文章编号:1000-5404(2006)10-1019-03

论著

日本脑炎病毒基因片段-GM-CSF双顺反子表达载体的构建

高 娜,彭 涛,陈 炜,张俊磊,王嘉丽,万颖杰,陈宗涛,李东英,田衍平,安 静 (第三军医大学基础医学部微生物学教研室,重庆市微生物工程实验室,重庆 400038)

提 要: 目的 利用分子生物学技术,构建pCAG-JG双顺反子真核表达质粒,为研制新型的日本脑炎病毒(Japanese encephalitis virus, JEV)核酸疫苗奠定基础。**方法** RT-PCR扩增JEV的prM-E-NS1和小鼠粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF)后,分别克隆入中间载体pIRES,经酶切获得prM-E-NS1-IRES-GM-CSF片段,并将其插入pCAGGSP7质粒,鉴定阳性重组子。**结果** 成功的将prM-E-NS1-IRES-GM-CSF片段插入到pCAGGSP7质粒,测序鉴定结果正确,该质粒命名为pCAG-JG。**结论** 成功的构建了pCAG-JG双顺反子真核表达质粒。

关键词: 日本脑炎病毒; GM-CSF; pCAG-JG
中图法分类号: Q782;R737.31;R394-33 **文献标识码**: A

Construction of bicistronic plasmid for expressing Japanese encephalitis virus-prM-E-NS1 and GM-CSF genes

GAO Na, PENG Tao, CHEN Wei, ZHANG Jun-lei, WANG Jia-li, WAN Ying-jie, CHEN Zong-tao, LI Dong-ying, TIAN Yan-ping, AN Jing (Department of Microbiology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct a bicistronic plasmid for expressing JEV-prM-E-NS1and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) so as to provide new insight into Japanese encephalitis virus (JEV) DNA vaccine. **Methods** The prM-E-NS1 and GM-CSF fragments obtained by RT-PCR were inserted into the MCSA and MCSB site of pIRES plasmid vector respectively. Then total prM-E-NS1-IRES-GM-CSF fragment was digested with *Xho*Ⅰ and *Not*Ⅰ, and subcloned into plasmid pCAGGSP7. Positive clones named pCAG-JG were screened and identified with restriction endonuclease and DNA sequencing. **Results** pCAG-JG bicistronic plasmid was constructed and confirmed by restriction endonuclease and DNA sequencing. **Conclusion** The expression plasmid pCAG-JG, consisted of the prM-E-NS1 and GM-CSF gene, has been cloned successfully.

Key words: Japanese encephalitis virus; GM-CSF; pCAG-JG

日本脑炎病毒(Japanese encephalitis virus, JEV)又称乙型脑炎病毒,是流行性乙型脑炎(简称乙脑)的病原体,属黄病毒科。乙脑主要流行于亚洲的东南亚各国和远东地区,据WHO统计,近年来亚洲每年的乙脑病例约16 000例,死亡约5 000例,幸存者大都有严重的后遗症[1],而我国是乙脑的主要流行区。目前乙脑尚无有效的治疗手段,因而以疫苗接种为主的预防措施尤为重要。核酸疫苗是近年来发展起来的一种新兴的疫苗构建技术,是一个替代传统疫苗的极具潜力的发展方向。

JEV基因组为单股正链RNA,约11 kb,仅有1个开放阅读框,从5′到3′端排列着3个结构基因(C、prM和E)和7个非结构基因(NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B和NS5),分别编码相应的蛋白。目前的研究认为其保护性表位集中在prM-E和NS1蛋白[1-3]。但单纯的核酸疫苗并不足以引发良好的免疫效果,还需要结合其他的手段例如基因佐剂,特别是将细胞因子与核酸疫苗共表达,利用细胞因子上调机体免疫水平的作用,进而显著增加核酸疫苗的效能。粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF)已被证实是良好的基因佐剂[4-6]。为此,本研究将JEV的prM-E-NS1基因和小鼠GM-CSF基因同时插入真核表达质粒pCAGGSP7中,两者由IRES序列相连接,实现其共同表达。本研究所构建的双顺反子质粒pCAG-JG为进一步研究其免疫原性及对JEV感染的保护作用奠定了基础。

基金项目:全军医学科研"十一五"计划面上项目(06MA182);重庆市自然科学基金资助项目(2004-2005)
Supported by the Research Project of the "Eleventh Five-Year Plan" for Medical Science Development of PLA (06MA182) and the Natural Science Foundation of Chongqing

作者简介:高 娜(1979-),女,河北省衡水市人,硕士研究生,主要从事病毒的致病机制和预防手段方面的研究。电话:(023)68752239
通讯作者:安 静,电话:(023)68752774,E-mail: anjing60@yahoo.com.cn

收稿日期:2005-12-02;修回日期:2006-03-20

1 材料与方法

1.1 病毒株、细胞株及动物

JEV(Beijing-1 株)及细胞株 C6/36 由本室保存;6 周龄雌性 BALB/c 小鼠 1 只购自第三军医大学实验动物中心。

1.2 质粒和主要试剂

RT-PCR 试剂为 TaKaRa 公司产品;双顺反子真核表达质粒 pIRES 购自 BD Clontech 公司;真核表达质粒 pCAGGSP7 由本室保存;*Xho* Ⅰ、*Eco*R Ⅰ、*Xba* Ⅰ、*Not* Ⅰ 和 *Sac* Ⅱ 限制性内切酶均购自 MBI 公司。

1.3 引物设计和扩增位置

参照 GenBank 上 JEV(Beijing-1 株)序列设计引物如下:

上游引物 JS:5′-CGCGCTCGAGATGAGAGGAGGAAATGAAGGC-3′,下游引物 JA:5′-GCGCGAATTCCTAAGCATCAACCCGTGATCTG-3′,在 5′端分别包含了 *Xho* Ⅰ 和 *Eco*R Ⅰ 酶切位点。扩增 prM-E-NS1 全长,其中包括了 C 末端的信号肽序列,位于整个基因组的 408 ~ 3 533 位,长 3 126 bp。

同样参照 GenBank 上小鼠 GM-CSF 序列设计引物序列如下:上游引物 GS:5′-CTAGTCTAGATGTGGCTGCAGAATTTAC-3′,下游引物 GA:5′-CGATCGGCCGCTCATTTTTGGACTGGTTTTT-3′,并在 5′端分别包含了 *Xba* Ⅰ 和 *Not* Ⅰ 酶切位点。扩增其编码序列(coding domain sequence, CDS),位于整个基因组的 33 ~ 458 位,长 426 bp。上述引物均由 TaKaRa 公司合成。

1.4 病毒 RNA 的制备、RT-PCR 及克隆入载体 pIRES

JEV 感染 C6/36 细胞 24 h 后,用 Biozol(BioFlux,Japan)抽提细胞总 RNA,其中即包括病毒 RNA。病毒 RNA 逆转录及 PCR 按操作说明进行,PCR 反应参数如下:95 ℃ 预变性 5 min,94 ℃ 50 s、58 ℃ 50 s、60 ℃ 3 min,反应 30 个循环后,72 ℃ 延伸 10 min。PCR 产物在 1% 琼脂糖电泳上分析,并用胶回收产物试剂盒(博大泰克,北京)回收 PCR 产物,经 *Xho* Ⅰ 和 *Eco*R Ⅰ 双酶切,定向插入表达载体 pIRES 的 MCSA 多克隆位点的相应位点。该质粒命名为 pIRES-JE,经 *Xho* Ⅰ 和 *Eco*R Ⅰ 双酶切和测序鉴定序列是否正确。

1.5 小鼠 RNA 的制备、RT-PCR 及克隆入上述载体 pIRES-JE

取 6 周龄的雌性 BALB/c 小鼠 1 只,放血处死后迅速取其脾脏,于冰上研碎,加入 Biozol 抽提总 RNA,以此为模板进行逆转录和 PCR 扩增。PCR 反应参数如下:95 ℃ 预变性 5 min,94 ℃ 30 s、60 ℃ 30 s、72 ℃ 30 s,30 个循环后,72 ℃ 延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖电泳分析、胶回收及纯化后,利用 *Xba* Ⅰ 和 *Not* Ⅰ 进行双酶切,定向插入 pIRES-JE 载体的 MCSB 多克隆位点的相应位点,该质粒命名为 pIRES-JG,经酶切和测序鉴定其正确性。

1.6 pCAG-JG 的构建

与其他表达质粒相比,pCAGGSP7 质粒含有较强的鸡 β-actin 启动子,可以使下游的基因更加高效的表达,因此 *Xho* Ⅰ 和 *Not* Ⅰ 双酶切上述质粒 pIRES-JG,琼脂糖电泳胶回收 prM-E-NS1-IRES-GM-CSF 片段,定向插入 pCAGGSP7 的 *Xho* Ⅰ 和 *Not* Ⅰ 位点之间,将该质粒命名为 pCAG-JG。

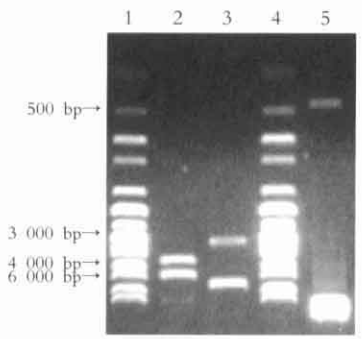
2 结果

2.1 prM-E-NS1 的扩增及 pIRES-JE 的构建

从感染的 C6/36 细胞提取 JEV-RNA,以此为模板,应用前述引物进行 RT-PCR,扩增出分布于标准 3 ~ 4 kb 的特异条带,与预计长度 3 126 bp 相符。将 PCR 产物进行 *Xho* Ⅰ 和 *Eco*R Ⅰ 双酶切后克隆入 pIRES 的 MCSA 位点。阳性克隆送上海生工测序,测序结果正确。

2.2 GM-CSF 的扩增及 pIRES-JG 构建

以提取小鼠脾脏的 RNA 为模板,用前述引物进行 RT-PCR 扩增,扩增出位于标准 250 ~ 500 bp 的特异条带,与预计长度 426 bp 一致。*Xba* Ⅰ 和 *Not* Ⅰ 双酶切 PCR 产物,定向插入已经构建好的 pIRES-JE 的 MCSB 位点,阳性克隆送上海生工测序,结果正确。同时对 pIRES-JG 进行了双酶切鉴定:*Xho* Ⅰ 和 *Eco*R Ⅰ 酶切后出现分布于标准 3 ~ 4 kb 的条带;*Xha* Ⅰ 和 *Not* Ⅰ 酶切后出现分布于标准 250 ~ 500 bp 的条带;而 *Xho* Ⅰ和 *Not* Ⅰ酶切后出现分布于标准 4 ~ 5 kb 的条带(IRES 序列约 580 bp,prM-E-NS1-IRES-GM-CSF 全长约 4.2 kb),均与预期相符(图 1)。

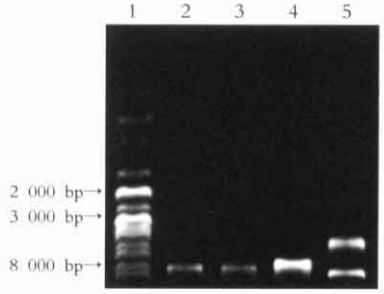


1,4:标准;2:*Xho* Ⅰ 和 *Not* Ⅰ 双酶切;3:*Xho* Ⅰ 和 *Eco*R Ⅰ 双酶切;5:*Xba* Ⅰ 和 *Not* Ⅰ 双酶切

图 1 pIRES-JG 酶切鉴定电泳图

2.3 pCAG-JG 的构建

Xho Ⅰ 和 *Not* Ⅰ 双酶切 pIRES-JG 切下 prM-E-NS1-IRES-GM-CSF 片段后,插入 pCAGGSP7 相应位点。由于 pIRES-JG 上无 *Sac* Ⅱ 酶切位点,而 pCAG-JG 上存在 *Sac* Ⅱ 位点,因此,通过 *Sac* Ⅱ 酶切鉴定阳性克隆(图 2)。



1:标准;2:pIRES-JG;3:pIRES-JG *Sac* Ⅱ 酶切;4:pCAG-JG;5:pCAG-JG *Sac* Ⅱ 酶切

图 2 pIRES-JG 和 pCAG-JG 酶切电泳图

3　讨论

乙型脑炎尚无特殊的治疗手段，免疫接种是保护易感人群，控制其流行的有效措施。传统使用的疫苗主要有 3 种：一种是经日本研发的灭活疫苗，采用感染的成年鼠脑，经甲醛灭活、纯化制成，目前该疫苗在仍在世界范围内广泛使用；其余 2 种为我国研制，分别为原代地鼠肾细胞灭活疫苗和经 SA14-14-2 减毒株感染地鼠肾细胞反复传代研制而成的减毒活疫苗，仅在中国境内使用。上述疫苗的使用极大地降低了乙脑的病死率，然而 3 种疫苗均有其局限性：灭活疫苗存在高生产成本、免疫力不持久、需多次注射及存在变态反应等缺陷；而减毒活疫苗则存在毒力回复的危险。

核酸疫苗因为能够诱发良好的体液免疫和细胞免疫而备受关注，特别是在对抗病原微生物方面，应用最为广泛。核酸疫苗是将表达抗原的基因插入含有适当的真核转录和翻译元件的质粒中，将质粒直接注射到机体内，在体内表达具有正常构象和转录后加工修饰的抗原，进而引发机体良好的体液免疫和细胞免疫。因此，与传统疫苗相比，核酸疫苗具有价廉、易于生产和更为安全的优点。

对于 JEV 而言，当前核酸疫苗研究主要集中在表达结构蛋白和非结构蛋白的质粒构建。其中 E 蛋白是病毒表面的主要抗原，含有众多的免疫表位，在对抗病毒感染产生保护性免疫起到了十分重要的作用，是核酸疫苗研究的重要靶点。研究表明 prM 蛋白对于 E 蛋白的细胞内加工和形成正确的构象是必需的；同时 Chang 等[1]认为 C 蛋白末端的信号肽序列对于形成正确的 prM 和 E 蛋白空间结构必不可少，并可增加 prM、E 蛋白的分泌，进而增加疫苗的免疫效果。NS1 蛋白也是核酸疫苗关注的焦点，Lin 等[3]以表达 NS1 和 NS1'（较 NS1 长，包括部分 NS2A 的序列）的质粒免疫小鼠，仅前者能诱导保护性的免疫。可见 prM-E-NS1 可能是保护性抗原位点较为集中的部位，为此本研究表达了 prM-E-NS1 全长，并在其中包含了 C 蛋白末端的信号肽序列。期望上述 3 个蛋白抗原表位的同时表达，能进一步提高抗原的免疫原性和保护性。

单纯核酸疫苗的不足之处是免疫原性较低，因此使用基因佐剂，与病毒抗原基因共同表达是增加核酸疫苗免疫原性的重要策略。在众多的基因佐剂中，GM-CSF 因能促进抗原递呈细胞的增殖、分化和成熟，诱导较强的免疫应答而备受青睐。Xiang 等[4]在小鼠狂犬病毒模型中发现 GM-CSF 是良好的 DNA 疫苗佐剂，将表达 GM-CSF 与糖蛋白的质粒共免疫之后，增加了 B 细胞和 T 细胞的抗病毒活性。相似的结果在对脑炎心肌炎病毒和单纯疱疹病毒的 DNA 疫苗的研究中也得到了证实[5,6]。为此本研究选用了 GM-CSF 作为疫苗佐剂。

与以往的研究比较，本研究构建的双顺反子真核表达质粒 pCAG-JG 具有以下特点：①pCAG-JG 综合了 prM-E-NS1 三者的保护性表位，理论上应获得更好的保护效果。②实现了目的基因和细胞因子基因在同一载体的共同表达：在用细胞因子做佐剂的研究中，既可将细胞因子基因同抗原基因分别构建在不同的载体上，也可以构建在同一载体上。Xiang 等[4]分别将 GM-CSF 和狂犬病毒抗原基因构建在不同载体免疫小鼠时发现，只有 2 种质粒同时导入同一部位 GM-CSF 才能发挥佐剂作用，而将两者分别接种并间隔数小时，就会导致 GM-CSF 佐剂作用的丧失，说明细胞因子和抗原在时间和空间上的表达差异会严重影响免疫应答的效果。为解决这一问题，本研究将 JEV prM-E-NS1 和 GM-CSF 片段同时插入 pCAGGSP7，两者由 IRES 序列相连接，实现了病毒基因和 GM-CSF 基因在同一个载体中达到共同表达。③目的基因的有效表达：DNA 疫苗能否有效的表达，与载体的基因启动子和增强子元件密切相关，在黄病毒 DNA 疫苗的研究中，大多数选用了含 CMV-IE 启动子的表达质粒[7]。本研究选用了真核表达质粒 pCAGGSP7，与其他常用的质粒相比最大的优点在于其含有 β-actin 启动子，该启动子可使下游基因有效转录，进而实现高效表达。综上所述，本研究构建的 pCAG-JG 双顺反子质粒，为进一步研究其免疫原性和对 JEV 感染保护作用奠定了良好的基础。

参考文献：

[1] CHANG G J, HUNT A R, DAVIS B. A single intramuscular injection of recombinant plasmid DNA induces protective immunity and prevents Japanese encephalitis in mice[J]. J Virol, 2000, 74(9): 4244 - 4252.

[2] ZHAO Z, WAKITA T, YASUI K. Inoculation of plasmids encoding Japanese encephalitis virus PrM-E proteins with colloidal gold elicits a protective immune response in BALB/c mice[J]. J Virol, 2003, 77(7): 4248 - 4260.

[3] LIN Y L, CHEN L K, LIAO C L, *et al*. DNA immunization with Japanese encephalitis virus nonstructural protein NS1 elicits protective immunity in mice[J]. J Virol, 1998, 72(1): 191 - 200.

[4] XIANG Z, ERTL H C. Manipulation of the immune response to a plasmid-encoded viral antigen by coinoculation with plasmids expressing cytokines[J]. Immunity, 1995, 2(2): 129 - 135.

[5] SIN J I, SUNG J H, SUH Y S, *et al*. Protective immunity against heterologous challenge with encephalomyocarditis virus by VP1 DNA vaccination: effect of coinjection with a granulocyte-macrophage colony stimulating factor gene[J]. Vaccine, 1997, 15(17 - 18): 1827 - 1833.

[6] SIN J I, KIM J J, UGEN K E, *et al*. Enhancement of protective humoral (Th2) and cell-mediated(Th1) immune responses against herpes simplex virus-2 through co-delivery of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor expression cassettes[J]. Eur J Immunol, 1998, 28(11): 3530 - 3540.

[7] PUTNAK R, PORTER K, SCHMALJOHN C. DNA vaccines for flaviviruses[J]. Adv Virus Res, 2003, 61: 445 - 468.

（编辑　龙　亮）