

网络出版时间:2012-03-21 18:12

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20120321.1812.030.html>

# 兔岩藻糖基转移酶基因的克隆与原核表达

哲名家<sup>1,2</sup>, 张森涛<sup>1</sup>, 云涛<sup>3</sup>, 王玢瑛<sup>1,2</sup>, 刘光清<sup>2</sup>

(1 西北农林科技大学 动物医学院, 陕西 杨凌 712100; 2 中国农业科学院 上海兽医研究所, 上海 200241;

3 浙江省农业科学院 病毒学与生物技术研究所, 浙江 杭州 310021)

**[摘要]** **【目的】**克隆兔岩藻糖基转移酶(FUT2)基因,并进行原核表达,为进一步研究 RHDV 的感染过程和致病机理奠定物质基础。**【方法】**从兔肌肉组织中抽提基因组 DNA 作为模板,PCR 扩增出 FUT2 基因,然后将该基因亚克隆入原核表达载体 pET30a 中,获得重组原核表达质粒 pET30a-FUT2。将该重组原核表达质粒转化 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞,用 IPTG 进行诱导表达,分别用 SDS-PAGE 和 Western-blot 方法对表达产物进行鉴定。**【结果】**成功克隆了 FUT2 基因,该基因长度为 1 044 bp。成功构建了原核重组表达质粒 pET30a-FUT2,其诱导表达产物分子量约为 45 ku;表达的重组 FUT2 蛋白可与 His 标签抗体发生抗原抗体反应。**【结论】**成功克隆了兔岩藻糖基转移酶基因,获得了分子量约为 45 ku 的 FUT2 蛋白。

**[关键词]** 兔病毒性出血症病毒;岩藻糖基转移酶;原核表达

**[中图分类号]** S852.65<sup>+</sup>9.6;Q785

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-9387(2012)04-0021-04

## Cloning and prokaryotic expression of rabbit fucosyltransferases

ZHE Ming-jia<sup>1,2</sup>, ZHANG Miao-tao<sup>1</sup>, YUN Tao<sup>3</sup>,

WANG Bin-bin<sup>1,2</sup>, LIU Guang-qing<sup>2</sup>

(1 College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Shanghai Veterinary Research Institute, CAAS, Shanghai 200241, China; 3 Institute of Virology and Biotechnology,

Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou, Zhejiang 310021 China)

**Abstract:** **【Objective】**The research cloned and expressed Fucosyltransferases (FUT2), to lay the basis for further exploring the infection process and pathogenesis mechanism of Rabbit hemorrhagic disease virus. **【Method】**Extraction genome from rabbit muscle tissue, FUT2 gene was synthesized and sub-cloned into the pET30a vector, and then the recombinant plasmid pET30a-FUT2 transformed into *E. coli*. BL21 (DE3). The expression of the recombinant plasmid was induced by IPTG and analyzed by SDS-PAGE and Western-blot. **【Result】**The results show that FUT2 gene is 1 044 bp in length, and the molecular weight of the recombinant protein, fused to his tag, is about 45 ku. **【Conclusion】**FUT2 gene is successfully cloned, and the molecular weight of the recombinant protein is about 45 ku.

**Key words:** rabbit hemorrhagic disease virus; fucosyltransferases (FUT2); prokaryotic expression

兔出血症(Rabbit hemorrhagic disease, RHD)俗称“兔瘟”<sup>[1]</sup>,其病原兔出血症病毒(RHDV)为无囊膜的单股正链 RNA 病毒,属于杯状病毒科(Cali-

civiridae)兔病毒属(Lagovirus)。RHDV 可以感染多个品种的兔,以呼吸系统出血、肝坏死及实质脏器水肿<sup>[2-3]</sup>、淤血和出血性变化为主要特征。自 1984

\* [收稿日期] 2011-10-28

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30870114);浙江省自然科学基金项目(3100396)

[作者简介] 哲名家(1984—),女,满族,辽宁锦州人,在读硕士,主要从事动物病毒分子生物学研究。

[通信作者] 刘光清(1968—),男,安徽砀山人,研究员,主要从事病毒分子生物学研究。E-mail: liugq @ shvri. ac. cn

张森涛(1963—),男,陕西礼泉人,副教授,博士,主要从事动物病毒分子生物学研究。E-mail: zmt6371@ yahoo. com. cn

年中国首次报道 RHD 以来,该病已经传播至全球 40 多个国家和地区,给世界养兔业和野生兔资源造成了极大的威胁<sup>[4]</sup>。关于 RHDV 的感染过程和致病机理,目前还不是很清楚,研究 RHDV 的受体对了解此过程将很有帮助。Ruvoën-clout 等<sup>[5]</sup>研究发现,RHDV 能够与兔上呼吸道和消化道上皮细胞表面的三糖(Fuc $\alpha$ 2Gal $\beta$ 4GlcNAc $\beta$ -R)结合,这种特殊的三糖是 H2 型组织血型抗原(HBGA)家族的一个成员,虽然该抗原在其他哺乳动物(包括人类)中广泛存在,但其在各组织中的分布具有明显的动物种属差异性。RHDV 能够与 HBGA 结合,并且该特殊抗原的糖基化过程需要在  $\alpha$ 1,2 岩藻糖基转移酶(FUT2)的参与下才能完成<sup>[6]</sup>。据报道,兔体内有 3 种不同的岩藻糖基转移酶基因:FUT1、FUT2 和 Sec1,其中 Sec1 和 FUT2 基因只在上皮细胞中才可以表达相应的蛋白,而 FUT1 的 mRNA 仅在脑组织中能够检测到<sup>[7-8]</sup>。最近的研究还证明,Sec1 不仅是一个假基因,而且与兔 FUT2 基因具有直接同源性,其表达决定了宿主是否对诺瓦克病毒具有敏感性或抵抗力<sup>[9-10]</sup>。FUT2 基因首先通过  $\alpha$ 1,2 糖苷键与 HBGA 前体的半乳糖基团相互连接,然后发挥催化岩藻糖基的功能,使其糖基化成为 RHDV 的功能性受体。因此,FUT2 的表达与否决定了兔是否对 RHDV 敏感,研究 FUT2 基因在宿主细胞内的表达和分布,对于探索 RHDV 的感染过程和致病机理等具有重要意义。为此,本试验对兔体内的 FUT2 基因进行了克隆和表达,并对 FUT2 蛋白进行了纯化,以期为进一步研究 FUT2 在 RHDV 致病过程中的作用提供物质基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 试验动物 2~3 kg 新西兰白兔,购自上海陈行实验用兔有限公司。

1.1.2 质粒和菌株 原核表达载体 pET-30a(+)及工程菌株 *E. coli* DH5 $\alpha$  和 *E. coli* BL21(DE3),购自 Novagen 公司。

1.1.3 主要试剂 T4 DNA 连接酶、DNA 抽提试剂盒和 Ex Taq DNA 聚合酶,均购自大连宝生物工程有限公司;His-tag Monoclonal Antibody,为北京康为世纪公司产品;HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG,为中杉金桥公司产品。

### 1.2 方法

1.2.1 引物的设计与合成 根据 GenBank 登录的

兔 FUT2 基因序列(GenBank 登录号:X91269),采用 Primer premier 5.0 软件设计 1 对扩增 FUT2 的特异性引物,其两端分别设计有 Not I 和 Xho I 酶切位点。引物由上海杰李生物技术有限公司合成,其序列如下:

FUT2F:5'-CAAGA GCGGCCTAACTAACAT CCCTGC-3',下划线部分为 Not I 酶切位点;

FUT2R:5'-GAAACCTCGAGTGGCCCACG T-3',下划线部分为 Xho I 酶切位点。

1.2.2 FUT2 基因的 PCR 扩增及产物的纯化 使用 DNA 基因组抽提试剂盒,按照说明书从兔肌肉组织抽提兔基因组 DNA。以抽提的兔基因组 DNA 为模板,用 Ex Taq Mix DNA 聚合酶 PCR 扩增 FUT2 基因,PCR 反应体系为 50  $\mu$ L,其中模板 DNA(100 ng/ $\mu$ L)1.0  $\mu$ L,Ex Taq Mix DNA 聚合酶 25  $\mu$ L,引物 FUT2F、FUT2R(10 pmol/L)各 1  $\mu$ L,加灭菌蒸馏水至 50  $\mu$ L。PCR 反应程序为:94  $^{\circ}$ C 5 min;94  $^{\circ}$ C 1 min,56  $^{\circ}$ C 1 min,72  $^{\circ}$ C 1 min,30 个循环;72  $^{\circ}$ C 10 min。取 PCR 产物,进行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析,并以 DNA 片段小量快速回收纯化试剂盒进行纯化,操作方法按产品说明书进行。

1.2.3 pMD18-T-FUT2 的构建及鉴定 将纯化的 PCR 产物与 pMD18-T simple 载体于 16  $^{\circ}$ C 下连接过夜后,转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞。提取质粒 pMD18-T-FUT2,进行 PCR 和 Not I、Xho I 双酶切鉴定,对鉴定正确的质粒送上海华津生物技术有限公司测序。

### 1.3 pET30a-FUT2 重组原核表达质粒的构建

将 pET-30a(+)质粒和 pMD18-T-FUT2 质粒分别用 Not I 和 Xho I 双酶切,双酶切反应体系为 50  $\mu$ L,其中质粒 30  $\mu$ L、10 $\times$ H Buffer 5  $\mu$ L、Not I 1.5  $\mu$ L、Xho I 1.5  $\mu$ L,加灭菌蒸馏水至 50  $\mu$ L;反应条件为 37  $^{\circ}$ C 反应 3 h。胶回收 pET-30a(+)载体片段和 FUT2 基因片段,之后用 T4 DNA 连接酶于 16  $^{\circ}$ C 连接过夜,将连接产物转化 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞,涂布于固体 LB 培养基上(含 Kan<sup>r</sup>100  $\mu$ g/ $\mu$ L),37  $^{\circ}$ C 过夜培养后,挑取单菌落进行培养,用质粒提取试剂盒提取重组质粒,进行 Not I 和 Xho I 双酶切鉴定。将酶切鉴定正确的质粒送上海华津生物技术有限公司测序,测序正确的质粒命名为 pET30a-FUT2。

### 1.4 pET30a-FUT2 的诱导表达

挑取鉴定正确的阳性克隆,接种于 3 mL LB(含 Kan<sup>r</sup>100  $\mu$ g/ $\mu$ L)培养基中,37  $^{\circ}$ C、250 r/min 振荡培

养 12 h。按 1 : 100 比例转接种到新鲜液体 LB 培养基中(含 Kan<sup>r</sup> 100 μg/μL),振荡培养 3 h 至 OD<sub>600</sub> 为 0.5~0.6 时,预先吸取 3 mL 菌液作为未诱导对照,其余菌液加入 IPTG 至终浓度为 1.0 mmol/L,37 ℃ 诱导 8 h,期间每隔 1 h 收获菌液样品 3 mL,检测 FUT2 的表达情况,以确定 IPTG 的最佳诱导时间。将全部菌液于 12 000 r/min 离心 10 min,所得沉淀用 PBS 缓冲液重悬,用 120 g/L 的 SDS-PAGE 电泳方法分析 FUT2 的表达情况。

1.5 表达产物的纯化及鉴定

向 400 mL 的菌液中加入 IPTG 至终浓度为 1.0 mmol/L,培养 5 h 后将全部菌液离心(10 000 r/min,10 min);弃上清,向沉淀中加入 40 mL 的 Tris-HCl 缓冲液(pH8.0、20 mmol/L),悬浮菌体,吹打均匀;再加入 400 μL 新配制的溶菌酶液(浓度为 1 mg/mL),37 ℃ 振荡培养 30 min 后,置于一 20 ℃ 冷冻 30 min,反复冻融 3 次裂解菌体;超声波破碎(超声破碎每次 5 s,间隔 6 s,99 次/周期,电压 40 V)菌体后再反复冻融 3 次。裂解后的菌体经洗涤后,用 8 mol/L 尿素透析过夜,每 12 h 更换 1 次透

析液,最终得到纯化的重组蛋白,浓缩后进行蛋白定量,—70 ℃ 保存。用 Western-blot 方法检测纯化的蛋白,一抗为 1 : 1 000 倍稀释的 His-标签鼠单抗,二抗为 1 : 1 000 倍稀释的 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG,使用 DAB 法显色。

2 结果与分析

2.1 兔 FUT2 基因的 PCR 扩增

PCR 结果显示,从兔肌肉组织提取染色体 DNA 中成功扩增到 1 044 bp 的 FUT2 基因(图 1)。测序结果表明,该基因由 1 044 个碱基组成;序列比对分析发现,扩增的 FUT2 基因与 GenBank 登录的兔 FUT2 参考基因(GenBank 登录号:X91269)同源性在 99% 以上。

2.2 pET30a-FUT2 重组原核表达质粒的鉴定

对重组原核表达质粒 pET30a-FUT2 进行 Not I 和 Xho I 双酶切鉴定,结果获得了约 5 400 和 1 044 bp 的 2 个基因片段(图 2),表明目的基因已成功连接到表达载体中。

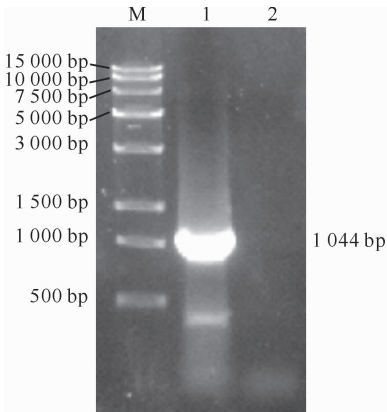


图 1 兔 FUT2 基因的 PCR 扩增

M. DNA 分子质量标准 DL15000;1. PCR 产物;  
2. 阴性对照

Fig.1 PCR product of rabbit FUT2 gene

M. DNA Marker DL15000;1. PCR product;  
2. Negative control

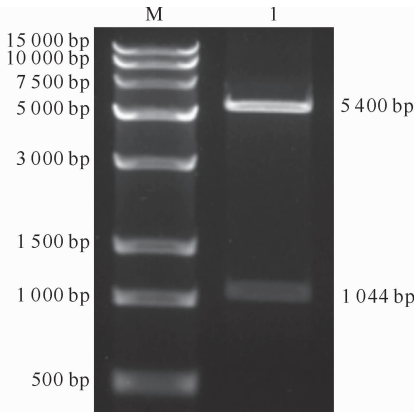


图 2 重组原核表达质粒 pET30a-FUT2 的双酶切鉴定

M. DNA 分子质量标准 DL15000;  
1. pET30a-FUT2 的 Not I 和 Xho I 双酶切产物

Fig.2 Identification of the recombinant pET30a-FUT2

by the double enzymes digestion  
M. DNA Marker DL15000;1. The products from  
pET30a-FUT2 digested with Not I + Xho I

2.3 pET30a-FUT2 重组原核表达质粒的诱导表达

图 3 结果显示,获得的 FUT2 重组蛋白的分子质量约为 45 ku,与预期结果一致,说明重组蛋白已成功表达;重组蛋白的表达量随诱导时间的延长而增加,在诱导 5 h 时达到高峰,此时的表达量与 6~8

h 的表达量几乎无差别,所以选取 5 h 为重组蛋白的最佳诱导时间。

2.4 重组 FUT2 蛋白的 Western-blot 分析

Western-blot 结果(图 4)显示,在膜上出现 1 条特异性反应条带,融合表达的 FUT2 蛋白分子质量大小约为 45 ku。该结果表明,所构建的重组原核表

达载体 pET30a-FUT2 能正确表达出目的蛋白,且重组 FUT2 蛋白具有良好的反应原性。

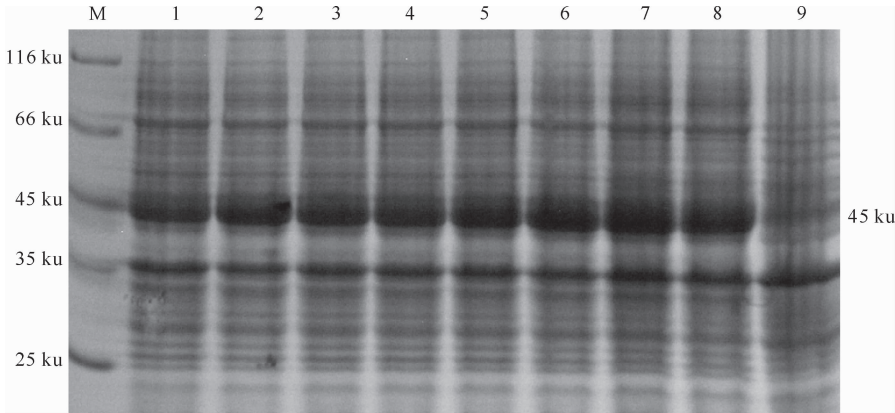


图 3 兔 FUT2 重组蛋白的 SDS-PAGE 电泳分析

M. 蛋白质分子质量标准;1~8. 分别为 pET30a-FUT2 在 1,2,3,...,8 h 内的诱导表达产物;9. 未诱导对照

Fig. 3 Analysis of recombinant FUT2 with SDS-PAGE electrophoresis.

M. Protein molecular weight marker;1~8. The expression products of recombinant *FUT2* at 1–8 h.;9. *E. coli* BL21 without induction

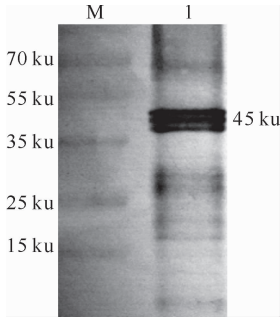


图 4 纯化重组兔 FUT2 蛋白的 Western-blot 分析

M. 蛋白质分子质量标准;1. 纯化的重组 FUT2 蛋白

Fig. 4 Analysis of the purified recombinant FUT2 with Western-blot

M. Protein molecular weight Marker;

1. The purified recombinant FUT2

够抵抗诺瓦克病毒的感染<sup>[12-16]</sup>。可见,FUT2 不仅在诺瓦克病毒感染过程中发挥重要作用,而且在兔出血症病毒的致病机制中也起到决定性作用。因此,研究兔 FUT2 在 HBGA 糖基化过程中的催化机理以及其在兔体内的表达和分布,对于探明 RHDV 的致病机理和感染机制具有重要意义。

本研究从正常成年兔体内成功克隆到了 *FUT2* 基因,其与 GenBank 登录的兔 *FUT2* 参考基因 (GenBank 登录号:X91269) 序列具有高度同源性,表明该基因在兔体内是高度保守的。*FUT2* 基因的克隆对于建立 RHDV 的细胞感染模型具有重要意义,研究人员可以通过构建稳定表达 *FUT2* 基因的细胞系,人为地提高宿主细胞中 *FUT2* 的表达水平,进而提高 HBGA 前体的糖基化水平,最终建立一种对 RHDV 比较敏感的细胞系,在当前缺乏有效培养 RHDV 细胞系的情况下,该研究思路无疑将突破这种瓶颈,可为体外研究 RHDV 的感染过程提供良好的研究平台。本研究利用原核表达系统成功表达了兔 FUT2 蛋白,并进行了纯化,为进一步研究 RHDV 的感染过程和致病机理奠定了良好的物质基础。

[参考文献]

[1] 刘光清,云涛,陈柳,等. 动物病毒反向遗传学 [M]. 北京: 科学出版社,2009.  
Liu G Q, Yun T, Chen L, et al. Reversed genetics of animal virus [M]. Beijing: Science Press, 2009. (in Chinese)

3 讨论

兔瘟是一种可感染多品种兔的烈性传染病,具有极高的发病率和致死率。但临床诊断结果发现,兔瘟仅发生于青壮年兔,幼龄兔很少发生兔瘟,即便是用强毒感染乳兔,也不能够使其发病死亡,最初人们以为这是由于母源抗体干扰所致,但最近研究发现,这是由于幼龄兔体内 FUT2 表达水平低下,H2 型组织血抗原的糖基化水平过低,不能与 RHDV 有效结合引发自然感染过程造成的<sup>[11]</sup>。此类现象也存在于诺瓦克病毒中,有研究发现,诺瓦克病毒也可以利用 HBGA 作为受体感染人类,而 HBGA 的糖基化过程也需要在 FUT2 的参与下才能完成,人的 *FUT2* 非功能性等位基因决定其非分泌表型,具有非分泌表型的 *FUT2* 非功能性等位基因的个体能