DOI [illegible] cnki [illegible]
河南 农业 科学

法氏囊B细胞λ轻链基因编码蛋白在大肠杆菌中的表达

宋海涛[1,2]，张　红[1,2,3]，王　丽[2]，段艳华[1,2]，乔松林[1,2]，李学伍[2]，赵光辉[1,2]，张改平[2*]
（1. 河南农业大学，河南 郑州 450002；2. 河南省动物免疫学重点实验室，河南 郑州 450002；
3. 河南教育学院，河南 郑州 450003）

摘要：为获得鸡λ轻链基因的表达蛋白，采用聚合酶链反应从鸡法氏囊B细胞cDNA文库中扩增出分泌表达蛋白的编码基因；用限制性内切酶消化后，插入克隆载体pUC19中。经PCR鉴定与序列测定证实后，以亚克隆法构建于原核表达载体PET43a的相应酶切位点。经过基因序列测定、*Bam*HⅠ和*Hind*Ⅲ双酶切鉴定证实克隆载体正确插入载体PET43a。转化宿主菌BL21(DE3)，经IPTG诱导、SDS－PAGE分析表明目的蛋白得到表达；且能与His－Taq单抗相结合。

关键词：传染性法氏囊；基因；蛋白；表达
中图分类号：S858.31　　文献标识码：A　　文章编号：1004－3268(2007)03－0109－03

Expression of Protein Encoded by λ Light Chain Gene of Bursal B Lymphocytes in *E. coli*

SONG Hai-tao[1,2], ZHANG Hong[1,2,3], WANG Li[2], DUAN Yan-hua[1,2], QIAO Song-lin[1,2], LI Xue-wu[2], ZHAO Guang-hui[1,2], ZHANG Gai-ping[2*]
(1. Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; 2. Henan Key Laboratory of Animal Immunology, Zhengzhou 450002, China; 3. Henan Institute of Education, Zhengzhou 450003, China)

Abstract: λ light chain gene encoding the expression protein was amplified by polymerase chain reaction(PCR) from infectious bursal B lymphocyte cDNA library, and inserted into the corresponding sites of vector pUC19 after digested by restriction endonuclease to construct protocaryon expression vector PET43a. Both nucleotide sequencing and *Bam*HⅠ and *Hind*Ⅲ digestion confirmed that λ light chain gene fragment encoding the target protein was correctly inserted into the vector. The recombinant plasmid was transformed into *E. coli* BL21(DE3) and induction by IPTG and SDS－PAGE indicated that the target protein was expressed.

Key words: Infectious bursal disease; Gene; Protein; Expression

鸡传染性法氏囊病(IBD)是由传染性法氏囊病毒(IBDV)引起的鸡的一种高度接触性传染病，最早发生于美国Delaware州的Gamboro地区，又称Gumboro病[1]，主要感染3～6周龄的青年鸡。病毒粒子直径约60 nm。组成病毒核衣壳的结构蛋白主要以三聚体形式存在[2]。在分类上属于双RNA病毒科的禽双RNA病毒属[3,4]。病毒在法氏囊的B淋巴细胞中迅速繁殖，损伤法氏囊的B淋巴细胞，引起严重的免疫抑制；从而导致疫苗免疫失败和继发感染的发生。试验构建表达载体，旨在为研究针

收稿日期：2006－11－02
基金项目：国家自然科学基金重点项目(30203270)
作者简介：宋海涛(1979－)，男，河南许昌人，在读硕士研究生，主要从事分子免疫学研究。
通讯作者：张改平(1960－)，男，河南内黄人，研究员，博士生导师，博士，主要从事动物免疫和分子生物学方面的研究。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

对该蛋白的单克隆抗体奠定基础，用于鸡传染性法氏囊病的试验研究。

1 材料和方法

1.1 材料

EX－Taq Premix 高保真酶、小量质粒 DNA 提取试剂盒购自 Takara 公司。T4 DNA 连接酶、*Bam*HⅠ和 H*ind*Ⅲ购自 Promega 公司。切胶回收试剂盒用 OMEGA EZNA™ Gel extraction kit made in USA。鸡 cDNA，*E. coli* JM109，PET43a，BL21(DE3)、辣根过氧化物酶标记的兔抗鼠二抗为河南省动物免疫学重点实验室保存。其他试剂均为进口分析纯。

1.2 法氏囊 B 细胞轻链基因的扩增、克隆及测序

PCR 反应根据 B 细胞轻链基因的全序列设计引物，P_1：含 *Bam*HⅠ酶切位点和起始码；P_2：含 H*ind*Ⅲ酶切位点和终止码，由大连 Takara 公司合成。PCR 反应体系为：P_1，P_2 各 1μL。模板cDNA 1μL，EX－Taq 酶 12.5μL，加双蒸水至总体积为 25μL。反应条件为：95℃变性 2min，94℃ 30s，58℃ 30s，72℃ 50s，共 30 个循环，再 72℃延伸 5min，扩增的结果用 1%的琼脂糖凝胶电泳进行鉴定，然后进行切胶回收。切下目的条带，纯化用 OMEGA EZNA™ Gel extraction kit made in USA 试剂盒进行。

取 PCR 产物和 T 载体，按 3∶1 的分子比混合，用 T4 连接酶进行连接，转化用低温 $CaCl_2$ 制备的 *E. coli* JM109 感受态细胞，然后涂布于含 AMP(100μg/μL)的 LB 固体平板上；从 LB 固体平板上随机挑取 5 个白色菌落，分别接种在 4mL 含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中，37℃振荡培养过夜，以质粒少量提取试剂盒提取质粒 DNA。把提取的质粒 DNA 进行 PCR 鉴定。然后进行 1%的琼脂糖凝胶电泳进行鉴定，用 DL2000 标准 Marker 作对照。观察到有约 630bp 大小的条带。将阳性菌液送上海生物公司进行测序。

1.3 表达载体的构建

将提取的阳性克隆质粒 DNA，用 *Bam*HⅠ和 H*ind*Ⅲ双酶切后(50μL 体系)，用 1%的琼脂糖凝胶电泳进行切胶纯化回收得到 630bp 大小的酶切产物；并与用相同酶切回收的 PET43a 质粒载体 DNA 进行连接，转化 BL21(DE3)感受态细胞。氨苄青霉素抗性筛选，所获阳性克隆用 *Bam*HⅠ和 H*ind*Ⅲ双酶切和 PCR 鉴定。重组质粒命名为 PET－R1，并送上海生物公司测序。

1.4 重组蛋白的表达

将载体 PET43a 和重组质粒 PET－R1 转化大肠杆菌 BL21(DE3)，挑取阳性菌落接种含 30μL/mL AMP 的 LB 培养基，37℃ 200r/min 振摇培养至对数生长期(A600＝0.5～0.6)，4℃冰箱过夜。次日将带有 PET43a 重组表达质粒的 BL21(DE3)菌液按 1∶100 的比例加入含有 AMP(30μg/mL)的 2× YT 液体培养基中，37℃振荡培养 2h 左右至 A600＝0.5～0.6，吸取 1mL 培养物作为未诱导对照。在剩余培养基中加入 100mmol/L IPTG 至终浓度 1.0mmol/L，37℃继续震摇培养 2～8h 作诱导表达，每隔 2h 吸取 1mL 诱导培养物。将收集的培养物于 4℃ 5000r/min 离心 10min，收集菌体；用 50μl PBS 重悬菌体，并加入 50μL 2× SDS－PAGE 电泳上样缓冲液，100℃变性 10min，进行 SDS－PAGE 电泳。

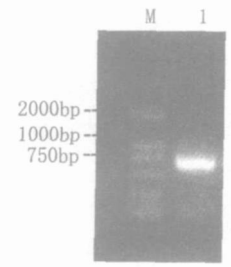
1.5 Western blot 鉴定

将表达蛋白的细菌裂解液和空质粒诱导菌液及重组表达质粒未诱导对照分别进行 SDS－PAGE 凝胶电泳分析，然后电转 PVDF 膜；将膜放入 PBST 中洗 6 次，每次 3min。用 5%脱脂牛奶封闭 4℃过夜，PBST 洗膜 3 次，加 His－Taq 单抗；加 1∶1000 稀释的辣根过氧化物酶标记的兔抗鼠 IgG 37℃孵育 2h，PBST 洗膜 6 次，每次 3min，放入 AEC 显色液显色，出现红色条带即用去离子水终止显色。

2 结果

2.1 目的基因 cDNA 克隆 PCR 扩增产物

经 1%琼脂糖凝胶电泳后，约在 630bp 处有 1 条特异带，其大小与预期结果相符(图 1)。



M：DL2000 DNA 分子量 marker；1：PCR 产物；

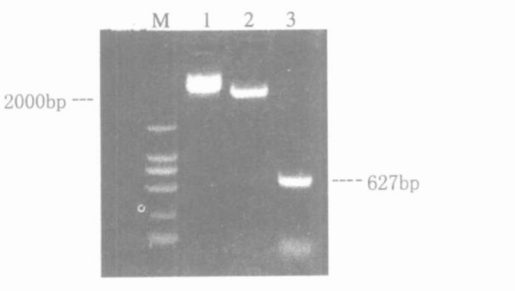
图 1 鸡λ 烃链基因的 PCR 扩增

2.2 PCR 鉴定

将经过 PCR 获得的目的片段与 T 载体相连接，转化 JM109 感受态细胞后，随机挑取 5 个白色

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

菌落摇菌(加氨苄青霉素 100mg/mL)。然后热裂解菌液做 PCR 鉴定,结果从中扩增出长度为 630bp 的目的片段。将阳性克隆扩大培养,用 Takara 公司的小量质粒 DNA 提取试剂盒提取质粒 DNA。然后分别将目的基因和 PET43a 质粒载体经双酶切后,用 OMEGA EZNATM Gel extraction kit made in USA 纯化试剂盒进行纯化。然后将目的片段与 PET43a 质粒载体按一定比例连接,转化 *E. coli* JM109 感受态细胞,所获阳性克隆摇菌提质粒后用 B*am*HⅠ和 H*ind*Ⅲ双酶切和 PCR 鉴定(图 2)。

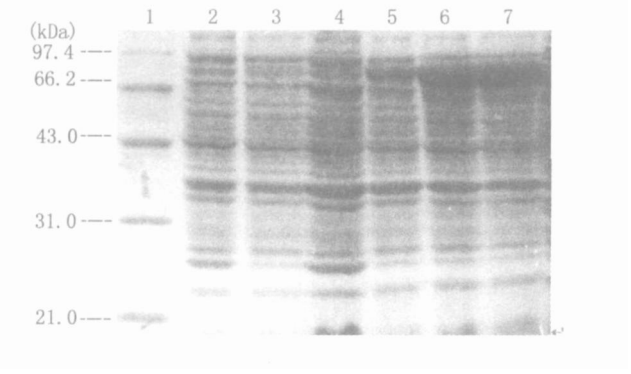


M. DL 2000; 1: PET43a 质粒; 2. 重组质粒酶切鉴定; 3. PCR 扩增到的外源片段

图 2 鸡λ轻链重组质粒的酶切鉴定

2.3 诱导蛋白的表达

重组质粒和空载体质粒转化 BL21 菌体诱导后 SDS-PAGE 电泳分析,结果在 66kDa 和 85kDa 处有 1 条特异带,和预期大小相符合(图 3)。

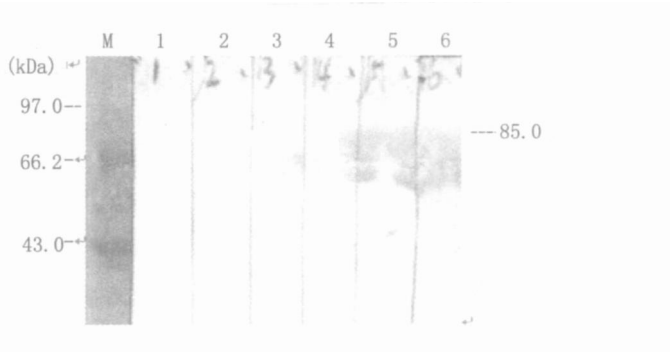


1. Marker; 2. 空质粒未诱导; 3. 重组质粒未诱导; 4. 空质粒诱导后 4h; 5. 重组质粒诱导后 2h; 6. 重组质粒诱导后 4h; 7. 重组质粒诱导后 6h

图 3 重组质粒表达前后的 SDS-PAGE 电泳分析

2.4 Western blot 鉴定

诱导蛋白通过半干式电转仪转印到 PVDF 膜上,与 His-Taq 单克隆抗体发生结合反应,结果在膜上出现一个大小为 85kDa 的蛋白印迹。而空质粒和重组质粒的诱导前裂解物,则没有出现蛋白印迹(图 4)。



M. Marker; 1. 空质粒未诱导; 2. 重组质粒未诱导; 3. 空质粒诱导后 4h; 4. 重组质粒诱导后 2h; 5. 重组质粒诱导后 4h; 6. 重组质粒诱导后 6h

图 4 重组鸡λ轻链的 Wstern blot 鉴定

3 讨论

本次试验采用 PCR 技术从鸡的法氏囊 B 细胞 cDNA 文库中扩增出λ轻链基因,试验所用基因是从全长中去掉信号肽的序列。全长 627 个碱基,包括 1 个完整的 ORF 编码 209 个氨基酸,表达蛋白的分子量约为 18.9kDa。该蛋白在表达过程中与表达载体上的 His-Taq, Nus-Taq 标签相结合,表达的蛋白可以通过切割酶的作用进行分离纯化。

通过基因重组的方法,将λ轻链基因(无信号肽区段)按正确的阅读框插入到 PET43a 原核表达载体多克隆位点处;经 IPTG 诱导[5],诱导菌体裂解物经 SDS-PAGE 电泳后有蛋白表达,并且该蛋白能够特异性的和 His-Taq 单克隆抗体发生结合反应。该蛋白的成功表达为下一步研制针对该蛋白的单克隆抗体打下了基础。

参考文献:

[1] Cosgrove A S. An apparently new disease of chicken avian nephrosis[J]. Avian Dis, 1962, 6: 385-389.

[2] Bottcher B, Kiselev N A, Stel'Mashchuk V Y, *et al*. Three dimensional structure of infectious bursal disease virus determined by electron cryomicroscopy[J]. J Virol, 1997, 71: 325-330.

[3] Dobos P, Hill B J, Hallett R, *et al*. Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented double stranded RNA genomes[J]. J Virology, 1979, 32: 593-605.

[4] Müller H, Scholtissek C, Becht H. The genome of infectious bursal disease virus consists of two segments of double stranded RNA[J]. Journal of Virology, 1979, 31: 584-589.

[5] [美] J 萨姆布鲁克, D W 拉塞尔. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002.

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net