

传染性囊病病毒结构蛋白 VP2 的融合表达

曹永长, 史泉城, 马静云, 毕英佐

(华南农业大学 动物科学学院, 广东 广州 510642)

摘要: 将 IBDV 超强毒株 HK46 的结构蛋白 vp2 基因的 cDNA 片段插入表达质粒 pSOC 的 *EcoRI* 位点, 获得重组质粒 pSOC-VP2. 用 pSOC-VP2 转化 *E. coli* BL21(DE3), 获得表达 VP2 蛋白的工程菌 BL-SOC-VP2. 在 1 μg/mL IPTG 诱导之下, BL-SOC-VP2 表达了融合蛋白 SOC-VP2. 其相对分子质量为 49 000. SDS-PAGE 检测表明, 融合蛋白 SOC-VP2 的最大表达量为细菌总量的 14.35%. ELISA 分析表明, 大肠杆菌表达的 SOC-VP2 能与 IBDV 阳性血清发生特异性反应.

关键词: 传染性囊病病毒; VP2; 融合表达

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2004)04-0078-04

Fusion expression of viral structural protein VP2 of infectious bursal disease virus in *E. coli*

CAO Yong-chang, SHI Quan-cheng, MA Jing-yun, BI Ying-zuo

(College of Animal Science, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: The cDNA fragments of gene vp2 of very virulent infectious bursal disease virus strain HK46 were cloned into the *EcoRI* site of expression plasmid pSOC to obtain recombinant plasmid pSOC-VP2. Then the recombinant plasmid pSOC-VP2 was conducted into the competent cell of BL21 (DE3) by Ca^{2+} to obtain the engineering bacterial strains BL-SOC-VP2. By addition of IPTG at end concentration of 1 μg/mL, BL-SOC-VP2 expressed SOC-VP2 fusion protein with relative molecular mass 49 000. It was showed by density-metry scanning on SDS-PAGE gel that the largest amount of SOC-VP2 fusion is 14.35% of total bacterial protein. It was demonstrated also by ELISA that bacteria expressed SOC-VP2 which specifically reacted with antisera against IBDV.

Key words: infectious bursal disease virus; VP2; fusion expression

传染性囊病病毒 (IBDV) 是传染性法氏囊病的致病因子, 属于双 RNA 病毒科禽双 RNA 病毒属. 目前普遍认为, IBDV 具有 5 种蛋白质: VP1、VP2、VP3、VP4 和 VP5. 其中 VP2 是主要的宿主保护性抗原, 具有诱导宿主产生病毒中和抗体的能力^[1]. 真核系统表达的重组 VP2 具有良好的免疫原性, 免疫后能对免疫鸡提供一定程度的保护. 因此, 研制 IBDV 亚单位疫苗多采用 vp2 作为目的基因. IBDV 基因工程研究在 IBDV 的分子生物学研究中占有非常重要的地位. vp2 已先后在大肠杆菌^[2,3]、酵母^[4,5]、痘病毒^[6-9]、昆虫杆状病毒表达系统^[10-12]、腺病毒^[13] 等表达系统中进行了表达. 本文采用 T4 噬菌体高拷贝数蛋白表面展示系统的表达质粒 pSOC, 将 VP2 和 T4 噬菌体

表面蛋白 SOC 融合表达, 并对表达产物的抗原性进行了研究.

1 材料与方法

1.1 质粒和菌株

质粒 pSOC 为含有 T4 噬菌体小外壳蛋白基因 soc 的原核表达质粒^[14], 由任兆钧博士提供, 华南农业大学动物基因工程实验室保存. *E. coli* BL-21 (DE3)、*E. coli* DH5α 均由华南农业大学动物基因工程实验室保存.

1.2 vp2 基因的扩增

根据已发表的传染性囊病病毒超强毒株 HK46 的碱基序列^[15] 设计了 1 对引物 VP2-S/VP2-A 用于

扩增 vp2 基因. VP2-S (5'-TGAAGAATTCTAT-GACGAACCTGCAA-3')位于 IBDV A 片段 131~145 位碱基处, 在 5' 端加上 *Eco*RI 酶切位点; VP2-A (5'-ATTGGAATTCTATAGGCCCGAATTAG TCCTT-3')位于 IBDV A 片段 1463~1480 位碱基处, 在 5' 端同样加上 *Eco*RI 位点, 并加上终止密码子 TAG, 预计扩增的 vp2 长度为 1 350 bp. 根据 T4 噬菌体小外壳蛋白 (small outer capsid protein, SOC) 基因序列, 设计了另 1 个引物 SOC-S (5'-GAATCATATGGCTAGTCTGCGG-3')^[14]. 用引物 SOC-S/VP2-A 检测融合基因 soc-vp2, 融合基因 PCR 产物大小约为 1 600 bp. 引物均由大连宝生物公司合成.

采用特异性引物 VP2-S/VP2-A, 用 PCR 方法从质粒 FA-pAlter 中扩增 vp2 基因片段. PCR 条件参考曹永长等^[14].

1.3 重组表达质粒的构建与鉴定

PCR 产物经酚/氯仿抽提、酒精沉淀之后, 用 *Eco*RI 酶切消化. pSOC 质粒经 *Eco*RI 消化, CIAP 去磷酸化. 酶切消化产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳后, 回收目的 DNA 片段. 然后在 T4 DNA 连接酶作用下, 经 *Eco*RI 消化的 PCR 产物和质粒进行连接. 连接产物直接用于转化. 用常规方法制备 *E. coli* DH5 α 受体菌, 采用 CaCl₂ 法进行转化. 在含有氨苄青霉素的平板上长出的阳性菌落, 进一步用特异性引物, 采用 PCR 方法对含有 vp2 基因的转化子进行筛选. 用引物 VP2-S/VP2-A 特异性扩增 vp2 基因, 用引物 SOC-S/VP2-A 特异性扩增融合基因 soc-vp2.

将 PCR 筛选出的阳性重组子采用 E.Z.N.A.[®] Plasmid Minipreps Kit 抽提质粒, 将含有 vp2 基因的重组质粒命名为 pSOC-VP2. 分别用 *Eco*RI 和 *Nde*I 酶切消化, 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测. 并对重组质粒进行 DNA 序列测定.

1.4 融合蛋白 SOC-VP2 的表达

用 CaCl₂ 法制备 *E. coli* BL-21 (DE3) 感受态细胞, 用经测序鉴定的重组质粒 pSOC-VP2 转化 *E. coli* BL-21 (DE3). 将含有质粒 pSOC-VP2 的大肠杆菌命名为 BL-SOC-VP2.

挑取单个 BL-SOC-VP2 菌落, 接种于 3 mL LA 液体培养基中, 37 °C 振荡培养过夜; 取出菌液, 置于 4 °C 冰浴过夜. 按 1% 比例接种 LA 液体培养基, 37 °C 振荡培养. 当 $D_{600\text{nm}} = 0.3 \sim 0.4$ 时, 加入 IPTG, 使 IPTG 终质量浓度达到 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 然后分别在不同时间取样, 采用 SDS-PAGE 电泳分析表达产物, 并用 VL 凝胶成像系统分析表达产物占菌体蛋白的比例.

1.5 融合蛋白与 IBD 阳性血清的反应性

采用 ELISA 对表达产物与 IBD 阳性血清的反应性进行测定. 将表达 SOC-VP2 的细菌裂解后分成上

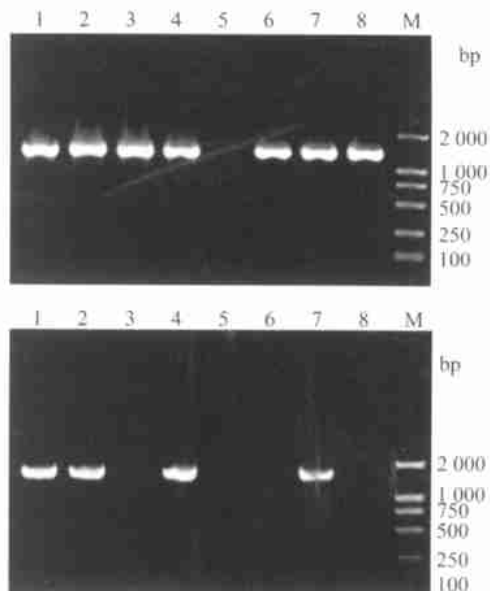
清液和沉淀, 直接将上清液或沉淀包被在酶标板上, 然后和 IBDV 阳性血清进行 ELISA 反应, 同时用培养相同时间的 BL21 (DE3) 细菌沉淀作为对照, 用 $D_{630\text{nm}}$ 表示表达产物和 IBD 阳性血清的反应性.

2 结果

2.1 重组表达质粒的构建与鉴定

采用 PCR 技术, 用特异性引物 VP2-S/VP2-A 成功地获得了 vp2 基因, 大小约为 1 350 bp.

对于 Amp^R 筛选阳性的重组子, 在用 VP2-S/VP2-A 检测 vp2 基因的同时, 采用引物 SOC-S/VP2-A 检测融合基因 soc-vp2. 随机挑取 8 个 Amp^R 阳性菌落进行 PCR 检测, 有 4 个同时出现了 vp2 和 soc-vp2 的 PCR 产物, 另有 3 个只有 vp2 的 PCR 产物, 有 1 个既无 vp2 产物, 也无 soc-vp2 产物 (图 1), 说明 7 个阳性转化子中有 4 个转化子的插入方向正确.



M: DNAmaker DL2000. 1~8 编号为 1~8 的阳性重组子; 1~8: positive recombinants NO. 1~8

上: vp2 基因 PCR 产物, 长度约为 1 350 bp; 下: soc-vp2 融合基因 PCR 产物, 长度约为 1 600 bp

Up: PCR products of vp2 with 1 350 bp; Down: PCR products of soc-vp2 fusion with 1 600 bp

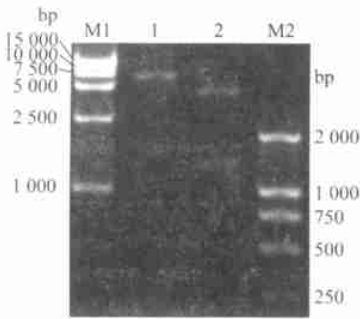
图 1 vp2 重组子的 PCR 筛选

Fig. 1 Screening of recombinant plasmids by PCR amplification of vp2

对 PCR 检测确定的阳性转化子, 继续在 37 °C 培养, 采用 E.Z.N.A.[®] Plasmid Minipreps Kit 抽提质粒 DNA. 将含有 vp2 基因的重组质粒命名为 pSOC-VP2. 酶切鉴定结果表明, 用 *Eco*RI 消化 pSOC-VP2, 获得 2 个 DNA 条带, 大小分别为 1 350 bp 和 4 800 bp; 用 *Nde*I 消化, 获得单一条带, 大小约为 6 200 bp (图 2).

2.2 表达条件的优化

用经测序鉴定的重组质粒 pSOC-VP2 转化 *E. coli* BL-21 (DE3) 受体菌, 挑取单个阳性菌落进行 PCR 鉴定. 用 1 对特异性引物 VP2-S/VP2-A 转化菌中检测 vp2, 从所有阳性菌落中扩增到预期大小的 DNA 片段. 将 pSOC-VP2 阳性转化菌命名为 BL-SOC-VP2.



1: *Nde*I 消化的重组质粒 pSOC-VP2, DNA 条带大小约为 6 200 bp; 2: *Eco*RI 消化的重组质粒 pSOC-VP2, DNA 条带大小分别为 4 800 bp 和 1 350 bp

1: recombinant pSOC-VP2 digested with *Nde*I, showing one band with length of about 6 200 bp; 2: recombinant pSOC-VP2 digested with *Eco*RI, showing two band with length of 4 800 bp and 1 350 bp respectively

图2 重组质粒 pSOC-VP2 的酶切鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid pSOC-VP2 by RE digestion

取 BL-SOC-VP2 在 LA 液体培养基中培养至 $D_{600\text{nm}} = 0.6$ 左右时, 加入 IPTG 诱导融合蛋白 SOC-VP2 的表达. 分别在加入 IPTG 之后 1、2、3、4、5、6 h 取菌液, 用 SDS-PAGE 鉴定表达产物. SDS-PAGE 结果 (图 3) 表明, IPTG 能较好地诱导 SOC-VP2 融合蛋白的表达, 在表达体系中加入 IPTG 1 h 之后, 在细菌菌体中可以检测到融合蛋白, 表达产物相对分子质量约为 49 000, 与预期相符. 随着诱导时间的延长, 表达量逐渐增加, 2~4 h 时表达量最大, 随后急剧降低.

表1 融合蛋白 SOC-VP2 在 ELISA 反应中的 $D_{630\text{nm}}$

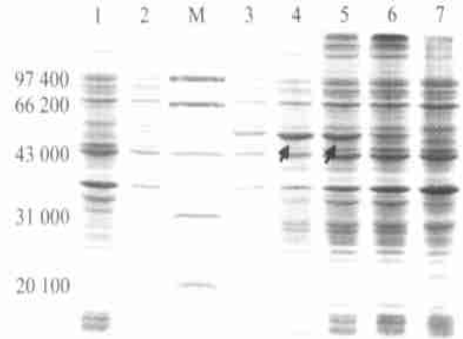
Tab. 1 Reactivities of SOC-VP2 fusion with positive sera again IBDV in ELISA

组别 groups	稀释度 dilution				
	1:2 ⁸	1:2 ⁹	1:2 ¹⁰	1:2 ¹¹	1:2 ¹²
细菌沉淀对照 bacterial pellet without SOC-VP2 fusion	0.057	0.048	0.030	0.039	0.052
SOC-VP2 上清液 supernatant with SOC-VP2 fusion	0.394	0.313	0.219	0.163	0.155
SOC-VP2 沉淀 pellet with SOC-VP2 fusion	0.338	0.321	0.336	0.293	0.307

3 讨论

大肠杆菌操作容易, 遗传背景清楚, 表达外源基因的周期较短, 因而利用大肠杆菌表达外源基因是基因工程中常用的方法. 作为 T4 噬菌体表达系统的

此外, 当表达系统中 IPTG 质量浓度分别为 1、2 和 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 诱导表达的效果大致相同. 用 VL 凝胶成像系统 Bio1D⁺⁺ 程序对电泳结果扫描分析表明, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ IPTG 诱导 1 h 即可检测到目的产物, 目的产物 SOC-VP2 融合蛋白占细菌总蛋白的 9.18%, 2、3、4 h 时, 分别占 14.35%、13.21% 和 12.19%, 5 h 后目的蛋白占细菌总蛋白的比例下降到 6.55%, 6 h 时为 6.35%.



M: 蛋白质相对分子质量标准; 1: 空质粒对照 加入 IPTG 5 h 后的细菌裂解物; 2~6: IPTG 诱导的 BL-SOC-VP2 细菌裂解物, 诱导时间分别为 1、2、3、4 和 5 h; 7: 不加 IPTG 诱导的 BL-SOC-VP2 裂解物

M: protein relative molecular mass (standard); 1: *E. coli* containing empty plasmid induced by IPTG; 2~6: Expression products of *E. coli* containing recombinant plasmids induced by IPTG for 1~5 h; 7: *E. coli* containing recombinant plasmids without IPTG induction

图3 SOC-VP2 融合表达产物的 SDS-PAGE (12%) 检测

Fig. 3 SDS-PAGE (12%) analysis of SOC-VP2 fusion

2.3 SOC-VP2 融合蛋白的 ELISA 检测

融合蛋白 SOC-VP2 与 IBD 阳性血清的反应性如表 1 所示. 在 1:2⁸~1:2¹² 的稀释范围内, 未表达目的蛋白的细菌对照与阳性血清反应的 $D_{630\text{nm}}$ 在 0.030~0.065 的范围之内, 而融合蛋白 SOC-VP2 和 IBD 阳性血清反应的 $D_{630\text{nm}}$ 在 0.155~0.394 之间; 且上清液和沉淀组分都能与 IBD 阳性血清发生特异性反应.

一部分, 大肠杆菌表达外源基因的目的, 主要在于对融合基因表达产物的免疫原性等生物学特性进行研究. 本研究中, 将目的基因 vp2 与 soc 基因重组为融合基因, 置于 T7 启动子控制之下, 经 IPTG 诱导, 表达融合蛋白 SOC-VP2. ELISA 试验结果表明, 融合蛋

白 SOC-VP2 具有良好的免疫反应性. 这为采用 T4 噬菌体表面展示系统进行 VP2 的表达提供了依据.

在本研究的实验条件下, SOC-VP2 占细菌总蛋白的比例最高为 14.35%, 低于华南农业大学动物科学学院基因工程实验室采用该系统对其他蛋白质表达的水平. 这可能与 VP2 蛋白质的性质有关. 有证据表明, IBDV 的主要抗原蛋白 VP2 是一个凋亡因子, 能诱导多种细胞的凋亡^[17]. 虽然不能说 VP2 在大肠杆菌中的表达导致了细胞凋亡, 但 VP2 蛋白对细胞的毒性作用却是不能忽视的. 由于 VP2 对细胞的毒性作用, VP2 在细胞中的大量表达导致了细胞本身生理特性的变化, 从而反过来影响了 VP2 的进一步表达. 于涟等^[2] 在大肠杆菌中表达的 VP2 只占细菌蛋白总量的 8%, 姜平等^[18] 也认为 VP2 在大肠杆菌中的表达量低, 是由于 VP2 对细胞的毒性作用引起的. 本研究中大肠杆菌表达的 VP2 占细胞总蛋白的含量大于其他作者的报道, 其原因可能在于: 一是本研究所用的表达质粒 pSOC 采用 T7 启动子等表达元件的效力较高, 二是 VP2 蛋白与 SOC 形成融合蛋白之后, 降低了 VP2 对细胞的毒性. 如果是后一原因的话, 那么这种降低毒性作用的效果也是有限的. 本实验观察到, IPTG 诱导 5 h 以后, 随着细菌总蛋白的增加, VP2 在细菌总蛋白中所占比例却降低了.

参考文献:

- [1] LUKERT P D, SAIF Y M. Infectious bursal disease [A]. CARNEK B W, BARNES H J, BEARD C W, et al. Diseases of poultry, 10th [C]. Ames: Iowa State University Press, 1997. 721—738.
- [2] 于 涟, 宋坤华, 金勇丰, 等. 传染性法氏囊病病毒 HZ96 VP2 cDNA 的结构分析及在大肠杆菌中的表达 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 1999, 15(2): 97—100.
- [3] AZAD A A, FASHY K J, BARRETT S A, et al. Expression in *Escherichia coli* of cDNA fragments encoding the gene for the host protective antigen of infectious bursal disease virus [J]. *Virology*, 1986, 149(2): 190—198.
- [4] JAGADISH M N, VAUGHAN P R, IRVING R A, et al. Expression and characterization of infectious bursal disease virus polypeptide in yeast [J]. *Gene*, 1990, 95(2): 179—186.
- [5] MACREADIE I G, VAUGHAN P R, CHAPMAN A J, et al. Passive protection against infectious bursal disease virus by viral VP2 expressed in yeast [J]. *Vaccine*, 1990, 8(6): 549—552.
- [6] 刘小军, 陈 楠, 陈永福. 鸡传染性法氏囊病病毒 vp2 基因的克隆及序列分析 [J]. 农业生物技术学报, 1999, 7(2): 129—134.
- [7] 沈瑞忠, 王笑梅, 陈忠斌, 等. 表达传染性法氏囊病病毒基因的重组鸡痘病毒的构建及免疫保护性研究 [J]. 中国畜禽传染病, 1998, (2): 65—67.
- [8] BAYLISS C D, PETERS R W, COOK J K A, et al. A recombinant fowlpox virus that expresses the VP2 antigen of infectious bursal disease virus induces protection against mortality caused by the virus [J]. *Arch Virol*, 1991, 120: 193—205.
- [9] SHAW I, DAVISON T F. Protection from IBDV-induced bursal damage by a recombinant fowlpox vaccine, fpIBD1, is dependent on the titre of challenge virus and chicken genotype [J]. *Vaccine*, 2000, 18(28): 3230—3241.
- [10] 于 涟, 宋坤华, 张耀洲, 等. 家蚕表达传染性法氏囊病病毒 VP2 蛋白的免疫原性初步研究 [J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2000, 26(1): 9—16.
- [11] VAKHARIA V N, SNYDER D B, HE J, et al. Infectious bursal disease virus structural proteins expressed in a baculovirus recombinant confer protection in chickens [J]. *J Gen Virol*, 1993, 74: 1021—1026.
- [12] SNYDER D B, VAKHARIA V N, MENGEL-WHEREAT S A, et al. Active cross-protection induced by a recombinant baculovirus expressing chimeric infectious bursal disease virus structural proteins [J]. *Avian Dis*, 1994, 38(4): 701—707.
- [13] SHEPPARD M W, WERNER W, TSATAS E, et al. Fowl adenovirus recombinant expressing VP2 of infectious bursal disease virus induces protective immunity against bursal disease [J]. *Arch Virol*, 1998, 143: 915—930.
- [14] REN Z J, LEWIS G K, WINGFIELD P T, et al. Phage display of intact domains at high copy number: A system based on SOC, the small outer capsid protein of bacteriophage T4 [J]. *Protein Sci*, 1996, 5: 1833—1843.
- [15] LIM B L, CAO Y C, YU T, et al. Adaptation of very virulent infectious bursal disease virus to chicken embryonic fibroblasts by site-directed mutagenesis of residues 279 and 284 of viral coat protein VP2 [J]. *J Virol*, 1999, 73(4): 2854—2862.
- [16] 曹永长, 毕英佐, 梁志清, 等. 传染性囊病病毒 CJ801 株 vp2 基因 cDNA 的序列分析 [J]. 华南农业大学学报, 1997, 18(增刊): 65—72.
- [17] FERNANDEZ-ARIAS A, MARTINEZ S, RODRIGUEZ J. The major antigenic protein of infectious bursal disease virus VP2 is an apoptotic inducer [J]. *J Virol*, 1997, 71(10): 8014—8018.
- [18] 姜 平, 陈溥言, 蔡宝祥, 等. 传染性法氏囊病病毒 VP3 结构蛋白基因在大肠杆菌中的高效表达 [J]. 病毒学报, 1998, 14(3): 279—283.

【责任编辑 柴 焰】