

## FMDV VP1 基因与 HSP70 基因在毕赤酵母中的融合表达及免疫特性

# Fusion Expression of O Type Foot-and-Mouth Diseases Virus VP1 Gene and HSP70 Gene and Induction of Immune Responses in Mice

苏春霞<sup>1</sup>, 段相国<sup>2</sup>, 王秀青<sup>1</sup>, 任雪枫<sup>1</sup>, 曹瑞兵<sup>1</sup>, 周 斌<sup>1</sup>, 陈溥言<sup>\*</sup>

SU Chun-Xia<sup>1</sup>, DUAN Xiang-Guo<sup>2</sup>, WANG Xiu-Qing<sup>1</sup>, REN Xue-Feng<sup>1</sup>, CAO Rui-Bing<sup>1</sup>, ZHOU Bin<sup>1</sup> and CHEN Pu-Yan<sup>\*</sup>

1 南京农业大学农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室, 南京 210095

2 宁夏大学农学院动物科学系, 银川 750021

1 Key Laboratory of Animal Diseases Diagnosis & Immunology of China's Department of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

2 Ningxia University, Agricultural College, Department of Animal Science, Yinchuan 750021, China

**摘 要** 利用毕赤酵母系统对 O 型口蹄疫病毒 VP1 基因与结核杆菌 HSP70 基因进行融合表达, 并检测此融合蛋白对小鼠细胞免疫和体液免疫的影响。将人工合成的 O 型口蹄疫病毒 VP1 基因与结核杆菌 HSP70 基因克隆入酵母表达载体 pPICZαA 中, 以电穿孔法转化酵母菌 X-33, 用 Zeocin + YPDS 平板筛选重组子, 经甲醇诱导表达后, SDS-PAGE 和免疫印迹分析表达产物。以皮下接种的方式给小鼠进行 3 次免疫, 同时设两组对照, 分别免疫 PBS 和常规灭活疫苗, 然后通过 MTT 法和 ELISA 分别检测淋巴细胞的增殖情况和抗体水平。结果表明融合蛋白既能诱导细胞免疫应答又能诱导体液免疫应答, 其诱导产生的抗体水平略低于常规灭活疫苗, 而细胞免疫水平则高于后者。

**关键词** O 型口蹄疫病毒, VP1 基因, HSP70, 毕赤酵母, 融合表达

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2006)05-0733-04

**Abstract** Vp1 gene of O type foot-and-mouth diseases virus and *M. tuberculosis* HSP70 were expressed in methylotrophic yeast *Pichia pastoris* expression system. The results of cellular immune responses and humoral immune response were examined after BALB/c mice were immunized with fusion protein expressed in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. The genes was cloned into the vector pPICZαA by routine molecular technique. The plasmid fusion (pPICZαA-vp1-HSP70) was created that HSP70 located downstream of VP1 gene of O type foot-and-mouth disease virus. Vp1 was expressed by fusing to the amino terminus of *M. tuberculosis* hsp70 in yeast *Pichia pastoris*. The recombinant fusion plasmid was transformed into methylotrophic yeast *Pichia pastoris* X-33 by electroporation. The recombinant transformants were selected by Zeocin and induced by the addition of methanol every 24h. The expressed product analyzed by SDS-PAGE and Western blotting. The result indicated that the fusion protein (vp1-HSP70) has specific antigenicity. Mice were inoculated transcutaneous three times at a two-weeks interval with fusion protein, PBS and conventional inactivated vaccines. To evaluate the prophylactic efficacy of fusion protein, Titers of antibodies was detected by ELISA and proliferation of lymphocytes were determined by MTT. The results indicated that fusion protein could elicit specific humoral immune and cellular immune responses. Compared with conventional inactivated vaccines,

Received: April 11, 2006; Accepted: May 12, 2006.

\* Corresponding author. Tel: 86-25-84396028; E-mail: aid@njau.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

fusion protein elicited slightly lower FMDV antibody level but stronger T cell proliferation.

**Key words** O type foot-and-mouth disease virus, HSP70, *Pichia pastoris*, fusion expression

口蹄疫(foot-and-mouth disease, FMD)是严重危害偶蹄动物的一种急性、热性和烈性传染病。国际兽医局(OIE)将该病列为A类家畜传染病。该病的病原口蹄疫病毒(FMDV)属小RNA病毒科(Picornaviridae) FMDV属(Aphthovirus)。病毒粒子外壳由外壳蛋白VP1、VP2、VP3和VP4各60个分子构成,其中VP1是诱导产生中和抗体的主要成分,是最重要的抗原位点。因此,在FMDV基因工程疫苗的研制、诊断方法的建立等领域,VP1基因均得到众多研究人员的关注<sup>[1]</sup>。

疫苗是控制FMD的最有效措施,但FMD传染性极强,在灭活疫苗的生产、使用过程中有诱发FMD的危险,这促使其基因工程疫苗的研究逐渐成为FMD疫苗研究的热点<sup>[2-3]</sup>。但基因工程疫苗在诱导机体免疫反应方面还存在一些不尽如人意之处,因此,研究者试图从多方面增强FMD疫苗的免疫效果,例如增加细胞因子(IL-18、IFN- $\gamma$ )和其他辅助分子如IgG等<sup>[4-5]</sup>。

HSP70具有分子佐剂和载体效应<sup>[6]</sup>,HSP70还是免疫系统识别的主要抗原,可诱导和增强机体体液免疫和细胞免疫的发生,特别是在效应T细胞的激活过程中扮演着重要角色。很多研究者将HSP70融合到人类的一些病毒病(如HIV、HPV)的抗原肽上,用于增强抗原的免疫原性和疫苗的免疫效果。本研究将HSP70加入口蹄疫病毒VP1的羟基端,实现了其在毕赤酵母中的融合表达,试图借助它的载体分子效应和佐剂作用,来增强抗原的免疫性,为进一步研制FMD的基因工程疫苗提供一种新的思路。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 质粒、菌株:**O型口蹄疫病毒VP1基因(pMD18-VP1)由上海Invitrogen公司合成;质粒pPICZ $\alpha$ A,带有HSP70基因的载体(pMD18-HSP70),宿主菌DH5 $\alpha$ ,巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)受体菌X-33均由本室保存。表达FMDVVP1基因的原核表达载体pET-VP1由本室构建。

**1.1.2 主要试剂:**PCR引物由上海Invitrogen公司合成;Taq酶,限制酶及T4DNA连接酶,DNA凝胶回收试剂盒均购自大连TaKaRa公司;Zeocin、YNB、生物素均为BioRad公司产品;四甲基偶氮唑盐(MTT),低

分子量标准蛋白质Marker购自创瑞公司;DAB显色试剂盒、HRP-SPA及羊抗鼠的酶标二抗均为武汉博士德生物工程有限公司产品;其它试剂均为国产或进口分析纯。FMDV的标准阳性血清为中国农业科学院兰州兽医研究所产品;O型FMD灭活疫苗为中牧股份兰州生物药厂产品。

### 1.2 方法

**1.2.1 酵母表达载体pPICZ $\alpha$ A-VP1-HSP70的构建与表达:**据NCBI上公布的O型口蹄疫病毒的VP1基因的序列,进行人工合成(由上海Invitrogen公司合成),并命名为pMD18-VP1,设计扩增VP1基因的引物,P1(5'):5'-CCAGAAATTCATGACCACCTCA-3',P2(3'):5'-GGAGGATCCCAAAGCTGTTT-3',5'端带有EcoRI位点,3'端带有BamHI位点,以pMD18-VP1为模板进行PCR扩增。同时设计扩增HSP70基因的引物,P1(5'):5'-TTAGGATCCGCTCGTGCGGTC-3',P2(3'):5'-GTTTCTAGATCACTTGGCCTC-3',5'端带有BamHI位点,3'端带有XbaI位点,以质粒pMD18-HSP70为模板进行PCR扩增。按常规方法进行酶切、连接。经酶切鉴定后,将筛选出的阳性重组子送上海Invitrogen公司测序,并命名为pPICZ $\alpha$ A-VP1-HSP70。采用电穿孔转化法:用SacI线性化pPICZ $\alpha$ A-VP1-HSP70后,在1.5kV,20 $\mu$ F,200 $\Omega$ 条件下转化至受体菌X-33感受态细胞中,用含有100mg/L Zeocin<sup>+</sup> YPDS平板进行筛选,28 $^{\circ}$ C~30 $^{\circ}$ C孵育3~7d。将筛选的阳性转化子接种到Zeocin<sup>+</sup> YPDS液体培养基中振荡培养。经PCR鉴定出阳性克隆(上游引物为载体5'AOX鉴定引物,下游引物为VP1基因的下游引物),最后经甲醇诱导表达72h后,取培养液上清进行SDS-PAGE分析。

**1.2.2 表达产物的免疫印迹检测:**按文献<sup>[7]</sup>所述方法进行Western-blot分析所表达融合蛋白的免疫学活性,Western-blot所用一抗为FMDV的标准阳性血清,二抗为HRP-SPA(按1:2000稀释),DAB显色。

**1.2.3 免疫小鼠试验:**试验动物:BALB/c小鼠,4~6周龄,由南京医科大学实验动物中心提供,均为雌性。将小鼠分为3组,每组8只。第一组免疫VP1-HSP70融合蛋白,50 $\mu$ g/只;第二组免疫O型FMD灭活疫苗,200 $\mu$ L/只;第三组免疫PBS,200 $\mu$ L/只;均以皮下注射的方式进行免疫,每间隔2周免疫一次,共免疫3次。

**1.2.4 T 淋巴细胞增殖试验 :**第三次免疫后 3d 处死小鼠 ,按常规方法制备脾细胞并计数细胞 ,接种到 96 孔板内 ,使达到  $2 \times 10^5$  /孔 ,同时加入终浓度为  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$  的纯化的 VP1 蛋白进行刺激。将细胞培养 44h 后 ,加 MTT( 原始浓度  $5\text{mg}/\text{mL}$  ) $20 \mu\text{L}/\text{孔}$  ,继续培养 4h 取出后弃上清 ,加 DMSO $100 \mu\text{L}/\text{孔}$  ,使结晶溶解 ,在微量振荡器震荡 ,测  $OD_{570}$  值。

**1.2.5 抗体滴度的测定 :**第三次免疫后 3d ,经小鼠眼球采血 ,分离血清。用 pH9.6 的碳酸盐缓冲液包被纯化的 VP1 蛋白 , $100\text{ng}/\text{孔}$  , $4^\circ\text{C}$  过夜 ,PBS 洗涤 3

次 ,加 1% BSA , $37^\circ\text{C}$  封闭 2h ,PBS 洗涤 3 次 ,加小鼠血清样  $37^\circ\text{C}$  作用 1h ,PBS 洗涤 3 次 ,加入羊抗鼠的酶标二抗  $37^\circ\text{C}$  作用 1h ,PBS 洗涤 3 次 ,加入 OPD 显色 ,反应 30min 后 ,加入  $2\text{mol}/\text{L}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  终止反应。以  $OD_{490}$  值大于 0.2 的血清最高稀释度作为抗体滴度。

## 2 结果与分析

### 2.1 FMDVVP1 基因与 HSP70 的克隆与重组表达载体的构建( 图 1 )

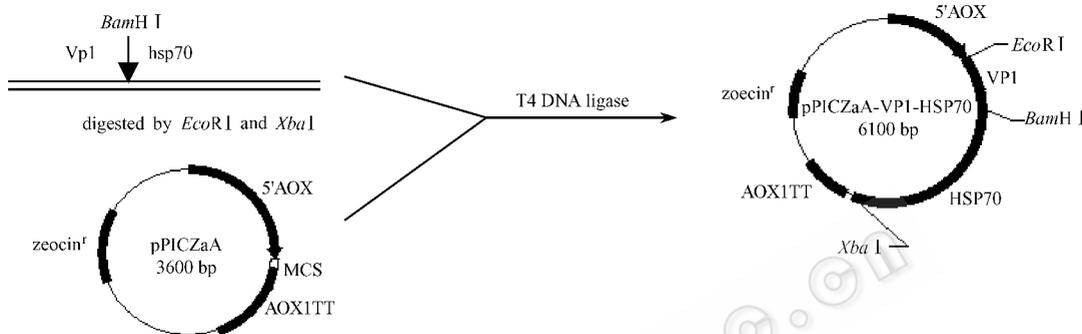


图 1 表达载体 pPICZαA-VP1-HSP70 的构建

Fig.1 Construction of recombinant expression vector pPICZαA-VP1-HSP70

### 2.2 电转化后 PCR 的鉴定结果( 图 2 )

在挑取的 4 个转化子中均可扩增出预期大小为 1.2kb 的片段 ,而阴性对照没有扩增出任何条带 ,表明外源基因已稳定地整合入毕赤酵母细胞中( 图 2 )

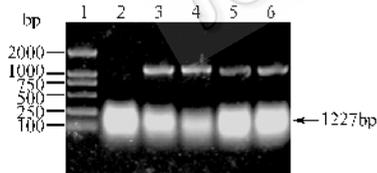


图 2 PCR 鉴定电转化后的酵母基因组

Fig.2 Identification of transformants by PCR

1 : marker DL2000 ; 2 : products of PCR from control yeast cells ; 3 ~ 6 : products of PCR from four selected clones.

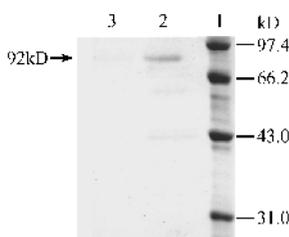


图 3 表达产物 SDS-PAGE 电泳鉴定

Fig.3 Expressed products analyzed by SDS-PAGE

1 : protein Marker ; 2 : expressed product of pPICZαA-VP1-HSP70 in yeast cells ; 3 : expressed product of pPICZαA in yeast cells.

### 2.3 融合蛋白在酵母中的表达

阳性转化子 pPICZαA-VP1-HSP70/X-33 及空载体 pPICZαA2A/X-33 表达上清的 SDS-PAGE 分析结果( 图 3 ) 阳性转化子的表达上清在 92kD 处有一条带 ,而 pPICZαA2A/X-33 上清没有相应的蛋白条带。

### 2.4 融合蛋白的免疫印迹检测

用 O 型口蹄疫阳性血清进行蛋白印迹 ,显示出一条特异性条带 ,其分子量约 92kD( 图 4 ) ,表明融合蛋白具有较好的免疫原性。

### 2.5 MTT 分析

图 5 结果显示 ,免疫 VP1-HSP70 融合蛋白的小鼠组  $OD_{570}$  平均值为  $0.349 \pm 0.038$  ,免疫常规灭活疫苗的小鼠组  $OD_{570}$  平均值为  $0.340 \pm 0.050$  ,免疫 PBS 小鼠组  $OD_{570}$  平均值为  $0.127 \pm 0.088$  。经 SPSS 软件分析 ,VP1-HSP70 融合蛋白组和灭活疫苗组分别与 PBS 组差异显著(  $P < 0.05$  ) ,而这两组之间差异不显著。

### 2.6 抗体滴度检测结果

经测定 ,VP1-HSP70 融合蛋白产生的抗 VP1 蛋白的抗体滴度为  $10^{2.8}$  ,常规灭活疫苗产生的抗 VP1 蛋白的抗体滴度为  $10^{3.4}$  。这一结果表明融合蛋白能诱导小鼠产生体液免疫应答 ,但免疫效果略低于常规灭活疫苗。

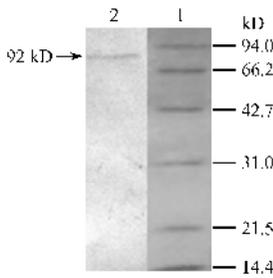


图4 表达产物的 western-blot 分析

Fig.4 Expressed product analyzed by western-blot

1: protein marker; 2: Western-blot result of expressed product of pPICZ $\alpha$ A-VP1-HSP70 in yeast cells.

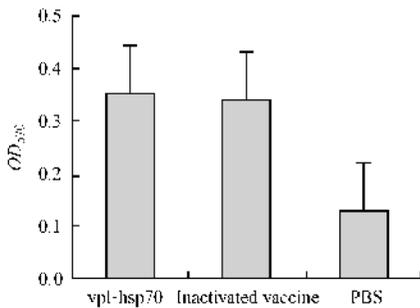


图5 蛋白免疫的 T 淋巴细胞增殖反应

Fig.5 T lymphocyte proliferation assays

### 3 讨论

目前研究认为,体液免疫对于 FMDV 的免疫至关重要,在 FMDV 感染中细胞免疫的作用也是必不可少的。FMDV 抗原结构研究表明,VP1 片段是 FMDV 的主要抗原位点,能诱导机体产生保护性的中和抗体,并能产生部分保护作用。在已发现的 O 型 FMDV 5 个抗原位点中,有 3 个位于 VP1 上,其中第 140~160 位氨基酸处的 G-H 环是最主要的保护性抗原位点,VP1C 端的 200~213 位氨基酸形成另外一个抗原位点,这个位点与 140~160 位的 G-H 环构成一个非连续的形态表位,在免疫中发挥着重要的作用。

HSP70 具有分子佐剂和载体效应,可诱导和增强机体体液免疫和细胞免疫的发生。由于传统灭活疫苗是外源性抗原,不能通过 MHC I 抗原递呈途径有效的激活 T 淋巴细胞,因而诱导的细胞免疫水平较低。很多实验表明,在部分具有吞噬功能的抗原

递呈细胞(APC)中,HSP 可将与之结合的外源性抗原引入 MHC I 类途径从而诱导细胞免疫应答。另外,HSP70 自身也含有多个 T 细胞表位,所以就增加了 T 细胞表位的数目。

本研究表达的融合蛋白是在 VP1 的羟基端加入 HSP70 以增强抗原的细胞免疫应答。同时,为了克服表达的抗原与天然结构蛋白在结构上存在较大差别,本研究将口蹄疫病毒 VP1 基因与 HSP70 基因在真核表达系统(酵母)中进行融合表达,表达的有活性的外源蛋白就在酵母上清中,离心后就能获得,自体蛋白极少而且不需考虑 LPS 的影响,我们从细胞免疫和体液免疫两方面来评价此融合蛋白免疫效果,研究结果表明 VP1-HSP70 融合蛋白诱导产生的抗体水平略低于常规灭活疫苗,但细胞水平则高于后者,为口蹄疫基因工程疫苗的研究奠定了基础。

### REFERENCES (参考文献)

- [1] Lu ZX(卢曾军), Liu ZX(刘在新). Development of foot-and-mouth disease virus. *Chinese Journal of Veterinary Science and Technology* (中国兽医科技). 2003, 33(2): 69-74
- [2] Mayr GA, O'Donnell V, Chinsangaram J *et al.* Immune responses and protection against foot-and-mouth disease virus (FMDV) challenge in swine vaccinated with adenovirus-FMDV constructs. *Vaccine* 2001, 19(15-16): 2152-2162
- [3] Carrillo C, Wigdorovitz A, Trono K *et al.* Induction of a virus specific antibody response to foot-and-mouth disease virus using the structural protein VP1 expressed in transgenic potato plants. *Viral Immunol* 2001, 14: 49-57
- [4] Beard C, Ward G, Rieder E *et al.* Development of DNA vaccines for foot-and-mouth disease, evaluation of vaccines encoding replicating and nonreplicating nucleic acids in swine. *J Biotechnology*, 1999, 73(223): 243-249
- [5] Blanco E, Garcí'a Briones MM, Sanz Parra A *et al.* Identification of T-cell epitopes in nonstructural proteins of foot-and-mouth disease virus. *J Virol*, 2001, 35: 3164-3174
- [6] ASEA A, KRAEFT SK, JONES EAK *et al.* HSP70 stimulate cytokine production through a CD14-dependent pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nature Medicine* 2000, 4: 435-436
- [7] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup> ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989