

编码山羊补体 C3d 与口蹄疫病毒 VP1 融合蛋白重组质粒的构建及表达

凌洁玉^{1,2}, 刘朝^{1,2}, 佟铁铸³, 樊惠英^{1,2}, 张德坤⁴, 陈焕春^{1,2}, 郭爱珍^{1,2}

1 华中农业大学农业微生物国家重点实验室, 武汉 430070

2 华中农业大学动物医学院, 武汉 430070

3 广东省惠州市出入境检验检疫局, 惠州 516001

4 新疆维吾尔自治区畜牧厅, 乌鲁木齐 830001

摘要: 旨在构建含分子佐剂山羊补体 C3d 基因的 O 型口蹄疫病毒 VP1 基因真核表达质粒。克隆山羊 C3d 基因, 通过 linker(G₄S)₂ 将 3 拷贝 C3d 基因串联; 克隆羊源 O 型口蹄疫病毒 VP1 基因, 通过 linker(G₄S)₂ 与 3 拷贝 C3d 基因相连, 构建重组质粒 pUC19-VP1-C3d₃。将 VP1-C3d₃ 融合基因亚克隆入含有分泌表达信号肽 tPA 序列的 pcDNA3.1(+)-CMV 启动子下游, 构建重组真核表达质粒 pcDNA3.1-tPA-VP1-C3d₃。在脂质体介导下, 将 pcDNA3.1-tPA-VP1-C3d₃ 转染 HeLa 细胞。间接免疫荧光分析表明, VP1-C3d₃ 在 HeLa 细胞中获得了瞬时表达, Western blot 分析证实转染的阳性细胞能分泌预期大小 (133 kD) 的融合蛋白。重组质粒 pcDNA3.1-tPA-VP1-C3d₃ 为研制以羊补体 C3d 为分子佐剂的口蹄疫新型疫苗奠定了基础。

关键词: 山羊 C3d, 口蹄疫病毒 VP1 基因, 分子佐剂, 真核表达

Construction and Eukaryotic Expression of Recombinant Plasmid Encoding Fusion Protein of Goat Complement C3d and Foot-and-Mouth Disease Virus VP1

Jieyu Ling^{1,2}, Zhao Liu^{1,2}, Tiezhu Tong³, Huiying Fan^{1,2}, Dekun Zhang⁴, Huanchun Chen^{1,2}, and Aizhen Guo^{1,2}

1 The State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Wuhan 430070, China

2 College of Veterinary Medicine, Huazhong Agriculture University, Wuhan 430070, China

3 Huizhou Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Huizhou 516001, China

4 Department of Animal Husbandry of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumchi 830001, China

Abstract: We constructed a recombinant plasmid encoding VP1 gene of O type foot-and-mouth disease virus fused to a molecular adjuvant, goat complement C3d gene. The goat C3d gene was cloned and three copies were tandem-linked with the linker (G₄S)₂ sequence. VP1 gene of O type foot-and-mouth disease virus was linked to three tandem repeats of C3d through the linker sequence

Received: May 27, 2007; **Accepted:** July 19, 2007

Supported by: "Eleventh Five-Years" National Key Technology R & D Program Dairy Key Project (Nos. 2006BAD04A05 and 2006BAD04A12) and Hubei Province Key Technology R & D Program (No. 2006AA205A02).

Corresponding author: Aizhen Guo. Tel: +86-27-87286861; E-mail: aizhen@mail.hzau.edu.cn

国家“十一五”奶业专项(Nos. 2006BAD04A05, 2006BAD04A12); 湖北省科技攻关计划(No. 2006AA205A02)。

and cloned into pUC19 to obtain the recombinant plasmid pUC19-VP1-C3d₃. The VP1-C3d₃ fusion gene was then subcloned into the eukaryotic vector pcDNA3.1(+) that had been modified to contain the tissue plasminogen activator (tPA) leader sequence to obtain pcDNA3.1-tPA-VP1-C3d₃. HeLa cells were transfected with pcDNA3.1-tPA-VP1-C3d₃ by LipofectamineTM 2000. Indirect immunofluorescent assay and Western blot assay showed that VP1-C3d₃ fusion gene was successfully expressed in HeLa cells. The fusion protein with the expected size 133 kD could be secreted outside the cells. This study laid a good foundation to further research on the novel vaccine against foot-and-mouth disease virus by using goat C3d as a molecular adjuvant to enhance the immunogenicity of VP1.

Keywords: goat C3d, FMDV VP1 gene, molecular adjuvant, eukaryotic expression

血清补体蛋白C3 是宿主先天免疫防御系统的中心分子,在补体活化的经典途径、替代途径、甘露聚糖结合凝集途径中均发挥枢纽作用^[1,2]。补体C3d分子是补体C3 分子不能再被蛋白酶裂解的最终片段,能与抗原共价偶连形成抗原-C3d复合物,通过与其B细胞表面受体CR2(CD21)作用将抗原信号提呈给免疫细胞,同时还能与树突状细胞表面的CD21 结合,促进抗原摄取^[3,4,10]。一系列研究证实C3d能极大增强与之相偶联的各种抗原的免疫原性,并能转变免疫应答格局及提高中和抗体水平等,是连接先天性免疫和获得性免疫的重要桥梁^[5-9]。

鼠源C3d的免疫增强作用得到广泛研究。但有研究表明,C3d的免疫增强作用具有种属特异性^[10-12]。为了更为广泛地研究与应用C3d分子的分子佐剂效应,本研究克隆了羊C3d分子及羊源O型口蹄疫病毒(foot-and-mouth diseases virus, FMDV)的主要免疫原性基因VP1 基因,构建了包含VP1-C3d₃融合基因的真核表达载体,并证实其在HeLa细胞中获得分泌性表达,为进一步研究口蹄疫病毒新型疫苗奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

DH5 α 由本实验室保存; linker (G₄S)₂序列由美国宾夕法尼亚大学Bello 博士惠赠;含分泌表达信号肽tissue plasminogen activator(tPA)的pcDNA3.1(+)质粒由本课题组构建并保存。

1.1.2 酶、抗体及主要试剂

PCR所用聚合酶、dNTP、各种限制性内切酶、连接酶、碱性磷酸酶(CIAP)、RT-PCR试剂盒等均购自TaKaRa公司; RNA抽提试剂购自Omega Bio-Tek公司; DNA回收试剂盒购自上海生工生物工程公司;

高纯度质粒大提试剂盒购自Tiangen生物公司; 脂质体(LipofectamineTM 2000)、无血清培养基(Opti-MEM)、DMEM培养基均购自Invitrogen公司。HRP标记的羊抗牛IgG购自SBA公司。抗FMDV高免血清购至中国农业科学院兰州兽医研究所。

1.2 方法

1.2.1 羊C3d的克隆

取新鲜山羊肝脏,参照Omega公司RNA抽提试剂盒说明书提取总RNA。参照GenBank上已发表的鼠源、人源及牛源补体C3 基因序列,根据其链同源保守区设计如下引物,上游引物: 5'-CACCTTATCCAAACCC-3'(位于鼠补体C3 基因NM_009778 的 3105~3122 nt),下游引物: 5'-CAGGTCAGCTCCTTGTGATC-3'(位于鼠补体C3 基因NM_009778 的 3963~3983nt)。采用宝生物公司的RT-PCR一步法试剂盒进行RT-PCR操作,扩增C3d基因。将PCR产物克隆至pMD18-T,送宝生物公司进行序列测定。扩增片段长 879 bp,编码 293 个氨基酸,涵盖与鼠、牛C3d同源性较高的功能区段^[9,11]。以鉴定正确的质粒为模板,利用前述引物进行PCR扩增,同时在上游引入BglII酶切位点,下游引入BamHI酶切位点。扩增产物鉴定正确后,通过BglII酶切位点将C3d基因连接到含linker序列的pUC19质粒上,获得pUC19-C3d。

1.2.2 口蹄疫VP1基因的克隆

参照发表的牛/羊源O型FMDV的VP1 基因序列(GenBank No.AJ004677, No.AY145897),根据其中的保守序列设计特异性引物VP1A与VP1B:上游引物(VP1A): 5'-TTT AGATCT ATGACCACCTCCACGGGTGAGTC-3'(画线斜体部分为BglII识别位点);下游引物(VP1B): 5'-TTT GGATCC CAGAAGCTGTTCACAGGTG-3'(画线斜体部分为BamHI识别位点)。以病毒RNA为模板,采用宝生物公司的RT-PCR

一步法试剂盒进行RT-PCR操作, 扩增VP1 基因。回收PCR产物送至宝生物公司测序。

1.2.3 pcDNA3.1-VP1-C3d₃重组质粒的构建

利用BamH 和BglI 酶切位点, 进行VP1 基因以及三拷贝羊 C3d 序列首尾串连, 构建质粒 pUC19-VP1-C3d₃, 其中VP1 与C3d以及三拷贝C3d之间均由linker[(G₄S)₂]序列连接, 整个构建过程参照 Dempsey 等报道的策略^[9], 如图 1 所示。最后将 VP1-C3d₃融合基因通过BamH 酶切位点亚克隆至含分泌表达信号肽 (tPA) 序列的表达载体 pcDNA 3.1(+)-CMV 启动子下游。重组质粒 pcDNA3.1-tPA-VP1-C3d₃经酶切和测序鉴定正确后, 于-20 °C 保存。

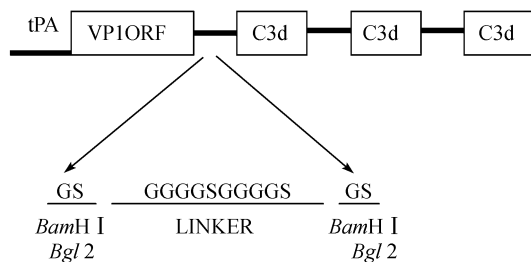


图 1 VP1-C3d₃表达框的结构图

Fig. 1 Structure of VP1-C3d₃ expression cassette

The linker {(G₄S)₂} sequence was inserted between the junctures of VP1 and C3d genes, and of each two C3d repeats by previously introduced BamH I /BglII sites in every sequence

1.2.4 重组质粒pcDNA3.1-tPA-VP1-C3d₃转染HeLa 细胞

将HeLa细胞按 5×10^6 个细胞/孔接种于六孔细胞培养板中, 37 °C、5% CO₂ 条件下培养, 待细胞长至 60%~80% 丰度时进行转染。采用质粒大提试剂盒抽提重组质粒 pcDNA3.1-tPA-VP1-C3d₃ 和 pcDNA3.1(+)-空载体。取制备好的重组质粒与空质粒各 6 μg, 分别加至 100 μL 无血清培养液中, 轻轻混匀; 将 8 μL 脂质体加入 92 μL 无血清培养基中。将质粒 DNA 溶液和脂质体溶液轻轻混合, 室温放置 20 min, 使 DNA 与脂质体形成复合物。随后将复合物滴加到经 DMEM 洗涤过的细胞表面, 最后每孔补加 600 μL 无血清培养基。37 °C、5% CO₂ 条件下培养细胞 6 h 后, 以细胞维持液代替转染培养基继续培养。

1.2.5 间接免疫荧光检测

细胞转染后 24 h 进行间接免疫荧光检测。将细胞用 PBS 清洗 3 次, 以预冷甲醇固定 10 min; PBS 清洗后, 用含 10% 犊牛血清的 PBS 封闭 30 min; 加入 1:100 稀释的牛抗 FMDV 阳性血清, 37 °C 温育 30

min; PBS 清洗后, 加入 1:200 稀释的羊抗牛 IgG 荧光二抗, 37 °C 温育 30 min; PBS 清洗, 自然干燥后, 于荧光显微镜下进行观察。转染空载体的细胞用作阴性对照。

1.2.6 Western blot 检测

取转染后 48 h 的细胞培养上清, 浓缩 10 倍, 取 30 μL 进行 SDS-PAGE 和 Western blot 分析。首先将样品蛋白质进行 SDS-PAGE 分离, 随后转移至硝酸纤维素膜上, 37 °C 封闭过夜 (封闭液为含 0.5% BSA 与 1% 脱脂牛奶的 TBST)。加入以封闭液 1:200 稀释的牛抗 FMDV 阳性血清, 37 °C 温育 60 min, TBST 洗涤后, 加入以 1:2500 稀释的 HRP 标记羊抗牛 IgG 二抗, 37 °C 温育 60 min, TBST 彻底洗涤后, DAB/H₂O₂ 进行显色。

2 结果

2.1 羊 C3d 基因与口蹄疫 VP1 基因的扩增与克隆

对 C3d 基因的扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测, 获得一约 900 bp 的特异性条带, 与预期大小一致。将该序列克隆 pMD18-T 中, 并进行测序鉴定, 测序结果提交至 GenBank (登陆号: DQ408207)。同源性比较发现, 所获得的山羊 C3d 与牛 C3d (GenBank 登录号: AY630404) 核苷酸水平同源性达 96%, 氨基酸同源性为 94%, 与鼠 (GenBank 登录号: NM_009778)、人 (GenBank 登录号: NM_000064)、猪 (GenBank 登录号: DQ408206) C3d 基因核苷酸水平的同源性分别为 80%, 83% 和 86%, 氨基酸水平同源性均在 80% 左右。

运用 RT-PCR 获得 FMDV 的 VP1 基因扩增产物, 琼脂糖凝胶电泳检测到一约 650 bp 的特异性条带, 与预期大小一致。将该序列克隆 pMD18-T 中进行测序鉴定。将测序结果与 GenBank 中已发表的 VP1 序列 (AJ004677) 进行比对, 其 DNA 序列与 AJ004677 有 91% 的同源性, 氨基酸序列有 93% 的同源性。

2.2 重组质粒的鉴定

利用 BamH I 和 Bgl II 对重组质粒进行鉴定。将重组质粒 pUC19-VP1-C3d₃ 进行 BamH I /Bgl II 双酶切, 得到一约 2700 bp 和一约 3400 bp 的片段, 与预期大小相符 (图 2A)。将重组质粒 pcDNA3.1-tPA-VP1-C3d₃ 进行 BamH I 单酶切, 得到一约 9000 bp 的片段, 而进行 BamH I /Hind III 双酶切时, 得到一约 3500 bp 与一约 5400 bp 的片段, 均与

预期结果相符(图 2B)。以上结果表明 VP1-C3d3 已成功克隆到克隆载体 pUC19 和表达载体 pcDNA3.1(+)上。

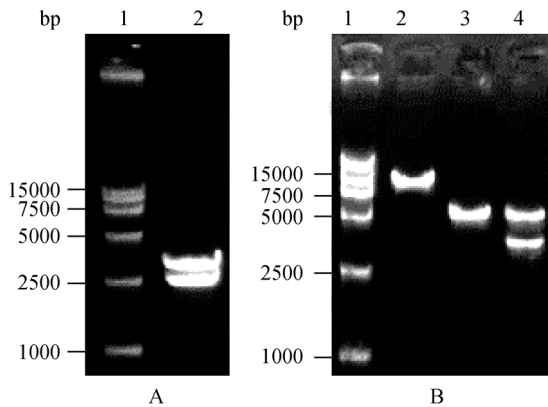


图 2 重组质粒pUC19-VP1-C3d₃(A)和pcDNA3.1-tPA-VP1-C3d₃(B)的酶切鉴定

Fig. 2 Identification of the recombinant plasmids pUC19-VP1-C3d₃ (A) and pcDNA3.1-tPA-VP1-C3d₃ (B) with restrictive digestion

(A) Lane 1: DNA ladder DL15000; Lane 2: pUC19-VP1-C3d₃ cut by *Bam*H I /*Bgl* II; (B) Lane 1: DNA ladder DL15000; Lane 2: pcDNA3.1-tPA-VP1-C3d₃ cut by *Bam*H I; Lane 3: pcDNA3.1 cut by *Bam*H I; Lane 4: pcDNA3.1-tPA-VP1-C3d₃ cut by *Bam*H I /*Bgl* II

2.3 间接免疫荧光技术检测重组质粒的瞬时表达
重组质粒pcDNA3.1-tPA-VP1-C3d₃转染HeLa细胞 24 h后,用牛抗FMDV阳性血清和绿色荧光蛋白标记的羊抗牛IgG二抗检测VP1 基因的表达,用荧光显微镜观察转染细胞的绿色荧光。结果可见重组质粒pcDNA3.1-tPA-VP1-C3d₃转染的细胞具有较强的绿色荧光,而转染空载pcDNA3.1(+)的阴性对照细胞未检测到荧光(图 3),说明重组质粒 pcDNA3.1-tPA-VP1-C3d₃已成功地在HeLa细胞中获得表达。

2.4 Western blot 检测VP1-C3d₃融合蛋白的分泌表达

细胞转染后 48 h,取细胞培养液上清(浓缩 10 倍)进行SDS-PAGE 和Western blot 分析,用牛抗FMDV 阳性血清及HRP标记羊抗牛IgG二抗检测融合蛋白的分泌表达。结果显示,重组质粒 pcDNA3.1-tPA-VP1-C3d₃转染细胞培养液对应孔道出现了约 133 kD大小的特异性条带,与预期的VP1-C3d₃融合蛋白的分子量一致,而空载体转染细胞培养液没有出现相应条带(图 4),说明VP1-C3d₃融合蛋白能够在哺乳动物细胞内表达并且以分泌形式被运输到细胞外。

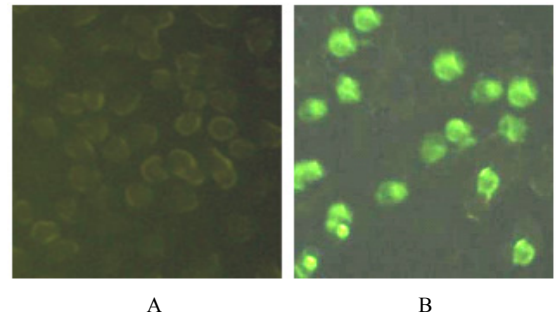


图 3 间接免疫荧光技术检测转染 pcDNA3.1-tPA-VP1-C3d₃ 的 HeLa 细胞中 VP1 基因的表达
Fig. 3 Indirect immunofluorescent technique detected VP1 expression in HeLa cells transfected by pcDNA3.1-tPA-VP1-C3d₃
(A) HeLa cells transfected by the vector pcDNA3.1 as negative control; (B) HeLa cells transfected by pcDNA3.1-tPA-VP1-C3d₃

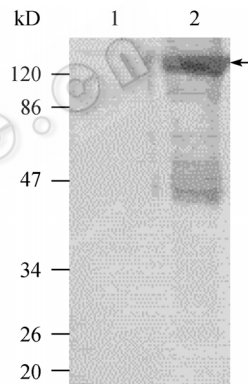


图 4 Western blot检测VP1-C3d₃融合蛋白在转染的 HeLa细胞中分泌表达

Fig.4 Western blot assay detected the secretion of VP1-C3d₃ fusion protein in transfected HeLa cells
Lane 1: negative control; Lane 2: the cell culture containing VP1-C3d₃ fusion protein of 133 kD shown by the arrow. The molecular sizes of the protein markers are labeled in the left

3 讨论

C3d是一个很有前途的分子佐剂,对蛋白亚单位及DNA疫苗均有显著的免疫增强作用^[5-11]。但其免疫增强作用具有种属特异性^[10-12]。有关羊C3d免疫增强作用的研究极少,因此,本研究克隆了羊C3d基因,有望在羊用疫苗分子佐剂研究与推广中发挥作用。

口蹄疫(FMD)是由口蹄疫病毒(FMDV)引起的严重危害偶蹄动物的国际性传染病,传播快,感染率高,给世界造成重大经济损失。常规 FMDV 灭活疫苗在预防和控制 FMD 的过程中发挥了重要作用,

但存在着病毒灭活不彻底、病毒毒力返强等不安全因素^[13], 因此有必要寻求一种更加安全有效的 FMDV 疫苗。VP1 基因含有 B 细胞抗原表位(141–160 aa) 和 T 细胞抗原表位(200–213 aa), 是 FMDV 主要的免疫原性基因。

尽管研究表明其诱导机体免疫反应的能力不及完整的结构蛋白基因 P1, 或 P1-2A-3C-3D 所构成的空衣壳, 但从安全角度考虑, VP1 基因依然表现出其优越性^[14,15]。然而不断有研究表明, 单独的 VP1 基因不能诱导出高水平中和抗体和产生有效的免疫保护反应^[14,15]。应用分子佐剂增强 VP1 免疫原性, 被认为是解决当前困境的途径之一, 如利用细胞因子 IFN- α ^[16]、IL-1^[17] 及其它辅助分子如 HSP70^[18] 等增强 VP1 的免疫原性。

羊口蹄疫是一种严重危害牛羊业的烈性传染病, 本研究将羊 C3d 基因与羊源 O 型口蹄疫病毒的 VP1 基因串联, 构建成能分泌表达 VP1-C3d₃ 融合蛋白的真核质粒, 期望能研制一种防制羊口蹄疫的新型疫苗。同时, C3d 基因序列同源性分析表明, 羊、牛 C3d 在核苷酸水平的同源性达 96%, 氨基酸水平的同源性达 94%。这种同源性水平高于目前已知的其它动物的 C3d^[5–11]。因此, 本研究构建的口蹄疫 DNA 疫苗虽然应用的是羊 C3d, 但在牛体内具有同样的应用前景。由于先前的研究报道证实, 三拷贝 C3d 基因串联的免疫增强作用较 1~2 拷贝 C3d 基因大^[9,11], 因此, 本研究在质粒构建中直接运用了三拷贝 C3d 基因。间接免疫荧光与 Western blot 均证实, 所构建的重组质粒能在转染的 HeLa 细胞中分泌表达, 根据分子量大小判断所表达蛋白为融合蛋白, 证明先前设计的构建策略是正确的, 该结果为进一步体内研究羊 C3d 基因对羊源口蹄疫病毒 VP1 基因的免疫增强作用奠定了良好基础。

REFERENCES

- [1] Fearon DT. The complement system and adaptive immunity. *Semin Immunol*, 1998, **10**: 355–361.
- [2] Yu M. Advances of Molecular Adjuvant C3d. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 2004, **20**(4): 508–512.
余敏. 分子佐剂 C3d 研究进展. *细胞与分子免疫学杂志*, 2004, **20**(4): 508–512.
- [3] Nagar B, Jones RG, Russell J, et al. X ray crystal structure of C3 d: A C3 fragment and ligand for complement receptor 2. *Science*, 1998, **280**(5367): 1277–1280.
- [4] Fearon DT, Carter RH. The CD19/CR2/TAPA-1 complex of B-lymphocytes: linking natural to acquired immunity. *Annu Rev Immunol*, 1995, **13**: 127–149.
- [5] Ross TM, Xu Y, Bright RA, et al. C3d enhancement of antibodies to Hemagglutinin accelerates protection against influenza virus challenge. *Nat Immunol*, 2000, **1**: 127–131.
- [6] Green TD, Montefiori DC, Ross TM. Enhancement of antibodies to the human immunodeficiency virus type 1 envelope by using the molecular adjuvant C3d. *J Virol*, 2003, **77**(3): 2046–2055.
- [7] Mitchell JA, Green TD, Bright RA, et al. Induction of heterosubtypic immunity to influenza A virus using a DNA vaccine expressing hemagglutinin-C3d fusion proteins. *Vaccine*, 2003, **21**(9-10): 902–914.
- [8] Green TD, Newton BR, Rota PA, et al. C3d enhancement of neutralizing antibodies to measles hemagglutinin. *Vaccine*, 2001, **20**(1-2): 242–248.
- [9] Dempsey PW, Allison MED, Akkaraju S, et al. C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity. *Science*, 1996, **271**: 348–350.
- [10] Szakonyi G, Guthridge JM, Li D, et al. Structure of complement receptor 2 in complex with its C3d ligand. *Science*, 2001, **292**(552, 2): 1725–1728.
- [11] Wang LS, Sunyer JO, Bello LJ. Immunogenicity of a bovine viral diarrhea virus E2-C3d fusion protein containing a bovine homolog of C3d. *Developmental and Comparative Immunology*, 2005, **29**: 907–915.
- [12] Nielsen CH, Leslie RG. Complement's participation in acquired immunity. *J. Leukoc. Biol*, 2002, **72**(2): 249–261.
- [13] King, AM, Underwood BO, McCahon D. et al. Biochemical identification of viruses causing the 1981 outbreaks of foot-and-mouth disease in the UK. *Nature*, 1981, **293**: 479–480.
- [14] Li Y, Aggarwal N, Takamatsu HH. et al. Enhancing immune responses against a plasmid DNA vaccine encoding a FMDV empty capsid from serotype O. *Vaccine*, 2006, **24**(21): 4602–4606.
- [15] Yang NS, Wang JH, Lin KF. et al. Comparative studies of the capsid precursor polypeptide P1 and the capsid protein VP1 cDNA vectors for DNA vaccination against foot-and-mouth disease virus. *J Gene Med*, 2005, **7**(6): 708–717.
- [16] Guo HC, Liu ZX, Sun SQ, et al. The effect of bovine IFN-alpha on the immune response in guinea pigs vaccinated with DNA vaccine of foot-and-mouth disease virus. *Acta Biochim Biophys Sin* (Shanghai), 2004, **36**(10): 701–706.
- [17] Shao HJ, Chen L, Su YB. DNA fragment encoding human IL-1beta 163–171 peptide enhances the immune responses elicited in mice by DNA vaccine against foot-and-mouth disease. *Vet. Res. Commun*, 2005, **29**(1): 35–46.
- [18] Su CX, Duan XG, Wang XQ, et al. Fusion Expression of O Type Foot-and-Mouth Diseases Virus VP1 Gene and HSP70 Gene and Induction of Immune Responses in Mice. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2006, **22**(5): 733–736.
苏春霞, 段相国, 王秀青, 等. FMDV VP1 基因与 HSP70 基因在毕赤酵母中的融合表达及免疫特性. *生物工程学报*, 2006, **22**(5): 733–736.