

医学与免疫生物技术

携带 HIV-1 抗原的单纯疱疹病毒载体疫苗的构建及鉴定

赵晓飞, 郭景霞, 刘晓娟, 马正海

新疆大学生命科学与技术学院, 新疆 乌鲁木齐 830046

赵晓飞, 郭景霞, 刘晓娟, 等. 携带 HIV-1 抗原的单纯疱疹病毒载体疫苗的构建及鉴定. 生物工程学报, 2015, 31(3): 384-393.

Zhao XF, Guo JX, Liu XJ, et al. Construction and identification of HSV-1 vector vaccine carrying HIV-1 antigen. Chin J Biotech, 2015, 31(3): 384-393.

摘要: 利用细菌人工染色体技术将串联的 HIV-1 *gp160*、*gag* 和 *protease* 基因以及表达元件插入 1 型单纯疱疹病毒 (Herpes simplex virus type 1, HSV-1) 内部反向重复序列区, 以获得携带 HIV-1 抗原的单纯疱疹病毒载体疫苗。首先将 HIV-1 *gp160* (B 型和 C 型)、*gag* 和 *protease* 基因串联克隆入 pcDNA3 获得重组质粒 pcDNA/gBgp 和 pcDNA/gCgp, 重组质粒转染 293FT 细胞, Western blotting 检测 HIV 抗原表达。继而将 pcDNA/gBgp 和 pcDNA/gCgp 中包括 HIV-1 抗原基因和表达元件的表达框克隆入 pKO5/BN 获得重组穿梭质粒 pKO5/BN/gBgp 和 pKO5/BN/gCgp, 穿梭质粒电转含 BAC-HSV 的大肠杆菌, 筛选重组菌, 提取重组 DNA 并转染 Vero 细胞, 挑取病毒蚀斑纯化重组病毒, Southern blotting 鉴定重组病毒 DNA, Western blotting 检测重组病毒感染细胞中 HIV 抗原表达, 并分析病毒的增殖特性。结果表明, Western blotting 在 pcDNA/gBgp 和 pcDNA/gCgp 转染的 293FT 细胞中检测到表达的 *gp160* 和 *gag* 蛋白。pKO5/BN/gBgp 和 pKO5/BN/gCgp 分别电转获得重组菌, 并从重组 DNA 转染的 Vero 细胞中纯化获得重组 HSV, Southern blotting 检测表明重组 HSV 基因组发生特异性重组, 重组病毒感染细胞中检测到 *gp120* 和 *gp41*, 且重组 HSV 保留了在哺乳动物细胞中的复制能力。本研究获得携带 HIV-1 *gp160*、*gag* 和 *protease* 基因的重组 HSV, 并保留了在哺乳动物细胞中的复制能力, 可作为 HIV-1 复制型病毒载体疫苗。

关键词: 1 型单纯疱疹病毒, HIV-1 抗原, 病毒载体疫苗, 细菌人工染色体

Received: June 10, 2014; **Accepted:** July 22, 2014

Supported by: Xinjiang Uygur Autonomous Region High-tech Research and Development Project (No. 2010016).

Corresponding author: Zhenghai Ma. Tel: +86-991-8582500; E-mail: mzhxju@126.com

新疆维吾尔自治区高技术研究发展项目 (No. 2010016) 资助。

网络出版时间: 2014-08-20

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13345/j.cjb.1400320.html>

Construction and identification of HSV-1 vector vaccine carrying HIV-1 antigen

Xiaofei Zhao, Jingxia Guo, Xiaojuan Liu, and Zhenghai Ma

College of Life Science and Technology Xinjiang University, Urumqi 830046, Xinjiang, China

Abstract: To construct an HSV-1 vector vaccine carrying HIV-1 antigens, HIV-1 *gp160*, *gag*, *protease* and the expression elements were chained together, and then inserted into the internal inverted repeat sequence region of HSV-1 by bacterial artificial chromosome technology. Firstly, HIV-1 *gp160* (including type B and C), *gag* and *protease* genes were cloned into pcDNA3 in series to generate the pcDNA/gBgp and pcDNA/gCgp, then the recombinant plasmids were transfected into 293FT cells, and HIV-1 antigen was detected from transfected cells by Western blotting. Then the expression cassettes from pcDNA/gBgp and pcDNA/gCgp, comprising HIV-1 antigen genes and expression elements, were cloned into pKO5/BN to generate the shuttle plasmids pKO5/BN/gBgp and pKO5/BN/gCgp. The shuttle plasmids were electroporated into *E. coli* cells that harbor an HSV-BAC, the recombinant bacteria were screened, and the recombinant DNA was extracted and transfected into Vero cells. The recombinant virus was purified through picking plaques, the virus' DNAs were identified by Southern blotting; HIV-1 antigen was detected from the recombinant HSV-1 infected cells by Western blotting, and the virus' replication competent was analyzed. As the results, gp160 and gag proteins were detected from 293FT cells transfected with pcDNA/gBgp and pcDNA/gCgp by Western blotting. The recombinant bacteria were generated from the *E. coli* electroporated with pKO5/BN/gBgp or pKO5/BN/gCgp. The recombinant HSV was purified from the Vero cells transfected with the recombinant DNA, the unique DNA fragment was detected from the genome of recombination HSV by Southern blotting; gp120 and gp41 were detected from the infected cells by Western blotting, and the recombinant HSV retained replication competent in mammalian cells. The results indicate that the recombinant HSV carrying HIV-1 *gp160*, *gag* and *protease* genes was generated, the virus retains replication competent in mammalian cells, and could be used as a replicated viral vector vaccine.

Keywords: herpes simplex virus type 1, HIV-1 antigen, a viral vector vaccine, bacterial artificial chromosome

人类免疫缺陷病毒 (Human immune deficiency virus, HIV) 感染机体后主要侵犯 CD4⁺ T 细胞, 导致机体免疫缺陷并继发各种机会性感染和肿瘤。自首例艾滋病报道以来, 全球科学家一直致力于艾滋病疫苗的研制^[1]。针对 HIV 这类高度变异、攻击免疫系统且能引起持续感染和产生免疫病理反应的病毒而言, 研制能有效诱导机体全面免疫反应的疫苗尤为重要。目前, HIV 病毒样颗粒疫苗、亚单位疫苗、合成多肽疫苗、DNA 疫苗、细菌活载体疫苗和病毒载体疫苗均见报道, 上述疫苗在非人类灵长类动物模型中均可引起不同程度的免疫保护反应。

HSV-1 是一种嗜神经性病毒, 在人群中感染非常普遍, 常见的临床表现为黏膜和皮肤局部集聚的疱疹等轻微症状^[2]。HSV-1 为双链 DNA 病毒, 基因组 152 kb, 由独特的长片段 (Unique long sequence, U_L) 和短片段 (Unique short sequence, U_S) 组成, 两端为末端重复序列, 两片段连接处为内部反向重复序列 (Internal inverted repeat sequence, IR)^[2]。HSV-1 编码约 90 种蛋白, 功能大多已明确, 其中约一半为病毒复制所必需, 另一些为复制非必需, 删除非必需基因并以外源基因代之不会影响病毒复制, 故 HSV-1 可改造为病毒载体。HSV-1 作为疫苗载体

有其独特的优势,如: HSV-1 感染机体后潜伏于神经元,机体针对 HSV-1 的预存免疫很低; HSV-1 载体疫苗可通过口服和黏膜等途径免疫并激发机体全面的免疫应答;另外,有研究表明 HSV-1 能激发机体的固有免疫反应^[3]。与其他病毒载体相比,HSV-1 作为 HIV 载体疫苗的优势在于其宿主范围广、感染效率高、基因组游离存在、抗疱疹病毒药物可终止治疗意外感染和具有靶向性,遗传背景清楚,重组方法成熟^[4-5]等方面。

目前,以 HSV-1 为载体的 HIV-1 疫苗已有报道^[6-8],这些疫苗能够诱导 HIV-1 特异性的细胞免疫和体液免疫反应。本研究利用细菌人工染色体技术将串联的 HIV-1 *gp160*、*gag* 和 *protease* 抗原基因以及表达元件重组至 IR 区,以期获得新型 HIV 病毒载体疫苗。

1 材料与方法

1.1 菌种、质粒及细胞系

含 HSV-1 F 株全长基因组的细菌人工染色体 BAC-HSV 及其转化的大肠杆菌、含 HSV-1 基因组 *Bam*H I B 片段的质粒 pRB112 由芝加哥大学微生物系 Roizman Bernard 教授惠赠。穿梭质粒 pKO5/BN 为研究组前期构建,含 HSV-1 基因组 *Bam*H I B 片段和 *Bam*H I N 片段,在本研究中两个片段为同源重组臂。pIRES/*neo* 和 pcDNA3.1 质粒为本室保存。pcDNA3/*gp160*B、pcDNA3/*gp160*C、pMT/Bip/v5-*his-gag*、HIV-1 Bru3 以及 183H12 细胞 (*gag* 单克隆抗体杂交瘤细胞)均由上海巴斯德研究所周保罗研究员惠赠。293FT 和 Vero 细胞系为本室保存。

1.2 主要试剂

DNA marker 购自东盛公司;限制性内切

酶、T4 DNA 连接酶、Ex *Taq*、AMV 反转录酶、Klenow Fragment、DNA 连接试剂盒均购自 TaKaRa 宝生物公司;RNA 提取试剂盒、DNA 回收及纯化试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;质粒大量提取试剂 QIAGEN Plasmid Maxi Kit 购自 QIAGEN 公司;细胞培养液基质 HGMEM 和 Medium 199 购自 GIBCO 公司;Southern blotting 试剂盒购自 Roche 公司;转染试剂 Lipofectamine 2 000 购自 Invitrogen 公司;其余试剂均为国产分析纯。

1.3 引物设计及合成

根据 GenBank 公布的 HIV-1 基因组序列设计引物序列(表 1)。

1.4 方法

1.4.1 HIV-1 抗原基因串联质粒的构建及鉴定

质粒 HIV-1 Bru 3 含 HIV-1 全长基因组,以其为模板 PCR 扩增 *protease* 片段,以该片段替换 pIRES/*neo* 中的 *Neo^r* 基因,即经 *Sma* I 和 *Xba* I 位点克隆入 pIRES/*neo*,获得重组质粒 pIRES/*protease*;将 pMT/Bip/v5-*gag* 经 *Not* I (消化后补平)和 *Eco*R I 酶切获得的 *gag* 片段经

表 1 HIV-1 基因组所需扩增基因的引物序列

Table 1 Primers for target gene of HIV-1 genome

Primer name	Primer sequence (5'-3')
<i>gp160</i> -F	CATCCAAGCCAGCCAAGTTA
<i>gp160</i> (B)-R	GCTGGTAGTTCTTGCGGA
<i>gp160</i> (C)-R	GATCCACCACTGCTGGCAG
<i>gag</i> -F	AGATATCCACCATGGGTGCGAGAG CG
<i>gag</i> -R	AGTGGATCCTTATTGTGACGA
<i>Protease</i> -F	ATACCCGGGCCGCCATGCCTCAGAT CACTCTTTGGC
<i>Protease</i> -R	ACCTCTAGATTCTGAATCATTAAAAA TTTAAAGTGCAACC

*Bam*H I (消化后补平) 和 *Eco*R I 克隆入 pIRES/*protease* 多克隆位点, 获得重组质粒 pIRES/*gag/protease*; *Eco*R I (消化后补平) 和 *Asu* II 酶切 pIRES/*gag/protease* 获得含 HIV-1 *gag* 和 *protease* 的 DNA 片段, 以之取代 pcDNA3/*gp160B* 和 pcDNA3/*gp160C* 中的新霉素抗性基因, 即经 *Sma* I 和 *Asu* II 位点克隆入 pcDNA3/*gp160B* 和 pcDNA3/*gp160C*, 获得重组质粒 pcDNA3/*gp160B/gag/protease* (pcDNA/gBgp) 和 pcDNA3/*gp160C/gag/protease* (pcDNA/gCgp), 酶切鉴定重组质粒。

pcDNA/gBgp 和 pcDNA/gCgp 分别转染 293FT 细胞, 于 CO₂ 培养箱 37 °C 培养 48 h 后收集细胞, 常规方法裂解细胞, Western blotting 检测细胞裂解液上清和沉淀中的 HIV 抗原。

1.4.2 重组穿梭质粒的构建和重组 BAC-HSV 的筛选

pcDNA/gBgp 和 pcDNA/gCgp 分别经 *Nru* I 和 *Sal* I (消化后补平) 双酶切后得到 HIV-1 抗原基因串联的 DNA 片段, 并经 *Eco*R V 位点克隆入穿梭质粒 pKO5/BN, 获得重组质粒 pKO5/BN/*gp160B/gag/protease* (pKO5/BN/gBgp) 和 pKO5/BN/*gp160C/gag/protease* (pKO5/BN/gCgp), 酶切鉴定重组质粒。

按 Horsburgh 等^[9]报道的方法制备含 BAC-HSV 大肠杆菌的感受态细胞, 以 pKO5/BN/gBgp 和 pKO5/BN/gCgp 分别电转感受态细胞, 转化细胞经温度 (包括 43 °C 和 30 °C) 以及添加抗生素 (包括氯霉素和博来霉素) 和蔗糖的培养基筛选重组菌, 菌落 PCR 检测重组菌中 HIV-1 抗原基因。按 QIAGEN Plasmid Maxi Kit 说明书提取重组菌 DNA, PCR 鉴定重组

BAC-HSV。

1.4.3 重组病毒的纯化与鉴定

重组 BAC-HSV 转染 Vero 细胞后收集病毒蚀斑区细胞, 经冻融和超声处理的细胞裂解液感染 Vero 细胞, 经 3 轮蚀斑挑选纯化病毒, 随后大量感染 Vero 细胞并提取重组病毒基因组。以 pRB112 中 *Bam*H I 和 *Stu* I 酶切片段为模板, 随机引物法制备探针, 病毒基因组经 *Eco*R I 酶切、电泳并转至硝酸纤维素膜上进行 Southern blotting 检测, 探针制备及 Southern blotting 按 DIG DNA Labelling and detection Kit 的说明书进行。鉴定正确的重组 HSV 大量感染 Vero 细胞, 以 25 cm² 培养瓶为例, 每瓶感染细胞经冻融和超声处理后加入 1 mL 病毒储液, 于 -86 °C 保存备用。

1.4.4 Western blotting 检测重组病毒感染细胞中 HIV 抗原的表达

HSV/gBgp 和 HSV/gCgp 分别感染 Vero 细胞, 收集细胞沉淀, 细胞裂解液经 SDS-PAGE 分离并电转移至硝酸纤维素膜, 30 g/L 脱脂奶粉 4 °C 过夜封闭, 按 1 : 2 000 稀释小鼠抗 HIV gp160 抗体 (多抗), 室温孵育 1.5 h, 加入以 1 : 5 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠 IgG, 室温反应 1 h, DAB 避光显色, 拍照。

1.4.5 重组 HSV 增殖特性的检测

重组 HSV 病毒储液以无血清培养基按 10 倍梯度稀释后感染 Vero 细胞, 于 CO₂ 培养箱中 37 °C 培养 1–2 h, 期间间断振荡培养瓶 5–6 次, 之后换为 199Ö 培养基 (含 0.1 % 人 γ 球蛋白), 于 CO₂ 培养箱 37 °C 培养 48 h。细胞经甲醇固定和吉姆萨染液染色后于显微镜下进行病毒蚀斑计数, 并计算病毒储液的蚀斑形成单位 (Plaque

forming unit, PFU)。重组 HSV 按 0.5 感染复数 (Multiplicity of infection, MOI) 感染 Vero 细胞, 分别于感染后 12 h、18 h、24 h、48 h 收集感染细胞, 并按上述方法测定细胞裂解液中重组病毒的 PFU, 绘制重组病毒在 Vero 细胞中的生长曲线。

2 结果

2.1 HIV-1 抗原基因串联质粒的鉴定

pcDNA3/gBgp 和 pcDNA3/gCgp 中 HIV-1 抗原基因及表达元件的结构如图 1A 所示。图 1B 为 pcDNA3/gBgp 的酶切鉴定结果, 该质粒经 *Kpn* I 酶切产生 3 416 bp 和 6 456 bp 的 DNA 片段; 经 *Nru* I 酶切产生 9 872 bp 的 DNA 片段; 经 *Sal* I 酶切产生 2 479 bp 和 7 393 bp 的 DNA 片段; 经 *Nru* I 和 *Sal* I 双酶切产生 7 200 bp、2 500 bp 和 172 bp 的 DNA 片段; 经 *EcoR* I 和 *Bam* H I 双酶切产生 2 600 bp 和 7 272 bp 的 DNA 片段; 经 *Nru* I 和 *Asu* II 双酶切产生 2 690 bp 和 7 182 bp

的 DNA 片段; 经 *EcoR* I 和 *Sma* I 双酶切产生 3 563 bp 和 6309 bp 的 DNA 片段; 以上结果均与预期相符。pcDNA3/gCgp 经上述酶酶切鉴定亦正确。

pcDNA3/gBgp 和 pcDNA3/gCgp 转染 293FT 细胞后, Western blotting 在细胞沉淀和细胞裂解液上清中均检测到约 55 kDa 的 gag 蛋白和约 43 kDa 的 gag 蛋白降解产物 (图 2A), 以及约 160 kDa 的 gp160 蛋白及其降解产物 gp120 蛋白 (图 2B)。

2.2 穿梭质粒的鉴定和重组 BAC-HSV 的筛选

PKO5/BN/gBgp 和 pKO5/BN/gCgp 的酶切分析见图 3, 两个重组质粒经 *Sal* I 酶切均线性化产生约 15 500 bp 的 DNA 片段。pKO5/BN/gCgp 经 *EcoR* I 酶切产生约 8 500 bp 和 7 000 bp 的 DNA 片段, 经 *Xba* I 酶切产生约 15 000 bp 和 500 bp 的 DNA 片段, 经 *Xho* I 酶切产生约 6 900 bp、6 300 bp 和 1 800 bp 的 DNA 片段, 说明串联的

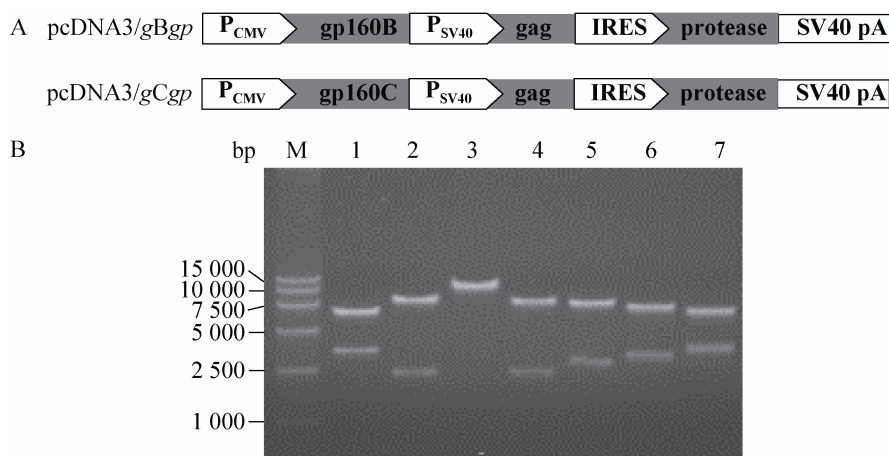


图 1 pcDNA3/gBgp 和 pcDNA3/gCgp 的结构及其酶切分析

Fig. 1 The structure and restriction analysis of pcDNA3/gBgp and pcDNA3/gCgp. (A) The structure and expression elements of HIV-1 genes. (B) The restriction analysis of pcDNA3/gBgp. M: DL15 000; 1: pcDNA3/gBgp digested by *Kpn* I; 2: pcDNA3/gBgp digested by *Sal* I; 3: pcDNA3/gBgp digested by *Nru* I; 4: pcDNA3/gBgp digested by *Nru* I and *Sal* I; 5: pcDNA3/gBgp digested by *EcoR* I and *Bam* H I; 6: pcDNA3/gBgp digested by *Nru* I and *Asu* II; 7: pcDNA3/gBgp digested by *EcoR* I and *Sma* I.

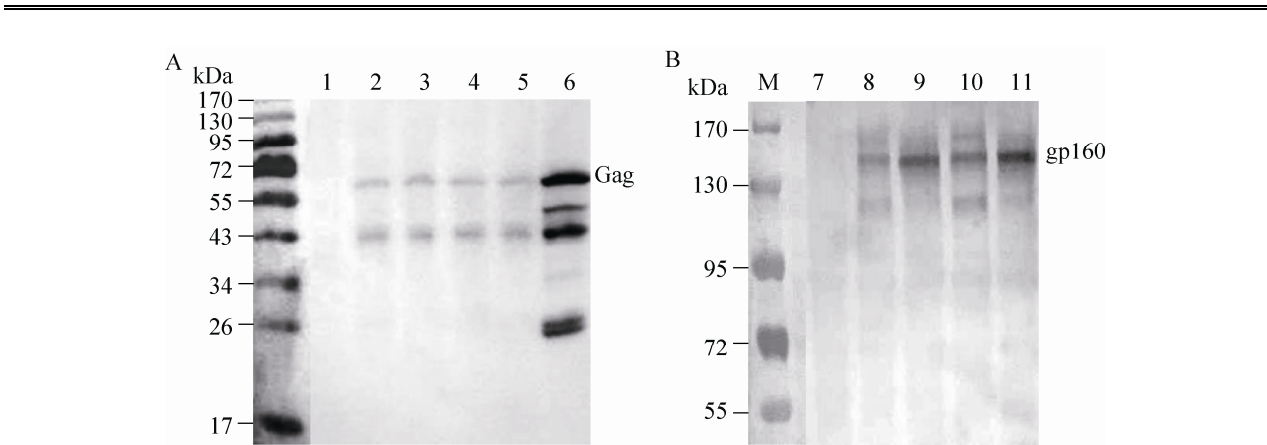


图 2 pcDNA3/gBgp 和 pcDNA3/gCgp 转染细胞中 gag 和 gp160 的检测

Fig. 2 Detection of gag and gp160 in cells which transfected with pcDNA3/gBgp and pcDNA3/gCgp. (A) The detection of gag in transfected cells. (B) The detection of gp160 in transfected cells. M: protein marker; 1 and 7: blank; 2: pcDNA3/gBgp (Cell lysate); 3: pcDNA3/gBgp (Cell pellet); 4: pcDNA3/gCgp (Cell lysate); 5: pcDNA3/gCgp (Cell pellet); 6: positive control; 8: pcDNA3/gBgp (Cell lysate); 9: pcDNA3/gBgp (Cell pellet); 10: pcDNA3/gCgp (Cell lysate); 11: pcDNA3/gCgp (Cell pellet).

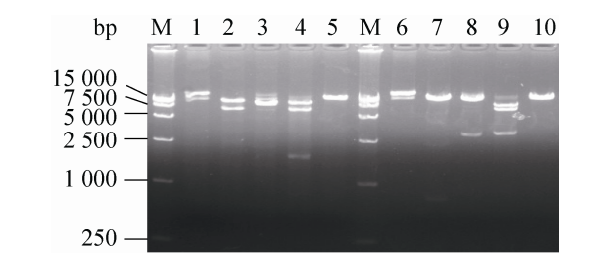


图 3 pKO5/BN/gBgp 和 pKO5/BN/gCgp 的酶切分析

Fig. 3 The restriction analysis of pKO5/BN/gBgp and pKO5/BN/gCgp. M: DL15 000; 1: pKO5/BN/gCgp; 2: pKO5/BN/gCgp digested by *EcoR* I; 3: pKO5/BN/gCgp digested by *Xba* I; 4: pKO5/BN/gCgp digested by *Xho* I; 5: pKO5/BN/gCgp digested by *Sal* I; 6: pKO5/BN/gBgp; 7: pKO5/BN/gBgp digested by *EcoR* I; 8: pKO5/BN/gBgp digested by *Xba* I; 9: pKO5/BN/gBgp digested by *Xho* I; 10: pKO5/BN/gBgp digested by *Sal* I.

HIV-1 基因表达框正向克隆入 pKO5/BN 质粒。pKO5/BN/gBgp 经 *EcoR* I 酶切产生约 14 700 bp 和 800 bp 的 DNA 片段, 经 *Xba* I 酶切产生约 12 900 bp 和 2 600 bp 的 DNA 片段, 经 *Xho* I 酶

切产生约 6 300 bp、5 800 bp 和 2 900 bp 的 DNA 片段, 说明串联的 HIV-1 基因表达框反向克隆入 pKO5/BN 质粒。

2.3 重组病毒的纯化与鉴定

重组 BAC-HSV 转染 Vero 细胞后获得病毒蚀斑, 挑取病毒蚀斑并在 Vero 细胞连续传代以纯化病毒, 图 4 为在 Vero 细胞中获得的三轮病毒蚀斑。纯化的重组 HSV 大量感染 Vero 细胞并提取病毒基因组, Southern blotting 检测到约 7 000 bp 的重组区特异性 DNA 片段 (图 5), 说明重组病毒正确, 分别命名为 HSV/gBgp 和 HSV/gCgp。

2.4 感染细胞中 HIV 抗原的检测

经 Western blotting 法检测, 在 HSV/gBgp 和 HSV/gCgp 感染的 Vero 细胞中均检测到约 120 kDa 大小的 gp120 和约 41 kDa 的 gp41, 正常 Vero 细胞中未检测到上述特异性蛋白 (图 6)。

2.5 重组 HSV 增殖特性的检测

HSV/gBgp 和 HSV/gCgp 感染 Vero 细胞 48 h 后病毒 PFU 分别达到 1.26×10^8 PFU/mL 和 1.53×10^8 PFU/mL, 略低于野生型 HSV-1 感染 Vero 细胞 48 h 时病毒 PFU (3.82×10^8 PFU/mL)。以 0.5 MOI 重组病毒感染 Vero 细胞 12 h、18 h、24 h、48 h 时的病毒 PFU 略低于野生型 HSV-1 的 PFU, 但无显著差异 ($P > 0.05$) (图 7)。

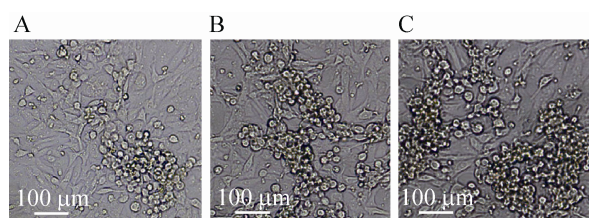


图 4 重组 HSV-1 的获得及纯化

Fig. 4 Purification of the recombinant virus by picking plaques. (A) The virus plaque in the Vero cells transfected with recombinant BAC-HSV (The first generation virus). (B) The virus plaque in the Vero cells infected with the first generation virus (The second generation virus). (C) The virus plaque in the Vero cells infected with the second generation virus (The third generation virus).

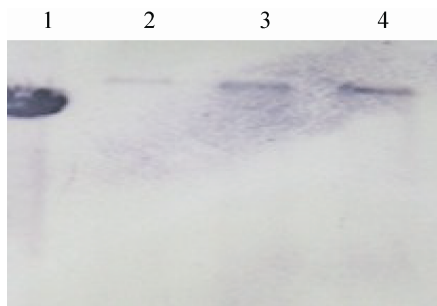


图 5 Southern blotting 鉴定重组病毒基因组

Fig. 5 Identification of recombinant virus genome by Southern blotting. 1: DNA fragment of HSV-1 *BamH I* B (Positive control); 2: Recombinant BAC-HSV/gBgp digested with *EcoR I*; 3: The genome of HSV/gBgp digested with *EcoR I*; 4: The genome of HSV/gCgp digested with *EcoR I*.

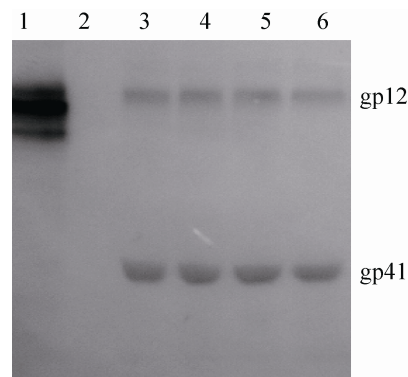


图 6 重组 HSV-1 感染细胞中 HIV-1 抗原的检测

Fig. 6 Detection of HIV-1 antigen in recombinant HSV-1 infected cells. 1: gp120 (Positive control); 2: Vero cells (Cell lysate); 3, 4: Vero cells infected with HSV/gBgp (Cell lysate); 5, 6: Vero cells infected with HSV/gCgp (Cell lysate).

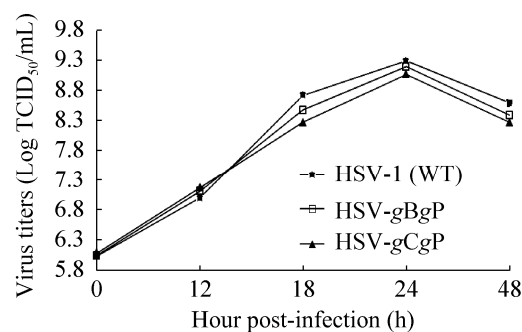


图 7 野生型病毒与重组病毒在 Vero 细胞中的生长曲线

Fig. 7 The one step growth curves of wild-type and recombinant HSV-1 in Vero cells.

3 讨论

近年来, 艾滋病疫苗领域出现了许多新的疫苗设计理念, 如改造 HIV 天然抗原的新免疫原设计路线、以诱导中和抗体产生为目标的 B 细胞疫苗技术路线、以提高免疫原性并兼顾细胞免疫和体液免疫的复制型病毒载体疫苗路线以及以诱导黏膜免疫为主的活载体疫苗等技术

路线^[10-11]。HIV 活载体疫苗能引起较强的细胞免疫反应,并能模拟 HIV 抗原的天然构象,已成为 HIV 疫苗研究的热点领域,其中以痘病毒和腺病毒为载体的 HIV 疫苗研究得最为深入^[12-13]。HSV-1 载体作为基因治疗载体和疫苗载体的研究已有很长的历史。目前,HSV-1 为载体的 HIV 疫苗也有大量研究,如研究报道表达 HIV-1 *gp120* 和 *gag* 的 HSV-1 扩增子 (Amplicon) 能诱导机体产生针对 HIV 的免疫应答。Knipe 课题组^[14]构建了含 SIV 的复制缺陷型和复制型 HSV-1 重组病毒,该研究组将包括 *gp120*、*gag* 和 *ref-tat-nef* 融合蛋白在内的 SIV 基因重组至复制缺陷型 HSV-1 载体 d106 中,该重组病毒能诱导短尾猴产生针对 SIV 的中和抗体和细胞免疫反应,攻毒实验中免疫组的病毒载量减少。为增强疫苗载体抗原表达水平和诱导的免疫应答水平,该研究组恢复 d106 中部分立即早期 (IE) 基因以提高病毒载体的复制能力,获得的 HSV-1 重组病毒 d106S 细胞毒性较低,并保持了对抗疱疹病毒药物的敏感性,故其安全性较高。目前,研究者已将 HIV 囊膜蛋白 *gp120* 基因重组至 d106S 并获得表达^[15]。另有研究者构建了含 *tat* 或基质蛋白基因 *p17* 等 HIV 基因的复制缺陷型 HSV-1,这些重组疫苗均能诱导 HIV 特异性的免疫反应^[16-17]。

本研究将 HIV-1 *gp160*、*gag* 和 *protease* 基因以及表达元件串联后克隆入真核表达质粒 pcDNA3.1,在重组质粒 pcDNA/gBgp 和 pcDNA/gCgp 转染的 293FT 细胞沉淀和细胞裂解液上清中均检测到 *gag* 蛋白、*gp160* 蛋白及其降解产物,说明 HIV-1 抗原基因及表达元件的串联框架保证了各基因的表达,且表达的 *gag*

蛋白和 *gp160* 蛋白能够在细胞内进行加工。随后将 HIV-1 抗原基因及表达元件的串联框架克隆至穿梭质粒 pKO5/BN,利用细菌人工染色体技术获得重组 BAC-HSV,继而转染 Vero 细胞获得重组病毒,Southern blotting 检测结果表明重组区已发生特异性重组。重组 HSV-1 感染的 Vero 细胞中检测到 *gp120* 和 *gp41*,说明表达的 *gp160* 经酶解产生了 *gp120* 和 *gp41*,与 HIV-1 感染细胞时 *gp160* 的加工过程一致。病毒增殖特性的研究表明,获得的重组病毒 HSV/gBgp 和 HSV/gCgp 在 Vero 细胞中的增殖水平略低于野生型 HSV-1,但与野生型 HSV-1 的增殖水平无显著性差异 ($P>0.05$)。

研究中,重组病毒的获得是基于穿梭质粒 pKO5/BN 中 HSV-1 *BamH* I B 和 *BamH* I N 片段在含 BAC-HSV 的大肠杆菌中与 HSV-1 基因组的同源区发生重组,故 HIV-1 抗原基因及表达元件的串联框架重组至 HSV-1 基因组的同时,删除了 HSV-1 *BamH* I B 和 *BamH* I N 片段之间约 15 kb 的内部反向重复序列 (Internal inverted repeat sequences, IR),IR 区包括 3 个 IE 基因、神经毒性基因 $\gamma 34.5$ 和病毒潜伏相关转录本 LAT。Roizman 课题组^[18]早在 1988 年就报道了删除大部分 IR 区并插入 HSV-2 多个囊膜糖蛋白编码基因的重组 HSV-1 R7020 (又称 NV1020),构建 R7020 的最初目的是研制预防 HSV-1 和 HSV-2 感染的疫苗,研究中发现其保留了在哺乳动物细胞中的复制能力,安全性较高,抗肿瘤活性明显^[19],并将其改造为 NV1023、NV1042、NV1066 等溶瘤病毒^[20]。本研究获得的重组病毒 HSV/gBgp 和 HSV/gCgp 在插入 HIV-1 多价抗原的同时删除了完整的 IR 区,其

感染特性和安全性等方面可能与 R7020 有相似之处,本研究也证实获得的重组 HSV 保留了感染能力,其安全性尚待进一步研究证实。

HIV-1 疫苗抗原选择方面,病毒囊膜糖蛋白 (Env) 和衣壳蛋白 (gag) 是主要的候选抗原。HIV-1 感染过程中,Env 是中和抗体的主要靶点,同时也是诱导中和抗体的主要抗原。gp160 是 HIV-1 Env 的前体蛋白,在宿主细胞蛋白酶的作用下酶解成 gp120 和 gp41, gp120 为外膜蛋白,其上分布有大量的糖基化位点^[21-22], gp41 为跨膜蛋白,在病毒感染过程中介导病毒脂膜与细胞膜融合^[7,23]。Hocknell 等^[24]以表达 HIV-1 gp120 的 HSV-1 扩增子诱导小鼠产生了较强的细胞免疫和体液免疫反应。Gag 作为免疫原主要激发细胞免疫反应,能自我装配成病毒颗粒 (VLP)^[25-27],经改造后仍能够自我组装成 VLP 并保持天然构象。Parker 等^[7]构建了表达 gag 的复制型重组 HSV-1,其可诱导小鼠产生特异性细胞免疫反应。除 Env 和 gag 之外,Pol、Tat、Nef 等为抗原以及多价抗原的 HIV 疫苗研究也均见报道。本研究中将 HIV-1 B 型和 C 型 gp160, gag 和 protease 基因的表达框重组至 HSV 获得 HIV-1 多价病毒载体疫苗,表达的 gp160 和 gag 经宿主细胞蛋白酶和外源表达的 protease 降解及各组间互作更接近 HIV-1 感染细胞时 HIV-1 蛋白表达和加工的过程,其诱发的免疫反应也将针对并阻断 HIV-1 感染过程,我们后期将通过动物免疫试验深入探讨该载体疫苗的免疫效果。

REFERENCES

- [1] Soshin Ahn, Youngchul Sung. AIDS vaccine development: the past, the present, and the future. *Immune*, 2009, 9(1): 1-3.
- [2] Manservigi R, Argnani R, Marconi P, et al. HSV recombinant vectors for gene therapy. *Open Virol J*, 2010, 4: 123-156.
- [3] Tsitoura E, Epstein AL. Constitutive and inducible innate responses in cells infected by HSV-1-derived amplicon vectors. *Open Virol J*, 2010, 4: 96-102.
- [4] Chen NG. *Cancer Management in Man: Chemotherapy, Biological Therapy, Hyperthermia and Supporting Measures*. New York: Springer Press, 2011, 13: 295-316.
- [5] Todo T. Oncolytic virus therapy using genetically engineered herpes simplex viruses. *Front Biosci*, 2008, 13: 2060-2064.
- [6] Santos K, Duke CM, Rodriguez-Colon SM. Effect of promoter strength on protein expression and immunogenicity of an HSV-1 amplicon vector encoding HIV-1 Gag. *Vaccine*, 2007, 25(9): 1634-1646.
- [7] Parker SD, Rottinghaus ST, Zajac AJ, et al. HIV-1_{89.6} Gag expressed from a replication competent HSV-1 vector elicits persistent cellular immune responses in mice. *Vaccine*, 2007, 25(37/38): 6764-6773.
- [8] Duke CM, Maguire CA, Keefer MC, et al. HSV-1 amplicon vectors elicit polyfunctional T cell responses to HIV-1 Env, and strongly boost responses to an adenovirus prime. *Vaccine*, 2007, 25(42): 7410-7421.
- [9] Horsburgh BC, Hubinette MM, Tufaro F. Genetic manipulation of herpes simplex virus using bacterial artificial chromosomes. *Methods Enzymol*, 1999, 306: 337-352.
- [10] Cohen J. Promising AIDS vaccine's failure leaves field reeling. *Science*, 2007, 318(5847): 28-29.
- [11] Kadoki M, Choi BI, Iwakura Y. The mechanism of LPS-induced HIV type I activation in transgenic mouse macrophages. *Int Immunol*, 2010, 22(6): 469-478.
- [12] Kim JH, Rerks-Ngarm S, Excler JL, et al. HIV vaccines: lessons learned and the way forward. *Curr Opin HIV AIDS*, 2010, 5(5): 428-434.

- [13] Esteban M. Attenuated poxvirus vectors MVA and NYVAC as promising vaccine candidates against HIV/AIDS. *Hum Vaccin*, 2009, 5(12): 867–871.
- [14] Watanabe D, Brockman MA, Ndung'u T, et al. Properties of a herpes simplex virus multiple immediate-early gene-deleted recombinant as a vaccine vector. *Virology*, 2007, 357(2): 186–198.
- [15] Liu X, Broberg E, Watanabe D, et al. Genetic engineering of a modified herpes simplex virus 1 vaccine vector. *Vaccine*, 2009, 27(21): 2760–2767.
- [16] Fiorentini S, Marconi P, Avolio M, et al. Replication-deficient mutant Herpes Simplex Virus-1 targets professional antigen presenting cells and induces efficient CD4⁺ T helper responses. *Microbes Infect*, 2007, 9(8): 988–996.
- [17] Bozac A, Berto E, Vasquez F, et al. Expression of human immunodeficiency virus type 1 tat from a replication-deficient herpes simplex type 1 vector induces antigen-specific T cell responses. *Vaccine*, 2006, 24(49/50): 7148–7158.
- [18] Meignier B, Longnecker R, Roizman B. *In vivo* behavior of genetically engineered herpes simplex viruses R7017 and R7020: construction and evaluation in rodents. *J Infect Dis*, 1988, 158(3): 602–614.
- [19] Kemeny N, Brown K, Covey A, et al. Phase I, open-label, dose-escalating study of a genetically engineered herpes simplex virus, NV1020, in subjects with metastatic colorectal carcinoma to the liver. *Hum Gene Ther*, 2006, 17(12): 1214–1224.
- [20] Geevarghese SK, Geller DA, de Haan HA, et al. Phase I/II study of oncolytic herpes simplex virus NV1020 in patients with extensively pretreated refractory colorectal cancer metastatic to the liver. *Hum Gene Ther*, 2010, 21(9): 1119–1128.
- [21] Zhang PF, Cham F, Dong M, et al. Extensively cross-reactive anti-HIV-1 neutralizing antibodies induced by gp140 immunization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(24): 10193–10198.
- [22] Morrison LA, Knipe DM. Immunization with replication-defective mutants of herpes simplex virus type 1: sites of immune intervention in pathogenesis of challenge virus infection. *J Virol*, 1994, 68(2): 689–696.
- [23] Dudek T, Knipe DM. Replication-defective viruses as vaccines and vaccine vectors. *Virology*, 2006, 344(1): 230–239.
- [24] Hocknell PK, Wiley RD, Wang X, et al. Expression of human immunodeficiency virus type 1 gp120 from herpes simplex virus type 1-derived amplicons results in potent, specific and durable cellular and humoral immune responses. *J Virol*, 2002, 76(11): 5565–5580.
- [25] Promkhatkaew D, Pinyosukhee N, Thongdeejaroen W, et al. Prime-boost immunization of codon optimized HIV-1 CRF01-AE Gag in BCG with recombinant vaccinia virus elicits MHC class I and II immune responses in mice. *Immunol Invest*, 2009, 38(8): 762–779.
- [26] Himmel ME, Ding SY, Johnson DK, et al. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science*, 2007, 315(5813): 804–807.
- [27] Wen Y, Song Y, Li JL. The effects of *Vitreoscilla* hemoglobin expression on growth and antibiotic production in *Streptomyces cinnamonensis*. *Chin J Biotech*, 2001, 17(1): 24–28 (in Chinese).
文莹, 宋渊, 李季伦. 透明颤菌血红蛋白在肉桂地链霉菌中的表达对其细胞生长及抗生素合成的影响. *生物工程学报*, 2001, 17(1): 24–28.

(本文责编 郝丽芳)