

口蹄疫病毒 3AB 基因的表达及活性分析

王生育^{1,2} 孔繁德¹ 颜江华² 林祥梅³ 韩雪清³ 吴绍强³ 黄印尧¹

(1. 厦门出入境检验检疫局, 福建 厦门, 361012; 2. 厦门大学医学院抗癌研究中心, 福建 厦门, 361005;
3. 中国检验检疫科学研究院动植物检疫研究所, 北京, 100029)

摘要: 通过重叠 PCR 合成口蹄疫病毒 3AB 基因, 构建原核表达载体 pGEX-5X-1/3AB, 转化大肠杆菌 BL21 (DE3), IPTG 诱导表达。重组蛋白主要以包涵体的形式表达, 将包涵体洗涤溶解后, 采用 Na^{2+} 离子金属螯合亲和层析柱纯化, 逐步透析法复性。ELISA 实验表明, 目的蛋白能与猪口蹄疫阳性血清发生特异性反应。本研究为建立以基因工程产品为抗原、鉴别诊断自然感染和免疫动物的方法提供了技术条件。

关键词: 口蹄疫病毒; 3AB 基因; 表达; 活性

中图分类号: S852.65

EXPRESSION AND ACTIVITY ANALYSIS OF FMDV 3AB PROTEIN

WANG Shengyu^{1,2}, KONG Fande¹, YAN Jianghua², LIN Xiangmei³, HAN Xueqing³, WU Shaoqiang³, HUANG Yinyao¹
(1. Xiamen Entry-Exit Inspection & Quarantine Bureau, Xiamen, Fujian, 361012; 2. Cancer Research Center of Medical College, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005; 3. Institute of Animal and Plant Quarantine, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing, 100029)

Abstract: The 3AB gene of FMDV was assembled by overlapping PCR. The expression vector pGEX-5X-1/3AB was constructed and transformed into E.coli BL21 (DE3). The FMDV 3AB protein was expressed after IPTG induction. Recombinant proteins were expressed mainly as inclusion bodies in the system. After inclusion bodies was washed and dissolved, expressed protein was purified by Ni^{2+} -affinity chromatographic column, and refolded by following dialysis. ELISA assay suggested that the purified protein react specifically with FMDV positive serum. This study provided technical support for developing recombinant antigen-based method to distinguish naturally infected animals from vaccinated.

Key words: FMDV; 3AB gene; Expression; Activity

1 前言

口蹄疫 (food-and-mouth disease, FMD) 是由口蹄疫病毒 (foot-and-mouth disease virus, FMDV) 引起偶蹄兽的一种多呈急性热性、高度接触感染的传染病。FMDV 属于小 RNA 病毒科 (Picornaviridae) 口蹄疫病毒属 (Aphthovirus) 病毒, 已发现 7 个血清型, 分别称为 O、A、C、SAT1、SAT2、SAT3 和亚洲型 (Asia)。血清型间无血清学交叉反应和交叉免疫现象。病毒颗粒由单股 RNA 和衣壳蛋白构成, 不含囊膜。RNA 全长约 8500 个碱基, 占病毒组分 30%。衣壳蛋白由 VP1、VP2、VP3 和 VP4 四种结构多肽各 60 个分子构成^[1]。非结构蛋白包括 L、2A、2B、2C、3A、3B、3C 和 3D 等, 主要功能是参与病毒的复制、多聚蛋白的裂解和病毒颗粒的组装过程^[2]。

近年来, 国内外学者对 FMDV 非结构蛋白 2C、3A、3B、3AB、3ABC 等进行了深入的研究, 并建立了适用于鉴别感染和注射疫苗动物的 ELISA 方法。非结构蛋白 3ABC 参与病毒 RNA 复制过程, 是 FMDV

一个高度保守区域。利用原核和真核系统表达的 3ABC 蛋白能与全部 7 个血清型的 FMDV 感染血清发生免疫反应, 是鉴别免疫动物和感染动物的理想抗原之一^[3]。研究证明, 单克隆抗体捕获 (MAT) ELISA 法检测 3ABC 抗体^[4]和阻断 ELISA 法检测 3AB 或 3ABC 抗体是敏感、特异和可靠的。单个 ELISA 试验或用酶联免疫电转移印记技术可同时检测几个非结构蛋白抗体, 典型的蛋白质印记实验对确定 3AB 或 3ABC 抗体阳性动物是非常必要的^[5]。

本研究通过重叠 PCR 技术构建了 FMDV 3AB 基因, 并在大肠杆菌中获得高效表达, 重组蛋白特异性鉴定实验表明纯化后的 3AB 蛋白具有与猪口蹄疫阳性血清结合的特异性。

2 材料与方法

2.1 实验材料

大肠杆菌 BL21 (DE3) 由厦门大学医学院抗癌研究中心保存。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。pfu DNA 聚合酶、限制性内切酶、T4

* 基金资助: 国家质检总局科研项目 (2007IK039) 资助

表1 3AB引物

序号	引物
F1	ATCTCAATTCCTTCCAAAAGTCAGTGTGTACTTCTCATCGAGAAA GGCCAACACGAAGCAGCAATTGAATTCTTTGAGGGGATGGT
F2	TCAGGCGCTTAAAAGCGCGTTTCACAAATGATGTCTGTTGAATGAGA GGTCGGAGCTCCTTGTGAGATCGTGCACCATCCCCTCA
F3	TTAAGCGCCTGAAGGACAACCTTTGAGATCGTTGCCCTGTGCTTGACTC TTTTGGCAAACATTGTGATCATGATCCGCGAGACTCGCAAG
F4	TCAAGAGTCTTGTATCTGTGGTGTGTTTGTCTTCTCAATGTACTCATT CACTGCATCATCCACCATCTGTTGTCTCTTGCAGTCTC
F5	CAAGACTCTTGACGAGGCGGAAAAGAACCCTCTGGAGACCAGCGGTGC CAGCACTGTAGGTTTCAGAGAGAGAACCCTCCCGGGACACA
F6	TCCGGCGTAGGGTCTTCAGCTTGTGGTTTCTCCACGGGTCTGG CGGGCTCGGAGTTCACGTATCACTCGCTTTGTGTCCCGGGA
F7	CCCTACGCCGGACCACTAGAACGTGAGAAACCTCTGAAAGTGAGAGC CAAGCTCCCACAACATGAGGGACCTTACGCTGGTCCGATGGA
F8	GCTTCTTACCCGGTCCCTCGTAAGGTCTTCTTAACGACCCGGGGC TTTTGCTTTCACCTTCAATGGTTTCTGCCTCTCCATCGGACCA
F9	CTCAGTGACAATCAAGTTCTTAGCTTTCACTTTCAAAGCGACAGGCTTCTTACCCG

DNA连接酶为NEB公司产品。Ni²⁺-HiTrap Chelating HP树脂为Amersham Pharmacia Biotech公司产品。口蹄疫阳性、阴性血清由厦门出入境检验检疫局提供。pGEX-5X-1/6×His载体、辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗猪IgG抗体厦门大学医学院抗癌研究中心制备。

2.2 引物设计

经GenBank检索分析,参照已公布的亚洲株(A Y687333)选取3AB基因,根据密码子的简并性和大肠杆菌的密码子喜好性原则,在不影响氨基酸序列的前提下,修改3AB序列中的部分稀有密码子。将其分为9条长引物,各长引物之间设计12个互补序列。利用引物F05': GCATGGATCCAAATCT-CAATTCCTTC、F03': ACACCTTAAGCTCAGTGA-CAATC引入酶切位点BamH I和EcoR I。9条长引物详见表1。

2.3 重叠PCR合成基因

经5轮PCR将9个长引物片段拼接成完整的3AB基因序列。第1轮PCR反应将F5、F6连接成产物F_{5,6};第2轮PCR反应将产物F_{5,6}与引物F4、F7连接成产物F_{4,7};第3轮PCR反应将产物F_{4,7}与F3、F8连接成产物F_{3,8};第4轮PCR反应将产物F_{3,8}与F2、F9连接成产物F_{2,9};第5轮PCR反应将产物F_{2,9}与F1、F05'、F03'扩增完整的3AB基因F₁₋₁₀₆。反应条件均为:95℃预变性4min;95℃变性30s,53℃退火45s,72℃延伸1min,循环10次;95℃变性4

min;95℃变性30s,58℃退火45s,72℃延伸1min,循环30次;72℃延伸10min。

2.4 重组表达质粒的构建

将PCR得到的3AB基因与载体pGEX-5X-1/6×His分别用BamH I、EcoR I消化,胶纯化回收。用T4 DNA连接酶将3AB基因克隆至质粒载体pGEX-5X-1/6×His中,构建重组质粒pGEX-5X-1/3AB,转化E.coli BL21(DE3),重组子质粒经酶切鉴定,阳性克隆菌送上海英俊生物技术有限公司测序,将测序正确的重组质粒命名为pGEX-5X-1/3AB。

2.5 重组基因的诱导表达、纯化、复性

将阳性单菌株接种到含Amp的LB液体培养基中,振荡培养过夜后,按比例放大培养至A_{600nm}值约0.6~0.8时,加入IPTG进行诱导表达,4~6h后离心收集菌体。蛋白的纯化参照Amersham Pharmacia Biotech公司提供的Ni柱蛋白纯化操作手册进行。收集的蛋白采用逐步透析法复性。SDS-PAGE分析结果。

2.6 3AB蛋白的活性鉴定

选用已知猪口蹄疫阳性血清、阴性血清对包被的抗原进行检测。用3AB蛋白包被酶标板,2%BSA封闭,加入稀释的猪口蹄疫阳性血清,同时设阴性、阳性、空白菌体做对照,酶标羊抗猪IgG按一定比率稀释,TMB(四甲基联苯胺)显色,用2mol/L硫酸中止反应。酶标检测仪测定A₄₅₀。重复3次。用所测得的A值按公式计算P/N值,以样品的P/N值≥2.1判为阳

性。P/N值 ≠ 被检样品A值—空白对照A值 / (阴性样品A值—空白对照A值)。

3 结果

3.1 基因的构建

用各层引物扩增的产物，经1.7%琼脂糖凝胶电泳检测，得到与预期大小相符的各层DNA条带(图1)。

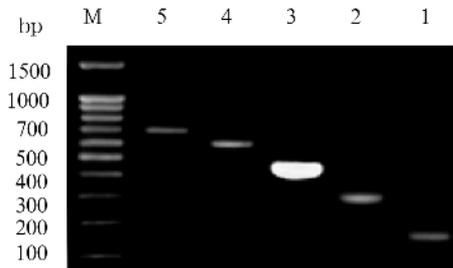


图1 PCR产物电泳图

M. DNA marker; 1. F₅₆(166bp); 2. F₄₇(320bp); 3. F₃₈(474bp); 4. F₂₉(594bp); 5. F₁₋₁₀(694bp)

3.2 重组质粒的构建

3AB基因片段与载体连接后，转化感受态细菌，筛选氨苄青霉素抗性的阳性克隆挑取单菌落，提取质粒酶切得到约为4.2Kb和700bp的片段，与预期结果相符(图2)。测序结果证明3AB基因插入的位置、大小和读码框均正确。

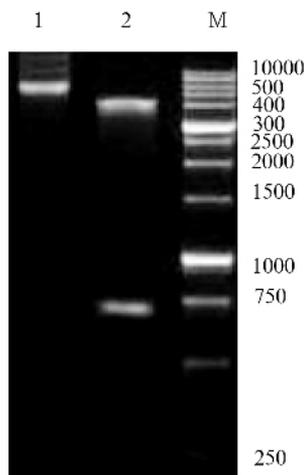


图2 重组质粒PGEX-5X-1/3AB的酶切鉴定图

M. DNA marker; 1. PGEX-5X-1/3AB质粒; 2. PGEX-5X-1/3AB质粒的BamHI和EcoRI双酶切

3.3 表达产物的SDS-PAGE电泳

将表达物上清液、沉淀超声裂解物上清分别电泳，经过染色、脱色，在51kD左右有一表达带，与预期的目的蛋白带大小一致，表明3AB基因获得表达，而未诱导菌没有出现相同的条带，空载体菌仅仅表达GST条带，同时可以看出目的蛋白绝大部分出现在超声沉淀中，这说明融合蛋白在宿主中主要以包涵

体的形式存在。包涵体处理后，过Ni²⁺亲和柱，用pH4.3 Elute buffer(含有20mmol/L Tris-HCL、8mol/L尿素和0.1mol/L PBS)洗脱液洗下亲和蛋白，胶上几乎只出现一条蛋白质条带，说明经亲和层析纯化到较高纯度含6×His的3AB融合蛋白。通过紫外分光光度计扫描，计算蛋白质浓度(C)。

$C=1.45A_{280}-0.74A_{260}$ ，测得纯化样品浓度为1.0mg/mL(图3)。

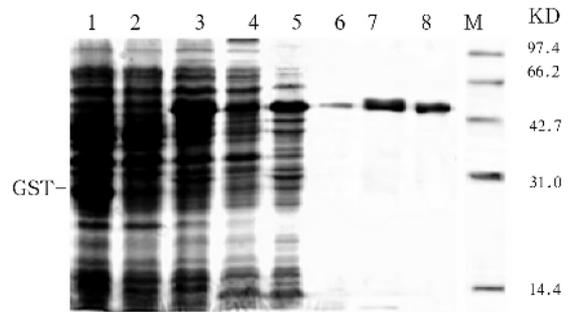


图3 表达蛋白的SDS-PAGE分析

1.空载体pGEX-5X-1(GST表达带); 2.未诱导菌;
3.IPTG诱导菌; 4.超声波上清液; 5.超声波沉淀;
6-8.依次洗脱的蛋白; M.蛋白Maker

3.4 活性鉴定

ELISA鉴定表明，纯化后的重组3AB蛋白可以与猪口蹄疫阳性血清发生特异性结合，3次所测得的结果均相同，其P/N值分别为2.53、2.69、3.28，均大于2.1，说明复性后的融合蛋白是表达纯化的3AB蛋白。

4 讨论

采用RT-PCR直接获得的基因并不一定适合于原核系统的表达。为了实现3AB基因在大肠杆菌中高效表达，我们采用人工设计引物和PCR组装方法合成基因。在保持3AB基因所编码的氨基酸序列不变的前提下，我们修改了部分稀有密码子，使得重组的3AB基因在大肠杆菌中获得高效表达。

本试验采用pGEX-5X-1载体，其N端设计带有6×His，这为纯化蛋白提供了方便，同时采用该载体也可以用GST和6×His的单克隆抗体进行检测。本试验也曾采用分泌胞外表达的pET-22b(+)载体，结果证实3AB基因并不表达，这可能与3A为锚定蛋白有关，与国内外的报道一致。实验证明该重组蛋白主要以包涵体的形式表达。利用高浓度的尿素溶解包涵体，并直接用Ni²⁺柱纯化，获得了较纯的重组蛋白。所用的Ni²⁺金属层析柱是依据6个组氨酸中咪唑基与Ni²⁺的螯合而使表达蛋白得到纯化，具有快速、特异

直接固体进样石墨炉原子吸收光谱法测定食品包装纸中铅镉

孙普兵 刘建宇 刘文丽 康荣
(宁夏出入境检验检疫局,宁夏银川,750001)

摘要: [目的]建立直接固体进样测定食品包装纸中铅、镉的方法。[方法]采用德国耶拿分析仪器股份有限公司的 ZEE nit 600 型原子吸收光谱仪进行测定。[结果]测定 μg 和 mg 级固体样品的精密度在 3.3% ~ 10.6% 之间,铅、镉检出限为 0.002 ng/mL 和 0.001 ng/mL。[结论]与湿法消解方法相比较,该方法无需样品前处理,具有简便、快速特点,同时可避免样品的稀释以及试剂的交叉污染带来的分析误差。

关键词: 直接固体进样; 原子吸收光谱; 食品包装纸; 铅; 镉

中图分类号: O657.31; TS206.4

DETERMINATION OF Pb AND Cd ELEMENTS IN PAPER FOR FOOD-PACKAGING BY SS-GFAAS

SUN Pubing LIU Jianyu LIU Wenli KANG Rong
(Ningxia Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Yinchuan, Ningxia, 750001)

Abstract: A direct solid sample inducing method is introduced for the detection of Pb and Cd in paper for food-packaging by AAS ZEE nit 600, AnalytikJena AG. The analysis was made without digestion chemicals; the RSD was between 3.3% ~ 10.6% ($n = 7$), the detection limits are 0.002 ng and 0.001 ng for Pb and Cd respectively. Compared with liquid sampling graphite furnace AAS analysis, the Direct SS-GFAAS proved to be a good alternative to conventional methods of trace analysis after wet-chemical digestion and compared favorably with these methods, it can save a lot of work for sample processing, has benefits to avoid dilution and external contamination.

Key words: Solid sampling graphite furnace atomic absorption Spectrometry (SS-GFAAS); Paper for food-packaging; Lead; Cadmium

许多研究表明,以 3ABC 前体蛋白的抗体效价作为鉴定感染的指标,可信度较高,可以用来鉴别感染动物与免疫动物。由于不同毒株的 3ABC 基因变异较小,以 3ABC 聚蛋白作为诊断抗原,检出的机率大,结果更可靠,在已建立的针对单个非结构蛋白的检测方法中,以检测聚蛋白 3ABC 和 3AB 抗体的方法最理想^[6]。Silberstein 等^[7]用在大肠杆菌中表达的 3AB 蛋白作检测抗原,结果表明,3AB 可以作为区别感染与免疫的重要指标。对重组蛋白进行特异性鉴定证实基因工程表达的 3AB 蛋白具有天然抗原的活性,能与猪口蹄疫阳性血清发生特异性反应。本结果为建立以 FMDV 基因工程产品为抗原,区别免疫动物和自然感染动物,检测隐性感染的检疫方法提供了材料,为发展 FMDV 诊断技术奠定基础。

参考文献

- [1] 于大海,崔砚林.中国进出境动物检疫规范[M].北京:中国农业出版社,1997:251~264.
- [2] 任武泽,潘洁,孙世铎,等.口蹄疫非结构蛋白 3ABC 的融合表

达及纯化研究[J].上海畜牧兽医通讯,2004,3:20~22.

- [3] SORENSEN K J, MADSEN K G, MADSEN E S, et al. Differentiation of infection from vaccination in foot-and-mouth disease by the detection of antibodies to the non-structural proteins 3D, 3AB and 3ABC in ELISA using antigens expressed in baculovirus [J]. Archives of Virology, 1998, 143 (8):1461~1476.
- [4] DE Diego M, BROCCCHI E, MACKAY D, et al. The non-structural polyprotein 3ABC of FMDV as a diagnostic antigen in ELISA to differentiate infected from vaccinated cattle[J]. Arch Virol, 1997, 142 (10):2021~2033.
- [5] SHEN F, CHEN PD, WALDIEDL AM, et al. Differentiation of convalescent animals from those vaccinated against foot and mouth disease by a peptide ELISA[J]. Vaccine, 1999, 17: 3039 - 3049.
- [6] 曹轶梅,刘在新,卢曾军,等.口蹄疫病毒非结构蛋白 3ABC 基因的克隆及 3AB 基因的原核表达[J].中国兽医学报,2004,24 (1):31~34.
- [7] SILBERSTEIN E, KAPLAN G, TABOGA O, et al. Foot-and-mouth disease virus infected but not vaccinated cattle develop antibodies a gain strecombinant 3AB non-structural protein[J]. Arch Virol, 1997, 142:795-805.