

鸡贫血病毒 *VP1* 基因的克隆及其在大肠杆菌中的表达

黄冬艳¹, 杨 兵², 齐 欣³, 陈小玲², 徐福洲²

(1 江西农业大学 动物学院, 江西 南昌 330045; 2 北京市农林科学院畜牧兽医研究所, 北京 100089;

3 沈阳农业大学 畜牧兽医学院, 辽宁 沈阳 110161)

摘要: 根据鸡贫血病毒 Cux_1 株基因组序列设计了一对引物, 通过 PCR 扩增出 *VP1* 基因。将扩增出的片段克隆到 pGM_T 载体上, 通过测序分析证实该片段与鸡贫血病毒 Cux_1 株的 *VP1* 基因序列一致。然后将克隆化 *VP1* 基因亚克隆到 PET_32a(+) 载体上并进行原核表达。SDS-PAGE 和 Western Blot 分析表明, 一个分子质量为 70.4 kDa 的重组蛋白获得了成功表达, 并且鸡贫血病毒阳性血清能和重组蛋白发生反应。

关键词: 鸡贫血病毒; *VP1* 基因; 克隆; 表达

中图分类号: S188 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2006)05-0050-04

Cloning of *VP1* Gene of Chicken Infectious Anemia Virus and Its Expression in *E. coli*

HUANG Dong_yan¹, YANG Bing², QI Xin³, CHEN Xiao_ling², XU Fu_zhou²

(1. College of Animal Science and Technology, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China;

2. Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100089, China; 3. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

Abstract: We designed a pair of oligonucleotide primers based on the genomic sequence of CAV Cux_1 strain, and amplified *VP1* gene by PCR. The amplification fragment was cloned into pGM_T easy vector. The result of nucleotide sequence analysis demonstrated that the cloned genomic DNA was identical with that deduced from Cux_1 strain of CAV. Then the cloned genomic DNA was subcloned into prokaryotic expression vector PET_32a(+), and the recombinant protein was expressed in *E. coli* cell. SDS-PAGE and Western Blot analysis showed that a protein with a molecular weight of 70.4 kDa was successfully expressed and CAV-infected chicken serum reacted with the recombinant protein.

Key words: Chicken infectious anemia virus; *VP1*; Cloning; Expression; *E. coli*

鸡贫血病毒(Chicken anemia virus, CAV)是鸡传染性贫血(Chicken infectious anemia, CIA)的病原。自1979年 Yuasa 等^[1]在日本首次分离到鸡贫血病毒(Gifu_1株)以来, 英国^[2]、瑞典^[3]、美国^[4~6]、巴西^[7]、阿根廷^[8]、澳大利亚^[9]、新西兰^[10]和南非^[11]等国均已发现该病毒的存在。我国于1992年首次在黑龙江省分离到 CAV^[12], 随后在河南、山东、江

苏、辽宁、吉林等地的鸡群中也陆续分离到 CAV^[13]。CAV 感染可引起雏鸡骨髓造血组织和胸腺等淋巴组织萎缩, 从而导致严重贫血, 使病鸡生长受阻, 甚至造成死亡^[14]。因此, 在世界范围内, CAV 已成为为害养禽业的重要病原体之一。

CAV 含有3个开放阅读框, 分别编码3种蛋白质(VP1, VP2 和 VP3)。VP1 是 CAV 唯一的结构蛋

收稿日期: 2006-03-12

基金项目: 北京市青年创新基金项目(2005-2007)

作者简介: 黄冬艳(1975-), 男, 江西湖口人, 讲师, 主要从事兽医微生物教学与科研工作; 杨兵为通讯作者。

白,从起始密码子至终止密码子整个阅读框架全长为 1 350 bp,蛋白分子量为 50 kDa。VP2 为辅助蛋白,与病毒的装配有关。VP3 是 CAV 的致病性蛋白^[15]。其中 VP1、VP2 和病毒的免疫保护有关^[16]。

本研究设计了一对引物,成功克隆并表达出 CAV 的 VP1,为进一步开展 CAV 的分子生物学研究和研制 CAV 的基因工程疫苗及诊断试剂盒打下了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

CAV Cux_1 株由北京市畜牧兽医研究所提供;克隆载体 pGM_T Easy Vector(TA 连接试剂盒)、感受态细胞 *E. coli*. BL21(DE3)、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、预混合蛋白质 Marker 购自北京天为时代科技有限公司;表达载体 pET_32a(+)由北京市畜牧兽医研究所李永清博士惠赠;感受态细胞 *E. coli*. DH5 α 购自博大泰克公司;Taq DNA 聚合酶, dNTPs, DNA Marker DL2000, T4 DNA Ligase, *Sal* iv, *Xho* iv 均为 Takara 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 CAV 基因组 DNA 的提取 将含 CAV 的鸡肝脏匀浆液反复冻融 3 次后 8 000 r/min 离心 10 min,先向上清中加入 RNase A, 37℃水浴作用 3 h,再加入蛋白酶 K, 56℃水浴作用 2 h,然后用等体积的酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)抽提一次,用无水乙醇沉淀后溶解于 10 mmol/L TE (pH 8.0) 中,即为病毒 DNA 溶液。

1.2.2 引物设计与合成 根据 GenBank 中发表的 CAV CUX_1 株的基因组序列,采用 Primer Premier 5.0 软件,设计并由上海博亚生物技术有限公司合成如下特异性引物:上游引物 5' TATGTCGACAGAGGCAAGACGAGCTC 3';下游引物 5' TTA CTG GAGCTTTTCAGGGCTGCGTC 3'。上游引物中引入 *Sal* iv 酶切位点,下游引物中引入 *Xho* iv 酶切位点,预期扩增产物长度约为 1 370 bp。

1.2.3 PCR 扩增 以 CAV 基因组 DNA 为模板,用上述引物扩增 VP1 基因特异片段,反应总体积 100 μ L,两种引物各 200 nmol/L,4 dNTPs 4 μ L,模板 50 ng,Taq 酶 0.5 μ L,Taq 酶 buffer 10 μ L,加灭菌去离子水至 100 μ L。扩增条件设置:94℃预变性 5 min。94℃ 1 min,57℃ 1 min,72℃ 2 min,循环 35 次。最后在 72℃延伸 10 min。

1.2.4 VP1 基因的克隆 将 VP1 基因的 PCR 产物纯化、回收后,在 T4 DNA 连接酶的作用下与 pGM_T Easy 载体进行重组连接,连接产物转入 DH5 α 受体菌。

1.2.5 重组质粒的 PCR 及酶切鉴定 将重组转化子经碱裂解法提取质粒,用 PCR 方法进行鉴定,再利用特异性内切酶 *Sal* iv, *Xho* iv 对 PCR 鉴定为阳性的重组质粒进行酶切鉴定。

1.2.6 序列测定 选取已插入目的基因的阳性重组子(命名为 pGM_VP1),利用位于 pGM_T Easy 载体多克隆位点两侧的通用测序引物结合位点,对克隆产物进行自动测序。序列测定由上海博亚生物技术有限公司完成。

1.2.7 VP1 基因的原核重组表达载体的构建和鉴定 对重组质粒 pGM_VP1 和表达载体 pET_32a(+)分别用 *Sal* iv 和 *Xho* iv 进行双酶切,产物经 0.8% 琼脂糖凝胶纯化、回收后,在 T4DNA 连接酶的作用下进行重组连接,连接产物转入 BL21(DE3)受体菌。将重组转化子经碱裂解法提取质粒,用 PCR 方法进行鉴定,再利用特异性内切酶 *Sal* iv, *Xho* iv 对 PCR 鉴定为阳性的重组质粒进行酶切鉴定。

1.2.8 基因工程重组菌的诱导表达 挑取阳性重组菌的单菌落,接种于 3 mL Amp/LB 液体培养基中。37℃ 200 r/min 振荡过夜,1:100 稀释到 Amp/LB 液体培养基中。37℃ 200 r/min 振荡培养至对数生长期(OD_{600} = 0.7),加入 IPTG 贮存液至终浓度为 1 mmol/L。37℃ 200 r/min 振荡诱导培养 5 h。

1.2.9 重组蛋白的 Western Blot 分析 表达产物经 SDS-PAGE 后,转移到硝酸纤维素膜上进行 Western Blot 分析。一抗为鸡贫血病毒免疫血清,二抗为 HRP 标记的兔抗鸡 IgG,用二氨基联苯氨显色。

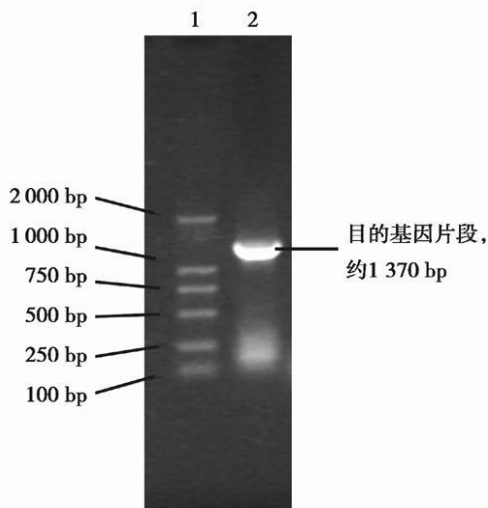
2 结果与分析

2.1 VP1 基因特异片段的 PCR 扩增

以 CAV 的基因组为模板,利用设计的特异性引物进行 PCR 扩增,获得了与预期片段大小(1 370 bp)相符、清晰且单一的扩增条带(图 1)。

2.2 重组质粒 pGM_VP1 的鉴定

从转化了重组质粒 pGM_VP1 的 *E. coli*. DH5 α 中抽提质粒,分别用 PCR 和双酶切对重组质粒进行鉴定,以 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检查,得到与目的基因(约 1 370 bp)及载体(约 3 020 bp)相同大小的片段,表明目的基因已经成功克隆到 T 载体上(图 2)。

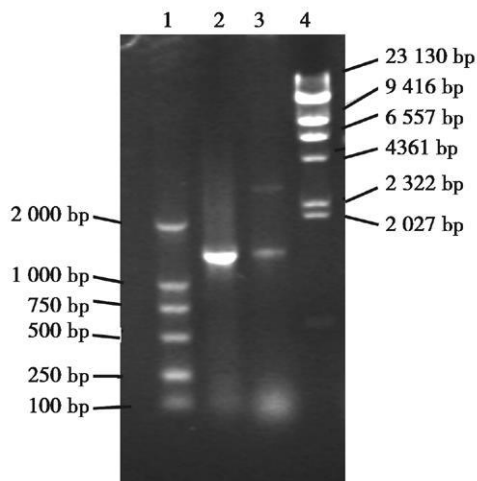


1. DL2 000 DNA Marker; 2. VP1 基因的扩增产物

1. DL2000 DNA Marker; 2. The amplification result of VP1 gene

图 1 VP1 基因的 PCR 结果

Fig. 1 The PCR product of VP1 gene



1. DL2000 DNA Marker; 2. PCR 鉴定结果;

3. 双酶切鉴定结果; 4. λ DNA/Hind III DNA Marker

1. DL2000 DNA Marker; 2. The amplification result of the recombinant plasmid pGM_VP1; 3. The recombinant plasmid pGM_VP1 digested by *Sal*I+*Xho*I; 4. λ DNA/Hind III DNA Marker

图 2 重组质粒 pGM_VP1 的鉴定

Fig. 2 Identification of the recombinant plasmid pGM_VP1

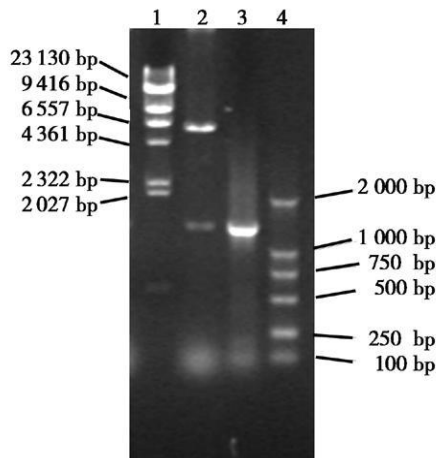
2.3 序列分析结果

将测序结果与 GenBank 中发表的 CAV Cux_1 株 VP1 基因序列进行比较。通过同源性分析表明, 扩增出的片段与 CAV Cux_1 株 VP1 基因序列只相差 2 个碱基, 同源性达 99.7%, 是所要克隆表达的目的基因片段。并且碱基的差异并没有引起氨基酸序列的变化。

2.4 重组质粒 pET_32a(+)_VP1 的鉴定

从转化了 pET_32a(+)_VP1 的 *E. coli*. BL21 (DE3) 中抽提质粒, 分别用 PCR 和双酶切对重组质

粒进行鉴定, 以 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检查, 结果得到与目的基因(约 1370 bp) 及载体(约 5900 bp) 相同大小的片段, 表明目的基因已经成功地连接到载体 pET_32a(+) 上(图 3)。



1. λ DNA/Hind III DNA Marker; 2. 双酶切鉴定结果;

3. PCR 鉴定结果; 4. DL2000 DNA Marker

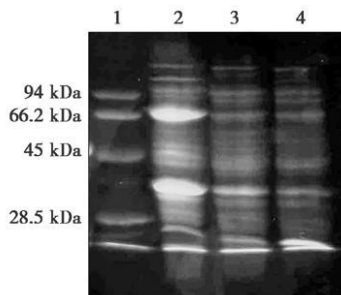
1. λ DNA/Hind III DNA Marker; 2. The recombinant plasmid pET_32a(+)_VP1 digested by *Sal*I+*Xho*I; 3. The amplification result of the recombinant plasmid pET_32a(+)_VP1; 4. DL2000 DNA Marker

图 3 重组质粒 pET_32a(+)_VP1 的鉴定

Fig. 3 Identification of the recombinant plasmid pET_32a(+)_VP1

2.5 克隆化基因的表达

含重组表达载体的 *E. coli*. BL21(DE3) 菌株以 1 mmol/L IPTG 诱导, 用 12% SDS-PAGE 分析, 可发现有目的蛋白表达, 相对分子质量约为 70.4 kDa, 与实际预测大小相符(图 4)。



1. 蛋白质 Marker; 2. pET_32a(+)_VP1 诱导后样品;

3. pET_32a(+)_VP1 诱导后样品; 4. pET_32a(+)_VP1 诱导后样品

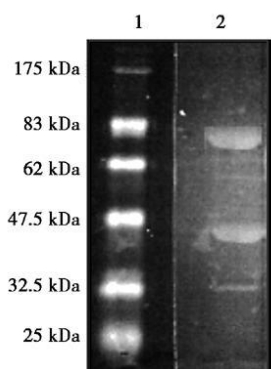
1. Protein molecular weight marker; 2. Induced plasmid pET_32a(+)_VP1; 3. Uninduced plasmid pET_32a(+)_VP1; 4. Induced plasmid pET_32a(+)_VP1

图 4 重组蛋白的表达

Fig. 4 Expression of recombinant protein

2.6 重组蛋白的 Western Blot 分析

对表达出的重组蛋白进行 Western Blot 分析, 结果表明(图 5), 重组蛋白能与 CAV 阳性血清发生反应, 具有一定的抗原性。



1. 蛋白质 Marker; 2. 纯化后的重组蛋白

1. Protein molecular weight marker; 2. The recombinant protein

图 5 重组蛋白的 Western Blot 分析

Fig. 5 Western Blot analysis of the recombinant protein

3 讨论

目前 CAV 检测的主要方法有病毒的分离及鉴定、分子生物学诊断和血清学诊断技术。CAV 广泛存在于感染鸡的胸腺、脾、骨髓、肝、肾、法氏囊及脑中, 可采取这些组织进行病毒分离, 分离病毒经细胞培养或 SPF 鸡接种可用透射电镜进行检测。分子生物学诊断技术主要有 PCR 和核酸探针技术。血清学诊断技术包括间接荧光抗体试验 (IFA)、中和试验 (VN) 和 ELISA 等。目前, 国外已经建立了各种 ELISA 技术用于检测和定量鸡血清中 CAV 抗体。Todd 等利用单克隆抗体捕获从感染的 MSB1 细胞培养物部分纯化的 CAV 作为靶抗原, 建立了高特异性和敏感性的 ELISA。用部分纯化的病毒直接包被 ELISA 反应板似乎也同样适合。这两种技术均已用于商品化的 ELISA 试剂盒的生产。高度纯化的 CAV 也适合用作 ELISA 抗原, 可是难于大批量生产这种抗原。很有希望的进展是用重组的 CAV 蛋白抗原建立的 ELISA。

VP1 是 CAV 唯一的结构蛋白, 同时也是 CAV 的主要保护性抗原, 并且许多研究已经证实, 在日本、欧洲和美洲各种 CAV 分离株间没有抗原差异。基于这一点, 我们对 CAV Cux_1 株 VP1 进行克隆和表达, 一方面将为深入研究 VP1 的功能打下基础, 另一方面为研究以 VP1 为抗原制造 ELISA 诊断试剂盒提供重要的物质基础。

参考文献:

[1] Yuasa N, Taniguchi T, Yoshida I. Isolation and characteristics of an agent inducing anemia in chicks [J]. Avian Dis, 1979, 23: 366-385.

[2] Chettle N J, Eddy R K, Wyeth P J, *et al.* An outbreak of disease due to chicken anaemia agent in broiler chickens in England [J]. Vet Rec, 1989, 124: 211-215.

[3] Engstrom B E. Prevalence of antibody to chicken anemia virus (CAV) in Swedish chicken breeding flocks correlated to outbreaks of blue wing disease (BWD) in their progeny [J]. Acta Vet Scand, 1999, 40 (2): 97-107.

[4] Goodwin M A, Brown J, Miller S L, *et al.* Infectious anemia caused by a parvovirus-like virus in Georgia broiler [J]. Avian Dis, 1989, 33: 438-445.

[5] Lucio B, Schat K A, Shivaprasad H L. Identification of the chicken anemia agent, reproduction of the disease, and serological survey in the United States [J]. Avian Dis, 1990, 34: 146-153.

[6] Rosenberger J K, Cloud S S. The isolation and characterization of chicken anemia agent (CAA) from broilers in the United States [J]. Avian Dis, 1989, 33: 707-713.

[7] Brentano L, Mores N, Wentz I, *et al.* Isolation and identification of chicken infectious anemia virus in Brazil [J]. Avian Dis, 1991, 35: 793-800.

[8] Buscaglia C, Crosetti C F, Nervi P. Identification of chicken infectious anaemia, isolation of the virus and reproduction of the disease in Argentina [J]. Avian Pathol, 1994, 23: 297-304.

[9] Connor T J, McNeilly F, Firth G A, *et al.* Biological characterization of Australian isolates of chicken anaemia agent [J]. Aust Vet J, 1991, 68: 199-201.

[10] Stanislawek W L, Howell J. Isolation of chicken anaemia virus from broiler chickens in New Zealand [J]. NZ vet J, 1994, 42: 58-62.

[11] Wicht J V, Maharaj S B. Chicken anaemia agent in South Africa [J]. Vet Rec, 1993, 133: 147-148.

[12] 崔现兰, 辛桂香, 吴东来, 等. 鸡传染性贫血病毒的鉴定 [J]. 中国畜禽传染病, 1992, (6): 3-5.

[13] Zhou W, Shen B, Yang B, *et al.* Isolation and identification of chicken infectious anemia virus in China [J]. Avian Dis, 1997, 41 (2): 361-364.

[14] Landman W J, vd Bogaard A E, Doornenbal P, *et al.* The role of various agents in chicken amyloid arthropathy [J]. Amyloid, 1998, 5(4): 266-278.

[15] Notebom M H M, de Boer G F, Van Roozelaar D J, *et al.* Characterization of cloned chicken anemia virus DNA that contains all elements for the infectious replication cycle [J]. J Virol, 1991, 65(6): 3131-3139.

[16] Koch G, Van Roozelaar D J, Verschueren C A, *et al.* Immunogenic and protective properties of chicken anaemia virus proteins expressed by baculovirus [J]. Vaccine, 1995, 13 (8): 763-770.