

EIAV *env* 基因在痘苗病毒中的表达及其免疫效果的观察\*代春铭<sup>1</sup>, 张晓燕<sup>1</sup>, 邵一鸣<sup>1\*\*</sup>, 沈荣显<sup>2</sup>

(1. 中国疾病预防控制中心性病艾滋病预防与控制中心病毒免疫室, 北京, 100050;

2. 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所疫病室, 黑龙江哈尔滨, 150001)

## Study on Immunity of Recombinant Vaccinia Viruses

Containing *env* Gene of EIAVDAI Chun-ming<sup>1</sup>, ZHANG Xiao-yan<sup>1</sup>, SHAO Yi-ming<sup>1\*\*</sup>, SHEN Rong-xian<sup>2</sup>

(1. Division of Research on Virology and Immunology, National Center for AIDS/STD Control and Prevention, CDC, Peking 100050, China; 2. Division of Research on EIAV, Harbin Veterinary Research Institute, Harbin 150001, China)

**Abstract:** In order to develop new vaccine candidate of *Equine infectious anemia virus*(EIAV), *env* gene of EIAV Chinese donkey leukocyte attenuated strain and its parental virus strain was inserted into the downstream of pE/L promoter of pSC65 vector, separately. The resulted recombinant vaccinia viruses were screened out by homologous recombination in TK region and the positive clone was confirmed with blue plaque assay. Protein expression was examined by Western blot. It was shown that the recombinant vaccinia viruses successfully expressed the complete EIAV Env proteins and induced significant cellular and humoral immune responses in the Balb/c mice by intramuscular inoculation. CTL specific lysis is 28% at most. The study will provide important elements for development of new EIAV genetic engineering vaccine.

**key words:** EIAV Env protein; Recombinant vaccinia virus; Immunity

**摘要:** 将马传染性贫血病毒疫苗及其亲本株 *env* 基因克隆到痘苗病毒表达载体 pSC65 的 pE/L 启动子下游, 通过同源重组插入到痘苗病毒天坛株基因组 TK 区, 经蓝白斑筛选获得重组痘苗病毒 rvv-DLVenv 和 rvv-LNenv, Western blot 检测目的蛋白的表达, 结果表明重组痘苗病毒能够有效表达完整的 EIAV Env 蛋白, 其肌肉接种免疫小鼠后, 表达的目的蛋白具有良好的免疫原性, 能够诱导机体产生有效的体液和细胞免疫应答, 其中以细胞免疫效果更为显著, CTL 特异性裂解最高可达 28%。本研究为 EIAV 基因工程疫苗的开发研制奠定了基础。

**关键词:** EIAV Env 蛋白; 重组痘苗病毒; 免疫应答

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125 (2003) 05-0473-05

马传染性贫血病病毒 (*Equine infectious anemia virus*, EIAV) 是马传染性贫血病的病原, 其 *env* 基因编码的病毒粒子前体外膜蛋白可被宿主细胞蛋白水解酶修饰加工成为膜表面蛋白 Gp90 和穿膜蛋白 Gp45, 其中 Gp90 位于 Env 多聚蛋白的 N 末端。外膜蛋白通过与细胞受体作用从而影响病毒的细胞嗜性, 同时它也是介导细胞融合和病毒穿入细胞

过程中的重要作用成分, 在宿主对病毒感染的免疫应答中, 外膜蛋白是中和抗体和细胞毒 T 细胞的主要靶分子<sup>[1-4]</sup>。本实验利用痘苗病毒天坛株作为活病毒载体, 将我国学者成功研制的马传染性贫血病病毒驴白细胞弱毒疫苗株 (EIAV DLV) 与其亲本株 (EIAV LN) *env* 基因插入到痘苗病毒表达载体 pSC65 的 pE/L 启动子下游, 通过同源重组和蓝白

收稿日期: 2003-05-06, 修回日期: 2003-06-13

\* 基金项目: 科技部基础研究重大项目前期研究专项经费资助

作者简介: 代春铭 (1972-), 女, 黑龙江省籍, 博士, 研究方向为 EIAV 基因工程疫苗。

\*\* 通讯作者: 邵一鸣 (1957-), 男, 研究员, 博士, 研究方向为 HIV 基因工程疫苗。

Corresponding author. Tel: 010-63166184. E-mail: yshao@public3.Bta.net.cn

筛选,获得重组痘苗病毒 rvv-DLVenv 和 rvv-LNenv,免疫接种小鼠后检测其诱导的体液和细胞反应水平,为研制有效的 EIAV 基因工程疫苗奠定基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 实验材料

扩增 EIAV *env* 基因的引物由上海生物工程公司合成。上游引物 ENVUF: 5'-ggC gCC ATg gTC AgC ATT gCA TTC TAT-3'。下游引物 ENVLR: 5'-CgC TCg AgC TAAACA TCA TAT TgA ggCA-3'。工具酶:均购自大连 TaKaRa 生物工程公司。大肠杆菌 *DH5 $\alpha$* 、TK143 细胞、P815 细胞与鸡胚成纤维细胞均由本室提供。驴胎皮肤细胞及马传贫驴胎皮肤毒由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所提供。痘苗病毒表达载体 pSC65 与痘苗病毒天坛株 (TVV) 均引自中国疾病预防控制中心病毒研究所遗传室。pSC65 启动子 pE/L 下游含有多克隆位点,供外源基因片段的插入;其 p7.5 启动子下游含有 *lacZ* 基因,是重组病毒的筛选标志;左右侧翼为痘苗病毒胸苷激酶 (TK) 基因,是重组病毒发生同源重组的同源序列。pBDLVenv 和 pBLNenv 质粒由本人构建,其中 pBDLVenv 含有 EIAV DLV 株 *env* 基因,pBLNenv 含有 EIAV LN 株 *env* 基因。6 周龄 18~20g Balb/c 雌性小鼠购自药检所动物养殖中心。

### 1.2 重组质粒的构建

以 *EheI* 与 *XhoI* 双酶切 pBDLVenv 和 pBLNenv 质粒,得到的 *env* 基因用 *Clenow* 酶补平后,平端连入 pSC65 质粒 *SmaI* 位点,*NcoI* 与 *BamHI* 双酶切鉴定 *env* 基因插入的方向,构建重组质粒 pSC65-DLVenv 和 pSC65-LNenv。克隆方法参考文献<sup>[5]</sup>进行。

### 1.3 重组痘苗病毒的筛选和纯化

将质粒 pSC65-DLVenv 和 pSC65-LNenv 用 DOTAP 包裹后,转染到已感染痘苗病毒天坛株的 TK143 细胞中,进行同源重组,48h 后收获病毒液。将得到的病毒液再以适量感染 TK143 细胞 48h 后,在 Budr 的选择压力下挑选蓝斑病毒,纯化蓝斑病毒 3 次以上,直至没有白斑病毒出现为止。

### 1.4 重组痘苗病毒 PCR 鉴定

以提取的重组痘苗病毒 rvv-DLVenv 和 rvv-LNenv 的基因组为模板,以 ENVUF 和 ENVLR 为引物,PCR 扩增 EIAV *env* 基因,阴性对照为痘苗病毒天坛株 TVV。扩增条件:95℃ 预变性 5min 后,94℃ 变性 50s,55℃ 退火 50s,72℃ 延伸 3min,30 个循环。

### 1.5 重组痘苗病毒表达蛋白的鉴定

重组痘苗病毒 rvv-DLVenv 和 rvv-LNenv 以 10 MOI 接种鸡胚成纤维细胞,48h 后收获感染细胞,裂解后进行 SDS-PAGE、Western blot 检测,一抗为 EIAV 阳性马血清,二抗为辣根过氧化物酶标记的兔抗马 IgG。

### 1.6 免疫接种

免疫接种动物为 6 周龄以上 Balb/c 小鼠,重约 18~20g,将实验动物随机分为 4 组,正常小鼠对照组、野毒对照组、重组痘苗病毒 rvv-DLVenv 和 rvv-LNenv 免疫组,每组 5 只野毒对照组和重组痘苗病毒免疫组均以肌肉注射  $1 \times 10^7$  PFU 病毒。免疫 8 周后,小鼠摘眼球取血测 EIAV Env 蛋白的特异性结合抗体和中和抗体,然后杀鼠取脾做淋巴细胞增殖试验和检测细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 杀伤活性。

### 1.7 结合抗体和中和抗体的检测

参照文献<sup>[5]</sup>用 ELISA 方法检测免疫小鼠血清中抗 EIAV Env 蛋白抗体。判定标准: P/N>2:1 为阳性。100TCID<sub>50</sub> 马传贫驴胎皮肤毒感染驴胎皮肤细胞后,观察 50% 细胞发生病变的最高血清稀释度即为中和抗体滴度。

### 1.8 淋巴细胞增殖试验

参照文献<sup>[6]</sup>按常规方法进行。

### 1.9 CTL 杀伤活性检测

参照文献<sup>[7]</sup>按常规方法进行。

## 2 结果

### 2.1 pSC65-DLVenv 和 pSC65-LNenv 的构建

*EheI* 与 *XhoI* 双酶切 pBDLVenv 和 pBLNenv 质粒后,得到了大小约 2.60kb 的 *env* 基因条带,用 *Clenow* 酶补平后,将其平端连入 pSC65 质粒 *SmaI* 位点,得到的重组质粒 pSC65-DLVenv 和 pSC65-LNenv 经 *NcoI* 与 *BamHI* 双酶切后,得到 3.30kb 和 6.55kb 两个片段,而载体质粒 pSC65 经 *NcoI* 与 *BamHI* 双酶切后,仅得到一条与之大小相符的 7.25kb 的条带,说明 *env* 基因已正向插入了痘苗病毒表达载体 pSC65 的 pE/L 启动子下游。酶切鉴定结果见图 1。

### 2.2 重组痘苗病毒的筛选和纯化

以痘苗病毒天坛株 TVV 为亲本毒株,感染 TK143 细胞后,分别转染质粒 pSC65-DLVenv 和 pSC65-LNenv,二者在 TK143 细胞中发生同源重组,使目的基因和 *lacZ* 基因导入痘苗病毒天坛株的 TK 区,通过挑取和纯化蓝斑病毒得到重组痘苗病

毒, 共构建了两株重组痘苗病毒, 分别为 *rvv-DLVenv* 和 *rvv-LNenv*。

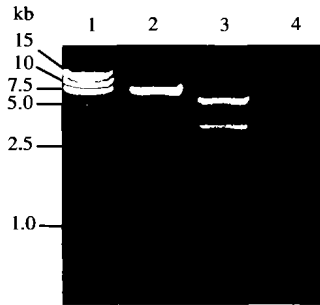


图 1 pSC65-DLVenv 和 pSC65-LNenv 的酶切分析

Fig. 1 Analysis of pSC65-DLVenv and pSC65-LNenv.

1, DL15000; 2, pSC65/*NcoI*+*BamH* I; 3, pSC65-DLVenv/*NcoI*+*BamH* I; 4, pSC65-LNenv/*NcoI*+*BamH* I.

### 2.3 重组痘苗病毒的 PCR 鉴定

以提取的重组痘苗病毒 *rvv-DLVenv* 和 *rvv-LNenv* 的基因组为模板, 以 ENVUF 和 ENVLR 为引物进行 PCR 扩增, 阴性对照为痘苗病毒天坛株 TVV。从 *rvv-DLVenv* 和 *rvv-LNenv* 基因组中扩增出了约 2.60kb 的条带, 大小与 *env* 基因相符, 而 TVV 基因组中无此特异性片段的扩增, 说明重组病毒基因组中含有目的基因的插入。PCR 鉴定结果见图 2。

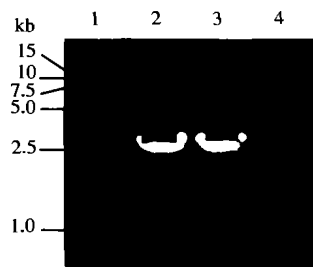


图 2 PCR 鉴定重组痘苗病毒 *rvv-DLVenv* 和 *rvv-LNenv*

Fig. 2 Identification of recombinant vaccinia virus *rvv-DLVenv* and *rvv-LNenv* by PCR

1, DL15000; 2, Amplification of *rvv-DLVenv*; 3, Amplification of *rvv-LNenv*; 4, Amplification of TVV.

### 2.4 重组痘苗病毒表达蛋白的鉴定

重组痘苗病毒 *rvv-DLVenv* 和 *rvv-LNenv* 以 10 MOI 接种鸡胚成纤维细胞, 48h 后收获感染细胞, 裂解后进行 SDS-PAGE 电泳, 未见明显外源蛋白表达带, Western blot 检测可知 *rvv-DLVenv* 表达产物在 120kDa 处能与 EIAV 阳性马血清发生特异性反应, *rvv-LNenv* 表达产物则在大于 120kDa 处与 EIAV 阳性马血清发生特异性反应, 这可能是由于

EIAV LN Env 蛋白比 EIAV DLV Env 蛋白多两个糖基化位点的缘故, 因而二者的表达产物大小稍有差异, 这表明所构建的重组痘苗病毒 *rvv-DLVenv* 和 *rvv-LNenv* 在鸡胚细胞中表达了 EIAV Env 蛋白。鉴定结果见图 3。

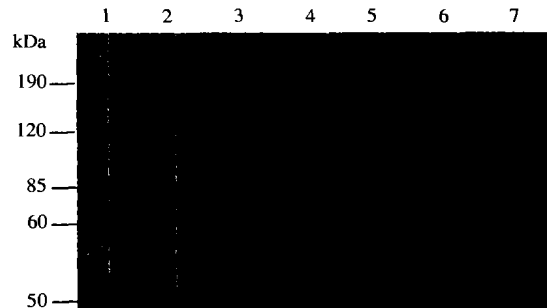


图 3 EIAV 阳性马血清检测重组痘苗病毒 *rvv-DLVenv* 和 *rvv-LNenv* 目的基因的表达

Fig. 3 Analysis of foreign genes expressed in *rvv-DLVenv* and *rvv-LNenv* by EIAV positive serum

1, BENCHMARK™ Pretained protein Ladder; 2, Lysate of chicken embryo fibroblast; 3, Lysate of chicken embryo fibroblast infected with TVV; 4, Supernatant of Chicken embryo fibroblast infected with *rvv-LNenv*; 5, Supernatant of Chicken embryo fibroblast infected with *rvv-DLVenv*; 6, Lysate of chicken embryo fibroblast infected with *rvv-LNenv*; 7, Lysate of chicken embryo fibroblast infected with *rvv-DLVenv*.

### 2.5 重组痘苗病毒诱导小鼠特异性结合抗体及中和抗体应答的检测

重组痘苗病毒 *rvv-DLVenv* 和 *rvv-LNenv* 免疫小鼠后, 可诱导出一定水平的抗 EIAV Env 蛋白的特异性结合抗体和抗 EIAV 的中和抗体, 而正常和阴性对照组血清均无抗 EIAV Env 蛋白的特异性结合抗体的产生, 也观察不到任何对 EIAV 的中和活性。统计学分析表明, *rvv-DLVenv* 与 *rvv-LNenv* 诱导小鼠产生的结合抗体和中和抗体的滴度差异无显著意义 ( $P>0.05$ )。重组痘苗病毒免疫小鼠后诱导的结合抗体及中和抗体应答的检测结果见表 1。

表 1 重组痘苗病毒免疫小鼠后血清中抗 EIAV Env 蛋白的特异性结合抗体及中和抗体的滴度

Table 1 Anti-Env binding and neutralizing antibody titre induced by recombinant vaccinia viruses in mice

Group	Binding antibody titre*	Neutralizing antibody titre*
TVV	—	—
Rvv-DLVenv	1:2560.0	1:40.00
rvv-LNenv	1:2228.6	1:36.47

\*Anti-Env binding and neutralizing antibody titre both are geometric mean

## 2.6 淋巴细胞转化实验

重组痘苗病毒 rvv-DLVenv 和 rvv-LNenv 免疫小鼠后, 于第 8 周以  $^3\text{H-TdR}$  掺入法检测所诱导的特异性的记忆性 T 淋巴细胞增殖应答, 野毒对照组小鼠的刺激指数约等于 1, 而重组痘苗病毒免疫组小鼠的刺激指数均明显高于对照组, 统计学分析表明, 重组痘苗病毒免疫组与野毒对照组之间具有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 这说明重组痘苗病毒诱导了针对 EIAV Env 蛋白的记忆性 T 淋巴细胞增殖应答, 而且 rvv-DLVenv 组与 rvv-LNenv 组之间也具有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。重组痘苗病毒免疫小鼠后诱导的淋巴细胞增殖反应结果见表 2。

表 2 重组痘苗病毒免疫小鼠后诱导的淋巴细胞增殖反应  
Table 2 The lymphocyte proliferation induced by recombinant vaccinia viruses in mice

Group	Stimulation Index (SI)
TVV	1.0700±0.0525
rvv-DLVenv	1.9530±0.0496
rvv-LNenv	1.8306±0.0494

## 2.7 特异性 CTL 反应的检测

重组痘苗病毒 rvv-DLVenv 和 rvv-LNenv 免疫小鼠后, 于第 8 周以  $^{51}\text{Cr}$  释放法检测所诱导的特异性 CTL 反应, 选取的靶细胞为 P815, 检测时的效靶比分别为 50:1、25:1 和 12.5:1。统计学分析表明, 重组痘苗病毒免疫组与野毒对照组之间存在显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 其特异性裂解在 13%~28% 之间, 这说明重组痘苗病毒免疫小鼠后能够诱导针对 EIAV Env 蛋白的特异性 CTL 反应, rvv-DLVenv 组和 rvv-LNenv 组之间在效靶比为 50:1 时差异显著 ( $P < 0.05$ ), 而在效靶比为 25:1 和 12.5:1 时差异无显著性意义 ( $P > 0.05$ )。重组痘苗病毒诱导的特异性 CTL 检测结果见图 4。

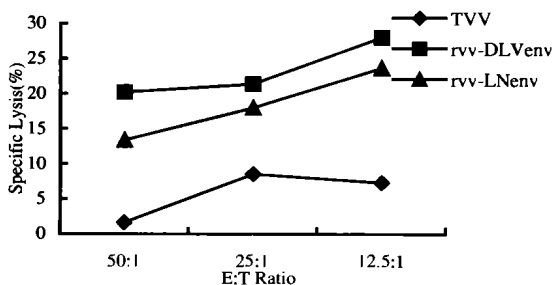


图 4 重组痘苗病毒免疫小鼠后诱发的 CTL 应答  
Fig.4 CTL responses induced by recombinant vaccinia viruses in mice

## 3 讨论

马传染性贫血病毒与人免疫缺陷病毒 (Human immunodeficiency virus, HIV) 一样是逆转录病毒科慢病毒属的成员之一, 由于慢病毒给人类和动物的健康造成严重威胁, 因此慢病毒的免疫预防尤其是艾滋病的免疫预防就成为了研究热点。在慢病毒疫苗研究中遇到的主要问题之一, 是缺乏对抗慢病毒感染的保护性免疫的认识: 面对如此复杂多变的病毒, 究竟什么样的免疫应答才能完全保护机体免受感染; 保护性免疫的免疫原、提呈途径和清除感染的机制如何; 能否研制出有效的疫苗, 可在体内长期预防、控制和清除病毒。与其它慢病毒不同, 大多数 EIAV 自然感染马最终能控制住病毒的复制, 因此 EIAV 最吸引人处就是对免疫控制和疫苗的研究。

从当前研究现状来看, 中和抗体和 CTL<sup>[8,9]</sup> 在抗 EIAV 免疫中发挥重要的作用。CTL 反应能够清除各发病周期的病毒血症, 中和抗体随后可以中和 CTL 漏掉的游离病毒。宿主免疫系统与病毒变异株经过几轮较量后, 将病毒的复制控制在较低的水平, 这可能是由于机体已产生了种类足够多的 EIAV 特异性 CTL 克隆或 EIAV 较弱的保守抗原表位已诱导出较强的 CTL 反应, 此时低载量的病毒既可以不断地刺激机体记忆性免疫反应又不使马发病, 这样 EIAV 感染马就进入了隐性感染阶段。

EIAV LN 毒株是我国现地分离的马传贫自然强毒株, 我国学者将其在驴体内连续传代变成驴强毒, 然后再在驴白细胞培养系统进行弱化而获得马传贫驴白细胞弱毒疫苗 EIAV DLV 毒株。该疫苗免疫接种动物后, 能产生持久坚强的免疫力, 能抵抗同源和异源强毒攻击, 该疫苗在中国和古巴已广泛应用并取得了良好的效果。中国马传贫驴白细胞弱毒疫苗的成功应用, 也证明了研制慢病毒疫苗的现实可行性。对 EIAV DLV 免疫保护的分子机制的研究, 将为慢病毒疫苗尤其是 HIV 疫苗的设计和研发提供极有价值的理论依据。

虽然弱毒疫苗具有其它疫苗无可比拟的优越性, 但其安全性是最大的隐患, EIAV 的宿主是马, 可以通过动物实验来验证弱毒疫苗的安全性, HIV 宿主是人, 无法在人体上验证弱毒疫苗的安全性, 而迄今为止又有找不到各方面都令人满意的动物模型, 因而研制 HIV 弱毒疫苗的可行性较小。很多学者对 HIV 基因工程疫苗的研究做了大量工作, 然而结果却不令人满意, 这可能是由于对真正的保护

性抗原表位了解的还不够多。

国内学者对 EIAV DLV 减毒和免疫保护机制作了多方面的研究, 发现该弱毒疫苗株在马体内存在着 env 基因“优化”表达的现象, 即弱毒株在体内低水平复制一年后, p26 抗体消失, 而囊膜抗原则呈持续性表达<sup>[10]</sup>, 使得囊膜蛋白中的 B 细胞和 T 细胞抗原表位能够不断刺激机体免疫系统, 从而维持保护性免疫反应的持续存在并不断得到强化。这种现象提示我们, 如果我们选择适当的表达 EIAV DLV Env 蛋白的活病毒载体免疫动物就可以模拟弱毒疫苗株在体内的持续复制和 env 基因的“优化”表达机制, 用来研究这种“优化”表达在免疫保护中的作用和意义。

本研究选用痘苗病毒天坛株作为活病毒载体, 将我国学者成功研制的马传染性贫血病毒驴白细胞弱毒疫苗株 EIAV DLV 与其亲本株 EIAV LN 的 env 基因插入到痘苗病毒天坛株 TK 区, 以重组痘苗病毒免疫接种 Balb/c 小鼠并且观察其免疫效果。结果表明重组痘苗病毒表达了 Env 蛋白, 从本实验数据可知, 重组痘苗病毒所表达的外源蛋白能够诱导机体产生良好的体液和细胞免疫反应, 且 rvv-DLVenv 所诱导的细胞免疫效果强于 rvv-LNenv。对 DLV 株与其亲本 LN 株的 Env 蛋白氨基酸序列分析表明, 疫苗株比亲本株少 2 个 N-连接糖基化位点, 在 LN 毒株中被糖链所掩盖的抗原表位可在 DLV 疫苗株中被暴露出来, 这可能增强了其免疫原性。本实验结果还需重组痘苗病毒免疫马后, 作攻毒试验进一步验证, 本实验室正在进行这方面研究。如果宿主马的体内试验及 EIAV 的攻毒试验能够确证强、弱毒株囊膜蛋白免疫原性差异的存在, 可以将 EIAV 弱毒疫苗囊膜蛋白氨基酸的变异规律模拟到 HIV 囊膜蛋白上, 制备人工改造的具有强免疫原性的 HIV 基因工程疫苗。本研究为进一步揭示我国马传贫驴白细胞弱毒疫苗免疫保护

的分子机制和制备有效的 EIAV 基因工程疫苗奠定了基础, 这将为 HIV 基因工程疫苗的开发研制提供新的思路。

## 参考文献

- [1] Ball J M, Rushlow K E, Issel C J, *et al.* Detailed mapping of the antigenicity of the surface unit glycoprotein of equine infectious anemia virus by using synthetic peptide strategies[J]. *J Virol*, 1992, 66:732-742.
- [2] Leroux C, Issel C J, Montelaro R C. *et al.* Novel and dynamic evolution of equine infectious anemia virus genomic quasispecies associated with sequential disease cycles in an experimentally infected pony[J]. *J Virol*, 1997, 71:9627-9639.
- [3] Lonning S M, Zhang W, Leib S R, *et al.* Detection and induction of equine infectious anemia virus specific cytotoxic T lymphocyte responses by use of recombinant retroviral vectors[J]. *J Virol*, 1999, 73:2762-2769.
- [4] McGuire T C, Tumas D B, Byrne K M, *et al.* Major histocompatibility complex-restricted CD8+ cytotoxic T lymphocytes from horses with equine infectious anemia virus recognize Env and Gag/PR proteins[J]. *J Virol*, 1994, 68:1459-1467.
- [5] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 EF, 曼尼阿蒂斯 T, 等. 分子克隆[M]. 北京: 科学出版社, 1992, 16.
- [6] 沈关心, 周汝麟. 现代免疫学实验技术[M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 1998.
- [7] 陶义训. 免疫学和免疫学检验(第二版)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1999.
- [8] Hammond S A, Cook S J, Lichtenstein D L, *et al.* Maturation of the cellular and humoral immune response to persistent infection in horses by equine infectious anemia virus in a complex and lengthy process[J]. *J Virol*, 1997, 71:3840-3852.
- [9] McGuire T C, Zhang W, Hines M T, *et al.* Frequency of memory T lymphocytes to equine infectious anemia virus protein in blood from carrier horses[J]. *Virology*, 1997, 238:85-93.
- [10] 王徽. 马传染性贫血强、弱毒蛋白分析及弱毒免疫机制的研究[D]. 哈尔滨: 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 1991.