

A 型鸭肝炎病毒微基因组的构建

梁瑞英¹, 胡文², 李宁³, 缪秋红¹, 毕庄莉³, 孟春春¹, 李传峰¹, 陈宗艳¹, 刘光清^{1*}

(1. 中国农业科学院上海兽医研究所, 上海 200241; 2. 甘肃农业大学, 兰州 730050; 3. 安徽农业大学, 合肥 230036)

摘要: 为研究 A 型鸭肝炎病毒(DHAV)非编码区的结构和功能, 笔者拟构建该病毒的微基因组并对其进行初步鉴定。采用酶切的方法将萤火虫荧光素酶报告基因(*fLuc*)与 A 型鸭肝炎病毒的 ORF 进行替换; 并在 5' UTR 上游插入海肾荧光素酶报告基因 *Rluc* 作为内参基因; 同时还在 *Rluc* 上游引入锤头状核酶, 3' UTR 下游引入丁型肝炎核酶, 至此得到了含有双报告基因的 A 型鸭肝炎病毒微基因组(pRluc-fLuc)。将 pRluc-fLuc 转染 DF-1 细胞, 8 h 便可以检测到报告基因的表达, 24 h 表达量达到峰值。上述结果表明, 已经成功构建了 A 型鸭肝炎病毒微基因组, 这为进一步研究病毒非编码区的结构和功能以及病毒的翻译或复制的调控机理提供了良好的技术平台。

关键词: A 型鸭肝炎病毒; 微基因组; 非编码区

中图分类号: S852.659.6

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2014)04-0609-05

Construction of the Mini-genome of Duck Hepatitis A Virus

LIANG Rui-ying¹, HU Wen², LI Ning³, MIAO Qiu-hong¹, BI Zhuang-li³,
MENG Chun-chun¹, LI Chuan-feng¹, CHEN Zong-yan¹, LIU Guang-qing^{1*}

(1. Shanghai Veterinary Institution, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 200241, China; 2. Gansu Agricultural University, Lanzhou 730050, China; 3. Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract: In this study we constructed and identified the mini-genome of Duck Hepatitis A virus (DHAV), for analysis of the functional and structural properties of DHAV un-translated region (UTR). To construct a bicistronic of DHAV mini-genome (pRluc-fLuc), the ORF of DHAV was replaced by firefly luciferase (*fLuc*) gene through enzyme digestion and the Renilla luciferase (*Rluc*) gene was inserted before 5' UTR. We also added the hammerhead ribozyme ahead *Rluc* gene and the hepatitis delta virus ribozyme behind 3' UTR. We transfected the pRluc-fLuc into DF-1 cells, the *fLuc* gene expression could be detected at 8 hours post transfected (h. p. t.) and with the levels peaking was at 24 h. p. t. The results showed that the DHAV mini-genome was constructed successfully and can be used for explore the role of UTR in virus transcription and translation.

Key words: duck hepatitis a virus; mini-genome; un-translated region

A 型鸭病毒性肝炎 (duck virus a hepatitis, DVAH) 是由 A 型鸭肝炎病毒引起的, 主要感染 5 周龄以内的雏鸭, 以肝出血、肿大和高死亡率为特征的急性接触性传染病, 给中国养禽业带来较大威胁。

DHV 最早由美国学者 P. P. Levine 等分离到^[1]。1958 年, 中国首次报道 DHV 疫情, 但是直到 1984 年才完成病毒鉴定^[2]。2006 年, 研究人员完成病毒的全基因组序列测定, 标志着对该病的研究进入一

收稿日期: 2013-11-06

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31270194; 31101848; 31300141); 公益性农业科研专项 (201003012; 201303046; 2014JB14); “863” 计划 (2011AA10A200)

作者简介: 梁瑞英 (1989-), 山东菏泽人, 硕士生, 主要从事动物病毒分子生物学研究, E-mail: ruiyingliang89@163.com

* 通信作者: 刘光清 (1968-), 男, 安徽砀山人, 研究员, 主要从事病毒分子生物学研究, E-mail: liuqq@shvri.ac.cn

个崭新的阶段。

根据 DHAV 的形态学特征,国际分类委员会将其划分为小 RNA 病毒科,禽肝病毒属^[3]。研究表明,DHAV 基因组为单股正链 RNA 分子,全长约 7 690 nt,由 5' 和 3' 非编码区(un-translation region, UTR)和 1 个开放阅读框(ORF)组成。5' UTR 长度约 621 bp,含有翻译起始信号等重要元件;3'UTR 长度约 315 bp,含有与病毒翻译或复制调控有关的重要元件。DHAV 的 3' UTR 是小 RNA 病毒科中最长的,其它小 RNA 病毒则较短,人类鼻病毒的 3'UTR 只有 40 nt^[4]。推测 DHAV 的表达可能首先翻译出 1 个多聚蛋白前体,再经自身编码的蛋白酶裂解成 VP1、VP3、VP0、2A1、2A2、2B、2C、3A、3B、3C 和 3D 等成熟蛋白^[5-6],但迄今为止尚无试验支持该预测结果,而且关于 DHAV 的 3'UTR 结构对病毒翻译的影响的研究也尚属空白。反向遗传学的操作技术无疑为研究病毒的结构与功能及致病机理提供了良好的技术平台。本研究利用反向遗传学操作技术构建了 DHAV 的微基因组。

病毒的“微型基因组”(mini-genome)是只保留与病毒基因复制,转录及翻译相关的一些必需元件,用报告基因置换病毒编码基因的一种反向遗传操作系统^[7]。借助于该系统可以很方便地研究与病毒的复制或翻译相关的顺式作用元件和非编码区的结构与功能以及与病毒非编码区相互作用的反式作用因子^[8]等。相对于 RNA 病毒感染性克隆而言,微基因组的构建比较简单,而且不依赖于敏感细胞系,通过检测报告基因的表达变化可以客观评价病毒的翻

译或调控过程以及病毒拯救等,例如:赵伟等利用微基因组成功完成新城疫病毒的拯救^[9]。因此,微基因组已被广泛应用于许多 RNA 病毒基础研究之中。本文即构建了含有 DHAV 非编码区和报告基因的微基因组操作系统,为研究鸭肝炎病毒非编码区的结构和功能区提供了便利的操作平台。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 工具酶与试剂 ExTaq DNA 聚合酶、Solution I 连接酶、*Nhe* I、*Xho* I、*Eco*R I、*Not* I、*Apa* I 限制性内切酶,购自 TaKaRa 公司(大连);DAB 显色液,购自武汉博士德公司;去内毒素质粒抽提试剂盒为 OMEGA 公司产品;DNA 回收试剂盒和质粒抽提和纯化试剂盒购自 AxyGen 公司;羊抗 fLuc 多克隆抗体, Anti-Luciferase Ab 和荧光素酶检测试剂盒(Dual-luciferase Report Assay system 10-Pack) 购自 Promega 公司;胎牛血清和 DMEM 细胞培养液(GIBCO);HRP 标记的兔抗羊 IG 二抗,购自中山金桥公司(北京)。

1.1.2 菌种和质粒 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,购自北京全式金生物技术有限公司;pRLuc、PGL3 购自 promega 公司;DF-1 细胞由本实验室保存;pDHV (pCDNA3.1 含有 DHV 全基因组 cDNA 序列的重组质粒),由中国农业科学院上海兽医研究所保存。

1.1.3 引物的设计与合成 参照 DHAV 浙江株序列设计引物,由上海杰李生物技术有限公司合成(表 1)。

表 1 本文所使用的引物及其序列

Table 1 PCR primers used in this study

引物名称 Name	引物序列(5'→3') Sequence
Luc- <i>Xho</i> I +	5'-TCCCTCGAGATGGAAGACGCCAAAAACATAAAG-3'
Luc- <i>Eco</i> R I -	5'-AGAGAATTCTTACACGGCGATCTTCCGCC-3'
Rluc- <i>Nhe</i> I +	5'-CTAGCTAGCATGACTTCGAAAGTTTATG-3'
Rluc- <i>Pst</i> I -	5'-CCCGCTTTCAAACTGCAGTTATTGTTCATTTTTGAGAAC-3'
5'UTR- <i>Pst</i> I +	5'-CTGCAGTTTGAAAGCGGGTGCATGCATG-3'
5'UTR- <i>Xho</i> I -	5'-CCGCTCGAGGAAAGTCTACTGGTATTATAG-3'
3'UTR- <i>Eco</i> R I +	5'-ATAGAATTCAGTGTGGTCCGCAGGTA-3'
3'UTR- <i>Not</i> I -	5'-AAATAT <u>GCGGCCGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT</u> TAGGTAGGGTAGGGAATAGTA-3'
β -actin +	5'-CTCCATCCTGGCCTCGCTGT-3'
β -actin -	5'-GCTGTACCTTCACCGTTCC-3'
RT-fLuc+	5'-TTCGGTTGGCAGAAGCTATG-3'
RT-fLuc-	5'-GGTAGGCTGCGAAATGCCCA-3'

下划线为限制性酶切位点; *fLuc* 为荧光素酶报告基因; *Rluc* 为海肾荧光素酶报告基因; RZ 为核酶; “+”、“-”表示上下游引物

The underscores are the sites for restriction digest; *fLuc*, Firefly luciferase reporter gene; *Rluc*, Renilla luciferase reporter gene; RZ, Ribozyme; “+”, “-” mean the Sense, Anti-sense primer

1.2 方法

1.2.1 微基因组的构建 以质粒 pRluc 为模板,用 Rluc-*Nhe*I⁺和 Rluc-*Pst*I⁻引物扩增 *Rluc* 报告基因;以质粒 pDHV 为模板,用 5' UTR-*Pst*I⁺和 5' UTR-*Xho*I⁻为引物,扩增 DHV 5' UTR;*Rluc* 报告基因和 DHV 5' UTR 片段融合(Rluc, 5' UTR)。所扩增出的 Rluc, 5' UTR 上游引入 *Nhe*I 酶切位点,下游引入 *Xho*I 酶切点。将融合片段链接 19T 载体,鉴定正确后,经 *Nhe*I 和 *Xho*I 酶切,将该融合片段克隆到 pCDNA. RZ 载体,鉴定正确的克隆命名为 pRluc, 5' UTR。

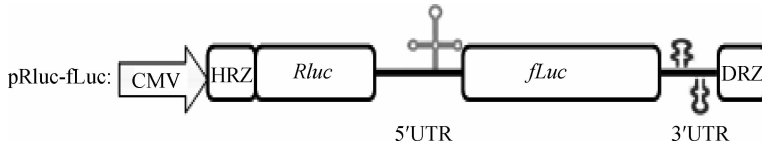


图 1 pRluc-fLuc 微型基因组结构示意图

Fig. 1 Construction of mini-genome of pRluc-fLuc

1.2.2 细胞转染 使用 OMEGA 质粒提取试剂盒进行重组质粒的提取,按 LipoFectaminTM2000 说明书进行转染,将 pRluc-fLuc 转染长满 90% 的 DF-1 细胞,5 h 后更换培养基,置于 37 °C 5% CO₂ 培养箱中进行培养观察。

1.2.3 RT-PCR 检测 收集 pRluc-fLuc 转染后培养 24 h 的 DF-1 细胞,提取 RNA。以特异引物 RT-fluc⁺/⁻进行 RT-PCR 检测 *fLuc*,以 β -actin⁺/⁻为引物检测 β -actin 作为内参。

1.2.4 Western blot 检测 将 pRluc-fLuc 转染 DF-1 细胞,培养 48 h,收集细胞裂解液进行 SDS-PAGE 电泳,然后转膜,以羊抗 fLuc 多克隆抗体 1:1 000 稀释作为一抗,兔抗羊 HRP-IgG 1:1 000 稀释作为二抗,Western blot 检测 fLuc 表达情况。

1.2.5 荧光素酶和海肾荧光素酶活性检测 pRluc-fLuc 转染 DF-1 细胞后收集不同时间点的样品,每个时间点设置 3 个重复,按照双荧光报告基因检测试剂盒说明书,收集 24 孔板中细胞裂解液,置于 -70 °C 保存待检。同时,以转染 pCDNA3.1 质粒的细胞作为阴性对照,用 GloMax 发光仪检测 fLuc 和 Rluc 的活性,即每 20 μ L 细胞裂解液上清加入 100 μ L Buffer I,检测 fLuc 活性,之后加入 100 μ L stop Buffer,检测 Rluc 的活性。

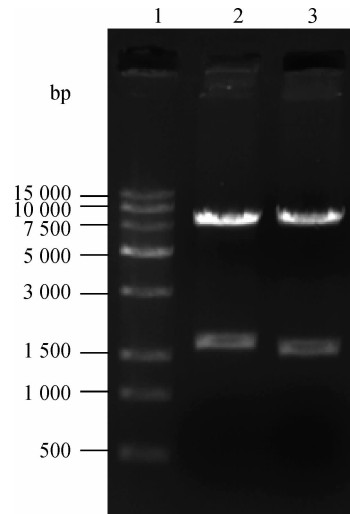
2 结果

2.1 微基因组构建与鉴定

为探讨鸭肝炎病毒 5' UTR 和 3' UTR 基因保

pCDNA. RZ 载体是参考丁型肝炎病毒核酶序列 (Genbank 登录号 AY705792. 1) 由上海杰李公司合成。以 pDHV 为模板,用 3' UTR-*Eco*RI⁺和 3' UTR-*Not*I⁻为引物,扩增 DHV 3' UTR;产物上游引入 *Eco*RI 酶切位点,下游引入 *Not*I 酶切位点。经 *Eco*RI 和 *Not*I 酶切连入 pRluc, 5' UTR,重组质粒命名为 pRluc, UTR。以 pGL3 为模板,以引物 Luc-*Xho*I⁺和 Luc-*Eco*RI⁻扩增荧光素酶报告基因 *fLuc*,插入 pRluc, UTR,经鉴定正确命名为 pRluc-fLuc。其结构示意图如图 1。

守序列和元件在病毒复制和翻译机制中的作用,本研究构建了含有荧光素酶基因和海肾荧光素酶基因的微基因组,构建的微基因组重组质粒经酶切(图 2)和测序鉴定,结果与预期的大小和序列相一致。



1. 15000 kb DNA 相对分子质量标准;2. *Xho*I/*Eco*RI 双酶切重组质粒;3. *Nhe*I/*Xho*I 双酶切重组质粒

1. 15000 kb DNA marker; 2. Recombinant plasmid digested with *Xho*I/*Eco*RI; 3. Recombinant plasmid digested with *Nhe*I/*Xho*I

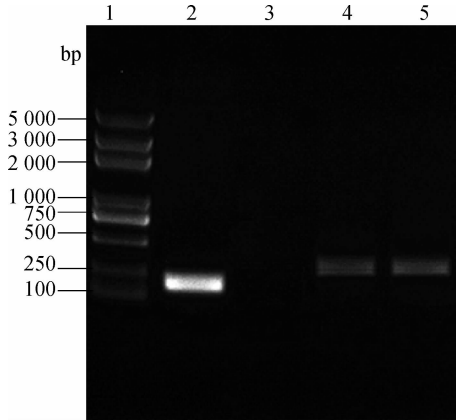
图 2 pRluc-fLuc 酶切鉴定结果

Fig. 2 Identification of pRluc-fLuc by enzymes digestion

2.2 RT-PCR 鉴定

以 RT-fLuc⁺和 RT-fLuc⁻为引物,将 pRluc-fLuc 和 pCDNA3.1 转染 DF-1 细胞后提取总 RNA 进行 RT-PCR 检测,结果显示:扩增 *fLuc* 的部分片

段长度约为 191 bp, β -actin 片段长度约为 267 bp, 大小与预期结果相符(图 3)。



1. 5000 kb DNA 相对分子质量标准; 2, 4. pRluc-fLuc 转染 DF-1 细胞, RT-PCR 分别检测 *fLuc* 和 β -actin; 3, 5. pCDNA3.1 转染 DF-1 细胞, RT-PCR 分别检测 *fLuc* 和 β -actin

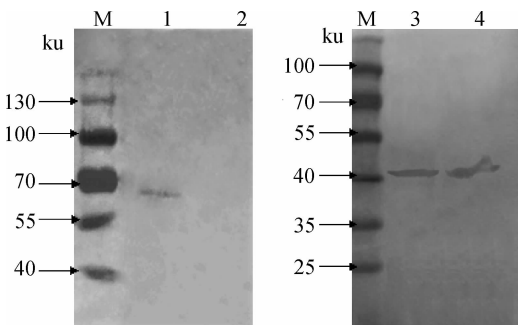
1. 5000 kb DNA marker; 2, 4. Sample of cell transfected with pRluc-luc; 3, 5. Negative control

图 3 RT-PCR 检测结果

Fig. 3 Identification of *fLuc*'s and β -actin's mRNA by RT-PCR

2.3 Western blot 检测

将 pRluc-fLuc 转染 DF-1 细胞, Western blot 检测结果显示有 1 条约 62 ku 的条带(图 4)与 fLuc 的蛋白理论值符合, β -actin 作为内参蛋白, 大小约为 42 ku。



M. 蛋白质相对分子质量标准; 1, 3. pRluc-fLuc 转染 DF-1 细胞, Western blot 分别检测 fLuc 和 β -actin; 2, 4. pCDNA3.1 转染 DF-1 细胞, Western blot 分别检测 fLuc 和 β -actin

M. Protein marker; 1, 3. Lysate of DF-1 cell transfected with pRluc-fLuc; 2, 4. Lysate of DF-1 cell transfected with pCDNA3.1

图 4 Western blot 检测 fLuc 和 β -actin 的表达

Fig. 4 Expression identification of fLuc and β -actin by western blot

2.4 荧光素酶报告和海肾荧光素酶活性检测

将 pRluc-fLuc 微基因组转染 DF-1 细胞, 检测

不同时间点 Rluc 和 fLuc 的活性。结果发现: Rluc 和 fLuc 均在 24 h 达到最大表达量(图 5)。上述结果表明: 本研究获得了可稳定表达 fLuc 的微基因组, 并且可以检测到 pRluc-fLuc 微基因组在 DF-1 细胞中的瞬时表达情况。

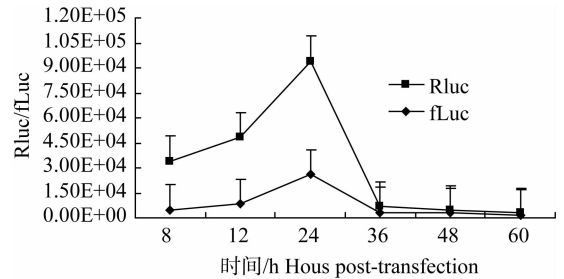


图 5 pRluc-fLuc 动力学曲线

Fig. 5 Expression kinetics of the mini-genome in DF-1 cells

3 讨论

DHV 是一种对雏鸭有强烈感染性和致死性的 RNA 病毒, 但是目前对于该病毒的研究缺乏可靠的体外细胞培养系统。传统的细胞培养方法在 DHV 体外培养研究中一直没有获得真正意义上的成功, 但各国学者利用反向遗传学技术在建立 DHV 细胞培养系统研究方面取得了一定进步。微型基因组系统, 含有表达病毒 NS 蛋白的基因和报告基因, 在该细胞模型中病毒的翻译与复制相互独立。

微基因组结构简单有效, 因此, 可以通过微型基因研究非编码区对病毒复制和翻译的影响。目前研究表明鸭肝炎病毒 5' 非编码区含有典型的 IRES 元件^[10]。已经发现很多依赖 IRES 元件进行翻译起始的 RNA 病毒, 如口蹄疫病毒、丙型肝炎病毒、肠道病毒和猪脑心肌炎病毒等。根据 IRES 的二级结构和功能, 可将其分为四大类: I 型主要包括心病毒属和口疮病毒属的成员; II 类主要存在于肠道病毒属和鼻病毒属; III 型多见于肝病毒属; IV 类存在于黄病毒属成员中^[11-14]。且已经证明 A 型 DHV IRES 的二级结构与 IV 类 IRES 的结构相近^[14]。由于 IRES 是通过形成复杂而稳定的 RNA 结构在反式作用因子存在的情况下富集核糖体来启动翻译的。因此, 可以利用微型基因组研究病毒 5' UTR 与反式作用因子的作用机制。目前, 还不能确定 A 型 DHV 的 3' 非编码区是否像脑心肌炎病毒一样含有 3 个茎环结构, 像人类的脊髓灰质炎病毒和口蹄疫病毒含有

2 个茎环结构^[4]。因此,可以利用构建的微型基因组进行鸭肝炎病毒 3'UTR 结构和功能的分析。

本研究构建了含有 *Rluc* 和 *fLuc* 双顺反子的微型基因组,*Rluc* 作为内参基因,能够更加准确的反映 *fLuc* 蛋白表达量,该微基因组 5'端和 3'端的核酶,保证基因组结构的精确性。通过蛋白水平检测和 RNA 水平检测证明了该微基因组系统有效。目前,国内外关于鸭肝炎病毒微型基因组的研究未见报道,本研究首次对鸭肝炎病毒微基因组表达系统进行初步探索,证明了该微基因组表达系统的可行性,为进一步研发 DHV 的翻译机制和非编码区的结构及功能等提供了良好的平台。

参考文献:

- [1] LEVINE P P, HOFSTAD M S. Duck disease investigation [M]. Annual Report of the New York State Veterinary College, Ithaca, 1945: 55-56.
- [2] 刘兆宇,程安春. 雏鸭病毒性肝炎的研究进展[J]. 中国家禽, 2002, 24(10): 6-9.
- [3] PAN M, YANG X, ZHOU L, et al. Duck Hepatitis A virus possesses a distinct type IV internal ribosome entry site element of picornavirus [J]. *J Virol*, 2012, 86(2): 1129-1144.
- [4] YAMASHITA T, SAKAE K, TSUZUKI H, et al. Complete nucleotide sequence and genetic organization of Aichi virus, a distinct member of the Picornaviridae associated with acute gastroenteritis in humans[J]. *J Virol*, 1998, 72(10): 8408-8412.
- [5] TSENG C H, KNOWLES N J, TSAI H J. Molecular analysis of duck hepatitis virus type 1 indicates that it should be assigned to a new genus [J]. *Virus Res*, 2007, 123(2): 190-203.
- [6] DING C, ZHANG D. Molecular analysis of duck hepatitis virus type 1 [J]. *Virology*, 2007, 361(1): 9-17.
- [7] HOENEN T, GROSETH A, DE KOK-MERCADO F, et al. Minigenomes, transcription and replication competent virus-like particles and beyond: reverse genetics systems for filoviruses and other negative stranded hemorrhagic fever viruses [J]. *Antiviral Res*, 2011, 91(2): 195-208.
- [8] EMONET S E, URATA S, DE LA TORRE J C. Arenavirus reverse genetics: new approaches for the investigation of arenavirus biology and development of antiviral strategies [J]. *Virology*, 2011, 411(2): 416-425.
- [9] ZHAO W, HU H, ZSAK L, et al. Application of the ligation-independent cloning (LIC) method for rapid construction of a minigenome rescue system for Newcastle disease virus VG/GA strain [J]. *Plasmid*, 2013, 70(3): 314-320.
- [10] LIU G, YANGÜEZ E, CHEN Z, et al. The duck hepatitis virus 5'-UTR possesses HCV-like IRES activity that is independent of eIF4F complex and modulated by downstream coding sequences[J]. *Virol J*, 2011, 8: 147.
- [11] PALMENBERG A C, SGRO J Y. Topological organization of picornaviral genomes: statistical prediction of RNA structural signals [J]. *Semin Virol*, 1997, 8(3): 231-241.
- [12] DORNER A J, SEMLER B L, JACKSON R J, et al. *In vitro* translation of poliovirus RNA: utilization of internal initiation sites in reticulocyte lysate [J]. *J Virol*, 1984, 50(2): 507-514.
- [13] GLASS M J, SUMMERS D F. Identification of a trans-acting activity from liver that stimulates hepatitis A virus translation *in vitro* [J]. *Virology*, 1993, 193(2): 1047-1050.
- [14] CHARD L S, KAKU Y, JONES B, et al. Functional analyses of RNA structures shared between the internal ribosome entry sites of hepatitis C virus and the picornavirus porcine teschovirus 1 Talfan [J]. *J Virol*, 2006, 80(3): 1271-1279.

(编辑 白永平)