

牙鲈(*Paralichthys olivaceus*) β 诺达病毒衣壳蛋白重组表达及复性条件优化*

蒋嫣冉¹ 张亦陈¹ 刘逸尘¹ 耿绪云² 孙金生^{1,2}

(1. 天津市动植物抗性重点实验室 天津师范大学生命科学院 天津 300387;
2. 天津市水生动物疫病预防控制中心 天津 300221)

提要 β 诺达病毒利用其缺乏校正功能的聚合酶进行基因组复制, 易导致突变, 因而具有广泛的宿主感染性, 而且可引发致死率极高的病毒性神经坏死症, 需要有针对性地研究检测及防御方法。本研究以感染牙鲈(*Paralichthys olivaceus*)的 β 诺达病毒为对象, 利用引物设计, 将 His 标签编码序列连接到完整病毒衣壳蛋白 C 端, 构建原核表达载体; 采用 SDS-PAGE 及质谱对表达产物进行分离和鉴定; 重组衣壳蛋白经镍离子亲和柱纯化后进行复性条件的正交优化。结果表明 4 个肽段经质谱鉴定与预期一致; 纯化产物产量可达 36mg/L; 4°C 条件下, 复性缓冲液中尿素和 PBS 的最适浓度为 0.8mol/L 和 0.05mol/L。本研究建立的制备方案可为研制相关疫苗以及开发针对该病毒快速检测产品等提供有价值的参考。

关键词 牙鲈; β 诺达病毒; 重组表达; 复性优化

中图分类号 P735 doi: 10.11693/hyhz20140200045

β 诺达病毒(*Betanodavirus*)亦被称为神经坏死病毒(viral nervous necrosis, NNV), 是已发现的最小鱼类病毒(Chi *et al.*, 2001; Grove *et al.*, 2003; 黄剑南等, 2005), 其基因组包括 2 条正义的、不含有 poly (A)末端的单链 RNA, 分别为 RNA1 和 RNA2。RNA1 的大小约为 3.1kb, 编码非结构 A 蛋白, A 蛋白是病毒的依赖 RNA 的 RNA 聚合酶(RNA-dependant RNA polymerase, RdRp) (Johnson *et al.*, 2000; Tan *et al.*, 2001)。RNA2 的大小约为 1.4kb, 编码病毒主衣壳蛋白(major capsid protein, MCP) (Kroniris *et al.*, 2002)。该病毒能感染 5 个目 17 科的 40 多种经济鱼类, 引发病毒性神经坏死症(Viral nervous necrosis, VNN), 对仔鱼和稚鱼的致死率极高, 是国际兽医组织确定的严重疫病[Munday *et al.*, 1992; 世界动物卫生组织(OIE)鱼病专家委员会, 2001]。该病自 1985 年暴发至今, 已在世界范围蔓延, 我国水产养殖也深受其害。Lin 等(2001)首次在我国

大陆地区的石斑鱼体内分离获得 β 诺达病毒, 基因型分析显示属于 RGNNV 型。2006 年本实验室从天津地区养殖牙鲈体内也检出该病毒(PONNV 毒株)(毛海涛, 2008), 其基因型与 RGNNV 型相似性最高, 这是我国大陆地区首次发现该病毒感染牙鲈的病例, 近几年本地区 β 诺达病毒感染养殖牙鲈的状况频发, 亟需建立有效的防控方法。

牙鲈(*Paralichthys olivaceus*)属硬骨鱼纲、辐鳍亚纲、鲈形目、鲈亚目、鲈科、牙鲈属, 是名贵海水经济鱼类, 极具经济价值, 在我国渔业养殖中占有非常重要的地位。但随着养殖规模扩大和养殖密度提高, 各种病害暴发越来越频繁, 其中由 β 诺达病毒引起的病毒性神经坏死症是严重危害鱼苗的重大病害之一, 由于鱼苗普遍易感染, 且死亡率极高, 经济损失巨大(顾中华等, 2012)。研制有针对性的疫苗对病毒性疫病的防控至关重要, 基于天然病毒的灭活和减

*国家科技支撑计划项目, 2011BAD13B04 号, 2011BAD13B07 号。国家 863 项目, 2012AA092205 号, 2012AA10A401 号; 国家 973 项目, 2012CB114405 号; 蒋嫣冉, 硕士研究生, E-mail: jiangyanran_2008@163.com

通讯作者: 张亦陈, E-mail: zhangycn@outlook.com

收稿日期: 2012-07-25, 收修改稿日期: 2012-09-28

上述包涵体经 WashI buffer (500mmol/L NaCl, 20mmol/L Iminazole, 20mmol PB, 8mol/L Urea)溶解, 涡旋振荡 20min, 4°C, 10000r/min 离心 10min, 上清经 0.22 μ m 滤膜过滤后结合于镍离子亲和柱纯化, 具体操作按照 Bio-Scale Mini profanity IMAC 操作手册进行。

1.2.5 重组蛋白复性条件优化 参考稀释复性主要优化条件(吴正辉等, 2008; 庞怀宇等, 2010), 以大肠杆菌表达产生的重组衣壳蛋白包涵体为材料, 利用正交试验优化重组蛋白的稀释复性条件。以盐离子浓度即 PBS 浓度(A)、尿素浓度(B)、温度(C)以及 pH(D)四个因素做为主要优化参数, 针对每个参数设置 4 个实验条件进行综合正交分析, 研究不同因素对重组蛋白复性影响的大小并找出适宜的匹配条件。参照表 1 设计将分别将 400 μ L 浓度为 1.06 μ g/ μ L 的重组包涵体蛋白溶液加入到 4mL 不同复性缓冲液中在不同温度下复性 12h。复性产物 10000g 离心 10min, 收集上清冻干后用 1 \times PBS 溶解, 利用微量核酸蛋白测定仪进行蛋白浓度测定, 计算可溶蛋白总量。

表 1 重组蛋白复性中的因素与水平参数值
Tab.1 Refolding factors and levels of recombinant protein

水平	因素			
	A(mol/L)	B(mol/L)	C(°C)	D(pH)
1	0.05	0.8	4.0	7.0
2	0.1	1.2	16.0	8.0
3	0.15	1.6	30.0	9.0
4	0.2	2.0	37.0	10.0

2 结果

2.1 原核表达载体的构建

以 RNA2-PMD18T 质粒为模板, 利用引物 NYQf0001e 和 NYQr1014He 扩增长度为 1017bp 的 诺达病毒衣壳蛋白编码区, 电泳检测在约 1kb 处有单一条带, 测序结果与预期一致。目的片段经 *Hind* III 和 *Nde* I 双酶切连入表达载体 Pet-21a, 测序显示含有 T7 启动子驱动的 C 端融合 His 标签的完整病毒衣壳蛋白表达盒, 表明载体构建成功。

2.2 目的蛋白诱导表达与质谱鉴定

含有 RNA2-Pet21a 表达载体的大肠杆菌在 37°C 条件下培养至 OD = 0.5—0.6, 加入 IPTG 至终浓度为 1mmol/L, 进行诱导表达, 分别在 0、0.5、1、2、3、

4、5h 点取样, 破碎菌体后分别取上清和沉淀, 经 15% SDS-PAGE 分离检测。结果显示对照组在预期大小没有明显条带, 实验组在 37kDa 左右有预期大小条带, 且随诱导时间延长表达量也随之增加并在约 5h 后达到峰值(图 1)。用洁净手术刀小心切取目标条带经质谱鉴定, 利用 LC-ESI-MS 进行分析和鉴定, 结果采用 BioWorks 软件与 SEQUEST 数据库进行比对, 发现目标蛋白有 -ISQAVLPAGTGTGTYVVVDATIVPDLR-、-LILLCVGNNTDVVNVSVLCR-、-FAGNAGTPAGWFR-、-QILLPVGTVCTR-4 条肽段与预期蛋白中的相应氨基酸序列完全匹配(图 2), 由此判定上述蛋白条带即为表达的重组衣壳蛋白。

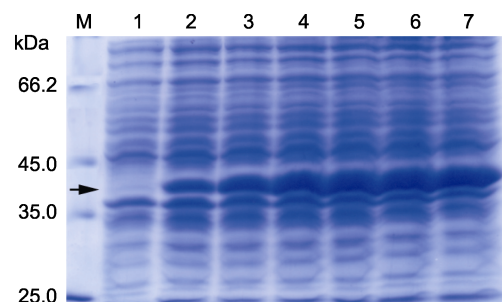


图 1 重组衣壳蛋白在大肠杆菌 BL21(DE3)pLsS 中的表达

Fig.1 Expression of recombinant capsid protein in *E. coli* BL21(DE3)pLsS

M: 蛋白分子量标记; 1: 未加 IPTG 诱导表达的全菌蛋白; 2—7: 分别为诱导 0.5h、1h、2h、3h、4h、5h 的全菌蛋白(箭头表示重组目的蛋白)

2.3 衣壳蛋白纯化及复性条件优化

离心收集诱导后的发酵菌体, 破碎后取上清经镍离子亲和柱纯化, SDS-PAGE 电泳检测表明获得单一条带, 纯度 >98%(图 3)。正交试验中包涵体溶液经 12h 稀释复性后, 离心取上清, 冻干后用 1 \times PBS 溶解并测量蛋白浓度, 计算可溶蛋白总量。测量结果见表 2, 直接分析表明, 重组衣壳蛋白初步复性的最佳条件为 A₁B₁C₁D₁, 即在温度为 4°C, 复性缓冲液中 PBS 浓度 0.05mol/L, 尿素浓度 0.8mol/L, pH 为 7 的条件下复性效果最好, 其复性前蛋白总量为 424 μ g, 复性后可溶蛋白总量为 73.08 μ g, 蛋白复性率为 17.24%。极差大小为 B > D > A > C, 表明尿素浓度对重组蛋白复性的影响最大, 其次是复性缓冲液的 pH, PBS 浓度和温度对复性影响较小。方差分析结果见表 3, 计算得到因素的偏差平方和、自由度、F 比、临界值, 显示出各因素对重组蛋白复性影响的显著性, 因素显著性程度为 B > D > C > A。

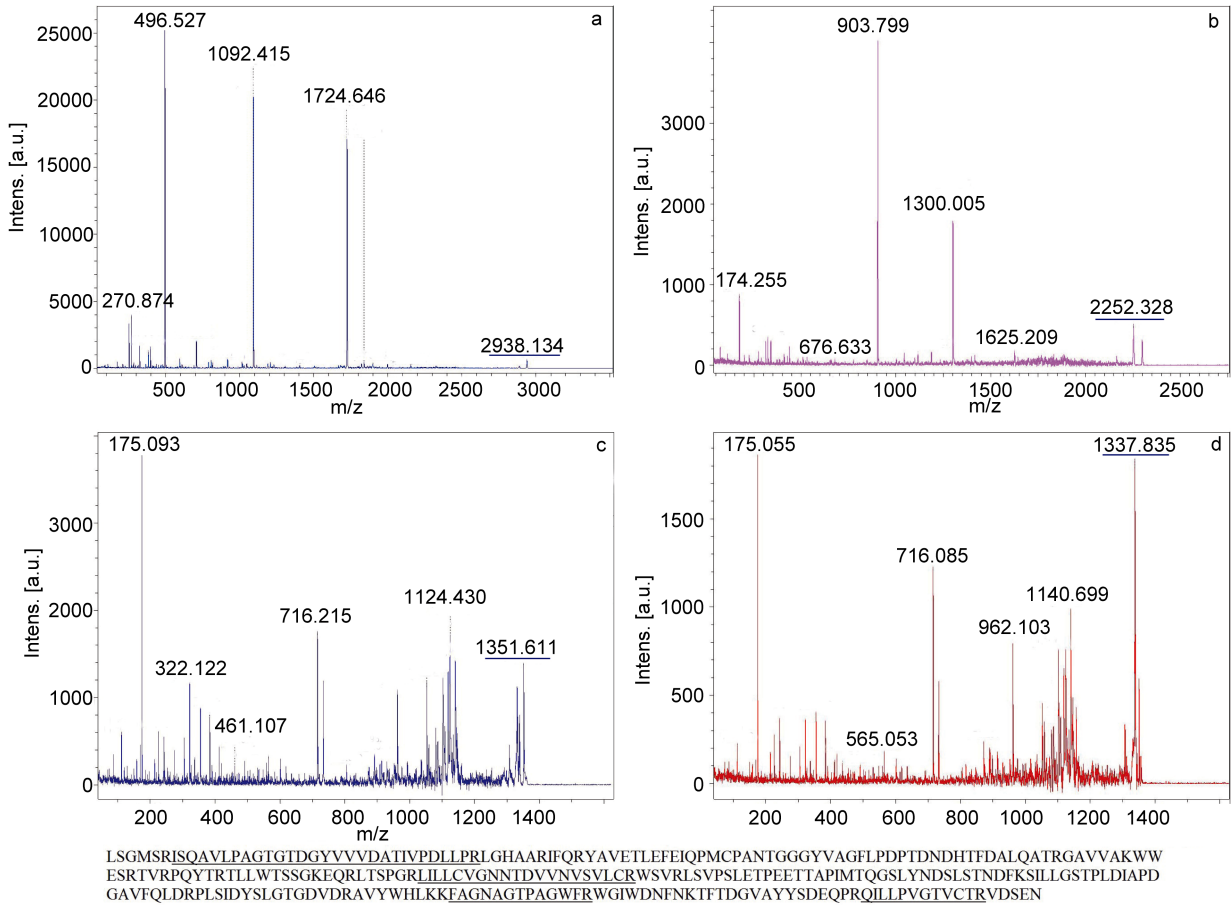


图 2 重组蛋白的质谱鉴定

Fig.2 Mass spectrum verified the recombinant capsid protein

a、b、c、d 中下划线峰值提示为检出的衣壳蛋白预期肽段。横坐标代表核质比, 纵坐标代表离子强度

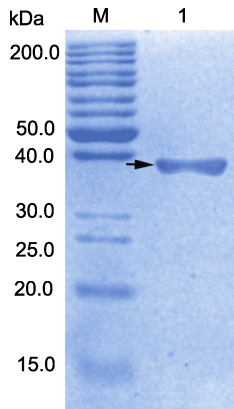


图 3 纯化后重组蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig.3 SDS-PAGE analysis of purified recombinant protein

M: 蛋白分子量标记; 1: 纯化后的重组蛋白

表 2 $L_{16}(4)^4$ 正交试验结果分析

Tab.2 Analysis of orthogonal test

试验号	因素				可溶蛋白总量 (μg)
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	73.08
2	1	2	2	2	68.81
3	1	3	3	3	72.62
4	1	4	4	4	70.77
5	2	1	2	3	72.93
6	2	2	1	4	65.31
7	2	3	4	1	71.57
8	2	4	3	2	67.61
9	3	1	3	4	70.11
10	3	2	4	3	70.59
11	3	3	1	2	70.62
12	3	4	2	1	71.49
13	4	1	4	1	72.17
14	4	2	3	2	70.50
15	4	3	2	3	71.28
16	4	4	1	4	68.59
均值 1	71.32	72.07	69.40	71.66	
均值 2	69.36	68.80	71.13	71.28	
均值 3	70.70	71.52	70.21	71.18	
均值 4	70.64	69.62	71.28	69.37	
极差	1.96	3.27	1.88	2.29	

试验结果为重复试验 3 次的平均值

3 讨论

诺达病毒(Nodaviridae)可分为主要感染昆虫的诺达病毒属(*Alphanodavirus*)以及以鱼类为主要感染对象的诺达病毒属(*Betanodavirus*)(刘传凤等, 2011), 其中诺达病毒根据来源、感染宿主以及致病

表 3 正交试验方差分析
Tab.3 Analysis of variance for orthogonal test

因素	偏差平方和	自由度	F 值	F 临界值	显著性
PBS 浓度	8.17	3	0.54	3.49	4
尿素浓度	28.73	3	1.90	3.49	1
温度	9.15	3	0.60	3.49	3
pH	14.32	3	0.95	3.49	2
误差	60.38	12			

性等方面的不同可分为 4 种基因型。诺达病毒衣壳蛋白具有大量抗原表位,可诱导宿主产生保护性抗体,因此可通过体外表达该病毒的衣壳蛋白来研制抗病毒疫苗(Hegde *et al*, 2002)。但是,不同诺达病毒株系衣壳蛋白之间虽具有较高的相似性,但也存在差异,主要原因是其复制所依赖的聚合酶 RdRp 校正能力弱,容易引发突变,从而产生针对不同宿主细胞表面受体的表位,因此该病毒具有非常广泛的宿主侵染性。基于诺达病毒这一特点,有必要研制有针对性的疫苗产品,以提高保护效率;另一方面也可为进一步研究其与特定宿主细胞表面相互识别及结合位点的信息提供参考。近年来已有一些研究尝试利用原核表达系统制备诺达病毒衣壳蛋白。陈晓艳等(2005)将斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)神经坏死病毒(orange-spotted nervous necrosis virus, OGNV)衣壳蛋白基因连接到 pet32a 表达载体,转化至大肠杆菌 BL21(DE3),表达获得分子量为 55.3kDa 的融合蛋白。苏友禄等(2010)将赤点石斑鱼(*Epinephelus akaara*)神经坏死病毒(RGNV)主衣壳蛋白(MCP)基因进行原核重组表达,得到分子量约为 44.5kDa 的重组蛋白。Tanaka 等(2001)将七带石斑鱼(*Epinephelus septemfasciatus* Thunberg)诺达病毒的 MCP 基因在大肠杆菌中进行了融合表达,提取包涵体溶液免疫动物后,用不同滴度的病毒液进行攻毒。低剂量病毒攻毒组的相对存活率达 69%—88%,平均为 78.5%,高剂量病毒攻毒组的相对存活率为 35%—37%,因此可利用重组诺达病毒衣壳蛋白制备疫苗。本研究针对感染牙鲆的诺达病毒,利用大肠杆菌表达系统,构建用于制备该病毒衣壳蛋白的表达载体 RNA2-Pet21a,转化 BL21(DE3)plysS 后经诱导表达获得约 37kDa 的重组蛋白,质谱鉴定为诺达病毒衣壳蛋白,这将有助于进一步研制有针对性的疫苗或检测制品。

工业生产重组蛋白药物,一半以上是在大肠杆菌中表达的,并多以包涵体形式存在,因此,复性过

程对生产效率和生产成本至关重要,对工业生产影响巨大(冯小黎, 2001; 吴正辉等, 2008)。通常,天然构象的蛋白较包涵体形式具有更多的抗原表位,免疫原性亦更高,因此利用复性后的衣壳蛋白有望获得更佳的免疫效果,但目前对于重组该病毒衣壳蛋白的包涵体复性条件的分析鲜有报道。本研究构建的诺达病毒衣壳蛋白表达载体转化宿主菌,经诱导表达后利用 SDS-PAGE 分析发酵液以及菌体裂解液等组分,发现表达的重组蛋白主要以包涵体的形式存在,这与已报道的一些诺达病毒衣壳蛋白重组表达结果一致(陈晓艳等, 2005; 苏友禄等, 2010)。产物经镍离子亲和柱纯化后得到目的蛋白的单一的条带,在此基础上,尝试了对重组蛋白的包涵体进行复性条件的优化。通过正交试验着重分析了 4 种关键因素对复性效果的影响,数据分析中极差是反映试验因素影响的关键参数,极差越大表明其对试验结果的影响越大,本研究中极差最大的为 B,说明尿素对该包涵体复性的影响较大,其次是复性缓冲液 pH, PBS 浓度和温度相对影响较小。复性后蛋白浓度最高的因素组合为 A₁B₁C₁D₁,即在 4°C 条件下,利用 PBS 浓度 0.05mol/L, 尿素浓度为 0.8mol/L, pH 为 7 的缓冲液对包涵体进行稀释复性可以获得较好的效果,其蛋白复性率为 17.24%,是较理想的复性条件。本研究成功构建了诺达病毒衣壳蛋白原核表达载体,实现重组蛋白高效表达,并优化了复性条件,可为今后批量放大生产提供技术支持,亦可为同类研究提供重要参考。

参 考 文 献

- 毛海涛, 2008. 养殖牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)病毒性神经坏死病的调查及诊断技术研究. 天津: 天津师范大学硕士学位论文, 12—13
- 世界动物卫生组织(OIE)鱼病专家委员会, 2001. 水生动物病害诊断手册. 北京: 中国农业出版社, 80—83
- 冯小黎, 2001. 重组包涵体的折叠复性. 生物化学与生物物理进展, 28(4): 482—485
- 刘传凤, 张珈敏, 胡远扬, 2011. 野田村病毒 RNA 的复制机制. 微生物学通报, 38(9): 1418—1424
- 苏友禄, 郭志勋, 冯娟等, 2010. 赤点石斑鱼神经坏死病毒主衣壳重组蛋白多克隆抗体的制备. 南方水产, 6(6): 8—13
- 吴正辉, 郜金荣, 余应龙等, 2008. 不同复性条件对重组人组织纤溶酶原激活剂复性的影响. 武汉大学学报(理学版), 54(4): 462—466
- 陈晓艳, 翁少萍, 殷志新等, 2005. 斜带石斑神经坏死病毒主

- 衣壳蛋白的原核表达和纯化. 中山大学学报, 44(6): 83—86
- 庞怀宇, 吴娇娇, 李素霞等, 2010. 正交试验优化黏质沙雷菌脂肪酶包涵体复性条件. 食品与药品, 12(1): 4—6
- 顾中华, 张亦陈, 耿绪云等, 2012. 牙鲆 诺达病毒环介导等温扩增检测方法的建立. 天津水产, (1): 10—14
- 黄剑南, 林 鑫, 翁少萍等, 2005. 赤点斑神经坏死病毒外壳蛋白全基因克隆与序列分析. 水产学报, 29(3): 429—432
- Chi S C, Lo B J, Lin S C, 2001. Characterization of grouper nervous necrosis virus. Journal of Fish Diseases, 24(1): 3—13
- Grove S, Johansen R, Dannevig B H *et al*, 2003. Experimental infection of Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* with nodavirus: tissue distribution and immune response. Diseases of Aquatic Organisms, 53(3): 211—221
- Hegde A, Chen C L, QIN Q W *et al*, 2002. Characterization, pathogenicity and neutralization studies of a nervous necrosis virus isolated from grouper, *Epinephelus tauvina*, in Singapore. Aquaculture, 213(1): 55—72
- Johnson K N, Zeddarn J L, Ball L A, 2000. Characterization and construction of functional cDNA clones of pariacoto virus, the first *Aaphanodavirus* isolated outside Australasia. Journal of Virology, 74(11): 5123—5132
- Kroniris J V, Sideris D C, 2002. Intramolecular disulfide bonding is essential for betanodavirus coat protein conformation. Journal of General Virology, 83(9): 2211—2214
- Lin L, He J, Mori K *et al*, 2001. Mass mortalities associated with viral nervous necrosis in hatchery-reared groupers in the People's Republic of China. Fish Pathology, 36(3): 186—188
- Munday B L, Langdon J S, Hyatt A *et al*, 1992. Mass mortality associated with a viral-induced vacuolating encephalopathy and retinopathy of larval and juvenile barramundi, *Lates calarifer* Bloch. Aquaculture, 103(3): 197—211
- Tan C, Huang B, Chang S F *et al*, 2001. Determination of the complete nucleotide sequences of RNA1 and RNA2 from greasy grouper (*Epinephelus tauvina*) nervous necrosis virus, Singapore strain. Journal of General Virology, 82(3): 647—653
- Tanaka S, Mori K, Arimoto M *et al*, 2001. Protective immunity of sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* Thunberg, against experimental viral nervous necrosis. Journal of Fish Diseases, 24(1): 15—22

EXPRESSION AND REFOLDING OPTIMIZATION OF RECOMBINANT CAPSID PROTEIN OF *BETANODAVIRUS* ISOLATED FROM *PARALICHTHYS OLIVACEUS*

JIANG Yan-Ran¹, ZHANG Yi-Chen¹, LIU Yi-Chen¹, GENG Xu-Yun², SUN Jin-Sheng^{1,2}

(1. Tianjin Key Laboratory of Animal and Plant Resistance, College of Life Science, Tianjin Normal University, Tianjin 300387, China;
2. Tianjin Aquatic Animal Infectious Disease Control and Prevention Center, Tianjin 300221, China)

Abstract *Betanodavirus* replicated their genome with RNA dependent RNA polymerase (RdRp). However, the proofreading deficiency of RdRp may lead to mutation that could infect many economic fish species and cause viral nervous necrosis. In this study, an expression vector was constructed for the capsid protein (CP) of a betanodavirus infecting *Paralichthys olivaceus*; a His Tag for purification of recombined CP was introduced to the C termini by primer designing; product was separated and verified by SDS-PAGE and mass spectrum analysis, and the refolding conditions were optimized in orthogonal experiments. Results show that the 4 peptide segments of recombined CP reoccurred in mass spectrum. The production of purified product per liter could reach 36mg, the optimum concentrations of urea and PBS (phosphate buffer solution) in refolding buffer for recombined CP were 0.8mol/L and 0.05mol/L, respectively. The outcome of this study would help develop effective products for the detection and defense against betanodavirus.

Key words *Paralichthys olivaceus*; *Betanodavirus*; recombinant expression; optimization of refolding