

网络出版日期:2016-12-29
网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1220.S.20161229.1005.008.html>

小反刍兽疫病毒疫苗株 *N* 和 *M* 基因的 克隆、序列分析及原核表达

何亚鹏, 鲍长磊, 张 琪, 付明哲, 许信刚
(西北农林科技大学 动物医学院, 陕西杨凌 712100)

摘 要 根据 GenBank 已登录的 PPRV 基因组序列, 设计并合成 2 对特异性引物, 以 PPRV 疫苗株基因组为模板, 经 RT-PCR 扩增获得 *N* 和 *M* 基因并进行序列分析, 再将 2 个基因插入到原核表达载体 pET-28a 中, 经鉴定正确后转化 BL21 感受态细胞进行 IPTG 诱导表达, 并进行 SDS-PAGE 和 Western blot 检测。成功克隆 PPRV 疫苗株 *N* 和 *M* 基因, 重组菌经 IPTG 诱导后表达分子质量为 57.7 ku *N* 蛋白(核衣壳蛋白)和 38.1 ku 的 *M* 蛋白(基质蛋白), 2 个蛋白均能与小反刍兽疫阳性血清特异性结合, 具有良好的反应原性。

关键词 小反刍兽疫; *N* 基因; *M* 基因; 克隆; 序列分析; 原核表达

中图分类号 S852. 61 **文献标志码** A **文章编号** 1004-1389(2017)02-0179-06

小反刍兽疫(Peste des petits ruminants, PPR)是由小反刍兽疫病毒(Peste des petits virus, PPRV)引起的一种急性、热性、接触性传染病, 主要感染山羊、绵羊和鹿等小反刍动物, 世界动物卫生组织(OIE)将该病列为必须通报的动物传染病, 中国将其列为一类动物疫病^[1]。PPRV 是副黏病毒科(Paramyxoviridae)麻疹病毒属(Morbillivirus)的成员。PPRV 的基因组为不分节段的单股负链 RNA, 从 3'至 5'依次是 *N-P-M-F-H-L* 6 个基因, 编码 8 种相应的蛋白, 分别为核衣壳蛋白(*N*)、磷蛋白(*P*)、大蛋白(*L*)、囊膜基质蛋白(*M*)、纤突糖蛋白(*F*)、血凝素蛋白(*H*)及 2 个非结构蛋白(*C* 和 *V*)^[2-3]。*N* 基因全长 1 674 bp, 包含 1 个开放性阅读框(ORF), 编码 525 个氨基酸, 其编码的 *N* 蛋白在病毒蛋白中含量最高, 同时也是核蛋白核心的主要组成元素, 与 RNA 紧密结合, 保护核酸, 其被认为在病毒的复制和转录中起主要作用^[4]。*M* 基因全长 1 466 bp, 含 1 个 ORF, 编码 335 个氨基酸, *M* 蛋白有形成病毒囊膜的内层, 与病毒的成熟释放有关^[5-6]。中国 2007 年暴发小反刍兽疫疫情^[7], 造成严重的

经济损失, 近期中国境内又有小反刍兽疫的发生^[8-9]。目前, 针对小反刍兽疫尚无有效的治疗手段, 主要靠疫苗进行防控。疫苗免疫后免疫效果如何? 需要进行抗体水平的检测。因此, 建立快速有效的抗体检测方法就显得尤为重要。本试验对小反刍兽疫的 *N* 和 *M* 基因进行克隆并原核表达, 为下一步小反刍兽疫基因工程疫苗的开发、单克隆抗体的制备及抗体快速诊断方法的建立奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

- 1.1.1 病毒、菌种和质粒 PPRV 疫苗株(Nigeria 75 /1 株)为新疆天康畜牧生物技术股份有限公司产品; pEASY-T1 Cloning Kit、感受态细胞 Trans5a、原核表达菌株 BL21 为北京全式金生物技术有限公司产品; pET-28a 质粒由西北农林科技大学动物医学院兽医微生物实验室保存。
- 1.1.2 主要试剂 FastQuant RT Kit、Trizol Reagent 为天根生化科技(北京)有限公司产品; 2×Es Taq MasterMix、DM2000 DNA Marker、

收稿日期:2015-12-21 修回日期:2015-12-29
基金项目:陕西省科技攻关(2015NY162); 西北农林科技大学试验示范站(基地)科技成果推广(TGZX2015-32); 陕西省科技统筹创新工程计划(2016KTZDNY02-05)。
第一作者:何亚鹏, 男, 硕士研究生, 研究方向为分子病原学与免疫学。E-mail:1692831800@qq.com
通信作者:许信刚, 男, 博士, 副教授, 研究方向为分子病原学与免疫学。E-mail:286567031@qq.com
付明哲, 男, 高级兽医师, 研究方向为羊病学。E-mail:1692831800@qq.com

Super DNA Marker、广谱蛋白 Marker 购于北京康为世纪生物科技有限公司;Blue plus II Protein Marker 购自北京全式金生物技术有限公司;各种内切酶、T₄ DNA 连接酶购于 NEB 公司;血液/组织/细胞基因组提取试剂盒购于天根生化科技(北京)有限公司;IPTG 购自 Sigma 公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的兔抗羊 IgG 抗体购于北京博奥森生物技术有限公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.1.3 血清 PPRV 阳性血清为采自临床免疫过 PPRV 弱毒疫苗(Nigeria 75 /1 株)的羊血清。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 根据 GenBank 中收录的 PPRV 全基因序列,并参考国内外相关文献^[3-4,6],利用 Primer 5.0 引物分析软件设计引物,用于扩增 PPRV 的 N 基因(N-F/N-R)和 M 基因(M-F/M-R),N 基因上游引物 5'- CCGGAATTCGCTACTCTCCTTAAAAGCTTGGCAT -3'(下划线为 *EcoR* I 酶切位点),下游引物 5'- CCGCTCGAGGCTGAGGAGATCCTTGTCGT-TGTA-3'(下划线为 *Xho* I 酶切位点),目的片段为 1 578 bp;M 基因上游引物 5'- CCGG-GATCCACCGAGATCTACGATTTTGATAA-AT -3'(下划线为 *Bam*H I 酶切位点),下游引物 5'- CCGCTCGAGCAGGATCTTGAACAGGC-CTTGATCA -3'(下划线为 *Xho* I 酶切位点),目的片段为 1 008 bp。引物由 Invitrogen 上海贸易有限公司合成,-20℃保存,备用。

1.2.2 N 和 M 基因的扩增与克隆 取 PPRV 疫苗株稀释液 200 μL,用 Trizol Reagent 说明书方法提取 RNA,以提取的基因组 RNA 为模板,按照 PrimeScript RT reagent Kit 试剂盒说明书将病毒 RNA 反转录为 cDNA,以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增 N 和 M 基因。胶回收 N、M 目的基因片段,连接至 pEASY-T1 载体并转化克隆感受态细胞,PCR 鉴定,提取阳性质粒并命名为 pEASY-T1-N、pEASY-T1-M。

1.2.3 原核表达载体的构建及鉴定 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切 pEASY-T1-N 及 pET-28a 空质粒;*Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切 pEASY-T1-M 及 pET-28a 空质粒;琼脂糖凝胶电泳并回收酶切产物。T₄ 连接酶将回收的 N 和 M 目的片段与对应相同酶切的 pET-28a 线性化质粒于 16℃连接过夜。将连接产物转化克隆感受态细胞 Trans5α

中。挑取单克隆后扩大培养,分别进行 PCR 和双酶切鉴定后送华大基因(北京)测序。

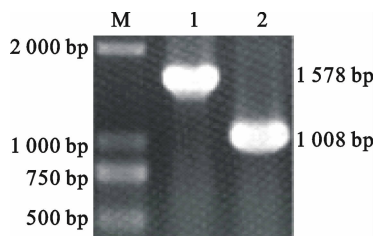
1.2.4 重组蛋白 N 和 M 的诱导表达及表达条件的优化 将鉴定为阳性的重组质粒 pET28a-N 和 pET28a-M 以及 pET-28a 空载体分别转化表达感受态细胞 BL21,挑取单克隆,37℃、220 r/min 过夜培养,按 $\varphi=1\%$ 转接 5 mL 新鲜 LB 培养基,培养至对数期,加入终浓度为 1.0 mmol/L 的 IPTG 诱导培养,分别于诱导后 3、4、5、6、7 h 收集菌体,进行 SDS-PAGE 电泳分析。

1.2.5 重组蛋白的 Western blot 分析 将重组蛋白表达产物进行常规 SDS-PAGE 后,250 mA 恒流转膜 2.5 h。以 50 g/L 脱脂奶粉室温封闭 PVDF 膜 2 h,分别以 1:500 倍稀释的 PPRV 阳性血清 4℃孵育 PVDF 膜过夜。TBST 振荡洗涤 3 次,每次 15 min。将 PVDF 膜以 1:5 000 倍稀释的辣根过氧化物酶(HRP)标记的兔抗羊 IgG 抗体室温孵育 2 h,TBST 振荡洗涤 3 次,每次 15 min。ECL 反应液孵育 PVDF 膜,暗室压片曝光。同时设立阴性对照。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增结果

以 PPRV 疫苗株(Nigeria 75 /1 株)提取的 RNA 为模板,经 RT-PCR 扩增得到 1 578 bp 的 N 基因和 1 008 bp 的 M 基因,与预期大小相符(图 1)。



M. DNA Marker DL2000;1. N 基因扩增产物 Amplification of N gene;2. M 基因扩增产物 Amplification of M gene

图 1 N 和 M 基因的扩增

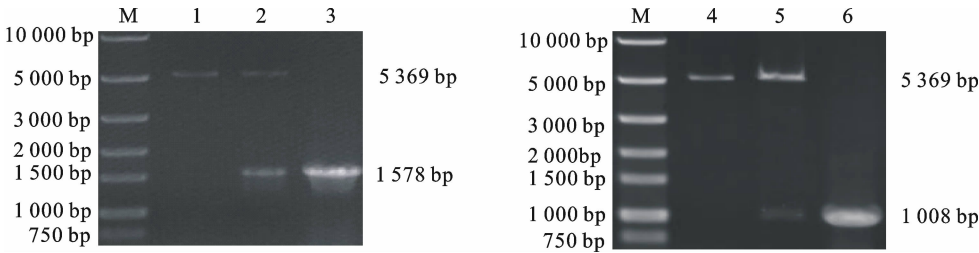
Fig. 1 Amplification of N and M gene by PCR

2.2 原核重组质粒的鉴定

重组质粒 pET28a-N 经 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定,琼脂糖凝胶电泳后出现 1 578 bp 的目的条带和 5 369 bp 的载体条带。重组质粒 pET28a-M 经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切鉴定,琼脂糖凝胶电泳后出现 1 008 bp 的目的条带和 5 369 bp 的载体条带。同时双酶切 pET-28a 载体

作阴性对照,载体条带与阴性对照大小相同,目的条带与 PCR 鉴定相符,说明重组质粒构建正确

(图 2)。



M. DNA Marker DL10000;1. pET-28a 经 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切 pET-28a digested using *EcoR* I and *Xho* I ;2. pET28a-N 经 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切 pET28a-N digested using *EcoR* I and *Xho* I ;3. N 基因扩增产物 Amplification of N gene;4. pET-28a 经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切 pET-28a digested using *Bam*H I and *Xho* I ;5. pET28a -M 经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切 pET28a-M digested using *Bam*H I and *Xho* I ;6. M 基因扩增产物 Amplification of M gene

图 2 重组表达质粒的双酶切鉴定

Fig. 2 Digestion identifications of recombinant plasmid

2.3 N 和 M 基因的序列分析及编码氨基酸的结构预测

测序结果表明,该 N 和 M 序列与 Nigeria 75/1 的核苷酸序列 100% 符合,表明基因克隆正确。利用 Internet 在线软件预测 N 和 M 基因编码的氨基酸序列。结果表明,N 和 M 氨基酸序列均没有信号肽和跨膜区。对 N 基因编码蛋白的亲水性分析表明,N 基因编码的核衣壳蛋白在 10~23、120~164、184~230、240~251、399~467、471~495 和 504~525 位的氨基酸残基处有较高的亲水性;由抗原表位分析图可知,核衣壳蛋白在第 10~21、44~70、83~101、106~114、119~127、132~147、182~230、239~252、318~328、340~361、366~377、398~415、421~466、471~494 和 503~525 位可能存在抗原表位(图 3)。对 M 基因编码基质蛋白的亲水性分析表明,

M 基因编码的基质蛋白在 4~13、23~32、42~49、59~69、82~97、149~158、163~181、196~215、221~243、258~271、286~300 和 312~321 位的氨基酸残基处有较高的亲水性;由抗原表位分析图可知,基质蛋白在第 5~32、35~49、59~71、79~96、149~157、161~170、195~204、209~216、222~244、261~271、286~292 和 311~322 位可能存在抗原表位(图 4)。

2.4 重组蛋白诱导表达条件的优化

用终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 诱导不同时间(3~7 h),SDS-PAGE 凝胶电泳结果显示在诱导 6 h 后,重组蛋白 N 表达量显著增加,在 7 h 时表达量最大(图 5);诱导 5 h 后,重组蛋白 M 表达量显著增加,在 6 h 时表达量最大(图 6);pET-28a 空质粒对照组和 pET28a-N 和 pET28a-M 未诱导对照组均没有重组蛋白的表达。

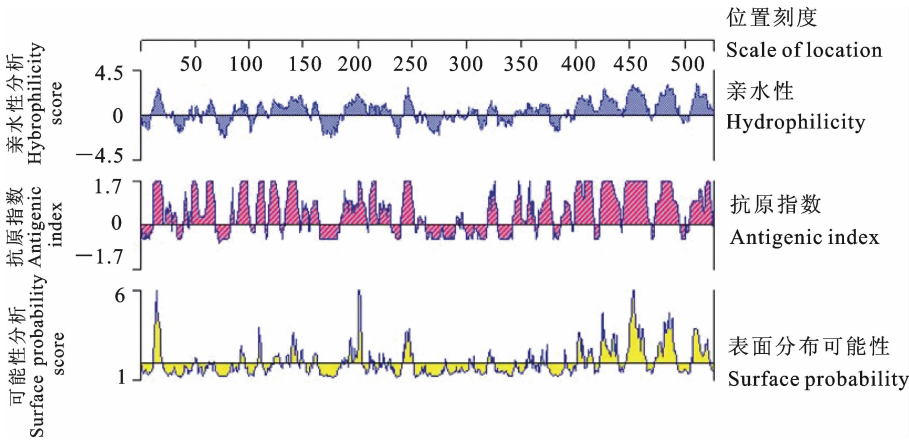


图 3 N 蛋白氨基酸序列的亲水性、抗原指数和表面分布可能性分析

Fig. 3 Analysis of hydrophilicity, antigenic index and surface probability of N protein amino acid

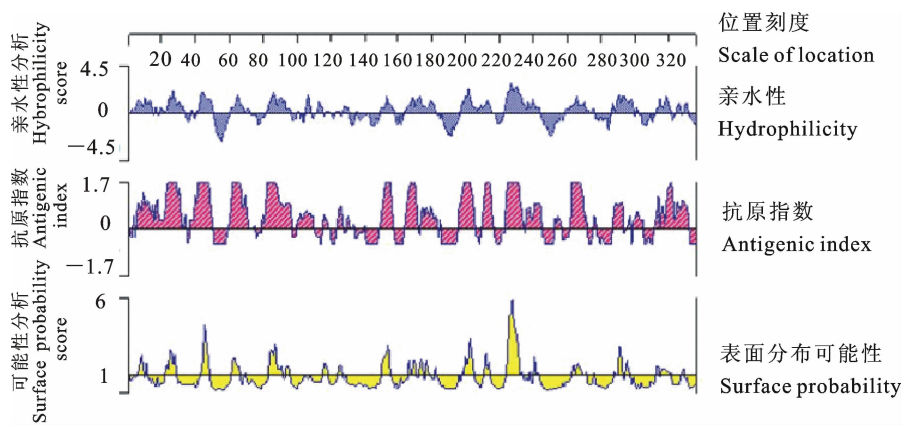


图 4 M 蛋白氨基酸序列的亲水性、抗原指数和表面分布可能性分析

Fig. 4 Analysis of hydrophilicity, antigenic index and surface probability of M protein amino acid

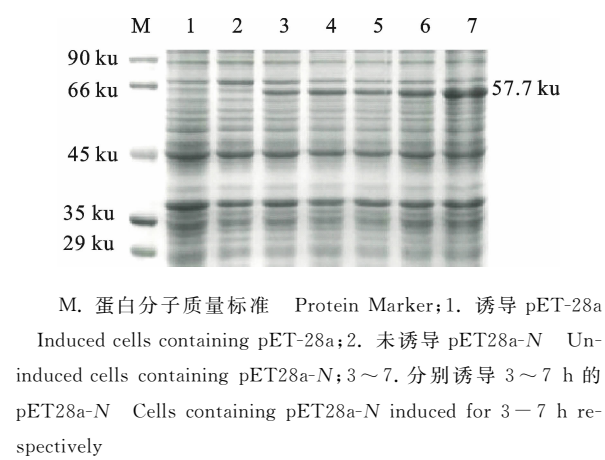


图 5 不同诱导时间对 N 重组蛋白表达的影响

Fig. 5 Effects of different induction time on expression of N fusion protein

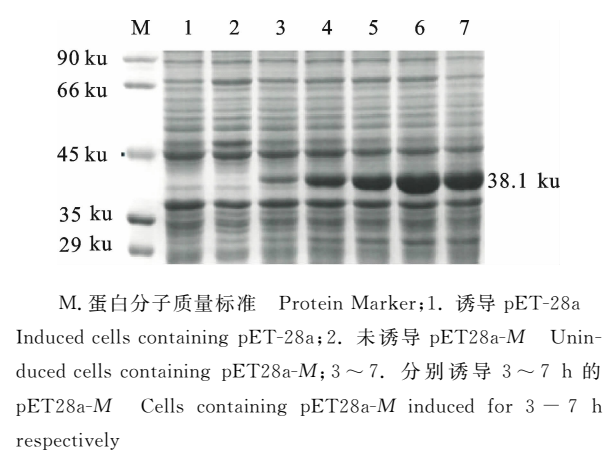


图 6 不同诱导时间对 M 重组蛋白表达的影响

Fig. 6 Effects of different induction time on expression of M fusion protein

2.5 重组蛋白的 Western blot 分析

Western blot 结果显示(图 7), N 和 M 重组蛋白均能与小反刍兽疫阳性血清发生特异性反

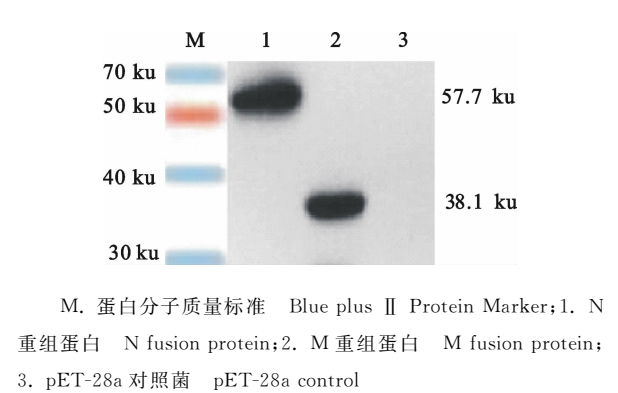


图 7 N 和 M 重组蛋白的 Western blot 结果

Fig. 7 Western blot analysis of N and M fusion protein 应, 出现特异性条带, 而阴性对照转染空载体 pET-28a 的重组菌与阳性血清不反应。

3 讨论

本研究成功克隆 PPRV 疫苗株(Nigeria 75 / 1)的 N 和 M 全长基因, 测序结果与 NCBI 中 Ni-geria 75 / 1 的核苷酸序列 100% 相符合, 证明 N 和 M 基因克隆正确。利用在线生物软件预测 N、M 蛋白序列, 分析表明 N 和 M 蛋白均没有信号肽序列和跨膜结构域; 亲水性分析表明, N 和 M 基因编码的蛋白均有较高的亲水性; 由抗原表位分析表明, N 和 M 基因编码的核心蛋白存在多个可能抗原表位。综合分析表明, N 基因编码的核衣壳蛋白和 M 基因编码的基质蛋白均具有较强的抗原性和亲水性, 且抗原性峰值和亲水性峰值基本同步。N 和 M 基因编码的蛋白具有良好的抗原性, 成为临床上诊断 PPRV 感染的理想抗原, 必将在 PPRV 的诊断及血清学调查中发挥巨大作用。

大肠埃希菌表达系统具有方便、高效、简单、可操作性强等优点。pET-28a(+) 为高效表达载体,pET-28 a(+)中的 His 标签蛋白在纯化过程中起到很重要的作用,为今后的蛋白纯化提供保障^[4]。本试验将 N 和 M 基因克隆于 pET-28a 原核表达载体 T7 启动子的下游,与 His-tag 同框融合,构建原核表达载体,并在宿主菌 BL21 中成功诱导表达 N 和 M 蛋白。在诱导表达的过程中,通过对诱导剂的浓度、诱导温度、诱导时间的调节,最终确定诱导表达的最佳条件为 37 ℃,IPTG 的终浓度为 1 mmol /L、220 r/min、诱导 7 h 获得 PPRV N 抗原蛋白;37 ℃、IPTG 的终浓度为 1 mmol /L、220 r/min、诱导6 h获得 PPRV M 抗原蛋白。Western blot 检测 N 和 M 蛋白均能与小反刍兽疫阳性血清特异性结合,出现特异性条带,说明表达的重组蛋白具有良好的反应原性。本试验为建立实验室快速诊断 PPRV 的感染、疫苗免疫后抗体水平的检测以及基因工程疫苗的研制奠定基础。

小反刍兽疫近年在中国周边国家包括孟加拉国、印度、尼泊尔、巴基斯坦、哈萨克斯坦和蒙古等先后暴发大规模 PPR 疫情^[10-12],中国也在 2007 年报道西藏地区发生小反刍兽疫疫情,给畜牧业生产带来巨大的经济损失^[7],其大规模爆发的风险明显提高,且近期境内罕见发生的 PPR 疫情^[9],农业部也积极防控,所以当前应加强对 PPRV 的基础研究,同时还应加强对该病的流行病学监测,建立高效、快速、可靠的病原学检测新方法,并研发出可引起强烈的细胞免疫应答和体液免疫应答的疫苗,以有效控制该病在中国的流行,甚至消灭该病。国际上针对小反刍兽疫的诊断技术主要有琼脂免疫扩散试验(AGID)、病毒分离鉴定、胶体金试纸条、竞争 ELISA、夹心 EII-SA、RT-PCR、中和试验等^[8]。而特异性高、操作简便、成本低对病毒的检测很重要。ELISA 方法更加方便、快捷、可靠,适用于大量样品的检测诊断。N 蛋白的抗原稳定性高,而基因的保守与特异性是建立 ELISA 方法的关键,而 M 蛋白含有众多 B 细胞线性表位。所以本试验对 GenBank 发表的 PPRV Nigeria 75/1 株 N 和 M 基因序列进行克隆、分析及原核表达,旨在为以后建立抗体间接 ELISA 的快速诊断方法奠定物质基础。

参考文献 Reference:

[1] 李景玉,高玉竹,李元果,等.小反刍兽疫研究进展[J].中国

畜牧兽医,2014,41(10):274-280.

LI J Y,GAO Y ZH,LI Y G,*et al.* Research progress on peste des petits ruminants[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2014, 41 (10): 274-280 (in Chinese with English abstract).

[2] BAILEY D,BANYARD A,DASH P,*et al.* Full genome sequence of peste des petits ruminants virus,a member of the Morbillivirus genus[J]. *Virus Research*, 2005,110(1):119-124.

[3] MUTHUCHELVAN D,SANYAL A,BALAMURUGAN V,*et al.* Sequence analysis of the nucleoprotei N gene of Asian lineage peste des petits ruminants vaccine virus. [J]. *Veterinary Research Communications*, 2006, 30 (8): 957-963.

[4] 阮 洋,秦峻岭,高玉伟,等.小反刍兽疫病毒 N 基因的原核表达[J]. 动物医学进展,2011,32(3):21-25.

RUAN Y,QIN J L,GAO Y W,*et al.* The prokaryotic expression of N gene from peste des petits ruminants virus [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2011, 32 (3): 21-25 (in Chinese with English abstract).

[5] 黄华欣,李 刚,史利军,等.小反刍兽疫病毒 M 蛋白主要抗原表位区的原核表达及鉴定[J]. 中国兽医科学,2013, 43(3):266-270.

HUANG H X,LI G,SHI L J,*et al.* Prokaryotic expression and identification of M protein main epitopes of peste des petits ruminants virus [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2013,43(3):266-270(in Chinese with English abstract).

[6] 黄华欣.小反刍兽疫病毒 Nigeria75/1 株 M 蛋白的原核表达及单克隆抗体的制备和初步应用[D]. 北京:中国农业科学院,2013.

HUANG H X. Prokaryotic expression of peste des petits ruminants virus Nigeria75/1 strain M protein and monoclonal antibody preparation and preliminary applications. [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2013(in Chinese with English abstract).

[7] 王志亮,包静月,吴晓东,等.我国首例小反刍兽疫诊断报告[J]. 中国动物检疫,2007,24(8):24-26.

WANG ZH L,BAO J Y,WU X D,*et al.* Diagnosis of the first outbreak of peste des petits ruminants in Tibet[J]. *Chinese Journal of Animal Quarantine*, 2007,24(8): 24-26 (in Chinese with English abstract).

[8] 江馥语.小反刍兽疫诊断方法的研究进展[J]. 现代畜牧兽医,2014(5):53-57.

JIANG K Y. Application progress in diagnostic method of peste des petits ruminants[J]. *Modern Journal of Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2014(5):53-57(in Chinese with English abstract).

[9] 赵 刚.小反刍兽疫的流行动态及疫苗的研究进展[J]. 现代畜牧兽医,2014 (3):52-55.

ZHAO G. Prevalence of peste des petits ruminants and application progress in its vaccines[J]. *Modern Journal of Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2014(3): 52-

55(in Chinese with English abstract).

- [10] ULLAH R W,ZAHUR A B,LATIF A,*et al.* Mild form of peste des petits ruminants virus (PPRV) in Pakistan[J]. *Pakistan Journal of Zoology*,2015,47(1):276-279.
- [11] BALAMURUGAN V,SEN A,VENKATESAN G,*et al.* Isolation and identification of virulent peste des petits ruminants viruses from PPR outbreaks in India[J]. *Tropical*

Animal Health & Production,2010,42(6):1043-1046.

- [12] MUTHUCHELVAN D,DE A,DEBNATH B,*et al.* Molecular characterization of peste-des-petits ruminants virus (PPRV) isolated from an outbreak in the Indo-Bangladesh border of Tripura state of North-East India[J]. *Veterinary Microbiology*,2014,174(3):591-595.

Cloning,Sequence Analysis and Prokaryotic Expression of *N* and *M* Gene of Peste des Petits Ruminants Virus Vaccine Strain

HE Yapeng,BAO Changlei,ZHANG Qi,FU Mingzhe and XU Xingang

(College of Veterinary Medicine,Northwest A&F University,Yangling Shaanxi 712100,China)

Abstract According to the published sequence of *N* and *M* gene of PPRV Nigeria 75/1 vaccine strain, two pairs of specific primers were designed and synthesized. *N* and *M* gene were amplified by RT-PCR from PPRV. *N* and *M* gene sequences were analyzed and cloned into pET-28a vector. The recombinational prokaryotic expression plasmid pET28a-*N* and pET28a-*M* were successfully constructed. *E. coli* BL21 transformed by recombinant plasmid pET28a-*N* and pET28a-*M* were induced by IPTG and detected by SDS-PAGE and Western blot analysis. *N* and *M* gene were successfully cloned and expressed. SDS-PAGE analysis showed that 57.7 ku *N* and 38.1 ku *M* fusion protein were expressed by IPTG induction,respectively. Western blot analysis showed that the *N* and *M* fusion protein could combine with PPR positive serum and had well reactiongenicity. This experiment provides molecular biology characteristics of PPRV. Further more,the *N* and *M* protein can be used to prepare PPRV antibody detection kit.

Key words PPRV; *N* gene; *M* gene; Clone; Sequence analysis; Prokaryotic expression

Received 2015-12-21

Returned 2015-12-29

Foundation item Shaanxi Province Science and Technology Research Project (No. 2015NY162); Northwest A&F University Scientific and Technological Generalized Project of Test Station(No. TG-ZX2015-32); Shaanxi Province Science and Technology Co-ordination Innovation Project (2016KTZDNY02-05).

First author HE Yapeng,male, master student. Research area: molecular etiology and immunology. E-mail:1692831800@qq.com

Corresponding author XU Xingang,male, Ph. D, associate professor. Research area: molecular etiology and immunology. E-mail: 286567031@qq.com

FU Mingzhe, male, senior veterinarian. Research area: sheep disease. E-mail:1692831800@qq.com

(责任编辑:顾玉兰 Responsible editor:GU Yulan)