

# 猪源转录因子 AP-2 $\delta$ 通过增强 *rep* 基因启动子活性促进猪圆环病毒 2 型的复制

王越<sup>1</sup>, 宋东峰<sup>1</sup>, 林翠<sup>2</sup>, 李佳容<sup>1</sup>, 王胜男<sup>1</sup>, 顾金燕<sup>1</sup>, 周继勇<sup>2</sup>

1 南京农业大学 免疫研究所, 江苏 南京 210095

2 浙江大学 农业部动物病毒学重点实验室, 浙江 杭州 310058

王越, 宋东峰, 林翠, 等. 猪源转录因子 AP-2 $\delta$  通过增强 *rep* 基因启动子活性促进猪圆环病毒 2 型的复制. 生物工程学报, 2018, 34(12): 1985–1995.

Wang Y, Song DF, Lin C, et al. Porcine transcription factor AP-2 $\delta$  promotes porcine circovirus type 2 replication through enhancing the activity of the *rep* gene promoter. Chin J Biotech, 2018, 34(12): 1985–1995.

**摘要:** 本研究旨在探究猪圆环病毒 2 型 (Porcine circovirus type 2, PCV2) 能否借助 *rep* 基因启动子区的转录因子结合位点调控自身基因转录, 并寻找参与这一调控过程的宿主因子。凝胶迁移实验证实 *rep* 基因启动子具有核蛋白结合活性。DNA-pull down 联合液相-串联质谱分析鉴定到了可与 *rep* 基因启动子结合的猪源转录因子 AP-2 $\delta$  (Porcine transcription factor AP-2 $\delta$ , poTFAP2 $\delta$ )。双荧光素酶报告基因试验、实时荧光定量 PCR、免疫印迹及间接免疫荧光等试验证明 poTFAP2 $\delta$  不仅可以特异性地增强 *rep* 基因启动子活性, 而且可以在 PCV2 感染过程中促进 *rep* 和 *cap* 基因的转录、翻译及 PCV2 病毒滴度。文中揭示了 PCV2 利用宿主蛋白促进自身增殖的分子机制, 为进一步从病毒与宿主互作角度阐明 PCV2 的致病机制提供新的研究思路, 亦为 PCV2 高效疫苗的研制提供理论基础。

**关键词:** 猪圆环病毒 2 型, *rep* 基因启动子, 转录因子结合位点, 猪源转录因子 AP-2 $\delta$

**Received:** February 22, 2018; **Accepted:** May 9, 2018

**Supported by:** National Key Technology R & D Program of China (No. 2015BAD12B01), National Natural Science Foundation of China (No. 31402198), the Fundamental Research Funds for the Central Universities (Nos. KJQN201524, KYZ201730), the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions.

**Corresponding authors:** Jinyan Gu. Tel: +86-25-84396068; Fax: +86-25-84395166; E-mail: gjy@njau.edu.cn

国家科技支撑计划 (No. 2015BAD12B01), 国家自然科学基金 (No. 31402198), 中央高校基本科研业务费 (Nos. KJQN201524, KYZ201730), 江苏高校优势学科建设资助。

网络出版时间: 2018-06-06

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20180605.1654.001.html>

# Porcine transcription factor AP-2 $\delta$ promotes porcine circovirus type 2 replication through enhancing the activity of the *rep* gene promoter

Yue Wang<sup>1</sup>, Dongfeng Song<sup>1</sup>, Cui Lin<sup>2</sup>, Jiarong Li<sup>1</sup>, Shengnan Wang<sup>1</sup>, Jinyan Gu<sup>1</sup>, and Jiyong Zhou<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Immunology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China

<sup>2</sup> Key Laboratory of Animal Virology of Ministry of Agriculture, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang, China

**Abstract:** Several putative transcription factor binding sites (TFBSs) exist in the PCV2 *rep* gene promoter. To explore if porcine circovirus type 2 (PCV2) could regulate the viral replication by using these TFBSs, we conducted electrophoretic mobility shift assay (EMSA), DNA-pull down and liquid chromatography-tandem mass spectrometric (LC-MS/MS) assays. EMSA confirmed the binding activity of the *rep* gene promoter with nuclear proteins of host cells. DNA-pull down and LC-MS/MS identified the porcine transcription factor AP-2 $\delta$  (poTFAP2 $\delta$ ) could bind the PCV2 *rep* gene promoter. Dual-luciferase reporter assay, quantitative real-time PCR, Western blotting and indirect immunofluorescent assay demonstrated that poTFAP2 $\delta$  could not only promote the activity of the *rep* gene promoter, but also enhance the transcription/translation activity of the *rep/cap* gene and the virus titer of PCV2 during the entire life cycle of PCV2 infection. This study revealed the molecular mechanism of PCV2 using host proteins to enhance the viral replication, provided a new perspective for studying the pathogenic mechanism of PCV2 from virus and host interactions, and provided a theoretical basis for developing highly effective PCV2 vaccines.

**Keywords:** porcine circovirus type 2, *rep* gene promoter, transcription factor binding sites, porcine transcription factor AP-2 $\delta$

猪圆环病毒 2 型 (Porcine circovirus type 2, PCV2) 属于圆环病毒科,无囊膜,直径约 12–23 nm,具有大约 1.7 kb 的单链环状 DNA 基因组<sup>[1]</sup>,是猪圆环病毒相关疾病 (PCV2-associated disease, PCVAD) 的主要病原体,给养猪业造成了巨大的经济损失<sup>[2-5]</sup>。

PCV2 的 *cap* 基因编码衣壳蛋白 Cap,作为 PCV2 唯一的结构蛋白及主要的免疫原性蛋白, Cap 蛋白在病毒入侵及致病性方面发挥重要作用<sup>[6-8]</sup>。PCV2 的 *rep* 基因编码两个病毒复制相关蛋白 Rep 和 Rep', Rep 和 Rep'能够与位于基因间区复制起点 (*ori*) 内的特定序列结合,启动 PCV2 复制<sup>[9-12]</sup>。PCV2 *rep* 基因启动子区存在一个类干扰素刺激反应元件 (Interferon-stimulated response element, ISRE),这个类 ISRE 作为一个转录因子结合位点 (Transcription factor binding sites, TFBS),可以促进 *rep* 基因转录及病毒增殖<sup>[13]</sup>,本研究旨在探究

PCV2 *rep* 基因启动子是否具有利用类 ISRE 等 TFBSs 调控自身基因转录的生物学特性,并鉴定参与这一调控过程的宿主蛋白。

研究表明,某些病毒的基因启动子可以与宿主转录因子结合,通过调控病毒基因的启动子活性而调节自身基因的转录及翻译。如单纯疱疹病毒 1 型 (Herpes simplex virus type 1, HSV-1)、人乳头瘤病毒 (Human papillomavirus, HPV) 的启动子均具有利用宿主转录因子调节启动子活性的功能。本研究通过分析发现,PCV2 *rep* 基因启动子上除了拥有一个已知的类 ISRE,还存在其他一些潜在的 TFBSs,这些 TFBSs 是否具有生物学功能?何种宿主蛋白可与之结合并调控基因转录?

本研究通过 DNA-pull down 联合液相-串联质谱分析 (Liquid chromatography-tandem mass spectrometric, LC-MS/MS) 等试验鉴定出猪源转录因子 AP-2 $\delta$  (Porcine transcription factor AP-2 $\delta$ ,

poTFAP2 $\delta$ ) 可以在体外与 *rep* 基因启动子结合。据报道, TFAP2 家族蛋白具有与病毒基因启动子结合并调控启动子活性的功能, 如 TFAP2 能与 EB 病毒 (Epstein-Barr virus, EBV) 及人类免疫缺陷病毒 (Human immunodeficiency virus, HIV) 等病毒的启动子结合, 调控病毒基因的表达<sup>[14-16]</sup>。本研究通过一系列试验证明, poTFAP2 $\delta$  不仅能够显著增强 PCV2 *rep* 基因启动子活性及 *rep/cap* 基因的转录和翻译, 还能在一定程度上促进 PCV2 的病毒滴度。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞和病毒

无 PCV 污染的猪肾细胞系 (Porcine kidney epithelial cell line, PK15) 由本实验室保存, 在含有 8% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中培养。PCV2 HZ0201 毒株 (GenBank 登录号: AY188355) 为本实验室分离保存, 病毒毒价为  $10^{6.4}$  TCID<sub>50</sub>/0.1 mL。

### 1.2 主要试剂及载体

双荧光素酶报告系统质粒 pGL3-Basic (Basic) 和 pRL-TK 均购自 Promega 公司; 真核表达载体 pCMV-N-Myc (Myc-Empty Vector, Myc-EV) 由本实验室保存; RPMI-1640 培养基购自 Hyclone 公司; 胎牛血清购自 Biological Industries 公司; 双荧光素酶报告基因检测试剂盒、细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒均购自碧云天公司; 限制性内切酶购自 New England BioLabs 公司; 蛋白 Marker、EMSA 化学发光试剂盒、尼龙膜均购自 Thermo Fisher Scientific 公司; 0.22  $\mu$ m 无菌滤器购自 Millipore 公司; DNA 胶纯化试剂盒购自 Axygen 公司; 质粒小提试剂盒购自 Tiangen 公司; 荧光定量 PCR 试剂 (SYBR Green Master Mix)、一步克隆法试剂盒 (Clonexpress II one step cloning kit)、增强型 ECL 化学发光检测试剂盒均购自诺唯赞公司; 转染试剂 Lipofectamine 3 000 及链霉

亲和素磁珠均购自 Invitrogen 公司; 鼠抗 Myc 单抗购自 Biolegend 公司; 兔抗  $\beta$ -actin 单抗购自杭州华安生物技术有限公司; 鼠抗 Rep 单抗 (2E11) 及鼠抗 Cap 单抗 (5E11) 为本实验室制备并保存; HRP 标记羊抗鼠 IgG、HRP 标记羊抗兔 IgG、FITC 标记羊抗鼠 IgG 均购自 KPL 公司。

**1.3 *rep* 基因启动子区潜在 TFBSs 预测及分析**  
PCV2 *rep* 基因启动子位于 *rep* 基因的上游, 从 -193 nt 至 *ori*, 共 193 bp (图 1)。本研究用在线数据库 JASPAR (<http://jaspar.genereg.net/>) 对 PCV2 *rep* 基因启动子进行潜在 TFBSs 的预测, 对预测分值较高 (score>10) 的位点进行后续分析。

**1.4 凝胶迁移实验 (Electrophoretic mobility shift assay, EMSA) 验证 *rep* 基因启动子的核蛋白结合活性**

根据 *rep* 基因启动子潜在 TFBSs 预测及分析结果, 本研究设计了用于 EMSA 试验的互补生物素标记的单链核酸探针 p119biotin-s 和 p119biotin-a (表 1) 及未标记的竞争探针并委托金斯瑞生物科技有限公司进行合成。p119biotin-s 和 p119biotin-a 为 5'端生物素标记的长度为 119 nt (-133 nt 至 -15 nt, 图 1) 的互补单链核苷酸序列, 包含 EGR、SP、KLF、ZNF、YY、TFAP2、XBP、Crem、Atf、IRF 等主要潜在 TFBSs, 竞争探针为没有生物素标记的同序列单链探针。单链探针进行退火操作后可获得用于 EMSA 试验的双链生物素标记探针 p119biotin 及竞争探针 p119。

细胞核蛋白抽提按细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒操作说明进行, 将 PK15 细胞接种于 25 cm<sup>2</sup> 细胞瓶, 常规培养至细胞密度约为 90%, 从  $3 \times 10^6$  个 PK15 细胞中抽提细胞核蛋白用于 EMSA 试验。EMSA 试验按照 EMSA 化学发光试剂盒操作说明进行, 反应体系如下: p119biotin ( $1 \times 10^4$  fmol/L), 2  $\mu$ L, 10 $\times$ 结合缓冲液 2  $\mu$ L, 细胞核蛋白提取物 4  $\mu$ L, p193 ( $1 \times 10^3$  pmol/L) 4  $\mu$ L。

表 1 本研究所用引物及探针序列

Table 1 Oligonucleotide primers and probes used in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Application
cap-s	TGTAGTATTCAAAGGGCACAGAGC	qPCR for <i>cap</i> mRNA
cap-a	CGGATATACTATCAAGCGAACCCAC	
rep-s	TGATGACTTTTATGGCTGGCT	qPCR for <i>rep</i> mRNA
rep-a	TCCTCCGTGGATTGTTCTGT	
$\beta$ -actin-s	TCATCACCATCGGCAACG	qPCR for $\beta$ -actin mRNA
$\beta$ -actin-a	TTGAAGGTGGTCTCGTGGAT	
p119biotin-s	Biotin-GGCGGGGGTGGAGGAGCCAGGGGCGGGCGGAGGATCTGG CCAAGATGGCTGCGGGGGCGGTGTCTTCTTCTCCGGTAACGCCTCCT TGGATACGTCATATCTGAAAACGAAAGAAGT	Biotin labeled probe for EMSA
p119biotin-a	Biotin-ACTTCTTTTCGTTTTTCAGATATGACGTATCCAAGGAGGCGTTACC GGAGAAGAAGACACCGCCCCCGAGCCATCTTGCCAGATCCTCCGC CGCCGCCCTGGCTCCTCCACCCCGCC	

### 1.5 DNA-pull down 联合 LC-MS/MS 鉴定结合蛋白

为了探索能与 PCV2 *rep* 基因启动子结合的宿主转录因子,本研究采用 DNA-pull down 联合 LC-MS/MS 技术进行鉴定。具体步骤如下:将 5  $\mu$ g p119biotin 与 500  $\mu$ g PK15 细胞核蛋白提取物室温孵育 30 min,加入链霉亲和素标记的磁珠充分混匀,4  $^{\circ}$ C 翻转过夜,利用磁力架反复清洗 3 次,最后将沉淀进行 LC-MS/MS 蛋白鉴定(上海博苑生物科技有限公司)。

### 1.6 重组质粒的构建

poTFAP2 $\delta$  基因根据 NCBI 数据库中的预测序列 (GenBank 登录号:XM\_003356639) 委托生工生物工程(上海)股份有限公司进行基因合成,并利用一步克隆法构建真核表达载体 pCMV-N-Myc-poTFAP2 $\delta$  (Myc-poTFAP2 $\delta$ )。PCV2 *rep* 基因启动子测试载体 pGL3-Basic-p193 (p193) 由本实验室保存。

### 1.7 双荧光素酶报告基因试验

PK15 细胞接种于 24 孔细胞板,常规培养 24 h 至细胞密度约为 75%,用 Lipofectamine 3000 将

Basic/pRL-TK、p193/pRL-TK 分别与 Myc-EV 和 Myc-poTFAP2 $\delta$  共转染 PK15 细胞,转染 24 h 后依据双荧光素酶检测试剂盒说明书进行相对荧光素酶活性检测,分析 poTFAP2 $\delta$  对 *rep* 基因启动子活性的影响。

### 1.8 实时荧光定量 PCR (Quantitative real-time PCR, qPCR)

将 PK15 细胞接种于 12 孔板,常规培养 24 h 至细胞密度约为 75%,用 Lipofectamine 3000 将 Myc-EV 和 Myc-poTFAP2 $\delta$  分别转染 PK15 细胞,转染 24 h 后,以感染复数 (Multiplicity of infection, MOI) =1 的 PCV2 HZ0201 毒株感染该细胞,在感染后 24、48、72 h 收取细胞,trizol 法抽提病毒 RNA,取 10 ng 进行反转录得病毒 cDNA,用 qPCR (SYBR 法) 检测 *rep*、*cap* 的 mRNA 水平。qPCR 引物如表 1 所示,两步法 qPCR 反应程序按 SYBR Green Master Mix 使用说明书进行。

### 1.9 免疫印迹试验 (Western blotting, WB)

将 Myc-EV 和 Myc-poTFAP2 $\delta$  在 PK15 细胞上瞬时过表达后接种 PCV2 HZ0201 (MOI=1),方法如 1.8 所述,病毒感染 24、48、72 h 后收集细

胞,裂解蛋白样品后 WB 检测 Rep 及 Cap 的蛋白表达水平。WB 所用一抗分别为鼠抗 Myc 单抗 (1:1 000)、兔抗  $\beta$ -actin 单抗 (1:1 000)、鼠抗 Rep 单抗 2E11 (1:500) 和鼠抗 Cap 单抗 5E11 (1:500),二抗分别为 HRP 标记羊抗鼠 IgG (1:7 500) 和 HRP 标记羊抗兔 IgG (1:7 500)。最后加入 ECL 显色液用 Amersham Imager 600 超敏多功能成像仪显色,用 ImageJ 软件进行灰度值分析,计算 Rep 和 Cap 对  $\beta$ -actin 的比率。

### 1.10 间接免疫荧光试验 (Indirect immunofluorescent assay, IFA) 测定 PCV2 病毒滴度

将 Myc-EV 和 Myc-poTFAP2 $\delta$  在 PK15 细胞上瞬时过表达后接种 PCV2 HZ0201 (MOI=1),方法如 1.8 所述,在感染后 24、48、72 h 收取板子,反复冻融 3 次后收集病毒样品,4  $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min 后收取上清,利用 IFA 测定样品中病毒的半数组织培养感染量 (Median tissue culture infectious dose, TCID<sub>50</sub>)。IFA 所用一抗为鼠抗 Cap 单抗 5E11 (1:500),二抗为 FITC 标记羊抗鼠 IgG (1:350)。最后,用 Reed-Muench 方法计算各样品中 PCV2 的 TCID<sub>50</sub>。

## 2 结果与分析

### 2.1 PCV2 *rep* 基因启动子上存在多个潜在的 TFBSs

为了探究 PCV2 *rep* 基因启动子是否具有利用宿主转录因子促进自身启动子活性的功能,本研究利用 JASPAR 数据库对 *rep* 基因启动子进行潜在 TFBSs 的预测分析,结果发现,该启动子上存在多处潜在的 TFBSs,如图 1 所示,评分较高 (score>10) 的有 EGR、SP、KLF、ZNF、YY、TFAP、XBP、Crem、Atf、IRF 等 TFBSs,这些位点集中在 *rep* 基因启动子的中间位置 (-133 nt 至 -15 nt, 119 bp),所以推测这段序列是 *rep* 基因启动子的转录因子结合核心区域。

### 2.2 PCV2 *rep* 基因启动子具有核蛋白结合活性

根据潜在 TFBSs 的预测结果,将 *rep* 基因启动子的关键序列 119 bp 合成标记探针 p119biotin 及竞争探针 p119,利用 EMSA 验证 *rep* 基因启动子的核蛋白结合活性。结果如图 2 所示,当标记探针中加入 PK15 细胞核蛋白提取物时,p119biotin 出现了明显的迁移条带,说明 PK15 细胞核蛋白提取物中存在与 p119biotin 结合的宿主蛋白;但是,

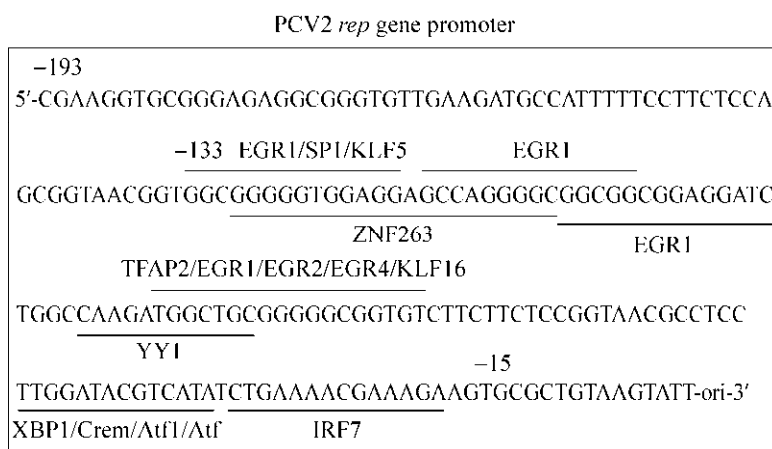
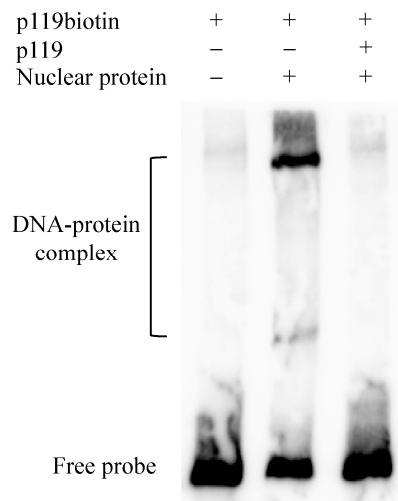


图 1 PCV2 *rep* 基因启动子区潜在 TFBSs 预测图

Fig. 1 Prediction of putative TFBSs in the PCV2 *rep* gene promoter. Sequence between -193 nt and the *ori* is the PCV2 *rep* gene promoter, the marked sites are the high score (score>10) putative TFBSs predicted by JASPAR database. The probe used in EMSA, sequence between -133 nt and -15 nt, contains all the high score sites.



**图 2 EMSA 验证 *rep* 基因启动子的核蛋白结合活性**  
 Fig. 2 Identification of binding activity of the *rep* gene promoter with nuclear proteins by EMSA. p119biotin: biotin-labeled EMSA probe; p119: EMSA competitive probe; nuclear proteins: PK15 cell nuclear proteins.

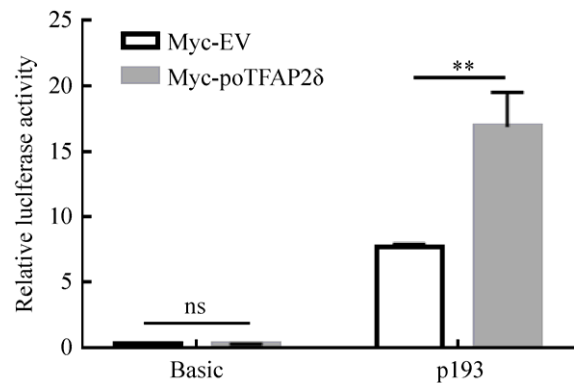
当加入竞争探针 p119 时迁移条带消失, 说明这种蛋白与探针的结合具有高度特异性。

### 2.3 poTFAP2 $\delta$ 可以与 PCV2 *rep* 基因启动子结合

为了探究何种核蛋白可以与 PCV2 *rep* 基因启动子结合, 本研究以 p119biotin 为探针进行 DNA-pull down 联合 LC-MS/MS 试验, 将 DNA-pull down 后能与 p119biotin 结合的细胞核蛋白进行 LC-MS/MS 分析, 质谱鉴定结果显示, 与 *rep* 基因启动子序列结合的蛋白中有 poTFAP2 $\delta$ , 这个发现与 *rep* 基因启动子的潜在 TFBSs 预测结果相吻合, 所以推测 poTFAP2 $\delta$  可能在 *rep* 基因的转录启动方面发挥重要作用。

### 2.4 poTFAP2 $\delta$ 对 PCV2 *rep* 基因启动子的活性具有促进作用

为了探究 poTFAP2 $\delta$  是否可以特异性增强 *rep* 基因启动子活性, 本研究比较了 *rep* 基因启动子在 poTFAP2 $\delta$  瞬时过表达及对照 PK15 细胞中的启动子活性差异。结果如图 3 所示, 在 poTFAP2 $\delta$



**图 3 poTFAP2 $\delta$  对 PCV2 *rep* 基因启动子活性的影响**  
 Fig. 3 Effects of poTFAP2 $\delta$  on the activity of the PCV2 *rep* gene promoter. The relative luciferase activity of Basic and p193 in the Myc-poTFAP2 $\delta$ - or Myc-EV-transfected cells was detected. ns: no significant difference; \*\*:  $P < 0.01$ .

瞬时过表达的 PK15 细胞中, p193 的平均相对荧光素酶活性为 16.95, 而其在对照 PK15 细胞中的平均相对荧光素酶活性仅为 7.732, 差异显著, 这个结果充分证明 poTFAP2 $\delta$  对 *rep* 基因启动子活性具有显著的促进作用。

### 2.5 poTFAP2 $\delta$ 对 PCV2 *rep*、*cap* 基因的转录及翻译具有促进作用

poTFAP2 $\delta$  可以促进 *rep* 基因的启动子活性, 那么是否也能促进 *rep* 基因的转录和翻译, 从而进一步促进 *cap* 基因的转录及翻译? 为了探究这个问题, 试验将 PCV2 分别接种 poTFAP2 $\delta$  瞬时过表达及对照 PK15 细胞, 感染 24、48、72 h 后检测 *rep*、*cap* 基因 mRNA 及蛋白表达水平的差异。结果如图 4 所示, 在 poTFAP2 $\delta$  瞬时过表达的 PK15 细胞中, PCV2 *rep* mRNA 的平均表达水平在病毒感染后 24、48、72 h 分别是对照组的 2.133、1.587、2.444 倍, 而 PCV2 *cap* mRNA 的平均表达水平在病毒感染后 24、48、72 h 分别是对照组的 2.196、1.993、1.811 倍。不论在病毒感染后 24、48 h 还是 72 h, poTFAP2 $\delta$  过表达后病毒基因 mRNA 水平均显著上调, 说明在 PCV2 感染过程

中 poTFAP2 $\delta$  可以持续显著促进 *rep* 及 *cap* 基因的转录。

poTFAP2 $\delta$  是否能进一步促进 Rep 及 Cap 蛋白的表达? 结果如图 5 所示, 将 WB 试验所检测的 Rep、Cap 蛋白与  $\beta$ -actin 蛋白条带进行灰度值比值分析, 发现在 poTFAP2 $\delta$  瞬时过表达的 PK15 细胞中, PCV2 Rep 蛋白的平均相对表达水平在病毒感染后 24、48、72 h 分别为 0.295、1.858、3.985, 而对照组为 0.183、1.144、2.361, 说明在 PCV2 感染后 24、48、72 h, poTFAP2 $\delta$  过表达均能上调 Rep 蛋白的表达量, 虽然感染后 24、48 h 上调不显著, 但是 72 h 上调极显著; 同样的, 在 poTFAP2 $\delta$  瞬时过表达的 PK15 细胞中, PCV2 Cap 蛋白的平均相对表达水平在病毒感染后 24、48、72 h 分别是 0.520、1.390、2.790, 而对照组为 0.512、0.883、1.997, 说明在 PCV2 感染后 24、48、72 h, poTFAP2 $\delta$  过表达均能上调 Cap 蛋白的表达量, 虽然感染后 24 h 上调不显著, 但 48 h 上调显著, 72 h 上调极显著。这两组试验结果说明 poTFAP2 $\delta$  过表达能在 PCV2 感染的整个过程中持续促进 Rep 及 Cap 蛋白的表达, 且这种促进作用随着感

染进程的推进而增强。依据以上实验结果推测, 在 PCV2 感染过程中, poTFAP2 $\delta$  不仅可以促进 *rep* 基因的转录及翻译, 而且能通过促进 Rep 蛋白的表达进一步促进 PCV2 *cap* 基因的转录及翻译。

## 2.6 poTFAP2 $\delta$ 对 PCV2 病毒增殖具有一定的促进作用

为了确认 poTFAP2 $\delta$  是否可以增加 PCV2 病毒滴度, 本研究利用 IFA 对 PCV2 在 poTFAP2 $\delta$  瞬时过表达及对照 PK15 细胞上的 TCID<sub>50</sub> 进行测定, 结果如图 6 所示。在对照 PK15 细胞上, PCV2 感染后 24、48、72 h 的平均滴度为  $10^{3.250}/0.1$  mL、 $10^{3.667}/0.1$  mL、 $10^{4.333}/0.1$  mL, 而在 poTFAP2 $\delta$  瞬时过表达 PK15 细胞中则为  $10^{3.417}/0.1$  mL、 $10^{4.000}/0.1$  mL、 $10^{4.917}/0.1$  mL。瞬时过表达组与对照组 PCV2 在感染后 24、48、72 h 的病毒滴度比值分别为 1.469、2.153 和 3.837。虽然 *t* 检验分析显示, poTFAP2 $\delta$  瞬时过表达组与对照组的差异并不显著, 但是滴度比值显示, poTFAP2 $\delta$  对 PCV2 的滴度还是具有一定的促进作用, 说明 poTFAP2 $\delta$  可以在一定程度上促进 PCV2 的增殖。

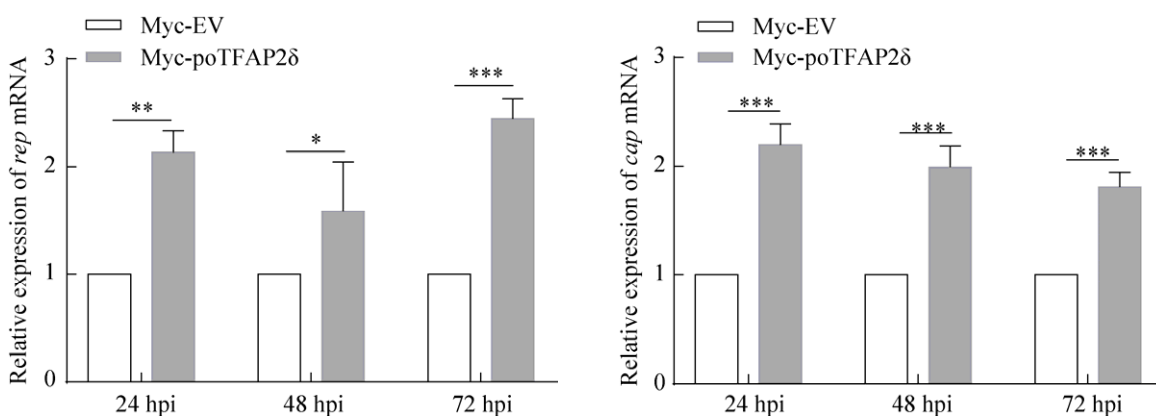


图 4 poTFAP2 $\delta$  对 *rep* 及 *cap* 基因 mRNA 表达水平的影响

Fig. 4 Effects of poTFAP2 $\delta$  on the expression level of the *rep* and *cap* gene mRNA. The relative expression level of the *rep* and *cap* gene mRNA was detected by qPCR at 24, 48 and 72 h post-infection (hpi) with PCV2 HZ0201 (MOI=1) in the Myc-poTFAP2 $\delta$ - or Myc-EV-transfected cells. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ ; ns: no significantly difference.

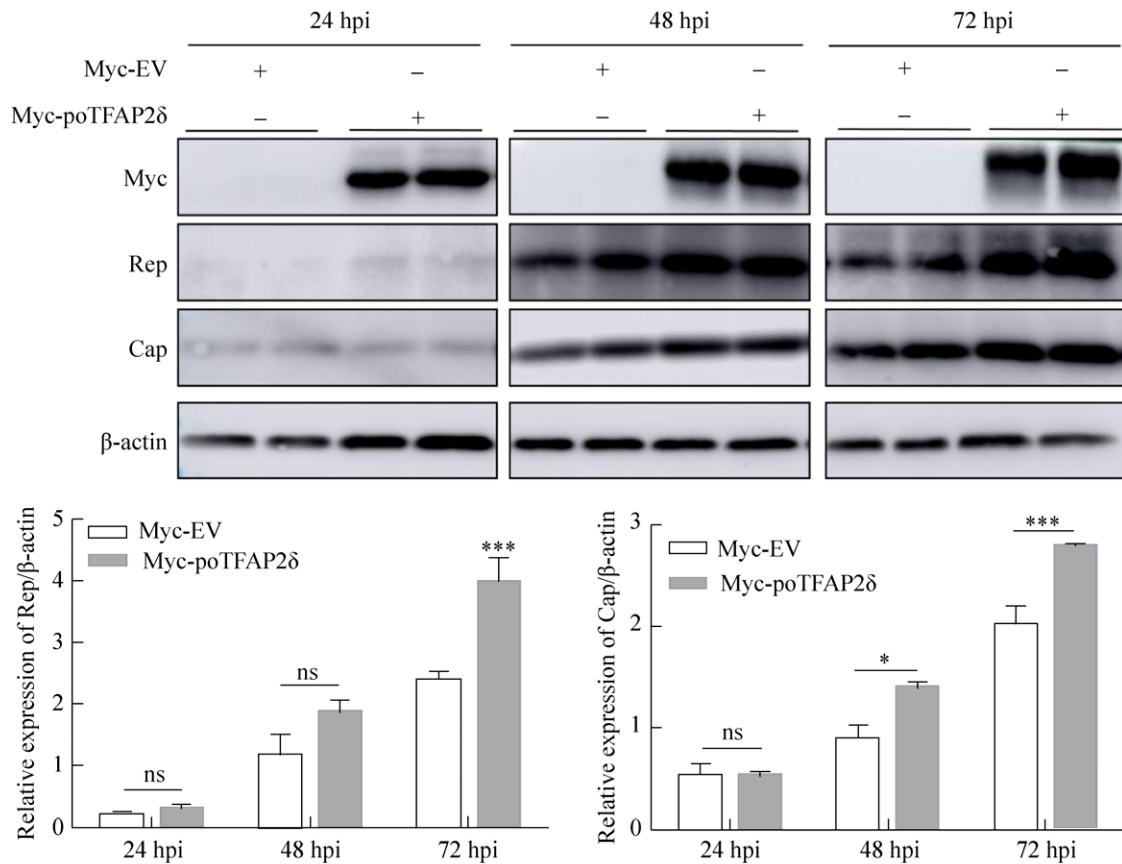


图5 poTFAP2δ对Rep及Cap蛋白表达水平的影响

Fig. 5 Effects of poTFAP2δ on the expression level of the Rep and Cap protein. The relative expression levels of the Rep and Cap protein was detected by WB at 24, 48 and 72 h post-infection with PCV2 HZ0201 (MOI=1) in the Myc-poTFAP2δ- or Myc-EV-transfected cells. The ratio of Rep/β-actin and Cap/β-actin was analyzed by ImageJ software. ns: no significantly difference.

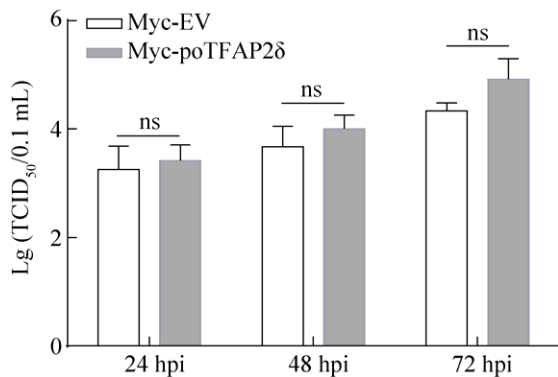


图6 poTFAP2δ对PCV2病毒滴度的影响

Fig. 6 Effects of poTFAP2δ on the viral titer of PCV2. The viral titer of PCV2 was detected by IFA at 24, 48 and 72 h post-infection with PCV2 HZ0201 (MOI=1) in the Myc-poTFAP2δ- or Myc-EV- transfected cells.

### 3 讨论

作为严格的细胞内寄生微生物,病毒利用宿主蛋白调控自身增殖是许多病毒的普遍生存法则。在自然界中,病毒利用宿主转录因子调控自身基因启动子活性,从而调节病毒基因转录及翻译的情况并不罕见,如HIV-1基因组5'末端的长末端重复序列(Long terminal repeat, LTR)作为启动子,LTR可以借助NF-κB、SP及TATA盒等TFBSs与宿主转录因子结合调控自身的基因转录<sup>[17-18]</sup>; HSV-1的LAT启动子,可以与宿主细胞的信号转导及转录激活因子结合,调控病毒启动子活性<sup>[19]</sup>; HPV的E6/E7基因启动子P97,可以与细胞因子



YY1 结合而下调自身基因转录活性<sup>[20]</sup>；恒河猴疱疹病毒 (Rhesus rhadinovirus, RRV) 的复制和反式激活子 (Replication and transactivator, Rta) 的启动子, 可以与宿主 Sp 蛋白结合, 启动 Rta 的转录翻译, 实现 RRV 的潜伏感染<sup>[21]</sup>。

PCV2 作为最小的动物病毒之一, 基因组仅为 1.7 kb, 表达的蛋白非常有限, 为了更好地生存, 它是否也存在利用宿主蛋白调控自身增殖的复制机制? 前期研究发现, PCV2 *rep* 基因启动子区存在一个类 ISRE, 与 PCV2 *rep* 基因启动子的活性、病毒的复制增殖及干扰素促进 PCV2 增殖的功能均相关, 但具体机制还未得到阐释。PCV2 *rep* 基因启动子是否能像 HIV-1 LTR 等病毒启动子一样存在一系列 TFBSs, 通过与宿主转录因子的结合调控病毒基因转录, 从而突破自身编码蛋白有限的困境?

本研究通过在线数据库对 PCV2 *rep* 基因启动子区进行潜在 TFBSs 的预测, 结果显示, 这个启动子上除了有类 ISRE, 还存在诸如 EGR、SP、KLF、TFAP2 等一系列 TFBSs, 这些位点均集中在启动子中部的 119 bp (-133 nt 至 -15 nt), 特别是位于 -133 nt 至 -120 nt 的位点“GGCGGGGGTGGAGG”、位于 -86 nt 至 -69 nt 的位点“TGGCTGCGGGGGCGGTGT”和位于 -46 nt 至 -33 nt 的位点“TTGGA TACGTCATA”, 这三个位点均含有一些分值较高的潜在 TFBSs, 推测可能是 *rep* 启动子与宿主转录因子结合的核心区域。

EMSA 证明了 *rep* 基因启动子确实能与宿主核蛋白结合, DNA-pull down 联合 LC-MS/MS 将这些结合蛋白鉴定为包含有转录因子的一系列宿主核蛋白 (数据未展示), 其中包括 poTFAP2 $\delta$ 。TFAP2 家族是序列特异性的 DNA 结合蛋白, 在动物发育、分化和肿瘤发生过程中调控基因表达, 发挥重要作用<sup>[22]</sup>。哺乳动物普遍存在 5 个 TFAP2 基因 (TFAP2 $\alpha/\beta/\gamma/\delta/\epsilon$ ), 分别编码 TFAP2 $\alpha/\beta/\gamma/\delta/\epsilon$

蛋白。TFAP2 家族常表达于中枢神经系统, 基因缺失小鼠实验表明 TFAP2 家族对发育极其关键, 常为致死性缺失<sup>[23-30]</sup>。TFAP2 $\delta$  与 TFAP2 家族其他成员的相似度最低, 对于 TFAP2 家族蛋白功能极其重要的 8 个保守残基, TFAP2 $\delta$  仅有 3 个<sup>[31-33]</sup>。据报道, TFAP2 家族蛋白具有与病毒基因启动子结合并调控启动子活性的功能, 如 TFAP2 $\alpha/\beta/\gamma$  能与 EBV 的 LMP1 基因启动子结合, 促进 LMP1 蛋白的表达, 稳定 EBV 的潜伏感染<sup>[14-15]</sup>; TFAP2 还可以与 HIV-1 的 LTR 结合, 调控 HIV-1 基因的表达<sup>[16]</sup>。巧合的是, 在预测的 *rep* 基因启动子潜在 TFBSs 结果中也存在 TFAP2 位点, 那么 poTFAP2 $\delta$  是否可以与 *rep* 基因启动子结合而调节 *rep* 基因的转录? 通过启动子活性试验、qPCR、WB 及 IFA 等一系列试验, 表明 poTFAP2 $\delta$  不仅可以促进 *rep* 基因启动子的活性, 而且可以在 PCV2 感染过程中持续促进 *rep* 及 *cap* 基因的转录及翻译, 最后对 PCV2 的病毒滴度也有一定的促进作用。

PCV2 自身不编码复制酶, 主要依靠细胞有丝分裂 S 期表达的酶及蛋白进行滚环复制, PCV2 的复制起始依赖于 Rep 及 Rep' 蛋白与 PCV2 复制子的结合, 所以 *rep* 基因的转录翻译在 PCV2 复制增殖中发挥至关重要的作用。我们基于本研究的结果推测, poTFAP2 $\delta$  可以特异性地与 *rep* 基因启动子区某位点结合启动或促进 *rep* 基因的转录, 翻译所得的大量 Rep 及 Rep' 蛋白启动病毒复制, 产生更多的 PCV2 基因组及基因转录所需的模板, 导致 Cap 蛋白的大量表达, 保证了 PCV2 病毒包装所需衣壳蛋白及基因组的供给, 于是病毒滴度增加。从试验结果可见, poTFAP2 $\delta$  对 PCV2 Rep、Cap 蛋白及病毒滴度的促进均具有时间依赖性, 随着 PCV2 感染进程的推进, 这种促进作用越来越强, 说明以上推测的 poTFAP2 $\delta$  对 PCV2 复制增殖的促进是一个不断累加的循环过程。至

于 poTFAP2 $\delta$  是否与预测的 TFAP2 位点“TGGCTGCGGGGGCGGTGT” (-86 nt 至 -69 nt) 结合, 还需要大量的后续试验验证。

本研究首次证明了 PCV2 *rep* 基因启动子具有通过利用宿主转录因子 poTFAP2 $\delta$  促进病毒基因转录、翻译及病毒滴度的生物学功能, 从病毒利用宿主因子的角度阐释了 PCV2 的复制机制。该研究结果为进一步从病毒与宿主互作角度阐明 PCV2 的致病机制提供新的研究思路, 亦为 PCV2 高效疫苗的研制提供了理论基础。

## REFERENCES

- [1] Finsterbusch T, Mankertz A. Porcine circoviruses—small but powerful. *Virus Res*, 2009, 143(2): 177–183.
- [2] Madson DM, Opriessnig T. Effect of porcine circovirus type 2 (PCV2) infection on reproduction: disease, vertical transmission, diagnostics and vaccination. *Anim Health Res Rev*, 2011, 12(1): 47–65.
- [3] Nayar GP, Hamel A, Lin L. Detection and characterization of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *Can Vet J*, 1997, 38(6): 385–386.
- [4] Segalés J, Sitjar M, Domingo M, et al. First report of post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs in Spain. *Vet Rec*, 1997, 141(23): 600–601.
- [5] Gu JY, Xing G, Lei J, et al. Porcine circovirus type 2 and PCV2-systemic disease - a review. *Chin J Biotech*, 2015, 31(6): 880–891 (in Chinese).  
顾金燕, 邢刚, 雷静, 等. 猪圆环病毒 2 型与猪圆环病毒相关性系统疾病的回顾及展望. *生物工程学报*, 2015, 31(6): 880–891.
- [6] Zhang LK, Li YF, Xie LB, et al. Generation and characterization of recombinant classical swine fever virus C-strain expressing the cap protein of porcine circovirus type 2. *Chin J Biotech*, 2018, 34(2): 216–223 (in Chinese).  
张玲楷, 李永锋, 谢利豹, 等. 表达猪圆环病毒 2 型 Cap 蛋白的重组猪瘟兔化弱毒疫苗株的构建与鉴定. *生物工程学报*, 2018, 34(2): 216–223.
- [7] Wang XW, Li YF, Jiang P. Construction and immunogenicity of recombinant adenoviruses expressing Cap protein of PCV2 and GP5 protein of PRRSV in mice. *Chin J Biotech*, 2009, 25(11): 1639–1645 (in Chinese).  
王先炜, 李玉峰, 姜平. 表达猪圆环病毒 2 型 Cap 和猪繁殖与呼吸综合征病毒 GP5 融合蛋白重组腺病毒的构建和免疫原性测定. *生物工程学报*, 2009, 25(11): 1639–1645.
- [8] Fan HY, Chen HC, Tong TZ, et al. The expression of porcine circovirus Type 2 ORF2 gene in insect cells and its character. *Chin J Biotech*, 2005, 21(6): 123–126 (in Chinese).  
樊惠英, 陈焕春, 佟铁铸, 等. 猪圆环病毒 2 型 ORF2 基因在昆虫细胞中的表达及其特性. *生物工程学报*, 2005, 21(6): 123–126.
- [9] Cheung AK. The essential and nonessential transcription units for viral protein synthesis and DNA replication of porcine circovirus type 2. *Virology*, 2003, 313(2): 452–459.
- [10] Cheung AK. Identification of the essential and non-essential transcription units for protein synthesis, DNA replication and infectious virus production of *Porcine circovirus* type 1. *Arch Virol*, 2004, 149(5): 975–988.
- [11] Mankertz A, Hillenbrand B. Replication of porcine circovirus type 1 requires two proteins encoded by the viral *rep* gene. *Virology*, 2001, 279(2): 429–438.
- [12] Steinfeldt T, Finsterbusch T, Mankertz A. Rep and Rep' protein of *porcine circovirus* type 1 bind to the origin of replication *in vitro*. *Virology*, 2001, 291(1): 152–160.
- [13] Gu JY, Zhang Y, Lian X, et al. Functional analysis of the interferon-stimulated response element of porcine circovirus type 2 and its role during viral replication *in vitro* and *in vivo*. *Virol J*, 2012, 9: 152.
- [14] Jansson A, Johansson P, Yang W, et al. Role of a consensus AP-2 regulatory sequence within the Epstein-Barr virus LMP1 promoter in EBNA2 mediated transactivation. *Virus Genes*, 2007, 35(2): 203–214.
- [15] Murata T, Noda C, Narita Y, et al. Induction of Epstein-Barr Virus Oncoprotein LMP1 by Transcription Factors AP-2 and Early B Cell Factor. *J Virol*, 2016, 90(8): 3873–3889.
- [16] Perkins ND, Agranoff AB, Duckett CS, et al. Transcription factor AP-2 regulates human immunodeficiency virus type 1 gene expression. *J Virol*, 1994, 68(10): 6820–6823.
- [17] Hiscott J, Kwon H, Génin P. Hostile takeovers: viral

- appropriation of the NF- $\kappa$ B pathway. *J Clin Invest*, 2001, 107(2): 143–151.
- [18] Kilaeski EM, Shah S, Nonnemacher MR, et al. Regulation of HIV-1 transcription in cells of the monocyte-macrophage lineage. *Retrovirology*, 2009, 6: 118.
- [19] Kriesel JD, Jones BB, Dahms KM, et al. STAT1 binds to the herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript promoter. *J Neurovirol*, 2004, 10(1): 12–20.
- [20] Lace MJ, Yamakawa Y, Ushikai M, et al. Cellular factor YY1 downregulates the human papillomavirus 16 E6/E7 promoter, P97, *in vivo* and *in vitro* from a negative element overlapping the transcription-initiation site. *J Gen Virol*, 2009, 90(Pt 10): 2402–2412.
- [21] Demaster LK, Rose TM. A critical Sp1 element in the rhesus rhadinovirus (RRV) Rta promoter confers high-level activity that correlates with cellular permissivity for viral replication. *Virology*, 2014, 448: 196–209.
- [22] Eckert D, Buhl S, Weber S, et al. The AP-2 family of transcription factors. *Genome Biol*, 2005, 6(13): 246.
- [23] Feng WG, Williams T. Cloning and characterization of the mouse AP-2 $\epsilon$  gene: a novel family member expressed in the developing olfactory bulb. *Mol Cell Neurosci*, 2003, 24(2): 460–475.
- [24] Moser M, Pscherer A, Roth C, et al. Enhanced apoptotic cell death of renal epithelial cells in mice lacking transcription factor AP-2 $\beta$ . *Genes Dev*, 1997, 11(15): 1938–1948.
- [25] Moser M, Dahmen S, Kluge R, et al. Terminal renal failure in mice lacking transcription factor AP-2  $\beta$ . *Lab Invest*, 2003, 83(4): 571–578.
- [26] Nottoli T, Hagopian-Donaldson S, Zhang J, et al. AP-2-null cells disrupt morphogenesis of the eye, face, and limbs in chimeric mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(23): 13714–13719.
- [27] Schorle H, Meier P, Buchert M, et al. Transcription factor AP-2 essential for cranial closure and craniofacial development. *Nature*, 1996, 381(6579): 235–238.
- [28] Wang HV, Vaupel K, Buettner R, et al. Identification and embryonic expression of a new AP-2 transcription factor, AP-2 $\epsilon$ . *Dev Dyn*, 2004, 231(1): 128–135.
- [29] Wenke AK, Rothhammer T, Moser M, et al. Regulation of integrin  $\alpha$ 10 expression in chondrocytes by the transcription factors AP-2 $\epsilon$  and Ets-1. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 345(1): 495–501.
- [30] Zhang J, Hagopian-Donaldson S, Serbedzija G, et al. Neural tube, skeletal and body wall defects in mice lacking transcription factor AP-2. *Nature*, 1996, 381(6579): 238–241.
- [31] Li XD, Glubrecht DD, Mita R, et al. Expression of AP-2 $\delta$  in the developing chick retina. *Dev Dyn*, 2008, 237(11): 3210–3221.
- [32] Wankhade S, Yu YH, Weinberg J, et al. Characterization of the activation domains of AP-2 family transcription factors. *J Biol Chem*, 2000, 275(38): 29701–29708.
- [33] Zhao F, Satoda M, Licht JD, et al. Cloning and characterization of a novel mouse AP-2 transcription factor, AP-2 $\delta$ , with unique DNA binding and transactivation properties. *J Biol Chem*, 2001, 276(44): 40755–40760.

(本文责编 陈宏宇)