

Hsp70 与汉滩病毒 S 基因融合蛋白的原核表达 及免疫小鼠的初步研究*

李 静¹, 叶正旭², 杨守京^{1**}, 高 娟³, 刘彦仿¹

(1.第四军医大学西京医院病理科, 陕西西安 710032; 2.第四军医大学西京医院骨科, 陕西西安 710032; 3.第四军医大学西京医院消化内科, 陕西西安 710032)

Prokaryotic Expression and Purification of Hsp70-NP and Its Immunity

LI Jing¹, YE Zheng-xu², YANG Shou-jing^{1**}, GAO Juan³, LIU Yan-fang¹

(1. Department of Pathology, Xian 710032, China; 2. Department of Orthopaedics, Xian 710032, China; 3. Department of Gastroenterology, Xi Jing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

Abstract : Recombinant fusion prokaryotic expression vector pGEX-4T-1/hsp70-S was constructed by cloning genes Hsp70 and *Hantaan virus S* gene coding region into pGEX-4T and was expressed in *E. coli*. The Hsp70-NP fusion protein was separated and purified with GSTrapFF purification system. We also constructed the prokaryotic expression vectors pGEX-4T-1/hsp70 and pET28a/S to prepare the purified protein Hsp70 and NP. Then BANB/c mice were vaccinated with the protein Hsp70-NP, Hsp70 and NP separately. ELISA results showed that both Hsp70-NP and NP could induce specific antibodies against NP. The specific antibody titers stimulated by Hsp70-NP were obviously higher than that of NP. The lymphoproliferative responses of spleen cells clearly showed that the spleen cells from both groups of mice were able to proliferate in the presence of NP protein. The stimulation indexes of splenocytes to NP induced by Hsp70-NP were significantly higher than that induced by NP. It indicated that linkage of Hsp70 to NP enhanced the immune response to *Hantaan virus* nucleocapsid protein.

Key words : Heat shock protein; *Hantaan Virus S* gene; Prokaryotic expression; Protein immunization

摘要 : 本文构建了 *hsp70* 与 S 基因的原核融合表达载体 pGEX-4T-1/hsp70-S, 在大肠杆菌中表达, 并通过 GSTrapFF 柱进行了纯化。同时制备了 NP 和 Hsp70 两种纯化蛋白。分别用这三种纯化蛋白免疫 BALB/c 小鼠, 结果表明纯化的 NP 和 Hsp70-NP 两种蛋白均可同时诱导产生抗汉滩病毒核蛋白 (NP) 抗体, 且后者刺激产生的抗体效价明显高于前者。淋巴细胞增殖实验表明, 两组免疫小鼠的脾细胞均能够对体外抗原刺激产生增殖反应, 而 Hsp70-NP 组免疫小鼠脾细胞对 NP 的增殖指数明显高于 NP 组免疫组。结果显示, 与单独用 NP 免疫小鼠相比, Hsp70-NP 纯化蛋白可以刺激机体产生更强的抗汉滩病毒体液免疫应答和特异性淋巴细胞增殖反应。

关键词 : 热休克蛋白; 汉滩病毒 S 基因; 原核表达; 蛋白免疫

中图分类号: Q786

文献标识码: A

文章编号: 1003-5153(2006)01-0011-05

肾综合征出血热 (HFRS) 一直是危害全球人类的一种病毒性传染病, 尚无特效治疗药物。目前因其作为一种潜在的生物武器可能威胁人类安全而倍受瞩目。我国的 HFRS 主要由汉滩病毒 (*Hantaan virus*, HTNV) 和汉城病毒引起。汉滩

病毒是布尼亚病毒科汉坦病毒 (*Hantaviruses*, HV) 的血清型之一, 为单股负链 RNA 病毒, 其基因组有大 (L)、中 (M)、小 (S) 3 个片段组成, 分别编码病毒相关的依赖 RNA 的 RNA 聚合酶、囊膜糖蛋白 (Glycoprotein, GP) G1 和 G2 及核衣壳蛋白

收稿日期: 2005-06-27, 修回日期: 2005-08-26

* 基金项目: 国家自然科学基金 (30271186)

作者简介: 李 静 (1975-), 女, 四川省籍, 博士研究生, 主要从事传染病的免疫治疗研究。

** 通信作者: 杨守京 (1965-), 男, 山东省籍, 教授。Corresponding author. Tel: 029-83373527, E-mail: yangsj@fmmu.edu.cn

(Nucleocapsid protein, NP) 四种结构蛋白。其中 NP 具有很强的抗原性和免疫原性, 刺激机体产生抗体出现时间早、滴度高、持续时间长, 而且也是 CTLs (Cytotoxic T lymphocytes) 识别的主要抗原之一。基于 NP 的免疫一直受到广泛研究, 而将 hsp70 与汉滩病毒 76-118 株 S 基因相结合用于抗 HV 免疫尚未见报道。本研究通过构建原核表达载体 pGEX-4T-1/hsp70-S, pET28a/S, pGEX-4T-1/hsp70, 分别制备了 Hsp70-NP, NP 和 Hsp70 三种纯化蛋白, 并进一步比较其诱导小鼠产生抗汉滩病毒体液免疫和细胞免疫应答能力。

1 材料与方法

1.1 实验材料

E.coli 菌种 DH5⁺, BL21(DE3) 由本室保存。原核表达载体 pGEX-4T-1 为 GE Healthcare 公司产品。含 hsp70 基因全长片段的质粒 pCDNA3.1(+)/hsp70 由本实验室保存。含 HTNV 的 S 基因全长片段的质粒 pGS/HanS 由 Schmaljohn 惠赠。

工具酶均购自 TakaRa 公司; 小量质粒提取试剂盒, DNA 胶回收试剂盒购自上海华舜生物工程公司; 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 为 Promega 公司产品; 蛋白质 Marker 购自上海生物制品研究所; 鼠抗 Hsp70 mAb 购自 Santa Cruz 公司; 鼠抗 NP mAb (1A8) 由本校微生物教研室惠赠; HRP 标记的羊抗鼠 IgG 购自 DAKO 公司; 其它所用配制各种液体的化学试剂均为分析纯或分子生物学纯级。

1.2 引物设计与 PCR

hsp70 引物: 引物中去除起始码 ATG 和终止码 TAG, 引入酶切位点 *Bam*H 和 *Eco*R。P1: 5'-GTTGGATCCGCCAAAGCCGCGGCGAT-3' P2: 5'-GGGGAATTCATCTACCTCCTCAATGGT-3'。S 基因引物: 引入酶切位点 *Eco*R 和 *Xho*I, P1: 5'-GCGAATTCATGGCAACTATGGAGGAATTAC-3' P2: 5'-GCCTCGAGTTAGAGTTTCAAAGGCTCTTGG-3'。由上海博亚生物公司合成。

1.3 原核表达载体的构建

hsp70 PCR 产物经回收纯化后, 用 *Bam*H 和 *Eco*R 酶切连入载体 pGEX-4T-1 构建为 pGEX-4T-1/hsp70; S 基因 PCR 产物经回收纯化后, 用 *Eco*R 和 *Xho*I 酶切连入同样酶切的载体 pGEX-4T-1/hsp70、pET28a, 构建为 pGEX-4T-1/hsp70-S、pET28a/S。构建好的载体均经上海博亚公司测序, 验证融合表达读框的正确性。

1.4 蛋白的制备

挑取单个 pGEX-4T-1/hsp70-S, pGEX-4T-1/hsp70 转化的 DH5⁺ 菌落接种 3mL 2YT 培养基 (含氨苄青霉素 100μg/mL), 单个 pET28a/S 转化的 BL21 (DE3) 于 LB (含卡那霉素 30μg/mL) 培养过夜。次日 1:100 转接, 继续培养至 A₆₀₀≈0.5, 加入 IPTG 终浓度为 0.3mmol/L, 5h 后取 1mL 菌液行 SDS-PAGE。薄层扫描仪扫描蛋白条带, 确定菌体总蛋白中目的蛋白以及可溶性蛋白的比例。Western blot 分析表达产物: 一抗分别为鼠抗 Hsp70mAb (1:100) 和鼠抗 NP mAb(1A8) (1:4000); 二抗为羊抗鼠 IgG (1:20)。采用 1mL GSTrapFF 柱, Ni-NTA 珠子纯化 (具体步骤按说明书进行)。所得蛋白冻干, -70 保存。

1.5 动物免疫

选用 6-8 周的 BALB/c 雌性小鼠, 由本校实验动物中心提供。采用微量免疫法将纯化好的三种蛋白 NP, Hsp70, Hsp70-NP 按 200pmol/只分别滴在 NC 膜上, 晾干并剪成小条。实验分成 3 组, 每组 5 只。将上述 NC 膜条卷起, 包埋于小鼠一侧后肢腹股沟皮下。设对照组: PBS 组, NC 膜免疫组。每隔 2 周免疫 1 次, 共免疫 3 次。第二次 NC 膜埋于另一侧后肢腹股沟皮下, 第三次免疫直接将蛋白腹腔注射。每次免疫前采小鼠尾静脉血, 留血清测定抗体滴度。最后一次免疫后 10d, 取脾淋巴细胞测定淋巴细胞增殖功能。

1.6 血清抗体检测

采用间接 ELISA 法检测血清中抗汉滩病毒抗体的滴度。包被纯化的汉滩病毒 NP, 加不同稀释度的免疫鼠血清, 二抗为 HRP-IgG(1:20); ABTS 显色, 测定各孔 O.D_{410nm} 值。设空白对照 (生理盐水), 阳性对照 (1A8, 1:2000)。

1.7 淋巴细胞增殖实验

制备小鼠脾细胞悬液 1×10⁶/mL 加入 96 孔板, 200 μL/孔, 用纯化的 NP 进行刺激 (终浓度为 10 μg/mL), 每样本做 3 个复孔。37℃, 5%CO₂ 孵育 68h, 加入四甲基偶氮唑盐 (MTT) 溶液 (5mg/mL) 20 μL/孔, 37℃, 5%CO₂ 孵育 4h, 弃孔内培养上清, 加入 DMSO 150 μL/孔, 振荡 10min, 测定各孔 O.D_{490nm} 值。设空白对照刺激。增殖指数: 实验组抗原刺激 O.D_{490nm} 值/实验组空白对照 OD_{490nm} 值。

2 结果

2.1 原核表达载体的构建与鉴定

经 PCR 分别获得约 2.0Kb 的 hsp70 基因全长和

1.3kb 的 S 基因全长, 经测序证实与 GenBank 公布一致。酶切鉴定结果: pET28a/S 用 *EcoR* I+*Xho* 可切出 5.4kb 及 1.3kb 片段; pGEX-4T-1/hsp70 用 *Bam*H I+*EcoR* 可切出 4.9kb 及 2.0kb 片段; pGEX-4T-1/hsp70-S 用 *EcoR* I+*Xho* 可切出 6.9kb 及 1.3kb 片段, 均与预期相符 (图.1)。经测序证实融合表达读框正确。

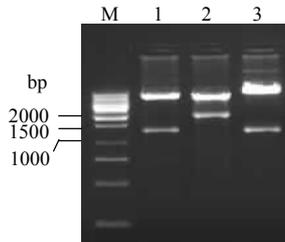


图 1 原核表达载体的酶切鉴定

Fig.1 Analysis of expression plasmids

M, DNA ladder; 1, pET28a/S (*EcoR* I+*Xho*); 2, pGEX-4T-1/hsp70 (*Bam*H I+*EcoR*); 3, pGEX-4T-1/hsp70-S(*EcoR* I+*Xho*).

2.2 表达产物的检测

pGEX-4T-1/hsp70-S/DH5, 经 IPTG 诱导表达分子量约 146kDa 的蛋白 (图 2), 其中 GST 蛋白约为 26kDa。纯化蛋白条带下方有 2 条蛋白降解带。扫描结果显示, 在 4 h 时表达量可达 30%左右, 说明重组载体可以在大肠杆菌中特异性高表达。pGEX-4T-1/hsp70/DH5、pET28a/S/BL21 (DE3) 经 IPTG 诱导分别表达 96kDa (图 3)、50kDa (图 4) 的蛋白质分子。

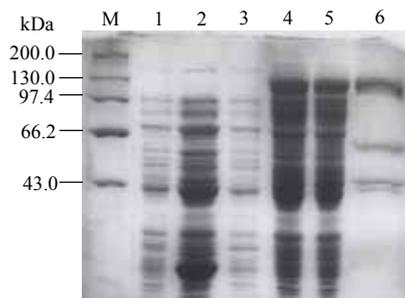


图 2 Hsp70-NP 诱导表达与分离纯化的检测

Fig.2 SDS-PAGE of Hsp70-NP expression and purification M, Protein marker; 1, pGEX-4T-1 before induction; 2, pGEX-4T-1 induced by IPTG; 3, pGEX-4T-1/hsp70-S before induction; 4, pGEX-4T-1/hsp70-S induced by IPTG(0.1mM); 5, pGEX-4T-1/hsp70-S induced by IPTG (0.3mM); 6, Purified protein.

分子量为 146kDa 的蛋白质同时能与 Hsp70 mAb 和 1A8 mAb 特异性结合, 证实该蛋白为 Hsp70-NP 融合蛋白; 分子量为 96kDa、50kDa 的蛋白质分子分别能与 Hsp70 mAb 和 1A8 mAb 特异性结合, 证实为 Hsp70 蛋白和 NP 蛋白 (图 5)。

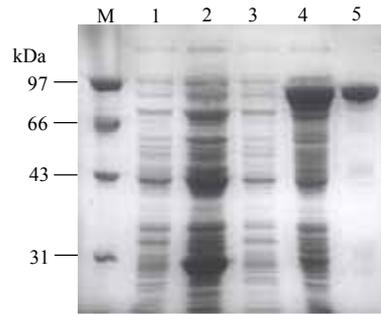


图 3 Hsp70 诱导表达与分离纯化的 SDS-PAGE

Fig.3 SDS-PAGE of Hsp70 expression and purification

M, Protein marker; 1, pGEX-4T-1 before induction; 2, pGEX-4T-1 induced by IPTG; 3, pGEX-4T-1/hsp70 before induction; 4, pGEX-4T-1/hsp70 induced by IPTG (0.1mM); 5, Purified protein.

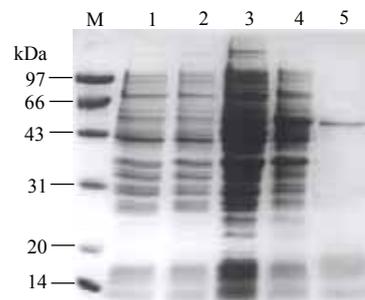


图 4 NP 诱导表达与分离纯化的 SDS-PAGE

Fig.4 SDS-PAGE of NP expression and purification

M, Protein marker; 1, pET28a before induction; 2, pET28a induced by IPTG; 3, pET28a/S before induction; 4, pET28a/S induced by IPTG; 5, Purified protein;

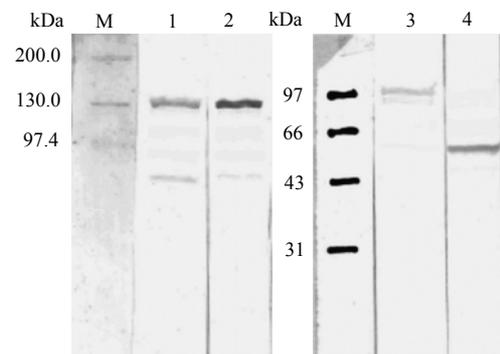


图 5 Hsp70-NP 的 Western Blot 结果

Fig.5 Western blot of Purified protein Hsp70-NP

M, Protein marker; 1, Purified protein Hsp70-NP (Hsp70 mAb); 2, Purified protein Hsp70-NP (1A8 mAb); 3, Purified protein Hsp70 (Hsp70 mAb); 4, Purified protein NP (1A8 mAb).

2.3 血清抗体水平检测

ELISA 检测结果表明, NP 组和 Hsp70-NP 组在初次免疫后 5 只小鼠血清中均检测到 NP 抗体。NP 组小鼠血清中抗体平均效价分别为: 1:50、1:800 及 1:6400。Hsp70-NP 组小鼠血清中 NP 抗体平均效价分别为 1:200、1:1600 及 1:25600。而 Hsp70 组, PBS

组, NC 膜免疫组均检测不到抗 NP 抗体 (图 6)。

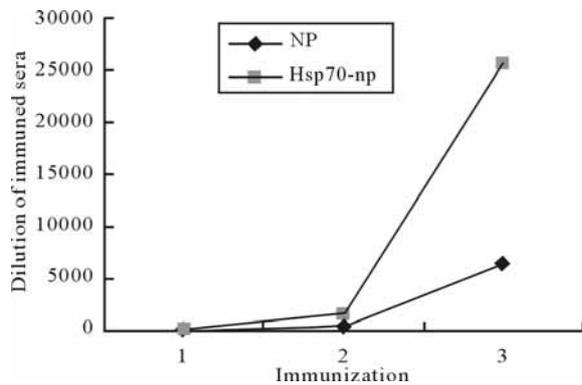


图 6 免疫鼠血清抗 NP 抗体检测结果

Fig.6 ELISA results of average titers of immunized mice sera

2.3 淋巴细胞增殖实验

Hsp70-NP 组和 NP 组小鼠脾细胞对 NP 的刺激有明显的增殖,而且 Hsp70-NP 组的增殖指数 $SI=6.95 \pm 0.61$ 明显高于 NP 组 $SI=4.62 \pm 0.46$ ($P < 0.01$)。Hsp70 组, PBS 组, NC 膜免疫组对 NP 的刺激都没有明显增殖(图 7)。

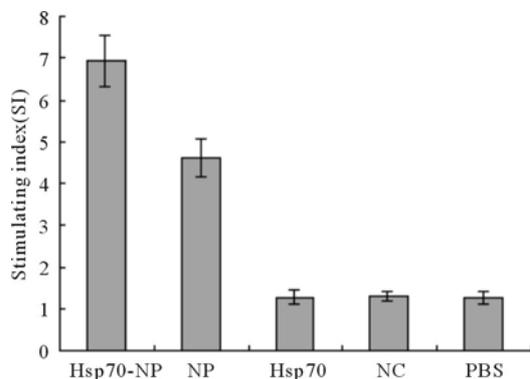


图 7 小鼠脾细胞对汉滩病毒 NP 的增殖反应指数

Fig.7 The average stimulation indexes of splenocytes to NP of *Hantaan virus*

3 讨论

病毒感染是诱导热休克反应的重要因素之一。病毒感染诱导的 Hsps 可与病毒蛋白发生相互作用^[1,2]。本实验组以前研究证实, HTNV 感染可诱导 Hsp70 的高表达,并形成 Hsp70-病毒抗原肽复合物^[3-5]。这种复合物的形成一方面体现了在感染过程中病毒与宿主的相互作用。另一方面, Hsp70-病毒抗原肽复合物可以作为特异性细胞免疫的天然生物疫苗用于 HFRS 防治。近年研究发现,从感染细

胞或肿瘤组织中提取的 Hsp70-抗原肽复合物 (HSPPC) 免疫动物可有效产生针对同一病毒或肿瘤的特异性 CTLs 免疫反应^[6-8]。该免疫反应主要由 Hsp70 与吞噬细胞、树突状细胞等抗原呈递细胞 (APC) 上特定的 Hsp70 受体结合,通过 MHC 类途径,向 APC 提呈与之结合的抗原肽,被 CD8⁺ 细胞识别,从而诱导特异性细胞免疫反应^[9-11]。HSPPC 诱导特异性 CTLs 的能力吸引了众多科研工作者,他们利用 HSPs 与感兴趣可溶性细菌或者病毒蛋白体外重建和基因工程融合表达,研制新一代针对 AIDS 和其它病毒疾病的疫苗,并且有了突破性的进展^[12]。但对于将 Hsp70 与 HTNV-NP 联合用于抗 HTNV 免疫尚未见报道。

国内外大多数学者认为, NP 免疫动物产生的抗病毒免疫反应与细胞免疫有关。目前已经明确 HTNV-NP 上存在能诱导特异性 CTLs 的表位, HTNV 感染可以同时产生针对 NP 上少数株特异性识别表位和针对不同 HV 毒株有交叉反应的 T 细胞反应^[13,14]。Hsp70-NP 融合蛋白中的 Hsp70 可以作为病毒抗原的载体分子,将 NP 提呈给机体免疫系统,以期更好地刺激机体同时产生体液免疫和细胞免疫。

本研究在以往研究基础上,通过基因工程手段制备了 Hsp70-NP 融合蛋白。Hsp70-NP 融合蛋白作为 146kDa 的大分子蛋白,实现可溶性高表达具有一定的难度。其表达的成功实现在很大程度上可能与 Hsp70 有关。在体外制备 Hsp70-NP 的过程中, Hsp70 的分子伴侣作用能够协助抗原肽的正确合成、折叠,保护其不被降解,从而增强 NP 免疫原性。Hsp70 在一定程度上优化了蛋白表达的条件,解决了原核表达过程中可能遇见的包涵体表达、表达量低甚至不表达的难题。此外,在免疫的过程中,实行无佐剂蛋白免疫,其目的在于观察 Hsp70-NP 融合蛋白中 Hsp70 作为一种天然免疫佐剂的效果。

血清中 NP 抗体检测和淋巴细胞增殖实验结果显示, Hsp70-NP 融合蛋白与单独 NP 蛋白相比,刺激机体产生的抗 NP 抗体效价和淋巴细胞增殖指数均更高。提示 Hsp70-NP 融合蛋白能够诱导机体产生更强的体液免疫和细胞免疫反应。进一步评价细胞免疫反应效果的实验正在进行当中,希望能为汉滩病毒的免疫治疗研究提供更多的实验依据。

References

- [1] Z gel U, Kaufmann S H E. Role of Heat Shock Proteins in Protection from and Pathogenesis of Infectious Diseases[J].Clinical

- Microbiology Reviews, 1999, 12 (1) : 19-39.
- [2] Nieland T J F, Agnes M C, Tan A, *et al.* Isolation of an immunodominant viral peptide that is endogenously bound to the stress protein GP96/GRP94[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93: 6135- 6139.
- [3] Ye L, LIU Y F, Yang S J (叶 苓, 刘彦仿, 杨守京). Increased expression of Hsp70 induced by Hantaan virus[J]. Virologica Sinica(中国病毒学), 2000,15:106-110.
- [4] Zhao J, Yang S J, Liu Y F(赵 君, 杨守京, 刘彦仿). HSP7221 like Immunoreactivities in the Brains of Mice Experimentally Infected with Hantavirus[J]. Virologica Sinica (中国病毒学), 2001, 16:11-14.
- [5] Sun Y J, Yang S J, Zhao Jun(孙玉静, 杨守京, 赵 君). Hantaan virus induces heat shock protein 70 expression in brain of suckling mice and its correlation with viral proteins[J]. Chin J Infect Dis(中华传染病杂志), 2002, 20:83-85.
- [6] Li Z. In vitro reconstitution of heat shock protein-peptide complexes for generating peptide-specific vaccines against cancers and infectious diseases[J]. Methods, 2004, 32:25-8.
- [7] Oki Y, Younes A. Heat shock protein-based cancer vaccines[J]. Expert Rev Vaccines, 2004,3:403-11.
- [8] SenGupta D, Norris P J, Suscovich T J. Heat shock protein-mediated cross-presentation of exogenous HIV antigen on HLA class I and class II [J]. J Immunol., 2004, 173:1987-93.
- [9] Zheng H, Li Z. Cutting edge: cross-presentation of cell-associated antigens to MHC class I molecule is regulated by a major transcription factor for heat shock proteins[J]. J Immunol.2004, 173: 5929-33.
- [10] Suto R, Srivastava P K. A mechanism for the specific immunogenicity of heat shock protein-chaperoned peptides [J]. Science, 1995, 269: 1585-1588.
- [11] Epps H L, Schmaljohn C S, Ennis F A. Human Memory Cytotoxic T-Lymphocyte (CTL) Responses to Hantaan Virus Infection: Identification of Virus-Specific and Cross-Reactive CD81 CTL Epitopes on Nucleocapsid Protein[J]. J Virol, 1999, 73:5301-5308.
- [12] 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, 156:873-9.
- [13] Van Epps H L, Schmaljohn C S, Ennis F A. Human memory cytotoxic T-lymphocyte(CTL) responses to hantaan virus infection: identification of virus-specific and cross-reactive CD8(+) CTL epitopes on nucleocapsid protein[J]. J Virol, 1999, 73:5301-5308.
- [14] Park J M, Cho Sy, Hwang Y K, *et al.* Identification of H-2K (b)-restricted T-cell epitopes within the nucleocapsid protein of Hantaan virus and establishment of cytotoxic T-cell clones[J]. J Med Virol, 2000, 60:189-199.

Notice of Inviting Contributions for English Version of Virologica Sinica

VIROLOGICA SINICA is an academic, professional periodical. It is published bimonthly by the Wuhan Institute of Virology, CAS and Chinese society for Microbiology and distributed worldwide. It is the core issue in the biology and medicine science in China, It is indexed and abstracted in Chemical Abstract (CA), BIOSIS previews (BA), Cambridge Science Abstracts (CSA), Life Sciences Collection, TOXLINE, Abstract Journal VINTI (AJ VINTI), Index of Copernicus (IC), Excerpta Media (EM) and some Chinese periodical citation abstracts and Databases.

VIROLOGICA SINICA will change its publishing language into English in 2007. It will be published for every 2 month. English manuscripts from any part of the world will be welcome.and should be sent to :

Editorial Office for Virologica Sinica,
Xiaohongshan Central 44,
Wuchang, Wuhan 430071,
CHINA