

赵冬敏, 刘宇卓, 黄欣梅, 等. 坦布苏病毒 E 蛋白结构域 I/II 蛋白免疫保护效果[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(2): 379-383.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2017.02.022

坦布苏病毒 E 蛋白结构域 I/II 蛋白免疫保护效果

赵冬敏, 刘宇卓, 黄欣梅, 韩凯凯, 杨婧, 刘青涛, 毕可然, 李银

(江苏省农业科学院兽医研究所/国家兽用生物制品工程技术研究中心/农业部兽用生物制品工程技术重点实验室, 江苏南京 210014)

摘要: 为了探讨原核表达的坦布苏病毒 E 蛋白结构域 I/II 蛋白对于坦布苏病毒感染的免疫保护作用, 利用 IPTG 诱导重组大肠杆菌表达坦布苏病毒 E 蛋白结构域 I/II 蛋白, Anti-FLAG M2 Affinity Gel 纯化后进行 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定。经 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定, 纯化后坦布苏病毒 E 蛋白结构域 I/II 蛋白仅有单一目的条带。免疫组小鼠血清 ELISA 效价均达 4.67 ± 0.11 ($\lg 10$)。攻毒保护试验结果表明, 免疫组小鼠体质量在攻毒 9 d 后高于对照组, 荧光定量 RT-PCR 检测结果显示, 攻毒后免疫组小鼠脑、肝脏、脾脏组织中坦布苏病毒核酸含量均低于对照组。表明使用原核表达的坦布苏病毒 E 蛋白结构域 I/II 蛋白免疫可诱导产生高水平抗体, 并提供良好的免疫保护力, 为开发有效的坦布苏病毒亚单位疫苗提供依据。

关键词: 坦布苏病毒; E 蛋白; 结构域 I/II; 免疫保护

中图分类号: S852.65⁺9.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2017)02-0379-05

Immunoprotective effect of Tembusu virus E protein domains I and II

ZHAO Dong-min, LIU Yu-zhuo, HUANG Xin-mei, HAN Kai-kai, YANG Jing, LIU Qing-tao, BI Ke-ran, LI Yin

(*Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Veterinary Biologicals Engineering and Technology, Ministry of Agriculture/National Center for Engineering Research of Veterinary Bio-products, Nanjing 210014, China*)

Abstract: The immunogenicity of the prokaryotically-expressed Tembusu virus E protein domains I and II was tested by SDS-PAGE and Western blot identification of Tembusu virus E protein domains I and II expressed in *Escherichia coli* and induced by IPTG. The results showed that only a single target band was detected after purification. The titers of antibody of immunized group reached 4.67 ± 0.11 ($\lg 10$). The weight of immunized group was higher than that of control group from the 9th day postinoculation. Real-time RT-PCR showed that the Tembusu virus nucleic acid in the brain, liver and spleen of mice in immunized group was less than that of control group. It was indicated that the immunization with recombinant tembusu virus E protein domains I and II could induce high level of specific antibody and provide immuno protection against Tembusu virus infection.

Key words: Tembusu virus; E protein; domains I and II; immunoprotection

收稿日期: 2016-06-22

基金项目: 江苏省自然科学基金项目(BK20160064); 江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(14)2091]

作者简介: 赵冬敏(1982-), 女, 山东兖州人, 博士, 副研究员, 主要从事家禽重大疫病流行病学及致病分子机制研究工作。
(E-mail) zhaodongmin126@126.com

通讯作者: 李银, (E-mail) muziyin08@163.com

坦布苏病毒属于黄病毒科、黄病毒属, 该属病毒主要包括登革病毒、西尼罗病毒、乙型脑炎病毒和蜱传脑炎病毒等, 是一种带有囊膜的单股正链 RNA 病毒, 病毒基因组大小约为 11 kb, 仅含有 1 个长的开放阅读框(ORF), 可以直接作为 mRNA 翻译出 1 条

长链前体蛋白,前体蛋白被切割成10种成熟的蛋白,其中包括3种结构蛋白(衣壳蛋白C、膜蛋白prM/M和囊膜蛋白)与7种非结构蛋白(NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B和NS5)^[1-2]。其中囊膜蛋白(E蛋白)全长500个氨基酸左右,相对分子质量约为54 000,位于成熟病毒颗粒表面,构成病毒颗粒的突起。E蛋白是黄病毒属主要的病毒抗原,含有多种抗原表位,与病毒的吸附、穿入、致病性、组织嗜性、血凝反应、血清特异性和诱导宿主的免疫应答等作用紧密相关^[3-5]。

黄病毒属病毒E蛋白以延伸的二聚体形式平铺在病毒表面,折叠成3个不同的结构域(I、II和III)。结构域I由3个不连续片段组成,形成 β 桶状中心结构,可稳定E蛋白二聚体,是病毒进入细胞的重要结构成分。结构域II由2个不连续片段组成,折叠成指状结构,参与E蛋白二聚体形成及膜融合过程。结构域II的第98~111位氨基酸序列富含甘氨酸且完全疏水,可在E蛋白由二聚体向三聚体转变的过程中插入胞膜,参与病毒与宿主细胞膜的融合,这一区域称为融合肽。结构域III具有免疫球蛋白G样结构,可介导病毒与受体的结合^[6-7]。

坦布苏病毒病作为一种新发疫病,尚无有效防治的商品化疫苗。鉴于E蛋白结构域I和II在黄病毒细胞入侵细胞过程中发挥重要作用,本研究利用大肠杆菌表达的坦布苏病毒E蛋白结构域I/II蛋白研究了小鼠免疫后对坦布苏病毒感染的免疫保护效果,为进一步预防和控制坦布苏病毒病奠定理论基础。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

坦布苏病毒JS804株、表达E蛋白结构域I/II蛋白的重组大肠杆菌均由江苏省农业科学院兽医研究所禽病与生物兽药研究室保存^[8],健康4周龄BALB/C小鼠购自扬州大学比较医学中心。

1.2 主要试剂

Anti-FLAG M2 Affinity Gel购自Sigma公司, QuantiNova SYBR GREEN PCR Kit购自QIAGEN公司,体液病毒DNA/RNA抽提试剂盒购自Axygen公司,RNase抑制剂、AMV反转录酶购自大连宝生物有限公司。根据GenBank中登录的坦布苏病毒JS804株(登录号:JF895923)E基因序列,设计荧光定量PCR扩增引物,上游引物为E-F:5'-GT-

GAGATCTTACTGCTATGAG-3',下游引物为E-R:5'-ACTTGGCACATGTCTGTATGC-3',以上引物由南京金斯瑞生物有限公司合成。

1.3 E蛋白结构域I/II蛋白的纯化

将表达E蛋白结构域I/II蛋白的重组大肠杆菌按1:100比例培养过夜,于次日接种到新的含100 μ g/ml卡那霉素的LB培养基中,37 $^{\circ}$ C振荡培养至 $OD_{600}=0.4\sim 0.6$,加入IPTG,使IPTG终浓度为1 mmol/L,诱导表达6 h,5 000 r/min离心5 min收集细菌,将1 g湿菌重悬于3 ml细胞裂解液(50 mmol/L Tris-HCl, 2 mmol/L EDTA, 100 mmol/L NaCl,pH8.0)中。加入终浓度为1.0 mg/ml溶菌酶,37 $^{\circ}$ C作用30 min。在冰浴中超声波破碎细菌(300 W,工作10 s、间隔10 s,80个循环)。12 000 r/min离心15 min后弃上清液。用包涵体洗涤缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L EDTA, 100 mmol/L NaCl,0.5% Triton X-100,pH 8.0)洗涤沉淀3次。12 000 r/min离心10 min收集包涵体沉淀,溶解于8 mol/L尿素中,12 000 r/min离心10 min,取上清液。4 $^{\circ}$ C下进行透析复性,透析液为不同浓度尿素溶液,每8 h更换1次透析液,透析液浓度依次为6 mol/L、4 mol/L、2 mol/L,最后将透析液更换为PBS缓冲液。复性结束后将蛋白参照Sigma公司Anti-FLAG M2 Affinity Gel试剂盒说明书进行蛋白纯化。

1.4 纯化E蛋白结构域I/II蛋白的Western-blot鉴定

取回收蛋白质样品加2 \times SDS凝胶上样缓冲液煮沸处理5 min后,进行SDS-PAGE鉴定蛋白纯度。纯化蛋白经12% SDS-PAGE分离后,采用湿法将蛋白质转印至硝酸纤维膜(NC)膜上,采用70 V电压作用1 h。5% BSA、37 $^{\circ}$ C封闭2 h,TBST(0.05% Tween-20)洗涤后分别加入FLAG标签单抗于4 $^{\circ}$ C过夜。TBST(0.05% Tween-20)洗涤后加入碱性磷酸酶(AP)标记的羊抗鼠IgG于37 $^{\circ}$ C孵育1 h。TBST(0.05% Tween-20)洗涤后按照BCIP/NBT碱性磷酸酶显色试剂盒说明书显色。

1.5 免疫程序

以纯化的E蛋白结构域I/II蛋白为免疫原,与弗式完全佐剂等体积混合,乳化后皮下多点注射免疫4周龄BALB/C小鼠,每只免疫70 μ g。初次免疫2周后,将纯化的E蛋白结构域I/II蛋白与弗氏不完全佐剂等体积混合,乳化后皮下多点注射免疫4

周龄 BALB/C 小鼠,每只免疫 70 μg 。二免 2 周后按照二免方案进行加强免疫。加强免疫后 2 周断尾采血, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.6 ELISA 测定抗体效价

利用纯化的 E 蛋白结构域 I/II 蛋白包被 ELISA 板, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜。PBST 洗涤 3 次后每孔加入 100 μl 梯度稀释(1:100、1:200、1:400、1:800、1:1600、1:3200、1:6400、1:12800、1:25600、1:51200、1:102400) 的小鼠血清, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。PBST 洗涤后每孔加 1:10000 稀释的 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 100 μl , $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, PBST 洗涤 3 次, 加入 TMB 底物避光显色 15 min。以 2 mol/L H_2SO_4 终止反应, 450 nm 波长下读取 OD 值。

1.7 攻毒保护试验

24 只 4 周龄 BALB/c 小鼠随机分为 2 组, 即对照组和免疫组。免疫组按照方法 1.5 中所述免疫程序进行免疫, 对照组仅接种相同体积的 PBS。所有小鼠于最后一次免疫后 2 周进行攻毒, 每只小鼠肌肉接种 10^4 TCID_{50} 坦布苏病毒。各组于攻毒后 3 d、6 d、9 d、12 d、14 d 和 17 d 分别称质量, 并剖杀 2 只, 取肝脏、脾脏、脑组织, 用荧光定量 RT-PCR 检测坦布苏病毒核酸含量。荧光定量 RT-PCR 检测以 *GAPDH* 为内参基因, 采用相对定量法 ($\Delta\Delta Ct$) 分析不同组织中坦布苏病毒核酸含量。 $\Delta\Delta Ct = (\text{检测样品 } Ct_{E\text{基因}} - \text{检测样品 } Ct_{GAPDH}) - (\text{对照组 } Ct_{E\text{基因}} - \text{对照组 } Ct_{GAPDH})$ 。

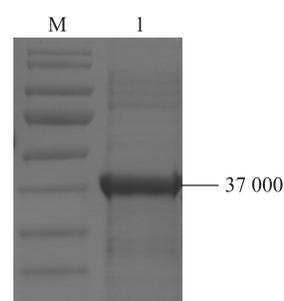
2 结果与分析

2.1 E 蛋白结构域 I/II 蛋白纯化及鉴定

原核表达的 E 蛋白结构域 I/II 蛋白纯化后, 经 SDS-PAGE 电泳分析, 结果(图 1)发现, 仅在 37 000 出现单一蛋白条带, 与预期蛋白的大小一致, 且无其他杂蛋白条带, 说明纯化蛋白符合预期效果。利用抗 FLAG 抗体进行 Western-blot 鉴定, 结果显示, 纯化后蛋白在相对分子量约为 37 000 的位置有与 FLAG 标签单抗反应的特异条带(图 2)。

2.2 ELISA 测定小鼠血清效价

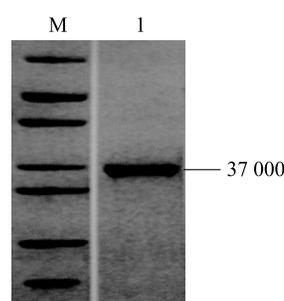
将纯化的 E 蛋白结构域 I/II 蛋白包被 ELISA 板, 以获得的小鼠抗血清作为一抗, 结果显示, 二免两周后, 抗体效价达均可达 $4.67 \pm 0.11 (\lg 10)$, 表明 E 蛋白结构域 I/II 蛋白具有良好的免疫原性, 免疫后诱导机体产生了特异性免疫应答反应。



M: 蛋白分子量标记; I: E 蛋白结构域 I/II 蛋白。

图 1 E 蛋白结构域 I/II 纯化的 SDS-PAGE 检测

Fig.1 SDS-PAGE detection of purified E-I/II protein



M: 蛋白分子量标记; I: E 蛋白结构域 I/II 蛋白。

图 2 E 蛋白结构域 I/II 纯化的 Western blot 鉴定

Fig.2 Western blot identification of E-I/II protein

2.3 攻毒对小鼠体质量增长的影响

攻毒后, 于第 3 d、6 d、9 d、12 d、14 d 和 17 d 分别对各组称质量, 计算体质量平均数, 结果(图 3)发现, 坦布苏病毒可影响小鼠体质量的生长, 自攻毒后 9 d 开始, 免疫组小鼠体质量显著高于对照组小鼠体质量。

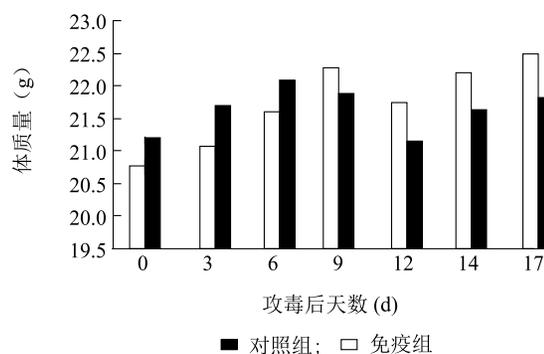


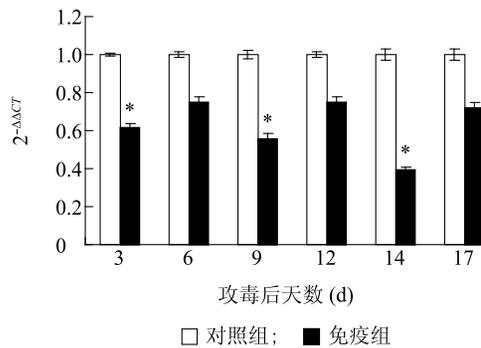
图 3 攻毒后小鼠体质量的变化

Fig.3 Weight of mice after virus challenge

2.4 小鼠脑组织中坦布苏病毒核酸的检测

研究结果表明, 黄病毒属病毒对宿主具有神经

毒力,坦布苏病毒可在小鼠脑内进行有效复制并导致小鼠死亡。本研究中2组小鼠在攻毒后均未出现死亡,但是对照组出现瘫痪、震颤等神经症状,而免疫组则未出现任何临床症状。利用荧光定量 RT-PCR 方法检测免疫组和对照组小鼠脑组织中坦布苏病毒核酸发现,自攻毒后 3 d 开始,免疫组核酸含量显著低于对照组,其中在攻毒后 3 d、9 d、14 d 时免疫组小鼠脑组织中坦布苏病毒核酸含量显著低于对照组(图 4)。



*表示对照组与免疫组差异显著($P < 0.05$)。

图 4 攻毒后小鼠脑组织中坦布苏病毒核酸检测

Fig.4 Detection of nucleic acid of Tambusu virus in mice brain after challenge

2.5 小鼠脾脏中坦布苏病毒核酸的检测

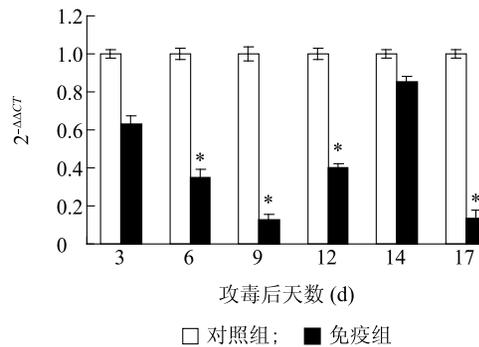
坦布苏病毒感染后可导致脾脏肿大、出血,病毒在脾脏中持续复制并在较长时间内维持高滴度。本研究对小鼠脾脏中坦布苏病毒核酸的检测结果显示,免疫组小鼠脾脏中病毒核酸含量均低于对照组,在攻毒后 6~12 d 及 17 d 出现显著下降,说明 E 蛋白结构域 I/II 蛋白诱导的高滴度抗体可有效抑制病毒增殖。

2.6 小鼠肝脏中坦布苏病毒核酸的检测

自攻毒后 3 d,免疫组和对照组小鼠肝脏中均可检测出坦布苏病毒核酸,但是攻毒后 3~14 d 内,免疫组小鼠肝脏中坦布苏核酸含量显著低于对照组,说明 E 蛋白结构域 I/II 蛋白免疫后,小鼠肝脏中坦布苏病毒的增殖受到抑制。但是攻毒后 17 d,免疫组和对照组小鼠中坦布苏病毒核酸含量相当,这可能是由于对照组小鼠机体清除病毒导致病毒核酸含量下降造成的(图 6)。

3 讨论

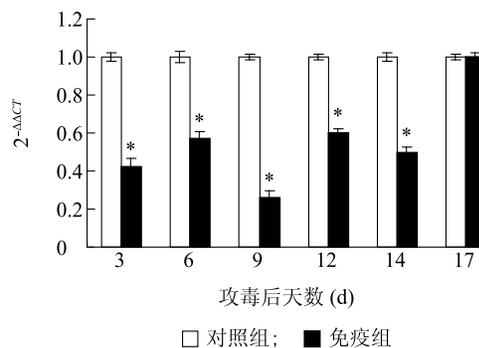
2010 年 4 月以来,坦布苏病毒病已连年在中国



*表示对照组与免疫组差异显著($P < 0.05$)。

图 5 攻毒后小鼠脾脏中坦布苏病毒核酸检测

Fig.5 Detection of nucleic acid of Tambusu virus in mice spleen after challenge



*表示对照组与免疫组差异显著($P < 0.05$)。

图 6 攻毒后小鼠肝脏中坦布苏病毒核酸检测

Fig.6 Detection of nucleic acid of Tambusu virus in mice liver after challenge

多省大面积流行,并且感染的宿主谱还在不断扩大,蛋鸭、种鸭、雏鸭、蛋鹅、种鹅及蛋鸡等均出现了坦布苏病毒感染的病例报道^[9-10],已成为危害中国鸭鹅养殖业的重要疫病之一。黄病毒属的其他大部分成员能够引起严重的人畜共患性传染病,先前的研究结果^[11]显示在感染坦布苏病毒的鸭场从业者口腔中可检出坦布苏病毒核酸,检出率达 47.7%,而血清中坦布苏病毒抗体阳性率达 71.9%,因此不能排除坦布苏病毒感染人类的可能性。小鼠是评价黄病毒属病毒对人类致病性及相关疫苗研发的理想模型,因此本研究以 BALB/C 小鼠为试验动物模型,评价了坦布苏病毒 E 蛋白结构域 I/II 蛋白的免疫保护效果。

黄病毒病的有效预防和控制的关键是研制安全、有效的疫苗。黄病毒 E 蛋白是病毒最重要的免

疫原,因此,对 E 蛋白结构和功能的研究将为研制黄病毒亚单位疫苗提供分子水平的依据。完整的黄病毒 E 蛋白可保留该病毒的抗原特异性,在鼠及猴的动物试验中多数可诱导针对原型病毒的中和抗体,抵抗病毒攻击。Ledizet 等^[12]在昆虫细胞中表达西尼罗病毒 E 蛋白,免疫小鼠后可获得高滴度抗体,并可保护小鼠耐受致死剂量的西尼罗病毒的攻击。Mutoh 等^[13]构建了可以持续分泌乙型脑炎病毒 E 蛋白的细胞克隆,其分泌的抗原在无佐剂的条件下可诱导小鼠产生中和抗体。

本研究将大肠杆菌表达的坦布苏病毒 E 蛋白结构域 I/II 蛋白纯化后免疫小鼠,可获得高水平特异性抗体,在随后的攻毒保护性试验中,免疫组小鼠体质量增长优于对照组,免疫组小鼠脑、肝脏、脾脏中病毒核酸含量均显著低于对照组。本研究结果表明坦布苏病毒 E 蛋白结构域 I/II 蛋白具有良好的免疫原性和免疫保护效力,可作为坦布苏病毒亚单位疫苗研制的候选抗原。

参考文献:

- [1] BAI X, LV R, LIU C, et al. Molecular characterization of a duck tembusu virus from China[J]. *Virus Genes*, 2013, 47(3):478-482.
- [2] YOUN S, CHO H, FREMONT D H, et al. A short N-terminal peptide motif on flavivirus nonstructural protein NS1 modulates cellular targeting and immune recognition[J]. *J Virol*, 2010, 84(18): 9516-9532.
- [3] KOLASKAR A S, URMILA K K. Prediction of three-dimensional structure and mapping of conformational epitopes of envelope glycoprotein of Japanese encephalitis virus[J]. *Virology*, 1999, 261(1):31-42.
- [4] MUKHOPADHYAY S, KUHN R J. A structural perspective of the flavivirus life cycle[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2005, 3(1):13-22.
- [5] HURRELBRINK R J, MCMINN P C. Molecular determinants of virulence:the structural and functional basis for flavivirus attenuation[J]. *Adv Virus Res*, 2003, 60(1):1-42.
- [6] MENDES Y S, ALVES N S, SOUZA T L, et al. The structural dynamics of the flavivirus fusion peptide-membrane interaction[J]. *PLoS One*, 2012, 7(10):e47596.
- [7] YU K, SHENG Z Z, HUANG B, et al. Structural, antigenic, and evolutionary characterizations of the envelope protein of newly emerging duck tembusu virus[J]. *PLoS One*, 2013, 8(8):e71319.
- [8] 赵冬敏,黄欣梅,刘宇卓,等. 鹅坦布苏病毒 E 蛋白质结构域 I 和 II 在大肠杆菌中的表达及鉴定[J]. *江苏农业学报*, 2014, 30(3): 590-594.
- [9] LIU M, CHEN S, CHEN Y, et al. Adapted tembusu-like virus in chickens and geese in China[J]. *J Clin Microbiol*, 2012, 50(8): 2807-2809.
- [10] HUANG X, HAN K, ZHAO D, et al. Identification and molecular characterization of a novel flavivirus isolated from geese in China[J]. *Res Vet Sci*, 2013, 94(3): 774-780.
- [11] TANG Y, GAO X, DIAO Y, et al. Tembusu virus in human, China[J]. *Transbound Emerg Dis*, 2013, 60(3):193-196.
- [12] LEDIZET M, KAR K, FOELLMER HG, et al. A recombinant envelope protein vaccine against West Nile virus[J]. *Vaccine*, 2005, 23(30):3915-3924.
- [13] MUTOH E, ISHIKAWA T, TAKAMIZAWA A, et al. Japanese encephalitis subunit vaccine composed of virus-like envelop antigen particles purified from serum-free medium of a high-producer J12# 26 cell clone[J]. *Vaccine*, 2004, 22(20):2599-2608.

(责任编辑:陈海霞)