

以免疫球蛋白为载体的抗 O 型口蹄疫病毒基因工程疫苗的构建

赵 凯 陈光辉 张震宇 严维耀 郑兆鑫*

(复旦大学生命科学院遗传工程国家重点实验室,上海 200433)

摘 要 以自体免疫球蛋白作为外源抗原的载体来研制疫苗是一条研制安全、高效疫苗的新途径。将猪 IgG H 链基因中的 CDR3 区缺失,剩余的两个片段分别连接到 pBluescript II SK(+) 和 pBluescript II KS(+) 上,其中一片段再与编码 FMDV VP1 两个拷贝的 141~160 位氨基酸残基和一个拷贝的 200~213 位氨基酸残基构成的串联片段 20AA~14AA~20AA 的核苷酸片段相连。然后将它们切下与质粒表达载体 p^{ET}_{28b} 相连,构建出融合表达质粒 p^{ET}_{28b}-FH,经限制酶酶解及 DNA 序列分析证明该融合基因各连接点及读框正确。转入大肠杆菌 BL21(DE3)_{plysS} 表达出一分子量为 64kD 的蛋白质。经 ELISA 检验证明,大肠杆菌细胞中表达的融合蛋白有 O 型 FMDV 抗原活性。将该融合蛋白肌肉注射免疫豚鼠和猪,攻毒实验表明,疫苗 p^{ET}_{28b}-FH 对豚鼠产生了保护作用,保护率为 66%,对猪也有保护作用。

关键词 FMDV 基因工程疫苗 自体免疫球蛋白 猪的 IgG H 链

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)06-0679-05

口蹄疫病毒病是一种高度传染性的家畜病毒性疾病,对畜牧业有极大的危害。研究新型的安全、有效的遗传工程疫苗,控制该病流行是一项极为重要的研究方向。随着对口蹄疫病毒的分子免疫学研究的深入发展,发现 VP1 蛋白的 141~160 位和 200~213 位氨基酸序列是决定口蹄疫病毒免疫原性的主要抗原决定簇片段。郑兆鑫等^[1]构建重组质粒 pXZ500,其中含有编码 O 型口蹄疫病毒外壳蛋白中 141~160 位氨基酸和 200~213 位氨基酸的串联基因,并证明该基因在大肠杆菌细胞中表达的抗原蛋白具有很强的免疫原性,可作为抗 O 型口蹄疫病毒的疫苗。为了构建这种基因工程疫苗,增强免疫原性,必须将抗原决定簇与大分子的载体蛋白相连。但是,用作载体的蛋白如果选择不当可能会对动物产生毒性。因此, Bond^[2]提出用自体蛋白作为外源抗原的载体蛋白来研制疫苗。在自体蛋白中, IgG H 链分子最为理想。(1)由于 IgG H 链 FC 片段具有 APC 受体作用,可以专一性地被不同 APC 所摄取;(2)取代 CDR3 区的外源片段,可以暴露于 IgG H 链分子的表面;(3)IgG 在体内半衰期长达 2~3 周,

另外,如用免疫动物的自体 IgG H 作为载体蛋白,因其是自体蛋白,一般对自体不会产生免疫排斥反应,不影响疫苗的重复使用。因此,用自体 IgG H 作为外源抗原的载体来研制疫苗,不仅高效而且安全。为了提高疫苗的免疫原性,我们改用猪 IgG H 链蛋白作为载体,与口蹄疫病毒(Food-and-Mouth Virus)VP1 中两个拷贝的 141~160 位氨基酸残基和一个拷贝的 200~213 位氨基酸残基构成的串联片段 20AA~14AA~20AA 相连接使其取代猪 IgG H 链的 CDR3 区构成融合蛋白疫苗。以豚鼠和猪作为动物模型来研究该疫苗的免疫效果,为研制高效安全的抗口蹄疫病毒的基因工程疫苗提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 动物、病毒株及质粒 豚鼠购自第二军医大学实验动物中心。动物实验用猪系长白猪,购自甘肃省武威地区。口蹄疫病毒为 O 型毒株。质粒 pBS-SH(含猪全长 IgG H 链基因,参见文献[3]), pXZ500(含与大肠杆菌 β -半乳糖苷酶融合的 O 型

收稿日期 2000-04-17,修回日期 2000-08-25。

基金项目 科技部生物工程中心中试开发处下达的 863 课题(1997210)。

* 联系人。其他作者:孙理云 盛祖恬 浙江农业科学院病毒研究室 杭州 310021;尤永进 徐泉兴 上海农业科学院畜牧兽医研究所,上海 201106;朱彩珠 冯霞 张强 卢永干 农业科学院兰州兽医研究所,兰州 730046。

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

FMDV VP1 抗原决定簇串联片段 20AA~14AA~20AA, 见文献[1], pBluescript II SK(+), pBluescript II KS(+) 和 p^{ET}_{28b} -FH 和大肠杆菌 XL-1 blue cell JM109 和 BL21(DE3) plysS 等均为本实验室保存。

1.1.2 限制酶及其它试剂 均购自华美生物工程公司, Promega 公司, Bio-Lab 公司和 Boehringer Mannheim 公司。标准 O 型 FMDV 抗原和 O 型 FMDV 标准阳性血清为兰州畜牧兽医所提供, 羊抗豚鼠 HRP-IgG 为 Sigma 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 DNA 操作 基本上参照文献[4]。

1.2.2 基因表达 基本上参照文献[4]。

1.2.3 斑点 ELISA 试验 基本上参照文献[5]。

1.2.4 攻毒试验 按常规方法制备疫苗。取 8 周龄豚鼠, 股内侧肌肉注射 0.25mL 含 400 μ g p^{ET}_{28b} -FH 融合蛋白, 2 周后同样途径加强 1 次, 对照组不作免疫。第一次免疫后 6 周用 0.2mL 100ID₅₀ 的口蹄疫病毒攻击。2 周内观察豚鼠发病情况。猪的攻毒实验采用无病毒感染的甘肃长白猪, 体重约 20kg。免疫 2 次, 第一次免疫剂量为 3mL 含 1.5mg p^{ET}_{28b} -FH 融合蛋白, 二周后再以相同剂量增强一次。第一次免疫后 63d 用 2mL 50ID₅₀ 的口蹄疫病毒攻击, 2 周内观察猪的发病情况。

2 结果

2.1 表达质粒 p^{ET}_{28b} -FH 的构建

2.1.1 PCR 扩增 DNA 片段 PCR 用 Tag plus II 酶从质粒 pBS-SH 上扩增出片段 I 和片段 III, 扩增引物分别为: P_1^+ 5'GCG ACG CGT TCT TGC ACA GTA ATA GCG3'(5'端含 Mlu I 位点) 和 P_2^- 5'GTA ATA CGA CTC ACT ATA GG3', P_3^+ 5'CTT TTT AAA TGG GGC CCA GGC GTT GAA GTC3' 和 P_4^- 5'GCG CAA TTA ACC CTC ACT AAA GG3'。片段 I 长 438bp, 含有已缺失了的 CDR3 的 IgG H 链的 V 区。片段 III 长 1130bp, 含有 IgG H 链的 J 区和 C 区。从质粒 pXZ500 上扩增出片段 II, 扩增引物为 P_5^+ 5'GCG ACG CGT ATG GTA CCA AAC CTG CGT G3'(5'端含有 Mlu I 位点) 和 P_6^+ 5'CGG GAT CCT GGC AGA GTA CGA GCA AC3'(5'端含有 BamH I 位点)。产物为 2 个, 大片段称之为片段 II, 长 211bp, 含有 FMDV VP1 免疫活性肽串联基因(20AA~14AA~20AA)。小片段长 78~86bp, 只

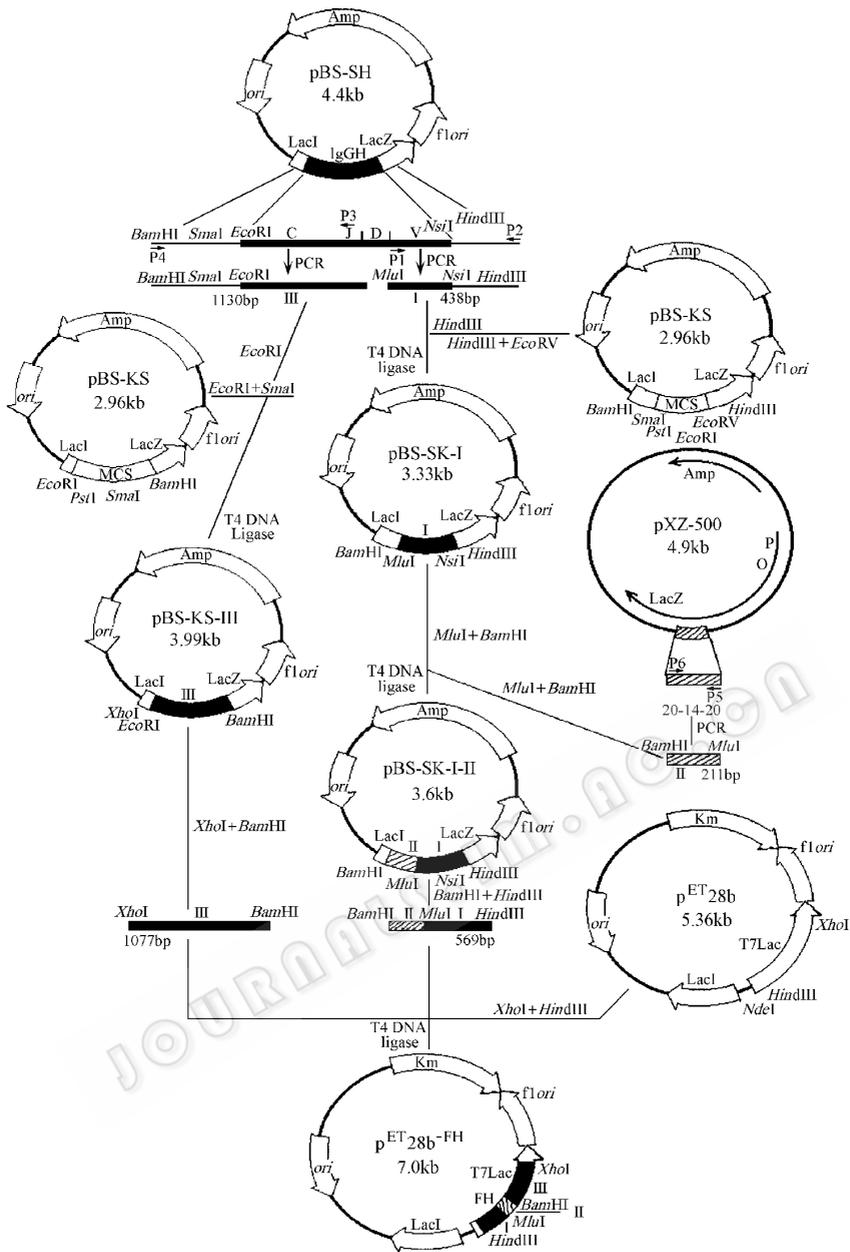
含一个 20AA 肽段基因。因 PCR 扩增 DNA 所用的酶为混合酶, 除了 Tag 酶外, 还有一种 3'-5'的外切核酸校正酶, 因而片段 I、II、III 大部分为平端。

2.1.2 表达质粒 p^{ET}_{28b} -FH 的构建 将 PCR 产物片段 I 用 Hind III 酶切, 分离出 384bp 的 IgG H 链 V 区片段(缺少 CDR3 区), 插入到 pBS-SK 的 Hind III 和 EcoR V 位点, 构成重组质粒 pBS-SK-I。将片段 II 用 Mlu I 和 BamH I 酶切, 分离出 200bp 的片段(含有 FMDV VP1 免疫活性串联片段 20AA~14AA~20AA 核苷酸序列), 插入到质粒 pBS-SK-I 上, 片段 I 上游的 Mlu I 和 BamH I 位点, 将片段 I 和片段 II 连接起来, 构成重组质粒 pBS-SK-I-II。再将片段 III 用 EcoR I 酶切, 分离出 1035bp 含 IgG H 链完整 J 和 C 区的片段, 插入到 pBS-KS 的 EcoR I 和 Sma I 位点, 将片段 III 方向调整与片段 I+II 的方向一致, 同时利用载体 pBS-KS Sma I 下游的 BamH I 位点, 这样构成重组质粒 pBS-KS-III。最后用 BamH I 和 Hind III 酶切重组质粒 pBS-SK-I-II, 分离出片段 I+II, 用 Xho I 和 BamH I 酶切重组质粒 pBS-KS-III, 分离出片段 III, 将片段 I+II 和片段 III 与 Hind III 和 Xho I 酶切的表达载体 p^{ET}_{28b} 一起共同组建表达载体 p^{ET}_{28b} -FH, 如图 1。该表达质粒的启动子为 T71ac, 启动子下游为融合抗体基因 FH, 长 1644bp。它由三部分组成, 前面部分为猪 IgG H 链的 V 区(缺少 CDR3), 中间部分为已取代 IgG H 链 CDR3 区的 FMDV VP1 免疫活性片段 20AA~14AA~20AA 的核苷酸序列, 后面部分为 IgG H 链的 J+C 区。

2.1.3 表达质粒 p^{ET}_{28b} -FH 的鉴定 用限制酶酶切分析证明各片段已正确连接到质粒 p^{ET}_{28b} 上, 部分序列分析证明质粒 p^{ET}_{28b} -FH 上各片段连接位点正确, 融合基因读框正确。

2.2 FMDV 的 VP1 蛋白中串联免疫活性肽基因与 IgG H 链融合基因的表达

将融合表达质粒 p^{ET}_{28b} -FH 转入表达宿主菌 BL21(DE3) plysS 中, 用 IPTG 诱导表达, 同时做对照宿主菌 BL21(DE3) plysS 和原始质粒菌株 p^{ET}_{28b} [BL21(DE3) plysS] 的表达。图 2 示表达产物的 SDS-PAGE 电泳。从图上可以看出 p^{ET}_{28b} -FH 表达质粒已表达出 1 分子量为 64kD 的蛋白质。经凝胶扫描成像系统分析, 融合蛋白的表达量约占菌体总蛋白的 10%。进一步鉴定, 表达的融合抗体是以包涵体形式存在。

图1 表达质粒 p^{ET}_{28b} -FH 的构建Fig.1 Construction of expression plasmid p^{ET}_{28b} -FH

2.3 64kD 融合蛋白的免疫原性鉴定

图3的ELISA结果说明。阳性对照1产生了较浓的颜色,表达质粒菌株 p^{ET}_{28b} -FH [BL21(DE3)plysS]的表达产物2也产生了较浓的颜色,阴性对照3颜色很淡。1和2比阴性对照3颜色差别显著。因此,ELISA结果表明由重组质粒 p^{ET}_{28b} -FH 表达的融合蛋白具有O型FMDV的免疫原性。

2.4 攻毒实验

2.4.1 重组疫苗 p^{ET}_{28b} -FH 对豚鼠的保护作用 经疫苗 p^{ET}_{28b} -FH 免疫2次的豚鼠,用100ID₅₀O型

FMDV毒株进行攻击,表1结果说明,用疫苗 p^{ET}_{28b} -FH 免疫的豚鼠获得了良好的保护作用,保护率为66%。

2.4.2 重组疫苗 p^{ET}_{28b} -FH 对猪的保护作用 经疫苗 p^{ET}_{28b} -FH 免疫2次的长白猪,在第一次注射疫苗后63d用50ID₅₀O型FMDV毒株进行攻击,分别在72、96、120、144、186和240h后检测发病情况。表2结果指出,用疫苗 p^{ET}_{28b} -FH 免疫的长白猪与对照相比发病时间推迟6d,说明本疫苗有一定的保护效果。

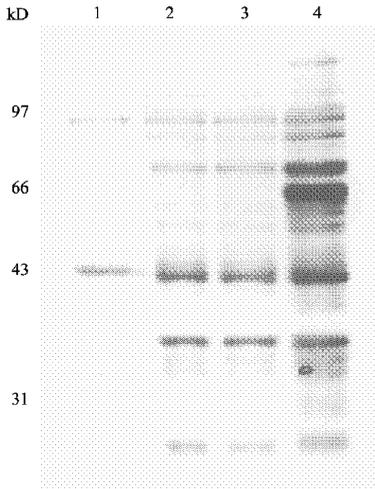


图2 表达质粒菌株 p^{ET}_{28b} -FH [BL21(DE3) plysS] 的表达产物 SDS-PAGE 检测

Fig.2 SDS-PAGE of expressing products of expression vector p^{ET}_{28b} -FH [BL21(DE3) plysS]

1. Protein Marker ; 2. Control host BL21(DE3) plysS ;
3. Control p^{ET}_{28b} [BL21(DE3) plysS] ;
4. p^{ET}_{28b} -FH [BL21(DE3) plysS] .

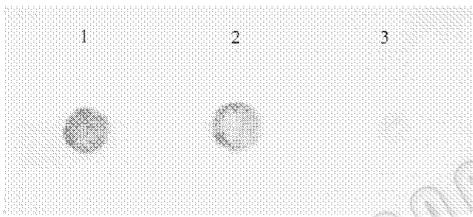


图3 p^{ET}_{28b} -FH 质粒的表达产物 ELISA 检测

Fig.3 ELISA assay of expression products of p^{ET}_{28b} -FH [BL21(DE3) plysS]

1. Positive control (inactivated FMDV O Type) ; 2. Expression products of p^{ET}_{28b} -FH [BL21(DE3) plysS] ; 3. Negative control (expression products of host BL21(DE3) plysS)

表1 重组疫苗 p^{ET}_{28b} -FH 对豚鼠的保护作用

Table 1 Immunization of guinea Pigs with the vaccine of p^{ET}_{28b} -FH

Group	Virus challenge (ID 50)	Number protected	Protect rat/ %
Control	100ID ₅₀	0/6	0
p^{ET}_{28b} -FH	100ID ₅₀	4/6	66

表2 重组疫苗 p^{ET}_{28b} -FH 对猪的保护作用

Table 2 Protection data from swine immunized with p^{ET}_{28b} -FH vaccine

t/h	72	96	120	144	168	240
Control	0/3	1/3	3/3	3/3	3/3	3/3
Number of ailing animals/total number						
p^{ET}_{28b} -FH	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	3/3
Number of ailing animals/total number						

3 讨 论

IgG H 链 V 区的 CDR 区 ,即抗原互补决定区 ,是特异性结合抗原的区域。其空间结构和与之对应的抗原的空间结构相匹配 ,其空间结构的变化也对应于众多抗原的千变万化。不管抗原是什么 ,总是有一种 CDR 区与之对应。但是不管 CDR 区的氨基酸序列及空间结构如何变化 ,经过重链、轻链的配对及三维结构的折叠 ,V 区的三个环 ,CDR 区总是暴露于抗体立体结构的表面。因此将外源抗原取代 CDR 区 ,融合抗体经过三维折叠 ,外源抗原也应该暴露于融合抗体立体结构的表面^[5]。因此如果取代 CDR 区的抗原是一种抗原表位 ,融合抗体呈递给机体的仍然是以该抗原的表位形式呈递给机体。这样的疫苗设计模拟了抗原以天然形式呈递给机体的免疫系统。也就是说如果不是精确地将 IgG H 链 V 区的 CDR3 缺失掉 ,那么融合抗体基因经过三维折叠 ,抗体的空间结构就会遭到大的破坏 ,插入的外源片段很可能会被包埋于空间结构的内部 ,而不会暴露于空间结构的表面。那样的疫苗就不会模拟抗原表位的天然形式。本实验通过基因工程方法将 IgG H 链的 CDR3 区缺失掉 ,代之以 FMDV VP1 免疫活性肽串连片段 20AA~14AA~20AA 的核苷酸片段。部分序列分析表明该片段基因准确地取代了 CDR3 区 ,达到了预期的设计效果 ,确保了融合抗体基因可以折叠成天然结构 ,使 FMDV VP1 的串连抗原决定簇得以暴露在融合抗体的表面 ,以近乎天然的形式呈递给机体的免疫系统。IgG H 链的 FC 区含有 APC 细胞的受体 ,通过受体介导的吞噬作用 ,使融合抗体疫苗 p^{ET}_{28b} -FH 能特异性地被多种 APC(抗原呈递细胞)所吞噬^[6] ,增强了疫苗的免疫效果 ,提高了疫苗的利用率。免疫反应的有效诱导 ,特别是中和抗体的诱导需要抗原在体内维持一定的时间。而 IgG 在体内长达 3~4 周的半衰期可显著地提高融合抗体基因疫苗 p^{ET}_{28b} -FH 对机体免疫反应诱导的效果。另外 ,作为载体的蛋白是自体蛋白 ,机体一般不会对其产生免疫反应 ,不影响疫苗的重要使用 ,也无副作用 ,因而安全。通过以上分析 ,融合抗体疫苗 p^{ET}_{28b} -FH 的设计是合理的。动物实验结果也表明 ,该疫苗对受试动物产生了显著的保护作用。在以豚鼠为动物模型的实验中 ,66% 的豚鼠被保护。国外报道 ,用含有 VP1 的重组腺病毒免疫的猪 ,经口蹄疫病毒攻毒后 ,免疫效果最好的组只抗毒^[8]。用同样的疫苗免疫牛 ,攻毒后 ,免

疫效果最好的组也只抗毒 6d^[9]。而我们的疫苗免疫猪,攻毒后整整 10d 才出现口蹄疫病毒感染。我们推测其主要的原因为 VP1 的抗原决定簇串联片段 20AA~14AA~20AA 取代 IgG H 链 CDR₃ 区后,能够暴露于融合蛋白分子的表面,以近似天然表位抗原形式呈递给机体的免疫系统,因而取得了一

定的免疫效果。由于此融合蛋白的表达量较低,只有 13.94%,按照常规的总蛋白注射量(3.5mg/mL),每次免疫所使用的融合蛋白量仅有 1.5mg。在进一步的动物实验中,若加大疫苗的用量,可能会取得更好的保护效果。

参 考 文 献

- [1] Zheng Z X , Xu Q X , Yan W Y *et al.* *Recombinant and synthetic vaccines* ,1994 ,pp.30~35
- [2] Zaghouani H , Steinman R , Bona C *et al.* *Science* ,1993 ,**259** :224~227
- [3] 赵 凯等.科学通报,1999 ,**44**(7):743~746
- [4] Sambrook J , Fritsch EF , Maniatis T. *Molecular Cloning :A Laboratory Manual* 2nd ed. New York :Cold Spring Harbor Laboratory Press ,1989
- [5] 彭秀玲等.基因工程实验技术(第二版).长沙:湖南科学技术出版社,1997 ,pp.252~261
- [6] Bona C , Brumeall T D *et al.* *Cellular and Molecular Biology TM* 40 (Suppl. 1) ,1994 ,pp.21~30
- [7] Bona C , Ghyka G. *Nature* ,1968 ,**217** :172~173
- [8] Sanz-Parra A , Jimene-Claver M A *et al.* *Virology* ,1999 ,**259** :129~134
- [9] Sanz-Parra A , Na 'zquez B *et al.* *Journal of General Virology* ,1999 ,**80** :671~679

Using Swine Self IgG H Chain as a Carrier to Construct an Recombinant Vaccine Against Type O Foot-and-Mouth Disease Virus Infection

ZHAO Kai CHEN Guang-Hui ZHANG Zhen-Yu YAN Wei-Yao ZHENG Zhao-Xin
(State Key Laboratory of Genetic Engineering ,School of Life Science ,Fudan University ,Shanghai 200433)

Abstract It is a new approach to use self immunoglobulin molecule as carriers for the foreign epitopes to prepare for effective and safe vaccines. Recombinant vaccine study on foot-and-mouth disease virus proved that the fusion protein containing a β -galactosidase from *E. coli* and the two copies of amino acid residue 141~160 and one copy of amino acid residue 200~213 of FMDV type O elicited high levels of neutralizing antibody and protected both guinea pigs and swine against viral challenge. In this study using swine self IgG H chain as a carrier protein to construct a recombinant vaccine against FMDV type O. Firstly ,the CDR3 region of the V-region of swine IgG H chain was deleted by PCR techniques. Secondly ,the partial V-region and FR₄-C-region were cloned into pBluescript II SK(+) and pBluescript II KS(+) respectively. Thirdly ,a tandem repeat nucleotide fragment encoded 20AA~14AA~20AA of VP1 of FMDV O Type was ligated at the 3' end of partial V-region. Finally ,partial V-region 20AA~14AA~20AA and FR₄-C-region were cut and isolated respectively ,and ligated into prokaryotic expression vector p^{ET}_{28b}. Desired recombinants were obtained by restriction endonucleases and partial sequence analysis and termed p^{ET}_{28b}-FH. A 64kD protein was expressed in *E. coli*. Western blot and ELISA assay showed that the immunogenicity of expressed fusion protein was positive. Guinea pigs were intramuscularly inoculated with 200 μ g of p^{ET}_{28b}-FH fusion protein at two weeks intervals for two times. 66% of guinea pigs were protected against FMDV Type O infection. Swines were intramuscularly inoculated with 1.5mg of p^{ET}_{28b}-FH fusion protein at two weeks intervals for two times and the symptom had been postponed for six days compared with the control.

Key words FMDV genetic engineering vaccine ,self immunoglobulin ,swine IgG H chain