

以猪 IgG 重链恒定区为抗原载体的抗口蹄疫病毒 DNA 疫苗的研制

李光金¹ 严维耀¹ 徐泉兴² 盛祖恬³ 郑兆鑫^{1*}

¹(复旦大学生命科学院遗传工程国家重点实验室 上海 200433)

²(上海农业科学研究院兽医研究所 上海 201106)

³(浙江省农业科学研究院病毒研究所 杭州 310021)

关键词 口蹄疫病毒, DNA 疫苗, 免疫球蛋白 G 抗原

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)03-0322-03

口蹄疫(Foot-and-Mouth Disease, FMD)是当今世界上最为严重的家畜传染病之一,主要危害猪、牛、羊等偶蹄动物。FMD的致病原为FMD病毒(FMDV),属小RNA病毒科口蹄疫病毒属,有A、O、C、SAT I、SAT II、SAT III及Asia I共7个血清型。FMDV结构较简单,完整的病毒颗粒由4种结构蛋白VP1、VP2、VP3及VP4各60个拷贝构成的衣壳包裹一条单股正链RNA组成,其中VP1是主要的抗原蛋白^[1]。

目前尚无治疗FMD的有效办法,免疫接种是控制FMD发生的主要手段,因此,研制有效、安全及经济的抗FMDV疫苗显得尤为重要。FMDV VP1蛋白中141~160位氨基酸残基是一主要B细胞表位^[2],而21~40位氨基酸残基则是一重要T细胞表位^[3],但这些小分子抗原肽需与大分子载体蛋白相连才能有效地诱发机体产生免疫应答。因此,本研究里,我们在克隆了一株O型FMDV外壳蛋白VP1基因并测定了其序列之后,化学合成了141~160及21~40位氨基酸残基2个表位基因,并采用猪免疫球蛋白G(IgG)重链恒定区作为载体蛋白,将合成的抗原表位基因连接在载体蛋白基因的3'端,再克隆进真核表达载体pCDM8中,构建成重组表达质粒pCDM8FZ3,并检测了其诱发豚鼠产生免疫应答的情况。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒

大肠杆菌JM109及质粒pBluescript II KS(pBS KS)由本室保存,含有猪IgG重链全长基因的质粒pBS-SH由本室构建,真核表达质粒pCDM8及大肠杆菌Top10由香港科技大学生物系提供。

1.2 PCR扩增猪IgG重链信号肽基因及恒定区基因

扩增信号肽基因正链引物(P1):5'-TGATGCTCGAGATA-TGGAGTTTCGG-3',负链引物(P2):5'-ATCGGGATCCCTC-CACCAGCTTCTC-3',两5'端分别引入XhoI及BamHI酶切位点。扩增恒定区基因正链引物(P3):5'-ACGGGATCCTCAGC-

CCCCAAGACGG-3',负链引物(P4):5'-ACCGGAATTCCT-TACCCTGACTCTTGG-3',两5'端分别引入BamHI及EcoRI酶切位点。反应条件均按常规进行。

1.3 动物免疫

所用豚鼠购自第二军医大学实验动物科学部,雄性,每只体重200g左右。将抽提纯化好的质粒DNA溶于0.9% NaCl中(质粒的抽提纯化采用Promega公司Wizard核酸纯化系统)配成1mg/mL,于每只豚鼠腿部肌肉注射0.2mL DNA溶液,分3~4点注射,3周后用相同剂量的DNA加强免疫1次,阴性对照组注射相同剂量的空白质粒(pCDM8)。

1.4 豚鼠血清中和抗体检测

按文献4报道的方法作乳鼠保护试验,计算出半数致死量(LD₅₀),结果以中和指数(NI)表示:NI = -lg(实验组LD₅₀/阴性对照组LD₅₀),NI即反映病毒中和抗体的滴度。

1.5 豚鼠T细胞增殖检测

用³H-TdR掺入法。以不同稀释度的O型FMDV精制抗原与豚鼠脾脏T细胞(1×10⁵)共同培养60h后,加入[³H]-TdR继续培养12h,测定[³H]-TdR掺入量(cpm),结果用刺激指数(SI)表示:SI = 实验孔cpm值/不加刺激原的阴性对照孔cpm值,以SI≥2判为阳性。

1.6 豚鼠抗病毒能力检测

采用划痕涂布与注射相结合的方式接种病毒。豚鼠第2次免疫后7周,于每侧跖部沿腿部方向注射0.1mL O型FMDV溶液(毒株:Hongkong株),另将两侧跖部皮肤划破,涂布病毒液,每只豚鼠接种总剂量为50倍的半数感染量(ID₅₀),接种后2周内观察发病情况。

2 结果

2.1 FMDV抗原表位基因的设计、化学合成与克隆

选择VP1中141~160及21~40位氨基酸肽段,将其组成141~160(20AA)-21~40(20AA)-141~160(20AA)串联形

式,在串联片段基因的 5'端引入 *EcoRI* 酶切位点,3'端引入 *NotI* 酶切位点,共分 12 个片段进行合成。合成片段经磷酸化、退火并连接成完整基因后,克隆进质粒 pBS KS 中。经酶切、PCR 及序列分析后,筛选出阳性重组子,命名为 pBS-FZ。

2.2 猪 IgG 重链信号肽基因及恒定区基因克隆

以质粒 pBS-SH 为模板,用 PCR 方法分别扩增出猪 IgG 重链信号肽基因(98bp)及恒定区全长基因(1005bp),PCR 产物经酶切后,与经 *XhoI* 及 *EcoRI* 酶切过的 pBS KS 大片段相连,构建含猪 IgG 重链信号肽及恒定区基因的质粒 pBS-ISC。

2.3 免疫用重组质粒构建

用 *XhoI* 及 *EcoRI* 双切质粒 pBS-ISC,回收猪 IgG 重链信号肽及恒定区基因,用 *EcoRI* 及 *NotI* 双切质粒 pBS-FZ 回收 FMDV 抗原表位基因。质粒 pCDM8 为一真核表达载体,经 *XhoI* 及 *NotI* 酶切后回收大片段,将该大片段与上面回收的两个基因片段相连,转化大肠杆菌 Top10,经酶切、PCR 及 DNA 序列分析后筛选出阳性重组子,命名为 pCDM8FZ3 构建过程如图 1 所示。

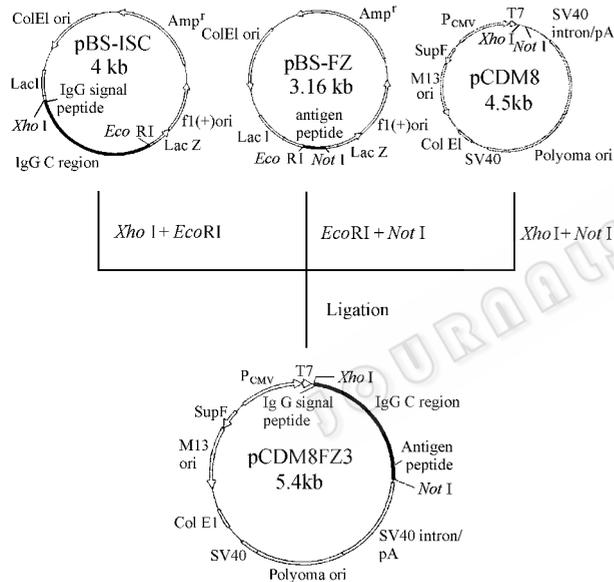


图 1 重组质粒 pCDM8FZ3 的构建

Fig.1 Construction of recombinant plasmid pCDM8FZ3

2.4 血清中和抗体检测

将 pCDM8FZ3 免疫豚鼠后,进行了免疫效果检测。表 1 示中和指数,豚鼠第 2 次免疫后第 2 周,即可检测到病毒中和抗体。

表 1 免疫豚鼠中和抗体

Table 1 Neutralizing antibody titers in immunized guinea pigs

Groups	Number of animals	Weeks post secondary inoculation	
		2	4
pCDM8FZ3	3	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.1
pCDM8	3	0	0

2.5 T 细胞增殖检测

图 2 示第 2 次免疫后第 4 周,豚鼠脾脏 T 细胞在抗原刺激下增殖反应情况。在 1:50 ~ 1:200 稀释度的 O 型 FMDV 特

异抗原刺激下,经 pCDM8FZ3 免疫过的豚鼠脾脏 T 细胞有明显增殖作用,而 pCDM8 组 T 细胞对病毒抗原的刺激无应答。

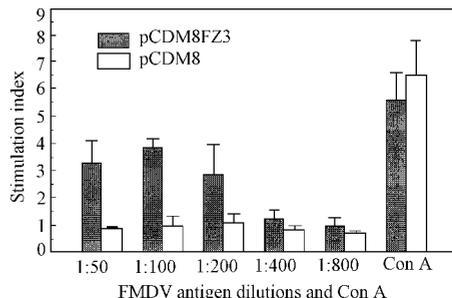


图 2 免疫豚鼠 T 细胞增殖检测

Fig.2 Proliferation of spleen T cells of immunized guinea pigs

2.6 抗病毒能力检测

用 O 型 FMDV 对免疫豚鼠进行攻击,结果发现,在免疫的 6 只豚鼠中,有 4 只未发病,而对照组豚鼠则全部发病(表 2)表明免疫豚鼠有一定的抗病毒能力。

表 2 免疫豚鼠抗病毒能力检测

Table 2 Protection of immunized guinea pigs from viral challenge

Groups	Number of animals	Number of protection	Protection rate
pCDM8FZ3	6	4	66%
pCDM8	5	0	0

3 讨论

业已证明,小分子抗原肽需与大分子载体蛋白相连构成融合蛋白才能有效地诱发机体产生免疫应答。一般认为,连上载体一方面避免小分子抗原肽被降解,从而增加抗原的稳定性,另一方面是由于小分子抗原肽单独使用时因分子量太小而无法有效地诱发机体产生免疫应答。目前用于 FMDV 小分子抗原肽的载体蛋白主要有大肠杆菌 β -半乳糖苷酶及乙型肝炎病毒核心抗原等^[5,6]。由于自体免疫球蛋白在体内半衰期较长,重链 Fc 段上具有抗原提呈细胞受体而易被抗原提呈细胞所摄取,并且安全无毒性^[7],因而本室曾尝试以猪 IgG 重链作为 FMDV 多肽抗原的载体,用抗原肽取代猪 IgG 重链 CDR3 区,构建了一种 DNA 疫苗。但动物实验结果发现,该疫苗对豚鼠的保护作用很弱,只能使豚鼠发病延迟。本实验则将猪 IgG 重链可变区全部缺失掉,只用恒定区作为载体,将 FMDV 抗原肽连接在其羧基端,结果表明,构建的 DNA 疫苗对豚鼠的保护率达 66%,效果远远强于以整个 IgG 重链作为载体的 DNA 疫苗。另外,我们也在大肠杆菌中表达出由猪 IgG 重链恒定区及 FMDV 抗原肽组成的融合蛋白,用该融合蛋白免疫豚鼠 2 次(400 μ g/次/只),第 2 次免疫后 3 周用 O 型 FMDV 对豚鼠进行攻击,结果豚鼠的保护率达 100%,证明猪 IgG 重链恒定区更适合作为 FMDV 多肽抗原的载体蛋白。这可能是由于恒定区与 FMDV 抗原肽构成的融合蛋白的空间结构更有利于免疫系统的识别。

有许多优点而受到重视,被誉为第三代疫苗。Ward 等^[9,10]曾构建了 2 种抗 A 型 FMDV DNA 疫苗,它们均能诱发受试动物产生特异免疫应答,但保护作用较弱,最佳保护率只有 20%。本文将 FMDV 主要 T、B 细胞表位组成串联结构,并与猪 IgG 重链恒定区相连,结果证明,构建的 DNA 疫苗对豚鼠有较好的保护效果,这为抗 FMDV DNA 疫苗的应用打下了一定的基础。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Kupper H, Keller W, Kruz C *et al.* Cloning cDNA of major antigenic of foot-and-mouth disease virus and expression in *E. coli*. *Nature*, 1981, **289**: 555 ~ 559
- [2] Bittle J L, Houghten R A, Alexander H *et al.* Protection against foot-and-mouth disease by immunization with a chemically synthesized peptide predicted from the viral nucleotide sequence. *Nature*, 1982, **298**: 30 ~ 33
- [3] Collen T, Dimarchi R, Doel T R. A T cell epitope in VP1 of foot-and-mouth disease virus is immunodominant for vaccinated cattle. *The Journal of Immunology*, 1991, **146**: 749 ~ 755
- [4] Mulcahy G, Pullen L A, Gale C *et al.* Mouse protection test as a pre-

dictor of the protective capacity of synthetic foot-and-mouth disease vaccines. *Vaccine*, 1991, **9**: 19 ~ 24

- [5] Winther M D, Allen G, Bomford R H *et al.* Bacterially expressed antigenic peptide from foot-and-mouth disease virus capsid elicits variable immunogenic responses in animals. *The Journal of Immunology*, 1986, **136**: 1835 ~ 1840
- [6] Clarke B E, Newton S E, Carroll A R *et al.* Improved immunogenicity of a peptide epitope after fusion to hepatitis B core protein. *Nature*, 1987, **330**: 381 ~ 384
- [7] Zaghouani H, Steinman R, Nonacs R *et al.* Presentation of a viral T cell epitope expressed in the CDR3 region of a self immunoglobulin molecule. *Science*, 1993, **259**: 224 ~ 227
- [8] Restifo N P, Ying H, Hwang L *et al.* The promise of nucleic acid vaccines. *Gene Therapy* 2000, **7**(2): 89 ~ 92
- [9] Ward G, Rieder E, Mason P W. Plasmid DNA encoding replicating foot-and-mouth disease virus genomes induces antiviral immune responses in swine. *Journal of Virology*, 1997, **71**: 7442 ~ 7447
- [10] Chinsangaram J, Beard C, Mason P W *et al.* Antibody responses in mice inoculated with DNA expressing foot-and-mouth disease virus capsid proteins. *Journal of Virology*, 1998, **72**: 4454 ~ 4457

Study on the DNA Vaccine Against Foot-and-mouth Disease Virus Using the Heavy Chain Constant Region of Swine IgG as the Carrier for Peptide Epitopes

LI Guang-Jin¹ YAN Wei-Yao¹ XU Quan-Xing² SHENG Zu-Tian³ ZHENG Zhao-Xin^{1*}

¹(State Key Laboratory of Genetic Engineering, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China)

²(Institute of Veterinary Science, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China)

³(Institute of Virology, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China)

Abstract The peptide of amino acids 141 ~ 160 of VP1 protein of foot-and-mouth disease virus (FMDV) is a major B cell epitope and the peptide of amino acids 21 ~ 40 is an important T cell epitope. In this study, the DNA fragments of 141 ~ 160 and 21 ~ 40 peptide epitopes of a strain of type O FMDV was chemically synthesized and arranged into a tandem repeat 141 ~ 160 (20AA)-21 ~ 40 (20AA)-141 ~ 160 (20AA). This tandem sequence was fused to the 3' end of the heavy chain constant region gene of swine immunoglobulin G and was then cloned into mammalian expression vector pCDM8 to form a recombinant plasmid pCDM8FZ3. After pCDM8FZ3 was inoculated intramuscularly into guinea pigs, it elicited a neutralizing antibody response and a specific spleen T cell proliferative response, and 66% of the vaccinated animals were protected from viral challenge. Our study indicated that the heavy chain constant region of swine IgG can act as the carrier protein for FMDV peptide epitopes, and pCDM8FZ3 is a potential DNA vaccine candidate to prevent FMDV infection.

Key words Foot-and-mouth disease virus, DNA vaccine, immunoglobulin G, antigen

Received September 15, 2000

This work was supported by Chinese National Programs for High Research and Development (1997210).

* Corresponding author. Tel: 86-21-65642504; Fax: 86-21-65104949; E-mail: zzheng@fudan.edu.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>