

C 型口蹄疫病毒衣壳蛋白前体 P1 基因的原核表达及其生物活性的初步分析

常惠芸¹,丛国正¹,独军政¹,邵军军¹,林 彤¹,冯金瑞¹,刘 萍^{1,2}

(1. 中国农业科学院 兰州兽医研究所,家畜疫病病原生物学国家重点实验室,农业部畜禽病毒学重点开放实验室,国家口蹄疫参考实验室,甘肃 兰州 730046;2. 中农威特生物科技股份有限公司,甘肃 兰州 730046)

摘要:将口蹄疫病毒(FMDV)结构蛋白基因 P1 的完整 cDNA 序列插入原核表达性载体 pET-28 (+) 中,获得融合表达质粒 pET-P1,转化 *E. coli* BL21 (DE3),经 IPTG 诱导,SDS-PAGE 结果表明,pET-P1 获得融合表达,Western Blot 检测证实表达的融合蛋白具有免疫活性,表达产物主要以包涵体的形式存在,进一步采用纯化试剂盒纯化 P1 蛋白做为诊断抗原。

关键词:C 型口蹄疫病毒;重组蛋白 P1;表达生物活性

中图分类号:Q785 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2009)05-0007-04

Expression of the Capsid:Precursor Polypeptide P1 of Foot-and-mouth Disease Virus Type C and Analysis of Its Biology Activity

CHANG Hui-yun¹, CONG Guo-zheng¹, DU Jun-zheng¹, SHAO Jun-jun¹,
LIN Tong¹, FENG Jin-rui¹, LIU Ping^{1,2}

(1. State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, Key Laboratory of Animal Virology Ministry of Agriculture, National Foot-and-mouth Disease Reference Laboratory, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, China;
2. China Agricultural Veterinary Biological Science and Technology Co., Ltd, Lanzhou 730046, China)

Abstract: The complete gene encoding the structural protein of FMDV (P1) was subcloned into expression vector pET-28 (+), resulting in the fusion expression plasmid pET-P1. After transformed into *E. coli* (DE3) and induced by IPTG, the results of SDS-PAGE showed that the fusion protein was expressed in high level. The molecular weight of the fusion protein was 85 kDa and the expressed products were significant at inclusion body. Western blotting was performed to confirm that the expressed fusion protein could specifically react with antiserum against FMDV. The fusion protein were further purified and vaccinated antigen based on the purified protein was developed.

Key words: FMDV type C; Recombinant P1; Expression biology acting

口蹄疫(Foot-and-mouth disease FMD)是由口蹄疫病毒(Foot-and-mouth disease virus FMDV)引起的危害最严重的家畜传染病之一,牛、猪等偶蹄动物感染后会迅速传播,大面积感染引起死亡而造成严重的经济损失;另外疫情的流行也严重影响了肉类产品的国际贸易,因此,国际兽医局将该病列为 A 类传染病^[1,2]。

口蹄疫病毒颗粒包括衣壳和 RNA 两部分,衣壳

由 VP1、VP2、VP3 和 VP4 等 4 种结构蛋白各 60 个分子组成。4 种结构多肽都具有免疫原性。P1 编码决定结构蛋白,由 P1 基因编码的病毒抗原和株型,是研究分子流行病学,毒株演化关系和基因工程疫苗的基础,同时也是研究口蹄疫基因检测方法的基础^[3,4]。

大多发达国家通过扑杀感染或未被感染的动物来控制该病的发生。然而,在发展中国家多数采取

收稿日期:2009-07-11

基金项目:国家科技支撑计划项目(2006BAD06A14)

作者简介:常惠芸(1964-),女,河南许昌人,博士,研究员,主要从事分子病毒学方面的研究。

适当的诊断和常规疫苗接种来预防。常规的灭活疫苗在生产过程中由于利用组织毒或灭活不彻底,存在散毒的危险;研究表明,用口蹄疫病毒结构蛋白 P1 在大肠杆菌中表达产物来免疫动物,取得良好的效果,其中对 O 型、Asian 1 型 FMDV 研究较多,与其他几种血清型 FMDV 相比,C 型 FMDV 研究较少^[5]。C 型 FMD 流行范围虽然少,但亚洲仍然存在,有传入我国的可能。目前有关 C 型 FMDV 血清诊断试剂及疫苗还未见报道。鉴于 C 型 FMDV 对畜牧业存在潜在的威胁以及一旦暴发引起的国际声誉等一系列问题,笔者认为有必要对 C 型 FMDV 进行研究,以防止 C 型 FMDV 传入我国。本试验研究以大肠杆菌作为表达系统来表达 FMDV P1,具有良好的免疫原性,为今后 P1 基因工程疫苗的研制提供了基础,这对口蹄疫的控制与防疫都有重要意义。

1 材料和方法

1.1 病毒株

C 型鼠源口蹄疫病毒,原始毒株号为 AV104 (L),由前苏联中监所保存,1958 年引进兰州兽医研究所国家口蹄疫参考实验室(以下称本室)保存。

1.2 质粒和工程菌

质粒 pGEM-T Easy vector 为 Promega 公司产品,表达载体 pET-28 (+) 为 Invitrogen 公司产品;大肠杆菌 BL21 (DE3), DH5a 由本室保存。

1.3 主要试剂

Rneasy Mini Kit 购自 Qiagen 公司;AMV 反转录酶购自 Invitrogen; dNTP、Taq DNA 聚合酶、IPTG、Agarose Gel DNA 回收试剂盒和质粒快速提取试剂盒均购自大连宝生物工程有限公司; BamH¹、Sal¹ 限制性内切酶购自 Biolabs 公司; C 型 FMDV 阳性血清由本室保存,辣根过氧化物酶标记兔抗牛 IgG 购自 Sigma 公司; Ni-NTA His. Bind Resins 蛋白质纯化试剂盒购自 Invitrogen 公司;其他试剂均为分析纯。

1.4 PCR 引物

参照基因库已发表的 C 型口蹄疫病毒基因序列,用 Oligo5.0 软件设计了 2 对目的片段包含 P1 基因在内的特异性引物:

P1 (1) :5'-GAC ATG TCC TCC TGC ATC TG-3

P1 (2) :5'-ACC TCC RAC GGG TGT ATC GC-3

P1 (3) :5'-ATGGATCCGGCGCCGGGCAATCAAGC-3 (BamH¹) (26nt)

P1 (4) :5'-AGGTCGACGTA GAA GCTGCTTCGCGGG-3 (Sal¹) (26nt)

由大连宝生物工程有限公司合成。

1.5 FMDV P1 基因的 RT-PCR

参照 Rneasy Mini Kit 说明提取 RNA,以 P1 (2) 为引物,在 AMV 反转录酶作用下合成 FMDV P1 基因的 cDNA。以上述产物为模板,以 P1 (1)、P1 (2) 为引物,按照常规方法扩增 P1 基因,反应条件:94 预变性 3 min;94 变性 40 s,50 退火 90 s,72 延伸 90 s,循环 30 次;72 延伸 10 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.6 FMDV P1 基因的克隆与鉴定

凝胶回收试剂盒回收 PCR 产物,在 T₄ DNA 连接酶作用下,将 PCR 产物连接到 pGEM-T Easy 载体,连接产物转化大肠杆菌 DH5a 感受态细胞。用 PCR 筛选阳性 pGEM-P1 重组质粒,阳性菌液送往大连宝生物工程有限公司测序鉴定。

1.7 重组表达质粒 pET-P1 的构建及鉴定

以测序正确的 pGEM-P1 为模板,以 P1 (3)、P1 (4) 为上下游引物,按照 1.5 的条件扩增、检测目的片段 P1。用 BamH¹、Sal¹ 限制性内切酶消化的 P1 基因与消化的 pET-28 (+) 质粒连接,转化子 pET-P1 分别用 PCR、酶切进行阳性筛选。

1.8 重组蛋白的表达和制备

将重组质粒 pET-P1 转化 *E. coli* BL-21 (DE3),按 1:100 比例将阳性菌种接种含相应抗性的 LB 培养基中,至 OD₆₀₀ 值达到 0.6~1.0 时分别加入终浓度为 0.5,1.0,1.5,2.0 mmol/L 的 IPTG,将诱导 5 h 菌液离心,沉淀用 PBS 悬浮,超声波裂解,离心,将上清与沉淀分别保留,以 SDS-PAGE 电泳判定表达蛋白的存在形式,通过凝胶薄层扫描测定表达的融合蛋白量。

1.9 Western 印迹分析

将 SDS-PAGE 凝胶电泳的蛋白带转移到硝酸纤维素膜上,用含有 0.5%BSA 的 PBST 封闭 2 h,以 C 型 FMDV 阳性血清为一抗,HRP 标记的兔抗牛 IgG 为二抗,DAB 显色。

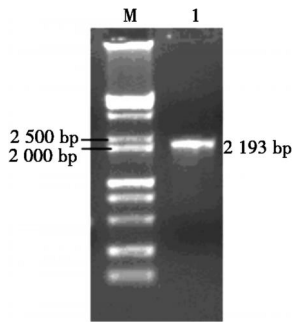
1.10 重组蛋白的纯化

将诱导表达的菌体,加入 10 mL 37 预热 6 mol/L 的盐酸胍裂解缓冲液重悬沉淀,按 His. tag 蛋白纯化试剂盒说明书进行纯化。

2 结果与分析

2.1 FMDV P1 基因的 RT-PCR 扩增

以提取 RNA 反转录所得 cDNA 为模板进行 PCR,其产物经琼脂糖电泳,在约 2 193 bp 出现特异性条带,大小与预期相符(图 1)。测序结果表明,与基因库检索的口蹄疫病毒 P1 基因同源性达 94% 以上。



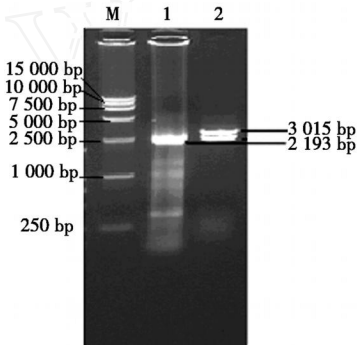
1. *PI* 基因的 RT-PCR 产物;M. DNA 分子质量标准。
1. PCR product of *PI* gene;M. DL2000 + 15000 DNA Marker.

图 1 *PI* 基因 PCR 产物的电泳结果

Fig.1 PCR product of *PI* gene

2.2 重组表达质粒 pET-PI 的鉴定

以质粒 pGEM-PI 为模板,扩增的 *PI* 基因亚克隆到 pET-28 (+) 质粒中,通过 *Sal* a + *Bam*H 双酶切出现大小约 2.0 kb 和 3.0 kb 带,以及 PCR 结果证实,大小与预期结果相符,证实表达质粒构建正确(图 2)。



1. pET-PI 的 PCR 产物;2. pET-PI 的酶切产物;M. DNA 分子质量标准。
1. PCR product of *PI* gene;2. *Sal* and *Bam*H digested;M. *Eco*R -T14 Marker.

图 2 重组质粒 pET-PI 酶切和 PCR 鉴定

Fig.2 Identification of the recombinant plasmid

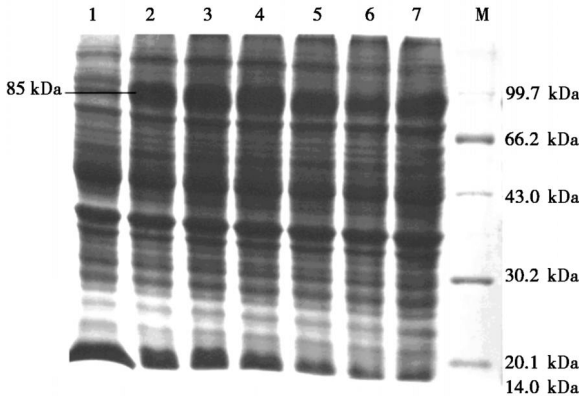
2.3 FMDV PI 表达产物的检测

将含有原核重组表达质粒的 *E. coli* BL21 (DE3) 基因工程菌进行 IPTG 诱导表达,取诱导不同时间段的重组菌裂解产物进行 SDS-PAGE 分析,结果表明,在 85 kDa 处出现特异性条带(图 3)。经凝胶薄层扫描分析,目的蛋白占菌体总蛋白的 35 %左右。经超声破碎的菌液,分别收集上清和沉淀并进行 SDS-PAGE 检测,结果表达的融合蛋白主要在沉淀中,表明目的蛋白在大肠埃希氏菌中以包涵体的形式存在。

2.4 表达产物的活性分析及融合蛋白的纯化

将 SDS-PAGE 电泳胶,转移硝酸纤维素膜,用 C 型 FMDV 阳性血清对 *PI* 融合蛋白进行 Western blot,结果约 85 kDa 处与 C 型 FMDV 阳性血清发生特异反应,表明表达产物具有良好的反应原性(图 4)。利用镍离子亲和树脂对其纯化后,目的蛋白的纯化

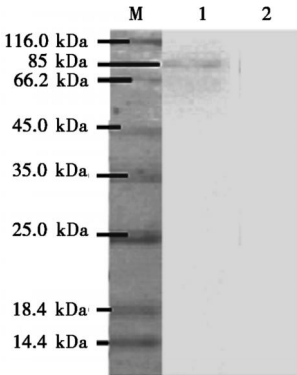
达 95 %。



1. T28a 诱导产物;2~7. 诱导产物;M. 蛋白质分子质量标准。
1. Product of pET28a induced;2 - 7. Induced recombinant plasmid;
M. Protein Marker.

图 3 *PI* 基因 SDS PAGE 检测结果

Fig.3 SDS PAGE analysis of the expressed product of *PI*



M. 蛋白质分子质量标准;1. *PI* 基因的分析结果;2. 空白对照。
M. Protein Marker;1. Product of *PI* Western blotting;2. Control of negative.

图 4 重组蛋白 *PI* Western blotting 分析

Fig.4 The results of Western blotting analysis

3 讨论

口蹄疫在世界各地都有发生的可能,造成巨大经济损失,各国都在加紧研究预防疫苗和防治措施,尤其是对基因工程疫苗的研究。本研究中,我们在原核表达系统中尝试表达 FMDV *PI* 蛋白,经 Western blot 检测,发现表达产物有很好的免疫活性,进一步将表达产物经超声波处理,SDS-PAGE 检测融合蛋白主要以包涵体形式存在,将重组蛋白纯化,纯化的蛋白为下一步研究口蹄疫病毒的基因工程疫苗和检测方法奠定基础。

研究表明,*PI* 裂解后组装成的空衣壳保留了感染性病毒粒子的免疫原性和抗原性,能够诱导类似于全病毒的抗病毒免疫反应,因此利用 *PI* 作为免疫原基因有很好的应用前景^[6]。Sanz 等^[7]将重组表达的 FMDV *PI* 蛋白免疫猪,产生较高细胞免疫滴度;余晓岚等^[8]将大肠杆菌中表达的 O 型 FMDV *PI*

产物作为 ELISA 诊断抗原,总的检测率达 87%,说明具有较高的特异性和反应活性。本试验构建的质粒包含衣壳蛋白正确表达、加工的必需序列,其中 P1 带有 B、T 细胞表位以确保刺激产生和完整病毒粒子相似的体液免疫和细胞免疫。研究表明,缺乏核酸但包含病毒抗原蛋白的衣壳,不仅能诱导机体产生免疫反应,且这些衣壳能诱导与完全病毒粒子相同的特异性中和抗体,这可能是病毒衣壳和完全病毒粒子都具有中和抗体的主要靶目标,即两者都有相似的抗原性,因此,空衣壳对于研究重组疫苗是一个较好的方向^[9,10]。

试验中,FMDV P1 表达蛋白主要以包涵体的形式存在,这是由于表达蛋白部分折叠或错误折叠造成的。包涵体中除目的蛋白外,还有其他宿主菌蛋白质、核酸、脂质以及糖类等,这些物质的存在,会影响目的蛋白复性的效果。因此复性之前必须将这些杂质降至最低。笔者在试验中选用原核表达载体 pET-28(+),是一种融合表达载体,具有强启动子 T7 Lac,载体序列的 N 端编码 6 个组氨酸残基,利用 His-Tag 与 Ni 离子的亲和作用,采用树脂进一步分离与纯化重组蛋白,大大提高了反应的敏感性和特异性。P1 蛋白的纯化为今后 P1 蛋白成为抗原制备疫苗或用来做检测方法都奠定坚实的基础,这对口蹄疫的防治和控制都有着重要意义^[11]。

本试验中,尽管 P1 蛋白在大肠杆菌中的得到高效表达,但纯化蛋白的过程繁琐,条件掌握难度大,且回收的经济成本低。因此探讨一种更简单、廉价的表达系统,得到较高纯度重组蛋白以及研究其理化性质,重组蛋白的稳定性等方面是下一步研究工作的重点。

参考文献:

- [1] Saiz M, Nune J I, Jimenez M. Foot-and-mouth disease virus biology and prospects for disease control[J]. *Microbes Infect*, 2002, 4(1): 1103 - 1192.
- [2] Ling Jie-yu, Liu Zhao, Tong Tie-zhu. Construction and eukaryotic expression of recombinant plasmid encoding fusion protein of goat complement C3d and foot and mouth disease virus VP1[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2008, 24(2): 209 - 213.
- [3] 周建华, 丛国正, 高闪电. 口蹄疫病毒株 OA/58L 蛋白酶的结构构建和功能分析[J]. *华北农学报*, 2007, 22(4): 176 - 179.
- [4] Li Yan-min, Catrina M A, Stirling Michael S Denyer. Dramatic improvement in FMD DNA vaccine efficacy and cross-serotype antibody induction in pigs following a protein boost[J]. *Vaccine*, 2008, 26: 2647 - 2656.
- [5] Balamurugan V, Renji R, Ana S N, et al. Protective immune response of the capsid precursor polypeptide (P1) of foot and mouth disease virus type O produced in pichia pastoris[J]. *Vaccine*, 2003, 21: 141 - 149.
- [6] 潘丽, 张永光, 王永录, 等. 口蹄疫结构蛋白 P1-2A 及蛋白酶 3C 基因的转基因番茄对豚鼠免疫反应的初步研究[J]. *病毒学报*, 2006, 22(4): 297 - 303.
- [7] Sanz Parra A, Jimenez Clavero M A, Garc Briones M M, et al. Recombinant virus expression the foot-and-mouth disease virus capsid precursor polypeptide P1 induce cellular or not humoral antiviral immunity and partial protection in pigs[J]. *Virology*, 1999, 259: 129 - 134.
- [8] 余晓岚, 肖少波, 方六荣, 等. 口蹄疫病毒 P1 基因在大肠杆菌中的高效表达及其生物活性的初步分析[J]. *生物工程学报*, 2005, 21(1): 163 - 167.
- [9] Sanz A, Vazquez B, Sobrino F, et al. Evidence of partial protection against foot-and-mouth disease in cattle immunized with a recombinant adenovirus vector expressing the precursor polypeptide (P1) of foot-and-mouth disease virus capsid protein[J]. *Gen Virol*, 1999, 80(3): 671 - 679.
- [10] 周建华, 丛国正, 高闪电, 等. 口蹄疫 OA/58 病毒株 CP2 蛋白结构模拟与 B 细胞抗原原表位的分析[J]. *华北农学报*, 2008, 23(3): 5 - 8.
- [11] Berinstein A, Taboga, Smitsaart E, et al. Protective immunity against foot-and-mouth disease virus induced by a recombinant vaccinia virus[J]. *Vaccine*, 2000, 18: 2231 - 2238.