

鹅源新城疫病毒 NP、P 和 L 基因的 克隆与 P 基因的表达鉴定*

刘玉良 吴艳涛 黄勇 邵卫星 韦栋平 刘秀梵**

(扬州大学农业部畜禽传染病学重点开放实验室 扬州 225009)

摘要: 将鹅源新城疫病毒的 NP、P 和 L 基因通过 RT-PCR 方法从尿囊液中扩增后分别克隆进 pGEM-T easy 载体, 再分别亚克隆到真核表达载体 pCI-neo 上, 通过酶切、PCR 和测序验证克隆正确。利用 P 基因开放性阅读框 (ORF) 上靠近终止密码上游的 AgeI 位点, 将报告基因绿色荧光蛋白 (GFP) 基因克隆进 P 基因真核表达重组质粒, 分别转染 COS-1 细胞和 CEF 细胞, 在倒置荧光显微镜下可见到绿色荧光, 表明 GFP 基因已得到表达, 由此证明 P 基因也已得到表达。鹅源新城疫病毒 NP、P 和 L 基因的克隆成功, 为即将进行的鹅源新城疫病毒的反向遗传操作以及功能基因组研究打下基础。

关键词: 鹅, 新城疫病毒, NP、P 和 L 基因, 绿色荧光蛋白, 表达

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 02-0037-04

CLONING OF NP, P AND L GENE OF NEWCASTLE DISEASE VIRUS OF GOOSE ORIGIN AND IDENTIFICATION OF P GENE EXPRESSION

LIU Yu-Liang WU Yan-Tao HUANG Yong SHAO Wei-Xing WEI Dong-Ping LIU Xiu-Fan

(Key Laboratory for Animal Infectious Diseases of Ministry of Agriculture of Yangzhou University, Yangzhou 225009)

Abstract: NP, P and L gene of Newcastle disease virus of goose origin were amplified and cloned into pGEM-T easy vector and then subcloned into pCI-neo expression vector respectively, the positive clones were identified by enzyme cutting, PCR and sequencing. GFP reporter gene was inserted into the downstream of recombinant expression plasmid of P gene, which of stop codon was deleted. The experiment of transfection of P and GFP recombinant plasmid on COS-1 cells and CEF showed that GFP gene expressed, and this demonstrated that P gene was also expressed. This research may be helpful for further study of reverse genetics and functional genome of NDV of goose origin.

Key words: Goose, Newcastle disease virus, NP, P and L gene, Green fluorescence protein, Expression

新城疫 (Newcastle disease, ND) 是威胁养禽业的一种高度接触性、烈性传染病。ND 的病原是副粘病毒科、腮腺炎病毒属中的新城疫病毒 (NDV), 是一种有囊膜、单股不分节段的负链 RNA 病毒。NDV 基因组全长约 15kb, 编码 6 种病毒结构蛋白: 核衣壳蛋白 (NP)、磷蛋白 (P)、基质蛋白 (M)、融合蛋白 (F)、血凝素-神经氨酸酶蛋白 (HN) 和大分子蛋白 (L)。其中 HN 和 F 蛋白是病毒的两种主要囊膜糖蛋白, 与病毒吸附于感染细胞、毒力和致病性等密切相关^[1]。

长期以来, 水禽曾被认为是 NDV 无毒或低毒力株在其中循环传播的一个自然储存库。但自 1997 年开始, 我国华东地区许多鹅群陆续发生 NDV 的感染流行, 造成严重的

* 国家自然科学基金资助项目 (No.2002 320)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No.2002 320)

** 联系人 Tel: 0514-7979386

收稿日期: 2003-05-12, 修回日期: 2003-06-30

发病和死亡,至今仍在继续感染和流行。从发病鹅群中分离到的毒株,在生物学特性和核苷酸序列上都符合 NDV 强毒株的特征,而且用这些毒株很容易复制本病^[2]。这些 NDV 毒株无疑对养禽业构成很大威胁。本实验室已从发病鹅群中分离到部分新城疫病毒株,并对其生物学特性进行了鉴定^[3]。而且,对分离到的一株鹅源新城疫强毒 ZJ/1/Go 株成功构建了基因组全长片段 cDNA 克隆并进行了序列测定(待发表)。本研究在此基础上,将该株鹅源 NDV 的 3 个辅助蛋白基因 NP、P 和 L 基因克隆进真核表达载体并对其中的 P 基因进行了表达鉴定。NDV 的反向遗传操作中共转染时需要 NP、P 和 L 基因真核表达质粒的参与。因此,本研究旨在为本实验室即将开展的对该株 NDV 进行反向遗传操作以及有关功能基因组研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒:鹅源新城疫病毒 ZJ/1/Go 株,2000 年本室从浙江发病鹅群中分离并鉴定为强毒株^[4]。

1.1.2 菌株和质粒: *E. coli* DH5 α 为本室保存;真核表达载体 pCI-neo 购自 Promega 公司;质粒 pEGFP 为美国 Clontech 公司产品。

1.1.3 试剂:T4 DNA 聚合酶、禽白血病反转录酶(AMV)、高保真 DNA 聚合酶、各种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、pGEM-T easy vector 购自 Promega 公司;Expand Long Template PCR System、DNA 凝胶回收试剂盒、FuGENE6 转染试剂盒购自 Roche 公司;质粒小量抽提试剂盒为上海华舜公司产品;细胞培养基及普通化学试剂购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 病毒增殖及病毒 RNA 抽提:按文献[5]方法进行。

1.2.2 PCR 引物设计与合成:根据在 GenBank 已登陆的鹅新城疫病毒 ZJ/1/Go 株基因序列(登录号:AF431744)设计下列 3 对引物,分别扩增 NP、P 和 L 基因:

NP1: 5' CGGAATTCGAGCGCGAGGCCGAAGCTCGAA 3' (含 *Eco*RI 位点)

NP2: 5' ATGTCGACCTGGGTCTGTCTCGATCAGTAC 3' (含 *Sal*I 位点)

P1: 5' CCGCTCGAGGTGGATTACGGTGAAGATGGCCACT 3' (含 *Xho*I 位点)

P2: 5' GCCGTCGACAGTGACGGGAGCCTGTTATGACT 3' (含 *Sal*I 位点)

L1: 5' GCCTCTAGA ACACGGGTAGGACATGGCGGGCTCCGCTCCCGA 3' (含 *Xba*I 位点)

L2: 5' TTCGTCGACCGATTGCCTTTAAGAGTCATTATTACTGT 3' (含 *Sal*I 位点)

所有引物 5' 端均设计有酶切位点(黑斜体字)和保护碱基,引物由宝生物工程大连(有限)公司合成。

1.2.3 cDNA 合成及克隆:NP 和 P 基因 PCR 反应:94℃ 预变性 5 min;94℃ 45s,48℃ 45s,72℃ 1min,5 个循环后进入第 2 个循环程序:94℃ 45s,50℃ 45s,72℃ 1min,25 个循环后 72℃ 延伸 10min。

L 基因 PCR 反应:按 Expand long template PCR system 说明书进行。

PCR 产物均用 DNA 凝胶回收试剂盒回收后与 pGEM-T easy vector 16℃ 连接 8h 以上或过夜。连接产物用一步法^[6]转化大肠杆菌 DH5 α ,挑白色菌落接种到 2mL LB 培养基中,振荡培养后小提质粒用酶切和 PCR 方法鉴定。

1.2.4 亚克隆及鉴定:将克隆进 pGEM-T easy vector 的 3 种目的基因分别用相应的两种

限制性内切酶(见引物序列)进行双酶切后回收纯化,再分别亚克隆到用相同双酶切的真核表达载体 pCI-neo 上,用酶切和 PCR 方法鉴定,阳性克隆分别命名为 pCI-NP, pCI-P 和 pCI-L,送上海生工生物工程公司测序验证。

1.2.5 含绿色荧光蛋白(GFP)及P蛋白基因重组质粒的构建:将 pEGFP 用 *EcoRI* 酶切后用 T4 DNA Polymerase 补平,乙醇沉淀,70%乙醇洗涤,干燥,溶解后再用 *AgeI* 酶切,回收含完整 GFP 基因(约 750bp)的条带;将 1.2.4 步骤中 P 基因阳性克隆用 *SmaI* 和 *AgeI* 双酶切后回收纯化,然后二者连接,转化 DH5 α ,挑斑提取质粒,用酶切和 PCR 方法鉴定,所得阳性克隆命名为 pCI-P-GFP。

1.2.6 P 基因的表达鉴定:将 pCI-P-GFP 用质粒 DNA 小量抽提试剂盒抽提后用紫外分光光度计(Eppendorf 公司)测定浓度和纯度,转染 COS-1 细胞和 CEF 细胞。转染方法按 FuGENE6 转染试剂盒使用说明书进行。转染后在倒置显微镜下观察 GFP 表达情况。

2 结果与讨论

2.1 PCR 扩增和重组质粒的构建与鉴定

鹅源新城疫病毒在 SPF 鸡胚上复壮后,收集尿囊液,用 PEG-6000 沉淀,SDS 裂解。酚:氯仿抽提病毒 RNA 后进行 RT-PCR 反应,扩增产物经 0.8% 的琼脂糖凝胶上电泳,在约 1.5kb, 1.3kb 和 7.0kb 左右的位置各有一条电泳带,表明已分别成功扩增出 NP、P 和 L 基因。

在病毒 RNA 抽提时,未使用试剂盒抽提,而是采用本实验室所摸索建立的 PEG 沉淀,酚:氯仿抽提的方法,该方法成功率很高。L 基因片段较长,本研究曾试图用普通 *Taq* DNA 聚合酶进行扩增,但试验几次均未成功,后改用 Expand long template PCR system 进行扩增,第一次即扩增到目的条带,而同时用普通 *Taq* DNA 聚合酶扩增却仍不能扩增出。因此,扩增较长片段时,建议用长模板扩增试剂盒。而如果采取“分段克隆”的策略,步骤较繁琐,也容易发生碱基突变。

PCR 产物回收纯化后,与 pGEM-T easy vector 连接克隆,转化后在 AIX 板(X-gal、IPTG、Amp)上用蓝白斑法初选阳性克隆,再通过酶切和 PCR 方法鉴定。结果表明,3 种基因均已克隆到 pGEM-T easy vector 上,通过扩大培养,得到大量的阳性克隆。在转化连接产物时,不是用经典的 CaCl_2 法,而是采用一步法^[7],该方法十分简便,易于操作,成功率也较高。

2.2 重组质粒的亚克隆与鉴定

将上述 NP 基因阳性重组质粒用 *EcoRI* 和 *SalI* 双酶切, P 基因重组质粒用 *XhoI* 和 *SalI* 双酶切, L 基因重组质粒用 *XbaI* 和 *SalI* 双酶切,电泳分离目的基因,切胶回收纯化,然后将目的基因分别与 pCI-neo 真核表达载体连接,转化,挑斑培养,提取质粒通过酶切、质粒 PCR 和测序鉴定。结果表明,3 种目的基因均成功亚克隆到真核表达载体 pCI-neo 上(图 1 和 2)。

2.3 含报告基因(GFP)重组质粒的构建与表达鉴定

为使 GFP 基因与 NDV 的 P 基因的编码序列同框,以便表达两者编码的融合蛋白,本研究利用了靠近 P 基因终止密码上游附近的 *AgeI* 位点,将 GFP 基因克隆进 P 基因重组表达质粒,通过检测报告基因的表达来间接评价 P 基因的表达。本研究将含 P 基因和 GFP 基因的重组质粒转染 COS-1 和 CEF 细胞,转染后 24h 左右即可看到 GFP 基因的

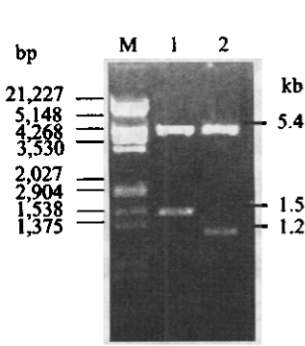


图1 NP和P基因重组质粒的琼脂糖凝胶电泳检测
M 分子量标准 (λ DNA/*Hind*III + *Eco*RI),
1 重组质粒 pCI-NP 用 *Eco*RI 和 *Sal*I 双酶切,
2 重组质粒 pCI-P 用 *Xho*I 和 *Sal*I 双酶切

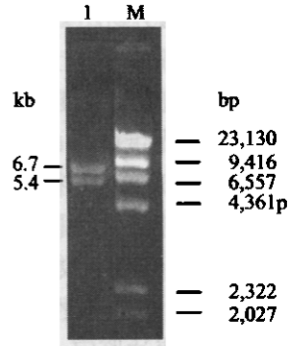


图2 L基因重组质粒的琼脂糖凝胶电泳检测
M 分子量标准 (λ DNA/*Hind*III),
1 重组质粒 pCI-L 用 *Xba*I 和 *Sal*I 双酶切

表达 (图3和4)。在表达的量上通过荧光的强弱和多少可知转染 COS-1 细胞的表达得较多些,这可能是 COS-1 细胞更适合于 *GFP* 基因的表达。

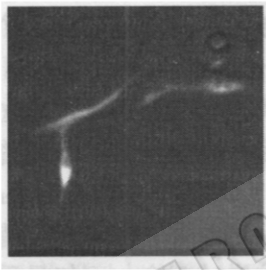


图3 GFP在CEF细胞上的表达

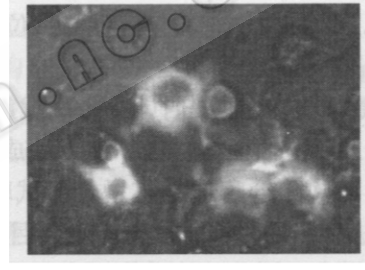


图4 GFP在COS细胞上的表达

GFP 基因是1994年从水母体内分离发现的一种新型报告基因,它是目前唯一能在异源细胞内表达后自发产生荧光的蛋白。*GFP* 只需光激发,不需要底物或辅助因子,表达结果判断较直观,操作简便。因此,逐渐被研究者广泛采用。本研究中报告基因克隆在 *P* 基因的下游,二者表达为融合蛋白,因此,检测到报告基因表达则可说明目的基因也已得到表达。虽然将 *P* 基因终止密码和其 ORF 的小部分末端序列 (约200bp) 去除,但整个基因的绝大部分仍保留。基于本室无相应单抗用来对其表达进行鉴定,因此,本研究所采用的方法可为该问题的解决提供一定的思路。本研究成功克隆了鹅源新城疫病毒的 *NP*、*P* 和 *L* 基因,并对 *P* 基因的表达进行了鉴定,这为本室即将开展的对该株鹅源新城疫病毒进行反向遗传操作以及有关功能基因组研究等打下了基础。

参考文献

- [1] 殷震,刘景华. 动物病毒学. 第二版. 北京: 科学出版社, 1997. 743~748.
- [2] Liu XF, Wu YT, Wen QY, et al. International conference and exhibition on veterinary poultry proceedings, 1999. 130~136.
- [3] Liu XF, Wan HQ, NXX, et al. Archive Virol, online.
- [4] 万洪全, 吴艳涛, 刘秀梵, 等. 微生物学报, 2002, 42 (2): 208~213.
- [5] 吴艳涛, 刘秀梵, 张如宽. 病毒学报, 1999, 15 (2): 143~146.
- [6] Chang CT, Niemela SL, Miller RH. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 96: 2172~2175.