



## 长链非编码 RNA CTO-S 对伪狂犬病毒复制的影响

苏乐<sup>1</sup>, 段龙川<sup>1,2</sup>, 姜慧<sup>1</sup>, 付雯<sup>1</sup>, 李林涛<sup>1</sup>, 陈焕春<sup>1</sup>, 刘正飞<sup>1\*</sup>

1 华中农业大学动物医学院, 农业微生物学国家重点实验室, 湖北洪山实验室, 湖北 武汉 430070

2 温州科技职业学院动物科学学院, 浙江 温州 325000

苏乐, 段龙川, 姜慧, 付雯, 李林涛, 陈焕春, 刘正飞. 长链非编码 RNA CTO-S 对伪狂犬病毒复制的影响. 微生物学报, 2022, 62(2): 754–763.

Su Le, Duan Longchuan, Jiang Hui, Fu Wen, Li Lintao, Chen Huanchun, Liu Zhengfei. Effect of long non-coding RNA CTO-S on the replication of pseudorabies virus. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(2): 754–763.

**摘要:** 【目的】研究伪狂犬病毒(pseudorabies virus, PRV)的长链非编码 RNA(long noncoding RNA, lncRNA)CTO-S 对于病毒复制的影响。【方法】利用 3'RACE 和 5'RACE 鉴定 CTO-S 的全长序列。验证 CTO-S 是否具有编码多肽的能力。Red 重组方法构建 CTO-S 缺失株以及回复突变株。分析野毒株、缺失株和回复突变株复制的差异。利用 RNA pull down 联合质谱的方法筛选与 CTO-S 互作的宿主蛋白。利用 RNA 免疫共沉淀(RNA immunoprecipitation, RIP)方法进行验证。最后利用四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测野毒株、缺失株和回复突变株对细胞凋亡的影响。【结果】CTO-S 全长 267 bp, 不具有编码多肽的能力。CTO-S 缺失不影响 PRV 的复制。CTO-S 与泛醇细胞色素 c 还原酶的组成部分 cytochrome b-c1 complex subunit 1 互作, 诱导细胞凋亡。【结论】CTO-S 对于 PRV 的复制是非必需的, CTO-S 与泛醇细胞色素 c 还原酶的组成部分 cytochrome b-c1 complex subunit 1 互作, 诱导细胞凋亡。

**关键词:** 伪狂犬病毒; 长链非编码 RNA; CTO-S; 突变株; 复制; 互作

**基金项目:** 国家自然科学基金(31770191); 湖北省科技重大专项工程(2020ABA016)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31770191) and by the Major Special Project of Science and Technology in Hubei Province (2020ABA016)

\*Corresponding author. Tel/Fax: +86-27-87644219; E-mail: lzf6789@mail.hzau.edu.cn

Received: 7 June 2021; Revised: 19 August 2021; Published online: 22 November 2021

# Effect of long non-coding RNA CTO-S on the replication of pseudorabies virus

SU Le<sup>1</sup>, DUAN Longchuan<sup>1,2</sup>, JIANG Hui<sup>1</sup>, FU Wen<sup>1</sup>, LI Lintao<sup>1</sup>, CHEN Huanchun<sup>1</sup>, LIU Zhengfei<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Hubei Hongshan Laboratory, College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei, China

<sup>2</sup> College of Animal Science, Wenzhou Vocational College of Science and Technology, Wenzhou 325000, Zhejiang, China

**Abstract:** [Objective] This study aims to reveal the effect of the long non-coding RNA (lncRNA) CTO-S on the replication of pseudorabies virus (PRV). [Methods] We employed 3'RACE and 5'RACE to identify the full-length sequence of CTO-S, and verified whether CTO-S had the ability to encode polypeptides. After constructing the CTO-S deletion and complementation strains with the Red recombination method, we analyzed the differences in the replication of wild-type, deletion, and complementation strains. We used RNA pull down combined with mass spectrometry to screen out the host protein interacting with CTO-S, and then adopted RNA immunoprecipitation (RIP) method to verify the interaction between the screened protein and CTO-S. Finally, the methyl tetrazolium (MTT) method was used to detect the effects of wild-type, deletion, and complementation strains on cell apoptosis. [Results] CTO-S had a full length of 267 bp and did not have the ability to encode polypeptides. The deletion of CTO-S did not affect the replication of PRV. CTO-S interacted with cytochrome b-c1 complex subunit 1, a component of ubiquinol-cytochrome c reductase, and induced apoptosis. [Conclusion] CTO-S is not essential for the replication of PRV. It interacts with cytochrome b-c1 complex subunit 1, a component of ubiquinol-cytochrome c reductase, and induces cell apoptosis.

**Keywords:** pseudorabies virus; lncRNA; CTO-S; mutant; replication; interaction

猪伪狂犬病毒(pseudorabies virus, PRV)是引发猪伪狂犬病(pseudorabies, PR)的病原体,在生产上造成仔猪死亡;公猪精液品质下降,失去种用性能;怀孕母猪流产、产木乃伊胎、死胎等临床症状;给养猪业带来严重的经济损失<sup>[1]</sup>。伪狂犬病毒可感染多种哺乳动物,人类也可能是该病原体的另一个潜在宿主<sup>[2]</sup>。

长链非编码 RNA (long noncoding RNAs, lncRNAs)是不具有编码蛋白质能力、大于 200 nt 的转录本<sup>[3]</sup>。lncRNA 在表观遗传、转录水平或者是转录后等水平调节基因的表达<sup>[4]</sup>,可参与多种生物学功能,包括细胞结构完整性、细胞周期、重编程和凋亡,在天然免疫调控方面也具有非常重要的作用<sup>[5]</sup>。除宿主能转录 lncRNA 外,

病毒自身基因也能编码 lncRNA。人类巨细胞病毒编码的  $\beta 2.7$  能够预防细胞凋亡<sup>[6]</sup>;虫媒病毒编码的 sfRNA,对宿主外切核酸酶 XRN1 具有抗性作用,它的表达丰度与病毒的致病性相关<sup>[7]</sup>;疱疹病毒编码的 HSURs 可以诱导 miR-27 的降解并调节宿主 T 细胞的基因表达<sup>[8]</sup>。

但是 PRV 编码的 lncRNA 作用机制尚未报道。Tombácz 等在感染 PRV Kaplan 株的 PK-15 细胞中鉴定出 2 种 lncRNA,分别为 CTO-L 与 CTO-S<sup>[9]</sup>。本研究首先鉴定 CTO-S 的全长序列,验证其是否具有翻译多肽的能力;然后构建 CTO-S 缺失株并研究其对病毒复制以及致病性的影响;最后筛选 CTO-S 的互作蛋白并利用 RNA 免疫共沉淀(RNA immunoprecipitation, RIP)方法

进行验证,为 PRV 的疫苗研发提供理论基础以及新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞、质粒、主要试剂、菌株、及病毒株

猪肾上皮细胞 PK-15、牛肾上皮细胞 MDBK 购自中国典型培养物保藏中心(武汉); pEPKan-S2、pcDNA3.1(+)由本实验室保存; pMD<sup>®</sup>18-T 购自大连宝生物工程有限公司; 10×Biotin RNA labeling mix 购自罗氏(Roche); DMEM 培养基、GIBCO 新生牛血清(FBS)购自美国 Invitrogen 公司; Anti-GAPDH 鼠单克隆抗体、Anti-6× His tag<sup>®</sup> antibody 鼠单抗、Anti-HA tag antibody 鼠单抗购自 Abcam 公司; Goat anti-pig IgG-HRP、Goat anti-rabbit IgG-HRP、Goat anti-mouse IgG-HRP 购自普美生物技术有限公司。

*Escherichia coli* GS1783 PRV Ea-BAC 感受态由本实验室构建并保存<sup>[10-11]</sup>。

伪狂犬病毒鄂 A 株(PRV Ea)由本实验室分离并保存。1998 年,陈焕春等从湖北省某些猪场大批死亡的新生仔猪的脑及内脏中分离到伪狂犬病病毒,并将该毒株命名为猪伪狂犬病病毒鄂 A 株<sup>[12]</sup>。Wang 等对伪狂犬病毒鄂 A 株的全

基因组序列进行测序并公布于 GenBank: KX423960.1<sup>[13]</sup>。

### 1.2 引物设计

根据 GenBank (KX423960.1)公布的 PRV 基因组序列,用 Primer 5 软件设计引物(表 1)。

### 1.3 CTO-S 全长 RACE 分析

#### 1.3.1 3'RACE

PRV Ea 感染 PK-15 细胞 24 h 后 Trizol 法提取总 RNA,以总 RNA 为模板逆转录合成 cDNA,逆转录引物末端连接 oligo(dT)<sub>30</sub>VN。以 cDNA 为模板利用引物 P2 与长引物 P3 对 CTO-S 的 3'末端进行 PCR 扩增。反应体系为 50 μL: 模板 1 μL,引物 P2 与 P3 各 2 μL, 2×TSINGKE Master Mix 25 μL, H<sub>2</sub>O 20 μL。反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 15 s, 60 °C 15 s, 72 °C 15 s, 30 个循环; 72 °C 3 min。再以该 PCR 产物为模板利用引物 P2 与短引物 P4 进行第二轮 PCR 扩增。反应体系为 50 μL: 模板 1 μL,引物 P2 与 P4 各 2 μL, 2×TSINGKE Master Mix 25 μL, H<sub>2</sub>O 20 μL。反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 15 s, 60 °C 15 s, 72 °C 15 s, 30 个循环; 72 °C 3 min。PCR 扩增后的产物进行琼脂糖凝胶纯化并连接于 T 载体转化至大肠杆菌 DH5α 中,利用蓝白斑筛选的方法挑取阳性克隆进行测序分析。

表 1 本研究中所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')
3'RACE	P1: AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T) <sub>30</sub> VN P2: AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC P3: GCCACAACCCGAGC P4: CCCGCCGTCCCGTCGAATCCAG
5'RACE	P5: CGTTGTACCCGGGTTTATTGAAAAC P6: ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTGGG P7: GTTAAAGTGTCTGCCGCTTGC
ΔCTO-S	P8: AAGACCGGAGAGTAAAGACCAGAGACACATTTTACAATTTCCGGGCTCCGGCTCCCCGGTCAGGATGACGACGATAAGTAGGG P9: CATGAGGTGTGGGTATAAAAAGACCGGGGAGCCGGAGCCCGAAATTGTAATAATGTGTCTCTCAACCAATTAACCAATTCTGATTAG
ΔCTO-SR	P10: CGATCGCCGAACGCGTTCAAG P11: TCACATGGGCAAATCCGAGGA

### 1.3.2 5'RACE

参考 Liu 等的 Capping-RACE 方法<sup>[14]</sup>。首先以总 RNA 为模板逆转录合成 cDNA, 逆转录引物为基因特异性引物 P7。逆转录后加入模板转换寡核苷酸(template switching oligonucleotide, TSO), TSO 的 3'末端连接 3 个鸟嘌呤核糖核苷酸, 与 cDNA 的 3'末端 poly(C)碱基互补配对并用作逆转录酶的模板, cDNA 的 3'末端继续延伸。然后以 cDNA 为模板利用引物 P6 与长引物 P5 对 CTO-S 的 5'末端进行 PCR 扩增。反应体系为 50  $\mu$ L: 模板 1  $\mu$ L, 引物 P6 与 P5 各 2  $\mu$ L, 2 $\times$  TSINGKE Master Mix 25  $\mu$ L, H<sub>2</sub>O 20  $\mu$ L。反应条件: 95  $^{\circ}$ C 5 min; 95  $^{\circ}$ C 15 s, 60  $^{\circ}$ C 15 s, 72  $^{\circ}$ C 15 s, 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 3 min。再以该 PCR 产物为模板利用引物 P6 与短引物 P7 进行第二轮 PCR 扩增。反应体系为 50  $\mu$ L: 模板 1  $\mu$ L, 引物 P6 与 P7 各 2  $\mu$ L, 2 $\times$  TSINGKE Master Mix 25  $\mu$ L, H<sub>2</sub>O 20  $\mu$ L。反应条件: 95  $^{\circ}$ C 5 min; 95  $^{\circ}$ C 15 s, 60  $^{\circ}$ C 15 s, 72  $^{\circ}$ C 15 s, 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 3 min。PCR 扩增后的产物进行琼脂糖凝胶纯化并连接于 T 载体转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$  中, 利用蓝白斑筛选的方法挑取阳性克隆进行测序分析。

### 1.4 CTO-S 编码多肽能力的验证

将 CTO-S 基因全长克隆下来, CTO-S 基因的 3'末端加上 His 标签, 通过 *EcoR* I/*Kpn* I 双酶切以及酶连的方法将 CTO-S 基因插入到真核表达质粒 pcDNA3.1 中构建 pcDNA3.1-CTO-S。将质粒转染至 PK-15 细胞, 24 h 后收取蛋白样品进行 Western blotting 检测。

### 1.5 CTO-S 缺失株以及回复突变株的构建

参考 Zheng 等的研究方法<sup>[10]</sup>, 设计 CTO-S 全长缺失突变或回复突变的引物, 以 pEPKan-S2 质粒为模板扩增 *KanR* 表达盒, 电转至 *E. coli* GS1783 感受态诱导第一步 Red 重组, 抗性筛选重组成功的阳性克隆转接至 LB 培养基中, 加入 1% L-阿拉伯糖培养 1 h 诱导

I-SceI 核酸内切酶的表达, 然后 42  $^{\circ}$ C 培养 30 min 诱导第二步 Red 重组, 去除 *KanR* 基因。挑选重组成功的阳性克隆大提质粒并转染至 PK-15 细胞中拯救病毒。

### 1.6 一步法增殖曲线和多步法增殖曲线

参考 Yan 等的研究方法, 测定病毒的一步法增殖曲线以及多步法增殖曲线<sup>[11]</sup>。将病毒按照 10 感染复数(multiplicity of infection, MOI) 感染 PK-15 细胞, 分别于感染后 0、3、6、9、12、18、24 和 30 h 收样, 测定不同时间点的病毒滴度。采用 GraphPad prism 7 软件统计数据, 得到病毒的一步法增殖曲线。多步法增殖曲线是将病毒按照 0.01 MOI 感染 PK-15 细胞, 分别于感染后 0、12、24、36、48 和 72 h 收样, 测定不同时间点胞内以及胞外的病毒滴度。采用 GraphPad prism 7 软件统计数据, 得到病毒的多步法增殖曲线。

### 1.7 病毒空斑大小的测定

将病毒以 120 PFU/孔接种于长满单层 PK-15 细胞的 6 孔板中。2 h 后每孔覆盖约 1 mL 含 4% 羧甲基纤维素钠和 2% FBS 的 DMEM 培养基, 置于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱内静置培养 48 h。待细胞出现病变, 用 10% 中性甲醛固定细胞, 并用结晶紫染液进行染色。体式显微镜下拍照, 随机选取 100 个空斑通过 digimizer 软件测量空斑直径, 每个空斑测量 3 次, 以最大值为准。用 GraphPad prism 7 软件统计数据, 并对测量数据进行 *t*-检验分析,  $P > 0.05$  的统计值被认为没有显著差异,  $P < 0.05$  的统计值被认为差异显著,  $P < 0.01$  的统计值被认为差异极其显著。

### 1.8 CTO-S pull down

设计引物克隆 CTO-S 全长, 并且在 5'端连接 T7 启动子序列, 根据罗氏生物素标记体外转录试剂盒说明书操作, 合成生物素标记的 RNA CTO-S 以及生物素标记的反义 RNA(作为阴性对照)。将生物素标记的 RNA 与细胞裂解产物以及链霉素亲和磁珠室温孵育。蛋白-RNA-磁

珠复合物低速离心,小心移除上清,RIP 缓冲液清洗磁珠 5 遍,小心吸取上清加入 5×SDS 缓冲液,95 °C 加热 10 min,对样品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳并用考马斯亮蓝染色。同时将样品送公司进行质谱分析。

### 1.9 RNA 免疫共沉淀

构建真核表达质粒 pcDNA3.1-RNA binding protein 和 pcDNA3.1-cytochrome b-c1 并且添加 HA 标签,分别转染至 PK-15 细胞中,在转染 16 h 后以 5 MOI 接种病毒 PRV Ea WT,接毒 12 h 后收取细胞裂解液,并取其中一部分作为阳性对照 Input 组;另一部分上清中加入抗体 Anti-HA tag 4 °C 孵育过夜;阴性对照组孵育抗体 IgG。再加入 20 μL 充分重悬的 protein A+G agarose,4 °C 孵育数小时;1 000×g 离心 5 min,小心移除上清,预冷的 PBS 洗涤沉淀 5 次,小心吸取上清,Trizol 法提取 RNA,DNase I 消化后进行 RT-PCR 检测 CTO-S。

### 1.10 四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测 CTO-S 对细胞凋亡的影响

准备 1 块 96 孔细胞培养板,接种 PK-15 细胞培养 12 h。待细胞融合度达到 80%,将细胞分为 4 组,5 个孔加入 PK-15 细胞裂解液作为对照(mock 组);5 个孔以 5 MOI 感染 PRV Ea WT (野毒组);5 个孔以 5 MOI 感染 PRV ΔCTO-S (突变株组);5 个孔以 5 MOI 感染 PRV ΔCTO-S R (回复突变株组)。病毒感染 48 h 后,每孔加 20 μL 的 MTT (5 mg/mL),孵育 4 h,终止培养。

吸弃培养基,每孔加入 DMSO 200 μL,37 °C 孵育 30 min,至颗粒完全溶解。以对照孔(培养基、MTT、DMSO、无细胞)调零,酶标仪测定 490 nm 的吸光度 OD 值。GraphPad prism 7 软件统计数据,并对测量数据进行 *t*-检验对分析, $P>0.05$  的统计值被认为没有显著差异, $P<0.05$  的统计值被认为差异显著, $P<0.01$  的统计值被认为差异极其显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 CTO-S 的全长序列分析

利用 3'RACE 和 5'RACE 对 CTO-S 末端进行 PCR 扩增,扩增片段的测序结果显示,CTO-S 具有多聚腺苷酸(polyA)尾巴以及帽子(cap)结构,全长为 267 bp,位于 UL22 基因和 UL21 基因之间,3'端与 UL22 基因 3'端相距 856 bp,5'端与 UL21 基因 3'端相距 743 bp,与复制起始位点 *oriL* 相邻,与其相距 79 bp (图 1)。

### 2.2 CTO-S 编码肽段能力的分析

为了研究 CTO-S 基因编码蛋白或多肽的能力,首先扩增 CTO-S 基因全长,在 3'端分别加上 6×His 标签、T+6×His 标签和 TT+6×His 标签 3 种不同阅读框模式,将目的片段克隆到 pcDNA3.1 中(图 2A),Western blotting 结果显示 CTO-S 目的基因蛋白 3 种阅读框模式都没有检测到相应蛋白(图 2B),说明 CTO-S 不具有编码多肽的能力。

### 2.3 CTO-S 缺失株与回复突变株的构建

Red 重组构建的 CTO-S 缺失株以及回复突

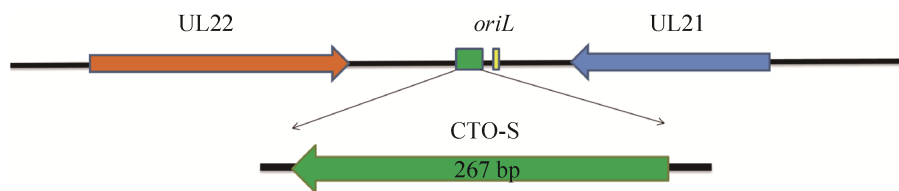


图 1 CTO-S 的全长序列分析

Figure 1 Full-length sequence analysis of CTO-S.

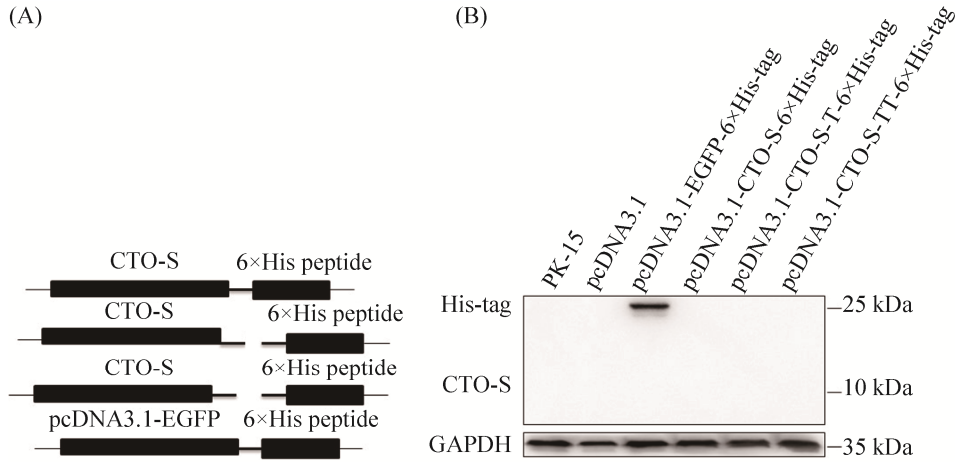


图 2 CTO-S 编码多肽的能力的验证

Figure 2 Verification of the ability of CTO-S to encode polypeptides. A: construction of three open reading frame eukaryotic expression plasmids of CTO-S; B: WB was used to detect the expression of three open reading frame eukaryotic expression plasmids of CTO-S.

变株提取病毒基因组并进行 PCR 扩增, 扩增片段送公司测序, 利用 Megalign 软件将测序结果与 PRV Ea WT 基因组序列进行比对。结果显示

缺失株 CTO-S 序列成功缺失(图 3A), 得到的病毒命名为 rPRV EaΔCTO-S; 回复突变株 CTO-S 序列成功回复(图 3B), 命名为 rPRV EaΔCTO-S R。

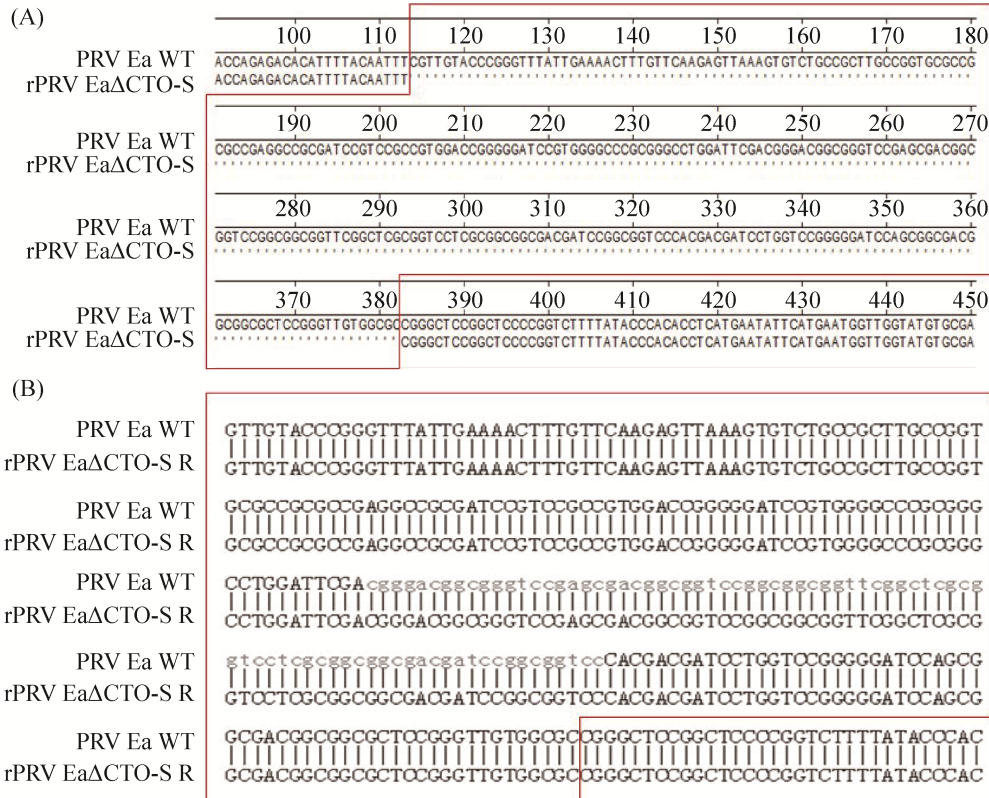


图 3 CTO-S 序列比对结果

Figure 3 CTO-S sequence alignment results. A: CTO-S sequence alignment results of deletion strain and wild-type strain; B: CTO-S sequence alignment results of back-mutant strain and wild-type strain.

## 2.4 CTO-S 对 PRV 复制的影响

在 10 MOI 接毒剂量下, PRV Ea WT、rPRV Ea $\Delta$ CTO-S 和 rPRV Ea $\Delta$ CTO-S R 在每个时间点的毒滴度均没有明显差异(图 4A), 表明在高剂量接毒情况下, CTO-S 对 PRV 的复制没有明显的影响。在 0.01 MOI 接毒剂量下, CTO-S 缺失株与野毒株以及回复突变株相比, 胞内以及胞外病毒滴度均没有显著差异(图 4B), 表明 CTO-S 对 PRV 在 PK-15 细胞中的组装和释放均无影响。野毒株的空斑直径平均为 0.650 mm, 缺失株空斑直径为 0.649 mm, 回复突变株空斑直径为 0.651 mm (图 4C)。缺失重组毒与野毒株相比统计学分析没有显著性差异(图 4D), 说明 CTO-S

缺失株在上皮细胞的横向扩散能力不受影响。

## 2.5 CTO-S 与 cytochrome b-c1 complex subunit 1 互作

CTO-S pull down 筛选 CTO-S 的互作蛋白进行凝胶电泳(图 5A 泳道 2), CTO-S 反义链 pull down 的蛋白作为阴性对照(图 5A 泳道 1)。质谱分析结果显示, 实验组筛选到 907 个蛋白, 对照组存在 813 个蛋白, 实验组和对照组重合 675 个蛋白(图 5B)。其中 cytochrome b-c1 complex subunit 1 与 RNA-binding protein 总肽段覆盖率高, 利用 RIP 技术进行进一步的验证。首先构建 pcDNA3.1-cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial 和 pcDNA3.1-RNA-binding

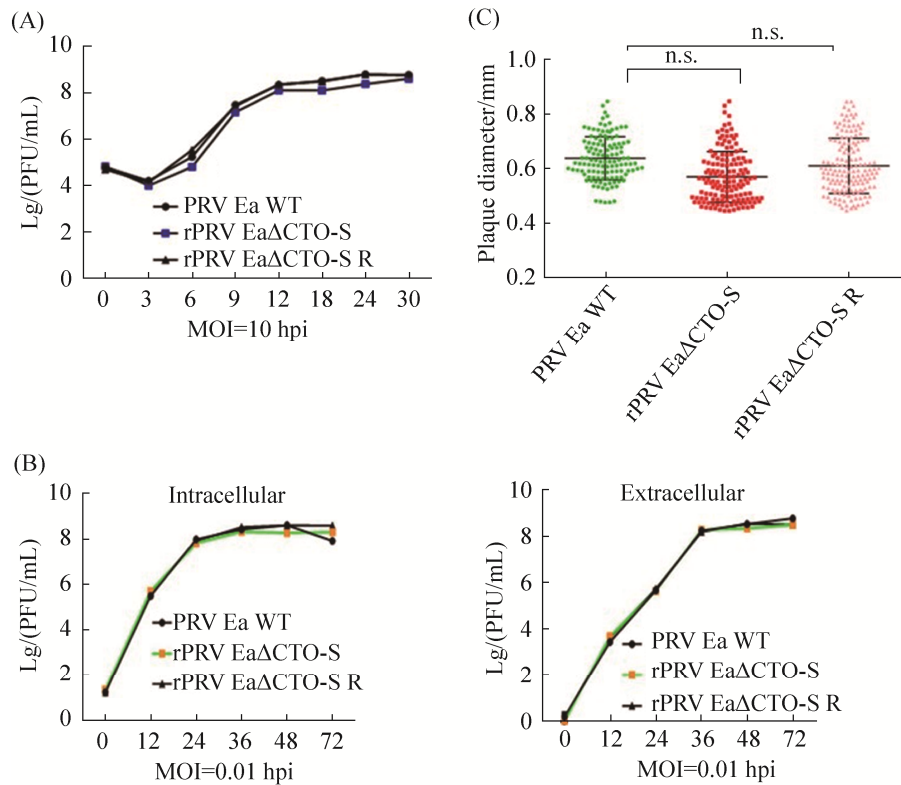
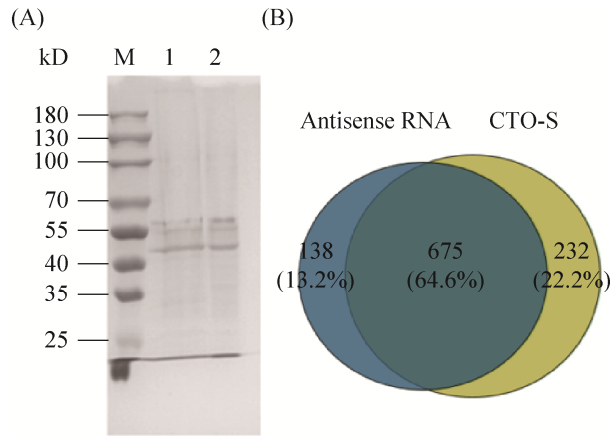


图 4 CTO-S 对 PRV 复制的影响

Figure 4 The effect of CTO-S on PRV proliferation. A: one-step growth curves of PRV Ea WT, PRV Ea $\Delta$ CTO-S and PRV Ea $\Delta$ CTO-S R; B: multi-step growth curves of PRV Ea WT, PRV Ea $\Delta$ CTO-S and PRV Ea $\Delta$ CTO-S R; C: plaque diameter statistics of PRV Ea WT, rPRV Ea $\Delta$ CTO-S, rPRV Ea $\Delta$ CTO-S R. n.s.:  $P>0.05$ .



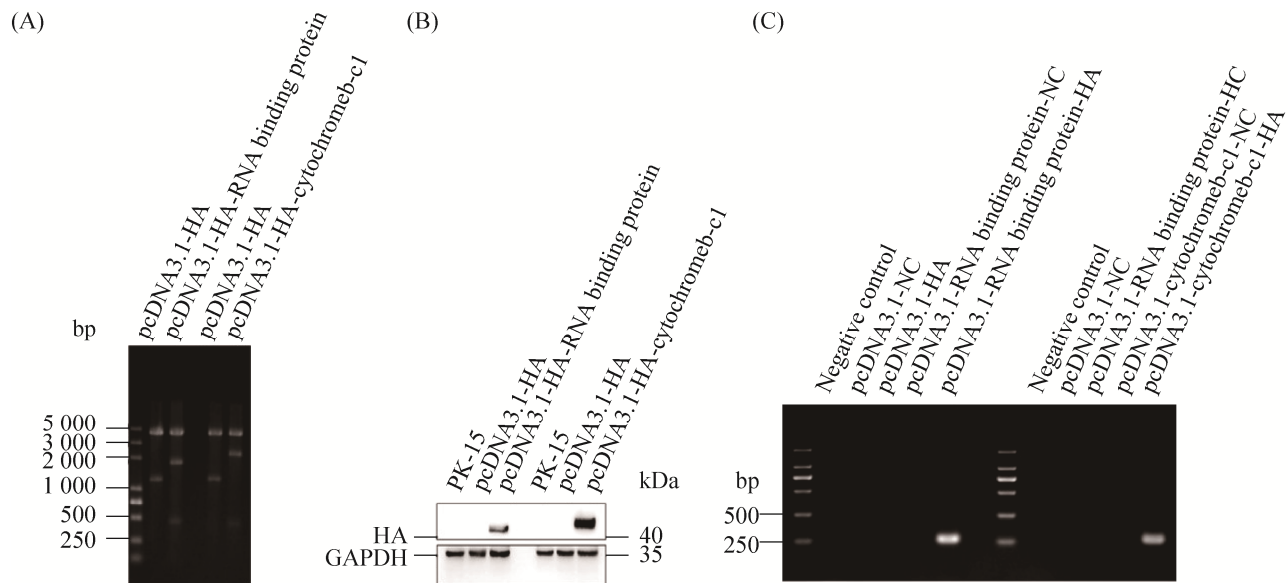
**图 5 RNA pull down 联合质谱筛选与 CTO-S 互作的宿主蛋白**

Figure 5 Screening of host proteins which interact with CTO-S by RNA pull down combined with mass spectrometry. A: SDS-PAGE image of host protein interacting with CTO-S. M: protein ladder; 1: host proteins which interact with antisense RNA; 2: host proteins which interact with CTO-S. B: protein Venn diagram of host protein interacting with CTO-S.

protein 重组质粒。酶切验证对应条带正确 (图 6A), Western blotting 结果显示蛋白大小正确, 分别为 42 kDa 和 56 kDa (图 6B)。RIP 结果显示 CTO-S 和 cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial 以及 RNA-binding protein 蛋白相互作用(图 6C)。

### 2.6 CTO-S 诱导细胞凋亡

将细胞分为 mock、野毒株、突变株、回复突变株 4 组, 分别接种细胞裂解液(对照)或感染不同的病毒毒株, 48 h 后 MTT 法检测细胞活性, 490 nm 的吸光度 OD 值越大, 则活细胞数量越多。结果如图 7 所示: 与 mock 组相比, 野毒株、突变株、回复突变株组的活细胞数量均减少, 与野毒株组以及回复突变株组相比, 突变株组的活细胞数量更多, 并且具有显著性差异。CTO-S 缺失后, 细胞凋亡减少, 说明 CTO-S 能够诱导细胞凋亡。



**图 6 CTO-S 互作蛋白的 RIP 验证**

Figure 6 RNA immunoprecipitation verification of host proteins which interact with CTO-S. A: restriction digestion verification of cytochrome b-c1 complex subunit 1 and RNA-binding protein eukaryotic expression plasmid; B: Western blotting verification of cytochrome b-c1 complex subunit 1 and RNA-binding protein; C: RT-PCR identification of CTO-S.



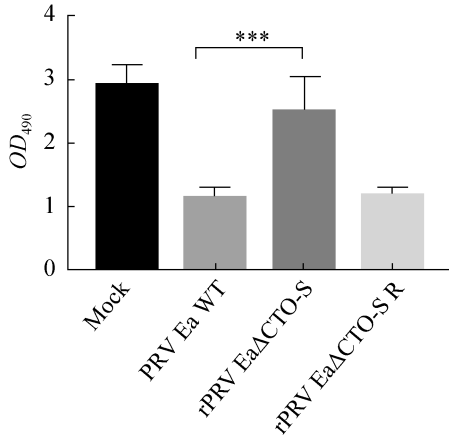


图7 不同毒株感染 PK-15 细胞的凋亡情况  
Figure 7 Apoptosis of PK-15 cells infected by different strains. \*\*\*:  $P < 0.001$ .

### 3 讨论与结论

随着测序技术的发展,长链非编码 RNA 的功能研究成为热点。了解 CTO-S 的真实全长序列能够为其功能研究奠定基础。我们首先利用 3'RACE 和 5'RACE 鉴定 PRV Ea WT 株中 CTO-S 的末端序列,CTO-S 全长为 267 bp,该研究结果为首次报道。研究发现部分 lncRNA 可以编码多肽<sup>[15]</sup>,而 CTO-S 是否也具有编码多肽的能力未见报道,我们的试验结果表明 CTO-S 不具有编码多肽的能力。

为了研究 CTO-S 的功能,利用细菌人工染色体(BAC)技术以及同源重组的方法成功构建出 CTO-S 缺失株以及回复突变株。一步法增殖曲线、多步法增殖曲线以及空斑大小的结果均表明 CTO-S 对于 PRV 的复制是非必需的。人类巨细胞病毒表达的 5 kb 的内含子 lncRNA 被证明不影响病毒在成纤维细胞中的复制<sup>[16]</sup>,但是小鼠巨细胞病毒表达的同源的 7.2 kb 内含子 lncRNA 促进了病毒由裂解感染转变为潜伏感染的过程<sup>[17]</sup>。lncRNA  $\beta 2.7$  是人类巨细胞病毒(HCMV)编码的 RNA,它对于 HCMV 的体外复制是非必需的<sup>[18]</sup>。但是  $\beta 2.7$  能够与线粒体酶复

合物 I 的亚基结合,从而稳定线粒体膜电位,抑制细胞凋亡,同时使线粒体持续产生能量提供给宿主和病毒利用<sup>[6]</sup>。

为了进一步研究 CTO-S 的功能,利用 RNA pull down 联合质谱的方法筛选与 CTO-S 互作的宿主蛋白,选择总肽段覆盖率高的 2 个蛋白(cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial 和 RNA binding protein)进行 RNA 免疫共沉淀验证,结果表明这 2 个蛋白能够与 CTO-S 互作。但是 RNA binding protein 与 RNA 的相互结合不具有特异性,而 cytochrome b-c1 complex subunit 1 是泛醇细胞色素 C 还原酶复合物(ubiquinol-cytochrome C reductase)的组分部分,因此又称 ubiquinol-cytochrome C reductase core protein 1 (UQCRC1),其是线粒体呼吸链的一部分,在呼吸作用 ATP 的产生过程中发挥重要作用。根据研究报道, cytochrome b-c1 complex subunit 1 还抑制细胞的凋亡。UQCRC1 的敲低降低线粒体膜电位,诱导永生化小鼠精母细胞凋亡<sup>[19]</sup>。UQCRC1 的过表达上调抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达,下调促凋亡蛋白 Bax 的表达,从而抑制细胞凋亡<sup>[20]</sup>。人类巨细胞病毒编码的  $\beta 2.7$  与线粒体复合酶结合,使线粒体持续产生能量提供给宿主和病毒利用,并且预防细胞凋亡<sup>[6]</sup>。野毒株、突变株以及回复突变株感染 PK-15 细胞并利用 MTT 法检测细胞凋亡的结果表明 CTO-S 诱导细胞凋亡。CTO-S 诱导细胞凋亡的具体机制有待于进一步的研究,为伪狂犬病毒潜在的药物靶标以及疫苗研制提供理论基础。

### 参考文献

- [1] Xia LM, Sun QY, Wang JJ, Chen Q, Liu PH, Shen CJ, Sun JH, Tu YP, Shen SF, Zhu JC, Zhao HJ, Wang QZ, Li BL, Tao J, Soares Magalhaes RJ, Yan YX, Cai C. Epidemiology of pseudorabies in intensive pig farms in

- Shanghai, China: herd-level prevalence and risk factors. *Preventive Veterinary Medicine*, 2018, 159: 51–56.
- [2] Ai JW, Weng SS, Cheng Q, Cui P, Li YJ, Wu HL, Zhu YM, Xu B, Zhang WH. Human endophthalmitis caused by pseudorabies virus infection, China, 2017. *Emerging Infectious Diseases*, 2018, 24(6): 1087–1090.
- [3] Guan X, Liu J, Jiang H, Wu CX, Chen HC, Liu ZF. Expression of pseudorabies virus-encoded long noncoding RNAs in epithelial cells and neurons. *Journal of NeuroVirology*, 2018, 24(5): 597–605.
- [4] Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS. Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nature Reviews Genetics*, 2009, 10(3): 155–159.
- [5] Wang P, Xue YQ, Han YM, Lin L, Wu C, Xu S, Jiang ZP, Xu JF, Liu QY, Cao XT. The STAT3-binding long noncoding RNA lnc-DC controls human dendritic cell differentiation. *Science*, 2014, 344(6181): 310–313.
- [6] Reeves MB, Davies AA, McSharry BP, Wilkinson GW, Sinclair JH. Complex I binding by a virally encoded RNA regulates mitochondria-induced cell death. *Science*, 2007, 316(5829): 1345–1348.
- [7] Pijlman GP, Funk A, Kondratieva N, Leung J, Torres S, van der Aa L, Liu WJ, Palmenberg AC, Shi PY, Hall RA, Khromykh AA. A highly structured, nuclease-resistant, noncoding RNA produced by flaviviruses is required for pathogenicity. *Cell Host & Microbe*, 2008, 4(6): 579–591.
- [8] Cazalla D, Yario T, Steitz JA. Down-regulation of a host microRNA by a herpesvirus *Saimiri* noncoding RNA. *Science*, 2010, 328(5985): 1563–1566.
- [9] Tombácz D, Csabai Z, Oláh P, Havelda Z, Sharon D, Snyder M, Boldogkői Z. Characterization of novel transcripts in pseudorabies virus. *Viruses*, 2015, 7(5): 2727–2744.
- [10] Zheng K, Jiang FF, Su L, Wang X, Chen YX, Chen HC, Liu ZF. Highly efficient base editing in viral genome based on bacterial artificial chromosome using a Cas9-cytidine deaminase fused protein. *Virologica Sinica*, 2020, 35(2): 191–199.
- [11] Yan K, Liu J, Guan X, Yin YX, Peng H, Chen HC, Liu ZF. The carboxyl terminus of tegument protein pUL21 contributes to pseudorabies virus neuroinvasion. *Journal of Virology*, 2019, 93(7): e02052–e02018.
- [12] 陈焕春, 方六荣, 何启盖, 金梅林, 索绪峰, 吴美洲. 猪伪狂犬病病毒鄂 A 株的分离鉴定. *畜牧兽医学报*, 1998, 29(2): 156–161
- Chen HC, Fang LR, He QG, Jin ML, Suo XF, Wu MZ. Isolation and identification of swine pseudorabies virus Ea strain. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 1998, 29(2): 156–161. (in Chinese)
- [13] Wang X, Wu CX, Song XR, Chen HC, Liu ZF. Comparison of pseudorabies virus China reference strain with emerging variants reveals independent virus evolution within specific geographic regions. *Virology*, 2017, 506: 92–98.
- [14] Liu F, Zheng K, Chen HC, Liu ZF. Capping-RACE: a simple, accurate, and sensitive 5' RACE method for use in prokaryotes. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(21): e129.
- [15] Anderson DM, Anderson KM, Chang CL, Makarewich CA, Nelson BR, McAnally JR, Kasaragod P, Shelton JM, Liou J, Bassel-Duby R, Olson EN. A micropeptide encoded by a putative long noncoding RNA regulates muscle performance. *Cell*, 2015, 160(4): 595–606.
- [16] Kulesza CA, Shenk T. Human *Cytomegalovirus* 5-kilobase immediate-early RNA is a stable intron. *Journal of Virology*, 2004, 78(23): 13182–13189.
- [17] Schwarz TM, Kulesza CA. Stability determinants of murine *Cytomegalovirus* long noncoding RNA7.2. *Journal of Virology*, 2014, 88(19): 11630–11633.
- [18] McSharry BP, Tomasec P, Neale ML, Wilkinson GWG. The most abundantly transcribed human *Cytomegalovirus* gene (beta 2.7) is non-essential for growth *in vitro*. *The Journal of General Virology*, 2003, 84(Pt 9): 2511–2516.
- [19] Huang SP, Wang J, Cui YQ. 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether injures cell viability and mitochondrial function of mouse spermatocytes by decreasing mitochondrial proteins Atp5b and Uqcrc1. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2016, 46: 301–310.
- [20] Yi TT, Wu XX, Li H. Ubiquinol-cytochrome c reductase core protein 1 overexpression protects H9c2 cardiac cells against mimic ischemia/reperfusion injury through PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$  pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2020, 529(4): 904–909.

(本文责编 李磊)