

特异性标记 EIAV 感染性克隆的构建及鉴定*

沈 弢¹, 张晓燕^{1**}, 南昌龙¹, 童 骁^{1,2}, 范秀娟¹, 沈荣显³, 邵一鸣¹

(1. 中国疾病预防控制中心 性病艾滋病预防控制中心 病毒免疫室, 北京 100050; 2. 中国科学院武汉病毒所, 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 Characterization of EIAV Vaccine Infectious Clones

Labeled with FLAGTM or 6 His-tag

SHEN Tao¹, ZHANG Xiao-yan^{1**}, NAN Chang-long¹, TONG Xiao^{1,2}, SHEN Rong-xian³, SHAO Yi-ming¹

(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: To provide convenient and effective tool for differentiating analysis between EIAV vaccine and pathogenic strain, molecular marker of FLAGTM or 6 His was inserted into S2 gene of EIAV (equine infectious anemia virus) vaccine infectious clone pFD3. The resulted chimeric clones pFD3-FLAG and pFD3-HISADD were used to transfect fetal donkey dermal (FDD) cells. After 5 generations of *in vitro* passages, the supernatant was collected to further infect donkey blood leukocyte (DL) for 3 generations of passage. The replicative characteristic of pFD3-HISADD was similar to its parental clone pFD3, RT activity assay was strong positive with significant cytopathic effect, and the virus particles could be observed under electron microscope. However, pFD3-FLAG showed a lower replication activity, RT activity was weak positive and no significant cytopathic effect was observed. These results implicated that S2 gene was an important factor for viral replication in DL cell.

Key words: Equine infectious anemia virus; Infectious clone; S2 gene; Cytopathic effect; Molecular tag

摘要: 用 FLAGTM 或 6 His 对 EIAV 疫苗株全基因感染性克隆 pFD3 的 S2 分子进行分子标记, 以建立 EIAV 疫苗株与野毒株感染鉴别诊断的方法。标记产物 pFD3-FLAG 和 pFD3-HISADD 转染驴胎皮细胞 (FDD) 后收获衍生病毒并用逆转录酶活性检测和 PCR 方法确定其感染性。在 FDD 细胞上盲传至第五代后收获细胞培养上清再感染驴单核巨噬细胞 (DL), 盲传三代后 pFD3-FLAG RT 酶活性显示弱阳性, 未见明显的细胞病变; pFD3-HISADD 为强阳性, 且细胞病变效应明显, 在电镜下可见明显的病毒颗粒。与父本克隆 pFD3 相比, 在细胞水平上二者复制特性有明显的不同。证明在 DL 细胞上 S2 基因的完整性是病毒复制很重要的因素。

关键词: 马传染性贫血病毒; 感染性克隆; S2 基因; 细胞病变效应; 分子标签

中图分类号: S852.65 文献标识码: A 文章编号: 1003-5125(2005)03-0257-05

马传染性贫血病 (EIA) 是由逆转录病毒科慢病毒属的马传染性贫血病毒 (Equine infectious anemia virus, EIAV) 引起的马属动物传染病。我国沈荣显等^[1]研制的马传染性贫血病弱毒疫苗 (Donkey lymphocyte vaccine, DLV) 是世界上唯一大规模成功应用的慢病毒疫苗。深入探索 DLV 的致弱及免疫机制将为研究 HIV (Human immunodeficiency virus) 等慢病毒的致病机理具有极为重要的参考价值^[2,3]。

phocyte vaccine, DLV) 是世界上唯一大规模成功应用的慢病毒疫苗。深入探索 DLV 的致弱及免疫机制将为研究 HIV (Human immunodeficiency virus) 等慢病毒的致病机理具有极为重要的参考价值^[2,3]。

收稿日期: 2004-10-25, 修回日期: 2004-12-17

* 基金项目: 国家自然科学基金 (30371319) 及留学人员科技活动项目择优资助经费共同资助。

作者简介: 沈 弢 (1971-), 男, 博士研究生。

** 通讯作者: 张晓燕 (1966-), 女, 黑龙江省籍, 副研究员。Corresponding author. Tel: (010) 87789398, Email: zhangxy@chinaids.org.cn

为了在 DLV 的马体动物实验中得到更有效准确的理论数据,有必要将疫苗株和强毒株在分子水平上提供鉴别依据。EIAV S2 基因位于基因组中 *pol* 和 *env* 阅读框中间。紧接着 *Tat* 第二个外显子的下游,与 *env* 基因的上游部分重叠。编码 68 个氨基酸残基。计算分子量约为 7.4kDa^[4]。S2 基因在公布的 EIAV 序列中属于相对比较保守的区段。有实验证明在体外病毒复制过程中 S2 基因的存在是非必须的^[5]。体外细胞培养中病毒的细胞嗜性和复制特征没有明显的改变。与 EIAV 野毒株感染细胞后比较,S2 缺失突变株在细胞内复制进程略有滞后,但最终的病毒滴度基本维持在相同的水平^[5,6]。本实验通过对 EIAV S2 基因进行部分改造:1) 替换 EIAV S2 起始密码后 21 个核苷酸并添加 3 个核苷酸共 24 个核苷酸,序列为 gattacaaggacgatgatgataag, 编码 FLAGTM (DYKDDDDK)。构建标记克隆为 pFD3-FLAG。2) 在 S2 序列的第一个起始密码后插入 24 个核苷酸 catcatcatcatcatcattctggg, 编码 6Hiso Sero Gly (HHHHHSG)。构建标记克隆为 pFD3-HISADD。将构建的两株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 实验材料

驴胎皮肤细胞驴单核巨噬细胞由哈尔滨兽医研究所提供;感染性 EIAV 全基因克隆质粒 pFD3 本室保存;大肠杆菌 DH5 本室保存。DNA 聚合酶、DNA 连接酶、DNA 内切酶(Qiagen)。DNA 回收试剂盒、病毒 RNA 提取试剂盒、RT-PCR 反应试剂盒(Qiagen),Non-Radioactive RT Assay Kit、DOTAP Liposomal Transfection System (Roche),质粒提取试剂盒(Promega),测序试剂盒(Applied Biosystem),鼠抗 FLAG 抗体(stratagene),鼠抗 6His 抗体(Qiagen),FITC-羊抗鼠 IgG(Serotec)。

1.2 克隆构建及测序

1.2.1 pFD3-FLAG 构建:引物设计如下(上海博亚公司合成):P1:5'-ACAATGGTACTAATTTTGTAGCAGAGTCA G³; P2:5'-CACACAA GAGACATTA GCA TTACTGGTACT³; P-FLAG-REV:5'-CGTCGTCGTCTTGTAATCCA TACACCAAA CCTTACAACA-3³; P-FLAG-FOR:5'-TTACAA GACGACGACGATAAGACATGGTCA GCA TTGCA TTCT³。提取质粒 pFD3;pfd3-flag-rev 由 P1 与

P-flag-rev 为引物,pFD3 质粒为模板的 PCR 反应扩增;pfd3-flag-for 由 primer2 与 P-flag-for 为引物、pFD3 质粒为模板的 PCR 反应扩增;产物由 1.2% Agrose 电泳,Qiagen 凝胶回收试剂盒回收 40μL。搭头拼接扩增由 primer1 与 primer2 为引物、P-flag-rev 和 P-flag-for 为模板的 PCR 反应扩增。产物由 1.2% Agrose 电泳回收后由 *Nco*、*Pme* 酶切纯化回收大片段;同时 pFD3 也用 *Nco*、*Pme* 酶切纯化回收大片段。连接转化、酶切鉴定。阳性克隆命名为 pFD3-FLAG。

1.2.2 pFD3-HISADD 构建:引物设计:P-HISADD-REV:5'-CCCCAGAA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TACACCAAACCTTACA-3³; P-HISADD-FOR:5'-CA TCA TTCTGGGGGA TTATTTGG TAAA GGG³,两侧引物仍为 P1、P2。具体方法同前述。阳性克隆命名为 pFD3-HISADD。序列测定使用本科室的 Applied Biosystem 377 DNA 测序仪上测定样品的 DNA 序列。

1.3 细胞转染、传代以及病毒培养上清 RT-PCR 标签检测

按照碱裂解法大量提取质粒 DNA,用 PEG 方法纯化,将 DNA 溶于 TE。在六孔板中培养 FDD 细胞至单层后,使用 Roche 公司的脂质体转染系统(DOTAP Liposomal Transfection System)按试剂盒说明书用 5μg 质粒 DNA 进行转染。10d 后收毒,冻融 2 次后作为毒种取 1mL 在 FDD 细胞上继续传代。每代均在第 10d 收毒。在 FDD 细胞上连续传 5 代后再在 DL 细胞上连续传 5 代,DL 细胞出现明显 CPE 时收毒。FDD 第三代病毒培养上清提取病毒 RNA 并 RT-PCR 电泳回收 DNA 片段测序鉴定。RT-PCR 引物序列为:P3:5'-AAGCCATCA GGGAGGGAA GACCACCTC³; P4:5'-GAAATGGTAAA GGA GTGA TG³。

1.4 病毒逆转录酶活性检测

取 pFD3、pFD3-FLAG、pFD3-HISADD 在 FDD 细胞上第三代病毒培养上清和 DL 细胞第三代病毒培养上清各 200μL,按照 Non-Radioactive RT Assay Kit 提供方法测定培养物中的逆转录酶活性。

1.5 表达产物的检测

取 pFD3、pFD3-FLAG、pFD3-HISADD 在 FDD 细胞上第三代衍生病毒感染 FDD 细胞,37 培养 15d,消化后涂片。用 -20 预冷的丙酮固定 30min。1:200 稀释的鼠抗 FLAG 抗体或鼠抗 6His 抗体 37 作用 30min,PBS 洗三遍,加上 FITC 标记的抗鼠 IgG 荧光抗体(1:200),37 作用

40min, PBS 洗三遍。加一滴甘油后在荧光显微镜下观察并拍摄实验结果。

1.6 病毒复制特性分析

病毒传代至 FDD 细胞第 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 培养瓶中培养 FDD 细胞至单层,按照 100 倍最低感染滴用量加入病毒,吸附 30min 后弃去上清,加入 10mL 维持液。从接毒后第 2d 开始收集样品,每次取出 200 μ L 上清样品,并补回 200 μ L 新的维持液,共持续 18d,收集的样品于 -80 冰箱中保存。样品收集完成后,200 μ L 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。

1.7 病毒颗粒电镜观察

取 DL 细胞第三代衍生病毒接毒单核巨噬细胞培养至出现明显病变,收取细胞制备组织切片,用电镜观察其中的病毒颗粒形成情况。

2 结果

2.1 pFD3-FLAG 与 pFD3-HISADD 嵌合质粒的鉴定

将经过两轮 overlap-PCR 以后得到的产物用 *Nco*、*Pme* 双酶切,片段回收后与同样双酶切的质粒 pFD3 的大片段连接,得到含有编码 FLAG 或 6His·Ser·Gly 肽段核苷酸序列的全基因克隆 pFD3-FLAG 和 pFD3-HISADD。利用 *Xba* 双酶切鉴定可得到大小分别为 3914、7295bp 两条带。构建的全长嵌合克隆见图 1。

2.2 转染及细胞病变效应

将获得的 2 个全长标记克隆 (pFD3-FLAG、pFD3-HISADD) 均以 5 μ g 转染六孔板培养 FDD 细

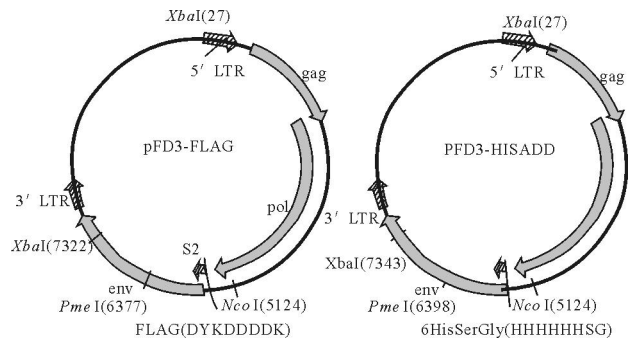


图 1 全长标记基因组克隆的质粒图谱

Fig. 1 Plasmid maps of full-length genomic clones

胞,设立阴性对照和阳性对照 (pFD3)。经过 FDD 细胞连续五代以及再在 DL 细胞连续传至第五代。总共历时 75d。FDD 细胞上 pFD3-FLAG、pFD3-HISADD 的衍生病毒均可见轻微的细胞病变,部分病变细胞萎缩、变暗脱落;而在单核巨噬细胞培养上 pFD3-HISADD 细胞病变非常明显。单核巨噬细胞病变呈多形型变化,常带有长长的刺突。部分呈空泡状,最终皱缩失去黏附特性而脱落凋亡。pFD3-FLAG 在单核巨噬细胞上仍未见明显的细胞病变。如图 2 所示。

2.3 逆转录酶活性和 RT-PCR 分析

收集 pFD3-FLAG 和 pFD3-HISADD 分别在 FDD 细胞和 DL 细胞上第三代衍生病毒培养上清。取 200 μ L 检测 RT 酶活性后比较。设立阴性对照和阳性对照 (pFD3)。比较结果见图 3。结果表明 pFD3-FLAG 和 pFD3-HISADD 在 FDD 细胞上 RT 酶活性与 pFD3 没有明显的区别。但在 DL 细胞上 pFD3-HISADD 的 RT 酶活性仍然保持很高的活性,与 pFD3 基本持平。但 pFD3-FLAG 在 DL 细胞上 RT 酶活性下降非常剧烈。同时也发现衍生病毒在 DL 细胞上表达的 RT 酶量要比在 FDD 细胞上要稍高。分别提取上述培养上清的病毒 RNA 后

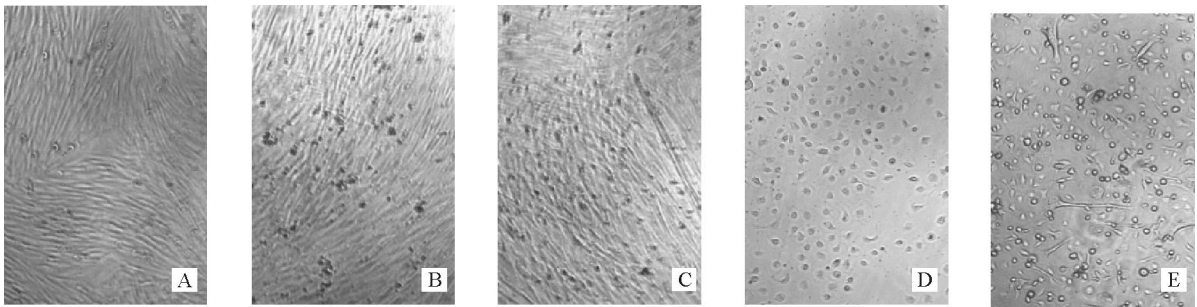


图 2 pFD3-HISADD 衍生病毒在细胞上 CPE 现象

Fig. 2 CPE phenomenon of pFD3-HISADD virus displayed on fetal donkey dermal cell as well as donkey peripheral blood monocyte differentiation-maturation culture system

A, FDD cell culture without EIAV inoculation; B, FDD cell culture within pFD3-FLAG infection; C, FDD cell culture within pFD3-HISADD infection; D, DL cell culture without EIAV inoculation; E, DL cell culture within pFD3-HISADD infection

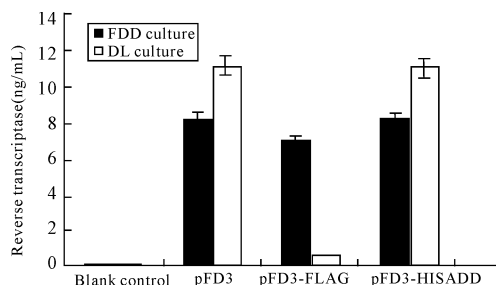


图 3 标记克隆的衍生病毒在细胞培养上清的 RT 酶活性分析比较

Fig. 3 Comparison of reverse transcriptase activity of viruses derived from labelled full-length clones in cells culture supernatant

RT-PCR 分析。除 pFD3-FLAG 在 DL 细胞培养上清为阴性外,其余 RT-PCR 检测均为阳性。凝胶回收大片段测序后无误。

2.4 间接免疫荧光实验结果

将 pFD3、pFD3-FLAG、pFD3-HISADD 第三代衍生病毒再次感染 FDD 细胞。培养 15d 后消化涂片,间接免疫荧光染色后 pFD3-FLAG 和 pFD3-HISADD 在荧光显微镜下可以清晰的看到较强的黄绿色荧光。而对应的 pFD3 荧光强度远远低于标记克隆的样品。说明与标记克隆的衍生病毒的 S2 分子相融合的标签分子得以充分表达。见图 4。

2.5 病毒颗粒电镜观察

病毒传至 DL 细胞第 4 代后,收获病毒感染的细胞进行电镜观察,pFD3-HISADD 可观察到典型的 EIAV 病毒颗粒(图 5A)和病毒从细胞芽生出来的形态(图 5B)。病毒粒子呈球形,大小约 100 nm。成熟的病毒粒子成堆地积聚在细胞外和胞浆空泡中。而 pFD3-FLAG 在电镜下未见病毒颗粒。

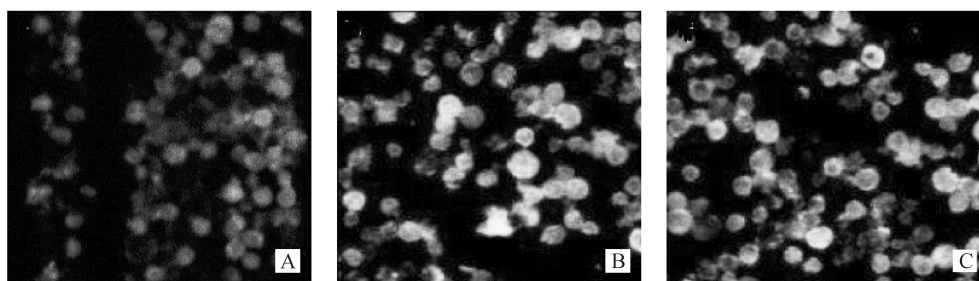


图 4 间接免疫荧光染色检测衍生病毒融合标签的表达

Fig. 4 Analysis of chimeric tag molecules of viruses derived from labelled full-length clones by the indirect immunofluorescence assay
A, pFD3; B, pFD3-FLAG; C, pFD3-HISADD

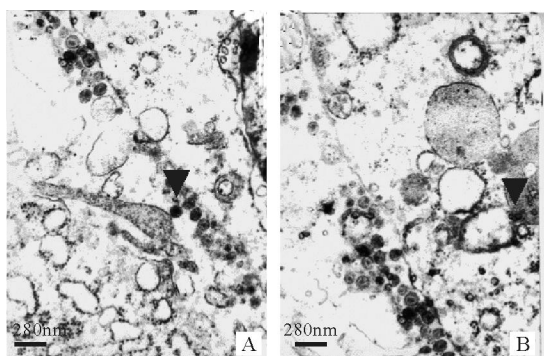


图 5 电镜观察结果

Fig. 5 Electron micrograph of pFD3-HISADD EIAV particles
A, pFD3-HISADD virus particles; B, Budding of EIAV particles.

2.6 FD3-HISADD 衍生病毒在驴胎皮肤细胞 FDD 上的复制特性评价

按 1.6 所述,时间 - RT 活性曲线比较 pFD3 与 pFD3-HISADD 衍生病毒的复制特性,结果见图 6。

逆转录酶活性是反映慢病毒复制水平最有特征性的指标。可以看出,pFD3 与 pFD3-HISADD 在 FDD 细胞上的逆转录酶活性变化在整个病毒复制

过程中没有明显的区别。两者均在第 8 天左右达到复制的高峰,且增长斜率基本一致。从第 8 天开始复制高峰持续 9-10d 开始下降。

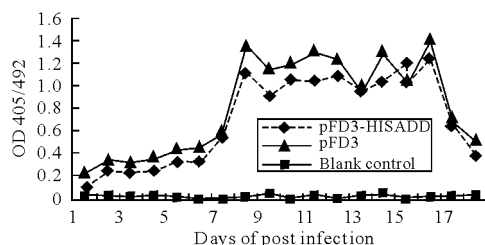


图 6 嵌合克隆衍生病毒复制曲线

Fig. 6 Replication curve of virus derived from pFD3-HISADD clone

3 讨论

在已发现的包括人 HIV 在内的 7 种慢病毒中,研制出的安全而有效的疫苗只有中国 EIAV 减毒活疫苗。其安全性和免疫保护性经受了几十年的考验,是研究包括艾滋病毒疫苗在内的慢病毒疫苗的绝好的参照。因此分析 EIAV 减毒活疫苗的致弱机制和免疫保护作用具有极为重要的意义。在 EIAV 整个

基因组中, S2 基因被认为有可能是病毒复制非必须的^[5,6]。本文对 S2 采用基因替换和嵌入的方法, 构建了两个不同类型的 Tag 标记的马传染性贫血病毒的嵌合克隆, 其中 pFD3-HISADD 转染后成功获得了相应的衍生病毒。采用分子生物学检测方法(如引物、探针或序列测定等)可以准确确定和区分重组毒株和野毒感染。如采用不同的探针可以对病毒载量进行定量分析并可以准确估计在标记疫苗和野生病毒同时感染的情况下两者的感染量的比例关系。为马传染性贫血病毒致病的分子机理和免疫保护机制的研究提供了一个良好的平台。

考虑到在对疫苗株全基因组克隆进行分子标记的同时必须要尽可能减少对基因组本身特性的影响以及尽可能不改变其衍生病毒的免疫保护作用。本文选择两种不同类型商品化的通用标签嵌入到病毒基因组中。FLAG 和 6^{*} His 本身的免疫原性就很弱, 因此标签本身的免疫原性对病毒免疫的影响是很微弱的。其中 pFD3-HISADD 构建时在 6His 肽的羧基端根据实验可行性增添了一个 Ser Gly 的很小的短肽分子, Ser 和 Gly 分子小, 柔韧性好, Ser-Gly 的加入有利于避免标签的存在对 S2 功能的影响。改造后并不破坏邻近的 S1 第二个外显子和 Env 蛋白的编码序列。实验证明, 采用对 S2 氨基端的 7 个氨基酸进行替换后克隆 (pFD3-FLAG) 尽管在 FDD 细胞上仍具有很强的 RT 活性, 但在 EIAV 的自然感染宿主细胞(单核巨噬细胞)上基本上丧失了复制能力。分析原因可能是在 S2 的氨基端存在一个公认的核穿孔基序(MGLFG)^[5]受到了破坏而在单核细胞内病毒活性丧失。但真正原因仍不清楚。而 pFD3-HISADD 并没有破坏 S2 本身的序列, 标签得以与 S2 分子融合表达。相应的衍生病毒在 FDD 和 DL 细胞上都得到了很好的表达。pFD3-HISADD 在 FDD 细胞上复制特性分析并没有看出

其与疫苗株未标记克隆存在明显的差别。同时也在细胞水平上证明 S2 基因的完整性对 EIAV 病毒复制具有重要的影响作用。但值得注意的是, 尽管 pFD3-HISADD 的体外实验证明与 pFD3 具有基本相似的复制特性, 但其动物体内免疫保护能力仍有待进一步评价^[7]。动物实验正在进行中, 结果将在后续发表。

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] Kahler S. Immunologic response to EIAV offers hope for AIDS treatment [J]. J Am Vet Med Assoc, 1992, 201: 1672-1673.
- [3] Cook R F, Berger S L, Rushlow K E, *et al.* Enhanced sensitivity to neutralizing antibodies in a variant of equine infectious anemia virus is linked to amino acid substitutions in the surface unit envelope glycoprotein[J]. J Virol, 1995, 69: 1493-1499.
- [4] Schiltz, R. L., D. S. Shih, S. Rasty, R. C. Montelaro, *et al.* Equine infectious anemia virus gene expression: characterization of the RNA splicing pattern and the protein products encoded by open reading frames S1 and S2[J]. J Virol, 1992, 66: 3455-3465.
- [5] Feng Li, Bridgeta A, Puffer, *et al.* The S2 Gene of Equine Infectious Anemia Virus Is Dispensable for Viral Replication In Vitro[J]. J Virol, 1998, 72: 8344-8348.
- [6] Feng LI, Leroux. C, J. K. Craigo, *et al.* The S2 Gene of Equine Infectious Anemia Virus Is a Highly Conserved Determinant of Viral Replication and Virulence Properties in Experimentally Infected Ponies [J]. J Virol, 2000, Vol. 74, No. 1: 573-579.
- [7] Feng Li, J. K. Craigo, L. Howe, *et al.* A Live Attenuated Equine Infectious Anemia Virus Proviral Vaccine with a Modified S2 Gene Provides Protection from Detectable Infection by Intravenous Virulent Virus Challenge of Experimentally Inoculated Horses [J]. J Virol, 2003, Vol. 77, No. 13: 7244-7253.