

中国猪瘟疫化弱毒(脾淋毒)基因组 5'-UTR 的克隆和二级结构分析*

胡建和^{1,2}, 张彦明¹, 张显升³, 刘在新³

韩雪清³, 季建莉³, 刘湘涛³, 谢庆阁³

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨陵 712100; 2 河南职业技术学院 动物科学系, 河南 新乡 453003;

3 中国农业科学院 兰州兽医研究所, 甘肃 兰州 730046)

[摘要] 据已发表的CSFV C-株序列, 设计合成了5'UTR 特异性PCR 引物对P1-N1 及半套式下游引物N1'。从兔脾组织中提取总RNA, 应用RT-PCR 及Half-nested PCR 成功地扩增出了CSFV 5'UTR, 进一步将该片段克隆到pMD-18T 载体质粒并进行了序列测定。与Shimen 株、ALD 株、GPE-株、Holland C-株和Russian C-株相应区段的比较分析表明, 其同源性分别为96.2%, 95.7%, 96.0%, 98.7%和95.4%。5'UTR 中发现的隐性AUG 起始密码子及茎环二级结构, 可能在多聚蛋白前体的翻译以及病毒的复制中起着重要作用。

[关键词] 猪瘟; 中国猪瘟疫化弱毒; 5'UTR; 克隆; 序列及二级结构分析

[中图分类号] 8582.65+1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2003)01-0105-04

猪瘟病毒(Classical Swine Fever Virus, CSFV)属黄病毒科(Flaviridae)瘟病毒属(Pestivirus), 是一种小的(40~60 nm)含单股正链DNA 基因组的有囊膜病毒。CSFV 基因组长约12.5 kb, 仅含有一个大的开放性阅读框架(ORF), 编码含3 898 个氨基酸残基的多肽序列, 在病毒和宿主细胞蛋白酶的作用下加工为成熟蛋白。CSFV 的所有结构蛋白和非结构蛋白均由该ORF 所编码, 其结构蛋白和非结构蛋白在病毒RNA 上的编码顺序为N^{pro}, C, E^{ms} (E0), E1, E2, P7, NS2-3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B^[1]。CSFV 基因组无5'端帽子结构和3'端poly(A)尾巴^[2]。ORF 两侧仅有5'端非翻译区(5' untranslated region, 5'UTR)和3'端非翻译区(3'UTR), 长度分别约360 和226 bp, 并且在5'UTR 中存在数量不等的可变区和二级结构^[3]。本研究旨在通过对5'UTR 的成功克隆及序列测定和分析, 为众多CSFV 株系的系统发育分析、基因型的划分和遗传图谱分析提供依据, 并进一步为病毒的复制机理研究以及病毒基因组的重组改造提供参考。

1 材料与方法

1.1 病毒

CSFV C-株脾淋毒采用中国农业科学院兰州兽医研究所保存的中国兽药监察所的种毒(兔脾淋组

织毒480代), 于3~4月龄兔体中复壮和增殖, 无菌采集产生定型热兔脾, -76℃保存。

1.2 引物的设计与合成

根据已发表的CSFV 核苷酸序列, 选择高保守区段, 设计3条特异性引物(宝生物工程大连有限公司合成, 表1)。

表1 设计合成的PCR 引物及套式引物

Table 1 PCR and half-nested PCR primers

引物 Primer	序列 Nucleotide sequence	位置 Position
P1	5'-GTA TACGA GGT TAGTTCA TTCTCG-3'	1~24
N1'	5'-TTTACTCCTTCCACCA CGA TC-3'	997~1 017
N1	5'-AGGTACATAGCATGCTGGATACC-3'	1 217~1 239

其中引物对P1-N1 用于对引物P1-N1 扩增产物的半套式扩增。

1.3 病料组织总RNA 的提取

采用GibcoBRL 公司的TRIzol[®] Reagent Total RNA Isolation Reagent, 所用器皿及试剂均进行无RNase 处理。剪取50 mg 组织, 研磨后加750 μ L TRIzol[®] Reagent, 匀浆, 室温孵育5 min。4℃, 11 500 $\times g$ 离心15 min, 取上层水相, 加0.5 mL 异丙醇, 混匀, 室温10 min, -20℃过夜。4℃, 11 500 $\times g$ 离心10 min, 弃上清, 加1 mL 体积分数75%乙醇洗沉淀1次, 吸去残余乙醇, 室温或37℃, 干燥5~10 min 至无色透明。加RNase-free 水和

* [收稿日期] 2002-01-23

[基金项目] 国家重点基础研究发展规划项目(G19990119)

[作者简介] 胡建和(1968-), 男, 河南辉县人, 博士, 主要从事动物微生物学和病毒分子生物学研究。

RNasin 适量, -20℃ 保存备用。

1.4 RT-PCR

取总 RNA 11 μL , 一扩下游引物(0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 1 μL , 65℃ 水浴 10 min, 立即冰浴 5 min。加 5 $\times$ RT-buffer 4 μL , dNTP 2 μL , AMV (Takara) 2 μL , 42℃ 水浴 60 min, 得到 cDNA 第一链反转录产物。取反转录产物 10 μL , 10 $\times$ PCR buffer(Mg^{2+} -free) 5 μL , Mg^{2+} 3 μL , dNTP 4 μL , 一扩上游引物和下游引物各 1 μL , 加纯水至 49.5 μL 。短时离心混匀, 采用 GeneAmp[®] PCR System 2400 进行 PCR 扩增, 反应体系为 50 μL 。设定解链 98℃, 8 min; 95℃ 50 s, 48℃ 1 min, 72℃ 100 s 为一次循环, 共循环 35 次, 第一次变性后, 温度降至 72℃ 时, 加入 Taq 酶(Takara) 0.5 μL 。最后 72℃, 延伸 10 min。

1.5 Half-nested PCR (半套式 PCR)

取 2 μL RT-PCR 产物作半套扩模板, 进行半套式扩增, 方法同上。设定解链 98℃, 8 min; 以 98℃ 10 s, 55℃ 30 s, 72℃ 100 s 为一次循环, 第一次变性后, 温度降至 72℃ 时加入 Taq 酶 0.5 μL ; 最后 72℃, 延伸 10 min。PCR 条件略作调整以增强 Half-nested PCR 目的片段的特异性。

1.6 PCR 产物的纯化回收

用 1 $\times$ TAE 配制的质量分数 0.8% 的琼脂糖 (Takara), 加入溴化乙锭 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 进行凝胶电泳, 切取目的条带, 采用 Roche 公司生产的 Agarose Gel DNA Extraction Kit, 按说明书进行。

1.7 重组质粒的构建、提取和鉴定

取回收 DNA 片段 4 μL , pMD-18T 载体 (Takara) 1 μL , 与连接 solution I (Takara) 5 μL 混匀后, 于 16℃ 恒温循环水浴箱中反应 1~3 h, 4℃ 过夜后, 全量转化新鲜制备的感受态细菌 JM 109, 挑选白色阳性克隆, 于 Amp + LB 中, 37℃, 220 r/min 摇瓶培养过夜。以碱法小量质粒制备法, 提取重组质粒, 进行 XbaI 和 SalI 双酶切鉴定 (参照说明书操作) 和半套式引物 PCR 扩增鉴定^[4]。

1.8 目的片段的序列测定及二级结构分析

将鉴定出的阳性重组质粒送宝生物工程 (大连) 有限公司, 采用 ABI PRISM[™] 377XL DNA Sequencer 进行测序。用 DNA star 和 RNA draw 软件对测序结果与已发表的 Shimen 株、ALD 株、GPE 株、Holland C 株和 Russian C 株的同源性以及链内茎环结构的数量、隐性起始密码子数量、互补的碱基对数等二级结构参数进行比较分析。

2 结果与分析

2.1 CSFV C-株 5'UTR 的扩增片段

用 P1-N1 引物分别扩增 5'UTR 后, 继之以 P1-N1 进行半套式扩增。检出预期片段大小是 1 017 bp (为进一步研究的需要, 目的片段远长于 5'UTR 目的片段, 图 1), 将半套式 PCR 产物克隆到 pMD-18T 载体中 (鉴定结果见图 2), 由宝生物工程 (大连) 有限公司完成测序。

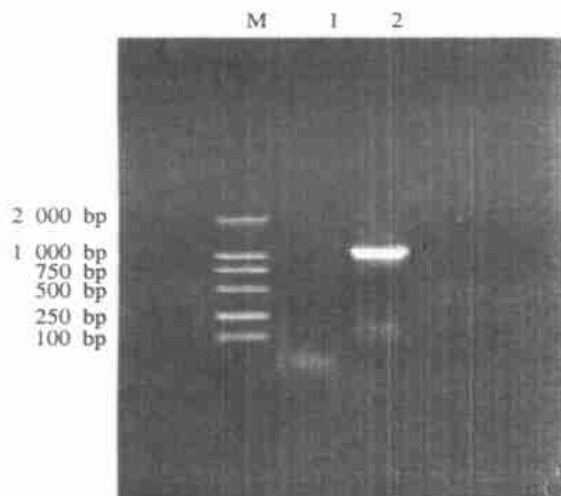


图 1 RT-PCR 和半套式 PCR

M. 标准分子质量 DL 2 000; 1 RT-PCR; 2 半套式 PCR

Fig 1 RT and half-nested PCR

M. Standard molecular mass DL 2 000;

1 RT-PCR; 2 Half-nested PCR

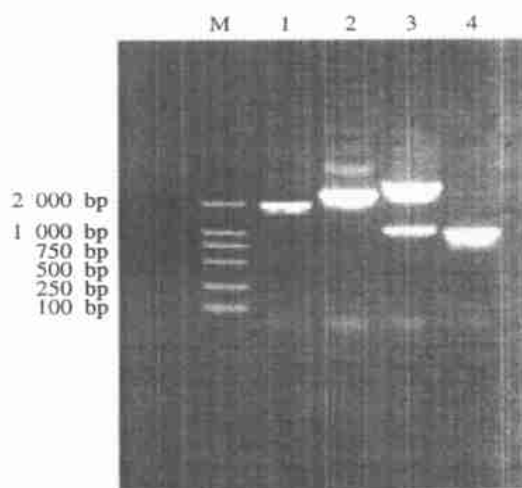


图 2 重组质粒鉴定

M. 标准分子质量 DL 2 000; 1 空质粒; 2 重组质粒; 3 双酶切; 4 PCR 鉴定

Fig 2 Restriction and PCR analysis of recombinant plasmids

M. Standard molecular mass DL 2 000;

1 pMD18-T; 2 Recombinant plasmids;

3 Restriction analysis; 4 Identification of PCR

2 2 核苷酸序列的测定及同源性比较

中国猪瘟兔化弱毒株 5'UTR 序列测定结果见表 2。对其核苷酸序列同源性的比较表明,在第 83 bp 处,Chinese C-株和 Holland C-株较其他各株多了 1 个 A;而在第 246 bp 处,Holland C-株较其他各株少了 1 个 C;在第 30 和 50 bp 处存在 2 个可变区

域。CSFV Chinese C-株 5'UTR 同 Shimen 株,ALD 株,GPE 株,Holland-株,Russian C-株的同源性分别为 96 2%, 95 7%, 96 0%, 98 7% 和 95 4%,说明 CSFV 各株 5'UTR 具有较高的保守性。

表 2 中国猪瘟兔化弱毒株 5'UTR 的序列测定结果

Table 2 Sequencing result of 5'UTR of Chinese lapnized attenuative strain of CSFV

1	gtatacaggagg ttagttcatt ctcgtataca cgattggaca aatcaaaatt
51	ataatttgggt tcagggcctc cctccagcga cggccgaact gggctagcca
101	tgcccatagtg aggactagca aaacggagggg actagccata gtggcgagct
151	ccctgggtgg tctaagtcct gagtacagga cagtcgtcag tagttcgacg
201	tgagcagaag cccacctcga gatgctacgt ggacgagggc atgcccaaga
251	cacaccttaa cctagcggg ggtcgctagg gtgaaatcac accacgtgat
301	gggagtacga cctgataggg cgctgcagag gccactatt aggctagtat
351	aaaaatctct gctgtacatg gcac

2 3 二级结构比较

二级结构比较结果(表 3)显示,各株间存在的链内茎环结构只有 Russian C-株为 26 个,其他各株均为 27 个。5'UTR 中存在数量不等的隐性 AUG 起始密码子,其中 Chinese C-株,Hooland C-株和 Russian C-株均为 5 个,Shimen 株,ALD 株和 GPE

株为 8 个。链内配对的碱基对数也不相同,其中 Chinese C-株,ALD 株和 GPE-株为 120 对,Shimen 株和 Holland C-株为 119 对,而 Russian C-株为 117 对。同时,在配对碱基中,G-C,A-U 和 G-U 的数量亦存在微小差异。

表 3 5'UTR 的二级结构比较结果(RNA rraw V 1. 1)

Table 3 Secondary structure comparing of 5'UTR (RNA draw V 1. 1)

毒株 Strains	碱基数 Bases	茎环结构 Stem-loop s	隐性AUG 起始密码子 CA SCs	配对碱基数 Base pairs	G-C	A-U	G-U
Chinese C	374	27	5	120	69	40	11
Shimen	373	27	8	119	70	36	13
ALD	373	27	8	120	68	40	12
GPE	373	27	8	120	69	37	14
Holland C	373	27	5	119	68	40	14
Russian C	372	26	5	117	69	35	13

3 讨 论

1) 比较 CSFV 不同毒株的 5'UTR 核苷酸序列的同源性,结果表明 5'UTR 在猪瘟病毒不同毒株间基因组结构中相当保守,这一点与 Brown, Deng 和 Brock 等人的观点相一致^[5- 7]。

2) 通过对 CSFV 不同毒株 5'UTR 相应序列的分析,发现在 5'UTR 中均有 5~ 8 个数量不等的隐性 AUG 起始密码子,这些隐性 AUG 中的大多数都有 1 个相应的小 ORF,可能编码 1 条 5~ 57 个氨基酸残基的多肽链,并可能在多聚蛋白的翻译调控

中具有重要的功能。至于 CSFV 如何滑过比真实启动子更有利的隐性起始密码子而启动 ORF 的翻译,机理还不太清楚。

3) 在 5'UTR 上含有丰富且相当稳定和保守的二级结构,这些二级结构可能在病毒的复制过程中具有识别信号的功能。从理论上讲,丰富的链内茎环结构的存 在,不利于核糖体从 RNA 5'端结合后向正确起始密码子的扫描和起始蛋白质的合成,至于核糖体如何在 5'UTR 上正确起始多聚蛋白前体的合成,还有待于进一步的研究与探讨。

[参考文献]

- [1] Meyers G, Rumenapf T, Thiel H J. Molecular cloning and nucleotide sequence of the genome of hog cholera virus[J]. Virology, 1987, 171: 555- 567.
- [2] Paton D J, McGoldrick A, Greiser-Wilke I, et al. Genetic typing of classical swine fever virus[J]. Veterinary Microbiology, 2000, 73: 137- 157.
- [3] 付烈振, 张楚瑜, 朱 燕. 猪瘟和猪瘟病毒的分子生物学[A]. 谢庆阁, 翟中和主编. 畜禽重大疫病免疫研究进展[C]. 北京: 中国农业科技出版社, 1996 32- 40.
- [4] [美]萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南(第 2 版)[M]. 北京: 科学出版社, 1995 19- 22.
- [5] Edwin A B, Zhang Hang-chun, Li Hua, et al. Secondary structure of the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and pestivirus genomic RNAs[J]. Nucleic Acids Research, 1992, 20(19): 5041- 5045.
- [6] Ruitang D, Keny B. Molecular cloning and nucleotide sequence of a pestivirus genome: noncytopathic bovine viral diarrhoea virus strain SD-1[J]. Virology, 1992, 191: 867- 879.
- [7] Ruitang D, Keny B. 5' and 3' untranslated regions of pestivirus genome: primary and secondary structure analyses[J]. Nucleic Acids Research, 1993, 21(8): 1949- 1957.

Cloning and secondary structure analysis of genomic 5'UTR of Chinese lapinized attenuative strain (derived from spleen) of CSFV

HU Jian-he^{1,2}, ZHANG Yan-ming¹, ZHANG Xian-sheng³, LIU Zai-xing³,
HAN Xue-qing³, JI Jian-li³, LIU Xiang-tao³, XIE Qing-ge³

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Department of Animal Sciences, Henan Vocational and Technical Teacher's College, Xinxiang, Henan 453003, China;

3 Institute of Lanzhou Veterinary Research, Lanzhou 730046, China)

Abstract: Based on published sequences of strain-C of CSFV, a specific PCR primer pair P1-N1 and a half-nested PCR reverse primer N1' were designed. Utilizing RT-PCR and half-nested PCR techniques, genomic 5'UTR of strain-C was successfully amplified after the total RNA had been extracted from spleens of experimentally infected rabbits. The target fragment was further sequenced after being cloned into pMD18-T vector plasmid. Sequence comparison with corresponding regions of other strains revealed that the nucleotide sequence homologies of 5'UTR of strain-C are 96.2% with Shimizu-strain, 95.7% with ALD-strain, 96.0% with GPE-strain, 98.7% with Holland C-strain, and 95.4% with Russian C-strain. Several cryptic AUG start codons (CASCs) and stem-loop secondary structures in the 5'UTR perhaps play an important role in the process of pre-polyprotein translation and viral replication.

Key words: classical swine fever virus; Chinese lapinized attenuative strain of CSFV; 5'UTR; cloning; sequence and secondary structure analysis