

1 型鸭甲肝病毒 VP3 蛋白的抗血清中和活性分析及 B 细胞表位鉴定

沈友林^{1,2,3}, 汪铭书^{1,2,3*}, 程安春^{1,2,3}, 贾仁勇^{1,2,3}, 朱德康^{1,3}, 陈舜^{1,2,3},
刘马峰^{1,2,3}, 刘菲³, 杨乔^{1,2,3}, 孙昆峰^{1,2,3}, 陈孝跃^{1,3}

(1. 四川农业大学动物医学院禽病防治研究中心, 成都 611130; 2. 四川农业大学预防兽医研究所, 成都 611130;
3. 动物疫病与人类健康四川省重点实验室, 成都 611130)

摘要: 旨在探究 1 型鸭甲肝病毒(DHAV-1)VP3 蛋白抗血清的中和活性并鉴定 VP3 的线性 B 细胞表位。利用 pGEX-4T-1 表达载体, 在 BL21(DE3) 宿主菌中原核表达 DHAV-1 VP3 基因, 以切胶纯化出的蛋白质为抗原免疫兔制备多克隆抗体, 通过鸡胚中和试验对多抗的中和效价进行检测; 采用 Karplus & Schulz、Emini、Jameson-Wolf 和 Parker 方法分别对柔韧性、表面可及性、抗原性及亲水性进行分析, 得到了 4 条候选线性 B 细胞表位, 以制备的兔抗 VP3 多克隆抗体为一抗, 通过间接 ELISA 方法对人工合成的 B 细胞表位进行鉴定, 并进一步用临床鸭血清样品对鉴定的 B 细胞表位的抗体检测能力进行评估。结果显示, VP3 在 BL21(DE3) 中以包涵体形式表达, 大小约 54 ku, Western blot 分析表明重组蛋白质具有较好的反应原性。制备的兔抗 VP3 多克隆抗体的琼扩效价达到 1:16, 并能中和 DHAV-1, 中和效价为 1:39; 利用间接 ELISA 鉴定出 GKRKPCRRIHKPKNPPQEP(1—20 aa)、FNTGRYQMSWYPIADGEQSL(131—150 aa) 和 VNSSAPSNID(200—209 aa) 为 VP3 的 B 细胞表位, 抗体检测能力试验结果显示表位肽可检测临床 DHAV-1 鸭血清。本研究表明 DHAV-1 VP3 的抗血清具备一定的中和活性, 1—20 aa、131—150 aa 和 200—209 aa 为 VP3 的 B 细胞表位且具有临床应用前景。

关键词: 1 型鸭甲肝病毒; VP3 蛋白; 多克隆抗体; 中和活性; B 细胞表位

中图分类号: S858.325.3; S852.659.6

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2016)01-0141-08

Neutralizing Activity Analysis of VP3 Antiserums and B-cell Epitopes Identification of VP3 Protein from Duck Hepatitis A Virus Type 1

SHEN You-lin^{1,2,3}, WANG Ming-shu^{1,2,3*}, CHENG An-chun^{1,2,3}, JIA Ren-yong^{1,2,3}, ZHU De-kang^{1,3},
CHEN Shun^{1,2,3}, LIU Ma-feng^{1,2,3}, LIU Fei³, YANG Qiao^{1,2,3}, SUN Kun-feng^{1,2,3}, CHEN Xiao-yue^{1,3}

(1. Avian Disease Research Center, College of Veterinary Medicine,

Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China;

2. Preventive Veterinary Institute, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China;

3. Key Laboratory of Animal Disease and Human Health of Sichuan Province, Chengdu 611130, China)

Abstract: This study aimed at researching neutralizing activity of VP3 antiserums and determining B-cell epitopes of VP3 protein from duck hepatitis A virus type 1(DHAV-1). The pGEX-4T-1 expression plasmid was used to express VP3 gene of DHAV-1 in *E. coli* BL21(DE3). The expressed recombinant VP3 protein was purified by gel extraction and was used as immunogen to rabbit to prepare polyclonal antibodies. Chicken embryo neutralization test was conducted to detect the neu-

收稿日期: 2015-04-24

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划(2015BAD12B05); 国家现代农业(水禽)产业技术体系专项(CARS-43-8); 四川省创新团队项目(12TD005/2013TD0015)

作者简介: 沈友林(1989-), 男, 湖北当阳人, 硕士, 主要从事禽病学研究, E-mail: youlin_5151luck@sina.com

* 通信作者: 汪铭书, E-mail: mshwang@163.com

tralizing titer of polyclonal antibodies. Moreover, Karplus & Schulz, Emini, Jameson-Wolf and Parker method were used to analyze the flexibility, surface accessibility, antigenicity and hydrophilicity of the VP3 protein, respectively. This contributed to obtain four probable B-cell epitopes for VP3 protein. The rabbit anti-VP3 polyclonal antibody was used as the first antibody of indirect ELISA to identify the synthetic peptides. Furthermore, a panel of clinical duck serum samples was used to evaluate capacity of the identified B-cell epitopes for antibodies detection. The results showed that the recombinant VP3 protein was expressed as inclusion body in *E. coli* BL21(DE3) with a molecular weight about 54 kD, and proved to be with good reactogenicity by Western blot analysis. The prepared polyclonal antibodies reached an titer of 1 : 16 by AGP test, it could neutralize DHAV-1 and reached a titer of 1 : 39. Furthermore, the B-cell epitopes identified by indirect ELISA were GKRKPCRRPIHKPNPPQEP(1-20 aa), FNTGRYQMSWYPIADGEQSL(131-150 aa) and VNSSAPSNID(200-209 aa). The test for antibody detection ability revealed the epitopes were capable of detecting clinical duck antisera of DHAV-1. This study proved antisera to VP3 protein of DHAV-1 with neutralizing activity and identified VP3's three promising B-cell epitopes, 1-20 aa, 131-150 aa and 200-209 aa, for clinical use.

Key words: duck hepatitis A virus type 1; VP3 protein; polyclonal antibodies; neutralizing activity; B-cell epitopes

鸭病毒性肝炎(duck viral hepatitis, DVH)是一种发病快、传播迅速、高度接触性和高死亡率的重要传染病,它主要感染 4 周龄以下雏鸭,以肝肿大、出血为主要病变特征,严重制约着养鸭业的健康发展。引起 DVH 的病毒至少有 3 种,其中鸭甲肝病毒 1 型(duck hepatitis A virus type 1, DHAV-1)和新型鸭肝炎病毒(DHAV-2 和 DHAV-3)分别为鸭甲型肝炎病毒(DHAV)的三种基因型^[1],均为小 RNA 病毒科禽肝炎病毒属成员^[2],而鸭肝炎病毒 2 型(duck hepatitis virus 2, DHV-2)和 3 型(DHV-3)已经归为星状病毒科^[3]。DHAV-1 所致的鸭肝炎是分布最广,危害最大的,1 周龄内死亡率可超过 50%,甚至达到 95%^[4]。

DHAV-1 为单股正链小 RNA 病毒,由 RNA 和衣壳组成,没有囊膜。基因组只有一个开放阅读框(open reading frame, ORF),上下游分别连接 5' 非编码区(5' UTR)和 3' 非编码区(3' UTR)。基因组编码的 2A、2B、2C、3A、3B、3C 和 3D 七种非结构蛋白在病毒的复制和增殖中发挥作用;编码的 VP0 (VP4 和 VP2 共价相连)、VP3 和 VP1 三种结构蛋白组装形成衣壳,其中 VP1 和 VP3 位于衣壳表面,彼此空间结构非常相似。序列比对发现,VP1 有很多高度变异的区段^[5],这些区域大多暴露在外,使 VP1 成为主要的抗原蛋白^[6],而 VP3 的 N 端也有一段暴露的高变氨基酸序列^[7],提示 VP3 也有可能是决定抗原

性的主要蛋白质之一,有研究证明 VP3 具有抗原性^[8-9]。然而,VP3 的抗血清是否具有中和活性以及 VP3 蛋白的 B 细胞表位鉴定还未见报道。

作者用原核表达的 VP3 蛋白制备多克隆抗体,并对其抗体效价及中和活性进行分析,同时利用生物信息学工具,综合分析获得 VP3 可能存在的线性 B 细胞表位,以制备的多克隆抗体通过间接 ELISA 鉴定 VP3 蛋白的 B 细胞表位,这对了解 VP3 的抗原结构和免疫学活性,开发 DHAV-1 新型诊断试剂和疫苗都具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 实验材料及动物

DHAV-1 H 株病毒、DHAV-1 鸡胚化弱毒株(CH60 株)、DH5 α 、BL21(DE3)和 pGEX-4T-1 载体均由笔者所在实验室保存和提供;T 克隆载体 pMD19-T(Simple)购自宝生物工程(大连)有限公司。RNAiso Plus、2 \times PrimeStar Max Premix、DNA Maker、DNA Ligase Mix、限制性内切酶(*Bam*H I、*Xho* I)均购自宝生物工程(大连)有限公司;HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体购自北京中杉金桥;HRP 标记的兔抗鸭 IgG 抗体购自北京康碧泉,兔抗 DHAV-1 IgG 由本实验室制备保存。临床鸭血清样(可能含 DHAV-1 阳性或阴性血清)采自各地养殖场;2~3 kg 健康雄兔、9 日龄鸡胚购自本

地养殖场。

1.2 引物设计与合成

根据 GenBank 公布的 DHAV-1 H 株(JQ301467) 基因序列,利用 Primer Premier 5 和 Oligo 7 软件设计一对可以扩增覆盖 VP3 基因全长的特异性引物,上游引物 VP3F:5'-GGATCCGCAATGGACAAT-CAGGGAAAGAGA-3'(下划线所示为 BamH I 位点),下游引物 VP3R:5'-CTCGAGAAGACTGGCTA-ATCATCCCCTA-3'(下划线所示为 Xho I 位点),预期目的片段长度 774 bp。引物由 Invitrogen(上海)公司合成。

1.3 VP3 的表达、纯化及反应原性分析

按 RNAiso Plus 试剂的说明书提取病毒 RNA,反转录成 cDNA 后进行 PCR 扩增,胶回收目的片段并 T-A 克隆至 pMD19(Simple)载体,PCR 和酶切鉴定正确后命名为 pMD-VP3。BamH I 和 Xho I 分别酶切 pMD-VP3 和 pGEX-4T-1 载体,胶回收目的片段并连接,转化 DH5 α ,鉴定的阳性菌送 Invitrogen(上海)公司测序,阳性质粒命名为 pGEX-VP3。将 pGEX-VP3 转化 BL21(DE3)并表达,冰浴超声破碎菌体后离心,分别收集上清和沉淀进行 SDS-PAGE 检测。对 IPTG 浓度、诱导温度和时间进行摸索并以最优表达条件大量诱导表达。对纯化方式进行摸索,选择切胶方式并参考文献纯化目的蛋白质^[10]。重组蛋白质经 SDS-PAGE 后转移至 PVDF 膜,以免抗 DHAV-1 IgG(1:100)作为一抗,阴性兔血清作为对照,HRP 标记的羊抗兔 IgG(1:3 000)作为二抗,按常规方法进行 Western blot 检测。

1.4 兔抗 VP3 多克隆抗体的制备

将切胶纯化的目的蛋白与等量弗氏佐剂混合并乳化,按常规程序免疫兔(除二免、三免分别免疫 1 mg·只⁻¹和 0.7 mg·只⁻¹外,其余 0.5 mg·只⁻¹);分离血清,琼扩试验检测多抗效价。以重组蛋白质作为抗原,制备的多抗(1:100)作为一抗,HRP 标记的羊抗兔 IgG(1:3 000)作为二抗,Western blot 检测 VP3 多抗的反应性。

1.5 VP3 抗血清的中和活性分析

首先以 CH60 株(10^{-4} ~ 10^{-8} 稀释)接种 9 日龄鸡胚尿囊腔,常规方法测定 ELD₅₀,然后采用“固定病毒—稀释血清”法检测中和效价,具体如下:将多抗在 56 °C 处理 30 min 后进行 1:2~1:256 稀释,然后将 200 ELD₅₀ 的 CH60 株病毒液与各稀释度的多抗血清等体积混合,37 °C 作用 1 h 进行中和。将

中和液接种 9 日龄鸡胚尿囊腔,每个稀释度 5 枚,0.2 mL·枚⁻¹,37 °C 继续孵育,同时设空白对照(用灭菌生理盐水替代中和液,如上步骤操作,鸡胚须全部健活)和病毒对照(接种 100 EID₅₀·0.2 mL⁻¹ 的 CH60 株,鸡胚须全部死亡)。连续观察 5 d,记录死亡情况,Reed-Muench 法计算结果。

1.6 VP3 的 B 细胞表位鉴定

1.6.1 B 细胞表位的预测与合成 登录免疫信息学网站(<http://tools.immuneepitope.org>),采用 Karplus&Schulz、Emini 及 Parker 方法分别对 VP3 蛋白序列的柔韧性、表面可及性和亲水性进行分析。进一步结合 DNASTar 7.1 的 Protean 程序,利用 Jameson-Wolf 法预测抗原性,综合各因素预测得到 VP3 蛋白的线性 B 细胞表位。将上述多肽序列送吉尔生化(上海)公司合成,纯度>95%。

1.6.2 VP3 蛋白 B 细胞表位的鉴定 首先用纯化的 VP3 重组蛋白质(1:20~1:2 560 稀释)作抗原包被酶标板,100 μ L·孔⁻¹,4 °C 过夜;次日洗板 4 次,每次 5 min,拍干反应板(洗板过程下同);每孔加入 200 μ L 1%明胶溶液,37 °C 封闭 90 min;弃封闭液,洗板,拍干后 100 μ L·孔⁻¹加入 VP3 多克隆血清和阴性血清(分别作 1:80~1:5 120 稀释),37 °C 孵育 90 min;洗板,拍干,加入 1:3 000 稀释的 HRP-羊抗兔 IgG,100 μ L·孔⁻¹,37 °C 孵育 45 min;洗板,拍干,100 μ L·孔⁻¹加入 TMB 工作液,室温避光作用 10 min 后,50 μ L·孔⁻¹加入 2 mol·L⁻¹ H₂SO₄ 终止反应,用酶标仪以 450 nm 和 630 nm 双波长测定 OD 值。选择阳性孔的 OD 值 1.0 左右、阴性对照的 OD 值 0.1 左右的稀释度作为最佳抗原工作浓度。

以最佳抗原浓度稀释各表位肽,兔抗 VP3 多克隆抗体作为一抗(1:20~1:2 560 稀释)并平行设置阴性血清对照,HRP-羊抗兔 IgG(1:3 000)作为二抗,按上述条件进行间接 ELISA,做 3 个重复,450 nm 和 630 nm 双波长读数。

1.7 B 细胞表位在检测应用中的初步评估

分别以 VP3a 单肽、VP3a+VP3b+VP3c 混合肽和纯化的 VP3 蛋白作抗原,200 ng·孔⁻¹包被酶标板;取 10 份临床鸭血清样作 1:40 稀释,设立阴性鸭血清对照;以 HRP 标记的兔抗鸭 IgG(1:1 000)作为二抗,参照“1.6.2”的步骤进行检测。

2 结 果

2.1 VP3 目的基因的克隆与鉴定

对提取的病毒 RNA 进行 RT-PCR 扩增,结果

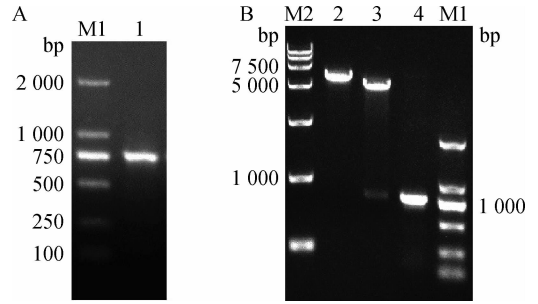
在约 750 bp 处得到了预期大小的条带(图 1A), 先后克隆至 pMD19-T(Simple)载体和 pGEX-4T-1 表达载体, 经菌液 PCR 和酶切鉴定得到预期大小的条带(图 1B)。送 Invitrogen(上海)测序, 对测序结果进行核苷酸序列比对, 结果显示载体中插入的基因片段大小为 774 bp, 并与原始片段相似性为 100%, 表明重组表达载体构建成功, 命名为 pGEX-VP3。

2.2 重组 VP3 蛋白的表达、纯化及反应原性分析

SDS-PAGE 结果表明, 重组 VP3 蛋白在阳性重组表达菌中得到表达(图 2A), 大小约 54 ku, 符合预期。表达条件优化结果显示, 以 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ IPTG、 37°C 诱导 8 h 时表达量最大, 且以包涵体形式存在。切胶纯化得到的目的蛋白质纯度较高(图 2B)。重组 VP3 蛋白能与兔抗 DHAV-1 IgG 特异性结合, 具有良好的反应原性(图 2C)。

2.3 多克隆抗体的制备

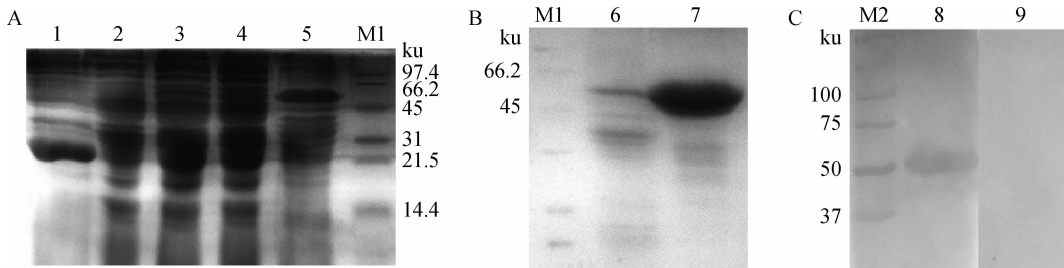
经过五免后的兔血清琼扩效价均达到 1 : 16,



M1. 2 000 bp DNA 相对分子质量标准; M2. 15 000 bp DNA 相对分子质量标准; 1. VP3 基因扩增产物; 2. pGEX-VP3 *Bam*H I 单酶切结果; 3. pGEX-VP3 的 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切结果; 4. pGEX-VP3 的 PCR 鉴定结果

图 1 VP3 基因的扩增(A)及重组表达质粒 pGEX-VP3 的 PCR、酶切鉴定(B)

Fig. 1 Amplification of VP3 gene (A), PCR and enzyme digestion identification of pGEX-VP3 recombinant plasmid (B)



M1. 蛋白质低相对分子质量标准; M2. 预染蛋白质相对分子质量标准; 1~5. 分别为空质粒诱导、重组质粒未诱导全菌、重组质粒诱导全菌、重组质粒诱导上清和重组质粒诱导沉淀; 6. 未纯化对照; 7. 纯化后蛋白质; 8. 重组 VP3 蛋白孵育兔抗 DHAV-1 抗体; 9. VP3 孵育阴性兔血清

M1. The low molecular weight protein standard; M2. Prestained protein standard; 1-5. The induced *E. coli* BL21 (DE3)(pGEX-4T-1), the uninduced *E. coli* BL21(DE3)(pGEX-VP3), the induced *E. coli* BL21(DE3)(pGEX-VP3), the supernatant of induced *E. coli* BL21(DE3)(pGEX-VP3), the sediments of induced *E. coli* BL21(DE3)(pGEX-VP3), respectively; 6. The unpurified proteins for control; 7. The purified protein; 8. The recombinant VP3 protein incubated with rabbit anti-DHAV-1 antibody; 9. VP3 incubated with negative rabbit serum

图 2 重组 VP3 蛋白表达形式分析(A)、纯化结果(B)和 Western blot 分析(C)

Fig. 2 Expression form (A), purification result (B) and Western blot (C) analysis of recombinant VP3 protein

对分离的血清进行 Western blot 分析, 结果显示制备的兔抗 VP3 多克隆抗能与重组 VP3 蛋白发生结合, 产生特异性印记, 与兔阴性血清则不能结合(图 3)。

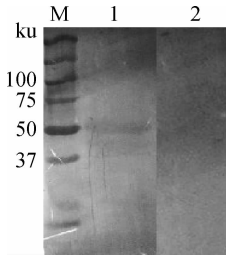
2.4 VP3 抗血清的中和活性分析

通过 Reed-Muench 法计算该批 CH60 病毒液的 ELD_{50} 为 $10^{-7.3} \cdot 0.2 \text{ mL}^{-1}$ 。用测过 ELD_{50} 的病毒液, 以“固定病毒-稀释血清”法进行鸡胚中和试验, Reed-Muench 法计算其中和效价为 1 : 39, 即 1 : 39 的血清可保护 50% 鸡胚不发生死亡。

2.5 VP3 蛋白 B 细胞表位的鉴定

2.5.1 B 细胞表位预测 综合生物信息学软件分析 VP3 蛋白序列的柔韧性(图 4A)、表面可及性(图 4B)、亲水性(图 4C)和抗原性(图 4D), 确定了 VP3 蛋白可能的 4 条 B 细胞表位序列: VP3a(¹GK-RKPCRRPIHKPKNPPQP²⁰)、VP3b(¹³¹FNTGR-YQMSWYPIADGEQSL¹⁵⁰)、VP3c(¹⁷⁷TTWRKST-RDPYG¹⁸⁸)和 VP3d(²⁰⁰VNSSAPSNID²⁰⁹)。由吉尔生化(上海)人工合成表位肽段。

2.5.2 B 细胞表位鉴定 按照方阵法, 确定了



M. 预染蛋白质相对分子质量标准;1. 重组 VP3 蛋白孵育兔抗 VP3 多抗;2. VP3 孵育阴性兔血清

M. Prestained protein marker; 1. The recombinant VP3 protein incubated with rabbit anti-VP3 polyclonal antibodies; 2. The VP3 incubated with negative rabbit serum

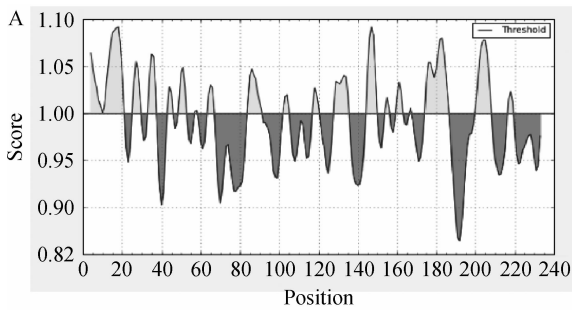
图 3 VP3 多抗的 Western blot 分析

Fig. 3 Western blot analysis of anti-VP3 polyclonal antibodies

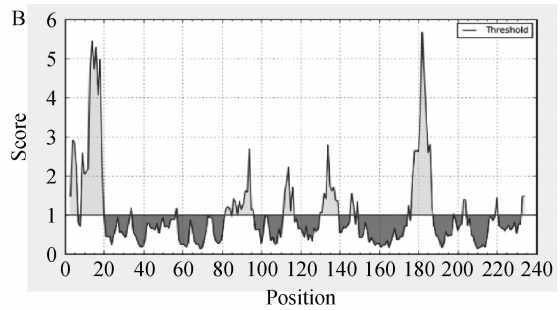
最佳抗原工作质量浓度为 $0.174 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ (1 : 1 280 稀释)。以该质量浓度包被各表位肽,以阴性血清组作为对照,进行间接 ELISA 检测,结果表明 VP3a ($^1\text{GKRKPCRRPIHKPKNPPQEP}^{20}$)、VP3b ($^{131}\text{FNTGRYQMSWYPIADGEQSL}^{150}$) 和 VP3d ($^{200}\text{VNSSAPSNI}^{209}$) 能与 VP3 多抗特异性结合,为 VP3 蛋白的 B 细胞表位(图 5)。

2.6 B 细胞表位检测应用潜力的初步评估

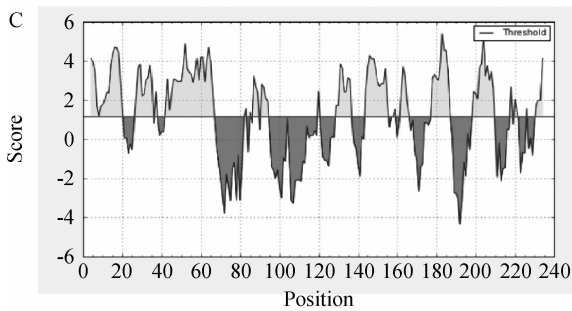
通过检测 10 份临床鸭血清,结果发现 VP3a 单肽及 VP3a+VP3b+VP3d 混合肽与 VP3 蛋白一样,可以区分不同 DHAV-1 抗体水平的鸭血清,而且对于检测结果反映的抗体水平高低的规律,三者是一致的。但 VP3a 单肽和 VP3a+VP3b+VP3d



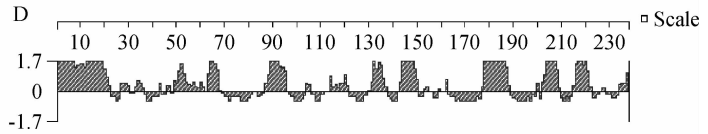
Average: 0.992 Minimum: 0.864 Maximum: 1.092



Average: 1.000 Minimum: 0.121 Maximum: 5.676



Average: 1.154 Minimum: -4.371 Maximum: 5.414



A. 柔性分析;B. 表面可及性分析;C. 亲水性分析;D. 抗原性分析

A. Flexible region;B. Surface property;C. Hydrophobicity plot;D. Antigen index

图 4 VP3 蛋白的柔性、表面可及性、亲水性及抗原指数分析

Fig. 4 Flexible region, surface property, hydrophobicity plot and antigen index analysis of VP3 protein

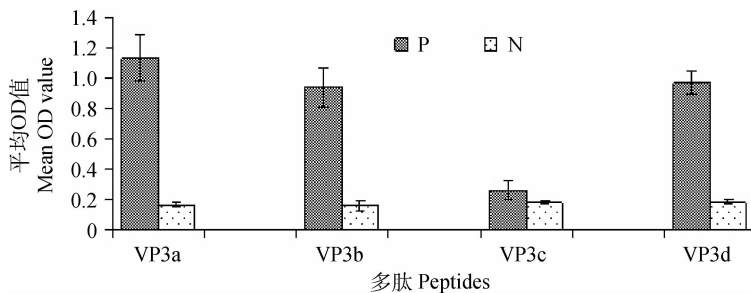


图 5 VP3 蛋白 B 细胞表位鉴定结果

Fig. 5 The result of B-cell epitopes identification for VP3 protein

混合肽分别作抗原的间接 ELISA 检测值(以下分别简称 VP3a 的值和混合肽的值)显著低于 VP3 全蛋

白作抗原的间接 ELISA 检测值,VP3a 的值与混合肽的值之间没有显著差异(图 6)。

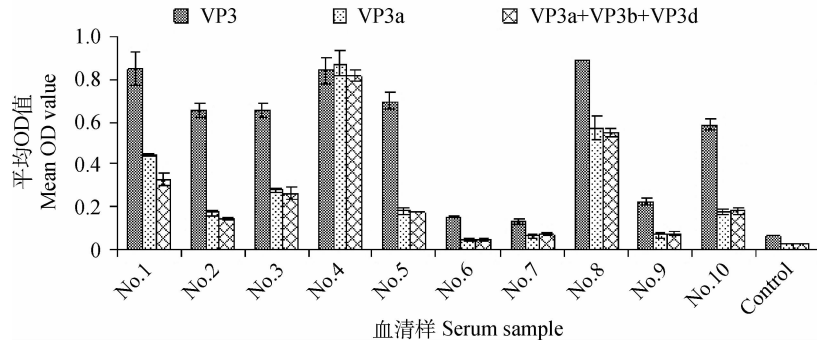


图 6 B 细胞表位肽与 VP3 蛋白在抗体检测中的对比分析

Fig. 6 Comparison analysis between VP3 protein and its B-cell epitopes in antibodies detection

3 讨论

目前对 DHAV 的研究主要集中于 VP1 蛋白^[11-15],它是公认的小 RNA 病毒最主要的抗原蛋白,对开发亚单位疫苗有重要意义。然而,VP3 也是重要的衣壳蛋白,和 VP1 一样位于病毒衣壳表面,其他小 RNA 病毒的研究表明 VP3 上存在大量 B 细胞和 T 细胞表位^[16-17],对抗原性有重要影响,但 DHAV VP3 的相关研究未见报道。

本研究表达的重组 VP3 蛋白能与兔抗 DHAV-1 抗体特异性结合,证明了其良好的反应原性。虽然 VP3 蛋白的反应原性已经被大量研究证实^[8-9,18],但其是否具有免疫原性以及其抗血清是否具有中和活性还不清楚,而中和活性是评价免疫保护力,进而评价疫苗潜力的重要指标,对其研究具有重要意义。对于小 RNA 病毒的 VP3 蛋白,目前只有禽脑脊髓炎病毒(avian encephalomyelitis virus)的 VP3 被证明是有免疫原性的^[19]。本研究通过鸡胚中和试验初步证明由 DHAV-1 VP3 激发机体所产生的抗体能够中和 DHAV-1,表明 VP3 具备开发亚单位疫苗的潜力。

B 细胞表位是位于抗原蛋白上能够被机体 B 淋巴细胞特异性识别的氨基酸序列,有线性 and 构象型之分,是体液免疫的直接诱因,对 B 细胞表位的鉴定有利于揭示体液免疫的本质,开发新型诊断试剂和安全、高效的表位疫苗。目前对线性 B 细胞表位的研究主要有单克隆抗体技术、噬菌体展示技术、裂解法、交互重叠多肽法、肽芯片高通量扫描法等^[20],随着生物信息学的发展,通过计算机软件预测线性

B 细胞表位成为简便、可靠的方法。本研究利用生物信息学软件综合分析,并通过间接 ELISA 方法检测表明,1—20 aa、131—150 aa 和 200—209 aa 能与兔抗 VP3 多抗产生免疫结合反应。1—20 aa 和 177—188 aa 是之前预测的 DHAV-1 VP3 的 B 细胞表位^[8-9],与 DHAV-1 亲缘关系最近的人类双埃柯病毒(human parechoviruses)VP3 的 N 端有一段暴露的碱性氨基酸富含区域,被证明是 B 细胞表位^[21],而 DHAV-1 的 VP3 在 N 端也有同样的结构特征^[5],暗示其也可能是 B 细胞表位,本研究对 1—20 aa 的鉴定证明了上述推测;然而 177—188 aa 在本研究中未得到验证,有可能预测的表位并非真实的 B 细胞表位,也可能它是隐蔽性表位。为了评估 VP3 蛋白 B 细胞表位在检测应用中的潜力,以鉴定出的 B 细胞表位肽和 VP3 蛋白分别作抗原,用间接 ELISA 检测了 10 份临床鸭血清样本,结果发现表位肽与 VP3 重组蛋白质一样可区分不同 DHAV-1 抗体水平的鸭血清,而 VP3 能用以检测 DHAV-1 抗体^[22],这表明表位肽同样具有检测 DHAV-1 抗体的潜力。本研究中,尽管表位肽也能识别 DHAV-1 血清,但反应原性不及 VP3 重组蛋白质强,可能是因为本研究中采用的是经优化后的 VP3 重组蛋白质的间接 ELISA 检测条件,没有另对表位肽检测 DHAV-1 抗体的条件进行优化;也有可能是表位肽相对分子质量太小,包被时未能很好地吸附到 ELISA 板上;还有可能 VP3 上包含了比本研究中更多的 B 细胞表位,这需要进一步研究确认。这也提示我们对 DHAV 表位诊断试剂及疫苗的研究需考虑多表位重叠或偶联载体等技术手段。由于目前尚无对 DHAV VP3 蛋白 B 细胞表位鉴定的报

道,也没有商品化的 DHAV 单克隆抗体,因此本试验以自制的兔抗 VP3 多克隆抗体为材料,采用间接 ELISA 方法鉴定 B 细胞表位,结果显示该方法是切实可行的。本研究为深入研究 DHAV-1 VP3 的抗原结构和免疫学功能提供了重要材料,并为今后 DHAV-1 新型诊断试剂和新型疫苗的研制带来启发。

4 结 论

制备的兔抗 VP3 多克隆抗体具有一定的中和活性,1—20 aa、131—150 aa 和 200—209 aa 为 VP3 蛋白的线性 B 细胞表位,初步证明 VP3 蛋白的 B 细胞表位具有检测 DHAV-1 抗体的潜力。

参考文献 (References):

- [1] WANG L, PAN M, FU Y, et al. Classification of duck hepatitis virus into three genotypes based on molecular evolutionary analysis [J]. *Virus Genes*, 2008, 37 (1): 52-59.
- [2] KING A M Q, ADAMS M J, CARSTENS E B, et al. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses; ninth report of the international committee on taxonomy of viruses [M]. San Diego: Elsevier, 2012: 855-880.
- [3] TODD D, SMYTH V J, BALL N W, et al. Identification of chicken enterovirus-like viruses, duck hepatitis virus type 2 and duck hepatitis virus type 3 as astroviruses [J]. *Avian Pathol*, 2009, 38(1): 21-30.
- [4] SWAYNE D E, GLISSON J R, MCDUGALD L R, et al. Diseases of poultry [M]. 13ed. Wiley & Sons, 2013: 422-431.
- [5] KIM M C, KWON Y K, JOH S J, et al. Molecular analysis of duck hepatitis virus type 1 reveals a novel lineage close to the genus Parechovirus in the family Picornaviridae [J]. *J Gen Virol*, 2006, 87 (Pt 11): 3307-3316.
- [6] JIN X, ZHANG W, ZHANG W, et al. Identification and molecular analysis of the highly pathogenic duck hepatitis virus type 1 in Hubei province of China [J]. *Res Vet Sci*, 2008, 85(3): 595-598.
- [7] 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 Res*, 2007, 123(2): 190-203.
- [8] 刘家森, 甘一迪, 姜 骞, 等. 鸭肝炎病毒 I 型 VP3 基因的克隆及原核表达 [J]. *中国兽医科学*, 2008, 38 (7): 587-590.
- [9] LIU J S, GAN Y D, JIANG Q, et al. Cloning and prokaryotic expression of VP3 gene of duck hepatitis virus type I [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2008, 38 (7): 587-590. (in Chinese)
- [9] 廖俊伟, 张小飞, 黄显明, 等. I 型鸭肝炎病毒 VP3 基因的克隆与原核表达 [J]. *动物医学进展*, 2009, 30 (7): 49-52.
- LIAO J W, ZHANG X F, HUANG X M, et al. Cloning and prokaryotic expression of VP3 gene of duck hepatitis virus type I [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2009, 30(7): 49-52. (in Chinese)
- [10] 高慎阳, 查恩辉, 王 坤, 等. 一种“高性价比”切胶纯化原核表达蛋白的方法 [J]. *中国农学通报*, 2010, 26 (22): 24-26.
- GAO S Y, ZHA E H, WANG K, et al. A ‘Cost-Effective’ method for purification of prokaryotic expression proteins in gel slices [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2010, 26(22): 24-26. (in Chinese)
- [11] LIU M, ZHANG T, ZHANG Y, et al. Development and evaluation of a VP1-ELISA for detection of antibodies to duck hepatitis type 1 virus [J]. *J Virol Methods*, 2010, 169(1): 66-69.
- [12] LI C, CHEN Z, MENG C, et al. High yield expression of duck hepatitis A virus VP1 protein in *Escherichia coli*, and production and characterization of polyclonal antibody [J]. *J Virol Methods*, 2013, 191(1): 69-75.
- [13] ZHANG T, LI X, WU X, et al. Characterization of monoclonal antibodies against duck hepatitis type 1 virus VP1 protein [J]. *J Virol Methods*, 2014, 208: 166-170.
- [14] WANG C, LI X K, WU T C, et al. Recombinant VP1 protein of duck hepatitis virus 1 expressed in *Pichia pastoris* and its immunogenicity in ducks [J]. *Acta Virol*, 2014, 58(4): 333-339.
- [15] 杨发龙, 张焕荣, 程方明, 等. 基于基因 C 型鸭甲肝病毒 VP1 重组蛋白的鸭甲肝病毒抗体 ELISA 检测方法的建立 [J]. *畜牧兽医学报*, 2014, 45 (7): 1148-1153.
- YANG F L, ZHANG H R, CHENG F M, et al. Development of an indirect ELISA for detecting antibodies against genotype A and C duck hepatitis A virus based on recombinant VP1 protein [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2014, 45(7): 1148-1153. (in Chinese)
- [16] ZHANG Z W, ZHANG Y G, WANG Y L, et al.

- Screening and identification of B cell epitopes of structural proteins of foot-and-mouth disease virus serotype Asia1[J]. *Vet Microbiol*, 2010, 140(1-2): 25-33.
- [17] YAUCH R L, KEREEKES K, SAUJANI K, et al. Identification of a major T-cell epitope within VP3 amino acid residues 24 to 37 of Theiler's virus in demyelination-susceptible SJL/J mice[J]. *J Virol*, 1995, 69(11): 7315-7318.
- [18] 李 露, 程英杰, 李传峰, 等. I 型鸭肝炎病毒 VP3 基因的克隆及原核表达[J]. *中国畜牧兽医*, 2013, 40(10): 33-37.
- LI L, CHENG Y J, LI C F, et al. Cloning and prokaryotic expression of VP3 gene of duck hepatitis virus I [J]. *Chinese Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2013, 40(10): 33-37. (in Chinese)
- [19] 徐建生, 唐 波, 成大荣, 等. 禽脑脊髓炎病毒结构蛋白 VP3 基因真核表达载体的构建及其免疫[J]. *中国兽医学报*, 2006, 26(4): 367-368, 372.
- XU J S, TANG B, CHENG D R, et al. Construction and immunization of recombinants of the structural protein VP3 gene of avian encephalomyelitis virus[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2006, 26(4): 367-368, 372. (in Chinese)
- [20] 郭春艳, 赵向绒, 胡 军. B 细胞抗原表位的研究进展及其应用[J]. *生物技术通讯*, 2013, 24(2): 266-270.
- GUO C Y, ZHAO X R, HU J. Research and application of B cell epitope[J]. *Letters in Biotechnology*, 2013, 24(2): 266-270. (in Chinese)
- [21] JOKI-KORPELA P, ROIIVAINEN M, LANKINEN H, et al. Antigenic properties of human parechovirus 1 [J]. *J Gen Virol*, 2000, 81(Pt 7): 1709-1718.
- [22] SHEN Y, CHENG A, WANG M, et al. Development of an indirect ELISA method based on the VP3 protein of duck hepatitis A virus type 1 (DHAV-1) for dual detection of DHAV-1 and DNAV-3 antibodies[J]. *J Virol Methods*, 2015, 225: 30-34.

(编辑 白永平)