

# 鸡传染性法氏囊病病毒非结构蛋白基因的克隆、表达 及多克隆抗体制备

于 涟\* 李 龙 刘 岩 郑江涛 魏永伟

(浙江大学动物预防医学研究所 浙江省重点实验室 杭州 310029)

**摘 要** 利用 RT-PCR 技术从传染性法氏囊病病毒( IBDV )TL2004 株感染鸡胚尿囊液中扩增到 VP5 基因,进而构建了 T7 启动子控制下的 N 端 GST-Tag 融合表达质粒 pGEX-VP5。序列测定表明 VP5 基因全长 438bp,编码一个由 145 个氨基酸组成的 VP5 蛋白。将 pGEX-VP5 转化大肠杆菌 BL21,在 IPTG 的诱导下高效表达了 GST-VP5 融合蛋白( 44kD)。通过包涵体纯化的方法,获得的较高纯度的融合蛋白,免疫新西兰兔,Western blot 和 ELISA 分析表明,制备的融合蛋白抗血清效价在 1:12800 以上,并具有良好的免疫反应特异性,为进一步研究 VP5 在 IBDV 复制与致病中的作用,以及研制 IBDV VP5 基因缺失疫苗打下了良好的基础。

**关键词** 传染性法氏囊病病毒( IBDV ),VP5 基因,表达,多克隆抗体

中图分类号:Q78 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2005)05-0763-04

传染性法氏囊病( Infectious bursal disease, IBD )是由传染性法氏囊病病毒( Infectious bursal disease virus, IBDV )引起的急性、高度接触性传染病。IBDV 主要侵害雏鸡的中枢免疫器官法氏囊,导致免疫抑制和免疫缺陷,同时造成其它疫苗的免疫失败,是目前危害世界养禽业的主要传染病之一<sup>[1]</sup>。IBDV 是双链 RNA 病毒,属于双 RNA 病毒科( Birnaviridae )禽双 RNA 病毒属( Avibirnavirus ),其基因组由 A、B 两个节段组成。B 节段(约 2.8kb)编码 VP1 蛋白,为 RNA 依赖的 RNA 聚合酶<sup>[2]</sup>。A 节段(约 3.3kb)具有两个相互重叠的开放阅读框架( ORF ),下游的 ORF1 编码的前体蛋白 VP2/4/3 可进一步剪切加工为 VP2、VP4、VP3。其中 VP2 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<sup>[3]</sup>;VP4 为一种丝氨酸蛋白酶,负责前体蛋白 VP2/4/3 的自我剪切;VP3 则是病毒的结构蛋白之一,具有群特异性抗原。上游的 ORF2( 438bp )编码非结构蛋白 VP5(约 15kD),该蛋白非病毒复制所必需,与病毒致病性有关<sup>[4,5]</sup>。

Mundt 等<sup>[4]</sup>用定点突变令 D78 弱毒株 ORF A2 的起始密码 ATG 换成 AGG(编码 Arg),其 cRNA 转染鸡胚细胞( CEC )获得无 VP5 表达的缺陷型病毒 IBDV/VP5-可正常感染 Vero 细胞,提示 VP5 在 IBDV 复制并非必要。Yao 等<sup>[5]</sup>用 VP5 缺陷的 D78 弱毒株

( rD78NSΔ )及亲本病毒 rD78 分别感染 3 周龄 SPF 鸡,前者即使加大接种剂量也不引起任何临床症状与法氏囊组织损伤,后者相反;并且两者诱导 IBDV 中和抗体的能力相似。进一步的研究表明<sup>[6,7]</sup>,将 VP5 置于 CMV 启动子下游分别转染鸡 B 淋巴细胞( RP9 )和 CEF,结果 VP5 的表达诱导了 RP9 和 CEF 的细胞凋亡,而缺失了 VP5 拯救的病毒引起的细胞病变比野生型轻,复制速度比野生型慢,细胞上清液的病毒量比野生型降低 30 倍,缺失了 VP5 的病毒大大降低了细胞溶解释放病毒的能力,可见 VP5 具有很强的细胞毒性,与成熟病毒从胞内向胞外释放及病毒的致病性有关。因此对 VP5 相关生物学特性进行研究,将有助于我们进一步了解 IBDV 的致病和免疫机制。

本文克隆了 IBDV 浙江地方分离株 TL2004 株的 VP5 基因,并成功表达了 GST-VP5 融合蛋白,对表达产物进行了纯化,该融合蛋白免疫新西兰兔后,制备了高效价的 IBDV VP5 抗血清,为深入研究 VP5 蛋白的结构与功能及其在 IBDV 感染中的作用机理打下基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 病毒毒株、菌株和质粒:传染性法氏囊病病

基金项目:国家科技攻关计划( 2004BA757C )、浙江科技计划重点项目( 2003C22002 )

\* 通讯作者。Tel/Fax 86-571-86974894 ;E-mail :yulian@zju.edu.cn

作者简介:于 涟( 1943 - )女,江苏镇江人,教授,博导,主要从事兽医免疫学与病毒学研究。

其他作者:许 健

收稿日期:2005-01-25,修回日期:2005-06-08

毒( IBDV )强毒株 TL2004 株为本实验室于 2004 年分离自杭州某鸡场。大肠杆菌 BL21 由本实验室保存; 原核表达质粒 pGEX-4T-2 为 Amersham 公司产品。

**1.1.2 试剂:** MMLV 反转录酶、*Taq* plus DNA 聚合酶、IPTG、DNA 纯化回收试剂盒购自上海 Sangon 公司; 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司; 兔抗 GST 多克隆抗体为本实验室制备保存; 辣根过氧化物酶( HRP )标记的羊抗兔 IgG 购自鼎国生物技术发展中心。其它试剂均为国产分析纯。

## 1.2 病毒增殖及基因组 RNA 的抽提

IBDV TL2004 株在 SPF 鸡胚中增殖 96h 后, 14000r/min 离心收集尿囊液上清, 置于 50% 聚乙二醇( PEG )中 4℃ 透析过夜, 沉淀溶于 TEN 中( 20:1 ), 加入 SDS 至终浓度 5g/L, 然后加入蛋白酶 K 至终浓度 1g/L, 在 50℃ 下反应 2h, 接着按酚/氯仿( 1:1 ), 氯仿/异戊醇( 24:1 )抽提, 乙醇沉淀的标准程序获得病毒 dsRNA, 溶于 DEPC 水中。

## 1.3 VP5 基因的 RT-PCR 和原核表达载体的构建

引物设计以 IBDV 德国 P2 株 VP5 序列为参考, 通过 Primer Premier 5.0 软件设计引物, 上游引物: 5'-CGGAATTC CCGTCAGTAGAGATCAGACA-3'( *EcoRI* ), 下游引物: 5'-CGGTCGACCTCAGGCTTCCTTGGGA-3'( *SalI* )。42℃ 反转录 50min 后, 进入 PCR 循环。反应体系: 反转录产物 2 $\mu$ L, 上下游引物各 1 $\mu$ L, *Taq* plus 5U, 10 $\times$  PCR buffer 2.5 $\mu$ L, dNTPs 1.2 $\mu$ mol/L, 用超纯水补足 50 $\mu$ L; 反应条件: 94℃ 2min; 94℃ 25s, 53℃ 30s, 72℃ 1min, 共 30 个循环。1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。PCR 产物以 *EcoRI* 和 *SalI* 双酶切后, 插入同样双酶切的 pGEX-4T-2 载体, 转化大肠杆菌 BL21, PCR 及酶切筛选阳性克隆, 并测序证实。

## 1.4 VP5 蛋白在大肠杆菌中的表达和纯化

取阳性菌落在含 100 $\mu$ g/mL 氨苄青霉素( AMP )的 LB 培养基中 28℃ 培养至  $OD_{600}$  为 1.0 左右时, 加入 IPTG 至终浓度为 1mmol/L 进行诱导表达, 定时取样离心收集菌体, 直接与上样缓冲液混合煮沸后, 进行 SDS-PAGE 和 Western blot 分析。收获的菌体重悬于 PBS( 0.01mol/L, pH8.0 )中, 经超声破碎后, 离心, 分别取上清与沉淀经 SDS-PAGE 分析目的蛋白以可溶性还是以包涵体形式存在。包涵体的纯化按常规方法进行, 最后用 5mol/L 的尿素洗涤包涵体。

## 1.5 兔抗 VP5 蛋白多克隆抗体的制备

上述提纯的包涵体 5mg 与弗氏不完全佐剂等体积混合, 研磨乳化, 皮下多点注射新西兰兔。初次

免疫后每 2 周加强免疫一次。试血后颈动脉采血, 离心制备血清, 分别用间接 ELISA 和 Western blot 检测抗体效价和免疫反应性。

## 2 结果

### 2.1 IBDV TL2004 株 VP5 基因原核表达载体的构建和序列分析

以下游引物进行反转录获得 cDNA 第一链, 进行 PCR 扩增获得分子量在 450bp 左右的特异性条带, 与理论预测值一致, 该序列在 GenBank 的 Bankit 为 712201。上述 PCR 产物经 *EcoRI* 和 *SalI* 双酶切后, 与相同酶切的 pGEX-4T-2 载体连接, 获得重组原核表达载体 pGEX-VP5。进一步的测序结果证实 VP5 基因全长 438bp, 编码一个由 145 个氨基酸组成的 VP5 蛋白。氨基酸序列同源性比较发现, TL2004 株 VP5 蛋白与其它毒株之间的同源性在 95.2% ~ 98.6% 之间, 其中与 HK46 株同源性最低( 95.2% ), 与同为浙江分离的强毒株 ZJ2000 只有 1 个氨基酸的差别( 24 位 S $\rightarrow$ P )。分子进化分析表明, TL2004 株与欧洲分离株和亚洲分离株形成同一分支, 而与美国分离株距离较远( 图 1 )。

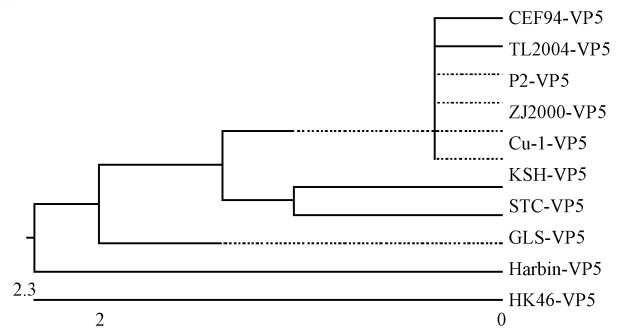


图 1 IBDV 各毒株 VP5 蛋白氨基酸序列系统进化树分析

Fig. 1 Phylogenetic trees of the amino acid sequences of VP5 protein of several IBDV isolates

### 2.2 VP5 蛋白在大肠杆菌中的表达和纯化

SDS-PAGE 分析表明, IPTG 诱导后可获得 44kD 的融合蛋白条带, 并在诱导表达 5h 后获得最高的表达量( 图 2-A )。以兔源 GST 多克隆抗体为一抗, HRP 标记的羊抗兔 IgG 为二抗进行 Western blot 分析, 可分别在 44kD 和 29kD 处获得特异性反应条带( 图 2-B )。虽然在略大于 29kD 处也出现了非特异性反应条带, 但并不影响结果的真实性和特异性。上述结果提示 VP5 融合蛋白在大肠杆菌 BL21 株获得了高效表达。

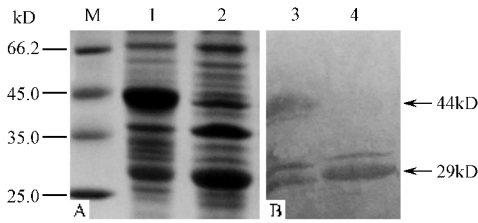


图2 VP5 在大肠杆菌中表达的 SDS-PAGE(A)和 Western blot(B)分析

Fig.2 SDS-PAGE(A) and Western blot(B) analysis of expressed fusion protein in *E. coli* strain BL21

M. Protein molecular weight marker ; 1. Strain BL21 containing pGEX-VP5 ; 2. Strain BL21 containing pGEX-4T-2 ; 3. Western blot detection of crude extract of *E. coli* BL21 containing pGEX-VP5 ; 4. Western blot detection of crude extract of *E. coli* BL21 containing pGEX-4T-2.

如图3所示,菌体经超声波裂解后,融合蛋白均存在于离心沉淀中,提示融合蛋白是以包涵体的形式表达的。以常规方法纯化细菌包涵体并进行 SDS-PAGE 分析,薄层扫描表明目的蛋白的含量约为 90%(图略)。

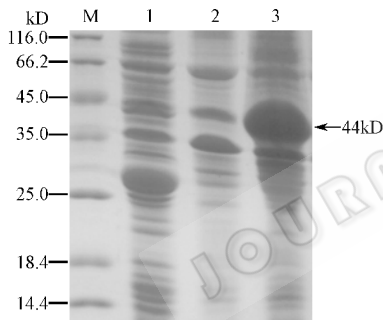


图3 重组蛋白存在形式的 SDS-PAGE 分析

Fig.3 SDS-PAGE analysis of the existence of the fusion protein

M. Protein molecular weight marker ; 1. Crude extract of IPTG-induced *E. coli* BL21 containing pGEX-4T-2 ; 2. Supernatant of sonicates of BL21 containing pGEX-VP5 ; 3. Deposit of sonicates of IPTG-induced *E. coli* BL21 containing pGEX-VP5.

### 2.3 兔抗 VP5 蛋白多克隆抗体鉴定和效价测定

将加强免疫 2 周后采集的血清作为一抗(1:2000 稀释),经 Western blot 分析证实重组蛋白在 44kD、29kD 和 15kD 处有特异性条带出现(图4),这些条带分别与 GST-VP5、GST 和 VP5 蛋白的分子量一致,表明本实验制备的多克隆抗体具有免疫反应性,并且为 VP5 蛋白特异性的。以纯化后的 VP5 融合蛋白为阳性包被抗原,以 *E. coli* BL21 粗提物为阴性对照,间接 ELISA 法测定兔抗 GST-VP5 融合蛋白抗体效价。结果表明加强免疫 2 周后,抗体效价达到 1:12800(图5)。

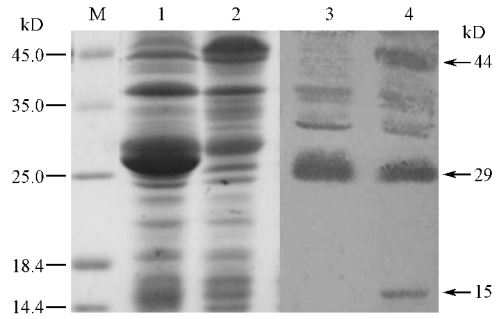


图4 兔抗 GST-VP5 抗血清的 Western blot 分析

Fig.4 Western blot analysis for rabbit anti-GST-VP5 serum

M. Protein molecular weight marker ; Crude extract of BL21 containing (1) pGEX-VP5 ; (2) pGEX-4T-2 ; Western blot detection of crude extract of BL21 containing (3) pGEX-VP5 ; (4) pGEX-4T-2.

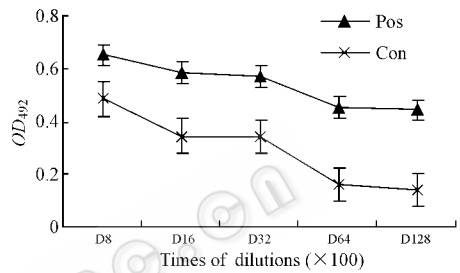


图5 兔抗 GST-VP5 抗血清 ELISA 效价测定

Fig.5 ELISA titer determination of the rabbit anti-GST-VP5 serum

## 3 讨论

IBDV 的分子生物学研究始于 70 年代,但大多数研究集中于 VP2 基因,对于 VP5 的研究相对较少。近年来,随着 IBDV 反向遗传系统的建立,VP5 与 IBDV 复制和毒力的关系的研究进一步展开。马静云等<sup>[8]</sup>在国内首次克隆并表达了 IBDV VP5 基因。本文克隆了 IBDV 浙江分离株 TL2004 株的 VP5 基因,推导的氨基酸序列分析表明,TL2004 株 VP5 蛋白与欧洲分离株 CEF94、P2、Cu-1 和同为浙江分离株 ZJ2000 VP5 蛋白处于同一分支,提示这与我国长期使用 IBDV 欧洲分离毒株作为疫苗株有关,IBDV 野毒株在疫苗的免疫压力下,虽然发生了变异(包括 VP5 基因),但是依然与欧洲分离毒株在分子进化上处于相对接近的位置。

我们曾经尝试使用 pET 表达系统表达 IBDV VP5 蛋白,但始终只能得到很低的蛋白表达量。本文应用 pGEX 表达系统成功表达了 VP5 蛋白,1mmol/L IPTG、28℃ 诱导表达 5h 后,获得了最佳的 VP5 表达量,GST 多克隆抗体可捕获到 44kD 和 29kD 两条特异性反应条带,表明 GST-VP5 融合蛋白获得了表达,并且有部分融合蛋白表达不完全或发生了酶解。由于使用了 GST 多克隆抗体,Western blot 反

应中也出现了非特异性条带,但并不影响结果判定。超声波裂解物的 SDS-PAGE 分析表明,GST-VP5 融合蛋白存在于包涵体中,应用常规方法纯化的细菌包涵体中,目的蛋白的含量达 90% 左右。

曾有学者在大肠杆菌 BL21 中表达并纯化了带有组氨酸(His)标签的 IBDV VP5 蛋白,但未进一步研究其免疫活性<sup>[8]</sup>。本文将 GST(29kD)与 VP5(15kD)进行融合表达,一方面有利于 VP5 蛋白的进一步纯化,另一方面可以增强 VP5 蛋白对新西兰兔的免疫原性。实验表明纯化包涵体免疫后,获得的融合蛋白抗体的 ELISA 效价至少达 1:12800。本试验制备的抗血清与纯化的融合蛋白可发生很好的特异性反应,而与 *E. coli* BL21 粗提物的非特异反应很低,两者的 P/N 比值达 3.18。以该抗血清为一抗进行 Western blot 在 15kD 处获得了特异性反应条带,该条带与 VP5 蛋白的分子量一致,而使用兔源 GST 多克隆抗体为一抗进行上述 Western blot 杂交时,则不能检测到 15kD 的条带(结果未显示),上述结果提示实验制备的抗血清为 IBDV VP5 蛋白特异性的,该也提示确实有部分融合蛋白发生了裂解。虽然 SDS-PAGE 未能在 15kD 处显示出明显的 VP5 特异条带,但随后进行的 Western blot 杂交在该处获得了 VP5 的特异性反应条带,提示获得的 VP5 蛋白具有很好的免疫反应性和对新西兰兔的良好免疫原性。在 Western blot 中同样出现了一些微弱的非特异性反应条带,这些并不影响实验结果的真实性。

综上所述,本文成功地在大肠杆菌中表达了

IBDV VP5 基因并制备了高效价的抗 VP5 蛋白多克隆抗体,为今后深入研究 VP5 在 IBDV 病毒复制及在致病中的作用,进而研制 IBDV VP5 基因缺失疫苗打下了良好的基础。

## 参 考 文 献

- [1] Müller H, Islam M R, Raue R. Research on infectious bursal disease—the past, the present and the future. *Veterinary Microbiology*, 2003, **97**: 153–165.
- [2] Azad A A, Barrett S A, Fahey K J. The characterization and molecular cloning of the double-stranded dsRNA genome of an Australian strain of infectious bursal disease virus. *Virology*, 1985, **143**: 35–44.
- [3] Bayliss C D, Spies U, Shaw K, et al. A comparison of the sequence of segment A of four infectious bursal disease virus strains and identification of a variable region in VP2. *J Gen Virol*, 1990, **71**: 1303–1312.
- [4] Mundt E, Kollner B, Kretzschmar D. VP5 of infectious bursal disease virus is not essential for viral replication in cell culture. *J Virol*, 1997, **71**(7): 5647–5651.
- [5] Yao K, Goodwin M A, Vakharia V N. Generation of a mutant infectious bursal disease virus that does not cause bursal lesions. *J Virol*, 1998, **72**(4): 2647–2654.
- [6] Lombardo E, Maraver A, Espinosa I, et al. VP5, the nonstructural polypeptide of infectious bursal disease virus, accumulates within the host plasma membrane and induces cell lysis. *Virology*, 2000, **277**(2): 345–357.
- [7] Yao K, Vakharia V N. Induction of apoptosis in vitro by the 17-kD nonstructural protein of infectious bursal disease virus: possible role in viral pathogenesis. *Virology*, 2001, **285**(1): 50–58.
- [8] 马静云,曹永长,毕英佐. 传染性法氏囊病病毒 VP5 基因的克隆及表达. *中国预防兽学报*, 2002, **22**(6): 405–407.

## Cloning, expression and preparation of polyclonal antibody for IBDV non-structure protein gene

YU Lian\* LI Long LIU Yan ZHENG Jiang-tao WEI Yong-wei

(Zhejiang Provincial Key Laboratory of Preventive Veterinary Medicine, Institute of Preventive Veterinary Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

**Abstract**: Infectious bursal disease virus (IBDV) VP5 gene was amplified and cloned into an N-terminal GST-Tag fusion expression vector, pGEX-4T-2, which was controlled by T7 promoter. The sequencing result showed that the VP5 gene was composed of 438 base pairs, and coded 145 amino acids. High VP5 product was expressed in *E. coli* BL21 induced by IPTG, and the GST-VP5 fusion protein existed in inclusion. High titer anti-VP5 serum was also prepared in New Zealand rabbit immunized with purified fusion protein inclusion. These results gave a basis for further research for VP5 function in IBDV replication and pathogenicity, which also paved the way for developing VP5 gene deleted IBDV live vaccine.

**Key words**: Infectious bursal disease virus (IBDV), VP5 gene, Expression, Polyclonal antibody

Foundation items: Chinese National Programs for Science and Technology Development (2004BA757C); Key Project of Zhejiang Province (2003C22002)

\* Corresponding author. Tel/Fax: 86-571-86971894; E-mail: yulian@zju.edu.cn

Other author: XU Jian

Received date: 01-25-2005