

口蹄疫病毒3D基因的克隆表达及功能分析*

张倩, 顾潮江, 石立立, 李勇, 屈三甫, 郑从义**

(武汉大学生命科学院 病毒学国家重点实验室, 湖北武汉 430072)

FMDV 3D Gene Cloning Expression and Functional Analysis

ZHANG Qian, GU Chao-jiang, SHI Li-li, LI Yong, QU San-fu, ZHENG Cong-yi**

(State Key Laboratory of Virology, College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract: The RdRp gene of *Foot-and-mouth disease virus* was amplified by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) using pfuUltra™ High-Fidelity DNA polymerase, and was then cloned into the prokaryotic expression vector pET-28a(+). *E.coli* BL-21 cells were transformed with the recombinant plasmid and the target protein was expressed in soluble form. The purified recombinant protein was confirmed to be expressed correctly by Western-blotting. The RNA *in vitro* replication assay was used to determine the high activity of purified RdRp. The product of replication system was quantified by strand-specific real-time RT-PCR. These results suggested that the purified RdRp could initiate the *de-novo* RNA synthesis but was mainly in a primer-dependent manner, which shows high activity of RNA-dependent RNA polymerase. The Vpg protein primer can dramatically improve the capacity of RNA synthesis.

Key words: *Foot-and-mouth disease virus* (FMDV); RNA-dependent RNA polymerase; Replication system *in vitro*; Strand-specific real-time RT-PCR

摘要: 利用RT-PCR技术扩增了口蹄疫病毒(FMDV)编码RNA依赖的RNA聚合酶的3D基因, 并将其克隆到原核表达质粒载体pET-28a(+)中。3D基因经测序确认后在大肠杆菌BL-21中表达, 表达产物纯化的目的蛋白进行Western-blotting检测, 获得分子量约55KDa的单一3D基因表达产物。利用RNA体外复制体系和荧光定量PCR技术, 证明纯化的3D基因表达产物RNA依赖的RNA聚合酶具有较高的酶活性, 可以在体外从头合成FMDV RNA, 且主要以引物依赖的方式合成病毒基因组。

关键词: 口蹄疫病毒; RNA依赖的RNA聚合酶; 体外复制实验; 荧光定量PCR

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2006)04-0375-05

口蹄疫病毒 (*Foot-and-mouth disease virus*, FMDV) 是口蹄疫的病原体, 为小RNA病毒科 (*Picornaviridae*), 口蹄疫病毒属 (*Aphthovirus*) 的成员。FMDV主要感染偶蹄类动物, 对畜牧业生产危害极大。此外, 已证明FMDV为人畜共患疾病病原体, 因此, 国际兽疫局 (OIE) 将口蹄疫列为A类家畜传染病之首, 并严格控制其传播。FMDV系单股正链RNA病毒, 其基因组全长约8.5kb, 在病毒复制过程中, 病毒编码的RNA聚合酶是复制自身基

因组的关键酶^[1~3]。FMDV RNA复制酶由其3D基因 (1410bp) 编码, 它是一种RNA依赖的RNA多聚酶 (RdRp)。目前国外对同属小RNA病毒科的脊髓灰质炎病毒以及黄病毒科的丙肝病毒RNA复制酶的蛋白空间结构和生物化学特性进行了一些研究^[4~6], 但FMDV则研究较少。FMDV RNA依赖的RNA聚合酶首先以基因组正链RNA为模板合成互补的负链RNA, 然后再以合成的负链为模板起始子代病毒基因组正链RNA的合成, 因此基因组正链和负链RNA

修稿日期: 2006-01-16, 修回日期: 2006-03-08

* 基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目“973” (1999011904)

作者简介: 张倩 (1982-), 女, 山东曲阜籍, 硕士研究生。

** 通讯作者. Corresponding author. Tel:027-68754001, E-mail: cctcc202@whu.edu.cn.

模板的3'末端可能含有起始RNA复制所必须的顺式作用调控元件,如启动子、增强子等。目前研究表明,正链RNA病毒RNA依赖的RNA聚合酶起始基因组RNA合成的分子机制主要有两种:引物依赖的RNA合成(Primer-dependent RNA synthesis)和引物非依赖的RNA合成即从头合成(*De-novo* RNA synthesis)。对于FMDV的复制方式,有研究表明,其复制方式主要为以Vpg为引物的引物依赖的复制方式,是否还可以引物非依赖的方式复制至今尚未见文献报道。

为了深入了解FMDV复制和起始基因组正链和负链RNA合成的分子机制,本研究从FMDV OGBF15中成功克隆了3D基因,经原核细胞表达、纯化等步骤,得到了高纯度的3D蛋白,并以3D蛋白(RdRp)为基础,建立了FMDV体外RdRp复制系统和链特异性荧光定量RT-PCR技术检测平台,对复制产物进行精确定量和分析。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

口蹄疫病毒(OGBF15)细胞毒,由中国农业科学院兰州兽医研究所提供;兔抗His-tag血清,购自三鹰生物公司;增殖病毒用BHK-21细胞,大肠杆菌BL-21(DE3),均由武汉大学中国典型培养物保藏中心提供;大肠杆菌表达载体pET-28a(+),纯化蛋白用His-Band@Purification Kit,均为Novagen公司产品;Micro BCATM Protein Assay Reagent Kit,为PIERCE公司产品;RNA抽提用的Trizol试剂盒,为GIBICO公司产品。

1.2 FMDV RNA复制酶基因3D的克隆

以FMDV OGBF15株序列(GeneBank accession number: DQ478936)为参照,设计引物从FMDV基因组RNA中扩增3D基因。上游引物5-GAACGCGGATCCGGGTTGATTGTTGACACCAG-3(含BamH I酶切位点);下游引物5-GAACCTCGAGTCATGCGTCACCGCACACGGCGT-3(含Xho I酶切位点和终止密码子)。反转录操作按invitrogen公司说明进行。常规PCR及凝胶电泳鉴定。回收、酶切后与用BamH I、Xho I双酶切的pET-28a(+)连接,转化BL21(DE3),卡那霉素抗性平板筛选阳性克隆,小量抽提质粒,送华大基因公司测序。

1.3 FMDV RNA复制酶基因3D的表达

将克隆3D基因的重组pET-28a(+)质粒转化至表达宿主菌BL21(DE3)中。加入IPTG至终浓度为0.4mmol/L,分别在诱导1.5h、2h、2.5h、3h后取样

进行SDS-PAGE鉴定。取IPTG诱导效率最高的时间收集菌体,菌体超声波破碎,用His-Band@Purification Kit纯化表达产物。纯化操作按产品说明书进行。蛋白洗脱液分管收集后用SDS-PAGE鉴定,其浓度用Micro BCATM Protein Assay Reagent Kit测定。

1.4 RNA复制酶基因3D表达产物的鉴定

FMDV 3D蛋白的免疫印迹分析参照文献^[7]。简言之,离心收集菌体,裂解后总蛋白于12%的SDS-PAGE分离,电转移到NC膜,NC膜经PBS封闭后用1:500稀释的兔抗His-tag一抗和1:1000稀释的碱性磷酸酶标记的羊抗兔二抗进行免疫标记,NBT/BCIP室温显色30min,拍摄NC膜照片作为实验记录。

1.5 RNA体外复制实验

将纯化后的3D蛋白透析,透析液的组成为:50mmol/L Tris-Cl pH8.0,100mmol/L NaCl,10% Glycerol,1mmol/L EDTA,1mmol/L DTT。体外复制反应体系组成为:20mmol Tris-HCl pH8.0,5mmol MgCl₂,5mmol MnCl₂,2mmol DTT,50mmol NaCl,0.25mmol NTP,0.3μg RNA template,1μg 3D protein,40(u) RNasin,50μg/mL BSA。3D蛋白工作浓度为0.1~1μg/mL。设计Vpg蛋白引物,序列为:GPYAGPMERQKPLKVKAKAPVVKE。Vpg蛋白引物用DEPC-treated water溶解至10mg/mL。四组并行实验中只有一组加入Vpg蛋白引物,用以验证起始复制的方式。将混合好的反应体系50μL在25℃温育2h后,酚氯仿异戊醇抽提,3mol/L NaAc和异丙醇沉淀RNA,75%的乙醇洗涤,超净台上干燥后用15μL DEPC-treated water溶解,取5μL进行荧光定量PCR检测。

1.6 FMDV基因组的实时荧光定量RT-PCR检测

利用本实验室建立的FMDV荧光定量PCR技术检测病毒基因组复制效率,以口蹄疫病毒高度保守区即编码依赖RNA的RNA聚合酶的3D区核苷酸序列为基础设计引物及制备TaqMan探针,用转录产生的已知浓度的RNA标准品作为逆转录和扩增的双重对照。正反义引物序列为5'-GAACACATTCTTTACACCAGGAT-3';5'-CATATCTTTGCCAATCAACATCAG-3',扩增子大小为121bp,荧光探针序列为:5'FAM-ACAACCTACCGCCGAGCCAATTC-TAMRA-3',探针的5'端标记荧光发射基团FAM,靠近3'端标以荧光淬灭基团TAMRA。在每个循环的第二步结束时进行荧光检测。FMDV的定量可通过与标准品的循环域值(Threshold Cycle,

Ct) 相比较得出。

2 结果

2.1 FMDV 3D基因的PCR扩增和克隆

RT-PCR扩增产物的琼脂糖凝胶电泳鉴定表明, 扩增产物的片段大小与FMDV 3D基因理论值相符(1410bp)。将扩增片段克隆至载体pET-28a(+), 构建重组质粒pET-28a(+)-3D, *Bam*H I、*Xho* I双酶切鉴定重组质粒, 结果见图1。重组质粒送华大基因公司进行测序后与FMDV OGBF15株序列进行BLAST分析, 证实扩增并克隆的是FMDV 3D基因。

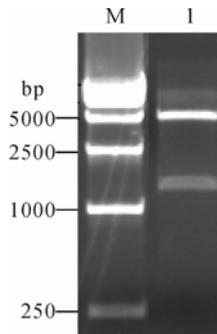


图1 pET-28a(+)-3D酶切鉴定

Fig.1 Identification of recombinant plasmid pET-28a(+)-3D
M, DNA Marker 15000; 1, 3D-pET-28a(+) digested with *Bam*H I and *Xho* I.

2.2 3D基因表达产物的纯化

将重组质粒pET-28a(+)-3D转化BL21(DE3), 经IPTG诱导后的表达产物在不同时间取样进行SDS-PAGE鉴定, 结果如图2所示。图2的结果显示, IPTG诱导1.5h、2h、2.5h、3h均能促使3D基因高效表达目标蛋白, 其中以2.5h表达量最大。

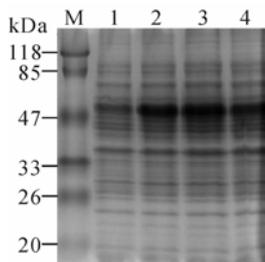


图2 3D基因在BL-21中的时相表达

Fig.2 Time course of expression 3D gene in BL-21
M, Protein marker; 1~4, Induced for 1.5h, 2h, 2.5h and 3h respectively.

以 IPTG 诱导 2.5h 培养菌液提取蛋白过柱纯化, 进行 SDS-PAGE 鉴定, 在约 55kDa 蛋白分子量标记处, 有一单一的电泳条带(图 3), 大小与图 2 中 55kDa 的带一致, 说明我们纯化的蛋白有很高的纯度。用 Micro BCA™ Protein Assay Reagent Kit 测定纯化后 3D 蛋白的浓度为 0.4mg/mL。

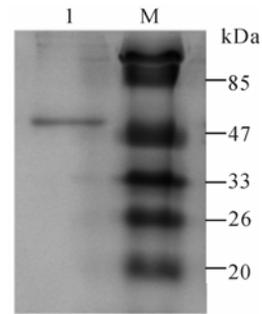


图3 纯化的表达产物的SDS-PAGE分析

Fig3 Analysis of purified product of 3D protein in BL-21
M, Protein molecular weight standard marker; 1, Purified product of 3D protein.

2.3 3D基因表达产物的鉴定

收集细胞总蛋白电转移到NC膜, NC膜经PBS封闭后依次加入兔抗 His-tag 一抗和碱性磷酸酶标记的羊抗兔二抗进行标记, NBT/BCIP 室温显色结果如图 4 所示。结果显示, 3D 蛋白与兔抗 His-tag 血清反应阳性, 表明兔抗血清特异性地与重组表达产物所携带的 His-tag 起反应, 从而表明 3D 蛋白得到了正确表达。

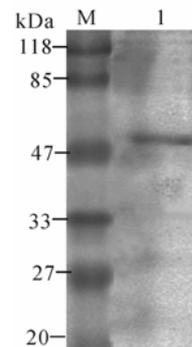


图4 3D基因表达产物的Western-blotting鉴定

Fig.4 Western-blotting of expressed product of 3D gene
M, Protein molecular weight standard marker; 1, Purified product of 3D protein.

2.4 3D蛋白的活力分析及其起始复制方式

为了证明我们表达的3D蛋白具有RdRp活性, 建立了FMDV基因组RNA的体外复制体系。50μL体系在25℃反应2h后, 用酚氯仿异戊醇抽提, NaAc和异丙醇沉淀RNA, 取5μL进行荧光定量PCR检测, 结果如图5所示。图中A为口蹄疫病毒基因组正链检测结果, B为负链检测结果, 结果表明, 在无引物(图5中A3、B3)和有引物(图5中A4、B4)存在的情况下, 口蹄疫病毒均可复制, 且在引物存在时的效率更高(图5中A4、B4)。A2、B2的体系中不加模板和引物, 虽加3D蛋白, 拷贝数为零, 说明系统没有污染。A1、B1的体系中加模板, 无3D蛋白和引物, 检测到的拷贝数比A3、B3和A4、B4低,

说明3D蛋白能在体外起始RNA的从头合成,并具有较高的RdRp酶活性,但在有引物存在时,复制效率更高。尤其是反应体系中负链RNA的合成,直接证明了表达产物中3D蛋白的酶催化活性(图5中B3)。在本研究的复制体系中,引物依赖RNA的合成是主要的合成方式,其详细的机制还有待进一步的研究。

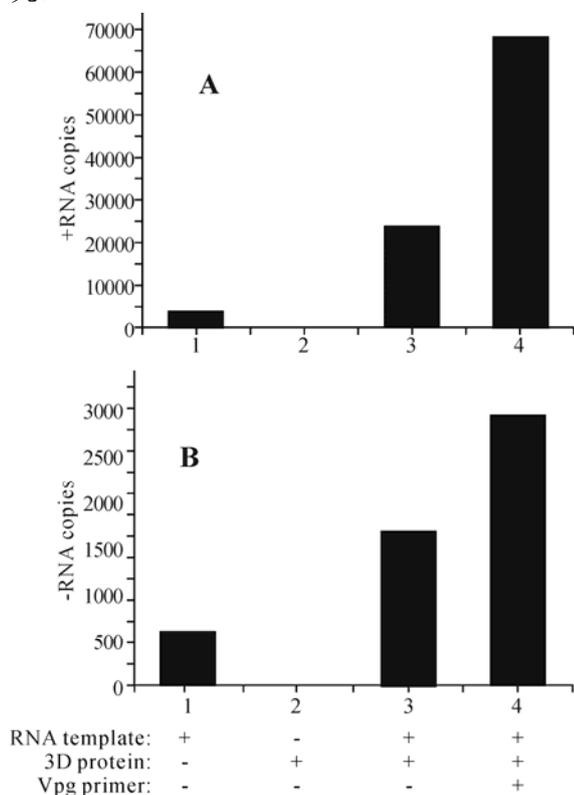


图5 3D蛋白活力分析的荧光定量PCR结果

Fig.5 The activity of 3D protein *in vitro* quantified by strand-specific real-time RT-PCR

A, +RNA copies; B, -RNA copies.

3 讨论

正链RNA病毒基因组为单股正极性RNA,有感染性,可以直接作为mRNA起始病毒蛋白质的翻译,除逆转录病毒外,几乎所有的正链RNA病毒都编码有RNA依赖的RNA聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)^[8]。正链RNA病毒基因组RNA作为mRNA利用宿主的核糖体和其他生物大分子从基因组的5'端起始病毒蛋白质的翻译,合成RNA复制所必须的RNA依赖的RNA聚合酶。RdRp与病毒的复制酶(replicase)系统,其中RdRp是构成复制酶最重要的成分。目前已有许多正链RNA病毒如POLV、HCV^[9,10]等的RdRp都已经被证明是具有催化RNA合成的能力。体外重组的RdRp起始RNA合成一般不具备模板特异性,能够以病毒的RNA或合

成的RNA甚至DNA作模板,在没有其他辅助因子的作用下直接催化新生RNA的合成^[11]。

正链RNA病毒复制酶或RNA依赖的RNA聚合酶起始RNA合成的机制主要分为两种:引物依赖的RNA合成(Primer-dependent RNA synthesis)和引物非依赖的RNA合成即从头合成(De-novo RNA synthesis)^[12]。需要说明的是,由于目前对正链RNA病毒起始RNA合成的机制尚未完全清楚,因此这种划分方式仅仅是基于对现有研究阶段性结果的归纳而划分的。目前,对FMDV的RdRp体外催化特性的研究较少,因此我们建立了口蹄疫病毒的体外复制系统,并利用基因工程表达的3D蛋白研究其复制特性。结果表明,利用原核表达系统表达出的3D蛋白为可溶性蛋白,经Ni²⁺亲和层析柱纯化得到了高纯度的目的蛋白,在体外复制系统中表现出很高的活性。荧光定量PCR的测定结果表明, FMDV的复制方式为引物依赖的RNA合成和从头合成两种,而且在体外引物依赖的RNA合成效率更高。国内有采用毕赤酵母^[13]、杆状病毒^[14]表达口蹄疫病毒3D基因的报道,但尚未显示相关功能研究的结果。这两个表达系统都具有良好的蛋白质翻译后加工系统,但均存在表达量低的问题,给功能及结构的研究带来不便。本文采用了原核表达系统,表达出的3D蛋白为可溶性蛋白,且表达量很高,而且由于3D蛋白是一种简单的非结构蛋白,不需要加工修饰,利用原核表达系统得到的3D蛋白仍具有很高的催化活性。更为重要的是本文通过体外复制体系测定表达产物的酶催化活性,验证了功能的稳定存在。

References

- [1] Domingo E, Baranowski E, Escarmis C, *et al.* Foot-and-mouth disease virus [J]. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.*, 2002, 25: 297-308.
- [2] Bachrach H L. Foot-and-mouth disease virus [J]. *Annu Rev Microbiol*, 1968, 22: 201-44.
- [3] Pereira H G. Foot-and-mouth disease virus [A]. *Virus diseases of food animals* [M]. New York: Academic Press. 1981, 2: 333-363.
- [4] Gohara D, Crotty S, Arnold J J, *et al.* Poliovirus RNA dependent RNA polymerase [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275: 25523-25532.
- [5] Labonté P, Axelrod V, Agarwal A, *et al.* Modulation of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase activity by structure-based site-directed mutagenesis [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277:38838-38839.
- [6] Lohmann V, Krner M F, Herian U, *et al.* Biochemical properties of hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase and identification of amino acid sequence motifs essential for enzymic

- activity [J]. *J Virol*, 1997, 71: 8416-8428.
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [8] Koonin E V. The phylogeny of RNA-dependent RNA polymerases of positive-stranded RNA virus [J]. *J Gen Virol*, 1991, 72: 2197-2206.
- [9] Tuschall D M, James E H, Flanagan B. Poliovirus RNA-Dependent RNA Polymerase Synthesizes Full-Length Copies of Poliovirion RNA, Cellular mRNA, and Several Plant Virus RNAs In Vitro [J]. *J Virol*, 1982, 44(1): 209-216.
- [10] Behrens S E, Tomei L, De Francesco R. Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus [J]. *EMBO Journal*, 1996, 15: 12-22.
- [11] Sivakumaran K, Kim C H, Tayon R, *et al.* RNA sequence and secondary structural determinants in a minimal viral promoter that directs replicase recognition and initiation of genomic plus-strand RNA synthesis [J]. *J Mol Biol*, 1999, 294 (16): 667-682.
- [12] Yi G H, Zhang C Y, Cao S, *et al.* De novo RNA synthesis by a recombinant classical swine fever virus RNA-dependent RNA polymerase [J]. *Eur J Biochem*, 2003, 270: 4952-4961.
- [13] Zhang T G, Liu Z X, Xie Q G (张腾国, 刘在新, 谢庆阁) *et al.* Expression of FMDV RNA polymerase 3D gene in *Pichia pastoris* [J]. *Chin J Veter Sci Technol* (中国兽医科技), 2004, 34 (1): 8-11.
- [14] Lu H J, Jin N Y, Han S, (鲁会军, 金宁一, 韩 松) *et al.* Expression and detection of 3D gene of FMDV in recombinant baculovirus [J]. *Chin J Prev Veter Med* (中国预防兽医学报), 2005, 27 (3): 175-178.