

猪水泡病病毒 VP1 基因抗原区的原核表达

张永国^{1,2} 刘湘涛^{1*} 韩雪清¹ 张彦明² 谢庆阁¹

(¹ 中国农业科学院兰州兽医研究所 农业部畜禽病毒学重点实验室 兰州 730046)

(² 西北农林科技大学动物科技学院 杨凌 712100)

摘 要 利用 RT-PCR 和 nested PCR (nPCR) 技术扩增出猪水泡病病毒 VP1 基因的抗原区, 将其克隆到表达载体 pProEX-HTb 中, 获得重组质粒。经 PCR、酶切和序列分析鉴定表明, 目的基因插入的位置、大小和读码框均正确。将重组质粒导入 BL21(DE3), 经 IPTG 诱导表达后 SDS-PAGE 检测表明, 重组菌能表达猪水泡病病毒 VP1 抗原区蛋白; Western blot 检测表明, 诱导表达的抗原区蛋白能与猪水泡病阳性血清发生特异性反应。

关键词: 猪水泡病病毒, VP1 基因, 抗原区, 表达

中图分类号: Q786 文献标识码: A 文章编号: 1006-6179(2003)03-0342-05

猪水泡病 (Swine vesicular disease, SVD) 是由小 RNA 病毒科 (Picornaviridae) 肠道病毒属 (Enterovirus) 的猪水泡病病毒 (SVDV) 引起的一种猪急性传染病, 其临床表现以口鼻腔黏膜、蹄部等出现水泡或溃烂为特征, 与猪口蹄疫极其相似, 因而其防治问题极受重视^[1]。SVDV 基因组为一单股正链 RNA 分子, 从 5' 端到 3' 端依次为 5' 非编码区 (5'-NCR) \ P1 区 (1ABCD) \ P2 区 (2ABC) \ P3 区 (3ABCD) \ 3' 端非编码区 (3'-NCR) 和 Poly (A) 尾结构。SVDV 基因组含有一个大的开放阅读框架 (ORF), 编码一条由 2185 个氨基酸组成的多聚蛋白。SVDV 编码的结构蛋白有 VP4 (1A, 69aa) \ VP2 (1B, 261aa) \ VP3 (1C, 238aa) 和 VP1 (1D, 283aa); 非结构蛋白有 2A、2B、2C、3A、3B、3C 和 3D, 这些非结构蛋白在 SVDV 复制中起十分重要的作用。SVDV 粒子衣壳由 4 种结构蛋白构成, VP4 为内壳蛋白, VP2、VP3 和 VP1 为外壳蛋白。对 SVDV 结构蛋白研究发现, 其中中和性抗原位点在病毒的外壳蛋白上^[2,3]。

该研究旨在利用基因重组技术将猪水泡病病毒 VP1 基因的抗原区克隆到大肠杆菌表达载体中, 表达出 VP1 的抗原区蛋白, 为建立以重组蛋白为检测抗原的猪水泡病诊断方法奠定基础。

1 材料和方法

1.1 病毒

猪水泡病病毒为国内检疫标准株。

1.2 菌株和质粒

大肠杆菌 DH5a 和 BL21(DE3) 均由本室保存, pProEX-HTb 购自 GIBCOBRL 公司。

基金项目: 国家重大基础研究发展规划项目 (G19990119)

* 通讯作者。Tel 86-931-8342710; Fax 86-931-8340977; E-mail: HNXiangtao@hotmail.com

作者简介: 张永国 (1976 -) 男, 山东菏泽, 西北农林科技大学博士研究生, 主要从事动物病毒学研究。

收稿日期: 2002-09-09, 修回日期: 2002-12-11

1.3 试剂

反转录酶(AMV)及反转录试剂、*Taq* DNA 聚合酶、PCR 试剂、RNA 酶抑制剂均购自宝生物(大连)工程有限公司;DNA 纯化试剂盒为 BOEHRINGER MANNHEIM 公司产品;限制性内切酶、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;SVDV 阳性血清、兔抗豚鼠 IgG-HRP 为本室自制。

1.4 引物合成

由宝生物(大连)有限公司合成,引物设计见表 1。

表 1 引物的编号、序列、位置和长度

Table 1 The code, sequence, location and length of the primers

Primers	Sequence	Location	Length/bp
SV1	5'TTCTCAGTTAGGATGCTCAAGG3'	2391 ~ 2412	22
SV2	5'TGCTCACTAGAAGGTCTCTGT3'	3406 ~ 3426	21
SD1	5'GCGGATCCGTCGCTGATACTATITGGG3'	2479 ~ 2504	26
SD2	5'GGCCTCGAGCATTATTTGGTGGGTGAGCA3'	2857 ~ 2885	29

1.5 VP1 基因抗原区的获取

1.5.1 RNA 提取 参照试剂盒操作进行。

1.5.2 PCR 扩增 :RT-PCR 和 nPCR RT-PCR :取提取的总 RNA12μL ,片段下游引物 1μL ,65℃ 预热 10min ,立即冰浴 5min 后加入 5 倍的反转录缓冲液 4μL ,dNTP2μL ,AMV1μL ,使总体积为 20μL ,42℃ 反应 1h。PCR 和 nPCR ,PCR 取反转录产物 5μL ,10 倍的 PCR 缓冲液 5μL ,MgCl₂ 3μL ,dNTP4μL ,引物各 1μL ,*Taq* 酶 0.5μL 加水至 50μL 扩增。反应条件为 95℃ 50s ,48℃ 60s ,72℃ 90s ,35 个循环 ,最后在 72℃ 延伸 10min。nPCR :取 PCR 产物 1μL ,加入引物 SD1、SD2 各 1μL 反应条件为 95℃ 50s ,55℃ 30s ,72℃ 90s ,35 个循环 ,最后在 72℃ 延伸 10min ,其余条件及步骤均同 PCR。

1.6 VP1 基因抗原区和 pProEX-HTb 重组表达质粒的构建

通过 PCR 方法在 VP1 基因抗原区的 5'端引入 *Bam*HI 酶切序列 ,在其 3'端引入 *Xho*I 酶切位点。把此 VP1 基因抗原区与 PGEM-T easy 载体相连接 ,转化大肠杆菌 ,小量制备质粒。用 *Bam*HI 和 *Xho*I 双酶切阳性质粒 ,纯化回收目的片段 ,与用 *Bam*HI、*Xho*I 酶切的 pProEX-HTb 连接 ,构建重组表达载体。

1.7 感受态细胞的转化和阳性克隆的筛选^[4]

重组表达载体转化感受态细胞 BL21(DE3) ,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 ,命名阳性克隆为 pProEX-VP1。

1.8 重组质粒在大肠杆菌中的表达及其产物的鉴定

挑取含 pProEX-VP1 的单个转化菌接种于 3mL 含 100μg/mL 氨苄青霉素的 2 × YT 培养基中过夜培养后 ,取 500μL 接种于 50mL 2 × YT 培养基中于 37℃ 培养 1.5 ~ 2.0h ,当 OD₆₀₀ 达 0.6 ~ 1.0 后 ,加 IPTG 至终浓度为 2.5mmol/L 继续培养 ,分别在加入 IPTG 后 3 ~ 4h 收菌。同时培养诱导含 pProEX-HTb 的受体菌。

1.9 SDS-PAGE

收取的菌液离心后弃上清 ,用 PBS 液悬浮后加入等体积的 2× SDS-PAGE 上样缓冲液于沸水中煮 10min 作为加样的样品。积层胶浓度为 5% ,分离胶浓度为 12% ,每个加样孔上样 20μL ;采用 90V 电压电泳 ,电泳结束后考马斯亮蓝 R250 染色、脱色分析。

1.10 Western blot

样品的处理及电泳参照 1.9。将预先在转移缓冲液中浸泡 1h 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 层海绵依次放入塑料夹中后以 180mA 转移 3h 转移结束后 ,取出 NC 膜 ,剪下标准分子量蛋白泳道和另一个泳道 ,氨基黑染色观察转移的效果。NC 膜用封闭液浸泡过夜 ,用 PBST(NaCl 8.0g ;KH₂PO₄ 0.2g ;Na₂HPO₄ 2.9g ;KCl 0.2g ;吐温-20 0.5mL ,加超纯水至 1000mL)洗涤 3 次 ,加入猪水泡病阳性血清(1 :400 稀释) 37℃结合 1.5h 后用 PBST 洗涤 3 次 ,加入辣根过氧化物酶标记兔抗豚鼠二抗(1 :2000 稀释)37℃结合 1h 后 PBST 洗涤 3 次 ,显色。

2 结果

2.1 质粒 pProEX-VP1 的 PCR 和酶切鉴定

质粒 pProEX-VP1 的 PCR 及酶切鉴定产物电泳结果见图 1。由图可以看出 ,均有与预测的大小相符(407bp)的片段 ,pProEX-VP1 测序结果证明猪水泡病病毒 VP1 基因抗原区插入的位置、大小和读码框均正确 ,测序结果略。

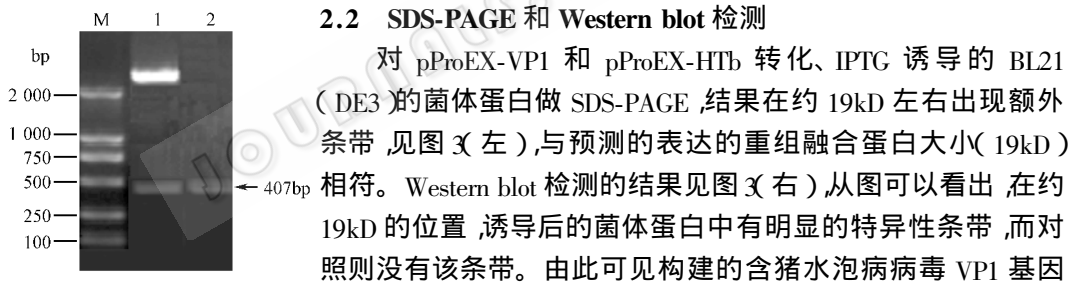


图 1 重组质粒 pProEX-VP1 的 PCR 和酶切鉴定

Fig.1 PCR and restriction analysis of recombinant plasmid pProEX-VP1

1. Restriction analysis of pProEX-VP1 ; 2. PCR identification of pProEX-VP1 .

3 讨论

对 SVDV 结构蛋白的研究发现 ,病毒中和性抗原位点在病毒的外壳蛋白上。薛景山^[5]认为 VP3 和 VP1 是诱导中和性抗体产生的主要抗原蛋白 ,且发现 VP3 和 VP1 不仅为序列依赖性抗原多肽 ,而且还具有抗变性作用。Kanno^[6]认为 VP1 的 87、88 位残基为一中和性抗原位点 ;Jimenez-Clavero^[7]认为 VP1 的 1 ~ 40 位氨基酸残基为一中和性抗原位点 ;Borrego^[8]认为 VP1 的 95、98 位氨基酸残基为一中和性抗原位点。综合以上的研究成果 ,并避开大肠杆菌中低利用率密码子^[9] ,实验选择 VP1 基因包括上述主要中和抗原位点区域进行表达。

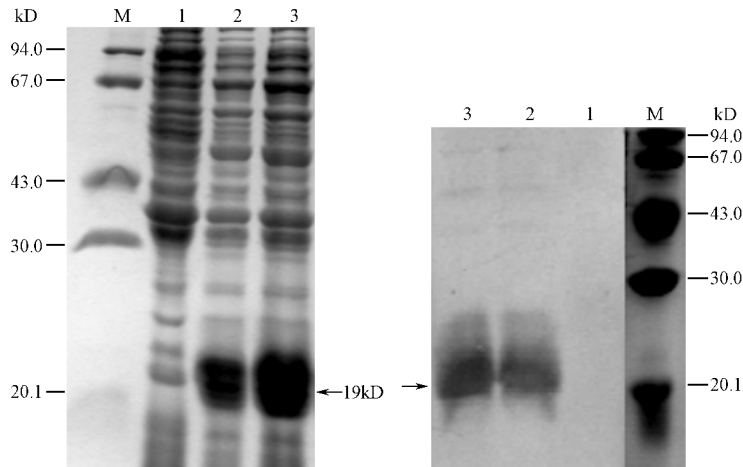


图 2 表达蛋白的 SDS-PAGE(左)和 Western blot(右)检测

Fig.2 SDS-PAGE(left) and Western blot(right) detection of protein expressed in *E. coli*
M. Marker ;1. pProEX-HTb transformed BL21(DE3) After induced with IPTG 4h);2 ,3. pPro-EX-VP1 transformed BL21(DE3) After induced with IPTG 3 ~ 4 h).

此项研究已成功地得到了猪水泡病病毒 VP1 基因抗原区在大肠杆菌中表达的蛋白。该蛋白在重组大肠杆菌中含量较高,且又可以与 SVDV 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。下一步的研究工作将是对表达的蛋白进行纯化,开发以表达重组蛋白作为检测抗原的猪水泡病诊断方法。

参 考 文 献

[1] 周鹏程,谢庆阁.猪水泡病病毒的分子生物学研究进展.中国兽医科技,1998,3:18~21.
[2] Inoue T, Suzukiichi T, Sekiguchi S. The complete nucleotide sequence of swine vesicular disease virus. *J Gen Virol*, 1989, 70: 919~934.
[3] Seechurn P, Knowles N J, Cauley J W, et al. The complete nucleotide sequence of swine vesicular disease virus. *Virus Res*, 1990, 16: 255~274.
[4] Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
[5] 薛景山,赵启祖,谢庆阁,等.猪水泡病病毒中和性抗原多肽的研究.见:第一届生命科学青年学术研讨会论文集摘要.北京:中国农业出版社,1993. 140~141.
[6] Kanno T, Inoue T, Wang Y, et al. Identification of the location of antigenic sites of swine vesicular disease virus with neutralization-resistant mutants. *J Gen Virol*, 1995, 76(Pt 12): 3099~3106.
[7] Jimenez-Clavero M A, Douglas A, Lavery T, et al. Immune recognition of swine vesicular disease virus structural proteins: novel antigenic regions that are not exposed in the capsid. *Virology* 2000, 270(1): 76~83.
[8] Borrego B, Carra E, Garcia-Ranea J A, et al. Characterization of neutralization sites on the circulating variant of swine vesicular disease virus (SVDV): a new site is shared by SVDV and the related coxsackie B5 virus. *J Gen Virol* 2002, 83(Pt 1): 35~44.
[9] Zhang S, Zubay G, Goldman E. Low-usage codons in Escherichia coli, yeast, fruit fly and primates. *Gene*, 1991, 105: 61~72.

Expression of Antigenic Region of VP1 Gene
of Swine Vesicular Disease in *Escherichia coli*

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

(¹ Lanzhou Veterinary Research Institute , Chinese Agriculture Academy of Sciences , Lanzhou 730046 , China)

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

Abstract : The antigenic region of VP1 gene of swine vesicular disease virus was amplified by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and nested polymerase chain reaction (nPCR). After the amplified fragment was cloned into the expression vector pProEX-HTb . 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 indicated that the transformed BL21(DE3) by the recombinant plasmids and induced by IPTG could express the antigen region of VP1 of swine vesicular disease virus , the expressed antigen protein could be recognized by the positive serum of SVDV .

Key words : Swine vesicular disease virus , VP1 gene , Antigen region , Expression

Foundation item : Major Project of Chinese National Fundamental Research Development (G19990119)

* Corresponding author . Tel 86-931-8342710 ; Fax 86-931-8340977 ; E-mail : HNXiangtao @ hotmail . com

Received date 09-09-2002

科技论文中常见的一些格式

参照《中国科学院自然科学期刊编排格式规范》、国家标准 GB7713 - 87 和《中国学术期刊(光盘版) 检索与评价数据规范》的要求 , 对本刊经常遇到的一些格式暂作如下规定 :

正体与斜体

- 1. 物种的学名 : 菌株的属、种用拉丁文斜体 , 属的首字母大字 , 其余小写 ; 属以上用拉丁文正体。病毒一律正体 , 首字母大写。
- 2. 限制性内切酶 : 内切酶前 3 个字母用斜体 , 后面的字母和编码正体平排 , 如 *Bam*H I , *Hind* III , *Pst* I , *Sau*3A I 等。
- 3. 氨基酸和碱基的缩写 : 氨基酸缩写用 3 个字母表示时 , 仅第一个字母大写 , 其余为小写 , 全部正体 ; 用单字母表示时为大写正体。碱基缩写均为大写正体。
- 4. 质粒和载体 : 质粒一律用正体 , 首字母 P 为小写 , 后面字母和数码平排 , 如 pBR322、pGBKT-ipaB 等。

计 量 单 位

- 计量单位和单位符号以国家技术监督局发布的《量和单位》GB3100-3102-93 执行。
- 1. 时间 : 日(天) 用 d , 小时用 h , 分钟用 min , 秒用 s 等 , 单位符号均用英文小写正体。
 - 2. 溶液浓度 : 溶液浓度用 mol/L 表示 , 而不用 M 或 N。
 - 3. 旋转速率 : 单位符号为 r/min , 而不用 rpm。
 - 4. 生物大分子的分子量 : 蛋白质用 kD , 核酸用 bp 或 kb。
 - 5. 光密度 : 光密度符号用斜体表示 , 如 *OD* , *OD*₆₀₀ 等。
 - 6. 图表中数值的量和单位 : 用量与单位的比值表示数值 , 即物理量符号(斜体) 与单位(正体) 之间用斜线隔开 , 如 t/(时间 , 单位是小时)。
 - 7. 有些数值带的计量单位不能省略 , 如 30cm × 0.5cm 不可写成 30 × 0.5cm ; 15℃ ~ 20℃ 不可写成 15 ~ 20℃ ; 15% ~ 20% 不可写成 15 ~ 20% 等。