

猪水疱病自杀性 DNA 疫苗的初步研究

孙世琪, 郭慧琛, 尹双辉, 冯 霞, 尚佑军, 代兴国, 刘在新, 刘湘涛*, 谢庆阁

(中国农业科学院兰州兽医研究所 农业部畜禽病毒学重点开放实验室, 兰州 730046)

摘要: 利用 RT-PCR 技术, 用保真酶扩增获得猪水疱病病毒外壳蛋白 1BCD 基因, 克隆于 DNA 复制子载体 pSCA1 中, 获得重组质粒 pSCA/1BCD。将重组质粒转染 BHK-21 细胞, RT-PCR 法和间接免疫荧光法检测显示, 猪水疱病病毒外壳蛋白基因在转染细胞中表达。豚鼠免疫试验表明, 自杀性 DNA 疫苗 pSCA/1BCD 可诱导 SVDV 特异性抗体和 T 淋巴细胞增殖。

关键词: 猪水疱病病毒(SVDV); 甲病毒复制子载体; 自杀性 DNA 疫苗

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2006)10-1016-05

Suicidal DNA Vaccine of Swine Vesicular Disease Virus Induces Immune Response in Guinea Pig

SUN Shi-qi, GUO Hui-chen, YIN Shuang-hui, FENG Xia, SHANG You-jun,

DAI Xing-guo, LIU Zai-xin, LIU Xiang-tao*, XIE Qing-ge

(Key Laboratory of Animal Virology of Ministry of Agriculture, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, China)

Abstract: The capsid protein gene, 1BCD, of swine vesicular disease virus (SVDV) was amplified by RT-PCR using high fidelity DNA polymerase and cloned into alphavirus replicon-based plasmid, namely suicidal plasmid, pSCA1. The recombinant plasmid was checked by restriction enzyme analysis and nucleic acid sequencing, and right constructed plasmid was named pSCA/1BCD. Then the recombinant plasmid was transfected into BHK-21 cells by Lipofectamine Plus™ reagent. The capsid proteins of SVDV expressed in BHK-21 cells were confirmed by RT-PCR and indirect immunofluorescence test. Immunization of guinea pig with suicidal DNA vaccine, pSCA/1BCD induced SVDV specific antibody and proliferation of PMBC.

Key words: swine vesicular disease virus (SVDV); alphavirus replicon-based plasmid; suicidal DNA vaccine

猪水疱病(Swine vesicular disease, SVD)是猪的一种急性传染病,其临床症状与猪口蹄疫极为相似,能引起严重的公共卫生问题,被世界动物卫生组织(OIE)列为 A 类传染病。猪水疱病病毒(SVD virus, SVDV)是猪水疱病的致病因子,属于小 RNA 病毒科(Picornavirida)肠道病毒属(Enterovirus),其抗原特性与柯萨奇病毒 B5(Coxsackievirus B5,

CVB5)关系密切,被认为是 CVB5 的一个猪变种或亚种^[1]。SVDV 粒子衣壳由 4 种结构蛋白构成,VP4 为内壳蛋白,VP2、VP3、VP1 为外壳蛋白。研究发现,SVDV 的线性表位和构象表位均位于外壳蛋白上^[2~4]。

基于甲病毒复制子的 DNA 疫苗可引起转染的细胞凋亡^[5,6],也称自杀性 DNA 疫苗,它比传统

收稿日期: 2005-10-28

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划)(2003AA241110)

作者简介: 孙世琪(1972-),男,甘肃通渭人,助理研究员,博士生,主要从事动物病毒分子生物学与免疫方面的研究。E-mail: shiqisun21@hotmail.com

* 通讯作者: 刘湘涛,研究员,主要从事动物病毒学研究

DNA 疫苗更安全,无整合到宿主染色体的潜在危险性。自杀性 DNA 疫苗可引起高水平的体液免疫和细胞免疫^[7,8],且可打破免疫耐受^[9]。本试验构建了 SVDV 外壳蛋白基因重组 DNA 复制子表达载体,并进行了体外表达和豚鼠免疫试验研究,为猪水疱病自杀性 DNA 疫苗的深入研究奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 细胞、毒株、菌株、质粒和实验动物

BHK-21、SVDV HK'70 毒株和大肠杆菌 DH5 α 由兰州兽医研究所农业部畜禽病毒学重点开放实验室保存。质粒 pSCA1 由加拿大多伦多大学 Rod Bremner 教授惠赠,是含 CMV 启动子等真核表达结构及 Semliki 森林病毒复制子元件的真核表达载体^[10];健康豚鼠(300~500 g)由兰州兽医研究所实验动物养殖场提供,试验期间饲养于隔离间。

1.2 主要试剂

RNeasy Mini kit 和 Plasmid Maxi Kit 为 QIAGEN 公司产品;反转录酶、Probest DNA 聚合酶、碱性磷酸酶 SAP 和限制性内切酶等分子生物学试剂均为宝生物工程(大连)有限公司产品;Lipofectamine PlusTM Reagent 和 RPMI1640 购自 Invitrogen 公司;FITC-羊抗兔 IgG、过氧化物酶(HRP)标记的兔抗豚鼠 IgG、四甲基偶氮唑盐(MTT)、植物血凝素(PHA)和 Dulbecco's PBS (DPBS)为 Sigma 公司产品;猪水疱病兔阴性血清和猪水疱病豚鼠阳性血清由张强博士惠赠;SVDV VP1 原核表达抗原为本室研制。

1.3 引物的设计和合成

根据 SVDV HK'70 毒株(GenBank AY429470)设计用于扩增外壳蛋白基因 1BCD 的引物,在上游引物中引入 Kozak 序列和 ATG 起始密码子,在下游引物中引入 TAG 终止密码子。引物由宝生物工程(大连)有限公司合成。

1.4 目的基因的获得与重组复制子载体的构建

参照 RNeasy Mini kit 使用说明提取病毒 RNA,反转录合成 cDNA,用保真酶 Probest 扩增 SVDV 1BCD 基因。

将 pSCA1 用 *Sma*I 酶切并去磷酸化,与经磷酸化的目的基因连接,转化大肠杆菌 DH5 α ,用 PCR 筛选阳性重组子,用 *Bam*H I 酶切筛选正向插入的重组子(pSCA1 载体和 SVDV 的 1BCD 上各有 1 个 *Bam*H I 位点,酶切时,正向:2 268 bp 和 11 600

bp,反向:122 bp 和 13 757 bp),并通过序列分析确证,命名为 pSCA/1BCD。

1.5 BHK-21 细胞的转染

按照 QIAGEN Plasmid Maxi Kit 的操作说明,从大肠杆菌 DH5 α 中纯化重组质粒,用脂质体转染试剂盒 Lipofectamine PlusTM Reagent 按照说明书转染 60%~80%的 BHK-21 细胞。24~48 h 后,收获转染细胞,进行检测。

1.6 RT-PCR 法检测转染细胞目的基因的表达

转染 48 h 后取出细胞,PBS 洗涤后胰酶消化,离心弃上清,细胞沉淀用于提取 RNA,如 1.4 进行 RT-PCR。

1.7 间接免疫荧光检测

转染 48 h 后收取培养皿中的盖玻片,PBS 液漂洗 1~2 次,冷丙酮(-20℃)固定 30 min,漂洗后吸干液体,滴加 SVDV 兔阳性血清,37℃湿盒中孵育 30 min,PBS 液漂洗 5 次,加 FITC-羊抗兔 IgG,37℃湿盒中染色 30 min,甘油封片,于 Leca 荧光显微镜下观察并拍照。

1.8 试验动物免疫

将 21 只豚鼠随机分为 3 组,每组 7 只,分别为:Ⅰ组注射 DPBS 为对照,Ⅱ组免疫 pSCA1 空质粒,Ⅲ组免疫 pSCA/1BCD。采用股四头肌注射免疫,每组动物均免疫 3 次,间隔 3 周,第一次免疫剂量为 200 μ g,第二次和第三次为 400 μ g。

1.9 SVDV 特异抗体的检测

以间接 ELISA 法测定血清抗体的 OD₄₅₀ 值。于 96 孔酶标板上以 SVDV VP1 原核表达蛋白为包被抗原(1:100 稀释),被检豚鼠血清为一抗,过氧化物酶标记的兔抗豚鼠 IgG 为二抗,于 λ_{450} nm 处测定每孔的 OD 值,以空白孔调零,SAS 统计软件分析。

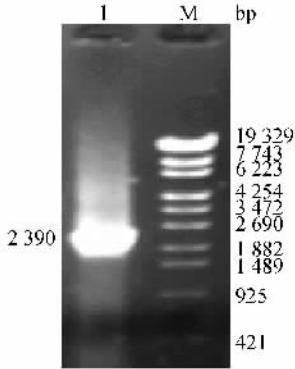
1.10 豚鼠 T 淋巴细胞增殖试验

在初免后第 3 周、第 6 周和第 9 周,心脏采血分离淋巴细胞,以含 10%FBS 的 RPMI 1640 稀释成 1×10^7 /mL。于 96 孔细胞培养板中,每孔加入 50 μ L 细胞悬液和 50 μ L 灭活 SVDV,同时设 RPMI 1640 自身对照,每个样品设 3 个重复孔。培养板置 37℃、5%CO₂ 饱和湿度条件下培养 68 h 后,每孔加 10 μ L MTT(5mg/mL),孵育 4 h,加入 50 μ L 10%SDS-0.01 mol/L HCl 溶液终止反应,待蓝色沉淀溶解后于 λ_{570} nm 处测定 OD 值,进行统计学分析。

2 结果

2.1 目的基因的获得

采用 RT-PCR 法,用保真酶扩增获得了 SVDV 1BCD 基因,经 1% 琼脂糖凝胶电泳,与预期大小相符(图 1)。



1. SVDV 的 1BCD 基因; M. DNA marker

1. 1BCD gene; M. λ -EcoT14 I digest marker

图 1 目的片段电泳

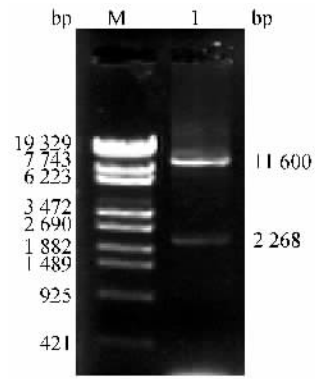
Fig. 1 Agarose gel electrophoresis map of PCR products

2.2 真核表达质粒的构建及鉴定

将目的基因片段 1BCD 和复制子载体 pSCA1 通过平末端连接,PCR 筛选阳性重组子,用 *Bam*H I 酶切筛选正向插入的重组子(图 2)。

2.3 重组质粒的序列测定及分析

测定的序列用 DNASTar 软件分析,结果表明目的基因长 2 367 bp,编码 789 个氨基酸,与预期的外壳蛋白基因 1BCD 序列相符(序列略),且以正确方向连接于复制子载体 pSCA1。



M. DNA marker; 1. *Bam*H I 酶切重组质粒

M. λ -EcoT14 I digest marker; 1. Enzymatic digestion with *Bam*H I

图 2 重组质粒电泳分析

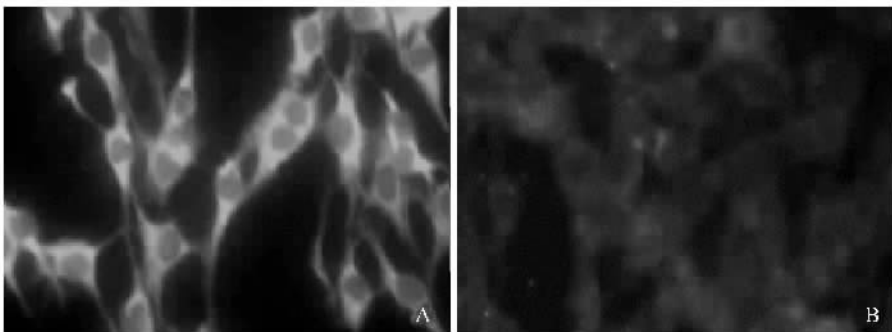
Fig. 2 Electrophoretic analysis for the recombinant plasmid

2.4 RT-PCR 法检测

转染 48 h 后收获细胞沉淀,用 RNeasy Mini kit 提取 RNA,以此为模板进行 PCR 和 RT-PCR 扩增。结果 PCR 未能扩增出目的基因,RT-PCR 扩出了预期大小的片段,说明转染细胞中有目的基因的表达。

2.5 间接免疫荧光检测

取分别转染 pSCA/1BCD 和 pSCA1 的细胞飞片以及未转染细胞的飞片,经荧光染色后,在镜下观察并拍照。结果显示,转染 pSCA/1BCD 的 BHK-21 细胞中有特异荧光产生,而转染 pSCA1 的阴性细胞及未转染的空白细胞中未出现特异荧光,说明目的蛋白在 BHK-21 细胞中正确表达(图 3)。



A. 重组质粒 pSCA/1BCD 转染 BHK-21 细胞; B. 空载体 pSCA1 转染 BHK-21 细胞
A. BHK-21 cells transfected with pSCA/1BCD; B. BHK-21 cells transfected with pSCA1

图 3 转染的 BHK-21 细胞间接免疫荧光染色

Fig. 3 Expression of SVDV proteins in transfected BHK-21 cells by IFAT

2.6 SVDV 特异抗体的产生

用 VP1-ELISA 对免疫豚鼠血清进行检测,结果显示(图 4),pSCA/1BCD 组豚鼠产生的 SVDV 抗体水平与免疫前和对照组相比,第 1 次免疫后第 3 周时差异显著($0.01 < P < 0.05$),第 2 次和第 3 次免疫后较第 1 次免疫抗体水平均有所升高,但差异不显著($P > 0.05$)。

2.7 T 淋巴细胞增殖试验

不同时期采集豚鼠外周血进行淋巴细胞增殖试验,结果(图 5)显示,自杀性 DNA 疫苗免疫可诱导 T 淋巴细胞增殖。pSCA/1BCD 组初免后第 3、6、9 周的增殖程度与免疫前和 pSCA1 对照组相比,差异显著($P < 0.01$),但第 3、6、9 周间的增殖差异不显著($P > 0.05$)。

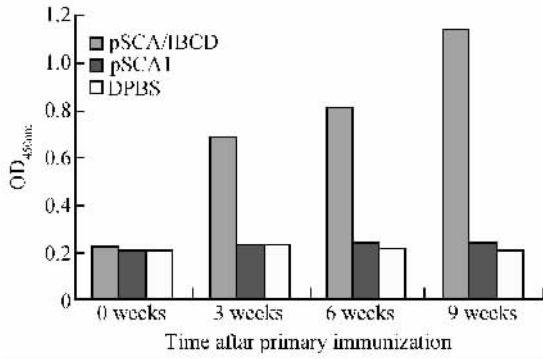


图 4 自杀性 DNA 疫苗诱导产生 SVDV 特异性抗体

Fig. 4 SVDV specific antibody in guinea pig serum induced by suicidal DNA vaccine

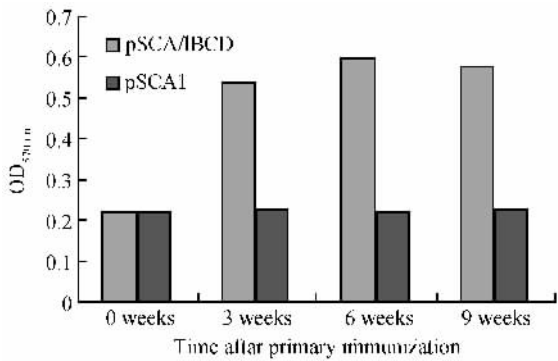


图 5 豚鼠外周血淋巴细胞的特异性增殖

Fig. 5 Specific proliferation of PMBC from immunized guinea pig

3 讨论

SVDV 的衣壳具有小 RNA 病毒衣壳的典型结构,由 60 个亚单位或原体构成,每个亚单位由 4 个

不同的多肽(VP1、VP2、VP3 和 VP4)形成,这些亚单位自我组装形成二十面体对称($T=1$)结构,并包裹一条单股正链 RNA。在成熟的病毒粒子中,VP1、VP2 和 VP3(分别为 33、32 和 29 ku)位于表面形成一紧密的蛋白外壳,而 VP4 位于衣壳内,与病毒 RNA 相互作用。VP1、VP2 和 VP3 呈现三级结构,在小 RNA 病毒中高度保守且在八链 β 桶中形成一疏水中心,这些链按其出现顺序,以字母从 B 到 I 命名。 β 桶由两个四链 β 片组成,即 BIDG 和 CHEF,大多数连接这些链的环,即三条多肽的 C 末端暴露在衣壳表面,而其 N 端朝里。另外还有两条内部 α 螺旋(名为 αA 和 αB),分别位于 βD 片和 βF 片之前。深入了解病毒的抗原特性,对于疫苗的设计是非常重要的。研究发现,SVDV 的构象依赖型中和表位和非中和性线性表位均位于外壳蛋白上^[2-4]。Jimenez-Clavero 等的研究发现 P1 区的原核重组蛋白可诱导猪体产生 SVDV 特异性体液免疫和细胞免疫反应,提示该区可作为基因工程疫苗的候选基因^[11]。

基于甲病毒复制子的 DNA 载体与传统真核表达载体对外源基因的表达机制不同。在传统的真核表达载体中,RNA 聚合酶 II 直接介导外源基因 mRNA 的转录。而在甲病毒复制子载体中,第一层表达核也利用 CMV(即早期增强子)作为启动子,但此启动子并不介导外源基因的表达,而是控制具有自身复制能力的复制子的表达,该复制子包含甲病毒基因组 5' 和 3' 末端的顺式作用元件、全部非结构蛋白编码区(包括复制酶编码基因)和替代病毒结构蛋白基因的外源基因。甲病毒 RNA 的翻译产生甲病毒复制酶复合物,继而介导细胞浆内重组 RNA 的自身复制,从而引起外源基因的编码 mRNA 的表达。该复制型 DNA 载体在表达外源基因的过程中能够产生双链 RNA 复制中间体,而双链 RNA 复制中间体可以通过一种双链 RNA 依赖的蛋白激酶诱导被转染细胞凋亡,消除了质粒 DNA 持续存在的潜在危险性。基于该复制子的 DNA 疫苗也称自杀性 DNA 疫苗,它比传统 DNA 疫苗更安全。自杀性 DNA 疫苗可引起高水平的体液免疫和细胞免疫^[7,8],且可打破免疫耐受^[9]。

本研究根据甲病毒复制子载体的优点和 SVDV 的抗原特点,构建了包含 SVDV 完整外壳蛋白基因 1BCD 的自杀性 DNA 疫苗,试图能够引发较全面的免疫应答。在构建策略上采用保真酶扩增,利用平

末端连接法直接将其插入复制子载体,最大程度地降低了基因突变的可能。本次研究旨在考察重组复制子载体 pSCA/1BCD 能否作为猪水疱病自杀性 DNA 疫苗。体外转染试验表明,目的蛋白在转染重组质粒的 BHK-21 细胞中正确表达,且具有免疫反应活性。动物免疫试验表明,重组复制子载体 pSCA/1BCD 可诱导豚鼠产生 SVDV 特异性抗体并诱导 T 淋巴细胞增殖。本研究为猪水疱病自杀性 DNA 疫苗的深入研究奠定基础,其诱导产生中和抗体的能力以及能否保护本动物抵抗高滴度病毒的攻击,还需进一步研究。

致谢:柴可兰,田宏,吴锦艳,龚真莉和郑海学等在动物试验中给予了大力帮助,在此表示衷心的感谢。

参考文献:

- [1] Zhang G, Wilsden G, Knowels N J, *et al.* Complete nucleotide sequence of a Coxsackie B5 virus and its relationship to swine vesicular disease virus [J]. *J Gen Virol*, 1993,74:845~853.
- [2] Escribano-Romero E, Jimenez-Clavero M A, Ley V. Swine vesicular disease virus. Pathology of the disease and molecular characteristics of the virion [J]. *Animal Health Research Reviews*, 2000,1(2):119~126.
- [3] Rebel J M, Leendertse C H, Dekker A, *et al.* Construction of a full-length infectious cDNA clone of swine vesicular disease virus strain NET/1/92 and analysis of new antigenic variants derived from it [J]. *J Gen Virol*, 2000, 81(Pt 11):2 763~2 769.
- [4] Borrego B, Carra E, Garcia-Ranea J A, *et al.* Characterization of neutralization sites on the circulating variant of swine vesicular disease virus (SVDV): a new site is shared by SVDV and the related coxsackie B5 virus [J]. *J Gen Virol*, 2002, 83(Pt 1):35~44.
- [5] Kohno A, Emi N, Kasai M, *et al.* Semliki Forest virus-based DNA expression vector: transient protein production followed by cell death [J]. *Gene Ther*, 1998,5:415~458.
- [6] Leitner W W, Ying H, Driver D A, *et al.* Enhancement of tumor-specific immune response with plasmid DNA replicon vectors[J]. *Cancer Res*, 2000,60:51~55.
- [7] Hariharan M J, Driver D A, Townsend K, *et al.* DNA immunization against herpes simplex virus: enhanced efficacy using a Sindbis virus-based vector[J]. *J Virol*, 1998,72:950~958.
- [8] Kirman J R, Turon T, Su H, *et al.* Enhanced immunogenicity to Mycobacterium tuberculosis by vaccination with an alphavirus plasmid replicon expressing antigen 85A[J]. *Infect Immun*, 2003, 71:575~579.
- [9] Leitner W W, Hwang L N, Devere M J, *et al.* Alphavirus-based DNA vaccine breaks immunological tolerance by activating innate antiviral pathways[J]. *Nat Med*, 2003,9:33~39.
- [10] DiCiommo D P, Bremner R. Rapid, high level protein production using DNA-based Semliki Forest virus vectors[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273 (29): 18 060 ~ 18 066.
- [11] Jimenez-Clavero M A, Escribano-Romero E, Sanchez-Vizcaino J M, *et al.* Molecular cloning, expression and immunological analysis of the capsid precursor polypeptide (P1) from swine vesicular disease virus [J]. *Virus Res*, 1998,57(2):163~170.