

牛病毒性腹泻病毒 E₂ 蛋白的亚细胞定位研究

刁乃超¹, 时 坤², 李健明², 李仲乐¹, 姜园园¹, 刘东旭¹, 王春风¹, 杜 锐^{2,3*}

(1. 吉林农业大学动物科技学院, 长春 130118; 2. 吉林农业大学中药材学院, 长春 130118;

3. 教育部动物生产及产品质量安全重点实验室, 吉林省梅花鹿生产与产品应用研究室, 长春 130118)

[收稿日期] 2016-01-19 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2016) 04-0001-04 [中图分类号] S

[摘 要] 为深入研究牛病毒性腹泻病毒 E₂ 蛋白的生物学功能, 了解其在哺乳动物细胞中的亚细胞定位情况, 采用 RT-PCR 扩增牛病毒性腹泻病毒 Changchun184 株 E₂ 基因, 将其克隆至真核表达载体 pcDNA3.1/V5HisA 中, 并进行酶切鉴定和测序分析, 将构建的重组质粒 pcDNA3.1/V5HisA-E₂ 经脂质体介导转染至 MDBK 细胞。继续培养 48 h 后, 在激光共聚焦显微镜下观察 E₂ 蛋白在细胞中的亚细胞定位情况。结果表明, E₂ 蛋白在细胞核与细胞质中均有表达, 且绿色荧光呈点状均匀分布。该研究为进一步研究牛病毒性腹泻病毒 E₂ 蛋白的相关功能奠定基础。

[关键词] 牛病毒性腹泻病毒; E₂ 蛋白; 亚细胞定位

Subcellular Localization Analysis of Bovine Viral Diarrhea Virus E₂ Protein

DIAO Nai-chao¹, SHI Kun², LI Jian-ming², LI Zhong-le¹, JIANG Yuan-yuan¹,

LIU Dong-xu¹, WANG Chun-feng¹, DU Rui^{2,3*}

(1. College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;

2. College of Chinese Medicine Material, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;

3. Key Laboratory of Animal Production, Product Quality and Security, Ministry of Education of the People's Republic of China, Laboratory of Production and Product Application of Sika Deer of Jinlin Province, Changchun 130118, China)

Abstract: This experiment was designed to make a thorough study on the biological function of bovine viral diarrhea virus E₂ protein by investigating its subcellular localization in mammalian cells. The E₂ gene fragments of Changchun184 were amplified by RT-PCR, cloned into eukaryotic expression vector pcDNA3.1/V5HisA, and then identified by restriction enzymes digestion and sequencing analysis. The subcellular location of E₂ protein in MDBK cells was observed by confocal laser scanning microscope after that the recombinant plasmid pcDNA3.1/V5HisA-E₂ was transfected into MDBK cells by lipofectin for 48 h. The results showed that the E₂ protein was expressed in both the nucleus and cytoplasm, and most of the green fluorescence was distributed in a speckled pattern. All of these results will be as a basis for the further research on E₂ protein's functions.

Key words: bovine viral diarrhea virus; E₂ protein; subcellular localization

基金项目: 国家自然科学基金(31372436); 科技部星火计划(2014GA660004)

作者简介: 刁乃超, 硕士, 从事经济动物疫病的研究

通讯作者: 杜 锐。E-mail: durui71@126.com

牛病毒性腹泻病毒(Bovine viral diarrhea virus, BVDV)为牛病毒性腹泻-黏膜病的病原,会引起牛发热、腹泻、急性慢性肠炎、怀孕母畜流产或产畸形胎、持续感染等临床症状。该病传染性强、感染率高,虽有疫苗应用但仍时常爆发。目前还没有治疗该病的特效药物^[1-3],因此应对其致病的分子作用机制进行深入研究,以期寻求预防和治疗该病的新途径。

蛋白质的代谢以及信号转导等生物过程都与其亚细胞定位密切相关。病毒蛋白与宿主细胞蛋白之间的相互作用是病毒致病的基础,成熟蛋白质必须在特定的细胞部位才能发挥其生物学功能^[4-5]。BVDV E₂蛋白是一种囊膜蛋白,为BVDV的主要保护性抗原,在参与BVDV与宿主细胞的识别、吸附和介导免疫中和反应等过程中起重要作用^[6-8]。但目前对E₂基因及E₂蛋白的研究主要集中在E₂基因的表达和E₂蛋白抗体的制备以及新型疫苗的研制方面^[9-11],在E₂蛋白与宿主细胞的确切分子致病作用机制方面鲜有相关报道。因此,本试验对BVDV E₂蛋白在哺乳动物细胞中的亚细胞定位进行了研究,旨在为进一步研究其生物学功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒、载体和细胞 牛病毒性腹泻病毒 Changchun 184 株为本实验室保存; pcDNA3.1/V5HisA 真核表达载体购于 Invitrogen 公司; *E. coli* DH5 α 菌株由本实验室保存; MDBK 细胞购自中国科学院上海细胞库。

1.1.2 主要试剂 DNA Marker DL 15000、DNA Marker DL 2000、DNA Polymerase、限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Xho* I、T₄DNA 连接酶,均购自 TaKaRa 生物工程有限公司;凝胶回收试剂盒、质粒抽提试剂盒,购自杭州维特洁生化技术有限公司;脂质体转染试剂盒购自 Promega 公司,鼠源 V5-tag Monoclonal Antibody 和 FITC 标记的羊抗鼠单抗购自 Proteintech 公司,HRP 标记的羊抗鼠 IgG 购自博士德生物公司。

1.2 方法

1.2.1 E₂ 基因的扩增与克隆 根据 GenBank 收录 E₂ (登录号: AF526380.1) 基因序列设计一对引物,上游引物 P1: 5'-GGAATTTCATGCTCCCAGCCTGTAAACCTGAC-3', 引入 *EcoR* I 酶切位点; 下游引物 P2: 5'-CCGCTCGAGTTAACCTAAGGTCGTTTGTCTCTG-3', 引入 *Xho* I 酶切位点, 扩增目的片段大小为 1122 bp, 引物由库美生物技术有限公司合成。采用 Trizol 方法, 提取 BVDV 基因组, 进行 RT-PCR 扩增, 反转录体系 10 μ L: MgCl₂ 2 μ L, 10 $\times$ RT Buffer 1 μ L, RNase Free dH₂O 3.25 μ L, dNTP Mixture 1 μ L, RNase Inhibitor 0.25 μ L, AMV 0.5 μ L, 下游引物 P2 0.5 μ L, 模板 1.5 μ L; 反转录条件: 30 $^{\circ}$ C 10 min, 42 $^{\circ}$ C 30 min, 95 $^{\circ}$ C 5 min, 5 $^{\circ}$ C 5 min, 一个循环。PCR 反应体系 40 μ L: 5 $\times$ PCR Buffer 10 μ L, DEPC 水 28.5 μ L, TaKaRa Ex Taq HS 1 μ L, 上游引物 P1 0.5 μ L。将 PCR 反应液加入到反转录产物中, 混匀, 按如下条件进行 PCR 反应。94 $^{\circ}$ C 30 s, 60.1 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 回收纯化后与 pGEM-T 载体连接, 转化到 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 经蓝白斑筛选后, 小量提取质粒, 进行酶切鉴定, 并送库美生物公司测序。

1.2.2 真核表达载体 pcDNA3.1/V5HisA-E₂ 的构建及鉴定 *EcoR* I 和 *Xho* I 分别对 pGEM-T-E₂ 和真核表达载体 pcDNA3.1/V5HisA 双酶切, 回收目的片段后, 用 T₄DNA 连接酶 16 $^{\circ}$ C 连接过夜, 转化到 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中, 37 $^{\circ}$ C 培养 12~16 h, 挑取重组质粒, 进行双酶切鉴定, 并将阳性重组质粒送库美生物技术有限公司测序。测序正确的质粒命名为 pcDNA3.1/V5HisA-E₂。

1.2.3 真核表达载体 pcDNA3.1/V5HisA-E₂ 的转染 将 MDBK 细胞接种到铺有盖玻片的 6 孔板中, 2.5 $\times 10^5$ ~ 3 $\times 10^5$ /mL, 待融合度达到 70% ~ 80% 时, 用 FuGENE HD 将重组质粒 pcDNA3.1/V5HisA-E₂ 和 pcDNA3.1/V5HisA 转染到 MDBK 细胞中, 同时设空白对照, 具体操作参照说明书。

1.2.4 间接免疫荧光检测 取转染 48 h 后 MDBK

细胞,用 PBS 洗 3 遍,每次 10 min,4% 多聚甲醛室温固定 12 min,PBS 洗 3 遍,5% 胎牛血清 37 ℃ 封闭 1 h,PBS 洗 3 遍,加入鼠抗 V5 标签抗体(1:200) 4 ℃ 过夜,用 4 ℃ 预冷的 PBS 洗 3 遍,加入 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 37 ℃ 孵育 1 h,用 4 ℃ 预冷的 PBS 洗 3 遍,DAPI 室温染核 3 min,甲醇漂洗后加入封片剂封片。用倒置荧光显微镜进行观察。

1.2.5 E_2 蛋白的亚细胞定位 将制备好的细胞爬片置于激光共聚焦显微镜下,观察 E_2 蛋白亚细胞定位情况。

1.2.6 pcDNA3.1/V5HisA- E_2 表达产物的 Western blot 分析 取转染 48 h 后 MDBK 细胞,弃去培养液,PBS 漂洗 3 次后加入裂解液,冰上裂解 30 min,将裂解液及细胞碎片收集于 1.5 mL EP 管中,12000 g 离心 10 min,取上清 20 μ L 进行 SDS-PAGE 电泳,湿转至 PVDF 膜后用脱脂奶粉封闭。抗体孵育:一抗为鼠抗 V5 标签抗体(1:20000) 4 ℃ 过夜,二抗为 HRP 标记羊抗鼠 IgG(1:3000) 37 ℃ 孵育 1 h,加入 ECL 显色液,用化学发光成像系统记录结果。

2 结果

2.1 E_2 基因的扩增和克隆 以提取 BVDV Changchun184 株总 RNA 为模板,进行 RT-PCR 扩增,获得 PCR 产物大小约为 1000 bp(图 1),与预期结果一致。*Eco*R I 和 *Xho* I 对 pGEM-T- E_2 双酶切,获得大小约为 1122 bp 的目的片段(图 2)。

2.2 真核表达载体 pcDNA3.1/V5-HisA- E_2 的构建 真核表达载体 pcDNA3.1/V5HisA- E_2 经 *Eco*R I 和 *Xho* I 双酶切后,获得片段大小正确的目的片段和载体片段(图 3)。DNA 测序结果表明, E_2 基因已经插入到 pcDNA3.1/V5HisA 载体中且方向正确,将其命名为 pcDNA3.1/V5HisA- E_2 。

2.3 E_2 蛋白间接免疫荧光检测 将制备好的细胞爬片置于倒置荧光显微镜下进行观察,可以观察到 DAPI 将细胞核染成蓝色(如图 4A 所示),表达 E_2 蛋白的 MDBK 细胞呈现绿色荧光(如图 4B 所示)。表明 pcDNA3.1/V5HisA- E_2 在 MDBK 细胞中成功表达。

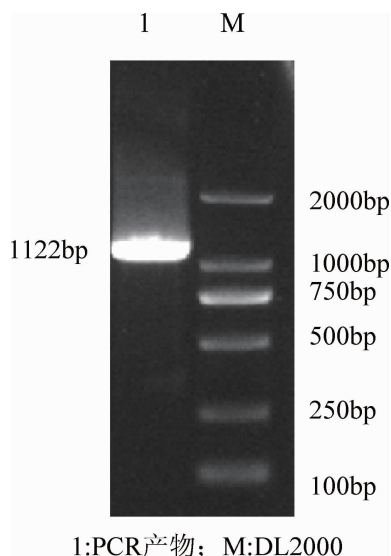


图 1 E_2 基因 PCR 扩增结果

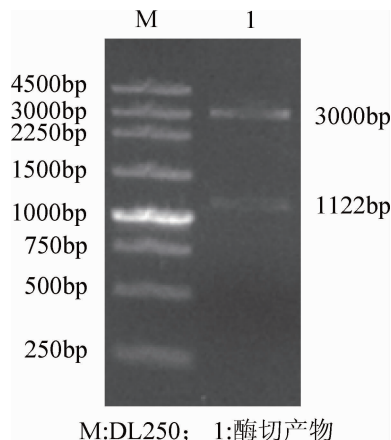


图 2 重组克隆载体的酶切验证

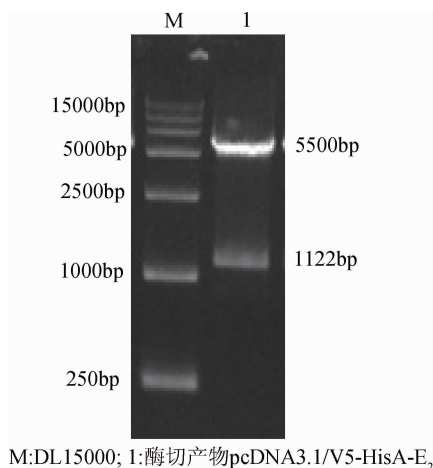


图 3 pcDNA3.1/V5HisA- E_2 重组质粒的酶切鉴定结果

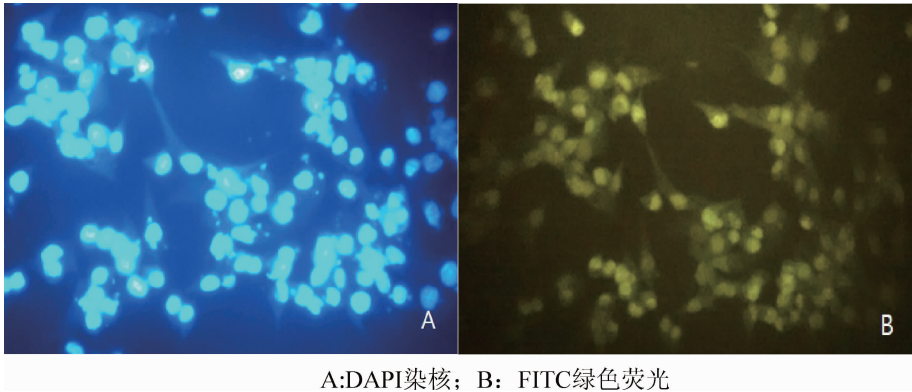


图4 pcDNA3.1/V5HisA – E2 蛋白间接免疫荧光结果

2.4 E₂ 蛋白的亚细胞定位分析 在激光共聚焦显微镜下进行观察(图 5A、B、C)未转染的 MDBK 细胞细胞核和细胞质中均未出现绿色荧光;转染 pcD

NA3.1/V5HisA – E₂ 的 MDBK 细胞(图 5D、E、F)细胞核上和细胞质中均呈现点状均匀分布的绿色荧光。

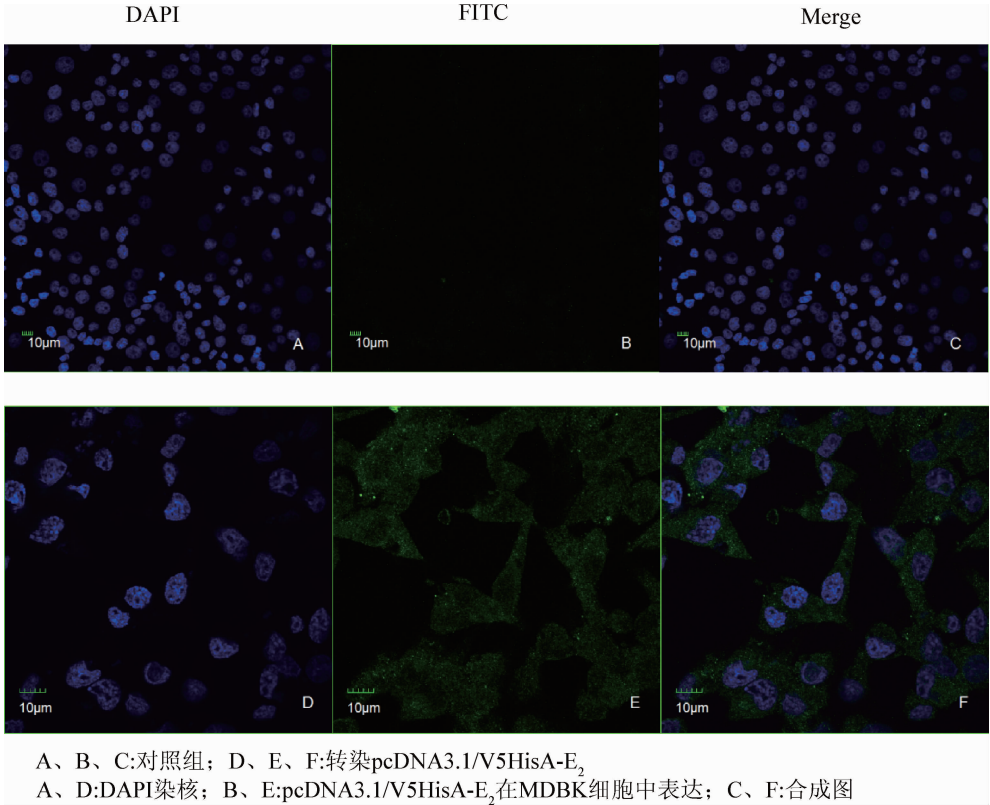


图5 pcDNA3.1/V5HisA – E2 蛋白的亚细胞定位情况

2.5 E₂ 蛋白 Western blot 检测 对转染细胞裂解后进行 Western blot 分析(图 6),转染 pcDNA3.1/V5HisA – E₂ 的 MDBK 细胞样品呈现单一的目的条带(泳道 3、4),大小与预期结果相符, pcDNA3.1/V5HisA 空载体(泳道 2)和空白对照(泳道 1)均无

条带,表明 E₂ 蛋白在 MDBK 细胞中正确表达。

3 讨论

本研究选择含有 V5 和 HisA 双标签的真核表达载体 pcDNA3.1/V5 – HisA 来研究目的蛋白的亚细胞定位情况,这与常用的含有绿色荧光蛋白

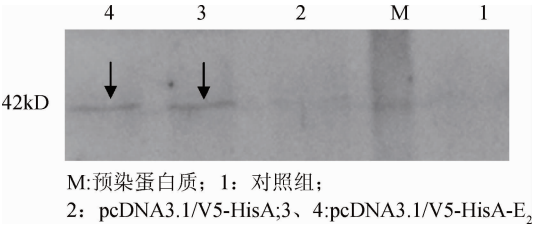


图6 pcDNA3.1/V5-HisA-E₂和pcDNA3.1/V5-HisA的Western blot分析

(GFP)标签的真核表达载体相比,能够更准确的显示出目的蛋白在细胞中的分布情况,因为V5-HisA双标签分子量(约2 kD)远小于GFP标签的分子量(约25 kD)^[12],能够克服因大的标签分子量对蛋白亚细胞定位产生的影响。

本试验选择MDBK细胞作为E₂蛋白表达和定位的对象,这更接近E₂蛋白所在的天然宿主细胞模式,更有利于后期E₂蛋白与宿主蛋白互作机制的研究。E₂蛋白在MDBK细胞中的表达时限由转染预试验确定,经脂质体介导转染的MDBK细胞,分别于转染后12、24、36、48、72 h用倒置荧光显微镜观察,结果显示在转染24 h后E₂蛋白开始表达,在转染48 h时达到峰值并趋于稳定,因此选择转染48 h的MDBK细胞做进一步分析。

激光共聚焦显微镜观察转染48 h的MDBK细胞,结果显示E₂蛋白在细胞核上和细胞质中均有表达,且绿色荧光大多呈点状均匀分布。此外,在细胞转染48 h后,转染有pcDNA3.1/V5HisA-E₂的MDBK细胞有少部分出现变圆、皱缩的形态变化,这在转染pcDNA3.1/V5-HisA空载体和正常MDBK细胞对照组中并没有出现,这很可能与E₂蛋白表达诱导MDBK细胞凋亡或自噬有关^[13]。本试验将pcDNA3.1/V5HisA-E₂转入MDBK细胞,通过激光共聚焦显微镜确定E₂蛋白定位于细胞质和细胞核中,为进一步筛选与E₂蛋白互作的宿主蛋白,研究二者在牛病毒性腹泻分子致病机制中的作用奠定了基础。

参考文献:

[1] 殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 2版. 北京:科学出版社,1997.

[2] 张丽颖,涂长春. 牛病毒性腹泻病诊断方法的研究进展[J]. 畜牧兽医科技信息,2004(5):17-19.

[3] 宫晓炜,曹小安,郑福英,等. 牛病毒性腹泻病毒感染的免疫应答研究进展[J]. 中国兽医科学,2012,42(11):1200-1205.

[4] 张松,黄波,夏学峰,等. 蛋白质亚细胞定位的生物信息学研究[J]. 生物化学与生物物理进展,2007,34(6):573-579.

[5] 刘宁. 猪瘟病毒核衣壳蛋白C亚细胞定位信号的鉴定[D]. 长春:吉林农业大学,2014.

[6] 范进江,薄新文,钟发刚. 牛病毒性腹泻病毒基因组结构与蛋白功能研究进展[J]. 动物医学进展,2008,29(5):68-72.

[7] 李佑民,刘振润,武银莲,等. 牛病毒性腹泻-黏膜病病毒株(长春184)的分离和鉴定[J]. 中国人民解放军兽医大学学报,1983,3(2):113-121.

[8] 李庆超,苗利光. 牛病毒性腹泻病毒研究进展[J]. 动物医学进展,2009,30(5):68-72.

[9] 王伟利,钱爱东,胡桂学,等. 地高辛标记核酸探针检测牛粘膜病病毒[J]. 中国兽药杂志,2000,34(5):1-4.

[10] 陈其兵,薛霜,漆世华,等. 牛病毒性腹泻-黏膜病病毒TaqMan荧光定量RT-PCR检测方法的建立及初步应用[J]. 中国兽药杂志,2012,46(4):4-6,47.

[11] 张云,郝俊伟,刘红娜,等. 牛病毒性腹泻-黏膜病病毒C24V株E0截短基因密码子优化及其在卡介苗中的表达[J]. 中国畜牧兽医,2014,41(3):71-76.

[12] 龚燕华. 蛋白质相互作用及亚细胞定位原理与技术[M]. 中国协和医科大学出版社,2010.

[13] Singh M, Fraefel C, Bello L J, et al. Identification and characterization of BICP27, an early protein of bovine herpesvirus 1 which may stimulate mRNA 3' processing[J]. Journal of General Virology, 1996, 77(4):615-625.

(编辑:李文平)