猪水泡病病毒 VP1 基因的克隆和表达*

钟金栋[1]，花群义[2**]，肖荣海[2]，夏雪山[1]，杨云庆[2]，
周晓黎[2]，董　俊[2]，邓祖洪[3]

（1.昆明理工大学生化学院,云南昆明 650224；2.云南出入境检验检疫局技术中心，云南昆明 650228；3.西双版纳兽医站,云南景洪 666100）

Cloning and Expression of VP1 Gene of Swine Vesicular Disease Virus

ZHONG Jin-dong[1]，HUA Qun-yi[2**]，XIAO Rong-hai[2]，XIA Xue-shan[1]，
YANG Yun-qing[2]，ZHOU Xiao-li[2]，DONG-jun[2]，DEN Zu-hong[3]

(*1. Faculty of Bioengineering and Chemical Engineering, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650224, China; 2. Technology Center of Yunnan Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Kunming 650228, China; 3. Xishuangbanna Veterinary Station, Jinghong 666100, China*)

Abstract：The VP1 gene of *Swine vesicular disease virus* (SVDV) was amplified by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) yielding a product of 849bp cDNA fragment. Using T-A cloning technique, the PCR product was cloned into pMD18-T vector. The purified VP1 gene was subcloned into the pBAD/Thio TOPO vector and the plasmid was identified by PCR. It was sequenced to confirm the authenticity of the sequence and orientations. SDS-PAGE and Western blotting revealed that the VP1 protein was expressed in *Escherichia coli* LGM194 at a high level and the recombinant fusion protein contained a N-terminal HP-Thioredoxin and a C-terminal polyhistidine tag. The optimal amount of the expressed fusion protein was 16% of total bacterial protein after being induced with L-arabinose at 0.002%concentration for 5 hours. It had a molecular mass of approximately 47.13 kDa and was immunologically reactive. The recombinant protein will be characterized and tested in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) format for potential application in the serodiagnosis of swine vesicular disease.

Key words：Swine vesicular disease virus（SVDV）；VP1 gene；Cloning；Expression

摘要：以猪水泡病病毒 RNA 为模板，应用反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)技术，扩增了 849bp 的 *VP1* 基因，通过 T-A 克隆技术，将 *VP1* 基因片段克隆至 pMD18-T 克隆载体质粒中，构建 SVDV *VP1* 基因克隆重组质粒，进行核苷酸序列分析。然后亚克隆插入 pBAD/Thio TOPO 表达载体，经测序鉴定，筛选获得 *VP1* 基因正向插入、有正确读码框的阳性克隆，成功构建了猪水泡病病毒 *VP1* 基因重组表达载体。经 L-Arabinose 诱导表达，可稳定、高效地表达 *VP1* 蛋白抗原。SDS-PAGE 结果表明，以终浓度为 0.002%的 L－阿拉伯醛糖进行诱导，5h 后表达可达到高峰，表达蛋白为融合蛋白，质量约 47.13 kDa，表达产量约占菌体总蛋白的 16％。Western blotting 检测表明，诱导的蛋白能与猪水泡病阳性血清发生特异性反应。融合蛋白中含有猪水泡病病毒 VP1 蛋白抗原，为应用该表达蛋白抗原制备 SVD 免疫血清学诊断试剂和新型疫苗构建奠定基础。

关键词：猪水泡病病毒；VP1；克隆；表达

中图分类号：S852.65　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1003-5125(2006)04-0385-05

收稿日期：2006-02-13，修回日期：2006-03-25
* 基金项目：国家“十五”重大科技攻关项目（2001BA804A48 和 2004BA519A40）
作者简介：钟金栋（1982-），男，福建省籍，硕士研究生，研究方向为分子生物学。
** 通讯作者. Corresponding author. Tel: 0871-4613912; E-mail: ciqhua@yahoo.com.cn

猪水泡病（Swine vesicular disease, SVD）是由猪水泡病毒（*Swine vesicular disease virus*, SVDV）引起的一种急性、热性、接触性传染病，以口和蹄部产生水泡性损伤为特征，其临床症状与猪口蹄疫极为相似，引起严重的公共卫生问题，被世界动物卫生组织（OIE）列为A类传染病[1]。SVDV归为小RNA病毒科（*Picornaviridae*）肠道病毒属（*Enterovirus*），它与人类柯萨奇病毒（*Human coxsackievirus*）B5型有非常相近的理化特性、生物学特性及血清学关系 [2,3]。SVDV只有一个血清型，根据*VP1*和*3BC*基因的核苷酸序列可将SVDV分离株分为4个系统发生群。

SVDV基因组为一单股正链RNA分子，全长为740Obp-7401bp，基因组含一个大的开放阅读框（ORF），编码一条由2185个氨基酸组成的多聚蛋白，经翻译后加工成为各种功能蛋白。SVDV结构蛋白编码区(P1区)编码病毒特异性结构蛋白VP1（1D）、VP2（1B）、VP3（1C）和VP4（1A），外壳蛋白VP1、VP2、和VP3包含中和性抗原位点。非结构蛋白编码区(即P2和P3)编码参与病毒复制的非结构蛋白。VP1由283个氨基酸组成，其分子量为31.13kDa，SVDV的主要抗原位点位于VP1 BC环87-88位氨基酸残基和C末端261位氨基酸残基区域[4]。本文采用pBAD/TOPO原核表达系统首次对SVDV VP1基因进行了克隆表达，为我国猪水泡病的免疫血清学诊断试剂的制备和新型疫苗构建奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

猪水泡病病毒 RNA、标准阳性血清、标准阴性血清、参考血清和羊抗 SVDV 抗血清、由英国动物卫生研究所 Pirbright 实验室惠赠。pMD18-T 载体、E.coli.JM109 细菌、Taq 酶和 T_4DNA 连接酶购自宝生物工程（大连）有限公司；pBAD/Thio TOPO 载体、LMG194 细菌、TOP10 细菌、proBond^{TM}protein 纯化试剂盒购自美国 Invitrogen 公司；proteinG-HRP 为 Omega 公司产品；兔抗羊 IgG-HRP 为华美公司产品。

1.2 SVDV *VP1* 基因重组质粒的构建

按照参考文献[7]进行 SVDV 核蛋白基因重组质粒的构建。根据 GenBank 上公开发表的 SVDV VP1 基因序列，设计、合成一对引物，扩增长度为 849bp。引物 VP1-P1：5'-GGGCCCCCAGGAGAGGTGATG-3'，VP1-P2:5'-AGTGGTTTTCATGGTTGTTATATC-3'。PCR 产物回收纯化后经过与 pMD18-T 载体的连接反应（16℃连接 30min），然后将连接反应液热转化至 *E.Coli*.JM109 感受态细胞，在含有 IPTG、X-Gal 的 L-Amp 平板培养基上培养。挑取白色菌落进行小量培养，碱裂解法提取质粒，进行 PCR 实验，电泳初筛重组克隆，获得 SVDV *VP1* 基因克隆重组质粒。

1.3 SVDV *VP1* 基因重组表达载体的构建

为了构建可表达可溶性目的蛋白，设计引物时去除目的基因的起始密码子和终止子，使目的基因插入 pBAD 载体后表达融合蛋白，以提高特异性抗原的免疫原性和稳定性。以含有 SVDV *VP1* 基因的 pMD-VP1 质粒 DNA 为模板，进行目的片段的扩增。经琼脂糖电泳检测，回收纯化的目的片段按说明书连接插入 pBAD/ Thio-TOPO 载体，转化 TOP10 感受态细菌，在含 100μg/mL Amp 的 LB 培养基上选择培养 24h。

从 LB 平板培养基上挑选单个菌落，用 pBAD/ Thio-TOPO 载体上的 Trx Forward 和 pBAD Reverse 引物做鸡尾酒-PCR 体系法高效、快速分析鉴定。对重组质粒中的插入片段进行序列测定，进一步鉴别出正向插入SVDV *VP1* 基因和读码框正确的重组子。

1.4 重组表达质粒在 LMG_{194} 细胞中的诱导表达

制备 LMG194 细菌感受态细胞。将重组表达质粒转化入 LGM194 细胞后，在含 100μg/mL Amp 的 LB 平板上培养，挑取单个菌落，于 2mL 含 0.2％葡萄糖和 100μg/mL Amp 的 RM 培养基中，37℃振荡至 OD_{600}=1~2。制备 5 管 10mL 含 100μg/mLAmp 的 LB，每管加入 0.1mL 菌体培养液，37℃振荡培养至 OD_{600}=0.5~1，使细菌达到正处于中期对数生长期。从每管中取出 1mL 细菌液，12000r/min 离心 1min，吸取上清液作备用样品，沉淀细菌冻存于-20℃，作为基点样品。用 pBAD/Thio 载体作为阳性表达对照，用无载体的 LMG194 细胞作为阴性对照，同样方法制备基点样品。

用 20％阿拉伯糖和灭菌水，在无菌条件下制备 10 倍序列稀释的溶液，37℃振荡 4h，每管取出 1mL 菌液，12000r/min 离心 1min，吸取上清液作备用样品，沉淀细胞-20℃冻存，作为目的蛋白阿拉伯糖诱导表达的分析样品。

1.5 表达产物的检测

按文献方法[5]进行 SDS-PAGE 电泳，浓缩胶浓度为 5％，分离胶浓度为 10％，电泳后用考马斯蓝 R-250 进行凝胶染色，检查特异性的目的蛋白条带，

确定获得最高浓度表达的阿拉伯糖浓度。用含 20%蔗糖的 TE 缓冲液渗透休克浸出表达的融合蛋白，离心后取上清和沉淀分别电泳分析，以确定表达产物的可溶性和不可溶性形式存在的比例。

将 SDS-PAGE 凝胶电泳的各蛋白区带转移至硝酸纤维素膜，用羊抗 SVDV 抗血清为第一抗体、HRP-兔抗羊 IgG 为第二抗体，进行 Western blotting 分析，以检查表达产物是否具有特异性免疫活性。

1.6 重组蛋白质的纯化和定量

按 1%的体积接入二级种子菌液，37℃振荡培养 4h，加入确定的阿拉伯糖最佳诱导浓度，温度降至 30℃，继续振荡培养，缓慢诱导表达 5h，收集菌液。将菌体按 1：10（W/V）悬浮于 TE 缓冲液，置冰水浴中超声破菌，每次 15s，间隔 15s，涂片染色镜检至完全裂解菌体，以 4℃下 5000r/min 离心 30min，取上清液为粗提的重组蛋白。按重组蛋白质 Ni-NTA 纯化试剂盒的说明书，经上柱结合、洗涤和洗脱几个步骤，纯化重组核蛋白。纯化后的重组核蛋白在 Gene QuantPro RNA/DNA Calculator 仪上，用紫外分光光度法测定蛋白质的含量，并进行 SDS-PAGE 检测。

2 结果

2.1 目的片段的克隆与鉴定

扩增产物大小约为 849bp，与预期结果相符，琼脂糖凝胶电泳图谱上显示均一的 1 条带（图略）。扩增片段回收纯化，连接到 pMD18-T 载体上，转化 *E.Coli* JM109 感受态细胞，获得含有 SVDV VP1 基因 849bp 片段的阳性克隆。PCR 和核苷酸序列测定鉴定，阳性克隆命名为 pMD-VP1。

2.2 SVDV *VP1* 基因的亚克隆及重组表达质粒的构建

重组质粒 pMD-VP1 中的 *VP1* 基因经亚克隆，插入到载体 pBAD/Thio TOPO 中，获得重组子，转化至表达宿主菌 TOP10 和 LMG194 中，用载体引物进行 PCR 鉴定结果如图 1，SVDV *VP1* 基因已插入到载体中，与预期结果一样，获得含有 SVDV-VP1 的重组表达基因的阳性克隆。将 SVDV *VP1* 基因正向插入到载体 pBAD/Thio TOPO 的表达重组质粒克隆，命名为 pBAD-VP1。

2.3 SVDV 核蛋白表达重组质粒的序列分析

对表达重组质粒 pBAD–VP1 进行核苷酸序列分析，并与 GenBank 中报道的 SVDV 编码核衣壳蛋白 *VP1* 基因序列比较后发现，SVDV *VP1* 基因的编码序列全长为 849bp，其编码 283 个氨基酸，插入方向和阅读框架正确。推测的 SVDV *VP1* 蛋白的氨基酸序列和表达融合蛋白的氨基酸序列，N 端是

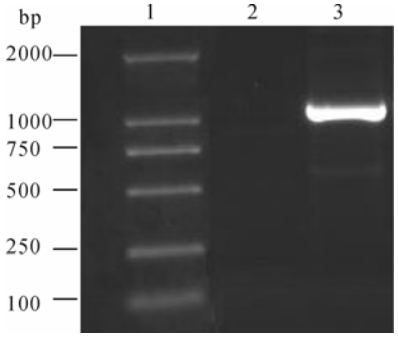

图 1 表达重组质粒的 PCR 鉴定

Fig.2 The identification of the recombination plasmid by PCR
1, DL-2000 Marker; 2,Negative control; 3, PCR products amplified from pBAD-VP1.

质量为 13kDa 的硫氧还蛋白，C 端是质量为 3kDa 的 V5 epitope 和 6 个组氨酸，中间是质量为 31.13 kDa 的 SVDV *VP1* 蛋白，整个表达融合蛋白的质量为 47.13kDa。

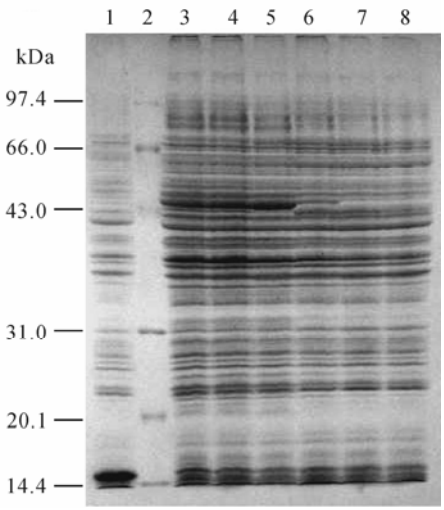

图 2 pBAD-VP1 在 LGM194 中表达产物的分析

Fig.2 Analysis of product of pBAD-VP1 expression in LGM 194
Lane 3/4/5/6/7/8, pBAD-VP1 induced expression in LGM194 by L-arabinose at 0.2%, 0.02%, 0.002%, 0.0002%, 0.00002%, respectively; Lane 1, LGM194; Lane 2,Protein marker.

2.4 表达产物的 SDS-PAGE 分析

通过加入阿拉伯糖诱导目的基因的表达，10% SDS-PAGE 分析结果表明，经阿拉伯糖诱导的工程菌获得表达，产生约 47.13kDa 的特异蛋白条带。以 0.002％的阿拉伯糖浓度诱导 5h 时，表达量最高，表达产量约占菌体总蛋白的 16％，如图 2。而经诱导的对照菌和未经诱导的重组菌没有相应的条带，说明 SVDV *VP1* 基因得到正确表达。用 20%蔗糖 TE 缓冲液渗透休克浸出表达的融合蛋白，离心后

取上清和沉淀分别电泳分析，重组表达菌株 pBAD-VP1 TOP10、p BAD-VP1 LMG194 菌体破碎上清和沉淀碎片中均出现了特异性蛋白条带，说明表达的融合蛋白在上清和沉淀中均存在，融合蛋白可以分泌到细胞间质中，大部分以可溶性形式存在，约占被表达蛋白的 57%左右。

2.5 表达产物的 Western blotting 检测

对重组表达菌株 pBAD-VP1 TOP10、pBAD-VP1 LMG194、TOP10、LMG194 的菌体裂解液进行 SDS-PAGE 及免疫印迹分析，结果 pBAD-VP1 TOP10、pBAD-VP1 LMG194 出现一条相对应于它们质量的特异显色条带，而 TOP10、LMG194 的菌体裂解液则未出现带（图 3）。说明表达蛋白可被相应的抗血清 IgG 所识别，具有免疫学活性。

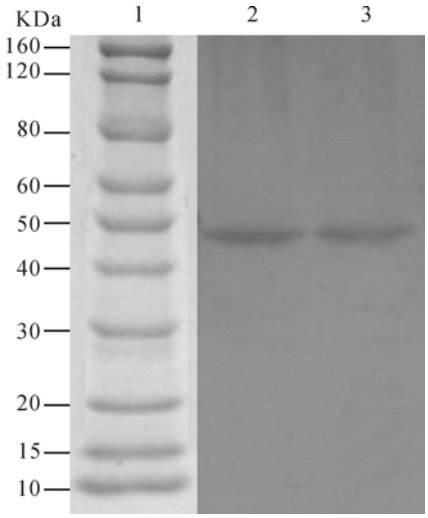

图 3 SVDV VP1 蛋白表达产物的 Western-blot 分析

Fig.3 Western blot of the fussion VP1 expressed in LGM194

1, Protein molecular weight marker; 2, pBAD-VP1 induced expression in TOP 10; 3, pBAD-VP1 induced expression in LGM194.

2.6 重组基因表达产物的纯化

诱导培养后收获的菌体反复超声破菌 20 次后，离心取上清液为粗提物，沉淀经 SDS-PAGE 已无目的蛋白，说明超声破菌 20 次已经完全获得了目的蛋白。粗提的重组蛋白质经 Ni-NTA 纯化后，进行 SDS-PAGE 分析，只有一条 47.13kDa 的蛋白质带，与直接用菌体进行 SDS-PAGE 出现的重组表达产物条带的质量大小一致，证实经 Ni-NTA 亲合层析纯化后重组核蛋白得到很好纯化。

3 讨论

原核表达系统具有操作简便、表达量高的特点，但表达产物大多以无生物活性、不溶的包涵体形式存在。为获得可溶性的活性蛋白，需将包涵体溶解，进行复性。表达产物的存在形式（可溶或不溶）、表达量、稳定性等与多种因素有关，如菌株、表达产物对菌株的毒性、表达形式（融合表达、非融合表达或分泌表达）、温度、诱导剂浓度、诱导时间、表达载体等。研究证实，大多数外源蛋白在大肠杆菌胞内不能正确折叠获得天然空间结构和生物功能，一般以无活性的形式存在，需先将包涵体溶解后进行重组蛋白复性，这些复杂操作极大增加了获得高活性纯品的难度和成本[6]。对于 SVDV 的 VP1 基因，用原核表达 VP1 蛋白抗原用于诊断试剂的报道不多，少数报道认为原核表达系统不能高效表达核蛋白，[7,8]本研究将 VP1 蛋白基因片段重组至 pBAD/Thio-TOPO 载体的 arapBAD 启动子下游附近，构建了高效表达核蛋白的重组表达质粒载体，具有表达含量高的特点；pBAD/Thio-TOPO 载体采用 6 组氨酸标签， 使用 Ni-NTA 亲合层析就能重组核蛋白很好纯化；此外，该硫氧还蛋白融合蛋白表达系统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，融合蛋白以可溶性的形式存在于细胞间质中，可通过蔗糖快速休克渗透压冲击法而有选择地释放，从而大大简化纯化程序，避免了包涵体处理这一下游棘手问题[6]。

本研究融合蛋白以可溶性形式存在的比例约占被表达蛋白的 57%左右，与细菌培养的条件如温度、时间等密切相关。用不同浓度的阿拉伯糖在同样条件下进行诱导表达，用 SDS-PAGE 和 Western blot 证实，表达的融合蛋白和原病毒 VP1 蛋白的质量分别为 47.13kDa 和 31.13kDa 左右。阿拉伯糖的最佳浓度为 0.002%。经转印后，与相应的抗血清发生特异性反应而显色。有报道认为，融合蛋白也能识别其中的非目的蛋白部分，可能会导致抗体与融合蛋白中的非目的部分发生交叉反应而影响检测结果，因而应将多克隆抗体中能识别非目的蛋白的部分去除[9]，本试验没有发现上述情况。目前我们正在进行应用表达的 VP1 蛋白抗原建立酶联免疫吸附试验（ELISA）的研究工作。

References

[1] Nardelli L, Lodetti E, Gualandi G L, *et al*. A foot-and-mouth disease syndrome in pigs caused by an enterovirus [J]. J Virol, 1997, 334: 320-325.

[2] Zhang G, Wilsden G, Knowles N J, *et al*. Complete nucleotide sequence of a coxsackie B5 virus and its relationship to swine vesicular disease virus [J]. J Gen Virol, 1993,74: 845-853.

[3] Borrego B, Carra E, Garcia-Ranea J A, *et al*. Characterization of

neutralization sites on the circulating variant of swine vesicular diseasevirus (SVDV): a new site is shared by SVDV and the related coxsackie B5 virus [J]. J Gen Virol, 2002, 83: 35-44.

[4] Kanno T, Inoue T, Wang T, *et al*. Identification of the location of swine vesicular disease virus with neutralization resistant mutant [J]. J Gen Virol, 1995, 76:3099-3106.

[5] Hua Q Y, Jin N Y, XU Z Z （花群义，金宁一，徐自忠） *et al*. Cloning and Sequence Analysis of N gene encoding vesicular stomatitis virus nucleocapsid protein [J]. Chin J Biologicals (中国生物制品学杂志), 2004, 1: 7-10.

[6] Maniatas T, Frisch E F, Sambrook M D. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory [M]. New York: Cold Spring Harbor, 1989.

[7] Werner S. Expression of coxsackie virus capsid protein in Escherichia coli and generation of virus-specific antisera [J]. DNA, 1988,7:307-316.

[8] Enger-Valk B E, Jore J, Pouwels P H. Expression in Escherichia coli of capsid protein VP1 of poliovirus type 1 [A]. In: Chanock R M, Lerner R A. Modern Approaches to Vaccines [C]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1990, 173-175.

[9] Guzman L M, Belin D, Carson M J, *et al*. Tight Regulation, Modulation, and High-Level Expression by Vectors Containing the Arabinose pqad Promoter [J]. J Bacteriol, 1995, 177: 4121-4130.

Notice of Inviting Contributions for English Version of Virologica Sinica

VIROLOGICA SINICA is an academic, professional periodical. It is pubished bimonthly by the Wuhan Institute of Virology, CAS and Chinese Society for Microbiology and distributed worldwide. It is the core issue in the biology and medicine science in China, and indexed and abstracted in Chemical Abstract (CA), BIOSIS previews (BA), Cambridge Science Abstracts(CSA), Life Sciences Collection, TOXLINE, Abstract Journal VINTI (AJ VINTI), Index of Copurnicus (IC), Excepta Media (EM) and some Chinese periodical citation abstracts and Databases.

VIROLOGICA SINICA will change its publishing language into English in 2007. It will be published for every 2 month. English manuscripts from any part of the world will be welcome, and should be sent to:

Editorial Office for Virologica Sinica,
Xiaohongshan Centrial 44,
Wuchang, Wuhan 430071,
CHINA

E-mail：bjb@wh.iov.cn