

禽流感病毒 NP 蛋白与 T4 噬菌体 SOC 蛋白的融合表达*

王新卫^{1,2} 毕英佐^{1**} 马静云¹ 詹爱军¹ 曹永长¹

(华南农业大学动物科学学院 广州 510642) (河南农业大学牧医工程学院 郑州 450002)

摘要 利用 PCR 技术扩增禽流感病毒(avian influenza virus, AIV) NP 基因。将 NP 基因克隆至 T4 噬菌体表达质粒 pSOC 的 SOC 基因(T4 噬菌体表面非结构蛋白基因)下游, 构建成 T4 噬菌体 SOC 位点表达 NP 的表达载体 pSOC-NP。将其转化至大肠杆菌 BL21(DE3), 经 IPTG 诱导后表达的目的蛋白 SOC-NP 进行 SDS-PAGE 与 Western-blot 方法检测。结果表明, 表达的 SOC-NP 蛋白相对分子质量约 58kD, 表达量占菌体总蛋白量的 20.34%, 并具有与 AIV 特异性抗体反应的活性。

关键词 禽流感病毒 核蛋白 T4 噬菌体 融合表达

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654(2007)05-0889-04

Fused Expression of AIV NP Gene And T4 Phage SOC Gene*

WANG Xin-Wei^{1,2} BI Ying-Zuo^{1**} MA Jing-Yun¹ ZHAN Ai-Jun¹ CAO Yong-Chang¹

(College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642)

(College of Animal Husbandry and Veterinary, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002)

Abstract NP gene of AIV was amplified by PCR and cloned into the expressing plasmid pSOC, where NP gene was fused to 3' end of T4 phage small outer capsid gene encoding SOC protein. T4 phage expression vector named pSOC-NP was constructed and used to transform *E. coli* BL21(DE3). The recombinant *E. coli* BL21(DE3) was induced by IPTG. The expressed fusion protein SOC-NP was detected by SDS-PAGE with expected molecular size of 58 kD and the expression product accounted for 20.34% of the total bacterial protein. The immunological test applying Western blot indicated that SOC-NP fusion protein could react to AIV specifically.

Key words Avian influenza virus, Nucleoprotein, T4 phage, Fused expression

禽流感病毒核蛋白(Nucleoprotein, NP)是较为保守的群特异性抗原。针对 NP 的抗体不能给动物提供被动保护, 但 NP 却是细胞毒性淋巴细胞识别的主要抗原, 在抗同一群内不同亚型流感病毒感染中起重要作用^[1]。因此, 核蛋白的免疫与抗原功能不仅对解决禽流感病毒感染的交叉保护具有现实意义, 也常常作为临床检测 AI 的诊断试剂, 在实际生产中具有重要的现实意义。

T4 噬菌体展示系统(T4 phage display)^[2]利用其衣壳表面上的两个非必需的外壳蛋白 SOC (small outer capsid protein) 和 HOC (highly antigenic outer capsid protein) 基因与外源蛋白基因融合, 将外源多肽或蛋白分别展示于 T4 噬菌体表面的 SOC 位点和

HOC 位点。与其它噬菌体展示系统相比, T4 噬菌体系统易于连接和组装, 不容易使外源基因删除和重排。其组装是在宿主细胞内进行的, 被组装的融合蛋白无需通过质膜, 这就使得一些不能被大肠杆菌分泌的蛋白质也能得到展示。这些特点使得 T4 噬菌体双重展示系统在药物设计、疫苗设计、诊断试剂的研制、抗原抗体库的建立、分析抗原表位、细胞因子、受体等方面具有广泛的应用前景^[3-5]。本实验旨在利用分子克隆技术, 将禽流感病毒 AIV 的保守性抗原蛋白(NP)基因亚克隆至 T4 噬菌体展示系统的表达质粒 pSOC^[2], 进行融合表达, 然后对其表达产物进行免疫学检测, 以期生产具有生物活性的、可用于临床检测的 NP 融合蛋白抗原; 也为进一

* 广东省科技攻关计划资助项目(No. A20403)

** 通讯作者 Tel: 020-85280283, E-mail: yzbi@scau.edu.cn

收稿日期: 2007-04-05, 修回日期: 2007-04-12

步构建表达 NP 的重组噬菌体奠定基础。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株与毒株

基因工程菌 *E. coli* BL-21(DE3), 基因型为 *hsdS*, *gal*(λ clT857), *ind1*, *Sam7*, *nin5*, *lacUV5-T7* (基因1), 基因工程菌 *E. coli* DH5 α , 均来自华南农业大学动物科学学院生物技术实验室。pSOC: 含有 T4 噬菌体小外壳蛋白基因 SOC 的原核表达质粒, 由美国马里兰大学任兆钧博士惠赠, 华南农业大学动物生物技术实验室保存备用。禽流感病毒 A/Duck/GD/2001/H5N1 由华南农业大学动物科学学院动物生物技术实验室分离、鉴定和保存。

1.2 阴、阳性血清

SPF 鸡血清、抗 H5N1 亚型 AIV 特异性抗血清 (用于免疫印迹) 购自哈尔滨兽医研究所, 酶标记兔抗鸡 IgG 为深圳百奥生物技术有限公司产品。

1.3 主要试剂

各种内切酶、T4 DNA 连接酶、RNA 酶、溶菌酶、Taq plus DNA 聚合酶、DNA 片段快速纯化回收试剂盒、pGEMT 载体等, 均购自大连宝生物生物工程有限公司。

1.4 重组 PCR 引物的设计

应用 DNA Star 软件, 参照 GenBank 中注册的 AIV H5 亚型 NP 基因序列, 设计了一对引物 NP1/NP2, 其 5' 端均含有用于 PCR 克隆的 *EcoR* I 酶切位点, 其中下游引物 NP2 含有终止密码子 TAA。此外, 根据已发表的 T4 噬菌体小外壳蛋白 (small outer capsid protein, SOC) 基因的序列, 设计了一个检测融合基因 SOC-NP 的检测引物: pSOC-UP, 用于检测 NP 基因插入的方向的正确与否。引物序列分别为: NP1: CAAGAATTCTATGATAACAATAGAGAGA; NP2: TCGAATTCTCAATTGTCATACTCCT; pSOC-UP: GAATCATATGGCTAGTCTCGCGG

1.5 NP 基因的克隆与鉴定

增殖病毒, 将禽流感病毒 H5N1 亚型毒株用灭菌的生理盐水 100 倍稀释后, 以尿囊腔途径接种 10 日龄 SPF 鸡胚, 37 $^{\circ}$ C 恒温箱孵育, 弃 24h 内死亡胚, 无菌收获 24h~72h 内感染胚的尿囊液, 测定病毒效价后 -80 $^{\circ}$ C 保存备用^[3]。使用 GibcoBRL 公司 TRIzol LS Reagent RNA 提取试剂盒提取禽流感病毒 RNA, 利用 TaKaRa 公司的 Reverse Transcriptase XL(AMV)

反转录酶合成 NP 基因第一链 cDNA。然后 PCR 扩增 NP 基因 cDNA, 将之加 A 尾后与 T 载体连接, 转化 DH5 α 感受态细胞, 鉴定阳性重组菌, 以碱裂解法抽取质粒, 后限制内切酶消化鉴定, 鉴定为阳性的重组质粒 (NPT) 进行序列测定。

1.6 pSOC-NP 表达载体的构建及酶切、PCR 鉴定

T4 表达质粒 pSOC 转化 DH5 α 感受态细胞, 培养后抽提质粒 pSOC。以限制性内切酶 *EcoR* I 同时分别消化 NPT 质粒和 T4 表达质粒 pSOC, 然后通过试剂盒分别纯化回收目的片段 (核蛋白 NP 基因片段为 1.32kb 和 pSOC 大片段约 4.8kb)。将 NP 基因片段通过 T4 连接酶连接到 T4 表达质粒 pSOC 的 C 末端, 构建成表达载体 pSOC-NP。将 pSOC-NP 表达载体转化入感受态菌 BL21(DE3) 中, 提取质粒后分别用 PCR 方法和限制性内切酶 *EcoR* I 进行酶切鉴定。

1.7 SOC-NP 融合表达产物的检测

取 pSOC-NP 转化菌进行 IPTG 诱导培养, 以表达产生 SOC-NP 蛋白, 随后对表达产物进行 SDS-PAGE 电泳及 Western-blot 检测^[6], 并用凝胶成像及分析系统 (法国 VL 产品) 凝胶扫描分析 (560nm 波长的吸收值) 测量表达产物的含量。

2 结果

2.1 NP 基因的克隆与鉴定

采用 RT-PCR 技术, 用特异性引物 NP1/NP2 成功获得一基因片段, 对这一片段序列分析表明, 成功获得 NP 部分基因, 大小约 1320bp 左右 (图 1)。

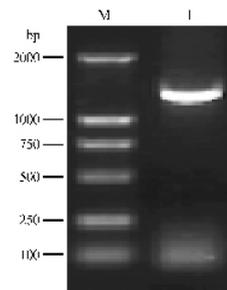


图 1 NP 基因的 PCR 结果

M DNA 分子量标准 DL2000; 1 NP 的 PCR 产物, 大小约 1320 bp

2.2 pSOC-NP 表达载体的构建及酶切、PCR 定向鉴定

采用 PCR 克隆技术将流感病毒和蛋白基因定向克隆至 T4 表达质粒 pSOC 的 C 末端, 构建成表达

载体 pSOC-NP ,分别用限制性内切酶 *EcoR* I 进行酶切和 PCR 方法(引物采用 pSOC-NP/NP2)鉴定,并进行序列测定,结果如图 2、3 所示,获得了准确的克隆,为流感病毒核蛋白与 T4 噬菌体 SOC 蛋白的融合表达奠定了基础。

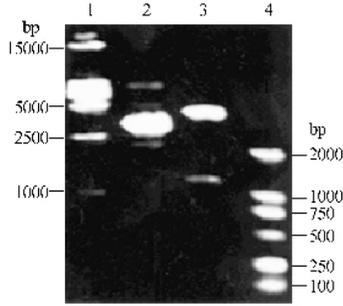


图 2 重组质粒 pSOC-NP 的酶切鉴定

1 DL15000 DNA 分子量标准; 2 重组质粒 pSOC-NP 对照; 3 *EcoR* I 消化出两条带,分别约为 4800bp 和 13200bp; 4 DL2000 DNA 分子量标准

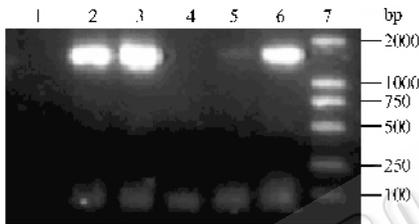


图 3 重组质粒 pSOC-NP 的 PCR 筛选

1~6 六个单菌落的 PCR,其中 2、3、6 为 NP 基因插入方向正确的阳性重组子,扩增产物大小为约 1600bp 左右; 7 DL2000 DNA 分子量标准。

2.3 SOC-NP 融合表达产物的检测

取表达载体 pSOC-NP 转化菌进行 IPTG 诱导培养,可表达以包涵体形式存在的目的蛋白。融合表达产物相对分子质量大约 58kD 左右。凝胶成像及分析系统凝胶扫描分析(560nm 波长的吸收值)测量显示,重组表达载体转化菌的 SOC-NP 融合蛋白的表达量占菌体总蛋白量的 20.34%(图 4)。以抗 H5N1 亚型流感病毒样阳性血清对 SOC-NP 融合蛋白进行 Western blot 检测,结果表明 SOC-NP 融合蛋白可与相应流感病毒抗体发生特异性的反应(图 5)。

3 讨论

T4 噬菌体衣壳外表面有两种非必需外壳蛋白 SOC 和 HOC,消除或者缺失其中 1 个或 2 个蛋白并

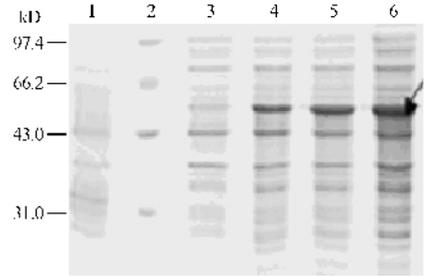


图 4 pSOC-NP 融合表达产物的 SDS-PAGE 结果

1 含空质粒菌诱导表达条带对照; 2 低分子量蛋白标准; 3~6 含 pSOC-NP 阳性重组菌在不同时间被 IPTG 诱导表达条带,分别为诱导 2h、4h、6h、8h 表达条带。

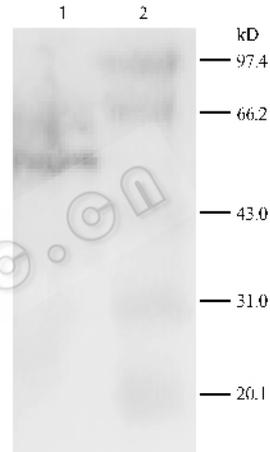


图 5 表达产物的 Western blot 检测

1 SOC-NP 融合蛋白; 2 预染色分子量蛋白标准

不影响其繁殖能力和感染能力。因此,利用非必需外壳蛋白建立起来的 T4 噬菌体展示系统具有优于其它噬菌体展示系统(丝状噬菌体、M13、fd、fl、λ)的特点,表达的外源蛋白容量大、拷贝数高,在宿主细胞内组装,展示的外源蛋白范围更广。已经有多种蛋白得到展示,并且展示的蛋白具有免疫学活性^[7]。为该系统用于新型疫苗的研制、分析抗原表位、制作诊断试剂等方面的应用奠定了基础。

T4 噬菌体展示系统由其表达载体、重组载体、噬菌体阳性选择载体组成。构建能够在 SOC 位点展示外源蛋白的重组噬菌体,SOC 基因与外源基因的融合表达作为关键。本研究将流感病毒核蛋白基因与 SOC 基因融合,经酶切鉴定、SDS-PAGE、Western blot 分析证实 SOC-NP 融合基因表达产物能与相应的抗血清可以发生特异性的免疫学反应。因此,该融合蛋白可用于生产检测流感的诊断试剂,生物安全性高,生产方便,但尚需建立适当的检测方法,进一步研究其实际诊断价值。同时也可以

研制新型流感重组亚单位疫苗,进一步研究其刺激动物机体产生的细胞免疫,深入研究新功能,筛选新的抗原表位,为生产新型流感基因工程疫苗奠定基础。

参考文献

[1] Ulmer J B. *Vaccine* 2002 **31**63 :1 ~ 3.

[2] Ren Z J , Lewis G K , Black L W , *et al.* *Protein Sci* ,1996 , **5** : 1833 ~ 1843.

[3] 殷震,刘景华. 动物病毒学(第二版). 北京:科学出版社, 1997. pp.343 ~ 348.

[4] Malys N , Chang DY , Baumann RG , *et al.* *Mol Biol* ,2002 **31**9(2) : 289 ~ 304.

[5] Kutter E , A Sulakvelidze. *Bacteriophages : biology and applications* [M]. CRC Press , Inc. , Boca Raton , Fla. 2005.

[6] 金冬雁,黎孟枫译. 分子克隆实验指南(第二版). 北京:科学出版社,1999. pp.133 ~ 135.

[7] Li Q , Shivachandra S B , Leppla S H , *et al.* *Mol Biol* , 2006 **36**3(2) : 577 ~ 588.