

I型鸭肝炎病毒基因组全长cDNA克隆的构建与分析

云涛^{1,2},倪征²,刘光清²,余斌²,陈柳²,华炯钢²,李双茂²,张彦明¹

(1 西北农林科技大学 动物医学院, 陕西 杨凌 712100;

2 浙江省农业科学院 病毒学与生物技术研究所, 浙江 杭州 310021)

【摘要】【目的】建立I型鸭病毒性肝炎(Duck hepatitis virus, DHV)的反向遗传系统。【方法】根据I型鸭肝炎病毒(DHV-I)ZJ-V/2006株全基因组序列设计并合成5对特异引物,进而应用RT-PCR技术分5段扩增了DHV全基因组cDNA。将扩增的cDNA重叠片段A、B、C和DE片段分别克隆到载体pBluescript II KS(+)中,获得了DHV-I ZJ-V/2006株全长基因组cDNA克隆pBLDHV。在扩增5'末端时,引入Apa I酶切位点和SP6启动子序列;在基因组3'末段PolyA尾引入Nru I酶切位点,以供cDNA模板的线性化之用。【结果】核酸序列分析表明, DHV-I ZJ-V/2006株基因组全长为7 711个核苷酸,与DHV-I ZJ-V BHK-21细胞分离株的同源性为99.9%;全长基因组中有6个核苷酸发生突变,均未导致对应的氨基酸发生改变,为沉默突变。【结论】成功构建了DHV-I ZJ-V/2006株基因组全长cDNA。

【关键词】 I型鸭病毒性肝炎;全长cDNA克隆;感染性克隆

【中图分类号】 S858.32;Q78

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2010)05-0027-05

Construction and analysis of full length cDNA of Duck Virus Hepatitis Type I

YUN Tao^{1,2}, NI Zheng², LIU Guang-qing², YU Bin², CHEN Liu²,
HUA Jiong-gang², LI Shuang-mao², ZHANG Yan-ming¹

(1 College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Research Institute of Virology & Biotechnology of Agriculture Ministry, Zhejiang Academy of
Agriculture Sciences, Hangzhou, Zhejiang 310021, China)

Abstract: 【Objective】The study was to develop a reverse genetics system of Duck Virus Hepatitis Type I (DHV-I). 【Method】Five pairs of oligonucleotides were designed based on the full length genomic sequence of DHV ZJ-V strain. Using RT-PCR technique, five overlapping cDNA fragments, designated as A, B, C, D and E were amplified respectively. And D and E fragments were fused by PCR designated as ED. Using pBluescript II KS(+) as a plasmid vector, the full-length cDNA clone pBLDHV of DHV ZJ-V strain was obtained by connecting the four cDNA fragments utilizing single restriction endonuclease site. A Apa I site and a SP6 promoter were introduced immediately upstream of 5' end, while a Nru I Site was engineered down stream of 3' end of DHV poly (A) tail (containing 20 As). 【Result】The results of sequencing and analysis showed that there were 99.9% identical between the construction of the full-length cDNA sequences and cDNA sequences of DHV-I ZJ-V strain. The only differences in sequence were at 6 positions, none of which affected the amino acid sequence. 【Conclusion】Successful construction of full-length

* [收稿日期] 2009-11-03

[基金项目] 浙江省自然科学基金项目(Y305031, Y307124); 浙江省重大科技专项(2007C12010); 嘉兴科技局项目(No. 2008AY1001); 浙江省农业科学院与中国科学研究院微生物所合作项目(2007R21Y03E01)

[作者简介] 云涛(1978—), 男, 新疆石河子人, 助理研究员, 在读博士, 主要从事病毒分子生物学基因工程疫苗研究。

[通信作者] 张彦明(1956—), 男, 陕西南郑人, 教授, 博士生导师, 主要从事分子病原学与免疫学研究。

E-mail: ylzhangym@sohu.com

cDNA clone of DHV- I ZJ-V strain lays a foundation for rescuing DHV effectively and enables further research of DHV at molecular level.

Key words: Duck virus hepatitis (DHV); full length cDNA clone; infectious cDNA clone

I 型鸭病毒性肝炎 (Duck hepatitis virus, DHV) 是由 I 型鸭肝炎病毒 (DHV- I) 引起的, 以肝脏出血、肿大和高死亡率为特征的一种急性接触性传染病^[1-2]。它主要感染 5 周龄内雏鸭, 其中以 3 周龄内的雏鸭最为易感, 是对鸭养殖业威胁最大的传染病之一。该病于 1950 年最先由美国学者 Levine 和 Fabricant 报道, 并分离出病原^[3]。随后, 英国、德国、加拿大、捷克、比利时、意大利、前苏联、日本、韩国等国相继报道了该病的疫情。1963 年, 中国首次报道了鸭病毒性肝炎流行的情况, 并于 1984 年确认是由 DHV- I 引起的^[4]。目前, 该病已遍及中国大部分鸭养殖地区, 严重威胁着鸭养殖业的持续健康发展。

DHV- I 在分类地位上属于小 RNA 病毒科, 尚未定属^[5], 其基因组是一种单股正链 RNA 分子, 全长约 7 690 nt, 包括 5' 和 3' 端非编码区及中间的一个大开放性阅读框 (ORF)。通过与小 RNA 病毒科其他成员基因组序列的比对和分析, 可以推测, 在表达策略上, DHV- I 的编码区首先翻译出一个多聚蛋白前体, 然后经自身编码的一些蛋白酶水解, 可形成 VP1、VP3、VP0、2A1、2A2、2B、2C、和 3A、3B、3C、3D 等成熟蛋白, 它们主要是病毒的结构蛋白及病毒复制所需要的一些酶。

虽然, DHV- I 已经被发现 50 余年, 但是其基因组却一直直到 2006 年才被完全测定^[6-9]。而如何尽快深入开展 DHV- I 的应用基础研究, 并取得突破性进展, 关键在于能否尽快建立一个可以在分子水平上对 DHV- I 基因组进行操作的技术平台, 即反向遗传操作平台。而反向遗传操作是研究病毒的重要手段, 运用感染性分子克隆可以在 DNA 分子水平上分析和改造病毒基因组, 进而对病毒的复制、致病性及抗病毒疫苗进行研究^[10-14]。基于此, 本研究拟构建 DHV- I ZJ-V/2006 株基因组全长 cDNA, 以期进一步获得具有感染性的 DHV- I 分子克隆, 并为研究该病毒基因组结构与功能及致病机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞与病毒 BHK-21 细胞和 DHV- I ZJ-

V/2006 株 BHK-21 细胞适应毒株, 均由浙江省农业科学院病毒学与生物技术研究动物病毒研究室分离与保存。

1.1.2 载体与试剂 PCR 相关试剂、SuperScript™ II Reverse Transcriptase, 购自 Invitrogen 公司; pBluescript II KS(+), 购自 Fermentas; FBS、DMEM, 购自 GIBCO 公司; *Pfu* Turbo Hot start DNA polymerase, 购自 Stratagene 公司; RNeasy Mimi Kit, 购自 Qiagen 公司; MiniBEST Plasmid Purification Kit、Agarose Gel DNA Purification Kit、DNA Fragment Purification Kit、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶、DL2000、250 bp DNA Marker, 购自 TaKaRa; 其他化学试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成 根据 DHV- I ZJ-V/2006 株基因组全序列 (GenBank access number: EF382778) 和 pBluescript II KS(+) 载体多克隆位点, 利用 Oligo 6.0 设计扩增全长基因组的 5 对引物, 引物由大连宝生物工程有限公司合成, 用无核酸酶水配制成所需浓度。其中引物 EF 中加入了 SP6 RNA 聚合酶启动子核心序列, 引物 AR 中加入了病毒原始序列中不存在的单一酶切位点 *Not* I 和 *Nru* I, 所设计引物及其序列如表 1 所示。

1.2.2 DHV- I 基因组的提取 用 DMEM (GIBCO) (含体积分数 8% 胎牛血清、100 U/mL 氨苄青霉素、100 U/mL 链霉素) 培养 BHK-21 细胞, 将含有 DHV- I ZJ-V/2006 株的细胞培养液接种到细胞融合率为 80% 的 BHK-21 细胞上, 待细胞病变且至 80% 的细胞脱落时收获病毒培养液。冻融 3 次后, 差速离心纯化病毒粒子。按 RNeasy Mimi Kit 说明中提取病毒 RNA, RNA 以 Nuclease Free Water 溶解, 于 -70 °C 保存。

1.2.3 RT-PCR 参照 SuperScript™ II Reverse Transcriptase 产品说明书, 以 AR 为 RT 引物, 合成 cDNA 第 1 链。合成的 cDNA 于 -20 °C 保存。PCR 扩增参照 *Pfu* Turbo Hot start DNA polymerase 产品说明书进行。每个 PCR 体系 50 μL, 包括 10 × *Pfu* Turbo Hot start Reaction Buffer 5 μL, dNTPs (2.5 mmol/L each) 4 μL, *Pfu* Turbo

Hot start DNA polymerase 1.0 μL ,上、下游引物各 1 μL (20 pmol/mL), cDNA 2.5 μL ,补充 ddH₂O 至 50 μL 。按常规 PCR 条件扩增,退火温度和延伸时间以每对引物的最适退火温度(T_m)及

其扩增片段的长度进行调整。将扩增的 RT-PCR 产物分别进行回收,并将各片段分别命名为 A、B、C、D、E。另外,通过融合 PCR 将 D 和 E 片段融合成 DE 片段,并回收。

表 1 DHV- I ZJ-V/2006 株基因组 cDNA 片段的扩增引物

Table 1 Oligonucleotides used for PCR amplification of strain DHV- I ZJ-V/2006

引物名称 Oligonucleotide designation	引物序列 (5'→3') 与酶切位点 Oligonucleotide sequence (5'→3') and restriction site(s)
AF	AGGATGAATTCGAAAGA (<i>EcoR</i> I)
AR	ATA GCGGCCGCTCGCGA T ₂₀ AGGTAGGGTAGGGAATA (<i>Not</i> I , <i>Nru</i> I)
BF	TTGGTATATCGATATCTGGTG (<i>Cla</i> I)
BR	CCTTCTTTTCGGAATTCATCTT (<i>EcoR</i> I)
CF	GTCGAC GTTAACAATGGCACTACACCA (<i>Sal</i> I)
CR	ACCAGATATCGATATACCAAG (<i>Cla</i> I)
DF	GATCCATGCAAATGTTGAGAG
DR	GTTAACAATAGTGAGAATGATCTC (<i>Hpa</i> I)
EF	TCAGGGCCCCATACGATT TAGGTGACACTATAG TTTGAAA- GCGGGTGCATGCATGGCCA (<i>Apa</i> I)
ER	GTATTGGTGC GGAGATCCAAGATGG

注:下划线代表酶切位点,黑体代表非病毒基因组序列,斜体部分代表 SP6 启动子序列。
Note:DHV- I sequences are shown in lightface type,non-DHV- I-specific sequences are shown in boldface type, and restriction sites used for cDNA cloning are underlined. The core sequence of the Sp6 promoter in primer DEF is shown in italics.

1.2.4 全长 cDNA 的连接 根据 DHV- I ZJ-V/2006 株全长序列限制性酶切图谱和 pBluescript II KS(+) 载体的多克隆位点,设计了各片段连接策略,将各片段依次从后向前克隆入 pBluescript II KS(+) 载体。具体方法如下:用 *Not* I 和 *EcoR* I 分别酶切 pBluescript II KS(+) 载体和 A 片段,将 A 片段定向克隆入 pBluescript II KS(+) 载体,获得含 20 个 ployA 的重组质粒 pBLA;然后用 *EcoR* I 和 *Cla* I 分别酶切重组质粒 pBLA 和 B 片段,将 B 片段定向克隆 pBLA 质粒,获得重组质粒 pBLAB;再用 *Cla* I 和 *Hpa* I 分别酶切重组质粒 pBLAB 和 C 片段,将 C 片段定向克隆入 pBLAB 质粒,获得重组质粒 pBLABC;最后用 *Cla* I 和 *Apa* I 分别酶切重组质粒 pBLABC 和 DE 融合片段,将 DE 片段定向克隆入 pBLABC 质粒,获得基因组全长 cDNA 克隆的 pBLABCDE 重组质粒,将其命名为 pBLDHV。将构建成功的全长 pBLDHV 质粒送大连宝生物公司测序。

1.2.5 序列分析 对测序结果,应用 DNASTar 中的 SeqMan 软件对各序列进行拼接,获得全长序列。同时与 GenBank 中最初 DHV- I ZJ-V BHK-21 细胞分离株序列(登录号:EF382778)进行比较,分析其在核苷酸序列和氨基酸序列上的同源性以及病毒蛋白氨基酸的变异状况。

2 结果与分析

2.1 DHV- I ZJ-V/2006 株全长 cDNA 序列各片段的 RT-PCR 扩增结果

利用设计的 5 对特异性引物,经 RT-PCR 扩增获得了 A、B、C、D、E 5 个片段(图 1),其大小分别为 1 261,2 026,2 178,1 231 和 1 222 bp,而融合的 DE 片段大小为 2 351 bp,与预期大小相符。

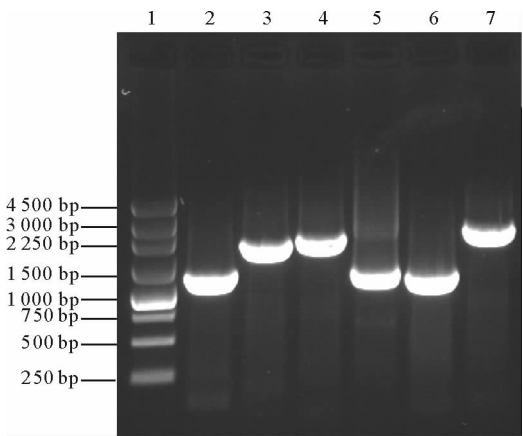


图 1 DHV- I ZJ-V/2006 株全长 cDNA 序列各片段的 RT-PCR 扩增产物

1. 250 bp DNA Marker;
2~7. A、B、C、D、E 和 DE RT-PCR 产物

Fig. 1 RT-PCR amplification products of strain DHV- I ZJ-V/2006

1. 250 bp DNA Marker;2~7. A、B、C、D、E 和 DE RT-PCR

2.2 DHV- I ZJ-V/2006 株全长 cDNA 的构建与鉴定

根据 DHV- I ZJ-V/2006 株全长序列限制性酶切图谱和 pBluescript II KS(+)载体的多克隆位点,设计了各片段连接策略,构建全长 cDNA,并将全长 cDNA 克隆到 pBluescript II KS(+)载体中,获得基因组全长 cDNA 克隆 pBLDHV 的长度约为 11.0 kb,其中全长 cDNA 长度为 7 711 bp。酶切鉴定结果(图 2)表明, DHV- I ZJ-V/2006 株全长 cDNA 克隆构建成功。

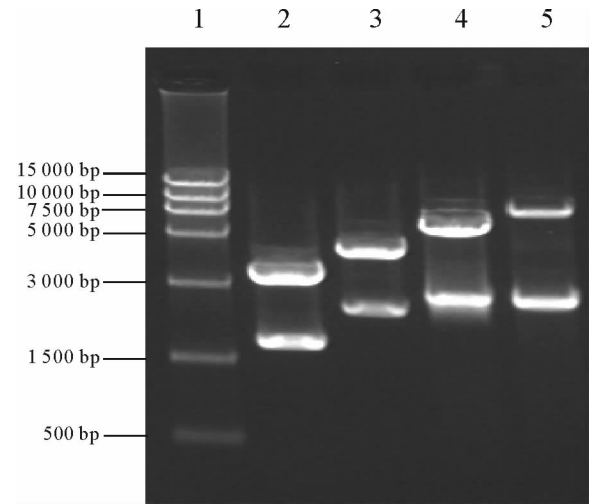


图 2 DHV- I ZJ-V/2006 株各片段重组质粒的双酶切鉴定结果

1. DL 15000 DNA Marker; 2~5. pBLA、pBLAB、pBLABC 和 pBLABCD 各重组质粒的双酶切产物

Fig. 2 Result of double enzymatic digestion of recombinant plasmids of strain DHV- I ZJ-V/2006

1. DL 15000 DNA Marker; 2-5. The double-digestion products of pBLA、pBLAB、pBLABC and pBLABCD recombinant plasmids respectively

2.3 DHV- I ZJ-V/2006 株全长 cDNA 的序列分析

应用 DNASTar 中的 SeqMan 软件,将测得的全序列进行拼接,获得了 DHV- I ZJ-V/2006 株基因组全序列,与 GenBank 上登陆的 DHV- I ZJ-V BHK-21 细胞分离株的全序列比较发现,二者核苷酸同源性为 99.9%,共有 6 个核苷酸发生了变异,其中 6 471 处核苷酸的变异是人为改变,目的是人为引入遗传标志(*EcoR* I 酶切位点),以区分自然毒与人工毒。这些核苷酸的变异并未导致对应的氨基酸发生改变,表明发生的变异均为沉默突变。

3 讨论

在构建全长 cDNA 的过程中,由于 DNA 聚合

酶扩增的不忠实性,有可能导致核苷酸的错配和病毒基因组的点突变,而且病毒基因组越长,发生点突变的几率也越大,而这些点突变可能对病毒转录本的感染性产生巨大的影响(多为致弱甚至无感染性)^[15-18]。因此,保持克隆序列的完整性与真实性,在构建感染性分子克隆中是最重要的,也是最难解决的问题。为此,本试验使用的耐热 SuperScript™ II Reverse Transcriptase 明显增加了逆转录产物的长度,其耐热特性使得反应甚至可以在高达 55 ℃ 的温度下进行,从而可以最大程度地减小 RNA 二级结构对逆转录反应的阻碍;使用的聚合酶 *Pfu* 具有较强的 3'→5' 的外切酶活性(校读活性),对高温下的耐受时间得到了改善,高保真反转录酶和 DNA 聚合酶的应用,降低了 RT-PCR 过程中可能出现的差错率,使得合成全长 cDNA 拷贝时突变率降低。另外,病毒基因组 cDNA 的分段克隆,也降低了病毒基因组中可能存在的毒性序列对宿主菌的影响^[19]。

构建成功的 DHV- I ZJ-V/2006 株全长质粒 pBLDHV,经测序拼接后发现,其核苷酸同源性与 GenBank 上登陆的 DHV- I ZJ-V BHK-21 细胞分离株的全序列核苷酸同源性为 99.9%,共有 6 个核苷酸发生了变异,且都为沉默突变。其中 6 471 处核苷酸的变异是人为改变,目的是人为引入遗传标志(*EcoR* I 酶切位点),以区分自然毒与人工毒。其余 5 处变异除了 RT-PCR 过程中可能出现的差错率外,还可能是由于 DHV- I 存在的准种特性所致。

本试验根据发表的 DHV- I ZJ-V/2006 株序列,设计引物进行 PCR 扩增,将扩增的 5 个重叠 PCR 片段拼接成全长的 cDNA,并将其克隆到 pBluescript II KS(+)载体中,得到的质粒 pBLDHV 含有全长的 cDNA 克隆,而处于 SP6 RNA 聚合酶启动子下游,要保证病毒全长 cDNA 的转录本具有感染性,需要使其带有一定数目的 polyA 尾^[20],于是本研究在 3' 端插入了 20 个 polyA 尾,并紧跟其后有个非病毒基因组的 *Nru* I 酶切位点,用于线性化质粒来进行体外转录,以便终止体外转录反应。同时,本研究在进行 DHV- I ZJ-V/2006 株全长 cDNA 构建过程中,采用了融合 PCR 技术及全基因组自身固有的特异性酶切位点进行拼接,而未引入多余碱基,保证了蛋白翻译的真实性。

通过 RT-PCR 和克隆的方法,将病毒全基因组

RNA 转变成全长的基因组 cDNA,然后转录出病毒的全基因组 RNA,并在敏感细胞中得到子代的病毒颗粒。使用反向遗传方法,目的是将病毒基因组 RNA 通过 DNA 阶段,并在 DNA 水平上进行体外基因操作(突变、缺失、插入和替换等)^[21]。这一新技术的出现,可以帮助病毒分子生物学研究工作者解释由 RNA 病毒介导的、复杂的感染过程,为众多病毒分子生物学研究领域提供了极为有价值的研究工具。总之,本试验成功构建了含有 DHV- I ZJ-V/2006 株基因组全长的重组质粒,为 DHV 的拯救、病毒结构和功能、基因组复制与转录的调控机制、病毒鸡胚传代致弱及变异机制的研究提供一个重要平台。

[参考文献]

- [1] Woolcock P R. Duck hepatitis [G]// Saif Y M ,Barnes H J, Glisson J R ,et al. Diseases of poultry. 11th ed. Ames,IA:Iowa State Press,2003;343-354.
- [2] McNulty M S. *Picornaviridae* [G]// Jordan F,Pattison M,Alexander D,et al. Poultry diseases. 15th ed. London:Saunders W B press,2001;305-318.
- [3] Levine P P,Fabricant J. A hitherto-undescribed virus disease of ducks in North America [J]. Cornell Vet,1950,40:71-86.
- [4] 郭玉璞. 我国鸭病毒性肝炎研究概况 [J]. 中国兽医杂志,1997,23(6):46-47.
Guo Y P. Study overview of duck hepatitis virus in China [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine,1997,23(6):46-47. (in Chinese)
- [5] Cornelia Buchen-Osmond. The universal virus database of the international committee on taxonomy of viruses [EB/OL]. http:// www. ncbi. nlm. nih. gov/ ICTVdb, 2005-02-18.
- [6] Kim M C,Kwon Y K,Joh S J,et al. Molecular analysis of duck hepatitis virus type 1 reveals a novel lineage close to the genus Parechovirus in the family Picornaviridae [J]. J Gen Virol,2006,87:3307-3316.
- [7] Tseng C H,Knowles N J,Tsai H J. Molecular analysis of duck hepatitis virus type 1 indicates that it should be assigned to a new genus [J]. Virus Res,2006,123:190-203.
- [8] Ding C Y,Zhang D B. Molecular analysis of duck hepatitis virus type 1 [J]. Virology,2007,123(2):190-203.
- [9] Liu G Q,Wang F,Ni Z,et al. Complete genomic sequence of a

Chinese isolate of duck hepatitis virus [J]. Virologica Sinica,2007,22:353-359.

- [10] Li X L,Zhang Y L. Reverse genetics by fast neutron mutagenesis in higher plants [J]. Funct Integr Genomics,2002,2(2):254-258.
- [11] Hohe A,Reski R. A tool for understanding homologous recombination in plants [J]. Plant Cell Rep,2003,21(12):1135-1142.
- [12] Nakaya T,Cros J,Park M S,et al. Recombinant Newcastle diseasevirus as a vaccine vector [J]. J Virol,2001,75(23):11868-11873.
- [13] Moser C,Trat schin J D,Hofman M. A recombinant classical swine fever virus stably expresses a marker gene [J]. J Virol,1998,72(6):5318-5322.
- [14] Singh M,Billeter M A. A recombinant measles virus expressing biologically active human interleukin-12 [J]. J Gen Virol,1999,80:101-106.
- [15] 袁晓东,李晶泉,王红伟,等. 超高忠实性 PCR 用 DNA 聚合酶 [J]. 遗传,1999,21(6):47-48.
Yuan X D,Li J Q,Wang H W,et al. The DNA polymerase of high fidelity for PCR [J]. Hereditas,1999,21(6):47-48. (in Chinese)
- [16] Boyer J C,Haenni A L. Infectious transcripts and cDNA clones of RNA viruses [J]. Virology,1994,198(2):415-426.
- [17] Domingo E,Holland J J. Mutation rates and rapid evolution of RNA viruses. [G]//Morse S S. Evolutionary biology of viruses. New York: Raven Press,1994:161-184.
- [18] Ramirez B C,Barbier P,Seron K,et al. Molecular mechanisms of point mutations in RNA Viruses. [G]//Gibbs A,Calisher C H. Molecular basis of viral evolution. Cambridge: Cambridge University Press,1995:105-118.
- [19] Sumiyoshi H,Hoke C H,Trent D W. Infectious Japanese encephalitis virus RNA can be synthesized from *in vitro* ligated cDNA templates [J]. J Virol,1992,66(9):5425-5431.
- [20] Baxt B,Grubman M J,Bachrach H L. The relation of poly (A) length to specific infectivity of viral RNA:a comparison of different types of foot-and-mouth disease virus [J]. Virology,1979 98:480-483.
- [21] Nam D K,Lee S,Zhou G,et al. Oligo (dT) primer generates a high frequency of truncated cDNAs through internal poly(A) priming during reverse transcription [J]. Proc Natl Acad Sci USA,2002,99(9):6152-6156.