

人呼吸道合胞病毒微型复制子的构建

唐倩^{1,2}, 虞结梅^{1,3}, 何金生^{1,2*}, 张梅¹, 魏薇¹, 付远辉², 郑嫻嫻¹, 王小波¹, 张莹², 洪涛^{2,3}

(¹安徽医科大学免疫学教研室, 合肥 230032)

(²北京交通大学生命科学与生物工程研究院, 北京 100044)

(³中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所, 北京 100052)

摘要 【目的】构建 RSV 微型复制子(minireplicon)并进行功能学研究。【方法】构建含 RSV 病毒前导序列(Leader ,genomic promoter ,Le)、转录起始信号(gene start ,GS)、多克隆酶切位点、转录终止信号(gene end ,GE)和尾随序列(Trailer ,antigenomic promoter ,Tr)的基因片段 GSGE ,通过引入 T7 RNA 多聚酶(T7 RNA polymerase ,T7 RNP)启动子、克隆入载体 px8 δ T 和插入增强型绿色荧光蛋白(Enhanced Green Fluorescent Protein ,EGFP)等多步操作,获得 RSV 微型复制子重组质粒 px8 δ T/GSGE1/EGFP 和 px8 δ T/GSGE2/EGFP。同时构建可表达大蛋白(large protein ,L)的质粒 pcDNA3.1/L 及表达转录延长/转录终止抑制因子(M2 ORF 1 protein ,M2-1)的质粒 pcDNA3.1/M2-1。通过脂质体法共转染 RSV 微型复制子质粒及四种 RSV 核壳体蛋白质粒至可表达 T7 RNP 的 BSR T7/5 细胞系,倒置荧光显微镜及流式细胞仪分析 EGFP 的表达情况。【结果】成功构建了 px8 δ T/GSGE1/EGFP 和 px8 δ T/GSGE2/EGFP 及 pcDNA3.1/L 和 pcDNA3.1/M2-1,五质粒共转染 BSR T7/5 细胞,倒置荧光显微镜及流式细胞仪均观察到绿色荧光的表达。【结论】构建的 RSV 微型复制子具有转录和复制功能,将有助于进一步开展以 RSV 反向遗传操作为基础的 RSV 疫苗研发及药物筛选。

关键词: 人呼吸道合胞病毒; 微型复制子; 增强型绿色荧光蛋白

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2009)08-1048-07

人呼吸道合胞病毒(Human Respiratory Syncytial Virus ,RSV)为非节段负链 RNA 包膜病毒,属于副粘病毒科肺炎病毒属,是导致婴幼儿、老年人及免疫力低下者病毒性呼吸道疾病的重要病原体,可引起感冒、支气管炎、肺炎等疾病,严重者可导致死亡^[1-2]。由于 RSV 体外培养效果较差且不稳定,作为 RNA 病毒,在分子生物学操作上也存在很多困难,限制了 RSV 研究的深入开展, RNA 病毒反向遗传学操作技术的出现,大大推动了 RSV 病毒的基础和临床应用研究。该技术是通过构建 RSV 感染性的 cDNA 克隆,经转染可提供 RSV 复制所必须的全部蛋白的细胞,通过拯救,获得感染性 RSV 的方法。利用这种

方法,我们可以在 DNA 水平上对 RSV 进行体外操作,以开展 RSV 结构和功能的基础和应用研究。一种被广泛应用的 RSV 反向遗传学系统是微型复制子(minireplicon),以短的 cDNA 编码 RSV 的基因组或反基因 RNA,缺失部分或全部的病毒基因组并替换为编码虫荧光素酶等标记蛋白的基因。当由共转染的质粒提供 RSV 复制及转录必须的病毒蛋白时,微型复制子能完成转录、复制及包装的过程。由于该复制子体积小且结构简单可方便的用于对具有顺式作用的 RNA 信号或反式作用的蛋白质的突变分析,也可用于对病毒具有强烈或致死性作用的突变分析^[3]。构建微型复制子也为我们进一步开展以反

基金项目: 北京交通大学科技基金资助项目(2007RC006)

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

作者简介: 唐倩(1982 -) ,女,安徽霍邱人,硕士研究生,从事人呼吸道合胞病毒反向遗传学研究。 E-mail : eva4662tq@163.com

收稿日期: 2009-03-06 ; 修回日期: 2009-04-30

向遗传学为基础的 RSV 减毒活疫苗研发及药物筛选奠定基础。

我们构建的 RSV 病毒微型复制子重组质粒是以报告基因 EGFP 替换 RSV 的全部基因,仅保留 RSV 复制、转录必须的前导(Leader, Le)尾随(Trailer, Tr)序列及基因起始信号(Gene start, GS)和基因终止信号(Gene end, GE),并以 T7 启动子实现微型复制子的转录,同时构建可分别表达 RSV 合成必需的核蛋白(nucleoprotein, N)、磷蛋白(phosphoprotein, P)、L、M2-1 四种核壳体蛋白的质粒,五种质粒共转染至 BSR T7/5 细胞,通过荧光显微镜及流式细胞仪分别观察和分析 EGFP 的表达情况,以用于研究 RSV 微型复制子的转录和复制功能及构建的 N、P、L、M2-1 四质粒在微型复制子的转录和复制过程中的生物学活性。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系、病毒株和质粒:人喉癌 HEp-2 细胞系、COS-7 细胞系由本实验室保种;px8 δ T 质粒和表达 T7 RNP 的 BSR T7/5 细胞系由德国慕尼黑大学基因中心 Max von Pettenkofer 研究所 K. Conzelmann 教授馈赠;RSV 毒株(A 亚型 Long 株)为首都儿科研究所钱渊教授馈赠;pcDNA3.1/N、pcDNA3.1/P 由本实验构建保存^[4]。

1.1.2 主要试剂和仪器:T4DNA 连接酶,PCR 片段回收试剂盒,质粒提取及纯化试剂盒,Taq 和 Pfu 聚合酶购自 Promega 公司,逆转录试剂盒和脂质体转染试剂盒 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司,倒置荧光显微镜为日本 NIKON 公司产品,流式细胞仪为美国 BD 公司产品;引物合成及 DNA 测序为上海博亚公司和上海生工生物工程技术有限公司完成。羊抗 RSV 多抗购自 Chemicon 公司,鼠抗羊-HRP 购自 Santa Cruz 公司,蛋白 Marker 为 MBI 公司产品,硝酸纤维素膜为 Amersham 公司产品,ECL 检测试剂盒购自 Pierce 公司。

1.2 人工合成 GSGE 基因片段

根据文献报道的 RSV 基因组结构及核酸序列,按照 Le-GS-multiple cloning sites-GE-Tr 的顺序,设计 GSGE 片段,并由上海博亚公司全基因合成 5'-ACG-CGAAAAAATGCGTACAACAACTTGCATAAACCAA-AAAAATGGGGCAAATGAATCC GCTAGCAG GATATC-GCTAGCAG CTGAGTA CTGCAGAGTTATTAAAAAAT-GAGAAAAAAGTGTGAAAACTAATATCTCGTAAT-

TTAGTTAATACACAT-3' 其中下划线部分分别为 GS 和 GE 序列,GS 上游为 Le 序列,GE 下游为 Tr 序列,大写及斜体字体为常用限制性内切酶酶切位点,从 5'到 3'末端依次为 *Nhe* I、*Eco*R V、*Sal* I、*Xho*I 和 *Pst* I。

1.3 PCR 法合成编码 RSV 基因组及反基因组的微型复制子

根据 GSGE 的核苷酸序列,分别设计并合成 2 对引物以扩增编码 RSV 基因组的 GSGE1 和编码 RSV 反基因组的 GSGE2。GSGE1F:5'-CCCAAGCTT-GGTAATACGACTCACTATAGGGACGCGAAAAAAT-GCGTAC-3';GSGE1R:5'-ACGAGAAAAAAGTGTCA-AAAACTAATATCTCG-3';GSGE2F:5'-ACGCGAAAAAATGCGTACAACAACTTGCAT-3';GSGE2R:5'-CC-CAAGCTTGGTAATACGACTCACTATAGGGACGAG-AAAAAAGTGTGTC-3'引物 GSGE1 的上游和 GSGE2 的下游均引入限制性内切酶 *Hind* III 酶切位点,同时在酶切位点后加入 T7 启动子序列(下划线部分所示),引物由上海博亚公司合成。

1.4 RT-PCR 法克隆 RSV 两种核壳体蛋白 L 和 M2-1

根据 GenBank 中公布的 RSV L 和 M2-1 的基因序列设计引物,引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。L 基因分四段扩增,4 对引物如下表所示:

Primer	Sequence(5'→3')
L1F nt1-30	GCGGCCGATGGATCCCAATATAATGGA
L1R nt2510-2473	CTCGAGCCAACCCATGGCTAGCAAATAATCTGCTTG
L2F nt2511-2535	GCGTGGCTAGCATTAAATAGCCTT
L2R nt3792-3767	ACCAACCCATGGTTAGTGGTCTT
L3F nt3793-3818	CCAATGGTTGGTTCATCTACACAAG
L3R nt5334-5313	TCTATCGATCACAACCGTAGG
L4F nt5335-5257	ATCGATAGAAATATAGATCAIT
L4R nt6498-6469	GCCCGCCTCGAGTTATTCATTATGAAAG

在 L1 上游引物 5'端和 L4 下游引物的 5'端中分别引入 *Not* I 及 *Xho* I 酶切位点。其余各引物的 5'端均含有来自 L 基因内部的酶切位点,分别为 *Nhe* I、*Nco* I、*Clu* I。

M2-1 基因的扩增使用了 1 对引物,为:M2-1F:nt1-29,5'-AAGCTTATGTACGAAGGAATCCTTGCAA-3',M2-1R:nt585-570,5'-GAGCTCTCAGGTAGTATCATTATTT-3'。上下游引物中分别引入 *Hind* III 和 *Xho* I 酶切位点。

1.5 GSGE1、GSGE2 和 L、M2-1 的扩增

以 GSGE 片段为模板和 GSGE1 及 GSGE2 的两

对引物及对半量的 Taq 和 Pfu 聚合酶进行 PCR 扩增 GSGE1 和 GSGE2, PCR 产物的纯化按 Promega 公司的试剂盒说明书进行操作, 纯化产物保存 -20℃ 冰箱备用。

以逆转录试剂盒的 oligo dT 为引物, 按说明书进行反转录, 以反转录得到的 cDNA 为模板和 L 基因的各段引物及 M2-1 基因的特异引物及对半量的 Taq 和 PfuDNA 聚合酶进行 PCR 扩增, PCR 产物的纯化按 Promega 公司的试剂盒说明书进行操作。

1.6 px8δT/GSGE1/EGFP、px8δT/GSGE2/EGFP 和 pcDNA3.1/L、pcDNA3.1/M2-1 的构建及鉴定

将扩增得到的 GSGE1 和 GSGE2 与经 Hind III 和 Sma I 消化处理的 px8δT(含有 HDV 核酶及 T7 RNA 聚合酶转录终止信号序列)载体连接, 转化大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5α 感受态细菌, 挑取克隆, 提取质粒后用 Xba I 和 Xho I 双酶切鉴定重组质粒, 送上海博亚公司测序, 鉴定成功的克隆命名为 px8δT/GSGE1 和 px8δT/GSGE2。根据本实验室保存的 pcDNA3.1(+)EGFP 质粒的酶切位点, 用 Nhe I 和 Xho I 双酶切, 并回收 EGFP 片段, 分别与经 Nhe I 和 Xho I 酶切消化的 px8δT/GSGE1 和 px8δT/GSGE2 连接, 转化, 提取质粒, 经 Hind III 和 Xho I 双酶切鉴定重组质粒, 将得到的重组质粒命名为 px8δT/GSGE1/EGFP 和 px8δT/GSGE2/EGFP。

将扩增得到的 4 段 L 基因和 M2-1 基因分别与 pGEM-T easy 连接, 转化 *E. coli* DH5α, 通过蓝白斑筛选, 选取疑似的阳性克隆, 提取质粒后均用上下游酶切位点进行鉴定, 鉴定正确后, 命名为 pGEM-T/L1、pGEM-T/L2、pGEM-T/L3、pGEM-T/L4、pGEM-T/M2-1。由上海生工生物技术有限公司完成测序, 测序正确后, 利用 L 基因的内部酶切位点, 将 L 基因正确拼接, 获得克隆有 L 基因的重组 pGEM-T 载体, 命名为 pGEM-T/L, 用 Not I 和 Xho I 分别消化处理 pGEM-T/L 及 pcDNA3.1(+)载体, 连接、转化, 小提质粒, 用 Not I 和 Xho I 鉴定。将 pGEM-T/M2-1 及 pcDNA3.1(+)分别用 Hind III 和 Xho I 酶切处理, 并进行连接, 转化, 小提质粒, 用 Hind III 和 Xho I 鉴定。将得到的重组质粒分别命名为 pcDNA3.1/L 和 pcDNA3.1/M2-1。

1.7 RT-PCR 分析目的基因 pcDNA3.1/L, pcDNA3.1/M2-1 的转录

PEG8000 方法大量提取质粒 pcDNA3.1/L/pcDNA3.1/M2-1。常规培养 COS-7 细胞, 待细胞丰富度为 70% ~ 80% 时, 按说明书用脂质体 Lipofectamine

2000 分别进行转染, 转染 72 h 后, 用 Trizol 试剂常规提取转染细胞的总 RNA, 进行 RT-PCR 分析目的基因转录。L 及 M2-1 基因的 RT-PCR 引物分别为 1.4 中的 PCR 引物 L2 和 M2-1。用 pcDNA3.1/L 和 pcDNA3.1/M2-1 分别转染细胞获得的总 RNA 为样品直接进行 PCR 作阴性对照。

1.8 px8δT/GSGE1/EGFP、px8δT/GSGE2/EGFP 和四种 RSV 核壳体蛋白质共转染 BSR T7/5 细胞及 EGFP 表达分析

PEG8000 方法大量提取质粒 px8δT/GSGE1/EGFP、px8δT/GSGE2/EGFP 和 pcDNA3.1/N、pcDNA3.1/P。DMEM 常规培养表达 T7 RNA 聚合酶的 BSR T7/5 细胞, 待细胞丰富度为 80% ~ 90% 时, 按说明书用脂质体 Lipofectamine 2000 进行转染。其中单转染 6 μg px8δT/GSGE1/EGFP 为阳性对照, 单转染 6 μg px8δT/GSGE2/EGFP 为阴性对照, 实验组为五质粒共转染, 包括 6 μg px8δT/EGFP/GSGE2、4 μg pcDNA3.1/N、4 μg pcDNA3.1/P、2 μg pcDNA3.1/L、2 μg pcDNA3.1/M2-1, 转染 56 h 后在倒置显微镜下观察 EGFP 的表达情况。消化转染细胞, 低速离心, PBS 悬浮细胞, 通过流式细胞仪分析表达 EGFP 的细胞。

2 结果和分析

2.1 GSGE1 和 GSGE2 基因片段的扩增

以合成的 GSGE 片段为模板, 用两对上下游分别带有 T7 启动子的特异性引物, 进行 PCR 扩增。取 PCR 产物 5 μL 行琼脂糖凝胶电泳可见一 180 bp 的 DNA 条带, 与预期值相符合。

2.2 px8δT/GSGE1、px8δT/GSGE2 和 pGEM-T/L、pGEM-T/M2-1 基因序列分析

将 GSGE1 和 GSGE2 基因克隆进载体 px8δT, 酶切鉴定后送至上海博亚公司进行序列测定, 测序结果显示, GSGE1 的 Tr 缺失了最后一个碱基, GSGE2 的 Le 缺失了第一个碱基。本实验中 GSGE1 仅用于 T7 RNA 聚合酶介导的转录分析, 因此缺失的碱基对结果不会产生重要影响。资料也表明, GSGE2 缺失的碱基不是 Le 的保守碱基^[5]。

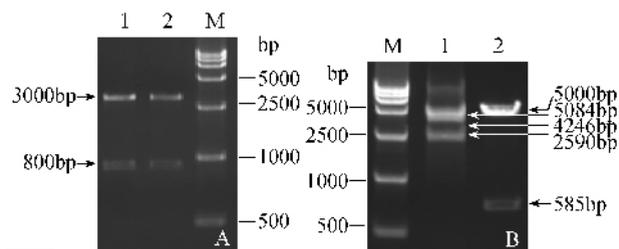
取 pGEM-T 载体与 L1、L2、L3、L4、M2-1 基因连接获得的重组质粒, 分别用 Not I 和 Nhe I、Nhe I 和 Nco I、Nco I 和 Cla I、Cla I 和 Xho I、Hind III 和 Xho I 进行双酶切鉴定。结果表明成功获得重组质粒 pGEM-T/L1, pGEM-T/L2, pGEM-T/L3, pGEM-T/L4 和 pGEM-T/M2-1, 将四个 L 片段进行正确拼接后获得重组质粒 pGEM-T/L, 取 pGEM-T/L 及 pGEM-T/

M2-1 送上海生工测序,经核酸序列分析与 GenBank 中收录的 RSV A 亚型 Long 株 L 和 M2-1 蛋白基因(收录号为 AY911262)序列比较, L 基因共有 15 处碱基发生突变,进一步分析显示,其中九处是错义突变,其余为同义突变。M2-1 基因无碱基突变。

2.3 px8 δ T/GSGE1/EGFP、px8 δ T/GSGE2/EGFP 和 pcDNA3.1/L、pcDNA3.1/M2-1 的构建及鉴定

取插入有 EGFP 的 px8 δ T/GSGE1/EGFP 和 px8 δ T/GSGE2/EGFP,分别用 *Hind* III 和 *Xba* I 进行酶切鉴定。得到约 3000 bp 和 800 bp 的条带,与预期值相符(图 1-A)。

取 L 及 M2-1 基因的真核表达载体 pcDNA3.1/L 及 pcDNA3.1/M2-1,分别用 *Nhe*I 和 *Sma*I 和 *Hind* III 和 *Xho*I 进行酶切鉴定。分别得到 5084 bp、4246 bp 和 2590 bp 及 5000 bp 和 585 bp 的条带,带型及分子量与预期值相符合(由于 5084 bp 和 4246 bp 两个片段的分子量接近,图中显示尚未完全分离)(图 1-B)。



2.4 RT-PCR 分析目的基因的转录

以 pcDNA3.1/L 及 pcDNA3.1/M2-1 分别转染细胞后获得的总 RNA 为模板进行 RT-PCR,取 RT-PCR 产物 5 μ L 行琼脂糖凝胶电泳,约在 1200 bp 和 600 bp 处分别有一条阳性条带,与预期值相同。以总 RNA 为模板直接进行 PCR 作为阴性对照。

2.5 Western blot 分析目的基因的表达

Western blot 分析发现 pcDNA3.1/L 转染的 COS-7 细胞在 250 kDa 处有特异性蛋白条带(图 2),与预期值大小一致。但 pcDNA3.1/M2-1 转染的 COS-7 细胞中未观察到特异性目的条带(结果未附)。

Western blot 分析发现 pcDNA3.1/L 转染的 COS-7 细胞在 250 kDa 处有特异性蛋白条带(图 2),与预期值大小一致。但 pcDNA3.1/M2-1 转染的 COS-7 细胞中未观察到特异性目的条带(结果未附)。

2.6 RSV 微型复制子质粒 px8 δ T/GSGE1/EGFP 和 px8 δ T/GSGE2/EGFP 的功能分析

EGFP 为增强型绿色荧光蛋白,通常作为报告基因或示踪基因,如能正常转录及表达将可在荧光显微镜下观察到绿色荧光,因此将 EGFP 插入微型复制子后,可用以研究微型复制子的复制和转录情况。将构建的 px8 δ T/GSGE1/EGFP 和 px8 δ T/GSGE2/EGFP 微型复制子,分别单转 BSR T7/5 细胞,同时以 px8 δ T/GSGE2/EGFP、pcDNA3.1/L、pcDNA3.1/M2-1、pcDNA3.1/N 和 pcDNA3.1/P 五质粒共转染 BSR T7/5 细胞,48 h 后在倒置荧光显微镜下观察 EGFP 的表达情况。结果显示 px8 δ T/GSGE1/EGFP 转染的细胞观察到了绿色荧光,px8 δ T/GSGE2/EGFP 转染的细胞没有观察到绿色荧光,五质粒共转染的细胞观察到表达绿色荧光、且具有典型形态的细胞,同时也可观察到较多的背景荧光,推测是由于多质粒共转染对细胞造成非特异性损伤、并释放 EGFP 所造成。通过流式细胞

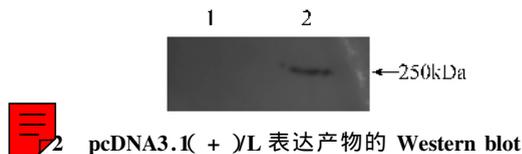


Fig.2 Expression of L gene in pcDNA3.1(L) transfected COS-7 cells analyzed by Western blot. 1. Mock transfected COS-7 cells 2. COS-7-cells transfected by pcDNA3.1(L).

2.6 RSV 微型复制子质粒 px8 δ T/GSGE1/EGFP 和 px8 δ T/GSGE2/EGFP 的功能分析

EGFP 为增强型绿色荧光蛋白,通常作为报告基因或示踪基因,如能正常转录及表达将可在荧光显微镜下观察到绿色荧光,因此将 EGFP 插入微型复制子后,可用以研究微型复制子的复制和转录情况。将构建的 px8 δ T/GSGE1/EGFP 和 px8 δ T/GSGE2/EGFP 微型复制子,分别单转 BSR T7/5 细胞,同时以 px8 δ T/GSGE2/EGFP、pcDNA3.1/L、pcDNA3.1/M2-1、pcDNA3.1/N 和 pcDNA3.1/P 五质粒共转染 BSR T7/5 细胞,48 h 后在倒置荧光显微镜下观察 EGFP 的表达情况。结果显示 px8 δ T/GSGE1/EGFP 转染的细胞观察到了绿色荧光,px8 δ T/GSGE2/EGFP 转染的细胞没有观察到绿色荧光,五质粒共转染的细胞观察到表达绿色荧光、且具有典型形态的细胞,同时也可观察到较多的背景荧光,推测是由于多质粒共转染对细胞造成非特异性损伤、并释放 EGFP 所造成。通过流式细胞

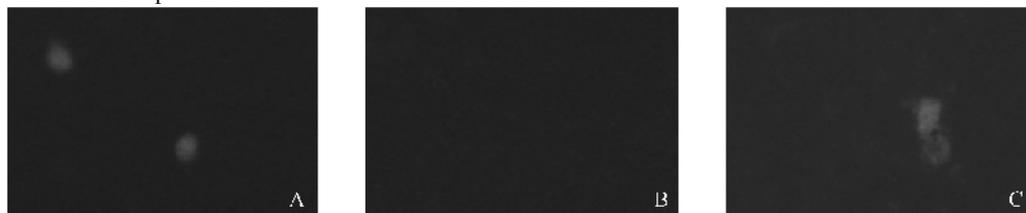


Fig.3 The expression of EGFP in BSR T7/5 cells transfected by single px8 δ T/GSGE1/EGFP (A);The expression of EGFP in BSR T7/5 cells transfected by single px8 δ T/GSGE2/EGFP (B);The expression of EGFP in BSR T7/5 cells co-transfected by px8 δ T/GSGE2/EGFP、pcDNA3.1/L、pcDNA3.1/N、pcDNA3.1/P、pcDNA3.1/M2-1 (C)(NIKON ECLIPSE TE 2000-S \times 100)

Fig.3 The expression of EGFP in BSR T7/5 cells transfected by single px8 δ T/GSGE1/EGFP (A);The expression of EGFP in BSR T7/5 cells transfected by single px8 δ T/GSGE2/EGFP (B);The expression of EGFP in BSR T7/5 cells co-transfected by px8 δ T/GSGE2/EGFP、pcDNA3.1/L、pcDNA3.1/N、pcDNA3.1/P、pcDNA3.1/M2-1 (C)(NIKON ECLIPSE TE 2000-S \times 100).

仪分析表达绿色荧光的细胞进一步证实了上述结果。(图3、4、5)。

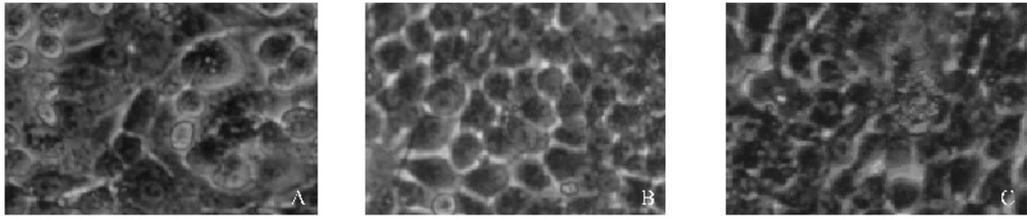


图4 单转 px8 δ T/GSGE1/EGFP 的 BSR T7/5 细胞在普通显微镜下的形态(A)、单转 px8 δ T/GSGE2/EGFP 的 BSR T7/5 细胞在普通显微镜下的形态(B)和转染 px8 δ T/GSGE2/EGFP、pcDNA3.1/L、pcDNA3.1/N、pcDNA3.1/P、pcDNA3.1/M2-1 的 BSR T7/5 细胞在普通显微镜下的形态(C) (NIKON ECLIPSE TE 2000-S \times 100)

Fig.5 BSR T7/5 cells observed under microscopy after transfecting px8 δ T/GSGE1/EGFP (A); BSR T7/5 cells observed under microscopy after transfecting px8 δ T/GSGE2/EGFP (B); BSR T7/5 cells observed under microscopy after co-transfecting px8 δ T/GSGE2/EGFP、pcDNA3.1/L、pcDNA3.1/N、pcDNA3.1/P、pcDNA3.1/M2-1 (C) (NIKON ECLIPSE TE 2000-S \times 100).

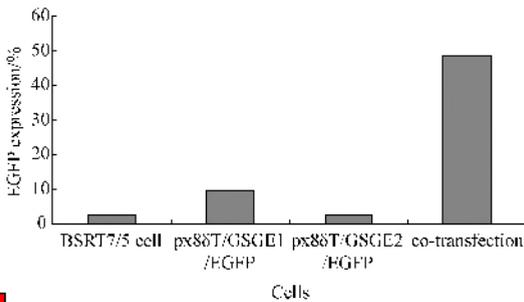


图5 流式细胞仪分析细胞内 EGFP 的表达(BD 公司, FACSCalibur)

Fig.5 EGFP expressed cells analyzed by FACS (BD, FACSCalibur).

3 讨论

RSV 为非节段负链包膜病毒,属副粘病毒科,编码 11 种蛋白,其中 L、M2-1、N、P 蛋白为核壳体蛋白或聚合酶蛋白,N、P、L 是 RSV 基因组在宿主细胞内转录和复制的必要条件,增加转录延长/转录终止抑制因子 M2-1,可确保基因组进行性转录的过程。我们获得的 M2-1 基因的 ORF 共含有 582 bp 碱基,经与 GenBank 收录的 RSV Long 株 M2-1 蛋白(收录号为 AY911262)进行比较分析,未发现有碱基差异。在进一步的 M2-1 蛋白 Western blot 分析中,未检测到特异的蛋白条带,分析原因是由于本实验使用的是羊抗人 RSV 多抗,虽针对 RSV 多种抗原,但 M2-1 为 RSV 功能蛋白,位于核壳体上,且 M2-1 蛋白分子量小,因此多抗中 M2-1 抗原特异性抗体较少,导致 Western blot 未能检测到 M2-1 蛋白,但在转染 M2-1 的细胞中进行 RT-PCR 分析,扩出 M2-1 目的条带,说明 M2-1 在细胞中有转录。我们获得的 L 蛋白基因的 ORF 共含有 6498 bp 碱基,经与 GenBank 收录的 RSV Long 株 L 蛋白(收录号为 AY911262)进行基

因序列比较,发现 L 基因 ORF 后第 404、886、924、1133、1429、1794、1914、2450、3773、3941、3978、5252、5324、5596、6174 位,共 15 处碱基发生突变。氨基酸分析表明 6 处为同义突变,9 处为错义突变,突变前后的氨基酸分别为 Asn295Ser、Ile308Val、Tyr476Phe、Asn598His、Val638Ile、Ile1313Met、Leu1326Ile、Glu1865Gly、Cys2058Arg,其中 295、598、1313、1865、2058 处的氨基酸类型发生改变。作为 RSV 聚合酶的主要活性单位,研究表明 L 蛋白含有 5 个高度保守的具有 RNA 聚合酶活性的功能区^[6-7],premotif A、motif A、motif B、motif C 及 motif D,还含有 2 个与 mRNA 5'端鸟苷酰化作用有关的保守的功能区,motif 5C 和 motif 1C。经过比对分析,我们克隆的 L 蛋白在这些保守的功能区内的氨基酸没有发生任何变化。因此,推测 L 蛋白应该具有正常的生物学活性。以往我们实验室成功克隆表达了 N、P 蛋白,可与 L、M2-1 及 RSV 微型复制子或 RSV 感染性 cDNA 克隆一起进行共转染,开展 RSV 反向遗传学操作。

我们所采用的是反向遗传学技术中的微型复制子技术,在这类系统中,病毒部分基因甚至全部基因都缺失,取而代之的是一个或多个示踪蛋白基因(如 EGFP、CAT 等),微型复制子缺乏可用于复制的必要蛋白,必须通过共转染提供可表达这些蛋白的质粒。

我们在构建微型复制子时采用了两种方案:第一,将报告基因 EGFP 插入编码 RSV 基因组的微型复制子 GSGE1 中,EGFP 在 T7 RNAP^[8-9]的作用下转录形成病毒的正链反基因组,其中含有 EGFP 的 mRNA,在真核细胞 BSR T7/5 中能直接表达绿色荧光,EGFP 的表达不需要 RSV 核壳体蛋白的辅助。

第二,将报告基因 EGFP 插入编码 RSV 反基因组的微型复制子 GSGE2 中,当 T7RNP 识别 T7 启动子将这些序列转录后,得到的是负链的病毒基因组,EGFP 不能在 BSRT 7/5 中直接进行翻译,由共转染质粒提供的四种辅助蛋白 pcDNA3.1/L、pcDNA3.1/M2-1、pcDNA3.1/N 和 pcDNA3.1/P,可与微型复制子中的 Le、Tr、GS 和 GE 等 RNA 信号序列互相作用,使负链的病毒基因组进一步转录、复制形成病毒正链反基因组,其中含有 EGFP 的 mRNA,或从 GS 处转录直接获得 EGFP 的 mRNA,从而在真核细胞内得到表达,可观察到绿色荧光。在单转 GSGE2 时,由于没有辅助蛋白的作用,仅获得负链的病毒基因组,无法观察到绿色荧光。

通过流式细胞仪分析发现,5 种质粒共转染时,表达荧光的细胞数量约为 50%,单转 px8 δ T/GSGE1/EGFP 时也发现表达荧光的细胞,但单转 px8 δ T/GSGE2/EGFP 时,没有发现表达荧光的细胞,与荧光显微镜观察到的结果相符。我们构建的微型复制子中 RSV 的 Tr 序列仅为 52 bp,虽然小于 RSV 通常的 155 bp 的 trailer 序列^[10],实验表明,52 bp 的反基因组启动子已经具有了基本的复制功能,通过进一步实验可比较不同长度的 trailer 序列对微型复制子复制、转录及包装效率的影响。也有报道认为,通过优化四种辅助蛋白质粒的比例,可进一步提高拯救效率^[11]。

总之,实验表明我们构建的 RSV 微型复制子具有转录和复制功能,4 种 RSV 重要的核壳体蛋白,经质粒表达后具有正常的生物学活性,为以 RSV 反向遗传学为基础的 RSV 疫苗研发及物药筛选提供了可能。

参考文献

[1] Boukhvalova MS ,Prince GA ,Blanco JC ,et al. Respiratory syncytial virus infects and abortively replicates in the lungs in spite of preexisting immunity. *Journal of Virology* ,2007 , 81(17) 9443 - 9450 .

[2] Falsey AR ,Walsh EE. Respiratory syncytial virus infection in adults. *Clinical Microbiology Reviews* ,2000 ,13(3) :371 - 384 .

[3] Collins PL ,Crowe JE Jr. Respiratory Syncytial Virus and Metapneumovirus//Knipe DM ,Howley PM , et al. *Fields Virology* 5th edition , Philadelphia : Lippincott Williams &Wilkins Press 2007 ,1601 - 1646 .

[4] Yu JM ,He JS ,Li DL ,et al. Cloning and expression of N and P of human respiratory syncytial virus RNA polymerase complex. *Virologica Sinica* 2006 ,21(3) :213 - 216 .

[5] Fearn R ,Peeples ME ,Collins PL. Mapping the transcription and replication promoters of respiratory syncytial virus. *Journal of Virology* 2002 ,76(4) :1663 - 1672 .

[6] Muller R ,Poch O ,Delarue M ,et al. Rift valley fever virus L segment :correction of the sequence and possible functional role of newly identified regions conserved in RNA-dependent polymerases. *Journal of General Virology* ,1994 ,75(6) : 1345 - 1352 .

[7] Liuzzi M ,Mason SW ,Cartier M , et al. Inhibitors of respiratory syncytial virus replication target cotranscriptional mRNA guanylation by viral RNA-dependent RNA polymerase. *Journal of Virology* ,2005 ,79(20) :13105 - 13115 .

[8] Kochetkov SN ,Rusakova EE ,Tunitskaya VL. Recent studies of T7 RNA polymerase mechanism. *FEBS Letters* ,1998 ,440 (3) 264 - 267 .

[9] Chamberlin M ,McGrath J ,Waskell L. New RNA polymerase from escherichia coli infected with bacteriophage T7. *Nature* ,1970 ,228(5268) :227 - 231 .

[10] Mink MA ,Stec DS ,Collins PL. Nucleotide sequences of the 3' leader and 5' trailer regions of human respiratory syncytial virus genomic RNA. *Virology* ,1991 ,185(2) :615 - 624 .

[11] Kaur J ,Tang RS ,Spaete RR ,et al. Optimization of plasmid-only rescue of highly attenuated and temperature-sensitive respiratory syncytial virus (RSV) vaccine candidates for human trials. *Journal of Virological Methods* ,2008 ,153(2) : 196 - 202 .

Construction of minireplicon of human respiratory syncytial virus

Qian Tang^{1,2}, Jiemei Yu^{1,3}, Jinsheng He^{1,2*}, Mei Zhang¹, Wei Wei¹, Yuanhui Fu², Xianxian Zheng¹, Xiaobo Wang¹, Ying Zhang², Tao Hong^{2,3}

(¹ Department of Immunology, Anhui Medical University, Hefei 230032, China)

(² College of Life Sciences & Bioengineering, Beijing Jiaotong University, Beijing 100044, China)

(³ Institute for Viral Disease Control and Prevention, China CDC, Beijing 100052, China)

Abstract [Objective] The reverse genetics technology is an important way to develop genetically engineered attenuated living human respiratory syncytial virus (RSV) vaccine candidates. As the pilot experiment, it is necessary to prepare RSV minireplicon and investigate its biological activity. **[Methods]** After the gene start and gene end (GSGE) fragment containing the sequence of leader (Le), gene start (GS), multiple cloning sites (MCS), gene end (GE) and trailer (Tr) was synthesized and positioned under the control of T7 RNA promoter, we cloned this fragment further into px8 δ T vector. Then, the enhanced green fluorescent protein (EGFP) was cloned into the above recombinant px8 δ T vector, and RSV minireplicon plasmids px8 δ T/GSGE1/EGFP and px8 δ T/GSGE2/EGFP were finally obtained. Meanwhile, two ORFs of nucleocapsid proteins of large protein (L) and transcription elongation/antitermination factor (M2-1) were cloned to construct pcDNA3.1/L and pcDNA3.1/M2-1. At the end, we co-transfected a RSV minireplicon plasmid and four nucleocapsid protein plasmids into BSR T7/5 cell lines expressing T7 RNA polymerase by lipofectamine 2000, and analyzed the expression of EGFP by inverted fluorescent microscopy and fluorescence activated cell sorter (FACS), respectively. **[Results]** The px8 δ T/GSGE1/EGFP, px8 δ T/GSGE2/EGFP, pcDNA3.1/L and pcDNA3.1/M2-1 were successfully constructed. After co-transfecting, EGFP can be observed in the transfected BSR T7/5 cells under fluorescent microscopy and by FACS. **[Conclusion]** The constructed RSV minireplicon is able to replicate and transcript, which provides a solid foundation for further RSV vaccine development and drug selection by RSV reverse genetics.

Keywords : human respiratory syncytial virus ; minireplicon ; enhanced green fluorescent protein

(本文责编 : 张晓丽 , 谷志静)

Supported by a grant from the Research Foundation of Beijing Jiaotong University (2007RC006)

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

Received 16 March 2009/Revised 21 April 2009.

《微生物学报》答作者问——关于投稿

问 : 投稿时都需要哪些手续 ? 是否还需要纸稿 ?

答 : 从 2006 年起, 本刊开始采用“稿件远程处理系统”。投稿时需要提供 :

- (1) 论文研究内容所属单位的介绍信(请注意 : 在此强调的是研究内容所属单位, 通常是第一单位), 介绍信主要应证明该文的作者署名无误, 未一稿两投及不涉及保密问题。介绍信模板可从本刊主页“ 下载专区 ”或“ 远程投稿 ”下载。
- (2) 在接到经过编辑部内审后 E-mail 发出的“ 稿件受理通知 ”后, 需要及时补寄纸样的 1 份稿件和介绍信, 并缴纳 100 元稿件受理费。

问 : 审稿费需邮局汇款还是转帐 ?

答 : 邮局汇款 ! 中科院微生物所共有 4 个期刊编辑部, 因此提醒您在办理汇款时一定要注意以下几点, 否则在登记汇款、办理发票时会造成混乱 ! 编辑部在收到汇款之后, 将以挂号信形式及时寄回发票。

- (1) 切忌在邮寄来的纸样材料中加入 100 元现金 !
- (2) 在收款人一栏填写“ 微生物学报编辑部 ”;
- (3) 在备注栏中注明“ 稿件编号 ”+“ 第一作者姓名 ”;
- (4) 通过邮局汇 100 元审稿费, 汇款后请登陆本刊网站, 填写“ 汇款时间 ”、“ 发票单位 ”和收“ 发票地址 ”等信息。编辑部会在收到后及时登记“ 收款时间 ”和“ 寄发票时间 ”, 作者可随时查询不必打电话来询问。