

章丽娇,赵冬敏,韩凯凯,等. 坦布苏病毒 RNA 复制子系统的构建与应用[J]. 江苏农业科学,2023,51(19):153–157.  
doi:10.15889/j.issn.1002–1302.2023.19.023

# 坦布苏病毒 RNA 复制子系统的构建与应用

章丽娇<sup>1,2</sup>, 赵冬敏<sup>1,2</sup>, 韩凯凯<sup>1,2</sup>, 黄欣梅<sup>1,2</sup>, 杨 婧<sup>1,2</sup>, 吴凤瑶<sup>1,2</sup>, 刘青涛<sup>1,2</sup>, 刘宇卓<sup>1,2</sup>, 张小飞<sup>1,2</sup>, 李 银<sup>1,2</sup>

[1. 江苏省农业科学院兽医研究所, 江苏南京 210014; 2. 兽用生物制品(泰州)国泰技术创新中心, 江苏泰州 225300]

**摘要:**黄病毒 RNA 复制子在病毒致病机制、新型疫苗和药物研发上应用广泛,而坦布苏病毒(Tembusu virus, TMUV)是我国新发现的以引起水禽产蛋量下降为主要特征的黄病毒属成员。为构建 TMUV RNA 复制子,本研究以 TMUV JXSP 株感染性克隆为基础,利用 Overlap PCR 分别对病毒基因组进行 CP<sub>pr</sub>ME、CP<sub>pr</sub>M、PrME 和 PrM 等 4 种方式结构蛋白基因的缺失,并在缺失部位插入绿色荧光蛋白报告基因,报告基因下游连接口蹄疫病毒 2A 蛋白基因序列,获得的基因组全长 PCR 融合产物纯化后,体外转录成 mRNA,并转染至 BHK-21 细胞,采用荧光显微镜观察不同时间点绿色荧光蛋白的表达;利用构建的 TMUV RNA 复制子,将绿色荧光蛋白基因替换为 H9 亚型禽流感病毒 HA 基因, mRNA 转染细胞 72 h 后 Western blotting 检测蛋白表达。结果显示,4 种 TMUV RNA 复制子转染细胞的胞浆和胞核内均能观察到明显的绿色荧光信号;Western blotting 能检测到 HA 蛋白的表达。结果表明,本研究成功构建了 ΔCP<sub>pr</sub>ME、ΔCP<sub>pr</sub>M、ΔPrME 和 ΔPrM 等 4 种能有效表达外源基因的 TMUV RNA 复制子。

**关键词:**坦布苏病毒;复制子;RNA;转录;蛋白表达;转染

**中图分类号:**S852.65+7 **文献标志码:**A **文章编号:**1002–1302(2023)19–0153–05

坦布苏病毒病是我国新发现的一种由坦布苏病毒(Tembusu virus, TMUV)引起的以水禽严重产蛋下降和神经系统异常为主要特征的重要传染病<sup>[1–2]</sup>。该病自 2010 年暴发以来,传播迅速,几乎席卷了我国大部分水禽养殖地区,发病率高达 100%,死亡率为 5%~30%<sup>[3]</sup>。目前,坦布苏病毒已成为危害我国水禽养殖业的主要流行病原之一。

坦布苏病毒是黄病毒科(Flaviviridae)黄病毒属(Flavivirus)成员之一,具有典型的黄病毒属基因组结构特征,为单股正链 RNA,全长 10 990 nt,编码单一的开放读码框,包括衣壳蛋白(C)、基质蛋白(PrM)、囊膜蛋白(E)3 个结构蛋白和 7 个非结构蛋白(NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B 和 NS5),5' 端有 I 型帽子结构,3' 端无聚合赖氨酸尾。研究表明,黄病毒属病毒作为单股正链 RNA 病毒,缺失部分或全部结构蛋白基因后仍可形成具有自主复制能力的病毒亚基因组,即 RNA 复制子,其可表达病毒自身非结构蛋白和插入的外源基因蛋白,但不会产生具有感染性的病毒颗粒<sup>[4]</sup>。目前,日本乙型脑

炎病毒、西尼罗病毒、登革热病毒及寨卡病毒等 RNA 复制子相继被成功构建与应用<sup>[5–8]</sup>。病毒复制子是病毒基因组结构与功能研究、抗病毒药物筛选及新型疫苗研发等方面的有力工具。

本研究在坦布苏病毒 JXSP 株感染性克隆基础上<sup>[9]</sup>,利用反向遗传操作技术,不同程度缺失病毒的结构蛋白基因,同时在缺失部位插入绿色荧光蛋白基因,构建 RNA 复制子,鉴定活性,并应用该平台表达 H9 亚型禽流感 HA 基因,为坦布苏病毒致病机制和新型疫苗的开发提供新的技术手段和平台。

## 1 材料与方法

### 1.1 毒株、细胞和质粒

试验所用坦布苏病毒 JXSP 株由中国农业大学苏敬良教授馈赠;BHK-21 细胞系和质粒 pEGFP-N1 均由笔者所在实验室保存。

### 1.2 主要试剂和耗材

高保真酶 Primer Star Mix,购自 Takara 公司;凝胶回收纯化试剂盒,购自 Axygen 公司;RiboMAX™ Large Scale RNA Production Systems(T7)和 Ribo m7G Cap Analog,均购自 Promega 公司;酚:三氯甲烷:异戊醇(25:24:1,pH 值<5.0)和三氯甲烷:异戊醇(24:1),均购自北京索莱宝科技有限公司;Opti-MEM® I Reduced Serum Medium 和 Lipofectamine

收稿日期:2023–04–07

基金项目:江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(21)3134];国家自然科学基金(编号:31802200)。

作者简介:章丽娇(1987—),女,浙江德清人,博士,副研究员,主要从事家禽病毒分子生物学研究。E-mail:zhang62810003@126.com。

MessengerMAX™,均购自 Invitrogen 公司;胎牛血清,购自 Hyclone 公司;SYBR qPCR Master Mix,购自诺唯赞公司;H9N2 HA 鼠单抗,购自北京义翘神州科技有限公司; $\beta$ -actin 鼠单抗,购自康维世纪生物科技有限公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG,购自中杉金桥公司;常规的试剂和仪器均由江

苏省农业科学院兽医研究所水禽实验室提供。  
1.3 引物设计与合成  
根据 GenBank 中登录的坦布苏病毒 JXSP 株全基因组序列(登录号:JQ920423)和绿色荧光蛋白基因序列设计引物(表 1)。引物于 2022 年 3 月份由南京金斯瑞生物有限公司合成。

表 1 TMUV RNA 复制子构建引物

引物名称	引物序列(5'→3')
T7 +1F	CCCCGGTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGTTCATCTGTGTAACTTATTCC
EGFP +211R	AGCTCCTCGCCCTTGCTCACCATCAGGACCCCATCAATCGTCCT
EGFP +478R	AGCTCCTCGCCCTTGCTCACCATACCAATTATAGTTTCCAAGCTTCAG
EGFP - F	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCT
2A + EGFP - R	TGGACCTGGATTGCTTTCTACATCCCCAGCCAGTTTGAGTAAATCAAAGTTAAGAGTTTGTTTGACAGGAGCGACAATTTTCT TGTACAGCTCGTCCATGCCGA
2A +932F	ATGTAGAAAGCAATCCAGGTCCAATGTTAATTGCCCCAGCGTACAGC
2A +2369F	ATGTAGAAAGCAATCCAGGTCCAATGGGGCTGAATGCAAGGGAC
2459R	GTCGATTGAGCACCCCGTGTC
2459F	GACACGGGGTGCTCAATCGAC
4015R	TATCCCCACTATTCTGAGCCCTG
4015F	CAGGGCTCAGAATACTGGGGATA
5851R	CGACTATCTATGACCCGTTGC
5851F	GCAACGGGTCATAGATAGTCG
7450R	GAACACCGCCACTAAGGCTAT
7450F	ATAGCCTTAGTGCGGTGTTTC
9500R	ATGAGCTGGACGCACAGGTTCGT
9500F	ACGAACCTGTGCGTCCAGCTCAT
10990R	AGACTCTGTGTTCTACCACCACGACCCACTTTTCGGCGATCTGTGCCAA
HA F +191F	AGGACGATTGATGGGGTCCTGATGGAACAATATCACTAATA
2A + HA R	TGGACCTGGATTGCTTTCTACATCCCCAGCCAGTTTGAGTAAATCAAAGTTAAGAGTTTGTTTGACAGGAGCGACAATTTT ATACAAATGTTGCATCTGCA

注:下划线部分为 T7 启动子序列,斜体表示口蹄疫病毒 2A 蛋白基因序列。

1.4 4 种坦布苏病毒 RNA 复制子全长 cDNA 的构建  
采用 Axygen 体液病毒核酸提取试剂盒,提取坦布苏病毒 JXSP 株 RNA,利用 Promega 反转录试剂盒生成 cDNA。以病毒 cDNA 为模板,利用表 1 引物分段扩增,获得不同程度缺失结构蛋白基因的病毒基因组 PCR 片段。以 pEGFP - N1 质粒为模板,利用 EGFP - F/2A + EGFP - R 引物对扩增,获得 EGFP - 2A 片段。各 PCR 目的片段产物经 1% 凝胶电泳鉴定,并用 Axygen 琼脂糖 DNA 凝胶回收试剂盒回收与纯化。纯化后的片段进行双链 DNA 浓度测定。按图 1 所示构建策略,采用融合 PCR 方法,连接各片段,分别使病毒基因组缺失 CPrME、CPrM、PrME 和 PrM 结构蛋白,缺失部位插入外源蛋白报告基因 EGFP - 2A。融合 PCR 反应体系如下:

Primer Star Mix(2 × ) 25 μL,T7 + 1F 和 10990R 各 1 μL,各连接片段以相同摩尔数加入,双蒸水加至 50 μL。PCR 反应程序如下:98 ℃ 预变性 5 min;98 ℃ 变性 10 s、52 ℃ 退火 15 s、72 ℃ 延伸 3 min 30 s、30 个循环;72 ℃ 延伸 7 min。融合片段电泳鉴定后切胶回收纯化,送至上海生工生物工程有限公司测序。  
1.5 体外转录 RNA  
采用 RiboMAX™ Large Scale RNA Production Systems(T7)对纯化并测序正确的融合 PCR 产物进行体外转录,根据说明书构建如下 30 μL 反应体系:5 × Reaction buffer 6.00 μL,ATP、CTP 和 UTP 各 2.25 μL,GTP 0.50 μL,Ribo m7G Cap Analog 2.25 μL,DNA 模板 12.00 μL,Enzyme mix 3.00 μL。37 ℃ 反应 4 h,加入 1.80 μL Dnase,37 ℃ 作用

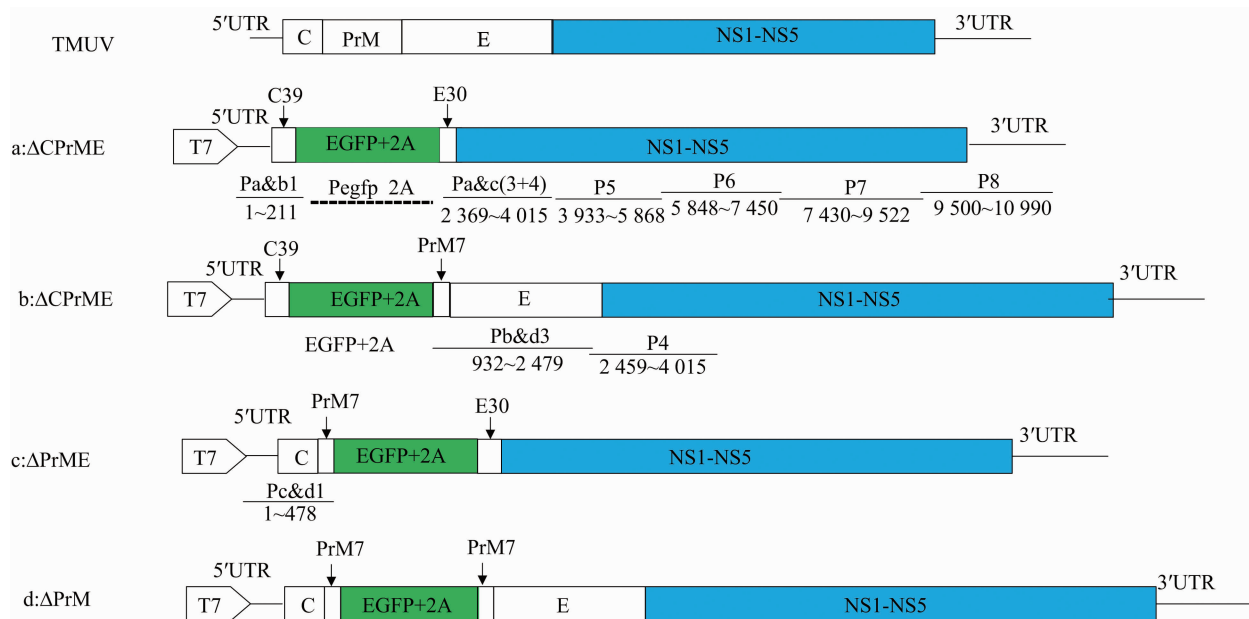


图1 坦布苏病毒 RNA 复制子构建策略

15 min, 消化模板。苯酚三氯甲烷抽提体外转录产物, 测定 RNA 浓度,  $-70^{\circ}\text{C}$  保存。

## 1.6 转染

采用 Lipofectamine MessengerMax™ 试剂盒将纯化的 RNA 转染至 BHK-21 细胞。具体操作步骤如下: PBS 轻轻洗涤细胞 3 次, 每孔加入 200  $\mu\text{L}$  Opti-MEM® I Reduced Serum Medium, 将 1.5  $\mu\text{L}$  Lipofectamine® MessengerMax Reagent 与 25.0  $\mu\text{L}$  Opti-MEM 混匀, 将 1  $\mu\text{g}$  RNA 与 25  $\mu\text{L}$  Opti-MEM 混匀, 将转染试剂稀释液和 RNA 稀释液等体积混匀, 室温 5 min, 复合物以 50  $\mu\text{L}$ /孔加入 24 孔板 BHK-21 单层细胞, 同时设立转染试剂对照,  $37^{\circ}\text{C}$  培养 4 h 后吸弃转染混合液, 加入含 3% 胎牛血清的 DMEM 维持液, 于  $37^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下培养。

## 1.7 EGFP 报告基因表达检测

使用 Olympus 公司 IX-51 型荧光显微镜观察转染后不同时间点 4 种 RNA 复制子在 BHK-21 细胞内绿色荧光蛋白的表达情况。

## 1.8 复制子中 EGFP 转录能力检测

采用 RNA 抽提试剂盒, 按说明书操作提取细胞样品 RNA, 反转录生成 cDNA。以 cDNA 为模板, 进行 SYBR Green 相对荧光定量 PCR 反应。EGFP 基因上下游扩增引物:  $5' - \text{AAGCAGAAGAACGGCATC AAGG} - 3'$  和  $5' - \text{CACGAAGTCCAGCAGGACCATG} - 3'$ ; 内参基因  $\beta - \text{actin}$  上下游扩增引物:  $5' - \text{TTGGA GGCTCTATCCTGG} - 3'$  和  $5' - \text{TAGAAGCATTTGCG GTGG} - 3'$ 。用  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  法计算 EGFP RNA 相对转录量。

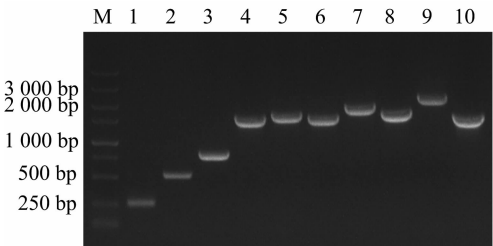
## 1.9 应用 TMUV RNA 复制子表达 H9 亚型禽流感 HA 基因

提取 H9 亚型禽流感病毒 NJ01 株 RNA, 反转录为 cDNA, 利用 HA F + 191F/2A + HA R 引物对扩增 HA 片段, 以  $\Delta\text{CPrME}$  构建策略为基础, 将 EGFP 片段替换为 HA 片段, 利用融合 PCR 方法获得基因组全长, 体外转录为 mRNA, 转染至 BHK-21 细胞。收集转染 72 h 后的细胞样品, 提取细胞总蛋白, 测定蛋白浓度后经 Western blotting 检测蛋白表达。以 H9N2 HA 鼠单抗为一抗, 辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG 为二抗, ECL 显影观察。

## 2 结果与分析

### 2.1 4 种 TMUV RNA 复制子全长 cDNA 的构建

通过 PCR 扩增获得了 Pa&b1、Pc&d1、Pegfp-2A、Pa&c(3+4)、Pb&d3、P4、P5、P6、P7、P8 等 10 个目的片段, 大小依次为 237、504、798、1 747、1 548、1 557、1 876、1 603、2 093、1 491 bp。PCR 片段经电泳鉴定, 由图 2 可知, 与预期大小一致。纯化的 PCR 片段按图 1 所示方案, 通过融合 PCR, 成功获得了  $\Delta\text{CPrME}$ 、 $\Delta\text{CPrM}$ 、 $\Delta\text{PrME}$ 、 $\Delta\text{PrM}$  4 种 TMUV RNA 复制子全长 cDNA, 大小依次为 9 657、11 094、9 924、11 362 bp。由图 3 可知, 电泳结果与预期相符, 测序结果显示, 序列均与预期一致。纯化的全长 PCR 产物经体外转录和苯酚-三氯甲烷抽提, 获得  $\Delta\text{CPrME}$ 、 $\Delta\text{CPrM}$ 、 $\Delta\text{PrME}$ 、 $\Delta\text{PrM}$  体外转录 mRNA, 浓度分别为 535、531、469、427  $\text{ng}/\mu\text{L}$ 。

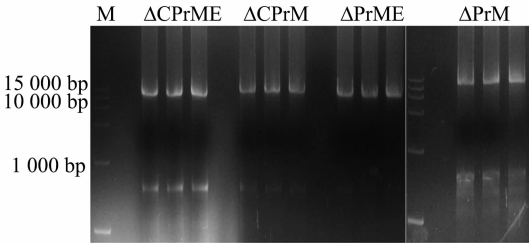


M—DL 5 000 分子量 Maker; 1—Pa&b1; 2—Pc&d1;  
3—Pegfp-2A; 4—Pa&c(3+4); 5—Pb&d3; 6—P4;  
7—P5; 8—P6; 9—P7; 10—P8

图2 TMUV RNA 复制子基因组各片段 PCR 产物

2.2 TMUV RNA 复制子活性的鉴定

为鉴定所构建的 TMUV RNA 复制子的活性,将  $\Delta$ CPrME、 $\Delta$ CPrM、 $\Delta$ PrME 和  $\Delta$ PrM 体外转录体 mRNA 转染 BHK - 21 细胞,分别于转染后 24、48、72 h 在荧光显微镜下观察细胞内 EGFP 的表达情况。由图 4 可知,4 种复制子 RNA 转染的 BHK - 21



M—DL 15 000 分子量 Maker

图3 4 种 TMUV RNA 复制子基因组全长融合 PCR 产物

细胞在各检测时间点均能在胞浆和胞核中观察到绿色荧光信号。4 种复制子中, $\Delta$ CPrME 荧光信号最强, $\Delta$ PrM 次之, $\Delta$ CPrM 和  $\Delta$ PrME 无明显差异。对照组细胞均未观察到绿色荧光信号。以上结果表明,构建的 4 种 RNA 复制子均能有效地表达外源蛋白 EGFP,其中, $\Delta$ CPrME 效果最佳。

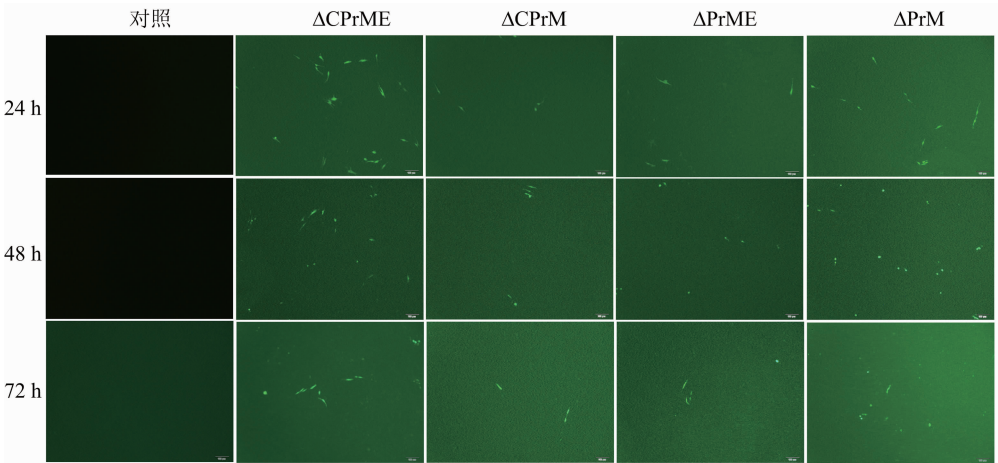


图4 EGFP 在 TMUV RNA 复制子转染细胞中的表达

2.3 TMUV RNA 复制子表达 EGFP 基因能力的验证

为验证构建的 TMUV RNA 复制子自我复制的能力,将  $\Delta$ CPrME 体外转录体 mRNA 转染 BHK - 21 细胞后,分别于 12、24、48、72 h 收集细胞样品 RNA,进行相对荧光定量 PCR 反应。由图 5 可知,随着时间的推移,复制子 EGFP RNA 量呈现增长趋势,转染 24、48、72 h 后细胞样品中 EGFP RNA 量分别比 12 h 增长了约 2.9 倍、5.8 倍和 9.8 倍,表明 TMUV RNA 复制子  $\Delta$ CPrME 具有自我复制的能力,能够表达外源基因。

2.4 应用 TMUV RNA 复制子表达 H9 亚型禽流感 HA 基因

Western blotting 结果(图6)显示,插入 HA 基因

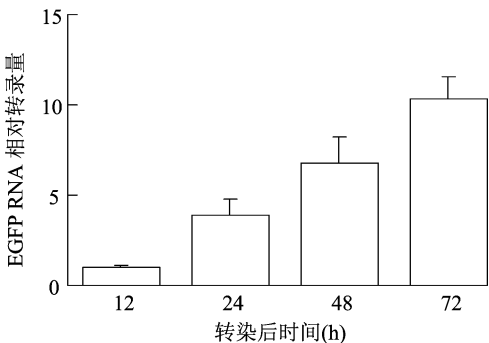
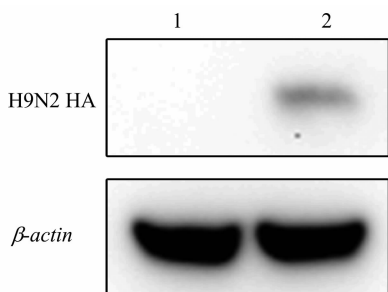


图5 TMUV RNA 复制子  $\Delta$ CPrME 转染细胞中 EGFP mRNA 量的表达

的 TMUV RNA 复制子转染细胞 72 h 后,能够检测到 HA 蛋白的表达,表明构建的 TMUV RNA 复制子能够应用于外源蛋白的表达。



1—细胞对照；2—携带外源基因 HA 的 TMUV RNA 复制子转染细胞

图6 携带外源基因 HA 的 TMUV RNA 复制子在 BHK-21 细胞中的蛋白表达检测

### 3 讨论与结论

病毒复制子技术是研究病毒复制和翻译、抗病毒药物筛选以及新型疫苗开发的理想工具。研究表明,黄病毒属病毒作为单链正股 RNA 病毒,在缺失结构蛋白后仍可由自身非结构蛋白完成亚基因组的复制,但复制效率可能与缺失程度相关。因此,本研究以坦布苏病毒 JXSP 株感染性克隆为基础,分别对病毒基因组进行 CPrME、CPrM、PrME 和 PrM 等 4 种方式结构蛋白基因的缺失,成功构建了 4 种病毒 RNA 复制子。为检测复制子的活性和表达外源基因的能力,缺失部位插入绿色荧光蛋白报告基因,并在报告基因序列后引入口蹄疫病毒 2A 蛋白基因序列(FMDV 2A),该蛋白具有自剪切功能,可将外源基因有效地分离出来<sup>[10]</sup>。文献报道,黄病毒基因组 5'UTR 下游的 C 蛋白编码区存在多个病毒复制和翻译必需的功能性元件,包括 5'AUG 下游序列、衣壳蛋白编码区发卡结构、5'保守序列等<sup>[11]</sup>。所以为保证复制子的有效复制和翻译,在构建 ΔCPrME 和 ΔCPrM 复制子时,本研究保留了 C 蛋白氨基端的 39 个氨基酸编码序列。在构建 ΔCPrME 和 ΔPrME 复制子时,保留了 E 蛋白羧基端的 30 个氨基酸编码序列,以保证 NS1 蛋白的正确剪切和加工。同时,在构建 ΔCPrM、ΔPrME 和 ΔPrM 复制子时,保留了 C 蛋白和 PrM 蛋白、PrM 蛋白和 E 蛋白间的信号肽酶裂解位点。

4 种病毒 RNA 复制子活性鉴定结果显示,ΔCPrME 复制子转染细胞内绿色荧光蛋白信号最强,ΔPrM 次之,剩余二者无明显差异。结果表明,复制子表达外源基因的能力可能与结构蛋白缺失的方式有关。在其他构建的黄病毒复制子中也观察到了类似的情况<sup>[5,7]</sup>。但总体看来,4 种复制子转染细胞中阳性信号的细胞比例均不高,可能是因为

复制子基因组较长(约 10 kb),转染效率低<sup>[12]</sup>。因此,如何高效地将 RNA 复制子递送进靶细胞是影响复制子表达效率的关键因素之一。同时结果发现,转染细胞胞核内也能观察到绿色荧光信号,可能是因为分离的绿色荧光蛋白质量较小,能够穿越进入细胞核。此外,本研究利用构建的 TMUV RNA 复制子进行了 H9 亚型禽流感病毒 HA 基因的表达,表明该复制子具有开发新型疫苗的潜力。

总而言之,本研究利用坦布苏病毒 JXSP 株感染性克隆,成功构建了 ΔCPrME、ΔCPrM、ΔPrME 和 ΔPrM 等 4 种病毒 RNA 复制子,为病毒致病机制的研究提供新的技术手段,也为新型疫苗开发奠定基础。

### 参考文献:

- [1]曹贞贞,张存,黄瑜,等. 鸭出血性卵巢炎的初步研究[J]. 中国兽医杂志,2010,46(12):3-6,97.
- [2]Su J L, Li S, Hu X D, et al. Duck egg-drop syndrome caused by BYD virus, a new Tembusu-related flavivirus[J]. PLoS One, 2011, 6(3):e18106.
- [3]Cao Z Z, Zhang C, Liu Y H, et al. Tembusu virus in ducks, China[J]. Emerging Infectious Diseases, 2011, 17(10):1873-1875.
- [4]Kümmerer B M. Establishment and application of *Flavivirus* replicons[M]//Advances in experimental medicine and biology. Singapore: Springer Singapore, 2018:165-173.
- [5]Yun S I, Choi Y J, Yu X F, et al. Engineering the Japanese encephalitis virus RNA genome for the expression of foreign genes of various sizes: implications for packaging capacity and RNA replication efficiency[J]. Journal of NeuroVirology, 2007, 13(6):522-535.
- [6]Shi P Y, Tilgner M, Lo M K. Construction and characterization of subgenomic replicons of New York strain of West Nile virus[J]. Virology, 2002, 296(2):219-233.
- [7]Leardkamolkarn V, Sirigulpanit W, Chotiwan N, et al. Development of Dengue type-2 virus replicons expressing GFP reporter gene in study of viral RNA replication[J]. Virus Research, 2012, 163(2):552-562.
- [8]Xie X P, Zou J, Shan C, et al. Zika virus replicons for drug discovery[J]. EBioMedicine, 2016, 12:156-160.
- [9]Zhang L J, Sun M X, Zhang Q S, et al. Long-term passage of duck Tembusu virus in BHK-21 cells generates a completely attenuated and immunogenic population with increased genetic diversity[J]. Vaccine, 2020, 38(4):933-941.
- [10]de Felipe P, Luke G A, Hughes L E, et al. *Eunum pluribus*: multiple proteins from a self-processing polyprotein[J]. Trends in Biotechnology, 2006, 24(2):68-75.
- [11]杨玉姣,熊柯尧,陶家成,等. 黄病毒基因组非编码区的结构与功能研究进展[J]. 病毒学报, 2021, 37(2):435-444.
- [12]Kowalski P S, Rudra A, Miao L, et al. Delivering the messenger: advances in technologies for therapeutic mRNA delivery[J]. Molecular Therapy, 2019, 27(4):710-728.