

减蛋综合症病毒六邻体蛋白基因的克隆与序列分析^{*}

李银聚^{1,2}, 吴庭才¹, 程相朝¹, 吴志明³, 张春杰¹

(1 河南科技大学 动物科技学院, 河南 洛阳 471003; 2 南京农业大学 动物医学院, 江苏 南京 210095;

3 河南省兽医防治站, 河南 郑州 450002)

[摘要] 设计了1对特异性引物,应用降落PCR法对减蛋综合症病毒(EDSV)六邻体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鉴定后,初步证明了目的片段的正确性。进一步经核苷酸序列测定表明,所扩增的基因片段长度为2 74 kb,共编码910个氨基酸,与由EDSV弱毒株(AA-2)全基因组的HindIII酶切片段测序所得到的六邻体结构基因推测的氨基酸序列相比,有11处氨基酸发生了变异。

[关键词] 减蛋综合症病毒;六邻体蛋白基因;克隆;序列分析

[中图分类号] S851.34⁺7.201

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2005)08-0031-04

减蛋综合症病毒(Egg drop syndrome virus, EDSV)是禽类腺病毒属中的成员,主要引起以产蛋鸡产薄壳蛋或无壳蛋、产蛋率严重下降为特征的传染病。自1976年荷兰科学家Van Eck首次报道该病之后,现已成为世界范围内引起鸡产蛋损失的主要原因^[1]。该病毒具有独特的抗原性和生物学特性^[2],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],因此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,因此严重阻碍了其作为疫苗载体及免疫学等方面的研究进展。

六邻体蛋白是EDSV的主要结构蛋白,它与五邻体蛋白和纤维蛋白一起构成衣壳,决定着病毒粒子的大小,且带有主要的属和亚属特异性抗原决定簇,是EDSV的主要保护性抗原成分,同时与病毒的型特异性有关。本研究对EDSV六邻体蛋白基因进行了扩增,并进行了克隆和序列分析,为进一步分析EDSV六邻体蛋白的基因结构、功能及EDSV基因工程疫苗的研究奠定了良好的基础。

1 材料与方法

1.1 质粒与菌株

JM 109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。

1.2 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;HindIII, Xho I, BamH I, DNA/HindIII+ EcoR I Marker等购自华美生物工程公司;其他试剂均为分析纯。

1.3 EDSV 毒株

EDSV毒株为河南科技大学禽病研究室分离保存的地方野毒株,HA效价为16 log₂。

1.4 病毒增殖

将EDSV用灭菌生理盐水按体积比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PEG₆₀₀₀ (100 mg/mL)和NaCl (2 mg/mL),振荡溶解,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至终质量浓度为1 mg/mL,加蛋白酶K至终质量浓度为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

* [收稿日期] 2004-12-14

[基金项目] 河南省自然科学基金资助项目(0214040027)

[作者简介] 李银聚(1965-),男,河南中牟人,副教授,在读博士,主要从事病毒分子生物学及动物传染病学研究。

乙醇沉淀, TE 溶液 (pH 8.0) 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 Genbank 中 EDSV 基因组核苷酸序列设计了 1 对引物。P1: 5'-CAA GCT TAT GGA ACC CCA ACG TGA ATT-3'; P2: 5'-GCT CGA GTC ATG TTG CTG CAC TAC CGG CG-3'。上下游分别含有 *Hind* III, *Xho* I 酶切位点, 由大连宝生物工程公司合成。该引物跨越包含起始密码和终止密码在内的六邻体完整结构基因, 其跨度为 2.74 kb。

1.7 目的基因的扩增

反应在 50 μ L 体系中进行, 各要素用量分别为 10 $\times$ Buffer 5 μ L, P1, P2 各 1 μ L (25 pmol/L), dNTP 2 μ L, 模板 DNA 2 μ L (阴性为正常尿囊液), ddH₂O 38.5 μ L, 加 30 μ L 石蜡油覆盖, 沸水浴 10 min 变性, 冰水浴淬火, Taq DNA 酶 0.5 μ L (5 U); 以降 PCR (TD-PCR) 进行扩增, 条件为热盖温度 105 $^{\circ}$ C, 前 5 个循环参数为: 95 $^{\circ}$ C 变性 90 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 60 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 120 s, 之后退火温度以 1 $^{\circ}$ C 梯度降落, 每个梯度循环 7 次, 共循环 33 次, 退火温度由 58 $^{\circ}$ C 降落至 54 $^{\circ}$ C, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 并观察照像。

1.8 PCR 产物的克隆

按试剂盒的要求, 将纯化后的 PCR 产物与 pMD18-T 载体连接 (16 $^{\circ}$ C, 4 h), 连接产物按常规方法转化至 JM 109 受体菌中, 转化产物接种于含有 Amp, X-gal 和 IPTG 的 LB 琼脂平板上, 37 $^{\circ}$ C 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 μ g/mL) 扩增培养。按碱裂解法^[4]提取其质粒, 筛选阳性重组质粒进行酶切鉴定和 PCR 鉴定。

1.9 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 *Hind* III+*Xho* I 双酶切鉴定, 以 λ DNA/*Hind* III+*Eco* R I Marker 作对照, 在 1% 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 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.10 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 六邻体蛋白基因的扩增

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 1% 琼脂糖凝胶电泳, 结果表明扩增出 1 条 2.74 kb 左右的目的片段, 与理论设计完全相符 (图 1)。

2.2 重组质粒的酶切鉴定和 PCR 鉴定

重组质粒以 *Hind* III+*Xho* I 双酶切后, 分别切出大小约为 2.69 kb 和 2.74 kb 2 个片段; 经 PCR 扩增后, 得到 1 条大小为 2.74 kb 的片段 (同时也有 2.69 kb 的载体反向扩增片段), 与预期结果完全一致 (图 2)。

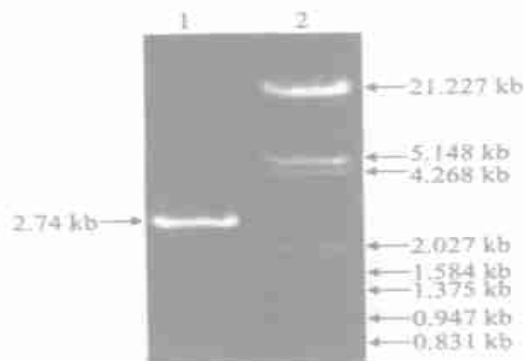


图 1 EDSV 六邻体蛋白基因 TD-PCR 扩增产物

1 Marker; 2 六邻体蛋白基因扩增产物

Fig. 1 TD-PCR products of hexon-encoding gene

1 Marker λ DNA/*Hind* III+*Eco* R I;

2 PCR products of hexon-encoding gene

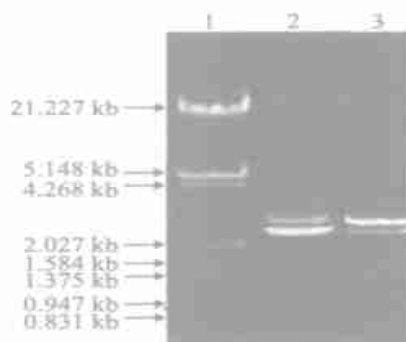


图 2 重组质粒的酶切鉴定和 PCR 鉴定

1 Marker; 2 酶切鉴定; 3 PCR 鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid

1 Marker λ DNA/*Hind* III+*Eco* R I;

2 Identified by digested *Hind* III+*Xho* I;

3 Identified by PCR

2.3 测序结果及由其推导的氨基酸序列

扩增出的 EDSV 六邻体蛋白编码基因经大连

宝生物工程公司测序, 片段大小为 2.74 kb, 共编码 910 个氨基酸 (图 3)。

```

1  caagcttt atg gaa ccc caa cgt gaa ttt ttt cac atc gct ggt aga aat gca aaa gag tat ett tca gag aat ctt gtg
   M E P Q R E F F H I A G R N A K E Y L S E N L V
25  cag ttt ata act gcc act cag aac tat ttt aat ctt ggg gac aag ttt cgt gat cca tat gtg gct cct aca aac ggt
   Q F I T A T Q N Y F N L G D K F R D P Y V A P T N G
51  gtt acc act gac cgg tca caa aaa ctt cat ctg cgc atc gtc ccg atc caa aca gaa gac aat gac agc ttt ttc aaa
   V T T D R S Q K L H L R I V P I Q T E D N D S F F K
77  gcc aga ttt acc cta aat gtg ggt gat aac agg att gtg gat atg gga agc agc tac ttc gac atc cag ggc atc ttg
   A R F T L N V G D N R I V D M G S S Y F D I Q G I L
103 gac aga gga cca tct ttc aaa cca tac cgc ggc aca gct tac aat cct ttg gcg ccc acc tct gga atg cct aac atg
   D R G P S F K P Y R G T A Y N P L A P T S G M P N M
129 gca tac acc cat tcc aat aat aca act tac ata gga cag ctg cca caa att tat tct gtc acc gat aaa ggt gtc aca
   A Y T H S N N T T Y I G Q L P Q I Y S V T D K G V T
155 gag gca aaa cag caa aat cca agc act gat cct aat cct cag gtt ggg caa agt tac ggt gct ggc ggc cct gat
   E A K Q Q Q I Q S T D P N P Q V G Q S Y G A G G P D
181 gat gtg gac acg gaa aaa agt ggc ggt aaa ggt cgg ttg gtt gta gga aca gcc gga gac agt cag gtt act ggt ttt
   D V D T E K S G G K G R L V V G T A G D S Q V T G F
207 cca gct tat gga agt tgg tct cca cct cag agt gtc acg gga gac atc aat act att ttg aat cct agc aca cgc tat
   P A Y G P S W S P P Q S V T G D I N T T L N P S T A Y
233 ctg aat aca aca acg gac act gat cgt gtt act gga ttg gtt gct ggg gat acg gta gaa tgg aat gct cct gat gct
   L N T T T D T D R V T G L V A G D T V E W N A P D A
259 cat tat gtt aat tac gtt agt gac atg cag tgc tct gct gcc ggt aat cgg cct aac tac att ggt ttt agg gat aat
   H Y V N Y V S D M Q C S A A G N R P N Y I G F R D N
285 ttt atc ggc ata atg tat tat aac tgc ggg agt aat gct gga tca ttt tcc agt caa aca cag caa ctc aac gtg gta
   F I G I M Y Y N S G S N A G S F S S Q T Q Q L N V V
311 cta gat ctt aat gac agg aat agt gag ctt agt ttc caa tat tta att gct gag ctt act gat aga tat aac aat ttt
   L D L N D R N S E L S F Q Y L I A E L T D R Y K H F
337 gct ctt tgg aat caa gct gtt gat agc tat gat aaa ttt gta cgt gtt att gag aat gat gga tat gag gaa ggg ccg
   A L W N Q A V D S Y D K F V R V I E N D G Y E E G P
363 cct tgc ctg tct ttt cct cct cat ggt ttt atg aat ttt ttt acg gct cct gac act ggg gct atg atg tgc tca
   P S L S F P P H G F M N F F T A P D T G T A M T V S
389 gac gac acg gcc act aaa aca gct aat act act gca atc ttc ggt tat ggc aat ttg cca tct atg gag att aat ctc
   D D T A T K T A N T T A I F G Y G N L P S M E I N L
415 act gca aat ttg cag cgt acg ttt ttg tgg tca aat gtt gca atg tac ctg cca gat tat ttg aaa acg act cta cct
   T A N L Q R T F L W S N V A M Y L P D Y L K T T L P
441 gga gtt act ctg cca gct aac cca aat tcc tat gct tat atg aat ggt cgg gtg ccg ctg cca aat att att gac acg
   G V T L Q P A N P N S Y A Y M N G R V P L P A N I I D T
467 tgg acc aat att ggc gct agg tgg tct ttg gat gta atg gat gaa att aat cct ttc aac cac cat aga aat ttg gga
   W T N I G A R W S L D V M D E I N P F N H H R N L G
493 ttg aag tac aga agt cag ctg ttg ggc aat ggc aga tat tgt aca ttc cat atc cca gta cca cag aaa ttc ttg gcg
   L K Y R S Q L G N G R Y C K F H I Q V P Q K F F A
519 ctt cgc aat ttg gtg ctg ctg tct ggc aca tac aat tat gag tgg tac ttt aga aaa gac cct aac atg att ttg cag
   L R N L V L L S G T Y N Y E W Y F R K D P N M I L Q
545 agt acg ctt ggc aat gac ttg aga gca gca gcc tct gta act tat act agc att ttg tat gtt gca ttt ttt
   S T L G N D L R A D G A S V T Y T S I N L Y V A F F
571 cct ctc gct tat gat act gta agc gag ctg gaa ttg atg ctg cgt aac gcg act aac gat cag aat ttt tct gat tat
   P L A Y D T V S E L E L M L R N A T N D Q N F S D Y
597 ctt ggc gct gtt aat aat ctg tat cac att cca gcc aac agt acg agc gtt gtg gtc aat gtc cct gat aga tct tgg
   L G A V N N L Y H I P A N S T S V V V N V P D R S W
623 gga gct ttt cga ggt tgg tgc ttt act aga att aaa gct aga gag acg cca gca att gga gcc aca aaa gat ccg aat
   G A F R G W S F T R I K A R E T P A I G A T K D P N
649 ttc aca tat tca gga tca att ccc ctg ttg gat ggc aca ttt tac ctt tet cat act ttt aac agg gtt tct att cag
   F T Y S G S I P L L D G T F Y L S H T F N R V S I Q
675 tgg gat tcc agt gtt ccc tgg cct gga aat gac aga ttg ctt acg cca aat tgg ttt gaa att aag cgc aat gta aac
   W D S S V P W P G N D R L L T P N W F E I K R N V N
701 gct gat cca gaa ggt tat aca ctg tca caa agt tct atc acc aag gac tgg ttt atg gtg caa atg gca gcc aat tat
   A D P E G Y T L S Q S S I T K D W F M V Q M A A N Y
727 aat caa gca tat cag ggc tat agt ttg ccg cat act aca ttc tac gat ttt ctc agc aac ttg gag ccg atg acg cgc
   N Q A Y Q G Y S L P H T K F Y D F L S N F E P M T R
753 caa att cca gat tac tca aag tat ttt gat ttg tac acc caa tac ttg gag gat cct aaa aag atg ccc att tgg aat
   Q I P D Y S K Y F D L Q Y T Y L E D P K K M P I W N
779 aac tca gcc gtg cag caa atg act aac tct cct gct ttg cga aac acg ggt cac ttg tat atg gct aac tgg cca
   N S G V Q Q M T N S P A L L E N T G H L Y M A N W P
805 tat cct ttg atc ggt acg gca gct gta gaa agt cag att aca gag agt aaa ttt ctg tgt gat aga tac atg tgg atg
   Y P L I G T A A V E S Q I T E S K F L C D R Y M W M
831 att cct ttc agc agt aac ttt ttg aac atg ggc act tta act gac tta ggt caa aat gtt ttg tat gct aac tct agc
   I P F S S N F L N M G T L T D L G Q N V L Y A N S S
857 cat tcc cta aac atg gtt ttt gat gtt gat cca atg gct gag act aca tat ctg ttg ttg ctc att ggt gta ttt gat
   L L L F G V F D H L N M V F D V D P M A E T T Y L
883 cag gtt gtt att aat caa ccg acg aga agc ggt atc agc gta gct tat ctc aga ttc cct ttt gcc gcc ggt agt gca
   Q V V I N Q P T R S G I S A V Y L R F P A F A G S A
909 gca aca tga
   A T

```

图 3 EDSV 六邻体蛋白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 hexon gene

图 3 中扩增出的 EDSV 与用 EDSV 弱毒株(AA-2)全基因组的 *Hind*III 酶切片段测序所得到的六邻体结构基因推测的氨基酸序列^[5]基本一致,但有 11 处氨基酸发生了变异,分别是第 115 位(A → G)、第 213 位(S → C)、第 227 位(N → I)、第 408 位(P → N)、第 424 位(W → G)、第 439 位(L → P)、第 503 位(G → F)、第 605 位(H → Q)、第 696 位(K → N)、第 762 位(D → G)和第 901 位(F → L)。发生变异的原因是六邻体蛋白基因本身存在明显的多态性,还是扩增过程中所造成的碱基错配,尚待进一步研究。

3 讨 论

一般来说,对 DNA 病毒基因组主要用限制性内切酶水解片段构建基因文库^[6]的方法对其结构特点进行研究。胡敬东等^[7]采用该法构建了 EDSV 限制性内切酶 *Hind*III 水解片段文库,并应用 *Exo*III 核酸外切酶降解法制备每个克隆的嵌套缺失模板,经荧光标记后用末端终止法测定 DNA 序列^[8]。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方便、可行。

六邻体蛋白是腺病毒的主要结构蛋白,它与五邻体蛋白和纤维蛋白一起构成核衣壳,决定着病毒粒子的大小,且带有主要的属特异性抗原决定簇和次要的种特异性抗原决定簇,同时也是 EDSV 的主要保护性抗原成分^[9]。因此,对减蛋综合症病毒的六邻体蛋白基因进行扩增、克隆与测序,不仅为进一步阐明 EDSV 六邻体蛋白基因结构与功能的关系打下了基础,而且为六邻体蛋白基因的表达及减蛋综合症基因工程疫苗的研究奠定了良好的基础。

本研究设计的引物,位于六邻体蛋白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,设计了多循环反应的程序,以使循环的退火温度越来越低,并使用热启动技术,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,能较常规 PCR 得到更多的特异性扩增产物,减少非特异性产物的产生,对于大片段的基因扩增更为合适。

[参考文献]

- [1] 卡尔尼克 B W. 禽病学[M]. 第 9 版. 北京: 中国农业出版社, 1999. 490- 492
- [2] 汪明磊. 减蛋综合症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
- [3] 段玉友, 崔治中, 葛天同, 等. 产蛋下降综合症 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
- [4] 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, 译. 北京: 科学出版社, 1998. 19- 22
- [5] 曾力宇, 金 奇, 章金刚, 等. 鸡减蛋综合症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
- [6] 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
- [7] 胡敬东, 章金刚, 李红卫, 等. 减蛋综合症病毒基因组 *Hind*III 酶切片段的克隆及酶谱分析[J]. 中国兽医学报, 1998, 18(1): 7- 10
- [8] Henikoff S. Unidirectional digestion with exonuclease III in DNA sequence analysis[J]. Methods Enzymol, 1987, 155: 156- 164
- [9] 杨永华. 鸡减蛋综合症病毒的分子生物学研究概况[J]. 中国兽医科技, 2002, 32(5): 18- 20

Cloning and sequence analysis of hexon-encoding gene of egg drop syndrome virus

LI Y in-ju^{1,2}, WU Ting-cai¹, CHENG Xiang-chao¹, WU Zhi-ming³, ZHANG Chun-jie¹

(1 College of Animal Sci-Tech, Henan University of Sci-Tech, Luoyang, Henan 471003, China; 2 College of Veterinary Medicine, Nanjing Agriculture University, Nanjing, Jiangsu 210095, China; 3 Henan Veterinary Prevention and Control Station, Zhengzhou, Henan 450002, China)

Abstract: Hexon-encoding 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 digested restriction endonuclease and PCR. The sequence analysis showed that the nucleotide sequence of hexon protein gene was 2 74 kb and encoding a protein of 910 amino acids, 11 amino acids were different from the hexon protein sequenced from the *Hind*III-D fragment of egg drop syndrome virus AA-2 strain.

Key words: EDSV; hexon gene; cloning; sequence analysis