

改良型痘苗病毒安卡拉株表达系统可删除筛选标记的双表达穿梭载体

郑其升¹, 毕志香², 李梅清², 侯继波¹, 陈溥言³

1 国家兽用生物制品工程技术研究中心, 南京 210014

2 山东省畜牧兽医职业学院, 潍坊 261061

3 南京农业大学 农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室, 南京 210095

摘要: 为了构建改良型痘苗病毒安卡拉株表达系统可删除筛选标记的双表达穿梭载体, 利用 Cre/LoxP DNA 重组系统以及本实验室表达 Cre 酶的 BHK-21 细胞系 (BHK-Cre), 以大肠杆菌黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶 (*Eco gpt*) 为筛选标记构建可删除筛选标记的双表达穿梭载体 pLR-*gpt*。将 *Eco gpt* 基因以及调控其表达的启动子基因置于 2 个同向的 *LoxP* 位点之间, 2 个独立的多克隆位点位于 2 个 *LoxP* 位点之外, 最终获得的重组病毒可以在 BHK-Cre 细胞系上删除筛选标记 *Eco gpt*。为了验证系统的有效性, 将 PRRSV NJ-a 株 *ORF5* 与 *ORF6* 基因分别克隆入 pLR-*gpt* 的 2 个多克隆位点中, 构建重组转移载体 pLRgpt-*ORF5/ORF6*。经脂质体介导, 将 pLRgpt-*ORF5/ORF6* 转染已感染亲本 MVA 2 h 的 BHK-21 细胞单层, 用药物选择性培养基 (MXHAT) 在 24 孔板上进行连续筛选纯化, 得到带有筛选标记的重组病毒 rMVAgpt-GP5/M。将 rMVAgpt-GP5/M 感染 BHK-Cre, 获得删除筛选标记的重组病毒 rMVA-GP5/M, Western blotting 与间接免疫荧光证明重组病毒能表达 GP5 与 M 蛋白, 经 PCR 和病毒生长曲线鉴定, 获得删除筛选标记的重组病毒 rMVA-GP5/M 已经完全删除筛选标记 *gpt*。结果表明成功构建了痘苗病毒表达系统可删除筛选标记的双表达穿梭载体, 并且外源基因的插入不影响亲本病毒的复制与外源基因的表达, 具有较好的稳定性。

关键词: Cre/LoxP, MVA 表达系统, 猪繁殖与呼吸综合征病毒, 无标记重组病毒

A novel double expression shuttle vector to get marker-free recombinant modified vaccinia virus Ankara

Qisheng Zheng¹, Zhixiang Bi², Meiqing Li², Jibo Hou¹, and Puyan Chen³

1 National Research Center of Veterinary Biological Engineering and Technology, Nanjing 210014, China

2 Shandong Vocational Animal Science and Veterinary College, Weifang 261061, China

3 Key Laboratory of Animal Disease Diagnosis and Immunology, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

Received: August 16, 2010; Accepted: November 22, 2010

Supported by: China Postdoctoral Science Foundation (No. 20080441060), Jiangsu Agricultural Academy Science Foundation (No. 6110820).

Corresponding author: Jibo Hou. Tel: +86-25-843962008; Fax: +86-25-84392028; E-mail: houjibo@jaas.ac.cn

中国博士后基金 (No. 20080441060), 江苏省农业科学院基金 (No. 6110820) 资助。

Abstract: A novel double expression shuttle vector named pLR-gpt was constructed for marker-free recombinant modified vaccinia virus Ankara generation. A delectable *Eco* gpt marker was adopted with Cre/*LoxP* DNA recombination system and a BHK-21 cell line that can express Cre enzyme. *Eco* gpt gene controlled by P7.5 promoter from Vaccinia virus was cloned between two *LoxP* sites in the same direction. Additionally, two multiple cloning site under control of other two Vaccinia virus promoters were constructed outside *LoxP* sites. With this new transfer vector, *Eco* gpt marker in rMVA can be deleted on BHK-Cre with interaction between Cre enzyme and *LoxP* sequence. In order to verify the efficacy of this system, *ORF5* and *ORF6* gene of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) NJ-a strain were cloned into two multiple cloning sites of pLR-gpt to construct recombinant plasmid pLR-*ORF5/ORF6*. Homologous recombination between pLR-*ORF5/ORF6* and wtMVA on BHK-21 cell was mediated by liposome by infecting cells with 0.01 MOI wtMVA two hours before transfection. After twelve cycles of selection, recombinant MVA with selecting marker *Eco* gpt was obtained and named as rMVAgpt-GP5/M. By infecting BHK-Cre, the *Eco* gpt marker in rMVAgpt-GP5/M was deleted and this rMVA was named as rMVA-GP5/M. Expression of GP5 and M protein was identified with Western blotting and IFA. Results from PCR and biological study for rMVA indicated that *Eco* gpt marker was completely deleted. Conclusions: double expression transfer vector for marker-free recombinant Modified vaccinia virus Ankara generation was successfully constructed, and works well in MVA expression system.

Keywords: Cre/*LoxP*, MVA expression system, porcine reproductive and respiratory syndrome virus, marker-free recombinant virus

随着 DNA 重组技术的发展和应用, 疫苗研究正逐渐从传统的灭活和减毒疫苗向基因工程疫苗过渡, 特别是以病毒和细菌为载体的重组活疫苗的研制, 有望克服常规疫苗的一些弊端。但同时, 重组病毒的安全性问题也越来越多地受到人们的关注^[1]。在获得重组活载体疫苗后, 一般随同目的基因转入载体的还有非目的基因, 主要是抗性选择基因或报告基因。利用标记基因等可以从大量非转化细胞中将阳性重组克隆筛选出来, 但随着重组病毒的传代, 抗性选择基因变得不再有用, 却仍在细胞内表达, 这些基因也可能会进入环境中, 产生安全性问题。因此, 如果在获得重组活载体疫苗后, 能除去这些非目的基因片段, 可大大提高重组疫苗的安全性。

Cre/*LoxP* DNA 重组系统具有位点特异、时期特异、组织特异和高效重组的特点, 被广泛用于细菌、真菌、植物、昆虫和哺乳动物的体内、体外基因重组^[2]。Cre 和 *LoxP* 均来自于 P1 噬菌体, 其介导因重组不需要其他蛋白质或辅助因子参与, 仅需纳摩尔的量即可与 *LoxP* 位点结合, 完成体内或体外的 DNA 重组, 将外源基因定点整合到染色体上或将特定的 DNA 片段删除; Cre/*LoxP* 重组系统在基因靶位操作、基因功能鉴定、外源基因整合等方面得到了广泛的

应用, 在转基因酵母、植物、昆虫、哺乳动物的体内外 DNA 重组方面成为有力的工具^[3-4]。

改良型痘苗病毒安卡拉株 (Modified vaccinia virus ankara, MVA) 是亲本痘苗病毒安卡拉株经鸡胚成纤维细胞 (CEF) 连续传代 500 次以上所获得的高度减毒的复制缺陷型痘苗病毒株。鉴于 MVA 突出的安全性和免疫原性, 近年来通过基因重组构建的 rMVA 已被广泛应用于多种重要传染病及肿瘤的疫苗研制, 并已取得良好的效果^[5-8]。在本研究中, 我们构建了一种实用新型可删除筛选标记双表达穿梭载体 pLR-gpt。为了彻底删除筛选标记实现重组病毒无标记, 将重组病毒的筛选标记基因放在 2 个同向 *LoxP* 位点间; 而在 2 个 *LoxP* 位点外, 设有 2 个多克隆位点, 可插入目的基因表达盒。当穿梭载体与 MVA 基因组发生同源重组后, 利用 gpt 抗性筛选阳性克隆, 然后将重组病毒接种 BHK-Cre 细胞, 2 个同向 *LoxP* 位点间的筛选标记基因将被剔除, 最终获得删除筛选标记的重组病毒。

为了验证系统的有效性, 将 PRRSVNJ-a 株 *ORF5* 与 *ORF6* 基因分别克隆入 pLR-gpt 的 2 个多克隆位点中, 经脂质体介导, 将构建好的 pLR-*ORF5/ORF6* 转染已感染亲本 MVA 2 h 的 BHK-21 细胞单

层,用药物选择性培养基 (MXHAT) 在 24 孔板上进行连续筛选纯化, 得到带有筛选标记的重组病毒 rMVA_{gpt}-GP5/M。将 rMVA_{gpt}-GP5/M 感染 BHK-Cre, 经 PCR 和病毒生长曲线鉴定, 获得删除筛选标记的重组病毒 rMVA-GP5/M, 筛选标记 *gpt* 已被完全删除。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌种及细胞

MVA 表达系统转移载体 pLR-*lacZ*, 由美国范德比特尔大学传染病学部张秀根博士惠赠, 由本实验室保存, 其筛选标记为 *lacZ* 基因; 鸡痘病毒表达系统的转移载体 pEF_{gpt}12S, 由美国明尼苏达大学张玉根博士惠赠, 具有一个痘苗病毒的双向启动子, 其中 P7.5 调控筛选标记 *Eco gpt* 基因的表达; 克隆质粒 pBluescript SK II(+) 及宿主菌大肠杆菌 DH5 α , 由本实验室保存; 质粒 pMD18-T 载体购自 TaKaRa 公司; BHK-21 细胞由本实验室保存; 表达 Cre 酶的 BHK-21 细胞系由本实验室苏鑫铭博士构建; 含有 PRRSV NJ-a 株 *ORF5* 及 *ORF6* 基因的重组质粒由笔者构建。

1.2 工具酶与试剂

DNA 分子量标准 DL2000、DL15000, 限制性内切酶 *Pme* I、*Asc* I、*Kpn* I、*Sac* I、*Apa* I 及 T4 DNA 连接酶、dNTPs、LA *Taq* DNA 聚合酶为宝生物 (大连) 公司产品; DNA 胶回收试剂盒购自上海

华舜生物公司; 霉酚酸 (Mycophenolic Acid, MPA) 购自 Sigma 公司; 黄嘌呤、氨基嘌呤、胸苷均购自 Promega 公司; LipofectaminTM 2000 转染试剂盒购自 Invitrogen 公司; 胰酶购自 Difco 公司; 兔抗 PRRSV NJ-a 株高免血清由本室制备, 系用纯化的 PRRSV NJ-a 株多次免疫家兔制备; 兔抗 PRRSV NJ-a 株 GP5、M 蛋白的特异性多抗由本室制备, 系分别用纯化的原核表达的重组 GP5 与 M 蛋白多次免疫家兔制备; HRP 标记的羊抗兔 IgG、FITC 标记的羊抗兔 IgG 均购自晶美生物公司; 其他各种化学试剂均为分析纯。

1.3 引物设计

根据质粒 pLR-*lacZ* 序列分析结果, 在筛选标记 *lacZ* 基因与左重组臂之间设计一对特异性引物 P1、P2, 用于扩增 pLR-*lacZ* 中除去 *lacZ* 的部分, 在 P1 的 5'端依次添加 *Kpn* I 与 *Sac* I 位点; 在 P2 的 5'端依次添加 *Kpn* I、*Apa* I 与 *Mlu* I 位点, 在 *Apa* I 位点之后加入了一个痘苗病毒早期转录双向终止信号; 根据质粒 pEF_{gpt}12S 的序列分析结果, 设计一对特异性引物 P3、P4, 用于扩增由痘苗病毒 P7.5 启动子调控表达的 *Eco gpt* 基因, 在 2 条引物的 5'端添加 2 个同向的 *LoxP* 基因序列, 然后在 *LoxP* 基因序列外侧分别加入 *Sac* I 及 *Apa* I 位点; P5、P6 为检测重组 MVA 的特异性引物, 所有引物均为上海英骏生物技术公司合成。

表 1 PCR 反应所用引物

Table 1 Primers used for gene PCR amplification in the study

Primer	Sequence	Enzyme site	Purpose
P1	CGGGGTACCGAGCTCTCGAATCATCCAGTCCAC	<i>Kpn</i> I + <i>Sac</i> I	Upstream primer for pLR amplification
P2	GACGGTACCGGGCC <u>ATTTTATAAAAAAT</u> ACGCGT TTATGATCTACTTCCCTACC	<i>Kpn</i> I + <i>Apa</i> I + <i>Mlu</i> I	Downstream primer for pLR amplification
P3	<u>GAGCTCATAACTTCGTATAAGCATAACATTATACGA</u> <u>AGTT</u> ATATATACTATATAGTAATACCAATACT	<i>Sac</i> I	Upstream primer for P7.5+Eco <i>gpt</i> amplification
P4	<u>GGGCCCATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGA</u> <u>AGTT</u> ATTTAGCGACCGGAGATTGGCGGGACGA	<i>Apa</i> I	Downstream primer for P7.5+Eco <i>gpt</i> amplification
P5	AGCGAAAAATACATCGTCACCTGG		Upstream primer for <i>gpt</i> deletion detection
P6	ACACCATTGTGTTCATCATCAGAC		Downstream primer for <i>gpt</i> deletion detection

Bold and italic letters are restriction enzyme sites; framed letters are the two directional stop signal for vaccinia virus early transcription; underlined letters are the two *LoxP* sites in the same direction.

1.4 可删除筛选标记双表达穿梭载体 pLR-gpt 的构建

利用引物 P1、P2, 以原有的转移载体质粒 pLR-lacZ 为模板, 扩增包括质粒骨架、左右重组臂, 以及痘苗病毒启动子在内的基因序列。PCR 产物回收纯化后用 *Kpn* I 单酶切, 酶切产物再回收, 在 T4 DNA 连接酶作用下自连, 获得删除 lacZ 筛选标记的转移载体 pLR。

利用引物 P3、P4, 以禽痘病毒表达系统的转移载体 pEFgpt12S 为模板, 扩增 *Eco* gpt 基因表达盒 (P7.5+Eco gpt), PCR 产物克隆入 pMD18-T 载体后, 获得重组质粒 pMD-LoxP-gpt-LoxP, 将阳性质粒送交大连宝生物生物工程公司进行序列测定, 以验证 2 个同向 *LoxP* 位点与 *Eco* gpt 表达盒基因序列的正确性。将测序正确的质粒, 用 *Asc* I 与 *Apa* I 双酶切, 回收目的基因, 克隆入经相同酶处理的质粒 pLR, 获得改造后的重组转移载体, 命名为 pLR-gpt。

1.5 含有 PRRSV 基因的双表达穿梭载体 pLR-ORF5/ORF6 的构建

用 *Pme* I 与 *Asc* I 双酶切 PRRSV NJ-a 株 *ORF5* 基因后克隆入 pLR-gpt 相应的位点中, 获得重组质粒 pLRgpt-ORF5; 利用 *Sac* I 与 *Apa* I 双酶切 PRRSV NJ-a 株 *ORF6* 基因后克隆入 pLRgpt-ORF5 相应的位点中, 获得共表达 PRRSV NJ-a 株 *ORF5* 与 *ORF6* 基因的重组 MVA 转移载体 pLRgpt-ORF5/ORF6。

1.6 删除筛选标记重组 MVA 的获得及删除

重组转移载体与亲本 MVA 的共转染照 Lipofectamin™ 2000 转染试剂盒说明书步骤进行。用含 2% MXHAT 的 DMEM 10 倍连续稀释病毒, 接种到长满单层 BHK-21 细胞的 24 孔板, 接毒量 500 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 吸附 1 h, 用 PBS 洗涤 2 次, 用含 2% 胎牛血清的选择性培养基维持, 每隔 48 h 换 1 次液, 逐日观察, 收获稀释倍数大且出现病变孔的病毒液, 如此反复, 直到病毒在选择性培养基和正常培养基中的 TCID₅₀ 值达到一致, 表明重组病毒已纯化, 为防止细胞脱落, 在接毒前 2 h 更换选择性培养基。

以 0.1 MOI 接种纯化的 rMVAgpt-GP5/M 于长满 BHK-Cre 细胞的 6 孔板, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养至细胞病变明显后收获病毒。收获病毒分为 2 份, 1 份重新接种 BHK-Cre 细胞, 另 1 份接种 BHK-21 细胞, 用 2% 的 MXHAT 选择性培养基培养, 连续反复传代筛选, 直到所收获病毒在 BHK-21 细胞上以选择性培养基培养不形成病变, 得到删除筛选标记的重组病毒 rMVA-GP5/M。

1.7 重组 MVA 筛选标记删除的鉴定

提取 rMVAgpt-GP5/M 与 rMVA-GP5/M 病毒基因组作为模板, 利用引物 P5、P6 进行目的基因的扩增, 以鉴定筛选标记基因在 MVA 基因组中的插入与缺失, 同时设亲本 MVA 基因组 DNA 对照。

取纯化的 rMVA-GP5/M、rMVAgpt-GP5/M 和亲本 MVA, 分别以 2.0 MOI 感染 24 孔板 BHK-21 细胞单层, 37 $^{\circ}$ C 吸附 1 h, 用 DMEM 冲洗 3 次, 加入含 2% FCS 的 DMEM 与含 2% MXHAT 选择性培养基, 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养。分别在接毒后 12、24、48、72 h 时, 收获病毒, 测定病毒的 TCID₅₀, 绘制生长曲线。

1.8 外源基因表达的鉴定

1.8.1 重组病毒 Western blotting 分析

将纯化的 rMVA-GP5/M 按 2.0 MOI 接种单层的 BHK-21 细胞, 感染 48 h 后收集并裂解细胞, 进行 SDS-PAGE 分离、转膜后以兔抗 PRRSV NJ-a 株多克隆抗体为一抗, 以 HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体为二抗进行显色反应, 显色后观察是否存在与预期蛋白大小一致的蛋白条带。

1.8.2 重组病毒 IFA 鉴定

将纯化的 rMVA-GP5/M 按 2.0 MOI 接种单层的 BHK-21 细胞, 在感染后 48 h, 弃营养液, 每孔用 PBS (pH 7.4) 洗涤 3 次, 加 -20 $^{\circ}$ C 预冷的固定液 (丙酮: 乙醇=6:4), 固定 5 min, 用 PBS 漂洗 3 次后空气干燥; 分别加入 1:100 稀释的兔抗 PRRSV NJ-a 株 GP5 或 M 蛋白的高免血清, 37 $^{\circ}$ C 作用 30 min; PBS 漂洗 3 次后, 加入 FITC 标记的羊抗兔抗体,

37 °C作用 45 min; PBS 漂洗 3 次, 风干后直接观察荧光。同时以 MVA 感染细胞作对照。

2 结果与分析

2.1 骨架质粒的获得

以转移载体 pLR-*lacZ* 为模板, 扩增除去 *lacZ* 基因的质粒全长基因。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳观察, 可清晰看到位于 4 000 bp 附近的特异性条带。PCR 产物回收后经 *Kpn* I 单酶切, 酶切产物再回收, 在 T4 DNA 连接酶作用下进行连接反应。连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 挑取单菌落, 碱裂解法提取质粒, 用 *Kpn* I 单酶切鉴定, 可见约 4 000 bp 的单一片段 (图略), 表明成功获得骨架质粒 pLR, 测序结果也证实了我们的结论。

2.2 带有 2 个同向 *LoxP* 位点的 *Eco gpt* 基因表达盒的扩增

以禽痘病毒表达系统的转移质粒 pEFgpt12S 为模板, 利用引物 P3、P4, 扩增带有 2 个同向 *LoxP* 位点的 *Eco gpt* 基因表达盒。PCR 产物回收后克隆入 pMD18-T 载体, 用 *Sac* I 与 *Apa* I 双酶切鉴定, 可见 2 600 bp 的载体片段与 890 bp 的目的基因片段 (图略), 阳性重组质粒命名为 pMD-*LoxP-gpt-LoxP*。序列测定结果证实了 *LoxP* 位点及 *Eco gpt* 基因表达盒序列的正确性。

2.3 可删除筛选标记的双表达转移载体的构建结果

将 pMD-*LoxP-gpt-LoxP* 用 *Sac* I /*Apa* I 双酶切, 回收 890 bp 的条带与用同样 2 个酶处理的 pLR 进行连接, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞后, 挑取白色菌落, 碱裂解法小量提取质粒, 经 *Sac* I 与 *Apa* I 双酶切鉴定为阳性, 命名为 pLR-*gpt* (图 1), 表明带有 2 个同向 *LoxP* 位点的以 *Eco gpt* 为筛选标记的重组痘苗病毒转移载体构建成功, 载体构建的过程见图 2。

2.4 含有 PRRSV 基因的双表达穿梭载体构建结果

pLR-*ORF5/ORF6* 用 *Pme* I /*Asc* I 或 *Mlu* I /

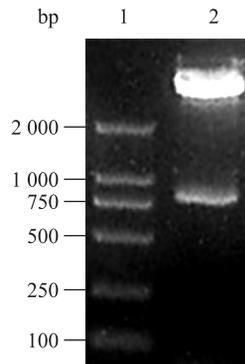


图 1 重组质粒 pLR-*gpt* 的酶切鉴定

Fig. 1 Identification of the recombinant plasmid pLR-*gpt*. 1: DNA marker DL2000; 2: recombinant plasmid pLR-*gpt* digested by *Sac* I and *Apa* I.

Apa I 双酶切, 酶切产物电泳, 在紫外光灯下出现 4 000 bp 的载体片段及 603 bp 的 *ORF5* 基因或 525 bp 的 *ORF6* 基因, 表明重组转移载体构建成功, 结果见图 3。

2.5 删除筛选标记重组 MVA 的获得及鉴定

以 rMVAgpt-GP5/M 为亲本毒, 在 BHK-Cre 细胞上筛选纯化后得到 rMVA-GP5/M。rMVA-GP5/M 在 2% MXHAT 选择性培养基中完全不能产生病变, 说明在 Cre 酶的作用下, rMVAgpt-GP5/M 中的 *Eco gpt* 表达盒已被正确删除。

2.6 删除筛选标记重组 MVA 的鉴定

rMVAgpt-GP5/M 中带 2 个同向 *LoxP* 位点的 *Eco gpt* 表达盒为 890 bp, 本实验设计的引物实际扩增大小为 1 012 bp (下游引物位于重组臂上), rMVA-GP5/M 由于 *Eco gpt* 表达盒被删除, 所以没有扩增产物。结果表明, 在 Cre 酶的作用下, *Eco gpt* 表达盒被正确除去, 结果见图 4。

2.7 外源基因表达的鉴定结果

2.7.1 Western blotting 分析

由图 5 可见, rMVAgpt-GP5/M 感染的细胞能够出现 25 kDa 和 19 kDa 的蛋白条带, 而亲本毒对照孔没有任何条带。结果表明, 构建的重组病毒能够同时表达 GP5 和 M 蛋白, 并且表达产物具有与兔抗 PRRSV NJ-a 株阳性血清结合的能力。

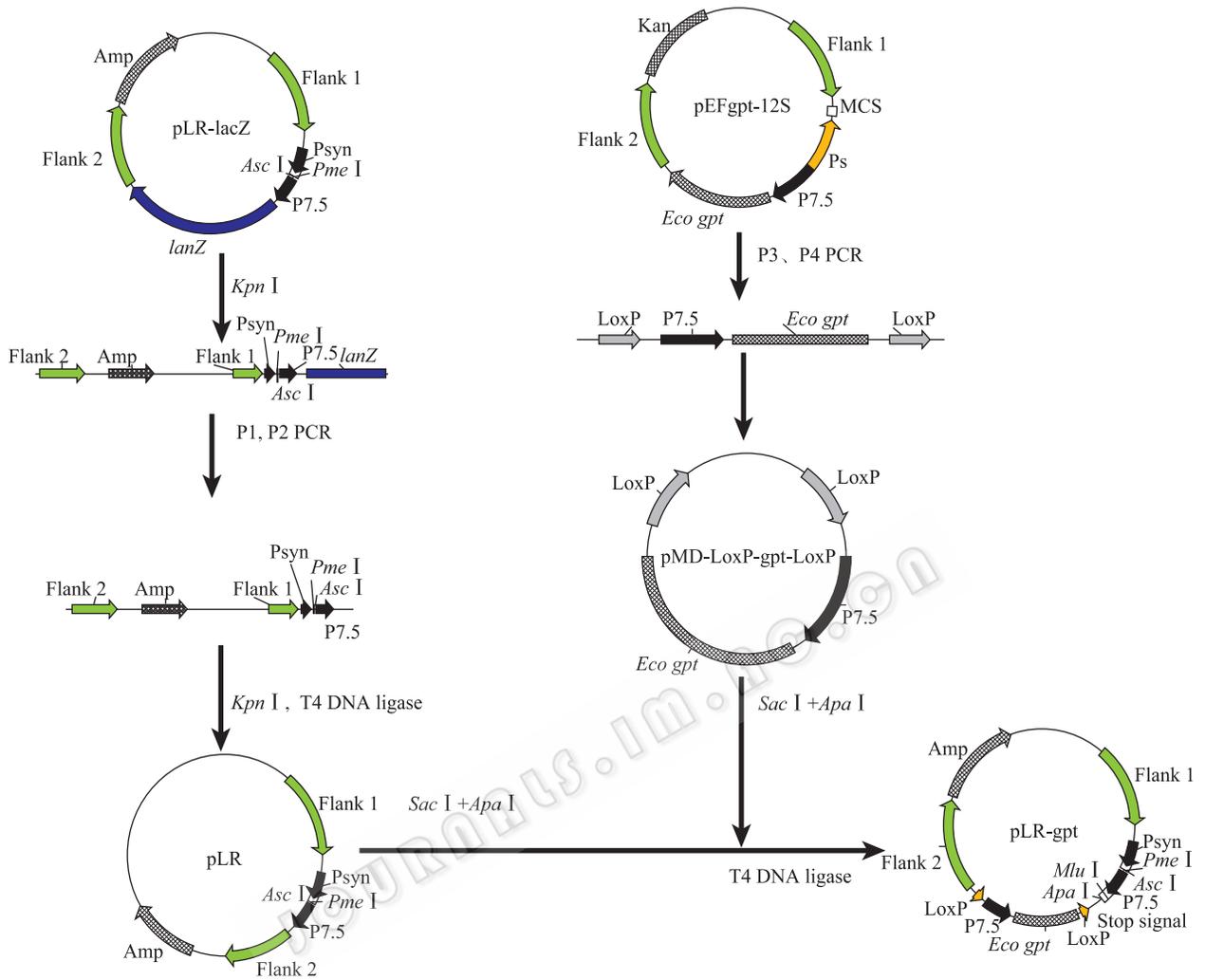


图 2 改良型痘病毒安卡拉株表达系统可删除筛选标记的双表达载体的构建流程图

Fig. 2 Construction for the marker free bio-expression transfer vector of the MVA expression system expression system.

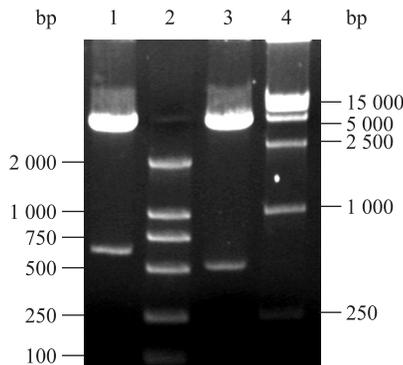


图 3 重组质粒 pLRgpt-ORF5/ORF6 的双酶切鉴定

Fig. 3 Identification for the recombinant plasmid pLRgpt-ORF5/ORF6. 1: pLRgpt-ORF5/ORF6 digested with *Pme* I and *Asc* I; 2: DNA marker DL2000; 3: pLRgpt-ORF5/ORF6 digested with *Mlu* I and *Apa* I; 4: DNA marker DL15000.

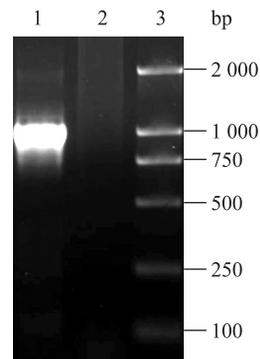


图 4 重组病毒筛选标记删除的 PCR 鉴定

Fig. 4 PCR identification for ECO *gpt* deletion of recombinant virus. 1: rMVAgpt-GP5/M amplified with primer P5 and P6; 2: rMVA-GP5/M amplified with primer P5 and P6; 3: DNA marker DL2000.

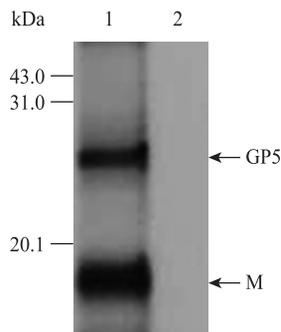


图5 rMVAgpt-GP5/M 的 Western blotting 鉴定

Fig. 5 Western blotting analysis of rMVAgpt-GP5/M. 1: rMVAgpt-GP5/M reacts with PRRSV positive serum; 2: MVA reacts with PRRSV positive serum.

2.7.2 IFA 鉴定

纯化的 rMVAgpt-GP5/M 和亲本毒 MVA 分别感染 BHK-21 细胞, 待病变明显后进行间接免疫荧光染色, 结果 rMVAgpt-GP5/M 感染细胞经与兔抗 GP5、M 特异性多抗反应后均呈现很强的绿色荧光(图 6), 而亲本毒 MVA 感染细胞没有荧光, 进一步证明重组病毒能同时表达 GP5 和 M 蛋白。

2.8 重组病毒在 BHK-21 细胞上的生长特性

rMVA-GP5/M 与 rMVAgpt-GP5/M 在 BHK-21 细胞上分别以普通培养基与选择性培养基 (含 2% MXHAT) 进行培养, 生长曲线见图 7、8。由图 7

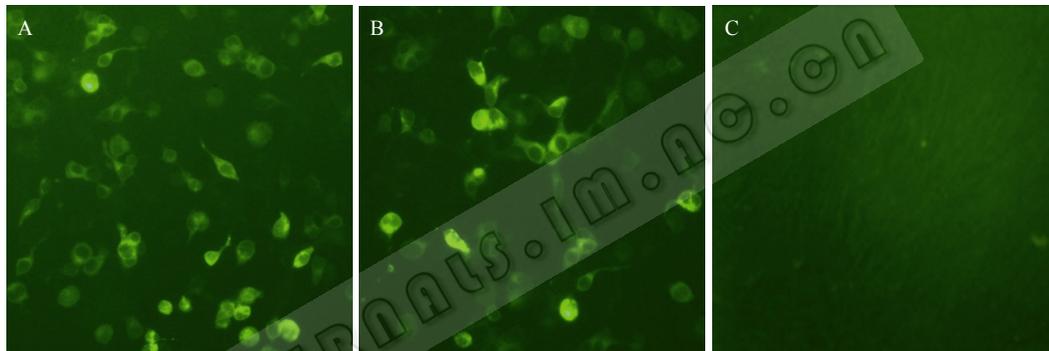


图6 IFA 检测重组病毒感染 BHK-21 细胞中 PRRSV 蛋白的表达

Fig. 6 Immunofluorescence assay with rMVAgpt-GP5/M-infected BHK-21 cells. (A) rMVAgpt-GP5/M infected BHK-21 cells reacted with GP5-specific antiserum. (B) rMVAgpt-GP5/M infected BHK-21 cells reacted with M-specific antiserum. (C) Negative control.

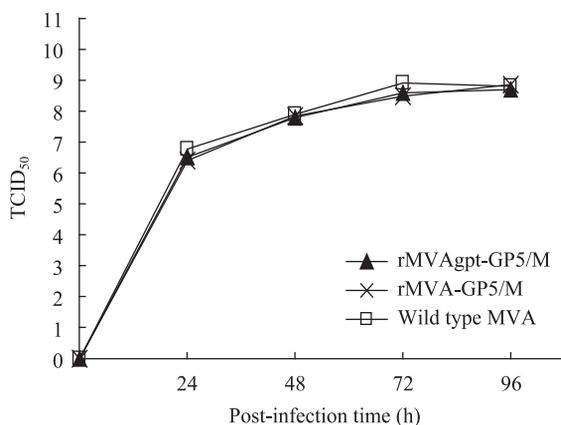


图7 重组病毒 rMVAgpt-GP5/M、rMVA-GP5/M 与亲本毒 MVA 在 2% DMEM 培养基中的生长曲线

Fig. 7 One-step growth curve for rMVAgpt-GP5/M, rMVA-GP5/M and wtMVA in DMEM containing 2% FCS.

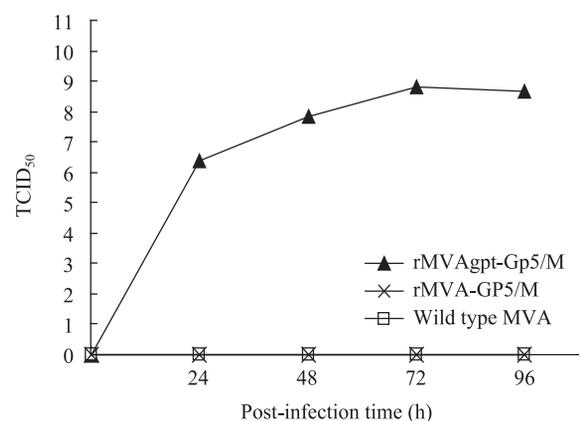


图8 重组病毒 rMVAgpt-GP5/M、rMVA-GP5/M 与亲本毒 MVA 在 2% MXHAT 培养基中的生长曲线

Fig. 8 One-step growth curve for rMVAgpt-GP5/M, rMVA-GP5/M and wtMVA in DMEM containing 2% MXHAT.

可见, 当 2 个重组病毒在 2% DMEM 中培养时, 滴度与亲本毒 MVA 基本一致, 说明外源基因的插入不影响病毒的增殖; 由图 8 可见, 当 2 个重组病毒在选择性培养基中培养时, rMVAgpt-GP5/M 滴度未发生明显的变化, 而 rMVA-GP5/M 与亲本毒 MVA 的生长被完全抑制, 也表明在 Cre 酶的作用下, rMVAgpt-GP5/M 中的 *Eco gpt* 表达盒已被正确删除。

3 讨论

MVA 的亲本病毒早先是从马的痘损害中分离获得, 起初经驴皮肤划痕传代, 经 CEF 连续传 516 代后, 其宿主范围和组织病理表型发生了显著的变化, 除在 CEF 和极少数哺乳细胞 (BHK-21) 中能够进行有效增殖以外, 在绝大多数哺乳细胞中都受到严格的限制。与亲本病毒导致大的皮肤溃疡痘痕不同, 接种 MVA 后仅产生小的白色痘痕^[9-10]。

改良型痘苗病毒安卡拉株是研究传染病与癌症重组活载体疫苗的首选载体。活载体疫苗能够模仿体内病毒感染的过程, 向机体的免疫系统提供“危险信号”。另外, 痘病毒的生活周期允许疫苗抗原能够在感染细胞的细胞浆中进行从头合成, 对抗原分子向 MHC-I 类分子的有效递呈, 引发特异性 CD8⁺ T 细胞反应特别有利。与复制型痘苗病毒不同, MVA 的宿主范围很窄, 对人类及其他哺乳动物仅产生一过性感染, 接种后的副反应小。因此, 许多利用 MVA 作为载体的前临床疫苗已经在动物模型中显示了非常好的保护型体液免疫与细胞免疫反应^[10]。也正是由于 MVA 载体具有的这些优点, 使其从众多的活病毒载体中脱颖而出, 成为目前重组病毒活载体疫苗研究的热点。目前, 对重组 MVA 活载体疫苗的研究已进入应用阶段。以其作为载体表达 HIV *gag-pol* 和 *env* 基因及疟疾红前期抗原 CSP 的重组活载体疫苗已分别进入了临床 I 与 II 试验^[12-13]。

本实验室所用的 MVA 表达系统的转移载体的筛选标记为 *lacZ* 基因, 虽然利用 *lacZ* 基因作为筛

选标记成功筛选到重组病毒的报道已经很多, 但是我们这套表达系统还是存在许多缺点。1) 筛选标记基因 *lacZ* 过大 (3 500 bp), 使得整个转移载体太大 (7 200 bp), 不便于基因的操作。2) 生物安全性问题, 利用此筛选标记获得的重组病毒最终不能去除筛选标记, 对于重组病毒的生物安全性存在严重的影响。3) 利用 *lacZ* 作为筛选标记, 在筛选过程中需要用低熔点琼脂糖固定细胞以挑取噬斑, 操作过于繁琐。4) 原有的转移载体只能进行单基因表达或者对多个基因进行融合表达, 而不能对 2 个基因进行共表达。

对该系统进行改造后, 转移载体的筛选标记 *Eco gpt* 基因大小只有 890 bp, 使转移质粒大大减小, 方便了基因的操作; Cre/LoxP 系统的引入提高了最终所获得重组病毒的生物安全性, 利用本实验室所拥有的表达 Cre 酶的 BHK-21 细胞系 (BHK-Cre), 在最后获得的重组病毒中, 筛选标记 *Eco gpt* 基因将被删除, 只保留一个 *LoxP* 位点; 转移载体改造后, 又添加了一个由痘苗病毒 P7.5 调控表达的多克隆位点框, 因此可以对 2 个基因同时进行共表达, 这对于表达存在相互作用的 2 个蛋白特别有利。总之, 本研究构建的可删除筛选标记的双表达穿梭载体, 用于无筛选标记的重组改良型痘苗病毒安卡拉株构建, 将为开发更安全高效重组 MVA 活载体疫苗奠定基础。

REFERENCES

- [1] Liu Q, Zhu XQ. Biosafety. Beijing: Science Press, 2001. 刘谦, 朱鑫泉. 生物安全. 北京: 科学出版社, 2001.
- [2] Kinker DR, Swenson SL, Wu LL, et al. Evaluation of serological tests for the detection of pseudorabies gE antibodies during early infection. *Vet Microbiol*, 1997, 55(1/4): 99-106.
- [3] Ray MK, Fagan SP, Brunicardi FC. The Cre-*loxP* system: a versatile tool for targeting genes in a cell- and stage-specific manner. *Cell Transplant*, 2000, 9(6): 805-815.
- [4] Marx CJ, Lidstrom ME. Broad-host-range cre-lox system for antibiotic marker recycling in gram-negative bacteria.

- Biotechniques, 2004, 33(5): 1062–1067.
- [5] Meyer H, Sutter G, Mayr A. Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence. *J Gen Virol*, 1991, 72(5): 1031–1038.
- [6] Antoine G, Scheiflinger F, Dorner F, et al. The complete genomic sequence of the modified vaccinia Ankara strain: comparison with other orthopoxviruses. *Virology*, 1998, 244(2): 365–396.
- [7] Carroll MW, Moss B. Host range and cytopathogenicity of the highly attenuated MVA strain of vaccinia virus: propagation and generation of recombinant viruses in a nonhuman mammalian cell line. *Virology*, 2002, 238(2): 198–211.
- [8] Sutter G, Moss B. Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(22): 10847–10851.
- [9] Blanchard TJ, Alcamì A, Andrea P, et al. Modified vaccinia virus Ankara undergoes limited replication in human cells and lacks several immunomodulatory proteins: implications for use as a human vaccine. *J Gen Virol*, 1998, 79(5): 1159–1167.
- [10] Sutter G, Staib C. Vaccinia vectors as candidate vaccines: the development of modified vaccinia virus Ankara for antigen delivery. *Curr Drug Targets Infect Disord*, 2003, 3(3): 263–271.
- [11] Antoine G, Scheiflinger F, Dorner F, et al. The complete genomic sequence of the modified vaccinia Ankara strain: comparison with other orthopoxviruses. *Virology*, 1998, 244(2): 365–396.
- [12] Dorrell L, Williams P, Suttill A, et al. Safety and tolerability of recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing an HIV-1 gag/multi-epitope immunogen (MVA.HIVA) in HIV-1-infected persons receiving combination antiretroviral therapy. *Vaccine*, 2007, 25(17): 3277–3283.
- [13] Weyer J, Rupprecht CE, Mans J, et al. Generation and evaluation of a recombinant modified vaccinia virus Ankara vaccine for rabies. *Vaccine*, 2007, 25(21): 4213–4222.