

# 严重发热伴血小板减少综合征病毒核蛋白核酸疫苗的构建及免疫原性研究

周宜庆,金 柯,徐菱遥,李 军\*

(南京医科大学第一附属医院感染病科,江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的:构建 SFTSV 的核蛋白核酸疫苗并探讨其免疫原性。方法:采用 PCR 方法扩增 SFTSV 核蛋白基因,并用引物引入限制性内切酶切位点,克隆入载体 pJW4303。经酶切和测序鉴定正确的质粒,用 PEI 瞬时转染 HEK293T 细胞,用免疫印迹法鉴定核蛋白的表达。同时以质粒 pJW4303 作为阴性对照,免疫 BALB/c 小鼠,酶联免疫法验证其免疫原性。结果:成功构建质粒 pJW4303-N,经 Western blot 证实 SFTSV 核蛋白能够在 HEK293T 细胞中表达。ELISA 检测免疫后小鼠血清特异性 IgG 抗体及其亚型发现,IgG 抗体及其亚型较免疫前明显升高,亚型中以 IgG2a 升高为主。结论:SFTSV 核蛋白核酸疫苗 pJW4303-N 具有良好的免疫原性,为进一步研究 SFTSV 核蛋白奠定了基础。

**[关键词]** SFTSV;核蛋白;核酸疫苗;免疫原性

**[中图分类号]** R511

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2015)07-928-05

doi:10.7655/NYDXBNS20150706

## Construction of nucleic acid vaccine plasmid of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus nucleoprotein and immunogenicity study

Zhou Yiqing, Jin Ke, Xu Lingyao, Li Jun\*

(Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** Objective: To construct nucleic acid vaccine plasmid encoding severe fever with thrombocytopenia syndrome virus(SFTSV) nucleoprotein and to study its immunogenicity. **Methods:** SFTSV nucleoprotein gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR). The PCR product was cloned into the expression vector pJW4303 to construct nucleic acid vaccine. The recombinant plasmid pJW4303-N was identified by sequencing and then transiently transformed into HEK293T cells to measure the nucleoprotein expression by Western blot. We immunized the BALB/c mice with pJW4303-N and used the blank vector pJW4303 as the control. The immunogenicity was detected by enzyme-linked immunosorbent method. **Results:** The recombinant SFTSV nucleoprotein expression vector pJW4303-N was successfully constructed and expressed in supernatants and cell lysates of HEK293T cells *in vitro*. Specific IgG antibodies and its subtype in mice were found by ELISA after immunization. IgG titer and its subsets in the serum of the BALB/c mice were significantly increased than those of the controls. IgG2a was significantly higher than IgG1. **Conclusion:** The nucleic acid vaccine of SFTSV nucleoprotein (pJW4303-N) has good immunogenicity. This research is the foundation for the further study of SFTSV nucleoprotein.

**[Key words]** SFTSV; nucleoprotein; nucleic acid vaccine; immunogenicity

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(07): 928-932]

严重发热伴血小板减少综合征病毒(severe fever with thrombocytopenia syndrome virus, SFTSV)

**[基金项目]** 国家重大科技专项(2013ZX10002005-002-005);江苏省医学创新团队与领军人才资助(LJ201121);江苏省科技支撑计划资助项目(BE2012770);江苏高校优势学科建设工程资助(JX10231801)

\*通信作者(Corresponding author),E-mail:dr-ljzun@vip.sina.com

于 2009 年在我国首先被发现并证实<sup>[1]</sup>。其感染后可致机体多系统损害及衰竭,病死率达 6.3%~30.0%<sup>[2]</sup>。人群普遍易感,发病机制目前尚不清楚,尚无特效治疗药物及预防疫苗<sup>[3]</sup>。SFTSV 属于布尼亚病毒科(Bunyaviridae)白蛉病毒属(Phlebovirus)病毒,基因组包括 L、M、S 3 个片段,分别编码 RNA 依赖的 RNA 聚合酶、包膜糖蛋白、核蛋白和非结构蛋白<sup>[1]</sup>。既往对布尼亚病毒科其他病毒研究发现,病毒核蛋

白免疫原性强,可诱导机体产生强有力的体液免疫及细胞免疫应答,且产生的抗体高效、持久。对立夫特山谷热病毒、普马拉病毒、H7N9 等的研究甚至发现核蛋白特异性抗体具有一定的保护作用<sup>[4-6]</sup>。因此,本研究通过构建 SFTSV 的核蛋白基因疫苗并探讨其免疫原性,为进一步研究 SFTSV 核蛋白致病机制奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

病毒 RNA 提取试剂盒(中山达安基因公司),Pfu DNA 聚合酶(北京天根生化),限制性核酸内切酶 *Hind* III、*Bam*H I、*Bgl* II、T4 DNA 连接酶(Fermentas 公司,美国),100 bp DNA marker(南京生兴生物),1 kb DNA marker(北京康为世纪生物),琼脂糖凝胶回收试剂盒(Omega 公司,美国),DMEM 高糖培养基(北京维森特公司),胎牛血清(杭州四季青公司),质粒小量提取试剂盒(北京天根生化),质粒大量提取试剂盒(QIAGEN 公司,美国),PEI(Invitrogen 公司,美国),生物素标记的羊抗鼠 IgG、IgG1、IgG2a(Southern Biotech 公司,美国),HRP 标记的山羊抗鼠 IgG(上海生工生物),pJW4303 质粒为本实验室保存。引物合成及测序由上海生工生物公司完成。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 引物设计和合成

以 HB29 株为参考序列(GenBank:HM745932.1),设计上游引物 NF1:5'-CCCAAGCTTATGTCGGAGTG-GTCCAGGATTGC-3';下游引物 NR1:5'-GGAA-GATCTCTATTACAGGTTTCTGTAAGC-3'。并分别设计引入酶切位点。引物由上海生工生物公司合成。

#### 1.2.2 扩增 SFTSV NP 基因

按中山大学达安基因公司病毒 RNA 提取试剂盒说明书提取严重发热伴血小板减少综合征(SFTS)患者外周血 SFTSV RNA,逆转录成 cDNA;用上述引物 PCR 扩增目的片段;PCR 反应条件为:94℃ 变性 30 s,58℃ 30 s,72℃ 3.5 min,35 个循环,72℃ 延伸 10 min;1%琼脂糖凝胶电泳,并按试剂盒回收目的基因片段。

#### 1.2.3 重组质粒的构建

将表达载体 pJW4303(*Hind* III、*Bam*H I)和回收的基因片段(*Hind* III、*Bgl* II)双酶切,酶切产物 1%琼脂糖凝胶电泳,回收电泳目的条带;连接回收产物,转化 HB101 感受态细胞,铺板,挑取单个菌落

培养;小量提取质粒进行酶切鉴定,鉴定为正确的质粒进行基因测序。构建的质粒命名为 pJW4303-N,即 SFTSV 核蛋白核酸疫苗。

#### 1.2.4 核酸疫苗体外瞬时表达

复苏 293T 细胞,用含 10%胎牛血清、青霉素、链霉素的 DMEM 培养基在 10 cm 培养板中培养;待细胞丰度达 80%时,用 PEI 分别转染 20 μg 重组质粒和载体质粒于每个 10 cm 培养板中,6~8 h 后更换为不含胎牛血清含双抗的 DMEM 培养基;48~72 h 后收集培养上清液和细胞裂解液。

#### 1.2.5 核酸疫苗免疫 BALB/c 小鼠

用质粒 pJW4303-N 免疫 BALB/c 小鼠,并用 pJW4303 作为阴性对照;采用肌肉注射和体外基因导入仪体内电转染方式进行免疫。每组免疫 7 只小鼠;每隔 2 周免疫 1 次,共 3 次;第 1 次免疫前和末次免疫后 4 周内眦采血,分离血清,-80℃ 保存。

#### 1.2.6 Western blot 检测核蛋白表达

收获的 293T 细胞培养上清液和细胞裂解液 SDS-PAGE 电泳;转至 PVDF 膜,5%的脱脂奶粉溶液封闭 2 h;加入 pJW4303-N 末次免疫后 4 周的小鼠血清(1:300 稀释),4℃ 孵育过夜;PBST 洗膜 6 次,10 min/次;加入 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG,室温孵育 1 h;PBST 洗膜 6 次,10 min/次;ECL 化学发光液显色,Bio-Rad 成像系统拍照。

#### 1.2.7 ELISA 检测 BALB/c 小鼠血清特异性 IgG 抗体及其亚型效价

将收获的 293T 细胞培养上清 1:5 稀释作为包被抗原,包被 96 孔 ELISA 板,4℃ 孵育过夜;第 2 天洗涤,37℃ 封闭 2 h;洗涤后加入小鼠血清,小鼠血清起始稀释度为 1:200,再进行 1:2 倍比稀释,100 μL/孔,37℃ 孵育 1 h;洗涤后加入 1:5 000 稀释的生物素标记羊抗鼠 IgG 或 IgG1 或 IgG2a,37℃ 孵育 1 h;洗涤后加入 1:4 000 稀释的 HRP 标记链亲和素,37℃ 孵育 1 h;洗涤后加入显色液显色 7 min 终止反应,450 nm 测定吸光度值。吸光度值>0.05 且>2.1 倍的免疫前血清吸光度值判定为阳性,即产生了针对核蛋白的特异性抗体。

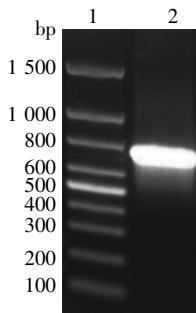
### 1.3 统计学方法

抗体滴度以中位数(百分位数间距)表示,两组间比较用非参数检验并在 SPSS20.0 中完成, $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

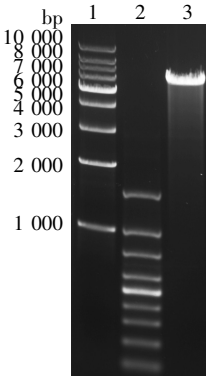
### 2.1 核酸疫苗的构建及鉴定结果

SFTS 患者急性期血清提取的病毒 RNA 逆转录成 cDNA, 以此为模板 PCR 扩增, PCR 产物琼脂糖凝胶电泳在约 753 bp 处可见单一清晰的扩增条带, 与预期目的片段位置相符 (图 1)。由于酶切载体 pJW4303 和目的片段的一个内切酶不同, 分别为 *Bam*H I 和 *Bgl* II, 黏性末端相连后, 失去了该酶切位点。因此, 构建成功的质粒 pJW4303-N (5 809 bp) 采用 *Hind* III 单酶切鉴定, 结果可见单一清晰的条带, 与理论值相符 (图 2)。DNA 序列测定表明, 与已知的 SFTSV 核蛋白基因序列完全一致。表明 SFTSV 核蛋白重组质粒 pJW4303-N 构建成功。



1: 100 bp DNA ladder; 2: 目的片段。  
图 1 目的片段 PCR 产物电泳图

Figure 1 PCR electrophotogram of target fragment



1: 1 kb DNA ladder; 2: 100 bp DNA ladder; 3: pJW4303-N (*Hind* III 单酶切)。

图 2 重组质粒酶切鉴定

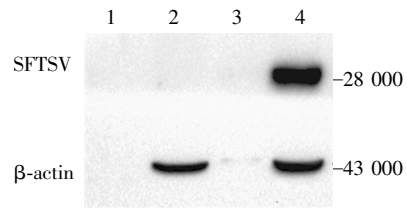
Figure 2 Identification of recombinant plasmid by endonuclease digestion

### 2.2 核酸疫苗的体外表达结果

Western blot 结果显示, SFTSV 核蛋白 (28 000) 在细胞裂解液中可见明显表达条带, 在细胞培养上清液中未见表达, 43 000 为内参  $\beta$ -actin (图 3)。

### 2.3 免疫 BALB/c 小鼠血清特异性抗体 IgG 及其亚型检测结果

采用 ELISA 方法检测免疫前后 BALB/c 小鼠血清 SFTSV 核蛋白特异性 IgG 抗体及其亚型变化



1: pJW4303 转染 HEK293T 细胞上清液; 2: pJW4303 转染 HEK293T 细胞裂解液; 3: pJW4303-N 转染 HEK293T 细胞上清液; 4: pJW4303-N 转染 HEK293T 裂解液。

图 3 重组质粒在 HEK293T 细胞的表达

Figure 3 Expression of target antigen NP encoded by recombinant plasmid in HEK293T cell lines

趋势: pJW4303-N 组免疫前及 pJW4303 组免疫前后血清均未检测到特异性 SFTSV 核蛋白 IgG 抗体; pJW4303-N 组 7 只小鼠免疫后血清均可检测到明显增高特异性抗核蛋白 IgG 和 IgG2a 抗体; 5 只小鼠免疫后血清可检测到特异性抗核蛋白 IgG1 抗体, 2 只小鼠免疫后血清未检测到该抗体 (图 4)。

免疫后血清抗体滴度检测发现: pJW4303-N 组免疫后 7 只小鼠血清核蛋白特异性 IgG 抗体稀释度均达 1:102 400; IgG2a 抗体亚型稀释度则在 1:51 200~1:102 400 之间; 5 只小鼠的 IgG1 抗体亚型稀释度为 1:6 400~1:12 800 (图 5)。pJW4303-N 组 IgG、IgG1、IgG2a 抗体滴度与载体对照组相比, 差异均有统计学意义; pJW4303-N 组 IgG1、IgG2a 亚型间抗体滴度比较差异有统计学意义 (图 5)。

### 3 讨论

SFTS 是我国近年新发传染病, 目前没有特效的治疗和预防方法。众所周知, 疫苗是预防传染性疾病的 有效手段, 而核酸疫苗是近年发展起来的一种较传统蛋白疫苗更具优势的接种疫苗, 其中人类免疫缺陷病毒 (HIV)、流感病毒、乙型肝炎病毒等病毒核酸疫苗已经进入临床实验阶段<sup>[7]</sup>。核酸疫苗的本质是将含有抗原基因的真核表达载体导入机体后, 通过分泌抗原蛋白, 诱导机体的特异性体液免疫和细胞免疫反应<sup>[7]</sup>。疫苗导入机体的方式不同, 影响其免疫效果。肌肉注射基础上采用电脉冲瞬间增加细胞膜通透性, 使更多的核酸快速进入细胞内, 可提高核酸疫苗的免疫原性<sup>[8]</sup>。

通过酶切鉴定及测序证明, 本研究成功构建 SFTSV 核蛋白核酸疫苗。用该核酸疫苗免疫 BALB/c 小鼠, 以末次血清做为 一抗检测 SFTSV 核蛋白在 HEK293T 细胞的表达, 结果表明该核酸疫苗可在 HEK293T 细胞胞内良好表达, 但分泌到胞外量较

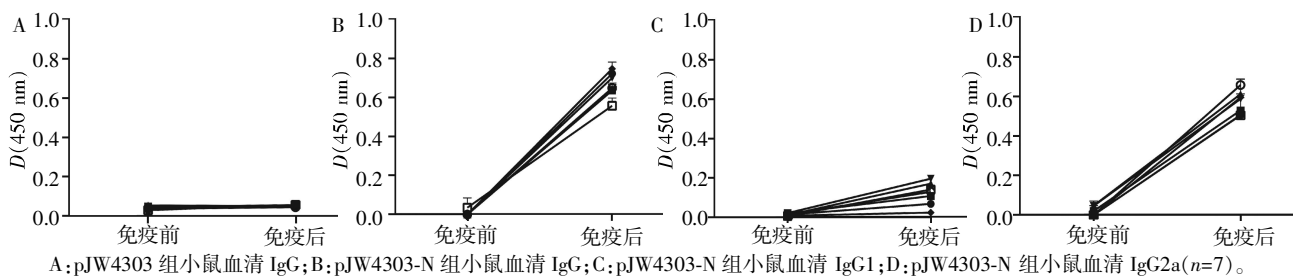


图 4 免疫前后小鼠血清 SFTSV 核蛋白特异性抗体效价变化趋势

Figure 4 Rend of SFTSV immunoglobulin in mouse serum before and after immunization

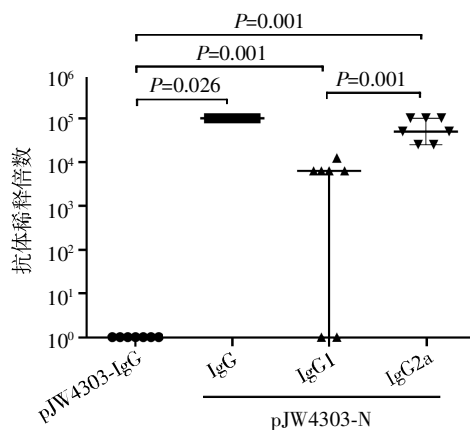


图 5 免疫后小鼠血清特异性抗体滴度比较 (n=7)

Figure 5 Mouse serum immunoglobulin titers after immunization (n=7)

少。本课题组也在积极努力,运用基因工程方法,使得更多的抗原蛋白能够分泌到胞外,从而更好地刺激免疫应答。

本实验室前期以 SFTSV 核蛋白作为包被抗原,检测 SFTS 患者血清 IgG、IgM 抗体发现,病毒核蛋白特异性抗体出现早、水平高<sup>[9]</sup>。Yu 等<sup>[10]</sup>的研究发现鼠源性单克隆抗体主要识别 SFTSV 核蛋白,而仅有少数株识别糖蛋白。上述结果表明核蛋白可能为诱导体液免疫反应的主要蛋白,可诱导产生高水平特异性抗体,与以往对布尼亚病毒科其他病毒的认识一致。ELISA 检测 SFTSV 核蛋白核酸疫苗免疫后小鼠血清中特异性 IgG 抗体发现,IgG 效价较免疫前及载体组显著增高。稀释滴度检测达 10<sup>5</sup> 水平,表明该核酸疫苗能够诱导机体产生高滴度的核蛋白特异性抗体,具有良好的体液免疫原性。立夫特山谷热病毒(RVSV)属于白蛉病毒属的另一组病毒,其核蛋白特异性抗体具有一定的保护作用<sup>[4]</sup>。因此,SFTSV 核蛋白特异性抗体是否也能够起到保护作用有待研究。

核酸疫苗在诱导机体产生有效体液免疫的同时也可有效诱导机体辅助 T 细胞(Th1 和 Th2 型)应

答,而 IgG1 和 IgG2a 分别是 Th2 型和 Th1 型免疫应答的标志<sup>[11]</sup>。对本研究构建的疫苗诱导的 IgG 抗体亚型检测发现,SFTSV 核蛋白核酸疫苗可以诱导小鼠产生 IgG1 和 IgG2a 抗体亚型,但以 IgG2a 增高为主,IgG1 滴度显著低于 IgG2a。表明 SFTSV 核蛋白疫苗诱导的免疫应答趋向于 Th1 型免疫应答。Th1 型细胞主要分泌白介素 2(IL-2)、肿瘤坏死因子  $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) 和  $\gamma$  干扰素(IFN- $\gamma$ ),参与机体细胞免疫应答,有利于抑制和清除病毒等胞内病原体<sup>[11]</sup>。

值得注意的是,以往研究发现布尼亚病毒科病毒中不同病毒核蛋白的核酸疫苗诱导机体免疫的反应有所不同,在其他病毒中也有同样发现<sup>[11]</sup>。如 Maes 等<sup>[12]</sup>研究多布拉伐病毒核蛋白发现,其重组核蛋白疫苗免疫机体后主要产生 IgG1 抗体,这可能与不同的病毒核蛋白免疫作用不同有关。而 DNA 疫苗可以通过结合不同的抗原基因、密码子优化或连接信号肽等基因工程方法,促进分泌和改变免疫原性,产生更好的免疫效果<sup>[11]</sup>。本课题组也正在就 SFTSV 核蛋白核酸疫苗做深入研究。

核酸疫苗还可诱导细胞毒性 T 细胞(CTL)免疫应答<sup>[7]</sup>。对流感病毒核蛋白研究发现不仅对同型产生保护性的 CTL 应答而且可产生交叉保护作用<sup>[7]</sup>。RVSV 核蛋白核酸疫苗研究表明可有效诱导产生 CTL 细胞免疫应答<sup>[4]</sup>。此外,汉坦病毒核蛋白可抑制 NF- $\kappa$ B 激活而抑制细胞因子分泌<sup>[13]</sup>。Qu 等<sup>[14]</sup>研究也表明 SFTSV 核蛋白可抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路和 IFN- $\beta$  的产生。SFTSV 的核蛋白在诱导机体 CTL 细胞免疫应答和固有免疫应答方面的作用还不清楚。本研究构建的 SFTSV 核蛋白疫苗可用于进一步研究。

总之,本研究成功构建 SFTSV 核蛋白核酸疫苗,免疫小鼠后显示有良好的免疫原性,为 SFTSV 疫苗研制奠定了基础。此外,该核酸疫苗也可用于 SFTSV 发病机制的研究。

[参考文献]

[1] Yu XJ,Liang MF,Zhang SY,et al. Fever with thrombocy-

- topenia associated with a novel bunyavirus in China[J]. *N Engl J Med*, 2011, 364(16):1523-1532
- [2] Liu Q, He B, Huang SY, et al. Severe fever with thrombocytopenia syndrome, an emerging tick-borne zoonosis[J]. *Lancet Infect Dis*, 2014, 14(8):763-772
- [3] 中华人民共和国卫生部. 发热伴血小板减少综合征防治指南(2010版)[J]. *中华临床感染病杂志*, 2011, 4(4):193-194
- [4] Boshra H, Lorenzo G, Rodriguez F, et al. A DNA vaccine encoding ubiquitinated Rift Valley fever virus nucleoprotein provides consistent immunity and protects IFNAR(-/-) mice upon lethal virus challenge[J]. *Vaccine*, 2011, 29(27):4469-4475
- [5] Lundkvist A, Kallio-Kokko H, Sjölander KB, et al. Characterization of Puumala virus nucleocapsid protein: identification of B-cell epitopes and domains involved in protective immunity[J]. *Virology*, 1996, 216(2):397-406
- [6] Yang PH, Wang WJ, Gu HJ, et al. Protection against influenza H7N9 virus challenge with a recombinant NP-M1-HSP60 protein vaccine construct in BALB/c mice[J]. *Antiviral Res*, 2014, 111(1):1-7
- [7] Liu MA. DNA vaccines: an historical perspective and view to the future[J]. *Immunol Rev*, 2011, 239(1):62-84
- [8] Bachy M, Boudet F, Bureau M, et al. Electric pulses increase the immunogenicity of an influenza DNA vaccine injected intramuscularly in the mouse[J]. *Vaccine*, 2001, 19(13-14):1688-1693
- [9] 刘艳, 金柯, 韩亚萍, 等. 发热伴血小板减少综合征患者血清中核蛋白抗体的动态变化[J]. *现代生物医学进展*, 2013, 13(18):3432-3435
- [10] Yu L, Zhang L, Sun LN, et al. Critical epitopes in the nucleocapsid protein of SFTS virus recognized by a panel of SFTS patients derived human monoclonal antibodies[J]. *PLoS One*, 2012, 7(6):e38291
- [11] Doria-Rose N, Haigwood NL. DNA vaccine strategies: candidates for immune modulation and immunization regimens[J]. *Methods*, 2003, 31(3):207-216
- [12] Maes P, Keyaerts E, Bonnet V, et al. Truncated recombinant Dobrava hantavirus nucleocapsid proteins induce strong, long-lasting immune responses in mice[J]. *Immunology*, 2006, 149(5):253-260
- [13] Elliott RM, Weber F. Bunyaviruses and the type I interferon system[J]. *Viruses*, 2009, 1(3):1003-1021
- [14] Qu BQ, Qi X, Wu XD, et al. Suppression of the interferon and NF-kappaB responses by severe fever with thrombocytopenia syndrome virus[J]. *J Virol*, 2012, 86(16):8388-8401

[收稿日期] 2015-03-21

本刊邮发代号 28-61

网址: <http://jnmn.njmu.edu.cn>