

猪轮状病毒 *vp4* 基因在大肠杆菌中的表达\*

宋岩, 李一经\*\*, 魏丽丽, 于小龙, 樊琛, 师东方

(东北农业大学动医学院病原分子生物学实验室, 黑龙江哈尔滨 150030)

Expression of *vp4* Gene from Porcine Rotavirus in *E. coli*

SONG Yan, LI Yi-jing\*\*, WEI Li-li, YU Xiao-long, FAN Chen, SHI Dong-fang

(Molecular Virology Veterinary Medicine College, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

**Abstract:** A pair of primers was used in cloning and sequence analysis of *vp4* gene from Porcine rotavirus JL94 isolated in China. According to the idea that 5' segments of VP4 (1bp~750bp) principally control the activity of *vp4* gene, a pair of another primers was used in cloning and obtained major antigen sites. The gene was cloned into the expression plasmid pGEX-6P-1. The recombinant plasmid VP4-pGEX-6P-1 was transformed into *E. coli* BL21(DE<sub>3</sub>) plays and induced with IPTG. Homology of amino acids between CRW-8 strain and BEN-307 strain is 96.98% and 98.05% respectively. The product of the VP4 gene was 26% of total bacterial protein of BL21. Western blot test and neutralization test circumstantiate the protein of expression has biological activity.

**Key Words:** Porcine rotavirus (PRV); *vp4* gene; Major antigen site; Prokaryotic expression

**摘要:** 以猪轮状病毒JL94株核酸为模板扩增该病毒*vp4*全基因, 对扩增产物进行测序及序列比较; 根据VP4的5'端(1bp~750bp)特异片段主要决定其活性的观点, 再设计一对引物扩增该主要抗原位点基因, 将此主要抗原位点基因同pGEX-6P-1载体连接并转化入*E. coli*.BL21(DE<sub>3</sub>)plays, 经IPTG诱导表达出蛋白质; 对表达的蛋白进行Western blot分析、纯化和血清中和抗体试验。结果表明: JL94株与国外分离株CRW-8株、BEN-307株*vp4*全基因片段氨基酸同源性分别为96.98%和98.05%, 说明JL94株与CRW-8株、BEN-307株属于同一VP4血清型; 经IPTG诱导VP4主要抗原位点基因获得了高效表达, 表达量占菌体蛋白的26%; Western blot结果和所表达的融合蛋白免疫小鼠产生的中和抗体能阻断JL94在MA104细胞上引起的细胞病变, 说明所表达蛋白有良好的生物学活性。

**关键词:** 猪轮状病毒; *vp4* 基因; VP4 主要抗原位点基因; 原核表达;

**中图分类号:** S852.65

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1003-5125(2004)05-0462-05

猪轮状病毒(Porcine rotavirus, PRV)属于呼肠病毒科轮状病毒属, 是引起仔猪病毒性腹泻的主要病原之一。病毒粒子呈球形, 无囊膜, 完整的粒子有双层衣壳, 芯髓含有病毒转录酶和一条由11个节段双股RNA组成的基因组, 每一节段分别编码一种蛋白。由基因片段4编码的VP4外衣壳蛋白是PRV重要的型抗原, 据此可将轮状病毒分为21个P型(P<sub>1</sub>~P<sub>21</sub>)<sup>[1]</sup>。VP4蛋白有极其重要的生物学功能, 经胰蛋白酶处理后裂解为VP8和VP5, 其中VP8能吸附宿主细胞, VP5参与病毒穿入宿主细胞<sup>[2]</sup>。

VP4 还是一种重要的中和抗原, 能够刺激机体产生中和抗体。

本研究以 RT-PCR 技术在我国首次克隆了 PRV-VP4 全基因序列; 完成 *vp4* 基因的主要抗原位点重组表达载体构建并获得了高效表达, 并对所表达的 VP4 蛋白功能作了初步的研究。研究 *vp4* 基因片段有利于掌握轮状病毒的抗原变异、确定病毒毒力的相关基因位点及其 VP4 蛋白的致病机理。

## 1 材料和方法

收稿日期: 2004-02-23, 修回日期: 2004-03-24

\* 基金项目: 黑龙江省十五攻关课题(GC01B510)

作者简介: 宋岩(1976-), 男, 主治医师, 博士生, 研究方向分子病毒学。Tel: 0451551 91410, E-mail: yansong1976@hotmail.com;

\*\* 通讯作者。Corresponding authou. Tel: 045155190385, E-mail: yijingli@yahoo.com

### 1.1 实验材料

PRV/JL94 株系本实验室分离保存的强毒株。MA104 细胞是恒河猴胚肾细胞,购自武汉大学中国典型培养物保藏中心。pMD-18T 载体、*E.coli*TG1 感受态菌和 BL21(DE3) plays 感受态菌购自大连宝生物公司。反转录酶、Taq 酶、T4-DNA 连接酶等购自 Promega 公司。限制性内切酶、胶回收试剂盒等购自上海华舜生物公司。JL94 病毒株的兔高免血清由本实验室制备。辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 购自北京中山生物公司。

### 1.2 引物设计

根据已发表的 PRV *vp4* 全基因序列和 VP4 主要抗原位点分析,设计合成两对引物。第一对命名为 S1 和 S2;第二对命名为 S3 和 S4。引物序列如下: S1: CGGGGATCCGGCTATAAAATGGCTTC; S2: CGGGTCGACCTCAGACACTGCTTA; S3 同 S1; S4: GCGGTCGACTTAAGCTCTTGTGTGCA

### 1.3 PRV 总 RNA 的提取及 cDNA 的合成

用蛋白酶 K、SDS 法提取病毒总 RNA,操作步骤按照分子克隆实验指南(第三版)进行<sup>[3]</sup>。

按 AMV 反转录酶说明书使用下游引物进行反转录合成单链 cDNA。转录体系 20 $\mu$ L,其中:模板 RNA 溶液 1 $\mu$ L, 5 $\times$ Buffer 4 $\mu$ L, dNTP mixture (2.5mmol/L) 4 $\mu$ L, Nase Inhibitor(20U)0.5 $\mu$ L, 下游引物(50pmol/ $\mu$ L) 5 $\mu$ L, AMV Rtase(10U)2 $\mu$ L, 灭菌超纯水 3.5 $\mu$ L。反应后结果-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

### 1.4 JL94 株 *vp4* 全基因 PCR 扩增

扩增体系 50 $\mu$ L,其中:灭菌超纯水 36.5 $\mu$ L,10 $\times$ PCR buffer 5 $\mu$ L, dNTP 4 $\mu$ L, 模板 2 $\mu$ L, 引物 S1 和 S2 (50 pmol/ $\mu$ L)各 1 $\mu$ L, rTaq 酶 0.5 $\mu$ L。反应条件:97 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 94 $^{\circ}$ C 变性 1min, 55 $^{\circ}$ C 退火 1min,72 $^{\circ}$ C 延伸 2min,30 个循环,72 $^{\circ}$ C 终延伸 10min。反应结束用 1%琼脂糖凝胶电泳检测结果,-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

### 1.5 重组质粒的构建

按上海华舜公司胶回收试剂盒操作说明对 PCR 产物进行纯化,纯化后的 PCR 产物与 pMD-18T 载体连接并将连接产物转化入 *E. coli* TG1 感受态菌。挑取菌落培养后提取质粒 DNA 进行酶切鉴定和 PCR 鉴定,筛选重组质粒 VP4-pMD-18T。

### 1.6 重组质粒序列测定及同源性比较

对阳性重组子送上海 Sagon 生物公司进行序列测定。用 DNAMAN 软件将其与 GenBank 中发表的 2 个 PRV 序列进行核苷酸序列及由此推导的氨基

酸序列比较。

### 1.7 JL94-VP4 主要抗原位点基因的扩增

研究资料<sup>[4-6]</sup>表明 PRV-*vp4* 基因 5' 端的 750 个 bp 特异片段主要决定其活性,肖玮等称此区为主要抗原位点基因<sup>[7]</sup>。据此又设计合成一对引物,以测序后的 JL94-VP4 为模板,用引物 S3 和 S4 扩增该主要抗原位点集中区 1bp~756bp。扩增体系 50 $\mu$ L,其中:灭菌超纯水 36.5 $\mu$ L, 10 $\times$ PCR buffer 5 $\mu$ L, dNTP 4 $\mu$ L,模板 2 $\mu$ L, 引物 S3 和 S4(50pmol/ $\mu$ L)各 1 $\mu$ L, rTaq 酶 0.5 $\mu$ L。反应条件:97 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 94 $^{\circ}$ C 变性 1min, 55.5 $^{\circ}$ C 退火 1min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1min, 28 个循环,72 $^{\circ}$ C 终延伸 10min。反应结束用 1%琼脂糖凝胶电泳检测结果,-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

### 1.8 重组质粒 JL94-VP4-pGEX-6P-1 构建

按上海华舜公司胶回收试剂盒操作说明对 PCR 产物进行纯化,而后分别对纯化后的 PCR 产物和表达载体 pGEX-6P-1 质粒进行 BamH I、Sal I 双酶切和回收,经连接后转化入 TG1 感受态菌。挑取菌落培养后提质粒 DNA 进行酶切鉴定和 PCR 鉴定,筛选阳性重组质粒 VP4-pGEX-6P-1。

### 1.9 *vp4* 基因在大肠杆菌中的表达

将重组质粒 JL94-VP4-pGEX-6P-1 转化入 *E. coli* BL21(DE3)plays 感受态菌,挑取含有重组质粒的阳性菌落接种于 Amp<sup>+</sup> LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C 培养过夜的重组菌按 1/10 的量转接于 Amp<sup>+</sup> LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C 培养待 OD 值达 0.5,加入 IPTG 使终浓度为 1mol/L,以后每隔 1h 收集 3mL 菌液并测 OD<sub>600</sub> 直至 4h,4h 后 OD 值不再升高。将经 IPTG 诱导前和诱导后 1h、2h、3h、4h 的菌液离心,PBS 重悬后加入等体积 2 $\times$ SDS 凝胶加样缓冲液,煮沸 5min 用于 SDS-PAGE 电泳上样,按照分子克隆实验指南<sup>[3]</sup>方法进行 SDS-PAGE 电泳,浓缩胶 5%,分离胶 12%,恒压 120V,考马斯亮蓝 R250 染色。以上过程均以含有 pGEX-6p-1 质粒的 BL21(DE<sub>3</sub>)plays 菌相同实验方法作为对照。

### 1.10 *vp4* 基因在大肠杆菌中的表达产物的纯化

操作步骤按照分子克隆实验指南(第三版)<sup>[3]</sup>谷胱甘肽琼脂糖亲和层析纯化融合蛋白进行。并用紫外分光光度计测定纯化的蛋白浓度。

### 1.11 纯化后融合蛋白的 Western bolt 检测

具体操作参照分子克隆实验指南<sup>[3]</sup>方法进行,半干转印仪 50mA 转印 30min;37 $^{\circ}$ C 脱脂乳封闭 2h;500 倍稀释的 JL94 兔高免血清室温吸附 30min;洗涤后 1000 倍稀释的羊抗兔 IgG 室温作用 30min。

### 1.12 免疫血清的中和试验

纯化的 VP4 融合蛋白与弗氏完全佐剂混合,肌肉注射免疫小鼠。共 4 次,10d/次。最后一次免疫后 10d,测定血清抗 VP4 中和抗体。血清经 56℃ 30min 灭活后,作连续倍比稀释,PRV/JL94(病毒剂量 100 TCID<sub>50</sub>/0.1mL)用 30μg/mL 胰酶 37℃ 处理 1h,0.1mL 的经胰酶作用的病毒与中和抗体血清等量混合 37℃ 吸附 2h 后,加入到 MA104 单层细胞中(10000 个细胞/μL),37℃ 5%CO<sub>2</sub> 培养箱培养 5d,观察结果,50% CPE 判定结果。同样条件下以未经血清中和的 PRV/JL94 侵袭 MA104 细胞为对照。

## 2 结果

### 2.1 RT-PCR 方法扩增 VP4 全基因片段结果

用 RT-PCR 的方法,以逆转录合成的 PRV/JL94 病毒株 cDNA 为模板,用引物 S1 和 S2 扩增出一个 2.3kb 的目的片段(图 1-5 泳道)。

### 2.2 阳性重组质粒 VP4-pMD18-T 的酶切鉴定及 PCR 鉴定结果

根据 PRV *vp4* 全基因参考序列的酶切位点分析,用 *Bam*H I 和 *Sal* I 分别进行单酶切鉴定,单纯的线性载体大小约为 5.0kb(其中 pMD-18T 载体 2.69kb,目的片段 2.3kb);用 *Bam*H I 和 *Sal* I 进行双酶切鉴定,得到约 2.6kb 和 2.3kb 的两条带。经 PCR 扩增有约 2.3kb 的特异带产生,与预期的结果一致,结果见图 1。

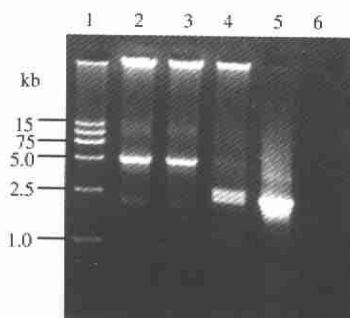


图 1 阳性重组子 VP4-pMD18-T 的酶切及 PCR 鉴定

Fig.1 Electrophoresis of recombinant plasmid pMD18-T-VP4 digested with restriction enzyme and PCR identification lane1, DNA marker DL15000; 2, pMD-18T-VP4/*Bam*H I; 3, pMD-18T-VP4/*Sal* I; 4, pMD-18T-VP4/*Bam*H I+*Sal* I; 5, PCR product; 6, PCR negative product.

### 2.3 *vp4* 全基因序列测定结果及同源性比较

PRV/JL94 株 *vp4* 全基因片段测序结果已登录 GenBank (AY523636)。测序结果表明 JL94-*vp4* 基因全长 2362bp,含有一个完整的开放阅读框架,编码 776 个氨基酸。与国外分离株 CRW-8 株、

BEN-307 株 *vp4* 核苷酸序列比较,同源性都为 96.98%。由核苷酸测序结果推导 VP4 氨基酸序列并同上述两个病毒株比较,同源性都为 98.01%。

### 2.4 扩增 JL94-VP4 主要抗原位点基因序列结果

以经测序的 PRV-VP4 全基因序列为模板,用引物 S3 和 S4 扩增出一个 756bp 的目的片段,结果见图 2 所示。

### 2.5 重组质粒 VP4-pGEX-6P-1 的酶切鉴定及 PCR 鉴定结果

根据 PRV/JL94-VP4 测序结果的酶切位点分析,用 *Bam*H I 和 *Sal* I 分别进行单酶切鉴定,得到约为 5.6kb 片段(其中 pGEX-6P-1 载体 4.9kb;目的片段 756bp);用 *Bam*H I 和 *Sal* I 进行双酶切鉴定,得到约 4.9kb 和 750bp 的两条带。经 PCR 扩增有 756bp 的特异带产生,与预期的结果一致,结果见图 2 所示。

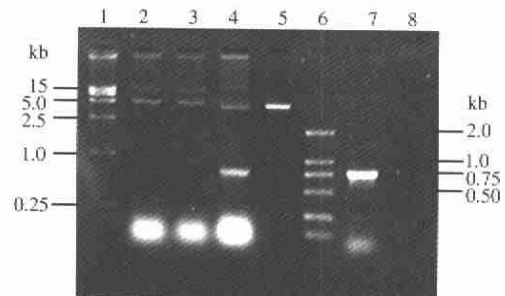


图 2 阳性重组子 VP4-pGEX-6P-1 酶切及 PCR 鉴定

Fig.2 Electrophoresis of recombinant plasmid VP4-pGEX-6P-1 digested with restriction enzyme and PCR identification lane1, DNA marker DL15000; 2, VP4-pGEX-6P-1/*Bam*H I; 3, VP4-pGEX-6P-1/*Sal* I; 4, VP4-pGEX-6P-1/*Bam*H I+*Sal* I; 5, pGEX-6P-1/*Bam*H I; 6, DNA marker DL2000; 7, PCR product; 8, PCR negative product.

### 2.6 JL94 株 *vp4* 基因在大肠杆菌中表达产物的 SDS-PAGE 结果

SDS-PAGE 结果表明, IPTG 诱导后重组菌在 50kDa 左右出现特异的蛋白带,与预期大小相符,并且在 3h 和 4h 时表达量相同,而对照菌在相应位置上无此条带,结果见图 3 所示。

### 2.7 纯化后融合蛋白的 Western bolt 结果

在 50kDa 有特异性极强的条带,说明表达的融合蛋白均有良好的抗原反应性,结果见图 4 所示。

### 2.8 免疫血清的中和试验结果

经免疫血清中和的 PRV/JL94 未引起 MA104 细胞病变(Cytopathic effect, CPE),细胞形态规则、贴壁生长牢靠,结果见图 5 A 所示;而未经血清中和的 PRV/JL94 侵袭 MA104 细胞,48h 后出现明显的 CPE,细胞发生圆缩融合,继而大量脱落、死亡,结果见图 5 B 所示。表明 VP4 蛋白免疫血清有效地

中和了病毒, 产生对 MA104 细胞的保护效果。

在 aa248~aa776。

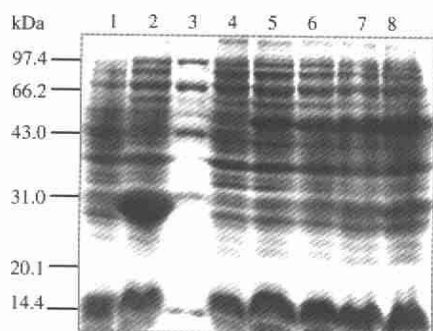


图3 表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of expression protein

1, pGEX-6P-1; 2, pGEX-6P-1 induced with IPTG; 3, Molecular weight marker(kDa); 4, pGEX-6P-1-VP4; 5/6/7/8, pGEX-6P-1-VP4 induced with IPTG after 1h, 2h, 3h, 4h.

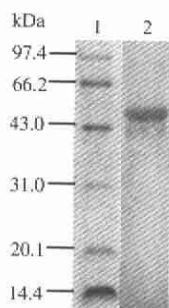


图4 纯化后 GST-VP4 融合蛋白的检测

Fig. 4 Western blot analysis of purified GST-VP4

1, Molecular weight marker; 2, Purified GST-VP4 fusion protein.

### 3 讨论

本研究以 PRV/JL94 中国分离株 RNA 为模板, 通过 RT-PCR 技术扩增出约 2.3kb 的基因片段, 将其与 pMD18-T 载体连接, 构建重组质粒 VP4-pMD18-T, 对扩增的 *vp4* 全基因进行序列测定, 结果表明 JL94-*vp4* 基因全长 2362bp, 含有一个完整的开放阅读框架, 编码 776 个氨基酸。JL94 *vp4* 全基因序列与国外毒株 CRW-8 株、BEN-307 株的核苷酸及由此推导出的氨基酸序列同源性比较结果表明, JL94 株同此二毒株高度同源, 同源性达 98.01%。Gorziglia 认为, 轮状病毒两个毒株之间的 VP4 氨基酸同源性在 89% 以上认为是同一 VP4 型别<sup>[8]</sup>, 说明 JL94 株与 CRW-8 株、BEN-307 属于同一 VP4 血清型。Serneno 等进行的扫描电镜观察发现, VP4 以二聚体形式存在<sup>[9]</sup>, 在 aa241 或 aa247 处经胰蛋白酶作用可裂解为两条长度不等的肽段 VP8 和 VP5。我们认为 PRV/JL94 可分为 3 部分: VP8 在 aa1~aa240; 胰酶作用区在 aa241~aa247; VP5

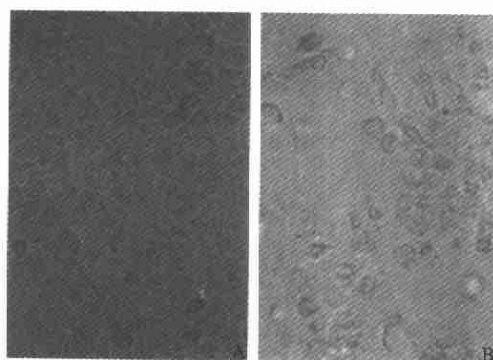


图5 GST-VP4 融合蛋白免疫血清的中和试验

Fig. 5 Neutralization test of immune serum of GST-VP4

A, MA104 cell without CPE( $\times 150$ ); B, CPE on MA104 cell monolayer after inoculation with JL94.

经研究发现 VP4 在 aa308-aa310 处含有一个完整的标记链 Asp-Gly-Glu, 根据该序列产生的多肽能封闭轮状病毒的感染性<sup>[2]</sup>。PRV/JL94 的测序研究表明 Asp-Gly-Glu 标记链结构位于 aa311-aa313, 考虑这可能是毒株不同的结果。Ruggeri 认为, VP5 有 3 个位点决定重要抗原决定簇。抗原决定簇 I 为线性决定簇, 位于 aa392; VP5 抗原决定簇 II 为构象性决定簇, 位于 aa439; 抗原决定簇 III 位于 aa434<sup>[2]</sup>。JL94-VP5 在 aa392 是 Leu; aa439 是 Ser; aa434 是 Thr, 我们未对上述氨基酸定点突变以观察病毒毒力的变化情况, 有待进一步研究。

已知 A 组轮状病毒感染引起婴幼儿和多种幼龄动物严重的暴发性腹泻, 但某些毒株的轮状病毒不能引起明显的临床症状, Hoshino Y 研究证实这种现象同 VP7 血清型无关<sup>[10]</sup>。RNA 杂交结果显示各株无症状病毒之间 *vp4* 基因片段明显保守, 进一步研究发现这些无症状病毒各株之间的血清型特异片段 VP8、胰酶区和 VP5 的 N 端(1bp~750bp) 推导的氨基酸同源性在 96% 以上, 而这些无症状毒株同引起明显临床症状的病毒的该片段同源性只有 68%~72%<sup>[11]</sup>。由此可见, 临床症状严重与否同此区域的基因组成和结构直接相关, 肖玮等称此区为主要抗原位点基因<sup>[7]</sup>。因此我们扩增了 VP4 的主要抗原位点 1bp~756bp 区域, 此区包括了全部的 VP8 区、胰酶区和部分 VP5 的 N 端。

构建的重组质粒 VP4-pGEX-6P-1 转化入 BL21(DE3)感受态菌, 经 IPTG 诱导获得了高效表达, 光密度扫描证实表达产物占菌体总蛋白的 26%, 且 1h、2h、3h 表达量逐渐增加, 但 3h 后不再增加, 这与钱渊等认为 2.5h~3h 表达量最高相一

致<sup>[12]</sup>。经 Western blot 分析, 获得表达的 VP4 蛋白有良好的生物学活性。实验中所表达的 VP4 主要抗原位点蛋白免疫小鼠后, 产生中和抗体, 该抗体能灭活 JL94 病毒在 MA104 细胞中产生的 CPE, 中和效价为 1 : 10240。

VP4 和 VP7 作为轮状病毒的中和性抗原均可诱导保护性免疫反应, 如果血清型别不同, 其所诱导产生的抗体免疫活性就存在差异, 而 VP4 的一个血清型别涉及几个 VP7 血清型<sup>[11,12]</sup>, 因此对不同的血清型别的 VP4 特异基因片段进行研究, 对研究我国轮状病毒的抗原变异、病毒毒力的相关基因位点及其 VP4 蛋白的致病机理研究更有实践意义和理论意义。

### 参考文献

- [1] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 第二版, 北京: 科学出版社, 1997. 562-570.
- [2] 苏琦华. 轮状病毒蛋白质的作用[J]. 天津医科大学学报, 2001, 7(2): 299-300.
- [3] J 萨姆布鲁克, D W 拉塞尔, 黄培堂. 分子克隆实验指南[M]. 第三版, 北京: 科学出版社, 2002, 518-528, 1245-1249
- [4] Estes M K, Cohen J. Sequence analysis of the serotype specific gene fragment of VP4[J]. Microbiol Rev, 1989, 53(2): 410-449.
- [5] Larralde G, Li B, Kapikian A Z, *et al.* Identification of group A rotaviruss gene 4 types[J]. Virology, 1991, 65(2): 3213-3218.
- [6] Gorziglia M, Hoshino Y, Buckler-white A, *et al.* Relative frequency of VP4 gene alleles among human rotaviruses recovered over a 10 year period from Japanese children with diarrhea[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 83(2): 7039-7043.
- [7] 肖玮, 钱渊. 人 A 组轮状病毒北京地方株 VP4 血清型特异性片段的序列分析[J]. 微生物学报, 1998, 38(2): 196-203.
- [8] Gorziglia M, Larralde G, Kapikian A Z, *et al.* Identification of group A rotaviruss gene 4 types by polymerase chain reaction [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 87(2): 7155-7159.
- [9] Sereno M M, Gorziglia M I. The outer capsid protein VP4 of murine rotavirus Eb represents a new P type. Virol.1994. 199(2): 500-504
- [10] Hoshino Y, Wyatt R G, Scott F M *et al.* Isolation and characterization of a canine rotavirus[J]. 1982, 72(1-2):113-125.
- [11] Larralde G, Gorziglia M. Distribution of conserved and specific epitopes on the VP8 subunit of rotavirus VP4[J]. Virol, 1992, 66(2): 7438- 7443.
- [12] 霍云雯, 钱渊, 李国华, 等. 轮状病毒北京地方株 VP4 基因的序列分析和原核系统的初步表达[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2000, 20, (1):26-27.