

水泡性口炎病毒2种血清型核衣壳蛋白的原核表达及生物信息学分析

曾彩云¹, 陈茹^{1,2}, 谢青梅¹, 马静云¹, 曹永长³

(1 华南农业大学动物科学学院, 广东 广州 510642; 2 广东出入境检验检疫局, 广东 广州 510623;

3 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275)

摘要:用 RT-PCR 方法从水泡性口炎病毒(vsv)扩增印第安纳(Indiana)和新泽西(New Jersey)血清型核蛋白 N 基因,分别克隆至 pMD20-T 载体进行序列鉴定及生物信息学分析. 构建重组表达质粒 VSV-IN-pBCX 和 VSV-NJ-pBCX,并经 SDS-PAGE 和 Western-blot 鉴定表明 2 种血清型病毒核衣壳蛋白 N 基因在 BL21(DE3) 宿主菌中成功表达,重组蛋白相对分子质量约为 82 000,并能够与各自对应血清型阳性血清反应. 这表明 2 个重组蛋白具有良好的抗原性,可作为用于建立水泡性口炎血清学诊断方法的诊断抗原.

关键词:水泡性口炎病毒; 核衣壳蛋白基因; 原核表达

中图分类号: S852.653

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2009)01-0116-03

Prokaryotic Expression and Bioinformatics Analysis of the Nucleoprotein Genes of Vesicular Stomatitis Virus

ZENG Cai-yun¹, CHEN Ru^{1,2}, XIE Qing-mei¹, MA Jing-yun¹, CAO Yong-chang³

(1 College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2 Guangdong Entry-Exit Inspection & Quarantine Technical Center, Guangzhou 510623, China;

3 College of Life Science, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: The nucleoprotein genes of vesicular stomatitis virus (VSV, Indiana type and New Jersey type) were amplified by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), and then cloned into pMD20-T vector for sequencing and bioinformatics analysis. These genes were inserted into the prokaryotic expression plasmids pBCX. The recombinant plasmid VSV-IN-pBCX and VSV-NJ-pBCX were transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3) cells. The relative molecular mass of the recombinant protein was 82 000, which was detected by SDS-PAGE and reacted with VS positive serum in Western-blot. The recombinant nucleoproteins can be used as the specific diagnosis antigens for immunoassay such as ELISA.

Key words: vesicular stomatitis virus; nucleoprotein gene; prokaryotic expression

水泡性口炎(Vesicular stomatitis, VS)是由水泡性口炎病毒(Vesicular stomatitis virus, VSV)所引起的、人畜共患高度接触性传染的病毒性疾病. 国际兽医局(OIE)将该病列为动物 A 类传染病,是国际动物贸易中的重要检疫对象,也是我国重点防范的外

来动物疫病. VSV 分成 2 种血清型:印第安型(IND)和新泽西型(NJ). 核蛋白(N)由 422 个氨基酸组成,具高度保守性,由 VSV 所共有;VSV 呈现群特异性,诱导产生非中和抗体,与其他弹状病毒无任何交叉反应;在病毒 RNA 复制和转录调控中起核心作用^[1,2].

收稿日期:2007-11-05

作者简介:曾彩云(1982—),女,硕士研究生; 通讯作者:陈茹(1968—),女,高级兽医师,在职博士研究生,E-mail:

chenr@gdcq.gov.cn

1 材料与方法

1.1 病毒和血清

VSV 由广东出入境检验检疫局从澳大利亚国家动物健康实验室引进. VS 阳性血清由广东出入境检验检疫局保存.

1.2 主要试剂

RNA 提取试剂盒 TRIzol LS Reagent 为 Gibco-BRL 公司产品;山羊抗豚鼠 IgG 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记抗体为 Merck 公司产品;原核表达载体 pBCX、克隆菌 DH5 α 、表达菌 BL21 (DE3) 均由华南农业大学动物科学学院家禽实验室保存.

1.3 病毒 RNA 的提取

按 Gibco-BRL 公司 TRIzol LS Reagent RNA 提取试剂盒的使用说明书进行. 提取的 RNA 直接用于 RT-PCR 或 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用.

1.4 N 基因的克隆及其推导氨基酸序列生物信息学分析

用 Primer premier5.0 和 DNASTart 软件设计的 2 对引物进行 RT-PCR 扩增,将 PCR 产物克隆到 T 载体上构建克隆质粒,送上海英骏生物技术有限公司进行测序.

采用 Hoop&Woods 亲水性参数分别对 VSV 2 种血清型的核蛋白进行生物信息学分析 (<http://www.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl>)^[3],并采用 antigenic.pl 服务器 (<http://bio.dfci.harvard.edu/Tools/antigenic.pl>) 预测抗原位点^[4].

1.5 原核表达重组质粒的构建及鉴定

将测序正确的 VSV 的 N 序列分别与质粒 pBCX 进行重组质粒构建. 将经酶切鉴定和序列测定正确的质粒命名为 VSV-IN-pBCX 和 VSV-NJ-pBCX,分别转化感受态表达菌 BL21 (DE3),并进行 SDS-PAGE 鉴定.

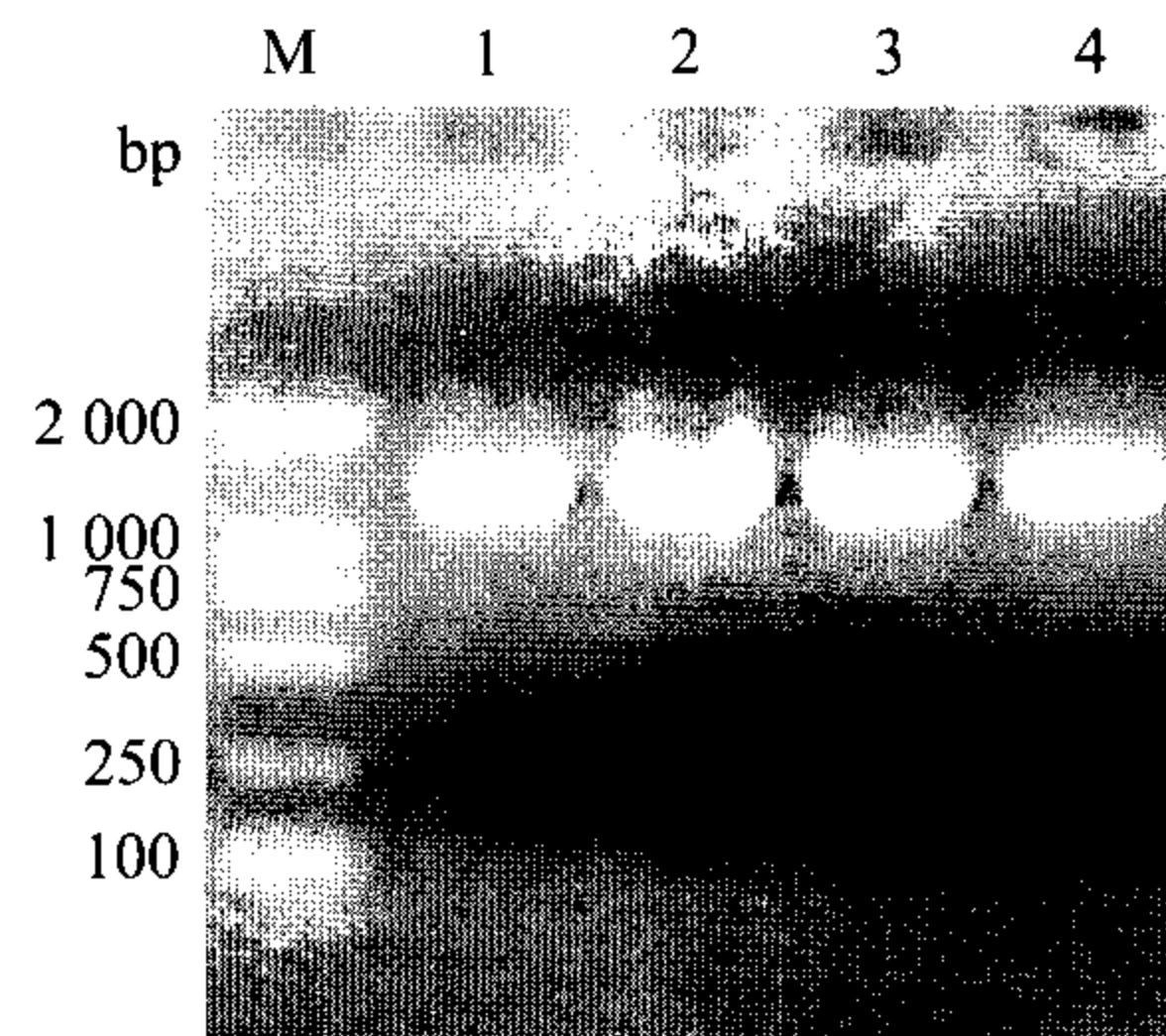
1.6 N 基因原核表达 SDS-PAGE 检测及 Western-blot 鉴定

将 VSV-IN-pBCX 和 VSV-NJ-pBCX 分别转化感受态表达菌 BL21 (DE3). 诱导表达后进行 SDS-PAGE 鉴定,并按照常规方法进行 Western-blot.

2 结果

2.1 N 基因的扩增及克隆

采用 RT-PCR 技术,用特异性引物扩增获得 1 条大小约为 1.2 kb 的产物,与预期 N 基因大小相符,结果见图 1. 将产物克隆至 pMD20-T 载体进行序列测定和分析,结果证实得到的 2 种血清型的 N 基因与 GeneBank 登录的基本一致.



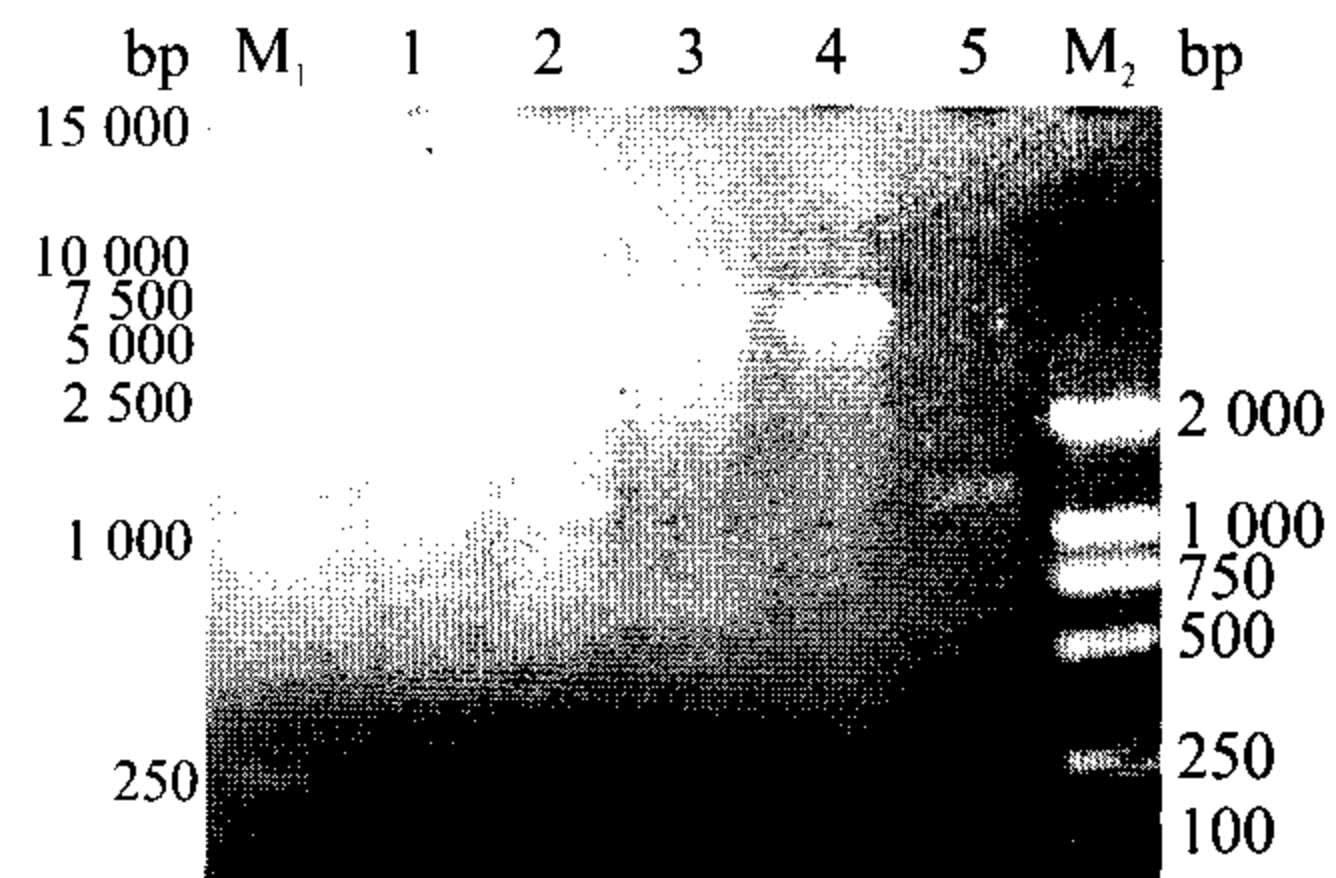
M: DNA Marker DL2000; 1,2 为 VSV-IN-N;3,4 为 VSV-NJ-N

图 1 VSV N 基因的 RT-PCR 电泳图

Fig. 1 Gel electrophoresis of N gene RT-PCR products

2.2 原核表达重组质粒的构建及鉴定

将构建好的重组质粒 VSV-IN-pBCX 和 VSV-NJ-pBCX 进行酶切鉴定,双酶切产物在 5 000 bp 以上及 1.2 kb 左右出现条带,均与预期大小相符,结果见图 2.



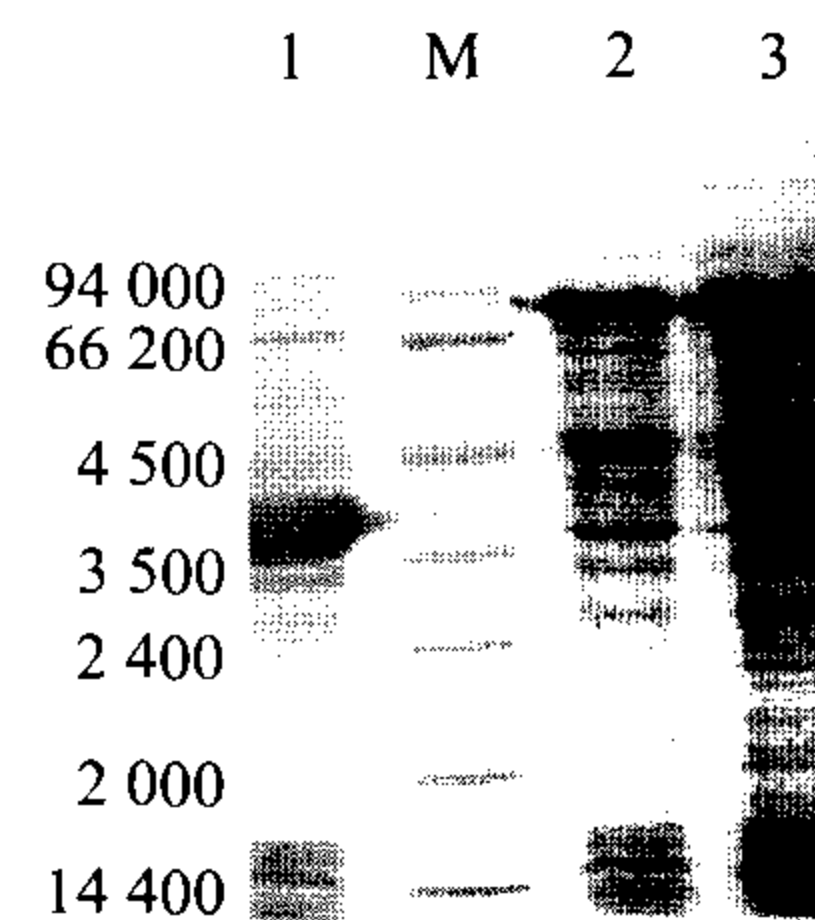
M₁:DNA Marker DL15000; M₂:DNA Marker DL2000;1,2 为 VSV-IN-pBCX 和 VSV-NJ-pBCX 质粒酶切结果;3,4 为 pBCX 空质粒;5 为 VSV 的 N 基因

图 2 VSV-IN-pBCX 和 VSV-NJ-pBCX 质粒酶切结果

Fig. 2 Restriction analysis of plasmid VSV-IN-pBCX and VSV-NJ-pBCX

2.3 N 基因在大肠杆菌表达及 SDS-PAGE 检测

取 VSV-IN-pBCX 和 VSV-NJ-pBCX 转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 诱导表达后进行 SDS-PAGE 检测,可分别检测到相对分子质量约为 82 000 的表达产物,如图 3.

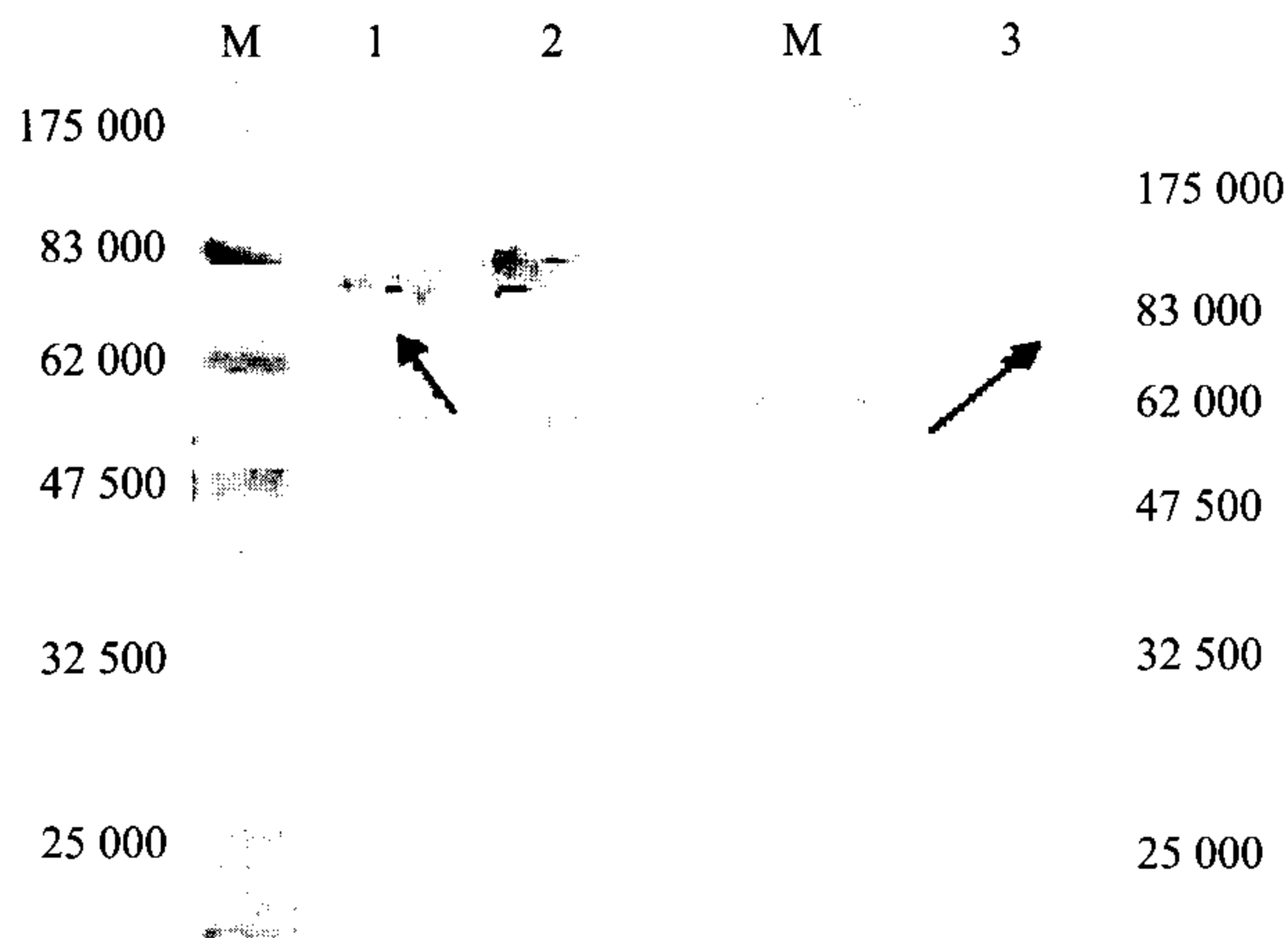


M:蛋白质相对分子质量标准;1:为空质粒 pBCX 在 BL21 (DE3) 中诱导表达产物;2,3:分别为 VSV-IN-pBCX 和 VSV-NJ-pBCX 在 BL21 (DE3) 中诱导表达产物

图 3 VSV-IN-pBCX 和 VSV-NJ-pBCX 表达产物的 SDS-PAGE 检测
Fig. 3 SDS-PAGE detection of recombinant plasmid VSV-IN-pBCX and VSV-NJ-pBCX expression products

2.4 重组蛋白 Western-blot 鉴定

用 VSV 的 2 种血清型的豚鼠阳性血清进行免疫印迹分析,结果如图 4 所示.在预染蛋白质相对分子质量标准的 83 000 附近出现一条抗原活性带,大小与 SDS-PAGE 检测的蛋白一致.



M: 预染蛋白质相对分子质量标准;1、2 为 VSV-IN-pBCX 表达产物;3 为 VSV-NJ-pBCX 表达产物

图 4 VSV-IN-pBCX、VSV-NJ-pBCX 表达产物 Western-blot 鉴定
Fig. 4 Western-blot analysis of recombinant plasmid VSV-IN-pBCX and VSV-NJ-pBCX expression products

3 讨论

VSV 核蛋白 N 较保守,其诱导的抗体为非中和抗体,可用 ELISA 检测出来.花群义等^[5,6]构建的 VSV N 基因重组表达载体 pBAD/ThioToPo,生产的重组核蛋白抗原可以代替完整病毒作为 ELISA 检测用的标准抗原.本文利用在 pET43a 载体基础上改造的 pBCX 载体,通过基因重组方法对 VSV 的核蛋白 N 基因进行大肠杆菌表达,为之后建立快速、特异、简便的 ELISA 方法诊断 VS,也为将来 VS 其他血清学诊断试剂的制备和新型疫苗构建做好前期准备.

现已被大众认可并具有较好抗原表位预测效果的参数,主要有亲水性参数(Hydrophilicity),其中应用最广泛的是 Hopp & Woods 方案.在机体内,疏水性残基一般埋在蛋白内部,而亲水性残基位于表面,因此蛋白的亲水部位与蛋白的抗原位点有密切的联系,最高亲水性区域常位于抗原决定簇内部或其附近^[4].据此标准,亲水性图中最高峰成为抗原表位的可能性为 100%.Hoop&Woods 亲水性参数分析结果都与通过 antigenic.pl 服务器(<http://bio.dfci.harvard.edu/Tools/antigenic.pl>)预测抗原表位得到的结

果是一致的,通过对 VSV 2 种血清型的核蛋白的生物分析,初步可以预测核蛋白作为抗原来检测 VSV 对应阳性血清型.

大肠杆菌易于培养,而且表达量大,作为 ELISA 的检测抗原使用更具有优势.本文 pBCX 载体上的 msyB 多肽作为载体蛋白可与外源蛋白一道分泌到大肠杆菌的胞止中表达,大大增加了外源蛋白的可溶性,表达的目的蛋白与天然产物在构象及生物活性等方面没有区别.本文将 2 种血清型核蛋白基因片段重组至在 pET43a 载体基础上改造的 pBCX 载体,使核蛋白获得高效表达.

VSV 有着广泛的宿主群,可感染家畜和其他多种野生动物,临床症状与水疱疹(VE)、猪水疱病(SVD)和口蹄疫(FMD)不易区别,必须进行快速鉴别诊断^[7].随着加入 WTO 后国际贸易的增加,VSV 传入风险越来越大.2 种血清型的 N 基因在大肠杆菌中的高效表达为建立一套快速有效的血清学检测方法奠定了基础.今后的研究包括重组蛋白的纯化以及检测 2 种血清型 ELISA 方法等血清学诊断方法的建立.

参考文献:

- [1] ALVARADO J F, DOLZ G, HERRERO M V, et al. Comparison of the serum neutralization test and a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to vesicular stomatitis virus New Jersey and vesicular stomatitis virus Indiana[J]. J Vet Diagn Invest, 2002, 14(3):240-242.
- [2] ISENI F, BAUDIN F, BLONDEL D, et al. Structure of the RNA inside the vesicular stomatitis virus nucleocapsid [J]. RNA, 2000, 6(2):270.
- [3] HOPP T P, WOODS K R. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981, 78(6):3824-3828.
- [4] KOLASKAR A S, TONGAONKAR P C. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens[J]. FEBS Lett, 1990, 276(1-2):172-174.
- [5] 花群义,徐自忠.水疱性口炎病毒核蛋白基因的克隆和序列分析[J].中国生物制品学杂志,2004,17(1):4.
- [6] 花群义,金宁一,徐自忠.水疱性口炎病毒核蛋白基因的表达及初步应用[J].生物工程学报,2004,20(1):130.
- [7] 蒋秋燕,刘向松,林洪,等.水疱性口炎病毒的鉴别诊断技术[J].食品与药品,2005,7(9):44-48.

【责任编辑 柴 焰】