

I型鸭甲型肝炎病毒VP1基因在昆虫细胞中的表达及鉴定

顾玲玲,吴萌,朱善元,王安平*

(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(DHAV-I)的主要结构蛋白VP1,根据GenBank已发表的DHAV-I SH株VPI基因序列,设计1对特异性引物,通过RT-PCR扩增VPI基因,将其克隆至杆状病毒转移载体pFastBac1,获得重组杆状病毒转移载体pFB-VPI,将其转化E.coli DH10Bac感受态细胞,经抗性、蓝白斑筛选及PCR鉴定后,构建重组穿梭质粒rBacmid-VPI。在脂质体介导下将重组质粒rBacmid-VPI转染昆虫细胞Sf 9,制备含有DHAV-I VPI基因的重组杆状病毒rBac-VPI。Western blot结果显示,表达的重组蛋白VP1大小约27 ku,能与DHAV-I VP1多克隆抗体发生特异性反应;间接免疫荧光检测结果显示,重组蛋白VP1能与DHAV-I全病毒阳性血清发生特异性反应,细胞内出现较强的荧光。以上结果表明,在昆虫细胞中成功表达了具有免疫原性的DHAV-I主要结构蛋白VP1。

关键词:I型鸭甲型肝炎病毒;VPI基因;昆虫细胞;表达;鉴定

中图分类号:S852.65⁺⁹ **文献标志码:**A **文章编号:**1004-3268(2018)01-0114-04

Expression and Identification of VPI Gene of Duck Hepatitis A Virus Type I in Insect Cells

GU Lingling, WU Meng, ZHU Shanyuan, WANG Anping*

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

Abstract: In order to express the main structural protein VP1 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 VPI gene by RT-PCR, the amplified fragment was cloned into baculovirus expression vector pFastBac1. The recombinant vector pFB-VPI was transformed into E. coli DH10Bac competent cells, and the positive recombinant bacmid rBacmid-VPI was screened according to the resistant and the blue-white plaque screening, confirmed by PCR. The recombinant bacmid rBacmid-VPI was transfected into the Sf 9 insect cells by liposome to obtain the recombinant baculovirus, and was named as rBac-VPI. The result of Western blot showed that the molecular weight of the recombinant proteins was about 27 ku, and could be recognized by the antiserum of DHAV-I VP1. Indirect immunofluorescence analysis proved that the recombinant proteins could be recognized by the positive anti-virus serum. These results suggested that the main structural protein VP1 of DHAV-I with immunogenicity was expressed successfully in insect cells.

Key words: Duck hepatitis A virus type I ; VPI gene; Insect cells; Expression; Identification

鸭病毒性肝炎(Duck viral hepatitis, DVH)是由鸭甲型肝炎病毒(Duck hepatitis A virus, DHAV)引起

的、主要侵害3周龄以下雏鸭的一种高度接触性致死性传染病,1周龄以内的雏鸭病死率可高达

收稿日期:2017-07-20

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,江苏泰州人,硕士,主要从事兽用生物制药的研究。E-mail:gull1118@163.com

*通讯作者:王安平(1980-),女,江苏泰州人,副教授,博士,主要从事兽用生物制药的研究。E-mail:wap4017@163.com

100%,对养鸭业造成了严重危害。DHAV可分为3种血清型:DHAV-I(经典的血清型)、DHAV-II(新发现于台湾的血清型)和DHAV-III(新发现于中国和韩国的血清型),3个血清型之间存在明显的差异,无交叉免疫性^[1,2]。

目前,我国DHAV-I流行较普遍。DHAV-I病毒粒子呈球形或类球形,无囊膜。基因组大小约7 690 bp,只编码1个开放阅读框(ORF),病毒基因组编码的多聚蛋白在病毒自身编码的蛋白酶的作用下水解成1个结构蛋白区(P1)和2个非结构蛋白区(P2和P3)。P1区进一步水解为VP0、VP1和VP3等3种结构蛋白,P2区进一步水解为2A1、2A2(2A3)、2B和2C等4种或5种非结构蛋白,P3区进一步水解为3A、3B、3C和3D等4种非结构蛋白。其中,VP1蛋白为其主要的结构蛋白,位于病毒衣壳表面,是决定病毒抗原性的主要成分^[3,4],而且VP1包含多个中和抗原表位,可诱导机体产生保护性中和抗体^[5-7]。目前,对于DVH尚无有效的药物治疗措施,免疫接种仍是预防该病的主要措施,但普遍存在安全性低、免疫效果不够理想等缺点,并且变异毒株的出现使其免疫失败也逐渐增多,迫切需要开发DVH的新型疫苗。鉴于此,利用昆虫细胞-杆状病毒表达系统表达DHAV-I SH株的VP1基因,以期表达出具有免疫原性的VP1重组蛋白,为DVH基因工程亚单位疫苗的研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 毒株、菌株、载体和血清

E. coli DH5 α 、DH10Bac感受态细胞,草地夜蛾卵巢细胞Sf 9,Bac-to-Bac杆状病毒表达系统,含有DHAV-I VP1基因的重组质粒pET-VP1,DHAV-I全病毒阳性血清(DHAV-I SH株免疫鸭后收集的鸭血清),DHAV-I VP1多克隆抗体(原核表达的DHAV-I VP1蛋白免疫小鼠后制备)均由江苏省兽用生物制药高技术研究重点实验室保存。

1.2 主要工具酶和试剂

转染试剂Cellfectin II Reagent购自Invitrogen公司;T4 DNA连接酶, pfu DNA聚合酶,限制性核酸内切酶Xho I、BamHI均购自Thermo公司;昆虫细胞培养基Sf-900 II SFM购自GBICO公司;SDS-PAGE凝胶制剂盒购自康为世纪生物科技有限公司;FITC标记的羊抗鸭IgG、HRP标记的羊抗鼠IgG均购自Southern Biotech公司。

1.3 引物的设计与合成

根据GenBank中发表的DHAV-I SH株VP1基因序列设计1对特异性引物,分别在上下游引物的5'端引入BamHI、Xho I酶切位点。用于扩增DHAV-I VP1基因的PCR引物序列为VP1-F:5'-TAAGGATCCACCATGGTGATTCCAACCAGTTGGGG-3'(下划线为BamH I酶切位点),VP1-R:5'-

CGACCTCGAGTTATTCAATTCCAGATTAAGTTC-3'(下划线为Xho I酶切位点)。预期扩增片段大小为714 bp。用于杆状病毒质粒同源重组鉴定的通用引物M13-F/M13-R序列参照Bac-to-Bac杆状病毒表达系统使用说明设计。引物均由上海生工生物技术有限公司合成。

1.4 VP1基因扩增

以重组质粒pET-VP1为模板进行PCR扩增。50 μ L反应体系:模板1 μ L、10 \times Buffer 5 μ L、VP1-F 2 μ L、VP1-R 2 μ L、dNTP 5 μ L、pfu DNA聚合酶1 μ L、去离子水34 μ L。反应程序:94 $^{\circ}$ C预变性3 min;94 $^{\circ}$ C变性20 s,51 $^{\circ}$ C退火20 s,72 $^{\circ}$ C延伸90 s,30个循环;72 $^{\circ}$ C延伸7 min,4 $^{\circ}$ C保存。

1.5 重组转移载体pFB-VP1的构建

将回收的VP1 PCR产物及杆状病毒转移载体pFastBac1分别用Xho I和BamHI酶切后回收,T4 DNA连接酶连接,连接产物转化至*E. coli* DH5 α 感受态细胞,37 $^{\circ}$ C培养15 h。随机挑取单菌落,接种于含氨苄青霉素(100 μ g/mL)的LB液体培养基中培养过夜。以过夜菌为模板,以VP1-F和VP1-R为上、下游引物进行PCR扩增,将PCR初步鉴定为阳性的菌株提取质粒,用Xho I和BamHI进行双酶切鉴定,并送上海英潍捷基生物技术有限公司测序。将鉴定正确的重组质粒命名为pFB-VP1。

1.6 重组杆状病毒穿梭质粒的制备

根据Bac-to-Bac杆状病毒表达系统操作说明,将重组质粒pFB-VP1转化至*E. coli* DH10Bac感受态细胞进行同源重组,取菌液均匀涂布于含卡那霉素、庆大霉素、四环素、X-Gal及IPTG的LB平板上,37 $^{\circ}$ C培养48 h。随机挑取数个白色菌落,过夜培养后,碱裂法提取重组Bacmid DNA。用通用引物M13-F/M13-R进行PCR鉴定,反应体系及反应程序均参照Bac-to-Bac杆状病毒表达系统操作说明书进行,将鉴定正确的阳性重组穿梭质粒命名为rBacmid-VP1。在平板上挑取蓝色菌落,过夜培养后,碱裂解法提取未重组的Bacmid DNA,即为野生型Bacmid DNA。

1.7 重组杆状病毒rBac-VP1的制备

参照Cellfectin II Reagent转染说明,将rBacmid-VP1和野生型Bacmid DNA分别转染处于对数生长期的Sf 9昆虫细胞。约72 h后,待细胞出现明显病变,收集细胞液,500 r/min离心5 min,获得的上清即为P1代重组杆状病毒rBac-VP1。同样参照Bac-to-Bac杆状病毒表达系统操作说明书,将P1代重组杆状病毒在Sf 9昆虫细胞上进行扩增至P3代,空斑试验测定P3代rBac-VP1的病毒滴度。

1.8 重组蛋白VP1的间接免疫荧光鉴定

为检测重组蛋白VP1的表达情况,将Sf 9昆虫细胞以 6×10^5 个/孔的量铺于24孔板。分别以不同的感染复数(MOI)感染P3代rBac-VP1及野生型杆状病毒,待细胞出现明显的病变(约感染72 h

后),弃去培养基,用预冷的固定液($V_{丙酮} : V_{乙醇} = 3: 2$)固定5 min,弃去固定液;PBS洗涤2遍后加入5% BSA室温封闭1 h;再加入1:100稀释的DHAV-I全病毒阳性血清,37℃孵育1 h;PBST洗涤5遍后加入1:500稀释 FITC 标记的羊抗鸭 IgG,37℃孵育30 min;PBST洗涤3遍后在荧光倒置显微镜下观察结果并拍照。

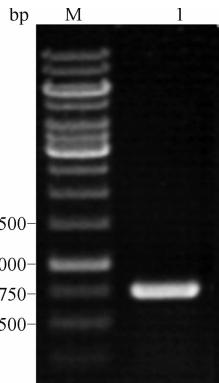
1.9 重组蛋白 VP1 的 Western blot 分析

将P3代 rBac - VP1 及野生型杆状病毒分别以不同的MOI感染处于对数生长期的Sf 9 昆虫细胞,待细胞出现明显的病变(约感染72 h后),500 r/min离心5 min,收集细胞沉淀,加入5×Loading Buffer,煮沸3 min,取15 μL进行SDS-PAGE分析。样品电泳结束后转印至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜,以DHAV-I VP1 多克隆抗体为一抗、HRP标记的羊抗鼠 IgG 为二抗,经 DAB 显色后观察结果。

2 结果与分析

2.1 VP1 基因的扩增结果

将VP1 PCR 产物进行1%的琼脂糖凝胶电泳检测,得到1条约714 bp的条带(图1),与预期条带大小一致。



M. DNA 分子质量标准;1. PCR 扩增产物
图 1 VP1 基因片段的 PCR 扩增结果

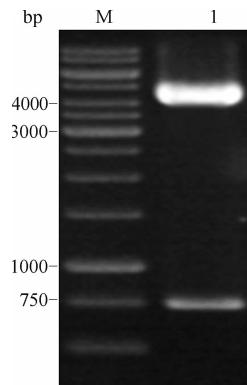
2.2 重组杆状病毒转移载体 pFB - VP1 的构建与鉴定

将回收的目的基因VP1与载体pFastBac1连接,转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,经PCR筛选获得重组子。*Xho* I 和 *Bam*H I 双酶切鉴定,产生与预期大小一致的2条约714 bp和4 800 bp的条带(图2),表明VP1基因已成功克隆入载体pFastBac1中,成功构建了重组杆状病毒转移载体pFB - VP1。

2.3 重组杆状病毒穿梭质粒 rBacmid - VP1 的鉴定

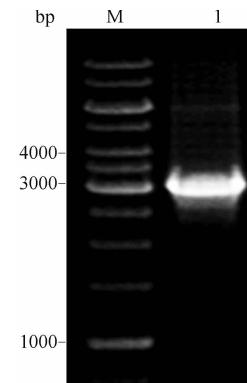
以通用引物M13-F/M13-R对重组杆状病毒穿梭质粒DNA进行鉴定,PCR产物经琼脂糖凝胶电泳检测,产物片段大小约3 000 bp,与预期条带大小一致(图3),表明成功制备了重组杆状病毒穿梭质

粒 rBacmid - VP1。



M. DNA 分子质量标准;1. pFB - VP1 的 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切产物

图 2 重组质粒 pFB - VP1 的双酶切鉴定结果

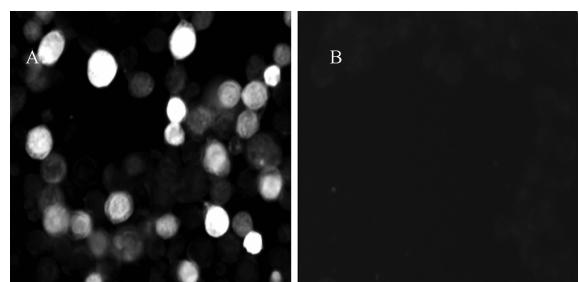


M. DNA 分子质量标准;1. rBacmid - VP1

图 3 重组穿梭质粒 rBacmid - VP1 的 PCR 鉴定结果

2.4 重组蛋白 VP1 的间接免疫荧光检测结果

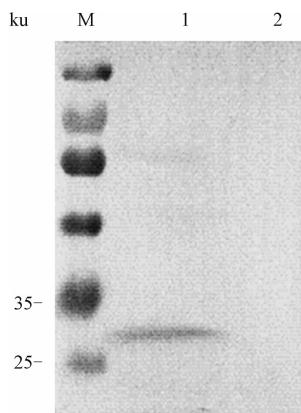
以DHAV-I全病毒阳性血清为一抗对昆虫细胞中的重组蛋白进行间接免疫荧光检测。结果显示,rBac - VP1 感染的昆虫细胞有大量特异性绿色荧光,而在野生型杆状病毒感染的昆虫细胞内则未观察到(图4),说明在昆虫细胞中成功表达了重组蛋白 VP1,且表达的重组蛋白具有免疫原性。



A. 感染 rBac - VP1 的 Sf 9 细胞;B. 感染野生型杆状病毒的 Sf 9 细胞
图 4 重组蛋白 VP1 的间接免疫荧光检测(400 \times)

2.5 重组蛋白 VP1 的 Western blot 分析

为鉴定重组蛋白的分子质量,以DHAV-I VP1 多克隆抗体为一抗进行Western blot 分析。结果显示,在分子质量约27 ku处出现了特异性条带,与预期条带大小一致,而野生型杆状病毒感染则未出现特异条带(图5)。



M. 蛋白质分子质量标准;1. rBac - VP1;2. 野生型杆状病毒

图5 重组蛋白VP1的Western blot分析

3 结论与讨论

目前,常用的外源基因表达系统主要包括原核表达系统和真核表达系统。其中,原核表达系统虽然能够进行大规模发酵生产,但大肠杆菌不能对表达产物进行翻译后加工,生产的重组蛋白一般没有活性,限制了该系统的应用^[8-10]。酵母表达系统作为一种真核表达系统,虽然能进行翻译后加工,但往往存在过糖基化的缺点,且重组蛋白的表达量也较低^[11]。Bac - to - Bac 杆状病毒系统是 Luckow 等^[12]在 1993 年研究成功的一种快速高效生产重组苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(*Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus, AcMNPV)的表达系统,该系统具有真核生物蛋白质翻译后加工所需要的酶系统,能够对表达产物进行适当的翻译后修饰,生产的重组蛋白的抗原性、酶活力等生物学活性与天然蛋白十分接近^[13-14],已成为病毒疫苗研究和商业产业化的平台^[15]。因此,本研究选用杆状病毒/昆虫细胞系统作为 DHAV - I VP1 基因的表达系统。Western blot 鉴定结果显示,昆虫细胞中表达的蛋白能够被 DHAV - I VP1 多克隆抗体特异性识别,证明成功表达了重组蛋白 VP1,且大小与预期相符;间接免疫荧光检测结果显示,表达的重组蛋白 VP1 能与 DHAV - I 全病毒阳性血清发生特异性反应,说明该重组蛋白具有良好的反应原性。

本研究采用 SDS - PAGE 对重组蛋白进行检测,与野生型杆状病毒感染组相比,未能观察到明显的目的条带(数据未显示),说明重组蛋白的表达量不高,分析其原因,在利用外源系统表达目的蛋白时需要考虑密码子的适应性。据报道,密码子适应指数(CAI)接近 1.0 时^[16],蛋白质表达水平较高,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。为提高重组蛋白在昆虫细胞中的表达水平,后续试验将对 VP1 基因的密码子进行优化,以提高 VP1 的表达量,促进其进一步应用。

参考文献:

- [1] 王安平,顾玲玲,王永娟,等. I型鸭甲型肝炎病毒VP0基因在杆状病毒表达系统中的表达[J]. 河南农业大学学报,2017,51(3):365-369.
- [2] 王永娟,朱善元,王安平,等. I型鸭肝炎病毒RT-PCR快速检测方法的建立[J]. 河南农业科学,2017,46(2):116-119.
- [3] 任丽倩,李晶,毕云海,等. 鸭甲型病毒性肝炎的研究进展[J]. 生物工程学报,2012,28(7):789-799.
- [4] 何冉娅. 鸭病毒性肝炎分子生物学研究进展[J]. 畜禽业,2014(4):4-6.
- [5] Feigelstock D A, Mateu M G, Valero M L, et al. Emerging foot-and-mouth disease virus variants with antigenically critical amino acid substitutions predicated by model studies using reference viruses[J]. Vaccine, 1996, 14(2):97-102.
- [6] 刘庆军,张永. 口蹄疫病毒基因组结构及其功能[J]. 动物医学进展,2005,26(5):1-5.
- [7] 聂奎,胡燕宾. 鸭肝炎病毒基因的生物信息学分析及多聚蛋白的加工预测[J]. 中国预防兽医学报,2009,31(6):230-235.
- [8] 吴双,马丽丽,朱善元,等. 鸭瘟病毒UL6基因的原核表达及多克隆抗体的制备[J]. 河南农业科学,2016,45(3):141-143,160.
- [9] 王安平,朱善元,吴双,等. 鸭新城疫病毒M基因的原核表达与多抗制备[J]. 河南农业科学,2016,45(1):124-126.
- [10] 张颖,刘恩平,陈海迪,等. 延边白鹅IFN-γ基因的原核表达及其多克隆抗体的制备[J]. 河南农业科学,2015,44(12):126-129.
- [11] 王琰,张志敏,王军,等. 耐有机溶剂脂肪酶基因lipI的克隆及其在毕赤酵母中的高效表达[J]. 河南农业科学,2013,42(6):143-148.
- [12] Luckow V A, Lee S C, Barry G F, et al. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*[J]. Journal of Virology, 1993, 67(8):4566-4579.
- [13] 石霖,熊永忠,李晓楠,等. 重组杆状病毒表达H9亚型禽流感HA基因的研究[J]. 河南农业科学,2014,43(1):120-122,126.
- [14] Felberbaum R S. The baculovirus expression vector system: A commercial manufacturing platform for viral vaccines and gene therapy vectors[J]. Biotechnology Journal, 2015, 10(5):702-714.
- [15] Altmann F, Staudacher E, Wilson I B, et al. Insect cells as hosts for the expression of recombinant glycoproteins [J]. Glycoconjugate Journal, 1999, 16(2):109-123.
- [16] Smith J M, Amara R R, Campbell D, et al. DNA/MVA vaccine for HIV type I: 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.