

乙脑病毒 E-Hsp70 与 E-肽连接区对小鼠特异性免疫的比较

葛菲菲¹, 邱亚峰¹, 杨耀武², 陈溥言^{1**}

(1. 南京农业大学动物医学院传染病组 农业部动物疫病诊断与免疫重点实验室, 江苏南京 210095; 2. 中国预防医学科学院病毒病研究所, 北京 100052)

Comparison of JEV E-Hsp70 and E-Bindingdomain Fusion Protein on Immune Responses in Mice

GE Fei-fei¹, QIU Ya-feng¹, YANG Yao-wu², CHEN Pu-Yan^{1**}

(1. Key Laboratory of Animal Disease Diagnosis and Immunology, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Institute of Virology, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing 100052, China)

Abstract: Further investigation of this interesting adjuvant-free carrier effect is necessary to ascertain whether peptide-binding portion alone can replace the whole *M. tuberculosis* Hsp70 acting as carrier. In our study, we selected a portion of E protein with higher index of antigenic determinants dependent on analysis of computer software and constructed two chimeric vectors of pPICZ-E-Hsp70 and pPICZ-E-BD. Vectors were transformed into yeast X-33 by electroporation. Expression of fusion protein in yeast was induced by the addition of methanol every 24 hours and analysed by SDS-PAGE and Western blotting. We produced E-Hsp70 fusion protein at a yield of 33 mg per liter of culture and E-Bindingdomain fusion protein at a yield of 97 mg per liter of culture in methylotrophic yeast *Pichia pastoris* with specific antigenicity. To compare the immune response induced by E-Hsp70 fusion protein with that induced by E-bindingdomain, mice were immunized i. p. on day 0 and day 21. Mice immunized with E-bindingdomain had higher amount of mL-2 and titers of antibody than that of mice immunized with E-Hsp70 fusion protein. But their proliferation of lymphocytes was almost the same. We concluded that peptide-binding portion alone can replace the whole *M. tuberculosis* Hsp70 acting as carrier. Besides, this vector in *Pichia pastoris* avoided inclusion bodies formed in *Escherichia coli* and complex purification. Moreover, it ruled out contamination of LPS.

Key words: Major antigenic segment; JEV E protein; *M. tuberculosis* Hsp70; Peptide-binding portion; Proliferation of lymphocytes

摘要: 在本实验室已构建的原核表达载体(含乙脑疫苗株 SA14-14-2 株 E 蛋白基因主要抗原片段)的基础上用巴斯德毕赤酵母系统表达, 该片段长 1113bp, 编码 371 个氨基酸残基, 研究酵母表达的该乙脑病毒(*Japanese encephalitis virus*) E 蛋白主要抗原片段与结核杆菌热休克蛋白 70 (Hsp70) 的融合蛋白以及该抗原肽与 Hsp70 上的一个功能域-肽连接区(Peptide binding domain, 以下简称 BD)融合形成的蛋白, 用这三种蛋白分别免疫 BALB/c 小鼠, 以酵母单独表达的 E 蛋白主要抗原片段免疫作为对照, 比较它们对小鼠抗 E 蛋白主要抗原片段特异性的细胞免疫和体液免疫的影响。采用腹腔内注射蛋白的方法免疫小鼠, 主要从 IL-2 的 mRNA 水平, 淋巴细胞的增殖和抗体滴度这三个方面进行比较, 最后我们得出 E-BD 融合蛋白在免疫效果方面比 E-Hsp70 略好一些, 所以在本试验中肽连接区是完全可以代替 Hsp70 独立行使其佐剂功能。

关键词: 乙脑病毒 E 蛋白; 主要抗原片段; 结核杆菌热休克蛋白 70 (Hsp70); 肽连接区; 淋巴细胞的增殖

中图分类号: R 373.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5125(2005)04-0357-05

收稿日期: 2004-12-20, 修回日期: 2005-02-23

作者简介: 葛菲菲(1980-), 女, 江苏泰州籍, 博士生, 研究方向为分子病毒学与免疫学。

** 通讯作者. Corresponding author. Tel: 025-84396028, E-mail: aid@njau.edu.cn

流行性乙型脑炎(简称乙脑)是由蚊虫传播引起人类中枢神经系统感染的病毒性疾病^[1],在许多亚洲国家使用的第一代疫苗是乙脑病毒的灭活苗和弱毒苗,都取得了很大的成就^[2],但是鼠脑来源的乙脑疫苗在过敏问题上越来越突出,使用灭活疫苗的一个主要问题是缺乏长效免疫^[3],由于需要多次重复免疫,使得免疫程序繁琐。因此国际上对改善发展新的乙脑疫苗的要求很迫切^[4]。E蛋白上有特异性抗体的中和表位^[5,6],可诱导免疫动物产生中和抗体,本试验选取了根据计算机软件分析出E蛋白上抗原决定簇比较集中的区域^[7]。

已有报道结核杆菌 Hsp70 能增强针对与其融合的抗原肽的特异性细胞免疫和体液免疫,可作为一种载体分子,具有佐剂效应。Hsp70 作为免疫佐剂主要是通过如下机制实现的:肽-Hsp70 融合蛋白进入细胞后,Hsp70 与内质网上的受体结合从而促进肽的进入,在内质网内进行一系列的修饰处理,最终进入 MHC 类分子提呈系统。根据 Wang 等研究表明:Hsp70 分为两个域,ATP 酶区(ATPase domain)和肽连接区(Peptide Binding domain),如果将肽连接区单独使用,它可以刺激 Th1 极性细胞因子,C-C 细胞分化因子的产生,树突状细胞的成熟^[8],并且肽连接区是 Hsp70 中真正行使佐剂功能的区域。

本试验旨在了解肽连接区是否能代替 Hsp70 完成免疫佐剂的功能,因为 Hsp70 分子量较大,如果在与某些大分子量的肽进行融合表达时,就有可能受限制,本试验中选择的肽连接区只有 22kDa,易于操作,并为我们在选取免疫载体蛋白时提供了一个新的选择。

1 材料和方法

1.1 实验材料

人结核杆菌 H37Rv 标准株的基因组,DH5⁺,X-33,PET-E 原核表达载体为本实验室杨耀武构建^[7],pMD18-T 购自 TaKaRa 公司,SK、pPICZ-A 为本室保存。*EcoR*、*BamH*、*Xba* 和 *Sac* 内切酶,T4DNA 连接酶,rTaq 酶及 LA Taq 酶均购自 TaKaRa 公司,PCR 引物由上海博亚公司合成,DNA 凝胶回收试剂盒为上海华舜生物工程有限公司产品,中分子量标准蛋白购自创瑞公司,Western 印迹试剂盒,HRP-SPA 及酶标羊抗鼠二抗为武汉博士德生物工程有限公司产品,其它试剂均为国产或进口分析纯试剂。BALB/c 小鼠,6~8 周龄,由南京医科大学实验动物中心提供,均为雌性。电穿

孔仪、电泳仪、电转仪均为 BioRad 公司产品,PCR 扩增仪为 Gene 公司产品。

1.2 酵母表达载体的构建及表达

酵母表达载体 pPICZ-E 的构建及表达另文待发表;设计扩增融合 E 蛋白基因主要抗原片段的引物,p1(5):5-GAATTCA TCCTCCTGCTGTTGG TC-3,p2(3):5-GGATCCGAA GGGGTTCA CTGTAC-3,5 端带有 *EcoR* 位点,3 端带有 *BamH* 位点;设计扩增 Hsp70 的引物,p1(5):5-GGATCCA TGGCTCGTGC GGTCGGGA TCGAC C-3,p2(3):5-TCTA GAAACTTGGCCTCCCGG CCGTTCGTC-3,5 端带有 *BamH* 位点,3 端带有 *Xba* 位点;设计扩增 Hsp70 肽连接区的引物,它从 Hsp70 的第 427 位氨基酸到第 626 位(最末位)氨基酸,其引物设计如下:p1(5):5-GGATCCTTG CTCGGGTCCTTCGA GCTGACCG3,3 端引物与 Hsp703 端完全相同,5 端带有 *BamH* 位点,3 端带有 *Xba* 位点;这两种载体构建完毕后,质粒中外源基因的序列测定由上海博亚生物公司完成。将重组质粒及载体对照线性化后电穿孔转化,用 PCR 鉴定重组子,最后,E-Hsp70 和 E-BD 融合蛋白在毕赤酵母中表达,进行 SDS-PAGE 分析和表达产物的免疫印迹检测,在免疫印迹检测中所用的一抗为江苏省畜牧兽医总站所提供。

1.3 表达蛋白的纯化

本试验中,从 SDS-PAGE 电泳结果可以得出,酵母表达的这三种外源蛋白均较纯,自体蛋白极少而且不需考虑 LPS 的影响,所以在免疫小鼠之前,将表达的蛋白用 PBS 进行透析,用 GeneQuant pro RNA/DNA Calculator 定量后就可直接进行免疫。

1.4 免疫小鼠

分为三组,每组 10 只;用 2.2 μ g(50pmol)E 蛋白主要抗原片段,5.7 μ g(50pmol)E-Hsp70 和 3.4 μ g(50pmol)E-BD 融合蛋白分别进行腹腔内注射,三周后第二次免疫。

1.5 脾淋巴细胞的获取

第二次免疫后 2 周处死小鼠,在超净台内无菌操作取出脾脏,制备成单个脾细胞悬液,取淋巴细胞分离液置于离心管管底,沿管壁小心加入两倍体积的脾细胞悬液,1200r/min 水平离心 20min,沿管壁小心吸出界面层细胞,PBS 洗涤 3 次。计数细胞,使达到 1×10^6 /mL,接种入六孔板,用终浓度为 18 μ g/mL 的 E 蛋白主要抗原片段同时加进板内刺激。

1.6 细胞免疫因子 mRNA 的半定量 RT-PCR 检测

以小鼠的 β -actin 作为内标,其引物为:p1(5):

5' CCCA TCTACGA GGGCTA T3 ,p2 (3) : 5' CTG GAA GGTGGACA GTGA G3 , PCR 产物长度为 570bp; IL-2 的引物为: p1 (5) : 5' AAGCTCTAC A GCGGAAGCAC3 , p2 (3) : 5' ATCCA GAACA TGCCGCA GA G3 , PCR 产物长度为 231bp。用 TRIzol 提取细胞 mRNA,用无 RNA 酶水溶解后,定量,每份样品取 2 μ g 进行 RT,首先在 PCR 管内加入 0.8 μ mol oligdT,2 μ g mRNA,直接在 PCR 机上进行 70 $^{\circ}$ C,5min;随后在同一管内加入 0.8mmol dNTP,5 μ L 5 \times RT-Buffer,1 μ L M-MLV (200U/ μ L),1 μ L RNA 抑制剂 (5U/ μ L),最后用水补足到 25 μ L,在 PCR 机上进行 37 $^{\circ}$ C,1h,95 $^{\circ}$ C,5min;在 cDNA 合成后,取出 4 μ L RT 产物进入 PCR 体系: 5 μ L 10 \times PCR Buffer,3 μ L DMSO,0.4 pmol IL-2 引物,0.4 pmol β -actin 引物,4 μ L 25mmol/L MgCl₂,2U rTaq 酶,0.4 mmol dNTP,用水补足到 50 μ L 体系,进行如下程序:95 $^{\circ}$ C 预变性 3min,94 $^{\circ}$ C 变性 30s,50.3 $^{\circ}$ C 退火 30s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30s,30 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。在 0.8% 琼脂糖凝胶电泳,读取灰度值。

1.7 MTT

在分离脾细胞后,接种到 96 孔板内,使达到 2 $\times 10^4$ /孔,每孔加入细胞的体积为 100 μ L,同时加入终浓度为 18 μ g/mL 的 E 蛋白主要抗原片段,将细胞板培养 48h,提前 4h 取出,加 MTT (5mg/mL) 20 μ L/孔,继续培养 4h,取出后弃上清,加入 DMSO 100 μ L/孔,使结晶溶解,在微量震荡器震荡,测 A_{570nm} 值。

1.8 抗体滴度的测定

以 10 μ mol 的 E 蛋白主要抗原片段包被,4 $^{\circ}$ C 过夜,PBS 洗涤,37 $^{\circ}$ C 封闭 2h,PBS 洗涤,加小鼠血清样作用 1h,洗涤,加入羊抗鼠的酶标二抗 1h,PBS 洗涤,加入 OPD 显色,反应 15min 后,加入 2mol/L H₂SO₄ 终止反应。以 A_{490nm} 的值大于 0.2 的血清最高稀释度作为抗体滴度。

2 结果

2.1 重组表达载体的构建及表达

重组表达载体 pPICZ-E 的构建及表达另文待发表;pPICZ-E-HSP70 和 pPICZ-E-BD 的构建见图 1,经测序,这两个重组载体中外源基因的阅读框和方向均正确,E 蛋白的序列登录号为 M55506,Hsp70 的序列登录号为 BX842573。经甲醇诱导后,pPICZ-E 表达出 44kDa 和 50kDa 两种糖基化程度不同的蛋白,pPICZ-E-Hsp70 表达出 114kDa 的蛋白,pPICZ-E-BD 表达出 68kDa 的蛋白,经

Western blot 分析,三者均具有较好的抗原性(图 2)。

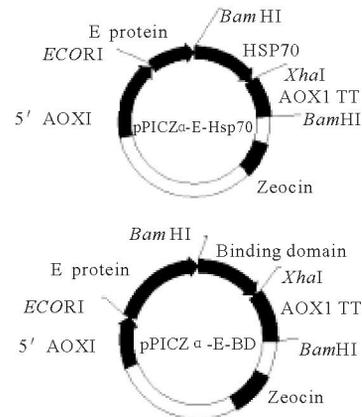


图 1 重组表达载体的结构

Fig. 1 Construction of recombinant expression vector

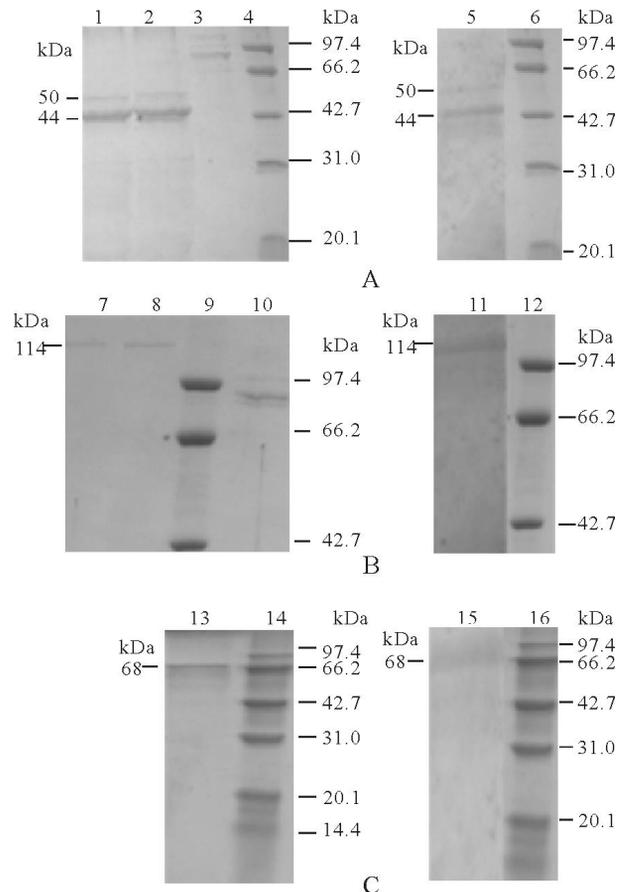


图 2 E 蛋白,E-Hsp70 融合蛋白和 E-BD 融合蛋白的分析
Fig. 2 SDS-PAGE and Western blot of E protein,E-HSP70 fusion protein and E-BD fusion protein

A: 1/2,SDS-PAGE of supernatant of pPICZ-E/X-33;3,Western blot of supernatant of pPICZ-E/X-33;4/6/9/12/14/16,Protein markers. B: 7/8,SDS-PAGE analysis of supernatant of pPICZ-E-H70/X-33;10,SDS-PAGE analysis of supernatant of pPICZ-A/X-33;11,Western blot of supernatant of pPICZ-E-H70/X-33. C: 13,SDS-PAGE analysis of supernatant of pPICZ-E-BD/X-33;15,Western blot of supernatant of pPICZ-E-BD/X-33.

2.3 细胞免疫因子 mIL-2 的半定量 RT-PCR 检测结果

每只小鼠取相同量的 mRNA 进行逆转录(反应体系相同),取等量的 RT 产物进行 PCR,用同体积的 PCR 产物进行核酸琼脂糖电泳(见图 3),以了解

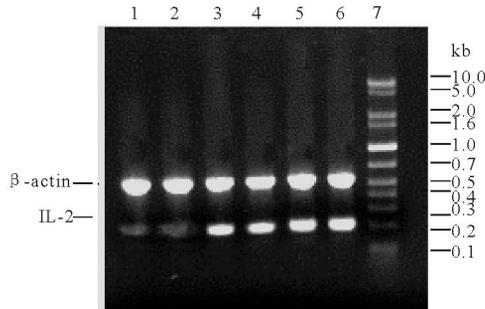


图 3 mIL-2 的半定量 RT-PCR 检测

Fig. 3 Result of semi-quantitative RT-PCR

1/2, Semi-quantitative RT-PCR of mIL-2 immunized by E protein; 3/4, Semi-quantitative RT-PCR of mIL-2 immunized by E-HSP70 fusion protein; 5/6, Semi-quantitative RT-PCR of mIL-2 immunized by E-BD fusion protein; 7, DNA Marker.

这三组 IL-2 mRNA 水平的差异。经分析, β -actin 的量大致相同,表明试验结果可靠,免疫 E 蛋白组中 IL-2 灰度值的平均值为 55.5 ± 6.364^b ,免疫 E-Hsp70 蛋白组中 IL-2 灰度值的平均值为 111.5 ± 2.121^a ,免疫 E-BD 融合蛋白组的 IL-2 灰度值的平均值为 130.5 ± 4.949^a ,E 蛋白组与其它两组均差异显著,而 E-Hsp70 组与 E-BD 融合蛋白组差异不显著 ($p < 0.05$) (图 4)。

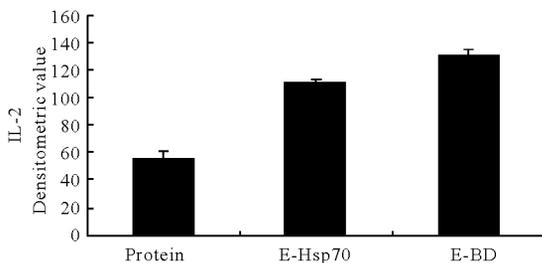


图 4 Hsp70 和肽连接区作为载体蛋白对小鼠产生 IL-2 量的比较

Fig. 4 Comparison of mIL-2 induced by Hsp70 and binding domain as carrier protein

Note: Data marked different letters differentiated significantly ($p < 0.05$).

2.4 MTT

MTT 为线粒体脱氢酶的作用底物,活细胞能将其还原为不溶于水的深紫色结晶体(formazan),此结晶在被 DMSO 溶解后呈紫色,用分光光度仪可定量测定其含量,OD 值的大小与活细胞数之间存在良好的线性关系。用 MTT 法测这三组淋巴细胞的增殖情况,免疫 E 蛋白组 OD_{570} 的平均值为 0.32

$\pm 0.068^b$,免疫 E-Hsp70 融合蛋白组 OD_{570} 的平均值为 0.55 ± 0.0812^a ,免疫 E-BD 融合蛋白组 OD_{570} 的平均值为 0.61 ± 0.116^a 。E 蛋白组与其它两组均差异显著,而 E-HSP70 组与 E-BD 融合蛋白组差异不显著 ($P < 0.05$)。

2.5 ELISA 结果

用 E 蛋白免疫小鼠后产生的抗 E 蛋白主要抗原片段的抗体滴度为 $10^{3.2}$,用 E-HSP70 融合蛋白免疫小鼠后产生的抗 E 蛋白主要抗原片段的抗体滴度为 $10^{3.5}$,用 E-BD 融合蛋白免疫小鼠后产生的抗 E 蛋白主要抗原片段的抗体滴度为 $10^{3.8}$ 。

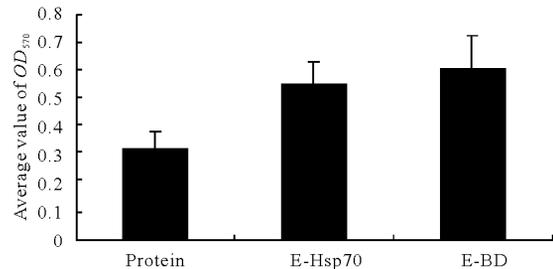


图 5 不同蛋白分别免疫小鼠后淋巴细胞增殖的比较

Fig. 5 Comparison of proliferation of lymphocytes in mice immunized with different proteins

Note: Data marked different letters differentiated significantly ($p < 0.05$).

3 讨论

Hsp70 能增强与其融合表达的抗原肽的免疫反应,起着载体蛋白的作用,主要是通过以下机制进行的: Hsp70 通过与抗原呈递细胞(APC)表面的受体 CD90, CD40 结合从而有利于融合肽在 APC 的内化^[9],随后向 II 类 MHC 限制的 $CD8^+$ T 细胞提呈抗原;此外, Hsp70 与抗原转运肽(TAP)进行物理性结合可以促进融合肽的提呈^[10];进一步讲,结核杆菌 Hsp70 在某些情况下可作为免疫反应中不需要佐剂的载体分子。另有报道表明 Hsp70 分为两个域: ATP 酶区(ATPase domain)和肽连接区(peptide Binding domain),而肽连接区是真正行使免疫增强作用的功能区。所以本试验旨在了解肽连接区是否为 Hsp70 中真正行使免疫佐剂功能的区域,我们分别从 mIL-2 的水平,淋巴细胞增殖以及抗体滴度这三个方面进行评定,发现肽连接区是完全可以取代 Hsp70 分子的,甚至其作为免疫佐剂的功能还稍强于 Hsp70,这可能是由于抗原呈递细胞(APC)表面的受体与 Hsp70 结合的区域集中在肽连接区内;此外已有报道表明 ATP 酶区有抑制 IL-10 和 TGF-^[11,12] 产生的作用并且 Hsp70 会掩盖某些刺激表位,从而降低其载体分子效应。本试验中

采用酵母表达系统,避免了大肠杆菌中形成的包含体,且呈分泌表达,自体蛋白极少而且不需考虑 LPS 的影响。所以本研究的结果在为选取载体蛋白分子时提供了可供参考的依据。

参考文献

- [1] 吴玉水,马文煜,朱忠勇. 日本脑炎病毒基因疫苗研究进展[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2002,18(5):512-514.
- [2] Tsai T F, Chang G F, Yu Y X. Japanese encephalitis vaccines [A]. In: Stanley A P, Oreustein WA, editors. Vaccine[C]. 3rd ed. Philadelphia: Saunders, 1999, 672-710.
- [3] Poland J D, Cropp C B, Craven R B, *et al.* Evaluation of the potency and safety of inactivated Japanese encephalitis vaccine in US inhabitants[J]. J Infect Dis, 1990, 161: (5):878-882.
- [4] Wu H H, Chen C T, Lin Y L, *et al.* Sub-fragments of the envelope gene are highly protective against the Japanese encephalitis virus lethal infection in DNA priming-protein boosting immunization strategies[J]. Vaccine, 2004, 22: 793-800.
- [5] Chambers T J, Halm C S, Galler R, *et al.* Flavivirus genome organization, expression and replication[J]. Annu Rev Microbiol, 1990, 44: 649-88.
- [6] Venugopal K, Gould E A. Towards a new generation of flavivirus vaccines[J]. Vaccine, 1994, 12: 966-975.
- [7] 杨耀武,齐香荣,陈德胜,等. 流行性乙型脑炎病毒 SA14-14-2 株 E 蛋白基因在原核细胞中的高效表达及其表达产物的抗原性分析[J]. 中国人兽共患病杂志,2003,19(5):31-35.
- [8] Wang Y, Kelly C G, Singh M, *et al.* Stimulation of Th1-Polarizing Cytokines, C-C Chemokines, Maturation of Dendritic Cells, and Adjuvant Function by the Peptide Binding Fragment of Heat Shock Protein 70[J]. J Immunol, 2002, 169: 2422-2429.
- [9] Suzue K, Young R A. Adjuvant-free hsp70 fusion protein system elicits humoral and cellular immune responses to HIV-1 p24[J]. J Immunol, 1996, 156:873-879.
- [10] Robert J. Evolution of heat shock protein and immunity [J]. Develop and Compa Immunol, 2003, 27: 449-464.
- [11] Kimura Y, Yamada K, Sakai T, *et al.* The regulatory role of heat shock protein 70 reactive CD40⁺ cells during rat listeriosis[J]. Int Immunol, 1998, 10:117.
- [12] Wendling U, Paul L, der Zee R V, *et al.* A conserved mycobacterial heat shock protein (hsp) 70 sequence prevents adjuvant arthritis upon nasal administration and induces IL-10-producing T cells that cross-react with the mammalian self-hsp70 homologue[J]. J Immunol, 2000, 164:2711.