



研究报告

人肠道病毒 D68 型 5' UTR 间隔区域对下游基因表达的影响

唐弘^{1,2} 杨春¹ 康月茜³ 田耘博⁴ 何永林¹ 徐蕾¹ 张光媛¹ 唐霞¹ 卢楠^{*1}

1 重庆医科大学基础医学院微生物教研室 重庆 400016

2 陆军军医大学第二附属医院麻醉科 重庆 400037

3 绵阳市第三人民医院四川省精神卫生中心检验科 四川 绵阳 621000

4 重庆市血液中心 重庆 400015

摘要:【背景】人肠道病毒 D68 型(EV-D68)属于小 RNA 病毒科肠道病毒属人肠道病毒 D 组, 在 2014 年 8 月至 2015 年 1 月间, 该病毒引起的感染在北美显著增多, 我国也出现流行。相对于原始的 Fermon 毒株, 流行株 5' UTR 区域几乎都存在一两处缺失, 在起始密码子 ATG 前还存在两处 ataaca 重复序列, 这两处位点的功能尚未见报道。【目的】探讨流行株 5' UTR 区域的缺失对下游基因表达的影响, 以及 ataaca 重复序列的功能。【方法】通过序列比对分析现阶段流行株与原始毒株 Fermon 株 5' UTR 的差异以及保守区域, 利用分子生物学方法缺失上述区域后, 利用双荧光素酶报告系统分析 5' UTR 中上述区域对下游报告基因的影响。【结果】序列比对分析发现, 目前流行的 EV-D68 毒株在对应于 Fermon 株基因组 5' UTR 的 685–707 区域发生了 23 个碱基的缺失, 而部分毒株还在 718–729 区域发生了第二处缺失。荧光素酶结果显示, 仅第一处缺失可以极大地提高下游基因的表达量, 同时具有两处缺失则与野生型几乎相当, 而仅缺失第二段序列则降低了下游基因的表达量。此外, 还发现第一处缺失中的序列可能对下游基因表达起到了抑制作用, 而靠近起始密码子的 ataaca 序列作用尚不明确。【结论】目前流行的 EV-D68 毒株在 5' UTR 区域大多出现了一两处缺失, 第一处缺失极大地增强了下游报告基因的表达, 而第二处缺失具有相反的功能, 这一现象可能与起始密码子前的两处 ataaca 重复序列有关。

关键词: 人肠道病毒 D68 型, 5' UTR, 双荧光素酶报告系统

Foundation items: Chongqing Natural Science Foundation (cstc2016jcyjA0212); Chongqing Education Commission Foundation (KJ1500203); Chongqing Science and Health Joint Medical Research Project (2019MSXM048); National Natural Science Foundation of China (31600139, 31372381); Health Commission of Sichuan Province Foundation (18PJ016)

*Corresponding author: E-mail: ficus@cqmu.edu.cn

Received: 08-03-2020; Accepted: 19-05-2020; Published online: 30-06-2020

基金项目: 重庆市自然科学基金(cstc2016jcyjA0212); 重庆市教委基金(KJ1500203); 重庆市科卫联合医学科研项目(2019MSXM048); 国家自然科学基金(31600139, 31372381); 四川省卫健委课题(18PJ016)

*通信作者: E-mail: ficus@cqmu.edu.cn

收稿日期: 2020-03-08; 接受日期: 2020-05-19; 网络首发日期: 2020-06-30

Effect of EV-D68 virus 5' UTR spacer region on downstream gene expression

TANG Hong^{1,2} YANG Chun¹ KANG Yue-Xi³ TIAN Yun-Bo⁴ HE Yong-Lin¹
XU Lei¹ ZHANG Guang-Yuan¹ TANG Xia¹ LU Nan^{*1}

1 Department of Pathogen Biology, School of Basic Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

2 Department of Anesthesiology, Second Affiliated Hospital, Army Medical University, Chongqing 400037, China

3 Sichuan Mental Health Center, Department of Clinical Laboratory, Mianyang Third People's Hospital, Mianyang, Sichuan 621000, China

4 Chongqing Blood Center, Chongqing 400015, China

Abstract: **[Background]** EV-D68 belongs to the enterovirus D group of the Enterovirus genus of the small RNA virus family. Between August 2014 and January 2015, the infection caused by the virus increased significantly in North America, and also appeared in China. Compared with the original Fermon strain, the epidemic strain has almost one or two deletions in the 5' UTR region, and there are two repeated ataaca sequences before the translation start codon. **[Objective]** We explored the effect of the deletion of 5' UTR region of epidemic strains on downstream gene expression and the function of ataaca repeat sequence. **[Methods]** Sequence comparison was used to analyze the differences and conserved regions of 5' UTR between the current epidemic strains and the original Fermon strain. The above regions were deleted by using molecular clone methods and then the dual-luciferase reporter system was used to analyze the effect on downstream luciferase reports genes. **[Results]** Sequence alignment analysis found that the current epidemic EV-D68 strain has a 23 base deletion in the region corresponding to the 685–707 of the 5' UTR of the Fermon strain genome, while some strains have an additional deletion in the 718–729 regions. The luciferase assay showed that only the first deletion can greatly increase the expression of downstream genes, while the two deletions occur at the same time are almost equivalent to the wild type, while the deletion of the second sequence only reduces the expression of downstream genes slightly. In addition, we also found that the ataaca sequence in the first deletion may have a suppressive effect on downstream gene expression, and the role of the ataaca sequence near the start codon is not yet clear. **[Conclusion]** At present, most of the epidemic EV-D68 strains have one or two deletions in the 5' UTR region. The first deletion greatly enhances the expression of downstream reporter genes, while the second deletion has the opposite function. The phenomenon may be related to the repeated ataaca sequences before the start codon.

Keywords: EV-D68, 5' UTR, Dual luciferase report system

EV-D68 属于小 RNA 病毒科肠道病毒属人肠道病毒 D (human enterovirus D species), 最早于 1962 年在美国加利福尼亚州 4 名患有肺炎和细支气管炎的儿童患者中分离得到^[1]。自发现以来, EV-D68 病毒很少被报道, 在 1970–2005 年的肠道病毒监测中, 只有 36 例 EV-D68 病毒感染的病例报道^[2]。但在 2014 年 8 月至 2015 年 1 月间, 该病毒引起的感染在北美显著增多^[3], 并于近年来频繁暴发, 容易引起儿童严重呼吸系统疾病和神经系

统疾病, 引起了国际社会的广泛关注。

EV-D68 在我国的研究主要集中在流行病学调查以及少量的基础研究。Xiang 等检测了北京协和医院从 2006 年 8 月到 2010 年 4 月急性呼吸道感染病人的咽拭标本, 从 13 份标本中检出了 EV-D68 病毒, 约占总标本数的 10%; 通过分析 VP1 编码基因部分序列发现, 与原始毒株 Fermon 株(GenBank 登录号 AY426531)相比, VP1 基因相似性只有 76.6%–78.9%, 存在较大的变异^[4]。Xiao 等对重庆

市儿童医院 2012 年 1 月至 2014 年 11 月的样本分析中发现, 1 876 份住院儿童的鼻咽抽吸物标本中检测到了 19 份 EV-D68 病毒阳性标本, 约占总数的 1%, 而在 2014 年 9–10 月两个月内检测到了 13 份 EV-D68 病毒阳性标本, 阳性率达到了总数的 9.8%, 而且与同时期美国流行毒株高度同源; 此外, 该研究还提示了 EV-D68 感染可能是哮喘发作的危险因素^[5]。Shen 等在 2014 年 EV-D68 北美大流行后对北京地区呼吸道感染的标本进行持续监测, 在 2015 年未检出 EV-D68 病毒阳性标本, 而 2016 年病毒检出率为 0.53%, 2017 年为 0.03%; 此外, 该研究还发现 EV-D68 病毒 D3 进化支最早出现在 2016 年, 并于 2016–2017 年间与 B3 同时流行; EV-D68 病毒感染的两个高峰期为夏末和初冬^[6]。Chen 等对深圳的 4 株 EV-D68 病毒测序后发现, 它们与中国其他地区流行株序列相似^[7]。Wang 等报告了 2018 年 9 月 21 日一名入院治疗的 6 岁儿童感染病例, 其为国内第一起由 EV-D68 引起的迟缓性麻痹(acute flaccid myelitis, AFM)的病例^[8]。

香港的一项流行病学调查发现, 2014 年在香港收集的 1 461 份呼吸道标本中, 有 24 份检出了 EV-D68, 占总数的 1.64%, 而且与其他地区的 EV-D68 感染主要发生在秋季不同, 该调查发现香港地区的感染主要发生在夏季^[9]。另外一份来自香港的研究也发现, 2010–2014 年间, EV-D68 流行峰值主要出现在春夏季, 而 2011 年则出现在秋冬季; 该研究还发现 EV-D68 除了感染儿童以外, 还能够在成年人/老人中引起呼吸道感染, 对 VP1、2C 和 3D 区域进行的系统发育分析显示, 香港地区分离出的病毒属于进化支 A1、A2、B1 和 B3, 成年人/老年人仅发现被进化支 A2 感染^[10]。Wang 等分析 2014 年 9 月到 2015 年 12 月香港两家地区医院收集的 10 695 份标本, 发现 EV-D68 病毒感染标本阳性率高达 24.9%, 而核酸序列分析发现都属于 B3 进化支^[11], 提示香港地区的 EV-D68 流行正在经

历快速变化。除流行病毒调查之外, 天津医科大学的 Pan 等建立了 EV-D68 病毒的反向遗传学系统和微复制子系统, 为其感染的分子机理研究奠定了基础^[12]。

与其他肠道病毒类似, EV-D68 病毒的基因组为单股正链 RNA, 约 7 300 nt, 包括 5'非翻译区(5' UTR)、多聚蛋白编码区和 3'非翻译区(3' UTR)。5' UTR 区域长度为 730 nt, 包括相对保守的核糖体内部进入位点(internal ribosome entry site, IRES)反向重复区域及 IRES 与编码框之间的间隔序列。Kaida 等对 EV-D68 病毒的序列进行分析, 发现在 1990 年之前, EV-D68 病毒的 5' UTR 与 Fermon 株类似, 有少量病毒包含一个 24 nt 的缺失突变; 然而在 2011 年之后, 部分病毒的 5' UTR 出现了一个新的 11 nt 的缺失突变^[13]。根据分子流行病学调查和 VP1 衣壳蛋白编码区域的比较, 近期流行的 EV-D68 毒株可以分为两个遗传支系^[14]。由于 EV-D68 病毒之前并不引起大规模的流行, 而较为流行的小 RNA 病毒(如脊髓灰质炎病毒、EV-71 等)在 5' UTR 的 IRES 区域与下游基因起始密码子 ATG 之间多样性不高, 因此, 过往的研究大多专注于 5' UTR 区域的 IRES 对毒力及流行的影响, 但是对 IRES 区域与起始密码子之间间隔区域的研究却鲜有报道^[15-16]。

本实验利用双荧光素酶报告系统研究了 EV-D68 病毒 IRES 与 ATG 前的 Spacer 序列对下游报告基因的影响, 以期为深入理解 EV-D68 病毒的变异和再流行提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 细胞和质粒

人横纹肌瘤细胞(rhabdomyosarcoma cells, RD cells)、荧光素酶质粒 pSiCheckII 由本实验室保存。

1.2 主要试剂和仪器及引物

转染试剂 Lipofectamine 2000 和双荧光素酶检测试剂盒, Promega 公司; 质粒提取试剂盒、限制

性核酸内切酶、高保真 DNA 聚合酶 PrimeSTAR Max 和 T4 DNA 连接酶, TaKaRa 公司; DMEM 细胞培养基和胎牛血清, HyClone 公司。多功能酶标仪, BioTek 公司。

根据 EV-D68 Fermon 病毒基因组序列进行引物设计, 用于重组质粒的检测, 分别为 J-F (5'-TTA AACAGCTCTGGGGTTG-3') 和 J-R (5'-TCTAGT AACTTGAGCTCCCA-3'), 由重庆擎科兴业生物技术有限公司合成。

1.3 EV-D68 流行株与 Fermon 株 5' UTR 序列比对分析

从 NCBI 数据库中下载已经测序的 EV-D68 病毒基因组 5' UTR 序列, 以原始株 EV-D68 Fermon 株作为参照序列, 利用软件 MEGAX 进行比对。

1.4 载体构建

人 RNA 聚合酶 I 启动子(Ppoll)、EV-D68 病毒 Fermon 株完整的 5' UTR 区域以及部分病毒 ORF 区域(1-57 nt)由重庆擎科兴业生物技术有限公司合成^[17]。在此基础上, 合成了其他 5 个片段, 分别在 5' UTR 区域含有第一个(Del1, 681-703 nt), 第二个(Del2, 715-726 nt)和两个区域同时缺失(DelBoth)的 3 个质粒, 以及缺失第一段 ataaca 序列和第二段 ataaca 序列的质粒。上述片段合成之后, 分别利用 *Bam*H I 和 *Nhe* I 双酶切, 荧光素酶报告质粒 pSiCheck2 用 *Bgl* II 和 *Nhe* I 双酶切。回收目的片段和酶切质粒用 T4 DNA 连接酶连接, 分别构建重组质粒 p5Ferm、pDel1、pDel2、pDelBoth、pDelATAA1 和 pDelATAA2。上述重组质粒用检测引物 J-F 和 J-R 进行 PCR 鉴定后, 经由 Sanger 测序验证。PCR 鉴定的反应体系(20 μ L): 待鉴定质粒 0.1 μ L, 上、下游引物(10 mmol/L)各 1 μ L, PrimeSTAR Max 10 μ L, 灭菌水补足至 20 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 10 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 34 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

1.5 重组质粒转染 RD 细胞

RD 细胞在 DMEM (10% FBS)培养基中培养, 转染前 24 h 将细胞接种至 24 孔细胞培养板中, 待

细胞密度达到 90%后, 将构建好的双荧光素酶重组质粒转染至 RD 细胞。具体步骤按照 Lipofectamine 2000 说明书进行, 将 1 μ g 混合质粒与 2 μ L 转染试剂分别与两管 125 μ L 无血清的 Opti-MEM 混合, 轻轻吹打均匀, 静置 5 min 后将两管混合均匀, 静置 15 min。期间用无血清的 Opti-MEM 将待转染细胞清洗 3 次, 后加入混合的质粒与脂质体 37 $^{\circ}$ C 孵育, 5 h 后更换为含有 5%血清的 DMEM 细胞培养基。

1.6 荧光素酶报告基因检测

萤火虫荧光素酶(Fluc)和海肾荧光素酶荧光素酶(Rluc)的活性用多功能酶标仪检测, 具体方法按照双荧光素酶检测试剂盒进行。详述如下: 细胞转染 24 h 后, 移除残留培养基, 用 PBS 清洗一次, 加入裂解液裂解后 3 000 r/min 离心 1 min 后收集上清; 取 100 μ L 上清液加入等体积的荧光素酶检测试剂 Dual-Glo Luciferase Reagent 混合后立即读取萤火虫荧光数值; 然后加入 100 μ L 荧光素酶检测试剂 Dual-Glo Stop & Glo Reagent, 读取海肾荧光数值, 至少统计 3 个孔的数值后进行统计分析。

1.7 统计学处理

统计数据用 SPSS 22.0 软件分析, 统计结果以均数 \pm 标准差表示, 组间比较用 *t* 检验。统计显著性水平设置为 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 EV-D68 流行株与 Fermon 株 5' UTR 序列比对分析

以原始株 EV-D68 Fermon 株作为参照序列, 利用软件 MEGAX 进行比对。结果如图 1 所示, 目前流行的毒株在 5' UTR 区域的 IRES 与下游 ORF 之间均出现了不同程度的缺失。但这些缺失并不是随机的缺失, 基本只存在两种类型的缺失。几乎现在流行的毒株其 5' UTR 对应于 Fermon 株基因组 685-707 区域的 23 个碱基都发生了缺失, 缺失的序列为 5'-CTCAAACCTCCAGTACATAACA-3' (Del1)。除了第一处缺失之外, 部分毒株还在对应于

Fermon 株基因组 718–729 的区域发生了缺失, 缺失序列为 5'-TTAAACTTATTT-3' (Del2)。

2.2 重组双荧光素酶报告载体的构建

在 pSiCheckII 质粒的基础上, 构建了重组质粒用于 EV-D68 病毒 5' UTR 区域双荧光素酶报告基因的检测。改造后的重组质粒包含一个上游的 RNA 聚合酶 I 启动子(Ppoll)以及 EV-D68Fermon 株 5' UTR 区域, 为了最大程度地模拟病毒的翻译起始, 在 5' UTR 区域下游保留了原病毒 VP4 区域的部分编码框, 再将其与报告基因 hRluc 融合表达

(VP4/hRluc); 其余序列与 pSiCheck2 相同, 主要包括 HSV-TK 启动子及其下游的 hFluc 报告基因, 作为对照荧光素酶, 该质粒被命名为 p5Ferm (图 2A)。在上述质粒的基础上, 分别构建了包含 5' UTR 第一处缺失(pDel1)、第二处缺失(pDel2)以及两处同时缺失(pDelBoth)的 3 个质粒, 以及 pDelATAA1 和 pDelATAA2 共 5 个质粒。每个克隆挑取 3 个菌落增菌后用引物 J-F 和 J-R 进行鉴定 (图 2B), 所有的质粒均通过 PCR 鉴定和 Sanger 测序验证正确。

	670	680	690	700	710	720	730	740
Human enterovirus 68 strain Fermon complete genome (2)	TGATTTGCTTTGAAATAATCTCACCTCAAACCTCCAGTACATAACATTTAAAGAGTTTAAACTTATTTATAACAATGGGAGCT							
Human enterovirus 68 isolate ... from France complete genome	CAACTTGCATTTTGATAACTTCAT-----TTTGAAAATT-----CTAATAATGGGGGCT							
Enterovirus D68 isolate BCH824A complete genome	CAACTTGTATTTTAACTTCAA-----TTTGAAAATT-----TTAATAATGGGAGCT							
Enterovirus D68 isolate NY329 complete genome	CAATTTGCATCTTGATAACTTTAA-----TTTGAAAATT-----TTAACAATGGGAGCT							
Enterovirus D68 isolate NY329 complete genome (2)	CAATTTGCATCTTGATAACTTTAA-----TTTGAAAATT-----TTAACAATGGGAGCT							
Enterovirus D68 isolate CA/SFP/11-1767 complete genome (2)	CAACTTGCATTTTGATAACTCTA-----TTGAAAATTCTAAACTCATTTTTAAATAATGGGAGCT							
Enterovirus D68 isolate CA/SFP/10-786 complete genome	CAATTTGTATTTGGATAGCTTCAT-----TT-GAAAATTCAAAATCATTTCATAAAGATGGGAGCT							
Enterovirus D68 isolate NY316 complete genome	CAACTTGCATCTTGATAACTTTAA-----TTTGAAAATT-----TTAACAATGGGAGCT							
Enterovirus D68 strain US/CA/1... polyprotein gene complete genome	CAACTTGCATCTTGATAACTTTAA-----TTTGAAAATT-----TTAACAATGGGAGCT							
Human enterovirus 68 strain N...403 from USA complete genome	CAATTTGTATTTGGATAGCTTCAT-----TT-GAAAATTCAAAATCATTTCATAAAGATGGGAGCT							
Human enterovirus 68 isolate NZ-2010-541 complete genome	CAATTTGTATTTGGATAGCTTCAT-----TT-GAAAATTCAAAATCATTTCATAAAGATGGGAGCT							
Enterovirus D68 isolate CA/RESP/10-786 complete genome (2)	CAATTTGTATTTGGATAGCTTCAT-----TT-GAAAATTCAAAATCATTTCATAAAGATGGGAGCT							
Enterovirus D68 isolate US/KY/14-18953 complete genome	CAATTCACATTTGGATAGCTTCAT-----TTTGAGGACTTTATACCTACTTCAAAAGATGGGGGCT							

图 1 EV-D68 病毒 5' UTR 间隔区的序列比对

Figure 1 Sequence align of partial of EV-D68 5' UTR region

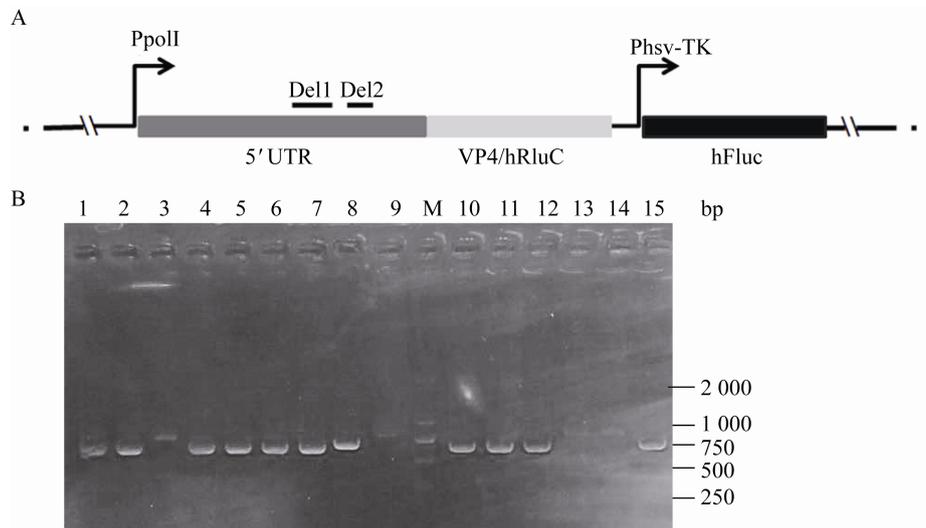


图 2 用于检测 EV-D68 病毒 5' UTR 活性的双荧光素酶报告载体的示意图(A)和重组质粒的 PCR 鉴定(B)

Figure 2 Schematic diagram of recombinant plasmids p5Ferm/Del1/Del2/DelBoth (A) and PCR identification of recombinant plasmids (B)

注: 1–3、4–6、7–9、10–12: 重组质粒 p5Ferm、pDel1、pDel2、pDelBoth 的 PCR 鉴定结果; 13–14: 不加模板阴性对照; 15: 使用病毒基因组 cDNA 为模板的阳性对照; M: DL2000 DNA Marker.

Note: 1–3, 4–6, 7–9, 10–12: The PCR amplification results of plasmids p5Ferm, pDel1, pDel2 and pDelBoth; 13–14: The negative control; 15: The positive control using the virial genomic cDNA; M: DL2000 DNA Marker.

2.3 EV-D68 病毒 5' UTR 缺失片段对下游 ORF 表达的影响

如图 3 所示, 相对于具有野生型 5' UTR 的质粒(p5Ferm), 含有 5' UTR 第一段缺失序列的质粒(pDel1)具有最高的荧光素酶相对表达量(2.053 ± 0.115); 仅含有 5' UTR 第二段缺失序列的质粒(pDel2)具有最低的荧光素酶相对表达量(0.424 ± 0.012); 两段序列同时缺失的质粒(pDelBoth)与野生型质粒(p5Ferm)荧光素酶表达量居中, 分别为 0.999 ± 0.048 、 0.963 ± 0.078 。上述结果表明, 相对于野生型 5' UTR, 缺失第一段的 5' UTR 序列介导了下游报告基因最为高效的表达($P < 0.05$), 而仅缺失第二段的 5' UTR 则具有最低的下游报告基因表达量($P < 0.05$); 两段同时缺失的 5' UTR 与野生型表达量没有统计学差异($P > 0.05$)。

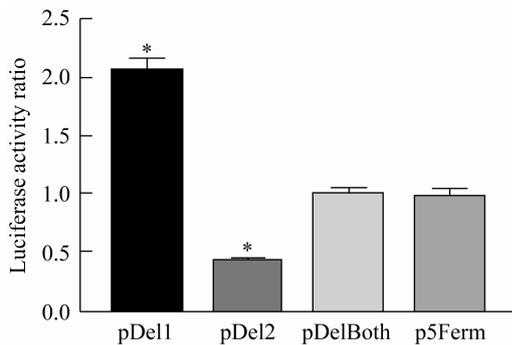


图 3 荧光素酶活性实验结果

Figure 3 Results of luciferase activity ratio assay

2.4 间隔区域 ataaca 序列缺失对下游基因表达的影响

为了进一步探究两处缺失影响下游报告基因表达的机理, 分析起始密码子上、下游发现, 其与真核生物起始密码子区域普遍存在的 Kozark 序列的符合程度并不高^[18-19], 而在 Fermon 株起始密码子 ATG 上游发现两处 ataaca 重复序列, 其中上游的重复序列位于 Del1 区域内, 将上游的 ataaca 序列命名为 ATAA1, 下游的命名为 ATAA2 (图 4)。构建了这两处片段分别缺失的质粒, 命名为 pDATAA1 和 pDATAA2, 通过双荧光素酶比较了这两处缺失对下游报告基因翻译的影响, 结果如图 5 所示: 仅含有第一段 ataaca 缺失的质粒 pDATAA1 具有最高的荧光素酶相对表达量(4.579 ± 0.263), 约为包含野生型 5' UTR 的报告质粒 p5Ferm 的 4.8 倍($P < 0.05$); 而仅含有第二段 ataaca 缺失的质粒 pDATAA2 荧光素酶相对表达量(1.214 ± 0.077)仅为包含野生型 5' UTR 的报告质粒 p5Ferm 的 1.2 倍($P < 0.05$)。进一步比较仅缺失上游 ataaca 序列的荧光素酶报告质粒 pDATAA1 和缺失整个 Del1 区域的荧光素酶报告质粒 pDel1 的荧光素酶报告基因表达结果, 如图 6 所示: pDATAA1 具有更高的荧光素酶表达量, 是 pDel1 的 2.25 倍, 说明第一处缺失造成的下游报告基因高表达可能主要是由于其序列内包含的 ataaca 缺失造成的。

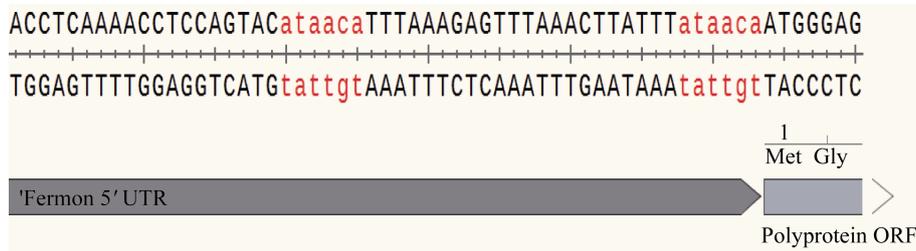


图 4 起始密码子上游 ataaca 重复序列示意图

Figure 4 The schedule of ataaca repeat region in the up stream of polyprotein ORF

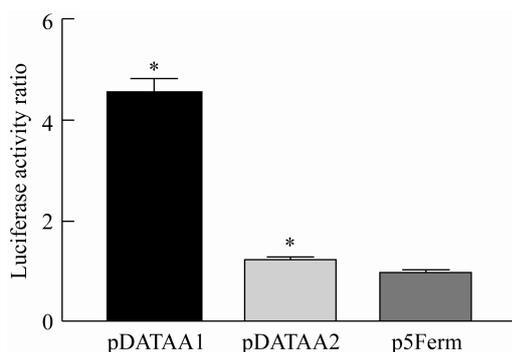


图5 缺失 *ataca* 序列 5' UTR 荧光素酶活性实验结果
Figure 5 Results of luciferase activity ratio assay of plasmids with *ataca* deletions

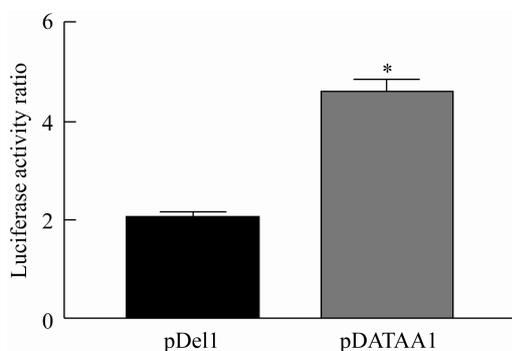


图6 pDel1 与 pDATAA1 荧光素酶结果比较
Figure 6 Comparison of luciferase activity ratio assay between pDel1 and pDATAA1

3 讨论与结论

在2009年之前,每年仅有少量的EV-D68病毒感染病例被报告,但是在2010–2015年间出现了大规模流行^[20]。研究者通过分析流行株的序列发现,从2011年开始,出现了5' UTR区域部分缺失(681–703 nt)的毒株^[13]。2014年大规模流行的部分毒株在5' UTR区域还存在第二个区域的缺失(715–726 nt)^[14]。但是,这些缺失与病毒流行是否存在相关性,以及这些缺失的意义,例如缺失后对病毒的复制、蛋白表达以及毒力的影响并不清楚。因此,本文利用改良的双荧光素酶报告系统检测了这一系列缺失对下游报告基因表达量的影响,初步确定了其在病毒蛋白翻译中的作用。

为了尽可能地接近EV-D68病毒5' UTR RNA

的真实序列,我们改造了荧光素酶报告质粒的启动子。原始的pSiCheck2双荧光素酶质粒具有CMV和HSV-TK两个独立的启动子,分别用于Fluc和Rluc荧光素酶报告基因的表达;CMV启动子是一个强启动子,属于II型启动子,其转录起始位点位于启动子内部,会在5' UTR转录本的5'端引入额外的RNA序列,不利于模拟原始的病毒RNA^[21]。因此,本文用人RNA聚合酶I启动子(human RNA polymerase I promoter, polI)替代了CMV启动子用于启动病毒5' UTR及下游序列的转录。虽然该启动子相对CMV启动子较弱,但在病毒5' UTR RNA中几乎不引入额外的序列;由于荧光素酶报告基因的检测技术成熟、灵敏度高,因此,poII启动子相较于CMV启动子较低的表达量对荧光素酶的检测影响不大^[17]。

我们研究了EV-D68病毒5' UTR区域的缺失对下游报告基因的影响,相对于原始的EV-D68病毒Fermon株,现在流行的部分毒株在5' UTR区域的IRES区域与ORF起始密码子之间的Spacer区域存在1–2个缺失。另外,部分流行株仅在第一个区域存在缺失,部分流行株在两个区域同时存在缺失,但是目前尚未发现只在第二个区域存在缺失的毒株。我们参照流行株Spacer区域的缺失,将原始株EV-D68病毒Fermon株Spacer区域进行了缺失突变,分别获得了缺失第一个位点、同时缺失两个位点的5' UTR双荧光素酶报告系统,结果显示,仅缺失第一段序列的质粒pDel1具有相对最高的荧光素酶表达量,说明该处序列对下游基因的翻译有一定的抑制作用。我们也利用上述方法构建了仅缺失第二个位点的5' UTR双荧光素酶报告系统,结果显示,仅缺失第二段序列会导致下游基因表达量的下降,推测该处序列对下游基因的翻译起促进作用。第二段缺失位点靠近起始密码子ATG,但是其序列不符合Kozark序列的原则^[18-19],其对下游基因翻译的具体机制还需要进一步研究。

此外, 通过序列比对发现, 在第一段缺失区域内和起始密码子 ATG 上游具有两个重复序列 *ataaca*, 我们也分别将这两个重复序列进行了缺失突变, 并通过双荧光素酶系统检测了其下游基因表达的影响。结果表明, 缺失第二处 *ataaca* 重复序列, 即起始密码子 ATG 上游的重复序列对下游报告基因影响不大, 相对于野生型序列仅有轻微的促进作用, 为野生型的 1.2 倍。通过分析发现, 第二处 *ataaca* 重复序列与翻译起始密码子 ATG 紧密相连, 但是并不太符合 Kozark 序列的要求, 仅-3 位的 a 基本满足要求。进一步分析起始密码子 ATG 上游-15 nt 内的序列, 则出现了大量的碱基 T, 与 Kozark 序列相去甚远^[18-19]。通过序列比对发现, 下游 *ataaca* 序列中只有-3 位到-5 位的 *taa* 比较保守。推测其 EV-D68 病毒的翻译起始识别机制与细胞不太相同, 可能需要一些病毒编码的蛋白参与。第一处 *ataaca* 远离起始密码子, 位于现今流行株两处天然缺失序列中的第一处片段内部, 但对下游基因表达的促进作用则非常明显, 我们构建的缺失第一处片段的双荧光素酶报告质粒 pDel, 其下游报告基因相对表达量是野生型的 2.13 倍, 而仅缺失内部的 *ataaca* 片段则将表达量提高到了野生型的 4.8 倍。虽然仅缺失 *ataaca* 序列能获得最高的下游基因表达量, 但是目前流行株还缺失了 *ataaca* 序列上游 17 个碱基, 造成下游基因表达量只比野生型多 2 倍, 其意义和功能还不清楚, 推测可能与病毒的复制有关。

我们通过双荧光素酶系统检测了 EV-D68 病毒 5' UTR 区域的缺失对下游基因表达的影响。初步阐明了这些缺失对下游蛋白表达具有的作用, 即对病毒蛋白翻译的影响。但是病毒的感染和流行往往需要在翻译和复制水平上进行调控。虽然 EV-D68 病毒发现于 20 世纪 60 年代, 但是近年暴发流行以后才引起重视, 因此相关的研究并不完善。5' UTR 区域的缺失是否对 EV-D68 病毒基因组 RNA 的复制产生影响, 还需要构建感染性克隆等进行进一步的研究。

REFERENCES

- [1] Schieble JH, Fox VL, Lennette EH. A probable new human picornavirus associated with respiratory diseases[J]. *American Journal of Epidemiology*, 1967, 85(2): 297-310
- [2] Khetsuriani N, LaMonte-Fowlkes A, Oberste MS, et al. Enterovirus surveillance-United States, 1970-2005[J]. *Morbidity and Mortality Weekly Report: Surveillance Summaries*, 2006, 55(8): 1-20
- [3] Gimferrer L, Campins M, Codina MG, et al. First Enterovirus D68 (EV-D68) cases detected in hospitalised patients in a tertiary care university hospital in Spain, October 2014[J]. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 2015, 33(9): 585-589
- [4] Xiang ZC, Gonzalez R, Wang Z, et al. Coxsackievirus A21, enterovirus 68, and acute respiratory tract infection, China[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2012, 18(5): 821-824
- [5] Xiao QY, Ren L, Zheng SY, et al. Prevalence and molecular characterizations of enterovirus D68 among children with acute respiratory infection in China between 2012 and 2014[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 16639
- [6] Shen LY, Gong C, Xiang ZC, et al. Upsurge of enterovirus D68 and circulation of the new subclade D3 and subclade B3 in Beijing, China, 2016[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9: 6073
- [7] Chen L, Shi L, Yang H, et al. Identification and whole-genome sequencing of four enterovirus D68 strains in southern China in late 2015[J]. *Genome Announcements*, 2016, 4(5): e01014-16
- [8] Wang XL, Zhang PF, Li J, et al. Enterovirus D68 in a 6-year-old acute flaccid myelitis case in China, 2018: a case report[J]. *BMC Infectious Diseases*, 2020, 20(1): 125
- [9] Lam HY, Wong ATC, Tsao YC, et al. Prevalence and phylogenetic characterization of human enterovirus D68 among children with respiratory infection in Hong Kong[J]. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2016, 85(2): 174-176
- [10] Lau SKP, Yip CCY, Zhao PSH, et al. Enterovirus D68 infections associated with severe respiratory illness in elderly patients and emergence of a novel clade in Hong Kong[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 25147
- [11] Wang HC, Tao K, Leung CY, et al. Molecular epidemiological study of enterovirus D68 in hospitalised children in Hong Kong in 2014-2015 and their complete coding sequences[J]. *BMJ Open Respiratory Research*, 2019, 6: e000437
- [12] Pan ML, Gao S, Zhou ZW, et al. A reverse genetics system for enterovirus D68 using human RNA polymerase I[J]. *Virus Genes*, 2018, 54(4): 484-492
- [13] Kaida A, Kubo H, Sekiguchi JI, et al. Enterovirus 68 in children with acute respiratory tract infections, Osaka, Japan[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2011, 17(8): 1494-1497

- [14] Xiang ZC, Wang JW. Enterovirus D68 and human respiratory infections[J]. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 2016, 37(4): 578-585
- [15] Gromeier M, Alexander L, Wimmer E. Internal ribosomal entry site substitution eliminates neurovirulence in intergeneric poliovirus recombinants[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93(6): 2370-2375
- [16] Li RQ, Zou QH, Chen LJ, et al. Molecular analysis of virulent determinants of enterovirus 71[J]. *PLoS One*, 2011, 6(10): e26237
- [17] Meng T, Kiener TK, Kwang J. RNA polymerase I-driven reverse genetics system for enterovirus 71 and its implications for vaccine production[J]. *Virology Journal*, 2012, 9: 238
- [18] Kozak M. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs[J]. *Nucleic Acids Research*, 1987, 15(20): 8125-8148
- [19] Kozak M. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes[J]. *Cell*, 1986, 44(2): 283-292
- [20] Imamura T, Oshitani H. Global reemergence of enterovirus D68 as an important pathogen for acute respiratory infections[J]. *Reviews in Medical Virology*, 2015, 25(2): 102-114
- [21] Zarrin AA, Malkin L, Fong I, et al. Comparison of CMV, RSV, SV40 viral and V λ 1 cellular promoters in B and T lymphoid and non-lymphoid cell lines[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1999, 1446(1/2): 135-139



征订启事

欢迎订阅《微生物学通报》

《微生物学通报》创刊于1974年，月刊，是中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办，国内外公开发行，以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括：工业、海洋、环境、基础、农业、食品、兽医、水生、药物、医学微生物学和微生物蛋白质组学、功能基因组、工程与药物等领域的最新研究成果、产业化新技术和新进展，以及微生物学教学研究改革等。

本刊为中文核心期刊，中国科技核心期刊，CSCD核心期刊，曾获国家优秀科技期刊三等奖，中国科学院优秀科技期刊三等奖，北京优秀科技期刊奖，被选入新闻出版总署设立的“中国期刊方阵”并被列为“双效”期刊。

据中国科学技术信息研究所信息统计，本刊2012年至今以国内“微生物、病毒学类期刊”综合评价总分第一而蝉联“百种中国杰出学术期刊奖”，并入选“中国精品科技期刊”，成为“中国精品科技期刊顶尖学术论文(F5000)”项目来源期刊。

欢迎广大读者到邮局订阅或直接与本刊编辑部联系购买，2021年每册定价130元，全年1560元，我们免邮费寄刊。

邮购地址：(100101)北京朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部

Tel: 010-64807511; E-mail: bjb@im.ac.cn, tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

国内邮发代号: 2-817; 国外发行代号: M413