

# 鸡传染性贫血病毒 VP2 基因在真核细胞中的表达以及对宿主细胞增殖的影响

黄超华, 杨汉春, 郑世军

(中国农业大学动物医学院 农业部预防医学系重点开放实验室, 北京 海淀 100094)

**摘要:**鸡传染性贫血是危害养禽业的重要疫病之一,其病原体是鸡传染性贫血病毒(CIAV)。该病原广泛存在于世界各地,是危害养禽业的主要病原。VP2 是该病毒的重要非结构蛋白,其对宿主细胞的确切作用还不十分清楚。本文通过 PCR 从病毒 DNA 中扩增出 VP2 基因并将 VP2 基因亚克隆到真核表达载体 pcDNA4.0。将重组质粒转染至 BHK 细胞,经 Western-blotting 证实,转染的真核细胞能表达 VP2 蛋白并具有良好的抗原性。pcDNA4.0-VP2 转染 293T 或 BHK 细胞后,与对照组(空载体转染细胞以及未转染的细胞)相比,VP2 超表达对这两种细胞的增殖没有影响。该结果表明鸡传染性贫血病毒的 VP2 基因不影响宿主细胞的增殖。

**关键词:**鸡传染性贫血病毒; VP2 基因; 克隆; 真核表达

中图分类号:Q786

文献标识码:A

文章编号:0529-6005(2007)06-0003-03

## Expression of chicken infectious anemia virus (CIAV) VP2 gene in eukaryotic cells and its role in cell proliferation

HUANG Chao-hua, YANG Han-chun, ZHENG Shi-jun

(Key Laboratory of Preventive Veterinary Medicine of Ministry of Agriculture, College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

**Abstract:** Chicken infectious anemia is one of the most important diseases in poultry industry. The causative agent, chicken infectious anemia virus(CIAV), spread over the globe. The role of VP2, a non-structural protein of this virus, in the interaction between the virus and host cells was not clear. In this study, VP2 gene was cloned from the viral DNA by PCR, and then sub-cloned into the eukaryotic expression vector pcDNA4.0, which was examined by the restricted enzymatic analysis. The pcDNA4.0-VP2 plasmid was transfected into BHK or 293T cells for the expression of VP2. The expression of VP2 by the transfected cells was determined by Western-blot. To probe into the role of VP2 in cell proliferation, 293T and BHK cells were transfected with pcDNA4.0-VP2 and examined by cell counting after Trypan blue staining. The result showed that over-expression of VP2 in 293T or BHK cells did not enhance the cell proliferation as compared to the controls, which indicated the uninvolved of the viral VP2 in cell proliferation and divisions.

**Key word:** chicken infectious anemia virus; VP2 gene; clone; eukaryotic expression

**Corresponding authors:** YANG Han-chun, ZHENG Shi-jun

鸡传染性贫血病毒(chicken infectious anemia virus, CIAV)是鸡传染性贫血(chicken infectious anemia)的病原。自1979年Yuasa等在日本首次分离到鸡传染性贫血病毒以来<sup>[1]</sup>,许多欧美国家相继发现该病毒的存在。我国于1992年首次在黑龙省分离到CIAV,随后在全国各地的鸡群中发现该病毒。

鸡贫血病毒基因组含有3个开放阅读框架,分别

编码分子质量为51.6 ku(VP1)、24 ku(VP2)和13.6 ku(VP3)的3种蛋白质<sup>[2]</sup>。其中VP2为一种非结构蛋白,该蛋白的功能目前还不清楚。人们认为CIAV VP2为一种多功能蛋白,在病毒的感染和复制过程中有着重要的作用<sup>[3]</sup>。Noteborn等人经实验发现只有VP1和VP2共同表达时才能诱导产生中和抗体,这表明VP2可能作为一种支架蛋白参与病毒的组装<sup>[4]</sup>。Peters等发现VP2具有双重特异性蛋白磷酸酶(DSPs)的活性,可以使蛋白的丝氨酸/苏氨酸和酪氨酸位点去磷酸化<sup>[5]</sup>。经进一步实验确定了决定VP2的丝氨酸/苏氨酸和酪氨酸磷酸酶活性的区

收稿日期:2006-10-08

作者简介:黄超华(1981-),男,硕士生,从事预防兽医学研究

通讯作者:杨汉春, E-mail: yanghanchun1@cau.edu.cn; 郑世军, E-mail: sjzheng@cau.edu.cn

域<sup>[6]</sup>。由于可逆性的蛋白磷酸化和去磷酸化在细胞发育和免疫效应性细胞的活化过程中有着关键性的作用,因此 VP2 蛋白的双重特异性蛋白磷酸酶活性,有可能是 CIAV 引起免疫抑制的原因之一。后来发现 VP2 下调感染细胞的 MHC I 类分子的表达,这证实了 VP2 蛋白有可能影响细胞免疫。在 VP2 突变株感染期间,VP3 只局限于感染细胞的细胞浆中,这表明 VP2 可能调节 VP3 的磷酸化,从而参与调节 VP3 的诱导凋亡的作用,而 VP2 本身诱导细胞凋亡的作用较弱<sup>[7]</sup>。根据目前发表的实验结果分析,VP2 可能在 CIAV 感染和致病过程中起着非常重要的作用,然而 VP2 对宿主细胞的增殖有何影响,目前还不清楚。我们克隆到了 CIAV VP2 基因并构建出真核表达载体,对该蛋白在细胞增殖中的作用进行了研究。结果表明,在 293T 和 BHK 细胞中瞬时表达 VP2,不影响细胞增殖和分裂周期。

## 1 材料与方法

1.1 CIAV 病毒毒株与细胞 CIAV 病毒 Cux-1 标准株和 CIAV 阳性血清由北京市畜牧兽医研究所杨兵副研究员提供,293T 和 BHK 细胞由本实验室保存。

1.2 主要试剂 DNA 回收试剂盒、质粒小量提取试剂盒、Taq plus DNA 聚合酶购自北京鼎国生物公司,限制性内切酶、pMD18-T simple 连接试剂盒购自宝生物工程(大连)公司,X-gal、IPTG 为 Sigma 公司产品,质粒大量提取试剂盒、真核细胞转染试剂盒和化学发光检测试剂盒购自北京威格拉斯公司,HRP 标记的兔抗鸡 IgG 购自博大泰克公司。

1.3 引物设计 参考 GenBank 中 CIAV 病毒 Cux-1 标准株的基因组序列设计引物,其上、下游引物中分别含有 *EcoRI* 和 *XhoI* 酶切位点,长度为 666 bp。采用由上海生工公司合成的如下特异性引物:

上游引物:5'-GAA TTC TGA TGC ACG GGA AC-3'

下游引物:5'-CTC GAG CTC ACA CTA TAC GTA CC-3'

1.4 CIAV VP2 基因的 PCR 扩增 以提取的 CIAV 基因组 DNA 为模板,利用上述引物扩增 CIAV VP2 基因。反应总体积为 50  $\mu$ l,其中引物各 0.5  $\mu$ mol/ml, dNTP 为 0.2 mmol/ml,模板 100 ng, Taq plus 酶 1U, 10 $\times$  反应缓冲液 5  $\mu$ l,加灭菌三蒸水补足至 50  $\mu$ l。反应程序:95 $^{\circ}$ C 4 min, 94 $^{\circ}$ C 45 s, 57 $^{\circ}$ C 50 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min,循环 30 次,72 $^{\circ}$ C 终延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后进行回收和纯化。

1.5 扩增产物的克隆和测序 将回收 PCR 产物与 pMD18-T vector 进行连接,1 h 后转化感受态细胞 DH5 $\alpha$ ,涂布于含氨苄青霉素(100  $\mu$ g/ml)和 X-gal IPTG 的 LB 培养板,于 37 $^{\circ}$ C 培养过夜,挑取白色菌落后过夜培养,提取质粒,经酶切和 PCR 初步鉴定为阳性的重组质粒并进行序列测定。

1.6 重组真核表达载体 pcDNA4.0-VP2 的构建

将上述重组质粒和真核表达载体 pcDNA4.0 分别用 *EcoRI* 和 *XhoI* 进行双酶切,电泳回收和纯化 DNA 片段后进行连接和转化,筛选阳性菌落并进行酶切和 PCR 鉴定。

1.7 重组真核表达质粒 pcDNA4.0-VP2 在 BHK 细胞中的瞬时表达 大量提取重组真核表达质粒 pcDNA4.0-VP2。随后,按照真核细胞转染试剂盒提供的步骤将重组真核表达质粒 pcDNA4.0-VP2 转染 BHK 细胞中,48 h 后提取 BHK 细胞蛋白。

1.8 Western blotting 分析 将提取的 BHK 细胞蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,然后转印至 PVDF 膜上,进行 Western blotting 分析。将 PVDF 膜置于 5% 脱脂奶粉中 4 $^{\circ}$ C 过夜封闭,洗涤后以鸡传染性贫血病毒免疫的 SPF 鸡阳性血清(1:20 稀释)4 $^{\circ}$ C 过夜孵育,洗涤后加入 HRP 标记的兔抗鸡 IgG(1:5 000 稀释)室温孵育 45 min,按照化学发光试剂盒提供的步骤进行处理后,在暗室中曝光和显影。

1.9 VP2 对 293T 和 BHK 细胞生长及活性的影响

将 293T 细胞和 BHK 细胞分别接种于 48 孔细胞板上,293T 细胞每孔接种  $2 \times 10^4$  个细胞,BHK 细胞每孔接种  $0.5 \times 10^3$  个细胞。24 h 后进行转染,试验设计有 3 组,分别为空白对照组(control 组)、空载体对照组(pcDNA4.0 组)和 pcDNA4.0-VP2 组。转染后 24 h、48 h、72 h、96 h 和 120 h,分别取细胞进行计数,每组有 3 孔重复。为了观察 VP2 是否影响细胞的活性,进行台盼蓝染色,在计数板上计数蓝染细胞。组间差异用 *t*-检验进行统计学分析, $P < 0.05$  为差异显著。

## 2 结果

2.1 CAV VP2 基因的 PCR 扩增和克隆 以 CIAV 基因组 DNA 为模板,利用 VP2 特异引物进行 PCR 扩增,其产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳显示大小约为 666 bp,与预期一致。对重组克隆质粒 pMD-VP2 进行 PCR 和酶切鉴定:PCR 扩增出约 666 bp 的目的条带;*EcoRI* 和 *XhoI* 双酶切后切出大小分别为 2 900 bp 和 666 bp 的两条带。结果表明,目的片段已克隆到克隆载体上。将克隆片段进行序列测定,该片段与 GenBank 发表的鸡传染性贫血病毒 Cux-1 标准株的 VP2 基因同源性在 99.5% 以上,说明克隆片段为 VP2 基因序列。

2.2 重组真核表达质粒 pcDNA4.0-VP2 的鉴定和瞬时表达 将构建的 pcDNA4.0-VP2,以 *EcoRI* 和 *XhoI* 双酶切,得到大小分别为 5 300 bp 和 666 bp 的两条带(见图 1A)。经测序以及序列比对,证实克隆到真核表达载体的 VP2 基因的氨基酸序列未发生突变。以 pcDNA4.0-VP2 转染 BHK 细胞,48 h 后提取胞浆蛋白。经 Western blotting 方法检测,出现一条特异的抗原抗体结合带(见图 1B),分子量大小与目的蛋白相同,从而证明真核表达质粒 pcDNA4.0-VP2 能够在真核细胞中表达具有抗原表位的 VP2 蛋白。

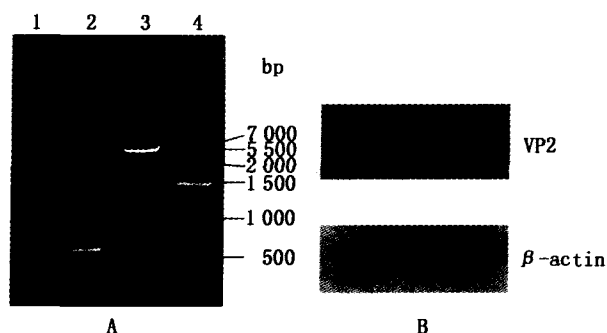


图 1 重组真核表达质粒 pcDNA4.0-VP2 的鉴定和瞬时表达

A: 重组真核表达质粒 pcDNA4.0-VP2 的鉴定: 1、2、3、4 分别为阴性对照、重组质粒 PCR 鉴定结果、重组质粒双酶切鉴定结果和 DNA 标准; B: 瞬时表达 Western blotting 结果,  $\beta$ -actin 为内源蛋白对照

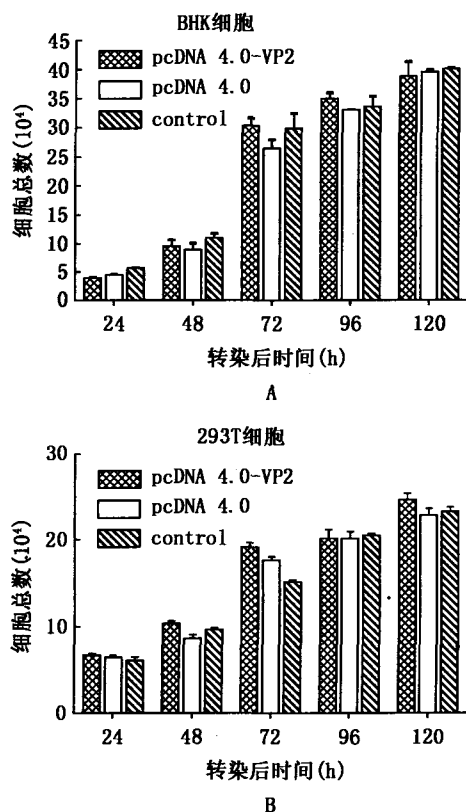


图 2 VP2 在 BHK 和 293T 细胞中表达对细胞生长的影响

2.3 VP2 对 293T 和 BHK 细胞的增殖的影响 为了解 VP2 在细胞增殖中的作用, 将 pcDNA4.0-VP2 转染至 293T 和 BHK 细胞中, 观察其对 293T 和 BHK 细胞生长的影响。结果发现 pcDNA4.0-VP2 转染组与空白对照组 (control 组) 和空载体转染对照组 (pcDNA4.0 组) 比较, VP2 超表达对细胞增殖没有明显的影响 (见图 2A 和图 2B), 说明 VP2 不能影响 293T 细胞和 BHK 细胞的生长周期。另外, 台盼蓝染色后, 未观察到明显的细胞凋亡情况, 这说明 VP2 不影响 293T 细胞和 BHK 细胞的活性。

以 pcDNA4.0-VP2 转染 BHK 细胞 (A) 和 293T (B) 细胞, 转染后不同的时间检测细胞数量, 图中的数值为细胞平均数  $\pm$  标准差, 图中的数值为细胞平均数  $\pm$  标准差。各组间无显著差异 ( $P > 0.05$ )。

### 3 讨论

鸡传染性贫血病毒感染可引起胸腺、骨髓细胞大量凋亡, 造成雏鸡的免疫抑制, 使鸡对其他病原感染的易感性增强, 常常导致疫苗免疫失败, 因而该病越来越受重视, 成为养禽业最关注的疾病之一。但是人们对 CAV 的致病机理还不十分清楚, 有待于深入探讨。在 CAV 3 个主要的蛋白成分中, VP3 (又称为凋亡素, apoptin) 是诱导细胞凋亡的主要成分, 在体外可独立诱导肿瘤细胞凋亡, 而 VP2 属于非结构蛋白, 具有增强 VP1 诱导产生中和抗体和促进 VP3 诱导细胞凋亡的作用<sup>[4,8]</sup>。那么 VP2 除了辅助 VP1 和 VP3 外, 其本身的主要作用是什么, 目前还不十分清楚。目前, 国内 VP2 的研究主要集中在对 VP2 的免疫原性的研究, 缺乏对 VP2 的功能分析并没有进一步开展 VP2 的功能的研究。

本研究成功构建了表达鸡传染性贫血病毒 VP2 基因的真核表达载体, 该载体转染 BHK 细胞和 293T 细胞后, 可超表达 VP2 蛋白。通过表达外源 VP2 基因的 293T 细胞和 BHK 细胞在不同的时间内与对照组相比, 本研究没有发现 VP2 对细胞增殖周期和凋亡方面有明显的作用。通过本实验发现 VP2 超表达对 BHK 细胞或 293T 细胞等细胞系的增殖没有影响, 为进一步研究 VP2 蛋白的功能提供了新的实验证据。

### 参考文献:

- [1] Yuasa N, Taniguchi T, Yoshita I, *et al.* Isolation and characteristics of an agent inducing anemia in chicks[J]. Avian Dis, 1979, 23: 366-385.
- [2] Noteborn M H M, G F de Boer, D J van Roozeleer, *et al.* Characterization of cloned chicken anemia virus DNA that contains all elements for the infectious replication cycle[J]. J Virol, 1991, 65: 3131-3139.
- [3] Phenix K V, Meehan B M, Todd D, *et al.* Transcriptional analysis and genome expression of chicken anemia virus[J]. Gen Virol, 1994, 75: 905-909.
- [4] Noteborn M H M, Verschuere C A J, Koch G, *et al.* Simultaneous expression of recombinant baculovirus-encoded chicken anemia virus (CAV) proteins VP1 and VP2 is required for formation of the CAV-specific neutralizing epitope[J]. Gen Virol, 1998, 79: 3037-3077.
- [5] Peters M A, Jackson D C, Crabb B S, *et al.* Chicken anemia virus VP2 is a novel dual specificity protein phosphatase[J]. Biol Chem, 2002, 277: 39566-39573.
- [6] Peters M A, Jackson D C, Crabb B S, *et al.* Mutation of chicken anemia virus VP2 differentially affects serine/threonine and tyrosine protein phosphatase activities[J]. Gen Virol, 2005, 86: 623-630.
- [7] Peters M A, Crabb B S, Washington E A, *et al.* Site-directed mutagenesis of the VP2 gene of chicken anemia virus affects virus replication, cytopathology and host-cell MHC class I expression[J]. Gen Virol, 2006, 87: 823-831.
- [8] Noteborn M H. Chicken anemia virus induced apoptosis: underlying molecular mechanisms[J]. Vet Microbiol, 2004, 98: 89-94.