

猪瘟病毒 E2 基因主要抗原区的克隆及其原核表达

谢金文^{1,2}, 王金良^{1,2}, 董林^{1,2}, 苗立中^{1,2}, 管宇^{1,2}, 高三阳¹, 沈志强^{1,2}

(1. 山东省滨州畜牧兽医研究院, 山东 滨州 256600; 2. 山东绿都生物科技有限公司, 山东 滨州 256600)

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1004-7034(2012)01-0010-04

关键词: 猪瘟病毒; E2 蛋白; 克隆; 原核表达; 鉴定

摘要: 为研究猪瘟病毒 E2 蛋白的抗原表位在机体免疫应答中的作用和特点, 试验参照猪瘟兔化弱毒疫苗株(HCLV)的基因组序列, 设计、合成了 1 对引物, 应用 RT-PCR 方法扩增出长为 786 bp 的基因片段, 命名为 zE2, 将 zE2 基因克隆到原核表达质粒 pET 32a 中, 经酶切鉴定后转化大肠杆菌 Rosetta(DE3), 于 37 °C、1.0 mmol/L IPTG 条件下诱导表达, 大肠杆菌菌体裂解产物再经 SDS-PAGE 和 Western-blot 分析。结果表明: 该基因片段得到较高表达, 融合蛋白的分子质量约为 48 ku, 主要以包涵体形式存在, 且具有一定的免疫学活性。

Cloning and prokaryotic expression of a section fragment of Classical swine fever virus E2 gene

XIE Jin-wen^{1,2}, WANG Jin-liang¹, DONG Lin^{1,2}, MIAO Li-zhong^{1,2}, GUAN Yu^{1,2},
GAO San-yang¹, SHEN Zhi-qiang^{1,2}

(1. Shandong Binzhou Animal Science & Veterinary Medicine Academy, Binzhou 256600, China;

2. Shandong Lvdu Bio-Sciences & Technology Co., Ltd, Binzhou 256600, China)

Key words: Classic swine fever virus; E2 protein; cloning; prokaryotic expression; identification

Abstract: A pair of primers were designed and synthesized according to the sequence of HCLV. A fragment about 786 bp(zE2) was amplified from the genome of Classical swine fever virus by RT-PCR. Then the fragment was cloned to the expression vector pET 32a to construct the recombinant plasmid. The recombinant plasmid was proved to be true by restriction endonuclease analysis, transformed to *E. coli* Rosetta(DE3) competent cells. The expression of the protein was induced with 1.0 mmol/L IPTG at 37 °C. The products were analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and western-blot. The results indicated that the gene fragment was more highly expressed, and the recombinant fusion proteins pET 32a-zE2 were expressed highly in *E. coli* Rosetta(DE3) and it was about 48 ku. The expression product existed mainly in the form of inclusion body and had a good immunogenicity with the antiserum against CSFV. This experiment lays a foundation for diagnostic reagent development.

猪瘟是猪的一种流行广、高度接触性的烈性传染病, 其病原体猪瘟病毒(CSFV)是黄病毒科瘟病毒属中的成员^[1-3], 为有囊膜的单股正链 RNA 病毒^[4]。E2 蛋白是猪瘟病毒的跨膜结构蛋白, 是诱导被感染动物机体产生免疫保护与 CSFV 中和抗体的主要病毒结构蛋白, 大约由 373 个氨基酸残基组成。C 端一

侧含有 1 个约由 18 个氨基酸组成的疏水侧链, 可形成跨膜结构蛋白(TMP)^[5-9]。不同毒株的 E2 蛋白糖基化程度不同, 分子质量亦随之不同, 一般在 51 ~ 55 ku 范围内变动, 因此也被称为 gp55 蛋白。E2 蛋白能够诱导动物机体产生高效价的中和抗体, 其抗原结构域主要集中在蛋白分子的 N 端区域(690 ~ 866 aa), 可以分为 A、B、C、D 4 个独立的抗原结构域。A 包括 A1、A2、A3 共 3 个亚抗原结构域^[8]。连接 A 和 D 这 2 个抗原结构域的是一个链内疏水序列, 该序列在瘟病毒中保守, 推测这部分序列可能参与病毒与细胞膜的融合过程。B、C 抗原结构域可能参与同宿主细胞受体的相互作用^[9-11]。为进一步研究猪瘟病毒 E2 蛋白分子在免疫中的作用机理, 建立

收稿日期: 2011-03-01; 修回日期: 2011-04-10

基金项目: 山东省 2008 年自主创新成果转化重大专项项目(2008ZHXX1A1103); 山东省自然科学基金项目(ZR2010CQ012)

作者简介: 谢金文(1981-), 男, 助理研究员, 硕士, 98xiejinwen@163.com.

通信作者: 沈志强(1963-), 男, 研究员, 博士, bzshenzq@vip.sina.com.

快速、准确诊断猪瘟的方法,试验克隆了含有 E2 蛋白主要抗原区域的 cDNA 片段,并与已登录的猪瘟病毒疫苗株相应序列进行比较,成功构建了原核表达重组质粒 pET 32a - zE2,并在 *E. coli* 中得到了表达,现报道如下。

1 材料和方法

1.1 细胞与病毒

猪肾细胞 PK-15,由山东省滨州畜牧兽医研究院预防兽医学与动物生物技术重点实验室提供;猪瘟病毒疫苗株,购自中国兽医药品监察所。

1.2 菌株和质粒

pMD18 - T 载体,购自 TaKaRa 公司;大肠杆菌 DH5 α 、Rosetta(DE3) 和原核表达质粒 pET 32a,由山东省滨州畜牧兽医研究院预防兽医学与动物生物技术重点实验室保存。

1.3 工具酶及试剂

DL-2 000 Marker、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、Taq 酶和 dNTP,购自宝生物工程(大连)有限公司;Trizol 试剂,购自美国 Invitrogen 公司;琼脂糖(电泳纯),购自上海生工生物工程技术服务有限公司;质粒纯化试剂盒、DNA 清洁/PCR 产物清洁试剂盒、DNA 提取试剂盒,购自杭州维特洁生化技术有限公司;EB、氨苄西林、低分子质量蛋白标准等,购自华美生物工程有限公司;胰蛋白胨、酵母提取物,OXID 公司产品;异丙基 - β - D - 硫代半乳糖苷(IPTG)和 RNA 反转录试剂盒,Promega 公司产品。

1.4 引物

根据 GenBank 报道的猪瘟病毒基因组 mRNA 序列和原核表达质粒 pET 32a 多克隆位点序列用 Primer Premier 5.0 软件设计 1 对引物:上游引物 CSFV1 5' - CGGAATTCCGGCTAGCCTGCAAGGAAGAY - 3';下游引物 CSFV2 5' - GCGTCGACAGTCGTGTTTCRATCAAGC - 3'。引物分别位于 CSFV 参照毒株 HCLV(登录号为 AY382481)基因组序列的 2 442 ~ 2 463 bp 处与 3 227 ~ 3 207 bp 处。引物的 5' 端分别加有 EcoR I 和 Sal I 酶切位点(下划线部分)及其保护碱基,预期扩增片段长度为 786 bp。引物由宝生物工程(大连)有限公司合成,试验用浓度为 20 pmol/ μ L。

1.5 猪瘟病毒 E2 蛋白部分基因的克隆与鉴定

1.5.1 病毒的培养及其总 RNA 的提取 用 PK-15 单层细胞培养猪瘟病毒疫苗株,然后用 Trizol 试剂提取感染细胞总 RNA。

1.5.2 RT-PCR 以 CSFV2 为引物,将上述抽提的总 RNA 应用 RNA 反转录试剂盒进行反转录合成 cDNA 第一链,并以其为模板,扩增 zE2 基因片段。PCR 反应体系:94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 40 s,55 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 90 s,共 35 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min。反应产物于 1% 琼

脂糖凝胶上电泳检测。

1.5.3 RT-PCR 产物的回收、纯化 参照试剂盒操作说明进行。

1.5.4 感受态细胞的制备 参照《分子克隆实验指南》进行。

1.5.5 猪瘟病毒 zE2 基因的克隆 在高效连接液的作用下,回收纯化产物与克隆载体 pMD18 - T 进行连接反应,进一步的转化和克隆参照《分子克隆实验指南》。以蓝白斑、氨苄抗性、菌液 PCR 和双酶切反应筛选鉴定重组克隆。

1.5.6 重组质粒的序列测定与分析 由上海生工生物工程技术服务有限公司对阳性重组质粒 pMD18 - T - zE2 进行测序,结果用 Blast 和 DNASTar 软件进行同源性分析。

1.5.7 原核表达质粒 pET 32a - zE2 的构建 凝胶回收后的 zE2 PCR 产物用 EcoR I 和 Sal I 双酶切,再经 DNA 试剂盒纯化,以同样方法处理 pET 32a 载体,两者经 T4 DNA 连接酶连接,转化大肠杆菌 Rosetta(DE3) 后,涂布于含氨苄西林的平板,挑取白色单个菌落扩大培养,质粒小量提取后,以菌液 PCR 和双酶切反应来筛选和鉴定阳性重组质粒。

1.6 猪瘟病毒 zE2 基因的表达与鉴定

1.6.1 zE2 蛋白的诱导表达与表达产物的 SDS - PAGE 鉴定 用重组质粒 pET 32a - zE2 和空白载体 pET 32a 分别转化大肠杆菌 Rosetta(DE3);涂布于含氨苄西林的平板,37 $^{\circ}$ C 条件下培养;挑取单个菌落接种于 2.0 mL 含氨苄西林的液体培养基内,37 $^{\circ}$ C 静置过夜培养;取 4 μ L 接种到 4.0 mL 含氨苄西林的新鲜液体培养基内,37 $^{\circ}$ C 振荡培养至 OD₆₀₀ 值达到 0.5 ~ 0.6 时取样,之后加 IPTG 至终浓度为 1.0 mmol/L 进行诱导,分别于 1,2,3,4,5,6 小时取样,收取菌液,离心后弃上清液,用适量纯化水悬浮后加等体积的 2 $\times$ SDS - PAGE 上样缓冲液,于沸水中煮沸 5 min 并作为加样的样品,然后进行 SDS - PAGE 鉴定。其浓缩胶为 3%,分离胶为 10%,其他染色脱色等均参照《分子克隆实验指南》。

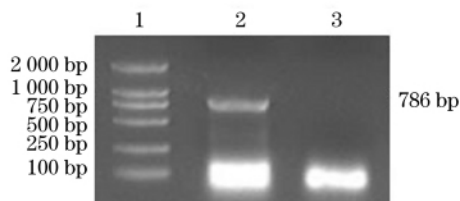
1.6.2 表达产物的可溶性鉴定 取 IPTG 诱导 2 h 的菌液,离心收集菌体;用裂解液重悬沉淀,冰浴,高强度超声波处理 4 次,每次 20 s,间隔 10 s,12 000 r/min 离心 2 min;分别取沉淀和上清液进行 SDS - PAGE 电泳,鉴定表达产物的可溶性。

1.6.3 融合蛋白的免疫印迹鉴定 表达产物经 SDS - PAGE 电泳后,将凝胶转移至 NC 膜上进行免疫印迹鉴定。一抗为兔抗猪瘟病毒血清,二抗为 HRP 标记的羊抗兔 IgG,用底物二氨基联苯胺(DAB)和过氧化氢显色,并设诱导的空载体菌作为对照。

2 结果与分析

2.1 猪瘟病毒 zE2 基因编码 cDNA 的扩增

以接种病毒的 PK-15 细胞总 RNA 为模板,反转录后通过 RT-PCR 扩增得到产物,经 1% 琼脂糖凝胶电泳,可见与预期目的基因大小(786 bp)相符的条带(见图 1 泳道 2),表明 RT-PCR 扩增所获得的 DNA 片段大小与 GenBank 登录的猪瘟病毒 zE2 基因相符。



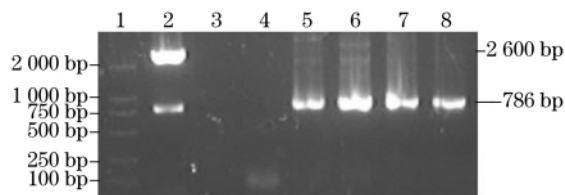
1. DL-2 000 Marker; 2. RT-PCR 产物; 3. 阴性对照。

图 1 RT-PCR 扩增产物

Fig 1 RT-PCR amplification of zE2 gene of CSFV

2.2 克隆重组质粒的鉴定

挑取连接后在氨苄西林平板上长出的白色单个菌落进行扩大培养,经菌液和重组质粒 PCR,可见在约 786 bp 处出现 1 条特异性条带(见图 2 泳道 5~8)。阳性重组质粒 pMD18-T-zE2 经 EcoR I 和 Sal I 双酶切,用 1% 琼脂糖凝胶电泳可出现长约 2 600 bp 和 800 bp 的 2 个片段(见图 2 泳道 2)。



1. DL-2 000 Marker; 2. pMD18-T-zE2 的双酶切结果; 3,4. 阴性对照; 5~8. PCR 产物。

图 2 阳性重组质粒 pMD18-T-zE2 的鉴定

Fig 2 Identification of the positive recombinant

plasmid pMD18-T-zE2

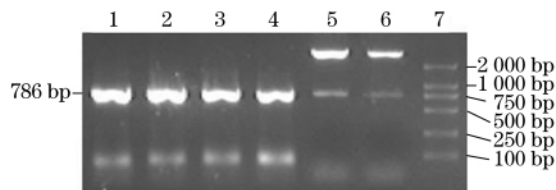
2.3 zE2 基因编码 cDNA 的序列测定与比较

用 DNASTar 和 Blast 软件分析上海生工生物工程技术服务有限公司的测序结果,表明试验所克隆的与已经登录的猪瘟病毒兔化弱毒株(登录号为 AF091507、AF531433、AY382481、AY805221 和 Z46258)的该部分核苷酸序列同源性较高,分别为 96.4%、99.7%、99.4%、99.6% 和 99.1%。从比较结果中可以看出,碱基的不同部分随机地分布于整个序列中,无缺失和插入。

2.4 原核表达重组质粒的鉴定

挑取连接后在氨苄西林平板上长出的白色单个菌落进行扩大培养,经菌液和重组质粒 PCR,可见在长约 786 bp 处出现 1 条特异性条带(见图 3 泳道 1~

4)。将筛选的阳性重组质粒 pET 32a-zE2 经 EcoR I 和 Sal I 双酶切,用 1% 琼脂糖凝胶电泳可出现预期大小的 2 个片段(见图 3 泳道 5~6)。



1~4. PCR 产物; 5,6. pET 32a-zE2 的双酶切结果;

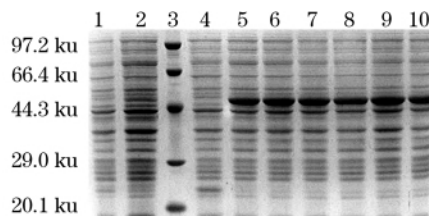
7. DL-2 000 Marker。

图 3 重组质粒 pET 32a-zE2 的鉴定

Fig 3 Identification of the recombinant plasmid pET 32a-zE2

2.5 zE2 基因在大肠杆菌中的表达

将 zE2 基因片段连入原核表达载体 pET 32a-zE2 中,并进一步转化大肠杆菌 Rosetta(DE3),表达产物经 SDS-PAGE 鉴定、考马斯亮兰染色后可在约 48 ku 处出现 1 条浓染的蛋白条带。而经诱导的空质粒转化菌以及未经诱导的重组质粒转化菌和空质粒转化菌培养提取物没有相应条带(见图 4),与预期结果一致,表明所表达的融合蛋白是所要的目的蛋白。而诱导 1 h 和 6 h 的蛋白浓度没有明显区别,也说明试验所构建的 zE2 蛋白的重组质粒在大肠杆菌中的表达效率较高。



1. 未诱导的 pET 32a; 2. 未诱导的 pET 32a-zE2; 3. 低分子量蛋白标准; 4. 诱导 4 h 的 pET 32a; 5~10. pET 32a-zE2 诱导 1,2,3,4,5,6 h 的结果。

图 4 表达产物的 SDS-PAGE 图谱

Fig 4 SDS-PAGE map of the expression products

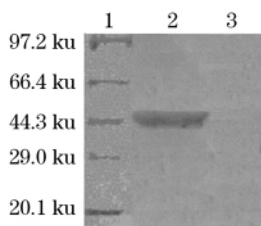
2.6 表达产物的可溶性鉴定

将诱导后的重组菌悬浮于裂解缓冲液中,不同超声条件下破碎菌体,然后离心菌体裂解液,对上清液和沉淀分别进行 SDS-PAGE 分析。结果发现:目的蛋白出现在沉淀中,而上清液中则无目的蛋白,说明表达获得的 zE2 融合蛋白是不溶性的,以包涵体形式存在。

2.7 融合蛋白的免疫印迹鉴定

Western-blot 操作按《分子克隆实验指南》所述方法进行。结果显示,所表达的融合蛋白与兔抗猪瘟

病毒血清反应后在目标条带处出现 1 条棕红色的特异性反应条带(见图 5), 根据分子质量的大小推测这条带的分子质量与目的蛋白相同, 说明原核表达的 zE2 蛋白具有免疫学反应活性, 可用作抗原来建立猪瘟的血清学方法。



1. 低分子质量蛋白标准 Marker; 2. pET 32a-zE2;
3. pET 32a 表达产物。

图 5 融合蛋白 pET 32a-zE2 的 Western-blot 分析
Fig 5 Western-blot analysis of the fusion protein
pET 32a-zE2

3 讨论

RT-PCR 扩增出 1 条长约 786 bp 的 DNA 片段, pMD18-T-zE2 重组质粒经双酶切后, 得到 2 段与 pMD18-T 和 zE2 基因片段长度相符的 DNA 片段, 说明 zE2 基因克隆成功。此外, pET 32a-zE2 重组质粒经双酶切后, 得到 2 个与 pET 32a 和 zE2 基因片段长度相符的 DNA 片段, 说明重组质粒含有插入的 zE2 基因片段; 序列比较结果证明, 所克隆的 DNA 片段是猪瘟病毒预期基因片段; 而图 4 结果则进一步表明, 猪瘟病毒 zE2 基因在原核表达系统中被成功表达。

猪瘟病毒 E2 蛋白是主要保护性抗原, 编码该蛋白的基因是猪瘟病毒基因组中变异最大的部分。P. Lowings 等^[2]报道了 E2 蛋白变异率在 3.2%~25.0%。位于 E2 蛋白 N 端的 8 个氨基酸(683~690 aa) 是 E2 蛋白的信号肽序列, 其作用是引导糖蛋白前体进入细胞内质网进行下一步加工, 试验所测 zE2 序列包括这段信号肽序列。根据所测的核苷酸序列推导出氨基酸序列, 经比较证明这段信号肽的氨基酸序列较为保守, 无氨基酸变异。

R. P. A. Van 等^[8]发现, 在 E2 蛋白 B、C 抗原结构域中, 705, 710, 713, 729, 734, 833, 834, 837, 858 位的氨基酸变异可以影响特异性单克隆抗体的产生和抗原决定簇的保守性。本试验中 zE2 序列推导的氨基酸, 在上述各位置与疫苗毒株 HCLV 相比没有发生变化。因此, 试验所用猪瘟病毒疫苗株 E2 蛋白在抗原结构上依然保持着稳定性。

E2 蛋白的氨基酸序列中含有 15 个半胱氨酸(Cys) 残基, C 端的 9 个 Cys(869~984 aa) 形成了分子内二硫键。C 端的 Cys 缺失不影响中和性抗体的结合, 表明这些 Cys 不参与形成 N 端部分表位的构

象; 而 N 端 6 个 Cys 则对 E2 蛋白结构的正确折叠与特异性抗原决定簇的形成至关重要。Cys693 和 Cys737 形成 1 个二硫键并固定了功能 B 区及 C 区的构型, 这两个 Cys 对于 B 区和 C 区的抗原表位是必需的; 而 Cys792 和 Cys856、Cys818 和 Cys828 形成 2 个二硫键并固定 A 区与 D 区, 同时对于功能 A 区和 D 区的抗原表位也是必需的。由此, 形成了 2 个独立的抗原结构单位, 一个包括 B 区和 C 区, 另一个包括 A 区和 D 区。经比较得知, 本试验中 zE2 序列推导的氨基酸中 E2 蛋白 N 端的 6 个 Cys 也没有发生变化。因此, 本试验所用猪瘟病毒疫苗株 E2 蛋白在抗原构型上也没有发生变化。

试验克隆了猪瘟病毒疫苗株 E2 蛋白主要抗原区域, 并成功进行了原核表达, 诱导 1 h 和 6 h 的蛋白浓度都较高, 且没有明显区别, 也说明试验所构建的 zE2 蛋白的重组质粒在大肠杆菌中的表达效率较高。Western-blot 检测结果表明, 表达的 zE2 蛋白有一定的生物学活性。试验为单克隆抗体的制备及建立猪瘟血清 ELISA 诊断方法等深入研究奠定了坚实基础。

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, 1985.
- [2] 陆承平. 兽医微生物学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.
- [3] GREISER-WILKE I, DREIER S, HAAS L, et al. Genetic typing of Classical swine fever viruses a review [J]. Dtsch Tierarztl Wochenschr, 2006, 113(4): 134-138.
- [4] FAUQUET C M, MAYO M A, MANILOFF J, et al. Virus taxonomy: the eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses [M]. San Diego, California: Elsevier Academic Press, 2005.
- [5] MULDER W A, PRIEM J, GLAZENBURG K L, et al. Virulence and pathogenesis of non-virulent strains of Pseudorabies virus expressing envelop glycoprotein E1 of Hog cholera virus [J]. J Gen Virol, 1994, 75(Pt 1): 117-124.
- [6] HULST M M, WESTRA D F, WENSVOORT G, et al. Glycoprotein E1 of Hog cholera virus expressed in insect cells protects swine hog cholera [J]. J Virol, 1993, 67(9): 5434-5442.
- [7] VILCEK S, STADEJEK T, TAKACSOVA I, et al. Genetic analysis of Classical swine fever virus isolates from a small geographic area [J]. Dtsch Tierarztl Wochenschr, 1997, 104(1): 9-12.
- [8] Van R P A, Van G H G, DeMEIJER E J, et al. Epitope mapping of envelope glycoprotein E1 of Hog cholera virus strain Brescia [J]. J Gen Virol, 1993, 74(Pt 10): 2053-2060.
- [9] Van R P A, Van G R G, DeMEIJER E J, et al. A preliminary map of epitopes on envelope glycoprotein E1 of HCV strain Brescia [J]. Vet Microbiol, 1992, 33(1/2/3/4): 221-230.
- [10] WENSVOORT G. Topographical and functional mapping epitopes on Hog cholera virus with monoclonal antibodies [J]. J Gen Virus, 1989, 70(Pt 11): 2865-2876.
- [11] Van R P A, MIEDEMA G K, WENSVOORT G, et al. Antigenic structure of envelope glycoprotein E1 of Hog cholera virus [J]. J Virol, 1994, 68(6): 3934-3942.
- [12] LOWINGS P, IBATA G, NNNDHAM J, et al. Classical swine fever virus diversity and evolution [J]. J Gen Virology, 1996, 77(Pt 6): 1311-1321.