

• 医药生物技术 •

弓形虫优势表位融合于 HPV16L1“N 端”的融合体可显著提高表位免疫反应性

谭晓淳¹, 林中民², 吕金辉³, 谢自新¹, 陈薪安¹, 李文姝¹

1 温州医科大学 微生物学与免疫学教研室, 浙江 温州 325000

2 温州医科大学 附属第一医院病理科, 浙江 温州 325000

3 同济大学医学院东方医院 转化医学研究中心, 上海 200000

谭晓淳, 林中民, 吕金辉, 等. 弓形虫优势表位融合于 HPV16L1“N 端”的融合体可显著提高表位免疫反应性. 生物工程学报, 2021, 37(1): 290-300.

Tan XC, Lin ZM, Lv JH, et al. Enhanced epitope immunoreactivity of the dominant epitope of *Toxoplasma gondii* fused at the “N terminus” of HPV16L1. Chin J Biotech, 2021, 37(1): 290-300.

摘要: 弓形虫和人乳头瘤病毒 (HPV) 具有共同的免疫保护人群, 选择 HPV16 型晚期结构蛋白 1 (HPV16L1) 为载体, 携带弓形虫多表位 (RSeptope) 以期提高表位免疫原性同时可实现共免疫效应。文中分别以构建的融合体 RSeptope-HPV16L1 (RSeptope 融合于 HPV16L1“N”端) 以及 HPV16L1-RSeptope (RSeptope 融合于 HPV16L1“C”端), 脂质体转染 COS-7 细胞后, RSeptope-HPV16L1 融合体形式可以在转染细胞中得到有效转录和翻译, 分别可检测到相应的 RSeptope 和 HPV16L1 的 mRNA 和蛋白, 但 HPV16L1-RSeptope 融合体形式在转染细胞中检测不到目标抗原的 mRNA 和蛋白。融合体采用“DNA 初免-蛋白质加强免疫”的方案免疫 BALB/c 小鼠, 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 和酶联免疫斑点试验 (ELISPOT) 分别检测到 RSeptope-HPV16L1 免疫鼠血清中显著升高的体液和细胞免疫反应 (即最高水平的 RSeptope 特异性抗体 IgG 和 IFN- γ), 且比较单独 RSeptope 免疫组 (不与 HPV16L1 融合), 产生的是显著升高的 Th1 和 Th2 免疫反应类型, 提示 HPV16L1 作为表位载体的优势效应。而 HPV16L1-RSeptope 融合体形式体内也未能诱导有效的免疫反应。以上研究提示, HPV16L1“N”端可能是较为合适的表位融合位置, 融合体表位特异性免疫学效应显著提高, 研究结果为提高表位疫苗的免疫原性提供了一个合理的载体融合策略。

关键词: 弓形虫, HPV16L1, 融合体, 免疫效应

Received: April 15, 2020; **Accepted:** May 29, 2020

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 81973216), Public Welfare Foundation of Zhejiang Province, China (No. LGF18C010004).

Corresponding author: Wenshu Li. Tel: +86-577-86689910; E-mail: lwszw2019@163.com

国家自然科学基金 (No. 81973216), 浙江省基础公益研究计划项目 (No. LGF18C010004) 资助。

网络出版时间: 2020-10-30

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20201029.2024.001.html>

Enhanced epitope immunoreactivity of the dominant epitope of *Toxoplasma gondii* fused at the “N terminus” of HPV16L1

Xiaochun Tan¹, Zhongmin Lin², Jinhui Lv³, Zixin Xie¹, Xinan Chen¹, and Wenshu Li¹

¹ Department of Microbiology and Immunology, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, Zhejiang, China

² Department of Pathology, the First Affiliated Hospital, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, Zhejiang, China

³ Research Center for Translational Medicine, East Hospital Tongji University School of Medicine, Shanghai 200000, China

Abstract: For improving epitope immunogenicity and achieving the co-immunization, late protein 1 (L1) of HPV type 16 (HPV16L1) was selected as the vector to carry the dominant epitope of *Toxoplasma gondii* because of the shared common population between *Toxoplasma gondii* and human papillomavirus (HPV). RSeptitope-HPV16L1 (RSeptitope fused at the “N-terminus” of HPV16L1) and HPV16L1-RSeptitope (RSeptitope fused at the “C-terminus” of HPV16L1) chimeras were constructed. After transfection of COS-7 cells with the recombinants, Western blot, RT-PCR, and immunofluorescence experiments confirmed that RSeptitope-HPV16L1 could successfully express the corresponding mRNA and protein of RSeptitope and HPV16L1, but the HPV16L1-RSeptitope construct could not. A “prime-boost” immunization program was applied in mice to further evaluate the immune response elicited by the constructs, and the RSeptitope-HPV16L1 immunization group produced the most significantly increased humoral and cellular immune responses (the highest RSeptitope-specific IgG antibody level and the highest IFN- γ production, respectively), in which both elevated Th1 and Th2 immune responses were obtained. Moreover, the advantage of HPV16L1 as an epitope carrier was remarkable for RSeptitope-HPV16L1, which induced a more prominent immunological response than RSeptitope alone (without fusion with HPV16L1). Our research indicated that the N-terminus of HPV16L1 could be a better insertion site for enhancing target epitope immunogenicity, and our study offers a design for epitope vaccine of reasonable combination.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, HPV16L1, fusion, immunological effect

表位 (Epitopes) 是抗原分子中决定特异性免疫应答的关键化学基团, 是诱导免疫反应的结构基础, T、B 细胞优势多表位的联合可显著诱导机体全面的免疫反应。但由于表位免疫原性弱的问题需要选择合适的表位运载与释放体系, 构建合适的表位与载体的融合体, 一方面提高优势表位的免疫原性^[1], 另一方面, 达到表位与载体协同免疫的理想效果。

刚地弓形虫 *Toxoplasma gondii* 感染后的最大危害是通过垂直传播导致不良妊娠^[2-4], 而人乳头瘤病毒 (Human papilloma virus, HPV) 高危型别 16 和 18 型感染与宫颈癌的发生发展相关, 预防弓形虫和 HPV 的感染均是针对育龄期妇女, 二者有着相同的免疫人群, 可实现协同免疫效果。除此之外, 各型别的 HPV 晚期结构蛋白 L1、L2 在体内均可自行组装成病毒样颗粒形式, 可有效

提呈抗原表位, 作为抗原释放载体优势显著^[5-7]。

本研究前期工作利用生物信息学方法, 对弓形虫感染的两个关键抗原分子——主要膜表面蛋白 1 (SAG1) 和棒状体蛋白 2 (ROP2) 的优势表位进行了预测和筛选, 构建了 ROP2 和 SAG1 多表位的优势组合 (即 RSeptitope), 同时对潜在的表位运载与释放系统进行了筛选, 例如, 选择乙肝病毒核心抗原 (HBcAg) 中的主要免疫显性区域 (Major immunodominant region, MIR) 为表位载体, 体外可实现表位与载体融合的有效表达, 体内可诱导表位特异性免疫反应^[1]。

为了进一步优化融合体的免疫效应, 实现协同免疫反应, 本研究选择 HPV16 型 L1 为载体, 构建弓形虫多表位 RSeptitope 与 HPV16L1 的融合体^[8], 分析 RSeptitope 和 HPV16L1 不同融合体形式的体外表表达特征和体内免疫学效应, 为 RSeptitope

和其载体的优化组合及其免疫方案提供合理的设计策略。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 质粒、细胞和实验动物

弓形虫优势多表位 (RSeptope) 与载体 HPV16L1 的融合体质粒 pcDNA3.1/RSeptope-HPV16L1 (RSeptope 融合于 HPV16L1 的 N 端)、pcDNA3.1/HPV16L1-RSeptope (RSeptope 融合于 HPV16L1 的 C 端) 由本室构建和保存, 详细描述见已发表论文^[8]; COS-7 细胞购自中国科学院上海细胞库 (GNO 2); 6-8 周雌性 BALB/c 小鼠 (基因型为 H2-Kd, 编号 No. SCXK (Shanghai)) 饲养于温州医科大学实验动物中心 (SPF 级), 实验动物操作按照实验动物伦理要求规范执行。

1.1.2 主要试剂

核酸分子量标准 DNA Marker、蛋白分子量标准预染 Marker, 2×PCR Master Mix 均购自 Thermo 公司; 无内毒素质粒抽提纯化试剂盒 (Endofree Plasmid Maxi Kit) 购自美国 Omega 公司; 转染试剂 LipofectamineTM 2000 购自 Invitrogen 公司; 逆转录试剂盒 (ReverAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit) 为 Thermo 产品; HPV16L1 单抗购自赛默飞试剂公司 (美国); HRP-羊抗鼠 IgG、HRP-羊抗鼠 IgG1、HRP-羊抗鼠 IgG2a、FITC 标记羊抗鼠 IgG 以及 PI 荧光染料均购自联科生物技术有限公司 (KPL 公司产品); IFN- γ ELISPOT 试剂盒为 Dakewe Quick SpotTM 系列产品。其余试剂均为国产分析纯。弓形虫 ROP2-SAG1 优势多表位 (RSeptope) 蛋白的制备见参考文献^[9], RSeptope 免疫兔血清由本室制备并保存, RSeptope 多表位序列中一条 T 细胞表位肽 (同时包含 CTL (杀伤性 T 淋巴细胞) 和 Th (辅助性 T 淋巴细胞) 表位肽) 由上海波泰生物科技有限公司合成 (纯度 95% 以上)。

1.2 方 法

1.2.1 质粒提取与鉴定

优势表位 RSeptope 基因序列通过真核密码子优化 (Java Codon Adaptation Tool, <http://www.jcat.de/>), 与 HPV16L1 融合后的重组真核表达质粒 pcDNA3.1/RSeptope-HPV16L1、pcDNA3.1/HPV16L1-RSeptope、pcDNA3.1/RSeptope 以及质粒对照 pcDNA3.1 转化至大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 菌株进行扩增, 用去内毒素质粒 DNA 抽提试剂盒提取和纯化质粒, 具体操作按照说明书进行。获得质粒通过 PCR 和 DNA 测序鉴定。

1.2.2 质粒转染与鉴定

重组真核表达质粒与脂质体以 2:1 的比例电转染 COS-7 细胞, 具体操作按 LipofectamineTM 2000 转染试剂说明书进行, 转染细胞培养 48 h 后, 收集细胞, 分别通过 RT-PCR、蛋白免疫印迹 (Western blotting) 以及免疫荧光实验 (Immunofluorescence) 鉴定目标基因和目标蛋白的表达。①RT-PCR: 分别以 RSeptope 和 HPV16L1 的引物扩增相应的目标基因; ②Western blotting: 分别用 RSeptope 免疫血清、HPV16L1 单克隆抗体印迹目标蛋白; ③Immunofluorescence: 分别以 RSeptope 免疫血清、HPV16L1 单克隆抗体结合目标蛋白, 再以荧光标记抗体显示荧光。

1.2.3 动物免疫

采用前期研究^[10]确定的“初免-加强免疫”的方案 (即: 2 次 DNA 免疫再加强 1 次蛋白免疫)。6-8 周龄 BALB/c 雌性小鼠 (基因型为 H2-Kd) 随机分成 6 组 (5 只/组), 按表 1 所列方案免疫实验动物。

Group 1 为单独 RSeptope 表位免疫组; Group 2 为 RSeptope 融合在 HPV16L1“N”端融合体免疫组; Group 3 为 RSeptope 融合在 HPV16L1“C”端融合体免疫组; Group 4 为 RSeptope 表位蛋白免疫对照组; Group 5 为质粒载体免疫对照组; Group 6 为等体积的 PBS 免疫对照组。免疫共进行 3 次, 间隔 2 周,

表 1 免疫方案

Table 1 Immunization programme

Groups	Immunization (2 week intervals, n=5)		
	1st	2nd	3rd
Group 1	pcDNA3.1/RSeptope	pcDNA3.1/RSeptope	RSeptope protein
Group 2	pcDNA3.1/RSeptope-HPV16L1	pcDNA3.1/RSeptope-HPV16L1	RSeptope protein
Group 3	pcDNA3.1/HPV16L1-RSeptope	pcDNA3.1/HPV16L1-RSeptope	RSeptope protein
Group 4	RSeptope protein	RSeptope protein	RSeptope protein
Group 5	pcDNA3.1	pcDNA3.1	pcDNA3.1
Group 6	PBS	PBS	PBS

DNA 免疫采用肌肉注射, 剂量为每次 100 $\mu\text{g}/\text{鼠}$; 蛋白免疫采用皮下注射, 剂量为每次 5 $\mu\text{g}/\text{鼠}$, 蛋白与等量弗氏完全佐剂 (CFA) 混合后行第 1 次免疫, 与等量不完全弗氏佐剂 (IFA) 混合后行第 2、3 次免疫。免疫开始的第 0、2、4、6 周分别尾静脉取血分离血清, 测定 RSeptope 特异性抗体总 IgG 以及抗体亚类 IgG1 和 IgG2a。最后 1 次免疫结束 1 周后处死小鼠分离脾脏, 制备单个脾细胞悬液, ELISPOT 试剂盒测定 IFN- γ 的生成量。

1.2.4 ELISA 测定抗体

免疫鼠血清中 RSeptope 特异性抗体水平采用 ELISA 方法测定。将 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 RSeptope 表位蛋白 (100 μL) 加入到 96 孔酶标反应板中 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 5% 的脱脂奶粉 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h 后, 加入 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 1:100 稀释的各组免疫血清于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, 洗涤后分别加入 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 1:3 000 稀释的 HRP-标记的羊抗鼠 IgG、羊抗鼠 IgG1 以及羊抗鼠 IgG2a 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h。洗涤后, 加入底物邻苯二胺 (OPD, Sigma) 和过氧化氢 (H_2O_2), 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光显色 10 min 后, 于酶标仪 (Bio-Tek ELx800, USA) 492 nm 处测定光吸收度。每个样品均设置 3 个复孔。

第 6 周免疫血清进行 2 倍的系列倍比稀释检测 RSeptope 特异性抗体 IgG 效价, 操作过程如上所述, 每个样本同样设置 3 个复孔。

1.2.5 ELISPOT 测定 IFN- γ

收集免疫第 6 周的小鼠脾脏制备单细胞悬液,

于细胞裂解液 (0.83% NH_4Cl , 0.01 mol/L Tris-HCl, pH 7.2) 中作用 1 min 裂解红细胞。PBS 洗涤后, 将细胞数目调整至 $5 \times 10^6/\text{mL}$ 后, 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 细胞悬液加入到包被有抗 IFN- γ 单克隆抗体的酶标反应板中, 再加入 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RSeptope 多表位中的一条 T 细胞表位肽 (CTL+Th 表位, 序列为 TEWIFKRC RNIELSEPVKFL) 共孵育 20 h, 后续的操作按照 ELISPOT 检测试剂盒说明书进行。显色后斑点数目通过酶联斑点成像自动分析仪 (Elisporeader 400 PRO-X, BiosysBioreader[®], Germany) 测定。每个样本均设 3 个复孔。

1.2.6 统计分析

所有变量均以平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 应用 SPSS13.0 统计软件, 采用单因素方差分析 (ANOVA), 各实验组与对照组比较采用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 质粒密码子优化与鉴定

RSeptope 通过真核密码子优化后的基因序列见表 2, 优化后的 RSeptope 基因序列 GC 含量从 64.02% 提高到 71.21%。

优化的 RSeptope 重组真核表达质粒 pcDNA3.1/RSeptope、pcDNA3.1/RSeptope-HPV16L1、以及 pcDNA3.1/HPV16L1-RSeptope 抽提和纯化后, PCR 扩增 RSeptope 基因, 均可得到一个 282 bp 的目的片段 (图 1, 泳道 4、5、6); 而 PCR 扩增

表 2 真核密码子优化的 RSeptope 基因序列

Table 2 RSeptope gene sequence before and after eukaryotic codon optimization

Type	GenBank Accession No.	Sequence
Wild type	MG712798	<u>C</u> G <u>C</u> C <u>T</u> G <u>C</u> G <u>C</u> C <u>C</u> G <u>G</u> G <u>C</u> C <u>A</u> G <u>C</u> C <u>C</u> G <u>C</u> G <u>C</u> C <u>T</u> G <u>T</u> T <u>T</u> C <u>C</u> C <u>G</u> G <u>T</u> G <u>G</u> A <u>T</u> G <u>A</u> A <u>G</u> T <u>G</u> C <u>C</u> G <u>A</u> G <u>C</u> G <u>A</u> T <u>G</u> T <u>G</u> G <u>A</u> A <u>A</u> C <u>C</u> C <u>A</u> A <u>C</u> C <u>C</u> G <u>G</u> G <u>C</u> G <u>G</u> C <u>G</u> C <u>C</u> T <u>G</u> C <u>C</u> G <u>G</u> A <u>T</u> A <u>C</u> C <u>G</u> A <u>A</u> A <u>G</u> C <u>G</u> C <u>G</u> C <u>C</u> C <u>T</u> G <u>G</u> G <u>C</u> G <u>G</u> C <u>A</u> C <u>C</u> G <u>A</u> A <u>T</u> G <u>G</u> A <u>T</u> T <u>T</u> T <u>A</u> A <u>A</u> C <u>G</u> C <u>T</u> G <u>C</u> C <u>G</u> C <u>A</u> A <u>C</u> A <u>T</u> T <u>G</u> A <u>A</u> C <u>T</u> G <u>A</u> G <u>C</u> G <u>A</u> A <u>C</u> C <u>G</u> G <u>T</u> G <u>A</u> A <u>A</u> T <u>T</u> T <u>C</u> T <u>G</u> G <u>G</u> C <u>G</u> C <u>G</u> C <u>G</u> C <u>A</u> C <u>C</u> T <u>G</u> A <u>G</u> C <u>A</u> G <u>C</u> C <u>T</u> G <u>A</u> T <u>T</u> C <u>C</u> G <u>G</u> A <u>A</u> G <u>C</u> G G <u>A</u> A <u>G</u> A <u>T</u> A <u>G</u> C <u>T</u> G <u>G</u> T <u>G</u> G <u>A</u> C <u>C</u> G <u>G</u> C <u>G</u> A <u>T</u> A <u>G</u> C <u>G</u> C <u>G</u> A <u>G</u> C <u>C</u> T <u>G</u> G <u>A</u> T <u>A</u> C <u>C</u> G <u>C</u> G <u>G</u> C <u>A</u> T <u>T</u> A <u>A</u> A <u>C</u> T <u>G</u> A <u>G</u> G <u>C</u> T <u>G</u> A <u>G</u> G <u>C</u> C <u>C</u> G <u>G</u> C <u>A</u> G <u>C</u> C <u>C</u> A <u>G</u> G <u>C</u> T <u>G</u> T <u>T</u> C <u>C</u> C <u>C</u> G <u>T</u> G <u>G</u> A <u>C</u> G <u>A</u> G <u>G</u> T <u>G</u> C <u>C</u> C <u>A</u> G <u>C</u> G <u>A</u> C <u>G</u> T <u>G</u> G <u>A</u> G <u>A</u> C <u>C</u> A <u>A</u> C <u>C</u> C C <u>G</u> G <u>C</u> G <u>G</u> C <u>G</u> C <u>C</u> T <u>G</u> C <u>C</u> C <u>G</u> A <u>C</u> C <u>C</u> G <u>A</u> C <u>C</u> C <u>G</u> A <u>G</u> C <u>G</u> C <u>C</u> C <u>C</u> C <u>T</u> G <u>G</u> G <u>C</u> G <u>G</u> C <u>A</u> C <u>C</u> G <u>A</u> G <u>T</u> G <u>G</u> A <u>T</u> C <u>T</u> C <u>A</u> A <u>G</u> A <u>G</u> G <u>T</u> G <u>C</u> A <u>G</u> G <u>A</u> A <u>C</u> A <u>T</u> C <u>G</u> A <u>G</u> C <u>T</u> G <u>A</u> G <u>C</u> G <u>A</u> G <u>C</u> C <u>C</u> G <u>T</u> G <u>A</u> A <u>G</u> T <u>T</u> C <u>T</u> G <u>G</u> G <u>C</u> G <u>G</u> C <u>G</u> C <u>A</u> C <u>C</u> T <u>G</u> A <u>G</u> C <u>A</u> G <u>C</u> C <u>T</u> G <u>A</u> T <u>C</u> C <u>C</u> C <u>G</u> A <u>G</u> G <u>C</u> G <u>A</u> G <u>G</u> A <u>C</u> A <u>G</u> C <u>T</u> G <u>G</u> T <u>G</u> G <u>A</u> C <u>C</u> G <u>G</u> C <u>G</u> A <u>C</u> A <u>G</u> C <u>G</u> C <u>C</u> A <u>G</u> C <u>C</u> T <u>G</u> G <u>A</u> C <u>A</u> C <u>C</u> G <u>C</u> C <u>G</u> C <u>A</u> T <u>C</u> A <u>A</u> G <u>C</u> T <u>G</u>
Codon optimized	MG712799	<u>C</u> G <u>C</u> C <u>T</u> G <u>C</u> G <u>C</u> C <u>C</u> G <u>G</u> G <u>C</u> C <u>A</u> G <u>C</u> C <u>C</u> <u>A</u> G <u>G</u> C <u>T</u> G <u>T</u> T <u>T</u> C <u>C</u> C <u>G</u> G <u>T</u> G <u>G</u> A <u>C</u> G <u>A</u> A <u>G</u> T <u>G</u> C <u>C</u> G <u>A</u> G <u>C</u> G <u>A</u> T <u>G</u> T <u>G</u> G <u>A</u> A <u>A</u> C <u>C</u> C <u>A</u> A <u>C</u> C <u>C</u> G <u>G</u> G <u>C</u> G <u>G</u> C <u>G</u> C <u>C</u> T <u>G</u> C <u>C</u> G <u>G</u> A <u>T</u> A <u>C</u> C <u>G</u> A <u>A</u> A <u>G</u> C <u>G</u> C <u>G</u> C <u>C</u> C <u>T</u> G <u>G</u> G <u>C</u> G <u>G</u> C <u>A</u> C <u>C</u> G <u>A</u> A <u>T</u> G <u>G</u> A <u>T</u> T <u>T</u> T <u>A</u> A <u>A</u> C <u>G</u> C <u>T</u> G <u>C</u> C <u>G</u> C <u>A</u> A <u>C</u> A <u>T</u> T <u>G</u> A <u>A</u> C <u>T</u> G <u>A</u> G <u>C</u> G <u>A</u> A <u>C</u> C <u>G</u> G <u>T</u> G <u>A</u> A <u>A</u> T <u>T</u> T <u>C</u> T <u>G</u> G <u>G</u> C <u>G</u> C <u>G</u> C <u>A</u> C <u>C</u> T <u>G</u> A <u>G</u> C <u>A</u> G <u>C</u> C <u>T</u> G <u>A</u> T <u>T</u> C <u>C</u> G <u>G</u> A <u>A</u> G <u>C</u> G G <u>A</u> A <u>G</u> A <u>T</u> A <u>G</u> C <u>T</u> G <u>G</u> T <u>G</u> G <u>A</u> C <u>C</u> G <u>G</u> C <u>G</u> A <u>T</u> A <u>G</u> C <u>G</u> C <u>G</u> A <u>G</u> C <u>C</u> T <u>G</u> G <u>A</u> T <u>A</u> C <u>C</u> G <u>C</u> G <u>G</u> C <u>A</u> T <u>T</u> A <u>A</u> A <u>C</u> T <u>G</u> A <u>G</u> G <u>C</u> T <u>G</u> A <u>G</u> G <u>C</u> C <u>C</u> G <u>G</u> C <u>A</u> G <u>C</u> C <u>C</u> A <u>G</u> G <u>C</u> T <u>G</u> T <u>T</u> C <u>C</u> C <u>C</u> G <u>T</u> G <u>G</u> A <u>C</u> G <u>A</u> G <u>G</u> T <u>G</u> C <u>C</u> C <u>A</u> G <u>C</u> G <u>A</u> C <u>G</u> T <u>G</u> G <u>A</u> G <u>A</u> C <u>C</u> A <u>A</u> C <u>C</u> C C <u>G</u> G <u>C</u> G <u>G</u> C <u>G</u> C <u>C</u> T <u>G</u> C <u>C</u> C <u>G</u> A <u>C</u> C <u>C</u> G <u>A</u> C <u>C</u> C <u>G</u> A <u>G</u> C <u>G</u> C <u>C</u> C <u>C</u> C <u>T</u> G <u>G</u> G <u>C</u> G <u>G</u> C <u>A</u> C <u>C</u> G <u>A</u> G <u>T</u> G <u>G</u> A <u>T</u> C <u>T</u> C <u>A</u> A <u>G</u> A <u>G</u> G <u>T</u> G <u>C</u> A <u>G</u> G <u>A</u> A <u>C</u> A <u>T</u> C <u>G</u> A <u>G</u> C <u>T</u> G <u>A</u> G <u>C</u> G <u>A</u> G <u>C</u> C <u>C</u> G <u>T</u> G <u>A</u> A <u>G</u> T <u>T</u> C <u>T</u> G <u>G</u> G <u>C</u> G <u>G</u> C <u>G</u> C <u>A</u> C <u>C</u> T <u>G</u> A <u>G</u> C <u>A</u> G <u>C</u> C <u>T</u> G <u>A</u> T <u>C</u> C <u>C</u> C <u>G</u> A <u>G</u> G <u>C</u> G <u>A</u> G <u>G</u> A <u>C</u> A <u>G</u> C <u>T</u> G <u>G</u> T <u>G</u> G <u>A</u> C <u>C</u> G <u>G</u> C <u>G</u> A <u>C</u> A <u>G</u> C <u>G</u> C <u>C</u> A <u>G</u> C <u>C</u> T <u>G</u> G <u>A</u> C <u>A</u> C <u>C</u> G <u>C</u> C <u>G</u> C <u>A</u> T <u>C</u> A <u>A</u> G <u>C</u> T <u>G</u>

Note: the corresponding changed bases in the sequences between the wild type and optimized type marked by underline.

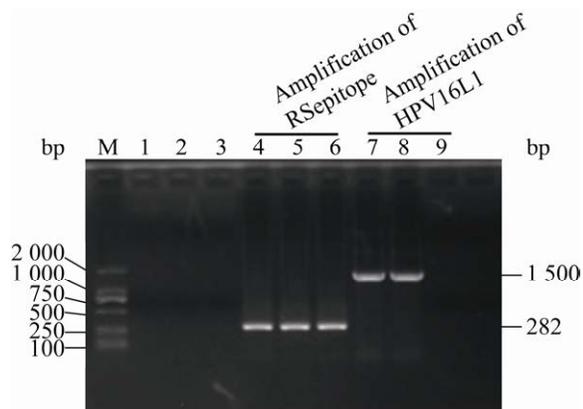


图 1 PCR 鉴定重组质粒结果

Fig. 1 Plasmid identification by PCR. M: DNA marker; 1: PCR control without template; 2: PCR amplification of RSeptope from pcDNA3.1; 3: PCR amplification of HPV16L1 from pcDNA3.1; 4, 7: pcDNA3.1/RSeptope-HPV16L1; 5, 8: pcDNA3.1/HPV16L1-RSeptope; 6, 9: pcDNA3.1/RSeptope. The right side represent the RSeptope gene (282 bp) and the HPV16L1 gene (1 500 bp).

HPV16L1 基因, 质粒 pcDNA3.1/RSeptope-HPV16L1 和 pcDNA3.1/HPV16L1-RSeptope 可扩增出一个 1 500 bp 的目的基因片段 (图 1, 泳道 7 和 8)。序列分析显示 RSeptope 和 HPV16L1 融合体构建成功 (测序结果略)。

2.2 重组质粒在细胞中的表达

重组质粒转染 COS-7 细胞后, 逆转录 PCR (RT-PCR)、蛋白免疫印迹、免疫荧光检测目的基因 mRNA、目的蛋白。RT-PCR 结果显示: 转染 pcDNA3.1/RSeptope-HPV16L1 质粒的细胞检测到 RSeptope 基因片段 (282 bp, 图 2 泳道 1) 和 HPV16L1 基因片段 (1 500 bp, 图 2 泳道 6); 而转染 pcDNA3.1/HPV16L1-RSeptope 质粒的细胞检测不到 RSeptope 和 HPV16L1 基因片段 (图 2 泳道 3 和 8); 转染 pcDNA3.1/RSeptope 质粒的细胞仅能检测到 RSeptope 基因片段 (图 2 泳道 2), 检测不到 HPV16L1 基因片段 (图 2 泳道 7)。

Western blotting 结果显示: 转染 pcDNA3.1/RSeptope-HPV16L1 重组质粒的细胞裂解液, 均可免疫印迹到 RSeptope (10 kDa) 和 HPV16L1 (65 kDa) 目标蛋白; 转染 pcDNA3.1/HPV16L1-RSeptope 重组质粒的细胞裂解液, 均无 RSeptope 和 HPV16L1 目标蛋白的表达; pcDNA3.1/RSeptope 转染细胞裂解液可检测到目标蛋白 RSeptope, 结果见图 3。

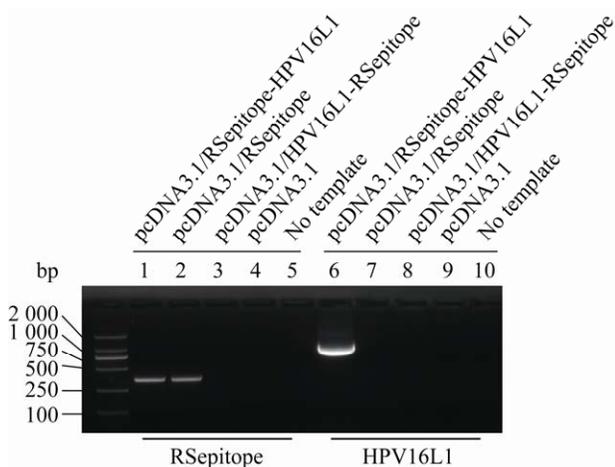


图 2 RT-PCR 鉴定目标基因的 mRNA

Fig. 2 Identification of target mRNA by RT-PCR. M: DNA marker; 1-2: RSeptitope gene fragment (282 bp) amplified from the transfected cells with pcDNA3.1/RSeptitope-HPV16L1, with pcDNA3.1/RSeptitope by RSeptitope-specific primers, respectively; 3-4: no RSeptitope gene fragment was amplified from the transfected cells with pcDNA3.1/HPV16L1-RSeptitope, with pcDNA3.1 by RSeptitope-specific primers, respectively; 5, 10: PCR control without template (no cDNA); 6: HPV16L1 gene fragment (1 500 bp) amplified from pcDNA3.1/RSeptitope-HPV16L1 by HPV16L1-specific primers; 7-9: no HPV16L1 gene fragment was amplified from the transfected cells with pcDNA3.1/RSeptitope, with pcDNA3.1/HPV16L1-RSeptitope, or with pcDNA3.1 by HPV16L1-specific primers, respectively.

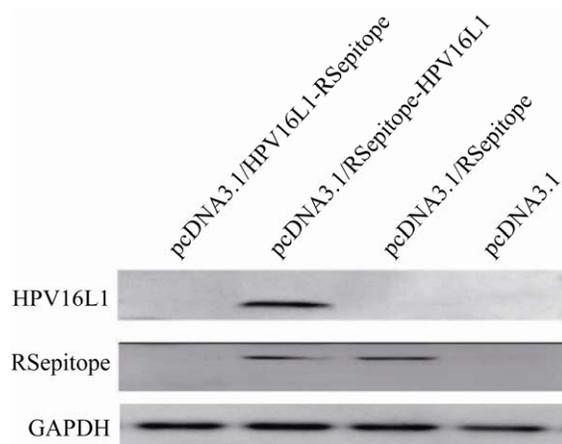


图 3 Western blotting 检测转染细胞裂解液中目标蛋白质的表达

Fig. 3 Identification of target proteins in cell lysate by Western blotting.

免疫荧光实验结果显示：转染 pcDNA3.1/RSeptitope-HPV16L1 重组质粒的 COS-7 细胞均可检测到 RSeptitope 和 HPV16L1 的共表达 (分别显示绿色荧光)；转染 pcDNA3.1/RSeptitope 的细胞仅能检测到 RSeptitope 的表达 (绿色荧光)；转染 pcDNA3.1/HPV16L1-RSeptitope 重组质粒的细胞，均无 RSeptitope 和 HPV16L1 的表达，均未显示绿色荧光，结果见图 4。

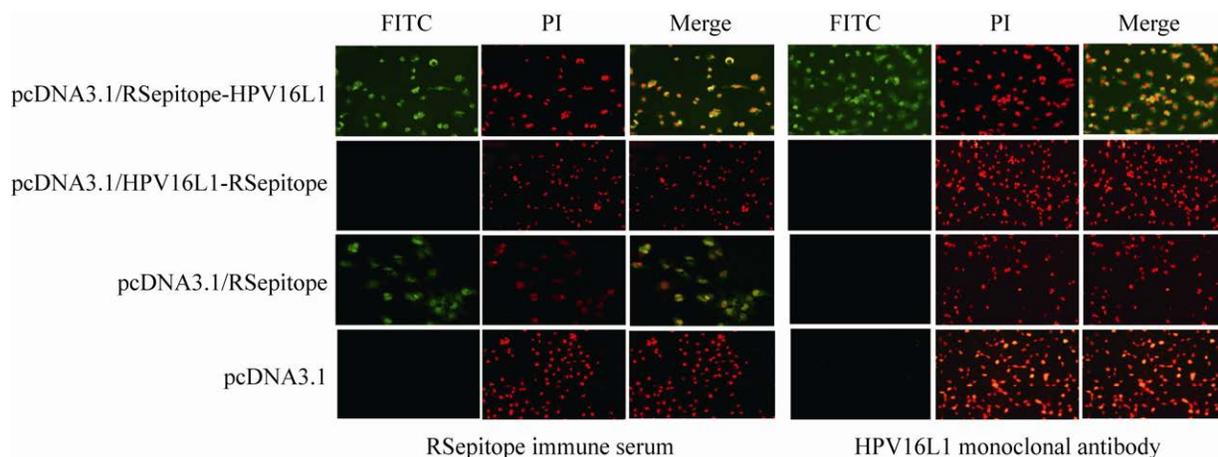


图 4 免疫荧光检测目标蛋白的表达

Fig. 4 Identification of target proteins by immunofluorescence.

图 2-4 实验结果表明：RSeptope 融合在 HPV16L1“N”端的融合体 (RSeptope-HPV16L1) 在细胞内可以正常转录，可实现表位与载体蛋白的共表达；RSeptope 融合在 HPV16L1“C”端的融合体 (HPV16L1-RSeptope) 在细胞内不能正常转录和翻译。

2.3 免疫血清中 RSeptope 特异性抗体 IgG 水平

免疫血清中 RSeptope 特异性抗体生成水平呈时间依赖关系，于免疫第 6 周抗体产生达到峰值，尤以 Group 2 (RSeptope-HPV16L1 融合体 DNA 初免蛋白加强免疫组) 和 Group 4 (RSeptope 蛋白免疫对照组) 抗体量最高，分别为 2.706 ± 0.193 和 2.547 ± 0.069 ，虽两组间差异不具有显著统计学意义 ($P > 0.05$)，但分别比较其他各组，差异均具有显著统计学意义 ($P < 0.05$)。Group 3 (HPV16L1-RSeptope 融合体 DNA 初免蛋白加强免疫组) 体内没有显示出免疫原性，其低水平抗体应该是最后一次 RSeptope 蛋白加强免疫所致。特别于第 4 周和第 6 周，Group 2 抗体 IgG 产生量显著高于 Group 1 (RSeptope 非融合体 DNA 初免蛋白加强免疫组)，差异具有显著统计学意义 ($P < 0.05$)，提示 HPV16L1 作为表位载体的优势效应，不仅可提高表位的免疫原性，pcDNA/RSeptope-HPV16L1 表达水平是否高于 pcDNA/RSeptope 待后续研究分析，见图 5A。

Group 2 和 Group 4 (均为抗体生成水平较高组) 免疫血清，于第 6 周确定抗体效价，结果显示：血清稀释至 1:10 240 时，两组能够检测到的抗体水平分别为 0.788 ± 0.147 和 0.575 ± 0.174 ；稀释至 1:20 480 时，Group 2 检测到的抗体低至 0.370 ± 0.039 ，因此确定该组抗体效价为 1:10 240 (图 5B)。实验结果证实：RSeptope-HPV16L1 融合体两次 DNA 免疫再以蛋白加强免疫的方案即可达到单独蛋白免疫所产生的抗体水平。

2.4 RSeptope 特异性抗体亚类水平

各组免疫血清检测抗体亚类 IgG1 和 IgG2a 确定免疫反应类型，结果显示：Group 1 (非融合体

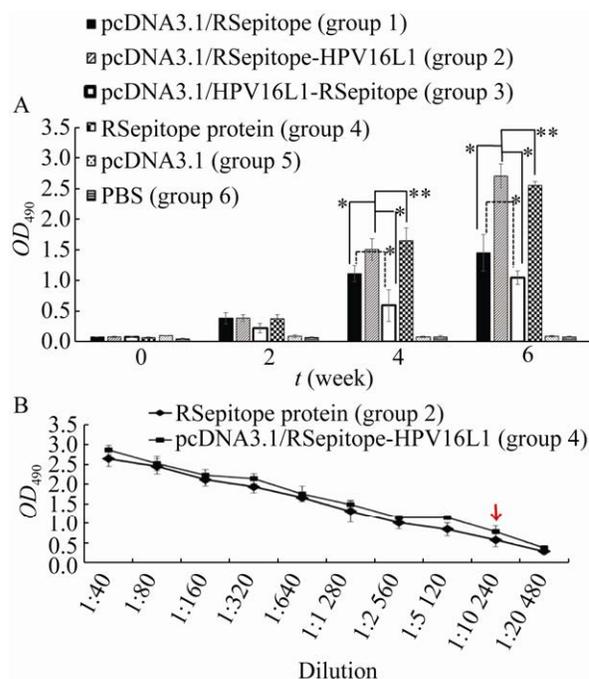


图 5 ELISA 检测 RSeptope 特异性抗体 IgG 及其效价 Fig. 5 Detection of RSeptope-specific IgG antibody production and titer by ELISA. (A) The production of RSeptope-specific IgG antibody over the immunization schedule. Comparison between corresponding groups, *: $P < 0.05$; **: $P > 0.05$. (B) The titer of RSeptope-specific IgG antibody. The groups of pcDNA3.1/RSeptope-HPV16L1 and RSeptope protein with the highest antibody level on week 6 were used for evaluation of the antibody titer. The antibody titer marked by the red arrow is 1:10 240 (when the serum diluted to 1:20 480, almost no RSeptope-specific IgG antibody can be detected).

和 Group 2 (融合体) 的 RSeptope 特异性抗体亚类 IgG1 和 IgG2a 产生水平，差异均无显著统计学意义 ($P > 0.05$)，说明“两次 DNA 免疫再以蛋白加强免疫”的方案既可诱导 Th1 型又可以诱导 Th2 型免疫反应类型 (即：同时诱导体液和细胞免疫反应)，而 Group 2 抗体亚类产生水平明显高于 Group 1，显示了融合体中 HPV16L1 的载体优势效应。Group 3 和 Group 4 的 IgG1 产生水平显著高于 IgG2a，差异均具有显著统计学意义 ($P < 0.05$)，提示蛋白质免疫诱导偏向 Th2 免疫反应类型 (主要是体液免疫)，Group 3 产生的较低水平 IgG1 和 IgG2a 推测应该归因于最后一次 RSeptope 蛋白加强免疫所致，见图 6。

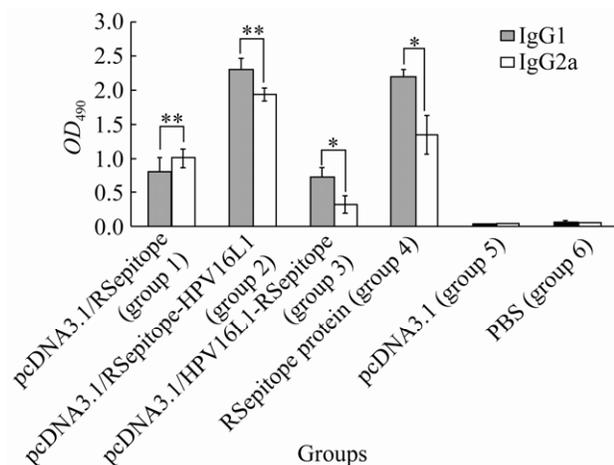


图6 ELISA 检测 RSeptitope 特异性抗体亚类 IgG1 和 IgG2a

Fig. 6 Detection of RSeptitope-specific IgG1 and IgG2a antibody subclasses by ELISA. Note: comparison between corresponding groups. *: $P < 0.05$; **: $P > 0.05$.

2.5 免疫鼠脾细胞中 IFN- γ 产生水平

RSeptitope 表位中的一个 T 细胞表位肽与免疫鼠脾细胞共孵育后检测 IFN- γ 产生水平, 结果见图 7A-B。Group 2 的 3 只小鼠脾细胞均可检测到最多数量的 IFN- γ 斑点数, 分别比较其他组别, 差异均具有显著统计学意义 ($P < 0.05$), 该组显著的细胞免疫可能不仅源于免疫方案, 而且可能也得益于 HPV16L1 的载体优势效应, 提高了表位的表达水平。pcDNA3.1 (质粒对照组) 比较 PBS 对照组也有一定的 IFN- γ 产生, 差异具有显著统计学意义 ($P < 0.05$), 提示可能存在非特异性免疫刺激效应。

3 讨论

表位免疫可提高免疫反应的特异性, T、B 细胞多表位的联合可全面诱导有效的体液和细胞免疫反应。优良的表位运载体可显著提高表位免疫原性, 如 HBsAg (乙肝病毒表面抗原)、HBcAg (乙肝病毒核心抗原)、HPV16L1 或 HPV16L2 等作为抗原表位的递送系统, 可实现目标抗原的有效释放, 体内诱导有效的免疫保护效应。研究表明:

HPV6bL1 为载体, 携带与鼻咽癌发生发展密切相关的 EB 病毒 (Epstein-Barr virus, EBV) 潜伏膜蛋白 2 (LMP2) 的 T、B 细胞优势多表位, 实验动物体内显示了较好的免疫学效应^[11]; HBcAg 为载体携带 E 型沙眼衣原体 *Chlamydia trachoma* 主要外膜蛋白 (MOMP) 优势多表位免疫实验动物后, 能够对衣原体的攻击产生免疫保护作用^[12]。

无论哪个型别的 HPV, 其 L1 或 L2 体内外均可自行组装成病毒样颗粒的形式, 作为免疫原或外源抗原的载体都是理想的选择。Slupetzky 等证实了将外源表位插入至 HPV16L1 衣壳蛋白表面是切实可行的, 不影响 L1 的抗原特性^[13]; HPV16L1 或 HPV16L2 与其他抗原分子融合, 还可实现共免疫反应, 例如, 羧基末端截短的 HPV16L1 蛋白融合到 HPV16-E7 蛋白 (早期蛋白 7) 的氨基末端的融合体重组表达可自行组装成嵌合的病毒样颗粒 (CVLP), 体内可诱导出分别针对 L1 和 E7 的特异性细胞毒性 T 淋巴细胞以及相应的特异性抗体^[14]。

弓形虫 *T. gondii* 具有着复杂多期的生活史^[15-17], 其主要外膜蛋白 SAG1 和棒状体蛋白 ROP2 与弓形虫感染的发生与进展密切相关, 研究显示: SAG1 具有诱导中和抗体的抗原表位, ROP2 包含多个 T 细胞表位, 可被体内具有高水平 IFN- γ 的免疫个体的淋巴细胞所识别^[18]。我们前期制备了融合抗原 ROP2-SAG1, 证实体内免疫学效应后, 为提高免疫反应的特异性, 又进一步筛选和确定了 ROP2-SAG1 免疫优势 T、B 细胞表位的组合, 体内外同样显示了有效的免疫学效应^[11,9]。

HPV 和 *T. gondii* 具有相同的免疫保护人群, 以 HPV16L1 为载体携带 *T. gondii* 可实现共免疫效果, 是比较理想的弓形虫免疫防治策略。本研究选择了 HPV16 型 L1 (HPV16L1) 为 RSeptitope 递送载体, 构建了两种形式的融合体 RSeptitope-HPV16L1 和 HPV16L1-RSeptitope, 而只有 RSeptitope-HPV16L1 融合体体外能够实现共表达效应, 而 HPV16L1-RSeptitope 融合体体外细胞中既不转录

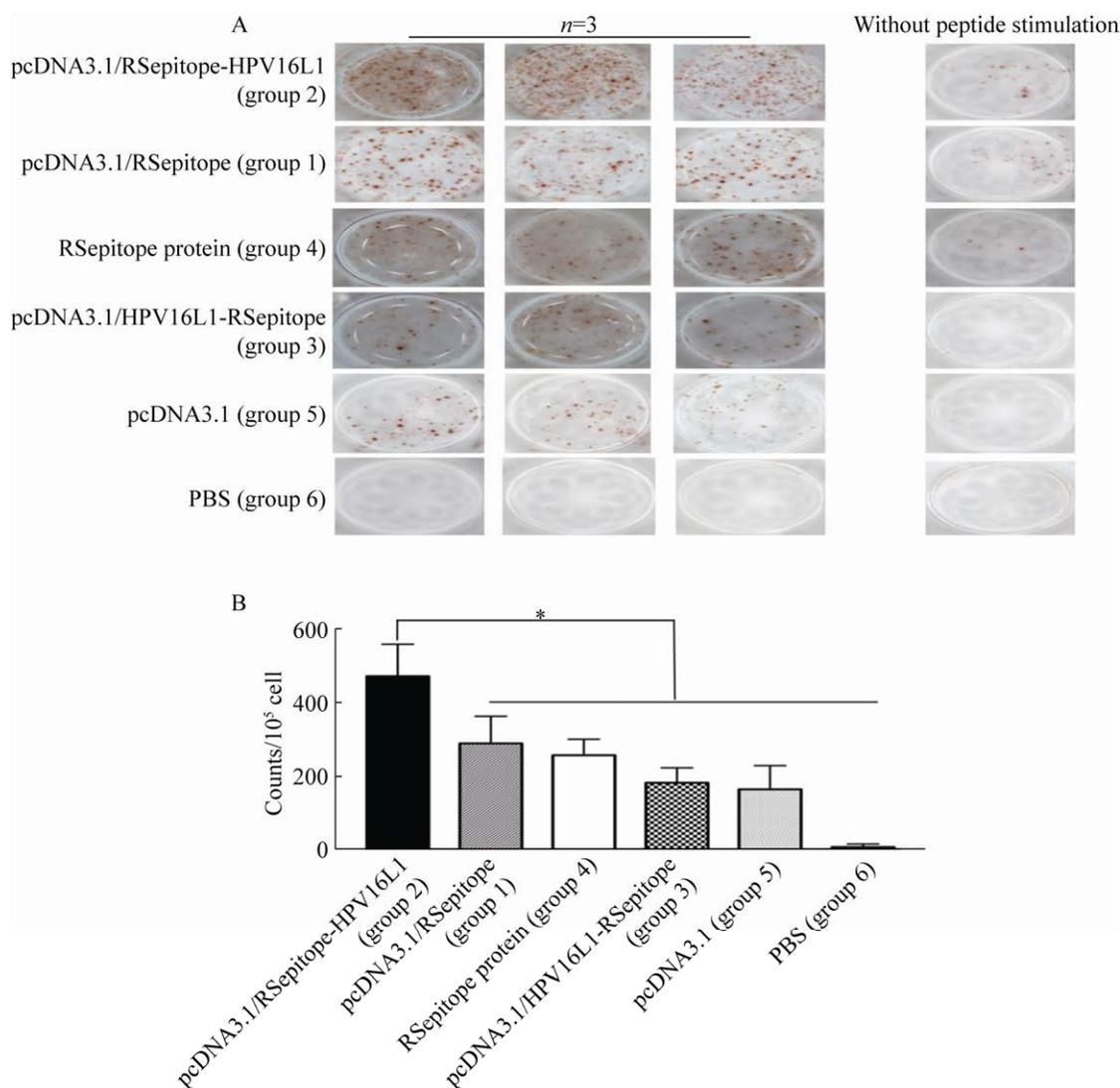


图 7 ELISPOT 检测免疫鼠脾细胞分泌 IFN- γ 的水平

Fig. 7 Detection of IFN- γ production in splenocytes from immunized mice by ELISPOT. (A) The production of IFN- γ was detected by ELISPOT after co-incubation of splenocytes and T cell epitope peptide ($n=3$). (B) Quantification of IFN- γ production in each group. The production of IFN- γ is expressed by the number of spots (in 10^5 cells) on the enzyme plate. The number of spots is determined by the spot imaging analyzer. Group 2 compared with each group. *: $P<0.05$.

也不能被翻译，说明表位和载体的融合位点导致序列的变化从而影响其后续生物学行为，其具体机制有待深入探讨。有文献也阐述了这个问题，即：外源表位插入至 HPV L1 特定区，产生的融合蛋白虽然能保留 L1 自行组装的能力，但过程很难预测，会受到插入表位的影响^[19]。

本研究采用一种“DNA 初免-蛋白质加强免疫”

的方案检测融合体的体内免疫学效应。与体外结果一致，HPV16L1-RSeptitope 融合体在体内也不能诱导有效的免疫应答，虽然比较质粒对照组 (pcDNA3.1) 和 PBS 对照组，产生了低水平的体液和细胞免疫反应应该是由最后一次 RSeptitope 蛋白的加强免疫所致，HPV16L1-RSeptitope 的融合体形式体内外均不能正常表达，融合后的基因分

析如何导致基因表达的调控需要后续研究进行解释。而 RSeptope 融合在 HPV16L1“N”端的融合体 (RSeptope-HPV16L1), 不仅在体外转染细胞中能够有效共表达 (载体和表位均可正常转录和翻译), 而且实验动物体内也可诱导最为显著的体液和细胞免疫反应 (即: 产生了最高水平的 RSeptope 特异性抗体 IgG 和 IFN- γ), 表现为 Th1 和 Th2 同时升高的免疫反应类型。而直接表位蛋白 RSeptope 免疫组 (Group 4, 蛋白免疫对照) 仅诱导了显著升高的抗体水平, 由于缺乏 DNA 免疫导致 IFN- γ 产生量明显缺乏, 表现为偏向 Th2 免疫反应类型。研究结果证实: “DNA 初免-蛋白质加强免疫”是比较理想的免疫方案, 通过 DNA 免疫诱导细胞免疫可以清除感染细胞, 再通过蛋白加强免疫诱导有效的抗体从而识别和结合游离细胞外的病原体, 这种免疫方案更适合针对胞内寄生病原体, 比如, 弓形虫感染的免疫防治。另外, 融合体 RSeptope-HPV16L1 组的免疫效应 (体液和细胞免疫) 也明显高于单独表位 RSeptope 组 (Group 1, 即: 没有与 HPV16L1 融合), 证实了 HPV16L1 载体的优势效应。

因此, 优势表位 RSeptope 融合在 HPV16L1“N”端的融合体 RSeptope-HPV16L1 诱导了既有 Th1 也有 Th2 型免疫反应, 且 HPV16L1 作为表位运载体系的免疫增强效应也尤为显著。本研究优化了一种合理的表位与载体的融合形式, 为后续进一步分析 RSeptope-HPV16L1 体内的免疫保护效应, 以及阐述表位与载体融合形式不同导致生物学效应显著差异的具体机制研究奠定了前期工作基础。

REFERENCES

- [1] Wang WH, Feng FF, Lv JH, et al. Major immunodominant region of hepatitis B virus core antigen as a delivery vector to improve the immunogenicity of the fusion antigen ROP2-SAG1 multiepitope from *Toxoplasma gondii* in mice. *Viral Immunol*, 2017, 30(7): 508-515, DOI: 10.1089/vim.2016.0135.
- [2] Wadman M. Closure of U.S. *Toxoplasma* lab draws ire. *Science*, 2019, 364(6436): 109, DOI: 10.1126/science.364.6436.109.
- [3] de Wit LA, Croll DA, Tershy B, et al. Potential public health benefits from cat eradications on islands. *PLoS Negl Trop Dis*, 2019, 13(2): e0007040, DOI: 10.1371/journal.pntd.0007040.
- [4] Tomasoni LR, Messina G, Genco F, et al. Risk of congenital toxoplasmosis in women with low or indeterminate anti-*Toxoplasma* IgG avidity index in the first trimester of pregnancy: an observational retrospective study. *Clin Microbiol Infect*, 2019, 25(6): 761.e9-761.e13, DOI: 10.1016/j.cmi.2018.09.024.
- [5] Castle PE, Stoler MH, Wright TC, et al. Performance of carcinogenic human papillomavirus (HPV) testing and HPV 16 or HPV 18 genotyping for cervical cancerscreening of women aged 25 years and older: a subanalysis of the ATHENA study. *Lancet Oncol*, 2011, 12(9): 880-890, DOI: 10.1016/S1470-2045(11)70188-7.
- [6] Garland SM, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, et al. Quadrivalent vaccine against human papilloma virus to prevent anogenital diseases. *N Engl J Med*, 2007, 356(19): 1928-1943, DOI: 10.1056/NEJMoa061760.
- [7] Vijayan V, Mohapatra A, Uthaman S, et al. Recent advances in nanovaccines using biomimetic immunomodulatory materials. *Pharmaceutics*, 2019, 11(10): 534, DOI: 10.3390/pharmaceutics11100534.
- [8] 谢自新, 姜洁, 汪文寰, 等. 弓形虫复合抗原 ROP2-SAG1 优势表位与人乳头瘤病毒 16 型晚期结构蛋白 L1 融合体的构建及其在真核细胞中的表达. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2018, 36(3): 266-271.
Xie ZX, Jiang J, Wang WH, et al. Construction of the RSeptope-HPV16L1 fusion protein using the dominant epitope of ROP2-SAG1 antigen from *Toxoplasma gondii* and late structural protein 1 of HPV type 16 and its expression in eukaryotic cells. *Chin J Parasitol Dis*, 2018, 36(3): 266-271 (in Chinese).
- [9] 吕金辉, 汪文寰, 熊一融, 等. 弓形虫棒状体蛋白

- 2 和膜表面蛋白 1 复合抗原优势表位免疫原性研究. 中华传染病杂志, 2016, 34(1): 32-38, DOI: 10.3760/cma.j.issn.1000-6680.2016.01.008.
- Lv JH, Wang WH, Xiong YR, et al. Immunogenicity of dominant of complex antigen rhostry protein 2-surface protein 1 derived from *Toxoplasma gondii*. Chin J Infect Dis, 2016, 34(1): 32-38, DOI: 10.3760/cma.j.issn.1000-6680.2016.01.008 (in Chinese).
- [10] Li WS, Chen QX, Ye JX, et al. Comparative evaluation of immunization with recombinant protein and plasmid DNA vaccines of fusion antigen ROP2 and SAG1 from *Toxoplasma gondii* in mice: cellular and humoral immune responses. Parasitol Res, 2011, 109(3): 637-644, DOI: 10.1007/s00436-011-2296-5.
- [11] Zhu SL, Xue XY, Liu JX, et al. Expression of HPV6b L1/EBV LMP2 multiepitope and immunogenicity in mice. Acta Biochim Biophys Sin, 2010, 42(8): 515-521, DOI: 10.1093/abbs/gmq054.
- [12] Jiang PF, Du WQ, Xiong YR, et al. Hepatitis B virus core antigen as a carrier for *Chlamydia trachomatis* MOMP multi-epitope peptide enhances protection against genital chlamydial infection. Oncotarget, 2015, 6(41): 43281-4392, DOI: 10.18632/oncotarget.6533.
- [13] Slupetzky K, Shafti-Keramat S, Lenz P, et al. Chimeric papillomavirus-like particles expressing a foreign epitope on capsid surface loops. J Gen Virol, 2001, 82(11): 2799-2804, DOI: 10.1099/0022-1317-82-11-2799.
- [14] Kaufmann AM, Nieland JD, Jochmus I, et al. Vaccination trial with HPV16 L1E7 chimeric virus-like particles in women suffering from high grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN 2/3). Int J Cancer, 2007, 121(12): 2794-2800, DOI: 10.1002/ijc.23022.
- [15] Wang JL, Zhang NZ, Li TT, et al. Advances in the development of anti-*Toxoplasma gondii* vaccines: challenges, opportunities, and perspectives. Trends Parasitol, 2019, 35(3): 239-253, DOI: 10.1016/j.pt.2019.01.005.
- [16] Zhang DC, Jiang N, Chen QJ. Vaccination with recombinant adenoviruses expressing *Toxoplasma gondii* MIC3, ROP9, and SAG2 provide protective immunity against acute toxoplasmosis in mice. Vaccine, 2019, 37(8): 1118-1125, DOI: 10.1016/j.vaccine.2018.12.044.
- [17] Rezaei F, Sarvi S, Sharif M, et al. A systematic review of *Toxoplasma gondii* antigens to find the best vaccine candidates for immunization. Microb Pathog, 2019, 126: 172-184, DOI: 10.1016/j.micpath.2018.11.003.
- [18] Dodangeh S, Daryani A, Sharif M, et al. A systematic review on efficiency of microneme proteins to induce protective immunity against *Toxoplasma gondii*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2019, 38(4): 617-629, DOI: 10.1007/s10096-018-03442-6.
- [19] Schellenbacher C, Roden RBS, Kirnbauer R. Developments in L2-based human papillomavirus (HPV) vaccines. Virus Res, 2017, 231: 166-175, DOI: 10.1016/j.virusres.2016.11.020.

(本文责编 郝丽芳)