

马传染性贫血病毒疫苗株 EIAV_{FDDV} 穿膜蛋白 GP45 的截短突变

马建^{1,2}, 史楠¹, 吕晓玲¹, 赵立平¹, 姜成刚¹, 林跃智¹,
孔宪刚¹, 沈荣显¹, 周建华^{1*}

(1. 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 兽医生物技术国家重点实验室, 哈尔滨 150001;

2. 东北林业大学野生动物资源学院, 哈尔滨 150040)

摘要: 为研究中国马传染性贫血病毒(EIAV)弱毒疫苗致弱过程中基因组的进化特征, 作者对 EIAV_{FDDV} 前病毒的囊膜基因 *env* 进行了分析。使用 PCR 方法体外扩增 EIAV_{FDDV} 前病毒 DNA 的 *env*, 并随机挑取 PCR 的阳性克隆子进行测序和序列比对分析。结果表明, 随机挑取的 PCR 阳性克隆中, 29/30 的克隆子在第 2 128—2 130 位核苷酸处存在 TGG→TGA(翻译中止密码)的突变。该基因对应的 EIAV 穿膜蛋白 gp45 的氨基酸数在突变株中较未截短株中减少 154, 变成 259 个 aa。对 EIAV_{FDDV} 进行 Western blot 分析时发现, EIAV_{DLV} 45 ku 的 gp45 条带被约 35 ku 的条带取代。由此推测, EIAV_{FDDV} 疫苗株绝大多数病毒颗粒的 gp45 是截短型。对该代代疫苗株免疫马匹第 15 和 40 天体内 EIAV 前病毒 DNA 和基因组 RNA 的序列进行分析, 结果表明该截短毒株具有在体内和体外进行复制的能力。由于已有研究表明细胞嗜性改变与 gp45 的截短有关, 因此, 推断 EIAV_{FDDV} 的 gp45 的截短是其适应在体外培养的驴胎皮肤细胞上复制传代的结果。综上所述, 本研究发现 EIAV_{FDDV} 的 gp45 存在高比例截短突变, 证明该截短突变毒株具有在体内和体外进行复制的能力。但该截短突变是否可通过改变 EIAV_{FDDV} 在免疫马体内的细胞嗜性, 进而影响其毒力和免疫原性, 还有待进一步验证。

关键词: EIAV_{FDDV}; gp45; 截短

中图分类号: S852.659.3

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2010)03-0377-06

The Truncated Mutation of Transmembrane Protein (TM or gp45) Identified in Fetal Donkey Dermal Cells-Adapted Viral Strains (EIAV_{FDDV}) of Chinese Equine Infectious Anemia Virus (EIAV) Attenuated Vaccine

MA Jian^{1,2}, SHI Nan¹, LV Xiao-ling¹, ZHAO Li-ping¹, JIANG Cheng-gang¹, LIN Yue-zhi¹,
KONG Xian-gang¹, SHEN Rong-xian¹, ZHOU Jian-hua^{1*}

(1. National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China;

2. College of Wildlife Resource, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

Abstract: To investigate the genomic evolution of EIAV vaccine strains during attenuation, we analyzed the sequence of *env* in provirus of EIAV_{FDDV}. After amplifying *env* in provirus DNA of EIAV_{FDDV} by using PCR, some positive T-A clones were selected randomly to sequence and analyze. A mutation from TGG to TGA, a premature stop codon, was detected at the position of 2 128—2 130 nt of the *env* in 29 of 30 randomly selected clones of *env*. This mutation causes a truncated transmembrane protein (TM, also termed as gp45) at the 262th aa residue that resulted this mu-

收稿日期: 2009-10-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(30771994); 中国博士后科学基金一等资助(20090450038)

作者简介: 马建(1981-), 男, 满族, 辽宁绥中人, 讲师, 博士, 主要从事病毒分子生物学与免疫学研究, Tel: 0451-85935024, E-mail: jianma1981@yahoo.com.cn。马建和史楠为共同第一作者

* 通讯作者: 周建华, E-mail: Jianhua_uc@126.com

tated glycoprotein 154 residues shorter than the wild gp45. Indeed, we can see the band of predicted truncated gp45 when EIAV_{FDDV} was analyzed by Western blot. To investigate the status of EIAV with the truncated gp45 *in vivo*, the *env* sequence of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) associated provirus DNA and circulating virions in EIAV_{FDDV}-vaccinated horses were analyzed. TGG to TGA mutation were both found in integrated provirus DNA and the genome of the circulating virions. The above results indicate that the virion with the truncated gp45 owns the ability to infect the target cell and replicate *in vivo*. Extend studies are needed to understand the contribution of the truncated gp45 to immunogenicity and virulence of attenuated EIAV vaccine strains.

Key words: EIAV_{FDDV}; gp45; truncation

马传染性贫血病毒(Equine infectious anemia virus, EIAV)作为反转录病毒科慢病毒属的一员,在马属动物中引发以反复发热、血小板减少、消瘦为主要症状的传染性疾病——马传染性贫血病(EIA)^[1]。由于该病毒在病原学及致病机理等方面与同属病毒 HIV 的相似性,作为 HIV 研究的动物模型一直受到相关领域研究人员的关注。

20 世纪 70—80 年代,沈荣显等通过独特的 EIAV 强毒致弱路线,对 EIAV 强毒株进行致弱,获得了可诱导马匹产生良好免疫保护的 EIAV 弱毒疫苗,包括在驴白细胞(Monocyte-derived macrophage, MDM)上连续传代得到的驴白细胞弱毒疫苗(EIAV_{DLV})和 EIAV_{DLV} 经驴胎皮肤细胞(Fetal donkey dermal cells, FDD)连续传代得到的驴胎皮肤细胞弱毒疫苗(EIAV_{FDDV})^[2-4]。实验室和临床使用证明,获得的这些弱毒疫苗不仅可以诱导免疫马匹产生抵抗同源和异源 EIAV 致病力毒株攻击的能力,且未发现毒力回复和垂直传播现象^[3]。同时, EIAV_{FDDV} 的免疫效果好于 EIAV_{DLV}^[4]。

阐明 EIAV 疫苗株的基因组特征,作为基因功能研究的基础,有助于明确 EIAV 疫苗株毒力弱化和具有良好免疫原性的机制。gp45 作为 EIAV 囊膜基因 *env* 的一部分,编码穿膜蛋白 TM。已有研究提示该穿膜蛋白 TM 与病毒粒子的复制、介导病毒粒子和靶细胞的融合、引发宿主细胞 CPE 等均具有相关性^[5-6]。因此,在对 EIAV 疫苗株基因组进行研究时,需要特别关注 gp45。通过基因序列比对分析,作者发现 EIAV_{FDDV} 的 gp45 相对于 EIAV_{DLV} 发生了可造成编码提前终止的基因点突变现象。本研究中,作者将对该突变现象进行系统阐述,并对该突变现象的生物学意义作初步探讨。

1 材料与方法

1.1 试验用动物、细胞和疫苗接种

用于免疫 EIAV_{FDDV} 的马匹,购自黑龙江省,遗传背景和品系不详。接种 EIAV_{FDDV} 前,经间隔 15 d 的 2 次免疫琼脂扩散试验确定为 EIA 阴性。按照 EIAV_{FDDV} 的推荐使用剂量约 10^{5-6} TCID₅₀ · 匹⁻¹,对马匹进行皮下接种。接种后第 15、40 天分离免疫马的 PBMC 和血浆样本,用于前病毒 DNA 和 RNA 的提取。EIAV_{FDDV} 和 EIAV_{DLV} 由作者实验室保存, EIAV 传代培养用的 FDD 和 MDM 由作者实验室制备。

1.2 EIAV 前病毒 DNA 和 RNA 的提取

体外 EIAV_{FDDV} 和 EIAV_{DLV} 前病毒 DNA 提取自二者的培养细胞 FDD 和 MDM。体内感染的 EIAV 的前病毒 DNA 提取自分离的马 PBMC^[7]。提取 DNA 使用 Qiagen Dneasy 试剂盒(Qiagen)。提取免疫马血浆中病毒 RNA 的程序:静脉抗凝血, $2\ 500\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心收集血浆;血浆 $4\ ^\circ\text{C}$ $68\ 000\ \text{g}$ 超速离心后,使用微量 RNA 提取试剂盒(Qiagen)从沉淀中提取 RNA,并用于反转录。

1.3 PCR 和 RT-PCR

扩增前病毒 DNA 的 *env* 的引物, env1: 5'-GGAAGACCACCTCAATATCTGTTGT-3'; env2: 5'-TATTAATCCCACAGTTCCCCCCTTG-3'。采用 $25\ \mu\text{L}$ PCR 反应体系: $1.2\ \text{mmol}\ \text{MgCl}_2$, $0.5\ \text{mmol}$ dNTPs, 引物 env1、env2 各 $10\ \mu\text{mol}$, $1.25\ \text{U}$ LA Taq 酶以及 DNA 模板 $2\ \mu\text{L}$ 。PCR 条件: $94\ ^\circ\text{C}$ 预变性 5 min; $94\ ^\circ\text{C}$ 1 min, $60\ ^\circ\text{C}$ 1 min, $72\ ^\circ\text{C}$ 2.5 min, 进行 35 个循环;最后 $72\ ^\circ\text{C}$ 10 min。

对提取的 RNA 进行 *env* 的体外扩增时,需先对获得的 RNA 进行反转录。反转录使用反转录试

剂盒(Invitrogen),具体操作过程见试剂盒说明,反转录引物为 env2。之后的 PCR 扩增反应同前病毒 DNA 的扩增。

当模板拷贝数较低时还需使用 nest-PCR 进行扩增,使用引物的序列如下,外套引物:env1/env2;内套引物:gp45-1:5'-CAACGATGAGTGGTGCAGG-3';gp45-2:5'-AGCCCATATCCCAACAAGC-3'。内套 PCR 反应体系同 EIAV_{FDDV} 前病毒 DNA env 的扩增,但扩增时退火温度为 52 ℃,延伸时间为 30 s。

1.4 基因克隆、测序和分析

将 PCR 和 nest PCR 产物经小量胶回收试剂盒(Axygen)回收纯化,对获得的基因片段进行 T-A 克隆,并转化至感受态细胞 JM109。随机挑取多个阳性克隆子用于序列测定和分析。

序列分析使用 DNASTar 和 Mega4.0 等生物分析软件进行。

1.5 Western blot

将消化获得的 EIAV_{FDDV} 和 EIAV_{DLV} 培养细胞,分别约 10⁶ 个,用 200 μL 细胞裂解液(Watson)进行裂解。将裂解产物加上样缓冲液煮沸 5 min 后,用于 Western blot 分析。Western blot 使用的一抗为由 EIAV 感染马获得的抗 EIAV 阳性血清(作者制备),二抗为羊抗马 IgG 单抗(中山金桥),使用时稀释度为 1:500。

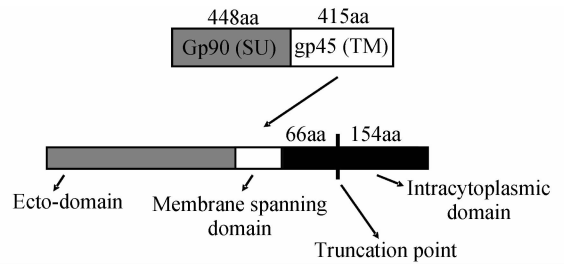
2 结果

2.1 EIAV_{FDDV} 和 EIAV_{DLV} 前病毒 DNA gp45 分析

对 EIAV_{FDDV} 和 EIAV_{DLV} 感染细胞的前病毒 DNA 的 env 进行了 PCR 扩增,并分别随机挑取 30 个阳性 T-A 克隆子进行序列分析。结果表明,EIAV_{FDDV} 在囊膜蛋白穿膜亚单位 TM 对应的 gp45 相对于 EIAV_{DLV} 在 env 的 2 230 核苷酸位点出现 G→A 的高比例突变,突变率为 29/30。该突变的出现,造成 gp45 提前出现了 1 个终止密码子 TGA,即出现过早停止编码突变,将造成 gp45 对应的 TM 蛋白的截短。截短部位靠近 TM 蛋白跨膜区的胞浆区,截短后 TM 蛋白的胞浆区氨基酸残基数由 220 变为 66(图 1)。在 EIAV_{DLV} 的 gp45 上未发现该截短突变(数据略)。

2.2 Western blot 结果

EIAV_{FDDV} 和 EIAV_{DLV} 培养细胞裂解物的 Western blot 检测结果见图 2,在 A 泳道中位于病毒核衣壳蛋白 p26 条带的上方约 35 ku 的位置,有明显条

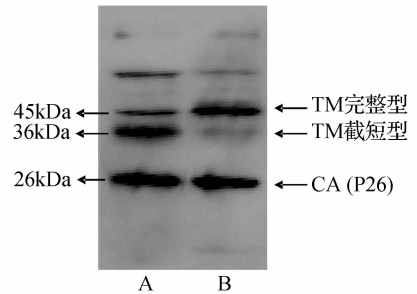


粗竖线示预测的 TM 截短部位

The thick vertical shows the predicted truncation site of TM
图 1 EIAV env 编码的囊膜蛋白和囊膜蛋白穿膜亚单位 TM 结构以及预测的 TM 截短部位示意

Fig. 1 EIAV envelope protein coded by env and the structure of its transmembrane subunit (TM)

带,其大小与预测截短后的 TM 大小基本相符,提示 EIAV_{FDDV} 的裂解产物中存在截短型 TM;而 B 泳道中则未见该截短型 TM 对应的条带,主要是完整型的 TM,相对分子质量约为 45 ku。另外,由于在 A 泳道中也存在完整 TM 所对应 45 ku 条带,推测 EIAV_{FDDV} 中也存在一定量的 TM 未出现截短的病毒粒子,这与作者进行的基因测序的结果相一致。



A. EIAV_{FDDV} 培养细胞 FDD 裂解物;B. EIAV_{DLV} 培养细胞 MDM 裂解物

A. Cleaved EIAV_{FDDV} culture cells; b. Cleaved EIAV_{DLV} culture cells

图 2 EIAV 培养细胞裂解物的 Western blot 结果

Fig. 2 Western blot of the cleaved EIAV culture cells

2.3 EIAV_{FDDV} 接种后第 15 天免疫马体内 EIAV 前病毒 DNA gp45 分析

对扩增获得的 gp45 片段经 T-A 克隆后,对获得的阳性克隆进行测序分析。本试验中从免疫的 3 匹马共获得 24 个前病毒 DNA gp45 片段。该 24 个基因片段的序列比对结果见图 3。由图 3 可知,在 EIAV_{FDDV} 免疫马体 PBMC 中提取的前病毒 DNA 的 gp45 克隆中,约 1/4 出现了 TGA 过早停止编码突变。

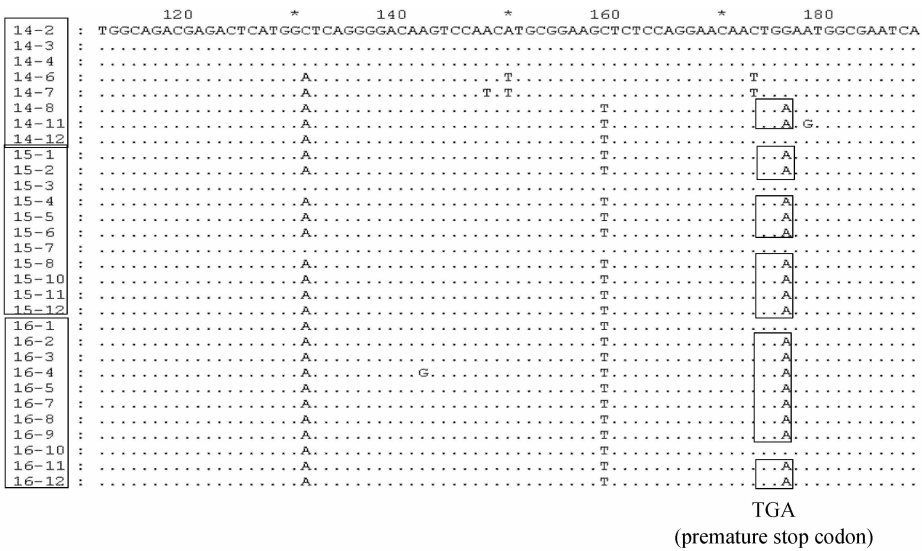


图 3 EIAV_{FDDV} 免疫马第 15 天 PBMC 相关前病毒 *gp45* 基因部分序列的对比分析

Fig. 3 Analysis of the *gp45* gene in PBMC associated provirus DNA from the 3 horses at the 15th day post inoculation with EIAV_{FDDV}

2.4 EIAV_{FDDV} 接种后第 40 天免疫马血浆中游离的 EIAV 病毒粒子 *gp45* 分析

免疫第 40 天, 免疫马血浆中游离病毒 *gp45* 的

核酸序列分析结果见图 4。结果显示, 在此时马匹血浆中的病毒粒子 *gp45* 中, 亦出现较高比例的过早停止编码突变。突变个体占挑取克隆总数的 7/10。

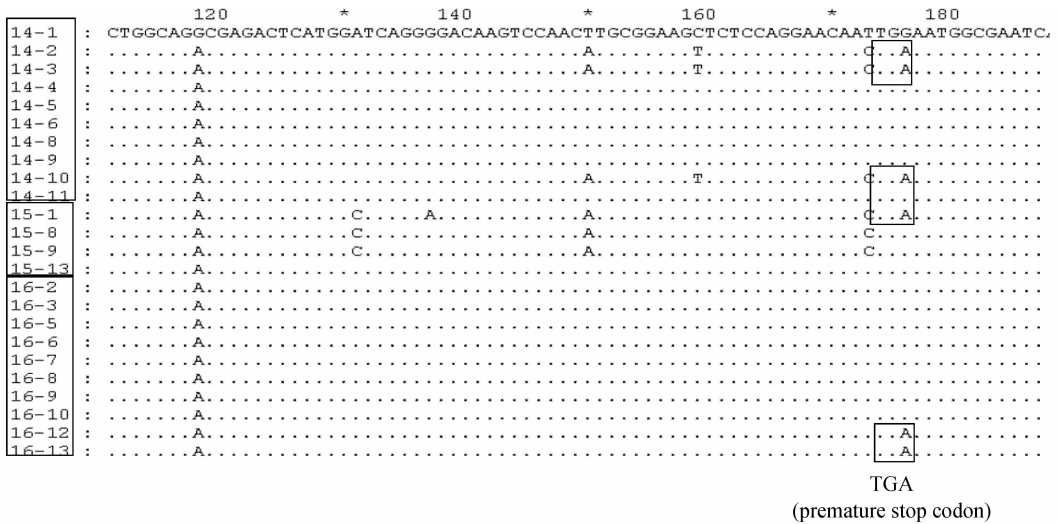


图 4 EIAV_{FDDV} 免疫马第 40 天血浆病毒 RNA RT-PCR 产物序列比较结果

Fig. 4 Analysis of the *gp45* gene in the genome of the circulating virions *in vivo* from the 3 horses at the 40th day post inoculation with EIAV_{FDDV}

3 讨论

分析中国 EIAV 减毒疫苗的基因组特征, 对于明确该疫苗毒力弱化和免疫原性增强的机制具有重要意义。本研究发现, EIAV_{FDDV} 的 *gp45* 相对于 EI-

AV_{DLV} 在病毒基因组的第 2 230 核苷酸位点出现 G → A 的突变, 形成 TGA, 造成编码过早停止。该突变在 EIAV_{FDDV} 前病毒中高比例存在。为确定该截短突变是否为致死性突变, 对接种 EIAV_{FDDV} 的 3 匹马免疫后第 15、40 天时体内 EIAV 前病毒 DNA 和

RNA 进行测定。分析前病毒 DNA,有助于判断出现该突变的病毒粒子是否具有对宿主动物进行感染的能力;而分析循环病毒粒子的基因组 RNA,可帮助我们判定出现该突变的病毒粒子,是否能够在宿主动物体内复制并保持该截短突变特性。综合分析图 2、3 的数据,证明存在该突变的病毒粒子既可对宿主动物进行感染,又具有在宿主体内复制的能力。但突变体在前病毒 DNA 和 RNA 中所占比例并不相一致。

研究数据表明,免疫后第 15 天 PBMC 中的前病毒 DNA 突变个体的比例,明显低于 FDD 基因组中整合的 EIAV_{FDDV}前病毒 DNA 和免疫第 40 天血浆中游离病毒粒子基因中突变个体的比例。对此,作者认为 TM 截短的病毒粒子在马体内主要靶细胞巨噬细胞上的复制能力可能有所下降,使得整合状态的 *gp45* 基因中 TM 截短突变的个体比例相对较低。而适应 FDD 的 TM 截短突变的病毒粒子可能类似 HIV,具有更强的感染内皮细胞等的能力^[8],产生较多数量的 TM 截短突变的病毒粒子。这些病毒粒子的产生,增加了血浆中 TM 截短突变的病毒粒子在所有游离病毒粒子中的比例。由于挑取克隆进行分析的方法具有一定的不确定性,TM 突变型病毒粒子在宿主体内的实际存在状态,还需进一步的试验予以确证。

对于 EIAV_{FDDV} *gp45* 突变的产生原因,作者认为其可能与细胞嗜性改变有关。有研究表明,TM 胞浆区截短突变的 HIV 病毒粒子在体外传代时,表现出了明显的细胞系依赖性。截短突变可在少数细胞系,如 MT4 和 M8166 中传代生长^[9-10],而在原代细胞(如 PBMC、巨噬细胞和多数 T 细胞系)上则不能复制和传代^[9-11]。在 EIAV 的研究中,也有报道一种包含有截短突变型 TM 的 EIAV 更适合在犬原细胞系 Cf2TH 上生长,而具有全长囊膜的 EIAV 则适合在马细胞上传代^[12-13]。因此,TM 截短突变可能作为慢病毒的一种细胞适应性突变而存在。结合 EIAV 疫苗株的细胞嗜性和突变特点,即巨噬细胞嗜性的 EIAV_{DLV} 的 TM 未出现截短突变,而转成 FDD 上传代培养后,则产生了该突变,提示该突变很可能为 EIAV 适应在驴胎皮肤细胞生长的需要。

在 EIAV 中,TM 蛋白为囊膜蛋白裂解所形成的病毒粒子的穿膜蛋白^[6],其作用尚未完全明确。参照其它慢病毒的相关研究^[14-16],推测其可能与细

胞内特定蛋白或病毒的基质蛋白 MA 相互作用,调控锚定到细胞膜上的病毒囊膜蛋白的水平,并影响病毒粒子的组装。Jia 等学者的研究表明,TM 存在截短的 EIAV 在宿主动物体内的复制能力比未截短亲本毒株低 10~1 000 倍^[6,17]。Luciw 等^[18]研究发现,TM 胞浆区截短的 SIV 感染性克隆毒在感染猴体内呈低拷贝复制状态,而回复突变病毒感染的动物则呈现较高水平的病毒载量和明显的 SIV 临床症状。以上研究均提示亲本毒株完整的 TM 在病毒致病过程中可能起到重要作用。本研究发现的 EIAV TM 的截短,是否会影响其在天然宿主体内的靶细胞(即巨噬细胞)上的复制能力,还需进一步的研究。然而,基于慢病毒间的相似性,作者推测经 FDD 适应的 EIAV TM 胞浆区的截短,很可能造成其在巨噬细胞上的复制能力下降。由于巨噬细胞是 EIAV 的宿主细胞,对巨噬细胞的破坏是 EIAV 致病的主要原因,截短后的 EIAV 在巨噬细胞上复制能力的进一步下降必将导致病毒毒力的进一步减弱。该推断提示了 EIAV_{FDDV} 能较 EIAV_{DLV} 诱导更强免疫保护的部分原因,而 EIAV_{FDDV} TM 截短对疫苗毒力稳定弱化和诱导坚强免疫保护是否具有贡献,则还需进一步的试验验证。

4 结 论

本研究发现 EIAV_{FDDV} 的 *gp45* 存在高比例截短突变,证明该截短突变毒株具有在体内和体外进行复制的能力。但该截短突变是否可通过改变 EIAV_{FDDV} 在免疫马体内的细胞嗜性,进而影响其毒力和免疫原性,还有待进一步验证。

参考文献:

- [1] SELTON D, FULLER F, MCGUIRE T. The immunopathogenesis of equine infectious anemia virus[J]. *Virus Res*, 1994, 32: 111-138.
- [2] SHEN R, WANG Z. Development and use of an equine infectious anemia donkey leucocyte attenuated vaccine. EIAV: a national review of policies, programs, and future objectives[M]. Amarillo, TX: American Quarter Horse Association, 1985.
- [3] 沈荣显,徐振东,何云生,等. 马传染性贫血病免疫的研究[J]. 中国农业科学, 1979, 12(4):1-15.
- [4] 沈荣显,王振漪,董君平,等. 马传染性贫血病驴胎皮肤细胞弱毒疫苗株及其培育方法: 中国,01123620 [P]. 2001.

- [5] HOWE L, LEROUX C, ISSEL C, et al. Equine infectious anemia virus envelope evolution *in vivo* during persistent infection progressively increases resistance to *in vitro* serum antibody neutralization as a dominant phenotype[J]. *J Virol*, 2002, 76 :10588-10597.
- [6] JIA B. Role of the cytoplasmic tail of equine infectious anemia virus transmembrane glycoprotein in acute disease induction[D]. *North Carolina State University*, 2004:37-55.
- [7] 耿庆华, 王晓钧, 相文华, 等. 马传染性贫血病毒阿根廷流行毒株前病毒 *gag* 和 *gp90* 基因在马体内的变异分析[J]. 畜牧兽医学报, 2006, 37(3): 270-273.
- [8] OAKS J L, ULIBARRI C, CRAWFORD T. Endothelial cell infection *in vivo* by equine infectious anemia virus[J]. *J Gen Virol*, 1999, 80(9):2393-2397.
- [9] AKARI H, FUKUMORI T, ADACHI A. Cell-dependent requirement of human immunodeficiency virus type 1 gp41 cytoplasmic tail for Env incorporation into virions[J]. *J Virol*, 2000, 74:4891-4893.
- [10] PILLER S, DUBAY J, DERDEYN C, et al. Mutational analysis of conserved domains within the cytoplasmic tail of gp41 human immunodeficiency virus type 1: effects on glycoprotein incorporation and infectivity[J]. *J Virol*, 2000, 74:11717-11723.
- [11] DUBAY J, ROBERTS J, HAHN B, et al. Truncation of the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein cytoplasmic domain blocks virus infectivity[J]. *J Virol*, 1992, 66:6616-6625.
- [12] RICE N R, LEQUARRE A S, CASEY J W, et al. Viral DNA in horses infected with equine infectious anemia virus[J]. *J Virol*, 1989, 63:5194-5200.
- [13] RICE N, HENDERSON L, SOWDER R, et al. Synthesis and processing of the transmembrane envelope protein of equine infectious anemia virus[J]. *J Virol*, 1990, 64:3770-3780.
- [14] WYSS S, DIMITROV A, BARIBAUD F, et al. Regulation of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein fusion by a membrane-interactive domain in the gp41 cytoplasmic tail[J]. *J Virol*, 2005, 79(19):12231-12241.
- [15] BHATIA A, CAMPBELL N, PANGANIBAN A, et al. Characterization of replication defects induced by mutations in the basic domain and C-terminus of HIV-1 matrix[J]. *Virology*, 2007, 369(1):47-54.
- [16] AFFRANCHINO J, GONZALEZ S. Mutations at the C-terminus of the simian immunodeficiency virus envelope glycoprotein affect gp120-gp41 stability on virions[J]. *Virology*, 2006, 347(1):217-218.
- [17] PAYNE S, PEI X, BIN J, et al. Influence of long terminal repeat and env on the virulence phenotype of equine infectious anemia virus[J]. *J Virol*, 2004, 78(5): 2478-2485.
- [18] LUCIW P A, SHAW K E S, SHACKLETT B L, et al. Importance of the intracytoplasmic domain of the simian immunodeficiency virus (SIV) envelope glycoprotein for pathogenesis[J]. *Virology*, 1998, 252(1):9-16.