

## 草鱼呼肠孤病毒衣壳蛋白 VP7 基因真核表达载体 pCI-VP7 的构建及鉴定

郝贵杰, 潘晓艺, 姚嘉赞, 徐洋, 尹文林, 沈锦玉\*

(浙江省淡水水产研究所, 浙江湖州 313001)

**摘要:** 将编码草鱼呼肠孤病毒(*grass carp reovirus*, GCRV)主要衣壳蛋白 VP7 0.9 kb 的基因片段连接至克隆载体 pMD19-T 中, 筛选阳性克隆并测序, 经检测为正确序列后, 再将目的片段克隆入真核表达载体 pCI, 筛选得到阳性重组质粒 pCI-VP7。然后构建 pCI-VP-GFP 重组表达质粒(即 GFP 基因与 VP7 的一段上游基因融合表达), 用 PCR 及酶切方法鉴定克隆的正确性。并用脂质体法将其转染入真核细胞 COS-1 和 CIK 进行瞬时表达, 荧光显微镜观察及 RT-PCR 特异性检测。结果表明, GFP 基因与 VP7 的一段上游基因被成功转染到 COS-1 和 CIK 细胞, 并得到了很好的表达。进而证明 pCI-VP7 可以成功的表达, 为 GCRV 基因疫苗的研制提供了实验资料。

**关键词:** 草鱼呼肠孤病毒; 衣壳蛋白; 转染; 真核表达

**中图分类号:** Q 786; S 917

**文献标识码:** A

草鱼呼肠孤病毒(*grass carp reovirus*, GCRV)为中国分离鉴定的第一株鱼类病毒, 自 Meyers 等<sup>[1-3]</sup>1979 年首次报道水生呼肠孤病毒的分离开始, 已分离鉴定出 60 余株水生呼肠孤病毒。水生呼肠孤病毒直径为 75 nm, 具有双层衣壳, 无囊膜; 其基因组由 11 条分节段的双链 RNA(double strand RNA, dsRNA)组成。该类病毒在 pH3-11 范围内十分稳定, 对氯仿和乙醚有抗性<sup>[4-5]</sup>。基于上述病毒特性与宿主来源, 国际病毒分类委员会第五次会议在呼肠孤病毒科中正式新建水生呼肠孤病毒属(*Aquareovirus*, ARV), 并将 GCRV 纳入该属的成员<sup>[6]</sup>。GCRV 是水生呼肠孤病毒属成员中毒力最强的病毒<sup>[7]</sup>, 可引起草鱼大批死亡, 严重地影响淡水养殖业的健康发展。在 GCRV 研究方面, 国内相继进行了系统的病毒流行病学、生物化学及分子生物学等研究。GCRV 为中国完成全基因序列分析的第一株水生呼肠孤病毒, 也是迄今研究得最系统深入的水生呼肠孤病毒<sup>[8-13]</sup>。近年来, 通过序列分析和三维结构研究, 表明成熟的 GCRV 颗粒由 7

种结构蛋白组成, 其中 VP5 和 VP7 构成了病毒的外层衣壳蛋白, 而且通过蛋白酶裂解实验揭示了 VP5 和 VP7 在病毒感染及致病中起着不可替代的作用<sup>[14-16]</sup>。VP7 蛋白是由 GCRV 第十基因片段编码, 编码框共有 830 bp, 编码约 34 ku 的蛋白。并且, VP7 是病毒颗粒最外层的蛋白, 可能在免疫应答中起着重要的作用。为了进一步研究 VP7 蛋白在病毒致病及其产生免疫应答中的作用, 方勤等<sup>[17]</sup>构建了高效表达 VP7 蛋白的原核表达载体, 证明 VP7 蛋白具有较好的抗原性。我们进一步将 GCRV VP7 基因片段克隆入真核表达载体, 并在真核细胞中进行了成功表达, 为 GCRV 基因工程疫苗的研制提供了实验基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 菌株和载体

大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、真核表达载体 pCI (Clontech 公司产品) 和 pEGFP-N1 载体由浙江大学动物科学学院惠赠, 克隆载体 pMD19-T Simple Vector 试剂盒为 TaKaRa 公司产品。

收稿日期: 2009-10-21 修回日期: 2010-01-21

资助项目: 浙江省科技厅重点项目(2007C22052)

通讯作者: 沈锦玉, Tel: 0572-2041403, E-mail: sjinyu@126.com

## 1.2 细胞株

COS-1 细胞由扬州大学预防兽医学农业部重点实验室惠赠, CIK 细胞由本实验室保存。

## 1.3 主要试剂

Trizol、RNA 提取试剂盒、一链合成试剂盒(反转录试剂盒)、限制性内切酶、 $T_4$  DNA 连接酶、*Ex Taq* 酶、Agarose Gel DNA Purification Kit, 氨苄青霉素等购自 TaKaRa 公司; lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司。IPTG 和 X-gal 购自上海华美生物公司。DMEM 为 Sigma 公司产品, 小牛血清购自杭州四季青公司, 其它为国产分析纯。

## 1.4 GCRV VP7 基因 PCR 的扩增、克隆和鉴定

**PCR 扩增** GCRV RNA 的抽提参照 Trizol 操作说明书进行, RNA 的反转录参照一链合成试剂盒进行。根据 GeneBank 中发表的草鱼呼肠孤病毒主要衣壳蛋白 VP7 基因序列(序列号 AF403396, AF236688), 辅用分子生物学软件 Primer Premier 5.0 设计了 1 对 PCR 引物。引物 1: 5'-CG GAA TTC ACC ACG ATG CCA CTT CAC-3' (含 *EcoR* I 位点), 引物 2: 5'-CTAC GTC GAC AAC GAG AGA CCC CTA CAC-3' (含 *Sal* I 位点), 预计产物为 900 bp。反应体系: 反应总体积 50  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 37.75  $\mu$ L, 10  $\times$  *Ex Taq* Buffer (内含  $Mg^{2+}$ ) 5  $\mu$ L, P1 (100 nmol/L) 1  $\mu$ L, P2 (100 nmol/L) 1  $\mu$ L, dNTP (2.5 mmol/L) 4  $\mu$ L, *Ex Taq* 酶 (5U) 0.25  $\mu$ L, 模板 cDNA 1  $\mu$ L。反应条件: 预变性 94  $^{\circ}$ C, 5 min, 然后按 94  $^{\circ}$ C, 50 s; 54  $^{\circ}$ C, 50 s; 72  $^{\circ}$ C, 1 min; 30 个循环, 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4  $^{\circ}$ C 10 min。取 5  $\mu$ L PCR 产物以 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 进行鉴定。

**PCR 产物的克隆和鉴定** 目的基因 PCR 扩增产物用琼脂糖凝胶 DNA 纯化试剂盒回收纯化, 与载体 pMD19-T 连接, 转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 在涂有 IPTG, X-Gal 和含有 50  $\mu$ g/mL *Amp*<sup>+</sup> 的 LB 平板上涂布进行初步筛选, 挑取白色菌落抽提重取质粒, 进行酶切和 PCR 鉴定, 阳性重组质粒命名为 T-VP7, 将阳性重组质粒送至上海英骏公司测序。

## 1.5 增强型绿色荧光蛋白 (EGFP) 基因 PCR 的扩增、克隆和鉴定

**PCR 扩增** 根据 pEGFP-N1 载体上 EGFP 的基因序列, 辅用分子生物学软件 Primer Premier

5.0 设计了 1 对 PCR 引物, 引物 3: 5'-TA GAT ATC AAG GGC GAG GAG CTG TTC A-3' (含 *EcoR* V 位点), 引物 4: 5'-GC GTC GAC TAT GTT TCA GGT TCA GGG GG-3' (含 *Sal* I 位点), 预期产物为 825 bp, 其中 *Sal* I 与 pCI 上相应的多克隆位点相吻合, *EcoR* V 与 GCRV VP7 基因片段中游的酶切位点相吻合。反应体系: 反应总体积 50  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 38.55  $\mu$ L, 10  $\times$  *Ex Taq* Buffer (内含  $Mg^{2+}$ ) 5  $\mu$ L, P3 (100 nmol/L) 1  $\mu$ L, P4 (100 nmol/L) 1  $\mu$ L, dNTP (2.5 mmol/L) 4  $\mu$ L, *Ex Taq* 酶 (5U) 0.25  $\mu$ L, 载体 pEGFP-N1 质粒 DNA 模板 0.2  $\mu$ L。反应条件: 预变性 94  $^{\circ}$ C, 5 min, 然后按 94  $^{\circ}$ C, 50 s; 48  $^{\circ}$ C, 50 s; 72  $^{\circ}$ C, 1 min; 30 个循环, 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4  $^{\circ}$ C 10 min。取 5  $\mu$ L PCR 产物以 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 进行鉴定。

**PCR 产物的克隆和鉴定** 目的基因 PCR 扩增产物用琼脂糖凝胶 DNA 纯化试剂盒回收纯化, 与载体 pMD19-T 连接, 转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 在涂有 IPTG, X-Gal 和含有 50  $\mu$ g/mL *Amp*<sup>+</sup> 的 LB 平板上涂布进行初步筛选, 挑取白色菌落抽提重取质粒, 进行酶切和 PCR 鉴定, 阳性重组质粒命名为 T-GFP, 将阳性重组质粒送至上海英骏公司测序。

## 1.6 重组质粒 pCI-VP7 的构建及鉴定

**pCI-VP7 的构建** 以 *EcoR* I 和 *Sal* I 对 T-VP7 及质粒载体 pCI 分别进行双酶切, 再对两者的酶切产物分别用琼脂糖凝胶 DNA 纯化试剂盒回收纯化。然后按照 3:1 的比例 (目的片段:pCI) 将两者混合, 加  $T_4$  DNA 连接酶, 于 16  $^{\circ}$ C 反应过夜。以连接产物转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 在含有 50  $\mu$ g/mL *Amp*<sup>+</sup> 的 LB 平板上进行筛选, 挑取白色菌落进行扩增, 并小量提取质粒。

**重组质粒 pCI-VP7 的鉴定** PCR 鉴定用 1.4 中的特异性上下游引物对重组质粒 pCI-VP7 进行 PCR 扩增, PCR 产物再进行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定。酶切鉴定用 *EcoR* I 以及 *EcoR* I 和 *Sal* I 分别对重组质粒 pCI-VP7 进行单酶切和双酶切后, 进行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

## 1.7 重组质粒 pCI-VP-GFP 的构建

**pCI-VP-GFP 的构建** 以 *EcoR* V 和 *Sal* I 对 T-GFP 及重组质粒 pCI-VP7 (其中 *EcoR* V 是 VP7 基因片段中部的一个酶切位点) 分别进行双

酶切,再对两者的酶切产物分别用琼脂糖凝胶 DNA 纯化试剂盒回收纯化。然后按照 3:1 的比例(目的片段:pCI-VP)将两者混合,加  $T_4$  DNA 连接酶,与  $16\text{ }^\circ\text{C}$  反应过夜。以连接产物转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞,在含有  $50\text{ }\mu\text{g/mL Amp}^+$  的 LB 平板上进行筛选,挑取白色菌落进行扩增,并少量提取质粒。

**重组质粒 pCI-VP-GFP 的鉴定** PCR 鉴定,用 1.5 中扩增 EGFP 基因的特异性上下游引物对重组质粒 pCI-VP-GFP 进行 PCR 扩增,PCR 产物再进行  $10\text{ g/L}$  琼脂糖凝胶电泳鉴定。酶切鉴定,用 *EcoR* V 以及 *EcoR* V 和 *Sal* I 分别对重组质粒 pEGFP-N1-VP7 进行单酶切和双酶切后,进行  $10\text{ g/L}$  琼脂糖凝胶电泳鉴定。

### 1.8 pCI-VP-GFP 质粒转染 COS-1 和 CIK 细胞

以转染 COS-1 细胞为例说明转染步骤,转染 CIK 步骤相同,只是 CIK 细胞培养温度为  $28\text{ }^\circ\text{C}$ 。转染用 COS-1 细胞用含小牛血清的 DMEM 培养:①将生长状态好的 COS-1 细胞用胰酶消化并计数,取  $(2\sim3)\times 10^5$  个细胞转移到 1 个 35 mm 的 dish 内, $37\text{ }^\circ\text{C}$  培养 18~24 h,准备转染。②240  $\mu\text{L}$  无血清、无抗生素的 DMEM 与 10  $\mu\text{L}$  转染试剂在指形管中混匀,于室温放置 30 min。③将 5  $\mu\text{L}$  质粒(约 3  $\mu\text{g}$ ) 加到 245  $\mu\text{L}$  无血清、无抗 DMEM 中。④在另一指形管中,将②和③混匀,室温放置 10~15 min。⑤与此同时,将准备转染的细胞用无血清、无抗的 DMEM 清洗 2 遍后,将④中混合物轻轻逐滴加入已清洗的细胞中,边加边混匀,并补加 0.5 mL 的无血清、无抗 DMEM,于  $37\text{ }^\circ\text{C}$  培养 6~8 h。⑥弃上清,换入含有小牛血清的 DMEM 约 1 mL,于  $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中继续培养 48 h,在荧光显微镜下观察。⑦同时用空载体 pCI 转染 COS-1 细胞(方法同上)作为阴性对照。

### 1.9 RT-PCR 检测转染质粒的转录

按 RNA 提取试剂盒说明提取转染 pCI-VP-GFP 质粒的 COS-1 和 CIK 细胞总 RNA,DNA 酶 I  $37\text{ }^\circ\text{C}$  消化 1 h,煮沸 10 min 灭活。按逆转录试剂盒说明进行 cDNA 合成,然后用 1.5 中的 GFP 特异性引物进行 PCR 扩增,再进行  $10\text{ g/L}$  琼脂糖凝胶电泳鉴定。

## 2 结果

### 2.1 GCRV VP7 基因 PCR 产物的鉴定

取 5  $\mu\text{L}$  GCRV VP7 基因的 PCR 产物进行凝胶电泳鉴定,可观察到 0.9 kb 左右的目的 DNA 条带,大小与预期扩增的目的片段相符合(图 1)。

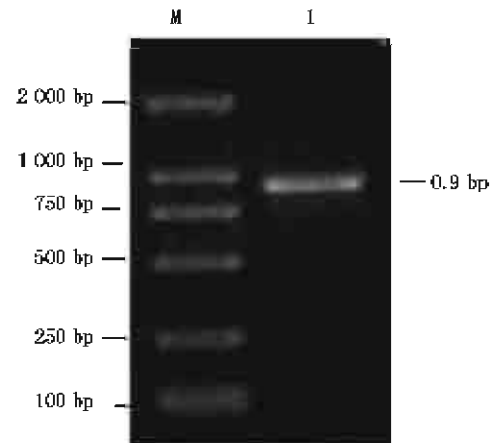


图 1 GCRV VP7 基因的 PCR 扩增电泳图谱

M. DL2000 标准分子量; 1. PCR 扩增产物。

Fig. 1 PCR amplification of VP7 gene of GCRV

M. DL2000 Marker; 1. PCR amplification products.

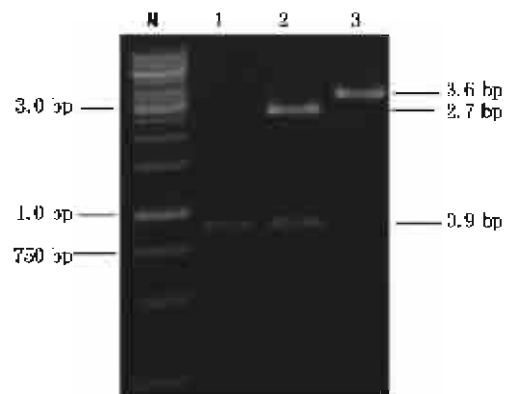


图 2 重组质粒 T-VP7 酶切及 PCR 鉴定结果

M. 1 kb DNA 标准分子量; 1. PCR 扩增产物; 2. T-VP7 的单酶切鉴定; 3. T-VP7 的双酶切鉴定。

Fig. 2 Characterization of recombinant plasmids by PCR and enzyme digestion

M. 1 kb DNA Marker; 1. PCR amplification products; 2. T-VP7 digested by *EcoR* I; 3. T-VP7 digested by *EcoR* I/*Sal* I.

## 2.2 重组质粒 pMD19-T-VP7 的鉴定

按照 1.4 中方法筛选后,PCR 扩增及电泳鉴定,结果显示 1 条 0.9 kb 左右的条带(图 2)。用 *EcoR* I 以及 *EcoR* I 和 *Sal* I 分别对重组质粒 T-VP7 进行单酶切和双酶切,电泳鉴定结果显示与载体大小及预期片段相符合。PCR 及酶切结果表明,GCRV VP7 基因片段已成功克隆入 pMD19-T 中(图 2)。

## 2.3 重组质粒 pMD19-T-GFP 的鉴定

按照 1.5 中方法筛选后,PCR 扩增及电泳鉴定结果显示 1 条 825 bp 左右的条带(图 3)。用 *EcoR* V 以及 *EcoR* V 和 *Sal* I 分别对重组质粒 T-VP7 进行单酶切和双酶切,电泳鉴定结果显示与载体大小及预期片段相符合。PCR 及酶切结果表明,GFP 基因片段已成功克隆入 pMD19-T 中(图 3)。

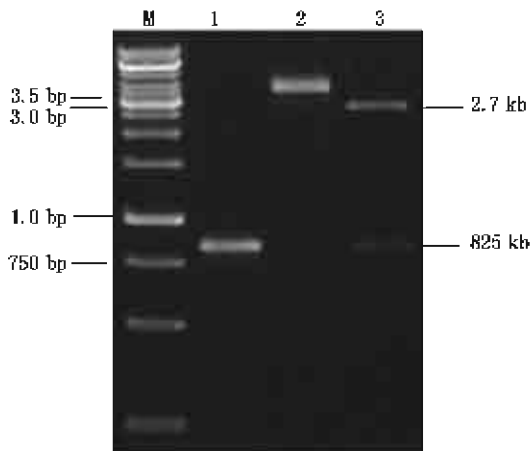


图 3 重组质粒 T-GFP 酶切及 PCR 鉴定结果

M. 1 kb DNA 标准分子量;1. PCR 扩增产物;2. T-GFP 的单酶切鉴定;3. T-GFP 的双酶切鉴定。

### Fig. 3 Characterization of recombinant plasmids by PCR and enzyme digestion

M. 1 kb DNA Marker; 1. PCR amplification products; 2. T-GFP digested by *EcoR* V; 3. T-GFP digested by *EcoR* V/*Sal* I.

## 2.4 重组质粒 pCI-VP7 的鉴定

按照 1.6 中方法筛选后,PCR 扩增及电泳鉴定结果显示 1 条 0.9 kb 左右的条带(图 4)。用 *EcoR* I 以及 *EcoR* I 和 *Sal* I 分别对重组质粒 T-VP7 进行单酶切和双酶切,电泳鉴定结果显示与载体大小及预期片段相符合。PCR 及酶切结果表明,GCRV VP7 基因片段已成功克隆入 pCI 中(图 4)。

## 2.5 重组质粒 pCI-VP-GFP 的鉴定

按照 1.7 中方法筛选后,PCR 扩增及电泳鉴定结果显示 1 条 825 bp 左右的条带(图 5)。用 *EcoR* V 以及 *EcoR* V 和 *Sal* I 分别对重组质粒 pCI-VP-GFP 进行单酶切和双酶切,电泳鉴定结果显示与载体大小及预期片段相符合。PCR 及酶切结果表明,GFP 基因片段已成功克隆入 pCI-VP7 中(图 5)。

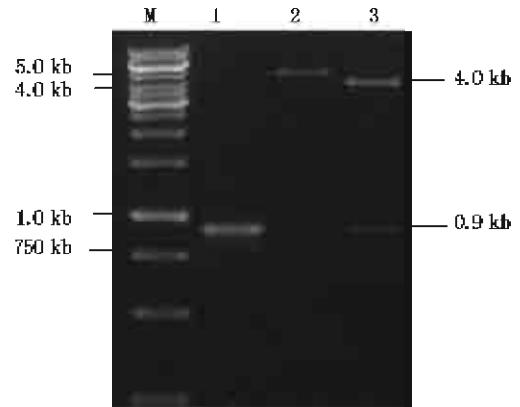


图 4 重组质粒 pCI-VP7 酶切及 PCR 鉴定结果

M. 1 kb DNA 标准分子量;1. PCR 扩增产物;2. pCI-VP7 的单酶切鉴定;3. pCI-VP7 的双酶切鉴定。

### Fig. 4 Characterization of recombinant plasmids PCR and enzyme digestion

M. 1 kb DNA Marker; 1. PCR amplification products; 2. pCI-VP7 digested by *EcoR* I; 3. pCI-VP7 digested by *EcoR* I/*Sal* I.

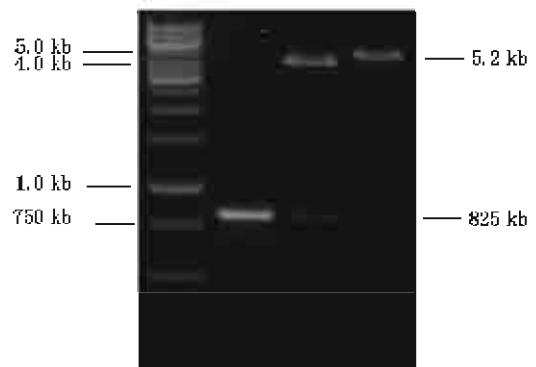


图 5 重组质粒 pCI-VP-GFP 酶切及 PCR 鉴定结果

M. 1 kb DNA 标准分子量;1. PCR 扩增产物;2. pCI-VP-GFP 的单酶切鉴定;3. pCI-VP-GFP 的双酶切鉴定。

### Fig. 5 Characterization of recombinant plasmids by PCR and enzyme digestion

M. 1 kb DNA Marker; 1. PCR amplification products; 2. pCI-VP-GFP digested by *EcoR* V; 3. pCI-VP-GFP digested by *EcoR* V/*Sal* I.

## 2.6 VP7 与 GFP 基因在 COS 细胞中的融合表达

按照 1.8 中方法,以重组质粒 pCI-VP-GFP 转染 COS-1 细胞,37 ℃ 培养 48 h 后,在荧光显微镜下观察到很亮的绿色荧光,说明 EGFP 基因与 VP7 基因在 COS-1 细胞中表达成功(图 6);而空载体 pCI 转染 COS-1 细胞则不产生荧光。

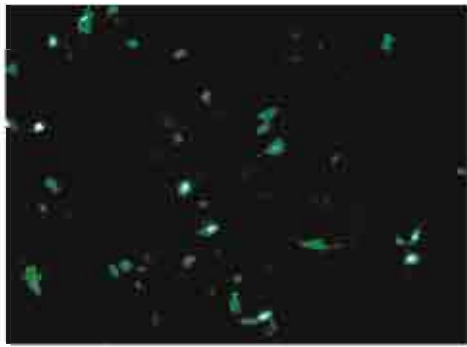


图 6 VP7 与 GFP 基因在 COS-1 细胞中的表达(×200)  
Fig. 6 The expression of VP7 and GFP genes in COS-1

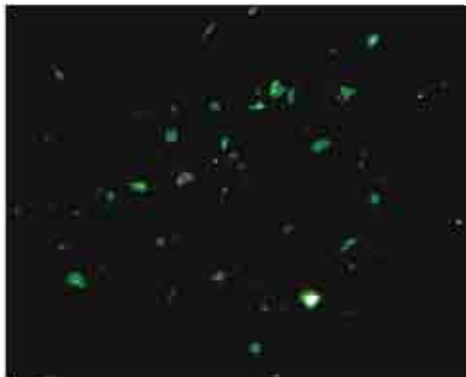


图 7 VP7 与 GFP 基因在 CIK 细胞中的表达(×200)  
Fig. 7 The expression of VP7 and GFP genes in CIK

## 2.7 VP7 与 GFP 基因在 CIK 细胞中的融合表达

按照 1.9 中方法,以重组质粒 pCI-VP-GFP 转染 CIK 细胞,于 28 ℃ 培养 48 h,在荧光显微镜下观察到很亮的绿色荧光,说明 EGFP 基因与 VP7 基因在 CIK 细胞中表达成功(图 7);而空载体 pCI 转染 COS-1 细胞则不产生荧光。

## 2.8 RT-PCR 鉴定重组质粒的转录

按照 1.10 中方法,提取 pCI-VP-GFP 质粒转染的 COS-1 和 CIK 细胞总 RNA,反转录成 cDNA 后,用 GFP 的特异性引物进行 PCR 扩增,电泳的结果显示 1 条 825 bp 左右的条带,而空载体 pCI 转染的 COS-1 和 CIK 细胞则没有任何条带(图 8)。

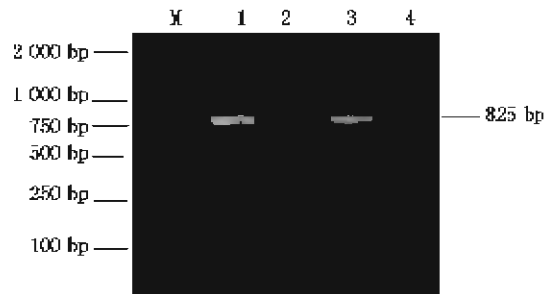


图 8 转染细胞中 GFP 的 RT-PCR 检测

M. DL2000 标准分子量; 1. COS-1 转染 pCI-VP-GFP 质粒后的扩增产物; 2. COS-1 转染 pCI 质粒后的扩增产物; 3. CIK 转染 pCI-VP-GFP 质粒后的扩增产物; 4. CIK 转染 pCI 质粒后的扩增产物。

## Fig. 8 GFP analysis of transfected cells by RT-PCR

M. DL2000 Marker; 1. GFP gene from COS-1 cells transfected with pCI-VP-GFP; 2. No product obtained from COS-1 cells transfected with pCI; 3. GFP gene from CIK cells transfected with pCI-VP-GFP; 4. No product obtained from CIK cells transfected with pCI.

## 3 讨论

草鱼呼肠孤病毒可引起草鱼出血病的大面积爆发,该病流行于我国各地养殖区,尤以长江流域和广东、广西、福建最为普遍,死亡率可达 50%~80%,严重影响我国草鱼养殖业的发展。大量的研究证明,VP7 基因所编码的产物是 GCRV 主要外壳蛋白,Fang 等<sup>[17]</sup>将 GCRV VP7 编码基因片段构建了原核表达载体并进行表达,经对表达产物的检测及免疫小鼠表明,该表达蛋白具有很好的抗原性。我们在前期工作的基础上进一步探讨 GCRV VP7 基因片段成为基因疫苗新材料的可能性。

DNA 疫苗在鱼类的应用已有成功报道<sup>[18-20]</sup>,Lorenzen 等<sup>[21]</sup>对病毒性出血败血症病毒(VHSV)糖蛋白构建的 DNA 疫苗能诱导 70% 的虹鳟产生较高水平的免疫保护。Kim 等<sup>[22]</sup>按照

IHNV、SVCV、SHRV 的糖蛋白基因构建三种病毒的 DNA 疫苗,免疫虹鳟后进行攻毒试验,发现三种疫苗均使虹鳟产生了对各病毒的免疫抵抗力。2005 年世界上有两种 DNA 疫苗拿到使用许可证书,其中之一就是针对虹鳟(IHNV)的 DNA 疫苗<sup>[23]</sup>。这说明鱼类 DNA 疫苗的免疫效果已得到认可并具有良好的发展前景。目前国内外对 GCRV 基因工程疫苗的研究还未见报道。我们选择了真核表达载体 pCI 作为构建载体,不同类型真核表达质粒的启动子/增强子、内含子序列等调控元件可直接影响基因表达效率和 DNA 疫苗的免疫效果。pCI 载体除了带有 CMV 的早期启动子/增强子以外,还含有来源于  $\beta$  球蛋白基因的内含子序列,此序列的存在可明显增加基因的表达,比无此内含子序列的载体 pcDNA3 表达能力强 10~40 倍<sup>[24]</sup>。我们构建了 pCI-VP7 真核表达载体,PCR 及酶切鉴定结果表明载体构建正确。

为了能够体外鉴定目的蛋白是否表达,我们进一步构建了 pCI-VP-GFP,使 VP7 基因片段的一部分和绿色荧光蛋白(GFP)能够进行融合表达,PCR 及酶切鉴定结果表明载体构建正确。GFP 是一种生物发光物质,其荧光强弱取决于蛋白的含量,并且在活细胞内长时间存在,还可通过荧光显微镜在活细胞内动态观察所研究得蛋白质<sup>[25]</sup>。将 pCI-VP-GFP 转染 COS-1 和 CIK 细胞,在荧光显微镜下均可观察到绿色荧光,说明 EGFP 基因与 VP7 基因在 COS-1 和 CIK 细胞中表达成功,转染细胞 RT-PCR 特异性检测显示,可扩增出约 825 bp 的 GFP 基因片段,表明该重组质粒已成功转染入细胞,研究表明构建的重组质粒 pCI-VP7 可成功转染到真核细胞中,并可以在其中自行表达,为今后 GCRV DNA 疫苗的研究奠定了基础。

#### 参考文献:

- [1] Meyers T R. A Reo-like virus isolated from juvenile American oysters (*Crassostrea virginica*) [J]. J Gen Virol, 1979, 43(5): 203-212.
- [2] Lupiani B, Subramanian K, Samal S K. Aquareoviruses [J]. Ann Rev Fish Dis, 1995, 5(3): 175-208.
- [3] Rangel A A, Rockemann D D, Hetrick F M, et al. Identification of grass carp haemorrhage virus as a new genogroup of aquareovirus [J]. J Gen Virol, 1999, 80(6): 2399-2402.
- [4] Winton J R, Lannan C N, Fryer J L, et al. Morphological and biochemical properties of four members of a novel group of reoviruses isolated from aquatic animals [4]. J Gen Virol, 1987, 68(2): 353-356.
- [5] 柯丽华,方勤,蔡宜权. 一株新的草鱼出血病病毒分离物的特性 [J]. 水生生物学报, 1990, 14(2): 153-159.
- [6] Francki R I B, Fanquet C M, Knudson D L, et al. Classification and nomenclature of viruses: Fifth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses [J]. Arch Virol, 1991 (Suppl), 2: 186-192.
- [7] Rangel A A, Rockemann D D, Hetrick F M. Identification of grass carp hemorrhage virus as a new genogroup of aquareovirus [J]. J Gen Virol, 1999, 80: 2399-2402.
- [8] Fang Q, Attoui H, Francois J, et al. Sequence of genome segments 1, 2 and 3 of the grass carp reovirus (Genus Aquareovirus, Family Reoviridae) [J]. BBRC, 2000, 274(3): 762-766.
- [9] Qiu T, Lu R H, Zhang J, et al. The molecular characterization of RNA segment S9 of grass carp hemorrhage virus (GCHV), an aquareovirus [J]. Aquaculture, 2001, 203(1-2): 1-7.
- [10] Qiu T, Lu R H, Zhang J. et al. Genome segment 38 of grass carp hemorrhage virus encodes a virion protein [J]. Intervirology, 2001, 44(5): 317-320.
- [11] Qiu T, Lu R H, Zhang J, et al. Molecular characterization and expression of the M6 gene of grass carp hemorrhage virus (GCHV), an aquareovirus [J]. Arch Virol, 2001, 146(7): 1391-1397.
- [12] Qiu T, Lu R H, Zhang J, et al. Complete nucleotide sequence of the S10 genome segment of grass carp reovirus (GCHV) [J]. Dis Aquar Organ, 2001, 44(1): 69-74.
- [13] 方勤,朱作言. 水生呼肠孤病毒研究进展 [J]. 中国病毒学, 2003, 18(1): 82-86.
- [14] Fang Q, Shah S, Liang Y, et al. 3D reconstruction and capsid protein characterization of grass carp reovirus [J]. Science in China Series C, 2005, 48(6): 593-600.
- [15] Ivanovic T, Agosto M A, Nibert M L. A role for molecular chaperone Hsc70 in reovirus outer capsid disassembly [J]. J Biol Chem, 2007, 282(16):

- 12210-12219.
- [16] Fang Q, Seng E K, Ding Q Q. Characterization of infectious particles of grass carp reovirus by treatment with proteases[J]. *Arch Viro*, 2008, 153 (2):675-682.
- [17] Zhang L L, Shen J Y, Fang Q, *et al.* High level expression of grass carp reovirus VP7 protein in prokaryotic cells[J]. *Virologica Sinica*, 2008, 23 (1):51-56.
- [18] Lorenzen N, Lorenzen E, Einer-Jensen K, *et al.* DNA vaccines as a tool for analyzing the protective immune response against rhabdoviruses in rainbow trout[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2002, 12 (5):439-453.
- [19] Katrin U, Holger K, Heike S, *et al.* Cell-mediated immune responses in rainbow trout after DNA immunization against the viral hemorrhagic septicemia virus [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2008, 32 (4):239-252.
- [20] Tian J Y, Sun X Q, Chen X G. Formation and oral administration of alginate microspheres loaded with pDNA coding for lymphocystis disease virus (LCDV) to Japanese flounder[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 24(5):592-599.
- [21] Lorenzen N, Lorenzen E, Einerjensen K, *et al.* Protective immunity to VHS in rainbow trout [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 1998, 18(4):261-270.
- [22] Kim C H, Johnson M C, Drennan J D, *et al.* DNA vaccines encoding viral glycoproteins induce nonspecific immunity and Mx protein synthesis in fish [J]. *J Virol*, 2000, 74(14):7048-7054.
- [23] Lorenzen N, Patra L. DNA vaccines for aquacultured fish[J]. *Rev Sci Tech*, 2005, 24(3):201-203.
- [24] Suarez D L, Schultz-Cherry S. The effect of eukaryotic expression vectors and adjuvants on DNA vaccines in chickens using an avian influenza model [J]. *Avian Dis*, 2000, 44(4):861-868.
- [25] 张晓红,唐圣松,李剑敏,等. 巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)融合 EGFP 真核表达载体的构建及表达[J]. *实用预防医学*, 2005, 12(60):1257-1260.

## Construction and identification of recombinant eukaryotic expression vector pCI-VP7 containing GCRV VP7 gene

HAO Gui-jie, PAN Xiao-yi, YAO Jia-yun, XU Yang, YIN Wen-lin, SHEN Jin-yu\*  
(Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001)

**Abstract:** A target sequence of 0.9kb which codes the major capsid protein VP7 of grass carp reovirus (GCRV) was amplified by PCR. The target fragment was inserted into the pMD19-T vector. The positive clone was screened and sequenced. Sequencing result showed the nucleic acid sequence is right. Then the target gene was cloned into eukaryotic expression vector pCI and the positive clone was screened. The recombinant plasmid pCI-VP7 extracted from the positive clone were identified by PCR and digestion. Then the recombinant plasmid pCI-VP-GFP (fusion expression of GFP and partial VP7 gene) was constructed to testify the expression of VP7 gene. The recombinant plasmid pCI-VP7-GFP were transfected into COS-1 and CIK cells by lipofectamine 2000. Fluorescence microscope and RT-PCR was used to detect the transient expression. The results showed that the gene fragment was transfected and expressed in COS-1 and CIK cell successfully. The results indicated that the recombinant plasmid pCI-VP7 can also express successfully. It establishes foundation to research the gene vaccine of GCRV.

**Key words:** grass carp reovirus; major capsid protein; transfection; eukaryotic expression

**Corresponding author:** SHEN Jin-yu. E-mail: sjinyu@126.com