

# 可表达人呼吸道合胞病毒融合蛋白辅助病毒 依赖型腺病毒载体的构建与制备

杨 兵<sup>1</sup>, 何金生<sup>1,2\*</sup>, 石长信<sup>4</sup>, 张 梅<sup>1</sup>, 虞结梅<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 安徽医科大学免疫学教研室 合肥 230032) (<sup>2</sup> 北京交通大学生物科学与技术研究所 北京 100044)

(<sup>3</sup> 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所 北京 100052)

(<sup>4</sup> Division of Hematology-Oncology, Mayo Clinic, Scottsdale AZ 85259, USA)

**摘 要** 构建可表达 A 亚型人呼吸道合胞病毒(human respiratory syncytial virus, RSV)融合蛋白(fusion protein, F)的辅助病毒依赖型腺病毒载体(helper-dependent adenoviral vector, HDAd),并完成大量制备、纯化和 F 蛋白的体外表达鉴定。将带有 CMV 启动子序列的 F 基因亚克隆至克隆载体 pSC11,鉴定正确后,克隆至 HDAd 质粒 pSC15B,构建 pSC15B/F HDAd 重组质粒, *Pme* I 消化 pSC15B/F 去除原核复制元件及抗性基因,获得 HDAd/F DNA 分子,经磷酸钙共沉淀法转染 293Cre4 细胞,16h 后感染辅助病毒,收获 HDAd/F 载体粗提液,随后以 HDAd/F 粗提液及辅助病毒连续共感染 293Cre4 细胞直至 HDAd/F 达到复制极限,同时以可表达  $\beta$ -半乳糖苷酶( $\beta$ -galactosidase, LacZ)报告基因的 HDAdLacZ 载体作为平行对照监测载体复制过程。与辅助病毒共感染 293Cre4 细胞进一步扩增 HDAd/F, CsCl 梯度法超速离心制备大量纯化的 HDAd/F 载体,体外感染 293 细胞,RT-PCR 检测到 F 基因有转录,Western blot 分析表明 F 蛋白有特异性表达。总之,成功构建 HDAd/F 载体并在真核细胞中实现表达,为体内免疫学效力试验奠定基础,为研制 RSV 疫苗提供了一种新方法。

**关键词**: 辅助病毒依赖型腺病毒载体; 人呼吸道合胞病毒融合蛋白; 逆转录聚合酶链式反应; 免疫印迹

中图分类号: Q78, Q93 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2007)04-0682-04

RSV 是一个世界范围内严重危害婴幼儿健康的最常见的呼吸道感染性病原体,首次感染多发生在一岁以内的婴儿,尤其是 2~6 个月的婴幼儿,是造成婴儿期住院的主要原因<sup>[1]</sup>。美国每年因 RSV 的感染约有 9 万人需要入院治疗,花费约 3 亿美元,欧洲 2 岁以下的婴幼儿的下呼吸道感染中有 42%~45% 是由 RSV 引起的<sup>[2]</sup>。我国北京地区 2000~2002 年间,对 1402 个病毒性呼吸道感染婴幼儿患者进行 RSV 检测,其中 66% 是由该病毒引起的<sup>[3]</sup>。鉴于 RSV 危害的严重性,目前尚无有效的预防和治疗手段,世界卫生组织及美国医学研究院有关 21 世纪疫苗报告中将发展 RSV 疫苗作为 21 世纪最优先发展的疫苗项目之一<sup>[3]</sup>。因此,研制一种有效而安全的 RSV 疫苗保护易感人群具有重要意义。

RSV 病毒属副黏病毒科,肺炎病毒属,由单股负链 RNA 组成,共编码 11 种蛋白,其中 F 和 G 两种糖蛋白是激发机体产生保护性抗体最主要的病毒抗原。与 G 蛋白相比, F 蛋白有更多的抗原识别位点,不但能刺激机体产生体液免疫还能激发细胞免疫应

答,可同时预防不同毒株的感染,因此,无论从诊断试剂研制还是疫苗开发的角度, F 蛋白都比 G 蛋白具有优势。辅助病毒依赖的腺病毒载体,俗称为“无肠型(gutless)”载体,仅含有腺病毒复制信号(ITRs)和包装信号( $\Psi$ ),缺乏所有腺病毒编码基因,需要辅助病毒为其提供全部的结构和功能蛋白,方能完成复制过程。因安全、高效、转移容量大和持续表达等特点,现主要用于基因治疗的研究<sup>[4-6]</sup>, HDAd 作为疫苗的研究起步较晚,2004 年底在 Gene Therapy 杂志发表了第一篇通过肌肉注射途径诱导系统免疫的研究论文<sup>[7]</sup>,至今,尚没有作为黏膜基因释放系统用于疫苗研究的报道。本试验旨在以 RSV F 抗原作为模式蛋白,构建可表达 F 蛋白的 HDAd 载体,并在体外进行表达和鉴定,以期 RSV 疫苗研究寻找一种新的有效方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 细胞株和毒株: HDAd Cre/loxP 系统购自加拿

基金项目: 国家自然科学基金(30671965)

\* 通讯作者。Tel: 86-10-51683887; E-mail: jshhe@bjtu.edu.cn

作者简介: 杨 兵(1979-)男,安徽安庆人,硕士研究生,研究方向为病毒基因工程疫苗。E-mail: yangbing1219@hotmail.com

其他作者: 谢 灿<sup>1</sup>, 陆燕燕<sup>1</sup>, 付远辉<sup>3</sup>, 彭向雷<sup>2</sup>, 洪 涛<sup>2,3</sup>

收稿日期: 2006-11-09 接受日期: 2006-12-12 修回日期: 2007-02-28

大 Microbix 公司,HEp-2 细胞由本实验室保存,RSV 毒株(A 亚型 Long 株)由首都儿科研究所钱渊教授惠赠,293 细胞由本室保存。

**1.1.2 菌株和质粒:**pcDNA3.1(+)/F 由本室保存,pSC9A、pSC11、pSC15B 由石长信<sup>[8]</sup>构建。

**1.1.3 主要试剂:**限制性内切酶 *Pme* I、*I-Sce* I、*I-Ceu* I 购自美国 New England Biolabs 公司;其它限制性内切酶、DNA Marker、SAP、T4 DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶购自 MBI;Taq DNA 聚合酶、TRIzol、Purification System 及 AMV Reverse Transcriptase 为 Promaga 公司产品;脂质体转染试剂盒 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司;羊抗 RSV 多抗(AB1128)购自 Chemicon 公司;引物由上海生工生物公司合成。

## 1.2 HDAd 重组质粒 pSC15B/F 的构建

用 *Mlu* I 和 *Xba* I 分别酶切 pcDNA3.1(+)/F 和 pSC11,回收目的片段,将含有 CMV 启动子的 F 基因与线性化的 pSC11 进行连接,转化、挑菌和摇菌,然后小提质粒用 *Eco*RV 进行鉴定,获得的重组质粒命名为 pSC11/F。

*Nhe* I 和 *Pme* I 酶切 pSC11/F,T4 DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶分别进行末端补平及连接,去除 *Pme* I 酶切位点,获得的重组质粒命名为 pSC11/F-*Nhe* I-*Pme* I。

用 *I-Sce* I 和 *I-Ceu* I 酶切 pSC11/F 和 pSC15B,切胶回收目的片段,进行连接、转化、挑菌和摇菌。提质粒分别用 *Bam*H I、*Eco*R I、*Eco*R V、*Hind* III、*Pst* I 进行酶切鉴定,将重组质粒取名为 pSC15B/F。

## 1.3 HDAd/F 载体的获得

取 pSC15B/F 重组质粒,*Pme* I 酶切消化,待 293Cre4 细胞丰度达到 90% 时,进行转染。转染后第 2 天,弃掉培养液,加入含 2% FCS 的 DMEM 维持液。取辅助病毒 H14,按 moi 5.0 pfu/细胞感染 293Cre4 细胞,置 37℃ CO<sub>2</sub> 培养箱继续培养。约 24~72h 后,细胞完全病变、脱落,收集脱落后的细胞及上清,转移至 15mL 离心管中,2000r/min,离心 5min。弃部分上清,保留约 4mL,用吸管重悬沉淀,-80℃ 冰箱,冻存 30min,37℃ 水浴融化,获得 P0 代 HDAd/F 载体粗提液,取 1mL 接种至形成单层、含 2% FCS DMEM 维持液的 293Cre4 细胞中,同时按 moi 2.0 pfu/细胞加入辅助病毒,37℃、CO<sub>2</sub> 培养箱继续培养至细胞病变。约 48h 后,细胞完全病变、脱落,按上法处理 293Cre4 细胞,重复 6 轮获得 P6 代 HDAd/F 粗提液。

同时以可表达 β-半乳糖苷酶(β-galactosidase, LacZ)报告基因的 HDAdLacZ 载体(*Pme* I 线性化

pSC9A)作为平行对照监测载体复制过程。

## 1.4 HDAd/载体大量制备及纯化

用 30 个 150×20mm 培养皿培养 293Cre4 细胞,待细胞丰度约为 90% 时,取 HDAd/F 和辅助病毒共感染 293Cre4 细胞,约 48~72h 后,收获细胞及培养液。CsCl 密度梯度及等密度梯度法两次超速离心纯化 HDAd/F 载体,样品在 4℃、10mmol/L Tris-HCl (pH8.0)中透析 24h,期间换液 3 次,紫外分光光度计测定 OD<sub>260</sub> 值并计算 HDAd/F 载体颗粒浓度,其余放 -80℃ 保存备用。

## 1.5 RT-PCR 鉴定

取 HDAd/F 载体按 moi 10 pfu/细胞感染 293 细胞 72h,弃去病毒维持液,提取细胞总 RNA,于 -80℃ 保存备用。

根据 F 基因序列合成一对引物:上游引物(nt1-nt19) 5'-ATGGAGTTGCCAATCCTCA-3',下游引物(nt741-nt721) 5'-TACAGG TGTAGTTACACCTG-3'。以细胞总 RNA 为模板,按逆转录试剂盒说明书进行操作,PCR 反应条件:94℃ 3min,93℃ 1min,58℃ 1min,72℃ 1min,进行 30 个循环,72℃ 10min。于 1% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物。同时用总 RNA 为模板,直接 PCR 扩增作为阴性对照。

## 1.6 Western blot 鉴定

纯化的 HDAd/F 载体感染 293 细胞后 48h,收获细胞,用预冷的 PBS 清洗 3 次,然后弃去上清,加入 150μL 的细胞裂解液振荡混匀,反复冻融 3 次,14000r/min、30min,取上清,进行 SDS-PAGE 分析,转膜后用 RSV 多抗进行 Western blot 分析,用 ECL 检测试剂盒检测,暗室内用 X 线片曝光并显影和定影。以正常培养的 293 细胞为阴性对照,以 RSV 感染的 HEp-2 细胞作为阳性对照。

# 2 结果

## 2.1 构建 HDAd/F 重组质粒 pSC15B/F

将含有 CMV 启动子的 F 基因亚克隆入中间载体 pSC11,*Eco*RV 酶切,琼脂糖凝胶电泳结果显示,得到一条约 2100bp 的电泳条带,与预计的一致。然后用 *Nhe* I 和 *Pme* I 酶切 pSC11/F,去除 *Pme* I 酶切位点,并用 *Pme* I 和 *Xba* I 进行酶切鉴定,仅观察到约 6000bp 的线性化条带,证实 *Pme* I 酶切位点已经消失。

进一步克隆 F 基因入辅助病毒依赖的腺病毒质粒 pSC15B,提质粒并用 *Bam*H I、*Eco*R I、*Eco*R V、*Hind* III、*Pst* I 酶切鉴定,与预计的一致(图略)。

## 2.2 RT-PCR 检测 F 基因是否转录

HDAd/F 载体感染 293 细胞 72h 后进行检测

实验组观察到约 750bp 的 DNA 片段,阴性对照组未见任何条带,说明 HDAd/F 载体感染 293 细胞后,F 基因有转录(图 1)。

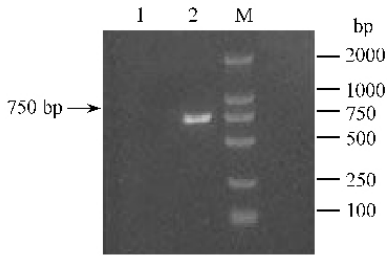


图 1 RT-PCR 鉴定 F 蛋白基因的转录

Fig.1 F gene transcription confirmed by RT-PCR. 1. PCR result of total RNA (Negative control) 2. product of RT-PCR 3. DL2000 marker.

### 2.3 Western blot 分析 F 基因在 293 细胞中是否表达

HDAd/F 载体感染 293 细胞裂解液,分别在 50kDa 和 22kDa 处出现特异性条带,而正常培养的 293 细胞裂解液无任何条带,说明 F 基因在 293 细胞可以表达(图 2)。

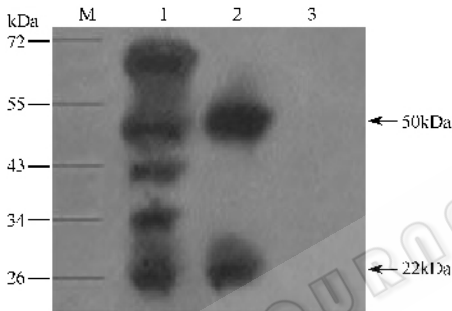


图 2 Western blot 鉴定 F 蛋白表达

Fig.2 The expression of F gene analyzed by Western blot. M. Protein marker; 1. Cell lysate of RSV infected HEp-2 cells (Positive control); 2. Cell lysate of HDAd/F infected 293 cells; 3. Cell lysate of 293 cells (Negative control)

## 3 讨论

RSV F 蛋白同时具有 B 细胞抗原表位和 CTL 抗原表位,是 RSV 感染后诱导机体产生体液免疫和细胞免疫的主要蛋白,在 RSV A、B 两个亚型中 F 蛋白抗原性极为保守,可以同时预防不同毒株感染,起交叉保护作用。

F 蛋白是一个典型的 I 型糖蛋白,全长 574 个氨基酸,相对分子量约 63.5kDa,经修饰后约 70kDa。F 蛋白包含 F1 区(AA137~574),F2 区(AA1~109)及裂解多肽(AA110~136),F2 区的 AA2~20 为信号肽,AA21~25 为信号肽切割位点,信号肽是一段可裂解的疏水性氨基酸。RSV 感染细胞后,F 蛋白首先合成 F<sub>0</sub> 前体,后被宿主细胞蛋白酶切割成 C-端 F1 和 N-端的 F2 两个亚单位,并获得融合活性,相对

分子量分别为 22kDa 和 50kDa<sup>[9]</sup>。

目前正在研制的 F 糖蛋白 RSV 疫苗有减毒活疫苗、亚单位疫苗、重组病毒疫苗和 DNA 疫苗等,减毒活疫苗和亚单位疫苗已进入临床试验阶段,特别是纯化的 F 糖蛋白亚单位疫苗已经在成人、大于 12 个月婴幼儿及有慢性肺部疾病儿童、住院的老年人和孕妇中进行了评估。但这些疫苗因安全性不足或免疫原性不理想尚难以用于 1~2 个月的新生儿。

以 HDAd 作为黏膜基因释放系统用于 RSV 疫苗研究较其它病毒载体有诸多优点。首先,HDAd 缺失了腺病毒所有的编码基因,不存在腺病毒毒力回复问题,解决了以往病毒载体作为递送系统存在的病毒毒力回复问题,增加了应用于免疫力低下的新生儿的安全性<sup>[10]</sup>;其次,HDAd 与缺失 E1 和 E3 区的第一代腺病毒载体(first generation adenovirus vector, FGAD)具有相同的细胞嗜性,可高效感染呼吸道上皮细胞,通过滴鼻途径进行接种,与 RSV 的自然感染途径相同,适于预防通过呼吸道感染的 RSV,痛苦小,便于早期应用<sup>[11]</sup>;第三,HDAd 缺失了所有腺病毒编码序列,不能在感染细胞内合成腺病毒的结构和功能蛋白,可避免或减轻机体产生抗腺病毒免疫应答,尤其是 CTLs 介导的腺病毒特异性的细胞免疫应答,缓解机体对病毒载体的免疫清除作用,使 HDAd 在细胞内可长期存在,能持续表达一个月甚至两年以上<sup>[12]</sup>;第四,产生增强的 Th1 型免疫应答,避免因 RSV 疫苗引起的疾病增强作用。证据表明与 FGAd 相比,HDAd 可诱导机体免疫系统产生更强的由 CTLs 介导的细胞免疫应答<sup>[7]</sup>;最后,与一般的病毒载体相比,HDAd 可携带的外源基因高达 37kb,能发展为同时表达 RSV 多种抗原或不同病毒抗原的新型多价疫苗载体。

本研究成功将 F 基因克隆至 HDAd 质粒,利用 Cre/loxP 系统获得并大量制备了 HDAd/F 载体,HDAd/F 载体的分子量为 29.8kb,介于 28~31kb 之间,不但有利于载体包装,而且便于与残存辅助病毒 H14(35.8kb)的分离<sup>[4]</sup>。总之,成功构建 HDAd/F 载体并在真核细胞中实现表达,为体内免疫学效力试验奠定基础,为 RSV 疫苗研制提供了一种新方法。

## 参 考 文 献

- [1] Welliver RC. Respiratory syncytial virus and other respiratory viruses. *Pediatr Infect Dis J*, 2003, 22(2 Suppl): S6-10; discussion S10-12.
- [2] Simoes EA, Carbonell-Estrany X. Impact of severe disease caused by respiratory syncytial virus in children living in developed countries. *Pediatr Infect Dis J*, 2003, 22(2 Suppl): S13-18;

- [ 3 ] Crowe JE Jr. Current approaches to the development of vaccines against disease caused by respiratory syncytial virus ( RSV ) and parainfluenza virus ( PIV ). A meeting report of the WHO Programme for Vaccine Development. *Vaccine*, 1995, **13** ( 4 ): 415 – 421.
- [ 4 ] Ng P, Parks RJ, Graham FL. Preparation of helper-dependent adenoviral vectors. *Methods Mol Med*, 2002, **69**: 371 – 388.
- [ 5 ] Parks RJ, Chen L, Anton M, *et al.* A helper-dependent adenovirus vector system: removal of helper virus by Cre-mediated excision of the viral packaging signal. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93** ( 24 ): 13565 – 13570.
- [ 6 ] Palmer DJ, Ng P. Helper-dependent adenoviral vectors for gene therapy. *Hum Gene Ther*, 2005, **16** ( 1 ): 1 – 16.
- [ 7 ] Harui A, Roth MD, Kiertscher SM, *et al.* Vaccination with helper – dependent adenovirus enhances the generation of transgene-specific CTL. *Gene Ther*, 2004, **11** ( 22 ): 1617 – 1626.
- [ 8 ] Shi CX, Graham FL, Hitt MM. A convenient plasmid system for construction of helper-dependent adenoviral vectors and its application for analysis of the breast-cancer-specific mammaplobin promoter. *J Gene Med*, 2006, **8** ( 4 ): 442 – 451.
- [ 9 ] Rixon HW, Brown C, Brown G, *et al.* Multiple glycosylated forms of the respiratory syncytial virus fusion protein are expressed in virus – infected cells. *J Gen Virol*, 2002, **83** ( Pt 1 ): 61 – 66.
- [ 10 ] Muruve DA, Cotter MJ, Zaiss AK, *et al.* Helper-dependent adenovirus vectors elicit intact innate but attenuated adaptive host immune responses in vivo. *J Virol*, 2004, **78** ( 11 ): 5966 – 5972.
- [ 11 ] Xiang ZQ, Pasquini S, Ertl HC. Induction of genital immunity by DNA priming and intranasal booster immunization with a replication-defective adenoviral recombinant. *J Immunol*, 1999, **162** ( 11 ): 6716 – 6723.
- [ 12 ] Toietta G, Mane VP, Norona WS, *et al.* Lifelong elimination of hyperbilirubinemia in the Gunn rat with a single injection of helper-dependent adenoviral vector. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102** ( 11 ): 3930 – 3935.
- [ 13 ] 朱汝南 邓 洁 王 芳 等. 2000 年秋冬至 2002 年夏北京地区急性呼吸道感染病毒病原学研究. 临床儿科杂志, 2003, **21** ( 1 ) 25 – 28.

## Construction and preparation of helper-dependent adenoviral vector expressing human respiratory syncytial virus F gene

YANG Bing<sup>1</sup>, HE Jin-sheng<sup>1,2\*</sup>, SHI Chang-xin<sup>4</sup>, ZHANG Mei<sup>1</sup>, YU Jie-mei<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Department of Immunology, Anhui Medical University, Hefei 230032, China)

(<sup>2</sup> Institute of Biological Science and Technology, Beijing Jiaotong University, Beijing 100044, China)

(<sup>3</sup> Institute of Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100052, China)

(<sup>4</sup> Division of Hematology-Oncology, Mayo Clinic, Scottsdale AZ 85259, USA)

**Abstract** :To construct a helper-dependent adenoviral vector expressing human respiratory syncytial virus ( RSV ) subgroup A F gene, and finish large scale preparation, purification and identification of the vector. F gene under the control of CMV promoter was subcloned into a shuttle vector pSC11, and then cloned into HADd plasmid pSC15B. The HDAd/F genome was liberated by removing the bacterial sequences from the resulting plasmid pSC15B/F digested with restriction enzyme *Pme* I, and then the linear HDAd/F DNA was transfected into 293Cre4 cells with calcium phosphate transfection method. The cells were infected by helper virus 16 hours after transfection. HDAd/F was amplified by serial coinfection of 293Cre4 cells by helper virus and the crude lysates from previous passage until it reached plateau of amplification by BFU staining of parallel amplified control vector pSC9A. HDAd/F was purified by CsCl gradient ultracentrifugation and expression of F protein was identified by RT-PCR and Western blot. HDAd/F was constructed, purified successfully. The expression of F protein was detected. The successful construction and preparation of HDAd/F is the foundation for the further investigation of potential immune protection in vivo and opens a new window for the RSV vaccine research.

**Keywords** : helper-dependent adenoviral vector ; F protein of human respiratory syncytial virus ; RT-PCR ; Western blot

Foundation item : National Natural Science Foundation of China ( 30671965 )

\* Corresponding author. Tel 86-10-51683887 ; E-mail : jshhe@bjtu.edu.cn

Other authors : XIE Can<sup>1</sup>, LU Yan-yan<sup>1</sup>, FU Yuan-hui<sup>3</sup>, PENG Xiang-lei<sup>2</sup>, HONG Tao<sup>2,3</sup>

Received 9 November 2006/Accepted : 12 December 2006/Revised : 28 February 2007

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>