

I 型鸭肝炎病毒 VP1 基因重组鸭瘟病毒载体的构建

张 婧, 董嘉文, 罗永文, 郭霄峰

(华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要:为了构建含有 I 型鸭肝炎病毒 VP1 基因的重组鸭瘟病毒, 将已建立的鸭瘟病毒 TK 基因缺失转移载体 (pBlueSK-TK-EGFP) 进行改造, 在其绿色荧光表达盒内插入 I 型鸭肝炎病毒 VP1 基因, 将重组后的转移载体 (pBlueSK-TK-EGFP-VP1) 转染已感染鸭瘟病毒的鸭胚成纤维细胞. 原始病毒液在鸭胚成纤维细胞上盲传 3 代后仍能观察到绿色荧光; 以 I 型鸭肝炎病毒阳性血清对 pBlueSK-TK-EGFP-VP1 转染的细胞样品作 Western-blot 检测, 出现特异条带, 且相对分子质量约为 54 000. 结果表明该研究已成功构建携带 I 型鸭肝炎病毒 VP1 基因的鸭瘟病毒 TK 基因缺失转移载体, 其能够在真核细胞中正确表达.

关键词: I 型鸭肝炎病毒; 鸭瘟病毒; VP1 基因; 载体构建

中图分类号: S852.65

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2011)04-0101-04

Construction of Recombinant Duck Plague Virus with VP1 Gene of Duck Hepatitis Virus Type I

ZHANG Jing, DONG Jia-wen, LUO Yong-wen, GUO Xiao-feng

(College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: In order to construct recombinant duck plague virus (DPV) containing VP1 gene of duck hepatitis virus type I (DHV-I), the VP1 gene of DHV-I was amplified and inserted into EGFP expression cassette of TK gene-deleted transfer vector (pBlueSK-TK-EGFP) for DPV. The recombinant transfer vector (pBlueSK-TK-EGFP-VP1) was transfected into the DPV infected duck embryo fibroblasts (DEF) and the green fluorescence was still observed in cells after the third blind passage. A specific band (54 000) was detected in pBlueSK-TK-EGFP-VP1 transfected cells by Western-blot using positive serum of DHV-I. These results showed that transfer vector pBlueSK-TK-EGFP-VP1 was successfully constructed and expressed in eukaryotic cells.

Key words: duck hepatitis virus type I; duck plague virus; VP1 gene; vector construction

鸭病毒性肝炎 (Duck viral hepatitis, DVH) 是由鸭肝炎病毒 (Duck hepatitis virus, DHV) 引起的急性高度致死性传染病, 4 周龄以内的雏鸭 (特别是 1 周龄雏鸭) 为其主要的侵害对象, 该病已经成为危害养鸭业的主要疾病之一^[1]. 鸭肝炎病毒属于小 RNA 病毒科肠道病毒属. 该病毒现有 3 个血清型, 其中以 I 型鸭肝炎病毒流行广, 影响范围大^[2]. 我国发生的鸭病毒性肝炎主要由 DHV-I 引起, 主要造成 5 ~ 10 日龄雏鸭发病, 发病率为 50% ~ 70%. 目前主要采取弱毒疫苗注射, 并同时采取饮水消毒、加强饲料管理等

方法进行综合防治^[3]. DHV-I 的基因组 P1 区编码病毒特异性结构蛋白 VP0 (VP2 和 VP4 前体)、VP3 和 VP1. 其中, VP1 基因位于 DHV-I 基因组的 2 103 ~ 2 816 位, 该基因由 714 个核苷酸组成, 编码 238 个氨基酸^[4]. I 型鸭肝炎病毒 VP1 区存在多个免疫优势辅助性 T 淋巴细胞抗原位点, 构成主要的 T、B 淋巴细胞抗原表位, 能够起到诱导机体产生中和抗体的作用^[5], 因此, VP1 基因常作为鸭肝炎病毒分子流行病学调查的主要参考依据^[6-7]. 鸭瘟病毒 (Duck plague virus, DPV) 属于疱疹病毒科, α -疱疹病毒亚

收稿日期: 2010-12-01

作者简介: 张 婧 (1985—), 女, 硕士研究生; 通信作者: 郭霄峰 (1963—), 男, 教授, 博士, E-mail: xfguo@scau.edu.cn

科. 该病毒基因组为双股线状 DNA, 大小约为 150 kb. α -疱疹病毒基因组中存在广泛的非必需区, 使用这些非必需区插入外源基因, 已经成功构造了多种动物的疱疹病毒重组载体系统^[8-9], 为各种病毒活载体疫苗研究做出贡献. 因此, 本研究在已构建的鸭瘟病毒 TK 基因缺失转移载体 (pBlueSK-TK-EGFP) 的基础上, 构建了表达 I 型鸭肝炎病毒 VP1 基因的重组转移载体 (pBlueSK-TK-EGFP-VP1), 为进一步研究 I 型鸭肝炎病毒 VP1 蛋白功能及鸭瘟-鸭病毒性肝炎二联疫苗的研制奠定了基础.

1 材料与方法

1.1 毒株、菌种、质粒

鸭瘟病毒 TK 基因缺失转移载体 (pBlueSK-TK-EGFP), 该质粒是将鸭瘟病毒疫苗株 UL22-TK-UL24 DNA 片段克隆于 pBluescript SK + 载体中, 构建了 pBlueSK-TK 质粒. 而后将 PCR 扩增的 EGFP 真核表达盒插入 pBlueSK-TK 质粒的 TK 基因内部, 缺失了 TK 基因中间部位约 102 个碱基, 获得转移载体 pBlueSK-TK-EGFP. 鸭瘟病毒弱毒株 GD01 株、大肠埃希菌 Top10 由华南农业大学兽医学院微生物学教研室分离保存; I 型鸭肝炎病毒 R 株 (DHV-I-R) 由华南农业大学张桂红教授惠赠; 10~12 日龄鸭肝炎病毒非免疫鸭胚购自三水联科畜禽良种鸭场.

1.2 试剂

pMD18-T Vector 为宝生物工程 (大连) 有限公司产品; I 型鸭肝炎病毒阳性血清由青岛易邦生物工程有限公司李明义研究员惠赠; AMV 反转录酶、Premix Ex-Taq DNA 聚合酶、碱性磷酸酶、Trizol 试剂为 TaKa-La 公司产品; T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *Kpn*2I 为 Fermentas 公司产品; DNA 胶回收试剂盒为 Omega 公司产品; 质粒抽提试剂盒为 QIAGEN 公司产品; 转染用脂质体 LipofectamineTM 2000 为 Invitrogen 产品; 胎牛血清、DMEM 培养液为 GBICO 公司产品; 辣根过氧化物酶标记羊抗鸭二抗为 KPL 公司产品.

1.3 I 型鸭肝炎病毒 R 株 VP1 基因的克隆

1.3.1 引物设计与合成 根据 GenBank (登录号: EF585200) 报道序列设计 1 对引物: DHVP4-1: 5' TCTCCGGAGGTGATTCTAACCAGTT 3'; DHVP4-2: 5' TCTCCGGATTCAATTTCCAGATTG 3'. 其中 TCCGGA 为 *Kpn*2I 的酶切位点 (引物由上海英骏生物技术有限公司合成).

1.3.2 DHV-I-R 的培养及 RNA 的提取 按照董嘉文^[10]的方法制备鸭胚成纤维细胞 (DEF) 并培养 DHV-I-R, 用 Trizol 法提取已接种 DHV-I-R 细胞培养

物总 RNA, 利用 AMV 反转录酶进行逆转录. 在 PCR 管中分别加入 5 × AMV Buffer 4 μ L、dNTPs (10.0 mmol/L) 2 μ L、RNA 酶抑制剂 1 μ L、引物 DHVP4-2 1 μ L、AMV 反转录酶 1 μ L、模板 RNA 8 μ L 及无 RNase 去离子水 3 μ L, 在 42 $^{\circ}$ C 水浴作用 1 h, 获得的 cDNA 直接用于 PCR.

1.3.3 PCR 反应及 PCR 产物的克隆和序列测定

在 PCR 管中分别加入 10 × Ex PCR Buffer 2 μ L、dNTPs (2.5 mmol/L) 2 μ L、DHVP4-1 和 DHVP4-2 各 1 μ L、Ex-Taq 0.2 μ L、DNA 模板 2 μ L、超纯水 11.8 μ L.

94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min、94 $^{\circ}$ C 30 s、54.5 $^{\circ}$ C 1 min、72 $^{\circ}$ C 1 min、72 $^{\circ}$ C 10 min、30 个循环. PCR 反应结束后在 0.01 g/mL 琼脂糖凝胶中电泳检测目的条带. 之后用胶回收试剂盒将目的片段回收, 与 pMD18-T 载体连接. 挑取可疑质粒做酶切鉴定 (使用 *Kpn*2I) 以及测序鉴定, 阳性质粒命名为 pMD18-VP1.

1.4 重组载体的构建及酶切、测序鉴定

以 *Kpn*2I 分别对鸭瘟病毒 TK 基因缺失转移载体及 pMD18-VP1 单酶切, 回收线性鸭瘟病毒 TK 基因缺失转移载体 (使用碱性磷酸酶处理酶切后的片段, 防止由于单酶切造成质粒自连) 和 VP1 基因后连接. 挑取可疑质粒后进行酶切鉴定 (使用 *Kpn*2I) 及测序鉴定, 阳性质粒命名为 pBlueSK-TK-EGFP-VP1.

1.5 转染

以去内毒素的中量质粒提取试剂盒提取重组质粒, 按照 LipofectamineTM 2000 产品说明书方法转染已接种 DPV-GD01 株 1 h 的 DEF 细胞, 4 h 后, 吸出转染混合液, 加入含有体积分数为 10% 胎牛血清 DMEM 细胞培养液, 于 37 $^{\circ}$ C 培养 48 h 后收取细胞和培养液作为重组病毒原始毒液.

1.6 重组病毒的鉴定

1.6.1 重组病毒荧光检测以及 DNA PCR 检测 将重组病毒原始病毒液接种 DEF 细胞盲传 3 代, 在荧光显微镜下观察. 然后 DEF 细胞反复冻融 3 次, 12 000 r/min 离心 10 min, 收取上清液, 按碱裂解法提取 DNA, 以其为模板, 按上述 1.3.3 方法进行 PCR 鉴定.

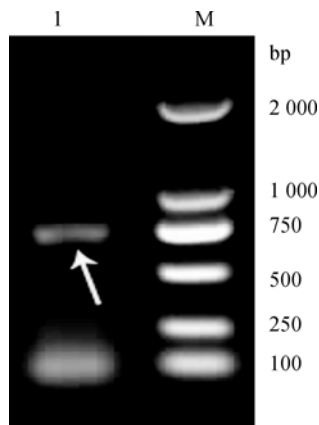
1.6.2 重组病毒 Western-blot 检测 将重组质粒 pBlueSK-TK-EGFP-VP1 转染 DEF 细胞 4 h 后, 使用含有体积分数为 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液进行培养 48 h, 收取细胞培养液, 反复冻融 3 次, 以 12 000 r/min 离心 8 min 收取细胞上清液为样品, 以体积比 1:1 的比例加入 2 × SDS Loading buffer, 沸水中煮 5 min 后 12 000 r/min 离心 2 min, 吸取上清液, 以 SDS-PAGE 分离蛋白后, 湿转至硝酸纤维素薄膜上, 使用 0.05 g/mL 脱脂奶粉-TBS 进行 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜.

使用 TBS 洗膜后(共 3 次,每次 10 min),加入 1:50 (体积比) TBS 稀释过的鸭病毒性肝炎阳性血清孵育 3 h,使用 TBS 洗膜后(共 3 次,每次 10 min),加入 1:1 000 (体积比) TBS 稀释过的辣根过氧化物酶标记羊抗鸭 IgG 孵育 3 h,使用 TBS 洗膜后(共 3 次,每次 10 min),加入化学发光底物 ECL 显色,胶片收集信号,观察结果。

2 结果

2.1 I 型鸭肝炎病毒 R 株 VP1 基因扩增

为了获得 I 型鸭肝炎病毒 R 株 VP1 基因,以鸭肝炎病毒 DHV-I-R 株的细胞培养物总 RNA 为模板, DHVP4-1 和 DHVP4-2 为引物进行 RT-PCR。结果显示,扩增的 DNA 大小约为 730 bp,与理论预测结果相符(图 1)



M: DNA marker DL2000; 1: VP1 基因 RT-PCR 产物。

图 1 DHV-I-R 株 VP1 基因 RT-PCR 产物

Fig. 1 RT-PCR product of VP1 gene of DHV-I-R

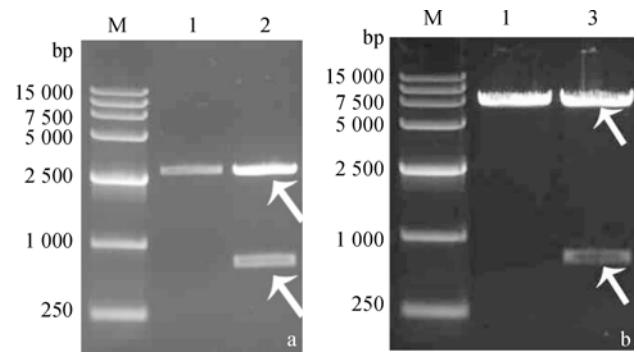
2.2 重组质粒 pMD18-VP1 酶切及测序鉴定

回收的 PCR 产物与克隆载体 pMD18-T 连接,获得多个可疑克隆。以 *Kpn*2I 处理重组质粒 pMD18-VP1,电泳后可见 2 600 和 730 bp 2 条 DNA 带(图 2a)。将 PCR 阳性克隆送上海英骏生物技术有限公司测序,再经生物学软件 DNASTar 的比对分析,表明 VP1 基因与 T 载体连接成功。测序结果与 GenBank 上发表的 DHV-I-R 株 VP1 序列有 2 个碱基的差别,即造成 2 个碱基的突变,分别是 551 位碱基 a→g, 558 位碱基 a→c,分别造成第 184 位氨基酸由 Lys→Arg,第 186 位氨基酸由 Lys→Asn,核苷酸相似性为 99.72%,氨基酸相似性为 99.16%。

2.3 重组质粒 pBlueSK-TK-EGFP-VP1 酶切及测序鉴定

以 *Kpn*2I 分别酶切 pBlueSK-TK-EGFP 和 pMD18-VP1,回收 pBlueSK-TK-EGFP 和 VP1 片段,并进行连接,获得多个可疑克隆。以 *Kpn*2I 酶切之后电

泳检测,结果显示 7 000 和 730 bp 2 条 DNA 带(图 2b)。将酶切鉴定阳性的克隆送上海英骏生物技术有限公司测序,并用 DNASTar 软件对所测序列进行分析,表明鸭肝炎病毒 VP1 基因已经成功连接到鸭瘟病毒 TK 基因缺失转移载体中,同时,测序结果证明片段连接方向正确。



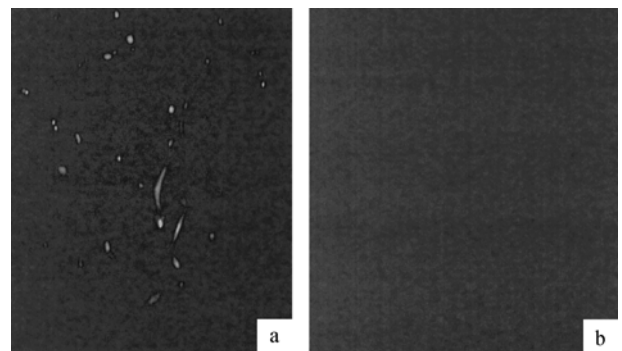
M: DNA marker DL15000; 1: 阴性质粒对照; 2: pMD18-VP1 *Kpn*2I 酶切产物; 3: pBlueSK-TK-EGFP-VP1 *Kpn*2I 酶切产物。

图 2 重组质粒 pMD18-VP1 (a) 和 pBlueSK-TK-EGFP-VP1 (b) *Kpn*2I 单酶切鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid pMD18-VP1 (a) and pBlueSK-TK-EGFP-VP1 (b) by *Kpn*2I digestion

2.4 重组病毒荧光结果

以重组病毒原始毒液接种 DEF 细胞后盲传 3 代,在荧光显微镜下观察,结果(图 3)显示,在镜下可见绿色荧光,说明 pBlueSK-TK-EGFP-VP1 中绿色荧光蛋白得到表达。



a: pBlueSK-TK-EGFP-VP1 转染的鸭胚成纤维细胞中 EGFP 的表达; b: 阴性质粒对照。

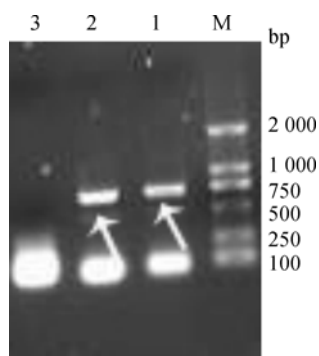
图 3 pBlueSK-TK-EGFP-VP1 转染的鸭胚成纤维细胞中 EGFP 的表达(200 ×)

Fig. 3 Expression of EGFP in pBlueSK-TK-EGFP-VP1 transfected duck embryo cells(200 ×)

2.5 重组病毒 DNA PCR 扩增结果

以重组病毒原始毒液接种 DEF 细胞,盲传 3 代后收集细胞上清液,按碱裂解法提取 DNA,并以其为模板,按 1.3.3 方法进行 PCR 检测,结果显示,扩增出 DNA 大小约为 730 bp(图 4),说明 DHV VP1 片段

已成功连接到鸭瘟病毒 TK 缺失转移载体中,并跟随该转移载体与鸭瘟病毒 GD01 株进行了同源重组.



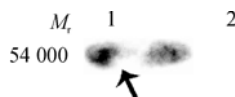
M: DNA marker DL2000; 1, 2: 重组病毒 DNA PCR 产物; 3: 阴性对照.

图4 重组病毒 DNA 的 PCR 检测

Fig. 4 PCR result of DNA of recombinant virus

2.6 Western-blot 检测结果

将重组质粒 pBlueSK-TK-EGFP-VP1 转染 DEF 细胞 4 h 后,使用含有体积分数为 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液进行培养 48 h,收取细胞培养液,反复冻融 3 次,以 12 000 r/min 离心 8 min 收取细胞上清液.以该上清液作为样品进行 Western-blot 鉴定.结果表明:使用 X 胶片显影、定影后出现特异条带(图 5),根据生物学软件分析其相对分子质量为 54 000,为绿色荧光蛋白与 VP1 基因融合表达产物,说明 VP1 基因在插入绿色荧光蛋白表达盒多克隆位点之后可以与绿色荧光蛋白融合表达.



1: 重组质粒 pBlueSK-TK-EGFP-VP1 转染 DEF 细胞样品; 2: 阴性载体对照

图5 重组质粒 pBlueSK-TK-EGFP-VP1 的 Western-blot 鉴定

Fig. 5 Western-blot analysis of expressed VP1 in pBlueSK-TK-EGFP-VP1 transfected DEF

3 讨论

本研究通过酶切、PCR、Western-blot 等手段证明了所构建的重组转移载体 pBlueSK-TK-EGFP-VP1 能够在真核细胞中正确表达 DHV-I-R VP1 基因和绿色荧光蛋白的融合蛋白,并且初步验证了重组转移载体与鸭瘟病毒发生了同源重组.其中,鸭肝炎病毒 VP1 蛋白是该病毒的主要结构蛋白,能够诱导产生抗体,是目前为止研究鸭病毒性肝炎毒力蛋白的主要研究对象.本文所构建的含有绿色荧光蛋白表达的真核表达载体 pBlueSK-TK-EGFP-VP1,为以上 2 种病毒基因功能的研究奠定了基础.

pMD18-VP1 测序结果与 GenBank 上发表的

DHV-I-R 株 VP1 序列有 2 个碱基的差异,造成了 2 个氨基酸的突变.经过反复抽提 RNA,并使用高保真酶,测序结果仍然是 551 位碱基 a→g,558 位碱基 a→c.根据何冉娅等^[5]的研究结果,DHV VP1 氨基酸序列高变区主要分布在 46~64、95~149、180~223 位,而本试验中碱基变异造成的氨基酸序列变化位置在 184、186 位,处于 DHV VP1 氨基酸序列高变区.因此本试验中碱基变异原因可能是种毒中编码高变区氨基酸的碱基发生突变,造成体外克隆的片段出现变异.

疱疹病毒重组载体是具有重大开发价值的病毒载体,重组 α-疱疹病毒已作为研究动物多价重组病毒疫苗的热点,但在这一领域鸭瘟病毒研究较少.因此,将危害养禽业的 I 型鸭肝炎病毒保护性抗原基因 VP1 基因插入鸭瘟病毒 TK 基因缺失转移载体 (pBlueSK-TK-EGFP) 中,构建二价基因工程疫苗,达到 1 针防治 2 种疾病的目的,不仅降低了养鸭业的生产成本、疫苗使用次数,也利于养鸭业的健康发展.

参考文献:

- [1] SAIF Y M, BARNES H J, GLISSON J R, et al. Diseases of poultry [M]. 11th ed. Ames: Iowa State University Press, 2003: 343-354.
- [2] 殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 2 版. 北京:科学出版社,1997:619-625.
- [3] 李耿森. 鸭病毒性肝炎的综合防治[J]. 水禽世界, 2010, 2: 28-29.
- [4] TSENG C H, TSAI H J. Molecular characterization of a new serotype of duck hepatitis virus[J]. Virus Res, 2007, 126 (1/2): 19-31.
- [5] 何冉娅,于森,张玉玲,等. 2007-2009 年华南地区鸭肝炎病毒流行病学调查及分离株的 VP1 基因变异分析[J]. 中国动物传染病学报, 2010, 18(1): 7-15.
- [6] LIU Guang-qing, WANG Fei, NI Zheng, et al. Genetic diversity of the VP1 gene of duck hepatitis virus type I (DHV-I) isolates from southeast China is related to isolate attenuation[J]. Virus Res, 2008, 4: 1-4.
- [7] 甘一迪,刘家森,姜赛,等. 3 株 I 型鸭肝炎病毒结构基因 VP1 的克隆及序列分析[J]. 畜牧兽医学报, 2009, 40 (6): 952-957.
- [8] 方六荣,陈焕春,肖少波,等. 伪狂犬病病毒 gG 基因缺失通用转移载体的构建[J]. 华中农业大学学报, 2001, 8(4): 306-309.
- [9] 潘华奇,刘磊,曹瑞兵,等. 含 LoxP 位点和 EGFP 的鸭瘟病毒 TK 基因缺失转移载体的构建[J]. 甘肃农业大学学报, 2008, 4(2): 8-12.
- [10] 董嘉文. 鸭瘟病毒 GD01 株部分基因的克隆以及 TK 基因缺失转移载体的构建[D]. 广州:华南农业大学兽医学院, 2009.

【责任编辑 柴 焰】