

新型鸭细小病毒样颗粒的制备及鉴定

邹昕熠¹, 杜彦妮¹, 陈姝汐¹, 周文笛¹, 王文秀², 张馨月¹, 刘文涛¹,
蔡春雨¹, 罗启慧^{*1}

1 四川农业大学动物医学院实验动物疾病模型研究中心, 四川 成都 611100

2 山东滨州畜牧兽医研究院, 山东 滨州 256600

邹昕熠, 杜彦妮, 陈姝汐, 周文笛, 王文秀, 张馨月, 刘文涛, 蔡春雨, 罗启慧. 新型鸭细小病毒样颗粒的制备及鉴定[J]. 微生物学通报, 2023, 50(12): 5404-5412.

ZOU Xinyi, DU Yanni, CHEN Shuxi, ZHOU Wendi, WANG Wenxiu, ZHANG Xinyue, LIU Wentao, CAI Chunyu, LUO Qihui. Preparation and identification of novel duck parvovirus virus-like particles[J]. Microbiology China, 2023, 50(12): 5404-5412.

摘要:【背景】鸭短喙侏儒综合征(beak atrophy and dwarfism syndrome, BADS)是由新型鸭细小病毒(novel duck Parvovirus, NDPV)感染导致雏鸭生长发育迟缓、上下喙萎缩的疾病。BADS的暴发给我国养鸭业造成了巨大的经济损失。【目的】利用大肠杆菌表达系统制备 NDPV 病毒样颗粒(virus-like particles, VLPs), 为研制 NDPV 相关疫苗奠定基础。【方法】对 NDPV VP2 序列全长进行密码子优化、合成, 连接至 pColdTF 表达载体, 获得 pColdTF-NDPV-VP2 重组质粒, 酶切、测序鉴定正确后将重组质粒转化至大肠杆菌 BL21(DE3)中进行诱导表达, 利用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)对蛋白表达进行可溶性分析; 使用凝血酶(thrombin)切除 trigger factor (TF)标签, 利用镍柱(Ni-NTA)亲和层析方法纯化重组蛋白; 利用 Western blotting 对纯化后的 VP2 蛋白进行反应原性分析; 利用透射电镜、动态光散射观察重组蛋白形态以及能否形成 VLPs。【结果】构建了 pColdTF-NDPV-VP2 重组质粒, 在大肠杆菌中主要以可溶性形式表达, 融合蛋白 TF-VP2 大小约为 115 kDa, 去除 TF 标签经镍柱纯化后得到 67 kDa 的 VP2 蛋白; Western blotting 试验表明 VP2 蛋白能与 NDPV 鸭阳性血清发生特异性结合; 通过透射电镜可以观察到形状规则、直径约为 20–25 nm 的病毒样颗粒。【结论】利用大肠杆菌表达系统制备了 NDPV VLPs, 为下一步研发 BADS 相关亚单位疫苗及生物相关制品提供了基础。

关键词: 新型鸭细小病毒; 病毒样颗粒; 大肠杆菌表达系统

资助项目: 2022 年四川农业大学学科建设“双支计划”; 四川省留学人员科技活动择优资助项目(2022999015)

This work was supported by the Sichuan Agricultural University Discipline Construction “Double Support Plan” in 2022 and the Science and Technology Activities of Overseas Chinese in Sichuan Province with Merit Funding (2022999015).

*Corresponding author. E-mail: luoqihui@sicau.edu.cn

Received: 2023-05-04; Accepted: 2023-07-07; Published online: 2023-08-29

Preparation and identification of novel duck parvovirus virus-like particles

ZOU Xinyi¹, DU Yanni¹, CHEN Shuxi¹, ZHOU Wendi¹, WANG Wenxiu², ZHANG Xinyue¹, LIU Wentao¹, CAI Chunyu¹, LUO Qihui^{*1}

1 Laboratory of Experimental Animal Disease Model, College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611100, Sichuan, China

2 Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine in Binzhou of Shandong Province, Binzhou 256600, Shandong, China

Abstract: **[Background]** Beak atrophy and dwarfism syndrome (BADs) caused by novel duck parvovirus (NDPV) infection leads to stunted growth and atrophy of the upper and lower beaks of ducklings. The outbreak of BADs has caused huge economic losses to the duck industry in China. **[Objective]** To construct NDPV virus-like particles (VLPs) in *Escherichia coli*, laying the foundation for the development of NDPV-related vaccines. **[Methods]** The full-length NDPV VP2 sequence was codon-optimized, synthesized, and then ligated into the pColdTF vector to obtain the pColdTF-NDPV-VP2 recombinant plasmid. After being identified by enzyme digestion and sequencing, the recombinant plasmid was transformed into *E. coli* BL21(DE3) for expression. SDS-PAGE was employed to analyze the solubility of the recombinant protein. The TF tag was removed by thrombin protease, and then recombinant protein was purified by Ni-NTA affinity chromatography. Western blotting was employed to examine the reactogenicity of purified VP2 protein and dynamic light scattering and transmission electron microscopy to observe the morphology of the recombinant protein and the formation of VLPs. **[Results]** The recombinant plasmid pColdTF-NDPV-VP2 was constructed successfully and expressed in *E. coli* mainly in the soluble form. The TF-VP2 fusion protein had a molecular weight of 115 kDa, and the molecular weight was 67 kDa after removal of the TF tag. Western blotting showed that the VP2 protein specifically bound to NDPV-positive duck serum. The VP2 VLPs with diameters of 20 nm to 25 nm could be observed by transmission electron microscopy. **[Conclusion]** We used the *E. coli* expression system to design NDPV VLPs, which can provide a basis for the development of subunit vaccines and biological-related products against BADs.

Keywords: novel duck parvovirus; virus-like particles; *Escherichia coli* expression system

鸭短喙侏儒综合征 (beak atrophy and dwarfism syndrome, BADs) 是由新型鸭细小病毒 (novel duck parvovirus, NDPV) 感染, 导致雏鸭生长发育缓慢、上下喙萎缩、舌头外伸肿胀为特征的疾病, 俗称“鸭长舌病”或“鸭大舌病”^[1]。该病易感染 10–30 日龄的樱桃谷北京鸭雏鸭^[2]。自 2015 年

以来, BADs 在中国广泛传播, 可导致 10%–100% 的发病率和 0–10% 的死亡率^[3]。患病鸭表现出不愿行走、进食减少甚至无法进食等症状; 3 周龄后, 鸭体矮小、生长不良现象更加明显; 在屠宰时, 患病鸭的腿骨和翅膀易折断, 对我国肉鸭养殖业造成严重的经济损失^[4]。

水禽细小病毒(waterfowl parvovirus)属于细小病毒科(Parvoviridae)细小病毒亚科(Parvovirinae)依赖病毒属(Dependovirus)成员,被人熟知的是鹅细小病毒(goose parvovirus, GPV)^[5]。新型鸭细小病毒包含一个小的无包膜、线性单链 DNA 基因组,长度约为 5.1 kb,其复制不需要宿主细胞中的辅助病毒,病毒呈正二十面体对称,直径 20–25 nm,无囊膜,与鹅细小病毒具有相似的基因组成与结构^[6]。全基因组主要由中间 2 个开放阅读框(open reading frame, ORF)和两侧末端倒置重复序列(inverted terminal repeat, ITR)区构成,左侧 ORF 编码非结构蛋白 NS1 和 NS2,右侧 ORF 编码结构蛋白 VP1、VP2 和 VP3^[7]。研究表明结构蛋白 VP2 (1 764 bp)含有丰富的抗原表位,能刺激机体产生免疫反应,是常用的疫苗候选抗原^[8]。

病毒样颗粒(virus-like particles, VLPs)是由病毒的一个或多个结构蛋白自发组成与天然病毒粒子结构相似的中空蛋白粒子,是非感染性病毒结构蛋白,因为它们不含病毒遗传物质,同时又保留了天然病毒的生物学活性,能有效诱导机体产生免疫应答反应,在疫苗开发中发挥着重要作用^[9-10]。已有研究表明细小病毒家族能通过不同表达系统表达这 3 种结构蛋白,并在体外组装形成病毒样颗粒。相关文献报道 VP2、VP3 形成的 VLPs 比 VP1 形成的 VLPs 能使机体产生更高水平的中和抗体^[11]。细菌是用于生产重组蛋白时最广泛使用的表达系统之一。大肠杆菌表达系统具有操作简单、生产成本低、细胞生长快和蛋白表达水平高等优点。目前未见大肠杆菌表达系统表达 NDPV 形成 VLPs 的相关研究报道,因此本研究通过应用大肠杆菌表达系统表达 NDPV VP2 蛋白制备病毒样颗粒,并进行纯化和组装鉴定,以期研制 NDPV 亚单位疫苗及相关生物制品提供基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

pColdTF 表达载体、T4 DNA 连接酶和 *Eco*R I、*Xho* I 限制性内切酶, TaKaRa 公司; 2×Phanta Max Master Mix 高保真酶, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 大肠杆菌 DH5 α 和 BL21(DE3) 感受态细胞, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 质粒提取试剂盒, Omega Bio-Tek 公司; His-Tagged Protein Purification Kit (Soluble Protein), 康为世纪生物科技股份有限公司; NDPV 鸭阳性血清、阴性血清由本实验室保存; 辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记兔抗鸭单克隆抗体, AB Box 公司; 预染蛋白标记, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 过氧化物酶显色底物 AEC (3-amino-9-ethylcarbazole)试剂盒和凝血酶(thrombin), 北京索莱宝科技有限公司。PCR 热循环仪、核酸蛋白电泳仪、凝胶成像系统, Bio-Rad 公司; 高速低温离心机、恒温制冷摇床, 赛默飞世尔科技公司; 超声波细胞破碎仪, 宁波新芝生物科技股份有限公司; 纳米粒度仪, 马尔文帕纳科公司。

1.2 NDPV VP2 基因的合成

NDPV 毒株使用由本实验室分离鉴定的 QH-L01 株,已测得 VP2 蛋白的基因序列(1 764 bp)。根据大肠杆菌密码子偏好性将基因序列进行优化,由南京金斯瑞生物科技有限公司合成 pUC57-NDPV-VP2 重组质粒和携带酶切位点的上、下游引物 VP2F [5'-GAATTC(*Eco*R I)ACAGCTCCCGTAAAAAAG-3'] 和 VP2R [5'-CTCGAG(*Xho* I)TTAGAGATTCTGGGTCAG-3']。

1.3 重组质粒 pColdTF-NDPV-VP2 的构建及鉴定

以 pUC57-NDPV-VP2 为模板,通过 PCR 扩增 VP2 基因。PCR 反应体系:上、下游引物 (10 μ mol/L)各 2 μ L, 2×Phanta Max Master Mix

25 μL , 模板 1 μL , ddH₂O 20 μL 。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。将反应产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定, 胶回收目的基因片段。用 *EcoR* I 和 *Xho* I 限制性内切酶分别与目的基因片段和 pColdTF 载体进行双酶切反应, 反应完成后进行 DNA 纯化回收, 随后用 T4 DNA 连接酶在 16 $^{\circ}\text{C}$ 环境下反应 30 min, 获得重组表达质粒 pColdTF-NDPV-VP2。将构建好的重组质粒转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞后涂布 LB 固体培养基培养过夜, 然后挑取单菌落进行扩大培养; 收集菌液并使用质粒提取试剂盒(Omega) 提取重组质粒, 对重组质粒进行双酶切鉴定后测序鉴定。

1.4 重组蛋白的诱导表达及可溶性分析

将鉴定正确的 pColdTF-NDPV-VP2 重组质粒转化到大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞中, 涂布至含有 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素的 LB 平板培养过夜, 次日挑取单菌落接种至含有氨苄青霉素(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的 LB 液体培养基培养为种子菌液, 再以 1:50 的比例接种至同样的培养基中 37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 振荡培养至 OD_{600} 约为 0.6–0.8 时, 加入终浓度为 0.2 mmol/L 的异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(isopropyl β -D-thiogalactopyranoside, IPTG), 分别在 16、24 和 37 $^{\circ}\text{C}$ 下诱导 16 h 以探索最佳诱导温度。在最佳诱导温度下按照上述方法分别加入终浓度为 0.2、0.4、0.6、0.8 和 1.0 mmol/L 的 IPTG, 探索最佳 IPTG 诱导浓度。诱导完成后, 收集菌液至离心管中, 7 000 r/min 离心 15 min 弃上清收集菌体沉淀, 加入 1/10 体积的磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)重悬菌体, 放置冰上进行超声破碎(功率设定 300 W, 工作 5 s, 间隔 5 s), 超声 10 min 后将破碎液转移至离心管中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min

离心 20 min, 分别收集上清和沉淀, 并各取 90 μL 进行 SDS-PAGE 分析重组蛋白的可溶性表达。

1.5 重组 VP2 蛋白的纯化和 TF 标签的切除

按照优化后的最佳诱导条件表达重组蛋白, 收集菌体并进行超声裂解, 详细操作参照 1.4 中的步骤, 收集超声破碎后的蛋白于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 20 min 后收集上清溶液。使用 Ni-NTA 亲和层析的方法对表达的重组蛋白进行纯化。将 Ni-NTA 填料吸至层析柱中, 洗涤后使用 5 倍柱体积的结合缓冲液(binding buffer) (20 mmol/L Tris-HCl、10 mmol/L 咪唑(imidazole)、500 mmol/L NaCl)平衡层析柱; 将超声破碎后得到的上清液过滤后转移至平衡后的层析柱, 放置摇床, 设置转速 90 r/min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 环境下相互作用 30 min, 用 15 倍柱体积的 binding buffer 洗涤, 最后使用 1 倍柱体积的洗脱缓冲液(elution buffer) (20 mmol/L Tris-HCl、500 mmol/L 咪唑、500 mmol/L NaCl)洗脱目的蛋白, 收集洗脱液。纯化后的重组蛋白由于带有较大的促溶标签 TF (trigger factor)-Tag (49 kDa), 因此使用 thrombin 切除标签蛋白, 4 $^{\circ}\text{C}$ 酶切过夜后将样品再次用 Ni-NTA 树脂纯化, 收集洗脱液, 得到纯化后的 VP2 蛋白。

1.6 重组蛋白的 Western blotting 鉴定

取纯化的蛋白样品进行 SDS-PAGE, 以 NDPV 感染鸭阳性血清作为一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 等渗缓冲盐溶液(Tris-HCl buffer solution Tween, TBST)洗膜 3 次, 每次 5 min; 以 HRP 标记的兔抗鸭 IgG 为二抗, 在摇床上低速振摇, 室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min, 最后加入化学发光显色液避光进行显色处理, 观察结果。

1.7 NDPV VLPs 的组装和鉴定

将纯化的 VP2 蛋白进行体外组装, 配制组

装缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl、250 mmol/L NaCl、pH 8.0), 将样品转移至 14 kDa 透析袋中密封后放入缓冲液中, 在 4 °C 低温环境下透析过夜。取透析组装后的蛋白样品 20 μ L 滴于 200 目铜网上, 室温下作用 2 min, 用磷钨酸染液负染, 等待自然干燥后使用透射电镜(transmission electron microscope, TEM)观察样品的形态。另外, 通过纳米粒度仪检测 VLPs 的粒径分布。

2 结果与分析

2.1 重组表达质粒 pColdTF-NDPV-VP2 的构建与鉴定结果

选择 pColdTF 作为表达载体, 该载体自带促溶标签 TF-Tag 以及 Thrombin 酶切位点方便后续切除, 将 VP2 基因片段插入载体 pColdTF 中构建重组质粒 pColdTF-NDPV-VP2, 将构建好的 pColdTF-NDPV-VP2 质粒经双酶切后用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测, 结果显示约在 1 700 bp 和 5 700 bp 处可见两条特异性条带(图 1), 经比对符合目的基因条带大小(1 764 bp)。将双酶切鉴定正确的质粒送检测序, 结果与密码子优化后的序列相同, 表明重组表达质粒 pColdTF-NDPV-VP2 构建成功。

2.2 重组蛋白的表达条件优化和可溶性分析结果

将重组表达质粒 pColdTF-NDPV-VP2 转化至大肠杆菌 BL21(DE3)中, 分别收集诱导前后的菌体, 超声破碎后离心分离获得上清和沉淀进行 SDS-PAGE 鉴定。结果显示, 空载质粒 pColdTF 经诱导后在 48 kDa 处出现明显条带, 符合 TF 标签大小; 重组表达质粒 pColdTF-NDPV-VP2 经诱导后在 115 kDa 处出现明显条带, 符合重组蛋白 TF-VP2 的大小(67 kDa+48 kDa), 表明成功诱导了重组蛋白的表达; 表达的重组蛋白大部分是可溶的, 主要存在于上清中(图 2)。对

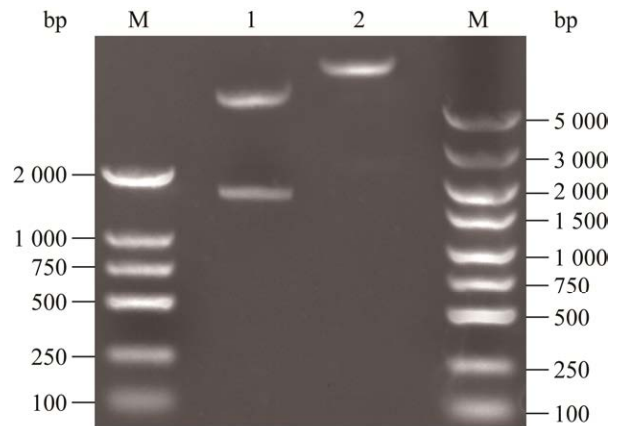


图 1 重组质粒 pColdTF-NDPV-VP2 的双酶切鉴定
Figure 1 Identification of pColdTF-NDPV-VP2 plasmid digested by *EcoR* I and *Xho* I. M: DNA molecular Marker; 1: pColdTF-NDPV-VP2 plasmid digested by *EcoR* I and *Xho* I; 2: pColdTF-NDPV-VP2 plasmid.

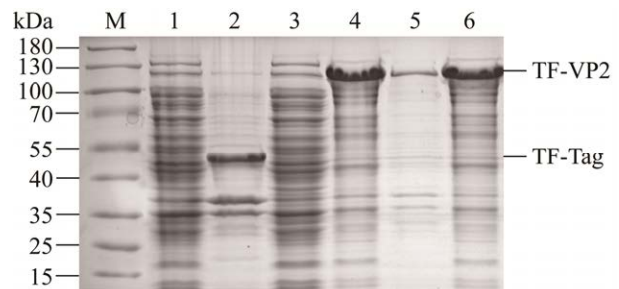


图 2 重组蛋白表达可溶性分析 M: 蛋白质 Marker; 1: pColdTF 空载诱导前对照; 2: pColdTF IPTG 诱导后对照; 3: pColdTF-NDPV-VP2 IPTG 诱导前全菌; 4: pColdTF-NDPV-VP2 IPTG 诱导后全菌; 5: pColdTF-NDPV-VP2 IPTG 诱导后沉淀; 6: pColdTF-NDPV-VP2 IPTG 诱导后上清

Figure 2 Soluble analysis of recombinant protein. M: Protein molecular weight Marker; 1: pColdTF without induced; 2: pColdTF induced by IPTG; 3: Total bacteria of pColdTF-NDPV-VP2 before induction by IPTG; 4: Total bacteria of pColdTF-NDPV-VP2 after induction by IPTG; 5: Sediment of pColdTF-NDPV-VP2 after induction by IPTG; 6: Supernatant of pColdTF-NDPV-VP2 after induction by IPTG.

重组蛋白的最佳诱导温度和 IPTG 诱导浓度进行优化, 结果显示重组蛋白在 16 °C 和 25 °C 条件下诱导主要以可溶性表达为主(图 3A), 采用 Image J 软件检测蛋白条带光密度值, 计算目的蛋白可溶性相对表达量, 结果显示在 16 °C 条件下目的蛋白可溶性相对表达量高于 25 °C (图 3B), 因此该蛋白表达的最佳诱导温度为 16 °C; 考虑到 IPTG 具有一定毒性以及使用成本的问题, 最终选取最低的 0.2 mmol/L 为诱导浓度(图 4)。

2.3 重组蛋白 TF-VP2 的纯化

将诱导后得到的重组蛋白经 Ni-NTA 柱亲和层析纯化后进行 SDS-PAGE 分析, 如图 5 所示, 得到了纯度较高、单一的目的蛋白, 且洗脱峰集中在泳道 5-7 样品中。

2.4 TF 标签蛋白的切除

将纯化得到的 TF-VP2 重组蛋白使用 Thrombin 酶切标签蛋白 TF, 酶切后的产物采用

SDS-PAGE 鉴定。结果显示, 分别在约 67 kDa 和 48 kDa 处出现两条特异性条带, 符合 VP2 蛋白和 TF 标签蛋白的大小, 表示 Thrombin 酶酶切成功, 得到单一的 VP2 蛋白(图 6)。通过 Ni-NTA 亲和层析纯化酶切后的蛋白, 即得到单一的不含 TF 标签的 VP2 蛋白, 使用二辛可宁酸蛋白浓度测定试剂盒 (bicinchoninic acid, BCA) 进行浓度测定, 得到重组蛋白 VP2 浓度为 1.023 mg/mL。

2.5 重组蛋白 VP2 的 Western blotting 分析

将纯化后的蛋白进行 Western blotting 鉴定, 一抗分别为 NDPV 鸭阳性血清、鸭阴性血清, 二抗为 HRP 标记的兔抗鸭 IgG 抗体。结果如图 7A 所示, 在 67 kDa 处出现一条特异性条带, 与目标条带大小相符, 而与鸭阴性血清反应未出现目的条带(图 7B), 表明纯化后的 VP2 蛋白能与 NDPV 鸭阳性血清中特异性抗体结合, 具有良好的反应原性。

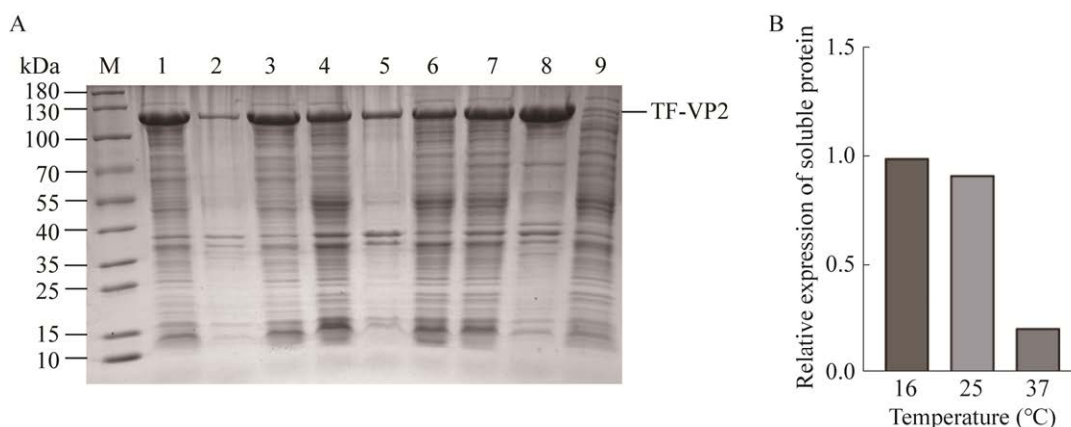


图 3 重组蛋白表达最佳温度条件优化 M: 蛋白质 Marker; A: 不同温度诱导下重组蛋白表达量. 1、2、3: 分别为 16 °C 诱导全菌、沉淀、上清; 4、5、6: 分别为 25 °C 诱导全菌、沉淀、上清; 7、8、9: 分别为 37 °C 诱导全菌、沉淀、上清. B: 可溶性目的蛋白相对表达量

Figure 3 Optimization of recombinant protein expression temperature. A: Expression of recombinant protein induced by different temperatures. M: Protein molecular weight (MW) Markers; 1, 2, 3: Total bacteria, sediment, supernatant of pColdTF-NDPV-VP2 after induction at 16 °C; 4, 5, 6: Total bacteria, sediment, supernatant of pColdTF-NDPV-VP2 after induction at 25 °C; 7, 8, 9: Total bacteria, sediment, supernatant of pColdTF-NDPV-VP2 after induction at 37 °C. B: Relative expression of soluble protein.

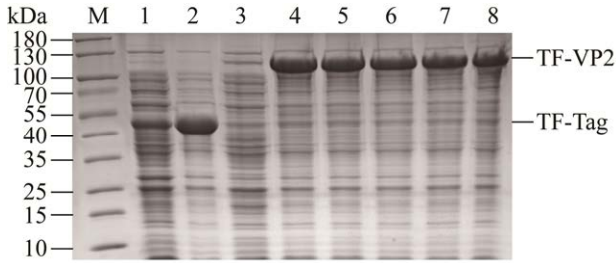


图 4 重组蛋白表达最佳 IPTG 浓度条件优化
M: 蛋白质分子质量标准; 1: pColdTF 空载未诱导; 2: pColdTF 空载诱导; 3: pColdTF-NDPV-VP2 未诱导; 4-8: IPTG 终浓度分别为 0.2、0.4、0.6、0.8 和 1.0 mmol/L

Figure 4 Optimization of IPTG concentration. M: Protein molecular weight (MW) Markers; 1: pColdTF without induced; 2: pColdTF induced by 0.2 mmol/L IPTG; 3: pColdTF-NDPV-VP2 without induced; 4-8: Final concentration of IPTG was 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 and 1.0 mmol/L, respectively.

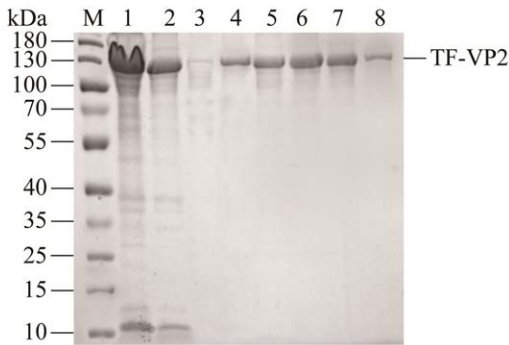


图 5 重组蛋白 TF-VP2 的纯化 M: 蛋白质分子质量标准; 1: 诱导后菌体上清; 2: 流穿液; 3: 洗涤液; 4-8: 洗脱液

Figure 5 Purification of TF-VP2 protein. M: Protein molecular weight (MW) Markers; 1: Supernatant of pColdTF-NDPV-VP2 after induction; 2: Flow buffer; 3: Wash buffer; 4-8: Purified TF-VP2 protein.

2.6 NDPV VLPs 的组装和鉴定结果

取组装后的重组蛋白样品经 3%的磷钨酸负染后进行透射电镜观察, 图 8A 结果显示可观察到大小均一、直径为 20 nm 左右的病毒样

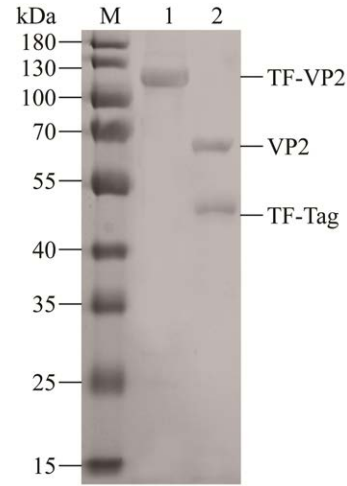


图 6 Thrombin 酶处理后的 TF-VP2 蛋白 M: 蛋白质分子质量标准; 1: 纯化后的 TF-VP2 蛋白; 2: Thrombin 酶处理后的 TF-VP2 蛋白

Figure 6 TF-VP2 protein after thrombin digestion. M: Protein molecular weight (MW) Markers; 1: Purified TF-VP2 protein; 2: Protein after Thrombin digestion.

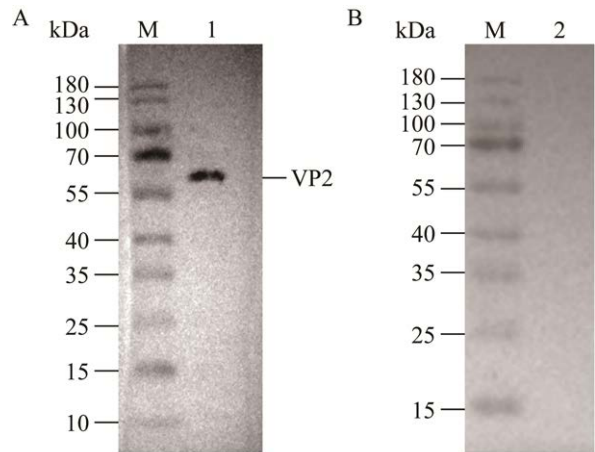


图 7 纯化后的 VP2 蛋白 Western blotting 分析
A: 纯化后的 VP2 蛋白与 NDPV 鸭阳性血清反应(泳道 1). B: 纯化后的 VP2 蛋白与鸭阴性血清反应(泳道 2). M: 蛋白质分子质量标准

Figure 7 Western blotting analysis of purified VP2 protein. A: Purified VP2 protein with NDPV duck-positive serum (lane 1). B: Purified VP2 protein with NDPV duck-negative serum (lane 2). M: Protein molecular weight Marker.

颗粒;图 8B 动态光散射结果显示组装液中形成了直径为 20 nm 左右的颗粒,符合 NDPV 颗粒大小。以上结果表明重组 VP2 蛋白成功在体外自组装成 VLPs。

3 讨论与结论

1971–1972 年间法国首次报道了由 NDPV 引起骡鸭的短喙侏儒综合征(BADS)^[12],随后在 1989–1990 年间在中国台湾报道。1995 年波兰出现相关病例报道,2009 年在匈牙利暴发此病^[13]。2015 年,我国山东、江苏、河南、安徽和河北等省份的商品樱桃谷鸭突发慢性传染病疫情,一年后四川省报道了该病^[14]。目前未见商品化

疫苗,一些农户仍使用病原特征相似的小鹅瘟卵黄抗体以获得交叉保护作用,但研发出安全高效的以预防为主的疫苗是防控本病的重点^[15]。

传统的灭活疫苗和弱毒疫苗虽然技术成熟,但存在一些局限性,而基于单一病毒蛋白的重组亚单位疫苗存在免疫原性较弱和高成本等缺点。相比之下,病毒样颗粒(VLPs)作为一种高效、安全的亚单位疫苗,能以更真实的构象呈现病毒抗原,具有良好的反应原性,较低剂量便能刺激机体产生体液和细胞免疫。

截至目前,研究者们已经通过不同的表达系统为 30 多种感染人类和其他动物的不同病毒生产了 VLPs,其中较常见的大肠杆菌表达系统具有操作简单、生长速度快和相对较低的成本,已广泛用于实验室和工业规模的重组蛋白生产。但是大肠杆菌表达系统缺乏转录后剪切、翻译后修饰能力的缺点,意味着表达一些复杂蛋白质时表达产物常容易相互结合形成不溶性聚集体^[16]。为了解决这些问题,通常采用优化表达条件、选择合适的宿主菌和共表达伴侣分子来解决。本研究选择 pColdTF 载体进行重组蛋白表达,该载体是一种冷休克载体,载体上带有 cspA (冷休克蛋白 A)启动子,可以在低温环境(15 °C)下培养。本试验经过表达条件优化,成功表达了可溶性的 TF-VP2 重组蛋白,通过 Thrombin 酶切位点去除 TF 标签,再通过 Ni-NTA 树脂纯化得到不含标签的单一 VP2 蛋白。经 Western blotting 分析,纯化后的 VP2 蛋白能与 NDPV 鸭阳性血清特异性结合,表明 NDPV VP2 蛋白具有良好的反应原性。透射电镜和动态光散射结果显示,NGPV VP2 蛋白在体外形成了与天然病毒颗粒形态相似、直径约为 20–25 nm 的 VLPs。综上所述,本研究利用大肠杆菌表达系统成功制备了 NDPV-VP2 VLPs,为后续研究 NDPV 相关疫苗奠定了基础。

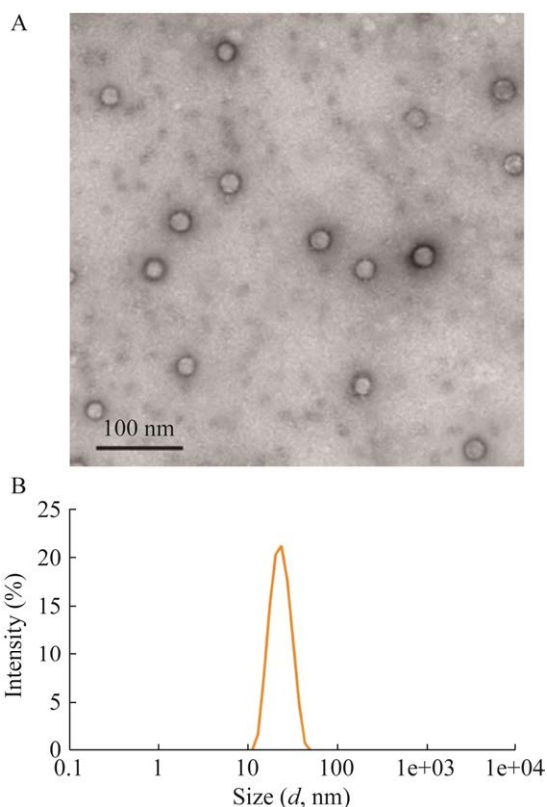


图 8 重组蛋白的透射电镜(A)与动态光散射(B)鉴定

Figure 8 The identification of recombinant proteins by TEM (A) and DLC (B).

REFERENCES

- [1] SOLIMAN MA, ERFAN AM, SAMY M, MAHANA O, NASEF SA. Detection of novel goose parvovirus disease associated with short beak and dwarfism syndrome in commercial ducks[J]. *Animals*, 2020, 10(10): 1833.
- [2] CHEN H, DOU YG, TANG Y, ZHENG XQ, NIU XY, YANG J, YU XL, DIAO YX. Experimental reproduction of beak atrophy and dwarfism syndrome by infection in cherry valley ducklings with a novel goose parvovirus-related parvovirus[J]. *Veterinary Microbiology*, 2016, 183: 16-20.
- [3] 郝雪飘, 王璐瑶, 雷白时, 张武超, 苗天姿, 庞洪泽, 赵款, 袁万哲. 致鸭短喙与侏儒综合征的新型鹅细小病毒不同传代毒株基因组分析[J]. *病毒学报*, 2022, 38(2): 394-401.
HAO XP, WANG LY, LEI BS, ZHANG WC, MIAO TZ, PANG HZ, ZHAO K, YUAN WZ. Genomic analysis of different-passage strains of the novel goose parvovirus causing short beak and dwarfism syndrome in ducks[J]. *Chinese Journal of Virology*, 2022, 38(2): 394-401 (in Chinese).
- [4] 王璐瑶, 郝雪飘, 雷白时, 赵款, 张武超, 袁万哲. 新型鹅细小病毒感染鸭的肝、胸腺、回肠转录组差异表达分析[J]. *畜牧兽医学报*, 2022, 53(2): 654-657.
WANG LY, HAO XP, LEI BS, ZHAO K, ZHANG WC, YUAN WZ. Differential expression of transcriptome in liver, thymus and ileum of ducks infected with novel goose parvovirus[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2022, 53(2): 654-657 (in Chinese).
- [5] CHEN YH, AFUMBA R, PANG FS, YUAN RX, DONG H. Advances in research on genetic relationships of waterfowl parvoviruses[J]. *Journal of Veterinary Research*, 2021, 65(4): 391-399.
- [6] FAN WT, SUN ZY, SHEN TT, XU DN, HUANG KH, ZHOU JY, SONG SQ, YAN LP. Analysis of evolutionary processes of species jump in waterfowl parvovirus[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 421.
- [7] ZHANG JY, LIU P, WU YY, WANG MS, JIA RY, ZHU DK, LIU MF, YANG Q, WU Y, ZHAO XX, ZHANG SQ, LIU YY, ZHANG L, YU YL, YOU Y, CHEN S, CHENG AC. Growth characteristics of the novel goose parvovirus SD15 strain *in vitro*[J]. *BMC Veterinary Research*, 2019, 15(1): 1-8.
- [8] WANG CY, SHIEH HK, SHIEN JH, KO CY, CHANG PC. Expression of capsid proteins and non-structural proteins of waterfowl parvoviruses in *Escherichia coli* and their use in serological assays[J]. *Avian Pathology*, 2005, 34(5): 376-382.
- [9] BHAT T, CAO A, YIN J. Virus-like particles: measures and biological functions[J]. *Viruses*, 2022, 14(2): 383.
- [10] NOORAEI S, BAHRULOLUM H, HOSEINI ZS, KATALANI C, HAJIZADE A, EASTON AJ, AHMADIAN G. Virus-like particles: preparation, immunogenicity and their roles as nanovaccines and drug nanocarriers[J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2021, 19(1): 59.
- [11] ZHANG L, XU W, MA X, SUN XJ, FAN JB, WANG Y. Virus-like particles as antiviral vaccine: mechanism, design, and application[J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering: BBE*, 2023, 28(1): 1-16.
- [12] PALYA V, ZOLNAI A, BENYEDA Z, KOVÁCS E, KARDI V, MATÓ T. Short beak and dwarfism syndrome of mule duck is caused by a distinct lineage of goose parvovirus[J]. *Avian Pathology*, 2009, 38(2): 175-180.
- [13] COTMORE SF, AGBANDJE-MCKENNA M, CHIORINI JA, MUKHA DV, PINTEL DJ, QIU JM, SODERLUND-VENNERMO M, TATTERSALL P, TIJSSSEN P, GATHERER D, DAVISON AJ. The family Parvoviridae[J]. *Archives of Virology*, 2014, 159(5): 1239-1247.
- [14] LIU HM, WANG H, TIAN XJ, ZHANG S, ZHOU XH, QI KZ, PAN L. Complete genome sequence of goose parvovirus Y strain isolated from Muscovy ducks in China[J]. *Virus Genes*, 2014, 48(1): 199-202.
- [15] 宫晓华. 新型鸭细小病毒 DS-15 株生物学特性研究及间接 ELISA 方法的建立[D]. 合肥: 安徽农业大学硕士学位论文, 2017.
GONG XH. Biological characters of the novel duck parvovirus DS-15 strain and establishment of an indirect ELISA for the detection of antibodies[D]. Hefei: Master's Thesis of Anhui Agricultural University, 2017 (in Chinese).
- [16] 仇宇星, 雷清. 病毒样颗粒的研究及其在疫苗中的应用[J]. *微生物学免疫学进展*, 2022(6): 1-8.
CHOU YX, LEI Q. Virus-like particles and their applications in vaccine development[J]. *Progress in Microbiology and Immunology*, 2022(6): 1-8 (in Chinese).