

• 动物及兽医生物技术 •

基因 I 型乙型脑炎病毒亚单位疫苗候选抗原的免疫原性比较

于瑞明¹, 田占成¹, 高闪电¹, 独军政¹, 刘光远¹, 罗建勋¹, 殷宏^{1,2}

1 中国农业科学院 兰州兽医研究所 家畜疫病病原生物学国家重点实验室, 甘肃 兰州 730046

2 江苏省动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 江苏 扬州 225009

于瑞明, 田占成, 高闪电, 等. 基因 I 型乙型脑炎病毒亚单位疫苗候选抗原的免疫原性比较. 生物工程学报, 2020, 36(7): 1314–1322.

Yu RM, Tian ZC, Gao SD, et al. Comparison of the immunogenicity of genotype I Japanese encephalitis virus subunit vaccine candidate antigens. Chin J Biotech, 2020, 36(7): 1314–1322.

摘要: 为了筛选出免疫原性最佳的基因 I 型乙型脑炎病毒亚单位疫苗候选抗原, 将基因 I 型 JEV GS 株的 prMEIII 融合基因、polytope 复合表位基因和 prMEIII-polytope 融合基因分别克隆构建到原核表达载体 pET-30a 上, 经诱导表达纯化获得重组蛋白。将制备的重组蛋白免疫小鼠, 通过 ELISA 监测体液免疫反应、通过噬斑减少中和试验滴定中和抗体滴度、通过细胞因子表达丰度和淋巴细胞增殖实验分析细胞介导的免疫反应, 比较分析制备的乙型脑炎病毒亚单位疫苗候选抗原的免疫原性。结果表明: 获得的分子量分别为 35 kDa (prMEIII)、28 kDa (polytope 复合表位抗原) 和 57 kDa (prMEIII-polytope) 的重组蛋白均能诱导免疫小鼠产生较强的体液免疫和细胞免疫反应。与 prMEIII-polytope 和 polytope 重组蛋白免疫组相比, prMEIII 蛋白可诱导免疫小鼠产生更高的 IL-2 和 IFN- γ 表达丰度和淋巴细胞增殖水平 ($P < 0.05$)。prMEIII 蛋白免疫小鼠诱导产生的中和抗体滴度接近于商品化乙脑减毒疫苗 SA14-14-2 ($P > 0.05$)。上述研究结果表明, prMEIII 重组蛋白可以作为乙型脑炎病毒亚单位疫苗的备选蛋白。

关键词: 流行性乙型脑炎, 复合表位, 亚单位疫苗, 免疫原性

Received: November 22, 2019; **Accepted:** March 23, 2020

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31201899), Agricultural Science and Technology Innovation Engineering Project (No. CAAS-ASTIP-2016-LVRI).

Corresponding author: Zhancheng Tian. Tel: +86+931-8342681; E-mail: tianzhancheng@caas.cn

国家自然科学基金 (No. 31201899), 中国农业科学院农业科技自主创新工程 (No. CAAS-ASTIP-2016-LVRI) 资助。

网络出版时间: 2020-05-06

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.q.20200430.1642.001.html>

Comparison of the immunogenicity of genotype I Japanese encephalitis virus subunit vaccine candidate antigens

Ruiming Yu¹, Zhancheng Tian¹, Shandian Gao¹, Junzheng Du¹, Guangyuan Liu¹, Jianxun Luo¹, and Hong Yin^{1,2}

¹ State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology/Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, Gansu, China

² Jiangsu Co-innovation Center for Prevention and Control of Important Animal Infectious Diseases and Zoonoses, Yangzhou 225009, Jiangsu, China

Abstract: To screen the best genotype I Japanese encephalitis virus subunit vaccine candidate antigens, the prMEIII gene, the polytope gene and the prMEIII-polytope fusion gene of the Genotype I Japanese encephalitis virus GS strain were cloned into prokaryotic expression vector pET-30a. The recombinant proteins were obtained after the induction and purification. The prepared recombinant proteins were immunized to mice, and the immunogenicity of the subunit vaccine candidate antigens was evaluated through monitoring the humoral immune response by ELISA, detecting the neutralizing antibody titer by plaque reduction neutralization test, and testing the cell-mediated immune response by lymphocyte proliferation assay and cytokine profiling. The recombinant proteins with the molecular weights of 35 (prMEIII), 28 (polytope antigen) and 57 kDa (prMEIII-polytope) induced strong humoral and cellular immune responses in mice. Compared with prMEIII-polytope and polytope proteins, the prMEIII protein induced a significant expression of IL-2 and IFN- γ ($P < 0.05$) and the significant lymphoproliferation of splenocytes ($P < 0.05$). The neutralizing antibody titer induced by the prMEIII protein was close to that induced by the commercial attenuated vaccine SA14-14-2 ($P > 0.05$). The study suggests that the prMEIII protein can be used for the development of the Japanese encephalitis virus subunit vaccine.

Keywords: Japanese encephalitis, polytope, subunit vaccine, immunogenicity

猪流行性乙型脑炎 (Japanese encephalitis, JE) 是猪感染乙型脑炎病毒 (Japanese encephalitis virus, JEV) 引起的一种自然疫源性疾病, 许多动物感染后都可成为本病的传染源^[1]。三带喙库蚊是该病毒的主要传播媒介, 叮咬猪后可传染给猪, 病毒在猪体内可大量繁殖。因此, 猪是该病毒的主要扩增宿主^[2]。猪感染 JEV 后, 主要患生殖系统疾病, 可造成怀孕母猪流产、死胎、木乃伊胎, 公猪睾丸炎, 使公猪的精子数量减少、活力降低。幸存的仔猪常出现震颤、惊厥等神经症状。成年猪感染 JEV 后死亡率接近于零, 但仔猪感染 JEV 后, 死亡率可达 100%^[3]。据报道, 随着近年来 JEV 新基因型的出现^[4], 基因 I 型 JEV 毒株有替代基因 III 型 JEV 毒株成为主要流行毒株的趋势, 且现有的基因 III 型 JEV 减毒疫苗 SA-14-14-2 对部分基因 I 型 JEV 流行毒株的保护力较差^[5-9]。因此, 基

因 I 型 JEV 疫苗研制的问题迫在眉睫。

JEV 是单股正链 RNA 病毒, 病毒粒子呈球形, 有囊膜^[10]。prM/M 和 E 蛋白是 JEV 的主要结构蛋白, E 蛋白是诱发机体产生中和抗体的主要免疫抗原^[11]。prM 蛋白是 M 蛋白的前体蛋白, 以分子伴侣的形式辅助 E 蛋白正确折叠、组装和运输, 是 E 蛋白诱发机体产生保护性免疫的重要协同成分^[12]。JEV NS1 蛋白诱导机体产生的特异性抗体具有补体结合活性, 通过介导细胞融合而获得中和病毒的能力, 从而抵抗 JEV 的感染和入侵^[13]。此外, Kumar 等用原核表达的 NS3 蛋白免疫小鼠, 诱发机体产生 Th1 型细胞免疫反应^[14]。

尽管现有 JEV 减毒疫苗可用于猪场 JE 的防治, 但安全性问题仍不可忽视^[15]。基因工程亚单位疫苗因其只含有病原体抗原, 不含核酸, 具有安全性好、产量和纯度高及稳定性好等优点, 尽

管存在后续工艺优化等诸多问题,但依然成为研制新型 JEV 疫苗的热点之一^[16]。本研究选取基因 I 型 JEV GS 株的 prMEIII 融合蛋白,以及结合文献报道及软件预测筛选的 E 蛋白 (EIII 结构域除外)、NS1 和 NS3 蛋白抗原表位组成的 polytope (复合表位)抗原和 prMEIII-polytope 融合蛋白免疫小鼠,比较这些 JEV 亚单位疫苗候选抗原的免疫原性,分析复合表位抗原 polytope 免疫原性的同时,观察复合表位抗原 polytope 与 prMEIII 重组蛋白融合表达之后能否促进 prMEIII 重组蛋白的免疫原性,以期筛选出基因 I 型 JEV 亚单位疫苗的最佳候选抗原。

1 材料与方法

1.1 材料

甘肃省平凉市周边地区收集的蚊虫媒介分离的基因 I 型 JEV GS 株^[17];幼年仓鼠肾 (Baby hamster kidney, BHK) 细胞、原核表达载体 pET-30a 均由中国农业科学院兰州兽医研究所家畜疫病病原生物学国家重点实验室保存;大肠杆菌 *Escherichia coli* Rosetta (DE3) 菌株购于天根生化科技 (北京) 有限公司;猪乙型脑炎病毒减毒活疫苗 (SA14-14-2) 购于中牧实业股份有限公司。雌性 BALB/C 小鼠 (4-6 周龄) 由兰州兽医研究所实验动物中心提供。碱性磷酸酶标记山羊抗小鼠 IgG 购自美国 Sigma 公司;辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG 购自北京中杉金桥生物技术

有限公司;小鼠细胞因子检测试剂盒购于深圳达科为生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 PCR 引物设计

参照 GenBank 中 JEV DH10M978 参考序列 (KT229573), 利用 Primer Premier 5.0 生物学软件设计克隆、表达和重叠延伸 PCR 所需引物 (表 1), 委托生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

1.2.2 复合多表位基因的设计与合成

根据文献[14,18]报道及网络服务器 CTL Pred、Bce Pred 和表位预测软件 Epitopia、Ellipro 对基因 I 型 JEV GS 株的 E、NS1 及 NS3 蛋白表位进行预测和筛选,综合评价各分析软件获得的结果和文献中所报道的实验数据,选定 13 个表位氨基酸序列作为复合表位。为保证各表位之间功能的独立性, T 细胞表位之间用 AAA 作为 Linker, B 细胞表位之间采用 GPGPG 作为 Linker, 将各个表位串联起来,合成得到 polytope 基因,序列如下所示:

```
>JEV-polytope
MCYHASVTDIAAASIGKAVHQVFAAAKV
ELGEAAAGGPGPGDLHPGSGKTGPGPGPTTGEA
HNEKRADSSYVCGPGPGSENHGNYSAQVGAS
QGPGPGQEGGLHQALAGAIVVEYSSSVKLTSG
HLGPGPGHKAGSTLGPGPGAIDVTRKGPGPGR
DELNVLGPGPGRSKHNRREGYGPGPGWDEN
GIVLDGPGPGDETTLVRSGPGPG
```

E 蛋白表位: ; NS1 蛋白表位:; NS3 蛋白表位:。

表 1 克隆、表达和融合 PCR 所需引物

Table 1 Primer sequences used for cloning, expression and fusion PCR

Primer	Sequence (5'-3')	Restriction enzyme
prMEIII-F	GCGAATTCATGAAGCTATCAAAC TTT	<i>EcoR</i> I
prMEIII-R	AGAGTCGAC TTAAGCTTT GTGCCAGT	<i>Sal</i> I
P1	TGGTGCCTCCGGCTTACAGTCGAAATTCTCGTTCGCG	
P2	CGCGAACGAGAATTTCCGACTGTAAGCCGGAGCGACCA	
MEP-F	CTGTCGACATGTGCTATCACGCTTCAGTCA	<i>Sal</i> I
MEP-R	TCTGCGGCCGC ACCAGGACCAGGACCTGATCTA	<i>Not</i> I

Underline displayed restriction site.

1.2.3 基因的扩增

TRIzol 法从 JEV 感染的 BHK21 细胞中提取 RNA, 经 PrimeScriptTM RT-PCR Kit 反转录获得一链 cDNA 模板, 扩增获得 prM、EIII 基因, 通过重叠 PCR 方法获得 prMEIII 融合基因, 进一步用表 1 中的引物与合成的 polytope 基因采用重叠延伸 PCR 的方法获得 prMEIII-polytope 融合基因。经琼脂糖凝胶电泳检测正确后, 胶回收目的片段。

1.2.4 重组质粒的构建和重组蛋白的诱导表达纯化

将获得的的目的基因片段 prMEIII、polytope、prMEIII-polytope 及 pET-30a 载体分别进行双酶切处理, 酶切产物进行胶回收纯化后, 用 T4 DNA 连接酶在 16 °C 连接过夜。将连接产物转化 *E. coli* JM109 感受态细胞, 将 PCR 鉴定为阳性的菌液委托南京金斯瑞生物科技有限公司进行测序, 将测序正确的阳性重组质粒命名为 pET-30a-prMEIII、pET-30a-polytope 和 pET-30a-prMEIII-polytope。将阳性重组质粒分别转化 *E. coli* Rosetta(DE3) 感受态细胞, 转化菌加入终浓度为 0.5 mmol/L IPTG 进行诱导表达, 在 0 h 和 6 h 取样用于 SDS-PAGE 检测。诱导后的菌体沉淀经超声后 4 °C、10 000 r/min 离心 15 min, 取上清和沉淀用于 SDS-PAGE 检测。按照 Ni-NTA Superflow Cartridge 手册进行镍柱亲和层析纯化重组蛋白, 用 Solarbio 公司的 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒测定纯化的重组蛋白浓度。纯化后的蛋白样品进行 SDS-PAGE 检测。

1.2.5 免疫印迹分析

为了检测 prMEIII 融合蛋白鼠源多克隆抗体与 JEV 天然蛋白的反应原性, 收集基因 I 型 JEV GS 株感染 BHK21 细胞 48 h 后的细胞样品, SDS-PAGE 后, 转印 PVDF 膜进行免疫印迹分析, 以 prMEIII 融合蛋白免疫小鼠制备的血清为一抗 (1:500 稀释), 碱性磷酸酶标记的山羊抗小鼠 IgG 为二抗 (1:6 000 稀释), 用 NBT/BCIP 显色, PBS 免疫小鼠的血清作为阴性对照。同时将纯化的重组蛋白样品进行 SDS-PAGE, 用 Trans-Blot[®]Turbo[™] 转印系统转印 PVDF 膜进行免疫印迹分析, 以小

鼠抗多聚组氨酸单克隆抗体为一抗 (1:1 000 稀释), 碱性磷酸酶标记的山羊抗小鼠 IgG 为二抗 (1:6 000 稀释), 用 NBT/BCIP 显色。

1.2.6 动物免疫实验方案

将 40 只 4-6 周龄雌性 BALB/C 小鼠按照 8 只/组, 分为 5 组, 开展动物免疫试验。各组小鼠在第 0、14 和 28 天分别免疫一次, 蛋白免疫组 (prMEIII、polytope 和 prMEIII-polytope) 一免和二免采用背部皮下多点注射含有免疫佐剂的 50 μg 抗原进行免疫。一免用弗氏完全佐剂, 二免用弗氏不完全佐剂, 三免采用腹腔注射 100 μg 不含佐剂的抗原加强免疫。SA14-14-2 弱毒疫苗免疫组和 PBS 免疫组免疫剂量为 200 μL。第 0、7、14、21、28、35、42 天, 通过小鼠尾尖采血制备血清, -20 °C 冻存备用, 第 42 天各免疫组随机取 3 只小鼠眼球采血制备血清用于细胞因子表达丰度和中和抗体滴度测定, 断颈处死后, 采集脾脏制备淋巴细胞用于淋巴细胞增殖实验。

1.2.7 特异性抗体水平监测

应用间接 ELISA 方法测定免疫小鼠血清中特异性抗体水平, 将镍柱亲和层析纯化的 EIII 蛋白^[17] 0.5 μg/孔包被板子, 5% 脱脂奶粉封闭, 每孔加入从 1:100 开始 2 倍倍比稀释的免疫小鼠血清作为一抗, HRP 标记山羊抗小鼠 IgG (1:2 500) 作为二抗, 酶标仪测定 450 nm 波长吸光光度值, 以 P/N>2.1 的血清最大稀释倍数为被检血清特异性抗体效价。

1.2.8 中和抗体滴度测定

噬斑减少中和试验测定初免后第 42 天采集的各免疫组小鼠血清中和抗体滴度, 将各免疫组小鼠血清 56 °C 灭活 30 min, 从 1:10 开始进行 2 倍倍比稀释, 将稀释的血清与含有 100 PFU 的病毒液等体积混合, 设 PBS 免疫小鼠血清处理病毒组作为对照组, 以能减少对照组 50% 空斑数的血清最高稀释度为该血清的中和抗体效价。

1.2.9 细胞因子表达丰度检测

应用达优[®]小鼠细胞因子 ELISA 试剂盒检测

初免后第 42 天采集的各免疫组小鼠血清中 IFN- γ 、IL-2 和 IL-4 的表达水平。

1.2.10 淋巴细胞增殖实验

将制备的 2×10^6 /mL 的淋巴细胞悬液加入到 96 孔细胞培养板中, 100 μ L/孔, 加入终浓度为 5 μ g/mL 的免疫抗原刺激淋巴细胞, 每个样品重复 3 孔, 并设 ConA (终浓度为 5 μ g/mL) 刺激细胞阳性对照和空白细胞阴性对照, 将 96 孔板放置于细胞培养箱中培养 72 h。每孔加入 10 μ L WST-1 溶液, 继续培养 3–4 h, 酶标仪测定 OD_{450} 值, 计算刺激指数 (SI) = $OD_{450, \text{试验}} - OD_{450, \text{对照}} / OD_{450, \text{对照}} - OD_{450, \text{空白}}$ 。

1.2.11 统计学分析

使用 GraphPad Prism Version 5 软件进行实验数据的统计学分析。利用单因素方差分析或 t 检验分析各免疫组间实验数据的差异 ($P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著)。

2 结果与分析

2.1 基因的扩增

以 JEV cDNA 和 pUC57-polytope 为模板, 扩增得到基因 prM (501 bp)、EIII (282 bp) 和 polytope (627 bp) 基因, 通过重叠延伸 PCR 的方法获得

prMEIII 融合基因 (786 bp) 和 prMEIII-polytope 融合基因 (1 416 bp) (图 1), 获得的目的片段与预期大小一致。

2.2 重组蛋白的诱导表达和纯化

SDS-PAGE 结果显示, 重组 prMEIII 和 prMEIII-polytope 蛋白主要以包涵体形式表达, 分子量大小分别约为 35 kDa 和 57 kDa, 重组 polytope 蛋白主要以可溶性形式表达, 分子量大小约为 28 kDa, 进一步经镍柱亲和层析纯化, 获得了纯度较高的重组蛋白 (图 2)。纯化的 prMEIII、polytope 和 prMEIII-polytope 重组蛋白的浓度分别是 600 μ g/mL、800 μ g/mL 和 530 μ g/mL。

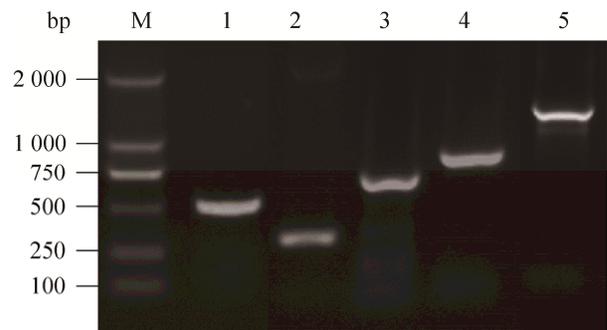


图 1 PCR 扩增靶基因

Fig. 1 PCR amplification of the target genes. M: DNA marker; 1: prM gene; 2: EIII gene; 3: polytope; 4: prMEIII fusion gene; 5: prMEIII-polytope fusion gene.

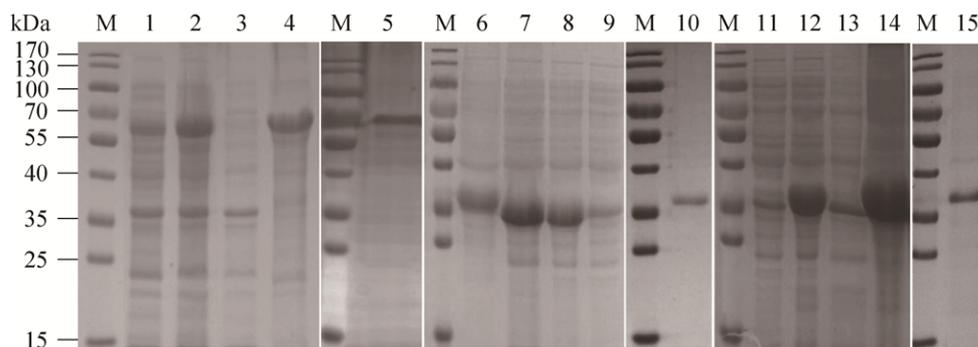


图 2 重组蛋白的诱导表达及可溶性分析

Fig. 2 Expression and solubility analysis of the recombinant protein. M: protein marker; 1: negative control; 2: induced prMEIII-polytope lysates for 6 h; 3: ultrasonic supernatant of prMEIII-polytope recombinant bacteria; 4: inclusion bodies lysate of prMEIII-polytope; 5: purified prMEIII-polytope recombinant protein; 6: negative control; 7: induced polytope lysates for 6 h; 8: ultrasonic supernatant of polytope recombinant bacteria; 9: inclusion bodies lysates of polytope; 10: purified polytope recombinant protein; 11: negative control; 12: induced prMEIII lysates for 6 h; 13: ultrasonic supernatant of prMEIII recombinant bacteria; 14: inclusion bodies lysate of prMEIII; 15: purified prMEIII recombinant protein.

2.3 prMEIII 融合蛋白鼠源多克隆抗体与 JEV 天然抗原的特异性反应

免疫印迹分析结果表明, prMEIII 蛋白免疫小鼠制备的血清能够特异性识别 JEV 的 53 kDa 的 E 蛋白和 19 kDa 的 prM 蛋白 (图 3A)。抗组氨酸蛋白抗体特异性识别了纯化的重组蛋白, 分子量大小分别为 35 kDa (prMEIII)、28 kDa (polytope) 和 57 kDa (prMEIII-polytope), 与预期重组蛋白分子

量大小一致 (图 3B)。

2.4 特异性抗体水平动态监测

通过间接 ELISA 测定第 0、7、14、21、28、35、42 天收集的免疫小鼠血清中的特异性抗体。结果显示, 3 种基因重组表达的蛋白质免疫组和减毒疫苗免疫组均可诱导小鼠产生特异性抗体, 但减毒疫苗 SA-14-14-2 免疫组诱导产生的抗体水平显著低于本研究所重组表达的蛋白免疫组 (图 4)。

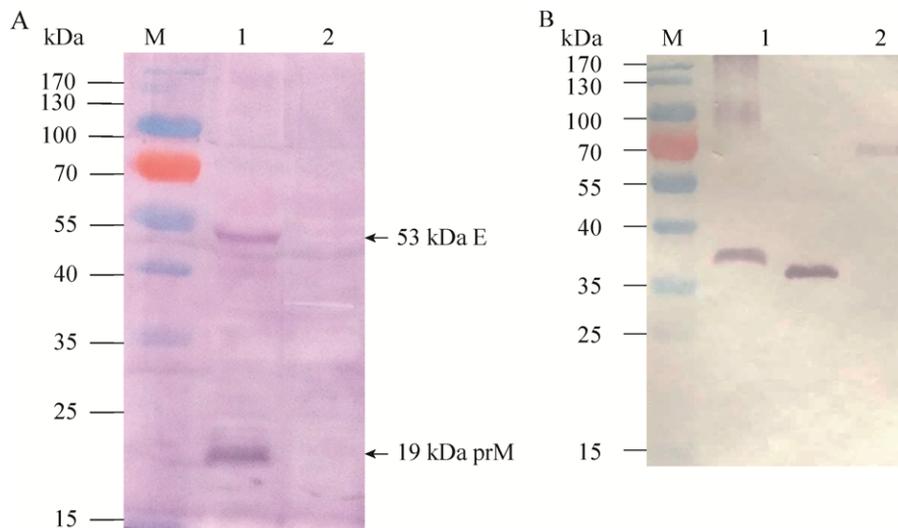


图 3 重组蛋白及 prMEIII 重组蛋白制备抗体的特异性免疫反应性分析

Fig. 3 The specific immune-reactivity of the recombinant proteins and the serum against the prMEIII fusion protein to JEV. (A) The reactivity of the serum against the prMEIII fusion protein to JEV. M: protein marker; 1: the serum against the prMEIII fusion protein; 2: the serum from mice immunized with PBS. (B) The specific immune-reactivity of the recombinant proteins. M: protein marker; 1: purified prMEIII recombinant protein; 2: purified polytope recombinant protein; 3: purified prMEIII-polytope recombinant protein.

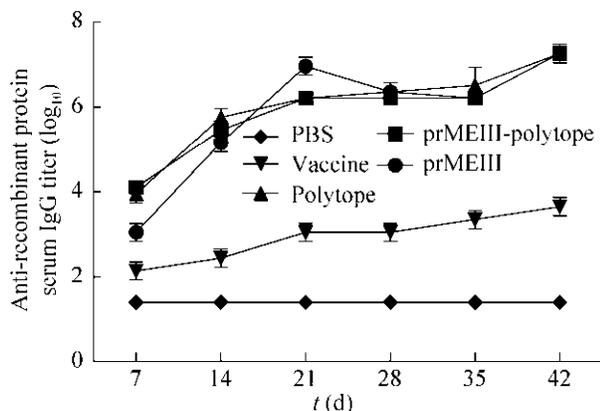


图 4 特异 ELISA 抗体滴度动态曲线

Fig. 4 The dynamic curve of ELISA antibody titer.

2.5 中和抗体滴度的测定

噬斑减少中和试验测定免疫小鼠血清的中和抗体滴度, 结果显示, prMEIII 蛋白免疫组平均中和抗体滴度为 1:200, polytope 蛋白免疫组平均中和抗体滴度为 1:50, prMEIII-polytope 蛋白免疫组平均中和抗体滴度为 1:80, SA14-14-2 减毒疫苗组平均中和抗体滴度为 1:240。prMEIII 蛋白免疫组平均中和抗体滴度显著高于其他蛋白免疫组 (polytope 和 prMEIII-polytope) ($P < 0.05$), 接近于 SA14-14-2 减毒疫苗免疫组 ($P > 0.05$) (图 5)。

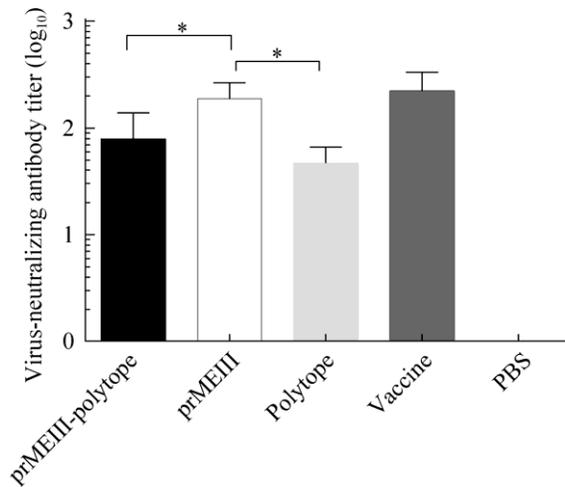


图5 中和抗体滴度检测

Fig. 5 The detection of the neutralizing antibody titer.

2.6 细胞因子表达丰度检测

利用细胞因子ELISA检测试剂盒检测首免后第42天小鼠血清中的细胞因子IFN- γ 、IL-2和IL-4的表达水平。结果显示,prMEIII蛋白免疫组的细胞因子(IL-2、IFN- γ 和IL-4)表达水平显著高于其他蛋白免疫组($P < 0.05$),其中IL-4的表达水平最高,与其他蛋白免疫组和商品化减毒疫苗SA14-14-2免疫组相比差异极显著($P < 0.01$),而prMEIII蛋白免疫组的IL-2和IFN- γ 的表达水平与商品化减毒疫苗SA14-14-2免疫组相比差异不显著($P > 0.05$) (图6)。

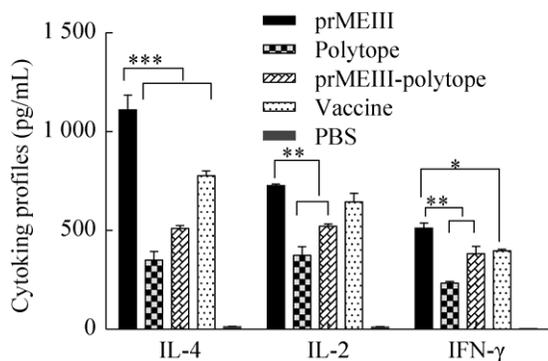


图6 免疫小鼠血清中的细胞因子表达丰度

Fig. 6 Cytokine profiles in the serum of immunized mice.

2.7 淋巴细胞增殖水平检测

利用WST法测定免疫小鼠脾脏淋巴细胞增殖能力,以评价重组蛋白免疫小鼠诱导产生的细胞免疫水平。结果显示,prMEIII-polytope蛋白免疫组的SI值为 1.75 ± 0.95 ,prMEIII蛋白免疫组SI值为 2.465 ± 0.065 ,polytope免疫组SI值为 1.68 ± 0.06 ,SA14-14-2减毒疫苗组用prMEIII融合蛋白刺激的SI值为 1.76 ± 0.085 ,而用ConA刺激的SI值为 2.365 ± 0.075 。prMEIII蛋白免疫组的刺激指数显著高于其他免疫组($P < 0.05$),但与ConA刺激的SA14-14-2减毒疫苗组SI值接近(图7)。

3 讨论

疫苗接种是预防人类和猪流行性乙型脑炎的最有效方法,减毒或嵌合减毒JEV活疫苗对于怀孕母猪的安全性存在争议^[15],福尔马林灭活改变了E蛋白的抗原结构,影响了灭活JEV疫苗的免疫效力^[19]。尽管现有疫苗存在一定问题,但目前仍是预防JEV感染的首选^[20]。因此,研制安全高效且成本低廉的新型JEV疫苗势在必行。病毒样颗粒因其空间结构类似于天然病毒粒子,其免疫保护效果接近于减毒疫苗,但由于生产成本的问题

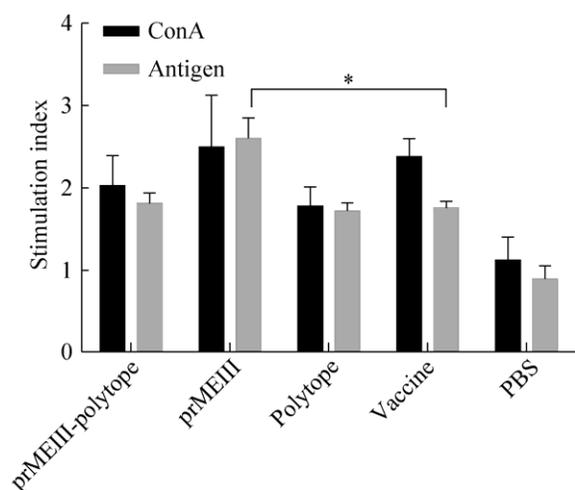


图7 免疫小鼠淋巴细胞增殖检测

Fig. 7 Detection of lymphocyte proliferation of immunized mice.

题和达不到规模化生产的要求,病毒样颗粒疫苗的研发任重而道远。因此,其他类型蛋白亚单位疫苗成为研发新型 JEV 疫苗的热点之一^[16]。疫苗免疫保护效应与所选择的抗原密切相关,因此,筛选出最有效的疫苗候选抗原对于疫苗免疫保护效应至关重要^[21-23]。为了筛选出免疫效应能接近 JEV 减毒疫苗的最佳抗原单位,本研究选取基因 I 型 JEV GS 株的 prMEIII 融合蛋白、E 蛋白(除 EIII 结构域)、NS1 和 NS3 蛋白的抗原表位串联形成的复合表位 polytope 抗原和 prMEIII-polytope 融合蛋白,通过免疫小鼠比较这些候选抗原的免疫原性。本研究获得了 3 个与预期分子量大小一致的纯度较高的融合蛋白(prMEIII、polytope 和 prMEIII-polytope),prMEIII 融合蛋白免疫小鼠制备的血清可特异性识别 JEV 的天然 E 蛋白和 prM 蛋白,动物免疫实验结果表明,prMEIII 融合蛋白的免疫原性显著优于其他候选抗原,可为 JEV 亚单位疫苗和诊断试剂的研发提供优质抗原。

通过 ELISA 方法评估免疫小鼠诱导的体液免疫反应水平,重组蛋白免疫组诱导产生的平均特异性抗体水平显著高于商品化减毒疫苗 SA14-14-2 免疫组,这可能是由于 ELISA 包被抗原采用的是基因 I 型 JEV 来源的 EIII 蛋白,而 SA14-14-2 减毒疫苗属于基因 III 型 JEV,JEV 不同基因型之间 E 蛋白抗原性的差异导致测得的 SA14-14-2 减毒疫苗免疫组的平均抗体效价很低^[24]。尽管这样,SA14-14-2 减毒疫苗免疫组的细胞因子 IL-4、IL-2 和 IFN- γ 的表达水平接近于 prMEIII 蛋白免疫组,显著高于 polytope 和 prMEIII-polytope 蛋白免疫组。SA14-14-2 减毒疫苗免疫小鼠可诱发机体产生强烈的细胞免疫反应,该细胞介导的免疫反应对于抵抗乙型脑炎病毒的感染和入侵至关重要,特别是 Th1 型细胞免疫反应^[25]。prMEIII 蛋白免疫组的细胞因子(IFN- γ 、IL-2 和 IL-4)表达水平均显著高于 polytope 和 prMEIII-polytope 蛋白免疫组,说明 prMEIII 蛋白免疫小鼠诱导产生强烈的 Th1 和 Th2 型细胞免疫

反应,这同淋巴细胞增殖实验结果一致,prMEIII 蛋白免疫组的淋巴细胞增殖水平显著高于 polytope 和 prMEIII-polytope 蛋白免疫组。此外,prMEIII 蛋白免疫组诱导产生的平均中和抗体水平接近于 SA14-14-2 减毒疫苗免疫组。据此推断,SA14-14-2 减毒疫苗与本研究中的基因 I 型 JEV GS 株可能具有较好的交叉免疫保护性。此外,复合表位抗原 polytope 集合了 JEV E、NS1 和 NS3 多个基因的主要抗原表位,但在本研究中所表现的免疫效力指标并不理想,尽管在 polytope 中存在 NS1 的多个抗原表位,但诱导产生的抗体是否具有抵抗 JEV 的感染和入侵的补体结合活性^[26]还需要进一步实验验证。同时将 polytope 和 prMEIII 蛋白融合表达之后,反而降低了 prMEIII 重组蛋白的免疫效力。推断其可能是 polytope 与 prMEIII 蛋白融合表达后,影响了 prMEIII 蛋白有效表位的空间构象展示。因此,prMEIII 蛋白被认为是本研究中研制新型 JEV 疫苗的最佳疫苗候选抗原。

综上所述,本研究制备的 JEV 亚单位疫苗候选抗原免疫小鼠均可诱导产生较强的体液免疫和细胞免疫反应,其中 prMEIII 融合蛋白免疫诱导产生的中和抗体水平接近于商品化减毒疫苗 SA14-14-2,该研究为今后 JEV 亚单位疫苗的研制提供了新的思路。

REFERENCES

- [1] Campbell GL, Hills SL, Fischer M, et al. Estimated global incidence of Japanese encephalitis: a systematic review. *Bull World Health Organ*, 2011, 89(10): 766-774.
- [2] Dhanda V, Mourya DT, Mishra AC, et al. Japanese encephalitis virus infection in mosquitoes reared from field-collected immatures and in wild-caught males. *Am J Trop Med Hyg*, 1989, 41(6): 732-736.
- [3] Mengeling WL, Paul PS, Lager KM. Virus-induced maternal reproductive failure of swine. *J Am Vet Med Assoc*, 1993, 203(9): 1268-1272.
- [4] Uchil PD, Satchidanandam V. Phylogenetic analysis of Japanese encephalitis virus: envelope gene based

- analysis reveals a fifth genotype, geographic clustering, and multiple introductions of the virus into the Indian subcontinent. *Am J Trop Med Hyg*, 2001, 65(3): 242–251.
- [5] Schuh AJ, Ward MJ, Brown AJL, et al. Dynamics of the emergence and establishment of a newly dominant genotype of Japanese encephalitis virus throughout Asia. *J Virol*, 2014, 88(8): 4522–4532.
- [6] Pan XL, Liu H, Wang HY, et al. Emergence of genotype I of Japanese encephalitis virus as the dominant genotype in Asia. *J Virol*, 2011, 85(19): 9847–9853.
- [7] Wei JC, Wang X, Zhang JJ, et al. Partial cross-protection between Japanese encephalitis virus genotype I and III in mice. *PLoS Negl Trop Dis*, 2019, 13(8): e0007601.
- [8] Fan YC, Chen JM, Chen YY, et al. Reduced neutralizing antibody titer against genotype I virus in swine immunized with a live-attenuated genotype III Japanese encephalitis virus vaccine. *Vet Microbiol*, 2013, 163(3/4): 248–256.
- [9] Fan YC, Chen JM, Chiu HC, et al. Partially neutralizing potency against emerging genotype I virus among children received formalin-inactivated Japanese encephalitis virus vaccine. *PLoS Negl Trop Dis*, 2012, 6(9): e1834.
- [10] Misra UK, Kalita J. Overview: Japanese encephalitis. *Prog Neurobiol*, 2010, 91(2): 108–120.
- [11] Ding D, Kilgore PE, Clemens JD, et al. Cost-effectiveness of routine immunization to control Japanese encephalitis in Shanghai, China. *Bull World Health Organ*, 2003, 81(5): 334–342.
- [12] Peng JG, Wu SC. Glutamic acid at residue 125 of the prM helix domain interacts with positively charged amino acids in E protein domain II for Japanese encephalitis virus-like-particle production. *J Virol*, 2014, 88(15): 8386–8396.
- [13] Li YZ, Counor D, Lu P, et al. Protective immunity to Japanese encephalitis virus associated with anti-NS1 antibodies in a mouse model. *Viol J*, 2012, 9: 135.
- [14] Kumar P. Conserved amino acids 193–324 of non-structural protein 3 are a dominant source of peptide determinants for CD4⁺ and CD8⁺ T cells in a healthy Japanese encephalitis virus-endemic cohort. *J Gen Virol*, 2004, 85(5): 1131–1143.
- [15] Hsu ST, Chang LC, Lin SY, et al. The effect of vaccination with a live attenuated strain of Japanese encephalitis virus on stillbirths in swine in Taiwan. *Bull World Health Organ*, 1972, 46(4): 465–471.
- [16] Donaldson B, Lateef Z, Walker GF, et al. Virus-like particle vaccines: immunology and formulation for clinical translation. *Expert Rev Vaccines*, 2018, 17(9): 833–849.
- [17] Yu RM, Tian ZC, Du JZ, et al. Identification of EDIII protein from the genotype I Japanese encephalitis virus. *Chin Vet Sci*, 2017, 47(12): 1475–1480 (in Chinese).
- 于瑞明, 田占成, 独军政, 等. 基因 I 型乙脑病毒 ED III 结构域蛋白的原核表达及其抗体制备与鉴定. *中国兽医科学*, 2017, 47(12): 1475–1480.
- [18] Sanchez-Trincado JL, Gomez-Perosanz M, Reche PA. Fundamentals and methods for T- and B-Cell epitope prediction. *J Immunol Res*, 2017, 2017: 2680160.
- [19] Fan YC, Chiu HC, Chen LK, et al. Formalin inactivation of Japanese encephalitis virus vaccine alters the antigenicity and immunogenicity of a neutralization epitope in envelope protein domain III. *PLoS Negl Trop Dis*, 2015, 9(10): e0004167.
- [20] Mansfield KL, Hernández-Triana LM, Banyard AC, et al. Japanese encephalitis virus infection, diagnosis and control in domestic animals. *Vet Microbiol*, 2017, 201: 85–92.
- [21] Lin HH, Yip BS, Huang LM, et al. Zika virus structural biology and progress in vaccine development. *Biotechnol Adv*, 2018, 36(1): 47–53.
- [22] Van Loben Sels JM, Green KY. The antigenic topology of norovirus as defined by B and T cell epitope mapping: implications for universal vaccines and therapeutics. *Viruses*, 2019, 11(5): 432.
- [23] Luca VC, AbiMansour J, Nelson CA, et al. Crystal structure of the Japanese encephalitis virus envelope protein. *J Virol*, 2012, 86(4): 2337–2346.
- [24] Kurane I, Takasaki T. Immunogenicity and protective efficacy of the current inactivated Japanese encephalitis vaccine against different Japanese encephalitis virus strains. *Vaccine*, 2000, 18(S2): 33–35.
- [25] Konishi E, Ajiro N, Nukuzuma C, et al. Comparison of protective efficacies of plasmid DNAs encoding Japanese encephalitis virus proteins that induce neutralizing antibody or cytotoxic T lymphocytes in mice. *Vaccine*, 2003, 21(25/26): 3675–3683.
- [26] Lin YL, Chen LK, Liao CL, et al. DNA immunization with Japanese encephalitis virus nonstructural protein NS1 elicits protective immunity in mice. *J Virol*, 1998, 72(1): 191–200.

(本文责编 郝丽芳)