



## 基于T7启动子表达系统的牛副流感病毒3型微型基因组的构建与拯救

姜男, 郑妍鹏\*, 蒋桂云, 张伟, 焦月盈, 付远辉, 彭向雷, 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】通过负链RNA病毒反向遗传学操作, 构建并拯救以T7启动子表达系统为基础的牛副流感病毒3型(Bovine parainfluenza virus type 3, BPIV3)微型基因组。【方法】分别构建表达该病毒NP、P和L蛋白的辅助质粒px8 $\delta$ T-PT1-bPIV3-NP、px8 $\delta$ T-PT1-bPIV3-P和px8 $\delta$ T-PT1-bPIV3-L以及含增强型绿色荧光蛋白(Enhanced green fluorescent protein, EGFP)开放读码框(Open reading frame, ORF)、BPIV3前导序列(Leader region)、转录起始信号(Gene start signal, GS)、转录终止信号(Gene end signal, GE)和尾随序列(Trailer region)等顺式作用元件(Cis-acting elements)的微型基因组质粒pSC11-bPIV3-EGFP, 鉴定正确后, 采用2种不同方法拯救BPIV3微型基因组, 并通过观察荧光表达情况判断是否拯救成功。【结果】成功构建了基于T7启动子表达系统的BPIV3微型基因组, 并实现了拯救。【结论】该系统的成功构建, 有助于今后对BPIV3开展基因修饰研究。

**关键词:** 牛副流感病毒3型, 微型基因组, 反向遗传学, 拯救

牛副流感病毒3型(Bovine parainfluenza virus type 3, BPIV3)属于副粘病毒科, 呼吸道病毒属, 是有包膜的非节段负链RNA病毒, 是引起牛呼吸道疾病综合征(Bovine respiratory disease complex, BRDC)的最重要的病毒性病原之一<sup>[1-2]</sup>。BRDC通常被称为“航运热”, 临床症状为咳嗽、厌食、发热、呼吸困难和腹泻等, 是多因素相互作用的结果, 包括传染性病原体、免疫力和舍饲等<sup>[3-4]</sup>。BRDC是牛的一个主要的全球性健康问题, 广泛分布于世界各地, 给养牛业造成了巨大的经济损失, 在美国每年因BRDC造成的经济损失达30亿

美元。BPIV3单独感染只产生轻微的临床症状, 但如果混合感染其他病毒会引起严重的肺炎。目前用于BPIV3防控的疫苗主要有2类: 减毒疫苗和灭活疫苗, 接种减毒疫苗容易引起继发性感染, 而灭活疫苗通常需要较大的免疫剂量。目前我国还没有有效的药物和疫苗来防治BPIV3感染。

BPIV3为非节段单股负链RNA病毒, 全基因组长约15.4 kb, 含10个亚基因组mRNA, 共编码8种蛋白: 核蛋白(Nucleoprotein, NP)、磷蛋白(Phosphoprotein, P)、基质蛋白(Matrix protein, M)、融合糖蛋白(Fusion glycoprotein, F)、血凝素-

\*通信作者。Fax: +86-10-51683887; E-mail: ypzhen@bjtu.edu.cn

神经氨酸糖蛋白(Hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein, HN)和聚合酶蛋白(Polymerase protein, L)。NP蛋白具有多种功能,是BPIV3感染后细胞中含量最高的蛋白<sup>[4]</sup>,对核壳体的稳定具有重要作用,可以保护RNA基因组不被RNA酶降解,在复制和转录过程中与P-L聚合酶相互作用,也起到从翻译到复制的转换因子的作用,并且在病毒装配过程中与M蛋白相互作用。L蛋白和P蛋白对转录酶活性和mRNA的加帽、甲基化作用及多聚腺苷酸化具有重要作用<sup>[5]</sup>。L蛋白是1种RNA依赖的RNA聚合酶。P蛋白本身对病毒核酸的合成至关重要,P蛋白本质上是1个无序的多肽,通过1个中央 $\alpha$ -螺旋卷曲螺旋区域形成四聚体,通过与NP和L相互作用负责将L招募到病毒NP-RNA模板上,对于激活酶的复合物和增强L蛋白的稳定性有重要作用<sup>[6-8]</sup>。

负链RNA病毒的反向遗传学技术(Reverse genetics)是通过构建RNA病毒的cDNA克隆,经体内转录及拯救,获得具有感染性RNA病毒的方法。利用这种技术,可以在BPIV3基因组cDNA克隆中插入报告基因或突变、缺失病毒某些基因,实现对BPIV3的体外改造,并经拯救获得重组BPIV3,为研究病毒复制循环、致病机理和宿主与病毒的相互作用及获得减毒活疫苗候选株提供了可靠的研究工具<sup>[9-10]</sup>。

微型复制基因组(minigenome)是反向遗传学技术中一种简单、实用的研究系统,该系统用报告基因替换了BPIV3全部编码基因,仅保留了BPIV3基因组3'和5'端的前导区(Leader region)和尾随区(Trailer region)。在外界提供BPIV3 RNA聚合酶的情况下,微型基因组能完成转录、复制、甚至包装的过程。由于该基因组具有基因长度小和结构简单等优点,被广泛应用在RNA病毒的反向遗传学操作中<sup>[7]</sup>。本实验中的BPIV3病毒微型基因组重组质粒中病毒的开放阅读框被报告基因EGFP取代,仅保留了BPIV3前导序列(Leader region)、转录起始信号(Gene start signal, GS)、转录终止信号(Gene end signal, GE)和尾随序列

(Trailer region)等顺式作用元件(Cis-acting elements),并分别在基因组两端添加了T7聚合酶启动子和终止子,同时构建3种以T7为启动子的BPIV3转录复制所必须的表达NP、P和L蛋白的辅助质粒,与微型基因组重组质粒一起共转染BSR T7/5细胞,通过荧光显微镜观察EGFP的表达情况。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞、质粒

HEp-2细胞、px8 $\delta$ T-PT1和pSC11为本实验室保存,BSRT7/5细胞由德国慕尼黑大学K. Conzelmann教授馈赠。

### 1.2 酶及实验试剂

全基因合成由生工生物工程(上海)有限公司完成;引物合成及DNA测序由华大基因完成;质粒小量提取试剂盒及胶回收试剂盒购自美国Omega公司;Endo Free Plasmid Mega Kits购自德国QIAGEN公司;pMD20-T、T4 DNA连接酶、*Taq* DNA聚合酶、Ex-*Taq* buffer、Primerstar HS DNA聚合酶、DNA 15000 Marker以及10 $\times$ DNA loading buffer均为日本TaKaRa公司产品。DMEM培养基购自Gibco公司;胎牛血清(FBS)购自Hyclone公司;限制性核酸内切酶及预染蛋白Marker均为美国NEB公司产品;jetPRIME购自Polyplus-transfection公司。RIPA裂解液购自碧云天公司;羊抗PIV2/3多抗购自LSBio公司,兔抗羊-HRP标记二抗购自中杉金桥公司;硝酸纤维素膜购自Amersham公司;细胞培养用耗材购自Corning公司。

### 1.3 BPIV3微型复制基因组重组质粒pSC11-bPIV3-EGFP的构建

参考GenBank上收录的BPIV3 Kansas/15626/84基因全序列(GenBank: AF178654.1),全基因合成含增强型绿色荧光蛋白(Enhanced green fluorescent protein, EGFP)开放读码框(Open reading frame, ORF)、BPIV3前导序列(Leader region)、转录起始信号(Gene start signal, GS)、转录终止信号(Gene end signal, GE)和尾随序列

end signal, GE)和尾随序列(Trailer region)等顺式作用元件(Cis-acting elements)的bPIV3-EGFP基因序列。*Bam*H I 和*Sac* I 双酶切bPIV3-EGFP和pSC11, 分别回收片段和载体进行连接, 转化、摇菌、提质粒后获得pSC11-bPIV3-EGFP。该质粒所包含的BPIV3微型复制基因组序列见图1。

#### 1.4 px8δT-PT1-bPIV3-NP、px8δT-PT1-bPIV3-P和px8δT-PT1-bPIV3-L的构建

分别设计并合成NP、P和L的引物(表1), 以全基因合成的pBSK-T7-Leader-GS-N-P-M为模板, PCR获得bPIV3-NP和bPIV3-P序列。以全基因合成的pUC57-L为模板, PCR获得bPIV3-L序列。将bPIV3-NP、bPIV3-P和bPIV3-L分别与T载体连接, 获得pMD20-T-bPIV3-NP、pMD20-T-bPIV3-P和pMD20-T-bPIV3-L, 测序正确后, 分别用*Nhe* I 和*Xho* I 双酶切pMD20-T-bPIV3-NP、pMD20-T-bPIV3-P、pMD20-T-bPIV3-L与px8δT-PT1, 回收bPIV3-NP、bPIV3-P、bPIV3-L片段和载体px8δT-PT1片段, 连接、转化、摇菌、提质粒后获得px8δT-PT1-bPIV3-NP、px8δT-PT1-bPIV3-P和px8δT-PT1-bPIV3-L。

#### 1.5 辅助质粒px8δT-PT1-bPIV3-NP、px8δT-PT1-bPIV3-P和px8δT-PT1-bPIV3-L的表达鉴定

取3瓶T25 BSR T7/5细胞, 分别转染px8δT-PT1-bPIV3-NP、px8δT-PT1-bPIV3-P和px8δT-PT1-bPIV3-L。37 °C、5% CO<sub>2</sub>继续培养48 h后, 收获细胞并裂解, 细胞裂解产物进行SDS-PAGE电泳、转膜, 5%脱脂牛奶室温封闭4 h; 一抗为羊抗HPIV2/3多抗, 可与BPIV3产生交叉反应, 1:100稀释, 二抗为HRP标记兔抗羊IgG, 1:5000稀释, 曝光15 min。

#### 1.6 BPIV3微型复制基因组的拯救

将BSR T7/5细胞转至6孔板, 待丰度达60%–80%后进行4质粒共转染, 质粒转染剂量和分组见表2, 转染后37 °C、5% CO<sub>2</sub>继续培养。共转染后12、24、36和48 h分别观察荧光。随后, 为获得更好的拯救效果, 我们对转染条件进行了

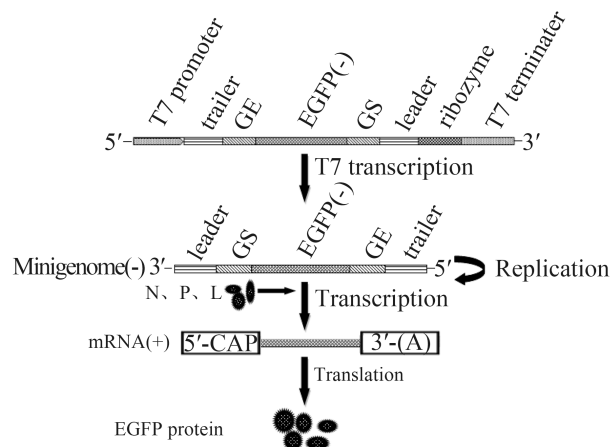


图 1. 以T7启动子表达系统为基础的微型反基因组cDNA的构建及其转录复制过程

Figure 1. Construction of mini-antigenomic cDNA and its replication and translation processes.

表1. 本研究中使用的引物

Table 1. Primers used in this study

Primers	Sequences(5'→3')
NP-F1	GCTAGCATGTTGAGTCTATTTCGACACATTCA GTGC
NP-R1	CTCGAGCTAGTTGCTTCCGAATGCACTGAAC AAATCATC
P-F2	GCTAGCATGGAAGACAATGTTCAAAACAATC AAATC
P-R2	CTCGAGTTACTGGGAGCTGACATCCTCATTG AACATG
L-F3	GCTAGCATGGACACCGAGTCCCACAGCGGCA CAACAT
L-R3	CTCGAGTTAATCAATATCAAATTCATTATCAT ATTCATAAC

优化。首先, 尝试利用痘苗病毒MVA-T7提供T7 RNA聚合酶, 在HEp-2细胞中进行拯救, 当HEp-2细胞丰度达60%–80%后, 以3 MOI接种痘苗病毒MVA-T7, 1 h后进行转染, 每孔加入px8δT-PT1-bPIV3-NP和px8δT-PT1-bPIV3-P各0.4 μg, px8δT-PT1-bPIV3-L 0.2 μg, pSC11-bPIV3-EGFP 2 μg, jetPRIME转染试剂6 μL, 37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养。分别于共转染后48 h和72 h观察荧光。然后, 采用不同剂量的辅助质粒共转染BSR T7/5细胞进行拯救, 质粒转染剂量和分组见表3, 共转染后24、48、72 h观察荧光。

表2. 多质粒共转染BSR T7/5细胞拯救微型复制基因组

Table 2. Minigenome was rescued by co-transfecting helper and minigenome plasmids into BSR T7/5 cells

Group	Plasmid/ $\mu$ g				Transfection reagents/ $\mu$ L
	px8 $\delta$ T-PT1-bPIV3-NP	px8 $\delta$ T-PT1-bPIV3-P	px8 $\delta$ T-PT1-bPIV3-L	pSC11-bPIV3-EGFP	
Experimental group	0.4	0.4	0.2	2.0	4.0
Control groups 1	–	0.4	0.2	2.0	4.0
Control groups 2	0.4	–	0.2	2.0	4.0
Control groups 3	0.4	0.4	–	2.0	4.0

表3. 不同量的辅助质粒共转染BSR T7/5细胞拯救微型基因组

Table 3. Minigenome was rescued by co-transfecting different amount of helper plasmids and minigenome plasmids into BSR T7/5 cells

Group	Plasmid/ $\mu$ g				Transfection reagents/ $\mu$ L
	px8 $\delta$ T-PT1-bPIV3-NP	px8 $\delta$ T-PT1-bPIV3-P	px8 $\delta$ T-PT1-bPIV3-L	pSC11-bPIV3-EGFP	
A	0.4	0.4	0.2	3.0	8.0
B	0.8	0.4	3.0	3.0	14.4
C	1.0	0.5	5.0	3.0	19.0

## 2 结果和分析

### 2.1 辅助质粒的构建及鉴定

用*Nhe* I 和*Xho* I 分别双酶切px8 $\delta$ T-PT1-bPIV3-NP、px8 $\delta$ T-PT1-bPIV3-P和px8 $\delta$ T-PT1-bPIV3-L, 获得与预期相同的目的条带(图2)。

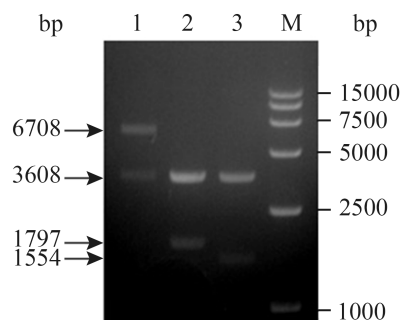


图2. 质粒px8 $\delta$ T-PT1-bPIV3-NP、px8 $\delta$ T-PT1-bPIV3-P和px8 $\delta$ T-PT1-bPIV3-L的酶切鉴定

Figure 2. The plasmids of px8 $\delta$ T-PT1-bPIV3-N, px8 $\delta$ T-PT1-bPIV3-P and px8 $\delta$ T-PT1-bPIV3-L identified by restriction endonuclease analysis with *Nhe* I and *Xho* I. lane 1: px8 $\delta$ T-PT1-bPIV3-L; lane 2: px8 $\delta$ T-PT1-bPIV3-NP; lane 3: px8 $\delta$ T-PT1-bPIV3-P; M: DL 15000 marker.

### 2.2 微型复制基因组重组质粒的构建及鉴定

pSC11-bPIV3-EGFP经*Bam*H I 和*Sac* I 双酶切鉴定, 产生一条1217 bp的条带和一条3136 bp的条带, 与预期相符(图3)。

### 2.3 辅助质粒的表达分析

以BSR T7/5细胞作为阴性对照, px8 $\delta$ T-PT1-bPIV3-NP、px8 $\delta$ T-PT1-bPIV3-P和px8 $\delta$ T-PT1-bPIV3-L分别转染BSR T7/5细胞后, Western blot分析目的基因表达情况, 分别在大约57、66、246 kDa处检测到特异性条带(图4), 大小与预期蛋白分子量一致, 而未转染质粒的BSR T7/5细胞裂解液中则没有这样蛋白条带出现。表明3种辅助质粒在BSR T7/5细胞中可以有效的表达产物。

### 2.4 BPIV3微型复制基因组的拯救

首先, 进行px8 $\delta$ T-PT1-bPIV3-NP、px8 $\delta$ T-PT1-bPIV3-P、px8 $\delta$ T-PT1-bPIV3-L和pSC11-bPIV3-EGFP四质粒共转染BSR T7/5细胞, 分别于转染后12、24、36、48 h进行荧光观察, 24 h

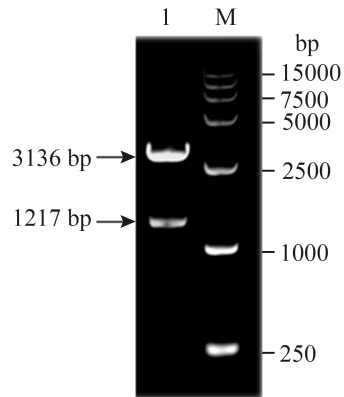


图 3. pSC11-bPIV3-EGFP酶切鉴定

Figure 3. The plasmid of pSC11-bPIV3-EGFP identified by restriction endonuclease analysis. lane 1: pSC11-bPIV3-EGFP digested by *Bam*H I and *Sac* I ; M: DL 15000 marker.

时开始出现荧光, 但荧光很少, 48 h时荧光有所增加, 但总的荧光数量还是比较少, 各对照组在任一时间点均没有观察到荧光(图5)。

随后, 将HEp-2细胞接种MVA-T7后, 共转染

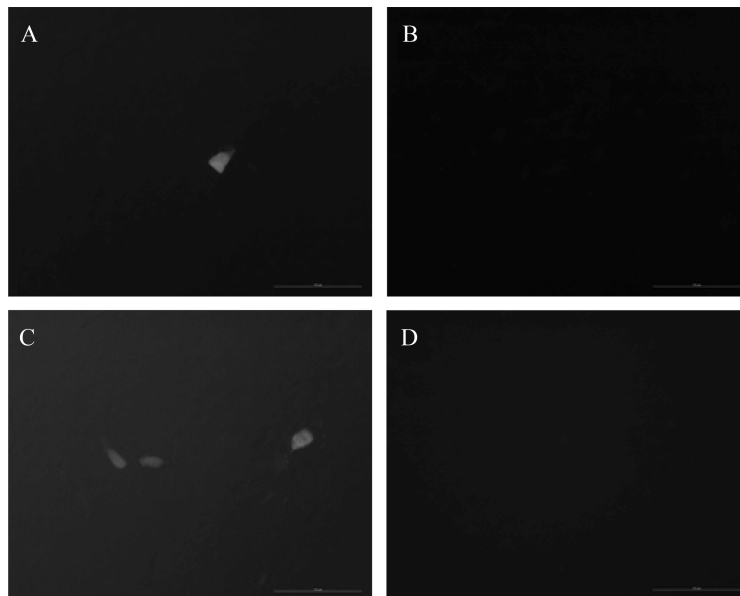


图 5. 4质粒共转染BSR T7/5拯救微型基因组(NIKON ECLIPSE TE 2000-S×100)

Figure 5. Minigenome rescued by co-transfected helper plasmids and minigenome plasmids (NIKON ECLIPSE TE 2000-S×100). A: minigenome rescued by co-transfected plasmids at 24 hours; B: representative of three different negative control groups at 24 hours; C: minigenome rescued by co-transfected plasmids at 48 hours; D: representative of three different negative control groups at 48 hours.

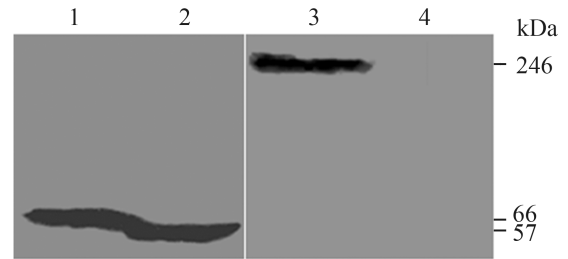


图 4. Western blot分析px8δT-PT1-bPIV3-NP、px8δT-PT1-bPIV3-P和px8δT-PT1-bPIV3-L

Figure 4. The expression of helper plasmids px8δT-PT1-bPIV3-NP, px8δT-PT1-bPIV3-P and px8δT-PT1-bPIV3-L identified by Western blot. 1: BSR T7/5 cells transfected with px8δT-PT1-bPIV3-NP; 2: BSR T7/5 cells transfected with px8δT-PT1-bPIV3-P; 3: BSR T7/5 cells transfected with px8δT-PT1-bPIV3-L; 4: BSR T7/5 cells (negative control).

px8δT-PT1-bPIV3-NP、px8δT-PT1-bPIV3-P、px8δT-PT1-bPIV3-L和pSC11-bPIV3-EGFP四个质粒, 转染后48 h和72 h进行荧光观察, 均能观察到绿色荧光(图6)。

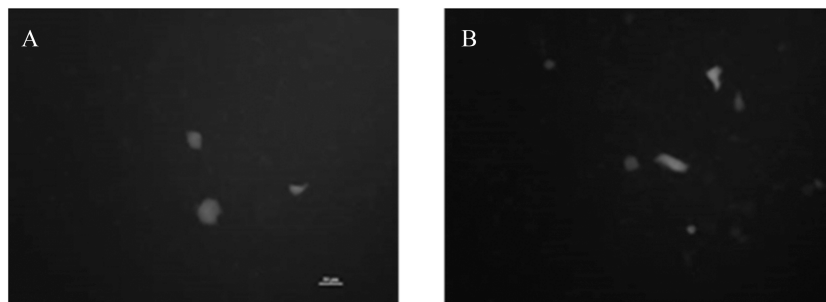


图 6. 4质粒共转染HEp-2细胞拯救微型基因组(NIKON ECLIPSE TE 2000-S×100)

Figure 6. Minigenome rescued by co-transfected helper plasmids and minigenome plasmids (NIKON ECLIPSE TE 2000-S×100). A: minigenome rescued by co-transfected plasmids at 48 hours; B: minigenome rescued by co-transfected plasmids at 72 hours.

最后，以不同比例的辅助质粒转染BSR T7/5细胞，分别于转染后24、48、72 h进行荧光观察，48 h时荧光最强，72 h时，荧光已有变弱的

趋势，其中px8δT-PT1-bPIV3-NP : px8δT-PT1-bPIV3-P : px8δT-PT1-bPIV3-L=2 : 1 : 7.5组的荧光最多(图7)。

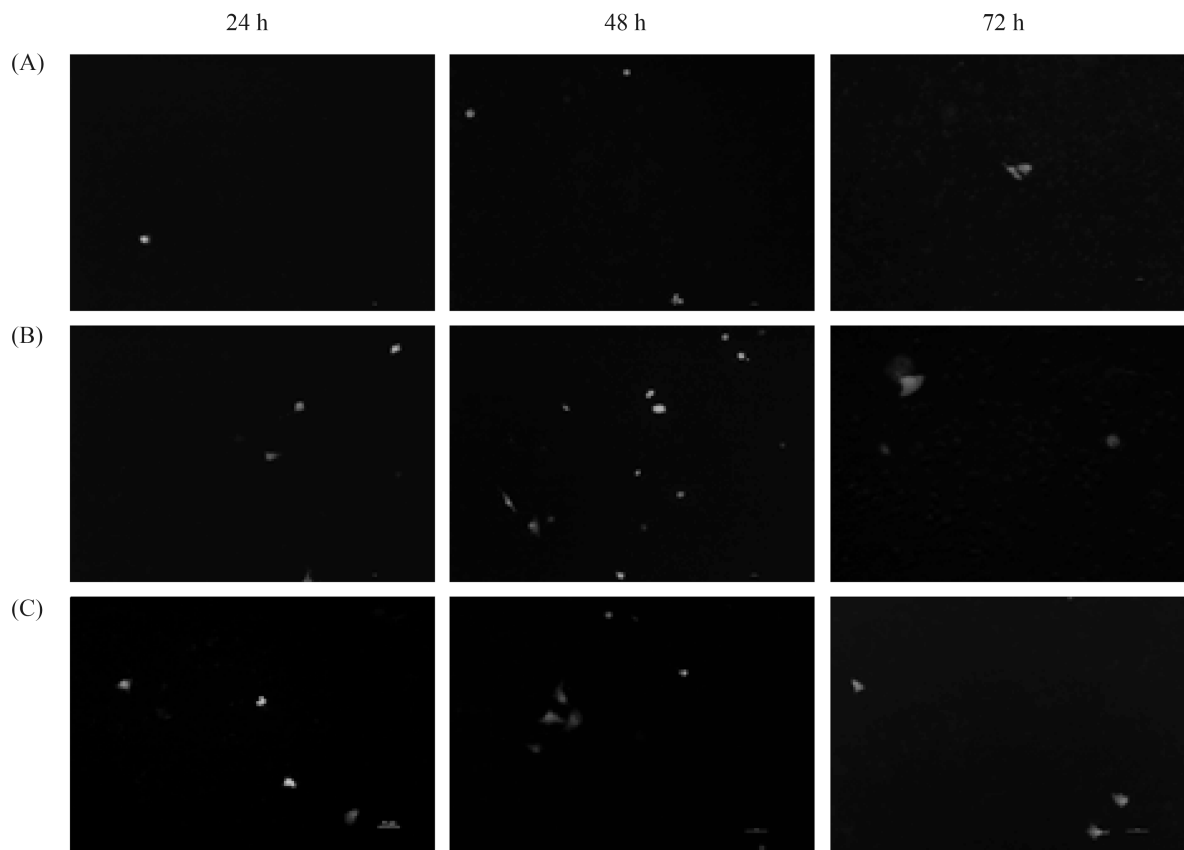


图 7. 不同量辅助质粒转染BSR T7/5拯救微型基因组(NIKON ECLIPSE TE 2000-S×100)

Figure 7. Minigenome rescued by co-transfected different amount of helper plasmids and minigenome plasmids (NIKON ECLIPSE TE 2000-S×100).

### 3 讨论

BPIV3的转录和复制与大多数负链RNA病毒一样,以核糖核蛋白复合体(Ribonucleoprotein complex, RNP)作为RNA合成的模板<sup>[11]</sup>,在转录过程中,聚合酶在3'端进入核糖核蛋白模板并由基因两侧的短的保守序列,即gene-start (GS)信号和终止/多聚腺苷酸化或gene-end (GE)信号引导,产生亚基因组mRNA。mRNA作为翻译的模板,合成病毒蛋白。在随后进行的基因组复制阶段,产生全长病毒复制中间体或反基因组作为子代基因组模板<sup>[12]</sup>合成新的负链RNA, RNA再与核蛋白、磷蛋白和聚合酶蛋白等相关蛋白组装成新的病毒颗粒。

在本文所构建的微型基因组质粒中,病毒的开放阅读框被报告基因EGFP所取代,微型基因组质粒可提供BPIV3正链微型反基因组(Mini-antigenome)的cDNA模板,经T7转录后产生带有精确BPIV3 leader序列和trailer序列的负链微型基因组(Mini-genome)。与其他报告基因[氯霉素乙酰转移酶(Chloramphenicol acetyltransferase, CAT)等]相比,EGFP的最大特点就是可以在不破坏细胞的前提下检测它的表达。

首先,我们利用BSR T7/5细胞提供T7 RNA聚合酶,借鉴其他副粘病毒拯救时辅助质粒的比例(px8 $\delta$ T-PT1-bPIV3-NP : px8 $\delta$ T-PT1-bPIV3-P : px8 $\delta$ T-PT1-bPIV3-L=2 : 2 : 1)进行微型基因组拯救,以确定微型基因组编码质粒设计的合理性。我们以微型基因组质粒与辅助表达质粒共转染拯救微型基因组,在进行拯救时,同时设立了缺少某一辅助质粒的对照组,结果显示只有3种辅助质粒同时存在,才能观察到EGFP的表达,各对照组均未出现荧光,一方面说明NP、P和L对拯救微型基因组均是必须的,另一方面也说明微型基

因组质粒设计合理。

随后,我们利用痘苗病毒MVA-T7提供T7 RNA聚合酶,在HEp-2细胞中进行微型基因组拯救,以确定能否提高微型基因组拯救效率。转染后48 h和72 h进行荧光观察,均能观察到绿色荧光,但荧光数量仍然较少,并没有显著提高微型基因组拯救效率。紧接着,我们尝试通过优化辅助质粒的比例提高拯救效率,当px8 $\delta$ T-PT1-bPIV3-NP : px8 $\delta$ T-PT1-bPIV3-P : px8 $\delta$ T-PT1-bPIV3-L=2.0 : 1.0 : 7.5时,荧光数目最多,拯救效率最高,说明合适的辅助质粒比例有利于提高拯救效率。另外,转染试剂、转染方法等因素也会对拯救效率产生影响。我们也可以利用辅助病毒BPIV3代替辅助质粒进行拯救<sup>[13]</sup>,利用辅助病毒感染提供拯救所需NP、P和L蛋白的方法拯救效率更高。但是,我们进行BPIV3微型基因组的构建与拯救是为了给我们今后构建BPIV3全长cDNA克隆来拯救BPIV3奠定基础,若使用辅助病毒进行拯救,会在拯救BPIV3的过程中引入外源病毒,为病毒的分离增加困难,因此,我们并未选择这种方法进行微型基因组的拯救。

我们成功构建了基于T7启动子表达系统的BPIV3微型基因组4质粒拯救系统,并实现了拯救,为今后开展BPIV3全长cDNA克隆的构建及拯救打下了坚实的基础,对抗BPIV3的减毒活疫苗的获得具有重要意义<sup>[14-15]</sup>。

### 参考文献

- [1] Ohkura T, Minakuchi M, Sagai M, Kokuho T, Konishi M, Kameyama KI, Takeuchi K. Infection of the upper respiratory tract of hamsters by the bovine parainfluenza virus type 3 BN-1 strain expressing enhanced green fluorescent protein. *Virology*, 2015, 476: 134-140.
- [2] Zhu YM, Shi HF, Gao YR, Xin JQ, Liu NH, Xiang WH, Ren XG, Feng JK, Zhao LP, Xue F. Isolation and genetic

- characterization of bovine parainfluenza virus type 3 from cattle in China. *Veterinary Microbiology*, 2011, 149(3/4): 446–451.
- [ 3 ] Oem JK, Lee EY, Lee KK, Kim SH, Lee MH, Hyun BH. Molecular characterization of a Korean bovine parainfluenza virus type 3 isolate. *Veterinary Microbiology*, 2013, 162(1): 224–227.
- [ 4 ] Ren JL, Zhu YM, Zhou YH, Lv C, Yan H, Ma L, Shi HF, Xue F, Zhu YM. Identification of three antigen epitopes on the nucleocapsid protein of the genotype C of bovine parainfluenza virus type 3. *Veterinary Microbiology*, 2015, 178(1/2): 61–69.
- [ 5 ] Haller AA, MacPhail M, Mitiku M, Tang RS. A single amino acid substitution in the viral polymerase creates a temperature-sensitive and attenuated recombinant bovine parainfluenza virus type 3. *Virology*, 2001, 288(2): 342–350.
- [ 6 ] Chapman AR. Regulation of the human parainfluenza virus (hPIV3) fusion protein. Tennessee: Master's Thesis of the University of Tennessee, 2008.
- [ 7 ] Su JH, Dou YX, You YN, Cai XP. Application of minigenome technology in virology research of the paramyxoviridae family. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 2015, 48(2): 123–129.
- [ 8 ] Ellis JA. Bovine parainfluenza-3 virus. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 2010, 26(3): 575–593.
- [ 9 ] Falzarano D, Groseth A, Hoenen T. Development and application of reporter-expressing mononegaviruses: current challenges and perspectives. *Antiviral Research*, 2014, 103: 78–87.
- [10] Stobart CC, Moore ML. RNA virus reverse genetics and vaccine design. *Viruses*, 2014, 6(7): 2531–2550.
- [11] Conzelmann KK. Genetic manipulation of non-segmented negative-strand RNA viruses. *Journal of General Virology*, 1996, 77(3): 381–389.
- [12] Durbin AP, Siew JW, Murphy BR, Collins PL. Minimum protein requirements for transcription and RNA replication of a minigenome of human parainfluenza virus type 3 and evaluation of the rule of six. *Virology*, 1997, 234(1): 74–83.
- [13] Dimock K, Collins PL. Rescue of synthetic analogs of genomic RNA and replicative-intermediate RNA of human parainfluenza virus type 3. *Journal of Virology*, 1993, 67(5): 2772–2778.
- [14] Haller AA, Mitiku M, MacPhail M. Bovine parainfluenza virus type 3 (PIV3) expressing the respiratory syncytial virus (RSV) attachment and fusion proteins protects hamsters from challenge with human PIV3 and RSV. *Journal of General Virology*, 2003, 84(8): 2153–2162.
- [15] Greenberg DP, Walker RE, Lee MS, Reisinger KS, Ward JI, Yogev R, Blatter MM, Yeh SH, Karron RA, Sangli C, Eubank L, Coelingh KL, Cordova JM, August MJ, Mehta HB, Chen W, Mendelman PM. A bovine parainfluenza virus type 3 vaccine is safe and immunogenic in early infancy. *The Journal of Infectious Diseases*, 2005, 191(7): 1116–1122.



# Construction and rescue of the minigenome of bovine parainfluenza virus type 3 based on T7 promoter expression system

Nan Jiang, Yanpeng Zheng<sup>\*</sup>, Guiyun Jiang, Wei Zhang, Yueying Jiao, Yuanhui Fu, Xianglei Peng, Jinsheng He

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

**Abstract:** [Objective] To establish a T7 promoter based reverse genetics system competent for the rescue of bovine parainfluenza virus type 3 (BPIV3). [Methods] We constructed three helper plasmids of px8 $\delta$ T-PT1-bPIV3-NP, px8 $\delta$ T-PT1-bPIV3-P and px8 $\delta$ T-PT1-bPIV3-L and one minigenome plasmid of pSC11-bPIV3-EGFP containing open reading frame (ORF) of the enhanced green fluorescent protein (EGFP) and cis-acting elements including BPIV3 leader region, gene start (GS), gene end (GE) and trailer region. All these plasmids are under the control of T7 promoter and identified by restriction endonuclease analysis. We rescued the pSC11-bPIV3-EGFP by two different methods. Then, we observed the fluorescence expression over time with fluorescence microscopy. [Results] We successfully constructed a reverse genetic system based 4 plasmids under the control of T7 promoter and finished the rescue operation to the minigenome of BPIV3. [Conclusion] This system can be further applied to investigate the function of BPIV3 genome by deletion and mutation of its genes.

**Keywords:** bovine parainfluenza virus type 3, minigenome, reverse genetics, rescue

(本文责编: 张晓丽)

---

<sup>\*</sup>Corresponding author. Fax: +86-10-51683887; E-mail: ypzheng@bjtu.edu.cn

Received: 22 February 2016; Revised: 23 April 2016; Published online: 10 May 2016