

呼肠病毒 BYD 株吸附蛋白 σ_1 的原核表达及其抗原性鉴定*

宋立华¹ 何君¹ 朱虹¹ 刘光桥¹ 黄如统¹ 貌盼勇² 端青^{1**}

(病原微生物生物安全国家重点实验室 军事医学科学院微生物流行病研究所 北京 100071)

(解放军 302 医院传染病研究所病毒研究室 北京 100039)

摘要 将呼肠病毒 BYD 株 S1 片段编码的细胞吸附蛋白基因连接至 pET-28a(+) 构建表达载体 pET-28a(+)-S1 转化表达宿主菌 *E. coli* BL21(DE3), 分析表达载体能否表达预期大小的重组 σ_1 , 并进一步鉴定重组 σ_1 的抗原性。SDS-PAGE 实验表明经 IPTG 诱导后, 表达载体能表达 53kD 左右蛋白质, 与重组 σ_1 的预期大小相符, 免疫印迹分析表明重组 σ_1 有较好的抗原性和特异性, 可用于呼肠病毒诊断试剂的制备。

关键词 呼肠病毒, S1 片段, 细胞吸附蛋白, 原核表达

中图分类号: Q786 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654(2007)06-1093-04

Prokaryotic Expression and Antigenicity Analysis of the Attachment Protein σ_1 of Reovirus BYD Strain*

SONG Li-Hua¹ HE Jun¹ ZHU Hong¹ LIU Guang-Qiao¹ HUANG Ru-Tong¹ MAO Pan-Yong² DUAN Qing^{1**}

(State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Beijing Institute of Microbiology and Epidemiology, Beijing 100071)

(Department of Virology, the 302nd Hospital of PLA, Beijing 100039)

Abstract The cell attachment protein gene of the S1 segment of reovirus BYD was cloned into prokaryotic expression vector, pET-28a(+). The resulting pET-28a(+)-S1 was transformed into *E. coli* BL21(DE3) for analyzing whether the constructed vector could express inferred recombinant σ_1 and characterizing the antigenicity of the recombinant σ_1 . SDS-PAGE showed the constructed vector expressed a protein around 53 kilodalton, which was consistent with the deduced molecular weight of the recombinant σ_1 . And immunoblot assays demonstrated that the recombinant σ_1 had good antigenicity and specificity, and therefore it should have great potential in developing diagnosis reagent.

Key words Reovirus, S1 segment, Cell attachment protein, Prokaryotic expression

呼肠病毒(ReoV)是一大类无包膜,有双层衣壳,呈20面体对称,基因组由10~12条dsRNA节段组成的病毒的统称。我们报道了从SARS患者的临床标本中分离到多株ReoV^[1,2],通过基因序列分析和生物学鉴定确认新分离ReoV为哺乳动物呼肠病毒(M-ReoV),属于呼肠病毒科、正呼肠病毒属。M-ReoV在自然界广泛存在,一般认为它属于孤儿病毒,但国外不断有M-ReoV引起婴幼儿或儿童严重疾病的报道,如致死性脑膜炎^[3~5]、致死性肺炎^[6]等。国外对M-ReoV的研究比较深入。在2003年之前,国内只有302医院在上世纪80年代初报道过从患儿的粪便中分离到2株ReoV^[7]。对已知M-ReoV

的研究发现,其S1片段编码细胞吸附蛋白 σ_1 和小分子非结构蛋白 σ_1s ,其中 σ_1 负责与宿主细胞上的受体结合,在介导膜融合进入细胞的过程中发挥了关键作用,已证明它决定了ReoV的组织嗜性、感染性和致病性等; σ_1 也是ReoV的主要抗原蛋白,可诱导宿主免疫系统产生中和抗体。

我们前期研究发现新分离ReoV的S1片段与目前已知的ReoV相比发生了比较大的变异,其主要编码蛋白 σ_1 的氨基酸序列与目前已知ReoV的同源性最高只有64%^[8]。虽然目前还不能确定新分离ReoV与人类疾病之间的联系,但考虑到新分离ReoV有较大变异,并能感染动物产生类似SARS的

* 国家自然科学基金资助项目(No. 30471555)

** 通讯作者 Tel: 010-66948560, Fax: 010-66948669, E-mail: duanq@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2007-02-28, 修回日期: 2007-05-08

症状^[9,10],有必要对目前成人感染新分离 ReoV 的情况进行血清学调查。本研究采用原核表达系统高效表达和初步纯化了重组新分离 ReoV 的 $\sigma 1$ 蛋白,并分析了重组 $\sigma 1$ 蛋白的抗原性,旨在为开发有效的诊断试剂提供依据,为进一步阐明新分离 ReoV 的致病性和感染机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

表达载体 pET-28a(+) 新分离 ReoV BYD 株均为本室保存; *E. coli* DH5 α 、*E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞购自北京天为时代科技有限公司; pMD-18T 载体、限制性内切酶 *Nde* I 和 *Not* I、T4 DNA 连接酶、*LA* Taq 酶均购自 TaKaRa; 辣根酶标记山羊抗兔 IgG (H+L) 购自 Santa Cruz 公司; 各种兔血清均为本实验室制备; PCR 回收试剂盒、凝胶回收试剂盒、质粒小量提取试剂盒均购自 Qiagen 公司; 其它试剂均是国内公司生产的分析纯产品。

1.2 引物

根据前期已发表的新分离 ReoV BYD 株 S1 片段的全长核酸序列 (GenBank Accession No. DQ312301) 选取 $\sigma 1$ 蛋白的全长开放阅读框为研究对象,设计引物 S1EF、S1ER,分别在 S1EF 和 S1ER 上引入了 *Nde* I 和 *Not* I 酶切位点。扩增的目的基因约为 1383bp,编码 461 个氨基酸。

S1EF 5'-TATACATATGCTCTGAGCTGATTTCAGC
TTATT-3'

S1ER 5'-GAGTGCGGCCCGCCCTAAGCATGGATA
CATAATTGT-3'

1.3 PCR

用本室保存的含有 S1 片段全长 cDNA 的质粒 pMD-18T-S12^[8] 作为模板,用引物 S1EF、S1ER 进行扩增(94℃ 5min 预变性; 94℃ 30s, 50℃ 30s, 72℃ 90s, 25 个循环; 最后 72℃ 延伸 7min), PCR 片段经琼脂糖凝胶电泳纯化切胶回收。

1.4 重组表达质粒的构建

将纯化的目的基因连入 pMD-18T 载体,经序列测定后用 *Nde* I 和 *Not* I 双酶切获得目的基因片段,与经相同酶切后的 pET-28a(+) 表达质粒连接,转化 *E. coli* DH5 α , 小量提取质粒酶切鉴定。

1.5 重组蛋白的表达和包涵体纯化

将鉴定为阳性的 pET-28a(+) 质粒转化 *E. coli*

BL21(DE3), 挑取单克隆接入含抗生素的 LB 液体培养基中,用 1mmol/L IPTG 诱导,同时设阴性对照,经 SDS-PAGE 检测目的蛋白的表达。阳性菌株进行大量诱导,经溶菌酶处理和超声裂解破碎,分别收集上清和沉淀,将沉淀用包涵体洗液清洗收集初步纯化的包涵体,经 SDS-PAGE 检测包涵体目的蛋白的含量,同时设全菌体对照。

1.6 抗新分离 ReoV BYD 株特异性兔多克隆抗体的制备

用 L929 细胞单层接种新分离 ReoV BYD 株,当 90% 细胞出现 CPE 时,收集培养物在 -70℃ 和室温反复冻融 3 次,6000r/min 离心 30min,收集上清,65℃ 灭活 30min,40000r/min 离心 1h,沉淀用生理盐水悬浮后,皮下和腹腔免疫兔子,每 2 周加强免疫 1 次,免疫 3 次后,收集兔子血清,经过硫酸铵沉淀,溶解于 PBS 中,即为抗 ReoV BYD 株的特异性兔多克隆抗体。

1.7 重组蛋白的抗原性分析

用 Western blotting 分析重组蛋白的抗原性。表达产物或纯化产物经 SDS-PAGE 电泳后,通过湿转法转膜至硝酸纤维素膜,用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭过夜,用 TBST 漂洗后,用 1:1000 稀释的免疫兔血清作一抗,同时设正常兔血清和其它由无关蛋白所制备的兔血清作对照,室温孵育 1h,同样漂洗后,加入按 1:5000 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗,室温孵育 1h,同样漂洗后,将膜浸入沉淀型单组分 TMB 底物溶液中,小心观察至理想对比度时及时将膜置于蒸馏水中终止反应,拍照记录结果。

2 结果

2.1 pET-28a(+)-S1 原核表达载体的构建

所扩增的特异目的片段长约 1400bp,将纯化的 PCR 产物连入 pMD-18T 载体中,转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞。提取质粒,用 *Nde* I 和 *Not* I 双酶切,经琼脂糖凝胶电泳纯化后,与同样经过双酶切的 pET-28a(+) 载体进行连接,转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞。提取质粒,用 *Nde* I 和 *Not* I 双酶切鉴定,获得载体带和 1400bp 的克隆片段(图 1)。酶切鉴定阳性克隆进行序列测定,测定结果表明,所克隆的片段序列与 GenBank 中 ReoV BYD 株的 $\sigma 1$ 基因序列一致。

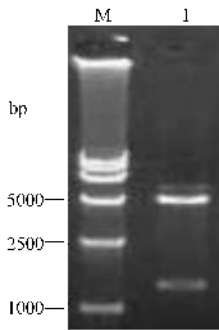


图1 pET-28a(+)S1 双酶切鉴定图

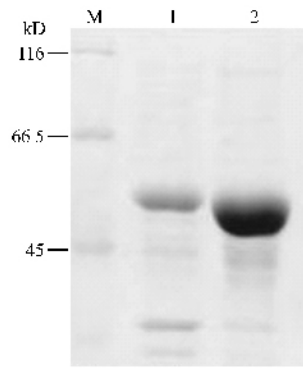
M DLI5000; 1 pET-28a(+)S1(*Nde* I + *Not* I)

图3 包涵体的纯化

M 蛋白 marker; 1 诱导后的菌体; 2 纯化的包涵体

2.2 重组蛋白的诱导表达

将重组质粒 pET-28a(+)S1 转入表达宿主菌 *E. coli* BL21(DE3),经 IPTG 诱导后进行 SDS-PAGE 电泳,并设诱导前阴性对照,考马斯亮蓝染色,结果表明其表达产物的分子量在 43kD~66.5kD 之间,与用 VectorNTI 10.0 软件预测的重组 σ_1 蛋白的分子量 53kD 相符(图 2A)。离心收集少量诱导后的菌体,用去离子水悬浮,经溶菌酶处理和超声裂解破碎后,分别收集上清和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳,结果表明表达产物主要以包涵体形式存在(图 2B)。

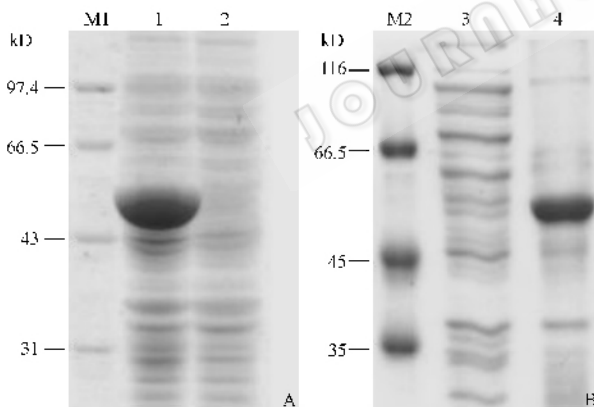


图2 含 pET-28a(+)S1 表达质粒的菌株的诱导表达

M1, M2 蛋白 marker; 1 诱导后的菌体; 2 诱导前的菌体;
3 菌体经超声破碎后的上清; 4 超声破碎后的沉淀

2.3 重组蛋白的包涵体纯化和溶解

表达重组蛋白的阳性菌株大量诱导后,离心收集菌体,用去离子水悬浮,经过 2 次反复冻融、溶菌酶处理和超声裂解破碎,分别收集上清和沉淀,沉淀用包涵体洗液清洗后,进行 SDS-PAGE 电泳,设诱导后的总菌体作对照,结果表明包涵体中目的蛋白的含量和纯度都比较高(图 3)。

2.4 免疫印迹分析

表达重组蛋白的工程菌经 IPTG 诱导后进行 SDS-PAGE 电泳,并设诱导前对照,转膜至硝酸纤维素膜,采用 1:1000 稀释的抗 ReoV 兔血清作一抗,进行免疫印迹分析,结果显示诱导后的样本在表达重组蛋白的位置上有一条特异的反应条带,说明重组蛋白与抗 ReoV 兔血清可产生特异性反应(图 4A);将纯化的包涵体进行 SDS-PAGE 电泳后,转膜至硝酸纤维素膜上,分别采用抗 ReoV 兔血清、正常兔血清、抗重组恶性疟原虫(FCC1/HN)乳酸脱氢酶兔血清、抗肺炎链球菌(010075)菌体兔血清、抗类鼻疽菌(350102)菌体兔血清、抗重组沙眼衣原体(L2)主要外膜蛋白兔血清和抗霍乱弧菌(M045)菌体兔血清(均为 1:1000 稀释)作一抗,进行免疫印迹分析,结果显示纯化的包涵体仅可以与抗 ReoV 兔血清发生免疫反应,而其它兔血清与重组蛋白没有反应(图 4B)。以上分析表明重组表达的 σ_1 蛋白有良好的抗原性,可以用来特异性检测 ReoV 抗体。

3 讨论

目前,文献上有关 M-ReoV 引起人类严重疾病的报道仅限于婴幼儿和儿童^[3-6];一般认为 ReoV 不引起成年人明显的疾病症状,是一种孤儿病毒。在 2003 年“非典”期间,我们从 SARS 患者的临床标本中连续分离到多株呼肠病毒,有的患者还同时分离到了 SARS 冠状病毒。由于病毒易发生变异,其毒力进化也比较快,所以虽然我们还不能确认新分离 ReoV 与人类疾病之间的关系,但或许新分离 ReoV 能引起疑似 SARS 患者的症状,如发烧、流鼻涕等,也有可能新分离 ReoV 能加重 SARS 患者的病情等。

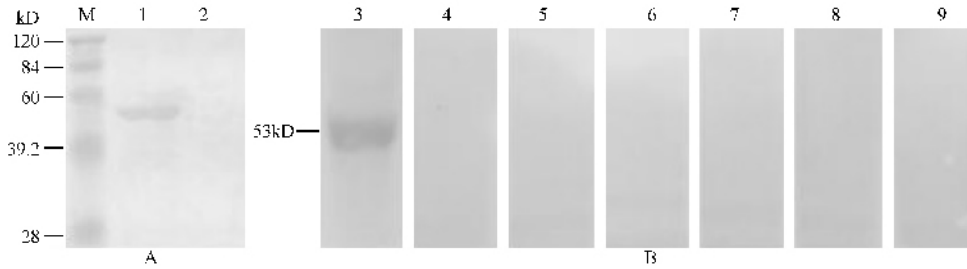


图4 重组 $\sigma 1$ 蛋白的 Western blotting 检测

A : M Pierce 预染蛋白 marker ; 1 IPTG 诱导后的菌体 , 一抗为抗 ReoV 血清 ; 2 IPTG 诱导前的菌体 , 一抗同 1。B : 纯化的包涵体 , 一抗分别为 : 3 抗 ReoV 血清 ; 4 正常兔血清 ; 5 抗重组恶性疟原虫乳酸脱氢酶兔血清 ; 6 抗肺炎链球菌菌体兔血清 ; 7 抗类鼻疽菌菌体兔血清 ; 8 抗重组沙眼衣原体主要外膜蛋白兔血清 ; 9 抗霍乱弧菌菌体兔血清

在本实验中 , 我们构建的表达质粒包含了 $\sigma 1$ 基因的全长序列 , 在大肠杆菌中实现了重组 $\sigma 1$ 的包涵体表达 , 易于重组蛋白的纯化 , 且重组 $\sigma 1$ 具有良好抗原性和特异性 , 可应用于 ReoV 诊断试剂的制备。

国外早在上世纪 80 年代就已证实大肠杆菌表达系统可用于 ReoV 的 S1 基因分析 , Masri 等人^[11]发现原核表达的重组 $\sigma 1$ 与 ReoV 的衣壳 $\sigma 1$ 有完全相同的血凝活性等性质。对 $\sigma 1$ 的结构与功能的认识也均是通过大肠杆菌表达系统重组表达后进行研究的^[12-14]。 $\sigma 1$ 是 S1 片段的主要功能蛋白 , 它在病毒 20 面体的 12 个顶角上形成三聚体结构 , 构成了与细胞受体结合的吸附蛋白。近期我们应用重组 $\sigma 1$ 蛋白免疫兔子 , 已成功制备了抗 $\sigma 1$ 多克隆抗体 , 表明该抗原蛋白还具有良好的免疫原性。这些工作也为今后研究新分离 ReoV 是否存在新的细胞受体、及发展 ReoV 疫苗等打下了基础。

参考文献

- [1] 端 青 , 朱 虹 , 杨 怡 , 等 . 科学通报 , 2003 , 48(13) : 1369 ~ 1372 .
[2] 杨 怡 , 李卫华 , 端 青 , 等 . 军事医学科学院院刊 , 2003 , 27 (04) : 封二 .

- [3] Tyler K L , Barton E S , Ibach M L , et al . J Infect Dis , 2004 , 189 (9) : 1664 ~ 1675 .
[4] Hermann L , Embree J , Hazelton P , et al . Pediatr Infect Dis J , 2004 , 23(4) : 373 ~ 375 .
[5] Johansson P J , Sveger T , Ahlfors K , et al . Scand J Infect Dis , 1996 , 28(2) : 117 ~ 120 .
[6] Tillotson J R , Lerner A M . N Engl J Med , 1967 , 276(19) : 1060 ~ 1063 .
[7] 吴 慎 , 李印堂 , 范文光 , 等 . 中华医学杂志 , 1982 , 62(3) : 146 ~ 151 .
[8] 宋立华 , 苏裕心 , 何 君 , 等 . 军事医学科学院院刊 , 2006 , 30 (1) : 15 ~ 21 .
[9] He C , Pang W , Yong X , et al . DNA Cell Biol , 2005 , 24(8) : 491 ~ 495 .
[10] Liang L , He C , Lei M , et al . DNA Cell Biol , 2005 , 24(8) : 485 ~ 490 .
[11] Masri S A , Nagata L , Mah D C , et al . Virology , 1986 , 149(1) : 83 ~ 90 .
[12] Nagata L , Masri S A , Pon R T , et al . Virology , 1987 , 160(1) : 162 ~ 168 .
[13] Duncan R , Home D , Strong J E , et al . Virology , 1991 , 182(2) : 810 ~ 819 .
[14] Chappell J D , Prota A E , Dermody T S , et al . Embo J , 2002 , 21(1-2) : 1 ~ 11 .