

## 用 PCR 扩增和克隆鸡传染性贫血病毒全基因组 DNA

陈为民 崔治中 段玉友 刘岳龙

(扬州大学畜牧兽医学院动医系, 扬州 225009)

585265

5858.315.3

**摘要** 根据已发表的序列, 分别在鸡贫血病毒(CAV)环形基因组 DNA(全长 2.3 kb)的 EcoRI 位点和 BamHI 位点的两侧选择适当序列合成两对引物, 用 PCR 技术, 从斑点杂交检测到病毒核酸的 CAV 感染的 MDCC-RP1 细胞基因组 DNA 中, 分别扩增出包含 EcoRI 和 BamHI 分割开的病毒基因组两部分(1.5 kb 和 0.8 kb)约 1.5 kb 和约 1.25 kb 的两个片段。再将其中相应序列拼接克隆进 pUC18 载体, 获得包含 CAV 全基因组序列 DNA 片段的克隆质粒 pCAV2.4。酶切分析表明, 该质粒具有预期的 BamHI 位点、PstI 位点、HindIII 位点, 而预期的 EcoRI 位点消失。重组质粒插入 DNA 片段的两端序列分析表明, 质粒 pCAV2.4 是包含 CAV 全基因组序列的重组质粒, 插入 DNA 片段序列中的 EcoRI 位点序列发生了一个碱基突变。

**关键词** 鸡传染性贫血病毒, 基因组 DNA, 聚合酶链式反应, 克隆 PCR

自 Yuasa 等<sup>[1]</sup>报道鸡贫血病毒(CAV)以来, 世界各地均陆续证明了该病毒感染的普遍性。CAV 属于一个新的病毒科——圆环病毒科<sup>[2]</sup>。这是一种无囊膜的呈二十面体的小病毒, 直径只有 20 nm 左右。CAV 的基因组是一条只有 2.3 kb 的单股环状“-”链 DNA<sup>[3]</sup>, 只产生一个转录子, 可编码三个蛋白质, 即衣壳蛋白 VP1 及其相关蛋白 VP2、细胞凋亡因子 VP3<sup>[4]</sup>。CAV 的致病性在于通过 CAV 编码产生的细胞凋亡因子造成的细胞程序性死亡<sup>[5]</sup>, 主要是造血细胞和淋巴细胞的程序性死亡, 进而造成感染鸡的贫血, 出血及免疫抑制。在野外, 感染 CAV 几乎不引起典型的临床症状, 但由于 CAV 的免疫抑制作用, CAV 感染群易并发或继发其它疾病, 以及常引起疫苗免疫失败等情况。CAV 的亚临床感染严重影响着养禽业的经济效益<sup>[6]</sup>, 然而至今仍没有理想的预防 CAV 感染的方法。国外将 CAV 基因组双拷贝串连在一起克隆进载体质粒后, 所得到的重组质粒 DNA 转染 MDCC-MSB1 细胞后可产生传染性的 CAV<sup>[7]</sup>。这就有可能用基因工程的方法构建出能在体内复制的无致病性 CAV 毒株。为了尝试构建这样的毒株用作疫苗株, 本研究用 PCR 技术成功地扩增和克隆了鸡贫血病毒全基因组 DNA。

## 1 材料与方 法

## 1.1 材料

- 1.1.1 引物 引物 1: 5'CATGATGAATTCCGAGTGGTTACTA3'  
引物 2: 5'CATGATGGATCCCTCATTTCTTAGTG3'  
引物 3: 5'CATGATCGCCAAGATCTCTGTGAACC'. G3'

引物 4:5'CATGATGCATGCGAGCGAAGTCGAGCGATTTCGTCCA3'

引物 1 和引物 2 分别对应于 Noterborn 等<sup>[10]</sup>发表的 CAV 环形基因组 DNA 序列的 1~19 及互补链的 1512~1494 序列,用于扩增 CAV 环形基因组 1~1512 间 1512 bp DNA 片段。两引物 5'端分别具有 EcoRI、BamHI 酶切位点序列。

引物 3 和引物 4 分别对应于 Noterborn 等<sup>[10]</sup>发表的环形基因组 DNA 序列的 1158~1179 及互补链的 82~58 序列,用于扩增 CAV 环形基因组 1158~82 间的 DNA 片段。引物 4 的 5'端人为添加有 SphI 酶切位点序列。

#### 1.1.2 细胞及病毒

MDCC-RP1 细胞系,由本教研室提供;CAVCux-1 株,由中国兽医监察所惠赠。

#### 1.1.3 菌株及质粒

大肠杆菌 TG1 用作质粒转化的受体菌,pUC18 质粒用作克隆的载体。二者皆由本教研室保存提供。

#### 1.1.4 分子生物学试剂

Dig DNA labeling and Detection Kit、PCR Kit、连接酶及各种限制性内切酶等均购自商业化公司,CAV VP1 基因质粒<sup>[9]</sup>由本教研室提供。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 CAV 感染 MDCC-RP1 基因组 DNA 的制备

以含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液培养 MDCC-RP1,CAV Cux-1 株感染后,每 48 h 自传一次,分别收集第 7、14、19、26 代细胞和未接种病毒的 RP1 细胞,按常规<sup>[7,8]</sup>提取细胞基因组 DNA。

#### 1.2.2 斑点杂交比较 CAV 感染的 MDCC-RP1 各代细胞中的病毒核酸的水平

对提取的各代细胞基因组 DNA 浓度定量后,以一系列已知浓度梯度的 CAV VP1 基因克隆 DNA 作为参考,用狄高辛标记的 CAV VP1 基因作为探针。在斑点杂交中检测和比较 CAV 感染后各代细胞中的 CAV DNA 水平。

#### 1.2.3 PCR 扩增

引物 1 和引物 2,引物 3 和引物 4 组成两对上下游引物,分别用于扩增包含 CAV 环形基因组 EcoRI 和 BamHI 分割开两部分的两 DNA 片段,1.5 kb 及 1.25 kb 片段。其 PCR 扩增步骤基本一致,即:100  $\mu$ L 反应体积中,模板 DNA 46 ng,引物浓度各为 2.5  $\mu$ mol/L,4 种 dNTP 浓度为 200  $\mu$ mol/L,10 $\times$  buffer 组成为 100 mmol/L Tris(pH8.3),500 mmol/L KCL,15 mmol/L MgCl<sub>2</sub>。反应混合液 98  $^{\circ}$ C 变性 10 min,在室温下退火的同时迅速加入 1  $\mu$ L Taq DNA 聚合酶,覆盖液体石蜡油 100  $\mu$ L,离心数秒,进入 PCR 循环:94  $^{\circ}$ C 60s-55  $^{\circ}$ C 60s-72  $^{\circ}$ C 180s,共 30 个循环,最后一个循环后 72  $^{\circ}$ C 再延伸 10 min。取 PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳,以  $\lambda$ DNA/HindIII 消化物为标记物,观察扩增片段长度。

#### 1.2.4 1.5kb PCR 产物的克隆及重组质粒的酶切分析

将已纯化的 1.5 kb PCR 产物与载体 pUC18 分别用 EcoRI、BamHI 双酶消化,低熔点琼脂糖电泳回收后,按常规<sup>[8]</sup>连接、回收。挑取若干单个白斑,进行质粒扩增、提纯,以 EcoRI、BamHI 双酶切筛选出重组克隆。对重组质粒分别用 EcoRI + BamHI、HindIII、PstI 等内切酶进行酶切,验证插入片段内部酶切位点是否符合预期的结果。

#### 1.2.5 两 PCR 扩增片段相应部分的拼接克隆及重组质粒的酶切分析

将已纯化的 1.25 kb PCR 产物与获得的 1.5 kb PCR 产物的重组质粒分别用 BamHI、SphI 酶消化后,低熔点琼脂糖电泳后,分别回收 0.9 kb、4.2 kb 大小的片段,按常规<sup>[8]</sup>连接转化。挑取若干单个白斑,分别进行质粒扩增、提取,酶切分析,筛选出包含 2.4 kb 插入片段的重组质粒。对筛选到的重组质粒进一步用 EcoRI、BamHI、PstI 酶切分析。

#### 1.2.6 包含 CAV 全基因组的重组质粒中插入片段的两段序列分析

采用双脱氧法。整个测序过程由中国科学院上海植物生理所完成。

## 2 结果

### 2.1 斑点杂交比较 CAV 感染后的各代细胞中 CAV DNA 水平

以 CAV 的 VP1-pUC18 狄高辛标记探针检测 CAV 感染 MDCC-RP1 后各代细胞基因组中 CAV DNA 水平, 结果表明: 自传 7 代的细胞中 CAV DNA 水平最高, 杂交反应呈阳性, 而自传 14 代, 19 代, 26 代以及未感染 CAV 的 RP1 细胞基因组 DNA 杂交反应呈阴性。以一系列已知含量的 VP1-pUC18 克隆 DNA 阳性样品对照作参考, 表明探针的灵敏度可达 1~10 pg, 估计自传 7 代的细胞基因组 DNA 每 4  $\mu$ g 约含 50~100 pg 左右的 CAV DNA(图 1)。



图 1 斑点杂交检测 CAV 感染的 MDCC-RP1 各代细胞中 CAV 核酸

Fig. 1 Detection of viral DNA in MDCC-RP1 cells infected with CAV by dot blot hybridization

B5, B6, A1, A2: 4  $\mu$ g genomic DNA of infected cells respectively in 7th, 14th, 19th, 26th passage; A3: 4  $\mu$ g genomic DNA of RP1 cells; A4 - A6: 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg VP1-pUC18 DNA

### 2.2 两对引物的 PCR 产物电泳结果

PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳显示: 以 CAV 感染 RP1 后自传第 7 代细胞基因组 DNA 为模板, 引物 1 和引物 2 扩增出约 1.5 kb 的条带, 与预期长度 1 512 bp 一致; 引物 3 和引物 4 扩增出约 1.25 kb 的条带, 与预期长度 1 243 bp 或 1 222 bp 一致。

### 2.3 CAV 基因组 1.5 kb 片段重组质粒的酶切分析

随意挑取 9 个白色菌落, 经质粒扩增、提取及 EcoRI + BamHI 双酶消化, 发现 9 个质粒均重组有 1.5 kb DNA 片段, 将此重组质粒命名为 pCAV1.5-01~09。对重组质粒 pCAV1.5-01 进一步酶切分析, EcoRI 单酶切产生的片段为 4.2 kb, EcoRI + BamHI 双酶消化产生的两个片段为 2.7 kb、1.5 kb, PstI 单酶切产生的两个片段为 3.3 kb、0.9 kb, HindIII 单酶切产生的两个片段为 3.5 kb、0.7 kb(图 2)。这与由已发表的 Cux-1 株 CAV 基因组序列所推测的结果一致。

### 2.4 包含 CAV 全基因组序列的重组质粒的酶切分析

重组质粒 pCAV1.5-01 在插入 CAV 基因组 1.5 kb 片段和 CAV 1.25 kb PCR 产物 BamHI + SphI 双酶切回收的 0.9 kb 大片段拼接而成的 2.4 kb 的大片段, 包含了 CAV 全基因组序列, 且比 CAV 基因组多了一段重复的序列, 即 Meehan 等序列<sup>[7]</sup>的 1-82 bp 段。随意挑取了 10 个白色菌落, 经扩增、小规模提取质粒, 以 EcoRI 酶切, 结果所有质粒都产生了 5.1 kb 大小一条带, 初步确定该 10 个质粒都是包含了 CAV 2.4 kb 插入片段的重组质粒, 将这 10 个质粒分别命名为 pCAV2.4-01~10。取重组质粒 pCAV2.4-01 进一步酶切分析, HindIII 单酶切产生了三个片段大小分别为约 1.5 kb、1.0 kb、0.6 kb, BamHI 单酶切产生的片段为 5.1 kb, EcoRI 产生的片段为 5.1 kb(图 3)。HindIII、BamHI 酶切结果与已发表的 CUX-1 株 CAV 基因组序

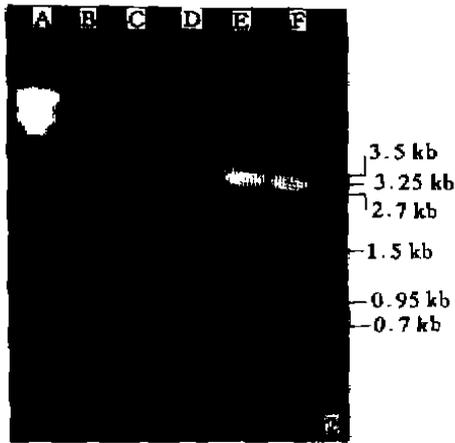


图 2 pCAV1.5-01 的酶切分析

Fig.2 Electrophoresis of pCAV1.5-01 digested with restriction enzymes

- A. Marker  $\lambda$ DNA/EcoRI + HindIII;
- B. pUC18 digested with EcoRI;
- C. pUC18 digested with BamHI;
- D. Digested with EcoRI/BamHI;
- E. Digested with HindIII;
- F. Digested with PstI

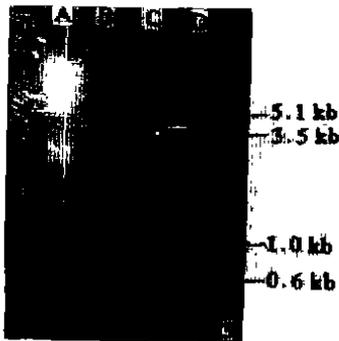


图 3 pCAV2.4-01 的酶切电泳结果

Fig.3 Electrophoresis of pCAV2.4-01 digested with restriction enzymes

- A. Marker  $\lambda$ DNA/HindIII;
- B. Digested with EcoRI;
- C. Digested with BamHI;
- D. Digested with HindIII.

列中酶切位点相符,而 EcoRI 酶切结果与产生大小为 2.8 kb、2.3 kb 两片段的预期推测不符,但 EcoRI 酶切产生的一条带大小为 5.1 kb,恰是 2.8 kb、2.3 kb 两片段大小之和,由此推测发表的 CAV 基因组 DNA 中的 EcoRI 位点,在该克隆中已消失了,可能发生了碱基的突变。构建的重组质粒位点见图 4。

### 2.5 包含 CAV 全基因组的克隆 DNA 的两端序列分析

包含 CAV 全基因组的重组质粒 pCAV2.4-01 的插入片段的两端 DNA 序列如图 5A、5B。pCAV2.4-01 EcoRI 克隆位点即 5'端碱基序列如图 5A。pCAV24-01 SphI 克隆位点端即 3'端碱基序列如图 5B。

比较所测序列与已发表的 Cux-1 株 CAV 环形基因组 DNA 序列<sup>[7]</sup>,具有高度一致性。稍有不同的是二者共有 13 处碱基差异,其中 6 个碱基差异发生在 CAV 衣壳蛋白 VP1 基因阅读框架内,但都没有引起相应位置氨基酸的改变。位于 CAV 环形基因组中的非编码区的 EcoRI 位点在克隆 DNA 中确实发生了突变,由 GAATTC 变为 GCATTC(图 6A 中 377-382),这与 pCAV2.4 质粒 EcoRI 酶切分析结果相符,证实了该位点已突变的推测,所测的两端重复区序列也完全一致。总之,这些都证实我们克隆到了包含 CAV 全基因组序列的 DNA 片段。

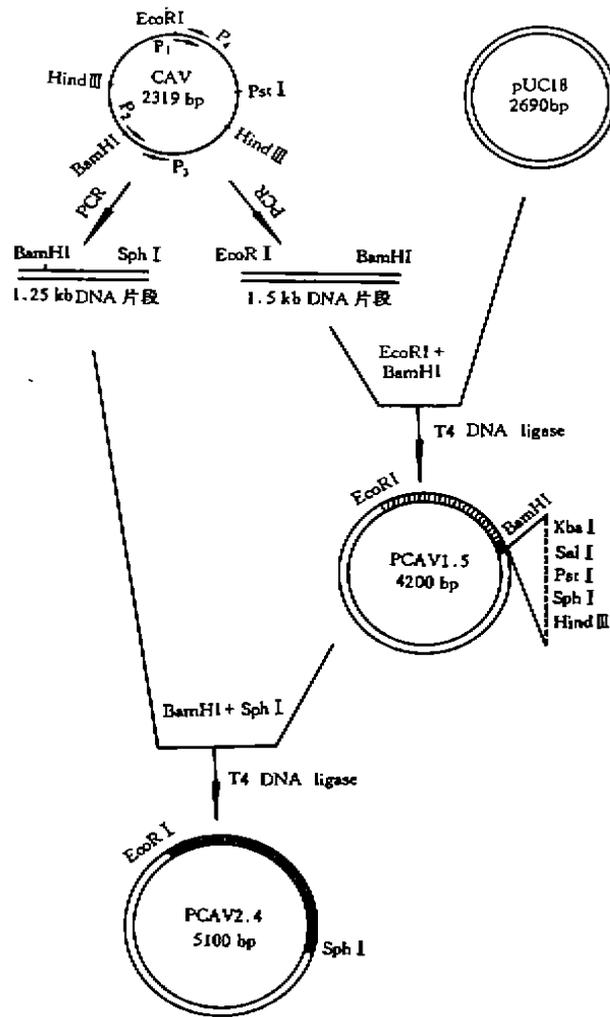


图 4 CAV 全基因组克隆的构建过程

Fig. 4 Construction of recombinant plasmid containing CAV genome

10	20	30	40	50	60
GAATCCGAG	TGGTTACTAT	TCCATCACCA	TTCTAGCATC	TACACAGAAA	GTCAAGATGG
70	80	90	100	110	120
ACGAATCGCT	CGACTTCGCT	CGCGATTCGT	CGAAGGCGGG	GGGG.....	.....

图 5A pCAV2.4-01 近 EcoRI 克隆位点序列

Fig. 5A The partial sequence down away the EcoRI site in pCAV2.4-01

### 3 讨论

CAV 的基因组是一条只有 2.3 kb 的单股环状负链 DNA,但是在易感细胞,如 MDCC-

```

      10          20          30          40          50          60
CACCGACAGC TACATGTCAG CACCCGCATC AGAGCTGGAC ACGAATTTCT TTACGCTTTA
      70          80          90          100         110         120
CGTAGCGCAA GGCACAAATA AGTCGCAGCA GTACAAGTTC GGCACAGCTA CATAACGCGCT
      130         140         150         160         170         180
AAAGGAACCG GTAATGAAGA GCGATGCATG GGCAGTGGTA CGCGTCCAGT CGGTCTGGCA
      190         200         210         220         230         240
ACTGGGTAAC CGGCAGAGGC CATAACCATG GGACGTCAAC TGGGCCAA(A GCACCATGTA
      250         260         270         280         290         300
CTGGGGGACG CAGCCCTGAA AAGGGGGGGG GGCTAAAGCC CCCCCCCTT GAACCCCCC
      310         320         330         340         350         360
CTGGGGGGG + TTCCCCCCA GACCCCCCTT TTAAATAGCA CTCAATAAAC GCAGCAAATG
      370         380         390         400         410         420
GCTTTATCGC ACAATCGCAT TCCGAGTGGT TACTATTCCA TCACCATTCT AGCATGTACA
      430         440         450         460         470         480
CACAAAGTCA AGATGGACGA ATCGCTCGAC TTCGC.....

```

图 5B pCAV2.4-01 近 SphI 克隆位点序列

Fig. 5B The partial sequence up away the SphI site in pCAV2.4-01

MSB1 内亦存在着复制型的线状或环状的双股 DNA 结构,加之 CAV 基因组中含 EcoRI、BamHI、PstI、HindIII 酶切位点,国外已从 CAV 感染细胞中克隆出复制型的 CAV 全基因组。由于我们没有 CAV 易感细胞,但具有与 CAV 易感细胞 MSB1 相类似的另一类马立克氏病病毒转化 T 淋巴瘤细胞系 RP1,因此,尝试用 RP1 细胞来增殖复制 CAV 病毒,然后以斑点杂交来检测 CAV 感染的 RP1 细胞各代中的病毒核酶水平,结果表明 CAV 感染的 RP1 能够不断传代下去,直至 26 代细胞并没有出现程序性死亡或病变,用灵敏度达 1~10 pg 的探针在斑点杂交中检测到 7 代细胞中的 CAV DNA,据估算约 4 μg 基因组 DNA 中含 50~100 pg。为了克隆 CAV 全基因组,采取了 PCR 扩增的策略。曾设计了一对反向引物来扩增 CAV 全基因组,但未能成功。又采取分步 PCR 扩增覆盖了整个基因组全部序列的两段 DNA,再将相应部分拼接克隆的策略。为了拼接克隆的方便,在引物 4 的 5' 末端人为添加了一个 SphI 位点序列,使容易拼接。这样拼接克隆到的片段包含了 CAV 全基因组序列,但比 CAV 全基因组序列多了一段 82 bp 序列,通过 EcoRI 酶切,能够获得完整的 CAV 全基因组的 DNA 片段。

酶切分析和序列分析结果表明,我们已经克隆到包含 CAV 全基因组序列的 DNA 片段。但序列分析结果与已发表序列比较,还有少数碱基差异,所测的 455 个碱基序列中,共有 13 个碱基变动,包括 EcoRI 位点中 GAATTC→GACTTC。虽然不能排除少数碱基是由 PCR 过程中的突变造成的,但我们认为多数碱基差异是毒株长期传代突变的结果。因为所测序列 13 个碱基差异中有 6 个发生在 VP1 基因阅读框架内,但都没有引起相应位置氨基酸的改变。这与 PCR 随机突变不符。而发生在 CAV 基因组非编码区中的 7 个碱基差异,除富含 AT 的调控序列 CACTAT→CACAAT 外,其它 6 个碱基差异都没有发生在目前已知的较为保守的调控序列中。两篇外国文献<sup>[7,10]</sup>所报道的 CuX-1 株 CAV 的基因组序列有很大差异就是毒株自然突变的一个佐证。

本研究获得了 CAV 全基因组 DNA 克隆,首先能够提供一个用作 CAV 检测用的理想探针,其次对该重组质粒克隆片段中突变了 EcoRI 位点序列进行校正后,用含有串连着二套 CAV 基

因组的重组质粒 DNA 转染 MSB1, 有可能产生具有感染性的病毒, 由于 CAV 基因组很小, 其中与感染和致病相关的三个编码基因已完全弄清, 因此将可能进一步以定向突变的方法, 构建无致病性但仍然能在体内复制组装成有传染性的 CAV, 作为预防 CAV 感染的基因工程疫苗。

### 参 考 文 献

- 1 Yuasa N, Taniguchi T, Yoshida I. Isolation and characterization of an agent inducing anaemia in chicks. *Avian Diseases*, 1979, 23: 366~385
- 2 陆承平. 最新脊椎动物病毒分类简介. *中国兽医学报*, 1996, 16(1): 94~100
- 3 Gelderblom H, Kling S, Lutz R. Morphological characterization of chicken anaemia agent (CAA). *Arch Virol*, 1989, 109: 115~120
- 4 Phenix KV, Meehan BM, Todd D *et al*. Transcriptional analysis and genome expression of chicken anaemia virus. *Journal of General Virology*, 1994, 75: 905~909
- 5 Nøtveit MHM, Koch G. Chicken anaemia virus infection: molecular basis of pathogenicity (review). *Avian Pathology*, 1995, 24: 11~31
- 6 McNulty, MS, McIlroy SG, Bruce DW *et al*. Economic effects of subclinical chicken anaemia agent infection in broiler chickens. *Avian Diseases*, 1991, 35: 263~268
- 7 Meehan BM, Todd D, Creelan JL *et al*. Characterization of viral DNAs from cells infected with chicken anaemia agent: sequence analysis of the cloned replicative form and transfection capabilities of cloned genome fragments. *Archives of Virology*, 1992, 124: 301~319
- 8 J. 萨姆布鲁克, E. F. 费里奇, T. 曼尼阿蒂斯著. 金冬雁等译. 分子克隆(实验指南). 第二版. 北京: 科学出版社, 1992.
- 9 刘岳龙, 崔治中, 段玉友. 用 PCR 扩增和克隆鸡贫血病毒衣壳蛋白基因. *江苏农学院学报*, 1997, 18(2): 49~52
- 10 Nøtveit MHM, de Boer GF, van Roozelaar DJ *et al*. Characterization of cloned chicken anemia virus DNA that contains all elements for the infectious replication cycle. *Journal of Virology*, 1991, 65(6): 3131~3139

## Amplification and Cloning of Chicken Anemia Virus whole genomic DNA by Polymerase Chain Reaction

Chen Weimin Cui Zhizhong Duang Yuyou *et al*

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009)

**Abstract** By two pairs of primers complementary to the published sequences at the both sides of EcoRI site and BamHI site on CAV circular genome, two DNA fragments containing two parts (1.5 kb and 0.8 kb) of CAV genome divided by EcoRI and BamHI sites were amplified by PCR from the circular CAV genome (2.3 kb) detected by dot blot in genomic DNA of CAV-infected RP1 cells. Through re-ligation of the selected sequences from the amplified fragments, the whole CAV genomic DNA was cloned into pUC18, and the recombinant plasmid was designated as pCAV2.4. Restriction endonucleases analysis of pCAV2.4 showed that there were sites of BamHI, PstI, Hind III, but no site of EcoRI. Two ends of cloned DNA sequence analysis showed that the recombinant plasmid pCAV2.4 contains the whole genomic DNA sequence of CAV, and that the site sequence of EcoRI in the cloned DNA was changed by one base substitution.

**Key words** Chicken anaemia virus, Genome, PCR, Clone