

马动脉炎病毒核蛋白基因的克隆与表达*

杜建^{1,3}, 王志亮¹, 赵永刚¹, 宋厚辉⁴, 金宁一⁵, 张念祖^{2**}

(1. 农业部动物检疫所国家外来动物疫病诊断中心, 山东青岛 266032; 2. 农业部热带亚热带动物病毒学重点实验室, 云南昆明 650224; 3. 昆明市畜牧兽医站, 云南昆明 650223; 4. 中国科学院微生物研究所, 北京 100088; 5. 解放军军需大学病毒基因工程重点实验室, 吉林长春 130062)

Cloning and Expression of Nucleocapsid Protein Gene of

Equine Arteritis Virus in *E. coli*

DU Jian^{1,3}, WANG Zhi-liang¹, ZHAO Yong-gang¹, SONG Hou-hui⁴, JIN Ning-yi⁵, ZHANG Nian-zu^{2**}

(1. National Diagnosis Center for Exotic Animal Disease, Animal Quarantine Institute, MOA, Qingdao, Shandong 266032 China; 2. Key Laboratory of tropical and subtropical Animal Virology, Kunming, Yunnan 650224 China; 3. Kunming Animal Husbandry and Veterinary Station, Kunming, Yunnan 650223 China; 4. Microbiology Institute of Chinese Science Academy, Beijing 100088, China; 5. Key Laboratory of virus gene engineering, Quartermaster University of PLA, Changchun, Jilin 130062, China)

Abstract: The gene of nucleocapsid protein of *Equine arteritis virus* was amplified from *PMD-18-T* plasmid with equine arteritis virus *ORF7* sequence by PCR. The PCR product was sequenced as well as purified and digested with *EcoR* I and *Xho* I, then directly cloned into the prokaryotic vector *pET32a*. Consequently the recombinant plasmid was constructed, designateds *pET32αN*. *PET32αN* was transformed into the host cell BL21 (*DE3*) and the expression procedure was optimized including cultivated temperature, optional induction concentration and time of IPTG. The result indicated that the nucleocapsid protein can be expressed efficiently with 0.8mmol/L IPTG and 4 hour induction. The resulting *Trx-N* recombinant fusion protein was identified to be consisted of 34 kDa protein by *SDS-PAGE* and western blotting analysis. It indicated that the recombinant fusion protein could be used as antigen of diagnostic assay for detecting antibodies.

Key words: *Equine arteritis virus*; Nucleocapsid protein; Cloning; Expression

关键词: 马动脉炎病毒; 核衣壳蛋白; 表达; 纯化

中图分类号: S852.65 文献标识码: A 文章编号: 1003-5125(2005)03-0323-03

马病毒性动脉炎是危害世界养马业的重要传染病之一,是由动脉炎病毒科动脉炎病毒属的马动脉炎病毒(*Equine arteritis virus*, EAV)引起的一种以病马发热,步态僵直,躯干及眼周围水肿,并出现粘液脓性鼻炎、结膜炎,外生殖道水肿为特征的传染病,对妊马能引起流产,使易感怀孕母马的流产率达 90%以上^[1,8]。我国目前尚未有本病发生的报道,梁成珠等曾应用中和试验、血凝试验的方法进行过进出口马匹的抗体检测和检测^[9,10]。该病传统的血

清学诊断方法有补体结合、间接免疫荧光、血凝及血凝抑制、琼脂扩散、微量血清中和试验和 ELISA 等^[1]。目前国外不仅有基于 PCR 的诊断技术,同时还以重组结构蛋白为诊断抗原的研究较多。研究表明,该病毒的核蛋白基因编码的核衣壳蛋白具有良好的免疫原性和反应原性,这为本病的诊断提供了分子生物学及免疫学依据^[3-7]。

本实验将病毒的核蛋白基因克隆于高效原核表达载体 *pET32a* 中,并进行了诱导表达,结果表明:

收稿日期:2004-10-22,修回日期:2004-12-13

* 基金项目:农业部诊断技术标准和农业部热带亚热带动物病毒学重点实验室开放基金(200205)

作者简介:杜建(1969-),男,四川省籍,助理研究员,博士研究生,主要从事分子病毒学的研究,目前在昆明市畜牧兽医站工作。

Email: djglkmvet@yahoo.com.cn

** 通讯作者:张念祖(1937-),男,研究员,主要从事动物病毒学、免疫学与微生物学的研究。

Corresponding Author. Tel.: 0871-5019110, E-mail: nzz918@vip.sina.com.cn

核蛋白以硫氧还蛋白融合蛋白的形式在大肠杆菌中高效表达,菌体超声破碎后,融合蛋白以可溶的形式存在与上清中,因而避免了纯化时对重组蛋白的变性、复性等复杂操作,适于放大生产。通过 Co^{2+} 亲和层析树脂可得到较纯的目的蛋白,该蛋白能与阳性血清发生反应,说明具有生物学活性,本研究为此病新型诊断方法的建立创造了条件。

1 材料与方法

1.1 实验材料

EA V 及其 RK-13 传代细胞,由农业部热带亚热带动物病毒学重点实验室保存。PMD18 T-ORF7 质粒由作者自建。pET32a 和菌株 DH5、BL21 (DE3) 由农业部动物检疫所国家外来动物疫病诊断中心保存。清洁级 4~6 周龄的 Wistar 大鼠,购自青岛药品检验所实验动物中心。其他分子生物试剂均购自大连宝生物 (TaKaRa) 公司。参照 GenBank 公布的病毒核苷酸序列,设计并合成一对特异引物,在上、下游引物 5 端分别加有 *EcoR* I、*Xho* I 的酶切位点(引物下划线处),引物序列为:

上游引物 P1: 5'-TGGAATTCGCCGCCACC ATGGCGTCAA GACGATCACG-3' *EcoR* I

下游引物 P2: 5'-GCCACTCGAGCCACAC AGGAGAA TA TCCACGTCTTAC-3' *Xho* I

1.2 病毒扩增纯化及高免血清制备

参照文献^[3]的方法制备。

1.3 模板的制备和 N 基因扩增

按小量碱裂解法提取 PMD18 T-ORF7 质粒,以 1:100 稀释液为模板,建立 50 μL /管 PCR 反应体系:模板 1 μL , 200 μmol dNTP 1 μL , 2mmol/L MgCl_2 3 μL , 10 \times PCR Buffer 5 μL , 20 μmol 上下游引物各 1 μL , 超纯水 37 μL , 2.5U taq DNA 聚合酶 1 μL 。PCR 反应程序为:94 预变性 3min, 94 变性 1min, 55 退火 1min, 72 延伸 1min, 共 30 个循环,最后 72 延伸 5min。1%琼脂糖凝胶电泳检查 PCR 产物。

1.4 重组表达载体的构建与序列确认

参照文献^[2]方法进行,将 PCR 和双酶切筛选鉴定为阳性重组子的菌液送上海生工生物工程有限公司测序,检查 N 基因读框和序列的正确性。

1.5 细菌的诱导表达及 SDS-PAGE 分析

挑取测序正确的菌液进行诱导。在菌液对数生长期($OD_{600} = 0.6 \sim 0.8$),加入诱导剂 IPTG,使终浓度为 0.8~1mmol,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 诱导培养 3~4h (250rpm)。诱导的菌体超声波冰浴破碎后取

100 μL 加入 2 \times SDS 上样缓冲液,煮沸 5min,用 12%聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分析。按 Co^{2+} 树脂纯化蛋白说明书的操作步骤,纯化目的蛋白。

1.6 表达产物的 Western-blotting 实验

参照文献^[6]的方法进行。

2 结果与讨论

2.1 重组表达载体的构建和鉴定

阳性重组子 pET32 α N 经 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切出现 5.0 kb 和 350bp 2 条带,且测序结果表明 N 基因未发生突变,读码框完全正确(图 1 为双酶切图,测序结果略)。

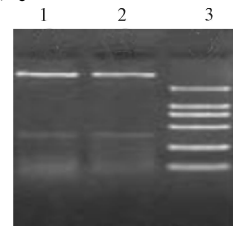


图 1 重组质粒 pET32 α N 的双酶切鉴定

Fig. 1 Identification of recombinant plasmid pET32 α N 1/2, Recombinant plasmid pET32 α N digested by *EcoR* I and *Xho* I; 3, DNA molecular weight marker, DL2 000.

2.2 表达的目的蛋白的分析

pET32 α N 转化菌经 IPTG 诱导后,在 34kDa 处出现 1 条特异性蛋白条带,与预期的融合蛋白大小一致。薄层扫描结果表明,重组 N 蛋白表达量最高可占菌体总蛋白的 50% (图 2A)。经 Co^{2+} 树脂纯化可见清晰的目的条带(图 2B,在目的条带下的淡条带为菌体杂蛋白)。用大鼠抗马动脉炎病毒的抗体进行 Western-blotting 检测,在 34kDa 处左右出现单一反应条带(图 2C),证明重组 N 蛋白具有良好的特异性和反应原性。结果见图 2。

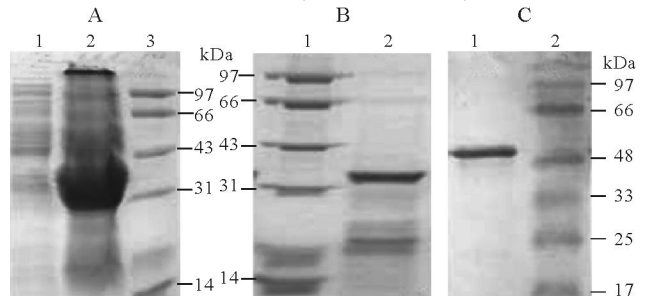


图 2 融合蛋白表达产物的 SDS-PAGE (A、B) 和 Western-blotting (C) 结果

Fig. 2 SDS-PAGE (A, B) and Western-blotting (C) analysis of pET32 α -N fusion protein

A: 1, pET32 α N recombinant plasmid without IPTG inducing; 2, pET32 α N fusion protein by IPTG induced; 3, Protein marker. B: 1, Protein marker; 2, pET32 α N fusion protein Co^{2+} resin purified by IPTG induced. C: 2, Prestained Protein marker; 1, 34kDa showed protein band.

马动脉炎病毒核蛋白 N 是具有免疫原性的结构蛋白之一, Kheyar A 等(1997) 曾用原核表达载体 (*pMAL-C2*) 表达了该病毒的结构蛋白 M 和 N, 建立了免疫斑点试验方法, 并认为重组 N、M 蛋白可用于 EAV 感染动物的血清检测^[7]。Hedges JF 等(1998) 用重组杆状病毒表达了 EAV 的三个主要结构蛋白 GL、M 和 N, 同样建立了间接 ELISA 方法^[9]。他们的研究证明采用人工表达的病毒结构蛋白作为非病毒的诊断抗原是可行的。本研究选用原核高效表达载体 *PET32a*, 成功地获得了马动脉炎病毒 N 蛋白在大肠杆菌中的高效表达, 菌体沉淀经超声波破碎后, 溶液上清含较多的目的蛋白, 这就为其后的纯化工作提供了极大的便利。Western-blotting 检测结果表明, 重组融合 N 蛋白具有良好的反应原性, 有望用做重组诊断抗原。本研究为最终建立基于基因工程的诊断技术奠定了基础。

参考文献

- [1] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 第2版, 北京: 科学出版社, 1997.
- [2] J 萨姆布鲁克, E F 弗里奇, T 曼尼阿蒂期(金冬雁, 黎孟枫, 译). 分子克隆实验指南[M]. 第2版, 北京: 科学出版社, 1997.
- [3] Chirnside E D, Francis P M, Mumford J A. Expression cloning and antigenic analysis of the nucleocapsid protein of equine arteritis virus. [J]. *Virus Res*, 1995, 39:277-288.
- [4] Kheyar A, Martin S, St-Laurent G, et al. Expression cloning and humoral immune response to the nucleocapsid and membrane proteins of equine arteritis virus. [J]. *Clin Diagn Lab Immunol*, 1997, 4:648-652.
- [5] MacLachlan N J, Balasuriya U B, Hedges J F, et al. Serologic response of horses to the structural proteins of equine arteritis virus. [J]. *J Vet Diagn Invest*, 1998, 10:229-236.
- [6] Hedges J F, Balasuriya U B, Ahmad S, et al. Detection of antibodies to equine arteritis virus by enzyme linked immunosorbent assays utilizing G(L), M and N proteins expressed from recombinant baculoviruses. [J]. *J Virol Methods*, 1998, 76:127-137.
- [7] Starik E, Gnter A, Coppe P. ELISA and direct immunofluorescence test to detect equine arteritis virus (EAV) using a monoclonal antibody directed to the EAV-N protein. [J]. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 2001, 48:1-9.
- [8] Balasuriya U B, Hedges J F, MacLachlan N J. Molecular epidemiology and evolution of equine arteritis virus. [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2001, 494:19-24.
- [9] 梁成珠, 陈忠国, 孟广校, 等. 马病毒性动脉炎血清微量中和试验的研究及应用 [J]. *中国兽医科技*, 1996, 26 (9):13-15.
- [10] 朱来华, 梁成珠, 黄从平, 等. 马动脉炎病毒的血凝性研究 [J]. *中国兽医科技*, 2001, 31(7):3-5.