

埃博拉病毒重组膜蛋白 Gp-Fc 表达及免疫原性研究

张晓光¹, 杨韧², 王娇¹, 王轩¹, 侯美玲¹, 安丽娜², 朱莹², 曹玉玺^{1*}, 曾毅^{1*}

(1. 中国疾病预防控制中心 病毒病预防控制所 卫生部医学病毒和病毒病重点实验室, 北京 100052;

2. 北京工业大学 生命科学与生物工程学院, 北京 100124)

摘要:本研究利用 HEK293F 细胞表达了埃博拉病毒重组膜蛋白, 并通过免疫小鼠初步研究了其免疫原性。按照人密码子使用频度优化编码埃博拉病毒膜蛋白胞外区基因, 合成后将其插入到真核表达载体 pXG-Fc 中, 构建埃博拉病毒糖蛋白和人 IgG Fc 片段融合蛋白表达质粒 pXG-modGP-Fc。利用瞬时转染技术, 将融合蛋白表达质粒转染到高密度培养的悬浮 HEK293F 细胞中, 实现了分泌表达。通过 Protein A 亲和层析, 得到了纯化的重组蛋白。将纯化的融合蛋白免疫小鼠, 并通过间接 ELISA 对小鼠抗体效价进行评价。蛋白纯化及分析结果表明, 本研究构建的真核表达系统能够有效表达埃博拉重组蛋白 GP-Fc, 细胞培养上清中重组蛋白以二聚体形式存在。通过间接 ELISA 分析, 纯化的重组蛋白免疫实验动物后, 可以在血清中检出高滴度的抗原特异性 IgG, 显示该重组蛋白具有良好的免疫原性。通过该研究, 我们得到了具有良好免疫原性的重组蛋白, 同时, 该工作为研制基于重组蛋白的埃博拉疫苗以及筛选单克隆抗体打下基础。

关键词:埃博拉病毒; 疫苗; 糖蛋白; 免疫原性

中图分类号: R373.3⁺2 文献标识码: A 文章编号: 1000-8721(2016)01-0008-06

DOI:10.13242/j.cnki.bingduxuebao.002861

埃博拉病毒(Ebola Virus, EBOV)于1976年在苏丹和刚果共和国被首次发现后, 在非洲多次暴发小规模疫情, 但是因为每次传播范围小, 时间短, 没有造成大量人员感染和死亡, 没有引起足够重视。2014年始于西非的埃博拉疫情^[1], 是埃博拉病毒被发现以来最为严重的一次, 据 WHO 统计, 目前已经超过2万人感染, 死亡病例超过1万例。埃博拉病毒病是由丝状病毒科(*filoviridae*)的埃博拉病毒感染引起的疾病。埃博拉病毒与马尔堡病毒和拉沙热病毒同属于生物安全四级病毒, 是最危险的病原微生物之一。埃博拉病毒有五个亚型^[2], 分别为扎伊尔型(Zaire ebolavirus)、苏丹型(Sudan ebolavirus)、本迪布焦型(Bundibugyo ebolavirus)、塔伊森林型(Tai Forest ebolavirus)和莱斯顿型(Reston ebolavirus)。前四个亚型对人的致病性依次减弱, 莱斯顿型目前还没有人感染致病的报道。其中扎伊

尔型和苏丹型可以引起人类严重疾病, 其特点是起病急, 死亡率高, 感染病例的死亡率在25%到90%之间。

埃博拉病毒4号基因编码两种蛋白, 一种是非结构蛋白sGP, 另外一种是非结构蛋白GP。sGP蛋白N端295个氨基酸与GP蛋白相同, 但是sGP缺乏穿膜区, 为游离蛋白。结构蛋白GP含有Furin酶切位点, 可以裂解为GP1和GP2, 其中GP2为穿膜蛋白, 通过二硫键与GP1相连接。GP1和GP2以3聚体的形式聚集在病毒包膜上, 负责与受体结合, 启动病毒侵入细胞^[3]。有研究结果表明, 用埃博拉膜蛋白(GP)免疫小鼠, 即可以激发小鼠产生保护抗体^[4]。本研究人工合成了编码埃博拉膜蛋白胞外区域的基因, 构建真核表达载体。利用瞬时转染技术, 在高密度培养的293细胞中表达了重组埃博拉膜蛋白。使用通过ProteinA纯化的重组蛋白免疫小鼠, 间接ELISA结果显示, 重组蛋白激发出了较高水平的特异性抗体。本研究为研制基于重组蛋白的埃博拉疫苗、筛选鼠源中和抗体打下基础。

材料与方法

1 材料

悬浮 HEK293F 细胞和培养基 Freestyle 293 Expression Medium 购自 Life 公司; pXG-Fc 为本室自行构建的真核表达质粒; 25 kD PEI 购自 Poly-Science 公司; Protein A 为 GE 公司产品; 小鼠免疫

收稿日期: 2015-11-23; 修回日期: 2016-01-04

基金项目: 艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治项目; 重大传染病应急检测技术平台(2013ZX1004-101); 埃博拉出血热防控应急研究(1061400100275)

作者简介: 张晓光, 杨韧并列第一作者。张晓光(1975-), 男, 副研究员, 从事病原微生物学研究, Tel: 010-63552662, Email: xg-zhang01@163.com; 杨韧(1991-), 男, 北京工业大学生命科学与生物工程学院, 硕士研究生, Tel: 010-63552662, Email: kindyr@126.com

* 通讯作者: 曹玉玺(1977-), 男, 副主任技师, 从事病原微生物研究和生物安全管理, Tel: 010-58900679, Email: yuxicao@hotmail.com; 曾毅(1938-), 男, 中国科学院院士, 从事病毒学研究, Tel: 010-63544432, Email: zengyicdc@sina.com

佐剂 Quick Antibody-Mouse 为博奥龙公司产品; BALB/C 小鼠购自北京万德锐志生物科技有限公司; ELISA 板为 Nunc 产品; 辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG 二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 质粒提取试剂盒为 Qiagen 公司产品; VPA 购自 Sigma 公司。

2 埃博拉病毒糖蛋白 Fc 融合蛋白 (EBOV Gp-Fc) 表达质粒的构建

选取埃博拉 1976 Zaire (GenBank accession no. U23187) Gp 基因作为模板, 按照人密码子使用频率, 优化编码 34~637 位氨基酸的基因。为提高 GP 蛋白在真核细胞中的表达量并增加重组蛋白稳定性, 在下游添加人 IgG Fc 片段。同时, 为使重组蛋白分泌到培养基中, 在上游添加编码人血清白蛋白信号肽的序列, 并在两端添加 *Not* I 和 *Hind* III 酶切位点。通过双酶切, 将序列插入到 pXG-Fc 表达质粒中, 构建 pXG-modGP-Fc 真核表达质粒。将构建的表达载体转化大肠杆菌 DH5 α 后, 提取质粒, 双酶切及测序以验证插入序列是否正确。

3 埃博拉病毒糖蛋白 Fc 融合蛋白 (EBOV Gp-Fc) 表达及纯化

表达质粒转化大肠杆菌 DH5 α 后, 使用 Qiagen Maxi DNA 提取试剂盒大量制备表达质粒。

使用不含血清的 Freestyle 293 Expression Medium 悬浮培养 HEK293F 细胞。将含有 HEK293F 细胞的一次性细胞培养三角瓶固定到细胞培养摇床上, 转速 130rpm, 37 $^{\circ}$ C, 8% CO $_2$, 旋转培养。选取处于对数生长期的细胞, 转染前细胞计数, 离心后用新鲜的 Freestyle 293 Expression Medium 重悬细胞, 并调整到 1×10^6 细胞/mL, 按照 30mL 每瓶接种到 125 三角瓶中。次日进行质粒 DNA 转染。按照说明书配制 1mg/mL PEI。在 2 只 15mL 尖底离心管中分别加入 2.5mL Freestyle 293 Expression Medium, 在一只离心管中加入 45 μ g 质粒 DNA, 立刻混匀; 在另一只离心管中加入 90 μ g 1mg/mL PEI, 立刻混匀。将两只离心管中的液体合并, 混合均匀后室温放置 15 min, 然后滴加到 30mL 悬浮培养细胞中。转染结束后, 继续悬浮培养。转染次日补加十分之一体积的培养基, 并加终浓度为 3.8mmol/L 的 VPA。5 日后 2 000rpm 离心 8min, 收集上清。

上清使用 Protein A 预装柱进行纯化。具体方法参见产品说明书。纯化得到的蛋白分别用还原和非还原 SD-PAGE 电泳分析蛋白分子量和聚集状态。

4 小鼠免疫及间接 ELISA 法检测重组蛋白免疫原性

将 16 只 6-8 周龄 BALB/c 小鼠分为免疫组、佐剂对照组和 PBS 对照组三组。其中免疫组 10 只, 两组对照组各 3 只小鼠。按照博奥龙公司 Quick-Antibody-5W 免疫佐剂使用说明, 将纯化的重组蛋白 EBOV Gp-Fc 与佐剂预混合后肌肉注射小鼠, 其中 5 只为 12.5 μ g 每只, 5 只为 20 μ g 每只。其余两组分别注射同样体积的佐剂和 PBS。2 周和 5 周按照同样的方法进行第二次注射。每隔 7 天眼眶采血。使用纯化的重组蛋白 EBOV Gp-Fc 作为检测抗原制备 ELISA 板, 取 100 μ l 倍比稀释小鼠血清加入到反应孔中, 37 $^{\circ}$ C 温育 1h, PBST 清洗 5 次后加入 HRP 标记羊抗鼠 IgG 抗体 (1:7 500 稀释), 37 $^{\circ}$ C 温育 1h, PBST 洗涤 5 次后, 加入 TMB 显色, 酶标仪以 630nm 为参照测定 450nm 吸收值。吸光度大于等于空白对照孔的 2.1 倍判断为阳性。

结 果

1 EBOV Gp-Fc 表达质粒构建

按照人密码子使用频率优化并合成的埃博拉病毒 Gp 核酸长度为 1 878bp, 下游融合人 IgG 抗体 Fc 片段, 在两端添加酶切位点后, 插入表达载体。构建的载体用 *Not* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定, 电泳结果显示构建载体酶切后的 DNA 片段与预期分子量一致。测序结果显示, 插入序列和表达载体正确。

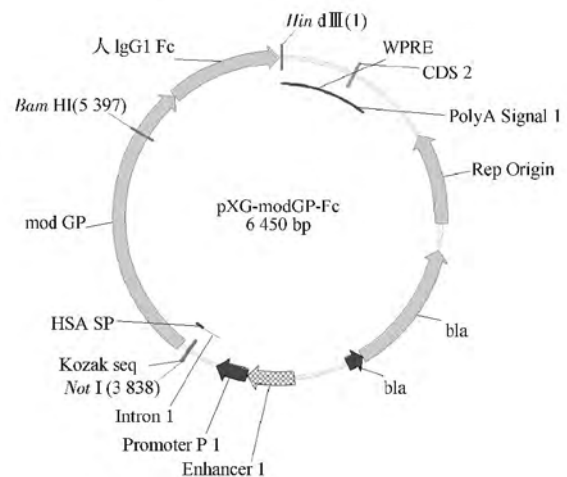


图 1 Ebola GP-Fc 重组蛋白表达质粒构建图
Figure 1 Construction of the GP-Fc expression plasmid of the Ebola virus

2 EBOV Gp-Fc 及纯化

重组蛋白 GP-Fc 在 120mL 浓度 2×10^6

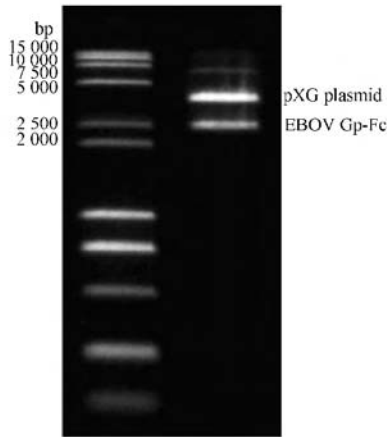
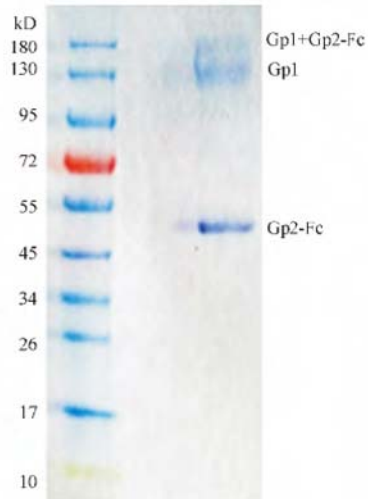


图 2 重组 EBOV Gp-Fc 表达质粒酶切鉴定图
Figure 2 Expression of the plasmid by enzyme digestion of *Not* I and *Hind* III

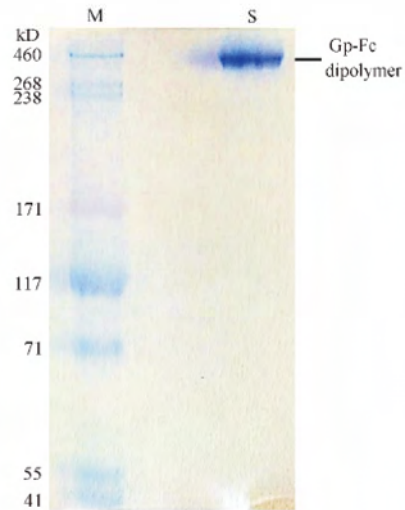
cells/mL HEK293F 细胞中表达。应用 ProteinA 亲和和柱层析技术纯化,获得目的蛋白。包含目的蛋白的洗脱液经透析后使用 eppendorf BioPhotometer 紫外吸收仪确定蛋白浓度。透析后洗脱液 6.5mL,测得蛋白质浓度为 0.11mg/mL。重组蛋白浓缩后,使用还原 SDS-PAGE 电泳分析纯化结果。电泳结果显示出 3 条电泳条带。由于 GP1 和 GP2 之间存在 Furin 酶切位点,因此,部分表达产物裂解为 GP1、GP2-Fc,没有裂解的重组蛋白为全长的 GP1-GP2-Fc。因此,从上往下蛋白条带依次为:未裂解的 GP1-GP2-Fc、GP1、GP2-Fc。由于蛋白表面存在大量糖基化,GP1 及 GP-Fc 出现轻度弥散情况(图 3)。表达的重组蛋白可以通过 Fc 片段自发形成二聚体,非还原 SDS-PAGE 电泳结果显示,在没有还原剂的情况下,二聚体分子量接近 460 kD(图 4)。由此可见,重组蛋白分子量大小与预期完全一致,纯化得到的蛋白即为 EBOV Gp-Fc 重组蛋白。

3 重组蛋白免疫原性评价

实验鼠在 0 周、3 周和 6 周接受免疫。每次免疫一周后采血,使用间接 ELISA 方法进行抗体结合效价检测。第一次免疫 7 日后,结合效价即可以超过 1:5k,证明重组蛋白 EBOV Gp-Fc 在较短时间内即可以激发小鼠的免疫应答反应,使其产生特异性抗体;第二次免疫后,小鼠血清抗体效价明显提升,35d 检测结果显示,血清结合效价超过第一次免疫 7d 后效价的 50 倍。在第 35d 时,血清中特异性多抗的效价可以达到 1:500k。可见重组蛋白可以激发小鼠产生较强的免疫应答,是理想的免疫原。结果如图 5。



M: protein Standard; S: purified Gp-Fc of the Ebola Virus
图 3 纯化后重组蛋白 EBOV Gp-Fc SDS-PAGE 检测
Figure 3 Reduced SDS-PAGE for purified recombinant protein Gp-Fc of the Ebola virus



M: high-molecular-weight protein standard; S: recombination protein Gp-Fc of the Ebola virus
图 4 重组蛋白非还原 SDS-PAGE 分析
Figure 4 Characterization of GP-Fc fusion protein by non-reduced SDS-PAGE

讨 论

埃博拉病毒感染会引起严重的疾病,如果得不到及时治疗,死亡率很高。埃博拉病毒病于 1976 年在苏丹和刚果共和国同时暴发。2014 年以前,埃博拉病毒虽然在非洲有过数次流行,但是由于波及范围小、感染人数少,一直没有引起足够重视。2014

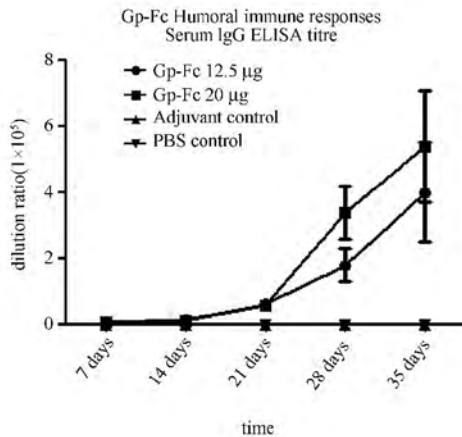


图5 GP-Fc 诱发的体液免疫反应

Figure 5 Humoral immune responses in BALB/c mice vaccinated with GP-Fc

年初,暴发了有史以来最为严重的一次埃博拉疫情。2014年3月,几内亚首先发现了埃博拉感染病例,随后埃博拉疫情很快蔓延到塞拉利昂、利比里亚、马里、塞内加尔等国家。由于卫生系统薄弱,几内亚、塞拉利昂和利比里亚的埃博拉疫情很快处于失控状态,感染病例数快速上升。根据WHO统计,截止2015年底,此次埃博拉暴发已经造成了超过28000感染病例,死亡超过11300人,病例最多的三个国家分别为:塞拉利昂、利比里亚和几内亚。除疫情最严重的西非三国以外,受到影响的国家还包括美国、英国、意大利、西班牙等欧美国家。

美国、加拿大的研究团队很早就开展了埃博拉疫苗的研究^[5-6]。美国Lupton在1980年就开展了灭活病毒疫苗研究^[7]。但是由于需要进行病毒培养,风险高,存在安全性的问题,灭活病毒疫苗很难大规模使用。除灭活病毒疫苗以外,还有重组亚蛋白疫苗、DNA疫苗、病毒载体疫苗等^[4, 8-10]。其中两种病毒载体疫苗走在了前面。一种是基于黑猩猩的腺病毒载体疫苗cAd3-EBOV;另一种是加拿大公共卫生局构建的基于重组水疱性口炎病毒的rVSVΔG-EBOV-GP。这两种疫苗都可以在攻毒试验中完全保护实验动物^[9]。2015年,这两种疫苗率先在非洲开展了临床试验。最近的研究临床结果表明,rVSVΔG-EBOV-GP可以保护埃博拉感染者密切接触者人群^[11]。无论是重组腺病毒载体疫苗还是重组水疱性口炎病毒疫苗,虽然都取得了较好的保护效果。但是为保证重组病毒疫苗活性,这些疫苗的保存、运输条件较为苛刻,要求冷链运输;另外,重组病毒大量制备工艺要求相对较高。埃博拉疫情

的数次暴发均发生在非洲大陆,大部分非洲国家卫生系统薄弱,不具备冷链运输条件。因此,疫苗是否易于保存、运输,是决定疫苗能否在非洲大规模应用必须要考虑的因素之一。2011年有研究结果表明,重组蛋白疫苗免疫动物后,可以保护致死剂量病毒攻击^[4]。同时,重组蛋白相比重组病毒更容保存。因此,研发基于重组蛋白的埃博拉疫苗更适合发展中国家。

病毒膜蛋白GP全长676个氨基酸。GP蛋白在福林蛋白酶的作用下裂解为GP1和GP2,二者通过二硫键形成异源二聚体。其中GP2亚基通过 α 螺旋穿过病毒包膜,将二聚体固定在膜上。GP1具有多个糖基化位点,含有与细胞受体结合的区域,是介导病毒感染的关键蛋白。与病毒编码的其他蛋白相比,GP蛋白具有良好的免疫原性,可以激发保护性中和抗体。有研究表明,单独使用GP蛋白免疫动物,既可以保护受试动物免于致死EBOV的攻击。近年来,真核表达技术有了很大的发展,特别是基于悬浮HEK293F细胞培养的瞬时转染技术的进步,可以使研究者避免挑选高表达细胞株,快速制备大量目标蛋白。在传染病防控领域应用该技术,可以快速研制用于诊断和疫苗的重组蛋白。与原核表达的重组蛋白相比,通过瞬时转染技术得到的真核重组蛋白,具有糖基化修饰和正确的三维结构,具有更好的生物学活性。本课题组首先根据人类密码子使用频度,合成了编码埃博拉膜蛋白胞外区34~637位氨基酸的基因,然后将其插入到本研究室构建的真核表达质粒pXG-Fc中。通过瞬时转染悬浮培养的HEK293F细胞,得到了埃博拉膜蛋白和Fc片段融合蛋白。重组抗原免疫BALB/C小鼠的结果显示,12.5 μ g和20 μ g剂量组均激发出高水平的特异性结合抗体。三次免疫后,血清中结合抗体滴度均接近1:500K。由于埃博拉病毒传播的特殊性质,在发现一例确诊感染病例后,需要对感染者的密切接触者进行紧急免疫接种,要求在尽可能短的时间产生保护抗体。我们制备的重组抗原,在免疫小鼠7d后,血清中抗体效价即可以超过1:5K。综上所述,该重组蛋白具有很好的免疫原性。在后续工作中,我们将用假病毒中和试验来检测小鼠血清中和抗体滴度。

(致谢:感谢中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所李德新研究员、梁米芳研究员对本工作给与的支持与帮助。)

参考文献:

[1] Dye, C. and W. H. O. E. R. Team, Ebola virus disease

- in West Africa—the first 9 months [J]. *N Engl J Med*, 2015, 372(2): p. 189.
- [2] Li, Y. H. and S. P. Chen. Evolutionary history of Ebola virus [J]. *Epidemiol Infect*, 2014, 142(6): p. 1138-1145.
- [3] Feldmann H, Volchkov V E, Volchkova V A, Ströher U, Klenk H D. Biosynthesis and role of filoviral glycoproteins [J]. *J Gen Virol*, 2001, 82(Pt 12): p. 2839-2848.
- [4] Konduru K, Bradfute S B, Jacques J, Manangeeswaran M, Nakamura S, Morshed S, Wood S C, Bavari S, Kaplan G G. Ebola virus glycoprotein Fc fusion protein confers protection against lethal challenge in vaccinated mice [J]. *Vaccine*, 2011, 29(16): p. 2968-2977.
- [5] Wang D, Raja N U, Trubey C M, Juompan LY, Luo M, Woraratanadharm J, Deitz S B, Yu H, Swain B M, Moore K M, Pratt W D, Hart M K, Dong J Y. Development of a cAdVax-based bivalent ebola virus vaccine that induces immune responses against both the Sudan and Zaire species of Ebola virus [J]. *J Virol*, 2006, 80(6): p. 2738-2746.
- [6] Sullivan N J, Sanchez A, Rollin P E, Yang Z Y, Nabel G J. Development of a preventive vaccine for Ebola virus infection in primates [J]. *Nature*, 2000, 408(6812): p. 605-609.
- [7] Lupton H W, Lambert R D, Bumgardner D L, Moe J B, Eddy G A. Inactivated vaccine for Ebola virus efficacious in guineapig model [J]. *Lancet*, 1980, 2(8207): p. 1294-1295.
- [8] Martin J E, Sullivan N J, Enama M E, Gordon I J, Roederer M, Koup R A, Bailer R T, Chakrabarti B K, Bailey M A, Gomez P L, Andrews C A, Moodie Z, Gu L, Stein J A, Nabel G J, Graham B S. A DNA vaccine for Ebola virus is safe and immunogenic in a phase I clinical trial [J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2006, 13(11): p. 1267-1277.
- [9] Jones S M, Feldmann H, Ströher U, Geisbert J B, Fernando L, Grolla A, Klenk H D, Sullivan N J, Volchkov V E, Fritz E A, Daddario K M, Hensley L E, Jahrling P B, Geisbert T W. Live attenuated recombinant vaccine protects nonhuman primates against Ebola and Marburg viruses [J]. *Nat Med*, 2005, 11(7): p. 786-790.
- [10] Kobinger G P, Feldmann H, Zhi Y, Schumer G, Gao G, Feldmann F, Jones S, Wilson J M. Chimpanzee adenovirus vaccine protects against Zaire Ebola virus [J]. *Virology*, 2006, 346(2): p. 394-401.
- [11] Henao-Restrepo A M, Longini I M, Egger M, Dean N E, Edmunds W J, Camacho A, Carroll M W, Doumbia M, Draguez B, Duraffour S, Enwere G, Grais R, Gunther S, Hossmann S, Kondé M K, Kone S, Kuisma E, Levine M M, Mandal S, Norheim G, Riveros X, Soumah A, Trelle S, Vicari A S, Watson C H, Kéita S, Kieny M P, Røttingen J A. Efficacy and effectiveness of an rVSV-vectored vaccine expressing Ebola surface glycoprotein: interim results from the Guinea ring vaccination cluster-randomised trial [J]. *Lancet*, 2015, 29;386(9996):857-866.

Eukaryotic Expression and Immunogenic Research of Recombination Ebola Virus Membrane Protein Gp-Fc

ZHANG Xiaoguang¹, YANG Ren², WANG Jiao¹, WANG Xuan¹, HOU Mieling¹, AN Lina²,
ZHU Ying², CAO Yuxi^{1*}, ZENG Yi^{1*}

(1. Key Laboratory of Medical Virology, Ministry of Health, National Institute for Viral Disease Control and Prevention,
Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100052, China;

2. College of Life Sciences & Bio-Engineering, Beijing University of Technology, Beijing 100124, China)

Abstract: We used 293 cells to express the recombinant membrane protein of the Ebola virus. Then, the immunogenicity of the recombinant protein was studied by immunized BALB/c mice. According to the codon use frequency of humans, the gene encoding the extracellular domain of the Ebola virus membrane protein was optimized, synthesized, and inserted into the eukaryotic expression plasmid pXG-Fc to construct the human IgG Fc and Ebola GP fusion protein expression plasmid pXG-modGP-Fc. To achieve expression, the fusion protein expression vector was transfected into high-density 293 cells using transient transfection technology. The recombinant protein was purified by protein A affinity chromatography. BALB/c mice were immunized with the purified fusion protein, and serum antibody titers evaluated by an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Purification and analyses of the protein revealed that the eukaryotic expression vector could express the recombinant protein GP-Fc effectively, and that the recombinant protein in the supernatant of the cell culture was present as a dimer. After immunization with the purified recombinant protein, a high titer of antigen-specific IgG could be detected in the serum of immunized mice by indirect ELISA, showing that the recombinant protein had good immunogenicity. These data suggest that we obtained a recombinant protein with good immunogenicity. Our study is the basis for development of a vaccine against the Ebola virus and for screening of monoclonal antibodies.

Key words: Ebola Virus; Vaccine; Glycoprotein; Immunogenicity

*Corresponding author: CAO Yuxi, E-mail: yuxicao@hotmail.com; ZENG Yi, E-mail: zengyicdc@sina.com