

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610124967.6

[51] Int. Cl.

C12N 7/01 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

A61K 39/21 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 4 月 18 日

[11] 公开号 CN 1948468A

[22] 申请日 2006.11.8

[21] 申请号 200610124967.6

[71] 申请人 武汉大学

地址 430072 湖北省武汉市武昌珞珈山

[72] 发明人 张林琦 陈志伟 庄柯 田波

[74] 专利代理机构 武汉宇晨专利事务所  
代理人 王敏锋

权利要求书 1 页 说明书 22 页 附图 6 页

## [54] 发明名称

一种杂交免疫缺陷病毒株及应用

## [57] 摘要

本发明公开了一种杂交免疫缺陷病毒株及应用,人免疫缺陷病毒(HIV-1)B'亚型、R5嗜性、杂交的人/猴免疫缺陷病毒株(SHIV-B'<sub>WHU</sub>)和用于构建该病毒的3'端嵌合质粒及该病毒在建立猴/AIDS动物模型中的应用。在猴免疫缺陷病毒SIV-mac239的基因组框架上,以B'HIV-1的基因片段取代SIVmac239的基因构成SHIV-B'<sub>WHU</sub>。构建的杂交病毒SHIV-B'<sub>WHU</sub>携带B'亚型HIV-1的外膜基因,具有R5嗜性,能体外感染人和恒河猴的PBMC并高效复制,保证SHIV-B'<sub>WHU</sub>感染恒河猴建立猴/AIDS动物模型。将用于研究艾滋病病毒的体内感染过程、病原特性、发病机理,免疫反应等,以及筛选和评价艾滋病疫苗、抗艾滋病病毒药物和杀微生物剂。

---

1、一种杂交免疫缺陷病毒株，其特征在于人猴免疫缺陷病毒（SHIV-B'<sub>WHU</sub>），CCTCC NO:V200510。

2、一种杂交免疫缺陷病毒株，其特征在于含有质粒的菌株为 *Escherichia coli* DH5  $\alpha$  /3'-p02HN<sub>SMX2</sub>-B'<sub>WHU</sub>，CCTCC NO:M205070。

3、一种杂交免疫缺陷病毒株/SHIV-B'<sub>WHU</sub> 在建立 SHIV/猴模型中的应用。

4、一种杂交免疫缺陷病毒株/SHIV-B'<sub>WHU</sub> 在检测艾滋病的疫苗中的应用。

5、一种杂交免疫缺陷病毒株/SHIV-B'<sub>WHU</sub> 在检测抗逆转录病毒的药物中的应用。

6、一种杂交免疫缺陷病毒株/SHIV-B'<sub>WHU</sub> 在检测杀微生物剂中的应用。

## 一种杂交免疫缺陷病毒株及应用

### 技术领域

本发明涉及一种杂交免疫缺陷病毒，它衍生于人类免疫缺陷病毒（HIV）和猴免疫缺陷病毒（SIV），它的特征是携带中国中部地区主要流行株 HIV-1 B'亚型的外膜基因（*env*）；具有 R5 嗜性；具有感染靶细胞及具有体外感染人和中国恒河猴外周血单核细胞（PBMC）和复制的能力。同时还涉及到这种杂交病毒的应用，用它感染恒河猴，能建立 B'亚型的 SHIV/猴模型；研究艾滋病病毒的体内感染过程、病原特性、发病机理，免疫反应等，检测和筛选艾滋病疫苗、抗逆转录病毒药物和杀微生物剂。

### 背景技术

人免疫缺陷病毒（Human Immunodeficiency Virus, HIV）属于逆转录病毒科，慢病毒属，它是引起人类免疫缺陷综合症（AIDS）的病原体（Marriott, D.J.E., *et al.*, 1997. HIV and advanced immune deficiency. *Managing HIV*, 164,15-16）。HIV 有两种类型，即 HIV-1 和 HIV-2。利用 HIV-1 的 DNA 序列构建进化树的方法将 HIV-1 分为三组，M 组、O 组和 N 组。大多数序列属于 M 组，少部分序列为 O 组，N 组的序列非常少。M 组进一步分为几种亚型（A、B、C、D、F、G、H、J 和 K 亚型）。

中国存在两个主要 HIV-1 流行株，一个是重组 C 亚型，另一个是 B'亚型。HIV-1 重组 C 亚型(CRF) 07 和 08 (也称 CB'重组 HIV-1)主要在中国西南和西北地区流行，如新疆，四川，云南。CB'重组亚型是中国静脉吸毒(IDU)人群中的主要致病株（Yu, X.F., *et al.*, 2002. Maintaining low HIV type 1 *env* genetic diversity among injection drug users infected with a B/C recombinant and CRF01\_AE HIV type 1 in southern China. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 18(2), 167-70）。HIV-1B'亚型主要在中国中部部分地区流行，如河南省及其周边省份（湖北，安徽，山西等）。造成 HIV-1B'亚型流行的主要因素是有偿献血(PBD)（Wu, Z., *et al.*, 1995. HIV-1 infection in commercial plasma donors in China, *Lancet* 346,61-62）。从 80 年代末至 90 年代中期，河南省存在十分活跃的合法和非法的有偿献血活动。由于没有对献血员进行 HIV 筛查并且没有执行正规的无菌超作，使许多有偿献血（浆）者在献血过程中感染了 HIV-1，导致 HIV-1B'在华中地区广泛传播，造成艾滋病在 PBDs 中爆发流行。专家保守估计，在中国将近 50 万人是由于不规范的献血途径而感染 HIV 病毒。通过分子流行病学调查研究发现，在华中地区没有发现最早在云南发现的嵌合式基因型，而且在此地区流行的 HIV-1 B'没有与其它亚型发生交叉重组。因此，B'似乎是在华中不同地区的 PBDs 中唯一的 HIV-1 基因型，成为在中国中部地区流行的，具有代表性的毒株（Su, B., *et al.*, 2003. HIV-1 subtype B' dictates the AIDS epidemic among paid blood donors in the Henan and Hubei provinces of China. *AIDS*, 17(17), 2515-20;）。为了阻止 HIV-1 的进一步传播，申请人急需建立一种动物模型进行 HIV-1 的基础研究和评估各种防治措施。根据目前的研究，非灵长类动物是建立 HIV 动物模型最适当的选择。

引起猴免疫缺陷综合症（SAIDS）的病原体是猴免疫缺陷病毒（Simian

Immunodeficiency Virus, SIV) (Daniel, M.D., et al.,1985. Isolation of T-cell tropic HTLV-III-like retrovirus from macaques. *Science*, 228(4704),1201-4)。通过分析 HIV 和 SIV 核苷酸序列发现两者基因组有很高的相似性。HIV-1 和 SIVcpz (来自大猩猩) 的基因组相似, 而 SIVs 与 HIV-2 相似。除了 HIV-1 和 SIVcpz 有 vpu 而 HIV-2 和 SIVs 是 vpx 的区别以外, 其它的基因组组成是一样的。(Desrosiers, R.C.,1988. Simian immunodeficiency viruses. *Annu Rev Microbiol*, 42,607-25)。因此研究者利用 HIV-1/大猩猩和 SIV/恒河猴等灵长类动物模型研究 HIV。但是它们也存在明显的缺点。首先, 黑猩猩是唯一能感染 HIV-1 的非人类的灵长类动物, 但感染后的黑猩猩没有任何疾病症状, 而且作为即将灭种的种系, 其使用是十分有限的。其次, HIV-1 外膜基因 env 决定 HIV 的生物学功能, 如细胞嗜性, 共受体使用和致细胞病变等, 但 env 存在高度变异性, 而且 HIV-1 与 SIV 编码的外膜糖蛋白截然不同, 因此使用 SIV/恒河猴模型研究 HIV-1 是不合适的。为了发展合适的动物模型, 研究者通过突变分析和互补研究发现 HIV-1 和 SIV 的某些基因的功能相似, 而且可以互换这些基因。因此, 构建出猴/人免疫缺陷杂交病毒 (SHIV) (Shibata, R., et al.,1991. Generation of a chimeric human and simian immunodeficiency virus infectious to monkey peripheral blood mononuclear cells. *J Virol*, 65(7), 3514-20)。杂交病毒保留相应的亲本 HIV-1 env 的生物学特性, 因此可以用它们来揭示病毒包膜决定的 SHIV 的体内复制能力和诱导多种病毒特异性免疫反应的差异。SHIV 感染猴后建立的 SHIV/猴模型可以研究 HIV-1 的致病机制和传播途径等, 评估 HIV-1 的疫苗和抗逆转录病毒药物 (Mascola, J.R., et al., 1999. Protection of Macaques against pathogenic simian/human immunodeficiency virus 89.6PD by passive transfer of neutralizing antibodies. *J Virol*, 73, 4009-18; Veazey, R. S., et al., 2003. Use of a small molecule CCR5 inhibitor in macaques to treat simian immunodeficiency virus infection or prevent simian-human immunodeficiency virus infection. *J Exp Med*,198,1551-62)。

世界上已经有数种 SHIV 毒株被构建成功, 并且评估了它们在非灵长类动物体内的致病性。目前现有的 SHIV 株大多数利用来自 HIV-1 B 亚型毒株的包膜基因, 这些毒株既有来自实验室构建的病毒(HIV-1<sub>HXB2</sub>, HIV-1<sub>NL43</sub>), 也有来自原始的毒株(HIV-1<sub>162</sub>, HIV-1<sub>133</sub>, HIV<sub>89.6</sub>, HIV-1<sub>DH12</sub>) (Luciw, P.A., et al., 1995. Persistent infection of rhesus macaques with T-cell-line-tropic and macrophage-tropic clones of simian/human immunodeficiency viruses (SHIV). *Proc Natl Acad Sci US A*, 92(16),7490-4)。还有少部分 SHIV 是针对 HIV-1 其它亚型的, 如 E 亚型 (SHIV<sub>9466.33</sub>, SHIV-E-CAR), C 亚型 (SHIV<sub>CHN19</sub>、SHIV-XJ02170、SHIV<sub>MJ4</sub>) 和 F 亚型 (SHIV<sub>cmr304</sub>) (Chen, Z. W., et al.,2000. Enhanced infectivity of an R5-tropic simian/human immunodeficiency virus carrying human immunodeficiency virus type 1 subtype C envelope after serial passages in pig-tailed macaques (*Macaca nemestrina*).*J Virol*, 74,6501-10)。针对不同亚型和地区流行的 HIV-1 毒株构建的 SHIV 在功能和生物学特性上存在明显的差异。由于华中地区的 HIV-1 流行株 B' 亚型与传统欧美 B 亚型在基因序列上, 尤其在高突变的 env 基因的 V3 loop 区存在较明显的差异, 而 V3 loop 环是刺激机体产生有效中和抗体的一个非常重要的免疫抗原决定簇。因此, B 亚型的 SHIV/猴模型并不适合 B' 亚型 HIV-1 毒株的研究。但到目前为止, 世界上还没有一种 SHIV 是针对 HIV-1B' 亚型构建的。

根据 HIV-1 株所利用的辅助受体, 可将 HIV-1 将其分为 X4 株(利用 CXCR4)、R5 株(利用 CCR5) 和 X4R5 株(利用 CXCR4 和 CCR5) 等。X4 毒株具有嗜 T

淋巴细胞、利用 CXCR4 辅助受体、快复制高滴度和合胞体诱导 (SI) 的特性, R5 为嗜巨噬细胞、利用 CCR5 辅助受体、慢复制低滴度和非合胞体诱导 (NSI) 的特性。R5 毒株比 X4 毒株更易传播。许多研究发现, 病毒对辅助受体的利用在感染过程期间是不断变化的, 使用不同的共受体可以导致病毒在体内产生截然不同的致病结果。早期感染者体内病毒以嗜巨噬细胞的 R5 毒株为主, 其原因是感染 HIV 的巨噬细胞对细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 较感染的 T 细胞不敏感, 嗜巨噬细胞 HIV 克隆株能更有效地逃逸 CTL 的压力而选择性地生长 (Schutten, M., *et al.*, 2001. Macrophage Tropism of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Facilitates In Vivo Escape from Cytotoxic T-Lymphocyte Pressure. *J Virol*, 75:2706-09)。随着病程的进展、宿主细胞识别 HIV-1 能力的增强和 HIV-1 自身为在宿主细胞内播散, 病毒才会出现受体利用的转移, 如利用 CXCR4 等其它受体。感染宿主病毒的生物学特性也会随着病程的进展而改变, 在病程早期病毒主要是 NSI 型, 晚期才转变成 SI 型。所以采取有效措施在早期阶段就阻断病毒进入细胞及在感染早期阻断病毒的进一步扩散, 延长病程是防治 HIV-1 的一个重要环节。目前世界上构建的 SHIV 大部分是利用 CXCR4 受体, 感染猴后, 可以导致猴在很短的时间内发病, 这种动物模型不能很好地模拟 HIV-1 在人体内自然感染状态。因而构建一种使用 CCR5 受体的 SHIV, 建立 R5 嗜性的, 能模拟 HIV-1 早期感染的 SHIV/猴模型对研究病毒早期感染机制, 免疫和致病机制和筛选抗艾滋病疫苗、药物以及杀微生物剂是具有重要的意义。

#### 发明内容

本发明的目的在于提供一种杂交免疫缺陷病毒株 (SHIV-B'<sub>WHU</sub>), CCTCC NO:V200510。该病毒的主要优点是携带 HIV-1 B' 亚型的外膜基因 (*env*); 具有 R5 嗜性; 能感染靶细胞及具有体外感染人和中国恒河猴外周血单核细胞 (PBMC) 和复制的能力。

一种用于构建 SHIV-B'<sub>WHU</sub> 病毒的 3' 端嵌合质粒 (3'-p02HN<sub>SMX2</sub>-B'<sub>WHU</sub>)。

本发明涉及一种杂交免疫缺陷病毒株, 其特征在于使用 3' 端嵌合质粒 /3'-p02HN<sub>SMX2</sub>-B'<sub>WHU</sub> (含有质粒的菌株是 *Escherichia coli* DH5  $\alpha$  /3'-p02HN<sub>SMX2</sub>-B'<sub>WHU</sub>, CCTCC NO: M205070), 构建 SHIV-B'<sub>WHU</sub> 病毒。该质粒的主要优点是包含 HIV-1 B' *tat/rev/vpu/env* 基因, 能与 5' 端质粒 pVP-1 共转染至细胞中构建出杂交病毒株 SHIV-B'<sub>WHU</sub>。

本发明还涉及一种杂交免疫缺陷病毒株 (SHIV-B'<sub>WHU</sub>) 在建立 SHIV/猴模型中的应用。

一种杂交免疫缺陷病毒株/SHIV-B'<sub>WHU</sub> 在检测艾滋病的疫苗中的应用。

一种杂交免疫缺陷病毒株/SHIV-B'<sub>WHU</sub> 在检测抗逆转录病毒的药物中的应用。

一种杂交免疫缺陷病毒株/SHIV-B'<sub>WHU</sub> 在检测杀微生物剂中的应用。

为了实现上述任务, 本发明的一个优选实施方案是利用基因重组技术 (分子生物学, 第二版, 科学出版社)。即在致病性的 SIVmac239 基因框架上将 HIV-1B' 的部分基因片断 (*tat*, *rev*, *vpu* 和 *env*) 取代 SIVmac239 相应基因而构建的一种杂交病毒株。

本发明提供的一种新的, B' 亚型, R5 嗜性 SHIV, 其 HIV-1 *env* 基因是来自于一位河南 HIV 感染者体内分离到早期的 HIV-1 02HNsmx2 毒株 [基因序列在美国国立生物技术信息中心 (National Center For Biotechnology Information, NCBI) 的 HIV 基因库 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>]。首先通过序列分析证明该毒株是

HIV-1B'亚型, 并且其 *tat/rev/vpu/env* 基因的开放阅读框是完整的。将 *tat/rev/vpu/env* 基因克隆到真核表达载体 pVAX1 (Invitrogen) 上, 而后转染到细胞中, 通过细胞融合实验分析, 证明病毒株为 R5 嗜性。

本发明构建的 3'端嵌合质粒 (3'-p02HN<sub>SMX2</sub>-B'<sub>WHU</sub>), 是将 HIV-1 02HN<sub>SMX2</sub> 毒株的 *tat/rev/vpu/env* 基因克隆到一个 3'端载体 (Chen, Z., *et al.*, 2000. Enhanced Infectivity of an R5-Tropic Simian/Human Immunodeficiency Virus Carrying Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtype C Envelope after Serial Passages in Pig-Tailed Macaques (*Macaca nemestrina*). *J Virol*, 74:6501-6510) 上构建而成。即使用巢式聚合酶链式反应 (Nest PCR) 扩增 HIV-102HN<sub>SMX2</sub> *tat/rev/vpu/env* 基因片断, 使用相同的限制性酶 (MBI) 酶切 *tat/rev/vpu/env* 基因片断和 3'端载体后, 使用连接酶 (Promega) 连接。3'-p02HN<sub>SMX2</sub>-B'<sub>WHU</sub> 包含了 HIV-1 B' 的 *tat/rev/vpu/env* 和 SIVmac239 的 3'端基因 (*nef* 和 LTR), 从 *SphI* 限制性酶切位点开始一直到 3'LTR (图 1)。该质粒与 5'端质粒 pVP-1 (Luciw, P.A., *et al.*, 1995. Persistent infection of rhesus macaques with T-cell-line-tropic and macrophage-tropic clones of simian/human immunodeficiency viruses (SHIV). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(16): 7490-4.) 共转染到细胞后可以产生 B'亚型的 SHIV 病毒。质粒 pVP-1 是在载体 pGEM7 (Promega) 上携带 SIV 的 5'端的 *LTR, gag, pol, vif, vpr, vpx, vpr*, 并在 *vpr* 末端有 *SphI* 的限制性酶切位点 (图 1)。

利用共转染技术 (分子克隆实验指南, 第三版, 科学出版社) 获得重组病毒。将线性 3'-p02HN<sub>SMX2</sub>-B'<sub>WHU</sub> 与 pVP-1 共转染到 293T 细胞中, 48 小时后将细胞上清液感染 PBMC, 培养细胞收集病毒上清, 获得重组病毒 SHIV-B'<sub>WHU</sub>。SHIV-B'<sub>WHU</sub> 的基因组中包含 SIV 的 3'LTR/*gag/pol/vif/vpr/vpx* 和 *nef/5'LTR*, HIV-1 B' 的 *tat/rev/vpu/env* (图 1)。

通过 SHIV-B'<sub>WHU</sub> 体外感染携带不同共受体的细胞, 鉴定重组病毒的生物学特性, 证明该病毒具有 R5 嗜性。

通过在人和中国恒河猴 PBMC 细胞中培养获得高滴度的重组病毒, 证明病毒具有体外感染和复制能力。

总之, 本发明的内容是针对华中地区的主要流行株 HIV-1 B'亚型, 构建了一个新的, R5 嗜性的杂交病毒株 (SHIV-B'<sub>WHU</sub>), 通过感染各种靶细胞证明 SHIV-B'<sub>WHU</sub> 具有 R5 嗜性的生物学特性, 并能在人和中国恒河猴 PBMC 中高效复制。

本发明的目的是 SHIV-B'<sub>WHU</sub> 在建立猴 AIDS 动物模型中的应用。

根据体外实验结果, 本发明的 SHIV-B'<sub>WHU</sub> 体内感染恒河猴, 病毒通过体内系列传代, 增强病毒的毒力, 建立 SHIV/猴模型。这一模型的优点是针对中国中部地区主要流行株 HIV-1B'亚型的动物模型; 由于病毒是 R5 嗜性, 因此建立的模型能更好地模拟 HIV-1 自然早期感染状态, 该模型能应用于研究 HIV-1B' 的传播途径, 致病机制, 猴体内病毒动力学和 HIV-1 *env* 介导的免疫机制以及检测和筛选艾滋病疫苗、抗逆转录病毒药物、杀微生物剂。

已将获得的新的 SHIV 已保藏, 保藏单位: 中国典型细胞培养物保藏中心 (China Center for Type Culture Collection, CCTCC), 地址: 中国.武汉.武汉大学, 保藏日期: 2005 年 7 月 11 日, 保藏编号: V200510, 分类命名: 人猴免疫缺陷病毒 SHIV-B'<sub>WHU</sub>。包含 3'端嵌合质粒的菌株也已保藏, 保藏单位: 中国典型细胞培养物保藏中心 (China Center for Type Culture Collection, CCTCC), 地址: 中国.武汉.武汉大学, 保藏日期: 2005 年 7 月 11 日, 保藏编号: M205070, 分类

命名: *Escherichia coli* DH5  $\alpha$  /3'-p02HN<sub>SMX2</sub>-B'<sub>WHU</sub>。

本发明的 SHIV-B'<sub>WHU</sub> 具有如下特性和优点, 具体描述如下:

#### 1. 携带具有代表性的 B'亚型 HIV-1 外膜基因 (env):

病毒外膜可以决定病毒的基因型, 嗜性和表型。从一名因有偿献血感染 HIV 的河南病人体内分离病毒后, 分析其病毒的外膜。病人编号为 02HN<sub>smx2</sub>, 从其体内分离的病毒编号为 HIV-1 02HN<sub>smx2</sub> (基因序列在 NCBI 的 HIV 基因库 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。首先对 HIV-1 02HN<sub>smx2</sub> 的 env 基因进行系统进化分析以确定用于构建 SHIV 的 HIV-1 的基因型。通过邻近连接方法对 HIV-1 的 env 基因序列进行聚类分析, 结果发现选择用于 SHIV 构建的 HIV-1 02HN<sub>smx2</sub> 毒株在 B 亚型簇内, 它与来自河南的其它 HIV-1 毒株, 02HN<sub>sc11</sub>, 02HN<sub>sq4</sub>, B'CNH24 和 B'CN.LTG 0218 (从 NCBI 中的 GenBank 中获得) 十分紧密地聚在一簇, 与来自中国云南的 B'亚型的 HIV-1 毒株 YN.RL42 (B' YN.RL42) (从 NCBI 中的 GenBank 中获得) 具有高度相似。这说明 HIV-1 02HN<sub>smx2</sub> 毒株是 B'亚型, 而且在河南和云南省流行的 B'亚型 HIV-1 毒株是相关联的 (图 3)。

通过基因重组分析整个 *tat/rev/vpu/env* 基因序列以便能排除 B' HIV-1 02HN<sub>smx2</sub> 与其它 HIV-1 基因型 (包括目前在中国流行的 HIV-1 C/B' 重组亚型) 发生内部亚型重组的可能。发现 B' HIV-1 02HN<sub>smx2</sub> 仅仅与在中国分离的 07-BC.CN.97.C54 (从 NCBI 中的 GenBank 中获得) 毒株在 env 基因的 5' 端有交叉 (图 4), 这主要是因为 07-BC.CN.97.C54 为 B'亚型和 C 亚型的重组病毒, 其 env 的 5' 末端是 B', 因此两者出现交叉。这些结果证明 B'亚型 HIV-1 02HN<sub>smx2</sub> 没有与其它亚型的病毒发生交叉和重组, 它是一个典型的, 能代表华中地区的主要病毒基因型。

通过分析 B' HIV-1 02HN<sub>smx2</sub> env 和其它地区 HIV-1 流行株的遗传距离, 结果发现 HIV-1 02HN<sub>smx2</sub> 与来自云南的 B' YN.RL42 遗传距离非常接近, 与泰国和马来西亚的 B'亚型遗传距离也非常小, 而与传统的 B 亚型毒株如美国的 B 亚型之间有较远的遗传距离 (表 1)。这提示在河南省流行的 B'亚型 HIV-1 是在中国发现的原型毒株, 并且能成为东南亚的代表性 B'亚型病毒。

表 1. HIV-1 02HN<sub>smx2</sub> 与其它 HIV-1 的遗传距离分析

	HIV-1 <sub>02HNsmx2</sub>		HIV-1 <sub>02HNsmx2</sub>
02HNsq4	0.039 ± 0.007	C.IN.IN022	0.193 ± 0.014
02HNsc11	0.035 ± 0.006	D.UG.UG114	0.138 ± 0.011
B'.YN.RL42	0.050 ± 0.007	D.UG.UGK	0.140 ± 0.011
B'.CNHN24	0.053 ± 0.007	F1.FR.96.MP	0.170 ± 0.013
B'.CN.LTG0218	0.062 ± 0.008	F2.CM.MP	0.188 ± 0.013
B'.MM.99.mSTD	0.074 ± 0.009	G.NG1929	0.176 ± 0.014
B'.TH.93	0.058 ± 0.008	H.BE.93.VI	0.187 ± 0.013
B.JP.86.JH32	0.106 ± 0.010	J.SE.93	0.194 ± 0.014
B.KR.95	0.108 ± 0.010	K.CM.96.MP	0.175 ± 0.014
B.JP.ETR	0.112 ± 0.011	01_AE.97CNGX2F	0.176 ± 0.013
B.KR.96	0.115 ± 0.010	01_AE.CN.GX	0.173 ± 0.013
B.TH.90	0.102 ± 0.011	01_AE.TH.95TNIH	0.180 ± 0.013
B.US.JRFL	0.084 ± 0.009	07_BC.97CN001	0.194 ± 0.013
B.US.WEAU	0.096 ± 0.010	07_BC.98CN009	0.188 ± 0.013
A1.SE.95	0.171 ± 0.013	07_BC.CN.CNGL	0.197 ± 0.013
A2.CY.94	0.176 ± 0.013	08_BC.97CNGX_6F	0.200 ± 0.013
C.CN.GX	0.202 ± 0.013	08_BC.97CNGX_7F	0.202 ± 0.014
C-CHN.AF268277	0.170 ± 0.012	08_BC.97CNGX_9F	0.200 ± 0.013
C.IN.IN21	0.180 ± 0.013		

以上结果证明 HIV-1 02HNsmx2 毒株可以被认为是在中国发现的一个非常典型的原型毒株，它能成为东南亚的代表性 B'病毒。因此使用这种极具有代表性的毒株构建 B'亚型 SHIV。

## 2. 具有 R5 嗜性和感染靶细胞的能力:

通过细胞融合形成实验分析 HIV-1 02HNsmx2 的 env 基因是否能表达功能性蛋白及其利用哪一种共受体。将没有经过任何体外修改的病毒 *tat/rev/vpu/env* 基因克隆到真核表达载体 pVAX1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 构建重组质粒 p2'ENV-VAX, 将其转染到 293T 细胞 (中国典型培养物保藏中心, CCTCC, 编号: GDC187)。24 小时后 293T 细胞分别与表达 CCR5 共受体的 GHOS.CD4.Hu-CCR5 细胞 (美国国立卫生研究院 AIDS 试剂计划, NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, 编号: 3944) 和表达 CXCR4 共受体的 GHOS.CD4.Hu-CXCR4 细胞 (美国国立卫生研究院 AIDS 试剂计划, NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, 编号: 3685) 共培养, 12-24 小时后观察结果。结果发现 293T 细胞能与 GHOS.CD4.Hu-CCR5 细胞发生明显细胞融合, 产生巨大的合胞体 (图 5 A,B), 但与 GHOS.CD4.Hu-CXCR4 细胞没有形成任何细胞融合 (图 5 C,D)。这证明用于构建 SHIV 的 HIV-1 02HNsmx2 env 使用的共受体是 CCR5, 并且具有调节 R5/CD4-细胞融合的功能。

为了产生具有复制能力的病毒, 质粒 5'-PVP-1 (Luciw, P.A., et al., 1995. Persistent infection of rhesus macaques with T-cell-line-tropic and macrophage-tropic clones of simian/human immunodeficiency viruses (SHIV). Proc Natl Acad Sci U S A, 92(16): 7490-4.) 和构建的嵌合质粒 3'-p02HNsmx2-B'WHU 经限制性酶 *SphI* (MBI Fermentas) 酶切成线形, 两个线性质粒通过脂质体共转染到 293T 细胞。转染后的 293T 细胞分别与 GHOS.CD4.Hu-CCR5 细胞和 GHOS.CD4.Hu-CXCR4 细胞共培养 48 小时。转染后的 293T 细胞与 GHOS.CD4.Hu-CCR5 细胞之间能形成巨大的细胞融合 (图 6 A,C), 融合的细胞产生明显的绿色荧光 (图 6 B,D)。而 293T 细胞与 GHOS.CD4.Hu-CXCR4 细胞之间没有出现任何细胞融合及绿色荧光 (图 6 E,F)。结果证明线形的 5'-PVP-1 和 3'-p02HNsmx2 共转染到 293T 细胞后构建出一种 SHIV 病毒, 该病毒能有效地将 HIV-1 外膜蛋白表达达到细胞表面, 并表现出 R5 嗜性。

为了确定新构建的 SHIV-B'WHU 是否具有感染性和复制能力, 将转染后得到的病毒上清液分别感染 GHOS.CD4.Hu-CCR5 和 GHOS.CD4.Hu-CXCR4 细胞。发现在 GHOS.CD4.Hu-CCR5 细胞中出现合胞体 (图 7 A,C), 并且合胞体产生绿色荧光 (图 7 B,D), 而在 GHOS.CD4.Hu-CXCR4 细胞中没有发现合胞体和绿色荧光 (图 7 E,F)。系列两倍稀释的 SHIV-B'WHU 上清液感染 TZM-b1 细胞 (美国国立卫生研究院 AIDS 试剂计划, NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, 编号: 8129) 48 小时后, 使用荧光素酶检测试剂盒 (Promega) 检测感染病毒的细胞的荧光素酶活性。数据显示 SHIV-B'WHU 能感染 TZM-b1 细胞, 表达功能性 Tat 蛋白激活荧光素酶报告基因的表达, 并且感染细胞的病毒量与细胞产生的荧光素酶活性成正比, 而没感染病毒的细胞, 其荧光素酶活性很差 (图 8)。结果证明 SHIV-B'WHU 利用的辅助受体是 CCR5 及具有感染靶细胞的能力。

以上结果证明 SHIV-B'WHU 与亲本 HIV-1 毒株 02HNsmx2 具有相似的生物学特性, 即使用的同样的辅助受体 CCR5, 即 R5 嗜性的毒株。而且 SHIV-B'WHU 具有体外感染靶细胞的能力。

## 3. 具有在人 PBMC 中有效复制的能力:

线形质粒5'-PVP-1和3'-p02HNSMX2-B'<sub>WHU</sub>共转染到293T细胞, 48小时后, 将植物血凝素 (PHA-P, Sigma) 刺激三天的健康人PBMC与转染的293T细胞共培养。24小时后收集PBMC, 磷酸盐缓冲液 (PBS: 0.02M 磷酸盐, 0.05M NaCl, PH 7.4) 洗涤两次后, 加入PBMC生长培养基 (GIBCO™ RPMI 1640培养基 (Invitrogen), 10% 胎牛血清 (Invitrogen), 20 U/ml 白细胞介素-2 (hIL-2, Roche) 和 1%氨苄青霉素和硫酸链霉素 (Amersco)) 培养细胞, 每7天收集病毒上清液, 监测病毒p27抗原产量。结果发现SHIV-B'<sub>WHU</sub>在人PBMC中复制产生较高滴度的病毒, 在感染第14天病毒p27产量达16ng/ml。阴性对照中均没有监测到p27抗原。阴性对照是没有转染质粒的293T细胞与人PBMC共培养 (图9 A)。

将以上感染病毒的PBMC与 $2 \times 10^6$ 的健康人PBMC (PHA-P刺激三天) 共培养, 每3~4天收集病毒上清液, 监测病毒p27抗原产量。结果发现细胞共培养的方式可以使病毒的产量明显增高, 在共培养第17天, 病毒产量已达到79ng/ml, 并且仍在增长。阴性对照中均没有监测到p27抗原。阴性对照是没有转染质粒的293T细胞与人PBMC共培养 (图9 B)。

以上结果证明, SHIV-B'<sub>WHU</sub>具有体外感染人PBMC并高效复制的能力。

#### 4. 具有在中国恒河猴 PBMC 中有效复制的能力:

转染后获得的病毒上清液感染 $2 \times 10^6$  PHA-P刺激三天的中国恒河猴PBMC (猴子编号: 990011和00031), 每3~4天收集病毒上清液, 监测病毒p27抗原产量。结果发现SHIV-B'<sub>WHU</sub>病毒上清液能感染中国恒河猴的PBMC, 并获得一定滴度的病毒 (图10)。而在对照组 (没有感染病毒上清液的恒河猴PBMC) 中没有检测到病毒的p27抗原。

以上结果证明, SHIV-B'<sub>WHU</sub>具有体外感染中国恒河猴PBMC并高效复制的能力。

通过分子水平进一步分析鉴定 SHIV-B'<sub>WHU</sub> 为活病毒, 即分析前病毒和病毒在细胞中合成总 mRNA 的其中一部分。通过扩增感染病毒的细胞基因组中前病毒 *env* 基因片段, 测序结果证明, SHIV-B'<sub>WHU</sub> 能将自己的病毒基因整合到 PBMC 中形成前病毒。通过逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 逆转录感染病毒细胞中的总 mRNA, 而后用巢式聚合酶链式反应 (Nest PCR) 扩增拼接的 Rev 序列, 测序结果证明 SHIV-B'<sub>WHU</sub> 感染 PBMC 后产生的 Rev 与亲本毒株 02HNSmx2 上的 Rev 序列是完全一致的。这说明 SHIV-B'<sub>WHU</sub> 是一个具有逆转录, 整合活性的活病毒。

本文中所述的术语“载体”, 是指运载外源 DNA 有效进入受体细胞内进行扩增和表达的工具。根据载体用途, 可将载体分为克隆载体和表达载体。前者是克隆了外源 DNA 后, 转入宿主细胞中进行增殖, 使克隆的 DNA 片段在数量上大大扩增。后者是将外源基因或 DNA 片段在宿主细胞中表达产生蛋白质。常用的载体包括质粒, 噬菌体, 病毒等, 但最常见的首选质粒。

本文中所述的术语“质粒”, 是多数细胞和某些真核生物细胞的染色体以外的, 能自主增殖的一类遗传因子, 为闭合环状的双链 DNA 分子, 大小从 1kb 直到 200kb 以上。

本文中所述的术语“杂交病毒”, 是指病毒基因组中含有多于两种不同来源的核酸序列, 即通过基因工程人为拼接来源于不同的病毒基因序列而成为一种 DNA 杂交体, 这种杂交 DNA 产生的病毒就是一种杂交病毒。

本文中所述的术语“细胞受体”, HIV-1 感染需要病毒与靶细胞表面受体的相互作用, 这种受体被称为 CD4 分子, 它主要表达在淋巴细胞表面, 其它有 CD4

受体的细胞也是 HIV-1 的靶细胞，如巨噬细胞、树突状细胞、星状细胞。但单纯 CD4 受体对病毒进入细胞既是不充分的，也不是唯一途径，病毒还需要第二个受体，即辅助受体。现已发现了 10 余种 HIV-1 的辅助受体，其中最主要的是 CCR-5 和 CXCR-4（表 2）。

本文中所述的术语“细胞嗜性”，不同来源的病毒感染不同类型细胞的能力是不相同的。根据 HIV-1 感染不同的细胞系，可以将其分为嗜 T 细胞病毒株和嗜巨噬细胞病毒株两大类。嗜 T 细胞病毒株也称 X4 毒株，利用 CXCR4 辅助受体，具有嗜 T 淋巴细胞、快复制高滴度、合胞体诱导（SI）特性。嗜巨噬细胞病毒株也称 R5 毒株，利用 CCR5 辅助受体，具有嗜巨噬细胞、慢复制低滴度、非合胞体诱导（NSI）的特性。双嗜性 HIV-1 毒株，是具有巨噬细胞性又具有 T 细胞嗜性，能够使用两个辅助受体的任何一个的毒株（表 2）。研究发现嗜巨噬细胞毒株比嗜 T 淋巴细胞毒株更易传播，它是早期感染者体内的主要病毒株，在性传播的 HIV-1 中约有 90% 以上都是 R5 毒株。但是，嗜 T 细胞病毒株的 HIV-1 一旦在体内繁殖，其毒力特别强，并可促使病程加快。

本文中所述的术语“表型”，是病毒具有感染性的重要因素。HIV-1 毒株根据其是否具有合胞体诱导(Syncytium Inducing)可分为合胞体诱导株（SI 株）和非合胞体诱导株(NSI 株）（表 2）。通常嗜 T 细胞病毒株是 SI 株，而嗜巨噬细胞病毒株一般为 NSI 株。两种毒株在机体的复制能力是不一致的，一般 SI 株复制迅速，而 NSI 株复制缓慢。

表 2. HIV 感染 CD4+淋巴细胞的辅助受体

受体	表型	嗜性
CCR5	NSI	巨噬细胞
CXCR4	SI	T 细胞系
CCR3	NSI	巨噬细胞
CC2b	SI	双嗜性
Bonzo/STRL33	NSI	巨噬细胞
BOB/GPR15	NSI	巨噬细胞

本发明与现有技术相比具有以下优点：

本 SHIV 毒株是针对中国中部地区的主要流行株 HIV-1B'亚型构建而成的，因此携带具有代表性的 B'亚型 HIV-1 的外膜基因(env)，使用该毒株研究 HIV-1B'亚型毒株更具有特异性。本 SHIV 毒株具有 R5 嗜性，与早期 HIV-1 病毒具有相同的生物学特性，因此使用该毒株模拟早期病毒，在分子水平上研究早期病毒的感染机制和传播途径。本 SHIV 毒株能感染各种靶细胞，尤其是具有体外感染人和中国恒河猴 PBMC，并具有高效复制的能力。因此该毒株可用于建立一个 B'亚型，R5 嗜性的 SHIV/猴模型，该模型可应用于研究 HIV-1 传播途径，致病机制，猴体内病毒动力学和 HIV-1 env 介导的免疫机制，检测和筛选艾滋病疫苗、抗逆转录病毒药物、杀微生物剂。

总之：本发明的 SHIV-B'<sub>WHU</sub> 具有下述特性和优点：

- 1) 携带具有代表性的 B'亚型 HIV-1 外膜基因 (env)；
- 2) 具有 R5 嗜性；
- 3) 具有感染靶细胞的能力；
- 4) 具有体外感染人 PBMC 和高效复制的能力；

5) 具有体外感染中国恒河猴 PBMC 和高效复制的能力。

### 附图说明

图 1: SHIV-B'<sub>WHU</sub> 基因结构示意图。

SHIV-B'<sub>WHU</sub> 的基因结构是在 SIVmac239 的基因组框架上, 以 HIV-1 02HNsmx2 的部分基因片段取代 SIV mac239 的相应基因。

图 2: pVP-1 基因结构示意图。

质粒 pVP-1 是在载体 pGEM7 (Promega) 上携带 SIV 的 5'端的 LTR, gag, pol, vif, vpx, vpr, 并在 vpr 末端有 SphI 的限制性酶切位点。

图 3: 系统进化分析 HIV-1 02HNsmx2 的 tat/rev/vpu/env 基因 (▲)。

HIV-1 02HNsmx2 的 tat/rev/vpu/env 基因与从 NCBI 的 GenBank 中获得参考序列进行系统进化分析, 发现 02HNsmx2 毒株与来自河南的其它 HIV-1 毒株 (02HNsc11, 02HNsq4, B'CNH24 和 B'CN.LTG 0218) 十分紧密地聚在一簇, 与来自中国云南的 B'亚型 HIV-1 毒株 YN.RL42 (B' YN.RL42) 具有高度相似性, 证明 HIV-1 02HNsmx2 毒株是 B'亚型。

图 4: HIV-1 02HNsmx2 (tat/rev/vpu/env) 内部亚型重组分析。

B'亚型 HIV-1 02HNsmx2 没有与其它亚型的病毒株发生交叉和重组, 仅与 B'亚型和 C 亚型的重组病毒株 07-BC.CN.97.C54 (env 5'末端为 B') 在 env 基因 5'端有交叉。

图 5: 细胞融合实验分析 HIV-1 02HNsmx2 env 的功能。

重组质粒 p2'ENV-VAX 转染到 293T 细胞后, 293T 细胞与 GHOS.CD4.Hu-CCR5 细胞发生明显细胞融合, 产生巨大的合胞体 (A,B), 而没有与 GHOS.CD4.Hu-CXCR4 细胞形成任何细胞融合 (C,D)。

图 6: 细胞融合试验和绿色荧光检测结果。

共转染线性质粒 5'-PVP-1 和 3'-p02HNsmx2-B'<sub>WHU</sub> 的 293T 细胞与 GHOS.CD4.Hu-CCR5 细胞共培养后, 形成巨大的细胞融合 (A,C), 并产生明显的绿色荧光 (B,D), 而转染的 293T 细胞与 GHOS.CD4.Hu-CXCR4 细胞之间没有出现任何细胞融合及绿色荧光 (E,F)。

图 7: SHIV-B'<sub>WHU</sub> 感染 GHOS.CD4 细胞的实验结果。

SHIV-B'<sub>WHU</sub> 病毒上清液分别感染 GHOS.CD4.Hu-CCR5 细胞出现合胞体 (A,C), 并产生绿色荧光 (B,D), 而 GHOS.CD4.Hu-CXCR4 细胞没有合胞体和绿色荧光的产生 (E,F)。

图 8: 两倍稀释的 SHIV-B'<sub>WHU</sub> 感染 TZM-b1 细胞的实验结果。

系列两倍稀释的 SHIV-B'<sub>WHU</sub> 病毒上清液感染 TZM-b1 细胞 48 小时后, 感染 SHIV-B'<sub>WHU</sub> 的 TZM-b1 细胞表达功能性 Tat 蛋白激活荧光素酶报告基因的表达, 而且感染细胞的病毒量与细胞产生的荧光素酶活性成正比, 而未感染病毒的细胞荧光素酶活性很低。

图 9: SHIV-B'<sub>WHU</sub> 在人 PBMC 中的复制能力。

A: 共转染线性质粒 5'-PVP-1 和 3'-p02HNSMX2-B'<sub>WHU</sub> 的 293T 细胞与健康人 PBMC 共培养 24 小时, 收集和培养 PBMC, 并监测病毒 p27 抗原产量, 发现 SHIV-B'<sub>WHU</sub> 在人 PBMC 中复制并产生较高病毒滴度。B: 感染 SHIV-B'<sub>WHU</sub> 的人 PBMC 与健康人 PBMC ( $2 \times 10^6$ ) 共培养, 发现共培养的方式可以使病毒的产量明显增高, 共培养第 17 天, 病毒产量达到 79ug/ml, 并且仍在增长。阴性对照均没

有监测到p27抗原

图10: SHIV-B'<sub>WHU</sub>在中国恒河猴PBMC中的复制能力。

SHIV-B'<sub>WHU</sub>病毒上清液分别感染 $2 \times 10^6$ 中国恒河猴PBMC (990011和00031), 每3~4天收集病毒上清液监测病毒p27抗原产量, SHIV-B'<sub>WHU</sub>能感染中国恒河猴PBMC, 并获得一定的病毒滴度, 阴性对照均没有监测到p27抗原。

图 11: SHIV-B'<sub>WHU</sub> 在中国恒河猴体内系列传代的病毒载量。

SHIV-B'<sub>WHU</sub> 病毒在 4 只中国恒河猴 (编号为 P1: 0002, P2: 0296, P3: 1032, P4: 1050) 体内系列传代, 分别在感染后第 0, 3, 7, 12, 14 天取血监测病毒载量, 发现病毒载量随感染时间而增高, 并且传代提高病毒在中国恒河猴的初始病毒血症。

图 12: 感染 SHIV-B'<sub>WHU</sub> 的中国恒河猴的淋巴结, 肝脏, 脾脏和肺脏的病理组织变化。4 只感染病毒的中国恒河猴的常规病理切片在镜下观察都有肺组织间隔增宽, 类似间质性肺炎的病理改变; 肝、脾、淋巴结组织可见单核吞噬细胞的免疫性增生。

### 具体实施方式

以下是描述的是如何构建杂交病毒株 SHIV-B'<sub>WHU</sub> 的具体方案。

#### 实施例 1

针对华中地区的主要流行株 HIV-1B'亚型构建 SHIV, SHIV-B'<sub>WHU</sub> 应携带具有代表性的 B'亚型 HIV-1 的外膜基因 (*env*)。

为了了解选择用于 SHIV 构建的 HIV-1 是 B'亚型毒株, 从一位河南 HIV 感染者体内分离到早期的 HIV-102HNsmx2, 通过 PCR 从细胞基因组中扩增 HIV-102HNsmx2 的 *tat/rev/vpu/env* 基因序列, 对其测序。在分子水平上分析 HIV-102HNsmx2 的 *tat/rev/vpu/env* 的基因型以及它与其它 HIV-1 毒株的区别。

HIV-1感染者和健康人外周血单核细胞 (PBMC) 的分离和培养:

1. 获得HIV-1感染者 (02HNsmx2) 和健康人全血 (肝素抗凝), 对已经脱离人体或生物体的组织、体液或排泄物进行处理或检测以获取作为中间结果的信息, 将全血与磷酸盐缓冲液 (PBS) 以1:1的体积比混合。

2. 在50ml离心管中加入20ml 淋巴细胞分离液 (上海华精生物技术有限公司), 将稀释的血液沿管壁缓慢叠加于淋巴细胞分离液面上, 2000rpm/400g, 离心20分钟。离心后管内分三层: 上层为血浆和PBS, 下层为红细胞和粒细胞, 中间层为淋巴细胞, 呈白色云雾层狭窄带。

3. 吸取云雾层单核细胞, 置入50ml 离心管, 加入5倍以上PBS, 1500rpm/400g 离心 10分钟, 重复三次。弃上清, 加入20ml PBMC生长培养基 (GIBCO™ RPMI 1640培养基 (Invitrogen), 10% 胎牛血清 (Invitrogen), 20 U/ml 白细胞介素-2 (hIL-2, Roche) 和重悬细胞。

4. 使用0.4%胎盘兰 (Trypan Blue, Sigma) 计数活细胞, 即10ul细胞悬液加入90ul 0.4%胎盘兰染液混合, 取10ul混合液于血球计数板上, 计4个大方格内细胞总数, 细胞浓度=4格细胞数/4 × 10<sup>5</sup>。

5.  $2 \times 10^6 - 8 \times 10^7$ /ml PBMC 接入75cm<sup>2</sup>细胞培养瓶, 加40-120ml 刺激培养基 (GIBCO™ RPMI 1640培养基 (Invitrogen), 10%胎牛血清 (Invitrogen), 10ug/ml 植物血凝素 (PHA-p, Sigma), 20 U/ml 白细胞介素-2 (hIL-2, Roche) 和1%氨苄青霉素和硫酸链霉素 (Amersco), 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 培养2-3天, 刺激PBMC增殖。

HIV-1感染者和健康人外周血单核细胞 (PBMC) 共培养及细胞基因组提取:

1. 经过 PHA-P (Sigma) 刺激三天的健康人 PBMC 与相同数目的 HIV-1 感染者的 PBMC ( $1 \times 10^6$ ) 共同培养 14 天。分别在培养的第 3、7、10 天取出一半上清液分装冻存至  $-70^\circ\text{C}$ , 补充等量的新鲜生长培养基 (GIBCO™ RPMI 1640 培养基 (Invitrogen), 10% 胎牛血清 (Invitrogen), 20 U/ml 白细胞介素-2 (hIL-2, Roche)。第 14 天收集所有的上清液和细胞,  $-70^\circ\text{C}$  冻存。

2. 使用细胞和组织 DNA 提取试剂盒 (GenomicPrep Cells and the Tissue DNA Isolation Kit, Gentra) 提取 PBMC 的基因组 DNA。即在共培养 14 天的 PBMC 中加入 600ul 的细胞裂解液 (Cell Lysis Solution), 室温 ( $15-25^\circ\text{C}$ ) 放置直到溶液变透明, 再加入 200ul 蛋白质沉淀液 (Protein Precipitation Solution), 剧烈震荡 20 秒, 13000rpm 离心 3 分钟, 取 1.5ml 上清液并加入 600ul 异丙醇, 轻柔颠倒 50 次, 13000rpm 离心 1 分钟, 去上清, 置室温 15 分钟晾干, 加入 100ul 无菌水溶解 DNA,  $4^\circ\text{C}$  冰箱保存。

巢式聚合酶链式反应 (Nest PCR) 扩增 HIV-1 *tat/rev/vpu/env* 基因片断:

1. 引物的设计:

第一轮引物: 4795F1 (5'-GTT TTT CAG AAT CTG CTA TAA GAA ATG CC-3') 和 BUR5 (5'-GAC GGG CAC ACA CTA CTT GAA GCA CTC AAG G-3')。

第二轮引物: VprA (5'-TGCC GAATTC GCATGC TA TAG A TAG AGG AGA GCA AGA AAT GGA G -3') 和 EnvB (5'- TGCC CTCGAG CT TAT AGT AAA GCC CTT TCG AGG -3')。

引物 VprA 和 EnvB 引入酶切位点 EcoRI (GAATTC)、SphI (GCATGC) 和 XhoI (CTCGAG) 以及终止子 (TAG)

2. 反应体系和反应条件:

第一轮的反应体系为: 总体积 50ul 中含  $10 \times$  缓冲液 (buffer, 含  $\text{NH}_4\text{SO}_4$ ) 5.0ul, 二甲基亚砷 (DMSO) 1.0ul, 稳定液 (Stable Solution) 1.0ul, 25mM dNTP (Promega) 1.0ul, 引物 4795F1 (20pmol/ul) 1.0ul, 引物 BUR5 (20pmol/ul) 1.0ul,  $\text{H}_2\text{O}$  34ul, 1.0ul EXL DNA 聚合酶 (Stratagene), 病毒基因组 DNA 5.0ul。

第一轮 PCR 反应条件为:  $92^\circ\text{C}$  5min, 1 个循环;  $92^\circ\text{C}$  20sec,  $45^\circ\text{C}$  45sec,  $68^\circ\text{C}$  9min, 10 个循环;  $92^\circ\text{C}$  20sec,  $50^\circ\text{C}$  45sec,  $68^\circ\text{C}$  10min, 25 个循环,  $68^\circ\text{C}$  15min。

第二轮的反应体系为: 总体积 50ul 中含  $10 \times$  缓冲液 (buffer, 含  $\text{NH}_4\text{SO}_4$ ) 5.0ul, 25mM 氯化镁 ( $\text{MgCl}_2$ ) 4.5ul, 25mM dNTP (Promega) 1.0ul, 引物 VprA (20pmol/ul) 1.0ul, 引物 EnvB (20pmol/ul) 1.0ul,  $\text{H}_2\text{O}$  33ul, 1u/ul Taq 酶 (MBI Fermentas) 3.5ul, 第一轮 PCR 产物 1.0ul。

第二轮的反应条件为:  $92^\circ\text{C}$  2min, 1 个循环;  $92^\circ\text{C}$  20sec,  $50^\circ\text{C}$  45sec,  $72^\circ\text{C}$  4min, 35 个循环;  $72^\circ\text{C}$  15min。

克隆 HIV-102HNsmx2 的 *tat/rev/vpu/env* 基因片断到表达载体中构建能在真核系统中表达蛋白的质粒:

1. 用限制性酶 EcoRI (MBI Fermentas) 和 XhoI (MBI Fermentas) 酶切 PCR 的扩增基因片断 HIV-1 *tat/rev/vpu/env* 和表达载体 pVAX-1/kana (Invitrogen)。pVAX-1/kana 是一个大小为 3Kb 的 DNA 质粒, 含有 CMV 启动子和卡那霉素抗性基因的真核表达载体。回收酶切后的 HIV-1 基因片断和载体, 而后对载体

pVAX-1/kana 去磷酸化, 并回收。

2. 将上游HIV-1基因片断和载体pVAX-1/kana按3:1的摩尔浓度比混合, 加入T4 DNA连接酶 (Promega) 和连接缓冲液, 使反应终体积为10 $\mu$ l, 16 $^{\circ}$ C连接过夜。

3. 将连接产物转化到大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞 (分子克隆, 第三版)。转化后的细菌涂布至 LB/Kana<sup>+</sup>平板上 (10g/L 用于细菌培养的胰化蛋白胨, 5g/L 用于细菌培养的酵母提取物, 10g/L NaCl, 调 pH 值至 7.0, 高压蒸汽灭菌。卡那霉素 (Kana<sup>+</sup>) 分别溶于无菌水中, 加入 Kana<sup>+</sup>使终浓度为 50 $\mu$ g/ml)。37 $^{\circ}$ C 培养过夜, 挑取单克隆至 5ml LB 培养基培养 (加入 Kana<sup>+</sup>), 37 $^{\circ}$ C, 220 rpm, 16 小时。

4. 从每个菌液中提取质粒, 使用限制性酶 *EcoRI* 和 *XhoI* 酶切鉴定, 酶切后的外源基因和载体 pVAX-1 的大小均是 3Kb, 挑选正确的克隆, 用 30% 的甘油保藏克隆的菌种 (用于保存的细菌), 提取质粒 p2'ENV-VAX 的质粒置于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

分析 HIV-1 *tat/rev/vpu/env* 基因的序列:

1. 对质粒 p2'ENV-VAX 的 HIV-1 *tat/rev/vpu/env* 基因测序, 对所有测序结果比对后拼接成一个完整的 *tat/rev/vpu/env* 基因 (从 ATG 到 TAA), 随后通过分子进化遗传分析软件 (Mega) 进行系统进化树和遗传距离分析。结果发现该毒株在 B 亚型簇内, 并与 B'亚型 HIV-1 毒株 YN.RL42, B'CNHN24 和 B'CN.LTG0218 (从美国国立生物技术信息中心 (National Center For Biotechnology Information, NCBI) 中的 GenBank 中获得) 十分紧密地聚在一起, 这证明选择用于 SHIV 构建的 HIV-1 是 B'亚型 (图 3 和 5)。

2. 进一步通过 BootScan 分析 HIV-102HNsmx2 的整个 *tat/rev/vpu/env* 基因序列, 以排除它与在中国流行的其它 HIV-1 基因型发生内部亚型重组的可能, 这包括目前在中国流行的 HIV-1 C/B'重组亚型。结果发现 B'亚型 HIV-1 02HNsmx2 没有与其它亚型的病毒发生交叉和重组 (图 4)。

以上结果证明 HIV-102HNsmx2 毒株 (基因序列在 NCBI 的 HIV 基因库 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 可以被认为是在中国发现的一个非常典型的原型毒株, 它能成为东南亚的代表性 HIV-1 B'病毒。因此申请人使用这种极具有代表性的毒株构建 B'亚型 SHIV。

## 实施例 2

HIV-1 02HNsmx2 *tat/rev/vpu/env* 阅读框的完整性和 R5 嗜性的基因表型。

为了证明 HIV-1 02HNsmx2 *tat/rev/vpu/env* 的每个基因的开放阅读框是完整的, 具有体内外表达蛋白的能力, 对其基因序列进行分析, 排除没有完整阅读框的可能。需要构建一个 R5 嗜性的 SHIV, 因此在构建 SHIV 之前必须证明 HIV-1 02HNsmx2 *env* 的表型为 R5 嗜性。

分析 HIV-1 02HNsmx2 *tat/rev/vpu/env* 基因阅读框:

使用 ClustalX1.81 程序对 HIV-1 02HNsmx2 的整个 *tat/rev/vpu/env* 基因序列与标准株 HIV-1 HXB2 相应序列进行比对, 比对后的序列提交到 HIV Databases 网站上 ([www.hiv-web.lanl.gov/content/index](http://www.hiv-web.lanl.gov/content/index))。点击 Tool 的 Gene Cutter 后, 网站分别

对 *tat*、*rev*、*vpu* 和 *env* 基因的开放阅读框进行分析。结果证明每个基因的开放阅读框均是完整的。

细胞融合实验分析 HIV-1 的表型：

1. 使用 Qiagen 公司的脂质体转染试剂盒将构建的重组质粒 p2' ENV-VAX 转染到 293T 细胞（具体方法见转染试剂盒说明书）。293T 细胞（CCTCC，编号：GDC187）是由 293 细胞派生，表达 SV40 大 T 抗原，含有 SV40 复制起始点与启动子区的质粒可以复制。瞬时转染 293T 细胞是表达蛋白并获得细胞内及细胞外（分泌的或膜）蛋白的便捷方式。

2. 24 小时后，转染的 293T 细胞 ( $2 \times 10^4$ ) 被混合到预先用同等数目的 GHOS.CD4 细胞共培养。GHOST.CD4 细胞系（美国国立卫生研究院 AIDS 试剂计划，NIH AIDS Research and Reference Reagent Program）由 HOS 细胞派生，能在 HIV-2 长末端重复序列（LTR）诱导下稳定表达绿色荧光蛋白（hGFP）可作为 HIV-1/2, SIV 感染的指示细胞。当 HIV 感染细胞后，表达的功能性 Tat 蛋白激活细胞中的 HIV-LTR，从而介导 hGFP 基因表达绿色荧光蛋白产生绿色荧光。分别转入 CCR5 基因和 CXCR4 基因（能表达 CCR5 受体和 CXCR4 受体的基因）到 GHOST.CD4 细胞构建 GHOST.CD4.CCR5 细胞和 GHOST.CD4.CXCR4 细胞，它们分别稳定表达 CCR5 和 CXCR4 受体表达达到细胞表面。GHOST.CD4.CCR5/CXCR4 细胞培养基：GIBCO™ DMEM 培养基（Invitrogen），10% 胎牛血清（Fetal Bovine Serum, Invitrogen），500  $\mu$ g/ml G418（Invitrogen），100  $\mu$ g/ml 潮霉素 B（hygromycin BTM, InvivoGen），1  $\mu$ g/ml 嘌呤霉素（Puromycin, InvivoGen）和 1% 氨苄青霉素和硫酸链霉素（Amersco）。转染的 293T 细胞分别于表达 CCR5 共受体的 GHOS.CD4.Hu-CCR5 细胞和表达 CXCR4 共受体的 GHOS.CD4.Hu-CXCR4 细胞混合。12-24 小时后，用相差显微镜对培养物拍照观察细胞合胞体形成情况。

结果发现转染的 293T 细胞与 GHOS.CD4.Hu-CCR5 细胞产生明显的细胞融合，形成较大的合胞体。因此 HIV-102HNsmx2 *env* 使用的共受体是 CCR5，并且具有最大调节 R5/CD4-细胞融合的功能。

### 实施例 3

构建杂交病毒株 SHIV-B'<sub>WHU</sub>。

为了获得杂交病毒株 SHIV-B'<sub>WHU</sub>，申请人首先克隆携带 HIV-1B' *tat/rev/vpu/env* 基因的 3' 端载体，该载体与 5' 端质粒共转染到 293T 细胞中构建杂交病毒。

构建 3' 嵌合载体（3'-p02HN<sub>SMX2</sub>-B'<sub>WHU</sub>）：

1. 用限制性酶 *SphI* 和 *XhoI* 将 HIV-1 *tat/rev/vpu/env* 基因片断从 p2'ENV-VAX 上酶切下来，使用胶回收试剂盒回收外源 HIV-1 *tat/rev/vpu/env* 基因（3Kb）。3' 端载体（3'-pvpv<sup>+</sup>）是一个包含猴免疫缺陷病毒 SIVmac239 的 3' 端基因（*nef* 和 *LTR*）以及多个限制性内切酶多克隆位点的非表达载体（Chen, Z., *et al.*, 2000. Enhanced Infectivity of an R5-Tropic Simian/Human Immunodeficiency Virus Carrying Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtype C Envelope after Serial Passages in Pig-Tailed Macaques (*Macaca nemestrina*). *J Virol*, 74:6501-6510)。用限制性酶 *SphI* 和 *XhoI* 酶切载体 3'-pvpv<sup>+</sup> 并去磷酸化。

2. 将上述处理后的 HIV-1 *tat/rev/vpu/env* 基因片断和载体 3'-pvpv<sup>+</sup> 按 3:1 的摩尔

浓度比混合,加入T4 DNA连接酶(Promega)和连接缓冲液,使反应终体积为10 $\mu$ l,16 $^{\circ}$ C连接过夜。

3. 将连接产物转化到 DH5 $\alpha$  感受态细胞。将转化后的细菌涂布至 LB/Amp<sup>+</sup>平板上,37 $^{\circ}$ C 培养过夜,挑取单克隆至 5ml LB 培养基培养,37 $^{\circ}$ C,220 rpm,16 小时。

4. 从每个菌液中提取质粒,使用限制性酶 *SphI* 和 *XhoI* (MBI Fermentas) 酶切鉴定,挑选正确的克隆 3'-p02HN<sub>SMX2</sub>-B'<sub>WHU</sub>,用 30% 的甘油保藏克隆的菌种,提取克隆的质粒置于 -20 $^{\circ}$ C 保存。3'-p02HN<sub>SMX2</sub>-B'<sub>WHU</sub> 包含了 HIV-1 B' 的 *tat/rev/vpu/env* 和 SIVmac239 的 3'端基因,从 *SphI* 酶切位点开始一直到 3'LTR (图 1)。

#### 构建杂交病毒株 SHIV-B'<sub>WHU</sub>:

1. 限制性酶 *SphI* 酶切质粒 PVP-1 和 3'-p02HN<sub>SMX2</sub>-B'<sub>WHU</sub> 使其成线形,将两个线形质粒共转然到 293T 细胞。质粒 PVP-1 是大小为 9.4Kb 的 DNA,包含了 SIVmac239 的 5'端基因,即 5' 长末端重复序列(LTR), *gag* 和 *pol*,从 5' LTR 到 *SphI* 酶切位点(图 1) (Luciw, P.A., et al., 1995. Persistent infection of rhesus macaques with T-cell-line-tropic and macrophage-tropic clones of simian/human immunodeficiency viruses (SHIV). Proc Natl Acad Sci U S A, 92(16): 7490-4.)。

2. 转染的具体方法:使用Qiagen公司的脂质体转染试剂盒进行转染。具体方法:转染前1天,在60mm的细胞培养皿中培养2-8 $\times$ 10<sup>5</sup> 293T细胞,37 $^{\circ}$ C,5%CO<sub>2</sub> 培养使细胞在转染之前长至40-80%。Buffer EC稀释2 $\mu$ g线性质粒(1 $\mu$ g PVP-1和1 $\mu$ g 3'-p02HN<sub>SMX2</sub>-B'<sub>WHU</sub>)至总体积150 $\mu$ l,充分混合后加入16 $\mu$ l Enhancer,在振荡器上振荡1秒混匀,室温(15-25 $^{\circ}$ C)下放置2-5min。DNA-Enhancer混合物中加入20 $\mu$ l的Effectene Transfection Reagent,上下颠倒5次混匀。在室温中放置20分钟形成转染复合体。转染复合体形成后,轻轻吸去细胞培养皿上的培养液,用8ml磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤293T细胞,加入4ml新鲜的细胞培养液。1ml培养液加入含有转染复合体的EP管,颠倒2次混匀后,立即把复合体溶液以点阵形状滴入含有293T细胞的60mm细胞培养皿中,轻轻摇晃培养皿后将培养皿放入细胞培养箱中。

3. 转染48小时后,在转然的293T细胞中加入PHA-P (Sigma) 刺激三天的5 $\times$ 10<sup>6</sup> 健康人PBMC共培养。24小时后,轻轻晃动转染平皿,重悬PBMC,收集细胞重悬液,离心(1500rpm,10分钟),收集上清液并分装冻存-70 $^{\circ}$ C。用PBS洗涤PBMC两次,用PBMC生长培养基培养细胞,每3-4天收集培养上清液,使用SIV p27抗原ELISA试剂盒(ZeptoMetrix)监测上清液中p27抗原产量。

结果监测到SIV p27抗原产量,证明构建出杂交病毒株SHIV-B'<sub>WHU</sub>。

#### 实施例 4

杂交病毒株 SHIV-B'<sub>WHU</sub> 的表型和感染性:

为了证明构建的杂交病毒株 SHIV-B'<sub>WHU</sub> 具有感染性,并且与亲本的 HIV-1 02HNsmx2 毒株具有相似其生物学特性。通过感染多种表达不同共受体的细胞鉴定病毒的表型特征和感染能力。

通过感染GHOST.CD4细胞鉴定病毒株的表型和感染性:

1. 线性质粒 PVP-1 和 3'-p02HN<sub>SMX2</sub>-B'<sub>WHU</sub> 转染后的 293T 细胞分别与

GHOS.CD4.Hu-CCR5细胞和GHOS.CD4.Hu-CXCR4细胞共培养24小时,进行细胞融合实验(具体方法见实施例2)。12-24小时后,用相差显微镜对培养物拍照观察细胞合胞体形成情况。

2. 在24孔板中分别接种GHOS.CD4.Hu-CCR5和GHOS.CD4.Hu-CXCR4细胞,培养24小时。500ul(1.5ng)/孔的病毒上清液加入细胞中,再加入500ul培养基,置于细胞培养箱中,孵育过夜。移去病毒上清液,用300ul/空的培养基洗涤细胞2次,加入1ml培养基培养细胞,24-48小时后观察结果,用相差显微镜对培养物拍照观察细胞合胞体形成情况。

结果出现细胞融合形成的合胞体和绿色荧光,因而证明SHIV-B'<sub>WHU</sub>使用的共受体是CCR5,并具有感染靶细胞和在靶细胞内复制的能力。

基于TZM-b1细胞的荧光素酶反应测定病毒株的表型和感染性:

1. 感染前24小时,在96孔板的每孔中接种100ul含有 $2 \times 10^4$ 的TZM-b1细胞,使细胞长到40-80%面积。TZM-b1细胞(美国国立卫生研究院AIDS试剂计划,NIH AIDS Research and Reference Reagent Program)来自HeLa细胞,能在细胞表面稳定表达大量CD4和CCR5受体,包含HIV-LTR介导的荧光素酶和 $\beta$ 牛乳糖报告基因,LTR被HIV Tat蛋白激活后诱导报告基因的表达,它对各种HIV-1毒株高度敏感。

2. 两倍稀释的SHIV-B'<sub>WHU</sub>病毒(300pg,150pg,75pg)分别感染TZM-b1细胞(50ul/孔),每孔加入DEAE-dextran(Sigma)至终浓度为20ug/ml,不加病毒的孔作为阴性对照以便测定发光背景,每孔重复3次,37°C培养3小时。每孔补加培养基50ul,继续培养48小时。

3. 使用荧光素分析试剂盒(Luciferase Assay System, Promega)检测感染SHIV-B'<sub>WHU</sub>病毒的TZM-b1细胞的荧光素值,具体方法:用加样器吸出培养基,PBS缓冲液洗细胞一次,吸出PBS缓冲液,加入20ul 1 $\times$ 荧光素细胞培养裂解液(Luciferase Cell Culture Lysis),室温放置1小时以上,转移细胞裂解液入96孔白板。每孔各加入荧光素分析底物(Luciferase Assay Substrate)和荧光素分析缓冲液(Luciferase Assay Buffer)混合液100ul,注意使此混合液和室温保持在22°C,立即使用酶标仪测定每孔的荧光素值。

数据显示SHIV-B'<sub>WHU</sub>能感染TZM-b1细胞,表达功能性Tat蛋白激活荧光素酶报告基因的表达,并且感染细胞的病毒量与细胞产生的荧光素酶活性成正比,而没感染病毒的细胞的荧光素酶活性很差。因此新构建的SHIV-B'<sub>WHU</sub>株使用的共受体是CCR5,并且是一个具有感染靶细胞能力的病毒。

### 实施例5

SHIV-B'<sub>WHU</sub>具有在人和中国恒河猴PBMC上的复制能力:

为了证明SHIV-B'<sub>WHU</sub>具有在人和中国恒河猴PBMC上的体外复制能力并能产生一定的病毒量,申请人将SHIV-B'<sub>WHU</sub>感染健康人或者中国恒河的PBMC,通过测定病毒的滴度鉴定病毒的体外复制动力学。

SHIV-B'<sub>WHU</sub>在健康人PBMC中的复制能力:

转染病毒上清液感染健康人PBMC:

1. 线性质粒PVP-1和3'-p02HN<sub>SMX2</sub>-B'<sub>WHU</sub>共转染到293T细胞后28小时,将PHA刺激三天的健康人PBMC与其共培养,24小时后,轻轻晃动转染平

血，重悬PBMC，收集细胞重悬液，离心后得到PBMC细胞沉淀，用PBS洗涤PBMC两次，加入5ml PBMC生长培养基。

2. 每3~4天收集一半病毒上清液，补充等量的PBMC生长培养基。每周补充一次新鲜的、植物血凝素（PHA-P）刺激三天的健康人PBMC（即三天前从健康人全血中提取的PBMC，具体方法见实施例1）。
3. 使用SIV p27抗原ELISA试剂盒（ZeptoMetrix）监测病毒上清液中p27抗原产量。

感染SHIV-B'<sub>WHU</sub>的人PBMC和健康人PBMC共培养：

将上述感染病毒的人PBMC与 $2 \times 10^6$ 的健康人PBMC（PHA-P刺激三天）共培养，每3~4天收集一半病毒上清液，补充等量的PBMC生长培养基。每周补充一次新鲜的、PHA-P刺激三天的健康人PBMC。使用SIV p27抗原ELISA试剂盒（ZeptoMetrix）监测病毒上清液中p27抗原产量。

SHIV-B'<sub>WHU</sub>在健康中国恒河猴PBMC中的复制能力：

取500ul转染病毒上清液感染 $2 \times 10^6$  PHA-P刺激三天的中国恒河猴PBMC（990011和00031），补充500ul PBMC生长培养基。每3~4天收集病毒上清液，补充等量的细胞培养基；每周补充一次新鲜的、PHA-P刺激三天的猴PBMC。使用SIV p27抗原ELISA试剂盒（ZeptoMetrix）监测病毒上清液中p27抗原产量。

结果发现SHIV-B'<sub>WHU</sub>能在人和中国恒河猴PBMC中复制产生较高滴度的病毒，因此证明SHIV-B'<sub>WHU</sub>具有体外感染人和中国恒河猴PBMC并高效复制的能力。

### 实施例 6

分子水平分析 SHIV-B'<sub>WHU</sub> 病毒株是具有复制能力的活病毒：

为了进一步证明逆转录病毒株 SHIV-B'<sub>WHU</sub> 能在 PBMC 中将自身的 RNA 逆转录成 DNA 整合到细胞基因组中并逆转录形成病毒 mRNA。申请人在分子水平上分析病毒的活性。

通过分析前病毒基因组 DNA 证明病毒为活病毒：

1. 从细胞中提取 SHIV-B'<sub>WHU</sub> 前病毒基因组：

收集感染病毒的 PBMC，用 PBS 洗涤细胞两次。使用 DNA 提取试剂盒（Puregene DNA Isolation Kit, Gentra）从感染病毒的细胞中提取前病毒基因组。

2. 扩增前病毒基因组 *env* 序列：

以前病毒基因组 DNA 为模板，用引物 VprA 和 EnvB 扩增杂交病毒 *env* 基因片段。具体反应体系和条件：总体积 50ul 中含 10×buffer(NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>) 5.0ul, MgCl<sub>2</sub>(25mM) 4.5ul, 25mM dNTP (Amersco) 1.0ul, 引物 VprA(20pmol/ul) 1.0ul, 引物 EnvB(20pmol/ul) 1.0ul, H<sub>2</sub>O 29ul, 1u/ul Taq DNA 聚合酶 (MBI) 3.5ul, 病毒基因组 DNA 5.0ul。92°C 2min, 1 个循环；92°C 20sec, 50°C 45sec, 72°C 4min, 35 个循环；72°C 15min。结果有一条大约 3.0Kb 的特异性 DNA 带，胶回收该 DNA。将该 DNA 连接到 pMD18-T 载体 (Takara) 上，送到测序公司测序。

通过分析病毒 RNA 证明病毒为活病毒：

1. 从感染病毒的PBMC中提取病毒总mRNA：

在1.5ml EP管中收集 $5 \times 10^6$ 感染病毒的PBMC细胞（PBS洗涤两次）。加入1ml的RNA提取试剂（TRIZOL LS Reagent, Invitrogen），15-30°C温度下孵育5分钟，使核蛋白复合物彻底裂解。加入0.2ml的氯仿，盖紧EP管盖，用手使劲摇动15秒，在15-30°C温度下孵育2-3分钟， $12,000 \times g$ ，4°C离心15分钟，病毒RNA应在上清液中。上清液转移到另一干净EP管中与0.5ml 异丙醇混合，15-30°C孵育10分钟后，4°C， $12,000 \times g$ 离心10分钟，沉淀RNA。移去上清液，加入1ml 75%的酒精与沉淀充分混合，洗涤沉淀。4°C， $7,500 \times g$ 离心5分钟。在室温下干燥RNA沉淀（注意不能使用真空干燥），加入RNase-free水，55-60°C 孵育十分钟，充分溶解RNA沉淀。

## 2. RT-PCR 和巢式 PCR 扩增出病毒 cDNA 的 rev 片段：

在含有 20 $\mu$ l 病毒 RNA 的 0.2ml PCR 管中加入 500ug/ $\mu$ l 随机引物（Random Primers, Promega）2 $\mu$ l，70°C 10 分钟，然后置于冰上 10 分钟。随后再向管中加入 5 $\times$ buffer 10 $\mu$ l，40u/ $\mu$ l Rnasin（Promega）1.5 $\mu$ l，10mM dNTP（Amersco）5.0 $\mu$ l，9.5 $\mu$ l Nuclease-free H<sub>2</sub>O（Minipore），200u/ $\mu$ l M-MLV RT（Promega）2.0 $\mu$ l，使总体积达 50  $\mu$ l。在 37°C 水浴中反应 1 小时。

针对 HIV-1 Rev 两处外显子区域设计两对引物，第一轮引物为 Rev1（5'-AGA AGA GAA GAC AGC GAC GAA GA-3'）和 Rev2（5'-TCC AAT ACT GCA GGA GAT TCC ACC-3'），第二轮引物为 Rev1-2（5'-GAA GAC AGC GAC GAA GA GCT CCT CAA G-3'）和 Rev2-2（5'-ACT GCA GGA GAT TCC ACC AAT ATC TGA GGG-3'）。

使用巢式 PCR 扩增 rev 片段。第一轮反应体系的总体积为 50 $\mu$ l，包含有 10 $\times$ buffer (NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>) 5.0 $\mu$ l，MgCl<sub>2</sub> (25mM) 4.5 $\mu$ l，10mM dNTP（Amersco）2.5 $\mu$ l，引物 Rev1 (20pmol/ $\mu$ l) 1.0 $\mu$ l，引物 Rev2 (20pmol/ $\mu$ l) 1.0 $\mu$ l，H<sub>2</sub>O 32  $\mu$ l，1u/ $\mu$ l Taq DNA 聚合酶（MBI）2.0 $\mu$ l，RT 产物（cDNA）2.0 $\mu$ l。反应条件为 95°C 5 分钟，一个循环；95°C 15 秒，52°C 45 秒，72 °C 1 分钟，35 个循环；72°C 10 分钟。第二轮 50 $\mu$ l 反应体系中包含 10 $\times$ buffer (NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>) 5.0 $\mu$ l，MgCl<sub>2</sub> (25mM) 4.5 $\mu$ l，dNTP (10mM) 2.5 $\mu$ l，引物 Rev1-2(20pmol/ $\mu$ l) 1.0 $\mu$ l，引物 Rev2-2 (20pmol/ $\mu$ l) 1.0 $\mu$ l，H<sub>2</sub>O 32  $\mu$ l，1u/ $\mu$ l Taq DNA 聚合酶 (MBI) 2.0 $\mu$ l，第一轮 PCR 产物 2.0 $\mu$ l。反应条件为 95°C 5 分钟，一个循环；95°C 15 秒，52°C 45 秒，72 °C 45 秒，35 个循环；72°C 10 分钟。PCR 扩增出大约 310bp 扩增带，其大小与预期的结果一致，而阴性对照中没有相应的特异带。将 PCR 产物回收，回收的 PCR 产物连接到 pMD18-T 载体（Takara）后测序。

测序结果证明，SHIV-B'<sub>WHU</sub> 能将自己的病毒基因整合到 PBMC 中形成前病毒。SHIV-B'<sub>WHU</sub> 感染 PBMC 后产生的 Rev 与亲本毒株 02HNsmx2 上的 Rev 序列是完全一致的。这说明 SHIV-B'<sub>WHU</sub> 是一个具有逆转录，整合活性的活病毒。

## 实施例 7

SHIV-B'<sub>WHU</sub> 在建立 B'亚型，R5 嗜性 SHIV/猴模型中的应用：

本构建的杂交病毒株 SHIV-B'<sub>WHU</sub> 具有其特殊的生物学特性和优点，利用该病毒建立一种新型的 SHIV/猴模型。

### 1. 动物选择：

选择 20 只年龄为 24 个月的雌性恒河猴。经血清学检测猴免疫缺陷病毒

(Simian Immunodeficiency Virus, SIV), 猴 D 型逆转录病毒 (Simian type D retrovirus, SRV-1), 猴 T 淋巴细胞 I 型病毒 (Simian T-cell lymphotropic virus type I, STLV-1), 猴泡沫病毒 (Simian foamy virus, SFV) 和肺结核 (Tuberculosis, TB)。

## 2. 建立 SHIV-B'<sub>WHU</sub>/猴模型:

第一阶段实验 (4 只幼年中国恒河猴, 编号为 P1: 0002, P2: 0296, P3: 1032, P4: 1050):

目的: SHIV-B'<sub>WHU</sub> 感染恒河猴后, 通过系列传代 (P) 获得具有致病性的病毒株 SHIV-B'<sub>WHUP4</sub>。

具体方法: 从一只健康的恒河猴 (P1) 静脉中抽取 3-5ml 全血 (肝素抗凝), 分离 PBMC, PHA-P 刺激细胞三天。用 3000 半数细胞感染量 (TCID<sub>50</sub>) 的 SHIV-B'<sub>WHU</sub> 病毒上清液体外感染该 PBMC。12 小时后将  $3 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub> 病毒上清液和经感染的猴自体 PBMC ( $2 \times 10^8$ ), 总共 1ml 的体积, 通过静脉途径回输给恒河猴 (P1)。2 周后取 P1 恒河猴 5ml 全血和 2ml 骨髓静脉输入到另外两个健康恒河猴体内, 作为 P2 动物。以同样的方法从 P2 动物传代形成 P3 和 P4 动物。收集标本的时间和内容: 攻毒前 1 天 (第 0 天), 攻毒后第 3, 7, 12, 14 天收集全血, 收集猴肠系膜淋巴结, 脾, 肺, 肝和肾脏。在无菌环境下收集所有组织标本, 将部分组织浸泡在福尔马林中固定, 部分组织立刻存放到液氮中保存。

第二阶段实验 (16 只幼年恒河猴):

目的: 建立 SHIV-B'<sub>WHUP4</sub>/猴模型。

具体方法: 从第一阶段实验中选择具有最高感染毒力的病毒株 SHIV-B'<sub>WHU</sub>。倍比稀释的病毒剂量 ( $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$  和  $10^5$  TCID<sub>50</sub>) 通过阴道粘膜途径输入另外 16 只健康恒河猴体内 (4 只/组, 共 4 组), 建立感染, 输入病毒的总体积为 1ml。根据感染 SHIV-B'<sub>WHU</sub> 恒河猴的 CD4 和 CD8 细胞计数, 体内病毒载量, 免疫缺陷症状等临床和实验室检测指标确定病毒感染恒河猴的感染剂量, 建立一种模拟 HIV-1 性传播途径的 SHIV/猴模型。收集标本的时间和内容: 攻毒前 1 天 (第 0 天), 攻毒后第 1, 2, 3, 5, 7, 12, 14 天收集全血, 以后每 1-2 周收集全血 1 次, 收集猴肠系膜淋巴结, 肠道的各个部分, 脾, 肺, 肝和肾脏。标本的处理和存放同上。

## 3. 检测指标:

第一和第二阶段实验都要进行如下的检测:

### 1) 病毒体内、外生长动力学 (SIV p27 分析):

提取每只感染病毒的猴血浆, 使用 SIV p27 抗原酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒 (ZeptoMetrix) 分析病毒在猴体内的生长动力学。

将  $10^6$  感染病毒猴的 PBMC 与  $2 \times 10^6$  健康猴的 PBMC 共培养 (PHA-P 刺激三天), 每 3-4 天收集病毒上清液, 补充新鲜培养基, 每周补充新鲜的健康猴 PBMC。通过检测上清液的 SIV P27 产量, 了解 SHIV-B'<sub>WHU</sub> 的体外生长动力学。

### 2) 病毒诱导猴体内产生的特异性抗体:

使用免疫印迹法 (Western Blot) 监测感染 SHIV-B'<sub>WHU</sub> 的恒河猴体内是否产生了特异性抗体。

SHIV-B'<sub>WHU</sub> 通过体外感染 CEM×174.Hu-CCR5 细胞 (美国国立卫生研究院 AIDS 试剂计划, NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, 编号: 272), 大量增殖病毒。当 p27 产量达到峰值时收获病毒上清液, 而后浓缩病毒, 并用蔗

糖梯度离心纯化病毒。将纯化的病毒重悬在 50ul 病毒裂解缓冲液 (0.15M NaCl, 0.05M Tris-HCl [pH 7.2], 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, and 0.1% sodium dodecyl sulfate), 而后在十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)中进行蛋白质凝胶电泳和免疫印迹 (Western Blot)。使用接种病毒 SHIV-B<sub>WHU</sub> 的猴血清作为一抗 (PBS 稀释 1:200), 以碱性磷酸酶标记的山羊抗猴 IgG 为二抗 (PBS 稀释 1: 500), 催化底物为 5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸/氮蓝四唑 (BCIP/NBT), 用数码相机对硝酸纤维素薄膜拍照作永久实验记录。

### 3) 接种 SHIV-B<sub>WHU</sub> 猴血浆中的 RNA 病毒载量:

使用实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 方法监测猴血浆中 RNA 病毒载量。

将 EDTA (乙二胺四乙酸) 抗凝的猴血浆离心 (5000rpm, 10 分钟) 去除残留的细胞。500ul 血浆/猴进行超离心 (13000rpm, 60 分钟, 4°C), 去除上清液, 留下病毒沉淀和 140ul 血浆。使用病毒 RNA 提取试剂盒 (QIAamp Viral RNA Kit, QIAGEN) 提取病毒 RNA。提取的病毒 RNA 进行逆转录 PCR, 即在含有 20μl 病毒 RNA 的 0.2ml PCR 管中加入 500ug/ul 随机引物 (Random Primers, Promega) 2μl, 5×buffer 10μl, 40u/ul Rnasin 1.5μl (Promega), 10mM dNTP (Amersco) 5.0μl, 9.5μl Nuclease-free H<sub>2</sub>O (Minipore), 200u/μl M-MLV RT (Promega) 2.0μl, 使总体积达 50 μl。RT-PCR 反应条件: 25°C 15 分钟, 42°C 40 分钟, 75°C 5 分钟。针对 SIV gag 区域设计引物和分子探针, 引物 SL03 序列为 5'-AGG GAA GAA AGC AGA TGA ATT A-3'; 引物 SL04 为 5'-GTT TCA CTT TCT CTT CTG CGT-3'; 分子探针 beacon 为 5'-FAM-CGC TGG AGA ACA AAG AAG GAT GTC ACA GCG-DABCYL-3', FAM (6-carboxyfluorescein) 是一种报告荧光染料, DABCYL (4' dimethylaminophenylazo benzoic acid) 是一种猝灭剂。PCR 反应体系和条件: 10×buffer 10μl 2.0ul, 25mM MgCl<sub>2</sub> 1.0ul, 20pmol/ul SL03 1.0ul, 20pmol/ul SL04 1.0ul, 20pmol/ul Beacon SL07 0.5ul, 1u/μl Taq DNA 聚合酶 (MBI) 0.5ul, H<sub>2</sub>O 14ul, 30ul cDNA, 总体积为 50ul。95°C 10 min, 1 个循环; 95°C 15 sec, 55°C 30 sec, 72°C 30 sec, 45 个循环, 在荧光定量 PCR 仪上完成 PCR 反应。

4) 荧光激活细胞分类 (FACS) 分析: 使用 FACS 分析 SHIV-B<sub>WHU</sub> 感染猴的外周血 CD4<sup>+</sup> 和绝对计数和 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值。具体方法: 50ul 全血加入到 TruCount 管 (Becton Dickinson, San Jose, Calif.), 而后加入 10ul leu-3a-PE 抗 CD4 的抗体 (Becton Dickinson), 10ul leu-2a-PerCP 抗 CD8 的抗体 (Becton Dickinson) 和 10ul 荧光素异硫氰酸盐 (fluorescein isothiocyanate) 抗 CD3e 抗体 (Pharmingen, San Diego, Calif.)。混合物在暗室, 室温 (15-25°C) 条件下孵育 20 分钟, 加入 450ul 的 1×FACS 裂解液 (Becton Dickinson), 室温下孵育 15 分钟以确保红细胞完全裂解。标本进入流式细胞仪进行 FACS 分析。根据软件的产商说明对 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞计数。

5) 免疫组化: 福尔马林固定的各种组织与单克隆抗体 FA2 (anti-SIVmac p27; National Institutes of Health AIDS Reference and Reagent Program, Bethesda, Md.) 反应, 随后加入生物素标记的羊抗鼠免疫球蛋白 G (Dako Laboratory, Carpinteria, Calif.), ABC 过氧化物酶 (Vector Laboratories, Burlingame, Calif.), 和 AEC 底物 (Biomedica Corp., Foster City, Calif.), 最后产生一种红色阳性产物。组织切片使用苏木精复染。使用来自 SIV 感染猴的组织切片为阳性对照, 未感染病毒的组织为阴性对照。

6) 原位杂交: 使用生物素标记的 SHIV gag cDNA 探针 (SV Joag, *et al*, 1997. Animal Model of Mucosally Transmitted Human Immunodeficiency Virus Type 1

Disease: Intravaginal and Oral Deposition of Simian/Human Immunodeficiency Virus in Macaques Results in Systemic Infection, Elimination of CD4<sup>+</sup> T Cells, and AIDS. *Journal of Virology*, 71: 4016–4023.) 与福尔马林固定的各种组织进行原位杂交, 而后与碱性磷酸酶标记的抗生物素抗体和BCIP底物反应, 产生的阳性结果呈紫蓝色。用核坚牢红 (Nuclear Fast Red) 对组织切片进行复染。

第一阶段实验数据证明 SHIV-B'<sub>WHU</sub> 病毒能在中国恒河猴体内生长繁殖, 病毒载量随感染时间而增高, 并且传代提高病毒在中国恒河猴的初始病毒血症 (图 11)。恒河猴的淋巴结, 肝, 脾和肺组织的常规病理切片发现肺组织间隔增宽, 类似间质性肺炎的病理改变; 肝、脾、淋巴结组织可见单核吞噬细胞的免疫性增生 (图 12)。

### 实施例 8

SHIV-B'<sub>WHU</sub> 在检测和筛选艾滋病疫苗、抗逆转录病毒药物、杀微生物剂中的应用。

#### 1、SHIV-B'<sub>WHU</sub> 在检测或筛选和评估艾滋病疫苗中的应用:

使用致病的 SHIV-B'<sub>WHU</sub> 攻击经 HIV-1 疫苗接种的恒河猴, 评估疫苗诱导的免疫效应和保护作用。评估的 HIV-1 疫苗应该是基于其 *env* 设计的, SHIV-B'<sub>WHU</sub> 与疫苗的 *env* 来源可以是同源或异源的。

1) 将待评估的 HIV-1 疫苗接种到 4 只恒河猴体内, 第 3 周和第 10 周时再用该疫苗进行加强免疫。阴性对照组的 4 只恒河猴不进行接种免疫。第 22 周时用 100 TCID<sub>50</sub> 的 SHIV-B'<sub>WHU</sub> 攻击每只恒河猴。攻毒后, 通过观察每只恒河猴的临床表现, 检测每只恒河猴体内的各项指标来观察疫苗对恒河猴的保护作用。

#### 2) 具体检测指标如下:

①通过酶联免疫斑点试验 (ELISOPT) 监测接种病毒猴体内 HIV-1 特异性细胞毒 T 淋巴细胞反应 (CTL):

将鼠抗人  $\gamma$  干扰素单克隆抗体 B27 (BD PharMingen, San Diego, California) 以 10ug/ml 的浓度溶于 Dulbecco's PBS (D-PBS, Life Technologies, Gaithersburg, Maryland), 然后按 100ul/孔包被 96 孔 Multiscreen HA 板 (Millipore, Bedford, Massachusetts), 4°C 过夜。第二天, 用含 0.25% Tween-20 的 D-PBS (D-PBS/Tween) 洗板 3 次, 然后用含 5% 胎牛血清 (Invitrogen) 的 D-PBS 于 37°C 封闭 2 小时 (100ul/孔)。

用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 (Invitrogen) 洗板以除去 Tween-20 后, 将 100ul 含  $2 \times 10^5$  个猴外周血单核细胞接入每个孔, 再将终浓度为 2ug/ml 的 ENV 或 GAG 或 POL 的肽库接入相应的孔, 37°C 孵育 18 小时。阴性对照孔不加多肽刺激物。孵育完成后用 D-PBS/Tween 洗板 9 次, 用蒸馏水洗板 1 次。然后每孔加入 2ug/ml 生物素标记的兔抗人  $\gamma$  干扰素抗体 (Biosource, Camarillo, California), 室温孵育 2 小时。孵育完成后用 Coulter 洗涤液 (Beckman Coulter, Miami, Florida) 洗板 6 次, 再用 1: 500 稀释的碱性磷酸酶标记的链霉亲和素 (Southern Biotechnology, Birmingham, Alabama) 孵育 2 小时。孵育完成后用 Coulter 洗涤液洗板 5 次, 用 D-PBS 洗板 1 次, 然后用 5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸/氮蓝四唑 (BCIP/NBT) 显色。显色完成后用自来水中止反应, 干燥后用 ELISPOT 读板机 (Hitech Instruments, Edgement, Pennsylvania) 分析结果。

②通过荧光激活细胞分类 (FACS) 分析恒河猴体内的 CD4 和 CD8 细胞数目:

方法与具体实施例子 7 中 4) 相同。

- ③使用实时荧光定量 PCR (Real-Time PCR) 监测猴血浆中 RNA 病毒载量：  
方法与具体实施例子 7 中 3) 相同。

- ④中和抗体效价：

将待测血清用新鲜培养基(RPMI 1640/12%fetal bovine serum/50 ug gentamicin)梯度稀释致终体积 100ul, 再将 50ul 含有 500 TCID<sub>50</sub> 的 SHIV-B'<sub>WHU</sub> 与其混合一起加入 96 孔细胞培养板, 37°C 孵育 1 小时, 然后每孔加入 100ul 含有 5×10<sup>4</sup> 的 MT-2 细胞(美国国立卫生研究院 AIDS 试剂计划, NIH AIDS Research and Reference Reagent Program) 细胞。4-6 天后用中性红(Finter's neutral red, ICN, Cat. No. 1691149) 染色, 活细胞将被染色而被病毒杀死的细胞将不被染色。中和抗体滴度计算为 50% 细胞被保护时的血清稀释度的倒数。

有效的艾滋病疫苗能保护恒河猴感染 SHIV-B'<sub>WHU</sub>, 即监测不到恒河猴体内的病毒; 或者感染病毒后各种指标接近正常值, 具体表现为在接种疫苗的恒河猴体内能检测到病毒的 DNA 和 RNA, 但是病毒载量监测不到或维持在较低的水平, CD4 和 CD8 细胞数目基本不变, 能监测到恒河猴体内产生的 HIV-1 特异性 CTL 反应和较高的中和抗体效价。而对照组的恒河猴均感染病毒, 并且出现各种临床症状(如发热, 体重下降, 腹泻, 肺部感染等), 病毒载量高和 CD4, CD8 细胞数目下降。

## 2. SHIV-B'<sub>WHU</sub> 在检测或筛选和评估抗逆转录病毒药物中的应用:

使用致病的 SHIV-B'<sub>WHU</sub> 攻击恒河猴, 导致感染病毒的猴出现与 AIDS 相关的综合症, 再给予待检测的逆转录病毒药物, 筛选具有抗病毒活性的逆转录病毒药物, 并评估药物的疗效。

1) 使用 100 TCID<sub>50</sub> SHIV-B'<sub>WHU</sub> 攻击 8 只恒河猴。2 周后, 实验组的 4 只恒河猴给予待测的逆转录病毒药物进行连续治疗 57 天, 按 30mg/kg 猴体重注射, 而对照组的 4 只猴不给与任何药物治疗。

2) 通过观察所有恒河猴的临床表现和检测每只恒河猴的 CTL 反应, CD4 和 CD8 细胞计数, 病毒 RNA 载量等, 了解待检测的抗逆转录病毒药物的保护作用。同时通过分析猴体内病毒序列, 监测病毒在药物压力下的突变和耐药毒株产生的情况。

有效的抗逆转录病毒药物使感染 SHIV-B'<sub>WHU</sub> 的恒河猴临床症状出现晚或者没有, 各项指标接近正常, 即感染病毒恒河猴使用有效的抗病毒药物猴, 体内的病毒病毒载量下降或监测不到, CD4 和 CD8 细胞数目升高。对照组中的恒河猴出现明显的临床症状, 病毒载量持续增高, CD4 和 CD8 细胞数目持续下降。

## 3. SHIV-B'<sub>WHU</sub> 在检测或筛选和评估杀微生物剂中的应用:

杀微生物剂 (Microbicides) 是一些化合物, 当局部使用时, 具有预防 HIV 感染和一些其它性传播感染的潜力。使用 SHIV-B'<sub>WHU</sub> 建立一种通过阴道粘膜途径感然的 AIDS 模型, 这种模型可用于检测和筛选杀微生物剂。

1) 将恒河猴麻醉后经阴道灌注以上的杀微生物剂, 15 分钟后以类似的方式阴道灌注 SHIV-B'<sub>WHU</sub> 并且保持恒河猴静止状态 30—45 分钟。3h 后重复刚才的操作。阴性对照组不给予任何杀微生物剂。

2) 通过观察所有恒河猴的临床表现和检测每只恒河猴的临床表现, CTL 反应, CD4 和 CD8 细胞计数, 病毒 RNA 载量, 组织中病毒含量等, 筛选和评估

有效的杀微生物剂。

有效的杀微生物剂能保护恒河猴感染 SHIV-B<sub>WHU</sub>，即监测不到恒河猴体内的病毒；或者感染病毒后各种指标接近正常值，具体表现为在接种疫苗的恒河猴体内能检测到病毒的 DNA 和 RNA，但是病毒载量监测不到或维持在较低的水平，CD4 和 CD8 细胞数目基本不变，能监测到恒河猴体内产生的 HIV-1 特异性 CTL 反应，猴组织中的病毒含量较低。而对照组的恒河猴均感染病毒，并且出现各种临床症状（如发热，体重下降，腹泻，肺部感染等），病毒载量高，CD4 和 CD8 细胞数目下降，猴组织中的病毒含量较高。

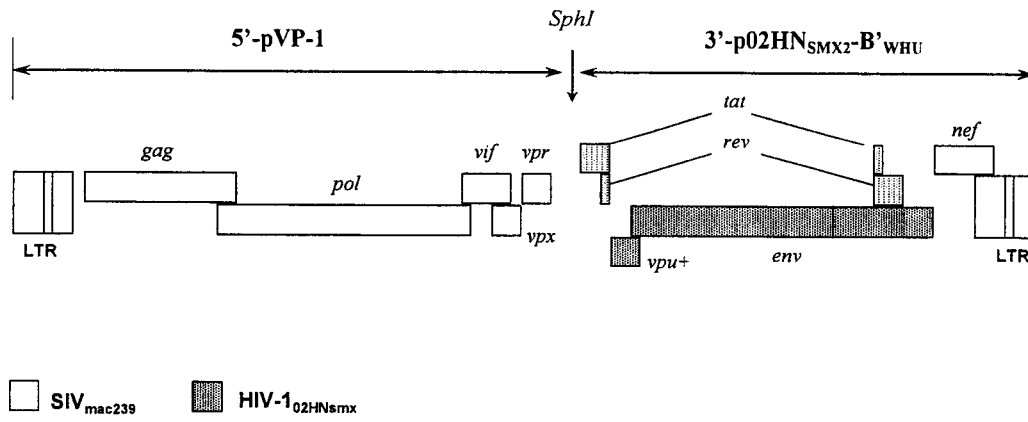


图 1

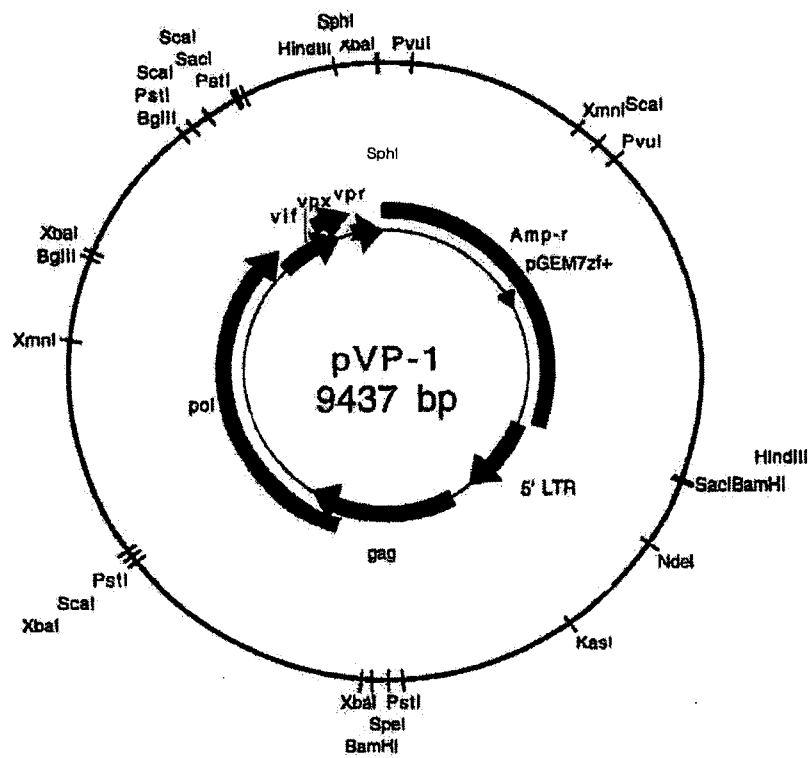


图 2

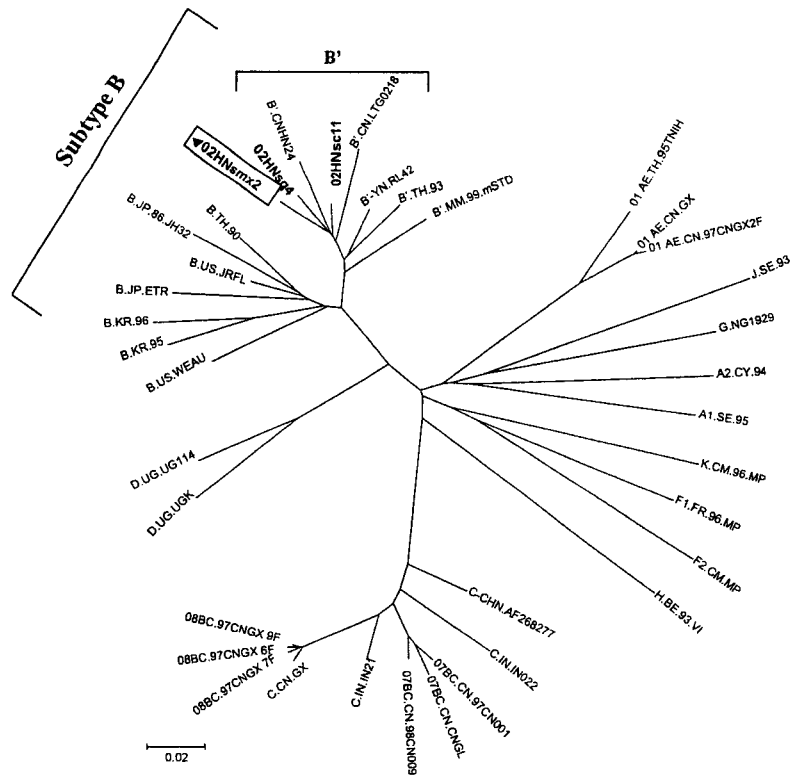


图 3

BootScan - Query: HIV-102HNsmx2

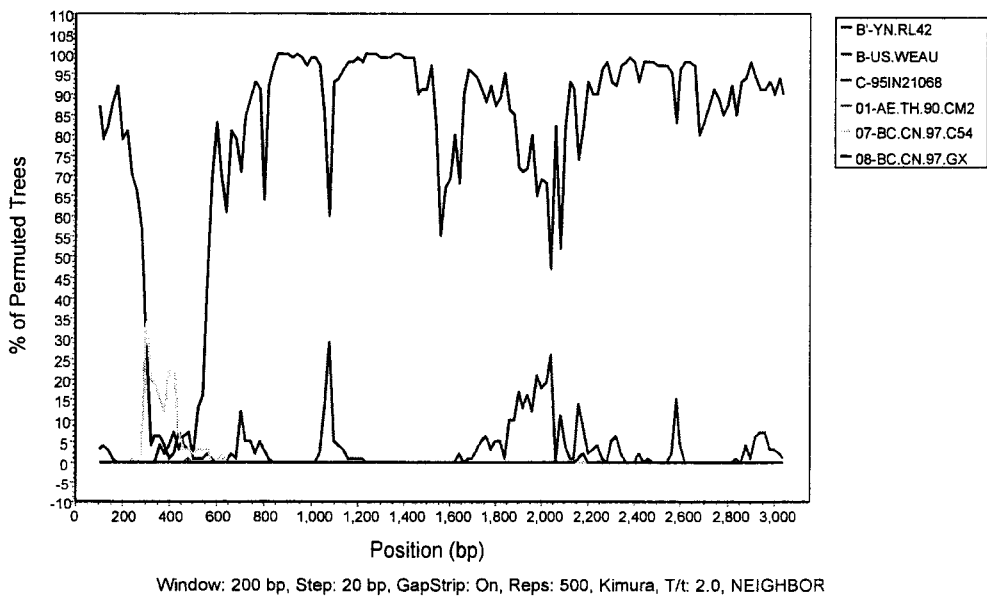


图 4

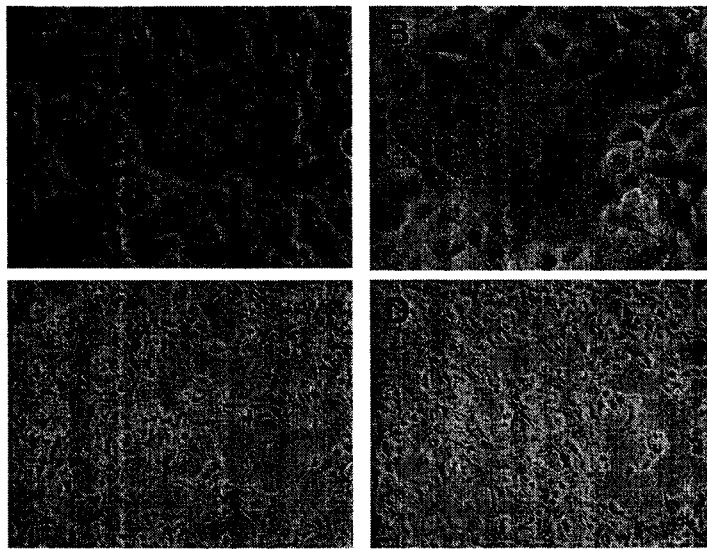


图 5

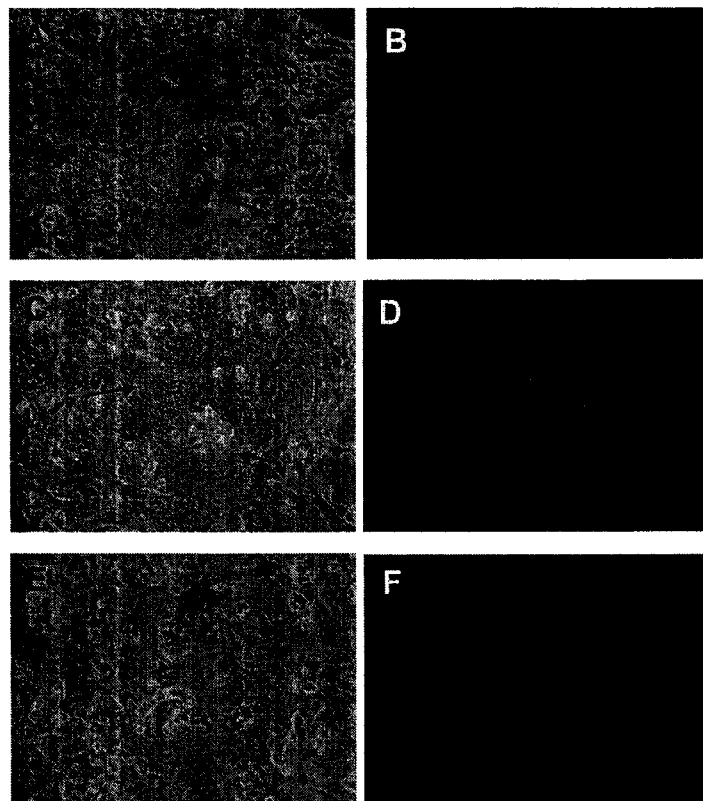


图 6

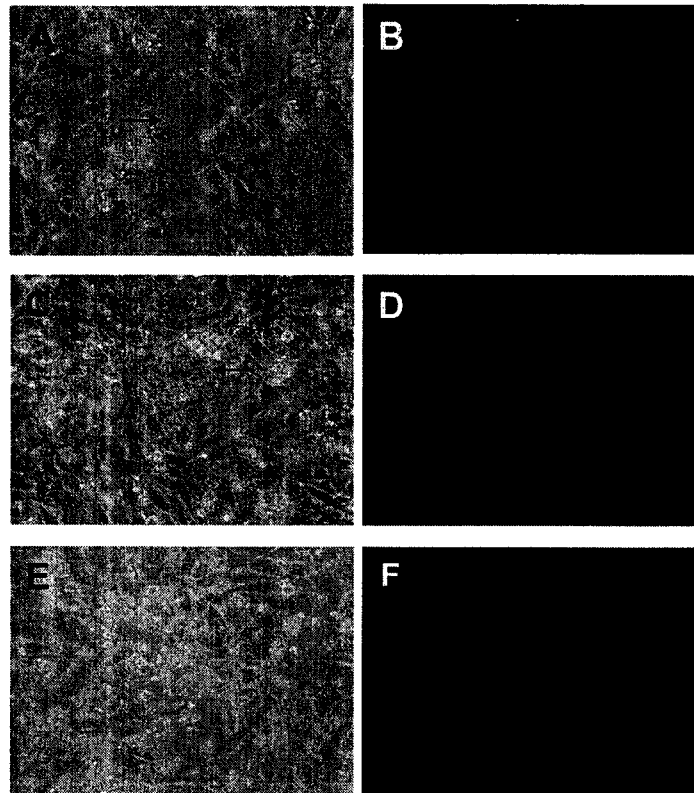


图 7

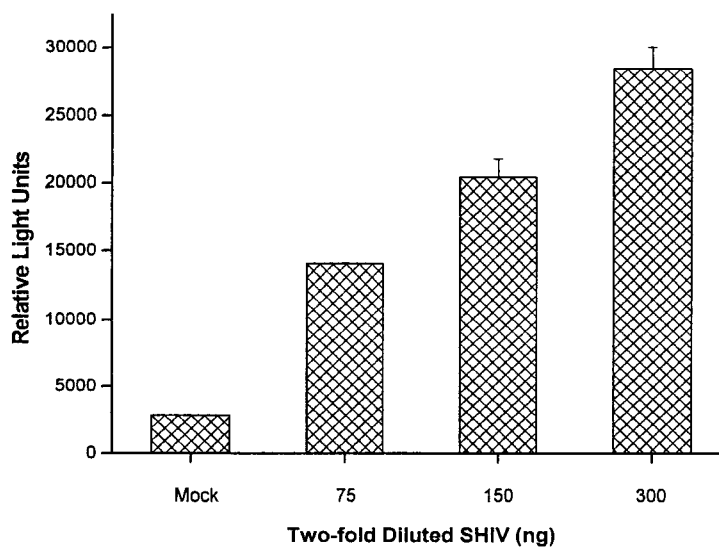


图 8

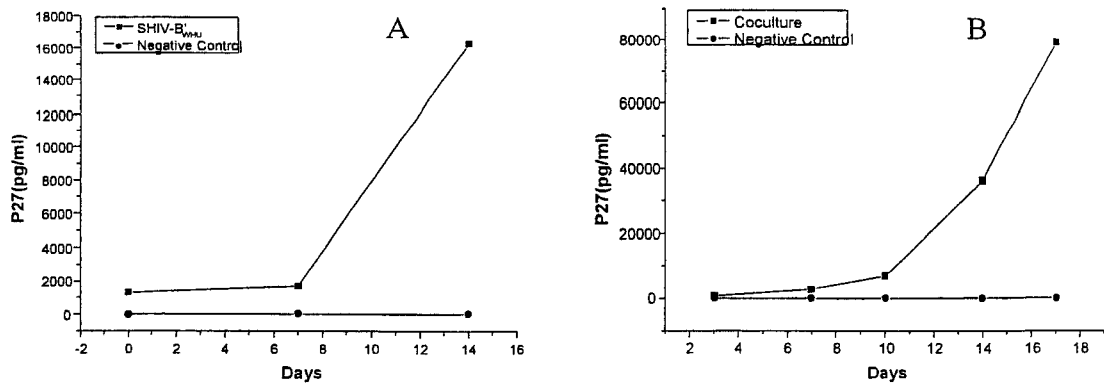


图 9

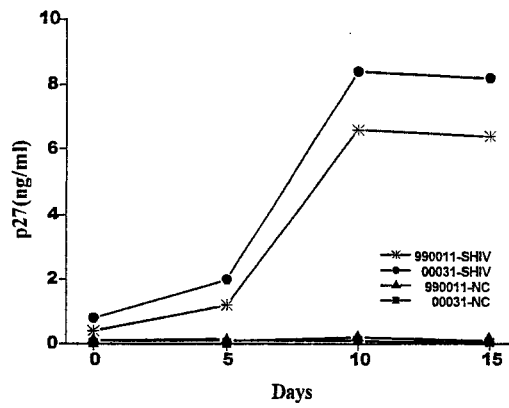


图 10

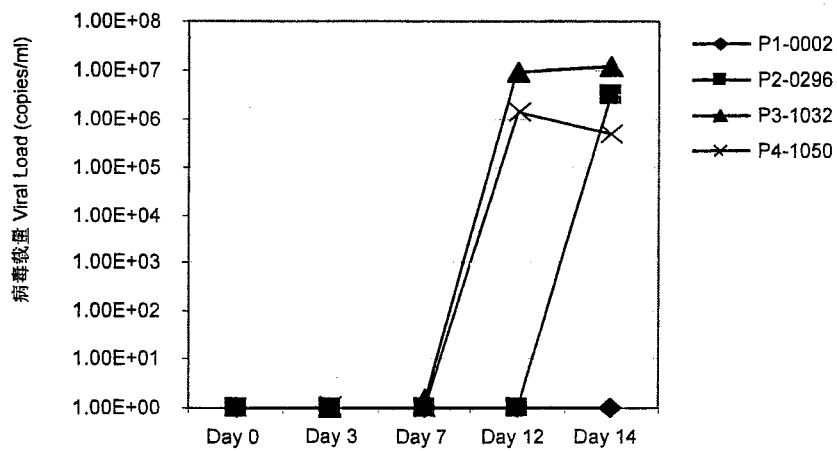


图 11

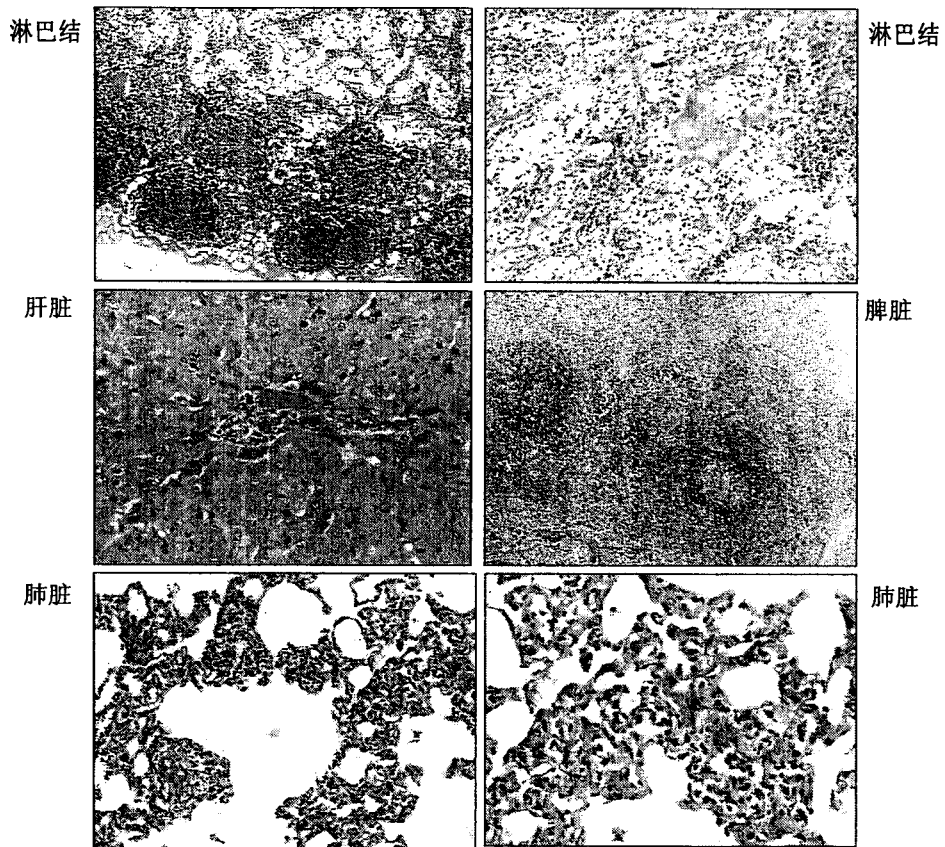


图 12

专利名称(译)	一种杂交免疫缺陷病毒株及应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN1948468A</a>	公开(公告)日	2007-04-18
申请号	CN200610124967.6	申请日	2006-11-08
[标]申请(专利权)人(译)	武汉大学		
申请(专利权)人(译)	武汉大学		
当前申请(专利权)人(译)	武汉大学		
[标]发明人	张林琦 陈志伟 庄柯 田波		
发明人	张林琦 陈志伟 庄柯 田波		
IPC分类号	C12N7/01 C12N1/21 G01N33/53 A61K39/21		
代理人(译)	王敏锋		
其他公开文献	CN100463964C		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种杂交免疫缺陷病毒株及应用，人免疫缺陷病毒(HIV - 1)B'亚型、R5嗜性、杂交的人/猴免疫缺陷病毒株(SHIV - B' WHU)和用于构建该病毒的3'端嵌合质粒及该病毒在建立猴/AIDS动物模型中的应用。在猴免疫缺陷病毒SIVmac239的基因组框架上，以B'HIV - 1的基因片段取代SIVmac239的基因构成SHIV - B' WHU。构建的杂交病毒SHIV - B' WHU携带B'亚型HIV - 1的外膜基因，具有R5嗜性，能体外感染人和恒河猴的PBMC并高效复制，保证SHIV - B' WHU感染恒河猴建立猴/AIDS动物模型。将用于研究艾滋病病毒的体内感染过程、病原特性、发病机理，免疫反应等，以及筛选和评价艾滋病疫苗、抗艾滋病病毒药物和杀微生物剂。

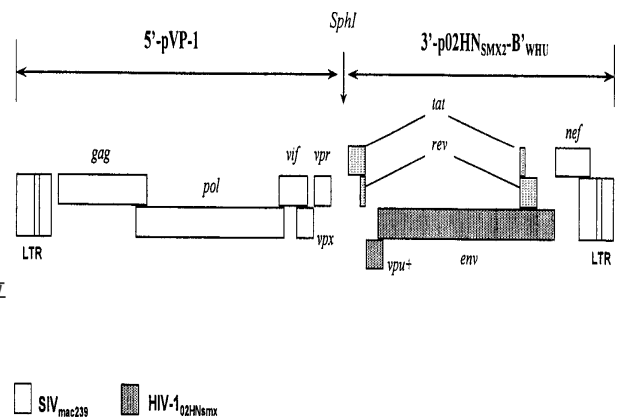


图 1