

## 研究简报

# 猪流感病毒抗原表位基因表达载体构建与免疫原性分析

刘惠莉, 邢继兰, 潘洁, 杨秋峰, 赵艳敏

上海市农业科学院畜牧兽医研究所, 上海 201106

**摘要:** 根据猪流感病毒血凝素蛋白基因(Hemagglutinine, HA)的核苷酸序列, 设计、筛选 HA 蛋白氨基酸序列的主要表位多肽 4 个, 将 4 个片段以柔性连接串联成模拟蛋白, 核苷酸约为 300 bp, 体外扩增该模拟蛋白基因, 插入到原核表达载体 pET30a(+)中, 转染宿主菌诱导表达, 结果获得分子量为 20 kD 的表达蛋白, 该蛋白可与抗 His-tag 抗体、抗猪流感病毒 H1N1、H3N2 亚型高免血清发生免疫学反应。纯化后免疫小鼠, ELISA 及血凝抑制(Hemagglutinine inhibitor, HI)试验检测, 小鼠产生针对多肽抗原的血清抗体, 同时还可检测到 H1N1、H3N2 亚型 SIV 血凝抗体。流氏细胞仪检测免疫组外周血淋巴细胞高于对照组, 说明该模拟蛋白具有与 H1N1、H3N2 亚型猪流感病毒相似的免疫原性及反应原性, 为 H1N1、H3N2 血清亚型猪流感病毒疫苗研制提供了新手段。

**关键词:** 猪流感病毒, 抗原表位, 新型疫苗

## Construction and Immunogenicity Analysis of Antigenic Epitopes of Swine Influenza Virus

Huili Liu, Jilan Xing, Jie Pan, Qiufeng Yang, and Yanmin Zhao

Institute of Animal Science and Veterinary Medicine, Shanghai Academy of Agricultural Science, Shanghai 201106, China

**Abstract:** Several antigen epitopes were designed according to the sequences of Swine influenza virus hemagglutinin (HA) genes and lined with the interval. The gene was amplified by PCR and sub cloned into pET30a (+) vector. The fusion protein was expressed in *E. coli* BL21 (DE3) by induced with IPTG and purified by affinity chromatography. The molecular weight of the protein was about 20 kD in SDS-PAGE. Immunological activity of the fusion protein was analyzed by Western blot. The results showed that the fusion protein could interact with anti-His antibody and the rabbit antiserum against SIV. The immunized mouse can produced antibodies against the target peptide and HI antibody against SIV H1N1 or H3N2. This study provides a new vaccine candidate for SIV.

**Keywords:** swine influenza virus, antigen epitopes, new vaccine

我国动物流感病毒流行广泛, 且无商品化的猪流感病毒疫苗, 因此急需加强研究, 及早作好技术储备。由于动物流感病毒高度的变异性, 毒株间发生重组的机率非常高, 因而采用活病毒做疫苗潜在风险很大。而以病毒完整基因片段为免疫原的重组

活病毒载体苗, 携带的基因, 也存在交叉重组等安全性问题<sup>[1-3]</sup>。而灭活疫苗的缺点是, 保护性抗体持续期短, 抗体水平不高<sup>[4]</sup>。因此设计开发理想的动物流感病毒疫苗是令人关注的领域。

表位疫苗是亚单位疫苗的一种, 但在疫苗设计

Received: August 23, 2007; Accepted: November 16, 2007

Supported by: Science and Technology Commission of Shanghai(No. 053919116).

Corresponding author: Huili Liu. Tel: +86-21-62208660-3334; Fax: +86-21-62207858; Email: huilil@163.com

上海市科委重点科技攻关项目(No. 053919116)资助。

上突破了以整个基因为目的片段的局限,而是通过表达机体 MHC 系统识别的线性肽段,刺激机体产生保护性免疫应答。表位疫苗的优点是:由于表位片段短,表达产物分子量小,为插入合适的免疫增强因子进行联合表达提供了非常大的空间;可同时设计含有 T、B 细胞表位疫苗,诱导机体系统的免疫反应;最重要的是比活载体苗、DNA 疫苗安全,不会存在基因整合、重组等问题<sup>[5,6]</sup>。血凝素蛋白基因(Hemagglutinine, HA)是动物流感病毒主要免疫原蛋白,且含有多个抗原表位,可诱导产生针对 HA 蛋白的中和抗体。

研究设计并串联了猪流感病毒 H1N1、H3N2 亚型 HA 基因 T、B 细胞表位抗原,并在原核系统中进行表达,对表达蛋白生物学活性、免疫原性进行了分析,以期猪流感病毒新型疫苗研制开发奠定基础,达到同时控制 H1N1、H3N2 亚型猪流感病毒的目的。

## 1 材料与方法

### 1.1 表位设计与筛选

采用软件分析 H1N1、H3N2 亚型 HA 基因序列,结合文献研究报道,筛选出 SIV H1N1 HA 基因 B 细胞表位 1 个、H3N2 B 细胞表位 1 个;HA 基因 T 细胞表位各 1 个,通用 T 细胞表位 1 个,抗原表位与通用表位间以柔性氨基酸片段连接,根据氨基酸序列推出核苷酸序列,基因由上海生工生物公司合成,序列长约 300 bp。

### 1.2 串联表位基因的获得

根据合成序列,设计一对引物,体外扩增合成序列,并在 5' 和 3' 端分别引入酶切位点 *Nco* I/*Hind* III。

### 1.3 全基因体外扩增与克隆

按照 PCR 扩增体系加入如下成分:10×PCR Buffer 5.0  $\mu$ L, 10 mmol/L dNTP 4.0  $\mu$ L, 上游引物 1.0  $\mu$ L, 下游引物 1.0  $\mu$ L, 模板 1  $\mu$ g, ExTaq 0.5  $\mu$ L, 用灭菌去离子水补足体积为 50  $\mu$ L, 按如下条件循环:94°C 2 min, 然后 94°C 30 s 55°C 30 s, 72°C 30 s, 进行 30 个循环,再 72°C 延伸 10 min, 结束反应,取 5~10  $\mu$ L PCR 产物电泳观察结果。

### 1.4 表达载体构建

体外 PCR 产物、PET30(a<sup>+</sup>)载体分别经 *Nco* I/*Hind* III 双酶切,产生粘性末端,连接,构建 PET30a(+)

表达载体,转化 DH5 $\alpha$  宿主菌,PCR 筛选阳性重组体,并经测序以证实阅读框架是否正确。

### 1.5 重组蛋白诱导表达

获得的阳性重组质粒,转化 BL21 感受态,挑取单个菌落,接种 LB 液体培养基,加入适当 Kana,培养 OD 值为 0.5~0.8 时,加终浓度为 0.01 mol/L 的 IPTG, 37°C 诱导,加入诱导剂后每隔 1 h 取样,SDS-PAGE 电泳检测蛋白表达情况。

### 1.6 诱导表达条件优化

分别采用不同诱导时间、不同培养基成分进行诱导表达,根据诱导蛋白表达情况,确定最佳诱导条件。

### 1.7 表达蛋白鉴定

诱导表达蛋白,SDS-PAGE 电泳,利用 Western blot 检测与抗 His-tag 抗体、SIV 高免血清的免疫学反应。

### 1.8 重组表达蛋白纯化

采用亲和层析法,变性条件下过柱纯化表达蛋白,纯化蛋白经复性后,BCA 法定量,备用。

### 1.9 免疫动物

6 周龄 BALB/c 小鼠,随机分成 2 组,每组 6 只,每只小鼠 50  $\mu$ g 量接种/次,对照组接种等体积生理盐水。首免时重组蛋白与等体积的氟氏完全佐剂乳化后皮下多点注射;间隔 10 d 进行第二次免疫,用等体积的氟氏不完全佐剂乳化免疫原蛋白。

### 1.10 样品采集及指标测定

初免前,及每次免疫后 7 d 尾部采血,收集血清,检测血清抗体;同时以肝素为抗凝剂,采血 100~150  $\mu$ L,由上海交通大学第二医科大学生理教研室采用流式细胞仪检测外周血 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> 淋巴细胞含量变化。

## 2 结果

### 2.1 基因扩增与鉴定

设计及推导的氨基酸序列见图 1。根据合成基因序列,体外扩增,获得了与预期大小一致的约 300 bp 的基因片段,该片段经双酶切,连接到 PET30(a)载体,PCR 鉴定,成功获得了含有外源目的基因的重组质粒(图 2A、2B)。

利用 IPTG 诱导表达,获得了分子量为 20 kD 的蛋白带,在菌体浓度 OD 值为 0.6~0.8, IPTG 终浓度 0.01 mmol/L,诱导 4~5 h,表达蛋白量最高(图 3)。

ATGGCTAGCTCGTGGTCTTATATTGTGGAAACCTCTAACTCGGATAATGGCACCTGTTAT  
M A S S W S Y I V E T S N S D N G T C Y  
(HA1 T cell epitope)  
GCGGCGTATGGTGGCGGTCTGCCGTTTCAGAATATTCATCCGGTGACCATTGGCGAAGCG  
A A Y G G G L P F Q N I H P V T I G E A  
(HA1 B cell epitope)  
GCGTATGGTGGCGGTATTGCGATGGCTTTTCAGAATGAAAAATGGGATCTGTTTGTGGAA  
A Y G G G H C D G F Q N E K W D L F V E  
(HA3 T cell epitope)  
CGCAGCAAAGCGGCGTATGGTGGCGGTGATAAACCGTTTCAGAATGTGAATAAAATCACC  
R S K A A Y G G G D K P F Q N V N K I T  
(HA3 B cell epitope)  
TATGGCACCTGCCACCGTGCCAGCGCCACAAGCTTGCGGCCGCACTCGAGCACCACCACCA  
Y G T C P P C P A P Q A C G R T R A P P P

图 1 SIV H1N1、H3N2 亚型表位抗原基因序列及推导氨基酸序列  
Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequence of the antigen epitopes of SIV

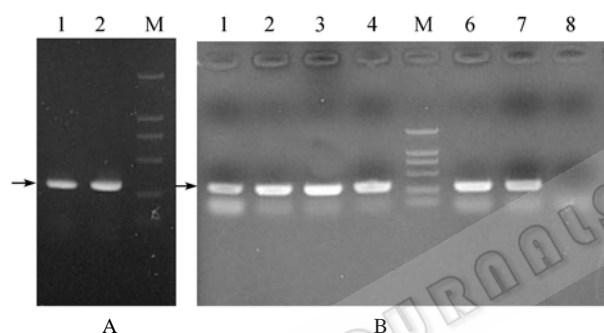


图 2 合成基因体外扩增与重组质粒鉴定结果  
Fig. 2 PCR amplification and characterization of recombinant

(A) 1, 2: PCR amplification of the target gene; (B) 1~7: positive recombinant; 8: negative plasmid; M: DL2000 molecular marker (100 bp, 250 bp, 500 bp, 750 bp, 1000 bp, 2000 bp); arrow indicates the 300 bp target gene

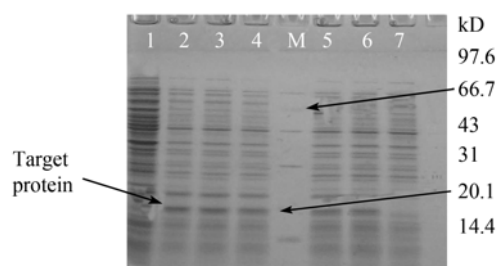


图 3 重组蛋白原核表达

Fig. 3 Expression of the recombinant protein

1: uninduced sample; 2~6: induced sample with different time;  
7: induced sample with no plasmid

表达蛋白的纯化: 该表达载体含有 His-tag 多肽, 采用亲和层析方法在变性条件下洗脱, 获得了较好

纯化效果(图 4)。

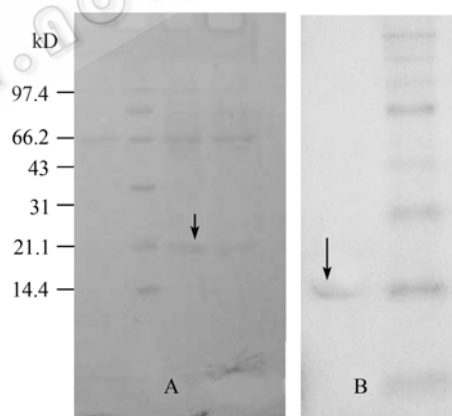


图 4 蛋白纯化与 Western blotting 检测

Fig. 4 Purification and Western blotting of recombinant protein

A: purification of the protein; B: immuno-detection of protein with anti His-tag antibody; arrow indicates the target gene

Western blotting 检测, 表达蛋白可与抗 His-tag、抗 H1N1 和 H3N2 亚型 SIV 高免疫血清发生免疫学反应, 产生特异性反应带(图 5)。

## 2.2 血清抗体监测

处理组针对重组蛋白免疫抗体监测结果: 随着免疫次数增加, 重组蛋白处理组免疫抗体水平上升明显, 与对照组差异显著(图 6)。

按照血凝及血凝抑制试验方法, 检测针对 SIV H1N1、H3N2 血清抗体水平, 对照组 HI 效价显著低于重组蛋白免疫组(表 1)。

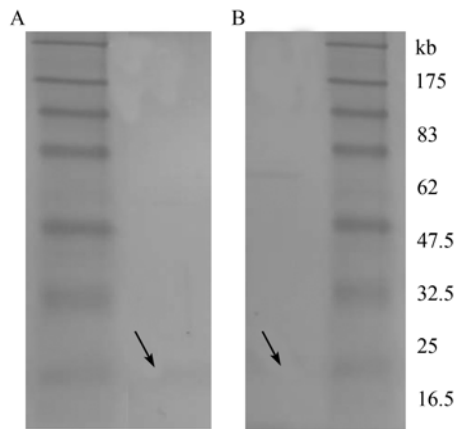


图 5 重组蛋白 Western blotting 检测

Fig. 5 Western blotting of recombinant protein

A: immuno-detection of protein with anti SIV H1N1 positive serum;  
B: immuno-detection of protein with anti SIV H3N2 positive serum;  
arrow indicates the target band

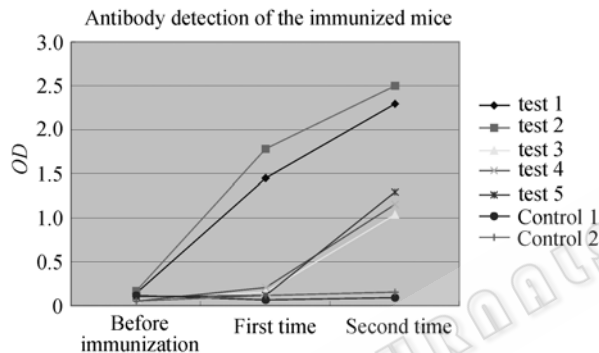


图 6 不同处理组抗体监测结果

Fig. 6 Antibody detection of the immunized mice (arrow means the control) Arrow indicates the negative control

Table 1 HI titer of the different groups

	H1N1 antibody			Average	H3N2 antibody			Average
Control	2 <sup>0</sup>			2 <sup>0</sup>	2 <sup>1</sup>			2 <sup>1</sup>
EP1	2 <sup>4</sup>	2 <sup>3</sup>	2 <sup>4</sup>	2 <sup>3.7</sup>	2 <sup>3</sup>	2 <sup>3</sup>	2 <sup>5</sup>	2 <sup>3.7</sup>

### 2.3 外周血淋巴细胞检测结果

采用抗小鼠 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>荧光标记的抗体直接标记外周血中 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>淋巴细胞含量，上流氏细胞仪检测，结果见表 2。

Table 2 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> detection by flow cytometer

CD4 <sup>+</sup>	1	2	3	4	5	Average
EP1	40.28	41.54	38.82	27.95	40.78	37.876
Control	34.48	47.2				40.84
CD8 <sup>+</sup>						
EP1	54.19	52.89	58.35	66.44	55.32	57.438
Control	54.46	45.85				50.155

## 3 结果与讨论

近年来采用生物学方法对动物流感病毒新型疫苗进行了许多研究，如采用病毒提纯蛋白、重组病毒活载体疫苗、构建嵌合病毒等<sup>[7-11]</sup>，直接提取病毒蛋白费用昂贵，而采用活载体疫苗，病毒基因片段仍然存在交叉重组的潜在危险。而表位疫苗的研究逐渐成为人们关注的焦点。以重组表位抗原作为新型疫苗研制，安全性好，且适合研制多价疫苗，可针对动物流感病毒各种血清亚型，而且还可以整合佐剂因子或串联多拷贝基因达到提高免疫效果的目的<sup>[12,13]</sup>。

研究成功构建表达了含有 SIV H1N1、H3N2 亚型 HA 基因 T、B 抗原表位的模拟蛋白，构建的串联表位基因，包含了来源于 SIV H1N1、H3N2 HA 基因的 T、B 表位抗原，可同时诱导机体 T、B 淋巴细胞反应，具备理想疫苗的特性。且串联了通用 T 细胞表位，可诱导机体 Th 细胞免疫学反应，以充分调动全身免疫系统，最大限度发挥机体免疫效果。Jeon<sup>[5]</sup>等串联表达了 HA、NP 蛋白 B 细胞的表位、辅助性 T 细胞的表位和细胞毒性 T 细胞表位，将此翻译肽段免疫小鼠后产生了体液免疫和辅助性 T 细胞反应，小鼠可抵抗致死性病毒的攻击，并迅速得以康复。另外的一项研究通过合成针对 NP 细胞毒性 T 淋巴细胞反应表位的多肽与抗 CD40 单克隆抗体混合，经脂质体包装后鼻腔接种小鼠。结果可有效刺激产生保护性抗病毒 CTL 反应，而且可引发黏膜免疫反应，减少病毒在肺内的复制。童光志等<sup>[14]</sup>构建了含禽流感病毒 HA、NP 基因表位表达载体，对雏鸡免疫并攻毒，存活鸡 HI 抗体效价显著增高，流式细胞仪检测显示外周血 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 细胞在免疫后都有不同程度的升高，对 H5N1 强毒攻击保护达 50% 以上。金宁一等<sup>[6]</sup>串联表达和动物流感 HN、NA 抗原表位，免疫小鼠，ELISA 检测具有较好的免疫原性，为进一步探讨其作为表位疫苗的可行性奠定了基础。Stoloff<sup>[15]</sup>等通过合成多个表位，拟研制对各种血清亚型流感病毒均有效果的通用疫苗，为预防控制流感病毒大流行做好了技术储备。

一般认为，在流感病毒变异性不大时。血清的 HI 抗体水平能大体反映动物免疫水平。抗体水平与免疫保护力在一定范围内呈正相关，从本研究结果来看，在重组表达蛋白免疫 BABL/c 小鼠后 7 d，HI

抗体滴度高于对照组,这一结果表明。重组蛋白具有与 SIV 相似的免疫原性,虽然 HI 效价不是很高,但可能与接种蛋白剂量及复性效果有关,如何获得理想的免疫效果,还需更进一步研究。

机体参与免疫应答的细胞免疫反应主要为 T 淋巴细胞,血液中有不同标志,如 CD4、CD8 等 T 细胞为免疫检测主要指标。CD8 是重要的细胞毒性 T 淋巴细胞亚群,其配体是 MHC I 类分子,CD8 与 MHC I 类分子结合,可以稳定 MHC I 类分子限制的 T 细胞(主要是 CTL)与带有 MHC I 类分子与抗原复合物的靶细胞结合,同时参与细胞信号传导途径,进而启动 MHC I 类限制性 T 细胞的免疫应答。

CD4 是细胞表面单链蛋白,其抗原可与 MHCII 类分子相互作用,与 MHCII 类抗原结合,增强与抗原提呈细胞(APC)或靶细胞的结合,促进 T 细胞识别抗原,参与细胞激活的信号传递。另 CD4 还可参与细胞内信号传导作用。

EP1 蛋白免疫组诱导 T 淋巴细胞免疫反应时,外周血监测以 CD<sup>+</sup>8 细胞增加较明显,而 CD<sup>+</sup>4 细胞数量未有明显增多。因此,注射免疫原后可能主要刺激的为细胞毒性 T 细胞亚群、自然杀伤性 T 淋巴细胞的活化:抗原经过 MHC I 类分子提呈,被 CTL、NK 识别,发挥攻击和杀伤作用。虽然研究使用的动物数量及免疫监测指标有限,相关免疫学指标还有待深入研究,但以上研究初步证实了构建的 SIV 多表位抗原基因可诱导小鼠产生体液和细胞免疫反应,为 SIV 新型疫苗研制提供了新思路。

## REFERENCES

- [1] Operschall E, Pavlovic J, Nawrath M, *et al.* Mechanism of protection against influenza A virus by DNA vaccine encoding the hemagglutinin gene. *Intervirology*, 2000, **43** (4-6): 322-330.
- [2] Kretzschmar E, Buonocore L, Schnell MJ, *et al.* High-efficiency incorporation of functional influenza virus glycoproteins into recombinant vesicular stomatitis viruses. *J Virol*, 1997, **71**(8): 5982-5989.
- [3] Tang M, Harp JA, Wesley RD. Recombinant adenovirus encoding the HA gene from swine H3N2 influenza virus partially protects mice from challenge with heterologous virus: A/HK/1/68 (H3N2). *Arch Virol*, 2002, **147**(11): 2125-2141.
- [4] Lim YK, Takada A, Tanizaki T, *et al.* Mucosal vaccination against influenza: protection of pigs immunized with inactivated virus and ether-split vaccine. *Japan J Vet Res*, 2001, **48**(4): 197-203.
- [5] Jeon SH, Ben-Yedidia T, Arnon R. Intranasal immunization with synthetic recombinant vaccine containing multiple epitopes of influenza virus. *Vaccine*, 2002, **20**(21-22): 2772-2780.
- [6] Chen YF, Jin NY, Jia LL, *et al.* Construction of multiple epitope rFPV against H3, H5, H7, H9 Subtype influenza A Virus. *Immunological Journal*, 2007, **5**(23): 524-527.  
陈义锋, 金宁一, 贾雷立, 等. H3、H5、H7、H9 亚型流感病毒通用多表位重组鸡痘病毒构建. 免疫学杂志, 2007, **5**(23): 524-527.
- [7] Johansson BE, Pokorny BA, Tiso VA. Supplementation of conventional trivalent influenza vaccine with purified viral N1 and N2 neuraminidases induces a balanced immune response without antigenic competition. *Vaccine*, 2002, **20**(11-12): 1670-4.
- [8] Mitchell KA, Lawrence BP. T cell receptor transgenic mice provide novel insights into understanding cellular targets of TCDD: suppression of antibody production, but not the response of CD8 (+) T cells, during infection with influenza virus. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2003, **192**(3): 275-286.
- [9] Huckriede A, Bungener L, Stegmann T, *et al.* The virosome concept for influenza vaccines. *Vaccine*, 2005, **8**, **23**(Suppl 1): S26-38.
- [10] Li ZN, Mueller SN, Ye L, *et al.* Chimeric influenza virus hemagglutinin proteins containing large domains of the Bacillus anthracis protective antigen: protein characterization, incorporation into infectious influenza viruses, and antigenicity. *J Virol*, 2005, **79**(15): 10003-10012.
- [11] Stech J, Garn H, Wegmann M, *et al.* A new approach to an influenza live vaccine: modification of the cleavage site of hemagglutinin. *Nat Med*, 2005, **11**(6): 683-689.
- [12] Haigh O, Guo H, Edgton K, *et al.* Multiple copies of a tumor epitope in a recombinant hepatitis B surface antigen (HBsAg) vaccine enhance CTL responses, but not tumor protection. *Virology*, 2007, **11**(368): 363-375.
- [13] Marazuela EG, Rodríguez R, Fernández-García H. Intranasal immunization with a dominant T-cell epitope peptide of a major allergen of olive pollen prevents mice from sensitization to the whole allergen. *Mol Immunol*, 2007, **2008**, **1**(45): 438-445.
- [14] Peng JM, Tong GZ, Wang YF, *et al.* Multi-epitope DNA vaccines against avian influenza in chickens. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2003, **9**(19): 623-627.  
彭金美, 童光志, 王云峰, 等. 抗禽流感病毒多表位 DNA 疫苗的构建及其免疫效力研究. 生物工程学报, 2003, **9** (19): 623-627.
- [15] Stoloff GA, Caparros-Wanderley W. Synthetic multi-epitope peptides identified in silico induces protective immunity against multiple influenza serotypes. *Eur J Immunol*, 2007, **37**(9): 2441-2449.