

类猪圆环病毒 P1 转录的 Northern Blot 分析

温立斌,王凤芝,何孔旺,倪艳秀,张雪寒,李 彬,王小敏,
郭容利,周俊明,俞正玉,茅爱华,吕立新,解建平

(江苏省农业科学院 兽医研究所,农业部兽用生物制品工程技术重点实验室,国家兽用生物制品工程技术研究中心,江苏 南京 210014)

摘要:为鉴定类猪圆环病毒 P1 的转录本,采用地高辛标记的 RNA 探针,通过 Northern Blot 方法,对转染 PK15 细胞的类猪圆环病毒 P1 进行了 RNA 转录分析。结果表明,Northern 杂交可检测到 2 个 RNA 转录本,包括正链上 *ORF3* 的 RNA 和负链上 *ORF1* 的 RNA。同时,*ORF3* RNA 表达时间比 *ORF1* 的短,且丰度也大大低于 *ORF1*。类猪圆环病毒 P1 至少存在 *ORF1* 和 *ORF3* 2 个转录本。

关键词:类猪圆环病毒 P1;转录分析;Northern Blot

中图分类号:S828 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2014)04-0160-04

Transcriptional Analysis of Porcine Circovirus-like Virus P1 by Northern Blot

WEN Li-bin, WANG Feng-zhi, HE Kong-wang, NI Yan-xiu, ZHANG Xue-han, LI Bin, WANG Xiao-min,
GUO Rong-li, ZHOU Jun-ming, YU Zheng-yu, MAO Ai-hua, LÜ Li-xin, XIE Jian-ping

(Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Veterinary
Biological Engineering and Technology, Ministry of Agriculture, National Center for Veterinary Biologicals
Engineering Research, Nanjing 210014, China)

Abstract: The purpose of this study is to identify transcripts of porcine circovirus-like virus P1. In this work, the RNAs of porcine circovirus-like virus P1 synthesized in PK15 cells were characterized by Northern Blot analysis using the DIG-labeled riboprobes. The results showed two RNAs were detected. They included *ORF3* RNA and *ORF1* RNA. Meanwhile, *ORF1* RNA had both more abundant and longer expression than those of *ORF3* RNA. Northern Blot analysis indicated that at least two viral-specific RNAs were synthesized in P1. infected PK15 cells.

Key words: Porcine circovirus-like virus P1; Transcriptional analysis; Northern Blot

本研究对于最终确定新发病毒——类猪圆环病毒 P1 的蛋白种类奠定基础。类猪圆环病毒 P1 为目前为止发现的拥有最小基因组的病毒,其单股、环状、DNA 基因组仅含 648 个核苷酸,除十余个核苷酸外,其余与猪圆环病毒 2 型(PCV2)的部分核苷酸高度同源。系统进化分析表明 P1 和 PCV2 有较近的亲缘关系,推测 P1 是由 PCV2 与其他生物分子重组而来^[1]。利用 P1 的感染性分子克隆接种仔猪,可使感染猪出现类似猪断奶后多系统衰竭综合征(PMWS)的临床症状,主要表现为进行性消瘦、皮肤苍白等^[2]。流行病学调查结果表明,P1 在我国猪群中已有相当范围的感染^[3]。因此,P1 有可能成为为害我国养猪业健康发展的又一潜在疾病的病原。

PMWS 自 1991 年发生以来,已成为当今为害我国乃至世界养猪业健康发展的重要免疫抑制性疫病之一^[4-5],也相应成为猪病研究领域的热点和难点。主要原因是目前公认是该病必要病原的 PCV2 单独接种很难复制出典型的 PMWS,因此,可能还需要其他因素参与,如猪的品种、日龄、PCV2 的基因型、混合感染等^[6]。P1 的发现有助于我们重新认识 PMWS 及其与 PCV2 的关系。

P1 作为病毒实体,其病毒蛋白种类对于病毒的复制、生长、致病机制等研究将起决定性作用。通过 DNAMAN 软件分析 P1 具有 3 个开放阅读框(ORF),编码蛋白的分子量大小从 3~12 kDa 不等。其中,位于负链上的最大开放读码框(*ORF1*)编码

收稿日期:2014-05-13

基金项目:国家自然科学基金项目(31272574;30972184)

作者简介:温立斌(1967-),男,河北宣化人,研究员,博士,主要从事动物分子病毒学与免疫学研究。

113 个氨基酸的蛋白,分子量大小为 12.4 kDa,其 N 端氨基酸序列与 PCV2 *ORF2* 编码的衣壳蛋白有高度同源性,C 端氨基酸则由于 1 个碱基的缺失造成读码框移位而与 PCV2 *ORF2* 编码的同源性较低,推测其为 P1 的衣壳蛋白;另外位于负链上的 *ORF2*,其编码的蛋白含有 28 个氨基酸,分子量为 2.9 kDa,与 PCV2 的 *ORF6* 所编码的氨基酸序列高度同源;而位于正链上的 *ORF3* 编码 34 个氨基酸的蛋白,分子量为 3.9 kDa,与 PCV2 的 *ORF10* 所编码的氨基酸序列高度同源。本试验主要通过 Northern Blot 分析检测 P1 感染细胞后出现的转录本,以期为 P1 病毒蛋白种类的确定奠定基础。

1 材料和方法

1.1 分子克隆和细胞

P1 双拷贝串联的分子克隆由江苏省农业科学院兽医所人兽共患病研究室保存,构建方法参见文献[7]。无 PCV 和支原体污染的 PK-15 细胞由江苏省农业科学院兽医所人兽共患病研究室传代、保存。

1.2 主要试剂及仪器

Lipofectamine™ 2000 转染试剂为 Invitrogen 产品;DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7) 和 RNA molecular weight marker I (digoxigenin-labeled) 为 Roche 公司产品;HyBond N + 正电荷尼龙膜为 Amersham 公司产品;分子杂交炉 (HB-1000 Hybridizer) 购自美国 Upland 公司。

1.3 采用 PCR 制备探针转录模板

根据登录 GenBank 类猪圆环病毒 P1 核苷酸序列 (EF514716),设计 2 对特异性引物,其中每对引物中有 1 条含有 T7 启动子序列(小写字母表示),这样转录后可制备分别针对 P1 基因组正链和负链的单链 RNA 探针。

F1: 5'-GCGCtaatacgaactcactatagggATCTTCAACACCCGCCTCT-3'

R1: 5'-GGATATTGTAGTCCTGGTCGTAT-3'

F2: 5'-ATCTTCAACACCCGCCTCT-3'

R2: 5'-GCGCtaatacgaactcactatagggGGATATTGTAGTCCTGGTCGTAT-3'

以保存的 P1 分子克隆为模板,进行 PCR 扩增,其中反应体系为 25 μ L,反应程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min 后;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,50 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s,30 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 复性 7 min。

1.4 RNA 探针的转录制备

采用 Roche 的 DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7),进行 RNA 探针的制备,具体步骤如下:在终体积为

20 μ L 的体系中加入 RNA 酶抑制剂 1 μ L,DNA 模板 1 μ g,10 \times 标记混合液 2 μ L,10 \times 转录缓冲液 2 μ L,0.1 mol/L DTT 3 μ L,T7 RNA 聚合酶 2 μ L,最后加入 DEPC 处理的水补齐,轻轻混匀和瞬时离心后置 37 $^{\circ}$ C 2 h;再加入 2 μ L DNase I,轻轻混匀和瞬时离心后置 37 $^{\circ}$ C 15 min;取出 -20 $^{\circ}$ C 冻存备用。

1.5 RNA 探针浓度的确定

将标记好的探针作倍比系列稀释,取 1 μ L 滴在杂交膜上,80 $^{\circ}$ C 干烤固定 30 min;Blocking Solution 孵育 30 min;含 1:10 000 AP-SA 的新鲜 Blocking Solution 再孵育 30 min;用 1 \times Phosphatase Wash Solution 洗膜 3 次,每次 5 min;用 1 \times Assay Buffer 洗膜 2 次,每次 2 min;加 CSPD 底物,孵育 5 min;放入杂交袋中,在暗室中压 X 线片,曝光 2 ~ 10 min;与标准品相比可计算出标记探针的浓度。

1.6 RNA 提取

按脂质体转染试剂盒说明,将 P1 分子克隆转染 PK15 细胞,分别与转染后 0,12,24,36,48,72,96,120 h,采用 TRIzol 法提取细胞总 RNA。

1.7 电泳及转膜

将上述提取的 RNA 样品于 1% 甲醛变性凝胶电泳,25 V 恒压低温电泳过夜。然后,将胶置于平皿、用蒸馏水冲洗一次后,加入数倍体积 20 \times SSC 室温振荡 2 \times 15 min,去除多余甲醛;毛细管法进行转膜 20 h,取下膜做好标记,在 2 \times SSC 中漂洗数分钟,80 $^{\circ}$ C 烘烤 2 h 固定。

1.8 杂交

首先取 10.0 mL DIG Easy Hyb,加入杂交管中,68 $^{\circ}$ C 杂交炉中预杂交 2 h;探针在 PCR 仪中 100 $^{\circ}$ C 变性 10 min,立即放冰水浴冷却 5 min;排尽预杂交液,在 10.0 mL DIG Easy Hyb 加入新变性好的、确定好浓度的探针,混匀。68 $^{\circ}$ C 杂交仪中杂交过夜。

1.9 洗膜、信号检测

杂交后室温下,100 mL 2 \times SSC/0.1% SDS 洗膜 2 \times 5 min;68 $^{\circ}$ C,100 mL 0.1 \times SSC/0.1% SDS 洗涤 2 \times 15 min;将膜置于 100 mL Washing Buffer 中平衡 2 ~ 5 min;将膜在 100 mL Blocking solution 中封闭 1 h(在摇床上轻轻摇动);将膜在 20 mL Antibody solution 中抗体反应 30 min(在摇床上轻轻摇动);去除抗体溶液,用 100 mL Washing Buffer 洗膜 2 \times 15 min;在膜的正面(核酸面)滴加 1 mL 的 CSPD,隔绝空气 15 ~ 25 $^{\circ}$ C 反应 5 min,去除多余的液体,37 $^{\circ}$ C 孵育 10 min;在暗房用 X-ray film 曝光、显影、定影、洗片,曝光记录结果。

2 结果与分析

2.1 RNA 探针的序列

经转录制备的 2 条 RNA 探针核苷酸序列如下:

探针 1: AUCUUC AACACCCGCCUCUCCCGUAC

CUUCGGAUAUACUAUCAAGGCUACCACAGUCAGA
ACGCCCUCUGGGCGGUGGACAUGAUGAGAUUUA
AUAUUGACGACUUUGUUCUUUUUUUAGGGGGGAC
CAACAAAAUCUCUAUACCCUUUGAAUACUACAGA
AUAAGAAAGGUUAAGGUUGAAUUCUGGCCUGCU
CCCCCAUCACCCAGGGUGAUAGGGGAGUGGGCAC
CACUGCUGUUAUUCUAGAUGAUAAUUGUACCA
AAGGCCACGGCCCAAACCUAUGACCCAUUAUGUAA
CUACUCCUCCCGCCAUACAAUCCCCCAACCCUUCU
CCUACCACUCCCGUUAUACUACACCCAAACCCUGU
CUUGACUCCACUAUUGAUUACUCCAACCAAUA
ACAAAAGGAAUCAGCUUUGGUGAGGAUACAAAC
CUCUAGAAAUGUAGACCACGUAGGCCUCGGCACU
GCGUUCGAAAACAGUAUAUACGACCAGGACUACA
AUAUCC。

探针 2: GGAUAUUGUAGUCCUGGUCGUAUAU
ACUGUUUUCGAACGCAGUGCCGAGGCCUACGUGG
UCUACAUAUUCUAGAGGUUUGUAUCCUCAGCCAAA
GCUGAUUCCUUUUGUUAUUGGUUGGAAGUAAUC
AAUAGUGGAGUCAAGAACAGGUUUGGGUGUGAAG
UAACGGGAGUGGUAGGAGAAGGGUUGGGGGAUUG
UAUGGCCGGGAGGAGUAGUUAUUAUUGGUCUAG
GUUUGGGCCGUGGCCUUUGGUACAAAGUUAUCAU
CUAGAAUAACAGCAGUGGUGCCACUCCCCUAUC
ACCCUGGGUGAUGGGGGGAGCAGGGCCAGAAUUA
ACCUUAACCUUUCUUAUUCUGUAGUAUUCAAAGG
GUAUAGAGAUUUUGUUGGUUUUUUUUCCGGGGG
AACAAAGUCGUCAAUAUUAUUUCUUAUUGUCC
ACCGCCCAGGAGGGCGUUCUGACUGUGGUAGCCU
UGAUAGUAUAUCCGAAGGUACGGGAGAGGCGGGU
GUUGAAGAU。

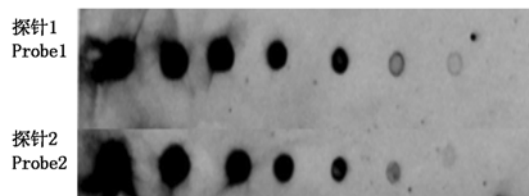
2.2 RNA 探针浓度的确定

由图 1 中可知,探针 1 和探针 2 的浓度在 0.1 pg/ μ L 左右时,可得到较好的杂交结果。

2.3 病毒 P1 的转录本

通过 T7 聚合酶可分别转录 1 条 RNA 探针(1 和 2),它们长度相同,序列为互补。P1 分子克隆转染 PK15 细胞后不同时间提取总 RNA,分别与 2 条探针进行杂交,结果见图 2。从中可以看出,与右向转录的 RNA 杂交结果显示 P1 有一个 350 nt 左

右的转录本(*ORF3*),在转染 12 h 后含量最高;与左向转录的 RNA 杂交结果显示 P1 有一个 390 nt 左右的转录本,根据 *ORF1* 和 *ORF2* 的长度,推测此转录本来自 *ORF1*,其在转染后 72~96 h 丰度最大。同时还观察到 *ORF1* 的表达量(丰度)高于 *ORF3* 的表达。

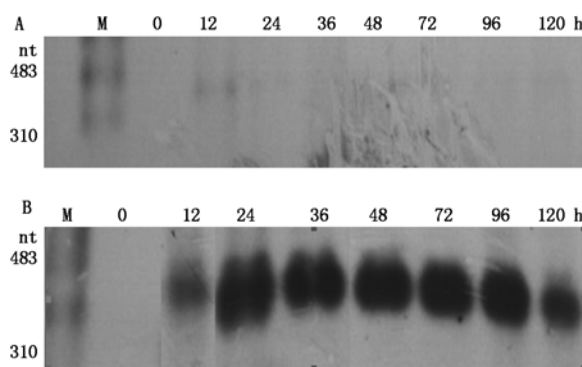


从左至右探针浓度分别为:10,3,1,0.3,0.1,0.03,0.01,0 pg/ μ L。

The riboprobes concentration, 1 and 2, from left to right, 10,3,1,0.3,0.1,0.03,0.01,0 pg/ μ L, respectively.

图 1 RNA 探针浓度的确定

Fig. 1 Determination of the labeled riboprobes concentration



M. RNA 分子量标准; 0~120 h 为转染后的不同时间; A. 探针 1 的杂交结果; B. 探针 2 的杂交结果。

M. RNA molecular weight marker I; Total cell RNAs isolated at different time p. t., indicated at the top of each lane; A. P1 was hybridized with probe 1, showing the very faint band; B. P1 was hybridized with probe 2.

图 2 Northern 杂交结果

Fig. 2 Transcription pattern of P1 RNA synthesized in PK15 cells by Northern Blot analysis

3 讨论

类猪圆环病毒 P1 首先是我们从 PMWS 病例中,通过 PCR 获得的基因组发现的,随后研究表明其是一种病毒,那么对病毒的蛋白种类等研究是必要的。

与 RT-PCR 进行转录分析相比,Northern Blot 尽管灵敏度不太高,但仍是检验 RNA 的标准方法,其可以比较 mRNA 表达的丰度、检验转录本的大小、是否存在剪切产物等。本方法只需制备与靶基因同源或部分同源的标记探针即可,目前探针基本分为基因组 DNA 探针、cDNA 探针、RNA 探针和寡核苷酸探针等,其中 RNA 探针具有更高的特异性和杂交效率。传统的探针采用同位素标记,其虽具备一定优点,但存在放射性污染,需要特定空间及特殊

防护,因此目前多采用地高辛、生物素等来标记探针。标记方法目前多为 PCR 标记法、随机引物标记法和体外转录标记法等,本研究采用体外转录法标记的 RNA 探针进行 Northern Blot,结果检测出 P1 病毒基因组正链和负链上各 1 个转录本,与预测的 *ORF* 相比,少了 1 个负链上 *ORF2* 的 RNA,可能与这个 *ORF* 的 mRNA 表达量低有关。其中 P1 的 *ORF3* 与 PCV2 的 *ORF10* 高度同源,但目前有关 PCV2 转录的研究都没有检测到其 *ORF10* 的 RNA^[8-10],所以 P1 *ORF3* 转录本的发现对 PCV2 相关的转录有借鉴意义。

总之,本研究对于进一步研究病毒的转录、复制及与宿主互作等奠定了基础。

参考文献:

- [1] Wen L B, He K W, Yu Z Y, *et al.* Complete genome sequence of a novel porcine circovirus-like agent[J]. J Virol, 2012, 86(1): 639.
- [2] Wen L B, He K W, Xiao Q Y *et al.* A novel porcine circovirus-like agent P1 is associated with wasting syndromes in pigs[J]. PLOS ONE, 2012, 7(8). e41565.
- [3] Wen L B, He K W, Yang H C, *et al.* Prevalence of porcine circovirus-like agent P1 in Jiangsu, China[J]. Virol J, 2011, 8: 543 - 547.
- [4] Segales J, Allan G M, Domingo M. Porcine circovirus diseases[J]. Anim Health Res Rev, 2005, 6(2): 119 - 142.
- [5] 杨汉春. 猪免疫抑制性疾病的流行特点与控制对策[J]. 中国畜牧兽医, 2004, 31(5): 41 - 43.
- [6] Tomás A, Fernandes L T, Valero O, *et al.* A meta-analysis on experimental infections with porcine circovirus type 2 (PCV2)[J]. Vet Microbiol, 2008, 132(3/4): 260 - 273.
- [7] 温立斌, 何孔旺, 杨汉春. 类猪圆环病毒 2 型因子 P1 与 P2 株全长基因组 DNA 分子克隆的构建[J]. 江苏农业学报, 2007, 23(6): 579 - 582.
- [8] Bratanich A C, Blanchetot A. PCV2 replicase transcripts in infected porcine kidney (PK15) cells [J]. Virus Genes, 2002, 25(3): 323 - 328.
- [9] Cheung A K. Transcriptional analysis of porcine circovirus type 2[J]. Virology, 2003, 305(1): 168 - 180.
- [10] Gao Z, Dong Q, Jiang Y, *et al.* Identification and characterization of two novel transcription units of porcine circovirus 2[J]. Virus Genes, 2013, 47(2): 268 - 275.