

# 逆向突变型 EIAV 全长基因组感染性克隆的构建及体外感染性评价\*

沈 弢<sup>1</sup>, 张晓燕<sup>1</sup>, 童 骁<sup>1,2</sup>, 范秀娟<sup>1</sup>, 梁 华<sup>1</sup>, 马 燕<sup>1</sup>,  
相文华<sup>3</sup>, 沈荣显<sup>3</sup>, 邵一鸣<sup>1\*\*</sup>

(1. 中国疾病预防控制中心 性病艾滋病预防控制中心, 北京 100050; 2. 中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430071; 3. 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 哈尔滨 150001)

## Construction and In Vitro Evaluation of EIAV Full-length Infectious Clones with Site-directed Retro-mutations

SHEN Tao<sup>1</sup>, ZHANG Xiao-yan<sup>1</sup>, TONG Xiao<sup>1,2</sup>, FAN Xiu-juan<sup>1</sup>, LIANG Hua<sup>1</sup>, MA Yan<sup>1</sup>,  
XIANG Wen-hua<sup>3</sup>, SHEN Rong-xian<sup>3</sup>, SHAO Yi-ming<sup>1\*\*</sup>

(1. National Center for AIDS/STD Prevention and Control, Chinese Center for Disease Prevention and Control, Beijing 100050, China; 2. Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China; 3. Harbin Veterinary Research Institute, the Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China)

**Abstract :** Based on the infectious clone pFD3-8 within EIAV full-length genome, and according to the variation of structural genes during vaccine preparation, several chimeric infectious clones involved in *gag* and *env* genes, modified by overlap PCR site-directed mutagenesis, were constructed successfully. These clones were used to transfect fetal donkey dermal (FDD) cells and donkey differentiated monocyte-macrophages (DL), and their infectious characteristics were monitored by RT-PCR and reverse transcriptase activity assay. The results indicated that after five generations passaged in FDD cells then five generations in differentiated monocyte-macrophages, RT activity and RT-PCR were found to be obviously positive in cell culture supernatant and viruses particles were also clearly observed under electron microscope. Nevertheless, the final viral titers of these 'artificial' viruses in DL culture were obviously higher than that in FDD culture. Analysis of the replicative characteristics between these chimeric viruses and their parental virus pL GFD3-8 showed that the formers slightly delayed in replication compared with the latter. All this provides a solid basis for further study of the pathogenic mechanism and immune protection against Chinese equine infectious anemia virus.

**Key words :** Equine infectious anemia virus (EIAV); Site-directed mutagenesis; Infectious clone

**摘要 :** 在已有全长基因组感染性克隆 pL GFD3-8 的基础上,按照疫苗制作过程中 EIAV 结构基因的变化规律,对其中 *gag* 基因进行定点逆向回复改造。并在 *gag* 突变的基础上增加 *env* 突变位点。将所改造的突变克隆转染驴胎皮肤细胞 (FDD) 以及驴单核巨噬细胞 (DL),并用逆转录酶活性检测和 RT-PCR 方法验证其感染性。结果发现,衍生病毒感染上述两种细胞均出现明显的细胞病变效应;细胞培养上清可检测到 RT 酶活性和 RT-PCR 阳性。电镜下可见大量典型的病毒颗粒。然而单核巨噬细胞培养病毒感染滴度要明显高于驴胎皮肤细胞培养病毒滴度。驴胎皮肤细胞内嵌合克隆衍生病毒和父本克隆衍生病毒的复制动力学比较分析显示前者的复制比后者略有滞后。此结果为深入研究马传染性贫血病毒致病的分子机制和疫苗保护机理奠定了基础。

**关键词 :** 马传染性贫血病毒;定点突变;感染性克隆

中图分类号: S852.65 文献标识码: A 文章编号: 1003-5125(2005)01-0055-06

收稿日期: 2004-08-10, 修回日期: 2004-09-20

\* 基金项目: 基础研究重大项目前期研究专项 (2001CCA0060); 国家自然科学基金 (30371319)

作者简介: 沈弢 (1971-), 男, 安徽省籍, 博士研究生。研究方向为分子免疫学及分子病毒学。

\*\* 通讯作者: 邵一鸣 (1957-), 男, 研究员。Corresponding author. E-mail: yshao@public3.bta.net.cn

马传染性贫血病毒 (Equine infectious anemia virus, EIAV) 与人免疫缺陷病毒 (HIV) 同属于逆转录病毒科慢病毒属。主要在马属动物引起传染性贫血。在上世纪 70 年代, 中国农科院哈尔滨兽医研究所沈荣显等通过传统的细胞传代的方法成功研制了马传染性贫血减毒活疫苗。通过体外传代制备减毒疫苗的过程中, EIAV 野毒株的毒力逐渐下降, 抗原性反而有所上升。这也是迄今为止在世界上唯一大规模应用的慢病毒疫苗<sup>[1]</sup>。缺乏动物模型和对 HIV 感染的保护性免疫机制知之甚少一直是 HIV 疫苗研究的最大障碍。而 EIAV 与 HIV 两者在病毒形态、基因组结构、细胞嗜性、病毒复制的分子机制、病毒的生活周期、抗原漂移规律、免疫机理及病毒与宿主相互作用等方面都极为相似。慢病毒 *gag* 基因编码成分不仅在病毒颗粒组装成熟的过程中提供重要的结构组分, 同时也是诱导宿主细胞免疫和细胞因子分泌的重要抗原成分<sup>[2]</sup>。本实验选定 EIAV *gag* 基因作为突破点来探索 EIAV 病毒由野毒株向减毒疫苗株进化过程中关键的遗传变异。通过比较分析 EIAV 疫苗制作过程中四个关键代次的结构基因一级结构得出数个存在强毒株与疫苗株之间稳定的突变位点<sup>[3]</sup>, 其中存在于 *gag* 分子内部的三个突变位点位于基质蛋白 P15 和酸性蛋白 P9 内。在介导病毒穿入以及脱壳成熟等阶段 P15 发挥重要的作用<sup>[4]</sup>, 而 P9 则与病毒基因组核定位以及病毒出芽等环节有着密切的联系<sup>[5]</sup>。本文利用定点突变和替换的方法构建了由疫苗株向野毒株逆向突变的两株感染性的 EIAV 嵌合克隆。转染后获得了相应的衍生病毒, 并在细胞水平上对其复制水平的动力学变化进行了分析。为进一步的马体内动物实验奠定了良好的基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 质粒和细胞株

驴胎皮肤细胞、驴单核巨噬细胞由哈尔滨兽医研究所提供; EIAV 全基因克隆质粒 pL GFD3-8 本室保存<sup>[6]</sup>, 该质粒是基于超低拷贝载体 pL G338 的基础上构建的 EIAV 驴胎皮肤细胞疫苗株全基因感染性克隆。pMFD5-4 本室保存<sup>[6]</sup>, 该质粒是基于 pL GFD3-8 的 *env* 区突变型嵌合克隆, 在 *env* 编码分子的第 102、192、235、236 氨基酸残基进行了由疫苗株向野毒株的逆向回复突变。大肠杆菌 DH5 本室保存。

### 1.2 主要试剂

Proofstart DNA polymerase kit (Qiagen)、T4

DNA ligase (promega)、DNA 内切酶 (Qiagen)、DNA 回收试剂盒 (Qiagen)、QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen)、RT-PCR one-step kit (Qiagen)、Non-Radioactive RT Assay Kit (Roche)、DOTAP Liposomal Transfection System (Roche)、新生牛血清 (Gibco)、质粒提取试剂盒 (Promega)、测序试剂盒 (美国 Applied Biosystem) 购自基因公司。其余试剂本室自备。

### 1.3 突变引物

Pmu1-F: 5'-TCCTTTGTCGATACTGGTACTAATG-3'

Pmu1-R: 5'-AATGCTGTATATTGTCTAAACTTTGGATCTAATGG-3'

Pmu2-F: 5'-ATCTGGACAGTTTGTGGGAGTAACTTATAATTTAG-3'

Pmu2-R: 5'-TAA GTTACTCCCACAAACTGTCCA GATTGAGATCC-3'

Pmu3-F: 5'-GAATGGTGCAAAA GCAACATTTACTATATTAAG-3'

Pmu3-R: 5'-CTT TTA ATA TAGTAA ATGTTGCTT TTG CAC CAT TC-3'

### 1.4 全基因组突变型嵌合质粒的构建

用 *EcoR* 和 *Hind* 分别对 pUC18、pL GFD3-8 双酶切。回收 pUC18 酶切 2600 左右 bp 和 pL GFD3mu 酶切 2800 左右 bp 的片段。纯化后连接得到克隆 pUC-gag。在 pUC-gag 载体上利用 overlap PCR 进行突变操作, 最终突变克隆命名为 pUC-gagmu。再将 pUC-gagmu 以 *EcoRI* 和 *PacI* 双酶切, 并与 pL GFD3-8 的 *EcoRI* 和 *PacI* 酶切大片段相连获得全基因克隆 pL Ggag3-1。分别用 *PacI* 与 *EcoRI* 酶切 pL Ggag3-1 以及 pMFD5-4, 回收 pL Ggag3-1 小片段和 pMFD5-4 大片段, 连接后得到又一全基因克隆 pL G5-3-1。

### 1.5 序列测定

使用 Applied Biosystem 公司的 BigDye Sequencing Kit, 按照说明书方法在 Applied Biosystem 377 DNA 测序仪上测定样品的 DNA 序列。

### 1.6 细胞转染和病毒传代

纯化质粒 DNA 至 OD 1.7-1.8, 溶于 TE。在六孔板中培养 FDD 细胞至单层后第二天, 以 1.5g 质粒 DNA 进行转染。16d 后收毒, 冻融 2 次后作为毒种在 FDD 细胞上继续传代, 每代第 10d 收毒, 提取病毒 RNA 并通过 RT-PCR 的方法检测培养上清中目的病毒基因的存在。连续在 FDD 细胞上传 6~7 代, 取 1mL 细胞培养上清液, 反复冻融后, 接种驴单

核巨噬细胞培养,继续传代至第 5 代。每代均在出现细胞病变效应 (cytopathic effect, CPE) 后立即收毒。保存于 -80 °C,用于感染滴度的测定以及动物实验的种毒。

### 1.7 病毒 RNA 提取及 RT-PCR

接毒后培养细胞 12d,收集培养物上清 140μL 按照试剂盒说明书操作提取病毒 RNA。Oligo T 为引物逆转录为 cDNA。PCR 鉴定引物序列为 EV-R61: 5' GAA TGG A GGT TGG ACACACA T3'; EV-F88: 5' GGT TCA TTT CCT GGG TGT A G3'。

### 1.8 逆转录酶活性检测

接毒后培养细胞至出现明显 CPE 后取 200μL 上清,超离富集病毒颗粒,测定培养物中的逆转录酶活性(测定波长 405nm,参考波长 495nm)。

### 1.9 病毒复制动力学分析

上述衍生病毒传代至第 3 代,按照 10 倍梯度稀释病毒接种至 24 孔板中,每一稀释度 2 孔,培养 15d 后,反复冻融细胞 2 次,收毒,取上清检测其中的逆转录酶活性。确定具有逆转录酶活性的最高稀释度为病毒的最低感染滴度 (infectious dose, ID)。在 25cm<sup>2</sup> 培养瓶中培养 FDD 细胞至单层,按照 100 × ID 加入病毒 1mL,吸附 30min 后弃去上清,加入 10mL 维持液。从接毒后第 2 d 开始收集

样品,每次取出 200μL 上清样品,并补回 200μL 新的维持液,共持续 18 d,收集的样品于 -80 °C 冰箱中保存。样品收集后,200μL 直接用于逆转录酶活性的检测。根据时间 - RT 活性曲线比较不同病毒的复制特性。

### 1.10 病毒颗粒电镜观察

在 FDD 细胞和 DL 细胞上接毒后 37 °C 培养至出现明显病变,收取细胞制备组织切片,用透射电镜观察其中的病毒颗粒形成情况。

## 2 结果

### 2.1 gag 基因的突变

根据 EIAV 强、弱毒株的序列比较结果,设计合适的突变引物,以质粒 pUC-gag 为模板,对 gag 基因中的相应位点进行突变,通过测序确定突变成功与否。按照强毒株的核酸序列对弱毒株基因的相应位点进行突变,得到带有 3 个突变位点的质粒,图 1 显示的是突变前后 GAG 分子氨基酸一级结构的区别,突变位点用阴影表示。这些位点是中国 EIAV 减毒疫苗 gag 基因中所共有的与强毒株不同的突变位点,期望可以通过动物实验确定这些突变位点在病毒致病性中的作用。

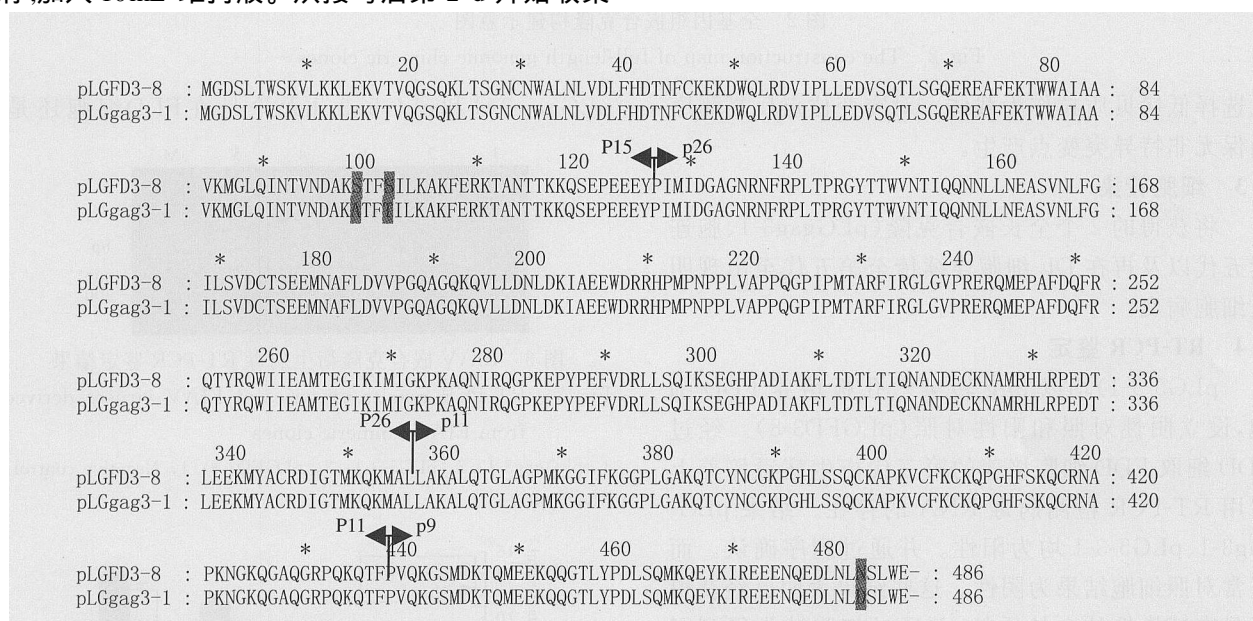


图 1 突变前后 GAG 氨基酸一级序列比较

Fig. 1 Comparison of amino acid primary sequence before and after mutation

Capitals shadowed mean the amino acid sites difference between pL GFD3-8 and PL Ggag3-1

### 2.2 全基因组突变型嵌合质粒 pL Ggag3-1 和 pL G5-3-1 的构建

构建如图 2 所示。由于 pL G338 衍生质粒为超

低拷贝质粒,因此选择 pUC18 对 gag 基因进行突变克隆筛选。由于 L TR 上存在重复序列,在高拷贝的质粒复制时容易造成同源重组而失去插入片段,因

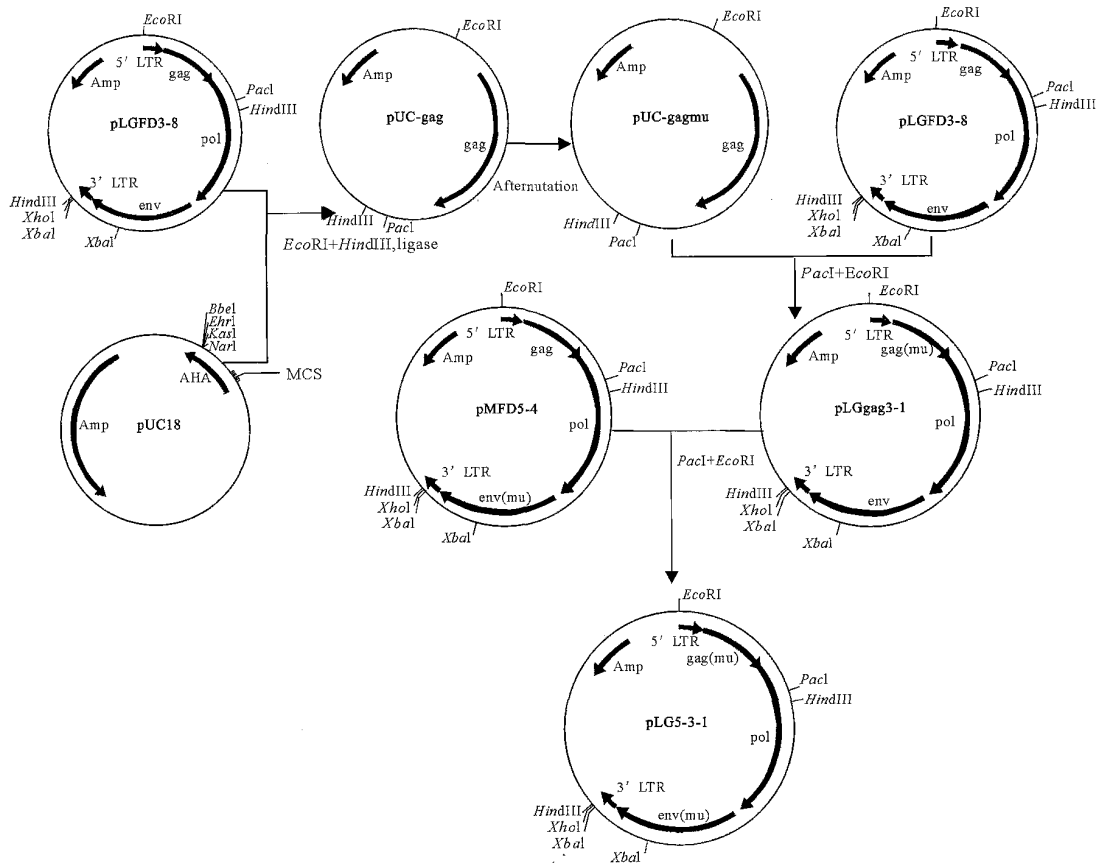


图 2 全基因组嵌合克隆构建示意图

Fig. 2 The construction map of full-length genomic chimeric clones

此选择低拷贝质粒作为载体。对突变位点反复测序确保无非特异突变点产生。

2.3 细胞转染

将获得的 2 个全长嵌合克隆(pL Ggag3-1、胞连续五代以及再在 DL 细胞连续传至第五代至出现明显细胞病变。

2.4 RT-PCR 鉴定

pL G5-3-1)均以 5μg 转染六孔板培养 FDD 细胞,设立阴性对照和阳性对照(pL GFD3-8)。经过 FDD 细取 FDD 细胞培养的第三代衍生病毒培养上清用 RT-PCR 检测病毒 RNA 的存在。结果 pL G-gag3-1、pL G5-3-1 均为阳性。并通过测序确认。而正常对照细胞结果为阴性。这些结果表明已经获得了具有感染性的全长质粒,并通过细胞转染得到了相应的衍生病毒。RT-PCR 结果如图 3 所示。

2.5 逆转录酶活性分析

收集 pL Ggag3-1 和 pL G5-3-1 分别在 FDD 细胞和 DL 细胞上第四代衍生病毒培养上清。取 200 μL 检测 RT 酶活性后比较。设立阴性对照和阳性对照(pL GFD3-8)。比较结果见图 4。结果表明:

pL Ggag 3- 1和pL G5- 3- 1无论是在FDD细胞还是

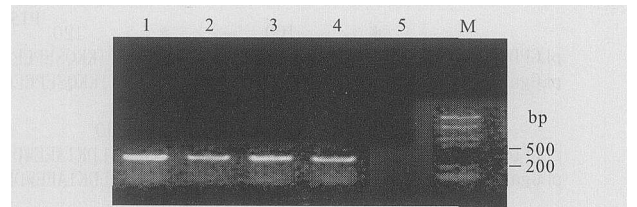


图 3 EIAV 嵌合克隆衍生病毒 RT-PCR 鉴定结果

Fig. 3 RT-PCR results of series of EIAV viruses derived from EIAV chimeric clones

1, pL Ggag3-1; 2, pL G5-3-1; 3, pL GFD3-8; 4, Negative control; M, Marker.

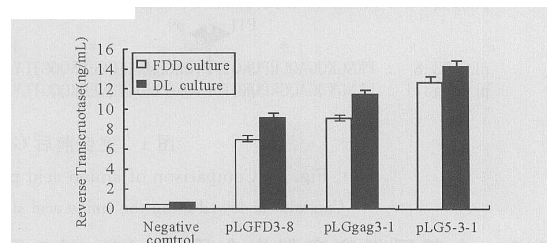


图 4 嵌合克隆衍生病毒在细胞培养上清的 RT 酶活性分析比较  
Fig. 4 comparison of Reverse transcriptase activity of viruses derived from chimeric clones in cells culture supernatant

DL 细胞培养所显示的逆转录酶活性均比其父本克隆 pL GFD3-8 要高。同时引人注意的是上述感染性克隆在 DL 细胞培养中表达的逆转录酶活性要比相应的 FDD 细胞培养的略高,说明在 FDD 第四代到 DL 第四代培养的过程中,病毒的复制能力得到了提高。

## 2.6 嵌合病毒复制动力学观察

选取 pL GFD3-8, pL Gag3-1, pL G5-3-1 衍生的第 4 代病毒按照材料和方法所述制备样品进行逆转录酶活性的检测,确定其最低感染滴度分别为  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^5$  ID/mL。按照 100 × ID 感染量加入病毒进行吸附感染,依照方法中所述制备不同时间的样品,检测其中的逆转录酶活性。得到的病毒复制曲线如图 5。

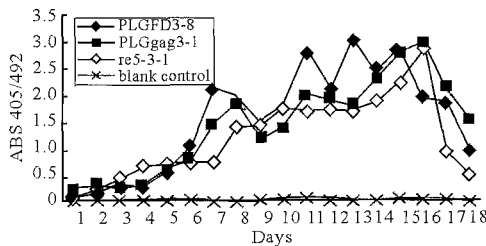


图 5 嵌合克隆衍生病毒复制曲线

Fig. 5 Replication curve of virus derived from chimeric clones

由图 5 可见,各个不同的病毒均在接毒后第 10d 到达复制平台期,到平台期的线性增长斜率相近,并且在第 14-15 d 到达最高点,第 17 d 上清液中的 RT 活性开始降低,这表明这 3 个感染性克隆衍生的病毒在复制特性上并没有太大差异。

## 2.7 衍生病毒在 FDD 细胞以及 DL 细胞上病毒颗粒电镜观察结果

用获得的病毒接种 FDD 细胞和 DL 细胞,持续观察 12d 出现轻微细胞病变时收获病毒感染细胞进行电镜观察,在细胞浆以及胞浆间隙均可观察到大量典型的 EIAV 病毒颗粒(图 6)。而在 DL 感染细胞间隙观察到的病毒粒子明显要多于 FDD 感染细胞间隙观察到的病毒颗粒。

## 3 讨论

中国马传染性贫血病毒弱毒疫苗作为目前世界上唯一大规模成功应用的慢病毒疫苗,引起了很多国内外学者的广泛兴趣。深入研究该疫苗所蕴含的减毒机理和免疫保护机制对 HIV 疫苗的研究将会提供良好的借鉴和指导作用。本科室构建的 EIAV 全长感染性克隆的病毒基因组来源清楚,是研究病毒基因组变异潜在机制、宿主免疫保护反应的有力

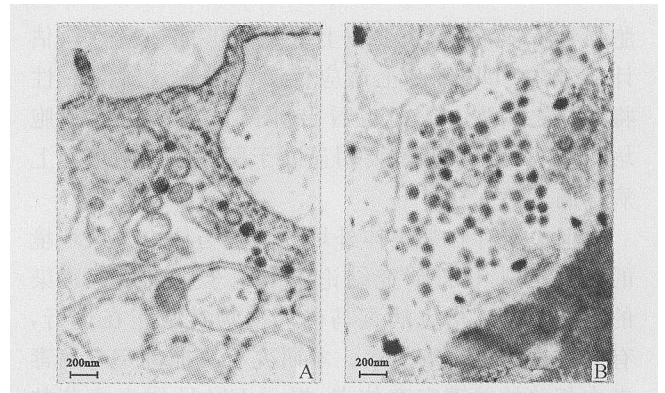


图 6 电镜观察结果

Fig. 6 Electron micrograph of EIAV particles  
A, EIAV particles displayed in FDD culture; B, EIAV particles displayed in DL culture.

工具。具体分析 EIAV 疫苗传代过程中 gag 基因的变化规律可以发现在 GAG 蛋白在有三个稳定一致性突变,其中两个位于 P15 蛋白的 99 和 102 位,它们的突变是属于亲水性的改变(分别由 A-S, T-S),这两个突变有利于降低野毒株 P15 蛋白碳末端螺旋结构的稳定性,以及它们形成二聚体的稳定性<sup>[4]</sup>。另一个突变位于 P9 的第 45 位。由天冬氨酸(D)突变为天冬酰胺(N),属于极性的改变,由负电性氨基酸变为中性氨基酸。Gag 在 EIAV 中是非常保守的,同时存在着大量的 CD4 和 CD8 抗原识别表位<sup>[7-8]</sup>。在强毒和疫苗株 Gag 区存在的少数突变很可能影响 CD4、CD8 特异性 CTL 的识别频率。位于 P17 和 P9 的少数突变的产生可能导致了更广泛的 CTL 表位的暴露从而产生了增强的免疫保护作用。研究这些稳定突变的出现与病毒毒力和机体免疫反应的相关性有助于深入了解中国 EIAV 弱毒疫苗减毒和免疫保护分子机理。

本文设计了相应的突变引物,对其中 gag 基因进行定点逆向回复改造,并在 gag 突变的基础上增加 env 突变位点,构建了 2 个在 EIAV 疫苗株遗传背景下具有 EIAV 野毒株 gag 以及 env 主要突变特征的嵌合克隆(pL Gag3-1, pL G5-3-1),分别转染 FDD 细胞并在 FDD 细胞和 DL 细胞上进行多次传代后,RT-PCR 和逆转录酶活性检测证明获得了相应的衍生病毒。电镜观察显示,嵌合克隆衍生病毒在 FDD 细胞和 DL 细胞均产生了大量典型的 EIAV 病毒颗粒。FDD 细胞上复制动力学分析显示嵌合克隆衍生病毒的复制变化趋势与父本克隆衍生病毒没有很大的区别(图 5)。所不同的是改造的嵌合病毒在复制水平最高峰出现的均比疫苗株克隆衍生毒稍晚。原因不完全清楚。推测由于疫苗株本身是皮

肤细胞适应株,而嵌合克隆衍生病毒携带部分白细胞强毒特征,在皮肤细胞上缺乏足够的适应性。估计随着在 FDD 细胞上适应代次的增加这种滞后性将会随之消失。同时也看出(图 4),单核巨噬细胞培养上病毒感染滴度要明显高于驴皮肤细胞培养上病毒滴度。

但由于存在病毒体外培养环境与体内感染环境的巨大差别,体外研究结论不能完全反应病毒感染的真实情况。衍生病毒马体内动物实验正在进行,有关数据将在后续发表。本研究有可能确定与病毒毒力相关的关键突变位点,揭示 EIAV 弱毒疫苗的毒力致弱机制,也为 HIV 等同属慢病毒的研究具有重要参考价值。

## 参考文献

- [1] 沈荣显,徐振东,何云生,等. 马传染性贫血免疫的研究[J]. 中国农业科学, 1979, 4: 1-15.
- [2] 于力,张秀芳. 慢病毒和相关疾病[M]. 北京:中国农业科技

出版社,1996.

- [3] Shao Y, Shen R, Chen G, *et al.* The comparative study on the full length genome of live attenuated vaccine and wild type EIAV strains[A]. XIII International AIDS Conference[C]. Durban: South Africa, 2000.
- [4] Hatanaka H, Iourin O, Rao Z, *et al.* Structure of equine infectious anemia virus matrix protein[J]. J Virol, 2002, 76: 1 876-1 883.
- [5] Chen C, Li F, Montelaro R C. Functional roles of equine infectious anemia virus Gag p9 in viral budding and infection[J]. J Virol, 2001, 75: 9 762-9 770.
- [6] 何翔,邵一鸣,薛飞,等. 感染性马传染性贫血病毒嵌合克隆的构建[J]. 病毒学报, 2003, 19: 128-132.
- [7] Lonning S M, Zhang W, Leib S R, *et al.* Detection and induction of equine infectious anemia virus-specific cytotoxic T-lymphocyte responses by use of recombinant retroviral vectors[J]. J Virol, 1999, 73: 2 762-2 769.
- [8] Zhang W, Auyong D B, Oaks J L, *et al.* Natural variation of equine infectious anemia virus Gag protein cytotoxic T lymphocyte epitopes[J]. Virology, 1999, 261: 242-252.