

口蹄疫病毒 P1 基因在大肠杆菌中的高效表达及其生物活性的初步分析 High Expression of the Foot-and-mouth Disease's Structural Protein P1 in *Escherichia coli* and Analysis of its Biology Activity

余晓岚, 肖少波, 方六荣, 胡梦雨, 严 琳, 董晓辉, 陈焕春*

YU Xiao-Lan, XIAO Shao-Bo, FANG Liu-Rong, HU Meng-Yu, YAN Lin, DONG Xiao-Hui and CHEN Huan-Chun*

华中农业大学动物医学院动物病毒室, 武汉 430070

Laboratory of Animal Virology, College of Animal Science and Animal medicine, Huazhong Agriculture University, Wuhan 430070, China

摘 要 将口蹄疫病毒(FMDV)结构蛋白基因 P1 的完整 cDNA 序列插入原核表达性载体 pGEX-KG 中, 使 P1 基因与 GST 融合, 获得融合表达质粒 pKG-P1, 转化 *E. coli* BL21(DE3), 经 IPTG 诱导, SDS-PAGE 结果表明 GST-P1 融合蛋白获得高效表达, Western-blot 检测证实表达的融合蛋白具有免疫学活性, 表达产物主要存在于细菌裂解液上清中。进一步采用 GST 纯化试剂盒纯化 P1 蛋白并作为诊断抗原, 建立了 P1-ELISA 诊断方法, 与 FMD 间接血凝(IHA)检测方法平行检测 864 份血清样品, 总的符合率达 87%。

关键词 口蹄疫病毒(FMDV), P1 基因, 高效表达, 生物活性, 分析

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)01-0163-04

Abstract Foot-and-mouth disease virus (FMDV) is the aetiological agent of a highly contagious viral disease. The complete gene encoding the structural protein of FMDV (P1) was subcloned into expression vector pGEX-KG, resulting in the fusion expression plasmid pKG-P1. After transformed into *E. coli* BL21(DE3) and induced by IPTG, the results of SDS-PAGE showed that the GST-P1 fusion protein was expressed in high level. The molecular weight of the fusion protein was 110kD and the expressed products were soluble. Western-blotting was performed to confirm that the expressed fusion protein could specifically react with antiserum against FMDV. The fusion proteins were further purified by GST purification kit and an indirect ELISA (P1-ELISA) based on the purified proteins was developed. Comparison between P1-ELISA and the standard indirect haemagglutinin assay showed the two methods had 87 per cent agreement by detecting 864 serum samples, indicating the purified P1 protein was specific as the antigen of indirect P1-ELISA.

Key words foot-and-mouth disease virus (FMDV), P1 gene, high expression, Biology acting

口蹄疫(Foot-and-mouth disease, FMD)是由口蹄疫病毒(Foot-and-mouth disease virus, FMDV)感染引起的一种急性、烈

性、高度接触性传染病^[1, 2], 主要感染牛、羊、猪等偶蹄动物。由于该病不仅对养殖业造成巨大的经济损失, 而且还对一个

Received: May 25, 2004; Accepted: July 7, 2004

This work was supported by Grant from the 863 National High Technology Research and Development Program(No. 2001AA213051).

* Corresponding author. Tel: 86-27-87282608; E-mail: hzauvet@public.wh.hb.cn

国家 863 高技术研究和发展计划项目基金资助(No. 2001AA213051)。

国家或地区造成不良的政治影响,因此长期以来该病一直受到世界各国的高度重视,联合国粮农组织和国际兽疫局也将其列为 A 类疾病之首^[3-6]。

FMDV 属于小 RNA 病毒科,口蹄疫病毒属^[7]。FMDV 由衣壳蛋白包裹着一条约 8.5kb 的单股正链 RNA 构成。病毒基因组含有一个大的开放性读码框,分为 L、P1、P2 和 P3 共四个区域。FMDV 的 P1 蛋白是其结构蛋白,由 P1 基因编码^[8-10]。P1 基因全长 2208 个碱基,编码 700 多个氨基酸,依次由 I A (VP4, 85 个氨基酸)、I B (VP2, 218 个氨基酸)、I C (VP3, 220 个氨基酸)和 I D (VP1, 213 个氨基酸)4 种蛋白组成,I B、I C、I D 位于衣壳表面^[11],4 种结构多肽都具有免疫原性。P1 编码区决定着病毒的抗原性和血清型,是研究分子流行病学、毒株演化关系和基因工程疫苗的基础,同时也是研究口蹄疫基因工程检测方法的基础^[12]。

由于针对口蹄疫的检测方法主要是建立在全病毒基础上的,如补体结合实验、中和实验以及酶联免疫吸附实验 (ELISA)^[13],存在一定的安全隐患,而当前又未见有关用口蹄疫结构基因的表达产物建立检测方法的报道。本研究中大肠杆菌中表达了完整的 P1 并在此基础上建立了 ELISA 方法,不仅具有很好特异性,而且安全、可靠,为口蹄疫血清学检测提供了一项安全而有效新的技术,并为今后 P1 亚单位疫苗的研制提供了基础,这对口蹄疫的检测与防治都有着重要的意义。

1 材料和方法

1.1 质粒与菌株

含 FMDV (O 型) P1 全基因的质粒 pMD-P1,由本室构建和保存。GST 融合表达载体 pGEX-KG、*E. coli* (DH₅ α) 和 BL21 (DE3),均由本室保存。

1.2 主要试剂

限制酶购自大连宝生物公司,胶回收试剂盒购自上海生物工程有限公司,GST 融合蛋白纯化试剂盒购自 Amersham 生物技术公司 (Not: 27-4574-01),IPTG 购于美国 Sigma 公司,其它试剂为进口或国产分析纯试剂。

1.3 表达载体 pGEX-P1 的构建

Bgl II 和 *Xba* I 酶切完整 P1 基因的质粒 pMD-P1,回收长约 2.2kb 的 P1 基因片段,将其与经 *Bam* H I 和 *Xba* I 酶切的原核表达载体 pGEX-KG 连接,连接产物转化 *E. coli* (DH₅ α),重组转化子经碱裂解法小量制备质粒,分别用 *Bam* H I 和 *Xba* I 酶切鉴定。阳性重组子命名为 pKG-P1。

1.4 FMDV P1 的表达

分别将 pKG-P1 及空载体 pGEX-KG 转化 BL21 (DE3),挑取单菌落于 LB 液体培养基中,37℃ 摇床培养 14h,然后以 1:100 稀释度转接种到 200mL LB 液体培养基,在 37℃ 继续培养 3h,加入 IPTG 至终浓度为 1.0mmol/L 诱导培养,置 37℃ 再培养 3h,先取 1mL 培养物离心弃上清,用 50 μ L PBS 悬浮,再加入等体积的上样缓冲液,煮沸 10min,按常规方法进行 10% SDS-PAGE 电泳和考马斯亮蓝 R250 染色分析。收集剩余诱

导后的菌液的菌体并用等体积 PBS 重悬,超声波裂解,离心后分别收集上清液和沉淀,沉淀再用等体积的 PBS 重悬。从收集的上清和重悬的沉淀中各取加入等体积的上样缓冲液,煮沸 10min,进行 SDS-PAGE 电泳检测,通过凝胶薄层扫描测定所表达的融合蛋白的量。

1.5 Western 印迹分析

将 SDS-PAGE 凝胶电泳的蛋白带通过半干法转移至硝酸纤维素膜上,用含 0.5% BSA 的 TBS-T 封闭 2h,以猪抗 FMDV 高免血清为一抗,HRP 标记的抗猪 IgG 为二抗,DAB 显色。

1.6 融合蛋白的纯化

将诱导表达的菌体经超声波破碎,离心取上清,用谷胱甘肽 4B 柱 (Ame Bio 27-4574-01) 纯化 P1 蛋白,具体操作步骤按纯化试剂盒说明书进行。

1.7 融合蛋白的 ELISA 方法建立

将纯化后的蛋白包被酶标板,方阵滴定确定最佳抗原包被浓度。取标准阳性血清、标准的阴性血清各 20 份及大量的血清样本进行 ELISA 检测,并与 FMD 间接血凝抑制检测方法进行比较。

2 结果

2.1 原核表达质粒 pKG-P1 的构建与鉴定

完整的 P1 基因从 pMD-P1 经 *Bgl* II + *Xba* I 酶切回收,将回收产物连接到经 *Bam* H I + *Xba* I 酶切的载体 pGEX-KG 上,这样经同尾酶相连,消掉了载体上的 *Bam* H I 位点,但 P1 基因中间仍有 *Bam* H I 位点,距上游插入位点约 1.0kb,距下游 *Xba* I 位点约 1.2kb。阳性克隆子用 *Bam* H I 酶切,出现约 7.0kb 的带,用 *Bam* H I + *Xba* I 双酶切出现约 1.2kb 的带和 5.8kb 的带,均符合预期的大小 (图 1),证实表达质粒构建正确。

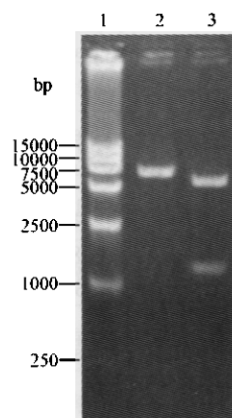


图 1 质粒 pKG-P1 的酶切鉴定

Fig. 1 Restriction enzyme analysis of plasmid pKG-P1

1: L15000; 2: pKG-P1/*Bam* H I; 3: pKG-P1/*Bam* H I + *Xba* I.

2.2 P1 在大肠杆菌中的表达

含有完整的 FMDV P1 基因的重组质粒 pKG-P1 和空白载体质粒 pGEX-KG 同步转化 BL21 (DE3),培养、诱导、收获和裂解后,经 10% SDS-PAGE 电泳后检测, pGEX-KG 在 28kD 的

地方出现特异性 GST 表达带,而 pKG-P1 表达菌在约 110kD 的地方出现一条特异性的带,与预期的大小相符(图 2)。经凝胶薄层扫描分析,P1 与 GST 融合蛋白占细菌总蛋白量的 43%。将诱导表达的菌体经超声波破碎后,分别收集上清和沉淀并进行 SDS-PAGE 检测,发现表达的融合蛋白主要在上清中;而沉淀中的量很少,表明 pKG-P1 在大肠杆菌中的表达产物主要以可溶性蛋白形式存在。

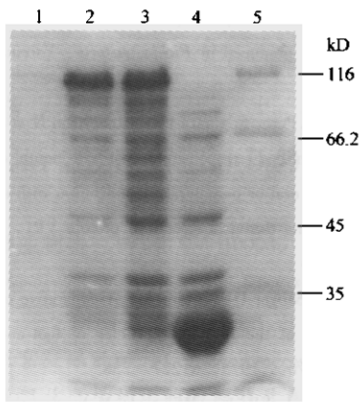


图 2 质粒 pKG-P1 在大肠杆菌中的表达与纯化

Fig.2 Expression and purification of pKG-P1 in *E. coli*

- 1: P1 elution fraction from 4B-sepharose;
- 2: Supernatant of the lysate of pKG-P1;
- 3: pKG-P1; 4: pGEX-KG; 5: protein marker.

2.3 表达产物免疫学活性检测及融合蛋白的纯化

对 IPTG 诱导的表达产物进行 Western 鉴定,结果 pKG-P1 在约 110kD 特异性的蛋白能与猪抗 FMDV 高免血清发生特异性反应,出现很浓的阳性带,而对照 pGEX-KG 则为阴性(图 3),表明表达的融合蛋白具有良好的反应原性。裂解液的上清经谷胱甘肽 4B 柱纯化的蛋白洗脱后,经 SDS-PAGE 检测,发现只在约 110kD 处出现一条特异性的带,但回收的量较低(图 2),200mL 的表达菌体经该过程纯化后回收得到的蛋白约 50μg。

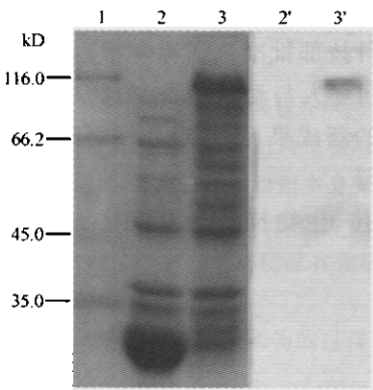


图 3 P1 表达产物的 Western-blot 鉴定

Fig.3 Western-blot analysis of *E. coli* expression product P1

- 1: protein marker;
- 2: pGEX-KG; 2': pGEX-KG western-blot analysis;
- 3: pKG-P1; 3': pKG-P1 western-blot analysis.

2.4 ELISA 检测

将纯化的表达产物包被酶标板,方阵滴定确定最佳定抗原包被浓度为 4.15μg/mL。检测标准的阴、阳性血清各 20 份,OD ≥ 0.4 为阳性,与兰州兽医研究所标准的间接血凝检测试剂盒相比,其阳性与阴性的符合率都达到了 100%。进一步对 864 份血清样品进行检测,检测结果见表 1。

从表中结果可以看出,与标准的 IHA 检测方法相比,其阳性符合率达 89%,其阴性符合率达 86%,总的符合率达 87%,这说明纯化后的 P1 蛋白作为诊断抗原,具有较高的特异性和反应活性。但 P1-ELISA 的检测方法还有待进一步完善,主要是 P1-ELISA 在检测阳性样品时的敏感性需要进一步提高。

表 1 P1-ELISA 和 IHA 检测 864 血清样品结果

	P1-ELISA	IHA	Coherence
Positive(Number)	442(405 *)	456	89 % (405/456)
Negative(Number)	422(350 *)	408	86 % (350/408)
Total(Number)	864(755 *)	864	87 % (755/864)

The number with * shows the same result between the P1-ELISA and IHA.

3 讨论

Miguel A 等^[13]报道了猪水疱病的 P1 基因在原核表达载体中的高效表达,发现其具有很好抗原性和免疫活性。本研究我们在原核表达系统中尝试表达 FMDV 的 P1 蛋白,结果表明 P1 不仅在 *E. coli* 中得到了高效表达,而且经过 Western-blot 检测,发现 P1 表达产物具有很好的免疫学活性。进一步将表达产物经超声波破碎处理,SDS-PAGE 检测发现融合蛋白的表达产物大部分在细菌裂解液的上清里,这为 P1 蛋白的纯化提供了方便,而且,得到的纯化的 P1 蛋白为 FMD 的亚单位疫苗研制的可行性提供了基础。

口蹄疫的检测方法除了直接检测病毒和分子生物学诊断外,还有血清学检测方法,如:补体结合实验,中和实验,以及酶联免疫吸附实验(ELISA)^[14]等。目前针对口蹄疫的检测方法主要是间接血凝和全病毒的 ELISA 方法,而这两种方法都是建立在全病毒的基础上的,存在一定的安全隐患。本研究中经基因工程方法得到的抗原建立的 P1-ELISA 方法,不仅不存在安全隐患的问题,而且具有很好特异性。

因此,P1 蛋白的纯化,为今后 P1 蛋白成为抗原制备疫苗奠定了坚实的基础;纯化的 P1 蛋白作为诊断抗原建立的 ELISA 方法,为 FMDV 的检测提供了一个很好的方法;对 FMD 的防治和控制有着重要的意义。

当然,尽管 P1 蛋白在 *E. coli* 中的表达量很高,但纯化蛋白的过程繁琐,回收率低,回收的经济成本高;并且建立的 P1-ELISA 方法与标准的 IHA 方法相比,其阳性率偏低,因此有必要进一步完善该方法。而且,在保证表达蛋白的抗原性的前提下,探讨一种更简单、廉价的表达系统是必要的。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Wong HT, Cheng SCS, Sin FWY *et al.* A DNA vaccine against foot-and-mouth disease elicits an immune response in wine which is enhanced by co-administration with interleukin-2. *Vaccine*, 2002, **20**: 2641 - 2647
- [2] Berinstein A, Tami, Taboga O, Smitsaert E *et al.* Protective immunity against foot-and-mouth disease virus induced by a recombinant vaccinia virus. *Vaccine*, 2000, **18**: 2231 - 2238
- [3] Sanz-Parra A, Jimenez-Clavero MA, Garcia-Briones MM *et al.* Recombinant viruses expression the foot-and-mouth disease virus capsid precursor polypeptide (P1) induce cellular but not humoral antiviral immunity and partial protection in pigs. *Virology*, 1999, **259**: 129 - 134
- [4] Wu LG, Jiang LB, Zhou ZA *et al.* Expression of foot-and-mouth disease virus epitopes in tobacco by a tobacco mosaic virus-based vector. *Vaccine*, 2003, **21**: 4390 - 4398
- [5] Wu QH, Moraes MP, Grubman MJ. Recombinant adenovirus co-expressing capsid protein of two serotypes of foot-and-mouth disease virus (FMDV): *in vitro* characterization and induction of neutralizing antibodies against FMDV in swine. *Virus Research*, 2003, **93**: 211 - 219
- [6] Patil PK, Bayry J, Nair SP *et al.* Early antibody responses of cattle for foot-and-mouth disease quadrivalent double oil emulsion vaccine. *Veterinary Microbiology*, 2002, **87**: 103 - 109
- [7] Acharya R, Fry E, Stuart D *et al.* Three-dimensional structure of foot and mouth disease virus at 2.9 Å resolution. *Nature*, 1989, **337**: 709 - 716
- [8] Zhang HY, Sun SH, Guo YJ *et al.* Immune response in mice inoculated with plasmid DNAs containing multiple-epitopes of foot-and-mouth disease virus. *Vaccine*, 2003, **21**: 4704 - 4707
- [9] Shieh JJ, Liang CM, Chen CY *et al.* Enhancement of the immunity to foot-and-mouth disease virus by DNA priming and boosting immunization. *Vaccine*, 2001, **19**: 4002 - 4010
- [10] Balamurugan V, Renji R, Aha SN *et al.* Protective immune response of the capsid precursor polypeptide (P1) of foot and mouth disease virus type 'O' produced in *Pichia pastoris*. *Vaccine*, 2003, **21**: 141 - 149
- [11] Wigdorovitz A, Perez Filgueira DM, Robertson N *et al.* Induction of a protective antibody response to foot-and-mouth disease virus in mice following oral or parenteral immunization with alfalfa transgenic plants expressing the viral structural protein VP1. *Virology*, 1999, **255**: 347 - 353
- [12] Rowlands DJ, Sabgar DV, Brown F. A comparative chemical and serological study of the full and particles of foot-and-mouth disease virus. *J Gen Virol*, 1975, **26**: 227 - 238
- [13] Miguel AJ, Estela ER, Joso MS *et al.* Molecular cloning, expression and immunological analysis of the capsid precursor polypeptide (P1) from swine vesicular disease virus. *Virus Research*, 1998, **57**: 163 - 170
- [14] Sorensen KJ, Madsen KG, Madsen ES *et al.* Foot-and-mouth disease: detection of antibodies in cattle sera by blocking ELISA. *Veterinary Microbiology*, 1992, **32**(3-4): 256 - 263