PIBB 生物化学与生物物理进展
Progress in Biochemistry and Biophysics
2011, 38(1): 60~66
www.pibb.ac.cn

A 组轮状病毒多个结构蛋白抗原表位的串联表达及其免疫原性的检测 *

杨艳梅[1, 2, 3] 李 霞[4] 杨 慧[4] 钱 渊[5] 张 又[5]
霍 岩[1, 2, 3] 方荣祥[1, 2]** 陈晓英[1, 2]**

([1] 中国科学院微生物研究所植物基因组国家重点实验室，北京 100101；[2] 国家植物基因研究中心，北京 100101；
[3] 中国科学院研究生院，北京 100039；[4] 北京农林科学院蔬菜花卉中心，北京 100097；
[5] 首都儿科研究所病毒室北京感染与免疫中心实验室，北京 100020)

摘要 从北京腹泻婴儿粪便提取的轮状病毒(rotavirus，RV)(T114 株)的 RNA 中，克隆到轮状病毒结构蛋白基因 *vp4*，*vp6* 和 *vp7* 的全长 cDNA，对它们编码的蛋白质序列和可能的抗原表位肽进行了预测，选择了 RV 主要抗原蛋白 VP7、VP6 和 VP4 的 4 个抗原表位肽，通过人工合成 DNA 的方式将这些抗原表位肽基因串联融合成一个阅读框 *RME* (rotavirus multiple epitopes, RME)并构建原核表达载体．大肠杆菌表达的 RME 在 ELISA 反应中可被 RV 多克隆抗体识别，纯化的 RME 蛋白注射免疫小鼠可诱导特异性免疫应答，产生高滴度的同源氨基酸序列特异抗体和人 RV 抗体，其中针对 RME 的 IgG 抗体滴度达到 1∶40 000，针对单个抗原表位 EV7、EV6 和 EV4 的 IgG 抗体滴度达 1∶10 000～1∶20 000，针对 RV Wa 株的 IgG 抗体滴度较低为 1∶2 500，但能特异地中和该病毒对 MAC145 细胞的侵染．上述结果为新型 RV 基因工程疫苗的研发提供了论据和基础．

关键词 轮状病毒，基因工程疫苗，多价抗原表位
学科分类号 Q78
DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00312

轮状病毒(rotaviruses，RV)属于呼肠孤病毒科(*Reoviridae*)轮状病毒属(*Rotavirus*)．1973 年，RV 作为人的病原体首次被发现，是引起人类以及多种动物传染性腹泻的原因，包括家畜和鸟类．根据其血清反应，RV 被分为 7 个血清组(A～G)，其中 A、B 和 C 组能够感染人类，A 组 RV 则是婴幼儿肠胃炎的重要病原体．

在全球，每年由 RV 引起的婴幼儿重症腹泻多达 200 万并导致超过 50 万婴幼儿死亡，到目前为止，没有针对此病的特效药，使用疫苗是唯一有效的防控手段，因此该疫苗的研发也被世界卫生组织列为最优先发展项目之一．目前市售的 RV 疫苗主要是减毒活疫苗或是减毒株的重配疫苗，在研究的疫苗有 DNA 疫苗和病毒样颗粒亚单位疫苗等．由于由 RV 导致的婴儿死亡多发生在发展中国家，疫苗昂贵的价格往往是限制其广泛使用的原因之一，因此研发高效、安全、廉价的疫苗具有十分重要的意义．

成熟的 RV 粒子无囊膜呈正二十面体对称，直径约 75 nm，包含有外衣壳蛋白、内衣壳蛋白和核心蛋白，其基因组包含 11 条双链 RNA，共编码 6 种结构蛋白(viral protein, VP: VP1～VP4,VP6,VP7)和 5 种非结构蛋白(non-structural protein, NSP: NSP1～NSP5)，其中结构蛋白 VP7、VP6 和 VP4 是最重要的抗原蛋白．

VP7 是含 326 个氨基酸(amino acid, AA)的糖蛋白，分子质量为 37 ku，为病毒外衣壳结构蛋白，是病毒的主要中和抗原，决定病毒的 G 血清型．

* 国家高技术研究发展计划(863)(2007AA100505)资助项目．
** 通讯联系人．
方荣祥．Tel: 010-64858245, E-mail: fangrx@im.ac.cn
陈晓英．Tel: 010-64861838, E-mail: chenxy@im.ac.cn
收稿日期：2010-07-30，接受日期：2010-11-10

Dyall-Smith 等[1]通过抗单克隆抗体突变和测序技术在轮状病毒 SA11 株 VP7 蛋白上鉴定出 3 个抗原区域 A(AA 87～96)，B(AA 145～150)和 C(AA 211～223)，同时还指出抗原区 A 和 C 虽然在线性序列上距离较远，但在折叠后的 VP7 蛋白上的空间距离很近．进一步研究发现中和抗原区域位于两个可变区 AA 87～101 和 AA 208～221 序列上[2-6].

与 VP7 一同构成 RV 外衣壳的还有 VP4，该结构蛋白决定 RV 的 P 血清型，VP4 有几个重要的功能，包括与细胞受体结合、细胞穿透、血凝反应、病毒毒力和中和反应等[7-8]．VP4 经胰蛋白酶作用在 241 位或 247 位氨基酸可裂解为两条长度不等的肽段 VP8 和 VP5，其中 VP8 靠近氨基端(247 AA, 28 ku)，有吸附宿主细胞的能力，VP5 靠近羧基端(529 AA，60 ku)[9-13]．针对两个酶切片段(VP8 和 VP5)的单克隆抗体都可以阻止病毒吸附细胞，并且可以体外中和 RV[14-15].

从人和动物 RV 的 VP4 上已经鉴定出 6 个中和抗原表位肽，其中有 5 个位于 VP8 上[16]．研究证明，VP8 的单克隆抗体不仅可以阻止病毒吸附到细胞，而且可以使已经吸附到细胞上的病毒脱落[17-18]，并可以被动保护小鼠抵抗 RV 攻击[19]．原核表达的 VP8 可以在小鼠和兔子体内产生中和抗体[20-21]．这些研究结果均表明 VP8 是轮状病毒疫苗研究的重要目标蛋白.

VP6 蛋白为组特异性抗原，位于病毒的内壳，占病毒颗粒的 51%的蛋白质为 VP6．在大肠中表达鼠轮状病毒 EDIM 株的 VP6 蛋白，以 LT(R192G)作为佐剂，鼻内或口服免疫小鼠后可诱导小鼠产生几乎完全的持久的保护[22-23]．研究还发现 VP6 具有一个与细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)有交叉反应的抗原表位．将 EDIM 株的 14 AA 肽段(RLSFQLMRPPNMTP)与麦芽糖结合蛋白在大肠杆菌中融合表达，用融合蛋白鼻内免疫成年小鼠，可以完全保护 EDIM 对试验鼠的攻击，但是在小鼠抗血清里并没有检测到对 EDIM 的抗体，这 14 个 AA 肽段被认为是 $CD4^+$ T 细胞抗原表位肽[24]．用 BALB/c J 链缺失型小鼠(Jch−/−)开展的进一步研究表明，保护轮状病毒保护作用和 $CD4^+$ T 细胞有关[25]，这说明对 RV 侵染的保护作用并不单纯依靠肠道 IgA 抗体.

本研究预测并选择了 RV 结构蛋白 VP4、VP6 和 VP7 上的 4 个抗原表位肽，将其串联成一个阅读框，人工合成了表达该融合多表位肽(rotavirus multi-epitopes，RME)的 DNA 片段．将 RME 在大肠杆菌中表达纯化，检测分析其抗原性和免疫原性．本试验结果为研发安全、高效、经济的 RV 亚单位疫苗提供试验数据.

1　材料与方法

1.1　材料

人 A 组 RV Wa 株(G1P[8])：由中国疾病预防控制中心病毒病研究所段招军研究员惠赠；MAC145 细胞：由中国科学院微生物研究所刘文军研究员惠赠；大肠杆菌表达载体 pTZ18，pET-30a(+)，pGEX-3X 及 BL21 菌株由本实验室保存．T 载体，T4 连接酶，限制性内切酶购自 Promega 公司；Ni-NTA 树脂纯化试剂盒，GST 亲和树脂纯化试剂盒均购自 Novagen 公司；质粒和胶回收试剂盒购自天根生物公司；轮状病毒多克隆抗体为 ABcam 公司产品；辣根过氧化物酶标记的抗鼠 IgG 抗体为 Bios 公司产品；DMEM 培养基和牛血清为 GIBCO 产品．6～8 周龄雌性 BALB/c 小鼠购自军事医学科学院实验动物中心.

1.2　方法

1.2.1　*vp4*，*vp6* 和 *vp7* 的全长 cDNA 克隆．采集患腹泻症状新生儿粪便标本．用 1% 十二烷基磺酸钠(SDS)、56℃ 30 min 处理，酚 - 氯仿抽提提取病毒核酸[26]．采用 Invitrogen 公司的 ThermoScript™ RT-PCR System 试剂盒，用 RT-PCR 方法从北京腹泻婴儿粪便提取的 A 组 RV(T114 株 G1P[8])的 RNA 中扩增得到轮状病毒结构蛋白基因 *vp4*，*vp6* 和 *vp7* 的全长 cDNA，并将其连接到 *Sma* Ⅰ剪切的 pTZ18 质粒上.

1.2.2　大肠表达载体的构建．利用抗原表位预测的在线工具(http://bio.dfci.harvard.edu/Tools/antigenic.html)选取 A 组 RV T114 株 VP7 蛋白的 AA 81～109 和 AA 201～250 序列(EV7)；VP6 蛋白的 AA 201～315 序列(EV6)；VP4 蛋白的 AA 86～215 序列(EV4)，将上述 4 个片段融合成一个连续的阅读框，人工合成编码该融合蛋白的 DNA 序列，基因密码子的选择兼顾植物和大肠杆菌的偏爱性，并在 DNA 序列两端加上 *Nde* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ酶切位点．DNA 合成由北京擎科生物技术有限公司完成，新基因命名为 *RME*，其 DNA 序列和所编码的蛋白质序列见图 1．通过 *Nde* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切，将 *RME* 连接到蛋白表达载体 pET30a(+)上，与 6×His 融合，得到表达载体 pET30a(+)-RME．同时设计多对引

物(表 1)，分别扩增编码被选为融合蛋白部分的抗原表位肽序列的 DNA 片段(EV7，EV6 和 EV4)和部分未选 DNA 序列(NE6 和 NE4)，并在引物两端引入 *Sma* Ⅰ和 *Eco*R Ⅰ酶切位点．分别以 *vp6*, *vp4* 和 *RME* 为模板，PCR 扩增出 VP6 的 AA 71～150 序列(NE6)，VP4 的 AA 609～700 序列(NE4)，以及 EV7、EV6 和 EV4．PCR 产物经胶回收后构建到 T 载体上，经测序验证后通过 *Sma* Ⅰ和 *Eco*R Ⅰ双酶切亚克隆到原核表达载体 pGEX-3X 上，得到 GST 融合表达载体 pGEX-3X-NE6、pGEX-3X-NE4、pGEX-3X-EV7、pGEX-3X-EV6 和 pGEX-3X-EV4.

```
1   ATG TTA TGT TTG TAT TGT CCA ACT GAA GCA AGT ACT CAA ATC AGT GAT GGT GAA TGG AAA GAC TCA TTA TCA CAA ATG TTT CTT ACA AAA
1     M  L  C  L  Y  C  P  T  E  A  S  T  Q  I  S  D  G  E  W  K  D  S  L  S  Q  M  F  L  T  K
91  GGT CAA ACT TTA GGA ATC GGT TGT CAA ACA ACT AAT GTT GAC TCA TTT GAA ACT GTT GCT GAA AAC GAA AAA TTA GCT ATC GTG GAT GTC
31    G  Q  T  L  G  I  G  C  Q  T  T  N  V  D  S  F  E  T  V  A  E  N  E  K  L  A  I  V  D  V
181 GTT GAT GGG ATC AAT CAT AAA ATC AAT TTG ACA ACT ACT ACA TGT ACT ATT CGA AAT TGT AAG GCA CCA GCT AAC ATC CAG CAA TTT GAG
61    V  D  G  I  N  H  K  I  N  L  T  T  T  T  C  T  I  R  N  C  K  A  P  A  N  I  Q  Q  F  E
271 CAC ATT GTC CAG CTT AGA CGT GCA CTG ACT ACA GCT ACT ATC ACT TTA TTA CCT GAT GCA GAA AGA TTC AGT TTT CCA AGA GTT ATT AAT
91    H  I  V  Q  L  R  R  A  L  T  T  A  T  I  T  L  L  P  D  A  E  R  F  S  F  P  R  V  I  N
361 TCA GCT GAT GGT GCA ACT ACA TGG CTC TTC AAT CCA GTT ATC TTA AGA CCA AAC AAT GTT GAA GTT GAA TTT TTG TTA AAT GGG CAA ATT
121   S  A  D  G  A  T  T  W  L  F  N  P  V  I  L  R  P  N  N  V  E  V  E  F  L  L  N  G  Q  I
451 ATC AAT ACA TAT CAA GCT AGA TTT GGC ACT ATT ATT GCA AGA AAT TTT GAT ACA ATT CGT TTG TCA TTC CAG TTA ATG CGC CCA CCA AAT
151   I  N  T  Y  Q  A  R  F  G  T  I  I  A  R  N  F  D  T  I  R  L  S  F  Q  L  M  R  P  P  N
541 ATG ACA CCA GCT GTT AAT GCA CTG TTT CCA CAA GCA CAA CCT TTT CAA GCA AAT ACA AAT GGA TTA GTG TAC GAG AGT ACT AAC AAG AGT
181   M  T  P  A  V  N  A  L  F  P  Q  A  Q  P  F  Q  A  N  T  N  G  L  V  Y  E  S  T  N  K  S
631 GAC TTT TGG ACT GCA GTC GTT GCT GTT GAA CCA CAC GTG AGT CCA GTG GAT AGA CAA TAT ACT GTG TTT GGT GAA AAC AAA CAA TTC AAT
211   D  F  W  T  A  V  V  A  V  E  P  H  V  S  P  V  D  R  Q  Y  T  V  F  G  E  N  K  Q  F  N
721 CTT AGA AAT GAT TCA GAC AAA TTG AAG TTT TTA GAA ATG TTT AGA AGC AGT AGT CAG AAT GAG TTT TAT AAT AGA CGT ACA CTG ACT TCT
241   L  R  N  D  S  D  K  L  K  F  L  E  M  F  R  S  S  S  Q  N  E  F  Y  N  R  R  T  L  T  S
811 GAC ACT AAA CTC GTG GGA ATC TTA AAA TAT GGT GGA AGA ATC TGG ACA TTT CAT GGT GAA ACA CCA AGA GCT ACT ACT GAT AGC TCA AAT
271   D  T  K  L  V  G  I  L  K  Y  G  G  R  I  W  T  F  H  G  E  T  P  R  A  T  T  D  S  S  N
901 ACT GCA AAT CTG AAC GAT ATT TCC ATT ATC ATC CAT TCA GAA TTT TAT ATT ATT CCA AGA TCT CAA GAA TCT AAG TGT TAA
301   T  A  N  L  N  D  I  S  I  I  I  H  S  E  F  Y  I  I  P  R  S  Q  E  S  K  C  *
```

Fig. 1　The nucleic acid and protein sequences of RME

Table 1　The sequence of primers

Primer name	Sequence
NE6(+)	5′ TTCCCGGGATGTTAAATTTGGATGCT 3′
NE6(−)	5′ TAGAATTCTTAAATCCGGTACGTTG 3′
NE4(+)	5′ TTCCCGGGATGACTAATTCGTTGAAC 3′
NE4(−)	5′ AAGAATTCTTACACTTCATTAAGTGTATC 3′
EV7(+)	5′ TACCCGGGATGTTATGTTTGTATTGTCC 3′
EV7(−)	5′ ATGAATTCTCACTTACAATTTCGAATAG 3′
EV6(+)	5′ TACCCGGGATGGCACCAGCTAACATCC 3′
EV6(−)	5′ TAGAATTCTCATTGAAAAGGTTGTGCTTG 3′
EV4(+)	5′ TTCCCGGGATGGCAAATACAAATGGATTAG 3′
EV4(−)	5′ TTGAATTCTTAACACTTAGATTCTTGAGATC 3′

1.2.3　蛋白质的诱导表达，纯化和鉴定．a. 将构建的质粒分别转化 BL21(DE3)感受态细胞获得表达菌株．分别挑取 pET30a(+)-RME 和 pET30a(+)空载体表达菌的新鲜单菌落接种于 50 ml 含卡那霉素(终浓度 100 μg/L) LB 液体培养基中，200 r/min，37℃ 振荡培养，当细菌浓度生长至吸光度 A_{600} 为 0.6～0.8 时，加入终浓度 1.0 mmol/L IPTG 诱导，同时设未诱导对照，继续在 37℃ 培养 3 h，离心收集菌体，取出一部分用于分析总蛋白其余用于提取包涵体蛋白．包涵体的提取按《分子克隆实验指南》进行．在纯化的包涵体蛋白中加入 8 mol/L 尿素，室温放置 30 min，使蛋白质充分溶解变性，18 000 r/min 离心后取上清．上清采用 Ni-NTA 树脂(Novagen 公司)纯化，具体方法按说明书进行．b. 分别挑取表达菌 pGEX-3X-EV7、pGEX-3X-EV6、pGEX-3X-EV4、pGEX-3X-NE6、pGEX-3X-NE4 和 pGEX-3X 空载体的新鲜单菌落接种到 50 ml 含 Amp(终浓度 50 mg/L)的 LB 液体培养液中，200 r/min，37℃ 培养至 A_{600} 为 0.6～0.8 时，向培养液中加入 IPTG 至终浓度为 1.0 mmol/L，同时设未诱导对照，诱导培养 4 h 后收集菌液，加入 1/10 体积 STE (10 mmol/L Tris-HCl pH8.0，1 mmol/L EDTA，150 mmol/L NaCl)缓冲液悬浮细胞．冰浴超声破碎，4℃，12 000 r/min 离心 20 min，收集上清中可溶性蛋白，采用 GST 亲和树脂(Novagen 公司)纯化，具体方法按说明书进行．

1.2.4　重组蛋白的表达鉴定．取纯化后的样品 1 μg，加入等体积的 2×上样缓冲液，沸水浴煮

5 min，进行 12%的 SDS-PAGE，考马斯亮蓝染色检测蛋白质的表达.

1.2.5　重组蛋白的抗原性鉴定. 100 μl PBST 稀释的 500 ng 纯化的重组蛋白及 RV (Wa 株)包被 ELISA 板，空载体总蛋白作阴性对照，每个样品做 3 个重复，4℃过夜. PBST 洗 3 遍，每孔加入 200 μl 封闭液(PBST + 2% BSA)，37℃封闭 2 h 后，同上洗板 3 次，加入 100 μl 抗鼠轮状病毒多抗(PBST 1∶3 000 稀释)，37℃作用 2 h. 洗板 3 次，加入 HRP 标记的抗鼠 IgG(PBST 1∶3 000 稀释)，37℃作用 2 h，洗板 3 次，加 100 μl OPD-H_2O_2 底物显色液，37℃避光显色 10 min，加 50 μl 2 mol/L H_2SO_4 终止液，在酶标测定仪波长 492 nm 处测吸光度值.

1.2.6　动物免疫. 动物试验均在中国科学院遗传与发育生物学研究所试验动物中心负压仓进行. 12 只小鼠分为两组，一组腹腔注射 100 μl 含 30 μg RME 的 PBS 溶液，一组注射 100 μl PBS 溶液作为对照. 第一次注射用完全弗氏佐剂，第二次和第三次注射用不完全弗氏佐剂. 每 2 周注射一次. 分别于免疫前和最后一次免疫后 2 周取血.

1.2.7　抗体效价检测. ELISA 检测小鼠血清 IgG 滴度，ELISA 检测方法同 **1.2.5**.

1.2.8　病毒培养与纯化. Wa 株轮状病毒用终浓度为 10 mg/L 胰酶于 37℃处理 1 h. 细胞培养皿内 MAC145 细胞长成致密单层时，用 PBS 轻洗 3 遍，接种胰酶处理的病毒，于 37℃吸附 1 h，弃去未结合病毒，加入 9 ml 含 0.5 mg/L 胰酶的无血清 DMEM，于 37℃ 5% CO_2 细胞培养箱中培养，待细胞 70%发生病变时收获病毒，反复冻融 3 次裂解细胞释放病毒，细胞裂解液 10 000 r/min 离心 5 min 去除细胞碎片，上清于 SW41Ti 转头，25 000 r/min 离心 2 h，沉淀用 TNC (10 mmol/L Tris-HCl pH 7.5，140 mmol/L NaCl，10 mmol/L $CaCl_2$)缓冲液重悬，在 35%蔗糖垫，SW41Ti 转头，30 000 r/min 离心 2.5 h，沉淀用 TNC 缓冲液重悬. 病毒滴度以蚀斑形成单位(plaque form unit，PFU/ml)来表示，测定方法见文献[27].

1.2.9　蚀斑减数中和试验. 将 6 只 RME 腹腔免疫小鼠的抗血清各取 100 μl混合，6 只 PBS 腹腔免疫小鼠的血清各取 100 μl混合作为负对照，本试验无正对照. 将待测血清在 56℃水浴 30 min 灭活处理，用 PBS 缓冲液连续两倍倍比稀释每个待检样品，0.1 ml 每个稀释样品与等体积的含有 200 个 PFU 胰酶处理过的病毒悬液混合，37℃水浴作用 1 h，取 0.1 ml 病毒 - 血清混合物接种到 6 孔板长成致密单层的 MAC145 细胞上，37℃吸附 1 h，弃掉吸附液，用 PBS 缓冲液轻洗单层细胞一遍，洗去未结合病毒，每孔加入 2 ml 营养琼脂(含 0.5 mg/L 胰酶的无血清 DMEM 配制的 3%低熔点琼脂糖)，室温静置约 15 min 待琼脂凝固以后倒置于 5% CO_2 培养箱中培养 3～5 天，待没有加血清只加病毒的培养孔出现清晰可见的蚀斑时(每个孔约形成 100 PFU 左右)进行蚀斑计数，免疫血清中和抗体的滴度，用保护细胞使蚀斑数减少 50%的血清稀释度的倒数表示. 每个稀释样品重复 4 次.

2　结　　果

2.1　蛋白质表达和纯化

原核表达载体 pET30a(+)-RME，被选择为融合蛋白部分的单个抗原表位肽(EV7、EV6、EV4)的原核表达载体 pGEX-3X-EV7、pGEX-3X-EV6 和 pGEX-3X-EV4，以及作为对照与蛋白抗原表位不相关的短肽序列(NE6 和 NE4)的原核表达载体 pGEX-3X-NE6 和 pGEX-3X-NE4，经酶切检测和序列测定均证明外源基因在载体中的插入方向和位置正确(图 2). 经 IPTG 诱导表达的重组蛋白用 SDS-PAGE 检测，如图 3 所示，与对照载体相比，各重组蛋白均表达出具有相应分子质量的特异性蛋白条带，证明重组蛋白能够正确表达.

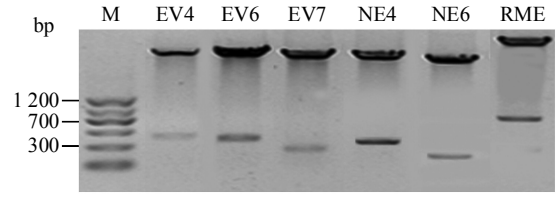

Fig. 2　Detection of the clones by enzyme digestion

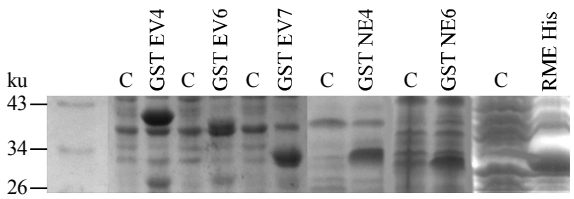

Fig. 3　SDS-PAGE detection of induced and noninduced(C) recombinant proteins in *E. coli*

2.2　重组蛋白抗原性鉴定

纯化重组蛋白(图 4)，以 RV 多克隆抗体为一

抗，ELISA 检测重组蛋白的抗原性．结果如图 5 所示，RME，EV7，EV6 和 EV4 可以在很高的滴度下被轮状病毒多克隆抗体识别,尤其是 EV6，相比较而言，与 NE4 和 NE6 的反应滴度较低．这说明所选择的抗原表位肽 EV7，EV6，EV4 在大肠杆菌中串连融合表达能够折叠成类似天然蛋白位于轮状病毒表面的空间构象，具有较好的抗原性，单个的 EV7，EV6，EV4 蛋白空间构象与其在 RME融合蛋白中的空间构象也都有某种程度的类似．

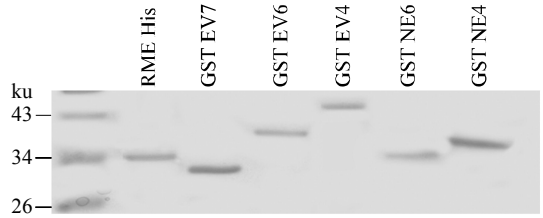

Fig. 4　SDS-PAGE detection of purified recombinant proteins

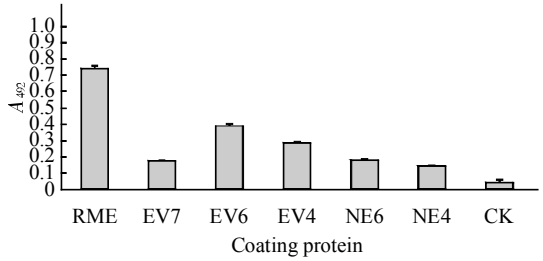

Fig. 5　ELISA detection of the antigenecity of the recombinant proteins

The polyclonal antibody to rotavirus was used as the primary antibody.

2.3　RME 诱导小鼠产生抗体特异性的检测

纯化的 RME 蛋白腹腔注射免疫小鼠 3 次，注射后第 42 天取小鼠血清，ELISA 检测血清效价．分别以 Wa 株病毒，RME，EV7，EV6，EV4，NE6，NE4 包被 ELISA 反应板，以注射 PBS 溶液的小鼠血清作为阴性对照，结果显示，小鼠抗血清和 NE6，NE4 的反应 IgG 抗体滴度很低，仅有 1∶400 左右，而和 RME，EV7，EV6 和 EV4 反应的 IgG 抗体滴度非常高，和 RME 反应的 IgG 抗体滴度达到 1∶40 000，和抗原表位 EV7，EV6 和 EV4 反应的 IgG 抗体滴度达 1∶10 000～1∶20 000 (图 6)，这说明 RME 蛋白在小鼠中诱导的抗体是特异的，和 RV 其他片段没有交叉反应．小鼠抗 RME 血清还可以识别轮状病毒全病毒颗粒，IgG 抗体滴度为 1∶2 500．以上结果表明在大肠杆菌中表达的 RME 上 EV4, EV6, EV7 能够折叠成与其在天然轮状病毒颗粒中的相似构象，尤其是某些重要的抗原表位．而且 8 mol/L 尿素溶液并没有影响 RME 蛋白的二级结构．

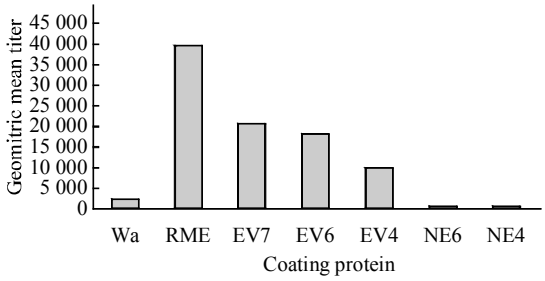

Fig. 6　ELISA detection of the titer of the anti-RME serum

2.4　小鼠抗 RME 血清可以体外中和轮状病毒

在 MAC145 细胞中进行轮状病毒体外中和试验，阴性对照为注射 PBS 溶液的小鼠血清，RME 免疫小鼠抗血清的稀释倍数分别为 16、32、64、128 和 256，没有阳性对照，试验重复 4 次．数据分析结果表明，由 RME 诱导的小鼠产生的抗血清在稀释 64 倍时可以使 Wa 株侵染 MAC145 细胞形成的蚀斑数减少 50%以上．随着样品稀释倍数加大，蚀斑数逐步递增，当血清稀释 256 倍时，蚀斑数接近阴性对照．这个结果证明 RME 可诱导小鼠产生针对 RV 的中和抗体．

3　讨　　论

RV 的结构蛋白 VP7，VP6 和 VP4 具有良好的免疫原性，并且 VP4 和 VP7 诱导产生的中和抗体可以被动保护寄主不被 RV 侵染，因此在 RV亚单位疫苗的研发中具有重要作用．亚单位疫苗具有较高的生物安全性，但是由单个蛋白质作为亚单位疫苗免疫效果往往较低，不能对机体产生有效的保护，这也是病毒样颗粒(virus-like particle，VLP)作为亚单位疫苗被广泛开发研究的原因．但不可否认的是，利用动物组织培养生产 VLP 成本太高，而利用植物生物反应器生产 VLP 则尚未克服产生效率低的技术问题．我们将 RV 的重要结构蛋白 VP7，VP6 和 VP4 的抗原表位串联到一起，希望这种含多抗原表位的人工重组蛋白有比单个蛋白质高的免疫原性，而又避免了同时表达多个蛋白质的复杂性或生产 VLP 的技术难题．实验结果表明人工合成的 RME 可以被轮状病毒多克隆抗体识别，具

有较好的抗原性. 利用原核表达的 RME 蛋白免疫小鼠，小鼠的抗血清不仅可以特异地识别 RME 和单独的 EV7，EV6 和 EV4 蛋白，也能够识别天然 RV 颗粒，尽管 ELISA 的结果显示，RME 抗血清识别 RV 粒子的效价较低，可是中和试验证明该抗血清还能够抑制 RV 在 MAC145 细胞中形成蚀斑，这说明 RME 上的表位肽可以某种程度地正确折叠成其原有的空间构象，具有良好的免疫原性，尽管这些表位肽中间没有任何连接肽段.

Gunn 等[28]用合成的 6 个 VP7 肽段(AA 66～76、AA 90～103、AA 174～183、AA 208～225、AA 247～259、AA 275～295)分别免疫兔子，产生的抗血清在固相放射性免疫检测中可以识别同型肽段，但都不能识别全病毒也没有中和抗性，而且轮状病毒的多克隆中和抗体也不能识别这些片段. Ijaz 等合成 VP4 的 AA 232～255，VP7 的 AA 275～295 和 VP6 的 AA 640～660 片段可诱导小鼠产生同源氨基酸序列特异性的抗体，并且在蛋白质印迹检测中可以和同型或异型相应病毒蛋白反应，但在 ELISA 检测中，除了 VP6 肽段，其他肽段产生的抗体都不能识别完整的病毒粒子[29]. 上述结果表明，这些肽段序列并不在病毒表面，或者由于肽段太短不能折叠成正确的抗原构象. 我们设计表达的 RME 能够诱导小鼠产生特异性抗 RV 的中和性抗体，但是由于 VP7 蛋白和 VP4 蛋白中和抗原表位同时存在于 RME 中，因此无法判定是 EV7 或 EV4 或者两者同时在诱导中和抗体中起作用.

本实验证明 RME 是一个良好 RV 抗原，这个结果为研究更加简单有效的 RV 亚单位疫苗提供了依据和基础，如果利用植物作为生物反应器，RME 或进一步改进的重组蛋白有希望替代 VLP 成为既安全、高效又经济的候选疫苗.

参 考 文 献

[1] Dyall-Smith M L, Lazdins I, Tregeart G W, *et al*. Location of the major antigenic sites involved in rotavirus serotype-specific neutralization. Proc Natl Acad Sci USA, 1986, **83**(10): 3465−3468

[2] Glass R I, Keith J, Nakagomi O, *et al*. Nucleotide sequence of the structural glycoprotein VP7 gene of Nebraska calf diarrhea virus rotavirus: comparison with homologous genes from four strains of human and animal rotaviruses. Virology, 1985, **141**(2): 292−298

[3] Green K Y, Midthun K, Gorziglia M, *et al*. Comparison of the amino acid sequences of the major neutralization protein of four human rotavirus serotypes. Virology, 1987, **161**(1): 153−159

[4] Gunn P R, Sato F, Powell K F H, *et al*. Rotavirus neutralizing protein VP7: antigenic determinants investigated by sequence analysis and peptide synthesis. J Virol, 1985, **54**(3): 791−797

[5] Taniguchi K, Hoshino Y, Nishikawa K, *et al*. Cross-reactive and serotype-specific neutralization epitopes on vp7 of human rotavirus: nucleotide sequence analysis of antigenic mutants selected with monoclonal antibodies. J Virol, 1988, **62**(6): 1870−1874

[6] Kobayashi N, Taniguchi K, Urasawa T, *et al*. Analysis of the neutralization epitopes on human rotavirus VP7 recognized by monotype-specific monoclonal antibodies. J Gen Virol, 1991, **72** (Pt 8): 1855−1861

[7] Estes M K. Rotavirus and their replication//Fields B N, Howley P M. Virology: 4th. Philadelphia: Lippincott-Raven Press, 2001: 1747−1785

[8] Jayaram H, Estes M K, Prasad B V. Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication. Virus Res, 2004, **101**(1): 67−81

[9] Clark S M, Roth J R, Clark M L, *et al*. Trypsin enhancement of rotavirus infectivity: mechanism of enhancement. J Virol, 1981, **39**(3): 816−822

[10] Estes M K, Graham D Y, Mason B B. Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: molecular mechanisms. J Virol, 1981, **39**(3): 879−888

[11] Arias C F, Romero P, Alvarez V, *et al*. Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity. J Virol, 1996, **70**(9): 5832−5839

[12] Arias C F, Lizano M and López S. Synthesis in *Escherichia coli* and immunological characterization of a polypeptide containing the cleavage sites associated with trypsin enhancement of rotavirus SA11 infectivity. J Gen Virol, 1987, **68**(Pt 3): 633−642

[13] Lopez S, Arias C F, Bell J R, *et al*. Primary structure of the cleavage site associated with trypsin enhancement of rotavirus SAll infectivity. Virology, 1985, **144**(l): 11−19

[14] Larralde G, Li B, Kapikian A Z, *et al*. Serotype-specific epitope(s) present on the VP8* subunit of rotavirus VP4 protein. J Virol, 1991, **65**(6): 3213−3218

[15] Padilla-Noriega L, Dunn S J, Lopez S, *et al*. Identification of two independent neutralization domains on the VP4 trypsin cleavage products VP5* and VP8* of human rotavirus ST3. Virology, 1995, **206**(1): 148−154

[16] Mackow E R, Shaw R D, Matsui S M, *et al*. The rhesus rotavirus gene encoding protein VP3: Location of amino acids involved in homologous and heterologous rotavirus neutralization and identification of a putative fusion region. Proc. Natl Acad Sci USA, 1988, **85**(3): 645−649

[17] Ruggeri R M, Greenberg H B. Antibodies to the trypsin cleavage peptide VP8* neutralize rotavirus by inhibiting binding of virions to target cells in culture. J Virol, 1991, **65**(5): 2211−2219

[18] Matsui S M, Offit P A, Vo P T, *et al*. Passive protection against rotavirus-induced diarrhea by monoclonal antibodies to the heterotypic neutralization domain of VP7 and the VP8 fragment of VP4. J Clin Microbiol, 1989, **27**(4): 780−782

[19] Zarate S, Espinosa R, Romero P, *et al*. The VP5* domain of VP4 can mediate attachment of rotavirus to cells. J Virol, 2000, **74**(2): 593−599

[20] Lizano M, López S, Arias C F. The amino-terminal half of rotavirus SA114fM VP4 protein contains a hemagglutinin domain and primes for neutralizing antibodies to the virus. J Virol, 1991, **65**(3): 1383-1391

[21] Lee J L, Babiuk L A, Harland R, *et al*. Immunological response to recombinant VP8* subunit protein of bovine rotavirus in pregnant catle. J Gen Virol, 1995, **76**(Pt10): 2477-2483

[22] Anthony H, McNeal M M, Basu M, *et al*. Intranasal or oral immunization of inbred and outbred mice with murine or human rotavirus VP6 proteins protects against viral shedding after challenge with murine rotaviruses. Vaccine, 2002, **20** (27-28): 3310-3321

[23] Anthony H, McNeal M M, Flint J A, *et al*. The level of protection against rotavirus shedding in mice following immunization with a chimeric VP6 protein is dependent on the route and the coadministered adjuvant. Vaccine, 2002, **20**(13-14): 1733-1740

[24] Anthony H C, Basu M, McNeal M M, *et al*. Functional mapping of protective domains and epitopes in the rotavirus VP6 protein. J Virol, 2000, **74**(24): 11574-11580

[25] McNeal M M, Stone S C, Basu M, *et al*. Protection after intranasal immunization of mice with a chimeric VP6 protein does not require intestinal IgA. Virology, 2006, **346**(2): 338-347

[26] Mitchell D B, Both G W. Completion of the genomic sequence of the simian rotavirus SA11: nucleotide sequences of segments 1, 2, and 3. Virology, 1990, **177**(1): 324-331

[27] Ciarlet M, Ludert J E, Liprandi F. Comparative amino acid sequence analysis of the major outer capsid protein (VP7) of porcine rotaviruses with G3 and G5 serotype specificities isolated in Venezuela and Argentina. Arch Virol, 1995, **140**(3): 437-451

[28] Gunn P R, Sato F, Powell K F H, *et al*. Rotavirus neutralizing protein VP7: antigenic determinants investigated by sequence analysis and peptide synthesis. J Virol, 1985, **54**(3): 791-797

[29] Arias C F, López S, Espejo R T. Gene protein products of SAll simian rotavirus genome. J Virol, 1982, **41**(1): 42-50

Linked Multi-epitopes of Several Rotavirus Structural Proteins as Antigens*

YANG Yan-Mei[1,2,3], LI Xia[4], YANG Hui[4], QIAN Yuan[5], ZHANG You[5],
Huo Yan[1,2,3], FANG Rong-Xiang[1,2]**, CHEN Xiao-Ying[1,2]**

([1] *State Key Laboratory of Plant Genomics, Institute of Microbiology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100101, China;
[2] *National Plant Gene Research Center, Beijing* 100101, China;
[3] *Graduate School of The Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100039, China;
[4] *Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing* 100097, China;
[5] *Laboratory of Virology, Capital Institute of Pediatrics, Beijing* 100020, China)

Abstract The full length cDNAs of rotavirus structural protein genes, *vp4*, *vp6* and *vp7* were cloned from the rotavirus infected child stool specimen in Beijing through RT-PCR. The protein sequences and their antigenic determinants were predicted. According to the epitope peptide sequences, 4 epitopes from these structural proteins were chosen, a DNA fragment encoding all these epitopes was synthesized and cloned into the prokaryotic expression vector. Multiple epitope protein (rotavirus multiple epitopes, RME) expressed in *E. coli* can be recognized by the polyclonal antibody of rotavirus, and induce immune response in mice. The specific antibody IgG induced by RME can recognize human rotavirus (Wa strain), RME itself as well as individual epitope peptides. The antibody titer of IgG to RME is high (1∶40 000), while the titers to EV4, EV6 or EV7 are in a range of 1∶10 000 to 1∶20 000. However the IgG titer to the Wa strain is lower, i.e., 1∶2 500. Intriguingly, the RME-induced IgG can neutralize the Wa strain rotavirus challenge in the MAC145 cell line. This research has laid the foundations of producing effective bioengineering vaccines to rotavirus.

Key words rotavirus, bioengineering vaccine, multi-epitopes
DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00312

*This work was supported by a grant from Hi-Tech Research and Development Program of China (20060487018).

**Corresponding author.
FANG Rong-Xiang. Tel: 86-10-64858245, E-mail: fangrx@im.ac.cn
CHEN Xiao-Ying. Tel: 86-10-64861838, E-mail: chenxy@im.ac.cn

Received: July 30, 2010 Accepted: November 10, 2010