

禽网状内皮组织增生病毒囊膜蛋白基因的克隆及其原核表达

瞿晓兰^{1,2}, 王宏俊², 陈小玲², 章振华¹

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

摘要:以本实验室保存的 REV 毒株为模板, 采用 RT-PCR 技术扩增了 REV *env* 部分基因, 长为 939 bp, 并进行亚克隆到 pMD18T 质粒载体上, 连接、转化、鉴定后得到阳性重组质粒 pET_{env}, 将目的片段进行序列分析, 结果表明, 该 REV 的 *env* 基因与已发表的 SNV 株、中国 HA9901 株以及 A 株同源性均达 94% 以上, 推导的氨基酸同源性为 94% 以上。将该基因片段与原核表达载体 pET_{32a} 重组, 并将重组质粒转化至宿主菌 BL21 中, 用 IPTG 诱导表达, 对表达的蛋白用 SDS-PAGE 电泳, 免疫印迹和薄层凝胶扫描分析, 表达产物与理论推理一致; 免疫印迹结果证明, 表达的 *env* 蛋白可被 REV 阳性血清所识别。

关键词: 禽网状内皮组织增生病毒; *env* 基因; 克隆; 原核表达

中图分类号: S432.4⁺1 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2006)增刊-0154-04

Cloning and Prokaryotic Expressing of the Envelope Glycoprotein Gene of Avian Reticuloendotheliosis Virus

QU Xiao_lan^{1,2}, WANG Hong_jun², CHEN Xiao_ling², ZHANG Zhen_hua¹

(1. College of Jiangxi Agricultural University, Nanchang, Jiangxi 30045, China; 2. Institute of Veterinary and Animal Husbandry, Beijing Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Beijing 100089, China)

Abstract: The viral sub-genome mRNA of Avian *Reticuloendotheliosis* Virus was amplified with RT-PCR. A DNA fragment was amplified which contains a part of *env* gene, and the size of the DNA fragment about 939 bp. The PCR products were purified and then cloned into plasmid pMD18T, the recombinant plasmid were designated pMD_{env} and analyzed by endonuclease digestion from proper inserts. The sequence analysis of the insert fragment in the recombinant pMD_{env} indicated that *env* shared more than 94% with SNV strain, HA9901 strain, and A strain. The amino acid sequence homology was above 94%. The *env* gene was subcloned into a prokaryotic expressing vector, pET_{32a}. Molecular cloning of *env* gene from REV provides a basis for the studies on protein expressing and molecular characteristic, and the constructed recombinant pET_{env} can be used in further protein expressing.

Key words: REV; *env* gene; Cloning; Prokaryotic expressing

禽网状内皮组织增生症病毒(Avian *Reticuloendotheliosis* Virus, REV)是禽网状内皮组织增生症的病原, 属反转录病毒科禽网状内皮组织增生症病毒属。该病毒主要侵害火鸡, 也能引起鸡、鸭等禽类以淋巴-网状细胞增生为特征的肿瘤性的一种综合

征^[1~3], 引起易感动物免疫抑制, 导致细胞免疫和体液免疫能力下降, 并发感染其他疾病。目前已分离到的 REV 有 30 多种毒株, 不同毒株的致病力不同, 但均具有相似的抗原特性。REV 基因组由 *gag*, *pol*, *env* 基因以及 LTR 组成, 其中囊膜蛋白(*env*)是

收稿日期: 2006-03-24

基金项目: 北京市优秀人才项目

作者简介: 瞿晓兰(1979-), 女, 在读硕士, 主要从事动物分子病毒学与免疫学研究; 王宏俊为通讯作者。

REV 主要变异基因。病毒的囊膜决定病毒的抗原性, *env* 在鸡体内表达可抵抗相应病毒的感染^[4]。本文用 RT-PCR 方法扩增出约 939 bp 的 *env* 片段, 克隆于 pMD18_T 载体, 对其进行克隆测序和序列分析, 并亚克隆于原核载体 pET_32a 进行表达, 为 REV 感染的诊断或流行病学调查奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 病毒与血清

禽网状内皮组织增生症病毒(REV) 及其阳性鸡血清由山东农业大学崔治中教授惠赠。9~ 10 日龄鸡胚购自中国兽医药品监察所。

1.2 主要试剂

RNA 提取试剂盒 TRIZOL Reagent 购于 Invitrogen 公司; 各种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶和 dNTPs 均购自 Takara 公司; 小量质粒提取试剂盒、胶回收纯化试剂盒购自北京天为时代公司。

1.3 质粒与菌种

pMD18_T 质粒载体均购自 Promega 公司; 感受态细胞 DH₅α 及 pET_32a 质粒由北京市农林科学院畜牧兽医研究所高技术研究室保存。

1.4 引物设计

根据 GenBank 报告的 REV 基因序列, 应用 Primer 5.0 软件设计了一对引物。其中上游引物引入限制性内切酶 *EcoR* I 和翻译起始密码子 ATG, 下游引物引入限制性内切酶 *Sal*I, 预期扩增长度为 939 bp, 由上海博亚生物技术有限公司合成。

上游 Primer: 5' GAATTC ATG TGC AGT CTT AGC3'; 下游 Primer: 5' GTCGAC AAA TCA TTG ACC TAG3'。

1.5 REV 的繁殖

鸡胚成纤维细胞(CEF) 由 10 日龄 SPF 鸡胚制得。营养液为含 5% 小牛血清的 DMEM。细胞第一次传代后在 90% 铺满的细胞培养瓶中倾去细胞液, 接入 0.5 mL 含 REV 病毒的细胞混悬液, 37 °C 感作 2 h, 再加入含 1% 小牛血清的 DMEM 培养液培养。方法见文献[5]。

1.6 RNA 的制备

用 Trizol 法进行 RNA 的提取, 方法参用 Trizol 使用说明。

1.7 RT-PCR

1.7.1 RT 反应 取提取的总 RNA 5 μL、Oligo(dT) primer(0.5 μg/μL) 1 μL、DEPC 处理过的 ddH₂O 6 μL、

5× Reaction buffer 4 μL、RNase inhibitor(20 U/μL) 1 μL、dNTPs(10 mmol/L) 2 μL、RT 反转录酶(200 Ug/μL) 1 μL, 20 μL 体系按以下条件进行反转录反应: 70 °C 温育 5 min, 37 °C 温育 5 min, 42 °C 温育 60 min, 70 °C 温育 10 min, 终止反应, -20 °C 保存备用。

1.7.2 PCR 反应 以合成的 cDNA 第一链为模板, 利用上述引物扩增 *env* 基因片段, 反应总体积 25 μL: 10× Buffer 2.5 μL、Mg²⁺(25 μmol/L) 2 μL、dNTP 2 μL、Taq 酶 0.5 μL、引物(上、下游)各 1 μL(25 μmol/L)、cDNA 3 μL、dd H₂O 14 μL, PCR 反应程序: 95 °C 5 min; 94 °C 45 s, 53 °C 50 s, 72 °C 1 min, 循环 30 次; 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.8 PCR 产物的克隆

1.8.1 PCR 产物的回收及纯化 参考 DNA 凝胶回收试剂盒说明书操作。

1.8.2 连接 在 10 μL 反应体系中进行, Ligation buffer 5 μL、pMD_18T 载体 1 μL、PCR 回收产物 3 μL、dd H₂O 1 μL, 16 °C 连接过夜。

1.8.3 转化质粒 DNA 按文献^[6], 采用热击法, 将重组质粒转化大肠杆菌 DH₅α。

1.9 重组质粒的酶切及 PCR 鉴定

挑取数个可疑的白色单菌落, 提取质粒, 命名为 pT_*env*, 用 PCR 方法进行鉴定, 再用 *EcoR*I 和 *Sal*I 进行双酶切鉴定重组子。

1.10 序列分析

挑取已鉴定为阳性的单个克隆, 接种于 5 mL LB 培养基中, 加 Amp 使其终浓度为 100 mg/L, 37 °C 过夜培养, 由上海博亚生物技术有限公司以通用引物对插入片段进行序列测定, 利用 DNA star 软件将测序结果与其他国内外已发表的 REV 基因进行核苷酸及编码氨基酸同源性分析。

1.11 原核表达质粒的构建及酶切鉴定

将重组质粒 pT_*env* 和原核表达载体 pET_32a 分别以 *EcoR*I 和 *Sal*I 双酶切, 0.8% 的琼脂糖凝胶回收目的片段, 连接, 转化感受态细胞, 随机挑选菌落培养, 小提质粒, 命名为 pET_*env*, 用 *EcoR*I 和 *Sal*I 进行双酶切鉴定。

1.12 重组质粒的诱导表达及其检测

1.12.1 诱导表达 挑取含重组质粒的单菌落, 移入 3 mL 含氨苄青霉素 100 mg/L 的 LB 培养基中, 37 °C 振荡过夜, 取 50 μL 菌液接种于 5 mL LB 培养基(含 Amp) 中振荡培养, 测其 OD₆₀₀ 值达 0.6~ 0.8 时,

在室温中以 0.8 mmol/L IPTG 诱导表达 6 h, 同时设置阴性对照。

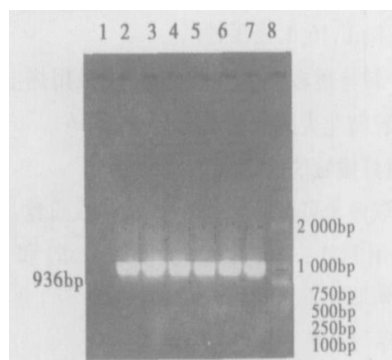
1.12.2 SDS-PAGE 电泳 按常规方法制备 12% 分离胶和 5% 浓缩胶。取 1 mL 菌液离心, 去上清, 加入 100 μ L 2 \times SDS 上样缓冲液, 90 μ L 灭菌水和 10 μ L DTT, 悬浮沉淀, 混匀, 煮沸 10 min, 12 000 r/min 离心 5 min, 取 16 μ L 进行蛋白电泳观察结果。

1.12.3 Western blotting 检测 表达产物经 SDS-PAGE 后, 将凝胶转移到 NC 膜上进行免疫印迹鉴定。一抗为 REV 阳性血清, 二抗为 HRP 标记的兔抗鸡 IgG, 用底物二氨基联苯氨(DAB)和过氧化氢显色。诱导前和后的空载体作为对照。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增结果

从 REV RNA 中, 利用 RT-PCR 方法扩增出一条大小为 939 bp 左右的 DNA 片段 (图 1), 其大小与目的片段理论值相符。



1. 阴性对照; 2~ 7. 扩增片段; 8. DL200Marker
1. Negative control; 2~ 7. Production of RT-PCR; 8. DNA marker

图 1 *env* 基因 RT-PCR 扩增结果

Fig. 1 RT-PCR results of *env* gene

2.2 重组质粒的克隆和鉴定

通过对阳性质粒 pT_{env} 的 PCR 和双酶切鉴定, PCR 扩增出一条约为 939 bp 的 DNA 条带, 用 *EcoRI* 和 *SalI* 进行双酶切鉴定, 结果切出的两条带大小分别为 2 690 bp 和 939 bp (图 2), 结果表明, 目的基因已克隆到质粒载体上。

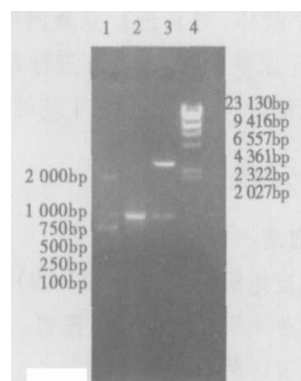
2.3 序列分析结果

克隆出的 *env* 基因从 ATG 开始共 939 bp, 利用 DNASTar 软件分析表明, pET_{env} 与美国 SNV 株、中国 HA9901 株以及 A 株的氨基酸同源性分别达 99.7%、96.1% 和 94.5%, 是所要克隆表达的目的基因片段。

2.4 原核表达质粒 pET_{env} 的酶切鉴定

对阳性重组质粒 pET_{env} 进行 PCR 和双酶切鉴

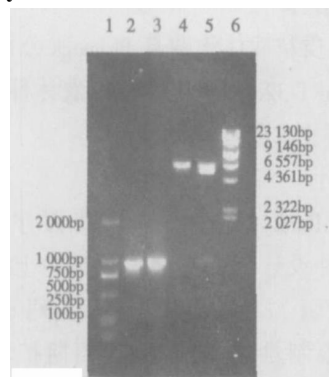
定, 双酶切后出现 5.9 kb 和 939 bp 两条带。鉴定表明 *env* 基因以正确的方向插入到原核表达载体 pET_{32a} 中 (图 3)。



1. DNA 分子量标准; 2. 重组质粒 PCR 产物;
3. *EcoRI* *SalI* 双酶切; 4. ADNA/*Hind* III marker
1. DNA marker; 2. Product of PCR; 3. pT_{env} digested by
EcoRI and *SalI*; 4. ADNA/*Hind* III marker

图 2 重组质粒 PCR 和酶切鉴定结果

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid pT_{env} by PCR and restriction endonuclease



1. DNA 分子量标准; 2, 3. PCR 产物;
4. 表达载体阴性对照; 5. *EcoRI* 和 *SalI* 双酶切结果;
6. ADNA/*Hind* III marker

1. DNA marker; 2, 3. Product of PCR; 4. Negative PET_{32a} control;
5. PET_{env} oligested *EcoRI* and *SalI*; 6. ADNA/*Hind* III Marker

图 3 重组质粒 pPER_{env} PCR 和酶切鉴定结果

Fig. 3 Identification of recombinant plasmid pPER_{env} by PCR and restriction endo, Culex

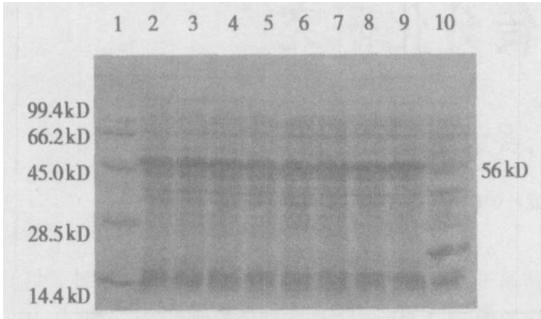
2.5 重组表达质粒 pET_{env} 的表达

经 SDS-PAGE 电泳后, 可见空载体 pET_{32a} 诱导表达出现一条分子量为 22 kDa 的载体自身编码的蛋白条带, 重组转化菌诱导表达后却在 56 kDa 处明显增加了一条蛋白带, 表明重组菌在诱导后表达了外源蛋白, 且外源片段大小约为 34 kDa, 与理论推导的大小相符 (图 4)。

2.6 免疫印迹鉴定分析

重组融合蛋白 pET_{env} 经 SDS-PAGE 电泳, 用兔抗鸡 IgG 进行免疫印迹检测, 出现一条特异性的抗原抗体结合带, 分子量大小与目的蛋白相同, 从而证

明所表达的蛋白具有抗体结合活性(图5)。

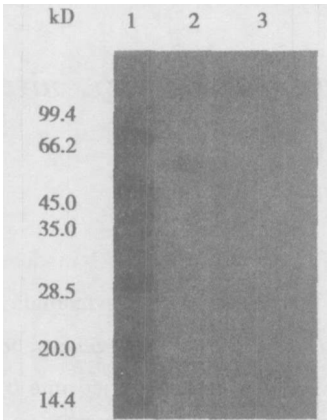


1. 蛋白分子量标准; 2~ 9. 分别不同 IPTG 浓度诱导 pETenv; 10. 诱导后的 pET_32A

1. Protein Marker; 2~ 9. Induced bacteria with PET_env by IPTG;
10. Induced bacteria with PET_32a by IPTG

图4 env 表达重组质粒在 BL21 中诱导表达后的 SDS PAGE 分析

Fig. 4 SDS PAGE of induced BL21 bacteria with PET_env



1. 蛋白分子量标准; 2. pET_env; 3. pET 空载体

1. Protein marker; 2. Product of PET_env induced by IPTG;
3. Product of PET_32a induced by IPTG

图5 Wester bolting 免疫原性检测

因, 与宿主产生中和抗体相关。在本研究中, 利用表达性载体 pET_32a 成功地对 REV env 进行了原核表达系统的构建, 为进一步 REV 的生物学活性及防治提供了重要依据。

通过对本实验室保存的 REV 毒株 env 基因克隆片段序列分析、氨基酸序列分析及与 GenBank 中已发表的 SNV 株、HA9901 株、A 株同源性比较可见, 本试验的 REV 株与 SNV 株同源性最高, 核苷酸序列和氨基酸序列分别为 99. 7% 和 98. 7%。在和其他毒株序列分析比较中, 同源性都在 94% 以上, 这种高度保守性及其在致病性和病毒复制转录过程中的作用, 为其在体外大量表达, 作为诊断抗原和制备多抗血清及单抗进行疾病诊断提供了基础。

参考文献:

[1] Calnek B W, Witter R L. Disease of Poultry[M] , 10th edition, Ames, USA: Iowa State U niv Press, 1997: 467- 484.

[2] 吉 荣,赵文明, 钱 莉, 等. REV 分离株囊膜糖蛋白基因的克隆及序列分析[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版) , 2003, 24(1) : 23- 25.

[3] 赵文明, 吉 荣, 丁家波, 等. REV 囊膜糖蛋白基因真核表达载体的构建[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版) , 2004, 25(1) : 22- 24.

[4] Delwart E L, Panganiban A T. Role of reticuloendotheliosis virus envelope glycoprotein in superinfection interference[J]. J Virol, 1989, 63(1) : 273- 280.

[5] 殷 震, 景 华. 动物病毒学(第2 版)[M]. 北京: 科学出版社, 1997: 204- 246.

[6] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 黄培唐, 等译. 分子克隆实验指南(第3 版)[M]. 北京: 科学出版社, 2002.

3 讨论

囊膜糖蛋白(env) 基因是 REV 的主要功能基