

何 晨,武秀知,王 浩,等. IBDV 分离株 JS7 的 VP3 基因的分子特征及其原核表达[J]. 江苏农业科学,2018,46(3):45-48.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.03.010

IBDV 分离株 JS7 的 VP3 基因的 分子特征及其原核表达

何 晨¹,武秀知¹,王 浩¹,何秀苗^{1,2}

(1. 广西民族大学海洋与生物技术学院/广西高校微生物与植物资源利用重点实验室,广西南宁 530006

2. 广西民族大学/广西多糖材料与改性重点实验室培育基地,广西南宁 530006)

摘要:应用 RT-PCR 技术扩增了鸡传染性法氏囊病病毒(IBDV)分离株 JS7 的 VP3 基因,并进行了分子特征分析和原核表达。结果显示,JS7 的 VP3 基因的关键氨基酸位点上表现为 981P、990A、1005A,既有致弱毒株的 990A,又有 vvIBDV 毒株的 981P 和 1005A,在遗传进化 and 同源性分析上,JS7 更接近于 vvIBDV 参考株;VP3 基因在 IPTG 的诱导下,在 pET-28a 系统中成功表达出 32 ku 的产物,western-blot 检测发现,该表达产物与鸡抗 IBDV 多抗血清发生反应。说明 JS7-VP3 成功表达并具有良好的免疫原性。这为进一步研究 IBDV 特异性的检测方法的建立以及 VP3 在 IBDV 致病性中的进一步研究奠定了基础。

关键词:鸡;传染性法氏囊病病毒;VP3 蛋白;分子特征;原核表达

中图分类号: S858.315.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)03-0045-03

传染性法氏囊病 (IBD) 是由鸡传染性法氏囊病毒 (IBDV) 引起的以危害青年鸡为对象的烈性、高度接触传染性的病毒病^[1]。IBDV 属于双 RNA 病毒科禽双 RNA 病毒属,IBDV 基因组由 A、B 等 2 个节段组成,A 节段编码病毒的结构蛋白 VP2、VP3,以及病毒的蛋白酶 VP4、非结构蛋白 VP5,B 节段编码具有 RNA 依赖聚合酶活性的 VP1 蛋白^[2]。VP3 是 IBDV 的主要结构蛋白之一,含有 IBDV 群特异性抗原决定簇,具有一定的免疫保护性。在病毒粒子中,VP3 同自己以及 VP2、VP1、病毒基因组相互作用,在病毒的致病性特别是病毒吸附细胞时具有重要作用,此外 VP3 还参与病毒的包装,并具有稳定 RNA 基因组的作用。Wang 等研究发现,IBDV VP3 羧基端一些氨基酸的改变将影响到病毒的致病性。为了解 IBDV 分离株中的 VP3 分子特征,本研究对获得的 1 株 IBDV 分离株的 VP3 进行分子特征分析,并对该蛋白进行原核表达,以期为进一步研究 VP3 的功能奠定基础,同时分子特征分析也为进一步研究流行株的变化趋势、制定有效的 IBD 防控措施提供依据^[3]。

1 材料与方 法

1.1 材 料

IBDV 分离株 JS7 为笔者所在的课题组自行分离保存,大

收稿日期:2016-09-03

基金项目:国家自然科学基金(编号:31560706,31660717);国家大学生创新训练项目(编号:201510608031);广西自然科学基金(编号:2017GXNSFAA198033);广西民族大学相思湖青年学者创新团队项目。

作者简介:何 晨(1993—),男,江苏泰兴人,主要从事生物技术研究。E-mail:619126897@qq.com。

通信作者:何秀苗,博士,教授,主要从事禽病病原生物学研究。E-mail:xiumiaohe0839@sina.com。

肠杆菌 DH5 α 及 BL21(DE3)、pET-28a 表达载体为笔者所在实验室保存,pMD18-T、DL2000 Marker 购自大连宝生物有限公司,限制性核酸内切酶 BamH I、Hind III 等购自 Fermentas 公司,Trizol RNA 抽提试剂、2 \times Taq DNA mix、dNTPs、PCR 产物纯化试剂盒等购自上海海洋仿生物科技有限公司;M-MLV 逆转录酶和 RNase 抑制剂购自 Promega 公司,琼脂糖购自生工生物工程(上海)股份有限公司,胶回收试剂盒购自天根生物试剂有限公司,其他试剂均为进口或国产分析纯产品。

1.2 引物的设计

利用 Primer5.0 软件根据已发表的 IBDV 毒株 CEF94 的 A 片段(序列号:AF194429)VP3 序列设计 1 对引物:上游 Y1,5'-CCGGATCCCGCTTCAGAGTTCAAAGAGA-3'(BamH I),下游 Y2,5'-CCAAGCTTCCTCACTCAAGGTCCTCATC-3'(Hind III),引物由深圳华大基因公司合成。

1.3 JS7-VP3 基因的 RT-PCR 扩增和克隆

将含有 JS7 毒株的鸡法氏囊组织剪碎研磨后按质量体积比 1 g : 5 mL 的比例加入 PBS(pH 值 7.4),混匀,反复冻融 3 次,12 000 r/min 离心 3 min,取上清 200 μ L,加入 1 mL Trizol 振荡混合均匀,按常规方法^[4]提取总 RNA。逆转录:取 RNA 6 μ L,加入随机引物 1 μ L(25 pmol/ μ L),混匀,70 $^{\circ}$ C 水浴作用 10 min,-20 $^{\circ}$ C 冰浴作用 5 min,加入 5 \times RT Buffer 2 μ L、dNTPs(2.5 m/moL)0.5 μ L,逆转录酶(200 U/ μ L)0.5 μ L,RNase 抑制剂 0.25 μ L(200 U/ μ L),总体积 20 μ L,42 $^{\circ}$ C 水浴作用 1 h 后,90 $^{\circ}$ C 灭活,即得 cDNA。RT-PCR(体系):2 \times Taq mix 12.5 μ L,Y1 和 Y2 引物各 1 μ L,cDNA 模板 4 μ L,ddH₂O 6.5 μ L,共 25 μ L。扩增程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 45 s,58 $^{\circ}$ C 退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,共 30 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物通过 1% 琼脂糖凝胶鉴定阳性后回收并直接进行 pMD18-T 载体克隆,克隆方法按说明书进行,重组载体的鉴定采用蓝白斑、PCR 和双酶切法

(即 *Bam*H I 和 *Hind* III) 进行,阳性克隆命名为 pTVP3 并送深圳华大基因股份有限公司测序。

1.4 序列分析

用 Lasergene 的 Megalign 软件对序列进行同源性比较分析,用 MEGA5.0 软件绘制遗传进化树。参考毒株为经典毒株为 Cu-1wt、IM、Lukert、CU1M;致弱毒株为 Gt、CEF94,疫苗株:B87;超强毒株为 OKYM、UK661、HK46、BD3/99、Harbin-1、02015.1、Gx、HLJ-0504、SH95;血清 II 型毒株 OH。

1.5 JS7-VP3 基因原核表达载体的构建

测序正确的阳性重组体 pTVP3 直接用于 VP3 的原核表达载体的构建,即用 *Hind* III 和 *Bam*H I 将 VP3 基因从 pTVP3 中酶切,回收的 VP3 与经过同样酶切回收的原核表达载体 pET-28a 进行连接,转化 BL21 感受态细菌,重组载体的鉴定通过菌落 PCR 和双酶切法进行,并命名为 pET-VP3。

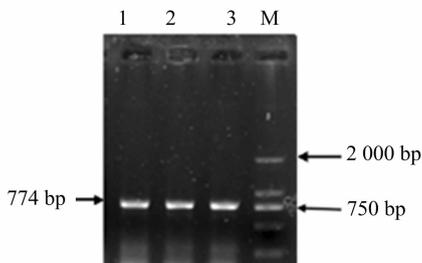
1.6 JS7-VP3 基因的原核表达及产物的 Western-Blot 分析

将经过鉴定的 pET-VP3 菌株接种到 2 × YT 培养基中 37 °C 180 r/min 培养过夜,按 1 : 100 比例加入过夜培养的上述培养液。于 37 °C 摇床,220 r/min,培养 4 h 左右,使其 D_{600nm} 值达 0.6,加入终浓度达 1.0 mmol/L 的 IPTG,于 37 °C 摇床中,220 rap/min 培养 4 ~ 5 h,收集菌体,PBS 洗涤 2 次后加入 100 μL 2 × SDS 上样缓冲液,并于 100 °C 水浴煮沸 10 min,12 000 r/min 离心 10 min,上清液通过 SDS-PAGE 进行蛋白质电泳鉴定。确定表达后,将含有表达产物的 SDS-PAGE 凝胶按常规方法转印到硝酸纤维素膜上,封闭液作用 1 h。按 1 : 400 加入抗 IBDV 多抗血清,4 °C 孵育过夜,TBST 洗膜 5 次后加入 HRP 标记兔抗鸡 IgG 二抗 (1 : 20 000) 孵育 1 h。TBST 洗膜 3 次,洗去未结合的二抗。将膜取出放入含 DAB 显色液的暗盒里,作用 10 ~ 30 min,使其显色,观察并拍照。

2 结果与分析

2.1 IBDV JS7-VP3 基因的 RT-PCR 扩增结果

用 Trizol 法提取 JS7 的 dsRNA,以获得的 dsRNA 为模板对 VP3 片段进行 RT-PCR 扩增,经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定后,所得片段与预期的目的片段大小相符,约为 774 bp,结果见图 1。



M—Marker DL2000; 1~3—JS7 感染的法氏囊样品
图1 IBDV JS7-VP3 基因的 RT-PCR 扩增结果

2.2 JS7-VP3 基因的测序结果及分子特征

阳性克隆 pTVP3 经过测序,所获得的 VP3 基因大小为 774 bp,与预期目的片段大小相符。同源性分析中 JS7-VP3 与 Gx 株等 vvIBDV 参考株的核苷酸和氨基酸同源性分别为

97.8% ~ 99.2% 和 98.8% ~ 100.0%,与致弱毒株的同源性分别为 96.1% ~ 96.5% 和 98.1% ~ 98.4%,与血清 2 型参考株的同源性也分别达到了 86.3% 和 94.2%。将 JS7-VP3 的氨基酸序列与所用参考株进行比对,发现 JS7-VP3 在关键的氨基酸位点上表现为 981P、990A、1005A,而致弱毒株参考株在这些位点上表现为 981L、990A、1005T,vvIBDV 参考株则表现为 981P、990V、1005A。

2.3 JS7-VP3 基因的遗传进化分析

JS7-VP3 与所有参考株 VP3 基因在遗传进化树中被分成 3 个大支,JS7 与 vvIBDV 参考株同属于一个大分支,并与 HK46 亲缘关系最近,而致弱毒株参考株同属于一个分支,血清 2 型毒株单独属于一个分支,结果见图 2。

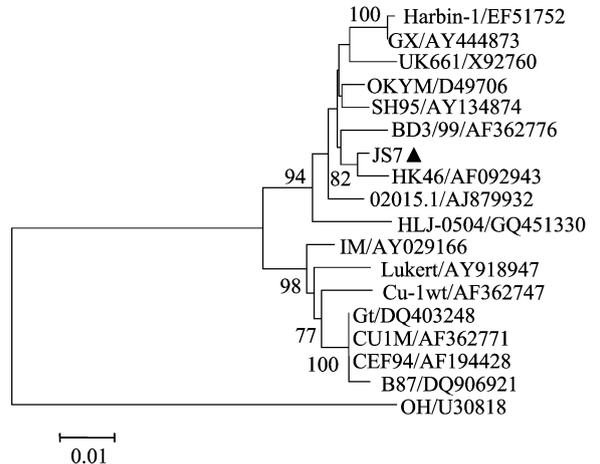
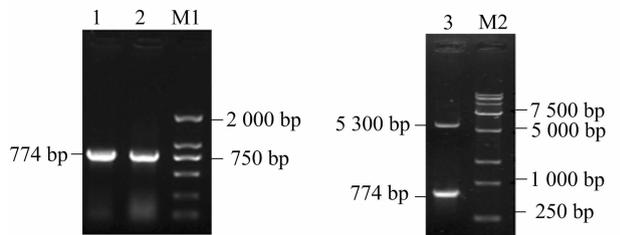


图2 基于 IBDV-VP3 的遗传进化树

2.4 JS7-VP3 原核表达的构建及其表达结果

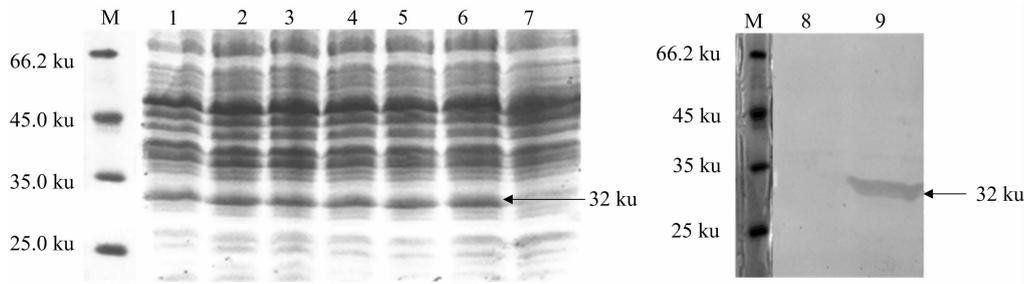
将 VP3 基因从 pT-VP3 亚克隆入原核表达载体 pET-28a,经过菌落 PCR 鉴定,疑似菌落出现了 774 bp 目的条带,将该菌落进行液体培养后提取质粒,经 *Hind* III 和 *Bam*H I 双酶切,出现了约 5.3 kb 的载体片段和 774 bp 的目的片段,表明 pET-VP3 构建成功(图 3)。重组表达载体经过 IPTG 诱导表达,SDS-PAGE 检测,pET-VP3 菌出现 1 条 32 ku 左右的特异性蛋白条带,经 Western-Blot 鉴定,该蛋白条带能与 IBDV 阳性血清发生特异性反应(图 4),表明克隆的 JS7-VP3 成功表达。



M1—Marker DL2 000; M2—Marker DL 15000; 1~2—VP3 基因的 PCR 产物; 3—pET-VP3 *Hind* III 和 *Bam*H I 的酶切产物
图3 pET-VP3 质粒的鉴定电泳结果

3 讨论与结论

在 IBDV 分子流行病学研究中,VP2 高变区分子特征分析是主要的研究靶分子^[5-6],然而更多的研究表明,IBDV 其他区域也与 IBDV 的毒力变化有关^[7-9],VP3 是其中的一个重



M—低分子量蛋白marker; 1~6—pET-VP3 诱导上清; 7—pET-28a 诱导上清; 8—pET-28a 诱导蛋白与抗 IBDV 抗体作用结果; 9—pET-VP3 诱导蛋白与抗 IBDV 抗体作用结果。

图4 pET-VP3 诱导表达的 SDS-PAGE 和 Western-Blot 分析结果

要基因。本研究通过对1株IBDV分离株JS7株的VP3基因分子特征分析发现,JS7-VP3基因在关键的氨基酸位点上表现为981P、990A、1005A,在981、1005位点上与vvIBDV有关,而在990位点上则与致弱毒株有关,但在同源性和遗传进化分析中,JS7-VP3则更接近于vvIBDV,笔者所在课题组前期进行的致病性试验^[10]也发现,该毒株在商品鸡上的死亡率仅为10%,远低于vvIBDV毒株NN1172引起的死亡率。VP3蛋白上的羧基端981、990、1005位点是不同毒株之间有突变的位点,而其羧基端也被认为与病毒的致病性相关。Wang等在分析vvIBDV Gx株和致弱毒株Gt株的基因组时发现,这2个毒株在VP3上的981、990、1005位点有差异,他们的进一步研究发现,将致弱毒株Gt株的990A变成V后,影响了重组病毒在CEF上的复制能力^[3]。在王伟的研究中,vvIBDV毒株GX8/99在SPF鸡胚和CEF连续传代后,该毒株也在这3个位点上发生改变,后与弱毒株完全一致,改变后的毒株再连续回鸡后,990位点仍然保持为A不变,1005位为T不变,与弱毒株一致,981位点则发生回复突变^[11]。在对JS7的背景进行查询时发现,该毒株分离于免疫鸡群,结合其死亡率低和VP3的分子特征,推测JS7发病鸡群很可能是由活苗污染、生物安全措施不到位、没有采取全进全出等造成疫苗毒在鸡场不断回鸡造成的^[10]。在Boot等的研究中,将血清II型毒株的VP3基因羧基端取代I型的vvIBDV后的重组病毒,其对SPF鸡的毒力大大的减弱^[12]。此外,在Jagadish等的研究中,VP3蛋白中与抗原相关的位点位于860~923位氨基酸之间,而笔者通过分析发现,不同毒株以及本分离株在VP3的860~923位点之间同源性均较高,仅仅在羧基端的981、990、1005位点上表现出差异^[13-14]。因此,本研究结果也进一步提示,在VP3基因分子特征分析中,尤其是羧基端的分析将在IBDV分子流行病学研究中发挥越来越重要的作用,值得关注。

本试验成功构建了JS7-VP3的原核表达载体pET-VP3,经IPTG诱导后主要以包涵体形式表达,重组蛋白能够和鸡IBDV高免血清发生特异性反应,表明利用pET-28a系统表达的VP3蛋白具有良好的免疫原性。pET系统是常用的一个高效原核表达系统,目的基因受噬菌体T7启动子的强转录及翻译信号控制,在IPTG诱导下,高效表达其下游的外源基因,表达量可高达菌体蛋白的50%^[15-17]。张改平等用pET系统对IBDV-VP3进行了表达,结果获得了2种不同分子量且都与IBDV阳性血清发生反应的表达产物,而本研究

结果利用该系统则获得了一种表达产物^[17-18],与Deng等的结果^[19]一致,单一表达产物更利于对产物进行纯化及相应的特异性抗体研制,为进一步研究IBDV特异性的检测方法的建立以及VP3在IBDV致病性中的进一步研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] Eterradossi N, Saif Y M. Infectious bursal disease [M] // Swayne D E, Glisson J R, McDougald L R, et al. Diseases of poultry. 13th ed. New Jersey: Wiley - Blackwell, 2013: 219 - 246.
- [2] von Einem U I, Gorbalenya A E, Schirmeier H, et al. VP1 of infectious bursal disease virus is an RNA - dependent RNA polymerase [J]. Journal of General Virology, 2004, 85 (8) : 2221 - 2229.
- [3] Wang Y, Qi X, Kang Z, et al. A single amino acid in the C - terminus of VP3 protein influences the replication of attenuated infectious bursal disease virus *in vitro* and *in vivo* [J]. Antiviral Research, 2010, 87 (2) : 223 - 229.
- [4] 萨姆布鲁克, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南 [M]. 2 版. 金冬雁, 黎孟枫, 译. 北京: 科学出版社, 1992.
- [5] He X, Wei P, Yang X, et al. Molecular epidemiology of infectious bursal disease viruses isolated from Southern China during the years 2000—2010 [J]. Virus Genes, 2012, 45 (2) : 246 - 255.
- [6] 何秀苗, 官丁明, 韦平, 等. 2000—2007 年广西鸡传染性法氏囊病病毒的分子流行病学 [J]. 病毒学报, 2009, 25 (5) : 437 - 443.
- [7] Boot H J, Hoekman A J, Gielkens A L. The enhanced virulence of very virulent infectious bursal disease virus is partly determined by its B - segment [J]. Archives of Virology, 2005, 150 (1) : 137 - 144.
- [8] Boot H J, ter Huurne A A, Hoekman A J, et al. Rescue of very virulent and mosaic infectious bursal disease virus from cloned cDNA: VP2 is not the sole determinant of the very virulent phenotype [J]. Journal of Virology, 2000, 74 (15) : 6701 - 6711.
- [9] Escaffre O, le Nouën C, Amelot M, et al. Both genome segments contribute to the pathogenicity of very virulent infectious bursal disease virus [J]. Journal of Virology, 2013, 87 (5) : 2767 - 2780.
- [10] He X, Chen G, Yang L, et al. Role of naturally occurring genome segment reassortment in the pathogenicity of IBDV field isolates in Three - Yellow chickens [J]. Avian Pathology, 2016, 45 (2) : 178 - 186.
- [11] 王伟. IBDV 超强毒株 GX8/99 株 VP3 基因及其 A 节段 3' 端非编码区基因与致病性的关系 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2007.

丁位华,王 丹,李婷婷,等. 播期、密度对小麦物质转运和籽粒灌浆的影响[J]. 江苏农业科学,2018,46(3):48-52.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.03.011

播期、密度对小麦物质转运和籽粒灌浆的影响

丁位华,王 丹,李婷婷,杨艳艳,茹振钢

(河南科技学院生命科技学院/河南省现代生物育种协同创新中心/河南省高等学校作物分子育种重点开放实验室,河南新乡 453003)

摘要:以百农 418 为材料,采用裂区试验设计,探讨播期(A1:10-09;A2:10-14;A3:10-19;A4:10-24;A5:10-29)、密度(B1:270×10⁴/hm²;B2:315×10⁴/hm²;B3:360×10⁴/hm²;B4:405×10⁴/hm²;B5:450×10⁴/hm²)对其物质转运和籽粒灌浆的影响。结果表明,播期和密度对转运量的影响大小为 A(播期) > B(密度),通过最长距离法 A1B4、A3B4、A1B1 和 A1B5 聚为一类,其转运量(4 348.8、4 099.8、3 585.4、4 379.2 g/hm²)、转运率(29.35%、32.52%、29.47%、32.46%)、贡献率(44.42%、41.20%、43.03%、52.71%)和籽粒千粒质量(51.61、58.03、53.30、53.68 g)较高;播期对灌浆持续期(T、T₁、T₂、T₃)、籽粒积累量(W、W₁、W₂、W₃)、灌浆整个过程平均速率(R)和渐增期平均速率(R₁)影响更大,密度对灌浆快增期的平均速率(R₂)影响更大,渐增期和缓增期的平均速率(R₁、R₃)随着播期的推迟逐渐降低;成熟期生物量、开花期生物量和转运量同产量呈极显著正相关,且影响大小为成熟期生物量(0.95) > 开花期生物量(0.77) > 转运量(0.68);从试验结果和节约成本 2 个方面综合考虑,百农 418 最适宜的播期和密度为 A1B1。

关键词:播期;密度;物质转运;籽粒灌浆;聚类分析

中图分类号: S512.104 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)03-0048-05

干物质积累是小麦产量与品质形成的主要物质基础^[1-3];籽粒灌浆是影响小麦产量和品质的另一个重要生物学过程^[4-6]。关于小麦物质转运和籽粒灌浆,前人进行了很多研究。杨铁钢等研究了施氮水平对不同小麦物质积累和转运的影响^[7-8];董剑等研究了水氮调控对不同小麦干物质积累与转运的影响^[9];王瑞霞等研究了不同生态环境对小麦籽粒灌浆速率及千粒质量 QTL 分析^[4];通过生长曲线模拟籽粒灌浆的过程,由其推导出的特征参数可以准确地反映籽粒灌

浆特性^[10-12]。前人关于播期和密度对小麦干物质积累、转运和籽粒灌浆特性方面的研究并不多,播期、密度影响小麦的干物质积累与灌浆速度,进而影响小麦产量和品质^[13-15]。基于此,本研究以百农 418 为材料,探讨播期、密度对其物质转运和籽粒灌浆的影响,以期对黄淮麦区小麦高产栽培提供理论依据。

1 材料与与方法

1.1 试验设计与方法

试验于 2015—2016 年在河南科技学院千亩试验基地(新乡)进行。试验田土质为中壤,地势平坦,灌排条件良好。采用裂区试验设计,主区为播期处理,副区为密度处理,均设置 5 个水平,3 次重复,播期和密度设置的水平见表 1,共设 75 个小区,小区面积为 24 m²(长 8 m×宽 1.7 m),土壤有机质含量 12 g/kg,全氮含量 0.9 g/kg、速效磷含量 9.8 g/kg、速效钾含量 100 g/kg。水分处理:共浇越冬水、拔节水、开花水、灌浆水 4 次。肥料处理:底施金正大复合肥 900 kg/hm²,全生育期施纯氮 180 kg/hm²,按基追比 5:5 进行,追肥在拔节初期

收稿日期:2017-09-20

基金项目:国家自然科学基金(编号:31371525);河南省农业科技攻关项目(编号:172102110163);河南省高等学校重点科研项目(编号:16A210020);河南科技学院高层次人才培养项目(编号:201010612006);作物学科特色学科(编号:201020216001/001)。

作者简介:丁位华(1979—),男,河南鹿邑人,博士,副教授,硕士生导师,主要从事小麦高产栽培生理研究。E-mail: dwh636@163.com。

通信作者:茹振钢,教授,硕士生导师,主要从事小麦遗传育种研究。E-mail: rzgh58@sohu.com。

[12] Boot H J, ter Huurne A A, Hoekman A J, et al. Exchange of the C-terminal part of VP3 from very virulent infectious bursal disease virus results in an attenuated virus with a unique antigenic structure[J]. *Journal of Virology*, 2002, 76(20): 10346-10355.

[13] Jagadish M N, Azad A A. Localization of a VP3 epitope of infectious bursal disease virus[J]. *Virology*, 1991, 184(2): 805-807.

[14] Mahardika G N, Becht H. Mapping of cross-reacting and serotype-specific epitopes on the VP3 structural protein of the infectious bursal disease virus (IBDV)[J]. *Archives of Virology*, 1995, 140(4): 765-774.

[15] Studier F W, Moffatt B A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes[J].

Journal of Molecular Biology, 1986, 189(1): 113-130.

[16] Studier F W, Rosenberg A H, Dunn J J, et al. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes[J]. *Methods in Enzymology*, 1990, 185: 60-89.

[17] 张改平, 席俊, 王选年, 等. IBDV VP3 结构蛋白在大肠杆菌中的表达与鉴定[J]. *河南农业科学*, 2005(8): 88-91.

[18] 赵坤, 郑玉妹, 赵德明, 等. 鸡传染性法氏囊病病毒 VP3 蛋白的原核表达及其 B 细胞抗原表位鉴定[J]. *中国预防兽医学报*, 2009, 31(12): 958-962.

[19] Deng X, Gao Y, Gao H, et al. Antigenic structure analysis of VP3 of infectious bursal disease virus[J]. *Virus Research*, 2007, 129(1): 35-42.