

鱼类病毒性出血性败血症 病毒核蛋白基因的原核表达

杜娟^{1,2,3} 兰文升^{2,3} 刘芸^{2,3} 郑晓聪^{2,3} 陈孝煊¹

1. 华中农业大学水产学院, 武汉 430070; 2. 深圳市外来有害生物重点实验室, 深圳 518045;
3. 深圳出入境检验检疫局, 深圳 518045

摘要 通过逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)获得编码病毒性出血性败血症病毒(*Viral hemorrhagic septicemia virus*, VHSV)核蛋白基因, 将其克隆至原核表达载体 pET28a, 并在 *E. coli* BL21(DE3)中得到表达, 用 SDS-PAGE 与 Western-blot 对表达产物进行鉴定。结果表明, 通过 RT-PCR 扩增获得长度为 1 221 bp 核蛋白基因片段, 诱导表达重组质粒 pET28a-N, 经 SDS-PAGE 检测, IPTG 终浓度为 1 mmol/L 时, 诱导 5 h 蛋白表达量最高, 获得的目的蛋白大小与 N 蛋白的预测分子质量一致, 约为 48 kDa。诱导后的菌液进行超声波破碎后, 将沉淀和上清分别用于 SDS-PAGE 电泳, 结果表明目的蛋白主要以包涵体的形式存在。表达蛋白经过复性、纯化, 得到了较高纯度的可溶性蛋白。经 Western-blot 检测表明, 该表达产物能被羊抗 VHSV 阳性血清特异性识别。

关键词 病毒性出血性败血症病毒; 核蛋白; 基因克隆; 原核表达; 可溶性蛋白

中图分类号 Q 786 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2012)03-0376-05

病毒性出血性败血症(viral hemorrhagic septicemia, VHS)是一种以暴发性流行为主的传染病, 常引起鲑鳟鱼类和多种海水鱼类发病^[1-5], 死亡率高达 90%^[6], 该病对世界水产养殖业的发展造成巨大经济损失。病毒性出血性败血症病毒(viral hemorrhagic septicemia virus, VHSV)是该病的致病因子, 属于弹状病毒科粒外弹状病毒属。迄今为止, 由于没有 VHSV 商用疫苗, 甚至缺乏有效防控措施, VHS 一旦进入我国引起暴发流行, 无疑将给水产业造成重大威胁。核蛋白是 VHSV 的主要结构蛋白。相关研究表明 VHSV 核蛋白具有良好的免疫原性, 并且与负链 RNA 基因组具有密切的关系, 构成了病毒粒子的核心结构^[7]。Lorenzo 等^[8]用抗 VHSV N 蛋白单克隆抗体建立了 VHSV 快速中和免疫过氧化物酶测定方法, 表明核蛋白在激发宿主的免疫反应时也具有较好的抗原性。Carolina 等^[9]用 VHSV 感染虹鳟单核细胞系(RTS-11), 其研究结果表明, 在蛋白水平上, 相对于糖蛋白, 能更早地检测到核蛋白。因此, 针对 VHSV 核蛋白建立相关免疫

学检测方法具有一定的意义。本研究通过原核表达系统对 VHSV 核蛋白基因进行了表达, 该表达产物能被羊抗 VHSV 阳性血清特异性识别, 可为进一步开展 VHSV 的侵染机制及亚细胞定位分析奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1) 毒株、细胞、菌株与质粒。VHSV 毒株、*E. coli* DH5a、*E. coli* BL21(DE3) 菌株, pET28a 载体和鲤鱼上皮瘤细胞(*Epithelioma papulosum cyprini*, EPC)等由笔者所在实验室保存, pMD18-T 载体购自大连宝生物公司。

2) 主要试剂。AMV-反转录酶、La Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、各种限制性内切酶以及小量胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自大连宝生物公司, 病毒 RNA 提取试剂盒购自 QIAGEN 公司, His Tag 融合蛋白纯化柱购自默克公司, 羊抗 VHSV 血清由中国检科院赠送, HRP 标记的鼠抗

收稿日期: 2011-07-28

基金项目: 质检公益性行业科研专项项目(201010020)

杜娟, 硕士研究生。研究方向: 水产动物疾病。E-mail: juandu1987@163.com

通讯作者: 兰文升, 博士, 兽医师。研究方向: 水生动物疾病。E-mail: lanwshao@yahoo.com.cn

陈孝煊, 教授。研究方向: 水产微生物学。E-mail: chenxx@mail.hzau.edu.cn

羊 IgG 购自 Sigma 公司。

3)引物。根据 GenBank 发表的序列(登录号: FJ362514.1),利用 Primer 5.0 和 Oligo 6.0 设计针对核蛋白(N蛋白)基因的特异性序列。上游引物 P1 5'-CATATGGACGGAGGACTTCGTGC-3' (含有 *Nde* I 酶切位点)和下游引物 P2 5'-GGATCCTTAAATCGGAGTCTCGGGTAGTCCTC-3' (含有 *Bam* H I 酶切位点),由大连宝生物公司合成。

1.2 核蛋白 VHSV-N 基因的克隆

VHSV 病毒由 EPC 进行增殖。取增殖后的 VHSV 病毒悬液,反复冻融 3 次后用试剂盒提取病毒总 RNA。再以总 RNA 为模板进行反转录,合成第一链 cDNA。以反转录产物为模板及合成的上下游引物进行 PCR 扩增,反应条件为 94 °C 预变性 5 min,然后按照 94 °C 变性 30 s,54 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,30 个循环,再 72 °C 10 min。经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离后,用胶回收纯化试剂盒回收目的片段。将回收产物与 pMD18-T 载体连接,16 °C 连接 4 h,再将连接产物转化到 *E. coli* DH5a 感受态细胞中,并涂布于含 100 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 平板,37 °C 过夜培养,随机挑取单菌落,提取质粒,进行双酶切初步鉴定结果后,将阳性克隆送往测序公司进行 DNA 测序。阳性菌株命名为 pMD18-T-N。测序结果用 DNA star 等软件进行分析。

1.3 重组表达质粒 pET28a-N 的构建

将重组质粒 pMD18-T-N 和载体 pET28a,分别用 *Nde* I 和 *Bam* H I 双酶切后,经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离,再用胶回收纯化试剂盒切胶回收目的片段,然后用 T₄DNA 连接酶 16 °C 连接 4 h,构建表达质粒 pET28a-N,并转化到 *E. coli* DH5a 感受态细胞中。涂布含 50 μg/mL 的卡那霉素的 LB 平板,37 °C 过夜培养。次日随机挑取单菌落,提取质粒,进行 PCR、酶切鉴定后,将 pET28a-N/DH5a 重组质粒进行测序验证。

1.4 核蛋白的诱导表达

将 pET28a-N/DH5a 重组质粒转化 BL21 (DE3) 感受态细胞,挑取阳性重组菌 pET28a-N/BL21(DE3) 单菌落于 5 mL 含 50 μg/mL 的卡那霉素的 LB 液体培养基中,37 °C,250 r/min,振荡过夜培养。将过夜培养菌液按 1:20 的比例接种到 LB 液体培养基中,37 °C 振荡培养。当菌液 D_{600} 值达 0.6 时加入终浓度为 1.0 mmol/L 的 IPTG,诱导

6 h,每隔 1 h 收集菌液,诱导后菌液 4 °C,5 000 r/min 离心 5 min,沉淀用 PBS 洗涤 2 次,再用 PBS 重悬后经超声波破碎,进行 SDS-PAGE 分析,观察表达量的变化。另外,将诱导后的菌液进行超声波破碎,4 °C,5 000 r/min 离心 5 min 后将上清和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳分析。

1.5 表达蛋白的复性及纯化

在 1 L LB 培养基中加入 10 mL 过夜培养的菌液,37 °C 振荡培养至 D_{600} 值达 0.6 时加入终浓度为 1.0 mmol/L 的 IPTG,诱导 5 h,收集菌体,用 PBS 重悬后加入终质量浓度为 1 mg/mL 的溶菌酶,冰浴作用 30 min,然后冰浴超声波破碎,再 4 °C,14 000 r/min 离心 15 min,收集沉淀,沉淀再用 PBS 重悬、超声波破碎、离心,如此重复洗涤包涵体几次,沉淀最后用浓度为 8 mol/L 的尿素进行溶解,4 °C,14 000 r/min 离心 15 min,上清即为可溶性包涵体。将用 8 mol/L 的尿素溶解的包涵体装入透析袋内,依次在浓度为 6、4、2 mol/L 的尿素溶液和 PBS(pH 9.0) 中透析 12 h。将透析后获得的产物 4 °C,14 000 r/min 离心 15 min,取上清,以镍离子亲和层析的方法进行纯化,步骤按说明书进行。

1.6 表达蛋白抗原性的检测

将诱导表达的核蛋白经 SDS-PAGE 电泳后转印到 PVDF 膜上,再用 2% BSA 封闭,4 °C 过夜。次日用 PBST 洗膜。将制备的羊抗 VHSV 全病毒血清作为一抗,1:20 000 稀释,37 °C 作用 1 h,将鼠抗羊 HRP-IgG 作为二抗,1:2 000 稀释,37 °C 作用 1 h,最后用 TMB 底物显色液进行显色。

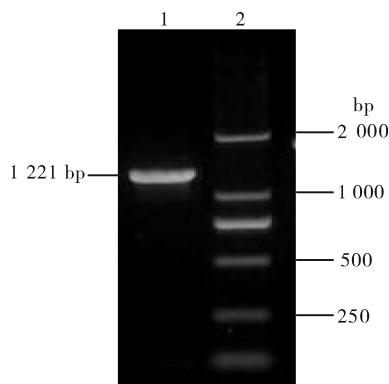
2 结果与分析

2.1 VHSV-N 基因的扩增及重组质粒的鉴定

通过 RT-PCR 方法对 VHSV-N 基因进行扩增,并对扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳鉴定,结果表明扩增到了大小为 1 221 bp 的目的片段(图 1)。其测序结果表明扩增的目的片段没有碱基突变等现象,与模板基因序列相同。

2.2 重组表达质粒 pET28a-N 的鉴定

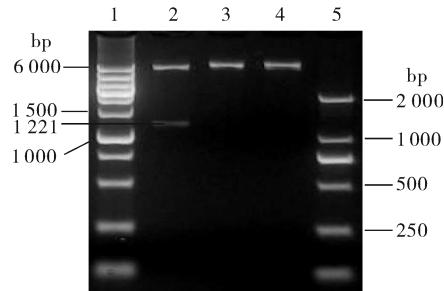
将获得的重组表达质粒 pET28a-N 经 *Nde* I 和 *Bam* H I 双酶切,酶切结果可见有大小约为 1 221 bp 的目的片段和 5 369 bp 的载体片段(图 2),表明目的片段已经正确插入了表达载体,从而成功地构建了表达质粒 pET28a-N。



1. RT-PCR 产物 RT-PCR product; 2. DNA 分子质量标准 DNA marker DL 2 000.

图 1 RT-PCR 产物琼脂糖电泳

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of RT-PCR



1. DNA 分子质量标准 DL100-6 000 DNA marker DL100-6 000; 2. *Nde*I 和 *Bam*HI 酶切 Digested with *Nde*I/*Bam*HI; 3. *Nde*I 单酶切 Digested with *Nde*I; 4. *Bam*HI 单酶切 Digested with *Bam*HI.

图 2 重组质粒 pET28a-N 酶切结果

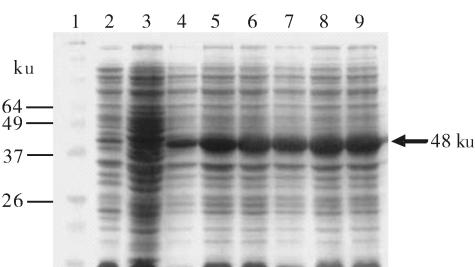
Fig. 2 Restriction enzyme digestion results of pET28a-N plasmid

2.3 核蛋白的诱导表达

将重组质粒 pET28a-N 转化 BL21(DE3) 感受态细胞后, 以 1 mol/L IPTG 诱导后 1~6 h 均表达了预期大小的融合核蛋白, 在分子质量 37~49 ku 处出现了表达的目的蛋白, 与 DNA Star 软件预测的理论值 48 ku 相符, 且在一定范围内随着诱导时间的延长表达量逐渐增多, 在诱导 5 h 时表达量最大(图 3)。超声波处理诱导后菌体, 经 SDS-PAGE 分析表明, 重组蛋白主要在沉淀中, 以不溶性的包涵体形式存在(图 4)。

2.4 表达蛋白的复性与纯化

重组蛋白 N 主要以包涵体的形式存在, 将包涵体进行复性和纯化后获得了可溶性的重组核蛋白。经 SDS-PAGE 分析, 纯化的蛋白为单一条带, 分子质量约为 48 ku(图 5)。

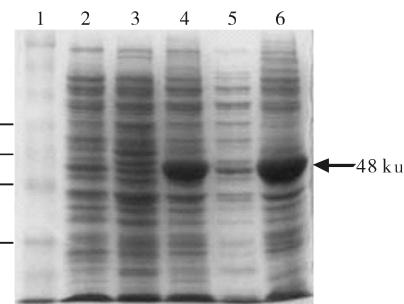


1. 蛋白分子质量标准 Protein marker; 2. 诱导的空载体 pET28a Induced bacteria contained pET28a; 3. 诱导前 Uninduced bacteria; 4~9. 诱导后 1~6 h Products by induced from 1 h to 6 h.

图 3 重组菌 pET28a-N/BL21(DE3)

表达蛋白 SDS-PAGE 鉴定结果

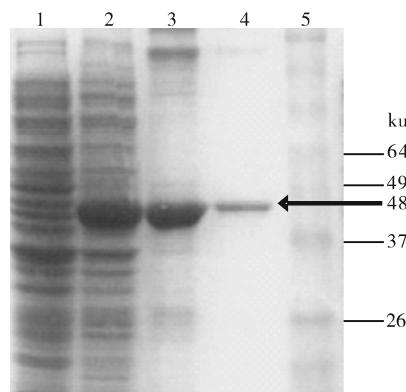
Fig. 3 SDS-PAGE profile of expressed protein



1. 蛋白分子质量标准 Protein marker; 2. 诱导的空载体 pET28a Induced bacteria contained pET28a; 3. 诱导前 Uninduced products; 4. 诱导后 Induced products; 5. 超声上清 Supernatant after supersonic; 6. 超声沉淀 Precipitation after supersonic.

图 4 重组菌诱导表达后超声上清和沉淀 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE supersonic of expressed protein



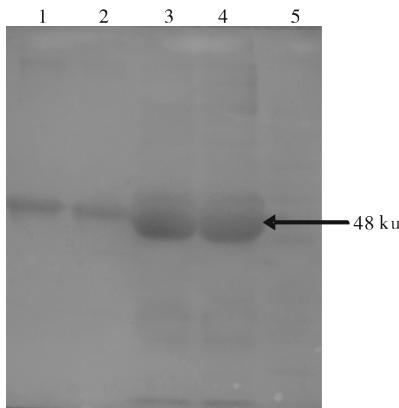
1. 诱导前 Uninduced products; 2. 诱导后总蛋白 Induced products; 3. 透析后的 N 蛋白 Dialyzed product of N protein; 4. 纯化后的 N 蛋白 Purification of N protein; 5. 蛋白分子质量标准 Protein marker.

图 5 纯化后 N 蛋白的 SDS-PAGE 鉴定

Fig. 5 The identification of N protein purification by SDS-PAGE

2.5 表达蛋白抗原性的检测

Western-blot结果如图5,诱导后的菌体蛋白和纯化的核蛋白在37~49 ku处出现了一条明显的特异性条带,且大小与SDS-PAGE出现的目的蛋白相符,而作为对照的未经诱导的菌体蛋白无条带产生(图6)。结果表明目的蛋白在大肠杆菌中得到了正确表达,且表达的核蛋白保留了与羊抗VHSV阳性血清发生特异性反应的抗原性。



1~2. 纯化蛋白 Purified N protein; 3~4. 诱导后 Induced products; 5. 诱导前 Uninduced bacteria.

图6 表达目的蛋白的Western-blot检测

Fig. 6 The identification of expressed protein by Western-blotting

3 讨 论

在过去20年,人们从越来越多的海水和淡水鱼种类中分离到VHSV。到2009年为止,已经从气候温和的北半球,包括北美、亚洲和欧洲的82种鱼体内分离到该病毒,这其中最易感的种类是虹鳟^[10]。鱼类感染该病毒后死亡率极高,鱼苗的死亡率可高达100%,成鱼的死亡率较低,通常为30%~70%,给鲑鳟鱼养殖业造成了巨大的经济损失^[11]。目前我国对于该病的研究较少,且研究主要集中在分子生物学检测方法的建立方面^[12~13],尚无关于核蛋白以及利用其建立免疫学检测方法方面的研究。VHSV核蛋白保守性较强,是完整病毒粒子和被感染的细胞中病毒的主要成分^[14],本研究成功表达出VHSV核蛋白,对于该病毒的基础研究也具有一定的意义。

本试验构建的原核表达载体系统表达的核蛋白多以包涵体形式存在。包涵体主要是由于在重组蛋白的表达过程中缺乏某些蛋白折叠的辅助因子或者环境不适,无法形成正确的次级键等原因形成。本

试验将获得的包涵体多次洗涤、8 mol/L尿素溶解、透析复性和用镍离子亲和层析的方法进行纯化后,获得了可溶性的重组蛋白,且得到了单一的较纯的目的蛋白。在溶解包涵体之前,通常会用温和的表面活性剂或低浓度的变性剂来除去其中的大部分脂质和膜蛋白,以减少这些物质对复性速率的影响^[15]。本试验中只是用PBS对包涵体进行多次洗涤,蛋白即得到了明显纯化。如果变性剂溶解的包涵体只是简单地通过透析除去变性剂,不寻找其合适的复性的条件,聚集体会重新形成。在复性过程中,分别将PBS的pH调节为5.0、7.4和9.0,试验结果表明,在PBS的pH为9.0的条件下,减少了蛋白凝聚物的形成,保证了蛋白以可溶形式存在,这可能与目的蛋白的等电点有关,本试验所获得的目的蛋白预测的等电点为5.01,将PBS的pH调至9.0,在碱性条件下有助于蛋白的溶解。虽然包涵体通过尿素处理后可溶,蛋白的二硫键被打断,失去了其天然结构,但是通过Western分析表明,本试验制备的核蛋白可被羊抗VHSV阳性血清识别,且反应条带单一,说明蛋白复性成功,表达的蛋白具有良好的抗原性。本试验制备的VHSV核蛋白可为进一步开展VHSV的侵染机制及亚细胞定位分析,以及为将要进行的噬菌体展示奠定一定基础。

参 考 文 献

- SCHLÖTFELDT H J, AHNE W. Epizootics in brown trout (*Salmo trutta fario*) caused by VHSV-F1[J]. Journal of Applied Ichthyology, 1988, 4: 147~148.
- HOPPER K. The isolation of VHSV from salmon at Glenwood Springs, Orcas Island, Washington[J]. Am Fish Soc Fish Health News, 1989, 17: 1.
- SCHLÖTFELDT H J, AHNE W, GLENDE W, et al. Occurrence of viral haemorrhagic septicaemia in turbot (*Scophthalmus maximus*)—a natural outbreak[J]. EAFF Bull, 1991, 11: 105~107.
- MEYERS T R, SULLIVAN J, EMMENEGER E, et al. Identification of viral haemorrhagic septicemia virus isolated from pacific cod, *Gadus macrocephalus* in Prince William Sound, Alaska, USA[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 1992, 12: 167~175.
- BRUDESETH B E, EVENSEN O. Occurrence of viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV) in wild marine fish species in the coastal regions of Norway[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2002, 52: 21~28.
- TORDO N, BENMANSOUR A, CALISHER C, et al. Family Rhabdoviridae[G]//The International Committee for Taxonomic

- my of Viruses. The eighth report of the international committee for taxonomy of viruses. San Diego: Academic Press, 2004.
- [7] ARUN A, VIKRAM N. Molecular characterization of the Great Lakes viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) isolate from USA[J]. Virology Journal, 2009, 6:171-187.
- [8] LORENZO G, ESTEPA A, COIL J M. Fast neutralization/immunoperoxidase assay for viral hemorrhagic septicemia with anti-nucleoprotein monoclonal antibody[J]. Journal of Virological Methods, 1996, 58:1-6.
- [9] CAROLINA T, ESTHER S, NIELS L, et al. Effects of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) on the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) monocyte cell line RTS-11[J]. Molecular Immunology, 2008, 45:1439-1448.
- [10] International Office of Epizootics. Manual of diagnostic tests for aquatic animals, 2009 [S/OL]. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/2010/2.3.09.
- [11] SKALL H F, OLESEN N J, MELLERGAARD S. Viral haemorrhagic septicemia virus in marine fish and its implications for fish farming-a review[J]. Journal of Fish Diseases, 2005, 28:509-529.
- [12] 倪穗, 余晓巍, 王建平, 等. 应用巢式逆转录聚合酶链反应检测鱼类病毒性出血性败血症病毒 (VHSV) [J]. 海洋与湖沼, 2009, 40(4):489-493.
- [13] 许建明, 张念之, 蒋一男, 等. Taqman MGB 探针快速定量检测 VHSV 方法的研究[J]. 高技术通讯, 2010, 20(2):208-213.
- [14] MCALLISTER P E, WAGNER R. Structural proteins of two salmonid rhabdoviruses[J]. Journal of Virology, 1975, 15: 733-738.
- [15] HLODAN R, CRAIG S, PAIN R H. Protein folding and its implications for the production of recombinant proteins[J]. Biotechnology & Genetic Engineering Reviews, 1991, 9:47-88.

Prokaryotic expression of recombinant nucleoprotein of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV)

DU Juan^{1,2,3} LAN Wen-sheng^{2,3} LIU Hong^{2,3} ZHENG Xiao-cong^{2,3} CHEN Xiao-xuan¹

1. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. Shenzhen Key Laboratory of Exotic Pests, Shenzhen 518045, China;

3. Shenzhen Entry & Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shenzhen 518045, China

Abstract Viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV), the etiologic agent of viral hemorrhagic septicemia in salmonid, caused great loss in aquaculture industry. Nucleoprotein is an important protein for activation of host immunological reaction. The nucleoprotein gene of VHSV was amplified by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), and cloned into pET28a vector. The recombinant *E. coli* BL21 (DE3) containing pET28a-N was induced and the expressed protein was detected by SDS-PAGE and Western-blot. The nucleoprotein gene fragment was 1 221 bp in length. The 48 ku target protein was expressed successfully after induced by 1 mmol/L IPTG at 5 hours. But the protein was mainly in the form of inclusion bodies after SDS-PAGE detection. The inclusion bodies was refolded with 8 mol/L urea, and diluted in 0.01 mol/L PBS (pH=9.0). Western-blot analysis showed that the expressed production can be identified specifically by the goat anti-VHSV positive serum.

Key words viral hemorrhagic septicemia virus; nucleoprotein; gene clone; prokaryotic expression; soluble protein

(责任编辑:边书京)