

DOI:10.13350/j.cjpb.230604

• 论著 •

重组麻疹病毒沪 191 株反向遗传系统的建立*

杨志辉,裴捷,郭靖,申硕**

(武汉生物制品研究所有限责任公司病毒性疫苗研究一室,湖北武汉 430207)

【摘要】 目的 构建麻疹减毒病毒(Measles virus, MV)沪 191(MV-S191)株感染性 cDNA,以绿色荧光蛋白(eGFP)为靶标,选择外源基因插入区域,建立反向遗传系统重组病毒载体疫苗技术平台。方法 提取 MV-S191 基因组 RNA,逆转录获得 cDNA,以 PCR 法分 8 段扩增麻疹病毒全长基因组 cDNA,通过 Gibson 法连接各片段构建全长基因组 cDNA,并将其克隆至 pBR322 质粒,获得 pMV-S191。在 pMV-S191 的 P、M 或 H、L 基因间区域插入 eGFP,获得 pMV2-eGFP、pMV3-eGFP。同时构建 pcDNA-N、P、L 3 个辅助质粒分别表达麻疹病毒核蛋白(N)、磷酸化蛋白(P)和依赖 RNA 的 RNA 聚合酶(L)。将 pMV-S191、pMV2-eGFP 和 pMV3-eGFP 分别与辅助质粒通过脂质体 lipofectamine 2000 共转染 BSR-T7/5 细胞,5 d 后取上清及细胞裂解液感染 Vero 细胞,收获重组病毒。结果 通过反向遗传系统成功获得麻疹病毒疫苗株拯救株 rMV-S191,感染 Vero 细胞后,在显微镜下观察到有合胞体形成。通过无缝克隆的方式,将 eGFP 基因克隆至 pMV-S191 中,成功获得 pMV2-eGFP、pMV3-eGFP,按照相同的方法共转染获得 rMV2-eGFP 和 rMV3-eGFP,将其分别感染 Vero 细胞,在显微镜下均可观察到形成的麻疹病毒合胞体,且在荧光显微镜下可观察到表达的绿色荧光蛋白。结论 成功建立 MV-S191 的反向遗传系统并确定外源基因的插入位点,为以麻疹病毒为载体新型疫苗的研发奠定了基础。

【关键词】 重组麻疹病毒;MV-S191;反向遗传学;T7 RNA 聚合酶

【中图分类号】 R373.1

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2023)06-0637-06

[*Journal of Pathogen Biology*. 2023 Jun;18(6):637-642, 649.]

Establishment of reverse genetic system to construct recombinant MV-S191

YANG Zhihui, PEI Jie, GUO Jing, SHEN Shuo (*Research Division 1 of Viral Vaccines, Wuhan Institution of Biological Product Co. Ltd, Hubei 430207, China*)

【Abstract】 **Objective** The establishment of the reverse genetic system for MV-S191 is important for basic research and measles virus (MV) based vaccine development. **Methods** The genomic RNA of MV-S191 was extracted, and the cDNA was obtained by RT-PCR. The GeneArt Gibson Assembly EX Cloning Kits was used to combined the 8 segments amplified from the cDNA. The full-length antisense genome of MV-S191 was amplified and cloned into pBR322 to construct pMVS191. A gene of enhanced Green fluorescent protein (eGFP) was inserted into the region between genes of P and M, H and L of pMV-S191 to construct pMV2-eGFP and pMV3-eGFP. At the same time, three helper plasmids of pcDNA-N, P and L were constructed to express nucleoprotein (N), phosphorylated protein (P) and RNA-dependent RNA polymerase (L) of MV-S191. pMV-S191, pMV2-eGFP or pMV3-eGFP were co-transfected into BSR-T7/5 cells with helper plasmids by lipofectamine 2000. After 5 days post transfection, the harvest (supernatant and cells were) was used to infect (transferred to) Vero cells. **Results** The measles virus vaccine strain (rMV-S191) was successfully obtained by reverse genetic system. The syncytium formation was observed in vero cells under the microscope. eGFP gene was cloned into pMV-S191 by seamless cloning, and pMV2-eGFP and pMV3-eGFP were successfully obtained. rMV2-eGFP and rMV3-eGFP were obtained by co-transfection according to the same method, and Vero cells were infected respectively. The syncytium could be observed under the microscope, and the expressed green fluorescent protein could be observed under the fluorescence microscope. **Conclusion** In this study, the reverse genetic system of MV-S191 was successfully established, and the insertion site of foreign gene was determined, which laid the foundation for the research and development of a new vaccine platform based on measles virus vector.

【Key words】 rMV-S191; MV-S191; Reverse genetics; T7 RNA polymerase***

* **【基金项目】** 湖北省技术创新专项(重大专项)(No. 2017ACA078)。

** **【通讯作者】** 申硕, E-mail: shenshuo1@sinopharm.com

【作者简介】 杨志辉(1995-),男,湖北襄阳人,博士,主要从事病毒性疫苗研究。E-mail: 2541625534@qq.com

麻疹(Measles)是由麻疹病毒引起的严重威胁公共健康的急性呼吸道传染病,以发热、呼吸道卡他症状和出疹为主要临床表现^[1]。麻疹病毒属于副黏病毒科(*Paramyxoviridae*),麻疹病毒属(*Morbillivirus*),为单股负链 RNA 病毒,基因组全长约为 16 kb^[2]。麻疹病毒共编码 6 种结构蛋白:核蛋白(N)、磷酸化蛋白(P)、基质蛋白(M)、融合蛋白(F)、血凝素蛋白(H)、RNA 依赖的 RNA 聚合酶(L)^[3]。目前国外有 Emonston B、Schwarz、Edm. Zagreb、AIK-C 等多株麻疹病毒疫苗株,国内以“沪 191”麻疹病毒疫苗株(MV-S191)为主要的疫苗株^[5]。随着负链 RNA 病毒反向遗传学技术的发展,在美国和日本等国已在体外成功拯救出重组麻疹病毒疫苗株。

MV-S191 基因组 RNA 呈螺旋状结构,病毒颗粒装配 RNA 容量具有较强的灵活性,可容纳 4~6 kb 乃至更大的外源基因片段^[2]。通过在外源基因两端加入调控结构基因复制起始(Gene start,GS)和终止序列(Gene end,GE),形成附加转录单位(Additional transcription unit,ATU),并将其克隆至 MV-S191 基因组骨架中,可增强外源基因表达^[4]。同时,作为副黏病毒科的一员,麻疹病毒基因组核苷酸数量必须满足“rule of six”原则,即麻疹病毒及其重组病毒基因组核苷酸数量必须是 6 的倍数,以保证病毒的复制效率^[5]。MV-S191 基因组转录有极性梯度效应,基因表达水平由 3'端至 5'端依次递减^[6]。

麻疹病毒已被证明是许多病毒性疾病的有效疫苗载体,如艾滋病病毒(HIV)^[7,8]、SARS 病毒(SARS-CoV)^[9]、中东呼吸综合征(MERS)^[10]、呼吸道合胞病毒(RSV)^[11,12]、乙型(HBV)和丙型肝炎病毒(HCV)^[13]、流感病毒(FluV)^[14]、基孔肯雅病毒(CHIKV)^[15]、寨卡病毒(ZIKV)、登革病毒(DENV)、西尼罗河病毒(WNV)和黄热病病毒(YFV)^[16-18]。

本研究拟构建带有 MV-S191 全长 cDNA 的 pMV-S191 麻疹病毒载体骨架,并以此为基础在 P、M 之间和 H、L 之间分别插入 ATU-eGFP 的重组麻疹病毒质粒 pMV2-eGFP 和 pMV3-eGFP。同时构建 3 个辅助质粒 pcDNA-N、pcDNA-P 和 pcDNA-L。分别将 pMV-S191、pMV2-eGFP、pMV3-eGFP 和 3 个辅助质粒共转染 BSR-T7/5 细胞(金黄仓鼠肾细胞,能够稳定表达 T7 RNA 聚合酶)进行病毒拯救,获得 rMV-S191、rMV2-eGFP 和 rMV3-eGFP。rMV-S191 感染 Vero 细胞后观察合胞体的形成,rMV2-eGFP 和 rMV3-eGFP 观察合胞体形成及绿色荧光蛋白表达,确定麻疹病毒外源基因插入位点,为研究麻疹病毒的致病机制、基因结构、遗传变异,开发新一代麻疹病毒疫苗及麻疹病毒载体疫苗提供技术平台。

材料与amp方法

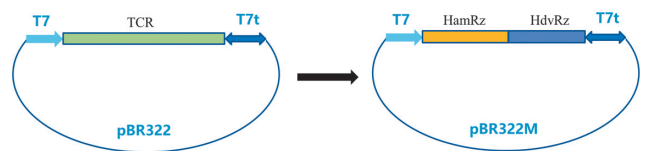
1 材料

1.1 毒株、细胞及质粒 麻疹病毒株 MV-S191 和 Vero 细胞由武汉生物制品研究所有限责任公司保存。BSR-T7/5 细胞来源于中科院武汉病毒研究所。pBR322 和 pcDNA3.1(+)载体购于生工生物工程(上海)股份有限公司(简称生工生物)。

1.2 主要试剂 QIAamp Viral RNA Mini Kit 病毒 RNA 提取试剂盒和 EndoFree Plasmid Maxi Kit 质粒提取试剂盒购于德国 QIAGEN 公司;Top10 感受态细胞购自生工生物;Grace's 培养基,转染试剂 Lipofectamine 2000, DH10B 感受态细胞, GeneArt Gibson Assembly EX Cloning Kits 无缝克隆试剂盒, DMEM 及 FBS 购于美国 Invitrogen 公司;EcoRI、XhoI、BamHI、NotI、BsiWI 和 BssHIII 限制性内切酶购于美国 NEB 公司;2 × Phanta Max Master Mix (Dye Plus) 高保真酶和 ClonExpress Ultra One Step Cloning Kit 无缝克隆试剂盒购于诺唯赞生物技术有限公司;DNA Ligation Kit、HiScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒和 Nucleospin gel and PCR clean-up 胶回收试剂盒购买自日本 TaKaRa 公司。

2 方法

2.1 pBR322 载体骨架改造 以 pBR322 载体为模板,通过 PCR 扩增去除载体序列中 TCR 基因(四环素抗性基因)。由金斯瑞生物科技股份有限公司人工合成 HamRz 序列(锤头核酸酶序列)及 HdvRz 序列(丁型肝炎病毒核酶序列)^[19],并使用无缝克隆试剂盒与载体 PCR 扩增产物连接,改造后的载体命名为 pBR322M(图 1)。



T7 T7 启动子 T7t T7 终止子。

图 1 pBR322 载体改造示意图

T7 T7 promoter T7T T7 terminator

Fig. 1 The schematic diagram of the reconstruction of pBR322

2.2 病毒 RNA 提取、逆转录及测序 将冻干 MV-S191 加入 DMEM 维持液溶解,4 °C、8 000 g 离心 10 min,取上清,按照 QIAamp Viral RNA Mini Kit 说明书提取 MV-S191 病毒基因组 RNA,同时使用 Oligo dT 和随机引物将基因组 RNA 逆转录为 cDNA。以此 cDNA 为模板,使用诺唯赞公司高保真酶通过 PCR 将病毒全基因组分 8 段进行扩增,得到 a、b、c、d、e、f、g

和 h 8 个片段,并交由生工公司测序。引物序列见表 1 (F 为正向引物,R 为反向引物)。

表 1 MV-S191 全长扩增引物
Table 1 The PCR amplification primers for MV-S191

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence	核苷酸位置 Nucleotide Position
MV-F1	ACCAAACAAAGTTGGGTAAGG	1-21
MV-R1	GTCAGCATCTTGGATTCCCTT	2167-2187
MV-F2	TCAACTGAAGGCGGTGCA	2014-2031
MV-R2	tTTTTGTCCGGGCCTTCT	4496-4531
MV-F3	GACGTGATCATAAATGATGACCAA	4401-4427
MV-R3	ATACCACTCTTGAGAGCC	6376-6396
MV-F4	GACCCATATCTGCGGAG	6124-6141
MV-R4	TGAGAATTGACCTCTGATTGTAGT	7844-7867
MV-F5	ATGAATGCATTGGTGAACCTCA	7757-7777
MV-R5	AGTCTTGACTGTAAACCAAAACAG	9729-9752
MV-F6	AAAGTCAGTGATAAGTTTTCCAA	9588-9611
MV-R6	ATGTAGCCTTTGCCTAAGAATTAC	11646-11669
MV-F7	GCTTCGTTAGTGCAAGGG	11532-11549
MV-R7	GCAACAATCTGTTTCGACGTG	13323-13343
MV-F8	ACAATCTCCAACGACAATCTC	13167-13187
MV-R8	ACCAGACAAAGCTGGGAATAG	15874-15894

2.3 pMV-S191、pMV2-EGFP 和 pMV3-EGFP 质粒构建 通过三步法构建 pMV-S191、pMV2-EGFP 和 pMV3-EGFP:(1)使用表 1 中引物 MV-F1/R2、MV-F3/R4,以 MV-S191 逆转录所得 cDNA 为模板 PCR 扩增得到 2 个长度约 4 kb 的片段。通过诺唯赞无缝克隆试剂盒克隆至 pBR322M,获得 pMV-S191-3'-Half 前半基因组克隆。使用表 1 中引物 MV-F5/R6、MV-F7/R8 按照相同方式构建 pMV-S191-5'-Half 后半基因组克隆(图 2)。(2)使用表 2 中引物(F 为正向引物,R 为反向引物),并以前、后半基因组克隆为模板,PCR 扩增得到两个大小约 8 kb 的片段,利用 Gibson 无缝克隆试剂盒将其克隆至 pBR322M,该质粒命名为 pMV-S191(图 2)。(3)以 pMV-S191 为模板,分别在 P、M 之间,以及 H、L 基因间区域引入人工合成经过密码子优化的 ATU-eGFP 基因(图 3),并在 ATU-eGFP 上游加入 Kozak 序列,增强外源基因表达,两端引入 BsiWI 和 BssHII 双酶切位点便于其余外源基因替换。

表 2 pMV-S191 扩增引物
Table 2 The PCR amplification primers for pMV-S191

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')	核苷酸位置 Nucleotide Position
Gibson-MV-1F	ATGCCACTTTTAAGGAGCTT	1-23
Gibson-MV-1R	CTGATTGTAGTGGGCCCTGAGCA GTTTCCTTTGAGACAGCTAGGAAC	7807-7854
Gibson-MV-2F	GAACAACCAATCAGTTCCTAGCT GTCTCAAAGGAAACTGCTCAGGG	7794-7840
Gibson-MV-2R	ACCAGACAAAGCTGGGAATAGAACTTC	15867-15894

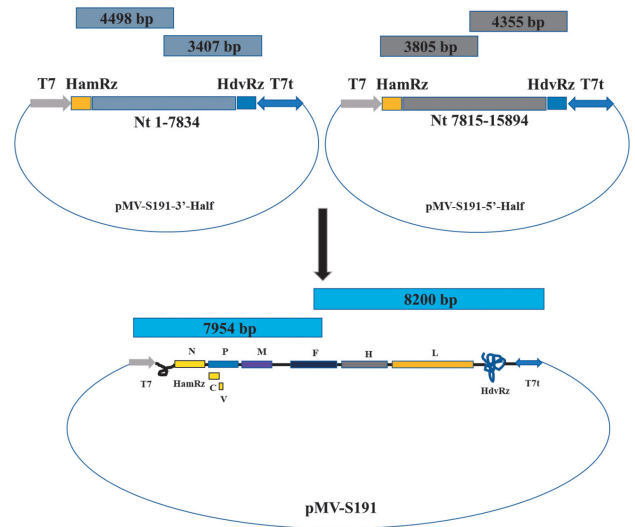


图 2 pMV-S191 质粒构建
Fig. 2 Construction of pMV-S191

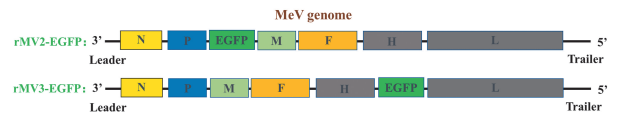


图 3 pMV-S191、pMV2-EGFP 和 pMV3-EGFP 质粒构建
Fig. 3 Construction of pMV-S191, pMV2-EGFP and pMV3-EGFP

2.4 pcDNA-N、pcDNA-P 和 pcDNA-L 辅助质粒构建 以构建的 pMV-S191 质粒为模板,以表 3 中引物 PCR 扩增 N、P 和 L 基因, MV-N、MV-P 通过 EcoRI 和 XhoI 双酶切引入 pcDNA3.1(+), MV-L 通过 BamHI 和 NotI 双酶切引入 pcDNA3.1(+)载体中。表达 N、P 和 L 蛋白的 3 种辅助质粒命名为 pcDNA-N、pcDNA-P 和 pcDNA-L。

表 3 辅助质粒扩增引物
Table 3 PCR amplification primers for helper plasmids

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')	限制性内切酶 Enzyme
pcDNA-N-1F	5'-CCGGAATTCATGGCCACACTTTTAAAGGAGCTTAGC-3'	EcoRI
pcDNA-N-1R	5'-CCGCTCGAGCAAAAAACCCCTCAAGACCCGTTTAG-3'	XhoI
pcDNA-P-1F	5'-CCGGAATTCATGGCAGAAGAGCAGGCACG-3'	EcoRI
pcDNA-P-1R	5'-CCGCTCGAGCAAAAAACCCCTCAAGACCCG-3'	XhoI
pcDNA-L-1F	5'-CCGGGATTC TAATACGACTCACTATAGGATGGACTCGC-3'	BamHI
pcDNA-L-1R	5'-CCGGCGCCGCTCGCAAAAAACCCCTCAAGACCCG-3'	NotI

注:划线部分为酶切位点。
Note: The underlined parts are the site.

2.5 酶切图谱鉴定 由于 pMV-S191、pMV2-EGFP 和 pMV3-EGFP 质粒大小接近 20 kb,为判断目的片段及载体骨架是否存在大片段丢失情况,选取 HindIII 进行酶切图谱鉴定。单酶切后进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳(电压 80 V,电泳 3 h),使用凝胶成像系统拍照观察。

2.6 病毒拯救 将 BSR-T7/5 细胞按照 1.5×10^6 /孔

铺在六孔板中,于 37 °C 培养 18~24 h 后进行转染。5 μg pMV-S191、pMV2-EGFP 和 pMV3-EGFP 质粒分别与 1.5 μg pcDNA-N、1.5 μg pcDNA-N 和 0.5 μg pcDNA-L 混匀(均加入 250 μL Grace's 培养基),再加入 10 μL Lipofectamine 2000 与等体积的 Grace's 培养基混合液,充分混匀,室温放置 15 min 后加入 6 孔板中,在 37 °C、5% CO₂ 条件下孵育 6 h。移除转染混合物,更换为新配制的含 2% FBS 的 DMEM 培养液,在 37 °C、5% CO₂ 条件下连续培养 5 d 后将转染上清及细胞全部转移至 Vero 细胞中继续培养,观察细胞病变。

结 果

1 MV-S191 基因组测序

为了测定本科室 MV-S191 基因组 RNA 序列是否与 NCBI 已上传的中国麻疹病毒疫苗株序列(GenBank:FJ416067.1)一致^[20],将病毒 RNA 反转录所得 cDNA 分成八段扩增(a-h),片段大小分别是 2 065 bp、2 442 bp、1 723 bp、1 684 bp、1 844 bp、1 961 bp、1 673 bp、2 682 bp(图 4A),将 PCR 产物送至生工生物进行序列测定。测序结果表明 MV-S191 于 H 蛋白结构基因区发生了 C9057A 突变,且峰高一致(图 4B)。

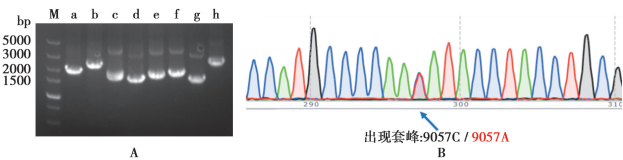


图 4 MV-S191 PCR 扩增(A)及测序(B)
Fig. 4 PCR amplification(A) and sequencing(B) of MV-S191

2 pMV-S191-3'-Half、pMV-S191-5'-Half 质粒的构建及鉴定

以 MV-S191 基因组 RNA 反转录所得 RNA 为模板,按照表 1 中引物进行组合使用(MV-F1/R2、MV-F3/R4、MV-F5/R6、MV-F7/R8),将基因全长分成 4 段(a+b、c+d、e+f 和 g+h)进行 PCR 扩增,得到的片段长度分别为 4 498、3 407、3 805、4 355 bp(图 5A)。使用无缝克隆试剂盒按照图 2 所示连接得到 pMV-S191 前、pMV-S191-5'-Half。针对片段连接处设计 3 对鉴定引物(未展示),pMV-S191-3'-Half 3 个片段连接处分别扩增得到 640、526、409 bp;pMV-S191-5'-Half 3 个片段连接处分别扩增得到 577、874、489 bp(图 5B)。分别挑取 3 个 pMV-S191-3'-Half 和 3 个 pMV-S191-5'-Half 阳性克隆进行测序,选取测序正确的克隆制备甘油菌,-20 °C 保存。

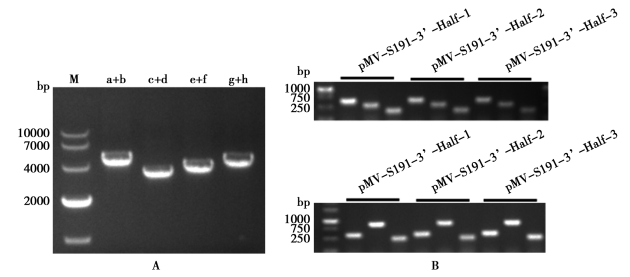
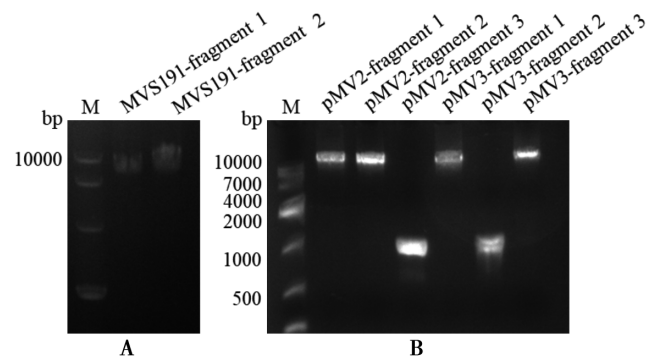


图 5 pMV-S191-3'-Half 和 pMV-S191-5'-Half 质粒 PCR 扩增(A)及鉴定(B)

Fig. 5 PCR amplification of pMV-S191-3'-Half, pMV-S191-5'-Half and identification(B)

3 pMV-S191、pMV2-eGFP 和 pMV3-eGFP 质粒的构建及鉴定

以测序正确的 pMV-S191-5'-Half、pMV-S191-3'-Half 质粒为模板,使用表 2 中引物进行 PCR 扩增,得到 MVS191-fragment 1、MVS191-fragment 2 两个片段,大小分别为 7 854 bp 和 8 100 bp(图 6A)。按照图 2 的连接方式构建 pMV-S191,阳性克隆挑选方法同上。测序结果显示,pMV-S191 仍存在 C9057A 突变。对该位点进行点突变,成功修复突变碱基(结果未展示)。以构建的 pMV-S191 质粒为模板,通过 PCR 将 pMV2-EGFP 和 pMV3-EGFP 分别分成 3 段进行扩增(图 6B),在 P、M 之间、H、L 之间分别引入 ATU2-eGFP 和 ATU3-eGFP。挑取阳性克隆测序,选取测序正确的克隆保存甘油菌,获得 pMV2-eGFP 和 pMV3-eGFP。



A MV-S191 PCR 扩增 B pMV2-EGFP 和 pMV3-EGFP PCR
图 6 pMV-S191、pMV2-EGFP 和 pMV3-EGFP 质粒构建

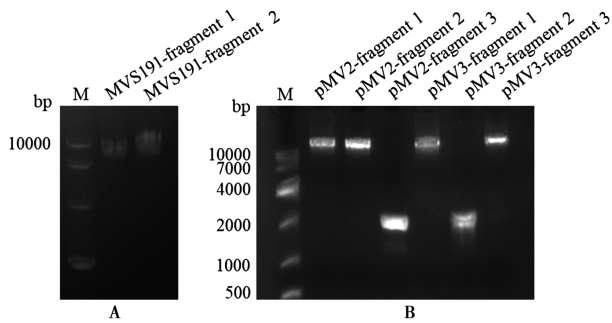
A PCR amplification of MV-S191 B PCR amplification of pMV2-EGFP and pMV3-EGFP

Fig. 6 Construction of pMV-S191, pMV2-EGFP and pMV3-EGFP

4 酶切图谱鉴定

为了验证构建的 pMV-S191、pMV2-eGFP 和 pMV3-eGFP 质粒的完整性,使用 HindIII 进行单酶切,其中 pMV-S191 单酶切后产生 7 个片段,大小分别为 7 037、4 167、2 517、2 079、1 718、1 051、678 bp(图 7A)。pMV2-EGFP 和 pMV3-EGFP 单酶产生的 7 个

片段大小分别为 7 871、4 167、2 517、2 079、1 718、1 051、678 bp(图 7B)。3 个质粒的酶切目的片段大小均与预期一致,表明质粒完整,未发生片段丢失现象,可用于病毒拯救。



A pMV-S191 酶切图谱鉴定 B pMV2-EGFP 和 pMV3-EGFP 酶切图谱鉴定

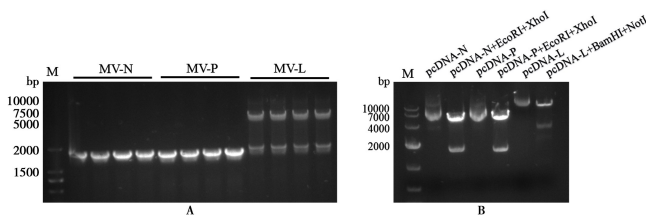
图 7 pMV-S191、pMV2-EGFP 和 pMV3-EGFP 酶切图谱鉴定

A Identification of restriction map of pMV-S191 B Identification of restriction map of pMV2-EGFP and pMV3-EGFP

Fig. 7 Identification of restriction map of pMV-S191, pMV2-EGFP and pMV3-EGFP

5 辅助质粒构建与鉴定

为了获得重组麻疹病毒,需要在 N、P 和 L 3 种辅助蛋白的参与下才能够形成具有感染性的核糖核蛋白(Ribonucleoprotein, RNP),随后开始病毒的组装。按照表 3 中引物,通过 PCR 扩增获得 MV-N、MV-P 和 MV-L 目的片段,大小分别为 1 638、1 584、6 631 bp(图 8A)。将 MV-N、MV-P 用 EcoRI 和 XhoI 双酶切, MV-L 用 BamHI 和 NotI 双酶切,酶切片段在 DNA 连接酶作用下分别克隆至 pcDNA3.1(+). 挑取阳性克隆,测序鉴定获得辅助质粒 pcDNA-N, pcDNA-P 和 pcDNA-L。3 个辅助质粒经双酶切鉴定,均在正确位置获得目的片段(图 8B)。表明辅助质粒构建正确,可用于病毒拯救。



A MV-N、P 和 L PCR 扩增 B pcDNA-N、P 和 L 质粒酶切鉴定

图 8 pcDNA-N、P 和 L 辅助质粒酶切鉴定

A PCR amplification of MV-N, P and L B restriction enzyme of pcDNA-N, P and L

Fig. 8 Construction and restriction enzyme of pcDNA-N, P and L

6 rMV-S191、rMV2-eGFP 和 rMV3-eGFP 病毒拯救

分别将 5 μ g pMV-S191、pMV2-eGFP 和 pMV3-eGFP 与 1.5 μ g pcDNA-N、1.5 μ g pcDNA-P 和 0.5 μ g pcDNA-L 转染至 BSR-T7/5 细胞中培养 5 d。将培养完成后的 BSR-T7/5 细胞用无菌枪头吹悬,再转

移至 Vero 细胞中继续培养,连续传六代,可观察到合胞体形成。荧光显微镜下观察到 rMV2-EGFP 和 rMV3-EGFP 感染 Vero 细胞表达的绿色荧光蛋白,而 rMV-S191 不表达绿色荧光蛋白(图 9)。表明插入 T7 基因的 BSR-T7/5 细胞直接转染重组 MV 及辅助基因 DNA 质粒能高效拯救重组病毒;构建的 MV 感染性 cDNA 在 P、M 和 H、L 基因间插入外源蛋白 eGFP 基因后均可高效表达。

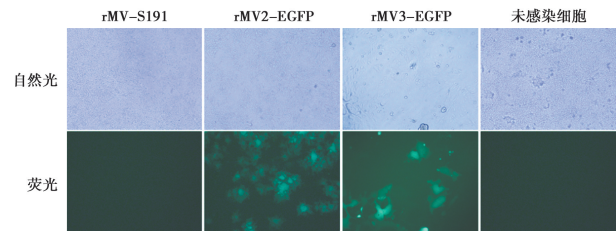


图 9 rMV2-EGFP 和 rMV3-EGFP 感染 Vero 细胞表达的绿色荧光蛋白

Fig. 9 Identification of MV-S191, rMV2-EGFP and rMV3-EGFP in Vero cells by microscope

讨论

MV-S191 是中国第一株麻疹减毒活疫苗株,距今为止已经有超过 50 年历史,大幅度降低了我国麻疹的发病率和死亡率。但近年我国麻疹疫情出现大幅度回升,大龄儿童体内麻疹病毒中和抗体水平随着时间推移不断衰减,无法保持终身免疫。人群中体内预存麻疹抗体水平降低,且现有麻疹病毒疫苗株仍会引起一定的副反应,因此运用反向遗传学技术对麻疹病毒基因组进行相应的突变、缺失或插入,从而获得免疫效果更强、安全性更高的新型麻疹病毒疫苗株至关重要。

本研究中对 MV-S191 基因组测序发现有两种基因型的麻疹病毒共同存在,说明其在传代过程中发生了突变(C9057),与汪一龙等^[21]研究结果一致,且突变位点位于 H 蛋白。H 蛋白为受体结合蛋白,参与宿主细胞的附着,协助病毒逃避天然免疫,特别是逃避 I 型干扰素(IFN)反应。与其他基因相比, H 基因具有更高的变异性。关于该位点的改变对病毒造成的影响尚不清楚,但为了保持疫苗株弱毒性,降低安全风险,本实验对该位点进行了回复突变,因此可以此为进行重组麻疹载体疫苗的相关研究。

本研究通过将 pMV-S191、pcDNA-N、P、L 4 种质粒共转 BSR-T7/5 细胞,在细胞产生的 T7 RNA 聚合酶作用下,启动 T7 转录产生病毒基因组 RNA,但由于负链病毒无法以自身 RNA 为模板产生所需蛋白,因此需同时共转 N、P 和 L 3 个辅助质粒,在 CMV 启动子控制下产生辅助蛋白,形成有功能的 RNP,从而开始包装病毒,但病毒拯救效率低下,成功率低于 50%。除此之外,还可通过以下几种方式进行麻疹病

毒拯救:(1)将以上4种质粒均换成CMV启动子;(2)将T7启动子控制的麻疹病毒全长质粒及pcDNA-L共转293-3-46细胞(能够稳定表达T7 RNA聚合酶以及麻疹病毒N、P蛋白的293T细胞);(3)将T7启动子控制的麻疹病毒全长质粒、pcDNA-N、P、L及由CMV启动子控制的能够表达T7 RNA聚合酶的质粒共转293T细胞中^[22]。

麻疹病毒结构蛋白表达量具有极性效应,由N蛋白至L蛋白呈梯度降低,其外源转基因表达的强度取决于其插入的位置^[23]。目前已有3个已知的外源基因插入位点,分别为ATU1(N蛋白上游)、ATU2(P、M基因间区)和ATU3(H、L基因间区)^[24]。根据目前重组麻疹病毒载体疫苗研究报道,已在ATU1区域插入人类疱疹病毒(EBV)、尼帕病毒(NiV)和RSV等病毒相关抗原基因,在ATU2区域插入CHIKV、DENV、FluV、HBV、HCV、人乳头瘤病毒(HPV)、日本脑炎病毒(JEV)、WNV、SARS-CoV和MERS-CoV等病毒相关抗原基因,在ATU3区域插入HBV、MERS-CoV和SiV等病毒相关抗原基因,均在动物体内获得良好的候选重组MV疫苗的免疫原性和效果^[24]。其中麻疹病毒载体CHIKV疫苗已进入临床II期,而相应的麻疹病毒载体HIV疫苗和ZIKV疫苗也已处于临床I期阶段,具有广阔的疫苗平台技术应用前景。本研究成功构建了MV-S191反向遗传学系统,并成功在ATU2和ATU3基因间区插入eGFP。为保证麻疹病毒基因组核苷酸数目是6的倍数,在其基因组3'端添加HamRz序列(锤头核酸酶序列),在5'端添加HdvRz序列(丁型肝炎病毒核酶序列),在基因组两侧实现精确剪切,提高转录效率。在ATU上游添加了Kozak序列,增强外源基因翻译效率。引入了BsiWI和BssHII两个单酶切位点,便于此后外源基因替换及表达。在表达T7 RNA聚合酶的BSR-T7/5细胞中,不经MV基因组体外转录,即可直接转染质粒DNA拯救细胞,提高了重组病毒拯救的效率和成功率。在荧光显微镜下观察到绿色荧光蛋白的表达,表明麻疹病毒载体疫苗平台初步建成,可继而用其余病原体有效抗原基因替换eGFP基因序列,开发基于减毒MV株的新型麻疹病毒载体疫苗。

【参考文献】

- [1] 唐金芳,石健. 现阶段我国麻疹流行特点及应对策略[J]. 疾病监测与控制,2014,8(5):301-303.
- [2] Gerke C,Frantz PN,Ramsauer K,et al. Measles-vectored vaccine approaches against viral infections;a focus on Chikungunya[J]. Expert Rev Vaccines,2019,18(4):393-403.
- [3] Frantz PN,Teeravechyan S,Tangy F. Measles-derived vaccines to prevent emerging viral diseases[J]. Microbes Infect,2018,20(9-10):493-500.
- [4] Billeter MA,Naim HY,Udem SA. Reverse genetics of measles virus and resulting multivalent recombinant vaccines:applications of recombinant measles viruses [J]. Curr Top Microbiol Immunol,2009,329:129-162.
- [5] 张勇侠,陈宗香,高雅丽,等. 表达2型登革病毒NS1重组麻疹病毒的拯救及鉴定[J]. 病毒学报,2018,34(6):860-868.
- [6] 修梅红. 麻疹病毒载体的优化与改造[D]. 中国疾病预防控制中心,2007.
- [7] Wang Z, Hangartner L, Cornu TI, et al. Recombinant measles viruses expressing heterologous antigens of mumps and simian immunodeficiency viruses [J]. Vaccine, 2001, 19 (17-19): 2329-2336.
- [8] Lorin C, Mollet L, Delebecque F, et al. A single injection of recombinant measles virus vaccines expressing human immunodeficiency virus (HIV) type 1 clade B envelope glycoproteins induces neutralizing antibodies and cellular immune responses to HIV [J]. J Virol, 2004, 78(1):146-157.
- [9] Escriou N, Callendret B, Lorin V, et al. Protection from SARS coronavirus conferred by live measles vaccine expressing the spike glycoprotein [J]. Virology, 2014, 452-453:32-41.
- [10] Malczyk AH, Kupke A, Pr fer S, et al. A highly immunogenic and protective middle east respiratory syndrome coronavirus vaccine based on a recombinant measles virus vaccine platform [J]. J Virol, 2015, 89(22):11654-11667.
- [11] Sawada A, Komase K, Nakayama T. AIK-C measles vaccine expressing fusion protein of respiratory syncytial virus induces protective antibodies in cotton rats [J]. Vaccine, 2011, 29(7): 1481-1490.
- [12] Mok H. Evaluation of measles vaccine virus as a vector to deliver respiratory syncytial virus fusion protein or epstein-barr virus glycoprotein gp350 [J]. Open Virol J, 2012, 6(1):12-22.
- [13] Reyes-del VJ, Dela FC, Turner MA, et al. Broadly neutralizing immune responses against hepatitis C virus induced by vectored measles viruses and a recombinant envelope protein booster [J]. J Virol, 2012, 86(21):11558-11566.
- [14] Ito T, Kumagai T, Yamaji Y, et al. Recombinant measles AIK-C vaccine strain expressing influenza HA protein [J]. Vaccines, 2020, 8(2):149.
- [15] Rossi SL, Comer JE, Wang E, et al. Immunogenicity and efficacy of a measles virus-vectored Chikungunya vaccine in nonhuman primates [J]. J Infect Dis, 2019, 220(5):735-742.
- [16] Despr s P, Combredet C, Frenkiel M, et al. Live measles vaccine expressing the secreted form of the West Nile virus envelope glycoprotein protects against West Nile virus encephalitis [J]. J Infect Dis, 2005, 191(2):207-214.
- [17] Brandler S, Marianneau P, Loth P, et al. Measles vaccine expressing the secreted form of West Nile virus envelope glycoprotein induces protective immunity in squirrel monkeys, a new model of West Nile virus infection [J]. J Infect Dis, 2012, 206(2):212-219.
- [18] Brandler S, Ruffie C, Najburg V, et al. Pediatric measles vaccine expressing a dengue tetravalent antigen elicits neutralizing antibodies against all four dengue viruses [J]. Vaccine, 2010, 28 (41):6730-6739.

