

兔出血症病毒 YL 株衣壳蛋白 VP60 基因 在原核系统中的高效表达

李传山^a,任力刚^a,李维英^b,杨增岐^c,郭蔼光^a

(西北农林科技大学 a. 生命科学学院;b. 林学院;c. 动物科技学院,陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 为了在原核系统中高效表达兔出血症病毒(RHDV)衣壳蛋白 VP60,应用 RT-PCR 方法从兔出血症病毒(RHDV)西北分离株 YL 中克隆出了衣壳蛋白 VP60 基因并测序,结果显示,YL 株 VP60 基因全长 1 740 bp,GC 含量为 55.3%,已在 GenBank 中注册(登录号为 DQ530363),VP60 基因与中国 RHDV 最早期分离株 WX84 的 VP60 基因核苷酸序列同源性为 93.0%,氨基酸序列同源性为 95.8%。构建成功 YL 株 VP60 基因原核表达载体 VP60-pET32a,转化到大肠杆菌表达菌株 BL21(DE3)中。1 mmol/L IPTG 诱导表达,SDS-PAGE 检测结果显示,VP60 融合蛋白分子质量约为 75 ku,其表达量占总菌体蛋白的 39.8%。Western blot 检测结果表明,VP60 融合蛋白可以和 RHDV 抗血清发生特异反应。本研究结果显示,兔出血症病毒在干旱半干旱条件下的遗传变异和免疫学特征无较大变化。

[关键词] 兔出血症病毒(RHDV);衣壳蛋白(VP60)基因;原核表达;Western blot

[中图分类号] S852.65+9.6;Q786

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)11-0024-05

High expression of capsid protein (VP60) gene from rabbit hemorrhagic disease virus YL strain in *E. coli*

LI Chuan-shan^a,REN Li-gang^a,LI Wei-ying^b,YANG Zeng-qi^c,GUO Ai-guang^a

(a. College of Life Sciences;b. College of Forestry;c. College of Animal Sciences and Technology,
Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The aim of this paper was to study the high expression of rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) capsid protein VP60 in *E. coli*. The capsid protein VP60 gene of RHDV YL Strain was cloned by employing the method RT-PCR and then sequenced. YL Strain was the first RHDV strain being sequenced in the northwest of China. The result showed that the nucleotide sequence of VP60 gene was 1 740 bp. The sequence had been submitted to GenBank (the accession number is DQ530363). Compared with the earliest Chinese RHDV isolated WX84, the homology of VP60 gene was 93.0% in nucleotide sequence and 95.8% in amino acid sequence and the proportion of GC was 55.3%. The prokaryote expression plasmid VP60-pET32a of VP60 gene was successfully constructed, and then inserted into the expression *E. coli* strain BL21(DE3). The target protein was highly expressed under the induction with 1 mmol/L IPTG. SDS-PAGE analysis showed that the molecular weight of the recombinant VP60 protein was about 75 ku. The proportion of the recombinant VP60 protein reached 39.8% of the total bacterial proteins. Western blot analysis demonstrated that the recombinant VP60 had a specific reaction with antiserum of RHDV.

Key words: rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV); capsid protein (VP60) gene; prokaryote ex-

†收稿日期] 2006-09-29

[作者简介] 李传山(1981-),男,安徽合肥人,在读硕士,主要从事口服疫苗研究。E-mail:chuanshanli@hotmail.com

[通讯作者] 郭蔼光(1942-),女,陕西西安人,教授,博士生导师,主要从事分子生物学研究。E-mail:guoai-guang@yahoo.com.cn

pression; Western blot

兔出血症(Rabbit Hemorrhagic Disease, RHD)是由兔出血症病毒(Rabbit Hemorrhagic Disease virus, RHDV)所致的一种急性、高度传染性、高度致死性疾病,它以全身实质器官水肿、淤血及出血性变化为主要特征,其发病率和致死率都很高,是兔的一种毁灭性传染病。该病于 1984 年春在中国江苏无锡、江阴等县市首先暴发^[1],其后世界各养兔地区都相继发生,给养兔业造成了巨大的经济损失。

RHDV 属于嵌杯样病毒科兔病毒属,为单链正义 RNA 病毒,其基因组由 7 437 个核苷酸组成,拥有两个开放阅读框(ORF)^[2],分别编码多个蛋白,如 2C 解旋酶、3C 样蛋白酶、3D 样聚合酶和衣壳蛋白(Capsid Protein),其中衣壳蛋白是 RHDV 的主要结构蛋白,称为 VP60;2.4 kb 的亚基因组 RNA 也编码衣壳蛋白 VP60。一方面,VP60 与诱导抗病毒感染的免疫反应直接相关^[2-3],是病毒免疫保护性抗原;另一方面,由于 RHDV 只有一个血清型^[4],注射疫苗是预防 RHD 的最有效方法,但由于 RHDV 迄今未能稳定地适应于任何细胞培养,现行组织灭活疫苗只能用感染 RHDV 致死的兔肝脾组织制备,存在着诸多弊端,如抗原制备麻烦,纯化过程繁琐,且抗原特质难免会发生一些变化。而用 VP60 制备 RHD 亚单位疫苗是疫苗生产的一个新途径。近年来,国内外学者在 RHDV 的分子生物学方面进行了大量的探索性工作^[5-9],已经成功地在不同的表达系统中表达了 RHDV VP60 重组蛋白。

中国西北地区一直未见 RHDV 西北分离株分子生物学特征的报道,这是 RHDV 分子流行病学的一个空白。本研究报道了 RHDV 西北分离株 YL 的 VP60 基因全序列,在此基础上,用原核系统对 VP60 基因进行了高效表达,并研究了重组 VP60 的免疫原性,以期兔出血症病毒亚单位疫苗的研制提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒、质粒、菌株及抗血清 兔出血症病毒 YL 分离株是近年从陕西省户县某养兔场分离获得,经鉴定为 RHDV 病毒,由西北农林科技大学动物科技学院预防兽医学研究室保存;克隆载体为 pGEM-Teasy,购自 Promega 公司;表达载体为 pET32a,购自 Novagen 公司;克隆菌株为大肠杆菌

(*Escherichia coli*) DH5 α 、表达菌株为大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3),均由西北农林科技大学生命科学院生物化学与分子生物研究室保存;RHDV 高免抗血清,由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所提供。

1.1.2 试剂 Trizol 试剂为 Invitrogen 产品;M-MLV、RNA 酶抑制剂 Rnasin、限制性内切酶,均购自 Promega 公司;DNA 聚合酶 Ex Taq 购自 Takara 公司;PVDF 膜购于 Amersham 公司;山羊抗兔 IgG 酶标二抗为华美生物技术公司产品;HRP-DAB(辣根过氧化物酶 DAB 底物)显色试剂盒购自 TIAN-GEN 生物技术公司。

1.2 YL 株病毒 RNA 的提取

取 RHDV 感染的病死兔肝脏,加 5 倍体积的 PBS,再加少许液氮研磨至匀浆状,-40℃ 冻融 3 次,在 0~3 000 g 离心 20 min,取上清液加 1 倍体积的氯仿处理 15 min,在 0~3 000 g 离心 20 min,取上清液在 10 000 g 离心 2 h,上清液即为病毒粗提液。RNA 提取按照 Invitrogen 公司的 Trizol 试剂说明书进行,所得 RNA 融于 DEPC(焦炭酸二乙酯)处理水中。

1.3 YL 株 VP60 基因的扩增、克隆和测序

1.3.1 引物设计 根据 GenBank 上已发表的序列以及构建原核表达质粒的需要(正确的阅读框、限制性酶切位点),设计了 VP60 基因的上游引物 F 和下游引物 R。

F:5'-CC ATG GAG GGC AAA GCC CGC AC-3';

R:5'-TTA TCA GAC ATA AGA AAA GCC ATT GG-3'。

引物由上海英骏生物技术公司合成。

1.3.2 RT-PCR 扩增 取提取的 YL 株病毒 RNA 2 μ L 作为模板,RT 体系为 20 μ L,以反转录引物 R 进行反转录^[10]。然后取 RT 产物 cDNA 0.5 μ L 作为 PCR 的模板,PCR 反应体系为 50 μ L,反应条件:94℃ 预变性 2 min;94℃ 变性 40 s,55℃ 复性 1 min,72℃ 延伸 1.5 min,循环 35 次;最后 72℃ 末端补齐 10 min。

1.3.3 RT-PCR 扩增产物的克隆及测序 将 1.3.2 的 PCR 产物切胶后,用凝胶 DNA 回收试剂盒回收纯化,按照 pGEM-Teasy 载体操作手册说明,连接到 pGEM-Teasy 载体上,用 KCM 法转化大肠杆菌

感受态细胞 DH5 α ^[11]。通过 IPTG 诱导, X-gal 蓝白斑和菌落 PCR 方法筛选阳性克隆^[10], 所得阳性克隆过夜培养, 提取质粒, 以 *EcoR* 酶切重组子验证, 经验证的阳性克隆菌穿刺培养后, 送上海英骏生物技术公司测序。

1.4 VP60 基因表达质粒的构建与转化

选择 1.3.3 中含有 VP60 基因的阳性克隆菌, 震荡培养提取质粒 VP60-T, 用 *Nco*、*EcoR* 过夜双酶切 VP60-T, 电泳回收目的基因片段; 将 pET32a 表达载体也按同样方法处理, 回收载体片段。16 过夜连接表达载体 pET32a 和目的基因 VP60^[10], 连接产物用 KCM 法转化克隆菌株 DH5 α ^[11], 通过氨苄青霉素抗性和限制性内切酶筛选鉴定阳性克隆, 经鉴定的阳性克隆送上海英骏生物技术公司测序, 以验证原核表达阅读框架的正确性。将验证后的阳性克隆提取质粒 VP60-pET32a, 再转化表达菌株 BL21(DE3)。

1.5 VP60 的诱导表达

挑取含有质粒 VP60-pET32a 的表达菌 BL21 单克隆, 于含有 Amp (80 mg/L) 抗生素的 LB 液体培养基中, 37 过夜培养, 次日, 按照体积比 1:100 接种到新 LB 液体培养基中, 37 扩大培养, 2 h 后加入 1.0 mmol/L IPTG 诱导表达, 分别于诱导 2, 3, 4 和 5 h 取 1 mL 菌液, 8 000 r/min 离心 1 min 收集菌体。同样方法处理含有 pET32a 表达载体的 BL21 表达菌, 作为阴性对照。

1.6 重组表达 VP60 的 SDS-PAGE 检测

将 1.5 中离心所得菌体, 用 300 μ L 重蒸水重

悬, 取出 30 μ L 混合液, 加入 10 μ L 4 倍的 loading buffer 混匀, 100 煮沸 5 min, 然后 13 000 r/min 离心 5 min, 取上清液 10 μ L 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳; 同时取 30 μ L 菌体重悬液, 用冻融法 (-40 10 min, 37 5 min, 反复 4 次) 裂解细胞, 13 000 r/min 离心 5 min, 取上清液, 加入 10 μ L 4 倍的 loading buffer 混匀, 煮沸后取 10 μ L 混合液进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 以检查 VP60 的可溶表达情况。用 Bandscan 软件分析 VP60 蛋白含量。

1.7 Western blot 检测^[12]

重组表达蛋白 VP60 经 SDS-PAGE 电泳分离后, 半干转移(转移条件为 1 mA/cm², 2 h)至 PVDF 膜; PVDF 膜于室温下在封闭液[100 g/L 脱脂奶粉的 TBS(100 mmol/L Tris·Cl, pH7.5, 9 g/L NaCl)]中封闭 2 h 后, 与 500 μ L 一抗兔抗 RHDV 血清(稀释 500 倍)和二抗辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG (稀释 1 000 倍)反应; 最后用 HRP-DAB 显色试剂盒显色。

2 结果与分析

2.1 YL 株 VP60 基因的扩增、克隆和测序

图 1 表明, YL 株扩增出 1 条约 1.7 kb 的 VP60 基因条带, 与预期的扩增片段大小相符。测序结果显示, YL 株 VP60 基因完整阅读框长 1 740 bp, GC 含量 55.3%, 已将测序结果在 GenBank 中注册(登录号为 DQ530363), 其与 RHDV 中国最早期分离株 WX84 的 VP60 基因核苷酸序列同源为 93.0%, 氨基酸序列同源性为 95.8%。

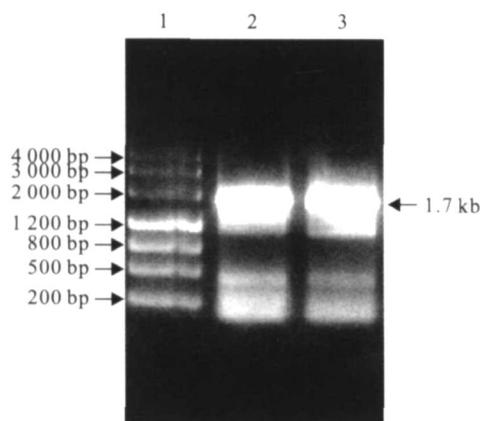


图 1 RHDV YL 株 VP60 基因的 PCR 扩增结果

1. DNA 标准 3; 2, 3. VP60 基因扩增产物

Fig. 1 Results of VP60 gene PCR

1. DNA Marker 3; 2, 3. Products of PCR

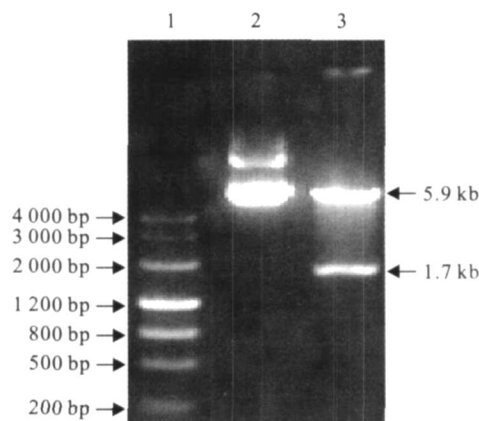


图 2 重组质粒 VP60-pET32a 的酶切鉴定结果

1. DNA 标准 3; 2. 重组质粒 VP60-pET32a;

3. 重组质粒 VP60-pET32a *Nco*、*EcoR* 双酶切产物

Fig. 2 RE analysis of recombinant VP60-pET32a

1. DNA Marker 3; 2. Recombinant VP60-pET32a;

3. VP60-pET32a by *Nco* and *EcoR*

2.2 重组质粒 VP60-pET32a 的鉴定

图 2 显示,通过 Amp 抗生素、菌落 PCR 筛选出阳性菌落,震荡培养,用质粒回收试剂盒回收的质粒 VP60-pET32a,经 *Nco*、*EcoR* 双酶切后,扩增产物中出现 1 条 1.7 kb 左右和 1 条 5.9 kb 的条带,表明 VP60 基因已插入到 pET32a 载体上,阳性克隆的测序验证了阅读框架的正确性。

2.3 VP60 的表达和 SDS-PAGE 检测

重组质粒 VP60-pET32a 和表达载体 pET32a 转化表达菌株 BL21 (DE3),并在其中进行了表达,表达的 VP60 蛋白在菌体中基本上以包涵体形式存在(细菌裂解液上清未检测到目的蛋白),经 SDS-

PAGE 电泳检测,表达出约 75 ku 的蛋白 VP60,与预期值相符(图 3)。Bandscan 软件分析 VP60 蛋白含量达 39.8 %。

2.4 重组表达 VP60 的 Western blot 检测

BL21 中表达的重组蛋白 VP60 经 SDS-PAGE 电泳,转到 PVDF 膜上,再经与一抗兔抗 RHDV 血清和二抗山羊抗兔 IgG 反应,在 75 ku 位置处,可看到 1 条杂交条带,而阴性对照未出现特异条带(图 4)。试验表明,BL21 (DE3) 中表达的重组 VP60 蛋白有很好的免疫原性,可被兔抗 RHDV 血清识别,VP60 基因所连有的促折叠标签蛋白基因对 VP60 的免疫原性无较大影响。

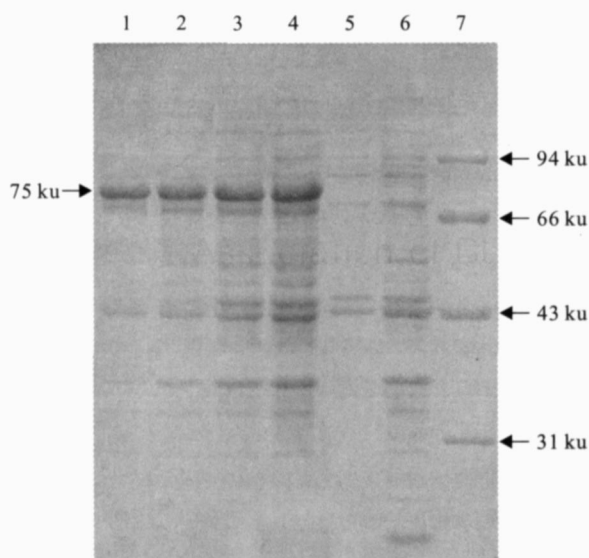


图 3 VP60 基因融合表达产物的 SDS-PAGE 检测结果

1~4. VP60-pET32a 转化菌经 IPTG 诱导 2,3,4 和 5 h 的表达产物;
5. VP60-pET32a 转化菌经 IPTG 诱导后冻融法裂解菌的上清液;
6. pET32a 转化菌的 IPTG 诱导产物;7. 蛋白分子质量标准
Fig. 3 SDS-PAGE analysis of VP60 gene expression
1 - 4. *E. coli* BL21 containing plasmid VP60-pET32a under induction with IPTG in 2,3,4 and 5 h;5. Bacterial lysate supernate of *E. coli* BL21 containing plasmid VP60-pET32a under induction with IPTG;6. *E. coli* BL21 containing plasmid pET32a under induction with IPTG;7. Protein Marker

3 讨论

兔病毒性出血症是 20 世纪末新暴发的兔烈性传染病,危害性很大,对其进行研究有重要的理论和经济价值。本研究对 RHDV 中国西北分离株 YL 的衣壳蛋白基因进行了克隆和测序,在此基础上,将 VP60 基因构建到 pET32a 载体上,利用原核表达系统对 VP60 基因进行了高效表达,同时,用兔抗

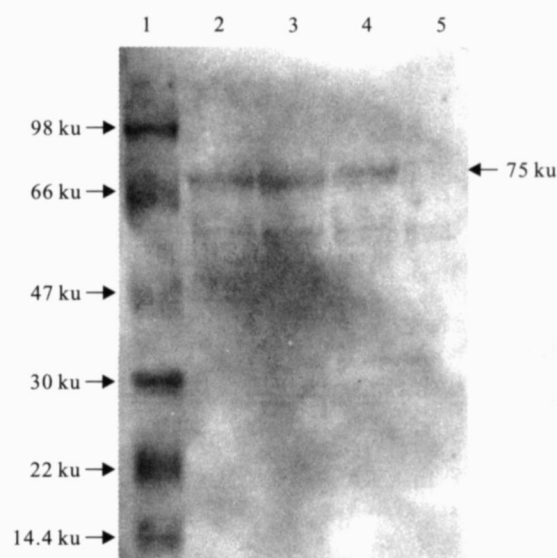


图 4 VP60 基因融合蛋白的 Western blot 检测结果

1. 预染蛋白分子质量标准;2~4. VP60-pET32a 转化菌经 IPTG 诱导产物;5. pET32a 转化菌的 IPTG 诱导产物
Fig. 4 Western blot analysis of VP60 gene
1. prestained protein Marker;2 - 4. *E. coli* BL21 containing plasmid VP60-pET32a under induction with IPTG;5. *E. coli* BL21 containing plasmid pET32a under induction with IPTG

RHDV 血清验证了表达的融合蛋白 VP60 的免疫原性,这对于研究 RHDV 在干旱半干旱条件下的遗传变异和免疫学变异特征有重要的参考价值。

从 1984 年江苏无锡首先暴发兔病毒性出血症并分离出毒株 WX84 到现在,时间跨度达 20 多年,空间跨度达大半个中国,但 RHDV YL 株与 WX84 株 VP60 基因核苷酸序列同源性依然达到 93.0 %;此外,用作 Western blot 的抗体来自 RHDV 哈尔滨

分离株 TP 灭活苗免疫兔的抗血清,和 YL 株 VP60 融合蛋白依然有很好的免疫反应,这进一步验证了 RHDV 只有一个血清型,这在 RNA 病毒中十分罕见。这可能是由于:首先,RHDV 的基因组很小,仅 7 437 个核苷酸,所有的编码蛋白都相互作用并彼此影响,因此所有蛋白都对病毒的生存极为重要,故而任何重要的基因组变化都使 RHDV 无法存活;其次,RHDV 的感染常常导致一个以急性、高死亡率(感染后 2~3 d)为特征的病理过程,使 RHDV 未产生有意义突变的足够时间。

应用大肠杆菌表达外源基因具有高效等诸多优点,但由于原核生物表达系统缺乏翻译后的高级修饰,细胞内部还原性过高,表达的目的蛋白难以正确折叠等,同时,外源蛋白在宿主细胞内可能会被蛋白酶降解,这使得重组蛋白在生物活性上存在着种种缺陷。为了克服以上问题,许多表达性载体都构建成为以融合蛋白表达的形式,然而,这对重组蛋白的生物学功能会产生一定影响。本研究以 pET32a 为载体,表达的 VP60 会在目的蛋白 N 端融合一个 15 ku 的促折叠硫氧还蛋白,Western blot 杂交显示这对 VP60 的免疫原性无较大影响,本研究使 VP60 蛋白获得了高效表达,表达量达 39.8%,这为研制 RHDV 的亚单位疫苗奠定了一定的理论和应用基础。

[参考文献]

[1] 杜念兴,徐为燕,刘胜江. 一种新病毒——兔出血症病毒的鉴定

初报[J]. 病毒学报,1986,2(2):146-152.

- [2] Clarke I N, Lambden P R. The molecular biology of calicivirus-es[J]. J Gen Virol, 1997, 78(Pt2):291-301.
- [3] Thiel H J, König M. Caliciviruses: an overview[J]. Vet Microbiol, 1999, 69(2):55-62.
- [4] Berninger M L, House C. Serologic comparison of four isolates of rabbit hemorrhagic disease virus[J]. Vet Microbiol, 1995, 47(1):157-165.
- [5] Meyers G, Wirblich C, Thiel H J. Rabbit hemorrhagic disease virus: Molecular cloning and nucleotide sequencing of a calicivirus genome[J]. Virology, 1991, 184(2):664-676.
- [6] 刘光清,张玉颖,云涛,等. 兔病毒性出血症病毒基因组 3 端非编码区的分子克隆及生物信息学分析[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版, 2006, 34(3):16-24.
- [7] 严维巍,崔治中,王永坤. 兔出血症病毒中国株衣壳蛋白基因的克隆和序列分析[J]. 中国病毒学, 2003, 18(2):129-133.
- [8] 严维巍,崔治中,王永坤. 兔出血症病毒衣壳蛋白基因在毕赤酵母中的表达[J]. 生物工程学报, 2005, 21(1):135-138.
- [9] Boga J A, Casais R, Marin M S, et al. Molecular cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of the capsid protein gene from rabbit hemorrhagic disease virus (Spanish isolate AST/89)[J]. J Gen Virol, 1994, 75:2409-2413.
- [10] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. 3th ed. Cold Spring Harbor, N Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002:103-105:597-628.
- [11] Chung C T, Miller R H. A rapid and convenient method for the preparation and storage of competent bacterial cells[J]. Nucleic Acid Research, 1988, 16(8):3580-3581.
- [12] Frederick M A, Roger B. Short protocols in molecular biology[M]. 3th ed. Harvard Medical School, Boston, MA: John Wiley & Sons, Inc, 1995:368-371.