



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1829796 B

(45) 授权公告日 2010.05.26

(21) 申请号 200380101146.5

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2003.10.09

*C12N 15/40* (2006.01)

(30) 优先权数据

10-2002-0061589 2002.10.09 KR

(56) 对比文件

(85) PCT申请进入国家阶段日

2005.04.08

WO 9963095 A1, 1999.12.09, 全文.

Ni Het al. U15763. NCBI. 1995, 1-5.

Ni Het al. U14163. NCBI. 1994, 1-6.

(86) PCT申请的申请数据

PCT/KR2003/002081 2003.10.09

Shihyun Y. et al. A Novel in

Vitro Replication System for Dengue

Virus. J. Biological Chemistry 274

47. 1999, 274(47), 33714-33722.

(87) PCT申请的公布数据

W02004/033690 EN 2004.04.22

审查员 丁慧萍

(73) 专利权人 CID 株式会社

地址 韩国京畿道

专利权人 李承翰

(72) 发明人 李荣敏 尹常妊 李承翰

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任  
公司 11021

代理人 程金山

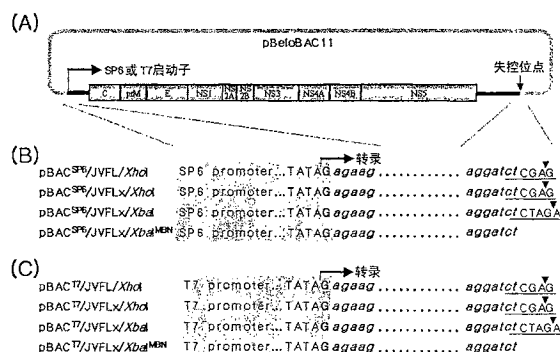
权利要求书 2 页 说明书 37 页 附图 13 页

## (54) 发明名称

新的日本脑炎病毒的全长基因组 RNA、来自它的  
感染性的 JEV cDNA 及其应用

## (57) 摘要

本发明涉及新的日本脑炎病毒 (JEV) 的基因组 RNA 和来自它的感染性的 JEV cDNA。更具体地, 本发明涉及由 SEQ. ID. No 15 表示的 JEV 的全长基因组 RNA 和来自它的感染性的 JEV cDNA。本发明的 JEV 基因组 RNA 和感染性的 JEV cDNA 不但可以用于鉴别 JEV 基因, 而且可以用于分子生物学研究, 包括 JEV 复制、转录和翻译。而且, 它们还可以用于开发日本脑炎的治疗剂、疫苗、诊断剂和诊断装置, 还可以用作多种外源基因的表达载体。



1. 一种载体,其包括遗传稳定的日本脑炎病毒的全长感染性的 cDNA 克隆,其中将日本脑炎病毒的全长 cDNA 克隆到 BAC 质粒中以获得所述载体。

2. 如权利要求 1 所述的载体,其中所述的 cDNA 克隆含有在对应于日本脑炎病毒基因组 RNA 的 DNA 序列的 5' 端起始处的启动子和在所述 DNA 序列的 3' 端的作为失控位点的限制内切酶识别序列。

3. 如权利要求 2 所述的载体,其中所述的启动子是 SP6 或 T7。

4. 如权利要求 2 所述的载体,其中所述的限制内切酶识别序列来自不同于日本脑炎病毒基因组 RNA 的来源。

5. 如权利要求 2 所述的载体,其中所述的限制内切酶识别序列是 Xho I 或 Xba I。

6. 如权利要求 2 所述的载体,其中所述的 cDNA 克隆选自由 SEQ. ID. No 43、No 44 和 No 45 表示的全部具有 SP6 启动子的序列,和 SEQ. ID. No 46、No 47 和 No 48 表示的全部具有 T7 启动子的序列组成的组。

7. 如权利要求 1 所述的载体,其中所述 BAC 质粒是 pBe1oBAC11。

8. 如权利要求 2 所述的载体,其中所述日本脑炎病毒基因组 RNA 由 5' 非翻译区域、单独的多肽编码区和 3' 非翻译区域组成。

9. 如权利要求 8 所述的载体,其中所述的日本脑炎病毒基因组 RNA 来源于韩国日本脑炎病毒并且核苷酸序列如 SEQ. ID. No. 15 所示。

10. 如权利要求 1 所述的载体,其中所述的载体选自由下述组成的组:含有由 SEQ. ID. No 43 表示的日本脑炎病毒 cDNA 的 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFL/XhoI,含有由 SEQ. ID. No 44 表示的日本脑炎病毒 cDNA 的 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XhoI,含有由 SEQ. ID. No 45 表示的日本脑炎病毒 cDNA 的 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XbaI,含有由 SEQ. ID. No 46 表示的日本脑炎病毒 cDNA 的 pBAC<sup>T7</sup>/JVFL/XhoI,含有由 SEQ. ID. No 47 表示的日本脑炎病毒 cDNA 的 pBAC<sup>T7</sup>/JVFLx/XhoI,和含有由 SEQ. ID. No 48 表示的日本脑炎病毒 cDNA 的 pBAC<sup>T7</sup>/JVFLx/XbaI。

11. 如权利要求 10 所述的载体,其中所述的载体是具有 T7 启动子的 pBAC<sup>T7</sup>/JVFL/XhoI,其保藏号为 KCTC 10346BP。

12. 如权利要求 10 所述的载体,其中所述的载体是具有 SP6 启动子的 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XbaI,其保藏号为 KCTC 10347BP。

13. 从权利要求 1 所述的载体合成的感染性的全长日本脑炎病毒 RNA 转录物。

14. 如权利要求 13 所述的感染性的全长日本脑炎病毒 RNA 转录物,其中除去了所述 RNA 在其 3' 端的与病毒无关的核苷酸。

15. 如权利要求 14 所述的感染性的全长日本脑炎病毒 RNA 转录物,其中通过用绿豆核酶处理除去了与病毒无关的核苷酸。

16. 一种细胞,其转染了如权利要求 13 所述的全长日本脑炎病毒 RNA 转录物。

17. 一种表达外源基因的方法,其包括下述步骤:

1) 通过将外源基因插入到权利要求 1 的载体中,制备重组日本脑炎病毒 cDNA 表达载体;

2) 从上述的重组日本脑炎病毒 cDNA 表达载体生产日本脑炎病毒 RNA 转录物;

3) 制备转染了上述日本脑炎病毒 RNA 转录物的细胞;

4) 通过培养上述细胞表达外源蛋白。

18. 如权利要求 17 所述的方法,其中所述的外源基因插入在日本脑炎病毒 cDNA 的日本脑炎病毒 3' 非翻译区域的起点。

## 新的日本脑炎病毒的全长基因组 RNA、来自它的感染性的 JEV cDNA 及其应用

### 发明领域

[0001] 本发明涉及可靠的日本脑炎病毒 (JEV) 基因组 RNA 序列的测定、感染性的 JEV cDNA 克隆的构建、和该克隆或其衍生物在治疗、疫苗和诊断应用目的中的利用。另外,本发明还涉及 JEV 载体,例如用于异源基因的表达系统、遗传免疫和瞬时基因治疗。

### [0002] 背景

[0003] JEV 是黄病毒科 (Flaviviridae) 家族的成员,通过蚊子传播。它是一种重要的人病原体,会造成永久性的神经精神后遗症和甚至致命疾病,特别是在儿童中 (Tsai, Vaccine, 2000, 18 (Suppl. 2), 1-25; Solomon, Neurological Infections and Epidemiology, 1997, 2, 191-199; Umenai 等, Bull. W. H. O., 1985, 63, 625-631)。每年报道高达 50,000 个病例,其死亡率约 25%,约半数存活者表现出永久性的神经精神后遗症 (Vaughn 和 Hoke, Epidemiol. Rev., 1992, 14, 197-221; Burke 和 Leake, Japanese encephalitis, 1988, 63-92, CRC Press Publisher)。JEV 主要分布在亚洲,从前苏联至印度。但是,近年来,已经在南半球发现了该病毒的传播,这表明该病毒会威胁全世界的公众健康 (Hanna, 等, Med. J. Aust., 1999, 170, 533-536; Hanna, 等, Med. J. Aust., 1996, 165, 256-260; Mackenzie 等, Arch. Virol., 1994, 136, 447-467)。

[0004] JEV 是小的有包膜病毒,具有长约 11kb 的单链有义 RNA 基因组。基因组含有一个由 5' 和 3' 非翻译区 (NTR) 连接的长开放阅读框架 (ORF),它们是用于病毒复制的重要顺式作用元件。JEV 的 RNA 基因组在其 5'-端具有 I 型帽结构,但是在其 3' 端没有 poly(A) 尾巴。ORF 被翻译成较大的多蛋白,它在共翻译或翻译后被加工成 3 个结构性的和 7 个非结构性的蛋白,它们的在基因组中的基因如下: C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5 (Lindenbach 和 Rice, Flaviviridae: The viruses and their replication, 2001, 991-1041, Lippincott Williams & Wilkins Publishers; Venugopal 和 Gould, Vaccine, 1994, 12, 966-975; Chamber 等, Ann. Rev. Microbiol., 1990, 44, 649-688)。其它信息 (例如,大多数 JEV 基因产物的功能和参与 JEV 复制的分子机制、神经毒力和发病机理) 非常有限,因为没有可靠的反向遗传系统。

[0005] 反向遗传系统的进展已经显著地促进了关于有义 RNA 病毒的研究。在这里,构建了所述病毒基因组的感染性 cDNA 克隆,并将其用作能生成合成病毒的感染性的 RNA 的合成模板。有两种用于反向遗传系统的方案,使用 RNA 的方案和使用 DNA 的方案。在典型的“使用 RNA 的”方案中,用从感染性的 cDNA 克隆制备出的 RNA 转录物转染细胞,然后从这些细胞中回收合成的病毒 (Satyanarayana 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999, 96, 7433-7438; van Dinten 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997, 94, 991-996; Liljestrom 和 Garoff, Biotechnology, 1991, 9, 1356-1361; Rice 等, New Biol., 1989, 1, 285-296; Rice 等, J. Virol., 1987, 61, 3809-3819)。在备选的“使用 DNA 的”方案中,通过将感染性的 cDNA 克隆直接转染进易感细胞中,生成合成的病毒。该方案首次报道用于脊髓灰质炎病毒 (Racaniello 和 Baltimore, Science, 1981, 214, 916-919), 并且已经用于甲病毒

(Schlesinger 和 Dubensky, Curr. Opin. Biotechnol., 1999, 10, 434-439)。

[0006] 这两个方案已用于构建许多有义 RNA 病毒家族的感染性的 cDNA 克隆, 包括冠形病毒, 它具有最大的 RNA 基因组 (Almazan 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, 97, 5516-5521)。这些克隆对于解决许多关于有义 RNA 病毒的问题是无价的。但是, JEV 的全长感染性的 cDNA 克隆的构建受到了阻碍, 主要是因为克隆的 cDNA 的遗传不稳定性。尽管作了大量努力, 仍然没有得到遗传稳定的 JEV 的全长感染性的 cDNA 分子克隆 (Mishin 等, Virus Res., 2001, 81, 113-123; Zhang 等, J. Virol. Methods, 2001, 96, 171-182; Sumiyoshi 等, J. Infect. Dis., 1995, 171, 1144-1151; Sumiyoshi 等, J. Virol., 1992, 66, 5425-5431)。

[0007] 因而, 本发明人已经公开了 JEV 株 CNU/LP2 (从一群韩国传播蚊子 (circulating mosquitoes) 分离出) 的完整的全长核苷酸序列。基于该序列, 本发明人还已经通过合成全长感染性的 JEV cDNA 分子克隆开发了方便可靠的用于 JEV 的反向遗传系统。基于本发明的新的感染性的 JEV cDNA 的反向遗传系统可以有效地用于研究 JEV 基因产物的功能和与 JEV 的复制、神经毒力和发病机理相关的其它分子生物学机制。而且, 本发明人已经通过确认感染性的 JEV cDNA 能以多种方式有效地作用于表达异源基因的载体完成了本发明。

[0008] 优选实施方案的详细描述

[0009] 本发明的一个目的是提供可靠的 JEV 基因组 RNA 序列、来自它的感染性的 JEV cDNA 克隆、和该克隆或其衍生物在新的基因表达载体中的应用。

[0010] 为了实现上述目的,

[0011] 1) 本发明提供了可靠的 JEV 基因组 RNA 序列。

[0012] 2) 本发明提供了感染性的 JEV cDNA 克隆, 它能生成可自我复制的 JEV RNA 转录物。

[0013] 3) 本发明提供了基于 JEV 的载体。

[0014] 4) 本发明提供了从上述基于 JEV 的载体合成的可自我复制的 RNA 转录物。

[0015] 5) 本发明提供了重组的 JEV 病毒, 它获自用从基于 JEV 的载体合成的合成 RNA 转录物转染的细胞。

[0016] 6) 本发明提供了基于 JEV 的表达载体。

[0017] 7) 本发明提供了多种使用基于 JEV 的表达载体表达异源基因的策略。

[0018] 下文中本发明的其它特征将是明显的。

[0019] I. 本发明提供了可靠的 JEV 基因组 RNA 序列。

[0020] 本发明的韩国分离物 JEV 基因组 RNA 由 5' 非翻译区 (NTR)、多肽编码区和 3' NTR 组成。具体地, 全长 RNA 基因组的长度为 10,968bp, 由 95bp 的 5' NTR、随后的 10,299bp 的单个开放阅读框架和末端的 574bp 的 3' NTR 组成。

[0021] 根据本发明的优选实施方案, JEV 的新型基因组 RNA 具有 SEQ. ID. No15. 所示的序列。本发明的新型基因组 RNA 还包括与 SEQ. ID. No 15. 所示的 JEV 基因组 RNA 具有 98% 同源性的任何序列。

[0022] 本发明的韩国分离物 JEV 是通过利用噬斑 - 纯化技术从韩国 JEV 株 K87P39 分离和纯化的, 并命名为“JEV CNU/LP2”(见图 1)。

[0023] 为了检测 CNU/LP2 (韩国分离物 JEV) 的完整核苷酸序列, 本发明人使用长反转录 - 聚合酶链式反应 (RT-PCR) 扩增了缺少 5' 和 3' 端的完整病毒 RNA 基因组, 并且产生

了 3 种重叠的 cDNA 产物,表示为 JVF(核苷酸(nt)1-3865)、JVM(nt 3266-8170)和 JVR(nt 7565-10893)(长度分别为约 3.9、4.9 和 3.3kb)(见图 2A)。

[0024] 将合成的寡核苷酸 T 连接到它上面后,分析了 CNU/LP2 病毒 RNA 的 3'-末端序列。寡核苷酸 T 作为 cDNA 合成和 PCR 扩增的特异性引发位点(见图 2B)。琼脂糖凝胶电泳表明,扩增产物形成 2 条带:约 700bp 的较大条带和约 450bp 的较小条带(见图 2C)。纯化并克隆两条带,对 20 和 10 个随机选取的含有较大和较小条带的克隆分别进行测序。正如大多数完整测序的 JEV 分离物已经记载的,本发明人发现,具有较大插入物(约 700bp)的所有克隆都用 -GATCT<sup>10968</sup> 作为病毒基因组的末端。相反地,具有较小插入物(约 450bp)的所有克隆表现出在 nt 10,684 处被截断的病毒基因组,它生成的更短 284bp 的条带。在装配全长 JEV cDNA 的过程中,本发明人使用了较大插入物的核苷酸序列,因为较小的插入物在病毒基因组的 3' 端不含有 284 个核苷酸。

[0025] 通过用烟酸焦磷酸酶孵育除去其 5' 端的帽结构后,检查 CNU/LP2 病毒 RNA 的 5'-末端序列。然后让得到的病毒 RNA 自连接,对 3'-5' 连接进行 cDNA 合成和 PCR 扩增,使用互补于临近病毒 3' 端(nt 10259-nt 10276)的序列的有义引物和与临近病毒 5' 端(nt 164-nt 181)的序列相对应的反义引物用于 RT-PCR(见图 2D)。琼脂糖凝胶电泳表明,扩增产物是约 850bp 的单独条带(见图 2E)。克隆扩增子,对 12 个随机选取的克隆进行测序。在所有的 12 个克隆中,病毒 3'-末端序列的 -GATCT<sup>10968</sup> 后面是 5'-末端序列<sup>1</sup>AGAAGT-(见图 2B 和 2C)。

[0026] 因此,本发明人已经确定了 SEQ. ID. No 15 所示的 JEV CNU/LP2 分离物的完整核苷酸序列。JEV CNU/LP2 的全长 RNA 基因组的长度是 10,968bp,由 95bp 的 5' NTR、随后的 10,299bp 的单个开放阅读框架和末端的 574bp 的 3' NTR 组成。本发明人对比了 CNU/LP2 分离物的完整核苷酸序列和所有可从 GenBank 数据库得到的 26 个 JEV 株(Ishikawa, K94P05, FU, CH2195LA, CH2195SA, RP-2ms, RP-9, CH1392, T1P1, YL, JaGAR01, HVI, TC, TL, Beijing-1, Ling, Vellore P20778, p3, SA14-14-2, SA(A), SA14-12-1-7, SA14-2-8, SA14, SA(V), GP78 和 JaOArS982)的序列。下面简单地说明了关于用于对比的病毒株的分离地点、分离年度、来源和 GenBank 保藏号的信息(见表 1)。

[0027] 表 1

[0028]

| 地理位置 | 年度   | 株                 | 来源            | GenBank 保藏号 |
|------|------|-------------------|---------------|-------------|
| 澳大利亚 | 1995 | FU                | 人血清           | AF217620    |
| 中国   | 1954 | SA14              | 蚊子            | U14163      |
|      |      | SA14-14-2         | SA14 衍生物      | AF315119    |
|      |      | SA14-12-1-7       | SA14 衍生物      | AF416457    |
|      |      | SA14-2-8          | SA14 衍生物      | U15763      |
|      |      | SA(V)             | SA14 衍生物      | D90194      |
|      |      | SA(A)             | SA14-14-2 衍生物 | D90195      |
|      | 1949 | 北京-1              | 人脑            | L48961      |
| 印度   | 1949 | p3                | 蚊子            | U47032      |
|      | 1978 | GP78              | 人脑            | AF075723    |
| 日本   | 1958 | Vellore<br>P20778 | 人脑            | AF080251    |
|      | 1982 | JaOArS982         | 蚊子            | M18370      |
| 韩国   | IU   | Ishikawa          | IU            | AB051292    |
|      | 1959 | JaGAr01           | 蚊子            | AF069076    |
| 台湾   | 1994 | K94P05            | 蚊子            | AF045551    |
|      | 1987 | CNU/LP2           | 蚊子            | 本发明         |
|      | 1997 | T1P1              | 蚊子            | AF254453    |

[0029]

|      |          |            |          |
|------|----------|------------|----------|
| 1994 | CH2195LA | CH2195 衍生物 | AF221499 |
| 1994 | CH2195SA | CH2195 衍生物 | AF221500 |
| 1990 | CH1392   | 蚊子         | AF254452 |
| 1985 | RP-2ms   | 蚊子         | AF014160 |
| 1985 | RP-9     | 蚊子         | AF014161 |
| 1965 | Ling     | 人脑         | L78128   |
| IU   | YL       | IU         | AF486638 |
| IU   | TC       | 蚊子         | AF098736 |
| IU   | TL       | 蚊子         | AF098737 |
| IU   | HVI      | 蚊子         | AF098735 |

[0030] IU:信息不明

[0031] 通过对比 CNU/LP2 分离物的核苷酸序列与其它 JEV 株的核苷酸序列,证实了 JEV 分离物 CNU/LP2 基因组与这些其它基因组具有不同程度的序列相似度 [89.0 % (Ishikawa), 89.1 % (K94P05), 89.3 % (FU), 95.8 % (CH2195LA), 95.9 % (CH2195SA), 97.1 % (RP-2ms), 97.2 % (RP-9), 97.3 % (CH1392), 97.3 % (T1P1), 97.0 % (YL), 97.4 % (JaGAr01), 97.1 % (HVI), 96.9 % (TC), 96.7 % (TL), 96.4 % (北京 -1), 96.3 % (Ling), 96.0 % (VelloreP20778), 97.1 % (p3), 97.4 % (SA14-14-2), 97.5 % (SA(A)), 97.5 % (SA14-12-1-7), 97.7 % (SA14-2-8), 97.9 % (SA14), 97.9 % (SA(V)), 96.3 % (GP78) 和 97.1 % (Ja0ArS982)] (见表 2)。因此,本发明的权利要求类别中可以包括与 SEQ. ID. NO 15 所示的本发明的核苷酸序列具有超过 98% 序列相似度的 JEV 病毒基因组 RNA 的核苷酸序列。

[0032] 表 2

[0033]

| Isolate       | % sequence identity <sup>a</sup> |        |      |          |          |        |      |        |      |      |         |      |      |      |           |      |               |      |           |       |             |          |      |             |             |             |           |      |      |
|---------------|----------------------------------|--------|------|----------|----------|--------|------|--------|------|------|---------|------|------|------|-----------|------|---------------|------|-----------|-------|-------------|----------|------|-------------|-------------|-------------|-----------|------|------|
|               | Ishikawa                         | K94P05 | FU   | CH2195LA | CH2195SA | RP-2ms | RP-9 | CH1392 | T1P1 | YL   | Ju6Ar01 | HV   | TC   | TL   | Beijing-1 | Ling | Yellow P20778 | p3   | SA14-14-2 | SA(A) | SA14-12-1-7 | SA14-2-8 | SA14 | SA(V)       | CNU/LP2     | GP78        | Ju6ArS962 | WNV  |      |
| Ishikawa      | 97.0                             | 90.1   | 88.3 | 88.3     | 88.9     | 89.0   | 89.1 | 89.1   | 88.9 | 89.2 | 89.0    | 88.8 | 88.8 | 88.9 | 88.8      | 88.8 | 88.8          | 89.1 | 88.8      | 88.9  | 88.8        | 89.1     | 89.2 | 89.2        | 89.3        | 89.5        | 89.5      | 89.4 | 89.0 |
| K94P05        | 97.7                             |        | 89.6 | 88.5     | 88.5     | 89.2   | 89.3 | 89.4   | 89.4 | 88.1 | 88.5    | 89.2 | 89.1 | 89.0 | 89.0      | 89.0 | 89.0          | 89.4 | 89.1      | 89.2  | 89.2        | 89.3     | 89.5 | 89.5        | <b>89.4</b> | 89.0        | 89.5      | 88.7 |      |
| FU            | 97.7                             | 97.0   |      | 88.9     | 88.9     | 89.3   | 89.4 | 89.4   | 88.4 | 89.2 | 89.6    | 89.4 | 89.2 | 89.1 | 89.3      | 89.0 | 89.1          | 89.4 | 89.1      | 89.2  | 89.2        | 89.3     | 89.5 | 89.5        | <b>89.3</b> | 88.7        | 89.4      | 89.5 |      |
| CH2195LA      | 97.7                             | 97.0   | 99.9 |          | 99.9     | 96.2   | 96.3 | 96.3   | 96.3 | 96.1 | 96.5    | 96.2 | 95.9 | 95.8 | 95.6      | 95.7 | 95.1          | 96.3 | 95.6      | 96.7  | 96.7        | 96.8     | 97.1 | 97.1        | <b>95.8</b> | 95.7        | 97.3      | 89.4 |      |
| CH2195SA      | 97.1                             | 96.5   | 99.0 | 99.0     |          | 96.3   | 96.3 | 96.3   | 96.3 | 96.1 | 96.5    | 96.2 | 95.9 | 95.8 | 95.6      | 95.7 | 95.1          | 96.3 | 95.6      | 96.7  | 96.7        | 96.8     | 97.1 | 97.1        | <b>95.9</b> | 95.7        | 97.3      | 89.5 |      |
| RP-2ms        | 97.5                             | 96.8   | 99.4 | 99.4     | 98.8     |        | 99.9 | 99.5   | 99.5 | 99.3 | 99.4    | 99.8 | 98.2 | 98.1 | 97.2      | 97.1 | 96.5          | 97.8 | 98.0      | 98.1  | 98.1        | 98.3     | 98.5 | 98.5        | <b>97.1</b> | 96.9        | 97.7      | 89.4 |      |
| RP-9          | 97.6                             | 96.9   | 99.5 | 99.5     | 98.9     | 99.7   |      | 99.6   | 99.5 | 99.3 | 99.5    | 99.8 | 98.2 | 98.2 | 97.2      | 97.2 | 96.7          | 98.0 | 98.1      | 98.1  | 98.1        | 98.3     | 98.5 | 98.5        | <b>97.2</b> | 96.9        | 97.8      | 89.4 |      |
| CH1392        | 97.8                             | 97.2   | 99.7 | 99.7     | 99.1     | 99.6   | 99.7 |        | 99.9 | 99.5 | 99.7    | 99.0 | 98.3 | 98.3 | 97.3      | 97.3 | 96.8          | 98.2 | 98.2      | 98.3  | 98.3        | 98.4     | 98.6 | 98.7        | <b>97.3</b> | 97.0        | 97.9      | 89.4 |      |
| T1P1          | 97.5                             | 96.8   | 99.3 | 99.3     | 98.7     | 99.1   | 99.2 | 99.4   |      | 99.5 | 99.7    | 99.0 | 98.3 | 98.3 | 97.3      | 97.3 | 96.8          | 98.1 | 98.2      | 98.2  | 98.3        | 98.4     | 98.6 | 98.6        | <b>97.3</b> | 97.0        | 97.8      | 89.4 |      |
| YL            | 97.4                             | 96.7   | 99.2 | 99.2     | 98.7     | 99.1   | 99.2 | 99.4   | 99.0 |      | 99.4    | 99.8 | 98.1 | 98.0 | 97.1      | 97.1 | 96.5          | 97.9 | 98.0      | 98.0  | 98.0        | 98.2     | 98.4 | 98.4        | <b>97.0</b> | 96.8        | 97.6      | 89.2 |      |
| Ju6Ar01       | 97.1                             | 96.4   | 98.8 | 98.8     | 98.2     | 98.7   | 98.8 | 99.1   | 96.6 | 98.7 |         | 99.1 | 98.4 | 98.4 | 97.4      | 97.4 | 96.8          | 98.3 | 98.3      | 98.4  | 98.4        | 98.5     | 98.8 | 98.8        | <b>97.4</b> | 97.1        | 98.0      | 89.5 |      |
| HV            | 97.2                             | 96.5   | 98.8 | 98.8     | 98.3     | 98.8   | 98.9 | 99.1   | 96.7 | 98.8 | 98.7    |      | 98.6 | 98.4 | 97.2      | 97.2 | 96.7          | 98.1 | 98.1      | 98.1  | 98.1        | 98.3     | 98.5 | 98.5        | <b>97.1</b> | 96.9        | 97.7      | 89.4 |      |
| TC            | 97.0                             | 96.4   | 98.8 | 98.8     | 98.2     | 98.7   | 98.8 | 99.0   | 98.6 | 98.5 | 98.2    | 98.4 |      | 99.0 | 97.2      | 97.1 | 96.4          | 97.7 | 97.8      | 97.9  | 97.9        | 98.1     | 98.3 | 98.3        | <b>96.9</b> | 96.7        | 97.4      | 89.5 |      |
| TL            | 97.2                             | 96.6   | 99.0 | 99.0     | 98.4     | 98.9   | 98.9 | 99.2   | 98.8 | 98.7 | 98.4    | 98.5 | 99.7 |      | 97.0      | 96.8 | 96.1          | 97.5 | 97.6      | 97.7  | 97.7        | 97.9     | 98.1 | 98.1        | <b>96.7</b> | 96.5        | 97.2      | 89.3 |      |
| Beijing-1     | 97.3                             | 96.6   | 99.0 | 99.0     | 98.5     | 98.9   | 99.0 | 99.2   | 98.8 | 98.7 | 98.4    | 98.6 | 99.2 | 99.3 |           | 99.1 | 96.7          | 97.4 | 97.2      | 97.2  | 97.3        | 97.5     | 97.6 | 97.6        | <b>96.4</b> | 96.1        | 97.0      | 89.5 |      |
| Ling          | 97.4                             | 96.7   | 99.1 | 99.1     | 98.6     | 99.0   | 99.1 | 99.3   | 98.9 | 98.9 | 98.6    | 98.5 | 99.7 | 99.0 | 99.2      |      | 96.7          | 97.3 | 97.1      | 97.2  | 97.2        | 97.4     | 97.6 | <b>96.3</b> | 96.2        | 97.2        | 89.5      |      |      |
| Yellow P20778 | 97.7                             | 97.1   | 99.5 | 99.5     | 98.9     | 99.4   | 99.5 | 99.7   | 99.3 | 99.2 | 99.9    | 99.1 | 99.1 | 99.2 | 99.3      | 99.4 |               | 96.8 | 96.6      | 96.7  | 96.7        | 96.9     | 97.1 | 97.1        | <b>96.0</b> | 95.6        | 96.4      | 89.5 |      |
| p3            | 97.6                             | 97.1   | 99.5 | 99.5     | 98.9     | 99.4   | 99.5 | 99.7   | 99.4 | 99.3 | 99.0    | 99.2 | 99.0 | 99.2 | 99.2      | 99.5 | 99.8          |      | 96.2      | 96.3  | 96.3        | 96.5     | 96.7 | 96.7        | <b>97.1</b> | 97.1        | 97.8      | 89.5 |      |
| SA14-14-2     | 97.9                             | 97.1   | 99.5 | 99.5     | 98.9     | 99.3   | 99.4 | 99.7   | 99.2 | 99.2 | 99.9    | 99.0 | 98.8 | 99.0 | 99.1      | 99.2 | 99.6          | 99.6 |           | 99.8  | 99.6        | 99.4     | 99.4 | 99.4        | <b>97.4</b> | 97.3        | 98.1      | 89.4 |      |
| SA(A)         | 97.1                             | 96.6   | 98.8 | 98.8     | 98.2     | 98.7   | 98.8 | 99.0   | 98.6 | 98.5 | 98.2    | 98.3 | 98.1 | 98.3 | 98.4      | 98.5 | 98.9          | 98.9 | 98.9      |       | 99.6        | 98.4     | 99.4 | 99.4        | <b>97.6</b> | 97.4        | 98.2      | 89.4 |      |
| SA14-12-1-7   | 97.2                             | 96.6   | 98.9 | 98.9     | 98.3     | 98.7   | 98.9 | 99.1   | 98.7 | 98.6 | 98.3    | 98.4 | 98.2 | 98.4 | 98.5      | 98.6 | 99.0          | 99.0 | 98.9      | 99.7  |             | 99.4     | 99.5 | 99.5        | <b>97.5</b> | 97.4        | 98.2      | 89.4 |      |
| SA14-2-8      | 97.7                             | 97.3   | 99.4 | 99.4     | 98.8     | 99.3   | 99.4 | 99.6   | 99.2 | 99.2 | 99.8    | 99.9 | 98.8 | 99.9 | 99.0      | 99.2 | 99.5          | 99.6 | 99.5      | 99.1  | 99.2        |          | 99.6 | 99.6        | <b>97.7</b> | 97.6        | 98.3      | 89.5 |      |
| SA14          | 97.5                             | 96.7   | 99.0 | 99.0     | 98.4     | 98.9   | 99.0 | 99.2   | 98.9 | 98.6 | 98.5    | 98.7 | 98.4 | 98.5 | 98.6      | 98.7 | 99.1          | 99.2 | 99.2      | 98.5  | 98.5        | 99.2     |      | 99.9        | <b>97.9</b> | 97.8        | 98.6      | 89.6 |      |
| SA(V)         | 97.3                             | 96.6   | 98.9 | 98.9     | 98.3     | 98.7   | 98.8 | 99.1   | 98.7 | 98.6 | 98.4    | 98.5 | 98.2 | 98.4 | 98.5      | 98.6 | 98.9          | 99.0 | 99.0      | 98.3  | 98.4        | 99.0     | 99.5 |             | <b>97.9</b> | 97.8        | 98.6      | 89.6 |      |
| CNU/LP2       | 97.4                             | 96.7   | 98.9 | 98.9     | 98.2     | 98.7   | 98.8 | 99.1   | 98.6 | 98.6 | 98.2    | 98.4 | 98.2 | 98.4 | 98.5      | 98.6 | 98.9          | 99.0 | 99.0      | 98.4  | 98.4        | 99.0     | 99.6 | 98.5        |             | <b>96.3</b> | 97.1      | 89.5 |      |
| GP78          | 97.0                             | 96.4   | 96.6 | 96.6     | 96.0     | 96.5   | 96.6 | 96.6   | 96.5 | 96.4 | 96.0    | 96.1 | 96.0 | 96.2 | 96.3      | 96.3 | 96.8          | 96.7 | 96.7      | 96.7  | 96.8        | 96.7     | 96.2 | 96.2        | <b>98.2</b> |             | 97.2      | 89.6 |      |
| Ju6ArS962     | 97.6                             | 96.8   | 97.8 | 97.8     | 97.2     | 97.7   | 97.8 | 98.0   | 97.6 | 97.6 | 97.2    | 97.3 | 97.1 | 97.3 | 97.4      | 97.5 | 97.9          | 97.9 | 98.0      | 97.3  | 97.4        | 97.9     | 97.6 | 97.4        | <b>97.5</b> | 97.1        |           | 89.6 |      |
| WNV           | 76.2                             | 75.8   | 76.6 | 76.6     | 76.1     | 76.4   | 76.5 | 76.7   | 76.5 | 76.5 | 76.3    | 76.4 | 76.1 | 76.2 | 76.3      | 76.4 | 76.6          | 76.6 | 76.8      | 76.8  | 76.2        | 76.3     | 76.7 | 76.6        | 76.6        | <b>76.4</b> | 76.5      | 76.7 |      |

[0034] <sup>a</sup> 完整基因组的核苷酸序列同一性的百分比在右上角。完整基因组的氨基酸序列同一性的百分比在左下角。CNU/LP2 序列同一性的百分比表示为粗体字。

[0035] 除了检测 JEV 的多肽编码区的核苷酸序列以外,还利用分子生物学方法检测了 5' 和 3'NTR 的核苷酸序列,包括参与调节病毒的复制、转录和翻译的顺式作用元件。这两个区域的重要性已经得到了一些早期研究文献的支持,即体外地 (You 和 Padmanabhan, J. Biol. Chem. , 1999, 274, 33714-33722) 和体内地 (Khromykh 等, J. Virol. , 2001, 75, 6719-6728) 启动黄病毒 RNA 的复制需要 5'-和 3'-末端区域。尤其是,高度预期<sup>1</sup>AGAAGT-和 -GATCT<sup>10968</sup> (证实了是在本发明中 JEV CNU/LP2 的 5'-和 3'-末端区域的核苷酸序列) 在病毒的自我复制中起重要作用。

[0036] 本发明人通过下文所述的实验证实了,用具有 JEV 的全长核苷酸序列的合成的 RNA 转录物转染细胞时能生成感染性的合成 JEV,而且,发明人首次证实了 JEV 自我复制所必需的完整全长核苷酸序列的功能。

[0037] II. 本发明提供了能生成可自我复制的 JEV RNA 转录物的感染性的 JEV cDNA 克隆。

[0038] 用 SEQ. ID. No 15 所示的核苷酸序列或与其具有超过 98%序列相似度的全长 JEV 基因组 RNA 的核苷酸序列合成了本发明的感染性的 JEVcDNA 克隆,并且用作通过体外转录合成可自我复制的 JEV RNA 转录物的模板。为了构建全长 JEV cDNA 克隆,通过 RT-PCR 扩增病毒基因组 RNA (包括 5'-和 3'-末端区域),随后顺序装配得到的重叠的 cDNA。

[0039] 为了通过体外失控转录 (runoff transcription) 反应生产全长的合成的 JEV RNA 转录物,使 SP6 或 T7 启动子转录起始位点位于 JEV 基因组 RNA 的 5'-端前面,使独特的限制内切酶识别位点位于病毒基因组的末端 (见图 3A)。在本发明的优选实施方案中,通过使用 3 个重叠的 JEV cDNA (JVF, JVM 和 JVR) 和 2 个另外的 cDNA 构建了 3 个 SP6-驱动的全长 JEV cDNA 和 3 个 T7-驱动的全长 JEV cDNA;一个对应着 5'-末端区域 (包括 SP6 或 T7 启

动子序列),其它的对应着 3'-末端区域(包括作为失控位点的 XhoI 和 Xba I 识别序列)(见图 3B 和 3C)。但是,也可以使用上述 2 种启动子以外的其它启动子,这是本领域普通技术人员的常识。本发明开发的全长 JEV cDNA 使用 Xho I 和 Xba I 作为失控位点,但是其它的限制酶可以如通常所知的那样使用。

[0040] 使用细菌人工染色体(BAC)质粒 pBe1oBAC11 作为载体,通过生产含有许多重叠的 cDNA 的亚克隆并随后将这些亚克隆连接到全长 JEV cDNA 中,构建了本发明的 JEV cDNA 克隆。

[0041] 在本发明的优选实施方案中,本发明的发明人提供了一组 3 种具有 SP6 启动子的 JEV cDNA 克隆,分别由 SEQ. ID. No 43、No 44 和 No 45 表示。另外,本发明的发明人还提供了其它组 3 种具有 T7 启动子的 JEVcDNA 克隆组,分别由 SEQ. ID. No 46、No 47 和 No 48 表示(见图 3B 和 3C)。为了保证病毒基因组的 3' 端在失控转录后是可靠的,在所有的实验中,本发明的发明人在病毒基因组的末端设置了独特的限制内切酶识别位点 Xho I 或 Xba I(见图 3B 和 3C)。

[0042] III. 本发明提供了基于 JEV 的载体。

[0043] 本发明的载体的特征在于包含全长的感染性的 JEV cDNA。在本发明的优选实施方案中,本发明的发明人提供了载体“pBAC<sup>SP6</sup>/JVFL/XhoI”、“pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XhoI”和“pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XbaI”,它们都具有 SP6 启动子,且分别由 SEQ. ID. No 43、No 44 和 No 45 表示,还提供了载体“pBAC<sup>T7</sup>/JVFL/XhoI”、“pBAC<sup>T7</sup>/JVFLx/XhoI”和“pBAC<sup>T7</sup>/JVFLx/XbaI”,它们都具有 T7 启动子,且分别由 SEQ. ID. No 46、No 47 和 No 48 表示。本发明的发明人于 2002 年 10 月 2 日将上面的两种最有效的载体 pBAC<sup>T7</sup>/JVFLx/XbaI 和 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XbaI 保藏在韩国生物科学和生物技术研究所以(Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology)(KRIBB)的基因库中(保藏号:KCTC 10346BP, KCTC 10347BP)。

[0044] IV. 本发明提供了从上述基于 JEV 的载体合成的可自我复制的 RNA 转录物。

[0045] 为了体外失控转录,通过用 Xho I 或 Xba I 酶切使 JEV cDNA 模板线性化,其在工程上用于在紧邻病毒基因组 3'-末端区域后的失控位点(run-off site)(见图 3)。两种 Xho I-线性化的质粒(pBAC<sup>SP6</sup>/JVFL/XhoI 和 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XhoI)在存在 m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')A 帽结构类似物的情况下的 SP6 聚合酶失控转录生成了带帽的合成的 RNA,在它们的 3' 端含有与病毒无关的序列的 3 个核苷酸(CGA)(见图 3B)。这是复制 Xho I 酶切剩下的 5' 突出物的结果。类似地, Xba I-线性化的 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XbaI 质粒在存在 m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')A 帽结构类似物的情况下的 SP6 聚合酶失控转录生成了带帽的合成的 RNA,在它们的 3' 端含有与病毒无关的序列的 4 个核苷酸(CTAG)(见图 3B)。

[0046] 本发明的发明人已经进行了侵染中心试验,以检测合成的 JEV RNA 转录物的特异感染性。结果,当用合成的 RNA 转录物转染易感的 BHK-21 细胞时,全部是高感染性的(3.4-4.3×10<sup>5</sup>PFU/μg)(见表 3)。从 T7 聚合酶失控转录的 T7-驱动的 cDNA 构建体转录的合成 RNA 得到了类似结果(2.9-3.8×10<sup>5</sup>PFU/μg)(见表 3)。

[0047] 已经报道,对于一些黄病毒,存在于从感染性的 cDNA 转录的合成 RNA 的 3' 端的与病毒无关的序列会减少或消除它们的特异感染性(Yamshchikov 等, Virology, 2001, 281, 294-304)。基于该报道,本发明的发明人生成了在它们的 3' 端缺少与病毒无关的序列的合成 RNA,并对比了它们的特异感染性。具体地,通过在转录反应之前用绿豆核酸酶(MBN)处

理 Xba I- 线性化的 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XbaI 质粒除去 4 个多余的核苷酸 CTAG, 本发明的发明人生成了缺少无关序列的合成 RNA。为了验证 MBN 活性, 使 Xba I- 线性化的和 MBN- 处理过的 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XbaI 质粒自连接, 对其病毒 3' 端测序, 证实去除了 4 个多余的核苷酸 CTAG。与未处理的转录物相比, 来自 Xba I- 线性化的和 MBN- 处理过的 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XbaI 和 pBAC<sup>T7</sup>/JVFLx/XbaI (pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XbaI<sup>MBN</sup> 见图 3B, pBAC<sup>T7</sup>/JVFLx/XbaI<sup>MBN</sup> 见图 3C) 的 RNA 转录物都具有增强的特异感染性。更准确地, 估计从 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XbaI<sup>MBN</sup> 转录的 RNA 的特异感染性为  $3.1 \times 10^6$  PFU/ $\mu$ g, 约是未修饰模板的特异感染性 ( $3.4 \times 10^5$  PFU/ $\mu$ g) 的 10 倍 (见表 3, 感染性)。源自 pBAC<sup>T7</sup>/JVFLx/XbaI 的 RNA 在 MBN 修饰后也具有增强的特异感染性 ( $2.7 \times 10^6$  PFU/ $\mu$ g) (见表 3, 感染性)。因此, 本发明的发明人确信, 应当存在 JEV 基因组的可靠的 3' 端, 以确保生成高感染性的合成的 JEV RNA 转录物。因而, 本发明的感染性的 JEVcDNA 克隆能用作失控转录的模板, 生成高感染性的合成的 RNA, 其特异感染性为  $10^5 \sim 10^6$  PFU/ $\mu$ g。

[0048] 以前的装配全长的感染性的 JEV cDNA 的尝试 (Mishin 等, *Virus Res.*, 2001, 81, 113-123; Zhang 等, *J. Virol. Methods*, 2001, 96, 171-182; Sumiyoshi 等, *J. Infect. Dis.*, 1995, 171, 1144-1151; Sumiyoshi 等, *J. Virol.*, 1992, 66, 5425-5431) 都失败了, 因为克隆的 JEV cDNA 的遗传不稳定性。一项研究尝试通过设计下述系统来克服该问题: 其中体外地连接 2 个重叠的 JEV

[0049] cDNA 来生成模板 (Sumiyoshi 等, *J. Virol.*, 1992, 66, 5425-5431)。该模板然后用于体外地合成感染性的 RNA 转录物。但是, 这些转录物的特异感染性是约 100 PFU/ $\mu$ g, 该值太低, 使得该系统不能用于病毒生物学的分子和遗传分析 (Sumiyoshi 等, *J. Virol.*, 1992, 66, 5425-5431)。

[0050] 在本发明中, 本发明人能通过将 JEV cDNA 克隆进 BAC 质粒 (它在大肠杆菌中维持 1 或 2 个拷贝) 中来克服它的遗传不稳定性。在大肠杆菌中繁殖的过程中, 感染性的 cDNA 质粒的遗传结构和功能完整性能在至少 180 代中维持稳定 (见图 7)。所以, 本发明的发明人通过导入 BAC 解决了制备全长的感染性的 JEV cDNA 时的遗传不稳定性问题, 并且具有稳定地处理合成的感染性的 JEV cDNA 的技术。

[0051] 生产全长的感染性的 JEV cDNA 是重要的, 在体外转录中它能生成具有可靠的 5' 和 3' 端的 RNA 转录物, 因为几项研究已经证实, 体外地 (You 和 Padmanabhan, *J. Biol. Chem.*, 1999, 274, 33714-33722) 和体内地 (Khromykh 等, *J. Virol.*, 2001, 75, 6719-6728) 启动黄病毒 RNA 转录需要 5' - 和 3' - 末端区域。为实现该目的, 本发明的发明人采用了先前用于其它黄病毒的方法 (van der Werf 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, 83, 2330-2334; Rice 等, *New Biol.*, 1989, 1, 285-296)。JEV 基因组 RNA 的帽结构后面是双核苷酸 AG, 它是黄病毒的绝对保守的特征 (Rice, *Flaviviridae: The viruses and their replication*, 1996, 931-960, Lippincott-Raven Publisher)。通过将 SP6 或 T7 启动子转录起点置于病毒基因组的起始, 确保了 5' 端的可靠性。通过将 m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')A 帽结构类似物整合进 SP6 或 T7 聚合酶驱动的转录反应 (Contreras 等, *Nucleic Acids Res.*, 1982, 10, 6353-6362), 本发明的发明人合成了具有可靠的 5' 端的带帽的 RNA 转录物, 它们在转染进易感细胞中时是高感染性的。另外, 将 m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')G 帽结构类似物整合进 SP6 或 T7 的聚合酶驱动的转录反应 (Contreras 等, *Nucleic Acids Res.*, 1982, 10, 6353-6362) 会将不相关的 G

核苷酸置于双核苷酸 AG 的上游。如以前报道 (Rice 等, New Biol., 1989, 1, 285-296) 的, 本发明的发明人确实发现, 回收的 JEV 子代的基因组 RNA 丢失了多余的核苷酸。而且, 本发明的发明人未观察到, 如果发明人添加额外的核苷酸, 会改变从感染性的 cDNA 模板转录的合成 RNA 的感染性或复制。

[0052] 在黄病毒中, 位于 JEV RNA 的 3' 端的双核苷酸 CT 是绝对保守的 (Rice, Flaviviridae: The viruses and their replication, 1996, 931-960, Lippincott-Raven Publisher)。这表明, 这些核苷酸在病毒复制中是重要的, 来自感染性的 cDNA 的转录物必须具有可靠的 3' 端。因而, 本发明的发明人设计了用于 JEV 的反向遗传系统, 使合成的 RNA 能以可靠的 3' 端结束。实际上, 本发明的发明人证实了, 具有可靠的 3' 端的 RNA 转录物比在它们的 3' 端连接有 3 或 4 个与病毒无关的核苷酸的转录物的感染性高 10 倍。

[0053] V. 本发明提供了获自用从基于 JEV 的载体合成的 RNA 转录物转染的细胞的重组 JEV 病毒。

[0054] 在本发明中, 生产了用从全长的感染性的 JEV cDNA 合成的 JEV RNA 转录物转染的细胞生产的合成 JEV 病毒。转染的细胞表现出明显的由 JEV 病毒感染诱导的细胞病理效应, 在噬斑形态学、致细胞病性、生长动力学、蛋白表达和 RNA 积累方面, 所有的合成病毒都不能与 CNU/LP2 亲代病毒区分开 (见图 5)。而且, 通过诱导 JEV cDNA 的特定区域上的定点突变可以生成重组的 JEV 病毒突变株, 这表明, 可以在大肠杆菌中操纵感染性的 JEV cDNA。因而, 使用本发明的感染性的 JEV cDNA 的反向遗传系统可以有效地用于关于 JEV 基因组的复制机制的遗传研究。

[0055] VI. 本发明提供了基于 JEV 的表达载体。

[0056] 本发明提供了 JEV cDNA 作为新型表达载体在多种细胞类型中的应用。甲病毒也是 RNA 病毒, 可以在多种常用的动物细胞中复制并因而已经成功地开发用作细胞培养和体内的真核表达载体 (Agapov 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, 95, 12989-12944; Frolov 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, 93, 11371-11377; Schlesinger, Trends Biotechnol., 1993, 11, 18-22)。有报道说, JEV 跟甲病毒一样, 也能在来自人、小鼠、猴子、猪和仓鼠的多种初始的和传代细胞培养物中复制 (Burke 和 Monath, Flaviviruses, 2001, 1043-1125, Lippincott Williams & Wilkins Publishers)。这表明, JEV 可以用作在多种不同细胞中表达异源基因的载体。当全长的感染性的 JEV cDNA 用作表达载体 (其中插入了异源基因) 时, 通过体外转录反应生成了具有异源基因的 RNA 转录物。那些转录物由于转染进了细胞中而能自我复制, 所以可以生产大量外源蛋白。

[0057] 表达盒有效地插入在用于表达外源基因的 JEV 3' NTR 的起始处。在 CNP/LP2 和 3 种其它的完全测序的 JEV 株的病毒的 3' NTR 的起始处缺失 9-25bp (Williams 等, J. Gen. Virol., 2000, 81, 2471-2480; Nam 等, Am. J. Trop. Med. Hyg., 2001, 65, 388-392; Jan 等, Am. J. Trop. Med. Hyg., 1996, 55, 603-609), 表明这可以是良好的插入外源基因的位点。因而, 本发明开发的感染性的 JEV cDNA 可以用作在多种细胞 (包括哺乳动物细胞) 中快速表达外源基因的载体。

[0058] VII. 本发明提供了多种使用基于 JEV 的表达载体表达外源基因的策略。

[0059] 表达载体的一个功能是将目标外源基因输送进用于表达这些基因的细胞中。在本发明中, 已经证实了全长的感染性的 JEV cDNA 在多种细胞类型 (包括哺乳动物细胞) 中起

外源基因表达载体的作用。

[0060] 在这里,本发明的发明人还描述了基于全长的感染性的 JEV cDNA(它起 BAC 的作用)的外源基因表达系统(Yun 等, J. Virol., 2003, 77, 6450-6465)。作为瞬时表达系统, JEV 具有多个优点:(i) 快速生成高滴度的病毒,(ii) 该病毒能感染广范围的宿主细胞,包括昆虫和哺乳动物细胞类型,(iii) 遗传稳定的感染性的 cDNA 是可以得到的,并且可以容易地操作,和 (iv) RNA 基因组的细胞质复制使其整合进行宿主基因组中的可能性和后续的不希望发生的突变结果最小化。

[0061] 本发明的发明人在这里证实了,基于 JEV 的系统可以用于以 3 种不同的方式表达外源基因。一种包括编码外源基因的感染性的重组载体 RNA/病毒,第二种包括生产能进行病毒复制但是增殖缺陷型的 JEV 病毒复制子载体 RNA。第三种包括使用用于形成病毒复制子颗粒(VRP)的包装系统。因而,本发明的发明人已经在这里证实了,JEV 系统可以用来生产 JEV 病毒/感染性的 RNA/复制子 RNA/VRP 载体,它们能在多种哺乳动物细胞类型中快速表达目标外源基因。

[0062] 使用本发明的感染性的或复制子 JEV cDNA 载体表达外源基因的基本方法由下述步骤组成:

[0063] 1) 通过将外源基因插入到感染性的或复制子 JEV cDNA 载体中,制备重组 JEV cDNA 表达载体;

[0064] 2) 从上述的重组 JEV cDNA 表达载体生产 JEV RNA 转录物;

[0065] 3) 用上述的 JEV RNA 转录物转染宿主细胞,制备转化体;

[0066] 4) 通过培养上述转化体表达外源蛋白。

[0067] 根据前文所述的方法,本发明的发明人生产了表达绿荧光蛋白(GFP)、增强的 GFP(EGFP)、荧光素酶(LUC)、LacZ 基因和显性选择性标记嘌呤霉素 N-乙酰基转移酶(PAC)(它能赋予对药物嘌呤霉素的抗性)的全长的感染性的重组 JEV cDNA(见图 8 和 9)。用从重组 JEV cDNA 转录出的 JEV RNA 转录物转染 BHK-21 细胞。GFP、EGFP、LUC、LacZ 和 PAC 表达如图 8 和 10 所示。另外,从培养上清液中制备了含有那些外源基因的重组的感染性 JEV 病毒颗粒。在用重组病毒感染了多种动物细胞系(BHK-21, Vero, NIH/3T3, ST, HeLa, MDCK, CRFK, B103 和 SHSY-5Y)(它们已经常规地用于生物和医药领域)之后,进一步研究了那些外源基因的表达。结果,在所有的测试细胞中都表达了插入在病毒基因组中的 GFP 或 LUC 基因(见表 4)。因而,证实了重组的 JEV cDNA、JEV RNA 转录物和重组的 JEV 病毒颗粒可以有效地用作在多种细胞类型中表达外源基因的载体。

[0068] 为了用 JEV RNA 复制机器独立地表达外源基因,本发明的发明人通过删除 1 个、2 个或全部病毒结构基因生成了一组能自我复制、自限制的且满足严格安全要求的病毒复制子(图 11A)。这些病毒复制子能依靠 RNA 转染启动复制和基因表达(见图 11B 和 11C)。

[0069] 通过开发能一组包装细胞系(PCL)的稳定复制子(它们能组成型地反向表达所有 JEV 病毒结构蛋白(C、prM 和 E)),进一步说明了基于 JEV 复制子的表达载体的使用(见图 12)。这些 PCL 能反向补充 JEV 病毒复制子的有效包装。因而,证实了这些 PCL 用于通过导入 JEV 病毒复制子有效地生产高滴度的病毒 VRP(见图 12)。

[0070] 本发明的发明人还证实,可以将编码高达 3kb 的外源基因的感染性的 JEV 重组病毒 RNA 包装进病毒颗粒中。通过选择 JEV 病毒复制子载体如 JEV/Rep/ $\Delta$ C+ $\Delta$ prM+ $\Delta$ E 和

JEV/Rep/NS1, 估计可以将至少 5kb 的外源基因包装进 JEV VRP 中。令人感兴趣的是, 检查可以包装进 JEV 病毒粒子的外源序列的大小上限。如果想表达长基因 (例如囊性纤维化跨膜电导调节物, 其编码序列约 4.5kb), 这可能是一个重要的问题 (Flotte 等, J. Biol. Chem., 1993, 268, 3781-3790)。另外, 如果想添加 2 个或多个表达单元, 大包装容量的 JEV 病毒复制子会是有用的 (Thiel 等, J. Virol., 2003, 77, 9790-9798; Agapov 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, 95, 12989-12994)。在基于腺相关病毒的载体的情况下, 已经优越地扩展了其包装容量, 避免了其自然大小的限制 (Duan 等, Nat. Med., 2000, 6, 595-598; Yan 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, 97, 6716-6721), 这表明, 可以以类似的方式扩展 JEV 病毒复制子的包装容量。

[0071] 至于源自 RNA 病毒的其它载体 (Agapov 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, 95, 12989-12994; Pushko 等, Virology, 1997, 239, 389-401; Berglund 等, Nat. Biotechnol., 1998, 16, 562-565; Basak 等, J. Interferon Cytokine Res., 1998, 18, 305-313; Barclay 等, J. Gen. Virol., 1998, 79, 1725-1734; Khromykh 和 Westaway, J. Virol., 1997, 71, 1497-1505; Molenkamp 等, J. Virol., 2003, 77, 1644-1648; Shi 等, Virology, 2002, 296, 219-233; Varnavski 和 Khromykh, Virology, 1999, 255, 366-375; Perri 等, J. Virol., 2000, 74, 9802-9807; Curtis 等, J. Virol., 2002, 76, 1422-1434), 本发明的发明人还能构建多种 JEV 病毒复制子载体 RNA, 通过使用基于甲病毒的表达系统反向提供结构蛋白时, 可以包装它们 (Agapov 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, 95, 12989-12994)。因而, 已经清楚地证实了包装系统有效地生成生物安全的 JEV 载体的能力。与甲病毒 (Frolova 等, J. Virol., 1997, 71, 248-258; White 等, J. Virol., 1998, 72, 4320-4326) 和反转录病毒 (Rein, Arch. Virol. Suppl., 1994, 9, 513-522) 不同, 关于黄病毒 (包括 JEV) 所采用的包装信号所知甚少。我们的 JEV 反向互补系统提供的证据表明, 整个 JEV 结构区域不太可能在包装中起作用。因而, 该系统可以用于定义 JEV RNA 中的包装信号和结构蛋白中的参与 RNA 包壳和形态发生的区域。该信息会进一步增加我们的基于 JEV 的表达系统的效用。

[0072] 总之, 本发明的全长 JEV 基因组 RNA 和来自它的感染性的 JEV cDNA 不但能鉴别与神经毒力和发病机制相关的 JEV 基因, 而且可以用于研究 JEV 复制、转录和翻译的分子机制。另外, 全长 JEV 基因组 RNA 和感染性的 JEV cDNA 可以有效地用于开发针对 JEV 的治疗剂、疫苗、诊断试剂和诊断试剂盒, 和在真核细胞中表达外源目标基因的载体。而且, 本发明所述的基于 JEV 的载体系统是一种有前途的系统, 通过它可以将外源基因体外地输送进细胞中, 并且可能体内地用于 DNA 免疫和瞬时基因治疗。

[0073] 附图简述

[0074] 参考附图会很好地理解本发明的优选实施方案的应用, 其中:

[0075] 图 1 中的一组照片对比了形成大噬斑的 JEV 分离物 CNU/LP2 和原始的 K87P39 株。(A-B) 中的一组照片显示了使用 (A) BHK-21 细胞或 (B) Vero 细胞时的噬斑形态学。用原始的 JEV K87P39 株模拟感染 (模拟感染的) 或感染 (K87P39-感染的) (A) BHK-21 或 (B) Vero 细胞, 形成病毒噬斑大小的异源混合物。在本发明中纯化的 CNU/LP2 分离物形成了大噬斑的同源群体 (CNU/LP2-感染的)。(C) JEV 蛋白表达的水平 and 图谱。用 K87P39、CNU/LP2 或黄热病病毒株 YF17D 模拟感染或感染 BHK-21 细胞。18 小时后, 将其固定, 依次用 JEV- 特异性的小鼠超免疫腹水、异硫氰酸荧光素-缀合的山羊抗小鼠免疫球蛋白 G (绿色荧光) 染

色,随后进行共焦显微镜检查。在存在 Rnase A 的情况下用碘化丙锭(红荧光)染色,使细胞核可视化。

[0076] 图2中的一组简图和一对电泳照片显示了用于对 CNU/LP2 的基因组 RNA 进行测序的策略。(A) 该示意图显示了代表脱离 5' 和 3' 末端的整个 JEV 基因组 RNA 的 3 个重叠的 cDNA 扩增子的 RT-PCR 扩增。RNA 表示为灰色, cDNA 用实平行线表示。上区块示意性地说明了 CNU/LP2 JEV 基因组 RNA (长 10,968bp)。下区块描绘了 3 个重叠的 cDNA : JVF (nt 1-3865)、JVM (nt 3266-8170) 和 JVR (nt 7565-10893)。(B) 该示意图显示了对 CNU/LP2 基因组 RNA 的 3' 端进行测序的程序。用 T4RNA 连接酶将 5' - 磷酸化的和 3' - 封闭的寡核苷酸 T (寡 T) 连接到 JEV 基因组 RNA 的 3' 端,然后用得到的 RNA 进行 cDNA 合成,并用箭头所示的引物进行扩增。对得到的产物进行克隆和测序。(C) 该电泳照片显示了从 (B) 所述的寡核苷酸 T- 连接的 JEV 基因组 RNA 合成的 JEV- 特异性的扩增子。用寡核苷酸 TR (与寡核苷酸 T 互补) 合成第一链 cDNA,在存在 (泳道 1) 或没有 (泳道 2) 上标 II 逆转录酶 (Superscript II reverse transcriptase) 的情况下进行 RT 反应。用寡核苷酸 TR 和引物 J35 (它与 nt 10259-10276 互补) 扩增 cDNA。预期 PCR 产物的大小是 727bp。在 1.2% 琼脂糖凝胶上分离产物,通过溴化乙锭 (EtBr) 染色使其可视化。(D) 该示意图显示了对 CNU/LP2 基因组 RNA 的 5' 端进行测序的程序。用烟酸焦磷酸酶除去病毒基因组 RNA 的帽结构,然后用 T4 RNA 连接酶使脱帽的病毒 RNA 自连接,并用于 cDNA 合成和扩增。对得到的扩增产物进行克隆和测序。(E) 该电泳照片显示了从 (D) 所述的自连接的 JEV 基因组 RNA 合成的 JEV- 特异性的扩增子。用与 nt 215-232 互补的引物 J40 进行第一链 cDNA 的合成。在存在 (泳道 1) 或没有 (泳道 2) 上标 II 逆转录酶的情况下进行 RT 反应。用引物 J35 和引物 J39 (它与 nt 164-181 互补) 扩增 cDNA。预期 PCR 产物的大小是 890bp。在 1.2% 琼脂糖凝胶上分离扩增产物,通过 EtBr 染色使其可视化。泳道 M 表示 100bp 的 DNA 大小梯度标记物 (按碱基对数)。

[0077] 图3中的一组图表显示了细菌人工染色体 (BAC) pBelobAC11 中的全长 JEV cDNA 克隆的构建。(A) 在 pBelobAC11 中构建的全长 JEV cDNA 的示意图。在代表病毒基因组的 5' 和 3' NTR 的两个末端用粗实线指示病毒蛋白。SP6 和 T7 启动子转录起始位点和独特的限制内切酶识别位点 (确保失控转录) 分别显示在 5' 和 3' 端。(B-C) 该组示意图显示了全长 JEVcDNA 克隆的 5' 和 3' 末端。JEV 基因组 RNA 的核苷酸序列显示为粗斜体小写字母。解释了 4 个 SP6- 驱动的 (B) 和 4 个 T7- 驱动的 (C) 全长 JEV cDNA 模板的 5' 末端。为了产生 SP6 和 T7RNA 聚合酶失控产物,通过 Xho I 酶切,对 2 个 SP6- 驱动的 (B, pBAC<sup>SP6</sup>/JVFL/XhoI 和 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XhoI) 和 2 个 T7- 驱动的 (C, pBAC<sup>T7</sup>/JVFL/XhoI 和 pBAC<sup>T7</sup>/JVFLx/XhoI) JEVcDNA 模板的 3' 末端进行线性化,在 3' 末端生成 3 个核苷酸的与病毒无关的序列 (CGA)。类似地,用 Xba I 剪切 SP6- 驱动的 (B, pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XbaI) 和 T7- 驱动的 (C, pBAC<sup>T7</sup>/JVFLx/XbaI) JEV cDNA 模板的 3' 末端,在 3' 末端得到 4 个核苷酸 (CTAG) 的与病毒无关的序列。相反地,当用 Xba I 酶切线性化 SP6- 驱动的 (B, pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XbaI<sup>MBN</sup>) 和 T7- 驱动的 (C, pBAC<sup>T7</sup>/JVFLx/XbaI<sup>MBN</sup>) JEV cDNA 模板时,存在可靠的 JEV 基因组 RNA 的 3' 端,然后用绿豆核酶 (MBN) 处理,除去不相关的单链序列。导入在病毒基因组的 3' 端的限制内切酶识别位点标有下划线。箭头表示剪切位点。

[0078] 图4中的一组照片和图片证实了下述事实,单独的全长 JEV cDNA 模板不是感染性

的,但是在体外地转录生成感染性的合成 RNA 的过程中需要它。(A) 电泳照片显示了 cDNA 模板和合成的 RNA 转录物。(B) 图片显示了用体外转录反应混合物(其含有全长 JEV cDNA 模板和合成的 RNA 转录物)转染 BHK-21 细胞得到的感染性。在没有(A,泳道 1 ;B,未处理)或有(A,泳道 2 ;B,Dnase I 处理过程中)Dnase I 存在的情况下,将 Xba I 线性化的和用 MBN 处理过的 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XbaI (100-200ng) 用于 SP6 聚合酶转录。合成后,用 Dnase I (A,泳道 3 ;B, Dnase I 处理后)或 RNaseA (A,泳道 4 ;B, Rnase A 处理后)在 37℃处理转录反应混合物 30 分钟。作为对照,在没有 SP6RNA 聚合酶(A,泳道 5 ;B,没有 SP6Po1)存在的情况下进行反应。(A) 处理后,在 0.6%琼脂糖凝胶上分离 5%的反应混合物,通过用 EtBr 染色使 cDNA 模板和 RNA 转录物可视化。(B) 用反应混合物转染 BHK-21 细胞,评估噬斑的感染中心。

[0079] 图 5 中的一组照片和图片对比了合成的 JEV 和亲代病毒 CNU/LP2。(A) 合成的 JEV 和亲代 CNU/LP2 的代表性的噬斑试验。用亲代或合成的病毒感染 BHK-21 细胞,覆盖琼脂糖,3 天后用结晶紫染色。(B) 合成的 JEV 和亲代 CNU/LP2(以 0.01、1 和 10 感染复数(MOI))的 BHK-21 细胞的生长动力学。在指定的感染后小时(h. p. i)收集病毒,通过噬斑试验确定滴度。(C-D) 分别通过(C)免疫印迹和(D)RNA 印迹分析病毒蛋白和 RNA 水平。用 MOI 为 1 的合成 JEV(泳道 1-4)或 CNU/LP2(泳道 5)感染或模拟感染(泳道 6)BHK-21 细胞,并培养 18 小时。(C) 从约  $3 \times 10^4$  细胞制备蛋白提取物,在 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶上分离。通过用 JEV-特异性的小鼠超免疫腹水进行免疫印迹,使病毒蛋白可视化(上区块)。平行地,检测作为装载和转移对照的肌动蛋白(下区块)。与病毒蛋白相关的切割中间产物和肌动蛋白的位置用左边的箭头标示。以 kDa 为单位的分子量标记标示在右边。(D) 从约  $1 \times 10^5$  细胞提取总 RNA,通过使用 <sup>32</sup>p-标记的反义核探针(它与包含 nt 9143-9351 的 NS5 基因序列杂交)的 RNA 印迹进行分析(上区块)。Etbr-染色的 18S rRNA 条带显示为装载对照(下区块)。全长基因组病毒 RNA(11kb)和 18S rRNA 标示在左边。

[0080] 图 6 中的一组简图和电泳照片显示了在来自 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/gm/XbaI 的重组 JEV 中存在 Xho I 遗传标记。(A) Xho I 酶切后预期的 JVFLx/XbaI<sup>MBN</sup> 和 JVFLx/gm/XbaI<sup>MBN</sup> RT-PCR 片段的示意图。标示的是用于 RT-PCR(箭头)的引物、导入的 Xho I 位点(星号)和 RT-PCR 产物的大小(2,580bp),以及用 Xho I 酶切 JVFLx/gm/XbaI<sup>MBN</sup> 后预期的 2 个 Xho I 酶切产物(1,506bp 和 1,074bp)。(B) 用从 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XbaI<sup>MBN</sup> 或 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/gm/XbaI<sup>MBN</sup> 转录出的合成的 RNA 转染 BHK-21 细胞。24 小时后收获病毒,在 0.1 感染复数下对 BHK-21 细胞连续传代。在每一代中,进行下一轮感染之前,将病毒与 DNase I 和 RNase A 一起孵育。在第 1 代和第 3 代,从含有释放出来的病毒的培养上清液中提取病毒 RNA,用于 RT-PCR。在有(+)或没有(-)Xho I 的情况下孵育 PCR 产物,在 1%琼脂糖凝胶上分离,用 EtBr 染色。未酶切的和酶切的 PCR 产物的预计大小显示在左边。泳道 M 标示了 1-kb 的 DNA 梯度标记物(按碱基对)。

[0081] 图 7 中的图显示了从繁殖了 180 代的感染性的 JEV cDNA 克隆(pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XbaI)转录的合成 RNA 的特异感染性。在 37℃,将两个携带有 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XbaI(实心 and 空心圆)的独立克隆在含有氯霉素的 2xYT 中培养过夜。通过  $10^6$  倍稀释和添加用于过夜生长的新鲜培养基,每天繁殖原代培养物,进行 9 天。每个传代细胞估计为约 20 代。在指定的传代细胞,纯化 DNA 质粒,通过 Xba I 酶切线性化,并用 MBN 处理,用作使用 SP6RNA 聚

合酶的失控转录的模板。然后用转录物转染 BHK-21 细胞,以检测特异感染性。

[0082] 图 8 是显示了用 JEV cDNA 作为载体表达外源基因的一组简图、照片和图片。(A) 用于 SP6RNA 聚合酶的失控转录的 cDNA 模板的示意图。标示的是脑心肌炎病毒 (EMCV) 内部核糖体进入位点 (IRES)- 驱动的 GFP 或 LUC 基因 (它们插入在病毒基因组 3' NTR 的起点)、SP6 启动子转录起点和失控位点 (通过 Xba I 酶切和 MBN 处理 (XbaI/MBN) 生成)。在 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/LUC<sup>REP-</sup>/XbaI<sup>MBN</sup> 中,垂直的实线表示在 NS3 基因 (它在 nt 5596 (星号) 预先终止病毒的翻译) 的中间的 83 个核苷酸缺失 (nt5580-5663)。(B) GFP 蛋白的表达。用 2 μg 从 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/GFP/XbaI<sup>MBN</sup> 模板 (JVFLx/GFP/XbaI<sup>MBN</sup>) 转录出来的合成 RNA 模拟转染 (模拟) 或转染 BHK-21 细胞,孵育 30 小时,然后固定并通过共焦显微镜检查。(C) LUC 蛋白的诱导。用 2 μg 从 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/LUC/XbaI<sup>MBN</sup> (●) 或 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/LUC<sup>REP-</sup>/XbaI<sup>MBN</sup> (○) 模板转录出来的合成 RNA 模拟转染 (模拟) 或转染 BHK-21 细胞 ( $8 \times 10^6$ ),以  $6 \times 10^5$  细胞/孔的密度接种 6-孔平板。在指定的时间点裂解细胞,检测 LUC 活性。从 3 个独立实验得到的标准偏差用误差棒标示。

[0083] 图 9 显示了基于双顺反子的全长感染性的 JEV cDNA (它作为 BAC) 编码外源基因的感染性重组 JEV 的构建和特征。(A) 构建感染性的重组 JEV cDNA 的策略。亲代感染性的 JEV cDNA (pJEV/FL) 的结构记载在 (Yun 等, J. Virol., 2003, 77, 6450-6465)。通过两端 (它们表示病毒基因组的 5' 和 3' NTR) 的粗实线解释了病毒的 ORF。使用独特的天然 Nsi I 位点,将由 EMCV IRES 驱动的其它表达单元插入到 3' NTR 的起点。标示了 SP6 启动子转录起始位点 (SP6 启动子) 和通过 Xba I 酶切和 MBN 处理生成的失控位点 (XbaI/MBN)。× 标示目标外源基因。(B) 显示了在本发明中构建的感染性的重组 JEV cDNA 的结构。将 3 中常用的报道基因 (EGFP, 768bp; LUC, 1653bp; 和 LacZ, 3012bp) 或显性选择性标记 PAC (600bp) 工程地构建到 3' NTR 的起点。关于能复制的 pJEV/FL/LUC cDNA,还用不能复制的 pJEV/FL/LUC<sup>REP-</sup> cDNA 作为阴性对照,这通过将 83 个核苷酸缺失 (■) 引入到 NS3 基因的中间来实现,这会导致病毒翻译在 nt 5596 (\*) 提前终止,如以前所述 (Yun 等, J. Virol., 2003, 77, 6450-6465)。(C-D) 对比了重组 JEV 和亲代的感染性。如标示的,用 2 μg 亲代或重组 JEV RNA (它们已经从相关的 JEV cDNA 转录出来) 模拟转染或转染 BHK-21 细胞 ( $8 \times 10^6$ )。(C) 代表性的噬斑。将转化后的细胞覆盖琼脂糖,5 天后用结晶紫染色。(D) 病毒蛋白积累。在指定的时间点,用 1X 样品装载缓冲液裂解转染的细胞 ( $4 \times 10^5$ ),将蛋白提取物溶解到 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶上。通过使用 JEV- 特异性的小鼠超免疫血清的免疫印迹使病毒蛋白可视化 (Yun 等, J. Virol., 2003, 77, 6450-6465)。病毒蛋白 (E 和 NS1) 和与切割有关的中间产物的位置通过左边的箭头标示。分子量标记 (按 kDa) 标示在右边。V 标示了用 JEV CNU/LP2- 感染的 BHK-21 细胞,而 N 标示了原初 BHK-21 细胞。

[0084] 图 10 显示了常用的报道基因和用感染性的 JEV cDNA 作载体的显性选择标记的表达。用 2 μg 亲代或重组 JEV RNA (它们已经从每个质粒转录出来) 模拟转染或转染 BHK-21 细胞 ( $8 \times 10^6$ )。(A-B) pJEV/FL/EGFP, (C) pJEV/FL/LacZ, (D) pJEV/FL/LUC 或 pJEV/FL/LUC<sup>REP-</sup>, (E) pJEV/FL/PAC。(A-B) EGFP 的表达。转染后 36 小时,制备转染的细胞,用于 (A) 共焦显微镜检查和 (B) 流式细胞分析。- 标示了 JEV/FL/EGFP RNA- 转染的细胞,…… 标示了模拟转染的细胞。(C) LacZ 的表达。转染后 36 小时,处理转染的细胞,进行 X-gal 染色。(D) LUC 的诱导。以  $4 \times 10^5$  细胞/孔的密度,将转染的细胞接种到 6-孔平板上。在指

定的时间点,用细胞裂解物进行 LUC 试验。试验一式三份,平均值通过误差棒表示。●标示了 JEV/FL/LUC RNA<sup>-</sup> 转染的细胞,○标示了 JEV/FL/LUC<sup>REP</sup> RNA<sup>-</sup> 转染的细胞,- 标示了原初细胞的背景荧光的水平。(E) PAC 的表达。将转染的细胞涂布到 6-孔平板上,并在完全培养基(平皿 1,3,5,和 7)中或含有 0.5%琼脂糖的涂层(平皿 2,4,6,和 8)中孵育。孵育 2 天后,在有(平皿 5-8)或没有(平皿 1-4)10 μg/ml 嘌呤霉素存在的情况下,将平皿再孵育 3 天。然后固定细胞,用结晶紫染色。

[0085] 图 11 显示了 JEV 病毒复制子的结构和载体特征。(A) 显示了 JEV 病毒复制子的结构。实框(■)表示已经导入感染性的 pJEV/FL/LUC 构建体的基因组中的框架内缺失。4 个构建体,即 pJEV/Rep/ΔCC/LUC, pJEV/Rep/ΔC/LUC, pJEV/Rep/ΔprM/LUC 和 pJEV/Rep/ΔE/LUC 都有单一的在每个 JEV 结构基因中的框架内缺失。pJEV/Rep/ΔCC/LUC 具有一个延伸至猜想的在 C 基因的 5'区域中环化序列基序的缺失,这与 pJEV/Rep/ΔC/LUC 不同。3 个构建体,即 pJEV/Rep/ΔC+ΔprM/LUC, pJEV/Rep/ΔC+ΔE/LUC 和 pJEV/Rep/ΔprM+ΔE/LUC 含有 2 个框架内缺失,而 pJEV/Rep/ΔC+ΔprM+ΔE/LUC 在所有的结构蛋白中具有 3 个框架内缺失。pJEV/Rep/NS1/LUC 也是工程化的,其编码 C 蛋白的 35 个 N-末端和 24 个 C-末端氨基酸,该 C 蛋白的后面紧跟着 NS1 蛋白的 N-末端和其它病毒基因组。(B) LUC 的诱导。用 2 μg 亲代或 JEV 病毒复制子 RNA(它们已经从每个质粒转录出来)转染原初 BHK-21 细胞(8×10<sup>6</sup>),然后以 4×10<sup>5</sup> 细胞/孔的密度接种到 6-孔平板上。在指定的时间点,对细胞裂解物进行 LUC 试验。试验一式三份地进行,并显示平均值。●黑色, pJEV/FL/LUC; ◆黑色, pJEV/FL/LUC<sup>REP</sup>; ◆蓝色, pJEV/Rep/ΔCC/LUC; ■蓝色, pJEV/Rep/ΔC/LUC; ▲蓝色, pJEV/Rep/ΔprM/LUC; ●蓝色, pJEV/Rep/ΔE/LUC; ■红色, pJEV/Rep/ΔC+ΔprM/LUC; ▲红色, pJEV/Rep/ΔC+ΔE/LUC; ●红色, pJEV/Rep/ΔprM+ΔE/LUC; ■绿色, pJEV/Rep/ΔC+ΔprM+ΔE/LUC; ●绿色, pJEV/Rep/NS1/LUC。 - 标示了原初细胞的背景荧光水平。(C) 病毒蛋白的积累。转染后 48 小时,用 1X 样品装载缓冲液裂解转染的细胞(4×10<sup>5</sup>),将蛋白提取物溶解到 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶上。将蛋白转移到硝酸纤维素膜上,用 JEV-特异性的小鼠超免疫血清进行免疫印迹。

[0086] 图 12 显示了用于 JEV 病毒复制子的包装系统的构建。(A) 以基于新培斯病毒的表达载体为基础的 JEV 结构蛋白表达盒的结构。pSinRep19 是双亚基因组的无致细胞病性的 RNA 载体。使用分开的亚基因组启动子表达外源基因和 PAC 基因,如箭头所示。pSinRep19/JEV C-E 盒编码 JEV C、prM 和 E 基因。pSinRep19/JEV C-E-BglIII 盒编码 JEV C、prM 和 E 基因,其后是 NS1 的 N 末端的 58 个残基,而 pSinRep19/JEV C-NS1 携带 NS1 基因的剩余物。MCS 标示了多克隆位点。(B) 从 3 个 JEV 结构蛋白表达盒表达出的 JEV 结构蛋白的蛋白质印迹分析。用每种 JEV 结构蛋白表达载体 RNA 模拟转染或转染 BHK-21 细胞,48 小时后获得裂解物。将等量的细胞裂解物溶解到 SDS-PAGE 上,用 JEV-特异性的超免疫血清检测。标示在右边的是病毒蛋白 E 和 NS1 的位置,在左边的是分子量标记(按 kDa)。(C) 该示意图显示了如何通过下述方法生成 JEV VRP:(i) 共转染 JEV 结构蛋白表达载体 RNA 和 JEV 病毒复制子 RNA,或(ii) 用 JEV 病毒复制子 RNA 转染能表达 JEV 结构蛋白的 PCL。(D-E) JEV VRP 的生产。使用了两个方案。一个方案包括用 2 种载体 RNA,即(D)所示的 JEV 结构蛋白表达载体 RNA 和 JEV 病毒复制子载体 RNA 共转染原初 BHK-21 细胞。另一个方案包括用(E)所示的 JEV 病毒复制子载体 RNA 转染的 JEV PCL。使用的 JEV 病毒复制子 RNA 如

下:□绿色, JEV/Rep/  $\Delta$  C+  $\Delta$  prM+  $\Delta$  E/EGFP; ■绿色, JEV/Rep/NS1/EGFP; □蓝色, JEV/Rep/  $\Delta$  C+  $\Delta$  prM+  $\Delta$  E/LacZ; ■蓝色, JEV/Rep/NS1/LacZ; □黑色, JEV/Rep/  $\Delta$  C+  $\Delta$  prM+  $\Delta$  E/LUC; ■黑色, JEV/Rep/NS1/LUC。转染后 48 小时收集上清液, 并用来感染原初 BHK-21 细胞来滴定 VRP 和检测各报道基因表达。- 标示了原初细胞的背景荧光水平。

## 实施例

[0087] 下面的实施例解释了本发明的可行的和目前优选的实施方案。

[0088] 但是, 本领域的技术人员能够明白, 参考公开的内容, 可以在本发明的精神和范围内进行修改和改进。

### [0089] 实施例 1: JEV 病毒的分离

#### [0090] <1-1> 细胞系和病毒

[0091] BHK-21 细胞系由 Rockefeller 大学的 Charles M. Rice 博士提供, 并维持在  $\alpha$ -极限必需培养基 (MEM) 中, 该培养基中添加了 10% 胎牛血清 (FBS)、2mM L-谷氨酰胺、维生素和抗生素。在细胞培养中使用的所有试剂均购自 Gibco/BRL Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD。韩国 JEV 株 K87P39 (Chung 等, Am. J. Trop. Med. Hyg., 1996, 55, 91-97) 是从韩国国家健康研究所 (Korean National Institute of Health) 得到。该 JEV K87P39 在 1987 年分离自韩国野生型蚊子, 并在乳小鼠脑中经历了 5 代。YF17D 黄热病毒株由感染性的 cDNA pACNR/YF17D (Charles M. Rice 博士提供) 通过如下所述的 SP6 聚合酶失控转录生成。

#### [0092] <1-2> 噬斑纯化

[0093] 用 MEM 覆盖感染了 JEV K87P39 株的细胞, 所述 MEM 含有 10% 胎牛血清和 0.5% SeaKem LE 琼脂糖 (FMC BioProducts, Rockland, Maine), 并在 5% CO<sub>2</sub>、37°C 的培养箱中孵育 3 至 4 天。培养 3 至 4 天后, 用 3.7% 甲醛在室温固定感染的细胞 4 小时。然后, 除去覆盖细胞的琼脂糖。通过结晶紫染色使噬斑可视化。结果, K87P39 株形成了病毒噬斑大小的异源混合物 (图 1A, K87P39-感染的)。

[0094] 随后, 本发明的发明人用 BHK-21 细胞进行了噬斑纯化试验, 以分离同源群体的形成大噬斑的变体, 本发明的发明人命名为 CNU/LP2。用 MEM 覆盖感染了 JEV K87P39 株的 BHK-21 细胞, 所述 MEM 含有 10% 胎牛血清和 0.5% SeaKem LE 琼脂糖, 并在 5% CO<sub>2</sub>、37°C 的培养箱中孵育 3 至 4 天。用无菌的巴氏滴管挑取单独的噬斑, 重新悬浮到 1ml MEM 中。在 4°C 从琼脂糖洗脱病毒 2 小时。将洗脱液在 BHK-21 细胞中仅扩增一次, 并在 -80°C 储存。

[0095] 进行噬斑试验, 对比用 JEV K87P39 和 JEV CNU/LP2 株感染的易感 BHK-21 细胞的病毒噬斑大小。结果, 用 K87P39 感染的易感 BHK-21 细胞的病毒噬斑大小发生了变化 (图 1A, K87P39-感染的)。另一方面, 在本发明中纯化的 CNU/LP2 形成了同源群体的大噬斑 (图 1A, CNU/LP2-感染的)。另外, 当用 JEV K87P39 和 JEV CNU/LP2 株感染 Vero 细胞时, 还观察到了类似的噬斑形态学 (图 1B)。

#### [0096] <1-3> 免疫荧光

[0097] 为了通过共焦显微镜检查感染的 BHK-21 细胞中的 JEV 表达, 将细胞 ( $2 \times 10^5$ ) 接种到 4 孔分室载玻片中, 孵育 12 小时, 然后用 MOI 为 1 的原始的 JEV K87P39 株、JEV CNU/LP2 分离物或 YF17D 株模拟感染或感染 18 小时。在含有 0.37% (v/v) 甲醛的磷酸盐缓冲盐

水 (PBS) 中在 25℃ 孵育 30 分钟, 第一次固定细胞, 完成 JEV 病毒蛋白的免疫染色。然后用 PBS 洗涤细胞 3 次, 用含有 0.2% (v/v) Triton X-100 的 PBS 在 37℃ 透化处理 10 分钟。此后, 用 PBS 洗涤细胞 4 次, 在 PBS 中再水化 15 分钟, 用含有 5% (w/v) 牛血清白蛋白 (BSA) 的 PBS 在 37℃ 封闭 1 小时。然后用对 JEV 特异性的 1 : 500- 稀释的小鼠超免疫腹水液在 25℃ 孵育细胞 2 小时, 用 PBS 洗涤 3 次, 用 1 : 500- 稀释的 FITC- 缀合的山羊抗 - 小鼠 IgG (Jackson ImmunoResearch Labs Inc.) 在 25℃ 孵育 2 小时, 再用 PBS 洗涤 3 次。此后, 将细胞在含有 5  $\mu$ g/ml 碘化丙锭和 5  $\mu$ g/ml RNase A 的 PBS 中在 37℃ 孵育 30 分钟, 以定位核, 并用 0.2ml 80% 甘油封固。在 Zeiss Axioskop 共焦显微镜成像, 其装配有带有 Bio-Rad MRC 1024 的 63X 物镜和 LaserSharp 软件。

[0098] 用抗 -JEV 的超免疫腹水进行的共焦显微镜检查表明, 感染了 CNU/LP2 的 BHK-21 细胞在核膜周围表达 JEV 病毒蛋白 (图 1C, CNU/LP2- 感染的), 这类似于 K87P39- 感染的细胞 (图 1C, K87P39- 感染的)。在模拟感染的 BHK-21 细胞中没有观察到这样的荧光染色 (图 1C, 模拟感染的)。作为阴性对照, 用黄热病毒 17D (与 JEV 密切相关的黄病毒) 感染的 BHK-21 细胞没有染上抗 -JEV 的超免疫腹水 (图 1C, YF17D- 感染的)。多种动物细胞系 (包括神经元的 SHSY-5Y (人) 和 B103 (小鼠) 细胞系和无神经元的 Vero (猴子) 和 MDCK (狗) 细胞系) 的 CNU/LP2 感染在培养上清液中产生了高病毒滴度 ( $10^6$ - $10^7$  PFU/ml)。因而, 本发明的发明人决定使用 CNU/LP2 作为亲代株来开发用于 JEV 的反向遗传系统。

#### [0099] 实施例 2 : JEV CNU/LP2 基因组 RNA 的完整核苷酸序列分析

[0100] 根据生产商 (Gibco/BRL) 的推荐, 使用 300  $\mu$ l TRIzol LS 试剂从 100  $\mu$ l 含有病毒的培养液中提取病毒的基因组 RNA, 然后重新悬浮到 20  $\mu$ l 无 RNase 的水中。为了分析病毒基因组 RNA 的完整核苷酸序列, 通过长 RT-PCR 扩增了代表整个病毒 RNA 基因组的 5 个重叠的 cDNA (JVF, JVM, JVR, JV3NTR 和 JV35NTR) (图 2)。根据可以从 GenBank 数据库得到的全部 16 个完整测序的 JEV RNA 基因组 (CH2195LA、CH2195SA、FU、GP78、HVI、JaGA01、Ja0ArS982、K94P05、Vellore P20778、p3、SA(A)、SA(V)、SA14、SA14-14-2、TC 和 TL 株) 的共有序列设计了用于 cDNA 合成和扩增的寡核苷酸。

#### [0101] <2-1> JEV CNU/LP2 基因组 RNA 的核苷酸序列分析

[0102] 对于 JVF 扩增子 (nt 1-3865), 将引物 J7 (由 SEQ. ID. No 1 标示, 且与 JEV 基因组的 nt 3986-4003 互补) 用于 cDNA 合成 (图 2A)。用于 PCR 扩增的引物是 SEQ. ID. No 2 所代表的且与 nt 1-18 互补的引物 J8、由 SEQ. ID. No 3 所代表的且与 nt 3845-3865 互补的引物 J6。对于 JVM 扩增子 (nt 3266-8170), 将引物 J4 (由 SEQ. ID. No 4 标示, 且与 JEV 基因组的 nt 8150-8170 互补) 用于 cDNA 合成。用于 PCR 扩增的引物是 SEQ. ID. No 5 所代表的且与 nt 3266-3283 互补的引物 J20 和引物 J4。对于 JVR 扩增子 (nt 7565-10893), 将引物 J1 (由 SEQ. ID. No 6 标示, 且与 JEV 基因组的 nt 10947-10967 互补) 用于 cDNA 合成。用于 PCR 扩增的引物是 SEQ. ID. No 7 所代表的且与 nt 7565-7582 互补的引物 J12、由 SEQ. ID. No 8 所代表的且与 nt 10870-10893 互补的引物 J2。在 20  $\mu$ l 反应混合物中进行标准的 RT 反应, 所述反应混合物含有 10  $\mu$ l 提取的病毒 RNA、5pmol 合适的引物、100U 上标 II 逆转录酶 (Gibco/BRL)、40U RNaseOUT (Gibco/BRL)、0.1mM 二硫苏糖醇 (DTT)、10mM 三磷酸脱氧核苷酸 (dNTP) 混合物和由生产商 (Gibco/BRL) 提供的 RT 缓冲液。将反应混合物在 37℃ 孵育 1 小时, 然后在 70℃ 加热 15 分钟。随后用 RT 混合物的 5  $\mu$ l 等份试样进行 PCR 扩增, 使用

Pyrobest DNA 聚合酶 (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) 和合适的引物对。PCR 进行 30 个循环,其中在 94℃变性 30 秒、在 60℃退火 30 秒并在 72℃延伸 5 分钟,最后在 72℃延伸 10 分钟。为了避免由于克隆导致的选择偏差,用自动化的 3700DNA 测序仪对扩增产物的未克隆物在两个方向直接测序。对 2 种独立分离的病毒 RNA 制品的测序分析产生了等同的序列。

[0103] 结果,检测了除 3' - 和 5' - 末端区域以外的 JEV CNU/LP2 整个病毒基因组的完整核苷酸序列,并由 SEQ. ID. No 9 表示。

[0104] <2-2> 检测 JEV CNU/LP2 基因组 RNA 的 3' - 末端序列

[0105] 为了对 JEV CNU/LP2 基因组 RNA 的 3' - 末端序列进行测序,将 SEQ. ID. No 10 所示的合成的寡核苷酸 T 连接到病毒基因组 RNA 的 3' 端,以提供用于 cDNA 合成和 PCR 扩增的引物结合位点 (Kolykhalov 等, J. Virol., 1996, 70, 3363-3371)。首先通过用末端脱氧核苷酸转移酶 (Takara) (它会阻断寡核苷酸 T 的分子内和分子间连接) 整合 ddATP 修饰寡核苷酸 T 的 3' 端。寡核苷酸 T 的 5' 端还用 T4 多核苷酸激酶 (Takara) 磷酸化。此后,通过 T4RNA 连接酶 (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA) 将修饰的寡核苷酸 T 连接到病毒基因组 RNA 的 3' 端。20 μl 连接反应混合物含有 10U T4 RNA 连接酶、40U RNaseOUT、10pmol 寡核苷酸 T、病毒基因组 RNA 和由生产商 (NEB) 提供的缓冲液。在 16℃孵育 12 小时后,用苯酚提取连接的病毒 RNA,用乙醇沉淀,用 20 μl 无 RNase 的水重新悬浮。随后,将 10 μl 寡核苷酸 - 连接的病毒 RNA 和 SEQ. ID. No11 代表的寡核苷酸 TR (如前所述,它与寡核苷酸 T 互补) 用于 cDNA 合成。用 SEQ. ID. No 12 表示的且与 nt 10259-10276 互补的引物 J35 和引物 TR 扩增第一链 cDNA。为了 PCR,用 Pyrobest DNA 聚合酶和 30 个循环 (94℃ 30 秒、60℃ 30 秒、和 72℃ 1 分钟) 并最后在 72℃延伸 10 分钟来扩增 5 μl 等份试样的 RT 反应混合物。PCR 混合物如上所述。使用分别整合进正义引物和反义引物中的 Hind III 和 EcoR I 位点,将命名为 JV3NTR 的 cDNA 扩增子克隆进 pRS2 载体 (由 Charles M. Rice 博士提供) (图 2B)。

[0106] 琼脂糖凝胶电泳的结果表明,扩增产物迁移成 2 条带,较大的带约 700bp,较小的带约 450bp (图 2C)。纯化和克隆两条带,分别对 20 个和 10 个随机挑取的含有较大带和较小带的克隆进行测序。如已经记载的大多数完全测序的 JEV 分离物,本发明的发明人发现所有的含有较大插入物 (约 700bp) 的克隆的病毒基因组末端都是 -GATCT10968。相反地,所有的含有较小插入物 (约 450bp) 的克隆的病毒基因组在 nt 10684 处被截断,产生的带短了 284bp。在装配全长 JEV cDNA 的过程中,本发明的发明人使用了较大插入物的核苷酸序列,因为较小的插入物在病毒基因组的 3' 端缺少 284 个核苷酸。

[0107] <2-3> 检测 JEV CNU/LP2 基因组 RNA 的 5' - 末端序列

[0108] 通过病毒 RNA 的自连接检测 JEV CNU/LP2 基因组 RNA 的 5' - 末端序列 (Campbell 和 Pletnev, Virology, 2000, 269, 225-237)。首先用烟酸焦磷酸酶 (TAP) 切除病毒基因组 RNA 的帽结构。剪切反应混合物 (20 μl) 含有 10U TAP (Epicentre Technology Co., Madison, WI)、10 μl 病毒 RNA 和生产商 (Epicentre Technology Co.) 提供的缓冲液。在 37℃孵育 1 小时后,用苯酚提取 TAP- 处理的病毒 RNA,用乙醇沉淀,用 20 μl 无 RNase 的水重新悬浮。如上所述,用 T4RNA 连接酶使一半 (10 μl) 去帽的病毒 RNA 在 20 μl 反应混合物中自连接。将四分之一 (5 μl) 自连接的病毒 RNA 和 SEQ. ID. No 13 表示的且与 nt 215-232 互补的引物 J40 一起用于 cDNA 合成。用 SEQ. ID. No 14 表示的且与 nt 164-181 互补的引物 J39 和

引物 J35 进行 PCR 扩增第一链 cDNA (图 2D)。琼脂糖凝胶电泳表明,作为单一带的扩增产物是约 850bp (图 2E)。用 Apo I 和 Spe I 酶切扩增的 cDNA 扩增子 (JV35NTR),并连接进已经用 Apo I 和 Xba I 酶切的 pRS2 载体,生成构建体 pRS2/JV3' 5'。

[0109] 为了对 JEV CNU/LP2 基因组 RNA 的 5'-末端序列测序,对 12 个随机挑取的克隆进行了测序。在所有的 12 个克隆中,本发明的发明人发现,病毒 3'-末端序列的 -GATCT<sup>10968</sup> 后面跟着 5'-末端序列<sup>1</sup>AGAAGT-(图 2B 和 2C)。通过对未克隆物进行直接循环测序,也得到了相同的结果。因而,本发明的发明人已经检测了 CNU/LP2 分离物的完整核苷酸序列,并确定其序列如 SEQ. ID. No 15 所示。

#### [0110] 实施例 3:构建用于 JEV 的全长感染性的 cDNA

[0111] 在我们初始尝试克隆 CNU/LP2RNA 基因组的 cDNA 时,发现病毒基因组的特定区域与在大肠杆菌中克隆高拷贝数的质粒不相容,因为克隆的 DNA 要经历遗传重排。这些困难在其它黄病毒中也已经有报道 (Campbell 和 Pletnev, Virology, 2000, 269, 225-237; Polo 等, J. Virol, 1997, 71, 5366-5374; Gritsun 和 Gould, Virology, 1995, 214, 611-618; Sumiyoshi 等, J. Infect. Dis., 1995, 171, 1144-1151; Sumiyoshi 等, J. Virol, 1992, 66, 5425-5431; Rice 等, New Biol., 1989, 1, 285-296)。由于遗传不稳定性和低 DNA 产率,将该区域克隆进低拷贝数的细菌质粒中的尝试也没有成功。因此,本发明的发明人使用细菌人工染色体 (BAC) 质粒 pBeloBAC11 作为载体来容纳 JEV 的全长感染性的 cDNA。

#### [0112] <3-1> 亚克隆 3 个长的重叠的 JEV cDNA 扩增子

[0113] 本发明的发明人使用了根据标准方法的重组 DNA 技术 (Sambrook 等, Molecular cloning, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory)。首先,将 3 个起始用于完整核苷酸序列分析的重叠的 cDNA 扩增子 (JVF, JVM 和 JVR) 亚克隆进 SEQ. ID. No 42 表示的 pBAC/SV (pBeloBAC11 质粒的衍生物) 中。pBAC/SV 质粒含有 pACNR/NADL 的 491bp 的 Not I-Aat II (T4 DNA 聚合酶处理过的) 片段 (Mendez 等, J. Virol., 1998, 72, 4737-4745)、pSINrep19 的 9, 215bp 的 Sac I (T4 DNA polymerase 处理过的)-Ssp I (T4DNA 聚合酶处理过的) 片段 (Frolov 等, Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 1996, 93, 11371-11377) 和 pBeloBAC11 的 6, 875bp 的 Sfi I (T4DNA 聚合酶处理过的)-Not I 片段。因而, JVF 扩增子的 3, 863bp 的 Rsr II-Avr II 片段、JVM 扩增子的 4, 717bp 的 BspE I-Mlu I 片段和 JVR 扩增子的 3, 326bp 的 Rsr II-Bgl II 片段被插入到了 pBAC/SV 质粒 (它已经用相同的酶酶切) 中。这分别生成了 pBAC/JVF、pBAC/JVM、pBAC/JVR 亚克隆构建体。使这些 BAC 质粒在大肠杆菌 DH10B 细胞中生长,并测序。克隆的 cDNA 的核苷酸序列与 CNU/LP2 的相同,只是在 pBAC/JVR 的 NS5 基因中有点突变: T<sup>8906</sup> → C (沉默)。T<sup>8906</sup> → C 的取代是翻译水平的沉默,并且一定是在克隆过程中产生的,因为对 8 个随机挑取的单个克隆进行的测序表明在 nt 8906 处有 T 残基。尽管 T<sup>8906</sup> → C 的取代没有改变对应的氨基酸,但是该变化可能会影响病毒复制 (van Dinten 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997, 94, 991-996), 因此,本发明的发明人将该取代修正回 T 残基。T<sup>8906</sup> → C 取代是通过再克隆 315bp 的 Apa I-Hind III 片段 (对应于 nt 8827-9142) 来修正的,生成构建体 pBAC/JVRR。在它们的操作和在大肠杆菌菌株 DH10B 中繁殖的过程中,所有 3 个亚克隆的 JEV cDNA 保持遗传稳定。

#### [0114] <3-2> 将 SP6 启动子插入全长 JEV cDNA 的 5' 端

[0115] 为了有利于将噬菌体 SP6 启动子转录起点精确连接到全长 JEV cDNA 的 5' 端,本

发明的发明人修饰了 pBAC/JVF。首先,通过 pBAC/SV 的 PCR(使用 SEQ. ID. No 16 表示的引物 J41 和 SEQ. ID. No 17 表示的引物 J43,它整合了 SP6 启动子的反义序列)和 pBAC/JVF 的 PCR(使用 SEQ. ID. No18 表示的引物 J42 和 SEQ. ID. No 19 表示的引物 J40) 分离了两个片段。通过第二轮的 PCR(使用引物 J41 和 J40),将这 2 个片段融合。用 Pac I 和 Pme I 酶切得到的扩增子,连接到 pBAC/JVF(它已经用相同的两种酶酶切)。这生成 pBAC<sup>SP6</sup>/JVF。

[0116] <3-3> 构建全长的含有 SP6 启动子的 JEV cDNA

[0117] 为了在病毒基因组的 3' 端被线性化的质粒失控转录的过程中生成可靠的或近乎可靠的 3' 末端,本发明的发明人修饰了 pBAC/JVRR,使可靠的 3' 末端的核苷酸序列后跟着独特的限制内切酶 Xho I 或 Xba I 的识别位点。为了创建在病毒基因组的末端含有独特的 Xho I 位点的 pBAC/JVRR/XhoI 亚克隆,用使用 SEQ. ID. No 20 表示的引物 J90 和 SEQ. ID. No 21 表示的引物 J45(它整合有 Xho I 位点)的 pRS2/JV3' 5' 的 PCR 扩增合成了片段 I。用 pBAC/JVRR(它已经用 Sfi I 和 Nhe I 酶切)连接片段 I 扩增子的 298bp 的 Sfi I-Spe I 部分。为了创建 pBAC/JVRRx/XbaI(其在病毒基因组的末端具有 Xba I 位点),首先通过 PCR 导入沉默点突变(A<sup>9134</sup> → T),使 NS5 基因中的核苷酸 9,131 至 9,136 处的 Xba I 位点失活。在该构建体中,“x”表示存在破坏原始的 Xba I 位点的沉默点突变(A<sup>9134</sup> → T)。更具体地,用 SEQ. ID. No 22 表示的引物 J31 和用 SEQ. ID. No 23 表示的引物 J47(其包含 A<sup>9134</sup> → T 的取代)扩增了 pBAC/JVRR。将 cDNA 扩增子的 315bp 的 Apa I-Hind III 部分(与核苷酸 8,828 至 9,143 对应)克隆进 pBAC/JVRR,生成构建体 pBAC/JVRRx。随后,按照对于 pBAC/JVRR/XhoI 描述的相同方式,构建了 pBAC/JVRRx/XbaI。通过 pRS2/JV3' 5' (使用引物 J90 和 SEQ. ID. No 24 表示的引物 J46,其包含 XbaI 位点)的 PCR 扩增得到了片段 II。然后将片段 II 扩增子的 298bp 的 Sfi I-SpeI 部分连接进 pBAC/JVRRx(它已经用 Sfi I 和 Nhe I 酶切)。为了创建含有独特的 Xho I 位点和 A<sup>9134</sup> → T 取代的 pBAC/JVRRx/XhoI,将片段 I 扩增子的 298bp 的 Sfi I-Spe I 部分连接进 pBAC/JVRRx(它已经用 Sfi I 和 Nhe I 酶切)。

[0118] 因而,本发明的发明人构建了 5 个质粒:pBAC<sup>SP6</sup>/JVF、pBAC/JVM、pBAC/JVRR/XhoI、pBAC/JVRRx/XbaI 和 pBAC/JVRRx/XhoI。这些质粒含有 JEV 基因组的邻接区域,并且现在可以用于组装 3 个不同的全长 JEVcDNA(图 3)。首先,通过将 pBAC/JVM 的 4,717bp 的 BspE I-Mlu I 片段、pBAC<sup>SP6</sup>/JVF 的 8,970bp 的 BspE I-Xba I 片段和 pBAC/SV 的 3,670bp 的 XbaI-Mlu I 片段连接到一起,构建了 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFM 亚克隆。随后,将 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFM 的 2 个片段(8,142bp 的 Pac I-Sap I 片段和 4,801bp 的 PacI-BsrG I 片段)与 i)pBAC/JVRR/XhoI 的 5,620bp 的 Sap I-BsrG I 片段相连生成 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFL/XhoI,与 ii)pBAC/JVRRx/XbaI 的 5,662bp Sap I-BsrGI 片段相连生成 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XbaI,或与 iii)pBAC/JVRRx/XhoI 的 5,620bp 的 Sap I-BsrG I 片段相连生成 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XhoI。最后,将 3 个组装的全长 JEV cDNA 命名为 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFL/XhoI、pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XhoI 和 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XbaI,并且分别由 SEQ. ID. No 43、No 44 和 No 45 表示(图 3B)。这些 cDNA 克隆都在病毒基因组的起始处具有 SP6 启动子转录起点,所以使用 SP6RNA 聚合酶进行体外转录能生成具有可靠的 5' 端的合成的 RNA 转录物(图 3B,灰框)。为了确保失控转录后的病毒基因组的 3' 端是近乎可靠的,本发明的发明人在病毒基因组的末端设置了一个独特的限制内切酶 Xho I 或 Xba I 的识别位点(图 3B,标有下划线的)。因而,pBAC<sup>SP6</sup>/JVFL/XhoI 携带有位于病毒基因组末端的 Xho I 位点。对于含有 Xba I 位点(紧挨病毒基因组末端)的构建体,由于该病毒基因组

在 NS5 基因中已经含有 Xba I 位点,该位点必须通过导入沉默点突变 ( $A^{9134} \rightarrow T$ ) 来破坏掉。该构建体命名为 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XbaI,其中“x”表示存在能破坏原始的 Xba I 位点的沉默点突变。第三个克隆 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XhoI 含有在病毒基因组末端的 Xho I 位点和  $A^{9134} \rightarrow T$  的取代。

[0119] 本发明的发明人于 2002 年 10 月 2 日将 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XbaI 保藏在韩国生物科学和生物技术研究所以 (Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology) (KRIBB) 的基因库中 (保藏号 :KCTC 10347BP)。

[0120] <3-4> 构建含有 T7 启动子的全长 JEV cDNA

[0121] 除了 SP6-驱动的 JEV cDNA 以外,本发明的发明人还以与实施例<3-3>类似的方式构建了一组 3 个 T7-驱动的全长 JEV cDNA。首先,用 SEQ. ID. No 25 表示的引物 J81 和 SEQ. ID. No 26 表示的引物 J80 进行 PCR,合成了来自 pBAC/NADLcIn-/PAC (由 Charles M. Rice 博士提供) 的片段。还用 SEQ. ID. No 27 表示的引物 J42 和 SEQ. ID. No 28 表示的引物 J82 合成了来自 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XbaI 的片段。通过用引物 J81 和 J82 的第二轮的 PCR,使这 2 个片段融合。将得到的扩增子的 793bp 的 EcoR I-SpeI 片段插入用 EcoR I 和 Xba I 酶切过的 pRS2 载体,生成构建体 pRS2<sup>T7</sup>/5' JV。将 pRS2<sup>T7</sup>/5' JV 的 675bp 的 Pvu I-Pme I 片段,与 i) pBAC<sup>SP6</sup>/JVFL/XhoI 的 18,364bp 的 Pac I-Pme I 片段相连接,生成 pBAC<sup>T7</sup>/JVFL/XhoI,与 ii) pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XhoI 的 18,364bp 的 Pac I-Pme I 片段相连接,生成 pBAC<sup>T7</sup>/JVFLx/XhoI,或与 iii) pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XbaI 的 18,366bp 的 Pac I-Pme I 片段相连接,生成 pBAC<sup>T7</sup>/JVFLx/XbaI。最后,将 3 个组装的全长 JEV cDNA 命名为 pBAC<sup>T7</sup>/JVFL/XhoI、pBAC<sup>T7</sup>/JVFLx/XhoI 和 pBAC<sup>T7</sup>/JVFLx/XbaI,并分别由 SEQ. ID. No 46、No 47 和 No 48 表示 (图 3C)。在组装过程中的每一个步骤,通过广泛的限制和核苷酸序列分析判断克隆的 cDNA 的结构完整性。没有观察到导致缺失或重排的结构不稳定性。

[0122] 本发明的发明人于 2002 年 10 月 2 日将 pBAC<sup>T7</sup>/JVFLx/XbaI 保藏在韩国生物科学和生物技术研究所以 (Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology) (KRIBB) 的基因库中 (保藏号 :KCTC 10346BP)。

[0123] 实施例 4:转录和转染

[0124] 本发明的发明人通过体外转录合成了 RNA 转录物。更具体地,将 100 至 200ng 模板 DNA (用 Xho I 或 Xba I 酶切线性化,并且在有些情况下用 MBN 修饰过) 加入到 25- $\mu$ l 由下述组分组成的反应混合物中:生产商提供的缓冲液 (Gibco/BRL)+0.6mM 帽类似物 [ $m^7G(5')ppp(5')A$  或  $m^7G(5')ppp(5')G$ , NEB Inc.], 0.5  $\mu$ M [ $^3H$ ]UTP (1.0mCi/ml, 50Ci/mmol, New England Nuclear Corp., Boston, MA), 10mM DTT, 1mM 各 UTP、GTP、CTP 和 ATP, 40U RNaseOUT 和 15U SP6RNA 聚合酶 (Gibco/BRL)。将该反应混合物在 37°C 孵育 1 小时。通过 RNA 向 DE-81 (Whatman, Maidstone, UK) 滤纸的吸附检测 [ $^3H$ ]UTP 的整合,在此基础上对 RNA 定量 (Sambrook 等, Molecular cloning, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory)。通过琼脂糖凝胶电泳检测反应混合物的 1- 至 1.5- $\mu$ l 等份试样,并在使用前将等份试样储存在 -80°C。

[0125] 为了进行 RNA 转染,使用型号为 ECM 830 的电穿孔仪 (BTX Inc., San Diego, CA), 按照生产商的说明,用合成的 RNA 对细胞进行电穿孔。简而言之,用胰蛋白酶处理分汇合的细胞,用冰冷却的无 RNase 的 PBS 洗涤 3 次,以  $2 \times 10^7$  细胞 /ml 的密度重新悬浮到 PBS 中。

将悬浮液的 400- $\mu$ l 等份试样与 2  $\mu$ g 合成的 RNA 相混合,立即在预先确定为最佳的条件(980V,99- $\mu$ s 脉冲长度,和 5 个脉冲)下进行电穿孔细胞。然后将电穿孔后的混合物转移至 10ml 新鲜培养基。

[0126] 用感染性中心试验定量合成的 RNA 的特异感染性。更具体地,为了失控转录,通过用 Xho I 或 Xba I 酶切,使 JEV cDNA 模板线性化。在存在 m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')A 帽结构类似物的情况下,2 个 Xho I-线性化的质粒 (pBAC<sup>SP6</sup>/JVFL/XhoI 和 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XhoI) 的 SP6 聚合酶失控转录生成了带帽的合成的 RNA,在其 3' 端含有 3 个核苷酸 (CGA) 的与病毒无关的序列 (图 3B)。这是复制 Xho I 酶切剩下的 5' 突出物的结果 (图 3B)。类似地,在存在 m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')A 帽结构类似物的情况下,Xba I-线性化的 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XbaI 质粒的 SP6 聚合酶失控转录生成了带帽的合成的 RNA,在其 3' 端含有 4 个核苷酸 (CTAG) 的与病毒无关的序列 (图 3B)。将电穿孔的细胞系列稀释 10 倍,在 6-孔平板涂布未转染的细胞的单层 ( $5 \times 10^5$ )。让细胞向平板吸附 6 小时,然后如上所述用含有 0.5% SeaKem LE 琼脂糖的 MEM 覆盖它们。将平板在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 下孵育 3 至 4 天,通过结晶紫染色使感染性的噬斑中心可视化。

[0127] 当易感的 BHK-21 细胞受到来自这些构建体的合成的 RNA 的转染时,都是高度感染性的 (表 3)。也就是说,在最佳电穿孔条件转染的来自 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFL/XhoI, pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XhoI 和 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XbaI 的合成 RNA 分别具有  $3.5 \times 10^5$ 、 $4.3 \times 10^5$  和  $3.4 \times 10^5$  PFU/ $\mu$ g 的特异感染性 (表 3, 感染性)。还从来自 T7-驱动的 cDNA 构建体转录的合成 RNA (通过 T7 聚合酶失控转录) 得到了类似的结果 (表 3, 感染性)。

[0128] 表 3 从全长 JEV cDNA 生成的体外 RNA 转录物的特异感染性和病毒滴度

|        | 用于转录的模板 <sup>a</sup>                           | 感染性 <sup>b</sup><br>(PFU/ $\mu$ g 的<br>RNA) | 病毒滴度 <sup>c</sup> (PFU/ml) |                   |
|--------|------------------------------------------------|---------------------------------------------|----------------------------|-------------------|
|        |                                                |                                             | 24 小时                      | 48 小时             |
| [0129] | pBAC <sup>SP6</sup> /JVFL/XhoI                 | $3.5 \times 10^5$                           | $4.4 \times 10^5$          | $3.6 \times 10^6$ |
|        | pBAC <sup>T7</sup> /JVFL/XhoI                  | $2.9 \times 10^5$                           | $2.0 \times 10^5$          | $2.3 \times 10^6$ |
|        | pBAC <sup>SP6</sup> /JVFLx/XhoI                | $4.3 \times 10^5$                           | $2.1 \times 10^5$          | $5.2 \times 10^6$ |
|        | pBAC <sup>T7</sup> /JVFLx/XhoI                 | $3.8 \times 10^5$                           | $3.3 \times 10^5$          | $4.1 \times 10^6$ |
|        | pBAC <sup>SP6</sup> /JVFLx/XbaI                | $3.4 \times 10^5$                           | $3.5 \times 10^5$          | $3.2 \times 10^6$ |
|        | pBAC <sup>T7</sup> /JVFLx/XbaI                 | $3.0 \times 10^5$                           | $2.4 \times 10^5$          | $2.7 \times 10^6$ |
|        | pBAC <sup>SP6</sup> /JVFLx/XbaI <sup>MBN</sup> | $3.1 \times 10^6$                           | $6.2 \times 10^6$          | $1.4 \times 10^6$ |
|        | pBAC <sup>T7</sup> /JVFLx/XbaI <sup>MBN</sup>  | $2.7 \times 10^6$                           | $5.6 \times 10^6$          | $2.4 \times 10^6$ |

[0130] <sup>a</sup>: 所有的全长 JEV cDNA 都用用于失控转录的合适的限制内切酶 (如在 cDNA 的名字中标示的) 线性化。关于 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XbaI<sup>MBN</sup> 和 pBAC<sup>T7</sup>/JVFLx/XbaI<sup>MBN</sup>, 这些 cDNA 模板是通过 Xba I 酶切线性化、然后用 MBN 处理来制备的。

[0131] <sup>b</sup>: 用 SP6 或 T7RNA 聚合酶体外转录后,如标示的,将样品用于电穿孔 BHK-21 细胞,

并检测感染性的噬斑中心。

[0132] c:在电穿孔后 24 和 48 小时时的病毒滴度。

[0133] <4-1> 构建在其 3' 端缺失与病毒无关的序列的 JEV RNA 转录物

[0134] 已经报道,对于一些黄病毒,存在于从感染性的 cDNA 转录的合成 RNA 的 3' 端的无关序列会减少或消除它们的特异感染性 (Yamshchikov 等, Virology, 2001, 281, 294-304)。基于该报道,本发明的发明人生成了在它们的 3' 端缺少与病毒无关的序列的合成 RNA,并对比了它们的特异感染性。更具体地,通过在转录反应之前用 MBN 处理 Xba I- 线性化的 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XbaI 质粒除去 4 个多余的核苷酸 CTAG,本发明的发明人生成了缺少与病毒无关的序列的合成 JEV RNA。与未处理的转录物相比,来自 Xba I- 线性化的和 MBN- 处理过的 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XbaI 和 pBAC<sup>T7</sup>/JVFLx/XbaI (pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XbaI<sup>MBN</sup>, 图 3B; 和 pBAC<sup>T7</sup>/JVFLx/XbaI<sup>MBN</sup>, 图 3C) 的 RNA 转录物都具有增强的特异感染性。更精确地,估计从 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XbaI<sup>MBN</sup> 转录出的 RNA 的特异感染性为  $3.1 \times 10^6$  PFU/μg, 约是未修饰模板的特异感染性 ( $3.4 \times 10^5$  PFU/μg) 的 10 倍 (表 3, 感染性)。源自 pBAC<sup>T7</sup>/JVFLx/XbaI 的 RNA 在 MBN 修饰后也具有增强的特异感染性 ( $2.7 \times 10^6$  PFU/μg) (表 3, 感染性)。因此,本发明的发明人证实了,应当存在 JEV 基因组的可靠的 3' 端,以确保生成高度感染性的合成的 JEV RNA 转录物。

[0135] 另外,由于在 3' 端存在 3 或 4 个与病毒无关的核苷酸,改变的 RNA 转录物的特异感染性还会影响从转染的 BHK-21 细胞的培养上清液中收获的病毒滴度。从未用 MBN 处理过的 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFL/XhoI、pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XhoI 和 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XbaI 得到 RNA 转录物转染的 BHK-21 细胞释放出的病毒滴度的范围在转染后 24 小时为  $2.1 \times 10^5$  至  $4.4 \times 10^5$  PFU/ml (表 3, 病毒滴度 24 小时), 这时仍有半数转染的细胞吸附在培养皿上,证实了病毒诱导的强烈的细胞病理效应。在转染后 48 小时,这些滴度升高了约 10 倍,达到  $3.2 \times 10^6$  至  $5.2 \times 10^6$  PFU/ml (表 3, 病毒滴度 48 小时), 这时大多数细胞已经死亡,并且从培养皿底部脱落。相反地,从来自 MBN- 处理过的 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XbaI<sup>MBN</sup> 的 RNA 转录物转染 BHK-21 细胞释放的病毒滴度在转染后 24 小时已经达到了  $6.2 \times 10^6$  PFU/ml, 这时大多数转染的细胞已经死亡, (表 3, 病毒滴度 24 小时)。在转染后 48 小时,该滴度略微下降,达到  $1.4 \times 10^6$  PFU/ml (表 3, 病毒滴度 48 小时)。用 T7 聚合酶驱动的 RNA 转录物观察到了类似的病毒生成情况 (表 3)。

[0136] 实施例 5: 确认合成的 RNA 转录物的特异感染性

[0137] 本发明的发明人确认了,特异性的感染性需要来自全长 JEV cDNA 模板的 RNA 的转录,它使用全长 cDNA 克隆 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XbaI<sup>MBN</sup> (图 4)。单独的 cDNA 模板不是感染性的 (图 4A, 泳道 5 和 B, 无 SP6Pol), 但是在转录反应的过程中需要完整的 cDNA 模板,因为 Dnase I 处理会消除感染性 (图 4A, 泳道 2 和 B, DNaseI 处理过程中)。转录反应后的添加 DNaseI 相对于完整的反应混合物 (图 4A, 泳道 1 和 B, 未处理) 没有作用 (图 4A, 泳道 3 和 B, DNaseI 处理后), 但是 RNaseA 处理消除转录的合成 RNA 的感染性 (图 4A, 泳道 4 和 B, RNaseA 处理后)。

[0138] 实施例 6: 从全长的感染性的 cDNA 回收的合成 JEV 和 CNU/LP2 亲代病毒之间的对比

[0139] 本发明的发明人对比了从全长感染性的 cDNA (pBAC<sup>SP6</sup>/JVFL/XhoI、pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/

XhoI、pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XbaI 和 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XbaI<sup>MBN</sup>) 回收的合成 JEV 和原始用于 cDNA 构建的亲代病毒 CNU/LP2 (噬斑形态学、生长动力学、蛋白表达、RNA 生产等)。

[0140] <6-1> 通过噬斑试验对比噬斑形态学

[0141] 从全长感染性的 cDNA (pBAC<sup>SP6</sup>/JVFL/XhoI、pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XhoI、pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XbaI 和 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XbaI<sup>MBN</sup>) 回收的合成 JEV 和亲代病毒 CNU/LP2 感染 BHK-21 细胞。用含有 10% 胎牛血清和 0.5% SeaKemLE 琼脂糖 (FMC BioProducts, Rockland, Maine) 的 MEM 覆盖细胞, 在 5% CO<sub>2</sub>、37℃ 的培养箱中孵育 3 至 4 天。培养 3 至 4 天后, 用 3.7% 甲醛在室温固定感染的细胞 4 小时。然后, 除去覆盖细胞的琼脂糖。通过结晶紫染色使噬斑可视化。如图 5A 所示, 与感染了 CNU/LP2 (盘 5) 的细胞类似, 感染了从 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFL/XhoI (盘 1)、pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XhoI (盘 2)、pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XbaI (盘 3) 和 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XbaI<sup>MBN</sup> (盘 4) 回收的合成的 JEV 的 BHK-21 细胞形成了同源大噬斑。

[0142] <6-2> 生长动力学的对比

[0143] 本发明的发明人用从全长的感染性的 cDNA (pBAC<sup>SP6</sup>/JVFL/XhoI、pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XhoI、pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XbaI 和 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XbaI<sup>MBN</sup>) 回收的合成 JEV 和亲代病毒 CNU/LP2 感染了 BHK-21 细胞。用低 (0.01PFU/细胞)、中 (1.0PFU/细胞) 和高 (10PFU/细胞) MOI 感染 BHK-21 细胞, 此后周期地收集细胞培养液, 用于检测感染性病毒随时间释放的动力学。更具体地, 在指定的时间点收集病毒, 通过噬斑试验检测滴度。如图 5B 所示, MOI- 依赖性的病毒滴度随时间的积累类似于 4 种回收的病毒 (pBAC<sup>SP6</sup>/JVFL/XhoI、pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XhoI、pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XbaI 和 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XbaI<sup>MBN</sup>) 和亲代病毒 CNU/LP2。

[0144] <6-3> 通过蛋白质印迹分析对比病毒蛋白水平

[0145] 本发明的发明人对比了在感染了从全长的感染性的 cDNA (pBAC<sup>SP6</sup>/JVFL/XhoI、pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XhoI、pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XbaI 和 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XbaI<sup>MBN</sup>) 回收的合成 JEV 的 BHK-21 细胞中表达的病毒蛋白和在感染了亲代病毒 CNU/LP2 的 BHK-21 细胞中的表达的病毒蛋白。更具体地, 用 200  $\mu$ l 样品装载缓冲液 [80mM Tris-HCl (pH 6.8), 2.0% SDS, 10% 甘油, 0.1M DTT, 0.2% 溴苯酚蓝] 裂解 BHK-21 细胞 ( $3 \times 10^5$ ), 将十分之一裂解液沸腾 5 分钟, 在 SDS- 聚丙烯酰胺凝胶上分级。用 Trans-Blot SD 电泳转细胞仪 (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA), 将蛋白电泳地转移到甲醇活化的聚偏氟乙烯膜上, 在室温下, 用 5% 脱脂奶粉的洗涤液 (0.2% Tween 20 的 PBS 溶液) 封闭膜 1 小时。用洗涤液洗涤 3 次后, 在室温下, 将膜与单克隆抗-肌动蛋白抗体 (A4700, Sigma, St. Louis, MO) (它能识别在所有肌动蛋白异构体的 C 末端保守的表位) 或对 JEV 特异性的小鼠超免疫腹水液 (ATCC VR-1259AF, American Type Culture Collection) 一起孵育 2 小时。然后用洗涤液洗涤膜 3 次, 在室温下, 与碱性磷酸酶 (AP)- 缀合的山羊抗-小鼠免疫球蛋白 G (Jackson ImmunoResearch Labs Inc., West Grove, PA) 一起孵育 2 小时。将膜用洗涤液洗涤 3 次, 用 PBS 洗涤 1 次。通过与底物 5- 溴-4- 氯-3- 吡啶磷酸和氮蓝四唑一起孵育, 使肌动蛋白和 JEV 蛋白带可视化。结果表明, 合成的 JEV 和亲代病毒生成了类似量的和相同带型的病毒-特异性的蛋白 (图 5C, 上区块)。检测作为内部样品装载对照的肌动蛋白, 发现在模拟感染的和感染的细胞中存在等同水平的肌动蛋白 (图 5C, 下区块)。

[0146] <6-4> 通过 RNA 印迹分析对比病毒 RNA 水平

[0147] 本发明的发明人对比了在感染了从全长的感染性的 cDNA (pBAC<sup>SP6</sup>/JVFL/XhoI、

pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XhoI、pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XbaI 和 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XbaI<sup>MBN</sup>) 回收的合成 JEV 的 BHK-21 细胞中表达的病毒 RNA 和在感染了亲代病毒 CNU/LP2 的 BHK-21 细胞中表达的病毒 RNA。更具体地,用 1ml TRIzol 试剂 (Gibco/BRL),从感染的 BHK-21 细胞 ( $3 \times 10^5$ ) 中提取总 RNA。通过 RNA 印迹分析,对三分之一 RNA 分析 JEV-特异性的 RNA (Sambrook 等, Molecular cloning, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory)。将 RNA 在变性 2.2M 甲醛-1% 琼脂糖凝胶上电泳,并转移到尼龙膜 (Amersham Biosciences Inc., Piscataway, NJ) 上。通过用 254-nm 光源 (Stratalinker UV cross-linker, Stratagene, La Jolla, CA) 辐照,使膜上的 RNA 交联,通过与 [<sup>32</sup>P]CTP-标记的反义核探针 (它能结合 JEV 基因组的核苷酸 9,143 至 9,351) 杂交,检测 JEV-特异性的 RNA。已经通过从 BamHI-线性化的 cDNA 克隆 pGEM3zf(+)/JV9143 (它通过将 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XbaI 的 209bp 的 Hind III-Sac I 片段与用相同酶酶切的 pGEM3zf(+) 相连来构建) 体外地转录合成了该探针。根据生产商的说明,使用 T7-MEGAscript 试剂盒 (Ambion, Austin, TX),使用 20- $\mu$ l 含有 3.12  $\mu$ M [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]CTP (800Ci/mmol, Amersham) 的反应混合物转录了该克隆。用 DNaseI 处理后,将反应混合物在 Quick Spin G-50Sephadex 柱 (Boehringer Mannheim) 中离心,除去未整合的核糖核苷三磷酸。在 55°C,将膜在杂交溶液 [5 $\times$ SSPE (0.9M NaCl, 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 和 5mM EDTA pH 7.7), 5 $\times$ Denhardt 氏试剂, 0.5% SDS, 100  $\mu$ g/ml 变性的鲑鱼精子 DNA, 50% 甲酰胺] 中预杂交 6 小时,然后在含有 10<sup>7</sup>cpm 标记的核探针的杂交溶液在 55°C 孵育过夜。用 1 $\times$ SSPE-0.5% SDS 在 55°C 洗涤膜 3 次 10 分钟,用 0.1 $\times$ SSPE-0.5% SDS 洗涤 1 次 10 分钟。通过放射自显影法使病毒 RNA 带可视化,并用分子成像机 (Bio-Rad Lab) 定量。结果,病毒 RNA 的水平都是类似的 (图 5D)。通过图像分析对这些印迹进行定量,发现病毒基因组 RNA (图 5D, 上区块) 与 18S rRNA (图 5D, 下区块) 的比例没有显著变化,表明所有病毒基因组 RNA 都以类似水平生成。

[0148] 因而,在噬斑形态学、致细胞病性、生长动力学、蛋白表达和 RNA 生成方面,从全长的感染性的 cDNA (pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XhoI、pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XhoI、pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XbaI 和 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XbaI<sup>MBN</sup>) 回收的所有合成病毒与亲代病毒 CNU/LP2 没有差别。而且,分析 3' 端序列后,在源自任何合成病毒的病毒 RNA 基因组的 3' 端没有发现多余的 3 个 (CGA) 或 4 个 (CTAG) 核苷酸的与病毒无关的序列。这些结果验证了本发明开发的感染性的 JEV cDNA 克隆在将来的分子遗传学中的应用。

#### [0149] 实施例 7: 检查转染的培养物被亲代病毒污染的可能性

[0150] 尽管上面的结果已经有力地证明了 JEV cDNA 克隆能在 SP6 或 T7 聚合酶转录后生成高感染性的 RNA 转录物,仍未正式排出转染的培养物受到亲代病毒 CNU/LP2 污染的可能性。为了评价这种极小的可能性,本发明的发明人使用了基于 PCR 的定点诱变,以将一个遗传标记 (gm) 导入 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XbaI 构建体。更具体地,通过基于 PCR 的定点诱变,将点突变 A<sup>8171</sup>  $\rightarrow$  C (沉默) 置于 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XbaI 中的 NS5 基因内,以生成 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/gm/XbaI (图 6A)。点突变的结果是得到了独特的 XhoI 限制内切酶识别位点。首先通过使用 SEQ. ID. No 29 表示的引物 J48 (其中 Xho I 通过 A<sup>8171</sup>  $\rightarrow$  C 取代来创建) 和 SEQ. ID. No 30 表示的引物 J3 的 PCR 生成了来自 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XbaI 的片段。然后将得到的扩增子的 665bp 的 Mlu I-Apa I 片段连接到 4,802bp 的 Apa I-BsrG I 和 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XbaI 的 5,874bp 的 BsrG I-Mlu I 片段,生成 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/gm/XbaI 构建体。感染了来自 Xba I-线性化的 MBN-处理过的 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/gm/XbaI<sup>MBN</sup> 的 RNA 转录物的 BHK-21 细胞会生成含有遗传标记

的感染性病毒（指示为 JVFLx/gm/XbaI<sup>MBN</sup>）（图 6A）。JVFLx/gm/XbaI<sup>MBN</sup> 的表型特征与起始病毒 JVFLx/XbaI<sup>MBN</sup> 的没有差别，表明 A<sup>8171</sup> → C 的取代没有影响病毒复制。

[0151] 为了证实已经从 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/gm/XbaI<sup>MBN</sup> 的 cDNA 模板回收了 JVFLx/gm/XbaI<sup>MBN</sup> 病毒，本发明的发明人将回收的病毒在 BHK-21 细胞中进行了连续传代（MOI = 0.1）。将在每一代中得到的病毒与 RNaseA 和 DNaseI 一起孵育，防止带出导入的转录物 RNA 和模板质粒 cDNA（Mendez 等，J. Virol., 1998, 72, 4737-4745）。从第 1 代和第 3 代释放的 JVFLx/gm/XbaI<sup>MBN</sup> 和 JVFLx/XbaI<sup>MBN</sup> 病毒提取病毒 RNA，用于 RT-PCR，扩增包含 A<sup>8171</sup> → C 取代的 2,580bp 的产物（图 6B，泳道 1、3 和 5）。用 Xho I 酶切来自 JVFLx/gm/XbaI<sup>MBN</sup> 的扩增产物，生成 2 个 1,506 和 1,074bp 的片段（图 6B，泳道 2 和 4）。另一方面，来自 JVFLx/XbaI<sup>MBN</sup> 的 RT-PCR 产物未受到 Xho I 酶切（图 6B，对比泳道 5 和泳道 6），表明在 JVFLx/gm/XbaI<sup>MBN</sup> 病毒中确实存在 A<sup>8171</sup> → C 的取代。因此，证实了回收的病毒 JVFLx/gm/XbaI<sup>MBN</sup> 源自全长的感染性的 cDNA pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/gm/XbaI<sup>MBN</sup>。

#### [0152] 实施例 8：全长的感染性的 JEV cDNA 的遗传稳定性

[0153] 早期的研究已经证实，含有全长 JEV cDNA 的构建体经常在编码结构蛋白 prM 和 E 的区域发生稳定无意义的突变（Sumiyoshi 等，J. Virol., 1992, 66, 5425-5431）。由于对 JEV 的分子遗传学的研究必不可少地需要使用可靠的感染性的 JEV 分子克隆用于操纵，本发明的发明人以几种方式调控 pBAC<sup>SP6</sup>/pJVFLx/XbaI，并广泛地研究了其遗传结构和功能完整性。

[0154] 更具体地，如下分析了感染性的 JEV cDNA 的遗传结构和功能完整性。用 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XbaI 转化大肠杆菌菌株 DH10B，使两个独立来源的克隆在 37℃、在 10ml 2×YT（含有 12.5 μg/ml 氯霉素）中生长过夜。通过每天稀释 10<sup>6</sup> 倍，将来自原代培养物的细胞维持 9 天（Almazan 等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, 97, 5516-5521）。在本发明的实验条件下，每传代细胞代表了约 20 代，它与以前进行的观察一致（Almazan 等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, 97, 5516-5521）。第 3、6 和 9 代后，通过 SDS-碱性方法大规模制备感染性的 cDNA 质粒，并进一步通过氯化铯密度梯度离心纯化（Sambrook 等，Molecular cloning, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory）。通过其限制内切酶图谱，监测质粒 DNA 的遗传结构。通过限制酶分析，检测从第 0、3、6 和 9 代的两种培养物中提取的质粒。第 3、6 和 9 代的限制酶图谱与第 0 代的图谱没有可视的差异。因而，在琼脂糖凝胶电泳分析的分辨率内，两种感染性的 cDNA 克隆在结构上看起来是稳定的。

[0155] 通过检测从 cDNA 模板（它通过 Xba I 酶切线性化和 MBN 处理）转录出的合成的 RNA 的特异感染性，还研究了 JEV cDNA 质粒的功能完整性。结果，从两种 cDNA 克隆制备出的 RNA 转录物的感染性在第 0 代和第 9 代之间没有差异（图 7）。上述结果证实了，在大肠杆菌中的系列生长中，感染性的 JEV cDNA 保持功能稳定性。

#### [0156] 实施例 9：感染性的 JEV cDNA 作为外源基因表达的载体

[0157] 如已经记载的（Burke 和 Monath, Flaviviruses, 2001, 1043-1125, Lippincott Williams & Wilkins Publishers），本发明的发明人发现，JEV 能在广范围的源自许多种属（包括人、鼠、猴子、猪、狗、猫和仓鼠）的真核细胞中复制。这表明，JEV 可以在多种不同细胞中用作表达外源基因的载体。为了证实这一点，将两种常用的报道基因（Aequorea victoria GFP 和 Photinus pyralis LUC）插入到 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XbaI 的病毒 3' NTR 的起

点,作为由 EMCV 的 IRES 元件驱动的表达盒(图 8A)。

[0158] 为了创建 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/GFP/XbaI 构建体(图 8A),用 SEQ. ID. No31 表示的引物 J72 和 SEQ. ID. No 32 表示的引物 J73 进行 PCR,扩增来自 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XbaI 的片段。还用 SEQ. ID. No 33 表示的引物 J74 和 SEQ. ID. No 34 表示的引物 J75,从 pRSGFP-C1 扩增了一个片段。通过第二轮 PCR(使用引物 J72 和 J75),将这两个片段融合。然后将得到的扩增子的 913bp 的 Kpn I-Nsi I 片连接到 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XbaI 的 8,011bp 的 Nsi I-PacI 和 11,021bp 的 Pac I-Kpn I 片段,生成 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/GFP/XbaI 构建体。

[0159] 为了生成 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/LUC/XbaI 构建体(图 8A),用引物 J72 和 SEQ. ID. No 35 表示的引物 J76 扩增了 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XbaI 片段。还用 SEQ. ID. No 36 表示的引物 J77 和 SEQ. ID. No 37 表示的引物 J78,从 pACNR/NADLcIn-/LUC(由 Charles M. Rice 博士提供)扩增了一个片段。通过第二轮 PCR(使用引物 J72 和 J78),将这两个片段融合。然后将得到的扩增子的 1,801bp 的 Kpn I-Nsi I 片段连接到 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XbaI 的 8,011bp 的 Nsi I-PacI 和 11,021bp 的 Pac I-KpnI 片段,生成 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/LUC/XbaI。

[0160] 为了生成在其 NS3 基因的中间含有 83 个核苷酸缺失(核苷酸 5,581 至 5,663)(该缺失会在核苷酸 5,596 处造成病毒翻译的过早终止)的 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/LUC<sup>REP-</sup>/XbaI(图 8A),用 SEQ. ID. No 38 表示的引物 J89 和 SEQ. ID. No 39 表示的引物 J91 扩增了 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/LUC/XbaI 片段。还用 SEQ. ID. No 40 表示的引物 J92 和 SEQ. ID. No 41 表示的引物 J93,从 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/LUC/XbaI 扩增了一个片段。通过第二轮 PCR(使用引物 J89 和 J93),将这两个片段融合。然后将得到的扩增子的 3,960bp 的 SfiI-Eag I 片段连接到 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/LUC/XbaI 的 6,493bp 的 Eag I-Sfi I 和 10,297bp 的 Sfi I-Sfi I 片段,生成 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/LUC<sup>REP-</sup>/XbaI。

[0161] 在 CNP/LP2 的病毒 3' NTR 的起点和 3 种其它的完全测序的 JEV 株中存在 9 至 25 核苷酸的缺失(Williams 等, J. Gen. Virol., 2000, 81, 2471-2480; Nam 等, Am. J. Trop. Med. Hyg., 2001, 65, 388-392; Jan 等, Am. J. Troop. Med. Hyg., 1996, 55, 603-609),表明这是插入外源基因的较好位点。因此,当 BHK-21 细胞转染了从 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/GFP/XbaI 和 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/LUC/XbaI cDNA 转录出的合成的 RNA 时,该插入不会改变合成的 RNA 转录物的特异感染性。

[0162] 为了检测 GFP 表达,用从 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/GFP/XbaI<sup>MBN</sup> 模板转录出的感染性的合成的 RNA 转染原初 BHK-21 细胞,并通过共焦显微镜检查。更具体地,用 2  $\mu$ g JVFLx/GFP/XbaI<sup>MBN</sup> RNA 模拟转染或转染 BHK-21 细胞。将转染的细胞( $1 \times 10^5$ )在 4 孔分室载玻片中孵育 30 小时。用 PBS 洗涤细胞 2 次,通过在 25℃、在含有 0.37% (v/v) 甲醛的 PBS 中孵育 30 分钟予以固定,用 0.2ml 80% 甘油封固。通过共焦显微镜检查细胞,并分析。结果,表达 GFP 的 BHK-21 细胞在核和细胞质中都显示出绿荧光(图 8B, JVFLx/GFP/XbaI<sup>MBN</sup>),因为 GFP 足够小,能在核和细胞质之间扩散。如预期的,在模拟转染的细胞(图 8B, 模拟的)或用来自 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XbaI<sup>MBN</sup> 的 RNA 转录物转染的细胞中没有观察到该荧光。

[0163] 为了以定量的方式监视 LUC 随时间的诱导,本发明的发明人不但生成了能复制的来自 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/LUC/XbaI<sup>MBN</sup> 的 RNA 转录物、而且生成了不能复制的来自 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/LUC<sup>REP-</sup>/XbaI<sup>MBN</sup> 的 RNA 转录物(图 8A)。pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/LUC<sup>REP-</sup>/XbaI<sup>MBN</sup> 模板在 NS3 基因的中间含有 83 个核苷酸的缺失(核苷酸 5,581 至核苷酸 5,663),它在核苷酸 5,596 处过早终止

病毒翻译（见图 8A 中的 \*，pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/LUC<sup>REP-</sup>/XbaI<sup>MBN</sup>）。

[0164] 关于 LUC 试验，用 2  $\mu$ g JVFLx/LUC/XbaI<sup>MBN</sup> RNA 或 JVFLx/LUC<sup>REP-</sup>/XbaI<sup>MBN</sup> RNA 模拟转染或转染 BHK-21 细胞 ( $8 \times 10^6$ )。以  $6 \times 10^5$  细胞 / 孔的浓度，将细胞接种到 6 孔平板中，培养。在给定的时间点，用无  $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{Mg}^{2+}$  的 PBS 溶液洗涤细胞，然后通过向每孔细胞加入 0.2ml 裂解缓冲液 [25mM Tris- 磷酸盐 (pH 7.8), 2mM DTT, 2mM 1,2- 二氨基环己烷 -N, N, N', N' - 四醋酸, 10% 甘油, 1% Triton X-100(v/v)] 进行裂解。将细胞裂解物在室温孵育 10 分钟，然后通过离心除去细胞碎片。迅速将上清液置于  $-80^\circ\text{C}$  保藏，直至使用。为了检测 LUC 活性，将 20  $\mu$ l 细胞裂解物置于含有 100  $\mu$ l LUC 试验试剂 [20mM Tricine, 1.07mM  $(\text{MgCO}_3)_4\text{Mg}(\text{OH})_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 2.67mM  $\text{MgSO}_4$ , 0.1mM EDTA, 33.3mM DTT, 270  $\mu$ M 辅酶 A, 470  $\mu$ M 荧光素 (Promega), 530  $\mu$ M ATP] 的发光计管中。通常检测活性 10 秒。每一个数据点代表了 3 个独立实验的结果。

[0165] 结果，在用能复制的 JVFLx/LUC/XbaI<sup>MBN</sup> RNA 转染的 BHK-21 细胞中（图 8C, ●），转染后 6 小时的原始 LUC 活性是  $2.4 \times 10^3 \pm 0.2 \times 10^3$  相对光单位 (RLU)。转染后 30 小时，该活性急剧增加至  $5.3 \times 10^4 \pm 0.1 \times 10^4$  RLU，在转染后 54 小时，达到  $7.8 \times 10^5 \pm 0.6 \times 10^5$  RLU 小时，这时超过 50% 的细胞是死亡的。相反地，用不能复制的 JVFLx/LUC<sup>REP-</sup>/XbaI<sup>MBN</sup> RNA 的转染的 BHK-21 细胞中，转染后 6 小时的原始 LUC 活性是  $1.9 \times 10^3 \pm 0.4 \times 10^3$  RLU（图 8C, ○），这类似于 JVFLx/LUC/XbaI<sup>MBN</sup>- 转染的细胞（图 8C, ●），但是该活性随着时间逐渐地降低，在转染后 54 小时降至  $16 \pm 1.2$  RLU，这是原初细胞的背景荧光水平（图 8C, ○）。因而，随时时间表达的 LUC 活性的水平根据是否存在病毒复制而变化。

[0166] 根据前文所述的方法，本发明的发明人生成了具有 GFP 和 LUC 基因的全长的感染性的重组 JEV cDNA。用从重组 JEV cDNA 转录出的 JEV RNA 转录物转染 BHK-21 细胞，然后从培养上清液中回收含有 GFP 和 LUC 基因的重组 JEV JVFLx/GFP/XbaI<sup>MBN</sup> 和 JVFLx/LUC/XbaI<sup>MBN</sup>。在用病毒感染了多种已经普遍用于生物和医学领域的动物细胞系 (BHK-21, Vero, NIH/3T3, ST, HeLa, MDCK, CRFK, B103 和 SHSY-5Y) 之后，研究了 GFP 和 LUC 基因在重组 JEV 中的表达。结果，插入到病毒基因组中的 GFP 或 LUC 基因在所有的检验细胞中都有表达（表 4）。因而，证实了重组的 JEV cDNA、JEV RNA 转录物和重组的 JEV 病毒颗粒可以有效地用在多种细胞类型中表达外源基因的载体。

[0167] 表 4 在感染性的 JEV cDNA 中工程化的 GFP 和 LUC 基因的表达

[0168]

| 细胞系    | GFP 表达 <sup>a</sup> | LUC 诱导 <sup>b</sup> |
|--------|---------------------|---------------------|
| BHK-21 | 有表达                 | 有表达                 |
| Vero   | 有表达                 | 有表达                 |
| HeLa   | 有表达                 | 有表达                 |
| MDCK   | 有表达                 | 有表达                 |
| CRFK   | 有表达                 | 有表达                 |

| 细胞系     | GFP 表达 <sup>a</sup> | LUC 诱导 <sup>b</sup> |
|---------|---------------------|---------------------|
| NIH/3T3 | 有表达                 | 有表达                 |
| ST      | 有表达                 | 有表达                 |
| B103    | 有表达                 | 有表达                 |
| SHSY-5Y | 有表达                 | 有表达                 |

[0169] a:用重组 JEV JVFLx/GFP/XbaI<sup>MBN</sup> 感染细胞后,分析 GFP 蛋白的表达。

[0170] b:用重组 JEV JVFLx/LUC/XbaI<sup>MBN</sup> 感染细胞后,分析 LUC 蛋白的表达。

[0171] 实施例 10:感染性的 JEV cDNA 作为新型外源基因表达系统的应用。

[0172] 本发明的发明人还研究了基于 JEV 的表达系统在表达目标外源基因中的应用。首先,本发明的发明人构建了全长病毒基因组,以表达 3 个常用的和不同大小的异源报道基因,即改进版的 *Aequorea victoria* GFP 基因 (EGFP, 768bp)、来自 *Photinus pyralis* 的 LUC 基因 (1653bp),和 LacZ (3012bp) 基因 (图 9B)。本发明的发明人还导入了显性选择标记 PAC (600bp),它会赋予对药物嘌呤霉素的抗性 (图 9B)。

[0173] <10-1> 异源基因编码的感染性的重组 JEV (它以作为 BAC 的双顺反子的全长的感染性的 JEV cDNA 为基础) 的构建和表征。

[0174] <10-1-1> 感染性的重组 JEV 载体的质粒构建

[0175] 所有的质粒都通过标准的分子生物方法构建 (Sambrook 等, Molecular cloning : a laboratory manual, 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory, ColdSpring Harbor, N. Y., 1989), 并通过测序验证了 PCR 扩增的所有区域。本发明中使用的所有重组 JEV 载体都是在 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/XbaI (它在下文中称作 pJEV/FL) 的基础上构建 (Yun 等, J. Virol., 2003, 77, 6450-6465) (图 9A)。

[0176] 本发明的发明人构建了一组 4 个表达 LUC、EGFP、LacZ 和 PAC 基因的感染性的重组 JEV 载体。pJEV/FL/LUC 与前面在实施例 9 中命名为 pBAC<sup>SP6</sup>/JVFLx/LUC/XbaI 的构建体相同 (图 9B)。为了构建 pJEV/FL/LacZ, 首先将 pJEV/FL/LUC 的 2, 409bp 的 Kpn I-Avr II 片段亚克隆进用 Kpn I 和 Xba I 酶切的 pGEM3Zf(+) 中, 生成 pGEM/LUC。将 pSinRep3/LacZ (由 Charles Rice 博士惠赠) 的 3, 177bp 的 Nco I-Stu I 片段连接到 pGEM/LUC 的 3, 935bp 的 Nco I-Nsi I (T4DNA 聚合酶处理过的) 片段, 生成 pGEM/LacZ。将 pGEM/LacZ 的 3, 873bp 的 Kpn I-Not I 片段连接到 pJEV/FL/LUC 的 7, 456bp 的 Not I-Pac I 和 11, 021bp 的 Pac I-KpnI 片段, 生成 pJEV/FL/LacZ (图 9B)。为了有利于 pJEV/FL/EGFP 的构建, 将 pJEV/FL/LacZ 的 5, 792bp 的 Sac II-Not I 片段插入用相同酶处理的 pRS2, 生成 pRS/LacZ。使用引物 EGFPF (由 SEQ. ID. No 49 表示) 和 EGFP R (由 SEQ. ID. No 50 表示) 进行 pEGFP-C1 的 PCR 扩增, 生成了编码 EGFP 的序列片段。将 EGFP 片段扩增子的 773bp 的 Nco I-Stu I 部分连接到 pRS/LacZ 的 3, 241bp 的 EcoR V-SacII 和 2, 062bp 的 Sac II-Nco I 片段, 生成 pRS/EGFP。将 pRS/EGFP 的 3, 406bp 的 Sac II-Not I 片段连接到 pJEV/FL/LUC 的 7, 456bp 的 Not I-Pac I 和 9, 102bp 的 Pac I-Sac II 片段, 生成 pJEV/FL/EGFP (图 9B)。为了生成 pJEV/FL/PAC, 使用引物 PACF (由 SEQ. ID. No 51 表示) 和 PACR (由 SEQ. ID. No 52 表示) PCR 扩增

pACNR/NADLcIns-/PAC(由 Charles Rice 博士惠赠)片段。将得到的扩增子的 881bp 的 Dra III-Nsi I 部分连接到 pJEV/FL/LUC 的 8,011bp 的 Nsi I-Pac I、10,096bp 的 Pac I-Nde I 和 842bp 的 Nde I-Dra III 片段,生成 pJEV/FL/PAC(图 9B)。将 EMCV IRES 驱动的表达盒插入到 pJEV/FL 的病毒 3' NTR 的起点(图 9A 和 9B)。

[0177] <10-1-2>EGFP 表达的试验

[0178] 转染后 36-48 小时,将细胞接种到 4 孔分室载玻片中。孵育后,通过在含有 0.37% (v/v) 甲醛的 PBS 中孵育固定细胞,然后用 0.2ml 80% 甘油封固。在配备有合适滤镜的共焦显微镜下观察细胞。还通过流式细胞仪分析检测了 EGFP 的表达。更具体地,用胰蛋白酶处理细胞,用 PBS 洗涤一次,重新悬浮到在 0.37% (v/v) 甲醛的 PBS 溶液中,随后用 FACScan 流式细胞仪 FACSCalibur (Becton Dickinson) 分析。通过合适的前和侧光散射门排除死细胞。计数一万存活的细胞。

[0179] <10-1-3> $\beta$ -半乳糖苷酶试验

[0180] 用 PBS 洗涤细胞 1 次,用 0.05% (v/v) 戊二醛的 PBS 溶液在室温固定 15 分钟,用 PBS 小心地洗涤 3 次。通过在染色溶液 [5mM 铁氰化钾,5mM 亚铁氰化钾,2mM  $MgCl_2$  的 PBS 溶液] 中与 5-溴-4-氯-3-吲哚- $\beta$ -吡喃半乳糖苷 (Sigma) 一起在 37°C 孵育,检测细胞的  $\beta$ -gal 活性。

[0181] <10-1-4>荧光素酶试验

[0182] 如前所述,通过使用底物荧光素 (Promega) 分析细胞的 LUC 活性 (Yun 等, J. Virol., 2003, 77, 6450-6465)。每个实验进行一式三份,取平均值。

[0183] <10-1-5>嘌呤霉素筛选

[0184] 将细胞接种到 6-孔平板中,在 37°C 培养 6 小时。为了检测  $Pur^R$  foci 的形成,用在 MEM(含有 10% 热灭活的 FBS 和青霉素/链霉素)中的 0.5% SeaKem LE 琼脂糖 (FMC BioProducts, Rockland, Maine) 覆盖细胞,在 37°C 孵育 2 天。此后,在有或没有嘌呤霉素 (10  $\mu$ g/ml) 存在的情况下将平板再孵育 3 天。筛选后,通过对甲醛固定的细胞进行结晶紫染色,使  $Pur^R$  foci 可视化 (Yun 等, J. Virol., 2003, 77, 6450-6465)。对于  $Pur^R$  细胞培养物,细胞不覆盖琼脂糖,在完全培养基中在 37°C 培养 2 天。随后,在含有 10  $\mu$ g/ml 嘌呤霉素的完全培养基中培养细胞,筛选后 24-48 小时,通过结晶紫染色使存活的细胞可视化。

[0185] <10-1-6>在转染了/感染了重组合成的含有其它表达单元的 JEV RNA/病毒的 BHK-21 细胞中表达异源蛋白

[0186] 为了检测插入的表达盒是否会改变其特异性的感染性/复制,本发明的发明人检测了合成的 RNA(它已经从 4 个携带有 SP6-驱动的外源基因的感染性的 JEV cDNA 构建体转录出来)的特异性的体外感染性(表 5)。通过 Xba I 酶切使纯化的 pJEV/FL 和其衍生物质粒线性化,随后用 MBN 处理。如前所述,将线性化的质粒用于采用 SP6RNA 聚合酶的体外转录反应 (25  $\mu$ l)。转录后,用 10U Dnase I 进一步孵育反应混合物 30 分钟,并用苯酚-氯仿-异戊醇提取。通过 RNA 向 DE-81 滤纸 (Whatman, Maidstone, UK) 的吸附检测 [ $^3H$ ]UTP 的整合,在此基础上对 RNA 的产量进行定量。如前所述,通过电穿孔,将 RNA (2  $\mu$ g) 转染进细胞 (Yun 等, J. Virol., 2003, 77, 6450-6465)。

[0187] 导入易感的 BHK-21 细胞中的源自 pJEV/FL/PAC、pJEV/FL/EGFP、pJEV/FL/LUC 和 pJEV/FL/LacZ 的合成的 RNA 分别具有  $3.5 \times 10^6$ 、 $2.5 \times 10^6$ 、 $3.4 \times 10^6$  和  $1.1 \times 10^6$  PFU/ $\mu$ g 的

特异感染性,这与亲代 pJEV/FL 的感染性 ( $3.2 \times 10^6$  PFU/ $\mu$ g) 类似。但是,转染了重组合成的 RNA 的 BHK-21 细胞确实形成了比 pJEV/FL- 转染的细胞更小的同源噬斑 (图 9C)。这与感染性病毒的迟延生成 (表 5, 病毒滴度) 和在重组 RNA- 转染的细胞中观察到的降低的致细胞病性 (表 5, CPE) 相一致。本发明的发明人还证实了,重组 RNA- 转染的 BHK-21 细胞中的病毒蛋白的迟延积累 (图 9D) 与已经插入的外源基因的长度相关 (图 9B)。

[0188] 表 5 从含有不同报道基因的全长 JEV cDNA 衍生物生成的体外 RNA 转录物的特异感染性和重组病毒滴度

|        | 用于转录的模板 <sup>a</sup>        | 感染性 <sup>b</sup><br>(PFU/ $\mu$ gRNA) | 病毒滴度 <sup>c</sup> (PFU/ml) |                   | CPE <sup>d</sup> |
|--------|-----------------------------|---------------------------------------|----------------------------|-------------------|------------------|
|        |                             |                                       | 48 小时                      | 72 小时             |                  |
| [0189] | pJEV/FL                     | $3.2 \times 10^6$                     | $3.0 \times 10^6$          | $5.1 \times 10^5$ | ++++             |
|        | pJEV/FL/PAC                 | $3.5 \times 10^6$                     | $6.2 \times 10^4$          | $4.0 \times 10^5$ | ++               |
|        | pJEV/FL/EGFP                | $2.5 \times 10^6$                     | $9.0 \times 10^4$          | $2.1 \times 10^5$ | ++               |
|        | pJEV/FL/LUC                 | $3.4 \times 10^6$                     | $2.0 \times 10^4$          | $3.2 \times 10^5$ | +                |
|        | pJEV/FL/LUC <sup>REP-</sup> | 0                                     | 0                          | 0                 | -                |
|        | pJEV/FL/LacZ                | $1.1 \times 10^6$                     | $1.1 \times 10^4$          | $1.3 \times 10^5$ | +                |

[0190] a:用于体外转录反应的所有 JEV cDNA 模板都是通过 Xba I 酶切进行线性化、随后用 MBN 处理制备的。

[0191] b:用 SP6RNA 聚合酶体外转录后,将样品用于电穿孔 BHK-21 细胞,检测感染性的噬斑中心 (Yun 等, J. Virol., 2003, 77, 6450-6465)。

[0192] c:电穿孔后 48 小时和 72 小时时的病毒滴度。

[0193] d:用 RNA 转录物 (从全长 JEV cDNA 衍生物生成) 电穿孔后观察到了病毒诱导的 CPE。在电穿孔后 24 小时,在亲代 pJEV/FL 观察到强烈的 CPE,如 ++++ 所示。对于 pJEV/FL/PAC 和 pJEV/FL/EGFP,在电穿孔后 60 小时观察的 CPE,如 ++ 所示。对于 pJEV/FL/LacZ,在电穿孔后 72 小时出现清楚的 CPE,如 + 所示。- 表示无 CPE。

[0194] 使用感染性的 JEV cDNA 进行的 EGFP、LUC、LacZ 和 PAC 表达如图 10 所示。JEV/FL/EGFP RNA- 转染的 BHK-21 细胞在荧光显微镜下显示出明亮的绿色荧光 (图 10A)。如通过流式细胞仪分析所测定的,与模拟转染的细胞 (……) 相比,绿色荧光的细胞 (-) 包含 99.7% 的细胞 (图 10B)。图 10C 说明了表达 JEV/FL/LacZ RNA 的 BHK-21 细胞的 X-gal 染色图案。本发明的发明人还监测了已经用能复制的 JEV/FL/LUC RNA (●) 或不能复制的 JEV/FL/LUC<sup>REP-</sup> RNA (○) (它缺少能在核苷酸 5596 (\*) 处过早终止病毒翻译的部分) 转染的 BHK-21 细胞随时间的 LUC 活性。这表明,增强的病毒复制与增强的 LUC 活性相关 (图 10D),如前所述 (Yun 等, J. Virol., 2003, 77, 6450-6465)。而且,用嘌呤霉素对 JEV/FL/PAC RNA- 转染的 BHK-21 细胞进行的筛选 (图 10E) 表明, JEV/FL/PAC RNA- 转染的细胞能存活,并且在含有嘌呤霉素的培养基 (平皿 7) 中汇合,或在用含有嘌呤霉素的培养基 (平皿 8) 铺成的半固体琼脂层下形成 Pur<sup>R</sup> foci,而模拟转染的细胞则在筛选 24 小时内死亡 (平皿 5-6)。如预期的,两种细胞类型在没有嘌呤霉素的情况下都能汇合 (平皿 1-4)。

[0195] <10-2>JEV 病毒复制子的构建和载体特征

[0196] <10-2-1>JEV 病毒复制子载体的质粒构建

[0197] 在 pJEV/FL/LUC (在结构蛋白的编码序列中工程地框架内缺失) 的基础上构建了用于所有 JEV 病毒复制子的质粒。所有的缺失通过新的 Xho I 位点 (它会插入两个残基, 即 Leu 和 Glu) 予以区别。首先, 本发明的发明人生成了一组 4 个在每个结构蛋白中含有一个框架内缺失的 JEV 病毒复制子载体。为了构建在 C 基因中含有 273 个核苷酸缺失 (核苷酸 132-404) 的 pJEV/Rep/ΔCC/LUC, 通过 PCR 扩增 pJEV/FL 合成了 2 个片段, 即片段 C1 使用引物 De1F (由 SEQ. ID. No 53 表示) 和 C1R (由 SEQ. ID. No 54 表示), 片段 C2 使用引物 C2F (由 SEQ. ID. No 55 表示) 和 De1R (由 SEQ. ID. No 56 表示)。将 2 个片段 (C1 片段扩增子的 267bp 的 Pac I-Xho I 部分和 C2 片段扩增子的 226bp 的 Xho I-BsiW I 部分) 连接到 pJEV/FL/LUC 的 20,073bp 的 BsiW I-Pac I 片段, 生成 pJEV/Rep/ΔCC/LUC 构建体。为了生成在 C 基因中含有 204 个核苷酸缺失 (核苷酸 201-404) 的 pJEV/Rep/ΔC/LUC, 通过使用引物 De1F 和 C3R (由 SEQ. ID. No 57 表示) 的 PCR 从 pJEV/FL 扩增片段 C3。将得到的扩增子的 336bp 的 Pac I-Xho I 片段连接到 pJEV/Rep/ΔCC/LUC 的 12,850bp 的 Xho I-Rsr II 和 7,449bp 的 Rsr II-Pac I 片段, 生成 pJEV/Rep/ΔC/LUC 构建体。为了创建在 prM 基因中含有 282 个核苷酸缺失 (核苷酸 531-812) 的 pJEV/Rep/ΔprM/LUC, 通过 PCR 扩增 pJEV/FL 得到 2 个片段, 即, 片段 prM1 使用引物 De1F 和 prM1R (由 SEQ. ID. No 58 表示), 片段 prM2 使用引物 prM2F (由 SEQ. ID. No 59 表示) 和 De1R。将 2 个片段 (prM1 片段扩增子的 666bp 的 Pac I-Xho I 部分和 prM2 片段扩增子的 1,616bp 的 Xho I-Sfi I 部分) 连接到 pJEV/FL/LUC 的 10,264bp 的 Sfi I-Nsi I 和 8,011bp 的 Nsi I-Pac I 片段, 生成 pJEV/Rep/ΔprM/LUC 构建体。为了生成在 E 基因中含有 1,170 个核苷酸缺失 (核苷酸 1,032-2,201) 的 pJEV/Rep/ΔE/LUC, 通过 PCR 扩增 pJEV/FL 生成了 2 个片段, 即, 片段 E1 使用引物 De1F 和 E1R (由 SEQ. ID. No 60 表示), 片段 E2 使用引物 E2F (由 SEQ. ID. No 61 表示) 和 De1R。将 2 个片段 (prM1 片段扩增子的 1,167bp 的 Pac I-Xho I 部分和 prM2 片段扩增子的 227bp 的 Xho I-Sfi I 部分) 连接到 pJEV/FL/LUC 的 10,264bp 的 Sfi I-Nsi I 和 8,011bp 的 Nsi I-Pac I 片段, 生成 pJEV/Rep/ΔE/LUC 构建体 (图 11A)。

[0198] 其次, 本发明的发明人构建了一组 3 个在 JEV 结构基因中含有 2 个框架内缺失的 JEV 病毒复制子载体。将 2 个 pJEV/FL/LUC 片段 (10,264bp 的 Sfi I-Nsi I 和 8,011bp 的 Nsi I-Pac I 片段) 连接到 (i) pJEV/Rep/ΔC/LUC 的 438bp 的 Pac I-Hind III 片段和 pJEV/Rep/ΔprM/LUC 的 1,646bp 的 HindIII-Sfi I 片段, 生成 pJEV/Rep/ΔC+ΔprM/LUC, (ii) pJEV/Rep/ΔC/LUC 的 866bp 的 Pac I-Mlu I 片段和 pJEV/Rep/ΔE/LUC 的 330bp 的 Mlu I-Sfi I 片段, 生成 pJEV/Rep/ΔC+ΔE/LUC, 或 (iii) pJEV/Rep/ΔprM/LUC 的 788bp 的 Pac I-Mlu I 片段和 pJEV/Rep/ΔE/LUC 的 330bp 的 Mlu I-Sfi I 片段, 生成 pJEV/Rep/ΔprM+ΔE/LUC (图 11A)。

[0199] 再次, 本发明的发明人创建了一组 2 个 JEV 病毒复制子载体, 其中缺失所有的 JEV 结构蛋白。为了生成 pJEV/Rep/ΔC+ΔprM+ΔE/LUC, 将 pJEV/FL/LUC 的 2 个片段 (10,264bp 的 Sfi I-Nsi I 和 8,011bp 的 Nsi I-Pac I 片段) 连接到 pJEV/Rep/ΔC+ΔprM/LUC 的 590bp 的 Pac I-Mlu I 片段和 pJEV/Rep/ΔE/LUC 的 330bp 的 Mlu I-Sfi I 片段。本发明的发明人还构建了 pJEV/Rep/NS1/LUC, 它含有 C 蛋白 (其后紧跟着 NS1 蛋白的 N-末端) 的 35

个 N- 末端和 24 个 C- 末端氨基酸、和病毒基因组的其余部分。首先通过使用引物 De1F 和 NS1R( 由 SEQ. ID. No 62 表示 ) 的 PCR, 从 pJEV/Rep/  $\Delta$  C/LUC 合成了 1 个片段。然后用引物 NS1F( 由 SEQ. ID. No 63 表示 ) 和 RR( 由 SEQ. ID. No 64 表示 ), 从 pJEV/FL 合成了 1 个片段。通过使用引物 De1F 和 RR 的第 2 轮 PCR, 将这 2 个片段融合。将得到的扩增子的 474bp 的 Pac I-ApaI I 片段连接到 pJEV/FL/LUC 的 3,038bp 的 ApaI-BamH I 和 15,122bp 的 BamH I-Pac I 片段, 生成 pJEV/Rep/NS1/LUC( 图 11A)。

[0200] 除了 pJEV/Rep/  $\Delta$  C+  $\Delta$  prM+  $\Delta$  E/LUC 和 pJEV/Rep/NS1/LUC 之外, 本发明的发明人还构建了 8 个其它的 JEV 病毒复制子载体。将 pJEV/FL/EGFP 的 6,797bp 的 BamH I-Not I 片段连接到 (i)pJEV/Rep/  $\Delta$  C+  $\Delta$  prM+  $\Delta$  E/LUC 的 11,529bp 的 BamH I-Not I 片段, 生成 pJEV/Rep/  $\Delta$  C+  $\Delta$  prM+  $\Delta$  E/EGFP, 或 (ii)pJEV/Rep/NS1/LUC 的 10,968bp 的 BamH I-Not I 片段, 生成 pJEV/Rep/NS1/EGFP。将 pJEV/FL/LacZ 的 5,792bp 的 Sac II-Not I 片段连接到 (i)pJEV/Rep/  $\Delta$  C+  $\Delta$  prM+  $\Delta$  E/LUC 的 7,456bp 的 Not I-Pac I 和 7,464bp 的 Pac I-Sac II 片段, 生成 pJEV/Rep/  $\Delta$  C+  $\Delta$  prM+  $\Delta$  E/LacZ, 或 (ii)pJEV/Rep/NS1/LUC 的 7,456bp 的 Not I-Pac I 和 6,903bp 的 Pac I-Sac II 片段, 生成 pJEV/Rep/NS1/LacZ。将 pJEV/FL/PAC 的 6,663bp 的 BamH I-Not I 片段连接到 (i)pJEV/Rep/  $\Delta$  C+  $\Delta$  prM+  $\Delta$  E/LUC 的 11,529bp 的 BamH I-Not I 片段, 生成 pJEV/Rep/  $\Delta$  C+  $\Delta$  prM+  $\Delta$  E/PAC, 或 (ii)pJEV/Rep/NS1/LUC 的 10,968bp 的 BamH I-Not I 片段, 生成 pJEV/Rep/NS1/PAC。

[0201] <10-2-2> 在多种自我复制的、自限制的 JEV 病毒复制子中表达异源蛋白

[0202] 为了利用 JEV RNA 复制机制独立地表达外源基因, 本发明的发明人生成了一组能满足严格安全要求的自我复制的、自限制的病毒复制子( 图 11A)。开始, 本发明的发明人使用了 LUC 报道基因作为外源基因, 因为它有利于以敏感的和定量的方式监测病毒复制。因而, 考虑每种蛋白的膜定位, 通过使 pJEV/FL/LUC 在框架内缺失 1 个、2 个或全部病毒结构基因( C、prM 和 E), 小心地构建了多种复制子载体( 图 11A)。

[0203] 用已经转染了不同病毒复制子的 BHK-21 细胞的 LUC 活性, 对时间作图( 图 11B)。用转染了能复制的 JEV/FL/LUC RNA( ●, 黑色 ) 的 BHK-21 细胞作为阳性对照, 转染后 6 小时的起始 LUC 活性是  $5.5 \pm 0.3 \times 10^3$  RLU。该活性在转染后 48 小时急剧增加至  $2.7 \pm 0.5 \times 10^6$  RLU, 并且维持至转染后 96 小时。在转染了不能复制的 JEV/FL/LUC<sup>REP-</sup> RNA( ◆, 黑色 ) 的 BHK-21 细胞中, 在转染后 6 小时, 从导入的病毒 RNA 表达的初始 LUC 活性近似, 即  $5.2 \pm 0.6 \times 10^3$  RLU。但是, 该活性随着时间逐渐降低, 在转染后 96 小时降至  $8.8 \pm 1.0$  RLU, 这与原初细胞的背景荧光等同。且不说 pJEV/Rep/  $\Delta$  CC/LUC( ◆, 蓝色 ), 其缺少与猜想的 3'NTR( 它在所有黄病毒中都是保守的 ) 中的环化序列互补的序列( Bredenbeek 等, J. Gen. Virol., 2003, 84, 1261-1268; Lo 等, J. Virol., 2003, 77, 10004-10014; Khromykh 等, J. Virol., 2001, 75, 6719-6728), 转染了病毒复制子( 其缺少一个或多个结构蛋白基因的一部分 ) 的 BHK-21 细胞的 LUC 活性在转染后 6-48 小时与能复制的 JEV/FL/LUC RNA- 转染的 BHK-21 细胞( ●, 黑色 ) 几乎相同。但是, 这些活性此后随着时间急剧下降, 因为不能进行病毒扩散, 这类似于 JEV/FL/LUC<sup>REP-</sup>。有趣的是, 由于 JEV/Rep/NS1/LUC RNA( ●, 绿色 ) 而不是 JEV/Rep/  $\Delta$  C+  $\Delta$  prM+  $\Delta$  E/LUC RNA( ■, 绿色 ) 造成的 LUC 活性在全部时间点都约是其它能复制的病毒复制子的活性的 5 倍。

[0204] 如通过使用 JEV- 特异性的超免疫血清的免疫印迹所定量的, LUC 的表达图谱与病

毒蛋白的积累相一致(图 11C)。本发明的发明人还证实了,通过使用基于 JEV 的复制子载体例如 pJEV/Rep/NS1 和 pJEV/Rep/ $\Delta$ C+ $\Delta$ prM+ $\Delta$ E,其它报道基因也能在多种常用的动物细胞中有效地表达。

[0205] <10-3> 用于 JEV 病毒复制子的包装系统的构建

[0206] <10-3-1> 以 pSinRep19 载体为基础的 JEV 结构蛋白表达载体的质粒构建

[0207] 本发明的发明人以 pSinRep19 为基础构建了 3 个 JEV 结构蛋白表达载体 (Agapov 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, 95, 12989-12994)。对于 pSinRep19/JEV C-E,用包含 Xba I 位点(标有下划线的)的引物 JEVCF(5'-GATTCTAGAATGACTAAAAACCA,由 SEQ. ID. No 65 表示)和包含 PmeI 位点(标有下划线的)的引物 JEVER(5'-GATGTTTAACTATTAAGCATG CACATTGGT,由 SEQ. ID. No 66 表示)扩增了 pJEV/FL 片段。将得到的扩增子的 2,393bp 的 Xba I-Pme I 片段连接到 pSinRep19 的 10,864bp 的 Xba I-Mlu I(T4DNA 聚合酶处理过的)片段,构建 pSinRep19/JEV C-E(图 12A)。对于 pSinRep19/JEV C-NS1,用引物 JEVNS1R(5'-GATGTTTAACTATTAAGCATCAACCTGTGA,由 SEQ. ID. No 67 表示)PCR 扩增 pJEV/FL 得到 1 个片段。然后将得到的扩增子的 3,449bp 的 Xba I-Pme I 片段连接到 pSinRep19 的 10,864bp 的 Xba I-Mlu I(T4DNA 聚合酶处理过的)片段,构建 pSinRep19/JEV C-NS1(图 12A)。对于 pSinRep19/JEV C-E-BglIII,将 pSinRep19/JEV C-NS1 的 2,559bp 的 Xba I-BglIII(T4DNA 聚合酶处理过的)片段连接到 pSinRep19 的 10,864bp 的 XbaI-Mlu I(T4DNA 聚合酶处理过的)片段(图 12A)。

[0208] <10-3-2> 源自 JEV 的复制子载体 RNA 的包装细胞系的生成。

[0209] 通过开发能组成型表达所有的 JEV 结构蛋白(C、prM 和 E)并反向补充 JEV 病毒复制子的有效包装的包装细胞系(PCL),详述了基于 JEV 复制子的表达载体的应用。在含有亚基因组启动子(它有利于筛选)驱动 PAC 基因的 pSinRep19 表达载体的基础上(图 12A),本发明的发明人构建了 3 个不同的 JEV 结构蛋白表达盒构建体,它们编码 C-E(pSinRep19/JEVC-E)、C-E+NS1 的 58 个 N-末端残基(pSinRep19/JEV C-E-BglIII)和 C-NS1(pSinRep19/JEV C-NS1)的序列。

[0210] 在转染了合成的 RNA(它们已经从相应载体体外地转录)的 BHK-21 细胞中评价了这些载体产生的蛋白表达。通过 Xho I 酶切,使 pSinRep19 和其衍生物线性化。如前所述,线性化的质粒用于使用 SP6RNA 聚合酶的体外转录反应(25  $\mu$ l)。转录后,用 10U DNase I 进一步孵育反应混合物 30 分钟,用苯酚-氯仿-异戊醇提取。通过 RNA 向 DE-81 滤纸(Whatman, Maidstone, UK)的吸附检测 [ $^3$ H]UTP 的整合,在此基础上对 RNA 的产量进行定量。如前所述,通过电穿孔将 RNA(2  $\mu$ g)转染进细胞(Yun 等, J. Virol., 2003, 77, 6450-6465)。当用 JEV-特异性的超免疫血清进行免疫印迹、分析转染的细胞的细胞裂解物时,在转染了 3 种载体中的每一种的 BHK-21 细胞中检测到了等量的病毒糖蛋白 E(图 12B)。如设计的,只在 SinRep19/JEVC-NS1RNA-转染的细胞中检测到了 NS1 蛋白(图 12B)。

[0211] 图 12C 解释了生产 JEV 病毒复制子颗粒(VRP)的 2 个方法。一个包括用能表达 JEV 结构蛋白的 SinRep19 载体 RNA 瞬时共转染体外转录的 JEV 复制子载体 RNA。通过用 VRP 感染原初 BHK-21 细胞然后检测报道基因的表达,可以滴定和监测包装的 VRP。在几个实验中,用表达 EGFP 的 JEV 病毒复制子 RNA[JEV/Rep/ $\Delta$ C+ $\Delta$ prM+ $\Delta$ E/EGFP(□,绿色)或 JEV/Rep/NS1/EGFP(■,绿色)]共转染 SinRep19/JEV C-NS1 RNA,生成了  $1.1-4.3 \times 10^4$

感染单位 /ml (IU/ml) 的 VRP (图 12D)。使用表达 LacZ 的 JEV 病毒复制子, 即, JEV/Rep/ $\Delta C + \Delta prM + \Delta E$ /LacZ (□, 蓝色) 或 JEV/Rep/NS1/LacZ (■, 蓝色) 得到了类似结果。当使用 SinRep19/JEVC-NS1 或 SinRep19/JEV C-E-BgIII JEV 结构蛋白表达盒时, 没有观察到差异。但是, 将 SinRep19/JEV C-E 载体 RNA 和表达 EGFP 或 LacZ 的病毒复制子共转染生成了少了  $\approx 100$  倍的 VRP (图 12D)。通过将所有的 JEV 结构蛋白表达载体 RNA 和表达 LUC 的 JEV 复制子 RNA, 即 JEV/Rep/ $\Delta C + \Delta prM + \Delta E$ /LUC (□, 黑色) 或 JEV/Rep/NS1/LUC (■, 黑色) 共转染, 证实了该结果 (图 12D)。

[0212] 生产 JEVVRP 的其它方法以使用连续 PCL (通过用 JEV 结构蛋白表达载体 RNA 转染细胞和用嘌呤霉素筛选建立) 为基础。如前所述, 用 JEV 结构蛋白表达载体 RNA 转染 BHK-21 细胞。转染后, 将细胞接种培养约 24 小时, 将培养基替换为新鲜的含有  $10 \mu\text{g/ml}$  嘌呤霉素 (Sigma) 的完全培养基。此后, 将细胞维持在存在嘌呤霉素的条件下, 并传代和冷冻作为亲代 BHK-21 细胞。

[0213] 证实选择的细胞能稳定地表达 JEV 结构蛋白, 并且对宿主细胞没有任何有害作用, 在生产基于 JEV 的 VRP 方面也比亲代 BHK-21 细胞略微更有效。在所有的情况下, 与包括用 2 个载体 RNA 共转染亲代 BHK-21 细胞的方法相比, 用 JEV 病毒复制子载体 RNA 转染这些 PCL 得到了更高的 VRP 滴度 ( $1.0 \times 10^3 - 1.2 \times 10^5 \text{ IU/ml}$ ) (图 12E)。

[0214] 为了检测在本发明开发的包装系统中存在能复制的病毒颗粒, 用  $3 \times 10^5 \text{ IU VRP}$  ( $\text{MOI} = 1$ ) 感染原初 BHK-21 细胞 72 小时。将从感染的细胞得到的未稀释的上清液进一步传代 3 次, 扩增可能存在的非常少量的能复制的病毒颗粒。在这些传代结束时, 使用 JEV-特异性的超免疫血清进行 IFA, 检测感染的细胞中的报道基因或病毒蛋白的表达。没有检测出能复制的病毒颗粒。而且, 表达 JEV 结构蛋白的 Sindbis 复制子 RNA 没有包封在释放的 VRP 中。

#### [0215] 工业实用性

[0216] 如前所述, 本发明的 JEV 基因组 RNA 的可靠的核苷酸序列和从其合成的全长的感染性的 JEV cDNA 不但可以用于鉴别 JEV 基因, 而且可以用于分子生物学研究, 包括 JEV 复制、转录和翻译。而且, 它们还可以用于开发日本脑炎的治疗剂、疫苗、诊断剂和诊断装置, 还可以用作表达多种外源基因的载体。

[0217] 本领域的技术人员应当明白, 前面的说明书中公开的概念和具体实施方案可以容易地用作实现本发明的相同目的的其他实施方案的修改基础和设计基础。本领域的技术人员还应当明白, 这样的等同实施方案没有脱离权利要求书所述的发明精神和范围。

[0218] 用于专利程序的国际承认的微生物保藏布达佩斯条约

[0219] 国际表格

[0220] 微生物保藏证明

[0221] 按照细则 Rule 7.1 发行

[0222] 致: 李荣敏

[0223] 医学院, 国立忠北大学, (College of Medicine, Chungbuk National University) #48, Gaeshin-dong, Heungduk-ku, Cheongju-si, Chungbuk, 361,763 韩国





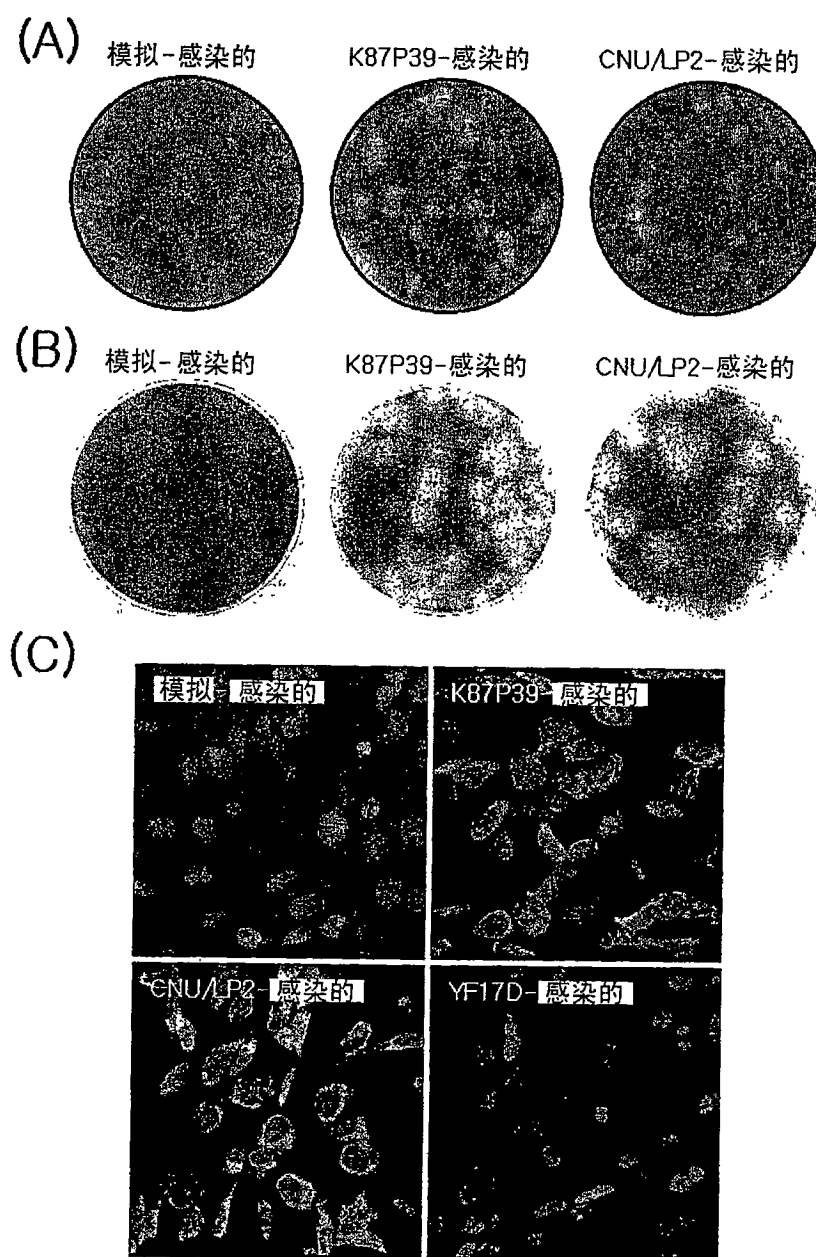


图 1

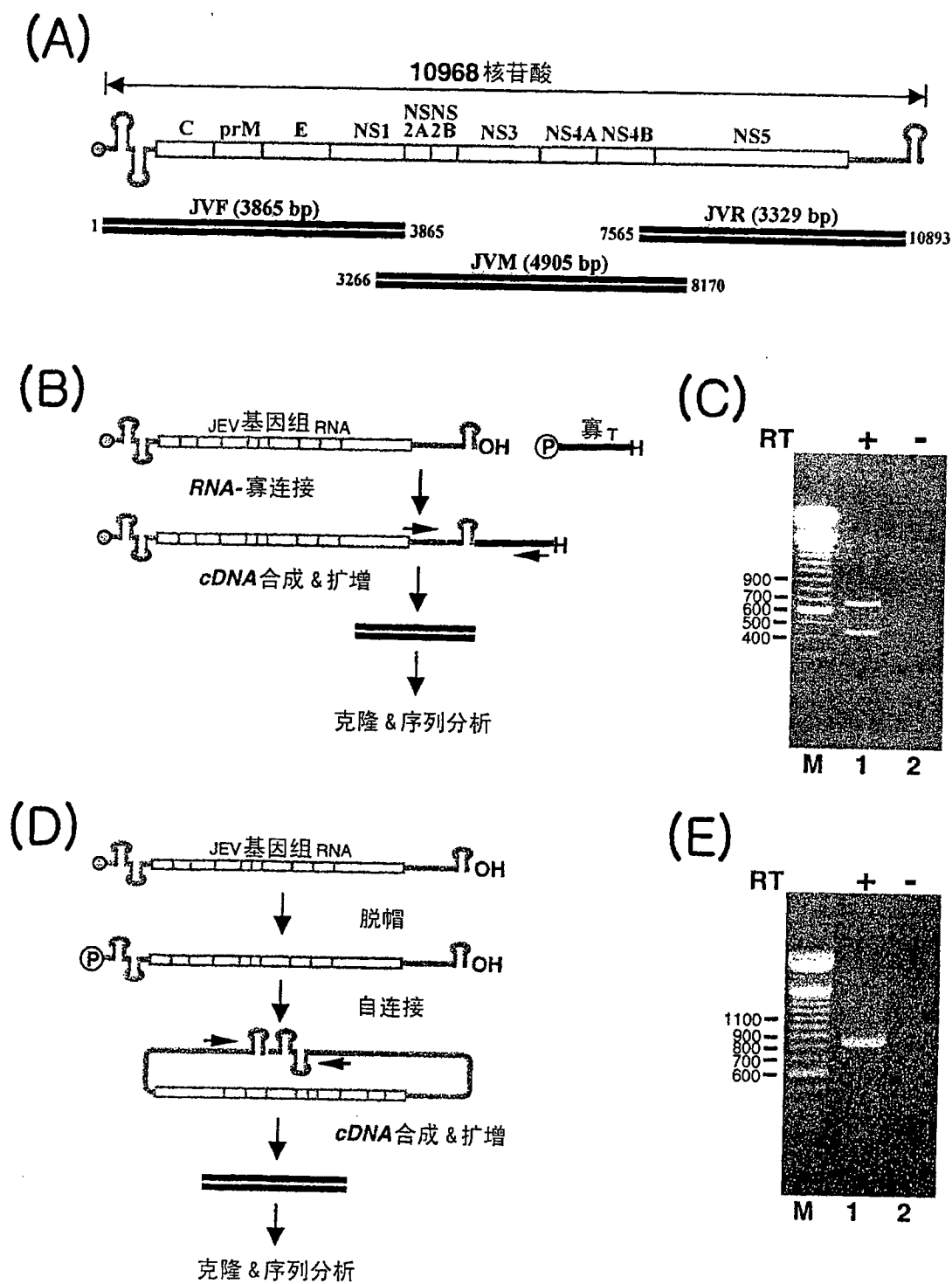


图 2

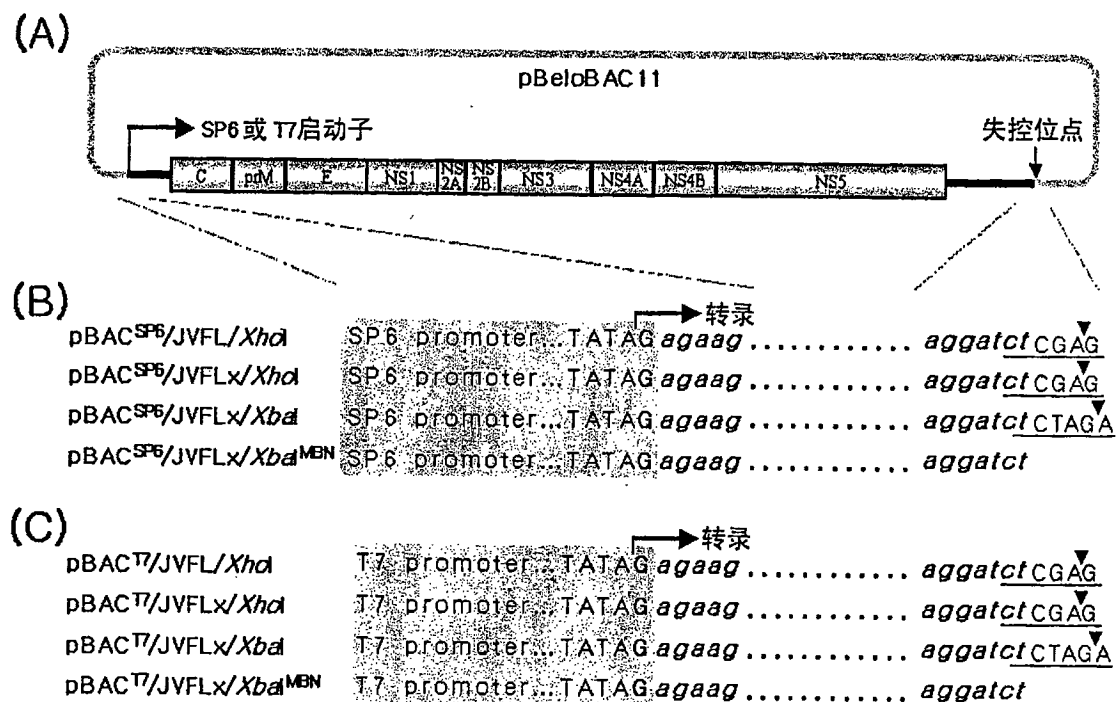


图 3

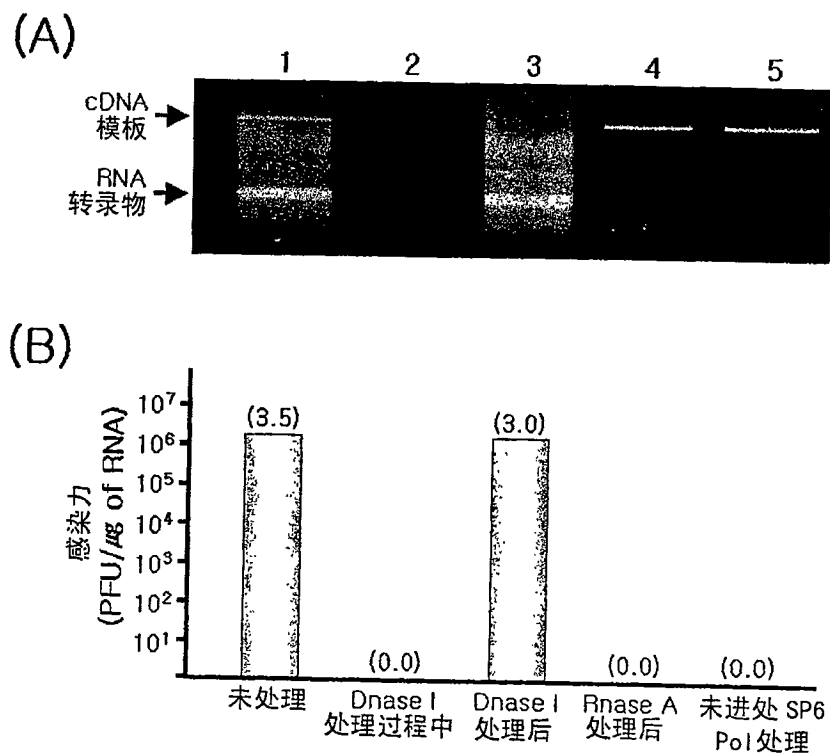


图 4

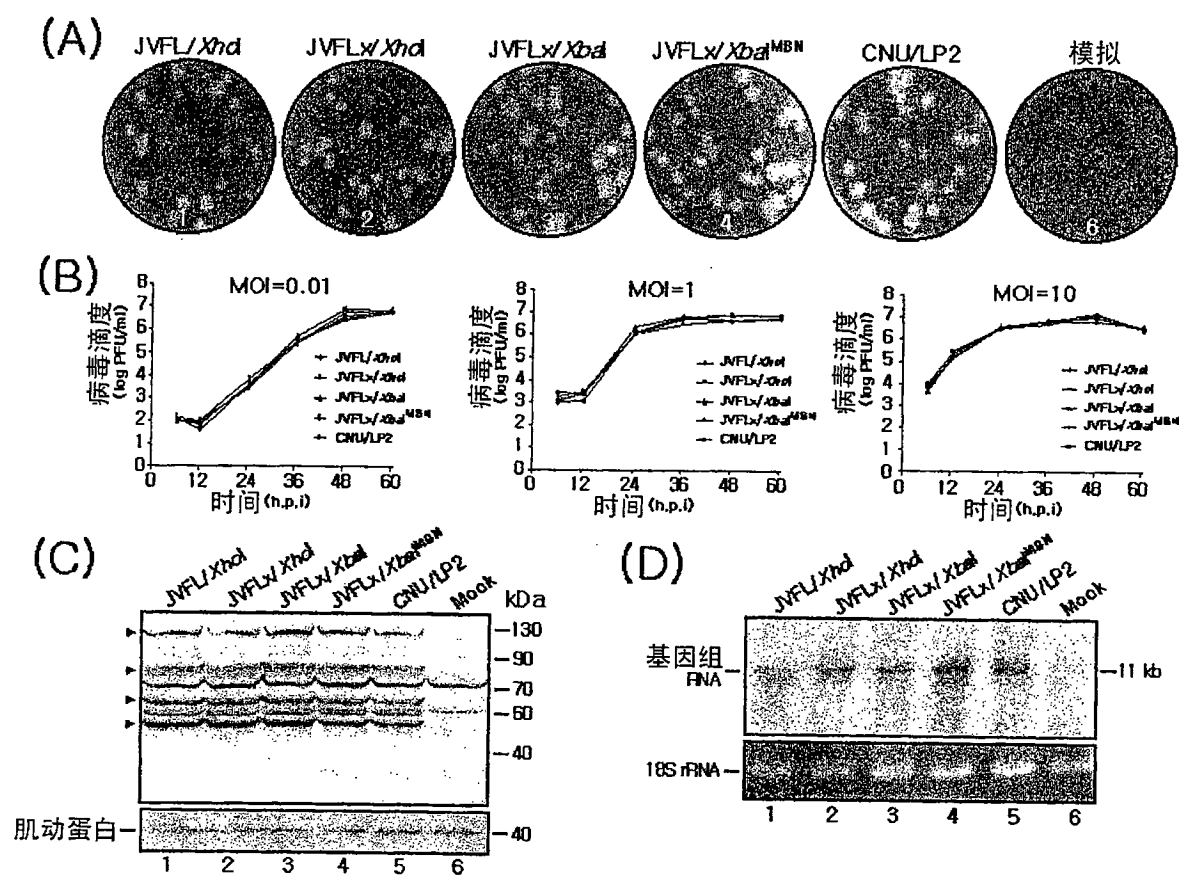
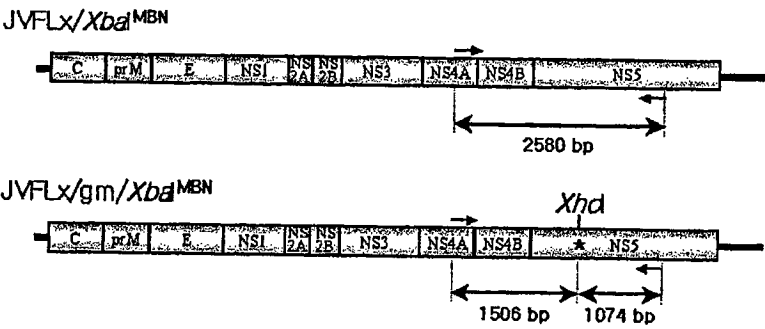


图 5

(A)



(B)

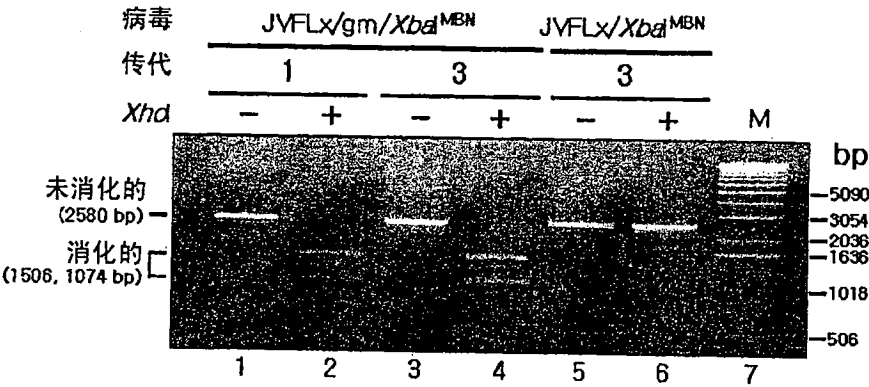


图 6

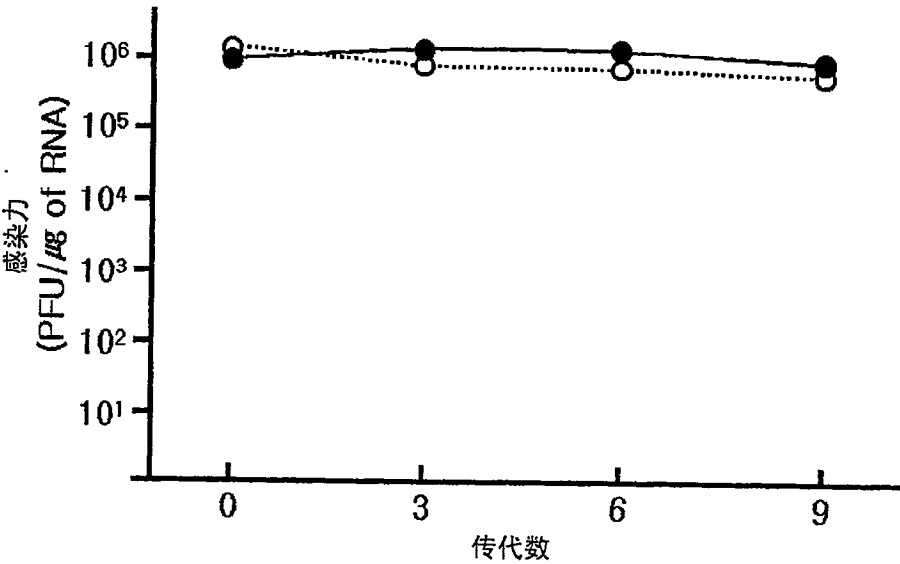


图 7

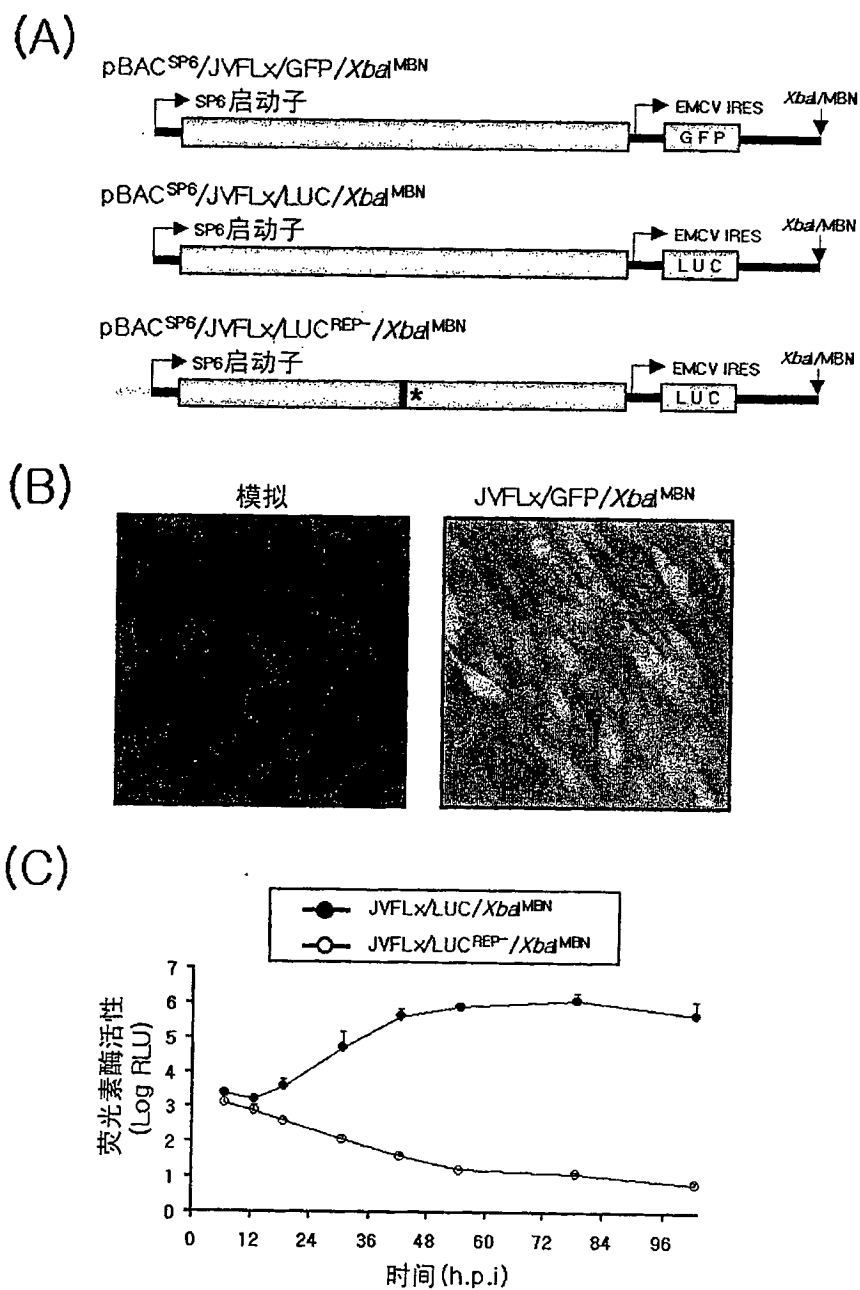


图 8

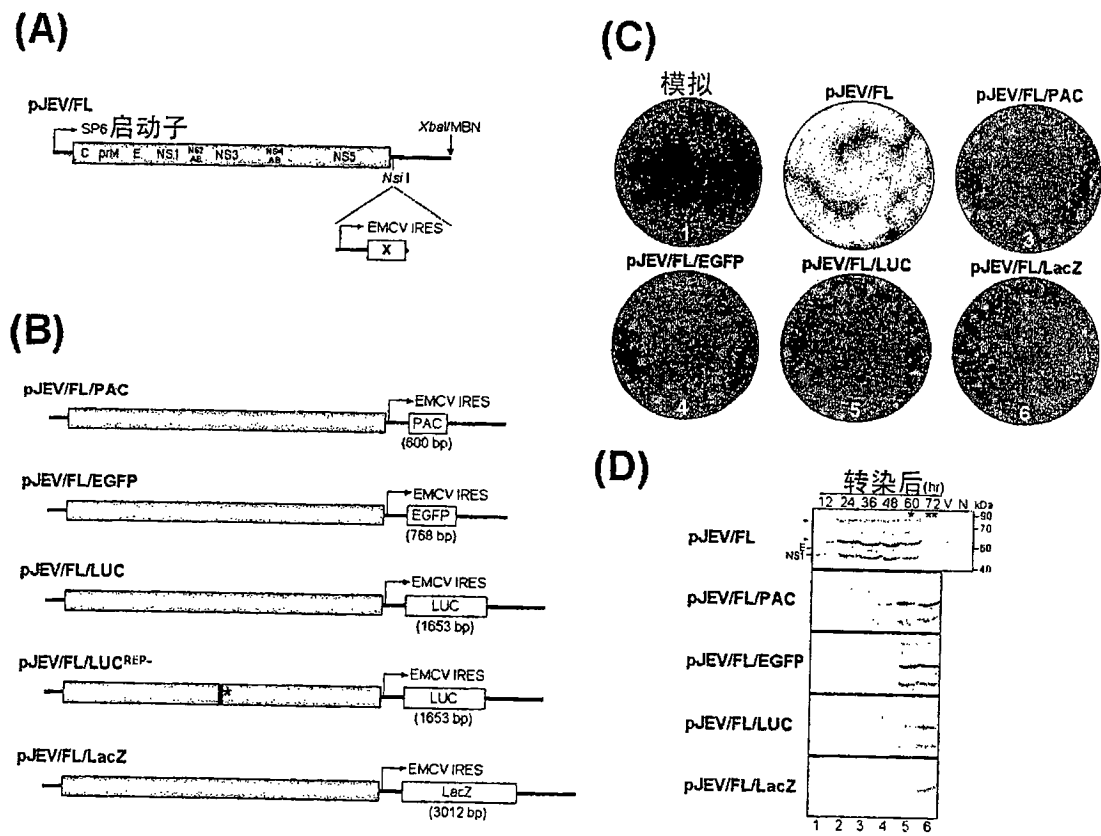


图 9

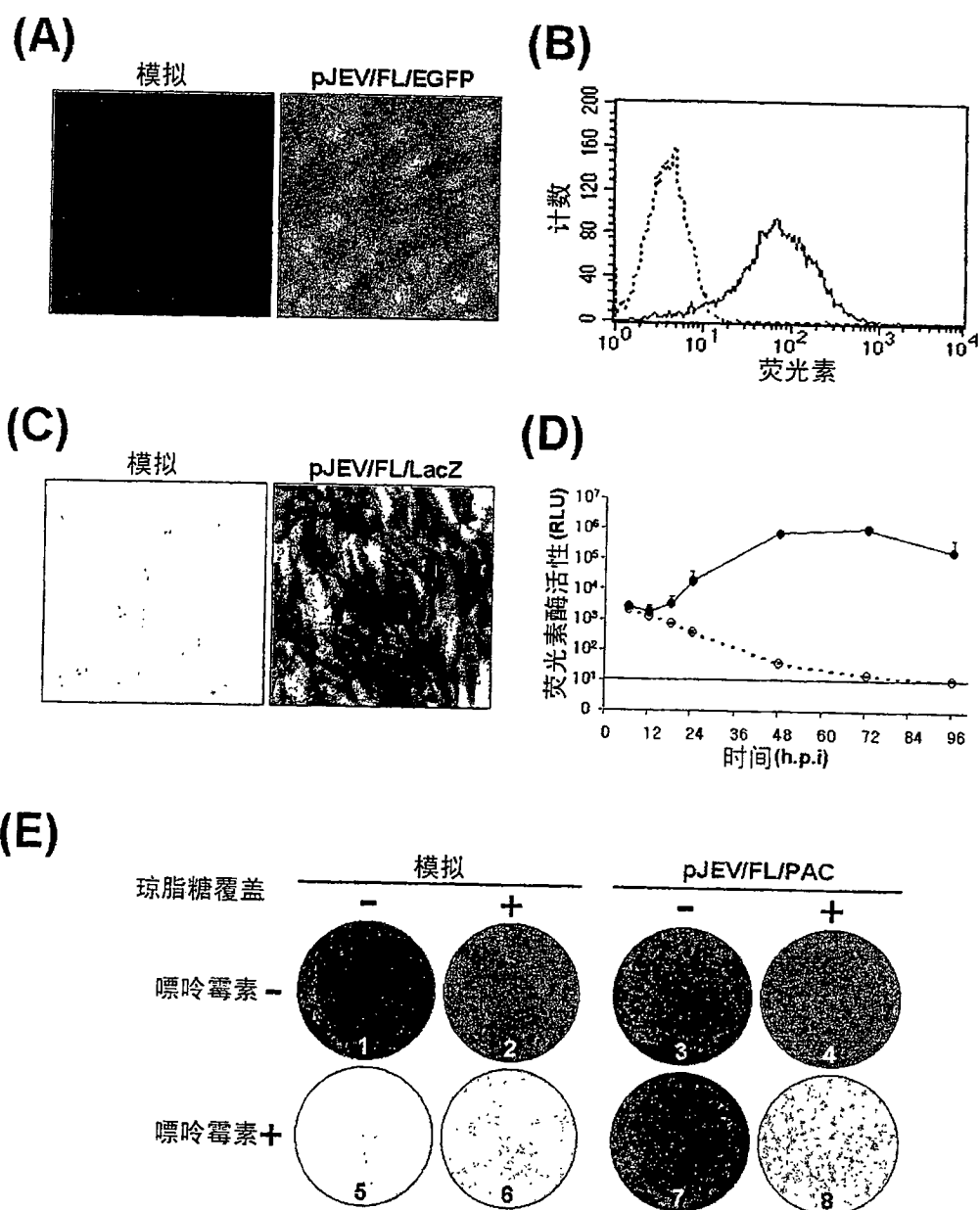


图 10

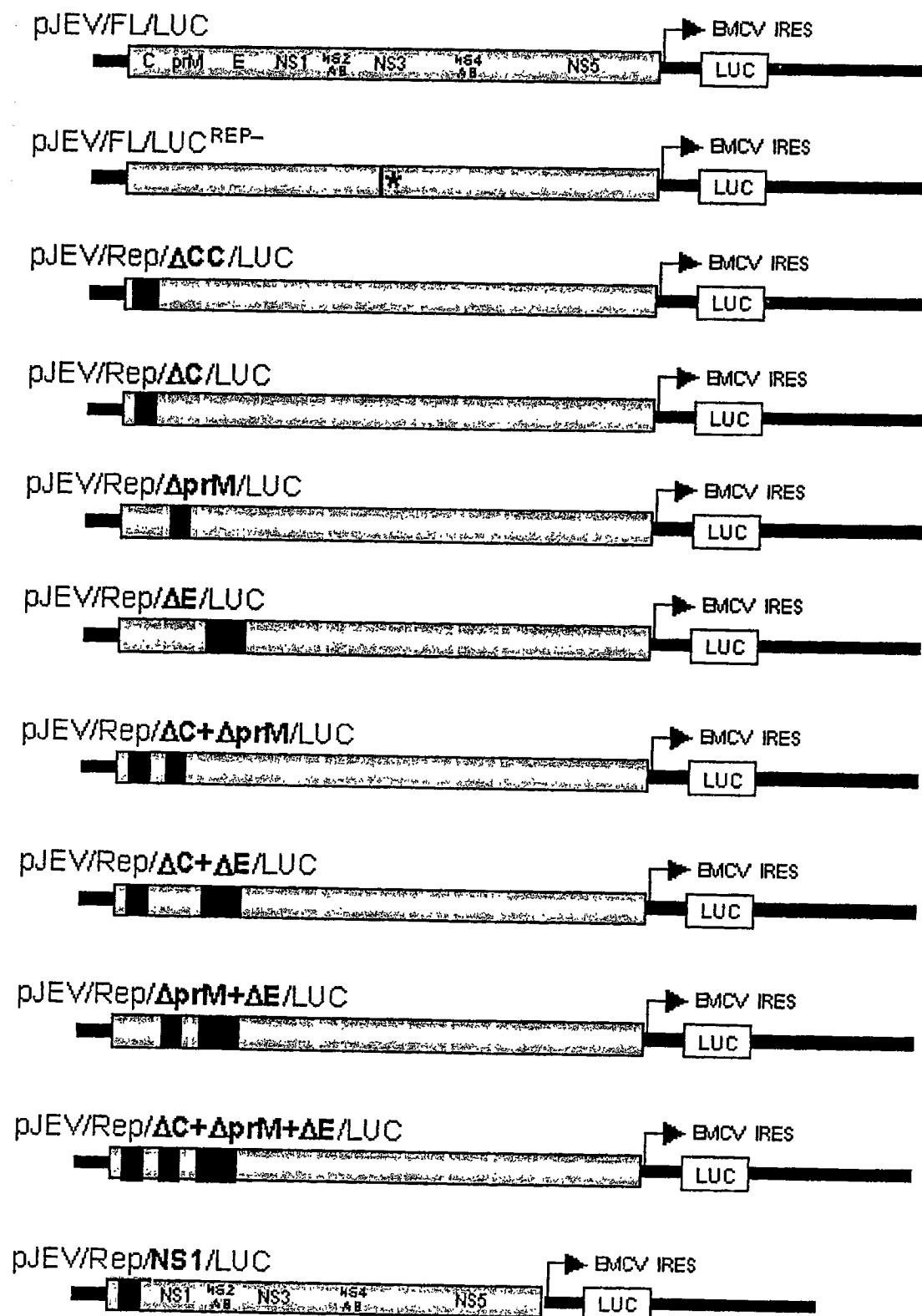


图 11A

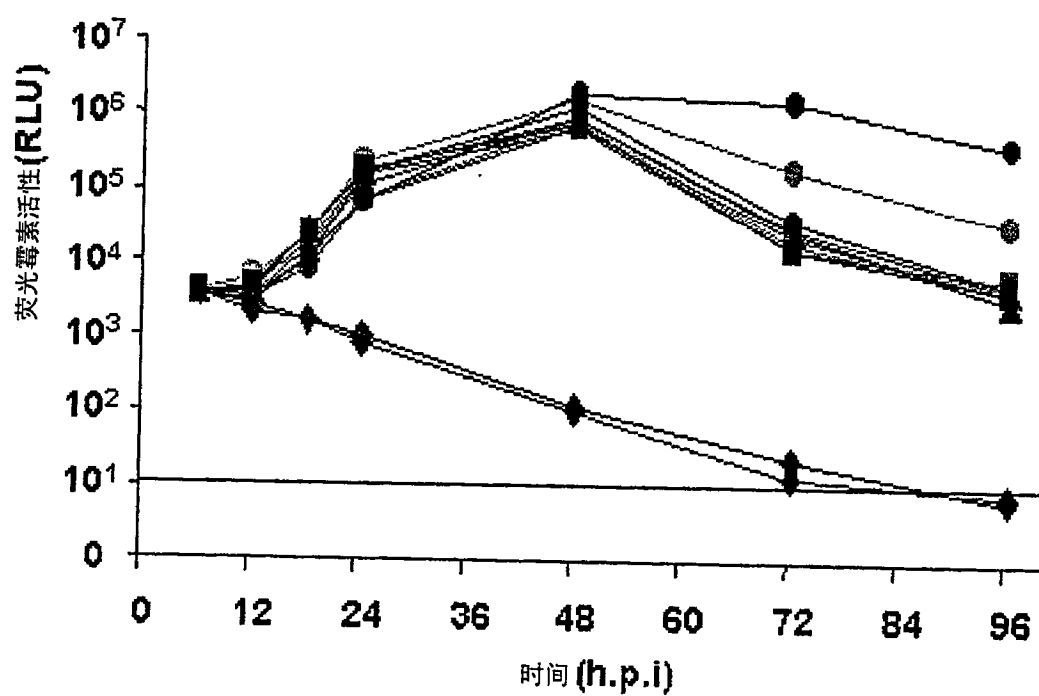


图 11B

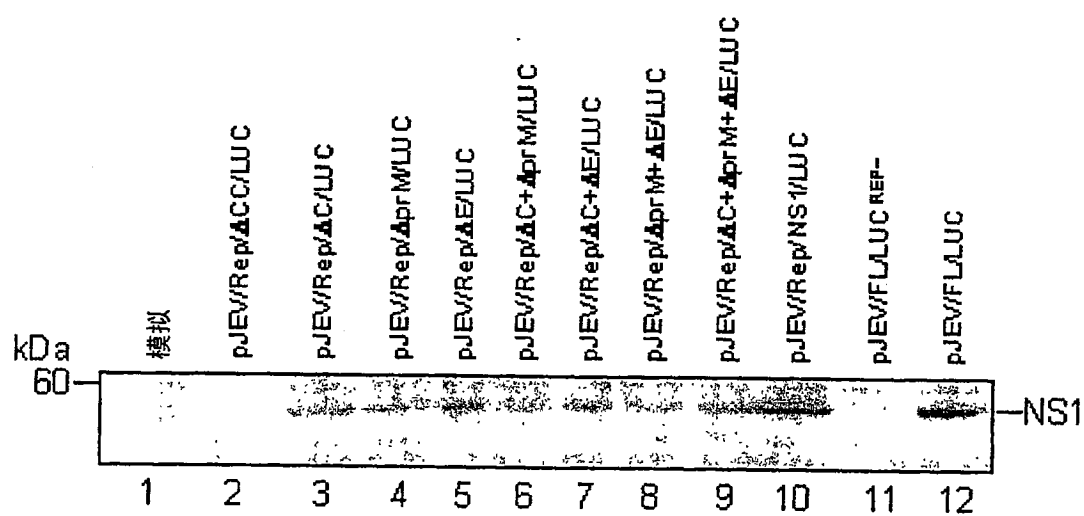


图 11C

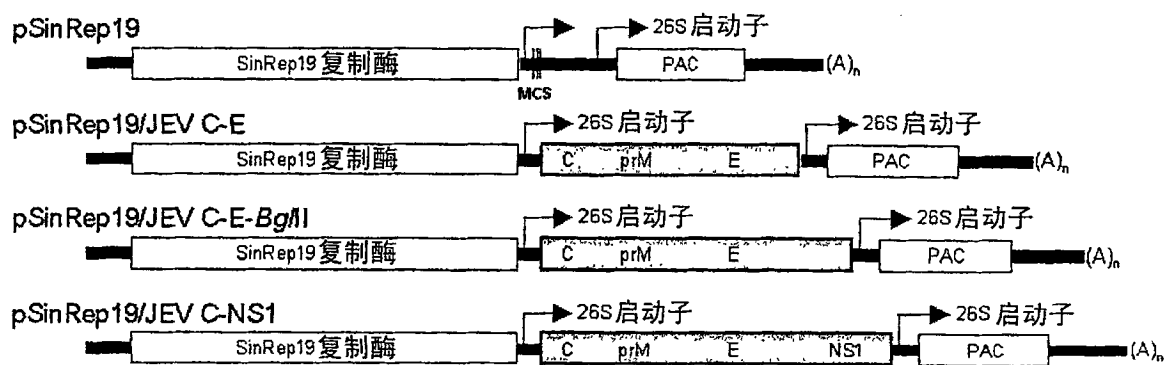


图 12A

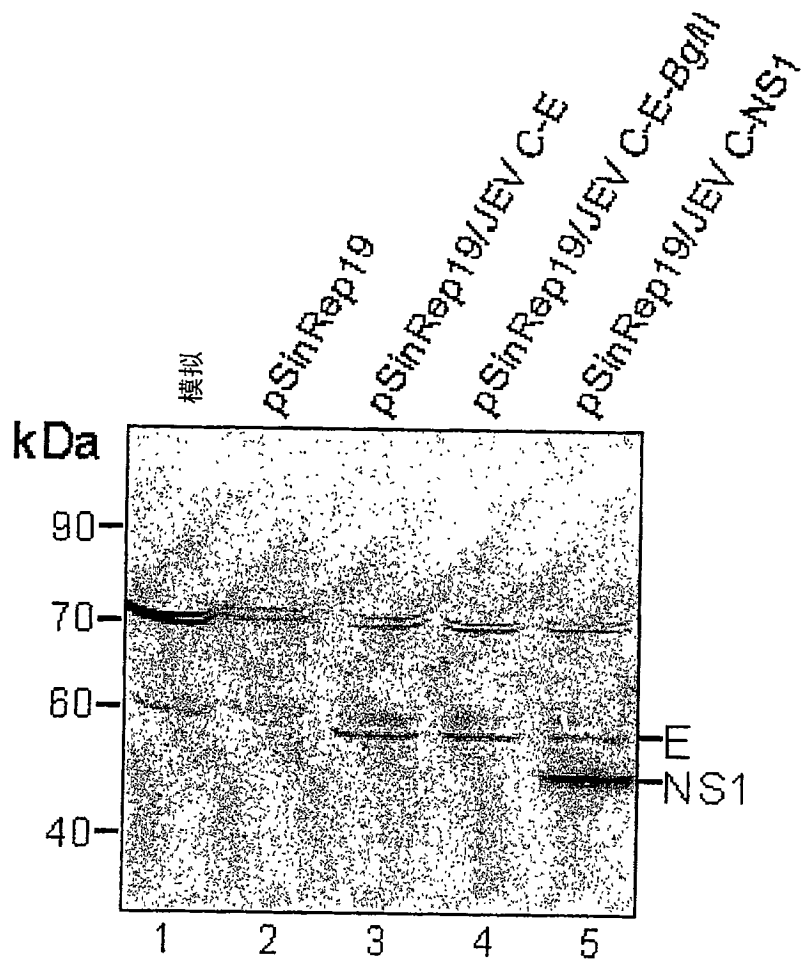


图 12B

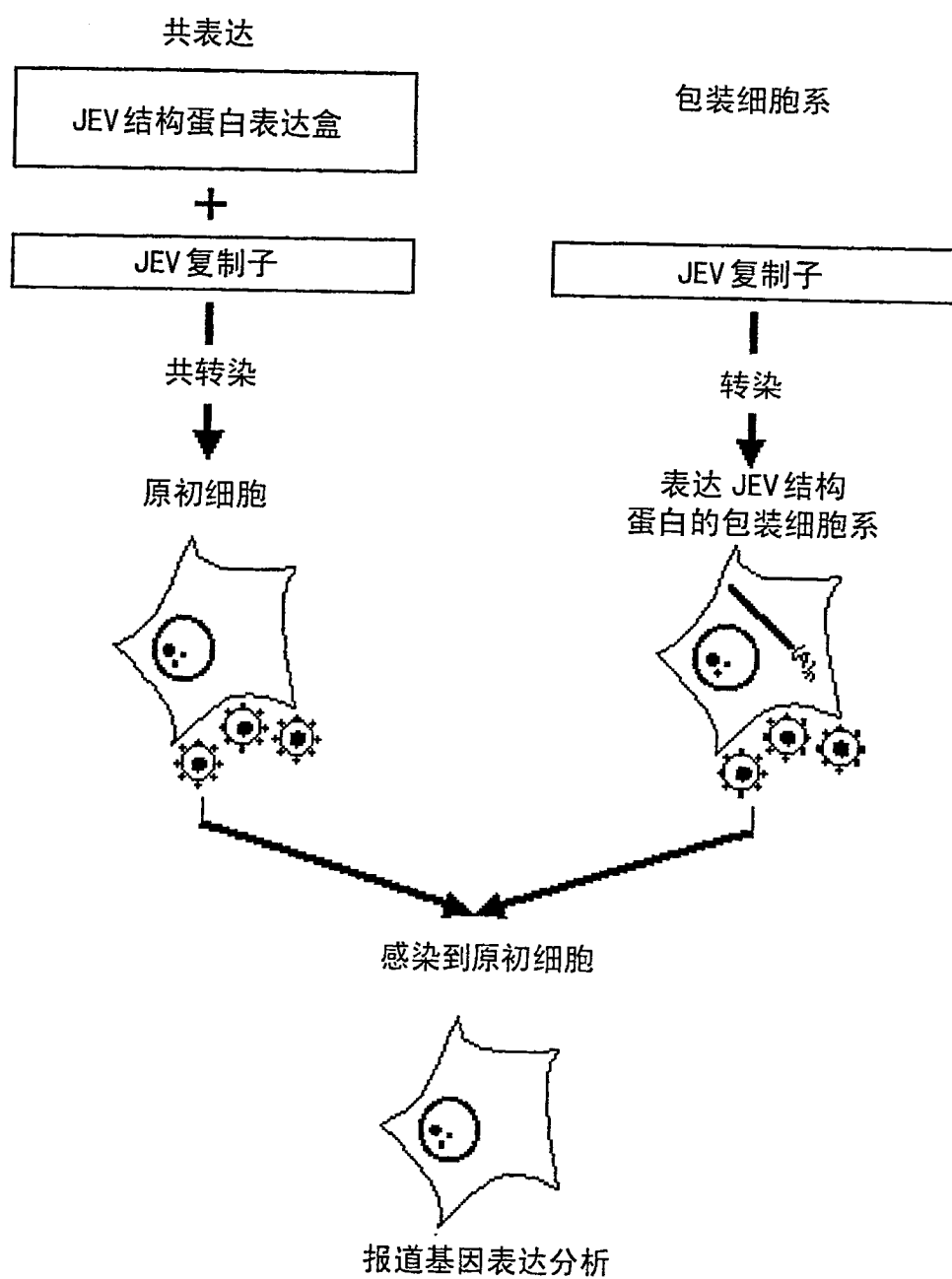


图 12C

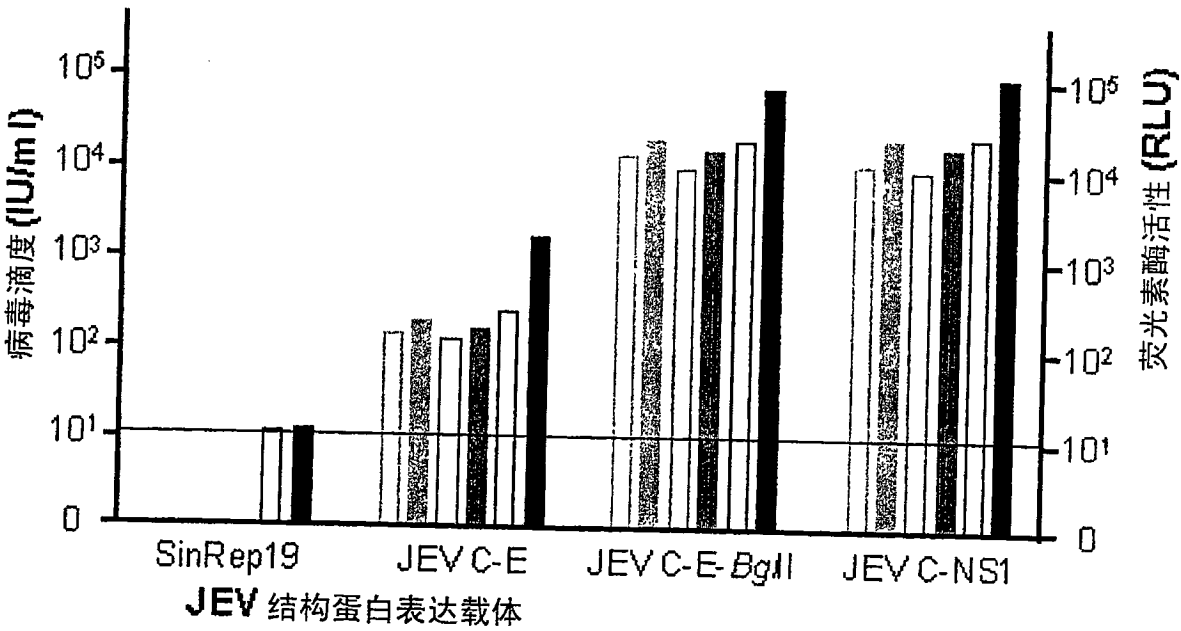


图 12D

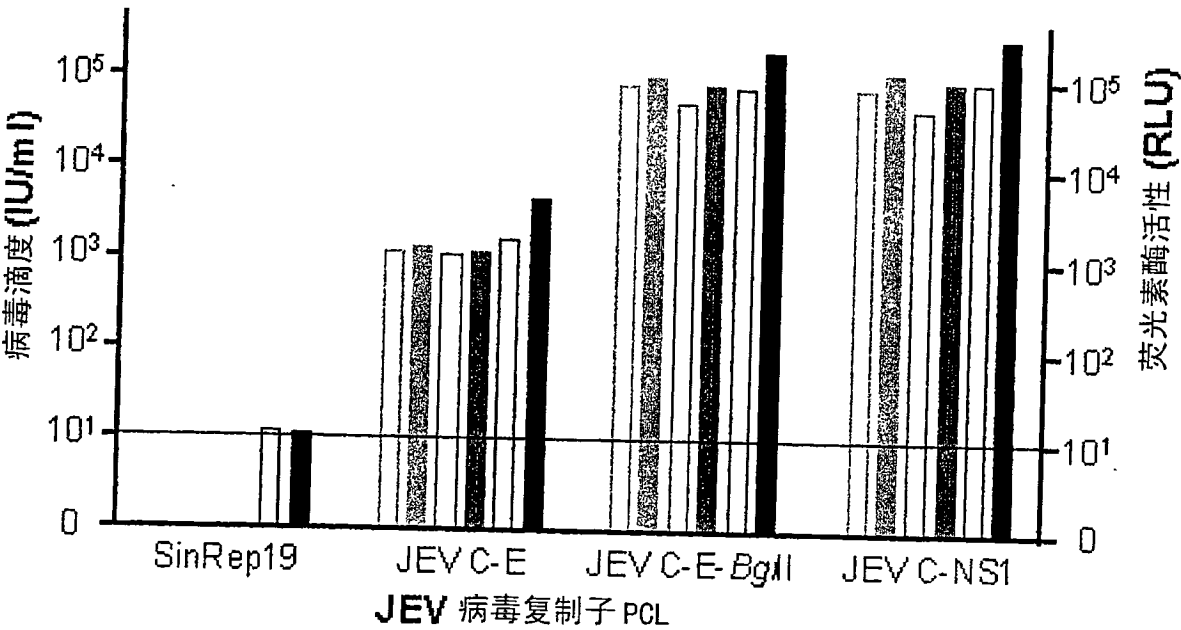


图 12E