

## 绵羊肺腺瘤病毒中国 NM 株部分 gag 基因的克隆与序列分析\*

刘淑英<sup>1\*\*</sup>, 马学恩<sup>1</sup>, 李景鹏<sup>2</sup>, 张九河<sup>1</sup>

(1. 内蒙古农业大学动物科学与医学学院, 内蒙古呼和浩特 010018; 2. 东北农业大学生命科学学院基因部, 黑龙江哈尔滨 150030)

Partial Cloning and Sequence Analysis of the gag Gene of  
Jaagsiekte Sheep Retrovirus NM StrainLIU Shu-ying<sup>\*\*</sup>, MA Xue-en, LI Jing-peng<sup>2</sup>, ZHANG Jiu-he

(1. College of Animal Science and Medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018, China; 2. College of life science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

**Abstract:** In order to amplify partial gag gene of Jaagsiekte sheep retrovirus Inner Mongolia strain, a pair of primers was designed according to the GenBank sequence. The fragment of gag gene was obtained by polymerase chain reaction (PCR), and the gene was cloned into PMD-18 T vector and identified by EcoR I and Sal I digestion. The nucleotide and amino acid sequences of NM strain partial gag gene were compared with the counterpart sequences of South Africa strain (Accession No. NC-001494) and USA strain (Accession No. AF105220). The nucleotide and amino acid homology of partial gag gene were 83%, 81.5% and 84%, 83%, respectively. This is the first JSRV nucleotide sequence reported in China.

**Key words:** Jaagsiekte sheep retrovirus; Partial gag gene; Clone; Sequencing analysis.

**摘要:** 参照 GenBank 中已发表的绵羊肺腺瘤病毒的基因序列, 设计合成一对引物, 对绵羊肺腺瘤病毒 (Jaagsiekte sheep retrovirus, JSRV) 内蒙株的 gag 基因中主要编码 CA 蛋白的基因段进行 PCR 扩增, 产物经琼脂糖凝胶电泳分析, 呈现一条约 897bp 的特异条带, 将其回收后克隆入 pMD-18 T 载体中, 并进行序列测定与分析。结果表明, 与南非株 (基因序列号 NC-001494) 的 gag 基因序列比较, 核苷酸同源率为 83%, 推导出的氨基酸同源率为 84%。与美国株 (基因序列号 AF105220) 的 gag 基因序列比较, 核苷酸同源率为 81.5%, 氨基酸同源率为 83%。这是我国首次报道的绵羊肺腺瘤病毒的 gag 基因的一段序列, 为我国科研工作者进行更深入的研究奠定基础。

**关键词:** 绵羊肺腺瘤病毒; gag 基因; 克隆; 序列分析

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1003-5152(2004)02-0133-04

绵羊肺腺瘤病毒 (Jaagsiekte sheep retrovirus, JSRV) 是引起绵羊肺腺瘤病 (Sheep pulmonary adenomatosis, SPA) 的主要病原。SPA 是绵羊的一种慢性、进行性、接触传染性的肺脏肿瘤性疾病, 是以患羊咳嗽、呼吸困难、消瘦、大量浆液性鼻漏, II 型肺泡上皮细胞和无纤毛细支气管上皮细胞 (Clara cells) 肿瘤性增生为主要特征的疾病。此病自 1825 年首次报道于南非后, 世界上除澳大利亚、

新西兰和冰岛外几乎所有养羊业发达的国家都有该病的发生与流行, 严重影响着养羊业的发展。此外, 有研究表明<sup>[2, 6]</sup>, 该病与人的细支气管—肺泡癌 (bronchiolo-alveolar carcinoma, BAC) 在临床症状、病理组织学特征及超微病变方面极为相似, SPA 病羊可作为研究 BAC 的理想动物模型。目前, SPA 的研究已成为人类医学界和兽医学界的热点。

JSRV 属反转录病毒科 D 型反转录病毒属, 肺

收稿日期: 2003-09-25, 修回日期: 2003-11-18

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30260083); 内蒙古自治区重点领域资助项目 (ZL9903)

\*\* 通讯作者: 刘淑英 (1968-), 女, 内蒙古籍, 副教授, 在读博士, 从事动物生理学病理学方面的科研与教学工作。

Corresponding author. Tel: 0471-4308913, E-mail: Liushuying@hotmail.com

泡上皮细胞是病毒复制的主要场所<sup>[3]</sup>。基因组 RNA 为线性单股正链 RNA, 全长 7642bp, 基因组 RNA 的编码区内有相互重叠的 *gag*, *pro*, *pol*, *env* 基因的典型结构。*gag* 基因编码病毒的衣壳蛋白(CA), 核衣壳蛋白(NC)和基质蛋白(MA), 而 *gag* 基因编码区的第 513-1400bp 段主要编码衣壳蛋白, 衣壳蛋白构成病毒粒子双层壳的内壳, 与病毒的抗原性有关。

本研究对 *gag* 基因编码区的 513-1400bp 段(以下用 JSRV-2 表示)进行扩增, 克隆并进行序列分析, 为进一步探讨该基因序列与国外已报道序列的同源性及其编码的衣壳蛋白与致病机制的关系及对该基因进行表达奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

绵羊肺腺瘤病毒材料取自内蒙古某羊场自然感染病例(经病理解剖、病肺组织切片和电镜负染色技术观察鉴定)采集的肺脏, 病毒暂命名为 NM 株。质粒是 pMD18-T 载体, 购自大连宝生物有限公司, 菌株 JM109 由东北农业大学生命科学学院基因部保存。*EcoR* I、*Sal* I 等限制性内切酶, TaKaRa Ex Taq DNA 聚合酶, 为大连宝生物有限公司产品, 质粒抽提试剂盒, 胶回收试剂盒为上海华舜生物有限公司产品。

### 1.2 引物设计

参考 GenBank 上已发表的 JSRV 全基因序列, 严格根据引物设计原则设计如下引物。

P1: 5'-TGATTCGTGACTGCCTGGAT-3'

P2: 5'-GAGCCGCATTCGATATTTGT-3'

该引物由北京赛百盛生物有限公司合成。

### 1.3 JSRV-2 基因段的扩增

参照常规方法提取含 JSRV 的肺泡上皮细胞总 DNA。

PCR 反应体系(共 50 $\mu$ L)取模板 DNA(0.3 $\mu$ g/ $\mu$ L) 3 $\mu$ L, 10 $\times$ Buffer 5 $\mu$ L, dNTP(2.5mmol/L) 4 $\mu$ L, P<sub>1</sub> 2.5 $\mu$ L, P<sub>2</sub> 2.5 $\mu$ L, Taq 酶 1 $\mu$ L。反应参数: 预变性 95 $^{\circ}$ C 5 min, 变性 94 $^{\circ}$ C 1 min, 退火 48 $^{\circ}$ C 1 min, 延伸 72 $^{\circ}$ C 2 min, 30 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min, 最后设置 4 $^{\circ}$ C, 反应结束后取 4 $\mu$ L PCR 产物在 1% 的琼脂糖凝胶上电泳检测。

### 1.4 JSRV-2 的克隆

PCR 产物纯化: 取 PCR 产物 90 $\mu$ L 在 1% 的琼脂糖凝胶上电泳后, 小心快速切下目的条带, 按上海华舜生物有限公司的胶回收试剂盒回收纯化, 并

在 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

连接反应(10 $\mu$ L 体系): PCR 胶回收产物 4 $\mu$ L, Solution I 5 $\mu$ L, pMD18-T vector 1 $\mu$ L, 15 $^{\circ}$ C 连接过夜。转化: 先制备 JM109 感受态细胞, 然后将 10 $\mu$ L 连接产物加入 100 $\mu$ L 新制备的感受态细胞中, 冰浴 30min, 42 $^{\circ}$ C 热激 90s, 再冰上冷却 2 min, 加入 400 $\mu$ L 37 $^{\circ}$ C 的 LB 液体培养基, 37 $^{\circ}$ C 摇床培养 1h, 加入 X-gal 16 $\mu$ L(20mg/mL)和 IPTG(100mmol/L) 8 $\mu$ L 混匀, 轻轻涂布在氨苄青霉素抗性的 LB 琼脂平板上, 37 $^{\circ}$ C 温箱中培养 10 h, 待长出菌落。

### 1.5 阳性质粒鉴定

质粒的提取: 取过夜生长出的白色单菌落, 分别加入 LB 液体培养基, 摇床培养。用上海华舜生物有限公司生产的质粒提取试剂盒分别小量提取质粒。酶切鉴定: 将提取的质粒分别用 *EcoR* I, *Sal* I 进行单、双酶切鉴定, 能切出目的片段的认为是阳性质粒。PCR 鉴定: 将小量提取的质粒取 1 $\mu$ L 作为 PCR 反应的模板, 进行上述 PCR 扩增反应, 扩增条件, 反应参数不变。用 marker 参照, 能扩出目的片段大小的为阳性。

### 1.6 测序

将鉴定为阳性质粒的菌落, 再摇菌培养, 取 1mL 新培养菌液邮寄上海联合生物有限公司测序部双向测序。

## 2 结果

### 2.1 JSRV-2 基因扩增结果

绵羊肺腺瘤病毒自然感染的肺组织细胞基因组 DNA OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>=1.86, 无小分子 DNA 降解, 其中含有整合进去的前病毒 DNA。以高纯度、较大分子 DNA 为模板, 按照上述的扩增条件得到 897bp 的 DNA 片段(如图 1)。

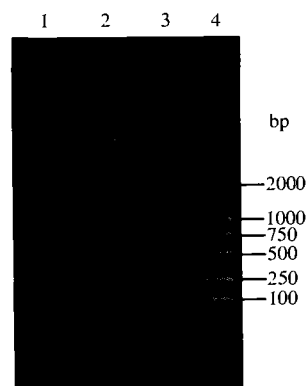


图 1 JSRV-2 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR products of JSRV-2

1. Negative control; 2/4,  $\lambda$ -EcoT14I and marker DL 2 000; 3, JSRV-2 gene.

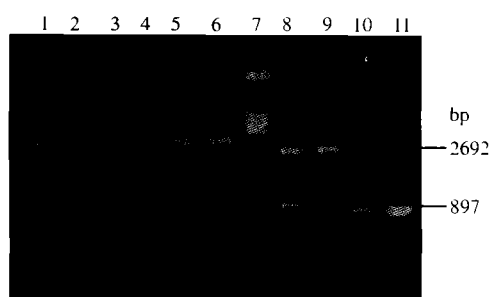


图2 JSRV-2 重组质粒酶切鉴定和 PCR 鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid by restriction endonuclease and PCR

1. Digestion of blank Plasmid with *EcoRI*: 2/3/4. Digestion of the plasmid with *EcoRI*: 5/6. Digestion of recombinant plasmid by *Sall*: 7.  $\lambda$ -*EcoT14I* digest marker: 8,9. Digestion of the plasmid by *EcoRI* /*Sall*: 10/11. Identification of the plasmid by PCR.

## 2.2 重组质粒 pMD-18 T/JSRV-2 的鉴定

少量抽提重组质粒, 以 *EcoRI*、*Sal I* 单、双酶切, 单酶切后, 产生约 3589bp 的线性化质粒条带, 双酶切后, 产生 2692 bp 和 897 bp 的 2 条带。用空质粒 *EcoRI* 单酶切后, 产生与线性 pMD-18 T 载体大小 2692 bp 相同的条带, 进一步证明重组质粒是阳性 (如图 2)

## 2.3 JSRV-2 测序及序列分析比较结果

以 pMD-18T 载体上的 M13 Primers 进行 DNA 双向测序, 测得绵羊肺腺瘤病毒 NM 株 gag 基因

JSRV-2 段基因全长 897bp, 编码 298 个氨基酸, 分子量为 32.8kDa (见图 3)。JSRV-2 株与 GeneBank 国外最早报道的绵羊肺腺瘤病毒南非代表株基因组相应序列 (基因序列号 NC-001494, 共 7462 bp, 1992 年) 的核苷酸同源性为 83%, 推导出的氨基酸同源性为 84%, 在 JSRV-2 基因序列中在原 631 位插入 GGGAGTT 七个碱基, 在 648 位插入 TTAA 五个碱基, 在原 853-855 位缺失 TAA 终止密码子。此二处突变都为有意突变。与美国报道的绵羊肺腺瘤病毒代表株相应基因序列 (基因序列号 AF105220, 共 7455 bp, 1999 年) 核苷酸同源性为 81.5%, 推导出的氨基酸同源性为 83%, 与这株病毒序列比较, 在原 639 位插入 GAAGGCGAC 九个碱基, 在 656 位插入 ATC 三个碱基。与 James C<sup>[1]</sup> 在 2001 年从绵羊肺肿瘤细胞系 (JS7) 分离得到的前病毒 (JSRV<sub>JS7</sub>), 并克隆到一个含细胞巨化病毒启动子的质粒中, 测序分析 JSRV<sub>JS7</sub> 具有致病性, 与该序列 (基因序列号 AF357971, 2001 年) 的核苷酸同源性为 81.9%, 推断的氨基酸同源性为 81%。利用软件分析该基因所编码的结构蛋白具有抗原表位, 说明该基因所编码的结构蛋白具有抗原性; 从软件分析的蛋白疏水性分析曲线看, 该基因所编码的结构蛋白具有疏水性。这些特点与该病毒的宿主细胞的嗜性有关<sup>[7,9]</sup>, 同时与同属病毒的 CA 蛋白具有相似的抗原性。(见图 4)。

```

TGATTCTGACTGCCTGGATTTTGATAATGATGAATTAACGTTTAGGAAATTTATTAACAGGAAAAATCCTCTC 80
CATGTTCTGATTTGGAACCCAGGTATGCTGTTCCCGAGGGAGTTGAAGCGACCCCTCCGTTTTTAAATTATCGCGTCC 160
TTCGGATAATGATGATTTCACTTTTCATCCACAGATGAGCGCGAGTTAGACGAAGAAGCTGCTAAATACCATCAAGAGGATT 240
GGGGTTTTTGGCACAAGAAAAGGGGGCGTCAACATCTAAAGATGATTTGGTTGAATGTTAAAAAACCTCACTGTTGCT 320
TTACAGAAGCTCAGGAATTAAGCTTCTAGTAACAATTCTAAACCTTCTGCTCCGCTCTTCCCCTGCTATGCTCCTTC 400
CGTTGTGGCTGGTCTCGATCCCCCTCCGGGGCCCTCCTCCATCTGAGATTGTGCTCCGCTGCAGAAGGCATTGAGAC 480
AAGCACAACGACTTGGTGAGTTGTCTCCGATTTTCTCTGCTTTTCCCTGTCTTGAATAACAACCAGCGTTTTTAT 560
GAAGCGCTGCCTTTCAAGCAACTAAAAGAGTTAAAGATTGCTGCTCACAATACGGTCTACCCTCCATTCCTACTATTGC 640
TATGATAGAAAATCTGGGTACTCAAAATCTACCCCAAATGATTGGAAACAAAATAGCTAGGGCCTGTCTCAGGGGGAG 720
ATTATTTACTATGGAATCTGAATATGTTGAACAGTGTGCTCGTATAGCCGATGTTAATCGGCAGCAAGGTATACAGACC 800
TCTTACAAAATGTTGACTGGTGAAGCGCTTTCCAAGCTACTGATACTCAACTTAATTTCTTACCTGGTGCATATGCACA 880
AATATCGAATGCGGCTC 897
    
```

(A)

```

I R D C L D F D N D E L K R I G N L L K Q E K N P L H V P D L E P R Y A V P E G V E G D P P F F K L S R P S D N D D
S L S S T D E A E L D E E A A K Y H Q E D W G F L A Q E K G A S T S K D D L V E C L K N L T V A L Q N S G I K L P S
N X S K P S A P L P P A Y V S S V V A G L D P P P G P P P P S E I V S P L Q K A L R Q A Q R L G E F V S D F S L A
F P V F E N N Q R F Y E A L P F K Q L K E L K I A C S Q Y G P T A P F T I A M I E N L G T Q N L P P N D W K Q I A
R A C L S G G D Y L L W K S E Y V E Q C A R I A D V N R Q Q G I Q T S Y K M L T G E G A F Q A T D T Q L N F L P G A
Y A Q I S N A A *
    
```

(B)

图3 gag 基因 JSRV-2 段核苷酸序列(A)和推定的氨基酸序列(B)

Fig. 3 Nucleotide sequence(A) and predicted amino acid sequence(B) of JSRV-2

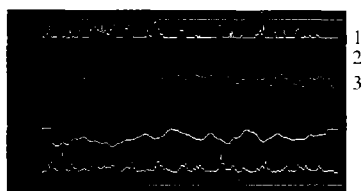


图 4 JSRV-2 编码的蛋白的特性分析图

Fig.4 Characteristic analysis of encoding protein

Curve1/3. Different antigenicity epitope analysis; Curve 2. Hydrophobicity analysis.

### 3 讨论

本研究首次报道我国绵羊肺腺瘤病毒 *gag* 基因的一段序列。该病毒属于反转录病毒科 RNA 病毒, 具有反转录酶活性, 在病毒侵袭宿主细胞时, 反转录酶将病毒 RNA 反转录为互补 DNA 并整合至宿主细胞的染色体 DNA 中, 此时病毒 RNA 反转录为前病毒 DNA, 前病毒在宿主细胞染色体中相当稳定, 目前还没有发现从染色体中切除的情况, 它作为宿主细胞染色体的一部分, 随染色体的复制而复制, 因而只有 RNA 病毒具有了反转录酶的活性, 才具有致病效力。同时由于我们在处理 4 例自然感染 SPA 病肺时, 采用电镜负染色技术, 观察到了典型的病毒粒子, 但病毒粒子的量较少, 因而提取病毒 RNA 没有成功。同时由于该病毒一直没有适合的体外培养体系<sup>[5]</sup>, 本研究的结果充分说明提取该病毒宿主细胞的总 DNA 来克隆前病毒 DNA 是一种切实可行的好方法。

*gag* 基因编码病毒的核心蛋白, 翻译时先形成一个大的前体蛋白, 然后在蛋白酶的作用下加工成基质蛋白 (MA)、衣壳蛋白 (CA)、核衣壳蛋白 (NC) 等成熟的蛋白质。JSRV-2 主要编码 CA 蛋白, 该基因序列虽与 GenBank 中具有代表性的基因组的序列相比, 同源性不足 90%, 但其插入突变和缺失主要集中在 631-648 和 853-855 两个区域, 在 1057-1124 区仍有一段由 18 个氨基酸组成的高度保守区域, 为主要同源区, 代表同属病毒的群抗原性。推测该病毒与南非株和美国株有可能是同一起源<sup>[1,8]</sup>, 但由

于地理环境的不同和该病毒对宿主品系的选择, 我国 NM 株与国外的两个代表株在基因结构方面已有一定差别。同时从软件分析出的抗原表位可看出, 此段基因序列所编码的蛋白具有群抗原性, 与文献报道该基因所编码的 CA 蛋白与同属病毒具有相同或相似的抗原性<sup>[4,5]</sup>是一致的。但对 *gag* 基因 5' 端 897bp 段序列的其他特性有待该病毒的全序列测出后进一步研究。

### 参考文献

- [1] DeMartini J C, Jeanette V. Jaagsiekte sheep retrovirus proviral clone JSRV<sub>JS7</sub>, derived from the JS7 lung tumor cell line, Induces Ovine Pulmonary Carcinoma and is integrated into the surfactant protein A gene[J]. *J Virol*, 2001, 80(4): 4239-4246.
- [2] Palmarini M J M, Heras M De Las, Hung Fan. Jaagsiekte sheep retrovirus is necessary and sufficient to induce a contagious lung cancer in sheep[J]. *J Virol*, 1999, 73 (8): 6964 - 6972.
- [3] Bai J, Bishop JV, Carlson jo, DeMartini JC. Sequence comparison of JSRV with endogenous provirus envelope genotypes and a novel ORF with similarity to a G-protein-coupled receptor[J]. *J Virol*, 1999, 258: 333-343.
- [4] Rosati S, Pittau M, Alberti A, *et al.* An accessory open reading frame(orf-x) of jaagsiekte sheep retrovirus is conserved between different virus isolates[J]. *Virus Res*, 2000, 66: 109-116.
- [5] Palmarini M, Sharp J M, Lee C. In vitro infection of ovine cell lines by Jaagsiekte sheep retrovirus[J]. *J Virol*, 1999, 280: 10070-10078.
- [6] Palmarini M, Hallwirth C, York D. Molecular cloning and functional analysis of three type D endogenous retrovirus of sheep reveal a different cell tropism from that of the highly related exogenous jaagsiekte sheep retrovirus[J]. *J. Virol*, 2000, 74: 8065-8076.
- [7] Palmarini M, Datta S, Omid R. The Long terminal repeat of Jaagsiekte retrovirus Is preferentially active in differentiated epithelial cells of the lungs[J]. *J Virol*, 2000, 5776-5787.
- [8] Maeda N, Palmarini M, Murgia C. Direct transformation of rodent fibroblasts by jaagsiekte sheep retrovirus DNA[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 4449-4454.
- [9] Nishigaki K, Hanson C, Ohashi T. Erythroid cells rendered erythropoietin independent by infection with friend spleen focus-forming virus show constitutive activation of phosphatidylinositol-3-kinase and Ake kinase: involvement of insulin receptor substrate-related adapter proteins[J]. *J Virol*, 2000, 74: 3037-3045.