文章编号:1000-5404(2010)04-0327-04

论著

利用DNA免疫技术制备抗登革2型病毒NS2B蛋白多克隆抗体

刘丽梅[1],陈宗涛[2],高 娜[3],田衍平[3],陈 炜[2],张俊磊[2],王嘉丽[2],安 静[4] (400038 重庆,第三军医大学:西南医院病理学研究所[1],基础医学部微生物学教研室,重庆市微生物工程实验室[2],基础医学部组织胚胎学教研室,重庆市神经科学研究所[3];100069 北京,首都医科大学基础医学院微生物学教研室[4])

[摘要] **目的** 构建登革2型病毒(dengue virus serotype 2,DV2)非结构蛋白NS2B的真核表达质粒pCAGGS-P7/NS2B,进行DNA免疫,制备小鼠抗NS2B特异性多克隆抗体。**方法** PCR扩增DV2-NS2B基因片段,构建真核表达载体pCAGGS-P7/NS2B,采用脂质体介导的方法转染Vero细胞,检测目标蛋白的表达。用该表达质粒免疫BALB/c小鼠,制备抗NS2B抗血清。**结果** 成功构建真核表达重组质粒pCAGGS-P7/NS2B,该重组质粒具有良好的免疫原性,免疫小鼠后所获的抗血清,抗体效价达1:3 200,Western blot和间接免疫荧光证实抗血清能特异性地识别DV2-NS2B蛋白。**结论** 通过DNA免疫所制备小鼠抗DV2-NS2B抗血清能特异性地识别DV2-NS2B蛋白。

[关键词] 登革热病毒;病毒非结构蛋白质类;NS2B;小鼠;近交BALBC
[中图法分类号] R392-33;R392.11;R512.8 **[文献标志码]** A

Preparation of polyclonal antibodies against NS2B of dengue virus serotype 2 by immunization with DNA

Liu Limei[1,2], Chen Zongtao[2], Gao Na[3], Tian Yanping[3], Chen Wei[2], Zhang Junlei[2], Wang Jiali[2], An Jing[4] ([1]Institute of Pathology, Southwest Hospital, [2]Department of Microbiology, [3]Department of Histology and Embryology, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [4]Department of Microbiology, College of Basic Medicine, Capital University, Beijing, 100069, China)

[Abstract] **Objective** To construct the eukaryotic expression plasmid pCAGGS-P7/NS2B of dengue virus serotype 2(DV2)NS2B and to prepare mouse anti-NS2B specific polyclonal antibody by immunizing mice with DNA. **Methods** An eukaryotic expression vector pCAGGS-P7/NS2B was constructed by PCR amplification of the NS2B gene fragment. Vero cells were transfected with lipid-mediated gene. The expression of target protein DV2 NS2B was detected in Vero cells. BALB/c mice were immunized with pCAGGS-NS2B to prepare anti-serum against NS2. **Results** The pCAGGS-P7/NS2B was constructed with a rather good immunogenicity. The antibody valence of anti-serum obtained from the immunized mice was 1:3200. Western blotting and indirect immunofluorescence showed that the anti-serum could specifically recognize the DV2-NS2B protein. **Conclusion** Anti-serum against DV2-NS2 prepared by immunizing mice with DNA can specifically recognize the DV2-NS2B protein.

[Key words] dengue virus; Viral nonstructural propeins; NS2B; antibody formation; antibody; specificity; immunity, active mice, inbred BALBC

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30671853, 30872227). Corresponding author: An Jing, E-mail: anjing60@yahoo.com.cn

登革病毒(Dengue virus, DV)是黄病毒属家族成员,可引起登革热(Classical dengue fever, DF)及登革出血热/登革休克综合征(dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome, DHF/DSS),DF是一种自限性疾病,而DHF/DSS虽发病率较DF低,却可导致严重的高热、出血、休克,病死率较高[1]。DF广泛流行于热带和亚热带地区,据WHO估计,目前全球每年DF患者多达1亿,DHF 50万例,死亡2.5万人[2,3]。我国于1978年起在广东佛山、海南岛及广西等地陆续发现该病。近年来,随着人口流动的增加及全球气候变暖,我国南方及东南亚的DF及DHF/DSS发病率明显增加。然而,目前对DV的发病机制仍不清楚,亦没有有效预防的疫苗和特异性抗病毒治疗的药物。

DV按包膜蛋白的抗原性不同,可分为4种血清型(DV1-4),DV2型在四个血清型中流行最广。DV是单股正链RNA病毒,其基因组全长约11 kb,编码

[基金项目] 国家自然科学基金(30671853,30872227)
[通信作者] 安 静,E-mail:anjing60@yahoo.com.cn

3 400 个氨基酸的多聚蛋白,包括 3 种结构蛋白(C、prM、E)和 7 种非结构蛋白(NS1、NS2a、NS2b、NS3、NS4a、NS4b、NS5)[3]。其中,非结构蛋白 NS3 是一个多功能蛋白,具有多种蛋白酶活性,在病毒的复制中具有关键的作用。但是,NS3 蛋白酶的活性需要一个有效的辅助因子——即非结构蛋白 NS2B。已证实 NS2B 能形成 NS2B-NS3 复合体(NS2B-NS3 protease complex),从而激活 NS3 蛋白酶,在 DV 复制过程中起着决定性作用[4,5],因而成为当前抗 DV 治疗药物和疫苗研发的新靶点[6],但目前对于 NS2B 在病毒复制中作用的分子机制尚不清楚,主要原因是缺乏有效的实验工具,特别是抗 NS2B 的特异性抗体。因此,为深入研究 NS2B 在 DV 感染中的作用,本研究构建了 NS2B 的真核表达载体,并进一步研究了该表达质粒的免疫原性及其抗体的特性,以期为进一步研究 DV 感染过程中 NS2B 的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒、细胞和主要试剂

登革 2 型病毒(DV2,Tr1751 株):分离自 DF 患者,由日本国立感染病研究所惠赠。白纹伊蚊 C6/36 细胞(ATCC):常规使用 RPMI1640 培养液,含 10% 新生牛血清(FBS),2 mmol/L 谷氨酰胺,10 mmol/L Hepes,28 ℃、5% CO_2 条件下培养;Vero 细胞株(ATCC)MEM 培养基,含 5% FBS,常规培养条件下培养;大肠杆菌 XL-blue1 和真核表达质粒 pCAGGS-P7 为本实验室保存;RNase 抑制剂、AMV 逆转录酶、T_4 DNA 连接酶与高保真 *Taq* 聚合酶均为 TaKaRa 公司产品;限制性内切酶 *Xho* Ⅰ、*Not* Ⅰ均购置 Fermentas 公司;脂质体转染试剂 Lipofectamine2000 购自美国 Invitrogen 公司;羊抗小鼠 IgG-FITC 购自 Sigma 公司;6 ~ 8 周龄 BALB/c 小鼠 10 只为北京军事科学院动物中心提供。

1.2 引物设计与合成

根据 GenBank 公布的 NS2B 的基因序列(GenBank:AY744147)经 Primer Premier 5.0 软件设计合成了 1 对引物。在每条引物 5′端加上保护碱基,在其后则分别引入 *Xho* Ⅰ、*Not* Ⅰ限制性内切酶识别序列。引物由北京三博远志生物公司合成。P1:5′-CCGCTCGAGATGAGCTGGCCTTTAAATGAGG-3′(下划线为 *Xho* Ⅰ酶切位点);P2:5′-ATAAGCGGCCGCCTACCGTTGTTTCTTTACTTCCC-3′(下划线为 *Not* Ⅰ酶切位点)。

1.3 pCAGGS-P7/NS2B 表达质粒的构建

通过对 PCR 反应体系和条件的优化,从质粒 pQE31-NS2B[7] 中成功扩增到 NS2B 全长结构基因。PCR 产物收及纯化按照 BioFlux 胶试剂盒说明书进行。简述如下:提取真核表达载体 pCAGGS-P7,分别用 *Xho* Ⅰ、*Not* Ⅰ对 pCAGGS-P7 和 NS2B 的 PCR 产物进行双酶切后,从琼脂糖上回收 pCAGGS-P7 约 5 200 bp 片段和 NS2B 约 390 bp 片段。经纯化后两者按 1∶4(体积分数)混合,用 T_4 连接酶连接反应 16 ℃ 16 h,构建重组质粒 pCAGGS-P7/NS2B。

1.4 大肠杆菌的转化及重组质粒的鉴定

制备 XL-blue1 感受态细胞,化学转化重组质粒 pCAGGS-P7/NS2B。挑取转化菌落培养后,提取质粒经 PCR 扩增及 *Xho* Ⅰ、*Not* Ⅰ双酶切,鉴定载体中是否插入目的基因。将阳性的重组质粒进行测序鉴定。

1.5 瞬时转染鉴定构建质粒的表达

将所构建质粒 pCAGGS-P7/NS2B 转染 Vero 细胞,间接免疫荧光染色验证其表达情况。步骤如下:取无菌盖玻片置于 24 孔板中,接种 Vero 细胞,37 ℃、5% CO_2,培养 18 ~ 24 h,使细胞融合率达到 80% 左右。利用 Lipofectamine2000,将 pCAGGS-P7/NS2B 和 pCAGGS-P7 空质粒分别转染细胞。转染 6 h 后,换成 2% MEM 培养液培养 48 h。取出细胞爬片,漂洗 2 ~ 3 遍后 4% 多聚甲醛固定,室温 20 min。以本室自制的鼠抗 DV2 多克隆抗体(1∶400 稀释)为一抗[8],以 FITC 标记的羊抗鼠 IgG(1∶500 稀释)为二抗,按照间接免疫荧光染色的方法进行染色,最后用 40% 甘油封片,荧光显微镜下观察。以转染空载体 pCAGGS-P7 的细胞作为阴性对照。

1.6 DNA 免疫制备抗 NS2B 抗体

提取质粒 pCAGGS-P7/NS2B 及空质粒 pCAGGS-P7,制备高纯度核酸免疫动物。免疫前 1 d,分别给 6 ~ 8 周龄 BALB/c 小鼠 5 只后肢股四头肌各注射 0.2% 布鲁卡因 100 μl,次日,每侧注射重组质粒 DNA50 μg,即每只小鼠 100 μg。于免疫后 0、30、60 d,按相同方法注射相同剂量,67 d 后取血分离血清。分装后 -70 ℃ 保存。同时以不含插入片段的 pCAGGS-P7 空载体免疫小鼠 5 只作为对照组。

1.7 ELISA 法测定抗血清效价

以纯化的 NS2B 蛋白为抗原包被 96 孔酶标板(2 μg/孔),倍比稀释小鼠抗 NS2B 抗血清,二抗为 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG(DAKO 公司)。OPD 底物显色后,利用酶标仪(Bio-Rad550)于波长 490 nm 测取光密度 OD 值[D(490)],检测抗血清效价。以 pCAGGS-P7 空载体免疫小鼠血清为阴性对照。

1.8 间接免疫荧光法

将 ECV304 细胞制成细胞悬液,以 2×10^5/孔,接种于 6 孔培养板中,37 ℃,5% CO_2 孵育 18 ~ 24 h。吸出培养上清,用无血清 DMEM 润洗 1 次,再加入 DV2 1 ml/孔(MOI 约为 0.5 ~ 1.0),37 ℃吸附 1 h。最后弃去病毒液,加入 DMEM 培养液(含 2% 小牛血清)2 ml/孔,置于 37 ℃、5% CO_2 孵箱中培养。感染后 48 h,取出盖玻片,用 4% 多聚甲醛(pH 值为 7.2 ~ 7.6)室温固定 20 min。以 DNA 免疫产生的 NS2B 抗血清(1∶100)为一抗,设 NS2B 蛋白免疫产生的小鼠多克隆抗体(1∶300)为阳性对照[7] 和未感染病毒的 ECV304 细胞及空载体 pCAGGS-P7(1∶100)免疫的小鼠血清为阴性对照,以羊抗小鼠 IgG-FITC(1∶400)为二抗,按照间接免疫荧光染色常规方法进行。

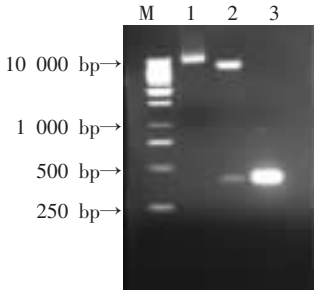
1.9 Western blot 检测

分别收集用 DV2 感染 48 h 的 C6/36 细胞裂解物和正常的 C6/36 细胞裂解物制成上样样本,经 SDS-PAGE(5% 积层胶,10% 分离胶)80 V 电泳 2 h 后,凝胶经 15 V 半干转印 1 h。以 50 g/L 脱脂奶粉液封闭膜 1 h。将免疫产生的 NS2B 抗血清作为一抗(1∶200),50 g/L 脱脂奶粉液为稀释液,分别浸泡条带并 4 ℃过夜。以缓冲液洗涤各条带 3 次,加入 HRP 标记的羊抗小鼠 IgG(1∶1 000),置 37 ℃孵育 1 h,DAB 显色观察。

2 结果

2.1 真核表达质粒 pCAGGS-P7/NS2B 的构建及鉴定

将 PCR 扩增产物经 *Xho* Ⅰ、*Not* Ⅰ双酶切后、回收纯化目的条带，与经同样双酶切的 pCAGGS-P7 质粒回收产物连接，连接产物转化 XL-blue1 细菌感受态细胞，挑取转化平板上的单个菌落，提取质粒 DNA，送公司测序。同时进行 PCR 和双酶切鉴定，结果见图 1。重组质粒经 *Xho* Ⅰ、*Not* Ⅰ双酶切后电泳，可切出预期大小的片段（理论值为 390 bp）。以提取的质粒 DNA 为模板用前述特异性引物进行 PCR 扩增，同样能扩增出与目的片断大小相符的片段（泳道 3）。进一步对重组质粒进行核苷酸测序。结果表明，重组质粒的序列和阅读框正确。



M：DNA 标准；1：pCAGGS-P7/NS2B 质粒；2：pCAGGS-P7/NS2B 经 *Xho* Ⅰ和 *Not* Ⅰ双酶切；3：以质粒为模板的 PCR 产物

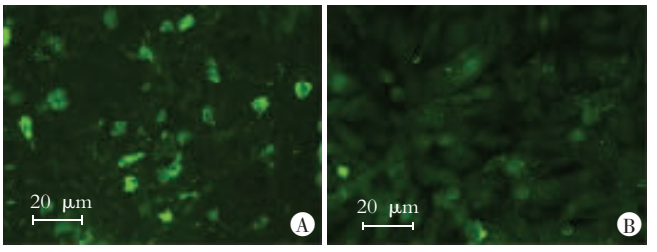
图 1　重组质粒 pCAGGS-P7/NS2B 的 PCR 及酶切鉴定

2.2 真核表达质粒 pCAGGS-P7/NS2B 在 Vero 细胞中的表达

将构建的质粒 pCAGGS-P7/NS2B 和 pCAGGS-P7 空质粒分别采用脂质体方法转染 Vero 细胞，转染 48 h 后，利用鼠抗 DV2 血清进行间接免疫荧光染色[8]。荧光显微镜下，可观察到转染的 pCAGGS-P7/NS2B 细胞核周及细胞质内有明显的强染（图 2A），而转染的空质粒 pCAGGS-P7 作为对照细胞（图 2B）只有微弱荧光。提示 pCAGGS-P7/NS2B 质粒能够表达具有免疫反应性的 NS2B 蛋白。

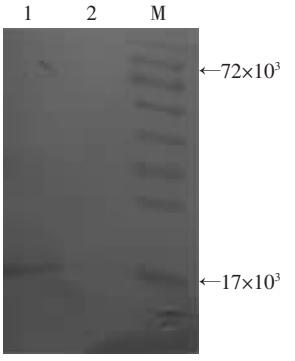
2.3 NS2B 抗体生物学特性的检测

用 ELISA，Western blot 和间接免疫荧光法对 pCAGGS-P7/NS2B 免疫后的各组小鼠血清中特异性抗体的特性进行了测定，经 ELISA 检测，所制备的抗 NS2B 小鼠抗血清效价为 1∶3 200。Western blot 实验结果表明，此抗体与感染 DV2 C6/36 细胞裂解物有特异的抗原抗体反应，只有一特异条带与理论上 NS2B 蛋白（约 16×10^3）相符（图 3：泳道 1），而正常的 C6/36 细胞裂解物对照组（图 3：泳道 2）无特异性反应出现。同时间接免疫荧光实验结果表明，DNA 密度制备的抗 NS2B 抗体在同蛋白免疫产生的 NS2B 一样抗体（图 3）DV2 感染的 ECV304 细胞中有较强特异性荧光，主要集中在细胞质区域（图 4A），而空载体及空白对照（图 4C、D）为非特异性阳性反应。进一步证明以 DNA 免疫产生的 NS2B 多克隆抗体能够识别自然状态下的 NS2B 蛋白。



A：pCAGGS-P7/NS2B 转染 Vero 细胞；B：pCAGGS-P7 转染 Vero 细胞

图 2　间接免疫荧光检测 NS2B 在 Vero 细胞中的表达（×400）

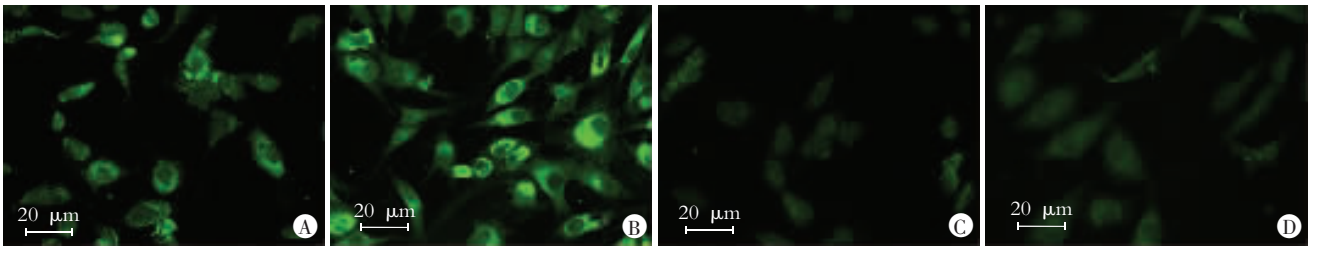


M：低分子量蛋白标准；1：DV2 感染 C6/36 细胞裂解物；2：正常 C6/36 细胞裂解物

图 3　Western blot 检测 DNA 免疫的 NS2B 抗体

3 讨论

DNA 免疫是 20 世纪 90 年代初期建立和发展起来的一门新的免疫学理论和技术。将含有目的基因的质粒 DNA 注射入动物肌肉、皮下或脾脏等部位，使得质粒上的遗传信息在动物体内表达，诱导动物体对 DNA 编码的外源蛋白产生抗体。DNA 免疫的详细机理目前尚不十分清楚。肌细胞能够有效地吸收和表达外源 DNA，这可能与其自身的结构有关[9]。Wolff 等[10]



A：pCAGGS-P7/NS2B 免疫小鼠抗血清染色 DV2 感染的 ECV304 细胞；B：抗 NS2B 小鼠多克隆抗体染色 DV2 感染的 ECV304 细胞；C：pCAGGS-P7 小鼠血清染色 DV2 感染的 ECV304 细胞；D：小鼠抗血清染色正常的 ECV304 细胞

图 4　间接免疫荧光检测免疫血清的特异性（×400）

认为,肌细胞通过T小管和细胞膜穴样内陷把外源基因纳入并表达相应的抗原蛋白,后者被降解为8~12个氨基酸小肽,包含不同的抗原表位。来源于胞液和囊液的抗原表位分别与MHC-Ⅰ类分子和MHC-Ⅱ类分子结合,被呈递到细胞表面,分别激活$CD8^+$ T细胞(CTL)和$CD4^+$ T细胞(炎性T细胞和辅助T细胞);而分泌到细胞外的抗原则被带有相应抗体的B细胞捕捉,在Th细胞的作用下转化为浆细胞产生抗体。Vahlsing等[11]认为,肌细胞可能作为一种中心成分直接参与免疫应答。另一种观点是,肌细胞的直接参与并非必需,NP被分泌出来后被巨噬细胞和/或树突样细胞吞噬、处理、提呈,分别在MHC-Ⅰ类和MHC-Ⅱ类分子的限制下,诱导CTL前体、B细胞和特异性Th细胞[12]。研究报道,利用DNA免疫在恒河猴体内产生高效价的、具有保护性作用的DV2preM-E核酸疫苗[13,14]。

免疫途径的不同,直接影响DNA的吸收和表达,以及细胞的抗原提呈能力[14,15]。在本实验中,采用大腿肌肉注射免疫小鼠的方式,并且在肌肉注射DNA之前,先在注射部位注射100 μl 0.2%的布鲁卡因进行麻醉。布鲁卡因的使用造成肌肉局部坏死但很快再生,使得注射的质粒DNA均匀分布,并有利于DNA的吸收。

本实验所用的质粒pCAGGS-P7包含*Kpn* Ⅰ,*Xho* Ⅰ,*Cla* Ⅰ,*Eco*R Ⅴ,*Sma* Ⅰ,*Not* Ⅰ和*Sac* Ⅰ酶切位点,与其他真核表达质粒相比,pCAGGS-p7具有鸡β-actin真核启动子和SV40双启动子,可以使下游插入基因能够在哺乳动物细胞中更加高效的表达,因此我们利用*Xho* Ⅰ和*Not* Ⅰ双酶切,回收登革病毒非结构蛋白NS2B(约390 bp),定向插入真核表达载体pCAGGS-P7相应位点克隆到大肠杆菌属XL-blue1细菌中,经PCR扩增、酶切测定证实重组质粒构建正确,进而利用脂质体介导的基因转染法将重组质粒瞬时转入Vero细胞,通过间接免疫荧光细胞化学染色可检测到重组质粒的表达产物,阳性率约为18%,证明该重组质粒可在哺乳动物细胞中表达,说明pCAGGS-P7/NS2B质粒能够表达具有免疫反应性的NS2B蛋白。用该重组质粒DNA直接免疫BALB/c小鼠,免疫3次后采血,经Western blot、免疫荧光及ELISA分析,表明DV2-NS2B基因具有较好的免疫原性,能够刺激机体产生特异性的抗NS2B抗体。我们在之前利用蛋白免疫的方法产生的NS2B抗血清,其抗体效价比DNA免疫产生的NS2B抗血清效价高,但存在蛋白纯化、复性等较为繁杂的步骤[7],而DNA免疫所获抗体效价略低,但方法较为简便,是一种简便易行的制备抗体的方法,适用于那些分子质量小、不易纯化的蛋白的抗体的制备。本研究所制备的抗DV2-NS2B多克隆抗体能够识别变性的和自然状态下的NS2B蛋白,为进一步研究该蛋白在病毒感染中的作用机制提供了重要的实验工具。

参考文献:

[1] Guha-Sapir D, Schimmer B. Dengue fever: new paradigms for a changing epidemiology[J]. Emerg Themes Epidemiol, 2005, 2(1): 1.

[2] Monath T P. Dengue: the risk to developed and developing countries[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, 29, 91(7): 2395-2400.

[3] Gubler D J. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century[J]. Trends Microbiol, 2002, 10(2): 100-103.

[4] Bera A K, Kuhn R J, Smith J L. Functional characterization of cis and trans activity of the Flavivirus NS2B-NS3 protease[J]. J Biol Chem, 2007, 282(17): 12883-12892.

[5] Gouvea I E, Izidoro M A, Judice W A, *et al*. Substrate specificity of recombinant dengue 2 virus NS2B-NS3 protease: influence of natural and unnatural basic amino acids on hydrolysis of synthetic fluorescent substrates[J]. Arch Biochem Biophys. 2007, 457(2): 187-196.

[6] Melino S, Paci M. Progress for dengue virus diseases. Towards the NS2B-NS3pro inhibition for a therapeutic-based approach[J]. FEBS J, 2007, 274(12): 2986-3002.

[7] 刘丽梅, 陈宗涛, 田衍平, 等. 登革病毒2型非结构蛋白NS2B的原核表达、纯化及其抗体的制备[J]. 免疫学杂志, 2008, 24(2): 135-138.

[8] 陈宗涛, 王嘉丽, 彭涛, 等. 小鼠抗登革病毒2型单克隆抗体的制备及鉴定[J]. 免疫学杂志, 2005, 21(3): 236-239.

[9] Whalen R G, Davis H L. DNA-mediated immunization and the energetic immune response to hepatitis B surface antigen[J]. Clin Immunol Immunopathol, 1995, 75(1): 1-12.

[10] Wolff J A, Dowty M E, Jiao S, *et al*. Expression of naked plasmids by cultured myotubes and entry of plasmids into T tubules and caveolae of mammalian skeletal muscle[J]. J Cell Sci, 1992, 103(Pt 4): 1249-1259.

[11] Vahlsing H L, Yankauckas M A, Sawdey M, *et al*. Immunization with plasmid DNA using a pneumatic gun[J]. J Immunol Methods, 1994, 175(1): 11-22.

[12] Rock K L, Rothstein L, Gamble S, *et al*. Characterization of antigen-presenting cells that present exogenous antigens in association with class I MHC molecules[J]. J Immunol, 1993, 150(2): 438-446.

[13] Simmons M, Porter K R, Hayes C G, *et al*. Characterization of antibody responses to combinations of a dengue virus type 2 DNA vaccine and two dengue virus type 2 protein vaccines in rhesus macaques[J]. J Virol, 2006, 80(19): 9577-9585.

[14] Mota J, Acosta M, Argotte R, *et al*. Induction of protective antibodies against dengue virus by tetravalent DNA immunization of mice with domain III of the envelope protein[J]. Vaccine, 2005, 23(26): 3469-3476.

[15] Golombage G, Hall R, Pavy M, *et al*. DNA-based and alphavirus-vectored immunisation with PrM and E proteins elicits long-lived and protective immunity against the flavivirus, Murray Valley encephalitis virus[J]. Virology, 1998, 250(1): 151-163.

(**收稿**:2009-08-08;**修回**:2009-11-22)

(编辑 汪勤俭)