

利用反向遗传技术制备重组人类偏肺病毒

张金辉¹ 葛金英² 任妍¹ 步志高² 赵晓东^{1*}

(1. 重庆医科大学附属儿童医院儿研所 P2 实验室 重庆 400014)

(2. 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要: 利用反向遗传技术, 将包含人偏肺病毒 2 个血清型 A 和 B 代表株 NL/1/00 和 NL/1/99 全基因组 cDNA 的质粒及其 4 种辅助蛋白 N、P、L、M2.1 的表达质粒 pCITE-N、pCITE-L、pCITE-P、pCITE-M2.1 分别共转染 BSR-T7 细胞以制备重组 hMPV。3 μg 全长 cDNA 质粒, 辅助蛋白质 pCITE-N、pCITE-L、pCITE-P、pCITE-M2.1 分别为 0.3 μg 、0.15 μg 、0.3 μg 和 0.24 μg , 通过 Lipofectamine 2000 转染 BSR-T7 细胞, 转染后 3 天, 将 BSR-T7 细胞于 -80°C 冻融一个循环以裂解细胞, 取上清液感染 Vero E6 细胞。接种后的 Vero E6 细胞, 6 天细胞可观察到明显的细胞病变效应; RT-PCR 检测出符合预期目标大小的 450 bp 条带; 间接免疫荧光实验检测感染后的 Vero E6 细胞可在荧光显微镜下可观察到特异性绿色荧光, 结果一致表明全基因组 cDNA 及其辅助质粒产生了有感染性的重组 hMPV 病毒。用细胞病变法和测试重组病毒的病毒滴度和生长曲线, 重组病毒 6 天时 A 型代表株 NL/1/00 在 Vero E6 细胞滴度为 $10^{6.4}$ TCID₅₀/mL, B 型代表株 NL/1/99 为 $10^{5.33}$ TCID₅₀/mL。

关键词: 反向遗传技术, 人偏肺病毒, 病毒拯救

Generation of Human Metapneumovirus Using Reverse Genetics Technique

ZHANG Jin-Hui¹ GE Jin-Ying² REN Yan¹ BU Zhi-Gao² ZHAO Xiao-Dong^{1*}

(1. Children's Hospital P2 Laboratory, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400014, China)

(2. HarBin Veterinary research institute, Chinese Agricultural Academy of Science, HarBin, Heilongjiang 150001, China)

Abstract: The full length cDNA clones for hMPV NL/1/00 and NL/1/99 strains from both subtypes, and the four helper vectors pCITE-N, pCITE-L, pCITE-P and pCITE-M2.1 for expressing major viral proteins were co-transfected into BSR-T7 cell to rescue live virions by reverse genetics technique. BSR-T7 cells were transfected using Lipofectamine 2000 with 3 μg of the full-length cDNA plasmid, 0.3 μg of pCITE-N, 0.15 μg of pCITE-L, 0.3 μg of pCITE-P, and 0.24 μg of pCITE-M2.1. Three days after transfection, cells were subjected to one -80°C freeze-thaw cycle to prepare lysates. The lysate was used to inoculate Vero E6 cells. The obvious CPE in Vero E6 cells was observed 6 days after inoculation. The 450 bp RT-PCR products was accordant with the expectant. The specific immunofluorescence was observed for inoculated positive cells.

The results demonstrated that infectious hMPV was successfully rescued. The NL/1/00 recombinant virus grew to peak titer of $10^{6.4}$ TCID₅₀/mL in Vero-E6 cells at 6 days after inoculation and $10^{5.33}$ TCID₅₀/mL for recombinant NL/1/99 virus.

Keywords: Reverse genetics technique, Human metapneumovirus, Rescue of virus

人偏肺病毒(Human metapneumovirus, hMPV)是由荷兰学者 Van den Hoogen 等于 2001 年发现的一种新的人类呼吸道病原, 根据病毒特征、基因结构及序列信息将其归属于副粘病毒科偏肺病毒属^[1]。随后, 北美、南美、欧洲等全球各地相继报道了儿童 hMPV 感染病例, 全球流行病学资料提示 hMPV 为儿科较为常见的呼吸道病毒病原。hMPV 是长约 13 kb 的单负链非节段 RNA 病毒, 包含编码核衣壳蛋白(N)、核包膜磷酸化蛋白(P)、非糖化基质蛋白(M)、融合蛋白(F)、转录延长因子(M2.1)、RNA 合成调节因子(M2.2)、小疏水表面蛋白(SH)、主要粘附蛋白(G)、主要聚合酶亚单位(L)基因, 顺序为 3'-N-P-M-F-M2-SH-G-L-5'。hMPV 基因结构和序列均与禽偏肺病毒(APV)相似, 最接近于 APV-C 亚型, 氨基酸同源性高达 80%。Peret 等^[2]对收集于 1958 年的人标本进行分析发现 hMPV 在人群中至少已流行半个世纪, 之所以多年未被发现, 主要因为病毒分离困难, hMPV 在多数呼吸道病毒宿主细胞无法复制或复制十分缓慢^[3], 临床流行株在体外复制动力弱, 不易检测。

反向遗传学技术, 通常称为“病毒拯救(The rescue of virus)”, 是将病毒 RNA 逆转录成 cDNA, 再由含病毒基因组 cDNA 的质粒获取 RNA 病毒的一项技术。该技术由于是在基于质粒的基础上获得活病毒, 因此可以在分子水平分析和改造病毒基因组, 从而对病毒的复制过程、致病机理以及防治新途径进行探讨。目前对 hMPV 各个蛋白的功能及其致病机理仍不十分清楚, 利用反向遗传技术建立 hMPV 拯救系统将为这一领域的研究提供技术平台。本研究采用该技术将 hMPV 两个血清型 A 和 B 代表株 NL/1/00 和 NL/1/99 的全基因组 cDNA 克隆及相应蛋白表达质粒 N、P、L 和 M2.1 基因, 分别共转染 BSR-T7 细胞, 以期获得 hMPV 两亚型重组活病毒, 为 hMPV 感染发病机制和疫苗研究奠定重要基础。

1 材料和方法

1.1 细胞与质粒

BSR-T7 和 Vero E6 细胞由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所人兽共患病实验室保存, BSR-T7 细胞培养于含 0.5 mg/mL G418 和 5%胎牛血清的 DMEM 中; Vero E6 细胞培养于含 100 IU/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素和 5%胎牛血清的 DMEM 中。病毒培养液为含 5%胎牛血清和 0.25 mg/mL 胰酶的 DMEM。hMPV 两个血清型 A 和 B 代表株 NL/1/00 和 NL/1/99 全基因组 cDNA 表达载体及其 N、P、L 和 M2.1 基因的 4 个表达载体(pCITE-N、pCITE-P、pCITE-L 和 pCITE-M2.1)^[4]由荷兰 Erasmus Institute Fouchier 教授惠赠。

1.2 主要试剂

DMEM 培养基干粉、G418 和胎牛血清购自 Gibco 公司; 转染试剂 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司; 质粒抽提试剂盒(QIAGEN Plasmid Midi Kit)为 QIAGEN 公司产品; 鼠源 hMPV F 蛋白单克隆抗体购自 Chemicon 公司; 异硫氰酸荧光素(FITC)标记的羊抗鼠 IgG 为北京中杉金桥公司产品。

1.3 hMPV 重组病毒的拯救

3 μg 全长 cDNA 质粒, 辅助蛋白质粒 pCITE-N、pCITE-L、pCITE-P、pCITE-M2.1 分别为 0.3 μg、0.15 μg、0.3 μg 和 0.24 μg, 稀释到 250 μL opti-MEM I 培养基中, 混合均匀; 另将 10 μL Lipofectamine 2000 稀释到 250 μL opti-MEM I 培养基中, 室温下混合 5 min。然后将稀释的质粒和 Lipofectamine 2000 溶液混合(250 μL+250 μL), 室温结合 20 min, 以形成 DNA-Lipofectamine 2000 复合物。将 6 孔板中培养的 80%~90%的 BSR-T7 细胞吸去培养液, 用无血清、无抗生素的 DMEM 液洗涤 2 次, 随即向每一孔中加入质粒和 Lipofectamine 2000 的混合液 500 μL, 摇匀。在 37°C、5%CO₂ 孵箱中培养约 5 h, 吸掉含有质粒和 Lipofectamine 2000 的混合液, 换为病毒培养液 2 mL, 继续在 37°C、5%CO₂

孵箱中培养。

1.4 感染 Vero E6 细胞及细胞病变观察(CPE)

转染后 3 天, 将 BSR-T7 细胞于 -80°C 冻融一个循环以裂解细胞, 取上清液感染密度为 60%~70% 的 Vero E6 细胞, 培养液为病毒培养液, 37°C 、5% CO_2 培养, 3 d~4 d 半换液, 6 d~10 d 观察细胞病变。

1.5 RT-PCR 检测重组病毒

当被重组病毒感染的 Vero E6 细胞出现 CPE 时, 提取总 RNA 进行 RT-PCR 反应扩增 hMPV F 基因, 上游引物 MPV-F1: 5'-TTTGGACTTAATGACAGATG-3', 下游引物 MPV-F2: 5'-TCTTCCTGTGCTAACTTTG-3', 扩增产物为 450 bp 片段。反转录反应按照 TaKaRa 反转录试剂盒进行。PCR 反应体系为: TaKaRa mix 25 μL , 上、下游引物(10 pmol/ μL) 各 2 μL , cDNA 5 μL , 灭菌超纯水补足 50 μL 。PCR 反应条件: 94°C 5 min; 94°C 30 s, 55°C 45 s, 72°C 30 s, 30 个循环; 72°C 10 min。取 5 μL PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶上电泳观察结果。

1.6 IFA 检测重组病毒

出现 CPE 的 Vero E6 细胞, 用 0.5 mol/L 的 EDTA 消化细胞重悬于 $1\times\text{PBS}$, 按常规方法制备成抗原片, 丙酮固定 20 min, 1% BSA 封闭 30 min, hMPV F 蛋白鼠源单抗孵育 30 min, FITC 标记的羊抗鼠 IgG 二抗孵育 30 min, EVAN'S-blue 染色, 甘油封片, 于荧光显微镜下观察。

1.7 细胞病变法测定病毒滴度

将病毒感染 6 d 的 Vero E6 细胞冻融收集上清, 用于病毒滴度测定。将重组病毒进行 10 倍系列稀释后接种于 96 孔培养板的 Vero E6 细胞, 于 37°C 、5% CO_2 条件下培养 6 d, 每日观察细胞病变, 根据 Reed-Muench 的方法计算病毒的组织细胞半数感染量(TCID_{50})。

1.8 重组病毒生长曲线

根据重组病毒 TCID_{50} 计算病毒滴度, 按照感染复数(MOI) 0.1 感染 6 孔板内的 Vero E6 细胞, 于 37°C 、5% CO_2 条件吸附 2 h, 2 h 后弃去病毒液, 用病毒培养基洗 2 遍, 每孔加 2 mL 病毒维持液, 37°C 、5% CO_2 条件下培养, 分别在第 2 天、第 3 天、第 4 天、第 5 天和第 6 天各从 1 个孔中取 1 mL 上清, 同样由细胞病变法测定计算不同检测时点 TCID_{50} 值。

2 结果与分析

2.1 hMPV 重组病毒的拯救

将 5 个质粒共转染 BSR-T7 细胞, 转染后 3 d, 上清接种 Vero E6 细胞, 6 天细胞可观察到病变, 病变可持续发展到第 10 天。将病变的 Vero E6 细胞冻融, 上清液再接种 Vero E6 细胞, 6 d 后细胞发生了明显的病变, 表现为颗粒增多, 拉网状改变, 合胞体形成。Vero E6 细胞产生的病变及模拟感染的对照 Vero E6 细胞见图 1。

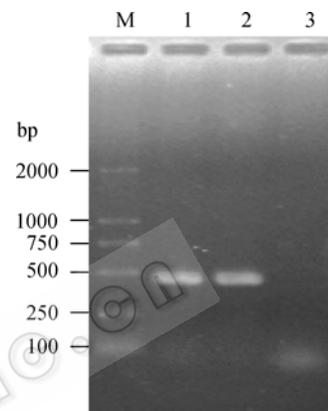


图 2 RT-PCR 扩增重组 hMPV 病毒 F 基因结果

Fig. 2 Result of RT-PCR amplification of recombinant hMPV F gene

M: DL2000 marker; 1: 重组 NL/1/00 hMPV PCR; 2: 重组 NL/1/99 hMPV PCR; 3: 阴性对照 PCR.

M: DL2000 marker; 1: NL/1/00 recombinant hMPV PCR; 2: NL/1/99 recombinant hMPV PCR; 3: Mock.

2.2 RT-PCR 验证重组病毒

提取 CPE 阳性 Vero E6 细胞总 RNA, 经 DNA 酶消化后进行 RT-PCR 反应, 结果扩增出大小约为 450 bp 的片段, 目的片段大小与预期一致, 而未感染的 Vero E6 细胞未扩增出 PCR 产物, 结果说明被感染的 Vero E6 细胞含有 hMPV 重组病毒的 RNA, 电泳结果见图 2。

2.3 间接免疫荧光检测(IFA)重组病毒

将 CPE 阳性的 Vero E6 细胞进行间接 IFA 检测, 荧光显微镜下可观察到特异性绿色荧光, 而模拟感染的 Vero E6 细胞则未观察到绿色荧光。其中 A 型 hMPV 代表株 NL/1/00 阳性细胞数目明显多于 B 型代表株 NL/1/99。结果见图 3。

2.4 重组病毒在 Vero E6 中的生长曲线

采用细胞病变法测定病毒滴度, 经一次传代的重组

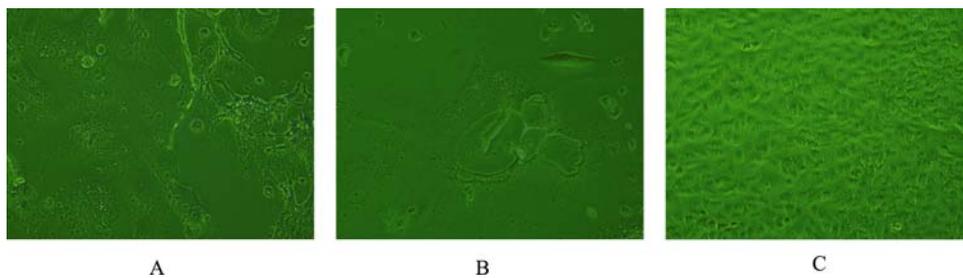


图 1 重组 hMPV 引起 Vero E6 细胞的细胞病变效应(20×物镜)

Fig. 1 CPE of Vero E6 cells infected by recombinant hMPV (20×objective)

注: A: 重组 NL/1/00 hMPV 引起的 Vero E6 细胞病变; B: 重组 NL/1/99 hMPV 引起的 Vero E6 细胞病变; C: 正常 Vero E6 细胞.

Note: A: Vero E6 cells infected by NL/1/00 recombinant hMPV; B: Vero E6 cells infected by NL/1/99 recombinant hMPV; C: Mock Vero E6 cell.

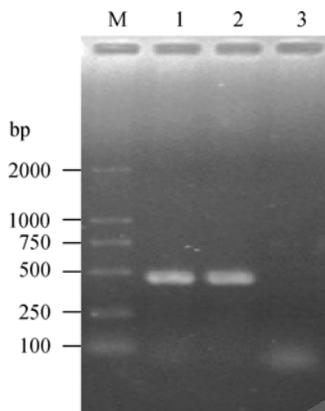


图 2 RT-PCR 扩增重组 hMPV 病毒 F 基因结果

Fig. 2 Result of RT-PCR application of recombinant hMPV F gene

注 M: DL2000 marker; 1: 重组 NL/1/00 hMPV PCR; 2: 重组 NL/1/99 hMPV PCR; 3: 阴性对照 PCR.

Note: M: DL2000 marker; 1: NL/1/00 recombinant hMPV PCR; 2: NL/1/99 recombinant hMPV PCR; 3: Mock.

hMPV 病毒可在第 4 天出现 CPE, 6 天 A 型代表株 NL/1/00 在 Vero E6 细胞滴度为 $10^{6.4}$ TCID₅₀/mL, 而 B 型代表株 NL/1/99 为 $10^{5.33}$ TCID₅₀/mL。两个血清型代表株生长曲线如图 4。

3 讨论

反向遗传技术是研究 RNA 病毒的重要手段, 运用该技术可以在分子水平上分析和改造病毒基因组, hMPV 为单股负链 RNA 病毒, 借助反向遗传技术可实现在 DNA 水平上对改病毒基因组的人工操作, 从而为阐明病毒基因组结构与功能以及研制候选疫苗株奠定基础。本研究采用反向遗传技术, 将 hMPV 全基因组 cDNA 克隆与 4 个辅助蛋白 N、P、L、M2.1 的表达载体共转染 BSR-T7 细胞, 在辅助载体提供病毒复制所需蛋白作用下, 产生出各种 mRNA, 进而表达出病毒各蛋白, 最终包装成有感染性的病毒

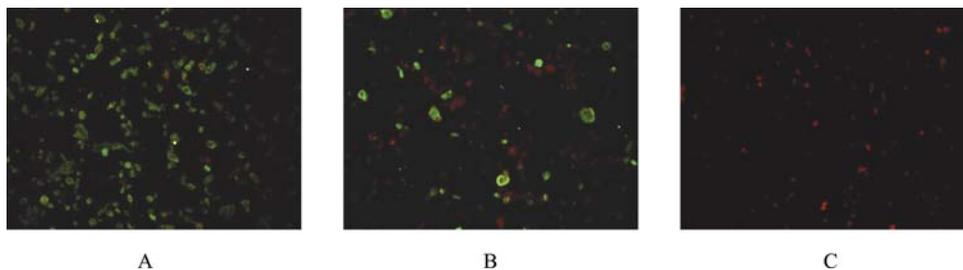


图 3 重组 hMPV 间接免疫荧光检测(40×物镜)

Fig. 3 The IFA assay in Vero E6 cells infected recombinant hMPV (40×objective)

注: A: 重组 NL/1/00 hMPV 感染 Vero E6 细胞的间接免疫荧光; B: 重组 NL/1/99 hMPV 感染 Vero E6 细胞的间接免疫荧光; C: 未感染的 Vero E6 细胞的免疫荧光.

Note: A: Vero E6 cells infected by NL/1/00 recombinant hMPV; B: Vero E6 cells infected by NL/1/99 recombinant hMPV; C: Mock of non-infected Vero E6 cells.

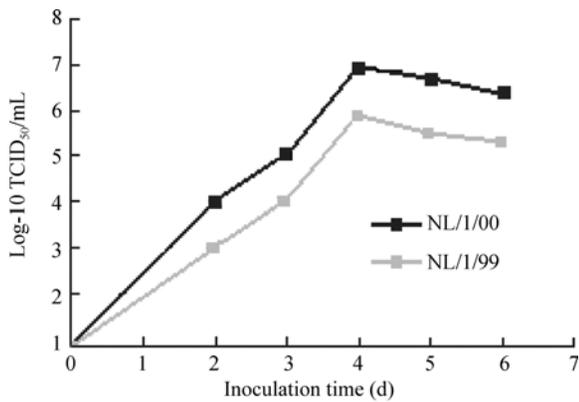


图4 重组 hMPV 病毒生长曲线

Fig. 4 Growth Curve of Recombinant hMPV

颗粒。本研究中获得的重组病毒可导致 Vero E6 细胞产生明显的细胞病变, 并且通过 RT-PCR 检测和间接免疫荧光测定, 结果显示拯救 hMPV 病毒具有感染性。重组病毒在体外传至第 10 代, 仍能导致明显 CPE, 且可用间接免疫荧光、RT-PCR 等手段验证感染性病毒存在, 因而证实 hMPV 两亚型重组病毒均可在体外稳定传代。

本实验拯救出的重组 hMPV, 通过 Vero E6 细胞的培养, A 型代表株 NL/1/00 比 B 型代表株 NL/1/99 滴度要高, 且间接免疫荧光也显示 A 型代表株 NL/1/00 比 B 型代表株 NL/1/99 阳性细胞数量多, 这与荷兰学者所报道结果不十分一致^[4], 这可能与我们所用的病毒培养的细胞 Vero E6 有关, 也可能是拯救过程中, NL/1/00 拯救效率高于 NL/1/99。刚刚拯救出的 hMPV 一般滴度比较低, 病毒生长速度慢, 需要几天的培养才能大量繁殖, Vero E6 细胞可以在正常情况下, 甚至是不更换培养液的情况下维持 7 d~10 d 甚至更长的时间, 因此 Vero E6 细胞是 hMPV 培养和分离比较适合的细胞株, 日本学者也曾有相关的报道^[5]。

人类偏肺病毒的发现虽然仅有短短几年, 中国重庆, 北京等地区的流行病学调查显示 hMPV 有较

高的发病率^[6-9]。反向遗传技术已用于 hMPV 病毒的体外重组, hMPV 的拯救成功, 可为今后我国的流行病学调查, hMPV 各蛋白功能研究, 以及基因突变减毒株的构建及疫苗的研制等奠定重要基础。

参考文献

- [1] Van den Hoogen BG, De Jong JC, Groen J, *et al.* A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nature Med*, 2001, **7**(6): 719-724.
- [2] Peret TCT, Boivin G, Li Y, *et al.* Characterization of human metapneumoviruses isolated from patients in North America. *J Infect Dis*, 2002, **185**(11): 1660-1663.
- [3] Chan PKS, Tam JS, Lam CW, *et al.* Human metapneumovirus detection in patients with severe acute respiratory syndrome. *Emerg Infect Dis*, 2003, **9**(9): 1058-1063.
- [4] Herfst S, De Graaf M, Schickli JH, *et al.* Recovery of human metapneumovirus genetic lineages A and B from cloned cDNA. *J Virol*, 2004, **78**(15): 8264-8270.
- [5] Abiko C, Mizuta K, Itagaki T, *et al.* Outbreak of human metapneumovirus detected by use of the Vero E6 cell line in isolates collected in Yamagata, Japan, in 2004 and 2005. *Journal of Clinical Microbiology*, 2007, **45**(6): 1912-1919.
- [6] 朱汝南, 钱 渊, 邓 洁, 等. 北京地区六岁以下儿童急性呼吸道偏肺病毒感染. *中华儿科杂志*, 2003, **41**(6): 441-444.
- [7] 赵林清, 曹守春, 朱汝南, 等. 北京地区人群中人偏肺病毒血清抗体水平的初步调查. *中华儿科杂志*. 2005, **43**(12): 904-907.
- [8] 毛华伟, 杨锡强, 王莉佳, 等. 重庆地区急性呼吸道感染患儿鼻咽吸取物标本中人偏肺病毒的分离研究. *中华儿科杂志*. 2007, **45**(1): 42-45.
- [9] 张 琴, 杨锡强, 赵 耀, 等. 重庆地区 0~6 岁儿童偏肺病毒感染状况调查. *中国实用儿科杂志*. 2007, **22**(8): 579-582.