

SFTSV 糖蛋白 Gn 重组质粒的构建及其体液免疫原性研究

徐菱遥,韩亚萍,周宜庆,金 柯,艾宇洁,黄祖瑚,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:研究严重发热伴血小板减少综合征病毒(severe fever with thrombocytopenia syndrome virus,SFTSV)糖蛋白 Gn 的体液免疫原性。方法:将 PCR 方法扩增的 SFTSV 糖蛋白 Gn 基因和密码子优化后 Gn 基因克隆入载体 pJW4303,构建 Gn 野生型和双优化重组质粒;经酶切和测序鉴定确认为目的质粒后,分别转染 HEK293T 细胞,Western blot 检测糖蛋白 Gn 的表达;用 Gn 重组表达质粒及空载体分别免疫 BALB/c 小鼠,ELISA 检测免疫后小鼠血清抗 Gn 特异性 IgG 抗体。结果:成功构建 Gn 重组野生型质粒 pJW4303-WSP-Gn 和双优化质粒 pJW4303-tPA-Gn-opt;Western blot 证实 pJW4303-WSP-Gn 编码 Gn 可在 HEK293T 细胞内表达,pJW4303-tPA-Gn-opt 编码 Gn 在 HEK293T 细胞内表达并分泌到细胞外;ELISA 检测免疫后小鼠血清抗 Gn 特异性 IgG 抗体证实各重组质粒均能诱导特异性 IgG 抗体产生,双优化质粒较野生型质粒诱导产生的 IgG 时间更早、滴度更高。结论:SFTSV 的糖蛋白 Gn 具有良好的免疫原性;和野生型质粒相比,双优化质粒更有利于糖蛋白 Gn 的表达和分泌,并且具有更好的体液免疫原性。

[关键词] SFTSV;糖蛋白 Gn;重组质粒;体液免疫原性

[中图分类号] R511

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)05-554-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20160509

Construction of recombinant plasmids expressing SFTSV glycoprotein Gn and immunogenicity study

Xu Lingyao, Han Yaping, Zhou Yiqing, Jin Ke, Ai Yujie, Hunag Zuhu, Li Jun*

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

[Abstract] **Objective:** To explore the immunogenicity of severe fever with thrombocyte-penia syndrome virus(SFTSV)glycoprotein Gn. **Methods:** SFTSV glycoprotein Gn gene and optimal Gn gene were amplified by polymerase chain reaction(PCR)respectively. The gene product were cloned to pJW4303 to construct recombinant plasmids and all constructs were identified by sequencing, and then transiently transformed into HEK293T cells to measure the Gn expression by Western blot. We immuned the BALB/c mice with recombinant plasmids and blank vector, and verified its immunogenicity by enzyme-linked immunosorbent method. **Results:** The recombinant plasmids pJW4303-WSP-Gn and pJW4303-tPA-Gn-opt were constructed success-fully. The pJW4303-WSP-Gn transiently expressed Gn antigen in cell lysates of HEK293T cells in vitro, and pJW4303-tPA-Gn-opt in supernatants as same as cell lysates. The specific IgG antibodies induced by pJW4303-tPA-Gn-opt was earlier and higher than that of pJW4303-WSP -Gn. **Conclusion:** SFTSV glycoprotein Gn showed good immunogenicity. The recombinant plasmid pJW4303-tPA-Gn-opt promoted the synthesis and secretion of Gn, and showed better humoral immunogenicity than pJW4303-WSP-Gn.

[Key words] SFTSV; glycoprotein Gn; recombinant plasmid; humoral immunogenicity

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(05):554-558]

严重发热伴血小板减少综合征(SFTS)是 2009 年于我国河南省发现的一种新发传染病,其主要临

床表现为高热、血小板减少、中性粒细胞减少、消化道症状,严重者可发生多器官衰竭,病死率甚至可高达 30%^[1]。SFTS 的病原体为 SFTSV,属于布尼亚病毒科^[2-3],其基因组分为 L、M、S 3 个片段,其中 M 片段编码糖蛋白(Gn/Gc)^[4]。既往对于布尼亚病毒科病毒的研究发现,包膜糖蛋白含有决定病毒与宿

[基金项目] 国家重大科技专项(卫生部十二五支撑计划)(2013ZX10002005)

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

主间相互作用的抗原决定簇^[5],抗糖蛋白特异性抗体是主要的中和抗体^[6]。此外,Hofmann 等^[7]研究证明恢复期 SFTS 患者的血清可以阻断由 Gn/Gc 介导的假病毒入胞过程。但是,目前对 SFTSV 糖蛋白 Gn 的免疫原性还缺乏深入了解。故本研究旨在通过构建含 SFTSV Gn 基因序列的真核表达质粒并免疫 BALB/c 小鼠观察其体液免疫原性,为后续诊断用抗体、预防性疫苗、治疗性抗体的开发奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

实验用 6~8 周龄 SPF 级 BALB/c 雌鼠(北京维通利华实验动物有限责任公司),MHC 单体型为 H^{2d}。HEK293T 细胞株和真核表达载体 pJW4303 均为本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 野生型糖蛋白 Gn 基因重组质粒的构建

以 SFTSV HB29 为参考病毒株,选取含野生型信号肽(WSP)的 Gn 编码基因(GenBank:HM745931.1),由南京金斯瑞生物科技有限公司合成并装入载体 pUC57,即 pUC57-WSP-Gn;设计上游引物 WSP-Gn-F:5' -CCCAAGCTTATGATGAAAGTCATCATCTGG-3',下游引物 5' -WSP-Gn-R;GAGCTCGGATCCC-TATTACTCAATCCTAACATCATC-3';通过 PCR 反应分别在 WSP-Gn 基因序列的 5'端和 3'端引入 *Hind* III 和 *Bam*H I 酶切位点;将表达载体 pJW4303 和 PCR 产物经 *Hind* III 和 *Bam*H I 双酶切后用 T4 DNA 连接酶(Fermentas 公司,加拿大)进行连接,转化 DH5 α 感受态细胞(北京天根生化科技有限公司);小量提取质粒进行酶切鉴定和基因测序,将测序正确的质粒命名为 pJW4303-WSP-Gn。

1.2.2 双优化型糖蛋白 Gn 基因重组质粒的构建

以 SFTSV HB29 为参考病毒株,选取 Gn 编码基因序列,运用软件 Optimum GeneTM 分析此序列,找出与哺乳动物密码子使用偏好不同的密码子位点并进行替换,即优化序列 Gn-opt,由南京金斯瑞生物科技有限公司合成,并连接到 pUC57 载体质粒,即得到 pUC57-Gn-opt;设计上游引物 tPA-Gn-opt-F:5'-GTCACTTCGCTAGCGACAGTGGACCTATT-ATCTGCG-3',下游引物 tPA-Gn-opt-R:5'-AGCTCGGATCCCTATTACTCAATCCGCACATCGT-CC-3';通过 PCR 反应分别在 Gn-opt 序列的 5'端和 3'端引入 *Nhe* I 和 *Bam*H I 酶切位点;将表达载体 pJW4303 和 PCR 产物经 *Nhe* I 和 *Bam*H I 双酶切后用 T4

DNA 连接酶进行连接,即 Gn-opt 连接到 pJW4303 载体 tPA 基因序列的下游,转化 DH5 α 感受态细胞,小量提取质粒进行酶切鉴定和基因测序,将测序正确的质粒命名为 pJW4303-tPA-Gn-opt。

1.2.3 重组质粒体外瞬时转染

用含 10%胎牛血清(南京宝灵科生物技术有限公司)、1%青霉素和链霉素(Gibco 公司,美国)的 DMEM 培养基于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱中培养 HEK293T 细胞;待细胞密度达 70%~90%时,分别用重组质粒和载体质粒转染 HEK293T 细胞,48 h 后收集培养上清和细胞裂解液,-20 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.4 重组质粒免疫 BALB/c 小鼠

分别用 pJW4303-WSP-Gn、pJW4303-tPA-Gn-opt 和 pJW4303 免疫 BALB/c 小鼠,肌肉注射,100 μ g/只,并用体外基因导入仪进行体内电转染;各免疫组均为 7 只小鼠,在 0、2、4 周各免疫 1 次,共 3 次;每次免疫前和末次免疫后 2 周内眦采血,分离血清,-20 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.5 Western blot 检测 Gn 的表达

将重组质粒和载体质粒转染 HEK293T 细胞收获的上清和细胞裂解液进行 SDS-PAGE 电泳,转 PVDF 膜 70 min,5%脱脂奶粉室温封闭 2 h,加入 pJW4303-tPA-Gn-opt 末次免疫后 2 周血清(1:300 稀释),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,洗膜,加入 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG (H+L)(上海生工生物工程股份有限公司)37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,洗膜,ECL 化学发光液(Pierce 公司,美国)显色。

1.2.6 酶联免疫吸附试验(ELISA)

将收获的 pJW4303-tPA-Gn-opt 转染 HEK293T 细胞上清 1:5 稀释,包被 ELISA 板,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,洗板,5%脱脂奶粉 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h,洗涤后加入起始稀释度为 1:200,并依次进行 1:2 倍比稀释的免疫小鼠血清,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,洗涤后加入 1:5 000 稀释的生物素标记的羊抗鼠 IgG(Southern Biotech 公司,美国)37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,洗涤后加入 1:4 000 稀释的 HRP 标记的链亲和素(Southern Biotech 公司,美国)37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,洗涤后 TMB 显色 15 min,随后终止反应并于 450 nm 测试波长测定吸光度值。吸光度值阳性定义为 $D(450 \text{ nm}) \geq 0.05$ 且大于等于免疫前血清吸光度值的 2.1 倍。

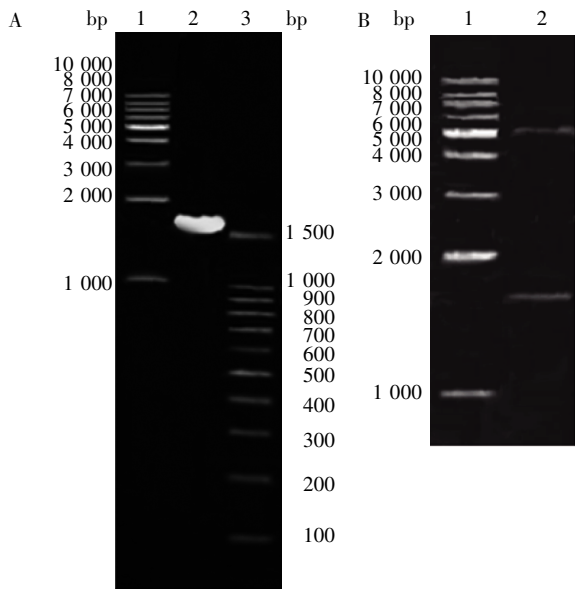
1.3 统计学方法

SPSS20.0 统计软件统计数据。抗体滴度以几何均数和 95%的可信区间表示,两组间比较采用 Wilcoxon Mann-Whitney 检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 重组质粒 pJW4303-WSP-Gn 的构建与鉴定

以 pUC57-WSP-Gn 为模板扩增 WSP-Gn，琼脂糖凝胶电泳后可在约 1 686 bp 的位置上见单一的扩增条带(图 1A)。将目的基因与载体 pJW4303 连接后构建完成的质粒 pJW4303-WSP-Gn，用 *Hind* III 和 *Bam*H I 双酶切后在凝胶电泳约 1 686 bp 和 5 065 bp 的位置各有一条条带(图 1B)。结果表明，所有 DNA 条带在凝胶电泳上的位置与理论值相符，且测序结果证实目的片段基因序列与参考序列完全一致。重组质粒 pJW4303-WSP-Gn 构建成功。



A: 1: 1 kb DNA ladder; 2: PCR 产物 WSP-Gn; 3: 100 bp DNA ladder。
B: 1: 1 kb DNA ladder; 2: pJW4303-WSP-Gn 双酶切产物。

图 1 pUC57-WSP-Gn PCR 扩增产物 WSP-Gn(A)及重组质粒 pJW4303-WSP-Gn 酶切鉴定电泳图(B)

Figure 1 Electropherogram of WSP-Gn amplified from pUC57-WSP-Gn by PCR (A) and pJW4303-WSP-Gn digested with *Hind* III and *Bam*H I (B)

Gn-opt 转染上清及裂解液在大约 61 kDa 位置出现单一条带(图 3)，与 SFTSV 糖蛋白 Gn 分子量一致，说明 Gn 在 HEK293T 细胞瞬时表达成功。

2.4 重组质粒免疫 BALB/c 小鼠血清特异性抗体 IgG 应答时间曲线及其滴度

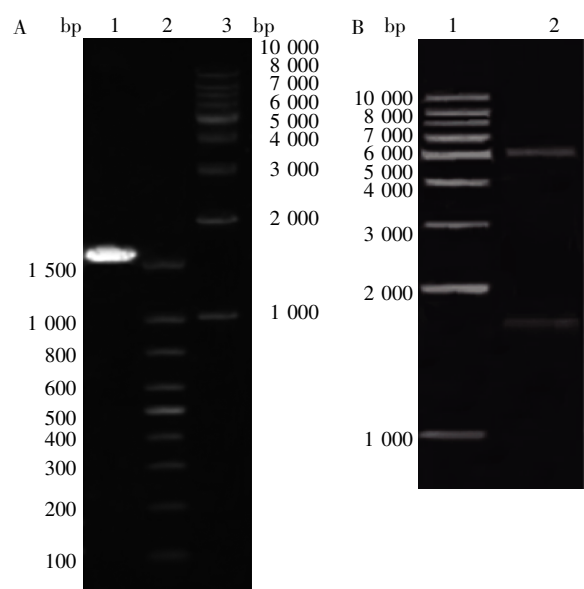
各组免疫前及 pJW4303 组免疫后 2、4、6 周均未检测到糖蛋白 Gn 特异性 IgG 抗体；免疫后 2 周，pJW4303-WSP-Gn 免疫组和 pJW4303-tPA-Gn-opt 免疫组分别检测到 1 只和 4 只小鼠血清中出现特异性 IgG 抗体，滴度均为 1:200，且仅 pJW4303-tPA-

2.2 重组质粒 pJW4303-tPA-Gn-opt 的构建与鉴定

以 pUC57-Gn-opt 为模板扩增 Gn-opt，琼脂糖凝胶电泳后可在约 1 554 bp 的位置上见单一的扩增条带(图 2A)。目的基因连接到载体 pJW4303 的 tPA 基因序列的下游后构建完成质粒 pJW4303-tPA-Gn-opt，用 *Nhe* I 和 *Bam*H I 双酶切后在凝胶电泳约 1 554 bp 和 5 140 bp 的位置各有 1 条条带(图 2B)。结果表明，所见 DNA 条带在凝胶电泳上的位置与理论值相符，且测序结果证实目的片段基因序列与参考序列完全一致。重组质粒 pJW4303-tPA-Gn-opt 构建成功。

2.3 糖蛋白 Gn 在 HEK293T 细胞的瞬时表达

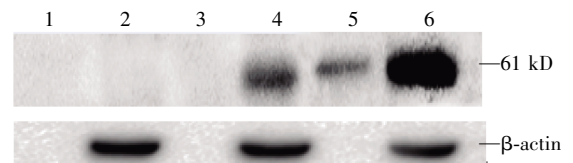
pJW4303-WSP-Gn 转染裂解液、pJW4303-tPA-



A: 1: PCR 产物 Gn-opt; 2: 100 bp DNA ladder; 3: 1 kb DNA ladder。
B: 1: 1 kb DNA ladder; 2: pJW4303-tPA-Gn-opt 双酶切产物。

图 2 pUC57-Gn-opt PCR 扩增产物 Gn-opt(A)及重组质粒 pJW4303-tPA-Gn-opt 酶切鉴定电泳图(B)

Figure 2 Electropherogram of Gn-opt amplified from pUC57-Gn-opt by PCR(A) and pJW4303-tPA-Gn-opt digested with *Nhe* I and *Bam*H I (B)



1: pJW4303 转染 HEK293T 细胞上清; 2: pJW4303 转染 HEK293T 细胞裂解液; 3: pJW4303-WSP-Gn 转染 HEK293T 细胞上清; 4: pJW4303-WSP-Gn 转染 HEK293T 细胞裂解液; 5: pJW4303-tPA-Gn-opt 转染 HEK293T 细胞上清; 6: pJW4303-tPA-Gn-opt 转染 HEK293T 细胞裂解液。

图 3 糖蛋白 Gn 在 HEK293T 细胞中的表达

Figure 3 Expression of glycoprotein Gn in HEK293T cells

Gn-opt 免疫组与 pJW4303 组相比差异有统计学意义 ($P=0.036$); 免疫后 4 周, pJW4303-WSP-Gn 组和 pJW4303-tPA-Gn-opt 组 7 只小鼠血清特异性 IgG 抗体均阳转, 滴度分别为 1:200~1:1 600 和 1:400~1:1 600, 且两组相比及分别与 pJW4303 组相比均有统计学意义 ($P=0.02, 0.01, 0.01$); 免疫后 6 周, pJW4303-WSP-Gn 免疫组和 pJW4303-tPA-Gn-opt 免疫组 7 只小鼠血清 IgG 滴度分别为 1:400~1:3 200 和 1:3 200~1:25 600, 且两组相比及分别与 pJW4303 组相比均有统计学意义 ($P=0.001, 0.011, 0.009$, 图 4、5)。

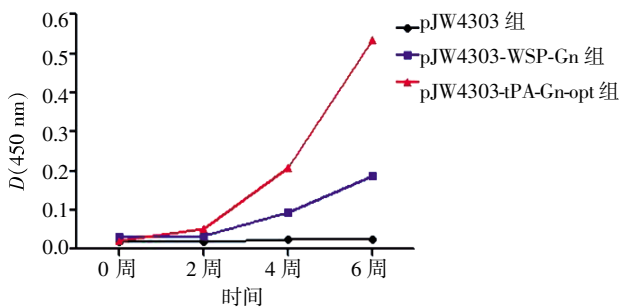


图 4 免疫前后小鼠血清抗 SFTSV 糖蛋白 Gn 特异性抗体 IgG 应答时间曲线

Figure 4 Dynamics of anti-Gn antibody IgG in the serum before and after immunization in mice

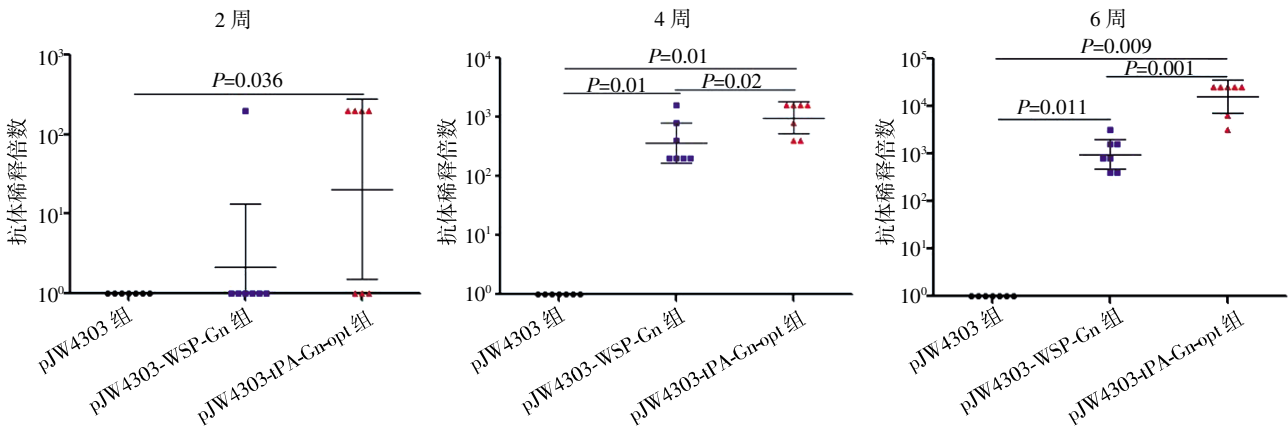


图 5 免疫后 2、4、6 周小鼠血清抗 Gn 特异性抗体 IgG 滴度比较

Figure 5 Titers of anti-Gn antibody IgG in the Serum at 2, 4, 6 week after immunization in mice

提高^[15]。基于此,本课题组构建了含 SFTSV 野生型糖蛋白 Gn 基因序列的重组质粒,以及密码子优化并将野生型信号肽替换为 tPA 信号肽的双优化重组质粒,并比较两种质粒在真核细胞表达目的蛋白的水平以及免疫小鼠后的体液免疫应答特点。Western blot 结果显示,无论是野生型还是双优化型重组质粒均能在真核细胞内有效表达糖蛋白 Gn,且双优化质粒表达量更高,但是仅双优化质粒能够将糖蛋白 Gn 分泌到细胞外,这提示 tPA 信号肽和密码子优化可能促进了目的蛋白的表达及分泌,但具

3 讨论

既往研究发现布尼亚科病毒如里夫裂谷热病毒(Rift Valley fever virus, RVFV)、汉坦病毒(Hantann virus, HTNV)等的包膜糖蛋白具有较强的免疫原性,而且诱导产生的抗体具有中和活性,可以降低 BALB/c 小鼠的病毒感染率^[8-9];此外, RVFV、HTNV、刚果出血热病毒(Crimean-Congo haemorrhagic fever virus, CCHFV)等的糖蛋白可激活细胞毒性 T 细胞(CTL)诱导机体产生特异性细胞免疫应答^[8-11],而且本实验室前期研究发现 SFTS 患者 CTL 升高提示预后良好^[12-13],基于此, SFTSV 糖蛋白 Gn 的免疫原性及生物学意义成为研究重点。

既往研究发现, tPA 信号肽能够与内质网膜上的受体 p63 结合从而直接引导下游肽链进入内质网腔进行折叠和修饰,促进目的蛋白的分泌,诱导机体产生更强的体液免疫应答^[14];病毒的基因密码子与真核细胞密码子使用频率存在差异,而蛋白表达的高低与密码子偏好有关,因此利用哺乳动物偏好的密码子替换外源基因的密码子进行优化后的目的蛋白基因序列在真核细胞中的表达量将得以

体是二者的协同作用还是单一优化介导的作用依然有待进一步研究。

ELISA 检测抗糖蛋白 Gn 特异性 IgG 抗体表明, pJW4303-WSP-Gn 和 pJW4303-tPA-Gn-opt 均可诱导 BALB/c 小鼠产生的特异性 IgG 抗体,免疫后 2 周, pJW4303-tPA-Gn-opt 免疫组可检测到特异性 IgG 的小鼠数量明显多于 pJW4303-WSP-Gn 免疫组;之后特异性 IgG 水平随着免疫次数的增加而升高,免疫后 6 周达到峰值;免疫后 4、6 周,双优化质粒诱导产生特异性 IgG 抗体滴度明显高于野生型质

粒,且二者差异有统计学意义。由此可见,双优化质粒诱导小鼠产生特异性 IgG 抗体更早且水平更高,具有更好的体液免疫原性。结合上文提到双优化质粒可诱导目的蛋白表达量增加并分泌到细胞外的特性不难看出,高效的体液免疫应答可能与目的蛋白的高表达、高分泌至胞外相关。双优化质粒为后续获得大量的糖蛋白 Gn 及其特异性抗体,并进一步研究 Gn 的免疫原性和生物学意义提供了有利条件。

综上所述,pJW4303-WSP-Gn 和 pJW4303-tPA-Gn-opt 均可在体外有效表达并均可诱导小鼠产生特异性抗体,但双优化质粒目的蛋白体外表达量更高、免疫原性更强,这为 SFTSV 尤其是针对其糖蛋白 Gn 的诊断用抗体、预防性疫苗、治疗性抗体的开发奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Zhang L,Sun JM,Yan J,et al. Antibodies against severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in healthy persons,China,2013[J]. Emerg Infect Dis,2014,20 (8): 1355-1357
- [2] XU XJ,Liang MF,Zhang SY,et al. Fever with thrombocytopenia associated with a novel bunyavirus in China [J]. N Engl J Med,2011,364(16): 1523-1531
- [3] Li D. A highly pathogenic new bunyavirus emerged in China[J]. Emerg Microbes Infect,2013,21(1):e1
- [4] Liu SL,Chai CL,Wang CM,et al. Systematic review of severe fever with thrombocytopenia syndrome: virology, epidemiology, and clinical characteristics [J]. Rev Med Virol,2014,24(2): 90-102
- [5] Elliott RM,Weber F. Bunyaviruses and the type I interferon system[J]. Viruses,2009,1(3): 1003-1021
- [6] Hooper JW,Moon JE,Paolino KM,et al. A Phase 1 clinical trial of Hantaanvirus and Puumala virus M-segment DNA vaccines for haemorrhagic fever with renal syndrome delivered by intramuscular electroporation[J]. Clin Microbiol Infect,2014,20(5): 110-117
- [7] Hofmann H,Li XX,Zhang XA,et al. Severe fever with thrombocytopenia virus glycoproteins are targeted by neutralizing antibodies and can use DC-SIGN as a receptor for pH-dependent entry into human and animal cell lines [J]. J Virol,2013,87(8):4384-4394
- [8] Elena L,Gema L,Esther H,et al. A single immunization with MVA expressing GnGcGlycoproteins promotes epitope-specific CD8⁺-T cell activation and protects immune-competent mice against a lethal RVFV infection[J]. PLoS Negl Trop Dis,2013,7(7):e2309
- [9] Cheng LF,Lan Yu,Xiang W,et al. Induction of specific humoral and cellular immune responses in a mouse model following gene fusion of HSP70C and hantaan virus Gn and S0.7 in an adenoviral vector[J]. PLoS One,2014,9(2):e88183
- [10] Liu MA. DNA vaccines: an historical perspective and view to the future[J]. Immunol Rev,2011,239(1): 62-84
- [11] Buttigieg KR,Dowall SD,Findlay-Wilson S,et al. A novel vaccine against Crimean-Congo Haemorrhagic Fever protects 100% of animals against lethal challenge in a mouse model[J]. PLoS One,2014,9(3):e91516
- [12] 韩亚萍,周东辉,翁亚丽,等. 发热伴血小板减少综合征患者外周血淋巴细胞亚群变化特点[J]. 中华检验医学杂志,2012,35(9):826-831
- [13] Li J,Han YP,Xing YP,et al. Concurrent measurement of dynamic changes in viral load,serum enzymes,T Cell subsets, and cytokines in patients with severe fever with thrombocytopenia syndrome[J]. PLoS One,2014,9(3): e91679
- [14] Rong L,Jan V,Chunfu Z,et al. Immunization with plasmid DNA encoding a truncated,secreted form of the bovine viral diarrhea virus E2 protein elicits strong humoral and cellular immune responses [J]. Vaccine,2005,23: 5252-5262
- [15] Jiang YS,Li JB,Gao M,et al. Optimized expression, preparation of human papillomavirus 16 L2E7 fusion protein and its inhibitory effect on tumor growth in mice [J]. Chin J Biotechnol,2015,31(4):566-576

[收稿日期] 2016-01-19