

表达马传染性贫血病毒受体和荧光素酶报告基因的 293 细胞系的建立

王登峰^{1,2**} 张淑琴^{1,3**} 马学恩³ 简子建² 周建华^{1*}

(¹ 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所兽医生物技术国家重点实验室大动物病室 哈尔滨 150001)

(² 新疆农业大学动物医学院 乌鲁木齐 830001) (³ 内蒙古农业大学动物医学院 呼和浩特 010018)

摘 要: 为了在体外精确、简便地测定马传染性贫血病毒(EIAV)的中和抗体和研究不同毒株与受体的亲和性,克隆了马慢病毒受体 1(ELR1) cDNA 并插入真核表达载体 pcDNA3.1(+) 构建了表达载体 pELR1。该载体瞬时转染 293 细胞后,经 Western blot 和间接免疫荧光(IFA)检测,确认了 ELR1 的表达。在 pELR1 质粒的基础上,插入 EIAV 疫苗株前病毒基因组转录调控区 LTR 以及萤火虫荧光素酶报告基因(Luc)构建了表达载体 pELR1-LTR-Luc,并转染 293 细胞,建立了 ELR1-LTR-Luc(293-E)细胞系。该细胞系能稳定表达 ELR1 基因,并且能在 LTR 的调控下表达萤火虫荧光素酶基因。用 1000TCID₅₀ 的 EIAV 驴胎皮肤细胞疫苗株 Di8V13 接种该细胞,24h 后检测其荧光素酶活性是未接毒对照的 3.15 倍。同时用 IFA 检测证明了病毒在细胞内的增殖。EIAV 强毒株 L21 的接毒试验显示,ELR1-LTR(293-E)细胞的萤火虫荧光素酶活性与该毒株的接毒量在 10⁻² ~ 10⁻⁷ 稀释范围内呈正相关。该细胞系传 35 代后,外源基因的表达特征未发生改变。该细胞系的建立为进一步开展 EIAV 与细胞受体相互作用以及中和抗体评价等研究奠定了重要基础。

关键词: EIAV 受体; LTR; 荧光素酶; 细胞系

中图分类号: Q936, Q934 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2007)06-1070-06

马传染性贫血病毒(EIAV)与和其同科同属的人类免疫缺陷病毒(HIV)在病毒形态、基因组结构和抗原特性等方面相似,EIAV 感染马可以作为 HIV 研究的动物模型^[1,2]。20 世纪 70 年代,中国农科院哈尔滨兽医研究所研制成功的 EIAV 减毒活疫苗^[3]免疫马后表现出良好的保护性和安全性,是迄今为止世界上唯一大规模应用的慢病毒疫苗。EIAV 减毒活疫苗被认为是研究 HIV 疫苗的模型和良好参照^[4],其免疫保护机制的研究是当前的研究热点。EIAV 受体的研究是免疫保护机制研究的重要方面之一。

病毒受体是病毒入侵靶细胞的门户,决定病毒的宿主范围、组织及细胞嗜性,并且病毒与受体的相互作用涉及细胞识别、吸附、免疫反应和信号传导等多方面。Zhang 等 2005 年发现了 EIAV 的细胞受体 ELR1,该受体属于肿瘤坏死因子(TNF)受体超家族蛋白,在不含 HIV 辅助受体 CXCR4 或 CCR5 的 EIAV 非感受细胞中表达后,可以支持 EIAV 强毒株和细

胞适应毒株的感染,推测它可能是 EIAV 的唯一受体^[5]。目前研究认为 EIAV 与 ELR1 结合后,在低 pH 环境下(pH 4.8 ~ 5.3)经由细胞内吞作用进入细胞内增殖^[6]。

在病毒种群中,衣壳或表面蛋白单个氨基酸的替换已经被证明影响受体识别和细胞嗜性及致病机制^[7]。淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒糖蛋白的单个氨基酸的取代即可改变它与 α -肌营养不良蛋白聚糖(α -dystroglycan)受体的亲和性,高亲和力的结合会造成宿主的免疫抑制和病毒的持续性感感染,而低亲和力的结合则导致感染的消除^[8]。因此,EIAV 强毒株及疫苗株与受体亲和性的研究对探讨 EIAV 疫苗免疫保护机制是非常重要的。此外,虽然细胞免疫在抵抗病毒感染和控制病毒复制中起主要作用,但高滴度的中和抗体也起着重要作用^[9]。在 HIV 疫苗的研究过程中发现,高滴度的中和抗体可以产生良好的保护作用^[2]。但在体外精确、快速的测定 EIAV 中和抗体仍是一个比较困难的问题^[10]。

基金项目:黑龙江省发展高新技术产业专项资金项目(FW05B007);哈尔滨市科技攻关计划项目(2006AA3AS040);中国农业科学院一级岗位人才基金

* 通讯作者。Tel 86-451-85935040;Fax 86-451-85935024;E-mail: jianhua_uc@yahoo.com

作者简介:**两位作者具有同等贡献。王登峰(1982-),男,河南信阳人,硕士研究生,从事免疫病理学研究。E-mail: wangdengfeng713@163.com 张淑琴(1978-),女(满),内蒙古赤峰人,博士研究生,从事病毒分子生物学与免疫学研究。E-mail: zsq504@sohu.com

其他作者:郭巍,全滢平

收稿日期:2007-04-17;接受日期:2007-08-08;修回日期:2007-08-28

Spengler 等在 2001 年建立了 CEM. NKR-CCR5-Luc 细胞系,该细胞系可以用于检测抗 HIV 中和抗体和筛选抑制 HIV 药物^[11]。借鉴该细胞系建立的经验,本试验建立了一个可感染 EIAV 的细胞系 ELR1-LTR-Luc(293-E)。长末端重复序列(long terminal repeat sequence, LTR)是 EIAV 前病毒的表达调控序列,其中含有反式作用位点(TAR)^[12]。病毒编码的反式激活蛋白(Tat)可以作用于该位点,促进病毒基因的表达^[13]。萤火虫荧光素酶(firefly luciferase)是从萤火虫中提取的能催化荧光素氧化发光的一种酶,它的检测十分灵敏、简便,目前荧光素酶基因在生物工程方面已成为广泛使用的报告基因^[14]。

已建立的该细胞系能稳定的表达 EIAV 受体 ELR1 基因,并且在 EIAV 驴白细胞疫苗株(DLV)前病毒 LTR 的控制下有条件地促进萤火虫荧光素酶基因表达。当 EIAV 通过与 ELR1 结合进入细胞增殖时,病毒编码的反式激活蛋白(Tat)能反式激活 LTR,使荧光素酶的表达量明显增加。该细胞系可以用来在体外精确、简便的测定 EIAV 的中和抗体和研究不同毒株与受体的亲和性。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞与病毒:293 细胞系、HeLa 细胞系和 EIAV 驴胎皮肤细胞适应毒 D18V13(第 18 代驴胎皮肤细胞接 12 代毒后维持培养 12 天的细胞培养上清)和强毒株 L21(L20 毒攻毒马后,采集其发热期的血清)均由本实验室保存,两毒株收集后均 12000r/min 4℃ 离心 10min 后-80℃ 冻存。

1.1.2 质粒和血清:pcDNA3.1(+),pGL3-basic、pRL-CMV、pMD-18T-LTR(LTR 分别来源于 EIAV 驴白细胞强毒 DA-25 前病毒和驴白细胞疫苗毒 DLA-122 前病毒)以及 EIAV 感染马阳性血清均由本实验室保存。

1.1.3 主要试剂:HRP I、ExTaq DNA 聚合酶、各种限制性内切酶、DNase I、Klenow 酶、T4 DNA 连接酶及 pMD18-T 均购自大连宝生物公司;Plasmid Mini Kit、Total RNA Kit 购于 Omega 公司、鼠抗血凝素(HA)单克隆抗体购自 TIANGEN 公司;DNA 快速胶回收试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司;预染蛋白分子量标准购自 Fermentas 公司;FITC 标记山羊抗鼠二抗、FITC 标记兔抗马二抗及 HRP 标记山羊抗鼠二抗均购自 Sigma 公司;G418 购自 Merck;M-MLV

Reverse Transcriptase、Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司;单报告基因荧光素酶检测试剂盒和双报告基因荧光素酶检测试剂盒购自上海科端生物科技有限公司;超敏化学发光试剂购自北京普利莱因公司。

1.1.4 培养基 293 细胞和 HeLa 细胞培养基均为高糖 DMEM(Hyclone),含 10% 的胎牛血清(FCS)(天津灏阳生物科技有限公司)。

1.2 细胞培养

293 细胞和 HeLa 细胞用含 10% FCS 的高糖 DMEM 培养。pELR1-LTR-Luc 质粒稳定转染 293 细胞,获取的细胞株用含 10% FCS 和 300μg/mL G418 的高糖 DMEM 培养。

1.3 引物设计

根据 GenBank 注册的 ELR1 受体序列(AY940455),利用 Oligo 6.0 软件设计引物,上游引物 P208 5'-CAGGGAATGAGGGCTCGTGAG-3',下游引物 P1215 5'-TGGATGGAGTCTGAAGCAAGC-3';这对引物用于从马巨噬细胞 RNA 中扩增受体 ELR1 的编码区。上游引物 P3 5'-GCGAAGCTTGACATGGAGCC TCTGCGAG-3',下游引物 P4 5'-GCGGATCCTTAGCA CAGGGACGCGTAGTCCGGGACGTCGTATGGGTAGGC CTGGCAGCTCT-3';P3 和 P4 的 5'端分别引入了酶切位点 HindIII 和 BamHI(分别用下横线表示),用于构建 ELR1 基因的真核表达质粒。为方便检测 ELR1 基因的表达产物,在用于扩增 ELR1 基因的下游引物 P4 的 5'末端融入 HA 标签序列。

1.4 RT-PCR 及测序

按照参考文献[10]的方法分离马外周血单个核细胞,体外培养 3 天后按 RNA 提取试剂盒说明书操作,在提取 RNA 时加入 DNase I 去除 DNA。用 M-MLV Reverse Transcriptase 将 RNA 反转录为 cDNA。随后用 P208、P1215 引物,进行 PCR 扩增。PCR 产物回收纯化后连接到 pMD18-T 载体上,转化后挑单克隆,经酶切鉴定为阳性的重组质粒送往上海生物工程技术有限公司完成双向测序。

1.5 真核表达质粒的构建

1.5.1 pELR1-HA 质粒的构建:将测序结果与 GenBank 序列进行比较,序列正确的质粒作为模板,用 P3、P4 引物进行下一步 PCR 扩增。PCR 产物用 HindIII 和 BamHI 酶切连接到与经同样酶切处理的真核表达载体 pcDNA3.1(+)构建成真核表达质粒 pELR1-HA,并经测序验证。

1.5.2 pELR1-LTR-Luc 质粒构建:在 pELR1-HA 质

粒的基础上进行构建。首先,用 Klenow 酶平端化处理,构建去除 *Hind* III 位点的质粒 pELR1-1,然后以此为基础,构建 pELR1-poly(A)-Luc 质粒。用 *Not* I 和 *Xba* I 双酶消化带有萤火虫荧光素酶报告基因的质粒 pGL3-basic,回收在 Synthetic poly(A) signal 与 Luc 之间有 pGL3-basic 质粒多克隆位点的片段 Synthetic poly(A) signal-Luc(1917bp);同时用 *Not* I 和 *Xba* I 双酶切 pELR1-1 质粒并回收。将 Synthetic poly(A) signal-Luc 片段连接到 pELR1-1 上,获取质粒 pELR1-poly(A)-Luc,并用 *Not* I 和 *Xba* I 双酶切鉴定。最后,用 *Kpn* I 和 *Hind* III 消化连上 LTR 的 pMD-18-LTR 载体,获得 LTR(360bp)。同时用 *Kpn* I 和 *Hind* III 消化 pELR1-poly(A)-Luc 质粒,在 Synthetic poly(A) signal 与 Luc 之间的多克隆位点上打开缺口,连接上来源于 EIAV 驴白细胞强毒 DA-25 前病毒和驴白细胞疫苗毒 DLA-122 前病毒的 LTR,构建成两个目的质粒 pELR1-LTR-Luc(DA-25)和 pELR1-LTR-Luc(DLA-122)均为 8669bp。构建的质粒经测序,确定与设计相符。

1.6 真核转染

转染前一天,用胰酶-EDTA 混合液消化 293 细胞,加入到 6 孔细胞培养板中,按 Lipofectamine 2000 转染试剂盒说明书进行细胞转染。

1.7 Western blot 和 IFA 检测外源基因 ELR1-HA 在 293 细胞中的表达

将 pELR1-HA 和/或 pELR1-LTR-Luc 质粒瞬时转染 293 细胞,35h 后收集细胞,用 Western blot 和 IFA 检测外源基因 ELR1-HA 的表达。一抗为鼠抗 HA 单克隆抗体,二抗 Western blot 为 HRP 标记山羊抗小鼠 IgG 抗体,IFA 为 FITC 标记山羊抗鼠 IgG 抗体。

为了选择合适的 LTR,用 pELR1-LTR-Luc 质粒与表达 Renilla 荧光素酶报告基因的内参质粒 pRL-CMV 做瞬时转染,共转染 293 细胞和 HeLa 细胞。目的质粒和内参质粒的比例为 4:1。转染后 48h,按照双报告基因荧光素酶检测试剂盒操作说明检测荧光素酶活性。

1.8 稳定表达 pELR1-LTR-Luc(DLA)细胞系的获取和确认

1.8.1 稳定表达细胞系的构建 用 *Nru* I 线性化处理后的 pELR1-LTR-Luc(DLA)质粒稳定转染 293 细胞。克隆筛选时 G418 用量为 600 μ g/mL,维持时为 300 μ g/mL。

1.8.2 稳定表达细胞株的鉴定 将扩大培养的不同细胞株,消化后加入到 96 孔板,2 \times 10⁴ 细胞(100 μ L

·孔),做 3 个复孔。24h 后接种 EIAV D13V18,接毒量为 1000TCID₅₀/孔。37℃ 孵育 1h 后,弃去上清,用含 5% FCS 和 G418(300 μ g/mL)的 DMEM 维持培养。在接毒 24h 后用单报告基因荧光素酶检测试剂盒(KenReal)检测荧光素酶活性,同时做阴性对照孔。接毒 3d 后,接毒组与未接毒组用 EIAV 感染马阳性血清做间接免疫荧光试验进一步确认病毒在感染细胞中的增殖。重复该试验 3 次。

1.8.3 ELR1-LTR(293-E)细胞接种强毒株后其荧光素酶活性与接毒量的关系 将获取的 ELR1-LTR(293-E)细胞消化后加入到 96 孔板,2 \times 10⁴ 细胞(100 μ L·孔),做 3 个复孔。24h 后,强毒 L21 以其病毒原液为基准,将 100 μ L 用 DMEM 进行 10⁻¹~10⁻⁷ 稀释的病毒接种到 ELR1-LTR(293-E)细胞,37℃ 孵育 1h,弃去上清,用含 5% FCS 和 G418(300 μ g/mL)的 DMEM 维持培养。在接毒 24h 后检测荧光素酶活性,同时做阴性对照孔。重复 2 次。

2 结果

2.1 外源基因 ELR1-HA 在 293 细胞中的表达

将构建好的重组质粒 pELR1-HA 瞬时转染 293 细胞,35h 后用鼠抗 HA 单克隆抗体进行 Western blot 检测外源基因 ELR1-HA 的表达。在瞬时转染 pELR1-HA 质粒的 293 细胞裂解物样品中可以检测到 49kDa 的特异性条带,而转染 pcDNA3.1(+)质粒的 293 细胞中无此条带,见图 1。同时以鼠抗 HA 单克隆抗体为一抗, FITC 标记山羊抗鼠 IgG 抗体为二抗做 IFA 检测外源基因 ELR1-HA 在 293 细胞中的表达。在瞬时转染 pELR1-HA 质粒的 293 细胞膜上可见绿色荧光,而转染空载体的 293 细胞上未见有绿色荧光,结果见图 2。

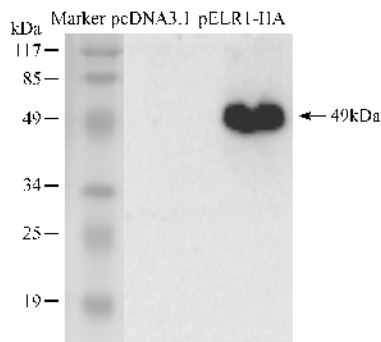


图1 Western blot 鉴定外源 ELR1-HA 基因在 293 细胞中的表达

Fig.1 Detection of ELR1-HA protein in 293 cells by Western blot.

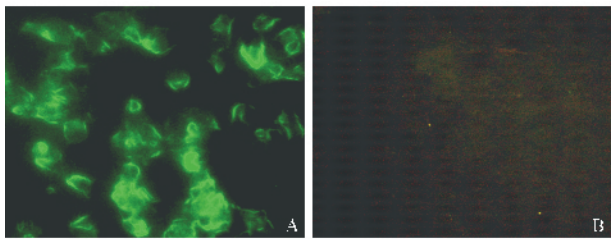


图2 鼠抗 HA 单克隆抗体间接免疫荧光鉴定外源 ELR1-HA 基因在 293 细胞中的表达
Fig.2 Detection of ELR1-HA gene expression in 293 cells with anti-HA antibody by IFA (200 ×). A : Transfected with pELR1-HA ; B : Transfected with pcDNA3.1.

2.3 pELR1-LTR-Luc 质粒的瞬时表达和 LTR 的选择

用 Western blot 确认 pELR1-LTR-Luc(DLA-122) 和 pELR1-LTR-Luc(DA-25)质粒均能在 293 细胞中表达 ELR1 ,其大小和转染 pELR1-HA 质粒后细胞表达的一致。转染空载体的 293 细胞不表达 ELR1。标定内参 Renilla 荧光素酶活性 ,在其一致的情况下比较萤火虫荧光素酶活性。发现在 293 细胞中 ,强毒株 DA-25 和疫苗株 DLA-122 LTR 的基础活性都比较高 ,达到 3.28×10^6 RLU/s(RLU :relative light unit)和 0.51×10^6 RLU/s ,在 HeLa 细胞中它们的基础活性都

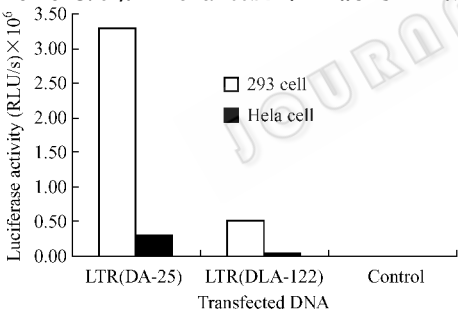


图3 pELR1-LTR-Luc(DA-25、DLA-122)瞬时转染 293 细胞和 HeLa 细胞后 LTR 基础转录活性的比较
Fig.3 LTR background activities in 293 and HeLa cells transiently transfected with either pELR1-LTR-Luc(DA-25) or pELR1-LTR-Luc(DLA-122).

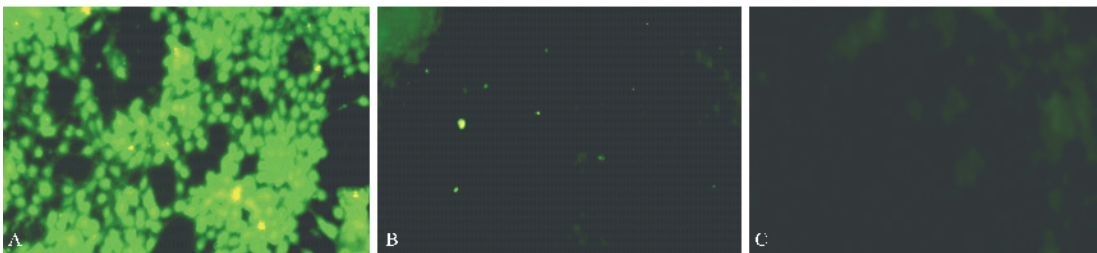


图5 EIAV 感染马阳性血清间接免疫荧光法鉴定 EIAV 在 ELR1-LTR-Luc(293-E)细胞系中的复制(100 ×)
Fig.5 Identification of EIAV replication in ELR1-LTR-Luc(293-E) cells by IFA (100 ×). ELR1-LTR-Luc(293-E) cells treated with EIAV (A) ; ELR1-LTR-Luc(293-E) cells treated without EIAV (B) and untransfected 293 cells treated with EIAV (C).

比较低 ,分别为 2.87×10^5 RLU/s 和 0.37×10^5 RLU/s。结果显示 ,在 EIAV 非靶细胞中 ,强毒株 DA-25 LTR 的基础活性是疫苗株 DLA-122 LTR 的 6 ~ 7 倍 ,结果见图 3。为减少检测本底 ,选择 pELR1-LTR-Luc (DLA-122)质粒建立细胞系进行以下研究。

2.4 稳定表达目的基因细胞系的建立

选取 EIAV-DLA-122 的 LTR 用以调控萤火虫荧光素酶基因的表达。用 pELR1-LTR-Luc(DLA-122) 质粒转染 293 细胞 ,挑选了 68 个经 $600 \mu\text{g/mL}$ G418 筛选 3 周形成的单克隆 ,再经过含有 $300 \mu\text{g/mL}$ G418 的培养液中扩大培养 ,得到 13 个接种病毒后能明显促进萤火虫荧光素酶基因表达的单克隆。最终在基础活性相似的 8 株克隆中选取了一株命名为 ELR1-LTR-Luc(293-E)进行以下研究。

在 ELR1-LTR-Luc(293-E)细胞上接 EIAV 皮肤细胞适应毒 D18V13 ,并做不接毒对照 ,24h 后检测萤火虫荧光素酶活性。接毒组与对照组平均萤火虫荧光酶活性分别为 $4.75 \pm 0.08 \times 10^5$ RLU/s 和 $1.53 \pm 0.13 \times 10^5$ RLU/s ,接毒组萤火虫荧光酶活性是对照组的 3.15 倍。经 3 次重复试验 $P \leq 0.001$ (图 4) ,接毒 3d 后 ,接毒组和对照组用 EIAV 感染马阳性血清做间接免疫荧光试验 ,确认了病毒进入细胞后病毒蛋白的表达 ,结果见图 5。

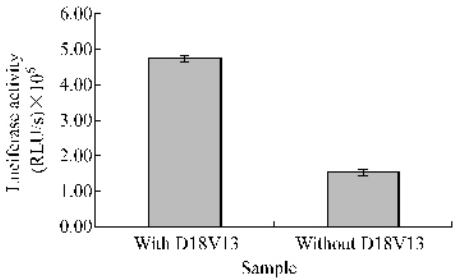


图4 检测 EIAV 细胞适应株 D18V13 接种组与对照组的 ELR1-LTR-Luc(293-E)细胞萤火虫荧光酶活性差异 (n = 3 , $P \leq 0.001$)

Fig.4 Luciferase activities in ELR1-LTR-Luc(293-E) cells treated with or without D18V13 (n = 3 , $P \leq 0.001$).

2.5 ELR1-LTR(293-E)细胞接种强毒株后其荧光素酶活性与接毒量的关系

为进行中和抗体的检测,病毒受体/荧光蛋白报告系统必须对接种的病毒量有较宽的线性相关性。为此,对 ELR1-LTR(293-E)细胞系接种了 EIAV 强毒株 L21 不同稀释倍数的毒量,并设了未接毒的对照组。24h 后检测萤火虫荧光素酶活性。在去除对照组本底后发现,在接种 $100\mu\text{L}10^{-2} \sim 10^{-7}$ 稀释的强毒株 L21 后 ELR1-LTR(293-E)细胞的萤火虫荧光素酶活性与接毒量呈现正相关,但接种 $100\mu\text{L}10^{-1}$ 接毒组荧光素酶活性反而下降,见图 6。

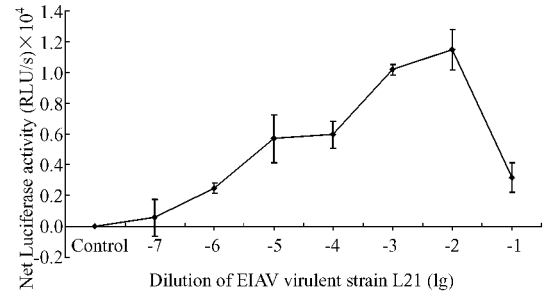


图 6 ELR1-LTR(293-E)细胞接种 EIAV L21 株 24h 后其荧光素酶活性与该毒株接毒量的关系 (n = 2)

Fig.6 Net firefly luciferase activity co-related to different doses of EIAV L21 that infected ELR1-LTR(293-E) cells for 24 hours (n = 2).

综上所述,获取的 ELR1-LTR-Luc(293-E)细胞系能够支持 EIAV 皮肤细胞适应株和强毒株 L21 的进入和增殖,证明该细胞系能稳定表达外源基因 ELR1,并且表达的 ELR1 受体具有生物学功能;与未接毒对照相比较,接毒组的 EIAV 进入 ELR1-LTR-Luc(293-E)细胞并增殖,明显地增强萤火虫荧光素酶活性。该结果与预计相符,且接种强毒株 L21 的不同稀释倍数的病毒时,ELR1-LTR(293-E)细胞的萤火虫荧光素酶活性与该毒株的接毒量呈现正相关,证明 ELR1-LTR-Luc(293-E)细胞系构建成功。

3 讨论

在构建 ELR1-LTR-Luc(293-E)细胞系的过程中,为了选择合适的 LTR,比较了 EIAV 强毒株和疫苗株 LTR 在非自然靶细胞上的基础活性。结果发现疫苗株 DLA-122 LTR 的基础活性是强毒株 DA-25 LTR 基础活性的 1/6,故选择了疫苗毒 DLA-122 的 LTR 作为调控荧光素酶转录的启动子元件。以往的研究证明在 EIAV 的自然靶细胞马(驴)巨噬细胞中,疫苗株 LTR 的基础活性要比强毒株的稍高[△]。LTR 是 EIAV

前病毒基因组的表达调控序列,在 293 细胞和 HeLa 细胞中强毒的复制能力是否会比疫苗毒的强?哪些因素决定了这种差异?这些问题有待进一步探讨。

用传统方法测定 EIAV 中和抗体较为困难,主要因为 EIAV 强毒只感染其靶细胞马(驴)单核细胞,并且在单核细胞中增殖缓慢,造成最终的检测困难且不准确,此外马(驴)单核细胞的体外分离培养难度也较大。利用细胞适应毒测定 EIAV 中和抗体是国外较常用的方法,但该方法不能够真实的反映感染马体内中和抗体的变化。为在体外精确简便的测定我国的 EIAV 疫苗株免疫马后其体内中和抗体的变化情况,建立了 ELR1-LTR(293-E)细胞系。在 ELR1-LTR(293-E)细胞接种强毒株 L21 后,在 $10^{-2} \sim 10^{-7}$ 稀释倍数范围内,其荧光素酶活性与 L21 的接毒量呈现正相关,但接种 10^{-1} 稀释的接毒组其荧光素酶活性反而下降。试验所用的强毒株 L21 是人工感染强毒 L20 马匹的发热期的血清,由于稀释倍数低,马血清含量过高,而对细胞有一定的毒性。

目前,ELR1-LTR-Luc(293-E)细胞系已经传 35 代,未发现外源基因的表达发生有变化。利用该细胞系可以在体外检测中和抗体的滴度,这在很大程度上节省了时间和降低了成本,而且比用观察半数细胞感染量(TCID₅₀)或测定反转录酶活性来确定中和抗体滴度的传统方法得到的结果更为精确。此外如果用抑制性药物使进入细胞的病毒只进行单轮复制^[15],可以利用该细胞系比较在相同条件下接毒后荧光素酶活性,研究不同病毒毒株与受体亲和性的关系。

致谢 感谢哈尔滨兽医研究所马建博士生和东北农业大学林耀智博士生在研究过程中给予的指导和技术支持。

参 考 文 献

[1] Leroux C, Cadore JL, Montelaro RC. Equine Infectious Anemia Virus (EIAV): what has HIV's country cousin got to tell us? *Vet Res*, 2004, 35(4): 485-512.

[2] McMichael AJ, Hanke T. HIV vaccines 1983-2003. *Nat Med*, 2003, 9(7): 874-880.

[3] 沈荣显. 马传贫驴白细胞弱毒的培育. *中国农业科学*, 1979, 4: 1-15.

[4] 于力, 张秀芳. 慢病毒和相关疾病. 北京: 中国农业科技出版社, 1996

△周家喜. DLA EIAV 与 D-A EIAV LTR 中启动子区域基础活性与 Tat 蛋白激活活性的比较. 中国农业科学院硕士学位论文, 2001. <http://journals.im.ac.cn>

- [5] Zhang B , Jin S , Jin J , *et al.* A tumor necrosis factor receptor family protein serves as a cellular receptor for the macrophage-tropic equine lentivirus. *Proc Natl Acad Sci USA* , 2005 , **102** : 9918 – 9923.
- [6] Jin S , Zhang B , Weisz OA , *et al.* Receptor-mediated entry by equine infectious anemia virus utilizes a pH-dependent endocytic pathway. *J Virol* , 2005 , **79** (23) : 14489 – 14497.
- [7] Lee B , Doranz BJ , Rana S , *et al.* Influence of the CCR2-V64I polymorphism on human immunodeficiency virus type 1 coreceptor activity and on chemokine receptor function of CCR2b , CCR3 , CCR5 , and CXCR4. *J Virol* , 1998 , **72** : 7450 – 7458.
- [8] Baranowski E , Carmen M , Ruiz-jarabo , *et al.* Evolution of cell Recognition by Viruses. *Sci* , 2001 , **292** : 1102 – 1105.
- [9] Hammond SA , Cook SJ , Lichtenstein DL , *et al.* Maturation of the cellular and humoral immune responses to persistent infection in horses by equine infectious anemia virus is a complex and lengthy process. *J. Virol* , 1997 , **71** (5) : 3840 – 3852.
- [10] Raabe MR , Issel C J , Montelaro RC. Equine monocyte-derived macrophage cultures and their applications for infectivity and neutralization studies of equine infectious anemia virus. *J Virol Methods* , 1998 , **71** (1) : 87 – 104.
- [11] Spencehauer C , Gordon CA , Trkola A , *et al.* A luciferase-reporter gene-expressing T-cell line facilitates neutralization and drug-sensitivity assays that use either R5 or X4 strains of human immunodeficiency virus type 1. *Virology* , 2001 , **280** (2) : 292 – 300.
- [12] Carvalho M , Derse D. Physical and functional characterization of transcriptional control elements in the equine infectious anemia virus promoter. *J Virol* , 1993 , **67** (4) : 2064 – 2074.
- [13] Sticht H , Willbold D , Bayer P , *et al.* Equine infectious anemia virus Tat is a predominantly helical protein. *Eur J Biochem* , 1993 , **218** (3) : 973 – 986.
- [14] 张菊梅 , 吴清平 , 周小燕 , 等. 荧光素酶研究进展. 微生物学通报 2001 , **28** (5) : 98 – 101.
- [15] Mascola JR , Louder MK , Winter C , *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 neutralization measured by flow cytometric quantitation of single-round infection of primary human T cells. *J Virol* , 2002 , **76** (10) : 4810 – 4821.

Establishment of a 293-cell line containing luciferase reporter for EIAV receptor and LTR functions

WANG Deng-feng^{1,2} , ZHANG Shu-qin^{1,3} , MA Xue-en³ , JIAN Zi-jian² , ZHOU Jian-hua^{1*}

(¹ National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology , Harbin Veterinary Research Institute , Chinese Academy of Agricultural Sciences , Harbin 150001 , China)

(² College of Veterinary Medicine , Xinjiang Agricultural University , Urumqi 830001 , China)

(³ College of Veterinary Medicine , Inner Mongolia Agricultural University , Huhehaote 010018 , China)

Abstract :To accurately and conveniently detect neutralizing antibodies and receptor binding affinities of different equine infectious anemia virus (EIAV) strains , the cDNA of EIAV receptor , ELR1 , was cloned and inserted in an eukaryotic expression vector pcDNA3.1(+). This recombinant plasmid was designated as pELR1. The 293 cell line was transiently transfected with pELR1 and the expression of ELR1 on transfected cells was verified by Western blot and indirect immunofluorescence assay (IFA). Furthermore , the transcription regulatory region , long terminal repeat (LTR) , of an EIAV vaccine strain and a reporter of firefly luciferase gene were tandemly cloned into pELR1. The resultant expression vector , which was designated as pELR1-LTR-Luc , was used to transfect 293 cells. A transfected cell line , ELR1-LTR-Luc (293E) which consistently expressed ELR1 and produced luciferase under the regulation of LTR , was isolated and further characterized. The entrance and replication of EIAV in ELR1-LTR-Luc (293E) cells were verified by IFA. The luciferase activity in the cell line treated with 1000 TCID₅₀ of an EIAV vaccine strain for 24h was increased by 2.15 folds when compared with the activity in untreated cells. Furthermore , the luciferase activities in the cell line were linearly correlated with the doses of inoculated EIAV virulent stain L21 diluted at 10⁻² ~ 10⁻⁷. The transfected genes in the ELR1-LTR-Luc (293E) cell line were consistently expressed during 35 passages of the host cells. This ELR1-LTR-Luc report system can be used for the study of interaction between EIAV strains and the receptor , as well as for the evaluation of neutralizing antibodies raised by EIAV.

Keywords : EIAV ; receptor ; LTR ; luciferase ; cell line

Foundation item : Heilongjiang Provincial Grant (FW05B007) ; Harbin City Grant (2006AA3AS040) , Grant for Outstanding Scientists from Chinese Academy of Agricultural Sciences (to Z J-H)

* Corresponding author : Tel : 86-451-85935040 ; Fax : 86-451-85935024 ; E-mail : jianhua_uc@yahoo.com

Received : 18 April 2007 / Accepted : 8 August 2007 / Revised : 28 August 2007 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>