

禽脑脊髓炎病毒 *VP1* 基因植物表达载体的构建

马 强¹, 张二芹², 张同旭³

(1. 河南省农业科学院 畜牧兽医研究所, 河南 郑州 450002; 2. 南阳师范学院 生命科学与技术学院, 河南 南阳 473061;

3. 南阳市第四职业中等专业学校, 河南 南阳 473000)

摘要: 以提取的禽脑脊髓炎病毒总 RNA 为模板, 以 P1 和 P2 为引物, 反转录为 cDNA, 再以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。将扩增产物克隆 pMD18-T 载体中, 获得重组质粒 pMD18-T-VP1, *Pst* I / *Bam* H I 双酶切及 PCR 确认正确后, 利用 pMD18-T-VP1 重组质粒为模板, 以 P3 和 P4 为引物, 经 PCR 扩增获得了大小约 810 bp 的产物。VP1 基因和 pBI121 植物表达载体用 *Sma* I 和 *Sac* I 双酶切, 经纯化后连接, 再转化到 EHA105 农杆菌中, 酶切和测序鉴定结果表明, 成功地构建了重组质粒 pBI121-VP1, 为进一步利用转基因植物生产 VP1 蛋白奠定了基础。

关键词: 禽脑脊髓炎病毒; VP1 基因; pBI121 植物表达载体

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2010)05-0025-03

The Construction of Plant Expression Vector of AEV *VP1* Gene

MA Qiang¹, ZHANG Er-qin², ZHANG Tong-xu³

(1. Institute of Animal Husbandry and Veterinary Science, Henan Academy of Agricultural Sciences,

Zhengzhou 450002, China; 2. Life Science and Technique College of Nanyang Normal University,

Nanyang 473061, China; 3. Fourth Vocational Secondary School of Nanyang City, Nanyang 473000, China)

Abstract: Using P1 and P2 as primers and extracted Avian encephalomyelitis virus total as template, 810 bp *VP1* gene fragment was amplified by RT-PCR. *VP1* gene fragment was cloned into pMD18-T vector, The positive plasmid contained *VP1* gene was determined by restriction analysis and PCR. Then using P3 and P4 as primers and plasmid pMD18-T-VP1 as template, *VP1* gene fragment was obtained by PCR amplification. then, *VP1* gene and plant expression vector pBI121 were digested with *Sma* I and *Sac* I, extracted, connected, recombinant plasmid was transformed into agrobacterium tumefaciens EHA105 by freeze-thawing method, recombinant plasmid pBI121-VP1 was successfully constructed by digested and sequenced.

Key words: Avian encephalomyelitis virus; *VP1* gene; pBI121 plant expression vector

禽脑脊髓炎(Avian encephalomyelitis, AE)是由禽脑脊髓炎病毒(AEV)引起的以侵害幼禽中枢神经系统为主要特征的传染病^[1-6]。鸡、火鸡、野鸡、鹌鹑均可感染。临床特征是病禽共济失调、震颤和非化脓性脑脊髓炎。

AEV 属于小 RNA 病毒科肠道病毒属成员, 无囊膜, 病毒粒子直径为 20 ~ 30 nm, 呈球形, 单股正链 RNA 病毒。AEV 只有一个开放阅读框, 其编码一个大的多聚蛋白, 多聚蛋白经病毒蛋白酶加工剪接成为成熟蛋白。AEV 蛋白包括基因组 P₁ 区的 4 个结构蛋白(VP4-VP2-VP3-VP1)以及 P₂、P₃ 区的 7

个非结构蛋白(2A-2B-2C 和 3A-3B-3C-3D), 其中结构蛋白 VP1 参与病毒的入侵以及构成病毒抗原的主要组成部分。AEV 既可经蛋垂直传播, 也可在禽群间水平传播, 给我国养禽业造成了巨大的经济损失。AE 只能以预防为主(接种疫苗)。为此, 本研究将构建 AEV 的 *VP1* 基因植物表达载体, 为利用转基因植物生产 VP1 蛋白进行前期准备工作。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌种和质粒 载体质粒 pMD18-T 和

收稿日期: 2010-03-10

基金项目: 河南省教育厅自然科学研究计划项目(2009B230010)

作者简介: 马 强(1977-), 男, 河南南阳人, 助理研究员, 硕士, 主要从事动物疫病防控研究。

通讯作者: 张二芹(1976-), 女, 河南焦作人, 副教授, 博士, 主要从事动物分子病毒学研究。

pBI121, 菌种 DH5 α 和农杆菌 EHA105 由南阳师范学院生命科学与技术学院实验室提供。

1.1.2 试剂 RNA 提取试剂盒购自天根生物公司; 限制性内切酶 *Pst* I、*Bam*H I、*Sma* I、*Sac* I、*Taq* DNA 聚合酶, T_4 DNA 连接酶, 标准分子量 Marker, 回收试剂盒等试剂, 均购自大连宝生物技术公司。

1.2 试验方法

1.2.1 设计引物 根据已知 *VP1* 基因序列和载体 pMD18-T 设计引物, P1: 5'-GGGAAAGAGGAT-GAAGG-3', P2: 5'-CTCTTCTACAACCTCCGTC-3'; 根据已知 *VP1* 基因序列和植物表达载体设计引物, P3: 5'-CCCCCGGGATGGGGAAGAGGATGAAGGAG-3' 含 *Sma* I 酶切位点, P4: 5'-CCGAGCTCTCATAGCT-CATCTTTCTCAGATTACTCTTCTACAACCTCCGTC-3' 含 *Sac* I 酶切位点, 划曲线部分为 SEKDEL 序列。

1.2.2 *VP1* 抗原基因 cDNA PCR 扩增 PCR 扩增引物按已发表的序列设计, 以 P1 和 P2 为引物, 以提取 RNA 为模板反转录为 cDNA, 然后再以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 50 s, 53 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 55 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

1.2.3 *VP1* 抗原基因 DNA PCR 产物的连接转化

由于 PCR 产物的 3' 端多了一个不依赖于模板组成的脱氧核苷酸 A, 所以利用 T-A 互补原理将 PCR 产物与 pMD18-T Vector 连接。将 PCR 产物纯化后按试剂盒说明书进行连接, 再将连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 。

1.2.4 pMD18-T-*VP1* 重组质粒的筛选与鉴定 挑若干个转化子, 在 6 mL LB 液体培养基 (Amp 50 μ g/mL) 中培养 12~16 h, 碱裂解法小抽提质粒后经 1% 凝胶电泳, 根据 DNA 分子量的大小, 初步筛选阳性质粒。取初步筛选的阳性质粒进行 *Bam*H I 和 *Sac* I 双酶切, 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 进一步筛选阳性质粒。

1.2.5 *VP1* 基因在农杆菌 EHA105 中的克隆 以 pMD18-T-N 为模板, P3 和 P4 为引物, 进行 PCR 扩增。反应条件与 1.2.2 相同, 扩增后电泳鉴定。将植物表达载体 pBI121 和 *VP1* 基因 PCR 产物用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Sac* I 分别进行酶切, 利用 AxyPrep DNA 凝胶化回收试剂盒将酶切后的 *VP1* 基因及 pBI121 载体回收, 用 T_4 DNA 连接试剂盒连接, 16 $^{\circ}$ C 连接过夜。连接产物经冻融法转化根癌农杆菌 EHA105, 液氮中放置 1 min, 37 $^{\circ}$ C 水浴 5 min, 28 $^{\circ}$ C 摇床培养 4 h 后, 最后将农杆菌涂 LB 培养基板 (Kan 50 μ g/mL), 48~72 h 后观察。

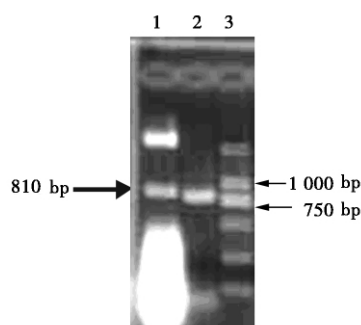
1.2.6 pBI121-*VP1* 重组表达质粒的筛选与鉴定

挑取白色菌落, 接种到 LB 液体培养基 (Kan 50 μ g/mL) 培养, 碱裂解法提取质粒, 对阳性菌进行初步筛选, 最后用 *Sma* I 和 *Sac* I 双酶切鉴定和测序分析。

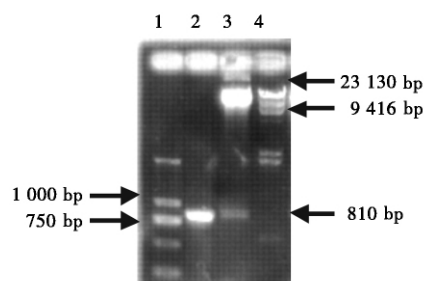
2 结果与分析

2.1 *VP1* 基因 cDNA 的 PCR 扩增与 pMD18-T-*VP1* 重组质粒酶切鉴定

用宝生物 RNA 提取试剂盒抽提禽脑脊髓炎病毒的总 RNA, 反转录为 cDNA, 再以 cDNA 为模板, PCR 扩增 *VP1* 基因, 纯化回收, 与 pMD18-T 连接, 转化到 *E. coli* DH5 α 中; 碱裂解法提取重组质粒, 最后用 *Pst* I 和 *Bam*H I 酶切鉴定。结果如图 1。



1. 重组质粒 pMD18-T-*VP1* 酶切产物;
2. *VP1* 的 PCR 产物; 3. DNA Marker DL2000。
1. Restriction pMD18-T-*VP1* by *Pst* I and *Bam*H I;
2. PCR product of *VP1*; 3. DNA Marker DL2000。
图 1 *VP1* 基因 cDNA 的 PCR 扩增及克隆载体酶切鉴定
Fig. 1 PCR amplification of *VP1* gene cDNA and restriction analysis of the recombinant plasmid pMD18-T-*VP1*



1. DNA Marker DL2000; 2. *VP1* 基因的 PCR 产物;
3. 重组质粒 pBI121-*VP1* 的酶切产物 4. DNA Marker λ /Hind III。
1. DNA Marker DL2000; 2. PCR product of *VP1* gene;
3. Restriction pBI121-*VP1* by *Sma* I and *Sac* I; 4. DNA Marker λ /Hind III。
图 2 *VP1* 基因 PCR 扩增及重组植物表达载体酶切鉴定
Fig. 2 PCR amplification of *VP1* gene and restriction analysis of the recombinant plant plasmid pBI121-*VP1*

2.2 *VP1* 基因的 PCR 扩增与 pBI121-*VP1* 重组质粒酶切鉴定

以 pMD18-T-*VP1* 为模板, 以 P3 和 P4 为引物, 扩增 *VP1* 基因的 PCR 产物。用 *Sma* I 和 *Sac* I 分别酶切 *VP1* 基因和 pBI121 植物表达载体, 回收、连接

后,冻融法转化到农杆菌 EHA105 中。以碱裂解法少量提取重组质粒 pBI121-VP1,然后用 *Sma* I 和 *Sac* I 进行酶切,用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳,其结果如图 2。

2.3 序列测定结果

以纯化的 pBI121-VP1 重组质粒为模板,用设计的特异引物进行序列测定,结果表明,插入的片段与预期设计完全相吻合,阅读框架正确,从而进一步确定了表达重组质粒构建的正确。

3 讨论

AE 是由 AEV 引起的以侵害幼禽中枢神经系统为主的传染病,主要特征为病禽共济失调、震颤和非化脓性脑脊髓炎。迄今为止,AE 主要以预防为主,如注射灭活苗、亚单位疫苗、DNA 疫苗等。1992 年, Maso 等^[7]提出了转基因植物疫苗(可食性疫苗)的概念,其利用分子生物学技术把外源基因导入到植物细胞中,使其在植物中表达,生产出能使机体获得特异抗病能力的疫苗。2002 年, Dus 等^[8]将 FMDV 结构蛋白基因 *VPI* 在苜蓿中有效表达,表达产物口服和注射都产生了免疫反应和保护。由于转基因植物疫苗具有免疫活性好、生产容易制备、价格低以及适于口服等优点^[9],再加上 *VPI* 是 AEV 的主要抗原组成部分,所以本研究将 *VPI* 基因与植物表达载体 pBI121 连接,转化到农杆菌 EHA105,结果成功地构建了植物表达载体 VP1-pBI121。pBI121 是一个常用的植物表达载体,有 CaMV35S 强启动子,在植物组织中能启动外源基因的表达,在 NOS 启动子下游带有 *NPTII* 基因,可通过 Kan 抗性筛选阳性重组质粒。目前外源基因在植物中表达水平低,因此设计植物表达载体引物时,在下游引物(P4)

中加入 SEKDEL 序列,它是内质网滞留信号肽,能将外源蛋白积累在植物细胞的内质网中,提高蛋白质的表达水平。本研究结果为最终应用植物生产 AE 转基因植物疫苗奠定了基础。

参考文献:

- [1] 殷 震,刘景华. 动物病毒学 [M]. 2 版. 北京: 科学出版社,2000.
- [2] 刘 爵,张 杰,刘有昌,等. 禽脑脊髓炎病毒在 BGM-70 传代细胞系上培养特性的初步研究 [J]. 华北农学报,1999,14(3): 136 - 140.
- [3] 张二芹,赵振华,孙 明,等. 禽脑脊髓炎病毒 VR 株衣壳蛋白基因的克隆及序列分析 [J]. 中国兽医科技,2004,34(3): 51 - 55.
- [4] 张二芹,赵心力,赵振华,等. 禽脑脊髓炎病毒 *Van Roekel* 株衣壳蛋白基因原核表达及其 ELISA 检测研究 [J]. 动物医学进展,2005,26(1): 55 - 58.
- [5] 马 强,张二芹,王 丽,等. 禽脑脊髓炎病毒(VR 株)接种鸡胚的病理变化 [J]. 河南农业科学,2008(8): 139 - 141.
- [6] 王新华,逯艳云,张二芹,等. 鸡病类别诊断图谱 [M]. 北京: 中国农业出版社,2009.
- [7] Mason H S, Lam D M, Arntzen C J. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992,89: 11745 - 11749.
- [8] Dus Santos M J, Wigdorovitz A, Trono K, et al. A novel methodology to develop a foot and mouth disease virus (FMDV) peptide-based vaccine in transgenic plants [J]. Vaccine,2002, 20(7/8): 1141 - 1147.
- [9] 张二芹,王会岩,张同旭. 外源基因在转基因植物中表达量的优化研究进展 [J]. 河南农业科学,2008(1): 8 - 12.