

口蹄疫病毒 VP1 与 3ABC 基因片段的克隆及表达

索青利, 赵明秋, 琚春梅, 陈金顶, 王伟利, 陈立军

(华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要:根据 GenBank 中注册的 O 型口蹄疫病毒(FMDV) VP1 和 3ABC 基因序列, 设计了 2 对引物. 采用 RT-PCR 方法从 FMDV 分离株 O/HK/2001 扩增得到 VP1 和 3ABC 基因. 经对它们的核苷酸序列测序和同源性比较, 显示与 14 株 O 型 FMDV 参考毒株中的 O/HKN/2002 同源性最高(分别为 98.3% 和 98.6%), 并且在 VP1 决定各种亚型 FMDV 免疫原性的主要抗原决定簇的 144、148、154 和 208 位关键氨基酸, 比对均未发现变异. 通过酶切将 VP1 和 3ABC 基因分别亚克隆到 4 个表达载体 pET-30a、pPROEX HTb、pQE30 和 pQE9 中构成重组表达质粒, 利用 IPTG 诱导表达, 经 SDS 电泳分析表明这些重组质粒在相应表达宿主菌 BL21、DH5 α 和 M15 中, 除 pQE30-3ABC 和 pQE9-3ABC 外均获得了表达, 其中 pET-30a 和 pPROEX HTb 载体表达量较高.

关键词:口蹄疫病毒; 血清 O 型; VP1 基因; 3ABC 基因; 表达

中图分类号:S852.65

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2008)01-0084-04

Cloning and Expression of VP1 and 3ABC Genes of Foot-and-Mouth Disease Virus Type O

SUO Qing-li, ZHAO Ming-qiu, JU Chun-mei, CHEN Jin-ding, WANG Wei-li, CHEN Li-jun

(College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Two pairs of primer were designed based on VP1 and 3ABC genes of foot-and-mouth disease virus(FMDV) serotype O which were registered in the GenBankTM. VP1 and 3ABC genes were amplified from the O/HK/2001 strain of FMDV by RT-PCR. Nucleotide analysis and homology comparison indicated that the sequences shared the highest homology with that of the strain O/HKN/2002 among the 14 strains. No variation was found on the antigenic sites of 144, 148, 154 and 208 of the key amino acids in the VP1 gene which determines various subtypes of FMDV. Then the VP1 and 3ABC genes were sub-cloned into four expression vectors pET-30a, pPROEX HTb, pQE30 and pQE30 to construct expression plasmids. IPTG induced expression and SDS electrophoresis indicated that except pQE30-3ABC and pQE9-3ABC, the others can be expressed in the bacteria of BL21, DH5 α and M15, pET-30a and pPROEX HTb vector's expression are the highest among them.

Key words: foot-and-mouth disease virus; serotype O; VP1 gene; 3ABC gene; expression

口蹄疫(foot-and-mouth disease, FMD)是由口蹄疫病毒(foot-and-mouth disease virus, FMDV)引起的主要侵害偶蹄动物的急性、热性、高度接触性传染病, 对畜牧业生产危害极大. 根据动物交叉保护和血清学试验, FMDV 被分为 O 型、A 型、C 型、南非 I 型、

南非 II 型、南非 III 型和亚洲 I 型 7 个血清型, 型间无交叉反应^[1-2]. FMDV 的 VP1 结构蛋白大部分暴露在衣壳表面, 其上有重要抗原表位, 能够诱导动物机体产生中和抗体, 抵抗 FMDV 的攻击^[3-4]. 因此, VP1 基因是 FMDV 新型疫苗的研究热点. 传统的 FMDV

收稿日期:2007-01-21

作者简介:索青利(1974—), 女, 硕士; 通讯作者:陈金顶(1964—), 男, 教授, 博士, E-mail:jdchen@scau.edu.cn

基金项目:广东省自然科学基金(020995, 06025827); 广东省科技计划项目(2005B20201006); 广东省自然科学基金创新团队项目(5200638)

检测方法难以区分注射疫苗动物与自然感染动物,现多转向开展建立检测非结构蛋白(no structure protein, NSP)抗体方法来诊断 FMD. 其依据是目前所使用的 FMD 疫苗为灭活疫苗,主要有效成分是 FMDV 结构蛋白,动物注射疫苗后主要产生结构蛋白抗体;而自然感染动物体内则有病毒的增殖,病毒装配过程中有 NSP 的产生,从而可刺激机体产生 NSP 抗体^[5-9]. 由于不同毒株的 3ABC 基因变异较小,保守性强,以 3ABC 蛋白作为诊断抗原,检出的机率大,结果更可靠. 本研究以猪源 O 型 FMDV 毒株为材料,构建其 VP1 与 3ABC 基因的重组表达质粒,并对其进行初步表达,为开发 FMD 的新型疫苗及鉴别诊断奠定基础.

1 材料与方法

1.1 毒株、菌种、质粒和酶

O/HK/2001 FMDV 毒株, pET-30a、pPROEX HTb、pQE30 和 pQE9 表达载体, TOP10 基因工程菌、DH5 α 、BL21 和 M15 表达宿主菌为华南农业大学兽医学院微生物学教研室保存. pMD18-T 载体为宝生物工程(中国)有限公司产品.

1.2 引物

根据 GenBank 中注册的 O 型口蹄疫病毒 VP1 和 3ABC 基因序列,设计了 2 对引物. 用于 VP1 和 3ABC 基因的扩增. 引物序列分别为: VP1F: 5' TAG-GATCCACCACCTCTGCGGGCGAGT3', VP1R: 5' GCTAAGCTTCTGTTTTGCGGGTGCCAC3'; 3ABCF: 5' GCGGATCCATTTCATCCCTTCCCAG3', 3ABCR: 5' CGTAAGCTTCTCGTGGTGTGGTTCAGGG3'. 这 2 对引物理论跨幅分别为 633 bp 和 1 281 bp,覆盖完整的 VP1 和 3ABC 基因片段. 此外,基于克隆和表达的需要,分别于引物的 5' 端引入了 BamH I 和 Hind III 酶切位点. 引物由上海博亚生物技术有限公司合成.

1.3 VP1 和 3ABC 基因的 RT-PCR 扩增

RNA 抽提参照 TRIzol LS Reagent RNA 提取试剂盒的使用说明书进行. 反转录参照 Invitrogen 公司的 SUPERSRIPTTM II 反转录酶使用说明. 反转录产物直接用做 PCR 扩增 VP1 与 3ABC 基因的模板.

1.4 VP1 与 3ABC 基因的克隆与序列分析

VP1 与 3ABC 基因与载体连接参照 TaKaRa 公司 pMD18-T 载体试剂盒使用说明进行. 连接产物直接转化 TOP 10 感受态细胞. 对阳性重组质粒进行序列测定,将获得的 VP1 与 3ABC 基因核苷酸序列与 GenBank 中注册的 14 株 FMDV 基因核苷酸序列进行分析. 分析所用毒株与 GenBank 序列号分别为:

O/HKN/2002 (AY3170981)、taiwan97iso106/112 (AY593835)、Tau-YuanTW97 (AF154271)、PengHu iso108 (AY593833)、Yunlin (AF308157)、Chu-pei (AF026168)、O/ES/2001 (AY6866870、TAW/2/99 BOV (AJ539137)、Tibet/CHA/99 (AJ539138)、TAW/2/99 TC (AJ539136)、UKG/35/2001 (AJ539141)、FRA/1/2001 (AJ633821)、SAR/19/2000 (AJ539140) 和 SKR/2000 (AJ539139).

1.5 VP1 和 3ABC 基因重组表达质粒的构建

通过 BamH I、HindIII 双酶切将 VP1、3ABC 基因分别与表达载体 pET-30a、pPROEX HTb、pQE30 和 pQE9 连接,共获得 pET-VP1、pPROEX-VP1、pQE30-VP1、pQE9-VP1、pET-3ABC、pPROEX-3ABC、pQE30-3ABC 和 pQE9-3ABC 8 个重组表达质粒,重组表达质粒转化相应的感受态细胞. 通过 PCR、质粒酶切鉴定和序列测定对重组质粒进行鉴定.

1.6 VP1 和 3ABC 基因的诱导表达

挑取鉴定为阳性且阅读框正确的单个菌落接种于含相应抗生素的 LB 液体培养基(重组质粒 pET-30a 加 Kan 34 μ g/mL、pPROEX HTb 加 Amp 100 μ g/mL、pQE30 和 pQE9 同时加 Kan 34 μ g/mL 和 Amp 100 μ g/mL), 37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜作为种子液. 取种子液 50 μ L 接种于 5 mL LB 液体培养基(含相应抗生素), 37 $^{\circ}$ C 剧烈振荡培养至 $D_{600\text{nm}}$ 值达 0.4~0.6 时,先取 1 mL 培养物作为非诱导对照,后在试管中加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 进行诱导表达. 诱导表达 4 h 后取出菌液, 12 000 r/min 离心 10 min, 去上清液,细菌沉淀中加入 50 μ L PBS 缓冲液重悬菌体, -80 $^{\circ}$ C 反复冻融 3 次,加入 50 μ L 2 $\times$ SDS 上样缓冲液,于沸水中煮沸 10 min,冷却至室温, 12 000 r/min 离心 10 min,取 15 μ L 上清液进行 SDS-PAGE 电泳检测.

2 结果

2.1 VP1 和 3ABC 基因的克隆和序列分析

抽提的 RNA 反转录后,经 PCR 扩增,见到大小约 650 bp 和 1 300 bp 的电泳条带,与预期大小一致(图略). 将 PCR 产物分别与 pMD18-T 载体连接,构成重组质粒 pMD18-VP1 和 pMD18-3ABC. 对重组质粒的序列测定结果表明,VP1 基因的大小为 633 个碱基,3ABC 基因大小为 1 281 个碱基. VP1 和 3ABC 基因核苷酸序列与 14 株参考毒株的序列分析表明,VP1 基因的相似性在 76.8%~98.3% 之间,3ABC 基因的相似性在 83.3%~98.6% 之间. 根据基因核苷酸序列推导出 VP1 区域上决定各种亚型 FMDV 免疫

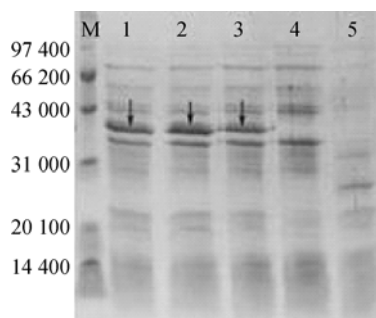
原性的主要抗原表位的第144、148、154和208位氨基酸^[1,10]与其他毒株相比均未发现变异。

2.2 VP1和3ABC基因重组表达质粒的构建

构建的8个重组质粒,经 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切鉴定,可见与目的基因相应大小的片段(分别为630 bp和1 300 bp)和1条与相应载体大小相同的片段(图略)。测序结果也证实 VP1 与 3ABC 基因均正确插入表达载体,且读码框完全正确。

2.3 VP1和3ABC基因表达产物的SDS-PAGE检测

对携带重组质粒的宿主菌进行裂解,裂解产物进行SDS-PAGE检测,结果表明,IPTG能较好地诱导 pET-VP1、pPROEX-VP1、pQE30-VP1、pQE9-VP1、pET-3ABC 和 pPROEX-3ABC 在宿主菌中表达,产物相对分子质量分别约为39 000、35 000、30 000、30 000、65 000和65 000(图1~6),与预期大小相符;pQE30-3ABC 和 pQE9-3ABC 未见到相应的表达条带。

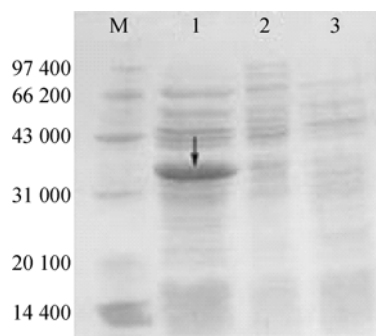


M:蛋白质相对分子质量标准;1~3:均为IPTG诱导的细菌裂解产物;4:未经IPTG诱导的细菌裂解产物;5:BL21裂解产物

M:protein relative molecular mass marker;1~3:BL21 cell lysate after IPTG induction;4:BL21 cell lysate non-induced with IPTG;5:BL21 cell lysate

图1 pET-VP1表达产物的SDS-PAGE分析

Fig.1 Analysis of the expressed product of pET-VP1 by SDS-PAGE

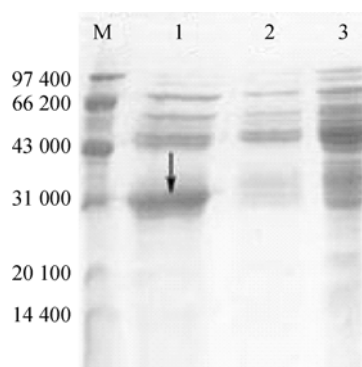


M:蛋白质相对分子质量标准;1:IPTG诱导的细菌裂解产物;2:未经IPTG诱导的细菌裂解产物;3:DH5α裂解产物

M:protein relative molecular mass marker;1:DH5α cell lysate after IPTG induction;2:DH5α cell lysate non-induced with IPTG;3:DH5α cell lysate

图2 pPROEX-VP1表达产物的SDS-PAGE分析

Fig.2 Analysis of the expressed product of pPROEX-VP1 by SDS-PAGE

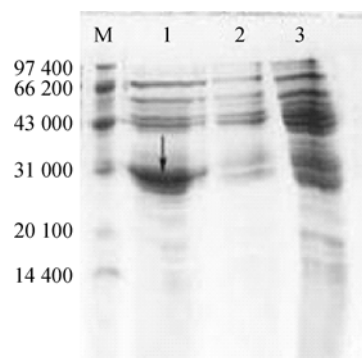


M:蛋白质相对分子质量标准;1:IPTG诱导的细菌裂解产物;2:未经IPTG诱导的细菌裂解产物;3:M15裂解产物

M:protein relative molecular mass marker;1:M15 cell lysate after IPTG induction;2:M15 cell lysate non-induced with IPTG;3:M15 cell lysate

图3 pQE30-VP1表达产物的SDS-PAGE分析

Fig.3 Analysis of the expressed product of pQE30-VP1 by SDS-PAGE

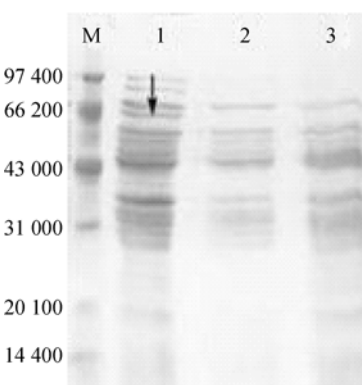


M:蛋白质相对分子质量标准;1:IPTG诱导的细菌裂解产物;2:未经IPTG诱导的细菌裂解产物;3:M15裂解产物

M:protein relative molecular mass marker;1:M15 cell lysate after IPTG induction;2:M15 cell lysate non-induced with IPTG;3:M15 cell lysate

图4 pQE9-VP1表达产物的SDS-PAGE分析

Fig.4 Analysis of the expressed product of pQE9-VP1 by SDS-PAGE

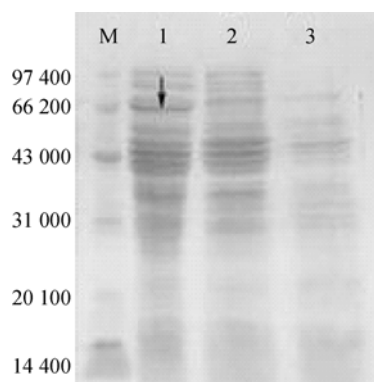


M:蛋白质相对分子质量标准;1:IPTG诱导的细菌裂解产物;2:未经IPTG诱导的细菌裂解产物;3:BL21裂解产物

M:protein relative molecular mass marker;1:BL21 cell lysate after IPTG induction;2:BL21 cell lysate non-induced with IPTG;3:BL21 cell lysate

图5 pET-3ABC表达产物的SDS-PAGE分析

Fig.5 Analysis of the expressed product of pET-3ABC by SDS-PAGE



M:蛋白质相对分子质量标准;1:IPTG 诱导的细菌裂解产物;2:未经 IPTG 诱导的细菌裂解产物;3:DH5 α 裂解产物

M:protein relative molecular mass marker;1:DH5 α cell lysate after IPTG induction;2:DH5 α cell lysate non-induced with IPTG;3:DH5 α cell lysate

图 6 pPROEX-3ABC 表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig.6 Analysis of the expressed product of pPROEX-3ABC by SDS-PAGE

3 讨论

VP1 是 FMDV 的主要抗原位点,在已发现的 5 个主要抗原位点中有 3 个位于其上. VP1 的结构与功能研究证明,由于 VP1 突出于病毒粒子的表面,承受的选择压力最大,使得 VP1 基因最容易发生变异^[10-11]. VP1 基因的变异常可导致 FMDV 毒株抗原性的变化,给 FMD 的防治造成困难. 相对于 VP1 来说,不同毒株的 3ABC 基因变异较小. 3ABC 蛋白在制苗工艺中被去除,免疫动物不会产生 3ABC 抗体,因此可以用其作为区别感染与免疫的重要指标.

本研究对 FMDV O/HK/2001 毒株的 VP1 和 3ABC 基因进行克隆测序,选用 4 个原核表达载体:分别为 pET-30a、pPROEX HTb、pQE30 和 pQE9,对它们进行表达. 4 个表达载体均是利用 6 个组氨酸/His 残基形成融合蛋白表达的载体,其相应表达宿主菌分别为 BL21、DH5 α 和 M15,表达产物可以通过 Ni-NTA 柱得到纯化. 融合蛋白比非融合蛋白更为稳定,且仍具有真核细胞的抗原性,其上带有 6 个 His,易于纯化. 但谷胱甘肽-S 转移酶(GST)融合蛋白也能识别其中的 GST 部分,可能会导致抗体与所研究组织中的类 GST 蛋白发生交叉反应而影响检测结果,因而应将多克隆抗体中能识别 GST 的部分去除.

本研究旨在找出适合 VP1 和 3ABC 基因表达(表达量高且易于纯化回收)的表达系统. 对 VP1 进行初步表达后,SDS-PAGE 电泳显示,VP1 在 4 个表达载体中均能有效表达且表达量高,但对 pQE9 载体

来说,其背景蛋白相对复杂,对以后纯化回收蛋白增加难度. 对 3ABC 进行初步表达后,SDS-PAGE 电泳显示,仅在 pET-30a 和 pPROEX HTb 中见到特异条带,在其余 2 个载体中未见到特异条带;且 3ABC 表达量不高. 可能为以下原因导致:(1)细菌蛋白酶的降解作用;(2)表达载体的选择;(3)外源基因的长度. 一般地,外源小片段在大肠杆菌中易于表达,且表达量相对较高;而外源大片段往往受宿主菌表达阈值的限制,变得难于表达或表达量低. 本研究中 3ABC 表达量低可能与其片段较大有关.

参考文献:

- [1] MASON P W, GRUBMAN M J, BAXT B. Molecular basis of pathogenesis of FMDV [J]. Virus Research, 2003 (91):9-32.
- [2] 殷震,刘景华. 动物病毒学 [M]. 2 版. 北京:科学出版社,1997:479-498.
- [3] KITSON J D, McCAHON D, BELSHAM G J. Sequence analysis of monoclonal antibody resistant mutants of type O foot and mouth disease virus: evidence for the involvement of the three surface exposed capsid proteins in four antigenic sites [J]. Virol, 1990, 179: 26-34.
- [4] BAXT B, VAKHARIA V, MOORE D M, et al. Analysis of neutralizing antigenic sites on the surface of type A12 foot-and-mouth disease virus [J]. Virol, 1989, 63: 2143-2151.
- [5] CHANG H K, YOUNG J K, WON K, et al. Development of a foot-and-mouth disease NSP ELISA and its comparison with differential diagnostic methods [J]. Vaccine, 2003, 21:1409-1414.
- [6] 尤永进,朱彩珠,葛艳,等. 口蹄疫病毒非结构蛋白 3abc 基因的克隆与表达[J]. 中国病毒学,2003,18:155-158.
- [7] SORESENSEN K J, MADSEN K G, MADSEN E S, et al. Differentiation of infection from vaccination in foot-and-mouth disease by the detection of antibodies to the non-structural proteins 3D,3AB and 3ABC in ELISA using antigens expressed in baculovirus [J]. Arch Virol, 1998, 143:1461-1476.
- [8] DE DIEGO M, BROCCHI E, MACKAY D, et al. The nonstructural polyprotein 3ABC of foot-and-mouth disease virus as a diagnostic antigen in ELISA to differentiate infected from vaccinated cattle [J]. Arch Virol,1997,142: 2021-2033.
- [9] MALIRAT V, NEITZERT E, BERGMANN IE, et al. Detection of cattle exposed to foot-and-mouth disease virus by means of an indirect ELISA test using bioengineered non-structural polyprotein 3ABC [J]. Vet, 1998, 20 (Suppl2):24-26.
- [10] DOMINGO E, ESCARMIS C, BARANOWSKI E, et al. Evolution of foot-and-mouth disease virus [J]. Virus Research, 2003(91):47-63.

【责任编辑 柴 焰】