

稳定表达 T7 RNA 聚合酶 IBRS-2 细胞系的建立 以及利用该细胞系对 SVDV 的体内拯救*

郑海学^{1,2)} 田 宏¹⁾ 靳 野¹⁾ 吴锦艳¹⁾ 尚佑军¹⁾ 刘湘涛^{1)**} 谢庆阁^{1)**}

¹⁾中国农业科学院兰州兽医研究所, 家畜疫病病原生物学国家重点实验室, 农业部畜禽病毒学重点开放实验室, 兰州 730046;

²⁾广东省农业科学院兽医研究所, 广州 510640)

摘要 利用 PCR 从 λ 溶源性细菌 DE3 中扩增出 T7 RNA 聚合酶基因, 定向克隆进逆转录病毒载体 pBABEpuro, 得到阳性重组质粒 pT7BABEpuro. 把该重组质粒与 pVSV-G 共感染 GP2-293 包装细胞系, 形成假型病毒. 通过 polybrene 介导假型病毒感染 IBRS-2 细胞, 利用嘌呤霉素进行传代筛选, 形成细胞系 IBRS7. 对不同代次的 IBRS7 细胞基因组进行 PCR 和 RT-PCR 鉴定, 结果表明, T7 RNA 聚合酶基因在细胞传代过程中能稳定存在, 并能表达目的蛋白的 mRNA. 为了鉴定 T7 RNA 聚合酶在 IBRS7 细胞内是否具有转录活性, 扩增口蹄疫病毒(FMDV)的内部核糖体进入位点(IRES)片段和 EGFP 基因, 定向克隆于原核表达载体 pET-43.1a-c(+)中, 构建了 T7 启动子控制下转录的具有非帽依赖性表达的重组质粒 pIERS-EGFP-ET, 把该质粒转染 IBRS7 细胞, 能够在紫外显微镜下观察到绿色荧光, 说明 EGFP 得到了表达, 表明 IBRS7 细胞系内的 T7 RNA 聚合酶具有转录活性. 然后, 利用该细胞系成功拯救出具有感染性的猪水泡病病毒(SVDV), 并对其生物学功能进行了鉴定. 该细胞系的建立为利用 T7 RNA 聚合酶转录系统体内高效拯救病毒提供了基础. 该拯救病毒的策略使 RNA 拯救简化为一步快速的拯救方法, 为进一步探索 SVDV 病毒致病的分子机制及研制新型 SVD 疫苗奠定了良好的基础.

关键词 T7 RNA 聚合酶, IBRS7 细胞系, 假型病毒, SVDV, 病毒拯救, 逆转录病毒载体, 感染性克隆

学科分类号 Q78

针对 RNA 病毒发展起来的反向遗传学, 实现了直接对 DNA 操作来研究 RNA 病毒的基因结构与功能. 而采用体外转录来拯救病毒的反向遗传学方法, 除了常规影响因素外, 体外转录本比亲本病毒 RNA 感染性低是导致体外拯救效率低的主要原因^[1]. 拯救效率低成为应用体外拯救病毒技术的一个“瓶颈”. 因此, 急需建立一种无需体外制备 RNA、拯救效率高的体内拯救病毒的方法. 体内病毒拯救除了构建忠实性的基因组全长 cDNA, 最关键的是要求一种高效的表达体系, 这种表达体系作为一种外力, 可以启动病毒复活必需成分的产生(病毒 RNA 合成和病毒蛋白翻译), 进而这些成分在合适条件下自反馈进入病毒本身的复制循环, 实现病毒的拯救. 基于 T7 RNA 聚合酶(T7 RNA polymerase, T7 RNAP)及其强启动子之间识别的特异性和高效性而建立起来的基因表达系统^[2], 为目前在大肠杆菌中表达外源蛋白的最强大的表达系统之一, 而且 T7 RNAP 在真核内具有转录活性, 能够转录较大的基因片段^[3]. 因此, 若能将 T7 RNAP

系统引入真核细胞, 不仅有望提高目的基因在真核细胞中的转录, 还可以应用该细胞系体内高效拯救病毒.

本研究利用逆转录病毒载体把 T7 RNAP 基因整合进宿主细胞基因组内, 进行传代筛选培养, 形成稳定表达具转录活性 T7 RNAP 的细胞系. 并对不同代次的细胞系进行 PCR、RT-PCR 和转录活性检测. 并利用该细胞系直接获得了猪水泡病病毒(SVDV)的拯救. 该细胞系为体内高效拯救病毒奠定了坚实基础, 也为利用 T7 RNAP 表达系统进行真核表达提供了细胞模型. 该拯救系统的建立为深入研究 SVDV 病毒致病的分子机制及研制新型 SVD 疫苗奠定了良好的基础.

* 国家重点基础研究发展计划(973)(2005CB523201)和国家科技支撑计划(2006BAD06A03)资助项目.

** 通讯联系人.

刘湘涛. Tel: 0931-8342710, E-mail: hnxiangtao@hotmail.com

谢庆阁. Tel: 0931-8342710, E-mail: xieqgkey@public.lz.gs.cn

收稿日期: 2007-08-29, 接受日期: 2007-12-14

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒与细胞

BL21(DE3)是被 DE3 噬菌体浸染的 BL21 大肠杆菌, 其基因组上整合了 T7 RNAP 的基因, 由本室保存. pET-40a-c(+)载体(以 T7 转录启动子和终止子元件为基础的表达载体)、GP2-293、IBRS-2 细胞、SVDV 和 FMDV 也由本室保存. 逆转录病毒载体 pBABEpuro 和表达水疱性口炎病毒糖蛋白的重组载体 pVSV-G 由田宏博士惠赠; 大肠杆菌 JM109 为 Promega 公司产品.

1.2 酶与试剂

所用限制性内切酶均购自 Promega 公司; DNA 连接试剂盒、DNA 回收试剂盒、质粒提取试剂盒、Lipfection™ 2000 转染试剂盒为 Invitrogen 公司产品; 琼脂糖购自美国 Biowest 公司; 细胞培养基及优等胎牛血清采用 Hyclone 公司产品; 细胞 DNA 提取采用 U-gene 公司的组织 DNA 提取试剂盒(Tissue DNA Kit).

1.3 引物设计与合成

根据 T7 RNAP 基因参考序列(M38308 和 NC-001604)和载体 pBABEpuro 多克隆位点设计引物扩增 T7 RNAP 基因, 上游引物为 PT7-F, 5' CGA GGA TCC CAC CAT GAA CAC GAT TAA CAT CG 3', 下游引物为 PT7-R, 5' TAC GAA TTC TAC GCG AAC GCG AAG TAA GAC TC 3', 下划线序列分别为 *Bam*H I 和 *Eco*R I 识别位点序列, 其中 CCACC 序列是为提高在真核细胞中表达效率的 Kozak 序列^[4]. 依据 FMDV 参考序列(GenBank 登录号为 AF506822), 设计 2 条扩增 IERS 的引物, 分别为 IERS-3'P(5' GTA TGA ATT CCA TAT TCA TGG ATT TAG TTG TGG GTA ATG 3')和 IERS-5'P(5' TGC GGA TCC TTT CCA CAA CTG ATA AAA CTC GTG C 3'), 下划线序列分别代表 *Eco*R I 和 *Bam*H I 酶切位点; 根据 EGFP 基因在 pGFPN1 载体中的序列, 设计 2 条引物, EGFP-F(5'CTC GA ATT CCA CCA TGG TGA GCA AGG GCG AGG AGC TGT TC 3')和 EGFP-R(5'CCG TGC GGC CGC TTA CTT GTA CAG CTC GTC CAT GCC 3'), 下划线序列分别代表 *Eco*R I 和 *Not* I; 根据 SVDV 序列(AY429470)设计 2 条扩增 SVDV 基因组的引物 SV-R(5'TCCTCTAGAACGTT(T)₃₈3') 和 SV-F (5' GCATATGGGGATGTGATAGATAGC-TTC 3'). 均由宝生物工程大连有限公司合成.

1.4 T7 RNAP 基因的扩增与逆转录病毒载体的克隆

接种 100 μ l 的 BL21(DE3)菌种于 10 ml 的 LB 培养液过夜培养, 按照细菌基因组提取试剂盒操作说明提取基因组, 然后利用 PT7-F 和 PT7-R 引物对进行 PCR, 扩增程序为: 预变温度 96°C 2 min, 变性 94°C 2 min, 退火 61°C 1 min, 延伸 72°C 2 min, 循环 30 次后, 72°C 延伸 10 min. 用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 分别切 PCR 产物及载体 pBABEpuro, 回收目的片段连接、转化, 将鉴定为阳性的质粒命名为 pT7BABEpuro.

1.5 鉴定 T7 RNAP 转录活性载体的构建

1.5.1 IERS 的扩增和克隆. 按照操作说明提取 FMDV 感染细胞总 RNA, 用 IERS-3'P 引物进行反转录合成第一链 cDNA. 然后, 以反转录的产物为模板, 用 IERS-3'P 和 IERS-5'P 引物对, 采用退火温度降温双循环 PCR(退火温度在 56.5°C, 72.0°C 延伸 1 min, 循环 10 次. 然后把退火温度降至 55°C, 72.0°C 延伸 3 min 30 s, 循环 20 次), 扩增体系为 50 μ l, 一步扩增出目的片段, 并纯化、回收, 然后, 利用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 定向克隆进 pET-40a-c(+)载体, 得到 pIERS-ET 重组质粒. 经 PCR、酶切和序列测定来鉴定重组质粒.

1.5.2 EGFP 基因(*egfp*)的扩增和克隆. 以 pGFPN1 质粒为模板, 用 EGFP-F 和 EGFP-R 引物对, 扩增程序为: 预变温度 96°C 2 min, 变性 94°C 1 min, 退火 55°C 1 min, 延伸 72°C 1 min, 循环 30 次后, 72°C 延伸 10 min. 一步扩增出目的片段, 并纯化、回收, 利用 *Eco*R I 和 *Not* I 定向克隆进 pIERS-ET 重组质粒, 得到的阳性重组质粒为 pIERS-EGFP-ET. 以 PCR、酶切和序列测定来鉴定重组质粒.

1.6 GP2-293 细胞培养与转染 pT7BABEpuro

GP2-293 细胞培养的条件为 37°C, 5% CO₂, 含 10% FBS 的 DMEM 培养基中, 每 3 天传代 1 次, 中间发现培养液的 pH 值偏低时, 应及时更换培养液. 转染前, 将包装细胞 GP2-293 细胞接种于 6 孔细胞培养板中, 待细胞密度达 60%~80% 时, 在脂质体 Lipfection 2000 的介导下将 2 μ g 的 pT7BABEpuro 与 2 μ g 的 pVSV-G 共转染 GP2-293, 转染后 8~10 h 吸出培养液, 加入 3 ml 完全培养基培养 48~72 h, 收集包装细胞的培养液, 用 0.45 μ m 的醋酸纤维素膜过滤(不可以用硝酸纤维素膜过滤, 因为硝酸纤维素膜对病毒的膜蛋白具有吸附作用, 容易引起病毒的裂解). 该滤液含有假型

病毒, -80℃冻存备用。

1.7 假型重组逆转录病毒感染宿主细胞

选取生长良好的 IBRS-2 细胞, 加入制备好假型病毒上清及 Polybrene 8 mg/L, 置 37℃, 5% CO₂ 孵箱, 其间每 30 min 摇一次培养瓶, 持续吸附 2 h。然后离心去除感染液, 加入含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液, 37℃ 5% CO₂ 培养箱中继续培养 2 天后, 加入 100 mg/L 的嘌呤霉素, 每 3 天换一次培养液, 持续 14 天可获得嘌呤霉素抗性的 IBRS-2 细胞, 命名为 IBRS-T7 细胞系。并对该细胞嘌呤霉素筛选培养 16 代。

1.8 对不同代次的 IBRS-T7 细胞的 T7 RNAP 基因的 PCR 检测

采用 U-gene 公司的组织 DNA 提取试剂盒 (Tissue DNA Kit), 按照操作说明, 分别提取第 2、4、7、16 代的 IBRS-T7 细胞系的基因组 DNA, 用 T7 RNAP 基因的引物 PT7-F 和 PT7-R, 以材料和方法 1.4 中扩增 T7 RNAP 基因的程序进行 PCR, 同时设未转染细胞作为阴性对照。

1.9 RT-PCR 对 IBRS-T7 细胞表达 T7 RNAP mRNA 的检测

用 RNeasy Mini Kit 提取第 7 代和第 16 代的 IBRS-T7 细胞总 RNA, 以 PT7-R 引物 42℃转录 1 h。以转录产物为模板, 用 T7 RNAP 基因的引物 PT7-F 和 PT7-R, 以材料和方法 1.4 中扩增 T7 RNAP 基因的程序进行 PCR, 同时设正常 IBRS-2 细胞为阴性对照。

1.10 T7 RNAP 活性检测

把 IBRS-T7 细胞接种于 6 孔细胞培养板中, 每个孔中放入一片载玻片, 待细胞密度达 80%~90% 时, 在以脂质体 Lipfection 2000 的介导下将 4 μg 的 pIERS-EGFP-ET 重组质粒转染 IBRS-T7 细胞, 转染后 4~6 h 吸出培养液, 加入 3 ml 完全培养基在 37℃培养。培养 20~30 h, 取出载玻片在紫外显微镜下观察。

1.11 SVDV 的拯救

1.11.1 转染 IBRS-T7 细胞。利用不含嘌呤霉素的培养液把 IBRS-T7 细胞接种于 6 孔细胞培养板中, 每个孔中放入一片载玻片, 待细胞密度达 80%~90% 时, 在脂质体(Lipfection 2000)的介导下将 4 μg Aat II 和 Psp1406 I 消化的 SVDV 全长 cDNA 质粒转染细胞, 转染后在 37℃ 5% CO₂ 培养箱进行培养 4~6 h, 加入 2 ml 完全培养基, 观察 3 天。待 90%左右细胞出现病变时收获病毒, 冻融 3 次收获

上清, 再次接种于正常 IBRS-2 细胞, 直到病毒能稳定地产生细胞病变(CPE)。

1.11.2 反向间接血凝鉴定试验。收集 1 ml 的上述病毒液, 58℃ 40 min 进行病毒灭活, 然后 1:2 连续稀释, 分别取出 50 μl 加入 96 孔板, 然后加入 25 μl SVDV 抗体致敏化的绵羊红细胞, 置微量振荡器上振荡 1~2 min, 20~35℃放置 1.5~2 h 后, 根据红细胞沉积情况判定结果。

1.11.3 间接免疫荧光检测病毒抗原。收取载有转染细胞的载玻片, 用 PBS 缓冲液漂洗 1~2 次, -20℃冷丙酮固定 30 min, 漂洗后吸净残液, 滴加 SVDV 兔阳性血清, 37℃湿盒中孵育 30 min, 再用 PBS 漂洗 5 次加 FITC 羊抗兔 IgG, 于 37℃湿盒中孵育 30 min, 用 70%甘油封片于 Olympus 荧光显微镜下观察并拍照。

1.11.4 RT-PCR 法检测病毒基因组。使用 RNeasy Mini Kit 提取病毒 RNA, 以特异性引物 SV-R 反转录出 cDNA 第一链, 以引物 SV-R 和 SV-F, 按照扩增程序(退火温度在 55.5℃, 72.0℃延伸 1 min, 循环 10 次。然后把退火温度升至 57℃, 72.0℃延伸 3 min 30 s, 循环 20 次)进行 PCR 扩增 SVDV 的基因组 cDNA, 对扩增产物的序列进行测定。

1.11.5 TCID₅₀ 实验。用 DMEM 10 倍稀释病毒, 然后将各稀释度(10^{-1.0}~10^{-9.0})的毒液分别加入 96 孔细胞培养板, 每个稀释度 8 孔, 每孔 50 μl; 然后按照常规方法对 IBRS-2 细胞进行消化, 用含有 10%胎牛血清的 DMEM 进行稀释细胞, 浓度不低于 10⁶ 个/ml, 在上述每孔加入 100 μl, 并设空白对照组。然后在 37℃ 5% CO₂ 的培养箱进行培养观察 3 天。用 Read-Muench 氏法进行统计结果。

1.11.6 乳鼠 LD₅₀ 实验。拯救病毒在 IBRS-2 细胞上连续传代 4 次后, 接种 2 日龄乳鼠, 采用 Read-Muench 氏法测定 LD₅₀。将乳鼠随机分为 3 组。拯救病毒组: 用 PBS 缓冲液 10×系列稀释病毒, 用系列稀释的病毒液接种乳鼠, 每个稀释度接种 4 只乳鼠, 接种剂量 200 μl / 只, 连续观察 14 天, 同时进行 LD₅₀ 计算。空白对照组: 只注射 PBS 缓冲液。阳性对照组(亲本病毒组): 按照实验组的接种方法和剂量接种亲本毒株病毒液。本实验重复做一次, 取 Read-Muench 氏法统计 LD₅₀ 的平均值。

2 结 果

2.1 T7 RNA 聚合酶基因的扩增及克隆结果

从 BL21(DE3)菌基因组中成功扩增出了约

2 650 bp 大小的片段. 对重组质粒 PT7BABEpuro 进行 PCR、双酶切鉴定, 均有 2 650 bp 大小相符的片段. 测序结果表明, 该基因为 T7 RNAP 基因, 与参考序列同源性 100%.

2.2 IRES 扩增和克隆的结果

成功扩增出了约 0.5 kb 的核苷酸序列. 通过 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切鉴定重组质粒 pIRES-ET, 有约 6 kb 的预期目的片段. 测序结果表明, FMDV IRES 被正确插入了 pET-43.1a-c(+)载体, 与来源该毒株的病毒 IRES 序列进行比较, 序列同源性 100%.

2.3 *egfp* 基因的扩增和克隆结果

利用扩增 *egfp* 基因的引物, 成功扩增出了约 730 bp 的目的片段. 对构建出的 pIRES-EGFP-ET 重组质粒进行 *Eco*R I 酶切鉴定, 出现约 7 kb 目的条带. 以该重组质粒为模板能够重新扩增出约 730 bp 目的带. 序列测定表明, *egfp* 基因被正确插入了 IRES 起始密码(ATG)下游, 与 pGFPN1 质粒的 *egfp* 基因序列进行比较, 同源性 100%.

2.4 PCR 扩增检测不同代次目的基因稳定性结果

检测样品均能成功获得预期大小的 PCR 片段, 但第 2 代的较少, 第 4 代和第 16 代 PCR 产物的量相差不多(图 1). 说明 T7 RNAP 基因能够在细胞基因组内稳定存在, 至少稳定传 16 代. 正常细胞没有扩增出目的带.

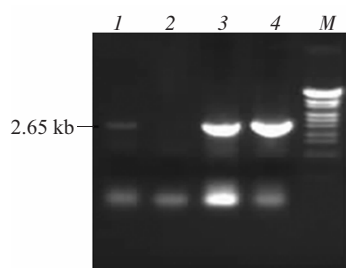


Fig. 1 PCR products from different passage times

IBRST7 passaged under puromycin selection pressure

M: Molecular mass marker λ -*Eco*T14 I fragment (TaKaRa); 1: The second passage; 2: Normal IBRS-2 cells; 3: The fourth passage; 4: The sixteenth passage.

2.5 RT-PCR 检测 IBRST7 细胞表达 T7 RNAP mRNA 的结果

第 7 代和第 16 代均能成功获得 T7 RNAP 基因预期 2.65 kb 大小的 PCR 片段, 而正常细胞未扩增出目的条带(图 2). 测序结果表明, 扩增出的片段序列是 T7 RNAP 基因, 同源性 100%.

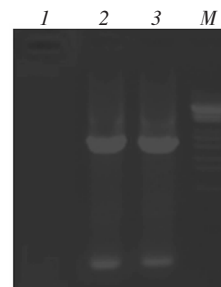


Fig. 2 The results of RT-PCR products of T7 RNAP gene expressed in IBRST7 cells

M: Molecular mass marker λ -*Eco*T14 I fragment (TaKaRa); 1: Normal IBRS-2 cells; 2: The seventh passage; 3: The sixteenth passage.

2.6 T7 RNAP 活性检测结果

将 pIRES-EGFP-ET 转染的及未经转染的 IBRST7 细胞在紫外荧光显微镜下观察, 可见用 pIRES-EGFP-ET 转染的 IBRST7 细胞中有特异荧光产生(图 3a), 而未转染的空白细胞(图 3b)和转染 pIRES-EGFP-ET 正常 IBRS-2 细胞中都没有特异荧光出现(图 3c). 结果表明, 细胞中有 EGFP 的存在, 表明 T7 启动子介导的 *egfp* 基因得到了转录, 证明在 IBRST7 细胞中的 T7 RNAP 具有转录活性.

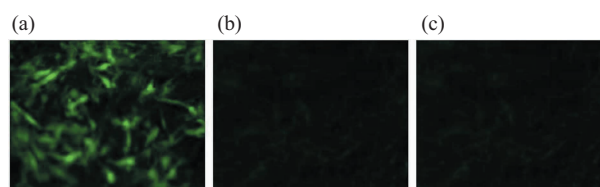


Fig. 3 The results observed under a fluorescence microscope

(a) IBRST7 cells transfected by the pIRES-EGFP-ET. (b) Normal IBRS-2 cells. (c) Normal IBRS-2 cells transfected by the pIRES-EGFP-ET.

2.7 SVDV 的拯救及其鉴定结果

2.7.1 转染 IBRST7 细胞结果. 用 SVDV 全长 cDNA 转染 IBRST7 68 h 后, 细胞出现细胞病变效应(CPE), 细胞变圆, 成葡萄状分布, 最终细胞崩解成碎片(图 4a).将细胞培养物连续传代, 细胞病变出现的时间缩短, 病变更加典型, 传至第 4 代细胞可在接种后 24 h 内出现明显的 CPE, 培养 14 h 可使 80%细胞单层脱落形成空斑. 对照细胞单层完整, 形态规则, 轮廓清晰(图 4b). 感染正常 IBRS-2 细胞, 结果与上述一致.

2.7.2 反向间接血凝鉴定试验结果. 1:16 稀释的

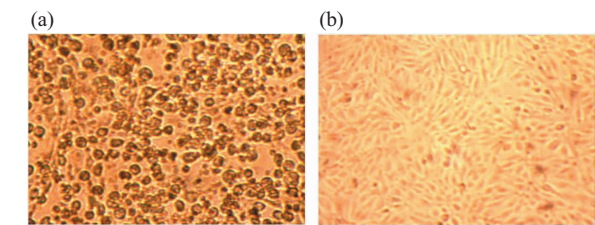


Fig. 4 CPE on IBRS-2 cell directly transfected with linearized full-length cDNA of SVDV
(a) IBRS-2 cells infected by transcripts. (b) Normal IBRS-2 cells.

检测样品红细胞凝集, 未有红细胞沉积, 样品呈阴性; 阴性对照样品出现红细胞完全沉积现象, 为阴性. 结果表明, 引起 IBRS-2 细胞病变的是 SVDV.

2.7.3 拯救病毒的 RT-PCR 鉴定结果. 收集产生病毒的细胞及其培养上清, 提取总 RNA. 用特异引物进行 RT-PCR 扩增, 扩增产物用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳分析. 扩增产物大小为 630 bp, 与预期大小一致(图 5). 对扩增产物序列测定, 测定的序列与其亲本毒株 SVDV HK/70 核苷酸序列同源性 100%.

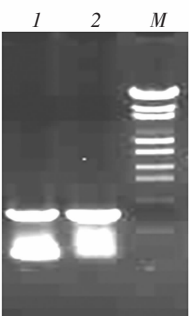


Fig. 5 Amplification of the genome of the recovered virus
1, 2: PCR products amplified by F1 and SV3 low ; M: λ -EcoT14 I digest.

2.7.4 免疫荧光检测结果. 将 pSVDV 感染的细胞及未经转染的 IBRS-2 细胞用免疫荧光染色, 在免疫荧光显微镜下可见 pSVDV 感染的 IBRS-2 细胞中有特异荧光产生(图 6a), 而未转染的空白细胞中没有特异荧光出现(图 6b). 结果表明, 细胞中有 SVDV 蛋白抗原成分的存在, 同时也佐证了拯救病毒获得成功.

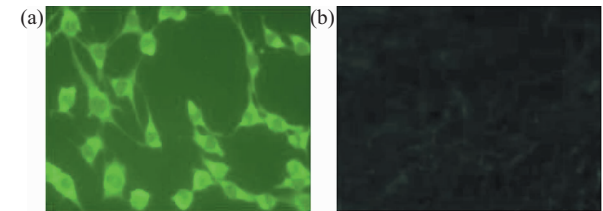


Fig. 6 The results of immunofluorescence
(a) IBRS-2 cells infected by pSVDV. (b) Normal IBRS-2 cells.

2.7.5 $TCID_{50}$ 实验结果. 空白对照组 IBRS-2 细胞培养 24 h 单层长满 96 孔细胞培养板, 符合实验的要求. 培养 72 h, $10^{-1.0}$ 和 $10^{-2.0}$ 两个稀释度的实验组细胞病变脱落, $10^{-3.0}$ 稀释度的实验组有 2 孔病变. 用 Read-Muench 氏法进行统计结果, pSVDV 的为 $10^{-3.67}$, 亲本毒的 $TCID_{50}$ 为 $10^{-5.83}$, pSVDV 的 $TCID_{50}$ 值比亲本毒的较小.

2.7.6 乳鼠毒力实验结果. 拯救病毒在 IBRS-2 细胞上连续传代 4 次后, 接种 2 日龄乳鼠, 50 h 时实验鼠出现呼吸困难、后肢麻痹等症状. 72 h 乳鼠死亡, 表现出四肢僵直. 拯救病毒组 $10^{-1} \sim 10^{-7}$ 乳鼠全部死亡, 10^{-8} 死 1 只, 10^{-9} 和 10^{-10} 全部健活, 重复实验结果与第一次相同(表 1), 用 Read-Muench 氏法计算 pSVDV 的 LD_{50} 为 $10^{-7.83}$; 亲本病毒组第一次试验结果为 $10^{-1} \sim 10^{-7}$ 乳鼠全部死亡, 10^{-8} 死 1 只, 10^{-9} 和 10^{-10} 全部健活, LD_{50} 为 $10^{-7.83}$, 第二次试验结果为 $10^{-1} \sim 10^{-7}$ 乳鼠全部死亡, 10^{-8} 、 10^{-9} 和 10^{-10} 全部健活(表 1), LD_{50} 为 $10^{-7.5}$, 两次试验 LD_{50} 平均值为 $10^{-7.625}$. 空白对照组乳鼠均无死亡.

Table 1 The tested results of 50% lethal dose of mice

Virus titers	Number of inoculated mouse	Number of lethal mouse		
		Group of reversed	Group of paternal virus	Control group
10^{-5}	4 (4)	4 (4)	4 (4)	0 (0)
10^{-6}	4 (4)	4 (4)	4 (4)	0 (0)
10^{-7}	4 (4)	4 (4)	4 (4)	0 (0)
10^{-8}	4 (4)	1 (1)	1 (0)	0 (0)
10^{-9}	4 (4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
10^{-10}	4 (4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

The data in bracket are from the second test and the others are from the first test.

3 讨 论

利用体外转录系统构建 RNA 病毒感染性全长 cDNA 克隆的方法, 需要体外制备病毒基因组 RNA, 其成本高、RNA 不稳定、得到的病毒 RNA 具有多态性和异质性、在细胞内竞争抑制完整 RNA 的感染性恢复、转染效率不高、难以在体内得到大量的完整的 RNA 等影响因素. 另外, 体外转录本比亲本毒 RNA 感染性低的特性^[1,5], 通过体外拯救方法是无法克服的. 因此, 体外拯救病毒的效率不高, 限制了该项技术对 RNA 病毒拯救的推广和应用, 甚至利用此方法难以进行深入研究. 由

于体外拯救系统不能稳定高效地拯救出病毒,也就难以稳定地拯救出病毒,也就难以通过表型来判定这些基因操作的效果,进而难以达到对病毒基因组表达调控机制、致病的分子机理等进行深入的研究.本研究通过建立稳定表达 T7 RNAP 的细胞系,把体外转录转为体内转录的方法来制备基因组 RNA,建立起了以 T7 RNAP 为基础的体内拯救病毒的方法.

我们建立稳定表达 T7 RNAP 的细胞系是通过逆转录病毒基因转导和假病毒包装的技术.其中选择 T7 RNAP 系统作为拯救病毒的转录体系的原因是 T7 RNAP 具有结构简单,是单链结构,转录能力强,与启动子结合特异性高,在不同细胞内表现较好的转录活性,能够有效地促进大量 RNA 在体内进行转录,并且能够表达较大的外源基因等优点^[6-9].与真核转录系统相比,T7 RNAP 不需任何辅助转录因子就能识别其特异性启动子并表现出较高的转录活性.而真核不仅需辅助转录因子,有的还要通过核膜进入细胞核内进行转录.因此,在病毒拯救的应用中,该转录表达系统往往被作为病毒拯救的制备病毒基因组 RNA 的外力系统.

基于 T7 RNAP 的病毒拯救系统,除了体外转录系统拯救病毒的方法外,还发展了几种辅助病毒拯救体系,如重组痘毒株的 vTF7 或 VacT7^[10,11],痘病毒株(VV-T7)或改进的(宿主变换的)痘毒株 Ankara (MVA-T7)^[12,13]等拯救系统.这些表明 T7 RNAP 达痘毒株系统已经成功地从一些 RNA 病毒的 cDNA 克隆中拯救到了感染性病毒,如其中一些 RNA 病毒,牛的腹泻病毒(BVDV)^[14],狂犬病毒^[13],水疱性口炎病毒^[14-16],仙台病毒^[17]和布尼病毒科^[18].这些方法不同程度地提高了病毒拯救的成功率.但由于痘病毒株而引起该系统一些缺陷^[3,19].首先,痘毒株对宿主细胞有较快致细胞病变作用,限制了拯救病毒在该细胞上繁殖的时间期限^[20],这使得对生长缓慢的高度致弱病毒或病毒载体进行拯救非常困难,子代痘病毒的释放同时也会干扰拯救病毒子代病毒的释放,这也干扰对目的产物的分析.其次,同源重组常常在全长基因组和辅助质粒之间通过疫苗毒株的 DNA 聚合酶而频繁发生^[21].

为了克服以痘苗病毒为基础的拯救系统的缺点,建立一个无痘病毒拯救系统,构建稳定表达 T7 RNAP 的细胞系被认为是一个很好的思路.因此,我们通过逆转录病毒基因转移技术建立表达

T7 RNAP 细胞系的体系,使其得到提高,从而能够更有效地诱导稳定的遗传物质进入任何分裂细胞的基因组中^[22].T7 RNAP 基因能够稳定地被整合到细胞的基因组中,在不同的靶细胞内能够高水平表达.利用该技术将很容易建立 T7 RNAP 表达细胞系,并且在选择压力下,我们发现,在没有损失 T7 RNAP 活性的情况下可以进行繁殖.这种策略很好地解决了如何建立稳定表达 T7 RNAP 在细胞系的问题.要建立具有高效拯救效率的细胞系,还要注意选择合适的逆转录病毒载体,要考虑它的转录启动子的转录效率以及与宿主基因组整合的效率和拷贝数.本研究采用的逆转录病毒载体体系安全性高,能够高效地整合外源基因^[22].为了产生具有广泛感染性的假型病毒,与 pVSV-G 重组质粒共转染,在 CMV 启动子控制下表达 VSV-G^[23],VSV-G 广泛地与靶细胞的磷脂成分结合,引起质膜融合,并介导该基因工程病毒进入靶细胞.而 VSV-G 不要求细胞受体,能代替病毒膜蛋白,这样扩大了该假型病毒的感染宿主细胞的范围^[24],进而,我们借此进一步感染其他不同型的细胞,能够建立多种稳定表达蛋白的细胞系.

为了检测表达的 T7 RNAP 是否具有转录活性,我们利用非帽依赖性复制理论,利用克隆出的 FMDV IERS,定向克隆在 GFP 基因的上游,T7 启动子下游.该载体不含有真核转录启动子,说明观察到的 GFP 是唯一由 T7 RNAP 识别 T7 启动子而转录表达的产物.这个结果表明,T7 RNAP 在 IBRST7 细胞内具有转录活性.借此细胞系,成功拯救出 SVDV,成功建立起了 SVDV 的体内拯救系统.使用反向血凝鉴定试验、间接免疫荧光实验、RT-PCR 和序列测定进行检测,各项结果与参考文献^[5]的一致,并测定了拯救出病毒的 $TCID_{50}$ 和 LD_{50} ,分别为 5.83 和 7.825,与亲本毒的毒力差别不显著^[5].这种策略将反向遗传学操作简化成一种拯救病毒的快速一步法,为不同 RNA 病毒的高效拯救奠定基础,为利用反向遗传学深入研究病毒基因功能打下坚实的一步.

参 考 文 献

- 1 Boyer J C, Haenni A L. Infectious transcripts and cDNA clones of RNA viruses. *Virology*, 1994, **198**(2): 415~426
- 2 Landick R. Active-site dynamics in RNA polymerases. *Cell*, 2004, **116**(3): 351~353
- 3 Naoto I, Takayama-Ito M, Yamada K, *et al.* Improved recovery of rabies virus from cloned cDNA using a vaccinia virus-free reverse

- genetics system. Microbiology and Immunology, 2003, **47** (8): 613~617
- 4 Kozak M. At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. J Mol Biol, 1987, **196**(4): 947~950
 - 5 Zheng H X, Liu X T, Xie Q G, *et al.* Infective viruses produced from full-length complementary DNA of swine vesicular disease viruses HK/70 strain. Chin Sci Bull, 2006, **51**(16): 2072~2078
 - 6 Delarue M, Poch O, Tordo N, *et al.* An attempt to unify the structure of polymerases. Protein Eng, 1990, **3**(6): 461~467
 - 7 Cheetham G M, Jeruzalmi D, Steitz T A. Structural basis for initiation of transcription from an RNA polymerase-promoter complex. Nature, 1999, **399**(6371): 80~83
 - 8 Cheetham G M T, Steitz T A. Structure of a transcribing T7 RNA polymerase initiation complex. Science, 1999, **286**(5448): 2305~2309
 - 9 Temiakov D, Montesana D, Temiakov D, *et al.* The specificity loop of T7 RNA polymerase interacts first with the promoter and then with the elongating transcript, suggesting a mechanism for promoter clearance. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, **97**(26): 14109~14114
 - 10 Fuerst T R, Niles E G, Studier F, *et al.* Eukaryotic transient expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesizes bacteriophage T7 RNA polymerase. Proc Natl Acad Sci USA, 1986, **83**(21): 8122~8126
 - 11 Vassilev V B, Collet M S, Donis R. *In vivo* rescue of infectious bovine viral diarrhoea virus by transfection of plasmid DNA into cells infected with vaccinia virus expressing T7 RNA polymerase. In: Edwards S, Paton D J, Wensvoort Geds. Proceedings of the Third ESVV Symposium on Pestivirus Infections. Weybridge: Central Veterinary Laboratory, 1996. 1~7
 - 12 Schneider H, Spielhofer, Kaelin P K, *et al.* Rescue of measles virus using a replication-deficient vaccinia-T7 vector. J Virol Methods, 1997, **64**(1): 57~64
 - 13 Schnell M J, Mebatsion T, Conzelmann K K. Infectious rabies viruses from cloned cDNA. EMBO J, 1994, **13**(18): 4195~4203
 - 14 Lawson N D, Stillman E A, Whitt M A, *et al.* Recombinant vesicular stomatitis viruses from DNA. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, **92**(10): 4477~4481
 - 15 Whelan S P, Ball L A, Barr J N, *et al.* Efficient recovery of infectious vesicular stomatitis virus entirely from cDNA clones. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, **92**(18): 8388~8392
 - 16 Harty R N, Brown M E, Hayes F P, *et al.* Vaccinia virus-free recovery of vesicular stomatitis virus. J Mol Microbiol Biotechnol, 2001, **3**(4): 513~517
 - 17 Garcin D, Pelet T, Calain P, *et al.* A highly recombinogenic system for the recovery of infectious Sendai paramyxovirus from cDNA: generation of a novel copy-back non-defective interferingvirus. EMBO J, 1995, **14**(24): 6087~6094
 - 18 Bridgen A, Elliott R M. Rescue of a segmented negative-strand RNA virus entirely from cloned complementary DNAs. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, **93**(26): 15400~15404
 - 19 Lowen A C, Noonan C, McLees A, *et al.* Efficient bunyavirus rescue from cloned cDNA. Virology, 2004, **330**(2): 493~500
 - 20 Kovacs G R, Parks C L, Vasilakis N, *et al.* Enhanced genetic rescue of negative-strand RNA viruses: use of an MVA-T7 RNA polymerase vector and DNA replication inhibitors. J Virol Methods, 2003, **111**(1): 29~36
 - 21 Hoffman M A, Banerjee A K. An infectious clone of human parainfluenza virus type 3. J Virol, 1997, **71**: 4272~4277
 - 22 Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, *et al.* Current Protocols in Molecular Biology. New York: Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, 1987. 120~141
 - 23 Yee JK, Friedmann T, Burns J C. Generation of high-titer pseudotyped retroviralvectors with very broad host range. Methods Cell Biol, 1994, **43**(Pt A): 99~112
 - 24 Emi N, Friedmann T, Yee J K. Pseudotyped formation of murine leukemia virus with G protein of vesicular stomatitis virus. J Virol, 1991, **65**(3): 1202~1207

Establishment of IBRS-2 Cell Line Stably Expressing T7 RNA Polymerase and Recovery of SVDV From IBRS-2 Cells *

ZHENG Hai-Xue^{1,2}, TIAN Hong¹, JIN Ye¹, WU Jin-Yan¹,
SHANG You-Jun¹, LIU Xiang-Tao^{1**}, XIE Qing-Ge^{1**}

⁽¹⁾Key Laboratory of Animal Virology of Ministry of Agriculture, State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology,
Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, China;

⁽²⁾Veterinary Research Institute of Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China)

Abstract The bacteriophage T7 RNAP gene was amplified *via* PCR from λ -lysogen DE3, and the gene was cloned into pBABEpuro retroviral vector, a recombinant plasmid named as pT7BABEpuro was constructed and sequenced. Then the pT7BABEpuro and pVSV-G plasmids were cotransfected into GP2-293 packaging cells by liposomes, some pseudotype viruses were ingathered and transfected into IBRS-2 cell under polybrene. The IBRS-2 cell was propagated in DMEM with puromycin. The genome extraction from the cells transfected different times, the T7 RNAP gene was amplified from the genome by PCR, the mRNA of T7 RNAP protein expressed in IBRS-2 cells was analyzed by RT-PCR, respectively, the results showed the T7 RNAP gene had been integrated into the chromosome of IBRS-2 cell and expressed stably at high level. To study whether T7 RNAP is of transcriptional activity in the established IBRS-2 cell line, a plasmid pIERS-EGFP-ET with a reporter gene (EGFP) under control of the T7 promoter was constructed. IRES element from FMDV (for CAP-independent translation) was cloned into plasmid pET-43.1a-c(+) downstream of the T7 promoter sequence, then EGFP gene was cloned in frame downstream of the AUG codon of the FMDV IRES, resulting in the plasmid. IBRS-2 cells were transfected with plasmid pIERS-EGFP-ET using lipfection, EGFP was expressed, the results showed the T7 RNAP in IBRS-2 cells has transcriptional activity. IBRS-2 cell line was directly transfected with linearized full-length cDNA of swine vesicular disease virus (SVDV) HK/70, infectious SVDV was efficiently recovered from the cDNA. The reverse genetic procedure is simplified to a faster, one step protocol to recover RNA virus and will be useful to understand the mechanisms of molecular pathology of RNA virus and develop effective vaccines.

Key words T7 RNA polymerase(T7 RNAP), IBRS-2 cell, pseudotype virus, retroviral vector, infectious clone

*This work was supported by a grant from National Basic Research Program of China (2005CB523201) and National Key Technology R&D Program of China (2006BAD06A03).

**Corresponding author .

LIU Xiang-Tao. Tel: 86-931-8342710, E-mail: hnxiaogao@hotmail.com

XIE Qing-Ge. Tel: 86-931-8342710, E-mail: xieqkey@public.lz.gs.cn

Received: August 29, 2007 Accepted: December 14, 2007