

赵冬敏, 黄欣梅, 刘宇卓, 等. 鹅坦布苏病毒囊膜蛋白结构域 II 在大肠杆菌中的表达及免疫学鉴定[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(3): 619-623.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2015.03.025

鹅坦布苏病毒囊膜蛋白结构域 II 在大肠杆菌中的表达及免疫学鉴定

赵冬敏, 黄欣梅, 刘宇卓, 韩凯凯, 杨婧, 谢星星, 刘晓燕, 李银

(江苏省农业科学院兽医研究所, 农业部兽用生物制品工程技术重点实验室, 国家兽用生物制品工程技术研究中心, 江苏南京 210014)

摘要: 为了实现鹅坦布苏病毒囊膜蛋白(E蛋白)结构域 II 在大肠杆菌中的表达并对其进行免疫学鉴定, 根据鹅坦布苏病毒 JS804 株囊膜蛋白基因序列, 利用人工合成法获得鹅坦布苏病毒囊膜蛋白结构域 II 编码基因并引入限制性酶切位点, 片段大小为 507 bp。将合成的基因片段克隆入 pGEX-4t-1 原核表达载体中, 构建重组表达载体 pGEX-EII 并转化至 BL21(DE3) 中。通过优化表达条件获得重组蛋白质并进行免疫学鉴定。结果显示, 重组蛋白质分子量约为 4.4×10^4 , Western-blot 和间接免疫荧光检测结果表明重组蛋白质具有良好的免疫原性。

关键词: 鹅坦布苏病毒; 囊膜蛋白; 结构域 II

中图分类号: S858.322.5+2 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2015)03-0619-05

Expression and immunology of domain II of goose tembusu virus envelope protein in *Escherichia coli*

ZHAO Dong-min, HUANG Xin-mei, LIU Yu-zhuo, HAN Kai-kai, YANG Jing, XIE Xing-xing, LIU Xiao-yan, LI Yin

(*Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Veterinary Biologicals Engineering and Technology, Ministry of Agriculture/National Center for Engineering Research of Veterinary Bio-products, Nanjing 210014, China*)

Abstract: To express and immunoidentify goose tembusu virus envelope domain II in *Escherichia coli*, the encoding gene of goose tembusu virus JS804 strain envelope protein domain II was artificially synthesized with the length of 507 bp. The synthesized gene was then inserted into the prokaryotic vector pGEX-4t-1 for the construction of recombinant expression plasmid pGEX-EII and then transformed into *E. coli* BL21 (DE3). The recombinant protein with the molecular mass of 4.4×10^4 was successfully expressed in *E. coli* by optimizing the conditions of expression. Western-blot and IFA revealed the good immunogenicity exhibited by the recombinant protein.

Key words: goose tembusu virus; envelope protein; domain II

收稿日期: 2014-11-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(31172345); 江苏省自然科学基金项目(BK2012376); 江苏省农业科学院基本科研业务专项项目[ZK(15)4005]

作者简介: 赵冬敏(1982-), 女, 山东兖州人, 博士, 副研究员, 主要从事家禽重大疫病流行病学和致病分子机制研究。(Tel) 025-84390047; (E-mail) zhaodongmin126@126.com

通讯作者: 李银, (E-mail) muziyin08@163.com

鹅坦布苏病毒属于黄病毒科黄病毒属成员。水禽感染该病毒后, 其临床病症为卵泡出血、萎缩、变性及瘢痕化, 部分出现脑膜出血, 食欲急剧减退、产蛋量骤降, 群内发病率高达 100%, 死亡率为 5% ~ 28%^[1-3]。鸭鹅坦布苏病毒自 2010 年暴发以来, 已连续在中国多省大面积流行, 并且感染的宿主谱还

在不断扩大,蛋鸭、种鸭、雏鸭、蛋鹅、种鹅及蛋鸡等均出现坦布苏病毒感染的病例^[4-6]。该病毒病已成为危害中国鸭鹅养殖业的重要疫病之一。

鹅坦布苏病毒基因组为单股正链 RNA,基因组全长约为 11 kb,包含 1 个开放阅读框架(ORF),编码 1 个多聚蛋白质。囊膜蛋白(E 蛋白)是黄病毒主要的结构蛋白,由约 500 个氨基酸残基组成,分子量约为 $5.5 \times 10^4 \sim 6.0 \times 10^4$,2 个囊膜蛋白单体分子以反向平行方式构成同源二聚体,90 个 E 蛋白同源二聚体排列于成熟病毒颗粒的表面^[7-8]。囊膜蛋白在病毒吸附,与宿主细胞膜融合以及病毒组装过程中具有重要作用。同时,囊膜蛋白也是黄病毒主要的病毒抗原,含有多种抗原表位,可通过诱发中和抗体产生保护性免疫应答^[9]。囊膜蛋白属于 II 型跨膜蛋白,X 射线晶体学阐明,囊膜蛋白的晶体结构中, β -折叠占绝大多数,在空间上形成 3 个不同的结构域:结构域 I、II 和 III(DI、DII 和 DIII)。囊膜蛋白结构域 II 由 2 个不连续片段组成,折叠成指样结构(Finger-like structure)。该区域 cd 环富含甘氨酸且完全疏水,在几乎所有的黄病毒属病毒中均是保守的,它对病毒的融合活性非常重要,定点突变试验已证实它可在囊膜蛋白由二聚体向三聚体转变的过程中插入胞膜,参与病毒与宿主细胞膜融合,被认为是病毒的融合多肽(Fusion peptide)。I 和 II 区界面存在 1 个分子铰链区,该区可通过酸性 pH 介导的构象变化使融合多肽移向宿主细胞膜,并形成融合多肽的突出部分^[10-11]。

由于黄病毒属坦布苏病毒引起的疫病是新发疫病,目前尚未见有关鹅坦布苏病毒囊膜蛋白结构域 II 的研究报道。本研究通过人工合成法合成鹅坦布苏病毒囊膜蛋白结构域 II 的编码基因并克隆入表达载体 pGEX-4t-1 中,利用大肠杆菌表达系统表达重组囊膜蛋白质结构域 II 并对其进行免疫学鉴定,为进一步研究鹅坦布苏病毒囊膜蛋白结构和功能及研制亚单位疫苗打下基础。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料

鹅坦布苏病毒 JS804 株囊膜蛋白结构域 II 基因核苷酸片段由南京金斯瑞生物有限公司合成。pGEX-4t-1 原核表达载体、宿主菌 BL21(DE3)、E 蛋白阳性血清,均由江苏省农业科学院兽医研究所家

禽重大疫病防控项目组保存。

1.2 主要试剂

琼脂糖凝胶回收试剂盒、小量提取质粒试剂盒等购自 Axygen 公司;T4 DNA 连接酶、限制性内切酶、DNA marker 等购自大连宝生物有限公司;GST 抗体、碱性磷酸酯酶标记山羊抗小鼠 IgG、BCIP/NBT 碱性磷酸酯酶显色试剂盒购自碧云天生物技术研究所;其他试剂均为进口分装或国产分析纯。

1.3 鹅坦布苏病毒囊膜蛋白结构域 II 基因片段的合成

根据 GenBank 中登录的鹅坦布苏病毒 JS804 株(登录号:JF895923)E 基因序列,由南京金斯瑞生物有限公司人工合成结构域 II 基因片段并分别在 5' 和 3' 端加入 *EcoR* I(GAATTC)和 *Sal* I(GTCGAC)酶切位点,片段全长为 507 bp。

1.4 重组表达质粒的构建与鉴定

将合成的结构域 II 基因片段和 pGEX-4t-1 质粒分别用 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切。用 T4 DNA 连接酶将酶切后的结构域 II 基因与 pGEX-4t-1 载体连接,构建重组表达载体 pGEX-EII,转化 BL21(DE3)感受态细胞。经酶切鉴定后,挑选阳性克隆质粒送南京金斯瑞生物有限公司进行基因序列测定,并进行序列分析。

1.5 结构域 II 蛋白的诱导表达与 SDS-PAGE 分析

取含重组质粒 pGEX-EII 的阳性 BL21(DE3)菌液,接种于 5 ml 含有氨苄青霉素(100 μ g/ml)的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 培养过夜。次日取 100 μ l 接种于 10 ml 含有氨苄青霉素(100 μ g/ml)的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 振荡培养至 OD_{600} 值达 0.3 ~ 0.4。以终浓度 1 mmol/L IPTG 诱导表达,分别于诱导后 0 h、3 h、4 h、5 h 取 500 μ l 菌液,12 000 r/min 离心 5 min,弃上清液。沉淀用生理盐水重悬后与 4 \times 蛋白质电泳上样缓冲液混匀,沸水浴 5 min,以 pGEX-4t-1 空载体进行同样的操作为对照,进行 SDS-PAGE 蛋白质电泳观察结果。

1.6 重组结构域 II 蛋白在菌体中的分布分析

取 5 ml 1 mmol/L IPTG 诱导 5 h 的菌液,12 000 r/min 离心 5 min,弃上清液。沉淀用 3 ml 菌体裂解液重悬,超声波破碎 15 min,12 000 r/min 离心 5 min。分别取上清液和沉淀与 4 \times 蛋白质电泳上样缓冲液混匀,沸水浴 5 min,进行 SDS-PAGE 蛋白质电泳观察结果,以确定表达蛋白质存在的位置。

1.7 重组蛋白质的 Western-blot 鉴定

重组蛋白质经 12% SDS-PAGE 分离后,采用湿法将蛋白质转印至硝酸纤维膜(NC)上,采用 70 V 电压,作用 1 h。5% BSA、37 °C 封闭 2 h, TBST (0.05% Tween-20)洗涤后分别加入 GST 标签单抗和 E 蛋白阳性血清并于 4 °C 过夜。TBST (0.05% Tween-20)洗涤后加入碱性磷酸酶(AP)标记的羊抗鼠 IgG 于 37 °C 孵育 1 h。TBST (0.05% Tween-20)洗涤后按照 BCIP/NBT 碱性磷酸酶显色试剂盒说明书显色。

1.8 鼠抗重组蛋白质血清的制备及其效价的测定

将纯化的重组蛋白质与等量弗氏完全佐剂混合并充分乳化后皮下多点免疫 BALB/c 小鼠,每只免疫重组蛋白质的剂量为 70 μg,免疫后 7 d 采集血清。以纯化的重组蛋白质包被 ELISA 板, PBST 洗涤 3 次后每孔加入 100 μl 梯度稀释的小鼠血清,37 °C 孵育 1 h。PBST 洗涤后每孔加 1:10 000 稀释的 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 二抗 100 μl,37 °C 孵育 1 h。PBST 洗涤 3 次,加入 TMB 底物避光显色 10 min。以 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应,450 nm 波长下读取 OD₄₅₀ 值。

1.9 间接免疫荧光 (IFA) 鉴定

利用鹅坦布苏病毒 JS804 株感染 BHK-21 细胞,感染后 4 d 弃去培养上清,用无水乙醇固定,加入 1:50 稀释的鼠抗重组蛋白质血清,37 °C 孵育 1 h。PBST 洗 3 次,加入 1:200 稀释的 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 二抗,37 °C 孵育 1 h。PBST 洗 3 次,置于荧光显微镜下观察并记录结果,以正常 BHK-21 细胞作对照。

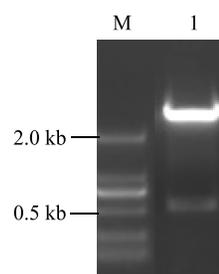
2 结果

2.1 鹅坦布苏病毒囊膜蛋白结构域 II 基因的获得

利用 *Eco* R I 和 *Sal* I 双酶切含有结构域 II 人工合成基因的质粒 pUC57-simple-*EII*, 获得大小约为 507 bp 的片段,与预期大小相符(图 1)。

2.2 鹅坦布苏病毒囊膜蛋白结构域 II 重组表达质粒的构建

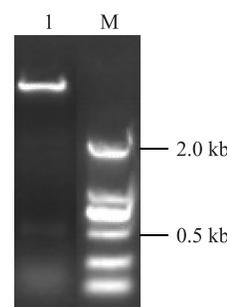
提取重组质粒 pGEX-*EII*, 限制性内切酶 *Eco* R I 和 *Sal* I 酶切,琼脂糖凝胶电泳检测,得到 2 个片段,大小与预期相符(图 2)。测序结果表明结构域 II 片段以正确方式插入 pGEX-4t-1 载体中且序列正确。



M:DL2000 marker;1:结构域 II 基因片段。

图 1 人工合成结构域 II 基因片段

Fig.1 Synthetic domain II gene fragment



1:重组质粒 pGEX-*EII* *Eco* R I 和 *Sal* I 酶切;M:DL2000 marker。

图 2 重组质粒 pGEX-*EII* 的酶切鉴定

Fig.2 Identification of recombinant plasmid pGEX-*EII* by enzyme digestion

2.3 鹅坦布苏病毒囊膜蛋白结构域 II 的诱导表达与 SDS-PAGE 分析

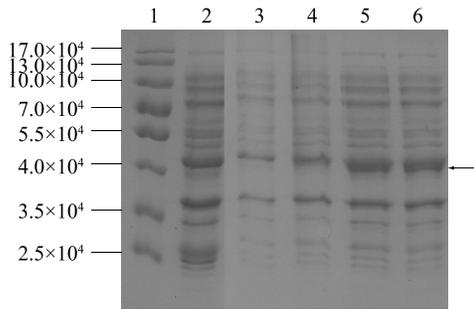
将鉴定为阳性的细菌进行 IPTG 诱导表达。经 SDS-PAGE 检测后发现,以 1 mmol/L IPTG 诱导时,pGEX-*EII* 在诱导后 4 h 出现目的条带,大小约为 4.4×10^4 的融合蛋白质,与预期蛋白质大小一致,在诱导 4 h 时表达量最高(图 3)。

2.4 重组鹅坦布苏病毒囊膜蛋白结构域 II 在菌体中的分布

将诱导表达 5 h 的细菌进行超声波裂解,经 SDS-PAGE 电泳分析,发现 pGEX-*EII* 融合蛋白质以包涵体形式存在(图 4)。

2.5 重组鹅坦布苏病毒囊膜蛋白结构域 II 的 Western-blot 鉴定

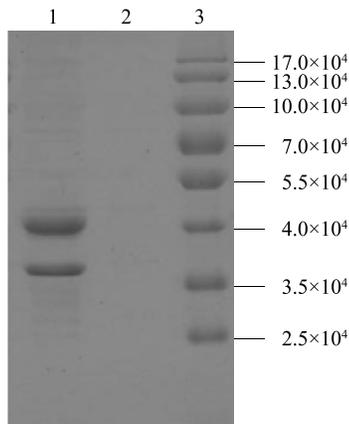
分别利用 GST 单抗和囊膜蛋白阳性血清 Western blot 检测重组结构域 II 蛋白,结果显示 GST 单抗和 E 蛋白阳性血清均检测到特异性条带,表明重组结构域 II 蛋白具有良好的免疫原性(图 5、图 6)。



1: 蛋白质分子量 marker; 2: pGEX 空载体; 3~6: 诱导后 0 h、3 h、4 h、5 h 表达的蛋白质。

图 3 pGEX-*EII* 重组蛋白质的 SDS-PAGE 检测

Fig. 3 Analysis of pGEX-*EII* fusion protein by SDS-PAGE



1: 超声裂解后沉淀; 2: 超声裂解后上清液; 3: 蛋白质分子量 marker。

图 4 pGEX-*EII* 重组蛋白质在菌体中的分布

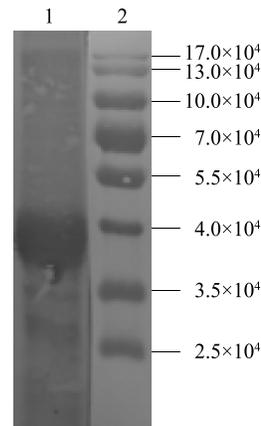
Fig. 4 Distribution of pGEX-*EII* fusion protein in recombinant *E. coli*

2.6 鼠抗重组蛋白质血清的制备及其效价的测定

用纯化的重组蛋白质免疫小鼠获得抗血清后, 利用间接 ELISA 方法检测血清效价。将纯化的重组蛋白质包被 ELISA 板, 以获得的小鼠抗血清作为一抗。结果显示, 免疫后 7 d, 抗体效价可达 1:800, 表明利用大肠杆菌表达的 E 蛋白结构域 II 具有良好的免疫原性, 免疫后可诱导机体产生特异性免疫应答。

2.7 间接免疫荧光 (IFA) 鉴定

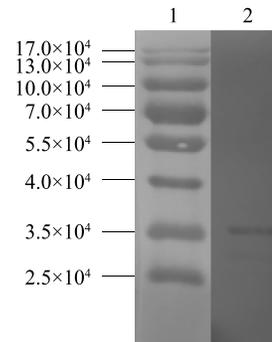
用大肠杆菌表达的重组蛋白质免疫小鼠获得抗血清后, 利用间接免疫荧光对该血清进行鉴定。结果显示, 获得的血清可与鹅坦布苏病毒 JS804 株发



1: 重组结构域 II 蛋白; 2: 蛋白质分子量 marker。

图 5 GST 单克隆抗体鉴定 pGEX-*EII* 表达的融合蛋白

Fig. 5 Western-blot identification of pGEX-*EII* fusion protein with GST McAb



1: 蛋白质分子量 marker; 2: 重组结构域 II 蛋白。

图 6 E 蛋白阳性血清鉴定 pGEX-*EII* 融合蛋白

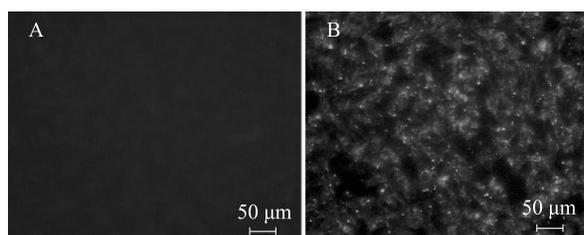
Fig. 6 Western-blot identification of pGEX-*EII* fusion protein with positive serum for E protein

生特异性结合, 表明该血清具有较好的特异性 (图 7)。

3 讨论

2010 年 4 月以来, 福建、河北、浙江、山东、江苏、北京等省市的鸭鹅陆续暴发了一种以食欲急剧减退、产蛋量骤降为主要特征的新发疫病, 给鸭鹅养殖业造成了重大经济损失。研究者通过病原分离和系统的实验室诊断, 确定该病由黄病毒科黄病毒属的坦布苏病毒感染引起^[12-13]。

黄病毒属病毒囊膜蛋白结构域 II 内的 cd 环是病毒的融合多肽, 参与病毒与宿主细胞膜融合。研



A: 未感染的空白 BHK-21 细胞; B: 鹅坦布苏病毒 JS804 株感染的 BHK-21 细胞。

图 7 抗血清的间接免疫荧光鉴定

Fig. 7 Indirect immunofluorescence analysis of the murine anti-serum

究结果表明,该区某些位点的突变可通过破坏病毒与宿主细胞膜融合而影响病毒的神经毒力。结构域 II 末端与茎干区相接触的 b、d 和 j 链,以及 bc 环上的氨基酸突变均可直接破坏囊膜蛋白外侧与 prM 和(或)其他囊膜蛋白单聚体之间的作用,并选择性地改变结构域 II 顶端的构象,干扰融合多肽的出现。因此,黄病毒属病毒囊膜蛋白结构域 II 与病毒的致病性密切相关^[14-15]。深入研究鹅坦布苏病毒囊膜蛋白结构域 II 将有助于开发基于囊膜蛋白的新型疫苗和特异性药物,为鹅坦布苏病毒病的防控以及抗病毒药物的设计提供理论基础。

本研究通过基因合成的方法获得编码鹅坦布苏病毒囊膜蛋白结构域 II 的基因片段,将其插入原核表达载体 pGEX-4t-1 中,构建了重组质粒 pGEX-EII,并在大肠杆菌中成功表达了鹅坦布苏病毒囊膜蛋白结构域 II。Western blot 鉴定结果表明,该蛋白质可与 E 蛋白阳性血清和 GST 标签单克隆抗体发生特异性反应。利用纯化后的重组蛋白质免疫小鼠,免疫后 7 d 抗血清效价可达 1:800。间接免疫荧光试验检测结果表明,该血清可与感染 BHK-21 细胞的鹅坦布苏病毒发生特异性反应,表明重组蛋白质具有良好的免疫原性。

由于鹅坦布苏病毒感染在中国主要鹅养殖地区广泛存在,严重危害鹅养殖业的健康发展,因此,有效预防及控制鹅坦布苏病毒病的发生和流行越来越受到人们的重视。本研究为进一步深入研究鹅坦布苏病毒囊膜蛋白结构和功能奠定了基础,此外该重组蛋白质也可作为鹅坦布苏病毒亚单位疫苗的候选疫苗,进行疫苗保护性研究。

参考文献:

- [1] HUANG X, HAN K, ZHAO D, et al. Identification and molecular characterization of a novel flavivirus isolated from geese in China [J]. Res Vet Sci, 2013, 94(3): 774-780.
- [2] SU J, LI S, HU X, et al. Duck egg-drop syndrome caused by BYD virus, a new tembusu-related flavivirus [J]. PLoS One, 2011, 6(3): 1-10.
- [3] YAN P, ZHAO Y, ZHANG X, et al. An infectious disease of ducks caused by a newly emerged tembusu virus strain in mainland China [J]. Virology, 2011, 417(1): 1-8.
- [4] 陈仕龙,陈少莺,王 劭,等. 一种引起蛋鸡产蛋下降的新型黄病毒的分离与初步鉴定[J]. 福建农业学报, 2011, 26(2): 170-174.
- [5] 傅光华,黄 瑜,施少华,等. 鸡黄病毒的分离与初步鉴定[J]. 福建畜牧兽医, 2011, 33(3): 1-2.
- [6] 李玉峰,马秀丽,于可响,等. 一种从鸭新分离的黄病毒研究初报[J]. 畜牧兽医学报, 2011, 42(6): 885-891.
- [7] ALCON S, TALARMIN A, DEBRUYNE M, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections [J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(2): 376-381.
- [8] ALCON-LEPODER S, SIVARD P, DROUET M T, et al. Secretion of flaviviral non-structural protein NS1: from diagnosis to pathogenesis [J]. Novartis Found Symp, 2006, 277: 233-247.
- [9] 邓永强,秦鄂德. 虫媒黄病毒包膜 E 蛋白的研究进展 [J]. 军事医学科学院院刊, 2006, 30(6): 575-579.
- [10] STIASNY K, BRESSANELLI S, LEPAULT J, et al. Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation [J]. Embo J, 2004, 23(4): 728-738.
- [11] 李 焱,时 莹,徐志凯,等. 登革病毒 E 蛋白入胞机制研究现状[J]. 热带医学杂志, 2010, 10(2): 221-222.
- [12] 黄欣梅,李 银,赵冬敏,等. 新型鹅黄病毒 JS804 毒株的分离与鉴定[J]. 江苏农业学报, 2011, 27(2): 354-360.
- [13] 苏敬良. 鸭的新型黄病毒 BYD 引起的产蛋下降综合征[J]. 兽医导刊, 2011(4): 27-29.
- [14] PLETNEV A G, BRAY M, HANLEY K A, et al. Tick-borne Langat/mosquito-borne dengue flavivirus chimera, a candidate live attenuated vaccine for protection against disease caused by members of the tick-borne encephalitis virus complex: evaluation in rhesus monkeys and mosquitos [J]. J Virol, 2001, 75(17): 8259-8267.
- [15] LI J, BHUVANAKANTHAM R, HOWE J, et al. The glycosylation site in the envelope protein of West Nile virus (Sarafenid) plays an important role in replication and maturation processes [J]. J Gen Virol, 2006, 87(3): 613-622.

(责任编辑:张震林)