

细胞因子与猪瘟病毒 E₂ 基因真核双表达载体的构建及其免疫增强作用

陈创夫¹, 余兴龙², 马正海³, 李作生², 李红卫², 涂长春², 殷震²

(¹ 石河子大学动物科技学院, 石河子 832003; ² 解放军军需大学, 长春 130062; ³ 新疆大学, 乌鲁木齐 832000)

摘要: 构建了猪瘟病毒 E₂ 基因与 IL-2、IL-3 基因的双表达真核表达载体, 观察其表达水平, 并对其免疫增强效果进行了观察。结果表明, 构建了 2 种猪瘟病毒 E₂ 基因与白细胞介素 2、3 的真核表达质粒 pIRST IL-2、pIRST IL-3。将 2 种质粒转染 BHK-21 细胞, 均可在体外表达 E₂ 抗原和有生物活性的 IL-2、IL-3 两种质粒能诱导产生 CSFV 的特异性免疫反应。pIRST IL-2、pIRST IL-3 所诱导的免疫应答反应比使用单表达质粒 pIRST 强。试验表明, 细胞因子与目的基因构建的双表达基因疫苗能有效提高基因疫苗的免疫效果。

关键词: 双表达载体; 猪瘟病毒 E₂ 基因; IL-2; IL-3; 基因疫苗

Studies on Construction and Immunity Enhancer IL-2 and IL-3 of the Double Expression Plasmids of Classical Swine Fever Virus E₂

CHEN Chuang-fu¹, YU Xing-long², MA Zheng-hai³, LI Zu-sheng²,

LI Hong-wei², TU Chang-chun², YIN Zhen²

(¹ College of Animal Science and Technology, Shihezi University, shihezi 832003; ² Quartermaster University of PLA, Changchun 130062; ³ Xinjiang University, Urumchi 832000)

Abstract: The double expression plasmids pIRST IL-2 and pIRST IL-3 were constructed by inserting swine fever virus (CSFV) E₂ Gene and IL-2 or IL-3 into pIRESneo vector. The enhancing effects of IL-2 and IL-3 on immunization was observed. The results demonstrated that the double expression plasmids pIRST IL-2 and pIRST IL-3 could express E₂ gene of CSFV and IL-2 or IL-3 *in vitro*. In mice vaccinated with them, the titer of specific antibody was higher than that of the control group. Double expression of interleukin genes and CSFV protective antigenic gene can raise the level of immune response of the mice.

Key words: Double expression plasmids; Construction; IL-2; IL-3; CSFV DNA vaccine

猪瘟是由猪瘟病毒 (CSFV) 引起猪的一种死亡率极高的急性败血性、接触性传染病, 尽管猪瘟兔化弱疫苗的广泛应用及其它综合防治措施的实施, 已控制了 CSF 的大规模流行, 但该病仍在我国广大养猪地区不断发生和小规模流行。基因工程苗和基因疫苗的出现给猪瘟的防制带来了新的希望, 余兴龙等^[1]已构建了含猪瘟病毒 E₂ 基因的真核表达质粒

(猪瘟病毒 E₂ 基因疫苗), 动物免疫试验表明, 可诱导小鼠产生抗 CSFV 的抗体。IL-2、IL-3 在免疫细胞的活化、增殖和分化中起调节作用^[2]。本试验旨在构建 CSFV 主要保护性抗原 E₂ 基因与鼠 IL-2、IL-3 基因的双表达真核载体, 观察白细胞介素能否增强基因疫苗反应, 为猪瘟基因疫苗的研制提供科学依据。

收稿日期: 2001-08-11

基金项目: 国家“九五”科技攻关资助项目 (96C010401)

作者简介: 陈创夫 (1962-), 男, 广东揭西人, 教授, 博士, 主要从事动物分子病理学研究工作。Tel: 0993-2058996; Fax: 0993-2017247; E-mail: ccfxb@163.com

1 材料与方 法

1.1 菌株与质粒

大肠杆菌菌株 JM109 由本室保存。质粒 pIRESneo(Clontech 公司), pBluescript II ks(+) (Pronega 公司), pcDST(含 E₂ 抗原真核表达质粒本室保存), pBCMCneoIL-2, pBCMCneoIL-3 由第二军医大学曹雪涛教授惠赠。

1.2 试验动物

雄性昆明种小鼠 50 只,每只体重 18~20 g,购自长春生物制品研究所。

1.3 主要试剂

限制性内切酶,工具酶和主要生化试剂,核酸分子量标准物(λ DNA Hind III / EcoR I 酶切片段)(Promega 公司) HRP 羊抗鼠 IgG, HRP 羊抗猪 IgG (Sigma), 重组 IL-2、IL-3(邦定生物医学公司), mE₂ 抗原 *E. coli* 上清由本室保存。

1.4 猪瘟疫毒 E₂ 基因与小鼠 IL-2 基因真核双表达质粒的构建

1.4.1 猪瘟疫毒 E₂ 基因真核表达质粒 pIRST 的构建 pcDST 用 BamHI 酶切,补平后再用 EcoR I 酶切,琼脂糖凝胶电泳后回收小片段即得到猪瘟疫毒 E₂ 基因片段。该片段与 EcoR I, EcoRV 双酶切的 pIRESneo 载体连接,得到重组质粒进行酶切鉴定。

1.4.2 猪瘟疫毒 E₂ 基因与小鼠 IL-2 基因真核双表达质粒 pIRSTIL-2 的构建 XhoI 酶切 pBCMCneoIL-2 质粒,琼脂糖凝胶电泳后回收小片段得到小鼠 IL-2 基因片段,将该片段与 XhoI 酶切 pBluescript II Ks(+) 载体连接,转化感受态细胞,涂布氨苄固体 LB 平板,筛选阳性重组菌落酶切鉴定正确后定名为 pBSIL-2。用 SmaI、XbaI 酶切 pIRST 质粒,琼脂糖凝胶电泳后回收小片段即猪瘟疫毒 E₂ 基因;用 ApaI 酶切 pBSIL-2, Klenow 片段补平后再用 Spe I 酶切,琼脂糖凝胶电泳后回收小片段即小鼠 IL-2 基因片段;将以上两片段基因用 T₄ 连接酶连接,得到重组质粒进行酶切鉴定。

1.5 猪瘟疫毒 E₂ 基因与小鼠 IL-3 基因真核双表达质粒的构建

构建方法同 1.4。

1.6 目的基因的表达与检测

取纯化疫苗质粒 pIRST IL-2, pIRST IL-3 10 μ g,分别用 10 μ l Lipofectin Agent 包裹后转染长成 40% 满度的 BHK-21 细胞,继续培养 48 h 后,加 TEN 液洗脱 3 000 r \cdot min⁻¹,离心 5 min,分别收集转

染细胞的上清液和转染细胞,转染细胞用裂解缓冲液作用 2 min, 5 000 r \cdot min⁻¹,离心 5 min,收集上清液,分别检测 E₂ 抗原 IL-2、IL-3 的生物活性。

1.6.1 E₂ 抗原检测 分别用转染细胞的上清液,转染细胞裂解液,正常对照 BHK-21 细胞上清液及裂解液包被酶标板(1:10 稀释),一抗猪高免 CSFV 血清,二抗酶标羊抗猪 IgG(1:4 000 稀释)。

1.6.2 ConA 诱导 IL-2 反应细胞制备 小鼠脾脏磨碎用 RPMI 1640 液配成每毫升 5 \times 10⁶ 单细胞悬液,取 5 ml 加入细胞培养瓶,再加 ConA 25 μ g, 5% CO₂ 37 $^{\circ}$ C 培养 40~48 h。将培养的细胞悬液置于淋巴细胞分层液上, 2 000 r \cdot min⁻¹,离心 5 min,取界面层细胞即为 IL-2 反应细胞。

1.6.3 IL-2 活性检测 将上述反应细胞配成每毫升 1 \times 10⁶ 浓度的悬浮液取 0.1 ml 加入 96 孔微量培养板各孔,再加入 0.1 ml 待测的转染细胞上清,细胞裂解液,重组 IL-2。置 5% CO₂ 37 $^{\circ}$ C 培养 40~48 h,每孔加入 MTT 20 μ l(5 mg \cdot ml⁻¹) 继续培养 4 h,各孔加入酸化 SDS(0.01 mol \cdot L⁻¹ HCl, 10% SDS) 0.1 ml 作用 8 h。OD_{570 nm} 检测 OD 值。

1.6.4 IL-3 活性检测 取小鼠双股骨,双股骨髓细胞, RPMI 1640 液调细胞至每毫升 1.5 \times 10⁶。取上述细胞液 0.1 ml 加入 96 孔微量培养板,再加入 0.1 ml 待测的转染细胞上清,细胞裂解液,重组 IL-3,于 5% CO₂ 37 $^{\circ}$ C 培养 60 h,每孔加入 MTT 20 μ l(5 mg \cdot ml⁻¹) 继续培养 4 h,各孔加入酸化 SDS(0.01 NHCl, 10% SDS) 0.1 ml 作用 8 h。OD_{570 nm} 检测 OD 值。

1.7 动物免疫试验

小鼠 50 只分为 5 组,试验 I 组 10 只,免疫 pIRST 质粒,每只 100 μ g;试验 II 组 10 只,免疫 pIRST IL-2 每只 100 μ g;试验 III 组 10 只,免疫 pIRST IL-3,每只 100 μ g;试验 IV 组 10 只,免疫 pIRST IL-2, pIRST IL-3 每只 50 μ g;对照组 10 只,免疫 pIRESneo,每只 100 μ g。免疫方法:两后腿胫前肌肌肉注射。共免疫 2 次间隔 15 d,分别于第一次免疫后 20 d、40 d、60 d、80 d、100 d,剪尾采血,每次每只鼠采血 25 μ l 左右,37 $^{\circ}$ C 0.5 h,4 $^{\circ}$ C 过夜离心,收集血清检测。

1.8 抗体检测

以 mE₂ 做包被抗原 37 $^{\circ}$ C 1 h,4 $^{\circ}$ C 过夜。洗涤液 3 \times 5 洗涤后,加 10% 正常小牛血清 37 $^{\circ}$ C 感作 1 h。3 次各 5 min 洗涤后,加以正常 *E. coli* 裂解上清 1:100 稀释待检血清,37 $^{\circ}$ C 2 h 3 次各 5 min 洗涤

后,加 1:8 000 稀释的羊抗鼠酶标抗体,37℃ 2 h 3 次各 5 min 洗涤后加入底物溶液,室温作用 15 min,加 2 mol·L⁻¹ H₂SO₄ 终止反应,测定 OD₄₉₂ 值。

2 结果与分析

2.1 猪瘟疫病毒 E₂ 基因和小鼠 IL-2 基因双表达质粒

的构建及鉴定

2.1.1 pIRST 的构建 pCDST 经 BamH I EcoR I 酶切后,电泳回收得到小片段,冰融法回收 1.2kb 的 E₂ 基因与经 EcoR V 酶切的质粒 pIRSIneo 连接,得到较 pIRSIneo 质粒大的克隆质粒,经 BgI II KpnI 酶切鉴定,证明为所需重组质粒。

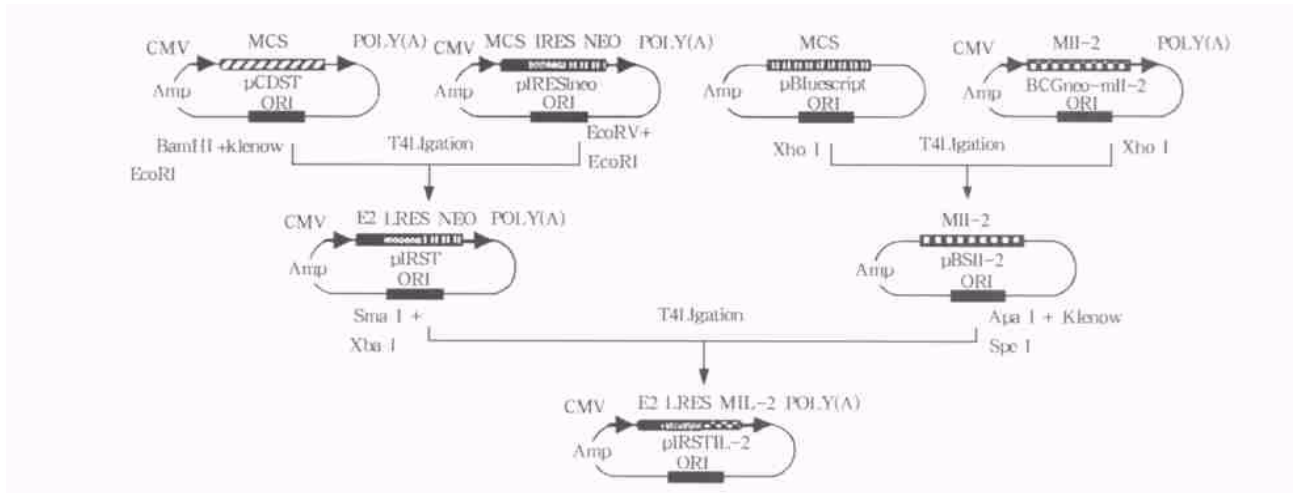


图 1 质粒构建策略图

Fig.1 Construction tactics picture of plasmid

2.1.2 pBSIL-2 的构建 pBMCneoIL-2 经 XhoI 酶切,电泳回收得到 IL-2 基因片段,与 XhoI 酶切的 pBluescript II ks⁺ 载体连接,转化感受态细胞涂布氨苄固体 LB 平板,筛选菌落提取质粒经 HindIII SacI 酶切鉴定为所需重组质粒。

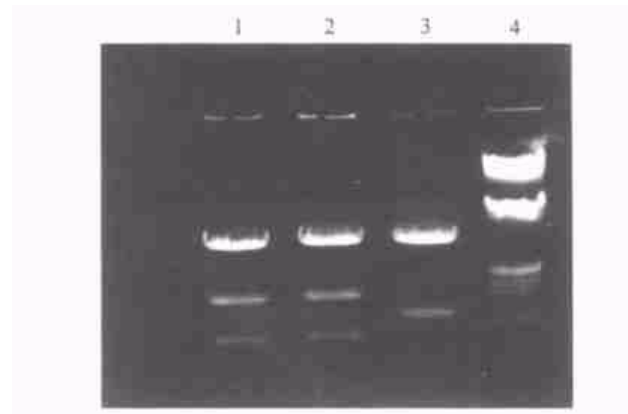
2.1.3 pIRSTIL-2 的构建 pIRST 经 BamI、XbaI 酶切,回收得到片段猪瘟疫病毒 E₂ 基因与用 ApaI 酶切 pBSIL-2, Klenow 片段补平后再用 SpeI 酶切,回收得到小片段小鼠 IL-2 基因,用 T₄ 连接酶连接得到重组质粒。提取重组质粒经 Xho I 酶切鉴定为 3 条带(0.56kb、0.34kb、4.2kb),为所需重组质粒,重组质粒命名为 pIRSTIL-2(图 2)。

2.2 猪瘟疫病毒 E₂ 基因和小鼠 IL-3 基因双表达载体的构建及鉴定

2.2.1 pBSIL-3 的构建 构建方式及结果同 pBSIL-2, 筛选菌落提取质粒经 Hind III 酶切鉴定为所需重组质粒。

2.2.2 pIRST IL-3 的构建 构建方式及结果同 pIRST IL-2。提取重组质粒经 xho I 酶切为 3 条带(0.57kb、0.34kb、4.2kb),为所需重组质粒,重组质粒命名为 pIRSTIL-3(图 2)。

2.3 基因疫苗质粒细胞表达试验



1. pIRSTIL-2; 2. pIRSTIL-3; 3. pIRST; 4. Marker

图 2 质粒酶切图

Fig.2 Restriction endonuclease digestion pattern of plasmid

2.3.1 E₂ 抗原检测 3 种质粒转染细胞后,分别收集上清液和细胞裂解物,经 ELISA 检测 3 种质粒在转染的细胞上清液和细胞裂解中均可检测到 E₂ 抗原(表 1)。

2.3.2 IL-2 检测 pIRST IL-2 质粒在 Lipofectin agent 包裹后转染 BHK-21 细胞 48 h,分别收集上清液和细胞裂解物,用 MTT 法检测表明可表达 IL-2,且主要在上清(表 2)。

表 1 抗原表达检测(OD₄₉₂)

Table 1 Detection of antigen expression

组别 Group	上清液 (X±S) Supernatant	细胞 (X±S) Cell
PIRST	0.33 ± 0.03 *	0.11 ± 0.01 *
pIRST IL-2	0.09 ± 0.01 *	0.07 ± 0.02 *
pIRST IL-3	0.08 ± 0.01 *	0.08 ± 0.01 *
BHK(阴性 Negative)	0.03 ± 0.01	0.12 ± 0.01

P < 0.05, 下同 The same as below

表 2 IL-2 在体外表达检测(MTT OD₅₇₀)

Table 2 Detection of IL-2 expression

组别 Group	上清液 (X±S) Supernatant	细胞 (X±S) Cell
pIRST	0.245 ± 0.021 *	0.183 ± 0.062 *
BHK(阴性 Negative)	0.120 ± 0.012	0.113 ± 0.01
IL-2(阳性 Positive)	0.323 ± 0.025	

2.3.3 IL-3 检测 pIRST IL-3 疫苗质粒在 Lipofectin agent 包裹后转染 BHK-21 细胞 48h, 分别收集上清液和细胞, 用 MTT 法检测表明可表达 IL-3, 且主要在上清中(表 3)。

fectin agent 包裹后转染 BHK-21 细胞 48h, 分别收集上清液和细胞, 用 MTT 法检测表明可表达 IL-3, 且主要在上清中(表 3)。

表 3 IL-3 在体外表达活性检测(MTT OD₅₇₀)

Table 3 Detection of IL-3 expression

组别 Group	上清液 (X±S) Supernatant	细胞 (X±S) Cell
pIRST IL-3	0.301 ± 0.033 *	0.155 ± 0.133 *
BHK(阴性 Negative)	0.137 ± 0.026	0.138 ± 0.015
IL-3(阳性 Positive)	0.325 ± 0.04	

2.4 动物免疫试验

免疫后 40 d, 在小鼠血清中可检测到 CSFV 抗体, 60 d 达到高峰, 100 d 血清中还有抗体, pIRST IL-2 组、pIRST IL-3 组抗体水平显著高于 pIRST 组(表 4、图 3)。

表 4 基因疫苗免疫后抗体 IgG 消长规律(OD₄₉₂)

Table 4 Dynamics of antibodies IgG from the DNA vaccines

组别 Group	免疫后天数 Post immunity day				
	20d	40d	60d	80d	100d
pIRST	0.075 ± 0.014	0.274 ± 0.009	0.258 ± 0.038	0.157 ± 0.016	0.100 ± 0.022
pIRST IL-2	0.070 ± 0.021	0.362 ± 0.01 *	0.424 ± 0.012 *	0.247 ± 0.023 *	0.153 ± 0.021
pIRST IL-3	0.085 ± 0.008	0.366 ± 0.021 *	0.420 ± 0.013 *	0.252 ± 0.021 *	0.141 ± 0.014
pIRSTIL-2、IL-3	0.082 ± 0.015	0.389 ± 0.009 *	0.460 ± 0.023 *	0.235 ± 0.015 *	0.148 ± 0.017
pIRESIneo	0.070 ± 0.006	0.069 ± 0.012	0.075 ± 0.013	0.071 ± 0.011	0.079 ± 0.005

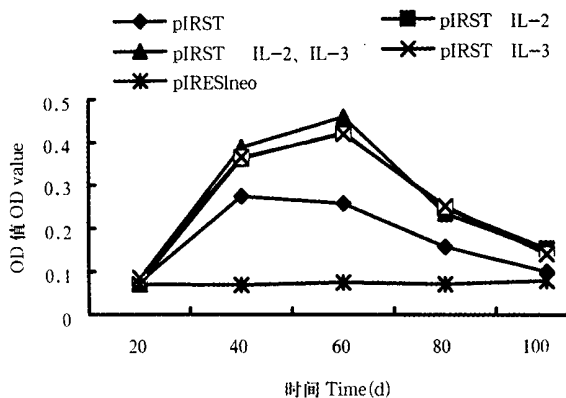


图 3 基因疫苗免疫后抗体 IgG 消长规律

Fig. 3 Dynamics of antibodies IgG from the DNA vaccines

3 讨论与结论

3.1 影响基因疫苗免疫效果的因素中最重要的是保护性抗原基因的选择。CSFV E₂ 基因的 5' 端有编码信号肽的序列, 3' 端有编码跨膜区的序列^[3], Zijl^[4]在研究以伪狂犬病(PRV) 弱毒苗为载体的

CSFV E₂ 基因的重组疫苗时发现, E₂ 蛋白的跨膜区对所诱导的免疫应答反应强度有很大影响, 无跨膜区的 E₂ 基因重组疫苗所诱导的中和抗体(NAb) 滴度低, 免疫猪抵抗 CSFV 强毒株攻击的能力弱; 而有跨膜区的 E₂ 基因重组苗可诱导动物产生较高水平的 NAb, 并且可使免疫猪在 CSFV 强毒株的攻击下获得完全保护。按照这一试验结果, 余兴龙等^[1]选择应用有信号肽有跨膜区的 CSFV E₂ 基因与 pCDNA₃ 载体构建了 pCDST 猪瘟基因疫苗, 但其表达及免疫效率较低。近年来, 随着人们对真核基因表达和调控的认识逐渐深化, 对高效的真核基因表达载体的研究进展也很快, 已有许多高效表达载体和高表达系统问世。因此, 为了提高外源基因的表达效率, 选择适宜和合理设计的真核表达载体是进行真核基因工程的前提, 也是进行外源基因在哺乳动物细胞高效表达及其生物学效应等研究的首要条件。本试验研究选择的 pIRESIneo 载体的特点是一个启动子, CMV 可启动两个基因同时表达。基因转

录物上带有编码两个蛋白的信息,其第一个蛋白的翻译按真核生物蛋白翻译的普遍规则进行,而其第二个蛋白的翻译则依靠 IRIS 序列结合核糖体能以较高效率进行翻译,当 IRES 不存在时转录物上第二个蛋白的翻译效率则特别低。按分子克隆的方法,将含猪瘟病毒 E₂ 抗原基因真核表达质粒 pcDST 的 E₂ 基因酶切克隆于 pIRESneo 载体的 CMV 控制下的多克隆位点上,IL-2 和 IL-3 基因取代载体上的 Neo 基因分别构建 pIRST IL-2 和 pIRST IL-3 两个真核表达载体,经体外细胞表达试验表明,转染 BHK 细胞后,能高效表达 E₂ 抗原和白细胞介素。

3.2 基因疫苗试验动物的研究表明^[5],尽管可诱导机体产生特异性抗体,但免疫水平不是很高。因此,如何提高基因免疫水平是近几年研究的重点之一。细胞因子可作用于体内免疫活性细胞通过促进其分化与增殖,加强其活性和功能或影响细胞内生物活性分子的表达与分泌,因此细胞因子可通过不同作用环节调节和增强 DNA 免疫效应。IL-2 具有促进和刺激淋巴细胞增殖,和增强细胞毒细胞^[2]、增强活化 T 细胞产生 IFN 和 CSF;IL-3 可诱导多能造血干细胞和各种前体血细胞分化、增殖,刺激淋巴细胞的增殖及分化^[6]。Kim 等^[7]将编码鼠 IL-12 和 GM-CSF 基因的质粒分别与编码 HIV-1 免疫原的质粒共同免疫小鼠,结果促进抗原特异性 Th 细胞增殖,使免疫反应的类型由 Th1 转向 Th2。随着分子生物学的发展,将抗原基因与细胞因子基因克隆入同一表达质粒已成为可能,以这种质粒免疫动物后,两个基因同时得到表达,细胞因子即可发挥其佐剂作用。Tsuji 等^[8,9]将多种细胞因子(GM-CSF、IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-12,及编码 IL-19 个氨基酸的特殊序列)基因与卵白蛋白(DVA)基因相连表达了 DAV-细胞因子融合蛋白,DVA 和细胞因子均保持了生物活性,这些质粒接种小鼠后能有效地抵抗 DVA 的毒性。Chow 等^[10]将 HBsAg 基因与编码 IL-2 基因融合或非融合表达,如用单独编码 HBsAg 的 DNA 免疫,当 DNA 用量低于 1 μ g 则不能检出抗-HBs,但如加上 IL-2 基因,同样以 1 μ g 免疫时,所产生的抗 HBS 与用 100 μ g 单独 HBsAg DNA 免疫相似。本试验结果显示非融合双表达的 pIRST IL-2、pIRST IL-3,免疫后抗体水平明显高于单表达 E₂ 的 pIRST 质粒,表明 IL-2、IL-3 作为细胞因子佐剂增

强猪瘟基因疫苗的免疫效果是非常明显的。

References

- [1] Yu X L, Tu C C, Li H W, et al. Construction of eukaryotic expression plasmids of CSFV E₂ gene and the study on DNA vaccine. *China Virology*, 2000, 15(3): 264 - 271. (in Chinese)
余兴龙,涂长春,李红卫,等.猪瘟病毒 E₂ 基因真核表达质粒的构建及基因疫苗的研究.中国病毒学,2000,15(3):264 - 271.
- [2] Yang G Z. *Immunity Biological Project Technology*. Changchun: Jilin Science Press, 1991: 28 - 100. (in Chinese)
杨贵贞主编.免疫生物工程纲要与技术.长春:吉林科学技术出版社,1991,28 - 100.
- [3] Ru menape T, Unger G, Strauss J H, et al. Processing of the envelope glycoproteins of pestiviruses. *J. Virol*, 1993: 3 288 - 3 294.
- [4] Zijl M, Wensvoort G, Kluiver E, et al. Live attenuated pseudorabies virus expressing envelope glycoprotein E₁ of hog cholera virus protects swine against both pseudorabies and hog cholera. *J. Virol*. 1991, 65: 2 761 - 2 765.
- [5] Chen C F, Yu X L, Qiao J, et al. Studies on immunopathology of classical swine fever virus DNA vaccine in the muscle of mice. *Journal of Shihezi University*, 2001, 5(3): 215 - 218. (in Chinese)
陈创夫,余兴龙,乔军,等.猪瘟基因疫苗在小鼠肌肉中的免疫病理学观察.石河子大学学报,2001,5(3):215 - 218.
- [6] Zhang W P, Chao X T, Xu Z G, et al. Experimental studies on the augmentation of antitumor immunity by IL-3 gene transfected melanoma cells. *Chinese Journal of Immunology*, 1995: 11 (6): 344 - 347. (in Chinese)
章卫平,曹雪涛,徐志工,等.IL-3 基因转染的肿瘤细胞增强机体免疫功能的实验研究.中国免疫学杂志,1995,11(6):344 - 347.
- [7] Kim J J, Bagarazzi M L, Trivedi N, et al. Engineering of in vivo immune responses to DNA immunization via codelivery of costimulatory molecule genes. *NAT Biotechnol*. 1997, 15: 641 - 646.
- [8] Tsuji, Hamajima K, Ishii N, et al. enhancement of cell-mediated immunity against HIV-1 induced by coinoculation of plasmid encoded HIV-1 antigen with plasmid expressing IL-12. *J. Immunol*. 1997, 158: 4 008 - 4 013.
- [9] Maecker H T, Umetsu D T, Dekruyff R H, et al. DNA vaccination with cytokine fusion constructs biases the immune response to ovalbumin. *Vaccine*, 1997, 15: 1 687 - 1 696.
- [10] Chow Y H, Chinag B L, Lee Y L, et al. Development of Th1 and Th2 Populations and the nature of immune responses to hepatitis B virus DNA vaccines be modulated by codelivery of various cytokine genes. *J. Immunol*. 1998, 160: 1 332 - 1 329.