

# 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@hzncnc.com](mailto:jpchen2001@hzncnc.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)<sup>[1]</sup>. 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<sup>[2]</sup>. 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<sup>[3]</sup>.

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<sup>[3]</sup>. 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)<sup>[4]</sup>. 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)<sup>[5]</sup>. 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<sup>[6]</sup>, 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<sup>[7]</sup>, 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  $\mu$ L rNTP (25 mmol/L), 4  $\mu$ L 5 $\times$ 缓冲液, 2  $\mu$ L SP6 RNA 聚合酶混合液, 8  $\mu$ L 用 *Nru* 线性化的 pBIRHDV 重组质粒(2  $\mu$ g), 总体积为 20  $\mu$ 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 μg) 与 DMR1E-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% CO<sub>2</sub> 的培养箱中, 37 °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× 稀释的 RHDV 抗血清等量混合, 37 °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'-AGCTCTAGAGCGCCCGGGT <sub>16</sub> -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 °C 固定 30 min, 漂洗后吸干残液, 滴加 RHDV 兔阳性血清, 37 °C 湿盒中孵育 30 min, 再用 PBS 漂洗 5 次, 加 FITC 羊抗兔 IgG, 于 37 °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 μL, 对照孔和感染病毒孔加入 100 μL 维持液, 在含有 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中, 于 37 °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).

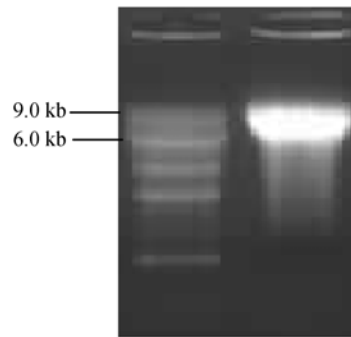


图 1 RHDV 全长 cDNA 的体外转录产物

### 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.

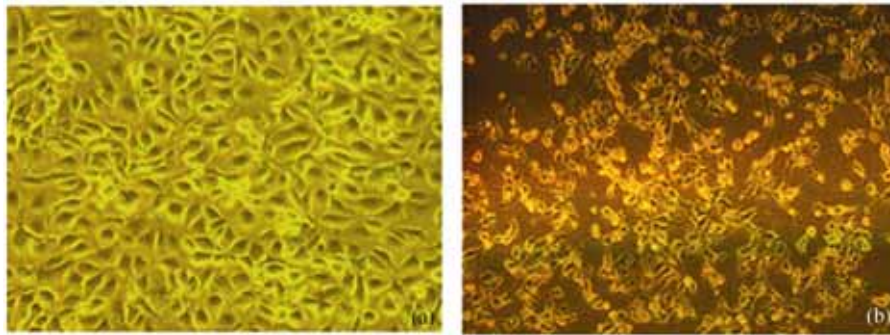


图 2 体外转录物 RNA 转染 RK-13 细胞所产生的 CPE  
(a) 正常的 RK13 细胞; (b) 感染 RHDV 的 RK13 细胞

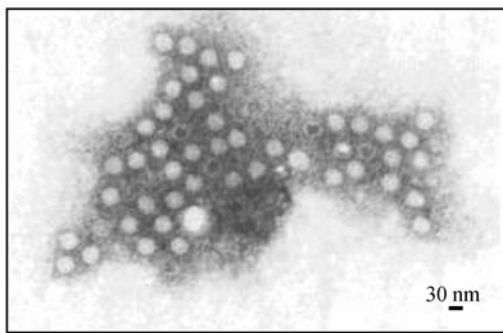


图 3 透射电子显微镜下观察到的 RHDV 病毒粒子形态

### 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  $3.49 \times 10^9$  基因拷贝/mL, 在第 28 h RHDV 的滴度达到峰值 ( $1.52 \times 10^{10}$  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<sup>[8]</sup>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<sup>[9]</sup>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<sup>[10]</sup>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<sup>[2]</sup>。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  $2.42 \times 10^7$  个/mL, 在 28 h RHDV 的基因组拷贝数达到峰值 ( $1.52 \times 10^{10}$  个/mL), 随后迅速下降, 至 72 h 降到最低值 ( $2.23 \times 10^6$  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

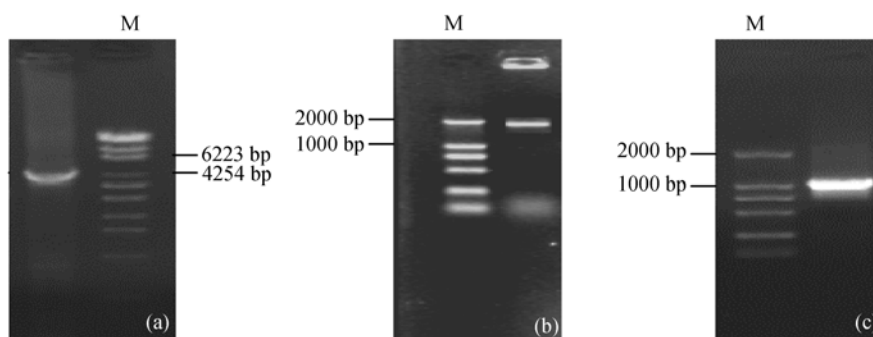


图 4 RHDV 全基因组各片段 PCR 扩增结果

(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

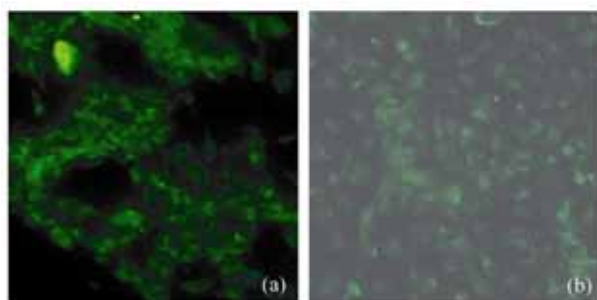


图 5 免疫荧光检测结果

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

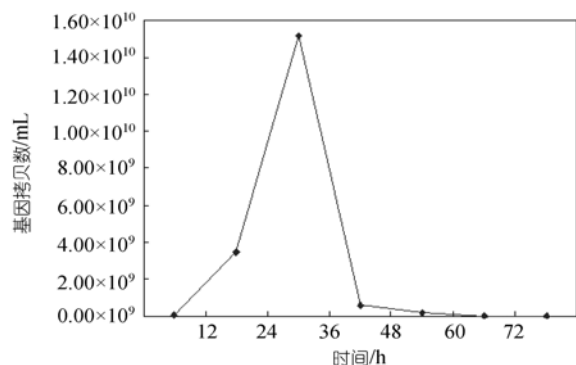


图 6 转染细胞中 RHDV 基因组增殖的动力学曲线

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)