

吴 植,顾玲玲,朱善元,等. I 型鸭甲型肝炎病毒 3C 基因在昆虫细胞的表达与检测[J]. 江苏农业科学,2017,45(23):33-35.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.23.009

I 型鸭甲型肝炎病毒 3C 基因在昆虫细胞的表达与检测

吴 植, 顾玲玲, 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:利用杆状病毒表达系统进行 I 型鸭甲型肝炎病毒蛋白水解酶 3C 基因的表达研究。首先通过 PCR 方法扩增出 3C 基因,亚克隆至杆状病毒转移载体 pFastBac1 中,获得重组转座载体 pFB-3C,随后将该重组质粒转化感受态细胞 DH10Bac 进行同源重组,经蓝白斑筛选及 PCR 鉴定后,获得重组杆状病毒穿梭质粒 rBacmid-3C,将其在脂质体介导下转染 s9 昆虫细胞,获得重组杆状病毒 rBac-3C,并进行重组蛋白表达的检测。间接免疫荧光结果,鸭抗全病毒阳性血清能够与重组蛋白发生特异性结合。结果表明,DHAV-I 3C 蛋白在 s9 昆虫细胞中获得了成功表达。

关键词: I 型鸭甲型肝炎病毒;3C 基因;昆虫细胞;表达

中图分类号: S858.32 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)23-0033-02

鸭甲型肝炎病毒(duck hepatitis A virus, DHAV)主要侵害 4 周龄之内雏鸭,引起一种急性高度接触致死性烈性传染病,以角弓反张和肝脏病变为主要特征,1 周龄以内的雏鸭病死率接近 100%,严重危害我国养鸭业。DHAV 可分为 3 种血清型,分别为 DHAV-I (经典的 DHV-I)^[1]、DHAV-II (新发现于台湾的血清型)^[2]、DHAV-III (新发现于中国和韩国的血清型)^[3-4],3 个血清型之间存在明显的差异,无交叉免疫性。目前,我国 DHAV-I 流行较普遍,对养鸭业危害最大。

DHAV-I 为小 RNA 病毒科的成员,具有小 RNA 病毒的基本结构,整个基因组分为 3 个部分:5' 非编码区(untranslated region, UTR),1 个编码多聚蛋白的开放阅读框(Open Reading Frame, ORF)和 3' 非编码区(3'UTR),3'UTR 之后是 poly(A)尾。ORF 编码的聚合蛋白分为 1 个结构蛋白区(P1)和 2 个非结构蛋白区(P2、P3),结构蛋白 P1 在病毒自身编码的蛋白酶的作用下可以水解成 VP0、VP1、VP3 3 种衣壳蛋白;P2 区可以裂解为 2A1、2A2(2A3)、2B、2C 4 种或 5 种非结构蛋白;P3 区又可以裂解为 3A、3B、3C、3D 4 种非结构蛋白。其中 3C 蛋白是一种蛋白水解酶,在多聚蛋白的水解以及病毒的复制、形成过程中发挥重要作用^[5-6]。本研究利用杆状病毒/昆虫细胞系统表达 DHAV-I 3C 基因,为 3C 蛋白的开发应用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 载体、菌株和毒株

收稿日期:2017-08-12

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

作者简介:吴 植(1980—),男,江苏盐城人,硕士,讲师,研究方向为兽医微生物与免疫学。E-mail: yzwuzhi@163.com。

通信作者:王安平,博士,副教授,主要从事生物制药的研究。E-mail: wap4017@163.com。

DHAV-I SH 株由中国农业科学院上海兽医研究所惠赠;感受态细胞 DH10Bac、DH5 α 、杆状病毒转移载体 pFastBac1、含有目的基因的重组质粒 pET-3C 均由江苏省兽用生物制药高技术研究重点实验室制备并保存。

1.2 工具酶和试剂

转染试剂 Cellfectin[®] II Reagent 购自 Invitrogen 公司;限制性内切酶、T₄ DNA 连接酶、*pfu* DNA 聚合酶购自 Fermentas 公司;FITC 标记的羊抗鸭 IgG 购自 KPL 公司;异丙基硫代- β -D-半乳糖苷(IPTG)、氨苄青霉素(Amp)、卡那青霉素(Kan)、四环霉素(Tet)、庆大霉素(Gen)购自 Sigma 公司;昆虫细胞培养基 Sf-900 II SFM(serum free medium)购自 GBICO 公司;其他试剂均为国产分析纯级。

1.3 引物的合成

根据 GenBank 中 DHAV-1 SH 株病毒全基因组序列(登录号 FJ157178),设计 1 对特异性引物以扩增其开放阅读框,并在上下游引物 5' 端分别引入 *Bam*H I、*Xho* I 酶切位点,3C-F:5'-TATGGATCCATGACGGGGCGGTGAATTTCAGAC-3'(*Bam*H I 酶切位点),3C-R:5'-CGCCTCGAGTTATTGGTTAAAACTGGA AAAACC-3'(*Xho* I 酶切位点),通用引物 M13 序列参照杆状病毒表达系统操作说明书设计。引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.4 3C 基因的扩增

以含有目的基因的重组质粒 pET-3C 为模板高保真 PCR 扩增 3C 基因。50 μ L 扩增体系:*pfu* DNA Polymerase 1 μ L、10 \times Buffer 5 μ L、Primer F 1 μ L、Primer R 1 μ L、dNTP (2 mmol/L) 5 μ L、DNA 1 μ L、DDW 36 μ L。反应程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 20 s,52 $^{\circ}$ C 退火 20 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。PCR 产物用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5 重组转座载体 pFB-3C 的构建

将回收的 PCR 产物及杆状病毒载体 pFastBac1 分别用 *Xho* I 和 *Bam*H I 双酶切后,回收 3C 基因片段及线性化的载体,T₄ 连接酶连接,连接产物转化感受态细胞 *E. coli* DH5 α 。挑取单菌落,提取质粒,*Xho* I 和 *Bam*H I 双酶切鉴定。重组

子命名为 pFB-3C。

1.6 质粒 DNA 的转座

参照 Invitrogen 公司的杆状病毒操作流程说明书,将重组质粒 pFB-3C 转化感受态细胞 DH10Bac,均匀涂布于含有 IPTG、X-Gal 的 LB 平板上(含庆大霉素、卡那霉素和四环素),37℃ 培养箱内培养,直至蓝白斑出现。随机挑取数个白色菌落,碱裂法提取质粒 DNA,用引物 M13 进行 PCR 鉴定。PCR 产物用 0.7% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.7 重组杆状病毒 rBac-3C 的制备

将提取的重组杆状病毒 rBacmid-3C 和野生型 Bacmid DNA 参照转染试剂说明书转染昆虫细胞 sf9。转染后约 72 h,待细胞出现明显病变、细胞变大时,收集细胞上清,即为 P1 代 rBac-3C,4℃ 避光保存备用。参照 Invitrogen 公司的杆状病毒操作流程说明书,将 P1 代重组杆状病毒在 sf9 昆虫细胞上进行扩增,直至 P3 代,并利用空斑试验测定 P3 代 rBac-3C 的病毒滴度。

1.8 表达产物的间接免疫荧光鉴定

将 P3 代 rBac-3C 按 MOI 为 5 感染 24 孔板中处于对数

生长期的 sf9 细胞,72 h 后,弃去上清,用预冷的冷丙酮固定 20 min,PBS 洗涤 3 次,用 5% BSA 室温封闭 1 h,加入鸭抗全病毒血清(1:100),37℃ 孵育 2 h 后,PBST 洗涤 3 次后,加入 FITC 标记的羊抗鸭 IgG(1:100),37℃ 孵育 30 min,PBST 洗涤 3 次后,在荧光倒置显微镜下观察特异性荧光。

2 结果与分析

2.1 目的基因的克隆

高保真 PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测,可见 1 条大小约为 580 bp 的目的条带(图 1),与预期值一致。

2.2 重组转座载体 pFB-3C 的构建与鉴定

3C 基因经 *Xho*I 和 *Bam*H I 酶切后插入经同样酶切的 pFastBac1,*Xho*I 和 *Bam*H I 双酶切鉴定,结果出现约 580 bp 和 4 800 bp 的 2 条条带(图 2),与预期结果相符。

2.3 重组 Bacmid 的筛选与鉴定

用 M13 引物对重组 Bacmid 进行 PCR 鉴定,结果 rBacmid-3C 的扩增条带大小约为 2 900 bp,与预期片段大小相符(图 3),说明 3C 基因转座成功。

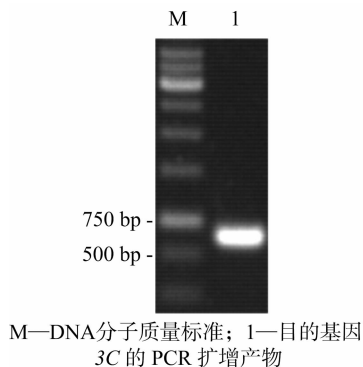


图1 目的基因 3C 的 PCR 扩增鉴定

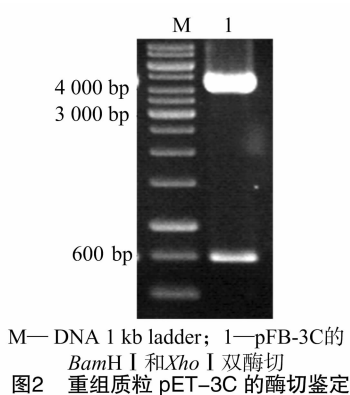


图2 重组质粒 pET-3C 的酶切鉴定

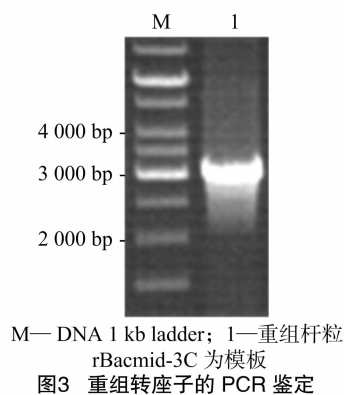


图3 重组转座子的 PCR 鉴定

2.4 表达产物的间接免疫荧光检测

以鸭抗全病毒血清为一抗对昆虫细胞内的表达产物进行间接免疫荧光检测,从图 4 可以看出,rBac-3C 感染的昆虫细胞胞浆内有大量特异性荧光出现,而野生型杆状病毒感染的细胞内则未观察到。

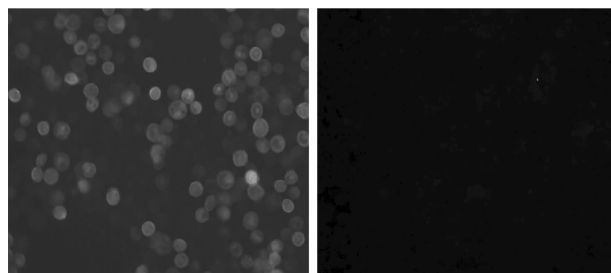


图4 重组蛋白的间接免疫荧光检测(400×)

3 讨论

鸭甲型肝炎病毒属于小 RNA 病毒科禽肝炎病毒属。3C 蛋白是小 RNA 病毒的自身蛋白水解酶之一,能够正确水解多种前体蛋白,从而保证了衣壳的形成。3C 蛋白酶不但能够水解自身的前体多聚蛋白,还能水解宿主细胞内的蛋白,包括一

些细胞的骨架蛋白、翻译因子、固有免疫信号分子等,从而抑制宿主蛋白的功能发挥,保证了病毒蛋白有效逃避固有免疫的监控,在病毒颗粒的穿入和释放中发挥重要的作用^[7]。

Bac-to-Bac 系统作为杆状病毒表达系统已被广泛使用,且已被商业化。Bac-to-Bac 系统主要利用 Luckow 等研发的基因转座技术而形成^[8]。该系统优点是可以高效获得重组杆状病毒,效率可达 100%,避免了以前采用同源重组机制获得重组杆状病毒效率较低的问题。与原核表达系统相比,该系统具有蛋白质翻译后修饰所必需的酶系统,能对外源蛋白进行糖基化、磷酸化和信号肽切除等翻译后加工修饰,从而保留表达蛋白的生物学活性^[9]。

本研究利用杆状病毒/昆虫细胞表达系统成功制备了表达 3C 蛋白的重组杆状病毒,间接免疫荧光结果显示,阳性鸭抗全病毒血清能与重组蛋白 3C 发生特异性结合,说明重组蛋白 3C 具有良好的反应原性,由于是首次利用该系统表达 3C 蛋白,后续将从优化密码子角度出发提高重组蛋白的表达量,为 3C 功能的进一步研究奠定基础。

参考文献:

- [1] Wang L, Pan M, Fu Y, et al. Classification of duck hepatitis virus into three genotypes based on molecular evolutionary analysis[J]. Virus

王兰萍,崔悦,马蕊,等. 滩羊群体产羔性状相关基因位点的遗传变异分析[J]. 江苏农业科学,2017,45(23):35-37.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.23.010

滩羊群体产羔性状相关基因位点的遗传变异分析

王兰萍¹,崔悦¹,马蕊¹,刘丽雅¹,孙慧丽¹,耿荣庆²

(1. 盐城师范学院海洋与生物工程学院,江苏盐城 224051; 2. 盐城师范学院药学院,江苏盐城 224051)

摘要:采用 PCR-RFLP、PCR-SSCP 方法检测滩羊群体中与产羔性状相关基因位点的遗传变异,并分析其与产羔数的关系,为探讨滩羊产羔的分子机制提供依据。结果表明,滩羊群体中存在 *BMP1B* 基因 *Fec B* 位点突变 A746G,表现出 B/+ 和 +/+ 2 种基因型,B/+ 基因型和 +/+ 基因型的频率分别为 0.06 和 0.94,+/+ 基因型是群体中的优势基因型;等位基因 B 和 + 的频率分别为 0.03 和 0.97,等位基因 + 是群体中的优势等位基因。在滩羊群体中,未检测到 *GDF9* 基因的突变位点,表明该突变位点与滩羊的产羔性能无相关性。因此,*BMP1B* 基因 *Fec B* 位点可能是滩羊高繁殖力的重要调控基因之一,在一定程度上影响母羊的产羔性能。

关键词:滩羊;产羔性状;遗传变异;SNP 位点

中图分类号: S826.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)23-0035-03

在绵羊育种中,产羔数是一个非常重要的经济性状。大多数绵羊品种为季节性发情和一胎单羔。然而,在长期的自然选择与人工选育过程中,人们也发现少数绵羊品种具有自然产多羔的遗传特性。例如,世界闻名的芬兰羊、湖羊、小尾寒羊等品种。

研究表明,绵羊存在影响产羔性状的主效基因^[1-3]。通过对绵羊高繁殖力性能基因组的分析,已经定位了生长分化因子 9(*GDF9*)、骨形态发生蛋白 15(*BMP15*)和骨形态发生蛋白受体 IB(*BMP1B*)等基因,还根据表型发现了 *Woodlands* 基因、*Thoka* 基因和 *Lacaune* 基因以及根据表型推断存在 *Olkuska* 基因、*Belle-Ile* 基因,这些基因的遗传方式对

排卵率和产羔数的影响及其染色体定位已明确^[4-6]。特别是 *Fec B* 基因和 *Fec X* 基因,已应用于绵羊育种实践。

滩羊是蒙古羊的一个分支,能很好地适应干旱、荒漠化等生活环境,其生产的二毛裘皮和羔羊肉久负盛名,是我国一个非常珍贵的绵羊品种。然而,滩羊的繁殖力较低,1 年只能产 1 胎,且产羔率低。因此,如果能从基因水平找到滩羊繁殖力基因型与产羔性状之间的可靠稳定关系,对于品种的选育具有重要的意义。本研究通过检测滩羊群体与产羔性状相关基因的遗传变异位点,旨在揭示滩羊产羔性状的分子遗传机理,为滩羊多胎新品系的选育提供可借鉴的基础资料。

1 材料与方法

1.1 试验动物及样本采集

试验动物为来自宁夏回族自治区中宁地区的滩羊。所有个体均选择健康的、有完整产羔记录的母羊,共 132 只,记录母羊产单羔和双羔的情况。颈静脉采集母羊抗凝血 5 mL,置于低温带回实验室,-20℃ 冷冻保存。

1.2 血液 DNA 提取与检测

采用血液 DNA 提取试剂盒提取血液样本基因组 DNA,试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司。产品型号为血

收稿日期:2017-01-29

基金项目:江苏省自然科学基金(编号: BK20141259);江苏省“六大人才高峰”高层次人才(编号:2013-NY-025、2017-NY-100);

江苏省高等学校大学生创新创业训练计划(编号:201510324031Y)。作者简介:王兰萍(1976—),女,江苏海门人,硕士,副教授,主要从事动物遗传学研究。E-mail:lpwang76@163.com。

通信作者:耿荣庆,博士,教授,主要从事动物遗传育种研究。E-mail:rqgeng@163.com。

Genes,2008,37(1):52-59.

[2] 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.

[3] Kim M C, Kwon Y K, Joh S J, et al. Recent Korean isolates of duck hepatitis virus reveal the presence of a new genotype and serotype when compared to duck hepatitis virus type 1 type strains[J]. Archives of Virology,2007,152(11):2059-2072.

[4] Kim M C, Kwon Y K, Joh S J, et al. Differential diagnosis between type-specific duck hepatitis virus type 1 (DHV-1) and recent Korean DHV-1-like isolates using a multiplex polymerase chain reaction[J]. Avian Pathology,2008,37(2):171-177.

[5] Ding C Y, Zhang D B. Molecular analysis of duck hepatitis virus type

1[J]. Virology,2007,361(1):9-17.

[6] 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):171-175.

[7] 刘艳,李冰清,孟红. 小 RNA 病毒 3C 蛋白酶及其裂解底物[J]. 生物技术通报,2014(8):46-51.

[8] 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.

[9] 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.