

猪水泡病病毒 VP2 基因抗原区在大肠杆菌中的表达

冶贵生^{1,2} 刘湘涛^{1*} 张彦明² 马玉花² 张森涛²

(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 技术,以 SVDV HK 70 为材料,扩增出 VP2 基因抗原区。将目的基因的 PCR 扩增产物直接进行双酶切,然后将酶切产物与酶切后的表达载体 pGEX 4T-1 进行连接,转化 BL21 菌体并提质粒,经酶切、PCR 鉴定为阳性的重组质粒命名为 pGEX-VP2,并测序。测序结果表明,目的基因插入的位置、大小和读码框均正确,表达载体构建成功。将含有阳性质粒的 BL21 菌液经 IPTG 诱导后进行 SDS-PAGE 分析,出现预期的目的蛋白条带,此目的蛋白经 Western blot 检测确定其有免疫活性。

关键词 SVDV HK 70, VP2 基因抗原区, pGEX-VP2, SDS-PAGE, Western blot

中图分类号 Q786 **文献标识码** A **文章编号** 1001-6209(2004)05-0593-03

猪水泡病是由猪水泡病病毒(*Swine vesicular disease virus*, SVDV)引起的猪的一种急性传染病,症状与口蹄疫极其相似。该病流行性强、发病率高,能造成严重的公共卫生问题,国际兽医局将其列为动物 A 类传染病,我国农业部列为动物一类传染病。SVDV 属于小 RNA 病毒科,肠道病毒属,其核酸类型为单股正链 RNA 分子,无囊膜,病毒基因组含一个大的开放阅读框,编码一条由 2185 个氨基酸组成的多聚蛋白。SVDV 基因组的结构与小 RNA 病毒科的其他病毒相似,从 5'端到 3'端依次为 5'非编码区、P1 区、P2 区、P3 区、3'端非编码区及 PolyA 尾结构。P1 区编码病毒的 4 种结构蛋白 VP1(1D)、VP2(1B)、VP3(1C)和 VP4(1A),其中 VP1、VP2、VP3 为外壳蛋白,VP4 为内壳蛋白。P2 区和 P3 区编码病毒的功能性非结构蛋白,P2 区包含 2A、2B 和 2C 基因,P3 区包含 3A、3B、3C 和 3D 基因。

本研究利用基因重组技术将猪水泡病病毒 VP2 基因抗原区克隆到原核表达载体 pGEX 4T-1 中,利用大肠杆菌进行融合表达,并对目的蛋白进行免疫检测,确定其有良好的免疫活性,从而为猪水泡病病毒诊断试剂和疫苗的研制奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 毒株 :SVDV HK 70 株(1970 年中国香港分

离株)为兰州兽医研究保存。

1.1.2 菌株、质粒和血清 :大肠杆菌(*Escherichia coli*)BL21(DE3)均由本室保存,pGEX 4T-1 载体为 Amersham pharmacia 公司产品。猪水泡病阳性血清由本室保存,辣根过氧化物酶标记的兔抗猪血清为 Sigma 公司产品。

1.1.3 试剂 :反转录酶(AMV)及反转录试剂、TaqDNA 聚合酶及 PCR 试剂、RNA 酶抑制剂、DNA 纯化试剂盒、限制酶、T4 DNA 连接酶等均为 TaKaRa 公司产品,Hybond-N 膜为 Amersham 公司产品。

1.1.4 引物 :根据作者测定的猪水泡病病毒全核苷酸序列(GenBank 登录号为 AY429470),设计出 4 条扩增 VP2 基因抗原区的引物,目的基因位于 VP2 基因的 91 ~ 708 位。引物对 1 :S1 5'-CTGTCGTAAT-GGGCAACTCT-3'; S2 5'-GAACCCAAAAACCTGAGAAC-3'。引物对 2 :R1 5'-CGGGATCCGTGGTAGTT-GGATATGGGCTGTGG-3'; R2 5'-CCG-CTCGAG-GG-TAGCCCCCTGTGCTGTAGCTCAGT-3'。

1.2 病毒 RNA 的提取

参照试剂盒说明书进行。

1.3 VP2 基因抗原区的 RT-PCR 和 nPCR RT-PCR

提取的总 RNA 12 μ L,片段下游引物 S2 1 μ L,65℃预热 10min,立即冰浴 5min 后加入 5 倍的反转录缓冲液 4 μ L,dNTP 2 μ L,AMV 1 μ L,使总体积为 20 μ L,42℃反应 1h。PCR 和 nPCR 取反转录产物 5 μ L,10 $\times$ PCR 缓冲液 5 μ L,MgCl₂ 3 μ L,dNTP 4 μ L,

基金项目 国家重大基础研究发展规划项目(G1999011905)

* 通讯作者。Tel 86-931-8342710,E-mail :HNxiangtao@hotmail.com

作者简介 冶贵生(1977 -),男(回族),新疆米泉市人,西北农林科技大学博士研究生,主要从事动物病毒分子生物学与免疫学研究。E-mail :xjguisheng@163.com

其他作者 洪海霞²,韩雪清¹

收稿日期 2004-01-07,修回日期 2004-04-19

引物 S1、S2 各 1 μ L, *Taq* 酶 0.5 μ L 加水至 50 μ L。反应条件 :95 $^{\circ}$ C 60s ,48 $^{\circ}$ C 60s ,72 $^{\circ}$ C 60s ,35 个循环 ;72 $^{\circ}$ C 10min。nPCR 取一扩产物 1 μ L 加入引物 R1、R2 各 1 μ L ,反应条件 :95 $^{\circ}$ C 60s ,55 $^{\circ}$ C 40s ,72 $^{\circ}$ C 60s ,35 个循环 ;72 $^{\circ}$ C 10min ,其余条件及步骤均同 PCR。目的片段的纯化参照试剂盒说明书进行操作。

1.4 VP2 基因抗原区与 pGEX 4T-1 重组表达质粒的构建

通过 PCR 方法在 VP2 基因抗原区的 5'端加入 *Bam*H I 酶切序列 ,在其 3'端加入 *Xho* I 酶切位点。把上述 VP2 基因抗原区的 PCR 扩增产物直接用 *Bam*H I 和 *Xho* I 进行双酶切 ,将纯化回收的目的片段与用 *Bam*H I、*Xho* I 酶切的 pGEX 4T-1 表达载体相连 ,构建重组表达载体 pGEX-VP2。

1.5 阳性克隆的筛选

重组表达载体 pGEX-VP2 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 鉴定后送 TaKaRa 公司测序。

1.6 VP2 基因的诱导表达

将上述鉴定好的阳性重组菌接种于 2 $\times$ YT 培养基中 37 $^{\circ}$ C 培养 ,然后加入诱导剂 IPTG 进行诱导培养 ,在相同条件下以含表达载体 pGEX 4T-1 的受体菌作为对照。

1.7 SDS-PAGE 分析

将上述诱导培养后的菌液离心收集沉淀 ,用 PBS 冲悬沉淀并加入 SDS 上样缓冲液于沸水中煮沸 10min ,加样 20 μ L 于事先配置好的聚丙烯酰胺凝胶 (积层胶浓度为 5% ,分离胶浓度为 12%)中 ,进行 SDS-PAGE ,分别进行考马斯亮蓝染色和脱色 ,观察电泳结果。

1.8 Western blot

样品电泳参照 1.7。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 160mA 转移 3h ,转移结束后 ,取出 NC 膜 ,剪下 Marker 所在的泳道 ,氨基黑染色观察转移的效果。NC 膜用封闭液浸泡过夜 ,用 PBST 洗涤 3 次 ,加入猪水泡病阳性血清 37 $^{\circ}$ C 结合 3h 后用 PBST 洗涤 4 次 ,加入辣根过氧化物酶标记兔抗猪二抗 37 $^{\circ}$ C 结合 2h ,PBST 洗涤 4 次 ,加入显色液显色。

2 结果

2.1 PCR 扩增结果

根据所设计的引物扩增出与预期大小完全一致的目的片段 ,大小为 635bp。

2.2 重组表达载体 pGEX-VP2 的鉴定

把酶切、PCR 测序鉴定均正确的阳性克隆命名为 pGEX-VP2。双酶切、PCR 鉴定及测序结果(测序结果略)证明猪水泡病病毒 VP2 基因抗原区插入的位置、大小和读码框均正确。将 SVDV HK '70 VP2 基因抗原区核苷酸和推导的氨基酸序列与 SVDV J1 '73(GenBank 登录号为 D16364) SVDV H/3 '76 (GenBank 登录号为 D00435) SVDV(Seerchurn 等测毒株) GenBank 登录号为 X54521) SVDV NET/1/92 (GenBank 登录号为 AF268065)等毒株进行比较 ,结果表明核苷酸同源性均在 89.2 以上 ,氨基酸同源性均在 97.1 以上 ,而且 SVDV HK '70、J1 '73、Seerchurn 等测、H/3 '76 这 4 个毒株之间只有一个氨基酸的差异。

2.3 重组质粒 pGEX-VP2 在大肠杆菌中的表达

重组质粒 pGEX-VP2 在大肠杆菌中诱导后的蛋白经 SDS-PAGE 后 ,出现目的融合蛋白 ,大小约 48kD 左右(图 1) ;对照 pGEX 4T-1 在大肠杆菌中诱导后出现了大小约 26kD 的 GST 载体标记蛋白 ;未诱导的 pGEX-VP2 重组菌在 48kD 附近未出现蛋白条带。电泳结果经扫描分析表明 ,目的蛋白表达量最高时(即诱导 5h) ,目的蛋白占细菌总蛋白的 30% 左右。由此可见 ,构建的含猪水泡病病毒 VP2 基因的重组表达质粒 pGEX-VP2 转化 BL21(DE3)菌经诱导后能表达猪水泡病病毒 VP2 基因编码蛋白。

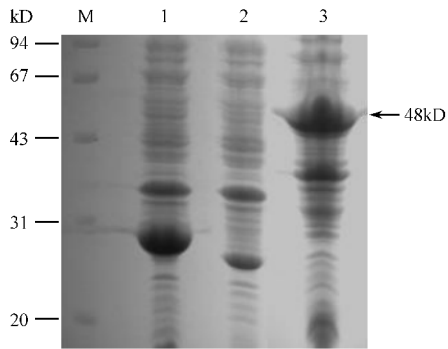


图 1 诱导表达蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig.1 SDS-PAGE of induced expression protein
M. Protein Marker ;1. pGEX 4T-1 transformed BL21(After induced 5h) ;
2. pGEX-VP2 transformed BL21(Before induced) ; 3. pGEX-VP2 transformed BL21(After induced 5h) .

2.4 目的蛋白的 Western blot 检测

用猪水泡病阳性血清和辣根过氧化物酶标记的兔抗猪水泡病病毒高免血清对目的蛋白进行 Western blot 实验后 ,纤维膜上出现大小约 48kD 左右特异性的目的条带(图 2) 。由此可见 ,构建的含猪水泡病病毒 VP2 基因的重组表达质粒 pGEX-VP2 转化 BL21(DE3)菌经诱导后表达的猪水泡病病毒 VP2 基

因重组蛋白具有良好的免疫活性。

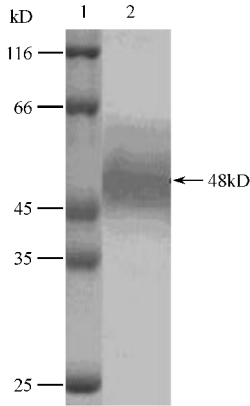


图 2 目的蛋白的 Western blot 检测

Fig.2 Western blot of protein

1. Standard proteins ; 2. Induced expression protein.

3 讨论

SVDV 结构蛋白编码区编码病毒特异性的衣壳蛋白,此蛋白进一步加工成熟为 VP1(1D)VP2(1B)VP3(1C)VP4(1A)4 种蛋白,其中 VP1、VP2、VP3 为外壳蛋白,VP4 为内壳蛋白。对 SVDV 结构蛋白的研究发现,其中性抗原位点在病毒的外壳蛋白上^[1,2],Kanno 等^[3]通过单抗实验确定了 SVDV 衣壳蛋白上有 5 个中和性抗原位点,位点 1 在 VP1 的 87 和 88 位氨基酸残基,位点 2、3 位于 VP2 的 154 和 163 位氨基酸残基,位点 4 位于 VP1 的 272、275 和 VP3 的 60 位氨基酸残基,位点 5 为于 VP2 的 70、233 和 VP3 的 73、76 位氨基酸残基。Borrego 等^[4]也通过单抗实验分析 SVDV 衣壳蛋白的抗原决定图谱并初步确定衣壳蛋

白上也存在 5 个中和性抗原位点,位点 1 位于 VP1 的 51 ~ 60 位氨基酸残基,位点 2 位于 VP2 的 142 ~ 161,位点 3 位于 VP3 的 61 ~ 70,位点 4 位于 VP1 的 C 端,位点 5 位于 VP3 的 N 端。以上中和性抗原位点的确定为 SVDV 诊断试剂和新型疫苗的研制奠定了基础。

我们避开大肠杆菌中低利用率密码子^[5]并对上述文献所报道的有关猪水泡病病毒 VP2 基因抗原位点的分布情况分析后,针对 VP2 基因抗原区进行了表达,表达的融合蛋白经检测有活性。本实验成功表达的猪水泡病病毒 VP2 基因重组蛋白,因其含有一个 GST 标记蛋白,所以可利用亲和层析的方法对融合蛋白进行纯化,纯化后的蛋白可用于猪水泡病病毒诊断试剂和基因工程疫苗的研制。

参 考 文 献

[1] Inoue T ,Suzukiichi T ,Sekiguchi S. The complete nucleotide sequence of swine vesicular disease virus . J Gen Virol ,1989 **70** :919 – 934.

[2] Seechurn P ,Knowles N J ,Mc Cauley J W ,et al . The complete nucleotide sequence of swine vesicular disease virus . Virus Res ,1990 , **16** :255 – 274.

[3] 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.

[4] Borrego B ,Garcia-Ranea J A ,Douglas A ,et al . Mapping of linear epitopes on the capsid proteins of swine vesicular disease virus using monoclonal antibodies . J Gen Virol 2002 **83** :1387 – 1395.

[5] Zhang S , Zubay G , Goldman E. Low-usage codons in *Escherichia coli* , yeast , fruit fly and primates . Gene , 1991 **105** :61 – 72.

Expressing Antigen Region of VP2 Gene of Swine Vesicular Disease Virus in *Escherichia coli*

YE Gui-Sheng^{1,2} LIU Xiang-Tao^{2*} ZHANG Yan-Ming² MA Yu-Hua² ZHANG Miao-Tao²

(¹ Lanzhou Veterinary Research Institute , Chinese Academy of Agricultural Science , Lanzhou 730046 ,China)

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

Abstract : The antigen region of VP2 gene of swine vesicular disease was amplified by RT-PCR and nPCR , the amplified fragments were cloned into the expression vector pGEX 4T-1. The insert position ,the size and the reading frame were identified by PCR ,restriction digestion and the sequence analysis of the recombinant plasmids. Results of SDS-PAGE indicated that the recombinant plasmids could express the VP2 gene of Swine vesicular disease. Western blot indicated that the positive serum of SVDV could react with expressed protein.

Key words Swine vesicular disease , VP2 gene , pGEX 4T-1 , SDS-PAGE , Western blot

Foundation item :Major Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development(G1999011905)

* Corresponding author. Tel :86-931-8342710 ,E-mail :HNxiangtao@hotmail . com

Received date :01-07-2004