

类猪圆环病毒因子 P1 核酸链型和极性的研究

温立斌,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

(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: 研究报道类猪圆环病毒因子 P1 的核酸链型和极性的研究结果。采用氯化铯平衡密度梯度离心获得较为纯净的病毒粒子后,提取病毒 DNA,经 S1 核酸酶消化、特异性单引物第一轮 PCR 扩增结合常规第二轮 PCR 扩增等研究,结果表明,类猪圆环病毒因子 P1 为单股、负链基因组。

关键词: 类猪圆环病毒因子 P1; 核酸链型; 极性

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2012)03-0120-03

Studies on the Nucleic Acid Strandedness and Polarity of Porcine Circovirus-like Agent P1

WEN Li-bin, 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, LU Li-xin

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

Abstract: The results of the nucleic acid strandedness and polarity of porcine circovirus-like agent P1 were reported here. Relatively pure viral particles were obtained by CsCl equilibrium density-gradient centrifugation. The P1 could be determined as single strand nucleic acid and negative-strand genome by S1 nuclease treatment and two round of PCR amplification, the first round using the single-stranded-specific primer and the second round by one pair of specific primers.

Key words: Porcine circovirus-like agent P1; Nucleic acid strandedness; Polarity

1991 年加拿大首次发生猪断奶后多系统衰竭综合征(PMWS)^[1-2], PMWS 主要发生于 5~12 周龄的断奶仔猪,感染猪主要呈现进行性消瘦、皮肤苍白、呼吸困难等症状,体表淋巴结,特别是腹股沟浅淋巴结肿大^[3]。PMWS 已成为当今危害我国乃至世界养猪生产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。目前,公认猪圆环病毒 2 型(PCV2)是该病的必要病原,PCV 是迄今发现的一种最小的动物病毒,分类地位属于圆环病毒科成员,基因组为单股、环状 DNA。根据致病性、抗原性及核苷酸序列的差异,PCV 被划分成了无致病性的 PCV1 和有致病性的 PCV2 两个基因型。但单独用 PCV2 感染很难复制出典型的 PMWS

症状,这促使研究人员从 PCV2 基因型、共感染等方面去进行研究,PMWS 是如何发生的。我们在检测临床送检疑似 PMWS 的样品中,不仅证实 PCV2 具有多种基因型^[6];而且还分离到一株类 PCV2 因子(暂定为 P1),其基因组全长仅 648 个核苷酸,且大部分核苷酸与 PCV2 相应的核苷酸具有很高的同源性,推测具有 3 个开放阅读框(ORF)。随后,研究发现,构建的 P1 基因组的双拷贝串联分子克隆在体外具有感染性,表现为可在转染的 PK15 细胞中形成胞浆和胞核包涵体;用长梅猪和广西巴马小型猪等建立的动物模型结果表明,P1 感染猪在临床上出现类似 PMWS 症状,即部分感染猪出现消瘦和贫血等现象^[7-11]。流行病学调查结果表明,该因子在我

收稿日期: 2012-03-26

基金项目: 国家自然科学基金(30972184); 江苏省自然科学基金(BK2008351)

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

国猪群中已有相当范围的感染^[12]。因此, P1 有可能成为危害我国养猪业健康发展的又一潜在疾病的病原, 它的出现不仅对重新认识传统的 PCV2 以及其与 PMWS 的关系具有意义; 同时, 拥有如此小的基因组对探讨生命的起源和进化也具有重大意义。前期研究表明, P1 为环状 DNA 病毒, 本试验主要对该病原核酸的链型和极性进行了研究。

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 PCV1、PCV2 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

氯化铯为 Sigma 产品; S1 核酸酶为 Fermentas 产品; Lipofectamine™ 2000 转染试剂为 Invitrogen 产品; 病毒基因组提取试剂盒为北京天恩泽基因科技有限公司产品(柱式病毒 DNAout); Optima™ L-80 XP 超速离心机为 Beckman 公司产品。

1.3 类猪圆环病毒因子 P1 和 PCV2 的提纯

将 PK-15 细胞传代入 6 孔细胞培养板, 待细胞密度达到 85% 细胞融合时, 按转染试剂说明进行 P1 双拷贝串联分子克隆的转染, 培养 72 h 后收获 P1 拯救毒, 冻融 3 次后, 首先进行差速离心进行粗提, 即通过 3 000 r/min 30 min 以及 10 000 r/min 30 min 离心, 去除较大的宿主细胞碎片及杂质; 然后进行氯化铯平衡密度梯度离心, 分段收集离心样品, 经过蛋白浓度测定及 PCR 确定病毒所在的区段。本研究通过了两轮氯化铯平衡密度梯度离心, 首先以 30%、40%、50% (W/V) 浓度的氯化铯对病毒样品 100 000 g 离心 48 h (SW41Ti 转头), 然后收集病毒条带再以 10%、20%、30% (W/V) 浓度的氯化铯对病毒样品 100 000 g 离心 48 h (SW41Ti 转头), 最后收集病毒。

PCV2 的细胞病毒提纯参照上述方法进行。

1.4 病毒核酸类型的鉴定

对提纯的 P1 及 PCV2 用病毒基因组提取试剂盒按说明提取病毒的 DNA。以 P1 分子克隆作为双链核酸对照, 以 PCV2 的核酸作为单链核酸对照, 同时进行 S1 核酸酶消化试验。消化步骤按照试剂说明书进行。即模板 DNA 约 1 μg, 5 × Buffer 6 μL, S1 核酸酶 0.1 μL (10 U), 加水至 30 μL。室温放置 30 min, 加 2 μL 0.5 mol/L EDTA, 加热 70℃ 10 min 终

止反应。消化产物进行琼脂糖凝胶电泳。

1.5 病毒核酸极性的研究

根据登录 GenBank 的 P1 核酸序列 (EF514716) 设计一对特异性引物: 即上游引物 F: 5'-GGGGG-GACCAACAAAATCTCT-3', 下游引物 R: 5'-TTC-CGGGGGAACAAAGTCGTCA-3'。该对引物可扩增出完整的 P1 基因组序列。

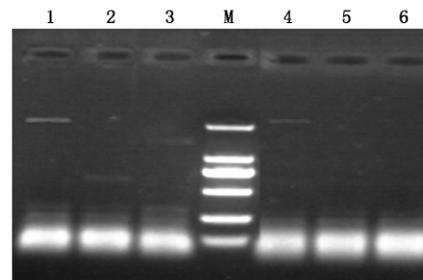
首先对提纯的 P1 所抽提的核酸, 分别用引物 F 和引物 R 进行第 1 轮 PCR 扩增。扩增体系为 25 μL, 25 pmol/L 引物, 模板 1 μL。反应程序如下: 95℃ 5 min; 95℃ 45 s; 56℃ 45 s; 72℃ 45 s; 40 个循环。

然后各取第 1 轮 PCR 产物 1 μL, 稀释 1 000 倍后, 再分别取 1 μL 作为模板, 用引物 F 和引物 R 进行第 2 轮常规 PCR 扩增。扩增体系和扩增条件同上。并且在扩增到第 10、20、30 个循环时分别取出扩增产物, 与最终 40 个循环的 PCR 产物同时进行琼脂糖凝胶电泳, 观察扩增情况。同时直接以提纯的 P1 所抽提的核酸为模板, 用引物 F 和引物 R 进行 PCR 扩增, 同样取扩增到第 10、20、30 个循环以及第 40 个扩增结束时的 PCR 产物, 一同进行琼脂糖凝胶电泳, 作为参照。

2 结果与分析

2.1 病毒核酸的类型

S1 核酸酶消化 P1 核酸、PCV2 核酸和 P1 分子克隆的结果表明, P1 和 PCV2 的核酸在 S1 核酸酶消化后, 电泳就检测不到任何条带, 而双链的 P1 分子克隆基本不受影响 (图 1)。说明 P1 的基因组和 PCV2 的相同, 为单链核酸。



M. DL2000; 1~3. 分别为未经 S1 核酸酶消化的 P1 分子克隆、P1 核酸和 PCV2 核酸; 4~6. 分别为经 S1 核酸酶消化的 P1 分子克隆、P1 核酸和 PCV2 核酸。
M. DL2000 DNA Marker; 1-3. Molecular cloning of P1, P1 DNA and PCV2 DNA without S1 nuclease treatment, respectively; 4-6. Molecular cloning of P1, P1 DNA and PCV2 DNA with S1 nuclease digestion, respectively.

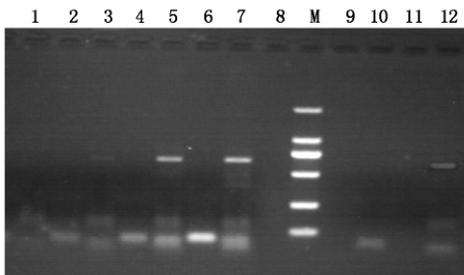
图 1 S1 核酸酶的消化结果

Fig. 1 Analysis of P1, PCV2 and P1 molecular clone digested with S1 nuclease

2.2 病毒核酸的极性

以单链特异性引物进行第 1 轮 PCR 扩增, 然后

将产物稀释后再进行常规 PCR 后,发现第 1 轮扩增用引物 F 进行,在第 2 轮扩增到 20 个循环时就可看到弱的特异扩增条带。随着循环数的增加,扩增条带亮度也在增加。而第 1 轮扩增用引物 R 进行,在第 2 轮扩增期间并未检测到扩增条带。直接用 P1 DNA 模板进行常规 PCR,结果表明,在进行到第 40 个循环时可检测到特异扩增条带(图 2)。从直接扩增条带的亮度来看,说明提纯的病毒核酸量较少,这也导致用引物 R 进行第 1 轮扩增后,由于将产物进行了稀释,DNA 模板量更加减少,致使进行第 2 轮 PCR 扩增 40 个循环也未见条带出现的情况发生。研究结果除进一步证实 P1 病毒为单链基因组外,还说明对于编码病毒衣壳蛋白的 *ORF1* 基因来说,其核酸链为负链。



M. DL2000; 1 3 5 7. 分别为第 1 轮单引物 F PCR 扩增产物在第 2 轮常规 PCR 中第 10 20 30 40 个循环的结果; 2 4 6 8. 分别为第 1 轮单引物 R PCR 扩增产物在第 2 轮常规 PCR 中第 10 20 30 40 个循环的结果; 9-12. 分别为 P1 DNA 的常规 PCR 第 10 20 30 40 个循环的结果。

M. DL2000 DNA Marker; 1 3 5 7. The second round of conventional PCR amplification product of P1 for the 10th 20th 30th 40th cycle after first round of PCR amplification using primer F, respectively; 2 4 6 8. The second round of conventional PCR amplification product of P1 for the 10th 20th 30th 40th cycle after first round of PCR amplification using primer R, respectively; 9-12. The conventional PCR amplification product of P1 for the 10th 20th 30th 40th cycle, respectively.

图 2 P1 核酸链极性的检测结果

Fig. 2 The detection results of polarity of P1 DNA strand by two round of PCR

3 讨论

类猪圆环病毒因子 P1 是我们新近发现的一种病毒,对新发病毒的主要成分,如核酸种类、核酸链型、极性研究是至关重要的。

本研究通过 S1 核酸酶消化来确定 P1 病毒的核酸链型。S1 核酸酶来源于米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) ,由 Vogt 于 1973 年分离^[13],是一种高度单链特异的核酸内切酶,在最适的酶催反应条件下,降解单链 DNA 或 RNA,产生带 5'-磷酸的单核苷酸或寡核苷酸。对双链 DNA、双链 RNA 和 DNA-RNA 杂交体相对不敏感,只有在高浓度下其才对双链核酸有降解作用。本研究使用 S1 核酸酶,严格按照其使用

说明,在相同条件下对病毒因子 P1 的核酸、PCV2 的核酸以及构建的 P1 分子克隆进行消化的结果显示,只有 P1 和 PCV2 的核酸被降解,证明了类猪圆环病毒因子 P1 的核酸类型与 PCV2 的相同,也属于单链。

P1 病毒核酸链的极性研究,可采取设计单链探针,与模板链进行杂交的结果来判定,但该方法费时、费力且花费昂贵。本研究根据 PCR 扩增原理,首先用单链特异性引物进行第 1 轮 PCR 扩增,如果该引物能与模板结合,虽不会出现像用一对引物进行常规 PCR 所出现的指数型扩增的情况,但经过 40 个循环后,也会出现大量的双链产物,这就可使在第 2 轮 PCR 过程中,更早地能检测到扩增条带的出现。如果引物不能与模板结合,经第 1 轮 PCR 扩增后,PCR 产物仍是原来浓度的 P1 单链核酸,经过稀释后进行的第 2 轮 PCR,其与直接用一对引物以提纯病毒的 DNA 模板进行 PCR 相比,扩增条带会更弱,甚至会由于模板的稀释在扩增循环数内检测不到条带。而且该方法也可判断病毒核酸链的链型,如果病毒 DNA 模板为双链,那么选定的 2 条单引物进行第 1 轮 PCR 后,经上述第 2 轮 PCR 后,在相同循环数时扩增的结果理论上应该相似。本研究经 S1 核酸酶消化及 PCR 扩增得到的结果表明 P1 为单股、负链病毒,这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] Allan G, Meehan B, Todd D *et al.* Novel porcine circovirus from pigs with wasting disease syndrome [J]. *Vet Rec*, 1998, 142(17): 467-468.
- [2] Meehan B M, McNeilly F, Todd D *et al.* Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs [J]. *J Gen Virol*, 1998, 79: 2171-2179.
- [3] Allan G M, Ellis J A. Porcine circoviruses: a review [J]. *J Vet Diagn Invest* 2000, 12: 3-14.
- [4] Segales J, Allan G M, Domingo M. Porcine circovirus diseases [J]. *Anim Health Res Rev* 2005, 6: 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] Wen L, Guo X, Yang H. Genotyping of porcine circovirus type 2 from a variety of clinical conditions in China [J]. *Vet Microbiol* 2005, 110: 141-146.
- [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] 温立斌,何孔旺,杨汉春. P1 因子分子克隆的体外感染性分析 [J]. *畜牧兽医学报* 2008, 39(7): 941-944.
- [9] 温立斌,何孔旺,杨汉春,等. 类猪圆环病毒因子 P1 感染对猪红细胞的影响 [J]. *内蒙古农业科技*, 2009(2): 46-48.
- [10] 温立斌,何孔旺,杨汉春. 一株类猪圆环病毒 2 型因子 P1 的全基因组序列测定与分析 [J]. *中国农业科学* 2010, 43(2): 411-416.
- [11] 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.
- [12] Wen L B, He K W, Yang H C, *et al.* Prevalence of porcine circovirus-like agent P1 in Jiangsu, China [J]. *Virology* 2011, 438: 543.
- [13] Vogt M. Purification and further properties of single-strand-specific nuclease from *Aspergillus oryzae* [J]. *Eur J Biochem*, 1973, 33: 192-197.