

内源性绵羊肺腺瘤病毒基因在蒙古羊染色体上的分布研究

柴局¹, 齐景伟¹, 刘淑英^{1*}, 张文广², 赖双英², 李金泉^{2*}

(1. 内蒙古农业大学动物科学与医学学院, 呼和浩特 010018; 2. 内蒙古自治区动物遗传育种与繁殖重点实验室, 呼和浩特 010018)

摘要: 本研究旨在探究内源性绵羊肺腺瘤病毒基因在蒙古羊染色体上的分布情况。参照已登入 GenBank 中的内源性绵羊肺腺瘤病毒(enJSRV, 登录号为 DQ838493)序列, 设计合成 1 对引物, PCR 扩增 *gag* 基因的部分片段, 用地高辛标记制备探针, 利用荧光原位杂交(FISH)技术检测 enJSRV 在蒙古羊染色体上的分布。结果表明, 用 enJSRV 的 *gag* 基因合成的 DNA 探针在蒙古羊中期分裂相的 6 条染色体上均有杂交信号, 分别为 1q45、1p23、2q41、3q23、6q13、9q22 和 14q25, 其中在 6 和 9 号染色体上出现有较强的荧光信号。结果提示, 在 6 和 9 号染色体上这两个位点上有多拷贝的 enJSRV 基因, 1q45、1p23、2q41、3q23、和 14q25 拷贝数少, 这与内源性绵羊肺腺瘤病毒进化有关。

关键词: 蒙古羊; enJSRV; FISH; 染色体

中图分类号: S826.2; Q343.2

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2009)11-1615-06

Chromosomal Distribution of Endogenous Jaagsiekte Sheep Retrovirus in the Mongolian Sheep Genome

CHAI Ju¹, QI Jing-wei¹, LIU Shu-ying^{1*}, ZHANG Wen-guang², LAI Shuang-ying², LI Jin-quan^{2*}

(1. *College of Animal Science and Animal Medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China*; 2. *Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Reproduction of Inner Mongolia, Hohhot 010018, China*)

Abstract: This study was aimed to explore the distribution of chromosomes of the endogenous sheep pulmonary adenomatosis virus gene in Mongolian sheep. A pair of primers was designed according to the sequence of the enJSRV in the GenBank(DQ838493). The partial sequence of the *gag* gene was cloned and amplified by PCR, which was further marked by Dig to locate the distribution of the enJSRV in the Mongolian sheep chromosomes with the FISH(Fluorescence in situ hybridization). The result showed that the distribution of the enJSRV *gag* gene in each of the 6 chromosomes of Mongolian sheep during the metaphase at 1q45, 1p23, 2q41, 3q23, 6q13, 9q22 and 14q25, and stronger fluorescence signal appeared on the 6th and 9th chromosomes. The results suggested that, on the 6th and 9th chromosomes, enJSRV genes were multiple copied at the two sites, and there were low copy number at 1q45, 1p23, 2q41, 3q23, and 14q25, which related to the endogenous evolution of the sheep pulmonary adenomatosis virus.

Key words: Mongolian sheep; enJSRV; FISH; chromosome

收稿日期: 2008-07-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(30560108); 国家自然科学基金(30760178)

作者简介: 柴局(1973-), 男, 内蒙古包头人, 博士生, 主要从事动物遗传学研究, E-mail: chajju_b@163.com

* 通讯作者: 刘淑英, E-mail: liushuying_imau@126.com; 李金泉, E-mail: lijinquan_nd@126.com

绵羊肺腺瘤病(Ovine pulmonary adenomatosis, OPA)是一种严重威胁我国养羊业发展的传染病,该病是由绵羊肺腺瘤病毒(Exogenous jaagsiekte sheep retrovirus, exJSRV)引起的一种慢性、进行性、接触传染性的肺脏肿瘤性疾病^[1]。但在所有已研究过的正常绵羊和山羊基因组内都含有15~20拷贝与exJSRV密切相关的内源性绵羊肺腺瘤病毒(Endogenous jaagsiekte sheep retrovirus, enJSRV)序列^[2-3]。在绵羊肺腺瘤病的致病过程中内源性绵羊肺腺瘤病毒与外源性绵羊肺腺瘤病毒密切相关,目前enJSRV的生物学效应虽还不十分清楚,但长期的演化理论推测其机体的作用是利大于弊。enJSRV在OPA的发生、发展中并未起关键作用,但enJSRV通过受体竞争干扰exJSRV侵入,并且enJSRV可以阻止exJSRV病毒粒子的释放,从而保护宿主免受感染,具有干扰exJSRV复制的功能^[4-5]。这些为人们通过研究enJSRV和exJSRV的结构变异来揭示致病机理以及寻找抗病差异育种方法,防治OPA在畜群的发生提供有用信息。因此研究品种中enJSRV原始地方分布特征,比较不同品种的差异,对于进一步确定OPA真正发病机理与OPA的生前诊断提供依据,同时为填补我国在此方面的空白做努力,本研究应用荧光原位杂交(FISH)技术进行enJSRV在蒙古羊染色体上的分布分析,以期为进一步揭示OPA的致病机理提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 外周血淋巴细胞的培养

用装有抗凝剂(肝素钠)的一次性真空负压采血管(或注射器)采取周岁公蒙古羊外周血5 mL,无菌条件下在每个培养瓶内滴入0.3~0.5 mL抗凝血,将培养瓶置于37℃恒温培养箱内培养70 h,在终止培养前1~2.5 h,分别加5 μg·mL⁻¹的秋水仙素2~3滴,使其终浓度约为0.08 μg·mL⁻¹,封好瓶口后继续培养^[6]。

1.2 染色体标本的制备

培养结束后,将培养物转入离心管,1 000 r·min⁻¹离心10 min,弃部分上清液,留细胞及上清液约1 mL,吹打混匀,加0.075 mol·L⁻¹ KCl溶液5~6 mL,37℃低渗20 min,甲醇:冰乙酸(3:1, v/v)固定液(新鲜配比),固定3次,制成细胞悬液,冰冻载玻片上滴2~3滴细胞悬液,空气干

燥。

1.3 enJSRV 探针合成

参照本实验室已克隆的序列(DQ838493),设计1对引物,上游引物(5'-GCTGCTTTRAGACCT-TATCGAAA-3'),下游引物(5'-ATACTGCAG-CYCGATGGCCAG-3'),由宝生物(大连)有限责任公司合成,采用随机引物标记法用地高辛(DIG-dUTP)标记绵羊enJSRV的gag基因PCR产物,PCR反应体系(20 μL):2×GC buffer I 10 μL, dNTPs(2.5 mmol·L⁻¹) 3.2 μL, Taq酶(5 U·μL⁻¹) 0.2 μL,上下游引物各1 μL,模板DNA 1 μL, d₃H₂O 3.6 μL,反应参数是95℃预变性5 min;94℃变性1 min,58℃退火1 min,72℃延伸2 min,30个循环;72℃延伸5 min。扩增产物在1%的琼脂糖凝胶上电泳检测。

1.4 探针变性

取标记好的探针10 μL于1.5 mL离心管中,加25 μL无水乙醇和1 μL NaAc溶液(pH 5.2),充分混匀后,-20℃放置30 min,以12 000 r·min⁻¹离心30 min,吸弃上清后,用1 mL 70%乙醇洗涤沉淀和管壁,吸弃乙醇,沥掉残液后,敞口向上放置于室温,使乙醇完全挥发,向探针沉淀加10 μL杂交液,充分吸打混匀,以12 000 r·min⁻¹离心10 s,使杂交液聚于管底,65℃预热5 min后,于75℃变性5 min,然后立即置冰上10~15 min。

1.5 染色体标本变性

从-20℃取出标本,待其恢复到室温时,用胃蛋白酶溶液于室温下处理5 min,室温下,用2×SSC洗2次,5 min·次⁻¹。用乙醇系列(70%、90%和100%)脱水,依次为3、3和5 min,晾干,显微镜下观察后,用钻石笔在标本背面标记杂交区域(约20 mm×20 mm),65℃烤片至少2 h,于72%、70%甲酰胺/2×SSC中变性2~3 min。立即将标本依次经预冷至-20℃的乙醇系列(70%、90%和100%)脱水各5 min,然后室温下晾干。

1.6 荧光原位杂交

将变性的探针加于染色体标本的杂交区域中央,盖上盖玻片(18 mm×18 mm)(注意避免气泡生成),用Rubber Cement封盖玻片四周,于37℃在潮湿暗盒中杂交过夜(约16~17 h)。

1.7 洗脱、免疫检测与信号放大

杂交次日,将标本从37℃温箱中取出,用镊子撕掉Rubber Cement,于41~50℃,将标本浸入

50%甲酰胺/2×SSC 洗涤 5 min(待盖玻片脱落后开始计时),然后再用相同温度的 50%甲酰胺/2×SSC 洗涤,于 50℃,1×SSC 中洗涤 1 min,室温下,在 2×SSC 中漂洗一下。①加 100 μL 封闭液 I 于杂交区域 30~40 min,加盖封口膜(20 mm×20 mm),37℃温育 30 min;②加 50 μL Anti-digoxigenin-fluorescein 于杂交区域,加盖封口膜,37℃温育 60 min;③标本于 45℃洗涤,加 100 μL 封闭液 II 于杂交区域,加盖封口膜后,37℃温育 30 min;在 2×SSC 中漂洗后,取出标本,室温下自然干燥,用 PI/antifade 复染,盖上盖玻片(18 mm×18 mm)后在 Nikon E800 荧光显微镜下,用滤光片 B-2A(激发波长为 450~490 nm)观察结果,可同时看到绿色杂交信号和红色染色体,用 CCD 和配套软件捕获并处理图像。

2 结 果

2.1 enJSRV 的 gag 基因 PCR 扩增

用外周静脉血快速培养法培养淋巴细胞制备染色体标本,得到良好的中期分裂相,以 DNA 为模板,加入合成的引物进行 PCR 扩增,取 PCR 产物电泳并于凝胶成像仪上观察,结果扩增出大约 228 bp 的无杂带目的基因片段(图略),产物纯化后,采用试剂盒 DIG DNA Labeling Kit(Cat. No. 11 745 832 910)的方法进行探针标记,并进行灵敏度的检测,探针在 7 min 内显色,浓度为 30 pg·μL⁻¹,浓度大于 0.1 pg·μL⁻¹可用于杂交。

2.2 染色体的 FISH

以 enJSRV 基因组中的 gag 基因设计引物合成探针,用绵羊外周血淋巴细胞制备的中期染色体作杂交标本,用荧光素异硫氰酸盐和抗地高辛抗体检测,最后染色体用碘化丙啶(PI)复染。在荧光显微镜下检测并照相,结果显示 enJSRV 探针与绵羊中期分裂相染色体成功杂交(图 1)。在图示中可见绿色荧光信号分布在中期分裂相的 6 条染色体(红色)中,说明蒙古羊基因组中有 enJSRV 的分布。

2.3 染色体核型分析及 enJSRV 的分布结果

按照第一届国际家养动物显带核型标准化会议(1976 年在英国 Reading 召开),绵羊 2 倍体细胞染色体数 2n=54,公羊核型为 54,XY,母羊核型为 54,XX。按绵羊染色体长度依次划分 1~3 号为大的中部或亚中部着丝粒染色体;4~26 号为端部着丝粒染色体,X 染色体为最端部着丝粒染色体,Y 染

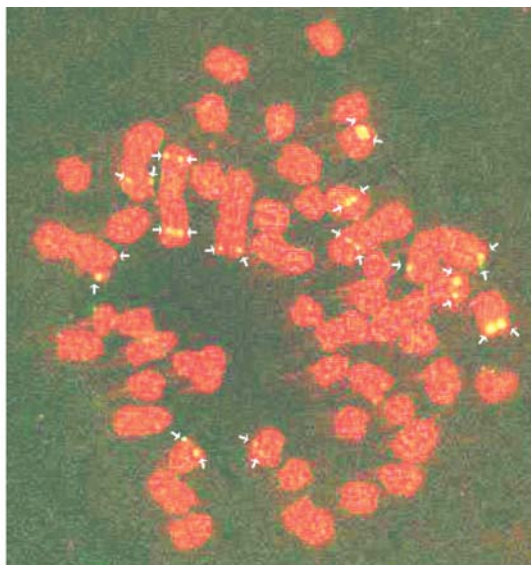
色体为最小的中着丝粒染色体^[7],绵羊染色体核型不分组,常染色体按同源染色体配对,然后再依染色体大小递减排列,依次编号为 1~26 号,一对性染色体不编号排在最后。因公羊具有染色体代表性,此研究作了公羊的有杂交信号的染色体核型分析,计算出其相对长度、臂比值和着丝粒指数(表 1),选取有杂交信号的染色体照片,根据以上结果进行配对,并进行核型分析确定信号所在染色体(图 2),经分裂相核型分析,利用绵羊染色体 G 一带模式图^[8]与相应染色体对照,确定杂交信号在染色体上的具体物理位置,其中 1 号染色体(1 对同源染色体)出现 2 个杂交信号,2、3、6、9 和 14 号染色体都出现 1 个杂交信号,在杂交信号的染色体上,除 1 号染色体上出现 2 个信号外,其它染色体都出现 1 个信号,且除 1 号同源染色体 1 个染色体短臂(p 臂)上出现单个杂交信号外,其它染色体出现的杂交信号都是同源配对的,在本研究中,确定了 enJSRV 在我国蒙古羊染色体中 1、2、3、6、9 和 14 号上的物理位置,通过比较分析,其中 6 和 9 号染色体上的杂交信号明显强于其它染色体上的信号,将信号所在的染色体与该染色体的 G 一带标准模式图作对照,其中优先着丝粒对齐(图 3),确定染色体上信号的具体位置(表 1)。

3 讨 论

本研究利用 FISH 技术初步研究了 enJSRV 在蒙古羊染色体中的分布及物理位置,确定了 enJSRV 在我国蒙古羊中 1、2、3、6、9 和 14 号染色体上的物理位置。其中 1、2、6 和 14 号位置与国外研究确定的相一致^[9-12],3 和 9 号是本研究新确定的。

已有的研究表明,正常绵羊和山羊基因组内都含有 15~20 拷贝与 exJSRV 病毒密切相关的内源性绵羊肺腺瘤反转录病毒序列(enJSRV)^[3,5],本研究结果也说明蒙古羊基因组内存在多拷贝的 enJSRV。在 Carlson 等研究山羊与绵羊的 enJSRV 分布时发现染色体组内仅有 2 个(1q45 和 2q41)分布相同^[13],说明羊属在进化过程中绵羊和山羊的区分(大约 400 万~1 000 万年前)要比内源性 enJSRV 整合到羊染色体中的时间(50 万~180 万年前)早得多^[14-15]。

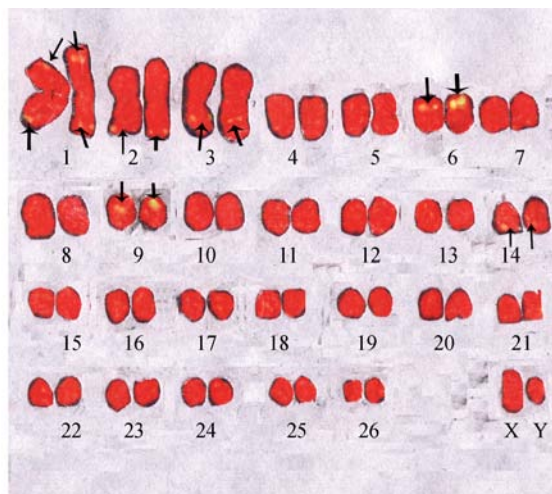
研究显示,在 6 和 9 号染色体上出现的信号强度比其它染色体上高出 3~5 倍,这说明在 6 和 9 号染色体位点可能出现多拷贝 enJSRV 串连重复结构,并且这些重复序列的结构可能是以典型的“头-



图中红色为染色体,绿色为信号(白色箭头所指)enJSRV 在绵羊染色体基因组中的 6 条染色体出现杂交信号(图中箭头所指为绿色荧光信号,FITC)

The red is the chromosome, the green signal (indicated by the white arrow) is the hybridization signal appeared in the 6th chromosome(the arrow indicates the green fluorescence signal, FITC)

图 1 enJSRV 在绵羊染色体基因组上的物理定位图(600×)
Fig. 1 The location of enJSRV in the sheep genome(600×)

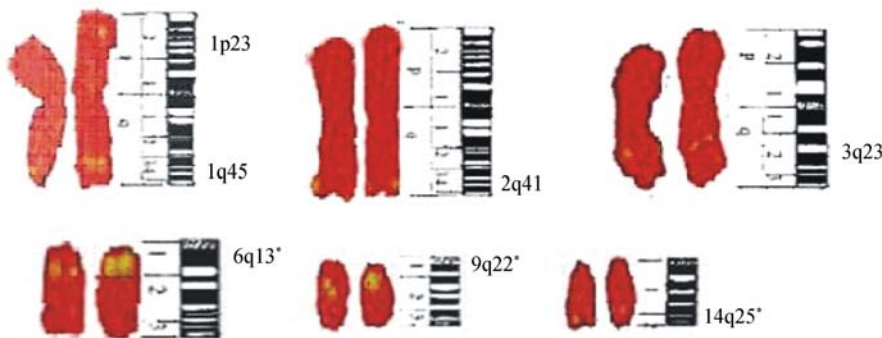


1~26、X 和 Y 为蒙古羊(♂)杂交图的核型分析(图中箭头所指为绿色荧光信号,FITC)

1-26、X and Y is karyotype analysis of the hybridization of Mongolian sheep(♂)(the arrow indicates the green fluorescence signal, FITC)

图 2 绵羊荧光原位杂交分裂相染色体核型图(600×)
Fig. 2 Caryogram of the fluorescence in situ hybridization cleavage chromosome of sheep(600×)

尾纵向串连”的方式排列。虽然这种序列结构在反转录前病毒中不常见,但也有以这种方式排列的病



* . 表示有很强的绿色荧光信号
* . Indicate strong green fluorescence signal

图 3 绵羊基因组中 EnJSRV 的 FISH 杂交位点与 G-带模式图对照确定绿色荧光信号(FITC)在染色体的位置(1 000×)

Fig. 3 The location of the green fluorescence signal on the chromosome with the comparison of the G-band ideograph and the FISH of the EnJSRV in the sheep genome(1 000×)

毒,人内源性逆转录病毒 K (HERV-K) 基因序列以及鸟类肉瘤病毒在鹌鹑转化中发现的串连重复结构就是以头-尾纵向串连重复出现的^[16-17]。在 1 号染色体中出现 2 个杂交信号,说明在 1 号染色体中有 2 个 enJSRV 拷贝。

本研究是参考 enJSRV 的 gag 基因设计合成的探针,检测结果比 Demartini 等用 Southern blot

方法检测 enJSRV 在绵羊与仓鼠杂种细胞系的分布结果差^[9-12],原因可能是 gag 出现变异造成的探针敏感性下降,不能完全检测出绵羊基因组中 enJSRV 的分布,也可能是 Carlson 等用的 JSRV 全基因序列探针(7.5 kb)长,削弱了特异性信号,不能灵敏的检测到有截断的或有不同突变的序列^[13]。

本研究检测了 enJSRV 在蒙古羊染色体基因组

中的分布,并确定了 enJSRV 的物理位置,对于进一步了解该基因的潜在功能具有重要意义,并丰富了绵羊的物理图谱,为深入揭示 OPA 的致病机理提供了分子遗传学依据。

4 结 论

在 6 和 9 号染色体上出现比其它染色体上更强

的信号,这说明在 6 和 9 号染色体位点出现了多拷贝 enJSRV 串连重复结构,而其它染色体上没有这种结构,对进一步研究内源性绵羊肺腺瘤病毒基因在蒙古羊染色体上的整合机理及肺腺瘤病毒致病机理提供了理论上的基础证据,为科研工作者进行更深入的研究奠定基础。

表 1 绵羊染色体的核型分析指标(相对长度、臂比、着丝粒指数)及 enJSRV 信号的位置

Table 1 Caryogram parameters of the chromosome of sheep and the location of the enJSRV with FISH

染色体号 Chromosome No.	相对长度 Relative length	臂比(q/p) Arm ratio	着丝粒指数 Centromere index	FITC 位置 FITC location
1	8.352±0.558	1.246±0.115	44.54±0.087	1q45,1p23
2	7.487±0.784	1.199±0.120	45.40±0.135	2q41
3	7.365±0.451	1.309±0.148	43.32±0.111	3q23
4	4.440±0.123			
5	4.183±0.145			
6	3.639±0.345			6q13*
7	3.632±0.069			
8	3.625±0.098			
9	3.568±0.128			9q22*
10	3.504±0.251			
11	3.368±0.135			
12	3.289±0.098			
13	3.210±0.115			
14	3.167±0.256			14q25
15	3.103±0.056			
16	3.089±0.253			
17	3.003±0.256			
18	2.981±0.120			
19	2.788±0.056			
20	2.681±0.224			
21	2.588±0.120			
22	2.524±0.113			
23	2.517±0.092			
24	2.359±0.120			
25	2.331±0.103			
26	2.216±0.056			
X	4.977±0.213			
Y	2.989±0.013	1.157±0.005	44.45±0.07	

*. 表示在这些位点荧光信号较强(空格处没有内容)

*. Indicate clearly strong green fluorescence signals at those positions

参考文献:

[1] 刘淑英,马学恩. 绵羊肺腺瘤病的研究进展[J]. 动物医学进展,2003,24(1):19-22.

[2] HECHT S J, STEDMAN K E, CARLSON J O, et al. Distribution of endogenous type B and type D sheep retrovirus sequences in ungulates and other mammals [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(8): 3297-

- 3302.
- [3] PAIMARINI M, SHARP J M, DE LAS HERAS M, et al. Jaagsiekte sheep ret rovirus is necessary and sufficient to induce a contagious lung cancer in sheep [J]. *Virology*, 1999, 73(8): 6964-6972.
- [4] PAIMARINI M, MURA M, SPENCER T E. Endogenous betaretroviruses of sheep: teaching new lessons in retroviral interference and adaptation [J]. *J Gen Virol*, 2004, 85(1): 1-13.
- [5] DeMARTINI J C, CARLSON J O, LEROUX C, et al. Endogenous retroviruses related to jaagsiekte sheep ret rovirus [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2003, 275: 117-137.
- [6] 赖双英. 动物遗传学试验指导[M]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学出版社, 2002: 17-23.
- [7] DIBERARDINA D, HAYES H, FRIES R, et al. The second international conference on standardization of domestic animal karyotypes[C]. *Jouy en Josas: Cytogenet Cell Genet*, 1990, 53(2-3): 65-79.
- [8] LONG S E. Standard nomenclature for the G-band karyotype of the domestic sheep (*Ovis aries*) [J]. *Hereditas*, 1985, 103(2): 165-170.
- [9] MAEDA N, PALMARINI M, MURGIA C, et al. Direct transformation of rodent fibroblasts by jaagsiekte sheep retrovirus DNA [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(8): 4449-4454.
- [10] DUNGAL N. Experiments with jaagsiekte [J]. *Am J Pathol*, 1946, 22(4): 737-759.
- [11] 国际动物卫生组织(OIE). 国际动物卫生法典[M]. 农业部畜牧兽医局, 译. 北京: 兵器工业出版社, 2000: 285-289.
- [12] DeMARTINI J C, CARLSON J O, LEROUX C, et al. Endogenous retroviruses related to jaagsiekte sheep Retrovirus [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2003, 275: 117-137.
- [13] CARLSON J, LYON M, BISHOP J, et al. Chromosomal distribution of endogenous jaagsiekte sheep retrovirus proviral sequences in the sheep genome [J]. *J Virol*, 2003, 77(17): 9662-9668.
- [14] TOMONAGA K, COFFIN J M. Structure and distribution of endogenous noncotropic murine leukemia viruses in wild mice [J]. *J Virol*, 1998, 72(10): 8289-8300.
- [15] RILEY L K, METHOD A. For biotinylating oligonucleotide probes for use in molecular hybridizations [J]. *DNA*, 1986, 5(4): 333-336.
- [16] REUS K, MAYER M, SAUTER D. et al. Genomic organization of the human endogenous retrovirus HERV-K(HML-2, HOM) on chromosome 7 [J]. *Genomics*, 2001, 72(3): 314-320.
- [17] HSU T W, TAYLOR J M, ALDRICH C, et al. Tandem duplication of the proviral DNA in an avian sarcomavirus-transformed quail clone [J]. *J Virol*, 1981, 38(1): 219-223.