

裂解性复制诱导产生可视化 重组 Epstein Barr 病毒*

唐运莲** 卢建红** 武明花 黄琛 曹利
彭淑平 周艳宏 李小玲 周鸣 唐珂 李桂源***
(中南大学湘雅医学院肿瘤研究所, 长沙 410078)

摘要 为了在病毒的整个基因组中研究基因的功能, 分析基因与基因之间的相互作用, 含有整个野生型 EB 病毒 (EBV) 基因组的 BAC-EBV 质粒 (p2089), 首先被转染 EBV 阴性的 HEK293 细胞, 经潮霉素筛选建立了 HEK293/p2089 稳定细胞系. 再构建 pcDNA3.1(+)/BZLF1 和 pcDNA3.1(+)/BALF4 真核表达质粒, 共转染至 HEK293/p2089 细胞内, 诱导 EBV 裂解性复制产生可视化的重组 EBV 颗粒. 重组 EBV 颗粒感染 Raji 细胞, 在倒置荧光显微镜下和流式细胞仪记数 GFP 阳性细胞, 根据这些“绿色 Raji 单位”确定病毒的滴度. 在国内首次建立这种以细菌人工染色体 (BAC) 为基础的 EBV 感染性克隆技术, 将允许对 EB 病毒基因组中任何基因的任何遗传修饰, 为在整个基因组中对 EB 病毒基因功能的研究奠定了基础, 也为对 EBV 与其相关的肿瘤如鼻咽癌发生机理的研究建立了新的技术平台.

关键词 裂解性复制, 重组 EB 病毒, 可视化, 基因组
学科分类号 R739.63

EB 病毒 (Epstein Barr virus, EBV) 属于 γ 疱疹病毒亚科, 基因组大小约 172 kb, 包含近 100 个基因, 编码 200 多种蛋白质. EBV 能使人的 B 淋巴细胞永生, 并与多种人类恶性肿瘤如 Burkitt's 淋巴瘤、何杰金氏病、单核细胞增多症和在中国南方高发的鼻咽癌相关^[1]. 处于潜伏感染时 EBV 基因组以环形的游离体存在, 只有少数基因表达, 但还是有少量成熟病毒子的产生 (裂解性复制)^[2]. EBV 在何种特殊条件下导致细胞转化、如何调控其呈潜伏或裂解性复制以及 EB 病毒的致病机理, 都与它庞大的复杂的基因组有关. 为了在病毒的整个基因组中研究基因的功能, 分析基因与基因之间的相互作用, Delecluse 等^[3]报道了第一个包含 EBV 全基因组的 BAC-EBV 穿梭系统 (Maxi-EBV 系统). 我们使用 Hammerschmidt^[4]提供的 Maxi-EBV 质粒, 建立了 HEK293/p2089 稳定细胞系. 再构建 pcDNA3.1(+)/BZLF1 和 pcDNA3.1(+)/BALF4 真核表达质粒, 共转染至 HEK293/p2089 细胞内, 成功诱导其裂解性复制产生可视化的重组 EBV, 子代病毒具有与野生型 EBV 一致的所有特性, 能使原代 B 细胞永生. 我们在国内首次建立这种以细菌人工染色体 (BAC) 为基础的 EBV 感染性克隆技术, 允许对 EB

病毒基因组中任何基因进行任何的遗传修饰, 为在整个基因组中对病毒基因功能的研究建立了技术平台, 为 EBV 致病机理与肿瘤发生机理的研究开辟了一条新的思路.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞. 5 型腺病毒 E1A 和 E1B 基因转化的 HEK293 人胚肾上皮细胞株, 中南大学肿瘤研究所细胞遗传室保存. Raji 人 EBV 阳性的 Burkitt's 淋巴瘤细胞株, 中南大学肿瘤研究所细胞遗传室保存. HEK293 细胞用 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, Raji 细胞用 15% 小牛血清的 RPMI 1640 培养基, 在 5% CO₂、37℃ 条件下培养.

1.1.2 菌株和质粒. DH10B 购于 Invitrogen 公司; 大肠杆菌 *E.coli* JM109 购于 TakaRa 公司; 含

*国家重大科学研究计划 (2006CB910504), 国家自然科学基金资助项目 (30330560), 湖南省自然科学基金资助项目 (05JJ300064) 和中国博士后基金 (20060390264).

** 并列第一作者.

*** 通讯联系人. Tel/Fax: 0431-4805383, E-mail: ligy@xysm.net

收稿日期: 2006-10-17, 接受日期: 2006-11-28

Maxi-EBV 的质粒 p2089 由德国 GSF- 国家环境与健康研究中心 Hammerschmidt 教授惠赠, 它含有野生型 EBV 的整个病毒基因组 172 kb, 一个 F 因子、氯霉素抗性基因 *cat* (用于在 *E.coli* 中的筛选)、潮霉素抗性基因 *hyg* (用于在真核细胞中的筛选) 以及 CMV 启动子控制的绿色荧光蛋白 GFP 基因 (用于 EBV 表型鉴定). 带有 CMV Promoter 的 pcDNA3.1(+) 表达载体购于 Invitrogen 公司.

1.1.3 酶和试剂. DMEM, RPMI 1640 细胞培养基购自 Gibco 公司; RNasin, 胎牛血清购自北京华美生物工程公司; Pyrobest™ DNA polymerase, dNTPs, λDNA/*Hind* III marker, DL2000 DNA marker, 限制性内切酶 *EcoR* I、*Bam*H I 及 T4 DNA 连接酶购自大连宝生物公司 (TakaRa 产品); 氯霉素, 潮霉素为 Ameraco 公司产品; NucleoBond PC 500 kit (MACHEREY-NAGEL) 购于北京博奥生物芯片公司; TRIzol™, Lipofectamine™ 购于 Invitrogen 公司; 小量质粒抽提试剂盒和凝胶 DNA 回收试剂盒购自上海华舜生物工程公司; Pretained protein molecular mass markers, RT 试剂盒购自 Promega 公司; mouse anti-BZLF1 购自 Chemicon 公司; ECL 化学发光检测试剂盒, 蛋白质浓度测定试剂盒 (BCA protein assay reagent kit) 购自 Pierce 公司, UltraSensitive™ S-P (Mouse) 超敏 SP (鼠) 试剂盒购自福州迈新公司.

1.1.4 PCR 引物的设计与合成. 根据 Laux 等报告的人 EBV BZLF1 和 BALF4 cDNA 序列 (NC_001345), 我们设计了两对引物如下, 其中 P1 为上游引物, P2 为下游引物. 为了便于质粒的构建和克隆的表达, 根据 BZLF1 和 BALF4 cDNA 的酶切图谱和 pcDNA3.1(+) 的多克隆酶切位点, 分别在引物的 5' 端和 3' 端引入 *Bam*H I (GGATCC) 和 *Eco*R I (GAATTC) 2 个限制性内切酶酶切位点, 并使扩增的产物分别包含 2 个基因的整个 ORF. 引物经计算机分析软件 Primer 分析, 由大连宝生物公司合成并经 PAGE 纯化. BZLF1 引物 (P1: 5' AAA GGA TCC *Bam*H I ATG ATG GAC CCA AAC TCG ACT 3', P2: 5' CCC GAA TTC *Eco*R I TTA GAA ATT TAA GAG ATC CTC 3'), BALF4 引物 (P1: 5' AAA GGATCC *Bam*H I ATG ACT CGG CGT AGG GTG CTA A 3', P2: 5' CCC GAATTC *Eco*R I TTA AAA CTC-TGC CTC C 3').

1.2 方法

1.2.1 大量抽提质粒. 含 Maxi-EBV p2089 质粒的 DH10B 细菌划线 (含氯霉素 25 mg/L 的 LB 平板), 37℃ 过夜培养, 将筛选的阳性单克隆加 3 ml LB 培养基 (含氯霉素 25 mg/L) 37℃ 过夜摇菌培养 (250 r/min), 次日再按 1:400 稀释, 37℃ 过夜摇菌培养 (250 r/min), 再按照 NucleoBond PC 500 kit 试剂说明书操作程序大量抽提质粒.

1.2.2 电转化. 加质粒 p2089 DNA 0.1 μg 至 tube 管中, 置冰上 10 min, 与电转化样品池、2 mm 电击杯也一起放在冰上冷却. 再把 DH10B 感受态细胞等解冻后 100 μl 加至预冷的含有 DNA tube 管中. 小心吸 DNA/ 细胞混合物至预冷的电击杯内. 将电击杯放在电击仪的样品池内, 调节电击仪, 使电脉冲为 25 μF, 电压 2.3 kV, 电阻 200 Ω, 启动对细胞的电脉冲 4~5 ms. 脉冲结束后加 750 μl SOC 至电击杯内, 将细胞转至 1.5 ml tube 管, 于 37℃ 在轻柔振荡下 (180 r/min) 培养 1 h. 铺板 100 μl/90 mm LB 平板 (含氯霉素 25 mg/L) 干燥 5~10 min. 倒置平板于 37℃ 过夜培养. 将筛选的阳性单克隆再用 NucleoBond PC 500 kit 大量抽提质粒, 用于稳定转染.

1.2.3 转染 Maxi-EBV 质粒稳定细胞系的建立. HEK293 细胞经胰酶消化后, 按 3×10^4 孔接种到 12 孔板中, 并加入 0.5 ml 完全培养液. 置 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养, 待细胞融合至 50%~80% 水平即可开始转染. 按照 Lipofectamine™ 脂质体说明书进行 Maxi-EBV 质粒 DNA 转染, 培养 24 h 后每孔细胞被转移至 50 ml 培养瓶, 第 3 天加含 100 mg/L 潮霉素和 10% 胎牛血清的 DMEM 进行筛选, 4 周后在荧光显微镜下可观察到含有 GFP 的阳性细胞 (HEK293/p2089) 的 5 个单克隆被挑出来并扩增培养^[9].

1.2.4 BZLF1 和 BALF4 基因真核表达质粒的构建. 按照 TRIzol™ 试剂盒说明书操作程序提取 B95-8 细胞总 RNA, 消化 RNA 中的痕量基因组 DNA, 用逆转录试剂盒合成 cDNA, 以反转录产物 2 μl 为模板, 以 2 对引物 P1、P2 各 1 μl, Pyrobest DNA polymerase 进行聚合酶链式反应 (PCR) 扩增 BZLF1-738 bp, BALF4-2574 bp 2 个 PCR 片段. 用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切经凝胶纯化回收的 PCR 产物片段和 pcDNA3.1(+) 载体, 4℃ 连接过夜, 转化至大肠杆菌 *E.coli* JM109, 挑克隆, 小量提取质粒用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切鉴定阳性重组克隆,

进一步对阳性重组质粒进行测序, 分析 2 个基因编码的正确性, 阳性重组质粒以 pcDNA3.1(+)/BZLF1 和 pcDNA3.1(+)/BALF4 表示.

1.2.5 蛋白质印迹检测 pcDNA3.1(+)/BZLF1 载体 BZLF1 蛋白的表达. 将 pcDNA3.1(+)/BZLF1 质粒 2.0 μg 和 pcDNA3.1(+)空白载体 2.0 μg (作为对照) 分别转染入 50 ml 培养瓶 HEK293 细胞, 用 Lipofectamine™ 转染试剂. 48 h 后收集细胞吸去培养液, 并用冰冷的 PBS 洗 4 次, 弃净 PBS. 加入适量的蛋白质抽提 Lysis 缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 150 mmol/L NaCl, 0.1% SDS, 100 mg/L PMSF, 1 mg/L Aprotinin, 1% Nonidet P-40 或 Triton X-100, 0.5% Na-deoxycholate) 裂解细胞 (50 μl /50 ml 培养瓶), 冰上放置 20 min, 不时摇晃几次. 用酒精消毒后的细胞刮子将裂解的细胞刮下来, 转移到 1.5 ml 离心管中. 12 000 r/min, 4℃ 离心 10 min, 吸取上清至另一管中, BCA 法测蛋白质浓度, 分装成小管, 存于 -80℃ 备用. 用前加 2× 上样缓冲液并混匀, 于 100℃ 变性 5 min. 每孔加入 100 μg 蛋白质, 12% SDS-PAGE 电泳, 结束后半干转至 NC 膜, 摇床上 5% 脱脂牛奶封闭 2 h, 杂交一抗鼠抗 -BZLF1, 4℃ 过夜. PBST 洗膜 3 次, 每次 10 min. 杂交二抗, 室温 2 h, PBST 洗膜 3 次, 每次 10 min. 用 Pirece 公司的 ECL 试剂盒进行化学发光检测, X 光片压片、显影、定影.

1.2.6 EBV 的裂解性复制和定量. 将 pcDNA3.1(+)/BZLF1 和 pcDNA3.1(+)/BALF4 2 个质粒共转染至 HEK293/p2089 细胞内, 72 h 后收集上清, 3 000 r/min 离心 10 min 去掉细胞碎片后将上清(即重组的 EBV) -80℃ 冻存, Neuhierl 等^[9]认为 BZLF1 是一个即刻早期基因, 能诱导病毒的裂解性复制, 上调共转染 BALF4 的病毒上清滴度. 不同浓度的病毒滴度可通过病毒感染 Raji 细胞来定量. 将 0.3×10^6 Raji 细胞接种于 24 孔板内, 每孔加 500 μl -80℃ 的病毒上清, 感染后 24 h 换液, 感染后 72 h 即可在倒置荧光显微镜下记数 GFP 阳性细胞, 根据这些“绿色 Raji 单位”就可以评价每毫升病毒上清感染颗粒的绝对记数. 病毒上清也可用流式细胞术分析定量. 分别取生长良好的 HEK293/Maxi-EBV 细胞, 重组病毒感染的 Raji 细胞, 未感染的 Raji 细胞(作为阴性对照)各 3 瓶, 1200 r/min 离心 10 min, PBS 洗涤后, 再用 PBS 重悬细胞使其变成单细胞悬液, 流式细胞仪(FACSort, Becton Dickinson)分析 GFP 的表达^[9].

1.2.7 免疫细胞化学染色. 采用链霉菌抗生物素蛋白 - 过氧化酶(S-P 法)进行免疫细胞化学染色. HEK293/p2089 细胞种板于加有盖玻片的六孔板内, 次日分别瞬时共转染 pcDNA3.1(+)/BZLF1 和 pcDNA3.1(+)/BALF4 2 个质粒, pcDNA3.1(+)空白质粒作阴性对照. 操作步骤见 UltraSensitive™ S-P (Mouse)超敏 SP(鼠)试剂盒试剂说明书, 若胞膜或胞浆呈棕黄色为阳性.

2 结 果

2.1 稳定转染 Maxi-EBV 的 HEK293 细胞单克隆

图 1 为倒置荧光显微镜下观察的稳定转染 Maxi-EBV 的 HEK293 细胞经潮霉素筛选 4 周后的细胞单克隆, 图 1a 为白光对照, 图 1b 为绿色荧光.

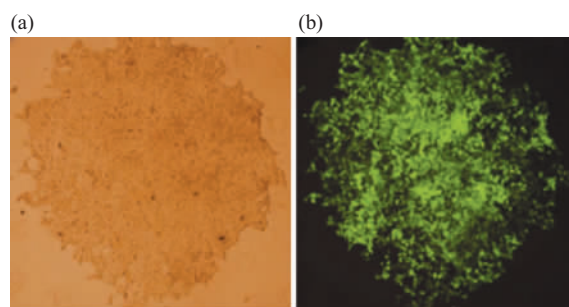


Fig. 1 293 cells clones stably transfected with Maxi-EBV
(a) Phase contrast. (b) A single clone of stably transfected HEK293 cells.
(inverted fluorescence microscope, magnification, 4×10).

2.2 pcDNA3.1 (+) /BZLF1 和 pcDNA3.1 (+) /BALF4 表达质粒的构建和鉴定

定向克隆构建 pcDNA3.1 (+) /BZLF1 和 pcDNA3.1(+)/BALF4 真核表达质粒, 对阳性质粒进行 RT-PCR 扩增、双酶切鉴定(图 2)和测序分析, BZLF1 和 BALF4 编码序列和接头序列完全正确. pcDNA3.1(+)/BZLF1 和 pcDNA3.1(+)/BALF4 测序结果与 Laux 等报告的人 EBV- BZLF1 和 BALF4 cDNA 序列(NC_001345)同源性为 100%.

2.3 蛋白质印迹检测 pcDNA3.1 (+) /BZLF1 质粒转染细胞中 ZEBRA 蛋白的表达

蛋白质印迹结果表明, 转染了 pcDNA3.1(+)/BZLF1 质粒的 HEK293 细胞、HEK293/ p2089 细胞和经 TPA 诱导处理的 B95-8 细胞, 能表达 42 ku 的 ZEBRA 蛋白质如图 3 所示.

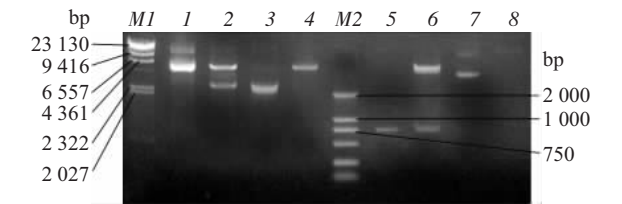


Fig. 2 RT-PCR amplification of BZLF1 and BALF4, double restrictive analysis of positive plasmids
M1: λDNA/*Hind*III marker; 1: pcDNA3.1(+)/BALF4; 2: Double enzyme cutting of pcDNA3.1(+)/BALF4 with *Eco*R I and *Bam*H I; 3: RT-PCR product of the 2 574 bp of BALF4 gene ORF from B95-8 cell; 4: Double enzyme cutting of pcDNA3.1 (+) with *Eco*R I and *Bam*H I; M2: DL2000 DNA marker; 5: RT-PCR product of the 738 bp of BZLF1 gene ORF from B95-8 cell; 6: Double enzyme cutting of pcDNA3.1 (+) /BZLF1 with *Eco*R I and *Bam*H I; 7: pcDNA3.1(+)/BZLF1; 8: RT-PCR product (negative) of BALF4 and BZLF1 gene ORF.

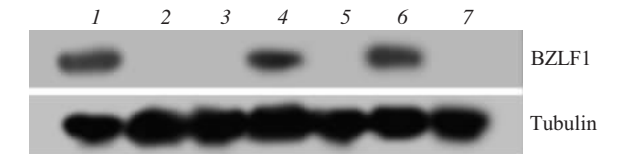


Fig. 3 Western blotting analysis of expression of the protein BZLF1
1: B95-8+TPA induction 48 h; 2: B95-8; 3: HEK293; 4: HEK293 transfected pcDNA3.1(+)/BZLF1; 5: HEK293 transfected pcDNA3.1 (+) (control); 6: HEK293/p2089 transfected pcDNA3.1 (+) / BZLF1 and pcDNA3.1(+)/BALF4; 7: HEK293/p2089 transfected pcDNA3.1(+).

2.4 EBV 的裂解性复制和病毒上清定量

将 pcDNA3.1 (+)/BZLF1 和 pcDNA3.1 (+) /BALF4 瞬时共转染至已经构建好的 HEK293/p2089 稳定细胞内，转染 72 h 后 gp350 免疫细胞化学染色结果证明，BZLF1 和 BALF4 能诱导 HEK293/p2089 细胞裂解性复制，gp350 在瞬时共转染了 pcDNA3.1 (+)/BZLF1 和 pcDNA3.1 (+)

/BALF4 的 HEK293/p2089 的胞浆有阳性表达(图 4). gp350 是 EBV 表达的包膜糖蛋白，通过与 CD21 (CR2)的结合，使 EBV 得以进入 CD21⁺ 细胞.转染 72 h 收集上清(即重组的 EBV) -80℃ 冻存.重组 EBV 感染 Raji 细胞，72 h 后在倒置荧光显微镜下观察记数 GFP 阳性细胞 (图 5).再通过流式细胞术分析 GFP 的表达，来进一步确定被感染的 Raji 细胞的百分比，结果表明 (图 6)在稳定转染了

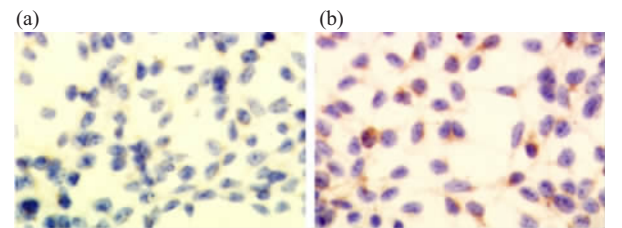


Fig. 4 Induction of the lytic cycle in 293 cells stably transfected with Maxi-EBV
(a) Stable HEK293/p2089 cells transiently cotransfected with pcDNA3.1(+)/BZLF1 and pcDNA3.1(+)/BALF4(phase contrast). (b) gp350 staining confirming induction of the lytic cycle (by immunostaining).(magnification, ×400).

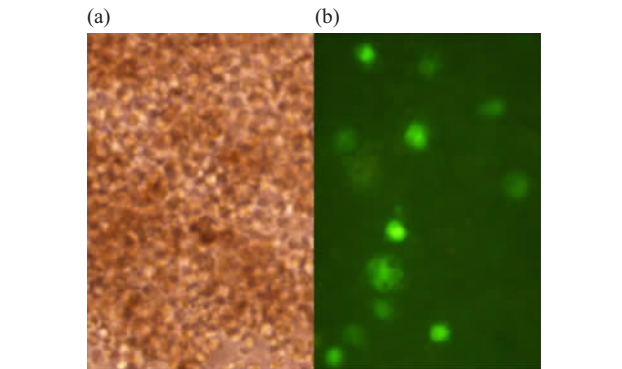


Fig. 5 Raji cells infected with recombinant EBV
(a) Phase contrast. (b) GFP expression of infected Raji cells (inverted fluorescence microscope, magnification, ×200).

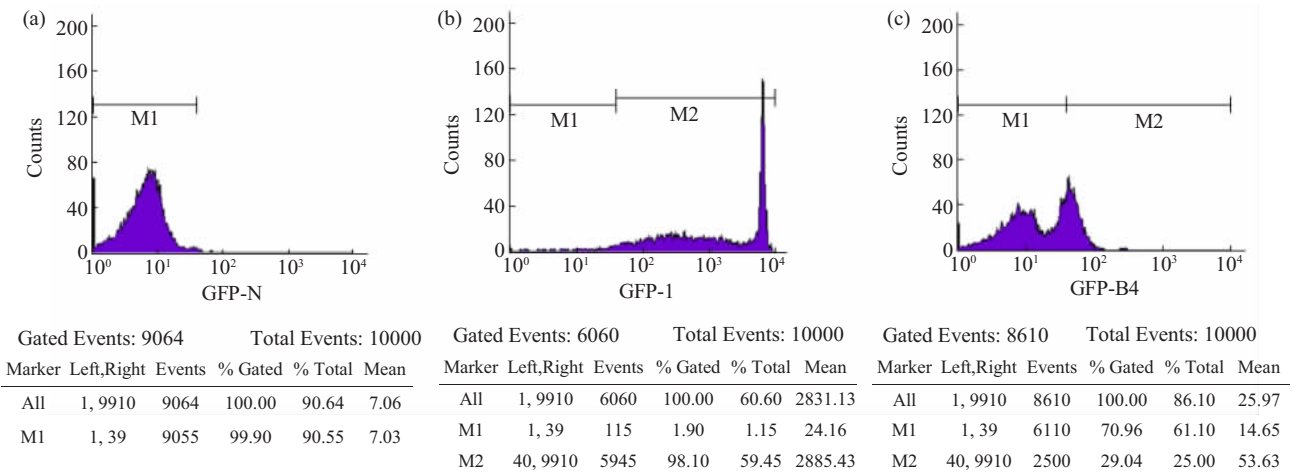


Fig. 6 GFP expression of infected Raji and stably transfected cells assessed by FACS analysis
(a) Phase contrast(Raji cells). (b) Stably transfected HEK293/p2089 cells. (c) Raji cells infected with recombinant EBV.

Maxi-EBV 的 HEK293 细胞内, GFP 阳性细胞为 98.1% ($P < 0.05$), 重组 EBV 感染的 Raji 细胞内 GFP 阳性细胞为 29.04% ($P < 0.05$). 重组 EBV 滴度可以通过这些“绿色 Raji 单位”(GRU/ μ l) 来定量, 这样, 重组 EBV 通过感染 Raji 细胞表达 GFP, 就成为在荧光显微镜下可数的 EBV (即可视化的 EBV)^[9]. 子代病毒具有与野生型 EBV 一致的所有特性, 能使原代 B 细胞永生。一个 GRU 为一个被重组 EBV 感染了的绿色 Raji 细胞 (假定为一个感染的病毒颗粒)。

$$\text{GRU}/\mu\text{l} = \frac{a \times b (\%) }{c \times 100}$$

a : 被感染的 Raji 细胞个数; b : GFP 阳性的 Raji 细胞百分比(%); c : 病毒上清的体积 (μ l)。

3 讨 论

由于疱疹病毒基因组庞大, 过去对单个基因的表达分析, 虽然为基因在体内的功能研究提供了线索, 但更深入地了解仍然需要在病毒基因组中的遗传分析^[2]。随着大 DNA 片段克隆载体如酵母人工染色体(YAC)和细菌人工染色体(bacterial artificial chromosome, BAC)及相关技术的出现, 疱疹病毒的遗传分析也发展到一个新的阶段, 即在 BAC 基础上的全长基因组感染性克隆技术。BAC 技术代表了疱疹病毒基因组学发展的里程碑, 它使病毒庞大的基因组能够稳定地在 *E.coli* 中保存、增殖和突变, 并且操作简便而安全, 也为疱疹病毒的反向和正向遗传研究开辟了新天地。

Maxi-EBV(p2089)是一种含有野生型 EBV 全长基因组的 BAC 质粒, 含有一个 F 因子、氯霉素抗性基因 *cat*、潮霉素抗性基因 *hyg*, 以及 CMV 启动子控制的绿色荧光蛋白 GFP 基因的外源表达盒约 11 kb。我们使用脂质体转染试剂把 BAC-EBV 质粒(p2089)转染至 EBV 阴性的 HEK293 细胞, 经潮霉素筛选建立了 HEK293/p2089 稳定细胞系。在建立此技术平台中, 最关键的步骤就是建立携带野生型 EBV 全基因序列的细胞系。要把 172 kb 的整个 EBV 基因组转入真核细胞中, 不像单个基因的表达操作那么简单, 整个过程需要 3~6 周。首先, 要选择 EBV 阴性的细胞株作为其宿主细胞。我们之所以选择 HEK293 细胞作为 EBV 的宿主细胞, 是因为 HEK293 细胞无 EBV 感染, 对外源基因的转染效率特别高。其次, 转染质粒 DNA 的质量要高。BAC-EBV 质粒是一个低拷贝的质粒, 所以用一般

的质粒抽提试剂和方法不能得到转染级质量的质粒, 我们通过反复的实验摸索出用 NucleoBond PC 500 kit 是最适合的、质量最高的、而且最节省时间的。一次大抽新鲜转化质粒的菌液 400 ml, 可以得到 1 mg/L 级的环形质粒 DNA 200 μ g。第三, 要选择合适的方法合适的转染试剂把外源基因导入真核细胞。Delecluse 等^[1]认为, 可以通过电穿孔和脂质体介导的方法, 我们尝试用过 LipofectamineTM 2000 和 Lipofectin 都没有取得成功, 最后用 LipofectamineTM Reagent 才建立了 HEK293/p2089 稳定细胞系。第四, 是潮霉素的筛选, 要设计不同的筛选浓度和维持浓度、不同的作用时间平行对照, 最后得到稳定表达 GFP 的阳性克隆。此外, 和一般的转染实验所要求的一样, 细胞的生长状态等也会影响转染效率。

EBV 裂解性复制主要与 BLLF1(gp350/220), BALF4(gp110)和 BZLF1 的表达有关^[7,8]。gp350 是病毒裂解性感染中最重要和最丰富的晚期结构蛋白, 是 EBV 表达的包膜糖蛋白, 是 EBV 中和性抗体识别的主要靶抗原, 主要分布在细胞浆膜、核膜以及病毒外膜上。gp350 通过与 B 淋巴细胞表面的 CD21 受体分子结合而使得病毒产生吸附^[4]。gp350/220 也通过中和 CD21 分子而促使病毒的释放, 是引起机体产生免疫反应的主要病毒抗原。Feederle 等^[9]实验证明了 BZLF1 与 *oriLyt* 的相互作用可促进 EBV 裂解性复制。BZLF1 的表达蛋白为病毒复制激活蛋白(ZEBRA)。ZEBRA 的氨基酸与 DNA 结合, 活化早期裂解基因的表达, 促进病毒 DNA 的复制^[10]。我们的 RT-PCR 和蛋白质印迹实验结果也证明 B95-8 细胞中 BZLF1 的表达很弱, 经 TPA 诱导的 B95-8 能增加 BZLF1 的表达(图 3)。BALF4 是 EB 病毒裂解性感染的晚期编码蛋白, 对于 EBV 在体内复制是必需的^[1]。所以我们采用 CMV Promoter 的 pcDNA3.1(+)表达载体, 首次构建了 pcDNA3.1(+)/BZLF1 和 pcDNA3.1(+)/BALF4 2 个真核表达质粒, 在 Hammerschidt 和 Chen 等的报道中使用腺病毒载体^[4,8], 表达 BZLF1 或这 2 个蛋白质。而我们采用 CMV Promoter 的 pcDNA3.1(+)表达载体, 允许重组蛋白在真核细胞中高效率高水平的表达, pcDNA3.1(+)表达载体基因组较小, 只有 5 428 bp, 比腺病毒载体更容易连接转化大肠杆菌和导入真核细胞内。这样, 既克服了腺病毒载体自身病毒对重组病毒的影响, 又避免了腺病毒载体的克隆、包装、扩增、纯化等一系列过程, 大大简化了操作程

序. 我们通过 RT-PCR 和蛋白质印迹验证 pcDNA3.1(+)/BZLF1 能转录 BZLF1 基因和 ZEBRA 蛋白后, 再把这 2 个质粒共转染至 HEK293/p2089 稳定细胞内, 诱导其裂解复制产生了可视化的重组 EBV 颗粒. 实验证明我们构建的 pcDNA3.1(+)/BZLF1 和 pcDNA3.1(+)/BALF4 能高效诱导重组 EBV 的裂解复制. 重组 EBV 感染 Raji 细胞后, 72 h 在倒置荧光显微镜下观察记数 GFP 阳性细胞(图 5). 再通过流式细胞术分析 GFP 的表达来进一步确定不同上清的病毒滴度, 这样使得 EBV 颗粒通过 GFP 的表达从而可视化(图 6). 子代病毒具有与野生型 EBV 一致的所有特性, 能使原代 B 细胞永生化. 根据 GFP 在 Raji 细胞中的表达估计病毒滴度, 通过(超)感染一定数量的 Raji 细胞用“绿色 Raji 单位”估计, 这个评价体系特别适合验证对 EBV 单个基因构建的不同突变体 EBV 与野生型 EBV 之间的比较^[1], 更适合在 EBV 整个基因组中研究基因的功能.

BAC-EBV 系统对复杂基因组病毒的基因结构与功能关系的研究具有很好的应用前景, 对于有细胞嗜性的肿瘤病毒 EBV 来说, 无论细胞是否容易感染 EBV, 都可以将在 *E.coli* 中得到纯化的、含有病毒基因组的质粒转染真核细胞重建 EBV、进一步研究 EBV 在细胞中的生物学行为. BAC 质粒转染真核细胞重建子代病毒, 从理论上讲, 它允许对病毒基因组中任何基因的任何遗传修饰, 可在病毒的整个基因组中研究 EBV 所有基因的功能, 分析基因与基因之间的相互作用, 其结果无疑会比对病毒基因的过表达分析更精确. 在 BAC-EBV 中缺失某个基因可以提示还有其他机制行使相关功能, 这更是单基因的表达分析无法做到的^[12]. 这种技术为在整个基因组中对 EBV 基因功能的研究建立了很好的技术平台, 有利于对 EBV 致病机理与肿瘤发生机理的研究.

致谢 感谢德国 GSF- 国家环境与健康研究中心 Prof.Hammerschmidt W 惠赠的质粒 p2089 (Maxi-EBV).

参 考 文 献

- 1 Serraino D, Piselli P, Angeletti C, *et al.* Infection with Epstein-Barr virus and cancer: an epidemiological review. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2005, **19** (1~2): 63~70
- 2 Delecluse H J, Hammerschmidt W. The genetic approach to the Epstein-Barr virus: from basic virology to gene therapy. *J Clin Pathol: Mol Pathol*, 2000, **53** (5): 270~279
- 3 Delecluse H J, Hilsendegen T, Pich D, *et al.* Propagation and recovery of intact, infectious Epstein-Barr virus from prokaryotic to human cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95** (14): 8245~8250
- 4 Hammerschmidt W, Delecluse H J. Infectious Epstein-Barr virus lacking major glycoprotein BLLF1 (gp350/220) demonstrates the existence of additional viral ligands. *J Virol*, 2000, **74** (21): 10142~10152
- 5 Neuhierl B, Feederle R, Hammerschmidt W, *et al.* Glycoprotein gp110 of Epstein-Barr virus determines viral tropism and efficiency of infection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99** (23): 15036~15041
- 6 Feederle R, Shannon-Lowe C, Baldwin G, *et al.* Defective infectious particles and rare packaged genomes produced by cells carrying terminal-repeat-negative Epstein-Barr virus. *J Virol*, 2005, **79** (12): 7641~7647
- 7 Adhikary D, Behrends U, Moosmann A, *et al.* Control of Epstein-Barr virus infection *in vitro* by T helper cells specific for virion glycoproteins. *J Exp Med*, 2006, **203** (4): 995~1006
- 8 Chen L, Yin J, Chen Y, *et al.* Induction of Epstein-Barr virus lytic replication by recombinant adenoviruses expressing the zebra gene with EBV specific promoters. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2005, **37** (4): 215~220
- 9 Feederle R, Delecluse H J. Low level of lytic replication in a recombinant Epstein-Barr virus carrying an origin of replication devoid of BZLF1-binding sites. *J Virol*, 2004, **78** (21): 12082 ~ 12084
- 10 Heston L, El-Guindy A, Countryman J, *et al.* Amino acids in the basic domain of Epstein-Barr virus ZEBRA protein play distinct roles in DNA binding, activation of early lytic gene expression, and promotion of viral DNA replication. *J Virol*, 2006, **80** (18): 9115~9133
- 11 Dirmeier U, Neuhierl B, Kilger E, *et al.* Latent membrane protein 1 is critical for efficient growth transformation of human B cells by Epstein-Barr virus. *Cancer Res*, 2003, **63** (11): 2982~2989
- 12 卢建红, 唐运莲, 李桂源. 以 BAC 为基础的疱疹病毒感染性克隆技术. *中国生物工程杂志*, 2006, **26** (6): 78~82
Lu J H, Tang Y L, Li G Y. *China Biotechnology*, 2006, **26** (6): 78~82

Lytic Replication and Inductive Production of Recombinant Epstein Barr Virus Visualized*

TANG Yun-Lian**, LU Jian-Hong**, WU Ming-Hua, HUANG Chen, CAO Li,
PENG Shu-Ping, ZHOU Yan-Hong, LI Xiao-Ling, ZHOU Ming, TANG Ke, LI Gui-Yuan***
(Cancer Research Institute, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078, China)

Abstract In order to study single viral gene functions in the context of genome and analysis interactions between one gene with another, the HEK293/p2089 stable cell line was established by transfecting the plasmid of DNA (p2089) into EBV-negative 293 cells and selecting for resistance against hygromycin. The plasmid p2089, which was kindly provided by Prof. Hammerschmidt, contained the whole EBV genome of wild-type B95-8. Two eukaryotic expression vectors (pcDNA3.1 (+)/BZLF1 and pcDNA3.1 (+)/BALF4) were constructed and then transiently cotransfected into the HEK293/p2089 stable cells, so as to induce EBV lytic replication and produce recombinant EBV particles visualized through GFP-expressing. To estimate the EBV production, Raji cells were incubated with supernatants from the induced 293 cells carrying p2089 DNA, as revealed by indirect visualization of the Raji cells. GFP-positive cells were evaluated by inverted fluorescence microscope or FACS analysis. The different virus supernatants were quantified with the help of “green Raji units” per ml as an absolute number of infectious particles. This technique makes it possible for the reconstitution of viral progeny or mutants by transfection of BAC plasmid into eukaryotic cells, and any genetic modification in *E. coli*, thereby facilitating the analysis of viral gene functions in the context of genome. This new technique has provided a useful tool for the study of pathogenesis mechanism of EBV, especially for that of cancer-associated.

Key words lytic replication, recombinant Epstein-Barr virus, visualization, genome

*This work was supported by grants from The Key National Research Plan of China(2006CB910504), The National Natural Sciences Foundation of China(30330560), The Natural Sciences Foundation of Hunan Province (05JJ300064) and China Postdoctor Foundation(20060390264).

These authors contributed equally in this work. *Corresponding author . Tel/Fax: 86-731-4805383, E-mail: ligy@xysm.net

Received: October 17, 2006 Accepted: November 28, 2006