

·论 著·

登革Ⅱ型病毒Tr1751株E蛋白基因的克隆与表达载体的构建

李东英^{1*}, 刘德辉¹, 聂清¹, 孙玉红², 王晓倩¹

1.潍坊市疾病预防控制中心, 山东 潍坊 261061; 2.潍坊市人民医院, 山东 潍坊 261061

摘要:目的 从登革Ⅱ病毒Tr1751株中克隆表达E蛋白的基因, 构建了真核表达质粒, 为其后继的关于结构和功能的研究提供了条件。方法 合成DEN2(Tr1751株)的E蛋白基因引物, 通过RT-PCR的方法扩增含有信号肽E蛋白的基因片段, 并与真核载体pIRES-hrGFP-1 α 连接, 得到重组的质粒pIRES-hrGFP-1 α -E, 再用PCR、双酶切和测序的方法进行鉴定。结果 RT-PCR得到的为1 527bp的E蛋白基因片段, 酶切鉴定和测序显示重组的质粒含有DEN2病毒中的E蛋白的基因。用重组质粒测序后与GenBank中的已知Tr1751株进行相似性比对, 核苷酸序列和推导的氨基酸序列同源性均为99%。结论 成功的构建出含有全长DEN2的E蛋白基因的真核质粒, 为登革病毒核酸疫苗的研究奠定了基础。

关键词:登革Ⅱ病毒; E蛋白; 克隆; 真核质粒

中图分类号: R512.8 文献标识码: A 文章编号: 1009-9727(2014)9-1050-05

Cloning of envelope glycoprotein of Tr1751 strain of Dengue Ⅱ virus and construction of a eukaryotic expression vector

LI Dong-ying¹, LIU De-hui, NIE Qing, SUN Yu-hong, WANG Xiao-qian

1. Weifang Municipal Center for Disease Control and Prevention, Weifang 261061, Shandong, P.R. China

Corresponding author: LI Dong-ying, E-mail: lidongying066@163.com

Abstract: Objective To construct a recombinant eukaryotic expression plasmid containing the E protein gene of dengue Ⅱ virus for studying the structure and function of E protein and providing a potential source of developing dengue subunit vaccine. Methods E protein fragment was amplified by RT-PCR using primers and then cloned into pIRES-hrGFP-1 α vector to construct the eukaryotic expression plasmid pIRES-hrGFP-1 α -E. Results The RT-PCR product was a gene fragment with 1 527bp, which is consistent with the expected size. The recombinant expression plasmid was identified and verified as correct using colony PCR and double restriction enzyme digestion. After sequencing, the recombinant plasmid had 99% similarity to the nucleotide sequence and 99% similarity to the deduced amino acid sequence of the E protein gene(Tr1751) registered in GenBank. Conclusions A recombinant eukaryotic plasmid of E protein were constructed which including of Full length DEN2 E gene. Recombinant plasmid of E protein has laid the foundation for further development of vaccines against dengue.

Key words: DEN2 virus; E proteion; Clone; Eukaryon plasmid

登革病毒(DV)为黄病毒科黄病毒属内的RNA病毒,它通过白纹伊蚊(*Aedes albopictus*)和埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)^[1]传播而引起登革热(Classical dengue fever, DF)和登革出血热/登革休克综合征(Dengue hemorrhagic fever/Dengue shock syndrome, DHF/DSS),这些疾病广泛流行于热带和亚热带地区。近年来,在东南亚和我国南方, DHF/DSS的发病率有明显增加的趋势。我国首次登革热的流行是在1978年,以后每隔几年就在南方暴发,目前已成为我国南方地区重要的传染病之一^[2]。

DEN基因组为单股正链RNA,约11kb,其病毒基因组编码三种结构蛋白(衣壳蛋白C、膜蛋白及其前体M/prM、包膜蛋白E)和七种非结构蛋白(NS1、NS2a/b、NS3、NS4a/b、NS5)。结构基因(占病毒基因组20%

以上)影响着病毒进入宿主细胞,病毒的组装和免疫反应。而E蛋白是登革病毒体上主要的包膜糖蛋白与最大的结构蛋白,分子量约为60kD,由495个氨基酸组成,在低PH的环境里,病毒包膜通过表面E蛋白的三维变构与内体膜相互融合^[3,4],释放病毒衣壳入胞质。E蛋白高级结构由Domain I、II、III组成,其中Domain I产生型特异性非中和抗体,Domain II介导病毒的膜融合并诱导产生交叉反应性中和以及非中和的单克隆抗体,Domain III为IgG免疫球蛋白样折叠,识别并结合宿主细胞表面的受体,含有诱导中和抗体的抗原表位^[5],是病毒与宿主细胞吸附的关键区域^[6]。可以用来制备亚单位疫苗和诊断试剂。M蛋白的前体为prM,是一种糖蛋白,长度为166个氨基酸。在病毒成熟过程中prM经由宿主细胞内的furin特异性剪

作者简介: 李东英(1975~),女,硕士,主管技师,研究方向:分子免疫及分子生物学。

*通讯作者: 李东英, E-mail: lidongying066@163.com

切后形成一个75个氨基酸的M蛋白,具有能作为跨膜区的疏水梭基端尾,它能增强病毒感染力^[7]。本研究拟用登革Ⅱ病毒的prM-E基因构建的真核表达重组质粒,为进一步制备登革病毒E蛋白抗体及疫苗等积累实验材料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒株、质粒、细胞株 登革Ⅱ病毒Tr1751株、真核质粒pIRES-hrGFP-1 α 、细胞株C6/36、大肠杆菌JM109菌株均由本室保存。

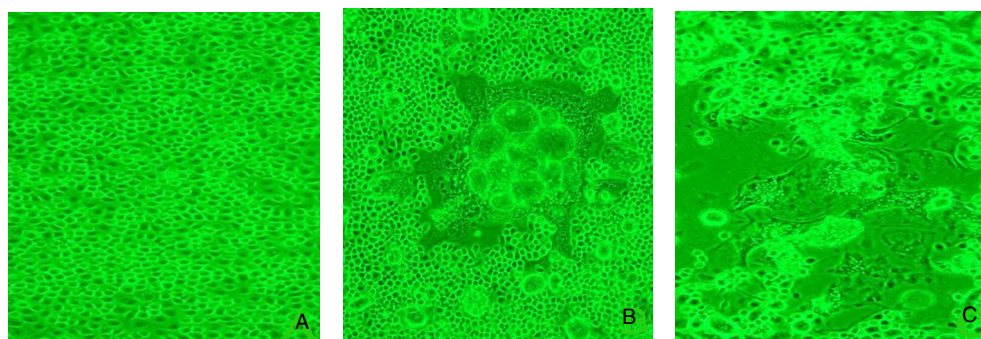
1.1.2 试剂 RT-PCR试剂和pMD-19 T simple vector为TakaRa公司产品;NotI和XhoI限制性内切酶和DNA marker均为MBI公司产品,RNeasy Mini Kit购于

德国QIAGEN公司,质粒提取试剂盒购于北京博大泰克公司。

1.2 方法

1.2.1 病毒RNA的制备 将C6/36细胞培养至单层后(见图1-A),28℃孵育18~24h,吸出培养上清,加入登革病毒液,28℃,60min。然后弃去病毒液,加入含2%小牛血清的1640培养液,28℃,5%CO₂孵箱中培养5~7d,待细胞出现变形、融合(见图1-B),死亡脱落(见图1-C)等明显细胞病变后,收取含有病毒的上清,离心去除细胞碎片后,用RNeasy Mini Kit(QIAGEN,德国)抽提病毒RNA,将获得的病毒RNA溶于40 μ L无RNA酶的水中,置于-80℃保存。

1.2.2 引物设计与合成 参照GeneBank上DENV-2



A 正常的C6/36细胞(100 \times); B 感染5d后的C6/36细胞(100 \times); C 感染7d后的C6/36细胞(100 \times)
A The normal cell of C6/36(100 \times); B Infection after 5 days of C6/36 cell(100 \times);C Infection after 7 days of C6/36 cell(100 \times)

图1 C6/36细胞感染登革病毒前后的镜下观

Fig. 1 Microscopic view of C6/36 cell infected with dengue virus before and after

病毒Tr1751株(GenBank登录号KF752596.1)中E蛋白基因序列设计真核表达扩增的引物序列如下:

上游引物 F894:5'-ATTTGCGGCCGCATGCTGATTTTCATCTTACTGAC-3',下游引物 R2421:5'-CCGCTCGAGGCCTGCACCATGACTCCCAA-3',并分别在5'端包含了NotI和XhoI酶切位点。扩增E蛋白的全长,并包括E蛋白的信号肽序列,位于整个基因组的894~2421位(见图2),长1527bp。其中GCGGCCGC为NotI酶切位点,ATG为起始密码子,ATTT为保护性碱基;CTCGAG为XhoI的酶切位点,CCG为保护性碱基。上述引物均由TaKaRa公司合成。

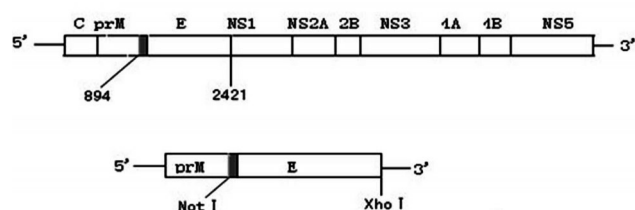


图2 扩增片段在全基因组位置

Fig. 2 The amplified fragments in genomic location

1.2.3 登革病毒E蛋白基因的RT-PCR扩增 通过

RT-PCR将提取的病毒RNA反转录成cDNA,并以此为模板,进行PCR扩增。

1.2.3.1 真核表达PCR反应参数如下 95℃预变性.5min, 94℃变性 1min, 63℃退火 1min, 72℃延伸.2min,30个循环,72℃延伸10min。反应结束后,将上述PCR产物5 μ L在1%琼脂糖电泳上分析。

1.2.3.2 E蛋白基因序列的克隆、鉴定和测序 用胶回收产物试剂盒(博大泰克,北京)将RT-PCR扩增产物回收纯化后与pMD-19 T simple vector 连接;连接产物转化JM109宿主菌,涂布于含IPTG、X-gal和氨苄西林(Amp)的琼脂平板;37℃孵育16h后,挑选白色菌落。采用质粒小量抽提试剂盒提质粒。

将含有带信号肽功能的部分prM和完整的E蛋白序列的T载体,经NotI和XhoI双酶切、PCR扩增以及测序鉴定后,回收E蛋白片断,定向插入表达载体pIRES-hrGFP-1 α 的MCS多克隆位点(见图3),将质粒命名为pIRES-hrGFP-1 α -E(见图4),序列插入的准确性分别经NotI和XhoI双酶切和PCR扩增及测序(TAKARA公司)验证。

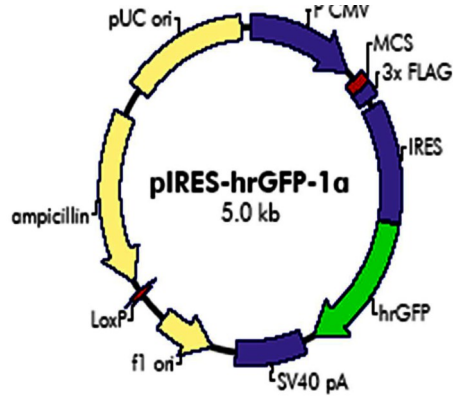


图3 真核表达质粒的图谱

Fig. 3 The map of eukaryotic expression plasmid

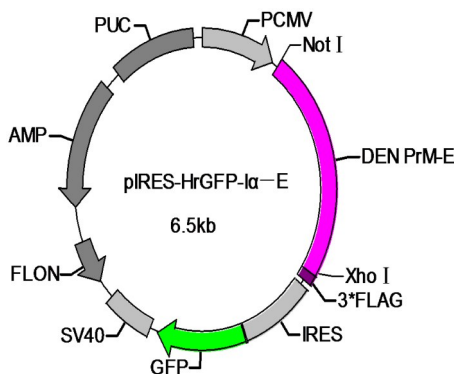
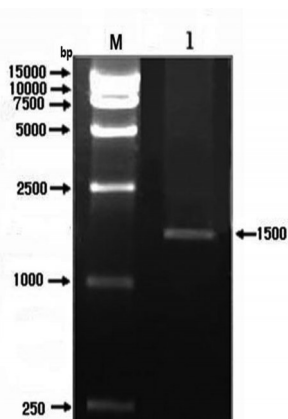


图4 构建重组质粒pIRES-hrGFP-1α-E的图谱
Fig. 4 Construction of recombinant plasmid map of pIRES-hrGFP-1α-E

2 结果

2.1 prM-E蛋白的扩增 从感染的C6/36细胞培养液中提取的RNA为模板,应用前述引物进行RT-PCR扩增,扩增出分布于Marker 1.5kb之间的特异条带(见图5),与预计长度相符。

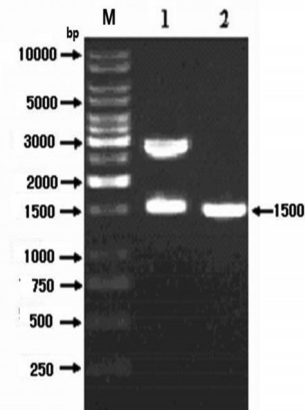


M: DNA标志物(DL-15000) ; 1 prM-E基因PCR产物
M: Marker DL15000 ; 1 PCR product of prM-E gene

图5 prM-E基因RT-PCR产物电泳鉴定
Fig. 5 RT-PCR product of the prM-E gene

2.2 prM-E蛋白与T载体相连 为了将片断酶切完全,故先将prM-E蛋白基因连入pMD19-T载体,经

NotI和XhoI双酶切和PCR扩增后,在琼脂糖凝胶电泳上鉴定,得到预期约为1500bp大小的片段(见图6)。阳性克隆测序结果与Genbank上的序列一致。



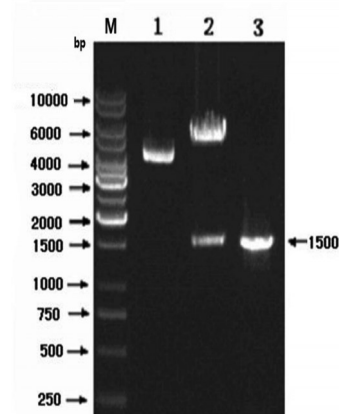
M: DNA标志物(DL-10000) ; 1 pMD19-T-prM-E NotI和XhoI双酶切 ; 2 pMD19-T-prM-E PCR产物

M: Marker DL10000 ; 1 pMD19-T-prM-E digested by NotI and XhoI ; 2 PCR product using pMD19-T-prM-E as template

图6 重组质粒pMD19-T-prM-E双酶切和PCR鉴定

Fig. 6 Identification of pMD19-T-prM-E by digestion with restriction enzyme and PCR amplification

2.3 pIRES-hrGFP-1α-E质粒的构建 将已连接目的片断的T载体进行双酶切后,克隆到真核表达载体的MCS位点。经NotI和XhoI双酶切和PCR扩增后,在琼脂糖凝胶电泳上鉴定,得预期约为1500bp大小的片段,(见图7)。阳性克隆测序结果与Genbank上序列一致。



M: DNA标志物(DL-10000) ; 1 重组质粒 pIRES-hrGFP-1α-E ; 2 pIRES-hrGFP-1α-E NotI和XhoI双酶切 ; 3 pIRES-hrGFP-1α-E的PCR扩增产物

M: Marker DL10000; 1 Recombinant plasmid pIRES-hrGFP-1α-E; 2 pIRES-hrGFP-1α-E digested by NotI and XhoI ; 3 PCR product using pIRES-hrGFP-1α-E as template

图7 重组质粒pIRES-hrGFP-1α-E双酶切及PCR鉴定
Fig. 7 The identification of pIRES-hrGFP-1α-E by digestion with restriction enzyme and PCR amplification

3 讨论

登革病毒根据其抗原性的不同分为I、II、III和IV 4个血清型,各型病毒间有抗原性交叉。

E蛋白以同源二聚体的形式分布于登革病毒颗粒的表面^[8], E蛋白具有抗原性和病毒的特异性,参与机体的保护性免疫,与宿主细胞受体选择性地结合,促使宿主细胞膜与病毒包膜融合,促进感染性的核衣壳进入细胞内,而导致感染并能影响细胞亲嗜性和病毒的毒力。因此, E蛋白在DV生物合成、感染和免疫应答过程中具有核心地位。

登革病毒的prM蛋白是抗体的主要靶点之一,该蛋白具有抗原功能区^[9],其特异性抗体除了引起感染后的免疫反应,还表现出交叉反应^[10,11]。prM蛋白有助于E蛋白的稳定和成熟^[12],当两个基因共同表达时, E蛋白才具有与天然结构类似的立体构象。prM和E蛋白在猴^[13,14]和小鼠^[15,16]的动物实验中可诱导机体产生高水平的免疫应答。因此,在登革新型疫苗研究中prM和E基因联合是重要的靶标。本研究所选取的prM-E基因片段包括完整的E蛋白、以及含有prM蛋白的信号肽序列(即C梭基端的45个氨基酸)。信号肽序列可以促进表达蛋白分泌至胞外,有报道将E蛋白的梭基端截短,其免疫原性大大降低^[15],故保留全长的E蛋白。全长的prM和E基因共同表达,可产生亚病毒样胞外颗粒(Extracellular particle, EP)^[17],这种分泌型的EP不但对动物有保护的作用^[18],还在鼠中可诱导产生中和抗体。Mahidol大学筛选出的减毒株DENV-2-PDK53构建重组质粒,分别嵌合DENV-1, -3, -4的prM-E基因^[19]。目前在动物实验水平中完成了DENV-2减毒疫苗株(PDK53)的免疫原性和安全性的检测^[20,21]。刘文权等将DENV-2的prM-E基因克隆入载体pGAPZaA,实现VLPs的高效表达,偶联prM信号肽序列的E蛋白结构基因可明显促进VLPs的胞外分泌^[22]。因此,在表达E蛋白的同时,联合prM蛋白、NS1蛋白^[23]等是重组蛋白疫苗的焦点。

载体pIRES-hrGFP-1 α 含有绿色荧光蛋白,根据GFP(Green Fluorescent Protein)的自发荧光特性,作为生物标记分子^[24-26],可用于细胞动力学和蛋白质分子定位的研究实验中。GFP作为蛋白质分子标签具有多种优势。首先,其自发荧光无需辅助分子、底物或其它试剂;其次,借助荧光显微镜便可对标记的蛋白质进行细胞内活体观察;第三,使研究靶蛋白在细胞内的功能成为可能。真核质粒的多克隆位点(MCS)的下游是3 \times FLAG的标签,可以把附加的抗原表位FLAG融合到目的蛋白上,这样通过免疫荧光染色,用

anti-FLAG的特异性抗体可以将E蛋白在细胞内进行特异性定位,以进一步研究研究E蛋白对细胞的作用以及其功能。

本实验应用基因工程技术将登革病毒的E蛋白基因连接于载体pIRES-hrGFP-1 α ,构建了真核质粒pIRES-hrGFP-1 α -E,期望获得分泌型的重组E蛋白,为深入研究E蛋白与宿主细胞的相互作用及DV疫苗等奠定基础。

参考文献

- [1] Bhatt S, Gething P, Brady O, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature*, 2013, 496(7446):504-507.
- [2] 张复春. 登革热: 一个日益严重的全球性公共卫生问题. *实用医学杂志*, 2011, 27 (19):3459-3461.
- [3] Modi Y, Ogata S, Clements D, et al. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature*, 2004, 427(6972):313-319.
- [4] Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, et al. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell*, 2002, 108(5):717-725.
- [5] Gregory D, Gromowski, Alan DT. Characterization of an antigenic site that contains a dominant, type-specific neutralization determinant on the envelope protein domain III (ED3) of dengue 2 virus. *Virology*, 2007, 366(2):349-360.
- [6] 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. *Vaccine*, 2005, 23(26):3469-3476.
- [7] Randolph VB, Winkler G, Stollar V. Acidotropic amines inhibit proteolytic processing of flavivirus prM protein. *Virology*, 1990, 174(20):450-458.
- [8] 李敏, 金侠. 登革病毒疫苗研究现状与展望. *生命的化学*, 2014, 34(1):29-38.
- [9] Wright PJ, Cauchi MR, Ng ML. Definition of the carboxy termini of the three glycoproteins specified by dengue virus type 2. *Virology*, 1989, 171(1):61-67.
- [10] Dejnirattisai W, Jumnainsong A, Qnsirisakul N, et al. Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in humans. *Science*, 2010, 328(5979):745-748.
- [11] Belramello M, Williams K, Simmons C, et al. The human immune response to dengue virus is dominated by highly cross-reactive antibodies endowed with neutralizing and enhancing activity. *Cell host microbe*, 2010, 8(3):271-283.
- [12] Allison SL, Stadler K, Mandel CW, et al. Synthesis and secretion of recombinant tick-borne encephalitis virus protein E in soluble and particulate form. *J Virol*, 1995, 69(9):5816-5820.
- [13] Raviprakash K, Porter KR, Kochel TJ, et al. Dengue virus type 1 DNA vaccine induces protective immune responses in rhesus macaques. *J Gen Virol*, 2000, 81(7):1659-1667.
- [14] Kochel TJ, Raviprakash K, Hayes CG, et al. A dengue virus serotype-1 DNA vaccine induces virus neutralizing antibodies and provides protection from viral challenge in Aotus monkeys. *Vaccine*, 2000, 18(27):3166-3173.
- [15] Raviprakash K, Kochel TJ, Ewing D, et al. Immunogenicity of dengue

(下转第1070页)