

# 口蹄疫病毒 AF72 株 3D 聚合酶基因的克隆 及其在大肠杆菌中的表达

张 昱, 王永录, 张永光, 潘 丽

(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, 甘肃 兰州 730046)

**摘要:**采用 RF-PCR 方法扩增口蹄疫病毒(FMDV) AF72 株的 3D 聚合酶基因, 并将其克隆至 pGEM-T easy 载体, 测序分析结果表明, AF72 3D 聚合酶基因与 GenBank 中公布的其他 4 个参考序列均具有较高的同源性。将目的基因插入原核表达载体 pEF-30a(+) 中, 构建了重组表达质粒 pEF-3D, 鉴定后转化至大肠杆菌 BL21(DE3) 中, 经 IPTG 诱导, 3D 聚合酶基因在大肠杆菌中获得了正确表达, 目的蛋白的分子量为 46 ku。Western blot 检测结果显示, 表达产物可以与抗 A 型 FMDV 阳性血清发生特异性反应, 具有良好的反应原性。

**关键词:** 口蹄疫病毒; 3D 聚合酶基因; 原核表达

中图分类号: Q945 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2008)06-0032-04

## Cloning of 3D of Foot-and-mouth Disease Virus Strain AF72 and Its Expression in *Escherichia coli*

ZHANG Yu, WANG Yong-lu, ZHANG Yong-guang, PAN Li

(Key Laboratory of Animal Virology of Ministry of Agriculture, State Key Laboratory of Veterinary  
Etiological Biology, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese  
Academy of Agriculture Sciences, Lanzhou 730046, China)

**Abstract:** The 3D polymerase gene of Foot-and-mouth disease virus strain AF72 was amplified by reverse transcription polymerase chain reaction(RF-PCR), The purified PCR products were cloned into pGEM-T easy Vectors, and the nucleotide sequences were highly homologous to other four reference strains from GenBank. The target gene was cloned into the prokaryotic expression vector pEF-30a(+), then recombinant expression plasmid pEF-3D was transformed into *E. coli* BL21(DE3) competent cells, the target protein was highly expressed by IPTG induction. The protein was about 46 ku. Western blot showed specific reaction of the expressed product with type A FMDV antibody-positive serum, and the protein had nice reaction activity.

**Key words:** FMDV; 3D polymerase gene; Prokaryotic expression

口蹄疫是由口蹄疫病毒(Foot-and-mouth disease virus, FMDV)引起的一种急性、烈性、高度传染性和可快速远距离传播的动物疾病。口蹄疫的暴发会带来严重的经济损失, 疫区乃至整个国家的畜产品出口都会受到限制甚至封锁, 这使得口蹄疫成为家畜疾病中的头号“经济病”<sup>[1]</sup>。FMDV 属于微 RNA 病毒科, 口蹄疫病毒属, 其基因组为单股正链 RNA, 它既是转录中的 mRNA, 又是负链合成的模板, 长度约为 8 500 个核苷酸。3D 蛋白是 FMDV 编码的 RNA

依赖的 RNA 聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp), 3D 聚合酶以 VPg-pU-pU 为底物催化病毒 RNA 的合成, 负链 RNA 的合成需要 3' UTR 和 poly(A), 正链 RNA 的合成需要核糖体核蛋白(RNP)和邻近的 5' UTR 及非结构蛋白, 在病毒复制过程中, 3D 聚合酶是复制自身基因组的关键酶, 此外, 3D 聚合酶蛋白的抗体可以抑制 FMDV RNA 的降解, 所以 3D 聚合酶还有核酸酶的活性<sup>[2,3]</sup>。

目前国内外对同属小 RNA 病毒科的脊髓灰质

收稿日期: 2008-09-05

基金项目: 国家支撑计划项目(2006BAD06A06)

作者简介: 张 昱(1983-), 男, 甘肃静宁人, 在读硕士, 主要从事动物病毒免疫学与分子生物学研究。

通讯作者: 王永录(1964-), 男, 甘肃临洮人, 研究员, 主要从事口蹄疫病毒免疫学与分子生物学研究。

炎病毒以及黄病毒科的丙肝病毒的 RNA 聚合酶的蛋白空间结构和生物化学特性进行了一些研究, 但对 FMDV RNA 聚合酶的研究则较少<sup>[4-6]</sup>。本试验旨在通过对 FMDV AF72 株的 3D 聚合酶进行序列测定和在大肠杆菌中的高效表达, 分析其免疫反应性, 为进一步的多克隆抗体制备和抗原表位研究奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 病毒、载体、转化菌和试剂

A 型 FMDV AF72 株及其阳性血清由国家口蹄疫参考实验室提供, RNeasy Mini Kit 购自 Qiagen 公司, pGEM-T easy 载体和 T4 连接酶购自 Promega 公司, 原核表达载体 pET-30a(+) 和 *E. coli* BL21(DE3) 由本实验室保存; *E. coli* JM109 转化菌、RNA PCR Kit(AMV) Ver. 3.0、*EcoR* Ⅲ酶、*LA Taq*、DNA Marker、DNA 纯化试剂盒和小型质粒提取试剂盒购自大连宝生物公司, 低分子量蛋白 Marker 购自 MBI 公司; 硝酸纤维素膜(NC 膜) 和十二烷基磺酸钠(SDS) 购自 Sigma 公司; 辣根过氧化物酶(HRP) 标记兔抗牛 IgG 购自北京索莱宝生物科技有限公司; 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)、丙烯酰胺(ACAM)、过硫酸铵(APS)、四甲基乙二胺(TEMED) 等均为国产或进口分析纯。

### 1.2 引物设计

根据 GenBank 中其他的 A 型 FMDV 病毒株 3D 聚合酶基因序列, 设计 2 对引物, 分别用于 RT-PCR 和构建重组表达载体。RT-PCR 引物: 3D1: 5'-GCG-TACAAAGCCGCCACCAAGGCTGGG-3'; 3D2: 5'-CTTTT CACT CCTACGGCGTCGCGG-3'; 载体构建引物: 3D3: 5'-AATGGATCCTAACGCGTCACCGCACAG-3' (下划线部分为 *Bam*H Ⅲ酶切位点); 3D4: 5'-CCGCATATGATGGGGTTGATTGTTGAG-3' (下划线部分为 *Nde* Ⅰ酶切位点)。引物由大连宝生物公司合成。

### 1.3 RNA 的提取

所有试剂和器皿均经 0.1% 的焦碳酸二乙酯(DEPC) 水溶液去 RNase 处理, 含有 FMDV AF72 病毒株的 BHK21 细胞毒经反复冻融后, 参考 RNeasy Mini Kit 操作说明提取病毒总 RNA。

### 1.4 RT-PCR

参考大连宝生物公司 RNA PCR Kit(AMV) Ver. 3.0 说明书操作。

### 1.5 基因的克隆与鉴定

将上述 PCR 产物按照 DNA 纯化试剂盒说明书

进行纯化, 然后按照 pGEM-T easy 载体试剂盒说明书进行 PCR 纯化产物与载体的连接, 转化感受态细胞 *E. coli* JM109, 均匀涂布于含有 Amp、X-gal 和 IPTG 的 LB 琼脂平板上, 挑取白色的单菌落。按照小型质粒提取试剂盒说明书提取质粒, 进行 *EcoR* Ⅲ酶切鉴定, 并将初步鉴定为阳性的重组质粒(pGEM-T-3D) 样品送大连宝生物公司测序。

### 1.6 序列分析

重组质粒序列测定后, 用 DNASTAR 分析软件将 AF72 3D 聚合酶基因的测序结果和已经公布了完整序列的 AJ131666、AY593763、AY593764、AY593772 (源自 GenBank) 的 3D 聚合酶基因序列进行比较, 并确定 AF72 3D 聚合酶的核苷酸保守区域。

### 1.7 重组表达载体的构建

以重组质粒 pGEM-T-3D 为模板, 用上述引物 3D3 和 3D4 扩增 3D 聚合酶基因片段, 反应体系为: 10×PCR Buffer 5 μL, dNTP 8 μL, 上下游引物各 1 μL, 质粒 0.5 μL, *Taq* 酶 0.5 μL, 加双蒸水至 50 μL; 反应程序如下: 95℃ 5 min, 94℃ 1 min, 58℃ 1 min, 72℃ 2 min, 35 个循环后, 72℃ 终延伸 10 min。参照 TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0 说明书切胶回收扩增产物, 然后和原核表达载体 pET-30a(+) 分别经 *Bam*H Ⅲ和 *Nde* Ⅰ进行双酶切, 回收后 16℃ 连接 3 h, 将连接产物转化入 BL21(DE3) 大肠杆菌感受态细胞, 挑斑、于含有 60 mg/L 卡那霉素的 LB 培养基中培养, 按照小型质粒提取试剂盒说明书提取质粒, 然后经 *Bam*H Ⅲ和 *Nde* Ⅰ双酶切鉴定, 将初步鉴定阳性的重组质粒命名为 pET-3D, 并送大连宝生物公司测序。

### 1.8 重组质粒的表达和 SDS-PAGE 分析

将测序正确的阳性重组质粒原菌液用含有卡那霉素的 LB 液体培养基进行 1:100 稀释, 置 37℃ 220 r/min 的条件下培养至 A 值为 0.4~0.6 后, 加 IPTG (终浓度为 1.0 mmol/L) 进行诱导, 分别在 0, 1, 3, 5, 7 h 各时间点取 1 mL 菌液, 4℃、12 000 r/min 离心集菌, 分别加入 1×SDS-PAGE 上样缓冲液作为样品, 进行 SDS-PAGE。

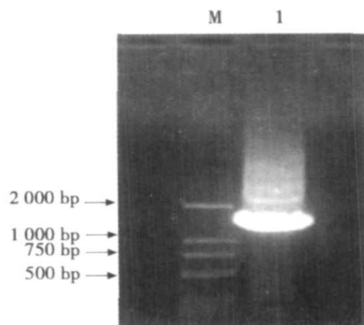
### 1.9 Western blot 检测

按照半干转印法<sup>[7]</sup> 将目的蛋白带转移至 NC 膜, 用 10 mL 0.5% BSA 的 PBST 溶液封闭, 37℃ 温和振荡 1 h 后转入 4℃ 封闭过夜。弃去封闭液, 加入用 PBST 1:5 稀释的牛抗 A 型 FMDV 血清, 37℃ 温和振荡结合 1 h; 加入用 PBST 1:200 稀释的 HRP 标记的兔抗牛 IgG, 37℃ 温和振荡结合 1 h; 加入 DAB 显色液显色 5 min 后转入 PBST 缓冲液终止显色。

## 2 结果与分析

### 2.1 3D 聚合酶基因 RT-PCR 和克隆结果

1% 琼脂糖凝胶电泳显示 PCR 扩增产物约 1 400 bp, 这与目的片段长度(1 410 bp)一致(图 1)。从培养 JM109 转化菌的培养基中挑取单克隆扩增培养后提取质粒, 经 *EcoR* iv 酶切鉴定, 目的片段长约 1 400 bp, 证明所克隆的为预期的 3D 聚合酶基因(图 2)。

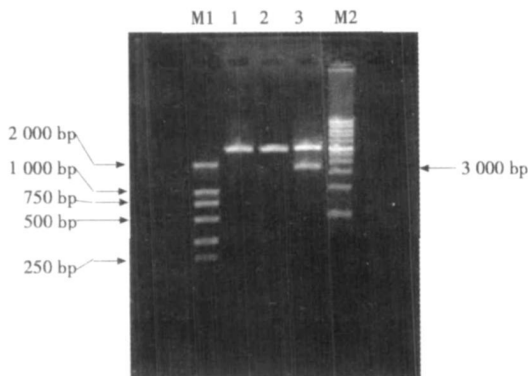


M. DNA 分子质量标准; 1. 3D 聚合酶基因扩增产物。

M. DL2000 DNA Marker; 1. Amplified 3D products.

图 1 3D 聚合酶基因 PCR 扩增产物电泳图

Fig. 1 Electrophoresis of amplified 3D products



M1, M2. DNA 分子质量标准; 1, 2. 阴性质粒对照 *EcoR* iv 酶切产物;  
3. 重组质粒 pGEM-T-3D *EcoR* iv 酶切产物。

M1. DL 2000 DNA Marker; 1, 2. Products from negative controls digested by *EcoR* iv; 3. Products from pGEM-T-3D digested By *EcoR* iv;

M 2. DL 12000 DNA marker.

图 2 重组质粒 pGEM-T-3D 及阴性质粒 *EcoR* iv 酶切电泳图

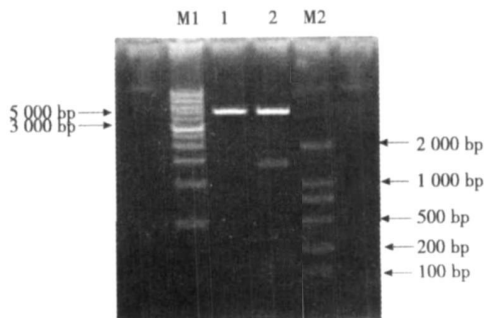
Fig. 2 Electrophoresis of pGEM-T-3D and negative controls digested by *EcoR* iv

### 2.2 FMDV AF72 3D 聚合酶核苷酸序列分析

测序结果显示, AF72 3D 聚合酶基因序列全长 1 410 个核苷酸, 编码 470 个氨基酸组成的多肽链。通过 DNASTAR 软件多序列比对显示, AF72 的 3D 聚合酶基因与 AJ131666、AY593763、AY593764、AY593772 的 3D 聚合酶基因同源性分别为 94%, 93%, 93% 和 92%, 且保守区主要分布在 46~ 74, 94~ 182, 202~ 248, 325~ 377, 565~ 638, 649~ 791, 877~ 1 013, 1 084~ 1 257, 1 305~ 1 409 等核苷酸区段。

### 2.3 表达载体的构建与鉴定

将构建的重组表达质粒用 *Bam*H iv 和 *Nde* iv 双酶切鉴定, 结果显示, 切出与预期相符的约 5 400 bp 的 pEF-30a(+) 载体片段和约 1 400 bp 的 3D 基因片段(图 3)。



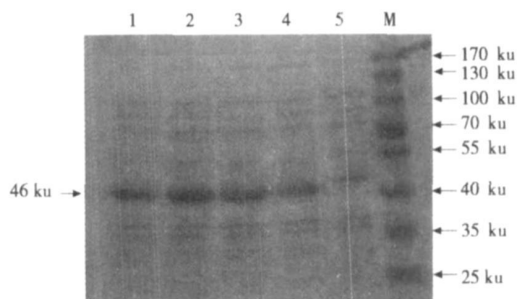
M1. DNA 分子质量标准(DL 12000); 1. pEF-30a(+) 载体的 *Bam*H iv+ *Nde* iv 双酶切产物; 2. 重组质粒 pEF-3D 的 *Bam*H iv+ *Nde* iv 双酶切产物; M2. DNA 分子质量标准(DL 2000)。  
M1. DL 12000 DNA Marker; 1. Products from pEF-30a(+) digested by *Bam*H iv+ *Nde* iv; 2. Products from pEF-3D digested by *Bam*H iv+ *Nde* iv; M2. DL2000 DNA Marker.

图 3 pEF-3D 的酶切鉴定

Fig. 3 Identification of pEF-3D plasmid digested by restriction enzymes

### 2.4 表达产物的 SDS-PAGE 分析

将阳性重组质粒 pEF-3D 转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 经 IPTG 诱导, SDS-PAGE 电泳结果显示, 在约 46 ku 处有一条特异的蛋白条带, 与预期的蛋白分子质量大小一致, 而且, 在 IPTG 诱导 5 h 后蛋白表达量最高(图 4)。



M. 蛋白分子质量标准; 1~ 4. 分别诱导 7, 5, 3, 1 h 的表达产物;  
5. 未诱导的表达产物。

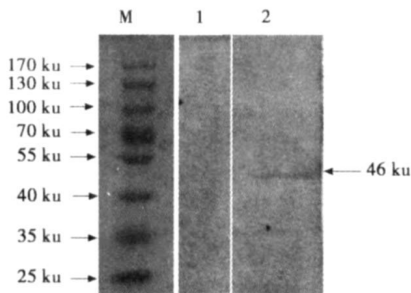
M. Protein molecular weight marker; 1~ 4. *E. coli* BL21(DE3) with pET-3D induced with IPTG for 7, 5, 3, 1 h, respectively; 5. *E. coli* BL21(DE3) with pEF-3D uninduced with IPTG.

图 4 3D 聚合酶基因在大肠杆菌中表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of expressed products from 3D gene in *E. coli*

### 2.5 Western blot 检测

Western blot 检测结果显示, 表达的目的蛋白可以与牛抗 A 型 FMDV 血清发生特异性反应(图 5), 证实 3D 聚合酶蛋白在大肠杆菌 BL21(DE3) 中得到了正确表达, 且表达产物具有良好的反应原性。



M. 蛋白质分子质量标准; 1. IPTG 诱导的 pET-30a(+) )

BL21(DE3) 菌体产物; 2. 重组质粒 pEF-3D 经 IPTG 诱导的表达产物。

M. Protein molecular weight marker; 1. Expressed proteins from *E. coli* BL21(DE3) with pET-30a(+) induced with IPTG; 2. Expressed proteins from *E. coli* BL21(DE3) with pEF-3D induced with IPTG.

图 5 表达产物的 Western blot 分析

Fig. 5 Western blot detection of the 3D proteins

### 3 讨论

3D 蛋白是 FMDV 的 RNA 聚合酶,除了在病毒的复制过程中发挥催化作用外,还与 FMDV 的感染和致病机理相关,由于可利用感染康复动物的血清在感染细胞中检测到 3D 蛋白,因此最初称之为 FMDV 感染相关抗原(FMD-VIAA)<sup>[8]</sup>。随后发现康复动物血清在体外可以抑制 RNA 聚合酶的活性,相应地,当血清用 FMD-VIAA 吸附后,其抑制活性大大减小<sup>[9,10]</sup>。由于 3D 聚合酶相对保守,没有型特异性,所以检测其抗体是评价动物是否接触过 FMDV 的重要指标,也是国际贸易必检项目,此外,3D 聚合酶和另一种非结构蛋白中间体 3ABC 结合被用来进行自然感染动物和免疫动物的鉴别诊断<sup>[11]</sup>。

综上所述,3D 聚合酶在基础研究和应用中的作用值得重视,尽管以前国内外对 3D 聚合酶的研究并不多,但是伴随着生物信息学的发展和日趋成熟,已经有越来越多的学者将其与传统的分子免疫学技术相结合用于口蹄疫病毒的研究,周建华等<sup>[12]</sup>利用同源建模的方法模拟出 FMDV 的 3C 蛋白酶的三维结构和表面模型,并鉴定出其活性中心,同时,3D 聚合酶的三维结构分析及其抗原表位研究也成为新的研究热点<sup>[13]</sup>。

目前基因工程表达蛋白主要利用三大系统:大肠杆菌系统、酵母表达系统和昆虫杆状病毒表达系统<sup>[14]</sup>。国内有采用毕赤酵母<sup>[15]</sup>和杆状病毒<sup>[16]</sup>表达口蹄疫病毒 3D 基因的报道,但是由于这 2 个表达系统均存在表达量低的问题,给功能和结构的研究带来不便,因此尚未见相关功能研究的结果,相比之下,大肠杆菌表达系统的表达效率较高。本研究利用 RT-PCR 方法扩增出了完整的 FMDV AF72 株 3D 聚合酶基因,将其插入原核表达载体 pET-30a(+) 中,使其在大肠杆菌中获得了正确表达,目的蛋白分

子量为 46 ku。由于 3D 蛋白的生物功能主要体现在 RdRp 活性,所以要充分考虑到重组表达给蛋白结构和功能带来的影响,尽量避免表达过程中蛋白性质的改变,以得到具有完整活性的目的蛋白,试验采用 Western blot 分析证实,表达产物可以与抗 A 型 FMDV 阳性血清发生特异性反应,表明表达蛋白具有良好的免疫反应性,本试验为进一步的多克隆抗体制备奠定了良好的基础。

### 参考文献:

- [1] Grubman M J, Baxt B. Foot and mouth disease [J]. Clin Microbiol Rev, 2004, 17: 465-493.
- [2] Domingo E, Baranowski E, Escamis C, et al. Foot and mouth disease virus [J]. Comp Immun Microbio Infect Dis, 2002, 25: 297-308.
- [3] Pereira H G. Foot and mouth disease virus [M] // Virus diseases of food animals. New York: Academic Press, 1981: 333-363.
- [4] Gohara D, Crotty S, Arnold J J, et al. Poliovirus RNA dependent RNA polymerase [J]. J Biol Chem, 2000, 275: 25523-25532.
- [5] Labont P, Axelrod V, Agarwal A, et al. Modulation of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase activity by structure-based site-directed mutagenesis [J]. J Biol Chem, 2002, 277: 38838-38846.
- [6] Lohmann V, Klier M F, Herian U, et al. Biochemical properties of hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase and identification of amino acid sequence motifs essential for enzymic activity [J]. J Virol, 1997, 71: 8416-8428.
- [7] Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, et al. Short Protocols in Molecular Biology [M]. 3rd ed. New York: John Wiley & Sons, 1995.
- [8] 谢庆阁. 口蹄疫 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2004: 30-31.
- [9] Morgan D O, Moore D M, Mckercher P D. Purification of foot and mouth disease virus infection associated antigen [M]. Proc Annu Met US Anim, Health Assoc, 1978, 82: 277-283.
- [10] Lowe P A, Brown F. Isolation of a soluble and template-dependent foot and mouth disease virus RNA polymerase [J]. Virology, 1981, 111: 23-32.
- [11] Polamick J, Arlinghaus R B, Graves J H, et al. Inhibition of cell-free foot and mouth disease virus ribonucleic acid synthesis by antibody [J]. Virology, 1967, 31: 609-615.
- [12] 周建华, 丛国正, 高闪电, 等. 口蹄疫病毒株 OA/58 3C 蛋白酶的结构模拟和功能分析 [J]. 华北农学报, 2007, 22(6): 9-13.
- [13] 张 昱, 王永录, 张永光, 等. 口蹄疫病毒株 AF72 3D 聚合酶的三维结构模拟和功能分析 [J]. 中国兽医科学, 2008, 38(9): 733-737.
- [14] 孙 涛, 陆 苹. 口蹄疫病毒 RNA 聚合酶基因 3D 的克隆、表达及纯化 [J]. 中国兽医学报, 2005, 25(2): 119-121.
- [15] 张腾国, 刘在新, 谢庆阁. 口蹄疫病毒 RNA 聚合酶 3D 基因在毕赤酵母中的表达 [J]. 中国兽医科学, 2004, 34(1): 8-11.
- [16] 鲁会军, 金宁一, 韩 松, 等. 口蹄疫病毒 3D 基因在重组杆状病毒中的表达及检测 [J]. 中国预防兽医学报, 2005, 27(3): 175-178.