

I 型鸭肝炎病毒 VP1、3D 基因克隆及其在大肠杆菌中的表达

孔留五^{1**} 罗玉均^{1,2**} 张桂红^{1*} 陈建红² 徐小芹¹ 廖 明¹ 康艳梅¹ 何逸民¹

(1. 华南农业大学兽医学院 广州 510642)

(2. 佛山科学技术学院生命科学院 南海 528231)

摘要: 根据 GenBank 中的 I 型鸭肝炎病毒全基因序列设计了扩增 I 型鸭肝炎病毒 VP1、3D 基因的引物, 用该特异性表达引物从 I 型鸭肝炎病毒 cDNA 模板中扩增得到目的基因 VP1、3D, 用相同的限制性内切酶酶切目的基因和表达载体 pET32a 后构建重组表达载体, 转化宿主 BL21(DE3), 用不同浓度的 IPTG 诱导 VP1、3D 基因的表达, 收集菌液进行 SDS-PAGE 电泳, Western-blotting 分析蛋白免疫原性。结果表明, VP1、3D 在大肠杆菌中表达量较高, 表达产物的分子量约为 48 kD、68 kD, 并能被兔抗 DHV-1 血清所识别。I 型鸭肝炎病毒 VP1、3D 蛋白在大肠杆菌中表达产物具有免疫原性。

关键词: I 型鸭肝炎病毒, VP1 基因, 3D 基因, 克隆表达

Cloning of VP1 and 3D Gene of Duck Hepatitis Virus 1 (DHV1) and Its Expression in *Escherichia coli*

KONG Liu-Wu^{1**} LUO Yu-Jun^{1,2**} ZHANG Gui-Hong^{1*} CHEN Jian-Hong²
XU Xiao-Qin¹ LIAO Ming¹ KANG Yan-Mei¹ HE Yi-Min¹

(1. College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642)

(2. College of Life and Science, Foshan University, Nanhai 528231)

Abstract: In this study, two special primer pair containing *EcoR* V and *Xho* I according to complete genome of duck hepatitis virus 1 (DHV1) were designed to amplify VP1 and 3D genes from cDNA of DHV1. The target genes VP1 and 3D were subcloned into PET32a vector digested by *EcoR* V and *Xho* I respectively. Then the recombinant plasmids were transfected into *Escherichia coli* BL21(DE3) for VP1 and 3D expression. The bacteria containing PET32a-VP1 and PET32a-3D were collected and examined by SDS-PAGE and western-blotting. Result showed that the VP1 and 3D protein were expressed in *E. coli* and the amount of expression was higher. Molecular weight of the protein was 48 kD, 68 kD. The protein can be recognized by DHV1 antibody. This study showed that the protein VP1 and 3D have antigenicity.

Keywords: Duck hepatitis virus 1, VP1 gene, 3D gene, Cloning and expression

基金项目: 广东省自然科学基金(No. 5006678)

* 通讯作者: Tel: 020-85280242; ✉ guihongzh@scau.edu.cn

** 罗玉均、孔留五同为第一作者

收稿日期: 2007-11-21; 接受日期: 2008-01-24

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

鸭肝炎病毒 型(duck hepatitis virus 1, DHV1)能引起雏鸭的一种急性高度致死性传染病, 主要侵害 4 周龄以内的雏鸭, 特别是 1 周龄以下的雏鸭最易感染, 死亡率较高, 是危害养鸭业最为严重的传染病之一^[1]。根据国际病毒分类委员会于 2005 年 7 月发表最新的病毒分类第八次报告, 型鸭肝炎病毒属于小核糖核酸病毒科, 暂未定属, 但 I 型鸭肝炎病毒粒子呈正二十面体结构, 病毒粒子的组成为衣壳蛋白和一条由衣壳蛋白包裹的长约 7.7 kb 左右的单链正股 RNA 组成, Ding^[2]、Kim^[3-5]、Tseng^[6,7]、罗玉均^[8,9]相继报道了 型鸭肝炎病毒基因组序列, 分析结果表明在遗传进化关系上与副伤寒病毒属亲缘关系较近, I 型鸭肝炎病毒结构蛋白 VP1 位于 DHV1 基因组的 2103~2816 位, VP1 全基因由 714 个核苷酸组成, 编码 238 个氨基酸, 3D 位于 DHV1 基因组的 6012~7373 位, 3D 全基因由 1362 个核苷酸组成, 编码 454 个氨基酸。然而, 目前国内外少见 I 型鸭肝炎病毒蛋白基因和功能的研究, 因此本研究采用原核高效表达载体 pET-32a 在大肠杆菌 BL21 中表达了 DHV1-R 株的 VP1 和 3D 蛋白, 这为深入研究 VP1 和 3D 蛋白的结构与功能奠定了基础, 也为研制 DHV1 的新型疫苗与诊断试剂盒研制奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 毒株

DHV1-R 株(GenBank No.EF585200)由华南农业大学禽病研究室分离保存。质粒 pET32a(+)、大肠杆菌 Top10、BL21(DE3)由本实验室保存, pMD18-T 购自宝生物工程大连有限公司。

1.2 酶和相关试剂

T4 连接酶、AMV 反转录酶、Premix EX-Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶 *EcoR* V、*Xho* I 均购自 TaKaRa 公司; 兔抗辣根过氧化物酶标二抗购自 Promega 公司; DL-2000 Marker、 λ -EcoT14 均购自 TaKaRa 公司。其他常规试剂均为分析纯。

1.3 引物的设计与合成

根据 GenBank 中发表的 型鸭肝炎病毒(DHV1)全基因序列, 设计了针对 VP1、3D 基因片段的引物, VP1、3D 基因扩增片段大小分别为 714 bp、1362 bp, 在上游引物中加入 *EcoR* 酶切位点, 在下游引物中加入 *Xho* 酶切位点, 引物由上海生物工程有限公

司合成(黑体部分为酶切位点)。

VP1-F: 5'-**CCGATATC**GGTGTCTAACCAGT
TGG-3' (*EcoR* V)

VP1 -R: 5'-**CCCTCGAGT**TCAATTCCAGATT
GAGT-3' (*Xho* I)

3D-F1: 5'-**GATATC**GGGAAATAGTAAGCAAG
CAATAT-3' (*EcoR* V)

3D-R1: 5'-**CTCGAGT**CAGATCTCATGCAAGC
TGTATA-3' (*Xho* I)

1.4 VP1、3D 基因的克隆

用 I 型鸭肝炎病毒的 cDNA 为模板按如下程序进行扩增: 95℃ 变性 5 min; 95℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 1 min, 共进行 30 个循环; 然后 72℃ 延伸 10 min。扩增结束后用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳观察结果。PCR 产物回收纯化后克隆入 pMD18-T 载体, 重组质粒(标记为 pMD-VP1、pMD-3D) 经酶切鉴定后送上海生物工程有限公司测序。

1.5 重组表达载体构建及鉴定

VP1、3D 基因片段和表达载体 PET32a 经相同的限制性内切酶酶切后, 按适当比例用 T4 连接酶进行连接。连接产物转化 BL21(DE3)感受态后, 经 PCR 鉴定及酶切鉴定, 对阳性的重组质粒测序, 以证明插入片段的正确性, 并由此推测重组质粒的读码框正确。

1.6 重组质粒的诱导表达及表达产物的检测

经鉴定的重组阳性质粒转化 BL21 (DE3)感受态, 菌液以 0.25 mmol/L、0.5 mmol/L、1 mmol/L 的 IPTG 在 37℃ 诱导表达 3 h, 收集菌液以 10000 r/min 离心 5 min, 沉淀用 100 μ L pH 7.4 的 PBS 悬浮, 再如上离心, 重复 3 次, 加入等体积 2 \times SDS 上样 Buffer 水浴煮沸 5 min, 诱导空质粒 PET32a 和重组菌进行 SDS-PAGE 电泳。将 SDS-PAGE 电泳的目的蛋白条带转移到硝酸纤维素膜上, 用 3% BSA 封闭, 以免抗 DHV-1 血清作为一抗, 兔抗辣根过氧化物酶标记的二抗与之反应, 最后用 DAB 显色。

2 结果

2.1 VP1、3D 基因的 PCR 扩增与转化产物的鉴定

用 I 型鸭肝炎病毒的 cDNA 为模板, 用引物对 VP1-F/VP1-R, 3D-F1/3D-R1 扩增得到与预计大小一致的 714 bp、1362 bp 的特异性 VP1、3D 目的条带。

用限制性内切酶酶切 *EcoR*、*Xho* 酶切后与经相同的限制性内切酶酶切的表达载体 PET32a 构建的重组载体转入 BL21(DE3)感受态后,提取经 PCR 鉴定的阳性质粒,对质粒经酶切后,电泳可见 VP1 基因片段 714 bp、3D 基因片段 1362 bp 结果均与预期一致。阳性质粒经测序鉴定,进一步证明了其正确性。

2.2 重组载体的诱导表达及 SDS-PAGE、western-blotting 检测

用不同浓度的 IPTG 在 37℃ 诱导表达 3 h 后,取诱导菌液经裂解后用 SDS-PAGE 电泳检测蛋白表达情况,电泳结束后经考马斯量蓝染色后可见一条相对分子量大约 48 kD、68 kD 的目的蛋白条带(见图 1、图 2)。以兔抗 DHV-1 血清作为一抗及兔抗

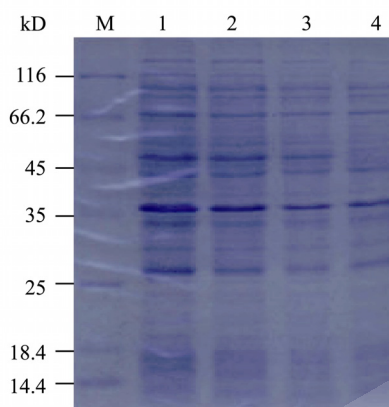


图 1 VP1 蛋白表达产物 SDS-PAGE

Fig. 1 SDS-PAGE of VP1 recombinant protein

M: 蛋白质分子质量标准; 1, 2, 3: 0.25 mmol/L、0.5 mmol/L、1 mmol/L IPTG 浓度诱导 pET32a-VP1 表达产物; 4: 空质粒对照

M: Molecular weight protein marker; 1, 2, 3: Protein expression by different IPTG concentration; 4: Expression of plasmid pET32a

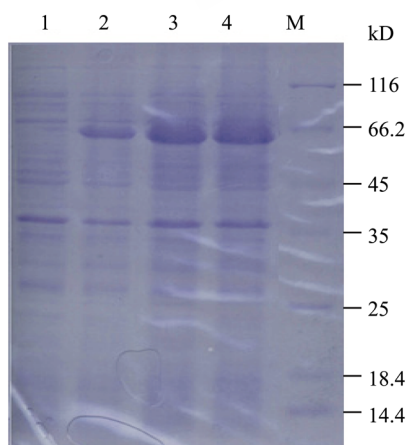


图 2 3D 蛋白表达产物 SDS-PAGE

Fig. 2 SDS-PAGE of VP1 recombinant protein

M: 蛋白质分子质量标准; 1: 未诱导 pET32a-3D 产物; 2, 3, 4: 0.25 mmol/L、0.5 mmol/L、1 mmol/L IPTG 浓度诱导 pET32a-3D 表达产物

M: Molecular weight protein marker; 1: Expression of plasmid pET32a; 2, 3, 4: Protein expression by different IPTG concentration

辣根过氧化物酶标二抗进行鉴定,结果在目的蛋白条带位置出现明显的颜色反应,而阴性对照未见颜色反应,表明表达蛋白为预期的特异性蛋白(见图 3)。

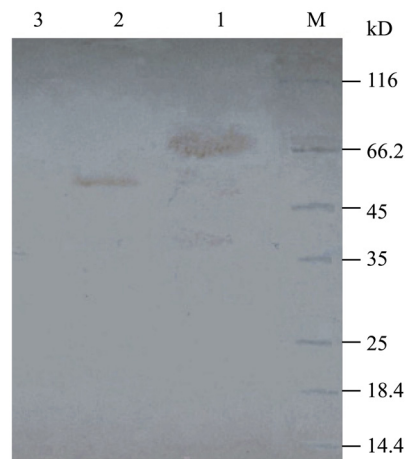


图 3 重组蛋白的 western-blotting 结果

Fig. 3 Western-blotting detection of the recombinant protein

M: 蛋白质分子质量标准; 1: 3D 蛋白表达产物; 2: VP1 蛋白表达产物; 3: 阴性对照

M: Protein molecular weight marker; 1, 2: The expressed protein from pET-3D and pET-VP1 in BL21; 3: Negative control

3 讨论

pET 是目前应用最为广泛的原核表达系统,已经成功地在大肠杆菌中表达了各种各样的异源蛋白。pET 系统可表达可溶性蛋白,表达的融合蛋白带个组氨酸,其肠激酶酶切位点可用于切除融合部分,方便纯化和研究。

VP1 蛋白大部分暴露在病毒的表面,是决定病毒抗原性的主要成分^[10,11]。VP1 蛋白是主要结构蛋白,含有可诱导 T、B 淋巴细胞反应的多个抗原表位,能诱导机体产生保护性的中和抗体^[12-14]。在原核表达系统对 型鸭肝炎病毒的 VP1 基因进行表达,表达的目的蛋白纯化后可作为诊断抗原建立 型鸭肝炎病毒血清抗体的 ELISA 诊断方法。本实验用 pET32a 表达系统成功表达了结构蛋白 VP1,利用 PCR 技术获得完整的 型鸭肝炎病毒的 VP1 基因,经序列分析表明:所克隆的 VP1 基因长度为 714 bp,与 型鸭肝炎病毒 R 株的序列同源性达 100%; SDS-PAGE 电泳和 Western-blotting 分析结果表明,原核表达产物大小约为 48 kD。

3D 为 RNA 依赖的 RNA 聚合酶,又称病毒相

关抗原(VIAA), 催化病毒RNA 的合成。Plotch SJ 等^[15]认为其催化作用概括起来包括: VPg的尿苷化; RNA聚合酶; 末端腺苷转移酶; 与 3' UTR 和 3AB 形成RNP复合物。3D编码区相对比较保守。本实验用pET32a 表达系统成功表达了 3D蛋白, 原核表达产物大小约为 68 kD。

以上实验结果表明本研究已成功获得了 I 型鸭肝炎病毒VP1 和 3D基因在大肠杆菌中的表达, 为进一步对表达的VP1 和 3D蛋白进行纯化复性, 并利用纯化复性后的VP1 和 3D蛋白作为包被抗原研制 I 型鸭肝炎病毒鉴别诊断试剂盒和基因工程疫苗奠定了基础。本实验用pET作为表达载体, 表达出的蛋白带有 6 个组氨酸标签, 可用Ni离子层析柱纯化表达出的蛋白^[16], 为建立特异性强和敏感性高的 I 型鸭肝炎病毒诊断方法提供了保证, 同时也为 I 型鸭肝炎病毒新型疫苗的研制提供了理论和技术。

参 考 文 献

- [1] Saif YM, Barnes HJ, Glisson JR, *et al.* Diseases of Poultry, 11th ed. American Association Avian Pathologists: Iowa State University Press, 2003, pp. 343–354.
- [2] Ding CY, Zhang DB. Molecular analysis of duck hepatitis virus type 1. *Virology*, 2007, **361**: 9–17.
- [3] Kim MC, Kwon YK, Joh SJ, *et al.* Molecular analysis of duck hepatitis virus type 1 reveals a novel lineage close to the genus Parechovirus in the family Picornaviridae. *Journal of General Virology*, 2006, **87**(11): 3307–3316.
- [4] Kim MC, Kwon YK, Joh SJ, *et al.* Recent Korean isolates of duck hepatitis virus reveal the presence of a new genotype and serotype when compared to duck hepatitis virus type 1 type strains. *Archives of Virology*, 2007, **126**(1-2): 11–25.
- [5] Tseng CH, Knowles NJ, Tsai HJ. Molecular analysis of duck hepatitis virus type 1 indicates that it should be assigned to a new genus. *Virus Research*, 2007, **123**(2): 190–203.
- [6] Tseng CH, Tsai HJ. 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. *Virus Research*, 2007, **104**(1-2): 101–111.
- [7] Tseng CH, Tsai HJ. Molecular characterization of a new serotype of duck hepatitis virus. *Virus Research*, 2007, **126** (1-2): 19–31.
- [8] 罗玉均, 张桂红, 陈建红, 等. I 型鸭肝炎病毒 R 株 VP1 基因克隆与序列分析. 广东畜牧兽医科技, 2007, **5**: 33–35.
- [9] 罗玉均, 张桂红, 陈建红, 等. I 型鸭肝炎病毒 R 株全基因组分析与检测技术的研究. 中国畜牧兽医学会 2007 年学术年会, 2007, **9**: 42–49.
- [10] Carrillo C, Wigdorovitz A, Oliveros JC, *et al.* Protective immune response to foot and mouth disease virus with VP1 expressed in transgenic plants. *Journal of Virology*, 1998, **72**(2): 1688–1690.
- [11] Brown F, Benkirane N, Limal D, *et al.* Delineation of a neutralizing subregion within the immunodomain epitope(GH Loop) of foot-and-mouth disease virus VP1 which does not contain the RGD motif. *Vaccine*, 1999, **18**(1-2): 50–56.
- [12] Balamurugan V, Renji R, Saha SN. Protective immune response of the capsid precursor polypeptide (P1) of foot and mouth disease virus type O produced in *Pichia pastoris*. *Virus Research*, 2003, **92**(2): 141–149.
- [13] Mason PW, Grubman MJ, Bant B. Molecular basis of pathogenesis of FMDV. *Virus Research*, 2003, **91**(3): 9–32.
- [14] 邢继兰, 潘洁, 陈波, 等. 口蹄疫病毒结构蛋白基因的表达与应用研究. 中国预防兽医学报, 2007, **4**: 209–302.
- [15] Plotch SJ, Palant O. Poliovirus protein 3AB form a complex with and stimulates the activity of the viral RNA polymerase, 3Dpol. *J Virol*, 1995, **69**(11): 7169–7179.
- [16] Brown F. Vaccination against foot and mouth disease virus. *Vaccine*, 1992, **10**: 1022–1026.