

禽脑脊髓炎病毒结构蛋白VP3 基因真核表达载体的构建及其免疫

徐建生, 唐 波, 成大荣, 曹 军, 吕 玲, 周晓昕 (扬州大学 兽医学院, 江苏 扬州 225009)

摘要: 根据已发表的禽脑脊髓炎病毒(AEV) 1 143株结构蛋白VP3 基因的序列, 设计1 对特异性引物, 经PCR 从原核表达载体pET-VP3 中扩增出VP3 基因片段, 克隆入T 载体经测序证明所扩增的序列正确。从T 载体切下目的片段, 定向克隆入pDNA 3.1(+)载体, 转化大肠杆菌DH5 α 鉴定后大量提取质粒, 转染COS-1 细胞, 用间接免疫荧光检测到目的基因的表达。将重组载体对BALB/c 小鼠进行免疫, 结果2 次免疫后就检测到特异性抗体, 表明该载体在动物体内有较高的表达水平, 可用于动物体内免疫, 为进一步研究AEV 的核酸疫苗打下了基础。

关键词: 禽脑脊髓炎病毒; VP3; 真核表达; DNA 疫苗

中图分类号: S852.65; Q 78

文献标识码: A

文章编号: 1005-4545(2006)04-0367-02

禽脑脊髓炎病毒(avian encephalomyelitis virus, AEV) 是小RNA 病毒科成员, 基因组为单股正链线状RNA, 可感染幼鸡、鹌鹑和火鸡等引起以共济失调和头颈震颤为特征的疾病^[1]。该病1932 年在美国首次发现, 随后迅速蔓延至世界其他地区。20 世纪80 年代以来, 我国广东、辽宁、江苏和黑龙江等地先后暴发本病, 造成流行^[2]。

到目前为止, 已有2 株AEV 全基因组被测定^[3-4], AEV 基因组拥有一个开放性阅读框(ORF), 编码一个大多聚蛋白, 然后该大多聚蛋白被病毒蛋白酶水解产生成熟蛋白。和其他小RNA 病毒一样, AEV 的基因组P1 区编码4 个结构蛋白(VP4-VP2-VP3-VP1), P2 和P3 区编码7 个非结构蛋白(2A-2C 和3A-3D)^[3], VP4 和VP2 由前体蛋白VP0 加工成熟而来。小RNA 病毒结构蛋白与病毒的许多理化和生物学特性有关, 目前研究表明AEV 结构蛋白VP3 与诱导宿主细胞的凋亡^[5]以及诱导产生抗病毒中和抗体有关^[1]。本研究从原核表达载体pET-VP3 经PCR 扩增出VP3 基因, 克隆入真核表达载体pDNA 3.1(+), 并在COS-1 细胞中进行了暂态表达, 然后以该重组载体免疫BALB/c 小鼠, 检测到了特异性抗体的产生, 为进一步研究AEV 的核酸疫苗打下了基础。

1 材料与方法

1.1 载体、菌体和实验动物 原核表达载体pET-VP3 由本课题组构建(待发表); pDNA 3.1(+)载体, *Escherichia coli* DH5 α *Escherichia coli* TG1 由扬州大学预防兽医学教研室保存; 清洁级的BALB/c 小鼠购自本院比较医学中心。

1.2 主要试剂 AEV 阳性血清由农业部动检所杜元钊研究员提供, Taq DNA 聚合酶, wizard DNA clean-up system (美国 Promega 公司), 转染试剂 Transfection Reagent (Gene Jammer 公司), BamH I、Xho I 等限制性内切酶(大连宝生物工程公司), HRP 标记羊抗鼠 IgG、FITC 标记的兔抗鸡 IgG (Sigma 公司)等。

1.3 PCR 扩增

1.3.1 引物的设计 根据已发表的AEV 1 143株序列, 设计1 对针对VP3 特异性引物。上游引物为5'-agcggatccatgatgcgc aacgaatttcgactgtcg-3'; 下游引物为5'-ggcctcgaggttgagcaaaaact gaggtgttggtggg-3'。为便于克隆, 在上下游引物中分别引入

BamH I 和Xho I 酶切位点。上述引物由大连宝生物工程公司合成。

1.3.2 PCR 扩增VP3 基因 按常规方法进行PCR^[5]。PCR 结束后, 其产物经0.8% 琼脂糖凝胶电泳观察目的条带。

1.4 PCR 产物的克隆与序列测定 按凝胶回收试剂盒说明书回收 PCR 产物, 连接pGEM -T easy 载体, 转化感受态 *Escherichia coli* TG1, 酶切鉴定, 阳性重组质粒命名为pGEM -VP3 并送大连宝生物工程公司测序。

1.5 VP3 基因真核表达载体的构建 碱裂解法^[6]小量提取质粒pGEM -VP3, 经BamH I、Xho I 37 双酶切作用3 h, 酶切产物经0.8% 琼脂糖凝胶电泳, 试剂盒回收目的条带。同法提取质粒载体pDNA 3.1(+), 经BamH I、Xho I 37 双酶切作用3 h, 试剂盒回收线性载体。按文献[6]将VP3 基因克隆入pDNA 3.1(+), 经鉴定得到重组载体pDNA VP3, 转化 *Escherichia coli* DH5 α 大量提取鉴定后的重组质粒pDNA VP3, 定量后分装, -20 保存备用。

1.6 重组载体pDNA VP3 在COS-1 细胞中的暂态表达

1.6.1 重组载体pDNA VP3 的转染 将生长良好的COS-1 细胞消化, 转移至35 mm 的培养皿继续培养至培养皿底部面积的40%~60%, 按转染试剂盒说明书进行转染, 转染2 h 后, 加入含10% 血清的DMEM 培养基继续培养24 h, 弃去培养液, 对细胞进行固定。同时以空载体转染作为阴性对照。

1.6.2 间接免疫荧光试验 将经过固定的细胞用PBS (0.01 mol/L, pH7.2) 洗涤3 次后, 加入鸡抗AEV 血清, 37 作用1.5 h, PBS 洗涤3 次, 加入1:200 稀释的FITC 标记的兔抗鸡 IgG, 37 作用45 min, PBS 洗涤3 次后, 在荧光显微镜下观察。

1.7 真核载体免疫小鼠

1.7.1 质粒的免疫 8 周龄BALB/c 小鼠经后腿肌肉免疫重组载体100 μ g/次; 2 周免疫1 次。在首次免疫前从眼眶静脉采血, 分离血清, -20 保存, 作为阴性血清。然后从首次免疫后每隔2 周从眼眶静脉采血1 次, 分离血清, 检测其抗体产生情况; 同时以免疫空载体小鼠作为阴性对照。

1.7.2 抗体的检测 采用ELISA 法, 以初步提纯的病毒^[7]作为抗原包被ELISA 板, 以质粒免疫的小鼠血清倍比稀释后作为一抗, 以HRP 标记羊抗鼠 IgG 为二抗, 同时以阴性血清为阴性对照, OPD 显色后测定P/N 值。

收稿日期: 2004-12-16

作者简介: 徐建生(1963-), 男, 副教授, 博士。

2 结果

2.1 PCR 结果以及 VP3 基因的序列分析 PCR 产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳后可见 1 条约 735 bp 的条带, 如图 1。序列分析结果显示, 本研究扩增的 VP3 基因与已发表的 VR 株 VP3 序列完全一致。

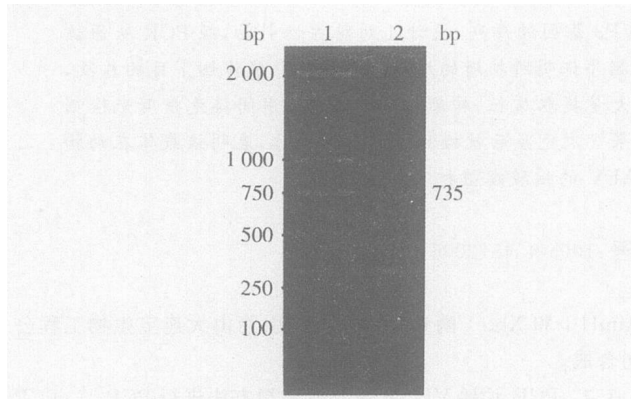


图 1 PCR 产物电泳结果 1. DNA M arker DL 2000; 2. PCR 产物

2.2 真核表达载体的鉴定 见图 2。重组质粒 pDNA VP3 经 PCR 或 BamH I、Xho I 双酶切均可得到 1 条约 735 bp 的条带。

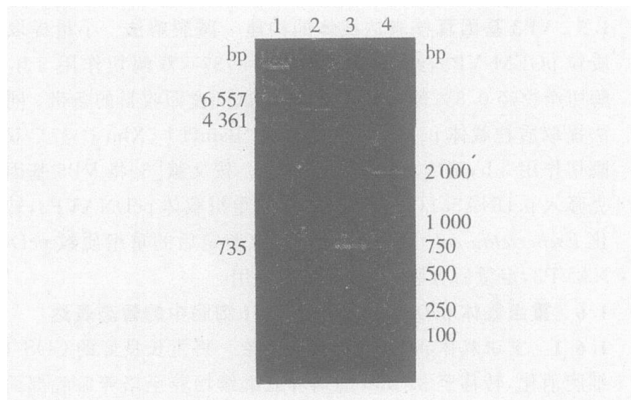


图 2 重组载体 pDNA VP3 鉴定 1. λ -HindIII M arker; 2 重组质粒 pDNA VP3 双酶切 (BamH I、Xho I); 3 重组质粒 pDNA VP3 的 PCR 鉴定; 4. DNA M arker DL 2000

2.3 重组质粒在 COS-1 细胞中的表达 重组质粒 pDNA VP3 转染 COS-1 细胞后, 经间接免疫荧光试验, 在荧光显微镜下可以看到绿色荧光, 对照组无荧光。

2.4 免疫小鼠抗体的检测 ELISA 结果显示, 经肌肉免疫重组质粒 pDNA VP3 的 5 只 BALB/c 小鼠在二免后皆能检测到特异性抗体, 平均效价为 2^5 , 最高效价为 2^{10} 。五免后平均效价上升至 2^9 ; 经肌肉免疫质粒 pDNA 3.1 (+) 的 5 只 BALB/c 小鼠, 没有检测到特异性抗体的产生。

3 讨论

小 RNA 病毒科中, 结构蛋白 VP3 被认为与病毒的持续感染、T 细胞免疫以及与病毒受体的相互作用有关^[8-10]。AEV 虽然目前在分类上属于肠道病毒属, 但研究表明 AEV 在小 RNA 病毒科中与甲肝病毒属亲缘性最近^[3]。甲型肝炎病毒的 VP3^[11]及脊髓灰质炎病毒的 VP2 和 VP3^[10]中有一些中和位

点, 提示小 RNA 病毒的 VP3 可能在某种程度上对抗病毒感染保护宿主方面起作用。近期研究还表明 AEV VP3 能够诱导宿主细胞的凋亡^[5], 本研究用 PCR 法从原核表达载体 pET-VP3 扩增出了 VP3 基因, 构建了真核表达载体, 并在 COS-1 细胞和小鼠体内获得了表达。一方面可以利用该真核表达载体作为基因疫苗来研究; 另一方面也可以利用该载体进一步研究 AEV 致病过程中, VP3 与宿主细胞的关系。

基因免疫是近几年发展起来的一项新技术, 将编码某种目的抗原的基因置于真核表达元件的控制之下, 并将其直接导入动物机体内, 通过宿主细胞的转录系统直接合成蛋白抗原, 从而诱导宿主产生对该抗原蛋白的免疫应答, 以达到预防和治疗疾病的目的, 同时也可以利用核酸免疫来制备抗特定抗原的多克隆抗体和单克隆抗体^[12], 避免了繁琐的纯化抗原的步骤, 也简化了单克隆抗体筛选的过程。其优点是目的蛋白在体内直接表达能够通过翻译后修饰并折叠成与自然感染情况下相同的构象。并能够同时引起机体的抗体应答和细胞免疫应答^[13]。本研究构建了真核表达载体 pDNA VP3 并通过肌肉免疫小鼠, 检测到了较高滴度特异性抗体的产生, 证明了该载体在动物机体内表达的可行性, 为下一步的研究工作奠定了基础。

参考文献

- [1] Calnek B W, Luginbuhl R E, Hemboldt C F. Disease of poultry [M]. Tenth Edition. Des Moines: Iowa state university, 1997. 571-581.
- [2] 殷震, 刘景华. 动物病毒学 [M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1997. 468-518.
- [3] Marvil P, Knowles N J, Mockett A P, et al. A avian encephalomyelitis virus is a picornavirus and is most closely related to hepatitis A virus [J]. J Gen Virol, 1999, 80: 653-662.
- [4] 韦莉, 刘爵, 姚炜光, 等. 我国禽脑脊髓炎病毒分离株全基因组的测定 [J]. 病毒学报, 2004, 20(3): 230-236.
- [5] Jue L, Ting W, Jimmy K. A avian encephalomyelitis virus induces apoptosis via major structural protein VP3 [J]. Virology, 2002, 300: 39-49.
- [6] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南 [M]. 第 3 版. 黄培堂, 译. 北京: 科学出版社, 2003.
- [7] Tannock G A, Shafren D R. A rapid procedure for the purification of avian encephalomyelitis viruses [J]. Avian Dis, 1985, 29(2): 312-321.
- [8] Minor P D. The molecular biology of poliovaccines [J]. J Gen Virol, 1992, 73: 3 065-3 077.
- [9] Luo M, Toth K S, Zhou L, et al. The structure of a highly virulent theiler's murine encephalomyelitis virus (GDV II) and implications for determinations of viral persistence [J]. Virology, 1996, 220: 246-250.
- [10] Yauch R, Keres K, Saujani K, et al. Identification of a major T-cell epitope within VP3 amino acid residues 24 to 37 of theiler's virus in demyelination-susceptible SJL/J mice [J]. J Virol, 1995, 69: 7 315-7 318.
- [11] Bosch A, Gonzales-Dankaart J F, Haro I, et al. A new continuous epitope of hepatitis A virus [J]. J Med Virol, 1998, 54: 95-102.
- [12] Seangdeun M, Panida K, Watchara K. Production of polyclonal and monoclonal antibodies against CD54 molecules by intra-

(下转 372 页)

- [3] 刘文江, 黄 兵, 欧阳五庆, 等. 柔嫩艾美耳球虫抗药株第二代裂殖子的双向电泳图谱比较[J]. 中国兽医科技, 2004, 34(3): 21-25.
- [4] Basco L K, Pecoulas P E, Wilson C M, *et al*. Point mutations in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene and pyrimethamine and cycloguanil resistance in *Plasmodium falciparum* [J]. Mol Biochem Parasitol, 1995, 69: 135-138.
- [5] Liang P, Pardee A B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction[J]. Science, 1992, 257: 967-971.
- [6] 韩红玉, 赵其平, 陈兆国, 等. 柔嫩艾美耳球虫(*Eimeria tenella*)地克珠利抗药株和马杜拉霉素抗药株的实验室诱导[J]. 中国兽医学报, 2004, 24(2): 138-140.
- [7] Liang P, Bauer D, Averboukh L, *et al*. Analysis of altered gene expression by differential display [J]. Methods Enzymol, 1995, 254: 304-321.
- [8] Mou L, Miller H, Li J, *et al*. Improvements to the differential display method for gene analysis [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1994, 199: 564-569.
- [9] 郝纯毅, 赵 敏, 李 勇, 等. 降低mRNA 差异显示技术假阳性率的一种方法[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2002, 18(1): 110-114.

Selection and Cloning of the Drug-resistant Related Genes of *Eimeria tenella* by Silver-staining mRNA Differential Display Method

HAN Hong-yu, JIANGLian-lian, ZHAO Q i-ping, DONG Hui, CHEN Zhao-guo, L N Jiao-jiao, HUANG Bing* (Key Laboratory for Animal Parasitology of Ministry of Agriculture, Shanghai Institute of Animal Parasitology, CAAS, Shanghai 200232, China)

Abstract Silver-staining mRNA differential display method was used to isolate and clone the differential expressed gene of drug-resistant strains of *Eimeria tenella* to diclazuril and maduramycin. Total RNA of three strains of *E. tenella* was isolated by using Trizol. DDRT-PCR was established by using an anchored primer Oligo (dT) 12GG and two arbitrary primers. Their products of PCR were analyzed on the denaturing polyacrylamide gels by silver-staining. The differential cDNA s fragment was excised from the gels and reamplified with the same sets of primers. Then the PCR products were purified and ligated with PGEM-T-easy Vector. The dot-blot hybridization proved that the two clones from each of two drug-resistant strains of *E. tenella* appeared the strong signals. Sequence analysis revealed that the two cDNA fragments would be a novel genes. This study paved the way for cloning the full-length cDNA s and finding the molecular mechanism about the drug-resistance of *E. tenella*.

Key words: *Eimeria tenella*; drug-resistance; silver-staining mRNA differential display; gene cloning

* Corresponding author

(上接368页)

- splenic immunization of plasmid DNA encoding CD54 protein [J]. Immunol Letters, 2001, 76: 25-30.
- [13] Hassett D E, Whitton J L. DNA immunization [J]. Trends Microbiol, 1996, 4(8): 307-312.

Construction and Immunization of Recombinants of the Structural Protein VP3 Gene of Avian Encephalomyelitis Virus

XU Jian-sheng, TANG Bo, CHENG Da-rong, CAO Jun, LU Ling, ZHOU Xiao-xin (College of Veterinary Science, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract A pair of primers specific to VP3 gene was designed according to the published sequence of VP3 gene of AEV strain 1. 143 VP3 fragment was amplified by PCR from prokaryotic expression vector pET-VP3. The fragment was then cloned into T-tailed vector pGEM-T easy. Sequence analysis showed that the sequence is identical to that of published VP3 gene of AEV VR strain. Then the fragment VP3 was cut from the vector pGEM-VP3 and inserted into eukaryotic expression vector pDNA3.1 (+) and transformed in *Escherichia coli* DH5 α . The VP3 was expressed after transfected into COS-1 cell and detected by IFA. BALB/c mice was immunized with the recombinant vector pDNAVP3 and antibodies against VP3 was detected by ELISA.

Key words: AEV; VP3; eukaryotic expression vector; DNA vaccines