

3 猪圆环病毒基因的复制与转录

3.1 复制的启动 PCV1 的复制起点至少有 111 bp 长的片段(第 728 ~ 838 位核苷酸),位于 2 个主要的阅读框之间,其中核酸序列 CGGCAGCGG/TCAG 共有 2 个拷贝,可能是复制起始蛋白的结合部位^[3]。Steinfeldt 等^[4]将该复制起点片段克隆进 PUC19 质粒中,与利用 SV40 晚期启动子表达 rep 基因的质粒 pORF4A 一起转染 PK15 细胞,观察该片段的复制。复制起点 PCV1 与基因间区重叠,包含 rep 基因的启动子。在其顶点具有一个通用的茎环结构序列,该序列内有一个序列为 5'-TAGIATTAC-3' 的九聚体。除了圆环病毒外,许多通过滚环复制的复制子也具有此基序。毗邻茎环结构有 4 个重复的六聚体(5'-CGGCAG),是体外试验中 rep 基因表达产物的结合位点。复制的顺式作用起点中的各种元件和在反式作用 rep 蛋白氨基酸序列中复制型病毒的特征都表明圆环病毒有类似复制型病毒的复制机理,但尚未用试验来验证。

3.2 复制 PCV1 的 rep 基因是病毒 DNA 复制所必需的。rep 基因经剪切后在 4 个保守的基序处引入点突变因而导致 Rep 蛋白不能作为复制的启动子。与其他病毒的复制生活周期相比,单独 Rep 蛋白不能启动病毒复制,需要 rep 和 rep 一起组成 PCV1 的功能性复制启动因子。

Mankertz 等^[5]通过 DpnI 酶切分析来分析 rep 和 rep 在 PK15 细胞中启动含有复制子 DNA 片段质粒的复制能力。他们将另一个表达 rep 基因的质粒一起转染,发现 rep 和 rep 都不能单独启动质粒复制。只有这 2 个蛋白同时作用时,才观察到病毒复制。表明 PCV1 的复制依赖于 Rep 蛋白 2 种产物的表达。他们检测 PCV1 的 Rep 和 Rep 蛋白对 PCV2 复制起始位点的作用时,把表达 Rep 和 Rep 蛋白的质粒 pORF4A 与携带 PCV2 复制起点的质粒 pRL16.2 同时转染 PK15 细胞,从细胞中检测到阳性复制信号,表明 PCV1 的 Rep 和 Rep 蛋白也能启动 PCV2 的 DNA 复制起点。

3.3 转录 Cheung^[6]鉴定了在 PK15 细胞中合成的 PCV1 RNAs。共检测到 12 个 RNAs,包括病毒衣壳蛋白 RNA(CR),8 个 rep 相关 RNAs 的家族(即 rep、rep、rep3a、rep3b、rep3c、rep3d、rep3e、rep3f、rep3g、rep3h、rep3i、rep3j、rep3k、rep3l、rep3m、rep3n、rep3o、rep3p、rep3q、rep3r、rep3s、rep3t、rep3u、rep3v、rep3w、rep3x、rep3y、rep3z)和 3 个 NS 相关 RNAs(即 NS462、NS642 和 NS0)。rep 相关 RNAs 家族的 5' 和 3' 端核苷酸序列相同,并与 NS 相关 RNAs 的 3' 端序列相同。rep 能编码全长的复制酶相关蛋白,似乎是主要的转录本,它通过选择性剪切可产生其他 7 种 rep 相关 RNAs;NS462、NS642 和 NS0 似乎是由 ORF1 中 3 个不同的启动子转录而来。这 3 个启动子与 rep 启动子无关。序列配对分析表明,非致病性 PCV1 和致病性的 PCV2 (有 8 个 RNAs:rep、rep、rep3a、rep3b、rep3c、NS515、NS672 和 NS0)利用基因组中相似的基因表达元件来进行基因表达。PCV1 和 PCV2 的 rep、rep、rep3a、rep3b 和 NS0 在它们各自的系统中都表达。然而,rep3c 和 NS 相关 RNAs 却存在数量和质量的差异。

Cheung^[7]进一步研究了在猪肾细胞复制性感染的过程中合成 PCV2 的各种 RNAs,包括病毒核衣壳蛋白 RNA(CR),rep 相关 RNAs 家族(即 rep、rep、rep3a、rep3b 和 rep3c),3 个 NS 相关蛋白 RNA(即 NS515、NS672 和 NS0)等,发现 rep 相关 RNA 家族的所有成员的 3' 端和 5' 端也都具有相同的核苷酸序列,

3' 端的 200 个核苷酸序列与 NS 相关 RNAs 相同。rep 能编码复制相关蛋白(RepP),似乎是主要的转录子,通过选择剪切产生 rep、rep、rep3a、rep3b 和 rep3c。蛋白质序列分析对照发现,PCV2 的 RepP 和 Rep 蛋白与 PCV1 的 RepP 和 Rep 蛋白相同。已发现其是 DNA 病毒复制所必需的。此结果也表明 NS615、NS672 和 NS0 是由 ORF1 内 rep 启动子下游 3 个不同的启动子转录而来。

同时 Cheung^[8]也发现 PCV2 在 PK15 细胞复制的过程中,要合成 9 个 PCV2 特异的 RNAs。他们通过变异分析来研究每个 PCV2 转录单位在病毒蛋白合成和 DNA 复制中的作用。这些研究发现在衣壳 RNA 5' 端的引入终止子并不影响 Rep 相关抗原或病毒 DNA 合成。改变稀有 RNAs(rep、rep、rep3a、rep3b 和 rep3c)剪切位点的共有核苷酸或在丰度较大的 NS0 RNA 中引入终止子并不影响病毒蛋白合成和 DNA 复制。然而造成 Rep 和 Rep 蛋白变短的突变可引起病毒蛋白合成降低 99%,并完全关闭病毒 DNA 的复制。这些研究表明 Rep 和 Rep 确实是 PCV2 复制所必需的。

Rep 的转录起始于核苷酸(767 ± 10) bp 处。内含子(核苷酸 1 178 ~ 1 558)通过剪切除去。这导致 Rep 蛋白剪切后的形式 Rep 蛋白(19.2 kDa)的合成。因为发生移码突变,Rep 的最后 48 个氨基酸从全长的分子量为 35.6 kDa 的 Rep 蛋白的羧基端剪出去。PCV1 感染 PK15 后,检测到在 PCV1 感染细胞和转染含有 rep 基因的质粒的细胞当中出现全长和经剪切的 rep 基因转录子,用实时 PCR 来检测 rep 和 rep 转录子间的比率,通过比较不同时间下不同的比率,发现在转染后 12 h,检测到这 2 种转录子数量相同。24 和 36 h 后,rep 转录子占主导地位。在 48 ~ 96 h 后,rep 转录子的数量降低^[9]。

4 猪圆环病毒蛋白及其功能

4.1 病毒复制酶蛋白 ORF1 基因编码的 2 种蛋白(Rep 和 Rep)与病毒复制有关,在体外试验中分析了 Rep 和 Rep 蛋白结合 DNA 片段的能力。蛋白质电泳转移检测分析发现这 2 种蛋白结合由复制起始位点、茎环结构元件和 4 个六聚体重复的 H1/H2 和 H3/H4 组成的核苷酸序列。已经用剪短后的寡核苷酸,确定了 Rep 和 Rep 的最小结合位点。这 2 种 Rep 蛋白结合由茎环结构的左侧部分序列和 2 个内部六聚体 H1/H2 组成的寡核苷酸。当此最小结合位点的序列发生改变时,Rep 仍可结合到茎环结构序列改变后的模板上,而 Rep 不能,这表明 Rep 和 Rep 对结合序列的要求不同。在 1 个或多个六聚体重复子的寡核苷酸序列突变后分析其与 Rep 和 Rep 的结合,发现茎环结构存在时,六聚体 H1/H2 和 H3/H4 被替代结合^[2]。

为了研究 Rep 和 Rep 蛋白在细胞中的结合部位,这 2 种蛋白都融合到红绿荧光蛋白中。相应的质粒 pDs1red-rep 和 pEGFP-rep 转染到 PK15 细胞中。pDs1red-rep 含有经改造后的 rep 基因,剪切供体位点被灭活了,结果 rep 基因不能剪切,只有 Rep 蛋白融合到红荧光蛋白中,而经剪切后的 rep 基因在另一个质粒 pEGFP-rep 中与 GFP 融合表达,用这 2 种质粒同时感染 PK15 细胞发现 Rep 和 Rep 的荧光在感染细胞核的位置相同,表明 Rep 和 Rep 蛋白结合相同的位置^[2]。

(下转第 3584 页)

(上接第3581页)

用裂解技术分析发现 Rep 和 Rep 蛋白能形成同源和异源的复合物。当谷胱甘肽S 转移酶(GST) 融合 Rep/ Rep 蛋白加到 GST 柱上,并用组氨酸加尾的 Rep/ Rep 蛋白孵育,脱洗蛋白的蛋白质电泳发现 Rep 和 Rep 蛋白形成同源多聚复合物。而且也检测到异源多聚体的形成。

4.2 病毒衣壳蛋白 PCV2 的衣壳蛋白的分子量为 30 kD,与在纯化病毒中检测到的颗粒相似,电子显微镜观察到它形成衣壳样的颗粒。一般认为 cap 基因编码 PCV 的主要病毒结构蛋白。

Liu 等^[10] 用克隆的圆环病毒 DNA 转染猪视网膜细胞系 (VIDO R1) 之后,制备了传染性 PCV2。转染后 24 h 检测 cap 基因的表达,用 Cap 蛋白特异性多克隆抗体的蛋白质电泳检测发现表达量在感染期间一直在增加。而且, Cap 蛋白也在纯化的 PCV2 病毒中检测到,表明 Cap 是 PCV2 病毒衣壳的结构蛋白。用免疫荧光检测在 PCV2 感染细胞中对 PCV2 Cap 在细胞核中的定位进行了研究,分析一系列 Cap 蛋白的剪短突变体与绿荧光蛋白融合后的亚细胞位点定位发现 Cap 蛋白的核酸定位信号由氨基端 41 个氨基酸决定。通过定点突变对此区域的进一步分析表明在位点第 12 ~ 18 和第 34 ~ 41 位处碱性氨基酸的存在对 PCV2 Cap 蛋白的细胞定位很重要。

Larochelle 等^[11] 对 34 个加拿大分离株和 Genbank 数据库中的 36 个 PCV2 毒株的衣壳蛋白氨基酸进行了比较发现, cap 基因的核苷酸同源性在 91% ~ 100%, 然而氨基酸的同源性在 89% ~ 100%。衣壳蛋白的氨基酸序列比较发现,在第 59 ~ 80 残基,第 121 ~ 136 残基和第 180 ~ 191 残基变异

程度较大。有趣的是其中 2 个区域(第 59 ~ 80 残基,第 121 ~ 136 残基)与用 Pepscan 技术分析编码 ORF2 的基因后所鉴定的 2 个主要免疫反应区域(第 65 ~ 87 残基和第 113 ~ 147 残基)有关。承受选择免疫压力的 PCV2 衣壳蛋白的这些免疫决定区域是参与 PCV2 变异株出现的潜在区域。然而, PCV2 衣壳蛋白的这些区域并不存在和从 PMWS 或其他临床条件下鉴定的毒株有关的重复的或特定的氨基酸基序。

参考文献

- [1] TISCHER R, RASCH R, TOCHTERMANN G. Characterization of papovavirus and picornavirus-like particles in permanent pig kidney cell lines [J]. *Zbl Bakt Hyg I Abt Orig A*, 1974, 226:153-167.
- [2] MANKERIZ A, CALISKAN R, HÄTTERMANN K, et al. Molecular biology of porcine circovirus: analyses of gene expression and viral replication [J]. *Veterinary Microbiology*, 2004, 98:81-88.
- [3] MANKERIZ A, PERSSON F, MANKERIZ J, et al. Mapping and characterization of the origin of DNA replication of porcine circovirus [J]. *Virology*, 1997, 71(3): 2562-2566.
- [4] STERNFELDT T, HENSCHBUSCH T, MANKERIZ A. Rep and Rep of porcine circovirus type 1 bind to the origin of replication [J]. *Virology*, 2001, 291:152-160.
- [5] MANKERIZ A, HILLENBRAND B. Replication of porcine circovirus type 1 requires two proteins encoded by the viral rep gene [J]. *Virology*, 2001, 279:429-438.
- [6] CHEUNG A K. Comparative analysis of the transcriptional patterns of pathogenic and nonpathogenic porcine circoviruses [J]. *Virology*, 2003, 310:41-49.
- [7] CHEUNG A K. Transcriptional analysis of porcine circovirus type 2 [J]. *Virology*, 2003, 305:168-180.
- [8] CHEUNG A K. The essential and nonessential transcription units for viral protein synthesis and DNA replication of porcine circovirus type 2 [J]. *Virology*, 2003, 313:452-459.
- [9] MANKERIZ A, HILLENBRAND B. Analyses of transcription of porcine circovirus type 1 [J]. *Gen Virology*, 2003, 83:2743-2751.
- [10] LIU Q, TIKKOS K, NABUKL A. Nuclear location of the ORF2 protein encoded by porcine circovirus type 2 [J]. *Virology*, 2001, 285:91-99.
- [11] LAROCHELLE R, MAGAR R, ALLAIRE S D. Genetic characterization and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains from cases presenting various clinical conditions [J]. *Virus Research*, 2002, 90:101-112.