

• 基础实验研究论著 •

登革病毒 1 型 E 蛋白的原核细胞表达及多克隆抗体的制备*

汪伟^{1,2}, 丁显平^{1△}, 杨会强², 李竹石², 谭帅², 赵宇², 刘莉娜², 谭昌耀², 曾献武²

(1. 四川大学生命科学学院, 四川成都 610064; 2. 成都生物制品研究所有限责任公司, 四川成都 610023)

摘要:目的 构建登革病毒 1 型(DENV-1)E 蛋白的原核细胞表达载体并进行原核细胞表达, 并制备其多克隆抗体。方法 利用聚合酶链反应(PCR)扩增 DENV-1 E 蛋白序列, 经酶切后将其插入原核细胞表达载体 pET-32a(+), 构建重组质粒 pET-32-D1-E。重组质粒转化 *E. Coli Rosetta* (DE3) 感受态细胞, 目的蛋白经异丙基-D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导表达, 纯化后采用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)初步分析蛋白表达情况, 并用纯化后的表达蛋白免疫家兔, 制备该蛋白的多克隆抗血清, 用间接酶联免疫吸附测定(ELISA)检测抗体的效价, Western blot 检测抗体的特异性。结果 成功构建了 pET-32-D1-E 原核细胞表达重组质粒, DENV-1 E 蛋白获得高效表达; 纯化后的重组蛋白免疫家兔获得的特异性抗血清效价为 1 : 25 600, Western blot 证实其特异性良好。结论 成功构建了 DENV-1 E 蛋白的原核细胞表达载体, 并制备了可用于 DENV 快速检测的高效多克隆抗体。

关键词:登革病毒; 原核细胞; 抗体, 多克隆; 遗传载体

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.23.002

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)23-3107-03

Prokaryotic expression of E protein of dengue virus type 1 and preparation of polyclonal antibody*

Wang Wei^{1,2}, Ding Xianping^{1△}, Yang Huiqiang², Li Zhushi², Tan Shuai², Zhao Yu², Liu Lina², Tan Cangyao², Zeng Xianwu²

(1. School of Life Science, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610064, China; 2. Chengdu Institute of Biological Products Co. Ltd., Chengdu, Sichuan 610023, China)

Abstract: Objective To construct prokaryotic expression vector for E protein of dengue virus type 1(DENV-1) and induce its expression and prepare its polyclonal antibody. **Methods** Polymerase chain reaction(PCR) was used to amplify DENV-1 E protein sequences which were inserted into prokaryotic expression vector pET-32a(+) after restriction enzyme digestion. Recombinant plasmid pET-32-D1-E was constructed and were transformed into *E. Coli Rosetta* (DE3) competent cells. The target protein was induced to expression by isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG) and preliminarily analyzed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE) after purification. The purified expression protein was adopted to immunize rabbits in order to prepare its polyclonal antibody. Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) was employed to detect the antibody titer and Western blot to test its specificity. **Results** Recombinant plasmid pET-32-D1-E plasmid expression in prokaryocyte was successfully constructed and DENV-1 E protein was highly expressed. The titer of the polyclonal antibody obtained by immunization was 1 : 25 600 and its high specificity was confirmed by Western blot. **Conclusion** Prokaryotic expression vector of DENV-1 E protein has been successfully constructed and efficient polyclonal antibody for rapid DENV detection has been prepared.

Key words: dengue virus; prokaryotic cells; antibodies, polyclonal; genetic vectors

登革病毒(DENV)是一种蚊媒传播的病原体,属于黄病毒科、黄病毒属,分为 4 个典型的血清型(DENV-1、DENV-2、DENV-3、DENV-4)。DENV 感染可引起人的登革热、登革出血热(DHF)和登革休克综合征(DSS)。DENV 病多见于热带和亚热带地区,在中国的华南和台湾地区时有流行。在过去的 20 年中,由 DENV 引起的疾病的发病率和病死率显著增加,据 WHO 统计,全球每年大约有 2.3 亿人感染 DENV,超过 25 亿的人群受到威胁^[1]。目前尚无特异性的防治方法,登革热已成为热带和亚热带地区重要的公共卫生问题。DENV 为单股正链 RNA 病毒,基因组 RNA 编码 3 个结构蛋白(C, prM/M, E)和 7 个非结构蛋白(NS1、NS2a、NS2b、NS3、NS4a、NS4b 和 NS5)^[2],其中,包膜糖蛋白 E 全长约 500 个氨基酸, N 端的 80% 组成暴露于病毒颗粒表面的外功能区, C 端的 20% 组成跨膜的疏水区域,锚定于病毒颗粒外周的一类脂双层膜分子上^[3]。结晶学的研究表明, DENV 的包膜糖蛋白 E 与其他黄病毒类似,分为 3 个结构域,分别为 D I (domain I)、D II (domain II)、D III (domain III)^[4-6],类似于以前定义的抗原区(C、

A 和 B)。A 区(包括残基 50~130)是线性区域,可刺激病毒中和抗体的产生; B 区(包括残基 300~400)诱导病毒中和抗体和血凝抑制抗体的产生; C 区(约在残基 130~185)是隔断 A 区的区域,包含能诱导产生特异性中和抗体的型和亚型抗原表位^[7-8],可以结合宿主细胞表面受体引起受体介导的病毒内吞现象^[9-10]。由于 E 蛋白与病毒的吸附、融合、细胞嗜性和免疫相关,因此常被用作制备亚单位疫苗首选的抗原基因,对其结构和功能的分析一直是登革疫苗研发及病毒致病机理研究的重点之一。本研究将不含跨膜区的 DENV-1 E 蛋白的基因序列插入原核细胞表达载体 pET-32a(+),经酶切鉴定后转化 *E. Coli Rosetta* (DE3)菌株,用异丙基-D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导表达,通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)、Western blot 鉴定表达蛋白,将纯化后的目的蛋白免疫家兔,获得了高效价的特异性多克隆抗体,这将为进一步研究 E 蛋白的功能及 DENV 的快速检测奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

* 基金项目:国家高技术研究发展计划(SS2012AA020901)。 作者简介:汪伟(1976~),女,学士,主要从事病毒疫苗方面的研究工作。

△ 通讯作者, E-mail: Brainding@scu.edu.cn。

1.1.1 细胞、病毒株、菌株及质粒 含有 DENV-1(ThD1_0008_81 株) E 蛋白编码序列的 pMD-D1prM/E 质粒由上海立菲生物技术有限公司构建; *E. Coli Rosetta* (DE3) 为本实验室保存; TOP 10 感受态细胞购自天根生化科技(北京)有限公司; 原核细胞表达载体 pET-32a(+) 购自德国 MERCK 公司。

1.1.2 主要试剂 氨苄青霉素(Amp)、5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-半乳糖苷(X-Gal)、IPTG 和 *Taq* DNA 聚合酶购自宝生物工程(大连)有限公司; 质粒提取试剂盒购于美国 Omega 公司; pGEM-T vector 购自 Promega 公司; 凝胶回收试剂盒购自德国 Qiagen 公司; *Bam*H I 和 *Xho* I 限制性内切酶、Phusion 超保真 DNA 聚合酶以及 T₄ DNA 连接酶购自英国 NEB 公司; 脱脂奶粉购自美国 BD 公司; 预染蛋白相对分子量标准、碱性磷酸酶标记的山羊抗兔 IgG、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔 IgG、5-溴-4-氯-3-吡啶磷酸(BCIP)/四唑氮蓝(NBT)碱性磷酸酶显色试剂盒购自上海碧云天生物技术研究所; 弗氏完全佐剂与不完全佐剂购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 其他试剂均为进口分装或国产分析纯。

1.1.3 实验动物 免疫用成年家兔, 雌性, 体质量约 2.5 kg, 由成都生物制品研究所有限责任公司实验动物中心提供。

1.2 方法

1.2.1 目的基因的合成 根据 DENV-1 病毒(ThD1_0008_81 株)包膜蛋白基因序列(GenBank 登录号 AY732483.1), 采用 Primer5.0 软件设计引物用于 E 片段的聚合酶链反应(PCR)扩增。PCR 上游引物(F)的 5' 端引入 *Bam*H I (GGATCC) 酶切位点, 下游引物(R)的 5' 端引入 *Xho* I (CTCGAG) 酶切位点, 扩增片段大小为 1 200 bp, 设计的引物委托上海立菲生物技术有限公司合成, 引物序列为: F(DENV1-E): 5'-CGG GAT CCA TGC GAT GCG TGG GAA TAG G-3'; R(DENV1-E): 5'-TCC TCG AGT TAT TTC CCT ATG CTG CTT CCT TTC-3'。以合成的含有 DENV-1 E 蛋白编码序列的 pMD-D1prM/E 质粒为模板, 采用 Phusion 超保真 DNA 聚合酶扩增目的基因。反应条件为: 98 °C 预变性 30 s, 98 °C 变性 10 s, 55 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 45 s, 25 个循环; 72 °C 延伸 10 min。

1.2.2 原核细胞表达载体 pET-32-D1-E 的构建 切胶回收 PCR 产物, 克隆至 pGEM-T 载体, 筛选阳性克隆 TA-D1-E, 送上海立菲生物技术有限公司测序验证。将插入正确序列的质粒 TA-D1-E 和载体 pET-32a(+) 用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切后进行胶回收, 然后用 T₄ DNA 连接酶 4 °C 连接过夜, 次日转化 TOP 10 感受态细胞, 提取质粒, 经双酶切鉴定正确的质粒命名为 pET-32a-D1-E。

1.2.3 目的蛋白的诱导表达及可溶性分析 将原核细胞表达质粒 pET-32a-D1-E 转化 *E. Coli Rosetta* (DE3) 菌株, 挑取阳性克隆接种于含 100 μ g/mL Amp 的 LB 培养基中, 37 °C 振荡培养过夜; 次日以 2% 接种量接入新鲜 LB 的培养基(含 Amp)中, 37 °C 培养至波长 600 nm 处的光密度(OD)值约为 0.6 时, 加入 IPTG 至终浓度为 1.0 mmol/L, 37 °C 继续诱导, 4 h 后收集菌液。分别取诱导前、后菌液进行 SDS-PAGE 分析。收集菌体用适当体积的超声裂解液(500 mmol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.9)重悬, 冰浴下超声裂解菌体。离心分离上清液和沉淀, 各取少量进行 SDS-PAGE 分析。

1.2.4 目的蛋白的纯化 从可溶性分析结果可知, 目的蛋白主要是以包涵体形式表达为主, 故离心后收集超声裂解后的沉淀, 依次用不含尿素和含 2 mol/L 尿素的洗涤液对包涵体进行洗涤, 最后用 8 mol/L 尿素变性条件下溶解包涵体, 进行 SDS-PAGE 分析, 并采用 Lowry 法测定纯化后的蛋白浓度, 过滤除菌后置 -20 °C 备用。

1.2.5 多克隆抗体的制备 常规方法免疫家兔。首次免疫时, 按每只 1 mg 的剂量将纯化后的 DENV-1 E 蛋白加入等体积的弗氏完全佐剂, 在家兔后脊柱两侧将充分乳化好的抗原进行多点皮下注射免疫(共 2 只), 每点不超过 200 μ L 乳化抗原, 同时以 MEM 免疫家兔作为对照。首次免疫后 14、21 及 28 d 进行加强免疫, 每次每只家兔免疫的蛋白剂量约为 1 mg (同初次免疫), 加弗氏不完全佐剂。末次免疫后 14 d 采血, 分离血清, -20 °C 保存。

1.2.6 多克隆抗体的 Western blot 鉴定 取适量纯化后的 DENV-1 E 蛋白和无目标产物的菌体蛋白进行 12% SDS-PAGE 电泳, 蛋白电转移(100 V, 30 min)至硝酸纤维素膜, 以溶解于磷酸盐缓冲溶液(PBS)的 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h, 加入上述制备的多克隆抗体(牛奶稀释, 稀释度均为 1:40)4 °C 孵育过夜。PBS 洗膜, 以碱性磷酸酶标记的羊抗兔 IgG 室温孵育 1.5 h, PBS 洗膜后以 BCIP/NBT 碱性磷酸酶显色试剂盒显色, 至目的条带染色清晰时终止反应。

1.2.7 抗血清效价的测定 采用间接酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测抗体的效价。用纯化的 DENV-1 E 重组蛋白包被酶标板(包被浓度为 0.05 μ g/mL, 100 μ L/孔), 置 4 °C 孵育过夜, 用含 5% 牛血清清蛋白(BSA)的 PBS (300 μ L/孔)置 37 °C 封闭 2 h。加入倍比稀释的兔抗血清(1:100 ~ 1:25 600)作为一抗, 100 μ L/孔, 置 37 °C 孵育 1 h。含吐温-20 的磷酸盐缓冲溶液(PBST) (pH 7.4)洗涤 5 次, 加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG(1:10 000, 100 μ L/孔), 置 37 °C 孵育 1 h。洗涤 5 次, 加入四甲基联苯胺(TMB)底物溶液, 100 μ L/孔, 置 37 °C 显色 10 min。最后加入 2 mol/L 硫酸(50 μ L/孔)终止反应, 酶标仪检测 OD₄₅₀ 值, 以 OD₄₅₀ 值大于阴性对照(MEM 免疫兔血清)2.1 倍判为阳性。

2 结果

2.1 DENV-1 E 基因扩增产物的鉴定 DENV-1 E 基因 PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 可见约 1 200 bp 条带, 大小与预期相符。

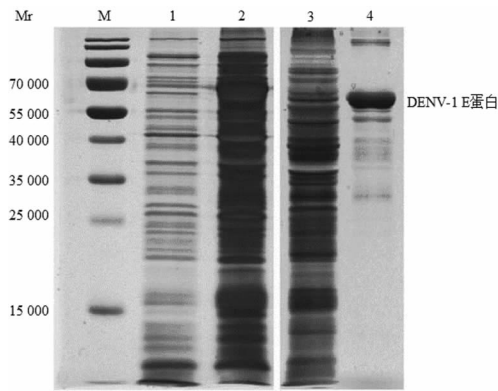
2.2 重组表达载体的鉴定 原核细胞表达重组质粒 pET-32-D1-E 经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切, 琼脂糖凝胶电泳可观察到 1 200 bp 和 5.9 kb 的条带, 与理论计算的质粒和目的基因的相对分子量大小一致, 说明克隆成功。测序结果证实, 插入片段的基因序列均与预期一致。

2.3 DENV-1E 蛋白的诱导表达及纯化 为获得目的蛋白的最佳表达, 笔者进行了不同的培养温度、不同的诱导剂(IPTG)浓度以及不同诱导时间的优化(数据未列出)。在终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG, 37 °C 诱导 4 h 后, 蛋白产量达到高峰。目的蛋白的检测经 SDS-PAGE、银染观察, 含重组质粒 pET-32-D1-E 的诱导菌在相对分子量约为 65 000 处出现 1 条蛋白条带, 见图 1, 而诱导前的重组质粒转化菌在相应位置的未发现明显条带。重组蛋白的大小与理论预测值一致, 且随 IPTG 诱导浓度的增加而未有明显增加。DENV-1 E 蛋白在 37 °C 以包涵体形式表达为主, 以尿素洗涤和溶解包涵体, 能够得到纯度较高的目的蛋白。用 Lowry 法测定纯化后目的蛋白浓度可达 1 mg/mL, 可达到本研究的要求。

2.4 Western blot 检测兔抗血清的特异性 由图 2 可见, 制备的 DENV-1 E 多克隆抗体与已纯化的 DENV-1 E 目的蛋白杂交后, 在转印膜接近 65 000 处的相应位置出现明显条带, 而阴性对照血清未出现条带, 表明所制备的多克隆抗体具有较高的特异性, 可用于检测样品中 DENV-1 E 蛋白的表达情况。

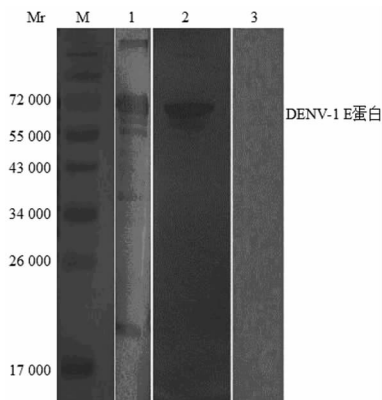
2.5 兔抗血清的效价 以大于阴性对照(免疫前兔血清) OD₄₅₀ 值 2.1 倍判为阳性, ELISA 实验结果显示, 所制备的重组

DENV-1 E 蛋白多抗效价为 1 : 25 600。



M: 蛋白质 Marker; 1: pET-32-D1-E/DE3 诱导前菌液; 2: pET-32-D1-E/DE3 诱导 4 h 菌液; 3: 裂解上清液; 4: 裂解沉淀(经 8 mol/L 尿素变性后包涵体溶解液)。

图 1 表达产物 DENV-1 E 的 SDS-PAGE 分析



M: 蛋白质 Marker; 1: DENV-1 E 纯化蛋白; 2: DENV-1 (Hawaii 株); 3: 阴性兔血清。

图 2 多克隆抗体的 Western blot 分析

3 讨论

DENV-1 E 基因全长 1 200 bp(除去 3'末端跨膜区),所编码蛋白相对分子质量约 65 000。去除 C 端疏水区的 E 蛋白不仅能够提高目的蛋白在大肠杆菌中的表达量,而且能够增加目的蛋白的稳定性^[11]。

本实验以 DENV-1 ThD1_0008_81 株为模版设计引物,通过 PCR 获取 E 蛋白基因(去除 C 端疏水区),再克隆至 pGEM-T 载体,将测序正确的目的片段插入到 pET-32a(+)表达载体的多克隆位点,并以 *E. Coli Rosetta* (DE3) 作为重组质粒表达的宿主菌,通过优化蛋白表达条件,发现目的蛋白即使在低温与低浓度 IPTG 诱导条件下仍易于形成包涵体。用尿素变性条件下纯化包涵体的方法纯化的目的蛋白免疫家兔,可刺激家兔产生特异性多克隆抗体,并且在第 3 次免疫后,经 ELISA 检

测抗体滴度可达到 1 : 25 600。利用 Western blot 试验结果证实,该抗血清能特异性地识别 DENV-1 E 蛋白,可以用于 DENV-1 病毒的快速检测。

综上所述,本实验成功表达和纯化了 DENV-1 E 蛋白,并制备了效价较高的特异性多克隆抗体,这不仅解决了登革疫苗研究中 DENV-1 E 蛋白抗体缺乏的问题,也为进一步研究 E 蛋白的功能及 DENV 感染的临床诊断试剂盒的研发奠定了实验基础。

参考文献

- [1] Monath TP. Dengue: the risk to developed and developing countries[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, 1(7): 2395-2400.
- [2] Kroeger A, Nathan M, Hombach J. Dengue[J]. Nat Rev Microbiol, 2004, 2(5): 360-361.
- [3] Jaiswal S, Khanna N, Swaminathan S. High-level expression and one-step purification of recombinant dengue virus type 2 envelope domain III protein in *Escherichia coli* [J]. Protein Expr Purif, 2004, 33(1): 80-91.
- [4] Rey FA. Dengue virus envelope glycoprotein structure: new insight into its interactions during viral entry[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(12): 6899-6901.
- [5] Modis Y, Ogata S, Clements D, et al. Variable surface epitopes in the crystal structure of dengue virus type 3 envelope glycoprotein [J]. J Virol, 2005, 79(2): 1223-1231.
- [6] Modis Y, Ogata S, Clements D, et al. A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(12): 6986-6991.
- [7] Crill WD, Roehrig JT. Monoclonal antibodies that bind to domain III of dengue virus E glycoprotein are the most efficient blockers of virus adsorption to Vero cells[J]. J Virol, 2001, 75(16): 7769-7773.
- [8] Hermida L, Bernardo L, Martin J, et al. A recombinant fusion protein containing the domain III of the dengue-2 envelope protein is immunogenic and protective in nonhuman primates[J]. Vaccine, 2006, 24(16): 3165-3171.
- [9] Chen Y, Maguire T, Hileman RE, et al. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate [J]. Nat Med, 1997, 3(8): 866-871.
- [10] Pattnaik P, Babu JP, Verma SK, et al. Bacterially expressed and refolded envelope protein (domain III) of dengue virus type-4 binds heparan sulfate[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2007, 846(1/2): 184-194.
- [11] Sugrue RJ, Cui T, Xu Q, et al. The production of recombinant dengue virus E protein using *Escherichia coli* and *Pichia pastoris* [J]. J Virol Methods, 1997, 69(1/2): 159-169.

(收稿日期: 2013-09-28)

(上接第 3106 页)

J Clin Microbiol, 2002, 40(10): 3798-3801.

- [3] Delphine G, Poirel L, Nordmann P. Rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* [J]. Emerg Infect Dis, 2012, 18(9): 1503-1507.
- [4] Delphine G, Poirel L, Nordmann P. Rapid detection of carbapenemase-producing *Pseudomonas* spp [J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(11): 3773-3776.
- [5] Delphine G, Poirel L, Nordmann P. Rapid identification of carbap-

enemase types using a biochemical test in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* [J]. Antimicrobial Agents Chemother, 2012, 56(37): 6437-6440.

- [6] Girlich D, Poirel L, Nordmann P. Value of the modified Hodge test for detection of emerging carbapenemases in *Enterobacteriaceae* [J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(2): 477-479.

(收稿日期: 2013-06-29)