

逆转录病毒载体介导的 HCV 囊膜蛋白基因的表达及动物免疫试验*

许信刚^{1,2}, 胡建和², 张彦明¹, 邓宏魁^{2**}

(1.西北农林科技大学动物科技学院, 陕西杨凌 712100; 2.北京大学生命科学学院, 北京 100871)

Retroviral Vector Mediated HCV E1E2 Envelope Protein Expression in
Eukaryotic Cells and Animal Immune ExperimentXU Xin-gang^{1,2}, HU Jian-he², ZHANG Yan-ming¹, DENG Hong-kui^{2**}

(1.College of Animal Sciences and Technology, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2.College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract: The recombinant retroviral vector pBABE-puro-E1E2 was constructed by inserting the full-length HCV *e1e2* gene of H77 strain into pBABE-puro. Both the recombinant retroviral vector and the pVSVg plasmid were transfected into eukaryotic cells 293T by calcium phosphate transfection method. And then, the pseudovirus were produced. The pseudovirus infected eukaryotic cells SP2/0 and E1E2 protein was expressed. E1E2 protein was detected by puromycin-resistant and FACS analysis. BALB/c mice were injected in abdomen with expressing E1E2 protein SP2/0 cells. Anti-HCV E1E2 antibody was screened by FACS. Moreover, the antibody was also analyzed by Western blot using E2 protein antigen which was expressed in *E. coli*. The results showed that HCV E1E2 protein was expressed in SP2/0 cells' envelope successfully. FACS could detect specific anti-E1E2 antibody in SP2/0 cells immune mouse serum. Western blot analysis showed that SP2/0 cells immune mouse serum could react specially to E2 protein that was expressed in *E. coli*.

Key words: Hepatitis C virus; Envelope protein gene; Retroviral vector; Pseudovirus; FACS

摘要: 利用 DNA 重组技术将丙型肝炎病毒 (HCV) H77 株 E1E2 囊膜蛋白基因插入逆转录病毒载体 pBABE-puro 中构建成重组逆转录病毒载体 pBABE-puro-E1E2, 该重组逆转录病毒载体与 pVSVg 质粒经磷酸钙共转染法将其转入 293T 细胞中包装逆转录病毒假病毒。用包装的假病毒感染 SP2/0 细胞, 经嘌呤霉素筛选阳性细胞后进行流式细胞技术 (FACS) 分析, 结果表明 HCV *e1e2* 基因在 SP2/0 细胞膜上成功表达。将表达 E1E2 蛋白的 SP2/0 细胞腹腔免疫 BALB/c 小鼠, 经 FACS 分析免疫鼠血清, 成功诱导小鼠产生了抗 HCV E1E2 蛋白的抗体, Western blot 表明该抗体能与原核系统表达的 E2 蛋白结合。

关键词: 丙型肝炎病毒; 囊膜蛋白; 逆转录病毒载体; 假病毒; FACS

中图分类号: R373

文献标示码: A

文章编号: 1003-5125 (2004) 06-0563-05

丙型肝炎病毒 (Hepatitis C Virus, HCV) 主要通过输血传播, 可以导致多种临床型的肝炎及其它肝脏疾病, 包括肝硬化及肝细胞癌^[1,2]。HCV 基因组为单股正链 RNA, 约 9.4 kb, 编码一个 3 010~3 033 氨基酸的多聚蛋白, 排列顺序为 5'UTR-C- E1-E2-

NS2-NS3-NS4-NS5-3' UTR, 其中 C 为核心蛋白, E1、E2 为囊膜蛋白。由于 HCV 在患者血中的滴度很低, 目前又没有合适的体外增殖系统加以扩增, 所以无法获得足够多的病毒粒子直接对其研究, 只能借助于基因工程的手段表达相关基因, 再对表达

收稿日期: 2004-06-11, 修回日期: 2004-07-11

* 基金项目: 国家自然科学基金资助 (No.30340027)

作者简介: 许信刚 (1974-), 男, 陕西咸阳籍, 讲师, 博士生, 主要从事分子病毒学方面的研究。

** 通讯作者: Corresponding author. Email: hongkui_deng@yahoo.com

蛋白进行研究。其中被认为带有 HCV 主要免疫原的 HCV 囊膜蛋白 E1 和 E2 的基因工程表达, 是研究 HCV 保护性抗原的性质、中和抗体以及亚单位疫苗的重要基础。

逆转录病毒载体具有能有效地将外源基因整合进宿主细胞基因组、长期表达外源基因以及病毒包装过程简单的特点而成为真核细胞基因转移的最常用载体系统之一。本研究为了探讨 HCV 是否具有中和抗体以及研制抗 HCV 单克隆抗体, 我们用逆转录病毒载体将 HCV E1E2 囊膜蛋白基因整合到 SP2/0 细胞基因组中, 在 SP2/0 细胞膜上成功表达了 HCV E1E2 囊膜蛋白。用表达细胞免疫 BALB/c 小鼠, 成功诱导小鼠产生了抗 HCV E1E2 蛋白的抗体。这为下一步研究该抗体是否具有中和活性以及用细胞免疫法研制抗 HCV 单克隆抗体奠定了物质基础。

1 材料与方 法

1.1 质粒、菌株和细胞

含有丙型肝炎病毒 H77 株囊膜蛋白全长基因 E1E2 的质粒 H77-E1E2/pCR3.1、293T 细胞、SP2/0 细胞、逆转录病毒载体 pBABE-puro、pVSVg 载体、大肠杆菌 DH5 α 均由北京大学生命科学学院细胞工程与细胞分化实验室构建或保存; FITC 标记的抗鼠 IgG 二抗、HCV 单克隆抗体 H2、H33 和 H53 购自 Promega 公司, -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.2 目的基因的扩增

以 H77-E1E2/pCR3.1 为模板, PCR 扩增 HCV 全长囊膜蛋白基因 E1E2。上游引物 P1 5' GGATCCA TGGGTTGCTCTTCTCTATCTTCC 3', 5' 端加上 BamHI 酶切位点, 下游引物 P2 5' GAATTCTTACG CCTCCGCTTGGGATATGAGTAA 3', 5' 端加上 EcoRI 酶切位点。扩增片断为 1735bp, 含有信号肽序列和跨膜区序列全长的 E1E2 基因, 这样可以确保 E1E2 基因在细胞膜上表达。

1.3 重组表达载体的构建

PCR 产物经 BamHI 和 EcoRI 双酶切后回收并纯化含 HCV *e1e2* 基因片段, 定向插入逆转录病毒载体 pBABE-puro 的多克隆位点 BamHI 和 EcoRI 处, 得到重组逆转录病毒载体 pBABE-puro-E1E2。用此质粒转化大肠杆菌 DH5 α 工程菌, 筛选阳性克隆, 扩增, 用酶切法鉴定重组质粒, 对重组质粒中的 HCV 囊膜蛋白基因进行序列测定。碱裂解法大量制备重组逆转录病毒载体 pBABE-puro-E1E2 及阴性对照逆转录病毒载体 pBABE-puro, 以

PEG8000 纯化, 溶于灭菌生理盐水, 测 OD 值, 调整浓度至 1 μ g/ μ L。

1.4 逆转录病毒假病毒的包装

用重组逆转录病毒载体 pBABE-puro-E1E2 和 pVSVg 质粒磷酸钙共沉淀法转染 293T 细胞, 包装逆转录病毒假病毒。转染 36h 至 48h 之后, 收集 293T 细胞的培养基, 离心分装上清, 冻存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中或直接使用。

1.5 假病毒感染 SP2/0 细胞及抗性筛选阳性细胞

感染前 24h 将 SP2/0 细胞低密度传至培养皿中, 将病毒上清加入 polybrene (聚凝胺)使其终浓度为 8 μ g/mL。将上述混合液体加至弃去培养基的靶细胞 SP2/0 之中。感染 12h 至 24h 后更换靶细胞的培养基, 去除假病毒。48h 后加入嘌呤霉素至终浓度 5 μ g/mL 进行筛选。同时设立不用假病毒感染的 SP2/0 细胞作为阴性对照。假病毒感染并表达了 *e1e2* 基因的 SP2/0 细胞将产生嘌呤霉素抗性能在嘌呤霉素存在情况下存活, 反之将死亡。

1.6 FACS 检测表达 HCV E1E2 囊膜蛋白的 SP2/0 细胞

感染 36h 至 48h 之后收取存活细胞, 再扩传培养后用鼠源 HCV 单克隆抗体 H2、H33 和 H53 进行结合, FITC 标记的抗鼠 IgG 二抗染色, 用流式细胞仪技术(FACS)进行分析检测是否在 SP2/0 细胞膜上表达了 E1E2 蛋白。同时用不表达 E1E2 蛋白 SP2/0 细胞作为阴性对照。

1.7 表达 HCV E1E2 囊膜蛋白的 SP2/0 细胞免疫小鼠及血清抗体的检测

取 6~8 周龄的雌性 BALB/c 小鼠 4 只。用表达 HCV E1E2 囊膜蛋白的 SP2/0 细胞腹腔免疫, 细胞量为 1×10^7 个, 免疫 2 次, 1 次/2 周。4 周后毛细管眼球采血分离血清。以表达 HCV 囊膜蛋白 E1E2 的 SP2/0 细胞和空白 SP2/0 细胞作为抗原, 一抗为免疫鼠血清, 稀释 100 倍, FITC 标记的抗鼠 IgG 二抗染色, FACS 分析检测血清抗体。

1.8 血清抗体的 Western blot 检测

用已知表达 E2 蛋白的大肠杆菌裂解物作为抗原, 该 E2 蛋白分子量约为 50kDa。一抗用免疫鼠的血清, 100 倍稀释, 二抗为碱性磷酸酶标记的抗鼠 IgG, 进行 Western blot 检测。同时设立用空白 SP2/0 细胞免疫的小鼠血清作阴性对照。

2 结果

2.1 重组表达质粒的构建及鉴定

PCR 产物经 BamHI 和 EcoRI 双酶切后回收并

纯化, 定向插入逆转录病毒载体 pBABE-puro 的多克隆位点 *Bam*H I 和 *Eco*R I 处, 重组质粒 pBABE-puro-E1E2 经 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切后得 5.1kb 和 1.7 kb 两片段, 分别与载体和 HCV 囊膜蛋白基因相对分子质量一致 (见图 1)。测序结果证明 *e1e2* 基因插入的位置、大小和读码框均正确。

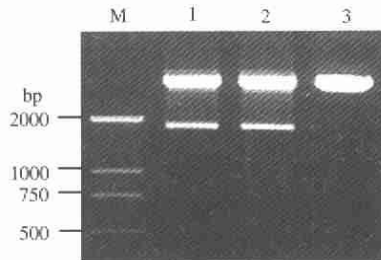


图 1 重组质粒酶切鉴定结果

Fig.1 Restriction analysis of recombinant plasmid

M, DL2000 Marker; 1-2, Restriction analysis of pBABE-puro-E1E2 recombinant plasmid; 3, Restriction analysis of pBABE-puro plasmid.

2.2 嘌呤霉素筛选假病毒感染的 SP2/0 细胞

用重组逆转录病毒载体 pBABE-puro-E1E2 和 pVSVg 质粒磷酸钙共沉淀法转染 293T 细胞, 包装逆转录病毒假病毒。假病毒感染 SP2/0 细胞, 试验结果在嘌呤霉素抗性筛选下假病毒感染的 SP2/0 细胞有 20% 的细胞存活, 其余细胞死亡。而阴性对照组的 SP2/0 细胞全部死亡。表明有 20% 的细胞被假病毒感染并将 E1E2 基因整合到 SP2/0 细胞基因组中, 使得 SP2/0 细胞产生了嘌呤霉素抗性。

2.3 FACS 分析检测表达 E1E2 囊膜蛋白的 SP2/0 细胞

用 H2、H33 和 H53 三种鼠源 HCV 单克隆抗体通过流式细胞仪技术(FACS)进行分析检测 E1E2 蛋白在 SP2/0 细胞膜上的表达, 结果如图 (图 2)。A、B、C 3 个图左峰分别为 H2、H33 和 H53 三种单抗与阴性 SP20 细胞 FACS 分析结果。右峰为三种单抗与表达 HCV E1E2 囊膜蛋白的 SP2/0 细胞 FACS 分析结果。图中形成明显的两个峰, 证明 E1E2 蛋白在 SP2/0 细胞膜上被表达。

2.4 免疫小鼠血清抗体的 FACS 检测

取四只免疫小鼠的血清分别与表达 E1E2 蛋白的 SP2/0 细胞和阴性 SP2/0 细胞结合, FITC 标记的抗鼠 IgG 二抗染色 FACS 分析, 比较 FACS 分析结果 (见图 3)。A、B、C、D 4 个图中左峰为四只免疫小鼠血清与阴性 SP20 细胞 FACS 分析结果; 右峰为免疫小鼠血清与表达 E1E2 蛋白的 SP20 细胞 FACS 分析结果。形成明显的两个峰, 说明用表达

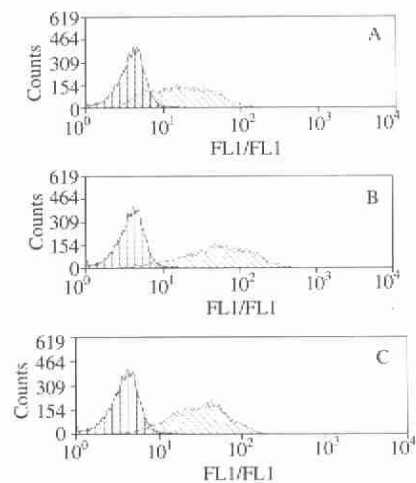


图 2 流式细胞仪分析表达 E1E2 蛋白的 SP2/0 细胞

Fig.2 Flow cytometric analysis of expression E1E2 protein SP2/0 cells

A: Right apex is H2 McAb reacted with expressing E1E2 protein SP2/0 cells and left apex is negative control; B: Right apex is H33 McAb reacted with expressing E1E2 protein SP2/0 cells and left apex is negative control; C: Right apex is H53 McAb reacted with expressing E1E2 protein SP2/0 cells and left apex is negative control.

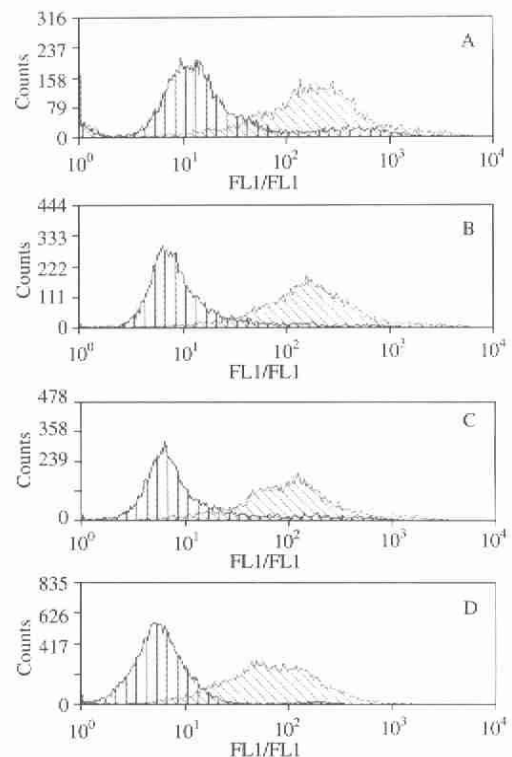


图 3 流式细胞仪分析免疫小鼠的血清抗体

Fig.3 Flow cytometric analysis of immune mouse serum

A: Right apex is the first immune mouse serums reacted with expressing E1E2 protein SP2/0 cells and left apex is negative control; B: Right apex is the second immune mouse serums reacted with expressing E1E2 protein SP2/0 cells and left apex is negative control; C: Right apex is the third immune mouse serums reacted with expressing E1E2 protein SP2/0 cells and left apex is negative control; D: Right apex is the fourth immune mouse serums reacted with expressing E1E2 protein SP2/0 cells and left apex is negative control.

HCV E1E2 囊膜蛋白的 SP2/0 细胞腹腔免疫小鼠产生了抗 E1E2 蛋白的抗体。

2.5 Western blot 检测结果

Western 印迹分析中在 50kDa 处有一条杂交带出现 (见图 4)。表明原核系统表达的 E2 蛋白可以与表达 HCV E1E2 囊膜蛋白的 SP2/0 细胞免疫小鼠的血清抗体特异性结合, 而与阴性 SP2/0 细胞免疫的小鼠的血清不结合。

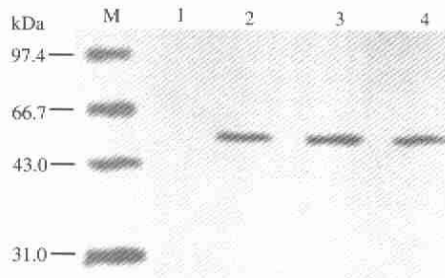


图 4 血清抗体的 Western Blot 检测

Fig. 4 Western-Blot detection of serum antibody

M, Protein marker; 1, immune mouse serum with SP2/0 cells; 2-4, immune mouse serum with expression E1E2 protein SP2/0 cells.

3 讨论

利用基因工程技术表达 HCV 蛋白是目前开展 HCV 基因与蛋白的性质及功能研究的主要手段, 已分别用于研究多聚蛋白前体的表达和加工规律^[4]、检测血清抗体^[5]、制备多抗、单抗^[6]以及设计亚单位疫苗等。Chiron 公司^[7]用重组痘病毒系统表达的 E1 E2 复合物免疫黑猩猩, 首次提出了研制 HCV 疫苗的可能性。近来, 他们还发现只有在哺乳动物细胞中被正常加工了的 E1E2, 才能有效地在体内诱导产生中和抗体并进而保护宿主免受病毒的攻击。大量的研究显示 HCV 结构蛋白的 E2 区能刺激机体产生具有保护作用的中和抗体^[8,9], 但是由于 E2 区的高度变异性, 针对某种型或株的抗体往往对其他型或株的 HCV 无中和作用。并且正常情况下, E2 蛋白与 E1 蛋白形成二聚体结构, 由于 B 细胞识别的是抗原的空间构象, E1E2 的二聚体结构对其抗原性有重要的意义。因此, 我们用逆转录病毒载体在 SP2/0 细胞中表达了 E1E2 基因的全长, 以保证其能形成正确的二聚体结构, 提高 B 细胞的识别能力, 更好地刺激机体产生抗体。试验表明 SP2/0 细胞免疫小鼠后, 血清经 FACS 检测, 成功地诱导了小鼠产生抗 HCV E1E2 蛋白的抗体, 为下一步 HCV 中和抗体的研究奠定了基础。

传统的单克隆抗体制备方法是利用天然病毒

或基因工程表达的蛋白作为抗原免疫动物, 但是 HCV 病毒体外很难培养而且原核表达系统表达的蛋白没有经过加工修饰, 不能反映蛋白的天然构象, 另外真核系统表达的蛋白纯化过程非常费时费力, 代价昂贵。我们采用逆转录病毒高效表达载体构建假病毒, 将 HCV *ele2* 基因转染到小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 细胞内, 由于逆转录病毒载体能够将外源基因整合到细胞 DNA 基因组中, 又由于 *ele2* 基因带有信号肽序列, 因此 SP2/0 细胞能够在细胞膜上稳定表达 E1E2 蛋白。外源基因在真核细胞中表达的优势是其蛋白能够完全糖基化、空间构象与天然蛋白一致, 保持完整的抗原结构。另外 SP2/0 细胞来源于 BACB/c 小鼠, 因此小鼠只能产生抗 E1E2 蛋白的抗体, 而不产生针对细胞的抗体。我们的试验结果证明了免疫血清不能和阴性 SP2/0 细胞结合, 就说明了这点。这就为下一步用表达细胞作为抗原直接免疫 BALB/c 小鼠研制抗 HCV 单克隆抗体奠定了基础。

Western blot 检测表明表达 E1E2 的 SP2/0 细胞免疫诱导产生的抗 E1E2 抗体能与大肠杆菌表达的 E2 蛋白结合, 这就为用原核表达的 E2 蛋白作抗原来检测细胞免疫后抗体水平的高低提供了基础。因为 FACS 只能定性检测, 不能定量检测, 而且 HCV 很难体外培养, 不可能用病毒直接做抗原, 所以细胞免疫后抗体水平的检测还需要原核系统表达的蛋白来检测。另外试验诱导产生的抗 E1E2 抗体是否具有中和活性? 以及抗 HCV 单抗的研制这些工作还在进一步研究之中。

致谢: 本研究在北京大学生命科学学院细胞工程与细胞分化实验室完成的, 对于在试验中给予帮助的相关人员在此表示衷心感谢。

参考文献

- [1] Scheuer P S, Ashrafzadeh P, Sherlock S, *et al.* The pathology of hepatitis C[J]. *Hepatology*, 1992, 15:567-571.
- [2] Kaneko T, Naka mura I, Kita H, *et al.* Three new cytotoxic T cell epitopes identified within the hepatitis C virus nucleo-protein[J]. *J Gen Virol*, 1996, 77: 1305-1309.
- [3] Uliner J B, Donnelly J J, Parker S E, *et al.* Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein[J]. *Science*, 1993, 259: 1745-1749.
- [4] Selby M J, Choo Q L, Berger K, *et al.* Expression, identification and subcellular localization of the proteins encoded by the hepatitis C viral genome[J]. *J Gen Virol*, 1993, 74: 1 103-1 113.

- [5] Chien D Y, Choo Q L, Tabrizi A, *et al.* Diagnosis of hepatitis C virus (HCV) infection using an immunodominant chimeric polyprotein to capture circulating antibodies: reevaluation of the role of HCV in liver disease[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 10 011-10 015.
- [6] Makumura M, Miyaka S, Akino N, *et al.* Introduction of antibodies against structural proteins of hepatitis C virus in mice using recombinant adenovirus [J]. *Vaccine*, 1996, 14:28-34.
- [7] Ralston R, Thudium K, Berger K, *et al.* Characterization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia viruses[J]. *J Virol*, 1993, 67: 6 753-6 761.
- [8] Zibert A, Schreier E, Roggerdorf M. Antibody in human sera specific to hypervariable region 1 of hepatitis C virus can block viral attachment[J]. *Virology*, 1995, 208: 653-661.
- [9] Shimizu Y K, Hijikata M, Lwamoto A. Neutralizing antibodies against hepatitis C virus and the emergence of neutralization escape mutant virus[J]. *J Virol*, 1994, 68: 1494-1500.

PI Recruitment

Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences

Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences (CAS) was founded in 1956. With scientific research elitists, Wuhan Institute of Virology is the only comprehensive institute carrying out fundamental researches on virology in CAS. The institute offers a highly interactive research environment and outstanding research facilities, including BSL3 laboratories. According to the national strategic need, Wuhan Institute of Virology has recently extended its emphasis from general virology to human virology and emerging diseases research.

The Institute is now seeking to recruit five senior research scientists (CAS Hundred Talents Program) for further development. The research fields contain Viral Immunology, HIV/AIDS, Epidemiology and Emerging Diseases, Vaccine and Antiviral Drugs and Molecular Virology. The recruited scientists can organize their own research groups. Qualified individuals are encouraged to apply.

All interested applicants must have a Ph.D. degree, good working experience with excellent scientific achievements and an established track record of publications. Applicants under the age of 45 has priority consideration.

The Institute will provide successful candidates with excellent working and living conditions. Salary and start-up support package will be commensurate with his/her experiences and qualifications.

Applicants should submit a complete CV, a copy of certification of the Ph.D. degree, a copy of current position, five representative publications, an anticipated plan of the applied position and three letters of recommendation by February 25, 2005.

The institute is also recruiting associate and assistant researchers for existing research groups including Tumor Virology, Hepatitis, Influenza Virus, Viral Zoonosis *etc.* Applicants are welcome to contact the institute. Please contact the following website for further information.

<http://www.whiov.ac.cn>

Contact Persons: Dr. Zhiming YUAN, Ms. Naxin SHANG

Address: Personnel Office, Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences,
44 Xiao Hongshan middle district, Wuhan 430071, China.

Tel: 86-27-87199413, Fax: 86-27-87198072

E-mail: yzm@wh.iov.cn shang@wh.iov.cn