

A 型肉毒毒素受体结合区 Hc 在重组 SFV 复制子载体中的表达

余云舟, 孙志伟, 王双, 俞炜源

北京生物工程研究所, 北京 100071

摘要: 为了在哺乳动物细胞中表达 A 型肉毒毒素 Hc 抗原, 构建了含 A 型肉毒毒素受体结合区 Hc 基因的基于 RNA 和 DNA 的重组 Semliki 森林病毒(Semliki forest virus, SFV)复制子表达载体。RNA 和 DNA 复制子载体转染 BHK21 细胞后, 经间接免疫荧光、Western 印迹和 ELISA 检测, 结果表明非分泌型和分泌型的 Hc 抗原在细胞中都得到了有效地表达; 而且复制子表达载体与辅助病毒载体共转染均可制备高滴度的重组病毒颗粒, 该重组病毒颗粒感染细胞后, 也都能表达 Hc 抗原。以上结果表明, 基于 RNA 和 DNA 的重组 SFV 复制子表达载体在细胞中均可有效地表达 Hc 抗原和制备具有感染能力并能表达 Hc 抗原的重组病毒颗粒。基于 RNA 和 DNA 的重组 SFV 复制子表达载体的构建和含 A 型肉毒毒素受体结合区 Hc 基因的重组病毒颗粒的获得, 为进一步观察 SFV 复制子疫苗的免疫原性奠定了基础, 从而为 A 型肉毒毒素新型疫苗的研制提供了新途径。

关键词: semliki 森林病毒, 复制子, A 型肉毒毒素, 受体结合区 Hc, 重组病毒颗粒

Expression of the Hc Fragment of *Clostridium botulinum* Neurotoxin Serotype A in Mammalian Cells with Recombinant Semliki Forest Virus Expression System

Yunzhou Yu, Zhiwei Sun, Shuang Wang, and Weiyuan Yu

Beijing Institute of Biotechnology, Beijing 100071, China

Abstract: To produce the C-terminal fragment of heavy-chain receptor (Hc) of the *Clostridium botulinum* neurotoxin serotype A (BoNT/A) in mammalian cells, we cloned the Hc gene from BoNT/A into the RNA and DNA-based Semliki Forest virus (SFV) replicon expression vectors, resulting in recombinant replicon expression vectors pSMHc, pSMShc, pSCARHc, and pSCARShc. Effective expression of non-secreted and secreted antigen Hc were confirmed by indirect immunofluorescence (IF), Western blot and ELISA after transfecting BHK21 cells with these replicon expression vectors based on both DNA and RNA. Recombinant virus particles (RVP) were prepared by cotransfecting these expression vectors with helper vectors (pSFV-helper2 or pSHCAR) and the expression of antigen Hc was confirmed by indirect immunofluorescence (IF) and Western blot in cells (BHK21) that were infected with these recombinant virus particles (RVP). RNA and DNA-based recombinant SFV replicon expression vectors and recombinant virus particles (RVP) containing Hc gene all effectively expressed antigen fragment Hc in cells. This work laid a foundation for the study of the immunogenicity of SFV replicon vaccines and provided an alternative to develop new type vaccines against botulinum neuro-

Received: March 26, 2007; Accepted: May 3, 2007

Corresponding author: Weiyuan Yu. Tel: +86-10-66948828; E-mail: yuwy@nic.bmi.ac.cn.

toxin serotype A.

Keywords: Semliki Forest virus, RNA replicon, botulinum neurotoxin serotype A, C-terminal fragment of heavy-chain receptor(Hc), Recombinant virus particles (RVP)

肉毒毒素(Botulinum neurotoxin, BoNT)是肉毒梭菌产生的神经毒素,是目前已知最毒的天然物质,共有七个血清型(A~G),其中A型的毒性最强^[1]。疫苗是预防肉毒中毒最有效的方法。但目前研究或有限使用的类毒素疫苗存在许多缺点,无法进行推广应用。肉毒毒素受体结合区Hc为保护性抗原基本决定簇,具有完全的免疫保护作用,是肉毒毒素新型疫苗研究的靶抗原^[2]。本实验室人工合成的A型肉毒毒素受体结合区Hc基因实现了在大肠杆菌中可溶性高效的表达,并且重组蛋白Hc具有良好的免疫原性和保护作用,极有潜力作为A型肉毒毒素亚单位疫苗^[3]。除了肉毒素Hc亚单位疫苗研究外,核酸疫苗、基因工程载体疫苗等新型疫苗也是肉毒素疫苗研究的另一个重要的方向,具有制备简单、成本低、安全、免疫程序方便等优点。

已报道的实验结果表明,针对A型^[4,5]或F型^[6,7]肉毒毒素DNA疫苗的结果均不是十分理想,诱导产生的抗体水平较低,相应的保护作用不够强大,尤其是针对A型肉毒毒素DNA疫苗的实验结果。但Lee等^[8]用委内瑞拉马脑炎病毒(Venezuelan Equine Encephalitis Virus, VEEV,一种甲病毒)复制子载体制备了A型肉毒毒素疫苗,免疫接种小鼠后能够产生良好的保护效果。这个结果提示甲病毒复制子载体在针对BoNT/A的疫苗可能具有更好的潜力。甲病毒复制子核酸疫苗是一种自杀性的RNA/DNA疫苗,不仅能增强传统核酸疫苗免疫原性,而且也能够提高传统核酸疫苗的安全性^[9,10],极有潜力作为新型疫苗载体应用。SFV复制子载体是基于semliki森林病毒(另一种甲病毒)的真核表达载体,具有宿主范围广,表达效率高等优点,已被广泛用于疫苗研究,并已有病毒和肿瘤复制子候选疫苗进入临床前期及临床试验,显示了其良好的应用前景^[11,12]。因此,本文构建了含A型肉毒毒素Hc基因的重组SFV复制子表达载体,证实该复制子载体在DNA和RNA二种递送方式上均可实现抗原基因的有效表达及重组病毒颗粒的制备,为研制基于SFV的肉毒毒素新型复制子疫苗打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

BHK21 细胞株于含 5%小牛血清, 10 u/mL青霉素和 10 mg/mL链霉素的DMEM培养基(Invitrogen)培养。pSM、pSMS和pSFV-helper2 为基于RNA的SFV复制子载体^[13,14], pSCAR和pSHCAR为基于DNA的SFV复制子载体^[15]。pGEMT-Hc为含A型肉毒毒素受体结合区Hc基因的质粒载体^[3]。

1.2 引物和寡核苷酸

用于构建含 Hc 基因的重组 SFV 复制子表达载体的引物如下:

引物 F-HB (*Bam*H I)序列为: 5'-cgcgatccgcaccatggaatacatcaagaacatcatcaatacctcc-3'; F-HN (*Nde*I)序列为: 5'-gccgcatatggaatacatcaagaacatcatcaatacctcc-3'; R-HC(*Cl*a I)序列为: 5'-tgacatcgatttacagtgacgttcaccccaac-3'。

1.3 PCR 和分子克隆

PCR, 质粒提取和 DNA 连接、转化、酶切等按常规方法进行, 参照《分子克隆实验指南》。

1.4 体外转录体 RNA 的制备

重组质粒经 *Spe* I 酶消化, 以纯化后的线性化 DNA 为模板(2 μg), 采用 Promega 公司 SP6 RNA 聚合酶系统转录试剂盒进行体外转录, 以获得 RNA 转录体^[13]。

1.5 RNA 和 DNA 转染细胞

RNA 和 DNA 转染细胞分别采用 Qiagen 公司 TransMessengerTM Transfection Reagent 和 Invitrogen 公司 LipofectamineTM 2000 脂质体试剂盒进行^[13,15]。

1.6 间接免疫荧光(IF)和 Western 印迹检测 Hc 在细胞中表达

通过间接免疫荧光分析抗原基因在复制子表达载体转染后和重组病毒颗粒感染后细胞中的表达。5%醋酸(溶于甲醇)固定细胞; 1% BSA 封闭后, 加入马源多抗血清(购自卫生部北京生物制品研究所)或鼠源抗 Hc 多抗血清(自制的高免血清), 37°C 放置 1 h; PBS 洗 3 次, 加溶于 1%伊文氏蓝及 1% BSA 的 PBS

中的 1:200 稀释 FITC 标记羊抗鼠或兔抗马二抗 (IgG/FITC, Jackson Immuno Research Laboratories Inc.), 37°C 放置 0.5 h; 荧光镜下观察并照相。

应用 Passive Lysis Buffer (Promega) 裂解转染了复制子载体或感染 RVP 后的细胞, 离心并收集上清, 上清中含有目的蛋白, 而细胞的培养基上清中含有分泌型表达的抗原蛋白可直接作样品。以上样品进行 SDS-PAGE 电泳和 Western 印迹检测抗原基因的表达。使用 Santa Cruz 公司的 Luminol reagent 试剂 X 光片曝光并照相。

2 结果

2.1 含 *Hc* 基因的重组 SFV 复制子表达载体的构建

以 pGEMT-*Hc* 为模板, F-HB 和 R-HC 为引物, PCR 扩增约 1.3 kb 基因序列 *Hc*, 经 *Bam*H I 和 *Cla* I 消化后, 连入相同酶消化的 pSM 载体中, 构建的重组质粒命名为 pSMHc; 以 F-HN 和 R-HC 为引物, PCR 扩增约 1.3 kb 基因序列 *Hc*, 经 *Nde* I 和 *Cla* I 消化后, 连入相同酶消化的 pSMS 载体中, 构建的重组质粒命名为 pSMSHc。

Xba I 和 *Spe* I 消化上述二个基于 RNA 的复制子表达载体 pSMHc 和 pSMSHc, 回收含 *Hc* 基因的片

段, 与相同酶消化的 pSCAR 载体相连, 构建的基于 DNA 的复制子表达载体分别命名为 pSCARHc 和 pSCARSHc。以上构建的重组质粒均经酶切鉴定和序列测定为正确的克隆。

2.2 *Hc* 基因在哺乳动物细胞中的表达

2.2.1 利用基于 RNA 的重组复制子载体在细胞中表达抗原基因 *Hc*

pSMHc 和 pSMSHc 载体的转录体 R-Hc 和 R-SHc 转染 BHK21 细胞后, 以 A 型肉毒毒素抗毒素多抗为一抗, IF 检测结果见图 1a, 细胞呈现特异的绿色荧光, 而空载体 pSM 转染细胞无荧光。另外, 对含 *Hc* 基因的 SFV 复制子 RNA 表达载体转染后的细胞进行 Western 印迹检测, 结果见图 2, 在相对分子质量约为 50×10^3 位置有特异条带产生, 与重组蛋白 *Hc* 大小一致, 而对照细胞中则无此条带。以上的结果表明 *Hc* 基因通过基于 RNA 的重组复制子载体在真核细胞中得到了有效的表达。

2.2.2 利用基于 DNA 的重组复制子载体在细胞中表达抗原基因 *Hc*

二种 DNA 复制子表达载体 pSCARSHc 和 pSCARHc 转染细胞后, 以重组蛋白 *Hc* 免疫后的多抗血清为一抗, 通过间接免疫荧光分析抗原基因在

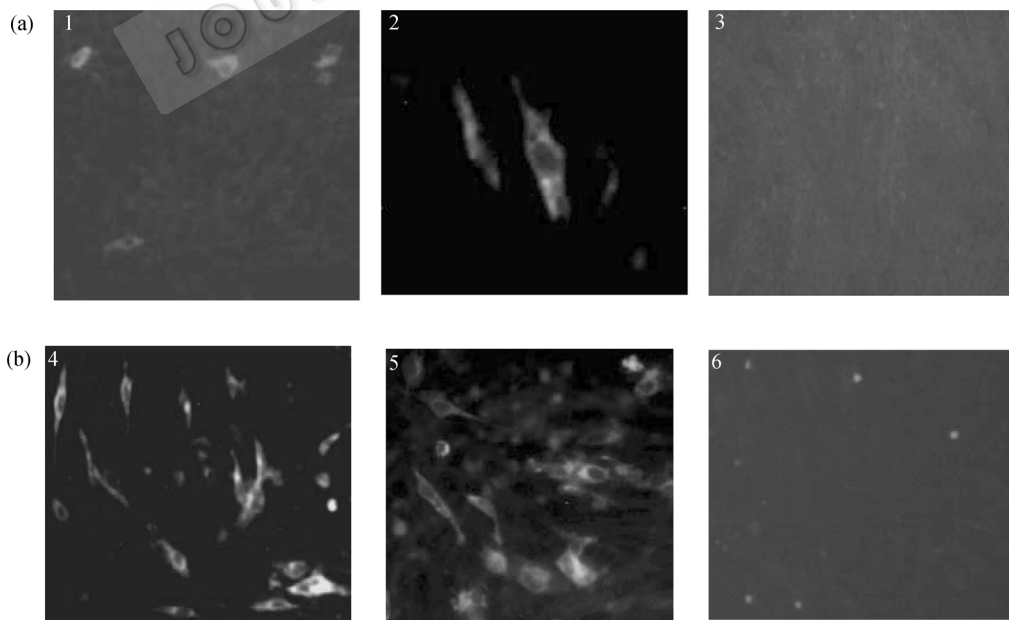


图 1 IF 检测 *Hc* 基因在基于 RNA 和 DNA 的重组 SFV 复制子表达载体转染细胞中的表达(400×)

Fig.1 Expression of *Hc* gene was detected in cells transfected with RNA and DNA-based replicon expression vectors by IF

- (a) 1: indicates cells transfected with RNA transcripts from pSMHc; 2: indicates cells transfected with RNA transcripts from pSMSHc; 3: indicates cells transfected with RNA transcripts from pSM (Negative control).
 (b) 4: indicates cells transfected with pSCARHc; 5: indicates cells transfected with pSCARSHc; 6: indicates cells transfected with pSCAR (Negative control)

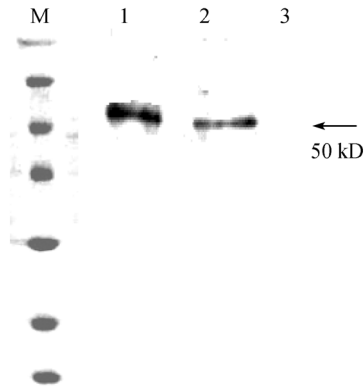


图 2 重组 Hc 表达的产物的 Western blot 检测结果

Fig. 2 Expression of Hc was detected in the lysates from cells transfected with RNA transcripts from pSMShc and pSMHc by Western blot

Lane 1: the lysates from cells transfected with RNA transcripts from pSMHc; Lane 2: the lysates from cells transfected with RNA transcripts from pSMShc; Lane 3: the lysates from cells transfected with RNA transcripts from pSM (Negative control); Lane M: protein molecular marker. The arrow indicates the position of the Hc

细胞中的表达。IF 检测结果见图 1b, 细胞呈现特异的绿色荧光, 而空载体 pSCAR 转染细胞无荧光。同样对含 Hc 基因的 SFV 复制子 DNA 表达载体转染后的细胞进行 Western 印迹检测, 结果见图 3。与基于 RNA 的复制子表达载体结果一致, 基于 DNA 的 SFV 复制子也能在真核细胞中有效地表达 Hc 抗原, 并且含有含分泌信号肽序列 S 的复制子载体表达载体

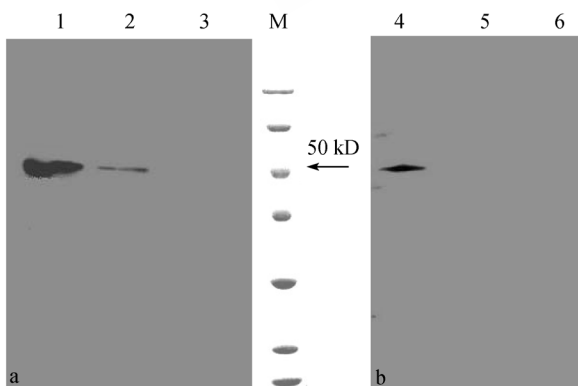


图 3 重组 Hc 的表达产物的 Western 印迹检测结果

Fig. 3 Expression of Hc was detected in the lysates and the cell culture supernatant from cells transfected with pSCARSHc (a) and pSCARHc (b) by Western blot

1: the lysates from cells transfected with pSCARSHc; 2: the cell culture supernatant from cells transfected with pSCARSHc; 3: the lysates from cells transfected with pSCAR (Negative control); 4: the lysates from cells transfected with pSCARHc; 5: the cell culture supernatant from cells transfected with pSCARHc; 6: the lysates from cells transfected with pSCAR (Negative control); M: protein molecular marker. The arrow indicates the position of the Hc

pSCARSHc 能够有效地分泌型表达 Hc 抗原, 见图 3(a-2)。该基于 DNA 的复制子载体可直接递送用于免疫机体作为复制型 DNA 核酸疫苗。

为了进一步检测 Hc 表达及免疫原性, ELISA 实验结果证实了含 Hc 基因的基于 DNA 的复制子表达载体 pSCARSHc 转染细胞的裂解液和培养基上清均能特异性与 A 型肉毒毒素抗毒素多抗及重组蛋白 Hc 免疫后的多抗血清结合, 而不与空载体转染细胞的裂解液和培养基上清结合(图略), 结果表明也复制子载体 pSCARSHc 能够分泌型表达 Hc 抗原并且表达的抗原具有良好的抗原性。

2.3 重组病毒颗粒感染细胞及其在细胞中表达抗原基因 Hc

共转染复制子表达载体和辅助载体(二种递送方式即 RNA 和 DNA)后收集重组病毒原液, 经激活后梯度稀释感染 BHK21, IF 检测到抗原基因在细胞中得到了表达, 见图 4(1-2, 4-5), 而转染空载体后获得的重组病毒颗粒没有检测到荧光信号, 见图 4(3, 6), 结果表明 4 种组合均可获得能感染细胞并表达 Hc 抗原的重组病毒颗粒。另外, Western 印迹检测结果也进一步表明 Hc 基因在重组病毒颗粒感染细胞中得到了有效的表达(图略)。通过 IF 检测定量分析了重组病毒颗粒的滴度, 4 种组合均可产生 5×10^5 个/mL 以上有活性的重组病毒颗粒, 而获得的重组病毒颗粒可直接作疫苗进行免疫接种, 能够提高其免疫效果, 是一种良好的疫苗载体。

总之, 构建了高效的重组 SFV 复制子表达载体, 并且能够有效地表达 Hc 抗原基因, 也能够分泌型表达抗原, 为下步进行复制子疫苗研究奠定了基础。

3 讨论

肉毒毒素是一种毒性较强的神经毒素, 其中 A 型肉毒毒素的毒性最强。肉毒毒素易于生产, 具有强神经毒性, 中毒死亡率高, 也是重要的生物战剂之一。各型肉毒毒素分子在结构上有很多相似的特点, 由重链(100 kD)和轻链(50 kD)组成。L 链具有锌离子肽链内切酶活性, 重链 N 端为一个跨膜转运功能区域, 另一个结构域为重链的羧基末端(Hc), 又称为受体结合区, 它与靶神经细胞结合^[1]。为了克服肉毒毒素类毒素疫苗的缺点, 正在致力于其他类型疫苗如亚单位疫苗和 DNA 核酸疫苗的研究, 试图研

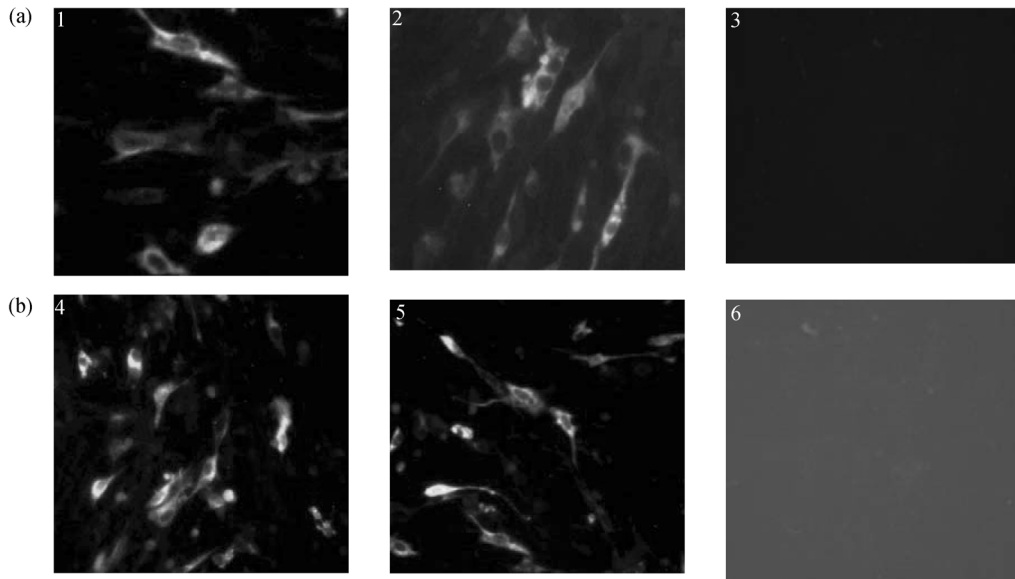


图 4 IF 检测 Hc 基因在重组病毒颗粒(RVP)感染的细胞中的表达(400×)

Fig.4 Expression of Hc gene was detected in cells infected with RVP contained Hc gene by IF

- (a) 1: indicates cells infected with RVP from co-transfected with RNA transcripts from pSMHc and pSFV-helper2; 2: indicates cells infected with RVP from co-transfected with RNA transcripts from pSMSHc and pSFV-helper; 3: indicates cells infected with RVP from co-transfected with RNA transcripts from pSM and pSFV-helper2 (Negative control).
 (b) 4: indicates cells infected with RVP from co-transfected with pSCARHc and pSHCAR; 5: indicates cells infected with RVP from co-transfected with pSCARSHc and pSHCAR; 6: indicates cells infected with RVP from co-transfected with pSCAR and pSHCAR (Negative control)

制高效、安全、方便的新型疫苗^[2]。A型肉毒毒素受体结合区Hc是肉毒毒素疫苗研究的靶抗原,免疫动物后具有完全的保护作用^[16,17]。本实验室人工合成了A型肉毒毒素受体结合区Hc基因,并且在大肠杆菌中表达的重组蛋白Hc具有良好的免疫原性和保护作用^[3]。在此基础上,利用基于SFV复制子载体表达A型肉毒毒素受体结合区Hc,并进一步探索其作为复制子疫苗的可行性。我们的实验结果表明,利用该复制子载体通过RNA、DNA以及重组病毒颗粒三种递送方式均可有效地表达A型肉毒毒素受体结合区Hc抗原基因。该结果表明人工合成的Hc抗原基因也在真核细胞中得到了表达。利用基于SFV复制子载体表达肉毒毒素受体结合区Hc抗原片段,目前国内外未见报道。已有实验结果表明与非分泌型表达载体相比,分泌型表达载体免疫机体后,增强Th2型免疫应答,更有利于产生抗体,增强中和毒素的能力及保护效果^[4,5]。分泌型和非分泌型Hc抗原SFV复制子表达载体的构建,为下一步进行复制子核酸疫苗研究奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Turton K, Chaddock JA, Acharya KR. Botulinum and tetanus neurotoxins: structure, function and therapeutic utility. *Trends Biochem Sci*, 2002, **27**(11): 552-558.
- [2] Middlebrook JL. Production of vaccines against leading biowarfare toxins can utilize DNA scientific technology. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2005, **57**: 1415-1423.
- [3] Yu YZ, Sun ZW, Wang S, et al. High-level expression of the Hc domain of *Clostridium botulinum* neurotoxin serotype A in *Escherichia coli* and its immunogenicity as an antigen. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2007, **23** (5): 812-817.
- 余云舟, 孙志伟, 王双, 等. A型肉毒毒素 Hc 结构域在大肠杆菌中的高水平表达及免疫原性. *生物工程学报*, 2007, **23**(5): 812-817.
- [4] Jennifer Clayton, John L, Middlebrook. Vaccination of mice with DNA encoding a large fragment of botulinum neurotoxin serotype A. *Vaccine*, 2000, **18**: 1855-1862.
- [5] Yu RH, Shao MF, Tang SS, et al. DNA vaccination using the fragment C of botulinum neurotoxin type A provided protective immunity in mice. *J Biomed Sci*, 2000, **7**: 51-57.
- [6] Bennett AM, Perkins SD, Holley JL. DNA vaccination protects against botulinum neurotoxin type F. *Vaccine*, 2003, **21**: 3110-3117.
- [7] Jathoul AP, Holley JL, Garmory HS. Efficacy DNA vaccines expressing the type F botulinum toxin Hc fragment using different promoters. *Vaccine*, 2004, **22**: 3942-3946.
- [8] Lee JS, Pushko P, Parker MD, et al. Candidate vaccine against botulinum neurotoxin serotype A derived from a Venezuelan equine encephalitis virus vector system. *Infect*

- Immun*, 2001, **69** (9): 5709–5715.
- [9] Leitner WW, Hwang LN, dEvEER MJ, *et al.* Alphavirus-based DNA vaccine breaks immunological tolerance by activating innate antiviral pathways. *Nat Med*, 2003, **9** (1): 33–39.
- [10] Leitner WW, Hwang LN, Bergmann-Leitner ES, *et al.* Apoptosis is essential for the increased efficacy of alphavirus-based DNA vaccines. *Vaccine*, 2004, **20**(11-12): 1537–1544.
- [11] Leitner WW, Ying H, Restifo NP. DNA and RNA-based vaccines: principles, progress and prospects. *Vaccine*, 2000, **18**: 765–777.
- [12] Rayner JO, Dravga SA, Kamrud KI. Alphavirus vectors and vaccination. *Rev Med Virol*, 2002, **12**(5): 279–296.
- [13] Yu YZ, Sun ZW, Yu WY. Construction of DNA and RNA based on bifunctional replicon vector derived from Semliki Forest virus. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2005, **21**(5): 713–718.
余云舟, 孙志伟, 俞炜源. 基于 DNA 和 RNA 的双功能 semliki 森林病毒复制子载体的构建. *生物工程学报*, 2005, **21**(5): 713–718.
- [14] Yu YZ, Sun ZW, Yu WY. Expression of domain 4 of the protective antigen from anthrax in mammalian cells using recombinant Semliki Forest virus replicon vectors. *Bull Acad Mil Med Sci*, 2006, **30**(6): 521–525.
余云舟, 孙志伟, 俞炜源. 炭疽保护性抗原第四结构域基因在重组 SFV 复制子载体中的表达. *军事医学科学院院刊*, 2006, **30**(6): 521–525.
- [15] Yu YZ, Sun ZW, Liu ZG, *et al.* High-level expression of foreign genes in vivo and in vitro by improved DNA-based replicon vector derived from Semliki Forest virus. *Prog Biochem Biophys*, 2006, **33**(1): 87–94.
余云舟, 孙志伟, 刘志刚, 等. 基于 DNA 的 Semliki 森林病毒复制子载体体内外高水平表达外源基因. *生物化学与生物物理进展*, 2006, **33** (1): 87–94.
- [16] Clayton MA, Clayton JM, Brown DR, *et al.* Protective vaccination with a recombinant fragment of Clostridium botulinum neurotoxin serotype A expressed from a synthetic gene in *Escherichia coli*. *Infect Immun*, 1995, **63**: 2728–2742.
- [17] Baldwin MR, Tepp WH, Pier CL, *et al.* Characterization of the antibody response to the receptor binding domain of botulinum neurotoxin serotypes A and E. *Infect Immun*, 2005, **73**(10): 6998–7005.

关于《生物工程学报》2008 年度开始专刊申请的通知

当前,随着生物技术的飞速发展,生物工程涵盖的领域越来越广,交叉学科的研究也越来越受到关注。除了已有的基因工程、细胞工程、酶工程、发酵工程之外,基因组学、代谢工程、纳米科学、生物炼制等也逐步成为生物工程研究的热门领域。为了更加系统、集中地反映各个领域的研究成果,以及该领域学科的热点难点问题,充分发挥《生物工程学报》的学科引领和导向作用,促进学科发展,《生物工程学报》编委会决定自 2008 年起,每年出版一定数量的专刊。专刊将系统地反映生物工程相关领域或新学科生长点的最新进展,及时介绍国内外生物工程相关前沿领域的突破性成果,以及面向国家和社会发展需要并具有重大应用前景的研究成果。真诚欢迎本领域各学科的学术带头人,申请并组织专刊。申请得到编委会批准后,申请人将被邀请担任本专刊的特约编辑,负责组织稿件、确定审稿专家,并撰写专刊序言。

根据专刊工作计划,编辑部已开始接受 2008 年度专刊申请,现将有关事项通知如下:

1. 专刊申请的有关规定详见本期第 136 页,或浏览我刊主页“编辑部公告”栏,请申请者仔细阅读(网址: <http://journals.im.ac.cn/cjbcn>);

2. 提交形式:请到我刊主页的“下载专区”下载专刊申请表;填好之后,以 E-mail 附件的形式发送到编辑部信箱: cjb@im.ac.cn, 并请在邮件主题中注明“专刊申请”字样;

3. 申请者如有疑问,请咨询编辑部:

E-mail: cjb@im.ac.cn; Tel: 010-64807509