

O 型口蹄疫病毒 VP1 基因的克隆与表达

林瑞庆, 罗满林, 黄毓茂, 刘镇明, 辛朝安

(华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要:以 O 型口蹄疫病毒(FMDV)流行毒株为研究对象,通过 RT-PCR 扩增出 VP1 基因,克隆至表达载体 pET-32a 中,分析比较不同地区 O 型口蹄疫病毒 VP1 基因序列,为构建 VP1 重组基因工程苗奠定基础. 经测序表明,目的基因 VP1 已以正确的阅读框架整合至表达质粒中,应用大肠杆菌 BL21(DE3)为宿主菌,通过 IPTG 诱导方法,表达包含 VP1 基因产物的融合蛋白,经 SDS-PAGE 和 Western-blotting 分析,表明表达蛋白表达量高,反应原性良好.

关键词:O 型口蹄疫病毒; VP1 基因; 基因克隆; 基因表达

中图分类号:S852.65 Q786

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2004)01-0092-04

Cloning and expression of foot-and-mouth disease virus type O VP1 gene

LIN Rui-qing, LUO Man-lin, HUANG Yu-mao, LIU Zhen-ming, XIN Chao-an

(College of Veterinary Medicine, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract:The subject of study was a foot-and-mouth disease virus(FMDV) type O prevalent strain. The VP1 gene of FMDV was amplified by RT-PCR and subsequently inserted into the expression vector pET-32a. The VP1 gene was sequenced and compared with other published FMDV type O strains isolated from different areas. The success in cloning of the VP1 gene laid down a basis for the construction of a recombinant genetically-engineered vaccine. Analysis of the sequence revealed that the reading frame of the VP1 gene insert was correct. The protein corresponding to the VP1 gene was expressed in *E. coli* BL21(DE3) after induction with IPTG. SDS-PAGE and western-blotting showed that the VP1 fusion protein was expressed efficiently and had good antigenicity.

Key words:foot-and-mouth disease virus(FMDV); VP1 gene; gene clone; gene expression

口蹄疫(foot-and-mouth disease, FMD)是口蹄疫病毒感染引起的偶蹄动物的急性、热性、高度接触性传染病. 本病在世界分布广,感染率高,传播迅速,不但直接危害畜牧业生产,其爆发和流行引致的国际贸易屏障所造成的政治影响和间接损失,更是难以估计^[1],如 1999 年发生于英国及 2000 年发生于韩国和日本的口蹄疫,使发病国家和地区畜产品无法进入高质量畜产品市场,造成巨大损失. 由于口蹄疫的危害,国际兽疫局(OIE)将其列为 A 类家畜传染病之首. 口蹄疫的病原为口蹄疫病毒(foot-and-mouth disease virus, FMDV),是小 RNA 病毒科,口蹄疫病毒属

成员. 病毒粒子为二十面体,直径 20~30 nm,结构比较简单,完整的病毒颗粒包括衣壳和 RNA 两部分,衣壳由 VP1、VP2、VP3、VP4 各 60 分子组成. 其中,VP1 是诱导产生中和抗体的主要成分,是最重要的抗原位点以及抗原变异的关键,因此,多年来,在 FMD 分子流行病学调查、疫源的追踪、毒株分型、基因工程疫苗的研制、诊断方法的建立等领域,VP1 基因均得到众多研究人员的关注. 在重组疫苗的研究中,Dennis 与 Kleid 首先应用重组 DNA 技术,使 VP1 基因在大肠杆菌中表达,表达产物证实可诱导牛和猪的中和抗体应答^[2],随后,类似的研究在国内外均有进

行^[3~5],近年在国内研制的以 VP1 的 21~40 位及 141~160 位基因片段与 β 半乳糖苷基因的重组的表达载体^[6],或以猪重链恒定区为抗原载体的 DNA 疫苗^[7],经动物实验均证明有良好效果. 在国外,有学者正在研究利用转基因植物来表达重组蛋白,并已取得初步成效^[8]. 这些研究,都为寻求一种对口蹄疫而言安全有效的疫苗作出有益的探索. 另外,口蹄疫的快速检测是控制和消灭该病的前提,现已建立了多种检测方法,包括血清学诊断方法、生物学试验、分子生物学诊断技术等,以病原相关蛋白的表达产物作为诊断抗原,在一些疾病包括口蹄疫在内均有研究^[9~11],基于 VP1 基因对 FMDV 的重要意义,本试验从 FMDV 基因组中扩增出结构蛋白 VP1 基因片段,并进行克隆、表达与鉴定,为 VP1 重组疫苗的研制及以表达产物作为诊断抗原的研究打下基础.

1 材料与方法

1.1 细胞和病毒

BHK21(仓鼠肾传代细胞),广州市出入境检验检疫局惠赠;FMDV O-L 病毒株,为 O 型口蹄疫流行毒株细胞培养毒.

1.2 质粒和工程菌

pGEM-T Easy 载体试剂盒为 Promega 公司产品;pET-32a 表达质粒由南京农业大学动物医学院传染病教研室惠赠;BL-21(DE3)表达宿主菌为家畜传染病教研室保存.

1.3 试剂

AMV 反转录酶为大连宝生物工程有限公司产品;Taq 酶为加拿大真达公司产品;RNA 酶抑制剂、T4DNA 连接酶为 Promega 公司产品;总 RNA 提取试剂盒 III,购自广州华美公司.

1.4 引物的设计与合成

参照基因库已发表的 O 型 FMDV 基因序列,在保守区域设计 1 对目的片段包含 VP1 基因在内的引物:

引物 1C: 5' —GACCACAAACGTACAGGGATG—3',

引物 2B: 5' —AGCTTGTACCAGGGTTTGGC—3'.

1C-2B 产物片段连接 pGEM-T Easy 载体后测序,根据所测序列针对 VP1 基因片段重新设计 1 对引物,上游引物引入 NcoI 酶切位点,下游引物引入 XhoI 酶切位点:

引物 L1: 5' —CATGCCATGGAAACCACTCTGCGGGTG—3',

引物 L2: 5' —CCGCTCGAGCGAAGTTCAGAAGCTG—3'.

均由上海博亚生物技术有限公司合成引物.

1.5 病毒基因组提取与反转录

细胞毒经 45 000 r/min 超速冷冻离心 1.5 h,病毒沉淀以适量 DEPC 水溶解后按华美公司的总 RNA 提取系统 III 说明书进行. 反转录按 AMV 产品说明书进行.

1.6 VP1 基因片段的 PCR 扩增

以重组质粒 pGEM-1C2B 为模板,扩增 VP1 基因片段,PCR 程序为:先 94 ℃ 预变性 4 min,再按 94 ℃ 30 s,58 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s 运行 25 个循环,再 72 ℃ 延伸 7 min,4 ℃ 保存.

1.7 重组表达载体的构建

VP1 基因片段通过 NcoI、XhoI 双酶切与已同样酶切后的 pET-32a 载体连接.

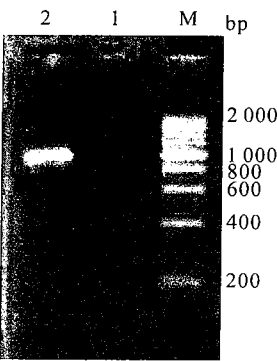
1.8 VP1 基因序列比较及表达产物的鉴定

重组质粒 pET-VP1 送上海博亚生物技术有限公司测序,所得 VP1 基因序列以 DNASTAR 软件进行序列比较. 重组质粒 pET-VP1 转化至表达宿主菌 BL-21,经 1 mmol/L 的 IPTG 诱导表达 6 h,产物经 SDS-PAGE 蛋白电泳和 western-blotting 分析.

2 结果

2.1 病毒基因组的 RT-PCR 扩增

以提取的 FMDV O-L 株病毒基因组为模板,用下游引物进行反转录,获得 cDNA 作模板,进行 PCR 扩增,得 2B-1C 基因片段,10 g/L 琼脂糖凝胶电泳,可见约 1 000 bp 条带(图 1),与预期一致.



M: 200 bp 分子量标记; 1: 空白对照; 2: 2B-1C 基因片段

M: 200 bp DNA Marker; 1: Negative control; 2: 2B-1C gene

图 1 FMDV 的 2B-1C 基因片段的 RT-PCR 扩增产物

Fig.1 Result of 2B-1C gene of FMDV amplified by RT-PCR

2.2 VP1 基因的 PCR 扩增、转化与鉴定

2B-1C 基因片段连接至 pGEM-T Easy 载体,转化

鉴定后测序,以阳性的重组质粒为模板,以 L1、L2 为引物,扩增 VP1 基因片段. 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳,可见约 650 bp 条带(图 2),与预期一致. 扩增产物经纯化和以 *Xho*I、*Nco*I 双酶切回收,质粒 pET-32a 同样经双酶切回收,两者以合适的浓度进行连接,连接产物转化后,经菌落 PCR 鉴定,电泳得 1 条约 650 bp 的特异性条带;提取重组质粒 pET-VP1 以 *Xho*I 单酶切,电泳得 6 500 bp 条带(图 3),以 *Xho*I、*Nco*I 双酶切,电泳可得目的基因(约 650 bp)及载体(约 5 900 bp),见图 3,结果均与预期一致.

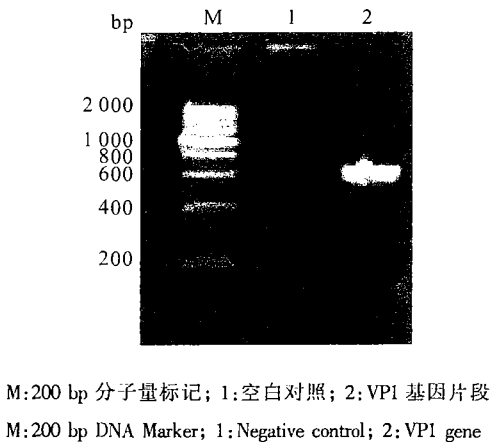
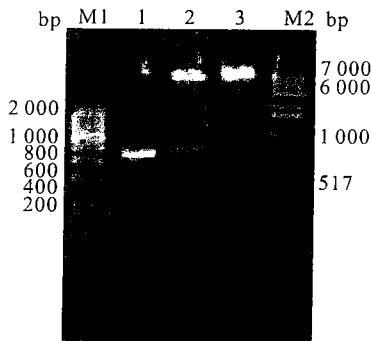


图 2 VP1 基因片段的 PCR 扩增产物
Fig.2 Result of VP1 gene amplified by PCR



M1: 200 bp 分子量标记; M2:1 000 bp 分子量标记; 1:VP1 基因片段;
2:重组质粒双酶切(*Nco*I + *Xho*I);3 重组质粒单酶切(*Xho*I)
M1: 200 bp DNA Marker; M2:1 000 bp DNA Marker; 1:VP1 gene; 2:Double digested products of pET-VP1 with *Nco*I and *Xho*I; 3: Single digested products of pET-VP1 with *Xho*I

图 3 重组质粒 pET-VP1 鉴定

Fig.3 Identification of recombinant plasmid

2.3 VP1 基因片段的核苷酸和氨基酸的序列分析

经序列测定,证实插入表达载体 pET-32a 的 VP1 片段阅读框架正确,用 DNASTAR 软件,与其他不同地区的 O 型 FMDV 毒株 VP1 基因片段比较(见表 1).

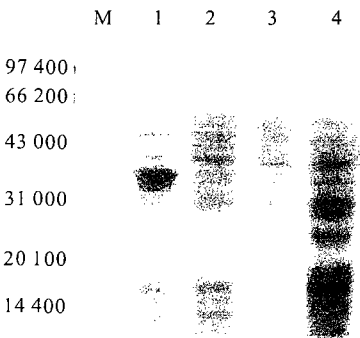
表 1 不同 FMDV 毒株 VP1 基因编码的核苷酸序列及推导的氨基酸序列同源性比较

Tab. 1 Homology of nucleotide sequences and deduced amino acid sequences of VP1 of FMDV

毒株 Strains	基因库代码 GenBank accession number	核苷酸同源性 the homloly of nucleotide sequences of VP1	氨基酸同源性 the homloly of deduced amino acid sequences of VP1/%
O/HKN/99	AJ294925	95.5	98.6
O/TaiWan/97	NC_004004	92.8	97.2
O/GD/CHA/86	AJ131468	85.1	92.0
O/UKG/6/2001	AJ00539141	79.8	90.1
O/JPN/2000	AB050978	80.1	89.7
O/HN/CHA/99	AJ318833	80.3	88.7
O/KEN/95	AJ303514	78.6	87.3
O/PHL/96	AJ294926	78.6	86.9
OIK	X00871	75.1	84.5
O/MYA/98	AJ303521	75.9	82.6

2.4 pET-VP1 的诱导表达及 western-blotting 鉴定

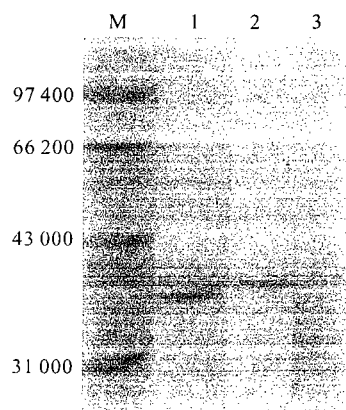
转化重组质粒后的 BL21(DE3)菌株以 1 mmol/L IPTG 诱导表达 6 h,取表达宿主菌处理后进行 SDS-PAGE 电泳,考马斯亮蓝染色,可观察到约在相对分子质量 36 000 处明显的表达产物条带(图 4). 以牛抗 FMDV 高免血清和猪抗 FMDV 高免血清进行 western-blotting 鉴定,结果在表达蛋白的位置出现明显的颜色反应条带,表明该表达产物为预期产物(图 5).



M:蛋白相对分子质量 Marker;1. BL21 + pET-VP1 诱导表达;
2. BL21 + pET-VP1; 3. BL21; 4. pET-32a
M:Marker; 1.The induced products of pET-VP1;
2: BL21 + pET-VP1; 3:BL21 4:pET-32a

图 4 pET-VP1 表达蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of expressed products



M: 蛋白相对分子质量 Marker; 1. 猪血清的蛋白印迹;

2. 牛血清的蛋白印迹; 3. 空载体菌

M: Marker; 1. The western-blotting of swine serum;

2. The western-blotting of bovine serum; 3: pET-32a(control)

图 5 表达蛋白的 western-blotting 分析

Fig. 5 Western-blotting of expressed product

3 讨论

口蹄疫缺乏有效的治疗方法,发达国家成功扑灭的经验是扑杀销毁政策,但对目前大多数流行口蹄疫的发展中国家来说,计划免疫和免疫监控仍是主要手段。由于传统的灭活疫苗存在着灭活不彻底以及防护不当而致病毒从生产车间散播的危险,国内外研究者一直在研制更为安全有效的新型疫苗并取得一定的成绩,主要为合成肽疫苗和基因工程苗,在这些研究中,VP1 作为 FMDV 产生中和抗体的主要成分,无论是整个 VP1 片段或其重要的抗原表位序列,一直是国内外研究者关注的热点。由于口蹄疫病毒抗原变异性大,亚型之间差异也大,往往造成了诊断的困难和免疫的失败。因此,在口蹄疫的研究中,强调以流行毒株进行研究,以便选择合适的种毒制成疫苗和检测抗原^[12]。本试验选用了新分离的流行毒株为研究对象,以 pET-32a 为表达载体成功表达 VP1 融合蛋白。

按照 Rice-Heasse 对小 RNA 病毒科脊髓灰质炎病毒的研究理论,毒株间核苷酸序列同源性差异小于 5% 为亲缘关系密切^[13],序列分析表明本研究所用毒株与 1999 年香港分离株 O/HKN/99、1997 年台湾分离株 O/TaiWan/97 同源性极高,为亲缘关系密切,其 144、148、154 和 208 位关键氨基酸没有变化,显示其可能有相同的抗原性。

pET 系统可表达可溶性蛋白,表达的融合蛋白带 6 个组氨酸,其肠激酶酶切位点可用于切除融合部分,方便纯化和研究。本试验以 pET 系统构建的重组质粒 pET-VP1 以 IPTG 诱导,在大肠杆菌中过量表

达,通过 SDS-PAGE 电泳,发现在细菌裂解后的上清中,也含部分可溶性表达蛋白,降低培养温度至 30℃ 后,表达的可溶蛋白含量增加。

本试验克隆的 VP1 基因片段,将为构建以伪狂犬病毒等为载体的重组疫苗奠定基础 and 提供材料。表达的 VP1 融合蛋白,可用于探索以表达产物作为诊断抗原的 FMD 检测方法的建立。

参考文献:

- [1] BROWN F. Vaccination against foot and mouth disease virus [J]. Vaccine, 1992, 10: 1 022 - 1 026.
- [2] 杨永钦,王家驹. 口蹄疫基因工程疫苗研究进展[J]. 云南畜牧兽医, 1997, 9(1): 27 - 29.
- [3] DIMARCHI R, BROOKE G, GALE C, et al. Characterizing sequence variation in the VP1 capsid proteins of foot and mouth disease virus (serotype O) with respect to virion structure [J]. Science, 1986, 232: 639 - 642.
- [4] CHINSANGARAM J, BEARD C, MASON P W, et al. Antibody responses in mice inoculated with DNA expressing foot-and-mouth disease virus capsid proteins [J]. Journal of Virology, 1998, 72: 4 454 - 4 457.
- [5] WARD G, RIEDER E, MASON P W. Plasmid DNA encoding replication foot-and-mouth disease virus genomes induces antiviral immune responses in swine [J]. Journal of Virology, 1997, 71: 7 442 - 7 447.
- [6] 杨志军,林 焱,李光金,等. 含 T 细胞表位和 B 细胞表位的抗 O 型 FMDV 基因工程疫苗诱导豚鼠产生免疫反应[J]. 复旦学报(自然科学版), 2000, 39(5): 564 - 568.
- [7] 李光金,严维耀,徐泉兴,等. 以猪 IgG 重链恒定区为抗原载体的抗口蹄疫病毒的 DNA 疫苗的研制[J]. 生物工程学报, 2001, 17(3): 322 - 324.
- [8] CARRILLO C, WIGDOROVITZ A, OLIVEROS J C, et al. Protective immune response to foot-and-mouth disease virus with VP1 expressed in transgenic plants [J]. Journal of Virology, 1998, 2: 1 688 - 1 690.
- [9] LUBROTH J, BROWN F. Identification of native foot-and-mouth disease virus non-structural protein 2C as a serological indicator to differentiate infected from vaccinated livestock [J]. RES Vet Science, 1995, 59: 70 - 78.
- [10] SURYANARAYANA V V S, VISWANATHAN S, RATISH G, et al. E. coli expressed proteins as diagnostic reagents for typing of foot-and-mouth disease virus [J]. Arch Virol, 1999, 144: 1 701 - 1 712.
- [11] 余兴龙,涂长春,李作生,等. 以重组 Me2 蛋白为抗原建立检测猪瘟病毒间接 ELISA 方法的研究[J]. 中国预防兽医学报, 1999, 21(3): 220 - 222.
- [12] 江鹏斐,赵启祖,谢庆阁. 口蹄疫研究进展[J]. 中国农业科学, 1999, 32(6): 93 - 100.
- [13] 马静云,曹永长,毕英佐. 5 株 O 型口蹄疫病毒结构蛋白 VP1 基因的克隆与序列分析[J]. 华南农业大学学报(自然科学版), 2003, 24(1): 70 - 73.

【责任编辑 柴 焰】