

# 马西尼罗热病毒 E 蛋白部分基因在大肠杆菌中的表达\*

姜 焱<sup>1</sup> 侯玉峰<sup>2</sup> 张常印<sup>1</sup> 王凯民<sup>1</sup> 张敬友<sup>1</sup>

(江苏出入境检验检疫局 南京 210001)<sup>1</sup> (南京出入境检验检疫局 南京 210001)<sup>2</sup>

**摘要:** 参考 GenBank 发表的西尼罗病毒 (west nile virus, WNV) 的 E 蛋白基因序列, 自行设计合成一对引物, 利用 RT-PCR 扩增出了 WNV E 基因 318bp 片段, 将其克隆入 pMD18-T-Vector 载体中, 阳性克隆命名 pMD-E, 并进行序列分析, 进一步亚克隆入表达载体 pET-32a (+)。重组质粒 pET32a-E 转化 BL21 (DE3) 感受态细胞中表达, 表达产物经 SDS-PAGE 可检测到分子量约为 32kD 的目的蛋白带, 经薄层扫描分析, 目的蛋白占菌体总蛋白的 33.1%。表达产物纯化后, Western-blotting 分析证明表达产物能被 WNV 的阳性血清所识别, 为下一步建立以表达产物为包被抗原建立检测马的 WNV 的 ELISA 方法打下了基础。

**关键词:** 马西尼罗病毒, E 蛋白基因, 表达

**中图分类号:** Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2007) 01-0101-04

## *E. coli* Expression of Equine West Nile Virus Partly E Protein

JIANG Yan<sup>1</sup> HOU Yu-Feng<sup>2</sup> ZHANG Chang-Yin<sup>1</sup> WANG Kai-Min<sup>1</sup> ZHANG Jing-You<sup>1</sup>

(Jiangsu Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Zhonghua Road 99, Nanjing 210001)<sup>1</sup>

(Nanjing Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Zhonghua Road 99, Nanjing 210001)<sup>2</sup>

**Abstract:** According to the GenBank published sequence of equine west nile virus (WNV) E protein gene, a pair of primer was designed in order to amplify equine WNV partly E gene by RT-PCR. The fragment was 318bp in length and was cloned into pMD18-T-Vector. The positive clone was named pMD-E and was sequenced. Then it was sub-cloned into pET-32a (+). The recombinant pET32a-E plasmid, which includes the gene fragment of the equine WNV E protein, was transformed into *E. coli* BL21, and expressed about 33.1%. The expressed product was about 32kD molecular weight by SDS-PAGE. The purified product could be recognized by positive serum of WNV by Western-blotting. It was laid a foundation for developing an ELISA to detect equine WNV used the purified production as coated antigen.

**Key words:** Equine west nile virus, E protein gene, Expression

西尼罗病毒 (WNV) 是一种单股、正链、不分节段 RNA 病毒, 属虫媒病毒黄病毒科、黄病毒属, 能引起人畜共患疾病。该病毒是 1937 年 12 月从非洲乌干达西尼罗地区 1 例发热女患者的血液标本中首次分离的, 并因此而得名<sup>[1]</sup>。WNV 最主要的传染源和储存宿主是带病毒的鸟类, 病毒在鸟体内高浓度存在多天, 产生高水平的病毒血症, 继而感染大批叮咬过带毒鸟类的蚊子, 通过蚊子传播给人和其他动物, 继而造成 WNV 的感染。

WNV 有 3 种结构蛋白, 核衣壳蛋白 (C)、包膜蛋白 (E) 和膜蛋白 (prM/M)<sup>[2]</sup>。E 蛋白

(55kD) 以同源二聚体的形式并通过一定的结构锚定在病毒包膜中, 是西尼罗病毒的主要抗原性结构蛋白, 具有血凝素活性, 能够诱导机体产生中和抗体; 参与病毒与宿主细胞亲和、吸附以及细胞融合过程, 是病毒亲嗜性以及毒力的主要决定蛋白<sup>[3]</sup>。

本研究通过分析马的 WNV 的 E 蛋白基因, 合成了一对引物, 利用 RT-PCR 方法扩增了 WNV E 蛋白部分基因, 将扩增产物克隆到 T 载体上, 并进行序列分析鉴定。然后将其用 *EcoRI* 和 *HindIII* 双酶切, 连接到表达载体 pET32a (+) 上, 构建

\* 奥运科技 (2008) 行动计划专项资助 (No. 2004BA904B06)

其他作者: 唐泰山 陈国强 陈博言 张鹤晓

通讯作者 Tel: 025-52345235, E-mail: jiangyan@jsci.gov.cn

收稿日期: 2006-04-21, 修回日期: 2006-05-31

了 WNV E 部分基因的重组表达载体, 经过 IPTG 诱导获得表达产物。通过自制的阳性血清进行 Western-blot 进行鉴定, 结果表明该表达产物是针对 WNV 的蛋白, 并对表达产物进行了纯化, 为进一步建立 ELISA 方法检测马的 WMV 的研究打下基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 病毒:** 马的 WNV 的病毒购自美国 Fort Dodge Animal Health 公司的灭活疫苗。

**1.1.2 质粒和菌株:** pMD18-T Vector 试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司, pET32a(+), DH5 $\alpha$ 、BL21(DE3)由本实验室保存。

**1.1.3 工具酶及试剂:** EcoRI、HindIII 限制性内切酶, RT-PCR 试剂盒, Taq DNA 聚合酶和 T4 DNA 连接酶购自宝生物工程(大连)有限公司; His·Bind® Purification Kit 为 Novagen 公司产品。其他所需试剂均为分析纯。

**1.1.4 引物设计:** 参照 GenBank 上公开发表的 E 基因序列, 自行设计了如下引物, 扩增长度为 400bp, 引物由上海皓嘉公司合成。

5' -引物 5' -ACTGAATTCACGTGACCCG-GCTCCCCG-3';

3' -引物 5' -CGGGATCCGCGGTAGAT-GCGATTC-3'。

### 1.2 方法

**1.2.1 WNV 的 RNA 提取:** 参照 TRIZOL 说明书进行总 RNA 的提取。器皿和试剂用 DEPC 处理去除 RNase。

**1.2.2 RT-PCR:** 50 $\mu$ L 的 RT-PCR 反应体系如下: 提取后的病毒 RNA 10 $\mu$ L, dNTP 5 $\mu$ L, MgCl<sub>2</sub> (25mmol/L) 10 $\mu$ L, AMV 酶、RNA 抑制酶、Taq 酶各 1 $\mu$ L, 引物 2 $\mu$ L, DEPC H<sub>2</sub>O 15 $\mu$ L。RT-PCR 反应过程: 50℃, 30min; 94℃ 2min; 94℃ 1min, 60℃ 1min, 72℃ 1min, 30 个循环; 72℃ 10min; 4℃ 保存。

**1.2.3 目的片段的克隆与鉴定:** PCR 产物纯化后与 pMD18-T Vector 连接、转化、提取质粒, 用 EcoRI 和 HindIII 酶切鉴定, 阳性克隆命名为 pMD-E。

**1.2.4 序列测定:** 对经酶切鉴定为阳性的重组质粒进行序列测定, 测序实验由宝生物工程(大连)有限公司完成。

**1.2.5 重组表达质粒的构建:** 将阳性质粒 pMD-E 用 EcoRI 和 HindIII 酶切消化, 回收目的片段。同时用 EcoRI 和 HindIII 消化 pET32a(+), 连接、转化、酶切鉴定, 阳性克隆命名 pET32a-E。

**1.2.6 重组表达质粒的诱导表达:** 将重组阳性菌在 37℃ 培养过夜, 按 2% 的比例转接到新的 20mL 的 LB 培养液(含 50 $\mu$ g/mL 氨苄青霉素)中, 37℃ 250r/min 培养至对数生长期, 取 1mL 作为未诱导的对照, 其余的加入 IPTG 至终浓度达 0.8mmol/L, 37℃ 诱导表达, 4h 后收集菌液进行检测。

**1.2.7 表达产物 SDS-PAGE 分析:** 按参考文献[4]进行蛋白电泳, 染色、脱色, 与标准蛋白分子量对照。

**1.2.8 表达产物纯化:** 按照 His·Bind® Purification Kit 说明书进行。

**1.2.9 Western-blotting 鉴定表达产物:** SDS-PAGE 纯化后的蛋白, 并转印到硝酸纤维素膜上, 与 WNV 灭活毒免疫的兔血清温浴后, 加入 HRP 酶标的鼠抗兔的抗体, 再加入底物显色。

**1.2.10 WNV 高免血清的制备:** 按参考文献[5]用 WNV 的灭活病毒与弗氏完全佐剂等量混合, 制成油包水疫苗免疫 2kg 以上的公兔。初免 10d 后, 用弗氏不完全佐剂与 WNV 的灭活病毒制成油苗再免疫 2 次, 最后一次免疫 7d 后采血, 分离血清, -20℃ 保存。

## 2 结果

### 2.1 RT-PCR 扩增结果

用设计的引物对所购买的 WNV 灭活疫苗进行 RT-PCR 扩增, 扩增产物经 1.4% 琼脂糖凝胶电泳, 结果如图 1, 扩增出一条大小为 318bp 的片段, 大小与预期相符。

### 2.2 重组质粒酶切鉴定

将 RT-PCR 产物回收后与 pMD18-T Vector 载体连接、转化、提取质粒, 用 EcoRI 和 HindIII 消化, 经琼脂糖凝胶电泳可看到 318bp 和 2, 690bp 的一大一小两条带, 与所设计的大小相符(图 2)

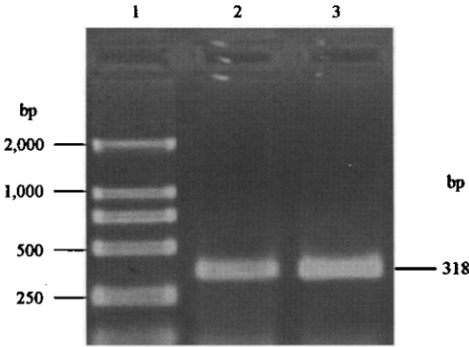


图 1 RT-PCR 扩增结果

1 Marker DL-2000, 2, 3 RT-PCR product of WNV

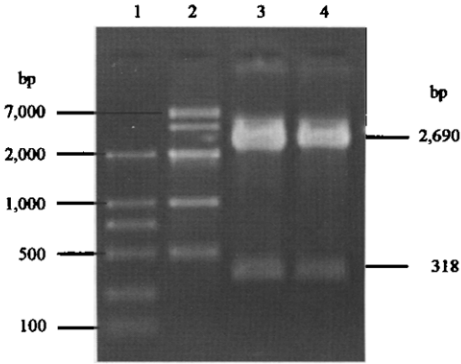


图 2 重组质粒的酶切鉴定

1, 2 Marker DL-2,000 and marker IV, 3, 4 RT-PCR product cloned into pMD18-T-Vector digested with BamHI and HindIII

2.3 序列测定

把 pMD-E 质粒进行测序, 测出序列长为 318bp, 与 GenBank 已发表的序列进行比较发现, 核苷酸的同源性达 100%, 这表明所扩增的片段为 WNV 的 E 蛋白基因。

2.4 重组表达载体的酶切鉴定

将 pET32a (+)、pMDE 用 *EcoRI* 和 *HindIII* 消化的酶切产物回收、连接、转化、提取质粒, 用 *EcoRI* 和 *HindIII* 消化, 经琼脂糖凝胶电泳可看到 318bp 和 5,900bp 的一大一小两条带, 与所设计的大小相符 (图 3)。

WNV 的抗体反应, 证明 E 蛋白基因的抗原决定簇得到表达 (图 6)。

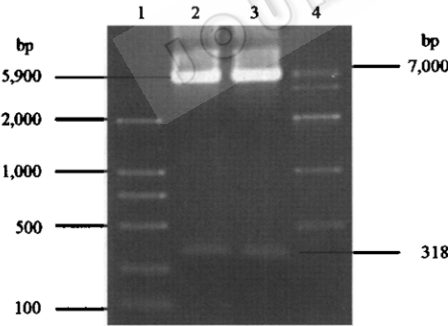


图 3 重组表达载体的酶切鉴定

1, 4 Marker DL-2000 and marker IV, 2, 3 Recombinant expression vectors were digested by *EcoRI* and *HindIII*

2.5 目的蛋白基因的表达

经 IPTG 诱导表达后, SDS-PAGE 分析蛋白, 与对照相比, pET32a-E 菌多一条蛋白带, 该蛋白分子量约 32kD, 与预期的分子量相同 (图 4)。按照 His · Bind® Purification Kit 说明书对表达产物进行了纯化, 纯化后的表达产物只有一条特异的条带 (图 5)。Western-blotting 显示该蛋白能与抗

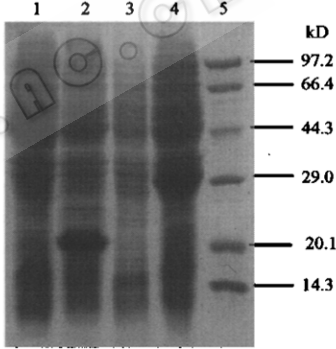


图 4 表达蛋白的 SDS-PAGE 分析

1 BL21 (DE3), 2 pET32a (+), 3 pET32a-E (uninduction), 4 pET32a-E (Expressed products after 4 hours induced by 1mmol/L IPTG), 5 Protein marker

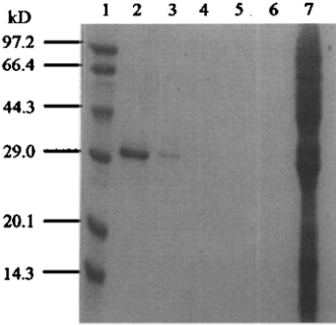


图 5 表达蛋白的纯化

1 Protein marker, 2 First washing, 3 Second wash, 4 Third wash, 5 Fourth wash 6 fifth wash, 7 pET32a-E (Expressed products after 4 hours induced by 1mmol/L IPTG)

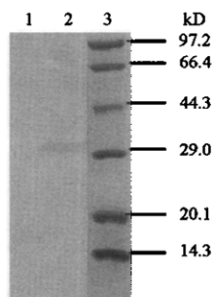


图6 表达蛋白的 Western-blot 鉴定

1 pET32a (+), 2 pET32a-E (Expressed products after 4 hours induced by 1mmol/L IPTG), 3 Protein marker

### 3 讨论

WNV 最近在多个国家和地区的频繁爆发说明, 它正成为一个趋于全球化分布的病原。我国目前还未见到 WNV 感染的报道, 但综合各方面的因素来看, 我国存在传入病原的风险, 具有 WNV 流行的生态学条件, 应当引起警惕。我国自改革开放以来, 对外交流不断扩大, 特别是加入 WTO 后, 多边商业贸易、旅游等人、物流不断扩大, 这会大大增加传入 WNV 这种外来病原的机会<sup>[6]</sup>。

由于 WNV 的传播途径的原因, 在人类暴发 WNV 之前, 往往会发现死亡大量的鸟类或其他一些动物。在美国, 自 1999 年人类暴发 WNV 以来, 每年都有大批的马、乌鸦、一些易感的鸟类感染 WNV 的报道, 其中马的死亡率达 35%。1999 年有 25 例马感染; 2000 年有 63 例马感染; 2001 年有 733 例马感染; 2002 年感染的马呈急剧上升趋势, 1 年内有 14,901 例马感染了 WNV, 由于美国加强了 WNV 的监控以及采取了许多灭蚊措施, 从 2003

年马感染 WNV 呈下降趋势, 从 2003 ~ 2005 年分别为 4494 例、2726 例、1162 例。

美国农业部于 2005 年 7 月 18 日批准了由美国 CDC (Centers for Disease Control and Prevention) 和美国福道 (Fort Dodge Animal Health) 公司联合开发的预防马西尼罗热的 DNA 疫苗—West Nile Innovator DNA 上市, 这是世界首个获准上市的 DNA 疫苗, 可以说是 DNA 疫苗科技的一个里程碑。该疫苗于 2006 年年初由福道公司正式出售, 有执照的兽医都可以购买到。

我国目前没有西尼罗病毒, 无法建立蚀斑减少中和试验, 也没有建立起检测西尼罗病毒抗体的其它一些血清学方法。而检测马的西尼罗热的方法在国内未见报道, 特别是近年来进口的马呈上升趋势以及该病的流行范围越来越大, 本研究对进一步开展以表达产物为包被抗原建立 ELISA 方法检测马 WNV 以及我国将来对该病的监控具有重要意义。

### 参考文献

- [1] Smithburn K C, Hughes T P, Burke A W, et al. Am J Trop Med Hyg, 1940, 20: 471 ~ 492.
- [2] West Nile Virus, complete, genome. Available at <http://www.npic.orst.edu/wnv/mosquito.htm>
- [3] 刘卫滨, 梁国栋. 中国病毒学, 2004, 19 (1): 92 ~ 96.
- [4] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 分子克隆实验指南. 金冬雁, 黎孟枫等译 (第三版). 北京: 科学出版社, 1999.
- [5] 王明俊. 兽医生物制品学. 北京: 中国农业出版社, 1997. 7333 ~ 7335.
- [6] 郭志儒, 金宁一. 中国兽医学报, 2004, 23 (2): 105 ~ 106.