

· 基础论著 ·

轮状病毒外壳蛋白 VP4 在大肠埃希菌中的表达

金琳琳 李鹏 万言珍 岳盈盈 李志会 孟红

【摘要】 目的 克隆表达轮状病毒融合素蛋白 VP4。**方法** 以轮状病毒 SA11 株细胞培养物提取总 RNA 为模板,经 RT-PCR 获得 VP4 全长基因片段 cDNA,将其重组于 pET-30a(+)表达载体,转化大肠埃希菌 BL21(plysS),异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导表达,表达产物经 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定,并用镍柱纯化。**结果** 重组载体所含目的基因片段的序列与文献公布序列相符,IPTG 诱导表达的目的蛋白主要以包涵体形式存在;SDS-PAGE 检测表达产物与目的蛋白大小一致,为 88 kD,Western blot 检测发现目的蛋白所带组氨酸标签可与标签抗体反应;镍柱纯化获得 RV SA11 VP4 融合素蛋白,纯度达 90%。**结论** 构建了表达载体 pET-30a(+)-VP4,经诱导表达、纯化,获得了 RV 融合素蛋白 VP4。

【关键词】 VP4;轮状病毒;原核表达

Expression of coat protein VP4 of rotavirus SA11 in *E. coli* JIN Lin-lin, LI Peng, WAN Yan-zhen, YUE Ying-ying, LI Zhi-hui, MENG Hong. Institute of Basic Medicine, Shandong Academy of Medical Science, Shandong 250062, China
Corresponding author: MENG Hong, Email: menghyky@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To express VP4 protein of rotavirus in prokaryotic expression system. **Methods** Total RNA were extracted from MA104 cells infected with rotavirus. Total length cDNA of VP4 (2331 bp) was amplified by RT-PCR. After sequencing, it was cloned into expression vector pET-30a(+). VP4 protein was expressed in *E. coli* BL21(plysS) induced by IPTG and was analyzed by SDS-PAGE and Western blot. VP4 protein was purified by Ni-NTA. **Results** The whole VP4 gene was successfully cloned and was expressed abundantly mainly in the form of inclusion bodies. Molecular weight of expressed products is 88 kD analyzed by SDS-PAGE. By consequence analysis of Western blot, we found VP4 protein with a six-His tag can bind with anti-His antibody. By Ni-NTA purification and dialysis, we acquired VP4 protein with more than 90% purity. **Conclusions** The rotavirus SA11 VP4 protein was successfully expressed by prokaryotic expression system.

【Key words】 VP4; Rotavirus; Prokaryotic expression

基金项目:国家自然科学基金(30470070)

作者单位:250062 济南市,山东省医学科学院基础医学研究所

通讯作者:孟红 Email: menghyky@yahoo.com.cn

轮状病毒(Rotavirus, RV)属于呼肠孤病毒科(reoviridae),是引起婴幼儿和各种幼龄动物腹泻的主要病原之一,目前缺乏特异性治疗药物。VP4是RV外壳蛋白,由RV第4基因编码,全长2331 bp,分子量为88 kD,是病毒融合素^[1,2],是研究抗病毒药物作用机制的主要靶点之一。本课题拟构建表达载体pET-30a(+)-VP4,获得高纯度的融合素蛋白VP4。

材料和方法

一、细胞、菌株和载体

MA-104细胞为本室保存,培养液为含有10%新生牛血清的RPMI 1640(GIBCO公司产品)。RV SA11株、宿主菌*E. coli* TOP10、BL21(plysS)分别引自中国CDC肠道病毒室,载体pET-30a(+)购自大连宝生物工程公司。

二、VP4基因的扩增

1. 制备模板:MA104细胞培养至单层时接种RV SA11毒种0.5 ml,加维持液(含2%新生牛血清的RPMI 1640)在35℃、5% CO₂条件下培养,待细胞90%病变(5 d)时,反复冻融3次收集病毒增殖物,用Trizol试剂、按说明书提取RNA,并用1.2%琼脂糖凝胶电泳检查总RNA的完整性。

2. PCR法获取目的基因:(1)引物设计:根据GenBank中RV SA11毒株VP4基因全序列设计引物,在上游引物5'-端导入*Nsp* V酶切位点(5'-TTCGAA-3'),下游引物5'-端引入*Xho* I酶切位点(5'-CTCGAG-3'),引物委托北京华大基因研究中心合成。上游引物:5'-TTCGAAATGGCTTCGCTCATTATAGAC-3',下游引物:5'-CTCGAGCAACCTGCATTGCATAATCAG-3';(2)逆转录:取模板RNA 5 μl,下游引物1 μl,80℃变性5 min后加入10×AMV Buffer 2 μl,dNTP 4 μl,RNasin 1 μl,反转录酶AMV 1 μl,加双蒸水至20 μl,37℃逆转录1 h;(3)PCR体系(50 μl)如下:逆转录产物(RV VP4 cDNA)5 μl,10×PCR Buffer 2.5 μl,dNTPs(2.5 mmol/L)2 μl,上游引物1 μl,下游引物1 μl,Taq plus 0.5 μl,双蒸水13 μl。反应条件:94℃预变性3 min,94℃ 50 s,58℃ 30 s,72℃ 1 min,29个循环,72℃延伸10 min。1.2%琼脂糖凝胶电泳鉴定(100 mV,30 min),DNA凝胶电泳回收试剂盒(博大泰克公司产品)回收2331 bp目的带。

3. 表达载体pET-30a(+)-VP4的构建:将回收的目的片段连接pUCM-T载体,转化Top10感受态菌株,提取质粒做*Nsp* V和*Xho* I双酶切,将片段连接于相同双酶切的载体pET-30a(+)质粒,并转化BL21(plysS)感受态(卡那霉素25 mg/L),用PCR法选取阳性菌落进行测序(上海博亚生物技术有限公司)鉴定。ANTHEPROT 5.0软件分析氨基酸变异对蛋白结构和功能的影响。

4. 目的蛋白的表达及鉴定分析:(1)诱导表达:挑取单菌落接种于5 ml LB(卡那霉素25 mg/L)培养液中,37℃培养16 h($A_{600}=0.8$),1:50稀释后继续培养2 h,加入终浓度0.1 mmol/L的IPTG置37℃分别诱导表达2 h、3 h、4 h,10 000 r/min离心收集菌体待做鉴定;(2)SDS-PAGE凝胶电泳:将上述菌体进行15% SDS-PAGE凝胶电泳(电泳仪和电泳槽为上海天能产品)、Coomassie blue染色。

电泳条件为 120 V、2 h, 预期大小 88 kD; (3) Western blot: 经电转移至硝酸纤维素膜, 脱脂奶粉封闭, 先后加鼠源抗-His 单克隆抗体、羊抗鼠 HRP-IgG (天根生化科技有限公司产品), 反应条件均为 37℃ 2 h。洗膜后加 DAB 显色, 条带出现棕色沉淀者判为阳性。

5. 目的蛋白的纯化:包涵体经差速离心提取后溶于变性液(8 mol/L 尿素, 14.4 mol/L β -巯基乙醇、18 mmol/L 磷酸二氢钠、7.5 mmol/L 磷酸氢二钠、5.8 mol/L氯化钠),然后进入 His 标签镍柱纯化系统。纯化后 VP4 蛋白经灰度扫描软件分析蛋白纯度。

结 果

一、VP4 基因的扩增

RT-PCR 扩增出的 VP4 特异性产物经琼脂糖凝胶电泳检测,2331 bp 处出现完整清晰的条带,与预期目的基因大小一致。

二、构建表达载体 pET-30a(+)-VP4

将 VP4 基因片段克隆于 pET-30a(+)，酶切前后产物做电泳，在 2331 bp 左右观察到电泳带，大小与目的基因片段长度一致(结果如图 1 所示)。基因测序的结果显示前 780 bp 处的 5 个碱基与后 870 bp 处的 2 个碱基与 GenBank 标准序列(RV SA11 H96 株 VP4)不一致，分别位于 309 位(A→G)，431 位(T→C)，458 位(G→A)，560 位(C→G)，694 位(T→C)，2022 位(A→G)，2224 位(A→G)，经蛋白分析软件分析上述氨基酸的改变对蛋白结构和功能无影响。

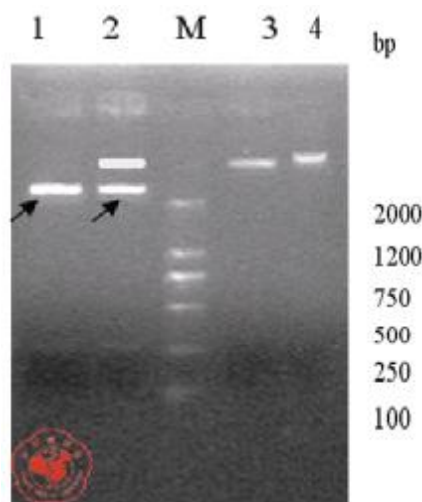


图1 pET-30a-VP4 质粒 *Nsp* V 和 *Xho* I 双酶切鉴定

M. DNA Marker; (1) VP4 质粒经 *Nsp V* 和 *Xho I* 双酶切; (2) pET-30a(+) -VP4 经 *Nsp V* *Xho I* 双酶切; (3) pET-30a(+) 载体经 *Nsp V* 和 *Xho I* 双酶切; (4) pET-30a(+) 载体对照

三、目的蛋白的表达和鉴定

1. 诱导表达和 SDS-PAGE 凝胶电泳: 将 pET-30a(+)-VP4 转化 BL21(plysS)

的阳性克隆子诱导 2 h、3 h、4 h, 然后将细菌总蛋白进行电泳, 各泳道均在 94.0 kD 和 66.2 kD 之间出现深染条带, 与预期值(88 kD)相符(图 2, 第 1、2、3 泳道), 未经诱导样品未出现明显电泳条带(图 2, 0 泳道)。将工程菌超声粉碎、离心, 将上清和沉淀分别做电泳, 发现沉淀中可见与目的蛋白分子量相当的电泳条带(图 2, 第 5 泳道), 而上清中未见上述电泳条带出现(图 2, 第 4 泳道)。

2. Western blot: 与预期蛋白大小相符(88.0 kD)的 VP4, 可与标签抗体反应, 在 DAB 染色下呈棕色, 如图 3 的箭头所示。

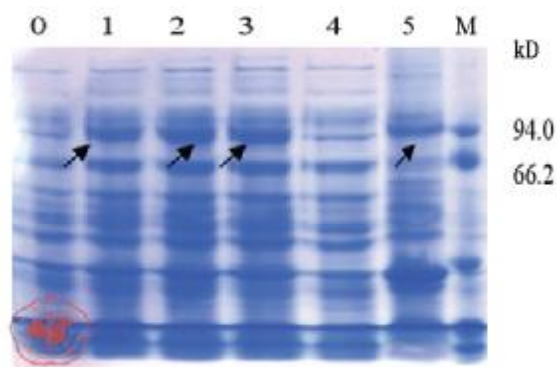


图 2 大肠埃希菌诱导表达产物 SDS-PAGE 结果
M. protein marker; 0、1、2、3 分别为诱导 0、2、3、4 h 菌液总蛋白; 4. 超声裂解后菌液上清; 5. 超声裂解后菌液沉淀

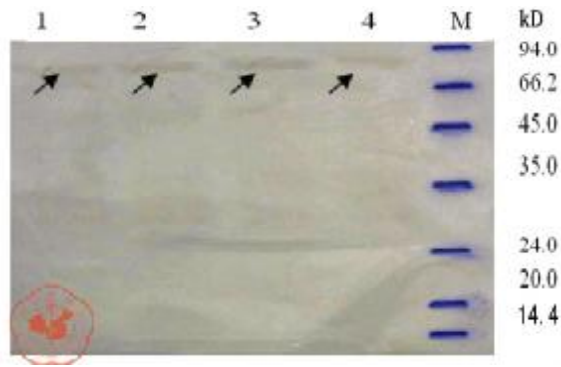


图 3 大肠埃希菌诱导表达产物 Western blot 结果
M. marker; 1、2、3、4 表达产物与 HIS 抗体反应, 呈棕色

四、目的蛋白的纯化

表达产物包涵体经 His 镍柱纯化后做 SDS-PAGE 凝胶电泳鉴定, 在 94.0 kD 和 66.2 kD 之间出现清晰条带, 其他蛋白杂带不明显(图 4), 经灰度扫描分析蛋白纯度达 90%。

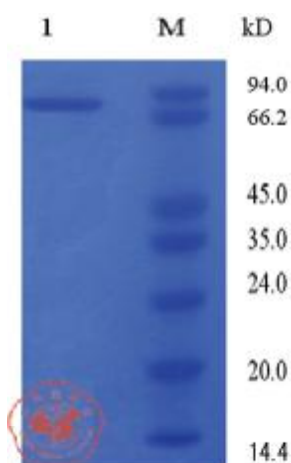


图 4 VP4 蛋白纯化结果
M. marker; 1. 纯化蛋白

讨 论

本论文将 RV VP4 全长基因序列重组于 pET-30a(+), 构建了表达载体 pET-30a(+)-VP4, 转化 *E. coli* BL21 感受态, 诱导表达获得了两端均携带6×His 标签的 VP4 融合蛋白, SDS-PAGE 结果提示, 与预期目的蛋白分子量大小一致(88.0 kD), 并与标签抗体发生特异免疫反应。用 His 镍柱层析法进行纯化, 灰度扫描分析纯度达 90%。

原核表达系统表达蛋白主要以包涵体形式, 在表达 VP4 蛋白过程中, 采用 37℃ 诱导表达 2 h、3 h、4 h, 10 000 r/min 离心收集菌体, 超声破碎后菌液上清与沉淀分别进行电泳, 电泳显示在菌液沉淀泳道中 88.0 kD 左右条带清晰, 菌液上清泳道中 88.0 kD 左右条带不明显, 说明原核表达 VP4 蛋白主要以包涵体形式存在。采用 2 h、3 h、4 h 不同时间进行诱导试验, 结果表明诱导 2~4 h 对蛋白表达量的变化无明显影响。

VP4 为 RV 融合素蛋白, 在病毒复制周期初期介导病毒吸附、穿入宿主细胞, 是重要的抗 RV 药物作用靶点^[3,4]。此类以病毒融合素为作用靶点的抗病毒药物对细胞毒性小、化学性质稳定, 如 HIV 融合抑制剂 T-20, 其作用机制就是通过与 HIV-1 融合素蛋白 gp41 的 HR1 区结合, 从而阻断病毒侵入健康细胞, 使患者免疫系统免于破坏^[5]; 普来可那立^[6,7]可与鼻病毒及肠道病毒的病毒壳蛋白结合, 阻止病毒穿入细胞, 从而抑制病毒复制。

本课题组在 1 株真菌中获得抗病毒组分, 初步认为其对多种病毒具有显著的体外抗病毒活性, 且对 RV 体内抗病毒活性较为显著^[8], 并且初步认为其抗病毒机制为与病毒表面蛋白阻断了病毒的穿入^[9,10]。本文克隆表达 RV 外壳融合素蛋白 VP4, 通过体外抗病毒试验(细胞病变法), 将可能阐明药物阻断 RV 穿入宿主细胞的分子机制, 阐明抗病毒药物作用靶点。

目前, 尚未见采用克隆表达 RV SA11 融合素蛋白用于抗病毒机制研究的资料报道, 而 Mahajan 等^[11]表达了人 RV VP4 蛋白, Nolan 等^[12]利用 pGEX-4T 载体表达人 RV WA 株 VP4 的 GST 融合 VP8, Favocha 等^[13]利用 pET-28a(+) 载体表达牛 RV C486 株 VP4 的酶切片段 VP8, 刘馨等^[14]利用 pThioHis(A) 载体表达 RV SA11 VP4 全长基因, 均用于 RV 诊断及疫苗研究。

本课题克隆表达的 RV SA11 VP4 蛋白将有可能为研发低毒、高效的病毒融合蛋白阻断剂类抗 RV 药物奠定物质基础。

参 考 文 献

- 1 Ciarlet M, Crawford SE, Estes MK. Differential infection of polarized epithelial cell lines by sialic acid-dependent and sialic acid-independent rotavirus strains. *J Virol*. 2001;75:11834-11850.
- 2 Ciarlet M, Ludert JE, Iturriza Gómara M, et al. Initial interaction of rotavirus strains with N-acetyl-neuraminic (sialic) acid residues on the cell surface correlates with VP4 genotype, not species of origin. *J Virol*. 2002;76:4087-4095.
- 3 Dormitzer PR, Sun ZYJ, Wagner G, et al. The rhesus rotavirus VP4 sialic acid binding domain has a galectin fold with a novel

- carbohydrate binding site. EMBO J, 2002, 21: 885-897.
- 4 Prasad BVV, Burns JW, Marietta E, et al. Localization of vp4 neutralization sites in rotavirus by three dimensional cryoelectron microscopy. Nature, 1990, 343: 476-479.
 - 5 Lalezari JP, Henry K, O' Hearn M, et al. Enfuvirtide, an HIV-1 fusion inhibitor for drug-resistant HIV infection in North and South America. N Eng J Med, 2003, 348: 2175-2185.
 - 6 Zhang Y, Simpson AA, Ledford RM, et al. Structural and virological studies of the stages of virus replication that are affected by antirhinovirus compounds. J Virol, 2004, 78: 11061-11069.
 - 7 Ledford RM, Patel NR, Demenczuk TM, et al. VP1 sequencing of all human rhinovirus serotypes: insights into genus phylogeny and susceptibility to antiviral capsid-binding compounds. J Virol, 2004, 78: 3663-3674.
 - 8 马丽霞, 高华英, 于风岭, 等. 乳鼠轮状病毒感染疗效模型的建立. 国际流行病学传染病学杂志, 2007, 34: 3-5.
 - 9 马瑜, 司书仪, 李妍, 等. jn219 的分离纯化及其抗人巨细胞病毒活性的初步研究. 生物技术通讯, 2007, 18: 35-37.
 - 10 薛开莲, 岳盈盈, 万言珍, 等. 真菌提取物 JN219 抗病毒谱的初步研究. 山东大学学报(医学版), 2007, 45: 10-13.
 - 11 Mahajan NP, Rao CD. Nucleotide sequence and expression in *E. coli* of the complete P4 type VP4 from a G2 serotype human rotavirus. Arch Virology, 1996, 141: 315-329.
 - 12 Nolan KJ, Sasaki E, Yoo D, et al. Cloning and expression of human rotavirus spike protein VP8* in *Escherichia coli*. Biochem Biophys Res Comm, 2001, 282: 1183-1188.
 - 13 Favacho AR, Kurtenbach E, Sardi SI, et al. Cloning, expression and purification of recombinant bovine rotavirus hemagglutinin, VP8*, in *Escherichia coli*. Pro Expr Purif, 2006, 46: 196-203.
 - 14 刘馨, 孙茂盛. 轮状病毒全长 VP4 抗原在大肠杆菌中的表达. 中华微生物学和免疫学杂志, 2005, 25: 198.

(收稿日期: 2008-01-07)

(本文编辑: 王丹静)

金琳琳, 李鹏, 万言珍, 等. 轮状病毒外壳蛋白 VP4 在大肠埃希菌中的表达[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2008, 2(1): 13-18.