), 男, 安徽省籍, 副研究员, 分子生物学研究方向。
Corresponding author. Tel: 010-66948490, E-mail: zhouyusen@hotmail.com

[2]。重组表达的糖蛋白(昆虫杆状病毒载体和痘苗病毒载体)可保护地鼠(*Hamster*)免受汉坦病毒感染[3]。因此,针对囊膜蛋白 G1、G2 的研究,对于流行性出血热的预防具有重要意义。

近年来,腺病毒载体因具有安全性好、宿主范围广、感染效率高等多种优点,被广泛用于基因治疗和基因工程疫苗研究。本研究通过对 G1、G2 基因在腺病毒载体的表达,并对其免疫原性进行初步探索,为进一步研究汉坦病毒基因工程疫苗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

汉滩病毒 76-118 株病毒、汉滩病毒免疫荧光检测抗原片由中国预防医学科学院杭长寿教授惠赠,293 细胞为本室保存,含有完整 76-118 M 片段的载体 pMD18-T-M 为本室构建;腺病毒载体构建所需载体及宿主菌均由 The Howard Hughes Medical Institute 的 Tongchuan He^[4]教授惠赠。

实验所需限制性内切酶分别购自 TaKaRa 和 Biolabs 公司;脂质体、长片段扩增 Taq 聚合酶购自 Gibco\BRL 公司;兔抗汉滩病毒血清由军事医学科学院微生物流行病学研究所病毒室提供,辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗购自欣经科公司;荧光标记羊抗鼠二抗购自中山公司。

1.2 基因的 PCR 扩增及克隆

根据文献报道^[5],利用 Vector NTI 6.0 软件设计引物分别扩增 G1、G2 基因,分别在 G1、G2 编码区的上游添加酶切位点 *Kpn* I 及 Kozak 序列,G1 的下游添加终止密码子及 *Xho* I 酶切位点。PCR 扩增所用引物如下:

G1u: 5'-acgggtaccAACATGGGGATATGGAAGTGGCTAGT-3';

G1d: 5'-tccgctcgagtaTGCAGCCACAGTATGGATTCTA-3';

G2u: 5'-acgggtaccatggCACCATTAACCTCTGTCTGGAAT-3';

G2d: 5'-tccgctcgagCAGAATTTAGCTATGATTTT-3'。

以含有完整 M 片段的载体 pMD18-T-M DNA 为模板,扩增条件为:94℃ 预变性 3min,94℃ 变性 20s,55℃ 退火 30s,68℃ 延伸 2min,25 个循环;68℃ 延伸 5min。上述 PCR 产物 0.7% 琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下切下目的条带,玻璃奶法回收,与经 *Kpn* I 和 *Xho* I 双酶切的载体 pAdTrackCMV16℃ 连接过夜,转化宿主菌 XL-1Blue,阳性克隆用不同的限制性内切酶鉴定,阳性克隆进行序列测定。

1.3 重组病毒的构建

经序列测定的阳性克隆 *Pme* I 线性化,转化含有超螺旋载体 pAdEasy-1 的宿主菌 BJ5183,挑选卡

那抗性菌落,提取 DNA, *Pac* I 酶切鉴定。

1.4 病毒的扩增及表达

取 1μg 重组病毒 DNA 转化宿主菌 XL-1Blue,大量提取质粒,取 5μg DNA *Pac* I 线性化,脂质体介导转染 293 细胞,转染方法参照说明进行。7d 后,收集细胞,经 3 轮反复冻融,离心收集上清,进行下一轮扩增。三轮扩增后,荧光显微镜下检测 GFP 基因的表达,测定病毒滴度。

1.5 重组病毒的免疫及抗体检测

将测定后的病毒稀释为 10^8 PFU/mL,腹腔注射免疫 Balb/c 小鼠,每组 6 只,每次 200μL,间隔两周,共免疫 3 次。以不含有目的基因的腺病毒 rAdEasy-GFP 作为阴性对照,细胞培养基 DMEM 免疫的小鼠为空白对照,分别在每次免疫前取尾血分离血清,最后一次免疫两周后眼眶取血杀鼠。ELISA 检测以原核表达纯化的 G1 部分片段(P1: 43-155 氨基酸)包被 96 孔板,4%BSA 封闭过夜,加入不同稀释度的免疫鼠血清,以 1:5000 稀释的 HRP 标记的羊抗鼠抗体为二抗,OPD 显色,测定各孔的 OD_{450nm} 值。免疫鼠血清抗体的间接免疫荧光检测参照文献^[6]进行。

2 结果

2.1 重组病毒的构建

按照图 1 模式构建重组病毒

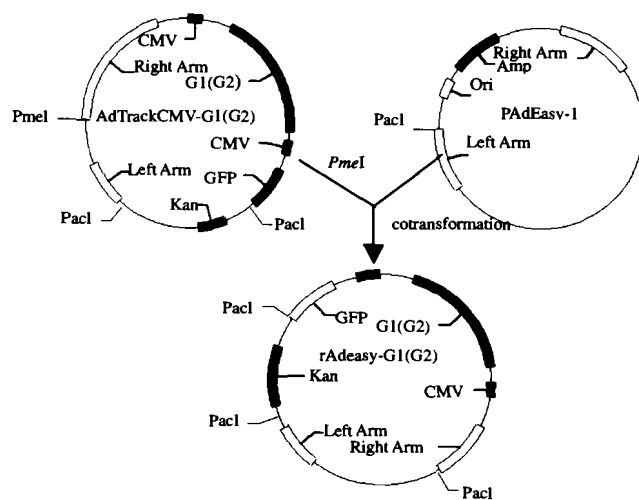


图 1 重组病毒构建模式图

Fig.1 Construction of the recombinant adenovirus

2.2 PCR 结果及阳性克隆的酶切鉴定

PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果表明,所扩增的 G1、G2 片段编码区全长分别为 1.94kb 和 1.467kb;

序列测定结果与 76-118 株所报道序列一致。两片段与载体 pAdTrack-CMV 连接, 阳性克隆经 *Kpn* I + *Xho* I 双酶切, 分别得到目的带 G1(1.9kb)、G2(1.5kb)和载体带 (9.2kb); pAdTrackCMV-G2 经 G2 片段上的酶切位点 *EcoR* V 与 *Kpn* I 双酶切, 得到 0.675kb 和载体带 9.2kb 两个片段; 与理论推测结果一致。pAdTrackCMV-G1 经 G1 片段上的酶切位点 *Hind* III 与 *Kpn* I 双酶切, 得到 0.566 kb、1.4kb 和载体带 9.2kb 三个片段, 均与序列分析结果一致 (图 2)。

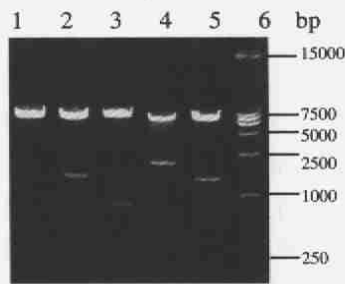


图 2 pAdTrack-CMV-G1、G2 酶切鉴定图

Fig.2 Restriction enzyme analysis of recombinant pAdTrack-CMV-G1 and pAdTrack-CMV-G2

1, pAdTrack-CMV / *Kpn* I + *Xho* I; 2, pAdTrack-CMV-G2 / *Kpn* I + *Xho* I; 3, pAdTrack-CMV-G2 / *Kpn* I + *EcoR* V; 4, pAdTrack-CMV-G1 / *Kpn* I + *Xho* I; 5, pAdTrack-CMV-G1 / *Kpn* I + *Hind* III; 6, DNA Ladder 15000.

2.3 重组病毒鉴定及滴度测定

含有 G1、G2 片段的阳性质粒 pAdTrack-CMV-G1、pAdTrack-CMV-G2 DNA 分别经 *Pme* I 线性化, 转化含有超螺旋载体的宿主菌 BJ5183, 挑选 Kan 抗性菌落, 提取质粒 DNA 酶切鉴定, 结果表明, 阳性质粒 pAdeasy-G1 与 pAdeasy-1 在同源区发生重组, 与载体 pAdeasy-1 相比, *Pac* I 酶切产生了一条约 4 kb 的条带; rAdeasy-G2 *Pac* I 酶切产生了一条约 3.5kb 的条带, 两条带大小的不同

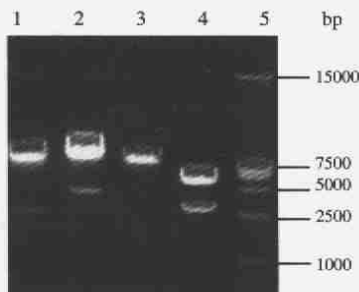


图 3 重组病毒 rAdeasy-G1、rAdeasy-G2 的酶切鉴定图

Fig.3 Restriction enzyme analysis of recombinant virus rAdeasy-G1、rAdeasy-G2

1, rAdeasy-G1 / *Pac* I; 2, rAdeasy-G2 / *Pac* I; 3, pAdeasy-1 / *Pac* I; 4, pAdTrack-CMV / *Pac* I; 5, DNA Ladder DL15000.

是由于重组位点不同造成的^[4], 均为正确的阳性克隆酶切结果见图 3。提取该阳性重组病毒 DNA, *Pac* I 线性化后, 脂质体介导转染 293 细胞, 细胞经反复冻融处理后, 进行下一轮扩增, 经三轮扩增后, rAdeasy-G1 滴度达到 2.4×10^9 PFU/mL, rAdeasy-G2 滴度达到 5.6×10^8 PFU/mL, 与正常细胞相比, 荧光显微镜下病毒感染细胞 GFP 基因得到表达, 可见绿色荧光, 见彩版图 4。

2.4 重组病毒免疫小鼠血清的抗体检测

ELISA 检测结果表明, rAdeasy-G1 组随着免疫次数的增加特异抗体的效价逐渐增高, 6 只免疫小鼠平均效价为 1:340, 效价最高可达到 1:640, rAdeasy-GFP 免疫组及空白组均未见特异反应。利用汉滩病毒感染 Vero-E6 细胞制备抗原片, 通过间接免疫荧光技术检测重组病毒免疫鼠血清, 结果表明, 随着免疫次数的增加抗体的效价逐渐提高; rAdeasy-G1、rAdeasy-G2 组均在第三次免疫后的两周效价达到最高, rAdeasy-G1 组 6 只小鼠均产生特异反应, 效价分别为: 1:160; 1:40; 1:40; 1:40; 1:80; 1:320。rAdeasy-G2 组 6 只小鼠有两只检测结果呈阴性, 4 只阳性小鼠效价分别为: 1:40; 1:80; 1:240; 1:40。而 rAdeasy-GFP 组及空白组均没有显示特异反应。阳性血清 IFA 反应结果见图 5。

3 讨论

汉坦病毒 M 片段为一连续开放阅读框, 编码一分子量约为 120 kDa 的糖蛋白前体, 在内质网糖基化后切割裂解成 G1 和 G2 糖蛋白。G1 糖蛋白 C 末端有一保守结构 WAASA, 是糖蛋白前体的裂解信号^[7]。研究表明, 在杆状病毒和痘苗病毒内表达的全 M 片段免疫动物后, 可保护动物免受汉滩病毒攻击, 我们也利用腺病毒载体表达了完整的 M 片段, 免疫 Balb/c 小鼠产生了较好的中和活性 (文章另文发表)。因此, 糖蛋白是研制 HFRS 基因工程疫苗和多肽疫苗的首选。Wang M^[8] 等的研究表明, 汉滩病毒感染的保护性免疫反应与病毒囊膜蛋白 G1、G2 所产生的中和抗体密切相关, 而且 G1 和 G2 的中和表位多为构象型表位。重组病毒免疫 Balb/c 小鼠, 均产生了能与汉滩病毒抗原产生特异反应的抗体, 说明重组腺病毒在机体内可产生针对汉滩病毒糖蛋白的特异性免疫反应。但总体说来, 抗体的效价偏低, 这也可能与汉滩病毒糖蛋白的免疫原性较弱、稳定性差有关; 另外, G1 和 G2 在 293 细胞中是否正确的糖基化、糖基化是否完全, 都有可能影

响所表达蛋白的免疫原性。理想的基因工程疫苗不仅要选择有保护性的抗原, 免疫途径、免疫剂量及免疫方案都对免疫效果有很大影响。

在我国, 汉坦病毒灭活疫苗已在疫区使用, 近期取得了一定的防病效果, 但仍有许多不足, 如接种途径复杂, 需多次接种, 有可能导致抗体依赖性感染增强等。因此, 探讨研究新型的活病毒载体疫苗, 成为近年研究的热点。利用昆虫细胞、痘苗病毒载体表达汉坦病毒囊膜蛋白国内外均有文献报道^[9, 10], 与其它载体相比, 腺病毒载体具有作为活疫苗的多种优点, 1、通过在细菌体内同源重组获得重组病毒, 减少了在细胞水平的空斑纯化过程; 2、利用载体所携带的 GFP 基因可以方便的监测转染和病毒的扩增过程; 3、接种途径简便 (可鼻饲、口服、肌注); 4、为活病毒载体疫苗, 可激发较强的细胞免疫反应。本研究所选用的腺病毒 5 型载体, 虽然在人群中存在针对该病毒的中和抗体, 但多篇文献报道表明^[11, 12], 利用该载体表达的外源基因仍可产生较好的特异免疫反应。这些均为进一步的汉滩病毒基因工程疫苗研制提供了可能。

参考文献

- [1] 车凤翔, 何亦祥, 李钟铎. 肾综合症出血热的传播及预防[M]. 北京: 中国大百科全书出版社, 1996.
- [2] Arikawa J, Yao J S, Yoshimatsu K, *et al.* Protective role of antigenic site on the envelope glycoprotein of Hantaan virus defined by monoclonal antibodies[J]. Arch Virol, 1995, 126: 271-281.
- [3] Connie S, Schmaljohn J, Yong Chu, *et al.* Antigenic Subunits of Hantaan virus Expressed by Baculovirus and Vaccinia Virus Recombinants[J]. J Virol, 1990, 88: 3162-3170.
- [4] He T, Zhou S, Luis T, *et al.* A simplified system for generating recombinant adenoviruses[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, 95: 2509-2514.
- [5] Lober C, Anheier B, Lindow S, *et al.* The Hantaan Virus Glycoprotein precursor is cleaved at the conserved pentapeptide WAASA [J]. Virology, 2001, 289: 224-229.
- [6] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, *et al.* Molecular cloning. A laboratory manual[M], Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [7] Anric D, Wrigh K E, t Kang Y. Maturation of hantaan virus glycoproteins G1 and G2 [J]. Virology, 1992, 189:324-328.
- [8] Wang M, Pennock D G, Spik K W, *et al.* Epitope mapping studies with neutralizing and non-neutralizing monoclonal antibodies to the G1 and G2 envelope glycoproteins of Hantaan virus[J]. Virology, 1993, 197:757-766.
- [9] 石晓宏, 杭长寿, 宋 干, 等. 汉滩病毒包膜糖蛋白 G1 和 G2 重组杆状病毒表达载体的构建与表达及其免疫原性[J]. 病毒学报, 1995, 3:208-213.
- [10] 马章亮, 杭长寿, 邱建明, 等. 汉滩病毒包膜糖蛋白 G1 和 G2 和核蛋白 NP 在痘苗病毒在天坛株中的联合表达[J]. 病毒学报, 1998, 14 (3): 221-228.
- [11] Gao W, Tamin A, Soloff A, *et al.* Effects of SARS-associated coronavirus vaccine in monkeys[J]. Lancet, 2003, 362(9399): 1895-1896.
- [12] Jooss K, Yang Y, Fisher K J, *et al.* Transduction of dendritic cells by DNA viral vectors directs the immune response to transgene products in muscle fibers[J]. J Virol, 1998, 72(5): 4212-4223.

彩版

何贤辉, 等. SARS-CoV Sars7a和EGFP融合蛋白真核表达载体构建及其表达(正文见第209页)

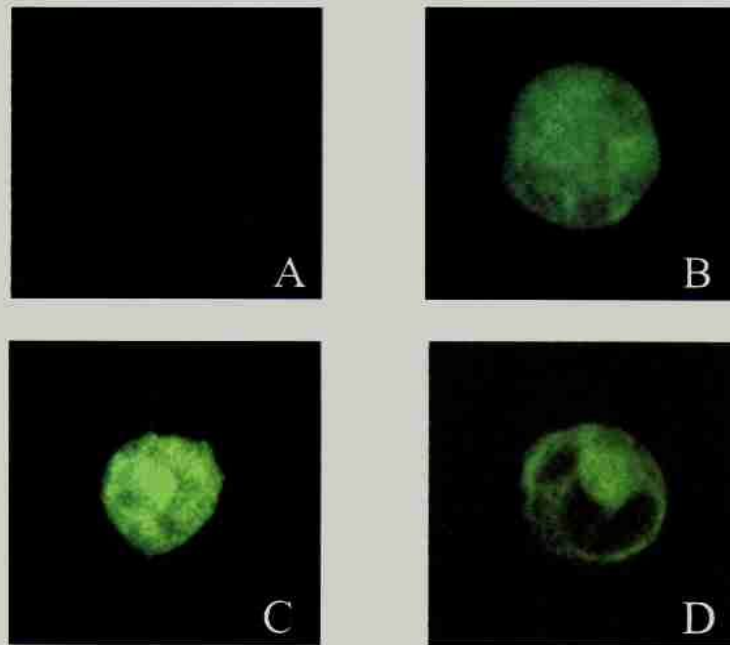


图4 激光共聚焦显微镜观察转染pEGFP-sars7a载体的K562细胞中绿色荧光分布

Fig.4 Laser scanning confocal microscopy analysis of the green fluorescence distribution in pEGFP-sars7a transfected K562 cells

A, Control; B, pEGFP-N1; C, pEGFP-sars7a; D, pEGFP-A0201.

罗保君, 等. 汉滩病毒囊膜糖蛋白G1、G2腺病毒载体的表达及免疫分析(正文见第224页)

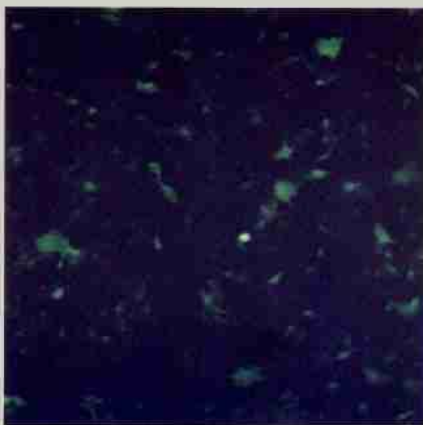


图4 荧光显微镜下重组病毒感染293细胞

Fig.4 293 cells infected by recombinant virus

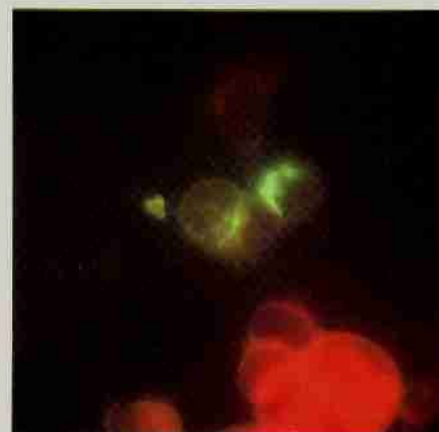


图5 阳性免疫鼠血清间接免疫荧光检测结果

Fig.5 IFA results of immunized mouse sera