

王安平,朱善元,吴 双,等.禽腺联病毒 VP 基因的克隆及杆状病毒表达载体的构建[J].江苏农业科学,2013,41(8):25-27.

# 禽腺联病毒 VP 基因的克隆及杆状病毒表达载体的构建

王安平,朱善元,吴 双,王永娟,左伟勇,洪伟鸣

(江苏畜牧兽医职业技术学院/江苏省兽用生物制药高新技术研究重点实验室,江苏泰州 225300)

**摘要:**根据禽腺联病毒 VP 基因序列设计引物,扩增出 VP 基因,将其克隆至杆状病毒表达载体 pFastBac1,经酶切鉴定筛选出阳性重组转移载体 pFastBac-VP,并对阳性质粒进行测序及序列分析;将 pFastBac-VP 转化到 DH10Bac 感受态细胞中,与 Bacmid 发生位点特异性转座作用,经抗性和蓝白斑筛选,获得含 VP 基因的重组穿梭载体 rBacmid-VP。研究结果为进一步在昆虫细胞中表达 VP 基因,开发研制重组禽腺联病毒载体奠定了基础。

**关键词:**禽腺联病毒;VP 基因;杆状病毒表达载体;克隆

**中图分类号:** Q785 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)08-0025-02

腺联病毒(adeno-associated virus, AAV)别称腺病毒相关病毒,是最初在纯化的腺病毒中发现的一种污染病毒,因而得名腺联病毒。作为一种新型的病毒载体,它具有对宿主没有致病性、免疫原性极低、宿主范围广等优点<sup>[1]</sup>,因此被认为是一种比较理想的基因转移载体,被广泛地用于基因治疗和基因工程疫苗等方面的研究。rAAV 已有效地转导了小鼠和灵长类动物的多个组织和细胞,并能介导外源基因在肝脏、肺、中枢神经系统、视网膜及骨骼肌等器官和组织中的长期表达<sup>[2-6]</sup>。

禽腺联病毒(avian adeno-associated virus, AAV)于 1973 年由 Yates 等首次报道,AAV 的理化性质、基因组结构等与 AAV 基本相似,说明可作为有潜力的重组病毒载体开发应用。目前,禽类也已经分离到 2 种血清型腺联病毒,并也已经完成序列测定<sup>[7-8]</sup>。国内王建业等也报道分离到 1 株血清型禽腺联病毒,并进行了测序<sup>[9]</sup>。笔者所在实验室前期也开展了利用三质粒制备 rAAV 的研究,并以此作为载体传递 hKLK1 及 miRNA,获得了长期、高效的表达<sup>[10-11]</sup>;但是三质粒法制备 rAAV 滴度较低,限制了其进一步开发应用。

本研究在国内首次利用 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统,成功构建了 VP 基因的杆状病毒表达载体,为进一步在昆虫细胞中表达 VP 蛋白,利用杆状病毒系统研制重组禽腺联病毒载体奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 载体和菌种

杆状病毒 Bac-to-Bac 表达系统(包括转座质粒 pFastBac1, *E. coli* DH10Bac 受体菌)购自 Invitrogen 公司;含 AAV 全基因组的重组质粒 pCR-AAV、大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞由笔者所在实验室保存。

收稿日期:2013-02-21

基金项目:江苏省自然科学基金(编号:BK2011536)

作者简介:王安平(1980—),女,江苏泰兴人,副教授,主要从事兽用生物制药的研究。E-mail:wap4017@163.com。

通信作者:朱善元,教授,主要从事兽用生物制药的研究。E-mail:jstzzsy@126.com。

### 1.2 工具酶和试剂

pfu DNA Polymerase、限制性内切酶 *Hind* III、*Not* I 及 *T*<sub>4</sub> DNA 连接酶购自 Fermentas 公司;Wizard DNA Clean-up System 购自美国 Promega 公司;其他试剂均为国产分析纯级。

### 1.3 引物的设计与合成

参考 GeneBank 中登录的 AAV 的基因序列设计 1 对引物扩增 VP 基因,为了便于基因的克隆及表达载体构建等后续工作,在 VP 引物的上下游 5' 端分别添加了 *Not* I 和 *Hind* III 酶切位点。通用引物 M13F/M13R 参照 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统设计,引物均由上海英潍捷基生物技术有限公司合成。引物序列:VP-F 为 5'-CATGCGGCCGCCACGGCTCTTATTTCTGACGCGATACCCGATTGTTG-3'(下划线为 *Not* I 酶切位点),VP-R 为 5'-CGTAAGCTTTTACAGCGTTTGGTGAGGTAACGGGTACCG-3'(下划线为 *Hind* III 酶切位点)。通用引物序列:M13-F 为 5'-GTTTCCAGTCACGAC-3', M13-R 为 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'。

### 1.4 VP 基因的扩增

以含 AAV 全基因组的重组质粒 pCR-AAV 为模板,VP-F 和 VP-R 为上下游引物扩增 VP 基因。反应条件:95℃ 预变性 3 min;95℃ 变性 30 s,53℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 2 min,30 个循环;72℃ 延伸 10 min。PCR 产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳,按 Wizard DNA Clean-up System 试剂盒说明书纯化回收目的基因,4℃ 保存,备用。

### 1.5 重组转座载体 pFastBac-VP 的构建

回收的 VP 基因经 *Not* I 和 *Hind* III 酶切后,与经同样酶切的 pFastBac1 连接,在含 100  $\mu$ g/mL 氨苄青霉素的 LB 琼脂平板上 37℃ 培养过夜后,挑取单菌落,提取质粒电泳筛选,并进行酶切鉴定。酶切鉴定正确后送往上海生工生物工程公司测序,鉴定正确的克隆命名为 pFastBac-VP。

### 1.6 重组杆状病毒穿梭载体的构建

参考 Invitrogen 公司的 Bac-to-Bac Baculovirus Expression System 使用说明,将阳性重组质粒 pFastBacDual-Rep 转化 DH10Bac 感受态细胞,用四环素(10  $\mu$ g/mL)、卡那霉素(50  $\mu$ g/mL)、庆大霉素(7  $\mu$ g/mL)、IPTG(40  $\mu$ g/mL)、X-gal(100  $\mu$ g/mL)LB 琼脂平板筛选白色阳性菌落。挑取白色菌落,提取质粒,用引物 M13F/M13R 进行 PCR 鉴定,扩增条件

为:95 ℃预变性 3 min;95 ℃变性 30 s,55 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 2 min,30 个循环;72 ℃再延伸 10 min。产物用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测,获得的阳性重组转座子命名为 rBacmid-VP。

## 2 结果与分析

### 2.1 VP 基因的扩增

以 VP-F 和 VP-R 为上下游引物扩增 VP 基因,产物经 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳,可见大约 2.2 kb 的条带(图 1),与预期结果相符。

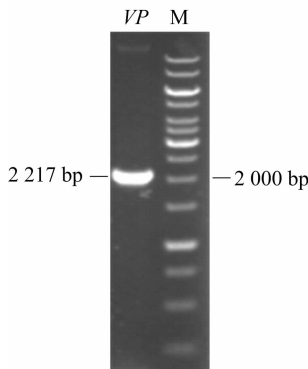
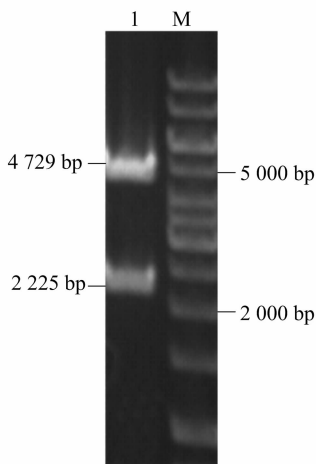


图1 目的基因的PCR扩增结果

### 2.2 重组转座载体 pFastBac-VP 的构建与鉴定

VP 基因回收后用 Sal I 和 Not I 酶切,与经同样酶切的 pFastBac1 连接,获得重组转座载体 pFastBac-VP。经 Not I 和 HindⅢ酶切出约 2.2、4.8 kb 的 2 条条带(图 2),与预期相符,且 DNA 测序证明 VP 基因克隆正确且无突变。



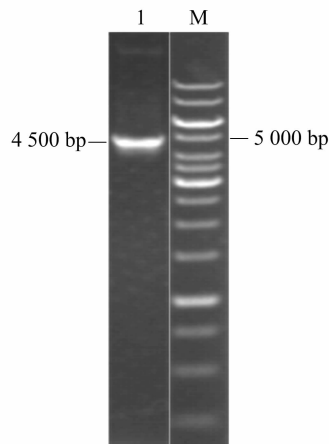
M—DNA 分子质量标准;1—pFastBac-VP 的 Not I+HindⅢ 酶切鉴定  
图2 重组质粒 pFastBac-VP 的酶切鉴定

### 2.3 重组杆状病毒穿梭载体的鉴定

以构建的重组穿梭载体 rBacmid-VP 为模板,以 M13F/M13R 为引物分别进行 PCR 鉴定,产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳后在 4.5 kb 处可见特异性条带(图 3),与预期片段大小相符,表明 VP 基因转座成功。

## 3 结论与讨论

AAV 病毒粒子直径为 20~25 nm,呈正二十面体对称,由



M—DNA 分子质量标准;1—重组转座子 rBac-Rep 的 PCR 鉴定  
图3 重组转座子的 PCR 鉴定

3 个衣壳蛋白构成,无包膜,基因组大小为 4.7 kb,两端是末端反向重复序列(inverted terminal repeat, ITR),中间部分含有 2 个大的开放阅读框架及 3 个启动子,分别编码结构基因 Cap 和非结构基因 Rep。Cap 基因编码衣壳蛋白,其转录从 p40 启动子开始,分别从主要的起始密码子 AUG 和次要的起始密码子 ACG 形成 mRNA,然后再经过剪接形成 3 个结构蛋白——VP1、VP2、VP3,在成熟毒粒中的比例约为 1:1:10。VP1 在病毒颗粒的稳定性或感染性上起作用,而 VP2 在病毒样空颗粒的装配中起重要作用,VP3 似乎需要与其他 2 个 VP 蛋白中的 1 个一起完成核定位任务<sup>[7-8]</sup>。

杆状病毒表达系统是 20 世纪 80 年代发展起来的真核基因表达系统,与大肠杆菌、酵母、哺乳动物细胞表达系统并称为基因工程中的四大表达系统。与其他 3 种表达系统相比,杆状病毒表达系统有以下优点:较高的克隆容量;外源基因表达量较高,最高可达细胞总蛋白的 50%;能对目的蛋白进行修饰、加工和转运,表达的外源蛋白具有很高的生物学活性;相对于其他病毒载体,杆状病毒具有很高的安全性。杆状病毒表达系统迄今已经被广泛应用于基因工程、药物开发、疫苗生产等方面,已有数百个基因利用该系统得到了高效表达<sup>[12-15]</sup>。

本试验扩增克隆得到 AAV VP 基因,并与杆状病毒表达载体 pFastBac1 连接,转化 DH10Bac 感受态细胞,获得重组转座子,为进一步在昆虫细胞中表达 VP 蛋白,研究 VP 蛋白的功能以及利用杆状病毒表达系统构建重组禽腺联病毒奠定了基础。

## 参考文献:

- [1] During M J. Adeno-associated virus as a gene delivery system[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 1997, 27(1): 83-94.
- [2] Koeberl D D, Alexander I E, Halbert C L, et al. Persistent expression of human clotting factor IX from mouse liver after intravenous injection of adeno-associated virus vectors[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(4): 1426-1431.
- [3] Afione S A, Conrad C K, Kearns W G, et al. In vivo model of adeno-associated virus vector persistence and rescue[J]. Journal of Virology, 1996, 70(5): 3235-3241.

邹芝英,杨弘,罗永巨,等. 长鳍鲤 mtDNA D-loop 区序列结构和多态性分析[J]. 江苏农业科学,2013,41(8):27-30.

# 长鳍鲤 mtDNA D-loop 区序列结构和多态性分析

邹芝英<sup>1</sup>, 杨弘<sup>1</sup>, 罗永巨<sup>2</sup>, 吴长敬<sup>1</sup>, 李大宇<sup>1</sup>, 祝璟琳<sup>1</sup>, 肖炜<sup>1</sup>

(1. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心/农业部淡水渔业和种质资源利用重点实验室, 江苏无锡 214081;

2. 广西水产研究所, 广西南宁 530021)

**摘要:**采用 PCR 技术和测序的方法分离长鳍鲤线粒体 DNA 控制区 (mtDNA D-loop) 的部分序列 (600~602 bp), 结合已报道长鳍鲤序列 (387 bp), 得到长鳍鲤 D-loop 区的全长序列 (921 bp), 对照其他已报道的鱼类控制区结构, 成功识别长鳍鲤 mtDNA D-loop 区的终止序列区、中央保守区和保守序列区, 找到了终止相关的序列 TAS 和 CSB-F、CSB-E、CSB-D、CSB-1、CSB-2、CSB-3 等 6 个特征序列, 运用 DNA 分析软件对本研究获得的序列 (600~602 bp) 进行序列多态性分析。结果显示, 序列碱基 A+T 的含量 (平均为 62.7%) 高于 G+C 的含量 (平均为 37.3%), 共检测到 13 个变异位点, 转换为 8 个, 颠换为 3 个, 有 2 个缺失, 碱基的替换有明显的偏倚。8 尾个体分属 6 种单倍型, 长鳍鲤的核苷酸多样性为 0.007 32, 单倍型间平均遗传距离为 0.009。稀有长鳍鲤种群 mtDNA D-loop 区序列存在着丰富的多态性, 说明该种群具有比较丰富的遗传多样性。

**关键词:**长鳍鲤; mtDNA; D-loop 区; 遗传多样性

**中图分类号:**Q348; S917.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2013)08-0027-04

长鳍鲤 (*Cyprinus carpio* var. *longfin*) 属于鲤科鲤属鲤种, 是分布于我国广西壮族自治区的一种野生鲤鱼, 因其身体各鳍条的长度均比普通鲤鱼长而得名。由于受环境变化和人为

捕捞等因素的影响, 现野生分布的长鳍鲤已基本消失, 品种资源已经变得非常宝贵。为保护物种资源, 广西自治区水产研究所将野生长鳍鲤引入池塘。目前, 关于长鳍鲤的研究特别是遗传结构和遗传多样性的研究报道很少<sup>[1-2]</sup>。动物线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 是共价闭合的环状双螺旋 DNA, 是细胞核外具自主复制、转录和翻译能力的遗传因子, 具有分子量小、结构简单、进化速度快、高度多态、母性遗传等特点。mtDNA D-loop 区别称控制区, 是线粒体基因组序列和长度变异最大、进化最快的区域。它因具有较高的突变积累而形成多态性, 成为种内、种群或个体间遗传多样性研究的理想材料<sup>[3]</sup>。近年来, 许多学者对很多鱼类的线粒体控制区自身结构以及种内种群遗传结构和遗传分化进行了大量的研

收稿日期:2013-01-14

基金项目:国家现代农业产业技术体系建设专项 (编号: CARS-49); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (编号: 2011JBFA04)。

作者简介:邹芝英 (1980—), 女, 江苏无锡人, 硕士, 助理研究员, 主要从事养殖与分子生物学研究。Tel: (0510) 85559009; E-mail: zouzy@ffrc.cn。

通信作者:杨弘, 研究员, 主要从事鱼类育种研究。Tel: (0510) 85550252; E-mail: yangh@ffrc.cn。

[4] Harrison P T, Dalziel R G, Ditchfield N A, et al. Neuronal-specific and nerve growth factor-inducible expression directed by the preprotachykinin-a promoter delivered by an adeno-associated virus vector[J]. Neuroscience, 1999, 94(3): 997-1003.

[5] Rolling F, Shen W Y, Tabarisa H, et al. Evaluation of adeno-associated virus-mediated gene transfer into the rat retina by clinical fluorescence photography[J]. Hum Gene Ther, 1999, 10(4): 641-648.

[6] Xiao X, Li J, Samulski R J. Efficient long term gene transfer into muscle tissue of immunocompetent mice by adeno-associated virus vector[J]. J Virol, 1996, 70(11): 8098-8108.

[7] Bossis I, Chiorin J A. Cloning of an avian adeno-associated virus (AAAV) and generation of recombinant AAAV particles[J]. J Virol, 2003, 77(12): 6799-6810.

[8] Estevez C, Villegas P. Sequence analysis, viral rescue from infectious clones and generation of recombinant virions of the avian adeno-associated virus[J]. Virus Research, 2004, 105(2): 195-208.

[9] Wang J Y, Zhu L Q, Zhu J, et al. Molecular characterization and phylogenetic analysis of an avian adeno-associated virus originating from a chicken in China[J]. Arch Virol, 2011, 156(1): 71-77.

[10] Wang A P, Sun H C, Wang J Y, et al. Recombinant avian adeno-associated virus-mediated oviduct-specific expression of recombinant human tissue kallikrein[J]. Poultry Science, 2008, 87(4): 777-782.

[11] Wang Y J, Sun H C, Shen P P, et al. Effective inhibition of infectious bursal disease virus replication by recombinant avian adeno-associated virus-delivered microRNAs[J]. Journal of General Virology, 2009, 90(Pt 6): 1417-1422.

[12] Hitchman R B, Possee R D, Crombie A T, et al. Genetic modification of a baculovirus vector for increased expression in insect cells[J]. Cell Biol Toxicol, 2010, 26(1): 57-68.

[13] Hitchman R B, Possee R D, King L A, et al. Baculovirus expression systems for recombinant protein production in insect cells[J]. Recent Patents on Biotechnology, 2009, 3(1): 46-54.

[14] Kost T A, Condreay J P, Jarvis D L. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells[J]. Nature Biotechnology, 2005, 23(5): 567-575.

[15] Smagghe G, Goodman C L, Stanley D. Insect cell culture and applications to research and pest management[J]. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2009, 45(3/4): 93-105.