doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2024.01.001

・基础研究・

人冠状病毒 OC43 感染性克隆的构建*

唐 晴 王 蓓 朱英霞 杜作苑 雷晓波 黄 鹤[△] (中国医学科学院病原生物学研究所 北京102629)

摘要 目的:构建携带绿色荧光报告基因的人冠状病毒 OC43 感染性克隆。方法:设计带有绿色荧光蛋白的人冠状病毒 OC43 感染 性克隆基因组序列,分段合成后利用融合聚合酶链式反应等方法得到 8 个亚基因组片段,通过酵母转化关联重组技术获得重组 质粒,转染 HEK-293T 细胞进行病毒拯救,收获转染细胞培养上清感染靶细胞分析病毒拯救情况。结果:获得人冠状病毒 OC43 感 染性克隆重组质粒,将该质粒转染细胞后成功获得携带绿色荧光蛋白报告基因的人冠状病毒 OC43 重组病毒。结论:成功构建了 人冠状病毒 OC43 感染性克隆并获得重组病毒,为针对冠状病毒的基础和应用研究提供了有效工具。 关键词:人冠状病毒 OC43;感染性克隆;反向遗传学 中图分类号:R-33;R373.19 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2024)01-1-05

Construction of a Recombinant Infectious Clone of HCoV-OC43*

TANG Qing, WANG Bei, ZHU Ying-xia, DU Zuo-yuan, LEI Xiao-bo, HUANG He[△]

(Institute of Pathogen Biology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing, 102629, China)

ABSTRACT Objective: To construct an infectious clone of HCoV-OC43 carrying the green fluorescent protein reporter gene. **Methods:** The whole genome sequence of the HCoV-OC43 infectious clone carrying the green fluorescent protein reporter gene was designed and synthesized into 32 segments. The segments were then assembled into 8 fragments by fusion PCR. Recombinant plasmids were obtained by reverse genetics using transformation-associated recombination cloning in Saccharomyces cerevisiae. The recombinant plasmid was transfected into HEK-293T cells for virus rescue. The virus rescue was confirmed by infecting cells with the collected supernatants from transfected cells. **Results:** HCoV-OC43 recombinant virus carrying the green fluorescent protein can be obtained using transformation-associated recombination clone carrying the green fluorescent protein can be obtained using transformation-associated recombination clone carrying the green fluorescent protein can be obtained using transformation-associated recombination clone carrying the green fluorescent protein can be obtained using transformation-associated recombination clone provides an effective tool in basic and applied research on human coronaviruses.

Key words: HCoV-OC43; Infectious clone; Reverse genetics Chinese Library Classification(CLC): R-33; R373.19 Document code: A Article ID: 1673-6273(2024)01-1-05

前言

冠状病毒(Coronavirus,CoV)是人和脊椎动物的重要病原体,可感染人、畜、禽、蝙蝠、小鼠等多种野生动物的呼吸、胃肠、 肝和中枢神经系统^[1,2]。已知人冠状病毒(Human Coronavirus, HCoV)共7种,包括HCoV-229E、HCoV-NL63、HCoV-HKU1、 HCoV-OC43、SARS-CoV、MERS-CoV和SARS-CoV-2^[3-5]。其中,SARS-CoV和MERS-CoV可引起致命性肺炎,分别是2003 年爆发的严重急性呼吸道综合症(Severe Acute Respiratory Syndrome,SARS)和2012年爆发的中东呼吸综合症(Middle East Respiratory Syndrome,MERS)的病原体^[69]。SARS-CoV-2 是一种新型冠状病毒,导致了始于2019年底的新型冠状病毒 全球大流行(Corona Virus Disease 2019,COVID-19),对全球经 济发展产生巨大冲击^[10-12]。其余四种HCoV一般仅能引起轻症 呼吸道感染^[1,5,13]。 利用反向遗传学技术构建感染性克隆是病毒学研究的重要工具,可以用于抗病毒药物的筛选评估、病毒与宿主相互作用的机制研究等^[14-17]。由于冠状病毒基因组庞大(约 30,000 个核苷酸)及其基因组序列在大肠杆菌中的不稳定性,构建冠状病毒的反向遗传学体系曾被认为非常困难^[18-20]。但是,近年来一些非传统方法已经成功应用于冠状病毒的反向遗传学体系构建,包括低拷贝克隆的细菌人工染色体(Bacterial artificial chromosomes,BACs)、体外连接、利用牛痘病毒作为载体、利用酵母转化关联重组克隆(transformation-associated recombination,TAR)等^[19-26]。HCoV-OC43 与 SARS-CoV、MERS-CoV 及 SARS-CoV-2 同属于β冠状病毒属,但由于其致病性相对较弱,其操作可以在生物安全二级实验室(Bio-safety level laboratory -2,BSL-2)中进行,是替代高致病性冠状病毒用来研究 HCoV 致病机制及筛选广谱抗冠状病毒药物的重要模型,利用反向遗传学构建带有报告基因的 HCoV-OC43 感染性克隆是

 ^{*} 基金项目:国家重点研发专项(2020YFA0707600);国家自然科学基金项目(82071795)
 作者简介:唐晴(1995-),女,硕士研究生,主要研究方向:感染免疫,E-mail: tangqing365@163.com
 △ 通讯作者:黄鹤,男,硕士生导师,副研究员,主要研究方向:感染免疫,E-mail: huanghe@ipbcams.ac.cn
 (收稿日期:2023-08-28 接受日期:2023-09-23)

HCoV的重要研究工具。本研究利用酵母转化关联重组技术构 建了带有绿色荧光蛋白(green fluorescent protein,GFP)报告基因的重组人冠状病毒OC43感染性克隆质粒 (pYES1L-OC43-GFP),该质粒转染细胞后进行病毒拯救,成功获得了带有GFP报告基因的重组人冠状病毒OC43 (HCoV-OC43-GFP)。

1 材料与方法

1.1 材料

HEK-293T 和 BHK-21 细胞购自美国模式培养物保藏中心 (American type culture collection, ATCC);I-5[™]2× High-Fidelity Master Mix 购自擎科生物;pEASY-Blunt Zero 克隆试剂盒购自 北京全式金生物技术有限公司;GeneArt 高阶遗传组装系统购 自 Thermo Fisher Scientific 公司。构建感染性克隆的 32 个基因 片段由北京睿博兴科生物技术有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 亚基因组片段的组装 以合成的基因片段(约1000 bp) 为模板,通过 PCR 获得 HCoV-OC43 基因片段,相邻的两个片 段间含 30 bp 重叠序列,PCR 产物经琼脂糖电泳后切胶回收。以含有重叠序列的相邻两个片段为模板,进行重叠延伸 PCR,获得长度约为 2000 bp 的片段。以相同的方法进行第二次重叠 延伸 PCR,获得长度约为 4000 bp 的亚基因组片段,克隆至 pEASY-Blunt 载体。

1.2.2 酵母中进行感染性克隆亚基因组片段的组装 以含有 亚基因组的 pEASY 质粒为模板,通过 PCR 扩增长度约为 4000 bp 的亚基因组片段,PCR 产物经琼脂糖电泳后切胶回收。 以 GeneArt 高阶遗传组装系统进行酵母的转化关联重组克隆, 实验按照说明书提供的操作流程进行。首先,将感染性克隆的 8 个亚基因组片段(每个片段 200 ng)和 100 ng 的 pYES1L 线 性化载体以 PEG/LiAc 方法转化酵母感受态 MaV203;转化的 酵母感受态 MaV203 涂 CSM-Trp 琼脂平板,置于 30℃培养 3 天;从 CSM-Trp 琼脂平板挑取克隆,通过酵母克隆 PCR 验证 是否含有重组片段;提取阳性克隆的质粒电转化 One Shot[®] TOP10 Electrocomp[™]大肠杆菌感受态;挑取大肠杆菌克隆对重 组片段再次进行验证,提取阳性克隆质粒备用。

1.2.3 重组病毒 HCoV-OC43-GFP 的拯救 $8 \times 10^{5/}$ 孔 HEK-293T 细胞铺六孔板。16 小时后,利用 Lipofectamine 3000 转染 5 µg 重组 pYES1L-OC43-GFP 质粒。转染 48 小时后,换为 含 2%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的维持液,置于 CO₂ 培养箱中 33℃继续培养。7 天后,荧光显微镜下观察细胞中 GFP 的表达,收集上清,2000× g,4℃离心 10 分钟。

1.2.4 HCoV-OC43-GFP 重组病毒感染实验 2×10⁵/孔 BHK-21 细胞铺六孔板,待细胞贴壁后进行感染实验。BHK-21 用无血清 DMEM 洗一次,去除培养上清的残留的血清。取上述 转染细胞的上清感染 BHK-21 细胞,12 小时后,细胞换为含 2% FBS 的维持液置于 CO₂培养箱 33℃继续培养 4 天,通过荧 光显微镜观察细胞中绿色荧光蛋白 GFP 的表达。

2 结果

2.1 人冠状病毒 OC43 感染性克隆的设计

如图 1 所示, 感染性克隆的序列以 HCoV-OC43 毒株 ATCC VR-759 为基础,包括病毒基因组全长 cDNA,在病毒基 因组的 5' 非编码区(5' untranslated Region,5'-UTR)的前端加上 CMV 启动子,在病毒基因组的 3' 非编码区的后端加上具有自 我催化功能的丁型肝炎病毒核酶(Ribozyme,Rz)和真核细胞转 录终止信号 (bovine growth hormone polyadenylation signal, BGH)。此外,GFP 报告基因的 3' 端融合具有 "自我切割 "功能 的 P2A 多 4 多肽编码序列,插入病毒蛋白 ORF5 编码序列前。 感染性克隆序列(32693 bp)连接到酵母人工染色体(Yeast artificial chromosome,YAC)-BAC 穿梭载体 pYES1L 上,获得感染 性克隆重组质粒 pYES1L-OC43-GFP。



图 1 人冠状病毒 OC43 感染性克隆示意图

Fig.1 Schematic diagram of human coronavirus OC43 infectious clone

2.2 pYES1L-OC43-GFP 重组质粒的构建和验证

pYES1L-OC43-GFP 重组质粒的构建流程如图 2a 所示。将 感染性克隆全长序列 32693 bp 分成 32 个片段进行基因合成 (F1-F32),每个片段约 1000 bp。通过重叠延伸 PCR 将相邻的 四个片段组装并克隆到 pEASY-Blunt 载体上,获得 8 个含有亚 基因组片段(F1-4,F5-8,F9-12,F13-16,F17-20,F21-24,F25-28, F29-32)的质粒。8 个质粒分别通过基因测序进行验证,选择序 列完全正确的克隆进行后续实验。以全基因组质粒为模板通过 PCR 扩增亚基因组片段(图 2b),与 pYES1L 线性化质粒共转 酵母感受态细胞(图 2c)。挑取 10 个酵母克隆,通过克隆 PCR 对亚基因组片段连接处(Junction)J1、J2 进行验证。结果显示, 所挑取的 10 个克隆均含有 J1、J2 片段(图 2d)。为了进一步验 证所挑选的酵母克隆中含有所有亚基因组片段,选取酵母克隆 1(Clone 1)和 6(Clone 6)对 8 个亚基因组片段上的一个 1000 bp 片段进行验证,结果显示两个克隆均含有所有亚基因组片 段的组份(图 2e),提示 8 个亚基因组片段均成功重组到载体 上。选取 Clone 1 进行下游实验,将酵母克隆中组装好的质粒转 化到大肠杆菌感受态中,质粒提取后通过 PCR 对所有亚基因 组片段进行再次验证,结果显示所得到的重组质粒中 8 个亚基 因组片段均与预期一致(图 2f),说明 pYES1L-OC43-GFP 重组 质粒构建成功。



Fig.2 Construction and validation of recombinant pYES1L-OC43-GFP plasmid

2.3 HCoV-OC43-GFP 的拯救

pYES1L-OC43-GFP 质 粒 转 染 HEK-293T 细 胞 进 行 HCoV-OC43-GFP 重组病毒的拯救,转染不同时间点于荧光显 微镜下观察 GFP 的表达。结果如图 3 所示,细胞转染后 4 天后 开始出现绿色荧光,随着转染时间的延长,HEK-293T细胞中 绿色荧光蛋白表达的阳性率逐渐增多,荧光灶逐渐扩大,提示 重组病毒可在转染细胞中复制。



图 3 重组质粒 pYES1L-OC43-GFP 转染细胞(200×)

Fig.3 Cells Transfected with recombinant pYES1L-OC43-GFP plasmid (200 $\!\times$)

2.4 重组病毒 HCoV-OC43-GFP 的感染与传代

将 pYES1L-OC43-GFP 转染的 HEK-293T 细胞上清感染 BHK-21 细胞,在感染后不同时间点观察细胞中绿色荧光蛋白 的表达。结果显示,感染 2 天后,BHK-21 细胞中开始出现散在 分布的绿色荧光,随着感染时间延长,感染所致的荧光灶逐渐 向周边扩散(图 4a),证明重组病毒 HCoV-OC43-GFP 拯救成 功,获得了具有感染性的 HCoV-OC43-GFP 重组病毒。将细胞 培养上清感染 BHK-21 细胞,对病毒进行传代培养,结果显示, 病毒传至第 3 代时,绿色荧光明显增多增强(图 4b),进一步证 明所获得的 HCoV-OC43-GFP 重组病毒可以在细胞中传代培养,HCoV-OC43-GFP 感染性克隆的反向遗传学体系构建成功。

3 讨论

本研究利用反向遗传学技术成功构建了人冠状病毒 OC43 感染性克隆质粒,获得了具有感染性的 HCoV-OC43-GFP 重组 病毒,该感染性克隆可以替代高致病性冠状病毒用于 HCoV 的 致病机制研究及广谱抗冠状病毒药物的筛选,是 HCoV 基础研 究和应用基础研究的重要工具。





b

图 4 重组病毒 HCoV-OC43-GFP 感染 BHK-21 细胞(200×) Fig. 4 BHK-21 cells infected with recombinant HCoV-OC43-GFP (200×)

2006年,加拿大学者 Pierre J. Talbot 等人利用 BAC 载体 首次构建了 HCoV-OC43 的 cDNA 感染性克隆pBAC-OC43FL, 拯救出具有神经毒性的 HCoV-OC43 重组病毒^[27]。之后,中国学 者在此基础上进行了改造,对外源基因的插入位置进行探索, 以 GFP 报告基因替代病毒 NS2 或 NS12.9 (ORF5)获得了重组 病毒 OC43-GFPΔ NS2 和 OC43-GFPΔ NS12.9^[28]。本研究采用 酵母的转化关联重组克隆方法从头构建了带有 GFP 的 HCoV-OC43-GFP 重组病毒,该方法是一种简单高效的反向遗 传学构建技术体系,可以有效避免对病毒基因片段多次操作, 快速构建冠状病毒的感染性克隆,曾被多次用于不同冠状病毒 反向遗传学体系的构建^[2029-34]。在 2020 年初新冠疫情全球爆发 的初期,瑞士学者利用此方法仅用一周时间完成了多种冠状病 毒感染性克隆的构建^[50]。本课题组也曾利用该方法成功构建了 SARS-CoV-2 非感染性复制子体系,用于 SARS-CoV-2 抗病毒 药物的筛选和评价^[56]。

本研究所构建的 pYES1L-OC43-GFP 重组质粒上,GFP 基 因通过具有自我切割功能的 P2A 编码基因与病毒 ORF5 基因 连接,三者位于同一阅读框内,但病毒感染后 GFP 与 ORF5 蛋 白可独立表达,最大限度保证了病毒基因组的完整性和病毒蛋 白的功能,可以更为真实的反映病毒感染和致病。

在本研究中,pYES1L-OC43-GFP转染细胞后获得的第一 代重组病毒滴度较低,感染细胞后的绿色荧光灶较少,经过三 代扩增后,病毒滴度提高。后续可通过优化病毒培养体系进一 步提高病毒滴度。该反向遗传学体系中外源报告基因 GFP 的 稳 定 性 和 病 毒 的 复 制 情 况 还 需 要 继 续 监 测,该 HCoV-OC43-GFP 重组病毒用于冠状病毒宿主因子和药物筛选 及验证有待进一步研究。

参考文献(References)

- Cui J, Li F, Shi ZL. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses
 [J]. Nat Rev Microbiol, 2019, 17(3): 181-192.
- [2] Chen Y, Liu Q, Guo D. Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis[J]. J Med Virol, 2020, 92(4): 418-423.
- [3] Shaban MS, Müller C, Mayr-Buro C, et al. Multi-level inhibition of coronavirus replication by chemical ER stress[J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 5536.
- [4] Holmes EC, Goldstein SA, Rasmussen AL, et al. The origins of SARS-CoV-2: A critical review[J]. Cell, 2021, 184(19): 4848-4856.
- [5] Kesheh MM, Hosseini P, Soltani S, et al. An overview on the seven pathogenic human coronaviruses [J]. Rev Med Virol, 2022, 32 (2): e2282.
- [6] Zhong NS, Zheng BJ, Li YM, et al. Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangdong, People's Republic of China, in February, 2003[J]. Lancet, 2003, 362(9393): 1353-1358.
- [7] Zaki AM, Van Boheemen S, Bestebroer TM, et al. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia[J]. N Engl J Med, 2012, 367(19): 1814-1820.
- [8] Stadler K, Masignani V, Eickmann M, et al. SARS--beginning to understand a new virus[J]. Nat Rev Microbiol, 2003, 1(3): 209-218.
- [9] MERS: Progress on the global response, remaining challenges and the way forward[J]. Antiviral Res, 2018, 159: 35-44.
- [10] Han X, Ye Q. The variants of SARS-CoV-2 and the challenges of vaccines[J]. J Med Virol, 2022, 94(4): 1366-1372.
- [11] Carabelli AM, Peacock TP, Thorne LG, et al. SARS-CoV-2 variant biology: immune escape, transmission and fitness [J]. Nat Rev Microbiol, 2023, 21(3): 162-177.
- [12] To KK, Sridhar S, Chiu KH, et al. Lessons learned 1 year after SARS-CoV-2 emergence leading to COVID-19 pandemic [J]. Emerg

Microbes Infect, 2021, 10(1): 507-535.

- [13] Kim MI, Lee C. Human Coronavirus OC43 as a Low-Risk Model to Study COVID-19[J]. Viruses, 2023, 15(2): 578.
- [14] Jackson D, Elderfield RA, Barclay WS. Molecular studies of influenza B virus in the reverse genetics era[J]. J Gen Virol, 2011, 92 (Pt 1): 1-17.
- [15] Stobart CC, Moore ML. RNA virus reverse genetics and vaccine design[J]. Viruses, 2014, 6(7): 2531-2550.
- [16] Kannan M, Zainal Z, Ismail I, et al. Application of Reverse Genetics in Functional Genomics of Potyvirus[J]. Viruses, 2020, 12(8): 803.
- [17] Johne R, Reetz J, Kaufer BB, et al. Generation of an Avian-Mammalian Rotavirus Reassortant by Using a Helper Virus-Dependent Reverse Genetics System [J]. J Virol, 2016, 90(3): 1439-1443.
- [18] Masters PS. The molecular biology of coronaviruses [J]. Adv Virus Res, 2006, 66: 193-292.
- [19] Xie X, Lokugamage KG, Zhang X, et al. Engineering SARS-CoV-2 using a reverse genetic system [J]. Nat Protoc, 2021, 16 (3): 1761-1784..
- [20] Kurhade C, Xie X, Shi PY. Reverse genetic systems of SARS-CoV-2 for antiviral research[J]. Antiviral Res, 2023, 210: 105486.
- [21] Torii S, Ono C, Suzuki R, et al. Establishment of a reverse genetics system for SARS-CoV-2 using circular polymerase extension reaction [J]. Cell Rep, 2021, 35(3): 109014.
- [22] Fang P, Zhang H, Sun H, et al. Construction, Characterization and Application of Recombinant Porcine Deltacoronavirus Expressing Nanoluciferase[J]. Viruses, 2021, 13(10): 1991.
- [23] Kouprina N, Larionov V. Selective isolation of genomic loci from complex genomes by transformation-associated recombination cloning in the yeast Saccharomyces cerevisiae[J]. Nat Protoc, 2008, 3 (3): 371-377.
- [24] Kouprina N, Larionov V. TAR cloning: insights into gene function, long-range haplotypes and genome structure and evolution [J]. Nat Rev Genet, 2006, 7(10): 805-812.
- [25] Kouprina N, Noskov VN, Larionov V. Selective isolation of large segments from individual microbial genomes and environmental

DNA samples using transformation-associated recombination cloning in yeast[J]. Nat Protoc, 2020, 15(3): 734-749.

- [26] Kouprina N, Kim JH, Larionov V. Highly Selective, CRISPR/Cas9-Mediated Isolation of Genes and Genomic Loci from Complex Genomes by TAR Cloning in Yeast[J]. Curr Protoc, 2021, 1 (8): e207.
- [27] St-Jean JR, Desforges M, Almazán F, et al. Recovery of a neurovirulent human coronavirus OC43 from an infectious cDNA clone[J]. J Virol, 2006, 80(7): 3670-3674.
- [28] 杨扬. HCoV-OC43 感染性克隆的改建与病毒拯救 [D]. 中国疾病 预防控制中心, 2012.
- [29] Hou YJ, Okuda K, Edwards CE, et al. SARS-CoV-2 Reverse Genetics Reveals a Variable Infection Gradient in the Respiratory Tract[J]. Cell, 2020, 182(2): 429-446.e414.
- [30] Nikiforuk AM, Leung A, Cook BWM, et al. Rapid one-step construction of a Middle East Respiratory Syndrome (MERS-CoV) infectious clone system by homologous recombination [J]. J Virol Methods, 2016, 236: 178-183.
- [31] Kim M, Cho H, Lee SH, et al. An infectious cDNA clone of a growth attenuated Korean isolate of MERS coronavirus KNIH002 in clade B [J]. Emerg Microbes Infect, 2020, 9(1): 2714-2726.
- [32] Xing N, Wang Z, Wang J, et al. Engineering and Characterization of Avian Coronavirus Mutants Expressing Fluorescent Reporter Proteins from the Replicase Gene[J]. J Virol, 2022, 96(14): e0065322.
- [33] Ujike M, Etoh Y, Urushiyama N, et al. Reverse Genetics with a Full-Length Infectious cDNA Clone of Bovine Torovirus [J]. J Virol, 2022, 96(3): e0156121.
- [34] Ye C, Chiem K, Park JG, et al. Rescue of SARS-CoV-2 from a Single Bacterial Artificial Chromosome[J]. mBio, 2020, 11(5): e02168-20.
- [35] Thi Nhu Thao T, Labroussaa F, Ebert N, et al. Rapid reconstruction of SARS-CoV-2 using a synthetic genomics platform [J]. Nature, 2020, 582(7813): 561-565.
- [36] Wang B, Zhang C, Lei X, et al. Construction of Non-infectious SARS-CoV-2 Replicons and Their Application in Drug Evaluation[J]. Virol Sin, 2021, 36(5): 890-900.