DOI:10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2003.0068

登革2型病毒重组E蛋白的生物学特性分析

魏惠永[1,2], 江丽芳[1], 曾祥凤[1], 方丹云[1], 郭辉玉[1]
(1. 中山大学中山医学院微生物学教研室, 广东 广州 510080;
2. 广东省人民医院医学实验中心, 广东 广州 510080)

摘 要:【目的】检测重组D2V全长E蛋白纯化后的免疫反应性与抗原性,为其亚单位疫苗研制奠定基础。【方法】酵母表达上清超滤浓缩后用金属螯合亲和层析(MCAC)法过柱,用十二烷基硫酸钠—聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)技术观察蛋白条带。将纯化蛋白与组氨酸抗体、D2V E单抗进行斑点印迹和蛋白印迹,以确定纯化物是否为含组氨酸尾的D2V E融合蛋白,并用ELISA检测纯化E蛋白与不同DV抗体的结合反应。用纯化的重组D2V E蛋白免疫小鼠后测定其产生的抗体类型与滴度,以分析其抗原性。【结果】表达产物经MCAC柱纯化获得单一的相对分子质量为69×10^3的蛋白,组氨酸抗体与D2V E单抗的印迹试验证实该条带就是含多聚组氨酸尾型特异的重组E蛋白(rEgp), ELISA显示纯化的rEgp保留有免疫反应性及型特异性,内糖苷酶H消化证实其含有*N*联高甘露糖残基。接种rEgp可诱生针对D2V抗原与重组E蛋白的高效抗体。【结论】纯化的D2V全长E蛋白保留其免疫原性和免疫反应性,并具有型特异性。

关键词:登革热病毒; 膜糖蛋白类; 重组蛋白质/分离与纯化; 抗体
中图分类号:R373.3 **文献标识码**:A **文章编号**:1672-3554(2003)03-0214-03

Analysis of Properties of the Purified Recombinant D2V E Glycoprotein

WEI Hui-yong[1,2], JIANG Li-fang[1], ZENG Xiang-feng[1], FANG Dan-yun[1], GUO Hui-yu[1]
(1. Department of Microbiology, Zhongshan Medical College, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China;
2. Medical Laboratory Center, Guangdong Provincial People's Hospital, Guangzhou 510080, China)

Abstract:【Objective】To evaluation of the immunoreactivity and immunogenicity of the purified recombinant D2V envelope glycoprotein expressed in Pichia pastoris for developing a subunit vaccine against DV infection.【Methods】The D2V rEgp expressed by the yeast cells was concentrated by ultrafiltration and then purified by passing a metal-chelating affinity chromatographic (MCAC) column. The property of the resultant protein was analyzed by dot blotting and Western blotting using QIA express anti-His antibodies and D2V E-specific McAb. The reactivity of the purified rEgp was also identified using different DV McAb by solid-phase ELISA. Aalysis of glycosylation of purified recombinant E protein was performed by endoglycosidase H treatment. Mice immunized with the purified rEgp was detected its responsible antibody.【Results】The purified E-poly (His) -tagged fusion protein with a molecular size of approx. 69×10^3 was obtained from the expressed product using MCAC. The purified rEgp could bind specifically to His antibody and anti-D2V E-McAb in dot-blot and western-blot assay. This purified rEgp was able to bind with mouse polyclonal D2V antibody and anti-D2V E-McAb in solid-phase ELISA. Treatment with endoglycosidase H showed that the recombinant E protein was modified by the addition of short mannose chains via *N*-linked glycosylation. Immunization of mice with the purified rEgp produced high levels of anti- D2V antibody response.【Conclusions】This study shows that the affinity-purified E glycoprotein is D2V type specific and retained its immunoreactivity and immunogenicity.

收稿日期:2002-11-13
基金项目:广东省自然科学基金资助项目(201036)
作者简介:魏惠永(1964-),男,江西安远人,在职博士生,助理研究员. E-mail: hywei 2002@yahoo.com.cn

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Key words: dengue virus; membrane glycoproteins; recombinant proteins / isolation and purification; antibody

[J SUN Yat-sen Univ(med Sci), 2003, 24(3): 214 ~ 216,220]

登革病毒(dengue virus, DV)借蚊媒传播,引起易感者的登革热及严重的登革出血热/休克综合症(DHF/DSS)。作为 DV 最大的结构蛋白与主要包膜糖蛋白,E 蛋白(envelope glycoprotein, Egp)包含多种重要的生物学活性与复杂的抗原表位,并在病毒吸附、致病及诱导免疫保护中起关键作用[1,2]。许多学者用不同表达系统获得重组 E 蛋白,并对其生物学特性及动物免疫保护效果进行分析,促进了 DV 发病机制及其亚单位疫苗的研究。本实验以 *P. pastoris* 酵母成功表达 D2V 全长 E 蛋白(rEgp)为基础,分析纯化后 E 蛋白的免疫反应性,并通过动物免疫试验检测其抗原性。

1　材料与方法

1.1　抗　体

1 ~ 4 型 DV E 单抗由美国疾病预防控制中心(CDC)惠赠,D2V NS1 单抗、D2V 多抗血清由本室制备,组氨酸单抗试剂盒购自 Qiagen 公司,HRP-羊抗鼠 IG 购自武汉博士德公司。

1.2　D2V E 蛋白的表达

参照本室的报道进行[3]。

1.3　E 蛋白超滤纯化

将鉴定有 D2V E 蛋白分泌表达的酵母转化菌进行规模培养,低温离心收集其上清进行超滤,取浓缩液冰浴下用金属螯合亲和层析(MCAC)法过柱纯化(安玛西亚, His Trap Kit),十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶纯泳(SDS-PAGE)技术确定洗脱峰,分光光度计测定 A_{260}/A_{280} 值以计算纯化后的蛋白含量。

1.4　斑点印迹与蛋白印迹

取 1 μL 纯化物点样于硝酸纤维素(NC)膜,按常规斑点免疫印迹法与组氨酸抗体进行结合;纯化物 SDS-PAGE 电泳后转印 NC 膜,与组氨酸抗体、D2V E 单抗进行蛋白印迹。

1.5　酶联免疫吸附试验

以纯化的重组 E 蛋白包被酶标板,按常规方法与不同的 DV 单抗/多抗反应,底物 ABTS(安玛西亚)显色后测定吸光值(A_{405})。

1.6　糖基分析

参照 NEB 的操作手册用内糖苷酶 H(endoglycosidase H)消化 D2V rEgp,SDS-PAGE 观察蛋白条带的改变。

1.7　动物免疫及其抗体测定

重组 E 蛋白加弗氏佐剂按常规方法免疫 6 ~ 8 周龄的昆明鼠(本校实验动物中心提供),间隔 2 周加强免疫 3 次,末次加强后 2 周取血分离免疫血清。按常规 ELISA 法检测免疫鼠血清与包被的 D1V、D2V 抗原及纯化 rEgp 的反应,确定抗体效价。

2　结　果

2.1　SDS-PAGE

超滤浓缩液见蛋白条带显著增强,MCAC 纯化洗脱液保留单一的相对分子质量为 69×10^3 的蛋白带,其它蛋白条带基本消失,由于酵母表达的 D2V 全长 E 蛋白的相对分子质量理论值约为 68×10^3,故本结果初步显示 MCAC 能有效地纯化表达产物中的 D2V E 融合蛋白(图 1)。

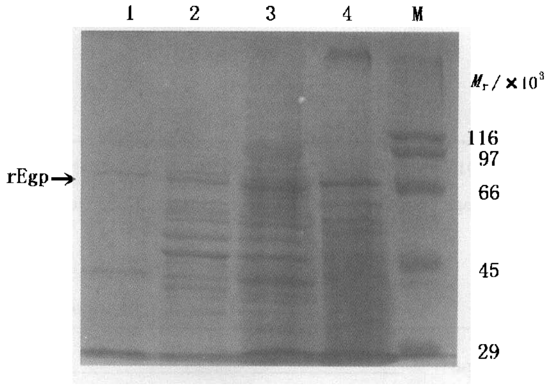

图 1　SDS-PAGE 分析 MCAC 纯化前后的 D2V E 蛋白

Fig. 1　SDS-PAGE of expressed D2V Egp before and after MCAC purification

1: purified rEgp by MCAC; 2: expressed supernatant; 3: sample after ultrafiltration; 4: *Pichia* cell lysate; M: markers

2.2　斑点结合与蛋白印迹

与组氨酸抗体的斑点结合试验为阳性,提示 MCAC 纯化蛋白含组氨酸尾。纯化蛋白与组氨酸抗体和 D2V E 单抗的蛋白印迹均在相对分子质量为 69×10^3 的位置出现阳性反应带(图 2),表明经 MCAC 纯化获得的相对分子质量为 69×10^3 的蛋白质就是含组氨酸尾的 D2V 全长 E 融合蛋白,并具有免疫反应性。

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

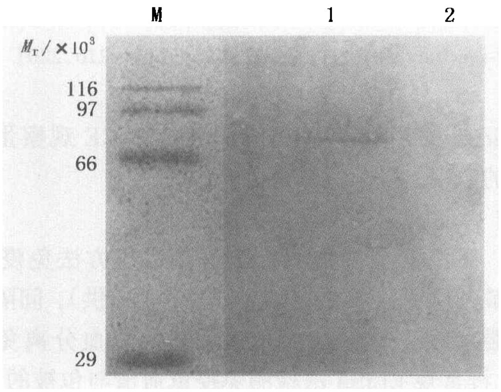

图 2 纯化蛋白与 D2V E 单抗的蛋白印迹结果

Fig. 2 Western blotting of the purified rEgp with anti-D2V E McAb

M: marker; 1: purified rEgp; 2. negative control

2.3 ELISA

纯化 E 蛋白仅与 D2V E 单抗、D2V 多抗酶联反应为阳性,其最高稀释度分别为 1:1 280,1:640,与其它 3 型 DV E 单抗及 D2V NS1 单抗无交叉,表明本实验纯化获得的全长 D2V E 蛋白具有免疫反应性和型特异性(表 1)。

2.4 糖基化检测

SDS-PAGE 见内糖苷酶 H 消化后 E 蛋白相对分子质量减少约 5~6×10³,提示该蛋白糖基化类型为 N 联高甘露糖残基。

2.5 诱生抗体

D2V 与纯化 rEgp 为抗原检测鼠免疫血清的效价≥1:1 280,D1V 抗原测定血清抗体滴度分别为 1:160,表明获得的纯化 rEgp 具有免疫原性,可诱导免疫鼠产生 D2V 型特异的高效抗体(表 2)。

表 1 纯化的 D2V E 蛋白与不同 DV 抗体的 ELISA 结果

Table 1 ELISA results of the D2V rEgp reaction to different DV antibodies

Ab type	Ab of different dilution							
	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1 280
1E	-	N						
2E	+	+	+	+	+	+	+	+
NS1	-	N						
PA	+	+	+	+	+	+	+	-
3E	-	N						
4E	-	N						

1E: D1V E-McAb; 2E: D2V E-McAb; NS1: D2V NS1-McAb; PA: D2V polyclonal Ab; 3E: D3V E-McAb; 4E: D4V E-McAb, +: positive value, -: negative value, N: no detect, Blank: PBS, Negative control: normal mouse sera

表 2 重组 E 蛋白免疫鼠的抗体水平测定

Table 2 Antibody response in mice vaccinated by purified rEgp

Ag type	Immunized sera of different dilution								
	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2 560
D1V	+	+	+	+	+	-	-	-	N
D2V	+	+	+	+	+	+	+	+	N
rEgp	+	+	+	+	+	+	+	+	N

Ag coated 1μg/well, +: positive value, -: negative value, N: no detect

3 讨 论

通过基因工程技术获得 DV 重组 E 蛋白质已屡见报道。然而,多数学者采用原核系统或真核的杆状病毒体系表达截断的 E 蛋白[4,5],对获得的 E 蛋白结构和功能有一定的影响,表达产物纯化过程较为复杂,其动物免疫效果也不够理想。因此,有必要选择其它真核系统表达全长的具有完整生物学特性的 DV E 蛋白。本实验以毕赤氏酵母菌(*Pichia pastoris*)成功分泌表达 D2V E 蛋白为基础,利用表达的融合蛋白含有六聚组氨酸尾的特性用 MCAC 法进行纯化,通过蛋白印迹与 ELISA 证实相对分子质量为 69×10³ 的纯化物就是具有免疫反应性与型特异性的 D2V 全长 E 蛋白,这表明该纯化的重

(下转第 220 页 to page 220)

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

本实验表明在PDVI引起的曲张大隐静脉中，DMN的含量明显少于正常静脉组织，同时其编码基因的表达水平也显著下调。虽然DMN的具体功能和在此所起的作用还不清楚，但是这一结果至少说明DMN与该疾病的发生发展过程有关。鉴于PDVI的原发部位－股浅静脉也存在着与曲张大隐静脉相似的形态学改变，所以DMN可能在PDVI的发生发展中也起着一定的作用。

对于DMN与大隐静脉曲张乃至PDVI本身的确切关系，我们将继续进行深入研究。

参考文献:

[1] 张柏根．原发性下肢深静脉瓣膜关闭不全［A］．见：吴在德．外科学［M］．第5版．北京：人民卫生出版社，2000. 687～689.

[2] 王深明，胡作军，黄雪玲．下肢深静脉瓣膜重建术的疗效评价［J］．中国实用外科杂志，2001，21(5)：273.

[3] Mizuno Y, Thompson T G, Guyon J R, *et al.* Desmuslin, an intermediate filament protein that interacts with alpha -dystrobrevin and desmin[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98 (11): 6156.

[4] Lodish H, Baltimore D, Berk A, *et al.* Molecular cell biology[M]. New York: Scientific American Books, 1995. 1106～1116.

[5] Bellin R M, Sernett S W, Becker B, *et al.* Molecular characteristics and interactions of the intermediate filament protein synemin. Interactions with alpha－actinin may anchor synemin-containing heterofilaments[J]. J Biol Chem, 1999, 274(41): 29493.

[6] Hemken P M, Bellin R M, Sernett S W, *et al.* Molecular characteristics of the novel intermediate filament protein paranemin. Sequence reveals EAP-300 and IFAPa-400 are highly homologous to paranemin[J]. J Biol Chem, 1997, 272(51): 32489.

[7] Hemmati B A, Mann R W, Harland R M. A protein expressed in the grouth cones of embryonic vertebrate neurons defines a new class of intermediate filament protein [J]. Neuron, 1992, 9(3): 417.

[8] Lendahl U, Zimmerman L B, McKay R D G. CNS stem cells express: a new class of intermediate filament protein [J]. Cell, 1990, 60(4): 585.

（编辑 张敏瑞）

(上接第216页 from page 216)

组E蛋白保留了其生物学活性，为今后重组E蛋白的大规模生产及其亚单位疫苗的研制提供了有利条件。

用针对*N*-联甘露糖链的内糖苷酶H处理重组E蛋白显示，其相对分子质量减小$(5\sim6)\times10^3$，提示该重组E蛋白被添加的高甘露糖残基修饰，与*P. pastoris*正常加工糖基化的E蛋白相符[6]。另一方面，动物免疫试验显示，纯化的重组E蛋白可诱导鼠产生D2V型特异的高滴度抗体，其作用类似于灭活的D2V疫苗，表明该重组E蛋白具有免疫原性，但对同型病毒攻击的保护作用有待验证。

由于该酵母系统表达产物无超糖基化现象[7]，分泌的重组E蛋白纯化方法简便，获得的全长蛋白具有较完整的生物学特性，对于发展DV亚单位疫苗具有诱人的前景。

参考文献:

[1] Leclerc C, Derlaud E, Megret E, *et al.* Identification of helper T cell epitopes of dengue virus E-protein [J]. Molec Immunol, 1993, 30(7): 613.

[2] 闻玉梅．现代医学微生物学［M］．上海：上海医科大学出版社，1999. 1117～1143.

[3] 魏惠永，江丽芳，薛耀华，等．登革2型病毒E蛋白在酵母菌中的分泌表达[J]．中国病毒学，2002，17(3)：198.

[4] Simmons M, Nelson W M, Wu S J, *et al.* Evaluation of the protective efficacy of a recombinant dengue envelope B domain fusion protein against dengue 2 virus infection in mice [J]. Am J Trop Med Hye, 1998, 58(5): 655.

[5] Staropoli I, Frenkiel M P, Megret F, *et al.* Affinity-purified dengue-2 virus envelope glycoprotein induces neutralizing antibodies and protective immunity in mice [J]. Vaccine, 1997, 15(19): 1946.

[6] Sugrue R J, Cui T, Xu Q, *et al.* The production of recombinant dengue virus E protein using *Escherichia coli* and *Pichia pastoris* [J]. J Virol Methods, 1997, 69(1－2): 159.

[7] Grinna L S, Tshhopp J F. Size distribution and general structural features of *N*-linker oligosaccharides from the methylotropic yeast *Pichia pastoris* [J]. Yeast, 1989, 5(1): 107.

（编辑 张敏瑞）

(C)1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net