

登革病毒 2 型 E 蛋白基因真核表达和 DNA 免疫的研究

高 阳, 江丽芳**, 方丹云, 曾祥凤

(中山大学中山医学院微生物学教研室, 广州, 510080)

Eukaryotic Expressing and the DNA Immunization of E Protein

Gene of *Dengue virus 2*

GAO Yang, JIANG Li-fang**, FANG Dan-yun, ZENG Xiang-feng

(Department of Microbiology, Zhong shan Medical College, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: The gene encoding a strategically truncated E glycoprotein, approximately 80% of the N-terminal sequence was cloned into the eukaryotic expressing plasmid pCXN2 to get the recombinant plasmid pCXN2-E. Indirect immune fluorescence assay showed that the recombinant plasmid pCXN2-E can be expressed in COS-7 cells. The specific antibody against DV2 E was detected by ELISA at 2 weeks after the last inoculation, and maintained to 15 weeks; Plaque reduction neutralization test (PRNT) was performed on sera obtained at 2 weeks post inoculation. The sera had high PRNT50 titer which was over 1:640; The percentage of CD4⁺ T-lymphocyte subtype cells in immune mice increased compared with the control group. The percentage of CD8⁺ T-lymphocyte subtype cells in the group of pCXN2-E was significantly higher than that of pCXN2 group ($p < 0.01$); Mice protection against challenge showed that 60% mice survived. In conclusion: pCXN2-E can induce humoral and cellular immune response. Especially, the raise of CD8⁺ CTL is important to clear virus.

Key Word: *Dengue virus 2*; E protein; Gene clone; DNA vaccine

摘要: 将编码登革病毒 2 型 (DV2) 氨基末端 80% 的 E 蛋白的 DNA 片段克隆到真核表达载体 pCXN2 AG 强启动子下游, 构建成 DV2E 重组真核表达质粒 pCXN2-E。间接免疫荧光显示其可在 COS-7 细胞中表达。ELISA 法检测 pCXN2-E DNA 免疫 BALB/c 鼠血清中的 E 抗体变化和维持规律, 结果显示三次免疫后 2 周已有抗体产生, 15 周时仍维持较高的水平; 血清空斑减数中和实验显示其中和滴度高于 1:640; 流式细胞计数仪 (FACS) 检测 DNA 免疫鼠 CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞变化情况, 与注射空载体 pCXN2 的阴性鼠相比, CD4⁺ 淋巴细胞水平略有上升, CD8⁺ 细胞水平有较大升高 ($p < 0.01$); 动物保护性实验结果显示, 当用致死剂量登革病毒攻击免疫鼠时, 其保护率为 60%。以上结果表明: pCXN2-E 在实验动物内表达出的 DV2E 蛋白可以诱导免疫动物的体液免疫和细胞免疫应答, 尤其是 MHC-I 限制性杀伤性 CD8⁺ T 淋巴细胞水平的提高对清除病毒是十分有利的。因此, DV2 E DNA 免疫为登革病毒 DNA 疫苗的发展进行了有益的探索。

关键词: 登革病毒 2 型 (DV2); E 蛋白; 基因克隆; DNA 免疫

中图分类号: R373.3

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125 (2003) 03-0201-05

登革病毒 (*Dengue virus*, DV) 是一种蚊媒传播的病原体, 属于黄病毒科、黄病毒属, 包括 4 个血清型, 即登革病毒 1、2、3、4 型病毒。登革病毒可引起人的登革热 (DF)、登革出血热 (DHF) 和

登革休克综合征 (DSS)。多见于热带和亚热带地区, 在我国的华南和台湾地区时有流行。在过去的 20 年中, 登革病毒引起的疾病的发病率和病死率显著增加, 每年大约有 1 亿人感染登革病毒, 超过 25

收稿日期: 2002-11-04, 修回日期: 2002-12-09

作者简介: 高阳 (1976-), 女, 山东青岛籍, 硕士研究生, 现在广州市疾病预防控制中心病免科工作。

** 通讯作者: 江丽芳 (1953-), 女, 广东省籍, 教授, 博士生导师。Correspondence author. E-mail: jiang LF@sums.edu.cn

亿的人群受到威胁^[1]。目前尚无特异性的防治方法,对登革病毒的 DNA 疫苗研究正处于探索阶段。在登革病毒所编码的结构蛋白中, E 蛋白含有中和抗原表位,能诱导机体产生中和抗体^[2],在 E 蛋白上还存在 T 细胞表位,能诱导机体产生特异性的 CD8⁺ CTL 细胞^[3-4]。本文利用 DNA 重组技术,构建了真核表达载体 pCXN2-E,并观察了其免疫效果,为登革病毒疫苗的研制提供了依据。

1 材料与方 法

1.1 材料

含有 AG 强启动子即 CMV-IE Enhancer 和 Chicken b-Action Promoter 的真核表达载体 pCXN2 由本室保存。*E. coli* JM109 及登革病毒 2 型(海南株 AF204177)由本室保存。C6/36 细胞由本室保存;COS-7 细胞购自本校动物中心。AMV 逆转录酶为 Promega 公司产品, Taq DNA polymerase 为加拿大 Biostar International Coperate 产品, DNA 限制性内切酶为上海生物工程公司产品。转染试剂 DMRIE-C reagent 为 Gibco 产品。

检测用抗原、单克隆抗体及第二抗体 检测用的抗原是登革病毒 2 型海南株全抗原,登革病毒 2 型 E 蛋白的单克隆抗体由美国 CDC 惠赠,羊抗鼠的 IgG-FITC 及 IgG-HRP 购自鼎国公司。昆明乳鼠和 BALB/c 鼠由本校动物中心提供。

1.2 方法

1.2.1 DV2 E 重组真核表达载体 pCXN2-E 的构建:登革病毒感染前 24h 将生长良好的 C6/36 细胞进行传代,感染时弃去培养液,加入 DV2 冻存液及少量 Eagle 维持液,37℃ 吸附 1h,弃感染液,再加入 2% 小牛血清的 Eagle 维持液,32℃ 继续培养至细胞出现病变。根据 DV2 (海南株 AF204177) 基因的碱基序列设计引物:正向引物 5'GGG TAC CTT

Kpn I

ATG GCA GCA ATC CTG-3' 与病毒 RNA 的第 844-858 碱基序列相同;反向引物 5'-GCG AGC TCT

Sac I

CAC TTA AAC CAG TTG-3' 与病毒 RNA 的第 2103-2115 碱基序列互补。取 DV2 感染的细胞上清 200μL,用 TRIZOL 试剂提取 RNA,特异性的引物逆转录后,PCR 扩增 DV2 目的基因片段。反应如下:先 94℃ 变性 5min,加 Taq DNA polymerase 后,94℃ 变性 1min,55℃ 退火 1min,72℃ 延伸 2min,30 个循环后,72℃ 延伸 10min。取 5μL PCR 产物进行琼脂糖电泳,检查 PCR 扩增产物。用限制性内切

酶 *Kpn* I-*Sac* I 消化纯化的 E 蛋白基因,将其与经过限制性内切酶 *Kpn* I-*Sac* I 双酶消化的载体质粒 pCXN2 进行连接。经 PCR 及限制性内切酶酶切鉴定得到重组质粒 pCXN2-E。提取重组质粒 pCXN2-E,用特异性引物进行序列测定。

1.2.2 重组质粒 pCXN2-E 在真核细胞 COS-7 细胞中的表达鉴定:按说明书进行。脂质体法转染 pCXN2 与 pCXN2-E 于 COS-7 细胞中,培养 72h 后,刮下细胞,制成抗原片,细胞孔加抗登革病毒 E 蛋白的单抗和荧光标记的羊抗鼠的 IgG,荧光镜下观察照相。

1.2.3 实验动物的 DNA 免疫:按分子克隆所述方法提纯质粒 DNA,测定核酸样品的纯度和浓度。用 PBS 调整浓度至 1.0μg/μL,作为 DNA 免疫的注射样品。选取 30 只 4-5 周龄的 BALB/c 小鼠,其中 15 只作为阴性对照注射载体质粒 pCXN2,另外 15 只作为阳性组注射重组质粒 pCXN2-E。DNA 免疫前先在实验动物左后退胫前肌按 50μL/只注射 0.05% 布比卡因注射液,使肌肉处于再生状态,提高 DNA 的摄取率,3d 后在相同的部位进行 DNA 免疫。初次免疫后 2、5 周各加强一次,同样先经布比卡因预处理,每次免疫剂量为 100μL DNA/只。

1.2.4 特异性抗体的检测:3 次免疫后,不同时间从小鼠尾静脉或眼眶取血,采用常规 ELISA 方法检测针对 DV2 E 蛋白的特异性抗体水平。包被抗原为登革病毒的全抗原,加适当稀释的待测血清样品反应后,加羊抗鼠 IgG-HRP (1:2000) 反应,加底物 OPD 显色后,置酶标仪测 OD_{450nm} 光密度值。末次免疫后 2 周,收集血清标本,以 2 倍稀释度稀释成不同倍数,分别取 10μL 血清与 190μL 10⁻⁶ 稀释度的病毒液 (DV2 海南株,13×10⁶ PFU/0.1mL) 混合(血清又稀释了 20 倍)。将其加入到培养 C6/36 细胞的 24 孔板,置 37℃ 5%CO₂ 孵箱作用 2h,弃病毒液,最终以 1% 的甲基纤维素的 MEM 覆盖培养,3d 后 1% 结晶紫染色,计数空斑数。以无抗体作用,等量单纯病毒所致空斑数为标准,导致空斑数减少 50% 的最高抗体稀释倍数作为中和抗体滴度。

1.2.5 细胞免疫水平的检测:末次免疫后 2 周的小鼠,断颈处死,取脾分离淋巴细胞,调整细胞数为 1×10⁶/mL,分别加入 CD4⁺-FITC 和 CD8⁺-PE 各 0.2μg,置流式细胞仪检测,每只均做两个平行管。

1.2.6 动物保护性实验:1-3 日龄的昆明乳鼠 10 只,脑内感染含有登革病毒的细胞上清 0.02mL,待小鼠

发病后, 制备 50% 的鼠脑悬液, 将其以 10 倍稀释度稀释, 分别将不同稀释度的鼠脑悬液 0.03mL 注射入 4~5 周龄的 BALB/c 鼠脑内, 观察其发病死亡情况, 共观察 21d, 计算 LD_{50} 。对末次免疫后 3 周的 BALB/c 鼠脑内攻击 $100LD_{50}$ 的鼠脑悬液, 每天观察其瘫痪死亡情况, 共观察 21d, 将所得数据作统计学分析。

2 结果

2.1 重组 DV2 E 真核表达载体的构建

RT-PCR 产物电泳检查, 显示一条大小约为 1 300bp 的 DNA 带, 与拟扩增的基因片段大小完全相符。重组真核表达载体经 PCR 扩增和 *Kpn* I-*Sac* I 双酶切后, 均可得大小约为 1 300bp 的 DNA 片段, 见图 1, 表明 E DNA 已被克隆到 pCXN2 表达载体中的 AG 强启动子下游。将获得的重组真核表达命名为 pCXN2-E。序列测定结果与 DV2 (海南株, AF204177) 比较, 其基因的核苷酸同源率为 95%, 氨基酸同源率为 98%。

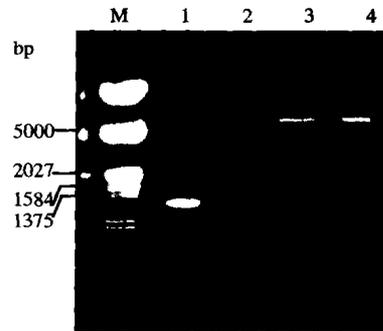


图 1 重组质粒 pCXN2-E 的酶切及 PCR 鉴定

Fig.1 PCR and digest of recombinant plasmid pCXN2-E
M, λ DNA/*Eco*R I + *Hind* III Marker; 1, pCXN2-E PCR product; 2, pCXN2 PCR product; 3, pCXN2/*Kpn* I-*Sac* I; 4, pCXN2-E/*Kpn* I-*Sac* I;

2.2 DV2 E 蛋白基因在 COS-7 细胞中的表达

重组质粒 pCXN2-E 与空载体分别导入 COS-7 细胞 72h 后涂片, 可见在重组质粒转染的细胞涂片中, 部分细胞的胞膜和胞浆有黄绿色的荧光, 表明此重组质粒可以导入真核细胞并有效表达, 空载体转染的 COS-7 细胞涂片结果为阴性 (图 2)。

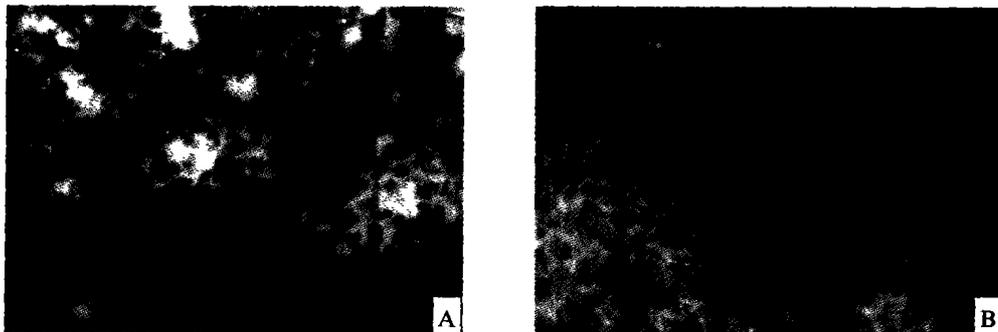


图 2 间接免疫荧光实验

A, pCXN2-E 阳性结果; B, 阴性对照。

Fig.2 Results of IFA

A, Positive results of pCXN2-E; B, Negative control.

2.3 DV2 E 蛋白基因 DNA 免疫抗体产生水平和动态观察

免疫后不同时间对注射了重组质粒及空载体质粒的各 5 只小鼠取血, 制备血清, 用间接 ELISA 方法检测抗体产生水平。图 3 结果显示, 注射了重组质粒的小鼠在末次免疫后 2 周已有抗体产生, 15 周时抗体水平仍维持较高的水平, 与对照组比较有显著性的差异 ($p < 0.01$)。

2.4 产生的 E 抗体体外中和病毒的能力

空斑减数中和实验结果显示, 免疫血清的中和

抗体滴度为 1:640 时, 在体外仍具有保护作用。

2.5 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ T 淋巴细胞增殖情况检测

末次免疫后 2 周的小鼠断颈处死, 分离淋巴细胞, 进行流式细胞仪检测, 结果显示, DNA 免疫可以诱发小鼠 T 淋巴细胞增殖, 特别是杀伤性 T 淋巴细胞 $CD8^+$ 水平有较大幅度升高, 说明 DV2 E 的 DNA 免疫可以促使免疫机体 MHC-I 限制性 $CD8^+$ T 淋巴细胞增殖, 发挥针对 DV2 的 CTL 效应。

2.6 动物保护性实验

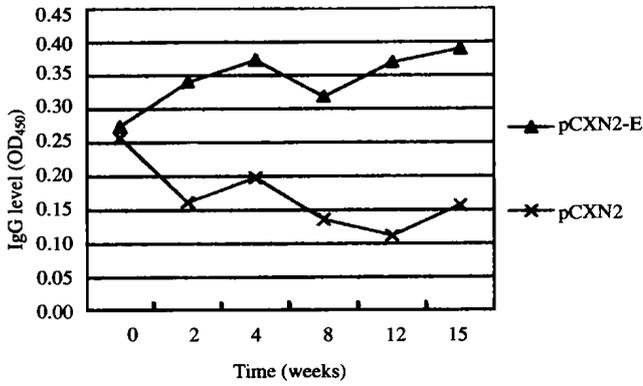


图 3 pCXN2-E 免疫 BALB/c 鼠抗体水平检测结果

Fig.3 The trend of Anti-DV2 E antibody in pCXN2-E immune mice

表 1 FACS 检测 DNA 免疫的小鼠体内 CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞变化情况

Table 1 FACS analysis the change of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in DNA immune mice

	Immune group			Control group		
	1	2	Average	1	2	Average
CD4 ⁺	35.3%	27.0%	31.2%	20.2%	22.8%	21.4%
CD8 ⁺	7.6%	14.0%	10.8%	3.5%	5.0%	4.25%

* Compared with control (P<0.01)

将制备的乳鼠脑悬液，以 10 倍的稀释度稀释，确定 LD₅₀。经观察 21d 后，各组死亡小鼠数如表 2。

表 2 各组小鼠死亡情况
Table 2 The death of the mice

Dilution of virus	Infected number	Survivor	Dead	Accumulation		Death rate(%)
				Survivor	Dead	
10 ⁻²	4	0	4	0	12	100
10 ⁻³	4	0	4	0	8	100
10 ⁻⁴	4	1	3	1	4	80
10 ⁻⁵	4	3	1	4	1	20
PBS	4	4	0			

用 100LD₅₀ 给免疫 3 周的 BALB/c 小鼠注射，每只 0.03mL。观察 21d 后，重组质粒组死亡 2 只，对照组 5 只全死亡，其保护率为 60% (图 4)。

3 讨论

DNA 疫苗是近年来随着分子生物学的发展而

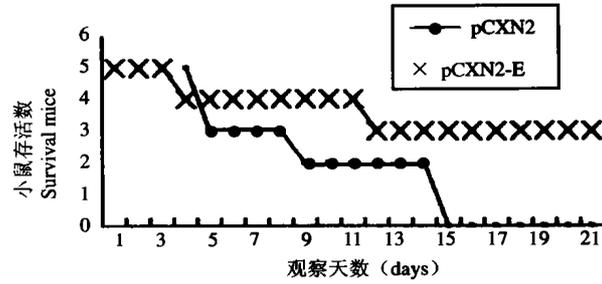


图 4 小鼠存活记录

Fig.4 The number of survivor

出现的一种新型疫苗，在登革病毒 DNA 疫苗研究中，结构蛋白 E 成为疫苗研究的热点。登革病毒的 E 蛋白是病毒体上的主要包膜糖蛋白，分子量为 51-60kDa，位于病毒粒的表面，构成病毒粒表面的突起。目前对 E 蛋白的结构有了更进一步的了解^[5]。黄病毒 E 蛋白有三个非重叠的抗原决定簇 A、B、C。这三个决定簇至少构成 16 个不同的表位。E 蛋白对病毒具有重要的生物学功能，能刺激机体产生中和抗体，保护机体免受病毒攻击，与病毒的吸附、穿入、致病和诱导宿主的免疫应答等作用紧密相关。Kulkari^[6]等通过研究认为，结构蛋白 E 对 Th 细胞的反应十分重要。近年来，有许多实验已经证明其诱导的免疫反应，在动物模型中，能抵抗病毒的攻击^[7-9]。Ruhe Men^[10]等证明一个表达 E 蛋白基因 N 末端 80% 的 DV2 DNA 疫苗在小鼠中能诱导产生中和抗体，这一重组质粒免疫猴子 3 次后，能产生较高的抗体水平，能够完全保护免疫猴子免受同一型 D₂V 病毒攻击。Raviprakash^[11-12]等构建了 4 个不同的 D₁V DNA 疫苗，表达 N 末端 80% 或全长的 E 蛋白基因，有或无 PrM 基因时，对其免疫效果进行比较，其结果发现，表达 E 蛋白基因 N 末端 80% 长的质粒和表达全长的 E 蛋白基因及 PrM 基因的重组质粒在小鼠体内具有免疫原性，能产生特异性的中和抗体，且维持时间较长。

本实验选用的目的基因包括 PrM 蛋白的 34 个氨基酸作为信号肽序列和 N 末端 80% 长的 E 蛋白基因。LEI-RON JAN^[13]和 RUHE MEN^[14]分别在其实验中，证实了 N 末端的 80% 的 E 蛋白可以在体外分泌在细胞上清中，从而，有利于抗体的产生。

本文将构建的重组质粒通过肌肉注射免疫动物的实验研究发现 DNA 免疫可以引起动物体内的体液免疫应答和细胞免疫应答。定期从小鼠尾部及眼眶取血观察抗体产生水平和变化规律，结果显示末次免疫后 2 周已有抗体产生，随后抗体水平保持

稳定至 15 周。病毒空斑减数中和实验结果显示, 免疫鼠产生的 E 抗体在体外有较高的中和病毒的能力。应用流式细胞仪检测 DNA 免疫后 2 周的小鼠体内杀伤性 T 淋巴细胞 CD8⁺ 和辅助性 T 淋巴细胞 CD4⁺ 变化情况, 发现注射重组质粒的小鼠体内 CD4⁺ 和 CD8⁺ 水平均比对照组有所升高, 尤其 CD8⁺ 水平上升更多。动物保护性实验说明, DNA 免疫在动物体内产生了一定的保护作用。但其对异型病毒的免疫保护作用及是否会引起免疫增强作用仍需进一步探讨。

参考文献

- [1] Monath T. Dengue: the risk to developed and developing countries [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, 91: 2395-2400.
- [2] 闻玉梅. 现代医学微生物学[M]. 上海: 上海医科大学出版社. 1999. 1117-1142
- [3] Rochrig J T, Risi P A, Mathews J H. T-Helper cell epitopes on the E-glycoprotein of dengue Jamacia virus [J]. *virology*, 1994, 198-231.
- [4] Rothman A L, Kurane I, Ennis F A, *et al.* Multiple specificities in the murine CD4⁺ and CD8⁺ T-cell response to dengue virus [J]. *J Virol*, 1996, 70: 6540-6546.
- [5] Rey F A, Heinz F X, Mandel C, *et al.* The envelope glycoprotein from tick-brone encephalitis at 2A resolution [J]. *Nature*, 1995, 375: 291-298.
- [6] Kulkarni A B, Mullbacher A, Blanden R V. Analysis of Murine major histocompatibility complex class II-restricted T-cell responses to the flavivirus Kunjin by using vaccinia virus expression [J]. *J Virol*, 1992, 66:3583-3592.
- [7] Colombage G, Hall R, Pavy M, *et al.* DNA-Based and Alphavirus-Vectored Immunisation with PrM and E Proteins Elicits Long-Lived and Protective Immunity against the Flavivirus, Murray Valley Encephalitis Virus [J]. *Virology*, 1998, 250: 151-163.
- [8] Konishi E, Yamaoka M, Khin S W. Induction of Protection Immunity against Japanese Encephalitis in Mice by Immunity with a plasmid Encoding Japanese Encephalitis Virus Premembrane and Envelope Genes [J]. *J Virol*, 1998, 72: 4925-4930.
- [9] Phillipotts R J, Venugopal k, Brooks T, *et al.* Immunisation with DNA polynuclestides protects mice against lethal challenge with ST. louis encephalizing virus [J]. *Arch Virol*, 1996, 141: 743-749.
- [10] Ruhe M, Linda W, Issei T, *et al.* Immunization of rhesus monkeys with a recombinant of modified vaccinia virus Ankara expressing a truncated envelope glycoprotein of dengue type 2 virus induced resistance to dengue type 2 virus challenge [J]. *Vaccine*, 2000, 18: 3113-3122.
- [11] Raviprakash K, Kochel T J, Porter K, *et al.* Immunogenicity of dengue virus type 1 DNA vaccines expressing truncated and full length envelope protein [J]. *Vaccine*, 2000, 18: 2426-2434.
- [12] Kanakatte R, Kevin R P, Tadeuscz J K. Dengue virus type 1 DNA vaccine induces protective immune responses in rhesus macaques [J]. *J Gen Virol*, 81: 1659-1667.
- [13] Jan L R, Yang C S, Henschal L S, *et al.* increased immunogenicity and protective efficacy in outbred and inbred mice by strategic carboxyl-terminal truncation of Japanese encephalitis virus envelope glycoprotein [J]. *AM J Trop Med Hyg*, 1993, 48: 412-423.
- [14] Ruhe M, Michael B, Lai C J. Carboxy-Terminally Truncated Dengue Virus Envelope Glycoproteins Expressed on the Cell Surface and Secreted Extracellularly Exhibit Increased Immunogenicity in Mice [J]. *J Virol*, 1991, 1400-1407.