

鸭肠炎病毒 gC 糖蛋白胞外区优势抗原表位的筛选与鉴定

崔立虹, 宋 鹤, 王晓东, 刘晓玫, 高明春, 张文龙, 马 波*, 王君伟*

(东北农业大学动物医学学院, 哈尔滨 150030)

摘要: 为筛选出鸭肠炎病毒(DEV)gC 糖蛋白胞外区的优势抗原表位, 本试验通过抗原表位作图法对 DEV-gC 基因进行分段克隆并构建重组表达载体, 表达蛋白经纯化后进行 Western blot 分析。结果显示, 经过 4 轮筛选, DEV-gC 糖蛋白优势抗原表位为第 73-88 位氨基酸。该优势表位的发现为 DEV-gC 糖蛋白具体功能区的研究、诊断试剂及表位疫苗的研制奠定了物质基础。

关键词: 鸭肠炎病毒; gC 糖蛋白; 优势抗原表位; 筛选

中图分类号: S852.659.1

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2011)08-1126-08

Screening and Identification of the Dominant Epitope within Extracellular Region of Glycoprotein C of Duck Enteritis Virus

CUI Li-hong, SONG Ge, WANG Xiao-dong, LIU Xiao-mei, GAO Ming-chun,

ZHANG Wen-long, MA Bo*, WANG Jun-wei*

(College of Veterinary Medicine, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: Based on the method of epitope mapping, the extracellular region of gC glycoprotein of duck enteritis virus (DEV) was dissected into a set of overlapping fragments which were used to construct the recombinant expression vector, respectively. The expression proteins were purified to analyze the antigenicity by Western blot. The results showed that the dominant epitope region is located in the 73-88 aa region after four times screening. The results from this study lay a foundation for the research of DEV-gC glycoprotein's function and develop a new strategy for diagnostic reagents and epitope vaccin.

Key words: duck enteritis virus; glycoprotein C; dominant epitope; screening

鸭病毒性肠炎(Duck viral enteritis, DVE), 又名鸭瘟(Duck plague, DP), 是由鸭肠炎病毒(Duck enteritis virus, DEV)引起的鸭、鹅及多种雁形目禽类的一种急性、热性、败血性传染病, 具有发病率和死亡率高等特征^[1]。该病在世界范围内的发生和流行给水禽养殖业带来了巨大的经济损失。

DEV 属 α -疱疹病毒亚科, 但属于未分属病毒^[2]。其核酸结构为线状双股 DNA, 大小约为 150 kb, 目前基因序列已完全公布。鸭肠炎病毒 DNA

具有典型的疱疹病毒 DNA 的特征, 即病毒粒子呈球形^[3]。囊膜糖蛋白为疱疹病毒的主要保护性抗原, 可诱导机体产生免疫应答反应, 同时其在介导病毒吸附, 穿入细胞, 及病毒的成熟与释放中起重要的作用^[4]。疱疹病毒的囊膜蛋白主要有糖蛋白 B (Glycoprotein B, gB)、gC、gD、gE 等 12 种。其中作为疱疹病毒家族中较不保守且非复制必需的 gC 糖蛋白具有多功能性, 它不仅参与病毒吸附细胞, 还对病毒粒子的释放、病毒的毒力以及病毒粒子的稳

收稿日期: 2011-01-14

基金项目: 黑龙江省科技攻关项目(GB01B503-02; GB04B504); 东北农业大学博士启动基金

作者简介: 崔立虹(1985-), 女, 黑龙江省肇东市人, 硕士, 从事动物免疫学与生物制品学研究, E-mail: cuilihonghappy@163.com

* 通讯作者: 王君伟, E-mail: jwwang@neau.edu.cn; 马 波, E-mail: maboLHT@yahoo.com.cn

定性^[4-6]等有影响,同时 gC 也是细胞免疫和体液免疫的主要靶标,参与淋巴细胞增殖、CTL、补体介导的中和作用等^[7]。因此 gC 基因是疱疹病毒疫苗研究的候选基因之一。

本试验通过基因分段克隆表达,结合蛋白质印迹技术^[8],筛选出 DEV-gC 糖蛋白胞外区的优势抗原表位,为 DEV 检测方法的建立、亚单位疫苗及核酸疫苗的开发等奠定了物质基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 质粒、载体、菌种与工具酶 重组质粒 pMD18-T-gC、表达载体 pET-32a(+),大肠杆菌 TG1 及 Rosetta(DE3)pLysS 均为作者实验室保存;各限制性内切酶类 *EcoR* I、*Xho* I、*Sal* I、*T₄* DNA 多聚核酸激酶(T4PNK)等购自宝生物工程(大连)有限公司,*T₄* 连接酶购自 New England BioLabs (NEB)。

1.1.2 分子生物学试剂 DL2000 Plus DNA Marker, Trans2K Plus II DNA Marker 等购自北京全式金生物技术有限公司;小量胶回收试剂盒购自北京百泰克生物有限公司。

1.1.3 阳性血清及酶标抗 鸭源 DEV 阳性血清由作者实验室制作并保存;HRP 标记羊抗鸭 IgG 抗体为美国 KPL 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 DEV-gC 糖蛋白抗原表位的初步筛选

1.2.1.1 DEV-gC 糖蛋白短肽分段设计与引物合成:为了对 DEV-gC 胞外区基因抗原表位进行分析,设计 7 个覆盖 gC 胞外区的多肽片段,每段蛋白大小为 60~80 aa,相互重叠 12~23 aa(图 1)。为了表达这些短肽,设计并合成了 7 对引物,在上游引物 5'端引入保护性碱基及 *EcoR* I 酶切位点,在下游引物 5'端引入保护性碱基、*Xho* I 酶切位点以及终止密码子(表 1),引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

表 1 DEV-gC 蛋白分段表达引物

Table 1 Primers for DEV-gC protein short peptides

片段名称 Name	引物序列 (5'-3') Sequence (5'-3')	退火温度/°C Annealing
gC-1(27-96 aa)	Sense 5'GAT GAATTCAGATGACATGTTTCG 3'	52.6
	Antisense 5'GAT CTCGAGTTAAGGTTGAGCTTGCTT 3'	
gC-2 (74-149 aa)	Sense 5'GCA GAATTCGATTTATTGTCTCCAG 3'	53.6
	Antisense 5'GAT CTCGAGTTAATACAATCCCTCGTC3'	
gC-3 (128-190 aa)	Sense 5'GAT GAATTCGCCGACCGAAGACTCT3'	53.3
	Antisense 5'GAC CTCGAGTTAAGCAATGACAGAGAT 3'	
gC-4(168-239 aa)	Sense 5'GAT GAATTCGCGACAGAAGCAATC3'	53.5
	Antisense 5'GATC CTCGAGTTAACTTTTTGCGGTAGA 3'	
gC-5(228-307 aa)	Sense 5'GGA GAATTCATAAACTCAGTGCGG 3'	53.8
	Antisense 5'GAT CTCGAGTTAGCATCTTGCATTACA3'	
gC-6 (279-338 aa)	Sense 5'GTC GAATTC AATGCTTCAGCAGTT 3'	53.2
	Antisense 5'TTA CTCGAGTTAGCCTACA ACTTCCAC 3'	
gC-7 (327-396 aa)	Sense 5'GAC GAATTC AACATTTGGAAGGAC 3'	54.1
	Antisense 5'TAT CTCGAGTTAGATCATAGGCTTCCC 3'	

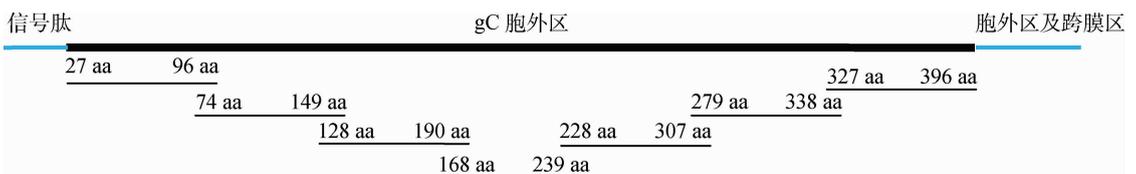


图 1 DEV-gC 短肽分段设计

Fig. 1 The construction of DEV-gC fragments

1.2.1.2 短肽表达载体的构建及表达与纯化:采用 25.0 μL PCR 反应体系, $10\times\text{Ex PCR Buffer}$ 2.5 μL , 上、下游引物各 0.5 μL ($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), dNTP 2.0 μL , 模板 DNA 0.5 μL , *Ex Taq DNA 聚合酶* 0.5 μL , ddH₂O 18.5 μL 。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 50 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸 8 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 终止反应。

1.2.1.3 重组表达载体的构建、表达及纯化: 将上述 7 个片段经 *EcoR I*、*Xho I* 双酶切后克隆入 pET-32a(+) 表达载体, 鉴定正确后送上海生工生物工程有限公司测序。经测序鉴定正确的重组质粒转化大肠杆菌感受态 Rosetta (DE3) pLysS, 经 IPTG 诱导表达 4 h 后通过 SDS-PAGE 检测重组蛋白的表达情况。

1.2.1.4 短肽融合蛋白 gC-1-7 Western blot 鉴定: 诱导后的短肽融合蛋白样品经小量纯化后, 经过 SDS-PAGE, 转印至 PVDF 膜, 5% 的脱脂乳 4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭过夜, PBST 洗膜 3 次, 每次 10 min; 加入 1×80 稀释的 DEV 阳性血清, 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床 $60\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 孵育 2 h, PBST 洗膜 3 次, 每次 10 min; 加入 $1\times 10\ 000$ 稀释的羊抗鸭 IgG-HRP, 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床 $60\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 孵

育 1 h, PBST 洗膜 3 次, 每次 10 min; ECL 显色试剂盒进行曝光显色。

1.2.2 DEV-gC 糖蛋白抗原表位的第 2 轮筛选

根据第 1 轮 Western blot 的鉴定结果, 选择 gC-1、gC-2 短肽设计了 5 个相互重叠 11~15 个氨基酸的短肽片段(图 2)。按照“1.2.1”方法, 对这 5 个短肽进行抗原表位的第 2 轮筛选。

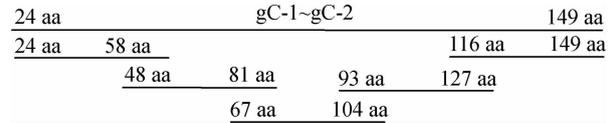


图 2 DEV-gC 第二轮短肽分段设计

Fig. 2 The second construction of DEV-gC fragments

1.2.3 DEV-gC 糖蛋白抗原表位的第 3 轮筛选

1.2.3.1 短肽 gC-2.1-A~E 分段设计与寡聚核酸片段的合成: 根据第 2 轮鉴定结果, 对 gC-2.1 短肽进行第 3 轮抗原表位筛选。设计 5 个相互重叠 10 aa 的短肽片段, 大小为 15~16 aa(图 3)。为了表达这 5 个短肽片段, 合成互补退火后具有黏性末端(正向为 *EcoR I*, 反向为 *Xho I*) 的寡聚核酸片段(表 2)。寡聚核酸片段由上海生工生物工程有限公司合成。

表 2 短肽 gC-2.1-A~E 分段退火寡聚核酸片段

Table 2 Oligomeric nucleic acid fragments for gC-2.1-A-E protein short peptide

片段名称 Name	寡聚核酸片段序列 (5'-3') Oligomeric nucleic acid sequences (5'-3')
A(67-82 aa)	Sense 5' AATTCC ACAAACCAACACAAGCAGTTCGATTTATTGTCTCCAGTTCGAATGGAACCTAAC 3' Antisense 5' TCGAG TTAGTTCCATTCGACTGGAGACAATAAATCGACTGCTTGTGTTGGTTTGTGG 3'
B(73-88 aa)	Sense 5' AATT CGTCGATTTATTGTCTCCAGTTCGAATGGAACGGAATGCAGTATGATCCCTAAC 3' Antisense 5' TCGAG TTAGGGATCATACTGCATTCGGTTCATTCGACTGGAGACAATAAATCGACG 3'
C(79-94 aa)	Sense 5' AATT CGTCGAATGGAACGGAATGCAGTATGATCCCGTCGGTTCTAAGCAAGCTTAAC 3' Antisense 5' TCGAG TTAAGCTTGCTTAGAACCGACGGGATCATACTGCATTCGGTTCATTCGACG 3'
D(85-99 aa)	Sense 5' AATT CCAGTATGATCCCGTCGGTTCTAAGCAAGCTCAACCTAGAATCATCTAAC 3' Antisense 5' TCGAG TTAGATGATTCTAGGTTGAGCTTGCTTAGAACCGACGGGATCATACTGG 3'
E(90-104 aa)	Sense 5' AATT CGGTTCTAAGCAAGCTCAACCTAGAATCATCTATACTGCGATGCCATAAC 3' Antisense 5' TCGAG TTATGGCATCGCAGTATAGATGATTCTAGGTTGAGCTTGCTTAGAACCG 3'

1.2.3.2 短肽 gC-2.1-A~E 表达载体的构建及表达:将合成的 5 对寡聚核酸片段,正反链经过 5'端磷酸化反应,退火成双链 DNA 分子片段后,与具有相同黏性末端的表达载体 pET-32a(+)连接过夜,转化大肠杆菌感受态 TG1 中,重组质粒经酶切鉴定正确后,送上海生工生物工程技术有限公司测序。鉴定正确的重组质粒转化大肠杆菌感受态 Rosetta (DE3)pLysS。诱导表达方法同“1.2.1.3”。短肽融合蛋白的 Western blot 鉴定,具体方法同“1.2.1.4”。

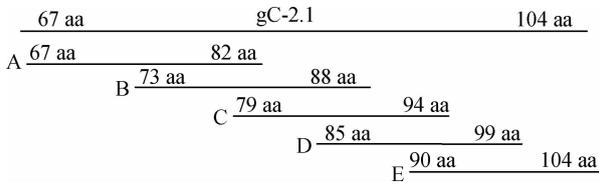


图 3 DEV-gC 第 3 轮短肽分段设计

Fig. 3 The third construction of DEV-gC fragments

1.2.4 DEV-gC 糖蛋白抗原表位的精确定位
根据第 3 轮的 Western blot 鉴定结果,为了更加精

确地鉴定出 gC 糖蛋白抗原表位,对 gC-2.1-B、C 进行进一步的截短表达(表 3),设计合成 5 个相互重叠 7 个 aa 短肽片段,大小为 10~11 aa(图 4)。寡聚核酸片段由上海生工生物工程技术有限公司合成。短肽 gC-2.1-B-1~E-2 表达载体的构建、表达与纯化及 Western blot 鉴定同“1.2.3.2”。

段肽 gC-2.1-B-1~E-2 表达蛋白应用鸭源 DEV 一次攻毒阳性血清的 Western blot 鉴定方法同“1.2.3.2”。

2 结果

2.1 DEV-gC 糖蛋白抗原表位的初步筛选

2.1.1 短肽基因 gC-1~7 的克隆与表达 PCR 反应扩增得到大小为 180~240 bp 的 7 个基因片段(图 5A);重组质粒经酶切和 PCR 鉴定正确后,得到与预期大小相符的载体和目的基因条带,DNA 测序表明插入片段完全正确。SDS-PAGE 分析表明各目的基因片段在 Rosetta 中获得了表达(图 5B),并且纯化结果满足 Western blot 的要求(图 5C)。

表 3 短肽 gC-2.1-B-1~C-2 分段退火寡聚核酸片段

Table 3 Oligomeric nucleic acid fragments for gC-2.1-B-1~C-2 protein short peptide

片段名称 Name	寡聚核酸片段序列 (5'-3')
	Oligomeric nucleic acid sequences (5'-3')
B-1(73-82 aa)	Sense 5' AATTCG TCGATTTATTGCTCCAGTTCGAATGGAAC TAAC 3'
	Antisense 5' TCGAGT TAGTTCCATTCGACTGGAGACAATAAAATCGACG 3'
B-2(76-86 aa)	Sense 5' AATTC TGTCTCCAGTTCGAATGGAACGGAATGCAGTATTAAC 3'
	Antisense 5' TCGAG TTAATACTGCATTCCGTTCCATTCGACTGGAGACAAG3'
B-3 (79-88 aa)	Sense 5' AATTCG TTCGAATGGAACGGAATGCAGTATGATCCCTAAC 3'
	Antisense 5' TCGAG TTAGGGATCATACTGCATTCCGTTCCATTCGACG 3'
C-1(82-91 aa)	Sense 5' AATTC AACGGAATGCAGTATGATCCCGTCGGTTCTTAAC 3'
	Antisense 5' TCGAG TTAAGAACCGACGGATCATACTGCATTCCGTTG 3'
C-2 (85-94 aa)	Sense 5' AATTC CAGTATGATCCCGTCGGTTCTAAGCAAGCTTAAC 3'
	Antisense 5' TCGAG TTAAGCTTGCTTAGAACCGACGGGATCATACTGG 3'

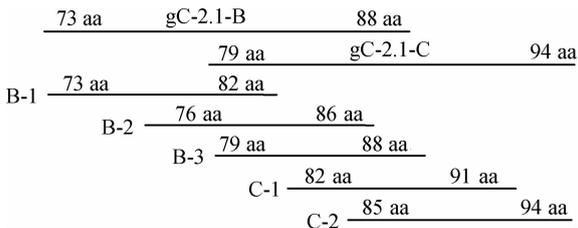


图 4 DEV-gC 第四轮短肽分段设计

Fig. 4 The fourth construction of DEV-gC fragments

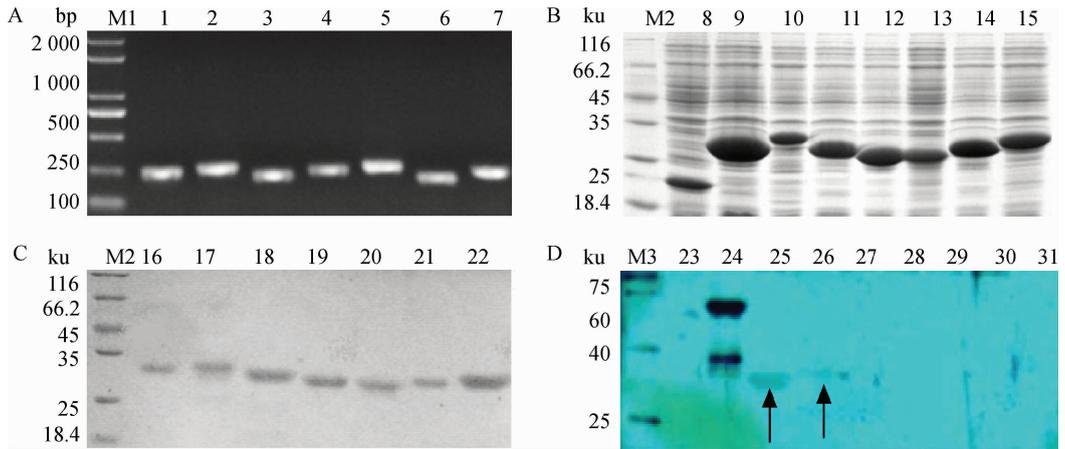
2.1.2 短肽融合蛋白 gC-1~7 的 Western blot 分析 经 Western blot 鉴定,表达的 7 个短肽片段中 gC-1(27-96 aa)、gC-2(74-149 aa)与 DEV 阳性血清产生特异性反应,且在 28 ku 左右处出现明显条带,且 gC-1 反应性较强(图 5D)。

2.2 DEV-gC 糖蛋白抗原表位的第二轮筛选

2.2.1 短肽基因 gC-1.1~2.3 的表达与纯化 通过 PCR 反应扩增得到大小为 99~114 bp 的 5 个基因片段(图 6A);克隆至表达载体中,经酶切和

PCR 鉴定正确后送测序,其结果表明插入片段完全正确。SDS-PAGE 分析表明各目的基因片段在

Rosetta 中获得了表达(图 6B),并且纯化结果满足 Western blot 的要求(图 6C)。

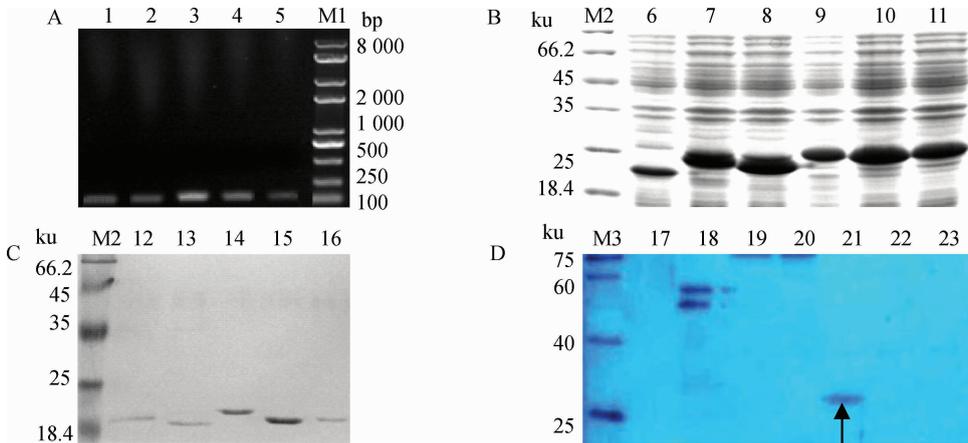


M1. DL2000 DNA 相对分子质量标准;1~7. gC-1~F7 PCR 扩增片段;M2. 蛋白质相对分子质量标准;8. Rosetta-pET-32a IPTG 诱导 4h 后;9~15. Rosetta-pET-32a-gC-1~7 IPTG 诱导 4h 后;16~22. 纯化后的融合蛋白 gC-1~7;M3. ECL 曝光蛋白质相对分子质量标准;23. pET-32a 阴性对照;24. DEV-gC 阳性对照;25~31. gC-1~7 短肽的 Western blot 结果
 M1. DL2000DNA Marker; 1-7. The PCR amplification of gC-1~7; M2. Protein marker; 8. Rosetta-pET-32a induced with IPTG for 4 h; 9-15. Rosetta-pET-32a-gC-1~7 induced with IPTG for 4h; 16-22. Depurated fusion protein gC-1~7; M3. ECL Protein Molecular Weight Marker; 23. Negative control of pET-32a; 24. Positive control of DEV-gC; 25-31. Western blot analysis gC-1~7 short peptides

图 5 gC-1~7 基因 PCR 扩增及表达的蛋白与纯化的 SDS-PAGE 分析和 Western blot 鉴定
 Fig. 5 PCR amplification of gC-1~7, SDS-PAGE and Western blot analysis of gC-1~7short peptides

2.2.2 短肽融合蛋白 gC-1. 1~2. 3 的 Western blot 分析

经 Western blot 鉴定,表达的 5 个短肽 片段中 gC-2. 1(67-104 aa)与 DEV 阳性血清产生特异性反应,且在 24 ku 左右处出现明显条带(图 6D)。

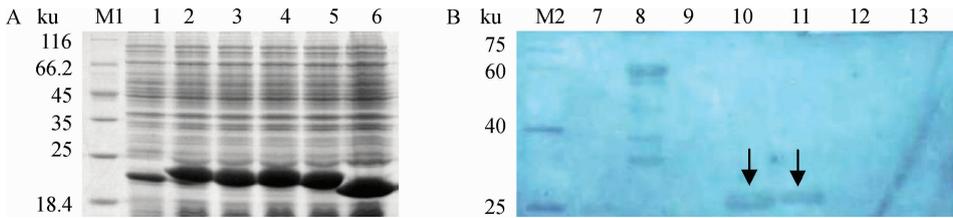


M1. Trans2K Plus II DNA 相对分子质量标准;1~5. gC-1. 1~2. 3 PCR 扩增片段;M2. 蛋白质相对分子质量标准;6. Rosetta-pET-32a IPTG 诱导 4 h 后;7~11. Rosetta-pET-32a-gC-1. 1~2. 3 IPTG 诱导 4 h 后;12~16. 纯化后的融合蛋白 gC-1. 1~2. 3;M3. ECL 曝光蛋白质相对分子质量标准;17. pET-32a 阴性对照;18. DEV-gC 阳性对照;19~23. gC-1. 1~2. 3 短肽的 Western blot 结果
 M1. Trans2K Plus II DNA Marker; 1-5. The PCR amplification of gC-1. 1~2. 3; M2. Protein marker;6. Rosetta-pET-32a induced with IPTG for 4h;7-11. Rosetta-pET-32a-gC-1. 1~2. 3induced with IPTG for 4h;12-16. Depurated fusion protein gC-1. 1~2. 3; M3. ECL Protein Molecular Weight Marker;17. Negative control of pET-32a. 18. Positive control of DEV-gC;19-23. Western blot analysis gC-1. 1~2. 3short peptides

图 6 gC-1. 1~2. 3 基因 PCR 扩增及表达的蛋白与纯化的 SDS-PAGE 分析和 Western blot 鉴定
 Fig. 6 PCR amplification of gC-1. 1~2. 3;SDS-PAGE and Western blot analysis of gC-1. 1~2. 3 short peptides

2.3 DEV-gC 糖蛋白抗原表位的第 3 轮筛选

短肽基因 gC-2.1-A~E 的表达与 Western blot 分析:各短肽片段经磷酸化退火后与 pET-32a(+) 表达载体连接,测序结果表明各编码序列正确。



M1. 蛋白质相对分子质量标准;1. Rosetta-pET-32a IPTG 诱导 4 h 后;2~6. Rosetta-pET-32a-gC-2.1-A~E IPTG 诱导 4 h 后;M2. ECL 曝光蛋白质相对分子质量标准;7. pET-32a 阴性对照;8. DEV-gC 阳性对照;9~13. gC-2.1-A~E 短肽的 Western blot 结果

M1. Protein marker;1. Rosetta-pET-32a induced with IPTG for 4h;2-6. Rosetta pET-32a-gC-2.1-A~E induced with IPTG for 4h;M2. ECL Protein Molecular Weight Marker;7. Negative control of pET-32a. 8. Positive control of DEV-gC; 9-13. Western blot analysis gC-2.1-A~E short peptides

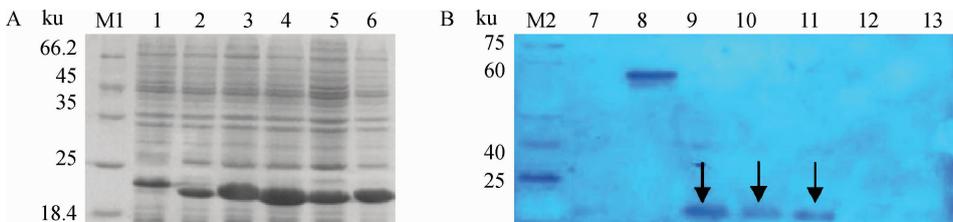
图 7 gC-2.1-A~E 基因 PCR 扩增及表达的蛋白与纯化的 SDS-PAGE 分析和 Western blot 鉴定

Fig. 7 PCR amplification of gC-1.1~2.3, SDS-PAGE and Western blot analysis of gC-2.1-A~E short peptides

2.4 DEV-gC 糖蛋白抗原表位的精确定位

短肽基因 gC-2.1-B-1~C-2 的表达与 Western blot 分析:短肽片段磷酸化退火后与表达载体连接,测序结果正确。SDS-PAGE 表明 gC-2.1-B-1~C-2

在 Rosetta 中获得了表达(图 8A)。Western blot 结果显示:gC-2.1-B-1, B-2, C-1 与 DEV 阳性血清产生特异性反应(图 8B),即 73-88 aa 为其优势抗原表位。



M1. 蛋白质相对分子质量标准;1. Rosetta-pET-32a IPTG 诱导 4 h 后;2~6. Rosetta-pET-32a-gC-2.1-B-1~C-2 IPTG 诱导 4 h 后;M2. ECL 曝光蛋白质相对分子质量标准;7. pET-32a 阴性对照;8. DEV-gC 阳性对照;9~13. gC-2.1-B-1~C-2 短肽的 Western blot 结果

M1. Protein marker;1. Rosetta-pET-32a induced with IPTG for 4 h;2-6. Rosetta-pET-32a-gC-2.1-B-1~C-2 induced with IPTG for 4 h;M2. ECL Protein Molecular Weight Marker;7. Negative control of pET-32a;8. Positive control of DEV-gC;9-13. Western blot analysis gC-2.1-B-1~C-2 short peptides

图 8 gC-2.1-B-1~C-2 基因 PCR 扩增及表达的蛋白与纯化的 SDS-PAGE 分析和 Western blot 鉴定

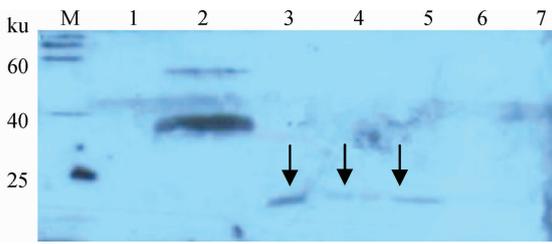
Fig. 8 PCR amplification of gC-1.1~2.3, SDS-PAGE and Western blot analysis of gC-2.1-B-1~C-2 short peptides

短肽 gC-2.1-B-1~E-2 表达蛋白应用鸭源 DEV 一次攻毒阳性血清的 Western blot 鉴定,结果显示:gC-2.1-B-1, B-2, C-1 与同样与鸭源 DEV 一次攻毒阳性血清产生特异性反应(图 9),即 73-88 aa 为其优势抗原表位。

2.5 DEV-gC 糖蛋白优势抗原表位的分析

根据“2.4”结果得出 DEV-gC 糖蛋白优势抗原

表位分布于 N 末端的第 73-88 氨基酸区域,氨基酸序列为“VDLLSPVEWNGMQYDP”。将 DEV-gC 基因与 GenBank 上发表的其他序列进行 BLAST 分析,结果显示本试验筛选出的抗原表位同其他公布序列的同源性在 95% 以上(图 9),即 DEV-gC 糖蛋白的 N 端基因序列高度保守。



M1. 蛋白质相对分子质量标准; 1. pET-32a 阴性对照; 2. DEV-gC 阳性对照; 3~7. gC-2, 1-B-1~C-2 短肽的 Western blot 结果

M1. Protein marker; 1. Negative control of pET-32a; 2. Positive control of DEV-gC; 3-7. Western blot analysis gC-2, 1-B-1~C-2 short peptides

图 9 gC-2, 1-B-1~C-2 表达的蛋白不同时间阳性血清 Western blot 鉴定

Fig. 9 Western blot analysis of gC-2, 1-B-1~C-2 short peptides with different times of positive serum

3 讨论

表位(epitope)是抗原分子中决定抗原特异性的特殊化学基团,它是 T 细胞抗原受体(T cell receptor,

TCR)和 B 细胞抗原受体(B cell receptor, BCR)及抗体特异结合的基本单位^[9]。严格来说,抗体的特异性是针对表位而不是针对完整的抗原分子的^[10]。因此,抗原表位不仅可以作为蛋白质抗原性研究的物质基础,同时也有利于病毒致病机理的研究、诊断试剂及表位疫苗的研制等。其中多表位疫苗的研究在 SARS-CoV 和结核病治疗方面具取得显著进展,不仅可以应用多个表位串联^[11],还可以插入免疫原性强的蛋白载体^[12]中,从而使表位疫苗更好地被呈现和识别。目前,DEV-gC 糖蛋白优势抗原表位区的研究仅处于预测阶段,具体的抗原表位区鉴定还没有报道^[13-14]。DEV-gC 糖蛋白是鸭肠炎病毒主要的囊膜蛋白之一。研究表明,DEV-gC 糖蛋白胞外区具有良好的抗原性,并且推测其能够刺激机体产生中和抗体并且引起机体 Th1 型的细胞免疫反应^[13]。因此,本试验选择 DEV-gC 糖蛋白作为目的蛋白进行优势抗原表位的筛选,为 DEV-gC 糖蛋白具体功能区的研究奠定基础。

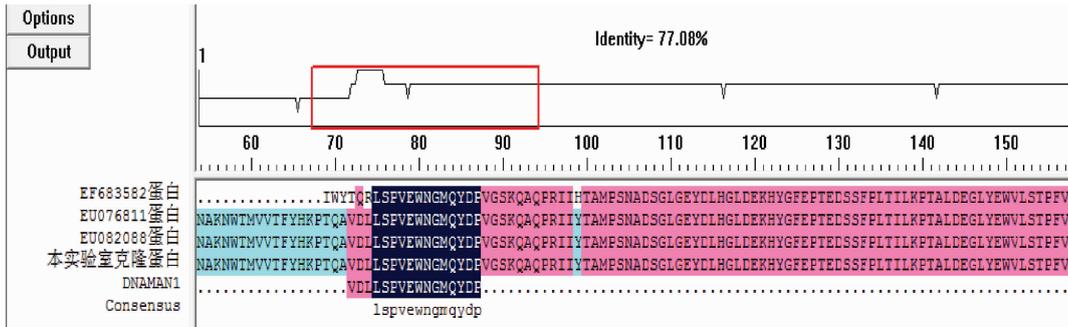


图 10 DEV-gC 氨基酸的比对

Fig. 10 Amino acid sequence of Glycoprotein C between four DEV strains

表位的筛选方法有很多,其中表位预测方法、合成肽库方法和表位作图方法较为常见。表位作图法以其技术成熟及易操作等优势得到了广泛的应用。表位作图法不仅可以检测免疫反应的特异性,还可以鉴定出结合特异性抗体的表位。本试验通过抗原表位作图法,利用 DNA 重组技术,实现了截短片段在大肠杆菌 Rosetta 表达系统中的融合表达,进而通过免疫印记法鉴定出 DEV-gC 糖蛋白的优势抗原表位。

2008 年刘峰源通过 DNASTAR 软件预测结果显示,gC 糖蛋白具有良好的抗原性,其中以区段 39-60、87-96、103-135、157-172、254-279、381-395 的抗原活性最高^[13]。本试验应用免疫的 DEV 阳性血

清,通过 Western blot 技术,筛选出的抗原表位位于 DEV-gC 糖蛋白第 73-88 氨基酸区域,这与预测结果有所偏差。推测其原因有可能是蛋白质抗原性预测方法中忽略了各个氨基酸之间的分子间作用力,从而没有真实地反映 DEV-gC 糖蛋白在引起机体免疫应答时的高级结构。因此软件预测结果只能作为潜在抗原表位优势区的参考,具体表位分布情况需要试验结果验证。本试验结果显示,鉴定出的表位抗原性与 DEV-gC 糖蛋白胞外区基本一致。因此,DEV-gC 糖蛋白优势抗原表位因其肽段短,易表达、纯化,易检测、包被等优势,可以广泛应用于抗原、抗体检测方法的建立及多表位疫苗的研究。

参考文献:

- [1] SANDHU T S, CALNEK B W, ZEMAN L. Pathologic and serologic characterization of a variant of duck hepatitis type I virus[J]. *Avian Dis*, 1992, 36 (4): 932-936.
- [2] 洪 健,周雪平. ICTV 第八次报告的最新病毒分类系统[J]. *中国病毒学*, 2006(1): 84-96.
- [3] 殷 震,刘景华. 动物病毒学[M]. 北京: 科学出版社, 1997: 1226.
- [4] HUEMER H P, WECHSELBERGER C, BENNETT A M, et al. Cloning and expression of the complement receptor glycoprotein C from Herpesvirus simiae (herpes B virus): protection from complement-mediated cell lysis. [J]. *J Gen Virol*, 2003, 84 (Pt 5): 1091-1100.
- [5] GRANDI P, FERNANDEZ J, SZENTIRMAI O, et al. Targeting HSV-1 virions for specific binding to epidermal growth factor receptor-vIII-bearing tumor cells. [J]. *Cancer Gene Ther*, 2010, 17(9): 655-663.
- [6] KAASHOEK M J, RIJSEWIJK F A, RUULS R C, et al. Virulence, immunogenicity and reactivation of bovine herpesvirus 1 mutants with a deletion in the gC, gG, gI, gE, or in both the gI and gE gene[J]. *Vaccine*, 1998, 16(8): 802-809.
- [7] SPEAR P G. Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry[J]. *Cell Microbiol*, 2004, 6 (5): 401-410.
- [8] HARLOW E, LANE D. 抗体技术实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 295.
- [9] BARLOW D J, EDWARDS M S, THORNTON J M. Continuous and discontinuous protein antigenic determinants[J]. *Nature*, 1986, 322 (6081): 747-748.
- [10] 周光炎. 免疫学原理[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2007: 348.
- [11] WANG X, XU W, TONG D, et al. A chimeric multi-epitope DNA vaccine elicited specific antibody response against severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus which attenuated the virulence of SARS-CoV in vitro[J]. *Immunol Lett*, 2008, 119 (1-2): 71-77.
- [12] GAO H, YUE Y, HU L, et al. A novel DNA vaccine containing multiple TB-specific epitopes casted in a natural structure (ECANS) confers protective immunity against pulmonary mycobacterial challenge [J]. *Vaccine*, 2009, 27(39): 5313-5319.
- [13] 刘峰源. 鸭肠炎病毒糖蛋白 gC 基因的克隆、表达及部分功能的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2008.
- [14] 徐 超. 鸭瘟病毒 gC 基因的发现、原核表达和应用研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2008.

(编辑 白永平)