

MDV-1 VP22 羧基端在大肠杆菌中高效可溶性表达*

陈鸿军, 宋翠萍, 秦爱建**, 刘岳龙, 金文杰

(扬州大学 江苏省动物预防医学重点实验室, 江苏扬州 225009)

Highly Soluble Expression of Carboxyl Terminus of Marek's

Disease Virus VP22 in *E. coli*

CHEN Hong-jun, SONG Cui-ping, QIN Ai-jian**, LIU Yue-long and JIN Wen-jie

(Key Lab of Jiangsu Preventive Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou, 225009, China)

Abstract : Viral protein VP22 is indispensable for the growth and replication of *Marek's disease virus* serotype 1(MDV-1). In this study, *vp22* gene was amplified from an avirulent CVI988/Rispens strain. Antibodies specific to the carboxyl terminus of VP22 expressed in *E. coli* were generated by immunizing Balb/C mice 3 times. The antibodies reacted with the complete VP22 expressed in Chick Embryo Fibroblast (CEF) cells infected with CVI988 virus. It is interesting that the VP22 protein could be found in normal CEF cells around MDV plaques. The results suggested that VP22 may be transported among cells in MDV infection, which is vital to the studies on functions of VP22.

Key words : *Marek's disease virus* (MDV), CVI988/Rispens strain, VP22, *E. coli*, protein transduction

摘要 : VP22 是血清 I 型马立克氏病病毒 (MDV-1) 的复制和传播必不可少的组分。本研究从 MDV-1 无致病性的 CVI988/Rispens 疫苗感染的鸡胚成纤维细胞 DNA 中扩增得到 VP22 基因, 并在大肠杆菌中表达其 C 端功能区。SDS-PAGE 电泳发现, VP22 C 端得到高效可溶性表达, 大小为 42kDa 左右。将获得的阳性条带经切胶免疫和细菌超声波裂解的上清作为抗原免疫 6 周龄 Balb/C 小鼠, 均能诱导产生特异性抗 VP22 C 端抗体。通过免疫荧光试验, 检测到 VP22 在感染 MDV CEF 所有细胞核中呈特异性表达。这一抗体对深入研究 VP22 蛋白转导功能起到重要的作用。

关键词 : 马立克氏病病毒; CVI988/Rispens 株; VP22; 大肠杆菌; 蛋白转导

中图分类号: S831.7

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2006)02-0169-04

血清 I 型马立克氏病病毒 (*Marek's disease virus* serotype 1, MDV-1) 的 *UL49h* 基因, 与 I 型单纯疱疹病毒 (*Herpes Simplex Virus* serotype 1, HSV-1) 的 *UL49* 同源, 编码病毒衣被蛋白 VP22, 分子量约 27.6kD。*vp22* 由 Yanagida 等^[1]从 MDV-1 GA 株的一段长为 8.4kb 的 *BamH* -*EcoR* 片段 DNA 中得到, 是病毒衣被 (在核衣壳和囊膜之间) 的主要成分。在组装的病毒子中, VP22 脱磷酸化; 但在病毒复制时, 磷酸化的 VP22 与核基质结合^[2]。现已证实 VP22 在 MDV-1 的复制和传播中发挥着非常重要的作用, 是必不可少的组分。Dorange 等

^[3,4]发现 MDV-1 VP22 具有与 HSV-1 相似功能的蛋白转导域 (Protein transduction domain, PTD)。随后, Hung 等^[5]构建 MDV-1 VP22 与人 16 型乳头状瘤病毒 (HPV-16) E7 抗原融合表达的 DNA 疫苗。结果发现, E7 的免疫原性增强, 且主要产生 CD8⁺ T 细胞介导的细胞免疫应答。近年来的研究表明, VP22 作为一种便捷的运输工具, 对于弥补 DNA 免疫缺陷和提高治疗性物质的转导效率具有重要的意义。

本研究利用 MDV-1 无致病性的 CVI988/Rispens 疫苗株作为对象, 扩增 *UL49h* 基因及不同的基因片

收稿日期: 2005-09-23, 修回日期: 2005-11-02

* 基金项目: 国家自然科学基金 (30371070)

作者简介: 陈鸿军(1979-), 男, 江苏南京籍, 博士研究生。主要从事 MDV 研究。

** 通讯作者. Corresponding author. Tel: 0514-7979224, E-mail: aijian@yzu.edu.cn

段,所以获得的基因均尝试在大肠杆菌进行原核表达,结果发现,只有 VP22 羧基端能够得到高效可溶性表达。以此表达产物作为可溶性抗原,并同时采用切胶免疫的方式,免疫 Balb/c 小鼠,经一定的免疫期后,均能够刺激机体产生针对 VP22 的特异性抗体。这一抗体可以用于检测 MDV 病毒感染时完整 VP22 的表达,为深入研究 VP22 功能奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

CVI988/Rispens 株属于血清 1 型 MDV 弱毒株,由本实验室保存; *E. coli* BL21 (DE3) 工程菌购于美国 Promega 公司。COS-1 为本实验室保存; pGEX-gp90 菌,为本室构建和原核高效表达禽网状内皮细胞组织增生征病毒 (REV) gp90 蛋白的重组菌;原代和次代细胞鸡胚成纤维细胞 (CEF) 均按常规方法制备。

T4 连接酶购于美国 Promega 公司, pGEX-6P-1 载体购于 Clontech 公司;凝胶回收 DNA 试剂盒购于德国 QIAGEN 公司; 1kb DNA Ladder Marker、Taq 酶、dNTP 及 *Bam*H、*Eco*R 等限制性核酸内切酶均购自上海生工; IPTG 购自 Sigma 公司。蛋白质标准分子量 Marker 购自上海生化所; FITC 标记的山羊抗鼠 IgG、HRP 酶标兔抗鼠 IgG、绵羊抗鸡 IgY (完全分子) 购自 Sigma 公司。鸡抗 CVI988 病毒和 GST 多抗血清由本实验室自行制备、保存。

1.2 VP22 C 端的 PCR 扩增

vp22 基因已在文献^[6]中获得。针对 GA 的公开序列,设计引物 P_F (5'-GCCGGATCCATGGGG GAT TCTGAA-3')、P_R (5'-GCCGAATTCCTATTCGCTATC ACT-3')、P_C (5'-GTGGATCCATGTTCGCTTTCA GTACG-3')、P_H (5'-CGAGGATCCATGTCTGCATAT GATGAC-3')、P_T (5'-GTG GAT CCA TGA GAC GCG GCCGTGAA-3') 即利用 P_F 和 P_R 扩增全长 732bp,命名为 VP22; 利用 P_T 和 P_R 扩增 VP22 的末端高亲水区,命名为 VP22T,共 120bp; 利用 P_C 和 P_R 扩增 VP22 的羧基端 280~732bp,共 453bp,命名为 VP22C; 利用 P_H 和 P_R 扩增 VP22 的 19-243aa,命名为: VP22H。

为便于克隆,在所有上游引物设计有 *Bam*H 酶切位点,下游引物中引入 *Eco*R 位点。上述所有引物均由上海生工合成。常规 PCR 进行扩增,模板 DNA 为 CVI988 VP22 克隆入 pGEM-T easy 中的

阳性质粒。扩增各种 VP22 片段。反应条件: 95 5min (94 1min 54 1min 72 10min) ×30cycles 72 10min。PCR 产物置 -20 保存。取 5μL PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。上述片段分别插入 pGEX-6P-1 载体中,进行原核表达。

1.3 *vp22C* 基因的原核表达

将通过 PCR 方法扩增的 *vp22C* 直接用 *Bam*H、*Eco*R 双酶切,克隆入 pGEX-6P-1 中,转化 BL21 感受态细胞。阳性菌经测序正确后,以 1:100 比例接种 10mL 2 YT 液体培养基,37 200rpm 摇 3.5hr 后,加 0.5mmol/L IPTG,诱导 6h 后,终止培养,同时设 pGEX-6P-1 空载体菌、pGEX-VP22 诱导菌组,并进行 SDS-PAGE 分析。通过 IPTG 诱导条件的改变来确定 VP22C 最高表达量和对 VP22C 进行可溶性分析,具体方法参照刘岳龙等方法^[9]。

1.4 Western-blot 检测表达

经 SDS-PAGE 分离特异性 GST-VP22C 阳性条带,切胶免疫 6 周龄 Balb/C 小鼠,八免后制备高免血清。利用制备的抗体,对 VP22C 的原核表达产物进行 Western-blot 检测,设立 VP22C 重组菌裂解产物、pGEX 空载体菌裂解产物和 pGEX-gp90 菌裂解产物作为对照。经 SDS-PAGE 分离,0.65mA/cm² 电流转印 NC 膜 2hr,用 5% 脱脂乳封闭过夜, TBST 洗涤后,加入 1:200 稀释的 VP22C 多抗血清,同时用 1:100 稀释的鼠抗 GST 多抗血清为对照,二抗为 HRP 标记的兔抗鼠 IgG (工作浓度 1:10000),以 DAB 显色,蒸馏水终止反应。

1.5 检测 MDV 感染的 CEF

用 CVI988/Rispens 病毒感染传代的 CEF 单层,感染后 48h,用预冷的丙酮:乙醇 (3:2) 4 固定 5min, PBS 洗涤后,吹干待用。用上述 VP22C 多抗血清进行检测。

2 结果

2.1 *vp22 C* 端的 PCR 扩增和原核表达载体的构建

用 1.0% 浓度的琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物,结果成功扩增出 GA 和 CVI988 的 *vp22*、*vp22H*、*vp22T* 和 *vp22C*,测序完全正确 (见图 1)。将这些片段纯化后,分别用 *Bam*H 和 *Eco*R 双酶切,2 倍无水乙醇沉淀,与相同酶切的 pGEX-6P-1 载体 DNA 连接,转化 DH5a,挑取细菌,提取质粒 DNA,相同酶切鉴定出各种含插入片段的重组质粒,分别命名为 pGEX-GVP22、pGEX-CVP22、pGEX-VP22H、pGEX-VP22T 和 pGEX-VP22C。

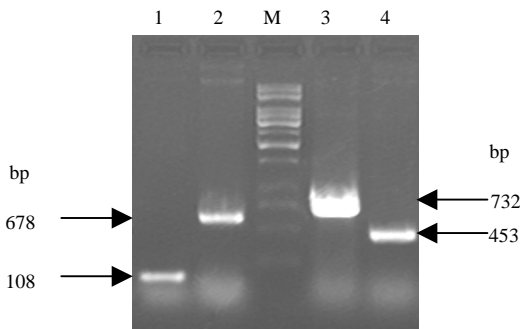
图1 不同片段 *vp22* 的 PCR 扩增结果

Fig.1 PCR products of truncated VP22 fragments

1, *vp22T* ; 2, *vp22H* ; 3, *vp22* (CVI988) ; 4, *vp22C* ; M, DNA Ladder

2.2 VP22C 在大肠杆菌中高效表达

我们经过反复的 SDS-PAGE 电泳条件摸索, 全长的 VP22 均未能获得非常明显和特异的表达。而将 VP22 N 端高度亲水区完全去除后, GST-VP22C 融合蛋白获得了高效表达(图 2), 大小约为 42kD。

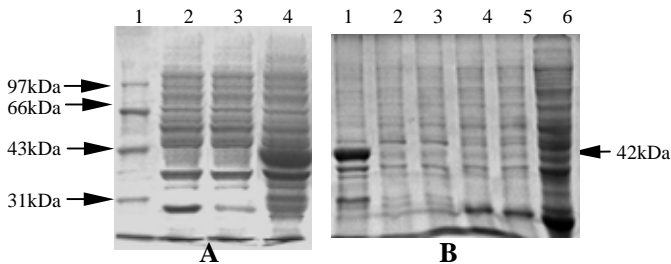


图2 各种重组菌的 SDS-PAGE 电泳图

Fig.2 SDS-PAGE analysis of recombinant bacteria

A: 1, Standard small molecular weight marker; 2, pGEX-6P-1 induction group for control; 3, pGEX-CVP22 induction; 4, pGEX-VP22C induction. B: 1, pGEX-VP22C; 2, pGEX-VP22T1; 3, pGEX-VP22H; 4, pGEX-GVP22; 5, pGEX-CVP22; 6, pGEX-6P-1 for control.

2.3 VP22 C 端原核表达条件的优化

IPTG 经 0.1mmol/L、0.2mmol/L 和 0.5mmol/L 三个工作浓度分别诱导表达 6h, 经超声波裂解, 离心后, 取裂解上清和沉淀, 进行 SDS-PAGE。结果发现: 在不同 IPTG 工作浓度的诱导下, 表达产物均呈高效可溶性表达(图 3)。

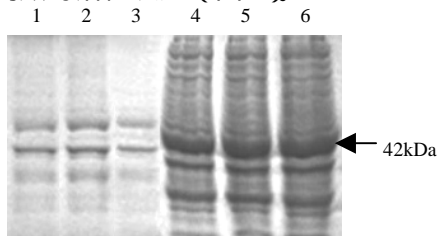


图3 pGEX-VP22C 原核表达产物的可溶性分析

Fig.3 Soluble analysis of expressed GST-VP22C induced by IPTG at various doses

Inclusion bodies (1, 2, 3) and supernatant products (4, 5, 6) of lytic pGEX-VP22C bacteria induced by IPTG at a final concentration of 0.05, 0.1, or 0.5mmol/L, respectively.

2.4 Western-blot 检测 VP22 C 端的原核表达

Western-blot 检测结果显示: 切胶免疫制备的阳性血清和抗 GST 多抗血清均能检测到 42kDa 阳性融合蛋白, 但我们惊奇的发现, 切胶免疫制备的 VP22C 多抗中并没有可以检出的 GST 抗体, 即 pGEX-6P-1 菌的 GST 条带(29kD)和 pGEX-gp90 菌的 GST-gp90 条带处(约 55kDa)均没有出现(图 4)。

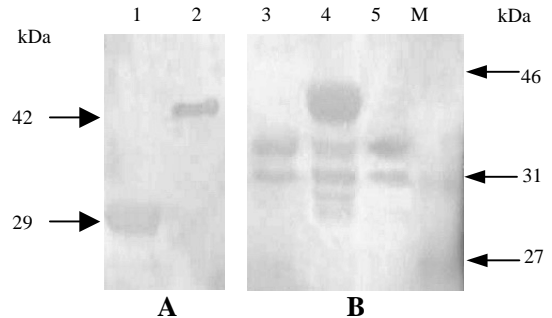


图4 Western-blot 检测原核表达产物

Fig.4 Western-blot analysis of VP22 expression

A: Detection by anti-GST sera, 1, pGEX-6P-1 detected by anti-GST antibody; 2, pGEX-VP22C by anti-GST antibody. B: Detection by anti-VP22C sera, 3, pGEX-gp90 for control; 4, pGEX-VP22C; 5, pGEX-6P-1 for control; M, prestained Marker.

2.5 VP22 C 端阳性血清检测 CVI988 感染的 CEF

用 CVI988 病毒感染正常传代 CEF, 48h 后固定细胞, 多抗血清按 1:200 稀释, 间接免疫荧光反应 (IFA) 检测, 我们发现血清中含有 VP22 特异性抗体, MDV 感染的 CEF 空斑和未形成空斑的周围细胞核内均呈亮绿色荧光(图 5)。

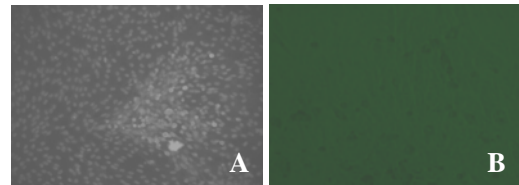


图5 多抗血清检测 CVI988 病毒感染的 CEF

Fig. 5 Detection of CVI988 complete VP22 in CEF.

A : CEF cells were stained with positive antibody above under fluorescence microscope, $\times 10$ fold. The antibody could detect complete VP22 and be focused on plaques. B: The nucleus in all cells had been visualized with the antibodies, perhaps indicating that VP22 could traffic into non-infected CEF cells.

3 讨论

MDV-1 的 VP22 是亲水性很强的碱性蛋白。一般而言, 亲水性强的区域在原核表达过程中是倍受青睐的。作者曾经尝试表达过 GA 株和 CVI988 株的 VP22, 甚至是表达去除 N 端 18aa 的 VP22N 和截取 C 末端 207~243aa 的高亲水性短肽区 VP22T, 但均未获得成功, 反而从第 94aa 处, 即非抗原表位优势的区域开始扩增 C 端, 却得到了高效的表达。

这段区域也是研究蛋白转导域的核心区^[7]。因此,制备的抗体对下一步蛋白转导功能的研究工作至关重要。

本研究利用原核表达系统高效表达了 CVI988/Rispens 病毒 VP22 蛋白的羧基端,并且呈可溶性表达。通过切胶免疫和利用细菌超声波裂解上清免疫的方式,小鼠能产生高滴度针对 VP22 羧基端的特异性抗体。该抗体可用于检测 MDV 感染 CEF 中 VP22 的表达。由图 5 可见:VP22 蛋白不但可以在空斑内聚集,而且在空斑周围呈辐射状定位于单层所有细胞核内,而正常 CEF 仅有些非特异性结合现象。这说明 VP22 的确具有细胞间转导的功能,体内外的很多实验也证实了 VP22 的这种功能,且极可能与 VP22 的羧基端相关(另文)。这与 Dorange 利用 RB-1B 株 VP22 的单抗检测 VP22 在鸡胚皮肤上皮细胞(CESC)种的定位情况相似^[3],也与同源的人 I 型单纯疱疹病毒(HSV-1)VP22 在细胞内的定位相同^[8]。我们曾报道 CVI988/Rispens 株的 VP22 在 C 端缺失 6aa^[6]。而本研究发现:这对 VP22 的细胞间转导影响很小。因此,我们通过原核表达制备的小鼠多抗极大地方便了 VP22 蛋白转导功能、VP22 磷酸化作用及其他功能的深入研究。

通过 Western-blot 方法,利用制备的抗 GST-VP22C 多抗检测重组菌中融合蛋白的表达,然而,我们却发现,将阳性血清按 1:200 稀释时,该多抗并不含有可以检出的 GST 抗体,而相反,VP22C 的反应性很好。我们经过多次重复,当出现非特异条带时,仍然不出现很明显的 GST 条带(图 4A)。然而,利用重组菌裂解上清免疫动物产生的多抗血清,则可以在 Western-blot 中产生抗 GST 抗体(图 4B)。出现这一结果的原因可能与 VP22C 具有蛋白转导的功能有关。在体内,GST-VP22C 融合表达后,VP22C 抗原位点占优势,而 GST 产生的抗体极可能不是针对 Western-blot 反应的。当然这一现象的具体机制尚有待进一步证实。

References

- [1] Yanagida N, Yoshida S, Nazerian K, *et al.* Nucleotide and predicted amino acid sequences of Marek's disease virus homologues of herpes simplex virus major tegument proteins [J]. *J Gen. Virol.* 1993, 74 (9): 1837-1845.
- [2] Elliott G, O'Reilly D, O'Hare P. Phosphorylation of the herpes simplex virus type 1 tegument protein VP22 [J]. *Virology.* 1996, 226 (1): 140-145.
- [3] Dorange F, El Mehdaoui S, *et al.* Marek's disease virus (MDV) homologues of herpes simplex virus type 1 UL49 (VP22) and UL48 (VP16) genes: high-level expression and characterization of MDV-1 VP22 and VP16 [J]. *J Gen Virol.* 2000, 81 (9): 2219-2230.
- [4] Dorange F, Tischer B K, *et al.* Characterization of Marek's disease virus serotype 1 (MDV-1) deletion mutants that lack UL46 to UL49 genes: MDV-1 UL49, encoding VP22, is indispensable for virus growth [J]. *J Virol.* 2002, 76 (4): 1959-1970.
- [5] Hung C F, He L, Juang J, *et al.* Improving DNA vaccine potency by linking Marek's disease virus type 1 VP22 to an antigen [J]. *J Virol.* 2002, 76 (6): 2676-2682.
- [6] Chen H J, Qin A J, Ding C, (陈鸿军, 秦爱建, 丁 铲等) *et al.* Sequence analysis of tegument protein VP22 encoding by attenuated strain of Marek's disease virus [J]. *J Yang zhou Univ-Agricultural and life Science Edition* (扬州大学学报-农业与生命科学版), 2003, 24 (4): 7-10.
- [7] O'Donnell L A, Clemmer J A, *et al.* Marek's disease virus VP22: subcellular localization and characterization of carboxyl terminal deletion Mutations[J]. *Virology.* 2002, 292 (2): 235-240.
- [8] Lisa E P, John A B. Modified VP22 Localizes to the Cell Nucleus during Synchronized Herpes Simplex Virus Type 1 Infection [J]. *J. Virol.* 1999, 73 (8): 6769-6781.
- [9] Liu Y L, Qin A J, Jin W J, (刘岳龙, 秦爱建, 金文杰) *et al.* Expression of Chicken Anaemia Virus (CAV) Apoptin Gene in *E. coli* and Analysis of It's Immunity [J]. *Chin J Vet Sci* (中国兽医学报), 2002, 22 (6): 541-543.