

网络出版时间:2013-08-26 17:51

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20130826.1751.013.html>

鸡传染性法氏囊病病毒 BJ-10 株 VP2 基因的 克隆及原核表达

王俊全¹, 王韦华¹, 刘桂梅²

(1 渭南职业技术学院, 陕西 渭南 714000; 2 渭南市动物疫病预防控制中心, 陕西 渭南 714000)

【摘要】 **【目的】**克隆鸡传染性法氏囊病病毒(IBDV) BJ-10 株 VP2 基因, 构建其原核表达载体, 并在大肠埃希菌中进行高效表达。**【方法】**根据 IBDV VP2 基因序列设计 1 对特异性引物, 应用 RT-PCR 技术克隆 IBDV BJ-10 株 VP2 基因; 将目的基因插入 pMD18-T 连接载体, 筛选出阳性重组质粒; 将该质粒克隆至原核表达载体 pET-32 α 中, 转化入 JM109, 经 IPTG 诱导表达, 对产物进行 SDS-PAGE 电泳分析, 确定 IPTG 的最佳诱导表达时间和浓度。**【结果】**克隆到了全长 1 356 bp 的 IBDV BJ-10 株 VP2 基因; PCR、酶切鉴定分析表明, 成功构建了重组质粒 pET-32 α -VP2; SDS-PAGE 电泳分析表明, 在宿主菌 JM109 中成功表达了约为 60 ku 的 VP2 蛋白; IPTG 诱导表达时间以 4.5 h 为宜, 诱导最佳浓度为 0.8 mmol/L。**【结论】**成功克隆了 IBDV BJ-10 株 VP2 基因, 并在大肠埃希菌中表达了 VP2 蛋白。

【关键词】 鸡传染性法氏囊病病毒; VP2 基因; 基因克隆; 原核表达载体

【中图分类号】 S852.65⁺9.4

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2013)09-0038-05

Clone and expression of VP2 gene of infectious bursal disease virus BJ-10 isolate in *Escherichia coli*

WANG Jun-quan¹, WANG Wei-hua¹, LIU Gui-mei²

(1 Weinan Vocational and Technical College, Weinan, Shaanxi 714000, China;

2 Animal Diseases Control & Prevention Centre of Weinan City, Weinan, Shaanxi 714000, China)

Abstract: **【Objective】** This study aimed to clone the VP2 gene of infectious bursal disease virus (IBDV) BJ-10 isolate, construct the prokaryotic expression vectors, and express them in *Escherichia coli*. **【Method】** A pair of specific primers were designed according to the sequences of IBDV BJ-10 strain, and the VP2 gene was cloned by RT-PCR. The IBDV VP2 gene was inserted into ligation vector pMD18-T and the recombinant plasmid was selected. The recombinant plasmid was cloned into the prokaryotic expression vector pET32 α and transformed into *E. coli* JM109. Then it was highly expressed by inducing with IPTG and proved by SDS-PAGE electrophoretic analysis, to designate the best inducement time and concentration. **【Result】** The IBDV BJ-10 VP2 gene with 1 356 bp was cloned. From the PCR and identification by enzyme digestion analysis, the recombinant plasmid pET-32 α -VP2 was constructed. SDS-PAGE analysis indicated that the VP2 protein 60 ku in size was expressed properly from *E. coli* JM109. The best IPTG inducement time was 4.5 h, and the best concentration was 0.8 mmol/L. **【Conclusion】** The IBDV BJ-10 isolate VP2 gene was successfully cloned, and the VP2 protein was expressed in *E. coli*.

【收稿日期】 2013-04-19

【基金项目】 渭南市基础 Research 计划项目(2011JH-6)

【作者简介】 王俊全(1963—), 男, 陕西白水人, 副教授, 主要从事畜牧兽医研究。E-mail: ldweiang@126.com

Key words: infectious bursal disease virus (IBDV); VP2 gene; gene cloning; prokaryotic expression vector

鸡传染性法氏囊病(Infectious bursal disease, IBD)是鸡的一种急性、高度接触性病毒传染病,其病原为传染性法氏囊病病毒(Infectious bursal disease virus,IBDV)^[1-2]。IBDV 主要侵害雏鸡和青年鸡的法氏囊,发病率和病死率较高,最重要的是还可引起免疫抑制,从而造成感染鸡群对鸡新城疫、大肠埃希菌病、沙门氏菌病、马立克病、传染性支气管炎等多种危害较大的传染病免疫失败,给世界养禽业造成严重的经济损失^[3-5]。IBDV 为双链 RNA 病毒,基因组中的 VP2 基因是病毒的主要宿主保护性抗原,与病毒的抗原变异和毒力相关^[6]。VP2 区域氨基酸片段的 206 至 305 位,是 IBDV 抗原性的主要部位,也是 IBDV 不同毒株氨基酸存在差异的主要区域,往往被称为 VP2 高变区^[7-9]。VP2 基因高变区结构包括 2 个亲水区 and 1 个 7 肽区,其中亲水区是病毒变异的主要部位,对发生变异的超强 IBDV 毒株(vvIBDV)的抗原性研究极为重要^[10-11]。

笔者从陕西宝鸡地区采集的病料样品中分离鉴定出 IBDV BJ-10 株,并证实了其为一超强毒株。为进一步了解该分离株的抗原性,本试验对 IBDV BJ-10 株的 VP2 基因进行了克隆,并构建其重组表达载体,转化 DH5 α 大肠埃希菌,进行诱导表达,旨在为 IBDV ELISA 检测中标准抗原的确定及 IBD 的防治提供有力的工具。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒、细菌和载体 IBDV BJ-10 分离株由渭南职业技术学院农学院微生物实验室分离鉴定并保存;大肠埃希菌 DH5 α 和 JM109 由渭南职业技术学院农学院微生物实验室保存;pMD18-T、pET-32 α 载体购自 Promega 公司。

1.1.2 主要工具酶与试剂 TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0、限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Xho* I、T4 DNA 连接酶,均购自大连宝生物工程有 限公司。质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒,均购自 AXYGEn 爱思进生物技术(杭州)有限公司;DNA 回收纯化试剂盒为 Bioteke 公司产品;IPTG 为 Sigma 公司产品。Trizol[®] LS Reagent 试剂盒为 Invitrogen 公司产品;PCR 试剂、RNA 酶抑制剂、PCR 试剂盒等,购自 Sigma 公司。其他化学试剂均

为分析纯级试剂。

1.2 方法

1.2.1 引物的设计与合成 根据 GenBank 数据库发表的 IBDV 的基因组序列,利用 Primer Primers5.0 软件设计 1 对特异性引物 P1、P2,并交由南京金斯特生物技术有限公司合成。上游引物 P1:5'-GCT CTCGAGATGACAAACCTGCAAGATC-3',下游引物 P2:5'-GGGGAATTCCCTTAGGGC-CCGATTATG-3'。为方便目的基因的克隆及表达,在上、下游引物 5'端分别引入 *Xho* I 和 *EcoR* I 酶切位点(以下划线指示),预计 VP2 基因序列的扩增片段长约 1 356 bp。

1.2.2 IBDV 总 RNA 的提取 吸取 200 μ L 纯化的 BJ-10 分离株病毒,按照 Trizol[®] LS Reagent 试剂盒说明书提取病毒总 RNA。

1.2.3 IBDV VP2 基因的 PCR 扩增 按照反转录试剂盒说明书的操作步骤,进行目的片段第 1 链 cDNA 的合成。以 cDNA 第 1 链为模板,设计好的 P1、P2 为 VP2 基因引物,进行 PCR 扩增。25 μ L PCR 反应体系为:10 $\times$ PCR buffer 2.5 μ L,10 mmol/L dNTP Mix 0.5 μ L,P1、P2 各 1.0 μ L,cDNA 模板 4.0 μ L,*Taq* 聚合酶 0.5 μ L,双蒸水 15.5 μ L。PCR 反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 50 s,50 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 1.5 min,循环 35 次;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,于 4 $^{\circ}$ C 保存。将 PCR 产物用 8 g/L 琼脂糖凝胶进行电泳鉴定,用溴化乙锭染色,凝胶成像系统观察电泳结果。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后,用 DNA 回收纯化试剂盒回收 PCR 的预期目的基因片段。

1.2.4 IBDV VP2 基因的克隆与鉴定 将回收的 PCR 产物与 pMD18-T 载体于 16 $^{\circ}$ C 连接 12 h,构建重组质粒 pT-VP2,连接产物转化大肠埃希菌 DH5 α 感受态细胞,蓝白斑筛选阳性克隆,LB 液体培养基摇床培养 12~15 h,提取质粒,进行 PCR 鉴定,试验同时设阴性(以空 pMD18-T 载体菌液为模板)和阳性(以菌液阳性重组质粒为模板)对照。提取经 PCR 鉴定呈阳性的克隆质粒,用 *EcoR* I 和 *Xho* I 进行双酶切鉴定,将酶切鉴定正确的质粒送上海生物工程公司测序。

1.2.5 原核重组表达载体的构建与鉴定 纯化回收质粒 pT-VP2 酶切的目的片段与原核表达载体

pET-32 α 经 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切的目的片段,用 T4 DNA 连接酶连接,连接产物转化大肠埃希菌 JM109 感受态细胞,涂布于含 100 μ g/mL 氨苄西林钠的 LB 琼脂平板培养,12~24 h 后用碱裂解法小量提取质粒,利用 PCR、限制性内切酶酶切鉴定阳性质粒。将阳性质粒送上海生工生物工程公司测序,以确定 VP2 基因插入的位置、长度和读码框是否正确,将正确插入目的基因的原核表达质粒命名为 pET-32 α -VP2。

1.2.6 pET-32 α -VP2 的诱导表达 分别挑取单个的含 pET-32 α 和重组质粒 pET-32 α -VP2 的菌落,接种于 4 mL 含 100 μ g/mL 氨苄西林钠的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 条件下静置过夜。将菌液按体积比 1%的比例接种于另一 4 mL 含 100 μ g/mL 氨苄西林钠的 LB 液体培养基中,230 r/min、37 $^{\circ}$ C 振荡培养约 2.5 h 至 OD₆₀₀达到 0.6~1.0,取 1.5 mL 培养物于微量离心管中。

在剩余培养物中加入诱导剂 IPTG 至其终浓度为 1 mmol/L,230 r/min、37 $^{\circ}$ C 下继续振荡培养,分别在培养 1.5,3,4.5 h 时各取 1 mL 培养物于微量离心管中,试验同时设对照组(不添加 IPTG)。所有样品以 10 000 r/min 离心 3 min,弃去上清,沉淀重悬于 30 μ L 1 $\times$ SDS 加样缓冲液中,100 $^{\circ}$ C 下静置 5 min,再 12 000 r/min 离心 5 min。SDS-PAGE 电

泳以确定 IPTG 的最佳诱导时间。

分别取 1 mL 培养物 5 份放入微量离心管中,各管分别加入 1 mmol/L IPTG 诱导剂 0,250,667,1 500,4 000 μ L,至其终浓度分别为 0,0.2,0.4,0.6,0.8 mmol/L,培养 4 h。将样品以 10 000 r/min 离心 3 min,弃去上清,沉淀重悬于 30 μ L 1 $\times$ SDS 加样缓冲液中,100 $^{\circ}$ C 下静置 5 min,再 12 000 r/min 离心 5 min。SDS-PAGE 电泳以确定 IPTG 的最佳诱导浓度。

2 结果与分析

2.1 VP2 基因的扩增

应用所设计的特异性引物对 IBDV BJ-10 株的反转录产物进行 PCR 扩增,得到 1 条长度约为 1 356 bp 的目的条带(图 1),与预期扩增的基因片段大小相符。

2.2 VP2 基因的克隆与鉴定

2.2.1 阳性克隆的 PCR 鉴定 对以阳性重组质粒菌液为模板扩增的 PCR 产物进行电泳时,得到长度约为 1 356 bp 的特异性 DNA 条带,重组质粒菌液的 PCR 产物电泳也得到了特异性目的条带,而阴性对照 PCR 产物未见特异性目的条带(图 2)。这表明目的基因已成功插入到 pMD18-T 载体中,初步证明重组质粒 pT-VP2 构建成功。

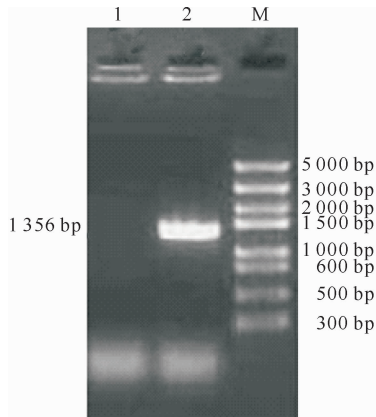


图 1 IBDV BJ-10 毒株 VP2 基因的 RT-PCR 扩增
M. DL5000 Marker;1. 阴性对照;
2. VP2 基因 RT-PCR 扩增产物
Fig. 1 RT-PCR amplification of VP2 gene of IBDV BJ-10 strain
M. DL5000 Marker;1. Negative control;
2. RT-PCR products of VP2 gene

2.2.2 重组质粒的酶切鉴定 从菌液 PCR 初步鉴定的阳性克隆中提取质粒后,再以 *EcoR* I 和 *Xho* I

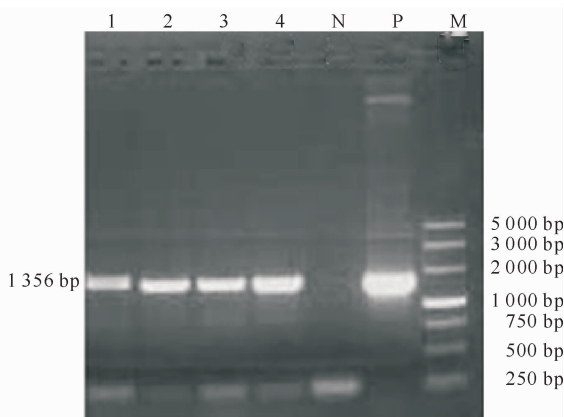


图 2 重组质粒 pT-VP2 菌液的 PCR 鉴定
M. Trans 2K Marker;1~4. 重组质粒菌液 PCR 结果;
N. 阴性对照;P. 阳性对照
Fig. 2 Identification of recombinant plasmid pT-VP2 by bacteria PCR
M. Trans 2K Marker;1~4. Bacteria PCR results of recombinant plasmid;N. Negative control;P. Positive control

进行双酶切,电泳后可见到 1 条约为 2 692 bp 和 1 条约为 1 356 bp 大小的片段(图 3),进一步表明重

组质粒 pT-VP2 构建成功。

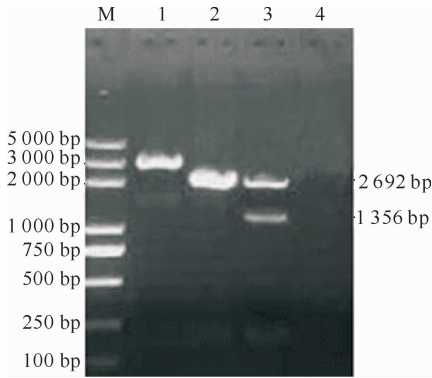


图 3 重组质粒 pT-VP2 的酶切鉴定

M. Trans 2K Marker;1. 重组质粒 pT-VP2;
2. pMD18-T 空载体;3. pT-VP2 质粒 *EcoR* I 和 *Xho* I
双酶切产物;4. 阴性对照

Fig. 3 Identification of recombinant pT-VP2
by enzyme digestion

M. Trans 2K Marker;1. Recombinant pT-VP2;2. pMD18-T
vector;3. Recombinant pT-VP2 digested by *EcoR* I + *Xho* I ;
4. Negative control

2.3 VP2 基因原核重组表达载体的鉴定与诱导
表达

2.3.1 重组质粒的酶切鉴定 将经菌液 PCR 初步鉴定的重组表达阳性菌落提取质粒后,再以 *EcoR* I 和 *Xho* I 对其进行双酶切鉴定。电泳结果显示,出现 1 条约 5 900 bp 和 1 条与目的基因长度(1 356 bp)完全相符的片段(图 4),表明重组表达质粒构建成功。

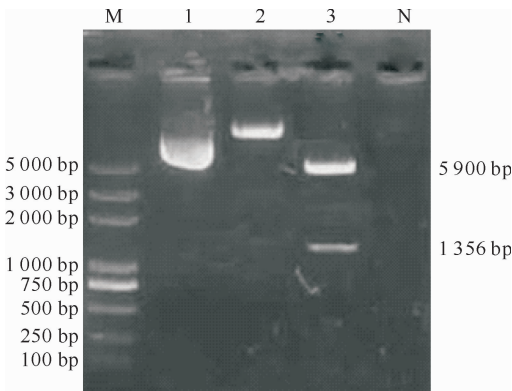


图 4 重组质粒 pET-32α-VP2 的酶切鉴定

M. Trans 2K Marker;1. pET-32α 空载体;
2. 重组质粒 pET-32α-VP2;3. pET-32α-VP2 的
EcoR I 和 *Xho* I 双酶切产物;N. 阴性对照

Fig. 4 Identification of recombinant pET-32α-VP2
by enzyme digestion

M. Trans 2K Marker;1. pET-32α vector;2. Recombinant
pET-32α-VP2;3. Recombinant pET-32α-VP2
digested by *EcoR* I + *Xho* I ;N. Negative control

2.3.2 最佳诱导时间的确定 图 5 表明,VP2 基因在大肠埃希菌 JM109 中融合表达时,当以 IPTG 诱导培养后,随着时间递增,在 4.5 h 重组融合蛋白就有较高的表达,故将 IPTG 的最佳诱导时间确定为 4.5 h。

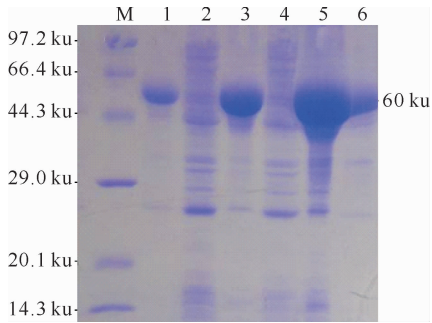


图 5 pET-32α-VP2 IPTG 最佳诱导表达时间的确定

M. 蛋白 Marker;1,3,5. 分别为 IPTG 诱导 1.5,3,4.5 h 的
pET-32α-VP2;2,4,6. 未经 IPTG 诱导的分别于
1.5,3,4.5 h 取样的 pET-32α-VP2 重组质粒

Fig. 5 Determination of the best inducement time of IPTG
by pET-32α-VP2

M. Protein Marker;1,3,5. pET-32α-VP2
after induced with IPTG for 1.5,3,4.5 h;2,4,6. pET-32α-VP2
uninduced with IPTG,take sample at 1.5,3,4.5 h

2.3.3 IPTG 诱导浓度的确定 由图 6 可知,随着 IPTG 浓度的增大,重组表达质粒 pET-32α-VP2 的表达量逐渐提高,在 IPTG 浓度为 0.8 mmol/L 时表达量最高,故确定该浓度为最佳诱导浓度。

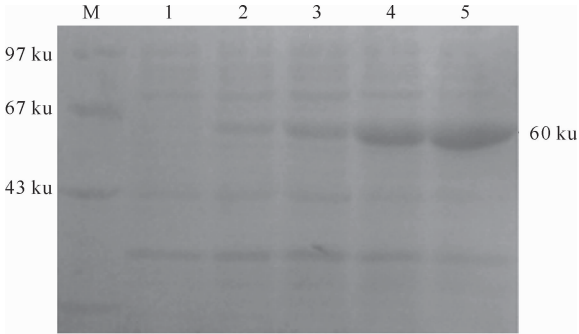


图 6 pET-32α-VP2 IPTG 最佳诱导浓度的确定

M. 蛋白 Marker;1~5. 分别为经 0,0.2,0.4,0.6,0.8 mmol/L
IPTG 诱导的 pET-32α-VP2 重组质粒

Fig. 6 Designation of the best concentration of IPTG
by pET-32α-VP2

M. Protein Marker;1~5. pET-32α-VP2
non-induced with 0,0.2,0.4,0.6,0.8 mmol/L IPTG

3 讨 论

由于 IBDV 基因组具有十分稳定的二级结构,

而且 dsRNA 的非编码区 GC 含量较高,需要更多的能量才能被解链,因此通常认为其难以变性^[11]。本研究采用 TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0 进行 PCR 扩增过程中的解链,基本可以解决这个问题。

本研究选择原核细胞表达系统表达目的蛋白,其关键问题是选择合适的载体,才能使目的基因得以表达。原核表达载体一般要求有一个强的启动子及其两侧的 SD 调控序列,而且 SD 序列与起始密码子之间要有合适的距离,在启动子与克隆基因之间要有正确的开放性阅读框架^[12]。pMD18-T 载体是一种高效克隆 PCR 产物的专用连接载体,具有较高的拷贝数,还具有 1 个以上的遗传标志和多个限制酶的单一酶切位点,能在宿主细胞中进行自我复制,可携带外源 DNA 片段进入宿主细胞内进行扩增^[13]。本研究将大肠埃希菌作为宿主细胞,使用 pMD18-T 载体将外源 DNA 导入后,可以明显区分未导入的细胞,能准确地克隆出 DNA 目的片段。

本研究将 IBDV BJ-10 株的 VP2 基因插入到原核表达载体 pET-32 α 中,成功构建了重组表达载体。用 IBDV VP2 蛋白重组表达载体转化大肠埃希菌,成功表达了 VP2 蛋白。对表达蛋白的鉴定结果证明,所表达的蛋白分子质量约为 60 ku,与预期结果一致,也与黄春旭等^[14]、高玉龙等^[15]原核表达的 VP2 蛋白大小一致。因此重组 VP2 基因主要抗原区蛋白可作为 ELISA 检测标准抗原,用来检测 IBDV 疫苗免疫抗体的效价,可为防制 IBD 提供有力的工具。

[参考文献]

- [1] Saif Y M. Diseases of poultry [M]. 12th ed. Oxford, UK: Wiley-Blackwell Publishing, 2008.
- [2] Lukert P D, Saif Y M. Infectious bursal disease [M]// Calnek B W, Barnes H J, Beard C W, et al. Diseases of poultry, 10th ed. Ames, USA: Iowa State University Press, IA, 1997: 721-738.
- [3] Muller H, Islam M R, Raue R. Research on infectious bursal disease: The past, the present and the future [J]. Vet Microbiol, 2003, 97(1/2): 153-165.
- [4] Wang Z C, Wang Y S, Tang Y D, et al. Development of the detection system for infectious bursal disease virus [J]. Chin J Vet Sci, 2008, 28(9): 1015-1019.
- [5] Kabell S, Handberg K J, Li Y, et al. Detection of vvIBDV in vaccinated SPF chickens [J]. Acta Vet Scand, 2005, 46(4): 219-227.
- [6] 万 勇, 谢金文, 余为一. 传染性法氏囊病毒 VP2 蛋白的分子生物学研究进展 [J]. 现代生物医学进展, 2006, 6(2): 77-80.
- Wan Y, Xie J W, Yu W Y. Research progress on molecular bio-

- logical characters of VP2 of infectious bursal disease virus [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2006, 6(2): 77-80. (in Chinese)
- [7] Brown M D, Green P, Skinner M A. Vp2 sequences 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(Pt3): 675-680.
- [8] Butter C, Sturman T D M, Baaten B J G, et al. Protection from infectious bursal disease virus (IBDV) induced immunosuppression by immunization with a FowlPox recombinant containing IBDV-VP2 [J]. Avian Pathology, 2003, 32(6): 597-604.
- [9] 祁小乐, 王笑梅, 高玉龙, 等. 鸡传染性法氏囊病毒 VP2 蛋白研究进展 [J]. 中国预防兽医学报, 2008, 30(8): 656-660.
- Qi X L, Wang X M, Gao Y L, et al. Progress in research about VP2 protein of infectious bursal disease virus [J]. Chin J Pre Vet Med, 2008, 30(8): 656-660. (in Chinese)
- [10] Boot H J, ter Huurne A A, Hoekman A J W, et al. Rescue of very virulent and Mosaic infectious bursal disease virus from cloned cDNA: VP2 is not the sole determinant of the very virulent phenotype [J]. J Virol, 2000, 74(15): 6701-6711.
- [11] 王永山, 周宗安, 高 键, 等. 应用 RT/PCR-SSCP 法分析传染性法氏囊病毒的变异性 [J]. 中国兽医学报, 2001, 21(4): 321-323.
- Wang Y S, Zhou Z A, Gao J, et al. Variation analysis of infectious bursal disease virus isolates by RT/PCR-SSCP [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2001, 21(4): 321-323. (in Chinese)
- [12] Studier F W, Rosenberg A H, Dunn J J, et al. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes [J]. Methods in Enzymol, 1990, 185(8): 60-89.
- [13] 宋幸辉, 王 睿, 王选年, 等. 传染性法氏囊病毒 VP2 蛋白抗原表位多肽 P22 的免疫原性及生物学功能鉴定 [J]. 畜牧兽医学报, 2011, 42(5): 692-697.
- Song X H, Wang R, Wang X N, et al. Preparation and identification of the epitope peptide P22 from VP2 of infectious bursal disease virus [J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2011, 42(5): 692-697. (in Chinese)
- [14] 黄春旭, 许信刚, 童德文, 等. 传染性法氏囊病毒 YL 株 VP2 基因的克隆、序列分析及原核表达 [J]. 西北农业学报, 2010, 19(4): 37-41.
- Huang C X, Xu X G, Tong D W, et al. Cloning, sequencing and prokaryotic expression of VP2 gene of infectious bursal disease virus YL strain [J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2010, 19(4): 37-41. (in Chinese)
- [15] 高玉龙, 高宏雷, 邓小芸, 等. 鸡传染性法氏囊病毒 VP2 基因的原核表达与抗原性分析 [J]. 中国生物制品学杂志, 2006, 19(2): 143-145.
- Gao Y L, Gao H L, Deng X Y, et al. Prokaryotic expression of VP2 gene of infectious bursal disease virus and antigenicity of expressed product [J]. Chinese Journal of Biologicals, 2006, 19(2): 143-145. (in Chinese)