

# 人博卡病毒 1 型感染性克隆的构建及鉴定

杨暄<sup>1#</sup>, 苏丽芳<sup>1#</sup>, 王悦<sup>1</sup>, 王媛<sup>2\*</sup>, 董衍明<sup>1\*</sup>

1 湖北大学生命科学学院 生物催化与酶工程省部共建国家重点实验室, 湖北 武汉 430062

2 湖北文理学院基础医学院, 湖北 襄阳 441053

杨暄, 苏丽芳, 王悦, 王媛, 董衍明. 人博卡病毒 1 型感染性克隆的构建及鉴定[J]. 生物工程学报, 2024, 40(2): 485-495.  
YANG Xuan, SU Lifang, WANG Yue, WANG Yuan, DONG Yanming. Construction and characterization of an infectious clone for human bocaparvovirus HBoV1[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(2): 485-495.

**摘要:** 人博卡病毒 1 (human bocaparvovirus 1, HBoV1) 为感染人并引起疾病的两种细小病毒之一。其感染 2-5 岁婴幼儿, 能引起轻度或重度急性呼吸道疾病, 严重时可危及生命。HBoV1 基因组末端含末端反向重复序列(repeat the sequence in reverse, ITR), 为病毒基因组复制所必需, 但是难以进行 PCR 扩增合成。本研究通过分步合成末端 ITR 及分子克隆方法成功构建 HBoV1 的全长感染性克隆 pSKHBoV1。经转染 HEK293 细胞后, 分别从重要非结构蛋白的表达、病毒 RNA 转录后修饰与加工、病毒基因组复制水平以及子代病毒粒子基因组鉴定等方面, 证实构建的感染性克隆在转染 HEK293 细胞后能够进入正常的复制周期并具有拯救出病毒粒子的潜力, 这为后续研究 HBoV1 的复制增殖、病毒与宿主互作关系以及病毒疫苗的研发奠定了基础。

**关键词:** 人博卡病毒; 感染性克隆; 人工合成; 病毒复制

## Construction and characterization of an infectious clone for human bocaparvovirus HBoV1

YANG Xuan<sup>1#</sup>, SU Lifang<sup>1#</sup>, WANG Yue<sup>1</sup>, WANG Yuan<sup>2\*</sup>, DONG Yanming<sup>1\*</sup>

1 State Key Laboratory of Biocatalysis and Enzyme Engineering, School of Life Sciences, Hubei University, Wuhan 430062, Hubei, China

2 School of Basic Medicine, Hubei University of Art and Science, Xiangyang 441053, Hubei, China

**Abstract:** Human bocaparvovirus 1 (HBoV1) is one of the two parvoviruses that infect humans and cause diseases. Infection with HBoV1 in infants and young children aged 2-5 years can

资助项目: 国家自然科学基金(32070171); 湖北省自然科学基金(2020CFB831)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32070171) and the Natural Science Foundation of Hubei Province, China (2020CFB831).

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this study.

\*Corresponding authors. E-mail: WANG Yuan, wy7859@126.com; DONG Yanming, dym615@icloud.com

Received: 2023-06-28; Accepted: 2023-10-16

lead to mild or severe acute respiratory diseases, with the most severe cases posing a life-threatening risk. Similar to other parvoviruses, the HBoV1 DNA genome consists of two terminal reverse repeats (ITRs) at its ends, which are necessary for viral genome replication. However, up to now, it has remained a technical challenge to clone the entire ITRs through PCR amplification. In this study, we successfully constructed a full-length infectious clone of HBoV1, termed as pSKHBoV1, by synthesizing and cloning the terminal ITRs in a stepwise manner. After transfecting HEK293 cells with the infectious clone pSKHBoV1, we were able to reconstitute the viral replication cycle. This included the expression of key non-structural proteins, post-transcriptional modification and processing of viral RNA, viral genome replication, and potentially the production of progeny virions containing the defined DNA genome. The successful construction of the infectious clone pSKHBoV1 lays the foundation for future studies on HBoV1 replication and propagation, virus-host interaction, and the development of viral vaccines.

**Keywords:** human bocaparvovirus; infectious clone; synthetic construction; viral replication

人博卡病毒(human bocaparvovirus, HBoV), 是细小病毒科(parvoviridae)、博卡病毒属(bocaparvovirus)的重要成员, 其与人细小病毒B19是目前能感染人并引起疾病的两种细小病毒<sup>[1]</sup>。HBoV主要包括HBoV1-4这4个亚型, 其中HBoV1于2006年由幼儿呼吸道痰样中首次发现<sup>[2]</sup>。HBoV1感染2-5岁婴幼儿, 能引起轻度或重度急性呼吸道疾病, 如普通感冒、肺炎、细支气管炎和严重哮喘, 病毒载量高的感染可危及生命<sup>[3]</sup>。HBoV1感染成年人后, 通常表现为无症状, 但也有报道显示, 该病毒是引起成年人尤其是老年患者、免疫抑制群体以及医院感染患者病毒性肺炎的潜在病原之一<sup>[2-3]</sup>。

HBoV1基因组全长大约为5.5 kb, 为单股负链DNA, 基因组左端有单一启动子P5, 在病毒转录过程中, 生成唯一的前体mRNA, 并经选择性剪接和选择性多聚腺苷酸化, 产生编码不同非结构蛋白NS1-70/NS1/NS2/NS3/NS4、NP1, 以及衣壳蛋白VP1/VP2/VP3的mRNA<sup>[4-5]</sup>。其中非结构蛋白NP1是博卡病毒属独特蛋白, 功能比较保守, 主要在病毒基因组复制和RNA转录后修饰与加工中扮演重要角色<sup>[4,6-8]</sup>。除中间编码上述不同病毒蛋白的3个阅读框外,

HBoV1基因组末端含有末端反向重复序列形成发夹结构ITR, 其中左端发夹(left end hairpin, LEH)为140 nt, 可形成短的兔耳Y型结构, 其功能目前未知, 推测可能与HBoV1基因组的包装有关<sup>[5,9]</sup>。右端发夹(right end hairpin, REH)含有46 nt与复制起始相关的区域, 主要包含NS1结合与切割位点, 虽然最新研究发现包含Ori的双链HBoV1基因组滚动发夹复制(rolling-hairpin DNA replication)可以不依赖于完整的REH结构, 但是不完整的REH使得双链HBoV1基因组在HEK293细胞中复制装配的病毒量降低80%-90%<sup>[10]</sup>。HBoV1主要感染人呼吸道上皮细胞并能在分化良好的原代人呼吸道上皮细胞培养体系(well-differentiated human airway epithelial cell culture, HAE)中复制<sup>[11-12]</sup>。研究表明, HEK293细胞虽然不能被HBoV1感染, 但是双链HBoV1基因组或HBoV1感染性克隆在转染入HEK293细胞后, 可以进行复制并产生能感染极化的人呼吸道气道上皮细胞的子代病毒<sup>[10,12-13]</sup>。HBoV1感染性克隆虽已成功构建, 但是其末端ITR结构不仅极大限制了后续对HBoV1感染性克隆的遗传改造, 也限制了基于感染性克隆的病毒疫苗的设计与开发。

本研究对已有的 HBoV1 感染性克隆构建策略进行部分优化,通过 ITR 结构的分段合成和 DNA 片段连接,成功构建了 HBoV1 感染性克隆。同时,经转染 HEK293 细胞后,Western blotting 及免疫荧光分析均表明病毒独特非结构蛋白 NP1 可正确表达,RT-PCR 显示病毒 RNA 转录后可发生标志性的受 NP1 调控的选择性剪切,并且 Southern blotting 及 PCR 验证也表明可发生病毒基因组复制以及拯救出含病毒基因组的子代病毒粒子,这均初步证实了构建的感染性克隆在转染 HEK293 细胞后能进入正常的复制周期,并具有最终拯救出病毒粒子的潜力。总之,上述感染性克隆的成功构建为后续探究病毒与宿主关系、筛选抗病毒药物靶标及病毒疫苗的研发奠定了基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

人胚肾上皮细胞系 HEK293 (293)、大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、BL21(DE3) pLysS 和质粒 pET-23a、pBluescript II SK (+), pskHBoV1m630/pSK-HBoV1-mNP1/3 $\times$ Flag-CMV-NP1-HBoV1 (密苏里大学 David Pintel 教授惠赠),构建策略见参考文献[12];免疫用 BALB/C 小鼠购自斯克贝斯生物科技公司。生物素标记及相应的生物素检测相关试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;转染试剂 PEI 购自上海翌圣生物科技股份有限公司;限制性内切酶、T5 核酸外切酶购自 NEB;小鼠抗 His-Tag 抗体、小鼠抗 Flag-Tag 抗体购自武汉爱博泰克生物科技有限公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠 IgG 购自武汉三鹰生物技术有限公司;抗荧光淬灭封片液购自武汉赛维尔生物技术有限公司;蛋白酶 K 购自 Roche 公司;ECL 化学发光检测 kit 购自 Millipore 公司。

### 1.2 HBoV1 全长感染性克隆的构建策略

借鉴 Qiu 等<sup>[12]</sup>的感染性克隆构建策略,以 HBoV1 RepCap 质粒 pskHBoV1m630 为基础,设计如表 1 所示的引物并按照图 1 所示的实验流程进行 HBoV1 全长感染性克隆的构建,具体步骤如下。

#### (1) HBoV1 左端 ITR 的合成策略

合成两端含 *Xho* I 和 *Bcl* I 酶切位点的 1-86 的基因片段 LEH-1-86 (*Xho* I-LEH-1-86-*Bcl* I),同时,利用引物 LEH-93-F (*Xho* I-*Bgl* II-93-F)/HB-1 505-R (*Hind* III-1 505-R),以 HBoV1 RepCap 质粒 pskHBoV1m630 为模板,PCR 扩增获得 93-1 505 nt 片段(分别在左端引入 *Xho* I-*Bgl* II,右端引入 *Hind* III),并经酶切纯化后克隆入 pBlueScript 载体获得 pSK-1413 重组载体,然后经 *Xho* I/*Bgl* II 酶切纯化后,与经 *Xho* I/*Bcl* I 酶切纯化的 LEH-1-86 片段连接后获得含左端 ITR 的 pSK-1-1505-LEH 载体。

#### (2) HBoV1 右端 ITR 的合成策略

首先,经变性退火合成 REH-5 371-5 429 片段,然后以 HB-4 398-F (*Eco*R I-4 398-F)/REH-5 446-5 403-R (*Xba* I-*Hind* III-*Nsi* I-5 446-5 403-R)为引物,以 REH-5 371-5 429 片段和 pskHBoV1m630 质粒为模板,经搭桥 PCR 扩增获得两端带有酶切位点的 4 398-5 446 片段,命名为 *Eco*R I-4 398-5 446-*Hind* III-*Xba* I;然后,经 *Xba* I/*Eco*R I 酶切后克隆入 pBlueScript,获得 pSK-4398-5446-REH;同时,合成两端带有限制性酶切位点的 5 543-5 441 序列,命名为 REH-5 441-5 543 (*Nsi* I-5 445-5 543-*Not* I-*Sma* I-*Sac* II),然后经 *Nsi* I/*Sac* II 双酶切后,克隆入 pSK-4398-5446-REH,获得 pSK-4398-5543-REH。

#### (3) HBoV1 全长感染性克隆的构建

如图 1 所示,分别将 pSK-1-1505-LEH 和 pskHBoV1m630 经 *Hind* III/*Xho* I 双酶切后,克

表 1 本研究所用的引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'→3')
LEH-1-86	CTCGAGGTGGTTGTACAGACGCCATCTTGAATCCAATATGTCTGCCGGCTCAGTCATGCCTG CGCTGCGCGCAGCGCGCTGCGCGCGCGCATGATCA
LEH-93-F	AATTCTCGAGAGATCTAATCGCCGGCAGACATATTGGATT
HB-1 505-R	ATTAATAAGCTTTATTGTCTGAGTCAAGCGAAGT
HB-1 505-F	AAATAAAGCTTTACAGCTTTTGTGTTGAT
REH-5 441-5 543	ATTAAATGCATGTTATATAACTAAGGCGCCAGCTGATATAAACTAAGATGGCGCATGTACAACA ACAACACATTAAGATATAGAGTTTCGCGATTGCATAAGCAAGCGGCCGCCCGGGCCGCGG GAATTCAGCCATACTCAAAACCAA
HB-4 398-F	ATATCTAGA AGCTT ATGCATGTTATATACTAA GGCGCCAGCTGATAT AAACTAAGA
REH-5 446-5 403-R	TCTTTTAATGTGTTGTTGTTGTACATGCGCCATCTTAGTTTTATATCAGCTGGCGCCTT
REH-5 371-5 429-oligo1	AAGGCGCCAGCTGATATAAACTAAGATGGCGCATGTACAACAACAACACATTAAGA
REH-5 371-5 429-oligo2	GGACAGCAAATGGGTGCGCATGAGCTCAGGGAATATGAAAGAC
NP1-F	GTGGTGGTGGTGGTGGTATTGGAGGCATCTGCTTC
NP1-R	CACCACCACCACCACCAC
pET23a-F	GCGACCCATTTGCTGTCC
pET23a-R	GTGACTTGGGGGATTTCGGA
F-2 236	CTGCCTGTGCTGGCTGCT
R-4 307	CCTAGAGGGTGGGTGCTGC
F-3 173	ACTATTACTTTCTTTAACACTTGGCAC
F-2 460	CTCCTGCTCCTGTGATGAG
R-2 615	

克隆获得含 LEH 的 pSK-1-4398-HBoV1; 然后, 将 pSK-1-4398-HBoV1 和 pSK-4398-5543-REH 分别经 *EcoR* I/*Sac* II 双酶切后, 克隆获得 HBoV1 全长感染性克隆 pSKHBoV1。

### 1.3 His-NP1 重组蛋白的原核表达纯化与多克隆抗体的制备

首先, 采用 T5 核酸外切酶介导的同源重组方法无缝克隆获得 pET-HBoV1-NP1 重组质粒后, 将测序验证正确的重组质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3) pLysS, 原核表达纯化过程见参考文献[14], 最后利用镍柱亲和层析法进行重组 His-NP1 蛋白的纯化。其次, 取上述验证正确的约 1.5 mg 重组蛋白 His-NP1 接种 BALB/C 小鼠, 首次免疫(50 μg 重组蛋白)采用皮下注射(加弗氏不完全佐剂), 接着, 分别于 2 周和 4 周后采用皮下注射(加弗氏不完全佐剂)和直接腹腔注射, 各加强免疫 1 次(50 μg 重组蛋白/次), 并于第 3 次免疫后断尾取血, 最后利用真核细胞表达的 NP1 蛋白进行 Western blotting 鉴定, 鉴

定正确后 1 周内心脏取血, 分装放于 -80 °C 保存, 成功制备多克隆抗体。动物实验已获湖北大学动物伦理与福利委员会批准(批准编号: 20240001)。

### 1.4 HBoV1 非结构蛋白 NP1 表达的 Western blotting 分析

按照质粒 DNA:PEI=1:3 的比例转染 72 h 后, 收集细胞, 加入 WL 裂解液(50 mmol/L Tris pH 8.0、400 mmol/L NaCl、0.5% NP40、10% glycerol、1 mmol/L EDTA), 经 SDS-PAGE 及蛋白转印后, 利用制备的 NP1 多抗血清(1:2 000), 4 °C 过夜孵育, TBST (0.05% Tween-20)洗膜 3 次, HRP 标记的山羊抗小鼠抗体(1:5 000)室温孵育 1 h, TBST (0.05% Tween-20)洗膜 3 次后, ECL 化学发光法检测 HBoV1 非结构蛋白 NP1 的表达情况。

### 1.5 HBoV1 非结构蛋白 NP1 表达的激光共聚焦显微镜观察分析

将生长状态良好的 HEK293 细胞接种于 24 孔板细胞爬片, 待细胞汇合度达到 70%–80%, 转

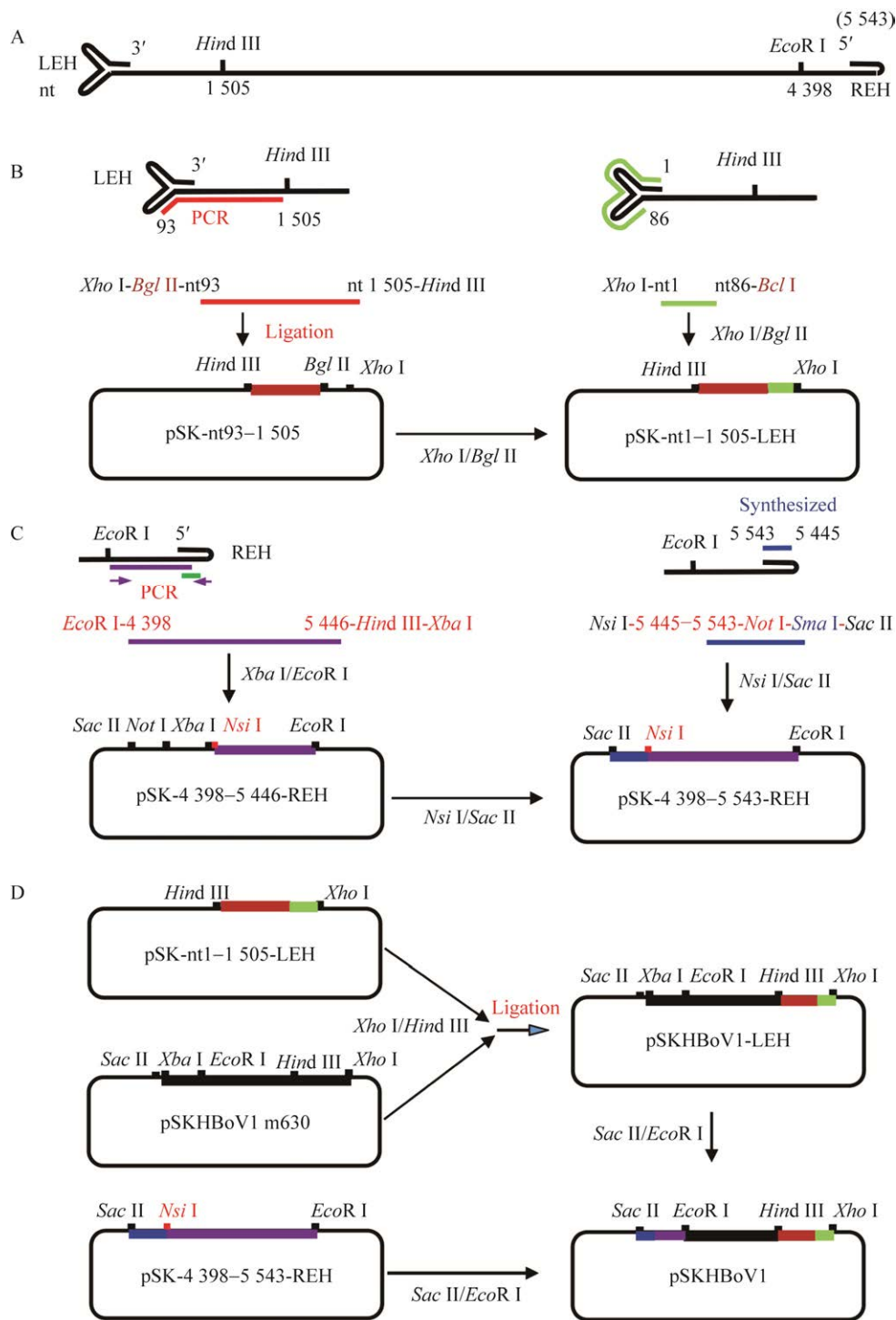


图 1 HBoV1 感染性克隆 pSKHBoV1 的构建策略 A: HBoV1 全长基因组示意图. B: HBoV1 左端 ITR 的合成策略. C: HBoV1 右端 ITR 的合成策略. D: HBoV1 全长感染性克隆的构建

Figure 1 The construction strategy for the HBoV1 infectious clone pSKHBoV1. A: Schematic map of HBoV1 full-length genome. B: The synthesis strategy of the left ITR of HBoV1. C: The synthesis strategy of the right end ITR of HBoV1. D: Construction of full-length infectious clone of HBoV1.

染 pSKHBoV1, 48 h 后, 经 4%多聚甲醛固定 20 min, 含 0.25% Triton X-100 的 PBS 通透细胞膜 30 min, 接着用含 3% BSA 的 PBS 封闭液室温封闭 1 h, 加入 Anti-HBoV1-NP1 抗鼠血清 (1:500) 室温孵育 1 h, 再用含 3% BSA 的 PBS 浸洗 3 次后加入 DyLight 488 标记的羊抗小鼠 IgG (H+L) 二抗 (1:2 000), 避光室温孵育 1 h, 最后加适量抗荧光淬灭封片液 (含 DAPI) 封片, 并置于激光荧光显微镜观察 HBoV1 非结构蛋白 NP1 的定位情况。

### 1.6 HBoV1 病毒 RNA 转录后修饰加工的 RT-PCR 分析

HEK293 细胞转染 pSKHBoV1 后 48 h, 收集细胞, 并加入 Trizol 裂解细胞, 提取细胞总 RNA; 接着, 用 4 398-R 作为引物进行逆转录, 获得病毒 RNA, 然后, 分别利用引物 F-2 236/R-4 398 和 F-3 173/R-4 398 进行 RT-PCR 检测, 并分析经第 3 个内含子剪切以及不经第 3 个内含子剪切的病毒 RNA, 进而分析转染感染性克隆后, 病毒 RNA 转录尤其是转录后的第 3 个内含子剪切情况。

### 1.7 HBoV1 病毒基因组复制的 Southern blotting 分析

Southern blotting 实验的样本制备、凝胶处理及转印实验过程详见文献 [8], 探针标记及检测过程采用上海碧云天生物技术有限公司的生物素标记及相应的生物素检测相关试剂盒的方法; 实验流程简述如下: 利用 *Hind* III/*Xba* I 对 pSKHBoV1m630 进行双酶切, 然后进行生物素末端标记获得杂交探针; 同时, 经 Southern 裂解液 (终浓度 1% SDS) 裂解转染感染性克隆 pSKHBoV1 的 HEK293 细胞, 收集总细胞 DNA, 加入 10×DNA loading dye, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 20 V, 过夜电泳 12 h; 然后凝胶经 HCl、NaOH、NaCl 处理后, “三明治法”转印 12 h, 再经 68 °C 预杂交, 含生物素 (biotin) 标记的 HBoV1 探针杂

交, HRP-标记的 Streptavidin 抗体孵育, ECL 化学发光法检测 HBoV1 基因组复制情况。

### 1.8 病毒粒子中基因组 DNA 的提取与 PCR 鉴定

HEK293 细胞转染 pSKHBoV1 后 72 h, 收集细胞并加入 TE 缓冲液 (pH 8.5) 重悬细胞, 经液氮速冻, 37 °C 解冻, 12 000 r/min 离心 5 min 取病毒上清; 然后, 病毒液按照 1:10 比例加入 ddH<sub>2</sub>O 稀释, 加入终浓度 2.2 mmol/L 的 MgCl<sub>2</sub>; 取稀释后的样品 28 μL, 分别加入 2 μL DNase I (10 U/μL), 37 °C 反应过夜, 除掉未包装入病毒粒子的基因组 DNA, 接着加入 30 μL 400 mmol/L NaOH 至 NaOH 终浓度为 200 mmol/L, 65 °C 孵育 45 min, 裂解病毒衣壳并释放基因组 DNA; 然后, 加入 30 μL 的 400 mmol/L HCl 至 NaCl 终浓度为 26.7 mmol/L, 最终获得病毒粒子中的病毒基因组 DNA。后续的 PCR 扩增鉴定采用引物 F-2 460/R-2 615, PCR 反应条件为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 28 个循环; 72 °C 再延伸 5 min 后, 琼脂糖凝胶电泳检测分析结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 HBoV1 全长感染性克隆的构建

鉴于细小病毒科基因组末端的 ITR 结构难以在体外进行 PCR 扩增合成, 因此, 本研究借鉴已发表的关于 HBoV1 感染性克隆的构建策略, 按照实验方法中 HBoV1 末端 ITR 的合成策略, 在已有的不含左右两端的 ITR 结构的 pSKHBoV1m630 质粒基础上, 首先合成了 96 bp 的 *Xho* I-1-86-*Bcl* I 基因片段, 片段的琼脂糖凝胶电泳结果如图 2A 所示; 最后, 分别利用 *Bgl* II/*Hind* III 双酶切、*Hind* III 和 *Bss*H II 单酶切对获得的 pSK-1-1505-LEH 重组质粒进行酶切鉴定, 结果如图 2B 所示, 克隆 1/3 的 *Bss*H II 单酶切片

段大小符合预期(1 695 bp), *Hind* III 和 *Bss*H II 单酶切均表明 2 号克隆插入片段小于预期;同时, 鉴于 *Bcl* I/*Bgl* II 为同尾酶, 故构建成功的 pSK-1-1505-LEH 不含 *Bcl* I/*Bgl* II 酶切位点, 因此, 克隆 1 的 *Bgl* II/*Hind* III 双酶切结果与 *Hind* III 单酶切结果一致;上述结果初步表明成功构建了 HBoV1 左端 ITR。右端 ITR 的验证如图 2C 所示, REH 中引入的 *Hind* III 在 *Nsi* I/*Sac* II 双酶切后被删除, 因此, 构建成功的 pSK-4398-5543-REH 被载体上唯一的 *Hind* III 酶切为单一条带, 这表明 HBoV1 右端 RTR 被成功构建。

## 2.2 NP1 蛋白的纯化及多克隆抗体的制备

为了从翻译水平上鉴定构建的感染性克隆在细胞中能否表达博卡病毒属的独特非结构蛋白 NP1, 利用原核表达纯化的 NP1 蛋白免疫小鼠, 并制备相应的多抗血清, 进而用于后续的实验。结果显示, 验证正确的重组质粒 pET-HBoV1-NP1 经 IPTG 诱导表达, 镍柱亲和层析纯化后获得较纯的重组蛋白(图 3A 左, 泳道 2), 并且利用小鼠抗 His-Tag 抗体, 经 Western blotting 验证显示重组蛋白大小符合预期, 表明成功纯化制备了目的 NP1 蛋白(图 3A 右, 泳道 2)。

最后, 按照实验方法 1.3 中的小鼠多抗血清制备方法制备 NP1 蛋白多抗血清并进行初步验证, 结果如图 3B 所示, 无论是原核 NP1 蛋白还是真核表达的 NP1 蛋白, 均可以被 NP1 多抗血清检测出, 这表明 HBoV1 NP1 蛋白的多抗血清制备成功, 可以用于后续的疾病复制过程中 NP1 蛋白的检测。

## 2.3 pSKHBoV1 转染 HEK293 细胞后 NP1 蛋白的表达

为了探究转染病毒感染性克隆后相关病毒基因的表达情况, 对博卡病毒的独特非结构蛋白 NP1 的表达情况进行了分析。免疫荧光结合激光共聚焦显微观察分析发现, 在病毒复制的过程中, NP1 蛋白的表达主要定位于细胞核(图 4A), 这与已有的报道一致;同时 Western blotting 分析显示, 在转染 pSKHBoV1 后, 能检测到 NP1 的表达(图 4B)。

## 2.4 pSKHBoV1 转染 HEK293 细胞后病毒 RNA 转录后修饰情况

HBoV1 病毒 RNA 转录后存在选择性剪切及选择性多聚腺苷酸化(图 5A), 其中第 3 个内含子的选择性剪切受其独特非结构蛋白 NP1 的调控<sup>[4]</sup>。因此, 为了进一步验证 pSKHBoV1 转

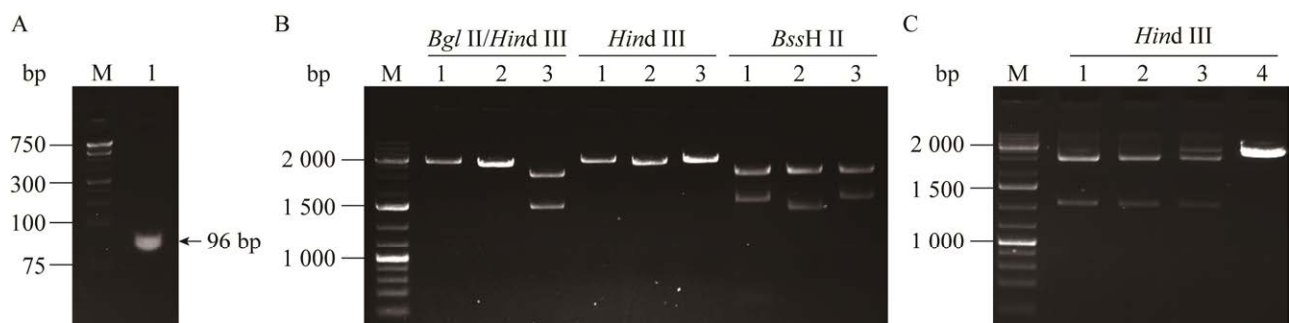


图2 HBoV1 感染性克隆 pSKHBoV1 的构建及鉴定 A: 左端合成 ITR 片段的琼脂糖凝胶电泳验证。B: HBoV1 左端 ITR 克隆 pSK-1-1505-LEH 的鉴定。C: HBoV1 右端 ITR 克隆 pSK-4398-5543-REH 的鉴定  
Figure 2 The construction and identification of the HBoV1 infectious clone pSKHBoV1. A: Agarose gel electrophoresis analysis of synthesized left ITR fragment (A). B: Identification of HBoV1 left ITR clone pSK-1-1505-LEH. C: Identification of HBoV1 right ITR clone pSK-4398-5543-REH.

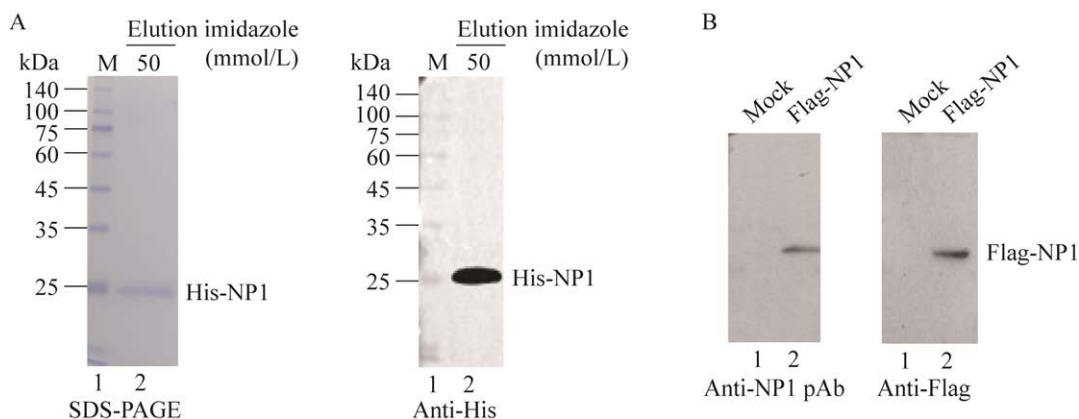


图 3 NP1 蛋白的纯化及其多克隆抗体的制备与验证 A: NP1 蛋白原核表达纯化的 SDS-PAGE 及 Western blotting 验证. B: NP1 多克隆抗体的 Western blotting 验证

Figure 3 Purification of the NP1 protein and preparation of its polyclonal antibodies. A: SDS-PAGE and Western blotting analysis of prokaryotic expression and purification of NP1 protein. B: Western blotting validation of polyclonal antibodies about NP1 protein.

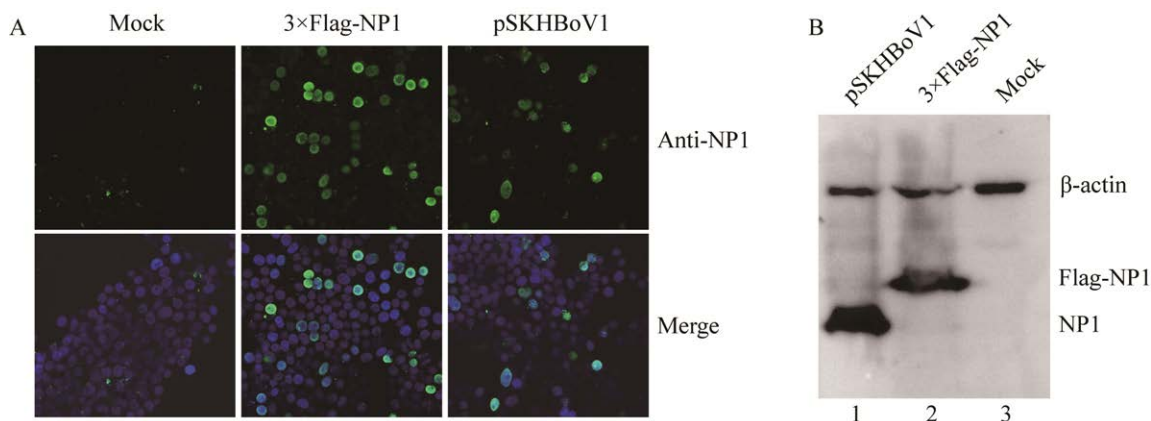


图 4 pSKHBoV1 转染后 NP1 蛋白的细胞内定位(A)及表达(B)

Figure 4 Intracellular localization (A) and expression (B) of the NP1 protein after transfection with pSKHBoV1. Validation of polyclonal antibodies about NP1 protein (20 $\times$ ).

染后病毒 RNA 转录后修饰情况, 采用 F-2 332/R-4 398 以及 F-3 173/R-4 398 两对引物, 利用 RT-PCR 方法对分别转染 pSK-HBoV1 以及 pSKHBoV1-mNP1 的病毒 RNA 转录后修饰情况进行分析。结果如图 5B 所示, 跨越第 3 个内含子的扩增产物存在未剪切 Uns1 以及 Sp1/Sp2 两种剪切形式, 而且 Sp1 为 D3/A3 剪切, 该选择性剪切受 NP1 蛋白的调控(图 5B, 泳道 5 和 6, Sp1); Sp2 为 D3/A3'剪切, 该形式的剪切尚未见

报道, 并且不受 NP1 蛋白的调控(图 5B, 泳道 5 和 6, Sp2); 而非跨越第 3 个内含子的扩增产物与预期的结果一致, 主要为非剪切形式(图 5B, 泳道 2 和 3, Uns2)。上述结果表明, pSKHBoV1 转染 HEK293 细胞后, 病毒 RNA 能够正常转录和完成转录后修饰。

## 2.5 pSKHBoV1 转染 HEK293 细胞后病毒基因组的复制及病毒基因组 DNA 的 PCR 鉴定

为了验证构建的 HBoV1 感染性克隆转染



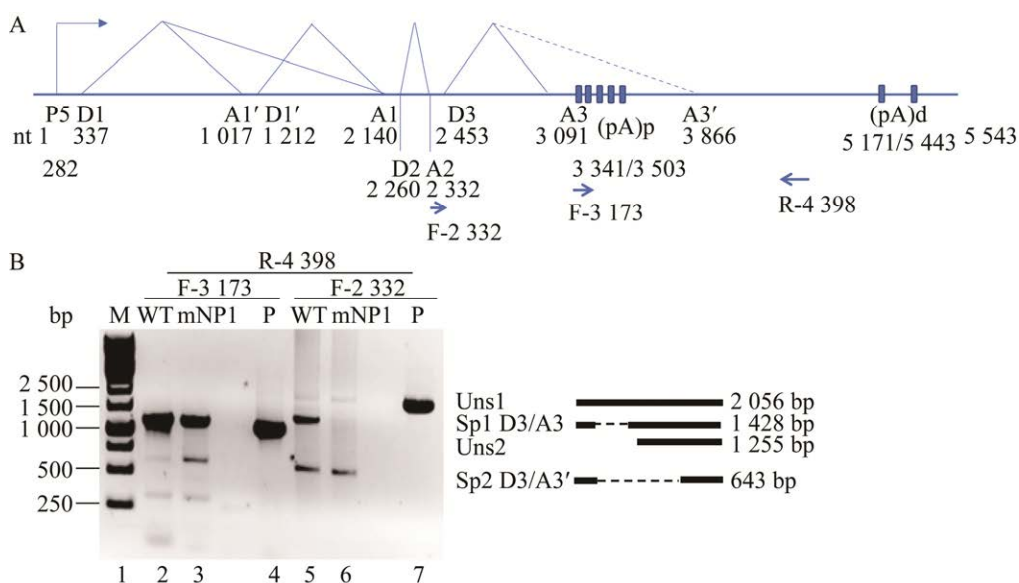


图 5 HBoV1 转录图谱简图(A)及 pSKHBoV1 转染 HEK293 细胞后病毒 RNA 转录后修饰情况分析(B)  
Figure 5 HBoV1 transcription map (A) and the analysis of viral RNA post-transcriptional modification after transfecting HEK293 cells with pSKHBoV1 (B).

细胞后是否能拯救出病毒粒子, 首先将感染性克隆 pSKHBoV1 转染 HEK293 细胞, 然后裂解细胞获得细胞总 DNA 进行 Southern blotting, 分析 HBoV1 病毒基因组的复制情况。结果如图 6A 所示, 转染 12 h, 未检测到 HBoV1 基因组复制中出现的复制中间体 mRF 和 dRF; 转染 24–60 h, 则能检测到病毒的复制中间体 mRF 和 dRF, 这表明, pSKHBoV1 转染 HEK293 细胞后, 在细胞核内能完成病毒基因组的复制过程。接着, 将分别转染 psKHBoV1m630 和 pSKHBoV1 的 HEK293 细胞, 按照实验方法 1.8 中的方案提取病毒粒子中的基因组 DNA, 并利用引物 F-2 460/R-2 615 进行 PCR 扩增, 结果如图 6B 所示, 与对照组相比, 转染 pSKHBoV1 后, 在完成病毒基因组复制后, 能成功装配出含病毒基因组的病毒粒子(图 6B, 泳道 2)。

### 3 讨论与结论

博卡病毒作为细小病毒科的重要成员, 主

要包括牛博卡病毒(bovine parvovirus, BPV)、犬博卡病毒(minute virus of canine, MVC)以及人博卡病毒(human bocavirus, HBoV) 3 个家族成员, 其中 BPV 是博卡病毒属最早发现的成员, 随着 MVC 和 HBoV1 被陆续发现, 它们一起被重新划分为博卡病毒属(bocaparvovirus)<sup>[15]</sup>。近年来又相继在黑猩猩(gorilla bocavirus, GBoV)、猪(porcine bocavirus, PBoV)、蝙蝠(bat bocavirus, FBoV)、鼠(rodent bocavirus, RoBoV)、猫(feline bocavirus, FBoV)、犬(canine bocaviruses 2, CBoV-2)以及加利福尼亚海狮(california sea lions bocavirus, CsIBoV)中发现了博卡病毒的新家族成员<sup>[16-20]</sup>。由于存在复杂的末端 ITR 结构, 因此难以通过一步 PCR 策略扩增获得病毒的全长基因组, 目前仅有 MVC 和 HBoV1 具有完整且有效的感染性克隆<sup>[12,21-22]</sup>。与具有相同末端的依赖病毒属腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)不同的是, 博卡病毒属成员的末端 ITR 不相同, 其 3'末端为兔耳结构 LEH, 5'末端为完

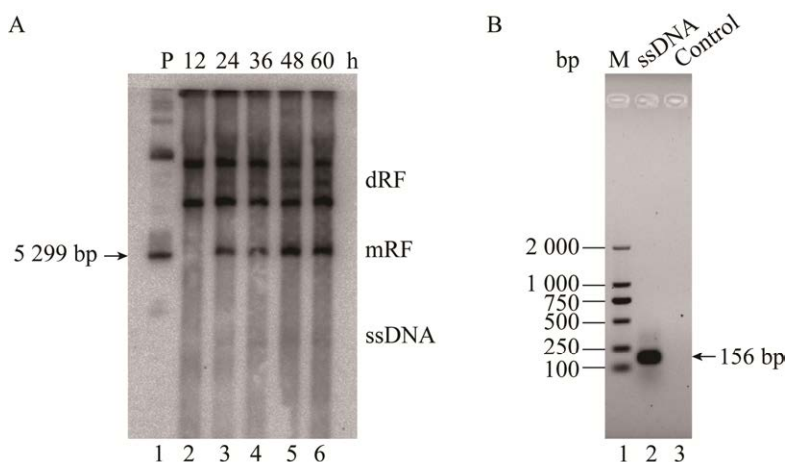


图6 pSKHBoV1转染HEK293细胞后病毒基因组的复制(A)及病毒基因组DNA的PCR鉴定(B)

Figure 6 Viral genome replication (A) and PCR identification of viral genomic DNA after transfection HEK293 cells with pSKHBoV1 (B).

全重复回文结构的REH。其中LEH提供3'-OH进而介导DNA合成的自引发, REH存在46 nt的Ori序列, 已被证明是合成双链后被NS1识别与切割的位点。研究显示含Ori的双链HBoV1基因组的复制可以不依赖于完整的LEH和REH, 但是其复制效率会显著降低, 因此, 含完整ITR的HBoV1感染性克隆的制备仍是必要的<sup>[10]</sup>。已有的HBoV1感染性克隆的末端ITR构建采用分段克隆与连接的策略, 其中REH的构建策略相对复杂, 尤其是其三步克隆中的中间片段的连接较难<sup>[12]</sup>。本研究通过优化REH的构建策略, 经片段合成和PCR扩增, 简化三步克隆为两步克隆, 避免了中间片段的连接, 提高了克隆成功率。同时, 为了验证该感染性克隆是否能在转染细胞后进入病毒复制周期, 从病毒RNA转录、转录后剪切与加工、病毒蛋白翻译以及病毒基因组复制和病毒粒子包装几个方面分别进行了验证, 结果表明构建的感染性克隆在进入细胞核后能完成基因组复制、转录及转录后修饰加工、病毒基因表达及病毒粒子装配。本研究中并未能通过电镜观察直接表征病毒粒子是否获得了拯救, 但是利用细小病毒研究中常用的病毒粒子中病毒基因组DNA的PCR扩增

鉴定实验, 初步表明与已知的报道类似, 在HEK293细胞中转染pSKHBoV1, 具有最终获得含有病毒基因组的病毒粒子的潜力。已有研究表明, HEK293细胞可支持双链HBoV1基因组的复制与具有感染性的病毒粒子的包装, 但是其并不能被HBoV1病毒感染<sup>[12-13]</sup>。而极化的原代人呼吸道上皮细胞(HAE-ALI)作为HBoV1唯一的敏感性细胞, 培养分化过程复杂且价格昂贵<sup>[11-12]</sup>。因此在本研究中, 尚不能验证拯救的病毒粒子是否具有感染性, 仍需在后续的研究中对其感染性进行验证。鉴于在转染细胞后对病毒复制周期中的不同水平的验证与已有的相关报道一致, 这表明该克隆仍可用于除病毒感染入侵以及释放以外的复制周期阶段的相关研究。

## REFERENCES

- [1] 董衍明, 李京京, 徐鹏, 李毅, 马立新, 王媛. 人细小病毒B19分子生物学研究进展[J]. 生物工程学报, 2020, 36(5): 879-890.  
DONG YM, LI JJ, XU P, LI Y, MA LX, WANG Y. Advances in molecular biology research on human parvovirus B19[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2020, 36(5): 879-890 (in Chinese).
- [2] COTMORE SF, AGBANDJE-MCKENNA M, CHIORINI JA, MUKHA DV, PINTEL DJ, QIU JM, SODERLUND-VENERMO M, TATTERSALL P,

- TIJSSEN P, GATHERER D, DAVISON AJ. The family parvoviridae[J]. Archives of Virology, 2014, 159(5): 1239-1247.
- [3] QIU JM, SÖDERLUND-VENERMO M, YOUNG NS. Human parvoviruses[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2017, 30(1): 43-113.
- [4] DONG YM, FASINA OO, PINTEL DJ. The human bocavirus 1 NP1 protein is a multifunctional regulator of viral RNA processing[J]. Journal of Virology, 2018, 92(22): e01187-18.
- [5] SHAO LT, SHEN WR, WANG SQ, QIU JM. Recent advances in molecular biology of human bocavirus 1 and its applications[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 696604.
- [6] WANG XM, XU P, CHENG F, LI Y, WANG ZK, HAO SY, WANG JK, NING K, GANAIE SS, ENGELHARDT JF, YAN ZY, QIU JM. Cellular cleavage and polyadenylation specificity factor 6 (CPSF<sub>6</sub>) mediates nuclear import of human bocavirus 1 NP1 protein and modulates viral capsid protein expression[J]. Journal of Virology, 2020, 94(2): e01444-19.
- [7] DONG YM, FASINA OO, PINTEL DJ. Minute virus of canines NP1 protein interacts with the cellular factor CPSF<sub>6</sub> to regulate viral alternative RNA processing[J]. Journal of Virology, 2019, 93(2): e01530-18.
- [8] FASINA OO, STUPPS S, FIGUEROA-CUILAN W, PINTEL DJ. Minute virus of canines NP1 protein governs the expression of a subset of essential nonstructural proteins *via* its role in RNA processing[J]. Journal of Virology, 2017, 91(12): e00260-17.
- [9] SUN YN, CHEN AY, CHENG F, GUAN WX, QIU JM. Molecular characterization of infectious clones of the minute virus of canines reveals unique features of bocaviruses[J]. Journal of Virology, 2009, 83(8): 3956-3967.
- [10] SHEN WR, WANG ZK, NING K, CHENG F, ENGELHARDT JF, YAN ZY, QIU JM. Hairpin transfer-independent parvovirus DNA replication produces infectious virus[J]. Journal of Virology, 2021, 95(20): e0110821.
- [11] YAN ZY, DENG XF, QIU JM. Human bocavirus 1 infection of well-differentiated human airway epithelium[J]. Current Protocols in Microbiology, 2020, 58(1): e107.
- [12] HUANG QF, DENG XF, YAN ZY, CHENG F, LUO Y, SHEN WR, LEI-BUTTERS DCM, CHEN AY, LI Y, TANG L, SÖDERLUND-VENERMO M, ENGELHARDT JF, QIU JM. Establishment of a reverse genetics system for studying human bocavirus in human airway epithelia[J]. PLoS Pathogens, 2012, 8(8): e1002899.
- [13] DENG XF, XU P, ZOU W, SHEN WR, PENG JX, LIU KY, ENGELHARDT JF, YAN ZY, QIU JM. DNA damage signaling is required for replication of human bocavirus 1 DNA in dividing HEK293 cells[J]. Journal of Virology, 2017, 91(1): e01831-16.
- [14] 王媛, 于倩, 李毅, 董衍明. 表达兔出血症病毒 VP60 蛋白的重组兔粘液瘤病毒的构建与初步评价[J]. 生物工程学报, 2020, 36(10): 2083-2091.
- WANG Y, YU Q, LI Y, DONG YM. Generation and evaluation of a recombinant myxomavirus expressing the VP60 protein of rabbit haemorrhagic disease virus[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2020, 36(10): 2083-2091 (in Chinese).
- [15] COTMORE SF, AGBANDJE-MCKENNA M, CANUTI M, CHIORINI JA, EIS-HUBINGER AM, HUGHES J, MIETZSCH M, MODHA S, OGLIASTRO M, PÉNZES JJ, PINTEL DJ, QIU JM, SÖDERLUND-VENERMO M, TATTERSALL P, TIJSSEN P, CONSORTIUM IR. ICTV virus taxonomy profile: parvoviridae[J]. The Journal of General Virology, 2019, 100(3): 367-368.
- [16] LI LL, SHAN TL, WANG CL, CÔTÉ C, KOLMAN J, ONIONS D, GULLAND FMD, DELWART E. The fecal viral flora of California Sea lions[J]. Journal of Virology, 2011, 85(19): 9909-9917.
- [17] LANAVE G, MARTELLA V, FARKAS SL, MARTON S, FEHÉR E, BODNAR L, LAVAZZA A, DECARO N, BUONAVOGLIA C, BÁNYAI K. Novel bocaparvoviruses in rabbits[J]. The Veterinary Journal, 2015, 206(2): 131-135.
- [18] WU ZQ, REN XW, YANG L, HU YF, YANG J, HE GM, ZHANG JP, DONG J, SUN LL, DU J, LIU LG, XUE Y, WANG JM, YANG F, ZHANG SY, JIN Q. Virome analysis for identification of novel mammalian viruses in bat species from Chinese Provinces[J]. Journal of Virology, 2012, 86(20): 10999-11012.
- [19] LAU SKP, YEUNG HC, LI KSM, LAM CSF, CAI JP, YUEN MC, WANG M, ZHENG BJ, WOO PCY, YUEN KY. Identification and genomic characterization of a novel rat bocavirus from brown rats in China[J]. Infection, Genetics and Evolution, 2017, 47: 68-76.
- [20] BODEWES R, LAPP S, HAHN K, HABIERSKI A, FÖRSTER C, KÖNIG M, WOHLSEIN P, OSTERHAUS ADME, BAUMGÄRTNER W. Novel canine bocavirus strain associated with severe enteritis in a dog litter[J]. Veterinary Microbiology, 2014, 174(1/2): 1-8.
- [21] BINN LN, LAZAR EC, EDDY GA, KAJIMA M. Recovery and characterization of a minute virus of canines[J]. Infection and Immunity, 1970, 1(5): 503-508.
- [22] CHEN KC, SHULL BC, MOSES EA, LEDERMAN M, STOUT ER, BATES RC. Complete nucleotide sequence and genome organization of bovine parvovirus[J]. Journal of Virology, 1986, 60(3): 1085-1097.

(本文责编 郝丽芳)