

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
49 (12):1650-1654; 4 December 2009
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn

1 型鸭肝炎病毒 CL 株感染性分子克隆的构建

于可响, 马秀丽, 李玉峰, 吴静, 林树乾, 姜亦飞, 黄兵*

(山东省农业科学院家禽研究所, 山东省禽病诊断与免疫重点实验室, 济南 250023)

摘要: 【目的】构建 1 型鸭肝炎病毒 (DHV) 的感染性克隆, 用于研究其基因组的结构与功能。【方法】用 RT-PCR 方法扩增出覆盖整个 1 型鸭肝炎病毒 CL 株基因组 3 个忠实性片段, 并按顺序组装进载体 pBR322 中, 获得全长 cDNA 克隆 (BR-CL)。将 BR-CL 在体外转录出的 RNA 转染鸭胚肾细胞, 并传至第 6 代, 利用 RT-PCR 方法和间接免疫荧光试验进行鉴定。将获得的子代病毒 (CL-R) 在 SPF 鸡胚上传代, 观察鸡胚死亡及胚体病变情况。通过胶体金免疫电镜观察子代病毒粒子的形态。【结果】RT-PCR、间接免疫荧光和胶体金免疫电镜均检测到了子代病毒。通过感染 SPF 鸡胚试验发现, 子代病毒能致死鸡胚。【结论】本研究成功构建出具有感染性的 DHV 全长 cDNA 克隆, 这在国内外还是首次报道, 为进一步揭示 DHV 基因组的结构和功能提供了良好的技术平台。

关键词: 1 型鸭肝炎病毒; 全长 cDNA 克隆; 拯救病毒

中图分类号: S852.65 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2009) 12-1650-05

鸭病毒性肝炎 (Duck viral hepatitis) 又称鸭肝炎, 俗称“背脖病”。5 周龄以下的雏鸭对该病最易感, 1~3 周龄内感染雏鸭的死亡率最高, 可达 90% 以上, 治疗效果不佳, 严重影响我国养鸭业的发展。该病由鸭肝炎病毒 (DHV) 引起, 分为 3 个血清型, 在我国流行的主要是 1 型 DHV^[1-2]。在国外, 鸭病毒性肝炎的发病率较低, 未引起足够的重视, 因此关于这种病毒的研究, 特别是在分子生物学方面的研究起步较晚。直到 2006 年, 该病毒的全基因组序列才被 Kim 等首次报道^[1]。鸭肝炎病毒基因组约 7.7 kb, 因毒株的不同而有所差异, 但基因功能还不清楚, 只是根据其他小 RNA 病毒的特点, 人为地对其基因组结构进行了划分^[3-4]。

构建有感染性的全长 cDNA 克隆技术平台已成为研究 RNA 病毒的一条有效的途径。其具体方法是以病毒 RNA 为模板进行 RT-PCR, 得到全长的

cDNA 片段, 然后将其克隆到转录载体上, 体外转录出病毒 RNA, 再转染到敏感细胞而得到子代的病毒粒子。用这种逆向遗传的方法构建病毒全长 cDNA 克隆, 为在 DNA 水平上对 RNA 病毒进行研究和操作提供了极为方便的工具^[5-6]。

为了利用反向遗传技术更好地研究 DHV 的基因组功能, 本研究构建了 DHV 全长 cDNA 克隆, 并将体外转录得到的 RNA 转染鸭胚肾细胞, 成功拯救出病毒, 为更好地研究该病毒基因组结构和功能以及防控该病奠定良好的基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 毒株、鸡胚与鸭胚: 1 型鸭肝炎病毒 CL 株及其单因子血清、大肠杆菌 DH10B 由山东省禽病诊断与免疫重点实验室分离、制备与保存; SPF 鸡胚由山

基金项目: 山东省自然科学基金 (Y2008D55)

* 通信作者。Tel: +86-531-85990248; E-mail: kbbind@163.com

作者简介: 于可响 (1979-) 男, 山东青岛人, 硕士, 主要从事家禽分子生物学和免疫学研究。E-mail: ykx1979@163.com

收稿日期: 2009-06-23; 修回日期: 2009-09-13

东省农业科学院家禽研究所昊泰实验动物中心提供; 非免疫鸭胚由山东临清种鸭场提供。

1.1.2 主要试剂和仪器: LipofectamineTM2000 购自 Invitrogen 公司; AMV Reverse Transcriptase、RNasin、dNTP 购自 Promega 公司; RNAiso Reagent、LA-Taq、pMD18-T 载体试剂盒、限制性内切酶、T7 RNA Polymerase、DNA Marker 购自大连宝生物工程(大连)公司; DNA 凝胶回收试剂盒、质粒小量抽提试剂盒、胰酶购自上海生工生物工程公司; DMEM 购自 GIBCO 公司; 谷胺酰胺为 Sigma 公司产品; 新生牛血

清为杭州四季青生物工程有限公司产品; 羊抗鸡二抗、FITC 标记的羊抗鸡二抗均购自 LifeHolder 公司。高速冷冻离心机、PCR 仪为 Eppendorf 公司产品; 倒置荧光显微镜为 Nikon 公司产品; 电子显微镜为 JEOL 公司产品。

1.2 引物设计与合成

根据 DHV CL 株的序列和酶切位点, 将 CL 株全基因组分为互相重叠的 A、B、C 三个片段进行扩增, 共设计了 7 条引物(表 1), 由上海生工生物工程有 限公司合成。

表 1 扩增鸭肝炎病毒基因组的引物

Table 1 Primers for amplification of overlapping segments of DHV genome by RT-PCR

Primer	Nucleotide sequence (5'→3')	Position
A1	TTC GACGTC <u>TAATACGACTCACTATAG</u> TTTGAAAGCGGGTGCATGCATGG'	- 27—23
	<i>Aat</i> II T7 promoter 5'UTR	
A2	CAT GCTAGC CAACAACCTAAGATAGGTCCTCG	2875—2904
	<i>Nhe</i> I	
B1	TTTTGCCTTAGGCTCAAACACTAGC	2769—2794
B2	GCT GCTAGC TGCCTAACCTGCAACTCACTC	5045—5074
	<i>Nhe</i> I	
C1	GTGGCAACAGCCATGAGAGATGG	4923—4945
C2 (anchor primer)	CTGATCTAG GCTAGC ACGCGTC	
	<i>Nhe</i> I <i>Mlu</i> I	
CR (reverse transcription primer)	<u>CTGATCTAGGCTAGCACGCGTC</u> (T) ₂₃	7691—
	C2 3'UTR	

The bold letters represent restriction enzyme sites introduced. The sequence underlined represents T7 promoter sequence.

1.3 RT-PCR 扩增基因片段

按照 RNAiso Reagent 试剂说明提取病毒 RNA, 加入适量无 RNA 酶的双蒸水溶解。利用 AMV Reverse Transcriptase 分别反转录出 A、B、C3 个片段的第一链 cDNA, 然后利用 LA-Taq 对这 3 个片段进行扩增(片段 C 先用 CR 作反转录, 然后用 C1 和 C2 作 PCR)。PCR 反应条件为: 95℃ 预变性 3 min, 94℃ 1 min, 54℃ 1 min, 72℃ 2.5 min, 30 个循环; 72℃ 10 min。反应产物在 1% 琼脂糖中电泳进行检验。

1.4 连接、鉴定与测序

按照 DNA 凝胶回收试剂盒说明回收 PCR 产物, 按照 pMD18-T 载体试剂盒说明进行连接, 转化 DH10B 挑菌提取质粒, 分别进行 PCR 和酶切鉴定, 鉴定为阳性的菌落送上海生工生物有限公司进行测序。

1.5 全长 cDNA 的构建与测序

以 *Aat* II 和 *Nhe* I 为克隆位点, 将测序正确的 A、B、C 片段按顺序依次连入 pBR322 载体中, 同时在 3' 端设计一个线性化位点 *Mlu* I, 经鉴定正确后, 命名为 BR-CL, 送上海生工生物有限公司进行测序。

1.6 体外转录与转染鸭胚肾细胞

用 *Mlu* I 将 BR-CL 酶切线性化, 纯化后按照 T7 RNA Polymerase 说明在体外转录出 RNA, 经酚/氯仿抽提、无水乙醇沉淀后, 加适量无 RNA 酶的双蒸水溶解, 使其浓度达到 200 ng/μL。按照 Lipofectamine2000 使用要求把 RNA 转染到培养于 24 孔细胞板的鸭胚肾细胞中, 要求 RNA 的含量达到 1 μg/孔。转染后培养 72 h, 收获细胞, 反复冻融 3 次后接种鸭胚肾细胞传代, 直至第 6 代, 收获细胞, 命名为 CL-R。

1.7 RT-PCR 方法鉴定

根据 CL 株序列设计一对检测引物, 上游引物序列为 5'-AGCACAACTCGTCCAA-3', 下游引物序列为 5'-CAACAAGGCGTCTCTAT-3', 扩增片段大小为 465 bp, 由上海生工生物有限公司合成。按照 1.3 中列出的方法对 CL-R 进行检测。

1.8 子代病毒接种 SPF 鸡胚

为排除转染用 RNA 的干扰与确定子代病毒对 SPF 鸡胚的致病力, 将 CL-R 接种 10 日龄 SPF 鸡胚进行传代, 观察鸡胚病变及死亡情况。收集第 5 代

的尿囊液,测定其鸡胚半数致死量(ELD₅₀),并利用 RT-PCR 方法进行检测。

1.9 间接免疫荧光试验鉴定

将 CL-R 接种培养于 24 孔细胞板的鸭胚肾细胞,72 h 后吸去培养液,用冰浴无水乙醇固定 5 min, PBS (pH7.2) 洗涤 3 次后加入 10% 胎牛血清 37℃ 封闭 30 min, PBS 洗涤 3 次。加入 1:50 稀释的 CL 株单因子鸡血清 37℃ 湿盒中作用 1 h, PBS 洗涤 3 次。最后加入 1:100 稀释的 FITC 标记的羊抗鸡二抗 37℃ 湿盒中作用 1 h, PBS 洗涤 3 次后甘油封孔,镜检。

1.10 电镜观察

收集在鸭胚肾细胞培养 72 h 的 CL-R, 反复冻融 3 次, 10000 rpm 离心 20 min, 取上清浓缩 500 倍, 然后 10000 r/min 离心 20 min, 取上清按文献 [7] 方法进行胶体金免疫电镜观察。

2 结果

2.1 材料和方法

利用设计的引物成功扩增出 A、B、C3 个片段, 测序结果显示, 与 GenBank 发表的 CL 株 (EF427899) 仅有个别碱基差别, 无碱基缺失。将这 3 个片段依次插入 pBR322 载体, 每连接一个片段, 经 PCR 和酶切鉴定均符合预期。最后将鉴定正确的全长 cDNA 克隆质粒 BR-CL 送去测序, 测序结果表明, 在连接、转化过程中, A、B、C3 个片段均未发生突变, 与 CL 株序列同源性达 99.6%, 与 R85952 (DQ226541) 和 DRL-62 (DQ219396) 序列同源性都在 97% 以上, T7 启动子和 *Mlu* I 线性化位点均成功引入。

2.2 RT-PCR 方法鉴定

全长 cDNA 克隆体外转录出的 RNA 转染鸭胚肾细胞, 传至第 6 代时, 细胞病变并不明显, 收集细胞, 冻融 3 次后提取 RNA, 利用检测引物进行 RT-PCR 检测, 结果能扩增出与预期大小 (465 bp) 一致的片段 (图 1)。

2.3 CL-R 接种 SPF 鸡胚

为了排除转染用 RNA 对 2.2 中 RT-PCR 鉴定结果的干扰, 将 CL-R 接种 10 日龄 SPF 鸡胚 96 h 后鸡胚未死, 收集尿囊液传代, 第 2 代鸡胚肝脏边缘出现坏死病变, 但鸡胚不死亡, 从第 3 代起鸡胚开始出现死亡, 第 5 代次尿囊液的 ELD₅₀ 为 10^{4.7}, 低于母本毒 (10^{5.3})。利用检测引物能从尿囊液中扩增出预期大小 (465 bp) 的片段 (图 2)。

2.4 间接免疫荧光试验鉴定

利用 CL 株单因子血清和 FITC 标记的羊抗鸡二

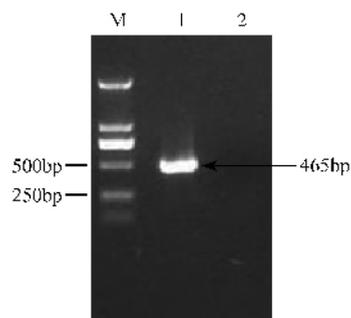


Fig.1 RT-PCR 方法检测 CL-R 细胞毒

Fig.1 The RT-PCR result of detecting CL-R from cells. M. DL2000 DNA Marker; 1. CL-R 2. Negative control.

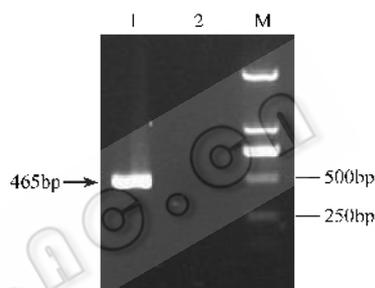


Fig.2 RT-PCR 方法检测 CL-R 鸡胚毒

Fig.2 The RT-PCR result of detecting CL-R from SPF chick embryos. 1. CL-R 2. Negative control M. DL2000 DNA Marker.

抗对 CL-R 接种 72 h 的鸭胚肾细胞进行间接免疫荧光试验, 结果显示, CL-R 接种细胞出现明显的荧光, 而阴性对照组没有荧光 (图 3)。

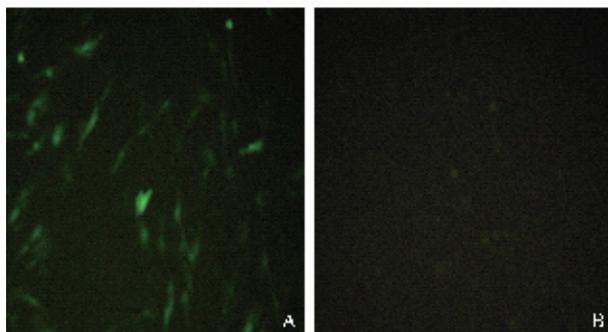


Fig.3 CL-R 的间接免疫荧光反应

Fig.3 The indirect immunofluorescence assay of CL-R. A. Duck embryo renal cells inoculated with CL-R; B. Negative control of duck embryo renal cells.

2.5 电镜观察

浓缩 500 倍的 CL-R 与 CL 株单因子血清结合后, 在胶体金标记的羊抗鸡二抗的作用下, 经负染, 在电镜下可观察到大小约 20 nm ~ 30 nm 的球形病毒颗粒 (图 4)。

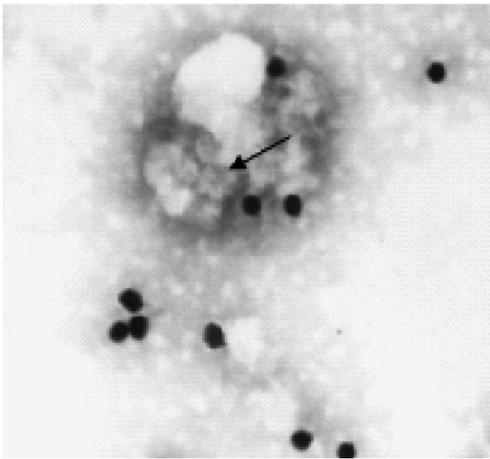


图 4 电镜下的 CL-R (100000 ×)

Fig. 4 CL-R under electron microscope (100000 ×).

3 讨论

本研究以国内 1 型 DHV 分离株 CL 为母本毒, 构建了全长 cDNA 克隆, 通过在基因组的 5 端引入 T7 启动子, 控制 cDNA 克隆在体外转录, 将得到的 RNA 转染鸭胚肾细胞, 成功获得子代病毒。

获得真实性好全长 cDNA 克隆是得到具有感染性 RNA 的前提, 也是整个实验最关键的步骤, 因为任何位置的碱基缺失或关键部位的碱基突变都有可能影响转录出的 RNA 无感染性^[8]。为了保证全长 cDNA 克隆的真实性, 首先, 考虑到 RNA 病毒的基因组具有稳定性差、二级结构丰富、反转录出的模板完整性较差^[9]等不易操作的特点, 为保证扩增片段的保真性, 我们采用重叠 PCR、高保真性酶、RACE 技术等策略, 每一个扩增出的片段要进行测序, 有碱基缺失或重要部位发生突变的片段要重新扩增; 其次, 在连接载体和宿主菌的选择上我们也十分谨慎。构建全长 cDNA 克隆前, 考虑到载体拷贝数、容量及基因组和载体上的酶切位点等多方面因素, 我们最终选择以 pBR322 为连接载体。pBR322 是一种常用的克隆载体, 具有拷贝数较低 (15 - 20 个)、容量较大、稳定性较好等特点^[10], 完全可以容纳 DHV 约 7700 bp 大小的基因组并保证其稳定复制。大肠杆菌 DH10B 具有错配修复功能, 可以尽量降低载体复制过程中发生突变的几率, 3 个基因片段在连入载体的过程中未发生碱基突变说明了该菌株的稳定性。通过以上措施, 我们最终构建的全长 cDNA 克隆 BR-CL 与 GenBank 发表的 CL 株序列同源性为 99.6%, 考虑到用于构建 cDNA 克隆和发表于

Genbank 的 CL 株为不同代次, 可能存在一些碱基差异, 因此并未对其进行碱基突变修饰。

全长 cDNA 克隆体外转录出的 RNA 转染鸭胚肾细胞, 传至第 6 代时仍然未出现明显的细胞病变, 而 RT-PCR、间接免疫荧光试验的结果都为阳性, 并通过电镜观察到了病毒粒子, 这并不能说明获得的子代病毒比母本毒的感染力差, 因为同时进行的阳性对照也未出现细胞病变。为了进一步证明子代病毒的感染性, 将 CL-R 接种 SPF 鸡胚传代, 结果发现, 第 2 代时鸡胚肝脏开始出现病变, 从第 3 代起鸡胚出现死亡, 第 5 代的 ELD₅₀ 可达 10^{4.7}, 可见子代病毒对鸡胚的致病力依然较强, 这对以后通过对基因组的改造来研究基因与致病力的关系、获得基因改造致弱毒株等方面打下了良好的基础。

本研究成功地由 DHV 全长 cDNA 克隆获得子代病毒, 这是国内外首次关于 DHV 拯救成功的报道, 为进一步研究 DHV 基因组的结构与功能提供了一条有效的途径。

参考文献

- [1] Saif YM. 禽病学. 苏敬良, 高福, 索勋, 主译. 第 11 版. 北京: 中国农业出版社, 2005: 376 - 384.
- [2] Sandhu TS, Calnek BW, Zeman L. Pathologic and serologic characterization of a variant of duck hepatitis type I virus. *Avian Disease*, 1992, 36 (4): 932 - 936.
- [3] Kim MC, Kwon YK, Joh SJ, et al. Molecular analysis of duck hepatitis virus type 1 reveals a novel lineage close to the genus Parechovirus in the family Picornaviridae. *Journal of General Virology*, 2006, 87: 3307 - 3316.
- [4] Ding CY, Zhang DB. Molecular analysis of duck hepatitis virus type 1. *Virology*, 2007, 361 (1): 9 - 17.
- [5] Yoshiyuki Nagai, Atsushi Kato. Paramyxovirus reverse genetics is coming of age. *Microbiol Immunol*, 1999, 43 (7): 613 - 624.
- [6] 刘玉良, 刘秀梵. RNA 病毒“拯救”技术. 中国生物工程杂志 (*China Biotechnology*) 2003, 23 (9): 21 - 25.
- [7] 殷震, 刘景华, 主编. 动物病毒学. 第二版. 北京: 科学出版社, 1997: 278 - 282.
- [8] Boyer JC, Haenni AL. Infectious transcripts and cDNA clones of RNA viruses. *Virology*, 1994, 198 (2): 415 - 426.
- [9] Stein SB, Zhang L, Roos RP. Influence of Theilermurine encephalomyelitis virus 5' untranslated region on translation and neurovirulence. *Virology*, 1992, 166 (7): 4508 - 4517.
- [10] Sambrook J, Russell DW. 分子克隆实验指南. 黄培堂, 等译. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002: 121 - 122.

Construction of infectious molecular clone of duck hepatitis virus type 1 CL strain

Kexiang Yu, Xiuli Ma, Yufeng Li, Jing Wu, Shuqian Lin, Yifei Jiang, Bing Huang*

(Institute of Poultry, Shandong Academy of Agricultural Sciences; Key Laboratory of Poultry Disease Diagnose and Immune of Shandong Province, Jinan 250023, China)

Abstract: [Objective] To construct an infectious clone for studying functions of duck hepatitis virus (DHV) type1 genome by reverse genetic technique. [Methods] Three fidelity DNA fragments covering the full genome of DHV type1 CL strain were amplified by RT-PCR, and inserted into pBR322 vector, resulting in the full-length cDNA clone BR-CL. The in vitro-transcribed RNA from BR-CL was transfected into duck embryo renal cells and the rescued virus was identified using RT-PCR, indirect immunofluorescence assay and colloidal gold immunoelectron microscopy after six generations. After inoculating the rescued virus into SPF chick embryos, embryo death and pathological changes were observed. [Results] The results of RT-PCR, indirect immunofluorescence assay and immunoelectron microscope showed that infectious virus was rescued. After inoculating into SPF chick embryos, the rescued virus was able to kill embryos with pathogenic changes. [Conclusion] This is the first report on generation of infectious cDNA clone of DHV, which provides a valuable platform for further research on functions of DHV genome.

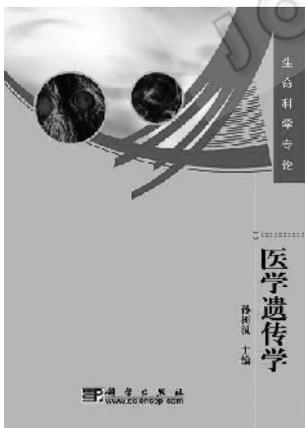
Keywords: Duck hepatitis virus type1; full-length cDNA clone; rescued virus

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Natural Science Foundation of Shandong Province (Y2008D55)

* Corresponding author. Tel: +86-531-85990248, E-mail: hbind@163.com

Received 23 June 2009/Revised 13 September 2009



科学出版社新书推介 (2009 - 10)

医学遗传学 (生命科学专论)

孙树汉 主编

978-7-0-025768-0 ¥ 60.00 2009年9月出版

内容简介: 本书提炼了当前医学遗传学教学内容的精华,同时引入了医学遗传学理论和相关研究的最新进展。书中染色体病、单基因病、多基因遗传、线粒体遗传及免疫遗传等章节在保留基本原理要点的同时,力求做到深入浅出,从新的角度启发读者认识医学遗传学的基本问题;表观遗传学、疾病相关基因克隆策略及连锁、关联分析等章节注重对前沿领域的介绍;而遗传学理论在医学上的应用是本书意图强化的内容要点,这在临床遗传学和各种遗传病的介绍中都有体现。

本书主要用作医学院校各专业本科生教材,也可供生命科学研究人员或临床医生参考。

欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)

邮购地址: 北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编: 100717

联系人: 周文宇 李韶文 联系电话: 010-64031535, 64000849

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目