

猪 A 组轮状病毒 Vp6 基因与乳酸菌非抗性表达载体的重组及在大肠杆菌中的表达

王春风¹ 丛彦龙² 刘尚高² 李 玉^{3*}

(¹ 吉林农业大学动物科学与技术学院 长春 130118)(² 中国农业大学动物医学院 北京 100094)

(³ 吉林农业大学菌物研究所 长春 130118)

摘 要:以猪 A 组轮状病毒 mRNA 为模板,应用反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)技术,扩增了 1194bp 的 Vp6 基因,通过 T-A 克隆技术,将 PCR 产物克隆至克隆载体 pGEM-T Vector 中,构建克隆质粒 pGEM-T-Vp6。用 *Sac* I 和 *Kpn* I 双酶切 pGEM-T-Vp6 和以胸苷酸合成酶基因(*thymidylate synthase*, *thyA*)为选择压力的非抗生素抗性的穿梭表达载体 pW425t,并将纯化的 Vp6 基因亚克隆至表达载体 pW425t 中,构建出可以在乳酸菌与大肠杆菌之间穿梭表达的原核表达重组质粒 pW425t-Vp6。将 pW425t-Vp6 转化至 *thyA* 基因缺陷型的大肠杆菌感受态 *E. coli* X13 中,经生长功能弥补筛选阳性克隆,通过 SDS-PAGE 分析,可见约 44.88kD 的融合蛋白。由 Western blot 分析,表明该蛋白具有与轮状病毒多克隆抗体的反应原性,从而为 pW425t-Vp6 在乳酸菌受体菌株中表达提供理论基础和实验依据。

关键词: 轮状病毒, Vp6 基因, 乳酸菌表达载体, 大肠杆菌

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2005)05-0685-05

轮状病毒(Rotavirus, RV)属于呼肠孤病毒科(*Reoviridae*)轮状病毒属(*Rotavirus*),作为婴幼儿和动物腹泻的主要病原在世界范围内广泛流行,每年造成巨大损失。鉴于其危害严重且无有效治疗手段,世界卫生组织将 RV 疫苗列为最优先发展的疫苗项目之一,尤其是它的基因工程疫苗的研制更为重要。

随着分子生物学技术的发展, RV 主要保护性抗原基因已经被克隆和测序,现已明确 VP6 蛋白为 RV 组特异性抗原,位于病毒的内壳,占病毒颗粒的 51%。由于 VP6 主要刺激机体产生黏膜免疫抗体 sIgA,在黏膜免疫中具有非常重要的作用,因而研制由轮状病毒 Vp6 基因介导黏膜免疫的口服基因工程疫苗具有重要的意义^[1,2]。

本研究将猪 A 组轮状病毒 Vp6 基因进行克隆、测序,与“疫苗级”以 *thyA* 基因为选择标记的可在乳酸菌和大肠杆菌之间穿梭表达的载体 pW425t 进行重组,并转化入 *thyA* 基因缺陷型的大肠杆菌(*Escherichia coli*)X13 中。通过 SDS-PAGE 和 Western

blot 检测表明,外源基因 Vp6 可以通过表达载体 pW425t 在大肠杆菌中表达并具有反应原性^[3,4],从而为下一步 pW425t-Vp6 在 *thyA* 基因缺陷型的乳酸菌受体菌株中表达提供理论基础和实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料:猪 A 组轮状病毒 Wa 株,由吉林省某地分离并鉴定;*thyA* 基因为选择压力的载体 pW425t,由本文第一作者构建[△]; *E. coli* JM109,由本文第一作者实验室保存; *E. coli* X13,由本文第一作者筛选;轮状病毒兔抗猪多克隆抗体,由本文第一作者实验室研制保存;辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG,由中国农业大学张国中博士惠赠。

1.1.2 主要试剂:RNA 提取用 TRIzol 试剂盒为 GIBCOBRL 公司产品;AMV 反转录酶、T4 DNA 连接酶和 pGEM-T Vector 克隆载体为 Promega 公司产品;Ex Taq DNA 聚合酶、RNasin、*Sac* I、*Kpn* I、核酸分子量标准为 TaKaRa 公司产品;琼脂糖为 Spanish 公

基金项目:国家“863 计划”(2003AA241121002);国家自然科学基金(30200199);吉林省科技厅项目(20020220);吉林省杰出青年基金(20030118);中国博士后科学基金项目(2002031156);吉林农业大学青年教师启动基金(2002-QQN-002)

* 通讯作者。Tel:86-431-4510966; E-mail: Liyu@jlau.edu.cn

作者简介:王春风(1972-),女,副教授,博士,从事动物微生物学与分子生物学研究。Tel:86-431-4532813; E-mail:wchunfeng@hotmail.com

收稿日期:2005-04-20,修回日期:2005-06-30

△王春风.共生乳酸菌非抗性表达载体的构建及柔嫩艾美耳球虫 S07 基因的表达.中国农业大学博士论文,2001.

公司产品;溶菌酶、dNTPs、X-Gal、IPTG 为 Bebcos 公司产品;氯苄青霉素、DL-苏氨酸、DTT、RNase A 为 Sigma 公司产品;DNA 凝胶回收纯化试剂盒为杭州维特洁生化技术有限公司产品;酵母浸出粉、胰蛋白胨为 Oxoid 公司产品;低分子量蛋白质标准为上海生物化学研究所产品;PVDF 转移膜为 Glemann 公司产品。

1.2 Vp6 基因的克隆

1.2.1 PCR 扩增

根据 GenBank 中(AF317123)猪轮状病毒 OSU 株 Vp6 的基因序列,设计一对扩增该基因的 PCR 引物(由大连 TaKaRa 公司合成):P1: 5'-GTG GAGCTCATGGAGGTTCTGTACTCTTTAT-3'; P2: 5'-GTG GGTACCTCACCTTAATCAACATGCTTCT-3'(划线序列分别为 *Sac* I、*Kpn* I 酶切位点)。按 TRIzol 试剂盒方法提取猪轮状病毒总 RNA;以总 RNA 为模板,以 P1、P2 为引物,RT-PCR 扩增 Vp6 基因。反转录反应体系(50 μ L)及反应条件如下:取 10.0 μ L mRNA, 75 $^{\circ}$ C 5min,迅速置于冰上冷却后,再加入 5 \times AMV Buffer 10.0 μ L, dNTPs(10mmol/L each) 4.0 μ L, RNasin 1.0 μ L, P2 0.5 μ L, AMV(5U/ μ L) 0.5 μ L, Olig(dT) 1.0 μ L, MgCl₂(25mmol/L) 4.0 μ L, 加 DEPC 处理的水 19.0 μ L。42 $^{\circ}$ C 1h, 95 $^{\circ}$ C 5min。PCR 反应体系(50 μ L)及反应条件如下:10 \times PCR Buffer 5.0 μ L; dNTPs(2.5mmol/L) 3.0 μ L; P1、P2 各 1.0 μ L; cDNA 5.0 μ L; RNasin 1.0 μ L; MgCl₂ 2.0 μ L; EX Taq DNase 0.5 μ L; DEPC 处理水 31.5 μ L。反应条件:94 $^{\circ}$ C 8min; 94 $^{\circ}$ C 1.5min, 55 $^{\circ}$ C 1.0min, 72 $^{\circ}$ C 2.0min, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10min。

1.2.2 Vp6 基因的克隆

PCR 产物经纯化后,以 T4 DNA 连接酶连接于 pGEM-T Vector 中,并转化至感受态 *E. coli* JM109 中。通过 α -互补法、质粒大小、酶切分析及 PCR 扩增鉴定重组克隆,获得重组质粒 pGEM-T-Vp6 送至大连 TaKaRa 公司进行测序,并应用 DNASTAR 软件进行分析。

1.3 乳酸菌与大肠杆菌原核表达重组质粒的构建与目的基因的表达

对重组质粒 pGEM-T-Vp6 和以 *thyA* 基因为选择压力的载体 pW425t 均以 *Sac* I、*Kpn* I 双酶切,切胶纯化后,以 T4 DNA 连接酶连接。连接产物转化至 *thyA* 基因缺陷型的大肠杆菌感受态 X13 中,在普通的 LB 固体培养基(没有添加胸腺嘧啶核苷)上培养,经生长功能弥补,筛选获得原核表达重组质粒 pW425t-Vp6。

将原核表达重组菌接种于 5mL 普通的 LB 液体培养基(没有添加胸腺嘧啶核苷)中,37 $^{\circ}$ C 200r/min

培养过夜。取 2mL 接种于 100mL LB 液体培养基中,在培养基中添加 40mmol/L DL-苏氨酸,37 $^{\circ}$ C 250r/min 培养至 OD₆₀₀ 为 0.6~0.8。每隔 1h 取一次菌液,取至 10h。以同样的方法诱导含空质粒 pW425t 的 *E. coli* X13 10h 作对照。

1.4 SDS-PAGE 分析

将各个时间诱导收获的菌液按《分子克隆》中方法进行 15% SDS-PAGE。

1.5 Western blot 分析

表达产物经 SDS-PAGE 后,按《分子克隆》中方法以 BIO-RAD 系统电转移至 PVDF 转移膜上,经牛血清白蛋白封闭后,依次加入轮状病毒兔抗猪多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG,最后在联苯胺(DAB)溶液中显色并观察结果。

2 结果

2.1 重组载体构建与阳性克隆筛选鉴定

用提取的总 RNA 为模板,RT-PCR 扩增 Vp6 基因,扩增产物约为 1200bp,与预期大小相符。纯化的 Vp6 PCR 产物与 pGEM-T Vector 连接,构建重组质粒 pGEM-T-Vp6。经过 α -互补法、质粒大小鉴定重组质粒后,用 *Sac* I 和 *Kpn* I 双酶切鉴定 pGEM-T-Vp6 结果得到约 3000bp 的 pGEM-T 线性片段和约 1200bp 的插入片段。再以阳性重组质粒为模板,经 PCR 扩增得到约 1200bp 的基因片段(图 1)。

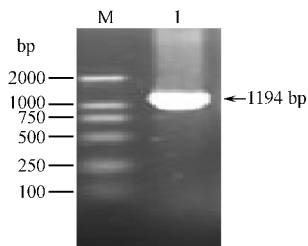


图 1 PCR 鉴定含 Vp6 基因的重组质粒

Fig. 1 Identification electrophoresis of recombinant plasmid pGEM-T-Vp6 by PCR

M. DL2000 marker; 1. PCR product with the recombinant plasmid as template.

2.2 Vp6 基因序列测定和分析

将上述鉴定为阳性的质粒送至 TaKaRa 公司测序,对测序结果与 RV 其它代表株绘制系统进化树(图 2),并进行核苷酸序列和氨基酸序列同源性比对。

试验株轮状病毒 Vp6 基因的开放阅读框为 1194bp,核苷酸序列比较结果显示:实验株 Vp6 基因序列(No. DQ119822)与美国株马里兰株(No.

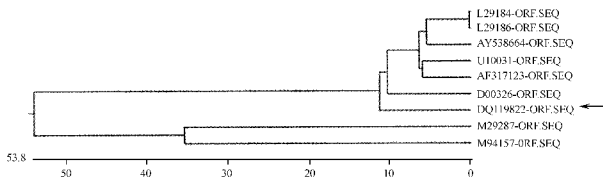


图 2 Vp6 基因的进化树

Fig.2 The phylogenetic tree of rotavirus Vp6 gene

D00326)和委内瑞拉株(No. AF317123)同源性分别为 81.6%和 80.0% ;与英国株(No. L29184、L29186)同源性分别为 80.7%和 80.5% ;与黑龙江株(No. AY538664)同源性为 79.8% ;与阿根廷株(No. U10031)同源性为 79.6% ;与巴西株(No. M94157)和法国株(No. M29287)同源性较低,分别为 55.2%和

54.9%(见表 1 中的 A)。

Vp6 基因翻译后编码 398 个氨基酸。与其它 RV 株 Vp6 基因的氨基酸序列比较,结果显示实验株的 Vp6 基因的氨基酸与国内外报道 Vp6 基因的氨基酸序列的同源性为 42.7% ~ 92.2%,其中与美国马里兰州(No. D00326)同源性最高,为 92.2% ;与英国株(No. L29184)和委内瑞拉株(No. AF317123)同源性均为 91.2% ;与另一英国株(No. L29186)同源性为 90.7% ;与黑龙江株(No. AY538664)的同源性为 90.5% ;与阿根廷株(No. U10031)同源性为 90.2% ;与巴西株(No. M94157)和法国株(No. M29287)同源性最低,分别为 42.8%和 42.7%(见表 1 中的 B)。

表 1 Vp6 基因序列同源性比较

Table 1 Homology comparison of Vp6 sequence of experimental strain with other strains

		A Percent identity of nucleotide sequences										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9		
B Percent identity of amino acid sequences	1		90.2	79.6	83.1	90.4	90.4	54.7	55.0	89.2	1	U10031-ORF.PRO
	2	97.7		79.8	82.4	90.3	90.3	53.3	53.6	86.9	2	AY538664-ORF.PRO
	3	90.2	90.5		81.6	80.7	80.5	54.9	55.2	80.0	3	DQ119822-ORF.PRO*
	4	94.0	93.2	92.2		83.5	83.5	54.5	54.7	79.9	4	D00326-ORF.PRO
	5	98.7	97.5	91.2	93.5		99.8	54.5	54.8	87.3	5	L29184-ORF.PRO
	6	98.7	97.5	90.7	93.5	99.5		54.5	54.8	87.3	6	L29186-ORF.PRO
	7	41.4	40.7	42.7	41.4	41.2	41.4		99.7	54.7	7	M29287-ORF.PRO
	8	41.6	40.8	42.8	41.6	41.3	41.6	97.5		55.0	8	M94157-ORF.PRO
	9	98.7	97.5	91.2	93.5	99.5	99.5	41.4	41.6		9	AF317123-ORF.PRO
	1	2	3	4	5	6	7	8	9			

A: Homology comparison of Vp6 amino acid sequence of experimental strain with other strains; B: Homology comparison of Vp6 nucleotide sequence of experimental strain with other strains; * DQ11982-ORF.PRO represents the experimental strain.

2.3 乳酸菌与大肠杆菌原核表达重组质粒的构建及重组子的鉴定

pGEM-T-Vp6 和 pW425t 均以 *Sac* I、*Kpn* I 双酶切和纯化后,由 T4 DNA 连接酶连接,连接产物转化至 *thyA* 基因缺陷型的大肠杆菌感受态 X13 中,*thyA* 基因缺陷的 *E. coli* X13 在普通的 LB 培养基上不能生长或生长不良,必须在加有外源的胸腺嘧啶核苷(50μg/mL)的条件下才能恢复生长。在本实验中含 *thyA* 基因重组质粒 pW425t-Vp6 的转入能使 *thyA* 基因缺陷的 *E. coli* X13 在普通的 LB 平板上恢复生长。

将经过生长功能弥补而获得的菌落在普通 LB 液体培养基(未添加外源的胸腺嘧啶核苷)中培养,进行质粒提取,以与预期大小一致的重组质粒为模板,PCR 扩增 Vp6 基因,结果显示(图 3-A),扩增出一条 1194bp 的目的带。

对经过 PCR 鉴定的重组质粒用 *Sac* I 和 *Kpn* I 双酶切,得约 3700bp 的 pW425t 线性片段和 1194 bp

的插入片段,表明已构建出含猪轮状病毒 Vp6 基因的重组质粒 pW425t-Vp6,结果见图 3-B。

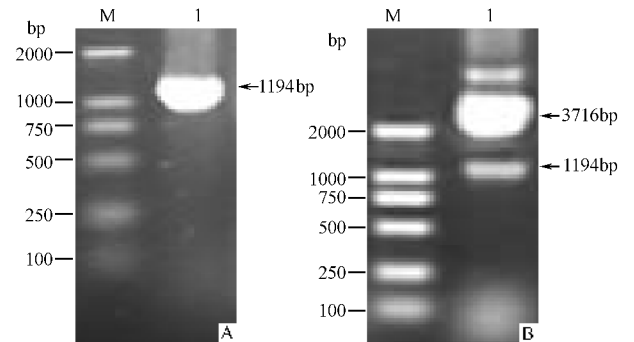


图 3 重组质粒 pW425t-Vp6 的鉴定

Fig.3 Identification electrophoresis of recombinant plasmid pW425t-Vp6
A: Identification electrophoresis of recombinant pW425t-Vp6 with PCR. M. DL2000 marker; 1. Vp6 PCR product.
B: Identification electrophoresis of recombinant pW425t-Vp6 with restriction enzymes. M. DL2000 marker; 1. pW425t-Vp6 digested with *Sac* I / *Kpn* I.

2.4 Vp6 基因表达产物的鉴定及生物活性分析

分析上述经鉴定为阳性的重组表达载体 pW425t-Vp6 在 *E. coli* X13 不同时间的表达情况,与对照相比,其表达量随时间的延长而增加,Vp6 基因表达蛋白为一相对分子量约 44.88kD 的融合蛋白

(图 4-A),与预期 VP6 蛋白的分子量一致。而含空质粒 pW425t 的 *E. coli* X13 对照则未见该蛋白质表达。蛋白印迹杂交反应结果显示(图 4-B),可见 44.88kD 处有一条明显的蛋白印迹带,说明该表达产物与猪轮状病毒多克隆抗体具有免疫反应活性。

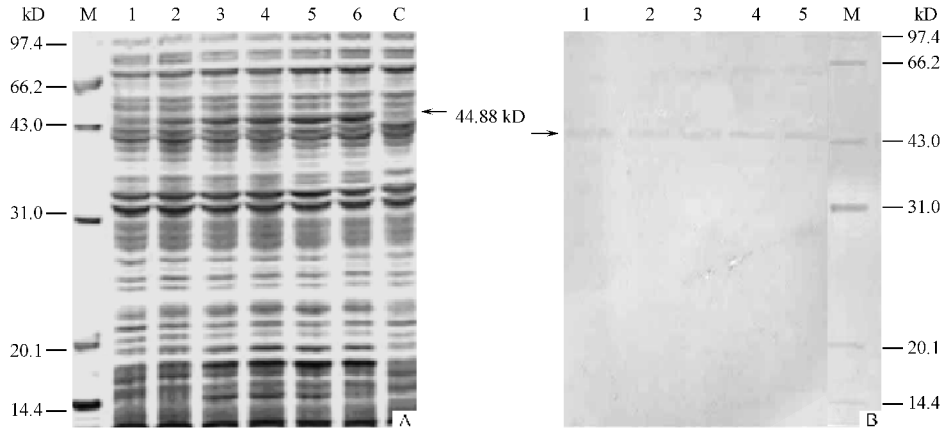


图 4 Vp6 基因表达产物的鉴定及生物活性分析

Fig.4 Identification of expression products of Vp6 gene and analysis of its biological activity

A :Detection of the VP6 protein with SDS-PAGE. M :Low molecular weight protein marker ; 1 ~ 6 :pW425t-Vp6 expression products in *E. coli* X13 after 0h 2h 4h 6h 8h 10h ,respectively ; C :pW425t expression products in *E. coli* X13 after 10h as negative control.

B :Western blot analysis on the expression products. 1 ~ 5 :Bacterial protein of the recombinant plasmid pW425t-Vp6 in *E. coli* X13 after induction ; M :Low molecular weight protein marker.

3 讨论

轮状病毒是引起婴幼儿和幼畜腹泻的主要病原,目前尚无有效治疗手段。研究表明,小肠 IgA 为抗 RV 保护作用的相关因素,黏膜免疫在抗轮状病毒中具有非常重要的作用。对于 RV 疫苗的研究者来说,最重要也是最富有挑战性的任务是构建一种能在肠黏膜表面诱导产生病毒特异性 sIgA 的疫苗。而 VP6 是 RV 的主要抗原,主要刺激机体产生 sIgA,从而介导黏膜免疫,抵抗再次感染^[1,2]。因而研制轮状病毒 Vp6 基因介导黏膜免疫的口服乳酸菌基因工程疫苗具有十分重要的意义。

而乳酸菌作为消化道共生的正常菌群之一,不仅具有很多益生的功能,又具有口服安全、方便、廉价等特点,以它作为基因工程的受体菌株,就可以将乳酸菌的生物学功能和外源功能抗原基因的特异性免疫相结合。Christiaens(1992年)等^[5]研究发现:乳酸杆菌可以作为基因工程菌表达的外源基因,与大肠杆菌相比较,乳酸杆菌仅有一层细胞膜,目的蛋白可在信号肽的引导下直接分泌进入上清,从而容易获得目的蛋白。Allson(1996年)^[6]研究指出,乳酸杆菌是保护性抗原基因或免疫调节因子的良好的转化或表达系统,以乳酸杆菌为载体表达内源或外源

蛋白,在功能食品、医疗保健等领域都具有诱人的前景。

但目前报道的人和动物消化道共生乳酸杆菌表达载体系统,多是以抗生素抗性作为外源基因稳定表达的压力。然而由于抗药性基因不断向环境中漂移扩散,可能造成对环境微生态的破坏,带来严重后果,因而这类表达系统离“可食性”的要求还有很大的距离,不能直接用于人和动物。所以构建以营养因子代替抗生素基因作为载体表达的选择压力具有非常重要的意义。非抗生素抗性为选择压力的表达系统是以细菌的管家基因缺陷菌株为受体菌,在质粒上克隆入同源或异源完整的受体菌缺陷基因,作为外源基因稳定表达的压力。自 Nakayama(1988年)用 *Asd* 基因为选择压力构建鼠伤寒沙门氏菌非抗生素抗性表达系统以来,此类表达系统发展很快。目前比较成熟的系统包括:胸苷酸合成酶基因(Thymidylate synthase, *thyA*)、*Asd* 基因、 β -半乳糖苷酶基因、*SSB* 基因、D-木糖异构酶基因、琥珀突变体、精石突变体、乳链菌肽及其它的营养生长因子基因等^[7-9]。

本文第一作者(2001年)已经用自己构建的以 *thyA* 基因为选择标记的非抗性穿梭表达载体 pW425t 成功表达了柔嫩艾美耳球虫 S07 基因。本

研究在此基础上,将猪 A 组轮状病毒 Vp6 基因用该载体表达,结果表明 VP6 蛋白与猪轮状病毒的多克隆抗体具有反应活性,从而为下一步将 pW425t-Vp6 在乳酸菌受体菌株中表达提供依据,也为研制口服轮状病毒乳酸菌疫苗奠定基础。

参 考 文 献

- [1] 霍云雯. 用无菌小猪模型研究轮状病毒腹泻. 国外医学病毒学分册, 2000, 3(3): 70-73.
- [2] 黄 英. 轮状病毒感染的免疫保护机制. 国外医学病毒学分册, 1997, 3(3): 69-73.
- [3] 晋圣瑾, 方肇寅, 杭长寿, 等. A 组轮状病毒 SA11 Vp6 基因的克隆和表达. 病毒学报, 1995, 11(2): 119-123.
- [4] Anthony H C C, Mitali B, Monica M M, et al. Functional mapping of protective domains and epitopes in the rotavirus VP6 protein. *Virology*, 2000, 74: 11574-11580.
- [5] Christiaens H, Leer R J, Pouwels P H, et al. Cloning and expression of a conjugated bile acid hydrolase gene from *Lactobacillus plantarum* by using a direct plate assay. *Appl Environ Microbiol*, 1992, 58: 3792-3798.
- [6] Allson G E, Klaenhammer T R. Function analysis of gene encoding immunity to lactacin F, LAFi, and its use as a *Lactobacillus*-specific food-grade genetic marker. *Appl and Envir Microbiol*, 1996, 44: 4450-4460.
- [7] Nakayama K, Kelly S M, Curtiss R. Construction of an Asd⁺ expression-cloning vector: Stable maintenance and high level expression of cloned genes in a *Salmonella* vaccine strain. *Biotechnology*, 1988, 6: 693-697.
- [8] Hashiba H, Takiguchi R, Jyoho K, et al. Establishment of a host-vector system in *Lactobacillus helveticus* with beta-galactosidase activity as a selection marker. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1992, 56: 190-194.
- [9] 傅晓丽, 徐建国, 高守一. 嗜酸乳杆菌 DOMLa 菌株 *thyA* 基因突变株的筛选. 生物工程进展, 1998, 18(5): 16-20.

Expression of recombinant Vp6 gene of porcine rotavirus A with non-antibiotic *Lactobacillus* vector in *Escherichia coli*

WANG Chun-feng¹ CONG Yan-long² LIU Shang-gao² LI Yu^{3*}

(¹ College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

(² College of Animal Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

(³ Institute of Mycology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: The antigenic determinants of Vp6 gene of porcine rotavirus A was amplified from infected MA 104 cell by the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), the product of which was a 1194bp cDNA segment. Using T-A cloning technique, the PCR product was cloned into pGEM-T vector. Cloning plasmid pGEM-T-Vp6 and the prokaryotic shuttle expression vector pW425t between *E. coli* and *Lactobacillus*, were digested by *SacI* and *KpnI* double enzymes, respectively. The purified Vp6 gene was subcloned into the expression vector pW425t. Thus, the recombinant pW425t-Vp6 was constructed, which then was transformed into the competence *thyA* gene-mutant *E. coli* X13. Treated lysates of bacterium were loaded directly onto SDS-PAGE, on which approximately 44.88 kD fusion protein was observed. The protein was further analyzed using Western blot, which indicated that the protein was reactive with the antibody of rotavirus A. The results lay foundation for further studies on the *Lactobacillus* subunit vaccine and DNA vaccine of Vp6 gene for prevention and control of porcine rotavirus.

Key words: Rotavirus, Vp6 gene, *Lactobacillus* vector, *Escherichia coli* X13

Foundation item: National Programs for High Technology Research and Development of China (2003AA241121002); National Natural Science Fund of China (30200199)

* Corresponding author. Tel 86-431-4510966; E-mail: liyu@jlau.edu.cn

First author: Tel 86-431-4532813; E-mail: wchunfeng@hotmail.com

Received date: 04-20-2005