

猪繁殖与呼吸障碍综合征病毒(PRRSV)3'末端 非翻译区中调控序列的研究

孙 志^{1,2}, 王金勇¹, 张建武¹, 秦爱健², 袁世山¹

(¹中国农业科学院上海兽医研究所 中国动物卫生与流行病学中心上海分中心 农业部动物寄生虫病重点实验室 上海 200232)

(²扬州大学兽医学院 扬州 225009)

摘 要 :以北美株 PRRSV 感染性克隆 pCBC2 为平台进行反向遗传操作,将 3'UTR 中的一级结构进行了系列缺失或插入突变,并改变二级结构中的一个保守的茎环结构,构建全长 PRRSV 突变体克隆,解析 3'UTR 突变对病毒感染性的影响,旨在界定调控 PRRSV 3'UTR 的启动子序列及二级结构,即复制过程中的最小调控元件。以空斑和 Northern blot 来研究拯救后重组病毒的复制、转录和生长特性,发现重组病毒感染动力学与亲本病毒无可见差别。结果表明 PRRSV 3'UTR 的 5'端可耐受一定数目的核苷酸的缺失(41nt)与插入(23nt)突变,但进一步 9nt 缺失造成保守的环结构突变后就使病毒失去了感染性。证明了这是 3'UTR 中控制 PRRSV 复制过程的必需序列及二级结构,为进一步解析 PRRSV 复制过程的调控元件奠定了基础。

关键词 :PRRSV ;反向遗传操作 ;3'非翻译区 ;基因组复制 ;mRNA 转录

中图分类号 :Q939 文献标识码 :A 文章编号 :0001-6209(2007)05-0774-05

猪繁殖与呼吸障碍综合征(Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome, PRRS),俗称“蓝耳病”,首先发现于上世纪 80 年代末^[1]。其致病病原为猪繁殖与呼吸障碍综合征病毒(PRRSV),于 90 年代初相继分离于欧洲和美国,并迅速的成为危害养猪业的重重大疫病。PRRSV 是新成立的套式病毒目(Nidovirales)动脉炎病毒科(Arteriviridae)的成员^[2]。动脉炎病毒是一种有囊膜、核衣壳为正二十面体对称的单股正链 RNA 病毒。PRRSV 全基因组长约 15kb,其基因组结构为不分节段、有 5'端帽状结构和 3' poly(A)尾的正义 RNA。左端 5'非编码区(Untranslated region, UTR)长为 190~220 个核苷酸(nucleotide nt);右端 3'UTR 长 110~150 nt。像其它正链 RNA 病毒一样,动脉炎病毒的 3'UTR 对病毒的整个复制过程起着重要的调控作用^[3]。黄病毒科和冠状病毒科的病毒 3'UTR 较长,能够独立的构成病毒复制所需的顺式调控元件^[4~6],在马动脉炎病毒(Equine arterivirus)和 PRRSV 中,试验证明其 3'端的顺式调控元件延伸到了上游的核衣壳蛋白(N)编码区(ORF7),PRRSV LV 株的 3'UTR 序列与 ORF7 中的序列互补形成调节复制的二级功能性结构。据报

道,PRRSV 的转录、翻译及病毒包装的正常运转依赖于 3'UTR 精细有序地调节才能完成^[7],但这种推理尚需进一步试验验证。随着反向遗传系统(Reverse Genetics System, RGS)技术的兴起,人们开始通过构建 RNA 病毒基因组的 cDNA,获得诸多 RNA 病毒的感染性克隆,在此基础上进行反向遗传学操作,探讨 RNA 病毒复制过程的侵入、复制、转录及病毒颗粒组装的精细调控机制,以及病毒的致病机理,进而确定病毒复制的调控元件。本研究利用前期构建的 PRRSV 感染性克隆,在其 3'UTR 的 5'端进行了一系列的缺失与插入突变,以期鉴定 3'UTR 核苷酸序列中对病毒转录复制的调控序列与结构,从而确定病毒复制、转录的启动子,以便了解 PRRSV 复制调控机制。

1 材料和方法

1.1 突变质粒的构建

PRRS 北美株全长感染性克隆(Genbank 登录号:AF184212)pCBC2 由本研究室构建(袁世山等,未发表)。利用 Quik Change 突变 PCR 技术(Stratagene)和中间质粒 pBT451,分别构建 3'UTR 突变的全长感

基金项目 国家自然科学基金(30530580),国家重点基础研究发展规划(973 项目)(2005CB523202)

* 通讯作者。Tel 86-21-54084162 Fax 86-21-54084162 E-mail shishanyuan@hotmail.com

作者简介 孙 志(1979-)男,上海人,研究实习员,主要从事分子病毒学方面的研究。E-mail sunzhi197982@yahoo.com.cn

收稿日期 2007-01-23;接收日期 2007-04-09;修回日期 2007-07-05

染性克隆 p4SLCA、p4SLDO、pUP295、pUP193、pLAU3、pCDU11c,全长突变感染性克隆均经 *Sma*I 酶切鉴定。

1.2 主要试剂和仪器

细胞生长液为含有 6% 胎牛血清(FBS, GIBCO Cat 16000)的 MEM 维持液为 2% FBS 的 MEM。MEM 液体培养基、胰酶(Trypsin-EDTA, 0.25%) 无钙、镁的磷酸盐缓冲液 PBS、胎牛血清 FBS、2XMEM 培养基、青霉素链霉素均购自 GIBCO 公司。化学转染试剂 Lipofectamine™2000、OPTI-MEM 购自 Invitrogen 公司。AMV 反转录酶, *hs* Taq DNA 聚合酶和 dNTPs 购自上海 TaKaRa 公司,限制性内切酶购自 NEB 公司。QIAGEN Viral RNA Mini Kit 购自 QIAGEN 公司。NorthernMax Kit RNAWiz Kit、BrightStar Psoralen-Biotin、BrightStarBioDetect 均购自 Ambion 公司。

1.3 细胞的转染

MARC-145 细胞由本实验室保存,将 MARC-145 细胞接种于 6 孔细胞培养板中,待细胞密度为 90% ~ 95% 时进行转染。每孔加入 2.5 ~ 5 μ g 的全长突变质粒和 10 μ L Lipofectamine™ 2000 试剂(Invitrogen)根据转染试剂说明书进行转染。转染后逐日观察细胞病变,第 10 天出现病变后收取病毒上清置 -80℃ 保存备用,第 10 天仍没有出现病变则吸 200 μ L 细胞上清在单层 MARC-145 细胞盲传 2 代后判定拯救病毒的感染性。

1.4 RT-PCR 鉴定突变病毒

参照构建克隆的病毒基因序列,利用 Oligo6.0 软件设计一对引物,上游引物在 ORF7 编码区上游,下游引物为 Poly(T),由上海申能博采技术有限公司合成。P1 上游:SF15008 5'-ACAACGGCAAACAGCAG AAG-3', P2 下游:Qst 5'-GAGTGACGAGGACTCGAGCC CATGCTTTTTTTTTTTTTTTT-3',按照 QIAGEN Viral RNA Mini Kit 说明提取细胞上清中的病毒 RNA,采用 TaKaRa 公司的 AMV 反转录酶进行病毒 RNA 的反转录,随后以 *hs*Taq 进行 PCR 反应,扩增产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定,有必要时,以 QIAGEN Gel-Purification Kit 纯化目的条带,送上海申能博采测序。

1.5 病毒空斑形态分析

待细胞长到 90% ~ 95% 后进行病毒空斑分析,制备 2.0% 的低熔点琼脂糖,在微波炉中融化后,置 60℃ 水浴中混匀,2 \times MEM 预先置 37℃ 水浴中。病毒收获液以 0.1MOI 接种 6 孔板培养的 MARC-145 细胞中,37℃,5% CO₂ 培养箱中培养。10 倍次递减

稀释待检的病毒,稀释好的病毒液感染细胞 200 μ L/孔。将 6 孔板置 37℃ 孵育 1h,再快速的将 2.0% 琼脂糖与 2 \times MEM 以 1:1 混合,然后加入到 6 孔板中,5mL/孔。室温凝固后,37℃,5% CO₂ 恒温箱倒置培养 5 ~ 6d。小心的除去凝胶,用 5% 的结晶紫染色,染色 10 ~ 12min,洗去多余的染色液,观察空斑的形态并拍照。

1.6 Northern blot 检测 PRRSV 亚基因组转录

1.6.1 细胞总 RNA 的提取:拯救后的突变病毒(vLAU3、vCDU11c、和 vCBC2)以低感染剂量感染单层 MARC-145 细胞,感染 48h 后弃去培养基并加入 7.5mL RNAWiz,参照说明书提取细胞 RNA,溶解到 200 μ L 无 RNA 酶的水中,-70℃ 冻存备用。

1.6.2 Northern blot 特异性探针的制备:参照 BrightStar Psoralen-Biotin 试剂盒的说明书标记探针,标记好的探针置 -70℃ 保存备用。设计探针参照全基因组序列,以 5'-UTR-5' 端的互补序列作为探针,序列如下:SR:CAGCTCCTGACAATACAAATGTCAAG GCATAGAGCCAACACCTATACGTCAT。

1.6.3 杂交:参照 NorthernMax Kit 的说明书电泳并杂交,20 μ L 细胞总 RNA 加入 45 μ L Formaldehyde Load Dye 混匀后 65℃ 变性 15min。40v 电泳过夜,转印到 BrightStar-Plus 膜上。将转印后的膜移入预热的 ULTRAhyb 杂交液中,42℃ 预杂交 30min,1mL 已预热的 ULTRAhyb 杂交液稀释 20pM 探针,42℃ 杂交过夜。洗涤后将膜密封在杂交袋内,置膜于暗盒中 X-光胶片上成像。曝光后的第 2 天开始洗底片,并拍照保存。

2 结果

2.1 PRRSV 3'-UTR 突变全长克隆的构建与鉴定

突变 PCR 构建的中间质粒 p4SLc1、p4SLd1 经 *Xho*I 和 *Spe*I 双酶切后获得的片段取代 pCBC2 中的相应区域构建感染性克隆 p4SLCA、p4SLDO,闭环结构和改变环的序列为互补序列,成功的构建了二级结构保守环的突变全长克隆,构建好的全长质粒送上海申能博采测序证明突变正确。在本室此前构建了在 3'-UTR-5' 端缺失了 41 个 nt(15370 ~ 15411)的质粒 pCDU11c,在此基础上又构建了 9 个 nt(15370 ~ 15419)和 19 个 nt(15370 ~ 15429)缺失的质粒 pUP193、pUP295 和 3'-UTR-5' 端插入 TRS 等 23 个 nt 的质粒 pLAU3。突变克隆经 *Sma*I 酶切出现了

预期大小片段 10454bp、4314 bp、2787bp、954bp、187bp,表明是大小正确的全长克隆(图 1)。

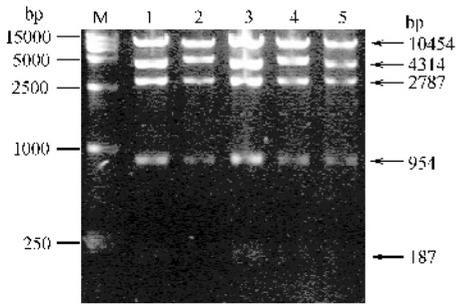


图 1 重组质粒的 *Sma* I 酶切鉴定

Fig.1 Identification of the mutagenesis infectious clone by *Sma* I. M: DL15000 Marker 1: pUP193 2: pCBC2 3: pCDU11c 4: pLAU3 5: pUP295.

2.2 突变对病毒感染性影响的分析

用 Lipofectamine™2000 和突变的全长克隆转染细胞后发现 pCBC2 出现细胞病变,一级结构上的突变克隆 pLAU3、pCDU11c 也出现了细胞病变,收取细胞上清置 -70℃ 冻存。二级茎环结构突变的 p4SLCA、p4SLDO 在转染后未出现细胞病变,一级结构上缺失 49 个 nt(15370~15419)和 59 个 nt(15370~15429)的 pUP193 和 pUP295 也未出现病变。突变对病毒感染性的影响见表 1。

表 1 突变对病毒感染性的影响

Table 1 Analysis of the mutant effect on virus infectivity

Name	Mutant position	Infectivity	RT-PCR
pCBC2	None	Yes	Positive
pCDU11c	delete 15370-15411	Yes	Positive
pLAU3	insert 23nt	Yes	Positive
pUP193	delete 15370-15419	No	Negative
pUP295	delete 15370-15429	No	Negative
p4SLCA/p4SLDO	loop structure	No	Negative

2.3 拯救后病毒的 RT-PCR 鉴定

经传代的病毒上清 vCBC2、vLAU3、vCDU11c 感染 MARC-145 细胞, QIAGEN Viral RNA Mini Kit 提取感染细胞上清的病毒 RNA, RT-PCR 检测 3'-UTR 的特异性序列(图 2), 出现了 500bp 左右的目的片段,

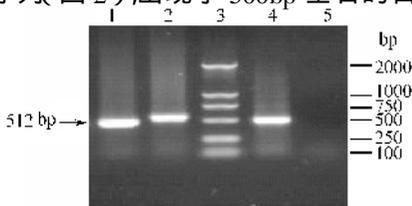


图 2 突变病毒的 RT-PCR 鉴定

Fig.2 Identification of the mutant virus by RT-PCR. 1: pCDU11c 2: pLAU3 3: 2000bp Ladder 4: pCBC2 5: MARC-145 cells supernatant.

测序后经 DNASTar 软件序列分析证明突变病毒含有构建的突变的序列。

2.4 病毒的空斑形态分析

将突变病毒 vLAU3、vCDU11c 和 vCBC2 进行传代, 将第 6 代后的病毒做空斑形态分析, 空斑形态与阳性克隆相比较无明显差异(图 3)。结果表明 PRRSV 3'-UTR 缺失 41 核苷酸序列和插入 TRS 序列后对病毒的生长特性没有影响。

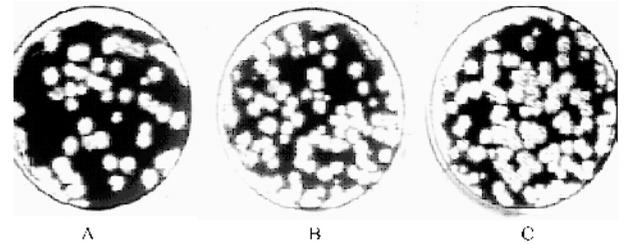


图 3 病毒的空斑形态学比较

Fig.3 Analysis of mutant virus plaque type. A: vCBC2 B: vLAU3 C: vCDU11c.

2.5 Northern blot 检测病毒亚基因组 mRNA 转录

将设计针对 5'-UTR 的特异性探针 SR5 标记生物素, 并与提取的 RNA 进行杂交并(图 4)。在 3'-UTR 一级结构上插入 TRS 序列存在于每一个 sg mRNA 中, 在 vLAU3 每一个亚基因组都大于阳性对照, 而缺失了 41nt 的 vCDU11c 的亚基因组比阳性对照要小。这说明在病毒拯救后一级结构上的突变存在于病毒复制中, 病毒的亚基因组 RNA 中有着共同的 3'-UTR。

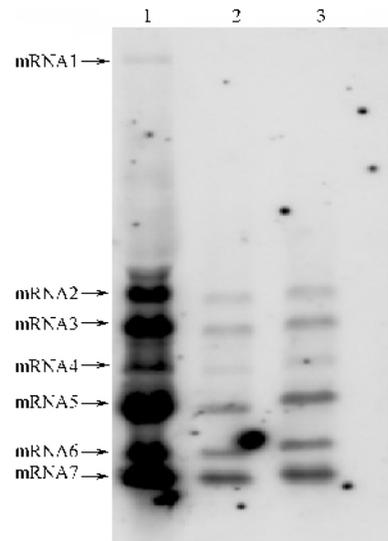


图 4 PRRSV 3'-UTR 突变病毒的 Northern blot 鉴定

Fig.4 Identification of the mutant virus in PRRSV 3'-UTR by Northern blot. 1: vCBC2 2: vCDU11c 3: vLAU3 4: Mock infected MARC-145 cells total RNA.

3 讨论

PRRSV 引起的 PRRS 给我国乃至全球的养猪业造成巨大的经济损失,它也是引起 PMWS 和多种病原混合感染的原凶。因此迫切需要有效手段来控制该病的传播蔓延,减少其他病原菌感染的机会,而目前 PRRS 新型有效的疫苗研制,需要了解病毒复制的机理。在病毒的复制、转录和翻译中起重要作用的 3'-UTR 指导了 RdRp 合成负链的基因组 RNA,因此 3'-UTR 可以做为疫苗开发的一个潜在靶位点,RdRp 通过识别特异的 3'-UTR 来选择相同病毒不同血清型的正链 RNA 模板合成负链,在复制过程中产生新的重组病毒,而 RdRp 酶本身的校正能力较差,使得病毒易发生突变。这都给疫苗的研究带来很大的困难,而且单纯的重组 DNA 疫苗对这类病毒缺乏好的保护效果。3'-UTR 有多种生物学功能:3'-UTR 中的顺式调控元件调控着病毒的复制、转录和蛋白的翻译^[8,9];有宿主特异性的限制作用,它能够决定病毒感染宿主细胞的特异性^[10];独立的增强病毒蛋白翻译的能力^[11]。因此我们有必要对 PRRSV 3'-UTR 中的必需序列与结构进行解析。已有研究发现欧洲株 PRRSV 3'-UTR 可以耐受 30nt 的缺失,而且 3'-UTR 二级结构中形成的一个顶端的环可以与编码核衣壳蛋白的基因序列形成的环状结构互补,形成的假扣结构是病毒复制所必需的^[12]。在国内由于没有成熟的 PRRSV 反向遗传操作系统,因此并没有 3'-UTR 顺式调控元件的相关报道。在北美株中 3'-UTR 是怎样发挥功能的,通过本研究以期找到对病毒复制、转录、包装起作用的序列与结构,为将来疫苗的研制奠定基础。

本研究对 PRRSV 北美株的 3'-UTR 中一级结构的改变,缺失或插入外源序列;二级结构的突变;对保守茎环结构中的环结构进行突变。结果证明 3'-UTR 的 5'端 41nt(15370~15411)对病毒的复制是非必须的,进一步 9nt 的缺失则使病毒丧失了感染性,说明 PRRSV 3'-UTR 复制元件 5'端介于 15411~15419 之间。在 ORF7 和 3'-UTR 之间插入 Pac I、

Asc I 位点,以及其它的 23nt,重组病毒感染动力学与亲本无明显差别。突变研究表明 3'UTR 二级茎环结构(Stem Loop LP)对病毒的感染性起着不可缺少的作用。

参 考 文 献

- [1] Keffaber KK. Reproductive failure of unknown etiology. *Am Assoc Swine Prac News* 1989 **1**(2):1-9.
- [2] Alexander EG,Enjuanes L,Ziebuhr J,et al. Nidovirales:Evolution of the largest RNA virus genome. *J Virus Res* 2006 **117**:17-37.
- [3] Alexander OP,Willy JM,Eric JS. Nidovirus transcription:how to make sense. *J Gen Virol* 2006 **87**:1403-1421.
- [4] Hsue B,Hartshome T,Masters PS. Characterization of an Essential RNA Secondary Structure in the 3'-Untranslated Region of the Murine Coronavirus Genome. *J Virol* 2000 **74**:6911-6921.
- [5] Liu Q,Johnson RF,Leibowitz JL. Secondary Structural Elements within the 3'-Untranslated Region of Mouse Hepatitis Virus Strain JHM Genomic RNA. *J Virol* 2001 **75**:12105-12113.
- [6] Chen MH,Frey TK. Mutagenic Analysis of the 3'-cis-Acting Elements of the Rubella Virus Genome. *J Virol* 1999 **73**:3386-3403.
- [7] Snijder EJ,Meulenberg JJM. The molecular biology of arteriviruses. *J Gen Virol* 1998 **79**:961-979.
- [8] Friebe P,Bartenschlager R. Genetic Analysis of Sequences in the 3'-Nontranslated Region of Hepatitis C Virus That Are Important for RNA Replication. *J Virol* 2002 **76**:5326-5338.
- [9] Brown DM,Cornell CT,Tran GP,et al. An Authentic 3'-Noncoding Region Is Necessary for Efficient Poliovirus Replication. *J Virol* 2005 **79**:11962-11973.
- [10] Hwang YK,Brinton MA. A 68-Nucleotide Sequence within the 3'-Noncoding Region of Simian Hemorrhagic Fever Virus Negative-Strand RNA Binds to Four MA104 Cell Proteins. *J Virol* 1998 **72**:4341-4351.
- [11] Katherine L, Holden, Eva Harris. Enhancement of dengue virus translation:role of the 3'-untranslated region and the terminal 3'-stem-loop domain. *J Viro* 2004 **329**:119-133.
- [12] Verheije MH,Olsthoorn RC,Kroese MV, Meulenberg JJ, et al. Kissing Interaction between 3'-Noncoding and Coding Sequences Is Essential for Porcine Arterivirus RNA Replication. *J Viro* 2002 **76**:1521-152.

Identification of porcine reproductive and respiratory syndrome virus regulation sequence in 3'-Untranslated region

SUN Zhi¹, WANG Jin-yong¹, ZHANG Jian-wu¹, QIN Ai-jian², YUAN Shi-shan^{1*}

(¹ Department of Animal Infectious Diseases, Shanghai Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Shanghai 200232, China)

(² Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: Based on our established infectious clone of PRRSV, designated as pCBC2, a series of mutagenesis of 3'-untranslated region (3'-UTR) at primary structure and secondary structure level were constructed. Then the full length mutant clones were transfected into MARC-145 cells, from which the influences of the discrete 3'-UTR mutation on PRRSV replication and transcription were analyzed. The properties of the rescued mutant viruses were then further characterized by Northern Blot and plaque morphology analysis. Our results demonstrated that PRRSV could tolerate more than 41 nucleotides deletion and 23nt insertion in the 3'-UTR, however, minor changes in the conserved stem loop region destroyed virus infectivity. To sum up, the stem-loop structure was essential for virus viability, but 5' end of the 3'-UTR tolerates certain level of nucleotide deletion or insertion. This is the first report to define the essential sequence and secondary structure for PRRSV genome replication and it is useful for future research about the regulation element.

Keywords: Porcine reproductive and respiratory disease virus; reverse genetics; 3'-untranslated region; genome replication; mRNA transcription

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (30530580); Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2005CB523202)

* Corresponding author. Tel/Fax: 86-21-54084162; E-mail: shishangyuan@hotmail.com

Received: 23 January 2007/ Accepted: 9 April 2007/ Revised: 5 July 2007