

口蹄疫病毒的生物工程研究进展

殷 礼

(吉林省兽医科学研究所, 长春)

口蹄疫病 (FMD) 是当前世界危害最严重的家畜传染病之一, 主要危害牛、猪、羊等偶蹄动物。世界上大多数国家和地区均有本病流行, 给农牧业生产造成巨大的损失。各国科学家十分重视 FMD 的研究。近年来, 由于分子生物学在理论上的不断突破, 在技术上的日臻完善, 致使 FMD 的研究获得了巨大成就。陆续报道了口蹄疫病毒 (FMDV) 基因工程疫苗^[1,2]和化学合成的多肽疫苗^[3,4]的研制成功, 开始利用淋巴细胞杂交瘤技术对 FMDV 的免疫学特性进行深入研究^[5,6]。基因工程、杂交瘤技术在 FMDV 上的广泛应用, 对进一步了解 FMDV 的基因结构、表达及调控机制均是有力的工具, 并为人、畜其它疫病的防治提供了新的手段。

FMDV 的结构

FMDV 属细小核糖核酸病毒科口疮病毒属。为 20 面体对称病毒, 直径 20—25nm。FMDV 感染的细胞培养物中含有 4 种病毒微粒, 即完整的 146S 微粒、空壳 75S 微粒、12S 微粒及沉降系数小于 4.5S 的病毒感染的抗原 (VIA)、完整的 146S 病毒微粒, 由单股 RNA 和衣壳蛋白组成, RNA 具有感染力和遗传力, 而外围的衣壳蛋白则决定其抗原性、免疫性和血清学反应能力。RNA 的分子量为 2.5×10^6 , 相当于 7800 个核苷酸; 在其 3' 末端有 Poly(A) 结构, 5' 末端有 Poly(C) 结构, 并连接有一个小蛋白质 (VPg)。近年来的研究表明, 只有 Poly(C) 区段和 RNA 3' 末端之间的区段携带有翻译多聚蛋白质的信息。以此 RNA 为模板所合成的多聚蛋白体, 可分为病毒结构

蛋白和非结构蛋白这种多聚蛋白体称为前体蛋白 (P20_s、P88、P52、P100)。在细胞内蛋白酶和病毒编码酶的作用下, 前体蛋白分解成 4 种主要的衣壳蛋白 (VP1、VP2、VP3、VP4) 和几种非衣壳蛋白 (P20_s、P34、P56_s) (图 1)。免疫学研究表明, 在 4 种衣壳蛋白中, VP1 是唯一能使动物产生中和 FMDV 抗体, 并保护动物耐受 FMDV 攻击的衣壳蛋白^[7,8]。

FMDV 基因组的克隆与表达

国外研究证明, 从 FMDV 中分离出的 VP1 加不完全佐剂制成亚单位疫苗, 对 FMDV 有预防作用^[7], 但是价格昂贵, 同时, 还可能有毒颗粒的污染, 在应用上有很大的局限性。DNA 重组技术出现后, 各国都寄予很大希望, 纷纷开展 FMDV 基因工程的研究, 试图利用细菌发酵的方法, 大量生产廉价、安全、有效的 FMDV 疫苗, 用于 FMDV 的预防。

近年来, 欧美一些国家分别研究了 A、O 型等 FMDV 基因组的结构, 并进行了限制性图谱分析和表达, 基因功能定位、核苷酸序列测定及其基因组的克隆等。以 FMDV-RNA 为模板, Oligo(dT)₁₂₋₁₈ 为引物, 再加上四种脱氧三磷酸核苷酸和 AMV 反转录酶, 通过反转录方法可以合成互补 DNA (cDNA)。以 cDNA 为模板, 用大肠杆菌 DNA 聚合酶在四种 ³²P 标记的脱氧三磷酸核苷酸存在下, 可使 cDNA 双股化。Küpper 等^[1]用限制性内切酶降解这种 cDNA, 然后根据降解片段大小, 及其在凝胶中区带的相对强度来定位 FMDV-cDNA 的限制性图谱, 发现 FMDV 基因组与 3'-端 RNA 有关。1977 年 Sanger 等人^[9]曾证明, VP1 基因位于 FMDV 基因组的中心附近。Kleid 等

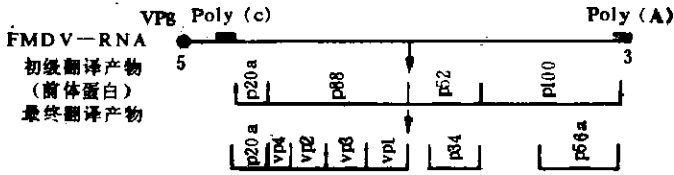


图1 FMDV-RNA 基因组和初级、最终翻译产物示意图^[9]

人^[2]通过分析含有亚基因组 cDNA 插入物的质粒的核苷酸序列,进一步证实了这一结果。同时,也搞清楚 FMDVA₁₂ 亚型的 VP1 基因起始于密码子为苏氨酸的 N-端 1 位,经 210 个密码子终止于密码子为亮氨酸的 C-端 212 位。用限制性内切酶 Pst I 和 Pvu II 切割,可得到绝大部分 FMDVA₁₂ 型的 VP1 密码子序列 (8—211 区段)。根据 VP1 基因的核苷酸序列,可以进一步推算出 VP1 的氨基酸排列顺序。

在 FMDV-VP1 的基因克隆成功以后,西德和美国科学家于 1981 年先后使 FMDV-VP1 基因在大肠杆菌中表达成功^[1,2]。首先西德科学家把克隆的 FMDV₀₁ 亚型基因用 PL 启动区操纵子拼接到质粒 pPLC 24 (其含有从第九位氨基酸起,与 VP1 的编码序列相同的 MS₂ 复制酶基因)。用这种重组质粒去转化大肠杆菌,当温度控制到 42℃ 时,诱导启动子,并产生融合蛋白 MS₂-VP1。放射免疫试验证明,每个细胞可以合成 1000 个分子的抗原多肽。把含有这种抗原性多肽的大肠杆菌溶解后,加完全佛氏佐剂制成疫苗。小规模接种试验发现,间隔 28 天两次接种,可以保护山羊耐受 FMDV 的攻击,一次接种只诱发低中和抗体应答^[1]。

另据报道,美国科学家在色氨酸操纵子的控制下,把 FMDVA₁₂ 亚型的 VP1 基因拼接到 PFM₁ 质粒上,并在 EcoR I 位置导入编码 LE 蛋白 (其具有保护表达产物不被降解的作用)的色氨酸 LE 基因。含有这种质粒的细胞可在有一定量色氨酸的培养基中生长,当色氨酸充分被利用时,可启动质粒,产生融合蛋白质 LE'-VP1。其以不溶性球蛋白的形式积累在大肠杆菌中。每个细胞大约可合成 10⁶ 个 LE'-VP1,即 LE'-VP1 融合蛋白占大肠杆菌总蛋

白的 17%,相当于每毫升培养液中含有 1mg LE'-VP1。经 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳提纯后,加油佐剂制成 LE'-VP1 融合蛋白疫苗。该苗在第一次接种后产生低水平的中和抗体应答 (类似于用化学方法分离的 VP1),二次接种 (牛、羊间隔 28 天,猪间隔 22 天)则引起动物产生高水平的 FMDV 中和抗体,并能防御 FMDV 的攻击^[2]。

用基因工程的方法制备 FMD 疫苗,可以把基因改造成只生产有保护性而无感染性的疫苗原料,从而,避免 FMDV 感染的危险性。原料方面,基因工程的优点更为显著。然而,由于 FMDV 分 7 个型和 62 个亚型,型内不能交叉免疫,同型异亚型间交叉免疫效果也很差。所以,从单一型 FMDV 毒株或克隆中分离到的目地基因研制出的遗传工程疫苗,现在也只能预防一个型甚至一个亚型所引起的 FMD。今后,一方面要探索出一种用无型特性而又有免疫作用的 FMDV 目地基因来制备多价遗传工程疫苗。另一方面,因为动物很难集中起来接种两次,故希望接种一次就能产生保护作用。所以需两次接种才能起保护作用的遗传工程疫苗,在实际应用时受到了限制。

化学合成的 FMDV 多肽疫苗

按照已知的天然蛋白质分子的一级结构和抗原构造,合成含有天然抗原的特定抗原决定簇的人工抗原,通常,大分子蛋白质可以携带大量的种类繁多的并具有各自的特异性抗原决定簇,其中,仅有少数抗原的部位在免疫反应中起重要作用。在病毒抗原中,可诱发中和抗体的抗原决定簇更小。因而,要想合成疫苗,就要首先了解与免疫活性有关的抗原部位。DNA 重

组技术帮助我们弄清了某些类型的 FMDV 基因的核苷酸一级结构。Sbrohmarer 等人^[1]通过分析 O 型 FMDV-VP1 的酶解和化学裂解片断的免疫学性质证明,诱发 FMDV 中和抗体的部位在 VP1 分子的羧基一边。对于 FMDV-VP1 分子的免疫原性和抗原专一性结构较为透彻的了解,为用化学方法合成 FMDV-VP1 多肽疫苗奠定了基础。

近年来,用化学合成方法制备出了某些 FMDV-VP1 片断的多肽疫苗。Pfoff^[4]按照 FMDV-VP1 基因组的核苷酸序列确定所合成的肽段序列,并合成了含有 16 个氨基酸残基,相当于 FMDV-VP1 144—159 位的氨基酸肽段。把这种合成肽与钥孔碱血蓝素 (KLH) 结合并加用佐剂,可以产生抗 FMDV 的中和抗体,并可特异地识别 FMDV。Bittle 等人^[3]根据从 O 型 FMDV-VP1 基因的核苷酸序列中推算出来的,含有 213 个氨基酸残基的多肽结构,固相法合成了 VP1 的 7 个多肽片断,其中有 4 个邻近 N-端(1—41),1 个位于 C-端(200—213),2 个接近中部区段(141—160)。将这些合成肽与 KLH 偶联,并加用佐剂(福氏佐剂或氢氧化铝胶),结果表明,一次接种 141—160 位合成肽,可激发足够的中和抗体,并使豚鼠耐受 FMDV 的攻击。另一种 201—213 合成肽也能产生中和抗体。对牛、猪的初步研究也证实了上述结果。对另外两个 A 亚型(A₁₁, 亚型 12、A₁₂ 亚型 10)的 FMDV-VP1 141—160 合成肽的试验表明,其同样可以诱导兔产生高水平的中和抗体。

虽然合成肽的免疫原性仅相当于灭活病毒粒子的 1—10%,然而,其诱导的中和抗体滴度却要比衣壳蛋白 VP1 高(无论 VP1 是由病毒粒子裂解产生或由大肠杆菌表达产生)。这可能是由于 FMDV-VP1 的抗原性取决于分子的三维空间折叠状态,而不是氨基酸的线性序列。合成肽在空间构象上,可能比提纯的 FMDV-VP1 更近似于完整的 FMDV 颗粒中的 VP1 蛋白所取的构象^[3]。

146—160 合成肽疫苗一次接种后,就可诱

发动物体内的保护性抗体应答的活性,从而便于供当地预防 FMD 使用。这是明显优于用 DNA 重组技术研制的 MS₂-VP1 和 LE'-VP1 疫苗的一个方面。另外,一般 FMD 疫苗病毒颗粒都是不很稳定的,特别是在 pH 5.0 以下和室温时。相比之下,合成肽疫苗相当稳定,不需低温贮藏。如果把具有不同型或亚型特异性的合成肽偶联到同一个载体蛋白上,还可以制备出多价的 FMD 疫苗。

抗 FMDV 单克隆抗体

自 1975 年英国剑桥大学科学家成功地研制出抗绵羊红细胞单克隆抗体 (MAb) 之后,已广泛使用 MAb 技术研究许多病毒(如马立克氏病毒、马流感病毒、禽肉瘤病毒等)的抗原特性,并相继报道了制备出抗细小病毒的 MAb。1982 年,McCullough 等^[5]首次把 MAb 技术用于另一种细小病毒-FMDV 抗原的研究。先用纯化的 FMDV 146S 病毒颗粒免疫 Balb/c 小鼠,取其脾与 NS1 骨髓瘤细胞融合,经 HAT 选择培养并克隆化以后,获得一些对 FMDV 具有免疫反应性的 MAb。用这些 MAb,可以鉴别 146S 病毒颗粒和 12S 亚基病毒颗粒中相似的抗原部位,也可以鉴别特异的抗原部位。用 MAb 证明,在这两种病毒颗粒表面和内部,至少存在 6 种截然不同的抗原决定簇。因为用纯化的 146S 颗粒接种动物时,可产生抗 12S 颗粒特异的抗原决定簇的 MAb,故认为 146S 颗粒中存在与 12S 颗粒类似的抗原决定簇。MAb 也可用于区别经酸水解 146S 颗粒而得到的 12S 亚基,和感染细胞溶菌产物中经蔗糖密度梯度离心定为 12S 的病毒成分。近年来还发现,抗完整 FMDV 颗粒的中和 MAb,仅同完整病毒、胰酶处理病毒颗粒及其 12S 亚基起免疫反应,而不同 FMDV-VP1 或其它病毒蛋白起反应。从而说明 FMDV-VP1 与完整病毒颗粒具有不同的中和抗原决定簇^[6]。如果把 FMDV-MAb 偶联到葡聚糖凝胶上,制成免疫吸附柱,还可以大量制备具有高纯度、高特异性

(下转铜版页 IV 下)