

[文章编号] 1000-2782(2000)05-0054-07

IBDV 超强毒 HZ 株 VP2 基因的克隆和真核表达质粒的构建

许信刚¹, 李健强¹, 王笑梅², 童光志²

(1 西北农林科技大学 畜牧兽医学院, 陕西 杨陵 712100;

2 中国农业科学院 哈尔滨兽医研究所, 黑龙江 哈尔滨 150001)

S852.659.4
Q78

[摘要] 利用反转录-聚合酶链反应(RT-PCR), 扩增克隆传染性法氏囊病毒超强毒(vvIBDV) HZ 株 VP2 基因, 并对 VP2 基因进行全序列测定、序列分析和聚类分析, 同时将 VP2 基因与真核表达载体 pcDNA3 相连接。结果克隆到 VP2 基因全序列长 1 356 bp, 分析表明 HZ 株与欧洲超强毒株 UK661 高度相似, 同时将 VP2 基因正向插入 pcDNA3 的 CMV 启动子下游, 得到了 VP2 基因的真核表达质粒。为 IBDV 分子流行病学和基因工程疫苗的研究奠定了物质基础。

VP2基因

传染性法氏囊病毒

[关键词] IBDV; 超强毒株; VP2; 克隆; 序列分析; 真核表达质粒

[中图分类号] S852.65+9.4 **[文献标识码]** A

传染性法氏囊病毒(IBDV)引起鸡传染性法氏囊病, 由于近年来变异株和超强毒的流行, 已严重威胁着包括我国在内的世界养鸡业的发展。IBDV 属于双链 RNA 病毒科, 其基因组由 2 个节段 dsRNA(A, B) 构成。大片段 A 长约 3.4 kb, 编码 1 条多聚蛋白, 该蛋白随后裂解为 VP2, VP3 和 VP4^[1]。小片段 B 长约为 2.9 kb, 编码 VP1。现已证实 VP2 携带宿主保护性抗原决定簇, 可以诱导产生保护性中和抗体, 并且有血清型特异性, 是 IBDV 最重要的功能蛋白^[2]。

本研究以国内分离株 HZ 株为材料, 致病性试验证实为 vvIBDV^[3]。鉴于 VP2 是 IBDV 的主要功能蛋白, 因此对 IBDV 基因组 A 片段 VP2 区进行了克隆和全序列测定。同时构建了 VP2 基因的真核表达质粒。从而在分子水平上探讨了 vvIBDV 的特点, 以期为我国 IBDV 分子流行病学研究及有效防治提供依据, 也为 IBDV 基因疫苗的研究奠定物质基础。

1 材料与方方法

1.1 材料

IBDV 超强毒株 超强毒 HZ 株由西北农林科技大学动物病毒研究室提供, 分离于陕西汉中某鸡场, 经生物学试验证实为 vvIBDV^[3]。

载体与菌株 PUC119 质粒、JM83 菌株、真核表达质粒 pcDNA3 由哈尔滨兽医研究

[收稿日期] 1999-10-14

[基金项目] 杨凌农业高新技术示范区科研基金资助项目(99KG9)

[作者简介] 许信刚(1974-), 男, 在读硕士生。

所生物技术国家重点实验室提供。

引物的设计和合成 根据已发表的 IBDV 52/70 株基因组序列,设计并合成 1 对用于扩增 IBDV VP2 基因的引物。引物 I 为 5'-GGTCTAGAACGATGGCAGCGATGAC-3', 位于第 117~135 位核苷酸,5'端加上 *Xba* I 酶切位点。引物 II 为 5'-GGTCTAGACTCAACCTTCCCAATTG-3', 位于第 1544~1564 位核苷酸,5'端加上 *Xba* I 酶切位点。两引物均位于 IBDV 基因组保守区。

1.2 方法

1.2.1 IBDV 核酸的提取 IBDV 核酸提取参考文献[4,5]进行。

1.2.2 RT-PCR 参照文献[6]进行。

1.2.3 PCR 产物处理及 HZ-PUC119 重组质粒的构建 按文献[7]进行。

1.2.4 重组质粒的筛选与鉴定 挑取白色菌落用碱裂解法快速提取质粒,用 *Xba* I 酶切分析鉴定重组质粒。以提取的重组质粒为模板进行 PCR,同时设立 PUC119 质粒阴性对照和空白对照。

1.2.5 VP2 基因 DNA 序列测定及序列比较分析 DNA 序列测定由宝生物大连有限公司承担。序列比较分析采用 GOLDKEY 软件进行,用 MEGA 程序对 IBDV HZ 株进行聚类分析。

1.2.6 重组真核表达质粒 HZ-pcDNA3 的构建 以 *Xba* I 酶切重组质粒(HZ-PUC119),回收 1.5 kb VP2 基因 cDNA 片段。与真核表达载体 pcDNA3 连接反应和转化。重组真核表达质粒的筛选参考 1.2.4 方法进行。

1.2.7 重组真核表达质粒的酶切鉴定和 PCR 鉴定 以重组质粒为模板建立反应体系,同时设立 pcDNA3 为模板 PCR 反应对照及不加任何模板的空白对照。

1.2.8 重组真核表达质粒的 VP2 基因插入方向鉴定 由于是相同末端的连接,所以有 2 种插入方式,有正向和反向之分,反向插入的基因不表达,所以必须选出正向插入的重组质粒。在 HZ VP2 基因序列中选 *Apa* I 酶进行酶切鉴定。

2 结果与分析

2.1 IBDV VP2 基因 PCR 扩增产物

IBDV 核酸经 RT-PCR 扩增长约 1.5 kb 的特异性产物(图 1),与理论设计完全符合。

2.2 PCR 产物的克隆及酶切鉴定

PCR 产物经处理后与 PUC119 平端连接,转化 JM83,在含 Amp, X-gal 和 IPTG 固体 LB 平板上长出约 100 个分布均匀、大小相近的白色菌落。随机挑取 10 个质粒,经质粒大小比较初步筛选到 3 个重组质粒,经 *Xba* I 酶切鉴定,这 3 个质粒均切出了 1.5 kb 长的条带(图 2),证明所克隆的 cDNA 片段为 VP2 基因。

2.2 重组质粒的 PCR 鉴定

以 HZ-PUC119 重组质粒为模板进行 PCR 反应,结果 3 个重组质粒均扩增出预期的 1.5 kb 片段(图 3)。而对照组没有扩增出目的条带,与理论设计完全相符。

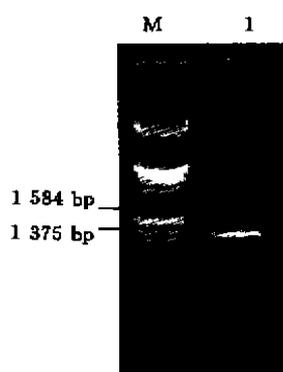


图 1 HZ 株 VP2 基因 RT-PCR
M 为 λ -DNA/(*EcoR* I + *Hind* III)
1 为 IBDV HZ 株 VP2 扩增产物

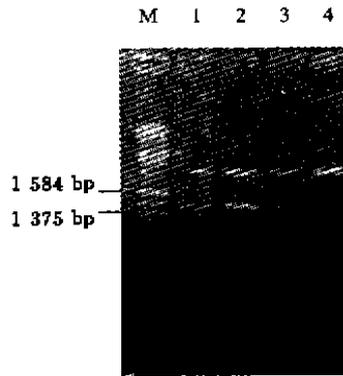


图 2 重组质粒的 *Xba* I 酶切鉴定
M 为 λ -DNA/(*EcoR* I + *Hind* III)
1, 2, 3. 阳性质粒; 4. 阴性质粒

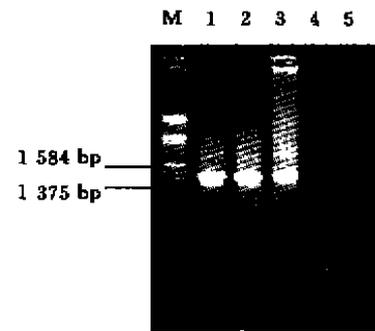


图 3 重组质粒的 PCR 鉴定
M 为 λ -DNA/(*EcoR* I + *Hind* III)
1, 2, 3. 阳性质粒; 4. PUC119
阴性质粒; 5. 空白对照

2.4 VP2 基因核苷酸及氨基酸序列

对 vvIBDV HZ 株的 VP2 基因进行全序列测定, 获得了 VP2 基因的全部核苷酸序列 (1 356 bp), 并推导出其氨基酸 (图 4, 5)。将所测的序列与已报道^[8,9]的 IBDV 毒株 OKYM, UK661, 52/70, PBG98, Variant E 的 VP2 cDNA 序列及推导的氨基酸序列进行比较, 结果见表 1。将 HZ 株 VP2 DNA 序列和其他毒株进行聚类分析, 并得到不同 IBDV 毒株的进化关系图 (图 6)。

```

ATGACAACCTGCAAGATCAAACCCAACAGATTGTTCCGTCACATCGGAGCCTTCTGATGCCAACAAACCGGACCGGGCGTCCATTCCGGACG
ACACCCCTAGAGAAGCACACTCTCAGGTCAGAGACCTCGACCTACAATTTGACTGTGGGGACACAGGGTGAGGGCTAATTGTCTTTTTCCCT
GGTTTTCCCTGGCTCAAATTTGGGTGCTCACTACACACTGCAGAGCAATGGGAACTACAAGTTCGATCAGATGCTCCTGACTGCCCAAGAACCT
ACCGGCCAGCTACAACACTGCAAGCTAGTGAGTCGGAGTCTCACAGTGAGGTCAAGCACACTCCCTGGTGGCGTTTATGCACTAAACGGGA
ACCATAAACGCCGTGACCTTCCAAGGAAGCCTGAGTGAAGTACAGATGTTAGCTACATTGGGTTGATGTCAGCAACAGCCAACATCAACG
ACAAAATCGGGAAACGTCCTAGTAGGGGAAGGGTAACCGTCCAGCTTACCCACATCATAATGATCTTGGGTATGTGAGACTCGGTGACCCC
ATTCCCGCTATAGGGCTCGAOCCTCAAAAATGGTAGCAACATGTGATAGCAGTGACAGGCCAGAGTCTACACCATAACTGCAGCCGATGATTA
CCAATICTCATCACAGTACCAAGCAGGTGGAGTAACAATCACACTGTTCTCAGCTAATATCGATGCCATCACAAGCCTCAGCATCGGGGGAG
AACTCGTGTTCAAACAAGGTCCAAAGGCCTTACTGGGTGCTACCATCTACCTTATAGGCTTGTGATGGGACTGCGGTAATAACCAGAGCTG
TGGCCGACAGCAATGGGCTAACGGCCGBCACTGACAACTTATGCCATTCAATATTGTGATTCCAACCGGCGAGATAACCCAGCCAATCACA
TCCATCAAACCTGGAGATAGTAACCTCCAAAAGTGGTGGTCAGGGCGGGGATCAGATGTCATGGTCAGCAAGTGGGAGCCTAGCAGTGACGA
TCCACGGTGGCAAATATCCAGGGGCCCTCCGTCCCGTCACTAGTAGCCTACGAAAGAGTGGCAACAGGATCTGTCTGTTACCGTCCGCCGG
GGTGAGCAACTTCGAGCTGATCCAAAATCCTGAACTAGCAAAGAACCTGGTCCACAGAATAOAGGCCGATTGACCCAGGAGCCATGAACACT
ACAAAATTGATACTGAGTGAGAGGACCGTCTTGGCATCAAGACCGTATGGCCAACAAGGGAGTACACAGACTTTCGGGAGTACTTCATGG
AGGTGGCCGACCTCAACTTCCCTGAAGATIGCAGGAGCATTTGGCTCAAAGACATAATCCGGGCCCTAAGG
    
```

图 4 HZ 株 VP2 基因核苷酸序列

```

MI N I Q D I I Q Q I V P S I R S L I M P T I G P A S I P D D I L E K I I I R S E I S L Y N I T V G D I G S G I I V E F P G F P G S I V G A I Y I I Q S N G N Y K E D Q M I I E
176
A Q N I P A S Y N Y C R L V S R S L I V R S S E I P G G V Y A I N G I I N A V T E Q G S I S E L I D V S Y I G L M S A T A N I N D K I G N V I V G F G V I V I S I P T S Y D L G
266
Y Y R I G D I P A R G I D P K M V A I C D S S D R P R V Y I I A A D I Y Q E S S Q Y Q A G G V T I E I I S A N I B A I I S L S I G G L I V I Q I S V Q G I I I G A T I Y I I G F D
1
355
G I A V I I R A V A A D N G L T A G I D N I M P F N I V I P I G I I I Q P I I S I K I I T I V E S K S G G Q A G D Q M S W S A S G S I A V I I H G G N Y T G A L R P V I I V A Y E R
2 3
442
V A I G S V V I V A G V S N F E I I P N P E I A K N I V T I Y G R F D P G A M N Y T K I I S E R D R I G I K I V W P I R I Y I D E R I Y I M I V A D I N S P I K I A G A T G
    
```

图 5 HZ 株 VP2 氨基酸序列
1,2. 亲水区,3. 七肽区

表 1 IBDV HZ 株 VP2 区核苷酸和氨基酸与其他 5 个毒株的比较

差异类型	毒株	OKYM	UK661	52/70	PBG98	Variant E
核苷酸	HZ	17	14	50	63	63
氨基酸	HZ	3	3	6	15	15

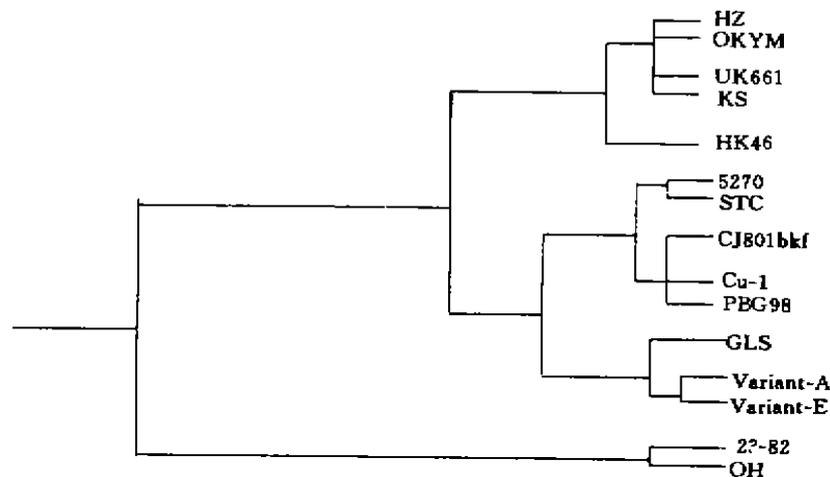


图 6 根据 VP2 基因核苷酸序列所作的系统进化图
(DNA 序列比较用 Goldkey 进行,用 MEGA 程序对 IBDV 毒株进行聚类分析)

2.5 重组真核表达质粒的酶切鉴定

快速提取质粒,选择电泳迁移较慢的质粒假定为阳性,经 *Xba* I 酶切得到长为 5.4 和 1.5 kb 的 2 个 DNA 片段(图 7)。证明所选质粒为真核重组质粒,命名为 HZ-pcDNA3。

2.6 重组质粒的 VP2 基因插入方向鉴定

经分析 HZ 株 VP2 基因核苷酸序列有 2 个 *Apa* I 酶切位点,而 pcDNA3 多克隆位点

有 1 个 *Apa* I 酶切位点。若 VP2 正向插入 pcDNA3 多克隆位点则酶切有 3 个片段,长分别为 6 600,300 和 150 bp。若 VP2 反向插入 pcDNA3 多克隆位点,则酶切产物有 3 个片段,长分别为 5 890,1 050 和 350 bp(图 8)。1 号质粒为正向插入,2 号质粒为反向插入。

2.7 重组真核表达质粒的 PCR 鉴定

以 HZ-pcDNA3 阳性重组质粒为模板进行 PCR 扩增得到 1 条 1.5 kb 片段,而对照组均没有扩增出目的条带(图 9),与理论设计完全相符。

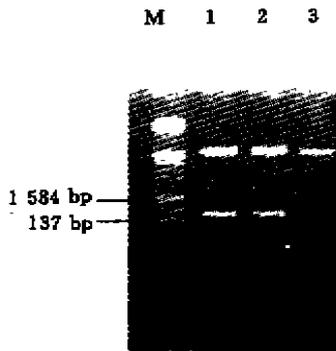


图 7 VP2 基因 cDNA 真核表达质粒构建的酶切鉴定

M 为 λ -DNA/(*Eco*R I + *Hind* III)

1. 2. HZ 阳性质粒;
3. pcDNA3 阴性质粒

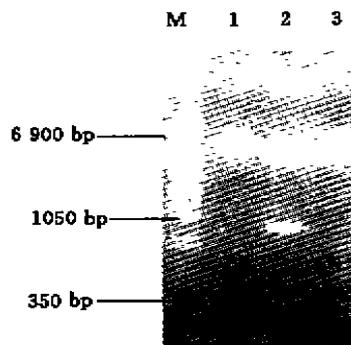


图 8 VP2 基因 cDNA 插入真核表达质粒的方向性鉴定

M 为 λ -DNA/(*Eco*R I + *Hind* III)

1. 正向插入酶切;2. 反向插入酶切;
3. pcDNA3 阴性质粒

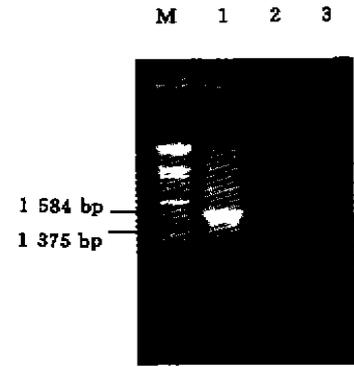


图 9 HZ 株 VP2 基因 cDNA 真核表达质粒的 PCR 鉴定

M 为 λ -DNA/(*Eco*R I + *Hind* III)

1. HZ-pcDNA3 阳性质粒;
2. pcDNA3 阴性质粒;3. 空白对照

3 讨 论

本研究成功地克隆到了 vvIBDV HZ 株 VP2 全长基因,共 1 356 bp,编码 445 个氨基酸残基。

比较 HZ 株及已报道的 5 株 IBDV VP2 核苷酸及氨基酸残基的差异(表 1)可见,HZ 株与 UK661(英国超强毒株)同源性很高,核苷酸同源达 98.9%以上,氨基酸同源达 99.3%。这说明 HZ 株与超强毒同源最高,而与一般强毒、弱毒及变异株差别较大。

经过对多株 vvIBDV VP2 基因序列的比较分析,vvIBDV VP2 在其高变区具有几个重要特征^[10]。首先在 249 和 254 位上的氨基酸分别为 Q 和 G,而非 K 和 S,从而保证其抗原性不发生变异;其次,七肽区保持 SWSASGS 不变,且 279 和 284 位分别为 D 和 A,而非 N 和 T,这是 IBDV 毒株具有致病力的必要条件;第三,在 222,294 和 299 位上具有 3 个特征氨基酸,分别为 A,I 和 S。这 3 个氨基酸使超强毒的亲水性发生变化,从而使毒力增强。本研究所测的 HZ 株氨基酸序列完全具有上述几个特点,这说明 HZ 株确实为 1 株超强毒。此结果与实际中测得生物学试验结果相符。

从进化关系上看,HZ 株与超强毒 UK661 株相近,这说明我国的 vvIBDV 与国外超强毒株有密切的亲缘关系,其传播途径值得进一步探索。

获得的 HZ 株 VP2 cDNA 基因,从序列分析结果看是正确的,可作为制备基因工程疫苗的目的基因。真核表达载体 pcDNA3 是目前普遍使用的一种较为先进的表达载体,

其启动子为 CMV,能在多种真核细胞中表达。试验研究表明^[11],在鸡体内表达效率较高。本研究将 vvIBDV VP2 基因插入 pcDNA3 中构建了真核表达质粒,既为研究超强毒 VP2 基因的结构与功能及其免疫保护作用提供了基础,也为 IBDV 的分子流行病学和基因工程疫苗的研究奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Lukert P D, Saif Y M. Infectious bursal disease[A]. In: Calnek B W. Disease of Poultry[C]. 9th ed. Ames, Iowa State University Press, 1991. 648—663.
- [2] Ready S K, Michael J H. Flow cytometric analysis of the neutralizing immune response against infectious bursal disease using reticuloendotheliosis virus-transformed lymphoblastoid cell line[J]. J Virol Methods, 1993, 44: 161—178.
- [3] 李健强, 伊 岚, 梁 荣, 等. 传染性法氏囊病 Vero 细胞灭活疫苗的研究[J]. 西北农业大学学报, 1998, 26(4): 60—65.
- [4] Azad A A, Barrett S A, Fahey K J. The characterization and molecular cloning of the double-stranded RNA genome of an Australian strain of infectious bursal disease virus[J]. Virol, 1985, 143: 35—44.
- [5] Liu H J, Giambone J J, Dormitorio T. Detection of genetic variations in serotype I isolates of infectious bursal disease virus using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis[J]. J Virol Method, 1994, 48: 281—291.
- [6] Jackwood D J, Saif Y M, Hughes J H. Charact and serological studies of two serotypes of infectious bursal disease virus in turkeys[J]. Avian Dis, 1982, 26: 871—882.
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Mariatis T. Molecular cloning: A laboratory manual (Book D)[M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998. 1—105.
- [8] 胡子信, 张曼夫, 陈红英, 等. 传染性法氏囊病病毒 A 节段编码序列 cDNA 基因的克隆和序列分析[J]. 中国预防兽医学报, 1999, 21(3): 178—181.
- [9] Brown M D, Green P, Skimer M A. VP2 sequence of recent European very virulent isolates of infectious bursal disease virus are closely related to each other but are distinct from those of classical strains[J]. J Gen Virol, 1994, 75: 675—680.
- [10] 曹永长, 毕英佐, 梁志清, 等. 超强 IBDV 毒株宿主保护抗原分子特征[J]. 中国兽医学报, 1998, 18(6): 521—526.
- [11] 梁 荣, 陈 杰, 曹殿军, 等. 禽痘病毒载体在新城疫病毒重组疫苗研究中的应用[J]. 动物医学进展, 2000, 21(1): 13—16.

Cloning and sequence analysis of the VP2 gene in HZ strain of very virulent infectious burial disease virus and construction of its expression plasmid

XU Xing-gang¹, LI Jian-qiang¹, WANG Xiao-mei²,

TONG Guang-zhi², LIANG Rong¹, ZHANG Yao-xiang¹, XIN Fu-shan¹

(1 College of Animal Science and Veterinary Medicine North-West Agri-Foristry Scie-tech University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2 Harbin Veterinary Research Institute of CAAS, Harbin 150001, China)

Abstract: According to the published sequence of IBDV strain 52/70, a pair of primers that could amplify the cDNA of protective antigen VP2 gene was designed and synthesized. By RT-PCR, a single DNA fragment of about 1.5 kb was obtained from HZ

strain of IBDV. Then the VP2 cDNA was cloned into PUC119 at SmaI site. The nucleotide sequence of the expected VP2 gene was determined by Sanger's DNA sequencing method, and then the amino acid sequence was deduced. Both the nucleotide sequence and amino acid sequence were compared with five published sequence of VP2 gene of IBDV strain. It was shown that HZ strain was mostly closely related to the very virulent strain UK661 but different from other serotype I strains. The IBDV VP2 gene was recovered from plasmid HZ-PUC119 by digestion with XbaI. Then the VP2 gene was subcloned into the downstream of CMV promoter of the same treated expression vector pcDNA3. The recombinant plasmid HZ-pcDNA3 containing IBDV VP2 gene was identified by restriction digestions and PCR amplification. The expression plasmid can be a potentially valuable gene vaccine against IBDV.

Key words: infectious bursal disease virus; vvIBDV; VP2; cloning; sequence analysis; expression plasmid

《畜牧兽医学报》2001 年征订启事

《畜牧兽医学报》是中国畜牧兽医学会主办,《畜牧兽医学报》编委会、中国农业科学院畜牧兽医研究所编辑出版的全国性的畜牧兽医学术刊物。创刊于 1956 年 7 月,读者对象为大、专院校的师生和各级畜牧兽医生产、科研工作者等。刊登较高水平的学术论文和专业研究报告以及对生产实践具指导性、启发性的文章。本刊为全国中文核心期刊、中国自然科学核心期刊,并被国内外重要引文数据库及文摘性期刊收录。

本刊为双月刊,96 页,每期定价 6.00 元。全国各地邮局均可订阅,邮发代号:82-453;国内统一刊号:CN 11-1985/S;国外代号:BM446;编辑部地址:北京市海淀区圆明园西路 2 号中国农业科学院畜牧研究所;邮政编码:100094;电话:(010)62815987。