

含口蹄疫病毒O₁K亚型VP₁基因的 重组痘苗病毒的构建及表达

吴晓军 李 鹏 莽克强

(中国科学院微生物研究所, 北京)

刘庚起 张永和

(中国预防医学科学院病毒学研究所, 北京)

本文报道了将欧洲流行的口蹄疫病毒O₁K亚型的主要表面抗原VP₁克隆插入痘苗病毒的TK基因中,并在动物细胞中表达。所用痘苗病毒载体为我国长期用于防治天花的痘苗病毒效果安全的天坛株,所用O₁K亚型VP₁克隆为Hofschneider, P.H.教授惠赠的pFMDV-1034。首先将pFMDV-1034中的VP₁基因片段插入中间质粒pBCB06*的BamHI/Hind III位点,该质粒含痘苗病毒WR株的P_{7.5}启动子和多克隆位点,其两侧序列为TK基因(由D. Boyle博士赠)。或插入pBCB08的Hind III位点,该质粒与pBCB06*之区别仅在于启动子为PL₁₁、多克隆位点种类不同。将杂合的中间质粒转化已由天坛株痘苗病毒TK⁺侵染过的143BTK⁻细胞,通过体内同源重组而获得有VP₁基因插入的重组痘苗病毒。在BUDR存在时不能侵染143BTK⁻细胞的病毒可视为TK⁻表型病毒即含VP₁基因的痘苗重组病毒,再经pFMDV-1034 BamHI-Hind III片段为探针进行杂交确证。其中所得两株重组痘苗病毒V.V10344H、V.V103408在143BTK⁻细胞中繁殖并用ELISA方法测表达,其P/N值最高分别为9.50和8.21。

关键词 FMDV O₁K亚型; VP₁基因; 重组痘苗病毒

1981年口蹄疫病毒(FMDV)两个不同血清型的亚型O₁K和A_{1,2}119的VP₁基因分别被克隆并在*E. coli*中表达^[1,2],但其VP₁的免疫原性并不令人满意。虽然A_{1,2}119VP₁融合蛋白在牛体内起到较好的保护反应,但所需剂量是天然VP₁或灭活苗的几十倍甚至200倍;而O₁K的VP₁融合蛋白的免疫原性则更差,至今未见有保护反应的报道^[3]。人工合成VP₁的与亚型特异性有关的主要抗原决定簇即第141—160氨基酸,并偶联适合载体能诱发较满意的中和抗体并保护豚鼠不受同源病毒之侵染^[4,5]。从疫苗研制考虑这是条有希望的途径。同年美国纽约州卫生部的E. paletti和NIH的B. Moss相继报道用痘苗病

毒为载体,插入外源基因,组建成重组痘苗病毒并成功地获得表达,为研制疫苗开辟另一条有希望的途径^[6,7]。重组痘苗病毒有如下优点:1.可容纳外源基因的量很大约25000bp,故能做多价疫苗之载体;2.动物实验表明重组痘苗病毒所诱发的免疫反应除体液免疫外还包括细胞免疫反应;3.所表达的多肽通常均为糖化的并能分泌;4.痘苗病毒的培养、生产工艺已相当成熟,若能直接用重组痘苗病毒接种免疫则可省略繁琐而昂贵的抗原后处理提纯

本文于1986年10月31日收到。

中国预防医学科学院病毒学研究所朱旻明教授对本工作的指导;刘建中、景新、解燕乡对本工作给予帮助,特此致谢。

工艺。自1982年来已有多种外源抗原基因通过重组痘苗病毒获得表达。如单纯疱疹病毒(HSV)的TK基因^[6], 流感病毒的HA基因^[8], 乙肝病毒表面抗原(HBsAg)^[8,10]、狂犬病毒和水泡性口膜炎病毒的表面糖蛋白^[11,12]。最近又组建了含HSV-1糖蛋白D、流感HA基因和HBsAg基因的三价重组痘苗病毒并在兔内获得表达,且对三种病毒的侵染有保护作用^[13]。尽管如此,从安全考虑,兽用重组痘苗病毒可能会首先得到应用。因为兽用的不象人用疫苗那样严格,同时从未报道过痘苗病毒能连续地自然传布^[14]。因此继多种人类病毒的主要抗原插入痘苗病毒后,1985年开始将牛水泡性口膜炎病毒表面抗原基因^[12],猪伪狂犬病毒糖蛋白的基因插入痘苗病毒^[15]。

本文以我国长期用于预防天花的疫苗

株痘苗病毒——天坛株为载体,以FMDV O₁K亚型(欧洲流行株)的VP₁克隆FMDV-1034为外源基因,进行了重组痘苗病毒的构建及VP₁在哺乳动物细胞内的表达,并讨论了将此用做猪口蹄疫活疫苗的前景。

材 料 和 方 法

(一) 细胞和病毒

人骨肉瘤胸苷激酶阴性细胞(143 B TK⁻),最初系由Rhim cho和Huebuer建株,经由上海生化所汪垣同志转赠。本实验中用到的其他细胞,如CV-1、LTK⁻等均为中国预防医学科学院病毒学研究所传代细胞。

pBCB06*由澳大利亚国立大学的John Curtin School of Medical Research的D.Boyle博士惠赠。该质粒已将痘苗

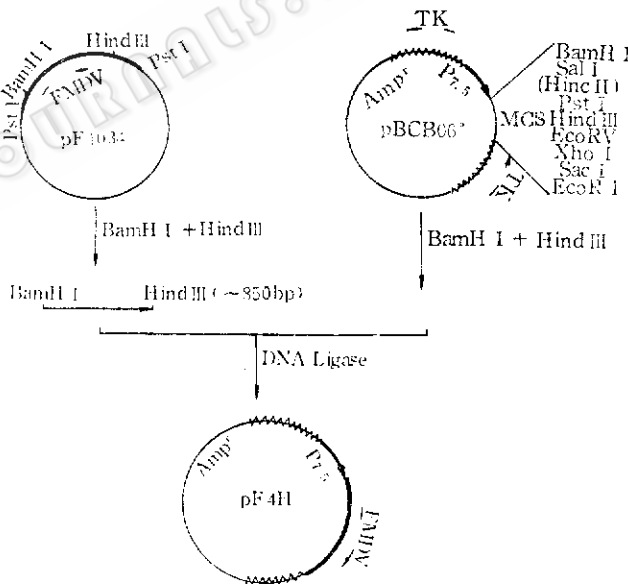


图1 含口蹄疫病毒O₁K亚型VP₁基因(cDNA拷贝)的痘苗病毒早-晚期启动子表达质粒的构建
 Fig.1 Construction of expression plasmid containing the early-late promoters of vaccinia virus and VP₁ gene (cDNA copy) of Foot-Mouth Disease virus O₁K subserotype pF1034经BamHI-Hind III酶解后分离出850bp片段,与BamHI-Hind III酶解的pBCB06*做定向连接得到pF4H
 850 bp fragment isolated from BamHI-Hind III digestion of pF1034 was ligated with BamHI-Hind III digested pBCB06* to produce pF4H

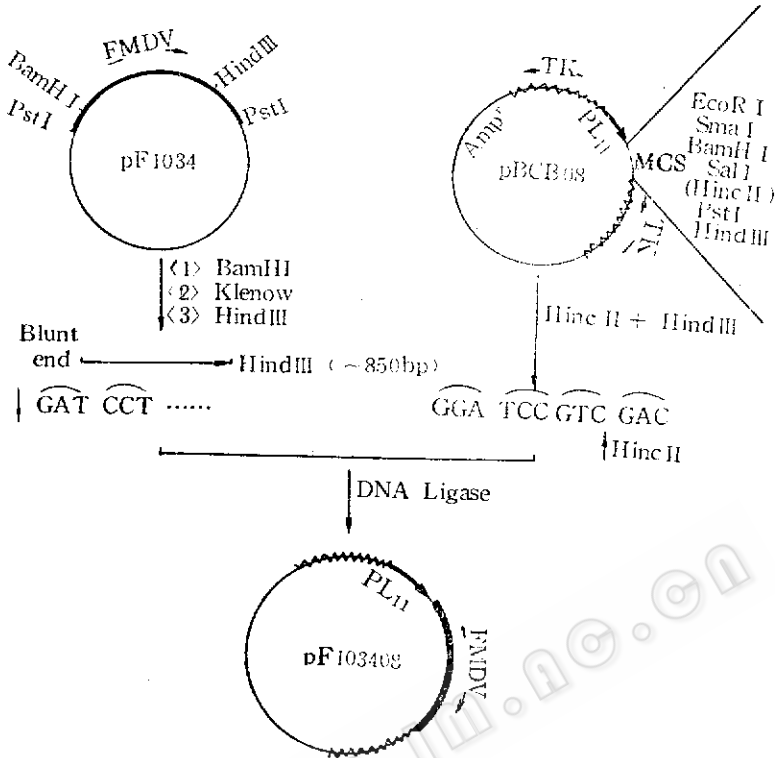


图2 含口蹄疫病毒O₁K亚型VP₁基因(cDNA拷贝)的痘苗病毒晚期启动子表达质粒的构建
Fig.2 Construction of expression plasmid containing the late Promoter of vaccinia virus and VP₁ gene (cDNA copy) of Foot-Mouth Disease virus subserotype O₁K

pF1034经BamHI酶解后,用大片段酶(Klenow fragment)补成平头,然后用HindIII酶解,分离出850bp片段,与HincII-HindIII酶解的pBCB08做定向连接,得pF103408,其中VP₁基因的序列与PL₁₁的ATG处于同一阅读框架之中

pF1034 was digested with BamHI and blunt-ended by Klenow fragment enzyme, after HindIII digestion 850bp fragment was isolated and ligated With HincII-HindIII digested pBCB08 to produce pF103408. The sequence of the gene in pF103408 has the same reading frame with ATG of PL₁₁

病毒WR株早-晚期启动子P_{7,5}和多克隆位点(MCS)插入TK基因,并带标记基因Amp^r(见图1)^[16]。

pBCB08也由D.Boyle博士惠赠。它与pBCB06*区别仅在于插入的是痘苗病毒WR株晚期启动子PL₁₁及MCS的切点种类不同而已(见图2)。

pFMDV-1034由Max Planck生化研究所的P.H. Hofschneider教授惠赠。该克隆覆盖O₁K亚型VP₁的全部以及P_{1,2}基因区的部分^[11]。

pF4H和pF103408的构建方法见“结

果”部分。

各种酶反应,感受态细胞制备、转化,质粒DNA的制备,克隆分析以及 $\alpha^{32}\text{P}$ 标记探针的制备等均基本参照文献所述^[17]。所有酶除T4DNA连接酶外,均由洛阳华美生物工程公司或BRL提供。T4DNA连接酶由中国科学院生物物理研究所提供。

(二) 标记拯救方法

参照文献[18],改进详见“结果”部分。

(三) 酶联免疫检测方法

抗口蹄疫病毒 (O₁BSF亚型) 的豚鼠抗血清由英国动物病毒研究所提供, 用 143 B TK⁻细胞及高岭土、BSA (牛血清白蛋白) 吸附后^[19], 检测 O₁ 亚型口蹄疫病毒抗原的表达^[20], 详见“结果”部分。

结 果

(一) 含口蹄疫病毒 (O₁K 亚型)

VP₁ 基因主要抗原决定区重组质粒的构建

构建重组痘苗病毒, 一般分两步进行。因为痘苗病毒基因组极大, 含有 187000bp 的 DNA, 难于直接操作, 而且分离后的痘苗病毒 DNA 不具有感染力, 不能直接应用超感染技术。因此首先要构建含外源基因的重组质粒, 然后在细胞内进行同源重组, 从而获得含外源基因的重组痘苗病毒。口蹄疫病毒属小核糖核酸病毒科, 它的基因组是一条约 8500bp 的正链 RNA, 在病毒增殖过程中, 此 RNA 被翻译成一条多蛋白链 (Polyprotein), 然后由病毒编码的蛋白酶经若干步骤后, 加工出成熟病毒毒粒上的各个结构蛋白, VP₁、VP₂、VP₃、VP₄、VP₅₋₈ 及若干非结构蛋白^[21], 其中 VP₁ 由 213 个氨基酸残基组成, 为病毒的主要抗原蛋白, 其中第 141—160 氨基酸残基及第 200—213 氨基酸残基区包含 VP₁ 蛋白的主要抗原决定簇^[4,22]。

我们取 O₁K 亚型 pF1034 克隆做材料, 此克隆含有 VP₁ 基因的 cDNA 拷贝^[1]。pF1034 经 BamHI 和 HindIII 双酶解后, 得到长度为 850bp 的片段, 含有近全长的 VP₁ 基因及部份 P_{1,2} 基因^[23]。将此片段分别按图 1 及图 2 步骤, 克隆到 pBCB06* 及 pBCB08 两个质粒中, 即获得含口蹄疫病毒 O₁K 亚型 VP₁ 基因的两个重组质粒。其中 pF4H 含痘苗病毒早-晚期启动子 P_{7,8}, 利

用口蹄疫病毒 VP₁ 第 36 个氨基酸 (Met) 的 ATG 为翻译起始子^[23]。pF103408 则是利用痘苗病毒晚期启动子 PL_{1,1} 的 ATG 为翻译起始子。其中口蹄疫病毒 VP₁ 序列与 PL_{1,1} 的 ATG 处于同一阅读框架中 (详见图 2)。由于在开展此项工作时, 我们不具备条件, 翻译终止子没有另加, 根据 TK 基因的序列^[24] 可知, 如果体内同源重组不影响序列, 则由于 pF1034 序列进入 TK 基因的反向序列而读入闭框架 (Blocked reading frame) 并终止于 TK 旁侧序列 (Flanking sequences) 之中。

(二) 标记拯救法选择 TK⁺ 天坛株痘苗病毒

因本工作中应用的痘苗病毒表达质粒中外源基因部分两侧的旁侧序列是痘苗病毒胸苷激酶 (TK) 的序列, 因此需要用 TK⁻ 毒做母体病毒。这样, 当质粒与 TK⁺ 病毒发生体内同源重组时, 使得重组病毒因为插入灭活而呈 TK⁻ 表型, 即可很容易地从 TK⁺ 病毒群体中选出重组痘苗病毒。我国的痘苗病毒天坛株是天花消灭前人群种痘用的疫苗株。我们选用天坛株是因为其神经毒力低, 种痘后副反应小, 如果将来发展成动物疫苗, 万一偶然回传到人, 其危害程度也小。但天坛株病毒以前未经纯化。我们挑选出 20 余个空斑, 分别经 BUDR (5-溴脱氧尿嘧啶) 及 MTAGG (氨甲喋呤、胸苷、腺苷、鸟苷、甘氨酸) 处理后^[24], 证明全部是 TK⁻ 表型。因此我们重新用未经空斑纯化的混合天坛毒, 按文献[24]方法用 MTAGG 处理, 但改为在病毒侵染的同时加入 MTAGG, 并将甘氨酸浓度改为 100μM, 以避免使用价格较贵非必需氨基酸的培养液。在 TK⁻ 的 143B 细胞上连续处理两代后, 按病毒侵染后 6h 加 MTAGG, 在 143B 细胞上挑斑并增殖病毒。经在 143B TK⁻ 细胞上滴定, 在含

BUDR (35 μ g/ml) 培养基中的滴度比在不含BUDR培养基中的滴度低 10000 倍以上者是为TK⁺痘苗病毒。

(三) 标记拯救法选择 TK⁻重组痘苗病毒

以每个细胞0.01—0.05蚀斑形成单位(PFU)的TK⁺痘苗病毒感染1—2日内成片的143B TK⁻细胞。37 $^{\circ}$ C培养1h后倾除病毒液, 换入2.5ml 10%血清的培养液(底面积12cm²), 37 $^{\circ}$ C培养1h后将病毒已侵染过的143B TK⁻细胞中的培养液倾除, 加入用磷酸钙法沉淀的重组质粒DNA。细胞在DNA沉淀液中约能维持10—30min, 待细胞单层开始受破坏时, 加入2ml含10%血清的培养液, 37 $^{\circ}$ C保温1—3h。此时应能在显微镜下观察到DNA在细胞表面上的沉积物。倾除含沉淀物的培养

液, 换成4ml含10%血清的培养液, 48h后收毒。

病毒收获后, 按1:30至1:300稀释, 感染143B TK⁻细胞, 并在培养液中加入35 μ g/ml的BUDR。两天后用0.01%中性红-磷酸缓冲生理盐水染色, 所出蚀斑均代表TK⁻表型。每个TK⁻斑挑入长满143B TK⁻细胞的24孔板中的一个孔, 在含有BUDR的培养液中让病毒繁殖48h。弃去培养液, 于每孔中加入20—40 μ l双蒸水。冻融3次后, 每孔取5 μ l点在硝酸纤维素膜上。膜经处理后^[17], 用pF1034的BamHI-HindIII片段(850bp)标记上 α ³²P做探针, 杂交后阳性孔为含有口蹄疫病毒VP₁基因(部分)的重组痘苗病毒(见图3)。挑出的重组痘苗病毒经再次挑斑, 再次杂交确证后, 在143B TK⁻细胞上增殖。我

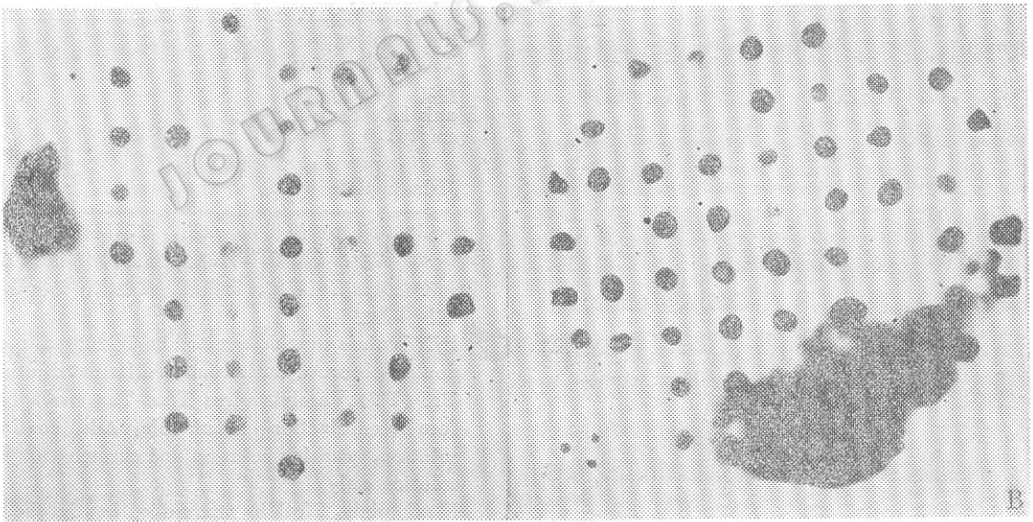


图3 用分子杂交挑选含口蹄疫病毒O₁K亚型VP₁基因(cDNA拷贝)的重组痘苗病毒
Fig.3 Screening of recombinant vaccinia virus containing VP₁ gene (cDNA copy) of Foot-Mouth Disease virus subserotype O₁K by molecular hybridization

按结果(三)所述方法点膜, 以每张硝酸纤维素膜(82mm) -5×10^5 cpm α^{32} P探针做杂交, 曝光48h后的X光底片。

The samples were dotted onto nitrocellulose membrane as described in results (三). Hybridization was performed using α^{32} p labeled probe with 5×10^5 cpm per membrane (82mm in diameter). The X-ray film was exposed for 48h.

A. 杂交第一代 First generation of hybrid

B. 杂交第二代 Second generation of hybrid

们选了6个含口蹄疫病毒VP₁基因(部分)的重组痘苗病毒,命名:V.V103408-2、V.V103408-15、V.V103408-19、V.V10344H-3、V.V10344H-13、V.V10344H46。

(四) 口蹄疫病毒VP₁在动物细胞中的表达

我们采用酶联免疫检测方法,参照文献[20]检测口蹄疫病毒VP₁在重组痘苗病毒感染的哺乳动物细胞中的表达。因O₁BSF抗血清中非特异性反应较重,因此我们先用20%压积体积的143B TK⁻细胞-磷酸缓冲生理盐水与等体积抗血清混匀后,4℃过夜再移至37℃保温30min,离心后取上清,再加入等体积的BSA-Kaolin混合液(BSA4%,高岭土25%),室温作用15min,离心后取上清,成为稀释度20:1的双吸附抗血清。

将长满较密的单层细胞——143B TK⁻细胞,按每个细胞1pfu感染重组痘苗病毒,24h后收获,冻融3次,超声波破碎,每次30秒,共3次,离心后取上清,装入透析袋,经聚乙二醇(MW20000)反透析浓缩。加入0.05M碳酸盐缓冲液(pH9.6)从袋上洗下抗原,得到10倍浓缩的抗原粗提液,用NaOH调至pH9.6。
包被抗原:将不同稀释度的抗原粗提液每孔加入100μl,4℃过夜。第2天倾除包被液。封闭:用PBS-T配制3%的BSA混合液,每孔加100μl,37℃保温1h,洗涤5次,每次5min。加入抗血清:每孔加100μl稀释度20:1的双吸附血清,37℃保温1h,洗涤5次,每次5min。加入酶标物(SPA-过氧化物酶):每孔100μl,作1:3000稀释,37℃保温1h,洗涤5次,每次5min。加入发色底物(邻苯二胺):每孔100μl,反应15—30min。终止反应(2M H₂SO₄):每孔50μl。于490nm波长下测

定,按以下公式计算P/N值。

$$\frac{P}{N} = \frac{\text{阳性对照}}{\text{正常对照}}$$

$$\frac{\text{抗原孔OD值} - \text{空孔OD值}}{\text{阴性对照孔OD值} - \text{空孔OD值}}$$

结果见表1及图版1。

表1 ELISA检测重组痘苗病毒中口蹄疫病毒VP₁基因的表达

Table 1 Expression of VP₁ gene contained in the recombinant vaccinia virus as detected by ELISA

蛋白抗原 Antigen protein	1:1		1:2	
	消光值 Extinction coefficient	P/N	消光值 Extinction coefficient	P/N
V.V10344H-3	1.65	9.50	1.27	6.78
V.V10344H-13	1.54	8.71	1.15	5.92
V.V10344H-46	1.43	7.92	1.22	6.42
V.V103408-2	1.47	8.21	1.11	5.64
V.V103408-15	1.46	8.14	1.07	5.35
V.V103408-19	1.30	7.00	1.17	6.07
TK ⁺ (TT)对照 TK ⁺ (TT)control	0.58		0.38	
空孔 对照 Blank hole control (empty)	0.29		0.35	
空板 Blank plate	0.10		0.10	

以20:1稀释度的双吸附血清,在不同稀释度所测的P/N值,其中:TK⁺(TT)是重组前的天坛株痘苗病毒,空孔只加有包被液、洗涤液、发色液;空板是不加任何液体的空孔

P/N Values were determined using 20:1 diluted double-absorbed antiserum at different dilution TK⁺(TT):Vaccinia virus Tian-Tan strain before recombination, Blank hole, Add coating solution, washing solution and chromogenizing solution only

Blank plate, Nothing was added in the holes

讨 论

本文报道的含口蹄疫病毒的VP₁基因的重组痘苗病毒的构建及其表达的成功,进一步证实痘苗病毒作为广泛应用的外源基因的表达载体是适宜的。但作为活疫苗

的最终应用尚需进行多方面的工作。如选择具有很好的免疫原性的口蹄疫病毒, 研究高效表达的途径, 免疫途径及免疫程序等。

本文报道中, 口蹄疫病毒主要抗原蛋白VP₁表达水平较低的可能原因是: (1) 病毒滴度低。我们用来测定VP₁表达的重组痘苗病毒的滴度为10⁶Pfu/ml, 而国外病毒繁殖的滴度可高达10⁸pfu/ml以上, 如果提高病毒的繁殖滴度, 表达水平会相应提高。(2) 由于包括VP₁在内的所有口蹄疫病毒蛋白都是由一个前体多蛋白经蛋白酶裂解而成, 因而单个的病毒蛋白基因, 包括VP₁基因无法以可表达的形式完整地分离出来, 而必须利用外源的或人工合成的翻译起始子及终止子等。本文所构建的两个重组痘苗病毒其VP₁基因下游含有P₁的部分序列, 且未加翻译终止子。V.V103408 是利用11k启动子相连接

的ATG为翻译起始子。V.V10344H是利用VP₁的第36个氨基酸(甲硫氨酸)的ATG作为VP₁的翻译起始子。如此组建的重组痘苗病毒很难说是表达VP₁的最佳结构, 因此很难得到很好的表达。从表1可以看出, 用P7.5和PL₁两个不同启动子组建的重组痘苗病毒, 对VP₁的表达效果无明显区别。(3) 不能排除口蹄疫病毒本身在细胞中传代所发生的变异。据报道美国梅岛(Plum island)实验室在其重组DNA实验中应用的口蹄疫病毒A_{1,2}119株, VP₁的主要抗原决定区在传代过程中发生变异, 与提供A_{1,2}119株的英国Pirbright 动物病毒研究所保存的A_{1,2}119株显著不同, 以至同名为A_{1,2}119病毒株, 一个能为抗A_{1,2}119的抗血清中和, 另一个则不能^[6]。

我们将设法进一步提高VP₁的表达水平。

参 考 文 献

- [1] Kupper, H. et al., *Nature*, 289:555, 1981.
- [2] Kleid, D.C. et al., *Science*, 214:1125, 1981.
- [3] Cheung, A. & Kupper, H., In "Biotechnology and Genetic Engineering Reviews". 1:223, 1984.
- [4] Bittle, G.J. et al., *Nature*, 298:30, 1982.
- [5] Pfaff, E. et al., *EMBO Journal*, 1:869, 1982.
- [6] Panicali, D. & Paoletti, E., *PNAS*, 79:4927, 1982.
- [7] Smith, G.L. & Moss, B., *Gene*, 25:21, 1983.
- [8] Smith, G.L. et al., *PNAS*, 80:7155, 1983.
- [9] Smith, G.L. et al., *Nature*, 302:490, 1983.
- [10] Paoletti, E. et al., *PNAS*, 81:193, 1984.
- [11] Kieng, M.P. et al., *Nature*, 312:163, 1984.
- [12] Mackett, M. et al., *Science*, 227, 429, 1985.
- [13] *McGraw-Hill's Biotech. News Watch*, 16, Sep. 1985.
- [14] 刘庚起等: 病毒学报, 1:209, 1985.
- [15] Paoletti, E., 私人通信, *Science*, 待发表.
- [16] Boyle, D.B. et al., *Cene*, 35:169, 1985.
- [17] Maniatis, T. et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* by Cold Spring Harbor Laboratory.
- [18] Weir, J.P. et al., *PNAS*, 79:1210, 1982.
- [19] Shillitoe, E.J. et al., *J. Virol Methods*, 4:241, 1982.
- [20] Zhang, Y.H. et al., *J. Virol Methods*, 9:45, 1984.
- [21] Forss, S. et al., *Nucleic Acid Res.*, 12:6587, 1984.
- [22] Strohmer, K. et al., *J. Gene Virol.*, 59:259, 1982.
- [23] Kurz, C. et al., *Nucleic Acid Res.*, 9:1919, 1981.
- [24] Weir, J.P. & Moss, B., *J. Virol.*, 46:530, 1983.

CONSTRUCTION OF RECOMBINANT VACCINIA VIRUS CONTAINING VP₁ GENE OF FMDV(O₁K SUBSEROTYPE) AND THE EXPRESSION OF VP₁ GENE

Wu Xiaojun Li Peng Mang Keqiang
(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

Liu Gengqi Zhang Yonghe
(*Institute of Virology, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing*)

The paper present the results about the insertion of the main surface antigen VP₁ of FMDV subserotype O₁K, an epidemic strain in west Europe, into thymine kinase gene of vaccinia virus and expression of the VP₁ gene in animal cells. The vaccinia virus Tian-Tan strain was used as the vector, a very safe strain which had been used to control smallpox in China for many years. The clone of the target gene, O₁K-VP₁ pFMDV-1034 was provided by professor Dr. P.H.Hofschneider.

Firstly, the VP₁ gene of pFMDV-1034 was inserted into a intermediate plasmid pBCB06* at BamHI-HindIII sites, which comprises the early-late P_{7.5} promoter of V.V WR strain and a multiple cloning sites, flanked by the TK gene, (provided by Dr.D.Boyle). Alternatively it was inserted into plasmid pBCB03 at HindIII site, which differs from pBCB06* in that it contains a late promoter PL₁₁ instead of P_{7.5}. Secondly, inoculated 143B TK⁻cells with Tian-Tan strain TK⁺ and followed by transforming 1 hr later with the two hybrid plasmids separately, to screen the recombinant vaccinia viruses FMDV-VP₁ in the presence of BUDR. The viruses which can multiply in 143B TK⁻cells in the presence of BUDR will be recognized as the virus with TK phenotype, that means they contain the VP₁ fragment insert. And then it was reconfirmed by hybridization with the probe, $\alpha^{32}\text{P}$ labelled BamHI-HindIII fragment of pFMDV-1034. Finally, expression ability of two recombinant viruses V.V-10344H and V.V-103408 were detected in 143B TK⁻cells by ELISA method, the maximum P/N value 9.50 and 8.10 respectively.

Key words

FMDV O₁K subserotype; VP₁ gene; recombinant vaccinia virus