

感染强、弱 PRRSV 毒株的 Marc-145 细胞 差异基因文库的构建

张 磊^{1,2}, 韩明远², 王建华¹, 宁宜宝², 陈 坚²

(1 西北农林科技大学 动物医学院, 陕西 杨凌 712100; 2 中国兽医药品监察所, 北京 100081)

【摘 要】 【目的】用强、弱 PRRSV GD 株传代毒株感染 Marc-145 细胞, 构建 Marc-145 细胞的差异基因 cDNA 文库。【方法】以感染 PRRSV GD 株第 100 代弱毒株的 Marc-145 cDNA 为测试组(Tester), 以感染 PRRSV GD 株第 5 代强毒株的 Marc-145 cDNA 为对照组(Driver), 采用抑制性消减杂交方法, 构建强、弱 PRRSV GD 株感染的 Marc-145 细胞差异基因 cDNA 文库, 并使用 LAMP(Loop-mediated isothermal amplification)技术对试验结果进行验证。【结果】经 4 次抑制性消减杂交重复试验, 得到 S8、S29、L6、L26 及 L30 等 5 个稳定差异表达的基因。LAMP 结果显示, S8、S29、L6、L26 及 L30 均为差异表达基因, 这与抑制性消减杂交结果吻合。【结论】成功构建了感染强、弱 PRRSV 毒株的 Marc-145 细胞差异基因文库, 为研究 S8、S29、L6、L26 和 L30 基因与 PRRSV 感染体外培养细胞 Marc-145 的关系奠定了基础。

【关键词】 PRRSV; Marc-145; 差异基因文库; 细胞培养

【中图分类号】 S852.65⁺1

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2011)07-0001-07

Construction of a library for genes differentially expressed in Marc-145 cells infected with high-virulence and low-virulence strains of PRRSV GD strain

ZHANG Lei^{1,2}, HAN Ming-yuan², WANG Jian-hua¹, NING Yi-bao², CHEN Jian²

(1 College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Abstract: 【Objective】The goal of this research is to construct a cDNA library of genes differentially expressed in host cells following infection of Marc-145 cells with low-virulent strain of PRRSV GD100 and strong-virulent strain of PRRSV GD5. 【Method】With GD100-infected Marc-145 cells as the test group (Tester) and GD5-infected Marc-145 cells as the control group (Driver), suppression subtractive hybridization (SSH) was applied to derive the differences in gene expression of host cells between the test group and the control group. The reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method was used to validate the differential genes screened out. 【Result】After four repeated trials of SSH, five stably differentially expressed genes were obtained, including S8, S29, L6, L26 and L30, which were validated to be differentially expressed genes by the LAMP method, tallying with the results of SSH. 【Conclusion】A cDNA library of genes differentially expressed in host cells following infection of Marc-145 cells with low-virulent strain of porcine reproductive and PRRSV GD100 and strong-virulent strain of PRRSV GD5 was constructed successfully, which laid the foundation for studies revealing the association between S8, S29,

* [收稿日期] 2011-03-08

[基金项目] 国家“十一五”科技支撑计划项目(2007BAD86B01)

[作者简介] 张 磊(1982—), 男, 吉林东丰人, 在读博士, 主要从事动物疫病诊断研究。

[通信作者] 宁宜宝(1955—), 男, 湖北大悟人, 研究员, 主要从事动物疫病防治及新兽药开发研究。E-mail: ningyibao@ivdc.gov.cn

L6, L26 and L30 genes and PRRSV infection.

Key words: PRRSV; Marc-145; library of differentially expressed genes; cell culture

猪繁殖与呼吸综合征 (Porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS) 又称蓝耳病, 其病原体为动脉炎病毒属猪繁殖与呼吸综合征病毒 (Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV), 该病被世界动物卫生组织 (OIE) 定为 B 类传染病。PRRSV 流行趋势日益复杂, 导致该病的防控和检疫工作也更加困难, 仅从病毒角度分析和研究 PRRSV 毒力、体内外接种的特性很难获得更多的信息, 因此研究 PRRSV 与宿主作用的机理, 可为 PRRS 的防控提供全面的资料。

抑制性消减杂交 (Suppression subtractive hybridization, SSH) 是由 Diatchenko 等在 1996 年提出的一种较成熟的筛选差异表达基因技术, 具有操作简便、灵敏度高、假阳性率低, 同时可以实现均一化和消减有效分离低丰度差异表达基因等优点^[1-6], 在基因功能研究中应用广泛^[7-12]。LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) 是一种新式恒温核酸扩增技术, 其原理是采用能特异识别靶序列上 6 个位点的 4 条引物及一种具有链置换活性的 DNA 聚合酶, 于 55~65 °C 选择合适温度, 等温孵育反应体系, 一般在 1 h 内即可完成核酸的指数级扩增, 扩增效率可达 $10^9 \sim 10^{10}$ 个拷贝数量级^[13]。

中国兽医药品监察所检测技术研究室于 2006 年在广东分离的 PRRSV GD 株是一种与美洲毒株亲缘较近的、以 NSP2 基因变异为特征的毒株。经过 Marc-145 细胞的体外传代培养, 在动物试验中发现, 100 代 GD 株较 5 代 GD 株在毒力、生物学特性和基因等方面发生了明显的变化, 但用这种方式获得的资料十分有限。

本研究采用 SSH 和 LAMP 技术, 构建了感染 PRRSV GD 株 100 代及 5 代的 Marc-145 细胞的差异基因 cDNA 文库, 以期了解 PRRSV GD 株在体外传代培养中的变化机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、细胞系与病毒 大肠杆菌菌株 Top10 由中国兽医药品监察所检测技术研究室保存。Marc-145 细胞购自中国兽医药品监察所菌种保藏中心。第 5 代和 100 代 PRRSV GD 株 (广东分离株, 经 Marc-145 细胞体外连续传代培养), 由中国兽

医药品监察所检测技术研究室制备保存。

1.1.2 主要试剂及仪器 犊牛血清购自 Hyclone 公司, DMEM 培养基、TRIZOL Reagent 提取试剂盒购自 Gibco 公司, 二甲基亚砜 (DMSO)、Magnesium sulfate 购自 Sigma 公司, 凝胶回收试剂盒购自 Omega 公司; CLONTECH PCR-Select™ Bacterial Genome Subtraction Kit 购自 Clontech 公司, DNA 分子质量 Marker (DL2000)、DNA Ligation Kit、AMV reverse transcriptase、Sal I 酶、Xba I 酶均购自 TaKaRa 公司, SYBR Green 购自 Invitrogen 公司, Betaine anhydrous 购自 Fluka 公司, Bst DNA Polymerase 购自 NEB 公司, QIAamp Viral RNAmini Kit 购自 QIAGEN 公司, Taq plus DNA 聚合酶购自北京鼎国公司, MAG-NET mRNA 提取试剂盒购自 AMRESCO 公司, pGEM-T-Easy 载体系统购自美国 Promega 公司。紫外分光光度计 (DU-65)、超速离心机 (L7-65) 购自美国 Beckman 公司, CO₂ 培养箱购自 Thermo 公司, 正置和倒置荧光显微镜购自德国 Leica 公司, 微量加样枪购自德国 Eppendorf 公司, DYY-III 2 稳压稳流电泳仪购自北京六一仪器厂。

1.1.3 引物设计与合成 按照 CLONTECH PCR-Select™ Bacterial Genome Subtraction Kit 要求, 合成 SSH 所需的接头引物 (Adapter 1、Adapter 2)、扩增引物 (Primer 1、Primer 2) 及甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因 (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, G3PDH) 的 3' 端和 5' 端特异性引物 (G3PDH3', G3PDH5') (表 1); 用 Primer Explorer V3 设计 S8、S29、L6、L26、L30 的 LAMP 引物 (表 2); 所用引物及接头均由 Invitrogen 公司合成。

1.2 病毒感染 Marc-145 细胞及总 RNA、mRNA 的提取

将第 5 代与 100 代 PRRSV GD 株按 10^7 TCID₅₀, 分别接种生长状态良好且处于对数期的 Marc-145 细胞。接种培养 36 h 后, 同时收获细胞培养物。按照 TRIZOL Reagent 提取试剂盒说明, 提取上述细胞培养物的总 RNA。按照 MAG-NET mRNA 提取试剂盒说明, 提取总 RNA 中的 mRNA。

1.3 抑制性消减杂交

1.3.1 cDNA 第 1 链的合成 取 2 μg mRNA、Oli-

go(dt) primer 2 μL 、dNTP (10 mmol/L) 1 μL , 加 ddH₂O 至终体积为 25 μL , 65 $^{\circ}\text{C}$ 下作用 5 min, 制备成变性反应液, 冰浴 1 min。取冰浴后的变性反应液 15 μL , 加 AMV reverse transcriptase 5 $\times$ Reac-

tion Buffer 5 μL 、AMV reverse transcriptase 2 μL 、0.1 mol/L DTT 1 μL 、RNaseOUT™ 1 μL , 最后加 DEPC-treated H₂O 至 25 μL , 42 $^{\circ}\text{C}$ 下作用 90 min, 然后再在 70 $^{\circ}\text{C}$ 下作用 15 min。

表 1 抑制性消减杂交所用的引物序列
Table 1 Sequences of the primer in SSH

引物 Primer	序列(5'→3') Sequence
Adapter 1	CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCCGCCGGGCAGGTACCTGCCCGG
Adapter 2	CTAATACGACTCACTATAGGGCAGCGTGGTCGCGGCCGAGGTACCTCGGCCG
Primer 1	CTAATACGACTCACTATAGGGC
Primer 2	TCGAGCGGCCCGCCGGGCAGGT
G3PDH3'	TATCATCCCTGCTTCTACTG
G3PDH5'	CTGTTGAAGTCGCAGGAGAC

表 2 S8、S29、L6、L26 和 L30 基因的 LAMP 引物
Table 2 LAMP primers for S8, S29, L6, L26 and L30

引物 Primer	序列(5'→3') Sequence
S8-A	TTTGCCTTTTACCTCGTTG
S8-B	ATATCCTTCGCGTACTGAC
S8-C	GAACCTGGCCGAATTTTCGCTTCGGAGAGCAAGATGG
S8-D	GCTCTTGTCGCGTGTGTTACACATATTGAGGCCATATTTCC
L6-A	CGGGTGGTTAAACTTCGCAA
L6-B	CCAGAGGTCCAGTCACAAGT
L6-C	TCACGTGCTGACTGAAGGGTTTCCTACTGAAGATGTGCCTCG
L6-D	TACCCCGGGACCATTCTGATCCACTAGCCAGCTGCTTC
L26-A	CCAGACCACACACTTGCTTA
L26-B	CTTTCGGATGGGCATGGAT
L26-C	CGGTGCGAAGTCACAAAGGGATGGGAGACTTCTAGGACCCG
L26-D	CAATGCACCTTCCCACATTCGCCGCACGTTGTACTTCTGTCT
S29-A	TTTGCCTTTTACCTCGTTG
S29-B	ATATCCTTCGCGTACTGAC
S29-C	GAACCTGGCCGAATTTTCGCTTCGGAGAGCAAGATGG
S29-D	GCTCTTGTCGCGTGTGTTACACATATTGAGGCCATATTTCC
L30-A	GAAAAAGTCGCTGGAGTCGA
L30-B	CATGCTGTGCCCAGTTCAA
L30-C	GAGTCTGCTTGTACCCAGGACCAACTCTAGGCTCCAACG
L30-D	TCGCTAACAAGTCCCAGCTTTGGACACCAAGTTTAGCCAA

1.3.2 cDNA 第 2 链的合成 根据 Second Strand cDNA Synthesis Kit 说明书配制反应液, 先 15 $^{\circ}\text{C}$ 作用 5 min, 然后 70 $^{\circ}\text{C}$ 作用 15 min。

1.3.3 感染第 100 代 PRRSV GD 株细胞培养物 dscDNA 两端接头的连接 以接种 100 代 PRRSV GD 株的 Marc-145 细胞培养物 cDNA 为测试组 (Tester), 以接种 5 代 PRRSV GD 株的 Marc-145 细胞培养物 cDNA 为对照组 (Driver)。将接种 100 代 PRRSV GD 株的 Marc-145 细胞培养物的双链 cDNA *Rsa* I 酶切产物分为 2 份, 在 T4 连接酶作用下分别与接头 1(adapter 1)和接头 2(adapter 2)连接, 以连接产物 Tester-adapter1 和 Tester-adapter2 为模板, 分别以 G3PDH3'/Primer 1 与 G3PDH3'/

G3PDH5'为引物进行 PCR 扩增, 检测接头连接效率。分别向连接不同接头的 Tester cDNA 中加入过量的 Driver cDNA, 68 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 8 h 后, 将杂交产物混合, 与过量的 Driver 进行第 2 次杂交。第 1 次杂交是为了使 Tester 单链 DNA 的相对含量达到基本一致; 第 2 次杂交则是进一步富集了差异 DNA, 并且产生了 2 个在 5'端有 2 个不同接头的双链 cDNA 分子。

1.3.4 2 次选择性 PCR 扩增 第 1 次 PCR 反应体系 25 μL : 第 2 次杂交产物 1 μL , Primer 1 2 μL , dNTP (10 mmol/L) 1 μL , Go-*Taq* 1 μL , *Taq* 5 $\times$ Reaction Buffer 4 μL , ddH₂O 16 μL 。首先在 PCR 仪中 75 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 5 min, 补平接头后立即按如下程序

进行 PCR 反应:94 ℃ 预变性 2 min; 94 ℃ 变性 20 s, 64 ℃ 退火 40 s, 72 ℃ 延伸 1.5 min, 30 个循环;最后 72 ℃ 延伸 8 min。

第 2 次 PCR 反应体系 25 μL :第 1 次 PCR 产物 3 μL , Primer 2 2 μL , dNTP(10 mmol/L) 1 μL , Go-Taq 1 μL , Taq 5 $\times$ Reaction Buffer 4 μL , ddH₂O 14 μL 。反应条件:94 ℃ 预变性 1 min;94 ℃ 变性 20 s, 68 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 15 min, 15 个循环;最后 72 ℃ 延伸 8 min。

1.3.5 cDNA 文库的构建 取第 2 次 PCR 纯化产物 3 μL , 与 pGEM-T-Easy 载体于 16 ℃ 连接过夜, 然后采用热激法将全部连接产物(10 μL)转化大肠杆菌 Top10 感受态细胞。将转化产物均匀涂布于 25 mL LB 琼脂培养基(含 50~100 mg/L 氨苄青霉素、40 μL X-gal 溶液(20 g/L)和 16 μL IPTG 溶液(50 g/L))的平板上, 37 ℃ 培养 12~16 h。挑选阳性重组子, 以接头内侧引物(Primer 1/Primer 2)进行 PCR 鉴定。

1.3.6 差异片段的序列测定及分析 将阳性克隆送交 Invitrogen 公司进行测序, 并对测得的序列进行 BlastX 分析。

1.4 LAMP 扩增

S8 LAMP 反应体系:ddH₂O 3.9 μL , 接种第 5 代和 100 代 PRRSV GD 株的 Marc-145 细胞 cDNA 5.0 μL , 10 $\times$ Bst DNA Polymerase Buffer 2.5 μL , dNTP (10 mmol/L) 3.5 μL , Betaine(5.0 mol/L) 5.0 μL , MgSO₄ (150 mmol/L) 0.6 μL , S8-C (40 $\mu\text{mol/L}$) 1.0 μL , S8-D (40 $\mu\text{mol/L}$) 1.0 μL , S8-A (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.5 μL , S8-B (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.5 μL , Bst DNA Polymerase (8 U/ μL) 1.0 μL , AMV 反转录酶(200 U/ μL) 0.5 μL 。待 LAMP Tubidimeter 温度达到 65 ℃ 后, 将上述反应液置于反应管中进行 LAMP 反应。S28、L6、L26、L30 LAMP 反应体系同 S8。

1.5 LAMP 反应产物的检测

1.5.1 电泳测定 在生物安全柜中, 取 10 μL Marc-145 细胞基因组 LAMP 扩增产物, 于 15 g/L 琼脂糖凝胶上进行电泳检测(100 V、15 min), 观察结果。

1.5.2 序列测定 将获得的 Marc-145 细胞基因组 LAMP 产物, 经限制性内切酶消化并回收, 用 Taq 酶加 A 尾处理后与 pGEM-T-Easy 载体连接, 对连接产物进行克隆并测序。

1.5.3 敏感性试验 抽提 Marc-145 细胞基因组

RNA, 并将其按 10 倍系列稀释成 $10^{-1} \sim 10^{-6}$ 等 6 个稀释度, 按照所建立的 PRRSV LAMP 方法, 进行差异基因敏感性扩增, 用 LAMP Tubidimeter LA-320 仪测定 LAMP 反应吸光度 OD_{260} 。

1.5.4 Tubidimeter real-time 鉴定 将第 5 代和 100 代 PRRSV GD 株分别接种处于对数生长期的 Marc-145 细胞, 36 h 后提取细胞总 RNA, 对 S8、S29、L6、L26、L30 进行 LAMP 反应, 利用 LAMP Tubidimeter LA-320 仪测定 LAMP 反应 OD_{260} , 当 OD_{260} 值大于 0.2 时, 即可判定为阳性反应, 此时对应的稀释度为各基因的最低扩增稀释度, 即检测下限。

2 结果与分析

2.1 细胞培养物总 RNA 及 mRNA 的检测

提取的细胞培养物总 RNA 经紫外分光光度计检测, 其 OD_{260}/OD_{280} 为 1.96; 分离的 mRNA 经紫外分光光度计检测, 其 OD_{260}/OD_{280} 为 1.92, 证明所提取的总 RNA 及 mRNA 质量好、纯度高, 可满足构建消减文库的要求。

2.2 接头连接效率的检测

由图 1 可见, G3PDH3'/Primer 1 特别引物组合的扩增片段大小(连接接头的 PCR 产物)大于 G3PDH3'/G3PDH5' 组合, 这与预期一致。灰度分析结果显示, 2 组 dscDNA 接头连接效率均在 80% 以上, 表明接头已经成功连接。

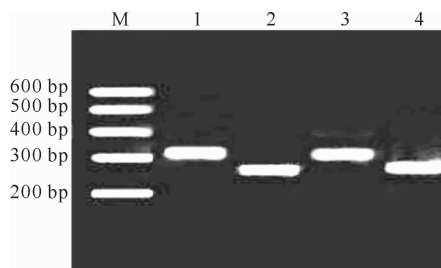


图 1 接头连接效率的检测

M. DNA 分子质量标准 Ladder 100; 1, 3. G3PDH3'/Primer 1 的 PCR 产物; 2, 4. G3PDH3'/G3PDH5' 的 PCR 产物

Fig. 1 Result of the ligation efficiency analysis

M. DNA Marker Ladder 100; 1, 3. PCR products of G3PDH3'/Primer 1; 2, 4. PCR products used of G3PDH3'/G3PDH5' primers

2.3 抑制性消减杂交的结果

图 2 显示, 消减和非消减杂交产物经过 2 次 PCR 扩增后, 消减杂交后的产物为集中于 200~700 bp 的弥散型 cDNA 集群, 而非消减的 PCR 产物主要集中在 100~600 bp, 表明消减杂交成功。

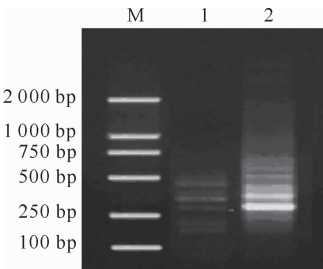


图 2 抑制性消减杂交结果

M. DNA 分子质量标准 DL2000;1.2 次消减杂交 PCR 产物;2.2 次非消减杂交 PCR 产物

Fig. 2 Result of SSH analysis

M. DNA Marker DL2000;1. Secondary PCR products of subtracted tester cDNA;2. Secondary PCR products of unsubtracted tester cDNA

2.4 感染 PRRSV 毒株 Marc-145 细胞差异基因 cDNA 文库插入片段的 PCR 鉴定

杂交产物经 2 次 PCR 扩增后,用其转化 Top10

感受态细胞,可得 64 个白色克隆,以 pMD18-T 载体通用引物对部分菌落进行 PCR 扩增,结果均能扩增出大小不等的插入片段,插入片段大小主要分布在 150~700 bp,与 SSH 设计预期的插入片段大小吻合,这些条带可能代表差异表达的基因片段(图 3)。

2.5 感染 PRRSV 毒株 Marc-145 细胞差异基因 cDNA 文库测序及序列分析

将文库送至 Invitrogen 公司,进行全文库单向测序扫描。根据 GenBank 数据库,对测序结果进行同源序列比对和 BlastX 分析,并使用 BlasTall.exe 剔除自建 EST 数据库(Marc-145 细胞基因差异文库)中的 100%重复且重叠大于 30 nt 的序列,再进行序列拼接,结果见表 3;并对表 3 中的 EST 序列进行分类,结果见表 4。



图 3 感染 PRRSV 毒株 Marc-145 细胞部分 cDNA 克隆外源插入片段的 PCR 扩增结果

M. DNA 分子质量 Marker(DL2000);1~24. cDNA 插入片段的 PCR 产物

Fig. 3 Marc-145 analysis of cDNA inserts which were randomly chosen from the SSH library

M. DNA Marker DL2000;1-24. PCR products of cDNA inserts

表 3 感染 PRRSV 毒株 Marc-145 细胞差异基因 cDNA 文库

Table 3 Gene transcription differences library of Marc-145 cell

基因 Gene	基因片段大小/bp Length of EST	重复频次 Repeat frequency of EST	同源性/% Homology	对照基因组 GenBank 登录号 Similar to BlastX with GenBank number
SSH1	145	4	94	AC187507.2
SSH2	137	6	98	AB170121.1
SSH3	676	9	100	AB169133.1
SSH4	143	5	98	AB170121.1
SSH5	189	11	100	XM001082945.1
SSH6	528	3	99	AJ293762.1
SSH7	167	7	100	AB170121.1
SSH8	621	2	94	AB169133.1
SSH9	134	9	97	AC187507.2
SSH10	180	8	97	NM001032.3

表 4 感染 PRRSV 毒株 Marc-145 细胞差异基因 cDNA 文库的分类

Table 4 Classification of gene transcription differences library of Marc-145 cell

基因 Gene	来源 Resource	功能 Function
SSH3、SSH4、SSH8	S8	加工蛋白质 Protein processing
SSH5	S29	加工蛋白质 Protein processing
SSH10	L26	加工蛋白质 Protein processing
SSH1、SSH9	L6	加工蛋白质 Protein processing
SSH2、SSH6、SSH7	L30	加工蛋白质 Protein processing

2.6 LAMP 反应产物检测

2.6.1 电泳检测 Marc-145 细胞基因组 LAMP 检测管产物电泳后,呈 LAMP 特征性梯状条带,对照组未扩增出条带(图 4)。

2.6.2 序列测定 对获得的 Marc-145 细胞基因组 LAMP 产物进行测序,结果显示,LAMP 扩增的产物为 S8、S29、L6、L26 和 L30 基因,未检测到其他非特异性扩增产物。

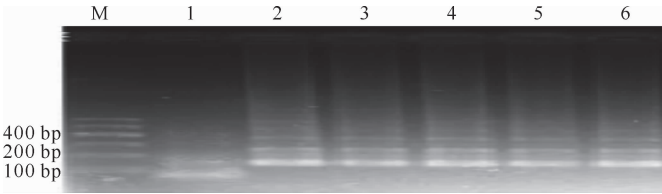


图 4 Marc-145 S8、S29、L6、L26 和 L30 基因的 LAMP 检测

M. DNA 分子质量 Maker(Ladder 100);1. 阴性对照;2~6. 依次为 S8、S29、L6、L26 和 L30 基因

Fig. 4 Specificity of LAMP-amplified S8、S29、L6、L26 and L30 genes

M. DNA Marker Ladder 100;1. Negative control;2-6. S8、S29、L6、L26 and L30 gene, respectively

2. 6. 3 敏感性试验 利用 LAMP Tubidimeter LA-320 仪,检测 S8、S29、L6、L26 和 L30 基因扩增的敏感性,结果(图 5)显示,S8 基因的最低扩增稀释度为 10^{-4} ,同理可得,S29、L6、L26 和 L30 基因的最低扩增稀释度分别为 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} 和 10^{-3} 。

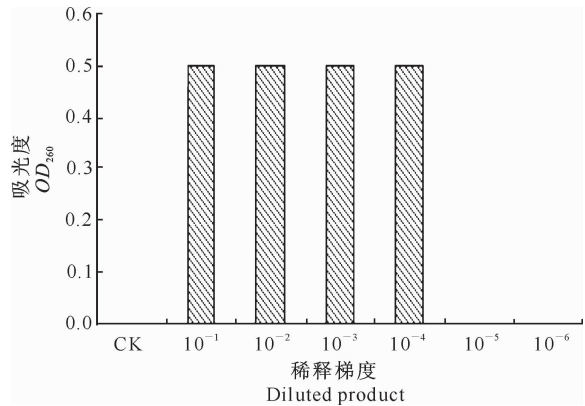


图 5 S8-LAMP 梯度稀释扩增 Tubidimeter

LA-320 柱形图

Fig. 5 S8 gene diluted product LAMP by Tubidimeter LA-320

2. 6. 4 Tubidimeter real-time 鉴定 按 1. 5. 4 方案,对用第 100 和 5 代 PRRSV GD 株接种的 Marc-145 细胞基因组中 S8、S29、L6、L26 和 L30 进行 LAMP 反应,第 100 代和 5 代 PRRSV GD 株接种的 Marc-145 细胞基因组中 S8、S29、L6、L26 和 L30 检测下限分别为 10^0 , 10^{-1} , 10^0 , 10^{-2} , 10^{-1} ; 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-3} , 10^{-3} 。可知第 100 代 PRRSV GD 株接种的 Marc-145 细胞基因组中 S8、S29、L6、L26 和 L30 表达较第 5 代 PRRSV GD 株有明显差异,与 SSH 文库筛选结果一致。

3 讨论

在以往的研究中发现,不同代次 PRRSV 引起细胞发生病变的时间不同,同时 PRRSV 的增殖滴度也随培养代次的增加而提高。本试验利用 SSH 技术,研究了 PRRSV GD 株第 5 代和 100 代感染的

Marc-145 细胞基因表达的差异。结果显示,通过测序获得的 10 个 EST 序列分别来源于 S8、S29、L6、L26 和 L30 基因。这些基因不仅可以合成蛋白质,而且具有核糖体功能,如参与复制、转录、翻译调控、正常细胞恶性转化等。其中 L30 可以参与 60S 大核糖体蛋白的亚基合成,与正常的生物体细胞生长发育和存活密切相关。L30 在神经生物学研究中是神经发育的重要生物标记,Yu 等^[14]在研究小鼠胚胎神经发育过程中发现,随着小鼠神经系统的发育,L30 的表达呈现出递增趋势。S29 是 40S 核糖体蛋白的组成部分,一些研究发现,其在生物发育调控和肿瘤恶化等病理方面发挥着重要作用,对该基因调控可影响纤维细胞的生长,所以目前被广泛应用于肿瘤研究和整容科学^[15]。L6 是核糖体大亚基的一个组成成分,同时它也是人类 T 淋巴细胞白血病病毒(human T cell leukemia virus type I, HTLV-1)基因组中病毒编码的原癌蛋白 Tax 应答元件结合蛋白。L6 的表达可以被 HTLV-1 编码的癌蛋白 Tax 所诱导。目前关于 L26 功能的研究报道较少。最新研究表明,L26 在肝癌中的表达水平明显高于癌旁组织,是肝癌癌变的生物学标志,且其能结合抑癌基因 P53 的 mRNA 并促进其翻译^[16]。核糖体蛋白 S8 是小亚基核糖体蛋白的一部分,对其的报道多见于肿瘤分子标志等方面的研究^[17]。最近有报道称,S8 可协同 CDK11p46 蛋白(PITSLRE 激酶异构体)诱导细胞凋亡^[18]。本研究结果表明,Marc-145 细胞中的 S8、S29、L6、L26 和 L30 基因调控可能与 PRRSV GD 株的体外培养适应性或动物毒力存在某种关联。

为了研究这 5 种基因在 PRRSV GD 株感染 Marc-145 细胞过程中的作用,可通过 RNA 干扰或基因过量表达等研究技术^[19-21],人为地调控这些基因在 Marc-145 细胞中的表达,从而探明 PRRSV GD 株在感染 Marc-145 过程中所行使的功能。

[参考文献]

- [1] Jin H, Cheng X, Diatchenko L. Differential screening of a subtracted cDNA library: A method to search for genes preferentially expressed in multiple tissue [J]. *Biotechniques*, 1997, 23(6): 1084-1086.
- [2] Caruso C, Bertini L, Tucci M. Isolation and characterization of wheat cDNA clones encoding Pk4 proteins [J]. *DNA Seq*, 2000, 10(4/5): 301-307.
- [3] Diatchenko L, Lau Y, Campbell A P, et al. Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 6025-6030.
- [4] Diatchenko L, Lukyanov S, Lau Y F. Suppression subtractive hybridization: A versatile method for identifying differentially expressed genes [J]. *Methods Enzymol*, 1999, 303: 349-380.
- [5] Rebrikov D V, Britanova O V, Gurskaya N G, et al. Mirror orientation selection: A method for eliminating false positive clones from libraries generated by suppression subtractive hybridization [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(20): 90.
- [6] Yao J, Burton J L, Saama P, et al. Generation of EST and cDNA microarray resources for the study of bovine immunobiology [J]. *Acta Vet Scand*, 2001, 42(3): 391-405.
- [7] Sonstegard T S, Capuco A V, White J, et al. Analysis of bovine mammary gland EST and functional annotation of the *Bos Taurus* gene index [J]. *Mammalian Genome*, 2002, 13(7): 373-379.
- [8] Glass E J, Coussens P M. Functional genomics of host-pathogen interactions in species of veterinary importance [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2005, 105: 173-174.
- [9] Madsen S A, Chang L C, Hickey M C, et al. Microarray analysis of genes expression in blood neutrophils of parturient cows [J]. *Physiol Genomics*, 2004, 16(2): 212-221.
- [10] Li J, Zhang W B, Loukas A, et al. Functional expression and characterization of *echinococcus granulosus* thioredoxin peroxidase suggests a role in protection against oxidative damage [J]. *Gene*, 2004, 326: 157-165.
- [11] Stubbs A P, Abel P D, Golding M. Differentially expressed genes in hormone refractory prostate cancer: Association with chromosomal regions involved with genetic aberrations [J]. *Am J Pathol*, 1999, 154(5): 1335-1343.
- [12] Wang H J, Benlimame N, Nab I. The AMF-R tubule is a smooth Ilimaqui-none-sensitive subdomain of the endoplasmic reticulum cell [J]. *Science*, 1997, 110(24): 3043.
- [13] Mori Y, Nagamine K, Tomita N, et al. Detection of loop mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 289: 150-154.
- [14] Yu L, Guan Y J, Gao Y M, et al. Cloning of RPL30 gene and its relationship with the development of the neural tube [J]. *Chinese Journal of Neuroanatomy*, 2006, 22(1): 33-37.
- [15] Zhang J, Wang X K, Mu S C, et al. Effects of genes RPs29, RPs15, EndoA and truncated septin2 on mouse epidermal cells and fibroblasts *in vitro* [J]. *The Chinese Journal of Dermatovenereology*, 2010, 24(4): 297-300, 309.
- [16] Masatoshi T, Michael J A, Kevin G M, et al. Regulation of p53 translation and induction after DNA damage by ribosomal protein L26 and nucleoli [J]. *Cell*, 2005, 123(3): 536-537.
- [17] Hide K, Daita N, Eiko H, et al. Differential expression of ribosomal proteins in human normal and neoplastic colorectum [J]. *Journal of Histochem Cytochem*, 2003, 51(5): 567-573.
- [18] Hao Y Q, Kong X G, Ruan Y Y, et al. CDK11p46 and RPs8 associate with each other and suppress translation in a synergistic manner [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2011, 407(1): 169-174.
- [19] Plasterk R H. RNA silencing: The genome's immune system [J]. *Science*, 2002, 296(5571): 1263-1265.
- [20] McManus M T, Sharp P A. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs [J]. *Nat Rev Genet*, 2002, 3(10): 737-747.
- [21] Tyers M, Mann M. From genomics to proteomics [J]. *Nature*, 2003, 422: 193-197.