18 (5): 441—445 October 2003

表达 HIV-I CN54 株 gagpol 基因重组痘苗病毒疫苗株的构建*

戴凯凡1,2,刘颖1,周小云1,王芙1,段丹丽1,吴岚1,赵斌2,邵一鸣1**

(1. 中国艾滋病预防和控制中心, 北京, 100050; 2.华中农业大学生命科学技术学院 农业微生物国家重点实验室, 湖北武汉, 430070)

Construction of Recombinant Vaccinia Virus for Expressing gagpol Gene of

Chinese Epidemic HIV-I Strain (CN54, clade B'/C)

DAI Kai-fan², LIU Ying¹, ZHOU Xiao-yun¹, WANG Fu¹, DUAN Dan-li¹, WU Lan¹, ZHAO Bin², SHAO Yi-ming^{1**}

(1. National Center for AIDS Control and Prevention, Beijing 100050, China; 2. National Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Life Science and Technology College, Huazhong Agriculture University, Wuhan 430070, China)

Abstract: To develop live-vectored vaccine of *Human immunodeficiency virus I* (HIV-I) without selectable marker, we first constructed a transfer plasmid pVI75 with selectable markers of *neo* and *lacZ* gene, and a recombinant plasmid pVI75-Gagpol containing the *gagpol* gene of Chinese predominant prevalent HIV-I strain CN54, pE/L upstream as the promoter. CEF was transfected by the recombinant plasmid pVI75-Gagpol, one hour after being infected with Tiantan vaccinia virus. A recombinant vaccinia virus rVV-Gagpol without selectable marker was constructed through two homologous recombinations as following: first, through three cycles of plaque purification under G418 pressure, the blue recombinant virus including both *gagpol* gene and the selectable marker gene was acquired; then through three cycles of plaque purification without G418 pressure, the white recombinant virus with *gagpol* gene but without the selectable marker gene was acquired. Thus, a recombinant vaccinia virus was acquired. PCR and Dot blot assay showed that the recombinant rVV-Gagpol lost the *neo* gene and *lacZ* gene. *Gagpol* gene could be detected by PCR. Antibody staining and Western blot results indicated this recombinant vaccinia virus could successfully express HIV Gagpol protein.

Key words: Human immunodeficiency virus I (HIV-I); gagpol gene; Recombinant vaccinia virus; Vaccines

摘要:为研制不带筛选标记的 HIV 活载体疫苗,首先构建含有 neo 基因和 lacZ 基因双重筛选标记的 pVI75 转移 质粒,并将 HIV-I 中国主要流行株 B'/C 重组株 CN54 gagpol 基因置于 pVI75 的启动子 pE/L 下,构建重组质粒 pVI75-Gagpol。重组质粒与痘苗病毒天坛株共转染鸡胚细胞。前三轮通过 G418 加压,噬斑纯化,得到既含目的 基因又含筛选标记的蓝色重组痘苗病毒;后三轮在无 G418 选择压力下,筛选只含目的基因而缺失了筛选标记的 白色重组痘苗病毒。结果表明筛选到了一株重组病毒,经 PCR 和 Dot blot 检测确认该株重组痘苗病毒的 neo 基因和 lacZ 基因已丢失; PCR 鉴定表明目的基因已插入重组痘苗病毒中;抗体染色和 Western blot 结果证实该重组病毒能很好地表达目的蛋白。

关键词:人免疫缺陷病毒(HIV)I型; gagpol基因; 重组痘苗病毒; 疫苗株

中图分类号: R512.6

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125 (2003) 05-0441-05

1983年,巴斯德研究所的科研人员首次发现了能引起艾滋病的人免疫缺陷病毒(Human immuno-

 $deficiency\ virus\ I$, HIV)^[1]。自此以后,HIV 的感染在全世界广泛流行,并迅速成为对人类健康威胁最大

收稿日期: 2003-04-28, 修回日期: 2003-06-25

^{*} 基金项目: 国家 863 高新技术发展项目(2001AA21503)

作者简介: 戴凯凡 (1978-), 男, 湖南岳阳籍, 研究生, 研究方向为分子病毒与免疫学。

^{**} 通讯作者。Corresponding author.

的传染性疾病。近年来,抗病毒药物的联合应用使 HIV 感染在一定程度上得到了控制,但随着耐药毒 株的大量出现^[2]、对病人的严重毒副作用^[3]以及不能 彻底清除蓄积于脑、淋巴结和其它隐蔽组织中受病 毒感染的细胞而使药物治疗蒙上了阴影^[4,5]。在这种 情况下,怎样预防 HIV 的感染显得尤为重要。从历 史经验和长远考虑,安全、有效、经济的疫苗是预 防和控制艾滋病的可能途径和有效措施之一^[6,7]。

Gag 蛋白为 HIV-I 的主要结构蛋白之一。在受 HIV 感染的病人和动物模型中,都有针对 Gag 蛋白 保守表位的 CTL 应答和 T 辅助细胞增殖反应^[8,9]。 尽管 Pol 蛋白的表达量很低[10], 但它富含 CTL 表位 和 T 辅助细胞表位。研究证明,表达 SIV gag 和 pol 基因的重组痘苗病毒免疫恒河猴后,激发了抗 原特异性的 CTL 反应,SIV 攻毒后,激发了强烈的 CTL 回忆应答[11];最近的研究显示,含有 gag-pol 基 因的 DNA 疫苗免疫感染了 SIV 的恒河猴后,在增 加 CD4 细胞数量和减少病毒载量方面都发挥了显 著成效[12]。痘苗病毒载体在细胞内以天然的方式合 成加工抗原并呈递给免疫系统, 从而能诱导良好的 体液免疫和细胞免疫.表达 HIV-I 型抗原的重组疗苗 病毒疫苗已经进入临床实验[13]。本研究构建转移质 粒 pVI75,将 HIV-I 型中国流行株 B'/C 重组株 CN54 gagpol 基因置于其早晚期启动子 pE/L 下,与痘苗 病毒天坛株共转染鸡胚成纤维细胞, 筛选不含筛选 标记的重组痘苗病毒疫苗株,为我国 HIV 疫苗的研 制提供候选疫苗。

1 材料与方法

1.1 质粒、病毒、菌株和细胞

PCR-script-CN54为中国流行株CN54的全基因克隆。质粒 pSC65 由美国 NIH Moss 教授惠赠。质粒 pJSD 由中国疾病预防控制中心病毒学研究所阮力教授惠赠。 质粒 pIRES-neo 购自 Clontech 公司。pT-easy-vector 购自 Promega 公司。痘苗病毒天坛株752-1 由北京生物制品研究所提供。菌株 TOP10、DH5α 等由本室保存。鸡胚成纤维细胞(CEF)是用购自北京实验动物中心的 8-10 日龄 SPF 的鸡胚,按常规方法制备。

1.2 酶和试剂

实验用酶购自 Biolab、Promega, GIBCO 等公司。转染试剂 Lipofectin 2000 购自 Invitrogene 公司。X-gal、G418、DAB、中性红和低熔点琼脂糖购自GIBCO、Sigma 等公司。地高辛 DNA 标记与检测试剂盒为 Roche 公司产品。病毒基因组 DNA 提取

试剂盒为 QIAGENE 公司产品。

1.3 引物及抗体

引物由北京赛百盛公司合成: Primer1: 5′-GCGGAGGCTAGAAGGAGAGAGAGAGAGGA'; Primer 2: 5′-CTACTAGCCTTCCATGGCTATTTTCTGCAC-3′; Primer3: 5′-TACCAGTTGGTCTGGGGAGAC CATTACCCAC-3′; Primer4: 5′-GAAAAGCTTAC AG ATTTCTTCTCCGTGATAGGGATCG-3′; Primer5: 5′-GACAAGCTTGTTTACACATGGCCCACACCA GTG-3′; Primer6: 5′-CCAGACCAACTGGTAATG GTAGCGAC-3′。一抗为 HIV_{SF2} P₂₄ Antiserum (Cata 4250),由美国 NIH 惠赠,二抗为辣根过氧化物酶 标记的羊抗兔 I gG 抗体。

1.4 转移质粒 pVI75 的构建

质粒 pIRES-neo 经 Xhol I 和 Sma I 消化, Klenow 酶补平, 回收 1.2kb 的 neo 基因片段; 载体 pJSD 经 Bgl II 消化, Klenow 酶补平, 去磷酸化酶 (CIAP) 处理, 回收; 将二者连接、转化, 挑取正向重组质粒 pJSD-neo。以 pJSD-neo 为模板, primer3 和 primer4 为引物, PCR 扩增, 回收约 1.4kb 的 PH6-neo-polyA 片段; 以质粒 pSC65 为模板, primer5 和 primer6 为引物, PCR 扩增, 回收约 200bp 的 lacZ'片段; 以上述两个 PCR 产物的混合物为模板, primer4 和 pimer5 为引物, PCR 扩增,得到约 1.6kb 的 lacZ'-PH6-neo-polyA 片段。将 lacZ'-PH6-neo-polyA 片段亚克隆到 T-easy-vector 上, 测序; 再经 Not I 和 Hind III 消化, 回收 1.6kb 的 lacZ'-PH6-neo-polyA 片段; 质粒 pSC 65 经 Not I 和 Hind III 消化,回收 7.4kb 的片段;将二者连接、转化,挑取重组质粒 pVI75。

1.5 gagpol 基因测序及重组质粒的构建

采用 PCR 扩增的 gagpol 基因片段,以 pT-easy-vector 克隆、测序。转移质粒 pVI75 经 Hind III 消化(此单酶切位点位于早晚期起动子 pE/L 下游),去磷酸化酶 (CIAP) 处理,回收;质粒 pT-Gagpol 经 Hind III 消化,回收 2.9kb 的 gagpol 基因片段。将二者连接、转化,挑取正向重组质粒 pVI75-Gagpol。

1.6 重组痘苗病毒的构建筛选及纯化

痘苗病毒天坛株 752-1 感染 80%~90%成片的鸡胚成纤维细胞 (MOI=0.01~0.1), 37℃吸附 1h后,重组质粒 pVI75-Gagpol 转染细胞,方法见试剂盒说明书。37℃二氧化碳孵箱培养 48-72h, 冻融三次后收获病毒。成片的鸡胚成纤维细胞用含0.4mg/mL G418 的 Eagle's 加压 24h, 收获的病毒感染加压过的鸡胚成纤维细胞,37℃后继续培养

48-72h,铺斑(Eagle's 含 10mg /mL X-gal 和中性红,1%低熔点琼脂糖)。挑取蓝色噬斑,此时的重组病毒带有 lacZ 基因和 neo 基因。单斑纯化 3 代(每一代用的鸡胚成纤维细胞都先用 0.4mg/mL 终浓度的 G418 加压 24h)。将收获的第三代痘苗病毒重组液冻融三次后,感染未经 G418 加压的鸡胚成纤维细胞,37℃继续培养 48-72h,铺斑,挑取白色噬斑,此时获得的重组病毒不再带有 lacZ 基因和 neo 基因。将此重组病毒再经 3 代噬斑纯化。

1.7 重组痘苗病毒基因组的 PCR 和 Dot blot 分析

用 QIAGENE 公司的病毒基因组 DNA 提取试剂盒提取重组痘苗病毒基因组 DNA。用 PCR 的方法初步确定 gagpol 基因是否已插入重组痘苗病毒中。以 Primer1 和 Primer2 为引物进行 PCR 扩增,反应条件为 95°C 预变性 5min,然后 95°C 30s,58°C 30s,72°C 2min,共 30 个循环;72°C 延伸 7min。扩增后进行琼脂糖电泳,应特异性出现 2.9kb 的条带。Dot blot 检测 neo 基因是否脱掉,方法见试剂盒说明书。

1.8 重组痘苗病毒表达的 Gag 和 Pol 蛋白的检测

将抗体染色初筛为阳性的 30 株重组病毒扩增后分别感染鸡胚成纤维细胞,48h 后收集细胞,每个样品加入蛋白提取缓冲液(1%SDS,1mmol/LPMSF, pH7.0 的 20mmol/lTris-Cl, β -巯基乙醇),混匀后冻融三次,经 SDS-PAGE 电泳。转印后检测 gagpol 基因的表达情况。一抗为 HIV_{SF2} P₂₄ Antiserum(Cata 4250),二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 抗体。

2 结果

2.1 转移质粒 pVI75 的构建

以 pJSD-neo 为模板, primer3 和 primer4 为引物, PCR 扩增,得到 1.4kb 的 PH6-neo-polyA 片段;以 pJSD-neo 为模板, primer3 和 primer4 为引物,PCR 扩增,得到 200bp 的 *lacZ'*片段;以上述两个PCR 产物的混合物为模板, primer4 和 pimer5 为引物,PCR 扩增,得到 1.6kb 的 lacZ'-PH6-neo-polyA 片段;将 lacZ'-PH6-neo-polyA 片段克隆到 Teasy-vector上,测序;再经 Not I 和 Hind III 消化,回收 1.6kb 的 lacZ'-PH6-neo-polyA 片段;质粒 pSC 65 经 Not I 和 Hind III 消化,回收 7.4kb 的片段;将二者连接、转化,挑取重组质粒 pVI75,分别用 KpnI、NdeI、EcoRV 酶切鉴定,酶切图谱见图 1。

2.2 gagpol 基因的 PCR 扩增、克隆、测序及 pVI75-Gagpol 重组质粒的构建

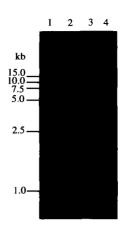


图 1 质粒 pVI75 酶切图谱

Fig. 1 Restriction enzyme digestion of plasmid pVI75

1, DL15000 marker; 2, pVI75 digested with *KpnI*; 3, pVI75 digested with *NdeI*; 4, pVI75 digested with *EcoRV*.

以 Primerl 和 Primer 2 为引物, PCR-script-CN 54 为模板, 扩增出与预期大小一致的约 2 .9kb 的片段, PCR 产物克隆到 T-easy vector 后测序, 再亚克隆到载体 pVI75 的启动子 pE/L 下游, 构建正向重组质粒 pVI75-Gagpol, 分别用 Pstl、Xbal、Ncol 酶切鉴定,酶切图谱见图 2。

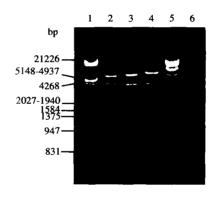


图 2 质粒 pVI75-Gagpol 酶切图谱

Fig. 2 Restriction enzyme digestion of plasmid pVI75-Gagpol 1, λDNA/HindIII+EcoRI marker; 2, pVI75-Gagpol digested with Pstl; 3, pVI75-Gagpol digested with NcoI; 5, λDNA/HindIII marker; 6, DL15000 marker.

2.3 重组痘苗病毒的构建

以痘苗病毒天坛株 752-1 感染 CEF,利用 Lipofectine 2000 转染重组质粒 pVI75-Gagpol 进入细胞。质粒 pVI75-Gagpol 在鸡胚细胞内与痘苗病毒发生同源重组重组,使目的基因 gagpol 与 neo 基因和 lacZ 基因双重筛选标记一同重组到痘苗病毒的基因

组DNA的TK序列中,前三轮在G418加压筛选后,用加有X-gal和中性红的低熔点琼脂糖铺斑,这样就可以挑取既含目的基因又含筛选标记的蓝色重组痘苗病毒(未发生重组的野毒株因G418的存在而被抑制生长);接着在无G418压力选择下,蓝色重组痘苗病毒自身会因为转移质粒的 gagpol 基因上游一小段约 200bp 的 lacZ'片段与完整的 lacZ 基因发生分子内的同源重组,从而丢失 neo 基因和 lacZ 基因而得到了只含目的基因 gagpol 的重组痘苗病毒,用加有X-gal和中性红的低熔点琼脂糖铺斑,就能挑取只含目的基因的白色重组病毒。挑取的白色病毒斑到斑纯化三代,就能得到单一克隆的重组病毒。重组病毒 rVV-Gagpol 的构建过程如图 3 所示。

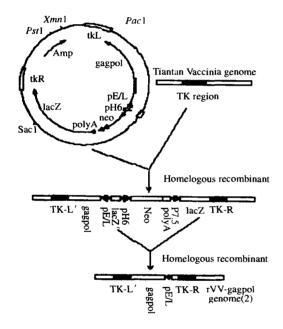


图 3 重组痘苗病毒的构建 Fig.3 Construction of recombination vaccinia virus

2.4 重组痘苗病毒 rVV-Gagpol 的PCR 鉴定

以提取的重组痘苗病毒 DNA 为模板,以 Primer 1 和Primer 2 为引物进行 PCR 扩增,阴性对照为痘苗病毒天坛株 752-1,阳性对照为 pVI75-Gagpol. 结果 rVV-Gagpol 和阳性对照均扩增出了 2.9kb 的片段,说明重组病毒中含有目的片段。

2.5 **重组**痘苗病毒 rVV-Gagpol 的 Dot blot 鉴定

将提取的重组痘苗病毒 DNA 固定到硝酸纤维素膜上,再用地高辛标记的 neo 基因合成探针进行 Dot blot 检测。阴性对照为痘苗病毒天坛株 752-1,阳性对照为质粒 pVI75-Gagpol,结果阳性对照出现蓝紫色斑点,阴性对照和重组痘苗病毒没有出现蓝

紫色斑点。说明重组痘苗病毒已经丢失了 neo 基因。 Dot blot 检测结果见图 4。

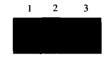


图 4 Dot blot 检测重组痘苗病毒筛选标记的丢失

Fig.4 Detection of loss of selection marker in recombination vaccinia virus

1, rVV-Gagpol; 2, Negative control (Tiantan VV); 3, pVI75-Gagpol.

2.6 Western blot 检测重组痘苗病毒表达的 Gag 和 Pol 蛋白

结果显示,重组痘苗病毒 rVV-Gagpol 能表达 Gag 蛋白,分子量为 55kDa; 24kDa 的蛋白是由 Gag 前体蛋白降解而成的衣壳(CA)蛋白。41kDa 的蛋白亦为 Gag 前体蛋白的降解产物之一(数据没有显示)。

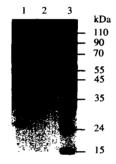


图 5 重组痘苗病毒表达的 Gagpol 蛋白的检测 Fig.5 Detection of expressed Gagpol protein in recombinant

Fig.5 Detection of expressed Gagpol protein in recombinant vaccinia virus

1. rVV-Gagpol; 2, Negative control-Tiantan VV; 3, Protein molecular weight standards.

3 讨论

艾滋病作为一种严重的传染性疾病,已经开始危害到整个人类的健康和安全。据估计,在过去的二十年中,全球已经有大约 5000 万的人感染了艾滋病,并有超过 4000 万人因此而死亡 [14]。2003 年3 月,由美国 VaxGen 公司组织完成的、以 HIV 膜蛋白 gp120 为主要成分的世界上第一个艾滋病疫苗 III 期临床试验结果宣布以失败而告终 [15, 16]。这说明,以单纯的 HIV 亚单位疫苗为免疫原的艾滋病疫苗研究将面临更多的困难。毫无疑问,其它形式和思路的艾滋病疫苗研究显得尤为重要。本研究利用能忠实加工和修饰外源蛋白的痘苗病毒为载体,使表达的外源蛋白更接近于天然构象,这样就可以弥

补亚单位疫苗的缺陷。众所周知,任何应用于临床 试验的疫苗都要求不带筛选标记, 这主要是为排除 筛选标记整合到人染色体上的可能。本实验构建的 pVI75 转移质粒系统,通过发生两次同源重组,而 获得不带筛选标记的活载体疫苗株,这在国内属首 次报道。另外,本研究构建的筛选系统具有工作量 小,周期短等优点,这将大大提高研制我国 HIV 候 选疫苗的效率。实验结果显示: 经过 PCR、Dot blot、 抗体染色和 Western blot 检测确定,获得 1 株不带 筛选标记且能较好表达目的蛋白的疫苗株。Pol 蛋 白因为表达量太低[10],本实验未能检测到(数据没 有显示)。考虑到疫苗使用的安全性,本实验使用的 pol 基因是本室改造过的,仅保留蛋白酶和部分反 转录酶、删除了整合酶和 RnaseH 的,排除了外源 基因被错误整合到细胞基因组的可能。HIV-I 型中 国流行株B'/C 重组株 CN54 是我国近几年出现的主 要流行株之一,本研究选用其基因构建我国的艾滋 病疫苗, 无疑具有极强的针对性。从目前的资料显 示,多价抗原在疫苗研究中是非常重要的,尤其是 在目前还没有找到 HIV 最保守的特异性表位情况 下,尽可能多的包含各种 HIV 抗原基因无疑将提高 艾滋病疫苗的免疫效果,这也成为用来对付 HIV 高 度变异的有效途径之一。本研究基于以上考虑构建 的表达 HIV-I 型中国主要流行株 B'/C 重组株 CN54 的 gagpol 基因重组痘苗病毒作为我国 HIV 疫苗研 究的候选疫苗,是有意义的。

致谢: 感谢美国 NIH AIDS Research and Reference Reagent Program 提供的试剂

参考文献

- [1] Barre Sinoussi F, Chermann J C, Rey F, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome(AIDS)[J]. Science, 1983, 220: 868-871.
- [2] Richman D D. HIV drug resistance [J]. AIDS Res Hum Retro. 1992, 8: 1065-1071.

- [3] Schooley R T. Initial therapy: Risk and benefits of earlier initiation of antiretroviral therapy[J]. Top HIV Med, 2000, 8: 4-8.
- [4] Li C, Simm M, Potash M J, et al. Human immunodeficiency virus type-1 DNA synthesis, integration, and efficient viral replication in growth –arrested T cells[J]. J Virol, 1993, 67: 3969-3977.
- [5] Finzi D, Hermankova M, Pierson T, et al. Identification of a reservoir for HIV-1 in patient on highly active antiretroviral therapy[J]. Science, 1997, 227: 112.
- [6] Ruprecht R M.1999: a time to re-evaluate AIDS vaccine strategies[J].J Hum Virol, 2000, 3: 88-93.
- [7] Malegapuru WM. The search for an HIV vaccine[J]. BMJ, 2002, 324: 211-213.
- [8] Van Baalen C A, klein M R, Huisman R C, et al. Fine-specificity of cytotoxic T lymphocytes which recognize conserved epitopes of the Gag pritein of human immunodeficiency virus type-1[J]. J Gen Virol, 1996, 77: 1659-1665.
- [9] Duradi D, Morvan J, Letourneur F, et al. Cross-reactions between the cytotoxic T lymphocyte responses of human immunodeficiency virus-infected African and European patients[J]. J Virol, 1998, 72: 3547-3553.
- [10] Oroszlan S, Luftig R B. Retroviral proteinases[J]. Curr Top Micro Immunol, 1990, 157: 153-185.
- [11] Seth A, Ourmanov I, Schmitz J E, et al. Immunization with a modified vaccinia virus expressing simian immunodeficiency virus(SIV) Gag-pol primes for a anamnestic Gag-specific cytotoxic T lymphocyte response and is associated with reduction of viremia after SIV challenge[J]. J Virol, 2000, 2502-2509.
- [12] Muthumani K, Bagarazzi M, Conway D, et al. A Gag-Pol/Env-Rev SIV239 DNA vaccine improves CD4 counts, and reduce viral loads after pathogenic SIV_{mac}251 challenge in Rhesus Macaques[J]. Vaccine, 2003, 21: 629-637.
- [13] Cho M W. Assessment of HIV vaccine development: past, present, and future[J]. Adv Pharmacol, 2000, 49: 63-314.
- [14] Mwau M, McMichael A J. A review of vaccines for HIV prevention[J]. J Gene Med, 2003, 5(1): 3-10.
- [15] McCarthy M. HIV vaccine fails in phase 3 trial[J]. The Lancet, 2003, 361: 755-756.
- [16] Cohen J. Vaccine results lose significance under scrutiny[J]. Science, 2003, 299: 1495.