

新型环形病毒 AGV7 的 VP3 基因克隆、表达及其多抗制备

中秋平, 田晓彦, 邵红霞, 秦爱建, 叶建强

(扬州大学兽医学院, 江苏扬州, 225009)

引言

鸡传染性贫血病毒 (CAV) 一直被认为是圆环病毒科中环形病毒属唯一成员。直到 2011 年, Rijsewijk 等从发病鸡的血清样品中检测到新型环形病毒序列命名为 AGV2。同年, Sauvage 等在健康人的皮肤拭子样品中检测到首个与 AGV2 高度同源的人源环形病毒 HGyV 序列^[1]。自 2012 年, 其它新型环形病毒包括 GyV3, GyV4, GyV5, GyV6, GyV7 等被陆续发现鉴定, 并具有潜在的公共卫生意义^[2]。然目前尚无检测 GyV7 抗原及其抗体的血清学方法。因此, 对 GyV7 病毒早期表达蛋白 VP3 基因在体外进行克隆, 构建 VP3 表达载体, 实现其表达, 将为深入开展 GyV7 蛋白抗原及其抗体检测、血清学调查, 明确 GyV7 在鸡群以及人群中的感染复制情况提供有效诊断试剂; 并为探究 GyV7 VP3 生物学功能具有重要意义。

材料与方法

根据 pGEX-6p-1, pcDNA3.1-EGFP, AGV7 -VP3 的序列及相应模版, 分别设计并合成引物扩增出相应线性化载体及基因片段。通过 EXnaseTMII 酶进行体外重组连接克隆, 分别获得 GST 融合表达载体 pGST-VP3 以及 EGFP 融合表达载体 pEGFP-VP3。将 pGST-VP3 转化到 BL21 细菌进行 IPTG 诱导表达, 并对表达的 VP3 蛋白进行纯化, 免疫小鼠。通过 western blot, 用转染 EGFP 融合表达载体 pEGFP-VP3 的 293T 细胞, 对免疫小鼠制备的抗 VP3 多克隆抗体进行验证, 并对 AGV7 的 VP3 蛋白在 HCT116 肿瘤细胞中的定位进行了观察。

结果与讨论

通过 EXnaseTMII 酶进行体外重组连接克隆, 我们成功获得了 AGV7 的 GST-VP3 融合表达产物。利用 GST 琼脂糖凝胶柱对可溶的 GST-VP3 表达产物进行了纯化, 并免疫小鼠成功获得抗 AGV7 的 VP3 蛋白的抗体。western blot 免疫印迹证明, 制备的抗 AGV7 的 VP3 蛋白的小鼠多克隆抗体能与在 293T 细胞中表达的 EGFP-VP3 融合表达产物进行良好的免疫反应。荧光共聚焦显微镜观察发现, EGFP-VP3 在 HCT116 细胞中表达主要集中在细胞核, 且呈散在点状分布, 类似凋亡小体。这些 AGV7 VP3 表达载体的构建, 表达产物、小鼠多克隆抗体的获得及其在肿瘤细胞中的表达分布, 为进一步研制 AGV7 血清学诊断方法提供了材料, 为深入探究 AGV7 VP3 的生物学功能打下了基础。

主要参考文献

- [1] Rijsewijk, F. A. et al. Discovery of a genome of a distant relative of chicken anemia virus reveals a new member of the genus Gyrovirus. Archives of virology 156, 1097-1100, doi:10.1007/s00705-011-0971-6 (2011).
- [2] Zhang W, Li L, Deng X, Kapusinszky B, Delwart E (2014) What is for dinner? Viral metagenomics of US store bought beef, pork, and chicken. Virology 468-470:303-310
- [3] SHAO H, FAN Z, WAN Z, et al. An efficient and rapid influenza gene cloning strategy for reverse genetics system [J]. Journal of Virological Methods, 2015 (222): 91-94.