

牛病毒性腹泻黏膜病毒 E2 基因的原核表达与免疫原性分析

王宇婷, 马莉莉, 李晓月, 王士霞, 毕莹, 倪宏波* (黑龙江八一农垦大学, 动物科技学院, 黑龙江大庆 163319)

摘要 [目的]原核表达牛病毒性腹泻黏膜病毒(BVDV)E2 基因编码蛋白。[方法]采用 PCR 方法从 BVDV 中扩增 E2 基因片段,与原核表达载体 pET-32a 连接,构建重组表达质粒 pET-32a-E2,转化 *E. coli*(Rosetta)感受态细胞,重组菌用 1 mmol/L IPTG 诱导表达 E2 蛋白,进行 SDS-PAGE 电泳,并用 Ni-NTA 亲和层析柱纯化目的蛋白,经 Western blot 分析鉴定免疫原性。[结果]重组质粒 pET-32a-E2 经 PCR 及酶切鉴定证明构建正确,重组质粒能够在大肠杆菌中大量表达,表达产物的分子质量大小约为 58 kDa,纯化后 E2 重组蛋白浓度 0.521 mg/mL,Western blot 分析表明,其能被 BVDV 阳性血清识别,具有很好的免疫原性。[结论]E2 蛋白成功表达,为后续建立 BVDV 检测方法奠定了基础。

关键词 牛病毒性腹泻黏膜病毒;E2 基因;原核表达

中图分类号 S852.4 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)12-0122-02

Prokaryotic Expression and Immunogenicity of E2 Gene of BVDV

WANG Yu-ting, MA Li-li, LI Xiao-yue, NI Hong-bo* et al (College of Animal Science and Technology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing, Heilongjiang 163319)

Abstract [Objective]To prokaryotic express the bovine viral diarrhea-mucosal disease viruses E2 gene encoding protein. [Method]Bovine viral diarrhea-mucosal disease viruses E2 gene were amplified by PCR and linked into the pET-32a prokaryotic expression vector,prokaryotic expression recombinant plasmid pET32a-E2 was constructed,which was then transformed into *E. coli*(Rosetta) cells for protein expression. E2 protein of recombinant strains was induced to express by 1 mmol/L IPTG and SDS-PAGE electrophoresis,target protein was purified by Ni-NTA affinity chromatography column and the immunogenicity was identified by Western blot analysis. [Result]The recombinant plasmid pET32a-E2 was confirmed by PCR, restriction enzyme. It had high-level expression in *E. coli*. SDS-PAGE showed that recombinant protein with molecular weight of 58 kDa,with concentration of 0.521 mg/mL. Western blot showed that recombinant protein can reacts with positive serum,indicating good immunogenicity. [Conclusion]E2 protein is expressed in successfully,which lays foundation for establishing BVDV detection method in future.

Key words Bovine viral diarrhea-mucosal disease viruses;E2 gene;Prokaryotic expression

牛病毒性腹泻/黏膜病(Bovine viral diarrhea/mucosal disease,BVD/MD)是由牛病毒性腹泻黏膜病毒(Bovine viral diarrhea-mucosal disease viruses,BVDV)引起的急性、接触性传染病。BVDV 除感染牛外,还可感染猪^[1],也会感染鹿、羊、骆驼、兔及其他动物,其宿主相当广泛。近年来也有人感染 BVDV^[2]以及从生物制品中分离出 BVDV 的报道^[3]。

BVDV 依据 5'端非编码序列,可分成 BVDV 基因 1 型和 BVDV 基因 2 型;依据 BVDV 在细胞培养物中能否产生细胞病变,可分为致细胞病变型(Cytopathogenic,CP)和非细胞病变型(Non-cytopathogenic,NCP),CP 型是 1.25 kDa,NCP 型是 1.23 kDa,包括一个开放阅读框、5'非翻译区和 3'非编码区。其中 C、Ems、E1 和 E2 为结构蛋白,p7、NS2/3、NS4A、NS4B、NS5A 和 NS5B 等为非结构蛋白^[4]。E2 蛋白是 BVDV 的主要保护性抗原蛋白。该试验对 BVDV E2 基因进行了克隆,并用大肠杆菌表达系统表达,通过 SDS-PAGE 和 Western blot 分析重组 E2 蛋白的反应原性,为 BVDV 检测方法的建立提供基础资料。

1 材料与与方法

1.1 材料和试剂 BVDV-1 NADL 株,pET-32a 质粒、大肠杆菌 Rosetta、DH5 α 感受态细胞、BVDV 阳性血清由黑龙江八一农垦大学预防兽医实验室保存。RNA 提取试剂盒购自北京博凌科为生物有限公司。蛋白纯化用的 Ni 螯合柱购自

美国英杰生物技术有限公司。HRP 标记的山羊抗小鼠二抗和 PVDF 膜购于北京中杉金桥公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计及合成。参照 GenBank 上 BVDV E2 基因设计引物,引物序列为上游 F1:5'-ACTGGATCCCACTTG-GATTGCAAACCTGAATTCTCG-3';下游 F2:5'-ATC-GAAGCTTCCCTAAGGCCTTCTGTTCTGATAGAC-3'。

上游引物含有 BamH I 位点,下游引物含有 Hind III 位点。引物及测序服务由北京华大基因公司完成。

1.2.2 BVDV E2 的原核表达载体构建。以 BVDV-1 NADL 株的基因组为模板进行 E2 基因的扩增和测序分析,并将其连接到 pET-32a 表达载体上,转化 *E. coli*(Rosetta)中并涂布在氯霉素和氨苄青霉素抗性的 LB 平板上,过夜培养,取单克隆扩大培养后提取质粒和酶切鉴定,得到 pET-32a-E2 阳性重组菌。

1.2.3 BVDV E2 基因在 *E. coli*(Rosetta)中表达、纯化和检测。将重组质粒转入到 *E. coli*(Rosetta)中,挑取单克隆扩大培养,37℃,180 r/min 振荡培养过夜,1 mmol/L IPTG 诱导 6 h,收集菌液沉淀,用 PBS 反复悬浮 2 次,超声破碎,收集上清液和沉淀。分别对上清液和沉淀进行 12% SDS-PAGE 检测,确定蛋白是在包涵体中表达。离心后用 Ni-NTA 亲和层析柱按说明书来纯化蛋白。

1.2.4 Western blot 检测重组菌表达。将纯化前的蛋白定量,12% SDS-PAGE 电泳后转 PVDF 膜,5%的脱脂乳 4℃过夜封闭,1:100 倍稀释一抗 37℃孵育 2 h,1:5 000 倍稀释二抗 37℃孵育 1 h,用 DAB 显色。

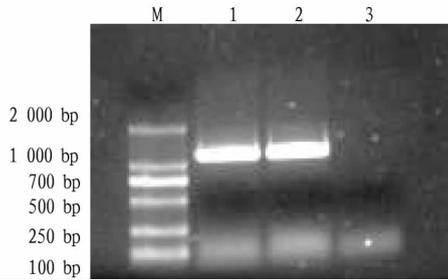
基金项目 黑龙江省农垦总局“十二五”重点科技攻关项目(HNK125B-11-10A,HNK125B-11-02)。

作者简介 王宇婷(1992—),女,黑龙江佳木斯人,硕士研究生,研究方向:动物病原学与免疫学。*通讯作者,教授,博士生导师,从事动物病原学与免疫学研究。

收稿日期 2017-03-17

2 结果与分析

2.1 目的基因的 PCR 扩增 用 F1/F2 引物扩增 E2 基因, PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测得到约 1 122 bp 条带, 与预期结果相符(图 1)。



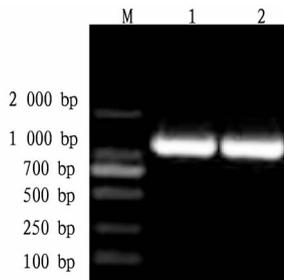
注: M. DNA marker 2000; 1~2. E2 目的基因; 3. 阴性对照

Note: M. DNA marker 2000; 1~2. amplification of E2 gene; 3. negative control

图 1 E2 基因的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of E2 gene

2.2 重组质粒的 PCR 及酶切鉴定 将重组质粒 pET-32a-E2 用 F1/F2 引物扩增到 1 122 bp 条带(图 2), 用双酶切法鉴定重组质粒 pET-32a-E2, 用 BamHI/HindIII 双酶切片段, 同样经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测得到 5 900 bp 和 1 122 bp 质粒片段, 与预期结果相符(图 3)。

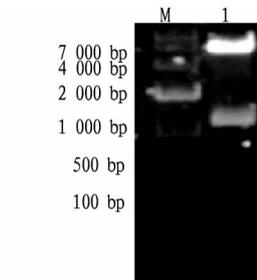


注: M. DNA marker 2000; 1~2. 以重组 pET-32a-E2 质粒为模板扩增出 E2 基因

Note: M. DNA marker 2000; 1~2. E2 gene was amplified by recombinant pET-32a-E2 plasmid

图 2 重组 pET-32a-E2 质粒 PCR 鉴定

Fig. 2 PCR identification of recombinant pET-32a-E2 plasmid



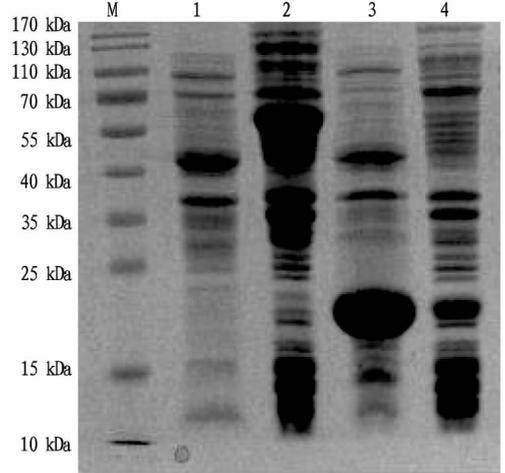
注: M. DNA marker 10000; 1. 经 BamHI/HindIII 双酶切鉴定的重组 pET-32a-E2 质粒

Note: M. DNA marker 10000; 1. double digestion identified by BamHI/HindIII of recombinant pET-32a-E2 plasmid

图 3 重组 pET-32a-E2 质粒双酶切鉴定

Fig. 3 Double digestion identification of recombinant pET-32a-E2 plasmid

2.3 重组蛋白的诱导表达 重组菌经 IPTG 诱导, 12% SDS-PAGE 分析表明, 目的蛋白成功表达并经纯化后的重组蛋白与目的蛋白条带一致。重组蛋白 pET-32a-E2 相对分子质量约为 58 kDa, 与理论分析值相符合(图 4~5)。

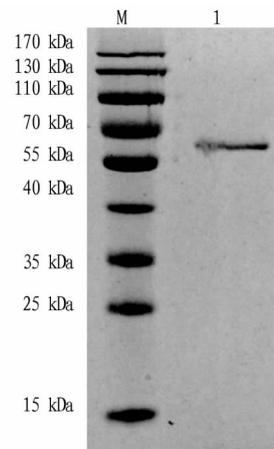


注: M. 蛋白质相对分子质量标准; 1. 重组菌诱导后上清; 2. 重组菌诱导后沉淀; 3. 空载体上清; 4. 空载体沉淀

Note: M. Protein relative molecular standard; 1. supernatant after induction of recombinant bacteria; 2. precipitation after induction of recombinant bacteria; 3. supernatant after induction of empty vector; 4. precipitation after induction of empty vector

图 4 重组蛋白 pET-32a-E2 的 SDS-PAGE E2 表达分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of recombinant protein pET-32a-E2



注: M. 蛋白质相对分子质量标准; 1. 纯化后的 E2 重组蛋白

Note: M. Protein relative molecular standard; 1. purification of recombinant E2 protein

图 5 纯化后的 E2 重组蛋白检测

Fig. 5 The detection of E2 recombinant protein after purification

2.4 Western blot 鉴定 重组菌表达产物通过 Western blot 进行分析, 结果显示, 在 58 kDa 处有明显的条带, 与理论分析值相符(图 6)。

3 讨论与结论

试验选择 BVDV E2 基因为研究对象, 是由于在 BVDV (下转第 129 页)

分支图将细齿水蛇麻与柘属分在一个分支上,表示它们的亲缘关系近。在《中国植物志》中,细齿水蛇麻属于族 1 水蛇麻族,柘属处在族 5 波罗蜜族,认为它们的亲缘关系较远;而在《中国被子植物科属综论》中,柘属和细齿水蛇麻分别属于桑族的第 5、7 属,系统位置较近。因此,该结果支持吴征镒等的观点。

2 种经典分类都认为桑属是原始类群,刺桑、圆叶刺桑和叶被木都属于族 4. 鹊肾树族鹊肾树属。桑属和鹊肾树属虽然都在桑亚科或者桑族,但它们的系统位置有一定距离。因此,2 种经典分类都不支持刺桑、叶被木、圆叶刺桑与桑属的亲缘关系近。

参考文献

- [1] LINNAEUS C V. Species plantarum[M]. Stockholm: Laurentii Salvii, 1753: 986.
- [2] MORETTI G. Prodomo di una monografia delle specie del genere *Morus* [J]. Istituto lombardo di scienze e lettere, 1842(1): 167.
- [3] SERINGE N C. Description Culture et taille des Muriers [M]. Paris: Victor Masson, 1855.
- [4] BUREAU L E. Moraceae [M]//CANDOLLE A P. Prodomus Systematis Naturalis Regni Vegetabilis (part XVII). Geneva: [s. n.], 1873.
- [5] KOIDZUMI G. Taxonomical discussion on *Morus* plants [J]. Bull Imp Seri-

- cult Exp Stat, 1917(3): 1-62.
- [6] 陈嵘. 中国树木分类学[M]. 北京: 科学技术出版社, 1953: 228-231.
- [7] 胡先骕. 植物分类学简编[M]. 北京: 高等教育出版社, 1955: 56.
- [8] 张秀实, 吴征镒, 曹子余. 中国植物志: 第 23 卷第 1 分册[M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [9] 吴征镒, 路安民, 汤彦承, 等. 中国被子植物科属综论[M]. 北京: 科学出版社, 2003: 560-562.
- [10] 张宏达. 种子植物系统学[M]. 北京: 科学出版社, 2004: 98-101.
- [11] ZEREGA N J C, CLEMENT W L, DATWYLER S L, et al. Biogeography and divergence times in the mulberry family (Moraceae) [J]. Mol Phylogenetics Evol, 2005, 37(2): 402-416.
- [12] BALDWIN B G, SANDERSON M J, PORTER J M, et al. The its region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence on angiosperm phylogeny [J]. Ann Mo Bot Gard, 1995, 82(2): 247.
- [13] KRESS W J, LIU A Z, NEWMAN M, et al. The molecular phylogeny of *Alpinia* (Zingiberaceae): A complex and polyphyletic genus of gingers [J]. Am J of Bot, 2005, 92(1): 167-178.
- [14] 史全良, 赵卫国. 桑树 ITS 序列测定及特点的初步分析[J]. 蚕业科学, 2001, 27(2): 140-141.
- [15] THOMPSON J D, GIBSON T J, PLEWNIAC F, et al. The ClustalX windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. Nucleic acids research, 1997, 25(24): 4876-4882.
- [16] SWOFFORD D L. PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods) [M]. Version 4. [s. l.]: [s. n.], 2001.
- [17] 陈焕镛. 海南植物志: 第二卷[M]. 北京: 科学出版社, 1965: 371-400.

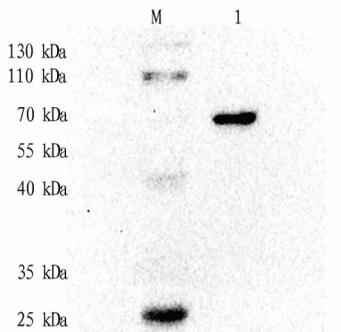
(上接第 123 页)

的结构基因中 E2 位于 BVDV 病毒粒子囊膜表面,能诱导感染动物产生病毒中和抗体并刺激机体发生免疫应答^[5],因此 E2 作为诊断抗原很有意义。刘昱成等^[6]对 BVDV-2 E2 基因进行原核表达,利用原核表达的 E2 蛋白建立的间接 ELISA 方法。鉴于国内 BVDV-1 型流行较为广泛,该试验根据 BVDV-1 型的 E2 基因原核表达并建立检测方法。同样, BVDV 会引发持续感染。持续性感染的动物就会充当携带 BVDV 的宿主和感染源。持续性感染 BVDV 的母畜会抑制胎儿的先天免疫系统,使胎儿在早期妊娠期间产生免疫耐受,给养牛业的发展带来很大危害。Saliki 等^[7]建立的夹心

ELISA 来检测持续感染的牛;邓宇等^[8]用纯化的 BVDV 免疫蛋鸡制备出的卵黄抗体作为包被抗体,建立牛病毒性腹泻病毒抗原捕获 ELISA 方法,都在 BVD 的流行病学调查中发挥了重要的作用。该试验根据 GenBank 的 BVDV E2 基因序列,设计特异性引物,扩增出 BVDV E2 基因,将其克隆到原核表达载体上,并成功表达,经 Ni-NTA 柱纯化后得纯度较高的 E2 蛋白(纯化后 E2 蛋白浓度 0.521 mg/mL),Western blot 分析表明,重组 E2 蛋白能与 BVDV 阳性血清发生特异性反应,说明纯化的重组 E2 蛋白有很好的免疫原性。以纯化的 E2 蛋白为抗原为建立 BVDV 检测方法奠定了基础。

参考文献

- [1] 邓宇. 猪源牛病毒性腹泻病毒研究进展[J]. 畜牧与兽医, 2012, 44(9): 97-99.
- [2] JONES L R, WEBER E L. Application of single-stranded conformation polymorphism to the study of bovine viral diarrhoea virus isolates [J]. Vet Diagn Invest, 2001, 13(1): 50-56.
- [3] PETERHANS E, BACHOFEN C, STALDER H, et al. Cytopathic bovine viral diarrhoea viruses (BVDV): Emerging pestiviruses doomed to extinction [J]. Vet Res, 2010, 41(6): 44.
- [4] 范进江, 薄新文, 钟发刚. 牛病毒性腹泻病毒基因组结构与蛋白功能研究进展[J]. 动物医学进展, 2008, 29(5): 68-72.
- [5] XUE W, MINOCHA H C. Identification of the cell surface receptor for bovine viral diarrhoea by using anti-idotypic antibodies [J]. J Gen Virol, 1993, 74(1): 73-79.
- [6] 刘昱成, 孟庆玲, 乔军, 等. BVDV-2 E2 基因的原核表达及重组蛋白反应原性的研究[J]. 石河子大学学报(自然科学版), 2013, 31(6): 680-683.
- [7] SALIKI J T, HUCHZERMEIER R, DUBOVI E J. Evaluation of a new sandwich ELISA kit that uses serum for detection of cattle persistently infected with BVD virus [J]. Ann N Y Acad Sci, 2000, 916(1): 358-363.
- [8] 邓宇, 王新华, 郭燕, 等. 牛病毒性腹泻病毒抗原捕获 ELISA 检测方法的标准化研[J]. 中国预防兽医学报, 2007, 29(7): 541-544.



注: M. 蛋白质相对分子质量标准; 1. 纯化重组 E2 蛋白

Note: M. Protein relative molecular mass standard; 1. purification of recombinant E2 protein

图 6 纯化后 E2 蛋白的 Western blot 检测

Fig. 6 Western blot analysis of the purified recombinant E2 protein