

EDSV HN03 株纤维蛋白基因的克隆与序列分析

陈红英^{1,2},李新生¹,崔保安^{1,2},夏平安¹,张红英¹,廖仲磊¹,邵攀峰^{1,2}

(1 河南农业大学 牧医工程学院,河南 郑州 450002;2 河南省动物性食品安全重点实验室,河南 郑州 450002)

[摘要] **【目的】**研究减蛋综合征病毒(EDSV)河南 HN03 株纤维蛋白基因全序列,为进一步分析 EDSV 纤维蛋白基因的结构、功能以及 EDSV 基因工程疫苗的研究奠定基础。**【方法】**根据 GenBank 中收录的 EDSV 纤维蛋白基因序列(Z86065),设计并合成了 1 对引物,PCR 扩增 EDSV 河南 HN03 株纤维蛋白基因。将扩增产物克隆入 pTG19-T 载体并测序。**【结果】**测序结果表明,HN03 株纤维蛋白基因为 1 935 bp,包含一个完整的开放阅读框,编码 644 个氨基酸,推导的氨基酸序列有 5 个潜在的 N-糖基化位点,有 5 个与二硫键形成有关的半胱氨酸。序列分析表明,EDSV HN03 株与 EDSV 国际标准株 AV-127 纤维蛋白基因核苷酸同源性为 99.3%,氨基酸同源性为 99.2%;与鹌鹑腺病毒 QU 株纤维蛋白基因核苷酸同源性为 98.9%,氨基酸同源性为 98.4%。**【结论】**腺病毒纤维蛋白基因相当保守。

[关键词] 减蛋综合征病毒;纤维蛋白基因;基因克隆;序列分析

[中图分类号] S851.31 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9387(2008)09-0001-04

Cloning and sequence analysis of *fiber* gene of the egg drop syndrome virus

CHEN Hong-ying^{1,2}, LI Xin-sheng¹, CUI Bao-an^{1,2},
XIA Ping-an¹, ZHANG Hong-ying¹, LIAO Zhong-lei¹, SHAO Pan-feng^{1,2}

(1 College of Animal Husbandry and Veterinary, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002, China;

2 Animal Food Safety Key Laboratory, Henan Province, Zhengzhou, Henan 450002, China)

Abstract:**【Objective】**The research is to study the full length nucleic acid sequence of *fiber* gene of Henan HN03 isolate of egg drop syndrome virus (EDSV).**【Method】**One pair of primers was designed and synthesized according to the *fiber* gene nucleic acid sequence (Z86065) of (EDSV) retrieved from the Gen-Bank. *Fiber* gene of Henan HN03 isolate of EDSV was amplified by PCR, then was cloned into pTG19-T Easy vector and sequenced.**【Result】**The result indicated that the full length sequence of *fiber* gene consisted of 1 935 bp, which included one open-reading frame, encoding 644 amino acid residues. There were five potential N-glycosylation sites and five cysteines in the deduced amino acid sequence. The sequence analysis showed that the identity was 99.3% at nucleotide level between HN03 isolate and EDSV AV-127 strain, and 98.9% at nucleotide level between HN03 isolate and quail adenovirus QU strain.**【Conclusion】**It showed fiber gene for adenovirus was highly conserved.

Key words: egg drop syndrome virus; *fiber* gene; cloning; sequence analysis

* [收稿日期] 2007-09-30
[基金项目] 国家“十一五”科技支撑计划专项(2006BAD06A08)
[作者简介] 陈红英(1965—),女,四川仁寿人,副研究员,博士,主要从事分子免疫学和分子病毒学研究。
E-mail: chhy927@163.com
[通讯作者] 崔保安(1948—),男,河南荥阳人,教授,博士生导师,主要从事分子病原学及分子免疫学研究。
E-mail: baoancui@henau.edu.cn

减蛋综合征病毒(Egg drop syndrome virus, EDSV)是禽腺病毒属(Aviadenovirus)的成员,其基因组结构独特,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构建、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^[1-3]。EDSV 是禽Ⅲ群腺病毒中的惟一成员,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 首次报道鸡减蛋综合征之后,该病现已成为世界范围内引起鸡产蛋量下降的主要疾病^[4]。EDSV 具有独特的抗原性和生物学特性^[5-6],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,可能更适合于构建禽病的基因疫苗载体^[7-8],因此倍受各国学者的重视。但目前对 EDSV 基因组结构的了解还比较有限,因此严重阻碍了其作为疫苗载体在免疫学等方面的研究进展。

纤维蛋白(fiber)是腺病毒编码的一个涉及病毒组装、病毒与受体结合以及病毒免疫原性的多功能蛋白,但目前尚未见对腺病毒株间 fiber 基因进行比较分析的报道。为此,本研究对 EDSV 河南 HN03 株 fiber 基因进行了扩增、克隆和序列分析,以期为进一步分析 EDSV fiber 基因的结构、功能以及 EDSV 基因工程疫苗的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 毒种、菌种和质粒 EDSV 河南 HN03 株和大肠杆菌(*Escherichia coli*)JM109,均由河南省动物性食品安全重点实验室保存。pTG19-T 载体购自捷瑞生物工程有限公司。

1.1.2 非免疫鸭胚 9~11 日龄非免疫鸭胚由中国牧业股份有限公司郑州生药厂提供。

1.1.3 试剂 Ex Taq DNA 聚合酶,DL2000 DNA Marker, X-gal (5-溴-4-氯-3-吡啶-β-D 半乳糖苷)和 IPTG(异丙基-β-D-硫代半乳糖),限制性内切酶 *EcoR* I、*Bam* H I 等,均购自宝生物工程(大连)有限公司;DNA 凝胶回收试剂盒,购自捷瑞生物工程有限公司;质粒快速提取试剂盒,购自北京博大泰克生物基因技术有限公司。

1.2 引物的设计与合成

参照国外发表的鸡减蛋综合征病毒 fiber 基因序列(Z86065),利用引物设计软件 Primer Premier 5.0 设计 1 对引物,预期扩增片段长度为 1 935 bp。

引物本身不形成发夹结构,两条引物间不形成二聚体。

上游引物 P1:5'-TGT GCG AAC AGA TGA AGC GAC T-3';

下游引物 P2:5'-TCC GAC TCA CTG TGC TCC AAC ATA-3'。

引物由上海生物工程公司合成。

1.3 EDSV HN03 株的增殖及其核酸的提取

将 EDSV HN03 株种毒用灭菌生理盐水按体积比 1:100 稀释,经尿囊腔接种于 10 日龄非免疫鸭胚(0.1 mL/枚,100 EID),37 °C 继续孵化,每天照蛋 2 次,弃去 24 h 内死亡胚,收集 24~96 h 死亡胚和 96 h 后活胚的尿囊液,测其 HA 效价。尿囊液反复冻融 3 次,4 °C、7 000 r/min 离心 30 min。吸取上清液,按文献[9]介绍的方法提取 DNA,-20 °C 保存备用。

1.4 EDSV HN03 株 fiber 基因的扩增

取 1.3 中提取的 DNA 6 μL,加入 10×Ex Taq 反应缓冲液 5 μL,10 mmol/L dNTP 混合物 1 μL,上游引物 P1 (50 μmol/L)1 μL,下游引物 P2 (50 μmol/L)1 μL,灭菌双蒸水 35.5 μL,混匀,加入 Ex Taq DNA 聚合酶(5 U/μL)0.5 μL 进行 PCR 反应。PCR 反应程序为:94 °C 预变性 5 min;94 °C 50 s,55 °C 1 min,72 °C 2 min,共循环 32 次;72 °C 延伸 10 min。取 5 μL PCR 产物,用 10 g/L 琼脂糖凝胶(含 0.5 μg/mL EB)进行电泳检测。

1.5 EDSV HN03 株 fiber 基因的克隆与鉴定

回收 1.4 中的 PCR 产物,与 pTG19-T 载体连接,构建重组质粒,命名为 pTG19-fiber,并按常规方法^[10]转化 *E. coli* JM109 感受态细胞,涂抹在含有 X-gal(40 μg/mL)、IPTG(40 μg/mL)和氨苄青霉素(Amp,50 μg/mL)的 LB 琼脂平板上,37 °C 培养 12~16 h。挑取白斑菌落接种于含有 Amp(50 μg/mL)的 LB 肉汤培养基,37 °C 振荡培养 12~16 h。用质粒快速提取试剂盒提取重组质粒,对重组质粒进行 PCR 鉴定和 *EcoR* I、*Bam* H I 酶切鉴定。

挑选 2 个酶切和 PCR 鉴定均为阳性的重组菌进行序列测定。测序反应由上海生物工程公司在 ABI-PRISM 377DNA Sequencer 上完成。

1.6 EDSV HN03 株 fiber 基因的序列分析

采用 DNASTar 软件,对 EDSV HN03 株 fiber 基因与 GenBank 中读取的腺病毒 fiber 基因进行序列分析。

2 结果与分析

2.1 EDSV HN03 株 fiber 基因的 PCR 扩增

利用合成的特异性引物对 EDSV HN03 株病毒 DNA 进行 PCR 扩增,电泳结果(图 1)显示,出现了 1 条约 1.9 kb 的特异片段,与预期扩增片段长度一致。

2.2 重组质粒的酶切鉴定和 PCR 鉴定

由图 2 可知,重组质粒 pTG19-fiber 经 *Bam*H I 酶切(*fiber* 基因序列中在 283 bp 处有 *Bam*H I 位点)可切出 3 条带:一条约 2 880 bp 的带,一条约 1 652 bp 的带,一条约 283 bp 的带;经 *Eco*R I 酶切,在 4 815 bp 左右出现 1 条特异性条带,均与预期结果相一致。初步证明重组质粒 pTG19-fiber 构建成功。以提取的重组质粒 pTG19-fiber 为模板进行 PCR 扩增、电泳,结果扩增出 1 条约 1.9 kb 的片段,与连接前的 PCR 产物大

小一致,进一步说明重组质粒 pTG19-fiber 构建成功。

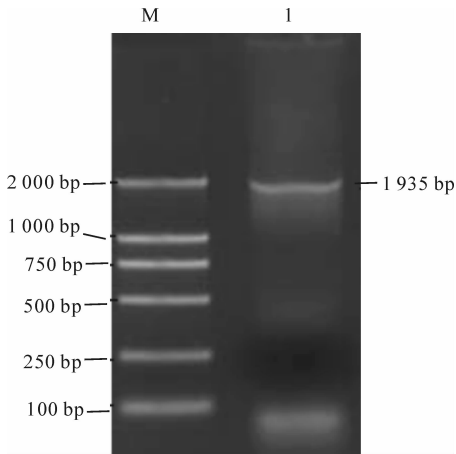


图 1 EDSV HN03 株 fiber 基因的 PCR 扩增电泳结果
M, DL2000 DNA Marker;1. PCR 产物

Fig. 1 PCR result of fiber gene of EDSV HN03 strain
M, DL2000 DNA Marker;1. PCR product

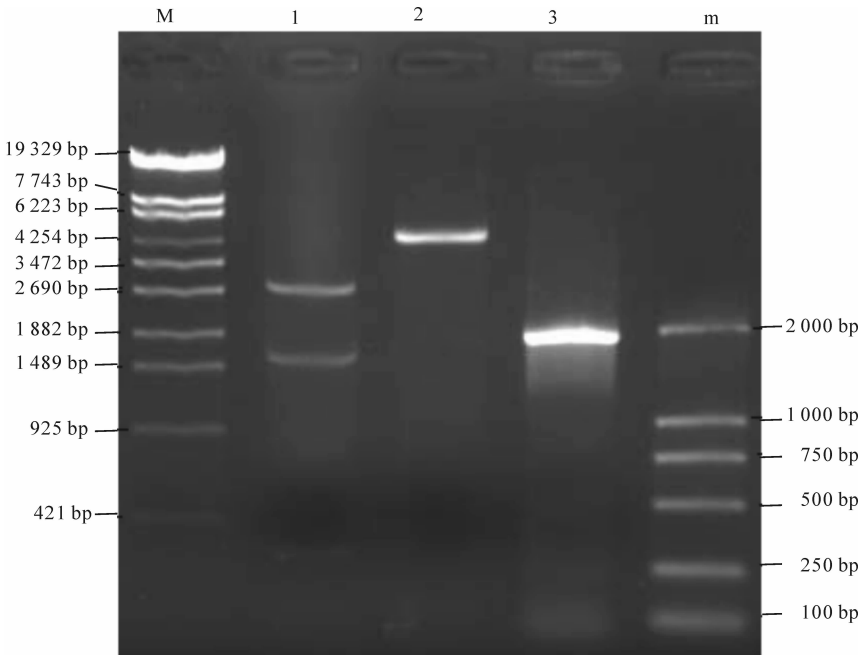


图 2 重组质粒 pTG19-fiber 的酶切鉴定和 PCR 鉴定

M, λ -*Eco*T14 I digest DNA Marker;1. *Bam*H I 酶切重组质粒 pTG19-fiber;2. *Eco*R I 酶切重组质粒 pTG19-fiber;
3. 重组质粒 pTG19-fiber 的 PCR 产物; m, DL2000 DNA Marker

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid by digestion (*Bam*H I ,*Eco*R I) and PCR

M, λ -*Eco*T14 I digest DNA Marker;1. Recombinant plasmid pTG19-fiber digestion by *Bam*H I ; 2. Recombinant plasmid pTG19-fiber digestion by *Eco*R I ; 3. PCR product of recombinant plasmid pTG19-fiber;m, DL2000 DNA Marker.

2.3 EDSV HN03 株 fiber 基因的序列测定及分析

测序结果显示,EDSV HN03 株 fiber 基因核苷酸序列为 1 935 bp,包含一个完整的开放阅读框,编码 644 个氨基酸。*fiber* 基因推导的氨基酸序列有

5 个潜在的 N-糖基化位点,分别是 NVS、NIS、NGS、NLS 和 NFT;有 5 个与二硫键形成有关的半胱氨酸。HN03 株 fiber 基因序列已上传到 Gen-Bank,登陆号为 EF625961。

序列分析表明,EDSV HN03 株与现已公布的国际标准株 AV-127^[11] 和 鹁 鹁 腺 病 毒 QU 株 *fiber* 基因核苷酸序列长度一致(1 935 bp),而 EDSV AAV-2 弱毒株 *fiber* 基因核苷酸序列长度为 1 758 bp^[12]。EDSV HN03 株与 EDSV 国际标准株 AV-127(Z86065) *fiber* 基因核苷酸同源性的 99.3%,有 11 个碱基发生点突变,5 个碱基为非同义突变(表 1),氨基酸同源性为 99.2%;与 鹁 鹁 腺 病 毒 QU 株 (EF093506) *fiber* 基因核苷酸同源性的 98.9%,有 20 个碱基发生点突变,10 个碱基为非同义突变,氨基酸同源性为 98.4%。由于未查到 AAV-2 的详细序列,无法与其比较。

表 1 腺病毒各毒株间纤维蛋白的氨基酸比较
Table 1 Comparison of the deduced amino acid sequences of fiber protein genes of adenoviruses

病毒株 Virus strain	氨基酸差异的位点 Site of difference	氨基酸同源性/% Homology
AV-127 和 HN03 AV-127 and HN03	86,312,320,328,333	99.2
AV-127 和 QU AV-127 and QU	15,18,86,172,273, 333,357,452	98.8
QU 和 HN03 QU and HN03	15,18,172,273,312, 320,328,333,357,452	98.4

3 讨 论

纤维蛋白是腺病毒的主要结构蛋白,其与六邻体和五邻体一起构成核衣壳,决定着病毒粒子的大小,同时也是 EDSV 的主要保护性抗原成分。因此,对减蛋综合征病毒纤维蛋白基因进行克隆和测序,不仅为进一步阐明 EDSV 纤维蛋白基因结构与功能的关系奠定了基础,而且为纤维蛋白基因的表达及减蛋综合征基因工程疫苗的研究提供了基础材料。本研究利用具有 3'→5' Exonuclease 活性的耐热性 DNA 聚合酶,从河南分离减蛋综合征病毒 HN03 株中扩增了纤维蛋白基因,并进行了克隆和序列分析,结果表明,从河南分离减蛋综合征病毒 HN03 株中扩增、克隆的纤维蛋白基因是正确的。目前正在进行纤维蛋白基因表达的研究。

序列比较发现,腺病毒纤维蛋白在氨基酸水平上同源性也极高,达到 98% 以上,表明腺病毒的纤维蛋白相当保守,这可能是因为纤维蛋白多肽是腺病毒主要的结构蛋白,其与五邻体和六邻体一起构成核衣壳,决定着病毒粒子的大小。但相比较而言,河南本地分离株 HN03 株纤维蛋白的氨基酸序列与国际标准株 AV-127 株的同源性更高,达 99.2%,仅 5 个氨基酸不同;而 QU 株与 HN03 株和国际标

准株 AV-127 株的同源性分别为 98.4% 和 98.8%,分别有 10 和 8 个氨基酸不同,其差异是前者的 2 倍和 1.6 倍。因此,腺病毒各毒株间纤维蛋白在核苷酸和氨基酸水平上的同源性与其生物学特性是一致的。HN03 株和 AV-127 株同为 EDSV 毒力毒株。

[参考文献]

[1] 杨家华. 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.
Yang J H. Research advances on molecular biology of chicken egg drop syndrome virus [J]. Chinese Journal of Veterinary Science and Technology, 2002, 32(5): 18-20. (in Chinese)

[2] Zakharchvk 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.

[3] Henikoff S. Unidirectional digestion with exonuclease III in DNA sequence analysis [J]. Methods Enzymol, 1987, 155: 156-165.

[4] 卡尔尼克 B W. 禽病学 [M]. 高 福, 刘文军, 译. 北京: 中国农业大学出版社, 1999: 490-492.
Calnek B W. Diseases of poultry [M]. Gao F, Liu W J, Translated. Beijing: China Agricultural University Press, 1999: 490-492. (in Chinese)

[5] 汪明磊, 余为一, 李 瑾 年. 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(3): 43-45.
Wang M L, Yu W Y, Li J N, et al. Progress on molecular biology of the egg drop syndrome virus [J]. Animal Science & Veterinary Medicine, 2000, 17(3): 43-45. (in Chinese)

[6] 胡敬东, 章金钢, 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.
Hu J D, Zhang J G, Li H W, et al. Cloning and mapping of Hind III fragments of the egg drop syndrome virus genome [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 1998, 18(1): 7-10. (in Chinese)

[7] 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.
Duan Y Y, Cui Z Z, Ge T T, et al. Restriction enzyme analysis of genome of the egg drop syndrome virus H91 strain [J]. Journal of Jiangsu Agricultural College, 1995, 16(3): 54-58. (in Chinese)

[8] 曾力宇, 金 奇, 章金钢, 等. 鸡减蛋综合征病毒(EDSV)的基因组特点 [J]. 科学通报, 1998, 43(5): 524-527.
Zeng L Y, Jin Q, Zhang J G, et al. The characteristics of the egg drop syndrome virus genome [J]. Science Bulletin, 1998, 43(5): 524-527. (in Chinese)