# 减蛋综合征病毒 PVⅢ蛋白基因的克隆与序列分析*

张春杰[1], 吴志明[2], 李银聚[1], 程相朝[1], 吴庭才[1]
(1 河南科技大学 动物科技学院, 河南 洛阳 471003; 2 河南省兽医防治站, 河南 郑州 450002)

[摘 要] 根据减蛋综合征病毒 PVⅢ蛋白基因序列设计了 1 对特异性引物, 应用降落 PCR 法对 PVⅢ蛋白基因进行了扩增。将扩增产物克隆至 pMD18-T 载体中, 经酶切和 PCR 鉴定, 初步证明了目的片段的正确性。进一步核苷酸序列测定表明, 所扩增的基因片段长度为 0.756 kb, 共编码 250 个氨基酸。

[关键词] 减蛋综合征病毒; PVⅢ基因; 基因克隆; 序列分析
[中图分类号] S851.347.201 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9387(2004)07-0025-04

减蛋综合征病毒(Egg drop syndrome virus, EDSV)是禽腺病毒属(Aviadenovirus)的成员, 由于其基因组结构的独特性, 故该属病毒可作为外源基因良好的表达载体, 从而使其在病毒载体疫苗、基因治疗等领域具有极大的研究开发潜力, 可望成为理想的载体系统[1]。EDSV 属于腺病毒Ⅲ群中的唯一成员, 与Ⅰ群和Ⅱ群毒株相比, 具有独特的抗原性和生物学特性[2], 且其宿主范围广泛, 毒株间毒力差异大, 许多毒株对鸡和水禽都不致病, 且可在机体内长期繁殖, 可能更适于构建禽病的基因疫苗载体[3], 由此而倍受各国学者的重视。但目前对 EDSV 的基因组结构、主要病毒蛋白等方面的了解还比较有限, 严重阻碍了其作为疫苗载体及其免疫学等方面研究的进展。PVⅢ蛋白是 EDSV 的主要结构蛋白, 位于衣壳的内面, 与六邻体紧密相连, 属六邻体相关蛋白, 由 250 个氨基酸残基组成, 其对完整病毒粒子的形成是必不可少的, 且与其他腺病毒和哺乳动物腺病毒的同源性差别很大[4]。为此, 本研究首次应用降落 PCR(TD-PCR)对 PVⅢ蛋白基因进行了扩增, 并进行了克隆和序列分析, 以期为进一步分析 EDSV PVⅢ基因的结构、外源基因的插入位点、病毒粒子的形成及抗原性相关研究提供分子生物学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 EDSV 毒株

为本院禽病研究室分离保存的地方野毒株, HA 效价为 16 log 2。

### 1.2 酶与试剂

基因组DNA 提取试剂盒、高保真 PCR 试剂盒及DNA 回收试剂盒均购自大连宝生物工程公司; *Eco*RⅠ、*Pst*Ⅰ、λDNA/*Hin*dⅢ+ *Eco*RⅠ Marker 等购自华美生物工程公司; 其他试剂均为分析纯。

### 1.3 质粒与菌株

JM109 受体菌购自华美生物工程公司; 克隆载体 pMD18-T 购自大连宝生物工程公司。

### 1.4 病毒增殖

将 EDSV 用灭菌生理盐水 1∶100 倍稀释, 经尿囊腔接种于 10 日龄非免疫鸭胚, 37 ℃下继续孵化, 每天照蛋 2 次, 弃去 24 h 内死亡胚, 收取 24～72 h 的死亡胚和未死亡胚的尿囊液, 测其 HA 效价, -20 ℃保存备用。

### 1.5 EDSV 核酸(EDSV-gDNA)的提取

取 1 mL 尿囊液于 4 ℃ 5 000 r/min 离心 20 min, 上清液中加入 $PEG_{6000}$(100 mg/mL)和 NaCl(2 mg/mL), 振摇溶解, 4 ℃静置 2～6 h, 并于 4 ℃ 16 000 r/min 离心 20 min, 沉淀以 100 μL TE 溶液(pH 8.0)重悬, 加 SDS 至终浓度为 1 mg/mL, 加蛋白酶 K 至终浓度为 1 mg/mL。55 ℃消化 2～4 h。依次用饱和酚、酚/氯仿、氯仿抽提, 经无水乙醇沉淀, TE(PH8.0)溶解, 核酸蛋白分析仪确定纯度并定量备用。

### 1.6 引物设计与合成

参照 EDSV 基因组核苷酸序列设计了 1 对引物, 分别为:

* [收稿日期] 2003-10-15
[基金项目] 河南省自然科学基金项目(0214040027)
[作者简介] 张春杰(1964- ), 女, 河南南召人, 副教授, 博士, 主要从事动物传染病学及病毒分子生物学研究。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

P1: 5′AgCTTCgCgCCAATgCAgCCTgTgACC-3′; P2: 5′TCATCAAACATATTgAAgAgTACgATCAg-3′。

该引物对由大连宝生物工程公司合成。两引物跨越 PV Ⅲ完整结构基因,跨度为 0.75 kb。

1.7 目的基因的扩增

反应在 50 μL 体系中进行,各要素的用量分别为:10×Buffer 5 μL,P1,P2 各 1 μL (25 Pmol),dNTP 2 μL,模板 2 μL (阴性为正常尿囊液),ddH$_2$O 38.5 μL,加 30 μL 石蜡油覆盖,沸水浴 10 min 变性,冰水浴淬火,*Taq* 酶 0.5 μL (5 U);以降落 PCR (TD-PCR) 进行扩增,热盖温度 105 ℃,前 5 个循环参数为:95℃变性 90 s,60 ℃退火 60 s,72 ℃延伸 120 s。之后退火温度以 2 ℃梯度降落,每个梯度循环 7 次,共循环 35 次,退火温度由 60 ℃降落至 52 ℃,最后 72 ℃延伸 10 min。扩增产物通过质量分数 0.8% 琼脂糖凝胶电泳,应用凝胶成像系统进行观察拍照。

1.8 PCR 产物的回收

按 DNA 回收试剂盒要求回收目的片段。

1.9 PCR 产物的克隆

按试剂盒的要求,将纯化后的 PCR 产物与 pMD18-T 载体进行连接(16 ℃,4 h),连接产物按常规方法转化至 JM 109 感受态菌中,转化产物接种于含有 AMP,X-gal 和 IPTG 的 LB 琼脂平板上,37 ℃培养 18~24 h,进行蓝、白斑筛选。挑取生长良好的白色菌落接种于 LB 培养基中(含 AMP 50 μg/mL)扩增培养。按碱裂解法[5]提取其质粒并筛选阳性重组质粒,以备进行酶切鉴定和 PCR 鉴定。

1.10 重组质粒的酶切鉴定和 PCR 鉴定

按常规方法,将筛选的阳性重组质粒以 *Eco*R Ⅰ + *Pst* Ⅰ 双酶切鉴定,以 λDNA/*Hin*dⅢ+ *Eco*R Ⅰ Marker 作对照,在质量分数 0.8% 琼脂糖凝胶上电泳检测;同时,以上述重组质粒为模板,应用相同的引物对其进行扩增,扩增产物通过质量分数 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.11 目的基因的核苷酸序列测定

经酶切鉴定和 PCR 鉴定均为阳性的重组质粒,由大连宝生物工程公司进行核苷酸序列测定。

## 2 结果与分析

2.1 PV Ⅲ基因的扩增

应用设计的特异性引物,采用 TD-PCR 对提取的 EDSV-gDNA 进行扩增,扩增产物经质量分数 0.8% 琼脂糖凝胶电泳。结果(图 1)表明,扩增出 1 条 0.75 kb 左右的目的片段,与理论设计完全相符。

2.2 重组质粒的酶切鉴定和 PCR 鉴定

重组质粒以 *Eco*R Ⅰ + *Pst* Ⅰ 双酶切后,分别切出 2.69 和 0.75 kb 左右 2 个预期片段;经 PCR 扩增后,得到 1 条大小与预期完全一致(0.75 kb)的特异性片段(图 2)。

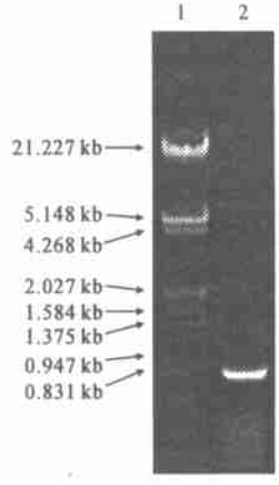


图 1 EDSV PV Ⅲ基因 TD-PCR 扩增产物

1. 参照 Marker;2. PV Ⅲ基因扩增产物

Fig. 1 TD-PCR products of PV Ⅲ gene

1. Marker λDNA/*Eco*R Ⅰ + *Hin*d Ⅲ;

2. PCR products of PV Ⅲ gene

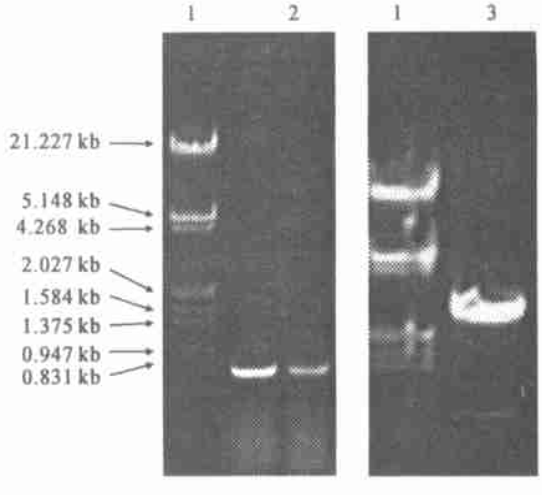


图 2 重组质粒的酶切鉴定和 PCR 鉴定

1. 参照 Marker;2. PCR 鉴定;3. 酶切鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid

1. Marker λDNA/*Eco*R Ⅰ + *Hin*d Ⅲ;2. Identified by PCR;

3. Identified by digestion with *Eco*R Ⅰ and *Pst* Ⅰ

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

### 2.3　PV Ⅲ基因的序列测定结果及其编码的氨基酸序列

扩增出的 EDSV PV Ⅲ蛋白编码基因经大连宝生物工程公司测序, 片段大小为 0.756 kb, 共编码 250 个氨基酸(图 3)。

```
1AAGCTTCGCGCCA ATG CAG CCT GTG ACC CCT TAC CTT TGG CGC TAC CAA CCA GAA ACA GGA ACC
1                M  Q  P  V  T  P  Y  L  W  R  Y  Q  P  E  T  G  T
52  GCG GCA GGA GCA AGA CAA GAC TAT GGC GCG GTT ATC AAT TGG TTC AAC TCT GGG CCT GAT
18  A  A  G  A  R  Q  D  Y  G  A  V  I  N  W  F  N  S  G  P  D
112 CTT TAC AGA CGT ATA AGG GAT GTA AAT ATT ACT CGC AAC AAT GTT GAG CAA ACA CGA GCT
38  L  Y  R  R  I  R  D  V  N  I  T  R  N  N  V  E  Q  T  R  A
172 TTA GCA CGC ACA CCT TTG TCT GGA AAT TTT AAC CGT TGG ACC GCA GCC CAG CTT ACC CAT
58  L  A  R  T  P  L  S  G  N  F  N  R  W  T  A  A  Q  I  T  H
232 CCA CCA GGA ACT CGC TAT AAA CCA TAC TTT CCA GTT GAT AGC ATT AAA GGG GCG CGT GAC
78  P  P  G  T  R  Y  K  P  Y  F  P  V  D  S  I  K  G  A  R  D
292 AGG GTT GCT ACC CAA CAA GGT CAG ATT CTT GCA GGT GCA GGG TAT GAT TTG CAT GAT GGG
98  R  V  A  T  Q  Q  G  Q  I  L  A  G  A  G  Y  D  L  H  D  G
352 CGC CAG TAT AGG AAA ATA ACA AGA GAT GCG TTG CCA TTT CCT CAT AAT TGG CAG GTC AAA
118 R  Q  Y  R  K  I  T  R  D  A  L  P  F  P  H  N  W  Q  V  K
412 GAT GGT TCG CGG TGG GTA AAT CTG GGT GGG AAA GGA GCT AAC AGC TTA ACC ACA TAT CCT
138 D  G  S  R  W  V  N  L  G  G  K  G  A  N  S  L  T  T  Y  P
472 GTT ATT GCT GAT ATA CCT CCG ATC ATG AGA TAT GGT AGG CCA GGA CAA CAG TTG CAA GGG
158 V  I  A  D  I  P  P  I  M  R  Y  G  R  P  G  Q  Q  L  Q  G
532 TCT GGG TTT CAC CGC CCA TCA CCT GCT TTA CTT ACA GAG GAA GCG AGA GTG CCT CGC AGT
178 S  G  F  H  R  P  S  P  A  L  L  T  E  E  A  R  V  P  R  S
592 CAC GGT ATG ACT GTG CGG CAG TTT GTA CAT GAA TTT CCA CCT GTG GTT TTT AAC CAC CCG
198 H  G  M  T  V  R  Q  F  V  H  E  F  P  P  V  V  F  N  H  P
652 TTT TCT GAA GAT ATT ACT TAT TTT CCC AAG GAG TTT AAC CCT TTG TTT AAT CCC TCC GAG
218 F  S  E  D  I  T  Y  F  P  K  E  F  N  P  L  F  N  P  S  E
712 GAT TAT AGA GTT AGT TCT GAT CGT ACT CTT CAA TAT GTT TGA
238 D  Y  R  V  S  S  D  R  T  L  Q  Y  V
```

图 3　EDSV PV Ⅲ基因编码区的核苷酸序列及其编码的氨基酸序列

Fig. 3　Sequence of nucleotide and predicted amino acid of EDSV PV Ⅲ gene

## 3　讨　论

目前, 主要应用限制性内切酶水解片段构建基因文库[6,7]对 DNA 病毒基因组的结构特点进行研究, 常用 *Exo*Ⅲ核酸外切酶降解法制备每个克隆的嵌套缺失模板, 用末端终止法测定 DNA 序列[8,9]。这种方法保真性好, 对研究基因的分子生物学特性具有重要意义, 但就研究某一功能基因而言, 限制性内切酶基因片段文库受到酶切位点的限制, 而应用 PCR 扩增具有完整读码框架的基因则更为方便、可行。

EDSV PV Ⅲ蛋白属六邻体相关蛋白, 对完整病毒粒子的形成是必不可少的, 该蛋白序列在腺病毒中比较保守。因此, 扩增完整的 PV Ⅲ基因对研究 EDSV 的分子生物学特性和进行 EDS 分子生物学诊断具有重要作用。

序列测定结果表明, 本研究扩增、克隆到的 EDSV PV Ⅲ蛋白基因序列, 与应用 EDSV 全基因组的 *Hin*dⅢ酶切片段测序所得到的 PV Ⅲ结构基因序列[10]基本一致, 全长 0.756 kb, 共编码 250 个氨基酸。但在第 120 位(C→A)、533 位(T→C)和 541 位(G→C)核苷酸处存在差异, 且这 3 位核苷酸的变化均导致此处对应的氨基酸发生了变异, 分别由 S→R、F→S、D→H。这些变异的发生原因应该与不同

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

EDSV 毒株本身的结构特性有关,这说明 PV Ⅲ基因本身存在着明显的多态性。

本研究设计的引物,位于 PV Ⅲ完整结构基因的两端,包括翻译起始密码子和终止密码子。同时,采用降落 PCR (TD-PCR)方法进行扩增时,这种方法设计的多循环反应程序使循环的退火温度越来越低,使用热启动技术可以确保第一个引物与模板发生的杂交反应发生在最互补的反应物之间,这种方法较常规 PCR 法能得到更多的扩增产物。

EDSV 编码的 PV Ⅲ与其他禽腺病毒和哺乳动物腺病毒的同源性差别很大[10, 11]。而无论 EDSV 的抗原性,还是其病毒特性均与其他禽腺病毒存在明显差别。因此,EDSV PV Ⅲ基因的扩增、克隆与序列分析,不仅为进一步阐明 EDSV PV Ⅲ基因结构与功能的关系打下了基础,而且也为 PV Ⅲ基因的表达及 EDSV 作为疫苗载体的研究奠定了良好的基础。

## [参考文献]


[1] 杨永华. 鸡减蛋综合征病毒的分子生物学研究概况[J]. 中国兽医科技, 2002, 32(5): 18-20.

[2] 卡尔尼克 B W. 禽病学[M]. 第 9 版. 北京: 中国农业大学出版社, 1999.

[3] 汪明磊. 减蛋综合征病毒的分子生物学研究进展[J]. 动物科学与动物医学, 2000, 17(5): 43-45.

[4] 段玉友, 崔治中, 葛天同, 等. 产蛋下降综合征 H91 病毒基因组 DNA 的酶切分析[J]. 江苏农学院学报, 1995, 16(3): 54—58.

[5] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆试验指南[M]. 金冬雁, 黎孟枫, 主译. 北京: 科学出版社, 1998. 19-22.

[6] 胡敬东, 章金刚, 李红卫, 等. 减蛋综合征病毒基因组 *Hin*dⅢ酶切片段的克隆及酶谱分析[J]. 中国兽医学报, 1998, 18(1): 7-10.

[7] Zakharchuk A N, Kruglyak V A, Akopian T A, et al. Physical mapping and homology studies of egg drop syndrome (EDS-76) adenovirus DNA [J]. Arch Virol, 1993, 128: 171-176.

[8] Henikoff S. Unidirectional digestion with exonuclease Ⅲ in DNA sequence analysis[J]. Methods Enzymol, 1987, 155: 156-164.

[9] 曾力宇, 金 奇, 章金刚, 等. 鸡减蛋综合征病毒六邻体蛋白基因的序列分析[J]. 中国兽医学报, 1997, 17(3): 215-218.

[10] 李茂祥, 金 奇, 章金刚, 等. 减蛋综合征病毒 PV Ⅲ基因和区序列测定及结构分析[J]. 中国兽医学报, 1998, 18(1): 27-31.

[11] 李茂祥, 李红卫, 金 奇, 等. 减蛋综合征病毒 33 蛋白基因克隆及结构分析[J]. 中国兽医学报, 1999, 19(3): 223-225.


# Cloning and sequence analysis of PV Ⅲ gene of egg drop syndrome virus


**ZHANG Chun-jie[1], WU Zhi-ming[2], LI Yin-ju[1], CHENG Xiang-chao[1], WU Ting-cai[1]**

(1 *College of Animal Science and Technology, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan* 471003, *China*; 2 *Henan Veterinary Prevention and Control Station, Zhengchou, Henan* 450002, *China*)



**Abstract**: PV Ⅲ protein gene of egg drop syndrome virus (EDSV) was amplified by touchdown PCR (TD-PCR) and was cloned into pMD18-T vector. The recombinant plasmids were identified by digestion with restriction endonuclease and PCR. The sequence analysis showed that the nucleotide sequence of PV Ⅲ gene was 0.756 kb and encoded with a protein of 250 amino acids.



**Key words**: EDSV; PV Ⅲ gene; gene cloning; sequence analysis


© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net