

口蹄疫病毒 3A 基因在大肠杆菌中的高效表达^{*}

薛青红^{1,2} 刘湘涛¹ 张彦明² 韩雪清¹ 谢庆阁¹

(¹ 中国农业科学院兰州兽医研究所 兰州 730046)

(² 西北农林科技大学 杨凌 712100)

摘 要 将口蹄疫病毒(Foot-and-Mouth Disease Virus, FMDV)的 3A 基因克隆到线性化的原核表达载体 pProEX-HTb 中,转化大肠杆菌 BL21 和 DH5 α ,经氨苄抗性筛选得到阳性克隆, IPTG 诱导表达。SDS-PAGE 和 West bolt 结果证实大肠杆菌菌体不可溶性蛋白中富含 3A 蛋白,说明 3A 蛋白在表达产物中以包涵体的形式存在,所表达的蛋白含量占菌体蛋白的 29.2%。

关键词:口蹄疫病毒, 3A 基因, 克隆, 表达

中图分类号: Q786 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2002)05-0539-04

口蹄疫(Foot-and-Mouth Disease, FMD)是由小核糖核酸病毒科(Picornaviridae)口蹄疫病毒属(Aphthovirus)的口蹄疫病毒(FMDV)引起的偶蹄动物传染病,被国际兽疫局(OIE)列为 A 类传染病之首, FMD 感染后的主要危害是使家畜生产力下降和种畜经济价值丧失,对畜产品出口贸易造成严重影响^[1]。FMDV 为单股正链无囊膜的 RNA 病毒,其宿主范围宽广,遗传变异频率高,抗原差异大,现已有七种血清型(A、O、C、Asia1、SAT1、SAT2、SAT3)和百余种血清亚型,并且每年还有为数众多的新变异株出现^[2,3], FMDV 的这一特性给 FMD 的免疫防制带来了很大困难。通过研究 FMDV 的基因结构与功能,认识病毒的感染和复制机制,以寻求新的防制办法,已成为当前国内外研究 FMDV 的方向之一。

FMDV 基因组包含结构蛋白基因 VP1、VP2、VP3、VP4 和非结构蛋白基因 L、2A、2B、2C、3A、3B、3C、3D,非结构蛋白主要参与病毒的复制、聚蛋白的裂解和病毒的装配过程。已有的研究表明,非结构蛋白 3A 在病毒复制中起重要作用,在复制起始时与宿主细胞成分相互作用,并诱发细胞内膜增生,这是病毒 RNA 复制的一个前提条件,并可作为宿主细胞受小 RNA 病毒感染的标志^[4]。3A 可能在宿主特异性和病毒毒力方面起决定作用,3A 基因发生的变异与宿主动物或细胞对病毒的选择优势相关^[5,6]。研究还发现, FMDV 经乳鼠、鸡胚、鸭胚、细胞培养传代后, 3A 基因可发生不同程度的缺失, Graudo 等在两个适应于鸡胚的 FMDV 毒株中分别观察到了 57 个和 60 个核苷酸的缺失。谢庆阁等发现 FMDV 毒株经乳鼠传代后,在 3A 基因发生 45 个核苷酸缺失的同时,病毒对不同种动物的致病力也发生明显变化。对自然流行毒 3A 基因分析表明,存在两种分子组成的 3A 基因,一种由

^{*} 国家重大基础研究发展规划项目(G19990119)

作者简介 薛青红(1977 -)女,内蒙古人,西北农林科技大学研究生,主要从事动物病毒学研究。

联系作者 刘湘涛(1962 -)男,湖南衡阳人,研究员,主要从事动物病毒学研究。本研究在农业部畜禽病毒学重点实验室(兰州兽医研究所)完成。参加该工作的其他作者:张永国²庄淑珍²马军武¹冯卫权³(³深圳市兽医卫生防疫检疫所 深圳 518008)。

收稿日期 2001-12-05, 修回日期 2002-03-04

153 个氨基酸构成,一种由 143 个氨基酸构成。

本研究旨在利用基因重组技术将两种分子组成的 3A 基因分别克隆到大肠杆菌表达载体中,表达出 3A 蛋白,为进一步研究 3A 蛋白的结构差异与病毒毒力、宿主嗜性等方面的相关作用打下基础,为 FMDV 多肽疫苗和基因疫苗的研制开发提供一些可借鉴的资料。目前国内尚无此方面研究报道。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 毒株、菌株及表达系统 毒株 China9(A₂₋₃)、China8(A₄₋₄) 其中 A₂₋₃ 的 3A 基因为 153 个氨基酸, A₄₋₄ 的 3A 基因为 143 个氨基酸。大肠杆菌 BL21 和 DH5 α 为本室保存。原核表达系统 pProEX-HTb 为本室保存。

1.1.2 酶和试剂 限制酶、T4 DNA 连接酶等工具酶均为 Promega 公司产品;Hybond-N 膜为 Amersham 公司产品;FMDV 阳性血清、兔抗猪 IgG-HRP 为本室自制。

表 1 引物序列

Table 1 The sequences of primers

Primers	Sequences
3A-1	5'-GGATCCATCTCAATTCCTTCCCAA3'
3A-2	5'-TCTAGATTCAGCTCGTGGTTGTTTC3'

1.1.3 引物合成 由宝生物(大连)有限公司合成。引物设计见表 1。

1.2 方法

1.2.1 3A 基因的克隆及鉴定 参照文献 [7]

1.2.2 3A 基因与 pProEX-HTb 重组表达质粒的构建 通过 PCR 方法在 3A 基因的 5'端引入 BamHI 酶切序列,在其 3'端引入 XbaI 酶切序列。把此 3A 基因与 PGEM-Teasy 载体相连接,转化大肠杆菌,小量制备质粒。用 BamHI 和 XbaI 双酶切,回收小片段,与线形化的 pProEX-HTb 连接,构建重组表达载体。

1.2.3 感受态细胞的转化及阳性克隆的筛选 参照文献 [7], 重组表达载体转化感受态细胞 BL21, 把转化菌涂布于含氨苄的 LB 琼脂平板,过夜培养后小量制备质粒,经酶切、PCR 及测序鉴定后,命名阳性克隆分别为 pProEX-3A₂₋₃、pProEX-3A₄₋₄。

1.2.4 重组质粒在大肠杆菌中的表达及其产物的鉴定 挑取含 pProEX-3A₂₋₃ 和 pProEX-3A₄₋₄ 的单个转化菌接种于 3mL 含 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基中过夜培养后,取 200 μ L 接种于 20mL 2 \times YT 培养基中于 37 $^{\circ}$ C 培养至 OD₆₀₀ 达 0.6 后,加 IPTG 至终浓度为 1mmol/L 继续培养分别在 3、4、5h 收集菌体,同时培养诱导含 pProEX-HTb 的受体菌。

诱导菌处理方法参照试剂盒操作进行,样品处理后分为可溶性蛋白和不可溶性蛋白,将其置于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.5 表达产物的检测 SDS-PAGE 和 Western blot 检测重组 3A 抗原方法参照 [7、8] 进行。所采用的酶标抗体为辣根氧化物酶标记的兔抗猪 FMDV IgG(本室标记)。

2 结果和讨论

经 RT-PCR 得到了与预计大小相符的扩增片段(图 1) 经测序表明该片段为 3A 基因。构建重组载体 pProEX-3A₂₋₃、pProEX-3A₄₋₄ 经酶切,片段大小与预期结果相符,结果

见图 2。再经测序证明重组载体阅读框架正确 ,序列无误。这表明我们成功的克隆了 FM-DV 3A 基因 ,并准确将其建入表达载体。

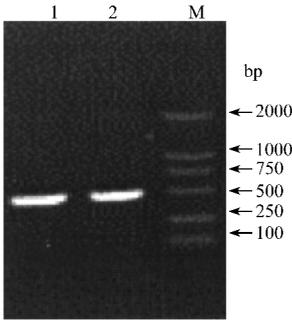


图 1 PCR 扩增 3A 基因的琼脂糖凝胶电泳图

Fig.1 Agrose electrophorsis of PCR 3A
 M. DNA Marker DL2000 ;
 1. 3A gene of A₂₋₃ ;
 2. 3A gene of A₄₋₄ .

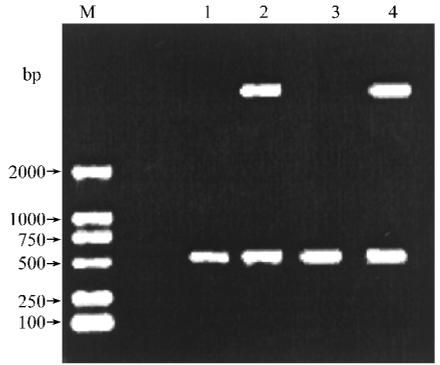


图 2 重组质粒的酶切及 PCR 鉴定结果

Fig.2 Identification of recombinant plasmids with PCR and restriction digestion
 M. DNA marker DL2000 ;
 1. PCR identification of ProEX-3A₂₋₃ ;
 2. Restriction identification of pProEX-3A₂₋₃ ;
 3. PCR identification of pProEX-3A₄₋₄ ;
 4. Restriction identification of pProEX-3A₄₋₄ .

以 pProEX-3A₂₋₃、pProEX-3A₄₋₄、pProEX-HTb 转化诱导的 BL21 菌体蛋白作 SDS-PAGE 电泳结果见图 3。从图可以看出 ,pProEX-3A₂₋₃ 和 pProEX-3A₄₋₄ 分别转化诱导的 BL21 菌体蛋白中的不可溶性成份均比对照组多出一条蛋白带 ,且大小与预期蛋白相符。含量占菌体蛋白的 29.2% ~ 22.1%。这说明所表达蛋白以包涵体形式存在。对上述样品作 Western blot 检测 结果见图 3。在图中可见 ,在 23kD 左右有与 HRP-抗 FMDV 抗体反应的区带 ,

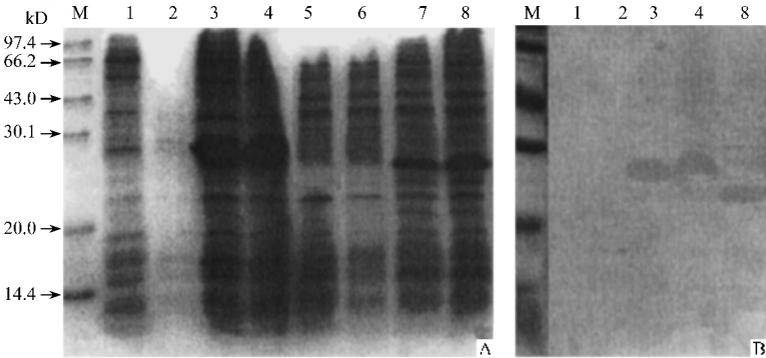


图 3 SPS-PAGE 电泳(A)及 Western-blotting(B)的结果

Fig.3 SDS-PAGE(A) and Western blo(B) detection of protein expressed in *E. coli*
 M. Protein marker ; 1 5. pProEXA-HTb(induced with IPTG);
 2 6. pProEX-3A₂₋₃ and pProEX-3A₄₋₄(before induced with IPTG);
 3 4. pProEX-3A₂₋₃(after induced with IPTG 3,4 h);
 7 8. pProEX-3A₄₋₄(after induced with IPTG 3,4 h)

而阴性对照则没有区带。可见构建的两种 3A 基因重组表达质粒在 BL21 中经诱导后均能成功表达 3A 抗原,重组 3A 抗原经纯化后可用作 ELISA 诊断抗原,用于鉴别诊断免疫动物与感染动物。

综上所述,我们已成功地得到了 FMDV 3A 基因在大肠杆菌中表达的蛋白。该蛋白在大肠杆菌中含量较高,且又可以与 FMD 阳性血清结合,表达产物融合有 6 个组氨酸残基,可用带有抗组氨酸抗体的亲和层析柱方便地纯化表达产物。下一步将是对表达的 3A 蛋白进行纯化,通过对 3A 蛋白三维结构的分析,研究由于基因缺失所引起的 3A 蛋白结构变化,进而研究由于 3A 蛋白结构变化所引起的病毒株在宿主嗜性和毒力方面的变化。

参 考 文 献

- [1] Beard C , Mason P W . *J Virol* ,2000 **4** :987 ~ 991 .
- [2] Xiang W , Cuconati . *J Virol* ,1998 **2** :6732 ~ 6741 .
- [3] Morace G , Pisani G , Beneduce F , *et al* . *Virus Res* ,1993 **28** :187 ~ 194 .
- [4] Weber S , Granzow H , Ward G , *et al* . *Virus Genes* ,1996 **12** (1) :5 ~ 14 .
- [5] Sagedahl A , Giraudo A T . *Virology* ,1987 **157** :366 ~ 374 .
- [6] Giraudo A T , Beck E , Strelbel K , *et al* . *Virology* ,1990 **77** :780 ~ 783 .
- [7] Knowles N J , Davies P R , Henry T , *et al* . *J Virol* ,2001 **75** :1551 ~ 1556 .
- [8] Heina B A , Vance L M . *J Virol* ,1996 **70** :4854 ~ 4857 .
- [9] Sambrook J , Fritch E , Maniatis T . *Molecular Cloning A Laboratory Manual* . 2nd ed . New York :Cold Spring Harbor Laboratory Press ,1989 . 188 ~ 196 .
- [10] 瞿礼嘉 . 现代生物技术导论 (第一版) . 北京 :高等教育出版社 ,1998 .

Study on the Expression of 3A Gene of Foot-and-mouth Disease in *E. coli* *

Xue Qinghong^{1 2} Liu Xiangtao¹ Zhang Yanming² Han Xueqing¹ Xie Qingge¹

(¹ Lanzhou Veterinary Research Institute , CAAS , Lanzhou 730046 , China)

(² Northwest Science and Technology University of Agriculture and Forestry , Yangling 712100 , China)

Abstract : 3A gene of foot-and-mouth disease virus (FMDV) was cloned into linearized pProEX-HTb prokaryotic expression vector . The vector was transformed into *E. coli* BL21 , the transformants were screened by Amp⁺ and were induced to express with IPTG . The results of SDS-PAGE and Western blot demonstrated that the insoluble component of the induced *E. coli* culture contained protein 3A . The results of the study indicated that protein 3A existed in the form of inclusion body . The content of the expressed protein in the induced bacteria culture was 29.2% .

Key words : Foot-and-mouth disease virus , 3A gene , Cloning , Expression

* Project of Developing Program of Chinese National Key Fundamental Research (G19990119)