

# 脊髓灰质炎病毒重组体的构建及其抗原性状分析\*

李琦涵 姜 莉 答云红 赵红玲 郭 仁

(中国医学科学院 中国协和医科大学 医学生物学研究所 昆明 650107)

**摘 要** 以脊髓灰质炎病毒(以下简称脊灰病毒)为载体构建的重组体活病毒可以做为探讨脊灰病毒的抗原结构和特性的有益手段。在构建重组有甲型肝炎病毒小片段抗原多肽的重组脊灰病毒基础上,分析了脊灰病毒 VP1 上中和抗原位点 I 的空间构象特点,并探讨了插入的外源抗原片段对其空间结构的可能影响。

**关键词** 脊髓灰质炎病毒, 重组体, 抗原空间构象

**分类号** R373.2

尽管脊髓灰质炎病毒作为重组病毒载体的研究迄今已进入利用产生缺陷性重组颗粒表达较大外源基因片段的阶段<sup>[1]</sup>,做为第一代的脊灰重组病毒嵌合体——亦即在脊灰病毒 VP1 的抗原位置插入或替代以小片段的外源基因片段所获得的可自身复制的病毒<sup>[2]</sup>,仍然在研究脊灰病毒结构方面有着重要的意义。事实上,早些时候所报道的利用脊灰病毒表达 HIV 的结构蛋白<sup>[3]</sup>、多瘤病毒抗原<sup>[4]</sup>等均在这个方面提供了极有意义的资料。

脊灰病毒具有严格的构象特征,其 VP1、VP2 和 VP3 即在此构象基础上,以不同的三级结构形成的亲水性突环结构在病毒的表面构成其特定的抗原位点<sup>[5]</sup>。但这样的抗原位点在病毒表面的位置分布与其抗原性质是否受其他因素的影响,或者说,当人为地改变其抗原结构或是增加新的抗原结构时,其抗原性质如何变化,仍是一个未知的问题。本文即是利用在脊灰病毒 VP1 中的一个保守区域(VP1 第 166 位氨基酸后),插入一个甲型肝炎病毒(HAV)的抗原片段——其经构象理论分析为 HAV 的主要抗原位点<sup>[6]</sup>,氨基酸序列结构表现为亲水性的 $\beta$ -折叠。重组成的脊灰病毒 cDNA 经转染形成活病毒后,分析其抗原性状。为脊灰病毒的抗原结构与病毒抗原性质关系的研究提供有关的资料。

## 1 材料和方法

### 1.1 脊灰病毒重组体质粒的构建

pSV202 质粒(含脊灰病毒 Mahoney 株全基因 cDNA,来源于 ATCC),以 Aval 内切酶(Bio. Rad)在脊灰病毒全基因上第 2976 位核苷酸处形成单一切口,碱性磷酸酶(Bio. Rad)处理去磷酸化。使用 ABC DNA 合成仪合成下列引物:5'-TCTTACCCCGAGTGCCTTGGCTCCTT-3'; 5'-TATTGTTGGTACTTCGGGCTCATTCTT-3',以 HAVcDNA 质粒 p-2(含

\* 云南省应用基础研究基金(92C115)资助。

收稿日期:1996-08-23

HAV VP4-VP1 结构蛋白基因 cDNA) 为模板, 使用 PCR 技术扩增, 参数为: 95℃ 5min 变性, 92℃ 30s, 56℃ 30s 复性, 72℃ 40s 延伸; 循环周期 30 个, 得到包括 HAV VP3 第 230 位氨基酸至 VP1 第 29 位氨基酸的长为 129 个核苷酸, 并在两端带有 *Ava*I 切点的片段, 经 *Ava*I 酶切后与上述 pSV202 线性 DNA 连接 (图 1) 构建了 pVH 重组体质粒。方法按 Sambrook 的方法进行<sup>[7]</sup>。

## 1.2 脊灰病毒重组体质粒的鉴定

提取 pVH 质粒 DNA, 用 *Ava*I 酶切以确定 pVH DNA 中确实插入 *Ava*I 酶切片段, 然后再以 HAV VP1 第 7~54 位核苷酸片段为探针进行点杂交, 阳性者再以 PCR 方法确定使用上述引物以重组克隆为模板, 相同条件检测其有否 129bp 片段被扩增。方法均按 Sambrook 的方法<sup>[7]</sup>。

## 1.3 脊灰病毒重组体质粒转染细胞

单层 Hep-2 细胞培养于含 10% 牛血清的 DMEM 培养液, 待单层形成至 90% 时弃上清, 以无血清 DMEM 洗五次, TBS (Tris · Cl 10mmol / L pH7.4, NaCl 10mmol / L, KCl 1mmol / L) 洗一次, 加入经柱层析纯化的脊灰病毒嵌合体重组质粒 DNA 20μg (溶于 0.25ml TBS, 4ml 无血清 DMEM 液中) 置 37℃ 保温 1h, 弃上清后加含 5% 小牛血清的 DMEM 液 10ml, 37℃ 5~7d 后观察是否出现病变; 病变细胞冻融, 接种人二倍体细胞 KMB-17 传代扩增。

## 1.4 Western blot 检测 HAV 抗原的表达

转染所得的病毒经扩增后, PEG8000 沉淀纯化, 取  $10^{8.0}$  pfu 病毒量上样 SDS-PAGE 电泳, 同时设立 HAV 对照, 病毒量为  $10^{7.0}$  pfu, 电泳完毕后转至硝酸纤维膜上, 按文献 [7] 进行抗原检测, 所用第一抗体为抗 HAV 疫苗株 H2 株的鼠单克隆抗体, 其识别特异性为 HAV 的 VP1 抗原<sup>[8]</sup>, 第二抗体为兔抗鼠酶标抗体。

## 1.5 HAV-ELISA

使用甲肝病毒检测试剂盒 (来自本所甲肝室) 按标准程序测 HAV 抗原; 使用 IgM 甲肝病毒试剂盒检测抗 HAV 抗体。

## 1.6 中和试验

按文献 [9] 方法用猴抗 HAV 血清和人抗脊灰病毒血清, 标定效价分别为猴抗 HAV 血清 1:2000 人抗脊灰病毒血清 1:3500, 使用原倍血清分别稀释至 1:20 和 1:35, 固定此血清稀释度, 病毒以十倍稀释与此血清混合, 37℃ 中和 1h, 接种人二倍体细胞 KMB-17, 3、7d 观察结果。

## 1.7 动物实验

2.5kg 健康家兔三只, 免疫前分别取血清测其抗 HAV 抗体为阴性, 初次免疫于右后腿肌注射脊灰病毒嵌合体病毒 1ml / 只, 病毒量为  $10^{8.0}$  pfu, 加等量 Freund 不完全佐剂, 二周后静脉加

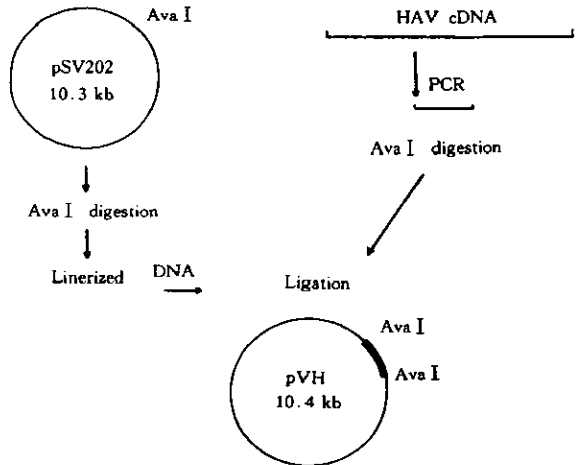


图1 重组体质粒的构建

Fig. 1 Construction of recombinant plasmid

强 0.5ml(无佐剂),四周再静脉取血检测抗脊灰病毒及抗 HAV 抗体产生情况,五周再次静脉加强 0.5ml(无佐剂),六周后再次兔静脉取血检测抗脊灰病毒及抗 HAV 抗体产生情况。

## 2 结果

### 2.1 脊灰病毒重组体质粒的构建

PCR 获得的编码 HAV 部分 VP3 和 VP1 序列的 120bpDNA 片段,包括了理论计算所得的两个 HAV 抗原位点,其分别位于 VP3 和 VP1 上,经纯化、酶切,并与用 *Ava*I 线性化的 pSV202 连接,所得克隆经酶切,PCR 鉴定(图 2-a),再经点杂交证实(图2-b),最后挑选出脊灰病毒嵌合体的三个阳性克隆,分别命名为 pVH-7、pVH-8和 pVH-9。

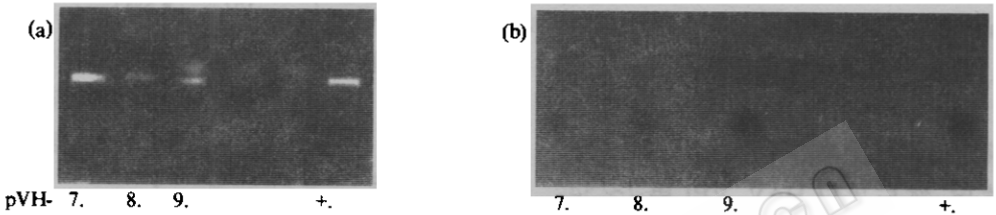


图 2 嵌合体质粒的鉴定

- a. 嵌合体质粒以 PCR 方法检测 HAV 抗原片段的插入,图中可见 pVH-7、pVH-8、pVH-9均呈阳性;
- b. 嵌合体以点杂交方法检测 HAV 抗原的插入,其结果与 a 相同

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid

- a. Detection of HAV antigen fragment inserted in recombinant plasmid by PCR. pVH7, pVH8, pVH9 are positive; b. Detection of HAV antigen fragment inserted in recombinant plasmid by dot hybridization, the result is as same as a.

### 2.2 脊灰病毒重组体质粒转染细胞结果

脊灰病毒重组体质粒 pVH-7和 pVH-9转染 Hep-2细胞后,第六天可见 pVH-7转染的细胞出现 CPE。取其冻融后上清 0.5ml 转种 KMB-17人二倍体细胞(50ml 方瓶)后,三天内即出现典型 CPE,形态与脊灰病毒所致病变相似(图 3),但 pVH-8和 pVH-9转染未成功。

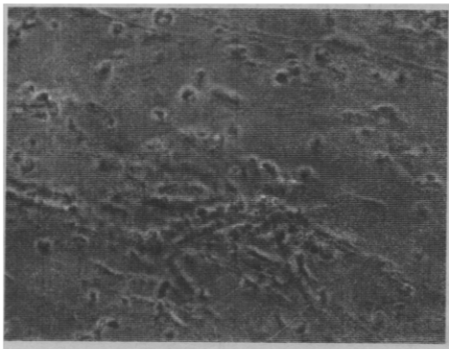


图 3 pHV-7质粒转染 Hep-2细胞病变后,接种人二倍体细胞 KMB-17四天出现的病变情况

Fig. 3 Four day's CPE of KMB-17 cell infected by the chimera virus from the transfected Hep-2 cell with pVH-7 plasmid

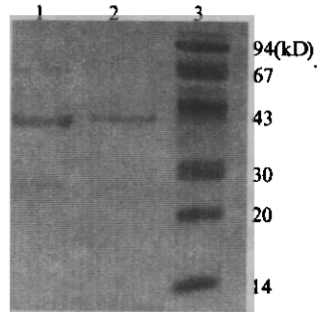


图 4 抗 HAV VP1 单抗在 Western blot 中与嵌合病毒 pVH-7的反应

- 1. HAV 病毒对照; 2. 重组体病毒;
- 3. 蛋白分子量标记物

Fig. 4 Western blot of chimera pVH-7 with anti-HAV VP1 monoclonal antibody.

- 1. HAV control; 2. Chimera pVH-7;
- 3. Protein marker.

2.3 转染所得病毒 CPH-7的 HAV 抗原检测

Western blot分析表明脊灰病毒重组体 CPH-7可以表达 HAV 的 VP1 抗原(图4), 根据与 HAV 对照的比较, CPH-7中 HAV VP1 抗原的表达量较低, 这可能是病毒重组体中仅存在 HAV VP1 的二十余个氨基酸的缘故。

2.4 ELISA 检测 HAV 抗原

未见阳性结果。

2.5 抗脊灰病毒血清和抗 HAV 血清对 CPH-7的中和结果

人抗脊灰病毒血清和兔抗 HAV 血清对 CPH-7嵌合体病毒的结果见表 1。其中令人感兴趣的是: 抗 HAV 的抗体亦可以中和低滴度的嵌合体病毒。

表 1 抗脊灰病毒血清和抗 HAV 血清对 CPH-7嵌合体病毒的中和结果

Table 1 Neutralizations of anti-poliovirus and anti-HAV antibodies to chimera CPH-7

	病 毒 稀 释 度						
	Dilution of virus						
	-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7
Anti-HAV	-	-	-	-	+	+	+
Anti-PV	+	+	+	+	+	+	+
Virus control	-	-	-	-	-	-	-

Anti-PV为抗脊灰病毒血清;

- 为不能中和病毒而出现 CPE, + 为可中和病毒而无 CPE。

Anti-PV: antiserum to poliovirus.

- : unneutralized virus. + : neutralized virus.

2.6 脊灰病毒嵌合体免疫动物后的免疫应答反应

脊灰病毒免疫动物后所能检测到的免疫反应为抗体产生情况对照免疫前的抗 HAV 抗体检测结果, 仅有一只家兔产生了低滴度的抗体, 但三只接受免疫的家兔均产生了较高滴度的抗脊灰病毒抗体。

表 2 动物免疫后抗体产生情况

Table 2 The antibody production of animal immunized

		免 疫 时 间	
		Time of immunization	
		21th day	42th day
Anti-HAV	1	1:2	1:4
	2	0	0
	3	0	0
Anti-PV	1	1:2560	1:5120
	2	1:2560	1:10240
	3	1:2560	1:5120

3 讨论

利用脊灰活病毒表达外源抗原, 早些时候曾受到病毒学界和疫苗界的重视, 因为脊灰

病毒疫苗的安全性、有效性以及对其长期积累起来的丰富的经验和知识,都似乎显示了它作为一种疫苗载体的优点<sup>[9]</sup>。但是这种能够自身复制的活病毒载体,由于严格的壳体结构象,其本身的空间构象是否能够限制外源抗原的表达;并且外源抗原的表达又是否影响做为载体的脊灰病毒的构象和性状,这些问题均无系统的认识<sup>[10]</sup>。Lemon 曾在一项甲型肝炎病毒—脊灰病毒的重组研究中发现<sup>[11]</sup>:在脊灰病毒的中和位点 I 处插入不同的甲肝病毒抗原片段所形成的嵌合体(插入片段最大为 50 余个 bp,最小为 10 余个 bp),除一个插入小片段的嵌合体外,其余虽能成活,但不表达 HAV 抗原。这意味着在脊灰病毒的中和位点处有着严格的抗原构象限制性,或者是脊灰病毒自身的抗原表达有着严格的构象特性;而改变这个构象特性,就无法表现其相应抗原性状。在本项工作中,插入外源片段的位置在 VP1 的第 168 位氨基酸处,而且,插入的甲肝病毒片段据氨基酸序列分析可形成一亲水性的突环<sup>[6]</sup>,因此,最终的嵌合体可能形成一个与脊灰病毒 VP1 上的中和位点 I 相平行的突环结构,从理论上说,此结构应该不影响脊灰病毒的抗原特性,并且外源抗原的表达亦不应受其影响和限制。

这个方式对插入抗原的表达,在本实验的结果中表明是可能的。从 Western blot 的结果可以看到,在这个嵌合体中的甲肝病毒抗原被抗甲肝病毒 VP1 的单抗特异性识别,尽管其量明显较低,但这很可能是因其较小的插入片段所致。在动物免疫实验中,有一只动物被诱发了抗甲肝病毒的低滴度抗体。同时,脊灰病毒的抗原性亦未受到明显影响。当然,ELISA 检测甲肝抗原阴性的结果亦提示,这样一个小片段的插入,并不能让嵌合体显示与甲肝病毒相同的抗原性状。同时,本实验中的一个有趣现象——即抗甲肝病毒抗体可以中和低滴度的该嵌合体病毒(表 1),这似乎意味着抗体对在脊灰病毒中和抗原位点 I 旁插入的甲肝病毒抗原片段的结合,可能影响了该脊灰病毒抗原位点与细胞膜上相应受体的结合,至少在低滴度病毒时可以有此效应。其原因可以理解为:这个结合所形成的免疫复合物从空间结构上屏蔽了脊灰病毒中和抗原位点 I。

由此分析可以发现,在脊灰病毒中和抗原位点旁侧结构部位插入形成新的、有一定大小限制的外源抗原片段突环并使其表达是可能的,但是这个插入的突环结构是否影响脊灰病毒的中和抗原特性则可能取决于多种因素。

## 参 考 文 献

- [1] Porter D C, Ansardi D C, Morrow C D *et al.* *J Virol*, 1995, **69**(3): 1548~1555.
- [2] Burke K L, Dunn G, Fergusin M *et al.* *Nature*, 1988, **332**(6159): 81~82.
- [3] Evans D J, McReating J, Meredith K L *et al.* *Nature*, 1989, **339**(6223): 385~388.
- [4] Jenkins O, Cason J, Burke K L *et al.* *J Virol*, 1990, **64**(3): 1201~1206.
- [5] Hogle J M, Chow M, Filman D J *et al.* *Science*, 1985, **229**: 1358~1365.
- [6] 李琦涵, 李 鸣, 姜 莉, 等. 医学生物学研究, 1989, **2**: 22~25.
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [8] 李琦涵, 董德祥, 陈统球, 等. 中华微生物学与免疫学杂志, 1990, **10**(6): 348~349.
- [9] 黄祯祥, 洪 涛, 刘崇柏. 医学病毒学基础及实验技术. 北京: 科学出版社, 1990.
- [10] Girard M, Altmeyer R, Werf S V D *et al.* *Biologicals*, 1995, **23**: 165~169.
- [11] Lemon S M, Barclay W, Ferguson M *et al.* *Virology*, 1992, **188**(1): 285~295.

## THE CONSTRUCTION OF POLIOVIRUS CHIMERA AND THE ANALYSIS OF ITS ANTIGENITIC STRUCTURE

Li Qihan Jiang Li Zan Yunhong Zhao Hongling Guo Ren

(*Institute of Medical Biology, CAMS. PUMC. Kunming 650107*)

**Abstract** The construction of poliovirus chimera is an useful way to investigate the antigenic structure conformation of poliovirus. In this research, the poliovirus chimera containing a piece of antigenic fragment of hepatitis A virus was constructed for analysis of poliovirus antigenic structure conformation. Depending on the characterization of this chimera, the conformation of poliovirus neutralization antigenic site I in VP1 was analyzed, and that the possible influence of hepatitis A virus antigenic fragment inserted to the structure conformation of poliovirus antigen was also investigated.

**Key words** Poliovirus, Chimera, Antigen conformation