

单位代码：84506

密 级：

武汉生物制品研究所 硕士学位论文

基于痘病毒天坛株的 H5N1 亚型禽流感病毒样颗粒的构建及
其免疫原性分析

申 请 人	邱冉
导 师	杨晓明研究员
学位类别	医学硕士
专业名称	免疫学
研究方向	病毒性疫苗研究
论文起止日期	2017 年 9 月至 2020 年 6 月

二〇二〇年六月

保护知识产权声明

本学位论文作者完全了解武汉生物制品研究所（以下简称武汉所）对研究生在学期间撰写的论文知识产权保护的相关规定。本人撰写的论文是在导师的具体指导下，并得到相关研究经费支持下完成的，其数据和研究成果归属于导师和作者本人，知识产权单位属武汉所。本人保证毕业后，以本论文数据和资料发表论文或使用论文工作成果时署名第一单位仍然为武汉所，任何个人、团体、单位等未经武汉所同意擅自使用本文数据、研究结果或其他相关材料进行论文发表、工业生产等行为武汉所将追究其相关法律责任。武汉所有权保留学位论文及其电子版，有权公布论文的全部或部分内容，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文、汇编以供查阅或借阅。（保密学位论文在解密后适用本声明）

论文作者签字：_____ 签字日期：_____

指导教师签字：_____ 签字日期：_____

独创性声明

本人声明,所呈交的论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知,除了文中特别加以标注和致谢的地方外,论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果,也不包含为获得其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

作者签名:

签字日期:

关于论文使用授权的说明

本人完全了解武汉生物制品研究所关于保留、使用学位论文的规定,有权向国家有关部门或机构送交论文的复印件和磁盘,允许论文被查阅和借阅;可以将论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索,也可以采用影印、缩影或其他复制手段保存论文。

☐公开 ☐保密(____年____月) (保密的学位论文在解密后应遵守此协议)

作者签名:

导师签名:

签字日期:

签字日期:

目录

缩略词表	1
摘要	3
Abstract	5
第一章 前言	8
1.1 流感病毒概述	8
1.2 流感疫苗	9
1.3 病毒样颗粒疫苗	11
1.4 痘病毒天坛株载体	12
1.5 研究目的	12
1.6 技术路线	13
第二章 实验材料	14
2.1 实验用细胞、病毒、菌种	14
2.2 实验用试剂	14
2.3 实验用仪器	15
2.4 主要试剂的配制	17
第三章 实验方法	19
3.1 穿梭质粒 pSCCK 的设计	19
3.2 重组质粒 pSCCK-HA/NA 的构建	20
3.3 重组痘病毒 rVTT-HA/NA 的构建	31
3.4 重组痘病毒 rVTT-HA/NA 的鉴定	34
3.5 病毒样颗粒的表达与纯化	37
3.6 病毒样颗粒免疫原性分析	40
第四章 实验结果	44
4.1 穿梭质粒 pSCCK 结构	44
4.2 重组质粒 pSCCK-HA/NA 的构建与鉴定	46
4.3 重组痘病毒 rVTT-HA/NA 的构建与鉴定	52
4.4 病毒样颗粒的表达与纯化	56

3.5 病毒样颗粒免疫原性分析	59
第五章 总结与讨论	66
5.1 讨论	66
5.2 总结	69
参考文献	70
综述	73
在读期间论文发表情况	84
致谢	85

缩略词表

ATCC	American Type Culture Center Collection	美国典型菌种保藏中心
bp	base pair	碱基对
BSA	Albumin from bovine serum	牛血清白蛋白
DMSO	Dimethylsulfoxide	二甲基亚砷
DNA	deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
dNTP	deoxyribonucleotide triphosphate	脱氧核糖核苷三磷酸
E.coli	Escherichia coli	大肠杆菌
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay	酶联免疫吸附实验
ELISPOT	Enzyme Linked Immunospot Assay	酶联免疫斑点实验
FBS	Fetal Bovine Serum	胎牛血清
h	hours	小时
HA	Hemagglutinin	血凝素
HI	Hemagglutination inhibition	血凝抑制
HRP	Horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
IgG	Immunoglobulin G	免疫球蛋白 G
kD	kilodalton	千道尔顿
LB	Luria-Bertani Medium	LB 培养基
M	Marker	标准参照
MDCK	Madin-darby canine kidney	狗肾细胞
mg	milligram	毫克
min	minute	分钟
mL	milliliter	毫升
MOI	multiplicity of infection	感染复数

NA	Neuraminidase	神经氨酸酶
NIBSC	National Institute for Biological Standards and Control	英国国家生物制品检定所
nm	Nanometer	纳米
OD	Optical density	吸光度
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
PBS	Phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液
PCR	polymerase chain reaction	聚合酶链反应
RDE	Receptor-Destroying Enzyme	受体破坏酶
Rpm	rounds per minute	转/分
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction	反转录聚合酶链反应
SDS	sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠
SFM	Serum-free medium	无血清培养基
SRID	Single radial immunodiffusion	单向免疫扩散
TCID ₅₀	Tissue culture infective dose	半数组织培养感染剂量
VLPs	Virus-like particles	病毒样颗粒
VTT	Vaccinia virus TianTan	痘病毒天坛株
WB	Western Blotting	免疫印迹
WHO	World Health Organization	世界卫生组织

基于痘病毒天坛株的 H5N1 亚型禽流感病毒样颗粒的构建及其免疫原性分析

摘要

流感病毒 (Influenza virus) 是流行性感冒病毒的简称, 属于正粘病毒科 (Orthomyxoviridae), 分为甲 (A)、乙 (B)、丙 (C)、丁 (D) 四型, 可引起人、禽、猪、马、蝙蝠等多种动物感染和发病。禽流感 (Avian influenza) 就是一种由甲型流感病毒引起的传染病, 这种传染病不仅可在鸟类、禽类中快速传播, 还可感染人类。H5N1 亚型属于高致病性禽流感病毒, 在 1997 年首次被发现可以感染人类, 截至目前, 已经有近千例 H5N1 感染患者, 且死亡率高达 50% 以上, 给人类健康和社会经济带来了巨大的影响和损失。

流感疫苗是当今社会对于流感防控最经济、最有效的手段。但是如今市场上销售的流感疫苗主要是以鸡胚基质为主的流感病毒灭活疫苗, 传统鸡胚工艺具有很强的局限性, 尤其当流感爆发甚至形成大流行时, 鸡胚生产周期长, 鸡胚的供给不足会成为限制疫苗大量生产的主要因素。病毒样颗粒 (Virus-like particles, VLPs) 是含有病毒结构蛋白的空心颗粒, 不含病毒基因组, 具有更高的安全性, 且与全病毒疫苗颗粒结构相似, 可以诱发机体较强的免疫作用, 并且病毒样颗粒主要通过体外细胞表达, 不依赖于鸡胚的生产系统。

痘病毒天坛株是上世纪中国用于预防天花的疫苗株, 同时也非常适合作为外源蛋白的表达载体。它基因组巨大, 非必需基因多, 可容纳较长的外源基因片段; 宿主范围广泛, 可在多种不同细胞系内扩增; 安全性高, 有长期的人体应用历史。

本研究的目的是以痘病毒天坛株为表达载体, 在 Vero 细胞内表达 H5N1 亚型禽流感 VLPs, 并通过免疫小鼠对其免疫原性进行分析。首先设计并构建了含 H5N1 病毒 HA、NA 基因的重组痘病毒穿梭质粒 pSCCK-HA/NA, 利用 pSCCK-HA/NA 转染预先感染了痘病毒天坛株的 Vero 细胞, 经过多轮荧光筛选后成功获得表达 H5N1 亚型禽流感病毒 HA、NA 蛋白的重组痘病毒 rVTT-HA/NA, Western blot 鉴定 HA、NA 蛋白表达正确。通过蔗糖密度梯度离心纯化获得病毒样颗粒, 电镜下可以看到形态大小与 H5N1 病毒类似的颗粒, 经 Lowry 法测定

纯化后的 VLPs 总蛋白含量为 93.49 $\mu\text{g/mL}$ ，经 SRID 测定 HA 蛋白含量为 24.58 $\mu\text{g/mL}$ 。以 VLPs 剂量 1 $\mu\text{g/只}$ 、5 $\mu\text{g/只}$ 、10 $\mu\text{g/只}$ 对小鼠进行免疫，同时以 H5N1 全病毒灭活疫苗剂量 1 $\mu\text{g/只}$ 免疫组作为阳性对照。体液免疫结果表明：5 $\mu\text{g/只}$ 、10 $\mu\text{g/只}$ 剂量组血清抗体中和活性均大于 1:40，10 $\mu\text{g/只}$ 剂量组最高可以达到 1:180，且在第八周的中和活性与全病毒灭活疫苗组相当；ELISA 检测 IgG 抗体，三剂量组在加强免疫后均可看到 IgG 效价的明显升高，且效价维持平稳，至第八周未见明显下降。细胞免疫结果表明病毒样颗粒三个剂量组所诱发的脾脏 $\text{CD8}^+\text{T}$ 细胞比例均高于全病毒灭活疫苗组，脾脏分泌细胞因子 $\text{IFN}\gamma$ 的淋巴细胞比例也比全病毒灭活疫苗组高，证明病毒样颗粒诱发的细胞免疫效果较强。本研究为新型病毒样颗粒流感疫苗的研发提供了一定的基础。

关键词：H5N1；病毒样颗粒；痘病毒天坛株；免疫原性

Construction of H5N1 Avian Influenza Virus-like Particles based on vaccinia virus Tiantan and Immunogenicity Analysis

Abstract

Influenza virus belongs to Orthomyxoviridae, and is divided into four types (A, B, C, D). It can cause infections and diseases in human, poultry, pigs, horses, bats and other animals. Avian influenza is an infectious disease caused by influenza A virus, which can not only spread rapidly among birds and poultry, but also infect humans. The H5N1 subtype is a highly pathogenic avian influenza virus, which was first found to be capable of infecting humans in 1997. So far, there have been nearly 1,000 cases of H5N1 infection with a mortality rate of more than 50%, leading to huge impact and losses on human health and economic.

At present, influenza vaccination is still the most effective and economical means to prevent influenza, but most of the flu vaccines on the market today are inactivated vaccines derived from chicken embryo. The traditional technique of these vaccines has many limitations, such as the preparation period of chicken embryo is long and the supply of chicken embryo is insufficient, especially during a pandemic, which may affect the timely availability of influenza vaccines. Therefore, the establishment of a rapid influenza vaccine research and production platform is crucial to the prevention and control of influenza. Virus-like particles (VLPs) are hollow particles containing viral structural proteins. Without virus genome, VLPs have higher safety, and the particle structures are similar to those of whole virus vaccines, which can induce stronger immune effect in the body. VLPs do not depend on the production system of chicken embryo and adopts in vitro cell culture.

Vaccinia virus Tiantan strain is a vaccine strain used for the prevention of smallpox, and is also very suitable for the expression of exogenous proteins. It has a large genome, many non-essential genes, so it can contain long exogenous gene fragments.

The host range is wide and can be amplified in many different cell lines. Vaccinia virus Tiantan replicates in cytoplasm and is of high safety, with a long history of human applications.

In this study, vaccinia virus Tiantan strain was used as the expression vector to express VLPs in mammalian cells, and its immunogenicity was analyzed by vaccination in mice. Firstly, the recombinant vaccinia virus shuttle plasmid pSCCK-HA/NA was designed and constructed. Then the shuttle plasmid was co-transfected with vaccinia virus Tiantan strain into Vero cells. After several rounds of fluorescence screening, recombinant virus rVTT-HA/NA expressing the HA and NA proteins of H5N1 avian influenza virus was successfully obtained. The expression of HA and NA proteins was confirmed by Western blot. Virus-like particles were obtained by sucrose density gradient centrifugation and purification, particles similar in shape and size to H5N1 can be seen under an electron microscope. The total protein content was 93.49 $\mu\text{g/mL}$ measured by Lowry method and HA protein content was 24.58 $\mu\text{g/mL}$ measured by SRID. The mice were divided into three groups (1, 2, 3), and each group was vaccinated with VLPs doses of 1 μg , 5 μg , and 10 μg each mouse respectively. At the same time, H5N1 whole virus inactivated vaccine (1 $\mu\text{g}/\text{mouse}$) was used as positive control. The results of humoral immunity showed that the neutralization activity of serum antibody was greater than 1:40 in the 2 and 3 groups. The titer of the third group reached to 1:180, and was comparable to that of the whole virus inactivated vaccine group at week 8. The titer of IgG detected by ELISA was significantly increased in all three groups after enhanced immunization, and the titer remained stable, with no significant decrease until the eighth week. The results of cellular immunity showed that the proportions of spleen $\text{CD8}^+\text{T}$ cells induced by virus-like particles in three groups were higher than that of the positive control, and the proportion of lymphocytes secreting cytokine IFN in the spleen was also higher than the positive control, which proved that virus-like particles induced stronger cellular immunity. This study can provide a foundation for the development of new virus-like particles influenza vaccine.

Key words: H5N1; Virus-like Particle; Vaccinia virus Tiantan; Immunogenicity

第一章 前言

1.1 流感病毒概述

流感病毒 (Influenza virus) 是流行性感冒病毒的简称, 属于正粘病毒科 (Orthomyxoviridae), 为单股负链的多节段 RNA 病毒。大小在 80~120nm 之间, 电镜下流感病毒为球形带刺突状的囊膜病毒。流感病毒共有八个多节段基因, 分别编码血凝素 (HA)、神经氨酸酶 (NA)、基质蛋白 (M)、核蛋白 (NP)、以及三种多聚酶蛋白 (PB1、PB2、PA) 和非结构蛋白 (NS)。流感病毒由包膜、基质蛋白及核心三部分组成, 在电镜下可观察到的外层包膜上的蛋白突起即为 HA 和 NA; 基质蛋白主要为 M1 蛋白, 构成病毒的框架, 与病毒核糖核蛋白 (RNP) 的核心部分连接; 病毒的核心部分由 PB1、PB2、PA、NP 及病毒 ssRNA 基因组组成^[1, 2]。HA 和 NA 是流感病毒最重要的毒力蛋白及表面抗原, 病毒通过 HA 与呼吸道上皮细胞表面的唾液酸-半乳糖受体结合, 从而与宿主膜融合; NA 有助于病毒从感染细胞中的释放, 具有催化活性, 可以为要出芽的病毒清理通道^[3]

流感病毒分为甲、乙、丙、丁 (A、B、C、D) 四个亚型, 其中甲型流感病毒可以在人类以及多种动物中传播, 包括禽类、猪、狗等等, 乙型流感病毒除了人类以外, 目前的证据仅发现可感染海豹^[4], 而丙型流感病毒的感染症状很弱, 只会引起轻微的上呼吸道感染, 目前尚未有证据证明丁型流感病毒会感染人类。甲型流感病毒宿主范围广, 可跨种传播, 且血清型众多, 到目前为止 HA 有 18 个亚型 (H1-H18), NA 有 11 个亚型 (N1-N11)^[5], 曾在历史上引起多次世界大流行, 造成的损失和伤害不可估量。

流感病毒的表面抗原 HA 和 NA 容易变异, 变异主要有两种形式: 抗原性转变和抗原性漂移。抗原性漂移一般是点突变, 是亚型范围内的抗原改变, 变异幅度较小, 具有连续性, 可能引起一些季节性流行性感冒; 而抗原性转变主要是由于基因重组, 产生的变异幅度大, 可形成新的亚型, 此时人群对它的免疫力较低甚至没有免疫力, 因此很容易造成大范围乃至世界范围的流行^[6]。

第一株甲型流感病毒于 1933 年分离得到^[7], 然而在此之前, 流感病毒就已经大范围的爆发过了, 历史上记载了多次流感病毒引起的世界范围内的大流行, 造成了不可估量的损失^[8]。最为严重的一次流感的大流行为 1918 年“西班牙大流

感”，由 H1N1 病毒引发，造成世界范围内的数亿人次感染，近 5000 万死亡，对经济，民生影响惨重，乃至使第一次世界大战提前结束，影响了世界格局的变化^{[[9, 10]]}。随着经济与科技发展，世界的高度全球化为病毒的流行提供了更有利的条件，2009 年甲型 H1N1 流感病毒的爆发是很好的例子，病毒最先出现在美国，随后快速蔓延全球，最终造成超过 6000 万人感染，超过一万人死亡^{[[11]]}。乙型流感病毒只感染人，但由于其变异性显著弱于甲型流感病毒，所以常引起局限性流行^{[[12]]}。

尽管甲型流感和乙型流感的临床症状很像，但两种病毒感染的住院率不同，甲型病毒感染造成的住院率显著高于乙型。流感病毒的主要传播途径是气溶胶传播、飞沫传播、接触传播，常在天气寒冷的季节爆发。临床上主要导致以发热、咳嗽等症状为主的急性呼吸道传染病，严重时可出现肺炎，呼吸衰竭，多脏器衰竭甚至死亡^{[[13]]}。据统计，每年全球约有 5%~15% 的人口会感染流感病毒，产生 300 万~500 万的严重病例以及约 50 万的死亡病例，对社会造成严重影响。

1.2 流感疫苗

人类为了应对流感病毒造成的季节性流感以及大流行型流感，已经开发了多种方法，包括疫苗和抗病毒药物。有效的流感疫苗可以在疾病流行前完全抑制住病毒的爆发，因此接种流感疫苗目前是预防流感病毒最有效并且最经济的手段。目前在世界范围内不同国家和地区已经得到批准的三种疫苗是灭活疫苗、减毒活疫苗和亚单位疫苗。这三种疫苗都必须定期更换种子毒株，使疫苗的抗原性可以与当年流行的流感病毒相匹配，起到有效的预防作用。世界卫生组织每年都会举办两次会议，公布当年南半球及北半球的流行毒株，这是疫苗生产商最重要的参考。

1. 灭活疫苗

灭活疫苗是流感病毒在鸡胚中培养传代后经灭活以及纯化制成的，它的生产成本相对较低且安全性较高，可以接种 6-12 个月的婴儿。灭活疫苗的使用非常普遍，但由于疫苗产生的保护性持续时间不长，所以每年都要接种^{[[14]]}。灭活疫苗包括全病毒灭活疫苗、病毒裂解疫苗及亚单位疫苗。

全病毒灭活疫苗是病毒颗粒经甲醛或 β -丙内酯化学灭活后纯化制成的。而裂解疫苗则是用乙醚或去污剂破坏病毒囊膜上的脂类成分，保留结构蛋白。亚单位疫苗通过进一步纯化去除了病毒的核糖核蛋白、M1 蛋白以及病毒囊膜等成分，疫苗主要含有 HA 蛋白及 NA 蛋白。相比全病毒灭活疫苗，裂解病毒疫苗及亚单位疫苗的免疫原性较低，保护范围更窄，但由于接种后的不良反应更少，它们在人群中的使用更为普遍，尤其是在老人和儿童中。

灭活疫苗存在一个关键问题，流感病毒疫苗株最初在鸡胚中的复制能力较弱，所以需要在鸡胚中经过多次连续传代，才能获得足够的滴度，但过度的传代可能会导致 HA 蛋白发生变异，改变了疫苗株的抗原性，影响最终疫苗的保护作用。同时，鸡胚的供应等问题也会制约灭活疫苗在流感大流行时的应用，因为在短时间内的大量生产的难度较大。为了避免 HA 在鸡胚中的适应性突变以及鸡胚供应存在的短板，可以使用培养的细胞系如 MDCK 细胞或 Vero 细胞繁殖病毒^[15]，然而疫苗种子毒株在无血清或无动物成分的培养条件下，在悬浮细胞及生物反应器中的病毒滴度低于鸡胚中培养的滴度，导致生产率偏低，生产成本低，这也是目前细胞基质培养的灭活疫苗的发展受限的原因。

2. 减毒活疫苗

减毒活疫苗目前已经在美国、加拿大和一些欧洲国家获批使用了。减毒活疫苗是冷适应且温度敏感型的弱毒株在鸡胚中的传代增殖后获得的。用野生毒株感染鸡胚后，在 25-30℃ 的低温条件下培养传代，在多次传代后，即可获得冷适应性流感病毒供体，再将其与表达靶 HA、NA 的毒株重组，经过筛选即可获得冷适应性流感疫苗毒株^[16]。由于机体的下呼吸道温度较高，因此病毒无法在此复制，但可在温度较低的上呼吸道复制，引发机体的免疫应答。减毒活疫苗可以通过鼻腔接种，刺激鼻腔粘膜产生特异性 IgA 抗体，可以针对其他亚型病毒发挥交叉保护作用^[17]。

3. 重组 HA 疫苗。

重组 HA 疫苗是利用昆虫细胞和杆状病毒重组蛋白表达系统生产的^[18]，已经获得了美国食品和药品监督管理局（FDA）的批准在美国使用。该系统不使用活病毒，HA 蛋白通过表达获得，不会引入活病毒在鸡胚中传代时产生的突变。此外，重组疫苗可以在两个月内制成，可以用于预防大流行性流感病毒。虽然该疫

苗的作用机制和灭活疫苗相似,但重组 HA 疫苗的血凝素含量是灭活疫苗的三倍,可以诱导与常规灭活疫苗相当的抗体效价^[19]。由于所获得的免疫作用有 HA 特异性以及毒株特异性,重组 HA 疫苗需要经常更新来应对不同的流行株。

1.3 病毒样颗粒疫苗

病毒样颗粒是含有病毒的一个或多个结构蛋白的空心颗粒,其形态结构与天然的病毒颗粒相似,但没有病毒的核酸,因此不能自主复制,也不具有感染性。由于它具有与全病毒疫苗相似的颗粒,因此也可以诱发机体较强的免疫作用。有研究表明,流感病毒样颗粒疫苗在小鼠体内诱导的免疫保护作用强于灭活疫苗或者重组 HA 疫苗。且多联流感病毒样颗粒疫苗可以同时针对不同病毒起到多重保护作用。病毒样颗粒分为无囊膜的和有囊膜的病毒样颗粒。无囊膜病毒样颗粒是由一种或几种病毒主要结构蛋白自我组装成的颗粒,颗粒中不含任何宿主细胞成分^[20];而有囊膜的病毒样颗粒的囊膜来源于宿主的细胞膜,膜表面嵌合许多靶抗原,囊膜型病毒样颗粒可以同时表达同源或者异源的多种抗原^[21]。

病毒样颗粒常用的表达系统主要包括:细菌表达系统、酵母表达系统、重组杆状病毒-昆虫细胞表达系统、哺乳动物细胞表达系统以及植物细胞表达系统。细菌表达系统应用广泛,但缺少蛋白翻译后修饰,因此不适合用于表达病毒样颗粒。酵母表达系统的蛋白质糖基化修饰不同于哺乳动物细胞的蛋白质翻译后修饰,因此常用于表达无囊膜的病毒样颗粒。默克公司已经有多种批准上市的酵母表达系统生产的病毒样颗粒疫苗,如 HBV 疫苗 Recombivax 和 HPV 疫苗 Gardasil。重组杆状病毒-昆虫细胞表达系统相比起其他表达系统有更好的适用性,能够进行真核细胞的蛋白质翻译后的糖基化修饰,且可以高效表达外源蛋白,并且不含哺乳动物细胞成分,因此用于表达多种病毒的病毒样颗粒,包括有囊膜和无囊膜的。但表达的病毒样颗粒可能混有杆状病毒成分,因此在后期纯化方面需要进一步优化。哺乳动物细胞表达系统最大的优点是能够进行复杂的蛋白质翻译后修饰,可以在内质网上进行组装和折叠,产生与天然结构相似的病毒样颗粒,因此有更强的免疫原性,但它存在一定的安全隐患,且生产成本较高。植物细胞表达系统是一种新型表达系统,生产成本低且表达效率高,同时还具有与哺乳动物细胞表达系统类似的蛋白质折叠组装和修饰系统。

1.4 痘病毒天坛株载体

痘病毒属于痘病毒科正痘病毒属，是有囊膜的 DNA 双链病毒。痘病毒的复制和增殖都在宿主细胞的细胞质中进行。痘病毒基因组大小约为 185-200Kbp，含有两百多个开放阅读框，基因组的两端变异程度大，主要为毒力基因，而基因组的中部为高度保守区。痘病毒曾经作为天花疫苗广泛地用于世界各国，在天花病毒的消灭上功不可没。

痘病毒天坛株是我国科学家上世纪分离出的一株疫苗株，由天花病毒在动物上连续传代获得。相比其他痘病毒株，痘病毒天坛株基因组的两端有大片段的缺失和插入，因此痘病毒天坛株的毒力较弱，副作用弱，上世纪在中国被广泛地接种用于预防天花，对中国消灭天花病毒起到了决定性的作用。

痘病毒宿主范围广，基因组容量大，非必须基因多，可以允许插入较长的外源基因片段，且有长期的人体应用历史，安全性高，因此非常适合用做载体表达外源蛋白，同时其自身也可作为疫苗载体。

1.5 研究目的

目前传统灭活疫苗存在诸多缺点，如依赖鸡胚生产系统，容易在大流行时供应不足；疫苗株需多次传代，容易发生适应性变异，影响疫苗的有效免疫原性等情况。因此本研究尝试用病毒表达载体痘病毒天坛株在 Vero 细胞内表达流感病毒样颗粒，并通过蔗糖密度梯度离心对其进行初步纯化，再用病毒样颗粒免疫小鼠评价其免疫原性，从而为研制新型流感病毒样颗粒疫苗奠定一定的基础。

1.6 技术路线



第二章 实验材料

2.1 实验用细胞、病毒、菌种

MDCK (Madin-Darby canine kidney) 细胞：引自美国 ATCC, CCL-34 株，由本实验室冻存。

Vero 细胞：引自美国 ATCC，由本实验室冻存。

H5N1 亚型禽流感病毒疫苗株 NIBRG-14：购自英国国家生物制品检定所 (NIBSC)，为 WHO 推荐的禽流感毒株，是由 A/VietNam/1194/2004 与 PR8 株重配而成。

痘病毒天坛株 VTT (Vaccinia virus TianTan)：由中国食品药品检定研究院馈赠。

大肠杆菌感受态细胞 DH5 α ：购自宝生物工程有限公司。

2.2 实验用试剂

名称	货号	厂家
DMEM 培养基	41500	GIBCO
0.25%trypsin-EDTA	25200	GIBCO
进口胎牛血清	10099	GIBCO
VP-SFM 培养基	12559	GIBCO
二甲基亚砜 (DMSO)	1784031	Merck
碳酸氢钠	S5761	Sigma
LB 培养基	R6546	Gibco
氨苄青霉素	2338B298	Amersco
琼脂糖	5264	Takara
GelRed 核酸染料	A616697	生工
病毒基因组提取试剂盒	9766	Takara
高保真反转录试剂盒	R022A	Takara
DNA 凝胶回收试剂盒	9762	Takara
DNA marker	B500350	生工
Phusion DNA 聚合酶	P534	Promega 公司
DNA loading buffer	4325	Takara
SalI 快切酶	1636	Takara
SmaI 快切酶	1629	Takara

BamHI 快切酶	1605	Takara
XhoI 快切酶	1635	Takara
T4DNA 连接酶	2011A	Takara
感受态细胞 DH5 α	1268	Takara
小提质粒试剂盒	9760	Takara
中提质粒试剂盒	9783	Takara
转染试剂盒	Lipo3000	Invitrogen
中性红	6546	生工
结晶紫	G45356	生工
12%预制胶	N00669	金斯瑞
蛋白 marker	M00624	金斯瑞
4X 蛋白 loading buffer	M4577	金斯瑞
BSA	M7783	金斯瑞
小鼠抗 HA 抗体	BDKT0329	博奥龙
小鼠抗 NA 抗体	BDKT0411	博奥龙
HRP-羊抗小鼠二抗	Q1739	博奥龙
DAB 显色试剂盒	MK210	Takara
甲醇	20080108	天津市天大化学试剂厂
考马斯亮蓝 G250	Fdsh123	武汉兴华柏茂
吐温-20	F990820	中国医药集团上海化学试剂公司
蔗糖	2302601	Amersco
淋巴细胞无血清培养基	DKW34-R0100	达科为
小鼠淋巴细胞分离液	DKW33-R0100	达科为
预包被 IFN- γ ELISPOT 试剂盒	DKW22-2000-048	达科为

2.3 实验用仪器

名称	货号	厂家
电热恒温干热灭菌箱	SJHX-03AC,	黄石市恒丰医疗器械有限公司
脉动真空灭菌柜	XG1.0	山东新华医疗器械股份有限公司
二氧化碳水套培养箱	Model: 3111	美国 Thermo 公司
冷冻离心机	Centrifuge 5810R	德国 eppendorf 公司
普通冰箱	225E	海尔
低温冰箱-70℃	Model 702	Thermo 公司
生物安全柜	SW-CJ/BSC-IIA2	苏净安泰公司
倒置显微镜	090-122 型	德国徕卡公司

液氮罐	YNZ-35-50	四川亚西机器厂
微波炉	WD900	格兰仕
生化培养箱	SPX-250BSM- II 型	上海新苗医疗器械制造有限公司
酶标仪	Sunrise F039300 型	Austria
电热恒温水浴箱	DK-S22 型	上海精宏实验设备有限公司
分析天平	Toledo AL204	美国梅特勒托利多公司
pH 计	pH10	德国 Sartorius
震荡仪	PCB08	德国 eppendorf
磁力搅拌器	C-MAG, HS7	意大利 IKA
细胞程序降温盒	1℃/min, 18 只	美国 Nalgene 公司
细胞培养板	6 孔、96 孔	美国 Corning 公司
细胞培养摇瓶	150mL、250mL、500mL、 1000mL	美国 Corning 公司
细胞培养方瓶	T25、T75、T175	美国 Corning 公司
细胞冻存管	2mL	美国 Corning 公司
EP 管	1.5mL、5mL	德国 greiner bio-one 公司
0.22μm 微孔滤膜	PN4612	PALL
离心管	15mL、50mL	美国 Corning 公司
超高速离心机	Hitachi	日本日立公司
台式冷冻离心机	Centrifuge 5417R	德国 eppendorf
恒温台式摇床	TS-2 型	海门市其林贝尔仪器制造有限公司
游标卡尺	S5-5220	哈尔滨量具有限公司
微量移液器	20、100、1000μL	德国 eppendorf 公司
PCR 仪	Biometra	BIO-RAD
水平 DNA 电泳槽	DF-22D 型	北京六一仪器厂
垂直蛋白电泳槽	DYCZ-40D 型	北京六一仪器厂
电泳仪	DYY-6C 型	北京市六一仪器厂
硝酸纤维薄膜	LC2000	Invitrogen
血细胞计数板		浙江玉环县五金光学仪器厂
紫外分光光度计	GeneRay UV-Photometer 型	Biometra 公司
凝胶成像系统	ImageQuant 300	GE
荧光显微镜	Evos7000	赛默飞
流式细胞仪		华中科技大学同济医院分子生物中心
透射电镜	HITACHI H-8100	中科院武汉病毒研究所

2.4 主要试剂的配制

2.4.1 细胞培养液

高糖 DMEM 培养液：称取 12.4g 高糖 DMEM 粉末于 1L 蓝盖瓶中，加入注射用水 500mL，待充分溶解后按说明加入 NaHCO_3 3.7 g/L，然后用 1 mol/L HCl、1 mol/L NaOH 调节 pH 至 7.1，待充分溶解后用注射用水定容至 1 L，在无菌条件下，用 0.2 μm 滤膜正压过滤，4℃避光保存备用，有效期 3 个月。

细胞生长液：高糖 DMEM 培养液加入 10% FBS。

痘病毒维持液：高糖 DMEM 培养液加入 2.5% FBS。

2.4.2 细菌培养基

LB 液体培养基：称取胰蛋白胨 10g，酵母提取物 5.0g，NaCl 10g，加入注射用水溶解，5M NaOH 调节 pH 至 7.0，然后定容到 1 L，高压蒸汽灭菌(0.12 Mpa，121℃，30 min)，灭菌完成的培养基室温放置，待不烫手后加入氨苄青霉素 (100 $\mu\text{g/mL}$)；

LB 固体培养基：称取 LB 粉末于蓝盖瓶中，加入适量注射用水溶解，每 100mL LB 培养基中加入 1.5 g 琼脂，高压蒸汽灭菌 (0.12 Mpa，121℃，30 min)，灭菌完成的培养基室温放置，待不烫手后加入氨苄青霉素 (100 $\mu\text{g/mL}$)，然后倒入平板中。

2.4.3 PH7.4 磷酸盐缓冲液 (PBS)

称取 2.0 g KCl，80.0 g NaCl，29.0 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ，2.0 g KH_2PO_4 加入大力瓶中，用适量注射用水溶解，待充分溶解后，用注射用水定容至 10 L，过滤除菌或 121℃ 30 min 高压灭菌备用。

2.4.4 1%鸡红细胞的制备

用 2mL 注射器于鸡翅静脉处取 1.5 mL 鸡血溶于 100 mL PBS 中，应拔下针头快速注射，以防溶血，将 PBS 分装于 15 mL 离心管中，4℃ 1000 rpm/rim 离心 10 min，倾去上清液，加入新鲜 PBS 复溶沉淀的红细胞，再依据上述方法离心 2 次，最后一次离心后取压缩的红细胞沉淀溶于 10 倍体积的 PBS 中，即为 1%鸡红细胞，4℃保存备用，一周内使用。

2.4.5 电泳相关试剂

50× TAE 电泳缓冲液：Tris-base 242 g，EDTA 37.4 g，加入冰乙酸 57.1 mL，溶于 900 mL 双蒸水中，放入 60℃ 水浴中，直至完全溶解，再用双蒸水补齐至终体积 1000 mL，放置于室温保存；

1% 琼脂糖：称取琼脂糖粉 1 g，加 1× TAE 100 mL，微波炉加热至沸腾使琼脂糖粉完全溶解。

2.4.6 SDS-PAGE 及 Western Blot 相关试剂

10× SDS 电泳缓冲液：称取甘氨酸 144 g，Tris-base 30 g，SDS 10 g，溶于 1 L 双蒸水中，即为 1.92 M 甘氨酸，0.25 M Tris-base，1% SDS 的电泳缓冲液。4℃ 保存，使用前 10 倍稀释；

10×转移缓冲液：称取甘氨酸 144g，Tris-base 30g，溶于 1L 双蒸水中，即为 10×的电转移缓冲液，用前按比例稀释且补加 20%甲醇；

0.01 mol/L PBS-T: 0.05% PBS-T, 将 0.5 mL Tween-20 加于 1000 mL 0.01 mol/L PBS 中；

1% BSA: 称取 1 g 的 BSA，溶于 100 mL 的 0.01 mol/L 的 PBS-T 中，现用现配。

第三章 实验方法

3.1 穿梭质粒 pSCCK 的设计

通过 HindIII 酶切鉴定,痘病毒基因组包括 16 个 HindIII 片段,根据片段大小由 A-P 排序,基因组含有大约 200 个开放性阅读框(Open reading frame, ORF),不同阅读框的功能不同,可在病毒复制周期的不同时间段表达,对病毒复制和形态发生具有精确的调控作用。在这 200 ORFs 中,有 90 个相对保守,这些阅读框主要分布于基因组中间,是痘病毒复制增殖所必需的基因。而其它 ORFs 则在不同毒株中变化较大,是痘病毒非必需基因,其中包括宿主范围相关基因、毒力相关基因和免疫调节基因等,这些相对多变的基因决定了不同痘病毒分离株的特性,如在不同宿主中的生长动力学、毒力大小和免疫原性等^[22]。痘病毒天坛株基因组结构见图 3.1^[23]。

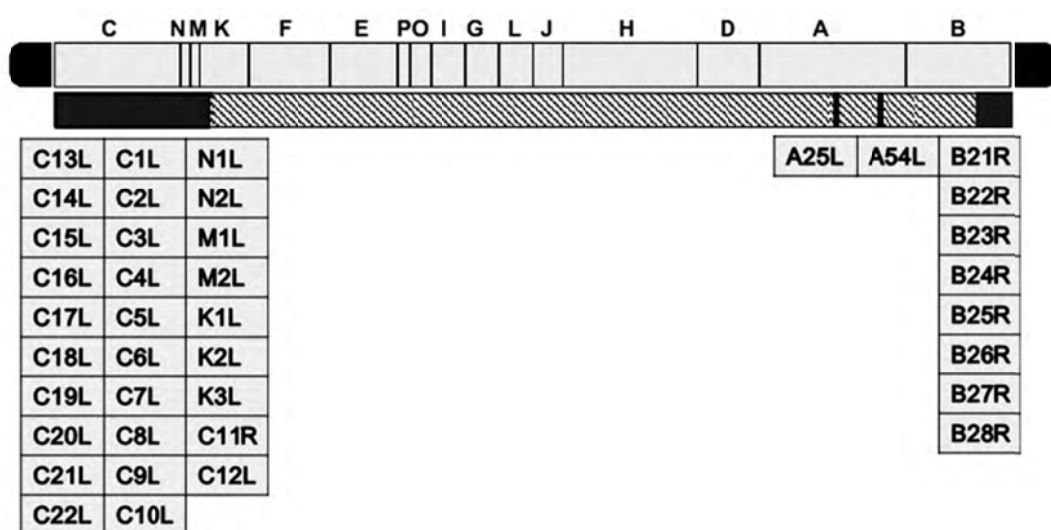


图 3.1 痘病毒天坛株基因组结构

Fig.3.1 Genomic Structure of VTT

本课题通过对痘病毒天坛株基因组的分析,选择痘病毒天坛株基因组 CK 区作为同源重组区段插入外源基因,表达外源蛋白。CK 区基因功能主要为免疫调节、宿主范围和毒力决定基因。分析 C7L-K2L 所在痘病毒天坛株基因组的位置及上下游序列,选择 C7L 左侧一段约 500 kb 的序列作为上游同源重组臂 CKL;选择 K2L 区右侧一段约 1000 kb 的序列作为下游同源重组臂 CKR。

由于同源重组臂的存在,在穿梭质粒 pSCCK 与痘病毒天坛株共转染细胞时,质粒可以与痘病毒天坛株基因组发生同源重组,将上下游同源臂间的序列转入痘病毒天坛株基因组 CK 区,构建重组痘病毒。

穿梭质粒选择 pSC65 质粒的骨架,在上下游同源重组臂之间选用反向排列的痘病毒特异性启动子 pE/L 及 p7.5 用于启动两个外源基因的表达,并分别在两启动子下游引入多克隆位点,便于外源基因的插入。选择增强绿色荧光蛋白 (Enhanced Green Fluorescent Protein, EGFP) 基因作为筛选标记,用于后期重组痘病毒的筛选,在荧光蛋白上游引入启动子 pE/L,控制荧光蛋白的表达。质粒 pSCCK 交由上海生工生物工程股份有限公司合成。

3.2 重组质粒 pSCCK-HA/NA 的构建

3.2.1 细胞复苏

- (1) 取 8.5 mL 细胞生长液(含 10% FBS 的高糖 DMEM 培养液)于 37℃ 预热;
- (2) 事先准备好 37℃ 水浴,快速地把细胞冻存管从液氮罐中拿出,放入 37℃ 水中,静置到细胞完全融化;
- (3) 将融化后的细胞液吹打混匀,转入到装有细胞生长液的 T25 瓶中,继续吹打混匀,放入 37℃, 5% CO₂ 孵箱中培养 4-8 h;
- (4) 4-8 h 后观察细胞,若细胞已经大量贴壁,则可倒出细胞培养液,用无菌 PBS 冲洗细胞瓶 2 次,再加入 8 mL 细胞生长液,放入 37℃, 5% CO₂ 孵箱中培养;
- (5) 每日观察细胞,待细胞汇合度达到 85% 时即可传代。

3.2.2 细胞传代

- (1) 每隔 12 h 在光学显微镜下观察细胞情况,当细胞汇合度达到 85% 时即可传代;
- (2) 将细胞培养瓶中的培养液倒掉,用无菌 PBS 冲洗两次,加入适量胰酶(0.25% trypsin-EDTA) (T25 加 1-2 mL、T75 加 3-6 mL、T225 加 9-18 mL),放入 37℃, 5% CO₂ 孵箱中静置;
- (3) 每隔三分钟观察细胞,当细胞在镜下变圆,细胞间隙变大,培养瓶中细胞肉眼可见磨砂样,且有少量细胞向下滑落时,消化完成;

(4) 将培养瓶中的胰酶用移液器吸出, 加入适量细胞生长液 (T25 加 4 mL、T75 加 10 mL、T225 加 20 mL), 用移液器将瓶壁上的细胞全部吹打下来, 然后继续将细胞吹打至散开;

(5) 根据不同传代比例吸取细胞悬液到新的含有细胞生长液的 T 瓶中 (T25 加 5 mL、T75 加 15 mL、T225 加 45 mL), 吹打混匀后放入 37℃, 5% CO₂ 孵箱中培养。

3.2.3 细胞计数

(1) 在计数前将血细胞计数板泡到酒精中, 待使用前将其擦干, 取干净的盖玻片盖到计数板上;

(2) 将待计数的细胞液用微量移液器加到盖玻片上的下端, 10 μL 即可, 细胞液会因为虹吸作用被吸到盖玻片和计数板之间, 并充满计数区;

(3) 当虹吸完成后, 将计数板置于显微镜下, 将计数区四个角落的大格中的细胞计数, 并根据四个格子中平均细胞数计算细胞密度: 细胞平均数 $\times 10^4 \times$ 稀释倍数

3.2.4 测量细胞活率

由于台盼蓝分子无法进入到活细胞的细胞膜内, 而可以进入到死细胞细胞膜内, 因此死细胞可以被台盼蓝染成蓝色, 而活细胞不行, 所以可以通过台盼蓝染色法判断细胞活力。

(1) 将细胞制成一定浓度的细胞悬液, 1:1 加入台盼蓝染色液 (0.4%), 震荡混匀后静置 2 min;

(2) 取 10 μL 的上述混合液滴加到计数板盖玻片一端, 在镜下计数蓝色细胞数和正常细胞数, 正常细胞数占总细胞数的比例即为细胞活率

3.2.5 细胞生长曲线的绘制

(1) 收集生长良好的细胞, 用新鲜的细胞生长液制成细胞悬液后用台盼蓝计数;

(2) 根据细胞计数结果, 将细胞稀释到 5×10^4 cells/mL, 将细胞液接种至 6 孔板中, 2 mL/孔;

(3) 待培养 24 h 后开始计数, 每隔 24 h 计数细胞一次, 每次计数 3 孔细胞, 取其平均值, 连续计数 6 天;

(4) 根据每天的数据, 做出细胞生长曲线图。

3.2.6 细胞的冻存

(1) 取生长旺盛且状态良好的细胞，长至 85%-90%汇合度时，用 0.25%胰酶消化，消化完成后用移液器将消化液全部吸出，加入适量细胞生长液，用移液器将所有细胞吹打混匀，细胞计数；

(2) 计数完成后将细胞悬液全部吸出至 15 mL 离心管中，放入离心机中离心 5 min (4℃, 2500 g)，倒掉上清；

(3) 根据上述细胞计数结果，向细胞沉淀中加入适量预冷过的细胞冻存液，使细胞终浓度为 2×10^6 cells /mL，用移液器将细胞吹打混匀；

(4) 将细胞悬液转移到预先做好标记的无菌冻存管中，每管 1 mL，用封口胶将管口封严，装入程序冻存盒，放到-70℃冰箱中过夜，次日将细胞冻存管转入液氮罐中长期保存。

3.2.7 流感病毒的扩增

(1) 预先培养 MDCK 细胞，待其长至 90%汇合度时，将瓶中的培养液倒掉，用无菌 PBS 冲洗细胞两次；

(3) 用病毒维持液将 H5N1 病毒稀释到适宜浓度，以 MOI=0.01 加入到细胞培养瓶中，摇匀后将培养瓶放到 34℃，5% CO₂ 孵箱中吸附 1h，每隔 15 min 将细胞培养瓶轻轻晃动，使病毒与细胞的接触更均匀，更充分；

(4) 吸附完成后将瓶中液体吸出，加入新的病毒维持液（T25 加 5 mL、T75 加 15 mL、T225 加 45 mL）继续放在 34℃，5% CO₂ 孵箱中培养，每日观察细胞病变情况，当病变达到 80%时即可收获病毒。

3.2.8 病毒基因组提取

(1) 收获接种 H5N1 病毒后的细胞上清，放入离心机中离心 10 min (4℃, 500 g)，取上清到 1.5 mL EP 管中，每管 200 μL；

(2) 向每管细胞上清中加入 Buffer VGB (200 μL)、Proteinase K (20 μL) 以及 Carrier RNA (1.0 μL)，震荡混匀放到 56℃水浴锅中静置 10 min；

(3) 水浴完成后向每管混合液中加无水乙醇 (200 μL)，震荡混匀；

(4) 将离心柱与收集管安装好，向离心柱中加入上述溶液，放入离心机中离心 2 min (4℃, 12000 rpm)，把滤下的液体倒掉；

- (5) 向离心柱中加入 500 μL 的 Buffer RWA, 放入离心机中离心 1 min (4°C , 12000 rpm), 把滤下的液体倒掉;
- (6) 向离心柱中加入 700 μL 的 Buffer RWB, 放入离心机中离心 1 min (4°C , 12000 rpm), 把滤下的液体倒掉;
- (7) 重复操作步骤 (6);
- (8) 将离心柱放在收集管上, 放入离心机中空离 2 min (4°C , 12000 rpm);
- (9) 将离心柱放在新的 1.5 mL 无 RNase EP 管上, 滴加 30~50 μL 的无 RNase dH_2O , 加的时候注意要滴加到膜上, 室温静置 5 min;
- (10) 放入离心机中离心 2 min (4°C , 12000 rpm), 洗脱 H5N1 病毒 RNA。

3.2.9 逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 获取 H5N1 病毒的 HA、NA 基因

参考 H5N1 亚型禽流感病毒 NIBRG14 株 (A/Vietnam/1194/2004) 在美国国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 上的 HA、NA 基因序列, 设计两对引物, 并通过引物在 HA、NA 基因前引入 kozak 序列, 以增加目的蛋白的表达; 同时在 HA 基因前后引入 SalI 及 SmaI 酶切位点, 在 NA 基因前后引入 XhoI 及 BamHI 酶切位点。引物序列见表 3.1。

表 3.1 实验所用引物序列

Tab.3.1 Sequences of primers used in experiment

引物名称	引物序列	引入酶切位点
HAL	5'-CGC <u>GTCGAC</u> -GCCACCATGGAGAAAATAGTGCTTCT-3'	SalI
HAR	5'-TCCCCCGGG-TTAAATGCAAATTCTGCATT-3'	SmaI
NAL	5'-CCG <u>CTCGAG</u> -GCCACCATGAATCCAAATCAGAAGAT-3'	XhoI
NAR	5'-CGC <u>GGATCC</u> -CTACTTGTCAATGGTGAATG-3'	BamHI

利用提取的 H5N1 病毒 RNA 作为模板，按下列组分配制 PCR 反应体系：

表 3.2 RT-PCR 反应体系
Tab.3.2 Reaction system of RT-PCR

试剂	使用量	终浓度
PrimeSTAR Max Premix (2×)	25	1×
PrimeScript RTase (for 2 step)	0.5 μL	
RNase Inhibitor (40 U/μL)	0.5 μL	
上游引物(20 μM)	1 μL	0.4 μM
下游引物(20 μM)	1 μL	0.4 μM
模板 RNA	10 μL	
RNase Free dH ₂ O	补齐 50 μL	

按以下程序进行一步法反转录 PCR (One-step RT-PCR)：

表 3.3 RT-PCR 反应程序
Tab.3.3 Reaction program of RT-PCR

温度	时间	循环
50℃	30 min	
94℃	2 min	
98℃	10 s	30
55℃	5 s	个
72℃	1.5 min	循环
72℃	10 min	

3.2.10 DNA 琼脂糖凝胶电泳

(1) 称取 0.5 g 琼脂糖，放于锥形瓶中，加入 50 mL 1×TAE 缓冲液，放入微波炉中加热至沸腾，摇动瓶身使琼脂糖充分溶化，静置；

(2) 当琼脂糖摸起来不烫手时，加入 2.5 μL GelRed 核酸染料，混合均匀后将液体倒入插好梳子的胶盘中；

(3) 待琼脂糖完全凝固后，将梳子取出，拔的过程保持竖直，不要损坏点样孔，把胶取出放入倒有 1×TAE 电泳缓冲液的水平电泳槽中；

(4) 将 PCR 产物与 DNA 上样缓冲液混匀后，用微量移液器点入上样孔中，再将适量 DNA marker 另点入一孔；

(5) 点样完成后, 开启电泳仪, 100 mA 恒流 25 min, 待溴酚蓝指示剂迁移至凝胶底部四分之一处时, 关闭电源;

(6) 将凝胶取出放入凝胶成像系统中成像。

3.2.11 DNA 凝胶回收

(1) 在紫外灯下将含有目的 DNA 的琼脂糖凝胶切下, 装入 EP 管中, 切胶时尽量避免切到不含 DNA 的空白凝胶;

(2) 称量凝胶的重量, 计算胶块体积 (以 1 mg=1 μ L 计算), 将凝胶切碎;

(3) 向胶块中加入三倍体积的 Buffer GM, 均匀混合后于室温溶解胶块, 间断地振荡混合, 使胶块充分溶解 (约 5~10 min);

(4) 将试剂盒中离心柱放在收集管中上, 当凝胶完全溶解后, 倒入离心柱, 放入离心机离心 1 min (12,000 rpm), 重复该操作一次;

(5) 向离心柱中加入 700 μ L 的 Buffer WB, 放入离心机中离心 0.5 min (4 $^{\circ}$ C, 12000 rpm), 把离下的液体倒掉。

(6) 重复操作步骤 (5), 然后把空的离心柱放在收集管上, 放入离心机中再离心 1min (4 $^{\circ}$ C, 12000 rpm);

(7) 将离心柱放在新的 1.5 mL EP 管上, 向离心柱中加入 30 μ L 预热的灭菌水或 Elution Buffer, 加的时候注意要滴加到膜上, 室温静置 1 min, 放入离心机中离心 1 min (4 $^{\circ}$ C, 12000 rpm), 收集离心下来的液体, 保存。

3.2.12 目的基因与质粒的酶切连接

(1) HA 基因与质粒 pSCCK 双酶切

用 takara 快切酶 SalI 及 SmaI 进行双酶切, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h, 酶切反应体系见表 3.4

表 3.4 HA 基因与质粒 pSCCK 双酶切体系

Tab.3.4 Reaction system of double digestion of HA and pSCCK

	HA 基因	pSCCK
10X 快切酶缓冲液	3 μ L	5 μ L
HA 基因 (PCR 产物)	2 μ L	
pSCCK		3 μ L
快切酶 SalI	1 μ L	1 μ L
快切酶 SmaI	1 μ L	1 μ L
灭菌水	43 μ L	40 μ L

(2) 酶切后产物跑胶，凝胶成像后切胶回收，过程见 3.2.11

(3) 用 T4 连接酶连接双酶切后回收的 HA 片段及 pSCCK 片段，16℃连接过夜，连接体系如下表 3.5。

表 3.5 HA 片段与质粒 pSCCK 连接体系
Tab.3.5 Ligation system of HA and pSCCK

名称	含量
10×ligation Buffer	2 μL
T4 DNA ligase	2 μL
HA 片段	10 μL
pSCCK	6 μL

(4) NA 基因与质粒 pSCCK-HA 双酶切

用 takara 快切酶 BmaHI 及 XhoI 双酶切，37℃孵育 5 min，酶切反应体系见表 3.6。

表 3.6 NA 基因与质粒 pSCCK-HA 双酶切体系
Tab.3.6 Reaction system of double digestion of NA and pSCCK-HA

	NA 基因	pSCCK-HA
10X 快切酶缓冲液	3 μL	5 μL
NA 基因 (PCR 产物)	3 μL	
pSCCK-HA		3 μL
快切酶 SalI	1 μL	1 μL
快切酶 SmaI	1 μL	1 μL
灭菌水	42 μL	40 μL

(5) 酶切后产物跑胶，凝胶成像后切胶回收，过程见 3.2.11

(6) 用 T4 连接酶连接双酶切后回收的 NA 片段及 pSCCK-HA 片段，16℃连接过夜，连接体系如下表 3.7

表 3.7: NA 片段与质粒 pSCCK-HA 连接体系
Table3.7: Ligation system of NA and pSCCK-HA

名称	含量
10×ligation Buffer	2 μ L
T4 DNA ligase	2 μ L
NA 片段	10 μ L
pSCCK-HA	6 μ L

3.2.13 连接产物转化大肠杆菌感受态细胞 DH5 α

- (1) E.coli DH5 α 感受态细胞使用前在冰上融化，轻微混匀，不能剧烈振荡混合细胞；
- (2) 向 DH5 α 中加入 DNA 连接产物 5 μ L；
- (3) 先在冰中放置 30min，再 42℃放置 45 s，最后冰中放置 1-2 min；
- (4) 向混合物中加入预热到 37℃的 SOC 培养基 1 mL，180 rpm 37℃振荡培养 1 h；
- (5) 取适量涂布于含氨苄青霉素的 LB 培养基，每个平板 50 μ L， 37℃过夜培养；
- (6) 待平板上长出适当大小的单菌落时，挑取单菌落接种于含有 5 mL LB 液体培养基（含氨苄青霉素）的摇菌管中，180 rpm 摇菌过夜。

3.2.14 质粒小提

- (1) 取 5 mL 的菌液（预先培养了 12-16 h），放入离心机中离心 2 min（4℃，12000 rpm），离心后倒掉上清；
- (2) 向细菌沉淀中加入 250 μ L 溶液 1（预先已加入 RNase A），用振荡器充分震荡，直到全部溶解；
- (3) 向溶解的菌液中加入 250 μ L 溶液 2，小心地颠倒混匀 5 次，在混匀的过程中可以看到管内混合液逐渐变成透明；
- (4) 溶液 3 预先放入 4℃预冷，向上述透明液体中加入 350 μ L 溶液 3 后轻柔地上下翻转混合 5~6 次，直至形成凝集块，静置 2 min；
- (5) 把 EP 管放入离心机中室温离心 10 min（4℃，12000 rpm），保留上清；

- (6) 把离心柱放到收集管上, 把上清液加入到离心柱中, 放入离心机离心 1 min (4℃, 12000 rpm), 倒掉离心下来的液体;
- (7) 向离心柱中加入 500 μ L 的缓冲液 WA, 放入离心机中离心 0.5 min (4℃, 12000 rpm), 倒掉离心下来的液体;
- (8) 向离心柱中加入 700 μ L 的缓冲液 WB, 放入离心机中离心 0.5 min (4℃, 12000 rpm), 倒掉离心下来的液体, 重复该操作一次;
- (9) 将空的离心柱再次放到收集管上, 放入离心机中离心 1 min (4℃, 12000 rpm);
- (10) 离心完后将离心柱放在新的 1.5 mL EP 管上, 向离心柱中加入 50 μ L 预热的灭菌水或 Elution Buffer, 加的时候注意要滴加到膜上, 室温静 1 min, 放入离心机中离心 1 min (4℃, 12000 rpm), 收集离心下来的液体, 保存。

3.2.15 质粒无内毒素中提

- (1) 菌体培养:
 种培养: 用 10 μ L 枪头在平板上挑取合适的单菌落, 放入摇菌管中, 每个摇菌管加入 4 mL 液体 LB 培养基 (含氨苄抗生素), 放入 37℃ 摇床摇菌过夜;
 主培养: 按照 1:1000 比例将种培养菌液接种于含有抗生素的液体培养基中 (培养容器的容积应大于 4 倍培养液的体积), 37℃ 过夜培养 (12~16 h);
- (2) 收集菌体: 分两次共取 100 mL 过夜培养菌液于 50 mL 离心管中, 放入离心机中离心 15 min (4℃, 6000 g), 弃上清;
- (3) 用 8 mL 的 Buffer P1 (含 RNase A) 充分悬浮细菌沉淀, 不要残留细小菌块;
- (4) 再加入 8 mL 的 Buffer P2, 轻柔地颠倒翻转离心管 5~6 次, 在翻转过程中液体逐渐透明, 证明菌体充分裂解,;
- (5) 向上述液体中加入 8 mL Buffer P3 (预先放入冰箱中预冷), 小心地颠倒混匀 5 次, 可以看到有白色沉淀形成, 将离心管放到冰上, 静置 5 min, 放入离心机中离心 15 min (4℃, $\geq 8000g$), 若离心后沉淀不紧实, 可延长离心时间至 30 min;
- (6) 将试剂盒中的塑料环套在 MidiEF DNA 柱子上, 置于锥形瓶或 50 mL 离心管上, 向 Filter 上加入 15 mL Buffer PB, 待溶液完全流出;
- (7) 将步骤 (6) 离心后的上清液倒入 MidiEF DNA Column 中, 小心操作, 避免倒入沉淀, 待溶液完全流出后, 移除 MidiEF DNA Column 中的 Filter;

(8) 向 Column 中加入 35 mL Buffer PW1; 待上一步溶液完全流出后, 向 Column 中加入 30 mL Buffer PW2;

(9) 待上一步溶液完全流出后, 将 Column 置于新的 15 mL 离心管上, 向 Column 中加入 5 mL 预热至 60℃ 的 Buffer PE 洗脱质粒, 收集洗脱液;

(10) 向洗脱液中加入 0.7 倍体积异丙醇, 充分振荡混匀, 放入离心机中离心 30 min (4℃, $\geq 8000g$);

(11) 小心移去上清液, 向沉淀中加入 2 mL Endo-free 70% 乙醇, 清洗沉淀, 放入离心机中离心 15 min (4℃, $\geq 8000g$), 小心弃上清, 室温干燥 10 min;

(12) 根据实验需要加入适量体积的 Endo-free H₂O 或 Endo-free TE 溶解沉淀, 得到的质粒 DNA 于 -20℃ 保存备用。

3.2.16 重组质粒 pSCCK-HA、pSCCK-HA/NA 的 PCR 鉴定

以小提的质粒 pSCCK-HA 或 pSCCK-HA/NA 为模板, 分别用 HA 基因特异性引物 HAL、HAR 及 NA 基因特异性引物 NAL、NAR 进行特异性扩增。扩增体系如下:

表 3.8 PCR 鉴定重组质粒反应体系

Tab.3.8 Reaction system of PCR identification of recombinant plasmid

试剂	使用量
PrimeSTAR buffer (5X)	10 μ L
dNTP Mixture(2.5 mM each)	4 μ L
PrimeSTAR DNA 聚合酶	0.5 μ L
上游引物(20 μ M)	1 μ L
下游引物(20 μ M)	1 μ L
重组质粒	1 μ L
RNase Free dH ₂ O	补齐 50 μ L

PCR 反应程序如下：

表 3.9 PCR 反应程序

Tab.3.9 Reaction program of PCR

温度	时间	循环
95℃	5 min	30 个 循环
98℃	10 s	
55℃	5 s	
72℃	1.5 min	
72℃	10 min	
4℃	1 h	

PCR 反应产物跑胶，凝胶成像后照相保存。

3.2.17 重组质粒的酶切鉴定

1. 质粒 pSCCK-HA 的酶切鉴定

用 takara 快切酶 SalI 及 SmaI 对质粒 pSCCK-HA 进行双酶切，37℃孵育 2 h，酶切反应体系见表 3.10。酶切后产物跑胶，凝胶成像后照相保存。

表 3.10 双酶切鉴定重组质粒反应体系

Tab.3.10 Reaction system of double digestion identification of recombinant plasmid

名称	含量
10×快切酶缓冲液	2 μL
重组质粒 DNA	1 μL
快切酶 1	1 μL
快切酶 2	1 μL
灭菌水	15 μL

2. 质粒 pSCCK-HA/NA 的酶切鉴定

(1) 质粒 pSCCK-HA/NA 用 takara 快切酶 SalI 及 SmaI 进行双酶切，酶切反应体系见表 3.10，37℃孵育 2 h。酶切后产物跑胶，凝胶成像后照相保存。

(2) 质粒 pSCCK-HA/NA 用 takara 快切酶 BmaHI 及 XhoI 双酶切，酶切反应体系见表 3.10，37℃孵育 5 min。酶切后产物跑胶，凝胶成像后照相保存。

(3) 质粒 pSCCK-HA/NA 用 takara 快切酶 SmaI 及 XhoI 双酶切，酶切反应体系见表 3.10，37℃孵育 5 min。酶切后产物跑胶，凝胶成像后照相保存。

3.2.18 重组质粒序列测定

先后提取质粒 pSCCK-HA、pSCCK-HA/NA 质粒 DNA 送上海生工生物工程有限公司测序。

3.3 重组痘病毒 rVTT-HA/NA 的构建

3.3.1 Vero 细胞复苏

细胞复苏过程见 3.2.1。

3.3.2 Vero 细胞传代

细胞传代过程见 3.2.2。

3.3.3 痘病毒天坛株滴度测定（噬斑法）

- (1) 将长至对数期的 Vero 细胞用胰酶消化下来，稀释至浓度为 5×10^5 cells/mL；
- (2) 在六孔板中加入 2 mL 细胞生长液/孔；
- (3) 再向六孔板中加入预先稀释好的细胞液 1 mL/孔，轻轻在桌面上按米字晃动均匀，置于 37℃，5% CO₂ 孵箱中培养；
- (4) 待六孔板中细胞长至 85% 左右汇合度，将细胞培养液吸出倒掉，向每孔加入 1 mL 无菌 PBS，摇晃孔板，冲洗细胞，然后吸出倒掉，重复上述操作两次；
- (5) 向六孔板中加入用痘病毒维持液梯度稀释的病痘病毒天坛株 1 mL/孔，摇匀，置于 37℃，5% CO₂ 孵箱中吸附 1 h，每隔 15 min 摇动六孔板一次；
- (6) 2×高糖 DMEM 培养液与 2% 无菌低熔点琼脂糖按 1:1 混匀，混合均匀后放入 42℃ 水浴；
- (7) 待吸附完成后弃掉病毒液，用无菌 PBS 冲洗六孔板两次；
- (8) 向六孔板中加入温浴的琼脂糖培养基，2.5 mL/孔，在室温下放置 10 min 等待培养基凝固，凝固后倒置，放入 37℃，5% CO₂ 孵箱中培养，每天观察细胞状态；
- (9) 待细胞在显微镜下可以看到较为明显的病变后，铺入含有无菌中性红染液的第二层固态培养基，1 mL/孔，继续放入孵箱中培养，观察六孔板中的噬斑数量并计数。

(10) 或者待细胞在显微镜下可以看到较为明显的病变后, 加入甲醛固定液固定 30 min 后, 磕出固体培养基, 加入稀释过的结晶紫染液, 常温下染色 15 min, 染色完成后用流水轻柔地冲掉染色液, 观察噬斑并计数。

3.3.4 痘病毒天坛株与质粒 pSCCK-HA/NA 共转染

- (1) 将长至对数期的 Vero 细胞用胰酶消化下来, 稀释至浓度为 $5 \times 10^5/\text{mL}$;
- (2) 在六孔板中预先加入 2 mL/孔细胞生长液;
- (3) 向六孔板中加入预先稀释好的细胞液 1 mL/孔, 轻轻在桌面上按米字晃动均匀, 置于 37°C , 5% CO_2 孵箱中培养;
- (4) 待六孔板中细胞长至 80% 左右汇合度, 将细胞培养液吸出倒掉, 向每孔加入 1 mL 无菌 PBS, 摇晃孔板, 冲洗细胞, 然后吸出倒掉, 重复上述操作两次;
- (5) 向六孔板中加入 0.5 MOI 痘病毒维持液稀释的病痘病毒天坛株, 摇匀, 置于 37°C , 5% CO_2 孵箱中吸附 2 h, 每隔 15 min 摇动六孔板一次;
- (6) 用无血清高糖 DMEM 培养液稀释 Lipofectamine™ 3000 试剂, 每孔 125 μL 培养液加 7.5 μL Lipofectamine™ 3000 试剂;
- (7) 用无血清高糖 DMEM 培养液稀释预先提取的无内毒素质粒 pSCCK-HA/NA (500 ng/ μL) 试剂, 每孔 125 μL 培养液+10 μL 质粒 DNA, 再加入 10 μL P3000™ 试剂, 充分混匀;
- (8) 在每管已稀释的 Lipofectamine™3000 试剂中加入稀释的 DNA (1:1 比例), 室温孵育 10-15 min;
- (9) 病毒吸附完成后, 弃掉六孔板中的病毒液, 用无菌 PBS 轻柔冲洗两次后, 每孔加入无血清高糖 DMEM 培养液 1 mL, 然后加入孵育好的转染试剂 DNA 混合物, 摇匀, 放入 37°C , 5% CO_2 孵箱中培养, 每天在显微镜下观察细胞病变和荧光表达。

3.3.5 筛选重组痘病毒 VTT-HA/NA

- (1) 痘病毒天坛株与重组质粒 pSCCK-HA/NA 共转染 Vero 细胞后, 每日观察荧光强度, 在转染后第五天, 选取荧光信号最强的孔, -70°C 常温反复冻融三次;
- (2) 收集细胞及细胞上清液, 放入离心机中离心 10 min (4°C , 500 g), 收集上清保存, 再取部分上清用病毒维持液梯度稀释;

- (3) 取 Vero 细胞长至 85%汇合度的六孔板，弃掉培养液，用无菌 PBS 清洗两次；
- (4) 向六孔板中加入梯度稀释好的上清液 1 mL/孔，摇匀，置于 37℃，5% CO₂ 孵箱中吸附 2 h，每隔 15 min 摇动六孔板一次；
- (5) 2×高糖 DMEM 培养液与 2%无菌低熔点琼脂糖按 1:1 混匀，放入 42℃水浴锅中温浴，使培养基保持液态；
- (6) 待吸附完成后弃掉上清液，用无菌 PBS 轻柔冲洗六孔板两次；
- (7) 向六孔板中加入温浴的琼脂糖培养基，2.5 mL/孔，在室温下放置 10 min 等待培养基凝固，凝固后倒置放入 37℃，5% CO₂ 孵箱中培养，每天观察细胞状态；
- (8) 待细胞在光学显微镜下可以看到病变，荧光显微镜下可以看到荧光后，铺入含有无菌中性红染液的第二层固态培养基，1 mL/孔，继续放入孵箱中培养；
- (9) 在荧光显微镜下用记号笔在六孔板外侧标记发出荧光信号的噬斑；
- (10) 在无菌操作台内挑取标记的噬斑，用无菌剪刀将 1 mL 枪头顶部剪成噬斑大小，插入固态培养基中，将细胞连带培养基吸出置于 1.5 mL EP 管中；
- (11) 加入 1 mL 病毒维持液到 EP 管中，摇匀后-70℃常温反复冻融三次；
- (12) 冻融完成后离心取上清，用病毒维持液梯度稀释，继续接种到 Vero 细胞长至 85%汇合度的六孔板中，重复上述操作，经过多轮荧光噬斑筛选，直到六孔板中所有噬斑均发出荧光后，再重复两代，此时重组痘病毒的筛选完成，获得了纯 rVTT-HA/NA；

3.3.6 rVTT-HA/NA 病毒冻存

- (1) 预先培养 Vero 细胞，待其长至 90%汇合度时，倒掉瓶中旧的培养液，用无菌 PBS 冲洗细胞两次；
- (2) 在 Vero 细胞上接种稀释好的筛选得到的重组痘病毒 rVTT-HA/NA，摇匀后将培养瓶放到 37℃，5% CO₂ 孵箱中吸附 1 h，每隔 15 min 将细胞培养瓶轻轻晃动，使病毒与细胞的接触更均匀，更充分；
- (3) 吸附完成后将瓶中液体吸出，加入新的病毒维持液（T25 加 5 mL、T75 加 15 mL、T225 加 45 mL）继续放在 37℃，5% CO₂ 孵箱中培养，每日观察细胞病变情况，当病变达到 80%时即可收获病毒；
- (4) 收获细胞培养上清液到离心管中，放入离心机离心 10 min（4℃，500 g），

将离心后的上清分装于做好标记的冻存管中，1 mL/支，放入-70℃冰箱或液氮罐中冻存。

3.4 重组痘病毒 rVTT-HA/NA 的鉴定

3.4.1 重组痘病毒 rVTT-HA/NA PCR 鉴定

以提取的重组痘病毒 rVTT-HA/NA 基因组为模板，分别用 HA 基因特异性引物 HAL、HAR 及 NA 基因特异性引物 NAL、NAR 进行特异性扩增。扩增体系如下：

表 3.11 PCR 鉴定 rVTT-HA/NA 反应体系

Tab.3.11 Reaction system of PCR identification of rVTT-HA/NA

试剂	使用量
PrimeSTAR buffer (5X)	10 μ L
dNTP Mixture(2.5 mM each)	4 μ L
PrimeSTAR DNA 聚合酶	0.5 μ L
上游引物(20 μ M)	1 μ L
下游引物(20 μ M)	1 μ L
rVTT-HA/NA 基因组 DNA	1 μ L
RNase Free dH ₂ O	补齐 50 μ L

PCR 反应程序如下：

表 3.12: PCR 反应程序

Table3.12: Reaction system of PCR

温度	时间	循环
95℃	5 min	
98℃	10 s	30
55℃	5 s	个
72℃	1.5 min	循环
72℃	10 min	
4℃	1 h	

PCR 反应产物跑胶，凝胶成像后照相保存。

3.4.2 VTT-HA/NA 感染上清血凝鉴定

- (1) 将 96 孔“V 型”血凝板横向放置，做好标记；
- (2) 用多道微量移液器（排枪）于加样槽中吸取 PBS 加入到血凝板中，50 μ L/孔；
- (3) 吸取 50 μ L 待检测的病毒液，加入到血凝板第一列做好标记的孔中，留取两孔作为阳性对照和阴性对照，阳性对照孔中加入 50 μ L 已知血凝滴度的病毒液，阴性对照孔中加入 50 μ L PBS；
- (4) 用排枪吹打混匀第一列孔中的液体，然后从第一列的各孔分别吸取 50 μ L 混匀后的液体，加入到第二列相应的各孔中，吹打混匀。这样依次从血凝板的第一列至第十二列做二倍倍比稀释；
- (5) 稀释完成后，将 1%红细胞悬液倒入加样槽中混匀，用排枪吸取红细胞悬液到血凝板中，50 μ L/孔，加样完成后轻轻地抖动血凝板，使孔内液体充分混匀；
- (6) 将血凝板放置在室温中等待 30 min 至 1 h，立起板子观察细胞凝集情况并将每排结果记录下来；
- (7) 以使红细胞完全凝集的最高稀释度的倒数为病毒的凝集滴度。

3.4.3 rVTT-HA/NA 感染上清 WB 鉴定

- (1) 选择细胞汇和度约为 90%的 Vero 细胞（T25 瓶），弃掉生长液，用无菌 PBS 冲洗两次；
- (2) 用病毒维持液稀释重组痘病毒 rVTT-HA/NA，加入 3 mL 病毒稀释液到 T25 瓶中，置于 37℃，5% CO₂ 孵箱中吸附 2 h。并同时设不加病毒，只加病毒维持液的 T25 瓶作为阴性对照；
- (3) 吸附完成后弃掉病毒液，用无菌 PBS 冲洗细胞两次，再向每个 T25 瓶加入 6mL 病毒维持液，置于 37℃，5% CO₂ 孵箱中培养；
- (4) 感染后 72 h 及 120 h 分别收集细胞培养上清；
- (5) 吸出培养上清至 15 mL 离心管，放入离心机中离心 10 min（4℃，500g），将上清分装于无菌冻存管中，1 mL/管，4℃备用；
- (6) 上清与 4×蛋白电泳上样缓冲液按 3:1 的比例混匀，100℃水浴中煮沸 10 min，冰上放置 1-2 min 冷却；

(7) 将 12% 预制胶插入垂直电泳槽，加入已准备好的 1×SDS 电泳缓冲液，将梳子拔出；

(8) 将预先煮沸完成的样品用微量移液器加入到样品孔中，同时留取一孔用于加入蛋白 marker；

(9) 将水平电泳仪接通电源，恒压 110 V 电泳 90 min，可以在电泳过程中观察溴酚蓝指示剂，当指示剂到达蛋白胶底部时，电泳完成；

(10) 将蛋白胶小心地从玻璃板中取出，切掉浓缩胶，剩余的分离胶一块用于考马斯亮蓝染色，一块放至平皿中待转膜；

(11) 取 NC 膜，比对着分离胶裁剪成相同大小，将四张滤纸片浸泡于转移缓冲液中，平衡 10 min，平衡完成后组装转移结构。由外及内依次铺上一层海绵、两张滤纸片、凝胶和 NC 膜，另一面顺序相同，凝胶和 NC 膜夹于最中间，铺每一层时注意赶走气泡；

(12) 将以上结构夹于黑白多孔板之间，最终的位置为：黑孔板-海绵-两层滤纸片-凝胶-NC 膜-两层滤纸片-海绵-白孔板，然后放置于电转仪中，倒入转膜缓冲液，没过多孔板，接通电源，使凝胶中的蛋白从凝胶（负极）中转移到 NC 膜（正极）上，180 V 转膜 1 h；

(13) 将转膜完成的 NC 膜取出，做好标记以区分正反面，放入 1% BSA 中于 4℃ 封闭。封闭完成后用 PBS-T 冲洗 2 次，再放入 PBS-T 中温和震荡洗膜 3 次，每次 5 min；

(14) 向装有膜的平皿中倒入 20 mL 含 1:1000 稀释的小鼠抗 HA 或小鼠抗 NA 单抗的 1% BSA，室温（25℃左右）下温和振荡 2 h；

(15) 用 PBS-T 缓冲液先冲洗 NC 膜 2 次，再放入没过膜的 PBS-T 中温和振荡 5 min，重复 3 次；

(16) 将膜转入 10 mL 含 1:1000 稀释的 HRP 羊抗小鼠二抗的 1% BSA 中，室温下温和振荡孵育 60 min；

(17) 孵育完成后用 PBS-T 缓冲液先冲洗膜 2 次，再放入没过 NC 膜的 PBS-T 中温和振荡 5 min，重复 3 次；

(18) 将膜置入新配的 DAB 显色液中，使膜上均匀接触显色液，轻柔震荡直至膜上出现棕色条带，终止显色，冲洗 NC 膜后在室温下晾干，拍照保存。

3.5 病毒样颗粒的表达与纯化

3.5.1 重组痘病毒 rVTT-HA/NA 扩增最佳条件摸索

(1) 准备 9 块 6 孔板，提前一天接种 Vero 细胞，待细胞长至汇合度约 90%时，可接种病毒；

(2) 用病毒维持液稀释病毒 rVTT-HA/NA，分别以 MOI=0.01、0.05、0.1、0.5、1、5 将病毒液加入到 6 孔板中的每个孔内，重复 7 块板；

(3) 病毒液加样完毕后轻轻晃动 6 孔板，使病毒分布均匀，将 7 块板子放入 37℃，5% CO₂ 孵箱，静置使病毒吸附 2h，在吸附过程中每隔 15 min 轻摇 6 孔板，使病毒与细胞的接触更均匀更充分；

(4) 取 1 块 6 孔板，每孔加入 3 mL 病毒维持液，置于 37℃，5% CO₂ 孵箱中培养，设为阴性对照。

(5) 病毒吸附完成后，弃掉病毒液，用无菌 PBS 冲洗两次，再在每孔中加入病毒维持液 3 mL，置于 37℃，5% CO₂ 孵箱中培养。

(6) 自 6 孔板放入孵箱 24 h 开始，每隔 24 h 收获一块 6 孔板的细胞上清进行不同 MOI 孔的病毒检测，直到第 7 天完成第七块板的检测；

(7) 检测七块板中不同孔的病毒 TCID₅₀，根据检测数据绘制不同接种 MOI 的病毒生长曲线。

3.5.2 蛋白最佳表达量的 MOI 摸索

(1) 准备 9 块 6 孔板，提前一天接种 Vero 细胞，待细胞长至汇合度约 90%时，弃去上清；

(2) 用病毒维持液稀释病毒 rVTT-HA/NA，分别以 MOI=0.01、0.05、0.1、0.5、1、5 将病毒液加入到 6 孔板中的每个孔内，重复 7 块板；

(3) 病毒液加样完毕后轻轻晃动 6 孔板，使病毒分布均匀，将 7 块板子放入 37℃，5% CO₂ 孵箱，静置使病毒吸附 2 h，在吸附过程中每隔 15 min 轻摇 6 孔板，使病毒与细胞的接触更均匀更充分；

(4) 取 1 块 6 孔板，每孔加入 3 mL 病毒维持液，置于 37℃，5% CO₂ 孵箱中培养，设为阴性对照。

(5) 病毒吸附完成后, 弃掉病毒液, 用无菌 PBS 冲洗两次, 再在每孔中加入病毒维持液 3mL, 置于 37℃, 5% CO₂ 孵箱中培养;

(6) 自 6 孔板放入孵箱 24 h 开始, 每隔 24 h 收获一块 6 孔板的细胞上清进行不同 MOI 孔的后续检测, 直到第 7 天完成第七块板的检测;

(7) 检测七块板中不同孔的上清液的血凝活性, 根据检测数据绘制不同接种 MOI 的蛋白表达曲线。

3.5.3 病毒样颗粒的纯化

(1) 将病毒以 MOI=1 接种 2 个 Vero 细胞汇合度达 90%左右的 T225 瓶, 置于 37℃培养箱培养, 120 h 收取细胞及上清;

(2) 将细胞及上清收集于 50 mL 离心管, 放入离心机中离心 10 min (4℃, 2000 rpm) 去掉细胞碎片, 然后取上清于超速离心管中离心 1 h (4℃, 30,000 rpm); 倒尽沉淀以外的溶液, 加 PBS 重悬沉淀, 4℃溶解过夜, 并轻轻吹打混匀;

(3) 取蔗糖, 配成 20%、30%、40%、50%、60%五个不同浓度的蔗糖溶液, 不同浓度的蔗糖溶液各取 1 mL, 小心地用长针管从 20%-60%依次加入到管中, 然后将样品轻轻地铺在蔗糖顶部, 放入离心机离心 3 h (4℃, 30,000rpm), 将不同密度蔗糖层分别收集到不同离心管中, 用于后续目标蛋白检测;

(4) 不同蔗糖密度层的样品均用 western blot 进行检测, 将检测结果证明含有 VLPs 的蔗糖层重新加入到超速离心管中置换蔗糖, 向离心管中加满 PBS, 充分混匀后放入离心机离心 2 h (4℃, 30,000 rpm), 将沉淀以外的溶液倒干净, 再用 PBS 重悬沉淀, 并测量总蛋白浓度以及 HA 含量。

3.5.4 蛋白含量的测定

1. 总蛋白浓度的测定 (lowry 法)

(1) 首先配碱性铜溶液: 酒石酸钾溶液 (0.1 mol/L) 0.5 mL、硫酸铜溶液 (0.04 mol/L) 0.5 mL、碳酸钠溶液 (4%) 25 mL、氢氧化钠溶液 (0.8%) 25 mL, 在使用前将这四种溶液混合均匀;

(2) 根据试剂盒中的说明书, 配制不同浓度的标准品 (100 μg/mL、80 μg/mL、60 μg/mL、40 μg/mL、20 μg/mL);

(3) 将样品稀释到浓度大概为 60 μg/mL;

(4) 将样品和不同浓度的标准品各取 1 mL 加入到 15 mL 离心管中, 再向各管中加入 5mL 现配的碱性铜溶液, 用移液器充分混匀后在室温下静置 10 min;

(5) 再向每个离心管中加入 500 μ L 的酚试剂, 用移液器充分混匀后在室温下静置 30 min;

(6) 混匀后的标准品以及样品各管分别取 1 mL 到一次性比色皿中, 放入紫外分光光度计, 检测不同样品在 650 nm 处的吸光值;

(7) 根据检测得到的不同浓度标准品的吸光值绘制标准曲线, 将待测样品的数据代入曲线, 计算其总蛋白浓度。

2.测定病毒样颗粒中的血凝素含量(单向免疫扩散法)

(1) 称量琼脂糖(每 10 mL PBS 中加入 0.15 g 琼脂糖), 微波炉加热至沸腾使琼脂糖充分溶解, 放入 56℃恒温水浴箱中, 30 min 后, 加入标准抗血清(每 10mL 琼脂糖加入 75 μ L NIBRG-14 抗血清)混匀, 取适宜大小的玻璃板, 在四周用灭菌指示带缠绕形成槽, 将琼脂糖倒入槽中, 待琼脂糖完全凝固后, 用剪断的 1 mL 枪头打直径为 3 mm 的孔;

(2) 用 PBS 溶解标准抗原, 并梯度稀释至五个浓度: 50 μ g/mL、40 μ g/mL、30 μ g/mL 及 20 μ g/mL, 同时用 PBS 稀释待测样品, 标准抗原及待测样品均加入 10% 裂解剂, 样品: 裂解剂比例为 9:1, 用移液器吹打混匀后放置在室温等待 30 min 裂解;

(3) 裂解完成后, 将不同浓度标准抗原及待测样品各取 10 μ L 点入到琼脂糖凝胶上的孔内, 然后将凝胶放入密闭的装有水的铁盒中, 在室温及湿润的环境下放置过夜;

(4) 第二天将凝胶从玻璃板上取下, 放入 PBS 中浸泡 1 h;

(5) 将凝胶放在滤纸上, 再用滤纸及重物覆盖在凝胶上, 重压 2 h;

(6) 待琼脂糖凝胶水分被压干后, 放入考马斯亮蓝中染色 10min;

(8) 染色结束后用水轻轻冲洗凝胶, 放入脱色液中再置于摇床上脱色, 当脱色液变蓝时, 换上新的脱色液继续脱色, 反复多次直到沉淀圈清晰可见;

(9) 将每个沉淀圈的直径测量并记录下来, 根据不同浓度标准品的沉淀圈直径作标准曲线, 再将待测样品的直径代入标准曲线中, 计算待测样品中 HA 的含量。

3.5.6 病毒样颗粒电镜鉴定

(1) 用移液器吹打混匀样品后, 取 1 滴样品滴到铜网上, 等待 1 min, 用滤纸小心地吸干液体, 尽量不要接触到铜网;

(2) 吸干后再在铜网上滴加 1 滴磷钨酸染色液, 等待 1.5 min, 用滤纸小心地吸干液体, 尽量不要接触到铜网;

(3) 用电子显微镜观察制备好铜网样品并照像保存。

3.6 病毒样颗粒免疫原性分析

3.6.1 动物免疫

取 40 只 14-16 g/只的雌性 BALB/C 小鼠, 分为五组, 每组八只。其中一组为阴性对照, 肌肉注射 PBS 0.2 mL/只; 一组为阳性对照, 注射 0.2mL/只稀释过的 H5N1 全病毒灭活疫苗, 注射剂量为 1 μ g/只 (HA: 242ng/只); 另外三组为实验组, 肌肉注射 0.2 mL/只稀释过的病毒样颗粒, 三组注射剂量分别为 1 μ g/只 (HA: 263 ng/只)、5 μ g/只 (HA: 1314 ng/只)、10 μ g/只 (HA: 2630 ng/只)。初次免疫三周后进行加强免疫, 免疫剂量和途径与初次免疫相同。

3.6.2 体液免疫评价

1. 小鼠眼眶后静脉丛采血

在实验第 0, 2, 4, 6, 8 周对实验小鼠进行采血。用左手抓住小鼠, 捏紧小鼠头部皮肤, 固定小鼠头部, 左手食指和拇指压迫小鼠两侧颈部以及眼球附近皮肤, 当眼球外突后用毛细玻璃管沿着小鼠眼眶内眦的后壁轻轻地旋转插入, 插入大概 2~3 mm 时微微地前后移动, 当血液顺着毛细玻璃管流出时, 用灭过菌的 EP 管收集血液。当收集到足够的血液 (0.2~0.3 mL) 后, 小心地拔出毛细管。将装有血液的 EP 管放到 37℃ 水浴锅中水浴 2h, 然后放入离心机中离心 10 min (4℃, 5000 rpm), 将上层透明血清吸出放入新的无菌 EP 管, 用于后续检测。

2. 血清中 IgG 抗体检测

(1) 包被抗原为 H5N1 (NIBRG-14 株) 标准抗原, 浓度为 2 μ g/mL, 提前一天包被空白酶标板, 100 μ l/孔, 放入冰箱 4℃ 层过夜;

(2) 次日倒掉板中的包被液, 用洗涤液 (PBS-T) 洗涤 4 次, 每次 1 min, 将未结合的抗原洗去, 将酶标板在干净的滤纸上拍干, 然后向酶标板中加入 1% BSA 封闭液, 220 μL /孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h;

(3) 弃去封闭液, PBS-T 洗涤 4 次, 拍干后加入抗体稀释液 100 μL /孔, 再在第一列的各孔中加入待测血清 100 μL /孔, 用移液器轻轻混匀后再吸出 100 μL 混合液到第二列各孔中, 轻轻混匀后继续上述操作, 直到最后一列, 将加样完成的酶标板放到 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 孵箱中孵育 1 h, 同时设置阴性、阳性以及空白对照;

(4) 孵育完成后弃去板内液体, 用 PBS-T 洗涤 4 次后拍干, 加入工作浓度 (1:20000) 的 HRP 标记的羊抗小鼠 IgG, 100 μL /孔, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 中孵育 1 h;

(5) 孵育完成后弃去板内液体, 用 PBS-T 洗涤 4 次, 在滤纸上拍干后加入 50 μL /孔的显色底物 A 和 B, 放入 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 孵箱 15 min, 显色完成后再向每孔内加入 50 μL 的 H_2SO_4 (2 mol/L) 终止反应;

(6) 将酶标板放入酶标仪, 在 450 nm 处测定 OD 值, 最终的抗体效价为样品的 OD 值/阴性对照的 OD 值 (200 倍稀释) ≥ 2.1 时最大稀释值的倒数, 抗体效价大于 1 时为阳性。

3. 血凝抑制实验 (HI) 检测中和抗体效价

(1) 将受体破坏酶 (RDE) 与血清按体积比 4:1 混合 (80 μL RDE:20 μL 血清), 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 16-18 h;

(2) 将混合液转入 56 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中放置 1 h 灭活补体以及受体破坏酶;

(3) 向处理过的血清中按体积比 10:1 加入浓缩红细胞, 放入冰箱 4 $^{\circ}\text{C}$ 层 1 h, 取出后放入离心机中离心 5 min (4 $^{\circ}\text{C}$, 900 g), 离心结束后将上层上清液取出备用;

(4) 四个血凝单位的标准抗原配制: 向一次性血凝板中加入 PBS (50 μL /孔), 在第一列的孔中加入稀释过的病毒抗原 (50 μL /孔), 用移液器吹打混匀后吸出 50 μL 混合液到第二列孔中, 继续吹打混匀后再次吸出 50 μL 混合液到第三列孔中, 直到最后一列, 倍比稀释完成后加入 1% 鸡红血球 (50 μL /孔), 放置在室温环境下等待 30 min, 当最后的血凝结果为: 第一个孔++++, 第二个孔++, 第三个孔+/-, 第四个孔- 时, 那么这一排对应的稀释度的病毒抗原即为四个血凝单位的标准抗原;

(5) 在另一块血凝板的第二列到第十二列中加 PBS (25 μ L/孔)，在血凝板的第一列中加入第 (3) 步处理完成的标准血清 (50 μ L/孔)；

(6) 从第一列的各孔中吸出 25 μ L 到第二列对应的各孔中，吹打混匀后继续上述倍比稀释的操作直至最后一列，最后一列每孔弃 25 μ L 混合液；

(7) 向血凝板中加入第 (4) 步制备的四个血凝单位的标准抗原 (25 μ L/孔)，轻轻混匀后放置在室温，等待 1 h；

(8) 每孔加 25 μ L 的 1% 鸡红血球，混匀后室温静置 30 min 将血凝抑制板立起观察结果；

(9) 结果判定：血凝被完全抑制时的血清最大稀释度的倒数即为抗体的效价。

3.6.3 细胞免疫评价

1. 小鼠脾单个核细胞分离

(1) 将小鼠断颈处死后放入装有 75%乙醇的烧杯中。5 min 后把小鼠转移到无菌操作台中，用剪刀镊子小心地取出小鼠脾脏；

(2) 在 50 mL 离心管上安上 70 μ m 细胞筛网，将脾脏放到筛网上用注射器橡胶塞进行研磨，一边研磨一边滴加 4-5 mL 小鼠淋巴细胞分离液，直至所有脾脏组织研磨完成；

(3) 研磨完成后把所有混合液吸到 15 mL 离心管中，轻轻地贴壁加入 1 mL RPMI 1640 培养基，加的时候注意不要让液体混合，要使液面有明显的分界；

(4) 室温下用水平转子离心 30 min (25 $^{\circ}$ C, 800 g)，将加速度和减速度调节至低档。离心结束后在可以看到上层 RPMI 1640 和下层分离液中间有一层白色的淋巴细胞层；

(5) 将含有淋巴细胞的液面吸出，向其中加入 RPMI 1640 培养基 10 mL，上下颠倒混后于室温离心 10 min (25 $^{\circ}$ C, 250 g) 收集细胞；

(6) 将上清液倒掉吸干后加入培养液吹打混匀细胞沉淀，计数后用于后续实验。

2. 小鼠脾脏淋巴细胞分型

(1) 将六孔板上的各孔分为未刺激孔及刺激孔，做好标记，向各孔中加入 1 mL 含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养液，再向各孔内加入 1 mL 细胞悬液，用移液器吹打混匀，吹打过程中避免气泡。再向刺激孔中加入 2 μ L Cell Activation Cocktail

(without Brefeldin A)及 1 μ L Monensin solution, 用移液器吹打混匀, 吹打过程中避免气泡, 将六孔板放入 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 的孵箱中培养;

(2) 培养 5 h 后, 收集各孔内的细胞, 再用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养液冲洗六孔板 (1 mL/孔), 将冲洗液也收集到对应的离心管中离心 5 min (25 $^{\circ}$ C, 400 g), 弃上清;

(3) 向离心管中加入 2 ml cell staining buffer, 充分混匀沉淀, 再次离心 5 min (25 $^{\circ}$ C, 400 g), 弃上清, 分别重悬细胞到 100 μ L cell staining buffer/管, 并涡旋混匀;

(4) 准备流式上样管, 并做好相应的标记

(5) 胞膜染色: 分别按照未刺激组和刺激组, 每管 100 μ L 细胞悬液, 约 1×10^6 /100 μ L; 按照 panel 设置, 每管中分别加入 5 μ L 的表面标记抗体 (CD8 或 FcR blocking), 涡旋混匀后, 室温避光孵育 15 min; 每管中加入 2 mL cell staining buffer, 涡旋重悬细胞, 然后放入离心机中离心 5 min (25 $^{\circ}$ C, 400 g), 弃上清;

(6) 细胞固定: 每管加 1 mL Fix 溶液, 涡旋混匀后, 4 $^{\circ}$ C 冷藏避光孵育过夜;

(7) 细胞破膜: 每管继续加 2 mL Perm 溶液, 放入离心机中离心 5 min (25 $^{\circ}$ C, 400 g), 弃上清; 重悬细胞于 100 μ L Perm 溶液中, 加入相应胞内因子染料, 涡旋混匀后, 室温避光孵育 15 min, 再向每管加 2 mL Perm 溶液, 放入离心机中离心 5 min (25 $^{\circ}$ C, 400 g), 弃上清; 再以 2mL 的 cell staining buffer 重复清洗 1 遍; 最后每管中加入 0.1 mL 的 cell staining buffer, 涡旋重悬细胞, 上机检测。

3.6.4 小鼠免疫保护性实验

取 5 组 14-16 g/只雌性 BALB/C 小鼠, 每组 8 只, 分组以及接种剂量与上述免疫过程相同。阴性对照组肌肉注射 0.2 mL/只 PBS; 阳性对照组注射 0.2 mL/只 (剂量为 1 μ g/只) H5N1 全病毒灭活疫苗; 三组为实验组, 肌肉注射 0.2 mL/只稀释过的病毒样颗粒, 三组注射剂量分别为 1 μ g/只、5 μ g/只、10 μ g/只。初次免疫三周后进行加强免疫, 免疫剂量和途径与初次免疫相同。在加强免疫后两周用同型病毒 H5N1 NIBRG-14 株 (5×10^6 TCID₅₀/mL) 滴鼻免疫小鼠, 80 μ L/只。攻毒后每隔一天记录各组小鼠体重, 直到第 16 天。

第四章 实验结果

4.1 穿梭质粒 pSCCK 结构

经过对痘病毒天坛株基因组的分析及对 C7L-K2L 区段上下游序列的分析, 选择 C7L 左侧一段长为 541kb 的序列作为上游同源重组臂 CKL。

上游同源重组臂 CKL 序列为:

```
CTACATGTAGGTATTCCTTTATCCAATAATAGTTTAAACACATCTACATTGGG
ATTTGATGTTGTAGCGTATTTCTCTACAATATTAATACCATTTTTGATACTATT
TATTTCTATACCTTTCGAAATTAGTAATTTCAATAAGTTTATATCGATGTTATC
AGAACATAGATATTCGAATATATCAAAAATCATTGATATTTTTATAGTCGACTG
ACGACAATAACAAAATCACAACATCGTTTTTTGATATTATTATTTTTCTTGGTA
ACGTATGCCTTTAATGGAGTTTCACCATCATACTCATATAATGGATTTGCACC
ACTTTCTATCAATGATTGTGCACTGCTGGCATCGATGTTAAATGTTTTACAAC
TATCATAGAGTATCTTATCGTTAACCATGATTGGTTGTTGATGCTATCGCATTT
TTTGGTTTCTTTCATTTCAAGTTATGTATGGATTTAGCACGTTTGGGAAGCATG
AGCTCATATGATTTCACTGTAGTGTCAGTACTATTAGTTTCGATCAGATC
AATGTCTA
```

选择 K2L 区右侧一段长为 954bp 的序列作为下游同源重组臂 CKR。

下游同源重组臂 CKR 序列为:

```
AAGTTAGATCAGTGTACGTATATTTAGATGTTTTTCAGCTTAGCTAATCCTGAT
ATTAATTCTGTAAATGCTGGACCCAGATCTCTTTTTCTCAAATCCATAGTCTT
CAATAATTCTATTCTAGTATTACCTGATGCAGGCAATAGCGACATAAACATAG
AAAACGAATAGCCAAACGGTGAGAAGACAATATTATCATCTTGAATATTTTT
ATACGCTACTATACCGGCATTGGTAAATCCTTGCAGACGATAGGCGGACGCT
GAACACGCTAACGATAGTATCAATAACGCAATCATGATTTTATGGTATTAATA
ATTAACCTTATTTTTATGTTTCGGTATAAAAATTATTGATGTCTACACATCCTTT
TGTAATTGACATCTATATATCCTTTTGTATAATCAACTCTAATCACTTTAACTT
TTACAGTTTTCCCTACCAGTTTATCCCTATATTCAACATATCTATCCATATGCA
TCTTAACACTCTCTGCCAAGATAGCTTCAGAGTGAGGATAGTCAAAAAGAT
```

AAATGTATAGAGCATAATCCTTCTCGTATACTCTGCCCTTTATTACATCACCC
GCATTGGGCAACGAATAACAAAATGCAAGCATCTTGTTAACGGGCTCGTAA
ATTGGGATAAAAATTATGTTTTTATATCTATTTTATTCAAGAGAATATTCAGGA
ATTTCTTTTTCCGGTTGTATCTCATCGCAGTATATATCATTGTACATTGTTTC
ATATTTTTTAATAGTTTACACCTTTTAGTAGGACTAGTATCGTACAATTCATAG
CTGTATTTTGAATTCCAATCACGCATAAAAATATCTTCCAATTGTTGACGAA
GACCTAATCCATCATCCGGTGTAATATTAATAGATGCTCCACATGTATCCGTA
AAGTAATTTCTGTCCAATTTGAGGTACCTATATAGGCCGTTTTATCGGTTAC
C

在上下游同源臂之间添加两个反向启动子、多克隆位点、筛选基因 EGFP 等，质粒 pSCCK 结构见下图：

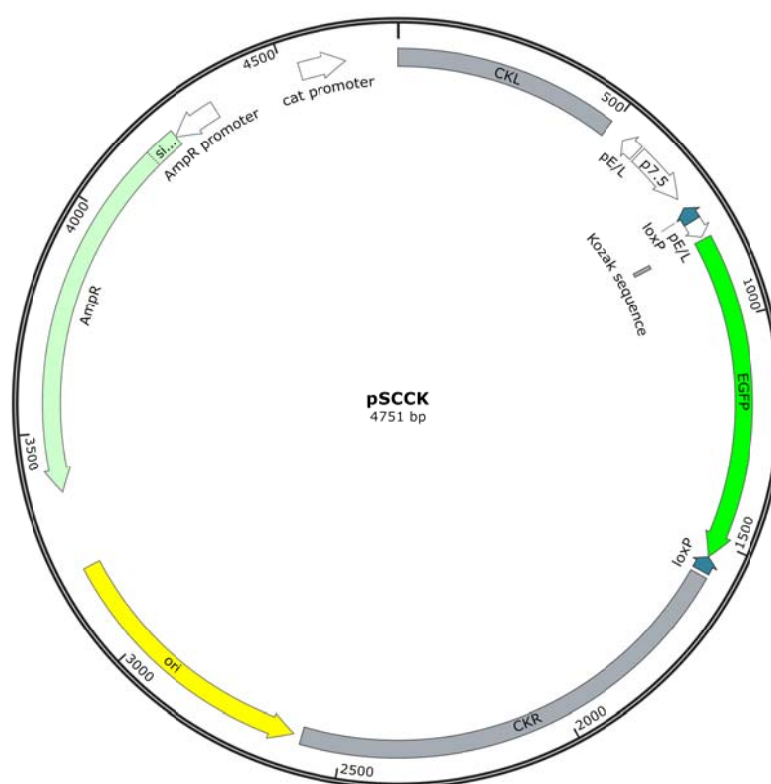


图 4.1 穿梭质粒 pSCCK 结构示意图

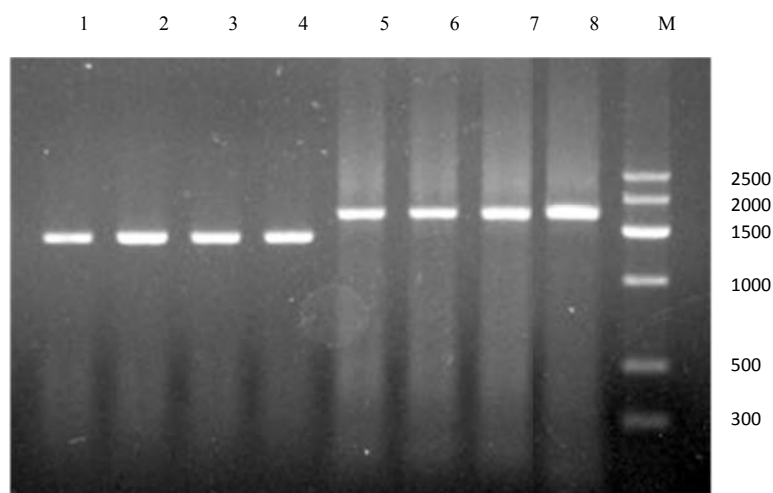
Fig.4.1 Structure of plasmid pSCCK

质粒 pSCCK 可以将上下游同源重组臂之间的序列通过同源重组的方式转入到痘病毒天坛株基因组的对应区域。

4.2 重组质粒 pSCCK-HA/NA 的构建与鉴定

4.2.1 HA、NA 基因编码区的扩增

用 H5N1 亚型禽流感病毒 NIBRG-14 株感染 MDCK 细胞后,观察细胞状态,在感染后 72 h 取细胞上清,提取病毒基因组 RNA。分别用 HA 基因特异性引物 HAL、HAR 及 NA 基因特异性引物 NAL、NAR 进行一步法 RT-PCR, PCR 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳,电泳结果见图 4.2。可以看到大小约为 1400 bp (1、2、3、4 条带) 和 1700 bp (5、6、7、8 条带) 的 DNA 条带,经过测序分析,扩增得到的 HA 基因与已发表的流感病毒 NIBRG-14 株 HA 序列相同,为 1719 bp,扩增得到的 NA 基因与已发表的流感病毒 NIBRG-14 株 NA 序列相同,为 1374 bp。分析 HA,NA 基因序列,发现 NA 基因存在痘病毒早期转录终止信号(TNTTTTT),会影响目的基因的表达,因此通过定点突变将 TCTTTTT 突变为 TCTTTCT,且不改变点突变序列对应氨基酸种类。点突变交由上海生工生物工程有限公司进行。



注: 1-4 号条带为 NA 基因片段; 5-8 号条带为 HA 基因片段; M 为 DNA marker

图 4.2 一步 RT-PCR 法扩增 HA、NA 基因

Fig.4.2 Amplification of HA and NA by one-step RT-PCR

4.2.2 重组质粒 pSCCK-HA/NA 的构建

扩增得到目的基因后,首先将 HA 基因通过酶切连接转入质粒 pSCCK 上 pE/L 启动子下游,经鉴定正确后,获得重组质粒 pSCCK-HA。在将 NA 基因通过酶切连接的方式转入质粒另一个启动子 p7.5 下游,因此两个反向启动子可以同时控制两个外源基因的表达。

重组质粒构建过程如下：

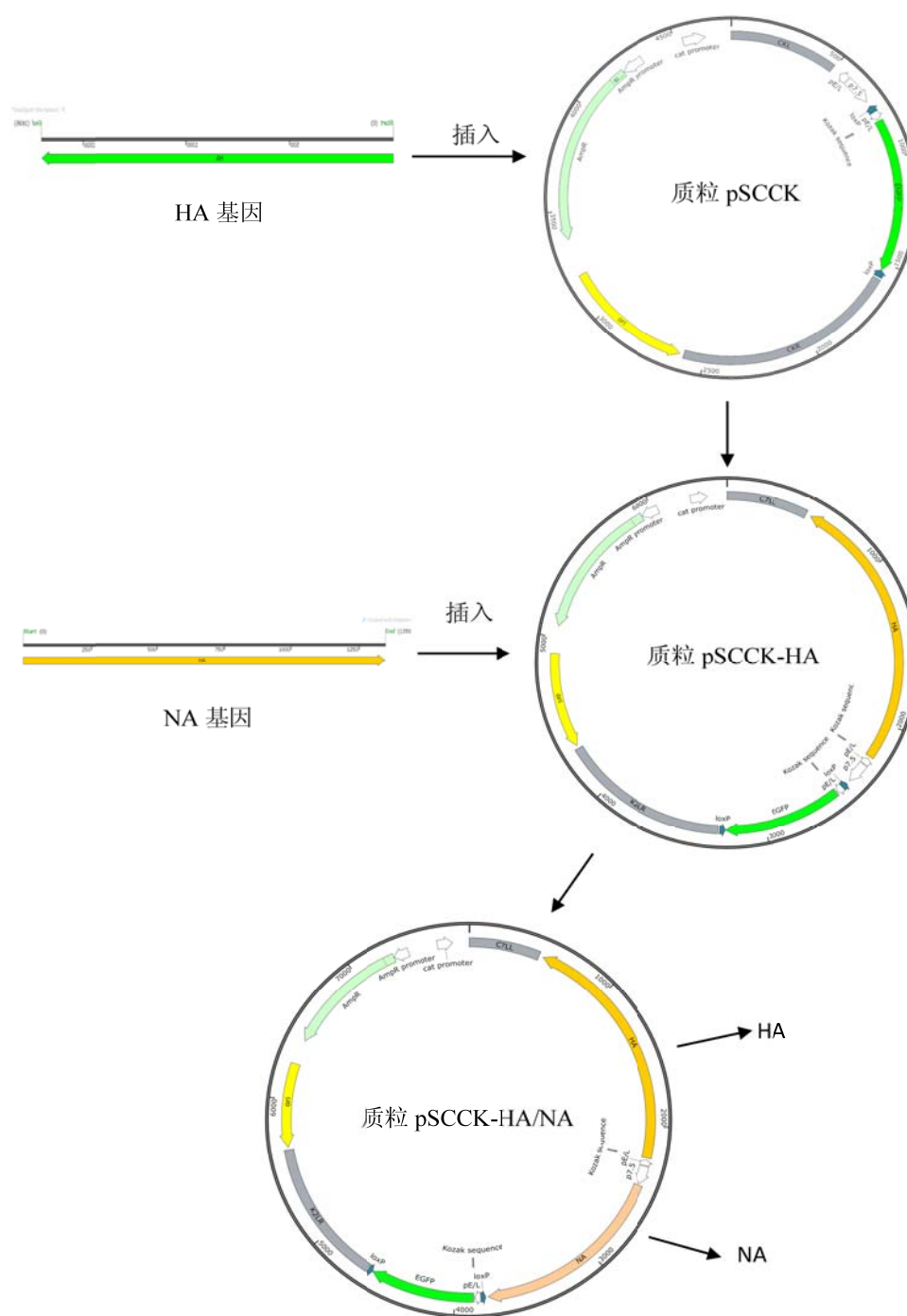


图 4.3 重组质粒 pSCCK-HA/NA 构建过程

Fig.4.3 Constructing process of recombinant plasmid pSCCK-HA/NA

构建完成的 CKL-CKR 之间的结构如下图：



注：CKL 与 CKR 为重组同源臂；HA、NA 为目的基因；EGFP 为筛选基因；pE/L、p7.5 为痘病毒特异性启动子

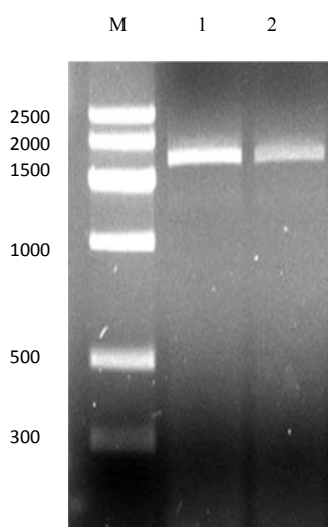
图 4.4 重组质粒 pSCCK-HA/NA 结构示意图

Fig.4.4: Structure of recombinant plasmid pSCCK-HA/NA

4.2.3 质粒 pSCCK-HA、pSCCK-HA/NA PCR 鉴定鉴定结果

(1) pSCCK-HA PCR 鉴定结果

HA 基因与质粒 pSCCK 经过双酶切以及连接后，连接产物转化大肠杆菌感受态细胞，涂布在含有氨苄青霉素的抗性平板上。待长出白色菌落后，挑选菌落进行 PCR 扩增，检测是否转入外源基因 HA，PCR 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳，结果如图 4.5，1-2 号条带大小约为 1700 bp，与 HA 基因（1719 bp）大小相符，证明筛选得到了阳性重组菌落，挑取菌落到摇菌管中，摇菌放大培养，提取质粒。



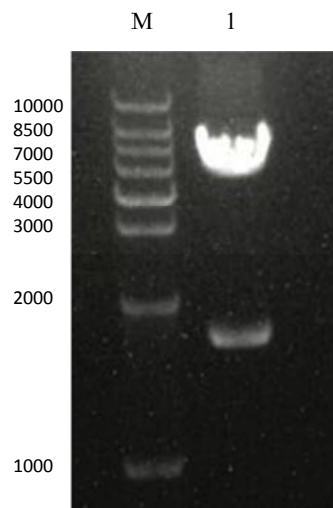
注：1-2 号条带为 HA 基因片段；M 为 DNA marker

图 4.5 PCR 鉴定 pSCCK-HA

Fig.4.5 Authentication of pSCCK-HA by PCR

(2) 质粒 pSCCK-HA 酶切鉴定结果

经 PCR 鉴定为阳性的菌落提取质粒, 由于 HA 基因两侧有 SalI 和 SmaI 单酶切位点, 因此将提取的质粒进行双酶切, 酶切产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳。如质粒 pSCCK-HA 双酶切后会产生大小为 4751 bp 和 1719 bp 的两个条带。图 4.6 的 1 号有两条大小约为 4700 bp 和 1700 bp 的条带, 证明质粒构建正确。



注: 1 号条带为 pSCCK-HA 双酶切后产生的片段; M 为 DNA marker

图 4.6 重组质粒 pSCCK-HA 的酶切鉴定

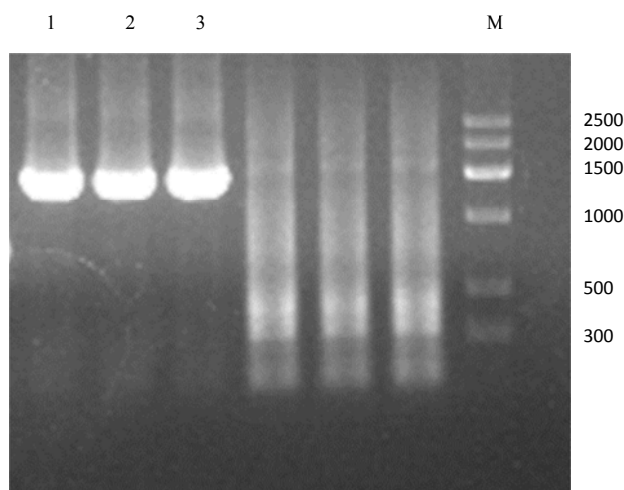
Fig. 4.6 Restriction analyze of recombinant plasmid pSCCK-HA

(3) 质粒 pSCCK-HA 的测序分析

选取 PCR 鉴定和酶切鉴定均为阳性的克隆进行测序, 测序结果进行分析, 并经过 BLAST 比对, 结果证明插入到质粒 pSCCK 中的 HA 基因插入位置和插入方向正确, 插入序列也与预期序列一致。

(4) 质粒 pSCCK-HA/NA PCR 初步鉴定结果

NA 基因与 pSCCK-HA 经过双酶切以及连接后, 连接产物转化大肠杆菌感受态细胞, 涂布在含有氨苄青霉素的抗性平板上。待长出白色菌落后, 挑选菌落进行 PCR 扩增, 检测是否转入外源基因 NA, PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 结果如图 4.7, 1-3 号条带大小约为 1400 bp, 与 NA 基因 (1374 bp) 大小相符, 证明筛选得到了阳性重组菌落, 挑取菌落到摇菌管中, 摇菌放大培养, 提取质粒。



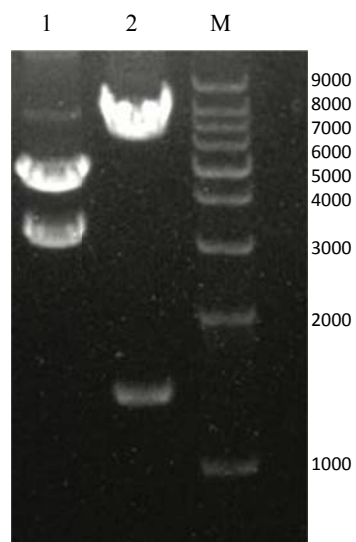
注：1-3 号条带为 NA 基因片段；M 为 DNA marker

图 4.7 PCR 鉴定 pSCCK-HA/NA

Fig. 4.7 Authentication of plasmid pSCCK-HA/NA by PCR

(5) 质粒 pSCCK-HA/NA 酶切鉴定结果

经 PCR 鉴定为阳性的菌落提取质粒, 由于 HA 基因两侧有 SalI 和 SmaI 单酶切位点, NA 基因两侧有 BamHI 和 XhoI 单酶切位点, 因此将提取的质粒进行分别进行 BamHI/XhoI 双酶切以及 SmaI/BamHI 双酶切。酶切产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳。质粒 pSCCK-HA/NA 经过 SmaI/BamHI 双酶切会产生大小为 3254 bp 和 4554 bp 的两段序列; 质粒 pSCCK-HA/NA 经过 BamHI/XhoI 双酶切会产生大小为 1356 bp 和 6452 bp 的两段序列。电泳结果如图 4.8, 1 号为 SmaI/BamHI 双酶切产物电泳条带, 可以看到大小约为 3200 bp 和 4600 bp 的两条条带, 2 号为 BamHI/XhoI 双酶切电泳条带, 可以看到大小约为 1400 bp 和 6500 bp 的两条条带, 与预期结果相符, 证明质粒构建正确。



注：1 号条带为 pSCCK-HA/NA 经 *Sma*I/*Bam*HI 双酶切产生的条带；

2 号条带为 pSCCK-HA/NA 经 *Bam*HI/*Xho*I 双酶切产生的条带；M 为 DNA marker

图 4.8 重组质粒 pSCCK-HA/NA 的酶切鉴定

Fig. 4.8 Restriction analyses of recombinant plasmid pSCCK-HA/NA

(6) 质粒 pSCCK-HA/NA 的测序分析

选取 PCR 鉴定和酶切鉴定均为阳性的克隆进行测序，测序结果进行分析，并经过 BLAST 比对，结果证明插入到质粒 pSCCK 中的 HA、NA 基因插入位置和插入方向正确，插入序列也与预期序列一致。

4.3 重组痘病毒 rVTT-HA/NA 的构建与鉴定

4.3.1 痘病毒天坛株感染细胞

痘病毒天坛株在感染 Vero 细胞 72h 后，显微镜下可以观察到边界明显的病变区，理论上在病毒稀释到一定程度后，在固体培养基的限制下，病毒增殖后也会固定在一个区域，因此一个病毒只会产生一个噬斑，所以噬斑的数量即为病毒的数量。如图 4.9，中性红染色后，光学显微镜下可以观察到细胞发生了明显的病变。而图片 4.10 则是结晶紫染色后肉眼可见的噬斑。

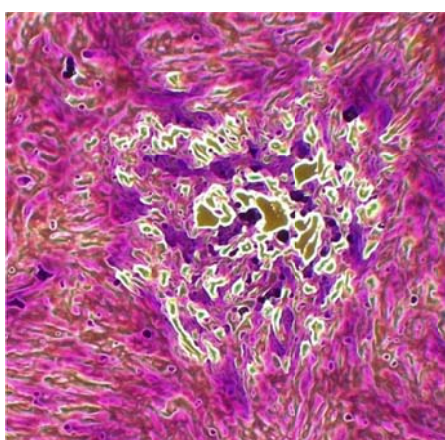


图 4.9 VTT 感染后细胞病变情况

Fig.4.9 Cytopathic effect after VTT infection

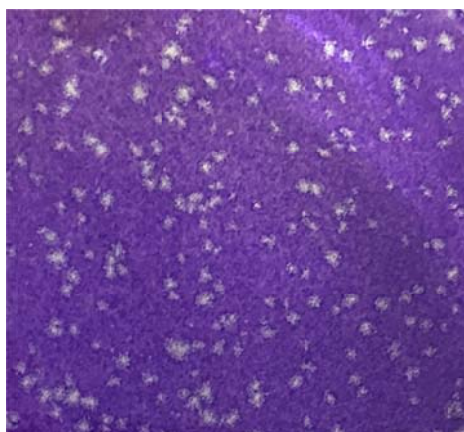


图 4.10 结晶紫染色后的噬斑

Fig.4.10 Plaques after crystal violet staining

4.3.2 重组痘病毒 rVTT-HA/NA 的荧光筛选

在重组质粒 pSCCK-HA/NA 与痘病毒天坛株共转染 Vero 细胞后，痘病毒天坛株基因组与重组质粒发生同源重组，因此同源重组臂之间带有外源基因及荧光筛选标记的基因区段可能被重组到痘病毒天坛株基因组上，代替了原有的 CK 区基因，产生重组痘病毒 rVTT-HA/NA。因此重组成功的痘病毒在荧光显微镜下可以观察到绿色荧光信号，挑取带有荧光的噬斑处的病毒，稀释后继续接种到 Vero 细胞上，即可通过荧光信号分离出重组病毒。经过多轮重复的筛选后，即可获得纯的重组痘病毒。下图展示了重组痘病毒在荧光显微镜下的噬斑。

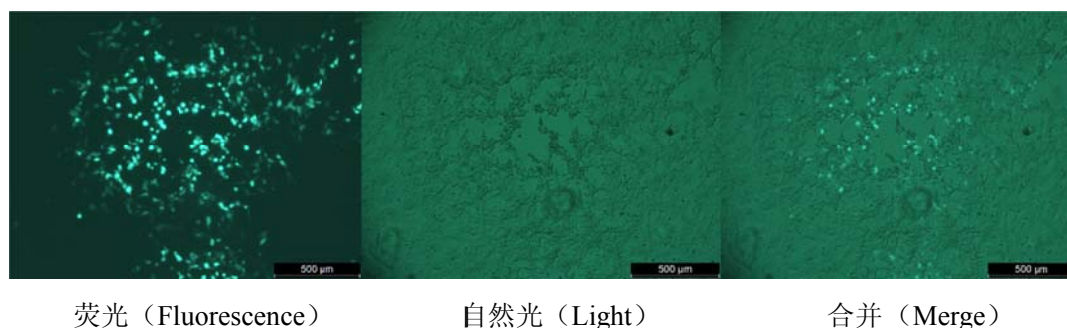


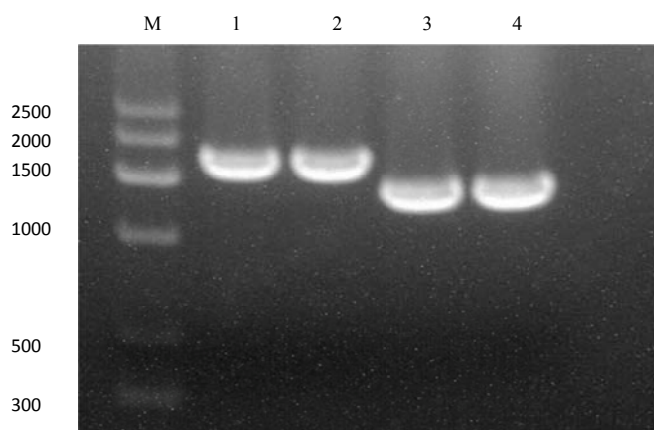
图 4.11 重组痘病毒 rVTT-HA/NA 感染 vero 细胞产生的荧光噬斑

Fig.4.11 Plaques with fluorescence after rVTT-HA/NA infection

4.3.3 重组痘病毒 rVTT-HA/NA 的鉴定

(1) PCR 鉴定 rVTT-HA/NA 基因组

提取重组痘病毒 rVTT-HA/NA 基因组 DNA。分别用 HA 基因特异性引物 HAL、HAR 及 NA 基因特异性引物 NAL、NAR 进行 PCR 扩增，PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳，电泳结果见图 4.12。可以看到 1-2 号条带大小约为 1400 bp，3-4 号条带大小约为 1700 bp，经过测序分析，扩增得到的 HA 基因与已发表的流感病毒 NIBRG-14 株 HA 序列相同，为 1719 bp，扩增得到的 NA 基因与已发表的流感病毒 NIBRG-14 株 NA 序列相同，为 1374 bp，重组痘病毒构建正确。



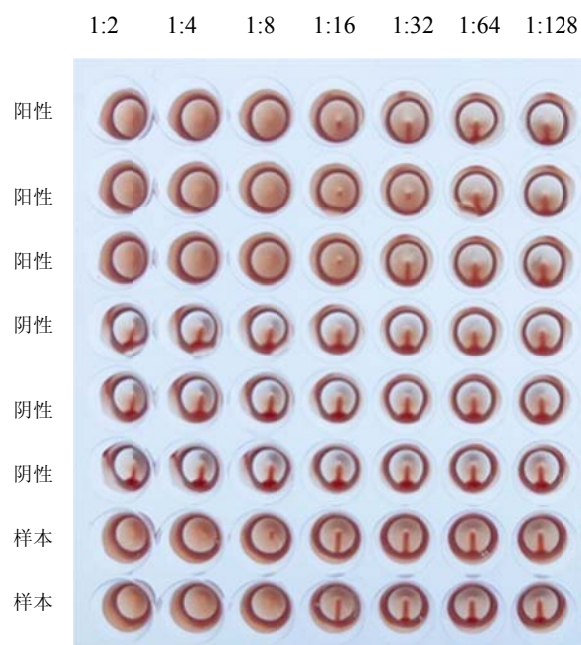
注:1-2 号条带为 HA 基因; 3-4 号条带为 NA 基因; M 为 DNA marker

图 4.12 重组痘病毒 rVTT-HA/NA 基因组 PCR 鉴定

Fig.4.12 Authentication of rVTT-HA/NA by PCR

(2) 血凝试验检测 HA 蛋白活性

对重组痘病毒 rVTT-HA/NA 感染 Vero 细胞上清进行血凝活性检测, 结果如下图所示: 阴性对照 VTT 感染 Vero 细胞上清、Vero 细胞上清、MDCK 细胞上清结果均为零, 阳性对照 H5N1 禽流感病毒感染 MDCK 细胞上清液血凝活性约为 1:16, rVTT-HA/NA 感染细胞上清血凝活性为 1:8, 证明重组痘病毒 rVTT-HA/NA 可以分泌具有血凝活性的 HA 蛋白。



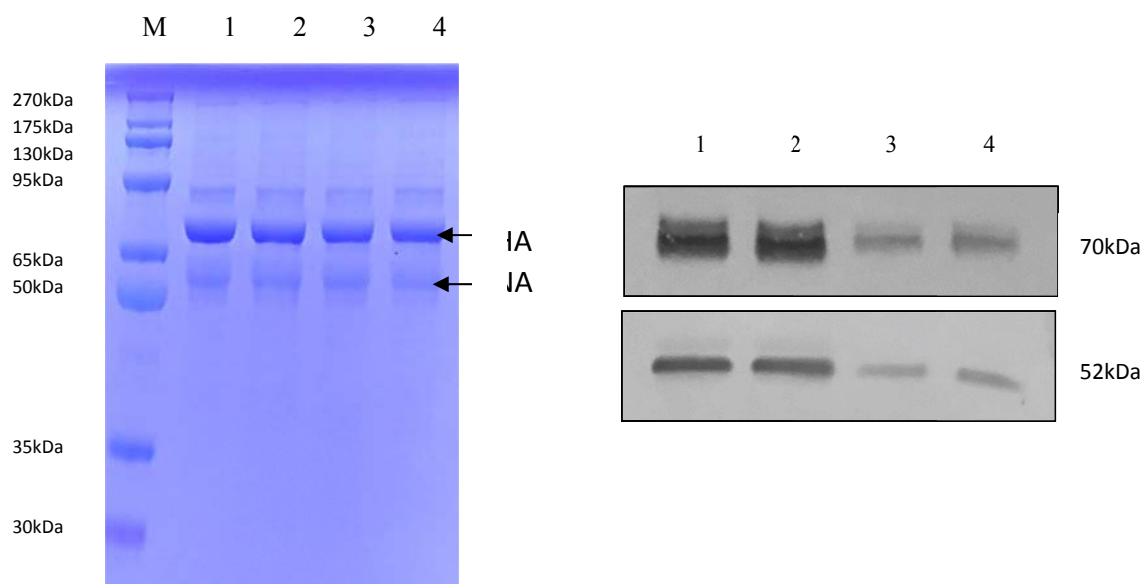
注: 第 1-3 排为阳性对照; 4-6 排为阴性对照; 7-8 排为待测样品

图 4.13 rVTT-HA/NA 感染细胞上清血凝活性检测

Fig.4.13 Hemagglutination activity of cell supernatant

(3) Western Blot 检测 HA、NA 的表达

重组痘病毒 rVTT-HA/NA 感染 vero 细胞后，取感染后 72 h 及 120 h 的细胞上清进行 western blot，所用抗体为小鼠抗 HA 抗体及小鼠抗 NA 抗体，如下图所示，可以看到左图 SDS-PAGE 图中有大小与 HA 和 NA 相似的条带，右图 Western blot 图中可以看到与小鼠抗 HA 抗体及小鼠抗 NA 抗体特异性结合产生的大小约为 70 kd 和 50 kd 的条带，与 HA 蛋白（70 kd）、NA 蛋白（52 kd）大小相符，且 Western blot 图中显示感染后 120 h 的条带较感染后 72h 的条带颜色明显加深，证明重组痘病毒成功地表达了 HA 蛋白和 NA 蛋白，并分泌到了细胞上清中，且蛋白表达量随时间递增。



注：1-2 号条带为 rVTT-HA/NA 感染细胞 120h 后上清样品；3-4 号条带为 rVTT-HA/NA 感染细胞 72h 后上清样品；M 为蛋白 marker

图 4.14 重组痘病毒 rVTT-HA/NA 蛋白表达检测

Fig.4.14 Detection of HA and NA proteins by Western blotting

4.4 病毒样颗粒的表达与纯化

4.4.1 rVTT-HA/NA 扩增最佳条件

分别按照 MOI=0.01、0.05、0.1、0.5、1、5 将重组病毒 rVTT-HA/NA 接种到 Vero 细胞中，每隔 24 h 取样测定 TCID₅₀ 值，得到结果如下图：

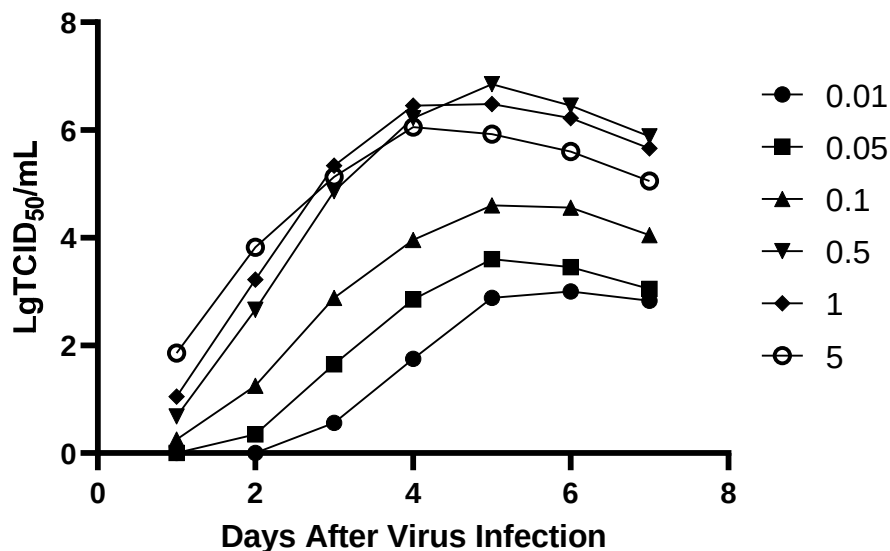


图 4.15 不同 MOI 接种 rVTT-HA/NA 时病毒收获液 TCID₅₀ 值

Fig.4.15 TCID₅₀ of virus harvested from different MOI

可以看到在 MOI 为 0.5 时，重组病毒 rVTT-HA/NA 在培养第五天时达到 lgTCID₅₀ 的最大值，随后略微下降，可能是培养时间过长导致病毒部分死亡。因此重组病毒的最佳种毒 MOI 为 0.5，最佳收获时间为 120 h。

4.4.2 HA 蛋白最佳表达条件

分别以 MOI=0.01、0.05、0.1、0.5、1、5 将重组病毒 rVTT-HA/NA 接种到 Vero 细胞中，每隔 24 h 取样测定细胞上清的血凝滴度，由此获得不同 MOI HA 蛋白表达曲线：

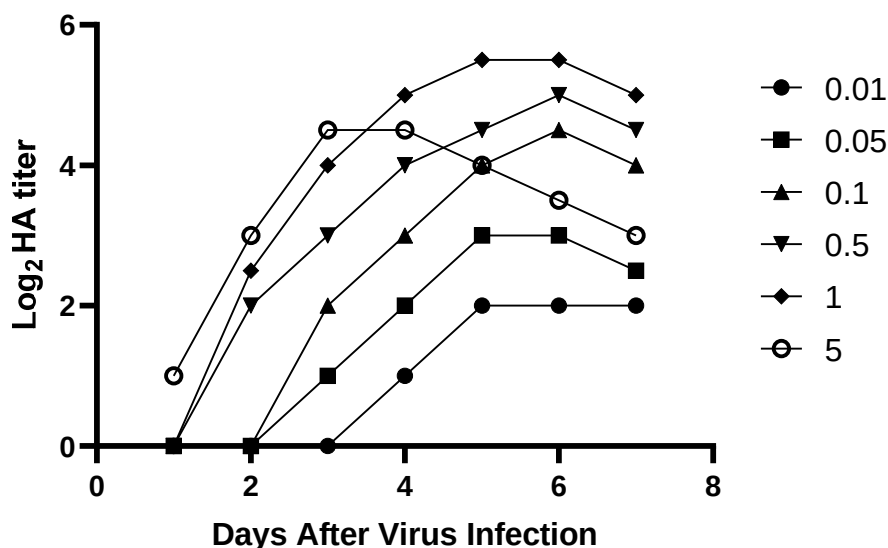


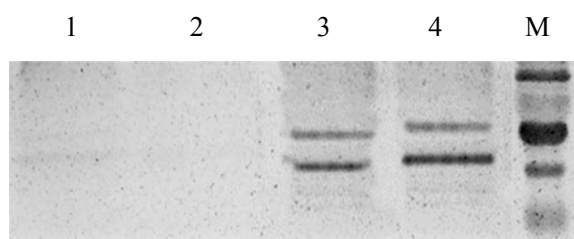
图 4.16 不同 MOI 接种 rVTT-HA/NA 时细胞上清血凝滴度

Fig.4.16 HA titer of cellular supernatant from different MOI

根据上图可以看到，当 MOI=1 时，在培养时间为第五天时，细胞上清液的血凝滴度最高，达到 1:64，证明上清中含有的 HA 蛋白血凝活性最高，因此最佳蛋白表达接种 MOI 为 1，最佳蛋白收获时间为 120 h。

4.4.3 病毒样颗粒的纯化及检测

对重组病毒 rVTT-HA/NA 感染细胞上清进行浓缩以及蔗糖密度梯度离心后，取 20%-30%、30%-40%、40%-50%、50%-60%蔗糖层之间的样品进行 Western blot。如下图 4.17，可以看到 3、4 两个样品中出现的两个蛋白条带与目标蛋白 HA (70 kd)、NA (52 kd) 大小相符，而 1、2 号样品未检测出目标蛋白，因此可以确定病毒样颗粒集中在 40%-60%蔗糖层之间，收集这两层的样品，离心去掉蔗糖后检测 HA 含量。



注：1、2、3、4 号分别为条带 20%-30%、30%-40%、40%-50%、50%-60%蔗糖层之间的样品；M 为蛋白 marker

图 4.17 WB 检测 VLPs 蔗糖密度梯度离心样品

Fig.4.17 Western Blot result of VLPs after sucrose density gradient centrifugation

血凝实验检测纯化前上清液以及纯化后样品，可以看到在纯化前，细胞上清液的血凝活性为 1:32，而在浓缩以及蔗糖密度梯度离心后，血凝活性达到了 1:128。

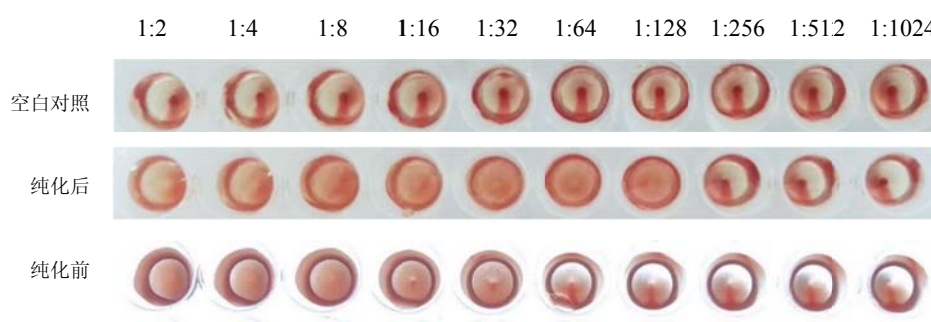


图 4.18 纯化前后病毒样颗粒的血凝活性检测

Fig. 4.18 Hemagglutination activity of samples before and after purification

通过单项免疫扩散法（SRID）对经过蔗糖密度梯度离心获得的纯化后样品进行检测，确定样品中的 HA 蛋白含量，根据计算得到，纯化后样品的 HA 蛋白浓度为 24.58 $\mu\text{g/mL}$ 。通过 Lowry 法检测纯化后样品中总蛋白，结果为 93.49 $\mu\text{g/mL}$ 。

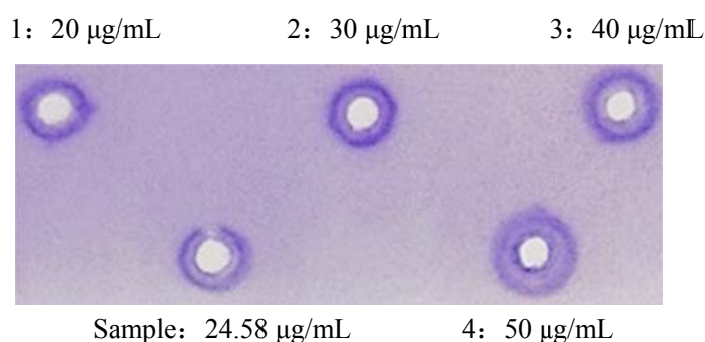


图 4.19 SRID 法检测 HA 蛋白含量

Fig. 4.19 HA protein content detected by SRID

纯化后的样品经处理后进行电镜观察，可以看到直径约为 100 nm 的形态类似流感病毒的球形颗粒。

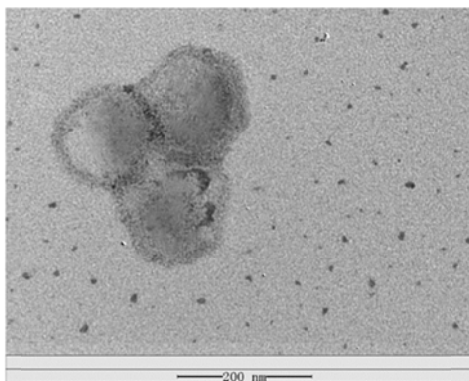


图 4.20 透射电子显微镜观察 VLPs

Fig. 4.20 VLPs observed by electron microscope

4.5 病毒样颗粒免疫原性分析

4.5.1 体液免疫效果分析

在第 0, 2, 4, 6, 8 周对实验组以及对照组小鼠采血并分离血清进行后续体液免疫效果检测

1. HI 检测血清中和抗体

按照实验方法中的步骤进行检测，得到结果如图 4.21。可以看到初次免疫后各组中和抗体均未有明显变化，而根据加强免疫后第四周血清检测结果，实验组 5 μg 剂量组、10 μg 剂量组以及阳性对照组（全病毒灭活疫苗 1 μg ）的中和抗体滴度均有较明显的变化，阳性对照组的中和抗体效价平均值达到 1:360、5 μg 组为 1:70、10 μg 组为 1:150，而 1 μg 组的效价只有 1:25，未达到有效效价 1:40。阳性对照组中和抗体效价在第 6 周和第 8 周逐步降低，最后降至 1:200；而 5 μg 实验组和 10 μg 实验组的中和抗体滴度在第 6 周达到峰值，5 μg 组中和抗体最高滴度为 1:100，10 μg 组中和抗体最高滴度为 1:180，两组数值在第 8 周才略有下降，且下降幅度弱于阳性对照组。阴性对照 PBS 组的中和抗体效价一直为零。

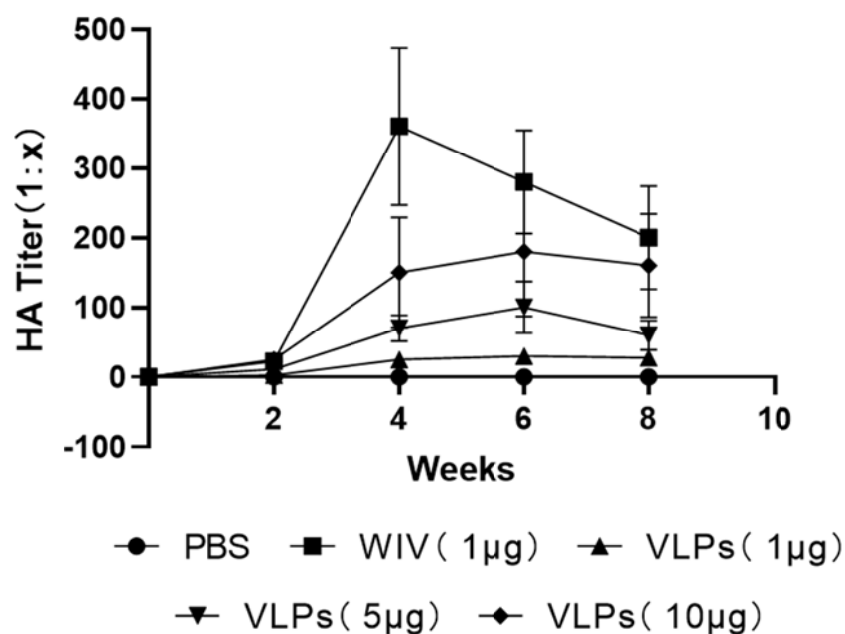


图 4.21 血清中和抗体滴度检测

Fig. 4.21 The detection of neutralization antibody titer

2. ELISA 检测 IgG 抗体

以 H5N1 亚型 NIBRG-14 株 HA 标准抗原作为包被抗原检测小鼠血清中的 IgG 抗体滴度，由图 4.22 可以看到，实验组各组以及 WIV 组的 IgG 抗体滴度均在 2-6 周逐步上升，尤其在加强免疫后第四周涨幅明显，抗体滴度与 VLPs 免疫剂量呈正相关。WIV 组在第八周的抗体滴度较第六周有明显下降，而 VLPs (10 μg) 组的降幅较低，IgG 抗体滴度较为稳定，在第八周与 WIV 组滴度相当。

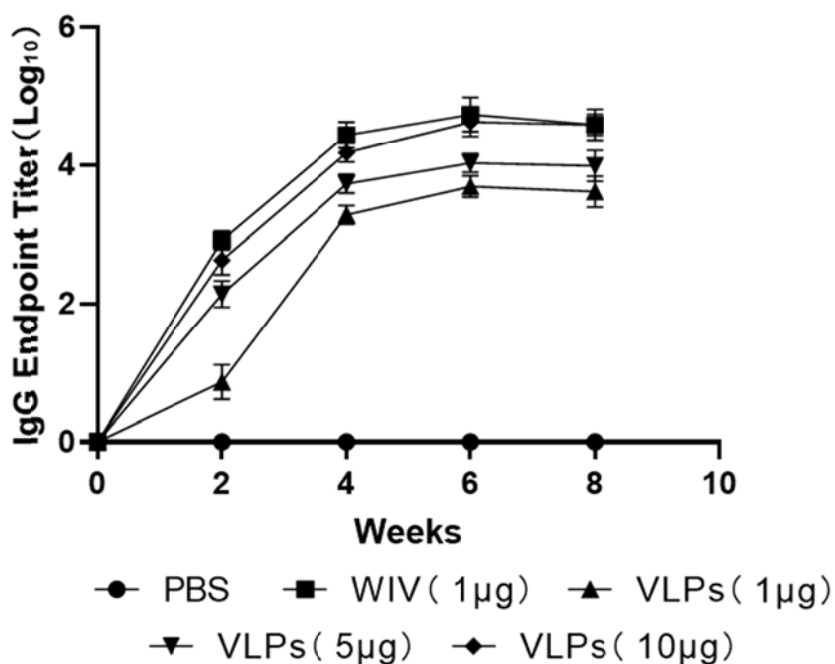


图 4.22 ELISA 检测血清 IgG 抗体

Fig. 4.22 IgG titer in serum detected by ELISA

4.5.2 细胞免疫效果分析

1. 小鼠脾脏淋巴细胞分型

取小鼠脾脏淋巴细胞,用流式细胞仪进行 $CD8^+$ T 细胞亚群分类,如图 4.23。每组取三只小鼠脾脏进行检测,结果如图 4.24,实验组三组以及阳性对照组数据相比阴性对照组具有显著性差异 ($P < 0.0001$); 实验组三组相对于阳性对照组具有显著性差异 ($1\ \mu\text{g}$ 组 $P = 0.0005$, $5\ \mu\text{g}$ 以及 $10\ \mu\text{g}$ 组 $P < 0.0001$); 实验组各组间数值也有显著性差异 ($P < 0.0001$)。VLPs 实验组 $5\ \mu\text{g}$ 以及 $10\ \mu\text{g}$ 剂量组 (2.92%、3.83%) 的 $CD8^+$ T 细胞比例平均值均比阳性 WIV 组 (2.34%) 高,且根据实验组三组数据可以看到 $CD8^+$ T 细胞比例与 VLPs 接种剂量呈正相关。

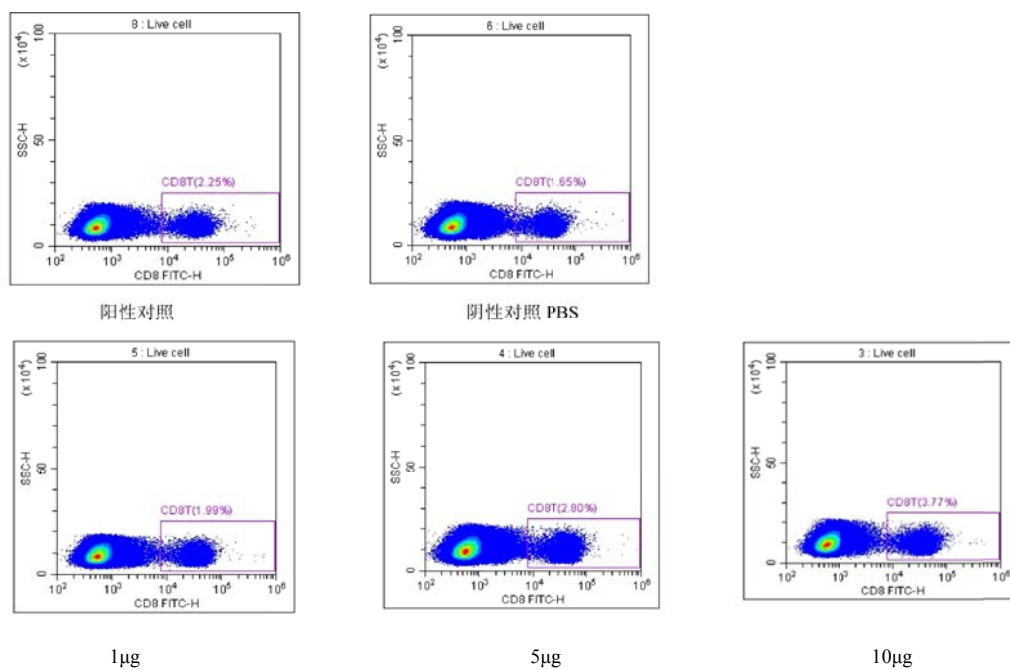


图 4.23 小鼠脾脏淋巴细胞 CD8⁺T 细胞亚群分类

Fig. 4.23 CD8⁺ T cell subsets classification results

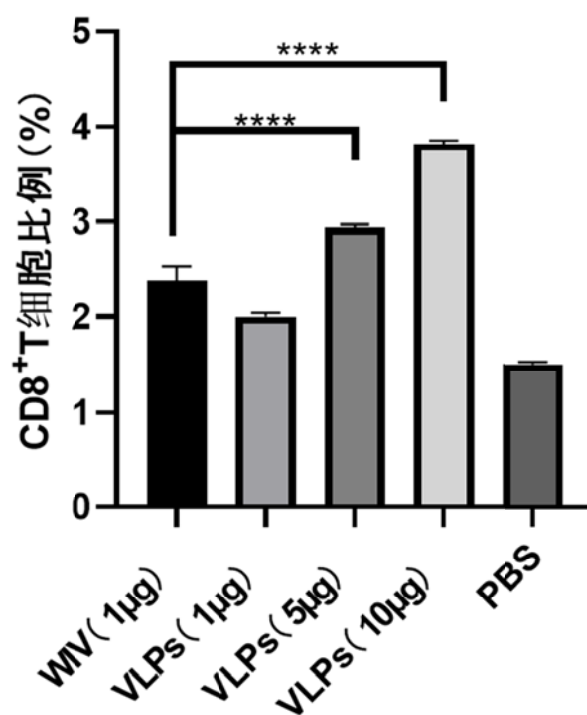


图 4.24 小鼠脾脏淋巴细胞 CD8⁺T 细胞比例

Fig.4.24 CD8⁺T cell ratio of spleen lymphocytes in mice

2. 小鼠脾脏表达细胞因子 IFN γ 的淋巴细胞检测

小鼠脾脏可分泌 IFN- γ 的淋巴细胞分析结果如图 4.25。每组取三只小鼠脾脏进行检测，统计结果如图 4.26，实验组 5 μg 、10 μg 剂量组以及阳性对照组数据均值相比阴性对照组具有显著性差异 ($P < 0.05$)，实验组 1 μg 剂量组与阴性对照无显著性差异 ($P > 0.99$)；实验组各组间数值也有显著性差异 ($P \leq 0.0001$)；实验组各剂量组与阳性对照组数值具有显著性差异 ($P \leq 0.05$)。可以看到与 CD8 $^+$ T 细胞类似，VLPs 实验组 5 μg 以及 10 μg 剂量组 (3.56%、5.01%) 的分泌 IFN- γ 淋巴细胞比例均比阳性对照组 (3.02%) 高，且根据实验组三组数据可以看到分泌 IFN- γ 淋巴细胞比例与 VLPs 接种剂量呈正相关。

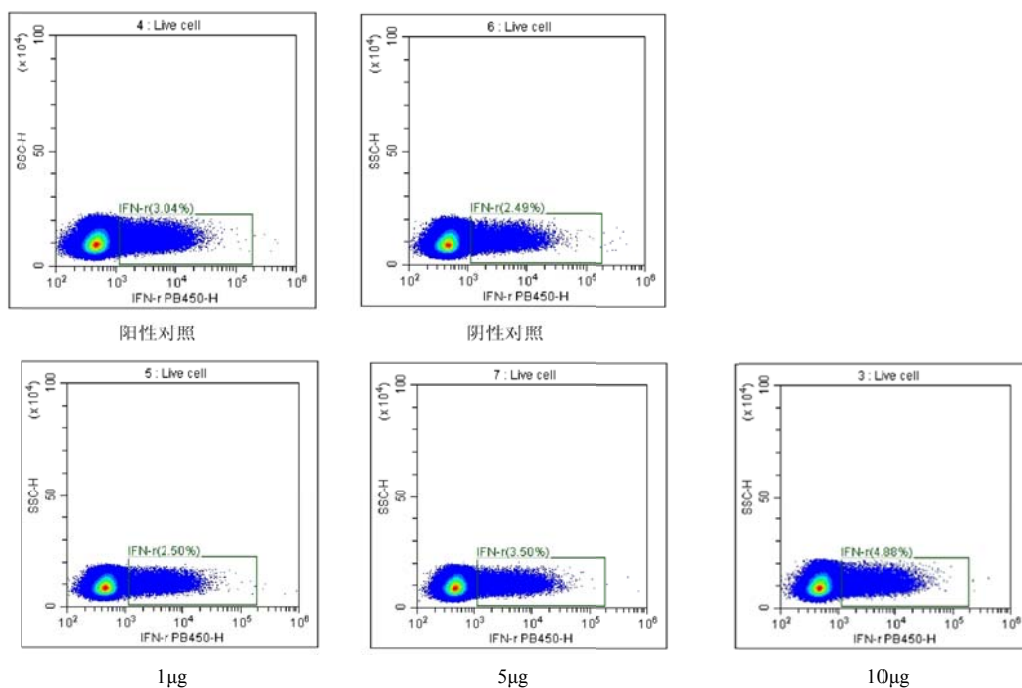


图 4.25 分泌 IFN- γ 细胞因子的淋巴细胞分型

Fig. 4.25 lymphocytes secreting IFN- γ subsets Classification

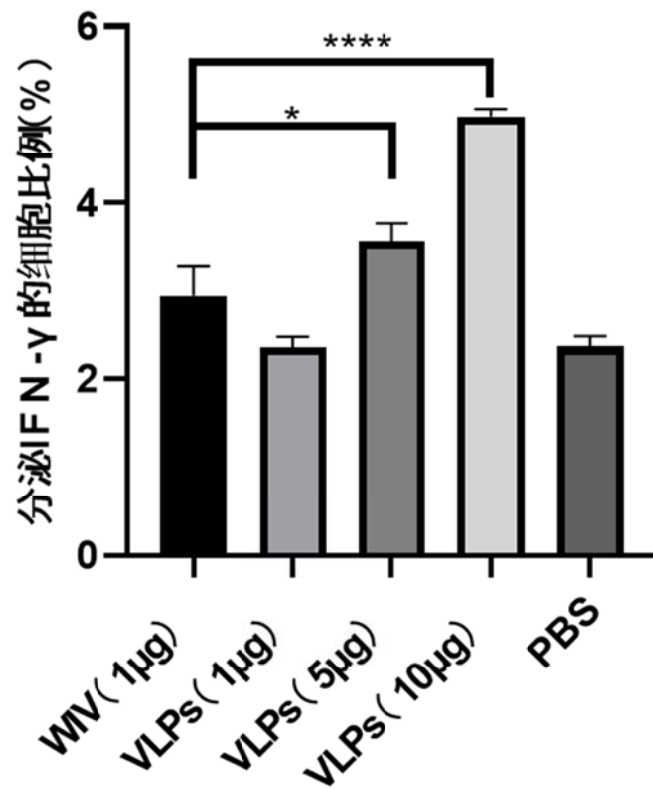


图 4.26 小鼠脾脏分泌 IFN- γ 的淋巴细胞比例

Fig.4.26 Lymphocyte proportion of IFN- secreted from mouse spleen

4.5.3 免疫保护性效果

加强免疫后利用同型病毒攻击小鼠，记录小鼠体重变化。结果如图 3.26: PBS 组小鼠在病毒攻击后，体重在 0-10 天有幅度较大的下降（71.56%），在 10-16 天逐渐趋于平稳；而 VLPs (1 μg /只) 组的小鼠体重也出现了明显的下降，因此 1 μg /只接种剂量不足以对小鼠提供免疫保护性；VLPs (5 μg /只) 组小鼠体重下降幅度较低，在 0-8 天降至 89.6%，随后体重逐渐上升，第 16 天恢复至 96.8%；VLPs (10 μg /只) 以及 WIV 组的小鼠体重变化趋势接近，均在攻毒后 4 天内有微弱的下降，随后体重增长恢复正常。以上结果表明 WIV 组以及 VLPs (10 μg /只) 均对同型病毒的攻击起到了保护作用，而 VLPs (5 μg /只) 组相比 VLPs (1 μg /只) 组以及阴性对照组也起到了一定的保护作用。

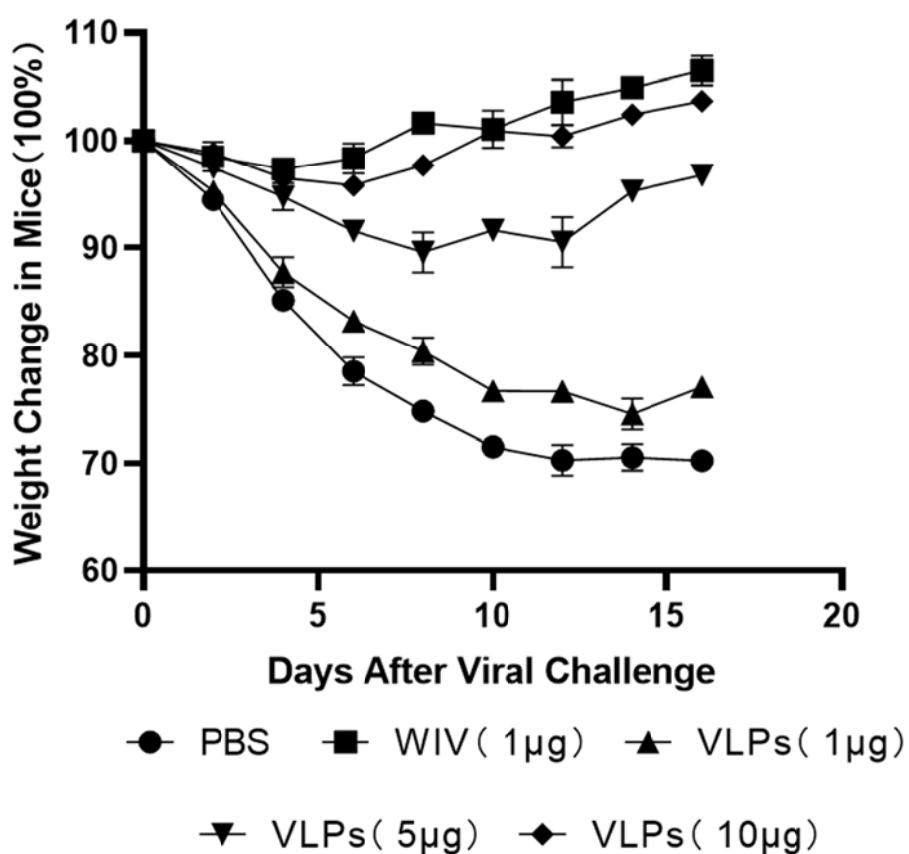


图 4.27 同型病毒保护性实验

Fig.4.27 Protection against heterologous viral challenge

第五章 总结与讨论

5.1 讨论

痘病毒天坛株痘病毒的基因组巨大, 长达 20 万 bp, 且非必须基因多, 因此非常适合作为表达载体, 插入外源基因。除此之外痘病毒天坛株作为哺乳动物细胞表达系统, 由其表达的蛋白可以较大程度地保持天然构象, 且免疫原性好, 这是因为该类表达体系可以对表达的蛋白很好地翻译后修饰。痘病毒天坛株基因组的两端主要是毒力相关基因, 本课题选择的同源区段 CK 区, 含有多个编码框, 如痘病毒宿主范围决定基因, 可以调节痘病毒在不同细胞系内的复制能力, 从而使病毒在细胞内正常地复制增殖^[24]; 还包括免疫抑制基因, 可以调控免疫相关细胞因子的分泌, 抑制机体炎症反应, 调节机体免疫应答, 从而影响机体免疫系统的抗病毒作用^[25]。

目前世界上使用较为广泛的痘病毒有两株, 一株是 NYVAC, 它是痘病毒哥本哈根株 (vaccinia virus Copenhagen, VACV-Cop) 的衍生株, NYVAC 是人为地将哥本哈根株的基因组敲除了 18 个开放阅读框获得的减毒株, 其中 12 个开放阅读框都位于 CK 区^[26]; 另一株是改良牛痘病毒安卡拉株 (Modified Vaccinia virus Ankara, MVA), MVA 是由一株称为安卡拉株的天花病毒经过在鸡胚成纤维细胞 (CEF) 中的 500 次连续传代而自然形成的减毒株, 它在传代过程中丢失了约 15% 的基因, 因此减毒明显, 其基因组两端包括左侧 CK 区和右侧 AB 区丢失了大量毒力相关基因^[27]。目前关于这两株病毒的相关研究较为成熟, 因此它们也被广泛地用于各类科学研究。已经有大量以这两个病毒为载体的疫苗进入临床研究, 如针对 HIV 的 NYVAC-C^[28]、MVA-CMRD^[29]; 针对流感病毒的 MVA-NP+M1^[30]; 针对疟疾的 NYVAC-Pf7^[31], 其安全性也得到了广泛证实。

痘病毒天坛株为我国上世纪用于消灭天花的疫苗株, 是我国科学家取天花患者带疱浆的痂皮, 经猴子、家兔、犍牛的多次传代获得的疫苗株。相比于上述两种疫苗株, 关于天坛株的研究较为有限, 因此本课题选择国内的痘病毒天坛株作为表达载体, 研究其对病毒样颗粒的表达情况。痘病毒基因组为双链线性 DNA, 不同株之间的基因组大小和结构大同小异, 总体上都满足中间部分为保守区, 两端为非保守区的结构特点。分析上述两个广泛使用的痘病毒基因组可知, CK 区

基因主要为痘病毒非必须基因,对其进行删除不会影响到痘病毒正常的生长复制和增殖,但同时可进一步地降低痘病毒的毒力,为后续活病毒载体疫苗的研究打下一定基础,且 CK 区含有基因数量多,基因组大,对于外源基因的容量大,是非常好的同源交换区域。基于以上分析,本课题选择痘病毒天坛株的 CK 区作为外源基因插入区域,设计穿梭质粒的同源重组臂,构建穿梭质粒 pSCCK。

目前针对流感病毒样颗粒蛋白的组成还存在一定争议,有的研究倾向于加入结构蛋白 M 蛋白以促进完整颗粒的形成和释放,而一项利用 DNA 载体表达流感 VLPs 的研究表明, M1 蛋白不是流感病毒样颗粒的组装和出芽过程中所必需的^[32],而 HA 和 NA 蛋白不仅是流感病毒关键的表面抗原及独立蛋白,在病毒样颗粒中的形成也是必须的,不同研究产生的差异可能是由于表达系统的不同,目前还没有定论,每一种流感蛋白在 VLPs 的出芽和释放过程中的具体功能还有待进一步研究。由于病毒样颗粒通常由一个以上的蛋白构成,表达不同蛋白的重组病毒或重组载体共感染细胞时,进入同一个细胞的概率较低,且蛋白表达的比例也无法把控,因此降低了不同蛋白之间的互作可能性以及病毒样颗粒的组装效率,因此本研究选择构建一种重组病毒,且使用两个独立的启动子同时启动两个外源蛋白的表达,从而使 HA 和 NA 蛋白同步表达,这对后续病毒样颗粒的形成有一定保证。

在重组病毒的筛选过程中,重组质粒 pSCCK-HA/NA 与痘病毒天坛株共转染 Vero 细胞后,可以明显的感受到重组痘病毒相对于普通痘病毒来说,生长上不占优势,直观的表现是带荧光的噬斑出现时间晚于普通噬斑,且直径也明显小于普通噬斑。推测这种现象出现的原因是重组痘病毒随着外源基因的转入,毒力基因丢失,因此其复制能力和扩散能力减弱。

经过多轮重复挑选荧光噬斑后,成功筛选出纯的重组痘病毒 rVTT-HA/NA,摸索其生长条件如最最佳接种 MOI 以及生长曲线,同时摸索最佳蛋白表达 MOI 以及收获时间。病毒样颗粒初步纯化方法选择蔗糖密度梯度离心,通过 SRID 检测 HA 蛋白含量,最终获得 HA 蛋白占总蛋白的 26.3%,推测可能还有部分细胞培养过程中产生的杂蛋白无法通过蔗糖密度梯度离心纯化完全,且痘病毒能否完全被去除也无法保证,因此后期还需研究病毒样颗粒进一步纯化的方法,如色谱层析、离子交换法等方法。

通过免疫小鼠分析病毒样颗粒的免疫原性, 可以看到在体液免疫上, VLPs 免疫的小鼠血清中和抗体效价相对于全病毒灭活疫苗组较低, 但随着接种 VLPs 剂量的增加, 中和活性也在上升。值得注意的是 WIV 组在加强免疫后一周(第四周)中和抗体效价达到 1:360 后, 在第六周和第八周都有幅度较大的下降, 最终降为 1:200, 而 VLPs 组三组中和抗体效价在加强免疫后一周(第四周)直到第六周一直上升, 在第八周有微弱下降, 10 μg 剂量组第八周中和抗体滴度仍有 1:160, 与全病毒灭活疫苗组最终效价相当。分析实验结果, 推测 VLPs 可能在初步纯化过程中含有许多哺乳细胞来源的杂蛋白, 干扰了中和抗体的产生, 使 VLPs 实验组获得的中和抗体滴度低于 WIV 组, 但 VLPs 颗粒免疫获得的中和抗体活性可维持时间更长, 免疫效果更为持久, 而全病毒灭活疫苗组接种诱导的中和抗体活性消失较快。免疫应答的持久性是衡量疫苗效果的一个非常重要的指标, 因此 VLPs 在这方面更具优势。细胞免疫方面, 通过淋巴细胞分型可以看到 VLPs 实验组的三组 $\text{CD8}^+\text{T}$ 细胞比例均比阳性对照 WIV 组高, 且脾脏中分泌细胞因子 $\text{IFN-}\gamma$ 的淋巴细胞比例, VLPs 实验组也比 WIV 组高, 这证明 VLPs 免疫小鼠可以获得更强的细胞免疫效果。根据以上结果可以得到 VLPs 免疫小鼠诱发的体液免疫作用弱于全病毒灭活疫苗, 而细胞免疫效果则强于全病毒灭活疫苗。分析认为具有更强的细胞免疫激活能力, 且 VLPs 激发的免疫作用持续时间相对更长, 今后可以在这方面进行更加详细的分析。

小鼠免疫保护实验使用的攻毒毒株为同型病毒 H5N1 NIBRG-14 株, 由于实验室目前没有致死性同源毒株, 因此本实验通过小鼠体重变化来检测 VLPs 对小鼠的免疫保护作用。可以看到 VLPs 5 $\mu\text{g}/\text{只}$ 以及 10 $\mu\text{g}/\text{只}$ 剂量组均可对小鼠产生不同程度的保护作用, 并且 10 $\mu\text{g}/\text{只}$ 剂量组产生的保护效果与 WIV 对照组相当, 小鼠的体重在接种 4 天后逐步上升, 恢复正常, 起到了很好地保护作用。证明虽然流感病毒样颗粒诱发的血清中和抗体滴度相对较低, 但仍可通过其他免疫作用如 $\text{CD8}^+\text{T}$ 细胞杀伤作用发挥抗病毒功能。

5.2 总结与展望

总结：

1. 设计了痘病毒穿梭质粒 pSCCK，含筛选标记 EGFP 基因，以及两个独立启动子控制的多克隆位点用于插入外源基因，为以后利用痘病毒天坛株作为表达载体的相关课题提供了方便；
2. 用转入了 H5N1 亚型禽流感病毒 NIBRG-14 株 HA、NA 基因的重组穿梭质粒 pSCCK-HA/NA 与痘病毒天坛株共转染 Vero 细胞，筛选到了可以表达 HA、NA 蛋白的重组痘病毒 rVTT-HA/NA，并摸索了重组痘病毒的生长条件：最佳接种 MOI 为 0.5，最佳病毒培养时间为 120 h；
3. 成功在 Vero 细胞内表达并获得了流感病毒样颗粒，并对流感病毒样颗粒进行了鉴定，且摸索了最佳蛋白表达条件：最佳病毒接种 MOI 为 1.0，最佳蛋白收获时间为 120 h；
4. 用三种不同剂量的 VLPs（1 $\mu\text{g}/\text{只}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{只}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{只}$ ）免疫小鼠，以 H5N1 全病毒灭活疫苗为对照，通过体液免疫及细胞免疫分析 VLPs 免疫原性，得到如下结果：①VLPs 免疫小鼠可产生有效的血清中和抗体，且可刺激小鼠产生 IgG 抗体，但 IgG 抗体效价低于 WIV 组；②VLPs 刺激小鼠脾脏产生的 CD8⁺T 细胞比例及分泌 IFN- γ 的淋巴细胞比例高于 WIV 组；③5 $\mu\text{g}/\text{只}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{只}$ VLPs 剂量组均可对同型 H5N1 流感病毒攻击产生一定的保护性。

展望：

本课题将 H5N1 禽流感病毒 HA 基因及 NA 基因重组到痘病毒天坛株基因组非必需区 CK 区，获得了一株可以表达 HA 蛋白及 NA 蛋白的重组痘病毒 rVTT-HA/NA。由于 CK 区基因主要为毒力决定基因，因此缺失了 CK 区部分基因的重组痘病毒理论上毒力会减弱，而这个假设也在重组病毒的筛选过程中得到了进一步的佐证。因此后续可以针对 rVTT-HA/NA 的生物学特点进行进一步研究，分析毒力减弱后的痘病毒是否适合作为疫苗载体，可直接纯化 rVTT-HA/NA 免疫小鼠，分析其免疫原性并与病毒样颗粒免疫原性进行比较，做进一步探究。

参考文献

- [1]. Brown, E.G., Influenza virus genetics. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2000. 54(4): p. 196-209.
- [2]. Bodewes, R., et al., Recurring Influenza B Virus Infections in Seals. *Emerging Infectious Diseases*, 2013. 19(3): p. 511-512.
- [3]. Mathew, N.R. and D. Angeletti, Recombinant Influenza Vaccines: Savors to Overcome Immunodominance. *Frontiers in Immunology*, 2020. 10.
- [4]. Kwon, J.S., et al., Vaccinia-based influenza vaccine overcomes previously induced immunodominance hierarchy for heterosubtypic protection. *European Journal of Immunology*, 2014. 44(8): p. 2360-2369.
- [5]. Wu, Y., et al., Bat-derived influenza-like viruses H17N10 and H18N11. *Trends in Microbiology*, 2014. 22(4).
- [6]. 杨春 and 余佳, 甲型流感病毒抗原变异的机理. *国际病毒学杂志*, 1999(03): p. 88-90.
- [7]. Smith, W., C.H. Andrewes, and P.P. Laidlaw, A VIRUS OBTAINED FROM INFLUENZA PATIENTS. 1933.
- [8]. 隋竑弢, et al., 1957 年流感大流行的流行病学概述. *病毒学报*, 2009. 25(s1): p. 27-32.
- [9]. Oxford, J.S., Influenza A pandemics of the 20th century with special reference to 1918: Virology, pathology and epidemiology. *Reviews in Medical Virology*, 2000. 10(2): p. 119-133.
- [10]. Kilbourne and D. Edwin, Influenza Pandemics of the 20th Century. *Emerging Infectious Diseases*, 2006. 12(1): p. 9-14.
- [11]. Dawood, F.S., et al., Emergence of a Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus in Humans. *N Engl J Med*, 2009. 360(25).
- [12]. 舒跃龙, 乙型流感病毒的分子生物学. *国际病毒学杂志*, (1): p. 3-8.
- [13]. 卫生部, 流行性感诊诊断与治疗指南(2011 年版). *全科医学临床与教育*, 2011. 34(3): p. 725-734.
- [14]. Young, B., et al., Duration of Influenza Vaccine Effectiveness: A Systematic Review, Meta-analysis, and Meta-regression of Test-Negative Design Case-Control Studies. *Journal of Infectious Diseases*, 2017.

- [15]. Feng, S.Z., et al., Development and strategies of cell-culture technology for influenza vaccine. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2011. 89(4): p. p.893-902.
- [16]. Hegde, N.R., Cell culture-based influenza vaccines: A necessary and indispensable investment for the future. *Human Vaccines*.
- [17]. Suzuki, T., et al., Relationship of the quaternary structure of human secretory IgA to neutralization of influenza virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2015. 112(25): p. 7809-7814.
- [18]. Cox, M.M.J. and J.R. Hollister, FluBlok, a next generation influenza vaccine manufactured in insect cells. *Biologicals*, 2009. 37(3): p. 182-189.
- [19]. Cox, M.M.J., P.A. Patriarca, and J. Treanor, FluBlok, a recombinant hemagglutinin influenza vaccine sp. *Influenza & Other Respiratory Viruses*, 2008. 2(6): p. 211-219.
- [20]. Zlotnick, A. and S. Mukhopadhyay, Virus assembly, allostery and antivirals. *Trends in Microbiology*, 2011. 19(1): p. 0-23.
- [21]. Visciano, M.L., et al., Generation of HIV-1 Virus-Like Particles expressing different HIV-1 glycoproteins. *Vaccine*, 2011. 29(31): p. 0-4912.
- [22]. 阚式绂, 减毒痘苗病毒天坛株的构建、致病性及免疫原性研究. 2013, 吉林大学.
- [23]. 庞聪 and 田厚文, 非复制型痘苗病毒的生物学性状研究进展. *生物技术通讯*, 2014(3).
- [24]. Ramsey-Ewing, A. and B. Moss, Restriction of Vaccinia Virus Replication in CHO Cells Occurs at the Stage of Viral Intermediate Protein Synthesis. *Virology*, 1995. 206(2): p. 984-993.
- [25]. Meng, X., et al., Vaccinia Virus K1L and C7L Inhibit Antiviral Activities Induced by Type I Interferons[▽].
- [26]. Tartaglia, J., et al., NYVAC: a highly attenuated strain of vaccinia virus. *Virology*, 1992. 188(1): p. 217-232.
- [27]. Sutter, G. and C. Staib, Vaccinia Vectors as Candidate Vaccines: The Development of Modified Vaccinia Virus Ankara for Antigen Delivery. *Curr Drug Targets Infect Disord*, 2003. 3(3): p. 263-271.
- [28]. Bart, P.A., et al., EV01: A phase I trial in healthy HIV negative volunteers to evaluate a clade C HIV vaccine, NYVAC-C undertaken by the EuroVacc Consortium. *Vaccine*, 2008. 26(25): p. 0-3161.

- [29]. Currier, J.R., et al., Phase I safety and immunogenicity evaluation of MVA-CMDR, a multigenic, recombinant modified vaccinia Ankara-HIV-1 vaccine candidate. *Plos One*, 2010. 5(11): p. e13983.
- [30]. Berthoud, T.K., et al., Potent CD8⁺ T-Cell Immunogenicity in Humans of a Novel Heterosubtypic Influenza A Vaccine, MVA-NP+M1. *Clinical Infectious Diseases*, 2011(1): p. 1.
- [31]. Ockenhouse, C.F., et al., Phase I/IIa safety, immunogenicity, and efficacy trial of NYVAC-Pf7, a pox-vectored, multiantigen, multistage vaccine candidate for *Plasmodium falciparum* malaria. 1998.
- [32]. Ogra, P.L., H. Faden, and R.C. Welliver, *Vaccination Strategies for Mucosal Immune Responses*. 2001.

综述

痘苗病毒天坛株载体研究进展

摘要: 痘苗病毒天坛株是中国用于预防天花的疫苗株, 在中国消灭天花运动中发挥了至关重要的作用由中国科学家构建的。其后又被成功开发为高效的外源基因表达载体, 多次被用于表达外源基因或研制基因工程疫苗。痘苗病毒宿主范围广, 在胞质内复制, 非必须基因多, 可插入外源基因片段长, 有长期的人体应用历史, 无致癌性, 安全性高且诱导的免疫反应强, 因此非常适合用作基因工程载体。本文介绍了痘苗病毒天坛株近几年来用作基因工程载体的研究情况以及减毒的研究进展, 同时也综合对比了目前研究广泛的几株痘苗病毒, 希望为更多以痘苗病毒天坛株为载体的疫苗研究及蛋白表达提供有价值的信息。

关键词: 痘苗病毒天坛株; 基因工程载体; 疫苗; 减毒

Research Progress of Vaccinia Virus Tiantan Vector

Abstract: Vaccinia virus Tiantan (VTT) is a vaccine strain used by Chinese scientists against smallpox, which was of vital important in the eradication of smallpox. After which it was constructed as efficient expression vector and used as vaccine vectors to express foreign genes. VTT has wide host range, replicates in cytoplasm, can be inserted of large amounts of foreign DNA and has been used for human beings for a long time, which means the safety can be guaranteed. In addition to this, VTT can induce strong immune response, so it is suitable for using as genetic engineering vector. This article demonstrates the research progress of VTT in expressing proteins and the attenuation in the last years, and compares different vaccinia virus used extensively in the world. We hope this article can provide valuable information for other researches about VTT.

Key words: Vaccinia virus Tiantan; Genetic engineering vector; Vaccine; Attenuation

痘病毒在现代疫苗学和免疫学上有非常深远的应用历史。天花是人类历史上最令人恐惧的疾病之一，它是由天花病毒引起的一种烈性传染病，感染天花病毒的死亡率高达 30%~40%，据后世学者估计，天花病毒导致的死亡人数高达 2 亿人，1979 年，世界卫生组织宣布人类成功消灭天花。天花病毒是历史上第一株被人为消灭的病毒，这主要归功于痘苗病毒^[1]。1798 年，英国人爱德华·詹纳发现将从牛身上分离得到的牛痘病毒接种到人身上后会产生对天花病毒的交叉保护作用，基于此方法，人类逐渐开始大规模地使用痘苗病毒预防天花，由此，消灭天花运动得以开展。

在全球使用范围最广的痘苗病毒有：EM63 株、李斯特株、NYCBH 株以及天坛株^[2]。表 1 列出了第一代用于预防天花的痘苗病毒。天坛株是由中国科学家构建的疫苗株，主要使用时间为 1926-1954 及 1960-1980 年^[3]，在这五十年间，接种了数亿人次，在中国消灭天花运动中起到了关键性作用^[1]。

表 1 作为第一代天花疫苗的痘苗病毒株^[2]

Tab.1 List of Vaccinia virus strains as the first generation of smallpox vaccine

痘苗病毒株	主要使用国家
NYCBH	美国
李斯特株	欧洲、亚洲、非洲、美国、英国
天坛株	中国
EM-63	苏维埃社会主义共和国联盟（USSR）、印度
Tashkent	USSR
Bern	德国、澳大利亚
Paris	法国、捷克、叙利亚
哥本哈根株	丹麦
Dairen、Ikeda	日本

1. 痘苗病毒天坛株的起源

痘苗病毒天坛株是由齐长庆先生取天花患者带疱浆的痂皮，经猴子、家兔、犍牛的多代传代获得的疫苗株^[3]。金奇等^[4]在上世纪九十年代对痘苗病毒天坛株进行了全基因组测序，并对其基因组结构进行了分析，得知天坛株共含有 189274bp，其中腺嘌呤和胸腺嘧啶核苷酸含量丰富，A+T 达到 67%。天坛株基

基因组具有正痘病毒属的典型结构，且具有较为独特的被自身 RNA 聚合酶所识别的启动子，并且分为早期，晚期，早晚期启动子，这些启动子在结构上也有所不同。天坛株相比其他痘苗病毒株的主要差异在于基因组旁侧区大片段的缺失和插入。2013 年，Li 等^[5]对经空斑纯化分离出的天坛株克隆株进行全基因组测序分析，新的测序结果与之前金奇等在上世纪测序的结果有一定的差异，推测部分原因可能是之前的测序由于年代久远存在一定错误，并且天坛株基因组随着时间推移也发生了一定的突变。系统发生学方法分析表明，天坛株属于牛痘病毒（VACA）下独立的一个分支，可能与哥本哈根/李斯特株有相同的起源。

痘苗病毒天坛株能否用作表达载体表达外源蛋白，基因组上的非必须区起决定性作用。徐水蟬^[6]等利用 lacZ 报告基因对天坛株基因组非必须区进行了研究，发现有四个非必须区（HindIII M-Sph I、HindIII K-3rd Bgl II、Hind K-4th Bgl II、HindIII K/F-HIII）在插入外源基因后对天坛株的毒力没有明显的影响，且检测的七个非必须区在插入 lacZ 基因后均可稳定表达，重组病毒具有稳定性。为痘苗病毒天坛株可作为基因工程载体表达蛋白提供了关键依据。

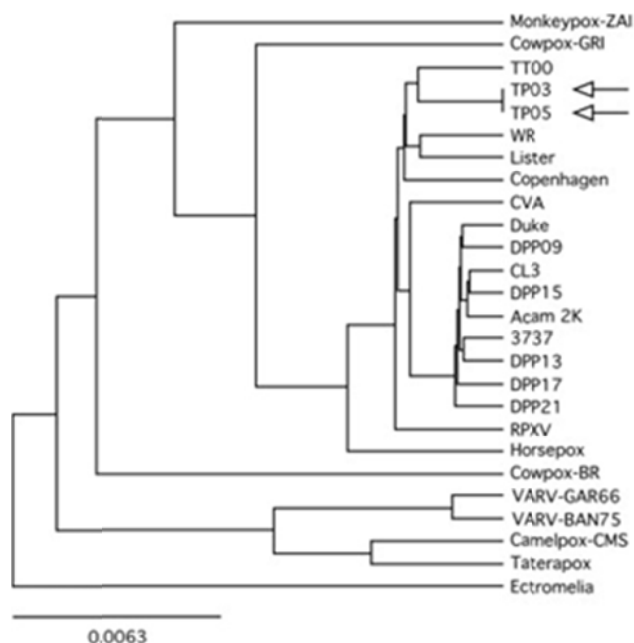


图 1 正痘病毒科不同病毒系统发生学关系（TP03、TP05 为痘病毒天坛株亚克隆株）

引用自文献^[3]

Fig.1 Phylogenetic relationships between different Orthopoxviruses.

2. 重组痘苗病毒天坛株

上世纪八十年代,随着生物技术以及基因工程的发展,痘苗病毒逐渐开始作为表达载体被广泛研究。1982 年,首次有文献报道将外源基因插入病毒基因组的非必须区构建出重组病毒^[7,8],其后,多种表达不同外源抗原的重组病毒被构建出来作为疫苗候选株预防或治疗人和动物的不同的疾病。痘苗病毒的宿主范围广,可在多种不同细胞系内繁殖;基因组巨大,非必须基因多,可以插入总量达 25kb 的外源基因,并且可以稳定的遗传和表达,且可以同时插入在病毒基因组的不同区域插入不同外源基因,互不干扰,因此非常适合用于构建多价疫苗。不仅如此,由于痘苗病毒在胞质内复制,不会整合到宿主基因组中,因此具有作为疫苗载体所必需的安全性;而且重组病毒表达的蛋白质可以在细胞质内进行加工后修饰,表达的蛋白具有天然构象和活性,为后续诱导机体产生较强的免疫反应奠定了基础。国外研究最为广泛的痘苗病毒有 NYVAC、MVA (Modified Vaccinia Virus Ankara, 改良牛痘病毒安卡拉株) 等,利用这些载体构建了诸多针对不同疾病的重组疫苗候选株。

表 2 以 MVA 或 NYVAC 为载体的不同重组痘病毒

Tab.2 Different recombinant vaccinia virus based MVA/NYVAC as vector

痘苗病毒	针对疾病或病毒	外源抗原	参考文献
MVA	HIV/AIDS	HIV-1 Env,Gag (clade C)	[9]
	InfluenzaA	NP+M1	[10]
	HepatitisB	HBs	[11]
	SARS	Nucleocapsid	[12]
NYVAC	HIV/AIDS	HIV-1 Env,Gag-Pol-Nef(clade B)	[13]
	MeV	HA	[14]
	Malaria	CS	[15]

而在国内,在天坛株帮助消灭天花病毒后,科学家们开始将关注点转移到了痘苗病毒天坛株作为表达载体的特性上,从上世纪九十年代以来先后构建了多种表达不同蛋白的重组病毒,如表达乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)^[16]、狂犬病毒糖蛋白^[17]、甲型肝炎病毒全部开放读码框 cDNA^[18]、单纯疱疹病毒 I 型(HSV-1)糖蛋白 D^[19]、汉滩病毒糖蛋白 G1、G2 和核蛋白 NP^[20]等多种蛋白的重组病毒。

近几年来,也有诸多重组痘苗病毒被构建出来,如王宏宇^[21]利用同源重组技术,设计了以 TC7L-TK2L 和 TJ2R 侧翼基因为同源重组臂的穿梭质粒,利用质粒上携带的 EGFP 荧光基因筛选出含有包括黄热病毒 E 基因、汉坦病毒 S 基因、克里米亚-刚果出血热病毒 M 基因、炭疽杆菌 POAX2 基因、埃博拉病毒 S 基因、马尔堡病毒 G 基因、辛诺柏病毒 G2 基因及非洲欧尼恩病毒 E2 基因等八种基因的重组痘病毒,为多联疫苗的构建奠定了一定的基础。王文等^[22]利用含流感病毒 H5N1 结构基因的 DNA 疫苗 pVRC-HAop、pVRC-NAop、pIRES-HAop/M2 及 pIRES-NAop/M1 及重组痘苗病毒天坛株疫苗 rTTV-HAop/M2 及 rTTV-NAop/M1,单独或联合免疫 BALB/c 小鼠,结果表明,采用 DNA 疫苗初免,重组痘病毒疫苗 rttv 加强的联合免疫可激发出更强的体液与细胞免疫应答,具有被开发为 H5N1 候选疫苗的潜力。另外刘存霞等^[23]也利用包含 HIV 复合表位的 DNA 疫苗 pCCMp24 及重组减毒痘病毒天坛株 rddVTT-CCMp24 进行小鼠单独免疫及联合免疫,同样得到了联合接种所诱导的免疫应答强于 DNA 疫苗或重组痘苗单独接种的结论。以上的研究结果为重组痘苗病毒应用于临床时接种策略的制定提供了理论基础。

由于痘苗病毒基因组巨大,常规的酶切连接难以导入外源基因,因此构建重组痘苗病毒天坛株的常规策略为利用穿梭质粒载体通过同源重组的方法将外源基因导入痘苗病毒不同区域,再通过抗性药物或标记基因筛选重组病毒。目前最常用的外源蛋白表达区主要有痘苗病毒毒力相关基因及宿主范围相关基因,如胸苷激酶基因(thymidine kinase, TK)区,血凝素基因 (thymidine kinase, HA)区,病毒基因组 HindIII 内切酶标记的 C 到 K 片段等区域。插入的外源基因在痘病毒启动子如早/晚期启动子 p7.5 及 PE/L 的作用下,可以实现体内或体外的表达。但由于同源重组的成功率较低,且筛选周期长,筛选程序较为复杂,导致重组病毒的筛选效率不高^[24]。

近期,中国医学科学院病原生物学研究所张迪等将 CRISPER (Clustered regularly interspaced short palindromic repeat)-Cas9 技术用于构建重组痘苗病毒,建立了较为高效的痘苗病毒重组系统。该研究构建了三个靶向痘苗病毒天坛株 TK 区的 gRNA-Cas9 的质粒并通过转染建立了稳定表达 gRNA-Cas9 的细胞系;同时通过在细胞内先后转染重组质粒 px330-delNLS-gRNA 及 pJ2R-EGFP,并感

染 VTT, 经过筛选获得表达 EGFP 的重组病毒。此方法通过 CRISPR-Cas9 技术切割病毒基因组产生切口, 提高与质粒的重组效率, 可以将重组病毒获得率从传统同源重组的 1% 提高到 10%^[25]。

3. 痘苗病毒天坛株的减毒

目前应用最为广泛的几株痘苗病毒如 NYVAC、MVA 病毒均为减毒株。NYVAC 是历史上第一株基因工程减毒株, 它是由哥本哈根疫苗株被精准缺失 18 个开放阅读框 (ORF) 后获得的, 其去除的基因包括胸苷激酶基因 (ORF J2R)、核糖核苷酸还原酶基因 (ORF I4L)、病毒血凝素基因 (ORF A56R)、与形成 A 型包涵体相关的高表达基因 (ORF A26L)、编码丝氨酸蛋白酶抑制剂基因 (ORFs B13R/B14R)、病毒宿主范围相关基因 (ORFs C7L-K1L) 以及毒力相关基因 (ORFs N1L, C3L) 等, 获得了一株高度减毒但仍保留了诱导针对外源抗原的免疫应答能力的痘病毒^[26], 在其后被广泛用于研制各类针对不同抗原的重组疫苗。

改良牛痘病毒安卡拉株 (MVA) 是由安卡拉株在原代鸡细胞中经过连续培养传代获得的, 适应了禽类细胞中生长的 MVA 丢失了接近 15% 的亲本基因, 其中包括大量宿主范围相关基因及调节免疫应答相关基因, 因此几乎丧失了哺乳细胞内复制的能力, 具有高度安全性, 但同时其又具有较强的激发机体免疫反应的能力, 因此被广泛用于开发为病毒载体, 目前已有多种重组 MVA 疫苗进入临床前或临床试验^[27-28]。

而国内对于痘苗病毒天坛株的减毒研究则相对来说要晚了许多, 这也是目前天坛株的研究与应用程度明显弱于 NYVAC 或 MVA 的主要原因。尽管痘苗病毒天坛株曾作为预防天花的疫苗株, 但其作为嗜神经性病毒, 本身还是具有一定毒力, 会引起部分接种者出现乏力、发热、皮疹等不良反应, 严重者甚至可能出现全身性发痘或急性脑炎等症状, 这些副作用都限制了痘苗病毒天坛株的广泛使用。因此, 要充分利用痘苗病毒天坛株, 将其广泛开发为疫苗载体, 对其进行减毒并且同时保留其免疫原性是非常有必要的。

阮力等^[29]通过基因重组技术敲除了痘苗病毒天坛株基因组中 C 到 K 片段间 21243 个核苷酸序列, 26 个基因 (TC1L-TC19L、TN1L-TN2L、TM1L-TM2L、TK1L-TK3L), 构建出毒力减弱但保留了良好的 DNA 复制、RNA 转录及蛋白质翻译等功能, 可在鸡胚细胞中正常繁殖, 但在人体内不能有效繁殖的复制缺陷型

痘苗病毒 NTV。在后续的研究中,赵颖等^[30]对 NTV 的细胞生物学特性及复制缺陷机制进行了研究,结果表明 NTV 相比于天坛株 VTT,仅可在 CEF 及 BHK-21 细胞中正常复制及扩散,而在其他哺乳动物细胞系如 HeLa、143TK -、2BS 和 Vero 中传播能力减弱,无法有效复制,允许细胞范围减小。

李一权等^[31]通过同源重组技术及 Cre/loxP 系统敲除天坛株上的 TC7L~TK2L(包括 C1L-C7L、N1L-N2L、M1L-M2L、K1L-K2L、TE3L、TA35R、TB13R 及 TA66R)等基因片段,构建了基因缺失天坛株 MVTTEAB,且分析表明,MVTTEAB 同样具有毒力减弱,宿主范围减小等特点,对其免疫原性进行分析可以发现减毒病毒仍可以刺激机体产生较强的免疫反应,保留了其作为疫苗的免疫原性。

减毒痘苗病毒可以在保留其诱发宿主免疫反应能力的同时,降低其本身的毒力,从而增加其应用的广泛性,可以为疫苗的开发奠定基础。

表 3 不同天坛株减毒株及其减毒位点

Tab.3 Different attenuated vaccinia virus Tiantan strains and the respective deletion

病毒名称	删减区域	参考文献
VTT Δ C7LK1L	C7L、K1L	[32]
MVTT	I4L	[33]
NTV	C1L-C19L、N1L-N2L、 M1L-M2L、K1L-K3L	[29]
TTVAC7	C7L-K2L、A35L、A66R、 E3L-E4L、B13R、I4L、J2R	[31]
VTKgpe	A53R、C12L	[34]
VTT Δ B8R	B8R	[35]

4. 小结及展望

痘病毒的特性使其非常适合用作重组疫苗载体,通过构建表达不同抗原的重组毒株,可以获得针对不同病原体的候选疫苗。目前已经有多种处于临床前或临床试验阶段的重组疫苗被研发出来,诸多结果显示以痘病毒为载体的疫苗候选株可以提供显著的保护力。如我国疾病预防控制中心邵一鸣博士的团队,利用痘苗病毒天坛株研制的 HIV 疫苗,动物实验证明在恒河猴上可以抵御 SHIV 病毒^[36],

目前该疫苗已经完成了一期和二期临床试验^[37], 在国际上艾滋病疫苗研制中处于领先水平。除了感染性疾病, 针对肿瘤的重组痘病毒疫苗也具有不错的应用前景, 由于痘病毒本身可以激发人体免疫作用, 作为疫苗载体对肿瘤进行免疫治疗时, 可以诱发机体更强的免疫作用, 对肿瘤的杀伤效果也会更强。

痘病毒天坛株的进一步减毒是其广泛应用前目前亟待解决的问题。随着基因编辑技术以及基因合成技术的发展, 对痘病毒天坛株基因组的操作会更加容易, 同时人们对天坛株基因功能及毒力基因的研究也会更加深入, 这些进展有利于早日获得可以广泛使用且对人体毒副作用小的减毒天坛株, 从而更有可能作为疫苗候选株用于人体接种。

参考文献:

- [1] Fenner F, Henderson DA, Arita I, et al. Smallpox and its eradication [M]. Geneva: World Health Organization, 1988.
- [2] Lucas Sánchez-Sampedro, Perdiguero B , Ernesto Mejías-Pérez, et al. The Evolution of Poxvirus Vaccines[J]. Viruses, 2015, 7(4):1726-1803.
- [3] DONG Shulin. ChangQing Qi, the creater of the vaccinia virus TianTAN [J]. Progress in Microbiology and Immunology, 2009, 37(3):1-3.
- [4] 金奇, 陈南海. 痘病毒天坛株全基因组结构特点的分析[J]. 中国科学, 1997(6):562-567.
- [5] Qin L , Liang M , Evans D H . Genomic analysis of vaccinia virus strain TianTan provides new insights into the evolution and evolutionary relationships between Orthopoxviruses[J]. Virology, 2013, 442(1):59-66.
- [6] 徐水蝉, 阮力, 朱既明. 痘病毒天坛株非必需区与病毒生物学性状的关系[J]. 病毒学报, 1992(04):293-302.
- [7] Panicali D , Paoletti E . Construction of poxviruses as cloning vectors: insertion of the thymidine kinase gene from herpes simplex virus into the DNA of infectious vaccinia virus.[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1982, 79(16):4927-4931.

- [8] Mackett M , Smith G L , Moss B . Vaccinia virus: a selectable eukaryotic cloning and expression vector.[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1982, 79(23):7415-7419.
- [9] Garber D A , O'Mara L A , Gangadhara S , et al. Deletion of Specific Immune-Modulatory Genes from Modified Vaccinia Virus Ankara-Based HIV Vaccines Engenders Improved Immunogenicity in Rhesus Macaques[J]. Journal of Virology, 2012, 86(23):12605-15.
- [10] Antrobus R D , Berthoud T K , Mullarkey C E , et al. Coadministration of Seasonal Influenza Vaccine and MVA-NP+M1 Simultaneously Achieves Potent Humoral and Cell-Mediated Responses[J]. Molecular Therapy, 2014, 22(1):233-238.
- [11] Cavanaugh J S , Awi D , Mendy M , et al. Partially Randomized, Non-Blinded Trial of DNA and MVA Therapeutic Vaccines Based on Hepatitis B Virus Surface Protein for Chronic HBV Infection[J]. PLOS ONE, 2011, 6.
- [12] Schulze K , Staib C , Sch?Tzl H M , et al. A prime-boost vaccination protocol optimizes immune responses against the nucleocapsid protein of the SARS coronavirus[J]. Vaccine, 2008, 26(51):6678-6684.
- [13] José Luis Nájera, Carmen Elena Gómez, Juan García-Arriaza, et al. Insertion of Vaccinia Virus C7L Host Range Gene into NYVAC-B Genome Potentiates Immune Responses against HIV-1 Antigens[J]. PLOS ONE, 2010, 5.
- [14] Kovarik J , Gaillard M , Martinez X , et al. Induction of Adult-like Antibody, Th1, and CTL Responses to Measles Hemagglutinin by Early Life Murine Immunization with An Attenuated Vaccinia-Derived NYVAC(K1L) Viral Vector[J]. Virology, 2001, 285(1):12-20.
- [15] Lanar D E , Tine J A , Taisne C D , et al. Attenuated vaccinia virus-circumsporozoite protein recombinants confer protection against rodent malaria.[J]. Infection & Immunity, 1996, 64(5):1666-1671.
- [16] 刘庚起,曹旭,朱既明,任贵方,李红梅,解燕乡,彭薇.以 β -半乳糖苷酶为标记选出高效表达乙型肝炎病毒表面抗原的天坛株重组痘苗病毒[J].中国科学(B 辑 化学 生命科学 地学),1989(06):627-634.
- [17] 李萍萍,陈乃民,朱家鸿.用 Lac 基因筛选表达狂犬病毒糖蛋白的重组痘苗病毒[J].中国病毒学,1993(03):293-295.

- [18] 高峰,郭可睿,阮力,伊瑶,刘崇柏,朱既明.甲型肝炎重组痘苗病毒(VMS11HAV25)的构建及其某些生物学性质[J].病毒学报,1992(02):110-117.
- [19] 李景赞,胡裕文,容敏清,阮力,侯云德,朱既明.采用我国痘苗病毒天坛株载体表达单纯疱疹病毒 I 型糖蛋白 D[J].病毒学报,1991(02):120-124+199.
- [20] 姚树元,杭长寿,邱建明,马章亮,李德新,薛颖,李川,宋干.汉滩病毒糖蛋白 G1 G2 和核蛋白 NP 在痘苗病毒天坛株中的联合表达[J].病毒学报,1998(02):29-33.
- [21] 王宏宇. 八联重组痘苗病毒天坛株的构建及筛选[D].吉林农业大学,2014.
- [22] 王文,陈红,邓瑶,杨扬,殷霄,王敏,周剑芳,舒跃龙,阮力,谭文杰.含 H5N1 多个结构抗原的 DNA 疫苗与重组痘苗病毒疫苗联合免疫小鼠可明显增强免疫原性[J].病毒学报,2011,27(06):594-598.
- [23] 刘存霞,杜寿文,李昌,王宇航,王茂鹏,李沂,尹荣兰,李霄,任大勇,秦艳青,任静强,金宁一.HIV 复合表位 DNA 重组体和痘苗病毒疫苗联合免疫实验研究[J].中国科学:生命科学,2013,43(05):411-420.
- [24] Ball L A . High-frequency homologous recombination in vaccinia virus DNA[J]. Journal of Virology, 1987, 61(6):1788-1795.
- [25] 张迪, 许丰雯, 熊梓辰, et al. 高效重组痘苗病毒天坛株载体系统的建立[J]. 病毒学报, 2019(2).
- [26] Tartaglia J , Perkus M E , Taylor J , et al. NYVAC: a highly attenuated strain of vaccinia virus.[J]. Virology, 1992, 188(1):217-232.
- [27] Hochsteinmintzel V , Hänichen T, Huber H C , et al. [An attenuated strain of vaccinia virus (MVA). Successful intramuscular immunization against vaccinia and variola (author's transl)].[J]. Zentralbl Bakteriolog Orig A, 1975, 230(3):283-297.
- [28] Volz A , Sutter G . Modified Vaccinia Virus Ankara: History, Value in Basic Research, and Current Perspectives for Vaccine Development[J]. Advances in Virus Research, 2016, 97:187-243.
- [29] 阮力, 朱既明, 娄元梅, et al. 复制缺陷型天坛株痘苗病毒: CN.
- [30] 赵颖,黄盼盼,赵莉,任皎,张鹏,阮力,谭文杰,田厚文.复制缺陷型痘苗病毒天坛株的细胞生物学特性及复制缺陷机制探究[J].病毒学报,2019,35(01):58-63.

- [31] Li Y , Sheng Y , Chu Y , et al. Seven major genomic deletions of vaccinia virus Tiantan strain are sufficient to decrease pathogenicity[J]. Antiviral research, 2016, 129(31):1-12.
- [32] Zheng L , Shuhui W , Qicheng Z , et al. Deletion of C7L and K1L Genes Leads to Significantly Decreased Virulence of Recombinant Vaccinia Virus TianTan[J]. PLoS ONE, 2013, 8(7):e68115-.
- [33] Generation of an attenuated Tiantan vaccinia virus by deletion of the ribonucleotide reductase large subunit[J]. Archives of Virology, 2014, 159(9):2223-2231.
- [34] Dai K , Liu Y , Liu M , et al. Pathogenicity and immunogenicity of recombinant Tiantan Vaccinia Virus with deleted C12L and A53R genes[J]. Vaccine, 2008, 26(39):0-5071.
- [35] Huang W , Liu Y , Duan D L , et al. [The construction of attenuated Tiantan recombinant vaccinia virus vector with IFN-gamma receptor gene deletion][J]. Chinese journal of experimental and clinical virology, 2004, 18(1):43-46.
- [36] Liu Q , Li Y , Luo Z , et al. HIV-1 vaccines based on replication-competent Tiantan vaccinia protected Chinese rhesus macaques from simian HIV infection[J]. AIDS, 2015, 29(6):649-658.
- [37] Shao Y, Li T, Wolf H, et al. The safety and immunogenicity of HIV-1 vaccines based on DNA and replication competent vaccinia vector in Phase I clinical trial[J]. Retrovirology, 2009, 6: 404

在读期间论文发表情况

- [1] 邱冉, 闫璐瑶, 李兴航, et al. 表达 H5N1 亚型禽流感病毒结构蛋白的重组痘苗病毒的构建与鉴定[J]. 国际生物制品学杂志 (已录用)
- [2] 邱冉. 痘苗病毒天坛株载体研究进展[J]. 中华微生物学与免疫学杂志 (已接收)

致谢

三年时光荏苒，转瞬间我的三年研究生时光便结束了，这是十分难忘的三年，也是十分宝贵的三年。这三年里在科研方面，我进步良多，专业技能的提升为我未来的道路铺下了坚实的基础；待人处事以及人生的格局方面的进步更是对我的未来意义非凡。

首先便要感谢武汉生物制品研究所，是武汉所为我们的科研及课题提供了优渥的条件以及广阔的平台，同时为我们提供良好的生活条件，让我们可以全身心的投入自己的学习研究，同时也感谢武汉所的各位领导老师们对我们的帮助。

衷心感谢我的导师，杨晓明研究员。杨老师在繁忙的工作外还尽力为我们的课题作出指导，同时也在我们遇到困难时为我们指导方向。杨老师渊博的知识和深厚的人生阅历让我们感触良多，从每一次谈话中都能够汲取到新的东西。十分地感谢杨老师这三年的帮助。

还要特别感谢张家友师兄对我的帮助。师兄不仅仅是师兄，更像一位老师，在日常的研究以及学习中，为我们解决困难，提供帮助，保障我们课题的顺利进展以及良好的实验环境，十分感谢师兄三年来不辞辛劳的指导和帮助。

感谢病研二室的师兄师姐师弟师妹们，是你们的陪伴以及帮助让我的科研及生活更加多姿多彩。

感谢我的同学们，虽然身处不同科室，是你们平日的帮助才让我的实验能更加顺利的进行。

感谢病研一室、动物房、培养基室、采购部、物流部的各位老师的帮助！感谢吴杰老师在我动物实验上的帮助。

感谢我的家人给予我的支持，是你们的支持让我没有后顾之忧地完成我的学业。

最后感谢百忙之中抽出空来审阅我的论文的各位专家老师。