



可用于辅助蛋白功能研究的人呼吸道合胞病毒双顺反子微型基因组的构建及拯救

郑元博, 张秀娟, 许敏, 姜男, 彭向雷, 付远辉, 郑妍鹏, 洪涛, 何金生*

北京交通大学生命科学与生物工程研究院, 北京 100044

摘要:【目的】构建可表达增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)报告基因的人呼吸道合胞病毒(human respiratory syncytial virus, RSV)双顺反子微型基因组 cDNA 克隆及重组质粒, 并进行拯救, 以探讨并验证 RSV 的聚合酶蛋白或辅助蛋白在 RSV 反向遗传学操作中的作用。【方法】利用全基因合成和分子生物学相结合的方法, 在获得可分别表达 EGFP 和无生物活性蛋白的单顺反子微型基因组质粒 pUC57-RSV-EGFP 和 pUC57-RSV-ORF1 的基础上, 进一步克隆至 pBR322B 载体, 获得编码 EGFP 及无生物活性蛋白的双顺反子微型基因组质粒, 经限制性内切酶和核酸序列分析正确后, 与可表达 4 种辅助蛋白的辅助质粒共转染至 BHK-T7 细胞, 通过荧光显微镜观察 EGFP 的表达以及 RT-qPCR 对 EGFP mRNA 的转录水平进行定量分析。【结果】成功构建了编码 EGFP 和无生物活性蛋白的 RSV 双顺反子微型基因组质粒 pBR322B-RSV II -EGFP, 经与编码 4 种辅助蛋白的辅助质粒共转染至 BHK-T7 细胞, 发现 4 种辅助蛋白对 EGFP 的表达具有不同的功能活性。【结论】以可表达 EGFP 报告基因的 RSV 双顺反子微型基因组重组质粒, 实现了对 4 种辅助蛋白的功能验证, 其中 M2-1 蛋白在双顺反子微型基因组拯救过程中具有转录延长的生物学活性。

关键词: 人呼吸道合胞病毒, 双顺反子, 微型基因组, 辅助蛋白

人呼吸道合胞病毒(human respiratory syncytial virus, RSV)是导致婴幼儿罹患下呼吸道疾病的重要原因, 症状常表现为支气管炎和肺炎^[1]。全球每年有 340 万儿童因 RSV 感染而住院治疗, 6 万-20 万儿童死亡^[2]。同时, RSV 也可导致老年人及免疫力低下者发病甚至死亡^[3]。在美国, 每年用于治疗

RSV 相关疾病的直接花销超过 10 亿美元, 而在发展中国家, 患儿则易因得不到及时救治而死亡^[4-5]。我国学者的研究表明, 因感染而住院治疗的婴儿, 人均治疗费用约为 571.8 美元^[6]。因此, RSV 感染在世界范围内带来了巨大的社会经济负担。

RSV 属于副黏病毒科肺病毒属, 病毒颗粒由

基金项目: “十二五”国家重大新药创制专项课题(2013ZX09103-003-011)

*通信作者。Tel: +86-10-51684080; E-mail: jshhe@bjtu.edu.cn

收稿日期: 2016-09-23; 修回日期: 2017-01-08; 网络出版日期: 2017-02-21

病毒包膜包裹核衣壳,核衣壳则由核蛋白和病毒基因组紧密结合而成,病毒基因组为 15.2 kb 的单股负链 RNA,携带 10 个亚基因组,编码 11 种蛋白,包括 3 种包膜糖蛋白(G、F 和 SH)、1 种基质蛋白(M)、2 种非结构蛋白(NS1 和 NS2)、1 种 RNA 调节因子(M2-2)以及 4 种在基因组的复制和转录过程起关键作用的核衣壳蛋白(N、P、L 和 M2-1)^[7-8]。大聚合酶蛋白(large polymerase protein, L)是 RSV 的 RNA 聚合酶,并且其能够为 mRNA 加帽和加尾。核蛋白(nucleoprotein, N)与病毒基因组 RNA 特异性结合形成核衣壳,其 C 末端区域可释放出来,与磷蛋白(phosphoprotein, P)的 C 末端相互作用暴露病毒基因组,在 P 蛋白的牵引下, L 蛋白得以结合 RSV 的基因组 RNA,开始病毒 mRNA 合成的过程。转录延长因子(M2 ORF 1 protein, M2-1)对于病毒基因组转录的起始不是必需的,但是它能够阻止在基因内部和基因间发生的转录终止现象,以形成完整的 mRNA 及各亚基因组 mRNA^[9]。因此, N、P、L 和 M2-1 蛋白是 RSV 复制必需的 4 种功能蛋白,又称聚合酶蛋白,在 RSV 的反向遗传学操作中,常被称为辅助蛋白(helper proteins)。

负链 RNA 病毒反向遗传学技术是通过构建并拯救病毒基因组或反基因组感染性 cDNA 克隆,获得感染性病毒。在拯救感染性 cDNA 以获得重组 RSV 时,需要利用某些细胞株(如 BSR T7/5 细胞^[10]或 BHK-T7 细胞^[11]等)或痘苗病毒安卡拉株(MVA-T7)^[12-14]提供 T7 RNA 聚合酶,特异性识别从感染性 cDNA 5'端侧翼插入的 T7 启动子,转录产生病毒的基因组或反基因组 RNA,并经转录产生的侧翼插入的锤头状核酶或丁型肝炎核酶(HDV ribozyme/HDV Rz)切割,得到具有准确末端的病毒基因组或反基因组 RNA。在由共转染的辅助蛋白质表达的 N、P、L 和 M2-1 四种辅助蛋

白的辅助下,像自然感染一样,完成 mRNA 转录、表达、基因组复制和包装等过程,产生重组病毒。因此,利用该技术和分子生物学技术的结合,使得改造或修饰 RSV 基因组及获得重组 RSV 成为现实^[15]。已有多个实验室通过该技术成功获得了重组 RSV,并成功应用于如减毒活疫苗开发和抗病毒药物筛选^[16-17]等领域。

RSV 微型基因组仅将 RSV 基因组的 3'端前导区(Leader)和 5'端尾随区(Trailer)保留,用编码报告基因的 cDNA 替换编码 RSV 病毒蛋白基因,并在编码报告基因的侧翼保留 RSV 的基因起始(GS, gene start)和基因终止(GE, gene end)序列^[18]。在微型基因组的 5'端侧翼插入 T7 启动子,3'端侧翼插入 T7 终止子,构建出微型基因组 cDNA 克隆。由于其结构相对简单,用于病毒基因组复制机制和抗病毒药物筛选等方面的研究具有很强的实用性^[19-20]。

如果微型基因组中含有两个 ORF,则称为双顺反子微型基因组,已用于 RSV 的基因间序列和 NS1 蛋白功能等的研究^[21-24],尚未见以 EGFP 作为报告基因,开展 RSV 双顺反子微型基因组拯救的相关研究。

对含有上、下游 2 个基因的双顺反子微型基因组来说,如果报告基因位于下游,那么 RSV 的 L 聚合酶在识别位于下游的报告基因的 GS 序列开始转录之前,需先完成上游基因的转录,在上游基因转录结束后,多数 L 聚合酶会识别上游基因的 GE 序列中的终止信号而终止转录,仅会有少量的 L 聚合酶因随机结合下游基因的 GS 序列开始报告基因的转录,使得下游报告基因的转录效率大大降低。因此双顺反子微型基因组更接近像 RSV 病毒等含有多个亚基因组的病毒基因组复制时的真实情况,可以更好的模拟病毒基因组进行拯救或病毒拯救中聚合酶蛋白或辅助蛋白的功能研究(图 1)。

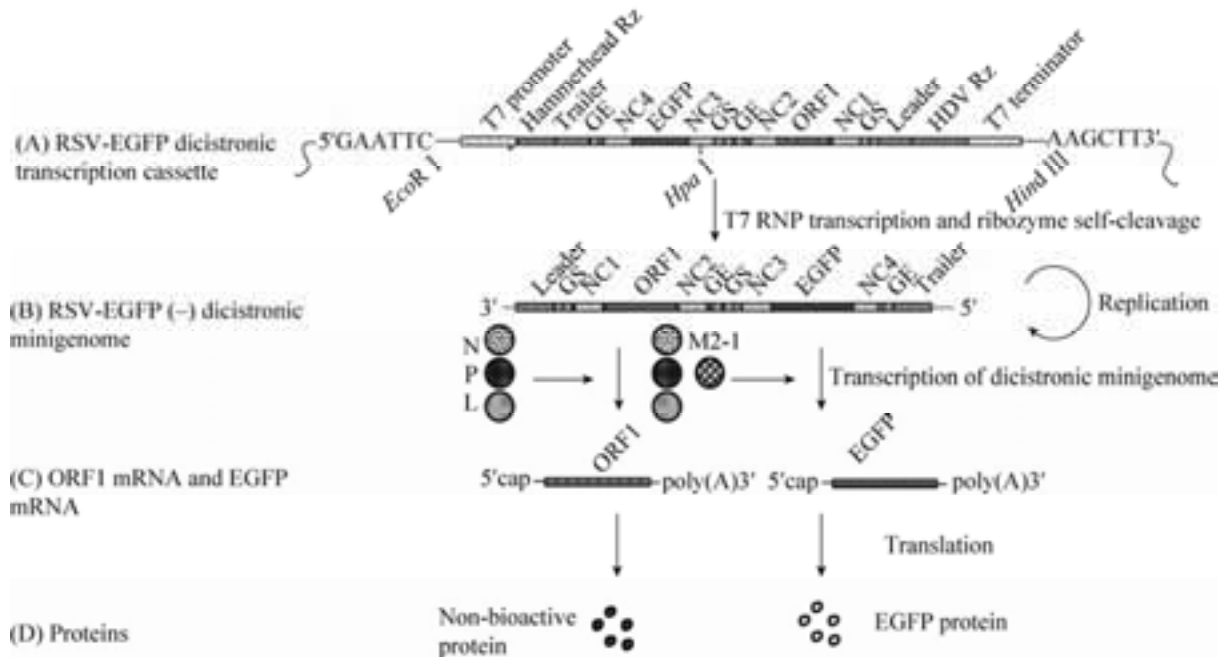


图 1. 人呼吸道合胞病毒双顺反子微型基因组拯救及表达原理示意图

Figure 1. Schematic diagram of rescue and expression of RSV dicistronic minigenome. A: structure of RSV-EGFP dicistronic transcription cassette. The synthesized transcription cassette includes cDNA of RSV-EGFP dicistronic minigenome and the flanking sequences of T7 promoter, Hammerhead Rz, HDV Rz and T7 terminator. The cDNA encoding RSV-EGFP dicistronic minigenome comprises leader region, GS (gene start sequence), NC1 (non-coding sequence of NS1 gene), ORF1 encoding nonfunctional pseudo-virus protein, NC2 (non-coding sequence of M gene), GE (gene end sequence), GS, NC3 (non-coding sequence of NS1 gene), EGFP gene, NC4 (non-coding sequence of L gene), GE and trailer region in 5' to 3' order; The encoding genes of EGFP and ORF1, respectively, in this transcription cassette are synthesized in reverse complementary copy; The cDNA encoding discistronic minigenome and the flanking ribozymes are transcribed by T7 RNP (T7 RNA polymerase). B: the resulting product of negative-sense RSV-EGFP dicistronic minigenome following the transfection of pBR322B-RSV-EGFP, plasmid encoding the transcription cassette, into BHK-T7 cells (not shown here) by T7 RNP. C: the transcribed mRNAs of ORF1 and EGFP by the co-transfected plasmids encoding helper proteins. D: the expressed nonfunctional pseudo-virus proteins and EGFP proteins.

本研究基于 T7 启动子表达系统、以 EGFP 为报告基因的单顺反子微型基因组研究^[25]，通过插入一个可表达无生物活性的、由 RSV NS1 和 M 部分基因序列组成的 ORF，获得以 EGFP 为报告基因的双顺反子微型基因组及其重组质粒，并分别与编码上述参与 RSV 复制的 4 种辅助蛋白的辅助质粒共转染至 BHK-T7 细胞，观察 EGFP 的表达并对 EGFP mRNA 转录水平进行定量分析，以期验证 4 种辅助蛋白在微型基因组拯救中的作用，尤其是 M2-1 抑制转录终止、促进亚基因组转录的

功能。本研究也将有助于提高重组 RSV 的拯救效率，为成功拯救重组 RSV 病毒积累实践经验。

1 材料和方法

1.1 质粒与细胞

质粒 pBR322B、pcDNA3.1-N-_{OPT}、pcDNA3.1-P-_{OPT}、pcDNA3.1-M2-1-_{OPT} 和 pcDNA3.1-L-_{OPT} 为本实验室保存。BHK-T7 细胞由中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所朱武洋教授馈赠。

1.2 实验试剂

质粒小提试剂盒和胶回收试剂盒均购自 Omega 公司, EndoFree Plasmid Mega Kits 购自 Qiagen 公司, 转染试剂 Lipo 2000 购自 Invitrogen 公司, T4 连接酶和 GoScript 反转录试剂盒购自 Promega 公司, 限制性内切酶购自 NEB 公司。PrimeSTAR 聚合酶和核酸电泳 Marker 均购自 TaKaRa 公司。DMEM 培养基以及 FBS (胎牛血清) 购自 Gibco 公司, 细胞培养用耗材均为 Corning 公司产品。SuperReal *q*PCR PreMix (SYBR Green) 试剂盒购自天根公司。

1.3 可表达 EGFP 的 RSV 双顺反子微型基因组 cDNA 的构建及鉴定

委托上海生工公司全基因合成编码 EGFP 的 RSV-EGFP 单顺反子微型基因组 cDNA, 从 5' 端至 3' 端分别是: 5'-T7 启动子-Hammerhead Rz (锤头核酶)-Trailer-GE(L)-NC4(L)-EGFP-NC3(NS1)-GS(NS1)-Leader-HDV Rz (丁型肝炎核酶)-T7 终止子-3', 并克隆至 pUC57 质粒, 其中 EGFP 基因为其编码基因的反向互补序列, 该重组质粒命名为 pUC57-RSV-EGFP。利用 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切位点将 RSV-EGFP 微型基因组 cDNA 克隆至载体 pBR322B 上获得重组质粒 pBR322B-RSV-EGFP。同时合成一段病毒假蛋白的基因序列 ORF1 cDNA, 以及在其 3' 端侧翼插入的 Leader、HDV Rz 序列和 T7 终止子, 并克隆至 pUC57 载体上获得重组质粒 pUC57-RSV-ORF1, 其中 ORF1 由 RSV 的 NS1 基因靠近病毒基因组 3' 端的一部分和

M 基因靠近病毒基因组 5' 端的一部分融合而成, 长度约为 1000 bp。该段基因组从 5' 端至 3' 端的顺序是: 5'-GE(M)-NC2(M)-ORF1(-)-NC1(NS1)-GS(NS1)-Leader-HDV Rz-T7 终止子-3', 其中 ORF1 基因为其编码基因的反向互补序列。利用 *Hpa* I 和 *Hind* III 于 37 °C 下双酶切 pUC57-RSV-ORF1 和 pBR322B-RSV-EGFP。体系如下: pUC57-RSV-ORF1/pBR322B-RSV-EGFP 10 μL; 10×CutSmart Buffer 5 μL; *Hpa* I 1 μL; *Hind* III 1 μL; ddH₂O 33 μL, 反应总体积 50 μL, 混匀, 37 °C 下温育 4 h。经连接、转化等, 获得质粒 pBR322B-RSV II-EGFP, 即含有可表达 EGFP 的 RSV 双顺反子微型基因组转录盒的质粒 (图 2)。送北京华大基因有限公司测序鉴定。

1.4 拯救 RSV 双顺反子微型基因组并检测 EGFP 基因的表达

转染前 1 d, 转 BHK-T7 细胞至 6 孔板, 次日, 待丰度为 80% 左右时, 换无血清培养液进行转染。加入 pBR322B-RSV II-EGFP 和仅缺少 M2-1 辅助质粒的转染孔为实验组 A, 加入 pBR322B-RSV II-EGFP 和包含 M2-1 的 4 种辅助质粒的转染孔为实验组 B, 其余为对照孔, 转染体系见表 1。37 °C 孵育, 转染后 24 h 和 48 h 在荧光显微镜下观察 EGFP 表达情况。

1.5 RT-*q*PCR 定量分析 RSV-EGFP 双顺反子基因组 EGFP 的转录水平

转染方法和转染体系参考 1.4 和表 1。转染后 24 h 使用 TRIzol 试剂提取细胞总 RNA, 按 Promega



图 2. RSV-EGFP 双顺反子微型基因组转录盒

Figure 2. Transcription cassette of RSV-EGFP dicistronic minigenome.

表 1. 多质粒共转染 BHK-T7 细胞拯救可表达 EGFP 的 RSV 双顺反子微型基因组

Table 1. Rescue of RSV dicistronic minigenome expressing EGFP by co-transfecting pBR322B-RSV II-EGFP and helper plasmids into BHK-T7 cells

Group	Plasmid/ μg					
	pcDNA3.1-N _{-OPT}	pcDNA3.1-P _{-OPT}	pcDNA3.1-L _{-OPT}	pcDNA3.1-M2-1 _{-OPT}	pBR322B-RSV II-EGFP	Transfection reagent/ μL
Experimental Group A	1	1	0.5	–	1.25	7.5
Experimental Group B	1	1	0.5	0.25	1.25	8.0
Control Group C	1	1	–	0.25	1.25	7.0
Control Group D	1	–	0.5	0.25	1.25	6.0
Control Group E	–	1	0.5	0.25	1.25	6.0
Control Group F	–	–	–	–	1.25	2.5

GoScript 反转录试剂盒说明进行 RT-PCR。设计扩增 EGFP mRNA 的 qPCR 引物 F1 (589–608 nt): 5'-CC CGACAACCACTACCTGAG-3'; R1 (705–686 nt): 5'-GTCCATGCCGAGAGTGATCC-3'。设计扩增 GAPDH mRNA 的内参引物: F0 (83–103 nt): 5'-AG GTCGGTGTGAACGGATTTG-3'; R0 (183–205 nt): 5'-TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA-3' (引物由北京华大基因有限公司合成)。设置 qPCR 体系: 1 个循环: 95 °C, 15 min; 40 个循环: 95 °C, 10 s, 60 °C, 20 s。

1.6 统计学分析

qPCR 结束后, 导出 C_t 值和 T_m 值等数据, 使用 2-($\Delta\Delta C_t$)法处理数据, 并通过双尾 T 检验进行统计分析。 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果和分析

2.1 全基因合成编码 EGFP 的 RSV-EGFP 单顺反子微型基因组 cDNA 及其重组质粒 pBR322B-RSV-EGFP 的构建和鉴定

以 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切 pUC57-RSV-EGFP 和 pBR322B 质粒, 经连接、转化及质粒提取, 获得 pBR322B-RSV-EGFP。用 *Bgl* II 和 *Hpa* I 双酶切鉴定 pBR322B-RSV-EGFP, 得到 4748 bp 和 749 bp 的 2 条特异性条带, 条带大小与预期一致(图 3-A)。

阳性克隆经测序后证实。

2.2 编码 EGFP 的 RSV 双顺反子微型基因组质粒 pBR322B-RSV II-EGFP 的构建及鉴定

以 *Hpa* I 和 *Hind* III 双酶切 pUC57-RSV-ORF1 和 pBR322B-RSV-EGFP, 经连接、转化及质粒提取, 获得 pBR322B-RSV II-EGFP。经 *Hpa* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定, 分别产生 5197 bp 的条带以及 1013 bp 的条带, 各条带大小与预期一致(图 3-B)。阳性克隆经测序后证实。

2.3 可表达 EGFP 的双顺反子微型基因组的拯救及荧光表达

为了解 4 种辅助蛋白与 RSV 双顺反子微型基因组中 EGFP 表达之间的关系, 我们将 RSV 微型基因组质粒与 4 种辅助质粒进行共转染, 并与仅缺少 1 种辅助质粒的共转染组开展比较研究。实验结果显示, 在转染后 24 h, pBR322B-RSV II-EGFP 与仅缺少 M2-1 辅助质粒的实验组出现极少量微弱荧光, pBR322B-RSV II-EGFP 与包含 M2-1 的 4 种辅助质粒的实验组出现大量荧光, 其余各组均未观察到荧光; 在转染后 48 h, pBR322B-RSV II-EGFP 与仅缺少 M2-1 辅助质粒的共转孔中荧光表达数量未观察到明显变化, pBR322B-RSV II-EGFP 与包含 M2-1 的 4 种辅助质粒共转孔中的荧光表达数量持续增多, 其余各组仍未观察到荧光(图 4)。

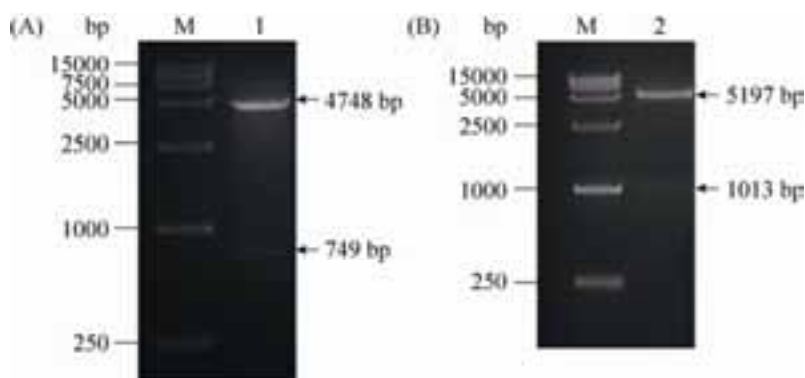


图 3. pBR322B-RSV-EGFP 和 pBR322B-RSV II-EGFP 质粒的酶切鉴定

Figure 3. pBR322B-RSV-EGFP and pBR322B-RSV II-EGFP identified by restriction endonuclease analysis. M: DL15000 marker; lane 1: pBR322B-RSV-EGFP digested by *Bgl* II and *Hpa* I; lane 2: pBR322B-RSV II-EGFP digested by *Hpa* I and *Hind* III.

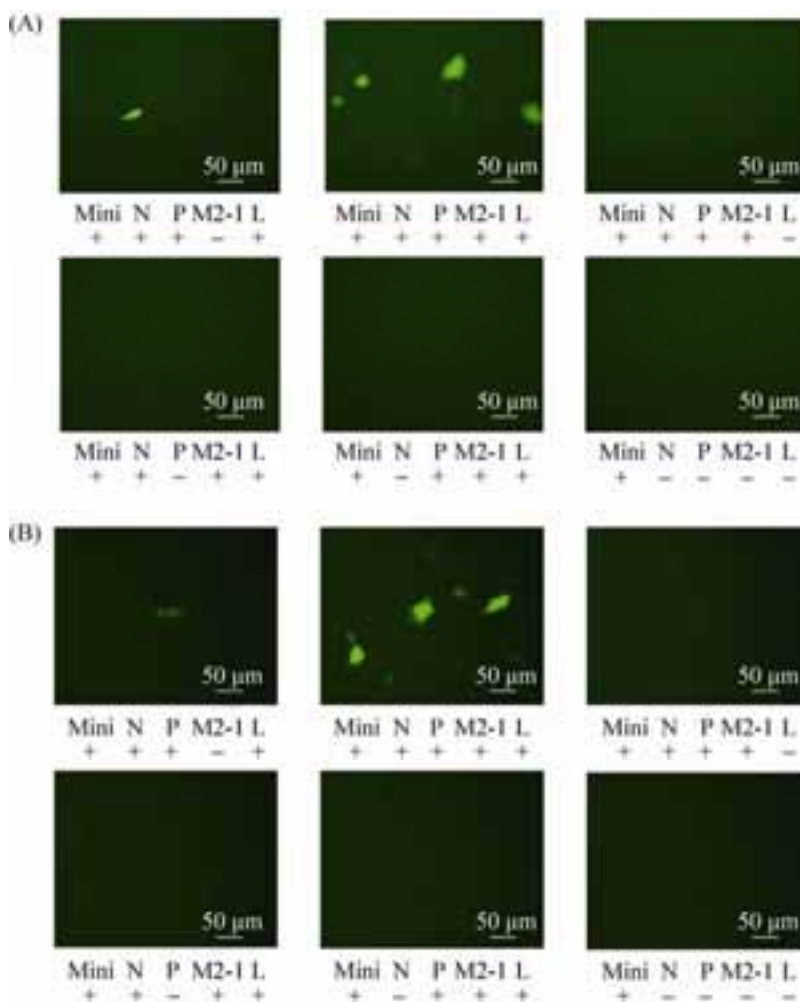


图 4. RSV 双顺反子微型基因组的拯救与 EGFP 的表达(转染后 24 h 和 48 h)

Figure 4. EGFP expressed by co-transfecting RSV dicistronic minigenome plasmid and helper plasmids in BHK-T7 cells at 24 h (A) and 48 h (B) post co-transfection, respectively (NIKON ECLIPSE TE 2000-S $\times 400$). Mini representing minigenome, N, P, M2-1 and L representing helper plasmids encoding N, P, M2-1 and L proteins, respectively.

从以上结果可以看出, 表达 N、P 和 L 蛋白的辅助质粒在双顺反子微型基因组拯救过程中是不可缺少的。而缺少 M2-1 蛋白的辅助质粒, EGFP 可以表达, 但相对于包含 M2-1 的 4 种辅助质粒的实验组, 其表达效率大幅降低。

2.4 RT-qPCR 定量检测 EGFP mRNA 水平

为了进一步分析 M2-1 蛋白对顺反子微型基因组中 EGFP 表达水平的影响, 在上述实验的基础上, 我们利用 RT-qPCR 检测了双顺反子微型基因组 EGFP mRNA 的水平。实验结果显示, pBR322B-RSV-EGFP 与仅缺少 M2-1 的 3 种辅助质粒共转染的细胞中 EGFP mRNA 的表达量显著低于含 M2-1 的 4 种辅助蛋白质质粒共转染组 ($P < 0.05$) (图 5)。因此, 从转录水平的分析表明 M2-1 蛋白确有促进转录的作用, 该功能对 RSV 等含有多个亚基因组的病毒, 顺利实现多个基因连续转录具有重要作用。

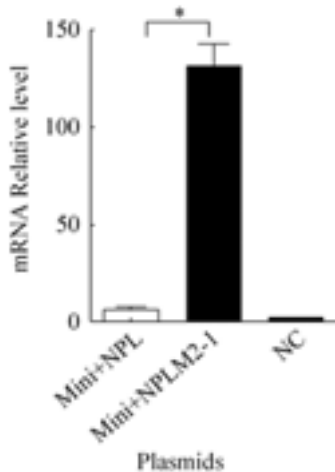


图 5. RSV-EGFP 双顺反子微型基因组的拯救与 EGFP mRNA 转录水平(转染后 48 h)

Figure 5. mRNA level of EGFP by co-transfecting RSV-EGFP dicistronic minigenome plamid and helper plasmids in BHK-T7 cells at 48 h post co-transfection. Mini: minigenome; N, P, M2-1 and L: helper plasmids encoding N, P, M2-1 and L proteins, respectively; NC: negative control group. *: $P < 0.05$.

3 讨论

本研究通过构建基于 T7 启动子表达系统、以 EGFP 为报告基因的 RSV 双顺反子微型基因组质粒, 并与编码 4 种辅助蛋白的质粒开展了双顺反子微型基因组拯救及 EGFP 表达水平研究, 发现以 EGFP 为报告基因的 RSV 双顺反子微型基因组, 可方便用于辅助蛋白在 RSV 拯救中的功能研究, 如 M2-1 蛋白的抑制转录终止和促进亚基因组转录的功能。

RSV 的 L 聚合酶通过基因组 3' 端的控制基因组转录和复制的前导区——Leader 序列引导与基因组结合, 启动转录或复制, 然后识别每个基因前后的 GS 和 GE 序列, 逐个转录 RSV 病毒多个亚基因组产生 mRNA 进而翻译表达。虽然 N、P 和 L 三种蛋白配合启动了转录, 但是完成 1 个亚基因组的转录后, L 聚合酶通过识别存在于亚基因组下游的 GE 中的转录终止信号, 会终止转录并脱离基因组。M2-1 蛋白是 RSV 的转录延长因子, 它的作用是抑制这种转录终止, 促进 L 蛋白与基因组的结合, 使转录能够稳定地持续下去, 使各亚基因组的 mRNA 能被连续地转录出来^[13]。

我们曾经在单顺反子微型基因组的拯救实验中观察到转染体系中缺少表达 M2-1 蛋白的质粒时, 拯救是可以成功的, 但是拯救效率相对于五质粒共转染的情况有所下降。由于双顺反子微型基因组更贴近于 RSV 基因组的真实情况, 如果把报告基因置于 3' 端 Leader 序列的远端, 如本研究中的 EGFP ORF 位于一个编码无功能的病毒假蛋白 ORF 的下游, 会把该下游亚基因组对 M2-1 蛋白的依赖性表现得更为突出, 拯救效率下降的现象会更明显, 因此我们构建了双顺反子微型基因

组克隆。

结果表明, 当使用双顺反子微型基因组质粒与4种辅助质粒共转染时, EGFP 荧光表达比较高, 而缺少表达 M2-1 蛋白的辅助质粒时, 仅能观察到少量较暗的荧光, 而且 EGFP mRNA 的转录水平明显降低, 与4种质粒共转染相比, 差异具有显著性。这提示双顺反子微型基因组在缺少 M2-1 蛋白的情况下, L 蛋白确实可以转录到达第2个 ORF 区, 但转录水平大大降低。

Fearns 和 Collins 等曾使用 Northern blot 的方法对 M2-1 的功能从转录水平上进行过研究。他们发现, M2-1 蛋白的促进转录的作用可以分为两个方面, 即转录终止抑制(transcriptional antitermination)^[22]和转录延长(transcriptional elongation)^[9]。

转录终止抑制作用主要体现在 M2-1 蛋白使得 L 聚合酶识别 GE 的转录终止信号后能够继续转录下游基因, 这是一种基因间的终止抑制作用; 转录延长作用主要体现在 M2-1 防止 L 聚合酶在基因内部的转录过程中提前终止(基因长度越长, 转录在基因内部终止的可能性越大), 这是一种基因内部的终止抑制作用。对于包含2个 ORF 双顺反子微型基因组, M2-1 不仅要抑制双顺反子微型基因组基因内部的转录终止还要抑制其基因间的转录终止以保证 L 聚合酶能转录下游基因, 因此如果缺少 M2-1, 完整转录双顺反子微型基因组的下游报告基因是非常困难的。

本实验用携带 EGFP 报告基因的双顺反子微型基因组, 从蛋白翻译和 mRNA 转录水平验证了辅助蛋白、尤其是 M2-1 在拯救过程中的重要作用, 所构建的双顺反子微型基因组可进一步应用于 RSV 病毒基因组转录和复制机制的研究, 并可作为重组 RSV 拯救条件的优化提供帮助。

参考文献

- [1] Collins PL, Graham BS. Viral and host factors in human respiratory syncytial virus pathogenesis. *Journal of Virology*, 2008, 82(5): 2040–2055.
- [2] Nair H, Nokes DJ, Gessner BD, Dherani M, Madhi SA, Singleton RJ, O'Brien KL, Roca A, Wright PF, Bruce N, Chandran A, Theodoratou E, Sutanto A, Sedyaningsih ER, Ngama M, Munywoki PK, Kartasasmita C, Simões EA, Rudan I, Weber MW, Campbell H. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet*, 2010, 375(9725): 1545–1555.
- [3] Falsey AR. Respiratory syncytial virus infection in elderly and high-risk adults. *Experimental Lung Research*, 2005, 31 Suppl 1: 77.
- [4] Johnson TR, Rangel D, Graham BS, Brough DE, Gall JG. Genetic vaccine for respiratory syncytial virus provides protection without disease potentiation. *Molecular Therapy*, 2014, 22(1): 196–205.
- [5] Rodriguez R, Ramilo O. Respiratory syncytial virus: how, why and what to do. *Journal of Infection*, 2014, 68: S115–S118.
- [6] Zhang T, Zhu Q, Zhang X, Ding Y, Steinhoff M, Black S, Zhao G. Clinical characteristics and direct medical cost of respiratory syncytial virus infection in children hospitalized in Suzhou, China. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 2014, 33(4): 337–341.
- [7] Collins PL, Melero JA. Progress in understanding and controlling respiratory syncytial virus: still crazy after all these years. *Virus Research*, 2011, 162(1/2): 80–99.
- [8] Yu Q, Hardy RW, Wertz GW. Functional cDNA clones of the human respiratory syncytial (RS) virus N, P, and L proteins support replication of RS virus genomic RNA analogs and define minimal trans-acting requirements for RNA replication. *Journal of Virology*, 1995, 69(4): 2412–2419.
- [9] Collins PL, Hill MG, Cristina J, Grosfeld H. Transcription elongation factor of respiratory syncytial virus, a nonsegmented negative-strand RNA virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93(1): 81–85.
- [10] Hotard AL, Shaikh FY, Lee S, Yan D, Teng MN, Plemper RK, Crowe JE Jr, Moore ML. A stabilized respiratory syncytial virus reverse genetics system amenable to recombination-mediated

- mutagenesis. *Virology*, 2012, 434(1): 129–136.
- [11] Olivo PD, Collins PL, Peeples ME, Schlesinger S. Detection and quantitation of human respiratory syncytial virus (RSV) using minigenome cDNA and a Sindbis virus replicon: a prototype assay for negative-strand RNA viruses. *Virology*, 1998, 251(1): 198–205.
- [12] Bukreyev A, Camargo E, Collins PL. Recovery of infectious respiratory syncytial virus expressing an additional, foreign gene. *Journal of Virology*, 1996, 70(10): 6634–6641.
- [13] Collins PL, Hill MG, Camargo E, Grosfeld H, Chanock RM, Murphy BR. Production of infectious human respiratory syncytial virus from cloned cDNA confirms an essential role for the transcription elongation factor from the 5' proximal open reading frame of the M2 mRNA in gene expression and provides a capability for vaccine development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995, 92(25): 11563–11567.
- [14] Yunus AS, Khattar SK, Collins PL, Samal SK. Rescue of bovine respiratory syncytial virus from cloned cDNA: entire genome sequence of BRSV strain A51908. *Virus Genes*, 2001, 23(2): 157–164.
- [15] Walpita P, Flick R. Reverse genetics of negative-stranded RNA viruses: a global perspective. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, 244(1): 9–18.
- [16] Karron RA, Wright PF, Belshe RB, Thumar B, Casey R, Newman F, Polack FP, Randolph VB, Deatly A, Hackell J, Gruber W, Murphy BR, Collins PL. Identification of a recombinant live attenuated respiratory syncytial virus vaccine candidate that is highly attenuated in infants. *The Journal of Infectious Diseases*, 2005, 191(7): 1093–1104.
- [17] Rameix-Welti MA, Le Goffic R, Hervé PL, Sourimant J, Rémot A, Riffault S, Yu Q, Galloux M, Gault E, Eléouët JF. Visualizing the replication of respiratory syncytial virus in cells and in living mice. *Nature Communications*, 2014, 5: 5104.
- [18] Collins PL, Mink MA, Stec DS. Rescue of synthetic analogs of respiratory syncytial virus genomic RNA and effect of truncations and mutations on the expression of a foreign reporter gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1991, 88(21): 9663–9667.
- [19] Khattar SK, Yunus AS, Collins PL, Samal SK. Deletion and substitution analysis defines regions and residues within the phosphoprotein of bovine respiratory syncytial virus that affect transcription, RNA replication, and interaction with the nucleoprotein. *Virology*, 2001, 285(2): 253–269.
- [20] Noton SL, Cowton VM, Zack CR, McGivern DR, Fearn R. Evidence that the polymerase of respiratory syncytial virus initiates RNA replication in a nontemplated fashion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(22): 10226–10231.
- [21] Atreya PL, Peeples ME, Collins PL. The NS1 protein of human respiratory syncytial virus is a potent inhibitor of minigenome transcription and RNA replication. *Journal of Virology*, 1998, 72(2): 1452–1461.
- [22] Fearn R, Collins PL. Role of the M2-1 transcription antitermination protein of respiratory syncytial virus in sequential transcription. *Journal of Virology*, 1999, 73(7): 5852–5864.
- [23] Kuo L, Fearn R, Collins PL. The structurally diverse intergenic regions of respiratory syncytial virus do not modulate sequential transcription by a dicistronic minigenome. *Journal of Virology*, 1996, 70(9): 6143–6150.
- [24] Kuo L, Grosfeld H, Cristina J, Hill MG, Collins PL. Effects of mutations in the gene-start and gene-end sequence motifs on transcription of monocistronic and dicistronic minigenomes of respiratory syncytial virus. *Journal of Virology*, 1996, 70(10): 6892–6901.
- [25] Yuan R, Fu YH, He JS, Jiao YY, Jiang GY, Zhang M, Peng XL, Kan XT. Rescue of the minigenome of human respiratory syncytial virus based on T7 promoter expression system. *China Biotechnology*, 2013, 33(9): 1–9. (in Chinese)
袁锐, 付远辉, 何金生, 焦月盈, 蒋桂云, 张梅, 彭向雷, 阚学通. 基于T7启动子表达系统的呼吸道合胞病毒微型基因组的拯救. *中国生物工程杂志*, 2013, 33(9): 1–9.

Construction and application of dicistronic minigenome of human respiratory syncytial virus

Yuanbo Zheng, Xiujuan Zhang, Min Xu, Nan Jiang, Xianglei Peng, Yuanhui Fu, Yanpeng Zheng, Tao Hong, Jinsheng He*

College of Life Sciences & Bioengineering, Beijing Jiaotong University, Beijing 100044, China

Abstract: [Objective] To clarify the role of nucleocapsid/polymerase proteins or helper proteins of human respiratory syncytial virus (RSV) in rescuing recombinant RSV, plasmids of RSV dicistronic minigenome encoding enhanced green fluorescent protein (EGFP) gene was constructed and rescued. [Methods] Based on the methods of gene synthesis and molecular cloning, RSV monocistronic minigenome plasmids, pUC57-RSV-EGFP encoding EGFP and pUC57-RSV-ORF1 encoding pseudo-virus protein, were constructed. Then, RSV dicistronic minigenome was further cloned through these two monocistronic minigenome plasmids and pBR322B vector, and identified by the analyses of restriction endonuclease and nucleotide acid sequence. Following co-transfecting helper plasmids to BHK-T7 cells together with RSV dicistronic minigenome plasmid, the function of helper proteins was evaluated based on the transcribed EGFP mRNA by real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) and the expressed EGFP by fluorescent microscope. [Results] The recombinant plasmid of RSV dicistronic minigenome encoding EGFP gene and driven by T7 promoter, pBR322B-RSV II -EGFP, was constructed successfully. The differential expressions of EGFP both transcriptionally and translationally occurred following the dicistronic minigenome rescued by different combinations of the helper plasmids, which showed the helper proteins functioned differently in the replication of RSV. [Conclusion] The constructed RSV dicistronic minigenome containing EGFP gene is a useful tool for function analysis of the helper proteins, and the M2-1 protein, capable of elongating the transcription, is confirmed.

Keywords: human respiratory syncytial virus, dicistronic, minigenome, helper proteins

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Major Scientific and Technological Special Project for "Significant New Drugs Development" during the Twelfth Five-year Plan Period (2013ZX09103-003-011)

*Corresponding author. Tel: +86-10-51684080; E-mail: jshhe@bjtu.edu.cn

Received: 23 September 2016; Revised: 8 January 2017; Published online: 21 February 2017