

兔病毒性出血症病毒基因组 3'端非编码区的 分子克隆及生物信息学分析

刘光清¹, 张玉颖^{1,2}, 云涛¹, 倪征¹, 张森涛³,
梁华丽¹, 华炯刚¹, 李双茂¹, 杜青云¹, 盛祖恬¹

(1 浙江省农业科学院 农业部病毒学与生物技术重点实验室, 浙江 杭州 310021;

2 甘肃农业大学 动物医学院, 甘肃 兰州 730070;

3 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘要] 采用 3'RACE 方法对兔病毒性出血症病毒(RHDV)JX/CHA/97 株基因组 3'端全序列进行了扩增、克隆和测序, 并利用 DNASTAR 和 DNAMAN 软件分析了 RHDV JX/CHA/97 株与各参比毒株 3'NCR 的序列同源性, 用 RNA structure 软件对 3'NCR 的二级结构进行了预测和分析。结果表明, 所扩增的目的基因片段长 1 500 bp, 包括部分 VP60 基因序列、ORF2 基因、3'端非编码区(3' Non Coding Region, 3' NCR)和 poly(A)尾巴, 其中 3' NCR 位于 ORF2 终止密码子 TAG 之后, 长 59 bp, poly(A)至少含有 27 个 A; 3'NCR 序列具有较高的同源性(93.5%~100%); 3' NCR 二级结构可以形成 2 个潜在的茎环结构(SL1 和 SL2), 其中 SL2 具有一定的保守性, 其形状和形成位置与 poly(A)尾巴的长度关系不大, 但是 SL1 的结构和形成位置与 poly(A)尾巴的存在与否密切相关, 提示 poly(A)尾巴与 3'NCR 高级结构的稳定性以及基因组复制有一定关系。

[关键词] 兔病毒性出血症病毒; 3'端非编码区; poly(A); 二级结构; 生物信息学

[中图分类号] S852.65⁺9.6; Q785

[文献标识码] A **[文章编号]** 1671-9387(2006)03-0016-05

兔病毒性出血症(Rabbit hemorrhagic disease, RHD)是由兔病毒性出血症病毒(Rabbit hemorrhagic disease virus, RHDV)引起的兔的一种急性、败血性传染病, 主要表现为传染性极强, 呼吸系统出血, 肝坏死以及实质脏器发生水肿、淤血、出血变化。目前已测试过的所有兔的品系均对该病易感, 致病率可达 90%, 致死率可达 100%, 是兔的一种毁灭性传染病。

1984 年该病首先在我国暴发^[1], 随后迅速在全世界广泛流行, 朝鲜、韩国、德国、意大利、法国、澳大利亚、墨西哥等国家均相继报道有本病流行^[2-4], 可见该病已经成为一种国际性传染病。由于该病的发病率和致死率都很高, 感染兔基本上在 48~72 h 死亡, 给养兔业造成了巨大的经济损失, 而且严重威胁濒临灭绝的野兔品种。

RHDV 属于杯状病毒科, 其基因组为单股正链 RNA, 全长 7 437 bp, 拥有 2 个开放阅读框架(ORF)^[5]。其中 5'末端的长开放阅读框架(ORF1)

编码一个含有 2 344 个氨基酸的多聚蛋白前体(分子量 257 ku)^[6], 该多聚蛋白被病毒蛋白酶进一步分解为衣壳蛋白和多个非结构蛋白, 其中分子量为 60 ku 的衣壳蛋白为病毒的主要结构蛋白(Vp60), 与诱导机体产生抗感染免疫直接相关^[7]; 3'末端的短开放阅读框架(ORF2)编码病毒另一个小的结构蛋白(Vp12), 该蛋白的生物学功能还不清楚。在 RHDV 基因组的 3'末端还具有一段长仅 59 个核苷酸的非编码区(Non Coding Region, NCR), 含有丰富的二级结构, 在病毒的转录与翻译过程中可能具有重要作用。目前, 对 RHDV 基因组的结构与功能了解得还很少, 仅部分基因的编码产物及其功能得到诠释, 而对 RHDV 基因组表达调控机理的研究更少。本研究采用 3'RACE 方法对 RHDV JX/CHA/97 株基因组 3'端全序列进行了扩增、克隆和测序, 同时利用计算机软件对 3'NCR 所含的生物学信息进行了分析, 以为进一步开展 RHDV 表达调控等方面的研究工作奠定基础。

[收稿日期] 2005-11-17

[基金项目] 浙江省自然科学基金资助项目(Y305047)

[作者简介] 刘光清(1968—), 男, 安徽砀山人, 副研究员, 博士, 主要从事动物病毒分子生物学研究。E-mail: Liuguangqing@hotmail.com

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 毒 株 JX/CHA/97 株由浙江省农业科学院动物病毒室提供;参比毒株的序列资料均来自 Genbank,具体情况见表 1。

表 1 参比毒株的序列资料
Table 1 Information of published RHDV
sequence used in this study

毒株 Isolates	基因登录号 Genebank accession No.	来源 Origin	登载年份 Submitted time
CD/China	AY523410	中国 China	2004
FRG	NC_001543	英国 English	2000
Iowa2000	AF258618	美国 america	2000
Czech351	U54983	澳大利亚 australia	1996
AST/89	Z24757	西班牙 Spain	1993
SD	Z29514	法国 France	1993
FRG-1	M67473	墨西哥 Mexico	1991
JX/CHa/97	DQ205345	中国 China	1997

1.1.2 工程菌与载体 大肠杆菌 JM109 由浙江省农业科学院农业部病毒学与生物技术重点实验室保存;载体为 pGEM-T 载体,购自 Promega 公司。

1.2 引物设计与合成

使用 Oligo 4.1 引物设计软件,根据 RHDV 基因组的结构特点以及 JX/CHA/97 株已知区域的序列,由大连宝生物工程有限公司设计并合成了扩增 JX/CHA/97 株基因组 3'端未知序列的特异性引物,序列如下:

A+: 5'-ACC ACG ACC GCC GGC ATG GAT-3';

A1 -: 5'-AGC TCT AGA GCG CGC CCC GGG T₁₆-3';

A2 -: 5'-AGC TCT AGA GCG CGC CCC GGG T-3'。

1.3 病毒 RNA 的提取

使用 Qiagen 公司的 Rnaeasy Mini Kit 提取病毒 RNA,具体操作按照说明书进行。

1.4 RHDV JX/CHA/97 株基因组 3'末端序列的扩增

以反转录引物 A1-进行反转录,合成 cDNA 第一链,以之为模板,使用引物 A+和 A2-进行 PCR 反应,扩增 3'端序列。反应条件:94℃变性 5 min;94℃ 1 min,55℃ 1 min;72℃ 2 min,30 个循环;最后 72℃延伸 5 min。取 5 μL PCR 产物进行凝胶电泳鉴定。

1.5 目的基因的克隆与鉴定

将目的基因片段的 PCR 产物用 DNA 凝胶回收试剂盒 (TaKaRa 公司)纯化回收后,克隆于 pGEM-T 载体中,转化 JM109 感受态细胞,在 LB 培养基中培养过夜,用碱裂解法提取质粒,以 PCR 法和 *EcoR* I (TaKaRa 公司)酶切分析法鉴定阳性重组子。阳性重组子的测序由大连宝生物工程有限公司进行。

1.6 3'NCR 序列分析

使用 DNASTAR 和 DNAMAN 等分子生物学软件,对 RHDV JX/CHA/97 株基因组 3'NCR 的序列进行分析,并与参比毒株的序列进行比较。

1.7 3'NCR 的生物信息学分析

使用 RNA structure 软件,根据 RHDV 3'NCR 及 poly(A)的核苷酸序列,对 3'NCR 的二级结构进行预测,并分析 poly(A)尾巴以及 3'NCR 核苷酸的变异对二级结构的影响,参考其他 RNA 病毒的研究资料,分析 3'NCR 对 RHDV 基因组的复制和表达调控等可能发挥的作用。

2 结果与分析

2.1 目的基因扩增结果

应用所设计的特异引物扩增出了预期的基因片段,大小约 1 500 bp(图 1)。

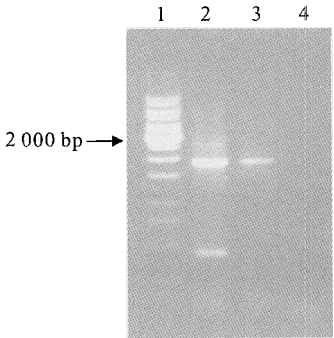


图 1 RHDV JX/CHA/97 株 3'NCR 扩增结果

1. DNA marker;2,3. 扩增产物;4. 阴性对照

Fig. 1 Result of RHDV JX/CHA/97 3' NCR PCR

1. DL-10000 DNA marker;2,3. The product of PCR;4. Negative control

2.2 重组质粒鉴定结果

用 PCR 扩增及 *EcoR* I 酶切鉴定重组子,结果表明成功地克隆到 JX/CHA/97 株基因组的 3'端序列。

2.3 测序结果

测序结果表明,扩增的目的基因序列长 1 500

bp, 包括 VP60 的部分基因序列、ORF2 基因、3'NCR 和 poly(A) 尾巴, 其中 3'NCR 位于 ORF2 终止密码子 TAG 之后, 长 59 bp, poly(A) 尾巴至少含有 27 个 A。

2.4 3'NCR 一级结构的分析

分析比较的结果表明, 3'NCR 在不同 RHDV 毒株之间具有较高的核苷酸序列同源性(93.5%~100%), 相对于 RHDV 基因组的其他区域来说, 应该是保守性最高的区域。由图 2 可知, JX/CHA/97 株(DQ205345), CD/China 株(AY523410)和 Iowa

2000 株(AF258618)3'NCR 的变异情况相同, 即第 26 位 G→A, 第 35 位 G→A; SD 株(Z29514), AST/89 株(Z24757)和 CD/China 株(AY523410)均在第 19 位发生了 A→G 变异; 而第 39~59 位核苷酸高度保守, 未发现碱基变异现象。利用 DNAMAN 软件绘制了 RHDV 各分离株 3'NCR 的系统发生树, 结果显示 JX/CHA/97 株(DQ205345)与 CD/China 株(AY523410), Iowa2000 株(AF258618)具有更密切的亲缘关系, 与根据 Vp60 基因绘制的系统发生树结果相符合(图 3)。

Iowa2000	TTTGATTTTATTGGTTTAAATTTAGTTTAATTAGGTTTATAGTTTAAAGTAAGCTATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	90
CD/China	TTTGATTTTATTGGTTTAAATTTAGTTTAATTAGGTTTATAGTTTAAAGTAAGCTATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	90
JX/CHA/97	TTTGATTTTATTGGTTTAAATTTAGTTTAATTAGGTTTATAGTTTAAAGTAAGCTATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	90
FRG-1	TTTGATTTTATTGGTTTAAATTTGGTTTAATTGGGTTTATAGTTTAAAGTAAGCTATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	90
FRG	TTTGATTTTATTGGTTTAAATTTGGTTTAATTGGGTTTATAGTTTAAAGTAAGCTAT	58
AST/89	TTTGATTTTATTGGTTTAAATTTGGTTTAATTGGGTTTATAGTTTAAAGTAAGCTAT	59
SD	TTTGATTTTATTGGTTTAAATTTGGTTTAATTGGGTTTATAGTTTAAAGTAAGCTAT	59
Czech351	TTTGATTTTATTGGTTTAAATTTGGTTTAATTGGGTTTATAGTTTAAAGTAAGCTATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	90

图 2 JX/CHA/97 株与参比毒株 3'NCR 的序列比较

—, 表示缺失; □, 表示差异

Fig. 2 Sequence comparison of 3' NCR between JX/CHA/97 and reference strains

—, Represent deletion; □, Represent difference

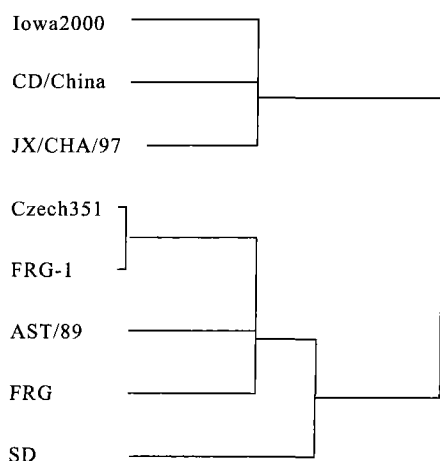


图 3 根据不同 RHDV 3'NCR 的核苷酸序列绘制的系统发生树

Fig. 3 Phylogenetic tree according to the sequence of 3'NCR from different RHDV strains

2.5 3'NCR 二级结构的预测及分析

应用 RNA structure 软件对 RHDV 不同分离

株的 3'NCR 二级结构进行预测, 并分析了 poly(A) 序列对 3'NCR 二级结构的影响。分析结果显示, RHDV 3'NCR 的二级结构具有 I 型和 II 型 2 种类型(图 4), 它们均能形成 2 个茎-环结构(SL1 和 SL2), 各毒株 I 型和 II 型的 SL1 完全相同, 其茎区的碱基对数均为 11, 以 A-T 配对为主(10/11); 环区由 5'-AAA GT-3' 构成五元环。但 SL1 在结构形态与组成方面存在明显差异, 拥有 I 型结构的毒株有 JX/CHA/97 株(DQ205345), CD/China 株(AY523410)和 Iowa 2000 株(AF258618); 拥有 II 型结构的毒株有 FRG-1 株(M67473)、Czech351 株(U54983)、FRG 株(NC_001543)、SD 株(Z29514)和 AST/89 株(Z24757)。I 型的 SL 结构又含有 2 个小的 SL 结构; II 型的 SL 结构仅含有 1 个环区和 1 个茎区。分析结果还表明, I 型二级结构的最低自由能为 -45.22 kJ/mol, II 型二级结构的最低自由能为 -32.24 kJ/mol, 据此推断 I 型的二级结构可能较 II 型的二级结构稍稳定些。

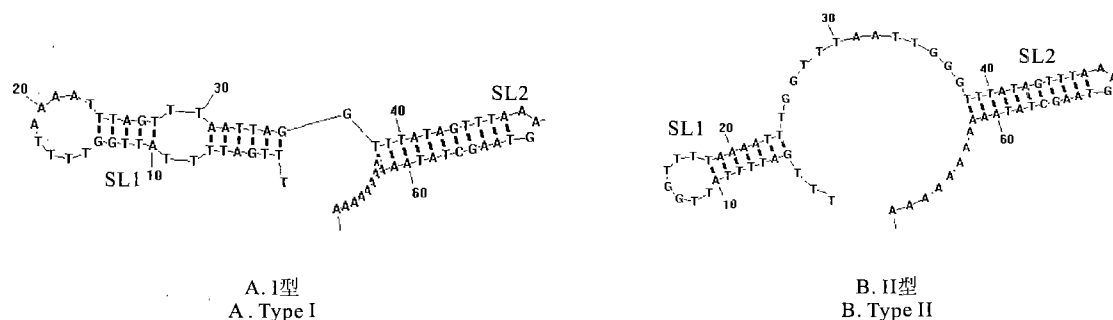


图4 RHDV 3'NCR 预测的二级结构

Fig. 4 Secondary structure of 3'NCR of RHDV

2.6 poly(A)对3'NCR 二级结构的影响

通过递减 poly(A) 尾巴的长度, 预测分析了 3'NCR 二级结构的变化情况。结果发现, 当 poly(A) 完全缺失时, 3'NCR 的二级结构发生显著变化(图 5A), 与上述 2 种类型的二级结构不同, 其 SL1 由第 20~40 位核苷酸形成; SL2 虽然形状与位置未发生

改变, 但其茎区的碱基对由原来的 11 对减少到 7 对(图 5B), 这种结构的最低自由能为 -27.63 kJ/mol, 高于上述预测的二级结构的自由能, 提示 poly(A) 序列对 3'NCR 二级结构的稳定起一定作用。当 poly(A) 尾巴的长度恢复到 3 个以上时, 3'NCR 的二级结构得以完全恢复。

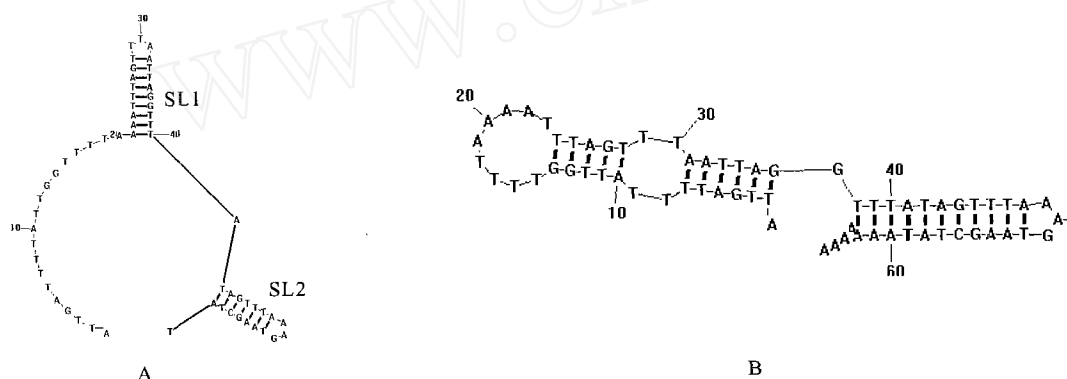


图5 poly(A)序列对3'NCR 二级结构的影响

Fig. 5 Effect of poly(A) on the secondary structure of 3'NCR

3 讨论

迄今为止, 已有足够的证据证明单股正链 RNA 病毒基因组的 3'NCR 与其基因组复制^[8]和翻译^[9]的调控以及亚基因组产生的调控密切相关^[10]。例如, 若删除 HCV 基因组 3'NCR X-区(3'端约 100 bp)中的茎环结构, HCV 的复制能力将丧失^[11]。3'NCR 中的一些高级结构(如茎-环等)也可与蛋白质相互作用, 调节病毒基因的翻译过程, 如 WNV 3'NCR 中的 SL 结构可与细胞抽提物中的一些翻译调控因子(如 eF1 α)结合起来, 调控翻译的过程^[12]。RHDV, 猪生殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)等一些

正链 RNA 病毒, 在感染过程中存在亚基因组的转录和翻译过程。有研究表明, 亚基因组生成的一些调控元件可能存在于基因组的非编码区, 如 Lin 等^[13]研究发现, 鼠疱疹病毒(MHV) 3'NCR 末端 305~350 bp 的序列对病毒的亚基因组生成有促进作用, 若将 305 bp 以后的区段缺失, 将没有亚基因组的产生。可见, 深入研究病毒基因组的非编码区, 对于揭示病毒基因组的表达调控机理有着重要意义。随着计算机技术及生物信息学的不断发展, 将 RNA 结构预测和实验室研究技术相结合, 深入研究病毒基因组非编码区的结构与功能已经被广大科研工作者所采用。实践证明这是一条研究病毒基因组功能的

新思路。目前,还没有见到关于 RHDV 非编码区结构与功能的研究报道,因此本研究为以后开展的相关研究工作,提供了一些科学的借鉴资料。

本研究结果表明,RHDV 3'NCR 二级结构可形成 2 个 SL 结构(SL1 和 SL2),由于第 26 位和第 35 位碱基的突变,SL1 发生了一定变化,而且呈现出一定的规律,据此可将 3'NCR 的二级结构分为 2 种类型(I 型和 II 型);SL1 的这种构象变化是否会影响病毒的复制与表达,尚需要进一步的研究证明。SL2 是一种保守性的结构,参考它在其他病毒上的研究结果,预测 RHDV 该结构区可能含有病毒复制酶结合的信号,对于调控基因组的复制具有重要意义。关于 RHDV 基因组的 Poly(A)尾巴的精确长度及其长度对基因组表达与调控的影响,尚未见研究报道,

本研究结果表明,RHDV 基因组的 poly(A)尾巴至少含有 27 个 A,该序列对 3'NCR 二级结构的稳定性存在一定影响,要维持 3'NCR 二级结构的正常、稳定,poly(A)的长度至少要含有 3 个 A,但该长度是否也是维持病毒感染性的需要,尚需实验验证。在这方面,FMDV 的相关研究结果可能有一定借鉴作用,例如,A 型 FMDV 的 poly(A)序列少于 10 个碱基时病毒的感染性,与具有大约 40 个 A 的 FMDV 相同^[14],O 型 FMDV poly(A)的长度与病毒感染性之间的关系则很小或没有^[15],与此相反,C 型 FMDV poly(A)序列 10~40 bp 的感染性差异在 5~16 倍^[16]。可见,研究 FMDV 基因组的非编码区和 poly(A)结构,对了解病毒的复制、感染性病毒粒子的形成等具有重要意义。

[参考文献]

- [1] 杜念兴,徐为燕,刘胜江. 一种新病毒——兔出血症病毒的鉴定初报[J]. 病毒学报,1986,2(2):146-152.
- [2] Mitro S,Krauss H. Rabbit hemorrhagic disease;a review with special reference to its epizootiology[J]. Eur J Epidemiol,1993,9:70-78.
- [3] Nowotny N,Ros Bascunana C,Ballagi-Pordany A,et al. Phylogenetic analysis of rabbit haemorrhagic disease and European brown hare syndrome viruses by comparison of sequences from the capsid protein gene[J]. Arch Virol,1997,142:657-673.
- [4] Ohlinger V F,Hass B,Meyers G,et al. Identification and characterization of the virus causing rabbit hemorrhagic disease[J]. J Virol,1990,64:3331-3336.
- [5] Lawson M. Rabbit virus threatens ecology after leaping the fence[J]. Nature,1995,378:531.
- [6] Pennisi E. Rampaging rabbit virus-again[J]. Science,1997,277:1441.
- [7] Cubbitt D,Bradley D W,Carter M J,et al. 1995 Family Caliciviridae[J]. Arch Virol,1995,10:359-363.
- [8] Friebe P,Bartenschlager R. Genetic analysis of sequences in the 3'nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication[J]. J Virol,2002,76(11):5326-5338.
- [9] Li K K,Sarnow P. Cytoplasmic expression of mRNAs containing the internal ribosome entry site and 3' noncoding region of hepatitis C virus;effects of the 3' leader on mRNA translation and mRNA stability[J]. J Virol,2002,76(24):12457-12462.
- [10] 孙道春,伯晓晨,王升启. 单股正链 RNA 病毒基因组 3'端非编码区的高级结构与功能研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展,2004,31:299-303.
- [11] Ali N,Siddiqui A. The La antigen binds 5'noncoding region of the hepatitis C virus RNA in the context of the initiator AUG codon and stimulates internal ribosome entry site2 mediated translation[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1997,94(6):2249-2254.
- [12] Shi P Y,Brinton M A,Veal J M,et al. Evidence for the existence of a pseudoknot structure at the 3' terminus of the flavivirus genomic RNA[J]. Biochemistry,1996,35:4222-4230.
- [13] Lin Y J,Zhang X N,Wu R C,et al. The 3' untranslated region of coronavirus RNA is required for subgenomic mRNA transcription from a defective interfering RNA[J]. J Virol,1996,70(10):7236-7240.
- [14] Snrnnow P. Role of 3'end sequences in infectivity of poliovirus transcripts made *in vitro*[J]. J Virol,1989,63:467-470.
- [15] Marvin J,Grubman,Barry Baxt,et al. Foot and mouth disease virion RNA;studies on the relation between the length of its 3'-poly(A) segment and infectivity[J]. Virol,1979,97:22-31.
- [16] Barry Baxt,Marvin J,Grubman,et al. The relation of poly(A) length to specific of viral RNA;A comparison of different types of foot and mouth disease virus[J]. Virol,1979,98:480-483.

(下转第 25 页)

The separation of X and Y spermatozoa in the environment of acid inducement

YANG Hai^{1,2}, LI Qing-wang^{1,2}, HU Jian-hong¹, HAN Zeng-sheng^{1,2},
ZHAO Hong-wei², CHEN Xiao-yu^{1,2}, WU Shu-yun^{1,2}, YANG Zhi-qing^{1,2}

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 College of Environment and Chemistry Engineering, Yanshan University, Qinhuangdao, Hebei 066004, China)

Abstract: Separating animal's X and Y spermatozoa is the most direct and efficient way to control animal's sex. Real-time separation technology was used in our study and its theory is that the X spermatozoa swims faster than Y spermatozoa in acidic solution, X spermatozoa are aim spermatozoa and the separation result (motility of separated sperm, rate of X spermatozoa) was identified with microscope and Quarine dyeing. In order to find the suitable pH value of separation solution, the original sperm was diluted with BWW solution in different pH values, finally, the pH 5.5 solution was found as separation solution. This study took pH 5.5 solution as separation solution and used real-time separation technology to separate the X and Y spermatozoa. The result showed that the motility of separated sperm reached $(91 \pm 1.4)\%$ and increased by 9.1% compared with the original, and significant differences existed between the separated sperm and the original ($P < 0.01$); the rate of X spermatozoa reached $(73.3 \pm 1.0)\%$, Y spermatozoa reached $(26.7 \pm 1.0)\%$, the difference was significant compared with the original. The real-time separation technology in the environment of acid inducement is a brief and effective technology in the separation of X and Y spermatozoa.

Key words: acid inducement; X, Y-spermatozoa; real-time separation; BWW solution; F-body

(上接第20页)

Abstract ID: 1671-9387(2006)03-0016-EA

Cloning and analyzing of the secondary structure
of the 3' noncoding region of RHDV

LIU Guang-qing¹, ZHANG Yu-ying^{1,2}, YUN Tao¹, NI Zheng¹, ZHANG Miao-tao³,
LIANG Hua-li¹, HUA Jiong-gang¹, LI Shuang-mao¹, DU Qing-yun¹, SHENG Zu-tian¹

(1 Key laboratory of Virology & Biotechnology of Agriculture Ministry, Zhejiang Academy of Agriculture Sciences, Hangzhou, Zhejiang 310021, China;

2 Animal Veterinary Medicine College Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China;

3 College of Animal Science and Technology, North west Sci-Tech University
of Agriculture and Forestry, Yangling Shaanxi 712100, China)

Abstract: The authentic 3' end sequence of Rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV), including part of VP60, VP12, 3'NCR, and poly (A) tail, was amplified by 3'RACE, and the result showed 3'NCR was 59nt in length, and at least 27 As existed in the poly(A) tail. Compared with other reference strains, JX/CHA/97 strain share higher nucleotide acid identity with the reference strains (93.5%—100%). With the help of RNA structure soft ware, the secondary structure of RHDV was predicted and analysed. The result showed that there were two stem-loops (SL) in the region, which may be necessary for viral replication. Besides, it was found that the formation of SL1 was closely related to the presence of poly(A) tail, which implied that poly(A) tail may be related to the stability of the second structure of 3' NCR, and to the replication of viral genom.

Key words: rabbit hemorrhagic disease virus; 3' Non-coding region; poly(A); secondary structure; bioinformatics