

登革 2 型病毒 PrM 基因的重组甲病毒 RNA 介导的抗病毒作用的研究*

于 曼 秦鄂德 赵 卫 胡志君 苑锡同

(军事医学科学院微生物流行病学研究所 北京 100850)

摘 要:将扩增的登革 2 型病毒株 PrM 基因导入 pSFV 载体的 SP6 启动子下游,筛选出含该基因正、反向插入的重组质粒 DNA。用 *Spe*I 酶分别将重组的和辅助的质粒 DNA 线性化,并将其体外转录成 5' 末端含帽子结构的 RNA。再将这两种 RNA 共转染 BHK 细胞。然后将转染的宿主细胞用登革 2 型病毒株攻击,并分别观察含正、反义 PrM 基因的重组甲病毒 RNA 介导的抗病毒效果。通过碱基序列测定,筛选出含 PrM 基因正、反向插入的 pSFV-PrM 重组质粒。并获得了经重组 RNA 与辅助 RNA 共转染细胞而产生的重组病毒颗粒。含有反义 PrM 基因的重组病毒 RNA,在宿主细胞中具有抗登革 2 型病毒复制的作用,而且强于含正义 PrM 基因的重组病毒 RNA。

关键词:登革 2 型病毒, PrM 基因, 甲病毒载体, 抗病毒作用

中图分类号:R 373.33 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209 (2001) 03-0334-06

登革病毒为单股正链 RNA 病毒,包括 4 个血清型。这类病毒均可经蚊媒传播而导致登革热或登革出血热、登革休克综合症的流行。近年来登革热的发病率呈上升趋势,据报道,全球每年发病人数约达 1 亿^[1],尤其是东南亚各国及我国的东南沿海地区是该病的高发区。但目前对这类蚊媒病毒病仍无有效的防治措施。

甲病毒表达载体(pSFV)系统具有感染宿主细胞范围广,转录和释放外源基因效率高等特点。并且用该表达系统制备的重组 RNA 和重组病毒颗粒均可直接作为免疫原,以病毒自然感染的方式诱发宿主产生强的免疫应答^[2,3]。此外,这种载体系统还可以将携带的目的基因定向导入靶器官。该载体系统包括表达载体和辅助载体两部分:前者含有 SFV 病毒的包装信号序列和病毒复制所需的酶即 4 种非结构蛋白(NSP1 ~ NSP4)的编码序列;辅助载体则含有编码病毒结构蛋白的基因。当将两者同时共转染宿主细胞时,可产生大量的含外源基因的病毒 RNA 和 SFV 病毒的结构蛋白,进而包装成重组病毒颗粒^[4,5]。登革病毒的 PrM 基因编码蛋白为病毒的结构蛋白^[6],存在于病毒复制早期,在 4 个型登革病毒中其核苷酸序列的同源性很高,该蛋白与病毒装配成熟密切相关。本研究将从我国广西登革热患者中分离的登革 2 型病毒(D₂-43)株的 PrM 基因导入甲病毒载体系统,构建成携带登革病毒正、反义 PrM 基因的重组 SFV 病毒颗粒,观察含该基因的重组病毒 RNA 介

* 国家自然科学基金资助项目(39770036)

作者简介:于 曼(1953-),女,山西长治市人,军事医学科学院微生物流行病学研究所病毒室高级实验师,主要从事分子病毒学研究工作。

参加此项工作的人员还有:耿丽卿 段鸿元 杨佩英

收稿日期:2000-06-14,修回日期:2000-11-08

导的抗登革病毒感染作用,为登革类疾病防治新途径的探讨提供依据。

1 材料方法

1.1 毒株和抗体

登革2型病毒43(D₂-43)株由本室从广西登革热患者血清中分离^[7]。该毒株的鼠免疫腹水抗体由本室制备。羊抗鼠 IgG 荧光抗体为原平皓公司产品。

1.2 甲病毒表达载体系统和宿主细胞株

甲病毒载体 pSFV 和辅助载体-2,均为 GIBCO/BRL 产品。BHK-21/13 细胞株由本所细胞库提供。

1.3 PrM 基因的扩增

依据 D₂-43 病毒株的 PrM 基因序列设计上、下游引物。以由 D₂-43 株病毒的感染 C6/36 细胞制备的总 RNA 为模板进行 RT-PCR 扩增。方法见文献[8]。

1.4 含 PrM 基因的重组 pSFV 质粒 DNA 的构建及鉴定

将扩增的全长 PrM 基因片段导入 pSFV 载体的 SP6 启动子下游的 *Bam*HI 位点,构建成重组质粒(简称 pSF·rM₂)。详细构建方法见文献[8]。重组质粒 DNA 中插入 PrM 基因的方向及核苷酸序列,用 ABIPRISM™ 377DNA sequencer 仪,由上海生物工程公司进行测定。不同方向插入片段的重组质粒构建见图1,正、反向插入 PrM 基因的重组质粒分别称为 pSF·rM₂⁺ 和 pSF·rM₂⁻。

1.5 重组 pSF·rM₂ 病毒颗粒的制备与激活

1.5.1 重组病毒 RNA 和辅助 RNA 的制备:帽子结构类似物 m⁷G(5')ppp(5')G、4种 NTP 和 SP6 RNA 聚合酶,均为 GIBCO/BRL 公司产品。先将 pSF·rM₂ 重组质粒 DNA 和辅助 DNA 经 *Spe*I 酶切使之线性化,并按常规法纯化后,分别将其体外转录成 RNA,方法见文献[8]。

1.5.2 RNA 转录物的共转染:采用 Bio-Rad 公司的 Gene Pulser II 型电穿孔仪,将 pSF·rM₂ 重组 RNA 和辅助 RNA 共转染 BHK-21/13 细胞,制备重组病毒颗粒。转染条件:2 × 10⁷ BHK-21/13 细胞,12 μg pSF·rM₂ 重组 RNA 和等量的辅助 RNA;850V,25 μF,300 Ω,脉冲 2 次。

1.5.3 pSF·rM₂ 病毒颗粒的收集及其活化:将受转染的 BHK 细胞接种于 25cm² 细胞瓶中,置 37℃ 培养。分别于转染后 16h 和 24h 收取培养上清液,该液中含有 pSF·rM₂ 病毒颗粒。将收取的上清液先于液氮中速冻 15min 后,置 -70℃ 贮存备用。

从 -70℃ 取出 0.5mL 含重组病毒的细胞培养液,于室温快速融化后,加入 0.05mL 糜蛋白酶 A4(激活剂, Sigma 产品)至终浓度为 200 μg/mL,混匀,置室温 10min;再加入 275 μL 抑蛋白酶肽(Sigma 产品),置冰浴 10min。此时的 pSF·rM₂ 病毒为激活的病毒,具有感染性。取 1mL,接种于用 PBS 液洗好的 BHK 细胞单层上。铺匀,置 37℃ 吸附 60min 后,去除吸附液,加入 5mL 生长液,置 37℃ 继续培养,观察细胞病变(CPE)。

1.6 对登革病毒复制的干扰试验

向每个细胞瓶中,加入用体外转录的 pSF·rM₂ RNA 和辅助 RNA 共转染的约 1 × 10⁶ 的 BHK 细胞,置 37℃ 培养。分别于接种后 16h 和 24h,用 D₂-43 株病毒进行攻击,剂量分别为

100TCID₅₀ 和 1000TCID₅₀。置 37℃ 吸附 1h 后, 去除吸附液, 加入 5mL 维持液。同样温度下继续培养至 48h, 收取用病毒攻击的细胞制作抗原片, 详见文献 [8]。利用该抗原片采用免疫荧光法, 观察含 PrM 基因的重组 RNA 对登革病毒复制的干扰作用。

1.7 间接免疫荧光检测

取于不同时间, 用不同剂量登革病毒攻击后制备的细胞抗原片, 按常规法, 以 D₂-43 病毒株免疫的鼠腹水抗体为第一抗体进行间接免疫荧光染色, 然后于荧光显微镜下观察。

2 结果

2.1 含正、反义 PrM 基因的重组质粒的构建与鉴定

首先采用 RT-PCR 方法扩增了我国登革 2 型病毒的 PrM 基因, 全长 567bp。然后将其导入 pSFV 载体的双启动子下游, 分别构建成相对于 SP6 启动子方向的正、反义 PrM 基因的重组质粒 DNA (图 1)。对重组质粒中插入的 PrM 基因的碱基序列测定结果表明, 该基因的序列与本实验室已发表的序列是一致的^[7]。同时还鉴定出含正向和反向插入基因的重组质粒。

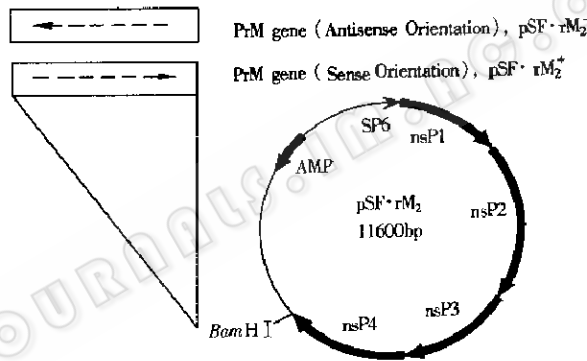


图 1 含正、反义 PrM 基因的 pSF·rM₂ 重组质粒 DNA 构建

Fig. 1 Construction of the recombinant pSF·rM₂ plasmid contained sense- and antisense- PrM gene

2.2 含 PrM 基因的重组病毒颗粒的制备及其致细胞病变作用的观察

如前所述, pSFV 表达载体系统包括可导入外源基因的含 SFV 病毒包装信号的表达载体和仅含该病毒结构蛋白的辅助载体两部分。为了构建含正、反义 PrM 基因的重组病毒, 首先应将含 PrM 基因的 pSFV 重组质粒和辅助质粒 DNA 分别体外转录成 RNA。为此, 将构建的含正、反义 PrM 基因的重组质粒 pSF·rM₂⁺ 和 pSF·rM₂⁻ 及辅助质粒 DNA 线性化之后, 在帽子结构类似物 m⁷G(5')ppp(5')G 的存在及 SP6 RNA 聚合酶作用下, 分别将其体外转录成 5' 端含帽子结构的重组 RNA。含 PrM 基因的重组质粒和辅助质粒 DNA 的体外转录产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 与标准分子量比较, 重组 RNA 和辅助载体 RNA 的分子大小, 分别约为 2.7kb 和 1.5kb, 与预期结果一致。为了证明这两种 RNA 的特异性, 分别将体外转录物用核糖核酸酶进行消化, 结果表明它们均被该酶降解, 证明它们是 RNA。

为制备含 PrM 基因的重组病毒颗粒, 首先采用电穿孔法, 分别将含正、反义基因的重

组 RNA 和辅助载体 RNA 共同转染 BHK 细胞。但是,在转染细胞中装配成的重组病毒颗粒,由于对 SFV 病毒突起蛋白基因预先进行了突变,所产生的病毒蛋白前体不能被裂解,因而缺乏感染性。因此,需用糜蛋白酶进行处理,才使产生的重组病毒颗粒具有感染性。为此,在两种 RNA 转录物共转染之后,分别于 16 和 24h 收集细胞培养液,用糜酶进行处理,然后再用这种具有感染性的重组病毒感染 BHK 细胞,并观察它们的致细胞病变作用(CPE)。图 2 是于不同时间收集的细胞培养液,经糜蛋白酶处理前后对 BHK 细胞的致病作用。从中可以看出,未经糜酶活化的重组病毒对 BHK 细胞不产生细胞病变(见图 2, A),而经糜酶活化的重组病毒在 BHK 细胞中可产生 CPE,随着时间的延长,病变则更严重(见图 2, B 和 C)。表明在转染后的细胞培养液中释放有重组病毒颗粒。

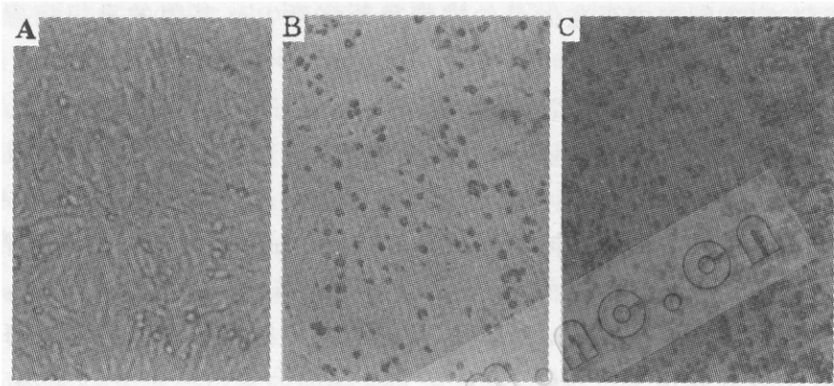


图 2 pSF·rM₂ 重组病毒颗粒在 BHK 细胞中产生的细胞病变(CPE)

Fig.2 The cytopathic effect produced in BHK cells infected with the recombinant pSF·rM₂ particle

A: BHK cells at 24h after infection with the recombinant pSF·rM₂ particles;

B and C: BHK cells at 16h and 24h after infection with the recombinant pSF·rM₂ particle treated by α-chymotrypsin A4, respectively.

2.3 PrM 基因的重组病毒 RNA 介导的抗病毒活性

为了进一步观察含正、反义 PrM 基因的重组病毒 RNA 在宿主细胞中对登革病毒复制的干扰作用,将重组病毒 RNA 和辅助载体 RNA 共转染 BHK 细胞后,分别对于 16h 和 24h 以不同剂量登革 2 型病毒攻击细胞而制备的抗原片,进行间接免疫荧光检测。结果表明,在转染细胞后 16h,攻击的登革病毒剂量无论是 100TCID₅₀ 还是 1000TCID₅₀,含正、反义 PrM 基因的 pSF·rM₂ 均可完全阻断登革 2 型病毒的复制。而于转染后 24h,含正义 PrM 基因的 pSF·rM₂⁺,用 100TCID₅₀ 和 1000TCID₅₀ 的登革病毒攻击,仅观察到少数具特异荧光的阳性细胞,约占细胞总数的 5%(图版 I—A、B)。表明在转染后 24h 含正义 PrM 基因的 pSF·rM₂⁺ 并不能完全阻断病毒的复制。从图版 I—C、D 可以看出,含反义 PrM 基因的 pSF·rM₂⁻ RNA 在转染后 24h,攻击病毒的剂量无论是 100TCID₅₀ 还是 1000TCID₅₀,均未观察到含特异荧光的阳性细胞。表明反义 PrM 基因具有极强的抗登革病毒复制的作用。图版 I 中的 E、F 和 G,分别为正常细胞对照、登革 2 型病毒感染的细胞阳性对照和不含 PrM 基因的重组甲病毒感染的细胞对照。

3 讨论

本研究的初步结果显示,由含登革病毒正、反义 PrM 基因的重组 RNA 与辅助 RNA 共转染所产生的重组病毒在宿主细胞中具有抗登革病毒复制作用。转染后 16h 的抗病毒效果优于 24h,这可能与 SFV 病毒颗粒的复制包装成熟时间有关。SFV 病毒基因组为单股正链 RNA,5'端有帽状结构,3'端具有聚 A 尾。当 SFV 病毒借助于受体介导的内吞作用进入宿主细胞之后,首先合成大量的正、负链 RNA,然后合成病毒的结构蛋白,并能快速抑制宿主细胞蛋白的合成。从复制到成熟病毒颗粒释放,于 24h 之内即可完成^[9]。本研究表明,体外转录的含 PrM 基因的重组病毒 RNA 在转染细胞后 6~16h 之间可能是重组病毒复制的高峰期,宿主细胞内存在大量的携带登革病毒 PrM 基因的重组病毒 RNA 分子,此时抗登革病毒复制的效果最佳。而 24 小时之后病毒已包装成熟,并释放到宿主细胞外,因而其抗病毒效果弱。再者,实验结果证明,含反义 PrM 基因的重组病毒 RNA 抗登革病毒复制的作用强于含正义 PrM 基因的重组病毒 RNA,表明反义 PrM 基因阻断登革病毒基因组 RNA 复制的效率更高,可能是由于反义基因与登革病毒的基因组 RNA 结合,阻止了核糖体在翻译期间的附着或延伸。而且结合了反义 PrM 基因的病毒 RNA 容易被 RNase 识别而降解,有效地减少了 mRNA 的量,从而阻止了登革病毒基因组的复制。另外,反义 PrM 基因结合到正链的基因组 RNA 上,则在负链合成期间阻止了病毒复制酶的结合和链的延长,使病毒的复制终止^[10]。因此,含反义 PrM 基因的重组病毒 RNA 抗病毒作用强于含正义 PrM 基因的重组病毒。

另外,对于 pSFV 重组病毒的生物安全性问题,由于在 pSFV 载体辅助系统编码的衣壳突起蛋白基因中插入了一突变序列,带有突变的突起蛋白的病毒颗粒无感染性,需经蛋白酶水解才能恢复其感染性^[4],因此,由该系统制备的重组病毒颗粒是安全的,并可直接作为免疫原。经体外转录的 pSF·rM₂ 重组 RNA 也可以直接进行免疫,从而避免 DNA 整合的潜在危险,可为登革疫苗研制新途径的探讨提供依据。目前,我们正用构建的重组 RNA 及重组病毒颗粒免疫动物,以观察对动物的保护作用。

参 考 文 献

- [1] Monath T P. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**:2395~2400.
- [2] Tsuji M, Bergmann C C, Takita-Sonoda Y, et al. *J Virol*, 1998, **72**(8):6907~6910.
- [3] Hariharan M J, Driver D A, Townsend K, et al. *J Virol*, 1998, **72**(2):950~958.
- [4] Liljestrom P. *Curr Opin Biotechnol*, 1994, **5**(5):495~500.
- [5] Berglund P, Sjöberg M, Garoff H, et al. *Bio Technol*, 1993, **11**:916~920.
- [6] 杨佩英,秦鄂德. 登革热和登革出血热. 北京:人民军医出版社,1999.34~43.
- [7] 杨佩英,司炳银,徐品芳,等. 军事医学科学院院刊,1994, **18**(2):81~85.
- [8] 于曼,秦鄂德,欧武,等. 中华微生物学和免疫学杂志,2000, **20**(5):473~476.
- [9] Helenius A, Kartenbeck J, Simons K, et al. *J Cell Biol*, 1980, **84**:404~420.
- [10] Denhardt D. *Ann N Y Acad Sci*, 1992, **660**:70~76.

STUDIES OF THE RESISTANCE OF THE RECOMBINANT ALPHAVIRUS RNAs CONTAINING DENGUE-2 PrM GENE TO VIRUS INFECTION*

Yu Man Qin Ede Zhao Wei Hu Zhijun Yuan Xitong

(Department of Virology, Institute of Microbiology and Epidemiology, Beijing 100850, China)

Abstract: The amplified PrM gene of dengue-2 virus was cloned into the downstream SP6 promoter of pSFV vector and the recombinant plasmid (pSF·rM₂) DNA which contained sense- or antisense-PrM gene, was selected. pSF·rM₂ DNA and helper DNA linearized by the enzyme *Spe*I digestion were both transcribed *in vitro* into recombinant RNAs which contained the capping analog on the 5'-end and cotaansfected into BHK cells by electroporation. The the transfected host cells were challenged with dengue-2 virus and the resistant efficiency of recombinant virus RNAs containing sense- or antisense- PrM gene to virus infection were observed, respectively. The recombinant plasmids (pSFV-PrM) containing sense- or antisense-PrM gene were selected with determination of the nucleotide sequence. The recombinant virus particles were obtained with recombinant RNA and helper RNA co-transfected into BHK cells. Host cells transfected with antisense-PrM RNA derived complete resistance to dengue-2 virus replication and the efficiency was higher than that of the recombinant virus RNA containing sense-PrM gene.

Key words: Dengue-2 virus, PrM gene, Alphavirus vector, Resistant to virus role

图 版 说 明

Explanation of plate

pSF·rM₂ 重组病毒 RNA 中正、反义 PrM 基因介导的抗病毒作用的免疫荧光分析结果: A, B. Helper2 和 pSF·rM₂⁺ RNAs 转染 BHK 细胞 24h 后, 分别用 100TCID₅₀ 和 1000TCID₅₀ 的 D₂-43 病毒攻击; C, D. Helper2 和 pSF·rM₂⁻ RNAs 转染 BHK 细胞 24h 后, 分别用 100TCID₅₀ 和 1000TCID₅₀ 的 D₂-43 病毒攻击; E. 正常 BHK 细胞; F. D₂-43 病毒感染的 BHK 细胞; G. Helper2 和 pSFV 的空载体 RNA 转染 BHK 细胞 24h 后, 用 100TCID₅₀ D₂-43 病毒攻击。

Immunofluorescent identification of the sense- and antisense- PrM genes of the recombinant pSF·rM₂ RNA-derived resistance to dengue virus replication. A and b: BHK cells, at 24h after cotransfection with RNAs of Helper2 and pSF·rM₂⁺, were challenged with D₂-43 virus at a 100 and 1000TCID₅₀, respectively; C and D: BHK cells, at 24h after cotransfection with RNAs of Helper2 and pSF·rM₂⁻, were challenged with D₂-43 virus at a 100 and 1000TCID₅₀, respectively; E: normal BHK cells; F: positive control-BHK cells infected by D₂-43 virus; G: BHK cells, at 24h after cotransfection with RNAs of Helper2 and pSFV, were challenged with D₂-43 virus at a 100TCID₅₀.

* Project Granted by Chinese National Natural Science fund (39770036)