

轮状病毒 VP7 基因在大肠杆菌中的表达及其免疫原性

袁力勇* 刘 勇 李春宏 孙茂盛 戴长柏

(中国医学科学院中国协和医科大学医学生物学研究所,昆明 650118)

摘 要 轮状病毒是世界范围内引起婴幼儿病毒性腹泻的主要病原体。VP7 是轮状病毒的主要外壳蛋白和中和抗原,是发展基因工程疫苗的首选。把包含全部 3 个主要抗原性区域的轮状病毒 SA11 VP7 基因片段以谷胱甘肽 S 转移酶融合蛋白的形式在大肠杆菌中进行表达,表达产物占菌体总蛋白的 30% 左右。经一步 Glutathione Sepharose4B 亲和纯化,重组蛋白纯度超过 90%。Western blot 实验表明,重组蛋白可被抗 SA11 的多抗特异性识别。动物实验表明,重组抗原可在小鼠和家兔体内诱导 VP7 特异的抗体和一定水平的 SA11 中和抗体。

关键词 轮状病毒, VP7, 大肠杆菌, 免疫原性

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)02-0145-05

轮状病毒是世界范围内引起婴幼儿病毒性腹泻的主要病原体,全世界 4 岁以下儿童几乎都受到过轮状病毒感染的感染。每年约有 87 万婴幼儿死于轮状病毒引起的腹泻^[1,2]。

轮状病毒是一种肠道病毒,VP7 是病毒的主要外壳糖蛋白,决定病毒的血清型,并可以诱导中和抗体。VP7 蛋白在轮状病毒中的重要性使其成为轮状病毒基因工程疫苗研究的首选^[2]。

全长 VP7 基因在大肠杆菌中的表达有一定难度,我们也曾尝试用多种原核表达载体和不同的宿主菌来表达全长 VP7 成熟蛋白,都没有成功。因此根据有关资料^[3-7]和计算机软件分析结果,删除了 VP7 蛋白 C 端的 1/3 共 92 个氨基酸,对剩余的包含了全部 3 个主要抗原性区域的 184 个氨基酸的编码区(称为 VP7_{TR},TR 表示 truncated)在大肠杆菌中进行表达,对表达产物进行分离纯化,并对其免疫原性进行研究。

1 材料和方法

1.1 材料

大肠杆菌菌株 DH5 α 、BL21(DE3)由本室保存,菌株 Top10 购自 invitrogen 公司。质粒载体 pGEX-KG 来自 ATCC(American Type Culture Collection),克隆有轮状病毒 SA11 VP7 成熟蛋白基因的质粒

pUC-VP7 由本室保存。

工具酶购自宝生物工程(大连)有限公司和上海生工生物工程公司,鼠抗 SA11 株全病毒免疫血清由作者自制,标记抗体购自华美生物工程公司。引物合成及 DNA 序列分析由宝生物工程(大连)有限公司完成。Glutathione Sepharose 4B 为 Amersham Pharmacia Biotech 公司产品。

1.2 VP7 基因的 PCR 扩增

VP7 信号肽切割位点位于 50 位 Ala 和 51 位 Gln 之间。PCR 扩增区域是从 Gln51 到 Asn234,共 184 个氨基酸的编码区。以质粒 pUC-VP7 为模板,利用 Primer1 和 Primer2 进行 PCR 扩增^[8],扩增产物命名为 VP7_{TR}。

Primer 1 5'-CGGAATTCTACAAAATTATGGTATTAATCTTCC-3'

上游引物,用于融合表达,含有 EcoRI 酶切位点(斜体字)

Primer 2 5'-GCGTCGACTTAATTAACGCCATCAACCACGTC-3'

下游引物,含终止密码 UAA(黑体字)及 Sal I 酶切位点(斜体字)

1.3 重组质粒 pGEX-KG-VP7_{TR}的构建

将 VP7_{TR}基因以 EcoRI 和 SalI 双酶切定向克隆的方式插入大肠杆菌表达载体 pGEX-KG^[9],酶切鉴定,测序。

收稿日期 2000-06-06,修回日期 2000-10-10。

基金项目 云南省应用基础研究基金(青年基金)资助项目(1999C0024Q)

* 联系作者。Tel 86-871-8315401;E-mail Liuyongsd@21cn.com

1.4 VP7_{TR}基因在大肠杆菌中的表达

挑取含 pGEX-KG-VP7_{TR} 质粒的单菌落接种于含 Amp 的 LB 培养基中, 37℃ 振荡培养至 OD₆₀₀ 约为 0.6~0.8, 加入 IPTG 至终浓度 1mmol/L, 37℃ 继续培养 6~8h, 收集菌体进行 SDS-PAGE 分析^[9]。

1.5 VP7_{TR}重组蛋白的制备

工程菌培养和诱导条件同上所述。将收获的菌体按 0.2g/mL 重悬于 PBS 缓冲液, 冰浴中超声破碎, 分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE 分析^[9]。用 0.5% Triton X-100 和 2mol/L 的尿素各洗涤沉淀 1~2 次, 将包涵体以 0.5~0.75mg/mL 的浓度溶于 8mol/L 尿素中, 装入透析袋, 4℃ 逐步透析复性, PEG 浓缩后进行蛋白纯化。使用 Amersham Pharmacia Biotech 公司的 Glutathione Sepharose 4B 作为纯化介质。

1.6 VP7_{TR}重组蛋白的 Western blot 检测^[9]

一抗为小鼠抗轮状病毒 SA11 的免疫血清; 二抗为 HRP 标记的羊抗小鼠 IgG 多抗。

1.7 重组抗原 VP7_{TR}免疫动物实验

1.7.1 重组抗原 VP7_{TR}免疫小鼠: 15 只小鼠用于免疫, 15 只小鼠用作对照。每只小鼠每次免疫重组抗原 20μg, 0、2、4 周各免疫 1 次。0 周采取腹部皮下多点注射, 每 2 周采取腹腔注射, 并加弗氏不完全佐剂, 第四周采取大腿肌肉注射。采血时间为 0、2、4、6、8 周各 1 次, 每次处死 3 只小鼠, 收集抗血清, 灭活, -20℃ 保存。

1.7.2 重组抗原 VP7_{TR}免疫家兔: 5 只家兔, 4 只用于免疫, 1 只作为对照。每只家兔每次免疫重组抗原 1mg, 0、4、6 周各免疫 1 次。0 周采取大腿肌肉注射, 第四周和第六周采取耳缘静脉注射。采取耳缘静脉采血方法, 每次 1.5mL, 采血时间为 0、2、4、5、6、7、9 周各 1 次。

1.7.3 抗体水平检测: ELISA 检测^[9]: 1) 用纯化的 VP7_{TR} 抗原以 0.5μg/mL 包被酶标板, 检测小鼠和家兔抗血清的效价; 2) 用 SA11 病毒以 10⁴ PFU/mL 包被酶标板, 检测小鼠和家兔抗血清的效价; 3) 根据 ELISA 实验结果, 绘制数据表和抗体消长趋势图。

病毒中和实验^[10]: 将不同稀释度的家兔(第 8 周)或小鼠(第 6 周)抗血清分别与等体积的 SA11 病毒(200 TCID₅₀/50μL)在 37℃ 共孵育 2h, 与 100μL MA104 细胞(8000~10000 个细胞)混合, 37℃ 培养 3~7d, 观察细胞病变, 得出样品的中和抗体效价。

2 结果和分析

2.1 VP7_{TR}的 PCR 扩增

PCR 扩增出 573bp 的 VP7_{TR} 特异性产物(图 1)与预期结果相符。

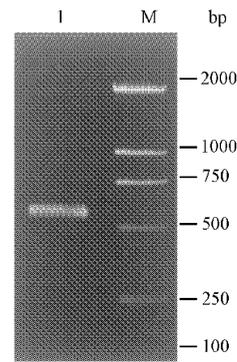


图 1 VP7_{TR} PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR amplification of VP7_{TR}

1. PCR amplification of VP7_{TR}(573bp); M. DNA Molecular weight standard (DL-2000)

2.2 重组质粒 pGEX-KG-VP7_{TR}酶切鉴定

电泳结果表明 pGEX-KG-VP7_{TR} 构建正确。基因测序结果与预期相符。

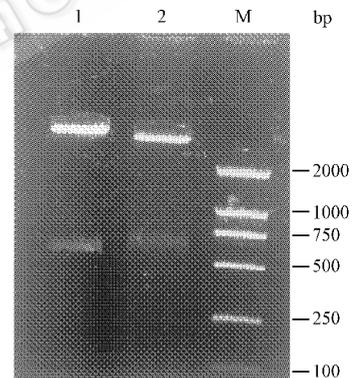


图 2 重组质粒 pThioHisB-VP7_{TR}和 pGEX-KG-VP7_{TR}的酶切鉴定

Fig. 2 Restriction analysis of recombinant plasmids

pThioHisB-VP7_{TR} and pGEX-KG-VP7_{TR}

1. pGEX-KG-VP7_{TR} digested with *Eco*RI and *Sal*I (563bp+4987bp);
2. pThioHisB-VP7_{TR} digested with *Eco*RI and *Hind*III (642bp+4258bp); M. DNA molecular weight standard (DL-2000)

2.3 VP7_{TR}基因在大肠杆菌中的表达

pGEX-KG-VP7_{TR} 在大肠杆菌 BL-21 中的表达产物分子量与预期值(47.768kD)相符, 表达量在 IPTG 诱导后 6~8h 达到高峰, 占菌体总蛋白的 30% 左右, 表达产物主要以包涵体形式存在。

2.4 VP7_{TR}重组蛋白的制备与纯化

洗涤后的包涵体经 8mol/L 尿素溶解、逐步透析复性, 一步 Glutathione sepharose 4B 亲和纯化可使重组 VP7_{TR} 的纯度达到 90% 以上, 完全可以满足动

物实验的要求。

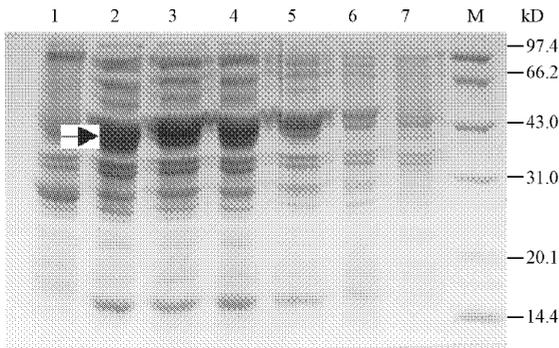


图3 pGEX-KG-VP7_{TR}在大肠杆菌 BL-21 中不同诱导时间的表达检测(箭头所指为表达带)

Fig.3 The expression of VP7_{TR} in *E. coli* BL-21 at different time after induction.

1. Cell lysate of BL21-pGEX-KG induced by IPTG ;
 2. Cell lysate of BL21/pGEX-KG-VP7_{TR} 10h after IPTG ;
 3. Cell lysate of BL21/pGEX-KG-VP7_{TR} 8h after IPTG induction ;
 4. Cell lysate of BL21/pGEX-KG-VP7_{TR} 6h after IPTG induction ;
 5. Cell lysate of BL21/pGEX-KG-VP7_{TR} 4h after IPTG induction ;
 6. Cell lysate of BL21/pGEX-KG-VP7_{TR} 2h after IPTG induction ;
 7. Cell lysate of BL21/pGEX-KG-VP7_{TR} before induction ;
- M. Protein molecular weight standard(middle range). The arrow indicates the expression band.

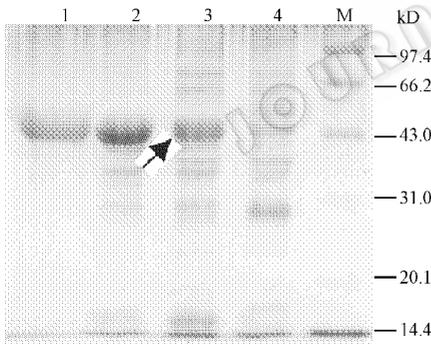


图4 重组 VP7_{TR}纯化产物 SDS-PAGE 检测(箭头所指为表达带)

Fig.4 SDS-PAGE of purified VP7_{TR}

1. VP7_{TR} purified by Glutathione Sepharose 4B ;
 2. VP7_{TR} inclusion bodies ;
 3. Cell lysate of BL-21/pGEX-KG-VP7_{TR} induce by IPTG ;
 4. Cell lysate of BL-21/pGEX-KG-VP7_{TR} before IPTG induction ;
- M. Protein molecular weight standard(middle range). The arrow indicates the expression band

2.5 VP7_{TR}重组蛋白的 Western blot 检测

用小鼠抗 SA11 病毒的多抗对表达 VP7_{TR} 的菌体和含 VP7_{TR} 的包涵体进行 Western blot 分析,在 VP7 分子量(约 48kD)处形成了特异的抗原-抗体结

合反应。这说明 VP7_{TR} 可被抗天然 VP7 的抗体有效识别。

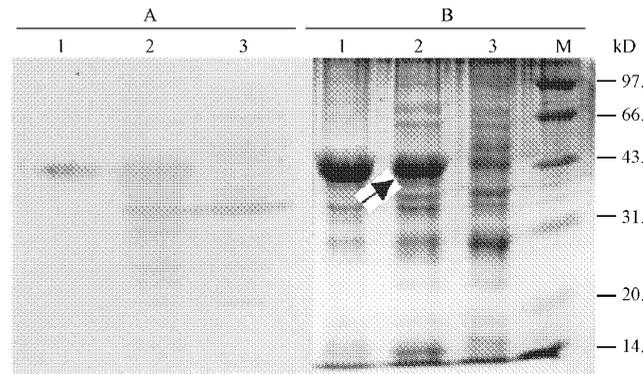


图5 VP7_{TR} Western blot 分析(箭头所指为表达带)

Fig.5 Western blot analysis of VP7_{TR}

A. Western blot analysis. A1. VP7_{TR} inclusion bodies ;A2. Cell lysate of BL-21/pGEX-KG-VP7_{TR} induced by IPTG ;A3. Cell lysate of BL-21/pGEX-KG-VP7_{TR} before IPTG induction.

B. SDS-PAGE. B1. VP7_{TR} inclusion bodies ;B2. Cell lysate of BL-21/pGEX-KG-VP7_{TR} induced by IPTG ;B3. Cell lysate of BL-21/pGEX-KG-VP7_{TR} before IPTG induction ;M. Protein molecular weight standard(middle range). The arrow indicates the expression band

2.6 VP7_{TR}免疫动物抗体检测

2.6.1 ELISA 实验结果 :分别用纯化的 VP7_{TR} 和 SA11 包被酶标板,检测免疫后不同时间小鼠和家兔抗血清的滴度,结果如图 6。

2.6.2 病毒中和实验 :微量中和实验表明,VP7_{TR} 免疫小鼠(第 6 周)和家兔所产生的抗体(第 8 周)可以中和轮状病毒 SA11 对 MA104 细胞的感染,结果如下:

表 1 VP7_{TR}免疫小鼠和家兔中和抗体滴度(几何平均滴度)

Table 1 Titers(GMT) of SA11 neutralizing antibodies induced by VP7_{TR} immunization

Animals	Titers of neutralizing antibodies	GMT
Mice	1 :10	1 :15.87
	1 :20	
	1 :80	
Rabbits	1 :20	1 :33.64
	1 :40	
	1 :20	

3 讨论

我们曾尝试在大肠杆菌中表达全长的 VP7 成熟蛋白基因,为此设计了非融合表达和融合表达两种方案。非融合表达采用了国内应用广泛的

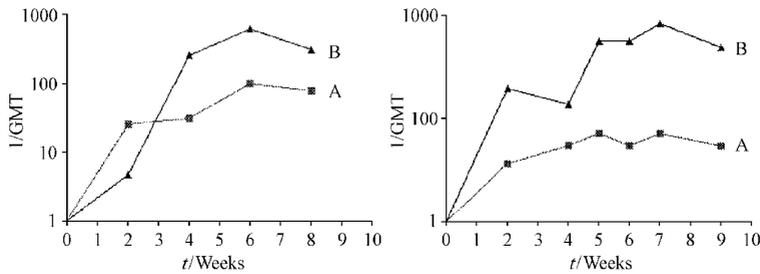


图 6 VP7_{TR}免疫小鼠(左)和家兔(右)抗体滴度消长曲线

Fig. 6 Induction of antibodies to rotavirus VP7 in mice (left) and rabbits (right) by recombinant antigen VP7_{TR} measured by ELISA.

The symbol ■ shows the results of ELISA examined by SA11 rotavirus. The symbol ▲ shows the results of ELISA examined by purified VP7_{TR} antigen.

pBV220 载体,融合表达则使用了 pET20b、pThio-HisB 和 pGEX-KG 3 种表达质粒,但这 4 种系统都没有检测到 VP7 表达。我们更换了宿主菌并对细菌的培养条件进行摸索,只有使用 M9 培养基时, BL21/pBV220-VP7 可见微量表达,但 M9 培养基中 BL21/pBV220-VP7 生长过于缓慢,加之表达量低于 5%,没有实际应用价值。

VP7 基因有很多不利于表达的因素:1)一些毒株的 VP7 基因在大肠杆菌中稳定性差。Wang L 等和 Mason 等都曾报道在大肠杆菌中克隆轮状病毒株的 VP7 基因时遇到了困难,因为这些 VP7 基因中存在潜在的大肠杆菌启动子序列,从而影响了 VP7 基因的稳定和表达^[6,11]。2)VP7 表达产物往往不稳定或对宿主菌具有毒性。如牛的 UK 株 VP7 与 LacZ 融合后表达产物对大肠杆菌有毒^[12]。3)有文献报道,VP7 作为一个内质网结合蛋白,C 端有一个不典型的膜锚结构^[13],该结构可能是限制 VP7 基因原核表达的重要因素。这些原因造成 VP7 的原核表达非常困难,迄今尚未有非融合表达成功的报道,而融合表达也不理想,如 Johnson MA 等用 pUC18 载体融合表达人轮状病毒 VP7 未获成功^[5]。

鉴于大量的探索没有取得理想结果,我们决定对 VP7 基因进行有利于原核表达的改造。VP7 的三个抗原性区域位于蛋白 N 端和中部,C 端 1/3 对免疫原性影响较小。因此,我们删除了 VP7 C 端 1/3 共 92 个氨基酸,对剩余的 184 个氨基酸的编码区重新进行表达。为了实现高效表达,我们用 pThio-HisB 和 pGEX-KG 两种系统在 DH5 α 、BL-21 和 Top10 三种宿主菌中进行比较性表达。在三种宿主菌中,pThioHis-VP7_{TR} 都未见明显表达。pGEX-KG-VP7_{TR} 在 DH5 α 和 Top10 中形成稳定表达,表达

产物分子量与预期值(47.768kD)吻合,表达量超过了菌体总蛋白的 20%。用 BL-21 作为宿主,表达量达到菌体总蛋白的 30%,超过了国外报道的 10%~15% 的最高水平。这说明 VP7 C 端序列是影响原核表达效率的最重要因素,但删除 C 端的 VP7 基因对表达载体仍有很强的选择性。

经 Western blot 检测,大肠杆菌表达的 VP7_{TR} 蛋白具有良好的抗原性。免疫家兔和小鼠后,不仅可以诱导产生与 SA11 病毒株相结合的抗体,还可以诱导一定水平的中和抗体。

综上所述,本文实现了轮状病毒 VP7 在大肠杆菌中的稳定高效表达,表达量占菌体总蛋白的 30% 左右,表达产物经简单纯化即可达到很高纯度。体外及动物实验证实,表达产物具有良好的抗原性和免疫原性。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Bajolet O, Chippaux-Hyppolite C. Rotavirus and other viruses of diarrhea, *Bull Soc Pathol Exot*, 1998, **91**(5 pt 1-2): 432-437
- [2] Fields BN, Knipe DM *et al.* *Virology*, 2nd Edition, London, Raven Press, 1990, pp. 1353-1404
- [3] Wang L, Huang J A, Nagesha H S *et al.* Bacterial expression of the major antigenic regions of porcine rotavirus VP7. Induces a neutralizing immune response in mice, *Vaccine*, 1999, **17**(20-21): 2636-2645
- [4] Reeves P R, Johnson M A, Holmes I H *et al.* Expression of rotavirus VP7 antigens in fusions with bacterial proteins, *Res Microbiol*, 1990, **141**(7-8): 1019-1025
- [5] Johnson M A, Misra R M, Lardelli M *et al.* Synthesis in *Escherichia coli* of the major glycoprotein of human rotavirus: analysis of the antigenic regions, *Gene*, 1989, **84**(1): 73-81
- [6] Wang L, Huang J A, Phelps A *et al.* Periplasmic expression of part of the major rotavirus capsid protein VP7 containing all the

- 2):155~162
- [7] Francavilla M ,Miranda P ,Di Matteo A *et al.* Expression of bovine rotavirus neutralization antigen in *Escherichia coli* *J Gen Virol* ,1987 **68** (pt 11) :2975~2980
- [8] Dieffenbach C W ,Dveksler G S. PCR Primer :A Laboratory Manual ,Cold Spring Harbor Laboratory Press ,1995
- [9] Ausubel F M ,Kingston R E ,Seidman J G *et al.* Short protocols in molecular biology ,3rd ed. John Wiley & Sons ,Inc ,1995
- [10] HUANG Z X (黄祚祥) ,HONG T (洪涛) ,LIU C H (刘崇柏) *et al.* Medical Virology Basis ,Fundamental Techniques & Methods (医学病毒学基础及实验技术) ,Beijing Science Press ,1990
- [11] Mason B B ,Dheer S K ,Hsiao C L *et al.* Sequence of the serotype-specific glycoprotein of the human rotavirus wa strain and comparison with other human rotavirus serotypes ,*Virus Res* ,1985 **4** (4) :291~299
- [12] McCrae M A ,McCorquodale J G. Expression of a major bovine rotavirus neutralisation antigen (VP7c) in *Escherichia coli* ,*Gene* ,1987 **55** (1) :9~18
- [13] Clarke M L ,Lockett L J ,Both G W. Membrane binding and endoplasmic reticulum retention sequences of rotavirus VP7 are distinct :role of carboxy-terminal and other residues in membrane binding *J Virol* ,1995 **69** (10) :6473~6478

Expression in *Escherichia coli* and Immunogenicity of Rotavirus VP7

YUAN Li-Yong* LIU Yong LI Chun-Hong SUN Mao-Sheng DAI Chang-Bai
(Institute of Medical Biology ,CAMS & PUMC ,Kunming 650118 ,China)

Abstract Rotaviruses are the single most important cause of severe diarrhea in young children all over the world. VP7 is the major outer capsid and is a primary candidate for inclusion in a subunit or recombinant vaccine. Part of the VP7 gene containing all the three antigenic regions was expressed as a chimeric protein with glutathione S-transferase (GST) in *E. coli*. The chimeric protein representing about 30% of the total protein of the recombinant-plasmid-carrying bacteria reacted with polyclonal antibodies raised against whole virus. Immunization of sero-negative rabbits and mice with purified fusion-protein generated both virus-binding and neutralizing antibodies.

Key words rotavirus , VP7 , gene expression , *E. coli* , immunogenicity

Received : June 6 , 2000

This work was supported by Applied Basic Research Funds of Yunnan Province (Youth Funds) (1999C0024Q) .

* Corresponding author : Tel 86-871-8315401 ; E-mail Liuyongsd@21cn.com 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>