

施少华, 程龙飞, 傅光华, 等. 鸭坦布苏病毒囊膜 E 蛋白的原核表达 [J]. 福建农业学报, 2014, 29 (10): 935-938.

SHI S-H, CHENG L-F, FU G-H, et al. Prokaryotic Expression of E Protein from Duck Tembusu Virus [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2014, 29 (10): 935-938.

鸭坦布苏病毒囊膜 E 蛋白的原核表达

施少华^{1,2}, 程龙飞^{1,2}, 傅光华^{1,2}, 陈红梅^{1,2}, 万春和^{1,2}, 傅秋玲^{1,2}, 林建生^{1,2}, 黄瑜^{1,2*}

- (1. 福建省农业科学院畜牧兽医研究所, 福建 福州 350013;
2. 福建省畜禽疫病防治工程技术研究中心, 福建 福州 350013)

摘要: 利用 RT-PCR 方法扩增鸭坦布苏病毒分离株 (WR 株) 全长 E 蛋白基因, 克隆到 pEASY-T3 载体中, 经 *Bam* HI 和 *Xho* I 酶切后将目的片段连接入 pET-32a 载体, 构建原核表达重组质粒 pET-E。表达质粒转化入感受态细胞 BL21 (DE3) 后, 经 IPTG 诱导后表达出鸭坦布苏病毒 E 蛋白, 并以包涵体的形式存在, Western-blotting 试验呈阳性, 表明 E 蛋白有很好的反应原性。

关键词: 鸭坦布苏病毒; E 基因; 原核表达

中图分类号: S 858

文献标识码: A

Prokaryotic Expression of E Protein from Duck Tembusu Virus

SHI Shao-hua^{1,2}, CHENG Long-fei^{1,2}, FU Guang-hua^{1,2}, CHEN Hong-mei^{1,2}, WAN Chun-he^{1,2},
FU Qiu-ling^{1,2}, LIN Jian-sheng^{1,2}, HUANG Yu^{1,2*}

- (1. *Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350013, China*;
2. *Fujian Animal Diseases Control Technology Development Center, Fuzhou, Fujian 350013, China*)

Abstract: The entire E gene from the duck Tembusu virus (strain WR) was amplified by RT-PCR, and cloned into the pEASY-T3 vector. The recombinant plasmids carrying the target fragment were digested with *Bam* HI and *Xho* I, and cloned into the pET-32a vector to construct recombinant plasmid to be named pET-E. pET-E was subsequently transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3). The fusion protein was expressed by IPTG induction, and presented mainly as inclusion bodies. The positive western blotting result suggested a strong reactinogenicity of the protein.

Key words: duck tembusu virus; E gene; prokaryotic expression

坦布苏病毒感染家禽始见于 2000 年 Kono 等^[1]报道的马来西亚肉鸡坦布苏病毒感染病例, 受感染的肉鸡表现生长迟缓及生产性能下降等, 并伴有脑炎病变。2010 年 4 月, 我国东部地区 (浙江、福建、山东等) 部分鸭群中暴发一种以产蛋骤降为特征的新疫病, 患病鸭产蛋率从 80%~95% 下降至 20%~30%, 有些甚至出现停产。患病鸭临床表现除了产蛋率下降外, 另一重要特点是有神经症状, 常摇头扭颈, 剖检可见卵泡充血、出血等, 部分出现脑膜出血。研究人员从病死种鸭分离到病

毒, 经电镜观察、理化特性检测、RT-PCR 鉴定和测序分析确定该病原为一种与坦布苏病毒关系密切的坦布苏病毒科新成员^[2-5]。随后蛋鸡养殖场发生了鸡坦布苏病毒感染, 引起蛋鸡出现发热、产蛋急降或停止、采食减少或食欲废绝, 可见卵泡出血, 部分卵黄破裂、卵黄性腹膜炎, 给蛋鸡养殖业造成较大的经济损失^[6-7]。鹅感染坦布苏病毒后表现为产蛋率急剧下降, 神经性症状, 摇头, 剖检可见肝脾出血、坏死, 肠黏膜坏死、溃疡、出血, 胰腺点状出血坏死, 肾脏呈花斑状, 卵巢出血坏死^[8-9]。

收稿日期: 2014-04-10 初稿; 2014-09-05 修改稿

作者简介: 施少华 (1977-), 男, 博士生, 副研究员, 主要从事兽医微生物学研究

* 通讯作者: 黄瑜 (1965-), 男, 研究员, 主要从事动物传染病研究 (E-mail: huangyu_815@163.com)

基金项目: 福建省科技计划项目——省属公益类科研院所基本科研专项 (2011R1025-8); 现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-43); 福建省种业创新与产业化工程建设项目 (2011FJZY-9)

坦布苏病毒是黄病毒科成员之一, 外附囊膜, 其基因组为单股正链 RNA, 包含一个长的阅读框, 编码的前体蛋白经酶解后产生一系列结构蛋白和非结构蛋白, 其中囊膜 E 蛋白位于病毒粒子表面, 是病毒的主要抗原蛋白, 含有多种抗原表位, 可通过诱发中和抗体产生保护性免疫应答。

鸭坦布苏病毒病是一种新出现的疫病, 建立简便快速的血清学检测方法尤为重要, 本研究成功扩增鸭坦布苏病毒 WR 株的 E 基因, 构建重组原核表达质粒, 为建立检测该病毒的血清学检测方法并用于流行病学调查奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒、质粒及菌株 鸭坦布苏病毒 WR 株由福建省农业科学院畜牧兽医研究所禽病室分离、鉴定和保存; 原核表达载体 pET-32a、大肠杆菌 DH5 α 、BL21 (DE3) 由福建省农业科学院畜牧兽医研究所保存。pEASY T3 载体和 Trans T1 感受态细胞购自北京全式金有限公司。

1.1.2 酶和试剂 Taq DNA 聚合酶购自 ROCHE 公司; dNTP Mixture、T₄ DNA 连接酶、Bam HI、Xho I 等内切酶及预染蛋白 Marker 均购自 Fermentas 公司; 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒, 普通质粒小提试剂盒、Anti-His 抗体、HRP 标记羊抗鼠 IgG 抗体为 TIANGEN 公司产品, ECL 试剂盒为 Thermo 公司产品; 其他试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 引物 根据已发表的鸭坦布苏病毒 WR 株基因组序列 (登录号 JX196334), 应用 Oligo 6.24 软件设计扩增鸭坦布苏病毒 E 基因的表达引物, 引物序列为: 上游引物 P1: 5'-CGTAGGATCC-CCAGCGTACAGCTTCAGC-3', 下划线为 Bam HI 限制性内切酶位点; 下游引物 P2: 5'-AT-CTCGAGGCACCCCGTGTCTCGGCATT-3', 下划线为 Xho I 限制性内切酶位点, 预计扩增长度为 1 535 bp。引物由南京金斯瑞有限公司合成。

1.2.2 病毒 RNA 提取及 RT-PCR 扩增目的片段

取 250 μ L 鸭坦布苏病毒 WR 株病毒尿囊液, 按照 Trizol 试剂说明书提取总 RNA。取 35 μ L RNA 作为模板, 加入反转录随机引物 1 μ L, 70 $^{\circ}$ C 反应 10 min 后冰浴 5 min。随后加入 5 \times AMV Buffer 10 μ L, 10 mmol \cdot L⁻¹ dNTP 2 μ L, 20 U RNase inhibitor 1 μ L, 5U AMV 反转录酶 1 μ L, 共 50 μ L 于 42 $^{\circ}$ C 反应 1.5 h, 80 $^{\circ}$ C 加热 5 min 停止反应。

取 2 μ L 反转录产物为模板, 以 P1、P2 作为引物进行 PCR 扩增, 反应体系为: 10 \times PCR Buffer 2.5 μ L、引物 P₁、P₂ 各 0.5 μ L、10 mmol \cdot L⁻¹ dNTP 0.5 μ L、反转录产物 2 μ L, 加水补足至 25 μ L。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 40 s, 70 $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 保存于 10 $^{\circ}$ C。

1.2.3 鸭坦布苏病毒 E 蛋白基因的克隆与测序 回收纯化目的片段, 并与克隆载体 pEASY-T3 于 25 $^{\circ}$ C 连接 15 min, 转化大肠杆菌 Trans T1 感受态细菌, 涂布于含氨苄青霉素 LB 琼脂平板, 过夜培养后挑取单斑于含氨苄青霉素 LB 液体培养基中培养。经菌液 PCR 和酶切鉴定后, 挑选阳性克隆质粒送上海生工生物工程有限公司进行基因序列测定, 阳性质粒命名为 pEASY-E。

1.2.4 重组表达载体的构建与鉴定 用 Bam HI 和 Xho I 内切酶对重组质粒 pEASY-E 进行酶切, 回收目的片段后与相同内切酶酶切的原核表达质粒 pET-32a 进行连接, 将连接产物转化入原核表达菌 BL21 (DE3) 感受态细胞, 经含氨苄青霉素的 LB 平板初步筛选后, 挑取单个菌落接种于含氨苄青霉素的液体 LB 培养基中, 过夜培养后提取质粒, 经双酶切和 PCR 鉴定筛选阳性克隆。

1.2.5 重组质粒的表达及溶解方式的鉴定 将重组表达菌接种于氨苄青霉素的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养至 OD_{600 nm} \approx 0.6, 加入终浓度为 1 mmol \cdot L⁻¹ 的 IPTG 诱导表达, 收集 4 h 的菌液处理后进行 SDS-PAGE 分析, 同时将未诱导作为阴性对照。菌液经 8 000 r \cdot min⁻¹ 离心 10 min 后沉淀重悬于 PBS 溶液中, 超声波破碎表达菌后 13 000 r \cdot min⁻¹ 离心 10 min, 分别收集上清和沉淀, SDS-PAGE 分析表达蛋白的存在形式。

1.2.6 蛋白表达的 Western-Blotting 鉴定 在鉴定表达 E 蛋白在菌体中存在方式的同时, 对诱导表达的重组菌进行 SDS-PAGE 电泳, 转印到硝酸纤维素膜, 以 5% 脱脂奶粉封闭后加入抗坦布苏病毒 WR 株的单克隆抗体进行孵育, 洗涤后加入 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 二抗, 最终用 ECL 试剂盒进行显影。

2 结果与分析

2.1 鸭坦布苏病毒 E 基因的 RT-PCR 扩增与克隆

通过 RT-PCR 技术扩增出鸭坦布苏病毒 WR 株 E 基因, 电泳后可见一约 1.5 kb 的条带, 与预期大小相符 (图 1)。将目的片段连接入 pEASY-

T3 克隆载体, 转化后提取质粒进行鉴定, 阳性重组质粒命名为 pEASY-E, 同时进行基因序列测定。测序结果显示所扩增的鸭坦布苏病毒 E 基因序列与鸭坦布苏病毒 WR 株 E 基因序列完全相同, 表明成功地克隆了鸭坦布苏病毒 E 基因。

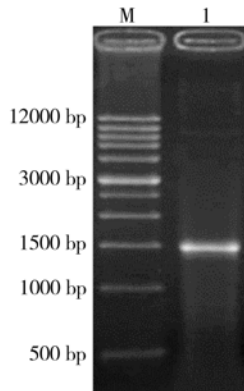


图 1 鸭坦布苏病毒的 E 基因扩增结果

Fig. 1 PCR products of duck Tembusu virus

注: M 为 Marker wide range (500~12 000); 1 为 E 基因 PCR 产物。

2.2 重组 E 蛋白表达载体的构建与鉴定结果

将 *Bam* HI 和 *Xho* I 内切酶双酶切后的鸭坦布苏病毒 E 基因与原核表达载体 pET-32a 连接并转化入大肠杆菌 BL21 (DE3), 提取质粒经限制性内切酶 *Bam* HI、*Xho* I 双酶切后电泳显示, 除了大小约为 5.9 kb 载体片段外, 还出现了约 1.5 kb 的条带, 其大小预期结果一致 (图 2), 测序结果也与预期相同, 将重组表达质粒命名为 pET-E。

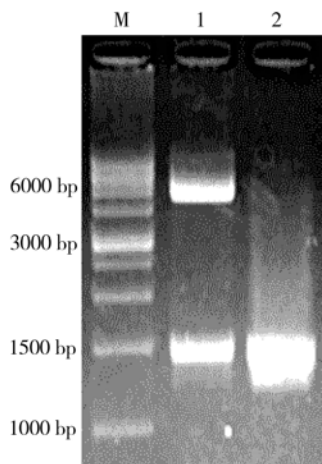


图 2 鸭坦布苏病毒的 E 基因表达重组质粒鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant plasmids for expressing E gene from duck Tembusu virus

注: M 为 Marker wide range (500~12 000); 1 为重组表达质粒的双酶切产物; 2 为 E 基因 PCR 产物。

2.3 重组质粒在大肠杆菌中的表达

阳性质粒 pET-E 转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 后, 经 IPTG 诱导后进行 SDS-PAGE 分析, 结果显示约在 75 kD 处出现 1 条明显的特异性蛋白条带, 与预期的融合蛋白 (目的蛋白和载体蛋白) 大小一致 (图 3)。超声波破碎诱导表达的菌体, 离心后分别收集表达菌上清和沉淀, SDS-PAGE 分析显示表达蛋白主要存在于包涵体中 (图 4)。

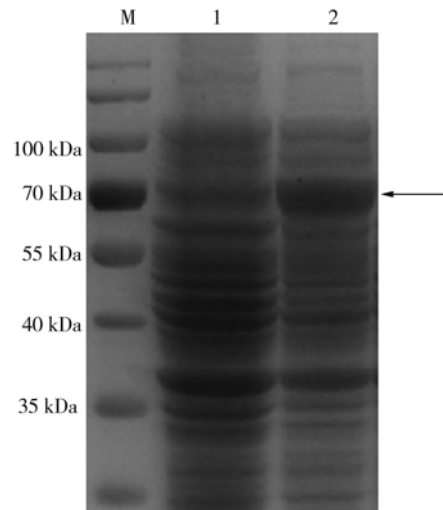


图 3 鸭坦布苏病毒 E 基因的 IPTG 诱导表达

Fig. 3 Expression of E protein from duck Tembusu virus induced by IPTG

注: M 为预染蛋白 marker; 1 为 pET-E 未诱导; 2 为 pET-E 诱导。

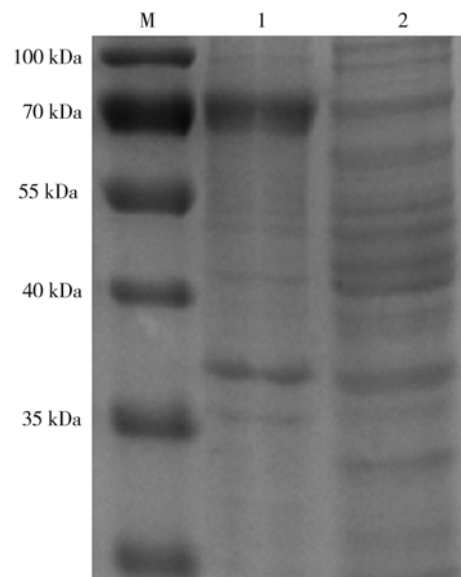


图 4 鸭坦布苏病毒 E 基因表达产物的存在形式

Fig. 4 Solubility of recombinant E protein from duck Tembusu virus

注: M 为预染蛋白 marker; 1 为沉淀; 2 为上清。

2.4 表达蛋白的 Western-blotting 分析

离心超声波破碎的菌体,收集上清与沉淀,将电泳条带转移至硝酸纤维素膜,用 5%脱脂奶粉封闭,以鸭坦布苏病毒单克隆抗体为一抗,HRP 标记的羊抗鼠 IgG 为二抗,用显色后在 75 kD 处沉淀蛋白与单抗发生反应,而上清反应微弱,证明了融合蛋白主要以包涵体形式存在,而且 E 基因表达的重组蛋白具备良好的反应原性(图 5)。

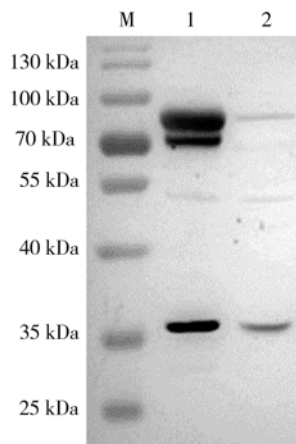


图 5 鸭坦布苏病毒 pET-E 表达 western-blot 检测

Fig. 5 Expression of E gene from duck Tembusu virus identified by Western-blot

注: M 为预染蛋白 marker; 1 为鸭坦布苏病毒 pET-E 沉淀; 2 为鸭坦布苏病毒 pET-E 上清。

3 讨论与结论

病毒囊膜蛋白(E 蛋白)是黄病毒的主要抗原蛋白,与病毒的毒力、组织嗜性、膜融合等生物学特性有密切关系,同时 E 蛋白存在优势抗原表位,能够刺激机体产生保护性抗体,是黄病毒科病毒疫苗设计和诊断抗原的首选靶蛋白。Miyata 等应用纳米微胶囊技术对日本乙型脑炎病毒囊膜蛋白 III 结构域进行生物包装,免疫小鼠可抵抗致死性攻击^[10]。Saxena 等成功表达了西尼罗河病毒的囊膜蛋白,并用于对该病毒感染的早期诊断^[11]。因此,囊膜蛋白一直是黄病毒科相关病毒亚单位疫苗研究的靶点和有效诊断抗原。

鸭坦布苏病毒作为黄病科的成员之一,其表面囊膜 E 蛋白的抗原性也得到证实^[12-17]。本研究利用 RT-PCR 技术成功扩增出鸭坦布苏病毒 WR 株 E 基因,其序列与 GenBank 已发表的鸭坦布苏病毒基因序列一致。对重组菌进行 IPTG 诱导表达,E 基因能够在大肠杆菌中得到高效表达,主要以包

涵体形式存在,并具备良好的反应原性,为建立检测抗体的诊断方法提供基础。

参考文献:

- [1] KONO Y, TSUKAMOTO K, ABD HAMID M, et al. Encephalitis and retarded growth of chicks caused by Sitiawan virus, a new isolate belonging to the genus Flavivirus [J]. Am J Trop Med Hyg, 2000, 63 (1-2): 94-101.
- [2] 曹贞贞, 张存, 黄瑜, 等. 鸭出血性卵巢炎的初步研究 [J]. 中国兽医杂志, 2010, 46 (12): 3-6.
- [3] 万春和, 施少华, 程龙飞, 等. 一种引起种(蛋)鸭产蛋骤降新病毒的分离与初步鉴定 [J]. 福建农业学报, 2010, 25 (6): 663-666.
- [4] SU J, LI S, HU X, et al. Duck egg-drop syndrome caused by BYD virus, a new Tembusu-related Flavivirus [J]. PLoS One, 2011, 6 (3): e18106.
- [5] CAO Z, ZHANG C, LIU Y, et al. Tembusu virus in ducks, China [J]. Emerg Infect Dis, 2011, 17 (10): 1873-1875.
- [6] 傅光华, 黄瑜, 施少华, 等. 鸡黄病毒的分离与初步鉴定 [J]. 福建畜牧兽医, 2011, 33 (3): 1-2.
- [7] 陈仕龙, 陈少莺, 王劭, 等. 一种引起蛋鸡产蛋下降的新型黄病毒的分离与初步鉴定 [J]. 福建农业学报, 2011, 26 (2): 170-174.
- [8] 黄欣梅, 李银, 赵冬敏, 等. 新型鹅黄病毒 JS804 毒株的分离与鉴定 [J]. 江苏农业学报, 2011, 27 (2): 354-360.
- [9] 施少华, 傅光华, 万春和, 等. 鹅源坦布苏病毒的分离及初步鉴定 [J]. 中国兽医杂志, 2012, 48 (12): 10-11.
- [10] MIYATA T, TAFUKU S, HARAKUNI T, et al. A bio-nanocapsule containing envelope protein domain III of Japanese encephalitis virus protects mice against lethal Japanese encephalitis virus infection [J]. Microbiol Immunol, 2013, 57 (6): 470-477.
- [11] SAXENA D, PARIDA M, RAO P V, et al. Cloning and expression of an envelope gene of West Nile virus and evaluation of the protein for use in an IgM ELISA [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2013, 75 (4): 396-401.
- [12] 张琳, 逯茂洋, 胡北侠, 等. 4 株鸭坦布苏病毒包膜蛋白基因的分子进化分析及表达 [J]. 中国兽医学报, 2013, 33 (2): 175-180.
- [13] 黄欣梅, 李银, 赵冬敏, 等. 鹅黄病毒囊膜蛋白的原核表达及抗原性分析 [J]. 华北农学报, 2012, 27 (5): 33-37.
- [14] 姬希文, 李雪松, 边延峰, 等. 鸭坦布苏病毒 E 蛋白的原核表达 [J]. 中国动物传染病学报, 2012, 20 (2): 42-46.
- [15] 刘宗梁, 付钰广, 吉艳红, 等. 鸭坦布苏病毒 E 蛋白膜外区的原核表达与鉴定 [J]. 中国兽医科学, 2013, 43(8): 850-854.
- [16] 柴顺秀, 马花, 韩英, 等. 鸭坦布苏病毒 E 蛋白主要抗原区域的原核表达与鉴定 [J]. 动物医学进展, 2013, 34 (7): 49-53.
- [17] 杨少艳, 于可响, 王华, 等. 鸭坦布苏病毒 E 基因的克隆表达及初步应用 [J]. 浙江农业学报, 2012, 24(5): 782-786.

(责任编辑: 林海清)