

原核表达人 41 型腺病毒(Ad41)蛋白 V 及其抗血清的制备

董流昕¹, 邹小辉², 宋敬东¹, 屈建国¹, 鲁茁壮^{1*}, 洪涛¹

(¹ 中国疾病预防控制中心 病毒病预防控制所 北京 100052)

(² 山东大学医学院微生物学教研室 山东 250012)

摘要 【目的】人肠腺病毒 Ad41 被称为难养腺病毒,其难以培养的特性可能与次要核心蛋白 V(Ad41 protein V, pV)表达不充分有关。本研究拟表达纯化 Ad41 pV 抗原,免疫动物制备抗血清,为研究 Ad41 难养性机理打下基础。【方法】以野生型 Ad41 基因组 DNA 为模板,PCR 扩增 pV,克隆到原核表达载体 pET30a(+),测序后转化大肠杆菌 BL21(DE3)菌株,异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导目的蛋白表达,固化金属亲和层析(IMAC)方法纯化,免疫 BALB/c 小鼠制备抗血清,将获得的抗血清用于 Western blot 检测 Ad41 感染各细胞系后 pV 的表达。【结果】克隆得到包括完全编码区的 pV 基因,表达质粒转化 BL21(DE3)菌株,使用 1 mmol/L IPTG 37℃ 诱导 4 h, pV 以包涵体形式表达,或使用 0.5 mmol/L IPTG 25℃ 诱导 8 h 获得可溶性表达。利用皮下多点注射包涵体的方法免疫小鼠,得到抗 pV 抗血清,使用纯化的可溶性 pV 作为抗原对抗血清进行了鉴定,表明该抗血清可用于 Western blot 检测。等量野生型 Ad41 感染 293 或 293E12 细胞(一株稳定表达 Ad41 E1B55K 基因的 293 细胞)后, pV 在 293E12 细胞的表达明显高于 293 细胞。【结论】成功克隆了 Ad41 pV 基因,表达纯化了重组蛋白,获得了可用于 Western blot 检测的抗血清,为进一步研究 Ad41 难养性机理打下了基础。

关键词: Ad41; protein V; 难养性; 抗血清

中图分类号: R392 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2009)05-0672-05

人 41 型腺病毒(Ad41)是肠道疾病的病原之一,能引起 5 岁以下婴幼儿腹泻,与 Ad40 一同被称为肠腺病毒,属于人腺病毒 F 组^[1]。一般认为,Ad41 可以在 HEp-2、293、HT-29 等细胞中传代,但是病毒产量低^[2,5]。目前常用的病毒培养细胞系是 293 细胞,但是有文献报道称 Ad41 在 293 细胞中连续传代 2 次后失去感染性^[6],我们前期的实验也发现粪便标本分离的野生型 Ad41 难以在 293 细胞连续传代。Kidd 和 Madeley 尝试用体外培养的小肠组织扩增 Ad41,未获得感染性病毒^[2];Lemiale 等利用 293-ORF6 细胞系进行 Ad41 的培养,病毒的扩增效率能够达到 Ad5 在 293 细胞的扩增水平,但是得到的病

毒基因组不稳定^[7]。由于 Ad41 在体外培养细胞系扩增困难,被称为难养腺病毒(fastidious adenovirus)。

目前 Ad41 体外复制困难的原因并没有完全阐明,Pieniazek 报道 Ad41 不能在 293 细胞连续传代与次要核心蛋白 V(minor core protein V, pV)表达量低有关^[6]。pV、蛋白 X/Mu 和蛋白 VII 一同与基因组 DNA 相结合形成腺病毒颗粒的核心(Core),每个腺病毒颗粒约含有 157 个 pV 分子^[8],推测 pV 起到连接腺病毒核心与衣壳蛋白的桥梁作用。最近的研究表明缺失 pV 的 Ad5 不稳定,容易失活,而且需要相对更多的病毒粒子才能在 A549 细胞形成单个噬斑^[8]。目前有关 pV 功能的知识多是来自对人 C 组

基金项目 国家自然科学基金项目(30671189)

* 通信作者。Tel: +86-10-63511368; Fax: +86-10-63529809; E-mail: luzz@bmi.ac.cn

作者简介 董流昕(1975-)女,河北人,博士研究生,主要从事免疫学研究。E-mail: dongliuxin@163.com

收稿日期 2008-11-04; 修回日期 2009-02-08

腺病毒(主要是 Ad2 和 Ad5)的研究,为进一步探索 protein V 与 Ad41 体外复制的关系,我们尝试克隆 pV 基因,进行原核表达和纯化,免疫 BALB/c 小鼠制备抗血清,通过 Western blot 方法初步分析 Ad41 感染不同细胞系后 pV 表达的差异,为进一步探究 Ad41 难养性奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要材料:婴幼儿腹泻的粪便标本,pET-30a(+)载体(美国 Novagen 公司),BL21(DE3),293 细胞,293E12 细胞^[9],BALB/c 小鼠。

1.1.2 主要试剂和仪器:Pyrobest DNA 聚合酶(TaKaRa 公司),金属亲和层析介质(Chelating Sepharose Fast Flow,GE 公司), β -actin 抗体(美国 Santa Cruz 公司),化学发光底物(Supersignal^R West Pico Chemiluminescent Substrate,Pierce 公司),蛋白酶抑制剂(Protease inhibitor cocktail tablets,Roche 公司)。

1.2 pV 基因克隆

本实验室从婴幼儿腹泻的粪便标本中筛得一份 Ad41 阳性标本(NIVD103)。生理盐水稀释该标本,离心去除残渣,0.22 μ m 滤膜过滤除菌后作为野生型 Ad41 原液使用。利用稳定表达 Ad41 E1B55K 基因的 293 细胞(293E12,本室构建保存)进行扩增^[9],氯化铯密度梯度离心纯化病毒,蛋白酶 K/SDS 法提取病毒基因组 DNA^[10]。以 Ad41 基因组 DNA 为模板,用 Pyrobest DNA 聚合酶进行 PCR 扩增,正向和反向引物序列分别为 5'-GGATCATATG AGCAAGCGCA AGTTC AAG-3'; 5'-GAGACTCGAG AATGAGAATG CTGGGGTG-3',20 μ L 反应体系,引物终浓度 0.25 μ mol/L,模板 200 ng,DNA 聚合酶 2 U。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 3 min,94 $^{\circ}$ C 40 s,57 $^{\circ}$ C 40 s,72 $^{\circ}$ C 80 s,循环 35 次,72 $^{\circ}$ C 5 min。预计扩增片段长度 1061 bp,将 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后,回收相应大小片段,再用 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切,连接到经 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切的 pET-30a(+)载体上。重组质粒用 *Sma* I 酶切鉴定后测序。

1.3 pV 蛋白表达

将上述重组质粒转化 BL21(DE3)菌株,在 37 $^{\circ}$ C LB 液体培养基中培养到 OD_{600} 值达 0.6~0.8,加入异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)至终浓度 1 mmol/L,37 $^{\circ}$ C 继续振荡 4 h(pV 基因以包涵体形式表达);300 mL 菌液 6000 \times g 离心 10 min,磷酸盐缓冲溶液

(PBS)洗涤 3 次;将菌体悬浮在 20 mL PBS 中(PBS 体积约为菌液体积的 1/20~1/10),超声破碎,功率 200 W,超声 10 s,间歇 15 s,重复 30 次,15000 \times g 离心 30 min,分别取上清和沉淀。沉淀用含 1% Triton X-100 的 PBS 洗涤 1 次,再用 PBS 洗涤 2 次,悬浮在 1 mL PBS 中(洗涤后的包涵体用于免疫动物)。25 $^{\circ}$ C,0.5 mmol/L IPTG 8 h 可诱导 pV 可溶性表达。10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)后,考马斯亮蓝 R-250 染色分析表达结果。

1.4 pV 蛋白纯化

使用固化金属离子亲和层析(immobilized metal ion affinity chromatography,IMAC)法纯化可溶性 pV 蛋白。金属亲和层析介质(Chelating Sepharose Fast Flow),用结合缓冲液(0.02 mol/L Na_2HPO_4 ,0.5 mol/L NaCl,75 mmol/L 咪唑,pH7.2)平衡,上样后,用结合缓冲液洗涤 2 次,每次 1 倍柱体积,再用 1 倍柱体积洗脱缓冲液(0.02 mol/L Na_2HPO_4 ,0.5 mol/L NaCl,500 mmol/L 咪唑,pH7.2)洗脱目的蛋白。10% SDS-PAGE 分析结果。纯化的蛋白用于抗血清的效果评价。

1.5 Ad41 pV 抗血清的制备及效果评价

采用皮下多点注射包涵体的方法免疫动物^[11]。包涵体蛋白与完全福氏佐剂混匀初次免疫 BALB/c 小鼠,以后蛋白与不完全福氏佐剂混匀进行免疫,每隔 15 d 加强免疫 1 次,共免疫 3 次,每次每只小鼠注射 100 μ g 蛋白(以已知质量的牛血清白蛋白为参照,10% SDS-PAGE 后考马斯亮蓝 R-250 染色,根据灰度值计算包涵体中 pV 的蛋白量),第 3 次免疫 15 d 后收集动物血清。纯化的蛋白经 10% SDS-PAGE 分离,进行 Western blot 实验检验抗血清的制备效果。抗血清用 PBS 1:2000 稀释作为一抗,辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗小鼠 IgG 作为二抗,化学底物发光法显色。

1.6 Ad41 感染 293 和 293E12 细胞后 pV 蛋白表达检测

以 5×10^5 细胞密度将 293 和 293E12 细胞接种于 6 孔板,在 37 $^{\circ}$ C,5% CO_2 条件下,用含 10% 新生牛血清(NCS)的 DMEM 培养基培养 24 h;吸尽原有培养基,每孔加入含 5% NCS 的 DMEM 1 mL 和病毒原液(见方法 1)45 μ L,继续培养 3 h 后更换为 2 mL 新鲜的含 5% NCS 的 DMEM 培养基;再培养 2~4 d,待细胞出现细胞病变效应(cytopathic effect,CPE)时,提取细胞总蛋白用于 Western blot 检测。简言之,冰冷的 PBS 洗涤细胞 2 次后,每孔加入 60 μ L RIPA 蛋白裂解液,蛋白裂解液成分为:50 mmol/L Tris-CK pH

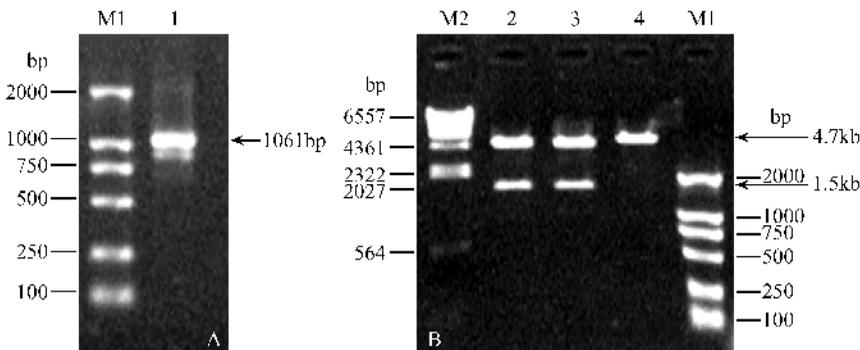
7.5), 150 mmol/L NaCl, 0.5% 乙酰胆酸钠, 1% NP-40, 按照产品说明书添加蛋白酶抑制剂^[11]; 细胞裂解后收集到 1.5 mL 离心管, 4°C 放置 1 h, 4°C 12000 × g 离心 10 min, 取上清 40 μL 制备电泳样。经 10% SDS-PAGE 后, 进行 Western blot 实验。先以 pV 的抗血清 1:500 稀释作为一抗检测 pV 的表达, 洗膜液洗涤除去结合的抗体后, 在同一张膜上以抗 β-actin 抗体检测 β-actin 蛋白的表达。

2 结果

2.1 Ad41 pV 原核表达载体的构建

以 Ad41 基因组为模板, PCR 扩增 Ad41 pV 基因得到 1061 bp 左右的片段(图 1-A)。PCR 产物直接

克隆到原核表达质粒 pET30a(+), *Sma* I 酶切鉴定, 1 号和 2 号克隆酶切后得到 4.7 kb 和 1.5 kb 左右的片段, 与理论计算的片段大小相符(图 1-B)。2 个克隆的测序结果完全一致, 克隆的基因包括 Ad41 pV 全部编码区, 与 Ad41 Tak 株(DQ315364.1)序列比对, 有 11 个核苷酸不同, 导致其编码的氨基酸序列有 3 个不同, 实验用病毒株(NIVD103)pV 蛋白的氨基酸序列第 52 位为甘氨酸(G), 244 位为脯氨酸(P), 249 位为缬氨酸(V), 而 Tak 株分别为天冬氨酸(D), 丙氨酸(A), 甘氨酸(G)。pV 被克隆到 pET30a(+)的 *Nde* I 和 *Xho* I 位点, 将表达 C 端带有 6 × His 标签的全长 pV 蛋白。



1 携带 Ad41 protein V (pV) 基因的原核表达载体构建

Fig. 1 Construction of prokaryotic expression plasmid carrying protein V (pV) gene of Ad41. A: Coding sequence of pV was amplified by PCR method with Ad41 genome DNA as the template. B: PCR product was inserted into the *Nde* I and *Xho* I sites of pET30a(+) plasmid (Novagen, Madison, USA) to generate the recombinant plasmid (pET-pV). M1. DNA marker DL2000; 1. Coding sequence of pV amplified by PCR (1061 bp); 2, 3. Clone 1 and 2 of pET-pV digested by *Sma* I (4748, 1534 bp); 4. pET30a(+) plasmid digested by *Sma* I (5422 bp); M2. DNA marker λ-*Hind*III.

2.2 pV 蛋白的表达和纯化

pET30a(+)质粒使用 λ 噬菌体的 T7 启动子控制目的基因表达, IPTG 诱导溶源菌 BL21(DE3)的 λ 噬菌体表达 T7 RNA 聚合酶, 从而目的基因的表达受到调控。在 37°C, 1 mmol/L IPTG 诱导条件下, 目的蛋白主要存在于菌体超声后的沉淀中, 即 pV 主要以包涵体形式表达, 将诱导条件变换为 25°C, 0.5 mmol/L IPTG, 目的蛋白主要存在于菌体超声后的上清液中, 说明 pV 以可溶性形式表达(图 2-A)。表达的融合蛋白 C 端带有 6 × His 标签, 可溶性表达的蛋白使用固化金属离子亲和层析法纯化。含 75 mmol/L 咪唑的结合缓冲液能够阻止绝大多数杂质蛋白结合于亲和层析介质, 用 1 个柱体积的含 500 mmol/L 咪唑的洗脱液洗脱, 得到目的蛋白(图 2-B)。灰度分析结果表明蛋白纯度大于 90%。纯化后的蛋白用于抗血清的效果评价。

2.3 制备的抗 Ad41 pV 抗血清可用于 pV 的 Western blot 检测

将原核表达的 Ad41 pV 包涵体免疫 BALB/c 小鼠得到抗血清。用纯化的 pV 作为检测靶, Western blot 结果显示(图 3), 未免疫小鼠的血清作为一抗, 杂交膜上无显色条带; 用 pV 免疫小鼠的血清作为一抗, 6 只小鼠的结果在相应分子量处呈现 1 条显色带(共免疫 8 只)。结果表明, 包涵体免疫动物后产生了抗 pV 的抗体。

2.4 等量 Ad41 感染 293 和 293E12 两种细胞后, pV 表达量不同

等量 Ad41 病毒液感染 293 或 293E12 细胞后, Western blot 检测(图 4)显示, 293E12 细胞中的 pV 表达量高于 293 细胞。293E12 包装 Ad41 的能力强于 293 细胞^[9], 这一结果提示: Ad41 感染 293 细胞后 pV 表达量不能满足病毒包装的需要, 293E12 产毒量的增加可能与 pV 的表达增强有关。

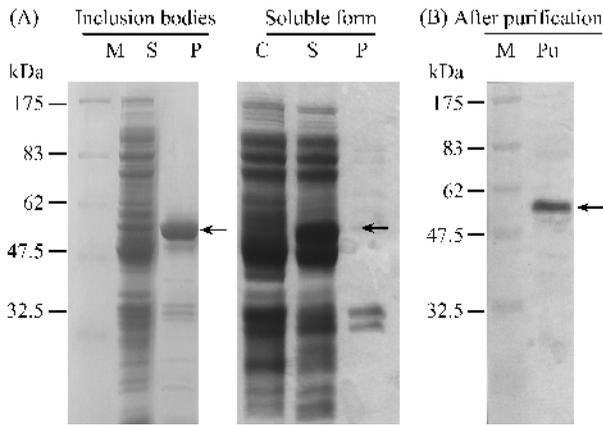


图 2 SDS-PAGE 电泳分析 pV 基因的表达和纯化

Fig.2 Analysis of the expression and purification of pV by Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamid Gel Electrophoresis (SDS-PAGE). A: In pET-pV-containing BL21(DE3) cells, pV was expressed as inclusion bodies or in soluble form under the inducing condition of 37°C, 1 mmol/L Isopropyl β -D-1-Thiogalactopyranoside (IPTG) or 25°C, 0.5 mmol/L IPTG, respectively. B: Purification of soluble pV by the method of immobilized metal ion affinity chromatography(IMAC). S: Supernate of the ultrasonicated bacteria; P: Precipitate of the ultrasonicated bacteria; C: Control of untransformed BL21(DE3); Pu: Purified pV; M: Protein marker (P7708S; New England Biolabs, Beijing, China). Arrows point to the bands of pV.

3 讨论

以包涵体形式表达的 pV 未经进一步纯化直接用于免疫小鼠。包涵体作为颗粒性抗原,较可溶性蛋白常能引发机体产生更强的免疫反应,因而适宜于作为免疫原制备抗血清^[11]。在用于表达 pV 检测时,抗血清表现出较强的特异性,因此制备的抗血清符合检测表达 pV 的要求。pV 与 DNA 结合,是碱性蛋白,计算的等电点 pI 为 10.4,由 348 Aa 组成,理论分子量 39.8 kDa,SDS-PAGE 显示的分子量约 50 kDa,这可能是由于 pV 的强碱性使得其在电泳时迁移减慢。

人 F 组腺病毒包括 2 个成员,Ad40 和 Ad41,它们是急性胃肠炎的病原,能引起婴幼儿腹泻,被称为肠腺病毒(enteric adenovirus)^[1]。绝大多数腺病毒都

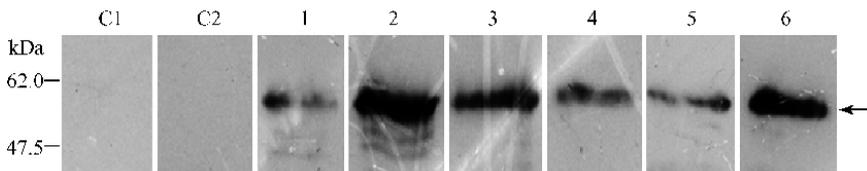


图 3 Western blot 检测 pV 免疫动物后血清抗体的产生情况

Fig.3 Determination of anti-pV antibody produced in the serums by Western blot. Purified pV was transferred to NC membrane post Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamid Gel Electrophoresis(SDS-PAGE) and hybridized with diluted serums. 1-6. Serums collected from the six immunized mice; C1 and C2. Serums collected from the two mock-immunized mice(negative control). Arrow points to the specific bands of pV.

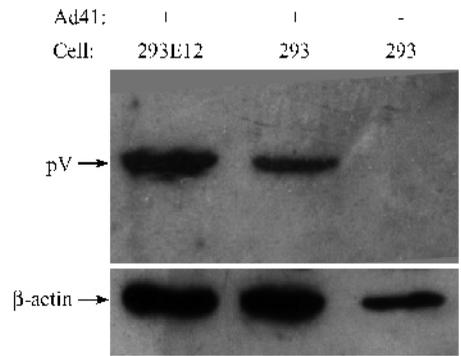


图 4 Western blot 检测等量 Ad41 感染 293E12 或 293 细胞后 pV 的表达

Fig.4 Western blot analysis of pV expression in Ad41-infected 293E12 or 293 cells. Cell lines were infected with equivalent Ad41. When cytopathic effect (CPE) occurred, total cell proteins were extracted and subjected to Western blot analysis. The expression of pV and β -actin was determined.

易于用原代细胞或细胞系在体外进行培养和扩增,但 Ad40 和 Ad41 在体外却难以培养,限制了对其进行深入研究和载体改造。对于 Ad41 难养的原因已经进行过一些研究,这些研究多是基于对感染细胞后病毒复制事件的描述,人们发现体外培养时 Ad41 的某些早期基因或晚期基因表达缺陷,但造成培养困难的关键因素并未阐明,或为多因素共同作用的结果^[1]。Pieniazek 等比较了 Ad41 在 HEp-2 和 293 两种细胞系的扩增情况,观察到 Ad41 在 293 细胞难以连续传代,但在 HEp-2 能够稳定传代,他们将这种现象的可能原因归结为病毒感染后 pV 在 293 细胞的表达量低于 HEp-2 细胞^[6]。我们将从粪便标本分离的野生型 Ad41 在 293 细胞传代时,也观察到活性病毒产量逐代减少。由于早期基因 E1B55K 表达不充分是 Ad41 难养的可能原因之一,我们克隆了 Ad41 E1B55K 基因,建立了稳定表达该基因的 293E12 细胞株,结果显示 293E12 可以用于扩增 Ad41。利用制备的抗血清检测等量 Ad41 感染 293 或 293E12 细胞后 pV 的表达情况,观察到 pV 在 293E12 的表达高于 293 细胞,这说明 E1B55K 可能通过上调 pV 的表达促进了 Ad41 在 293 细胞的包

装。本文报道的仅为初步的实验结果,阐明 E1B55K、pV 与 Ad41 难养性的关系需要更加深入的研究, pV 抗血清的制备为此打下了基础。

参考文献

- [1] Tiemessen CT, Kidd AH. The subgroup F adenoviruses. *Journal of General Virology*, 1995, 76(3):481-497.
- [2] Kidd AH, Madeley CR. *In vitro* growth of some fastidious adenoviruses from stool specimens. *Journal of Clinical Pathology*, 1981, 34(2):213-216.
- [3] Takiff HE, Straus SE, Garon CF. Propagation and *in vitro* studies of previously non-cultivable enteral adenoviruses in 293 cells. *Lancet*, 1981, (i)8251:832-834.
- [4] Witt DJ, Bousquet EB. Comparison of enteric adenovirus infection in various human cell lines. *Journal of Virological Methods*, 1988, 20(4):295-308.
- [5] Favier AL, Schoehn G, Jaquinod M, et al. Structural studies of human enteric adenovirus type 41. *Virology*, 2002, 293(1):75-85.
- [6] Pieniasek D, Pieniasek NJ, Macejak D, et al. Differential growth of human enteric adenovirus 41 (TAK) in continuous cell lines. *Journal of Virology*, 1990, 174(1):239-249.
- [7] Lemoliale F, Haddada H, Nabel GJ, et al. Novel adenovirus vaccine vectors based on the enteric-tropic serotype 41. *Vaccine*, 2007, 25(11):2074-2084.
- [8] Ugai H, Borovjagin AV, Le LP, et al. Thermostability/infectivity defect caused by deletion of the core protein V gene in human adenovirus type 5 is rescued by thermo-selectable mutations in the core protein X precursor. *Journal Molecular Biology*, 2007, 366(4):1142-1160.
- [9] Lu ZZ, Zou XH, Dong LX, et al. Novel recombinant adenovirus type 41 vector and its biological properties. *Journal Gene Medicine*, 2009, 11(2):128-138.
- [10] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis F. 分子克隆实验指南. 金冬雁, 等译. 第二版. 北京: 科学出版社, 1999, 463-469.
- [11] Harlow E, Lane D. *Antibodies (A Laboratory Manual)*. 1st Edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988.

Preparation of antiserum to protein V of human adenovirus type 41

Liuxin Dong¹, Xiaohui Zou^{1,2}, Jingdong Song¹, Jianguo Qu¹, Zhuozhuang Lu^{1*}, Tao Hong¹

(¹National Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100052)

(²Department of Microbiology, School of Medicine, Shandong University, Jinan 250012)

Abstract [Objective] The fastidious property of human adenovirus type 41 (Ad41) may be resulted from inadequate expression of protein V (pV), the minor core protein of adenovirus, in packaging cells. In this report, we prepared antiserum to pV of Ad41 and for study the mechanism of Ad41 fastidiousness. **[Methods]** Coding sequence of pV was amplified by PCR with the genome DNA of wild Ad41 (NIVD103) as template, and cloned into pET30a(+) vector to generate a recombinant plasmid called pET-pV. His-tag-fused pV was expressed in pET-pV-transformed *E. Coli* strain BL21(DE3) by adding the inducer of Isopropyl β -D-1-Thiogalactopyranoside (IPTG) and purified with the method of immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC). Antiserums to pV were collected from pV inclusion bodies-immunized mice and evaluated by Western blot. **[Results]** The sequencing assay showed that the cloned pV gene was highly homologous with that of Ad41 Tak strain, and there were only three residues changed in the corresponding amino-acid sequence. pV was expressed as inclusion bodies or in soluble form in BL21(DE3) cells under inducing condition of 1 mmol/L IPTG, 37°C, 4 h or 0.5 mmol/L IPTG, 25°C, 8 h, respectively. Antiserums to pV from most immunized mice were highly effective for Western blot assay. After infected with equivalent Ad41, 293E12, an Ad41 E1B55K-transfected 293 cell line, expressed more pV than 293 cells. **[Conclusion]** We successfully prepared antiserums to Ad41 pV and it could be used in Western blot assay to study the fastidious property of Ad41.

Keywords: Ad41; protein V; fastidiousness; antiserum

(本文责编: 张晓丽, 谷志静)