(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106754758 A
(43)申请公布日 2017.05.31

(21)申请号 201611248914.5

(22)申请日 2016.12.29

(71)申请人 汕头大学医学院
地址 515041 广东省汕头市新陵路22号

(72)发明人 李蕊 曾俊 陈小璇 赵颖 邓辉雄 代剑平 王革非 李康生

(74)专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限公司 44102
代理人 陈卫

(51)Int.Cl.
C12N 7/01(2006.01)
C12N 5/10(2006.01)
A61K 39/12(2006.01)
A61K 39/39(2006.01)
A61P 31/14(2006.01)

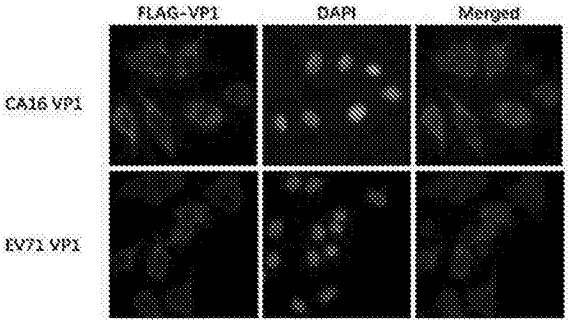
权利要求书1页 说明书6页
序列表1页 附图4页

(54)发明名称

一种含细胞因子佐剂的重组肠道病毒表型混合系统的构建方法及其应用

(57)摘要

本发明提供了一种含细胞因子佐剂的重组肠道病毒表型混合系统的构建方法，首先分别构建VP1重组细胞系和负载细胞因子基因的重组减毒肠道病毒株；后将重组减毒肠道病毒株在VP1重组细胞系中进行感染扩增即得；VP1重组细胞系为表达肠道病毒71型、柯萨奇病毒A组16型的VP1的一种或两种的细胞系；负载细胞因子基因的重组减毒肠道病毒株选自柯萨奇病毒B组3型、肠道病毒71型或者脊髓灰质炎病毒I型；细胞因子选自霍乱毒素或干扰素γ；负载细胞因子基因的重组减毒肠道病毒感染VP1重组细胞系，细胞病变后收获子代病毒，子代病毒可激活宿主免疫，针对多种肠道病毒产生免疫保护，具有应用价值。



CN 106754758 A

1.一种含细胞因子佐剂的重组肠道病毒表型混合系统的构建方法，其特征在于，首先分别构建VP1重组细胞系和负载细胞因子基因的重组减毒肠道病毒株；然后将负载细胞因子基因的重组减毒肠道病毒株在VP1重组细胞系中进行感染扩增即得含细胞因子佐剂的重组肠道病毒表型混合系统；所述VP1重组细胞系为单独或同时表达肠道病毒71型、柯萨奇病毒A组16型的VP1的一种或两种的细胞系；所述负载细胞因子基因的重组减毒肠道病毒株选自柯萨奇病毒B组3型、肠道病毒71型或者脊髓灰质炎病毒I型；所述细胞因子选自霍乱毒素或干扰素γ。

2.根据权利要求1所述含细胞因子佐剂的重组肠道病毒表型混合系统的制备方法，其特征在有，包括以下步骤：

S1．扩增肠道病毒71型和/或柯萨奇病毒A组16型的VP1基因，连接至真核表达载体中，经转染、筛选后得VP1重组细胞系；

S2．将柯萨奇病毒B组3型、肠道病毒71型或者脊髓灰质炎病毒I型进行全基因组克隆，在反向遗传系统下，在病毒全基因组的P1和P2区之间插入细胞因子得负载细胞因子基因的重组减毒肠道病毒株；

S3．S2得到的负载细胞因子基因的重组减毒肠道病毒株感染S1得到的VP1重组细胞系即得。

3.权利要求1或2所述方法获得的含细胞因子佐剂的重组肠道病毒表型混合系统。

4.权利要求3所述含细胞因子佐剂的重组肠道病毒表型混合系统在制备治疗肠道病毒的疫苗方法的应用。

一种含细胞因子佐剂的重组肠道病毒表型混合系统的构建方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域，更具体地，涉及一种含细胞因子佐剂的重组肠道病毒表型混合系统的构建方法及其应用。

背景技术

[0002] 手足口病(Hand-foot-mouth disease，HFMD)是一种由肠道病毒感染引起的传染性疾病，多发于5岁以下婴幼儿，临床表现为发热、厌食、哭闹，在手、足、口腔黏膜、肛周等部位出现疱疹或溃疡。手足口病通常具有自限性，多数患儿一周左右自愈，但少数患儿会出现无菌性脑膜炎、脑炎、心肌炎、肺水肿等中枢神经系统、心血管系统及呼吸系统并发症，迅速进展为重症手足口病，严重时可造成死亡。手足口病在我国高发，为我国公共健康带来巨大威胁，2008年卫生部将其纳入丙类传染病进行管理。

[0003] 引发HFMD的肠道病毒有柯萨奇病毒A组2-10、12、16、24型，B组的1-5型以及肠道病毒71型(EV71)等，其中最主要的病原为EV71和柯萨奇病毒 A组16型(CA16)。通常 CA16引起的症状相对较轻但感染病例数量大，EV71更易引起神经系统并发症等重症手足口病，而2012年以来的流行中CA6的分离率也日益增高。目前治疗手足口病缺乏有效治疗药物，主要以对症和支持治疗为主。

[0004] CA16、EV71以及CA6均属于小RNA病毒科肠道病毒属，为无包膜的正向单链RNA病毒，其衣壳为二十面体对称结构，病毒衣壳由VP1、VP2、VP3和VP4构成，其中VP1是其主要的衣壳蛋白，同时也是病毒吸附蛋白，在病毒吸附和穿入过程中起决定作用，因此VP1又是病毒的中和抗原。手足口病疫情严重，而在预防手段方面针对EV71病毒的目前仅有灭活疫苗已上市，CA16尚无疫苗应用。

[0005] 柯萨奇B组3型病毒、脊髓灰质炎病毒I型、II型和III型病毒亦属于小RNA病毒科肠道病毒属，肠道病毒属的病毒在生物学特性上有相似之处。其中，肠道病毒属的病毒在复制周期中，都是以基因组为模板，通读转录成一条mRNA，并翻译为前体蛋白，随后在病毒蛋白酶的作用自切割形成多种病毒蛋白质。在包装阶段，感染细胞中的病毒VP1、VP2、VP3和VP4会形成子代病毒衣壳，将子代基因组包裹并最终形成完整的子代病毒进行释放。在包装过程中，肠道病毒属的病毒VP1功能相似，因此，如一个细胞被两种以上的肠道病毒属病毒感染，会发生表型混合的现象，即一种病毒的基因组会被另一种病毒的衣壳所包裹，这种病毒的衣壳和基因组来源于不同的肠道病毒。

[0006] 肠道病毒属病毒的表型混合现象，具有疫苗研究的潜在价值，但天然的表型混合实际操作过程中存在问题。两种或两种以上的肠道病毒同时细胞会引发干扰现象，使病毒的增殖效率降低，且不同病毒混合感染后的复制增殖效率不一，无法进行有效的质控，而对于疫苗应用价值的毒株需要高复制效率，这也是目前疫苗研究领域均使用单型病毒各自增殖，然后将单独制备的各型疫苗按需进行混合，而不使用多种病毒同时感染细胞来增殖病毒，不去利用表型混合机制。

[0007] 用于“天然”表型混合的病毒，除了干扰现象和增殖效率不一的瓶颈外，如果是强毒株来源则需要进行灭活处理，制备为灭活疫苗，一方面其灭活疫苗的是利用已灭活无感染性的病毒衣壳，经肌注后依靠体内专职抗原提呈细胞加工处理后，激活机体产生免疫应答，为MHC-II类分子依赖的外源性抗原提呈，而自然条件下病毒感染更多的是以MHC-I类分子依赖的内源性抗原提呈方式激活机体免疫，因此保护力不如基于减毒毒株的减毒活疫苗。另一方面，如使用的是减毒肠道病毒毒株来进行表型混合，一样存在干扰现象和增殖效率不一的瓶颈，同时更为限制表型混合应用的是，多种减毒肠道病毒毒株混合感染细胞，由于毒株之间可以发生功能互补，且会发生非预期的基因重组，会极大加大减毒毒株回复毒力的风险。

[0008] 因此，如将肠道病毒表型混合现象应用于肠道病毒疫苗研究和开发，需要建立一种安全、高效的表型混合系统的方法，能够避免多种病毒同时感染所造成的干扰现象、增殖效率不一、非预期的基因重组、减毒毒株回复毒力，同时又比灭活疫苗免疫保护效果好。

发明内容

[0009] 本发明所要解决的技术问题是克服现有技术存在的上述缺陷，提供一种含细胞因子佐剂的重组肠道病毒表型混合系统的构建方法。

[0010] 本发明的第二个目的是提供所述方法获得的含细胞因子佐剂的重组肠道病毒表型混合系统。

[0011] 本发明的第三个目的是提供所述混合系统的应用。

[0012] 本发明的目的是通过以下技术方案予以实现的：

一种含细胞因子佐剂的重组肠道病毒表型混合系统的构建方法，首先分别构建VP1重组细胞系和负载细胞因子基因的重组减毒肠道病毒株；然后将负载细胞因子基因的重组减毒肠道病毒株在VP1重组细胞系中进行感染扩增即得含细胞因子佐剂的重组肠道病毒表型混合系统；所述VP1重组细胞系为单独或同时表达肠道病毒71型、柯萨奇病毒A组16型的VP1的一种或两种的细胞系；所述负载细胞因子基因的重组减毒肠道病毒株选自柯萨奇病毒B组3型、肠道病毒71型或者脊髓灰质炎病毒I型；所述细胞因子选自霍乱毒素或干扰素γ。

[0013] 该系统包括VP1重组细胞系和负载细胞因子基因的减毒肠道病毒毒株两个部分。其中VP1重组细胞系为：构建肠道病毒71型、柯萨奇病毒A组16型的VP1真核表达载体，经转染筛选获得稳定表达多种来源VP1蛋白重组表达细胞系。负载细胞因子基因的减毒肠道病毒的背景毒株为：肠道病毒71型减毒毒株、或萨奇病毒B组3型的减毒毒株、或脊髓灰质炎病毒I型减毒毒株。在上述背景毒株的基础上，构建感染性克隆，将细胞因子基因插入病毒基因组的P1和P2区之间，并加入病毒蛋白酶酶切位点，经感染性克隆载体转染和病毒拯救，获得可外源表达细胞因子的减毒肠道病毒。其中的细胞因子可以为霍乱毒素或干扰素γ。在该系统中，含有负载细胞因子基因的重组减毒肠道病毒，感染其它肠道病毒VP1重组表达细胞系后，在病毒增殖的包装阶段，子代病毒会将其它肠道病毒的VP1混入子代病毒衣壳中。例如，经过增殖的子代病毒，其病毒核心为柯萨奇病毒B组3型减毒毒株基因组，而其表面病毒衣壳中的VP1是混装的，含有来源于包括肠道病毒71型、柯萨奇病毒A组16型的VP1。所获得的子代病毒可感染宿主，但由于病毒核心为含有负载细胞因子基因的重组减毒肠道病毒毒株的基因组，其在宿主中的复制和致病性受到限制；同时重组表达的细胞因子可增强宿

主的免疫反应，而子代病毒含有多种肠道病毒的VP1蛋白，且VP1是肠道病毒具有型特异性的中和抗原，因此，此种系统形成的子代病毒可激活宿主免疫，针对多种肠道病毒产生免疫保护。

[0014] 优选地，所述含细胞因子佐剂的重组肠道病毒表型混合系统的制备方法，包括以下步骤：

S1．扩增肠道病毒71型和/或柯萨奇病毒A组16型的VP1基因，连接至真核表达载体中，经转染、筛选后得VP1重组细胞系；

S2．将柯萨奇病毒B组3型、肠道病毒71型或者脊髓灰质炎病毒I型进行全基因组克隆，在反向遗传系统下，在病毒全基因组的P1和P2区之间插入细胞因子得负载细胞因子基因的重组减毒肠道病毒株；

S3．S2得到的负载细胞因子基因的重组减毒肠道病毒株感染S1得到的VP1重组细胞系即得。

[0015] 本发明所述VP1重组细胞系和负载细胞因子基因的重组减毒肠道病毒株的制备方法均为分子生物学领域的常规技术。

[0016] 优选地，VP1重组细胞系的制备方法为提取相应病毒的RNA，利用polyA或随机引物进行逆转录，得到cDNA。利用相应病毒的特异性引物，通过PCR扩增得到相应病毒的VP1基因，利用酶切连接将VP1基因片段插入真核表达载体中。真核表达载体可使用Neo或Puyo抗性基因，构建好的真核表达载体利用脂质体转染至真核细胞Vero细胞(或293、Hep2、HeLa等细胞)中，然后使用G418或嘌呤霉素进行筛选，经免疫印迹鉴定和免疫荧光鉴定后，得到该表型混合系统的其中一部分，即VP1重组细胞系。

[0017] 优选地，负载细胞因子基因的重组减毒肠道病毒的制备方法为：将上述肠道病毒中的某一型进行全基因组克隆，构建病毒感染性克隆，在反向遗传系统下，在病毒的P1和P2区之间引入编码蛋白酶切位点的区域和特定限制性内切酶区域，然后利用限制性内切酶酶切位点，插入细胞因子。细胞因子为霍乱毒素，以促进该重组减毒毒株在肠道黏膜的黏膜免疫应答；也可使用干扰素γ，促进MHC-II抗原提呈，提高后续含有多种肠道病毒来源的VP1免疫应答效率。

[0018] 本发明还提供上述方法获得的含细胞因子佐剂的重组肠道病毒表型混合系统。

[0019] 如此，负载细胞因子基因的重组减毒肠道病毒感染VP1重组细胞系，细胞病变后收获子代病毒，获得含有多种不同来源肠道病毒VP1衣壳、含有减毒肠道病毒毒株基因组核心、可外源表达细胞因子的混合表型重组减毒毒株；此种系统形成的子代病毒可激活宿主免疫，针对多种肠道病毒产生免疫保护。

[0020] 因此，本发明还提供含细胞因子佐剂的重组肠道病毒表型混合系统在制备治疗肠道病毒的疫苗方法的应用。

[0021] 与现有技术相比，本发明具有以下有益效果：

本发明提供了一种含细胞因子佐剂的重组肠道病毒表型混合系统的构建方法，首先分别构建VP1重组细胞系和负载细胞因子基因的重组减毒肠道病毒株；然后将负载细胞因子基因的重组减毒肠道病毒株在VP1重组细胞系中进行感染扩增记得含细胞因子佐剂的重组肠道病毒表型混合系统；所述VP1重组细胞系为单独或同时表达肠道病毒71型、柯萨奇病毒A组16型的VP1的一种或两种的细胞系；所述负载细胞因子基因的重组减毒肠道病毒株选自

柯萨奇病毒B组3型、肠道病毒71型或者脊髓灰质炎病毒I型;所述细胞因子选自霍乱毒素或干扰素γ;负载细胞因子基因的重组减毒肠道病毒感染VP1重组细胞系,细胞病变后收获子代病毒,获得含有多种不同来源肠道病毒VP1衣壳、含有减毒肠道病毒毒株基因组核心、可外源表达细胞因子的混合表型重组减毒毒株;此种系统形成的子代病毒可激活宿主免疫,针对多种肠道病毒产生免疫保护,该表型混合系统具有实际和广泛的应用价值。

附图说明

[0022] 图1为CA16和EV71毒株VP1片段PCR扩增电泳图;M:NEB 1kb DNA ladder;1:CA16毒株VP1片段PCR产物;2:EV71毒株VP1片段PCR产物。

[0023] 图2为CA16和EV71毒株VP1片段及真核表达载体pcFlag的酶切回收;M:NEB 1kb DNA ladder;1:CA16毒株VP1片段酶切产物;2:EV71毒株VP1片段酶切产物;3:pcFlag酶切产物。

[0024] 图3为CA16的VP1真核表达质粒pcFlag-CA16-VP1和EV71的VP1真核表达质粒pcFlag-EV71-VP1的菌落PCR鉴定;M:NEB 1kb DNA ladder;1-8:pcFlag-CA16-VP1菌落PCR产物;9-16:pcFlag-EV71-VP1菌落PCR产物。

[0025] 图4为pcFlag-CA16-VP1和 pcFlag-EV71-VP1的*Hind* III和*Xho* I双酶切鉴定;M:NEB 1kb DNA ladder;1-2:pcFlag-CA16-VP1质粒*Hind* III和*Xho* I双酶切鉴定;9-16:pcFlag-EV71-VP1质粒*Hind* III和*Xho* I双酶切鉴定。

[0026] 图5为CA16和EV71重组VP1蛋白在细胞中表达的免疫荧光检测。

[0027] 图6(a)三段PCR扩增Sabin1基因全长,F1片段大小为2510bp,F2片段大小为3210bp,F3片段为1880bp。(b)三片段PCR桥接得到Sabin1全长,Sabin1 大小为7441bp。(c)PCR桥接得到的Sabin1 基因和pMD19-T载体通过EcoR1和Sal1黏性末端连接得到pv-1,pv-2两个克隆载体,用BamH1酶切鉴定,理论得到四个片段条带,大小分别为5730bp,2471bp,1879bp,30bp,电泳分析只有三个目的条带,30bp太小,无法辨认,可以确定为阳性克隆。(d)用EcoR1和Sal1 限制性内切酶切割pv-1,pv-2 Sabin1载体,得到大小为7441bp的Sabin1片段和大小为2692bp左右的pMD19-T 载体片段。

[0028] 图7(a)对Sabin1-f1,Sabin1-f2,Sabin1-f3,Sabin1-f4克隆质粒进行酶切回收目的片段,Sabin1-f1片段大小为2481bp,Sabin1-f2片段大小为2136bp,Sabin1-f3片段大小为1017bp,Sabin1-f4+pMD19-T片段大小为4487bp。(b) Sabin1-f1, Sabin1-f2, Sabin1-f3, Sabin1-f4+pMD19-T分段连接得到Sabin1基因全长,用BamH1限制性内切酶酶切鉴定,理论得到四个片段条带,大小分别为5730bp,2471bp,1879bp,30bp,电泳分析只有三个目的条带,30bp太小,无法辨认,基本可以判定Sabin1-1, Sabin1-2, Sabin1-3为阳性克隆。

[0029] 图8(a)通过PCR桥接构建的Sabin1载体用EcoR1和Sal1限制性内切酶酶切回收Sabin1基因,与使用EcoR1和Xho1限制性内切酶酶切得到EcoR1和Xho1黏性末端的pcDNA3连接,对克隆质粒用BamH1酶切鉴定,理论有5个大小不一的片段,为8236bp, 2471bp, 1879bp, 256bp, 30bp。其中琼脂糖凝胶电泳鉴定,可以看到8236bp,2471bp,1879bp大小的片段,256bp,30bp过小,无法有效辨认,初步确定为阳性克隆。(b)通过片段连接构建的pMD19-T_Sabin1载体用EcoR1和Not1限制性内切酶酶切回收Sabin1片段和使用EcoR1和Not1限制性内切酶酶切得到的pcDNA3连接得到的克隆,使用EcoR1和Sal1 限制性内切酶酶

切鉴定，理论有5个大小不一的片段：7441bp，2285bp，2188bp，903bp，34bp。实际琼脂糖凝胶电泳鉴定只可以分辨7441bp和(2285bp，2188bp)两条带，初步分析为阳性克隆。

[0030] 图9为pCV-CS质粒图谱。

具体实施方式

[0031] 下面结合具体实施例进一步说明本发明的内容，但不应理解为对本发明的限制。在不背离本发明精神和实质的情况下，对本发明方法、步骤或条件所作的简单修改或替换，均属于本发明的范围；若未特别指明，实施例中所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段。

[0032] 实施例1

一、稳定表达CA16和EV71的VP1的细胞的构建

临床及实验室确诊的柯萨奇病毒A组16型(以下简称CA16)和肠道病毒71型(以下简称EV71)感染病例的标本，使用病毒RNA提取试剂盒分别提取感染病例的病毒RNA，利用SuperScript III逆转录酶和随机引物，逆转录得到CA16和EV71的病毒cDNA。

[0033] 以CA16和EV71病毒cDNA为模板，CA16-VP1基因的上游引物：5’-CCTAAGCTTTCTGGGTACTTTGACTATTACACC，下游引物5’-CAGCTCGAGTCATGTTGTTATCTTGTCTCTACTAC。EV71-VP1基因的上游引物：5’-CCTAAGCTTTATGCCCGAGATGGAGTGTTTGAC，下游引物5’-CAGCTCGAGTCATTTCCCAAGAGTGGTGATTGCTG。

[0034] 扩增反应条件：94℃预变性3min后进入循环，94℃变性30s，52℃复性30s，72℃延伸2min，30个循环后72℃延伸5min。经1.2％琼脂糖凝胶电泳，回收相应的产物片断。PCR产物主带大小约为1100bp左右，结果与预计相符(图1)。

[0035] CA16和EV71毒株VP1 PCR产物，利用琼脂糖凝胶电泳，回收预计大小的扩增主带，利用*Hind* III和*Xho* I对VP1片段和pCMV-C-Flag 质粒(简称pcFlag质粒)进行双酶切，酶切产物再次利用琼脂糖凝胶电泳回收相应片段，CA16和EV71毒株VP1分别与pCMV-C-Flag质粒进行连接(图2)。CA16和EV71毒株VP1分别与pCMV-C-Flag质粒进行连接，转化感受态细胞后，经抗性筛选的单菌落各挑选8个进行菌落PCR鉴定，如图3所示，CA16的VP1真核表达质粒pcFlag-CA16-VP1和EV71的VP1真核表达质粒pcFlag-EV71-VP1的16个菌落均能扩增出相应的VP1片段。

[0036] 经菌落PCR鉴定阳性的菌落各挑取2个克隆进行细菌培养和质粒提取，进行酶切鉴定，如图4所示，经*Hind* III和*Xho* I双酶切后，均出现1100bp左右的VP1外源片段和约5kb的pcFlag载体片段。酶切鉴定的质粒进行测序分析，结果完全正确，质粒分别命名为pcFlag-CA16-VP1和 pcFlag-EV71-VP1。

[0037] 293T细胞、RD细胞、Vero细胞均用DMEM(含10% FBS)在37℃、5% CO_2、水饱和条件下培养。转染前，将生长至95%以上融合率的细胞接种于6孔细胞培养板，待细胞生长20~24h至细胞密度达70~90%时进行转染。转染操作按照Lipofectamine 2000转染试剂的操作手册进行。

[0038] 经酶切和测序验证的pcFlag-CA16-VP1和 pcFlag-EV71-VP1质粒转染293T和RD细胞，利用FLAG抗体进行免疫印迹检测，在约32Kd的位置出现了预计大小条带，表明真核表达

质粒可在293T和RD细胞中表达出FLAG融合的VP1重组蛋白。

[0039] pcFlag-CA16-VP1和 pcFlag-EV71-VP1质粒转染293T细胞，利用免疫荧光检测重组VP1的表达，如图5所示，CA16和EV71重组VP1蛋白主要分布于细胞胞浆中。

[0040] 将pcFlag-CA16-VP1和 pcFlag-EV71-VP1质粒，以1:1的比例共转染Vero细胞，转染后72h使用G418进行筛选，经过3周左右的筛选，获得抗性细胞克隆，经检测得到稳定表达CA16和EV71的VP1的Vero细胞系。

[0041] 二、负载细胞因子基因的重组减毒肠道病毒株的制备

减毒肠道背景病毒株可使用减毒的柯萨奇病毒B组3型、或减毒的肠道病毒71型、或减毒的脊髓灰质炎病毒I型(Sabin疫苗株)。克隆病毒毒株的全长，构建感染性克隆和反向遗传系统。

[0042] 以脊髓灰质炎病毒Sabin毒株I型为背景病毒，使用分段克隆的方式进行克隆。引物序列如下：

片段顺序	引物名称	序列(5'-3')	对应位置和酶切位点
F1	F1-F	CTAGAATTCTTAAAACAGCTCTGGGCTTGCACCC	1-2510bp,EcoR1
	F1-R	CAATCATGCTTTCAAGCATCTGACCTAACC	
F2	F2-F	GCGCTTCATGCGAGATACCACACATATAG	2331-5640bp
	F2-R	GTTCCTGCTTGATCTTCGACCGCTTTGGC	
F3	F3-F	TCACCTGGTGAAAGCATTGTGATCGATGGC	5561-7441,SalI
	F3-R	ATGTCGACCCTCCGAATTAAAGAAAAATTTACCCCTAC	

通过桥联PCR进行全长基因组的克隆，经鉴定得到Sabin毒株I型反向遗传质粒系统(图6-8)。然后利用PCR在Sabin毒株I型反向遗传系统质粒的P1和P2区，引入含有蛋白酶切位点的限制性酶切位点，然后插入霍乱毒素无毒B亚基基因片段。然后转染至Vero细胞后拯救出含有负载细胞因子基因的重组减毒肠道病毒株Sabin毒株I型。

[0043] 亦可使用pCV-CS质粒，内含减毒的柯萨奇病毒B组3型全基因组，以及含有蛋白酶切位点的限制性酶切位点(图9)，插入霍乱毒素无毒B亚基基因片段。然后转染至Vero细胞后拯救出含有负载细胞因子基因的重组减毒肠道病毒株柯萨奇病毒B组3型。

[0044] 含有负载细胞因子基因的重组减毒肠道病毒株Sabin毒株I型，或含有负载细胞因子基因的重组减毒肠道病毒株柯萨奇病毒B组3型，在稳定表达CA16和EV71的VP1的Vero细胞系进行感染，48h后收获细胞上清，利用超速离心法获得表型混合的重组肠道病毒。

SEQUENCE LISTING

<110> 汕头大学医学院

<120> 一种含细胞因子佐剂的重组肠道病毒表型混合系统的构建方法及其应用

<130>

<160> 4

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 33

<212> DNA

<213> CA16-VP1基因的上游引物

<400> 1

cctaagcttt ctgggtactt tgactattac acc 33

<210> 2

<211> 35

<212> DNA

<213> CA16-VP1基因的下游引物

<400> 2

cagctcgagt catgttgtta tcttgtctct actac 35

<210> 3

<211> 33

<212> DNA

<213> EV71-VP1基因的上游引物

<400> 3

cctaagcttt atgcccgaga tggagtgttt gac 33

<210> 4

<211> 35

<212> DNA

<213> EV71-VP1基因的下游引物

<400> 4

cagctcgagt catttcccaa gagtggtgat tgctg 35

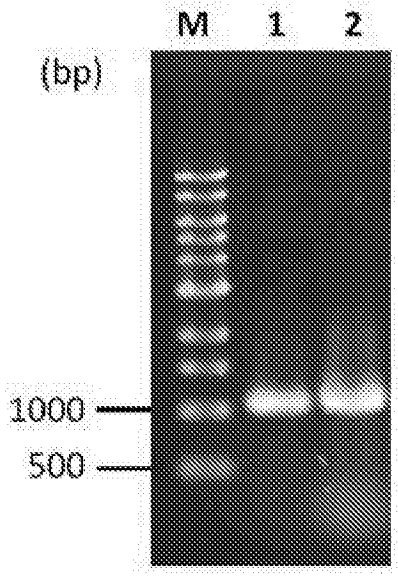

M
1
2
(bp)
1000
500

图1

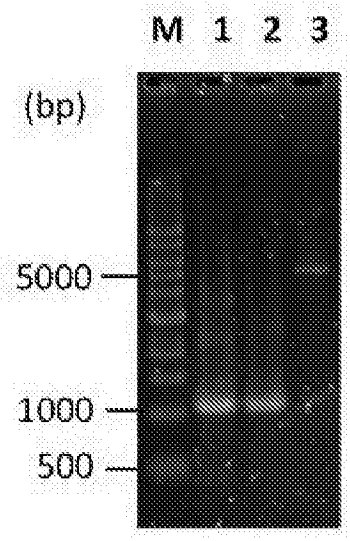

M
1
2
3
(bp)
5000
1000
500

图2

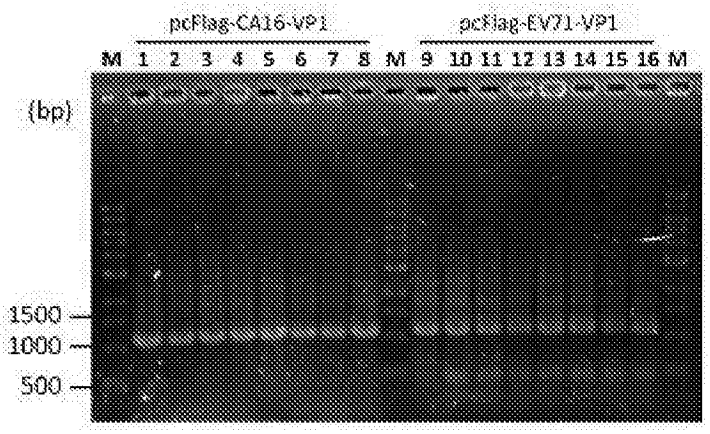

pcFlag-CA16-VP1
pcFlag-EV71-VP1
M 1 2 3 4 5 6 7 8 M 9 10 11 12 13 14 15 16 M
(bp)
1500
1000
500

图3

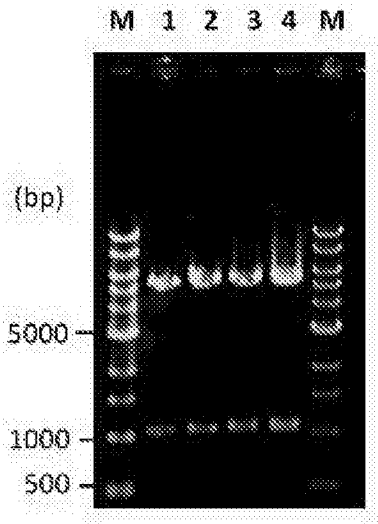

M
1
2
3
4
M
(bp)
5000
1000
500

图4

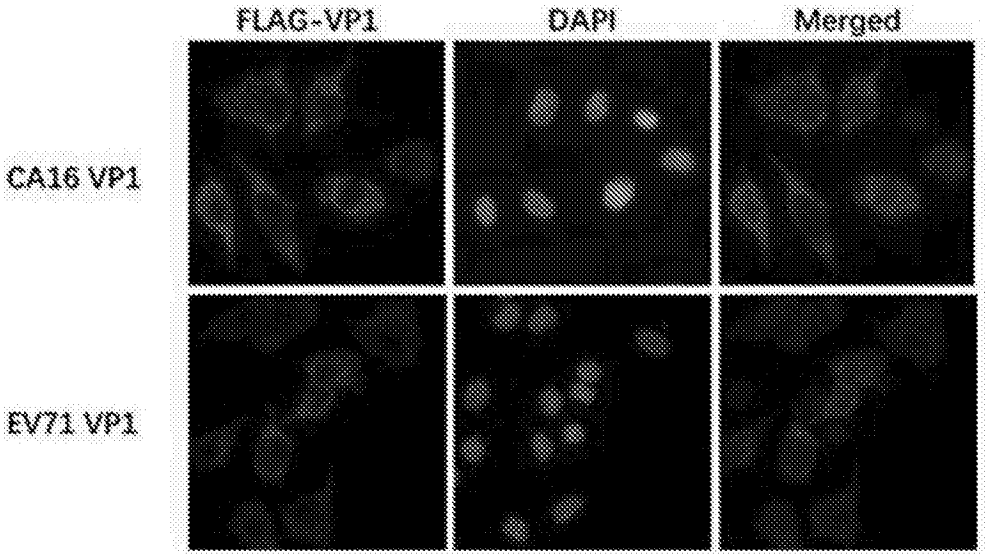

FLAG-VP1
DAPI
Merged
CA16 VP1
EV71 VP1

图5

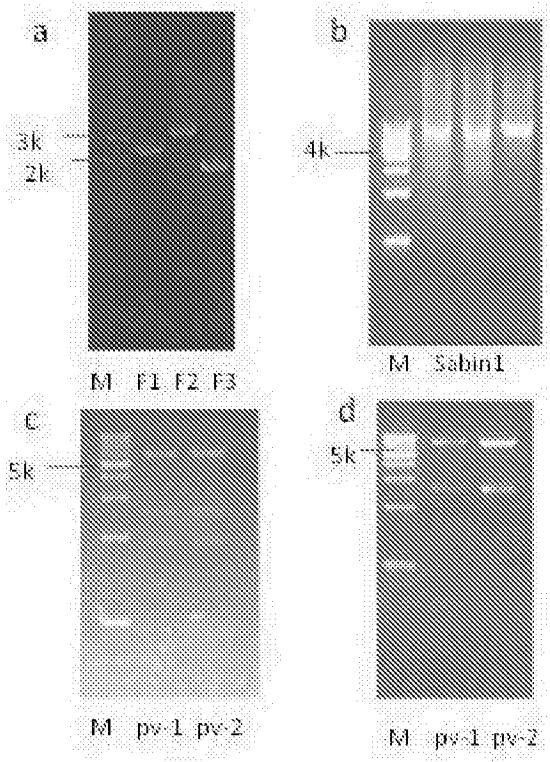

a
3k
2k
M F1 F2 F3
b
4k
M Sabin1
c
5k
M pv-1 pv-2
d
5k
M pv-1 pv-2

图6

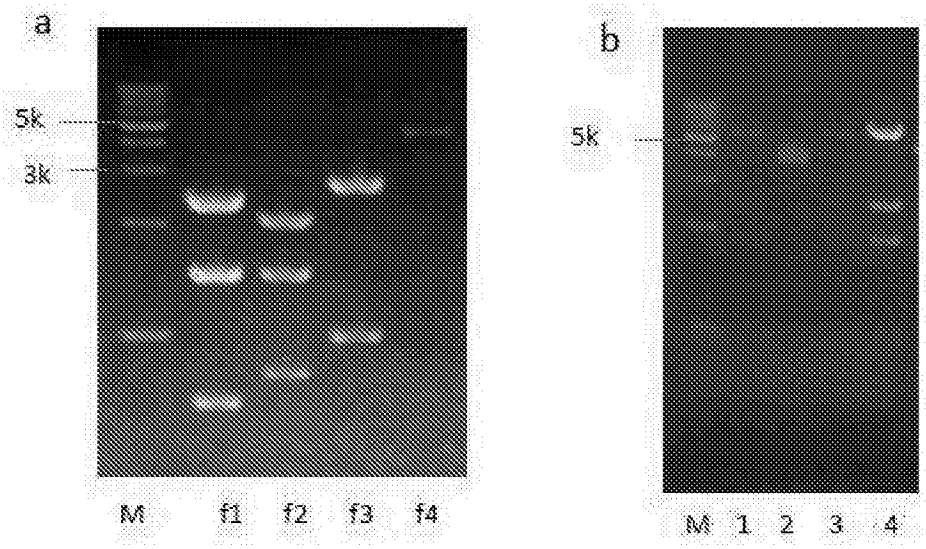


图7

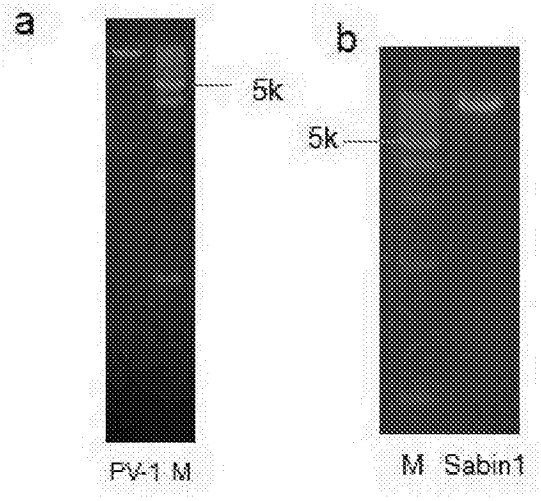


图8

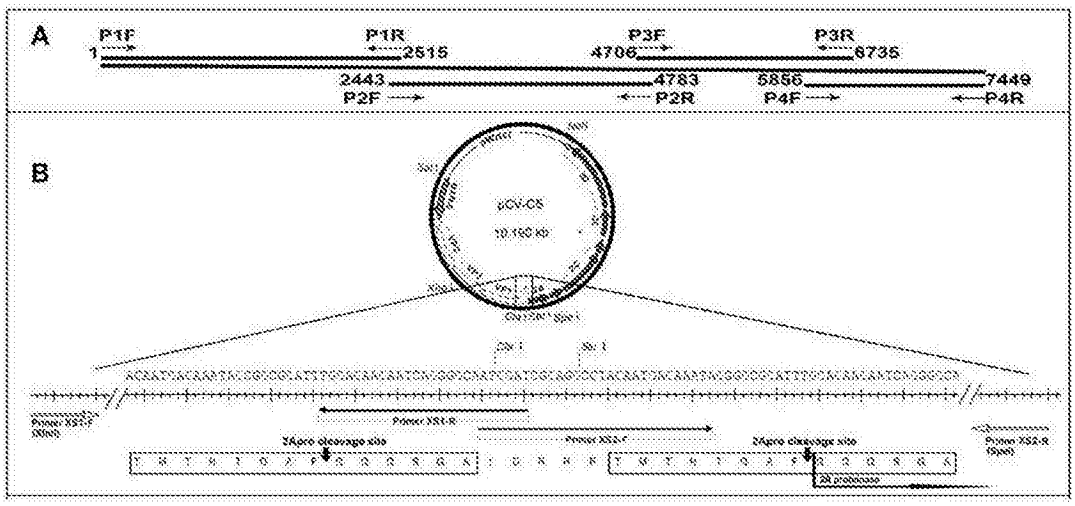

A
P1F
P1R
2515
P3F
4706
P3R
6735
2443
4783
5856
7449
P2F
P2R
P4F
P4R
B
pCV-CS
10,150 kb
3Apro cleavage site
3Apro cleavage site

图9