

# 柯萨奇病毒B3VP1重组腺病毒载体疫苗rAd/VP22-L-VP1的构建及表达\*\*\*

李 剑, 刘贵霞, 米立国, 蓝佳明, 张永红, 金玉怀

## Construction and expression of adenovirus-based coxsackievirus B3 VP1 recombinant adenovirus vector vaccine rAd/VP22-L-VP1

Li Jian, Liu Gui-xia, Mi Li-guo, Lan Jia-ming, Zhang Yong-hong, Jin Yu-huai

Department of Pathogenic Biology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, Hebei Province, China

Li Jian★, Master, Teaching assistant, Department of Pathogenic Biology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, Hebei Province, China  
lijian\_amy@sina.com

Correspondence to: Jin Yu-huai, Doctor, Professor, Master's supervisor, Department of Pathogenic Biology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, Hebei Province, China  
jinyuhuai@sina.com

Supported by: the Science & Technology Pillar Program of Hebei Province, No. 09276418D-5\*; Natural Science Foundation of Hebei Province, No. C2009001087\*

Received: 2011-09-07  
Accepted: 2011-12-25

### Abstract

**BACKGROUND:** Encoded by the UL49 gene of herpes simplex virus type 1 (HSV-1), VP22 is an alkaline protein. With the protein transduction domain (PTD), VP22 can mediate a transmembrane transduction of VP22-linked protein or DNA from the cells in which it is synthesized endogenously to adjacent cells, which shows advantage in gene targeting prevention.

**OBJECTIVE:** To construct a recombinant adenovirus based vaccine in order to express Vp22 of HSV-1 and the VP1, the main neutralizing antigen of coxsackievirus B3 (CV B3), and to observe the expression of exogenous gene in HEK293 cells.

**METHODS:** The DNA fragments of HSV-1 VP22 and CVB3 VP1 were amplified by PCR and linked by linker to produce VP22-L-VP1. The VP22-L-VP1 coding sequence was cloned to the pAdTrack-CMV plasmid to construct AdTrack-CMV/VP22-L-VP1. Then AdTrack-CMV/VP22-L-VP1 was transformed into Ecoli.Bj5183 carrying backbone plasmid pAdEasy-1 to produce the recombinant adenovirus plasmid pAd/VP22-L-VP1. HEK293 cells were transfected with pAd/VP22-L-VP1 to produce recombinant adenovirus rAd/VP22-L-VP1. The virus amplification and titration was performed on HEK293 cells and the exogenous gene expression was detected by Western blot.

**RESULTS AND CONCLUSION:** The titer of recombinant adenovirus rAd/VP22-L-VP1 of passage 4 was  $6.77 \times 10^7$  pfu/ml. And the expression of VP22-L-VP1 was verified on HEK293 cells by Western blotting. Recombinant adenovirus rAd/VP22-L-VP1 was generated successfully, which laid a foundation for further study on CVB3VP1 gene vaccine.

Li J, Liu GX, Mi LG, Lan JM, Zhang YH, Jin YH. Construction and expression of adenovirus-based coxsackievirus B3 VP1 recombinant adenovirus vector vaccine rAd/VP22-L-VP1. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(7): 1280-1284.  
[http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

### 摘要

**背景:** VP22 是单纯疱疹病毒 1 型(Herpes simplex virus type 1, HSV-1)UL49 基因编码的碱性蛋白质, 具有蛋白转导结构域 (protein transduction domain, PTD), 能够把与之融合的蛋白或与之结合的 DNA 等大分子跨膜递送到邻近细胞, 在基因靶向预防中表现出优势。

**目的:** 构建表达单纯疱疹病毒 1 型 VP22 与柯萨奇病毒 B3 主要中和抗原 VP1 融合蛋白的重组腺病毒载体疫苗, 观察外源基因在 HEK293 细胞中的良好表达。

**方法:** PCR 法扩增目的基因 HSV-1 VP22 和 CVB3 VP1, 经 Linker 连接, 将 VP22-L-VP1 插入腺病毒穿梭载体 pAdTrack-CMV, 构建重组穿梭质粒 AdTrack-CMV/VP22-L-VP1。再将此载体与腺病毒骨架载体 pAdEasy-1 在大肠杆菌 BJ5183 中进行同源重组, 生成重组腺病毒质粒 pAd/VP22-L-VP1, 脂质体介导 pAd/VP22-L-VP1 转染 HEK293 细胞包装重组腺病毒 rAd/VP22-L-VP1。HEK293 细胞上进行病毒扩增和滴定并检测外源基因的表达。

**结果与结论:** 构建的重组腺病毒载体 pAd/VP22-L-VP1 经过第 4 轮扩增, 其滴度达到  $6.77 \times 10^7$  pfu/mL, 体外感染 293 细胞可见 VP22 和 VP1 融合蛋白的表达。说明实验成功构建并包装重组腺病毒 rAd/VP22-L-VP1。

**关键词:** 柯萨奇病毒 B3; 腺病毒载体; 基因疫苗; 单纯疱疹病毒 1 型 VP22; 佐剂; 组织工程

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.07.033

李剑, 刘贵霞, 米立国, 蓝佳明, 张永红, 金玉怀. 柯萨奇病毒 B3VP1 重组腺病毒载体疫苗 rAd/VP22-L-VP1 的构建及表达 [J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(7): 1280-1284. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

## 0 引言

柯萨奇病毒B组3型(Coxsackievirus group B type 3, CVB3)感染导致的病毒性心肌炎严重危害人类健康, 开发具有较高基因转移率和靶向特异性的CVB3VP1基因疫苗是当前基因预防的关键因素。虽然腺病毒载体作为低毒高效的基因载体已被广泛应用, 但其表达的蛋白如不能很快地穿梭和扩散到更多的免疫活性细胞, 抗原提呈效率就不能有效提高。

在1988年, Green等<sup>[1]</sup>和Frankle等<sup>[2]</sup>首次

发现人类免疫缺陷病毒的反式激活蛋白能够跨膜导入细胞内, 并将其相关结构命名为蛋白转导域。在后续研究中人们相继发现其他一些具有蛋白转导功能的多肽, 其中单纯疱疹病毒1型(herpes simplex virus type 1, HSV-1) VP22是UL49基因编码的长301个氨基酸的碱性蛋白质, 具有蛋白转导结构域, 能够把与之融合的蛋白或与之结合的DNA等大分子跨膜递送到邻近细胞<sup>[3-4]</sup>。利用这一特性, 将与VP22融合的CVB3VP1抗原递送到周围的免疫活性细胞, 提高其抗原的提呈效率, 可望显著增强疫苗的免疫原性。

实验以CVB3主要中和抗原VP1为对象, 利用AdEasy腺病毒载体系统<sup>[5]</sup>构建表达HSV-1 VP22与CVB3主要中和抗原VP1融合蛋白的重组腺病毒rAd/VP22-L-VP1, 为CVB3VP1基因疫苗的进一步研究奠定基础。

## 1 材料和方法

**设计:** 单一样本观察实验。

**时间及地点:** 于2007-09/2010-03在河北医科大学病原生物学教研室完成。

**材料:**

**载体:** 腺病毒穿梭载体pAdTrack-CMV、骨架载体pAdEasy-1和大肠杆菌Bj5183由河北医科大学解剖学教研室米立国教授惠赠。质粒pAP85H由英国 Marie Curie 研究所 Peter O'Hare教授惠赠。质粒pcDNA3/VP1由本室前期构建。

**细胞:** HEK293细胞购自中国医学科学院基础所细胞中心。

**试剂及仪器:**

试剂及仪器	来源
pGEM-T 质粒、Taq DNA 聚合酶、T <sub>4</sub> DNA 连接酶	美国 Promega 公司
dNTPs	大连宝生物工程公司
限制性核酸内切酶 <i>Kpn</i> I, <i>Bam</i> H I, <i>Hind</i> III	日本 TaKaRa 公司
限制性核酸内切酶 <i>Pme</i> I, <i>Pac</i> I	英国 New England Biolabs 公司
DMEM 培养基	美国 Gibco 公司
胎牛血清(FBS)	中国杭州四季青生物工程公司
Lipofectamine™ 2000	美国 Invitrogen 公司
辣根标记山羊抗兔 IgG	北京中杉生物技术公司

**实验方法:**

**目的基因的扩增与鉴定:** 根据Genbank 登录的HSV-1 VP22基因序列(AY602769)和CVB3 VP1基因序列(M33854)并考虑连接需要, 分别设计各基因上下游引物, 经引物分析软件 Primer Premier 5.0分析设计的可行性。由上海生工基因技术公司合成。

VP22-L(带Linker的VP22)引物: 上游: 5'- GGT ACC ACC ATG ACC TCT CGC CGC TCC GTG AAG T-3'; 下游: 5'-T GGA TCC TCC TCC TCC ACT ACC TCC TCC TCC CTC GAC GGG CCG TCT G-3'。

VP22-L上游引物含 *Kpn* I 酶切位点(下划线部分)和起始密码子ATG, ATG和 *Kpn* I 酶切

位点之间有Kozak序列ACC。下游引物含有接头(Linker)序列(下划线部分), 其互补的编码链编码的氨基酸是甘-甘-甘-甘-丝-甘-甘-甘-甘-丝(Gly<sub>4</sub>SerGly<sub>4</sub>Ser), 还含有 *Bam* H I 识别序列GGA TCC, 5'端有1个保护碱基T, 不含终止密码子。

L-VP1(带Linker的VP1)引物: 上游: 5'-TA GGA TCC GGT GGA GGT GGA TCA GGC CCA GTG GAA G-3'; 下游: 5'- C AAG CTT CTA AAA TGC GCC CGT ATT TGT CAT TG-3'。

L-VP1上游引物含有接头(Linker)序列(下划线部分), 编码的氨基酸是甘-丝-甘-甘-甘-甘-丝(GlySerGly<sub>4</sub>Ser), 含有 *Bam* H I 识别序列GGATCC, 5'端有2个保护碱基TA, 不含起始密码子。下游引物含终止密码子CTA和 *Hind* III 酶切位点(下划线部分), 5'端有1个保护碱基C。

以编码VP22蛋白的质粒pAP85H为模板, 扩增VP22-Linker基因。以编码VP1蛋白的质粒pcDNA3/VP1为模板, 扩增VP1和Linker-VP1基因。将上述2种扩增产物分别与pGEM-T载体连接, 转化DH5α大肠杆菌, 构建质粒pGEM-T/VP22-L和pGEM-T/L-VP1。提取质粒进行酶切鉴定和测序, 筛选重组子。

**重组穿梭质粒的构建:** 将上述2种质粒以相应的限制性内切酶进行双酶切, 回收带粘末端的2种目的片段, 将VP22-Linker和Linker-VP1分别与经相应限制性内切酶双酶切的腺病毒穿梭载体pAdTrack-CMV连接。VP22-L和L-VP1引物都带有内含 *Bam* H I 识别序列GGATCC的Linker序列, 扩增的cDNA分别经 *Bam* H I 酶切后, 可以通过粘末端连接成编码15个氨基酸的Linker序列: 5'-GGA GGA GGA GGT CGT GGA GGA GGA GGA TCC GGT GGA GGT GGA TCA-3'。该序列编码产物(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>具有较大的空间活动性, 能较好的维持VP22-L-VP1融合蛋白的空间结构<sup>[6]</sup>。经转化、筛选和酶切鉴定, 构建重组穿梭质粒 AdTrack-CMV/VP22-L-VP1。

**重组腺病毒质粒的构建:** 参照文献[7]的方法, 制备 *E.coli* Bj5183的感受态, 将骨架载体 pAdEasy-1转化Bj5183感受态。筛选出的阳性菌落命名为Bj5183 pAdEasy-1+。用内切酶 *Pme* I 酶切穿梭质粒AdTrack-CMV/VP22-L-VP1, 并分别将线性化的穿梭质粒回收、纯化。制备 Bj5183 pAdEasy-1+的感受态。将 *Pme* I 线性化的AdTrack-CMV/VP22-L-VP1纯化片段, 转化Bj5183pAdEasy-1+感受态菌。利用AdEasy

河北医科大学病原生物学教研室, 河北省石家庄市 050017

李剑★, 女, 1982年生, 河北省石家庄市人, 汉族, 2008年河北医科大学毕业, 硕士, 助教。  
lijian\_amy@sina.com

通讯作者: 金玉怀, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 河北医科大学病原生物学教研室, 河北省石家庄市 050017  
jinyuhuai@sina.com

中图分类号: R318  
文献标识码: B  
文章编号: 1673-8225 (2012)07-01280-05

收稿日期: 2011-09-07  
修回日期: 2011-12-25  
(20110628025/WJ·C)

系统, 经两步法在大肠杆菌 Bj5183 中与骨架载体 pAdEasy-1 同源重组, 构建重组腺病毒质粒 pAd/VP22-L-VP1。经 *Pac* I 酶切, PCR 鉴定后, 将阳性质粒转化入感受态 *E.coli* DH5 $\alpha$ , 挑取阳性克隆。以碱裂解法大量提取重组质粒, 并用聚乙二醇沉淀法进行纯化<sup>[8]</sup>。

**重组腺病毒的包装与扩增:** 转染前 1 d 用 0.25% 胰酶消化 HEK293 细胞, 接种 25 cm<sup>2</sup> 细胞培养瓶中, 保证细胞密度在 24 h 后达到 50%~60% 融合<sup>[9]</sup>。转染前向培养瓶中更换无抗生素不含血清的 DMEM 培养基。

用 *Pac* I 酶切重组腺病毒, 以切去复制起始点 (ori) 和卡那霉素 (kan) 抗性基因等质粒元件, 并暴露其反向末端重复序列。酶切后经酚/氯仿抽提, 乙醇沉淀, 溶于无菌三蒸水中。将 *Pac* I 线性化的重组腺病毒质粒参照 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 说明书步骤优化转染条件, 以阳离子脂质体法转染 HEK293 细胞, 倒置荧光显微镜观察报告基因绿色荧光蛋白的表达。冻融法收集初代病毒液。取初代病毒液感染 293 细胞, 逐日观察细胞病变, 及有无彗星样斑块形成。并经三至四轮传代扩增, 提高病毒滴度。

**Western Blot 检测病毒蛋白的表达:** 接种重组腺病毒 rAd/VP22-L-VP1 感染 293 细胞, 细胞总数约 5 $\times$ 10<sup>6</sup><sup>[10]</sup>。待细胞病变达 70%~80% 时, 吸弃培养液, 加入 RIPA 细胞裂解液 50  $\mu$ L 于冰上裂解细胞。在 EP 管中加入适量细胞裂解液上清, 与等体积 2 $\times$  载样缓冲液混合, 煮沸 10 min, 10  $\mu$ L/孔上样, SDS-PAGE 电泳分离蛋白。电转条件为 160 mA 湿转 2.5 h 将蛋白质转移到 PVDF 膜上。将膜取出后浸入含 5% 脱脂奶粉的封闭液中, 4  $^{\circ}$ C 封闭过夜。用 PBST 将膜漂洗后与 1:100 稀释的兔抗 CVB3 多抗于 37  $^{\circ}$ C 孵育 2 h。用 PBS 洗膜 3 次, 10 min/次, 然后与 1:10 000 稀释的辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG, 37  $^{\circ}$ C 反应 1 h。再次以 PBST 洗膜 3 次, 10 min/次, 加入 4-氯-1 萘酚显色液 10 mL, 避光反应 10 min, 观察显色条带。

**重组腺病毒滴度测定<sup>[9]</sup>:** 将病毒用无血清 DMEM 培养基进行连续 10 倍稀释, 由 10<sup>-1</sup>~10<sup>-6</sup>。待 293 细胞在 96 孔板中生长至 70%~80% 汇合时, 加入不同稀释倍数的上述病毒液 50  $\mu$ L, 每个稀释度 3 个复孔。每行均设细胞对照孔, 该孔细胞中仅加入 50  $\mu$ L 无血清 DMEM 培养基。37  $^{\circ}$ C 体积分数 5% CO<sub>2</sub> 条件下孵育 2 h 后, 弃上清, 加入含 5% FBS 的 DMEM 培养基 150  $\mu$ L。置于 37  $^{\circ}$ C 体积分数 5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 48 h, 倒置荧光显微镜下计数荧光细胞数。用绿色荧光蛋白阳性细胞计数法测定病毒度。

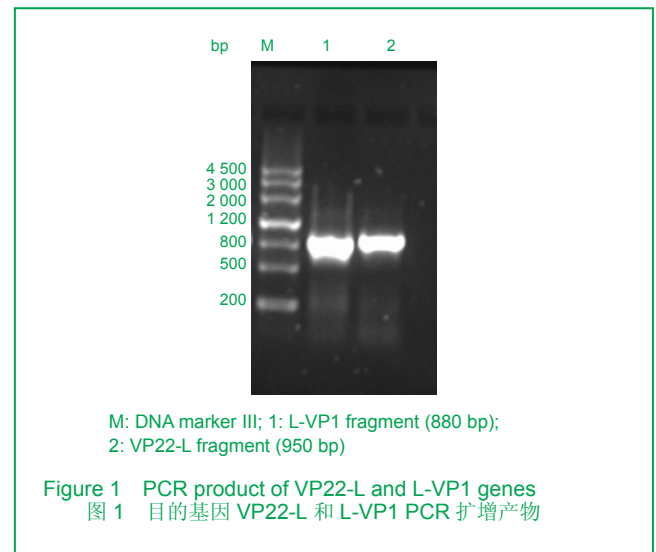
$$\text{病毒滴度 (pfu/mL)} = \frac{\text{荧光细胞数} \times \text{病毒液的稀释倍数}}{\text{病毒液量}}$$

**主要观察指标:** 重组腺病毒感染 293 细胞后的细胞病变效应; 重组腺病毒感染 HEK293 细胞后外源基因的

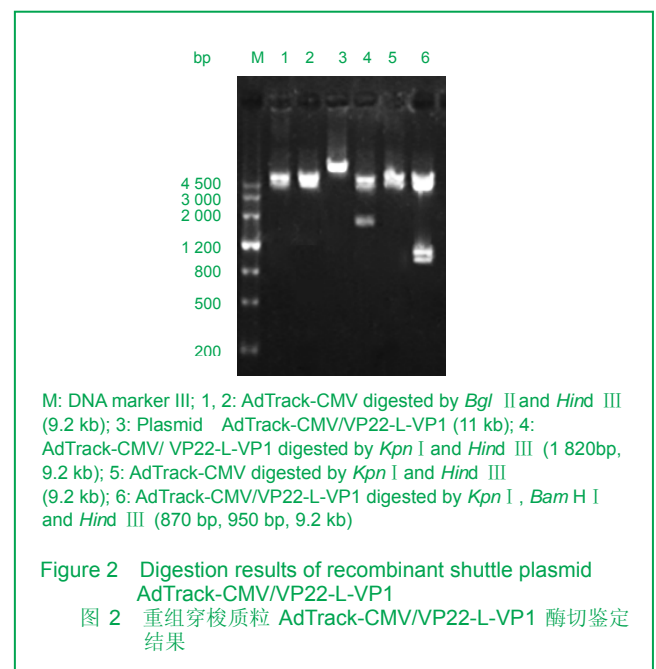
表达; 重组腺病毒滴度。

## 2 结果

**2.1 原核重组质粒 pGEM-T/VP22-L 和 pGEM-T/L-VP1 的鉴定** 用 PCR 法以质粒 pAP85H 为模板, 扩增 VP22-L, 以质粒 pcDNA3/VP1 为模板扩增 L-VP1, 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 可见约 950 bp 和 880 bp 特异条带, 与预期值大小吻合, 见图 1。测序结果证实所得阳性克隆均含有重组目的基因片段, VP22-L 和 L-VP1 基因序列与 Genbank 登录基因序列相同。



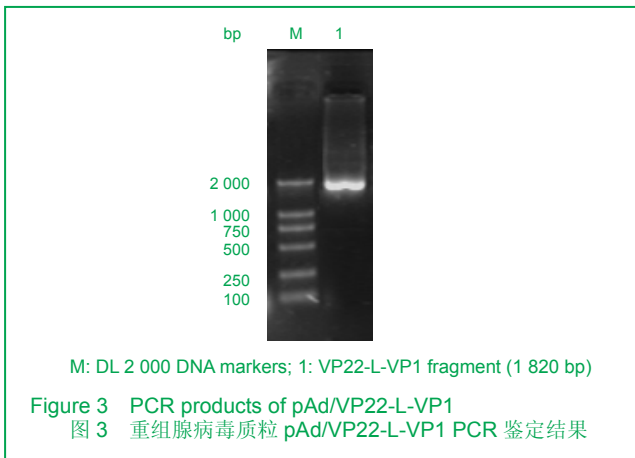
**2.2 重组穿梭质粒 AdTrack-CMV/VP22-L-VP1 的鉴定** 见图 2。



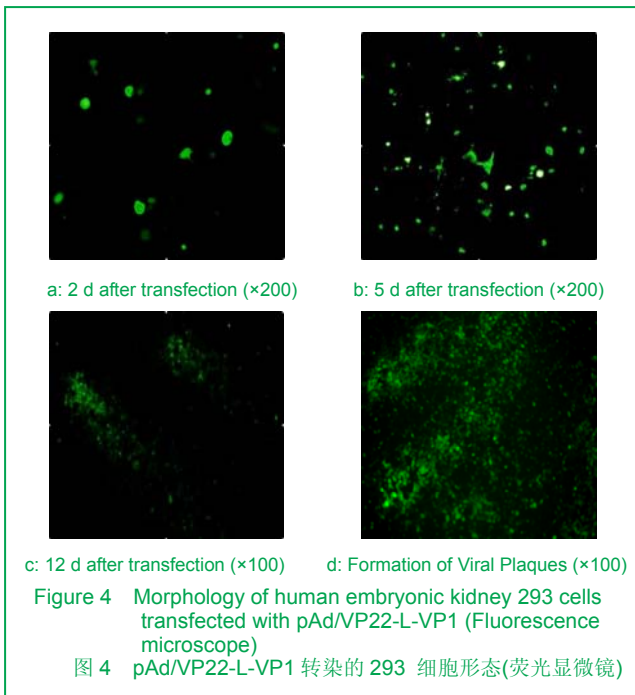
用适当的限制酶双酶切 pGEM-T/VP22L, pGEM-T/L-VP1 后, 回收目的基因 VP22L, L-VP1 片段。将二者与经内切酶 *Kpn* I 和 *Hind* III 处理的 AdTrack-CMV 载体

定向连接。连接产物转化感受态菌DH5 $\alpha$ 后, 接种2 $\times$ YT琼脂平板(含Kan<sup>+</sup>), 挑选菌落小量抽提质粒, 经双酶切及三酶切后经1%琼脂糖凝胶电泳, 可见预期大小为870 bp, 950 bp和1 820 bp的插入片段和线形的AdTrack-CMV载体。证明相应的菌落为含目的DNA的阳性克隆。

**2.3 重组腺病毒质粒 pAd/VP22-L-VP1 的鉴定** 经 *Pme* I 线性化的AdTrack-CMV/VP22-L-VP1纯化片段, 转化 B<sub>j</sub>5183 pAdEasy-1+感受态菌。转化产物接种于2 $\times$ YT(含Kan<sup>+</sup>)固体培养基, 挑选菌落小量抽提质粒。以 pAd/VP22-L-VP1为模板, 用VP22-L上游引物、L-VP1下游引物进行PCR, 扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳, 可见约1 820 bp的特异条带, 与预期值大小吻合, 见图3。



**2.4 重组腺病毒的包装结果** 见图4。



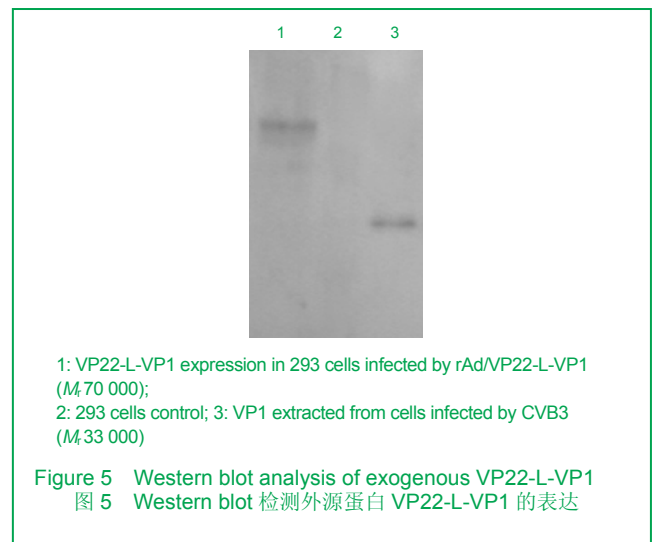
转染48 h后, 约10%的293细胞有绿色荧光蛋白表达。5 d时可见局部的荧光增多, 表明包装病毒的产生和扩增增加。8~10 d时出现典型的“彗星云”状荧光。14 d时“彗星云”增多, 在最初形成的“彗星云”头部

出现明显的噬斑, 产生第一代重组腺病毒。

腺病毒穿梭载体上预置有绿色荧光蛋白表达盒, 为示踪基因。在大肠杆菌B<sub>j</sub>5183中同源重组后, 绿色荧光蛋白表达盒与外源VP22-L-VP1表达盒一起整合入重组腺病毒E1缺失区。将 *Pac* I 酶切线性化的重组腺病毒质粒用脂质体Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000转染293细胞后, 在细胞内, 除表达VP22-L-VP1外, 还能表达示踪蛋白绿色荧光蛋白。在荧光显微镜下检测绿色荧光蛋白的表达, 可方便地了解重组腺病毒质粒DNA的包装过程。

**2.5 重组腺病毒的扩增结果及滴度** 转染10~14 d后观察细胞形态改变并收集含病毒的上清及细胞, 于-70  $^{\circ}$ C和37  $^{\circ}$ C水浴中反复冻融使病毒颗粒释放, 此为初代病毒液。取初代病毒液感染293细胞, 逐日观察细胞病变, 及有无彗星样斑块(FOCI)形成。并经三至四轮传代扩增, 提高病毒滴度。待293细胞在96孔板中生长至70%~80%汇合时, 以系列稀释的上述各代病毒液感染细胞, 感染后48 h绿色荧光蛋白阳性细胞计数法测定病毒滴度。病毒滴度=荧光细胞数 $\times$ 病毒液的稀释倍数/病毒液量(pfu/mL)。rAd/VP22-L-VP1初代至第四代病毒滴度分别为 $2.53 \times 10^5$ ,  $1.53 \times 10^6$ ,  $1.40 \times 10^7$ 和 $6.77 \times 10^7$  pfu/mL。

**2.6 感染后外源蛋白VP22-L-VP1的表达** 病毒感染后48 h, 提取细胞总蛋白, 通过Western Blot检测病毒蛋白的表达。见图5。



### 3 讨论

目前, 免疫预防和疫苗研究的主要目标是开发具有较高的基因转移率和靶向特异性的转基因载体。本室曾以质粒pcDNA3为载体构建CVB3 VP1基因疫苗, 亦曾使用IFN- $\gamma$ 和C3d等细胞因子作为佐剂<sup>[11-12]</sup>, 但其免疫原性低、保护作用弱是共同存在的问题。这可能与质粒载体的转染效率低有关。病毒载体与质粒载体相比具有可转染的细胞范围广、基因转移效率高等优点<sup>[13]</sup>。其中,

复制缺陷型腺病毒载体具有高滴度、高表达、不整合受体细胞基因组, 以及既可转染静止期细胞又可转染分裂期细胞等优点<sup>[14]</sup>。同时, 体内外运送腺病毒载体途径简便, 可以制成胶囊或药液<sup>[15]</sup>, 通过口服<sup>[16]</sup>、喷雾何滴注等方法进行<sup>[17]</sup>, 使其目前广泛应用于基因疫苗的研究中<sup>[18]</sup>。实验选用AdEasy腺病毒载体系统构建CVB3 VP1疫苗, 以期与质粒载体相比表现出优势。

大剂量使用腺病毒常会引起严重的免疫反应<sup>[19]</sup>, 甚至造成组织损伤<sup>[20]</sup>。因此基因预防的又一关键是发展一种好的传递体系, 既增强腺病毒感染细胞的能力, 又降低其毒性。1988年, Green等<sup>[1]</sup>和Frankle等<sup>[2]</sup>首次发现人类免疫缺陷病毒的反式激活蛋白能够跨膜导入细胞内, 后续研究将其功能区确定在47~57富含碱性氨基酸Arg和Lys的区域, 这段区域被称为蛋白转导域或者穿膜肽或者细胞穿透肽。其他一些具有蛋白质转导功能的多肽相继被发现, 包括HSV-1 DNA结构蛋白VP22<sup>[3-4]</sup>、果蝇的触角足同源异形基因的转录因子(ANTP)<sup>[21]</sup>以及内源性抗微生物多肽及其衍生物和人工合成的多聚精氨酸等。通过PTD穿越细胞膜的转导过程是以一种目前未知的机制进行, 不依赖于受体、递质, 也不是经由内吞方式, 可能是阳离子肽与生物膜上的阴离子物质形成中性复合物, 激活了细胞摄取机制。在37 °C和4 °C情况下, PTDs均能快速通过细胞膜, 且显示浓度依赖特性。如果将PTD通过重组合成融合蛋白或与全长蛋白质共价交联, 这些PTD能够携带生物活性蛋白进入细胞, 这些融合蛋白将出现在细胞浆和细胞核中。VP22是单纯疱疹病毒1型(HSV-1) UL49基因编码的长301个氨基酸的碱性蛋白质。其PTD为富含碱性氨基酸的片段, 能够把与之融合蛋白或与之结合的DNA等大分子跨膜递送到邻近细胞<sup>[22]</sup>。基于此, 我们设想如果将VP22与CVB3 VP1连接, 有望提高目的蛋白VP1的进入邻近免疫活性细胞的能力, 进而提高疫苗的免疫效果<sup>[23]</sup>。

实验以编码VP22蛋白的质粒pAP85H为模板, 经PCR扩增、DNA测序鉴定等步骤, 得到含有起始密码子的VP22序列。通过15个甘氨酸(glycine,G)和丝氨酸(serine,S)即(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>组成的接头(Linker)将其与含有终止密码子的CVB3 VP1基因拼接<sup>[6]</sup>, 能较好的维持VP22-L-VP1融合蛋白的空间结构。为便于融合基因的克隆, 通过选择密码子, 将Linker的第九、十位氨基酸碱基设计为GGATCC, 此序列既是Bam H I酶切位点, 也编码Linker中的甘氨酸和丝氨酸。实验用AdEasy腺病毒作为载体系统, 用15肽接头(Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>将CVB3 VP1与具有的胞间传递能力的VP22融合, 成功构建了CVB3 VP1的重组腺病毒载体疫苗rAd/VP22-L-VP1, 为发展新型的CVB3 VP1载体疫苗奠定基础。

致谢: 感谢英国Marie Curie研究所Peter O'Hare教授的慷慨惠赠。感谢天津医科大学李秋香、尹冰楠和周丽君老师的热情指导。

#### 4 参考文献

- [1] Green M, loewenstein PM. Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. *Cell*. 1988;55 (6):1179-1188.
- [2] Frankel AD, Pabo CO. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell*. 1988;5(6):1189-1193.
- [3] Elliott G, O'Hare P. Intercellular trafficking and protein delivery by a herpes virus structural protein. *Cell*. 1997;88:223-233.
- [4] Watanabe D. Medical application of herpes simplex virus. *J Dermatol Sci*. 2010;57(2):75-82.
- [5] He TC, Zhou S, da Costa L T, et al. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95(5):2509-2514.
- [6] Han XY, Zhao Na, Gao ZY, et al. *Zhonghua Weishengwuxue he Mianyixue Zazhi*. 2007;27(12):1145-1149. 韩小艳, 赵娜, 高志云, 等. 接头长度对MDC与CVB3VP1融合基因疫苗免疫效果的影响[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2007, 27(12): 1145-1149.
- [7] Zeng M, Smith SK, Siegel F, et al. AdEasy system made easier by selecting the viral backbone plasmid preceding homologous recombination. *Biol Techniques*. 2001;31:260-262.
- [8] Sambrook J, Russell DW. *Beijing: Kexue Chubanshe*. 2003. 萨姆布鲁克, 拉塞尔. *分子克隆实验指南[M]*. 3版. 北京: 科学出版社, 2003.
- [9] AdEasy™ Vector System Application Manual, Version 1.4, Qiogene, Inc.
- [10] Wang JZ. *Beijing: Kexue Chubanshe*. 2002. 汪家政. *蛋白技术手册[M]*. 北京: 科学出版社, 2002.
- [11] Chuai X, Gao ZY, Fang WL, et al. *Disi Junyidaxue Xuebao*. 2006;27(16):1462-1465. 揣侠, 高志云, 房文亮, 等. 小鼠IFN-γ基因佐剂对分泌型柯萨奇病毒B3 VP1核酸疫苗免疫作用的影响[J]. *第四军医大学学报*, 2006, 27(16): 1462-1465.
- [12] Zhao Na, Han XY, Wang XL, et al. *Zhonghua Yixue Zazhi*. 2007; 87(36):2561-2563. 赵娜, 韩小艳, 王晓凌, 等. C3d对分泌型柯萨奇病毒B组3型VP1 DNA疫苗的免疫增强作用[J]. *中华医学杂志*, 2007, 87(36):2561-2563.
- [13] Rollier CS, Reyes-Sandoval A, Cottingham MG, et al. Viral vectors as vaccine platforms: deployment in sight. *Curr Opin Immunol*. 2011;23(3):377-382.
- [14] Ferreira TB, Alves PM, Aunins JG, et al. Use of adenoviral vectors as veterinary vaccines. *Gene Ther*. 2005;12:73-83.
- [15] Maria HL, Rita M, Ana CS, et al. Encapsulation of adenoviral vectors into chitosan-bile salt microparticles for mucosal vaccination. *J Biotech*. 2006;126(2):152-162.
- [16] Mercier GT, Nehete PN, Passeri MF. Oral immunization of rhesus macaques with adenoviral HIV vaccines using enteric-coated capsules. *Vaccine*. 2007;25(52):8687-8701.
- [17] Kumaki Y, Ennis J, Rahbar R, et al. Single-dose intranasal administration with mDEF201 (adenovirus vectored mouse interferon-alpha) confers protection from mortality in a lethal SARS-CoV BALB/c mouse model. *Antiviral Res*. 2011;89(1): 75-82.
- [18] Rauschhuber C, Noske N, Ehrhardt A. New insights into stability of recombinant adenovirus vector genomes in mammalian cells. *Eur J Cell Biol*. 2011.
- [19] Rhee EG, Blattman JN, Kasturi SP, et al. Multiple innate immune pathways contribute to the immunogenicity of recombinant adenovirus vaccine vectors. *J Virol*. 2011;85(1):315-323.
- [20] Zachary CH, Daniel MA, Andrea A. Adenovirus vector induced innate immune responses: Impact upon efficacy and toxicity in gene therapy and vaccine applications. *Virus Res*. 2008;132(1-2): 1-14.
- [21] Le Roux I, Joliet AH, Bloch-Gallego E. Neurotrophic activity of the antennapedia homeodomain depends on its specific DNA-binding properties. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90(19):9120-9124.
- [22] Neil B, Anne P, Jeanteet W, et al. Evaluation of VP22 spread in tissue culture. *J Virol*. 2000;74(2):1501-1506.
- [23] Bolhassani A, Gholami E, Zahedifard F, et al. Leishmania major: Protective capacity of DNA vaccine using amastin fused to HSV-1 VP22 and EGFP in BALB/c mice model. *Exp Parasitol*. 2011; 128(1):9-17.

来自本文课题的更多信息—

**基金声明:** 河北省科技支撑计划(09276418D-5); 河北省自然科学基金(C2009001087)。

**作者贡献:** 李剑进行实验设计, 实验实施为李剑, 实验评估为米立国、金玉怀, 资料收集为刘贵霞、蓝佳明、张永红, 李剑成文, 金玉怀审核, 李剑对文章负责。