无内源逆转录病毒中国实验用小型猪的筛选与鉴定*

陆泉枝[①③] 韩红兵[①③] 连正兴[①③**] 李 宁[②③**] 张庆才[①]
赵自力[④] 裴德智[①] 张晓兰[①] 吴常信[①③]

(①中国农业大学动物科技学院, 北京 100094; ②农业生物技术国家重点实验室, 北京 100094;
③农业部畜禽遗传育种重点实验室, 北京 100094; ④湖北桑梓湖种猪场, 荆州 434041)

摘要 分布于猪基因组内的内源逆转录病毒(porcine endogenous retrovirus, PERV)序列是制约猪作为异种器官移植供体的主要因素, 其拷贝数在不同品种与个体间存在着很大差异. 实验中选取了中国农业大学畜牧实验站的 3~6 月龄、健康的雌性中国实验用小型猪 67 头, 通过 PCR 检测与 Southern 杂交方法测定了内源病毒的拷贝数与囊膜蛋白类型. 从囊膜蛋白类型来看, 长白猪和中国实验用小型猪之间没有明显的差异, 但在两个猪种中含有两种囊膜蛋白基因(*env*-A 和 *env*-B, 记为 *env*-AB) 的个体所占比例明显高于仅含一种囊膜蛋白基因(*env*-A 或 *env*-B)的个体比例. 在中国实验用小型猪中发现了 2 头内源病毒负载阴性的个体, 其他个体的内源病毒基因拷贝数也相对较低, 在 10~20 个拷贝之间. 这些都充分说明了中国地方猪种的遗传多样性以及中国实验用小型猪可以作为异种器官移植供体的可行性.

关键词 猪 中国实验用小型猪 猪内源逆转录病毒 囊膜蛋白 **Southern** 杂交

内源性逆转录病毒(endogenous retrovirus, ERV)是指以前病毒DNA形式整合在宿主细胞基因组中, 并随细胞染色体复制而复制的逆转录病毒. ERV可能在动物进化和病理生理学等方面具有一系列作用或效应[1]. 目前已在多种脊椎动物的体外培养细胞或体内组织中发现了这类病毒的核苷酸序列或病毒粒子.

猪内源性逆转录病毒(porcine endogenous retrovirus, PERV)是整合在猪的基因组内并垂直传递的一类C型逆转录病毒[2]. 早在 70 年代初, 已有不少学者在体外培养的猪PK-15, 38A-1, PFT等细胞系中发现了自发释放的C型逆转录病毒粒子并对其进行了鉴定. 另外, 含有PERV的猪体细胞在体外与人细胞共培养

2003-11-03 收稿, 2004-01-15 收修改稿
* 中法先进合作项目(PRA BT99-05)资助
** 联系人, E-mail: lianzhx@cau.edu.cn; ninglibau@public3.bta.net.cn

时能感染人的多种类型细胞，这也暗示了异种移植后PERV对人的潜在危险性．这些实验结果对猪能否作为异种器官移植的器官供体提出了质疑，同时也引发了人们对此技术的恐慌与争议．值得提及的是，Heneine等人[3]对接受过猪胰岛细胞移植的 10 例糖尿病病人进行的多年跟踪观察并未发现有PERV感染的证据，但这是否与人体内存在的其他免疫机制有关，仍有待进一步研究，所以，对PERV的病原安全性目前尚无一致的结论．

根据PERV囊膜蛋白(Env)受体结合区的差异，可将囊膜蛋白分为 3 种不同类型：Env-A，Env-B和Env-C．Env-A和Env-B之间有 92%的氨基酸序列同源性[4]．这 3 种类型囊膜蛋白的主要差异位于SU表面糖基化的VRA，VRB和PRO区．这些区域的差异说明具有不同囊膜蛋白的PERV可能具有不同的宿主感染特性．

2002 年，英国PPL公司宣布培育出了 5 头新型可用于异种器官移植的转基因克隆猪．其主要技术过程是采用不含PERV基因的猪体细胞作为核移植供体细胞，将 α-1,3-半乳糖苷转移酶(α-1,3-galactosyl transferase，α-1，3-GT)基因敲除后进行核移植而获得的[5]，解除了超急性免疫排斥反应的发生．

中国地方猪种具有良好的遗传多样性，在内源病毒基因负载方面存在着很大差异，有些猪种部分个体的PERV拷贝数只有 1~3 个，而且随着近交程度的加大呈现出下降趋势[6]，因此通过大规模筛选有望获得无内源病毒个体，为异种器官移植转基因克隆猪的研发提供良好的材料，以此来缓解移植器官的不足并挽救无数器官衰竭病人的生命．

1　材料和方法

1.1　实验材料

(1) 实验动物的选择与样品采集：选择中国农业大学畜牧实验站 3~6 月龄、健康、雌性中国实验用小型猪 67 头，湖北桑梓湖种猪场成年、长白母猪 40 头作为待检测个体，取 1 cm^3耳部组织浸于 70%的乙醇溶液中保存．采样时，每采完一头猪，就对采样器具进行严格的消毒，以免样品交叉污染．

(2) 基因组DNA的提取：将脱乙醇后的组织块用加入了蛋白酶K (浓度 20 mg/mL)的组织提取液消化 12 h以上，且每隔 2 h颠倒消化管一次以利充分消化．之后，用酚-氯仿抽提的方法提取基因组DNA．测定每一样品的A_{260nm} 值，将其浓度调到 100 ng/μL．

1.2　实验方法

(1) PCR 扩增引物设计与 PCR 检测：根据 PERV 序列中 *pol*, *env*-A, *env*-B 区段保守性较强的特性，设计以下特异引物．

pol 区的特异性引物: *pol*(F): 5′-GCTACAACCA-TTAGGAAAACTAAAAG-3′(上游引物); *pol*(R): 5′-AACCAGGACTGTATATCTTGATCAG-3′(下游引物). PCR 扩增条件: 94℃, 4 min; 94℃, 30 s, 55℃, 30s, 72℃, 30 s; 30 循环; 72℃, 5 min; 4℃长期保存，扩增 *pol* 区长度为 326 bp 的片段．

env-A 区的特异性引物: *env*-A(F): 5′-TGGAAA-GATTGGCAACAGCG-3′(上游引物); *env*-A(R): 5′-AGTGATGTTAGGCTCAATGG-3′(下游引物). PCR 反应条件: 94℃, 4 min; 94℃, 30 s, 58℃, 30 s, 72℃, 30 s; 30 循环, 72℃, 5 min; 4℃长期保存，所扩增的 *env*-A(囊膜蛋白 A 基因)片段长度为 359 bp.

env-B区的特异性引物：*env*-B(F): 5′-TTCTCC-TTTGTCAATTCCGG-3′(上游引物); *env*-B(R): 5′-TACTTTATCGGGTCCCACTG-3′(下游引物). PCR反应条件: 94℃, 4 min, 94℃, 30 s, 56℃, 30 s, 72℃, 30 s; 30 循环, 72℃, 5 min; 4℃长期保存，扩增的*env*-B(囊膜蛋白B基因)片段长度为 263 bp.

(2) 探针制备与 Southern 杂交检测: PCR 扩增出长度为 326 bp 的 *pol* 区段后，采用 GENECLEANⅢ Kit 回收纯化扩增片段．将扩增片段连接到 pMD18-T(2692 bp)质粒载体上形成 pMD18-T-*pol* 重组质粒并进行序列测定予以证实．之后，采用随机引物地高辛(digoxigenin-dUTP) 标记重组质粒以制备杂交探针．对 *pol*, *env*-A, *env*-B PCR 检测的阴性个体与部分阳性个体 20 μg 基因组 DNA 用限制性内切酶 *Pst* Ⅰ过夜消化，在 2 V/cm 的电场强度下用 1%的琼脂糖凝胶电泳 10 h，转膜、与探针杂交、洗膜、显色并扫描成像．

(3) PERV基因拷贝数的计算：为了确定中国实验用小型猪基因组中PERV的拷贝数，根据基因单拷贝数计算公式: $X = (2692+326)\times 20\ \mu g/(3\times 10^9)$ (其中:

*X*为基因的拷贝数; 2692 为PMD18-T载体碱基对数; 326为PCR扩增*pol*区碱基对数; 20 μg为待检个体基因组量; 3×10^9为哺乳动物基因组大小). 计算出基因组中等同于单拷贝PERV的重组质粒pMD18- T-*pol*的量, 然后将该重组质粒线性化, 依次在连续不同的点样孔加入 1×, 5×, 10×, 20×, 30×的浓度梯度, 用以测定样品中PERV的拷贝数.

(4) 统计分析: 采用 *t* 检验方法进行统计分析.

2 结果

2.1 *PERV* 聚合酶(*pol*)区段的 PCR 检测

pol 区是逆转录病毒活性维持所必需的区域, 保守性很强, 因此对该区段拷贝数的检测可以代表内源性逆转录病毒基因的拷贝数. 另外, 由于 PCR 检测的高度灵敏性, 实验采用两人分别独立进行 PCR 检测. 对可疑阴性个体重新采样做再次测定, 以保证检测结果的可重复性以及可靠性, 检测结果见图 1.

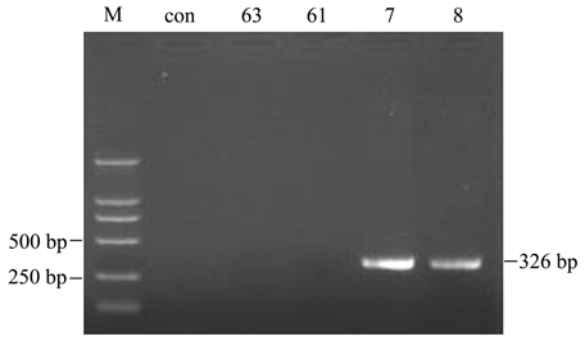


图 1 PERV 序列 *pol* 区段的 PCR 检测结果
M 示 DNA Marker DL2000; con 示空白对照; 61 和 63 示阴性个体; 7 和 8 示阳性个体

以上检测结果显示, 61, 63 号个体为内源病毒负载阴性个体, 其他为阳性个体. 初步可以判定有 2 头为无内源病毒负载个体.

2.2 两种囊膜蛋白类型 *env*-A 与 *env*-B 的 PCR 检测

利用囊膜蛋白基因区段的特性设计并合成了特异性引物, 对以上个体中内源病毒囊膜蛋白基因 *env* 的类型进行检测, 其中, 图 2 为利用引物 *env*-A(F) 和 *env*-A(R) 对 A 型囊膜蛋白基因 *env*-A 的检测结果; 图 3 是利用引物 *env*-B (F) 和 *env*-B (R) 对 B 型囊膜蛋白基因 *env*-B 的检测结果.

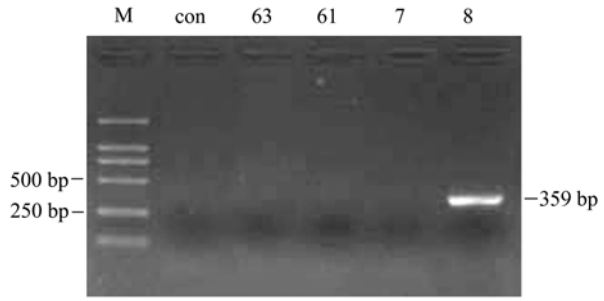


图 2 囊膜蛋白 A 基因(*env*-A)的 PCR 检测
M 示 DNA Marker DL2000; con 示空白对照; 61, 63, 7 示阴性个体; 8 示阳性个体

图 2 与图 3 说明了在中国实验用小型猪中, 存在 PERV 负载阴性的个体(61、63 号). 7 号个体的基因组中仅含有一种类型的囊膜蛋白基因, 为 *env*-B 型; 8 号个体的基因组中同时含有两种类型的囊膜蛋白基因, 为 *env*-AB 型.

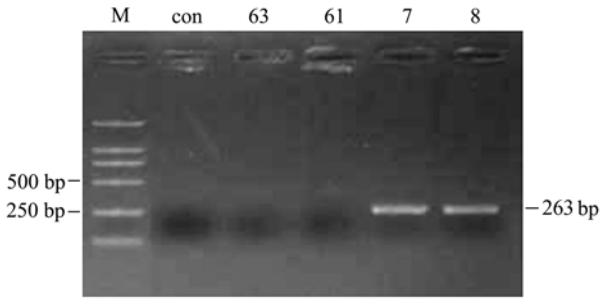


图 3 囊膜蛋白 B 基因(*env*-B)的 PCR 检测
M 示 DNA Marker DL2000; con 示空白对照; 61 和 63 示阴性个体; 7 和 8 示阳性个体

此外, 实验还选取 PERV 负载为阳性的香猪与长白猪各 40 头, 测定了中国实验用小型猪和长白猪中内源病毒囊膜类型的分布情况, 其结果见表 1.

表 1 不同类型囊膜蛋白基因的频率在两猪种中的分布[a)]

囊膜蛋白基因类型	频 率/%	
	中国实验用小型猪	长 白 猪
env-A	12.5%(5/40)^A	15.0%(6/40)^A
env-B	17.5%(7/40)^A	17.5%(7/40)^A
env-AB	70.0%(28/40)^B	67.5%(27/40)^B

a) 字母相同者为差异不显著($P > 0.05$), 不相同者为差异极显著($P < 0.01$)

以上统计结果说明, 不同囊膜蛋白基因的频率在两猪种间没有明显的差异($P > 0.05$), 但同一品种内含有两种类型囊膜蛋白的个体比例数明显高于仅含一种囊膜蛋白的个体比例($P < 0.01$).

2.3　Southern blotting 检测

为了保证检测结果的可靠性，进行了 Southern 杂交做进一步确定. 结果表明 61 号和 63 号个体为内源病毒负载阴性，其他个体的拷贝数分别在 10~20 个之间.

3　讨论

中国实验用小型猪是由香猪经过多年培育所形成的一个小型实验猪种，对其进行的大量生理生化指标检测和实验动物模型研究表明，中国实验用小型猪具有体重适宜、抗病性强、遗传背景清晰、生理生化指标稳定等优点[7]，适合作为异种器官移植的器官供体. 前期采用半定量PCR方法测定了香猪的内源病毒拷贝数为 39.90 ± 13.71，并发现了 1 头含有PERV基因 2 个拷贝、*env*-A 2 个拷贝、*env*-B 1 个拷贝的个体. 为此，进行了中国实验用小型猪内源病毒负载的研究，希望能够筛选出内源病毒基因拷贝数低或没有内源病毒的个体，为异种器官移植提供基础材料，同时挖掘我国的优良猪种资源.

从囊膜蛋白类型上看，同时含两种囊膜蛋白基因(*env*-AB)的个体与仅含一种囊膜蛋白基因(*env*-A或*env*-B)个体的比例在中国实验用小型猪和长白猪间没有明显的差异，但两品种中*env*-AB型所占比例明显高于*env*-A或*env*-B的比例，这主要是由于动物内源病毒是多拷贝所造成的，至于是由于两种类型的病毒同时感染，还是不同时期感染、或由一种病毒突变成另一种病毒等因素所造成，还有待进一步的研究. 有资料报道长白猪内源病毒的拷贝数平均为 50 个左右[8]，而中国实验用小型猪的拷贝数仅为 10~20 个拷贝，进一步说明了中国实验用小型猪作为异种器官移植供体的优势.

在实验过程中首先利用PCR方法进行初步筛选，有 2 头个体为PERV负载阴性，然后利用Southern方法对阴性个体做进一步确认，结果与PCR检测结果相符，最终从 67 头个体中找到了 2 头无内源病毒序列的个体，其出现的频率达到了 3.03%. 尽管PERV为多拷贝，但大部分拷贝出现了缺失、突变等现象而丧失了功能[6]，由此会造成PCR检测引物与检测模板配对的困难而呈现阴性，为此在阴性个体检测过程中除检测*pol*区段外，还检测了囊膜蛋白区域，保证了检测结果的可靠性. 图 4 中 7 号个体为*env*-B型，酶切之后应该为 2.5 kb左右的片段，但同时出现了 6 kb左右的片段，说明了中国实验用小型猪内源病毒序列发生了酶切位点突变.

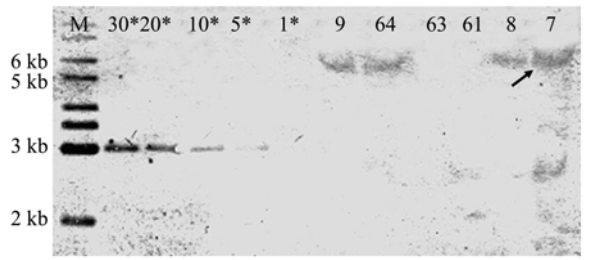


图 4　PERV 序列 *pol* 区段的 Southern 检测结果

M 示 1 kb ladder; 30*, 20*, 10*, 5*和 1*示拷贝数测定梯度参照; 9, 60, 61, 8 和 7 示个体编号; 箭头示显色目的片段

经 PCR 与 Southern 检测，中国实验用小型猪内源病毒负载量较低，平均在 10~20 个拷贝数之间，且实验中找到了 2 头没有 PERV 的个体，充分证明了其用于医学研究的可行性，同时也说明了我国地方猪种遗传资源的丰富多样性和亟待开发的重要性.

参　考　文　献

1　殷　震，刘景华主编. 动物病毒学. 北京：科学出版社，1997. 837~938

2　Ward T, Robert M P, Pamela A P. Role for β2-microglobulin in echovirus infection of rhobdomyosarcoma cells. J Virol, 1998, 72(7): 5360~5365

3　Heneine W, Tibell A, Switzer W M, Sandstrom P, Rosales G V, Mathews A, Korsgren O, Chapman L E, Folks T M, Groth C G. No evidence of infection with porcine endogenous retrovirus in recipients of porcine islet-cell xenografts. Lancet, 1998, 352: 695~699[DOI]

4　Le Tissier P, Stoye J P, Takeuchi Y, Patience C, Weiss R A.Two sets of human-tropic pig retrovirus. Nature, 1997, 389: 681~682[DOI]

5　Tonjess R R, Czauderna F, Fisher N. Molecularly cloned porcine endogenous retroviruses replicate on human cells. Transplantation Proceeding, 2000, 32(5): 1158~1161[DOI]

6　连正兴, Rogel-Galliard, 李　宁, Patrick Chardon, 吴常信. 利用半定量PCR方法分析中国地方猪种内源病毒序列拷贝数的多态性. 畜牧兽医学报, 2002, 33 (6): 521~524

7　滕岳峰. 中国小型猪资源丰富. 世界农业, 1998, 10: 41~43

8　Rogel Gaillard C, Bourgeaux N, Billault A, Vaiman M, Chardon P. Construction of a swine BAC library: application to the characterization and mapping of porcine type C endoviral elements. Cytogenet Cell Genet, 1999, 85: 205~211