

1 型鸭甲型肝炎病毒 3D 基因的原核表达与多抗制备

王安平, 朱善元*, 吴 双

(江苏农牧科技职业学院, 江苏省兽用生物制药高技术研究重点实验室, 泰州 225300)

摘 要: 根据血清 1 型鸭甲型肝炎病毒(DHAV-1) SH 株 3D 基因序列设计并合成 1 对特异性引物, 通过 RT-PCR 方法扩增 3D 基因, 将其克隆入原核表达载体 pET-32a, 转化大肠杆菌 BL21(DE3), 在 IPTG 的诱导培养下重组蛋白获得了成功表达。SDS-PAGE 显示重组蛋白的分子量约为 68 kD, Western blot 分析显示该重组蛋白能与多聚组氨酸标签单抗发生特异性反应。将切胶后纯化的目的蛋白免疫 ICR 小鼠, 制备针对重组蛋白的多抗血清, Western blot 结果显示制备的抗血清能够与 DHAV-1 感染的 SPF 鸡胚尿囊液总蛋白发生特异反应。以上结果表明, 3D 基因在大肠杆菌中获得了成功表达, 且制备的多抗血清可以用于 3D 蛋白的检测, 为 3D 蛋白的功能研究奠定了基础。

关键词: 鸭甲型肝炎病毒; 3D 基因; 原核表达; 抗血清

中图分类号: S855.3

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2015)04-0536-04

Prokaryotic expression and antiserum preparation of the 3D gene of Duck hepatitis A virus type-1

WANG Anping, ZHU Shanyuan, WU Shuang

(Veterinary Bio-pharmaceutical, Jiangsu Province Key Laboratory of High-tech Research, Jiangsu Agri-animal Husbandry Vocational College, Taizhou 225300)

Abstract: According to the genome sequences of duck hepatitis A virus type-1(DHAV-1), one pair of specific primers was designed to amplify the 3D gene using RT-PCR. The amplified fragment was cloned into prokaryotic expression vector pET-32a and the recombinant plasmid was transformed into BL21(DE3) *E.coli*. Recombinant proteins were successfully expressed following IPTG induction. SDS-PAGE showed that the recombinant expression protein was about 68 kD. Western blot assay revealed that the desired proteins could be recognized by the monoclonal antibody against histidine-tagged proteins. The antiserum against the recombinant protein was produced by the immunized ICR mouse with recombinant proteins. Western blot results showed that the antiserum could react specifically with DHAV-1 allantoic fluid. These results showed that the 3D gene was successfully expressed in *E.coli* and the antiserum could be used for detection of the 3D protein, which would lay a foundation for function study of the 3D protein.

Key words: duck hepatitis A virus type; 3D gene; prokaryotic expression; antiserum

鸭病毒性肝炎 (duck Viral Hepatitis, DVH) 是一种急性、高度致死性传染病, 可引起 21 日龄以下的雏鸭发生急性肝炎, 病死率高达 100%, 是严重危害养鸭业的疫病之一。过去认为 DVH 包括 3 个血清型, 即 I 型、II 型和 III 型, 国内外发生和流行的主要是 I 型鸭肝炎病毒 (DHV-I) [1-3], 2005 年国际病毒分类委员会发表的最新病毒分类报告将

DHV-II 和 DHV-III 归属于星状病毒科。2008 年后的分类, 将引起鸭甲型病毒性肝炎的病毒归属于小 RNA 病毒科的禽肝炎病毒属鸭甲型肝炎病毒种, 称为鸭甲型肝炎病毒 (duck hepatitis A virus, DHAV), DHAV 包括经典型 (即我国原 I 型鸭肝炎病毒)、台湾新型、韩国新型 3 种亚型, 名称分别为 DHAV-1、DHAV-2 和 DHAV-3 [4-7]。其中 DHAV-1 呈世界性分

收稿日期: 2014-07-31

基金项目: 国家自然科学基金 (31302096), 江苏省农业支撑项目 (BE2013415), 江苏省自然科学基金项目 (BK2011536), 江苏省“企业博士集聚计划”和江苏省“六大人才高峰项目” (NY-009) 共同资助。

作者简介: 王安平, 博士, 副教授。

* 通信作者: 朱善元, 教授。E-mail: jstzsy@126.com

布, 也是中国 DHAV 流行的主要血清型。

鸭肝炎病毒粒子呈二十面体对称, 无囊膜, 核心为单股正链 RNA, 整个基因组约有 7690 个核苷酸组成, 编码 2249 个氨基酸, 只有一个较大的开放读码框, 病毒的 RNA 指导合成一条完整蛋白, 称为多聚蛋白。多聚蛋白在翻译过程中不断被自身编码的蛋白酶水解, 分解成 P1、P2 和 P3 产物, P1、P2 和 P3 又进一步分别分解为小片段蛋白。编码的蛋白的顺序为 5'-UTR-VP0-VP3-VP1-2A1-2A2-2A3-2B-2C-3A-3B-3C-3D-3'UTR。其中 3D 蛋白是 RNA 依赖的 RNA 聚合酶, 分子量约为 51 kD, 在病毒的复制过程中发挥重要作用^[8]。目前, 关于 DHV 的研究主要集中在不同分离株的基因组分析、分子诊断试剂等方面, 对于各蛋白的功能、病毒的致病机制和新型疫苗等方面研究还比较滞后^[9-11]。本研究利用大肠杆菌系统表达 DHAV-1 SH 株的 3D 基因, 制备其多抗血清, 为进一步研究 3D 蛋白功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 毒株、菌株和载体 DHAV-1 SH 毒株由中国上海兽医研究所惠赠; 9 日龄 SPF 鸡胚购于江苏农牧科技职业技术学院国家水禽基因库; 鸭抗 DHAV-1 阳性血清、PET-32a 载体、大肠杆菌 BL21(DE3)和 DH5 α 均由江苏省兽用生物制药高技术重点实验室保存。

1.1.2 主要试剂 Trizol 试剂盒购自 TaKaRa 公司; M-MLV 反转录酶购自 Invitrogen 公司; T4 DNA 连接酶、*Bam*H I 和 *Sac* I 购于 Fermentas 公司; His 标签单抗、HRP-羊抗鼠 IgG、质粒小提试剂盒、DAB 显色试剂盒购于康为世纪公司; DNA 胶回收试剂盒购于爱思进公司。

1.1.3 引物设计与合成 根据 GenBank 中发表的 DHAV-1 SH 株病毒核苷酸序列 (HQ232302), 设计了针对 3D 基因序列的 1 对引物, 上游加入 *Bam*H I 酶切位点, 下游加入 *Sac* I 酶切位点, 由上海英潍捷基生物技术有限公司合成。引物序列为: 3D-F/R: 5'-GAAGGATCCGGGAAAGTAGTGAGT AAGC-3' (下划线为 *Bam*H I 酶切位点) /5'-CAA GAGCTCTCAGATCATCATGCAAGCTG-3' (下划线为 *Sac* I 酶切位点)。目的基因预期为 1380 bp。

1.2 方法

1.2.1 DHAV-1 的增殖与病毒 RNA 的提取 取 0.2 mL 10 倍稀释的原代病毒接种于 9 日龄 SPF 鸡胚尿

囊腔, 37℃ 孵化箱孵化。选择 48~72 h 之内死亡的鸡胚, 置于 4℃ 过夜, 收集尿囊液。按 Trizol 法抽提尿囊液总 RNA, 操作参照说明书。

1.2.2 DHAV-1 3D 基因的扩增 根据 Invitrogen 公司的 RT-PCR 试剂盒操作说明进行操作, 反应程序设定为: 25℃, 10 min; 42℃, 90 min; 70℃, 10 min。PCR 反应条件为: 95℃ 预变性 3 min; 95℃ 30 s、55℃ 30 s、72℃ 90 s, 共进行 30 个循环; 72℃ 再延伸 10 min。PCR 产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.2.3 重组质粒载体 pET-3D 的构建 PCR 产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分离回收, 纯化的目的基因经 *Bam*H I、*Sac* I 酶切后, 与经 *Bam*H I、*Sac* I 酶切的 pET-32a 连接, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 在含 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 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。酶切鉴定正确后送由上海英潍捷基生物技术有限公司测序, 测序正确的克隆命名为 pET-3D。

1.2.4 重组蛋白的诱导表达 将重组质粒 pET-3D 转化至 *E.coli* BL21 (DE3), 挑取单菌落接种于 5 mL 含氨苄青霉素 (Amp) 抗性的 LB 液体培养基中, 37℃ 振荡培养过夜, 次日按 1% 接种量转接至含 Amp 的 5 mL LB 液体培养基中, 37℃、200 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡培养, 当菌液 $D_{600\text{ nm}}$ 值达 0.6 左右时, 取出 1 mL 做对照, 其余的培养基中加入 IPTG 至终浓度为 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 37℃ 诱导表达, 在诱导后 5 h 离心收集菌体, 溶于适量 PBS 中, 超声波裂解菌体, 离心后分别收集上清及沉淀, 于 -20℃ 保存备用。在相同条件下诱导含表达质粒 pET-32a 的空载体及未加诱导剂的受体菌作为空白和阴性对照。

1.2.5 重组蛋白的检测 分别取 100 μL 的待检样品与 25 μL 的 5 \times SDS 上样缓冲液混匀后, 沸水煮沸 3 min, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分析。然后再将诱导样品和非诱导样品进行 SDS-PAGE 电泳后转印至 PVDF 膜上, 用 5% 的脱脂奶粉 4℃ 封闭过夜, 以鼠抗 His 单抗作为一抗, 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗鼠为二抗, DAB 显色试剂盒进行显色。

1.2.6 重组蛋白抗血清的制备 将重组蛋白经 SDS-PAGE 电泳后切出回收目的条带, 加入少量 PBS 研磨匀浆化, 以皮下两点注射法免疫 6 周龄 ICR 小鼠, 每隔 2 周免疫 1 次, 4 次免疫后第 14 天采血, 分离血清, 至 -80℃ 保存备用。

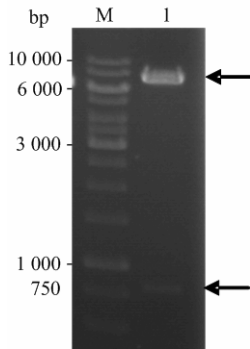
1.2.7 Western blot 检测 3D 抗原 将 DHAV-1 SH 毒株鸡胚尿囊液进行 SDS-PAGE, 然后转印至 PVDF 膜, 用 5% 的脱脂奶粉 4℃ 封闭过夜, 以制备的鼠多

抗血清作为一抗，辣根过氧化物酶（HRP）标记的羊抗鼠为二抗，DAB 显色试剂盒进行显色。同时以未接种 DHAV-1 鸡胚尿囊液作为阴性对照。

2 结果与分析

2.1 DHAV-1 3D 基因的克隆

以提取的尿囊液总 RNA 为模板，RT-PCR 扩增出约 1.4 kb 的目的条带，与预期相符。回收后用 *Bam*H I 和 *Sac* I 酶切，与经同样酶切的 pET-32a 连接，获得阳性克隆，命名为 pET-3D，经 *Bam*H I 和 *Sac* I 双酶切后获得约 0.8 kb 和 7.3 kb 左右的条带（图 1），与预期结果一致，且进一步的测序结果表明，克隆的 3D 基因序列及阅读框完全正确。

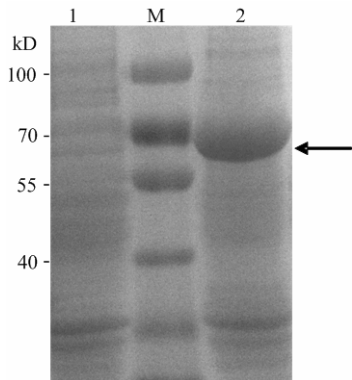


M: DNA 分子质量标准; 1: pET-3D 的 *Bam*H I 和 *Sac* I 双酶切

M: 1 kb DNA ladder; 1: digestion of pET-3D by *Bam*H I and *Sac* I

图 1 重组质粒 pET-3D 的酶切鉴定

Figure 1 Identification of pET-3D by restriction endonucleases digestion

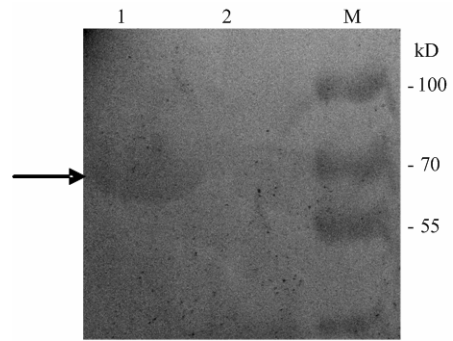


1: *E.coli*/pET-32a IPTG 诱导; 2: *E.coli*/pET-3D IPTG 诱导; M: 蛋白质分子质量标准.

1: *E.coli*/ pET-3C32a with IPTG induction; 2: *E.coli*/ pET-3D with IPTG induction; M: Protein molecular weight marker

图 2 3D 重组蛋白的 SDS-PAGE 分析

Figure 2 SDS-PAGE analysis of 3D recombinant protein

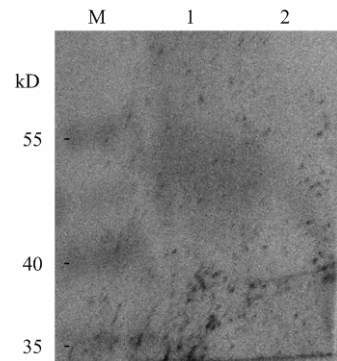


M: 蛋白质分子质量标准; 1: *E.coli*/pET-3D IPTG 诱导; 2: *E.coli*/pET-32a IPTG 诱导

M: Protein molecular weight marker; 1: *E.coli*/ pET-3D with IPTG induction; 2: *E.coli*/ pET-32a with IPTG induction

图 3 3D 重组蛋白的 Western blot 鉴定

Figure 3 Western blot identification of 3D recombinant protein



M: 蛋白质分子质量标准; 1: DHAV-1 SH 毒株尿囊液; 2: SPF 鸡胚正常尿囊液

M: Protein molecular weight marker; 1: SPF embryo infected with DHAV-1 SH strain; 2: normal SPF embryo

图 4 3D 多抗血清的 Western blot 鉴定

Figure 4 Western blot identification of 3D antiserum

2.2 重组蛋白的诱导表达与检测

将 pET-3D 重组菌用 IPTG 进行诱导表达，并用 pET-32a 载体质粒转化 *E.coli* BL21 (DE3) 宿主菌同时诱导作为对照。结果表明 IPTG 浓度为 $1.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ， 37°C 诱导 4~5 h，重组蛋白可以得到较高水平的表达，并都以包涵体形式存在。重组蛋白的相对分子量约为 68 kD（图 2），与理论值相符。以抗 His 标签单抗对重组蛋白进行鉴定，结果在目的位置出现一条特异条带（图 3）。

2.3 多抗血清的 Western blot 鉴定

以纯化的融合蛋白原核表达产物免疫 ICR 小鼠，制备 3D 蛋白的多抗血清，获得的血清能与 DHAV-1 SH 毒株鸡胚尿囊液反应，条带大小约为 50 kD（图 4），为 3D 蛋白大小。

3 讨论

pET 表达系统是目前使用较为广泛的一种原核表达系统, 在诱导状态下宿主菌内几乎所有的资源都可以转向目的基因的表达, 外源基因的表达量一般可以达到菌体总蛋白的 30% 以上。表达的融合蛋白带有组氨酸标签, 方便目的蛋白的纯化, 其肠激酶酶切位点可切除去融合部分, 利于目的蛋白的研究。本试验用 pET-32a 表达系统成功表达了 DHAV-1 3D 蛋白, 采用 RT-PCR 技术扩增出完整的 3D 基因, 序列分析表达克隆的 3D 基因长为 1362 bp, 与 DHAV-1 SH 株序列同源性达 100%, SDS-PAGE 电泳和 Western blot 分析证明表达的融合蛋白分子量约为 68 kD。

尽管 pET 原核系统表达的外源蛋白缺少翻译后加工功能, 但表达产物依旧保持了良好的免疫原性。本试验利用表达的融合蛋白免疫小鼠制备了针对重组蛋白的多抗血清, Western blot 分析说明制备的多抗血清可与 DHAV-1 尿囊液中的 3D 蛋白发生特异性反应, 充分说明制备的多抗血清具有很好的特异性, 可以作为检测用抗体进一步用于 DHAV-1 3D 抗原的检测及功能研究。下一步有必要将目的蛋白进行纯化, 并切除去标签蛋白, 以增强抗原及制备抗体的特异性。

参考文献:

- [1] 张艳芳, 罗薇, 刘内生, 等. 鸭肝炎病毒的研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38(7): 171-174.
- [2] Wang L, Pan M, Fu Y, et al. Classification of duck hepatitis virus into three genotypes based on molecular evolutionary analysis[J]. Virus Genes, 2008, 37(1): 52-59.
- [3] 施少华, 程龙飞, 傅光华, 等. 鸭肝炎病毒新血清型基因组序列分析[J]. 微生物学报, 2009, 49(3): 309-31.
- [4] Kim M C, Kwon Y K, Joh S J, et al. Molecular analysis of duck hepatitis virus type 1 reveals a novel lineage close to the genus *Parechovirus* in the family *Picornaviridae*[J]. Journal of General Virology, 2006, 87(11): 3307-3316.
- [5] Kim M C, Kwon Y K, Joh S J, et al. Recent Korean isolates of duck hepatitis virus reveal the presence of a new geno- and serotype when compared to duck hepatitis virus type 1 type strains[J]. Archives of Virology, 2007, 152(11): 2059-2072.
- [6] Tseng C H, Knowles N J, Tsai H J. Molecular analysis of duck hepatitis virus type 1 indicates that it should be assigned to a new genus[J]. Virus Research, 2007, 123(2): 190-203.
- [7] Tseng C H, Tsai H J. Sequence analysis of a duck picornavirus isolate indicates that it together with porcine enterovirus type 8 and simian picornavirus type 2 should be assigned to a new picornavirus genus[J]. Virus Research, 2007, 10429(2): 104-114.
- [8] Ding C Y, Zhang D B. Molecular analysis of duck hepatitis virus type 1[J]. Virology, 2007, 361(1): 9-17.
- [9] Tseng C H, Tsai H J. Molecular characterization of a new serotype of duck hepatitis virus[J]. Virus Research, 2007, 126(1/2): 19-31.
- [10] Liu G, Wang F, Ni Z, et al. Genetic diversity of the VP1 gene of duck hepatitis virus type 1(DHV-1) isolates from southeast China is related to isolate attenuation[J]. Virus Research, 2008, 137(1): 137-141.
- [11] Jin X, Zhang W, Hu X, et al. Identification and molecular analysis of the highly pathogenic duck hepatitis virus type 1 in Hubei province of China[J]. Research in Veterinary Science, 2008, 85(3): 595-598.