

猪瘟病毒 E2 基因的克隆及原核表达

程晓盈, 张彦明, 王 犇,

邢福珊, 郭抗抗, 洪海霞

(西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 利用 RT-PCR 技术扩增出不含信号肽的猪瘟病毒石门株的 E2 基因, 将其克隆到 PGEX-T-Easy 载体上, 用 *Bam*H I 和 *Hind* III 进行双酶切, 回收目的基因。将目的基因克隆到表达载体质粒 pP_{RO}EX-HTb 中, 获得重组质粒 pP_{RO}EXE2, 用 pP_{RO}EXE2 转化大肠杆菌, 诱导含重组质粒 pP_{RO}EXE2 的大肠杆菌 BL21 表达 E2 基因蛋白, 研究 E2 蛋白与猪瘟阳性血清反应的特异性。结果表明, 受体菌诱导后能表达 E2 基因蛋白, 所表达的 E2 蛋白能与猪瘟阳性血清发生特异性很强的反应。

[关键词] 猪瘟病毒石门株; E2 基因; 克隆; 表达

[中图分类号] S858.282.65-1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2005)11-0013-04

猪瘟(Classical Swine Fever, CSF)是由猪瘟病毒(CSFV)引起的高度接触性传染病, 给养猪业造成了巨大的经济损失。它的发生与免疫程序有着密切关系。哺乳仔猪在哺乳期由母乳获得母源抗体, 仔猪母源抗体的水平与泌乳母猪免疫抗体的水平有关。检测猪瘟疫苗免疫猪抗体效价的高低是有效防治猪瘟的重要措施, 血清学检测猪瘟病毒抗体是疫苗免疫猪抗体水平监测的主要手段, 也是诊断猪瘟的重要工具^[1]。目前, 用于 CSFV 抗体检测的主要方法是 ELISA, 但是国内 ELISA 所用的抗原均为完整病毒, 不易生产和纯化, 且存在感染性^[2]。猪瘟病毒 E2 基因编码的 gp55 囊膜糖蛋白是引起动物产生保护性免疫的主要抗原蛋白, 与完整的 CSFV 相比, gp55 糖蛋白无感染性, 而且易于生产和纯化^[3,4], 是替代完整 CSFV 抗原的理想抗原。本研究通过诱导含 E2 基因的大肠杆菌 BL21 来表达 gp55 糖蛋白, 并检测 gp55 糖蛋白与 CSF 阳性血清反应的特异性, 为建立以基因表达蛋白为检测抗原的 ELISA 诊断方法奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 猪瘟病毒石门株猪脾组织毒 猪瘟病毒石门株购于中国兽药监察所, 将猪瘟病毒石门株接种

于健康猪进行复壮增殖, 待猪发病出现典型症状时, 取病猪脾脏一小块, 充分剪碎后置乳钵中研磨, 随后加入 5 倍量的 PBS 液制成乳液后备用。

1.1.2 菌株与质粒 大肠杆菌 DH 5 α 和 BL21 均由西北农林科技大学保存; pP_{RO}EX-HTb 质粒购自 GIBCOBRL 公司。

1.1.3 试 剂 TRLZOL[®] LS Reagent 试剂盒购自 GIBCOBRL 公司; 反转录酶及反转录试剂、*Taq* DNA 聚合酶、RNA 酶抑制剂、PGEX-T-Easy 载体、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、蛋白分子量标准, 均购自 Promega 公司; 纯化试剂盒购自 Takara 公司; IPTG 购自 Sigma 公司; 硝酸纤维素膜购自 Amersham pharmacia biotech 公司; CSF 阳性血清和辣根过氧化物酶标记的兔抗猪 IgG 为西北农林科技大学制备。

1.2 方 法

1.2.1 引物的设计及合成 参照 CSFV 石门株序列^[5,6]设计 4 条引物, 其中正负链各 2 条, 由大连宝生物工程有限公司合成, 引物序列、位置及长度见表 1。

1.2.2 RNA 提取 参照 TRLZOL[®] LS Reagent 试剂盒的说明操作。

1.2.3 RT-PCR 和 nPCR 扩增 取提取的 RNA 12 μ L, 片段下游引物 CSFV₂ 1 μ L, 65 $^{\circ}$ C 预热 10

[收稿日期] 2005-03-24

[基金项目] 陕西省科技攻关项目(2003K02-G11)

[作者简介] 程晓盈(1973-), 男, 陕西临潼人, 讲师, 在读硕士, 主要从事分子病原学与免疫学研究。

[通讯作者] 张彦明(1956-), 男, 陕西南郑人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事分子病原学与免疫学研究。

min,立即冰浴,5 min 后加入 5 倍的反转录缓冲液 4 μL ,dNTP 2 μL ,AMV 1 μL ,42 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h。*E2* 基因的 PCR 和 nPCR 扩增。取反转录产物 5 μL ,10 倍的 PCR 缓冲液 5 μL , MgCl_2 3 μL ,dNTP 4 μL ,引物 CSFV₁ 和 CSFV₂ 各 1 μL ,Taq 酶 0.5 μL ,加水至 50 μL 进行扩增。反应条件为:98 $^{\circ}\text{C}$ 热变性 8 min;98

$^{\circ}\text{C}$ 10 s,48 $^{\circ}\text{C}$ 60 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 120 s,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。套式扩增(nPCR)时,取上述 PCR 扩增产物 1 μL ,加入引物 CSFV₃ 和 CSFV₄ 各 1 μL ,反应条件为:98 $^{\circ}\text{C}$ 热变性 8 min;98 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 90 s,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min,其余条件及步骤均同 PCR,纯化回收 PCR 产物。

表 1 引物的序列、位置及长度

Table 1 Code sequence,location and length of the primers

编号 Code	序列 Sequence	位置 Location	长度/nt Length
CSFV ₁	5'TGTATTAGACCAGACTGG3'	2 222~2 239	18
CSFV ₂	5'CTGCCAACC GCCGTCTATCTT3'	3 793~3 773	21
CSFV ₃	5'GCGGATCCCGGCTAGCCTGTAAGGAAGAT 3'	2 434~2 462	29
CSFV ₄	5'GCAAGCTTGTAGAACTGCGTAGGTCACTAT 3'	3 501~3 530	30

1.2.4 猪瘟病毒石门株 *E2* 基因与 pP_{RO}EX-HTb 重组表达质粒的构建 将纯化回收的 PCR 产物与 PGEM-T-Easy 载体相连接,转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,获得阳性质粒。用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切阳性质粒,纯化回收目的片段,并与经 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切的 pP_{RO}EX-HTb 连接,获得自组质粒 pP_{RO}EXE2。

1.2.5 表达质粒 pP_{RO}EX-HTb 和重组质粒 pP_{RO}EXE2 转化受体菌 BL21 用表达质粒 pP_{RO}EX-HTb 和重组质粒 pP_{RO}EXE2 分别转化大肠杆菌 BL21 感受态细胞,将转化菌涂布于含氨苄的 LB 琼脂平板上,过夜培养后小量制备质粒^[7],分别鉴定含表达质粒 pP_{RO}EX-HTb 和重组质粒 pP_{RO}EXE2 的重组菌。

1.2.6 重组质粒在大肠杆菌中的表达 挑取含 pP_{RO}EXE2 的单个转化菌接种于 3 mL 含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素的 2 $\times$ YT 培养液中,37 $^{\circ}\text{C}$ 250 r/min 摇床培养过夜后,取 500 μL 培养物接种于 50 mL 2 $\times$ YT 培养液中,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 1.5~2.0 h,当 OD₆₀₀ 达 0.6~1.0 时,加 IPTG 至其终浓度为 1.5 mmol/L,继续培养,分别在 3,4 h 时收菌。同时,诱导培养含 pP_{RO}EX-HTb 的受体菌。

1.2.7 表达产物的 SDS-PAGE 鉴定 收取的含 pP_{RO}EXE2 和 pP_{RO}EX-HTb 菌液离心后弃上清,用 PBS 液悬浮后加入等体积的 2 $\times$ SDS-PAGE 上样缓冲液,于沸水中煮 10 min,进行 SDS-PAGE 电泳,4~6 h 后染色,脱色后分析。电泳条件为:积层胶浓度 5%,分离胶浓度 12%,每个加样孔上样 20 μL ;

样品在积层胶中电压 80 V,在分离胶中电压 120 V。

1.2.8 表达产物的 Western blot 鉴定 样品的处理及电泳参照 1.2.5 的方法。将预先在转移缓冲液中浸泡 1 h 的滤纸、海绵和 NC 膜按 1 层海绵、3 层滤纸、凝胶、NC 膜、3 层滤纸、1 层海绵依次放入塑料夹中,180 mA 转移 3 h。转移结束后,取出 NC 膜,剪下 Marker 与 1 个加样孔,氨基黑染色观察转移的效果。NC 膜用封闭液浸泡过夜,用 PBST 洗涤 3 次,加入猪瘟阳性血清,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 结合 3 h 后用 PBST 洗涤 3 次,加入辣根过氧化物酶标记的兔抗豚鼠二抗,37 $^{\circ}\text{C}$ 结合 1 h,PBST 洗涤 3 次,显色。

2 结果与分析

2.1 猪瘟病毒石门株 *E2* 基因的克隆

由图 1 可见,PCR 扩增产物的片段大小与预测的大小相符。PCR 产物与 PGEM-T-Easy 载体连接后,阳性质粒 PCR 鉴定、酶切出大小相符的片段。

2.2 重组质粒 pP_{RO}EXE2 的表达及酶切鉴定结果

以 CSFV₃,CSFV₄ 为引物,以重组质粒 pP_{RO}EXE2 为模板进行 PCR 扩增,扩增出与预测大小相符(1 100 bp)的片段,酶切鉴定产物电泳结果见图 2。另外,图 2 中还出现 1 个小片段,这可能是引物二聚体条带或引物的非特异性扩增条带,对试验并无影响。

重组质粒 pP_{RO}EXE2 的测序结果证明,猪瘟病毒石门株 *E2* 基因插入的位置、大小和读码框均正确。

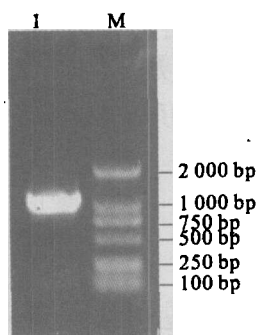


图 1 PCR 产物的凝胶电泳结果

M. DNA 标准 DL2000; 1. 以 CSFV₃、CSFV₄ 为引物 PCR 扩增产物

Fig. 1 Agrose gel electrophoresis of PCR product

M. DNA marker DL2000; 1. PCR product amplified with primers CSFV₃ and CSFV₄

2.3 E₂ 蛋白的 SDS-PAGE 和 Sestern blot 检测

pP_{RO}EXE2 和 pP_{RO}EX-HTb 转化、诱导的 BL21 菌体蛋白 SDS-PAGE 的电泳结果见图 3。图 3 结果表明,在约 35 ku 出现额外条带,与预测的重组融合蛋白大小相符。由此可见,构建重组质粒转化 BL21

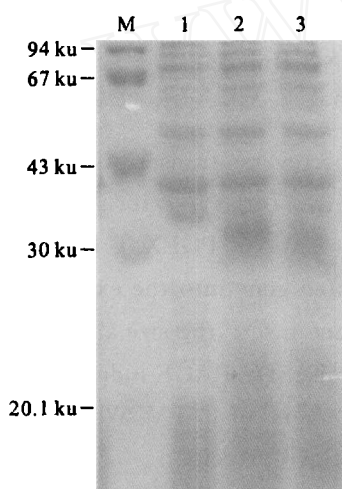


图 3 表达蛋白的 SDS-PAGE 检测结果

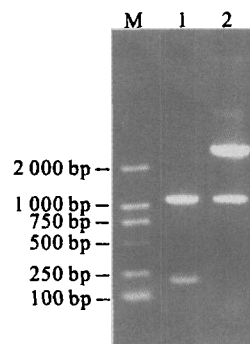
M. 标准分子量蛋白; 1. pP_{RO}EX-HTb 转化 BL21 (IPTG 诱导后 3 h); 2, 3. pP_{RO}EXE2 转化 BL21 (IPTG 诱导后 4, 3 h)

Fig. 3 SDS-PAGE and detection of protein expressed in *E. coli*

M. Marker; 1. pP_{RO}EX-HTb transformed BL21 (after induced with IPTG 3 hours); 2, 3. pP_{RO}EXE2 transformed BL21 (after induced with IPTG 4, 3 hours)

3 讨论

本研究发现,用直接酶切 PCR 产物的方法获得

图 2 重组质粒 pP_{RO}EXE2 PCR 和酶切鉴定

M. DNA 标准 DL2000; 1. 重组质粒 pP_{RO}EXE2 的 PCR 鉴定; 2. 重组质粒 pP_{RO}EXE2 的酶切鉴定

Fig. 2 PCR and restriction analysis of recombinant plasmid pP_{RO}EXE2

M. DNA marker DL2000; 1. PCR identification of pP_{RO}EXE2; 2. Restriction analysis of pP_{RO}EXE2

菌经诱导后能表达猪瘟病毒 E2 基因蛋白。

Western blot 检测结果见图 4。从图 4 可以看出,诱导菌体蛋白约在 35 ku 有明显的特异性条带,而对照无该条带。因此,重组蛋白经纯化后可作为诊断抗原,用于诊断猪瘟。

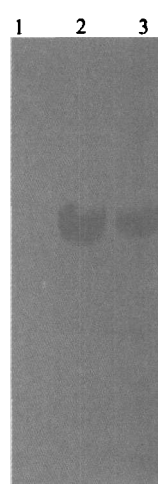


图 4 表达蛋白的 Western blot 检测结果

M. 标准分子量蛋白; 1. pP_{RO}EX-HTb 转化 BL21 (IPTG 诱导后 3 h); 2, 3. pP_{RO}EXE2 转化 BL21 (IPTG 诱导后 4, 3 h)

Fig. 4 Western blot detection of protein expressed in *E. coli*

M. Marker; 1. pP_{RO}EX-HTb transformed BL21 (after induced with IPTG 3 hours); 2, 3. pP_{RO}EXE2 transformed BL21 (after induced with IPTG 4, 3 hours)

带粘性末端的目的基因,无法通过电泳检测 PCR 产物是否切开,将其与表达质粒连接后很难获得阳性克隆。而利用 PGEM-T-Easy 载体可解决这一问题,

即将 PCR 产物连接到 T 载体上,再进行酶切,可切出带粘性末端的目的基因,且特异性很高,可通过电泳进行检测。

本试验成功地获得了猪瘟病毒 *E2* 基因编码的蛋白。该蛋白可以与 CSF 阳性血清结合,因此,*E2*

蛋白可以代替完整病毒粒子作为检测用的标准抗原,用来检测猪瘟疫苗免疫猪抗体的效价高低,为有效防治猪瘟提供了有力的工具。表达产物带有 6 个组氨酸残基,可用带有抗组氨酸抗体的亲和层析柱方便地纯化表达产物。

[参考文献]

- [1] 刘湘涛,赵启祖,李忠润,等.猪瘟病毒和猪瘟的防治[A].谢庆阁,翟中和.畜禽重大疫病免疫研究进展[M].北京:中国农业科技出版社,1996.321—338.
- [2] 丘惠深,王在时,廖国安.猪瘟单抗诊断试剂的研究[J].中国畜禽传染病,1991,(6):20—26.
- [3] Van Rijn P A. A preliminary map of epitopes on envelope glycoprotein *E*₁ of HCV strain Brescia[J]. Veterinary Microbiology,1992,33:212—230.
- [4] Van Rijn P A. Antigen structure of envelope glycoprotein *E*₁ of hog cholera virus[J]. Journal of General Virology,1994,68:3934—3942.
- [5] Moormann R J M, Warmerdam P M, Hulst M M, et al. Molecular cloning and nucleotide sequence of hog cholera virus strain Brescia and mapping of the genome region encoding envelop protein *E*₁[J]. Virology,1990,177:184—198.
- [6] Meyers G, Rumenap F T, Thie H. Molecular cloning and nucleotide sequence of hog cholera virus[J]. Virology,1989,171:555—567.
- [7] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 金冬雁, 黎孟枫, 译. 北京: 科学出版社, 1996.

Study on the cloning and expression of *E2* gene of Classical swine fever virus in *E. coli*

CHENG Xiao-ying, ZHANG Yan-ming, WANG Wei,
XING Fu-shan, GUO Kang-kang, HONG Hai-xia

(College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The *E2* gene of CSFV Shimen strain was amplified by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The amplified fragments were cloned into PGEX-T-Easy vector. We had digested the interested gene by the property without both of the two cleavage sites of PGEX-T-Easy vector and obtained the recombinant plasmids pP_{RO}EXE2 by cloning the interested gene into the expressed vector plasmids pP_{RO}EX-HTb. It was identified that the position of the *E2* gene insert, the size and the reading frame were all right by PCR, restriction digestion and the sequence analysis. SDS-PAGE indicated that the recipient germs induced by the recombinant plasmids could express *E2* gene of CSFV. Western blot indicated that the positive serum of CSFV could recognize the expressed antigen protein.

Key words: classical swine fever virus shimen strain; *E2* gene; cloning; expression