

狂犬病病毒 HEP-Flury 株 N 基因的修饰及原核表达

张 良, 黄永亮, 官培英, 王怡飞, 徐晓娟, 吴晓薇, 郭霄峰

(华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要:为了高效表达狂犬病病毒 HEP-Flury 的核蛋白,选取抗原决定簇富集区,利用生物信息学技术分析了狂犬病病毒 HEP-Flury N 蛋白的核苷酸序列. 根据大肠埃希菌 *Escherichia coli* 对密码子的偏嗜性,首先对所选取的核苷酸序列进行修饰、引入酶切位点,然后定向克隆至原核表达载体 pET-32a(+),构建重组质粒 pET-32-NP. 将其转化表达宿主菌 *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS,以 IPTG 诱导表达. 表达产物经 SDS-PAGE 电泳,发现在相对分子质量 34 000 处有 1 条特异的蛋白带,与预期大小一致. Western-blotting 检测结果显示,该蛋白可被鼠抗 His 单克隆抗体及犬抗 RV 多克隆抗体特异识别,表明所表达的 N 蛋白具有良好的免疫原性.

关键词:狂犬病病毒;核蛋白;原核表达

中图分类号:S852.65

文献标志码:A

文章编号:1001-411X(2012)01-0102-04

Modification and Prokaryotic Expression of Nucleoprotein Gene of Rabies Virus Strain HEP-Flury

ZHANG Liang, HUANG Yong-liang, GUAN Pei-ying, WANG Yi-fei,

XU Xiao-juan, WU Xiao-wei, GUO Xiao-feng

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

Abstract: Using bioinformatics analysis, a rich antigenic determinant area in HEP-Flury nucleoprotein sequence was selected, and the codons were modified to cater the codon usage bias in *Escherichia coli*, and the restriction enzyme sequences were inserted in upstream and downstream. The modified gene was synthesized and cloned into prokaryotic expression vector pET-32a(+). The recombinant plasmid was designated pET-32-NP. pET-32-NP was transformed to *E. coli* BL21(DE3)pLysS, and the recombinant protein was expressed after IPTG induction. SDS-PAGE analysis showed that the expressed protein had a relative molecular mass of 34 000. Western-blotting results also revealed that the expressed protein could be recognized specifically by mouse anti-His monoclonal antibody and mouse anti-RV polyclonal antibody.

Key words: rabies virus; nucleoprotein; prokaryotic expression

狂犬病病毒(Rabies virus, RV)是一种能引起人和动物高度致死的嗜神经病毒,属弹状病毒科狂犬病毒属,基因组从3'端至5'端依次排列核蛋白(N蛋白)、磷酸化蛋白(P蛋白)、基质蛋白(M蛋白)、糖蛋白(G蛋白)和转录酶蛋白(L蛋白)5种结构蛋白^[1]. 其中N蛋白为狂犬病病毒最保守的结构蛋白,共450个氨基酸,占病毒总蛋白的36%;是狂犬

病病毒粒子的一种主要内部蛋白,在狂犬病病毒复制过程中与基因组RNA紧密结合形成核糖核蛋白(RNP),保护病毒基因组RNA免受宿主细胞核酸酶的破坏^[2]. RNP还与P蛋白、L蛋白相互作用,形成转录与复制必需的螺旋对称结构^[3]. 同时,狂犬病病毒N蛋白不仅具有所有狂犬病病毒共有的群特异性抗原决定簇,而且具有狂犬病病毒和狂犬病相关病

收稿日期:2011-03-22

作者简介:张 良(1980—),男,硕士研究生;通信作者:郭霄峰(1963—),男,教授,博士, E-mail: xfguo@scau.edu.cn

基金项目:国家自然科学基金(30871876);公益性行业(农业)科研专项(201103032)

毒共有的属抗原决定簇^[4], N 蛋白还是主要保护性抗原之一,能刺激机体产生细胞免疫^[5]. 单独用 N 蛋白免疫小鼠和狗,能诱导这些动物产生保护性免疫应答,并能抵抗狂犬病病毒致死剂量的攻击^[6]. 用 N 蛋白基因构建的重组病毒也能抵抗狂犬病病毒致死剂量的攻击^[7-8]. 本研究以狂犬病病毒 HEP-Flury 株 N 基因序列为材料,通过生物信息学分析、序列合成与定向克隆方法构建重组表达质粒 pET-32-NP 并优化表达条件,在体外利用大肠埃希菌表达出带有 6 × His 标签的重组狂犬病病毒 N 蛋白并经纯化,为狂犬病诊断方法的建立奠定基础.

1 材料与方法

1.1 毒株、载体及主要试剂

狂犬病毒 HEP-Flury 株、原核表达载体 pET-32a (+)、犬抗 RV 多克隆抗体、基因工程菌为华南农业大学兽医学院微生物学教研室保存. 凝胶回收试剂盒、鼠抗 His 单克隆抗体、HRP 标记羊抗犬 IgG、HRP 标记羊抗鼠 IgG、DL2000 及 DL15000 DNA Marker 为天根生化科技(北京)有限公司产品, *Kpn* I、*Hind* III Prestained Protein Ladder 为 Fermentas 公司产品, His-Trap FF crude 为 GE 公司产品.

1.2 引物

根据 GenBank 所收录的 HEP-Flury 基因序列,分析设计了 1 对引物,上、下游分别引入 *Kpn* I 与 *Hind* III 酶切位点,命名为:

RV-N1 (5'- TTGGTACCCACTTTGTTGGATGCT-3'),

RV-N2 (5'- TTGAATTCCTTATCTCTTCAGTCGACCT-3').

1.3 pET-32-NP 重组质粒的构建

以 HEP-Flury 株 N 基因序列为参考,通过生物信息学分析,选取抗原决定簇富集区并根据大肠埃希菌密码子偏好性作密码子修改,然后引入酶切位点并送上海捷瑞生物技术有限公司合成及定向克隆至原核表达载体 pET-32a (+),构建重组表达质粒 pET-32-NP. 用 RV-N1、RV-N2 引物对 pET-32-NP 进行 PCR 检测及 *Kpn* I 与 *Hind* III 双酶切鉴定.

1.4 重组核蛋白的诱导表达与鉴定

将重组质粒 pET-32-NP 转化至 *E. coli* BL21 (DE3)pLysS,挑取单个菌落扩增后采用不同的 IPTG 浓度、诱导时间、诱导温度、诱导前 $D_{600\text{ nm}}$ 值、培养基抗生素浓度进行诱导表达. 优化诱导条件并检测不同表达条件下的表达量,确定最佳诱导条件,同时设

立含 pET-32a (+) 空载体及未诱导的重组质粒转化菌作为对照. 重组蛋白按试剂使用说明采用鼠抗 His 单克隆抗体、犬抗 RV 多克隆抗体和 HRP 标记羊抗鼠 IgG 或 HRP 标记羊抗犬 IgG 进行 Western-blotting 鉴定;SDS-PAGE 后切胶,送暨南大学再生医学实验室作蛋白质谱鉴定.

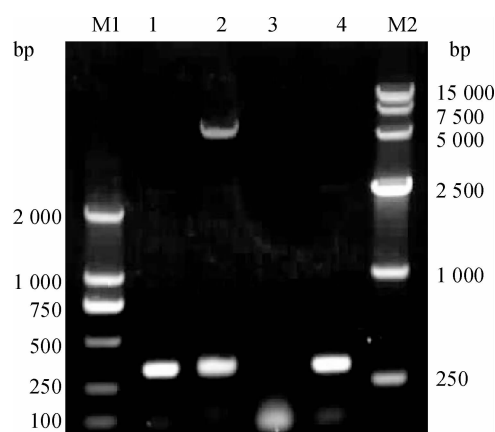
1.5 重组核蛋白的分离与纯化

取菌液以 1:100 的体积比进行大量表达,收获菌体后用含 8 mol/L 尿素的磷酸盐缓冲液悬浮菌体沉淀并超声破碎,4 °C 下 12 000 r/min 离心 15 min,取上清液过 HisTrap FF crude 柱. 蛋白与柱内 Ni^{2+} 充分结合后,用含 20 mmol/L 咪唑的磷酸盐缓冲液洗涤杂蛋白,用含 100 mmol/L 咪唑的磷酸盐缓冲液洗脱目的蛋白,收集的蛋白作 SDS-PAGE 鉴定,并用紫外分光光度计测定纯化蛋白的浓度.

2 结果

2.1 pET-32-NP 重组质粒的构建

用 RV-N1、RV-N2 引物对 pET-32-NP 进行 PCR 检测. 结果显示,在 250 ~ 500 bp 间有一明亮条带. 经计算,目的条带与预期片段大小相符,为 330 bp. 阴性对照无条带出现. 对 PCR 阳性的克隆质粒进行双酶切,亦在 250 ~ 500 bp 间得到大小相符的条带. 结果见图 1.



M1: DNA Marker DL2000; M2: DNA Marker DL15000; 1: 质粒 PCR 扩增产物; 2: *Kpn* I + *Hind* III 双酶切 pET-32-NP; 3: 阴性对照; 4: 阳性对照.

图 1 PCR 扩增鉴定及双酶切鉴定结果

Fig. 1 Result of PCR and enzymatic digestion

2.2 重组核蛋白的诱导表达与鉴定

对诱导表达产物进行 SDS-PAGE 电泳、染色、脱色后发现在相对分子质量约 34 000 处出现 1 条新的蛋白带,其大小与带有 6 × His 标签的重组融合 RVN

蛋白一致. 而阴性对照中相应位置没有类似粗细的条带. 经多次优化诱导条件发现, 不同的 IPTG 浓度、诱导时间、诱导前 $D_{600\text{ nm}}$ 值等条件下表达量未能出现明显的变化, 而不同的诱导温度下表达量则有较大的不同. 结果显示, 28 °C 诱导表达量较高, 且没有出现明显的降解现象, 结果见图 2. 采用 MS/MS 法对纯化后蛋白进行质谱鉴定, 经肽指纹图谱鉴定及部分强信号肽段测序(图 3), 显示纯化后的蛋白即为狂犬病毒 N 蛋白.

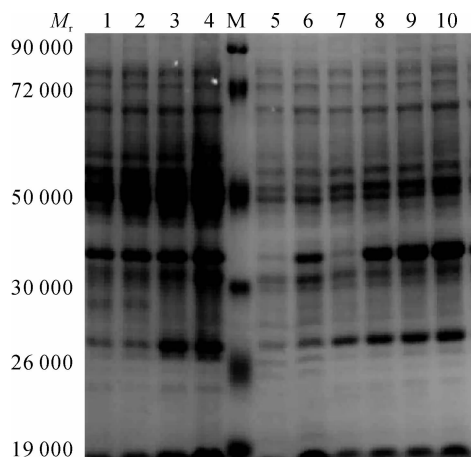


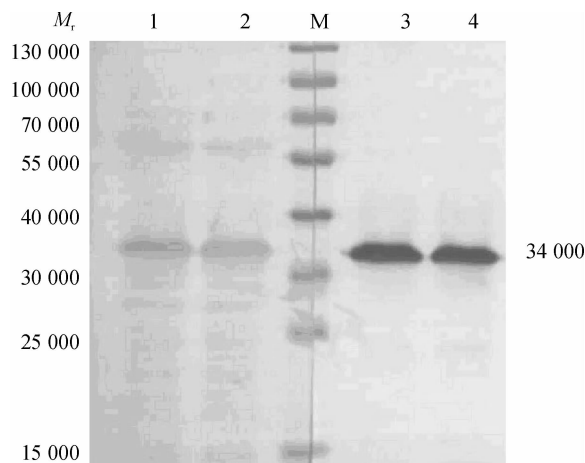
图2 核蛋白的诱导表达产物 SDS-PAGE 分析
Fig. 2 SDS-PAGE analysis of expressing N protein

HEP-Flury N蛋白 -MDADKIVFKVNNRVVSLKPEIIVDQYEYKYPADKI
MS/MS质谱鉴定结果 -.....
KKPCITLTKAPDLNKAYKSVLSGMNAAKLDPDDVCSYLAAMQFFEGTCPE
.....
DWTSYGILARKGDKITPDSLVEIKRIDVEGNWALTGGMELTRDPTVSEHASL
.....
VGLLLSLYRLSKISGQNTGNKYKTNIADRIEQIFETAPFVKIVEHHTLMTTHKMC
.....LSKISGQNTGNKY
.....
ANWSTIPNFRFLAGTYDMFFSRIEHLYSAIRVGTVTAYEDCSGLVSFTGFIKQI
.....
NLTAAREAILYFHKNFEEIIRMFEPGQETAVPHSYFIHFRSLGLSGKSPYSSNA
.....
VGHVFNLHFVGCYMGQVRSINATVIAACAPHEMSVLGGYLGEFFGKGTFE
.....SLNATVIAACAPHEMSVLGGYLGEFFGK.....
.....
RRFRDEKELQYEYAAELTKTDVALADDGTVNSDDEDYFSGETRSPYAYTRI
.....FFRDEKELQYEYAAELTKTDVALADDGTVNSDDEDYFSGETRSPYAYTRI
.....
MMNGGRLKRSHIRYVSVSNHOARPNSEAFNLKTYSDS

图3 肽段测序结果与 N 蛋白氨基酸序列的比较

Fig. 3 Comparison of peptide sequencing and N protein amino acid sequence

Western-blotting 结果显示, 重组狂犬病 N 蛋白能够被鼠抗 His 单克隆抗体及犬抗 RV 多克隆抗体特异性识别(图 4).



M: 蛋白质相对分子质量标准; 1, 2: pET-32-NP 蛋白与 Anti-His Tag Antibody 反应; 3, 4: pET-32-NP 蛋白与 Dog Anti-Rabies Antibody 反应.

图4 Western-blotting 分析

Fig. 4 Western-blotting analysis

2.3 重组核蛋白的分离与纯化

将分离纯化得到的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳后发现, 所得条带清晰明亮, 无杂带, 经紫外分光光度计测定, 质量浓度为 1.0 mg/mL.

3 讨论

狂犬病病毒 N 蛋白的作用不仅仅在于它和基因组 RNA 紧密结合, 保护基因组 RNA 免受宿主细胞核酸酶的切割, 而且它在病毒 RNA 从转录向复制切换方面起重要作用. N 蛋白虽然调控基因组的转录和复制, 但其具体机制和过程仍不完全清楚. 本研究利用分子生物学方法成功构建了基于原核表达载体 pET-32 的重组质粒 pET-32-NP, 优化表达条件后得到了带有 6 × His 标签的融合核蛋白, 为进一步探索 N 蛋白对病毒复制的调控机制奠定了基础.

原核表达常使用的优化条件中, 诱导温度对表达量有着极其重要的影响. 虽然大肠埃希菌在 10 ~ 43 °C 范围内都能够生长并合成蛋白, 但研究发现, 在 37 °C 条件下细菌生长活跃, 合成的蛋白量高, 同时由于蛋白酶活性太高, 容易造成蛋白质的降解, 因此该温度并不利于外源蛋白的大量表达^[8]. 本次研究的结果同样证实了这一现象, 重组的核蛋白在 37、16 °C 均不能很好地表达, 而在 28 °C 下表达量显著提升, 且没有出现明显降解.

真核生物的结构蛋白要进行原核表达, 需要考虑其基因中存在较多原核生物难于识别的密码子, 如真核生物中编码精氨酸(Arg)的常见密码子 agg、

aga, 编码亮氨酸(Leu)的常见密码子 cta 等在大肠埃希菌中就缺乏相应的 tRNA. 有研究显示, 这些稀有密码子大量或连续性的出现会严重影响蛋白的表达^[9]. 江飙等^[10]和郑佳琳等^[11]分别对狂犬病病毒的 M 和 G 基因进行了偏嗜性修饰并在大肠埃希菌中获得高效表达. 我们之前也曾对未经修饰的狂犬病病毒 N 基因进行原核表达, 但表达量不高^[12]. 为了提高狂犬病病毒 N 基因的表达水平, 我们对狂犬病病毒 HEP-Flury N 基因进行了生物信息学分析. 结果发现, 狂犬病病毒 N 蛋白中仅编码精氨酸的稀有密码子就有 24 组, 亮氨酸的稀有密码子有 34 组, 并且在编码第 270 与 271、357 与 358、422 与 423 位氨基酸处出现 3 组精氨酸稀有密码子连续成簇的现象, 在编码第 143、144、145 位氨基酸处出现 1 组亮氨酸稀有密码子连续成簇的现象. 因此, 本研究选取 N 蛋白抗原富集区并根据大肠埃希菌对密码子的偏嗜性进行修改, 大大提高了表达量.

参考文献:

- [1] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 1997: 777-955.
- [2] LARSON J K, WUNNER W H, OTVOS L, Jr, et al. Identification of an immunodominant epitope within the phosphoprotein of rabies virus that is recognized by both class I- and class-restricted T cells[J]. J Virol, 1991, 65(11): 5673-5679.
- [3] RAUX H, ISENI F, LAFAY F, et al. Mapping of monoclonal antibody epitopes of the rabies virus P protein[J]. J Gen Virol, 1997, 78(1): 119-124.
- [4] RAUX H, FLAMAND A, BLONDEL D. Interaction of the rabies virus P protein with the LC8 dynein light chain[J]. J Virol, 2000, 74(21): 10212-10216.
- [5] MEBASTION T, WEILAND F, CONZELMANN K K. Matrix protein of rabies virus is responsible for the assembly and budding of bullet-shaped particles and interacts with the transmembrane spike glycoprotein G[J]. J Virol, 1999, 73(1): 242-250.
- [6] HIRAMATSU K, MIFUNE K, MANNEN K, et al. Mapping of the antigenic determinants recognized by monoclonal antibodies against the M2 protein of rabies virus[J]. Virol, 1992, 187(2): 472-479.
- [7] CHONG L D, ROSE J K. Interactions of normal and mutant vesicular stomatitis virus matrix proteins with the plasma membrane and nucleocapsids[J]. J Virol, 1994, 68(1): 441-447.
- [8] 于志凤, 张守峰, 刘晔, 等. 狂犬病病毒核蛋白基因在大肠杆菌中稳定表达条件的优化及纯化[J]. 吉林农业大学学报, 2008, 5(28): 581-585.
- [9] 李宏, 哈斯, 张鹤龄, 等. 改造人干扰素 $\alpha 2b$ 基因在大肠杆菌中获得高效表达的理论方法[J]. 内蒙古大学学报, 1998, 1(29): 63-69.
- [10] 江飙, 郑佳琳, 邝贞结, 等. 狂犬病毒 HEP-Flury 株基质蛋白的原核表达及纯化[J]. 中国预防兽医学报, 2010, 32(5): 408-410.
- [11] 郑佳琳, 江飙, 郭霄峰. 优化密码子以提高狂犬病病毒糖蛋白基因在原核细胞的表达[J]. 中国人兽共患病学报, 2010, 26(5): 403-407.
- [12] 官培英. 狂犬病毒 N 基因的原核表达及荧光抗体的制备[D]. 广州: 华南农业大学, 2008.

【责任编辑 柴 焰】

欢迎订阅 2012 年《华南农业大学学报》

《华南农业大学学报》是华南农业大学主办的综合性农业科学学术刊物. 本刊主要报道农业各学科的科研学术论文、研究简报、综述等, 设有农学·园艺·土壤肥料、植物保护、生物学、林业科学、动物科学与兽医学、农业工程与食品科学、综述、简报等栏目. 本刊附英文目次和英文摘要. 读者对象主要是农业院校师生、农业科研人员和有关部门的专业干部.

本刊为《中国科学引文数据库》、《中国科技论文统计源(中国科技核心期刊)》及《中国学术期刊综合评价数据库》等固定刊源, 并排列在中国科学引文数据库被引频次最高的中国科技期刊 500 名以内. 被《中文核心期刊要目总览》遴选为综合性农业科学核心期刊、植物保护类核心期刊. 为美国《化学文摘》、美国《剑桥科学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、英国《CABI》、英国《动物学记录》、《中国生物学文摘》及国内农业类文摘期刊等多家国内外著名文摘固定刊源.

国内外公开发行, 季刊, A4 幅面. 每期 124 页, 定价 10.00 元, 全年 40.00 元. 自办发行, 参加全国非邮发报刊联合征订发行, 非邮发代号: 6573.

订阅办法: 订阅款邮汇至: 300381 天津市卫津南路李七庄邮局 9801 信箱, 全国非邮发报刊联合征订服务部.

《华南农业大学学报》编辑部