

116-12²

R373.22

脊髓灰质炎病毒缺陷型载体瞬时
表达系统 I 的构建*李琦涵 赵红玲[✓] 王丽春 孙明
姜莉 董承红 王炯

(中国医学科学院 中国协和医科大学 医学生物研究所, 昆明 650107)

摘要 为探索可表达较大片段外源基因的脊灰病毒重组载体, 以 HBV-S 基因置换脊灰病毒的 PI 基因, 同时以另一途径提供脊灰病毒 PI 结构蛋白, 经转染入 HeLa 细胞中形成缺陷型重组病毒颗粒, 此病毒可以感染新的细胞, 并表达其重组的外源基因, 但不产生子代病毒。实验结果表明, 这种瞬时表达系统的构建, 为脊灰病毒缺陷型重组载体用于基因转导技术打下基础。

关键词 脊灰病毒, 缺陷型重组体, 外源基因

随着分子病毒学技术的发展, 脊髓灰质炎病毒(以下简称脊灰病毒或 PV)作为一种重组病毒载体表达外源基因的研究已日益受到重视^[1], 在可表达小片段外源基因的第一代脊灰活病毒重组载体研究基础上^[2], 一种可以表达较大片段外源基因(>2.0 kb)的脊灰病毒缺陷型重组载体在理论和技术上都得到了发展^[3], 该系统的基本思路是病毒结构蛋白和病毒复制酶系统的分离^[4], 尽管其构建技术略嫌复杂, 但其具有的优势表现在: 可表达较大片段的外源基因, 不产生可繁殖的子代病毒; 具有良好的生物安全性; 同时, 由于其表达的目的基因产物产生在细胞内, 故可诱导机体产生完整的免疫反应。基于这样的基础, 探索有效的脊灰病毒缺陷型重组载体系统, 已成为病毒基因技术领域中的一个重要研究方向。本文介绍的就是构建这种重组载体系统中的一个类型——瞬时表达系统的研究工作。

1 材料与方 法

1.1 质粒

pXPA 含有 SV40 启动子序列及脊灰病毒 I 型 Mahoney 株基因全 cDNA 序列(本实验室保存), pHBV 含有 HBV 全基因序列(中国 NC 株, 本实验室保存), 均生长于含氨苄青霉素 75 μg/mL LB 中, 37℃ 过夜生长, 碱裂解法提取 DNA, Sapharose-2B 柱纯化, -20℃ 冻存备用。

1.2 细胞与病毒

HeLa 细胞生长于 DMEM-5% 小牛血清(本所产品)培养基中, 37℃ 5% CO₂, 生长成单层备用, 病毒 Mahoney 株感染 HeLa 单层细胞(moi. 1), 37℃, 7 h 后收获细胞, 冻融破碎细胞, -20℃ 保存备用。

收稿日期: 1998-04-10, 修回日期: 1998-09-21

* 国家自然科学基金 39670040

云南省面上基金 96C116M 资助

1.3 重组质粒的构建

按常规克隆方法^[4],分别构建含有脊灰病毒壳蛋白 VP1 表达载体和含有 HBV-S 基因及脊灰病毒复制酶系统基因的表达载体,即 pRc-P1 和 pXD-HBS,用于前者构建使用的 PCR 引物为:5'-AGTCAAGCT-TATGGGTGCTCAGGTTTCA-3'和 5'-AGTAAGCTTATATGTGGTCAGATCCTTG-3';用于后者使用的引物为:5'-CCTGACGTCATGGGAGGTTGG-3'和 5'-GAGCTCGGGTCAAATGTATACCC-3'。以 pXPA 为模板,用 PCR 扩增取得 P1 的全片段,两端带 HindⅢ 位点,插入 pRcCMV 中;同时,以 pHBV 为模板,PCR 扩增取得全 HBV-preS-S 片段,两端分别带有 AatⅡ 和 SnaBⅠ 位点,利用 pXPA 质粒中 PV 基因上第 1117 位的 AatⅡ 位点和第 2953 位的 SnaBⅠ 位点,酶切去除之间的 PV 部分结构蛋白,将 PCR 取得的 HBV-preS-S 基因片段置入该位置,详细过程见图 1。最终构建完成的质粒以 CsCl 离心纯化,测序确证,-20℃ 冻存备用。

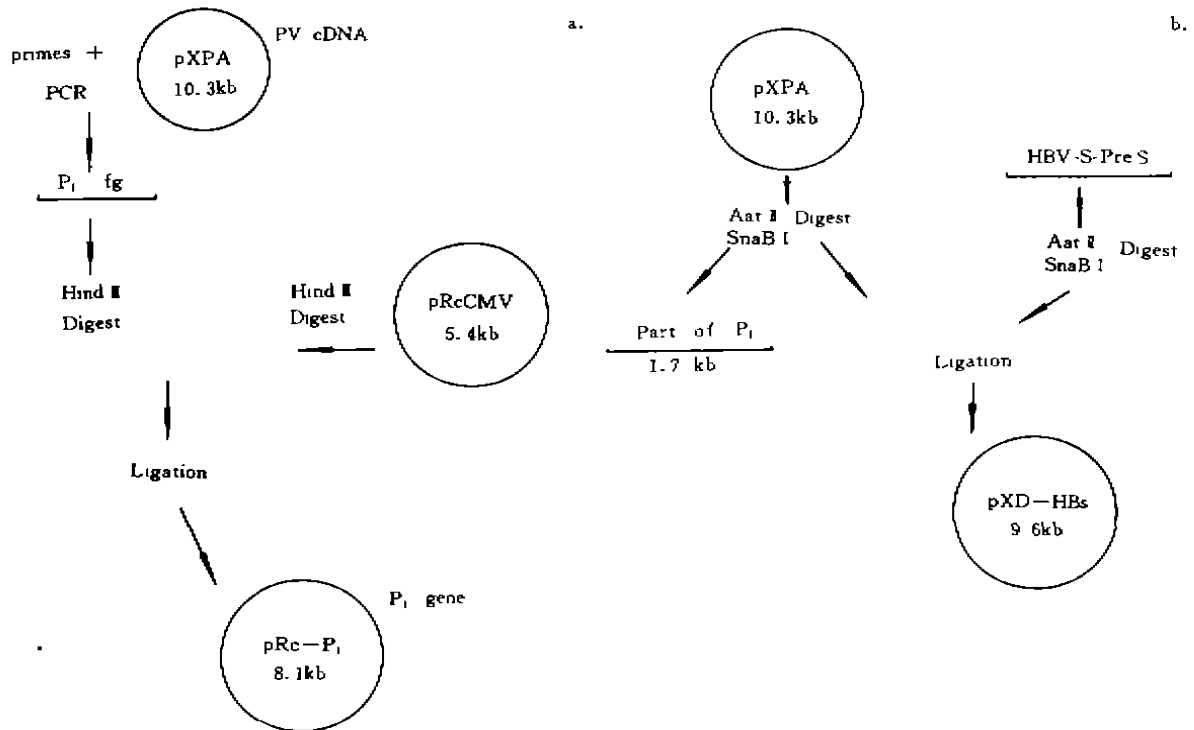


图 1 用于构建脊灰病毒缺陷重组系统的质粒构建过程

- a. 病毒结构蛋白表达载体(pRc-P1)的构建;
b. 病毒复制酶系统与 HBV-preS-S 基因重组表达载体(pXD-HBs)的构建。

Fig. 1 The Construction of recombinant plasmids of poliovirus defective vector system

- a. The Construction of expression plasmid of PV capsid protein (pRc-P1);
b. The Construction of expression plasmid of PV replicase and HBV-preS-S gene (pXD-HBs)

1.4 质粒对细胞的转染及重组病毒的标记

使用 Lipofectin 转染方法,取 Lipofectin(Bio-Rad) 50 μ L,加入甲硫氨酸缺陷-DMEM 培养液 100 μ L,室温静置 40 min,同时,纯化的 pRc-P1 和 pXD-HBS 各 4 μ g 加入同样培养液 100 μ L,二者混合后,再置室温 25 min,混合液转入已经同样培养液洗过的 HeLa 单层细胞(75%),再加入相同培养液 0.8 mL,37℃ 培养 16 h(5%

CO_2)^[5], 移出上清, 加入甲硫氨酸缺陷-DMEM-2% 胎牛血清 (Gibco) 2 mL, 同时加入 ³⁵S-甲硫氨酸标记 (40 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$), 37 $^{\circ}\text{C}$, 分别培养 24、48、72 h, 除去上清后, 用橡皮刮取出细胞, 悬于 RSB (10 mmol/L Tris·HCl pH 7.5, 1.5 mmol/L MgCl_2)-NP-40 (1%), 4 $^{\circ}\text{C}$ 2 h, 并超声处理, 离心去除细胞核后, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.5 共转染后缺陷型病毒颗粒形成分析

制备 15%~30% 蔗糖梯度离心管 (蔗糖溶于 RSB-0.1% NP-40) 将共转染后的细胞样品置于蔗糖顶端, 38 000 r/min (SW40 转头) 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 2.5 h, 分离取样, 每一样品量 300 μL , 从中取出 15 μL , 液闪仪 (Beekman) 测定其 cpm 值, 绘制曲线, 取 160S 峰样品透析, 4 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

1.6 Western 免疫印迹分析

转染细胞样品或缺陷病毒感染细胞样品, 上样于 12% SDS-PAGE 胶电泳, 并电转移至硝酸纤维膜上, 此膜经 TBST (10 mmol/L Tris·Cl pH 8.0, 150 mmol/L NaCl, 0.05% Tween-20)-1% BSA 于室温封闭 30 min, 再加抗脊灰病毒 I 型抗体或抗 HBs 抗体于无 BSA 的 TBS 中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 结合 30 min, TBST 洗三次, 加入酶标二抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 30 min 同法洗三次, 5-溴-4-氯-3-吡啶磷酸/氮兰四唑 (BCIP/NBT) 对膜显影。

1.7 免疫沉淀

160S 峰值样品加于 RIPA-BSA (0.5 mg/mL, 内含 10 mmol/L Tris HCl pH 7.5, 150 mmol/L NaCl, 1% 去氧胆酸, 1% Triton X-100, 0.1% SDS) 和抗脊灰病毒 I 型抗体 (1:100 稀释), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h 后, 抗原-抗体复合物由十倍体积的金葡萄菌 (10%) 于 0 $^{\circ}\text{C}$ 吸附 1 h, 12 500 r/min, 离心 15 s。沉淀以 5% 蔗糖-1% NP40-500 mmol/L Tris HCl pH 7.4-5 mmol/L EDTA 洗三次, RIPA 洗一次, 再于 SDS 缓冲液中煮沸 5 min, 离心除去金葡萄菌体, 上清以 12% SDS-PAGE 胶电泳, 干胶后自显影于 X 光片。

2 结果

2.1 质粒构建

为缺陷型重组载体 (瞬时表达系统 I) 所需的两个实验性质粒, pRC-P1 和 pXD-HBs 经酶切、连接和克隆过程完成构建 (见图 1), 经酶切鉴定和测序分析, 确定了其具有正确的接头序列和读码框架。

2.2 pRC-P1 和 pXD-HBs 分别在细胞中的表达

为明确 pRC-P1 和 pXD-HBs 是否可以在 HeLa 细胞中单独表达, 将两个质粒分别转染 HeLa 细胞, 转染 24 h 后收集的细胞样品, 经 Western blot 分析, 结果表明两个质粒可以在细胞中将相应基因表达 (见图 2a、b)。

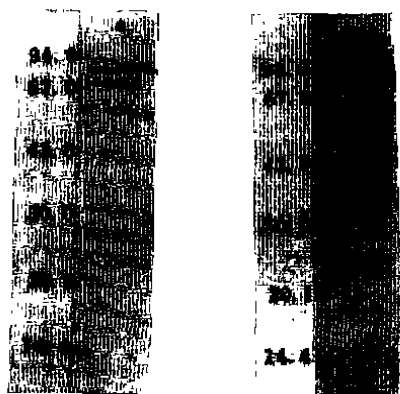


图 2 脊灰病毒 P1 蛋白和镶嵌在其复制酶基因中的 HBV-S 蛋白的表达
a. P1 蛋白的 Western blot 分析; b. HBV-S 蛋白的 Western blot 分析。

Fig. 2 The expression of P1 protein of poliovirus and HBV-S protein recombinant in poliovirus replicase

a. Western blot of P1 protein of poliovirus;

b. Western blot of HBV-S protein.

2.3 共转染后不同孵育时间对缺陷型病毒颗粒产生及形成的分析

pRC-P1 和 pXD-HBS 共转染 HeLa 细胞后,从次日起出现细胞病变(见图 3A),其病变细胞在 24~72h 之间无明显增加,表明缺陷型病毒颗粒的形成是连续的,同时,亦表明从细胞中释放出来的病毒颗粒为缺陷型,因为它不能导致继续感染的细胞出现病变,这是受转染的细胞不能在短时间内较快出现全面病变的基本原因。整个系统中缺陷型病毒颗粒形成的分析见图 3B,由图中利用蔗糖梯度离心所得到的 160S 颗粒形成结果看,从转染后的 24h 到 72h 之间均有病毒颗粒产生,但所形成的病毒颗粒数量无明显差异,其明确原因尚不能肯定,但很有可能是由于两种转染进入细胞的基因持续表达,从而不断产生缺陷型病毒颗粒的缘故(图 3B-b)。

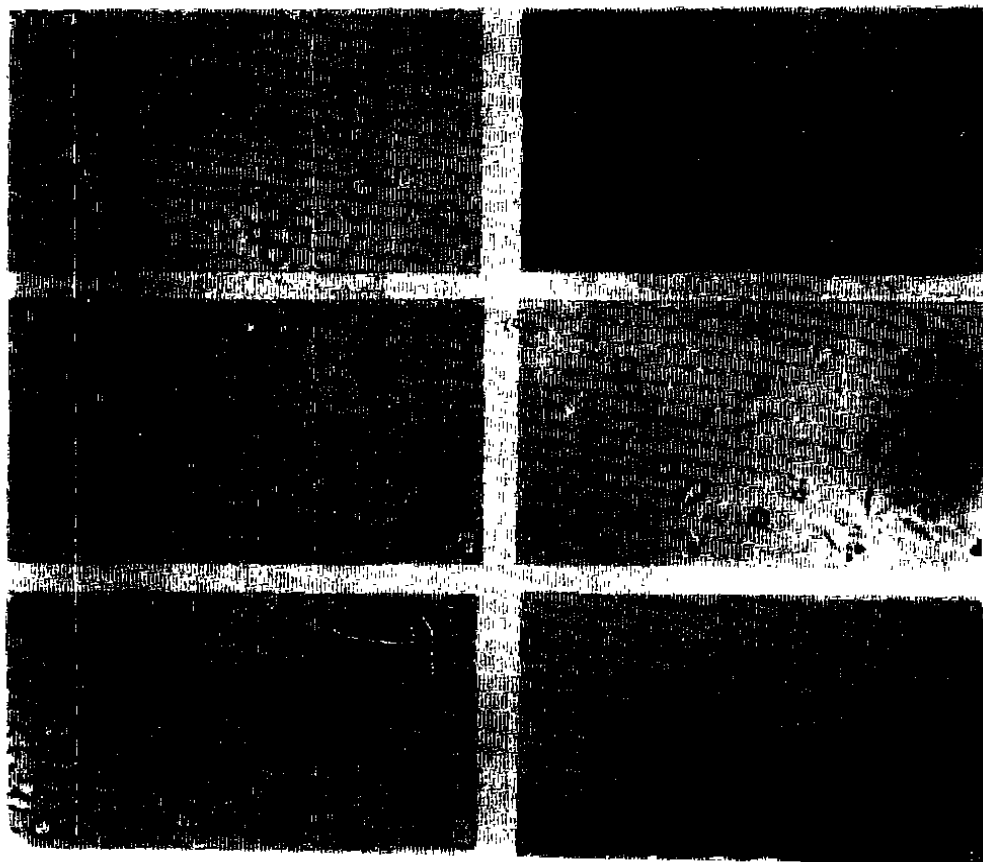


图 3A 共转染后不同时间的细胞变化 (200X)

a. 24 h; b. 24 h 细胞对照; c. 48 h; d. 48 h 细胞对照; e. 72 h; f. 72 h 细胞对照。

Fig. 3A The CPE of HeLa cell co-transfected with plasmids (200X)

a. 24 h; b. Cell control at 24 h; c. 48 h; d. Cell control at 48 h; e. 72 h; f. Cell control at 72 h.

2.4 缺陷型重组病毒颗粒的确定

为确定共转染后所形成的缺陷型病毒颗粒具有脊灰病毒的外壳蛋白,我们使用免疫沉淀法,将经蔗糖梯度离心分离出的 160S 峰值样品透析后与抗脊灰病毒 I 型抗体 37℃ 孵育结合,再经金葡萄菌体结合后,煮沸裂解,上样 SDS-PAGE 胶电泳,曝光结果见图 4,此结果呈现典型的

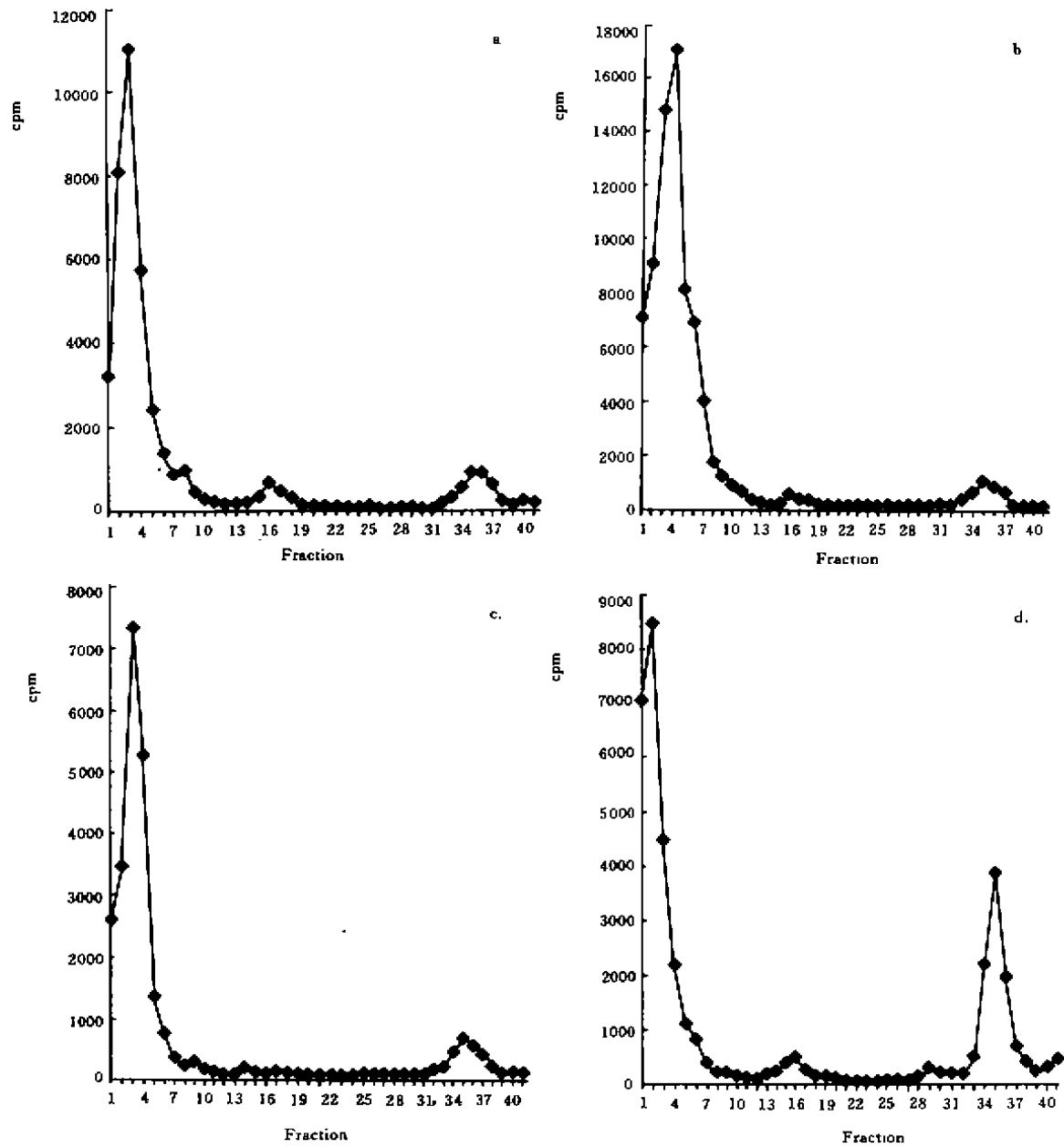


图 3B 共转染后细胞内缺陷型重组病毒颗粒的形成分析

a. 24 h; b. 48 h; c. 72 h; d. 病毒对照。

Fig 3B Analysis of defective recombinant particles forming after co-transfection

a. 24 h; b. 48 h; c. 72 h; d. Virus control.

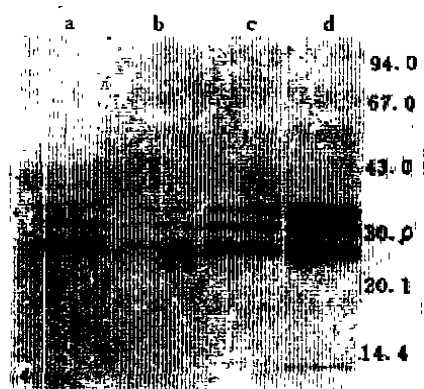


图 4 共转染样品经蔗糖梯度离心后 160S 成分的免疫沉淀结果

a. 转染 24h 160S 成分; b. 转染 48h 160S 成分;
c. 转染 72h 160S 成分; d. 72h 病毒对照。

Fig. 4 Immune precipitation of 160S sample from sucrose gradient after co-transfection

a. 160S sample at 24 h; b. 160S samples at 48 h;
c. 160S sample at 72 h; d. Virus control of 72 h

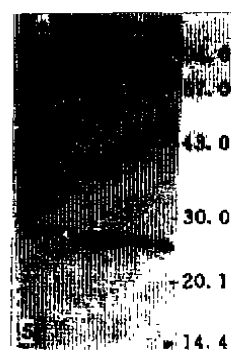


图 5 缺陷型重组病毒感染细胞后 HBV-S 的 Western blot 分析

Fig. 5 Western blot of HBV-S from the cell infected by defective recombinant virus

a. 缺陷型病毒感染 HeLa 细胞 72h 后, 抗 HBV-S 抗体对其的 Western blot 分析;
b. HBV-S 抗原对照 (HBV-S 基因工程疫苗)。
a. The Western Blot of HeLa cell infected with defective poliovirus in 72 h by anti-HBV-S antibody;
b. HBV-S antigenic control (HBV-S engineering vaccine).

脊灰病毒结构蛋白图形,提示在共转染过程中,确实存在具有脊灰结构蛋白外壳结构的病毒颗粒生成。

2.5 缺陷型病毒颗粒感染细胞后 HBV-S 的表达

当使用上述蔗糖梯度离心纯化后的 160S 样品即缺陷型病毒颗粒再次感染 HeLa 细胞后 72 h,收集细胞破碎后以 Western blot 检测,结果见图 5,此图提示细胞中有 HBV-S 的表达。

3 讨论

根据脊灰病毒天然缺陷颗粒的研究结果,已经明确了脊灰病毒缺陷型重组载体在理论上是完全可能的^[6]。但多方面的研究亦提示这个缺陷型载体系统的技术可行性仍需要全面地探索,才能从可靠、简便和经济的角度建立起一个具有实用意义的系统^[7,8]。上述结果可以肯定,我们所构建的缺陷型载体系统已表达了外源基因。图 5 中显示的结果表明:其所表达的产物(感染后 72 h 产物)稍大于对照的 HBV-S 抗原,是因它带有部分 pre-S 的缘故,但在感染后 48 h 左右经 Western Blot 分析(资料未显示),见到相同条带和一较大的蛋白片段。后者很可能是 HBV-S 产物和某些脊灰病毒的酶产物的复合体,但这仍需进一步明确。

目前,该技术仍有几个较为重要的问题需要考虑。

第一是如何提供足够数量的脊灰病毒结构蛋白,来包裹重组病毒 RNA。在这个方面,目前是使用含有脊灰病毒结构蛋白基因的重组痘苗病毒感染相应细胞,再以重组基因转染该细胞^[9]。在痘病毒感染过程中,脊灰病毒 P1 蛋白即可作为痘病毒的早期表达产物而产生,但痘

苗病毒感染周期较短,在感染5 h后,已有子代病毒生成,随即破坏细胞,不可能为脊灰缺陷重组病毒的形成提供足够的时间。我们为克服这一难点,使用共转染的方法,以一个合适的克隆载体表达P1蛋白,避免了痘苗病毒破坏细胞的可能,使缺陷病毒的形成有充分的时间,同时在显微镜下又可直接显示由于缺陷颗粒的形成而导致的细胞病变(见图3A)。

第二是如何有效地回收所形成的缺陷病毒颗粒,目前尚无新的突破,只能使用经典的蔗糖梯度离心的方法获得缺陷病毒颗粒。

第三是整个技术系统较为复杂,而且缺陷型病毒的获得率较低。为此,我们已发展了瞬时表达系统II,构建了通用型的重组质粒和可恒定表达P1蛋白的细胞系,该系统可望简化整个方法的技术程序和难度,并增加缺陷型病毒的获得率。

参 考 文 献

- 1 Hogle JM. Antigenic hybrids of poliovirus. *Nature*, 1988, 332:13
- 2 Murray M G, Glunis G, Morag F *et al*. Antigen chimeras of poliovirus as potential new vaccines. *Nature*, 1988, 332:81
- 3 李琦涵,郭仁.脊髓灰质炎病毒缺陷型重组载体系统,国外医学.流行病学传染病学分册,1997,5:219
- 4 Morrow C D, Porter D C, Ansardi D A *et al*. New approaches for mucosal vaccine for AIDS: encapsidation and serial passage of poliovirus replication that express HIV-1 proteins upon infection. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1994, 10:561
- 5 Malone R W, Felgner P L, Verme J M *et al*. Cationic liposome-mediated DNA transfection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86:6077
- 6 Percy N, Schultz A, Pincus S E *et al*. A poliovirus replicon containing the chloramphenicol acetyltransferase gene can be used to study the replication and encapsidation of poliovirus RNA. *J Virol*, 1992, 66:5040
- 7 Porter D C, Ansardi D C, Choi W S *et al*. Encapsidation of genetically engineered poliovirus minireplicons which express human immunodeficiency virus type I Gag and Pol proteins upon infection. *J Virol*, 1993, 67:3712
- 8 Porter D C, Ansardi D C, Morrow C D. Encapsidation of poliovirus replicon encoding the complete human immunodeficiency virus type I Gag gene by using a complementation system which provides the P1 capsid protein in trans. *J Virol*, 1995, 69:1548
- 9 Porter D C, Melsen L R, Compan R W *et al*. Release of virus-like particles from cells infected with poliovirus replicons which express human immunodeficiency virus type I Gag. *J Virol*, 1996, 70:2643

Establishment of Transient Expression System I of Poliovirus Defective Recombinant Vector

Li Qihan Zhao Honglin Wang Lichuang Sun Ming
Jiang Li Dong Chenghong Wang Jiong

(*Institute of Medical Biology, CAMS, PUMC, Kunming 650107*)

Abstract For investigating poliovirus recombinant defective vector system, the separated genes of poliovirus structure protein and replicase were induced into cell, the defective recombinant virus could be assembled. This virus is able to infect the cell and to express the extraneous gene in the cell, and, no filial virus would be produced. The transient expression system has been established in this work for investigating the applied technique of poliovirus defective recombinant system in gene transduction.

Key words Poliovirus, Defective recombinant, Extraneous gene