

鸡传染性贫血病毒 VP1 基因的克隆表达及抗原性分析

杨 勇¹, 任玉红¹, 梁宝怀², 朱雅宁³, 梁智选³

(1. 山西农业大学 动物科技学院, 山西 太谷 030801; 2. 山西省大同市南郊区畜牧局, 山西 大同 037001;

3. 天津市禽病诊断培训中心, 天津 300402)

摘要: 参考已发表的鸡传染性贫血病毒(CIAV)VP1 基因序列, 设计并合成了 2 对引物, 经 PCR 扩增获得了 2 个基因片段。将 PCR 产物克隆至 pGEM-T Easy 载体中, 成功构建了克隆载体 pGEM-CIAVVP1A 和 pGEM-CIAVVP1B。将上述重组质粒和原核表达载体 pMXB10 分别用 *Nde* I + *Eco*R I、*Nde* I + *Xho* I 双酶切, 并将纯化的 2 个基因亚克隆至 pMXB10 中, 构建出原核表达载体 pMXB10-VP1A 和 pMXB10-VP1B。在 0.3 mmol/L IPTG 诱导下, 目的基因在大肠杆菌 ER₂₅₆₆ 中以分泌型得到了大量表达。Western-blot 分析发现, 表达蛋白具有 CIAV 抗原性。表达蛋白经纯化后作为包被抗原, 用间接 ELISA 鉴定, 与 CIAV 阳性血清均能发生特异性反应。2 组蛋白免疫 SPF 鸡后, 用全病毒 ELISA 试剂盒检测血清呈阳性, 表明 2 组蛋白均可诱发机体产生抗 CIAV 的抗体。

关键词: 鸡传染性贫血病毒; VP1 基因; 原核表达; 酶联免疫吸附试验

Cloning and expression of VP1 genes of chicken infectious anemia virus and the antigenicity of the expressed products

YANG Yong¹, REN Yu-hong¹, LIANG Bao-huai², ZHU Ya-ning³, LIANG Zhi-xuan³

(1. College of Animal Science and Technology, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China;

2. Animal Husbandry Bureau of Nanjiao District in Datong Prefecture, Datong 037001, China;

3. Tianjin Poultry Diseases Diagnosis and Training Center, Tianjin 300402, China)

Abstract: Based on the published VP1 gene sequence of chicken infectious anemia virus(CIAV), two pairs of primers were designed and synthesized, and then two genes of VP1 were amplified by PCR. PCR products were cloned into pGEM-T Easy Vector to construct recombinant vectors pGEM-CIAVVP1A and pGEM-CIAVVP1B. pGEM-CIAVVP1A and pGEM-CIAVVP1B were digested by *Nde* I + *Eco*R I, and pMXB10 was digested by *Nde* I + *Xho* I. Then the prokaryotic expression vectors pMXB10-VP1A and pMXB10-VP1B were constructed by sub-cloning the purified VP1 genes into the pMXB10. The recombinant plasmids were expressed efficiently in the secreted form in *Escherichia coli* ER₂₅₆₆ by induction with 0.3 mmol/L IPTG. Western-blot analysis showed that the expressed proteins had antigenic activity. Using the purified proteins as antigen, the expressed proteins could be recognized by the antibody against CIAV in indirect ELISA. The sera from SPF chicken immunized by the two proteins were positive using the entire viral ELISA kit. The results showed that the two proteins could induce the animal to generate antibodies against CIAV.

Key words: chicken infectious anemia virus; VP1 gene; prokaryotic expression; ELISA

收稿日期: 2006-10-13; 修回日期: 2006-12-13

基金项目: 天津市科技培育项目(043122011)

作者简介: 杨勇(1981-), 男, 山西大同人, 硕士生, Tel: 13038096391, E-mail: s352881@163.com。梁智选为通讯作者, 研究员, 博士, 从事动物传染病的致病与免疫机理研究, E-mail: zxliang@263.net

鸡传染性贫血病毒(chicken infectious anemia virus, CIAV)是鸡的主要免疫抑制性疾病病原之一。CIAV 感染引起的鸡传染性贫血(CIA),主要发生在 2~3 周龄的雏鸡,病鸡的造血器官和淋巴组织受损,出现再生障碍性贫血、全身淋巴组织萎缩和免疫抑制^[1-2]。CIAV 是目前已知最小的动物病毒之一,为单股环状 DNA,分子质量为 2.3 kb。CIAV 基因组单链有 3 个部分或完全重叠的开放阅读框(ORF),分别编码核衣壳蛋白 VP1、相关蛋白 VP2、细胞凋亡因子 VP3 蛋白。VP1 是纯化的 CIAV 游离病毒粒子表面唯一的衣壳蛋白,分子质量为 52 ku,为主要免疫原蛋白^[3-5]。CIAV 在鸡体内和体外特定宿主细胞系(如常用的 MSB1 细胞系)中的复制数量很低,按常规的方法很难获得大量的病毒,更难以提取很多的 VP1 蛋白用于研究^[6]。因此,另一替代途径就是利用 VP1 基因的体外表达产物来研究其在 CIAV 的复制、侵染和宿主的抗病毒感染机制中的生物学作用^[7]。对于 CIAV VP1,采用原核表达并用于诊断试剂的研究报道不多。本试验在获得 CIAV VP1 基因的基础上,在大肠杆菌表达系统中表达了 CIAV VP1,旨在为 CIA 免疫血清学诊断试剂的制备和新型疫苗的构建奠定基础,同时也为我国防治 CIA 提供和加强技术储备。

1 材料与方法

1.1 CIAV 毒株和菌株

CIAV Cux-1 标准株、大肠杆菌 DH5 α , ER₂₅₆₆ 和 pMXB10(Amp⁺)载体均由天津市禽病诊断培训中心实验室保存。

1.2 主要试剂

DNA 回收试剂盒、质粒小量快速提取试剂盒、pGEM-T Easy 载体、辣根过氧化物酶(HRP)标记兔抗鸡 IgG 购自北京 TIANGEN 时代生物公司, T4 DNA 连接酶、限制性内切酶、rTaq DNA 聚合酶购自大连宝生物工程有限公司, CIAV ELISA 试剂盒购自北京测迪科技有限公司, 几丁质柱纯化试剂盒购自北京纽英伦生物技术有限公司, IPTG 为 Sigma 公司产品。

1.3 引物的设计

根据 GenBank 中登录的 CIAV VP1 基因序列, 用 Primer 5.0 软件设计了 2 对特异性引物: VP1 NDE-F139: 5'-GAACTCATATGAAGGCCTTT-CACAAC-3'; VP1 ECOR-F830: 5'-CACACTGAA-TTCATACGTACCGGGGC-3'; VP1 NDE-F547: 5'-TTCTTTCATATGAATCACCCAAAGCAGAT-3';

VP1 XHO-F1337: 5'-TACATCTCGAGGGTGCT-GTTCGCCCCAG-3'。上述引物由大连宝生物工程有限公司合成, 合成的引物用灭菌的去离子水配成 25 pmol/L, -20℃ 保存备用。

1.4 VP1 基因的 PCR 温度梯度扩增

以提取的 CIAV 基因组 DNA 为模板, 利用上述引物扩增 CIAV VP1 基因片段。反应总体积 25 μ L, 其中引物各 0.5 μ L, dNTP 2 μ L, 模板 50 ng、Taq 酶 1U、10 \times PCR 反应缓冲液 2.5 μ L、灭菌去离子水补足至 25 μ L。反应程序: 94℃ 5 min, 94℃ 1 min, 50~70℃ 1 min, 72℃ 2 min, 共 25 次循环; 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物经 8 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测后, 用 DNA 回收试剂盒回收和纯化。

1.5 扩增产物的克隆和测序

回收片段与 pGEM-T Easy 载体连接后转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 涂布于含氨苄青霉素(100 μ g/mL)、X-gal、IPTG 的 LB 培养板, 于 37℃ 培养过夜, 挑取白色菌落增殖后抽提质粒。经酶切和 PCR 初步鉴定为阳性的重组质粒进行序列测定。

1.6 表达载体的构建

将上述阳性重组质粒和原核表达载体 pMXB10 分别用 *Nde* I + *Eco*R I、*Nde* I + *Xho* I 双酶切, 电泳后回收目的片段进行连接并转化 ER₂₅₆₆, 筛选阳性菌落, 重组表达质粒经酶切和 PCR 鉴定。

1.7 目的片段的表达

挑取经 PCR 和酶切鉴定的阳性菌落接种于 5 mL 含 Amp(100 μ g/mL)的 LB 液体培养基, 37℃ 振荡培养, 当其 $D_{600\text{nm}}$ 值约为 0.7 时, 每管菌中加入终浓度为 0.3 mmol/mL 的 IPTG, 于 25℃ 诱导 6 h。分别在诱导前和诱导后取样, 将收集的沉淀悬起, 加入 40 μ L 2 \times 上样缓冲液, 煮沸 10 min, 12 000 r/min 离心 3 min, 取 15 μ L 上清液, 进行 12% 的 SDS-PAGE, 检测表达蛋白的情况。

1.8 重组蛋白的大量表达与纯化^[8]

直接挑取新转化的有重组表达质粒的单菌落(ER₂₅₆₆/pMXB10), 接种于 50 mL 液体培养基(含 Amp 100 μ g/mL), 37℃ 振荡培养至 $D_{600\text{nm}}$ 达 0.7(需 3~5 h)。加入终浓度为 0.3 mmol/L 的 IPTG 诱导蛋白表达, 20~25℃ 振荡培养 6 h。然后按几丁质柱纯化试剂盒说明纯化该重组蛋白。

1.9 重组表达蛋白的初步鉴定

1.9.1 重组表达蛋白的 Western-blot 分析^[9] 利用上述蛋白电泳方法对诱导前、后的含重组质粒的细菌和纯化蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 然后转印至 NC 膜上进行 Western-blot 分析。一抗为 CIAV 免

疫 SPF 鸡血清, 做 1:800 稀释, 二抗为 HRP 标记兔抗鸡 IgG, 做 1:500 稀释, 经 DAB 显色后分析。

1.9.2 重组表达蛋白的 ELISA 检测 参照文献 [10-11] 对 2 组纯化的蛋白进行 ELISA 检测。

1.9.3 动物试验 把 2 组纯化的蛋白 100 μ L 分别用 300 μ L 生理盐水稀释后与 300 μ L 弗氏完全佐剂混合后制成油乳剂疫苗。将 4 只 10 日龄的 SPF 雏鸡分为 2 组 (每组 2 只), 分别用 2 组蛋白免疫, 每隔 15 d 免疫 1 次, 共免疫 4 次。分别在第 1 次免疫前和每次免疫后第 15 d 采血, 分离血清, 用 IDEXX 公司的 Chicken Anaemia Virus Antibody Test Kit 检测抗体。试验步骤按 IDEXX 公司的 CIAV 抗体检测试剂盒说明进行操作。

2 结果

2.1 CIAV VP1 基因 2 片段的 PCR 梯度扩增

PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳分析, 分别在 690 bp 和 790 bp 处有 1 条带且退火温度在 60 $^{\circ}$ C 时条带最清晰, 无非特异性产物和引物二聚体的出现 (见图 1、图 2), 大小与预期相同。本试验分别扩增了 VP1 基因的 2 个片段, 被命名为 VP1A 和 VP1B。



图 1 CIAV VP1A 基因片段的 PCR 梯度扩增

Fig. 1 The amplification of CIAV VP1A by gradient PCR

M: DNA 分子质量标准; 1~12: VP1A 的 PCR 产物, 退火温度依次为 50.0, 51.0, 52.0, 54.0, 56.0, 58.0, 61.2, 63.0, 66.0, 68.0, 69.0, 70.0 $^{\circ}$ C

M: DL2000 DNA Marker; 1~12: PCR products of VP1A gene fragment at the melting temperatures of 50.0, 51.0, 52.0, 54.0, 56.0, 58.0, 61.2, 63.0, 66.0, 68.0, 69.0, 70.0 $^{\circ}$ C respectively

2.2 重组克隆质粒 pGEM-CIAVVP1A 和 pGEM-CIAVVP1B 的鉴定

对 pGEM-CIAVVP1A 和 pGEM-CIAVVP1B 分别用 *Nde*I + *Eco*R Ⅰ 和 *Nde*I + *Xho*I 双酶切, 可切出大小分别为 3 000 bp 和 690 bp 的 2 条带, 3 000 bp 和 790 bp 的 2 条带 (见图 3)。结果表明, 目的片段已克隆到质粒载体上。对克隆片段测序后与 GenBank 中发表的 CIAV VP1 基因比较, 结果显示序列同源性在 99.7% 以上, 说明克隆片段为 VP1 基因序列。



图 2 CIAV VP1B 基因片段的 PCR 扩增

Fig. 2 The amplification of CIAV VP1B by gradient PCR

M: DNA 分子质量标准; 1~12: VP1B 的 PCR 产物, 退火温度依次为 50.0, 51.0, 52.0, 54.0, 56.0, 58.0, 61.2, 63.0, 66.0, 68.0, 69.0, 70.0 $^{\circ}$ C

M: DL2000 DNA Marker; 1~12: PCR products of VP1B gene fragment at the melting temperatures of 50.0, 51.0, 52.0, 54.0, 56.0, 58.0, 61.2, 63.0, 66.0, 68.0, 69.0, 70.0 $^{\circ}$ C respectively

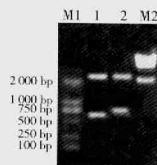


图 3 重组质粒 pGEM-CIAV VP1 的酶切分析

Fig. 3 Endonuclease digestion analysis of pGEM-CIAV VP1

M1, M2: DNA 分子质量标准; 1: pGEM-CIAVVP1A 的酶切产物; 2: pGEM-CIAVVP1B 的酶切产物

M1, M2: DL2000 DNA Marker; 1: Product of endonuclease digestion for pGEM-CIAVVP1A; 2: Product of endonuclease digestion for pGEM-CIAVVP1B

2.3 重组表达质粒 pMXB10-VP1A 和 pMXB10-VP1B 的酶切鉴定

对重组质粒 pMXB10-VP1A 和 pMXB10-VP1B 进行酶切鉴定, 与预期结果相同 (见图 4)。

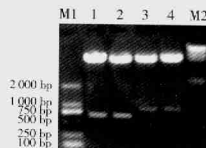


图 4 重组质粒 pMXB10-VP1A 和 pMXB10-VP1B 的酶切鉴定

Fig. 4 The endonuclease digestion analyses of pMXB10-VP1A and pMXB10-VP1B

M1, M2: DNA 分子质量标准; 1, 2: pMXB10-VP1A 的酶切产物; 3, 4: pMXB10-VP1B 的酶切产物

M1, M2: DL2000 DNA Marker; 1, 2: Products of endonuclease digestion from pMXB10-VP1A; 3, 4: Products of endonuclease digestion from pMXB10-VP1B

2.4 重组表达载体的诱导表达

将含有各组表达载体的阳性菌经 IPTG 诱导表达,经 SDS-PAGE 分析,在 50 ku 和 58 ku 附近可见明显的额外蛋白带存在(见图 5)。

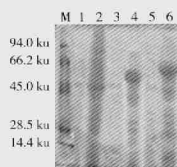


图 5 重组质粒 pMXB10-VP1 在大肠杆菌中的表达

Fig. 5 Expression of recombinant pMXB10-VP1 in *E. coli*

M: 蛋白质分子质量标准; 1: 空载体诱导前; 2: 空载体诱导后; 3: pMXB10-VP1A 阳性菌诱导前; 4: pMXB10-VP1A 阳性菌诱导后; 5: pMXB10-VP1B 阳性菌诱导前; 6: pMXB10-VP1B 阳性菌诱导后
M: Protein molecular weight Marker; 1: Blank plasmid un-induced with IPTG; 2: Blank plasmid induced with IPTG; 3: pMXB10-VP1A un-induced with IPTG; 4: pMXB10-VP1A induced with IPTG; 5: pMXB10-VP1B un-induced with IPTG; 6: pMXB10-VP1B induced with IPTG

2.5 重组表达蛋白的纯化

阳性菌裂解后,分别取上清液和沉淀进行电泳,发现重组蛋白在上清液中以分泌形式表达,将此上清液过几丁质柱,用还原剂(DTT)可诱导内含肽 N 端肽键裂解,将目标蛋白释放出来,得到 CIAV 纯化蛋白 VP1A 和 VP1B,分子质量分别为 30 ku 和 38 ku(见图 6、图 7)。

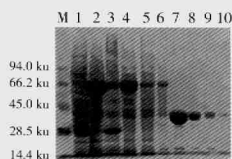


图 6 重组质粒 pMXB10-VP1A 的大量表达与纯化

Fig. 6 The expression and purification for recombinant pMXB10-VP1A in *E. coli*

M: 蛋白质分子质量标准; 1: 诱导前; 2: 诱导后; 3: 沉淀; 4: 上清; 5: 穿透液; 6: 洗涤液; 7~10: 分别是目的蛋白第 1、3、5、7 管

M: Protein molecular weight Marker; 1: Plasmid un-induced with IPTG; 2: Plasmid induced with IPTG; 3: Deposition; 4: Ascending fluid; 5: Penetrating fluid; 6: Washing fluid; 7~10: Destination protein

2.6 重组蛋白的初步鉴定

2.6.1 Western-blotting 鉴定 用阳性血清对 2 组

重组融合蛋白和纯化后的切割蛋白进行了免疫印迹检测,表明蛋白都有特异性反应(见图 8),2 组蛋白在大肠杆菌中获得了正确的表达。

2.6.2 重组表达蛋白的 ELISA 检测 用阳性血清对纯化的 VP1A 和 VP1B 蛋白进行 ELISA 检测,结果显示 S/P 值为 0.2~0.4,呈阳性。

2.6.3 动物试验 用纯化的 VP1A 和 VP1B 蛋白免疫鸡制备血清,分别在第 1 次免疫前和每次免疫后 15 d 采血,分离血清,用 IDEXX 公司的 CIAV 抗体检测试剂盒检测抗体。结果表明,在第 2 次免疫后,鸡产生了抗 CIAV 的抗体。

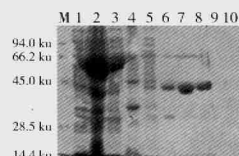


图 7 重组质粒 pMXB10-VP1B 的大量表达与纯化

Fig. 7 The expression and purification of recombinant pMXB10-VP1B in *E. coli*

M: 蛋白质分子质量标准; 1: 诱导前; 2: 诱导后; 3: 沉淀; 4: 上清; 5: 穿透液; 6: 洗涤液; 7~10: 分别是目的蛋白第 1、3、5、7 管

M: Protein molecular weight Marker; 1: Plasmid un-induced with IPTG; 2: Plasmid induced with IPTG; 3: Deposition; 4: Ascending fluid; 5: Penetrating fluid; 6: Washing fluid; 7~10: Destination Protein

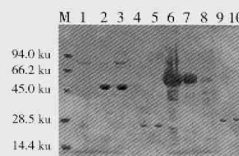


图 8 重组质粒 pMXB10-VP1 融合蛋白与纯化切割蛋白的 Western-blotting 鉴定

Fig. 8 Western-blotting analyses of the recombinant protein and the purified proteins

M: 蛋白质低分子质量标准; 1: 空白对照; 2、3: 融合蛋白 A; 4、5: 切割蛋白 A; 6~8: 融合蛋白 B; 9、10: 切割蛋白 B

M: Protein molecular weight Marker; 1: Blank control; 2、3: Synergic proteins A; 4、5: Incision proteins A; 6~8: Synergic proteins B; 9、10: Incision proteins B

3 讨论

本研究尝试把 VP1 大片段 VP1 NDE-F139 和 VP1 XHO-F 1337 以正确的方式插入到 pMXB10

载体中,未能获得明显的表达。然而,当把 VP1 分成 2 个较小的片段之后却得到了大量的表达,且融合蛋白和纯化后的切割蛋白经 Western-blotting 试验,发现能和 CIAV 的阳性血清发生反应,融合蛋白经过柱切割纯化后做 ELISA,可以和 CIAV 的阳性血清发生特异性反应。并通过平行试验发现,与试剂盒检测血清时的 D 值呈相关性,可以进行试剂盒的调试或应用,或进行免疫原性的后继试验。本研究进行的动物试验结果表明,表达蛋白可以诱发鸡产生较高的抗体效价,说明其免疫原性的存在,但本试验所表达的蛋白是 VP1 基因的片段,所以表达产物的体外活性与天然蛋白的生物学活性会有一定的差异,它的活性还有待进一步分析。

目前,国内尚无标准的 CIAV ELISA 诊断试剂盒,给现地 CIA 的流行病学调查及诊断带来诸多不便。与全病毒抗原相比,以原核表达的重组蛋白作为抗原可克服 CIAV 在体外培养效价低,大量的诊断抗原难以获得的缺陷,而且重组抗原还具有抗原成分相对单一,反应的特异性更强的特点。对于 CIA 的防制,尚无理想的、为大多数人所接受的疫苗。目前,国内外均已研制出 CIA 活疫苗和灭活疫苗,并可成功用于 CIA 的免疫接种。但二者均存在体外培养病毒效价低、大量的疫苗抗原难以获得且代价高昂的缺陷^[11]。此外,迄今为止尚未分离到非致病性 CIAV,所用的活疫苗株为非致弱的 CIAV 强毒株,免疫后可引起持续感染和蛋源传播,还可能有毒力增强的危险。本研究所构建的原核表达载体可大量增殖,用于生产所需的抗原蛋白,为进一步研制 CIA 重组诊断抗原和亚单位疫苗奠定了基础。

参考文献(References)

- [1] BOUNOUS D I, GOODWIN M A, JR BROOKS R L, *et al.* Immunosuppression and intracellular calcium signaling in splenocytes from chicks infected with chicken anemia virus, CL-1 isolate[J]. *Avian Dis*, 1995, 39(1): 135-140.
- [2] DE HERDT P, VAN DEN BOSCH G, DUCATELLE R, *et al.* Epidemiology and significance of chicken infectious anemia virus infections in broilers and broiler parents under nonvaccinated European circumstances[J]. *Avian Dis*, 2001, 45(3): 706-708.
- [3] YUASA N, TANIGUCHI T, YOSHIDA I. Isolation and some characteristics of an agent inducing anemia in chicks[J]. *Avian Dis*, 1979, 23(3): 366-385.
- [4] ENGSTROM B E. Prevalence of antibody to chicken anaemia 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.
- [5] KAFFASHI A, NOORMOHAMMADI A H, ALLOTT M L, Browning GF viral load in 1-day-old and 6-week-old chickens infected with chicken anaemia virus by the intraocular route [J]. *Avian Pathol*, 2006, 35(6): 471-475.
- [6] SMYTH J A, MOFFETT D A, CONNOR I J, *et al.* Chicken anaemia virus inoculated by the oral route causes lymphocyte depletion in the thymus in 3-week-old and 6-week-old chickens [J]. *Avian Pathol*, 2006, 35(3): 254-259.
- [7] SHEELA R R, BABU U, MU J, *et al.* Immune responses against *Salmonella enterica* serovar enteritidis infection in virally immunosuppressed chickens[J]. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2003, 10(4): 670-679.
- [8] 马歇尔 D R, 门永 J T, 布格斯 R R, 等. 蛋白质纯化与鉴定实验指南 [M]. 朱厚础, 译. 北京: 科学出版社, 1999: 148-156.
- MARSHAK D R, KADONAGA J T, BUTGESS R R, *et al.* *Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual* [M]. Translated by ZHU Hou-chu. Beijing: Science Press, 1999: 148-156. (in Chinese)
- [9] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2000.
- WANG Jia-zheng, FAN Ming. *Manual of Protein Technology* [M]. Beijing: Science Press, 2000. (in Chinese)
- [10] 王英, 高宏雷, 王笑梅, 等. 鸡传染性贫血重组抗原间接 ELISA 诊断方法的建立 [J]. 中国预防兽医学报, 2005, 27(6): 517-521.
- WANG Ying, GAO Hong-lei, WANG Xiao-mei, *et al.* Development of an indirect ELISA assay for detecting chicken infectious anemia virus antibody with recombinant antigen[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2005, 27(6): 517-521. (in Chinese)
- [11] DANIEL T. Circoviruses immunosuppressive threats to avian species are view[J]. *Avian Pathol*, 2002, 29(5): 374-394.

(责任编辑 胡志敏)