

王安平, 朱善元, 王永娟, 等. I型鸭甲型肝炎病毒 VP3 基因在昆虫细胞中的表达与鉴定[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(3): 649-653.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2017.03.024

I 型鸭甲型肝炎病毒 VP3 基因在昆虫细胞中的表达与鉴定

王安平, 朱善元, 王永娟, 吴 双, 左伟勇, 洪伟鸣

(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)

摘要: 为在昆虫细胞中表达 I 型鸭甲型肝炎病毒(Duck hepatitis A virus type-I, DHAV-I) SH 株的主要结构蛋白 VP3, 首先根据 DHAV-I SH 株 VP3 基因序列设计 1 对引物, RT-PCR 方法扩增出 VP3 基因, 克隆至杆状病毒表达载体 pFastBac1, 获得重组杆状病毒转移载体 pFB-VP3, 将其转化到 DH10Bac 感受态细胞中, 经抗性和蓝白斑筛选, 获得重组穿梭质粒 rBacmid-VP3, 在脂质体介导下转染昆虫细胞 Sf9, 获得重组杆状病毒 rBac-VP3。间接免疫荧光结果显示重组蛋白获得了正确表达, 能与鸭抗全病毒阳性血清发生特异性反应。Western blot 结果显示表达的重组蛋白分子量约为 27 000。表明, DHAV-I SH 株的主要结构蛋白 VP3 在昆虫细胞中获得了成功表达, 为 VP3 结构蛋白的功能研究及相关亚单位疫苗的研制奠定了基础。

关键词: I 型鸭甲型肝炎病毒; VP3 基因; 昆虫细胞; 表达; 鉴定

中图分类号: S855.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2017)03-0649-05

Expression and identification of VP3 genes of duck hepatitis A virus type-I in insect cells

WANG An-ping, ZHU Shan-yuan, WANG Yong-juan, WU Shuang, ZUO Wei-yong, HONG Wei-ming

(*Jiangsu Agri-animal Husbandry Vocational College, Jiangsu Key Laboratory for High-Tech Research and Development of Veterinary Biopharmaceuticals, Taizhou 225300, China*)

Abstract: In order to express the main structural protein VP3 of duck hepatitis A virus type-I (DHAV-I) in insect cells, one pair of specific primers were designed according to the published genome sequences of DHAV-I to amplify VP3 genes by PCR, and the amplified fragment was cloned into baculovirus expression vector pFastBac1. The recombinant vector pFB-VP3 was transformed into DH10Bac *Escherichia coli*, and the positive recombinant bacmid rBacmid-VP3 was selected through resistance and blue-white plaque screening. The recombinant bacmid rBacmid-VP3 was then transfected into the Sf9 insect cells by liposome. Indirect immunofluorescence analysis revealed that the recombinant protein was expressed, which could be recognized by the positive anti-virus serum, and the protein was about 27 000 in molecular weight. The successful

expression of protein VP3 of DHAV-I in insect cells lays a foundation of function study of VP3 protein.

Key words: duck hepatitis A virus type-I; VP3 gene; insect cell; expression; identification

收稿日期: 2017-01-02

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

作者简介: 王安平(1980-), 女, 江苏泰州人, 博士, 副教授, 主要从事兽用生物制药研究。(Tel) 15189910087; (E-mail) wap4017@163.com

通讯作者: 朱善元, (Tel) 13775665658

鸭病毒性肝炎(Duck viral hepatitis, DVH)是一种由鸭甲型肝炎病毒(Duck hepatitis A virus, DHAV)感染导致的急性 and 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%,是严重危害中国养鸭业的疾病之一。DHAV 包括经典型(即中国原 I 型鸭肝炎病毒)、台湾新型、韩国新型 3 种亚型,即 I、II、III 型,3 种亚型之间存在明显的差异,无交叉免疫性^[1-3],目前中国发生和流行的主要是 I 型鸭肝炎病毒(DHAV-I)^[4-6]。

鸭甲型肝炎病毒属于小 RNA 病毒科,病毒粒子无囊膜,呈二十面体对称,核心为单股正链的 RNA,基因组大小约为 7 690 核苷酸,只编码 1 个开放阅读框,编码的产物为多聚蛋白,多聚蛋白在翻译过程中不断被自身编码的蛋白酶水解为小片段蛋白,即 VP0、VP1、VP3、2A1、2A2、2B、2C、3A、3B、3C、3D^[7]。VP0、VP1、VP3 为病毒的结构蛋白,其中 VP3 蛋白位于病毒粒子表面,是其主要的结构蛋白之一。目前研究主要集中在结构蛋白 VP1 的功能和免疫原性研究,而对 VP3 的研究却很少^[8]。本研究利用杆状病毒/昆虫细胞表达系统表达 DHAV-I SH 株的 VP3 基因,为 VP3 蛋白的功能研究、诊断试剂及亚单位疫苗的研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 毒株、菌株和载体

DHAV-I SH 毒株由中国农业科学院上海兽医研究所惠赠,大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞由本实验室保存,Sf9 细胞、杆状病毒 Bac-to-Bac 表达系统(包括重组杆状病毒转移载体 pFastBac1、*E. coli* DH10Bac 受体菌)购自 Invitrogen 公司。

1.2 工具酶和试剂

Pfu DNA Polymerase、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *Bam* H I、*Xho* I 购自 Fermentas 公司,转染试剂 Cellfectin II Reagent 购自 Invitrogen 公司,昆虫细胞培养基 Sf-900 II SFM (Serum free medium) 购自 GBICO 公司,HRP 标记的羊抗鼠 IgG、FITC 标记的羊抗鸭 IgG 购自 KPL 公司,其他试剂均为国产分析纯。

1.3 引物的设计与合成

参考 GenBank 中登录的 DHAV-I SH 毒株病毒基因组序列设计 1 对引物扩增 VP3 基因,为便于基因的克隆及表达载体的构建,在 VP3 引物的上下游 5' 端分别引入 *Bam* H I 和 *Xho* I 酶切位点。通用引物 M13F/M13R 参照 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统设计,引物均由上海英潍捷基生物技术有限公司合

成。引物序列为:VP3-F: 5'-GTAGGATCCACCATGGGAAAGAGAAAACCACGCAGG-3' (下划线为 *Bam* H I 酶切位点),VP3-R: 5'-GTACTCGAGTTACTGATTATTGGTTGCCATCTGC-3' (下划线为 *Xho* I 酶切位点)。通用引物序列为:M13-F: 5'-GTTTTC-CCAGTCACGAC-3', M13-R: 5'-CAGGAAACAGC-TATGAC-3'。

1.4 DHAV-I 的增殖与病毒 RNA 的提取

取 10 倍稀释的原代病毒 0.2 ml 接种于 10 日龄 SPF 鸡胚尿囊腔,于 37 °C 孵化箱孵化。选择 48~72 h 之内死亡的鸡胚,置于 4 °C 过夜,收集尿囊液。按 Trizol 法抽提尿囊液总 RNA (参照说明书操作)。

1.5 DHAV-I VP3 基因的扩增

以提取的总 RNA 为模板,根据 Invitrogen 公司的 RT-PCR 试剂盒说明书进行操作,反应程序设定为:25 °C 10 min,42 °C 90 min,70 °C 10 min。以扩增的 cDNA 为模板,再进行高保真 PCR 扩增 VP3 基因。50 μ l 扩增体系为:*Pfu* DNA Polymerase 1 μ l、10 \times Buffer 5 μ l、dNTP (2 mmol/L) 5 μ l、Primer F 2 μ l、Primer R 2 μ l、cDNA 2 μ l、DDW 33 μ l。反应程序为:95 °C 预变性 3 min;95 °C 变性 30 s,49 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1.5 min,30 个循环;72 °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

1.6 重组杆状病毒转移载体 pFB-VP3 的构建

PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳分离后,按胶回收试剂盒说明书回收目的基因,经 *Bam* H I 和 *Xho* I 酶切后,与经同样酶切的杆状病毒转移载体 pFastBac1 连接。连接产物转化感受态细胞 *E. coli* DH5 α ,涂布于含 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 平板,37 °C 培养 12~16 h。挑取疑似单菌落,提取质粒,进行琼脂糖凝胶电泳筛选,并用 *Bam* H I 和 *Xho* I 双酶切鉴定。酶切鉴定正确后送上海生工公司测序,鉴定正确的克隆命名为 pFB-VP3。

1.7 重组杆状病毒穿梭载体的制备

参考 Invitrogen 公司的 Bac-to-Bac Baculovirus Expression System 使用说明,将鉴定正确的重组质粒 pFB-VP3 转化 DH10Bac 感受态细胞,涂布于含有 Kan⁺ (50 μ g/ml)/Gen⁺ (7 μ g/ml)/Tet⁺ (10 μ g/ml)/X-Gal (100 μ g/ml)/IPTG (40 μ g/ml) 的 LB 平板上,37 °C 培养箱内培养,直至蓝白斑出现。随机挑取白色菌落数个,分别接种于 5 ml 含有 Kan⁺ (50

$\mu\text{g/ml}$)/Gen⁺(7 $\mu\text{g/ml}$)/Tet⁺(10 $\mu\text{g/ml}$)的 LB 培养基,37 $^{\circ}\text{C}$ 250 r/min 摇床培养过夜,按改造后的碱裂法提取重组杆粒 DNA。用引物 M13F/M13R 进行 PCR 鉴定,反应体系为: *Taq* DNA 酶(5 U/ μl)0.5 μl ,10 \times PCR Buffer 2.5 μl , MgCl_2 (25 mmol/L) 2.0 μl , dNTP (2.5 mmol/L) 2.5 μl , M13-F、M13-R (25 mmol/L) 各 2.0 μl , 重组 Bacmid DNA 1.0 μl , DDW 12.5 μl , 总体积 25.0 μl 。反应程序为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s,49 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 3 min,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 产物用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测,获得的阳性重组转座子命名为 rBacmid-VP3。

1.8 重组杆状病毒 rBac-VP3 的制备

将 rBacmid-VP3 和野生型 Bacmid DNA 参照 Cellfectin II Reagent 转染试剂说明书转染对数生长期 Sf9 昆虫细胞。转染后每隔 12 h 观察 1 次细胞,直至细胞出现明显病变,收集上清液,500 g 离心 5 min,将上清液转移至新的无菌管中,此即为 P1 代 rBac-VP3,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存备用。将 P1 代 rBac-VP3 按 *MOI* 为 0.1 感染对数生长期 Sf9 细胞,直至约 72 h 后,细胞出现明显病变,收集上清液即为 P2 代重组病毒,按此方法将病毒传至 P3 代。

1.9 重组蛋白的间接免疫荧光鉴定

将 P3 代 rBac-VP3 及不含目的基因的野生型杆状病毒分别按 *MOI* 为 1、5、10 接种到 24 孔板中处于对数生长期的 Sf9 细胞,感染后 72 h,弃去上清液,PBS 洗涤 2 次,用预冷的固定液(冷丙酮:乙醇为 3:2)固定 5 min,PBS 洗涤 2 次后用 5% BSA 室温封闭 1 h,加入鸭抗全病毒血清,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h 后,PBST 洗涤 3 次,再加入 FITC 标记的羊抗鸭 IgG,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h,PBST 洗涤 3 次后在荧光倒置显微镜下观察特异性荧光。

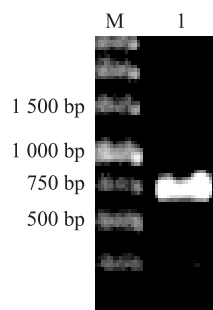
1.10 重组蛋白的 Western blot 分析

将 P3 代 rBac-VP3 及不含目的基因的野生型杆状病毒分别按 *MOI* 为 1、5、10 接种 24 孔板中处于对数生长期的 Sf9 细胞,分别在感染后 24 h、48 h、72 h 收集细胞沉淀,PBS 洗涤 1 次,于沉淀中加入 5 \times Loading buffer 煮沸 3 min 后,取 15 μl 进行 SDS-PAGE 分析,以未接种病毒的细胞沉淀作为阴性对照。样品电泳结束后转印 PVDF 膜,以 VP3 单抗作为一抗,以 HRP 标记的羊抗鼠作为二抗,按常规方法进行 Western blot 反应。

2 结果与分析

2.1 VP3 基因的扩增

以 VP3-F 和 VP3-R 为上下游引物扩增 VP3 基因,产物经 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳,可见大约 730 bp 的条带(图 1),与预期结果相符。



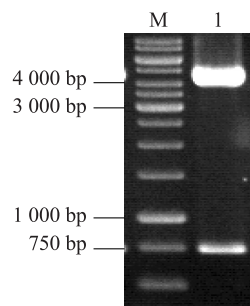
M: DNA 分子质量标准;1: VP3 基因的 PCR 扩增产物。

图 1 VP3 基因的 PCR 扩增结果

Fig.1 Products of VP3 genes amplified by PCR

2.2 重组转座载体 pFB-VP3 的构建与鉴定

VP3 基因回收后用 *Bam* H I 和 *Xho* I 酶切,与经同样酶切的 pFastBac1 连接,获得重组子。重组子经 *Bam* H I 和 *Xho* I 酶切后产生约 4 800 bp 和 730 bp 的 2 个条带(图 2),与预期相符,且 DNA 测序结果表明 VP3 基因克隆正确且无突变。



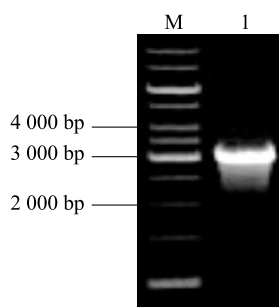
M: DNA 分子质量标准;1: pFB-VP3 的 *Xho* I+*Bam* H I 酶切。

图 2 重组质粒 pFB-VP3 的酶切鉴定

Fig.2 Identification of recombinant plasmid by restriction endonucleases digestion

2.3 重组杆状病毒穿梭载体的鉴定

以 M13F/M13R 为引物对重组转座子进行 PCR 鉴定,产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳后,在约 3 000 bp 处有一特异性条带(图 3),与预期片段大小相符,表明 VP3 基因转座成功。



M: DNA 分子质量标准; 1: 重组转座子 rBacmid-VP3。

图3 重组转座子的 PCR 鉴定

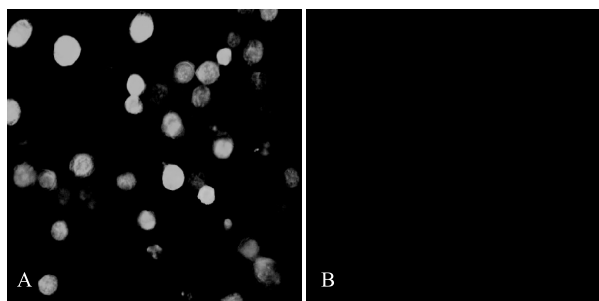
Fig.3 Identification of recombinant plasmid by PCR

2.4 重组杆状病毒的收获及感染细胞的病变

rBacmid-VP3 转染对数生长期 Sf9 细胞, 5 d 后可见明显的细胞病变现象(细胞生长停止, 细胞内出现颗粒, 细胞变大, 有些细胞肿大而破碎), 而未转染组的细胞未出现此现象。

2.5 重组蛋白的间接免疫荧光检测

为检测重组蛋白在昆虫细胞中的表达情况, 将 P3 代 rBac-VP3 感染 24 孔板中对数生长期的 Sf9 细胞, 以鸭抗全病毒血清为一抗, 进行间接免疫荧光检测, 结果(图 4)显示在 rBac-VP3 感染的 Sf9 细胞中出现特异性荧光, 而野生型杆状病毒感染组则未出现特异荧光。



A: 感染 rBac-VP3 的 Sf9 细胞; B: 感染野生型昆虫病毒的 Sf9 细胞。

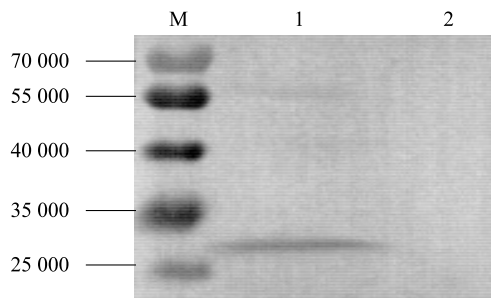
图4 重组蛋白的间接免疫荧光检测(×400)

Fig.4 Indirect immunofluorescence detection of recombinant protein (×400)

2.6 重组蛋白的 Western blot 分析

为鉴定重组蛋白的大小, 将 P3 代 rBac-VP3 感染后的细胞沉淀进行 Western blot 分析, 以 VP3 单抗为一抗。结果显示在分子量约为 27 000 处出现了

特异性条带, 分子量与目的蛋白相同, 而野生型杆状病毒感染则未出现特异条带(图 5)。



M: 蛋白质 Marker; 1: 感染 rBac-VP3 的细胞裂解液; 2: 感染野生型杆状病毒的细胞裂解液。

图5 重组蛋白的 Western blot 鉴定

Fig.5 Western blot identification of recombinant protein

3 讨论

鸭甲型肝炎病毒为无囊膜的二十面体对称的 RNA 病毒, 其衣壳由 VP0、VP1 和 VP3 3 种结构蛋白组成, VP1 作为其主要的保护性抗原蛋白, 对于其功能的相关研究较多, 而相关 VP3 的研究报道则较少。DHAV 和人肠道病毒 (Human parechovirus, HPeV) 同属于小 RNA 病毒科, 有报道表明 HPeV VP3 蛋白的 N-末端约 20 个氨基酸的区域有 1 个连续的抗原表位, 具有很强的免疫原性, 在抗病毒感染方面起到一定的作用^[9-11]。DHAV VP3 蛋白在该区域有较高的表面可及性、亲水性和抗原指数, 推测 VP3 在此区域也具有 1 个连续的抗原表位, 具有较强的反应原性。

杆状病毒表达系统作为一种体外基因表达系统, 不但克服了大肠杆菌原核表达系统不能对重组蛋白进行翻译后加工的缺陷, 而且也克服了动物细胞真核表达系统操作复杂、成本高等弊端, 已成为外源基因表达的主要候选系统。本研究选择利用 Bac-to-Bac 杆状病毒系统来表达 DHAV-I VP3 蛋白, Western blot 结果显示表达的蛋白大小正确, 间接免疫荧光结果说明重组蛋白能与阳性鸭抗全病毒血清发生特异性反应, 说明昆虫细胞中表达的 VP3 蛋白具有良好的反应原性。

杆状病毒系统表达外源蛋白有时需要对外源基因进行密码子优化。密码子适应指数接近 1.0 时,

蛋白表达水平较高,GC 含量平均为 30%~70%,目的基因能够进行有效的转录和翻译,许多研究者通过优化密码子实现了对目的基因的高效表达^[12]。本试验中在用 SDS-PAGE 对外源蛋白表达水平进行检测分析时,与对照组相比,未能观察到明显的差异条带,而 Western blot 分析时则出现了特异性的差异条带,说明重组蛋白的表达量不高,为提高重组蛋白的表达水平,在以后的试验中,我们将对 VP3 基因的密码子进行优化,以提高 VP3 的表达量,促进其进一步应用。

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): 309-315.
- [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 sero-type 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] 王安平,朱善元,王永娟. 鸭甲型肝炎病毒 1 型 3C 基因的原核表达与多抗的制备[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(8): 205-207.
- [8] 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.
- [9] 刘家森,甘一迪,姜 骞,等. 鸭肝炎病毒 I 型 VP3 基因的克隆及原核表达[J]. 中国兽医科学, 2008, 38(7): 587-590.
- [10] BOSCH A, GONZALEZ-DANKAART J F, HARO I, et al. A new continuous epitope of hepatitis A virus [J]. J Med Virol, 1998, 54(2): 95-102.
- [11] SANCHEZ G, PINTO R M, BOSCH A. A novel CD4⁺T-helper lymphocyte epitope in the VP3 protein of hepatitis A virus [J]. J Med Virol, 2004, 72(4): 525-532.
- [12] SMITH J M, AMARA R R, CAMPBELL D, et al. DNA/MVA vaccine for HIV type 1: effects of codon-optimization and the expression of aggregates or virus-like particles on the immunogenicity of the DNA prime [J]. AIDS Res Hum Retroviruses, 2004, 20(12): 1335-1347.

(责任编辑:陈海霞)