

水疱性口炎病毒N基因原核表达载体的构建及表达^{*}

郑增忍^{1,2}, 王海霞¹, 龚振华², 张彦明¹, 李 葳², 刘俊辉²

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100;

2 农业部 动物及动物产品卫生质量监督检验测试中心, 山东 青岛 266032)

[摘 要] 针对水疱性口炎病毒(VSV)N基因设计特异性引物,在引物中分别加入EcoR I和Xho I酶切位点。RT-PCR扩增后得到目的基因,将其克隆到表达载体pET30c,连接产物转化于DH5 α 菌株,在含Kan⁺的平板上37℃培养24 h,然后挑取白色菌落,鉴定为阳性者,转化于BL21菌株,再经异丙基硫代- β D-半乳糖苷(IPTG)诱导获得高效表达。表达融合蛋白分子质量为53 ku(目的蛋白大约47 ku),同预期蛋白大小相近。Western blot检测表明,其能与本病毒阳性血清发生特异性反应,表达蛋白有望成为有价值的VSV诊断抗原。

[关键词] 水疱性口炎病毒;N基因;原核表达载体

[中图分类号] S852.65⁺9.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2004)05-0005-04

水疱性口炎病毒(Vesicular stomatitis virus, VSV)是弹状病毒科、水疱病毒属成员,可引起多种哺乳动物的一种急性、高度接触性传染病^[1],以舌、唇、口腔黏膜、乳头和蹄冠等处上皮发生水疱为主要特征^[1,2]。VSV为不分节段的单股负链RNA病毒,从3到5'端依次排列着N、P、M、G和L 5个不重叠的基因,分别编码N、P、M、G和L 5种不同的蛋白^[2]。其中,N蛋白在本病的鉴别诊断上有重要意义^[3]。N蛋白为核衣壳蛋白,其基因的核苷酸序列比较保守^[4],有良好的抗原性,可激发机体产生非中和抗体^[3,5],N蛋白基因还在病毒的复制转录调节中发挥着重要的作用^[3]。用N蛋白抗原不但可以避免使用高效价活毒可能产生的危险,而且还可以作为感染毒与用重组G蛋白疫苗免疫的鉴别诊断^[6]。

国外已有表达N蛋白的相关研究报道。早在1983年,Sprague等^[7]就尝试给N基因加入SV40后启动子在COS细胞中表达,但此法表达效率较低。Jones等^[8]1986年报道,N蛋白重组疫苗对人和小鼠表现较高抗原性,但表达效率仍很低。Shabbir等^[9]建立了在昆虫SF9细胞及幼虫中高效表达N蛋白(NJ型),在多角启动子控制下,非融合N蛋白表达率(60%)较融合性N蛋白(41%)要高,非融合N蛋白表达在幼虫中高达68%。Katz等^[10]

报道了用杆状病毒构建载体,将N蛋白(N-1型)高效表达在昆虫细胞中。

由于N蛋白缺乏糖基化位点,故重组后可在原核细胞中大量表达,并维持抗原的完整性。由于VSV在国内很少研究,如果能够建立起一种在原核细胞中高效表达N蛋白的成熟路线方法,不但可为VSV重组抗原的研究提供进一步的资料,还能填补国内有关本病毒的研究空白,有着很重要的意义。本研究旨在建立一种在原核中高效表达N蛋白的试验方法,为进一步建立以重组蛋白为检测抗原的水疱性口炎的诊断方法奠定基础。

1 材料与方法

1.1 病毒、菌株和质粒

VSV RNA (Indiana型)由加拿大温哥华病毒研究中心宫云浩博士提供,大肠杆菌DH5 α BL21 (DE3)菌种和载体pET30c由质检中心病毒室提供。

1.2 酶与试剂

反转录酶(MMLV)及反转录试剂,TaqDNA聚合酶,PCR试剂,各种限制性内切酶,T4DNA连接酶和Mark DL2000,均购自大连宝生物工程公司,DNA回收试剂盒,pGEM-T Vector试剂盒和标准

^{*} [收稿日期] 2003-12-04

[基金项目] 农业部外来病研究项目(动物疫情监测与防治经费科目编码:070104)

[作者简介] 郑增忍(1962-),男,陕西渭南人,在读博士,主要从事动物检疫及动物产品卫生质量监督检验研究。

蛋白 Mark 为 Promega 公司产品; Hybond-N 膜为 Amersham 公司产品; VSV 阳性血清(牛)购自美国国家兽医实验室; 羊抗牛 IgG-HRP 酶标二抗购自 Bethyl 公司。

1.3 引物的设计与合成

参考标准序列, 应用 DNA star 软件, 选择保守性较好的两端区域, 设计的引物既包含整个 N 基因, 又加入了 N 基因中没有而载体中含有的 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切位点。引物由上海博亚有限公司合成, 引物序列如下:

VSVNF₄₂ GAAACTTTAACAGGAATTCAAAATGTC (*EcoR* I)

VSVNR₁₃₅₁ GTGATCTGAGAAATTCGAGTCAT (*Xho* I)

1.4 N 基因的获得

采用 RT-PCR 法获得目的基因。反转录体系 (20 μ L) 为: RNA 液 (RNA 溶于 10 μ L 三蒸水) 10 μ L, 5 $\times$ Buffer 4 μ L, dNTP (25 mmol/ μ L) 3 μ L, 引物 1 μ L, RNA sin 1 μ L, MMLVase 1 μ L。混匀后 37

水浴 1 h 即得 cDNA。在反转录完成后, 100 $^{\circ}$ C 水煮 1~2 min 终止反应。PCR 扩增体系 (30 μ L) 为: 10 $\times$ buffer 3 μ L, dNTP 3 μ L, MgCl₂ (25 mmol/L) 2 μ L, 引物 1 μ L, cDNA 模板 1 μ L, Taq 酶 0.5 μ L, 灭菌三蒸水 19.5 μ L。PCR 程序: 95 $^{\circ}$ C 变性 3 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 40 s, 50 $^{\circ}$ C 退火 40 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

1.5 重组表达质粒的构建

通过 PCR 法在 N 基因两端分别加入 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切位点, 纯化后与 pGEM-T 载体相连, 转化 DH5 α , 小量制备质粒。用 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切阳性质粒, 纯化回收目的片段, 与经 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切的 pET30c 载体连接, 构建重组表达载体。

1.6 感受态细胞的转化和阳性克隆的筛选

感受态细胞的制作参见文献[11]。先将重组表达载体转化到 DH5 α 感受态细胞中, 再将转化产物涂布于含 Kan⁺ 的 LB 琼脂平板上, 过夜培养后, 筛选阳性表达质粒。阳性表达质粒再被转化于 BL 21 感受态细胞中, 涂板, 提质粒, 再经 PCR、酶切和测序鉴定后, 命名为 pETVSV-N。

1.7 重组质粒在大肠杆菌中的表达及产物的鉴定

挑取含 pETVSV-N 的单个转化菌落, 接种于 3 mL 含 50 μ g/mL Kan⁺ 的 LB 培养基中过夜培养后, 按 1:100 比例接种于 50 mL 2 $\times$ YT 培养基中, 于 30 $^{\circ}$ C 继续培养 3 h, 加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L 继续培养, 每隔 2 h 收菌 1 次。同时诱导

含空载体 pET30c 的受体菌。

1.8 SDS-PAGE 电泳

取收取的菌液 1 mL, 8 000~12 000 r/min 离心 2~5 min 后弃上清液, 用 PBS 液洗 1 次, 将沉淀重悬于 1 $\times$ SDS-PAGE 上样缓冲液中, 水煮 5~10 min, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液作为加样样品。积层胶浓度为 5%, 分离胶浓度为 12%, 每个加样孔上样 15 μ L, 120 V 电压, 电泳结束后考马斯亮蓝 R 250 染色, 脱色后分析。

1.9 Western blot 分析

样品的处理及电泳方法参照 1.8 所述。将样品在同一块凝胶上重复点样, 一半用于转膜, 另一半用来染色。将预先在电泳缓冲液中浸泡润湿的滤纸、海绵、NC 膜按 1 层海绵, 3 层滤纸、凝胶、NC 膜, 3 层滤纸, 1 层海绵的顺序依次放入塑料夹中后, 含 NC 膜的一端面向阳极, 100 mA 转移 3 h。转移结束后, 取出 NC 膜, 一半用 10 g/L 氨基黑染色以观察转移效果, 另一半用 30 g/L BSA 室温封闭 1 h 或过夜, 用 TBST (20 mmol/L, pH 7.5 Tris-HCl, 500 mmol/L NaCl, 0.05% Tween-20) 洗涤 3 次, 加入 VSV 阳性血清 (1:1 000 稀释) 于室温结合 2 h 后用 TBST 冲洗 3 次, 然后加入辣根过氧化物酶标记的羊抗牛 IgG (1:5 000 稀释), 室温结合 2 h, 用 TBST 洗涤 3 次后, 加底物显色。

2 结果与分析

2.1 质粒 pETVSV-N 的 PCR 及酶切结果

质粒 pETVSV-N 的 PCR 及酶切结果见图 1。

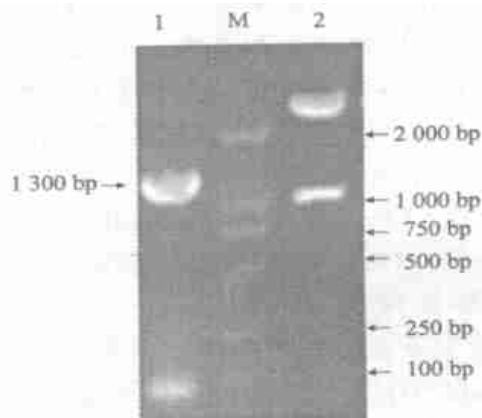


图 1 质粒 pETVSV-N 的 PCR 及酶切结果
M. 标准分子质量; 1 PCR 结果; 2 酶切结果

Fig 1 PCR and restriction analysis of recombinant plasmid pETVSV-N

M. Mark DL 2000; 1 PCR identification of pETVSV-N; 2 Restriction analysis of pETVSV-N

由图1可以看出,用表达引物经PCR可扩增出1 300 bp的目的基因,酶切结果与PCR结果相一致。测序结果表明V SV N基因的插入位置、大小和读码框均正确,表明N基因已正确克隆到载体中。

2.2 SDS-PAGE 检测结果

SDS-PAGE 检测结果见图2。由图2可见,在约53 ku位置出现了额外条带,与预测的表达重组融合蛋白大小相一致。pETV SV -N在30 与37 均可被诱导表达,表达量的多少无明显差别,而且在IPTG诱导10 h时仍可表达。在优化表达条件的试验中,当IPTG的量分别为1~5 mmol/L时,其诱导表达量间仍无明显差别。可见,构建的含V SV N基因的重组表达质粒转化BL 21,经诱导后能表达N蛋白。

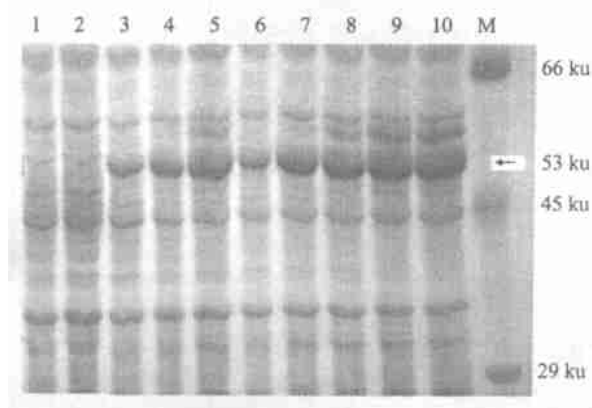


图2 表达蛋白的SDS-PAGE结果

M. 蛋白分子质量标准; 1, 2 pET30c 空白质粒对照 (IPTG 诱导后 2, 4 h); 3~ 5 37 时 pETV SV -N 诱导表达产物 (IPTG 诱导后 2, 4, 6 h); 6~ 10 30 时 pETV SV -N 诱导表达产物 (IPTG 诱导后 2, 4, 6, 8, 10 h)

Fig 2 SDS-PAGE detection of protein expressed in *E. coli*

M. Protein M ark; 1, 2 pET30c transformed BL 21 (DE3) (A fter being induced w ith IPTG 2, 4 h); 3- 5 pETV SV -N transformed BL 21 (DE3) (A fter being induced w ith IPTG 2, 4, 6 h at 37); 6- 10 pETV SV -N transformed BL 21 (DE3) (A fter being induced w ith IPTG 2, 4, 6, 8, 10 h at 30)

2.3 Western blot 检测结果

Western blot 检测结果见图3。在约53 ku位置,诱导后的菌体蛋白中有明显的特异性条带。表达的蛋白有抗原特性,能够与V SV 阳性血清发生特异性反应。曾用6×His 酶标进行抗体试验,结果与本试验结果一致,而空白对照无此条带。

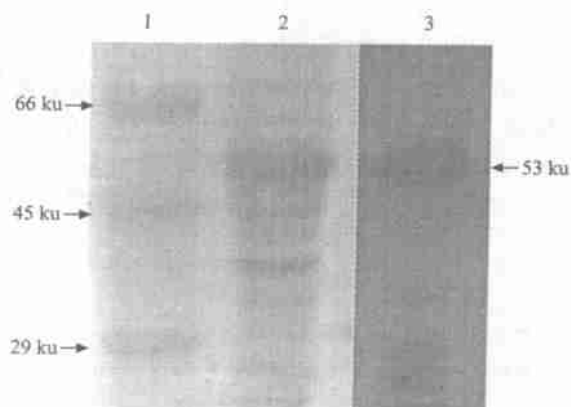


图3 表达蛋白SDS-PAGE(左)和 Western blot(右)检测

1 M ark; 2 pETV SV -N 诱导表达产物

(30 时 IPTG 诱导 6 h); 3 Western blot 结果

Fig 3 SDS-PAGE (left) and Western blot (right)

detection of protein expressed in *E. coli*

1 M ark; 2 pETV SV -N transformed BL 21 (DE3)

(A fter being induced w ith IPTG 6 h at 30);

3 Result of Western blot

3 讨 论

由于N蛋白在V SV 引起的传染病的诊断上具有重要意义^[11],因此自20世纪80年代就引起了学者们的广泛重视,人们至今仍在设法提高其表达含量。近年来,随着各种新型原核表达系统的出现,为高效表达和纯化N蛋白提供了崭新的途径。PET融合表达系统采用迄今为止最强的T₇lac原核启动子,能高效表达外源蛋白,且PET系统的融合伴随蛋白较短,对外源基因的活性影响较小。本试验采用的Pet30c属于硫氧还蛋白融合型表达载体。硫氧还蛋白是一种高效的融合蛋白配偶体,它可使目的蛋白的稳定性加强,同时可有效防止包涵体的形成。同时,表达产物含有6个组氨酸残基,可用带有组氨酸抗体的亲和层析柱结合,从而方便纯化表达产物。大肠杆菌表达系统具有产量高、生长速度快、操作容易、成本低等^[11, 12]优点,使得N基因能够得到很好表达。

作者尝试了不同温度(27~37)及不同IPTG浓度(0.5~5.0 mmol/L)下N蛋白的表达情况,发现蛋白表达量变化不大,可见温度及IPTG浓度对之影响不大。为了尽可能减少包涵体的形成,诱导温度应控制在30 以下。由图2可知,所表达的目的蛋白为53 ku,其中融合蛋白约6 ku,N蛋白约为47 ku,与预期大小一致。Western blot结果表明,N蛋

白有抗原特性,可与VSV 阳性血清发生反应。本研究获得在大肠杆菌中成功表达的VSV N 蛋白,该蛋白表达量较高,且表达产物含有 6 个组氨酸残基,产物极易纯化,为下一步开发以重组蛋白作为检测抗原的VSV 诊断方法奠定了基础。

虽然表达取得初步成功,但如何进一步提高表达蛋白含量、解决蛋白的进一步纯化技术,或尝试其他表达系统(如:杆状病毒、酵母)以比较各系统间的优劣性,以及建立以表达蛋白为检测抗原的诊断方法等,均有待于进一步研究。

[参考文献]

- [1] 殷 震,刘景华 动物病毒学[M]. 第 2 版 北京: 科学出版社, 1997.
- [2] 侯云德 分子病毒学[M]. 北京: 科学出版社, 1990
- [3] Amiya K, Banerjee, Sailen Barik. Gene expression of vesicular stomatitis virus genome RNA [J]. Virology, 1992, 188: 417- 428
- [4] Letchworth G J, Rodriguez L L, Barrera J D C. Vesicular stomatitis [J]. The Veterinary Journal, 1999, 157: 239- 260
- [5] Santiago F Elena. Evolution history conditions the timing of transmission in vesicular stomatitis virus [J]. Infection Genetics and Evolution, 2001, (1): 151- 159
- [6] Cantlon J D, Gordy P W, Bowen R A. Immune responses in mice, cattle and horse to a DNA vaccine for vesicular stomatitis [J]. Vaccine, 2000, 18: 2368- 2374
- [7] Sprague J Condra, J H Arnheiter H, Lazzarini R A. Expression of a recombinant DNA gene coding for the vesicular stomatitis virus nucleocapsid protein [J]. J Virol, 1983, 45: 773- 781
- [8] Jones L, Ristow S, Yilmaz T, et al. Accidental human vaccination with vaccinia virus expressing nucleoprotein gene [J]. Nature, 1986, 319: 543
- [9] Shabbir A, Mansour B, Amiya K B. Immunological characterization of the VSV Nucleocapsid (N) Protein Expressed by Recombinant Baculovirus in *Spodoptera exigua* larva: use in differential diagnosis between vaccinated and infected animals [J]. Virology, 1993, 192: 207- 216
- [10] Katz J B, Shafer A L, Eernisse K A. Construction and insect larval expression of recombinant vesicular stomatitis nucleocapsid protein and its use in competitive ELISA [J]. Journal of Virological Methods, 1995, 54: 145- 157
- [11] Joseph Sambrook, David W. 分子克隆试验指南[M]. 第 3 版 黄培堂, 王嘉玺, 朱厚础, 等译 北京: 科学出版社, 2002
- [12] 侯云德 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 2001

Construction and expression of vesicular stomatitis virus N gene in prokaryotic vector

ZHENG Zeng-ren^{1,2}, WANG Hai-xia¹, GONG Zhen-hua², ZHANG Yan-ming¹, LI Wei², LIU Jun-hui²

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest Sci-Tech University of

Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 National Animal Quarantine Institute, MOA, Qingdao, Shandong 266032, China)

Abstract: The N gene of VSV was amplified by RT-PCR. After the amplified fragment was cloned into the expression vector pET30c, the insert position, the size and the reading frame of the insertion were identified by PCR, restriction digestion and sequence analysis of the recombinant plasmids. SDS-PAGE and Western blot showed the recombinant plasmids induced by IPTG could express the N gene of VSV, the expression protein could be recognized by the positive serum of VSV. The recombinant N protein is potentially valuable antigen for serological test and immunoprophylaxis of VSV.

Key words: vesicular stomatitis virus; N gene; prokaryotic expression vector