

A 组轮状病毒 VP6 与霍乱毒素 B 亚基融合蛋白在大肠杆菌中的表达及生物活性分析

郭婷夏¹ 方荣祥^{1*} 李国华² 钱 渊²

¹(中国科学院微生物研究所植物生物技术开放实验室, 北京 100080)

²(首都儿科研究所北京市感染与免疫中心实验室, 北京 100020)

摘 要 利用霍乱毒素 B 亚基(Cholera toxin B subunit, CTB)的免疫载体作用, 将轮状病毒相关抗原引入口服免疫体系, 可激起有效的粘膜免疫反应, 这里报道了 CTB 基因与 A 组轮状病毒地方株 T114 VP6 全基因的融合, 并在大肠杆菌 BL21(DE3)中进行了融合蛋白的表达。在 IPTG 诱导下得到分子量为 56 kD 的融合蛋白, 表达量占菌体蛋白的 15%。分别用抗 CT 的抗体和抗 A 组轮状病毒的高价免疫血清进行 Western Blot 检测, 结果证明融合蛋白 CTB-VP6 保留了天然霍乱毒素 B 亚基及轮状病毒 VP6 的抗原性。 G_{m1} -ELISA 检测表明, 复性后的融合蛋白具有与神经节苷脂 G_{m1} 结合的能力。

关键词 轮状病毒, VP6, 霍乱毒素 B 亚基, 融合蛋白, 抗原性

中图分类号 Q784 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2001)06-0621-05

轮状病毒是导致婴幼儿重症腹泻的主要病原, 全球每年因轮状病毒腹泻造成的死亡人数超过 100 万^[1]。在发展中国家, 每年受到轮状病毒危害的婴幼儿数量非常巨大。在我国, 每年秋冬季有 40% ~ 60% 的小儿腹泻由轮状病毒引起。VP6 是轮状病毒的中壳蛋白, 分子量为 41 ~ 45 kD, 占病毒总蛋白的 50% 左右^[2]。在 A 组轮状病毒中, 该蛋白由基因组第六基因编码, 在序列上具有高度的保守性。VP6 具有很强的抗原性, 具有组特异性, 可能参与细胞免疫保护作用, 在病毒诊断上也是一个重要的检测指标。有研究表明重组的 VP6 还可以帮助 VP4 或 VP7 聚合并增强后者的免疫原性, 提高中和抗体水平^[3-5]。

对轮状病毒的免疫既有体液免疫又有细胞免疫, 还有局部分泌性 IgA 的免疫。由于轮状病毒腹泻是由于病毒感染了小肠绒毛尖端的粘膜上皮细胞而造成急性炎症^[2], 因此小肠的局部粘膜免疫就有明显的重要性和优越性。本研究首次将 CTB 与 A 组轮状病毒地方株 T114 VP6 的融合蛋白在大肠杆菌中表达, 以利用 CTB 的免疫载体作用, 提高 VP6 在粘膜免疫中的反应强度, 并对轮状病毒口服疫苗及针对腹泻的多价疫苗的可行性进行了探讨。

1 材料与方法

1.1 质粒与菌株

pGEM-T 载体为 Promega 公司产品, pET30a(+) 载体为 Novagene 公司产品, 含有轮状病毒 T114 VP6 基因的质粒 pTZ18-114 由首都儿科研究所北京市感染与免疫中心实验室构建^[6], 含有 CTB 基因的质粒 pUC18-CTB 由军事医学科学院生物工程研究所提供。

1.2 试剂

限制酶, BCIP/NBT 和 TMB 显色液购自 Promega 公司; T4 DNA 连接酶购自 Bio-Labs 公司; 兔抗 CT 抗体和辣根酶标记的羊抗兔 IgG 购自 Sigma 公司; 豚鼠抗 A 组轮状病毒 Wa 株高价免疫血清由美国 NIH Dr. Yasutaka Hoshino 惠赠; 辣根过氧化物酶标记的羊抗豚鼠 IgG 抗体为 EAPPEL 公司产品。

1.3 CTB 与 VP6 融合基因的构建和克隆

分别以质粒 pUC18-CTB 和 pTZ18-114 为模板, 利用 Primer 1 和 Primer 2 及 Primer 3 和 Primer 4, 用高保真度 *pfu* DNA 聚合酶(Promega)扩增出 CTB 基因(312 bp)及 VP6 基因 5'端片段(213 bp), 命名为 CTB 和 VP6_{5'}。

收稿日期: 2001-05-16, 修回日期: 2001-08-09。

* 联系作者。Tel: 86-10-62548243; Fax: 86-10-62560912; E-mail: fangrx@sun.im.ac.cn

Primer 1: 5'-ACATATGACACCTCAAAATATTACTGATT-3'

Primer 2: 5'-CATAGGTCAGGTCATTTGCCATACTAATTGCC-3'

Primer 3: 5'-AAATGGACCTGGACCTATGGAGGTTCTGTACTCA-3'

Primer 4: 5'-ACAAATTATAAAGTGTGTGCC-3'

CTB 序列 3'端和 VP6_s 序列 5'端有一段互补的 12 bp 铰链区序列(下划线部分)。以扩增出的 CTB 和 VP6_s 序列为模板, Primer 1 和 Primer 4 为引物, Taq plus DNA 聚合酶(生工)进行重组 PCR 扩增。程序如下:

加引物前先 94 °C 预变性 3 min, 然后 94 °C 变性 1 min, 55 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 63 s, 5 个循环之后补加 Primer 1 和 Primer 4, 94 °C 变性 1 min, 55 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 63 s, 30 个循环后, 72 °C 延伸 10 min。

扩增产物命名为 CTBV6_s。将 CTBV6_s 连接到 pGEM-T 载体上, 经 DNA 测序验证序列的正确性。

用 NdeI 和 DraI 酶切, 回收 CTBV6_s 片段。用 DraI 和 EcoRI 酶切 pTZ18R-114 质粒, 回收 VP6 基因 3'端片段。将两片段连接得到 CTB 基因与完整的 VP6 基因的融合 DNA 片段(1.5 kb)。两个基因之间是 12 bp 的铰链区, 编码 4 个氨基酸(GPGP)。融合 DNA 片段以 NdeI 和 EcoRI 双酶切定向克隆到大肠杆菌表达载体 pET30a(+), 生成 pET-CTBV6; 转化大肠杆菌 XLI-Blue。根据 VP6 基因 3'末端设计 Primer 5 (5'-AGAGCTCTCACTTAATCAACATGCTTCT-3'), 用 Primer 1 和 Primer 5 进行菌落 PCR 并酶切鉴定重组质粒。

1.4 CTB-VP6 融合蛋白在大肠杆菌中的表达

将 pET-CTBV6 重组质粒转入大肠杆菌 BL21 (DE3) 菌株, 挑取含 pET-CTBV6 质粒的单菌落接种于含 Kan 的 LB 培养基中, 37 °C 振荡培养过夜。按 1% 接种量转接到含 Kan 的新鲜 LB 培养基中, 继续培养至 OD₆₀₀ 约为 0.6~0.8, 加入 IPTG 至终浓度 0.6 mmol/L, 37 °C 振荡培养 4 h 后收集菌体。10% SDS-PAGE 分析融合蛋白表达情况。

收获的菌体重悬于 pH 7.4 的 PBS 缓冲液中, 于冰浴中超声破碎细胞, 12 000 r/min 离心收集沉淀。沉淀用含 0.05% Triton X-100, 2 mol/L 尿素的 PBS (pH 7.4) 及 20 mmol/L 的 PBS (pH 7.4) 分别洗涤 1~2 次。离心收集沉淀中的包涵体。

1.5 融合蛋白的纯化与复性

洗涤后的包涵体溶解在起始缓冲液(20 mmol/L 磷酸缓冲液, pH 6.0, 8 mol/L 尿素, 0.1 mol/L DTT), 离心并过滤除去不溶物。利用 Bio-CAD 灌注层析系统的 POROS 20HS 阳离子交换柱纯化融合蛋白; 洗脱

缓冲液为起始缓冲液中逐渐加入浓度为 1 mol/L 的 NaCl, 洗脱梯度为 0~500 mmol/L NaCl, 流速 3 mL/min, 洗脱体积 30 mL。10% SDS-PAGE 检测纯化效果。

经阳离子柱纯化的融合蛋白用含 8 mol/L 尿素的 20 mmol/L PBS (pH 7.4) 缓冲液稀释至浓度 100 μg/mL。装入透析袋置于透析液(20 mmol/L, pH 7.4 的 PBS)中, 4 °C 连续透析复性, 然后用 PEG 20 000 进行浓缩。

1.6 融合蛋白抗原性的检测

融合蛋白分别用兔源 CT 抗体(1:2000)和豚鼠抗 A 组轮状病毒 Wa 株高价免疫血清(1:200)为一抗, 碱性磷酸酶标记的羊抗兔 IgG 单抗(1:5000)和辣根过氧化物酶标记的羊抗豚鼠 IgG 单抗(1:500)为二抗进行 Western blot 检测。显色反应底物分别为 BCIP/NBT 及联苯二胺。同时分别以 Sigma 公司的标准 CTB 蛋白及在昆虫杆状病毒表达系统中表达的 VP6 蛋白做为对照。

1.7 融合蛋白 G_{m1} 结合能力的测定

利用 G_{m1}-ELISA 方法^[7], 测定复性后不加热与加热变性的融合蛋白与神经节苷脂 G_{m1} 的结合能力。以天然 CTB (Sigma) 和加热变性后的 CTB 样品为对照。

2 实验结果

2.1 CTB 与 VP6 融合基因的克隆与鉴定

利用 Primer 1 和 2 及 Primer 3 和 4 分别用 PCR 扩增出 CTB 编码区(312 bp, 不含终止密码子)及 VP6 基因的 5'端片段(213 bp, 从起始密码子 ATG 到 VP6 基因中的单一 DraI 切点序列 TTATAA)。由于 Primer 2 和 Primer 3 中分别含有编码铰链区 GPGP 的 12 个碱基的反义和正义核苷酸序列, 所以利用 Primer 1 和 4 通过重组 PCR 获得了 CTB 基因和 VP6 基因 5'片段的融合 DNA CTBV6_s, 经测序验证了其序列的正确性。将其与 VP6 基因的 3'端片段(从 DraI 切点到 EcoRI 切点)拼接后获得了 CTB-VP6 融合基因(1.5 kb), 克隆到 pET30a(+)载体上。经菌落 PCR 和酶切鉴定, 证明 pET-CTBV6 构建正确(图 1)。

2.2 融合蛋白在大肠杆菌中的表达

CTB 和 A 组轮状病毒 VP6 蛋白分子量分别为 11.4 kD 和 45 kD, CTB-VP6 分子量理论值应为 56 kD。SDS-PAGE 分析含 pET-CTBV6 的大肠杆菌 BL21 (DE3) 的蛋白表明, 融合蛋白分子量与预期结果一致, 为 56 kD 左右。表达产物主要以包涵体形式存

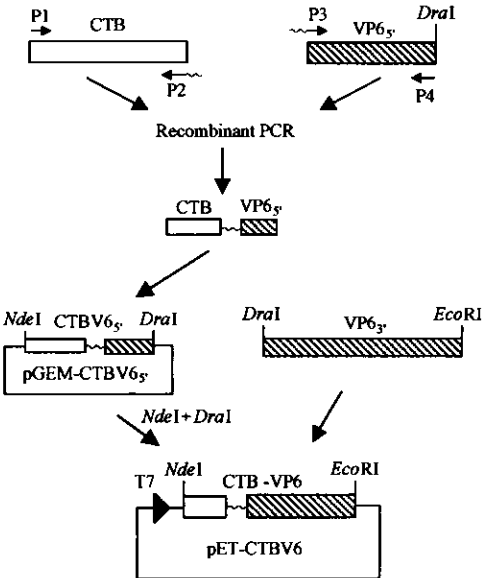


图 1 原核表达载体 pET-CTBV6 的构建

Fig.1 Construction of the expression vector pET-CTBV6
The wavy line represents the 12 nucleotides coding for the hinge peptide
The filled-triangle in pET-CTBV6 stands for the T7 promoter

至,上清中未见表达(图 2)。以牛血清白蛋白为标
准蛋白,将电泳后凝胶中经考马斯亮蓝染色得到的
蛋白带用 Master-Tools 软件分析,CTB-VP6 融合蛋白
与细胞总蛋白的 15%。

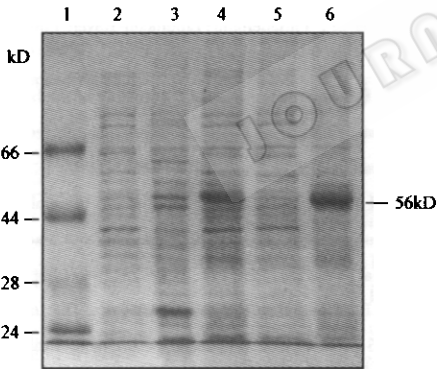


图 2 CTB-VP6 融合蛋白在大肠杆菌中的诱导表达
Fig.2 Expression of CTB-VP6 fusion protein in *E. coli*

1. Protein molecular weight marker;
2~3. Sonicate supernatant(Lane 2) or pellet(Lane 3) of
BL-21/pET-CTBV6 before induction;4~6. Total cell
lysate(Lane 4),sonicate supernatant(Lane 5) or sonicate
pellet(Lane 6) of BL-21/pET-CTV6 after induction
Protein samples are resolved in 10% SDS-PAGE

对 CTB-VP6 的工程菌进行了诱导温度、诱导时
间及 IPTG 浓度变化对表达量影响的实验。在其他
条件不变的情况下,在 20 ℃诱导时,融合蛋白表达
量很低;28 ℃诱导时,融合蛋白虽为包涵体但表达
量不高;37 ℃诱导时,表达量大大增加。故采用

37 ℃诱导,收集包涵体。诱导时间在 5 h 之后表达
量不再提高。所以,诱导时间以 4 h 为宜。IPTG 浓
度增加到 0.6 mmol/L 之后,再提高浓度对表达量无
影响。因此,采用 37 ℃、IPTG 浓度为 0.6 mmol/L、诱
导培养 4 h 后收集菌体。此条件下每升大肠杆菌培
养液中融合蛋白收获量最大,可达 120 ~ 150 mg。

2.3 融合蛋白的纯化

以包涵体形式存在的融合蛋白用含 8 mol/L 尿
素的缓冲液变性之后经阳离子交换层析纯化,收集
洗脱组分,再经透析复性。SDS-PAGE 后用考马斯亮
蓝染色检查蛋白的纯化和复性。蛋白条带扫描后经
Master-Tools 软件分析,表明复性后得到的 CTB-VP6
纯度可达 90% 以上(图 3)。

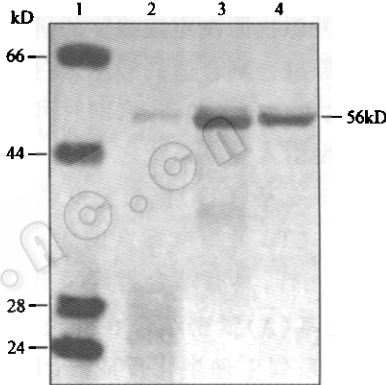


图 3 CTB-VP6 蛋白纯化及复性

Fig.3 Purification and renaturation of CTB-VP6 fusion protein
1. Protein molecular weight marker; 2. Flow-through of cation exchange
column; 3. CTB-VP6 eluted by NaCl; 4. Renatured CTB-VP6

2.4 融合蛋白的抗原性检测

用兔抗 CT 抗体和豚鼠抗轮状病毒高价血清分
别对融合蛋白进行 Western blot 分析,在 56 kD 左右
都呈现特异性的条带。证明融合蛋白 CTB-VP6 保
留了 CTB 和 VP6 的双重抗原性(图 4)。

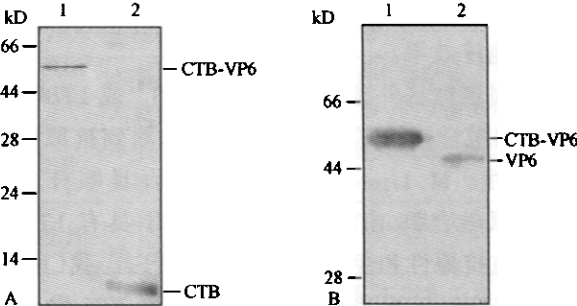


图 4 融合蛋白 CTB-VP6 的 Western blot 检测

Fig.4 Western blot analysis of the CTB-VP6 fusion protein
A. Western blot probed with anti-CT antibody: 1. CTB-VP6;
2. CTB(Sigma); B. Western blot probed with anti-rotavirus serum:
1. CTB-VP6; 2. VP6(expressed in baculovirus system)

2.5 CTB-VP6 的 G_{M1} 结合活性

G_{M1} -ELISA 分析表明,复性后的融合蛋白保留了 CTB 的 G_{M1} 结合活性。而同一个样品在经过加热变性之后,结合 G_{M1} 的能力大大下降(表 1)。

表 1 G_{M1} -ELISA 法测定融合蛋白的 G_{M1} 结合活性

Table 1 Detection of G_{M1} -binding activity of the fusion protein^{*}

Sample	CTB	CTB boiled	CTB-VP6	CTB-VP6 boiled
OD_{405}	0.735 ± 0.035	0.212 ± 0.021	0.450 ± 0.011	0.063 ± 0.006

* All assays were conducted in hexaplicates

3 讨 论

近年来人们越来越重视多肽衍生疫苗的发展,融合蛋白作为外源抗原决定簇载体的研究也方兴未艾。将相关抗原融合到合适的载体蛋白上具有毒性小、表达和纯化相对容易的特点,同时可将融合的多肽以确定的构型引入免疫系统之中。

霍乱毒素 B 亚基(CTB)作为免疫载体的应用越来越受到重视。CTB 是霍乱毒素的无毒亚单位,它与 *E. coli* LTB 一样,具有结合神经节苷脂 G_{M1} 的功能,可使毒性亚基(A)紧密结合在肠道粘膜细胞表面,进而引起一系列生理生化反应。CTB 是很好的口服和鼻粘膜免疫剂,当用做口服抗原时它可引起消化道粘膜产生分泌型抗体,同时诱导出血清中的抗体。另外,CTB 还可作为某些外源多肽的稳定载体。当它与化学耦联或基因融合的抗原同时进入体内之后,会激起融合表位抗原的免疫原性,使机体产生强烈的免疫反应,有可能达到免疫保护作用^[8]。通过 G_{M1} -ELISA 实验可以看出,复性后的融合蛋白与神经节苷脂具有较强的结合能力。这是 CTB 作为免疫载体的重要功能,利用这一特异的相互作用,可以使融合蛋白更易与消化道粘膜作用,产生更强的免疫效果。

有报道称将外源基因融合到 CTB^[9] 或 LTB^[10] 的 5'端得到融合蛋白的表达,但没有检测到抗原性或免疫原性。M. Lipscombe 等人^[11] 将百日咳杆菌的 P.69 抗原融合到 LTB 的 C 端,得到了具有 LTB 和 P.69 双重抗原性和免疫原性的融合蛋白。我们参考他们的方法,首次将轮状病毒的完整 VP6 融合到 CTB 的 C 端,得到了具有良好抗原性并保留了 CTB G_{M1} 结合活性的融合蛋白。另外,在融合时将一个 GPGP 铰链插入到 CTB 与 VP6 蛋白之间,这一四肽结构可以减少两个蛋白之间的刚性阻碍,帮助分子

进行正确折叠。同时, GPGP 碱基的稀有性可使翻译过程出现小小的停顿,有助新生肽链折叠出正确构型。

天然的 VP6 蛋白具有很强的抗原性,是诊断试验中检测到的主要抗原。虽然大多数的报道认为它不能诱导中和抗体的产生,但 VP6 可引起机体产生保护性抗体。另外,它还能稳定 VP4 和 VP7 组成的病毒样颗粒^[4],并增强机体对 VP4 和 VP7 的免疫应答作用^[3]。因此,有人用 VP6 作为免疫载体进行轮状病毒的保护性免疫^[12]。将病毒性抗原融合于 CTB 或 LTB 这样的免疫载体早有报道,而 Ramon A. Gonzalez 等人曾经将轮状病毒 VP4 的一段 17 个氨基酸的中和表位与 CTB 融合,得到了具有生物活性的融合蛋白^[8]。我们将完整的 VP6 与 CTB 融合,获得了融合蛋白的表达,具有两者的抗原性。今后可以同样将轮状病毒的中和性抗原(VP4 和 VP7)与 CTB 基因进行融合表达,为进一步尝试构建预防腹泻病原的多价联合疫苗打下基础。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Bajolet O, Chippaux-Hyppolite C. Rotavirus and other viruses of diarrhea. *Bull Soc Pathol Exot*, 1998, **91**(5pt 1 ~ 2): 432 ~ 437
- [2] Kapikian A Z, Chanock R M. Rotavirus. In: Virology, 3rd ed. Fields B N *et al.* Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996, pp. 1657 ~ 1708
- [3] Sabara M, Parker M, Aha P *et al.* Assembly of double-shelled rotavirus-like particles by simultaneous expression of recombinant VP6 and VP7 proteins. *J Virol*, 1991, **65**: 6994 ~ 6997
- [4] Redmond M J, Ijaz M K, Parker M D *et al.* Assembly of recombinant rotavirus proteins into virus-like particles and assessment of vaccine potential. *Vaccine*, 1993, **11**: 273 ~ 281
- [5] Esquivel F R, Lopez S, Guitierrez-X L *et al.* The internal rotavirus protein VP6 primes for an enhanced neutralizing antibody response. *Archives of Virology*, 2000, **145**: 813 ~ 825
- [6] LI G H(李国华), QIAN Y(钱渊), HE X J(何湘君) *et al.* Nucleotide sequence of the VP6 gene of group A rotavirus field strain and the expression in baculovirus expression system. *Chinese Journal of Virology*(病毒学报), 1999, **15**: 231 ~ 237
- [7] MA Q J(马清钧), LIU C X(刘传喧), YU X Q(于秀琴) *et al.* B subunit of cholera toxin produced in *Escherichia coli*. *Science in China*(中国科学, B 辑), 1991, **34**: 274 ~ 280
- [8] Gonzalez R A, Sanchez J, Holmgren J *et al.* Immunological characterization of a rotavirus-neutralizing epitope fused to the cholera toxin B subunit. *Gene*, 1993, **133**: 227 ~ 232
- [9] Dertzbaugh M T, Macrina F L. Plasmid vectors for constructing translational fusions to the B subunit of cholera toxin. *Gene*, 1989, **82**: 335 ~ 343
- [10] Schodel F, Will H. Construction of a plasmid for expression of foreign

epitopes as fusion proteins with subunit B of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Infect Immun*, 1989, **57**:1347 ~ 1350

[11] Lipscombe M, Charles I G, Roberts M *et al*. Intranasal immunization using the B subunit of the *Escherichia coli* heat-labile toxin fused to an epitope of the *Bordetella pertussis* P.69 antigen. *Mol Microbiol*, 1991, **5**(6):1385 ~ 1392

[12] Redmond M J, Ohmann H B, Hughes H P A *et al*. Rotavirus particles function as immunological carriers for the delivery of peptides from infectious agents and endogenous proteins. *Molecular Immunology*, 1991, **28**:269 ~ 278

A Fusion Protein of Rotavirus VP6 and Cholera Toxin B Subunit: Expression in *Escherichia coli* and Analysis of Biological Activities

GUO Ting-Xia¹ FANG Rong-Xiang^{2*} LI Guo-Hua² QIAN Yuan²

¹ (Laboratory of Plant Biotechnology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

² (Capital Institute of Pediatrics, Beijing municipal Laboratory of Infection and Immunity, Beijing 100020, China)

Abstract Rotavirus infection is a major cause of dehydrating diarrhea in infants worldwide. The non-toxic cholera toxin B subunit (CTB), known as an immunomodulatory carrier, might help to stimulate mucosal immune response when coupled to rotavirus antigens in oral immunization. Here we report for the first time the construction of a translational fusion of CTB gene 5' to the VP6 gene of a human rotavirus A (field strain T114), and expression of the CTB-VP6 fusion protein in *E. coli* BL21 (DE3). The expressed fusion protein has a molecular weight of 56 kD, as expected, and accounts for about 15% of the total *E. coli* protein. Western blottings with the hyperimmune serum against rotavirus strain WA and the antibody against cholera toxin indicated that the fusion protein retains the antigenicity identical to the native CTB and VP6. The G_{M1}-ELISA analysis proves that the renatured CTB-VP6 has strong affinity for G_{M1} ganglioside.

Key words rotavirus, VP6, cholera toxin B subunit, fusion protein expression, antigenicity

Received: May 16, 2001
* Corresponding author. Tel: 86-10-62548243; Fax: 86-10-62560912; E-mail: fangrx@sun.im.ac.cn

科学出版社生物类图书精品推荐

书 名	作(译)者	定价	出版时间	备 注
微生物生物学	Madigan, Martinko, Parker 著, 杨文博等译	160	2001 年 8 月	Brock Biology of Microorganisms 是国外经典微生物学教材, 本书为其第八版。
医学遗传学原理	T. D. Gelehrter, F. S. Collins, David Ginsburg 著, 孙开来等译	42	2001 年 2 月	本书作者之一是世界著名遗传学家, 美国 NIH 人类基因组研究所主任 F. S. Collins。
高级分子生物学要义	R. Twyman 著, 陈淳等译	55	2000 年 12 月	本书按参考手册的体例编写, 内容涵盖分子生物学各主要领域。
分子生物学(英文影印版)	Robert F. Weaver	77	2000 年 8 月	本书作者为美国著名分子生物学家。本书配有大量背景、图片和参考资料, 英文清晰简练。
细胞实验指南(上、下)	D. L. Spector, R. D. Goldman, L. A. Leinwand 著, 黄培堂译	220	2001 年 2 月	本书为论述细胞学实验集大成者, 与《分子克隆实验指南》齐名。
最新分子生物学实验技术	梁国栋	58	2000 年 12 月	本书重点介绍分子生物学及生物技术的新方法、新技术。
体外培养的原理与技术	薛庆善	148	2001 年 1 月	本书重点论述动物四大基本组织的各种细胞以及特殊类型组织细胞的体外培养原理和技术。

即日起, 欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书。凡购书者免邮费, 且可享受各种折扣优惠。请按以下方式联系我们:
电话: 010-64011127, 64002234 传真: 010-64034622 电子邮件: directselling@sina.com
通讯地址: 北京东黄城根北街 16 号 科学出版社 邮政编码: 100717 联系人: 卢秀明
同时欢迎访问生物编辑部主页: <http://spbio.yeah.net> 和网上售书合作伙伴: <http://www.biogene.com.cn>。