

单纯疱疹病毒 2gD-Hsp70 融合蛋白基因的构建及表达

Construction and Expression of HSV-2gD-Hsp70 Fusion Protein Gene

樊建勇, 杨慧兰*, 王 颖, 关 蕾

FAN Jian-Yong, YANG Hui-Lan*, WANG Ying and GUAN Lei

广州军区广州总医院皮肤科, 广州 510010

Department of Dermatology, Guangzhou General Hospital, Guangzhou 510010, China

摘 要 构建并原核表达 Hsp70-HSV2gD 融合蛋白。将 Hsp70 和 HSV-2gD 蛋白基因分别克隆到原核表达载体 pGEX-4T-1, 构建重组质粒 pGEX-4T-Hsp70-gD, 并测序鉴定。重组质粒 pGEX-4T-Hsp70-gD 转化大肠杆菌 DH5 α 后, IPTG 诱导表达并进行 SDS-PAGE 分析。表达产物纯化后做 Western blot 检测。将其肌注免疫 BALB/c 小鼠, 检测融合蛋白对免疫小鼠脾淋巴细胞增殖、 γ -干扰素产生以及血清中 gD IgG 水平的影响。表达产物的 SDS-PAGE 分析发现, 在相对分子量为 118kD 处有外源蛋白表达, 与预期蛋白带一致。用 GST 柱得到了纯化的 Hsp70-HSV2gD 融合蛋白。Western blot 证实, 表达产物具有良好的活性。GST-Hsp70-gD 组蛋白疫苗免疫的小鼠, 其脾淋巴细胞刺激指数和脾淋巴细胞培养上清中 γ -干扰素的水平高于其它组 ($P < 0.05$)。血清单纯疱疹病毒-2gD 蛋白的抗体水平高于其它组 ($P < 0.05$)。

关键词 热休克蛋白 70, gD 蛋白, 单纯疱疹病毒, 疫苗

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)06-0914-05

Abstract To construct and express Hsp70-HSV2gD fusion protein. Genes of Hsp70 and HSV-2gD were subcloned into vectors pGEX-4T-1 respectively. After confirmed by DNA sequence analysis, the recombinant plasmids pGEX-4T-HSP-gD was transformed into *E. coli* DH5 α and induced to express with IPTG. The expressed protein was characterized by SDS-PAGE and Western blot after purified. BALB/c mice were immunized with fusion proteins respectively via intra-muscular injection. The proliferation of spleen lymphocytes, the level of γ -IFN in culture and anti-HSV-2gD IgG antibody in serum was detected. The expressed protein was analyzed by SDS-PAGE after induced with IPTG, which showed a new band with an apparent molecular mass corresponding to the predicted size (118kD). Western Blotting analysis demonstrates that the purified Hsp70-HSV2gD fusion protein had specific binding activity. The stimulation indexes of spleen lymphocytes, the level of γ -IFN in culture and anti-HSV-2gD IgG antibody in serum of GST-Hsp70-gD group was obviously higher than that of other groups ($P < 0.05$ respectively). The successful expression of the Hsp70-HSV2gD fusion protein, which can induce immune responses, laid a solid foundation for its further research.

Key words heat shock protein70, glycoprotein D, herpes simplex virus, vaccine

Received: May 24, 2006; Accepted: July 21, 2006.

This work was supported by the grants from the Foundation of National Natural Science (No. 30371290) and Medical Science Foundation of Guangzhou Province (No. A2006492).

* Corresponding author. Tel: 86-20-36653506; E-mail: fanjianyong@hotmail.com

国家自然科学基金资助项目 (No.30371290), 广东省医学科研基金资助课题 (No. A2006492).

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

生殖器疱疹是由单纯疱疹病毒(HSV)感染生殖器及肛门部位皮肤粘膜引起的一种常见性传播疾病。生殖器疱疹预防困难,传染性强,复发率高,严重影响患者生活质量。在防治 HSV-2 感染的方法中,疫苗是免疫治疗的重要手段之一。由于单独采用抗原治疗作用较弱,所以目前使用的疫苗主要通过采用抗原载体分子或免疫佐剂,来增强其免疫激活作用,特别是增强细胞免疫活性。结核杆菌热休克蛋白 70(Hsp70)具有很强的抗原性,能够发挥类似免疫佐剂的作用,可以作为一种抗原载体分子,诱导产生细胞和体液免疫^[1-2]。本研究构建并表达了 HSV2 型 gD 与结核杆菌 Hsp70 的融合蛋白,为研究以 Hsp70 蛋白作为疫苗载体, gD 蛋白为靶点的疫苗研究提供实验依据,并为其在临床的应用打下了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

重组质粒 pVAX-gD 及 DH5 α 菌种由本实验室保存。pGEX-4T-1 质粒由第四军医大学西京医院皮肤科沈柱博士惠赠。结核杆菌 H37Rv 由第四军医大学西京医院皮肤科党育平博士惠赠。限制性内切酶、T4 连接酶及 Taq DNA 聚合酶均购自 TaKaRa 公司。山羊抗 gD 多抗购自 SANTA CRUZ 公司。HRP 标记兔抗山羊 IgG 购自威佳公司。GST 蛋白纯化柱购自 Invitrogen 公司。 γ -干扰素(IFN- γ)检测 ELISA 试剂盒购自晶美生物技术有限公司。4~6 周龄雌性 BALB/c 小鼠,购自广州中医药大学动物实验中心。

1.2 方法

1.2.1 Hsp70 基因的克隆及原核表达载体的构建: 根据 GenBank 中结核杆菌 Hsp70 基因设计针对 Hsp70 基因全长引物,上游引物的序列为 5' CGGAATTCGCCGCTACatggctcgtgcggtcgggAT;下游引物的序列为 5' GCCTCGAGTTCACCTTGGCCTCCCGGCCGTCGTCG,其中上游和下游引物分别加入 EcoRI 和 XhoI 的酶切位点(画线部分)。取结核杆菌 H37Rv,加入裂解液,煮沸 5min,以此为模板进行 PCR。PCR 产物和表达质粒 pGEX-4T-1 经相应的酶切后可以黏末端连接,连接后转化大肠杆菌 DH5 α 筛选 pGEX-4T-Hsp70 重组质粒阳性克隆并进行酶切和测序鉴定。

1.2.2 pGEX-4T- Hsp70-gD 重组质粒的构建: 以上游引物 5' CGGGATCCAGCATGgcctgcgcgaCGGTGC

TCCTACAT-3 和下游引物 5' CGGAATTCGGCCGAGTCCTCGGGGTCTT-3 从质粒 pVAX-gD 中扩增 gD 片段基因。由于引物中分别引入了 BamHI 和 EcoRI 酶切位点(划线部分),故 PCR 产物和表达质粒 pGEX-4T-Hsp70 经相应的酶切后可以黏末端连接,连接后转化大肠杆菌 DH5 α 筛选 pGEX-4T-Hsp70-gD 重组质粒阳性克隆并进行酶切和测序鉴定。

1.2.3 pGEX-4T-Hsp70-gD 重组质粒的表达: 取鉴定正确的 DH5 α /pGEX-4T- Hsp70-gD 重组菌和空载体 pGEX-4T-1 转化菌的单个菌落,接种于 2mL LB 培养基中,于 37℃ 培养过夜。次日按 1:100 分别接种于 2mL 新鲜 LB 培养基中,于 37℃ 培养至 A_{600} 值为 0.6~1.0。加诱导剂 IPTG 至终浓度 1mmol/L,以 250 r/min 于 37℃ 培养 3h。将诱导的重组菌和空载体转化菌以 12 000r/min 离心 2min,收集菌体,加入 30 μ L 去离子水及 30 μ L 2 \times 上样缓冲液,置沸水浴中 5min。以 12000r/min 离心 1min 后,取 5 μ L 上清做 SDS-PAGE 经考马斯亮蓝染色、脱色后观察结果。

1.2.4 表达产物的纯化: 表达菌液以 6 000r/min 离心 10min,收集菌体,用 20mL PBS 洗涤 1 次,用 30mL 裂解液(10 mmol/L Tris-Cl, 50mmol/L NaCl, 2mmol/L EDTA Na₂, 1mL/L TritonX-100 及 0.1mmol/L PMSF, pH 8.0)重悬菌体。在冰浴中用超声波破碎细菌后,于 4℃ 以 10 000r/min 离心 10min,收集上清和沉淀。用 20mL 裂解液洗涤沉淀 1 次,再以 10mL 包涵体溶解液(8mol/L 脲,含有 5mL/L 巯基乙醇)溶解沉淀。取上清 10 μ L 做 SDS-PAGE 经考马斯亮蓝染色、脱色后观察结果。收集的上清用 0.45 μ m 针头滤器过滤。采用 10mL PBS 平衡 1mL GSTrap 柱 0.5mL/min。将细菌裂解上清上样 0.5mL/min;采用 10mL PBS 清洗 GSTrap 柱 0.5mL/min;洗脱缓冲液洗脱结合蛋白,分段收集,SDS-PAGE 鉴定目的蛋白。

1.2.5 表达产物的 Western blot 检测: 纯化蛋白经电泳并转印到 PVDF 膜上,一抗为羊抗 HSV-2 gD 蛋白抗体,二抗为 HRP 标记的抗羊 IgG 抗体,用 DAB 显色。

1.2.6 动物的免疫和 γ -干扰素的检测^[3,4]: 纯化的 GST、GST-gD、GST-Hsp70-gD 用 0.2 μ m 滤器过滤,紫外分光光度计测定蛋白含量。用 PBS 调整 GST、GST-gD、GST-Hsp70-gD 各蛋白浓度至 0.2 μ mol/L。36 只 BALB/c 小鼠随机分为 6 组,每组 6 只(1)PBS 组(2)GST 组(3)GST-gD 组(4)GST-Hsp 组,(5)GST-gD + Hsp 组(6)GST-Hsp70-gD 组。于第 1 天、第 10 天、第 20 天分别在小鼠胫前肌肌注蛋白 0.1mL

次/只。最后一次免疫后 28d, 无菌取各组小鼠脾细胞, 用 1640 培养液重悬分离的脾淋巴细胞至终浓度为 $5 \times 10^6/\text{mL}$, 分别取 $100\mu\text{L}$ 加入 96 孔培养板, 同时加入 $50\mu\text{L}$ 1640 配置的 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ gD 蛋白, 培养 72h 后, 采用 $500 \times g$ 离心 5min, 取上清, 用 ELISA 试剂盒检测上清 γ -干扰素, 具体方法按照试剂盒进行, 置 BIORAD550 型酶标仪测 OD_{450} 测值。

1.2.7 HSV-2 gD 血清 IgG 抗体的检测 :小鼠于免疫完成后 d28 眼眶取血, ELISA 法检测血清 IgG 水平。单纯疱疹病毒 II 型 gD 蛋白为包被抗原, 一抗为免疫小鼠血清, 二抗为羊抗鼠 HRP-IgG, 显色, 酶标仪波长 450nm 测值。

1.2.8 MTT 法检测小鼠脾细胞增殖 :用 1640 培养液重悬分离的脾淋巴细胞至终浓度为 $5 \times 10^6/\text{mL}$, 分别取 $100\mu\text{L}$ 加入 96 孔培养板, 同时加入 $50\mu\text{L}$ 1640 配置的 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ gD 蛋白, 培养 72h 后, 加入 MTT $20\mu\text{L}$ 后 37°C 温育 4h, 去上清, 加入 $150\mu\text{L}$ DMSO 振荡 10min, 酶标仪 490nm 测值, 刺激指数(SI) = A 实验孔/A 对照孔。

1.2.9 统计学处理 :数据采用 SPSS 软件进行统计分析。结果以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两组间比较用 LSD 法, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 重组质粒的构建及鉴定

分别以结核杆菌 H37Rv 裂解液和 pVAX-gD 质粒为模板, 采用 Hsp70 基因引物和 gD 片段基因引物分别扩增出相应的目的片段。琼脂糖凝胶电泳显示, PCR 产物 Hsp70 基因和 gD 片段基因的大小分别约为 2000bp 和 630bp, 同预期的大小一致。重组质粒 pGEX-4T-Hsp70-gD 用 *Bam*H I / *Eco*R I、*Eco*R I / *Xho* I 和 *Bam*H I \ *Eco*R I / *Xho* I 酶切的结果显示, Hsp70 基因和 gD 片段基因已正确插入载体中的相应酶切位点(图 1)。测序结果表明, 重组载体中 Hsp70 基因和 gD 片段基因的序列与已知的序列相符合, 未发现突变的碱基。

2.2 Hsp70-gD 融合蛋白的表达

表达产物的 SDS-PAGE 结果显示, 与空载体转化的细菌诱导后蛋白的表达相比较, 含重组载体的细菌诱导后, 在 M 约为 118kD (包括 GST 约 26kD、gD 片段约 21kD、Hsp70 约 71kD) 处出现新的蛋白带。而转入空载体的细菌在 26kD (GST) 处出现新的蛋白带(图 2)。

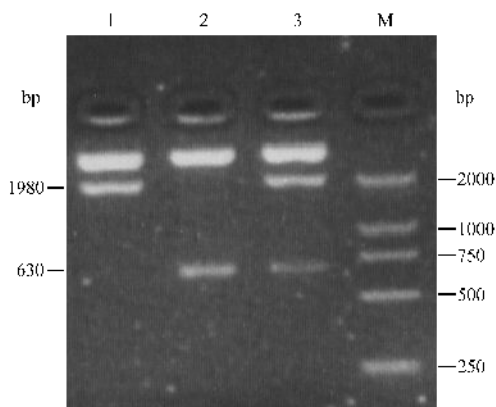


图 1 重组质粒 pGEX-45-Hsp70-gD 酶切电泳图

Fig.1 The restrictive endonuclease digestion analysis of recombinant vector pGEX-45-Hsp70-gD

1 : pGEX-4T-Hsp70-gD digested with *Eco*R I + *Xho* I ; 2 : pGEX-4T-Hsp70-gD digested with *Bam*H I + *Eco*R I ; 3 : pGEX-4T-Hsp70-gD digested with *Bam*H I + *Eco*R I + *Xho* I ; M : DL2000 Marker.

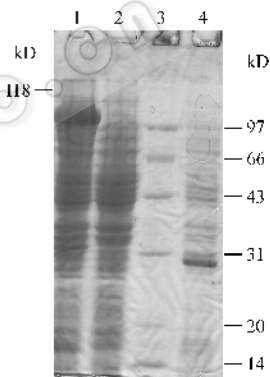


图 2 表达蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig.2 Analysis of expressed protein by SDS-PAGE

1 : Expression of recombinant vector pGEX-4T-Hsp70-Gd in bacteria after induction ; 2 : Expression of recombinant vector pGEX-4T-Hsp70-Gd in bacteria not induction ; 3 : Protein marker ; 4 : Expression of vector pGEX-4T in bacteria after induction.

2.3 融合蛋白的纯化

常规条件下诱导表达的 Hsp70、gD 融合蛋白的大部分为不可溶蛋白, 以包涵体形式存在。经分离纯化后得到了分子量约 118kD 的目的蛋白(图 3)。

2.4 融合蛋白的 Western blot 分析

纯化蛋白经电泳并转印到 PVDF 膜上, 一抗为羊抗 HSV-2 gD 蛋白抗体, 二抗为 HRP 标记的抗羊 IgG 抗体, DAB 显色后在 Mr 为 118kD 处出现一着色条带, 其它部位不显色(图 4)。表明表达的融合蛋白活性良好。

2.5 γ -干扰素的检测

脾淋巴细胞与 gD 蛋白混合培养, 脾淋巴细胞中具有 gD 蛋白特异性的 T 细胞能够被活化, 释放

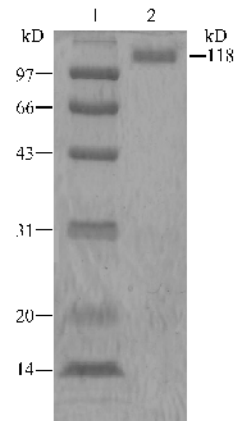


图 3 纯化蛋白的 SDS-PAGE

Fig.3 Analysis of purified protein by SDS-PAGE

1 :protein marker ; 2 :purified.

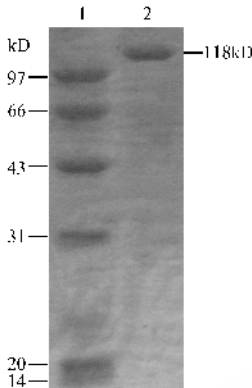


图 4 纯化蛋白的 Western blot

Fig. 4 Analysis of purified protein by Western blot

1 : purified protein ; 2 : protein marker.

γ -干扰素到培养上清中。 γ -干扰素的检测结果表明 ,GST-Hsp70-gD 组蛋白疫苗免疫的小鼠 其脾淋巴细胞与 gD 蛋白混合培养上清中 γ -干扰素的水平高于其它组 ($P < 0.05$) 结果见图 5。

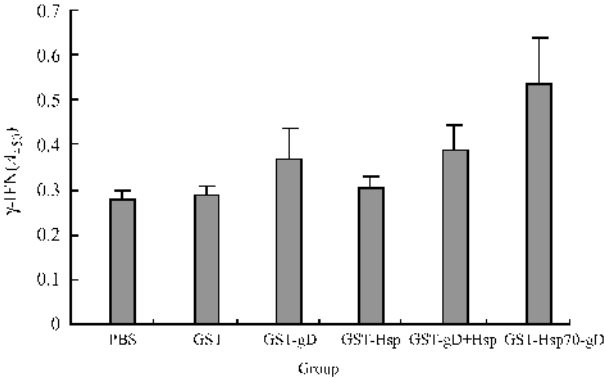


图 5 免疫小鼠 γ -干扰素的测定

Fig.5 Detection of γ -IFN of mice after immunization

2.6 HSV-2 gD 血清 IgG 抗体检测结果

为观察免疫小鼠血清中是否有针对 HSV-2 gD 蛋白的抗体 ,我们用单纯疱疹病毒 II 型 gD 蛋白为包被抗原 ,小鼠血清为一抗 ,羊抗鼠 HRP-IgG 为二抗 ,ELISA 法测定血清抗体。结果显示 ,gD 组、gD + Hsp70 组和 Hsp70-gD 组血清特异性抗体测值高于 PBS 组 ,差异有显著性 ($P < 0.05$) ;Hsp70-gD 组血清特异性抗体测值高于 gD + Hsp70 组、gD 组 ,差异有显著性 ($P < 0.05$) 。这表明 ,gD 蛋白免疫小鼠后可产生特异性抗体 ,Hsp70-gD 融合蛋白比 gD + Hsp70、gD 有更强的刺激小鼠产生针对特异性抗体的能力 ,结果见图 6。

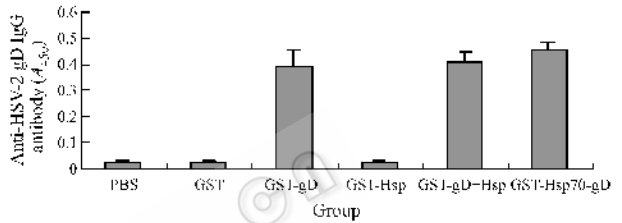


图 6 免疫小鼠血清 IgG 抗体的测定

Fig. 6 Detection of anti-HSV-2gD IgG antibody in serum after immunization

2.7 小鼠脾细胞增殖刺激指数测定结果

淋巴细胞的增殖能力是细胞免疫应答的一个重要指标。结果显示 ,gD 组、gD + Hsp70 组和 Hsp70-gD 组脾细胞增殖刺激指数高于 PBS 组 ,差异有显著性 ($P < 0.05$) ;Hsp70-gD 组脾细胞增殖刺激指数高于 gD + Hsp70 组、gD 组 ,差异有显著性 ($P < 0.05$) 。这表明从淋巴细胞的体外增殖能力来看 ,gD、gD + Hsp70、Hsp70-gD 蛋白免疫小鼠后可产生细胞免疫应答 ,Hsp70-gD 融合蛋白比 gD + Hsp70、gD 有更强的刺激小鼠产生细胞免疫应答的能力。这一结果与脾细胞体外分泌 IFN- γ 的水平相一致 结果见图 7。

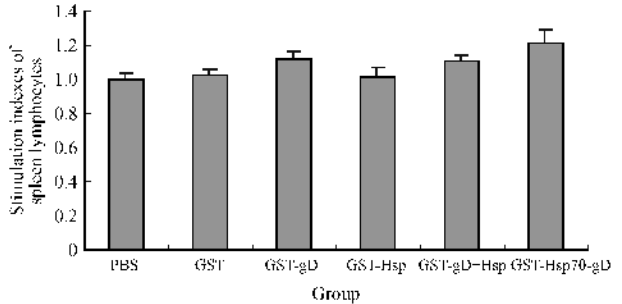


图 7 免疫小鼠脾细胞增殖的测定

Fig. 7 Detection of stimulation indexes of spleen lymphocytes after immunization

3 讨论

在防治 HSV-2 感染的方法中,疫苗是免疫治疗的重要手段之一。HSV 病毒蛋白中被普遍认为有免疫原性并能诱发保护性作用的是 gD、gB 糖蛋白,用基因工程方法将特异性糖蛋白编码基因克隆入表达载体表达,即可获得蛋白疫苗。试验证实蛋白疫苗能诱发机体产生中和抗体,不同程度地减低被病毒感染后的发病率和致死率^[5,6]。以 MF59 代替铝佐剂为免疫增强剂后,在动物和人体试验中抗体水平明显升高。Marc Dupuis 等用 HSV 的 gB、gD 重组蛋白疫苗并以 MF59 为佐剂在人体中进行了安全性免疫原性试验。结果表明,此疫苗可以在人体中产生与 HSV 自然感染相等或更强的体液免疫和细胞免疫^[7]。

Hsps 是一类在生物进化过程中高度保守、广泛存在于原核及真核生物的蛋白质。Hsps 能结合细胞内的其它蛋白质,介导其它蛋白质的折叠、装配、定标和转位;参与蛋白质水解,防止蛋白质聚集,在维持细胞正常结构和功能中起着重要的作用。近年来,Hsps 在疫苗研究领域也受到了重视。研究表明,Hsp70 蛋白可以作为一种蛋白载体分子,将抗原蛋白与 Hsp70 进行共价或非共价的连接,诱导产生抗原特异性的 T 细胞免疫反应。在 HIV-1 p24 与 Hsp70 的融合蛋白的研究中表明,Hsp70 能够增强 HIV-1 p24 的免疫原性,激活机体的细胞和体液免疫反应。Hsp70 诱导产生 T 细胞免疫,融合蛋白必须通过受体介导的入胞作用,融合蛋白进入细胞后,依赖与 Hsp70 的分子伴侣作用,促进与其融合的抗原的降解,使其形成的多肽顺利进入 MHC-I 类分子途径^[8,9]。

在以往的实验中,我们利用软件对 HSV-2 gD 蛋白的氨基酸序列做了分析,预测其抗原表位并克隆了该片段。在本实验中,我们构建了 HSV-2 gD 片段和 Hsp70 融合基因原核表达质粒,通过诱导表达,分离纯化,制备了 HSV-2 gD 片段和 Hsp70 融合蛋白。融合蛋白免疫小鼠后,可以刺激血清单纯疱疹病毒-2gD 蛋白抗体的产生、诱导脾淋巴细胞增殖及分泌 IFN- γ ,脾淋巴细胞刺激指数及其分泌 IFN- γ 水平、血清单纯疱疹病毒-2gD 蛋白抗体产生水平升高方

面均显著高于 gD + Hsp70 组、gD 组,差异有显著性。活化的辅助性 T 淋巴细胞按其功能和分泌细胞因子的不同至少可以分为两群:Th1 和 Th2。Th1 细胞可以分泌 γ -IFN 而不分泌 IL-4,主要介导细胞免疫应答;Th2 细胞可以分泌 IL-4 而不分泌 γ -IFN,主要介导体液免疫应答,通常以这两种细胞因子作为鉴别 Th1 和 Th2 的标志。本研究结果提示,我们表达的 HSV-2 gD 片段和 Hsp70 融合蛋白可以刺激小鼠产生有效的细胞免疫和体液免疫应答,为研究以 Hsp70 作为疫苗载体,HSV-2gD 为靶点的疫苗提供实验依据,并为其在临床的应用打下了基础。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Wendling U, Paul L, van der Zee R *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 Immunol*, 2000, **164**(5): 2711–2717
- [2] Wells AD, Malkovsky M. Heat shock proteins, tumor immunogenicity and antigen presentation: an integrated view. *Immunol Today*, 2000, **21**(3): 129–132
- [3] Xiao L(肖凌), Wei YZ(魏雅稚), Xia F(夏飞) *et al.* Construction of the fusion gene of Hsp65 of Mycobacterium tuberculosis and EGFP and preparation of dendritic cell vaccine against tuberculosis. *Journal of Cellular and Molecular Immunology* (细胞与分子免疫学杂志), 2005, **21**(1): 13–16
- [4] Li Z(李子健), Jin NY(金宁一), Jiang WZ(江文正) *et al.* Immune response to HIV22 gp105 DNA vaccine in mice. *Journal of Cellular and Molecular Immunology* (细胞与分子免疫学杂志), 2005, **21**(1): 86–89
- [5] Leung DT, Sacks SL. Current recommendations for the treatment of genital herpes. *Drugs*, 2000, **60**(6): 1329–1352
- [6] Stanberry LR, Cunningham AL, Mindel A *et al.* Prospects for control of herpes simplex virus disease through immunization. *Clin Infect Dis*, 2000, **30**(3): 549–566
- [7] Dupuis M, McDonald DM, Ott G. Distribution of adjuvant MF59 and antigen gD2 after intramuscular injection in mice. *Vaccine*, 1999, **18**(5–6): 434–439
- [8] Moroi Y, Mayhew M, Trecka J *et al.* Induction of cellular immunity by immunization with novel hybrid peptides complexed to hsp70. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**(7): 3485–3490
- [9] Suzue K, Young RA. Adjuvant-free hsp70 fusion protein system elicits humoral and cellular immune response to HIV p24. *J Immunol*, 1996, **156**(2): 873–879