

利用反向遗传学技术获得适应 RK13 细胞的兔出血症病毒

刘光清 倪征 云涛 张玉颖 杜青云 盛祖恬
梁华丽 华炯刚 李双茂 陈剑平*

(浙江省农业科学院病毒学与生物技术研究所, 农业部病毒学与生物技术重点实验室, 杭州 310021; 甘肃农业大学动物医学院, 兰州 730070. * 联系人, E-mail: jpchen2001@hzcnc.com)

摘要 在前期构建的兔出血症病毒(rabbit hemorrhagic disease virus, RHDV)全长 cDNA 分子的基础上, 利用 SP6 RNA 聚合酶系统, 在体外转录合成了病毒 RNA. 用转染试剂将病毒 RNA 导入 RK13 细胞, 12 h 后可见明显致细胞病变(CPE), 用间接免疫荧光方法在 RK13 细胞中检测到了病毒抗原的产生. 将收获的细胞培养物再次接种 RK13 细胞, 仍然能产生明显病变. 大量收取细胞培养物, 经差速离心法纯化病毒后, 在电子显微镜下可观察到 RHD 病毒粒子. 结果表明, 利用反向遗传学技术获得了可适应于 RK13 培养的 RHDV, 为将来研究 RHDV 的分子致病机理和新型疫苗等提供了有利的工具.

关键词 兔出血症病毒 反向遗传学 全长 cDNA RK13 细胞

兔病毒性出血症病毒(rabbit hemorrhagic disease virus, RHDV)是一种对兔具有高度致病性和致死性的病毒, 所引发的疫病俗称“兔瘟”, 病死率高达 100%, 是一种对养兔业危害较大的重要传染病. RHDV 在分类上属于杯状病毒科(Caliciviridae), 兔病毒属(Lagovirus)^[1]. 迄今所发现的 RHDV 均属于同一种血清型, 与杯状病毒科的其他成员, 如猫杯状病毒(FCV)、诺沃克病毒(NV)等没有交叉免疫反应^[2]. 在形态上, RHDV 与其他杯状病毒科成员一样, 也是呈球型, 直径 30 nm 左右, 无囊膜, 核衣壳呈 20 面体对称, 由 32 个颗粒组成, 在核衣壳上整齐地排列呈中空的杯状结构^[3].

RHDV 的基因组为一条单股正链的 RNA 分子, 由约 7437 个核苷酸组成^[3]. 基因组含有 2 个可读框(ORF), ORF1 编码一个大的多聚蛋白, 在随后的成熟与裂解过程中, 该蛋白可被进一步水解为至少 8 个功能蛋白, 其中一个为结构蛋白; ORF2 编码另一个结构蛋白(VP10)^[4]. 基因组的 5' 末端共价结合一个分子量约 15 kD 的蛋白 VPg, 3' 端含有一个多聚腺嘌呤尾结构 poly(A)^[5]. 目前, 关于 RHDV 的分子生物学研究还不够深入, 许多编码产物的生物学功能尚不清楚, 病毒的致病机理及其与宿主之间的互作更是空白. 究其原因, 一方面是缺乏一个有效的增殖 RHDV 的细胞培养模型^[6], 另一方面是缺少一个有效的研究平台. 近年来, 反向遗传学技术的兴起及广泛应用为

开展 RHDV 的分子生物学研究提供了良好的契机. 在此背景下, 我们开展了 RHDV 的反向遗传学研究, 并成功建立了 RHDV 的感染性克隆^[7], 将 RHDV 的体外转录物直接接种 SPF 实验兔, 可以引起兔子发病, 并产生兔瘟的典型症状. 由于长期以来一直没有建立起 RHDV 的稳定细胞培养模型, 大大阻碍了 RHDV 的分子生物学及疫苗学研究. 为了解决这一难题, 本研究利用反向遗传学技术获得能适应 RK13 细胞的 RHDV.

1 材料和方法

() 材料. RHDV CHA/JX/97 分离株是 1997 年从兔体中分离到的病毒, 由本室保存. 含有 RHDV CHA/JX/97 株的全长 cDNA 的重组质粒 pBISP6-RHDV 由本室构建; RK13 细胞系为本室保存; RiboMAX™ Large Scale RNA Production Systems-SP6 购自 Promega 公司; 细胞培养基 DMEM 和 DMRIE-C Reagent 购自 Invitrogen 公司; QIAquick Gel Extraction Kit 和 RNase-Free DNase Set 购自 QIAGEN 公司.

() 体外转录物 RNA 的制备. 采用 RiboMAX™ Large Scale RNA Production Systems-SP6 系统进行体外转录. 反应体系: 6 μ L rNTP (25 mmol/L), 4 μ L 5 \times 缓冲液, 2 μ L SP6 RNA 聚合酶混合液, 8 μ L 用 *Nru* 线性化的 pBIRHDV 重组质粒(2 μ g), 总体积为 20 μ L. 将反应液充分混匀后, 于 37 $^{\circ}$ C 孵育 2~4 h. 用

RNase-Free DNase Set 纯化所得到的转录产物, 具体操作按照操作说明书进行, 最后用含有甲醛的变性琼脂糖凝胶检测 RNA 的完整性.

() 转染 RK13 细胞. 在 RK13 细胞生长至 70%~90% 时, 用 OPTI-MEMI 培养基清洗细胞, 同时按照 1 : 2 的比例将 RNA (5 μ g) 与 DMRIE-C 转染试剂混合, 然后将该复合物加至清洗过的细胞中, 在含有 5% CO₂ 的培养箱中, 37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h 后, 用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 更换转染培养基. 继续培养, 观察细胞病变的出现情况, 待细胞出现 80% 左右病变时收获病毒.

() 拯救病毒的鉴定. (1) 电子显微镜观察病毒粒子. 用差速离心法纯化病毒后, 与 10 \times 稀释的 RHDV 抗血清等量混合, 37 $^{\circ}$ C 感作 2 h, 3000 r/min 离心 20 min, 用 PBS 重悬沉淀后, 做常规负染色, 然后于 JEM-1200EX 电子显微镜下观察病毒粒子, 并拍照. (2) RT-PCR 法检测病毒基因组. 以 RHDV RNA 转录物为材料, 用 RT-PCR 方法扩增 RHDV 的全基因组序列, 并对扩增产物进行序列测定, 表 1 给出了扩增引物的序列及其在序列中的位置.

表 1 扩增 RHDV 全基因组序列所使用的引物

引物	核苷酸序列	位点
D+	5'-GTGAAAATTATGGCGCTATGTCG-3'	1~24
D-	5'-CATGAAGATGAGGCAGCCAGCA-3'	1134~1156
C+	5'-CTCTGTCCCCACGGGCCAAC-3'	1113~1134
C-	5'-TTTGCGCACAGGTGTGATACACC-3'	2917~2941
AB+	5'-GGTGATATCACACCTGTGCGCAA-3'	2880~2904
AB-	5'-AGCTCTAGAGCGCGCCCCGGT ₁₆ -3'	3'末端

() 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, 冷丙酮 -20 $^{\circ}$ C 固定 30 min, 漂洗后吸干残液, 滴加 RHDV 兔阳性血清, 37 $^{\circ}$ C 湿盒中孵育 30 min, 再用 PBS 漂洗 5 次, 加 FITC 羊抗兔 IgG, 于 37 $^{\circ}$ C 湿盒中孵育 30 min, 用甘油封片于 Olympus 荧光显微镜下观察.

() 病毒滴定. 首先用病毒维持液 10 倍系列稀释病毒, 然后将长成单层的 RK13 细胞的培养液倒掉, 接种系列稀释的病毒液, 每个稀释度至少 4 个孔, 每孔 25 μ L, 对照孔和感染病毒孔加入 100 μ L 维持液, 在含有 5% CO₂ 的培养箱中, 于 37 $^{\circ}$ C 孵育. 每天观察并记录出现 CPE 的情况. 当细胞病变不再发展时, 用 Reed-Muench 公式计算病毒滴度.

() 荧光定量 RT-PCR. 用体外转录物转染 RK13 细胞, 培养 48~72 h 后收集转染细胞的裂解上清, 根据荧光定量 RT-PCR 试剂盒的说明书(购自 TaKaRa)测定样品的 RHDV 基因拷贝数.

2 结果

2.1 体外转录结果

体外转录后对转录产物进行纯化及电泳分析, 结果可见大小约 7.5 kb 的条带, 其相对分子量与其母本一致, 表明转录物 RNA 是完整的(图 1).

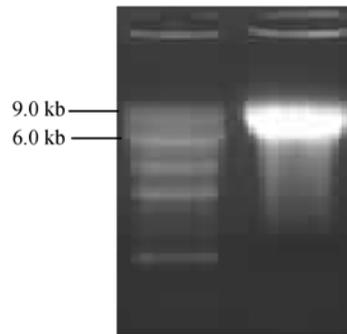


图 1 RHDV 全长 cDNA 的体外转录产物

2.2 转染 RK13 细胞结果

用体外转录物 RNA 转染 RK13 细胞后, 24 h 可见细胞出现 CPE 现象, 细胞变圆, 成葡萄状分布, 最后细胞崩解成碎片(图 2(a)). 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 3 代细胞, 在接种后 6 h 即可见明显的 CPE 现象, 培养 12 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(图 2(b)).

2.3 电子显微镜检查结果

拯救病毒与阳性 RHDV 抗血清反应形成免疫复合物以后, 做常规负染色, 然后于 JEM-1200EX 电子显微镜下观察病毒粒子, 结果可见明显的 RHD 病毒颗粒, 直径大小约 30 nm (图 3).

2.4 RT-PCR 鉴定拯救的病毒

收集产生病毒的细胞及其培养上清, 制备总 RNA. 用 RT-PCR 扩增 RHDV 的全基因组序列, 扩增产物用琼脂糖凝胶电泳分析. 结果表明, 分别扩增出各目的基因片段, 其产物大小分别为 4600, 1800 及 1100 bp (图 4), 与预期结果相符合. 同时对扩增产物进行序列测定, 结果也与母本毒株的序列一致.

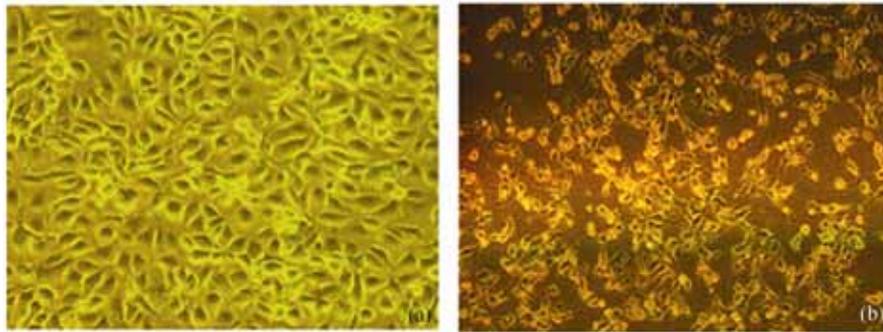


图 2 体外转录物 RNA 转染 RK-13 细胞所产生的 CPE
(a) 正常的 RK13 细胞; (b) 感染 RHDV 的 RK13 细胞

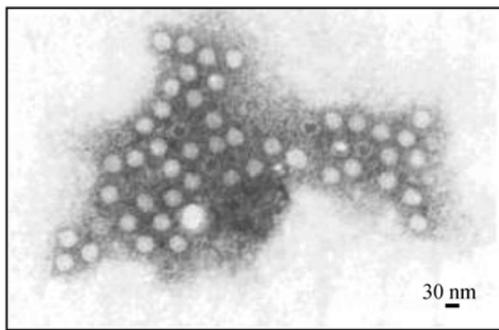


图 3 透射电子显微镜下观察到的 RHDV 病毒粒子形态

2.5 免疫荧光检测结果

将用体外转录物转染的 RK13 细胞及未经转染的 BHK 细胞用免疫荧光染色, 在免疫荧光显微镜下可见用转录物转染的 RK13 细胞中有特异荧光产生 (图 5(a)), 而未转染的空白细胞中没有特异荧光出现 (图 5(b)), 表明细胞中有 RHDV 的蛋白存在, 同时也佐证了拯救病毒获得成功。

2.6 转染细胞中 RHDV 基因组增殖的动力学特征

荧光定量 RT-PCR 技术检测结果表明, 体外转录物 RNA 转染细胞后, RHDV 基因的拷贝数与培养时间具有相关性 (图 6), 在转染后的 18 h RHDV 的滴度为 3.49×10^9 基因拷贝/mL, 在第 28 h RHDV 的滴度达到峰值 (1.52×10^{10} 基因拷贝/mL), 然后病毒基因组的拷贝数逐渐降低, 这充分说明 RHDV 可在细胞培养体系中高效转录和复制。

3 讨论

长期以来, RHDV 的细胞培养一直是制约其基础研究及疫苗学研究的一个关键问题。自该病毒被发现之日起, 人们就摸索尝试用不同的细胞系培养并增殖 RHDV, 但所取得的结果各不相同。美国梅岛外

来疫病研究所在其 1989 年度的科研年报中曾指出, 尝试用 60 余种动物的原代细胞或传代细胞培养 RHDV 均未获成功。在国内, Du 等人^[8]用自建的乳兔肾二倍体细胞培养 RHDV, 盲传若干代后出现明显的 CPE, 但继续传代后, CPE 和抗原性均消失。Luo 等人^[9]用乳兔肾和兔肺二倍体细胞, 以同步感染的方法分离培养 RHDV。结果在接种 36~48 h 开始出现 CPE, 72 h 后大部分细胞脱落, 免疫荧光染色可见特异性荧光, 电子显微镜检查也可看到 RHDV 粒子。Ji 等人^[10]也建立了一种乳兔肾细胞系, 接种 RHDV 并盲传 3 代后可出现规律性病变, 认为可用于 RHDV 的分离培养。令人不解的是, 他们虽然报道已成功建立了 RHDV 的传代细胞系, 但并没有见其有后续研究成果出现, 更没有见到细胞培养灭活疫苗问世。但是从他们的研究结果中我们至少可以得到一点启示, 即 RHDV 有可能适应兔肾上皮细胞系。最近, 我们构建了 RHDV 的全长 cDNA 分子, 体外转录后获得病毒 RNA, 然后将其直接接种 SPF 兔的肝脏, 可引发兔瘟的典型症状出现并致死兔, 证明我们获得了 RHDV 的感染性克隆^[2]。在此基础上, 我们尝试在 RK13 细胞中拯救 RHDV, 本研究证明, 这种策略是可行的, 我们不仅在 RK13 细胞中实现了 RHDV 的拯救, 而且对 RHDV 在该细胞中表达及复制等情况进行了分析研究, 结果表明, RHDV 的衣壳蛋白主要在细胞质中大量表达, RHDV 在细胞中的增殖也随着培养时间的延长而呈现动态变化。RHDV 接种 RK13 细胞以后 6 h 左右开始增殖, 基因组拷贝数可达 2.42×10^7 个/mL, 在 28 h RHDV 的基因组拷贝数达到峰值 (1.52×10^{10} 个/mL), 随后迅速下降, 至 72 h 降到最低值 (2.23×10^6 拷贝/mL)。RHDV 的这一增殖规律与 RHD 的发病规律很相似, 兔感染 RHDV 后 6~12 h 就发病, 24~48 h 死亡。为了证明这种拯救病毒是否可在 RK13 细胞中

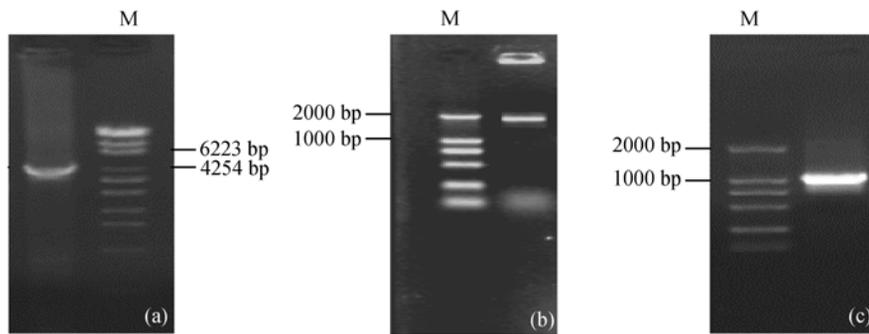


图 4 RHDV 全基因组各片段 PCR 扩增结果

(a) 扩增 RHDV 基因组 3'端序列的结果, 大小为 4600 bp; (b) 扩增 RHDV 基因组中间区域序列的结果, 大小为 4600 bp; (c) 扩增 RHDV 基因组 5'端序列的结果, 大小为 1100 bp. M, 标准分子量

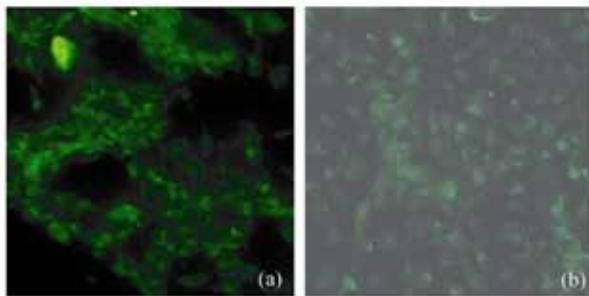


图 5 免疫荧光检测结果

(a) 转染体外转录物 RNA 的 RK13 细胞; (b) 正常的 RK13 细胞

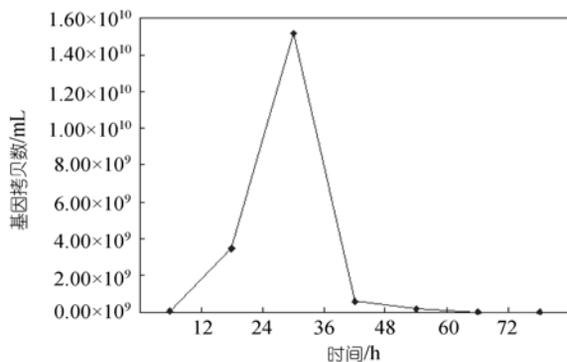


图 6 转染细胞中 RHDV 基因组增殖的动力学曲线

稳定增殖, 将收获的第一代细胞培养物, 在 RK13 细胞上连续接种 5 代, 结果都能产生规律性病变, 在接种后 12~72 h, 可见大量细胞变圆, 聚集, 最后脱落. 集最后的细胞培养液, 经差速离心纯化病毒后, 于电子显微镜下观察, 可以看到 RHDV 颗粒, 证明 RHDV 确实可在细胞中稳定增殖, 可用于 RHDV 的分离培养. 本研究利用反向遗传学技术在 RK13 细胞中实现了 RHDV 的人工拯救, 并探讨了 RHDV 在 RK13 细胞中的增殖规律, 为进一步开展 RHDV 的分子生物

学研究、探讨 RHDV 的分子致病机制以及研发新型的 RHD 疫苗奠定了良好的基础.

致谢 本工作为浙江省自然科学基金资助项目(批准号: Y305047).

参 考 文 献

- 1 Lawson M. Rabbit virus threatens ecology after leaping the fence. *Nature*, 1995, 378: 531
- 2 Cubbitt D, Bradley D W, Carter M J, et al. Family Caliciviridae. *Arch Virol*, 1995, 10: 359—363
- 3 Rasschaert D, Huguet S, Madelaine M F, et al. Sequence and genomic organization of a rabbit hemorrhagic disease virus isolated from a wild rabbit. *Virus Genes*, 1995, 9: 121—132 [DOI]
- 4 Gould A R, Kattenbelt J A, Lenghaus C, et al. The complete nucleotide sequence of rabbit haemorrhagic disease virus (Czech strain V351): Use of the polymerase chain reaction to detect replication in Australian vertebrates and analysis of viral population sequence variation. *Virus Res*, 1997, 47: 7—17 [DOI]
- 5 Daughenbaugh K F, Fraser C S, Hershey J W B, et al. The genome-linked protein VPg of the Norwalk virus binds eIF3, suggesting its role in translation initiation complex recruitment. *EMBO J*, 2003, 22: 2852—2859 [DOI]
- 6 Farnós O, Boué O, Parra F, et al. High-level expression and immunogenic properties of the recombinant rabbit hemorrhagic disease virus VP60 capsid protein obtained in *Pichia pastoris*. *J Biotech*, 2005, 117: 215—224 [DOI]
- 7 Liu G Q, Zhang Y Y, Ni Z, et al. Recovery of infectious rabbit hemorrhagic disease virus from rabbit after direct inoculation with *in vitro*-transcribed RNA. *J Virol*, 2006, 80(13): 6686—6690 [DOI]
- 8 Du N X, Xu W Y, Liu S J, et al. Studies on rabbit hemorrhagic disease virus. *Agri Sci China*, 1991, 24: 1—10
- 9 Luo J, Yang X L, Liu H, et al. Studies on the in vitro replication of rabbit hemorrhagic disease virus. *Virologica Sinica*, 1992, 7: 143—149
- 10 Ji C Y, Gong X M, Du N X. Systematic morphogenesis of the rabbit haemorrhagic disease virus in infected cell cultures and tissues. *Chin J Veterin Sci*, 1999, 19: 451—455

(2006-01-17 收稿, 2006-05-19 接受)