

狂犬病病毒糖蛋白胞外区基因 的原核表达、纯化及鉴定

杨艳艳,王 丽,杨继飞,鄧玉宝,滕 蔓,邓瑞广,肖治军,张改平

(河南省农业科学院 农业部动物免疫学重点开放实验室 河南省动物免疫学重点实验室 河南 郑州 450002)

摘要: 利用 RT-PCR 技术,将狂犬病病毒株 ERA 株糖蛋白胞外区基因分两段进行扩增,经克隆与序列分析,两段大小分别为 523,381 bp,各编码 174,127 个氨基酸,分子量分别为 19.7,14.5 kDa。在原核表达载体 pET-43a 中分别克隆了这两段糖蛋白基因,将重组质粒转化到表达菌 BL21(DE3)中,经 SDS-PAGE 电泳分析,在分子量约为 94,89 kDa 处分别出现新蛋白带,和预期的目的蛋白的分子量相符。两重组蛋白主要以可溶形式表达,利用 Ni^{2+} 亲和层析柱纯化了蛋白,纯度大于 95%。Western-Blot 分析结果显示,两种重组融合蛋白均可与兔抗 RBV 多抗血清反应,具有良好的反应原性。

关键词: 狂犬病病毒;糖蛋白;胞外区;纯化

中图分类号: S852.65 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2010)03-0028-04

Prokaryotic Expression Purification and Identification of Rabies Virus Glycoprotein Extracellular Domain Gene

YANG Yan-yan, WANG Li, YANG Ji-fei, ZHI Yu-bao, TENG Man,
DENG Rui-guang, XIAO Zhi-jun, ZHANG Gai-ping

(Key Laboratory for Animal Immunology of the Ministry of Agriculture, Henan Provincial
Key Laboratory for Animal Immunology, Henan Academy of Agriculture Sciences, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: The glycoprotein genes of extracellular domain were amplified from rabies virus ERA strain by RT-PCR. The products were respectively cloned and sequenced. The result showed that the two fragments length were composed of 523, 381 bp, which encoded 174, 127 amino acids respectively. Its molecular weight were 19.7, 14.5 kDa. The two products of glycoprotein gene were sub-cloned into the prokaryotic expression vector pET-43a. The positive recombinants were transformed into *E. coli* BL21(DE3). SDS-PAGE showed that the proteins were highly expressed in *E. coli* and the molecular weight were 94, 89 kDa. The results are consistent with the expected molecular weight of interest proteins. The recombinant proteins were mainly expressed in soluble form and purified by Ni-chelating chromatography. The results of Western-Blot analysis revealed that the two expressed proteins were recognized specifically by rabbit anti-RBV polyclonal antibody. The stable expression of the proteins and the analysis of its antigenic specificity provide the foundation to develop the ELISA diagnostic kit for rabies.

Key words: Rabies virus; Glycosidoprotein; Extracellular domain; Purification

狂犬病是由狂犬病病毒(Rabies virus, RV)引起的一种高度致死性人兽共患病,在世界范围内分布广泛。我国由于养犬较多,免疫接种不彻底,造成的危害比较严重。研究表明,加强犬的狂犬病免疫,是从源头上控制狂犬病的最有效措施。因此,对狂犬

病主要流行区的犬进行病原检测和抗体水平监测,对于预防和控制狂犬病具有重要的指导意义。

狂犬病病毒蛋白是由糖蛋白(G)、核蛋白(N)、基质蛋白(M)、磷酸化蛋白(N)和转录酶蛋白(L)组成^[1]。其中糖蛋白由 524 个氨基酸组成,分子量

收稿日期: 2010-04-28

基金项目: 河南省科技攻关项目(082102130006); 国家高技术研究发展计划“863”项目(2007AA100606)

作者简介: 杨艳艳(1962-),女,河南沁阳人,研究员,硕士,主要从事动物免疫学与细胞工程研究。

通讯作者: 张改平(1960-),男,河南内黄人,研究员,博士,博士生导师,中国工程院院士,主要从事动物分子免疫学研究。

为 67 kDa ,是病毒与宿主细胞结合的配体 ,介导了病毒与靶细胞的结合及在神经系统的分布 ,不但与病毒的毒力、致病性密切相关 ,而且是狂犬病毒的主要保护性抗原 ,能刺激机体产生中和抗体 ,保护机体抵抗病毒的感染^[2]。利用基因工程技术制备表达蛋白替代天然病毒粒子作为诊断抗原具有很多优点^[3,4]。在本研究中 ,为了获得反应性强、更具诊断价值的表达蛋白 ,在原核表达载体 pET-43a 中分别表达了含狂犬病 ERA 株糖蛋白胞外区主要抗原位点Ⅱ及Ⅰ-Ⅳ-Ⅲ的两个片段 ,并对表达产物进行了分离纯化和鉴定 ,旨在为进一步利用原核表达产物研制狂犬病的基因疫苗和抗体诊断试剂盒奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、载体及主要试剂 ERA 疫苗株、Vero 细胞、原核表达载体 pET-43a、大肠埃希氏菌(*Escherichia coil*) BL21 均由河南省动物免疫学重点实验室保存; 兔抗 RBV 多抗、兔阴性血清由河南省动物免疫学重点实验室自制; Total RNA 提取试剂盒 Rneasy-Mini Kit 购自 Qigene 公司; MLV 逆转录酶购自 Promega 公司; Taq DNA 聚合酶、DNA 纯化回收试剂盒购自上海生工生物工程技术服务有限公司; 限制性内切酶、T4 连接酶购自 Takara 公司; 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 病毒 RNA 的制备 将病毒接种到长满单层的 Vero 细胞瓶中 ,接种 4~5 d 后 ,间接免疫荧光(IFA) 法检查细胞感染程度。当 75% 以上的细胞感染病毒颗粒时 ,用胰酶消化感染细胞 ,抽提总 RNA。

1.2.2 PCR 引物的设计及合成 根据已发表的狂犬病毒株 ERA 糖蛋白基因序列 ,合成 2 对引物。第 1 对引物 PG5'Ⅰ-Ⅳ-Ⅲ: 5'-GTTCGGATCCAGTGAGACTT-GCGGCTTTG-3' ,PG3'Ⅰ-Ⅳ-Ⅲ: 5'-TGAGGTCGACCTTG-TAGTGAGCATCGGCTT-3'; 第 2 对引物 PG5'Ⅱ: 5'-TATTGGATCCGGTCCCTGGAGCCCCGATT-3' , PG3'Ⅱ: 5'-TCAGGTCGACTAGTCTGGATTCTCGGGCA-3'。

上述 2 对引物分别引入 *Bam*H I 和 *Sal* I 酶切位点。利用下游引物 PG3'Ⅰ-Ⅳ-Ⅲ ,以病毒基因组 RNA 为模板进行 RT 反应。反应条件如下: 全基因使用 MLV 逆转录酶(Promega) ,参照说明书进行操作。PCR 循环参数为 94℃ 预变性 2 min; 94℃ 变性 30 s ,58℃ 退火 30 s ,72℃ 延伸 1.5 min ,30 次循环; 最后 72℃ 延伸 10 min ,置于 4℃ 保存。PCR 产物在琼脂糖上进行电泳后 ,切下目的条带 ,用胶回收试剂

盒回收目的片段。

1.2.3 重组表达载体的构建 分别扩增狂犬病糖蛋白胞外区基因Ⅰ-Ⅳ-Ⅲ、Ⅱ ,制备表达载体 pET-43a 质粒 ,分别用 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切 ,用胶回收试剂盒回收酶切产物。在 T4 DNA 连接酶的作用下 16℃ 连接过夜。取适量的上述连接产物转化 *E. coli* BL21 感受态细胞 ,涂布于含氨苄青霉素的 LB 平板。

1.2.4 重组克隆的筛选和鉴定 取 LB 平板上的单菌落置于 LB 培养液(含氨苄青霉素 50 mg/L) 中 ,37℃ 培养过夜 ,用碱裂法制备质粒 ,用 PCR 鉴定和 *Bam*H I/ *Sal* I 双酶切鉴定质粒并筛选阳性克隆 ,送上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

1.2.5 重组克隆在大肠杆菌中的表达和鉴定 取重组克隆菌落在 LB 培养基(含氨苄青霉素 50 mg/L) 中 37℃ 培养至 OD₆₀₀ 为 0.4~0.6 时 ,加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L 进行诱导表达 4 h 后离心收集菌体 ,将菌体悬于 SDS-PAGE 上样缓冲液中 ,100℃ 煮沸 3 min ,作 12.5% SDS-PAGE 分析和 Western-Blot 检测。

1.2.6 重组蛋白的可溶性分析、纯化及活性鉴定 取菌液按 1:100 的比例接种于 200 mL LB 培养基中 ,37℃ 培养至 OD₆₀₀ 约为 0.6 时 ,在 16℃ 条件下 ,以终浓度 0.05 mmol/L IPTG 低速(200 r/min) 诱导 4 h ,收菌 ,菌体沉淀用 PBS 洗涤 1 遍 ,6 000 r/min 离心 10 min ,沉淀用 PBS 悬浮 ,超声波裂解后 ,4℃、12 000 r/min 离心 10 min ,分离上清和沉淀 ,进行 SDS-PAGE 电泳。将蛋白与 Ni-NTA 充分结合后 ,按试剂盒说明书纯化目的蛋白。重组蛋白经 SDS-PAGE 分析和 Western-Blot 检测其纯度和活性^[5]。

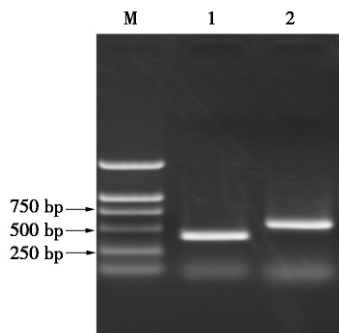
2 结果与分析

2.1 RV 糖蛋白基因的扩增和克隆

经 RT-PCR 扩增 ,分别得到 523 ,381 bp 左右大小的片段 ,与预测结果一致。回收扩增产物 ,经 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切后克隆到 pET-43a 质粒中 ,分别得到重组质粒 pET-RG-Ⅰ-Ⅳ-Ⅲ、pET-RG-Ⅱ ,两重组质粒经 PCR 及 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切鉴定正确(图 1 2) 。

2.2 pET-RG-Ⅱ、pET-RG-Ⅰ-Ⅳ-Ⅲ 融合蛋白在大肠杆菌中的表达

经 SDS-PAGE 电泳可见 ,pET-RG-Ⅱ、pET-RG-Ⅰ-Ⅳ-Ⅲ 诱导 4 h 后 ,在分子量约为 94.89 kDa 处出现了目的条带 ,与预期的分子量大小相符。



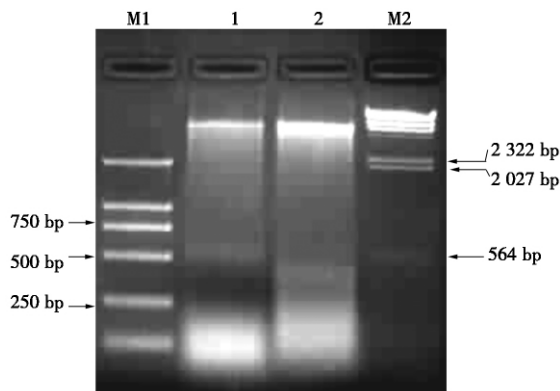
M. DNA 分子质量标准 DL2000 Marker; 1. I-IV-III 片段 PCR 产物; 2. II 片段 PCR 产物。

M. DL2000 Marker; 1. I-IV-III PCR product; 2. II PCR product.

图1 重组质粒 pET-RG-I-IV-III、pET-RG-II 的 PCR 鉴定

Fig. 1 Identification of the recombinant plasmid

pET-RG-I-IV-III pET-RG-II by PCR

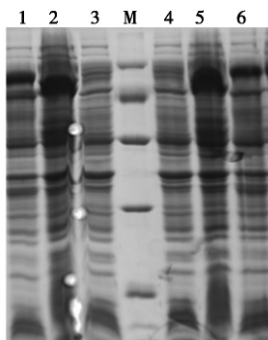


M1. DNA 分子质量标准 DL2000 Marker; 1. pET-RG-II 双酶切产物; 2. pET-RG-I-IV-III 双酶切产物; M2. DNA 分子质量标准 λ DNA/Hind III Marker。
M1. DL2000 Marker; 1. pET-RG-II /BamHI /SalI; 2. pET-RG-I-IV-III /BamHI /SalI; M2. λ DNA/Hind III Marker.

图2 pET-RG-I-IV-III、pET-RG-II 重组质粒 BamHI 和 SalI 的双酶切鉴定

Fig. 2 Identification of the recombinant plasmid

pET-RG-I-IV-III pET-RG-II by BamHI and SalI digestion



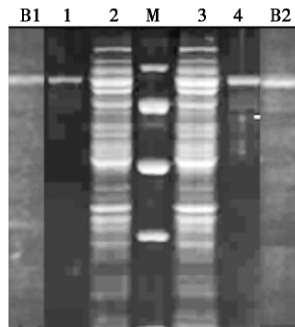
1. pET-RG-I-IV-III 转化菌诱导 4 h; 2. pET-43a 转化菌诱导 4 h; 3. pET-RG-I-IV-III 转化菌未诱导; M. 蛋白质分子质量标准 (97.4 ,66.2 ,43.0 ,31.0 ,20.1 ,14.4 kDa); 4. pET-RG-II 转化 *E. coli* BL21(DE3) 未经诱导; 5. pET-43a 转化菌诱导 4 h; 6. pET-RG-II 转化菌诱导 4 h。
1. Expressed product of pET-RG-I-IV-III induced for 4 h by IPTG; 2. Expressed product of pET-43a induced for 4 h by IPTG; 3. Expressed product of pET-RG-I-IV-III uninduced; M. Protein molecular weight Marker (97.4 ,66.2 ,43.0 ,31.0 ,20.1 ,14.4); 4. Expressed product of pET-RG-II uninduced; 5. Expressed product of pET-43a induced for 4 h by IPTG; 6. Expressed product of pET-RG-II induced for 4 h by IPTG.

图3 pET-RG-II、pET-RG-I-IV-III 表达产物的 SDS-PAGE 电泳检测

Fig. 3 Analysis of expressed products of pET-RG-II , pET-RG-I-IV-III by SDS-PAGE

2.3 pET-RG-II、pET-RG-I-IV-III 融合蛋白的纯化及 Western-Blot 鉴定

pET-RG-II、pET-RG-I-IV-III 转化 *E. coli* BL21 (DE3) 诱导菌经超声破碎后,在上清中以可溶形式表达。经 Ni-NTA 柱纯化了上述 2 种蛋白(图 4)。对纯化后的表达产物进行 Western-Blot 分析,结果表明,表达产物与狂犬病毒疫苗免疫后的兔血清呈现阳性反应。



1. pET-RG-II 纯化蛋白; 2. pET-RG-II 裂解液上清; M. 蛋白质分子质量标准 (97.4 ,66.2 ,43.0 ,31.0 ,20.1 ,14.4 kDa); 3. pET-RG-I-IV-III 裂解液上清; 4. pET-RG-I-IV-III 纯化蛋白; B1. pET-RG-II 纯化蛋白 Western-Blot 结果; B2. pET-RG-I-IV-III 纯化蛋白 Western-Blot 结果。

1. Purified protein pET-RG-II; 2. The lysate supernatants of pET-RG-II; M. Protein molecular weight Marker (97.4 ,66.2 ,43.0 ,31.0 ,20.1 ,14.4 kDa); 3. The lysate supernatants of pET-RG-I-IV-III; 4. Purified protein pET-RG-I-IV-III; B1. Western-Blot analysis (B1 ,B2) of pET-RG-II; B2. Western-Blot analysis (B1 ,B2) of pET-RG-I-IV-III.

图4 pET-RG-II、pET-RG-I-IV-III 融合蛋白的纯化及 Western-Blot 鉴定

Fig. 4 Purification and Western-Blot analysis of pET-RG-II , pET-RG-I-IV-III fusion protein expressed in *E. coli*

3 讨论

目前,人们已从不同的狂犬病毒株获得了全长糖蛋白并在大肠杆菌和真核细胞中进行了表达^[6-14]。尽管在细菌中表达病毒蛋白非常廉价,但在原核系统真核蛋白常常不能获得可溶性表达,而且由于原核系统不能进行糖基化等翻译后修饰而影响到重组蛋白的构像结构,使一些构像型抗原位点发生改变,因此,在一定程度上限制了应用。

为了获得理想的诊断抗原,本研究分别选择了两段含优势抗原表位区域的截短的糖蛋白胞外区序列进行表达,为避免形成包涵体,采用 pET-43a 表达载体,该载体具有溶解性极高的大肠杆菌蛋白 Nus • Tag 融合伴侣和标签,进一步提高了重组融合蛋白的可溶性,避免了包涵体的形成。为了提高狂犬病病毒糖蛋白膜外区的可溶表达量,本试验采用了降低表达温度、控制细菌培养过程与诱导表达过程的不同条件,最终获得了可溶性表达蛋白,并利用 Ni²⁺ 亲和层析柱纯化了蛋白,纯度大于 95%。经

Western-Blot 鉴定后,可见表达的纯化表达蛋白均与兔抗 RV 阳性血清反应,具有免疫反应性,可作为一种有效的诊断抗原。

参考文献:

[1] 姜海龙,钱爱东. 狂犬病病毒糖蛋白、核蛋白融合基因原核质粒的构建与表达 [J]. 吉林农业大学学报, 2006 28(3): 313-316.

[2] 蔡月琴,叶菊秀,李玲燕,等. 狂犬病病毒糖蛋白膜外区基因在大肠埃希氏菌中的高效表达 [J]. 中国兽医科学 2006 36(6): 449-453.

[3] 张改平,李清州,郝惠芳,等. H5N1 亚型禽流感病毒神经氨酸酶基因的表达及纯化 [J]. 华北农学报, 2008, 23(5): 107-110.

[4] 王秋霞,张美英,张改平,等. 猪囊尾蚴排泄分泌抗原 Ts881 蛋白原核表达条件的优化 [J]. 华北农学报, 2009 24(3): 59-63.

[5] 李清州,郝惠芳,王丽,等. H5N1 亚型禽流感病毒血凝素(HA) 基因的表达及纯化 [J]. 河南农业科学, 2008(8): 127-130.

[6] 徐引弟,陈焕春,肖少波,等. 伪狂犬病病毒 Ea 株 ORF21 基因在 BHK221 细胞上的表达 [J]. 河南农业科学 2009(3): 99-102.

[7] 李伟,张曼夫,张新梅,等. MBP-狂犬病毒 NP 融合蛋白在大肠杆菌中的表达及 NP 的纯化 [J]. 农业生物技术学报 2000 8(1): 29-32.

[8] 魏玉荣,易忠,符子华,等. 狂犬病病毒 SRV9 株 N、P、G 和 L 蛋白基因的克隆及表达载体构建 [J]. 新疆农业科学 2009 46(2): 354-358.

[9] 李江涛,李轶女,殷相平,等. 狂犬病病毒 CVS 株核蛋白基因的原核表达、纯化及鉴定 [J]. 生物技术通报, 2008(3): 103-106.

[10] 谢荣辉,朱函坪,翁景清,等. 狂犬病毒核蛋白基因的克隆及表达 [J]. 中国人兽共患病学报 2007 23(1): 56-58.

[11] 钱源,孙明波,张鸣,等. 狂犬病毒 aG 株糖蛋白在 CHO 细胞中的表达 [J]. 中国生物制品学杂志, 2005 18(3): 212-214.

[12] Bassi E, Vernal J, Zanluca C *et al*. Expression, purification and immunodetection of a recombinant fragment (residues 179-281) of the G protein from rabies virus ERA strain [J]. Protein Expression and Purification, 2008 59(2): 309-313.

[13] Dietzschold B, Gore M, Marchadier D *et al*. Structural and immunological characterization of a linear virus-neutralizing epitope of the rabies virus glycoprotein and its possible use in a synthetic vaccine [J]. J Virol, 1990, 64: 3804-3809.

[14] Bunschoten H, Gore M, Claassen I J T M *et al*. Characterization of a new virus-neutralizing epitope that denotes a sequential determinant on the rabies virus glycoprotein [J]. J Gen Virol, 1989 70: 291-298.