

鹅细小病毒 VP3 基因的克隆与表达

邓尚龙¹, 黄仁美², 王生育³, 颜江华³, 江清银⁴

(1. 福建省厦门市农产品质量安全检验检测中心, 福建 厦门 361009; 2. 福建省厦门市集美区农业局, 福建 厦门 361000; 3. 厦门大学医学院抗癌研究中心, 福建 厦门 361005; 4. 厦门鹅公农牧有限公司, 福建 厦门 361000)

中图分类号: S852.65+9.2 文献标识码: B 文章编号: 0529-6005(2009)06-0029-02

鹅细小病毒(Gooseparvovirus, GPV), 主要引起雏鹅和雏番鸭感染发病, 被感染禽的发病率和死亡率可高达 70%~100%, 是一种传播快、死亡率高的接触性传染病, 亦称小鹅瘟。该病以渗出性肠炎、小肠黏膜表层大片坏死脱落、肠道栓塞为特征性病变, 是目前危害养鹅业的主要疾病之一, 造成严重的经济损失。

研究表明 VP3 是主要的衣壳蛋白, 具有良好的免疫原性, 可以刺激机体产生中和抗体。因此本试验选取 VP3 基因构建原核表达载体 pET-22b/VP3 表达目的蛋白, 为研究重组蛋白的生物学特性及建立 ELISA 诊断试剂盒奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 试验材料 pET-22b(+) 载体为 Novagen 公司产品。Taq 聚合酶、1kb 的 DNA Marker、蛋白 Marker、dNTP 为上海生工生物工程技术有限公司产品。PCR 回收试剂盒、胶回收试剂盒为 OMEGA 公司产品。限制性内切酶、T4 DNA 连接酶为 NEB 产品。Ni²⁺-HiTrap Chelating HP 树脂为 Amersham Pharmacia Biotech 公司产品。鼠抗 6×His 抗体为北京天根生化公司产品。辣根过氧化物酶(HRP) 标记的兔抗鹅、羊抗鼠 IgG 抗体由厦门波生生物技术有限公司制备。临床患有鹅细小病毒病的组织病料、阳性血清、阴性血清由厦门农产品检测中心提供。大肠杆菌 BL21(DE3) 由厦门大学医学院抗癌研究中心保存。

1.2 引物设计 根据 GenBank 公布的鹅细小病毒序列(A Y506547.1), 设计两对引物, 扩增 VP3 基因, 引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。扩增 VP3 基因: VP3 5': 5'-AACCACATCTACAA GCAATTACC-3', VP3 3': 5'-AGATTTTGA GTTAGATA TCTGGTTC-3', 扩增基因 1 149 bp。引入酶切位点的引物: VP3 up: 5'-TATG GA TCCAAACCACATCTACA-3', VP3 down: 5'-GAT CTCGA GATTTTGA GTTAG-3', 上游引物含

BamH 位点, 下游引物含 Xho 位点, 加下划线表示, 扩增基因 1 456 bp。

1.3 PCR 模板制备 将组织病料充分研磨制成悬浮液, 反复冻融 3 次, 离心取上清, 加入蛋白酶 K 至终浓度 200 μg/mL、SDS 至终浓度 1%, 55℃ 水浴 3 h, 用苯酚、苯酚 氯仿 异戊醇(25:24:1) 和氯仿各抽提 1 次, 吸取水相, 加入 1/10 体积的 3 mol/L 乙酸钠和 2.5 倍体积的无水乙醇沉淀 DNA, 12 000 r/min (4℃) 离心 15 min, 沉淀悬浮于超纯水中。取适量做 PCR 模板。

1.4 PCR 扩增基因 VP3 基因扩增的反应条件: 95℃ 变性 5 min 后, 95℃ 变性 45 s, 53℃ 退火 1 min、72℃ 延伸 90 s, 共 35 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min。扩增产物在 1.7% 琼脂糖凝胶电泳分析。切下含 VP3 基因片段, 用 PCR 回收试剂盒回收。

1.5 重组表达质粒的构建 将得到的 VP3 基因与载体 pET-22b 用对应的内切酶消化, 产物用胶纯化回收。用 T4 DNA 连接酶将 VP3 基因克隆至载体 pET-22b 中, 构建重组质粒 pET-22b/VP3, 转化 *E. coli* BL21(DE3), 重组子质粒经酶切鉴定, 阳性克隆送上海英俊生物技术有限公司测序, 将测序正确的重组质粒命名为 pET-22b/VP3。

1.6 重组基因的诱导表达、纯化、复性 将 pET-22b/VP3 阳性单菌株接种到含 Amp 的 LB 液体培养基中, 振荡培养过夜后, 按比例放大培养至 OD_{600 nm} 值约 0.6~0.8 时, 加入 IPTG 进行诱导表达, 4~6 h 后离心收集菌体。由于 pET-22b 表达的融合蛋白 C 端带有 6×His 标签, 故目的蛋白纯化方案参照 Amersham Pharmacia Biotech 公司的镍柱蛋白纯化操作手册。纯化后的蛋白进行 12% SDS-PAGE 分析鉴定, 并采用逐步透析法复性。

1.7 重组蛋白 Western blot 鉴定 将纯化的 VP3 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 电转移至硝酸纤维素膜, 一抗为鼠抗 6×His 抗体, 辣根过氧化物酶(HRP) 标记的羊抗鼠 IgG 为二抗, 3,3'-二氨基联苯胺四盐酸盐(DAB) 显色。

1.8 ELISA 试验 选用鹅细小病毒阳性血清、阴性血清对包被的抗原进行检测, 同时设阴性、阳性、空白菌体做对照。用 VP3 蛋白包被 96 孔酶标板,

收稿日期: 2008-05-09

作者简介: 邓尚龙(1967-), 男, 副主任技师, 博士, 从事农产品质量安全监测和动物疫病的实验室诊断工作, 电话: 0592-5926143, E-mail: ds11234@sohu.com

4 过夜,洗涤后 2% BSA 封闭 2 h 以上,加入 1:100 稀释的鹅细小病毒阳性血清,37℃ 作用 30 min, PBST 洗板,扣干加 1:1000 稀释的酶标兔抗鹅 IgG 抗体,37℃ 作用 30 min, PBST 洗板,四甲基联苯胺(TMB)显色,用 2 mol/L 硫酸中止反应,酶标检测仪读取 $A_{450\text{ nm}}$ 值。用所测得的 A 值按下述公式计算 P/N 值,以样品的 P/N 值 ≥ 2.1 判为阳性。 $P/N \text{ 值} = (\text{阳性样品 A 值} - \text{空白对照 A 值}) / (\text{阴性样品 A 值} - \text{空白对照 A 值})$ 。

2 结果

2.1 PCR 扩增结果 PCR 扩增的产物,经琼脂糖凝胶电泳检测,得到与预期大小相符的特异性条带(图 1)。

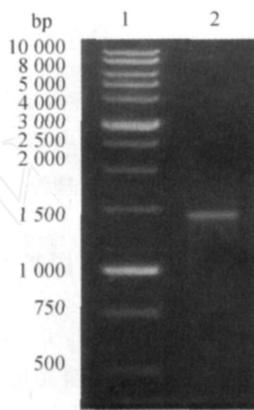


图 1 VP3 基因的 PCR 产物电泳图

1:1 kb DNA Marker;2:扩增产物(1456 bp)

2.2 重组质粒的构建 VP3 基因与载体连接后,转化 DE3 感受态细菌,筛选氨苄青霉素抗性的阳性克隆,挑取单菌落培养,提取质粒酶切,分别得到约为 5.4 kb、1448 bp 的片段,与预期结果相符,结果见图 2。测序结果证明 VP3 基因插入的位置、大小和读码框均正确(测序结果略)。

2.3 表达产物的 SDS-PAGE 分析 将表达产物裂解上清液、超声表达产物上清、沉淀分别电泳,经过染色、脱色,在 55 kD 有一明显的表达带,与预期的目的蛋白带大小一致,表明 VP3 基因获得表达,而未诱导菌没有出现相同的条带,同时可以看出目的蛋白绝大部分出现在超声沉淀中,说明融合蛋白在宿主菌中主要以包涵体的形式存在。包涵体处理后,过 Ni^{2+} 亲和柱,用 Elute Buffer (20 $\mu\text{mol/L}$ Tris-HCL pH7.9、8M 尿素、0.1M PBS pH4.3) 洗脱液洗下亲和蛋白,电泳后几乎只出现一条蛋白条带,说明经亲和层析纯化到较高纯度的 VP3 融合蛋白。结果见图 3。通过紫外分光光度计扫描,按照蛋白质浓度(C): $C = 1.45\text{OD}_{280} - 0.74\text{OD}_{260}$,测得 VP3 融合蛋白的浓度为 1.2 mg/mL。

2.4 重组蛋白 Western-blot 鉴定 Western-blot 试验结果表明,在 55 kD 处出现 1 条明显蛋白条带

(图 4),由此证实所表达的重组蛋白为含有 6 × His 的 VP3 蛋白。

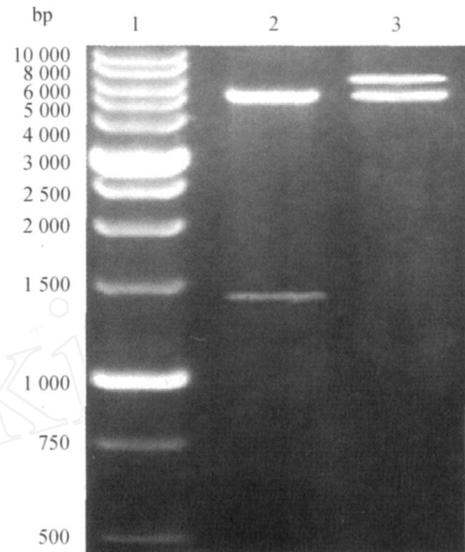


图 2 重组质粒 pET-22b/VP3 的酶切鉴定

1:1 kb DNA Marker;2:pET-22b/VP3 的 BamHI 和 XhoI 酶切产物;3:pET-22b/VP3 质粒

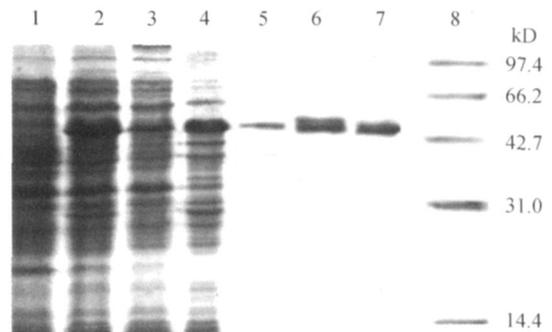


图 3 VP3 重组蛋白表达分析

1:VP3 未诱导菌;2:VP3 IPTG 诱导菌;3:VP3 超声波上清;4:VP3 超声波沉淀;5-7:VP3 过柱纯化;8:蛋白 Marker

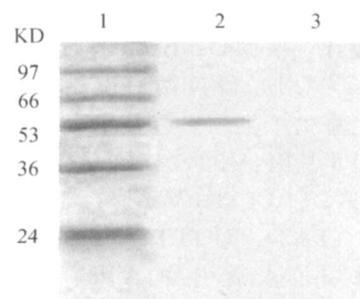


图 4 重组蛋白的 Western-blot 分析

1:蛋白 Marker;2:VP3 protein;3:pET-22b 空白菌

2.5 ELISA 鉴定 ELISA 试验结果见表 1,通过计算 P/N 值,结果均 ≥ 2.1 ,表明复性的 VP3 蛋白能与鹅细小病毒阳性血清发生特异性反应。

ESR 和 MDA 两种方法检测 BALB/c 小鼠肺组织自由基的比较

栾智华¹, 乔健¹, 何桂梅², 邓光存¹, 毕建敏¹, 田勇³, 吕娜娜¹, 张森洁¹

(1. 中国农业大学动物医学院, 北京 海淀 100193; 2. 上海华东师范大学生命科学院, 上海 普陀 200062;

3. 河北北方学院动物科技学院, 河北 张家口 075131)

中图分类号:S852.21 文献标识码:B 文章编号:0529-6005(2009)06-0031-01

自由基学说(free radical theory)是具有代表性的致衰学说之一。这一学说 20 世纪 50 年代中期由著名学者 Harman 首先提出,其后得到许多学者的共识^[1]。自由基是指能独立存在的,含有 1 个或 1 个以上的不配对电子的任何原子或原子团,是机体正常代谢的中间产物,在机体内有很强的氧化反应能力,且易产生连锁反应,对蛋白质、核酸、脂质等

产生伤害作用,从而导致机体的损伤^[2-3]。由于自由基在体内浓度低,且不稳定,起初人们只能检测标本中的丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量来了解体内自由基代谢情况。后来电子自旋共振波谱仪(electron spin resonance, ESR)的出现,可以用来直接测量活性氧(reactive oxygen species, ROS)。本试验用两种方法动态测量了 BALB/c 小鼠肺组织中的自由基含量变化。

1 材料与方法

1.1 动物分组 取 6~8 周龄雌性 SPF BALB/c 小鼠(购于北京市实验动物中心),饲养于三级生物安全实验室内不锈钢的小笼内,随机分为自由基检

收稿日期:2008-06-10

作者简介:栾智华(1979-),女,博士生,主要从事禽类心血管病理生理研究, E-mail: lzh4215@yahoo.cn

通讯作者:乔健, E-mail: qiaojian@cau.edu.cn

表 1 重组 VP3 蛋白的 ELISA 测定

		1 10	1 20	1 40	1 80	1 160	1 320	1 640	1 1 280	空白对照
VP3 蛋白	阳性血清	1.824	1.626	1.358	1.244	1.126	0.984	0.653	0.632	0.051
	阴性血清	0.621	0.554	0.460	0.513	0.412	0.294	0.258	0.182	0.042
	P/N	3.06	3.07	3.12	2.52	2.91	3.71	2.78	4.15	

3 讨论

目前小鹅瘟主要通过流行病学、临床症状和特征性的病理变化进行初步诊断,确诊还需要进一步的实验室诊断。ELISA 作为实验室常用的诊断技术之一,已成熟地运用于多种动物疫病的检测。本试验 ELISA 结果表明纯化的 VP3 蛋白能与鹅细小病毒阳性血清发生特异性反应,验证了重组蛋白的抗原反应活性,为进一步建立 ELISA 诊断试剂盒奠定基础。

Zadori 等^[7]通过 GPV 与 AAV2 衣壳蛋白三维结构模拟比较分析发现,暴露于衣壳表面的氨基酸序列均出现在 VP3 内,表明 VP3 内含有 GPV 主要抗原决定簇成分,是 GPV 主要免疫保护性抗原。原核表达可能会使 VP3 抗原决定簇的空间构象发生改变,本试验通过 Western-blot 和 ELISA 试验,表明 VP3 空间构象的改变并不会影响其免疫原性,因此表达出的 VP3 蛋白可用于血清学检测及疫苗的研制,但这些空间构象的改变是否会影响病毒粒子的毒力强弱和侵蚀性,还有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] Schettler C H. Isolation of a highly pathogenic virus from geese with hepatitis [J]. Avian Dis, 1971, 159(2): 323-325.
- [2] 蔡宝祥. 家畜传染病学[M]. 3版. 北京: 中国农业出版社, 2000: 283-285.
- [3] Derzy D, Dren C, Sze do M, et al. Viral disease of gosling: Isolation, properties and antigenic pattern of the virus strains [J]. Acta Vet Hung, 1970, 20: 194-228.
- [4] Gough R E, Spackman D, Collins M S. Isolation and characterization of a parvovirus from goslings [J]. Vet Rec, 1981, 108: 399-400.
- [5] Le Gall-Recule G, Jestin V, Changnaug P, et al. Expression of muscovy duck parvovirus capsid proteins (VP2 and VP3) in a baculovirus expression system: a demonstration of immunity induced by the recombinant proteins [J]. J Gen Virol, 1993, 77: 2159-2163.
- [6] 季新华. 抗小鹅瘟病毒中和性单克隆抗体的研制及实验防治效果 [J]. 中国畜禽传染病, 1998, 20(4): 247-249.
- [7] Zadori Z, Raymund S, Tibor R, et al. Analysis of the complete nucleotide sequence of goose and Muscovy duck parvovirus indicates common ancestral origin with adeno-associated virus 2 [J]. Virology, 1995, 212(2): 562-573.