

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.001917

EV71 病毒反向遗传学系统的建立及拯救病毒的鉴定

庄稀尧¹, 卢楠¹, 唐弘¹, 李智颖¹, 陈俊伊¹, 熊雨涵¹, 徐蕾¹, 王瑜伟², 康月茜³, 杨春¹

(1. 重庆医科大学分子医学与肿瘤研究中心、病原生物学实验室, 重庆 400016; 2. 重庆市中医院检验科, 重庆 400021; 3. 绵阳市第三人民医院·四川省精神卫生中心, 绵阳 421000)

【摘要】目的:建立高效的 EV71 病毒反向遗传学系统,快速获得拯救病毒并鉴定其活性。**方法:**首先构建含有人 RNA 聚合酶 I 启动子(Ppol I)、ccdB 自杀基因和鼠终止子(mTer)的接收质粒 pHM-ccdB,并在 ccdB 两侧引入 *Aar* I 酶切位点;为了回避 EV71 病毒基因组中自身的 *Aar* I 酶切位点,分两段 PCR 扩增基因组,在引物中引入必需的 *Aar* I 酶切位点,通过 Golden Gate Clone 技术连接到目的载体中获得病毒拯救质粒 pHT-EV71,转染至 RD 细胞后,获得拯救的 EV71 病毒,并以 RT-PCR、病毒滴度、Western blot 以及电镜检测等方法鉴定拯救子代病毒。**结果:**通过引入 ccdB 致死基因和 Golden Gate Clone 成功构建了 EV71 病毒的拯救质粒(pHT-EV71),并将其转染至 RD 细胞后,观察到明显的致细胞病变效应(cytopathic effect, CPE),将得到的拯救子代病毒,经 EV71 VP1 的特异性引物进行 RT-PCR 扩增,观察到长约 1 900 bp 的特异性条带;Western blot 结果显示,该病毒可与 EV71 VP1 特异抗体结合;透射电子显微镜(transmission electron microscopy, TEM)检测可见 20~30 nm 球形病毒颗粒;在 RD 细胞中将子代病毒连续增殖 8 代后,检测其毒力高于母本株(6.35 lgTCID50/mL)。**结论:**通过引入 ccdB 和 Golden Gate Clone 技术,建立了快速、高效构建 EV71 病毒的拯救质粒的方法,效率达到 100%,为正链 RNA 病毒反向遗传学系统的构建提供了一种新的策略,为进一步研究 EV71 病毒的致病机制及疫苗制备等提供了技术平台。

【关键词】肠道病毒 71;Golden Gate Clone;病毒拯救;病毒滴度**【中图分类号】**R373.2**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2018-08-26

Construction of EV71 virus reverse genetics system and identification of rescued viruses

Zhuang Xiyao¹, Lu Nan¹, Tang Hong¹, Li Zhiying¹, Chen Junyi¹, Xiong Yuhuan¹,
Xu Lei¹, Wang Yuwei², Kang Yuexi³, Yang Chun¹

(1. Center for Molecular Medicine and Cancer Research, Laboratory of Pathogenic Biology, Chongqing Medical University; 2. Department of Laboratory Medicine, Chongqing Hospital of Traditional Chinese Medicine; 3. Mianyang Third People's Hospital, Sichuan Mental Health Center)

【Abstract】Objective: To construct an efficient reverse genetics system for EV71 virus, and to rapidly obtain the rescued viruses and identify their activity. **Methods:** A recipient plasmid pHM-ccdB containing human RNA polymerase I promoter, ccdB suicide gene, and murine terminator(mTer) was constructed, and the *Aar* I enzyme cut site was introduced into both sides of the ccdB gene. The virus genome was amplified by PCR in two steps to avoid the *Aar* I enzyme cut site contained in the EV71 genome. The necessary *Aar* I enzyme cut site was introduced into the primer; then the products were connected with the target vector by Golden Gate Clone technique to obtain the rescued plasmid of EV71 virus(pHT-EV71); after the pHT-EV71 was transfected into RD cells, the rescued EV71 viruses were obtained. The progeny viruses were identified by RT-PCR, virus titer, Western blot, and electron microscopy.

Results: The pHT-EV71 was successfully constructed by introducing ccdB lethal gene and Golden Gate Clone technique. After the pHT-EV71 was transfected into RD cells, obvious cytopathic effect was observed. The rescued progeny viruses obtained were amplified by RT-PCR with EV71-specific primers, and specific bands of approximately 1 900 bp were observed. The viruses can be bound with EV71 VP1 specific antibody as showed by Western blot. Spherical virus particles of 20 to 30 nm in size were observed

作者介绍: 庄稀尧, Email: 657167473@qq.com,

研究方向: EV71 病毒疫苗相关方面研究。

通信作者: 杨春, Email: yangchunim@163.com。

基金项目: 重庆市自然科学基金资助项目(编号: cstc2016jcyjA0212);

重庆市科委基础科学与前沿技术(一般)资助项目(编号:

cstc2016jcyjA0277); 四川省卫计委资助项目(编号: 18PJ016)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20181105.0934.030.html>

(2018-11-06)

by transmission electron microscopy. After eight generations of progeny viruses in RD cells, the virulence of the progeny viruses was stronger than that of the parental viruses(6.35 lgTCID50/mL). **Conclusion:** A rapid and efficient method to construct the pHT-EV71 with a 100% efficiency was successfully established through introducing the ccdB gene and Golden Gate Clone technique. This method provides a new strategy for the construction of reverse genetics system for positive-strand RNA viruses and

a technical platform for further study on the pathogenesis and vaccine preparation of EV71 virus.

【Key words】EV71 virus; Golden Gate Clone; rescued virus; virus titer

手足口病(hand-foot-mouth disease, HFMD)的重要病原之一为肠道病毒 71 型(enterovirus 71, EV71), 患病人群以 5 岁下的婴幼儿为主。该病毒往往通过粪口途径传播, 引起轻型感染, 但也可以引起急性神经系统并发症, 如脑炎和脊髓灰质炎样麻痹, 甚至会导致死亡^[1-2]。

EV71 病毒的病毒颗粒直径大小约为 30 nm, 呈无包膜的正二十面体, 属于肠道病毒属中的小核糖核酸 RNA 病毒科。其基因组为单股正链 RNA, 长度约 7 400 bp, 含有一个单一的 ORF 区域, 编码一个大的多聚蛋白(VP 蛋白), 其后被蛋白酶水解为功能蛋白和结构蛋白。ORF 的两侧分别为 5' 端和 3' 端非翻译区, 5' 端含有核糖体内部进入位点(IRES), 为病毒翻译所必需^[3]。

因为 RNA 在体外易降解且不易操作, 相对于许多 RNA 病毒而言, cDNA 克隆常常用于感染性 RNA 的转录模板。所以反向遗传学系统成为目前研究 RNA 病毒复制、感染、毒力决定簇和疫苗开发分子特征的有力工具。本文采用改良 Golden Gate Clone 技术构建 EV71 的病毒拯救质粒, 经过转染后病毒拯救试验确认了病毒拯救成功^[1-2], 为进一步研究 EV71 的致病机制及疫苗制备等提供了技术平台和实验依据。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂与质粒

DMEM 高糖培养基、胰蛋白酶、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自 Hyclone 公司; 逆转录试剂盒、Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司; DH5 α 感受态细胞由本实验室制作并保存; T4 DNA 连接酶、DNA 聚合酶 PrimeSTAR Max Premix(2 \times)、RNA 纯化试剂盒与逆转录试剂盒均采购自 Takara 公司; 限制性内切酶 *Aar* I 购自 Thermo 公司; EV71 VP1 蛋白抗体及碱性磷酸酶标记二抗采购自 GENETEX 公司。本文使用的质粒、无常规酶切位点的 pUC57 由武汉金开瑞公司赠送。

1.2 菌种、细胞与 EV71 病毒

大肠埃希菌菌株 DH5 α 、DB3.1 由本实验保存。人横纹肌瘤细胞(RD 细胞)、EV71 野生毒株(GenBank: GU434678)由本实验室保存。RD 细胞培养于 DMEM 高糖培养基, 添加 10% 的 FBS, 维持培养基血清浓度调整至 2%。EV71 病毒扩增至

RD 细胞, 细胞经 PBS 洗涤 3 次后, 病毒液与细胞孵育 2 h, 后更换为维持培养基, 72 h 后收集上清采用 TCID50 测定法进行病毒滴度的测定。

1.3 引物与载体构建

人 RNA 聚合酶 I 启动子(Ppol I)、大肠埃希菌毒性基因 *ccdB* 和鼠终止子(mTer)由安徽通用生物科技有限公司合成, Ppol I 和 *ccdB* 基因 TA 克隆到 pMD-19T(Takara)载体上, mTer 克隆到 pUC57 载体上。EV71 病毒基因组为收集 EV71 感染 48 h 后的 RD 细胞, 用 Trizol 法提取病毒基因组后, 用 Takara 公司的 One step 逆转录试剂盒得到病毒基因组 cDNA。所有引物的合成经由重庆擎科生物科技有限公司负责(表 1)。载体构建(图 1)采用改良的 Golden Gate Clone, 酶切连接在同一个 EP 管中一步完成, 在 20 μ L 的体系中添加 1 μ L 内切酶, 1 μ L T4 DNA 连接酶及 T4 Buffer。与经典的 Golden Gate Clone 不同, 反应条件为 37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h, 然后转化至 DH5 α 感受态细胞。

具体方法如下: 用引物对 SapccDBF/R 扩增 *ccdB* 基因, 引物对 SapTerF/SapUCR 扩增 mTer 及 pUC57 载体, 引物对 SapPolF/R 扩增 Ppol I 基因, 然后将上述 3 个片段等比例混合, 加入内切酶 *Sap* I 和 T4 连接酶, 用上述方法进行一步法连接。将连接产物转化至 DB3.1 感受态中, 得到接收载体 pHM-*ccdB*。病毒拯救质粒载体 pHM-EV71 也采用类似方法构建, 但是由于 EV71 病毒基因组中含有 *Aar* I 内切酶识别位点, 构建过程中又需要使用 *Aar* I 内切酶, 因此不能采用 Golden Gate Clone 一步法构建, 否则连接好的质粒会被 *Aar* I 切断, 采用两步法可以解决该问题。具体而言, 用引物对 *Aar* I-EV71F/*Aar* I-EV71-midF、*Aar* I-EV71-midF/*Aar* I-EV71R 分两段进行扩增 EV71 病毒基因组 cDNA, 分别得到长度 3 100 bp 的 EV71-F1 和 4 400 bp 的 EV71-F2 两个片段, 然后利用 *Aar* I 内切酶酶切上述 2 个片段以及接收质粒 pHM-*ccdB*, 将上述 3 个片段按摩尔比 5:5:1 混合后利用 T4 DNA 连接酶进行连接, 转化大肠埃希菌 DH5 α , 酶切和 PCR 鉴定后测序。

1.4 从质粒中拯救 EV71 病毒

将适当浓度的 RD 细胞接种到 6 孔板中, 培养过夜, 弃去生长液后用无血清、无抗生素 DMEM 培养基清洗 2、3 次, 按照转染试剂盒(Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent)说明书比例将 1 μ g pHM-EV71 质粒与 Lipofectamine2000 脂质体混合并室温静置 20 min 后, 加入 RD 细胞中孵育 4 h, 用无血清的 DMEM 培养基代替转染液并用 PBS 清洗 2、3 次, 将正常细胞和脂质体转染细胞分别设为对照。将转染的 RD 细胞持续培养 72 h 后, 通过显微镜观察到 CPE 后将 RD 细胞 -80 $^{\circ}$ C 反复冻融 3 次, 离心收集上清, 得到的子代病毒命名 EV71-Rescue。

1.5 拯救病毒的鉴定

用 AxyPrep 体液病毒 DNA/RNA 小量试剂盒从 EV71-

表 1 构建及鉴定 EV71 病毒的病毒拯救质粒所用的引物

引物名称	引物序列
SapccDB	正义链 caGCTCTTCaCGTAGAGACCACTGTCCGTCAGA
	反义链 caGCTCTTCaCGGTGAGACCGTCAGTCAGACCG
SapTer	正义链 aaaGCTCTTCaCCGCACCTGCatttAAAACCCCCCAACTTCGGAGGTCG
	反义链 aaaGCTCTTCaGCCATGACCCAGTCACGTAG
SapPol	正义链 aaaGCTCTTCaGGCTAGCCCTGCGTTGGCA
	反义链 aaaGCTCTTCaACGCACCTGCattaTTTAAAATAACCCGGCGGCCA
<i>Aar I</i> -EV71	正义链 aaaCACCTGCattaTAAAACAGCCTGTGGGTTG
<i>Aar I</i> -EV71-mid	正义链 aaaCACCTGCattaACCTGCGAGTCTTATCAATGG
	反义链 aaaCACCTGCattaAGGTGACATGAATGGCACTGAAAC
<i>Aar I</i> -EV71	正义链 aaaCACCTGCattaTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTATTCTGCTTATAACA
JEV71	正义链 AGTTGCAACACCCGTACGTG
	反义链 AAGAGTGGTGATCGCTGTGC

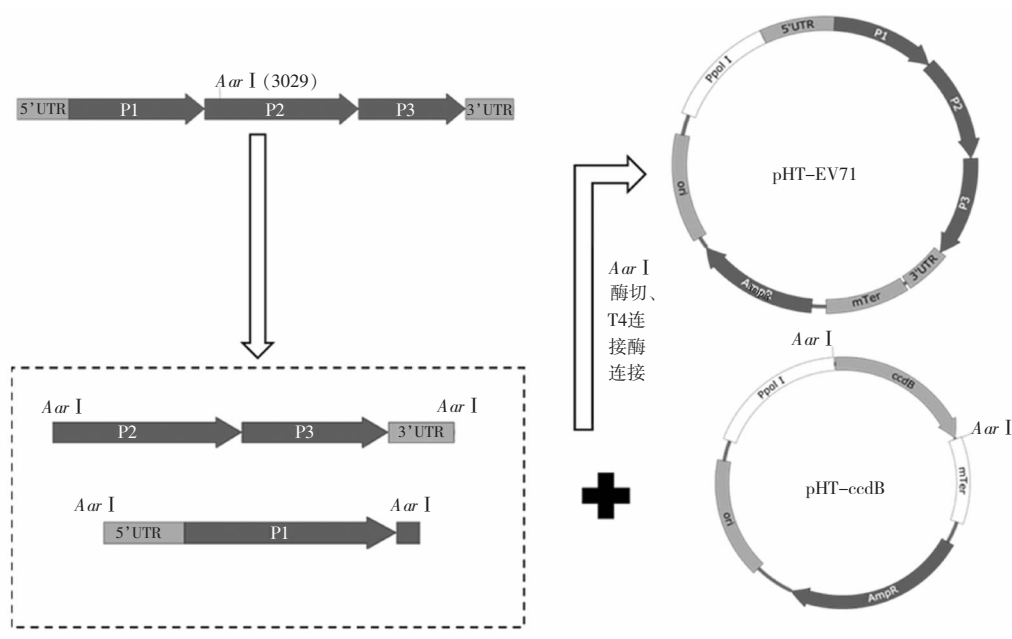


图 1 EV71 感染性克隆的构建过程

Rescue病毒感染细胞悬液中提取病毒 RNA,利用 EV71 VP1 基因特异性引物(表 1)进行 RT-PCR 鉴定。以同等的 MOI 值 (MOI=1)在 RD 细胞中接种 EV71-Rescue 和野生毒株,分别在第 1、2、3、4、5、6、7 天收集细胞上清并进行半数组织培养感染剂量(tissue culture infective dose, TCID₅₀)测定,绘制病毒一步生长曲线,比较 2 种毒株的增殖特性。

将感染了拯救病毒的 RD 细胞冻融 3 次,取上清进行 7 000 r/min 离心 30 min,取上清,弃去细胞碎片。加入等量的 16%PEG6000、3%NaCl,振荡混匀 4 h,4 ℃过夜,6 000 r/min 离心 1 h,弃上清取沉淀。经 PBS 复溶、透析后进行 CsCl 密度梯度超速离心,27 000 r/min,24 h。经电镜观察磷钨酸染后的纯化样品用 PBS 稀释被拯救病毒感染的 RD 细胞沉淀、野生毒株感染的 RD 细胞沉淀做阳性对照和用正常的 RD 细胞沉淀做阴性对照。然后用抗 EV71VP1 抗体进行 Western blot 分析。用于 Western blot 的标记是 PageRuler Prestained Pro-

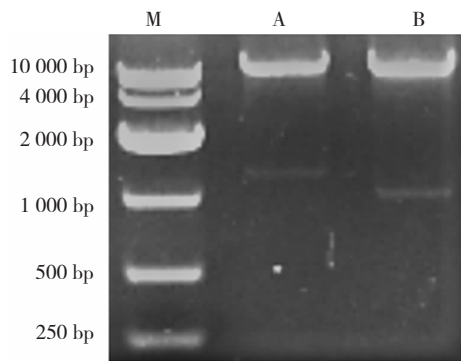
tein Ladder(Thermo Fisher Scientific 26616)。

2 结果

2.1 EV71 病毒拯救质粒的构建

EV71 病毒拯救质粒的接收载体为含有人 RNA 聚合酶 I 启动子(human Ppol I)、大肠埃希菌毒性基因 ccdB、鼠终止子(mouse terminator, mTer)的 pUC57 质粒。除 mTer 元件克隆到 pUC57 载体上以外,其他后克隆到 pMD19T 载体上,扩增后通过改良的 Golden Gate Clone 酶切连接后转化大肠埃希菌菌株 DB3.1,得到接收载体 pHT-ccdB。由于 ccdB 对普通的大肠埃希菌菌株,如 DH5 α 、DH10B、Top10 有致死毒性,只能在大肠埃希菌 DB3.1 中生长。得到该接收载体后与 EV71 病毒的基因组扩增产物连接,转化大肠埃希菌 DH5 α ,挑取单克隆培养 18 h 后提取质粒,利用 VP1 特异性引物

JEV71-F/R,进行 PCR 鉴定;利用内切酶 *Bam*H I (双酶切位点) 及内切酶 *Sal* I、*Eco*R I 对提取的质粒进行酶切鉴定,分别得到了 1 192 bp 及 994 bp 的目的条带,与预期相符合(图 2)。将阳性克隆通过 Sanger 测序,确定 EV71 病毒基因组已经精确地替换掉 *ccd*B 原件,位于 *pol* I 启动子和 *mTer* 终止子之间的正确位置,EV71 全长基因组序列阳性率在 95% 以上并且无突变,拯救质粒 pHT-EV71 成功构建。

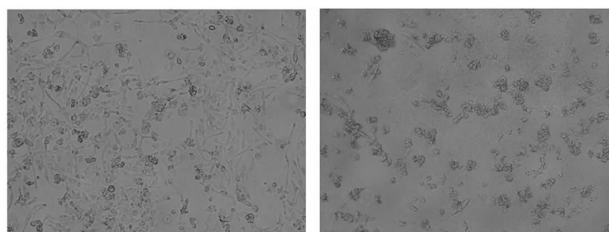


M: DNA DL10 000marker; A: *Bam*H I 双酶切; B: *Sal* I、*Eco*R I 酶切

图 2 pHT-bpEV71 酶切鉴定结果

2.2 病毒的拯救及鉴定

将质粒 pHT-EV71 转染至 RD 细胞,72 h 回收后经 -80 °C 反复冻融 3 次得到第一代病毒 P1,并将病毒盲传至第 8 代。由于 EV-71 为无包膜的 RNA 病毒,其增殖后释放的方式为裂解细胞,因此可以引起以细胞的裂解为主要现象的明显的 CPE。将 P1 病毒在 RD 细胞中进行增殖,72 h 后出现 CPE。RD 细胞形态由原来的梭形变为圆形皱缩,约 50% 的细胞失去贴壁能力,破裂、漂浮于培养基中。对照组细胞状态良好,无病变现象(图 3)。收集感染 P1 病毒的 RD 细胞和上清,并连续传代,可观察到 CPE 出现时间逐渐提前且程度更完全,细胞大约在 24 h 左右可出现 CPE,至 72 h 大部分的细胞漂浮、脱落。



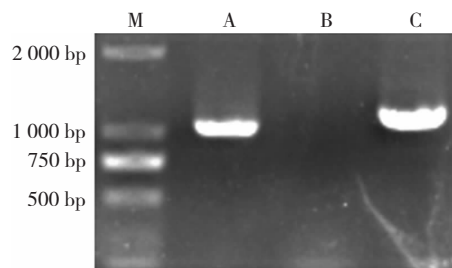
A. 野生毒株感染 RD 细胞

B. 拯救病毒感染 RD 细胞

C. 正常 RD 细胞

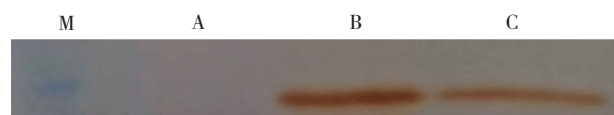
图 3 体外转录 RD 细胞 24 h 后的病变观察 (20 ×)

细胞出现明显病变后,离心收集细胞,一份用于 RNA 提取和 Western blot 鉴定。采用 EV71 VP1 特异性引物(表 1),对拯救病毒感染细胞 RNA 及野生毒株感染的 RD 细胞进行一步法 RT-PCR 扩增,可见长约 950 bp 的条带,大小与野生型的毒株一致(图 4)。另一份细胞裂解后,利用鼠抗 VP1 单克隆抗体进行 Western blot 鉴定,结果表明拯救病毒感染组在 37 kD 左右可见特异性条带并且与野生病毒对照组一致,而正常组无特异性条带(图 5)。磷钨酸负染病毒后,通过电镜可见直径 20~30 nm 的典型肠道病毒球形颗粒(图 6)。



M: DNA DL 2 000marker; A: 拯救病毒; B: 阴性对照; C: 野生毒株

图 4 拯救病毒的 RT-PCR 鉴定



M: 蛋白 Marker; A: 正常细胞沉淀组; B: 野生型毒株感染的细胞沉淀组; C: 拯救病毒感染细胞沉淀组

图 5 拯救病毒在 RD 细胞中表达的 Western blot 鉴定结果

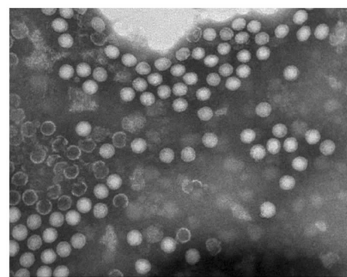


图 6 电镜下的拯救病毒颗粒 (5 900 ×)

2.3 病毒的毒力鉴定及比较

在 RD 细胞中将子代病毒持续增殖 8 代,记录每一代病毒滴度,并绘制生长曲线(图 7)。结果表明,随着病毒传代次数的增加,病毒的滴度稳步增长,第 2~6 代为快速增长期,第 6~8 代增长有所减缓,至第 8 代,病毒的滴度达到 8.11 lgTCID₅₀/mL。

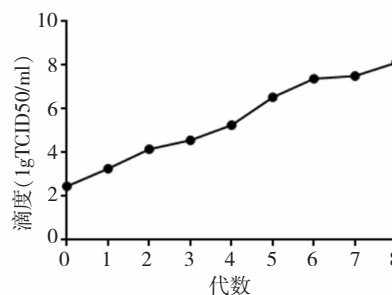


图 7 拯救病毒传代的稳定性

为了鉴定拯救病毒与原野生型病毒的增殖能力,将拯救的子代病毒与野生型病毒感染 RD 细胞(MOI=1)后,连续 7 d,每天收集病毒悬液,采用终点稀释法测定病毒滴度,计算 TCID₅₀ 后绘制病毒传代稳定性曲线图。经比较发现,接种病毒后病毒在细胞中的滴度稳步增加,直至第 96 h 达到高峰,而后病毒滴度开始逐渐下降。野生型病毒与拯救病毒均有相似的增值曲线,但拯救的病毒滴度一直略高于野生型病毒(图 8)

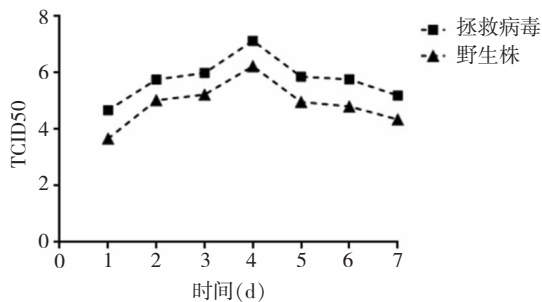


图 8 拯救病毒 EV71-Rescue 和野生毒株在 RD 细胞上的一步生长曲线

3 讨论

早在 1981 年 Racaniello 和 Baltimore 通过反向遗传学技术实现了小肠道病毒属的脊髓灰质炎病毒(poliovirus, PV)的拯救从而实现了在 DNA 水平上研究 RNA 病毒,为 RNA 病毒研究开辟了新方向^[6-9]。cDNA 拯救质粒的构建通过应用定点突变、重组、缺失和嵌合等 DNA 基因操作的手段,可获得多种遗传特性的 RNA 病毒,有助于对病毒基因功能与结构、表达调控、分子免疫机制以及致病机制等的研究,为开发研制新型疫苗奠定基础。但是,肠道病毒基因组普遍约为 7 400 bp,构建其拯救质粒仍需要复杂的操作。

尽管现在发展出了很多新颖的分子克隆方法,但是他们各有优缺点,在构建病毒的拯救质粒方面仍然各有利弊。目前常用的方法包括利用同源重组方法的 In-fusion Clone 技术、利用甲基化识别内切酶的 MASTER Ligation 技术、依赖限制性内切酶的传统分子克隆方法以及依赖 Type IIS 限制性内切酶的 Golden Gate Clone^[10]。In-fusion Clone 依赖拓扑异构酶,对含有 15 bp 以上的同源片段进行体外重组^[11-12],该方法已经应用于 EV71 病毒的病毒拯救质粒的构建。但是这种方法的重组效率随着片段的增大快速下降,特别是构建基因组偏大的病毒拯救

质粒时,仍然会受到酶切位点选择的诸多限制,所以将其用于基因组长达 7 400 bp 的肠道病毒的构建时,显得力不从心,成功率很低^[10]。病毒基因组越大,出现内切酶识别位点的可能性就越大,可供选择的内切酶的种类就少。因此,构建 EV71 病毒的拯救质粒时,往往需要选取一些不常用的单酶切位点进行拼接,需要酶切、回收、连接等繁琐的步骤,比较耗时耗力。本课题组尝试应用该方法,并没有获得阳性克隆。而且该方法依赖长片段扩增和专用载体,扩增整个病毒的基因组存在突变的风险且效率较低,载体也难以获取。MASTER Ligation 依赖识别甲基化位点的限制性内切酶,如 *FspEI* 等,切割目的序列和载体的 PCR 产物,得到黏性末端,再依赖 DNA 连接酶获得重组质粒。该方法与 In-fusion Clone 有类似的优点,可以不被片段和载体的内切酶位点所限制。但是也具有类似的缺点,如需要扩增长片段基因组和整个接收载体且内切酶和甲基化的引物价格昂贵,经济性较差。而经典的分子克隆方法受载体和序列中的酶切位点限制较多,且步骤繁琐,黏末端由于是回文结构,容易自连或产生错误连接,效率较低。

Golden Gate Clone 依赖 Type IIS 限制性内切酶,与 *EcoRI* 等常用于分子克隆的内切酶不同。这类酶,如 *BsaI*、*SapI* 等的切割位点位于内切酶识别位点的下游,切割后产生 3 或 4 个碱基的黏末端,而黏末端的序列没有限制性。因此,相比于普通内切酶产生的回文结构,其具有更低的错配率,从而提高克隆效率。因切割位点的上游有内切酶的识别位点在切割完成后游离出去,连接酶利用内切酶产生的黏末端将 2 条分子连接便可得到重组克隆,所以可将酶切和连接 2 个步骤合二为一,克隆效率得到极大提高。但是,其使用也受到酶切位点的限制。通常情况下,存在较多种类的 Type IIS 内切酶可供选择,如 *BsaI*、*BsmbI*、*BbsI*、*SapI* 和 *AarI* 等,但是本文涉及的 EV71 病毒基因组大小为 7 400 bp,经过 PCR 产物测序发现,其包含大量的常规酶切位点和几乎所有的常用 Type IIS 内切酶位点,如常规使用的 *EcoRI*、*BamHI* 等 Type IIS 是限制性内切酶,这给依赖普通限制性内切酶进行酶切连接的传统克隆方法带来了极大的不便。另外,该 EV71 病毒基因组中还含有常用的 Type IIS 限制性内切酶,如 *SapI*、*BsmbI*、*BbsI*、*BsaI* 和 *AarI*,这些酶同样为 Golden Gate Clone 一步法克隆带来了不便。本研究尝试使用 In-fusion Clone,依赖同源片段重组进行 EV71 反转录质粒的构建,但是由于病毒基因组

(7 400 bp)超过了该方法的最佳使用范围,经过多次尝试,仍不能得到阳性克隆。

因此,本研究使用改良的 Golden Gate Clone 技术,巧妙地将整个基因组分为两段扩增,并同时扩增接收载体,并在引物上引入 *Aar* I 的识别位点,将 3 个片段在 Thermo 内切酶 Buffer 中酶切后 55 °C 失活处理,溶液回收后加入 ATP 和 T4 DNA 连接酶进行连接,成功构建 EV71 的拯救质粒。此外还在构建的接收载体上引入了 *ccdB* 致死基因,将连接产物转化至 DB3.1 感受态中。因 DB3.1 大肠杆菌菌株基因组中含有 *gyrA462* 基因,赋予其对 λ 嗜菌体的 *ccdB* 毒性基因的抗性,而在普通的大肠埃希菌如 DH5α 中 *ccdB* 成为毒性基因导致其不能扩增,所以使没有连接成功的空载体在 DH5α 感受态细胞中不能生长,以及利用 *Aar* I 酶切产生的黏末端为非回文结构等策略,大大降低了假阳性率^[13-15]。RD 细胞在 EV71 病毒中的增殖动力学系统已有比较系统的研究^[16],对肠道该病毒的敏感性好^[17]。转染 RD 细胞表明,载体上携带的人 RNA 聚合酶 I 启动子 Ppol I 能够很好地介导病毒基因组的转录,并获得拯救的病毒,与之前的文献报道一致。VP1 蛋白是肠道病毒 EV71 的主要衣壳蛋白,与病毒吸附宿主细胞有关,是该病毒生物学特性和致病的主要结构蛋白,故在 RT-PCR 和 Western blot 的鉴定实验均用 VP1 蛋白作对照。通过验证,本研究获得的拯救病毒具有 EV71 病毒的典型特征,如正 20 面体,直径约 30 nm,能够引起典型的 CPE 现象。而相对于野生型病毒,拯救的病毒具有类似的生长曲线,但是在每一个生长的取样都发现拯救病毒的滴度高于野生型病毒,这一现象还有待于进一步研究,可能与拯救型病毒 3' 端具有长链 poly A 结构有关。

综上所述,本研究利用两步法 Golden Gate Clone 技术成功构建 EV71 的病毒拯救质粒,通过转染 RD 细胞获得了拯救病毒,经多途径鉴定后证明拯救病毒与野生株具有相似的遗传特性和生物学性状,使快速准确地构建肠道病毒 71 型基因组全长 cDNA 操作成为可能,为 RNA 病毒的分子生物学研究提供了技术支持,对 EV71 的分子生物学特性及疫苗的进一步研究提供实验基础。

参 考 文 献

[1] Chen M, Ju Y, Chen M, et al. Epidemiological and genetic characteristics of EV71 in hand, foot, and mouth disease in Guangxi, southern China, from 2010 to 2015[J]. PLoS One, 2017, 12(12): e0188640.

[2] Weng Y, Chen W, He W, et al. Serotyping and genetic characterization of hand, foot, and mouth disease (HFMD)-associated enteroviruses of No-EV71 and Non-CVA16 circulating in Fujian, China, 2011-2015[J]. Med Sci Monit, 2017, 23: 2508-2518.

[3] Su YS, Tsai YF, Ho YF, et al. Stimulation of the internal ribosome entry site (IRES)-dependent translation of enterovirus 71 by DDX3X RNA helicase and viral 2A and 3C proteases[J]. Front Microbiol, 2018, 9: 1324.

[4] Engler C, Gruetzner R, Kandzia R, et al. Golden gate shuffling: a one-pot DNA shuffling method based on type II restriction enzymes[J]. PLoS One, 2009, 4(5): e5553.

[5] Vad-Nielsen J, Lin L, Bolund L, et al. Golden gate assembly of CRISPR gRNA expression array for simultaneously targeting multiple genes[J]. Cell Mol Life Sci, 2016, 73(22): 4315-4325.

[6] Deng C, Li X, Liu S, et al. Development and characterization of a clinical strain of Coxsackievirus A16 and an eGFP infectious clone[J]. Virol Sin, 2015, 30(4): 269-276.

[7] Engler C, Gruetzner R, Kandzia R, et al. Golden gate shuffling: a one-pot DNA shuffling method based on type II restriction enzymes[J]. PLoS One, 2009, 4(5): e5553.

[8] Lazouskaya NV, Palombo EA, Poh CL, et al. Construction of an infectious cDNA clone of enterovirus 71: insights into the factors ensuring experimental success[J]. J Virol Methods, 2014, 197: 67-76.

[9] Liu F, Liu Q, Cai Y, et al. Construction and characterization of an infectious clone of coxsackievirus A16[J]. Virol J, 2011, 8: 534.

[10] Meng T, Kiener TK, Kwang J. RNA polymerase I-driven reverse genetics system for Enterovirus 71 and its implications for vaccine production[J]. Virol J, 2012, 9: 238.

[11] Shukla GS, Krag DN. Phage-displayed combinatorial peptide libraries in fusion to beta-lactamase as reporter for an accelerated clone screening: potential uses of selected enzyme-linked affinity reagents in downstream applications[J]. Comb Chem High Throughput Screen, 2010, 13(1): 75-87.

[12] Tuo D, Shen W, Yan P, et al. Rapid construction of stable infectious full-length cDNA clone of papaya leaf distortion mosaic virus using in-fusion cloning[J]. Viruses, 2015, 7(12): 6241-6250.

[13] Bahassi EM, Salmon MA, Van Melderen L, et al. F plasmid *ccdB* killer protein: *ccdB* gene mutants coding for non-cytotoxic proteins which retain their regulatory functions[J]. Mol Microbiol, 1995, 15(6): 1031-1037.

[14] Bernard P, Couturier M. Cell killing by the F plasmid *ccdB* protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes[J]. J Mol Biol, 1992, 226(3): 735-745.

[15] Bernard P, Kezdy KE, Van Melderen L, et al. The F plasmid *ccdB* protein induces efficient ATP-dependent DNA cleavage by gyrase[J]. J Mol Biol, 1993, 234(3): 534-541.

[16] Lu J, He YQ, Yi LN, et al. Viral kinetics of enterovirus 71 in human rhabdomyosarcoma cells[J]. World J Gastroenterol, 2011, 17(36): 4135-4142.

[17] Kok TW, Pryor T, Payne L. Comparison of rhabdomyosarcoma, buffalo green monkey kidney epithelial, A549 (human lung epithelial) cells and human embryonic lung fibroblasts for isolation of enteroviruses from clinical samples[J]. J Clin Virol, 1998, 11(1): 61-65.

(责任编辑:冉明会)