

鼠疫 F1-V 重组融合蛋白抗原的制备及其免疫保护效果的研究

王 栋¹⁾ 黄顺军¹⁾ 邢 丽¹⁾ 郭习勤¹⁾
韩 岳¹⁾ 罗德炎¹⁾ 李 敏²⁾ 王希良^{1)*}

¹⁾军事医学科学院微生物流行病学研究所免疫学研究室, 北京 100071;

²⁾青海省地方病研究所鼠疫科, 西宁 810000)

摘要 为制备鼠疫耶尔森氏菌 F1-V 重组融合蛋白抗原, 观察其免疫原性和免疫保护效果, 通过疏水层析、阴离子交换层析、凝胶过滤层析纯化鼠疫 F1-V 重组融合蛋白抗原. 用氢氧化铝凝胶吸附制备试验性鼠疫 F1-V 重组融合蛋白抗原, 皮下接种健康 BALB/c 小鼠, ELISA 检测血清 F1-V 抗体效价、MTT 法测定淋巴细胞增殖能力, 进一步用 400LD₅₀ 鼠疫耶尔森氏菌 141 标准毒株皮下攻毒, 观察动物的存活情况. 通过三步柱层析纯化获得的鼠疫 F1-V 重组融合蛋白抗原纯度达到 90% 以上. 氢氧化铝凝胶吸附的鼠疫 F1-V 重组融合蛋白抗原免疫 BALB/c 小鼠三次, 血清抗 F1-V 抗体效价为 1 : (51 200±800), 对耶尔森氏菌 141 强毒株攻击的保护率是 90%. 上述结果表明, 制备的鼠疫 F1-V 重组融合蛋白抗原具有良好的免疫原性和免疫保护效果, 为研制鼠疫 F1-V 重组融合蛋白疫苗奠定了基础.

关键词 鼠疫耶尔森氏菌, F1-V 重组融合蛋白抗原, 免疫保护效果

学科分类号 R363

鼠疫耶尔森氏菌是一种重要的烈性病原体, 也是重要的生物战剂和生物恐怖剂, 一直受到高度重视. 鼠疫在人类历史上曾有三次爆发流行, 并夺走了无数人的生命. 特别是近年鼠疫流行呈上升趋势, 2004 年秋在我国青海省就爆发了人间鼠疫, 这说明鼠疫流行有可能死灰复燃, 因此迫切需要安全有效的鼠疫疫苗.

传统的鼠疫灭活苗对腺鼠疫有一定的保护效果, 但存在着用强毒株生产安全性差、保护期短、接种反应率高等问题. 鼠疫弱毒苗存在苗株抗原性和免疫原性有差异影响疫苗效果及毒力反强的缺点. 且两种传统疫苗对肺鼠疫均无效. 有研究证明, 鼠疫耶尔森氏菌免疫保护性抗原, 主要是鼠疫耶尔森氏菌的荚膜蛋白抗原分子(fraction F1)和鼠疫耶尔森氏菌表面抗原(V)分子^[1~3]. 基于 F1 和 V 分子是鼠疫耶尔森氏菌属间保守的重要保护性抗原, 且 F1 和 V 分子在免疫原性及免疫保护性上具有叠加效应, F1-V 重组融合蛋白已成为鼠疫新一代疫苗研制的首选保护性抗原分子^[4,5]. 我们构建 F1-V/pET-11c 重组表达质粒菌株, 获得了鼠疫

F1-V 重组融合蛋白的高效表达. 通过疏水层析、阴离子交换层析和凝胶过滤层析三步纯化, 获得了较纯的鼠疫 F1-V 重组融合蛋白抗原. 鼠疫 F1-V 重组融合蛋白抗原用氢氧化铝凝胶吸附后免疫 BALB/c 小鼠获得了良好的免疫原性和免疫保护效果.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 重组表达质粒及菌株. F1/pET-28a、V/pET-32a、F1-V/pET-11c 三种重组表达质粒为本室构建保存; BL21(DE3)为本室保存; 鼠疫耶尔森氏菌 141 标准强毒株, 为青海省地方病研究所保存.

1.1.2 抗体及其他试剂. 羊抗鼠 IgG-HRP、IgG1-HRP、IgG2a-HRP 抗体, F1 和 V 的 McAb 购于 Sigma 公司; 异丙基半乳糖苷(IPTG)、ConA 购于华美生物工程公司; Al(OH)₃ 凝胶购于北京生物

* 通讯联系人. Tel: 010-66948678, E-mail: xiliangw@yahoo.com

收稿日期: 2005-10-12, 接受日期: 2005-12-31

制品研究所.

1.1.3 实验动物. 6 周龄雌性 SPF 级 BALB/c 小鼠, 体重 18~20 g, 购于并饲养于军事医学科学院试验动物中心.

1.2 方法

1.2.1 F1/pET-28a、V/pET-32a、F1-V/pET-11c 表达菌株的构建. 将 F1/pET-28a、V/pET-32a、F1-V/pET-11c 三种重组表达质粒转化 BL21(DE3), 构建 F1/pET-28a、V/pET-32a、F1-V/pET-11c 重组表达质粒菌株.

1.2.2 鼠疫 F1、V 重组蛋白抗原的表达与纯化. 大量 F1/pET-28a、V/pET-32a 重组表达质粒菌株经 IPTG 诱导培养后收集菌体、超声裂解、离心获取的上清通过 HiTrap Chelating HP 亲和层析柱, 用咪唑溶液洗脱出 F1 和 V 重组蛋白, 通过紫外分光光度计测定蛋白质含量, SDS-PAGE 鉴定, 用薄层凝胶扫描计算纯度.

1.2.3 鼠疫 F1-V 重组融合蛋白抗原的表达及纯化. 将大量培养的 F1-V/pET-11c 超声裂解后离心取上清, 用 0.8 mol/L 的硫酸铵处理后通过疏水层析柱, 将收集的样品脱盐后通过阴离子交换层析, 再将收集的样品浓缩后通过凝胶过滤层析纯化, 通过紫外分光光度计测定蛋白质含量, SDS-PAGE 鉴定, 用薄层凝胶扫描计算纯度^[9].

1.2.4 鼠疫 F1-V 重组融合蛋白抗原的制备. 纯化的鼠疫 F1-V 重组融合蛋白抗原、鼠疫 F1 重组蛋白抗原、鼠疫 V 重组蛋白抗原分别与 Al(OH)₃ 凝胶佐剂混合, 4℃ 下吸附 24 h, 并不断轻轻混匀以最大限度吸附抗原, 然后取上清, 用 Lorry 法测定蛋白质的吸附率.

1.2.5 动物分组及免疫方案. 动物分为实验组(F1-V 重组融合蛋白抗原组、F1 重组蛋白抗原组、V 重组蛋白抗原组)和 Al(OH)₃ 对照组, 每组 15 只. 免疫途径: 小鼠后腿肌肉注射. 免疫剂量: 实验组 50 μg/只, 对照组 1.2 mg/只. 免疫时间及次数: 每隔两周免疫一次, 共 3 次.

1.2.6 血清抗 F1-V、V 和 F1 抗体效价的测定. 在第三次免疫后 7 天采血, 每个样品设 4 个复孔, 通过间接 ELISA 测定血清中抗 F1-V、V 和 F1 抗体效价.

1.2.7 淋巴细胞转化实验. 在第三次免疫后 7 天每组杀 5 只小鼠取脾, 制备脾细胞悬液, 用 1640 培养液调细胞浓度为 5×10⁶ 个/ml, 以 100 μl/孔加入 96 孔板中, 每组设 3 个复孔, 共设 5 个组(特异性

抗原阴性对照组, ConA 阳性对照组, F1-V、V、F1 免疫组), 37℃ 5% CO₂ 孵箱培养 42 h 后 10 μl/孔(终浓度 5 mg/L)加入 MTT, 继续培养 4 h. 弃上清, 加 150 μl/孔 DMSO, 振荡 20 min 后, 选择波长为 570 nm 酶联仪测定. 刺激指数 SI = 重组蛋白刺激组 A 均值 / 阴性对照组 A 均值.

1.2.8 攻毒的免疫保护率. 选择鼠疫耶尔森氏菌 141 标准强毒株腹腔注射感染 BALB/c 鼠, 确定半数致死量(LD₅₀). 在第三次免疫后第 10 天, 用 400 LD₅₀ 鼠疫耶尔森氏菌强毒株进行攻毒, 观察各组动物的免疫保护情况, 计算免疫保护率.

2 结 果

2.1 F1 重组蛋白的表达、纯化及鉴定

将表达重组质粒 F1/pET-28a 菌株通过 IPTG 诱导表达后, SDS-PAGE 结果发现, 与 pET-28a 转化菌株相比在分子质量 16 ku 处出现特异的条带, 通过 HiTrap chelating HP 纯化获得 F1 重组蛋白(图 1), 纯度在 80% 以上. 将纯化的 F1 重组蛋白经 ELISA 检测其抗原性, 结果显示, F1 重组蛋白与兔抗鼠疫耶尔森氏菌多克隆抗体及 F1 单克隆抗体呈现特异性免疫反应.

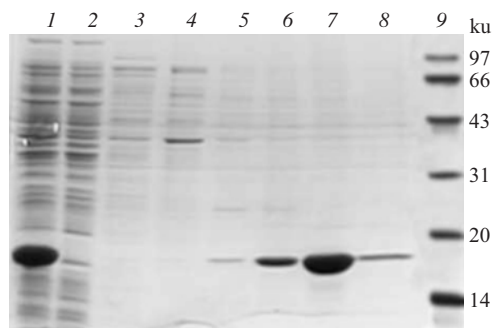


Fig.1 SDS-PAGE of expression and purification of the recombinant F1 protein

1: Induced engineering bacteria F1/pET-28a; 2~4: Flowthrough of F1 protein by affinity chromatography; 5~8: Purified recombinant F1 protein; 9: Low molecular mass marker.

2.2 V 重组蛋白的表达、纯化及鉴定

将 V/pET-32a 表达重组质粒菌株通过 IPTG 诱导表达, SDS-PAGE 结果发现, 与 pET-32a 转化菌株相比在分子质量 37 ku 处出现特异的条带, 通过 HiTrap chelating HP 纯化获得 V 重组蛋白(图 2), 纯度在 80% 以上. 将纯化的 V 重组蛋白通过 ELISA 检测其抗原性, 结果显示, V 重组蛋白抗原与兔抗鼠疫耶尔森氏菌多克隆抗体及 V 单克隆抗体呈现

特异性免疫反应.

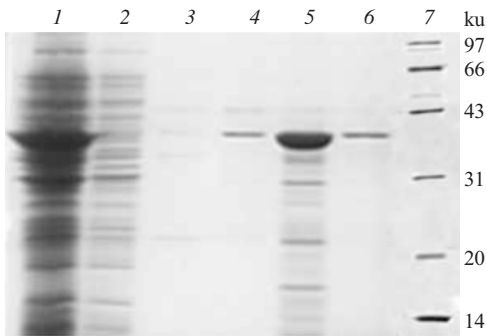


Fig. 2 SDS-PAGE of expression and purification of the recombinant V protein
1: Induced engineering bacteriaV/pET-32a; 2, 3: Flowthrough of V protein by affinity chromatograph; 4 ~6: Purified recombinant V protein; 7: Low molecular mass marker.

2.3 F1-V 重组融合蛋白的表达、纯化及鉴定

将 F1-V/pET-11c 表达重组质粒菌株通过 IPTG 诱导表达，SDS-PAGE 结果发现，在 53 ku 处出现特异的条带，通过疏水层析、阴离子交换和凝胶过滤层析纯化，收集 F1-V 重组融合蛋白，经 SDS-PAGE、薄层凝胶扫描结果表明其纯度达 90% 以上(图 3). 将纯化的 F1-V 重组融合蛋白通过 ELISA 检测其抗原性，结果显示 F1-V 重组融合蛋白与兔抗鼠疫耶尔森氏菌多克隆抗体、F1 和 V 单克隆抗体呈现特异性免疫反应.

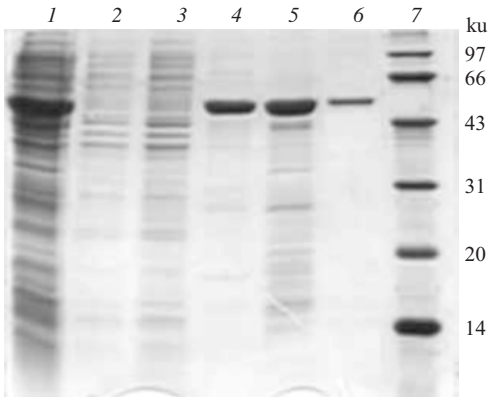


Fig. 3 SDS-PAGE of expression and purification of F1-V recombinant fusion protein
1: Induced engineering bacteria F1-V/pET-11c; 2: Flowthrough of hydrophobic chromatograph; 3: Flowthrough of ion exchange chromatograph; 4: F1-V fusion protein purified by hydrophobic chromatograph; 5: F1-V fusion protein purified by ion exchange chromatograph; 6: F1-V fusion protein purified by size exclusion chromatograph; 7: Low molecular mass marker.

2.4 鼠疫 F1-V 重组融合蛋白抗原诱导的免疫应答

用纯化 F1-V 重组融合蛋白抗原、F1 重组蛋白抗原、V 重组蛋白抗原分别用 Al(OH)₃ 凝胶佐剂吸附，蛋白质吸附率是 30%~40%. 鼠疫 F1-V 重组融合蛋白抗原在第三次免疫后 7 天采血，间接 ELISA 测血清 F1-V、V、F1 抗体效价，结果表明：F1-V、V、F1 重组蛋白抗原都能诱导小鼠产生抗鼠疫 F1-V，V 以及 F1 的特异性抗体，而 Al(OH)₃ 对照组未检测到抗鼠疫 F1-V、V、F1 的特异性抗体. 其中鼠疫 F1-V 重组融合蛋白抗原的抗体效价高达 1 : (51 200 ± 800)，明显高于鼠疫 V 或 F1 重组蛋白抗原免疫组的效价(图 4). 其抗体亚型分析结果表明，IgG1 的数值显著高于 IgG2a 的值 (图 5)，说明鼠疫 F1-V 重组融合蛋白抗原诱导的免疫应答以体液免疫为主^[7].

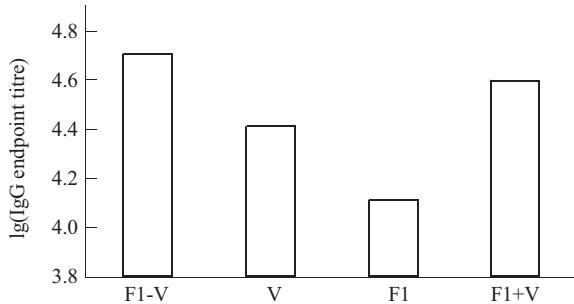


Fig. 4 IgG specific antibody titre from immunized mice serum of ELISA

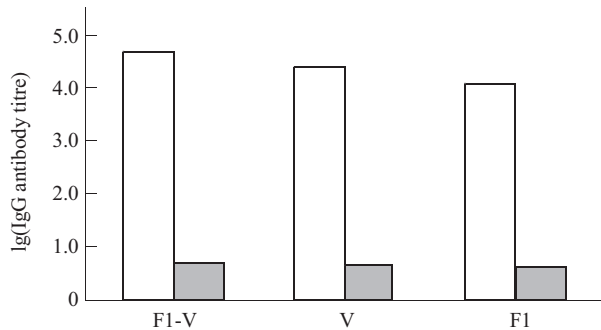


Fig.5 The role of BALB/c mice in the IgG isotype immune response of ELISA
□: IgG1; ■: IgG2a.

2.5 F1-V 重组融合蛋白抗原诱导的脾淋巴细胞反应

通过鼠疫 F1-V 重组融合蛋白抗原第三次免疫小鼠后的第 7 天，MTT 法测定脾淋巴 T 细胞增殖. 结果表明，ConA 阳性对照组刺激指数 SI 值在 10~12 之间，而实验组的 F1-V 重组融合蛋白、V 和 F1 重组蛋白特异性抗原刺激组刺激指数 SI 值在

1~2.5 之间, 即使培养时间延长 3 天也未见母细胞转化. 说明鼠疫 F1-V 重组融合蛋白抗原也有一定诱导细胞免疫的作用.

2.6 鼠疫 F1-V 重组融合蛋白抗原免疫保护效力

鼠疫耶尔森氏菌 141 标准强毒株腹腔注射感染 BALB/c 鼠的半数致死量(LD_{50})是 50 个菌. 第三次免疫后 10 天, 用 400 LD_{50} 鼠疫耶尔森氏菌 141 毒株皮下注射攻毒. 结果显示, 鼠疫 F1-V 重组融合蛋白抗原组在攻毒后仅有 1 只死亡、V 重组蛋白抗原组有 3 只死亡、F1 重组蛋白抗原组有 5 只死亡(表 1). 存活的免疫小鼠健康状况良好, 体重增加正常, 注射部位无脱毛、硬结等异常表现. 结果说明鼠疫 F1-V 重组融合蛋白抗原具有良好的免疫保护效果.

Table 1 Protection of F1-V, V and F1 immunized BALB/c mice against challenge with *Y.pestis*

Group	Challenge LD_{50} *	Survival ratio
F1-V antigen	400	9/10
F1 antigen	400	5/10
V antigen	400	7/10
PBS control	20	0/10

*BALB/c mice of experimental groups (F1-V, V and F1) and control group (PBS) were subcutaneously challenged with *Y.pestis* 141 strain and observed more for than 60 days.

3 讨 论

我们在纯化鼠疫 F1-V 重组融合蛋白抗原的工作中, 首先根据 F1-V 重组融合蛋白的疏水性选择疏水层析作为纯化的第一步, 再根据 F1-V 融合蛋白的等电点将疏水层析的洗脱产物脱盐后作为阴离子交换层析的上样样品, 再进一步将阴离子交换层析洗脱获得的目的蛋白经凝胶过滤层析, 收集纯化的 F1-V 重组融合蛋白. 在纯化过程中选择了较为合适的介质, 使得纯化的 F1-V 融合蛋白的纯度达到 90% 以上, 基本满足了动物试验阶段对抗原纯度的要求. 动物实验表明, 纯化的 F1-V 融合蛋白抗原未引起不良的局部反应和全身反应, 表明选择的纯化手段对 F1-V 融合蛋白是行之有效的.

用 F1-V 重组融合蛋白抗原加氢氧化铝凝胶吸附制备的试验性疫苗, 三次免疫 BALB/c 小鼠后产生了高效价的抗 F1-V 特异性抗体, 其中 F1-V 重组融合蛋白抗原的抗体效价明显高于 V 或 F1 重组蛋白单分子免疫产生的抗体效价, V 重组蛋白抗原性高于 F1 重组蛋白, 这些与文献报道结果类

似^[2,8~11]. 在淋巴细胞增殖试验中, 在 37℃ 孵箱中培养 42 h 后在倒置显微镜下观察, 实验组有体积变大的淋巴母细胞, 其中 F1-V 重组融合蛋白抗原比 V 和 F1 重组蛋白抗原淋巴细胞增殖的效果要强, 而对照组则没有发现类似情况. 表明 F1-V 重组融合蛋白抗原、V 和 F1 重组蛋白抗原有一定诱导 T 淋巴细胞增殖的效果, 就整体而言, 还是抗体免疫应答起主导作用.

采用鼠疫耶尔森氏菌 141 作为攻毒株, 是由于我国在生产的鼠疫减毒活疫苗至今选用它作为标准株来考核疫苗的质量. 按照《中国生物制品规程》的要求, 现行皮上划痕用鼠疫弱毒苗应能对小鼠受 200MLD 强毒鼠疫菌攻击起 95% 以上保护^[12]效果. 该实验选用的强毒株是标准株, 且没有污染外源因子, 腹腔注射感染 BALB/c 鼠的半数致死量(LD_{50})是 50 个菌, 全致死量是 80~100 个菌. 我们选择 400 LD_{50} 攻毒试验疫苗免疫的 BALB/c 小鼠, 初步证实, 鼠疫 F1-V 重组融合蛋白抗原的免疫保护效果达到 90%, 但仅能表明对腺鼠疫的保护效果. 深入的研究在进行之中, 为研制鼠疫新型疫苗奠定了基础.

参 考 文 献

- Andrews G P, Heath D G, Anderson G W, *et al.* Fraction 1 capsular antigen (F1) purification from *Yersinia pestis* CO92 and an *Escherichia coli* recombinant strain and efficacy against lethal plague challenge. *Infect Immun*, 1996, **64** (6): 2180~2187
- Titbal R W, Howells A M, Oyston P C F, *et al.* Expression of the *Yersinia pestis* capsular antigen (F1 antigen) on the surface of the *aroA* mutant of *Salmonella typhimurium* induces high levels of protection against plague. *Infect immun*, 1997, **65** (5): 1926~1930
- Helen L B, Kate F G, Steven M J, *et al.* Antibody responses to *Yersinia pestis* F1-antigen expressed in *Salmonella typhimurium aroA* from *in vivo*-inducible promoters. *Vaccine*, 2000, **18** (24): 2668~2676
- Price S B, Cowan C, Perry R D, *et al.* The *Yersinia pestis* V antigen is a regulatory protein necessary for Ca^{2+} -dependant growth and maximal expression of low- Ca^{2+} response genes. *J Bacteriol*, 1991, **173**: 2649~2657
- Nakajima R, Brubaker R R. Association between virulence of *Yersinia pestis* and suppression of gamma interferon and tumour necrosis factor alpha. *Infect Immun*, 1993, **61** (2): 23~31
- 黄顺军, 王希良, 李名扬, 等. 鼠疫 F1-V 融合蛋白在大肠杆菌中高效表达及鉴定. *免疫学杂志*, 2004, **20** (3): S152~S155
Huang S J, Wang X L, Li M Y, *et al.* *Immuno J*, 2004, **20** (3): S152~S155
- Pulendran B, Smith J L, Caspary G, *et al.* Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response *in vivo*.

- Proc Natl Acad Sci USA, 1999, **96** (3): 1036~1041
- 8 Leary S E C, Williamson E D, Griffin K F, *et al.* Active immunization with recombinant V antigen from *Yersinia pestis* protects mice against plague. *Infect Immun*, 1995, **63** (8): 2854~2858
- 9 Williamson E D, Vessery P M, Gillhespy K J, *et al.* An IgG1 titre to the F1 and V antigens correlates with protection against plague in the mouse model. *Clin Exp Immunol*, 1999, **116** (1): 107~114
- 10 Heath D G, Anderson Jr G W, Mauro J M, *et al.* Protection against experiment bubonic and pneumonic plague by a recombinant capsular F1-V antigen fusion protein vaccine. *Vaccine*, 1998, **16** (11~12): 1131~1137
- 11 Anderson G W, Heath D G, Bolt C R, *et al.* Short and long term efficacy of single dose subunit vaccine against *Yersinia pestis* in mice. *AM J Trop Med Hyg*, 1998, **58** (6): 793~799
- 12 中国生物制品标准化委员会. 皮上划痕用鼠疫活疫苗制造及检定规程. 中国生物制品规程. 北京: 化学工业出版社, 2000. 91~95
- Chinese Pharmacopoeia Commission of Biological Products Standardization. Regulations of Manufacture and Check of Plague Vaccine (Live) for Percutaneous Scarification. Beijing: Chemical Industry Press, 2000. 91~95

Purification and Immuno-protection in BALB/c Mice of Recombinant F1-V Fusion Protein of *Yersinia pestis*

WANG Dong¹⁾, HUANG Shun-Jun¹⁾, XING Li¹⁾, GUO Xi-Qin¹⁾,
HAN Yue¹⁾, LUO De-Yan¹⁾, LI Min²⁾, WANG Xi-Liang^{1)*}

¹⁾*Immunology Department, Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China;*

²⁾*Epidemic Institute in Qinghai, Xining 810000, China)*

Abstract F1-V recombinant fusion protein was purified to immunize mice and its immunogenicity and immuno-protection are detected. Different purification strategies were used to purify F1-V recombinant fusion protein. First hydrophobic chromatography, then anion exchange chromatography, and finally size exclusion chromatography. Aluminium hydroxide gel adsorbed F1-V fusion protein was intramuscularly injected into BALB/c mice. Anti-serum titer and protection ratio were detected. The purity of F1-V recombinant fusion protein was more than 90%. The anti-serum titer was high up to 1 : (51 200 ± 800). The protein antigen was capable of inducing an effective immuno-protection against subcutaneous challenge of 400 LD₅₀ virulent *Yersinia pestis* with the survival rate of 90%. The F1-V recombinant fusion protein was able to protect against subcutaneous challenge of virulent *Yersinia pestis*, suggesting that the F1-V substance is well suited for development as the active ingredient of the next plague vaccine.

Key words *Yersinia pestis*, recombinant F1-V fusion protein antigen, immuno-protection

*Corresponding author . Tel: 86-10-66948678, E-mail: xiliangw@yahoo.com

Received: October 12, 2005 Accepted: December 31, 2005