

O 型口蹄疫病毒 VP1 蛋白的原核表达及功能鉴定

杨苏珍^{1,2}, 张改平¹, 鲍登克^{1,2}, 乔松林^{1,2}, 万 博^{1,2}, 樊剑鸣¹, 职爱民¹, 李学伍¹

(1. 河南省农业科学院 河南省动物免疫学重点实验室, 河南 郑州 450002; 2. 河南农业大学 牧医工程学院, 河南 郑州 450096)

摘要:为获得具有免疫原性的 FMDV VP1 蛋白, 以 O 型 FMDV 重组质粒 PMD18T-VP1 为模板, 利用 PCR 技术扩增得到 O 型 FMDV VP1 基因片段, 将此基因片段与原核表达载体 pET32a 连接, 构建重组表达载体, 命名为 pET-VP1, 经 PCR 和测序鉴定后, 用 IPTG 诱导表达, 收集诱导的菌液进行 SDS-PAGE 电泳和 Western-Blot 分析。结果显示, 在分子量约为 45 ku 处有 1 条明显的蛋白条带, 且能被口蹄疫阳性血清识别, 表达产物通过包涵体纯化后用透析法复性; ELISA 检测结果显示, 所复性的蛋白具有较高的活性。结果表明, FMDV VP1 蛋白在大肠杆菌中得到高效表达, 为开发诊断制剂和疫苗的研制打下基础。

关键词:口蹄疫病毒; VP1 基因; 原核表达; 蛋白复性

中图分类号: Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2009)06-0011-04

Prokaryotic Expression and Activity Analysis of VP1 Gene of Foot-and-Mouth Disease Virus Serotype O

YANG Su-zhen^{1,2}, ZHANG Cai-ping¹, BAO Deng-ke^{1,2}, QIAO Song-lin^{1,2},
WAN Bo^{1,2}, FAN Jian-ming¹, ZHI Ai-min¹, LI Xue-wu¹

(1. Henan Provincial Key Laboratory of Animal Immunology, Henan Academy of Agriculture Sciences, Zhengzhou 450002, China; 2. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450096, China)

Abstract: The objective of this research is to get the FMDV VP1 protein which be of antigenancy activity. The recombinant expression vector pET-VP1 was constructed by cloning VP1 gene of FMDV into the prokaryotic expression plasmid pET32a from PMD18T-VP1. After the recombinant plasmid was verified by PCR and sequenced analysis, the result showed that VP1 gene was successfully cloned into expression plasmid pET32a. The protein corresponding to the VP1 gene was expressed after induction with IPTG. SDS-PAGE and Western-blot with the product of bacterial culture in different time showed that the molecular mass of the protein was approximately 45 ku, which was identified by positive sera of FMDV. The protein was refolded by dialysis method, and was assayed by ELISA, the result showed that it demonstrates high activity. So we can say that VP1 protein was expressed efficiently in *E. coli*, and the renaturation VP1 protein can be developed as diagnosis antigen or vaccine.

Key words: FMDV; VP1 gene; Prokaryotic expression; Protein renaturation

口蹄疫 (Foot-and-mouth disease, FMD) 是由口蹄疫病毒 (Foot-and-mouth disease virus, FMDV) 引起牛、猪、羊等多种偶蹄动物感染的一种高度接触性传染病。由于该病传播迅速、发病率高, 往往造成大流行, 并造成巨大的经济损失, 因此国际兽疫局 (OIE) 将其列为 A 类传染病首位^[1]。我国流行的主要是 O

型口蹄疫。FMDV 属于 RNA 病毒, 病毒粒子含单股正链 RNA 和衣壳蛋白 2 部分, 无囊膜^[2]。衣壳含有 4 种结构蛋白, 分别为 VP1、VP2、VP3 和 VP4, 其中 VP1 蛋白上存在主要的抗原位点, 能诱导感染动物产生中和抗体, 它暴露于病毒颗粒的表面, 易发生变异, 在分子流行病学调查、疫源追踪、毒株型与亚型分

收稿日期: 2009-09-11

基金项目: 国家“863”计划 (2007AA100606)

作者简介: 杨苏珍 (1980-), 女, 河南开封人, 在读博士, 主要从事微生物与免疫学研究。

通讯作者: 张改平 (1960-), 男, 河南内黄人, 研究员, 博士生导师, 主要从事动物免疫学及动物疫病快速诊断研究。

析、基因工程疫苗研制等方面具有较重要的学术价值和现实意义^[3,4]。本试验运用基因工程方法表达 O 型口蹄疫病毒 *VP1* 基因,将表达产物纯化、复性处理后代替传统的病毒抗原,建立具有较好重复性、特异性、灵敏性的 ELISA 方法,用于检测血清中的口蹄疫病毒抗体水平,旨在为开发安全、高效、广谱的新型基因工程疫苗提供依据。

1 材料和方法

1.1 试剂

Ex *Taq* DNA 聚合酶、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa,表达载体 pET32a 和 BL21 (DE3) 菌种,含 O 型 FMDV *VP1* 基因的质粒 pMD18T-VP1 和大肠埃希氏菌 BL21 (DE3) 由河南省动物免疫学重点实验室保存;口蹄疫阴、阳性豚鼠血清购自兰州兽医研究所,辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的兔抗豚鼠 IgG 抗体购自 Sigma 公司,其他试剂均为分析纯。

1.2 重组表达载体的构建与鉴定

根据已发表的 O 型 FMDV *VP1* 基因序列设计了如下 1 对特异性引物:上游引物为 5'-ATAGGATC-CATGACCACTGCTACCGGGGATG-3' 引入酶切位点 *Bam*H,下游引物为 5'-ATAAAGCTTCAAGAGCT-GCTTTCGGGGTG-3' 引入酶切位点 *Hind*。以重组质粒 pMD18T-VP1 为模板,PCR 扩增 *VP1* 基因。PCR 产物经 *Bam*H 和 *Hind* 双酶切消化并克隆到 pET-32a 载体中,构建重组质粒,将其命名为 pET-VP1,PCR、酶切分析和测序验证。

1.3 重组质粒的诱导表达

挑取阳性重组菌落,在含有氨苄青霉素的 LB 培养基中培养至 OD₆₀₀ 达到 0.6 时,加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG,37℃ 进行诱导表达。收集 IPTG 诱导前和诱导后 3、4、5、6 h 的菌液各 1 mL,用于 SDS-PAGE 电泳鉴定用。

1.4 表达产物的检测

1.4.1 SDS-PAGE 检测 将收集的表达菌液离心,收获细菌沉淀。在沉淀中加入 50 μL TE 缓冲液重悬细菌沉淀,加入等量的 2×SDS 上样缓冲液后,煮沸 5 min,冰浴 2 min,电泳观察结果。

1.4.2 Western-Blot 检测 IPTG 诱导的 pET-VP1 全菌和未诱导全菌进行 12% SDS-PAGE 后,将电泳分离的蛋白带电转到 PVDF 膜,5% 的脱脂奶粉封闭过夜,以 PBST 充分洗涤,加 100 倍稀释的豚鼠 O 型 FMDV 阳性血清,37℃ 孵育 1 h, PBST 洗涤 6 次,3 min/次,加 1:2 000 稀释的 HRP 标记兔抗豚鼠 IgG,37℃ 孵育 1 h, PBST 洗涤 6 次,3 min/次,以 DAB 显

色,用水冲洗终止显色反应。

1.5 表达蛋白变性与复性

1.5.1 包涵体的制备与纯化 将 200 mL pET-VP1 菌液离心,菌体重悬于 20 mL Lysis Buffer 中 (10 mmol/L Tris pH 8.0, 150 mmol/L NaCl, 10 mmol/L EDTA, 10% 甘油, 2 mmol/L DTT, 0.5 mmol/L PMSF 400 μg/mL 溶菌酶) 超声破碎后,离心收集沉淀,用 Wash Buffer (1% Triton-100, 50 mmol/L Tris pH 8.0, 100 mmol/L NaCl, 10 mmol/L EDTA, 2 mmol/L DTT) 洗涤包涵体 5 次。然后将沉淀悬于 20 mL Resuspension Buffer (50 mmol/L Tris pH 8.0, 100 mmol/L NaCl, 10 mmol/L EDTA, 2 mmol/L DTT) 中洗涤 1 次,最后离心沉淀即为纯化后的包涵体。

1.5.2 表达蛋白复性 将洗涤纯化后的包涵体溶于变性剂 (尿素 8 mol/L, NaCl 0.5 mol/L, Tris 20 mmol/L, EDTA 20 mmol/L, 2% SDS, pH 8.0) 中,于 4℃ 搅拌约 10 h 溶解变性,离心去除不溶物,将 90 mL 变性蛋白装入透析袋中,放入 1.8 L 复性缓冲液 (50 mmol/L Tris pH 8.0, 10 mmol/L NaCl, 10 mmol/L EDTA, 2 mmol/L DTT, 1 mmol/L 氧化性谷胱甘肽, 1 mmol/L 还原性谷胱甘肽, 0.5 mmol/L PMSF) 中,4℃ 条件下用磁力搅拌下透析,5 h 换液 1 次,再过夜透析后,用 1.8 L PBS 透析 4 次,前 2 次 12 h/次,后 2 次 6 h/次。收集透析袋内液,10 000 r/min,4℃ 离心 10 min,弃去沉淀,将上清用 0.45 μm 滤膜过滤。用 30 kD 浓缩管浓缩,3 000 r/min,4℃ 离心 30 min,收集浓缩蛋白,-20℃ 冻存备用。

1.5.3 ELISA 鉴定活性 以 2 μg/mL 重组 pET-VP1 复性蛋白包被酶标板,5% 脱脂奶粉封闭。加入倍比稀释 (1:50 ~ 1:12 800) 的豚鼠抗 O 型 FMDV 血清,同时设阴性血清对照,37℃ 孵育 30 min, PBST 洗涤 6 次,加入 1:1 000 稀释的 HRP 标记的兔抗豚鼠 IgG,显色后测 OD 值,分析复性蛋白的活性。

2 结果与分析

2.1 *VP1* 基因的 PCR 扩增结果

以重组质粒 pMD18T-O-VP1 为模板,用合成的引物对 *VP1* 基因进行 PCR 扩增,PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测可见到 639 bp 左右的目的片段 (图 1),与预期大小一致。

2.2 重组质粒的构建与鉴定结果

将 *VP1* 基因的 PCR 产物回收后,与原核表达载体 pET32a 进行连接,获得重组质粒 pET-VP1。连接产物转化 BL21 感受态细胞后,挑取单菌落培养,提取质粒,进行 PCR 鉴定和酶切鉴定,电泳结果显示,

扩增得到 639 bp 左右的片段(图 2),酶切得到 1 条 639 bp 左右的目的条带和 1 条 5 900 bp 左右的载体条带(图 3),初步鉴定为阳性克隆。将疑似阳性克隆的菌液送上海生工进行测序,得到了阅读框正确的重组表达载体 pET-VP1。

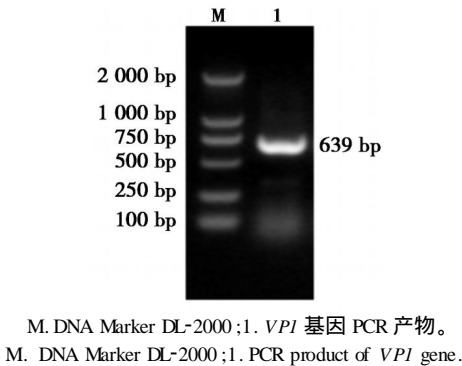


图 1 PCR 扩增结果

Fig. 1 Amplification of *VP1* gene

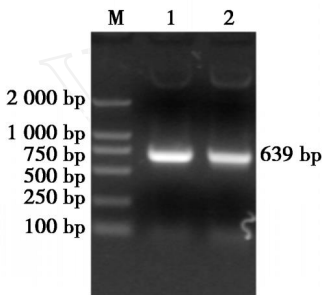


图 2 重组质粒的 PCR 鉴定结果

Fig. 2 Identification of recombinant plamid by PCR

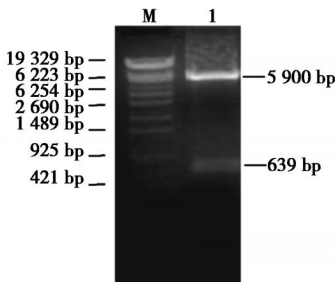


图 3 重组质粒的酶切鉴定结果

Fig. 3 Identification of recombinant plamid by enzyme digestion

2.3 重组质粒的诱导表达

转化重组质粒后的 BL21 (DE3) 菌株以 1 mmol/L IPTG 诱导,分别诱导 3,4,5,6 h 后取 1 mL 菌液,进行 SDS-PAGE 电泳,考马斯亮蓝染色,可观察到约在相对分子质量 45 ku 处有明显可见的条带,与预期大小相一致,诱导后 5 h 达到最大表达量(图 4)。超声波裂解诱导表达菌体,对表达蛋白进行可溶性分析,结果显示,大部分表达蛋白主要以包涵体形式存在。

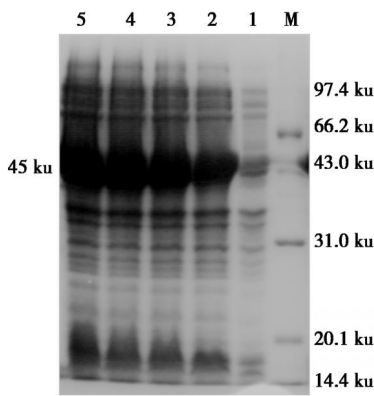


图 4 IPTG 在不同时间的诱导表达结果

Fig. 4 Expressed product induced by IPTG in different period

2.4 表达产物 Western-Blot 鉴定

以豚鼠抗 O 型 FMDV 高免阳性血清进行 Western-Blot 鉴定,结果在表达蛋白的位置出现明显的颜色反应条带,表明该表达产物为预期产物(图 5)。

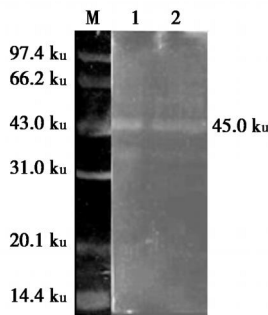


图 5 VP1 全菌蛋白 Western-Blot

Fig. 5 Identification of VP1 protein by Western-Blot test

2.5 复性 VP1 表达蛋白 SDS-PAGE 电泳鉴定

对纯化 VP1 表达产物进行 SDS-PAGE 电泳鉴定,在 45 ku 带出现单一条带,表明变、复性,纯化效果良好(图 6)。

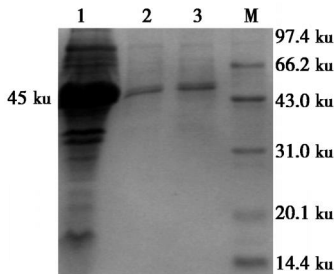


图 6 纯化 VP1 表达产物 SDS-PAGE 电泳鉴定

Fig. 6 Purified protein tested by SDS-PAGE

2.6 ELISA 检测复性蛋白的活性

以 2 $\mu\text{g/mL}$ 重组 PET-VP1 复性蛋白包被酶标板,当血清 1:1 600 稀释时,阳性值在 1.5 左右,阴性

值在 0.1 以下。随着稀释度的增加,OD 值呈下降的趋势(图 7)。

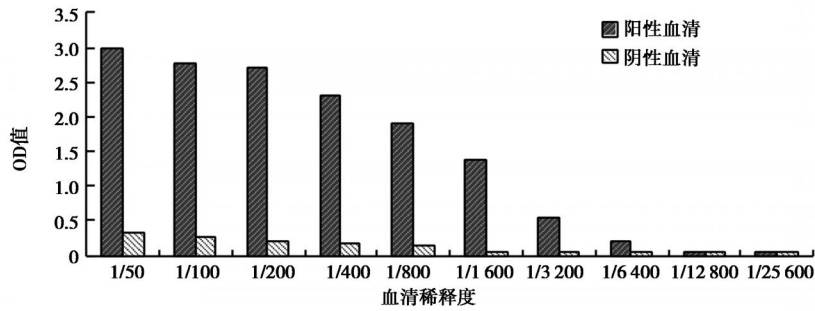


图 7 复性蛋白的 ELISA 检测

Fig. 7 ELISA Result of refold protein

3 讨论

由于 FMD 流行带来的严重危害性,目前发达国家大多采取扑杀销毁的措施,而发展中国家以疫苗接种为主要控制手段。FMDV 抗原变异频繁,亚型之间的抗原差异性也很大,因此往往造成诊断困难与免疫失败。国内外已对 FMDV 的分子流行病学的研究广泛关注,可为合理选择疫苗毒株,制备诊断抗原以及新型疫苗的研制提供理论和实践基础。VP1 蛋白暴露在 FMD 病毒粒子的表面,是诱导产生中和抗体的主要成分。它在免疫反应中发挥着重要作用,尤其是 140~160(GH 环)和 200~213 位的肽段是主要的抗原位点^[5,6]。因此研究 VP1 基因、表达 VP1 基因对于诊断和预防口蹄疫具有重要意义。

大肠杆菌表达系统是目前最常用的外源蛋白表达系统,其重组蛋白的表达量可达细胞蛋白的 50%^[7,8],然而,重组蛋白的高表达往往导致形成不溶的、没有生物活性的包涵体。目前的技术难点是溶解包涵体然后除去变性剂,以使重组蛋白再折叠(Refolding)成活性形式而无蛋白质聚集,这对于那些一硫键数目较多的重组蛋白尤其重要^[9,10]。本研究中采用 PCR 技术扩增得到 FMDV VP1 基因,并用原核表达载体 pET32a 对 VP1 基因进行表达,经 SDS-PAGE 和 Western-Blot 检测,结果表明结构蛋白 VP1 基因在大肠埃希氏菌中得到了高效表达。经过纯化、复性的 VP1 蛋白与其抗血清结合能力强,因此可将经过纯化、复性的 VP1 蛋白作为包被抗原,开发口蹄疫病毒 VP1 结构蛋白抗体间接 ELISA 诊断试剂盒,检测易感动物抗体水平。经过高度纯化的 VP1 蛋白还可以做成金标试纸,迅速诊断 FMD。

参考文献:

- [1] Kitching R P. Foot and mouth disease: current worlds situation [J]. Vaccine, 1999, 17: 1772 - 1774.
- [2] 张显升,刘在新,赵启祖,等. 口蹄疫病毒基因组 RNA 结构与功能研究进展[J]. 病毒学报, 2001, 17 (4): 375 - 380.
- [3] 陆承平. 兽医微生物学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001: 558 - 563.
- [4] Acharya R, Fry E, Stuart D, et al. The three dimensional structure of foot-and-mouth disease virus at 2.9 Å resolutions [J]. Nature, 1989, 337 (6209): 709 - 716.
- [5] 独军政,常惠芸,丛国正,等. Asia 型口蹄疫病毒 VP1 基因的克隆、原核表达及纯化[J]. 畜牧兽医学报, 2005, 36 (6): 631 - 634.
- [6] Kitson J D, McCahon D, Belsham G J. Sequence analysis of monoclonal antibody resistant mutants of type o foot and mouth disease virus: evidence for the involvement of the three surface exposed capsid proteins in four antigen sites [J]. Virology, 1990, 179 (1): 26 - 34.
- [7] 郑敏,金宁一,鲁会军,等. O 型口蹄疫病毒 VP1 嵌合基因的构建及原核表达[J]. 中国兽医学报, 2005, 25 (6): 561 - 563.
- [8] 马静云,陈峰,曹永长,等. 口蹄疫病毒 VP1 基因的原核表达及免疫原性检测[J]. 中国兽医科技, 2004, 34 (3): 17 - 20.
- [9] 李丛丛,吴艳红,何成强,等. 猪瘟疫病毒 F₂ 糖蛋白主要抗原域的原核表达及纯压[J]. 现代农业科技, 2007 (1): 109 - 110, 120.
- [10] 李清州,张改平,郝慧芳,等. H5N1 亚型禽流感病毒凝集素(HA)基因的表达及纯压[J]. 河南农业科学, 2008 (8): 127 - 130.