

顾玲玲, 朱善元, 成大荣, 等. I 型鸭甲型肝炎病毒 VP1 基因的原核表达及多克隆抗体的制备[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(1): 151-154.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2017.01.024

## I 型鸭甲型肝炎病毒 VP1 基因的原核表达及多克隆抗体的制备

顾玲玲<sup>1,2</sup>, 朱善元<sup>1</sup>, 成大荣<sup>2</sup>, 左伟勇<sup>1</sup>, 洪伟鸣<sup>1</sup>, 蔡树东<sup>2</sup>, 王安平<sup>1</sup>

(1. 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, 江苏 泰州 225300; 2. 扬州大学兽医学院, 江苏 扬州 225009)

**摘要:** 根据已经发表的 I 型鸭肝炎病毒 VP1 基因序列, 设计 1 对特异性引物(上下游分别插入 *Bam* H I 和 *Sac* I 酶切位点), 利用 PCR 技术扩增出 VP1 基因, 经 *Bam* H I 和 *Sac* I 双酶切后, 将其克隆至原核表达载体 pET-32a 上, 获得重组表达质粒 pET-VP1。重组质粒转化感受态细胞 *E. coli* BL21(DE3), 重组蛋白经 IPTG 诱导成功表达。将重组蛋白切胶免疫 6 周龄的 BALB/c 小鼠, 3 次免疫后采血, 制备 DHV-I 的多克隆抗体。SDS-PAGE 结果显示, 成功表达出的重组蛋白分子量约为 46 000。Western-blotting 分析结果表明, 该重组蛋白可与 His 组氨酸鼠单克隆抗体发生特异性反应, Western-blotting 检测抗鼠 DHV 多抗的结果显示, DHV 多抗能与目的蛋白发生特异性反应。以上结果表明, DHV 的 VP1 蛋白在大肠杆菌中成功表达, 且制备的 DHV 多抗能用于 VP1 蛋白表达的检测。

**关键词:** I 型鸭肝炎病毒; VP1 基因; 原核表达; 多克隆抗体

中图分类号: S852.65<sup>+</sup>9 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2017)01-0151-04

## Prokaryotic expression and antiserum preparation of the VP1 gene of duck hepatitis virus type I

GU Ling-ling<sup>1,2</sup>, ZHU Shan-yuan<sup>1</sup>, CHENG Da-rong<sup>2</sup>, ZUO Wei-yong<sup>1</sup>, HONG Wei-ming<sup>1</sup>, CAI Shu-dong<sup>2</sup>, WANG An-ping<sup>1</sup>

(1. Jiangsu Agri-animal Husbandry Vocational College, Veterinary Bio-pharmaceutical, Jiangsu Province Key Laboratory of High-tech Research, Taizhou 225300, China; 2. College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

**Abstract:** According to the genome of duck hepatitis virus type I (DHV-I), one pair of specific primers was designed. The VP1 genes were amplified by PCR, and then were cloned into prokaryotic expression vector pET-32a. The recombinant plasmids were transformed into *E. coli* BL21(DE3) cells. The proteins were successfully expressed following IPTG induction and detected by the SDS-PAGE. The antiserum against the recombinant protein were produced by immunized BALB/c mouse with recombinant protein. SDS-PAGE showed the approximate molecular weight of the recombinant protein was 46 000. Western-blotting assay revealed that desired proteins could be recognized by the monoclonal antibody against histidine-tagged proteins.

Western-blotting results showed that the antiserum could react specifically with desired proteins. These results show that VP1 genes are successfully expressed in *E. coli*, and the antiserum can be used for detection of VP1 proteins.

**Key words:** duck hepatitis virus type I; VP1 gene; prokaryotic expression; antiserum

收稿日期: 2016-04-01

基金项目: 国家自然科学基金项目(31302096); 江苏省农业支撑项目(BE2013415); 江苏省六大人才高峰项目(NY-009)

作者简介: 顾玲玲(1990-), 女, 江苏兴化人, 硕士研究生, 主要从事预防兽医学研究。(E-mail) 546374954@qq.com

通讯作者: 王安平, (E-mail) wap4017@163.com

鸭病毒性肝炎(DVH)由鸭肝炎病毒(DHV)引

起,主要侵害 3 周龄以下的雏鸭,是致死率高、传播快的传染性疾病,以肝出血、肿大和角弓反张为主要特征<sup>[1-2]</sup>。病原包括小 RNA 病毒科禽肝病毒属的鸭甲型肝炎病毒(DHAV)和星状病毒科禽星状病毒属的鸭星状病毒(DAstV)。DHV 分为 3 个血清型,I 型、II 型和 III 型,分别对应以往所称的鸭肝炎病毒(DHV)血清 1 型(DHV-1)以及 2007 年报道的台湾 DHV 新型病毒和韩国 DHV 新型病毒。DAstV 则指以往所称的 DHV 血清 2 型病毒(DHV-2)。在国际病毒分类委员会第 8 次分类报告中,血清 2 型(DHV-2)属于星状病毒科禽星状病毒属的成员,被更名为鸭星状病毒 1 型(DAstV-1),DHV-3 更名为 DAstV-2。DHV-I 型呈世界性分布,DHAV-2 仅见于中国台湾,DHAV-3 流行于韩国和中国大陆<sup>[3]</sup>。DHV-I 为小 RNA 病毒科成员<sup>[4]</sup>,病毒粒子呈球形或类球形,核衣壳 20 面体对称,无囊膜,胞浆内繁殖,具有不分节段的单股正链 RNA<sup>[5]</sup>。病毒基因组只含 1 个开放阅读框,编码 3 种结构蛋白(VP1、VP0、VP3)和 9 种非结构蛋白<sup>[6]</sup>。其中 VP1 基因位于 2 103~2 816 位,该基因由 714 个核苷酸组成,编码 238 个氨基酸。VP1 基因编码的 VP1 蛋白大部分暴露在病毒表面,含有病毒的大部分抗原位点,是 I 型鸭肝炎病毒的主要结构蛋白,能比较好地诱导机体产生保护性中和抗体。本试验拟通过原核表达系统成功表达 DHV-VP1 蛋白,并制备 DHV 抗鼠多克隆抗体,为建立 DHV 检测方法奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 载体和菌株

pET-32a 载体由本实验室保存,*E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞和 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞购自康为世纪生物科技有限公司。

### 1.2 主要试剂

*Pfu* DNA polymerase、预染蛋白标准 Marker、DL 10000 DNA marker、限制性核酸内切酶 *Bam* H I、限制性核酸内切酶 *Sac* I 及 T4 DNA 连接酶均购自 Thermo 公司,质粒提取试剂盒、异丙基硫代- $\beta$ -D-半乳糖苷(IPTG)、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒和 DAB 显色液均购自康为世纪生物科技有限公司,胶回收试剂盒购自爱思进生物技术有限公司,辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 购自武汉博士德生物工程有限公司,抗 His 标签鼠单克隆抗体购自康为世纪生

物科技有限公司。

### 1.3 引物的设计与合成

参考 GenBank 中已发表的 DHV-I VP1 基因序列,设计 1 对用于扩增 VP1 基因的引物,上游插入 *Bam* H I 酶切位点,下游插入 *Sac* I 酶切位点,引物由上海英潍捷基生物技术有限公司合成。上游引物:5'-TTAGGATCCGGTGATTCCAACCAGTTG-3',下游引物:5'-GCCGAGCTCTTCAATTTCCAGATTGAGTTC-3'。

### 1.4 目的基因 VP1 的扩增

采用 50  $\mu$ l 体系扩增目的片段,*Pfu* DNA polymerase 1  $\mu$ l、10 $\times$ Buffer 5  $\mu$ l、2 mmol/L MdNTP 5  $\mu$ l、Primer F 2  $\mu$ l、Primer R 2  $\mu$ l、cDNA 2  $\mu$ l、DDW 33  $\mu$ l。

反应程序:95  $^{\circ}$ C 预变性 3 min;95  $^{\circ}$ C 变性 30 s,49  $^{\circ}$ C 退火 30 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min,35 个循环后,72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。反应结束后,PCR 产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测。

### 1.5 PCR 产物的纯化回收

0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,于凝胶成像仪下观察并记录结果。按照 AxyPrep 凝胶回收试剂盒对 PCR 产物进行纯化回收。

### 1.6 重组质粒 pET-VP1 的构建

将制备的目的基因 VP1 和 pET-32a 质粒分别经 *Bam* H I 和 *Sac* I 双酶切。回收酶切后目的片段的 VP1 和 pET-32a 质粒,按 7:1 的摩尔比加入体系,经 T4 DNA 连接酶连接,连接体系为:T<sub>4</sub> DNA Ligase 0.2  $\mu$ l、10 $\times$ Buffer 2.0  $\mu$ l、VP1 2.0  $\mu$ l、pET-32a 2.0  $\mu$ l、DDW 13.8  $\mu$ l,22  $^{\circ}$ C 下作用 75 min,连接产物转化感受态细胞 *E. coli* DH5 $\alpha$ 。涂布于含 100  $\mu$ g/ml 氨苄青霉素的 LB 琼脂平板上,37  $^{\circ}$ C 培养过夜。

### 1.7 阳性重组质粒的筛选与鉴定

随机挑取生长状况良好的 24 个单菌落接种于含 AMP 液体 LB 的 2 ml 离心管中,200 r/min 振荡培养 12~14 h,温度为 37  $^{\circ}$ C。每管菌液取 2  $\mu$ l 作为模板进行 PCR 鉴定,于 PCR 反应管中依次加入菌液模板 2.0  $\mu$ l、PCR Mix 10.0  $\mu$ l、上下游引物各 0.5  $\mu$ l、DDW 7.0  $\mu$ l,共 20.0  $\mu$ l,循环体系同 PCR 反应程序。以 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,挑取疑似阳性产物接种于 5 ml 含 Amp 抗性的 LB 液体培养基中,37  $^{\circ}$ C 下 200 r/min 振荡培养过夜。对培养后的菌体提取质粒,酶切鉴定,酶切体系为:重组质粒 DNA 30  $\mu$ l、*Bam* H I 1  $\mu$ l、*Sac* I 1  $\mu$ l、10 $\times$  Buffer 4  $\mu$ l、DDW 4  $\mu$ l,总体积 40  $\mu$ l。37  $^{\circ}$ C 下酶切

20 min,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-VP1。

### 1.8 重组菌的诱导表达

将阳性重组质粒 pET-VP1 和空载体 pET-32a 质粒分别转化至 *E.coli* BL21 (DE3) 感受态细胞中,取单菌落接种于含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,37 °C 下培养过夜,次日以 1 : 100 的比例接种于新鲜含氨苄青霉素的 LB 培养基中,37 °C 下振荡培养至  $OD_{600}$  值为 0.8 ~ 1.0。加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/ml,继续在 37 °C 下培养 5 h。将菌液于 4 °C 下以 4 000 r/min 的速度离心 10 min,弃上清液,PBS 重悬,超声破碎裂解,裂解好后收集沉淀,在相同条件下诱导含表达质粒 pET-32a 的空载体作为对照。

### 1.9 表达产物的检测

**1.9.1 SDS-PAGE 检测** 将诱导后的菌液与 5×SDS Loading buffer 混合煮沸 5 min,以 10% 的聚丙烯酰胺凝胶进行电泳,考马斯亮蓝染色,脱色后观察结果。

**1.9.2 Western-blotting 分析** 将含有重组表达载体和 pET-32a 空载体的细菌分别进行诱导表达,表达产物经 SDS-PAGE 电泳后转印至 PVDF 膜上,用封闭液(含 5% 的脱脂乳)于 4 °C 下封闭过夜,次日用抗 His 标签蛋白的鼠单抗孵育 2 h,反应完毕后用二抗(HRP 标记的羊抗鼠 IgG)孵育 1.5 h,DAB 显色。

### 1.10 重组蛋白抗血清的制备

将重组蛋白经 SDS-PAGE 电泳后,于 0.5 mol/L KCl 溶液中染色,切下目的条带,加入适量 PBS 研磨匀浆,免疫 6 周龄 BALB/c 雌性小鼠,每隔 2 周免疫 1 次,于免疫 3 次后的第 7 d 采血,分离血清,-20 °C 分装冻存备用。

### 1.11 重组蛋白多克隆抗体的检测

将诱导后的重组蛋白经 SDS-PAGE 电泳后,转印到 PVDF 膜上,封闭过夜后以鼠抗 DHV-VP1 的血清为一抗,加辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗进行 Western-blotting 分析。

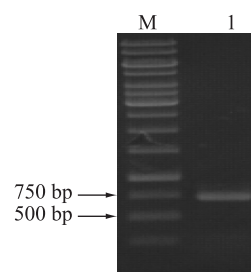
## 2 结果与分析

### 2.1 VP1 基因的克隆

根据特异性引物进行 PCR 扩增,PCR 产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测,得到 1 条约 750 bp 的片段(图 1),与预期的基因片段大小相符。

### 2.2 重组质粒 pET-VP1 的构建与酶切鉴定

提取重组质粒 pET-VP1,经 *Bam* H I 和 *Sac* I

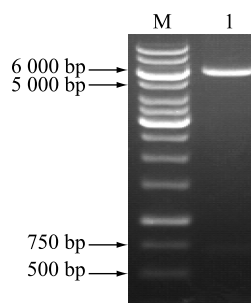


M: DNA 分子质量标准; 1: VP1 基因片段。

图 1 VP1 片段 PCR 扩增

Fig.1 Agorose gel electrophoresis of the PCR product of VP1

双酶切和琼脂糖凝胶电泳后,产生与预期大小相符的 2 条条带,分别约为 750 bp、5 900 bp(图 2)。



M: DNA 分子质量标准; 1: pET-VP1 的 *Bam* H I 和 *Sac* I 双酶切。

图 2 重组质粒 pET-VP1 的酶切鉴定

Fig.2 Identification of recombinant plasmid pET-VP1 by enzyme digestion

### 2.3 重组蛋白 pET-VP1 的 SDS-PAGE 分析

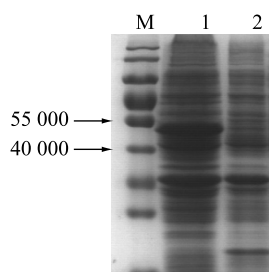
重组菌 pET-VP1 [*E.coli* BL21 (DE3)] 和空载体菌 pET-32a [*E.coli* BL21 (DE3)] 经 IPTG 诱导表达后收集菌体,以 PBS 溶液重悬,超声裂解。重组蛋白得到较高水平的表达,蛋白大小约 46 000(图 3),与预期结果相符并且均以包涵体形式存在。SDS-PAGE 电泳分析如图 3 显示。

### 2.4 重组蛋白的 Western-blotting 分析

将 pET-VP1 蛋白和 pET-32a 对照菌蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,转移至 PVDF 膜上进行免疫印迹分析。图 4 显示,重组蛋白可以与抗 His 标签鼠单克隆抗体发生反应,在约 46 000 处有一条明显的蛋白印迹带,而对照菌则与抗 His 标签鼠单克隆抗体不发生反应,蛋白表达正确。

### 2.5 多抗的鉴定

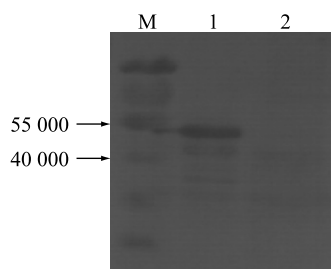
重组蛋白 pET-VP1 经 SDS-PAGE 分析后,电转印至 PVDF 膜上,以制备的 DHV 多抗为一抗,HRP



M: 蛋白质分子质量标准; 1: pET-VP1 [ *E. coli* BL21 (DE3) ] IPTG 诱导; 2: pET-32a [ *E. coli* BL21 (DE3) ] IPTG 诱导。

图 3 重组蛋白 pET-VP1 的 SDS-PAGE 分析

Fig.3 SDS-PAGE analysis of recombinant protein pET-VP1

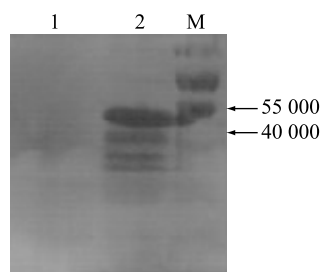


M: 蛋白质分子质量标准; 1: pET-VP1 [ *E. coli* BL21 (DE3) ] IPTG 诱导; 2: pET-32a [ *E. coli* BL21 (DE3) ] IPTG 诱导

图 4 重组蛋白的 Western-blotting 检测

Fig.4 Western-blotting of the recombinant protein pET-VP1

标记羊抗鼠 IgG 为二抗, 进行 Western-blotting 鉴定。结果(图 5)显示, DHV 多抗能与重组蛋白反应, 条带大小约 46 000, 为 VP1 蛋白大小。



M: 蛋白质分子质量标准; 1: pET-32a [ *E. coli* BL21 (DE3) ] IPTG 诱导; 2: pET-VP1 [ *E. coli* BL21 (DE3) ] IPTG 诱导。

图 5 VP1 多抗血清的 Western-blotting 鉴定

Fig.5 Western-blotting identification of VP1 antiserum

### 3 讨论

鸭肝炎病毒 (DHV) VP1 基因编码的 VP1 蛋白大部分暴露在病毒表面, 含有病毒大部分抗原位点, 是 I 型鸭肝炎病毒主要的结构蛋白, 能够比较好地

诱导机体产生保护性中和抗体。

本试验构建了原核表达质粒 pET-VP1, 使其在 *E. coli* BL21 (DE3) 中进行融合表达, SDS-PAGE 电泳结果显示 VP1 重组蛋白得到大量表达。根据 VP1 基因序列推导 VP1 蛋白分子量的大小约为 46 000, 本试验中表达的融合蛋白分子量比实际大, 可能是因为选用的 pET-32a 表达载体带有 6 个组氨酸的标签 (His-Tag), 组氨酸是碱性氨基酸, 带有正电荷, 可以改变蛋白在 SDS-PAGE 中的泳动行为, 降低蛋白的泳动速率, 导致表观分子量变大<sup>[7]</sup>, 加上部分多克隆位点序列, 从而使得本试验中融合蛋白表达的分子量比理论值大。

本研究以 pET-32a 为载体, 克隆、表达、纯化了鸭肝炎病毒 VP1 蛋白并获得了高效表达, 以纯化后的 VP1 蛋白免疫小鼠, 制备多抗血清。Western-blotting 检测结果显示 DHV-VP1 的多抗血清能够特异性地识别 VP1 蛋白, 而与 pET-32a 质粒转化的大肠杆菌无反应, 证实了 VP1 蛋白具有良好的抗原性, 该多抗血清日后可用于 VP1 蛋白表达的特异性检测。

本研究成功获得了 DHV 重组蛋白及多克隆抗体, 为 DHV 及其衣壳蛋白的研究以及 DHV 分子生物学研究的深入开展奠定了基础。

### 参考文献:

- [1] 殷震, 刘景华. 动物病毒学 [M]. 北京: 北京科学出版社, 1990: 67-78.
- [2] 范卫国, 杜佳慧, 曹瑞兵, 等. I 型鸭肝炎病毒的概述 [J]. 动物医学进展, 2009, 30 (11): 110-114.
- [3] TODD D, SMYTH V J, BALL N W, et al. Identification of chicken enterovirus-like viruses, duck hepatitis virus type 2 and duck hepatitis virus type 3 as astroviruses [J]. Avian Pathol, 2009, 38 (1): 21-29.
- [4] CORNELIA B O. The universal virus database of the international committee on taxonomy of viruses [EB-OL]. (2005-02-18) [2015-12-18]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb>.
- [5] 蔡宝祥. 家畜传染病学 [M]. 4 版. 北京: 中国农业出版社, 2001.
- [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] 唐威华, 张景六, 王宗阳, 等. SDS-PAGE 法测定 His-tag 融合蛋白分子量产生偏差的原因 [J]. 植物生理学报, 2000, 26 (1): 65-69.

(责任编辑: 王 妮)