

Expression of the M and N Protein Gene of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in *E. coli*

Cai Jiali² Cai Baoxiang¹ Jiang Pin¹

(*Animal Medical College, Nanjiang Agricultural University, Nanjiang 210095*)

Abstract The primers for RT-PCR were designed on the basis of M and N gene sequence of PRRSV. A gene fragment about 900 bp, which has digestion sites of EcoRI and BamHI, was amplified by RT-PCR. The M and N gene were cloned into expression vector pBV220 and one recombinant PBVMN was constructed which highly expressed a 34 kD protein in *E. coli* DH₅ α . The expressed product was identified by SDS-PAGE and Western blotting, which occupies 12% of total bacterial protein. The report has laid a basis for the development of molecular diagnostic antigen of PRRSV.

Key words Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), pBV220, Expression, M protein, N protein

牛泡沫病毒(BSV)对牛免疫缺陷病毒(BIV)的激活作用*

刘佳建 刘淑红 陈启民 耿运琪**

(南开大学生命科学学院, 天津 300071)

S 852.653

摘要 用瞬时表达分析等方法,证明牛泡沫病毒(BSV)3026中国毒株能在体外激活牛免疫缺陷病毒(BIV)基因表达,BSV3026编码的反式激活因子 Borf-1 行使这种激活作用。缺失突变分析表明,Borf-1 在 BIV LTR 上靶序列位于 -410/-115(+1 为转录起始位点)区域,但其中的 NF- κ B 位点(-367/-319)与这种激活作用无关,包括转录起点下游(RU5区)在内的-115/+204区域也与这种激活作用无关。该结果对研究 BIV 致病机理及防治 AIDS 有重要意义。

关键词 牛泡沫病毒(BSV),牛泡沫病毒反式激活因子(Borf-1),牛免疫缺陷病毒(BIV)

牛免疫缺陷病毒(bovine immunodeficiency virus, BIV)是反转录病毒科慢病毒属成员之一,与 HIV 在病毒形态、感染周期、基因组结构、表达调控等方面十分相似,能引起牛淋巴细胞增多症、中枢神经系统损伤及进行性消瘦等多种类艾滋(AIDS)症状^[1]。流行病学调查表明 BIV 分布范围广,普遍存在与其它病毒,如牛疱疹病毒 I 型(BHV-1)、牛病毒性腹泻病毒(BVDV)、牛泡沫病毒(bovine spumavirus, BSV)等的交叉感染,且交叉感染率高。这种交叉感染常常是导致 BIV 阳性牛类 AIDS 症状并导致死亡的原因^[1,2]。BHV、BVDV 对 BIV 激活作用的研究结果均证明了这一点^[3-5]。因此,探索病毒的交叉感染对 BIV 的影响,对研究 BIV 的病理及防治 AIDS 具有重要意义。

BSV 与 BIV 同属反转录病毒科,与 BIV 具有相似的基因组结构,但属泡沫病毒属。流行病学调查表明 BSV 与 BIV 有较高的交叉感染率,事实上 BSV3026 中国病毒株就是从 BIV 感染的牛体内分离到的^[2,6]。本研究在对 BSV3026 分子生物学研究取得了初步结果的基础上(另文发表),进一步研究证明 BSV 在细胞水平能激活 BIV,这种激活作用是由 BSV 编码的反式激活因子(Borf-1)所致。

1 材料与方 法

1.1 细胞培养 用含 10% 胎牛血清(天津生化制品厂生产)的 DMEM,37℃ 5% CO₂ 条件下培养本室分离的胎牛肺(FBL)细胞,用于繁殖病毒和转染。DMEM 购自 GIBCO/RBL。

1.2 质粒构建 BSV3026 感染的 FBL 细胞中提取的 Hirt DNA 为模板,用 PCR 方法克隆 BSV 反式激活因子(Borf-1)基因,将该基因克隆到本室保藏的 pRSVcat 质粒的 RSVLTR 之后替换 cat 基因构建 Borf-1 表达质粒

收稿日期:1998-06-15,修回日期:1998-08-10

* 国家自然科学基金和教育部重点科技项目

** 通讯作者

pBSVORF-1。该质粒表达 249 aa Borf-1 蛋白。BIV LTR 各缺失质粒(参见图 1)及 BIV 反式激活因子 Tat 表达质粒 pBIVTat 等为本室保藏^[4,8,9]。

1.3 质粒转染与荧光素酶活力测定 病毒 BSV3026 感染质粒转染 FBL 细胞时,先用质粒转染 FBL 细胞 24 h 后加入培养好的病毒,其转染步骤参见 GIBCO/BRL 公司产品说明书。荧光素酶(Luc)活力测定参见 Promega 公司产品说明书。

1.4 β gal 内对照系统 所有转染均设 β gal 内对照系统。pCMV β gal 质粒为本室保藏。ONPG- β -galactosidase 购自 Sigma 公司。

2 结果

2.1 BSV3026 对 BIV LTR-Luc 整体水平上的激活作用

为了证明 BSV3026 是否能激活 BIV 基因表达,本研究首先用 pBIV LTR-Luc 质粒与 pUC18(对照)或 pBIV Tat 共转染 FBL 细胞;用病毒(感染 FBL 细胞的 BSV3026,即 FBL/BSV3026)分别感染 pBIV LTR-Luc 质粒单独转染和 pBIV LTR-Luc 与 pBIV Tat 共转染的 FBL 细胞;其中病毒感染质粒转染 FBL 细胞时,在质粒转染 24 h 时后按 FBL/BSV3026 与 FBL 细胞(铺板时的计数)为 1:8 的比例加入病毒,瞬时表达分析如表 1 所示。结果表明 BIV LTR 能被自身的反式激活因子 Tat 激活(25 倍),同时还能被 BSV3026 单独(11 倍)或协同激活(pBIV Tat + FBL/BSV3026, 37 倍)。这说明 BSV3026 能在整体水平上激活 BIVLTR 起始 Luc 基因表达,并能协同 BIV Tat 激活 BIV LTR。

表 1 BSV3026 对 BIVLTR 的激活作用

Table 1 Activation of the BIV LTR by BSV3026

共转染(或感染) Cotransfecting plasmid	Luc 值 ^a Luc activity of pBIVLTR-Luc ^a	激活倍数 Fold increase
pUC18	530 ± 28	
pBIV Tat	13420 ± 807	25
FBL/BSV3026	5970 ± 115	11
pBIV Tat + FBL/BSV3026	19550 ± 1016	37

^a每孔转染用 1.0 μ g pBIVLTR-Luc, 1 μ g pUC18(或 pBIV Tat), 0.6 μ g pCMV β gal 与 3 μ g Lipofect AMINE (GIBCO/BRL)混合。每样品设三孔平行对照。转染 48 h 后裂解细胞测荧光素酶(Luc)值。Luc 值经 β -gal 内对照校正后,平行组之间变异系数 < 10%。

^aEach experiment was done at least 3 times in triplicate and each plate was transfected with 1 μ g of pBIVLTR-Luc, 1 μ g of pUC18 or pBIV Tat, 0.6 μ g pCMV β gal and 3 μ g Lipofect AMINE (GIBCO/BRL). The cells were harvested to determine Luc activity at 48 h after transfection. Luciferase activities were normalize for the amount of β -galactosidase. Generally, less than 10% variation in replicate samples was observed.

2.2 BSV3026 的反式激活因子 Borf-1 对 BIVLTR 的激活作用

为了探寻 BSV3026 对 BIVLTR 整体水平的激活作用是否与 BSV 的反式激活因子 Borf-1 有关,我们构建了 Borf-1 的表达质粒 pBSVORF-1,将它与 pBIV LTR-Luc 系列缺失质粒^[4,8,9]共转染 FBL 细胞,瞬时表达结果见图 1。可以看出 BSV 的反式激活因子 Borf-1 能激活 BIVLTR 起始 Luc 基因表达,激活倍数为 11.3;当 BIVLTR 从 5'端缺失到 -115 时,激活倍数依次下降至 8.9、7.4、5.2 直到 0.9(即缺失到 -115 失去激活作用);继续从 5'端缺失至 -52(-52/+204)同样不能被 Borf-1 激活(激活倍数为 1.1);当 3'端缺失 +32/+204 及 -2/+204(整个

RU5 区),即质粒 - 410/+ 32 和 - 410/- 2,能被 Borf-1 激活(激活倍数分别为 8.7 和 9.5)。这些结果表明 Borf-1 在 BIVLTR 上的靶序列位于 - 410/- 115 区域, - 115/+ 204(包括整个 RU5 区)与激活作用无关。

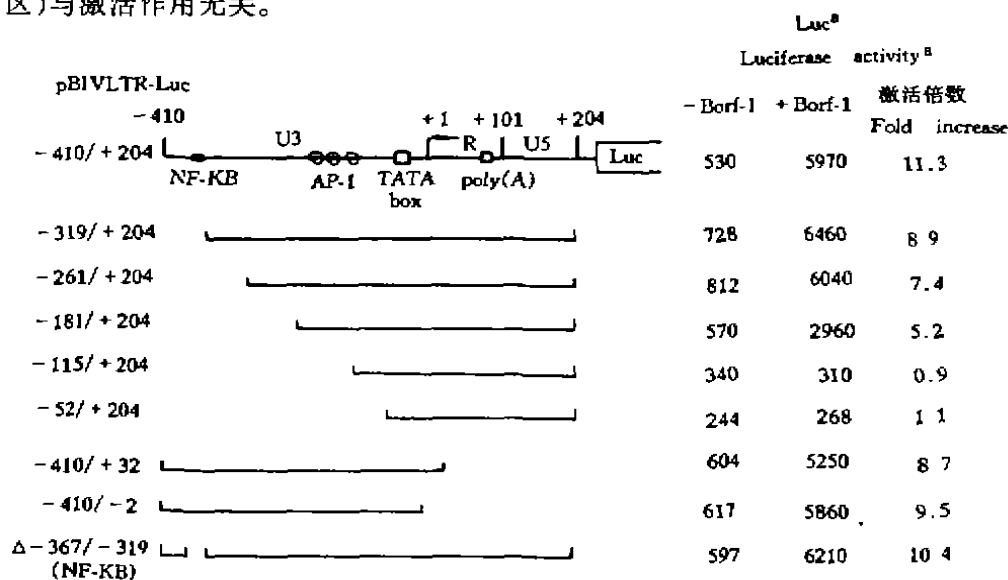


图 1 BSV Borf-1 对 BIVLTR 的激活作用。LTR 结构及质粒构建参见文献 4, 8, 9。+ 和 - 表示有或无 pBSVORF-1 共转染。注* 同表 1。

Fig. 1 Activation of the BIV LTR by the Borf-1 of the BSV. The diagram (upper) shows some regulatory elements in the BIV LTR, Luc: Firefly luciferase gene. Lines (lower) represent the BIV LTR regions remaining after deletion^[4, 8, 9]. + and -, presence or absence of Borf-1. *as in the legend of table 1.

研究表明 NF-κB 位点(- 367/- 319)在 BIV Tat 反式激活功能中起重要作用^[8, 9],为了研究该位点是否参与 Borf-1 对 BIV LTR 的反式激活作用,将缺失该位点的质粒 Δ- 367/- 319 (NF-κB)与 Borf-1 表达质粒共转染,结果发现其激活倍数(图 1 中的 10.4)比保留该位点时的激活倍数(11.3)几乎没有变化。这说明 Borf-1 对 BIV LTR 的反式激活作用与 NF-κB 位点无关。

2.3 Borf-1 与 Tat 协同激活 BIV LTR 起始基因表达

为了研究 Borf-1 对 BIV LTR 的激活是否与 BIV 自身的反式激活因子 Tat 具有协同作用,将质粒 pBIV LTR(- 410/+ 204)-Luc、pBIV LTR(- 115/+ 204)-Luc 分别与 BIV Tat, BSV Borf-1 表达质粒共转染,结果见表 2。从表 2 可以看出 Borf-1 单独能激活 - 410/+ 204 起始 luc 基因表达(11 倍),而不能激活 - 115/+ 204;Borf-1 与 Tat 共同激活 - 410/+ 204 倍数(39)超过了两者单独激活倍数(11 和 25)之和,而对 - 115/+ 204 则没有这种作用。这表明 Borf-1 对 BIV 的激活作用与 BIV Tat 具有协同作用,同时也进一步证明 Borf-1 对 BIV LTR 激活作用靶序列位于 - 410/- 115,而与 - 115/+ 204 无关。

3 讨论

本研究在过去工作的基础上^[1-9],结合新近对新分离到的 BSV3026 中国毒株的研究结果

(另文发表),首次证实 BSV 在细胞水平上能对 BIV 行使激活功能,这种激活作用是由 BSV 的反式激活因子 Borf-1 所致,且 Borf-1 与 BIV 自身的反式激活因子能协同激活 BIV。这表明 BSV 超感染与 BHV、BVDV 等一样能激活 BIV 基因表达^[3-5],并可诱导 BIV 携带者产生类 AIDS 症状甚至死亡,从一个侧面解释了自然界中普遍存在 BSV 自发感染而致 BIV 阳性个体死亡这一现象^[2,8],也有助于对免疫缺陷病毒致病机理的探索。

深入研究表明,BSV 对 BIV 的激活作用源于 BIV LTR 上存在 BSV 反式激活因子 Borf-1 的应答区(-410/-115),在 BIV Tat 调控中起重要作用的 NF- κ B 位点(-367/-319)缺失并不影响 BSV Borf-1 的激活功能,且该区也不包括 BIV 自身的反式激活因子 Tat 的靶序列(-2/+204)^[8,9]。此外 BIV 及 Tat 均不激活 BSV LTR 起始基因表达(待发表)。这些结果说明 Borf-1 与 Tat 对 BIV 的激活机理相差很大,也反映了泡沫病毒属(BSV)与慢病毒属(BIV)基因表达调控机制的不同。

事实上,调控机理相差甚远的病毒之间的相互作用现象是普遍存在的。现已证明,AIDS 病人常常伴随有其他病毒的超感染,例如单纯疱疹病毒 1 型(HSV-1)、人疱疹病毒 6 型(HHV-6)、巨细胞病毒(CMV)、乙肝病毒(HBV)等 DNA 病毒都能编码蛋白直接或间接激活 HIV LTR 的不同功能区^[7]。不仅如此,与 HIV 同属反转录病毒科的 HTLV、人泡沫病毒(HFV)等均能激活 HIV LTR 起始基因表达^[11,12]。Lee 等和 Keller 等研究表明 HFV 反式激活因子 Bel-1 在体外能激活 HIV LTR,其应答序列位于 HIV LTR -158/-118 之间(+1 为转录起点),紧邻 HIV LTR 核心增强子。该区域与已知的转录调控位点缺乏同源性,而且 HIV LTR 缺失其基因表达调控的功能位点 NF- κ B 时,Bel-1 对其激活作用可以提高 100 倍。令人更感兴趣的是,将 -158/-118 片段克隆至异源 LTR 启动子上,Bel-1 仍然能激活使其表达,且与该片段相对于启动子的方向无关。这些说明 HIV LTR -158/-118 即为 Bel-1 应答元件(TRE),并具有类似增强子的特点。并且,Bel-1 对 TRE 的应答不需要任何 HIV Tat 应答元件的作用,这说明 Bel-1 与 Tat 对 HIV 的激活作用机理也不相同,这与本研究结果类似。比较 Bel-1 在 HIV LTR 上的 TRE 与 Bel-1 在 HFV LTR 上的 TREs 发现 HIV TRE 区(-124/-116)与 HFV TREs (-134/-126)有 9 个保守的核苷酸序列。这说明 Bel-1 对 HIV 的激活作用至少与 Bel-1 对 HFV 的激活作用部分相似,即通过识别 LTR 上特异序列行使功能^[11-14]。BIV Borf-1 应答区(-410/-115)与 BSV Borf-1 靶点(TRE)之间是否也有类似的序列,还有待深入研究。

体内研究也证明了 HFV 对 HIV 的激活作用,而且证明这种作用需要 HIV LTR NF- κ B 位点(这点与 Lee 等、Keller 等体外研究结果明显有别^[15])。研究表明转基因鼠体内 HFV 对 HIV 的激活是一种协同作用,这种作用的机理,一方面可能是因为 HFV 能包裹 HIV 基因组而扩大其宿主范围,HFV 毒株形成的特殊性支持这种设想^[15,16];另一方面可能是 HIV 携带者免疫力低下,使 HFV 机会感染增强而协同加速 AIDS 进程。从本研究结果推测自然状态下

表 2 BSV Borf-1, BIV Tat 对 BIV LTR 的激活作用

Table 2 Activation of the BIV LTR by Borf-1 and Tat

共转染质粒 Cotransfecting plasmid	Luc 值 ^a	
	Luc activity of pBIV LTR-Luc ^a	
	-410/+204	-115/+204
pUC18	530	340
Borf-1	6970(11)	310(0.9) ^b
Tat	13420(25)	13670(40)
Tat + Borf-1	20620(39)	14390(42)

^a:同表 1;^b:括号内为激活倍数。

^a: as in the legend of table 1 ^b: fold increase

BSV 与 BIV 共感染可能也会协同激活 BIV, 加速 BIV 携带个体的类 AIDS 进程并死亡, 其机制是否与上述机理相同尚需研究证实。

最后需指出的是 FBL 细胞可能是 BSV3026 的最佳宿主之一, 但不一定是 BIV 的最佳宿主^[6,7,17,18], 而不同的宿主细胞或细胞系及不同的毒株都会影响激活效果^[11,12,19]。这可能是本研究中 BSV 对 BIV 激活倍数不高的原因之一, 也不排除可能 BSV 对 BIV 的激活作用本来就较弱。此外, 研究反式激活因子(Borf-1)在异源 LTR 上的精确靶点, 需在本研究的基础上进一步缩小靶点范围并引入点突变, 这也是深入进行 BSV 与 BIV 共感染机理研究的方向之一。

参 考 文 献

- 1 陈荷新, 耿运琪, 曾毅. 牛免疫缺陷病毒——BIV. 病毒学报, 1995, 11(2):186~193
- 2 耿运琪, 纪水刚, 陈荷新等. 从我国进口奶牛及其后代中发现牛免疫缺陷病毒(BIV)的自发感染. 病毒学报, 1994, 10(4):321~326
- 3 Yunqi Geng, Kashanchi F, Wood C. Activation of bovine immunodeficiency-like virus expression by bovine hepesvirus type 1. *Virology*, 1992, 187:832~836
- 4 梁臣, 耿运琪, Wood C. 牛疱疹病毒 I 型前早期基因 BICPO 的表达对牛免疫缺陷病毒 LTR 的反式激活作用. 病毒学报, 1995, 11(2):140~150
- 5 刘淑红, 陈启民, 陈家童等. 牛病毒性腹泻病毒(BVDV)对牛免疫缺陷病毒(BIV)的激活作用. 病毒学报, 1997, 13(3):229~234
- 6 刘淑红, 陈荷新, 陈家童等. 牛泡沫病毒(BSV)3026 毒株的分离及分子生物学鉴定. 病毒学报, 1997, 13(2):140~145
- 7 刘淑红. RNA 病毒对牛免疫缺陷病毒基因表达的影响 [博士论文], 天津, 南开大学, 1997.
- 8 梁臣, 耿运琪. 牛免疫缺陷病毒反式激活因子作用机理的研究. 病毒学报, 1995, 11(4):327~335
- 9 梁臣. 牛免疫缺陷病毒长末端重复区启动子的结构与基因表达. [博士论文], 天津, 南开大学, 1995
- 10 Jacobs RM, Pollari FL, McNab WB *et al.* A serological survey of bovine syncytial virus in Ontario: associations with bovine leukemia and immunodeficiency-like virus, production records, and management practices. *Can J Vet Res*, 1995, 59(4):271~278
- 11 Lee AH, Lee KJ, Kim S *et al.* Transactivation of human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat-directed gene expression by the human foamy virus bel protein requires a specific DNA sequence. *J Virol*, 1992, 66(6):3236~3240
- 12 Keller A, Garrett ED, Cullen BR. The bel-1 protein of human foamy virus activates human immunodeficiency virus type 1 gene expression via a novel DNA target site. *J Virol*, 1992, 66(6):3946~3949
- 13 Erlwein O, Rethwilm A. BEL-1 transactivator responsive sequences in the long terminal repeat of human foamy virus. *Virology*, 1993, 196:256~269
- 14 Leek KJ, Lee AH, Sun YC. Multiple positive and negative cis-acting elements that mediate transactivation by bel-1 in the long terminal repeat of human foamy virus. *J Virol*, 1993, 67(4):2317~2326
- 15 Marmo S, Kretschmer C, Brandner S *et al.* Activation of HIV transcription by human foamy virus in transgenic mice. *Lab Invest*, 1995, 73(1):103~110
- 16 Fischer N, Heinkelein M, Lindemann D *et al.* Foamy virus particle formation. *J Virol*, 1998, 72(2):1610~1615
- 17 刘淑红, 陈荷新, 耿运琪等. 牛免疫缺陷病毒(BIV)92044 毒株的分离及鉴定. 病毒学报, 1997, 13(4):357~363
- 18 Holzschu D, Delaney MA, Renshaw RW *et al.* The nucleotide sequence and spliced pol mRNA levels of the nonprimate spumavirus bovine foamy virus. *J Virol*, 1998, 72(3):2177~2182

Activation of Bovine Immunodeficiency Virus (BIV) Gene Expression by Bovine Spumavirus (BSV)

Liu Jiajian Liu Shuhong Chen Qimin Geng Yunqi

(College of Life Science, Nankai University, Tianjin 300071)

Abstract Bovine spumavirus (BSV) 3026 China strain, which was isolated by authors, encodes the transcriptional transactivator Borf-1. The Borf-1 protein, as well as the BSV3026, can transactivate the gene expression directed by bovine immunodeficiency virus long terminal repeat (BIV LTR) in transient transfection assays. To identify the specific region in BIV LTR responsible for the Borf-1 action, it was examined that the effect of the Borf-1 on firefly luciferase (Luc) gene expression in transfected cells with a series of mutant pBIV LTR-luc plasmids. The region between -410 and -115 from the transcription initiation site was identified as responsible for the transactivation by the Borf-1. However, the regions between -367 and -319 (NF- κ B site), between -52 and +204, which are very important in the activation of BIV transcription, are dispensable for the Borf-1-mediated transactivation.

Key words Bovine spumavirus (BSV), Transcriptional transactivator of the BSV (Borf-1), Bovine immunodeficiency virus (BIV)