

鹅细小病毒 vp 基因片段的原核表达及抗血清的制备

邵昱昊¹, 王 静^{1,2}, 王谨帅³, 韩宗玺¹, 刘胜旺¹, 冉多良², 孔宪刚^{1**}

(1. 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所兽医生物技术国家重点实验室禽传染病研究室 黑龙江哈尔滨 150001; 2. 新疆农业大学动物医学学院 乌鲁木齐 830052; 3. 甘肃省商业科技研究院, 甘肃兰州 730020)

Prokaryotic Expression of vp3 Gene Fragment from Goose Parvovirus and Preparation of an Antiserum

SHAO Yu-hao¹, WANG Jing^{1,2}, WANG Dong-shuai³, HAN Zong-xi¹, LIU Sheng-wang¹
RAN Duo-liang², KONG Xian-gang^{1**}

(1. Division of Avian Infectious Diseases, National Laboratory of Veterinary Biotechnology, Institute of Harbin Veterinary Medicine, CAAS, Haerbin 150001, China; 2. College of Veterinary Medicine, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China; 3. Institute of Gansu Trade Technology, Lanzhou 730020, China)

Abstract: An 864bp fragment at the 3'-end of the vp3 gene of *Goose parvovirus* (GPV) HG5/82 isolate was cloned by RT-PCR, and was cloned into pMD18-T Simple vector. Positive clones were identified by REN digestion and PCR and a recombinant plasmid was digested with BamH I and Hind III and subcloned into the prokaryotic expression vector pET-30a. *E. coli* BL21 were transformed by the recombinant vector and induced by IPTG at a concentration of 0.6mmol/L. It was ascertained that the target fusion peptide with a molecular weight of 34kDa was expressed. The bacteria induced by IPTG were treated with 6mol/L Guanidine hydrochloric acid and ultrasonotor. The fusion protein was purified by using a ProBondTM Resin kit. The antiserum against the fusion protein was raised in rabbits. Western blot analysis indicated that the antiserum specifically recognized the fusion protein as well as VP1、VP2 and VP3 of GPV HG5/82 strain. In addition, a 65kDa protein of HG5/82 strain was also recognized by the antiserum. Presumably, the protein may be an unknown structural viral protein of GPV. Combined with previous work, it can be seen the locations of B cell linear epitopes were mapped in amino acid 145~198 and amino acid 231~733 of VP1 sequence of GPV HG5/82 strain. This information may be helpful when designing recombinant diagnostic antigens for GPV.

Key words: *Goose parvovirus*; Fragment of vp gene; Prokaryotic expression; Antiserum

摘要: 以鹅细小病毒 (*Goose parvovirus*, GPV) HG5/82 株基因组作为 PCR 反应模板, 扩增 vp 基因 3'端长 864bp 的基因片段, 将其克隆到 pMD18-T Simple 克隆载体后转化入大肠杆菌 TG1。筛选阳性质粒, 并通过 *BamH* I 和 *Hind* III 将外源基因定向克隆到原核表达载体 pET-30a, 阳性重组质粒经确证性序列测定, 证明外源片段插入到 pET-30a 的预期位置。将其转入大肠杆菌 BL21, 经终浓度为 0.6mmol/L 的 IPTG 诱导, SDS-PAGE 表明外源基因获得表达, 融合蛋白分子量约为 34kDa。将诱导后的工程菌用 6mol/L 盐酸胍裂解, 经超声处理后离心, 利用镍离子亲和树脂对裂解产物的上清进行纯化。用纯化的融合蛋白免疫新西兰白兔制备兔抗该融合蛋白的抗血清。Western blotting 结果表明制备的兔抗血清与该融合蛋白及亲本病毒的结构蛋白都具有反应性。结合前期工作进展对 GPV VP 蛋白的 B 细胞线性抗原表位进行定位。

关键词: 鹅细小病毒; vp 基因片段; 原核表达; 抗血清

中图分类号: Q786

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2006)06-0581-04

收稿日期: 2006-05-30, 修回日期: 2006-09-01

作者简介: 邵昱昊 (1976-), 男, 黑龙江省籍, 助研, 在读硕士。主要从事分子病毒学研究。

** 通讯作者: 孔宪刚 (1955-), 男, 黑龙江省哈尔滨籍, 研究员, 博士, 主要从事动物病毒学和分子免疫学研究。
Corresponding author. Tel 0451-85935000, E-mail: xgkong@hvri.ac.cn

鹅细小病毒感染(Goose parvovirus infection)是一种主要侵害小鹅和雏番鸭的高度接触性传染病,该病也被称为小鹅瘟或Derzsy's病,传播速度快,发病率和死亡率可高达90%~100%^[1]。随着雏鹅的日龄增长,其发病率和死亡率下降。最大发病日龄为73日龄,但其症状较轻,病程较长,死亡率低。一年四季均可发生流行,但由于我国南方和北方养鹅季节不同、饲养方式不同等原因,小鹅瘟的流行发生时间也不同。它以小肠粘膜表层大片坏死脱落与渗出物凝成假膜栓子物堵塞于小肠为病变特征。目前,该病仍为养鹅业和集约化养殖番鸭的国家中最主要的传染病之一,能造成重大危害。1948年春该病就在我国江苏省扬州市郊发生,以后数年中先后在广西、广东、浙江、安徽发生,最终遍及全国各养鹅地区^[2]。所有年龄的鹅都能对鹅细小病毒感染产生免疫应答,但不一定表现临床症状。鹅感染本病后主要的体液反应以最初产生IgM,然后产生IgG为特征^[1]。20日龄内的雏鹅免疫功能不全,最容易发生感染^[3]。该病在我国每年都有不同程度的流行,长期困扰着水禽养殖业的发展^[3]。

鹅细小病毒(Goose parvovirus, GPV)为该病病原,是细小病毒科^[4]依赖病毒属^[5]的成员。每个病毒粒子都是成熟的细小病毒粒子一般都是由二至四种具有共同羧基端的细小病毒结构蛋白(Structural viral proteins, VPs)构成,目前认为该病毒有三种结构蛋白,即:VP1、VP2和VP3,它们有共同的羧基端,在病毒粒子中的比值约为1:1:8。VP2的原始结构与VP1羧基端的588个氨基酸残基完全相同。VP3是将VP2氨基端截去53个氨基酸残基而产生的蛋白。VP3在病毒粒子中含量最高^[6]。有研究显示最突出于细小病毒粒子外表面的三聚体峰和肩部与病毒刺激动物机体产生中和有关^[7,8],GPV的该同源序列位于VP3中部。细小病毒VP蛋白的羧基端可能在衣壳蛋白单体相互连接装配形成完整病毒粒子的过程中起着重要作用^[9]。

本实验针对VP3中部至羧基端的288氨基酸残基所组成的肽段,从GPV(HG5/82株)中扩增出编码该肽段的基因片段,在大肠杆菌原核表达系统中获得融合表达。以纯化后的融合蛋白作为抗原制备兔抗血清,采用Western blotting分析该抗血清与经纯化的融合蛋白及亲本病毒结构蛋白的反应性。现将试验结果报告如下:

1 材料与方法

1.1 材料

GPV HG5/82株由本实验室分离鉴定并保存^[10]。大肠杆菌TG1、BL21由本室制备并保存;克隆载体pMD18-T Simple Vector购自宝生物工程(大连)有限公司;原核表达载体pET30a购于Novagen公司;ProBondTM蛋白质纯化试剂盒购自Invitrogen公司;弗氏完全和弗氏不完全佐剂购自Sigma公司。引物根据孔宪刚等^[11]发表的GPV HG5/82基因序列(登陆号:AY506547)设计,上游引物(WJ3):5'-GGA TCCGAGGTAGACA GCAGCAG-3'(下划线为BamH I位点);下游引物(WJ5):5'-AAGCTTT TAC AG ATTTT GAGT TA-3'(下划线为Hind III位点)。引物的合成及DNA测序由上海生工生物工程技术有限公司完成。实验动物为哈尔滨兽医研究所实验动物中心提供的3月龄新西兰白兔。

1.2 重组克隆载体和表达载体的构建及鉴定

用含GPV HG5/82株病毒的鹅胚尿囊液提取DNA作为PCR反应的模板,扩增所需的部分vp基因片段,经DNA凝胶回收试剂盒纯化,与pMD18-T Simple载体按一定比例连接过夜,转化入大肠杆菌TG1。重组质粒经PCR初步鉴定正确后,用BamH I和Hind III酶将外源基因定向克隆于原核表达载体pET30a。采用PCR和测序对重组表达载体进行鉴定。

1.3 外源基因的诱导表达

将测序确证的阳性质粒,转入大肠杆菌BL21。将该转入外源基因的工程菌接种10mL含Kana⁺的液体LB培养基37℃振摇。当工程菌菌液OD_{600nm}约为0.4~0.5时,取1mL菌液离心后保留细菌沉淀作为诱导前对照,剩余菌液中加入IPTG至终浓度为0.6mmol/L,37℃继续振荡培养,在不同时间段取1mL菌液,离心收菌。用PBS悬起离心收集的细菌样品,再分别加入5×上样缓冲液混匀,在沸水中加热5min,冰浴2min后进行SDS-PAGE电泳,考马斯亮蓝染色2h,脱色至背景清晰后观察目的蛋白的表达情况。

1.4 融合蛋白的纯化及Western blotting检测

离心收集100mL诱导4h的工程菌菌液,冻融一次后用10mL 6mol/L盐酸胍裂解缓冲液悬起,在磁力搅拌器上搅拌裂解30min至溶液清澈透明,低温超声破碎,4℃离心后收集上清液参照文献ProBondTM蛋白质纯化^[12]方法过柱纯化,采用SDS-PAGE检测纯化效果。按文献^[13]的方法选取1.5kg左右的白兔制备该融合蛋白的兔抗血清。将纯化所得的融合蛋白和含GPV HG5/82株的鹅胚尿

囊液进行 SDS-PAGE, 再将 SDS-PAGE 胶的蛋白部分电转移到硝酸纤维膜上。在含 50mg/mL 脱脂乳的 TBS 中封闭过夜, 用本次制备的兔抗血清(1:100 稀释)作为一抗, 在 37℃ 反应 2h, 洗膜后将辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG(1:2500 稀释)作为二抗, 在 37℃ 反应 2h, 充分洗膜后浸入显色液中显色, 至目的条带清晰时用含浓硫酸的终止液终止反应。

2 结果

2.1 克隆载体及表达载体的构建及鉴定

以 GPV HG5/82 株 DNA 作模板, 用引物 WJ3 和 WJ5 做 PCR, 经琼脂糖凝胶电泳发现在 750bp-1000bp 间有一条与所需的目的片断 864bp 分子量大小一致的特异带。将其克隆于 pMD18-T Simple Vector, 用 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶将外源基因亚克隆到 pET-30a 原核表达载体中转化大肠杆菌 BL21。将经 PCR 初步筛选的阳性菌送交测序公司进行正向和反向两次测序, 结果表明重组载体 *Bam*H I 和 *Hind* III 位点之间插入序列与登陆于 GeneBank 上的 GPV HG5/82 相应的序列完全相同。说明外源片断插入到表达载体的预期位置, 构建了含有 GPV HG5/82 株 vp 基因 3' 端 864bp 基因片段的原核表达载体。

2.2 外源基因的表达及融合蛋白的纯化

12% 的 SDS-PAGE 分析表明, 经 IPTG 诱导后的工程菌表达出一条相对分子量约为 34kDa 的特异蛋白带, 与预计的融合蛋白分子量大小一致, 将该融合蛋白命名为 F3。利用镍离子亲和树脂纯化回收氨基端为 6×His 标签的融合蛋白, 经 SDS-PAGE 电泳后发现 PH 为 4.0 的洗脱液中有一条蛋白带与 F3 分子量一致(图 1)。

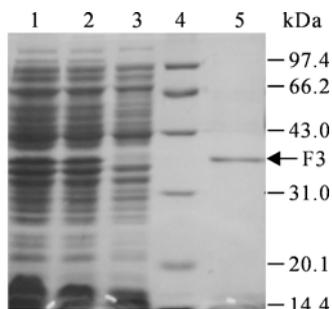


图 1 表达及纯化融合蛋白

Fig.1 Expression and purification of fusion protein

1, Engineering bacteria induced for 4h; 2, Engineering bacteria induced for 2h; 3, Uninduced engineering bacteria; 4, Protein molecular weight standard; 5, Purified F3

2.3 F3 兔抗血清检测 F3 及 GPV HG5/82 病毒的 Western blotting

用制备的 F3 兔抗血清分别与 F3 和含 GPV

HG5/82 的鹅胚尿囊液进行 Western blotting 检测, 发现该抗血清不仅能与纯化的 F3 发生反应, 还能与含 HG5/82 株病毒的鹅胚尿囊液中的四条蛋白带发生反应(图 2 箭头所指), 这四条蛋白带的分子量约为 88kDa、77kDa、65kDa 和 60kDa。

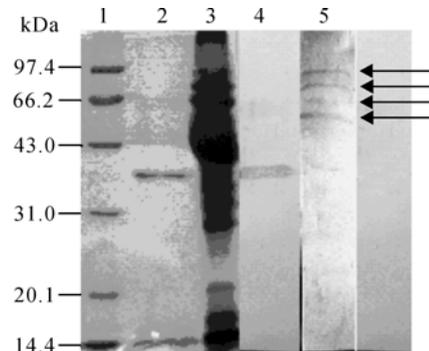


图 2 F3 抗血清检测 F3 及含 HG5/82 病毒鹅胚尿囊液的检测

Fig.2 Western blotting of F3 and HG5/82 strain with antiserum

M, Protein molecular Maker; 1, SDS-PAGE of F3; 2, SDS-PAGE of allantoic fluid with HG5/82 strain; 3, Western blotting of F3 with antiserum; 4, Western blotting of GPV HG5/82 strain with antiserum 5, negative contrast

3 讨论

在前期研究中, 我们对 1982 年从黑龙江某养鹅场的病料中分离到的一株 GPV 进行回顾性研究^[10], 分析了该毒株的分子生物学特征^[11], 并将其命名为 HG5/82 株。因为 VP 蛋白是 GPV 刺激动物机体产生保护性抗体的抗原成分, 所以我们试图通过分段表达 HG5/82 株的整个 vp 基因来分析 VP 蛋白各区段的抗原性。根据 HG5/82 株病毒的分子生物学特征及当时已报道的其它 GPV 分离株的相关研究进展^[14,15], 我们将 HG5/82 株整个 vp 基因分为三个有重合序列的基因片断, 即: vp1 基因 5' 端 662bp 的基因片断, vp2 基因 5' 端 969bp 的基因片断及 vp 基因 3' 端 864bp 的基因片断。把它们分别连入原核表达载体, 并将其表达产物分别命名为 F1^[16]、F2^[17]和 F3。采用 Western blotting 检测这三种融合蛋白的兔抗血清与亲本病毒的反应性, 一方面鉴定这三种融合蛋白的反应特性, 为重组诊断抗原的研制奠定基础。另一方面也为 GPV B 细胞表位的研究积累资料。

由于 GPV 三种结构蛋白具有共同的羧基端, 因此在理论上, 存在于 VP3 的表位应该也存在于 VP1 和 VP2; 存在于 VP2 的抗原表位应该也存在于 VP1。根据这种观点, 通过分析 F1 和 F2 兔抗血清与亲本病毒的 Western blotting 结果已说明: GPV VP1 的第 145~198 位和 231~468 位氨基酸残基中

含有 B 细胞线性抗原表位, 第 198~231 位氨基酸残基之间的肽段中没有线性抗原表位^[16]。本次试验制得的 F3 抗血清能与 HG5/82 株病毒的四条蛋白带发生反应, 这四条蛋白带的分子量约为 88kDa、77kDa、65kDa、60kDa, 其中 88kDa 的蛋白带和 GPV VP1 分子量一致, 77kDa 蛋白带和 VP2 分子量相同, 60 kDa 蛋白带和 VP3 分子量相符^[18]。说明 F3 能与 VP1、VP2 及 VP3 反应, 所以 VPs 羧基端 288 个氨基酸残基中含有抗原表位。由此可知: GPV VP1 的第 145~198 位和 231~733 位氨基酸残基中含有 B 细胞线性抗原表位, 第 198~231 位氨基酸残基之间没有线性抗原表位。此外, F3 的抗血清与亲本株的 Western blotting 结果与 Alexandrov 等^[18]报道的用鹅抗 GPV MX₄₅ 株经胶体金标记的多克隆 IgG 及单克隆抗体 IA₈ 检测 GPV 蛋白的结果一致, 说明 F3 的抗血清和鹅抗 GPV 的 IgG 及单克隆抗体 IA₈ 可能中和的是相同的表位。

目前普遍认为 GPV 有 3 种结构蛋白, 本次试验制备的 F3 兔抗血清经 Western blotting 检测却识别了亲本病毒的 4 条蛋白带, 其中分子量为 65kDa 的蛋白带也被前期制备的 F2 兔抗血清所识别。Alexandrov 等^[18]用鹅抗 GPV MX₄₅ 株(保加利亚分离株)制备的 GPV 多抗及 8 个单抗均能识别一条相对分子量为 65kDa 的蛋白带。他们认为这条蛋白带可能是一种尚未被公认的 GPV 结构蛋白, 并且它可能是 GPV 刺激鹅产生体液免疫最主要的抗原成分。本实验室用中国分离株部分 VP 蛋白的兔抗血清也识别了这条分子量为 65kDa 的蛋白带, 支持了 Alexandrov 等的推断, 但该未知结构蛋白的产生机制还有待于进一步研究。

References

- [1] Gough R E. Disease of poultry [M]. 10th edition. Beijing: Chinese Agricultural Press, 1999. 988-995
- [2] Fan D J, Wang Y K, Zheng Y M, (方定一, 王永坤, 郑玉美) *et al.* Studies on the aetiology and specific control of gosling plague [J]. Scientia Agricultura Sinica (中国农业科学), 1981, 4: 1-9.
- [3] Wang Y K, Tan H F, (王永坤, 田慧芳). Control disease of goose with developing viewpoint [J]. China Poultry (中国家禽), 2005, 27 (1): 37-43.
- [4] Schettler C H. Isolation of a highly pathogenic virus from geese with hepatitis [J]. Avian Disease, 1971, 159 (2): 323-325.
- [5] Mayo M A. Changes to virus taxonomy [J]. Arch Virol. 2005, 150 (1): 189-198.
- [6] Le Gall-Recule G, Jestin V. Biochemical and genomic characterization of muscovy duck parvovirus [J]. Arch Virol, 1994, 139: 121-131.
- [7] Bloom M E, Martin D A, Oie L L, *et al.* Expression of Aleutian mink disease parvovirus capsid proteins in defined segments: localization of immunoreactive sites and neutralizing epitopes to specific regions [J]. J Virol, 1997, 71: 705-714.
- [8] Strassheim M L, Gruenberg A, Vejjalainen P, *et al.* Two dominant neutralizing antigenic determinants of canine parvovirus are found on the threefold spike of the virus capsid [J]. Virology, 1994, 198 (1): 175-184.
- [9] Xie Q, Chapman M S. Canine Parvovirus Capsid Structure, Analyzed at 2.9 Å Resolution [J]. J Mol Biol, 1996, 264: 497-520.
- [10] Li G X, Liu S W, Kong X G, (李桂霞, 刘胜旺, 孔宪刚) *et al.* Isolation, identification and biological characteristics of goose parvovirus strain HG5/82 [J]. Chin J Prev Veter Med (中国预防兽医学报), 2005, 27 (3): 192-201.
- [11] Kong X G, Li G X, Liu S W, (孔宪刚, 李桂霞, 刘胜旺) *et al.* Analysis of Molecular Characteristics of Goose Parvovirus Strain HG5/82 [J]. Virologica Sinica (中国病毒学), 2005, 20 (1): 28-32.
- [12] Sambrook J, Russell D W. Molecular Cloning [M]. 3th edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002. 1252-1259.
- [13] Du N Q, Liu S W, Kong X G, (杜恩歧, 刘胜旺, 孔宪刚) *et al.* Expression of Avian Infectious Bronchitis Virus Nucleocapsid Protein Gene in *E. coli* and the Study of Its Antigenicity [J]. Chin J Virol (病毒学报), 2003, 19 (4): 342-347.
- [14] Chu C H, Pan M J, Cheng J T. Genetic variation of the nucleocapsid genes of waterfowl parvovirus [J]. Virology, 2001, 63 (11): 1165-1170.
- [15] Zadori Z, Stefancsik R, Rauch T, *et al.* Analysis of goose and muscovy duck parvoviruses indicates common ancestral origin with adeno-associated virus 2 [J]. Virology, 1995, 212: 562-573
- [16] Wang J, Wang D S, Han Z X, (王静, 王懂帅, 韩宗玺) *et al.* Expression of vp3 Gene Fragment of Goose Parvovirus in *E. coli* and Preparation of Its Antiserum [J]. J Agric Biotechnol (农业生物技术学报), 2006, (已接受).
- [17] Hou Q L, Wang J, Liu S W, (侯秋莲, 王静, 刘胜旺) *et al.* Expression of the vp2 Gene Fragment of Goose Parvovirus in Prokaryotic System and Preparation of its Antiserum [J]. Virologica Sinica (中国病毒学), 2005, 20 (4): 383-387.
- [18] Alexandrov M, Alexandrova R, Alexandrov I, *et al.* Fluorescent and electron-microscopy immunoassays employing polyclonal and monoclonal antibodies for detection of goose parvovirus infection [J]. J Virol Methods, 1999, 79: 21-32.
- [19] Hueffer K, Parrish C R. Parvovirus host range, cell tropism and evolution [J]. Curr Opin Microbiol, 2003, 6: 392-398.