

# 新城疫病毒 xx08 毒株血凝素-神经氨酸酶基因 主要抗原区原核表达及鉴定

朱艳平<sup>1</sup>, 田献礼<sup>2</sup>, 李 鹏<sup>1</sup>, 岳 锋<sup>1</sup>, 贾文科<sup>1</sup>, 张艳芳<sup>1</sup>,  
孙国鹏<sup>1</sup>, 郭东光<sup>2</sup>, 刘 卫<sup>2</sup>, 王选年<sup>1,2\*</sup>

(1. 新乡学院 生命科学与技术系 生物技术研究中心, 河南 新乡 453003;

2. 河南科技学院 动物科学学院, 河南 新乡 453003)

**摘要:** 利用基因工程技术构建新城疫病毒 *HN* 基因抗原表位集中区  $HN_{1175-K367}$  基因片段(523—1 101 位)的重组表达质粒 pET32- $HN_{1175-K367}$ 。将该质粒转化大肠杆菌 BL21(ED3), 经 IPTG 诱导, SDS-PAGE 鉴定表明,  $HN_{1175-K367}$  蛋白得到高效表达, 其分子量约为 38 kD。Western-blot 分析证实,  $HN_{1175-K367}$  蛋白与鸡新城疫病毒高免血清发生特异性反应, 表明利用原核表达系统获得的重组蛋白具有良好的反应原性。

**关键词:** 新城疫病毒; *HN* 蛋白抗原表位集中区; 原核表达; 多克隆抗体; 鉴定

**中图分类号:** S852.65 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2012)07-0134-05

## Prokaryotic Expression of the Main Antigen Region in *HN* Gene of Newcastle Disease Virus xx08 Strain

ZHU Yan-ping<sup>1</sup>, TIAN Xian-li<sup>2</sup>, LI Peng<sup>1</sup>, YUE Feng<sup>1</sup>, JIA Wen-ke<sup>1</sup>, ZHANG Yan-fang<sup>1</sup>,  
SUN Guo-peng<sup>1</sup>, GUO Dong-guang<sup>2</sup>, LIU Wei<sup>2</sup>, WANG Xuan-nian<sup>1,2\*</sup>

(1. Biotechnology Research Center, Life Science and Technology Department, Xinxiang University, Xinxiang 453003, China;

2. College of Animal Science and Technology, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China)

**Abstract:** In this study, the  $HN_{1175-K367}$  gene fragment of *HN* gene epitope concentration region of Newcastle disease virus (NDV) was cloned into pET-32a(+) vector to construct the expression plasmid pET32- $HN_{1175-K367}$ . The plasmid was transformed into *E. coli* BL21 (ED3) and induced by IPTG for  $HN_{1175-K367}$  protein expression. Then, the expressed protein was separated by SDS-PAGE and identified by western blot assay. The results showed that the  $HN_{1175-K367}$  protein was overly expressed and the molecular weight was about 38 kD. The expressed protein specifically reacted with anti-NDV antiserum, indicating that the prokaryotically expressed target protein had good antigenicity.

**Key words:** NDV; *HN* protein epitope concentration region; prokaryotic expression; polyclonal antibody; identification

新城疫(Newcastle disease, ND)是禽类易感染  
的一种急性、高度接触性、高死亡率的传染病, 其病

原是新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)。  
该病是当今全球范围内危害禽类最为严重的一种病

收稿日期: 2012-02-13

基金项目: 教育部科学技术研究重点项目(207065); 河南省高校科技创新团队支持计划项目(2008IRTSTHN011); 河南省基础与前沿技术研究项目(330002)

作者简介: 朱艳平(1980-), 女, 河南宝丰人, 讲师, 博士, 主要从事兽医微生物学与免疫学研究。

E-mail: yanpingzhu2005@163.com

\* 通讯作者: 王选年(1969-), 男, 河南灵宝人, 教授, 博士, 主要从事动物病理学与分子免疫学研究。

E-mail: xuannianwang@yahoo.com.cn

毒性疾病,给养禽业造成了巨大的经济损失,是世界动物卫生组织(OIE)列表传染病<sup>[1-2]</sup>,我国农业部也将其列为 I 类传染病。

NDV 是一种具有囊膜的单股、负链、不分节段的 RNA 病毒,为单负链病毒目(Mononegavirales)副粘病毒科(Paramyxoviridae)腮腺炎病毒属(*Rubulavirus*)成员<sup>[3]</sup>。NDV 基因组包含 6 个基因,其基因组结构为 3'-NP-P-M-F-HN-L-5',编码 6 种结构蛋白,依次为核衣壳蛋白(nucleocapsid protein, NP)、磷酸化蛋白(phosphoprotein, P)、基质蛋白(martix protein, M)、融合蛋白(fusion protein, F)、血凝素-神经氨酸酶蛋白(haemagglutinin-neuraminidase, HN)和大聚合酶蛋白(largeprotein, L)<sup>[4]</sup>。其中 HN 和 F 蛋白是 NDV 最重要的 2 种结构性糖蛋白,均能诱导机体产生特异性抗体。HN 蛋白是主要免疫保护性抗原之一,与病毒致病性相关,在免疫应答和致病过程中发挥着重要作用<sup>[5]</sup>。

HN 蛋白是位于 NDV 囊膜表面重要的结构糖蛋白,可以诱导机体产生特异性抗体,是有效的保护性抗原,包括胞浆区、跨膜区、柱状区和球状区,而受体结合位点、神经氨酸酶活性位点和所有的抗原位点位于球状区<sup>[6-7]</sup>。HN 是多功能蛋白,具有 HA 和 NA 2 种活性,NDV 在侵染过程中,HN 蛋白识别宿主细胞表面的唾液酸受体,并与之结合吸附宿主细胞,在病毒的组织嗜性上起决定性作用<sup>[8]</sup>,NA 活性是在病毒增殖期间防止病毒粒子发生自身凝集现象。另外,HN 蛋白与宿主细胞受体结合后,通过与 F 蛋白之间的相互作用,具有促进 F 蛋白膜融合的功能<sup>[9]</sup>。因此,NDV HN 蛋白可以作为保护性抗原

制备疫苗,刺激机体产生抗体,预防病毒的感染与传播。

目前,在 NDV 的抗原检测和疫苗制备方面还存在诸多问题,致使 NDV 在国内流行,给禽类养殖业带来了巨大的经济损失。为及时监控病毒的流行和获得有效的免疫保护,本研究以 HN 蛋白的抗原集中区为研究对象,构建原核重组表达载体,进行诱导表达,目的在于获得 HN 蛋白抗原集中区的重组蛋白,为建立 NDV 的检测方法及疫苗的制备奠定基础。

### 1 材料和方法

#### 1.1 菌株、载体及工具酶

大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、BL21(DE3)、含 NDV xx08 毒株 HN 基因的重组质粒 pMD-HN、鸡抗 NDV 多克隆血清,均由新乡学院生物技术研究中心保存;原核表达载体 pET-32a(+)vector systems 由华南农业大学郭霄峰教授惠赠;pMD18-T-simple 载体、IPTG、Ex *Taq* DNA 聚合酶、T<sub>4</sub> DNA 连接酶、内切酶 *EcoR* I、*Xho* I,均为 TaKaRa 公司产品; $\beta$ -巯基乙醇,Invitrogen 公司产品;AEC、His 标签单抗,北京中杉金桥科技公司产品;PVDF 膜,Millipore 公司产品;羊抗鸡 IgG-HRP 酶标二抗,博奥森公司产品。

#### 1.2 引物设计

通过 DNASTar 分析,获得 NDV xx08 株 HN 基因主要抗原区 HN<sub>1175-K367</sub>(523—1 101 位,579 bp)序列,设计引物,引入 *EcoR* I、*Xho* I 限制性酶切位点,由大连宝生物工程公司合成(表 1)。

表 1 NDV HN 抗原表位集中区(HN<sub>1177-K367</sub>)基因片段扩增引物

引物	序列	内切酶
上游	5'-CG GAATTCATACCTCATTTGACATGAGCAC-3'	<i>EcoR</i> I
下游	5'-CC CTCGAGTTACTTCCACCAAATCGCCC-3'	<i>Xho</i> I

#### 1.3 HN<sub>1175-K367</sub>基因片段的扩增与重组表达质粒的构建

利用合成的引物,以 pMD-HN 为模板,PCR 扩增 HN<sub>1175-K367</sub> 基因片段,回收纯化 PCR 产物,克隆至载体 pMD18-T-simple,构建重组克隆载体,命名为 pMD-HN<sub>1175-K367</sub>。经 PCR 扩增、*EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定,筛选阳性克隆并测序。采用 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切,克隆至 pET-32a(+)表达载体,转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞,涂布于含氨苄青霉素(Amp,100  $\mu$ g/mL)的 LB 培养板上,37  $^{\circ}$ C 下倒置培

养 12~14 h。挑单菌落于含 Amp(100  $\mu$ g/mL)的 LB 液体培养基中,37  $^{\circ}$ C 下 180 r/min 振荡培养约 12 h,抽提质粒,经 PCR、双酶切和测序鉴定,阳性克隆命名为 pET32-HN<sub>1177-K367</sub>。

#### 1.4 pET32-HN<sub>1175-K367</sub>重组表达质粒的诱导表达

将 pET32-HN<sub>1175-K367</sub> 重组表达质粒转入 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞,涂布于含 Amp(100  $\mu$ g/mL)的 LB 培养板上,37  $^{\circ}$ C 下倒置培养 12~14 h。挑取单菌落于含 Amp(100  $\mu$ g/mL)的 LB 液体培养基中,37  $^{\circ}$ C 下 180 r/min 振荡培养过夜。次日按 1

: 100 的比例接种于新鲜的含 Amp(100  $\mu\text{g/mL}$ ) 2  $\times$  YT 培养液, 37  $^{\circ}\text{C}$  下培养至  $\text{OD}_{600}$  值为 0.5~0.6, 取 1 mL 培养菌液作为未诱导对照于同样的条件下进行诱导表达, 剩余培养菌液中加入 IPTG 0.2 mol/L, 于 28  $^{\circ}\text{C}$  进行诱导表达 4 h, 收集表达菌体。同时诱导空载体 pET-32a 转化菌作为对照。将诱导的产物以 12 000 r/min 离心 1 min, 收集菌体, 加入 100  $\mu\text{L}$  PBS 和等量的 2  $\times$  SDS-PAGE Loading Buffer 重悬, 煮沸 10 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清进行 SDS-PAGE 鉴定。

### 1.5 pET32-HN<sub>1175-K367</sub> 重组质粒诱导表达产物的可溶性分析

参照 1.4 步骤进行中量诱导表达, 将诱导菌液于 4  $^{\circ}\text{C}$  下 5 000 r/min 离心 20 min, 收集菌体, 加入适量 PBS 重悬菌体, 然后加入溶菌酶, 使终质量浓度为 150  $\mu\text{g/mL}$ , 于 30  $^{\circ}\text{C}$  下放置 30 min, 冰浴中超声波破碎 10 min; 4  $^{\circ}\text{C}$  下 5 000 r/min 离心 20 min, 分别收集沉淀和上清, 进行常规 SDS-PAGE, 以确定表达蛋白存在形式。

### 1.6 HN<sub>1175-K367</sub> 目的蛋白的切胶回收与纯化

取处理好的包涵体, 加 PBS 和等量的 2  $\times$  SDS Loading Buffer, 煮沸 10 min, 12 000 r/min 离心 15 min, 上样进行蛋白质电泳。电泳结束后, 将胶块用 0.1 mol/L 的 KCl 染色 5~10 min, 待目的蛋白染成银白色, 切下目的条带, 放入盛有 1.5 mL Tris-Gly 的预处理的透析袋(MWCO: 12 000)内, 进行水平电泳(120 V, 220 mA, 4~6 h)。然后, 将整个透析袋放在新鲜的 PBS 溶液中, 低温透析过夜, 浓缩、离心收集上清。

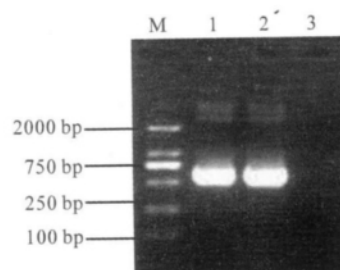
### 1.7 表达产物的 Western-blot 分析

常规 SDS-PAGE 检测后进行 Western-blot 鉴定, 用 5% 脱脂奶粉-TBST 封闭; TBST 洗膜 3 次后, 加入鼠源抗 NDV 阳性血清(一抗)进行反应; TBST 洗膜 3 次后, 加 HRP 标记羊抗鼠 IgG(二抗)进行反应; 最后 TBST 洗膜 3 次, AEC 显色。

## 2 结果与分析

### 2.1 HN<sub>1175-K367</sub> 基因的扩增结果

PCR 产物经 1% 琼脂糖电泳检测, 可见约 579 bp 大小的片段(图 1), 与理论值相符。经测序鉴定, 核苷酸序列和氨基酸序列未发生任何突变, 目的片段大小正确, 证实该条带为目的条带, 即 HN<sub>1175-K367</sub> 基因片段被成功克隆, 且成功构建了克隆质粒 pMD-HN<sub>1175-K367</sub>。

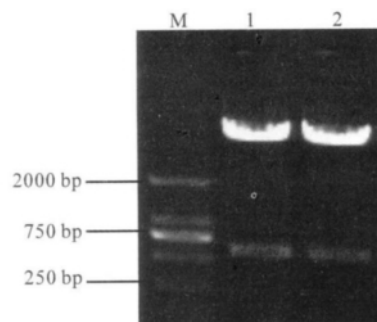


M, DL2000 Marker; 1, 2. HN<sub>1175-K367</sub> 基因片段; 3. 阴性对照

图 1 HN<sub>1175-K367</sub> 基因 PCR 产物

### 2.2 重组表达质粒的构建

将测序正确的重组克隆质粒 pMD-HN<sub>1175-K367</sub>, 用 *EcoR* I、*Xho* I 双酶切, 回收目的条带, 构建重组表达质粒 pET32-HN<sub>1175-K367</sub>。然后用 *EcoR* I、*Xho* I 双酶切重组表达质粒, 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 获得与理论值大小一致的目的条带, 与预期结果相符(图 2)。经测序鉴定, 运用 DNASTAR 软件对测序结果与原基因进行分析比较, 证明 HN<sub>1175-K367</sub> 基因片段以正确的方式插入 pET-32a(+) 载体中, 核苷酸序列和氨基酸序列未发生任何突变, 证明 HN<sub>1175-K367</sub> 基因片段被成功克隆, 且成功构建了表达质粒 pET32-HN<sub>1175-K367</sub>。



M, DNA Marker DL2000; 1, 2. 重组质粒 pET32-HN<sub>1175-K367</sub> 双酶切产物

图 2 pET32-HN<sub>1175-K367</sub> 重组质粒的双酶切鉴定结果

### 2.3 pET32-HN<sub>1175-K367</sub> 重组表达质粒的诱导表达及 SDS-PAGE 分析

将重组质粒转入大肠杆菌 BL21, 利用 IPTG 诱导表达后, 进行 SDS-PAGE 电泳检测, 表达产物的分子量约 38 kD, 与理论推测结果一致(图 3), 可见 HN<sub>1175-K367</sub> 重组蛋白获得表达。

### 2.4 HN<sub>1175-K367</sub> 蛋白的可溶性分析与切胶纯化

重组表达菌经诱导表达后, 超声波破碎菌体, 离心取上清和沉淀分别进行 SDS-PAGE 分析。电泳结果表明, 目的蛋白主要以包涵体的形式存在于沉淀中, 通过切胶纯化获得纯度较高的重组目的蛋白(图 4), 蛋白回收率及蛋白纯度能够满足本研究的

需要。因此,重组表达蛋白通过超声波破碎处理,并切胶回收进行纯化。

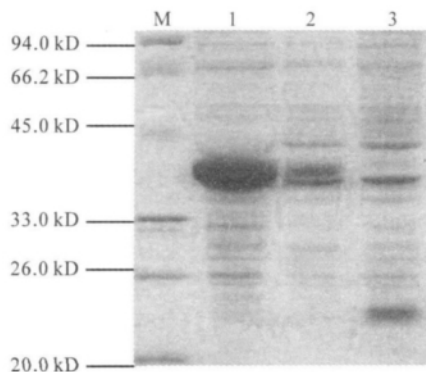


图 3 pET32-HN<sub>1175-K367</sub> 表达质粒的诱导表达产物

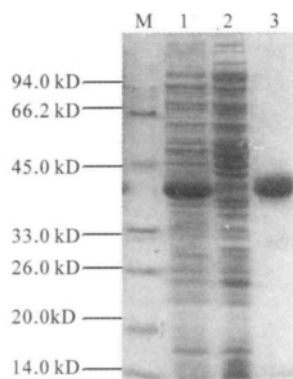


图 4 pET32-HN<sub>1175-K367</sub> 重组表达质粒表达产物可溶性分析及切胶回收纯化效果

## 2.5 表达产物的 Western-blot 鉴定结果

Western-blot 鉴定结果表明,HN<sub>1175-K367</sub> 融合表达产物与 NDV 高免血清发生特异性反应(图 5)。因此,重组表达蛋白具有 HN 蛋白的反应原性。

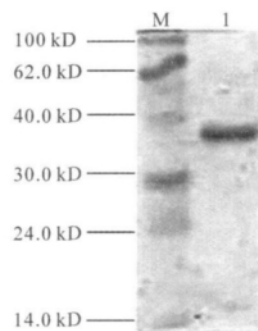


图 5 HN<sub>1175-K367</sub> 表达蛋白 Western-blot 鉴定结果

## 3 讨论

HN 蛋白的抗原性是由其抗原位点区域及空间构象共同决定的,其大多数的活性位点主要位于球状区<sup>[10]</sup>。NDV HN 蛋白具有 7 个抗原位点,其中 12、2、23、1、14 位这 5 个位点具有 HA 活性。位于头部 3 个抗原区域 193—201 位(位点 23)、345—353 位(位点 14、1)和 513—521 位,再加上第 494、569 位氨基酸残基(位点 12、2),只有第 345—353 位残基为线性抗原位点区<sup>[11]</sup>,其余抗原表位是由非连续区域经过一系列折叠集聚在一起形成的。HN 蛋白膜外区的 172、186、196、238、247、251、344、455、461、465、531 和 542 位氨基酸等 12 个完全保守的半胱氨酸残基对于其成熟有重要的作用,每个残基发生突变都会导致相应抗原位点无法形成<sup>[12]</sup>。

许多学者展开针对 NDV HN 抗原性的研究。董丽<sup>[13]</sup>对 HN 蛋白抗原区域进行研究,应用真核表达系统,截取 HN 蛋白前 400 个氨基酸序列,构建真核重组表达载体,获得具有活性的重组蛋白,制备其不同抗原表位多肽的单抗,研究不同毒株 HN 蛋白抗原性表位的差异。陈亚波等<sup>[10,14]</sup>构建 HN 蛋白的 3 个结构域基因片段(172—251、344—570、172—251位与 344—570 位通过 linker 连接的融合蛋白,包含位点 12、2、23、1、14)的重组原核表达载体与重组真核表达载体,并获得具有免疫反应性的重组蛋白。

本研究对 HN 蛋白基因进行抗原集中区的剪切,保留了大部分抗原位点,包括其中的头部抗原区域(位点 23)、球状区、线性抗原位点区(位点 14、1)和新乡学院生物技术研究中心筛选的 B 细胞抗原表位多肽,目的在于使获得的目的蛋白能够得到高效表达并且具有抗原性。研究结果表明,剪切的目的基因在大肠杆菌原核表达系统中获得高效表达,并且获得的重组蛋白能够与 NDV 高免血清发生特异性反应,说明重组蛋白具有 HN 蛋白的反应原性,抗原位点的空间构象变为线性位点时,对其抗原性影响不大。本研究为将来制备 HN 单克隆抗体、建立抗原检测方法和制备基因工程疫苗奠定了基础。

## 参考文献:

- [1] 赵瑞宏,张丹俊,潘孝成,等. 不同新城疫疫苗和免疫途径对鸡新城疫 HI 抗体的影响[J]. 现代农业科技,2009(19):303-304.
- [2] 张子蕾,邢秋菊. 鸡新城疫的发生与综合防治措施[J]. 现代农业科技,2010(10):338. (下转第 154 页)

业;三是着重推进畜禽良繁体系建设,提高畜牧业生产水平;四是着重进行科技推广普及,提高畜禽养殖的科技含量和养殖效益;五是着重进行养殖专业合作社和畜产品加工龙头企业建设,提高产业化经营。

2) 实现 4 个转变:一是从自给自足散养向规模化商品化生产转变。按照统一规划、统一设计、统一建设、统一服务、分户饲养的“四统一分”要求,加快基地建设和养殖小区建设,切实在品种改良、科学养殖、规范免疫程序、适时育肥出栏上下功夫,在规模化生产、产业化经营上取得新突破。二是从单一养殖向产业化经营转变。坚持内培外引方针,按照扶优、扶强、扶大的原则,大力扶持有条件的龙头企业扩能技改;积极引进国内知名企业和品牌落户毕节,大力发展精深加工,促进优势产品转化增值。三是由被动式坐等服务向主动深入基层服务转变。进一步加强服务体系建设,充分发挥中高级职务专业技术人员作用,切实抓好乡镇畜牧兽医站、村兽医室、猪牛羊综合品种改良点等基础设施建设和基层队伍建设,以设施建设为基础、良种为核心,全力加强现代畜牧技术的组装配套和推广。四是由耗粮型畜牧业向节粮型草地生态畜牧业转变。充分利用现有草

山草坡资源,抢抓生态建设、石漠化治理、科技扶贫等项目实施机遇,千方百计抓好人工草地建设和保护利用,大力发展草食牲畜,逐步降低耗粮型畜群比重,实现畜牧业和生态建设和谐发展。

#### 参考文献:

- [1] 毕节地区统计局. 2008 毕节地区统计年鉴[M]. 北京: 中国统计出版社, 2008: 8-9.
  - [2] 毕节地区统计局. 2010 毕节地区统计年鉴[M]. 北京: 中国统计出版社, 2010: 62-63.
  - [3] 周佳清, 王明进, 王思才. 贵州毕节生态试验区的发展[J]. 四川畜牧兽医, 2009(7): 16-17.
  - [4] 刘贵林. 贵州草地畜牧业发展及分析[J]. 四川草原, 2006(3): 47-49.
  - [5] 王世斌, 傅平, 余陆均. 凉山畜禽品种及其生态特征[C]//中国畜牧兽医学会家畜生态学会第六届全国代表大会暨学术研讨会论文集, 2004: 55-62.
  - [6] 吴道义, 顾明. 毕节地区畜牧业循环经济发展模式探索[J]. 贵州农业科学, 2009, 37(12): 68-70.
  - [7] 李富祥. 威宁县喀斯特草地生态畜牧业发展现状与对策[J]. 现代农业科技, 2011(2): 380-381.
- 
- (上接第 137 页)
- [3] Susta L, Miller P J, Afonso C L, *et al.* Clinicopathological characterization in poultry of three strains of Newcastle disease virus isolated from recent outbreaks[J]. Vet Pathol, 2011, 48(2): 349-360.
  - [4] Diel D G, Susta L, Cardenas Garcia S, *et al.* Complete genome and clinicopathological characterization of a virulent Newcastle disease virus isolate from South America[J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(2): 378-387.
  - [5] 王选年, 周继勇, 杨艳艳, 等. 抗克伦特罗单克隆抗体杂交瘤的建立及其分泌单抗的免疫学特性鉴定[J]. 中国免疫学杂, 2004, 20(3): 194-198.
  - [6] Zanetti F, Berinstein A, Carrillo E. Effect of host selective pressure on Newcastle disease virus virulence[J]. Microb Pathog, 2008, 44(2): 135-140.
  - [7] Peeters B P, de Leeuw O S, Verstegen I, *et al.* Generation of a recombinant chimeric Newcastle disease virus vaccine that allows serological differentiation between vaccinated and infected animals[J]. Vaccine, 2001, 19(13/14): 1616-1627.
  - [8] Huang Z, Panda A, Elankumaran S, *et al.* The hemagglutinin-neuraminidase protein of Newcastle disease virus determines tropism and virulence[J]. J Virol, 2004, 78(8): 4176-4184.
  - [9] Estevez C, King D J, Luo M, *et al.* A single amino acid substitution in the haemagglutinin-neuraminidase protein of Newcastle disease virus results in increased fusion promotion and decreased neuraminidase activities without changes in virus pathotype[J]. J Gen Virol, 2011, 92(3): 544-551.
  - [10] 陈亚波, 徐程, 张桂芝, 等. 新城疫病毒 HN 蛋白抗原表位分析及结构域基因原核表达[J]. 中国预防兽医学报, 2007, 29(1): 32-35.
  - [11] 王志玉. 副粘病毒表面糖蛋白的表达及其相互作用的研究[J]. 山东医科大学学报, 1999, 37(2): 117-119.
  - [12] 王海峰. 新城疫病毒地方分离株生物学特性的鉴定及疫苗后选株筛选的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2007.
  - [13] 董丽. 新城疫病毒 HN 蛋白单克隆抗体的制备及分离株 HN 蛋白抗原表位差异性分析[D]. 扬州: 扬州大学, 2010.
  - [14] 陈亚波. 新城疫病毒 HN 蛋白与 F 蛋白结构域共表达对细胞融合的影响[D]. 杭州: 浙江大学, 2006.