

DOI:10.13718/j.cnki.xsxb.2017.01.011

禽网状内皮组织增生病毒 gp90 全长蛋白的原核表达、表达形式鉴定与纯化^①

王豪举¹, 李天兰¹, 高彤¹,
孟向阁¹, 索化夷², 丁红雷¹

1. 西南大学 动物科技学院, 重庆 400715; 2. 西南大学 食品科学学院, 重庆 400715

摘要: 该研究将禽网状内皮组织增生病毒 gp90 基因克隆至原核表达载体 pET-30a(+), 转化至大肠杆菌 BL21 (DE3)感受态细胞, 经 IPTG 诱导, 并通过 SDS-PAGE 和 Western blotting 鉴定蛋白表达情况和蛋白表达。结果发现, 将 gp90 基因连接表达载体转化宿主菌后, 成功在大肠杆菌以包涵体形式表达。纯化的蛋白纯度超过 90%。

关键词: 禽网状内皮组织增生病毒; gp90 蛋白; 原核表达; 包涵体

中图分类号: S852.65⁺7

文献标志码: A

文章编号: 1000-5471(2017)01-0066-04

禽网状内皮组织增生病毒(Reticuloendotheliosis virus, REV)属于逆转录病毒科, 丙型逆转录病毒属的成员, 能够感染鸡、火鸡、鸭、鹅、雉鸡、孔雀和一些其他鸟类, 引起几种禽类的一群病理综合征。这些综合征包括矮小综合征、淋巴组织及其他组织形成的慢性肿瘤和急性网状细胞肿瘤^[1-2]。给雏鸡接种 REV 污染的疫苗时, 由矮小综合征或慢性肿瘤会引起巨大的经济损失。近年来, 随着我国养禽业的迅速集约化发展和动物流动频率加快, 目前没有 REV 的商品疫苗来控制该病, 造成 REV 在鸡群和不同易感动物间的迅速传播与扩散^[3-4], 给养禽业造成严重的经济损失。

REV 是一种正链单股 RNA 逆转录病毒, 基因序列比较保守, 不同的毒株之间基因组序列变化很小, 只有一个血清型。其基因组大小为 9.0 kb, 由 *gag*, *pol* 和 *env* 共 3 个基因及 1 个长末端重复序列(Long terminal repeat, LTRs)构成。*env* 基因编码 2 个蛋白, 即 gp90 和 gp20。gp90 是一种表面囊膜糖蛋白, 可能在免疫保护中发挥作用。

本研究构建了 gp90 蛋白编码序列的重组表达载体, 并将该蛋白在大肠杆菌表达系统中进行了原核表达, 旨在为下一步研究其生物学及免疫学功能提供工具, 并奠定研究基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与材料

PrimeSTAR[®] HS DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、*Eco*RI、*Xho*I 购自宝生物工程(大连)有限公司; 核酸 Marker 购自天根生化科技(北京)有限公司; 胶回收试剂盒、质粒小量提取试剂盒购自 Omega 公司; 广谱蛋白 Marker 购自北京康为世纪生物科技有限公司; 预染蛋白 Marker 购自 Thermo 公司; His-tag(4C2) 单克隆抗体购自 Bioworld 公司; HRP 标记羊抗鼠 IgG 购自 Proteintech 公司; 小规模蛋白纯化装置 Ami-

① 收稿日期: 2015-11-26

基金项目: “十二五”农村领域国家科技计划项目(2012AA101304-5); 西南大学博士基金(含引进人才计划)项目(SWU114018); 中央高校基本科研业务费专项(XDJK2014B029)。

作者简介: 王豪举(1963-), 男, 重庆永川人, 博士, 副教授, 主要从事兽医传染病学研究。

通信作者: 丁红雷, 副教授, 硕士生导师。

con® pro centrifugal filters 购自默克密理博公司; pET-30a(+)载体, 大肠杆菌感受态细胞 DH5 α , BL21 (DE3)由本试验室制备和保存. *gp90* 基因片段根据已发表的禽网状内皮组织增生病毒 *env* 基因序列由赛百盛公司合成.

1.2 目的片段的 PCR 扩增

参照已经公布的禽网状内皮组织增生病毒 *env* 基因序列, 设计针对 *gp90* 蛋白全长的上下游引物, 在两端分别引入 *EcoRI* 和 *XhoI* 酶切位点, 并添加保护性碱基. 引物序列为 *gp90*-F: 5'-CCGGAATTCATGATGGACTGTCTCACCAACCTCC-3' 和 *gp90*-R: 5'-CCGCTCGAGCTTATGACGCCTAGCGGTGTAC-3' (下划波浪线碱基为保护性碱基, 下划直线碱基为酶切位点), 交由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成. PCR 反应体系为 50 μ L: PrimeSTAR® HS DNA 聚合酶 1 μ L, DNA 模板 2 μ L, *gp90*-F(10 pmol/ μ L)4 μ L, *gp90*-R(10 pmol/ μ L)4 μ L, dNTPs(2.5 mmol/L each)4 μ L, 5 \times PrimeSTAR buffer 10 μ L, ddH₂O 25 μ L. 反应条件: 98 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 98 $^{\circ}$ C 预变性 20 s, 57 $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min 10 s, 共 25 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 6 min. 反应完毕后扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像系统观察结果.

1.3 *gp90* 重组工程菌的构建

PCR 扩增产物经胶回收后 *EcoRI* 和 *XhoI* 双酶切, 再次胶回收, 连接同样经 *EcoRI* 和 *XhoI* 双酶切和胶回收的 pET-30a(+)载体, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 筛选阳性重组子, 用 *EcoRI* 和 *XhoI* 双酶切鉴定, 选取双酶切鉴定正确的阳性重组子送英潍捷基(上海)贸易有限公司测序. 测序正确的重组质粒转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞, 提取质粒, 再次 *EcoRI* 和 *XhoI* 双酶切鉴定.

1.4 *gp90* 重组融合蛋白的原核表达

将鉴定正确的重组菌接种于含 100 μ g/mL 氨苄西林的 LB 液体培养基, 37 $^{\circ}$ C 摇床培养至 600 nm 处, 吸光度(OD₆₀₀)为 0.7~0.9 时, 加入终浓度为 1 mmol/L IPTG, 37 $^{\circ}$ C 诱导表达目的蛋白 4 h. 收集菌液, 4 $^{\circ}$ C 5 000 r/min 离心 15 min 收集菌体. 超声破碎细菌, 差速离心分离上清和沉淀. 经 SDS-PAGE 电泳和 Western blotting 检测蛋白表达情况及表达形式.

1.5 重组蛋白的纯化

分离的含目的蛋白的样品与填料混合, 室温孵育 3 h, 10 000 r/min 离心 1 min, 加入 wash buffer 重悬后 10 000 r/min 离心 1 min, 重复一次, 加入 500 μ L elution buffer, 4 000 r/min 离心 15 min. SDS-PAGE 检测蛋白纯化情况.

2 结果

2.1 *gp90* 基因的克隆及重组质粒的构建

以 *gp90* 基因为模板, 用引物 *gp90*-F 和 *gp90*-R 扩增 *gp90* 基因, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳结果显示在 1 191 bp 处有一特异的单一 DNA 条带(图 1), 与预期结果吻合, 初步证实扩增产物为目的基因片段.

将 PCR 产物经 *EcoRI* 和 *XhoI* 双酶切后克隆入同样经双酶切的 pET-30a(+)载体, 构建重组质粒. 经 Amp⁺ 抗性筛选, 酶切鉴定获得重组质粒 pET-30a-*gp90* (图 2). 重组质粒测序结果显示, *gp90* 基因碱基序列与 GenBank 发布的碱基序列完全一致.

2.2 *gp90* 蛋白在大肠杆菌中的诱导表达及纯化

重组菌经 1 mmol/L IPTG 诱导后, SDS-PAGE 检测其目的蛋白表达情况. 由图 2a 可知, 与未诱导菌和空载体菌相比, 经 IPTG 诱导的重组菌未见明显的 *gp90* 重组蛋白表达. 使用 His 标签抗体通过 Western blotting 检测目的蛋白表达情况. 通过图 2b 可知, 经 IPTG 诱导后的重组菌有目的蛋白的表达(图 2b), 蛋白相对分子质量比预期的蛋白略小, 为 4.1×10^4 . 通过差速离心后 SDS-PAGE 和 Western blotting 检测蛋白表达形式, 可见重组蛋白以包涵体形式表达, 但表达量不高(图 3). 通过小规模蛋白纯化装置纯化的目的蛋白纯度超过 90%(图 4).

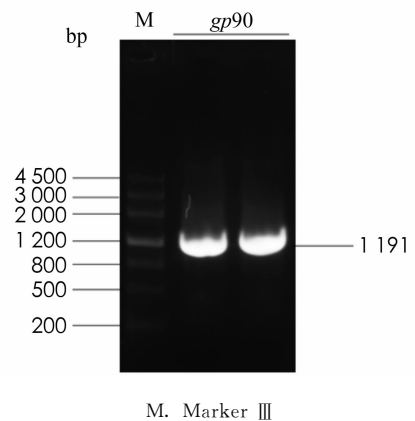
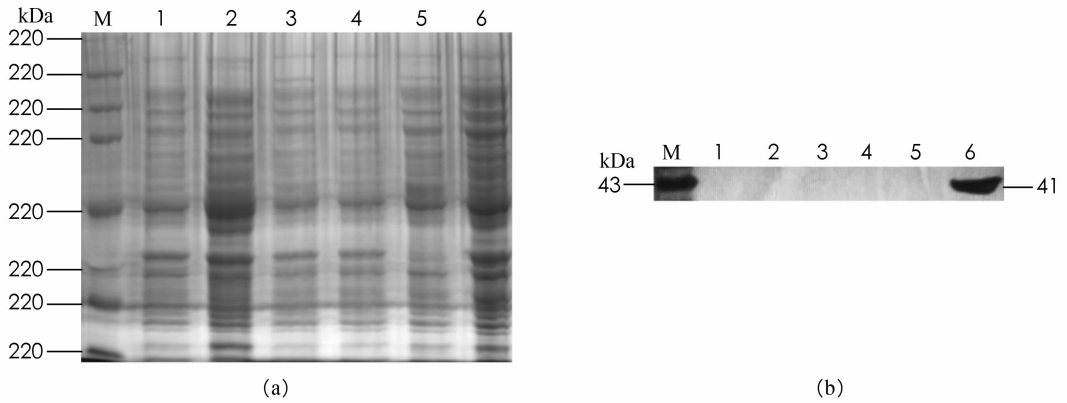
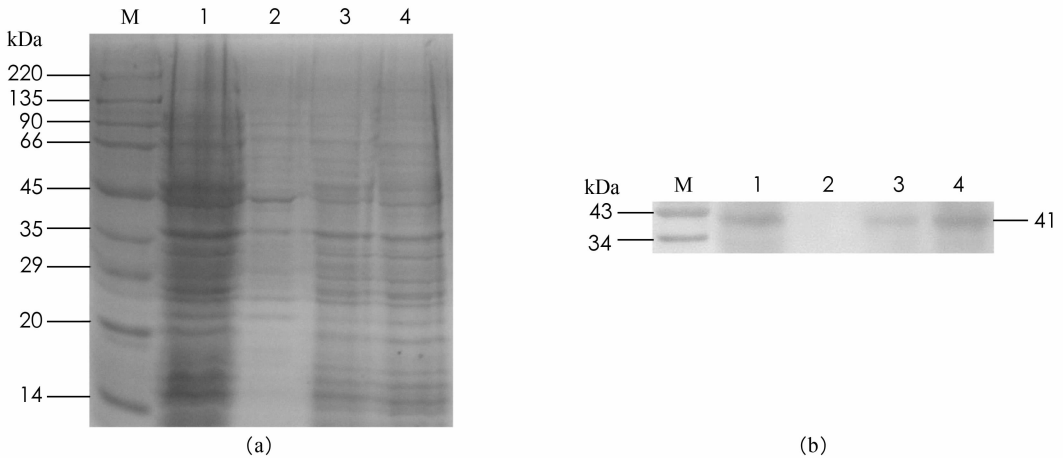


图 1 PCR 扩增 *gp90* 基因



M. 蛋白 Marker; 1. *E. coli* BL21-pET-30a 培养 2 h; 2. *E. coli* BL21-pET-30a 培养 6 h(不经 IPTG 诱导); 3. *E. coli* BL21-pET-30a 培养 6 h(1 mmol/L IPTG 诱导 4 h); 4. *E. coli* BL21-pET-30a-gp90 培养 2 h; 5. *E. coli* BL21-pET-30a-gp90 培养 6 h(不经 IPTG 诱导); 6. *E. coli* BL21-pET-30a-gp90 培养 6 h(1 mmol/L IPTG 诱导 4 h).

图 2 SDS-PAGE 和 Western blotting 检测目的蛋白的表达



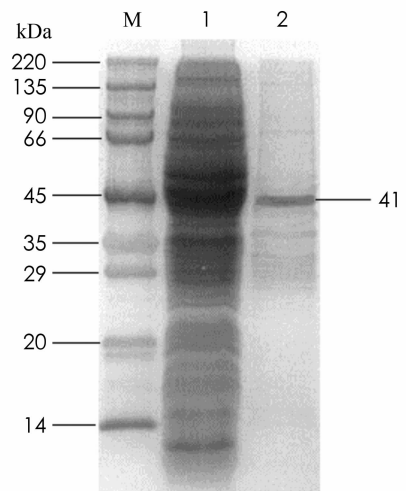
M. 蛋白 Marker; 1. *E. coli* BL21-pET-30a-gp90 全菌蛋白; 2. *E. coli* BL21-pET-30a-gp90 超声上清; 3. *E. coli* BL21-pET-30a-gp90 包涵体; 4. *E. coli* BL21-pET-30a-gp90 沉淀.

图 3 SDS-PAGE 和 Western blotting 鉴定目的蛋白表达形式

3 讨 论

REV 基因组由 *gag*, *pol* 和 *env* 共 3 个基因及长末端重复序列 LTRs 构成, 其中 gp90 蛋白由 *env* 基因编码, 位于病毒表面, 是一种膜表面糖蛋白, 能够刺激机体产生中和抗体^[5-6]. gp90 蛋白在不同的 REV 基因组中其氨基酸同源性超过 95%, 是一个比较保守的蛋白. 因此, gp90 蛋白可以作为 REV 检测的一个重要靶标蛋白^[7], 还可以作为候选的疫苗抗原.

已经有利用 pGEX-5X-3 和 pET-28a(+)原核表达载体表达 gp90 蛋白的报道^[8-9], 但均存在目的蛋白表达量不高, 且具有以没有活性的包涵体形式存在的问题. 在本研究中, 笔者将 *gp90* 片段连接 pET-30a(+)表达载体构建重组质粒并在大肠杆菌 BL21(DE3)中表达, 试图利用该蛋白表达系统提高目的蛋



M. 蛋白 Marker; 1. *E. coli* BL21-pET-30a-gp90 全菌蛋白; 2. 纯化的 gp90 重组蛋白

图 4 SDS-PAGE 检测 gp90 重组蛋白的纯化情况

白表达量并优化蛋白表达形式. 本试验尝试了 16 °C, 30 °C 和 37 °C 共 3 个诱导表达温度, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 和 1.0 mmol/L 共 5 个 IPTG 浓度, 虽然在所有的条件中均没有目的蛋白明显的大量表达, 但目的蛋白的表达需要有 IPTG 诱导. 通过 SDS-PAGE 电泳图无法判断蛋白是否表达, 因此本试验用 Western blotting 方法通过检测 His 标签来检测目的蛋白表达, 虽然蛋白表达量较少, 但经 IPTG 诱导后目的蛋白以包涵体形式表达. 为了在最容易达到的条件下迅速获得 gp90 蛋白, 笔者选择了在 37 °C 条件下用 1.0 mmol/L IPTG 诱导目的蛋白表达 4 h. 在后续的研究中, 笔者将通过构建其他的表达载体, 并通过表达条件优化 gp90 蛋白的表达量和蛋白表达形式, 为后续 gp90 蛋白的生物学及免疫学功能提供良好的研究工具.

参考文献:

- [1] BOHLS R L, LINARES J A, GROSS S L, et al. Phylogenetic Analyses Indicate Little Variation Among Reticuloendotheliosis Viruses Infecting Avian Species, Including the Endangered Attwater's Prairie Chicken [J]. *Virus Res*, 2006, 119(2): 187–194.
- [2] ZAVALA G, CHENG S, BARBOSA T, et al. Enzootic Reticuloendotheliosis in the Endangered Attwater's and Greater Prairie Chickens [J]. *Avian Dis*, 2006, 50(4): 520–525.
- [3] JIANG L, DENG X, GAO Y, et al. First isolation of Reticuloendotheliosis Virus from Mallards in China [J]. *Arch Virol*, 2014, 159(8): 2051–2057.
- [4] 沈清霞, 任冬梅, 丁红雷, 等. 重庆市禽白血病及网状内皮组织增生症的血清流行病学调查 [J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2014, 30(22): 54–55.
- [5] XUE M, SHI X, ZHANG J, et al. Identification of a Conserved B-Cell Epitope on Reticuloendotheliosis Virus Envelope Protein by Screening a Phage-Displayed Random Peptide Library [J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e49842.
- [6] LI K, GAO H, GAO L, et al. Recombinant gp90 Protein Expressed in *Pichia Pastoris* Induces a Protective Immune Response Against Reticuloendotheliosis Virus in Chickens [J]. *Vaccine*, 2012, 30(13): 2273–2281.
- [7] LI K, GAO H, GAO L, et al. Development of an Indirect ELISA for Serological Detection of Reticuloendotheliosis Virus Using the gp90 protein Expressed in *Pichia Pastoris* [J]. *J Virol Methods*, 2012, 180(1/2): 43–48.
- [8] 吉 荣, 崔治中, 丁家波, 等. 禽网状内皮组织增生症病毒囊膜糖蛋白 gp90 的原核表达 [J]. *中国兽医学报*, 2003, 23(1): 28–30.
- [9] 高 立, 祁小乐, 高宏雷, 等. 禽网状内皮组织增生症病毒 gp90 全长蛋白的原核表达、纯化及其免疫原性分析 [J]. *微生物学报*, 2009, 49(10): 1380–1384.

On Prokaryotic Expression, Identification of Expression Form, and Purification of Reticuloendotheliosis Virus Gp90 Protein

WANG Hao-Ju¹, LI Tian-lan¹, GAO Tong¹,
MENG Xiang-ge¹, SUO Hua-yi², DING Hong-Lei¹

1. School of Animal Science and Technology, Southwest University, Chongqing 400715, China;

2. School of Food Science, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: *Gp90* gene has been cloned into prokaryotic expression vector pET-30a(+). The recombinant vector has been transformed into *E. coli* BL21 (DE3) competent cells, and the gp90 protein been expressed by IPTG inducing. The expression and the expression form have been identified by SDS-PAGE and Western blotting. The target protein has been purified by protein purification mini Kit. The result show that *gp90* gene was ligated into pET-30a(+) and the recombinant plasmid is transformed into host cell. Recombinant gp90 protein is expressed in the recombinant bacteria as inclusion body. The purity of the purified gp90 protein is more than 90%.

Key words: reticuloendotheliosis virus; gp90; prokaryotic expression; inclusion body