

猪瘟疫病毒石门株NS3基因在大肠杆菌中的表达

鲁 絮, 张彦明, 许信刚

(西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 采用PCR技术, 扩增了猪瘟疫病毒石门株NS3基因的丝氨酸蛋白酶、NTPase、RNA解螺旋酶活性功能区长度为2 000 bp的片段, 将其克隆到pET-32a中, 构建了原核表达载体pET-NS3, 并将其在大肠杆菌Rosetta (DE3)中进行了表达, 同时对表达产物进行了SDS-PAGE和Western blotting检测。结果表明, IPTG诱导表达得到的pET-NS3融合蛋白的相对分子质量约为97 ku, 与预期结果一致, 且该重组蛋白能被CSFV阳性血清所识别。

[关键词] 猪瘟疫病毒; NS3基因; 大肠杆菌

[中图分类号] S813.3; S852.65⁺1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9387(2007)02-0015-04

Expression of NS3 gene of CSFV Shimen strain in E. coli

LU Xu, ZHANG Yan-ming, XU Xin-gang

(College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Serine protease and NTPase/RNA helicase functional domains, 2.0 kb of NS3 gene of CSFV Shimen strain were amplified by PCR, and cloned into prokaryotic expression vector pET-32a. The target protein was expressed in *E. coli* Rosetta (DE3) induced with IPTG, and detected by SDS-PAGE and Western blotting. The results indicated that the 97 ku expressed protein could be recognized by CSFV positive serum as expected.

Key words: classical swine fever virus (CSFV); NS3 gene; *E. coli*

猪瘟疫病毒(Classical swine fever virus, CSFV)属于黄病毒科瘟病毒属, 该属还有牛病毒性腹泻病毒(BVDV)和绵羊边界病病毒(BDV)^[1]。CSFV基因组含有一个大的读码框, 编码4种结构蛋白(C(p14)、Erns(gp48)、E1(gp33)和E2(gp53))、7种非结构蛋白(Npro、P7、NS2-3(p125)、NS4A、NS4B、NS5A和NS5B)。在非致细胞病变型(noncytopathogenic, nCP)瘟病毒感染的细胞内, NS2-3蛋白(p125)不能进一步被加工, 而在致细胞病变型(cytopathogenic, CP)瘟病毒感染的细胞中, NS2-3蛋白被加工成NS2(p54)和NS3(p80), 因此非结构蛋白NS3可作为CP型瘟病毒在蛋白质水平上的分子标志^[2-4]。NS3蛋白具有丝氨酸蛋白酶^[5]、

NTPase^[6]、RNA解螺旋酶活性^[7], 其丝氨酸蛋白酶活性与下游一系列非结构蛋白的加工有关, NTPase、RNA解螺旋酶活性在病毒基因组复制中起一定的作用^[8]。为了进一步研究NS3蛋白与CSFV致细胞病变效应(CPE)的关系, 需要研制出NS3蛋白的单克隆抗体, 以检测CSFV感染时NS3蛋白在发生与不发生CPE的细胞中的表达情况。

本试验构建了CSFV石门株NS3基因的原核表达载体, 并对其表达情况进行了研究, 对表达产物进行了Western blotting检测, 以期为进一步制备NS3单克隆抗体提供基础材料, 同时为进一步深入研究非结构蛋白NS3在CSFV复制及CSFV致细胞病变中的作用奠定基础。

· [收稿日期] 2006-01-23

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30270988)

[作者简介] 鲁 絮(1983-), 女, 陕西西安人, 在读硕士, 主要从事分子病原学与免疫学研究。

[通讯作者] 张彦明(1956-), 男, 陕西渭南人, 教授, 博士生导师, 主要从事分子病原学与免疫学研究。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒及主要试剂

大肠杆菌 DH5 α JM 109, BL 21 (DE3)、载体 pET-32a 和 CSFV 石门株 NS3 真核表达质粒, 均由西北农林科技大学动物疫病防治与畜产品安全实验室保存; 大肠杆菌 Rosetta 菌株, 由武汉大学病毒所馈赠; pMD18-T 载体、Taq DNA 聚合酶、dNTPs、各种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DNA Marker DL 2000、IPTG 和蛋白标样, 均购自 TaKaRa 公司; DNA 凝胶回收试剂盒及质粒微量提取试剂盒购自安徽优品公司; 猪瘟阳性血清购于中国兽药监察所; 辣根过氧化物酶标记的鼠抗猪 IgG 购自北京博奥森公司; PVDF 膜(0.45 μ m) 购自 Millipore 公司。

1.2 引物设计与合成

利用 Primer 5.0 引物分析软件, 根据 CSFV 石门株全基因序列中 NS3 的编码区序列设计一对引物 P1、P2, 引物两端分别设有 Sac I 和 Xho I 酶切位点, 可扩增出 CSFV 开放阅读框 5 142~7 191 bp (长度为 2 049 bp) 的基因片段。引物序列分别为:

上游引物 P1: 5'-GAG CTC GGG CCT GCC GTT TGC AAG A-3';

下游引物 P2: 5'-CTC GAG CTA GAC CAA CTA CCT GTT TTA GTG CTC TGC-3'。

上、下游引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.3 重组质粒 pMD18-T-NS3 的构建

以 CSFV 石门株 NS3 真核表达质粒为模板, 用特异性引物 P1/P2 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 50 μ L, 其中质粒 1 μ L, 10 $\times$ PCR 缓冲液 5 μ L, 25 mmol/L Mg²⁺ 3 μ L, 10 mmol/L dNTPs 4 μ L, 引物 P1/P2 各 2 μ L, 超纯水 32.5 μ L, Taq DNA 聚合酶 0.5 μ L。反应程序为: 98 $^{\circ}$ C 预变性 8 min 后加入 Taq 酶; 98 $^{\circ}$ C 30 s, 57 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 35 个循环; 最后在 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物用 8 g/L 琼脂糖凝胶进行电泳后, 切下目的条带, 用 DNA 凝胶回收试剂盒回收目的片段。将回收产物与 pMD18-T 载体用 T4 DNA 连接酶 16 $^{\circ}$ C 连接过夜, 构建重组质粒 pMD18-T-NS3。连接产物转化 DH5 α ^[9], 涂布于含氨苄青霉素(100 μ g/mL)的 LB 琼脂平板, 培养 12~15 h 后挑选单菌落, 用质粒微量提取试剂盒提取质粒, 进行 PCR 分析, 并用 Sac I 和 Xho I 进行双酶切鉴定。

1.4 CSFV 石门株 NS3 基因原核表达载体 pET-NS3 的构建

将上述鉴定为阳性的重组质粒 pMD18-T-NS3 与原核表达载体 pET-32a 均用 Sac I 和 Xho I 双酶切, 用 8 g/L 琼脂糖凝胶进行电泳后回收目的片段, 回收产物用 T4 DNA 连接酶 16 $^{\circ}$ C 连接过夜。连接产物转化 DH5 α , 涂布于含氨苄青霉素的 LB 琼脂平板, 培养 12~15 h 后挑单菌落, 小量提取质粒, 用 Sac I 和 Xho I 进行双酶切鉴定。将经 Sac I 和 Xho I 双酶切产生的片段长度与预期结果完全相符的阳性克隆, 送上海生工生物工程技术有限公司测序, 以确定 NS3 基因插入位置、方向、读码框的正确性。目的基因插入正确的重组质粒命名为 pET-NS3。

1.5 CSFV 石门株 NS3 基因在大肠杆菌中的表达

将 pET-NS3 转化到大肠杆菌 Rosetta (DE3) 中, 挑单菌落接种含氨苄青霉素(100 μ g/mL)和氯霉素(34 μ g/mL)的 LB 培养基, 培养至 OD₆₀₀ 为 0.6~1.0, 1:50 (体积比) 转接入 50 mL 2 $\times$ YT 培养基, 培养至 OD₆₀₀ 为 0.4~0.6, 取 1 mL 作为对照, 其余加入 IPTG 至终浓度 0.8 mmol/L, 置 37 $^{\circ}$ C 诱导培养 4 h^[9]。

1.6 融合蛋白 pET-NS3 的 SDS-PAGE 检测

按常规方法制备 120 g/L 的分离胶和 50 g/L 的浓缩胶^[10]。取 1.5 节中诱导后的细菌悬液 1 mL, 12 000 r/min 离心 3 min, 菌体沉淀加 PBS 液 50 μ L 悬浮, 再加等体积的 2 $\times$ SDS 上样缓冲液, 煮沸裂解 10 min, 以 5 000 r/min 离心 10 min, 取上清 20 μ L 上样, 做 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电压先用 80 V, 待溴酚蓝进入分离胶后, 将电压增至 120 V。电泳完毕后取下凝胶, 考马斯亮蓝 R 250 染色 2 h, 脱色液脱色 5 h。以未经 IPTG 诱导的重组质粒转化菌为对照。

1.7 融合蛋白 pET-NS3 的 Western blotting 分析

表达蛋白的电泳同 1.5 节。电泳结束后用 Bio-rad 电转移装置将其转印于 PVDF 膜上 (湿法转移 100 V, 1.5 h), 转印结束后, 按常规方法进行 Western blotting^[10], 一抗为猪瘟阳性血清 (体积比 1:40 倍稀释), 二抗为辣根过氧化物酶标记的鼠抗猪 IgG (体积比 1:4 000 倍稀释), 最后用 DAB 显色。

2 结果与分析

2.1 NSFV 石门株 NS3 基因的 PCR 扩增

扩增出长度约为 2 000 bp 的 1 条条带 (图 1), 与预期的基因片段长度相符。

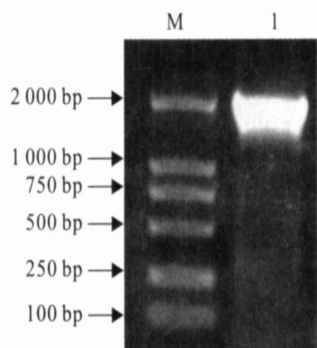


图1 NSFV 石门株NS3基因PCR扩增产物的电泳图谱

M. Marker DL 2000; 1 NS3基因的PCR产物

Fig. 1 PCR products of NS3 gene

M. Marker DL 2000; 1 PCR products of NS3

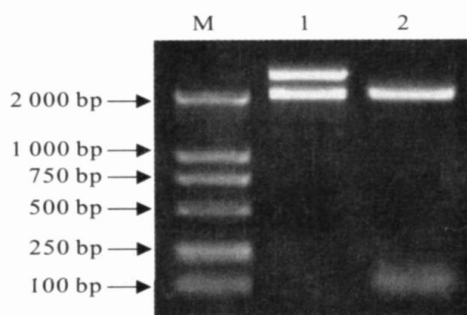


图2 重组质粒pMD18-T-NS3的鉴定

M. Marker DL 2000; 1 pMD18-T-NS3 双酶切产物;
2 pMD18-T-NS3的PCR产物

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid pMD18-T-NS3

M. Marker DL 2000; 1 Restriction analysis of
pMD18-T-NS3; 2 PCR products of pMD18-T-NS3

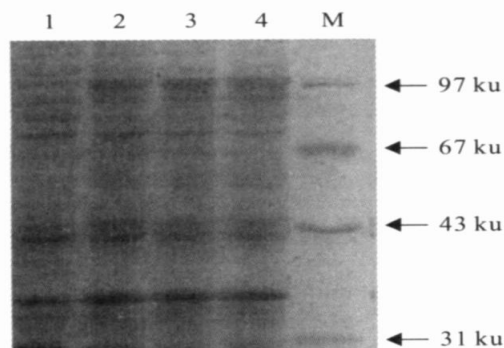


图4 融合蛋白pET-NS3的SDS-PAGE检测结果

M. 低分子量蛋白Marker; 1 未诱导对照;

2~4 pET-NS3诱导表达产物(37 °C IPTG诱导4 h)

Fig. 4 SDS-PAGE detection of
protein expressed in *E. coli*

M. Low range protein Marker; 1 pET-NS3 transformed into
Rosetta (uninduced with IPTG); 2~4 pET-NS3 transformed
into Rosetta (After induced with IPTG for 4 h at 37 °C)

2.4 融合蛋白pET-NS3的SDS-PAGE分析

SDS-PAGE结果显示,在97 ku处可见1条含

2.2 重组质粒pMD18-T-NS3的鉴定

重组质粒pMD18-T-NS3经PCR扩增,产物长度大约为2 000 bp;经Sac I和Xho I双酶切,得到长度大约为2 000 bp的目的片段和pMD18-T(图2),与预期结果一致。表明含NS3基因的重组质粒pMD18-T-NS3构建成功。

2.3 重组原核表达载体pET-NS3的鉴定

将插入NS3基因的重组原核表达载体pET-NS3用Sac I和Xho I双酶切,结果得到约为5 900 bp和2 000 bp的两个片段(图3),与预期结果一致。阳性克隆结果显示,基因插入位置、方向、读码框均正确,证明含有NS3基因的原核表达载体pET-NS3构建成功。

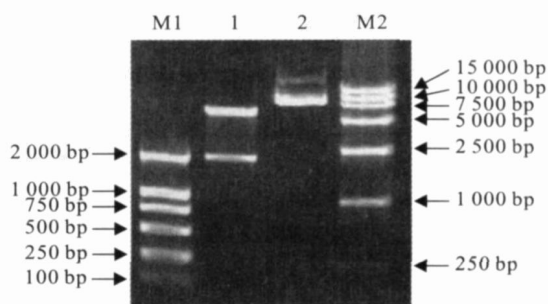


图3 重组原核表达载体pET-NS3的双酶切鉴定

M 1. Marker DL 2000; M 2. Marker DL 15000;

1. pET-NS3酶切产物; 2. 重组质粒

Fig. 3 Identification of recombinant plasmid pET-NS3

M 1. Marker DL 2000; M 2. Marker DL 15000; 1. Restriction
analysis of pET-NS3; 2. Recombinant plasmid pET-NS3

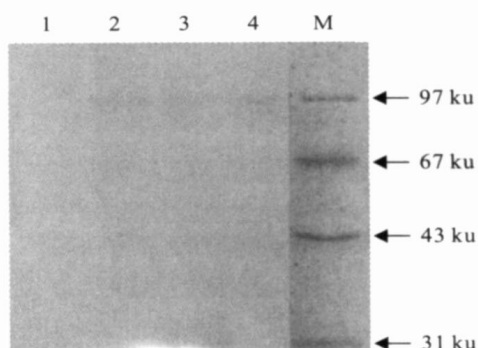


图5 融合蛋白pET-NS3的Western blotting检测结果

M. 低分子量蛋白Marker; 1 未诱导对照;

2~4 pET-NS3诱导表达产物(37 °C IPTG诱导4 h)

Fig. 5 Western blotting detection of
protein expressed in *E. coli*

M. Low range protein Marker; 1 pET-NS3 transformed into
Rosetta (uninduced with IPTG); 2~4 pET-NS3 transformed
into Rosetta (After induced with IPTG for 4 h at 37 °C)

量丰富的蛋白条带,与预期的带有组氨酸标签的NS3融合蛋白的相对分子质量相符(图4),初步表

明NS3基因表达成功。

2.5 融合蛋白pET-N S3的Western blotting分析

Western blotting分析结果显示,经诱导的重组质粒转化菌,在97 ku处出现1条特异条带,而对照的未诱导菌无条带(图5)。表明该重组蛋白可被CSFV阳性血清中的NS3抗体所识别。

3 讨论

猪瘟病毒NS3基因中有98.6%的密码子是大肠杆菌稀有密码子,且常有多重稀有密码子连续出现的情况,这在很大程度上影响了NS3基因在大肠杆菌中的表达。在翻译过程中,不充足的tRNA库可能导致翻译延迟、成熟前翻译终止和翻译移码等现象发生,影响基因的表达。尽管少量稀有密码子的出现通常不会给目的蛋白的表达造成太大影响,但如果一个基因中含有成串或多个*E. coli*稀有密码子,外源蛋白在*E. coli*的表达量将很低。Rosetta菌株含有一种与pET相容的氯霉素抗性质粒,能提供AUA、AGG、AGA、CUA、CCC和GGA等6种稀有密码子的tRNA。故本试验使用Rosetta菌株,改善了外源基因由于稀有密码子造成的表达限制,相对于JM109、BL21(DE3),表达量有明显提高。

Meyers等^[2-3]和Beate等^[4]研究表明,在CP型CSFV感染细胞内,NS2-3和NS3蛋白均出现,但NS3蛋白的量明显高于NS2-3,据此可推测细胞内NS3可能是导致细胞病变效应(CPE)的因素。Aoki等^[11]发现,感染CP型CSFV的细胞中CPE现象越明显,NS3蛋白的含量越高,说明NS3与CPE的发生联系紧密。那么,究竟是病毒本身编码的蛋白酶,还是宿主细胞内的蛋白酶将NS2-3裂解加工成NS2和NS3的,目前尚不清楚。为了进一步了解CSFV致CPE与非结构蛋白NS3之间的关系,洪海霞^[12]研究发现猪血管内皮细胞接种CSFV(石门株)后可产生病变。CSFV不是对猪的所有体细胞均有CPE效应,目前还未见CSFV感染的猪肾细胞中NS2-3被加工成NS3的报道。作者推测CSFV致猪血管内皮细胞病变很可能是由CSFV基因表达的NS2-3被加工成NS3引起的,在该加工过程中发挥作用的可能是某种蛋白酶,而这种蛋白酶又有可能是CSFV感染后刺激猪血管内皮细胞的“敏感基因”所表达的。到底是否存在这种蛋白酶,需要检测CSFV感染后,NS3蛋白在产生CPE的猪血管内皮细胞与其他不产生CPE的细胞系(如猪肾细胞)中表达的差异。这需要研制NS3蛋白的单克隆抗体来验证该假设。本研究

将CSFV石门株NS3基因在原核细胞中进行了表达,Western blotting分析结果证明,pET-N S3融合蛋白可被CSFV阳性血清中的NS3抗体所识别。将该重组蛋白纯化继而制备出NS3蛋白的单克隆抗体,就可以研制出用于诊断ELISA的试剂盒。此外,本研究获得了同时包含丝氨酸蛋白酶、NTPase和RNA解螺旋酶活性功能区的重组NS3蛋白,有利于更加全面地研究其在体内外的功能,尤其是在病毒复制及蛋白加工过程中的作用,这些探索对于进一步揭示猪瘟病毒的复制规律,以及致细胞病变的机制具有重要意义。

[参考文献]

- [1] Francki R B, Fauguet C M, Knudson D L, et al. Flaviviridae[J]. Arch Virol Suppl, 1991, 2: 223-233.
- [2] Meyers G, Thiel H J. Molecular characterization of pestivirus[J]. Adv Virus Res, 1996, 47: 53-118.
- [3] Meyers G, Thiel H J, Rumenapf T. Classical swine fever virus: recovery of infectious viruses from cDNA constructs and generation of recombinant cytopathogenic defective interfering particles[J]. Virology, 1996, 70: 1588-1595.
- [4] Beate M K, Meyers G. Correlation between point mutations in NS2 and the viability and cytopathogenicity of bovine viral diarrhoea virus strain Oregon analyzed with an infectious cDNA clone[J]. Virology, 2000, 74: 390-400.
- [5] Wiskerchen M M, Collett M S. Pestivirus gene expression: p80 of the bovine viral diarrhoea virus is a proteinase involved in polypeptide processing[J]. Virology, 1991, 184: 341-350.
- [6] Tamura J K, P Warrenner, Collett M S. RNA-stimulated NTPase activity associated with p80 protein of the pestivirus bovine viral diarrhoea virus[J]. Virology, 1993, 193: 1-10.
- [7] Warrenner P, Collett M S. Pestivirus NS3 (p80) protein possesses RNA helicase activity[J]. Virology, 1995, 69: 1720-1726.
- [8] Baohua G, Liu C B, Juili L G. The RNA helicase and nucleotide triphosphatase activities of the bovine viral diarrhoea virus NS3 protein are essential for viral replication[J]. Virology, 2000, 74: 1794-1800.
- [9] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 3版. 黄培堂, 王嘉玺, 朱厚础, 等译. 北京: 科学出版社, 2002: 96-99; 1232-1236.
- [10] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 77-90; 166-178.
- [11] Aoki H, Sakoda Y, Nakamura S, et al. Cytopathogenicity of classical swine fever viruses that do not show the exaltation of newcastle disease virus is associated with accumulation of NS3 in serum-free cultured cell lines[J]. J Vet Med Sci, 2004, 66(2): 161-167.
- [12] 洪海霞. 猪脐静脉血管内皮细胞的分离培养及猪瘟病毒对其的致病作用[D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2004.