

# 斜带石斑鱼神经坏死病毒主衣壳蛋白的原核表达与纯化<sup>\*</sup>

陈晓艳<sup>1,2</sup>, 翁少萍<sup>1</sup>, 殷志新<sup>1</sup>, 何建国<sup>1</sup>

(1. 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275;

2. 暨南大学生物工程学系, 广东 广州 510632)

**摘要:** 将含有斜带石斑鱼 *Epinephelus coioides* 神经坏死病毒 (orange-spotted grouper nervous necrosis virus, OGNNV) 主衣壳蛋白 (major capsid protein, MCP) 基因的重组表达质粒载体 pET32a-MCP 转化到大肠杆菌 BL21 (DE3) 中进行融合表达, 经 SDS-PAGE 分析和 Western blot 鉴定, 证实了重组大肠杆菌融合表达了斜带石斑鱼神经坏死病毒主衣壳蛋白。表达的融合蛋白主要以不可溶的包涵体形式存在, 提取的包涵体中融合蛋白含量占 60% 以上, 经柱层析纯化蛋白, 纯化度达 90% 以上。

**关键词:** 斜带石斑鱼 *Epinephelus coioides*; 神经坏死病毒; 主衣壳蛋白; 原核表达

**中图分类号:** Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2005) 06-0083-04

鱼类病毒性神经坏死病 (viral nervous necrosis, VNN) 是由诺达病毒科 Nodaviridae 的  $\beta$  诺达病毒属 *Betanodavirus* 的种类感染而致的一种传染病, 海水鱼类的仔稚鱼易受感染, 感染死亡率很高。目前, 除非洲以外, 其他各大洲均有海水鱼类受到该病毒感染的相关报道<sup>[1-4]</sup>, 受感染的鱼类达 40 余种<sup>[2,3]</sup>。我国人工养殖石斑鱼类已有近 20 a 的历史, 广东、福建、海南等沿海地区均有相当规模的网箱养殖。近年来由于养殖密度增高, 鱼的病害日益严重。其中, 病毒性神经坏死病是严重危害鱼苗的重大病害之一。

斜带石斑鱼 *Epinephelus coioides* 是我国重要的海水养殖品种, 由于受神经坏死病毒 (nervous necrosis virus, NNV) 感染, 使育苗生产造成极大损失<sup>[2,3]</sup>。目前对于此病毒病还没有特效药物, 主要以预防为主, 研制抗病毒疫苗是最有效的防治手段之一。本文将斜带石斑鱼神经坏死病毒 (orange-spotted grouper nervous necrosis virus, OGNNV) 主衣壳蛋白 (major capsid protein, MCP) 基因在大肠杆菌中进行了融合表达, 以为研制该病毒的疫苗打下基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 重组质粒与菌株 含 OGNNV MCP 基因的重组

质粒 pET32a-MCP 由本实验室构建<sup>[5]</sup>。表达受体菌 BL21(DE3) 由南方医科大学彭红娟博士惠赠。

1.1.2 试剂 抗狼鲈神经坏死病毒单克隆抗体 hc3 由 Aquatic Diagnostics Ltd. 公司赠送; 羊抗鼠 IgG-Ap 购自华美生物工程公司。Ni-NTA conjugate 购自 Invitrogen 公司, IPTG 购自 Gibco BRL 公司, LB 培养基购自 Oxoid LTD., 其它试剂均为国产分析纯。

### 1.2 方法

1.2.1 大肠杆菌 BL21/pET32a-MCP 重组菌的获得 提取重组表达载体 pET32a-MCP 的质粒 DNA, 转化大肠杆菌 BL21 感受态细胞, 次日挑取转化 LA 平板上长出的单菌落, 即为含 OGNNV MCP 基因的原核重组菌 BL21/pET32a-MCP。

1.2.2 融合蛋白表达及 SDS-PAGE 分析 挑取转化平板上长出的阳性菌落于 LA 液体培养基中 37 °C 活化过夜, 次日按照 1% (V/V) 的比例转接于新鲜的 LA 液体培养基中, 培养至  $A_{600}$  约为 0.6~1.0 时, 加入 100 mmol/L IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 继续培养 2~3 h。取培养后的菌液 1 mL 12 000 r/min 离心 1 min 收集菌体, 进行 SDS-PAGE 分析。

1.2.3 融合蛋白的 Western blot 鉴定 SDS-PAGE 电泳结束后, 将其蛋白转移至硝酸纤维素膜上, 按《分子克隆实验指南》和 Invitrogen 公司《Western-

<sup>\*</sup> 收稿日期: 2004-12-08

基金项目: 国家“863”计划资助项目 (2003AA603011); 广东省团队基金资助项目 (20023002); 广东省重大专项基金资助项目 (2001A305030202)

作者简介: 陈晓艳 (1972年生), 女, 博士; 通讯联系人: 翁少萍, E-mail: shaopingwh@163.net

blot Kit》说明书的方法进行 Western blot 分析。

1.2.4 融合蛋白的可溶性分析 诱导重组菌 BL21 进行表达，离心收集菌体；在沉淀的菌体中加入适量的 1×PBS 使之重悬，冰浴中进行超声波处理至菌液变澄清为止，12 000 g，4 ℃下离心 15 min；将沉淀和上清进行 SDS PAGE 分析。

1.2.5 包涵体的粗提和洗涤 参照《分子克隆实验指南》的方法进行。

1.2.6 融合蛋白的纯化 将洗涤后的包涵体用含 8 mol/L 尿素的 PBS 缓冲液溶解包涵体，经 Ni-NTA-Agarose 柱层析纯化融合蛋白，用透析液透析 36 ~ 48 h 后，取 10 μL 进行SD PAGE 分析。

2 结 果

2.1 融合蛋白表达与鉴定

SDS-PAGE（图 1）和 Western-blot（图 2）结果均显示在相对分子量约  $55.3 \times 10^3$  处有一条特异性表达带。OGNNV MCP 基因编码的氨基酸序列理论相对分子量为  $37 \times 10^3$ ，原核表达载体 pET32a 在起始密码子与多克隆位点之间融合了一段多肽与目的基因一起融合表达，表达的融合蛋白分子量是二者之和，约为  $55.3 \times 10^3$ 。SDS-PAGE 和 Western-blot 结果表明，OGNNV MCP 基因在重组菌 BL21 中得到了正确表达。凝胶薄层扫描显示， $55.3 \times 10^3$  带占约总蛋白含量 27.8%。

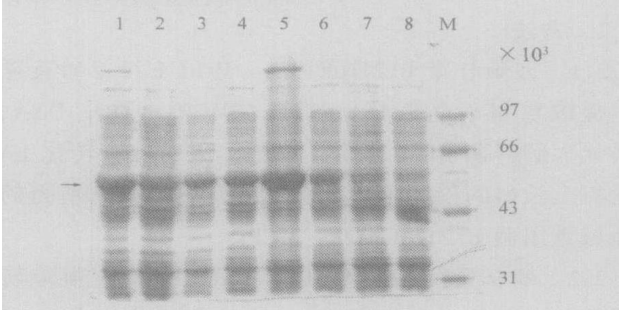


图 1 重组菌总蛋白的 SDS-PAGE 分析（箭头示融合蛋白带）

Fig 1 SDS-PAGE analysis of total proteins of recombinant bacteria (arrowhead)

1~7: 重组菌经 IPTG 诱导表达后的总蛋白；8: 重组菌未经 IPTG 诱导表达的总蛋白；M: 蛋白质标准相对分子量

2.2 表达产物的可溶性分析

诱导表达后，细胞经超声处理，上清与沉淀分别进行 SDS-PAGE，结果显示目的蛋白大部分在超声后的沉淀中，表明表达产物主要以不可溶的包涵体形式存在（图 3）。

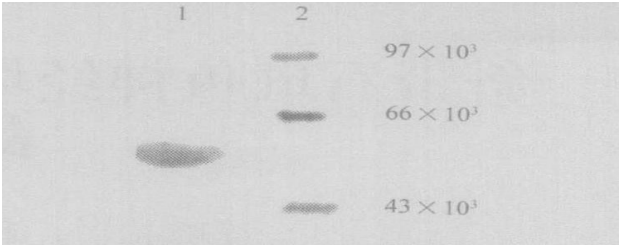


图 2 Western-blot 分析

Fig 2 Western blot analysis of total proteins of recombinant bacteria

1: 重组菌总蛋白 的 Western blot 分析；2: 蛋白质标准相对分子质量

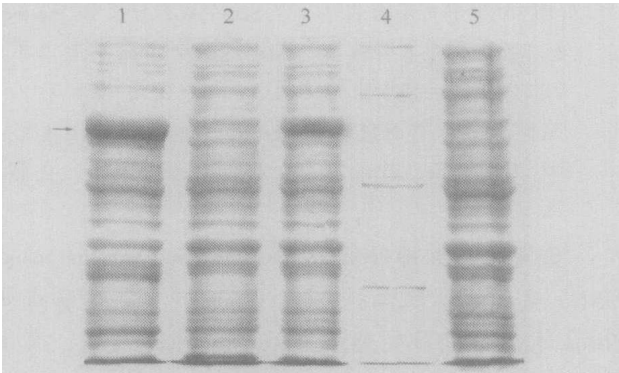


图 3 重组菌表达融合蛋白的可溶性分析（箭头示融合蛋白带）

Fig 3 SDS PAGE analysis of proteins in supernatant and precipitation after sonication of the recombinant bacteria. (Fusion protein is showed by arrow)

1: 重组菌经 IPTG 诱导表达后的总蛋白；2: 重组菌诱导表达后经超声波处理的上清液；3: 重组菌诱导表达后经超声波处理的沉淀；4: 蛋白质标准相对分子质量；5: 重组菌未经 IPTG 诱导表达的总蛋白

2.3 包涵体的提取

菌体经溶菌酶和超声破碎，离心后去除大部分可溶菌体蛋白，从图中可见。再用含 TritonX-100 或尿素溶液洗涤，可进一步去除杂蛋白和其它杂质，融合蛋白在包涵体中的含量可达 60% 左右（图 4）。

2.4 融合蛋白的纯化

将包涵体完全溶解后，加入 Ni-NTA-Agarose 混匀，用层析柱分离纯化融合蛋白，透析后进行 SDS-PAGE 分析，结果如图 4 所示，图中可见，融合蛋白的纯化度可达 90% 以上。

2.5 重组菌的高效表达

重组菌可在较宽的条件范围生长、表达融合蛋白，但从经济、方便的角度考虑，重组菌生长和表达融合蛋白最适的条件为：pH 7.0 的 LA 培养基中添加  $w=0.5\%$  的葡萄糖，37 ℃培养，当  $A_{600}$  达到 0.8~1.0 时，加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L，诱导 2~3 h。

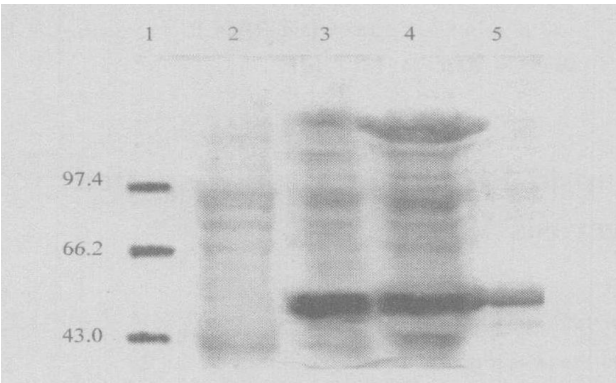


图 4 包涵体和纯化融合蛋白的 SDS—PAGE 分析(箭头示融合蛋白带)

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of inclusion bodies and purified recombinant proteins(Fusion protein is showed by arrow)

1: 蛋白质标准相对分子质量; 2: 重组菌未经 IPTG 诱导表达的总蛋白; 3: 包涵体; 4: 重组菌经 IPTG 诱导表达后的总蛋白; 5: 纯化的融合蛋白

3 讨 论

Nishizawa 等<sup>[6]</sup> 根据神经坏死病毒 MCP 基因将其分为 4 种血清型, 并且认为这 4 种血清型的 NNV 具有大量相同的抗原决定位点, SJNNV (striped jack NNV) 抗原决定位点在 MCP 基因编码的氨基酸序列中呈线性排列。其中 254—256 位的氨基酸残基是主要抗原决定位点, 也是区别 4 种血清型 NNV 最重要的抗原决定位点之一。由此可见, NNV 的主衣壳蛋白在病毒感染动物过程中以及引起动物保护性抗体产生起重要作用<sup>[7]</sup>。因此将病毒 MCP 基因重组表达, 研制抗病毒疫苗成为可能。Tanaka 等<sup>[8]</sup> 将 SJNNV 的 MCP 基因在大肠杆菌中进行了融合表达, 提取包涵体免疫动物后, 用不同滴度的病毒液进行攻毒。低剂量病毒攻毒组的相对存活率达 69%~88%, 平均为 78.5%, 高剂量病毒攻毒组的相对存活率为 35%~37%。Huang 等<sup>[9]</sup> 以 GGNNV (greasy grouper NNV) 的 MCP 基因重组融合表达蛋白为抗原, 建立了间接 ELISA 方法, 用于检测鱼血液中抗 NNV 抗体以此来判断鱼体是否受到 NNV 感染。本研究中表达 OGNNV MCP 基因的目的是用表达的目的蛋白作为抗原刺激免疫动物产生抗体。因此, 在选择表达系统时, 采用能够获得大量目的蛋白而且易于纯化表达产物的大肠杆菌表达系统。将构建好的重组质粒 pET32a—MCP 转化宿主 BL21 (DE3) 感受态细胞, 进行表达。经 SDS—PAGE 分析, 重组菌比空载体菌多出一条相对分子质量约为  $55.3 \times 10^3$  的带, 而且含量较多。进一步经 Western—blot 鉴定, 该条带可与 Ni—NTA 偶联物特异性的结合, 并且能特异性的与抗狼鲈神经坏死病毒单克

隆抗体发生反应, 证实了  $55.3 \times 10^3$  带为含有目的蛋白的融合表达产物。由于 pET32a 载体上带有一段编码硫氧还蛋白的序列和 6 个组氨酸标签序列与插入的目的基因一起融合表达, 因此表达产物的相对分子质量是三者之和, 约  $55.3 \times 10^3$ , 比目的蛋白相对分子质量大  $18.3 \times 10^3$ 。

重组表达产物经可溶性分析, 结果表明融合蛋白在宿主菌中主要以不可溶状态存在, 即包涵体。我们采用溶菌酶和超声破碎相结合的方法提取包涵体, 用温和去垢剂 Triton X—100 和低浓度的尿素洗涤包涵体, 经 SDS—PAGE 分析, 结果显示, 在提取的包涵体中融合蛋白约占 60% 以上。将提取的包涵体用 8 mol/L 尿素溶解, 经 Ni—NTA—Agarose 柱层析纯化融合蛋白, 得到融合蛋白的纯度达 90% 以上, 适合下一步提取抗原制备多克隆抗体和研制疫苗免疫动物。

参考文献:

[ 1 ] BREUIL G, MOUCHEL O, FAUVEL C, et al. Sea bass *Dicentrarchus labrax* nervous necrosis virus isolates with distinct pathogenicity to sea bass larvae[ J ]. Diseases of Aquatic Organisms, 2001, 45: 25—31.

[ 2 ] LIN L, HE J G, MORI K, et al. Mass mortalities associated with viral nervous necrosis in hatchery—reared groupers in the People's Republic of China[ J ]. Fish Pathology, 2001, 36(3): 186—188.

[ 3 ] MUNDAY B L, KWANG J, MOODY N. Betanodavirus infections of teleost fish: a review[ J ]. Journal of Fish Diseases 2002 25: 127—142.

[ 4 ] TAN C, HUANG B, CHANG S F, et al. Determination of the complete nucleotide sequences of RNA1 and RNA2 from greasy grouper (*Epinephelus tawina*) nervous necrosis virus, Singapore strain[ J ]. Journal of General Virology, 2001, 82: 647—653.

[ 5 ] 陈晓艳, 黄剑南, 吕玲, 等. 斜带石斑神经坏死病毒外壳蛋白基因克隆与序列分析[ J ]. 水产学报, 2004, 28(2): 183—188.

[ 6 ] NISHIZAWA T, TAKANO R, NUROGA K. Mapping a neutralizing epitope on the coat protein of striped jack nervous necrosis virus[ J ]. Journal of General Virology, 1999, 80: 3023—3027.

[ 7 ] HEGDE A, CHEN C L, QIN Q W, et al. Characterization, pathogenicity and neutralization studies of a nervous necrosis virus isolated from grouper, *Epinephelus tawina*, in Singapore[ J ]. Aquaculture, 2002, 213: 55—72.

[ 8 ] TANAKA S, MORI K, ARIMOTO M, et al. Protective immunity of sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* Thunberg, against experimental viral nervous necrosis[ J ]. Journal of Fish Diseases 2001, 24: 15—22.

[ 9 ] HUANG B, TAN C, CHANG S F, et al. Detection of noavirus coat protein-based ELISA and RT-PCR[ J ] . Journal of Fish Diseases 2001, 24: 131— 141.

in barramundi, *Lates calcarifer* (Bloch), using recombinant

Expression and Purification of Major Capsid Protein of Orange spotted  
Grouper Nervous Necrosis Virus

CHEN Xiao yan<sup>1,2</sup>, WENG Shao ping<sup>1</sup>, YIN Zhi xin<sup>1</sup>, ZHANG Min<sup>1</sup>, HE Jian guo<sup>1</sup>  
(1. School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China;  
2. Department of Biotechnology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

**Abstract:** Fish nodaviruses, members of the *Nodaviridae* family, are the causative agents of viral nervous necrosis (VNN) in many fishes. In this study, recombant expression vector pET32a MCP which inserted with major capsid protein gene (MCP) of orange spotted nervous necrosis virus (OGNNV) is transformed into BL21. SDS PAGE and Western blot analysis confirm that the transformed *E. coli* BL21 can express MCP protein fused with polytide. Fusion proteins are produced as inclusion bodies in BL21. The recombinant proteins are purified with above 90% purity level.

**Key words:** *Epinephelus coioids*; nervous necrosis virus; major capsid protein; prokaryotic expression

·简 讯·

本刊获“高校科技期刊先进集体”称号

由中国高校自然科学学报研究会组织的 2005 年全国高校科技期刊先进集体及优秀主编评选活动已经揭晓，最近在广西桂林举行了隆重的颁奖仪式。中山大学学报自然科学版被评为“高校科技期刊先进集体”。

近年来中山大学学报自然科学版团结协作，发挥团队作用，注重刊物的学术质量和编辑质量，在办刊中深化改革创新，走跨越式发展之路。经过多年努力，学报自然科学版从 10 年前全国高校学报排名 50 后一举跃居前列，在 2004 年教育部组织的优秀高校科技期刊评比中获一等奖，总得分列第 6 位。连续两届获国家期刊奖百种重点期刊称号，连续两次被评为“百种中国杰出学术期刊”。被美国《工程索引》(EI Compendex)列为收录的核心源期刊。

在本次评选活动中，学报自然科学版张楚民副主编荣获“高校科技期刊优秀主编”称号。

(本刊通讯员)