

草鱼出血病病毒 VP7 蛋白基因的 人工合成与原核表达*

韦先超^{1,3} 杨泽晓^{1,2} 王 印¹ 裴腊梅¹
姚学萍¹ 汪开毓¹ 杨水仙¹

(1. 四川农业大学动物医学院 雅安 625014; 2. 动物疫病与人类健康四川省重点实验室 雅安 625014;
3. 四川省水产学校 成都 611730)

提要 根据 GenBank 已发表的 GCRV VP7 蛋白基因序列, 设计合成 2 条特异性引物和 19 条搭桥引物, 通过搭桥 PCR 人工合成带有 3 处变异碱基的 GCRV VP7 蛋白基因整个编码框, 经过酶切、连接、PCR 鉴定和测序鉴定克隆到原核表达载体 pCold TF 中, 并转化大肠杆菌 BL21(DE3), 进行 IPTG 诱导表达和表达产物的 SDS-PAGE、Western-blotting 分析、纯化以及反应原性的 iELISA 检测。结果表明, 成功人工合成了长 831bp 的 GCRV VP7 蛋白基因编码框和构建了 VP7 蛋白基因的重组质粒 pCold TF-VP7, pCold TF-VP7 转化菌经 IPTG(1mmol/L)诱导 3—4h 即可获得特异性蛋白 VP7 重组蛋白的高效表达, VP7 重组蛋白相对分子量大小约为 73.9ku, 与预期大小相符, 且与鼠抗 GCRV 血清有良好反应原性。

关键词 草鱼出血病病毒; VP7; 搭桥 PCR; 原核表达

中图分类号 S917, Q753

草鱼出血病病毒(Grass Carp Hemorrhage Virus, GCHV), 属于呼肠孤病毒科水生呼肠孤病毒属 G 群病毒, 又称草鱼呼肠孤病毒(Grass Carp Reovirus, GCRV), 由我国科技工作者发现并鉴定, 是草鱼出血病的主要病原。GCRV 是水生呼肠孤病毒属成员中毒力最强的病毒(Rangel *et al*, 1999), GCRV 感染(草鱼出血病)是一种烈性病毒性传染病, 死亡率高达 90%以上。虽然近年来利用疫苗免疫进行控制获得了较好的效果, 但每年在发病季节依然会该病发生流行的情况, 常造成重大经济损失, 草鱼出血病的流行形势依然严峻(徐艳华, 2010; 郝贵杰等, 2011; 于利民, 2012)。GCRV 的基因组由 11 条分节段的双链 RNA(dsRNA)组成, 成熟的病毒颗粒由 7 种衣壳蛋白(VP1—VP7)组成, 其中 VP5 和 VP7 作为主要的病毒

外衣壳组分可能在免疫、感染及致病过程中起着重要的作用, 从而成为 GCRV 感染的新型疫苗研发和快速诊断技术研究的重要对象(Zhang *et al*, 2008; 郝贵杰等, 2010; 徐诗英等, 2011a; He *et al*, 2011a, b)。本研究通过对 GenBank 中公布的不同 GCRV 毒株 VP7 蛋白的基因进行序列分析, 根据碱基变异情况进行带有 3 处变异碱基的 VP7 基因的人工合成与原核表达载体的构建, 并对表达产物的抗原性进行检测, 以期为进一步 GCRV 感染防治的相关研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌种、载体与试剂

DH₅ 感受态细胞(CB104-01)、BL21(DE3)感受态细胞(CB104-02)、IPTG、TIANprep Mini Plasmid Kit

* 教育部《长江学者和创新团队发展计划》创新团队项目, IRT0848 号; 四川农业大学双支计划, 00270401 号。韦先超, 博士研究生, E-mail: 360771766@qq.com; 杨泽晓, 同等贡献第一作者, 博士, 副教授, E-mail: yzxyang2003@126.com

通讯作者: 汪开毓, 教授, E-mail: kywangsicau@126.com

收稿日期: 2012-05-06, 收修改稿日期: 2012-08-23

(DP103)、HRP-羊抗鼠 IgG、增强型 HRP-DAB 底物显色试剂盒(PA110)、Pfu DNA polymerase 和 TIANgel Midi Purification Kit (DP209)均为成都飞克生物科技有限公司产品; pMD-19T Vector kit (D102A)、DNA Maker DL2000、Protein MW Marker (low) (D530S)、*Bam*HI (D1010A)、TaKaRa rTaqTM均为大连宝生物工程有限公司产品; 草鱼出血病活疫苗(GCHV-892)购自广州普麟生物制品有限公司; Ni Sepharose High Performance (Amersham Biosciences 公司); 福氏佐剂 FAC 和 FIC(Sigma), 表达载体 pCold TF Vector, 由四川农业大学动物检疫实验室保存; 6—7 周龄 Balb/c 小鼠 10 只, 雌性, 由四川农业大学实验动物中心提供。

1.2 引物设计

收集 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)中发表的 GCRV VP7 蛋白的基因序列, 采用 Genestar 等软件对 AF236688.1、AF403396.1、AF403410.1、AF403411.1、HM545304 等序列进行分析比对, 设计 2 条表达引物 P1、P2(下划线为 *Bam*HI 酶切位点)和 19 条搭桥引物(含 3 处变异)(表 1), 送上海英潍捷基贸易有限公司合成, 按照合成说明书将其稀释至 10 μ mol/L, -20 $^{\circ}$ C 冻存备用。

1.3 GCRV VP7 蛋白基因的人工合成

1.3.1 搭桥延伸反应 采用王印等(2011)的方法, 分别进行初级延伸反应和次级延伸反应。初级延伸反应体系包括 5 μ L 10 \times Pfu DNA polymerase buffer, 4 μ L dNTP (10mmol/L), 1 μ L 搭桥引物(F1—10/R1—9) (10 μ mol/L), 1 μ L Pfu DNA polymerase 和 38 μ L ddH₂O, 混匀; 次级延伸反应体系包括两个相邻的前一次搭桥延伸反应产物各 22 μ L, 1 μ L 10 \times Pfu DNA polymerase buffer, 4 μ L dNTP (10mmol/L)和 1 μ L Pfu DNA polymerase, 混匀。反应条件为 94 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 15min。

1.3.2 VP7 蛋白基因的 PCR 扩增与鉴定

(1) 以最终次级延伸反应的产物为模板和 P1/P2 为引物, 按照下面体系和程序进行 PCR。反应体系 50 μ L: 10 \times rTaqTM DNA polymerase buffer 5 μ L, dNTP (10mmol/L) 4 μ L, P1/P2 (10 μ mol/L)各 1 μ L, 1 μ L of TaKaRa rTaqTM DNA polymerase, 1 μ L 最终次级延伸反应的产物和 37 μ L ddH₂O, 混匀后, 95 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 40s, 57 $^{\circ}$ C 40s, 72 $^{\circ}$ C 45s, 30 cycles, 72 $^{\circ}$ C 8min。反应结束后取 5 μ L 产物进行琼脂糖(10 g/L)凝胶电泳分析。

(2) 根据 TIANgel Midi Purification Kit (DP209)

表 1 GCRV VP7 蛋白基因人工合成的引物
Tab.1 Primers used for artificial synthesis of GCRV VP7

项目和引物编号	引物序列(5'—3')	产物大小(bp)	参考序列
PCR			
P1	AACGGATCCATGCCACTTCACATGA	831	AF236688
P2	AAAGGATCCTTAATCGGATGGCTCC		
Overlap extension PCR			
F1	atgccacttcacatgattccgcaagtcgcccacgctatggtgctgcagccgctgcagg		
F2	ctgagaccaccaactttgatcacgctgagtagcctcgcggcggtacaccatctgc		
F3	cgccaacgtcaagaccatcaagactcccacgctgttcaacgtaaccaaatgaagcca		
F4	gcgagaccgcccctcgtcgttagcctgactgtagactatcacgaattgagtgaaagc		
F5	caatagcccctctaagatacgtcgaactccgtttcgcacctgtgactgtacgat		
F6	ctgccagccggtcagcagcgcttatccacctcccgatcctttctggagattccaaat		
F7	gacgatacgcacccccagacaaggtgctgactcgtgccccaaagactggtctcctct		
F8	ccgtagttgccaccgctgctacgagactatcctcatgcagacctcctfacatcagcg		
F9	cgcttgctcgggtccagcgttaacaacctgacctcgttccactccacctgtgctt		
F10	gatcgttgactcacttgcatgtggagccatccgattaa		
R1	agttggtggtctcagttctgtgtataaggtaaggcgtcctgcagcggctgca		
R2	gtcttgacttgctgctggggagccagagctgtaaggcagaaggcagatggtgtaccg		
R3	gagggcggtcgtcgtttgtcactcacttcgactaatgagcgaatggctcatttggtt		
R4	tagaggggctattgttcatcggcagttgggagcagcaaccagctttcacatccaat		
R5	tgaccgacctggcagtgatttcggacgcaagcggtagcagaggaatcgtacaagtaca		
R6	gggatcgtatcgtccaacggttgggtggatgctcgttaggcaattggaatctccag		
R7	cgggtgcaactacggcgtgctgtgctgagtgatgcatggagaggagagaccagtc		
R8	ggaccgagcaagcggaaactgcttgatggcctcatccgcttcgctgtagtaaggag		
R9	gtcgagtccaacgatctggccgagtcgaagtgagccatatctgaagcacaggtggagt		

说明书纯化回收预期大小的 PCR 产物; 按照 pMD19-T Vector kit 说明书进行连接, 并将连接产物转化 DH_{5α} 感受态, 挑取 Amp⁺ LB 平板上的阳性克隆扩增培养, 进行 PCR 鉴定(P1/P2 为引物), 并将 PCR 鉴定阳性的重组质粒命名为 19T-VP7, 送往北京华大基因有限公司进行序列测定。

1.4 GCRV VP7 蛋白基因原核表达载体的构建

1.4.1 GCRV VP7 表达载体的构建 按照 TIANpre Mini Plasmid Kit (DP103)说明书抽提重组质粒 19T-VP7 和表达载体 pCold TF, 使用 *Bam*H I 分别进行重组质粒和表达载体 pCold TF 的酶切, 回收两种目的基因通过 T₄ DNALigase 连接过夜, 转化 DH₅ 感受态, 挑取 Amp⁺ LB 平板上的阳性克隆扩增培养, 进行重组质粒的电泳鉴定和 PCR 鉴定(P1/P2 为引物), 并将 PCR 鉴定阳性的重组质粒命名为 pCold TF-VP7, 送往北京华大基因有限公司进行测序验证。

1.4.2 VP7 重组蛋白的诱导表达 抽提重组质粒 pCold TF-VP7 和空载体 pCold TF, 分别转化 BL21 (DE3)感受态细胞, 挑取阳性克隆接种于 5ml 含 Amp 抗生素的 LB 液体培养基中, 37℃ 200r/min 培养过夜。按照 1:50 比例接种于 LB 液体培养基中, 37℃ 200r/min 培养至 OD₆₀₀ 为 0.6—0.8, 加 IPTG 至终浓度 1mmol/L 诱导表达, 分别收集不同时间表达菌体。

按照常规方法(萨姆布鲁克等, 1992)取一定量表达菌体与 2×SDS 上样缓冲液混合, 煮沸 5min, 12000 r/min 离心 5min 后, 取上清进行重组蛋白的 SDS-PAGE(积成胶为 5%, 分离胶为 12%)分析; 电泳结束后, 将蛋白条带转移至硝酸纤维素膜上, 用含 3% BSA 的 PBST 缓冲液 4℃ 封闭过夜, 加入鼠抗 His-6 抗体(1:2000 稀释), 37℃ 孵育 1h 用 PBST 洗膜 3 次, 再加入 HRP 标记的羊抗鼠 IgG(1:2000 稀释)37℃ 反应 45min 用 PBST 洗膜 3 次, 最后用增强型 HRP-DAB 底物显色试剂盒显色, 进行 Western-blotting 分析。

1.5 VP7 重组蛋白的纯化与活性分析

1.5.1 VP7 重组蛋白的纯化 按照刘林等(2012)的方法, 离心收集诱导表达菌体, 加入适量变性液溶解包涵体, 4℃ 过夜, 12000r/min, 10min, 取上清经 Ni-NTA His-bind 螯合亲和层析柱纯化进行 VP7 重组蛋白的纯化, 再利用不同咪唑浓度的洗脱液进行置换, 洗脱特异结合的蛋白, 收集蛋白洗脱液, 进行 SDS-PAGE 检测, 并用 ND-1000 核酸蛋白分光光度计(NanoDrop ND-1000)测定纯化蛋白浓度, -20℃ 保存备用。

1.5.2 VP7 重组蛋白的反应原性检测 取适度稀

释草鱼出血病活疫苗(GCHV-892) 10ml, 甲醛灭活后分别与福氏佐剂 FAC、FIC 等体积混合乳化, 然后将小鼠随机分成免疫组和对照组, 采用背部皮下多点注射进行首次免疫完全佐剂 FAC 乳化病毒液 0.2ml/只, 此后每隔 20d 后免疫不完全佐剂 FIC 乳化病毒液一次, 对照组注射生理盐水, 第 3 次免疫后第 7d, 摘除眼球采血分离血清, -20℃ 保存备用。

参考杨泽晓等(2008)间接 ELISA 的有关试剂和反应条件, 用 pH 7.4 的 0.01mol/L PBS 液将 VP7 重组蛋白稀释至 0.1mg/mL, 每孔 100μL, 4℃ 包被过夜, 对照孔分别用含 1% BSA 溶液、草鱼出血病活疫苗包被; 用 pH 7.4 的 0.01mol/L PBST 洗涤液洗板 5 次, 加入含 1% BSA 的 pH 7.4 的 0.01mol/L PBS (BS)每孔 200μL, 37℃ 封闭 2h; 同上洗涤后加入 1:1000 稀释的鼠抗 GCHV 阳性血清 37℃ 孵育 45min; 同上洗涤后加入 1:5000 稀释的 HRP-羊抗鼠 IgG (HRP-goat anti mouse IgG), 每孔 100μL, 37℃ 孵育 45min; 同上洗涤后加入底物显色液(TMB Work solution), 每孔 100μL, 37℃ 显色 10min。加 1mol/L H₂SO₄ 终止液(Stop solution), 每孔 50μL, 立即在全自动酶标仪上 450nm 波长处进行结果读判。

2 结果

2.1 GCRV VP7 蛋白基因的人工合成与鉴定

按照 1.3.1 和 1.3.2 中操作的方法和条件, 以 19 条 VP7 蛋白基因人工合成引物为模板通过多次初级和次级搭桥延伸反应获取 PCR 扩增反应模板后, 以 P1、P2 引物进行 PCR, 得到一条约 831bp 大小的特异性 DNA 条带(图 1), 将目的条带的纯化回收、连接 pMD19-T Vector 后转化 DH₅ 感受态, 挑取重组质粒 PCR 鉴定后进行序列测定, 结果见图 2, 下划线部分为引物位置, 与 GenBank 中发表的相关序列同源性高达 99% (JN206665.1, AF403396.1, AF403410.1, AF403411.1, HM545304 和 AF236688.1), 并且综合保留了整个开放阅读框(ORF)的第 406 (HM545304)、494 (AF403410.1)和 714 (AF236688.1)位 3 处变异碱基(用“ ”标出)。表明 GCRV VP7 蛋白全基因的成功人工合成。

2.2 pCold TF-VP7 表达载体的构建

按照 1.4.1 的操作, 将抽提重组质粒 19T-VP7 和表达载体 pCold TF, 使用 *Bam*H I 酶切后, 回收连接构建了 VP7 原核表达载体, 将其命名为 pCold TF-VP7, 进行重组质粒的电泳鉴定(图 3), 重组载体 pCold

TF-VP7(泳道 1)泳动速率较慢,再经 PCR 鉴定阳性后,送往北京华大基因有限公司进行测序验证,结果同图 2,表明了 pCold TF-VP7 的准确构建。

2.3 VP7 蛋白的表达与纯化

按照 1.4.2 的操作抽提质粒 pCold TF-VP7,转化 BL21(DE3)感受态细胞,挑取阳性克隆,在 37℃,IPTG (1mmol/L)条件下进行诱导表达,收集不同时间表达菌体进行 SDS-PAGE 分析和 Western-blotting 鉴定。结果见图 4 和图 5,由图 4 可知,转化了空载体 pCold TF 和重组质粒 pCold TF-VP7 的 BL21 菌体的诱导产物分别在 51.6ku(泳道 1)和 73.9ku (泳道 2、3、4 和 5)处出现特异性蛋白条带,与预期分子量大小相符,并且特异性表达的蛋白可以与鼠抗 His-tag 抗体特异性结合(图 5,泳道 2),同时显示 VP7 重组蛋白的表达水平随

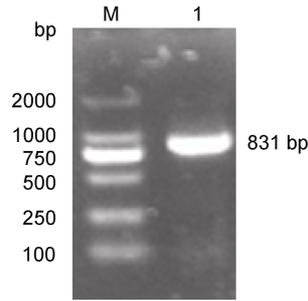


图 1 GCRV VP7 蛋白基因的搭桥 PCR 结果

Fig.1 Overlap extension PCR results of GCRV VP7
M: DNA marker DL2000;
1: GCRV VP7 基因搭桥 PCR 产物

着诱导时间的增加不断增加,诱导 3—4h 可以达到最高水平。这表明 GCRV VP7 蛋白已经在 BL21 中进行正确诱导表达。按照 1.5.1 中 Ni-NTA His-bind 螯合亲和层析柱纯化方法对 VP7 重组蛋白的进行纯化,结果(图 6,泳道 1),在 73.9ku 大小处有一条特异性条带,几乎没有其它大小的杂质蛋白条带,表明获得较高纯度 VP7 重组蛋白。

```

AACGGATCCATGCCACTTCACATGATTCCGCAAGTCGCCACGCTATGGTGGGTGCAGCCGCTGCAGGACGCTTACCTTATACACAAAGAACTAGAACTG
AGACCACCAACTTTGATCAGCTGAGTACGTACCTGCGGGCGGTACACCATCTGCGCCTTCTGCCTTACGACTCTGGCTCCCCACGCCAACGTCAAGAC
CATTCAAGACTCCACGCTTGTTCACGTC AACCAAATGAAGCCATTTCGCTCATTAGTTCGAAAGTACGACAAAGCGCAGACCCGCTCCTGTCGGTAGCCGT
ACTGTAGACTATCAGAAATGGATGTGAAAGCTGGGTTTCGTCGCCCAACTGCGGATGAAACAATAGCCCTCTAAGGATATCGTCGAACTTCCGTTTC
GCACCTGTGACTTTCACGATTTCCTCTGCTACCGCTTGGCTCCGAAATCACTGCCAGGCCGGTACGACGCGGCTTATCCACCTCCCGATCCTTTCTGGAGA
TTTCAAATTCGCTAACGAGCATCCACCAAACCGTTGGACGATACGCATCCCCACGACAAGGTGCTGACTCGCTGCCCAAGACTGGTCTCTCTCTCGTC
CATGACACTACGCACACGCCACCGCCGTAGTTGCCACCGCTGCTACGAGAGCTATCCTCATGCACGACTCCTTACATCAGCGAAACGCGGATGACGGCC
ATCAAGCACGTTCCGCTTGTTCGGTCCAGCGTTTAAACAACCTGACCTTTCGCTTGCCTCCACTCCACTGTGCTTCAGATATGGCTCAGCTTCGACTGCGGCCA
GATCGTTGGACTCGACTTGCATGTGGAGCCATCCGATTAAGGATCCTTT

```

图 2 人工合成 GCRV VP7 蛋白基因的测序结果
Fig.2 The sequencing results of artificial DNA of GCRV VP7

2.4 VP7 重组蛋白的活性分析

按照 1.5.2 中操作,利用草鱼出血病活疫苗免疫小鼠制备的鼠抗 GCHV 阳性血清,然后采用间接 ELISA 方法检测 VP7 重组蛋白的反应原性。结果(图 7)显示:

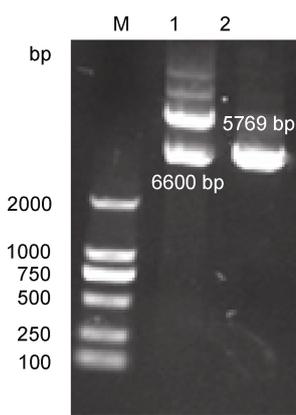


图 3 重组质粒的电泳鉴定
Fig.3 The electrophoresis identification results of recombinant plasmids
M: DNA marker DL2000;
1: pCold TF-VP7 重组载体;
2: pCold TF 空载体

孔 1、2、4、6 OD_{450} 值均在 0.1 左右,为抗原抗体反应阴性、孔 3、5 OD_{450} 值均在 2.5 左右,为抗原抗体反应阳性,其中孔 1 和孔 2 是 BSA 包被孔,孔 3 和孔 4 是 GCRV 包被孔,孔 5 和孔 6 是 VP7 重组蛋白的包被孔,孔 1、3、5 加入的一抗为草鱼出血病活疫苗免疫组小鼠血清,孔 2、4、6 加入的一抗为注射 PBS 阴性对照组小鼠血清,结果表明,草鱼出血病活疫苗免疫组小鼠血清为鼠抗 GCHV 阳性血清,VP7 重组蛋白

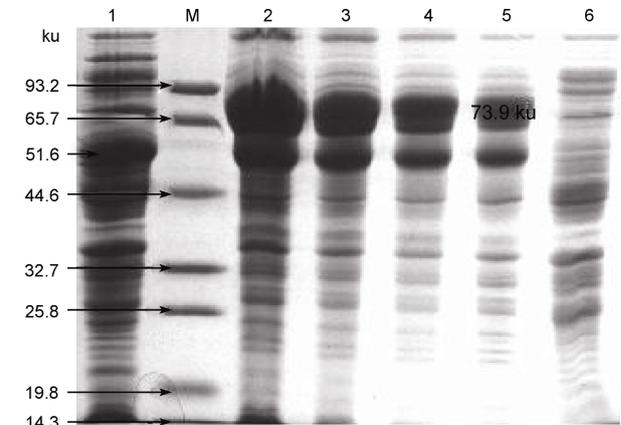


图 4 GCRV VP7 表达产物的 SDS-PAGE 结果
Fig.4 SDS-PAGE results of induced expression of pCold TF-VP7
M: Protein MW Marker (low); 1: pCold TF Vector 诱导表达产物;
2、3、4 和 5 分别为 pCold TF-VP7 诱导表达 4h、3h、2h 和 1h;
6: pCold TF-VP7 未诱导对照

与制备的鼠抗 GCHV 阳性血清具有良好反应原性。

3 讨论

疫苗是水产疾病防治的最有效途径之一。目前预

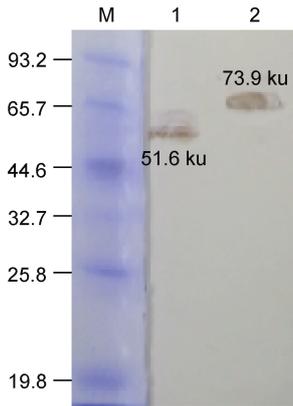


图5 GCRV VP7 表达产物的 Western-blotting 分析

Fig.5 Western-blotting results of induced expression of pCold TF-VP7

M: Protein MW Marker(low);
1: pCold TF Vector 表达产物;
2: pCold TF-VP7 表达产物

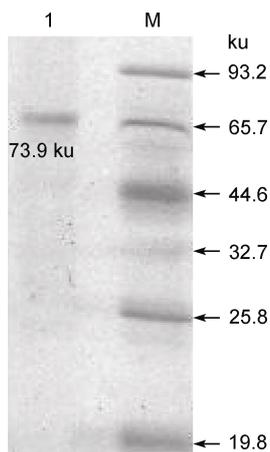


图6 纯化 GCRV VP7 重组蛋白的 SDS-PAGE 结果

Fig.6 SDS-PAGE analysis of purified VP7 recombinant protein

M: Protein MW Marker (low);
1: VP7 重组蛋白纯化产物

防 GCRV 感染临床上使用疫苗主要是国家农业部批准的 GCRV 甲醛灭活疫苗(刘林等, 2012)和草鱼出血病活疫苗(GCHV-892)(中国水产科学研究院, 2011), 效果都比较理想, 但它们具有各自的局限性, 比如死苗部分抗原成分被破坏、免疫力持久性差等, 传统减毒活疫苗存在一定的安全隐患, 并且注射困难等问题。因此, 探索 GCRV 基因工程疫苗成为预防 GCRV 感染研究一个重要方向。据报道, VP7 为 GCRV 病毒外衣壳主要组分, 由 GCRV S10 基因片段编码, 基因编码框为 831bp, 对应的分子量约为 34ku。VP7 蛋白具有较好的抗原性, 蛋白酶裂解实验揭示 VP7 在病毒感染及致病过程可能起着重要作用(徐诗英等, 2011a; Fang *et al.*, 2008); He 等(2011b)通过 VP7 蛋白的原核表达和体外中和试验证明了 VP7 蛋白的多克隆抗体具有中和活性, 可能是 GCRV 主要的抗原决定组, 为研制 GCRV 亚单位疫苗提供了参考依据; 郝贵杰等(2010)成功构建了

含有 VP7 蛋白基因的表达载体 pCI-VP7 并进行了真核表达。徐诗英等(2011a)将 GCRV VP7 双基因和团头鲂β肌动蛋白启动子基因扩增后构建了核酸疫苗载体 pFastBac-β-VP71-VP72, 并且对草鱼病毒性出血病有较好的免疫保护效果; 同时还将 VP7 基因片段克隆至原核表达载体 pET28a (+)构建重组质粒 pET-VP7, 转化 BL21(DE3)后诱导表达, 获得了具有很好抗原性的重组蛋白, 并且有较好的免疫保护效果(徐诗英等, 2011b)。但需要强调的是, 病原基因的突变和抗原的变异问题是在基因工程疫苗或者免疫学研究方面普遍存在和备受关注的问题。一般研究中通过 RT-PCR 或者 PCR 对某个毒株基因组直接扩增获得的目的基因能否代表不同分离株的该基因一直存在争议, 进而可能会影响到后续试验的预期效果。作者通过对部分 GCRV VP7 蛋白基因的编码框序列的同源性分析发现, 不同毒株存在一定的差异, 同源性在 90%以上, 同源性最高的(99%以上)JN206665.1、AF403396.1、AF403410.1、AF403411.1、HM545304.1 和 AF236688.1 几个序列也存在第 406 (HM545304)、494 (AF403410.1)和 714 (AF236688.1)位 3 处碱基颠换, 并且导致 3 处氨基酸残基的差异。三处碱基的变异同时存在会对 VP7 蛋白活性或功能产生的影响很难确定, 为此本研究设计 19 条搭桥延伸引物和 2 条 PCR 扩增引物人工合成了同时带有 3 处碱基变异的 VP7 蛋白基因, 通过原核表达载体的构建, 进行了 VP7 重组蛋白的表达和重组蛋白活性分析。结果显示 VP7 重组蛋白可与鼠抗 GCRV 血清发生抗原抗体反应, 具有良好的反应原性, 提示人工合成同时带有三处碱基变异的 VP7 蛋白基因未对 VP7 的反应原性产生显著影响。该试验也为通过基因突变对基因表达和表达产物活性、功能等研究提供了参考和依据。

pCold TF 原核表达载体是一种插入蛋白可溶性标签的融合型冷休克表达载体, 空载体融合表达的顺序为六聚组氨酸(His-Tag)、Trigger Factor (TF)、蛋白酶切位点和多克隆位点序列。其中 TF 作为原核核糖体结合伴侣蛋白能够促进新生肽链的共翻译折叠, 与目的蛋白融合表达, 提高目的蛋白的可溶性, 而蛋白酶切位点包括 HRV 3C protease, Thrombin 和 Factor Xa, 可用于去除融合蛋白的可溶性标签(朱海珍等, 2012)。因此, pCold TF 与常规的 pET28 等原核表达载体相比, 不仅含有启动子、乳糖操纵子和多克隆位点序列等基本功能元件, 还有冷休克表达系统和 TF 助溶蛋白。pCold TF 载体可以使一些表达困难的基因获

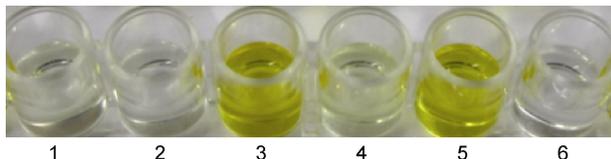


图7 纯化 GCRV VP7 重组蛋白活性的 iELISA 分析

Fig.7 Reactionogenicity analysis of purified VP7 recombinant protein by iELISA

1: BSA 包被-免疫组血清; 2: BSA 包被-对照组血清; 3: GCRV 包被-免疫组血清; 4: GCRV 包被-对照组血清; 5: VP7 重组蛋白包被-免疫组血清; 6: VP7 重组蛋白包被-对照组血清

得更高概率的可溶性表达,也是本研究选择该表达载体的原因。本研究将人工合成的 GCRV VP7 基因克隆到 pCold TF 载体构建重组质粒 pCold TF-VP7,初步研究经过诱导 3—4h 就可达到最高表达水平,且纯化的 VP7 重组蛋白经过 iELISA 检测具有良好的反应原性,表明了重组质粒 pCold TF-VP7 的正确构建,为进一步开展 GCRV 感染的高效疫苗研究和快速诊断技术研发提供了科学材料和依据。

参 考 文 献

- 于利民, 2012. 一起草鱼出血病的治疗实例. 科学养鱼, 2: 66
- 王 印, 杨泽晓, 韩雪清等, 2011. 兔瘟病毒与欧洲野兔综合症病毒复合 RT-PCR 检测方法的初步研究. 中国兽医科学, 41(11): 1165—1170
- 中国水产科学研究院, 2011. 首个草鱼出血病活疫苗获国家证书. 水产养殖, 31(4): 54
- 朱海珍, 雷少华, 刘春艳等, 2012. 人膜蛋白 CD81 的原核表达与纯化. 湖南大学学报(自然科学版), 39(8): 51—56
- 刘 林, 徐诗英, 李婧慧等, 2012. 草鱼出血病病毒 VP6 蛋白的原核表达、纯化及免疫效果. 水产学报, 36(3): 429—435
- 杨泽晓, 张彦明, 林祥梅等, 2008. 醋酸甲羟孕酮(MPA)人工抗原的合成与单克隆抗体制备. 上海交通大学学报, 26(2): 119—123
- 郝贵杰, 沈锦玉, 潘晓艺等, 2011. 草鱼呼肠孤病毒湖州分离株的分离及鉴定. 渔业科学进展, 32(1): 48—52
- 郝贵杰, 潘晓艺, 姚嘉赉等, 2010. 草鱼呼肠孤病毒衣壳蛋白 VP7 基因真核表达载体 pCI VP7 的构建及鉴定. 水产学报, 34(5): 807—813
- 徐诗英, 刘 林, 李婧慧等, 2011a. 草鱼呼肠孤病毒 VP7 基因核酸疫苗的构建及免疫效果. 水产学报, 35(11): 1695—1700
- 徐诗英, 李婧慧, 邹 勇等, 2011b. 草鱼呼肠孤病毒外衣壳蛋白 VP7 重组疫苗的构建及其免疫效力评价. 湖南农业大学学报(自然科学版), 37(6): 659—664
- 徐艳华, 2010. 2 龄草鱼出血病治疗实例. 齐鲁渔业, 27(8): 45
- 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T 著, 1992. 金东雁, 黎孟枫, 侯云德等译, 1993. 分子克隆试验指南(第二版). 北京: 科学出版社, 880—898
- Fang Q, Seng E K, Ding Q Q, 2008. Characterization of infectious particles of grass carp reovirus by treatment with proteases. Archives of Virology, 153(2): 675—682
- He Y X, Xu H X, Yang Q *et al*, 2011a. The use of an in vitro microneutralization assay to evaluate the potential of recombinant VP5 protein as an antigen for vaccinating against grass carp reovirus. Virology Journal, 8: 132—137
- He Y X, Yang Q, Xu H X *et al*, 2011b. Prokaryotic expression and purification of grass carp reovirus capsid protein VP7 and its vaccine potential. African Journal of Microbiology Research, 5(13): 1643—1648
- Rangel A A, Rockemann D D, Hetrick F M, 1999. Identification of grass carp hemorrhage virus as a new genogroup of aquareovirus. J Gen Virol, 80: 2399—2402
- Zhang L L, Shen J Y, Lei C F *et al*, 2008. High level expression of grass carp reovirus VP7 protein in prokaryotic cells. Chinese Journal of Virology, 23(1): 51—56

ARTIFICIAL SYNTHESIS AND PROKARYOTIC EXPRESSION OF GRASS CARP REOVIRUS VP7 PROTEIN GENE

WEI Xian-Chao^{1,3}, YANG Ze-Xiao^{1,2}, WANG Yin¹, PEI La-Mei¹,
YAO Xue-Ping¹, WANG Kai-Yu¹, YANG Shui-Xian¹

(1. College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Ya'an, 625014; 2. Key laboratory of Animal Disease and Human Health of Sichuan Province, Ya'an, 625014; 3. Aquatic Technology Vocational College of Sichuan Province, Chengdu, 611730)

Abstract 2 specific primers and 19 overlapping oligo primers were designed according to the gene sequences of GCRV VP7 protein published in GenBank. A 831bp DNA fragments of GCRV VP7 protein ORF with 3 mutation bases was synthesized in vitro using overlap extension PCR, and cloned into prokaryotic expression vector pCold TF through *Bam*H-digestion, DNALigase linking, PCR identification and DNA sequencing, then the recombinant plasmid were transformed into competent *Escherichia coli* BL21 (DE3) for expression induced by 1mmol/L IPTG, the expression products were analyzed by SDS-PAGE and Western-blotting, purified and its reactionogenicity was detected using iELISA. The results showed that the recombinant expression plasmid pCold TF-VP7 was constructed successfully, which could produce high level expression inducing with IPTG in 3—4h. The expressed fusion protein named VP7 fusion protein was about 73.9ku, consistent with the predicted size, and could be recognized by anti-GCRV serum (mouse).

Key words Grass Carp Hemorrhage Virus; VP7; Overlap extension PCR; Prokaryotic expression