

登革2型病毒E蛋白结构域III的表达及多克隆抗体制备*

邹 罡, 青 敏, 蔡全信, 袁志明**

(中国科学院武汉病毒研究所, 湖北武汉 430071)

Expression of Domain III of the DENV-2 E Protein and Preparation of Anti-His-D2EIII Polyclonal Antibody

ZOU Gang, QING Min, CAI Quan-xin, YUAN Zhi-ming**

(Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China)

Abstract: The gene fragment coding for amino acids 281 to 395 of the E protein of DENV-2 (New Guinea C strain) was amplified by PCR, comprising Domain III (amino acids 295 to 395) of the E protein. The fragment was cloned into pMD18-T vector and subcloned to expression vector pET-28a and pMAL-c2X. The recombinant plasmid pET-28a-D2EIII was transformed into *E.coli* BL21(DE3) and the pMAL-c2X-D2EIII was transformed into *E.coli* TB1. The induced recombinant proteins were purified by His-tag and MBP-tag affinity chromatography, respectively. The purified protein His-D2EIII was used to immunize rabbit three times at two-week intervals, the immunized rabbit produced high titer anti-His-D2EIII polyclonal antibody. The result of western blot indicated that the expressed fusion protein could react with the polyclonal antibody against Domain III of E protein.

Key words: DENV-2; E protein; Domain III; Affinity chromatography; Polyclonal antibody

关键词: 登革2型病毒; E蛋白; 结构域III; 亲和层析; 多克隆抗体

中图分类号: Q7

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2006)06-0619-03

登革病毒(Dengue virus, DENV)属于黄病毒科(Flaviviridae),黄病毒属(Flavivirus),为单股正链RNA病毒,有4个不同的血清型(DENV-1,2,3,4),主要通过埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)和白纹伊蚊(*Aedes albopictus*)传播,可引起登革热、登革出血热、登革休克综合征等多种疾病^[1,2]。

E蛋白是位于DENV表面的结构蛋白,由495个氨基酸组成,它既含有黄病毒亚群特异的和登革病毒血清型特异的抗原表位,又有与中和、血凝抑制作用有关的抗原表位,是病毒颗粒的主要包膜蛋白^[3]。Modis等研究表明,DENV-2型E蛋白以延伸的二聚体形式平铺在病毒表面,折叠成3个不同的区域。其中结构域I是一个 β 桶状中心结构;结构域II形成一个延伸的指状结构;结构域III为IgG免疫球蛋白样折叠,在介导病毒与宿主受体的融合

中具有重要的功能^[4,5]。

结构域III只包含诱导中和抗体的型与亚型特异性抗原表位,不含有诱导产生非中和抗体,交叉反应抗体的抗原表位,因而减少了产生抗体依赖的增强作用的危险^[6]。通过以蝉传

脑炎病毒为模型的E蛋白的结构和功能分析,Mandl等将E蛋白的303aa~395aa定义为抗原结构域III^[7]。本研究中我们在大肠杆菌中成功地表达并纯化出了His-D2EIII、MBP-D2EIII融合蛋白,用His-D2EIII免疫家兔,获得了抗His-D2EIII的多克隆抗体,这为进一步的研究奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株DH5a、

收稿日期: 2006-07-07, 修回日期: 2006-09-20

* 基金项目: 国家“863”高技术发展计划资助项目(2005AA219070)

作者简介: 邹 罡(1982-), 男, 江苏宜兴籍, 博士研究生, 研究方向为登革病毒与宿主相互作用机理。

** 通讯作者: 袁志明(1963-), 男, 湖北浠水籍, 研究员, 主要从事昆虫病原细菌基础和应用基础研究。

Corresponding author. Tel: 027-87198195, E-mail: yzm@pentium.whiov.ac.cn

BL21(DE3)和 TB1 由本实验室保存; 含有登革 2 型病毒 PrM-Envelope 编码区的质粒 pMT-Env 由美国密歇根大学 Rory Marks 博士馈赠; His-bind purification kit 购于 Novagen 公司; pMD18-T 载体, 各种限制性内切酶、Taq 酶、T4DNA 连接酶购于 Takara 公司; 免疫用的家兔由本所动物中心提供。

1.2 表达载体的构建与鉴定

根据登革 2 型病毒 (新几内亚 C 株) 包膜蛋白基因序列 (GenBank 登录号: M29095) 设计了两对引物用于 E 蛋白结构域 III 片段的 PCR 扩增。引物 (划线部分为酶切位点) 由上海生工公司合成。

pET-*NdeI*-D2EIII-F: 5'-CGACCATATGGGACATCT

CAAGTGCAGGC-3'

pET-*XhoI*-D2EIII-R: 5'-CCGCTCGAGTTATCCTTTC

TTAAACCAGTTGA-3'

pMAL-*SalI*-D2EIII-F: 5'-CGGGTCGACGGACATCT

CAAGTGCAGGC-3'

pMAL-*PstI*-D2EIII-R: 5'-GCCCTGCAGTTATCCTTT

CTTAAACCAGTTGA-3'

参照 Sambrook 法, PCR 扩增目的基因, 切胶回收 PCR 产物, 分别克隆至 pMD18-T 载体, 筛选阳性克隆 TA-pET-D2EIII 和 TA-pMAL-D2EIII, 插入片段由测序仪测序验证。

质粒 TA-pET-D2EIII 和 TA-pMAL-D2EIII 经对应的双酶切后, 回收目的片段, 然后分别与质粒 pET-28a、pMAL-c2X 连接, 转化大肠杆菌 DH5 α , 筛选鉴定获得重组质粒分别命名为 pET-28a-D2EIII 和 pMAL-c2X-D2EIII。

1.3 His-D2EIII、MBP-D2EIII 融合蛋白的诱导表达和纯化

重组质粒 pET-28a-D2EIII 转化大肠杆菌 BL21(DE3)后, 经筛选鉴定出的阳性克隆, IPTG 诱导 5h 后, 离心收集菌体, 按 Novagen 的 His-bind purification kit 使用说明, 利用 6mol/L 尿素在变性条件下纯化包涵体蛋白。

重组质粒 pMAL-c2X-D2EIII 转化大肠杆菌 TB1 后, 筛选鉴定出的阳性克隆, IPTG 条件下诱导 5h 后, 离心收集菌体, 按 NEB 的 pMAL 蛋白纯化手册纯化可溶性蛋白。纯化后的蛋白经 SDS-PAGE 分析蛋白纯度, 同时利用紫外吸收法测定蛋白浓度和产量。

1.4 抗 His-D2EIII 多克隆抗体的制备及 Western blot 鉴定

纯化得到的 His-D2EIII 融合蛋白, 经 SDS-

PAGE 后, 切下目的条带, 溶于生理盐水中, 在研钵中充分研磨, 分三次免疫一只家兔, 每次蛋白用量约 400 μ g, 间隔 2 周增强一次, 第 3 次免疫 9d 后采取血清。免疫家兔由本所动物中心完成。

诱导表达后的 His-D2EIII, MBP-D2EIII 融合蛋白经 SDS-PAGE, 半干电转移到硝酸纤维素薄膜上, 利用 Western blot 对其鉴定^[8]。

2 结果

2.1 pET-28a-D2EIII, pMAL-c2X-D2EIII 表达载体的构建与鉴定

pET-28a-D2EIII, pMAL-c2X-D2EIII 分别用 *NdeI*, *XhoI* 和 *SalI*, *PstI* 双酶切分析, 证明插入片段大小同预期结果一致 (图 1)。同时, 测序结果表明插入的目的基因片段的序列同 GenBank 上的序列完全一致 (GenBank 登录号: M29095)。

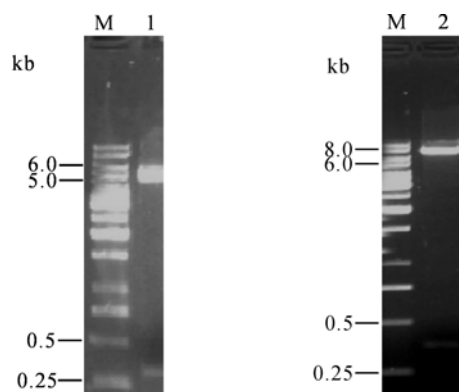


图 1 pET-28a-D2EIII、pMAL-c2X-D2EIII 的酶切鉴定
Fig.1 Identification of pET-28a-D2EIII, pMAL-c2X-D2EIII by enzyme digest

M, DNA marker; 1, pET-28a-D2EIII digested with *NdeI* and *XhoI*; 2, pMAL-c2X-D2EIII digested with *SalI* and *PstI*.

2.2 His-D2EIII, MBP-D2EIII 融合蛋白的诱导表达和纯化

经 His-bind purification kit 亲和层析纯化后可得到纯化的 His-D2EIII 融合蛋白, SDS-PAGE 结果表明, 纯化蛋白的分子量与预期分子量 (15.3kDa) 相当 (图 2), 纯度为 95% 以上。紫外吸收法测得蛋白浓度为 0.3mg/mL 左右, 产量为 30mg/L 发酵物。经 NEB 的 Amylose Resin 亲和层析纯化后可得到纯化的 MBP-D2EIII, SDS-PAGE 结果表明, 纯化蛋白的分子量与预期分子量 (56.5kDa) 相当 (图 2), 纯度为 95% 以上。紫外吸收法测得蛋白浓度为 0.2mg/mL 左右, 产量为 40mg/L 发酵物。

2.3 抗 His-D2EIII 的多克隆抗体的特异性检测

纯化的 His-D2EIII 融合蛋白免疫家兔三次后, 琼脂双扩散测得抗体效价达到了 1:6400, 表明

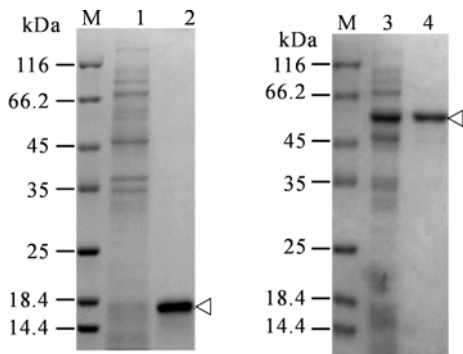


图 2 表达及纯化的 His-D2EIII, MBP-D2EIII 重组蛋白分析
Fig.2 SDS-PAGE analysis of His-D2EIII, MBP-D2EIII recombinant proteins

M, Protein marker; 1, Supernatant of His-D2EIII protein; 2, Purified His-D2EIII; 3, Supernatant of MBP-D2EIII protein; 4, Purified MBP-D2EIII.

该抗原能诱导家兔产生较强的免疫应答。Western blot 显示, 制备的抗 His-D2EIII 抗体对 His-D2EIII, MBP-D2EIII 蛋白具有较强的特异性, 可以有效识别 E 蛋白 Domain III 抗原。利用抗 His-tag 的单抗和抗 His-D2EIII 的多抗杂交时在 15.3kDa 处都出现了相应的 His-D2EIII 条带, 利用抗 His-D2EIII 的多抗杂交时在 56.5kDa 处出现了相应的 MBP-D2EIII 条带, 但利用多抗杂交时在 33kDa 处还出现了一条非特异性条带, 结果见图 3。

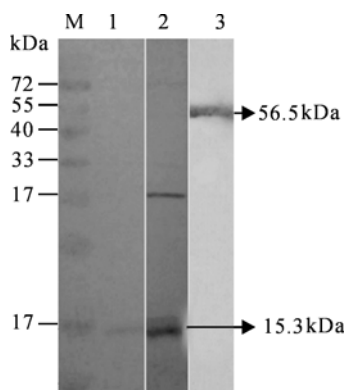


图 3 D2EIII 融合蛋白表达的 Western blot 检测

Fig.3 Western blot analysis of recombinant D2EIII protein

M, Prestained protein marker; 1, Western blot of supernatant of His-D2EIII with anti-His-tag monoclonal antibody; 2, Western blot of supernatant of His-D2EIII with Anti-His-D2EIII polyclonal antibody; 3, Western blot of supernatant of MBP-D2EIII with Anti-His-D2EIII polyclonal antibody.

3 讨论

本实验利用两种不同表达载体成功表达了登革 2 型病毒 E 蛋白 Domain III, 同时实验中还发现在 pET-28a 中, 目的蛋白即使在低温与低浓度 IPTG 诱导条件下仍易于形成包涵体, 这给下游纯化工作带来了麻烦, 但 His-tag 融合标签较小, 因而对目的蛋白空间构象影响较小, 对制备多克隆抗体有利; 而在 pMAL-c2X 中, 虽然 75% 的目的蛋白以可

溶性形式存在, 并且产量略高, 易于纯化, 但 MBP-tag 融合标签较大, 可能会影响到目的蛋白的正确折叠, 因此本实验选用了 His-D2EIII 作为抗原去免疫家兔。用尿素变性条件下纯化包涵体的方法纯化的目的蛋白免疫家兔, 可刺激家兔产生特异性的抗体, 并且在第三次免疫后抗体滴度就达到了 1:6400。在 Western blot 中我们发现用该多抗与原核表达的 His-D2EIII 杂交时在 33kDa 处还出现了一条非特异性条带, 我们分析有两种可能原因: 一、His-D2EIII 形成了同源二聚体; 二、制备的多抗存在非特异性, 因为 Domain III 中还含有其它抗原表位可能与其它蛋白相识别。

在本研究中我们用亲和层析的方法纯化得到了 D2EIII 蛋白, 成功地为快速大量制备 DENV 的诊断抗原和基因工程重组疫苗打下基础, 用该蛋白免疫家兔得到了高滴度的抗体, 表明抗原具有良好的免疫原性, 为以后进一步的实验研究奠定了基础。

References

- [1] Diamond M S, Edgil D, Roberts T G, *et al.* Infection of human cells by dengue virus is modulated by different cell types and viral strains [J]. *Virology*, 2000, 74 (17): 7814-7823.
- [2] Rey F A. Dengue virus envelope glycoprotein structure: new insight into its interactions during viral entry [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100 (12): 6899-6901.
- [3] Salas-Benito J S, del Angel R M. Identification of two surface proteins from C6/36 cells that bind dengue type 4 virus [J]. *Virology*, 1997, 71 (10): 7246-7252.
- [4] Modis Y, Ogata S, Clements D, *et al.* A ligand binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100 (12): 6986-6991.
- [5] Chen Y, Maguire T, Hileman R E, *et al.* Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate [J]. *Nat Med*, 1997, 3 (8): 866-871.
- [6] Crill W D, Roehrig J T. Monoclonal antibodies that bind to domain III of dengue virus E glycoprotein are the most efficient blockers of virus adsorption to vero cells [J]. *Virology*, 2001, 75 (16): 7769-7773.
- [7] Rey, F A, Heinz F X, Mandl C W, *et al.* The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2Å resolution [J]. *Nature*, 1995, 375: 291-298.
- [8] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning* [M]. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory press, 1989, 345-348.