

柯萨奇病毒 A 组 16 型 VP1 蛋白的原核表达及纯化

潘朋歌¹, 李克生^{2*}, 杜惠芬², 曾潮宁³ (1. 宁夏医科大学生育力保持教育部重点实验室/宁夏回族自治区生殖与遗传重点实验室, 宁夏银川 750004; 2. 甘肃省医学科学院医学生物技术研究中心, 甘肃兰州 730050; 3. 兰州雅华生物技术有限公司, 甘肃兰州 730050)

摘要 [目的]原核表达并纯化柯萨奇病毒 A 组 16 型(CVA16)VP1 蛋白。[方法]根据 GenBank CVA16 VP1 基因序列, 合成 VP1 全基因, 连接到载体 pET30a, 构建原核表达质粒 pET30a-CVA16-VP1。将测序正确的重组质粒转化至大肠杆菌 BL21(DE3), IPTG 诱导蛋白表达, Ni-NTA 亲和层析纯化, SDS-PAGE 和 Western Blot 鉴定重组蛋白。[结果]成功构建重组质粒 pET30a-CVA16-VP1, 表达蛋白经 SDS-PAGE 显示分子量约为 38.7 kDa, 目的蛋白以包涵体形式存在, 蛋白经复性、纯化, 纯度达 90% 以上; 经 Western Blot 检测, 证实表达的蛋白为 VP1 蛋白。[结论]成功获得了高纯度的 VP1 蛋白, 为此抗原用于临床诊断打下了基础。

关键词 柯萨奇病毒 A 组 16 型(CVA16); VP1 蛋白; 原核表达; 纯化

中图分类号 R 373.2²3 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)30-0099-03

Okaryotic Expression of VP1 Protein of Coxsackie Virus Group A 16 Strain and Purification

PAN Peng-ge¹, LI Ke-sheng², DU Hui-fen² et al (1. Fertility Maintenance Key Laboratory of Ministry of Education, Ningxia Medical University/Key Laboratory of Reproduction and Genetics in Ningxia Hui Autonomous Region, Yinchuan, Ningxia 750004; 2. Medical Biotechnology Research Center, Gansu Academy of Medical Sciences, Lanzhou, Gansu 730050)

Abstract [Objective] To express and purify the VP1 protein of coxsackie virus group A 16 strain (CVA16) in *E. coli*. [Method] The CVA16 VP1 gene was manually synthesized according to the GenBank VP1 sequence, and then cloned into pET30a to construct the expressional plasmid pET30a-CVA16-VP1. The plasmid pET30a-CVA16-VP1 confirmed through sequencing was transformed into *E. coli* BL21 (DE3) for inducing VP1 expression by IPTG and purification by Ni-NTA affinity chromatography. The purified protein was identified by SDS-PAGE and Western Blot. [Result] The recombinant plasmid pET30a-CVA16-VP1 was obtained. The relative molecular mass of the protein was 38.7 kDa by SDS-PAGE analysis. The target protein existed as inclusion bodies. The purity of the purified protein was above 90%. Western Blot proved that the expressed product is VP1 protein. [Conclusion] The recombinant CVA16 VP1 protein was successfully expressed in *E. coli*, which laid a solid foundation for the clinical diagnosis of MTB infection.

Key words Coxsackie virus A16 (CVA16); VP1 protein; Prokaryotic expression; Purification

柯萨奇病毒(coxsackie virus, CV)属于小核糖核酸病毒科, 肠道病毒属, 可导致多种人类疾病, 如呼吸道感染、手足口病、结膜炎、疱疹性咽颊炎、发热性皮疹、心肌炎、急性弛缓性麻痹及脑炎等^[1-2]。柯萨奇病毒被分为 A、B 两组, 其中 A 组 16 型(CVA16)作为引起儿童手足口病的主要肠道病毒之一而备受关注^[3]。

CVA16 为无包膜的单股正链 RNA 病毒, 基因组只含有 1 个开放读码框, 编码产生一个相对较长的多聚蛋白前体, 经蛋白酶水解形成 P1、P2、P3 这 3 个功能区, 其中 P1 区编码病毒的结构蛋白 VP1~VP4, 构成病毒衣壳, 而 P2、P3 区编码非结构蛋白^[4]。当病毒感染宿主细胞时, VP1 蛋白与细胞上的受体结合导致 VP4 释放, 进而使得病毒基因组进入细胞。此外, CVA16 的中和抗原决定簇大多位于 VP1 功能区, 且 VP1 基因与肠道病毒血清型相对应, 可作为 CVA 血清型或肠道病毒属内不同血清的分类依据^[5-7]。虽然 VP1 蛋白被作为研究 CVA16 的主要目标而被广泛关注, 但是目前对 CVA16 VP1 免疫性方面的研究仍然较少。该研究将 CVA16 VP1 全基因克隆到原核表达载体 pET30a, 构建重组表达质粒 pET30a-CVA16-VP1, 原核表达并纯化 CVA16 VP1, 以期对 CVA16 诊断试剂开发和疫苗研制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株。大肠杆菌 DH5 α 、BL21(DE3)感受态细胞、表达质

作者简介 潘朋歌(1987—), 女, 河南洛阳人, 助理实验师, 硕士, 从事分子生物学研究。* 通讯作者, 研究员, 博士, 从事医学生物技术、肿瘤分子生物学研究。

收稿日期 2018-06-12; **修回日期** 2018-06-27

粒 pET30a 由宁夏医科大学生育力保持教育部重点实验室保存; 序列合成与测序由苏州金唯智生物科技有限公司完成。

1.1.2 工具酶及主要试剂。限制性内切酶 *Hind* III/*Xho* I、*T*₄ DNA 连接酶、质粒小提试剂盒、琼脂糖凝胶电泳回收试剂盒购自 TaKaRa 公司; DNA Marker、蛋白 Marker 购自 Fermentas 公司; 卡那霉素、氨苄青霉素等为上海生物工程技术服务有限公司产品; 猴抗 CVA16 血清购自 ATCC; HRP 标记的羊抗猴 IgG 购自 Sigma 公司; 镍金属螯合层析柱购自 Pharmacia 公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒 pET30a-CVA16-VP1 的构建。根据 GenBank CVA16 VP1 基因序列, 对目的基因进行密码子优化, 按照优化后的基因序列, 人工合成 CVA16 VP1 全基因, 共 891 bp, 同时在 CVA16 VP1 基因 5' 端引入 *Hind* III 酶切位点, 3' 端删除终止密码子引入 *Xho* I 酶切位点。合成的 CVA16 VP1 基因和表达载体 pET30a 分别用 *Hind* III 和 *Xho* I 双酶切, 酶切完全后回收目的载体和片段, 按一定比例(1:3~1:5)混匀, 加入等体积 *T*₄ DNA 连接酶, 16 °C 过夜连接。采用热激法将上述连接液转化至新鲜制备的 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 在含有卡那霉素(100 μ g/mL)的 LB 固体培养基上于 37 °C 过夜培养。

1.2.2 重组质粒 pET30a-CVA16-VP1 的鉴定。挑取平板上的单菌落于 LB 液体培养基(含有卡那霉素)中, 37 °C 摇菌过夜, 按照质粒小提试剂盒的操作说明提取质粒 DNA。以该质粒 DNA 为模板, 用 pET30a 的通用引物 T7/T7 terminator 进行 PCR 扩增, PCR 条件为 95 °C 10 min; 95 °C 30 s, 58 °C 90 s, 72 °C 30 s, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。将琼脂糖凝胶电泳鉴

定大小正确的阳性质粒送测序,将测序结果与密码子优化后的VP1基因序列比对以确定插入序列的正确性。

1.2.3 融合蛋白CVA16-VP1的诱导表达。将测序正确的重组质粒pET30a-CVA16-VP1转化到感受细胞*E. coli* BL21(DE3)中,转化细胞涂于含卡那霉素的LB培养基平皿中,37℃恒温箱中过夜培养。随机挑取阳性克隆到5 mL LB液体培养基(含卡那霉素)中,37℃、180 r/min过夜培养至OD₆₀₀为0.5~1.0,次日按1:50~1:100的比例接种到300 mL含卡那霉素的LB液体培养基中,37℃、180 r/min培养至OD₆₀₀为0.5~1.0,取出1 mL未诱导菌作为阴性对照,4℃暂存。加入IPTG至终浓度为1 mmol/L,37℃继续培养4 h,离心收集菌体。按0.1 g/mL向菌体沉淀中加入PBS缓冲液,充分混匀,-70℃反复冻融3~4次,冰浴超声破碎至溶液透明,4℃12 000 r/min离心15 min,收集上清。向沉淀中加入适量2 mol/L的尿素溶液(20 mmol/L Tris-HCl,pH 8.0;0.5 mol/L NaCl;2 mol/L 尿素;2% Triton)重悬,室温静置30 min,12 000 r/min离心10 min,弃上清;重复上述步骤1次;最后加入包涵体溶解缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl,pH 8.0;0.5 mol/L NaCl;8 mol/L 尿素;0.2 mmol/L DTT;2% Triton)重悬,4℃充分溶解。分别将未诱导的菌液、诱导后的菌液、上清及尿素洗涤后的样品处理后进行SDS-PAGE分析。

1.2.4 重组蛋白的结构复性及纯化。将8 mol/L尿素溶解后的样品,通过Sephacryl S-300凝胶层析进行结构复性,柱床规格20 mm×400 mm,0.01 mmol/L 7.4 PBS、0.25 mL/min流速洗脱,收集主蛋白峰;Ni-NTA亲和层析纯化,咪唑梯度洗脱,收集目的蛋白。pH 8.0 Sephacryl S-300凝胶柱脱盐,超滤离心,浓缩抗原。SDS-PAGE分析抗原纯度,紫外分光光度计测定蛋白浓度。

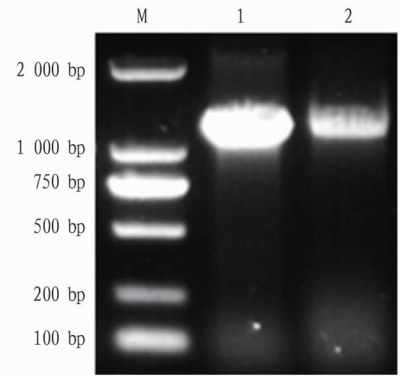
1.2.5 纯化产物的Western Blot鉴定。将纯化的重组CVA16VP1蛋白经SDS-PAGE分离后,电转移1 h至硝酸纤维素膜上,加入5%脱脂奶粉,室温封闭1 h;PBST缓冲液冲洗,加入1:2 000稀释的猴抗CVA16血清,室温孵育1 h;PBST缓冲液冲洗,再加入HRP标记的羊抗猴IgG(1:2 000稀释),室温孵育1 h;PBST缓冲液洗膜,最后加TMB显色。

2 结果与分析

2.1 重组质粒pET30a-CVA16-VP1的鉴定 重组质粒pET30a-CVA16-VP1经pET30a通用引物T7/T7 terminator扩增,琼脂糖凝胶电泳检测可观察到一条约1.3 kb的条带,与理论值相符;进一步的测序结果显示,基因序列与密码子优化后的序列一致,说明重组质粒构建成功,结果如图1。

2.2 重组蛋白CVA16-VP1的诱导表达 将重组表达质粒pET30a-CVA16-VP1转化到大肠杆菌表达菌株BL21(DE3)中,1 mmol/L IPTG诱导后,成功表达出VP1蛋白,未经诱导的菌体未见表达,经SDS-PAGE电泳分析,其分子量大约为38.7 kDa,与预期值相符(图2:1~2)。目的蛋白在细胞中以包涵体的形式存在(包涵体经洗涤、溶解,8 mol/L尿素时可看到有大量目的蛋白析出)(图2:3~7)。

2.3 重组蛋白的结构复性及纯化 8 mol/L尿素溶解液经

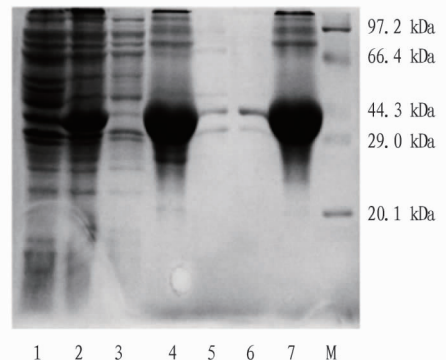


注:M.DL 2000 Marker;1,2.重组质粒的PCR鉴定产物

Note:M. DL2000 DNA Marker;1,2. PCR identification of pET30a-CVA16-VP1

图1 pET30a-CVA16-VP1重组质粒的鉴定

Fig.1 The identification of recombinant plasmid pET30a-CVA16-VP1



注:M.蛋白Marker;1.pET30a-CVA16-VP1转化菌未诱导;2.pET30a-CVA16-VP1转化菌经IPTG诱导;3.破碎后上清;4.破碎后沉淀;5.2 mol/L尿素洗涤;6.2 mol/L尿素二次洗涤;7.8 mol/L尿素溶解包涵体

Note:M. Protein Marker;1. pET30a-CVA16-VP1 transformed *E. coli*, not induced;2. pET30a-CVA16-VP1 transformed *E. coli* induced with IPTG;3. The supernatant after sonication;4. The precipitation after sonication;5. 2 mol/L Urea;6. Secondary 2 mol/L Urea;7. 8 mol/L Urea

图2 重组蛋白CVA16-VP1在*E. coli*中表达的SDS-PAGE分析

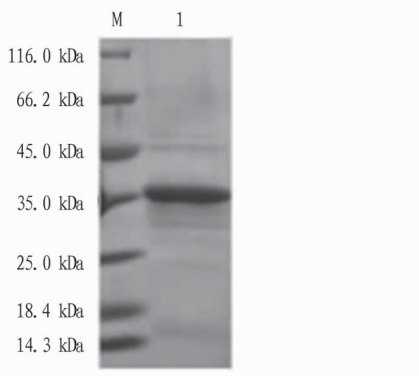
Fig.2 SDS-PAGE analysis of recombinant protein VP1 expressed in *E. coli* induced by IPTG

Sephacryl S-300凝胶层析进行结构复性和Ni-NTA亲和层析柱亲和层析纯化,获得了纯度约90%的目的蛋白,结果见图3。紫外分光光度法测蛋白浓度,蛋白浓度达2 mg/mL。

2.4 重组蛋白VP1的Western Blot测定 将纯化后的重组蛋白VP1与猴抗CVA16血清进行Western Blot分析,显色后在硝酸纤维素膜上出现单一条带(图4),表明表达的重组蛋白即为VP1蛋白。

3 讨论

手足口病(hand foot and mouth disease, HFMD)是一种全球性的急性儿科传染病,主要由肠道病毒71型(EV71)和CVA16引起^[8]。EV71在HFMD的流行中一直占主要地位,部分急性患者可引发严重并发症甚至死亡^[9];而CVA16的

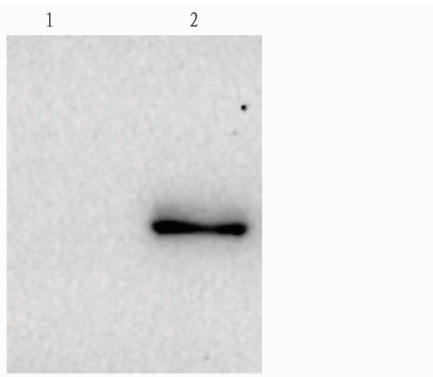


注: M. 蛋白质 Marker; 1. 纯化的 CVA16-VP1 重组抗原

Note: M. Protein Marker; 1. Purified VP1 recombinant antigen

图 3 纯化的 CVA16-VP1 重组抗原 SDS-PAGE 分析

Fig.3 SDS-PAGE of purified VP1 recombinant antigen



注: 1. 阴性对照; 2. 纯化的重组蛋白

Note: 1. Negative control; 2. Purified VP1

图 4 纯化蛋白的 Western Blot 分析

Fig.4 Western blotting of purified VP1

感染症状较为轻微^[3], 因此在过去的数十年 EV71 一直是研究的重点, CVA16 常被忽略。目前 EV71 灭活疫苗已经成功上市^[10], 但这些疫苗对 CVA16 感染导致的手足口病是没有交叉保护作用的^[11-12]。近些年又有研究发现, CVA16 感染的患者在重症阶段同样可引发严重并发症甚至死亡^[7], 不同的是患者年龄更小, 而且 CVA16 的感染往往反复, 致使患儿

(上接第 98 页)

上^[7], 与该研究结果相似。由此可见, 土霉素的热稳定性比强力霉素差。Lolo 等^[8] 研究显示, 恩诺沙星水溶液在 100 °C 水浴中能维持稳定长达 3 h。Franje 等^[9] 研究表明氟苯尼考和甲砒霉素在 100 °C 热水浴中加热 2 h, 降解率低于 20%, 且对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌 MIC 没有变化。

总体来看, 该研究测定的 14 种抗菌药物原粉的热稳定性要比国外研究文献报道的差一些^[7-9]。该差异可能与此次使用是国产原粉, 而不是标准品有关; 也可能与试验中采用的菌株或方法有关^[6-8]。该研究结果表明, 除氨苄西林外, 90 °C 30 min 处理基本不影响其他抗菌药物的活性。

参考文献

[1] OKOCHA R C, OLATOYE I O, ADEDEJI O B. Food safety impacts of antimicrobial use and their residues in aquaculture[J]. Public health reviews,

持久不愈^[13-14]。因此, 目前对于 CVA16 的研究就显得尤为重要, 而 VP1 作为 CVA6 主要外膜蛋白之一和抗原区的一部分, 成为 CVA6 疫苗和临床诊断试剂研究良好的候选抗原。

该试验成功构建了重组表达质粒 pET30a-CVA16-VP1, 并转入表达菌株 *E. coli* BL21 (DE3) 中进行优化表达, 经 SDS-PAGE 分析, 证明 VP1 蛋白在大肠杆菌中成功表达并主要以包涵体形式存在, 表达蛋白经复性、纯化, 纯度达 90% 以上; Western Blot 证实表达的重组蛋白即为 VP1, 为此抗原的临床诊断应用奠定了基础。

参考文献

- [1] OBERSTE M S, PEÑARANDA S, MAHER K, et al. Complete genome sequences of all members of the species Human enterovirus A[J]. Journal of general virology, 2004, 85(Pt6): 1597-1607.
- [2] 王慎玉, 朱凤才, 汪华. 柯萨奇病毒 A 组 16 型研究新进展[J]. 中华疾病控制杂志, 2014, 18(1): 68-73.
- [3] MAO Q Y, WANG Y P, YAO X, et al. Coxsackievirus A16: Epidemiology, diagnosis, and vaccine[J]. Hum Vaccin Immunother, 2014, 10(2): 360-367.
- [4] HAN J F, YU N, PAN Y X, et al. Phenotypic and genomic characterization of human coxsackievirus A16 strains with distinct virulence in mice[J]. Virus research, 2014, 179: 212-219.
- [5] DOS SANTOS G P, SKRABA I, OLIVEIRA D, et al. Enterovirus meningitis in Brazil, 1998-2003[J]. J Med Virol, 2006, 78(1): 98-104.
- [6] SHI J, HUANG X, LIU Q, et al. Identification of conserved neutralizing linear epitopes within the VP1 protein of coxsackievirus A16[J]. Vaccine, 2013, 31(17): 2130-2136.
- [7] 王志宏, 丁莹莹, 冯娇娇, 等. 柯萨奇病毒 A 组 16 型 VP1 蛋白的原核表达[J]. 中国现代医生, 2014, 52(14): 72-75.
- [8] SOLOMON T, LEWTHWAITE P, PERERA D, et al. Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of enterovirus 71[J]. Lancet Infect Dis, 2010, 10(11): 778-790.
- [9] ZHAO Y Y, JIN H, ZHANG X F, et al. Case-fatality of hand, foot and mouth disease associated with EV71: A systematic review and meta-analysis[J]. Epidemiol Infect, 2015, 143(14): 3094-3102.
- [10] 宋杰, 胡雅洁, 董少忠. EV71 和 CA16 研究进展综述[J]. 生命科学, 2018, 30(3): 241-247.
- [11] ASWATHYRAJ S, ARUNKUMAR G, ALIDJINOUE K, et al. Hand, foot and mouth disease (HFMD): Emerging epidemiology and the need for a vaccine strategy[J]. Med Microbiol Immunol, 2016, 205(5): 397-407.
- [12] LI R C, LIU L D, MO Z J, et al. An inactivated enterovirus 71 vaccine in healthy children[J]. N Engl J Med, 2014, 370(9): 829-837.
- [13] NASSEF C, ZIEMER C, MORRELL D S. Hand-foot-and-mouth disease: A new look at a classic viral rash[J]. Curr Opin Pediatr, 2015, 27(4): 486-491.
- [14] HUANG P N, SHIH S R. Update on enterovirus 71 infection[J]. Curr Opin Virol, 2014, 5: 98-104.

2018, 39: 1-22.

- [2] 彭开松. 鱼类应用药理学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2017.
- [3] 牛化欣, 过世东, 祝爱侠. 水产沉性颗粒饲料挤压蒸煮工艺对其理化特性的影响[J]. 农业工程学报, 2011, 27(9): 368-374.
- [4] 解绶启, 张文兵, 韩冬, 等. 水产养殖动物营养与饲料工程发展战略研究[J]. 中国工程科学, 2016, 18(3): 29-36.
- [5] 彭开松, 余锐萍, 杨玉荣, 等. 鸡 β-防御素 13 对尼罗罗非鱼生长和疾病抗性的影响[J]. 中国兽医学, 2009, 39(5): 432-436.
- [6] 刘玉庆, 李璐璐, 廖晓萍, 等. EUCAST 欧盟药敏试验标准[M]. 北京: 中国质检出版社, 2016.
- [7] HSIEH M K, SHYU C L, LIAO J W, et al. Correlation analysis of heat stability of veterinary antibiotics by structural degradation, changes in antimicrobial activity and genotoxicity[J]. Veterinarni medicina, 2011, 56(6): 274-285.
- [8] LOLO M, PEDREIRA S, MIRANDA J M, et al. Effect of cooking on enrofloxacin residues in chicken tissue[J]. Food additives and contaminants, 2006, 23(10): 988-993.
- [9] FRANJE C A, CHANG S K, SHYU C L, et al. Differential heat stability of amphenicols characterized by structural degradation, mass spectrometry and antimicrobial activity[J]. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2010, 53(4): 869-877.