

人 I 型免疫缺陷病毒 *gag-env*

嵌合基因在重组痘苗中的表达

毛春生¹ 金宁一 佟明华 郭志儒 殷震

解放军基因工程实验室
(长春 130062)
解放军农牧大学研究所

摘要 Gag 和 Env 蛋白是人 I 型免疫缺陷病毒(Human immunodeficiency virus type 1, HIV-1) 的结构蛋白, 是 HIV-1 诱导机体产生体液免疫和细胞免疫的主要抗原。本实验通过多次亚克隆, 将 *env* 基因以正确的三联密码读框插入 *gag* 基因的下游, 制备了 HIV-1 *gag-env* 嵌合基因, 并将嵌合基因分别置于痘苗病毒 p7.5 启动子和牛痘病毒 A 型包涵体(ATI) 启动子的下游, 经过同源重组和红细胞吸附试验筛选, 获得了 2 株重组痘苗病毒。免疫荧光试验和酶免疫试验证明, 两株重组痘苗病毒均能正确地表达 HIV-1 *gag-env* 嵌合基因。动物实验表明, *gag-env* 嵌合基因重组痘苗病毒可诱导小鼠产生抗 HIV 特异性抗体。这些结果为艾滋病颗粒化疫苗的研制提供了借鉴。

关键词 HIV-1 *gag-env* 嵌合基因 表达 重组痘苗病毒

艾滋病(Acquired immunodeficiency syndrome, AIDS) 是本世纪威胁人类最严重的病毒病之一, 严重威胁人类的身心健康, 药物治疗仅可改善症状, 延缓疾病的发生、发展, 但治疗的费用高昂, 因此疫苗研究仍是艾滋病研究的重要内容。HIV-1 Env 的糖蛋白中含有诱导机体产生体液和细胞免疫应答的抗原决定簇, 是研制艾滋病疫苗的首选抗原, 但其抗原性变异很快, 而且, HIV 以损害 CD4⁺ 淋巴细胞为主要致病原因, 所以针对 HIV Env 蛋白抗原决定簇的亚单位疫苗和基因工程疫苗效果一直不理想^[1]。Gag 蛋白和 HIV 的其它蛋白中也含有诱导体液免疫和细胞免疫的抗原决定簇, 将多种抗原决定簇基因嵌合在一起, 制备多价疫苗, 则可克服单独将 Env 蛋白作疫苗的缺陷^[2]。本实验在分别表达 *gag*、*env* 基因^[3, 4] 的基础上, 将两种基因嵌合, 成功地在痘苗病毒中进行了表达。

1 材料与方法

1.1 质粒

p16G、pATIG、pRJenv、p38EN 作者等构建^[3, 4]。p38EN 中的 HIV-1 *env* 基因来源于 pNL432, *env*

基因中所含的痘苗病毒早期终止信号 TTTTNT, 已通过将 7360 位的 T 点突变为 C 而消除^[4]。

1.2 细胞与病毒

BHK21 细胞由本室保存。痘苗病毒 WR 株由 R. Condit 博士惠赠, v38EN 由金宁一等构建, 该病毒可表达产生 HIV-1 Env 蛋白^[3]。重组痘苗病毒 v16G 由作者构建, 该病毒可表达全长的 Gag 蛋白^[4]。细胞和病毒用含有 10% 或 2% 小牛血清的 DMEM 或 MEM 培养增殖。

1.3 分子克隆操作

限制性内切酶消化、连接、转化、重组质粒的酶切鉴定等均参照文献^[5] 介绍的方法进行。所用的限制性内切酶和其它工具酶为 Promega 公司、华美生物工程公司、Boehringer Mannheim 等公司的产品。

1.4 HIV-1 *gag-env* 基因重组痘苗病毒的构建

采用脂质体共转染法进行体内同源重组。按照以前报道的方法^[3] 操作, 主要步骤是, 培养 BHK21 细胞至 20~ 40% 成层, 感染 PFU/cell 为 0.1 的野生型痘苗病毒, 37℃ 感染 1h。在一组微量离心管中将 10μl 转染试剂(DOTAP, Boehringer mannheim) 与 500μl DMEM 培养液轻轻混合, 在另一组微量离心管中将 10μg 的各种表达质粒 DNA 与 500μl DMEM 轻轻混合, 然后把后一组溶液小心地滴入前一组。

¹ 现通讯地址: 军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京 100071

室温静止 15~ 30min, 将混合物直接加至上述已感染有病毒的 BHK21 细胞平皿中, 6~ 8h 后换新鲜配制的 10% 小牛血清 DMEM, 培养 48h, 收获, 置-30℃保存, 为进一步筛选重组病毒的样品。

将样品用 PBS 10 倍递进稀释后, 接种 BHK21 单层细胞, 48h 后, 加入 0.5% 鸡红细胞, 吸附 20min。挑选不吸附鸡红细胞的重组病毒子空斑, 进行空斑纯化直至无吸附鸡红细胞的空斑出现。按常规方法测定病毒的空斑数(plaque forming units, PFU)。

1.5 间接免疫荧光试验鉴定重组病毒

将重组病毒子以 0.01~ 0.03PFU/ cell 的量接种于盖玻片培养的 BHK21 细胞单层, 36—48h 后取

出盖玻片, 100% 丙酮或 50% 乙醇-50% 丙酮固定, 洗涤后与抗 HIV-1 p24(Boehringer mannheim 公司)或抗 gp120(Enzyme 公司) 单克隆抗体反应, 再与异硫氰酸荧光黄(FITC) 标记的绵羊抗鼠 IgG(军事医学科学院) 反应, 最后置荧光显微镜下观察。

1.6 HIV-1 gag-env 嵌合基因的表达

将重组病毒以 10PFU/ cell 的量接种 BHK21 细胞, 接种后细胞以 2% 牛血清的 MEM 维持。接种后 24h 弃培养液, 收取感染病毒的单层细胞。

1.7 小鼠免疫试验

重约 20g 的昆明系小鼠(购自吉林省中医中药研究院实验动物中心), 随机分为 4 组, 每组 8 只。重组病毒免疫组每只足垫皮内(下) 多点注射 10^7

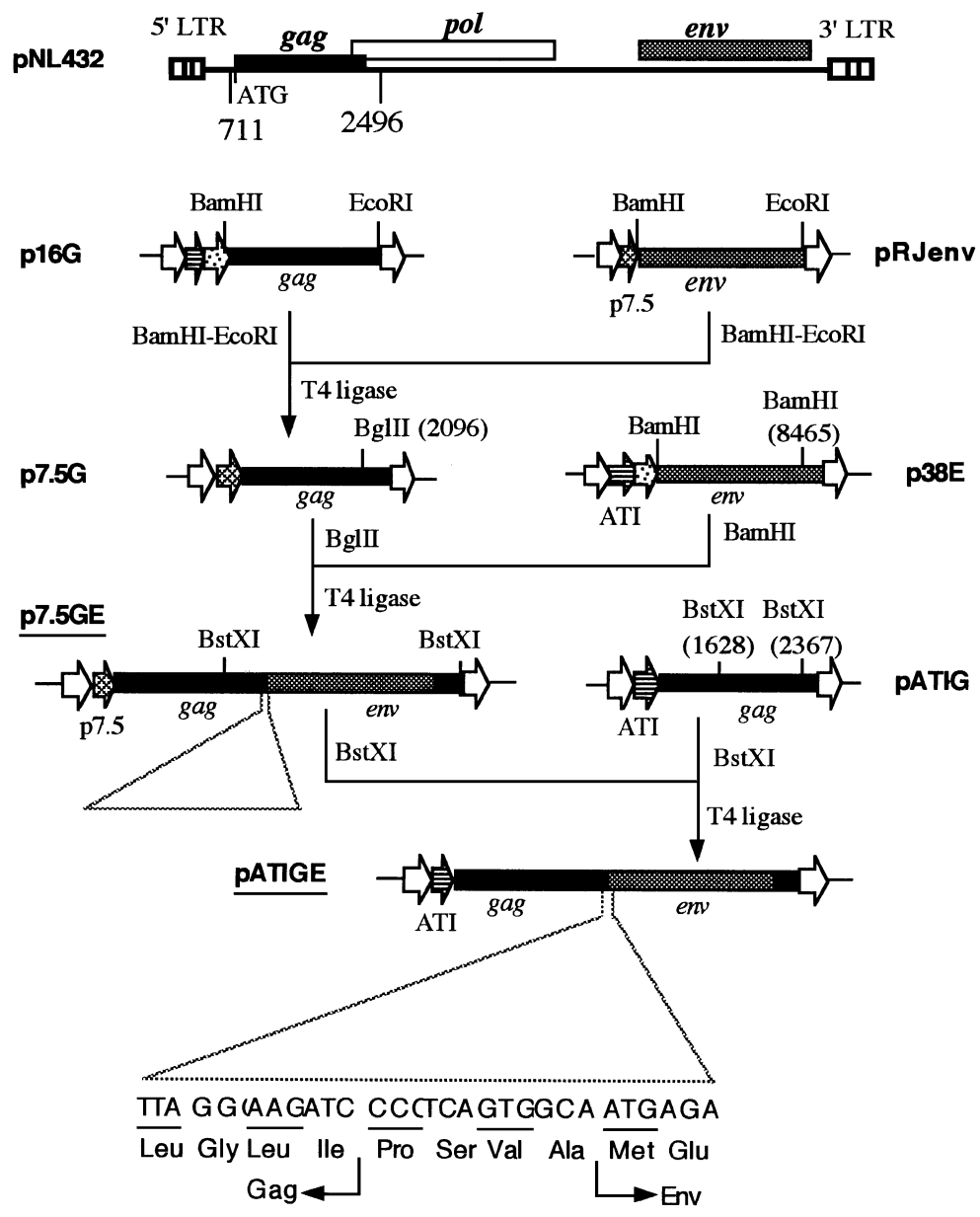


图 1 质粒 p7.5GE 和 pATIGE 的构建策略

PFU 重组痘苗病毒,痘苗病毒对照组接种 10^7 PFU WR 株痘苗病毒,阴性对照组注射 0.1ml 生理盐水。小鼠免疫后 40 天,采血分离血清, - 20℃保存备用。

1.8 ELISA 检测免疫小鼠血清中的抗 Gag 蛋白抗体

取免疫鼠血清和对照鼠血清,以 pH 9.6 碳酸盐缓冲液(15mmol/L Na_2CO_3 , 35mmol/L NaHCO_3 , 0.02% NaN_3) 1: 100 或 1: 200, 1: 400 稀释后,用商品化 HIV ELISA 检测试剂盒(科利公司惠赠),测定抗 HIV 特异性抗体。该试剂盒包被的抗原为 HIV 全病毒裂解物和 Env 合成肽组成的混合抗原。ELISA 试验按试剂盒说明书进行,不同的是将试剂盒中的酶标抗人 IgG 换为 HRP 标记的抗鼠 IgG。反应终止后以酶联仪(DG5030 型,国营华东电子管厂)在 490nm 波长下读取光吸收值(A),试验中所用的阳性血清由大肠杆菌表达的 p24 抗原和 gp120 抗原反复免疫小鼠而制备(结果另报)。

2 结果

2.1 gag-env 嵌合基因表达质粒的构建

质粒 p16G^[4]以限制性内切酶 BamHI-EcoRI 消化,得到 HIV-1 前病毒基因的 gag 基因(nt711~ nt2496,核苷酸编号与其在 pNL432 上一致,下同),插入质粒 pRJenv 的相应位点之间,构建成质粒 p7.5G;再以 BamHI 酶切 p38E^[3],得到 env 基因片段(nt6211~ nt8465),然后将其插入质粒 P7.5G 的 Bgl II 位点,成功构建带有 gag-env 嵌合基因的表达质粒 pAIGE;经过多次亚克隆,在 gag 基因的下游、env 基因 ATG 上游增加了 12 个核苷酸,保证了 env 基因三联密码读框的正确性,最后以 Bst XI 分别酶切质粒 pATIG 质粒 P7.5GE,将二者的 Bst XI 片段置换,构建出表达质粒 pATIGE。痘苗病毒表达质粒 P7.5GE 和 pATIGE 具体的构建体过程见图 1。酶切鉴定证明,质粒构建正确。

2.2 重组病毒的红细胞吸附试验筛选

痘苗病毒 WR 株感染 BHK21 单层细胞 1h 后,以 DOTAP 转染表达质粒 p7.5GE 和 pATIGE,经鸡红细胞吸附实验筛选出 HA⁻ 病毒。进一步克隆,直至筛选出的病毒感染细胞后,所有的空斑均不吸附鸡红细胞,显微镜下检查,绝大部分 BHK21 细胞形成了融合细胞。筛选得到 P7.5GE 和 pATIGE 转染产生的 HA⁻ 重组病毒各一组。

2.3 间接免疫荧光鉴定重组病毒

将红细胞吸附试验得到的 HA⁻ 病毒和 WR 对

照株病毒,计数后,以 0.01PFU/ cell 的量接种于盖玻片培养的 BHK21 细胞单层,感染后 36h 收取细胞盖玻片,丙酮固定,以抗 p24 或抗 gp120 的单克隆抗体为一抗,荧光标记的兔抗鼠抗体为二抗进行荧光染色。荧光显微镜下检查可见,WR 株病毒感染的细胞变圆,但不产生荧光,筛选得到的 HA⁻ 病毒感染的细胞,不管是以抗 p24 单抗为一抗,还是以抗 gp120 单抗为一抗,胞浆中均有明亮的荧光(图 2)。说明 gag-env 嵌合基因在重组痘苗病毒中成功地得到了表达。将 P7.5GE 和 pATIGE 转染得到的重组病毒分别命名为 v7.5GE 和 vATIGE。

2.4 小鼠免疫实验

昆明系小鼠随机分为 4 组,每组 8 只,第一、二组为试验组,足垫皮内和皮下多点注射 10^7 PFU 重组痘苗病毒 vATIGE 或 v7.5G,其余二组为对照。免疫后第 40 天时采血,分离血清,ELISA 测定小鼠血清中的抗体,结果(附表)表明,重组病毒免疫小鼠后,可产生抗 HIV-1 特异性抗体。

附表 vATIGE 免疫小鼠血清中抗 HIV 抗体的 ELISA 检测结果

	A ₄₉₀ ($\bar{X} \pm S$)		
	1: 100	1: 200	1: 400
vATIGE 免疫鼠血清	0.813±0.273	0.442±0.215	0.222±0.132
v7.5GE 免疫鼠血清	0.781±0.2522	0.468±0.196	0.247±0.148
WR 株免疫鼠血清	0.260±0.107	NT	NT
盐水注射鼠血清	0.119±0.051	NT	NT
p24 高免鼠血清	NT	2.745±0.328	2.193±0.229
gp120 高免鼠血清	NT	1.325±0.187	1.093±0.127

3 讨论

免疫荧光试验和酶免疫试验的结果说明,本实验构建的两株重组痘苗病毒均成功地表达了 HIV-1 的 gag-env 嵌合基因,以其重组病毒免疫小鼠,产生了特异性的抗 HIV 抗体。

表达 gag-env 嵌合基因的意义不仅在于可以提供更多的抗原位点,而且许多实验^[6],包括作者的实验结果^[4]都证明,HIV-1 的 Gag 蛋白,即使在病毒其它成分都缺失的情况下,也能自我装配成病毒样粒子(virus-like particle, VLP),并从细胞中释放出来。因此以 Gag 蛋白为载体,将 HIV-1 的其它中和性抗原决定簇基因与 gag 基因嵌合,表达制备的

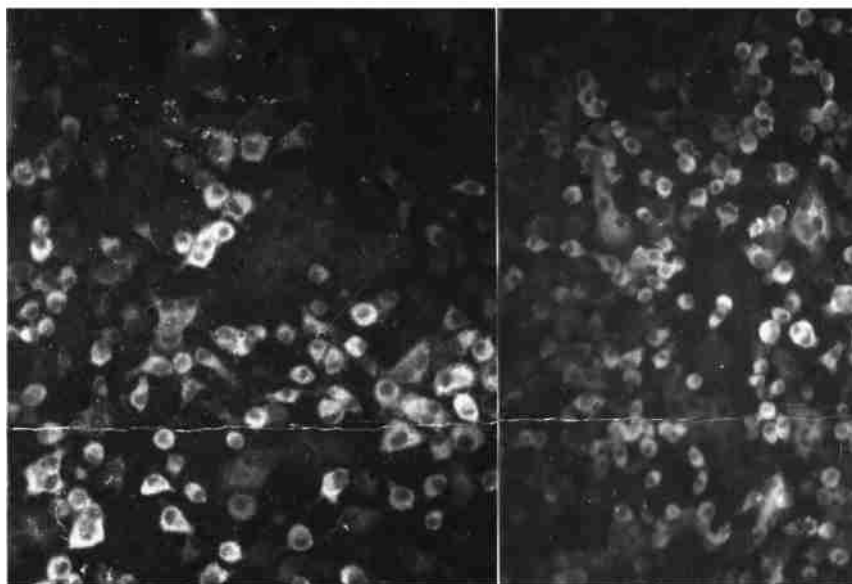


图2 间接免疫荧光检测重组病毒

BHK21 单层细胞感染 0.01~ 0.03PFU/ cell 的重组病毒 vATIGE, 36h 后收获细胞, 以抗 p24(A)和抗 gp120(B)单抗检测, 感染细胞的细胞浆中显示出特异性的荧光。

巨分子多价颗粒化抗原, 可以大大提高疫苗的抗原性, 是发展艾滋病疫苗的一条良好途径^[2, 7~ 9]。

构建巨分子多价颗粒化疫苗, 必须首先探索 *gag* 基因所能负载的外源基因容量。Luo 等在 *gag* 基因中插入 315bp 的 *env* 基因片段(包括 Env V3 区和 CD4 结合区), 在痘苗病毒中表达后仍能形成病毒样粒子^[10]。本实验插入 *gag* 基因 *env* (外源基因) 片段长达 2265bp, 免疫荧光试验结果(图 2)表明, 嵌合基因的重组病毒既能刺激小鼠产生抗 Gag 蛋白抗体, 也能产生抗 Env 抗体, 说明 Gag 蛋白包装外源蛋白的能力很强。

上述实验结果为构建巨分子多价颗粒化疫苗提供了有益的线索, 为我国 HIV 疫苗的研制积累了可借鉴的技术资料。

参考文献

[1] Fast P E, Walker M C, 1993, Human trials of experimental

AIDS vaccines. AIDS 7(suppl 1): S147- S159.

[2] Joanes G, Stephen J G, Guy T L, J Virol. 1993, 3191- 3198.

[3] Jin N Y, Funahashi S, Shida H, Arch Virol, 1994, 138: 315- 330.

[4] 毛春生, 金宁一, 佟明华等. 中国病毒学, 1998, 排印中

[5] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, 1989, Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press USA.

[6] Wagber R, Deml L, Fliebach H, Wanner G, Wolf H, Virology, 1994, 200: 162- 175

[7] Dani P B, 1989, HIV antibodies and vaccine design. AIDS 3 (Suppl 1): S111- S118.

[8] Ronald C D, 1992, HIV with multiple gene deletion as a live attenuated vaccine for AIDS. AIDS Res and Human Retro, 1992, 8: 411- 421.

[9] Haffar O, Garrigues J, Travis B, J Virol, 1990, 64(6): 2653- 2659.

[10] Luo L, Li Y, Paulam C, Sunyung K, Yong K, Proc Natl Acad Sci, 1992, 89: 10527- 10531.

(下转第 10 页)

- [22] Confalonieri M, et al. Plant Cell Reports, 1994, 13:256– 261
- [23] Confalonieri M, et al. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1995, 43: 215– 222
- [24] Devantier Y A, et al. Can. J. Bot., 1993, 71(11): 1458– 1466
- [25] De Block M. Plant Physiology, 1990, 93: 1110– 1116
- [26] Fillatti J J, et al. Mol. Gen. Genet., 1987, 206: 192– 199
- [27] Holford P, et al. Plant Cell Reports, 1992, 11: 196– 199
- [28] Howe G T, et al. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1994, 36: 59– 71
- [29] Huang F H, Li X Y. In Vitro, 1994, 30(3): 67
- [30] Kajita S, et al. Plant Science, 1994, 103: 231– 239
- [31] Klopfenstein, N B, et al. Can. J. Forest. Res. 1991, 21: 1321– 1328
- [32] Klopfenstein N B, et al. Silvae Genetica, 1993, 42(2– 3): 86– 90
- [33] Lan Godwin, et al. Plant Molecular Biology Report, 1992, 10(1): 12– 36
- [34] Leple J C. et al. Plant Cell Reports, 1992, 11: 137– 141
- [35] McNabb H S. Agriculture Research Institute, 1991, 155– 159
- [36] McCown B H, et al. Plant Cell Reports, 1991, 9: 590– 594
- [37] Owens L D, et al. Plant Pysiology, 1988, 88: 570– 573
- [38] Parsons T J, et al., 1986, 4(6): 533– 536
- [39] Pythoud F, et al. Bio/ technology, 1987, 5(12): 1323– 1327
- [40] Selmer J, et al. Hortscience, 1990, 25(9): 131
- [41] Shaw C H. Mol. M. Crobil, 1988, 2: 413– 417
- [42] Tzfira T, et al. Plant Cell Reports, 1996, 15(8): 566– 571
- [43] Wang Y C, et al. In Vitro Plant, 1995, 31(4): 226

Progress in Genetic Engineering of Poplar

Hao Guixia Zhu Zhen Zhu Zhiti

(Institute of Genetics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101)

Abstract The transgenic technology of poplar and the factors influencing transformation were discussed. The progress of genetic engineering on herbicide resistance, insect resistance and disease resistance of poplar were reviewed.

Key words Poplar, Transformation, Biotechnological breeding, Genetic improvement

(接第 29 页)

Expression of *gag-env* Chimeric Gene of Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Recombinant Vaccinia Virus

Mao Chunsheng Jin Ningyi Tong Minghua Guo Zhiru Yin Zhen

Laboratory of Genetic Engineering of PLA

(Institute, Changchun, University of Agricultural and Animal Science, Changchun 130062)

Abstract Both Gag and Env Protein are the structural protein of human immunodeficiency virus type 1, which are able to elicit humoral and cellular immunity. After subcloning to adjust the triplet codon, The *gag-env* chimeric gene was constructed by inserting 2265bp DNA fragment of *env* gene into *gag* gene with correct reading frame, and placed at the downstream of p7.5 promoter of vaccinia and cowpox A-type inclusion body promoter respectively. Two recombinant vaccinia viruses with the chimeric gene were isolated by use of homologous recombination technique and screening with hemabsorption test. Indirect fluorescence assay and immunoenzyme assay showed that Gag-Env chimeric protein was expressed in the recombinants. The mice injected with the recombinant vaccinia virus produced specific antibody against HIV. The present study supplied useful data for the development of AIDS vaccine.

Key words HIV-1 *gag-env* chimeric gene Expression Recombinant vaccinia virus