

猪圆环病毒 2 型 ORF2 编码基因真核表达载体的构建及表达*

谈国蕾, 胡志华, 芦银华, 陈德胜, 陈溥言**

(南京农业大学动物医学院, 江苏南京, 210095)

Construction of Eukaryotic Expression Vector Containing PCV-2 ORF2 and Its Expression

TAN Guo-lei, HU Zhi-hua, LU Ying-hua, CHEN De-sheng, CHEN Pu-yan**

(College of Veterinary Medicine, Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095, China)

Abstract: According to the published ORF2 gene sequence of PCV-2, two primers were designed to amplify the ORF2 gene from PK-15 cells inoculated by PCV-2. It was cloned into the pSecTag2 vector, and the recombinant plasmid named pSecORF2 was obtained. Another primer was designed to amplify ORF2 gene including signal peptide sequence from pSecORF2. Then it was cloned into pIRESHyg vector. The recombinant expression vector pIRESiORF2 was constructed. CHO cells were transfected in vitro with them. The expression of ORF2 gene was detected by indirect immunofluorescence assay (IFA). Further research is underway to study the biological activity of ORF2 protein and to establish the diagnostic kit of PCV.

Key words: Porcine circovirus; ORF2; Signal peptide

摘要: 根据 GenBank 中猪圆环病毒 2 型 (PCV-2) ORF2 基因序列, 设计了 1 对引物, 应用 PCR 从含有 PCV-2 的 PK-15 细胞中扩增出 ORF2 基因, 将其克隆入 pSecTag2 载体中, 构建了 pSecORF2 载体。又设计一条含信号肽序列的上游引物, 以 pSecORF2 为模板, 扩增出含信号肽序列的 ORF2 基因, 将其克隆到 pIRESHyg 载体上, 构建了 pIRESiORF2 真核表达载体。然后通过磷酸钙共沉淀法转染 CHO 细胞, 进行表达。间接免疫荧光实验 (IFA) 成功检测到 pIRESiORF2 在 CHO 细胞中的表达。这为进一步研究 ORF2 编码蛋白的生物学活性及建立 PCV 诊断试剂盒打下基础。

关键词: 猪圆环病毒; ORF2; 信号肽

中图分类号: S852.65

文章标识码: A

文章编号: 1003-5125 (2003) 04-0367-04

猪圆环病毒 (*Porcine circovirus*, PCV) 与鸡贫血病病毒 (*Chicken anemia virus*, CAV)、鸚鵡喙羽病病毒 (*Psittacine beak and feather disease virus*, PBFDV) 和一些植物病毒同属于圆环病毒科 (*Circoviridae*) 成员, 为单股负链环状 DNA 病毒。

PCV 病毒粒子直径 14~17nm, 是迄今为止已知最小的动物病毒之一^[1]。根据 PCV 的致病性及全基因组序列, 可分为两个血清型: PCV-1 与 PCV-2。PCV-1 无致病性, 广泛存在于猪体内及猪源细胞中。

PCV-2 与世界各国广泛发生的断奶仔猪多系统消耗综合症 (*Porcine post-weaning multisystemic wasting syndrome*, PMWS)^[2-4] 及 A2 型先天性震颤 (*Congenital tremors*, CT)^[5] 密切相关。其中以 PMWS 最为严重。在以呼吸道为主要症状的病猪中常常可以分离到 PCV-2 毒株, 并且已经发现 PCV-2 病毒粒子侵入机体后可引起 B 淋巴细胞凋亡^[6], 导致机体免疫力下降。所以 PCV-2 感染也越来越不容忽视。

猪圆环病毒近年来已逐渐引起国内外研究者

收稿日期: 2003-01-08, 修回日期: 2003-03-19

* 基金项目: 国家“863”项目资助 (2001AA249012); 上海科技兴农重点攻关项目 (农科攻字 2001 第 3-5 号)

作者简介: 谈国蕾 (1978-), 女, 江苏省南京籍, 硕士生, 研究方向为传染病学与预防兽医学。

** 通讯作者: 陈溥言 (1942-), 男, 江苏省南京籍, 教授, 研究方向为传染病学与预防兽医学。Correspondence author.

的关注。国外对 PCV-2 的血清学调查已初具规模, 而国内也有了该病的报道^[7], 但尚未开展类似的调查, 因此当前之际是进行 PCV-2 血清学的检测。目前, 血清学检测方法主要以免疫荧光检测为主, 但因其成本昂贵, 试验设施要求高, 在国内基层兽医站尚不能普及, 所以建立检测 PCV-2 血清的 ELISA 方法就很有必要。

PCV-1 与 PCV-2 基因组核苷酸序列同源性的 68%-76%, 两者均包含两个主要阅读框 ORF1 和 ORF2, ORF1 是 PCV 基因组中最大的阅读框, 编码与病毒复制相关的 Rep 蛋白^[8], 此蛋白在两种病毒之间有 85% 的同源性, 是 PCV-1、2 产生抗原交叉性的主要原因所在; ORF2 是编码病毒的主要结构蛋白(衣壳蛋白), 具有免疫原性, 是病毒刺激机体产生中和性抗体的重要抗原蛋白^[9, 10]。因而对 PCV-2 而言, ORF2 蛋白最具免疫原性, 该蛋白可作为检测 PCV-2 抗体的有力诊断工具。

所以本研究选取了 PCV-2 的 ORF2 编码的蛋白基因, 为研究其生物学活性及建立 PCV 诊断试剂盒作准备。

1 材料和方法

1.1 材料

无 PCV-1 污染的 PK-15 细胞为中国兽药监察所王在时老师惠赠; CHO-K1 细胞为本实验室保存。PCV-2 标准毒株由美国 Iowa 大学 Kyoung-Jin Yoon 教授惠赠。质粒: pSecTag2/hygroB 购自 Invitrogen 公司; pIRESHyg 购自 Clontech 公司; 宿主菌 DH5 α 由本实验室保存。PCV-2 阳性血清由美国 Iowa 大学 Kyoung-Jin Yoon 教授惠赠; 阴性血清为本课题组分离的健康猪血清。PCR 试剂盒, 蛋白酶 K 及试验用酶类均购自大连 Takara 公司; D-氨基葡萄糖由北京军事医学科学院汪海健博士提供; Hygromycin B 购自 Roche 公司; 细胞基础培养基 F12 为 HyClon 公司产品; 荧光标记的羊抗猪 IgG: 购自上海晶美生物工程有限公司。

根据公开发表的 PCV-2 ORF2 基因序列, 设计一对引物, 并在上、下游引物 5' 端分别加上 Hind III 和 EcoRV 酶切位点; 根据 pSecTag2/hygroB 质粒信号肽基因序列, 设计一条引物, 并在引物 5' 端加上 BamHI 酶切位点。引物 1: 5'—AGGAAGCTTGGCATCTTCAACACC—3' 引物 2: 5'—CCGATATCTTAGGGGTTAAGTGGGG—3' 引物 3: 5'—CTAGGATCCATGGAGACAGACACAC—3' 其中引物 1 与 2 用于扩增 PCV-2 ORF2 基因序列, 跨幅为

593bp; 引物 2 与 3 用于扩增含信号肽序列的 PCV-2 ORF2 基因序列, 跨幅为 692bp。引物由大连宝生物工程有限公司合成, 为冻干品, 用时溶解于适量灭菌超纯水, 浓度为 20pmol/ μ L, 分装保存于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱。

1.2 方法

1.2.1 病毒培养: 将长成单层的 PK-15 细胞(生长液为含 10% 血清的 MEM)用 0.05% 胰酶消化、分瓶, 同时细胞接种 PCV-2 毒株, 37 $^{\circ}$ C 培养 24h 后用 300mmol/L D-氨基葡萄糖(D-glucosamine)处理 30min, 用 PBS 洗涤后换上新鲜培养液继续培养 48h。传代 2 次后, 收获 PK-15 细胞, 悬浮于适量超纯水中。

1.2.2 细胞总基因组的提取: 取细胞悬浮液, 按文献^[8]提取基因组。将提取物溶解于超纯水中, 作为 PCR 模板。

1.2.3 PCR 扩增及产物的克隆: 以细胞总基因组的提取产物为模板, 用引物 1 和 2 进行 PCR 扩增, 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 5min, 1 个循环后, 94 $^{\circ}$ C 1min, 54 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 1min, 30 个循环后, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。电泳回收目的条带。PCR 产物及 pSecTag 用 HindIII/EcoRV 双酶切后连接转化, 构建成 pSecORF2。再以此质粒为模板, 用引物 2 和 3 进行 PCR 扩增, 反应条件与上相同。PCR 产物用 BamHI/EcoRV 双酶切后回收, 同时质粒 pIRESHyg 用 BstXI 单酶切后, 补平, 再 BamHI 单酶切回收后与前者连接转化 DH5 α , 构建成 pIRESiORF2。

1.2.4 潮霉素浓度的定量: 根据 Hygromycin B 说明书所推荐的 50-100 μ g/mL 为基础选取药物浓度分别为 50 μ g/mL、100 μ g/mL、150 μ g/mL、200 μ g/mL、250 μ g/mL、300 μ g/mL 的 10%F12 在 24 孔板上进行 CHO 选择性培养基的耐受性试验。把 CHO 接种到 24 孔板上(接种量为 2×10^5 个/孔), 加入不同浓度的药物, 48h 换一次液, 7-10d 后选取孔内细胞全部死亡的抗生素浓度为所选取的量。该药物即为重组质粒转染 CHO 进行筛选所用的药物筛选量。

1.2.5 重组质粒 pIRESiORF2 构建的流程图见图 1

1.2.6 重组质粒 pIRESiORF2 的大量提取和纯化: 参照文献^[9]大量提取质粒和纯化质粒, 最后用 TE 稀释到相应浓度。

1.2.7 重组质粒 pIRESiORF2 转染 CHO 及筛选相应细胞株: 用磷酸钙共沉淀法^[9]将重组质粒 pIRESiORF2 转染 CHO。转染后, 先用不含药物的培养基培养促成细胞长成单层, 再改成含潮霉素的培养基进行培养。以后每隔 48h 换一次选择性培养基。

当空白对照即未转染的 CHO 全部死亡后, 所转染的细胞中依旧存活的细胞继续用药物培养, 直至长成单层。表明已初步筛选到所要的细胞。

甘油封底, 用荧光显微镜观察结果。同时设置细胞对照组。

2 结果

2.1 ORF2 及有信号肽的 ORF2 的扩增和克隆鉴定

PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳观察。与预期结果一致。pSecORF2 经 *Hind*III/*Xho*I 酶切鉴定, 见图 2。pIRESIORF2 引物 2 和 3 进行 PCR 鉴定, 见图 3。

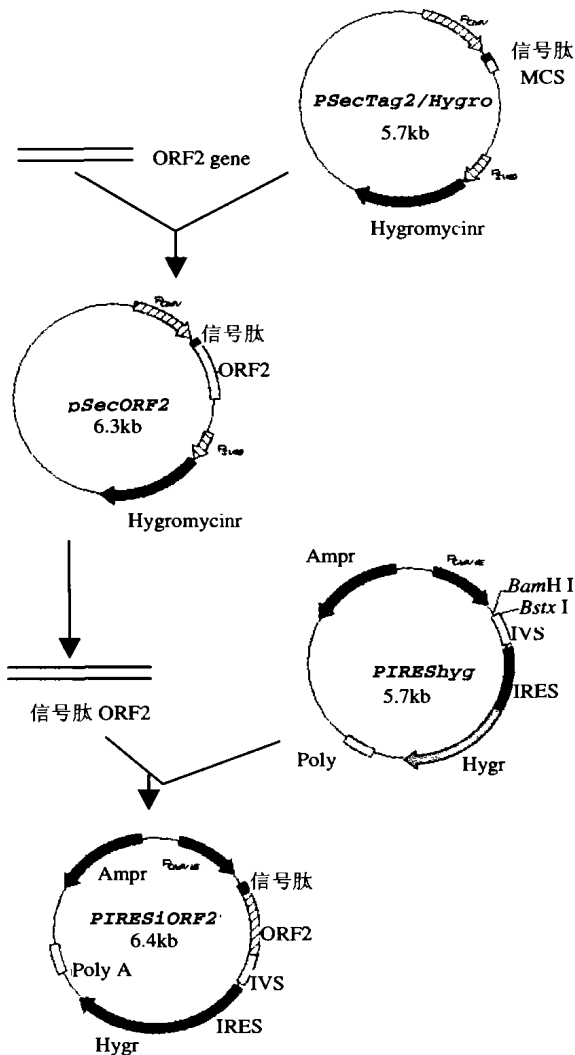


图 1 pIRESIORF2 构建的流程图

Fig.1 Construction of pIRESIORF2

1.2.8 PCR 检测: 收取筛选出的 CHO 细胞, 悬浮于适量超纯水中, 按文献^[8]提取细胞基因组, 将提取物溶解于超纯水, 作为 PCR 模板, 用引物 2 和 3 及引物 1 和 2 分别用原来的 PCR 条件进行扩增, 进行琼脂糖凝胶电泳。同样, 对照空载体 pIREShyg 转染的 CHO 及未经任何转染的 CHO 同前处理。

1.2.9 间接免疫荧光 (IFA) 检测 筛选出的 CHO 细胞接种 96 孔板, 长成单层后, 加上 -20℃ 预冷的丙酮: 乙醇 (6: 4), 室温固定 10min。然后每个细胞孔加入 PCV-2 阳性血清, 37℃ 作用 1h; PBS 洗涤 3 次, 自然干燥, 然后滴加羊抗猪荧光二抗, 37℃ 作用 30min, PBS 洗涤 3 次, 最后用 1:9 的磷酸

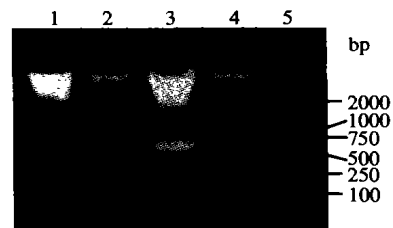


图 2 酶切鉴定结果

Fig.2 The result of RE analysis

1-4, pSecORF2(*Hind*III/*Xho*I); 5, Marker DL-2000

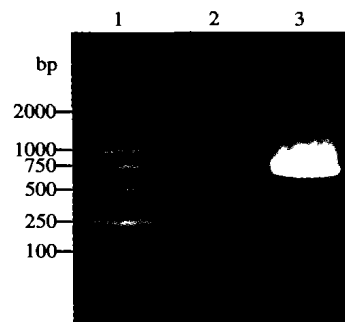


图 3 PCR 鉴定

Fig.3 The result of PCR product

1, Marker DL-2000; 2/3, the ORF2 gene including signal peptide sequence.

2.2 潮霉素浓度定量

在有 CHO 的 24 孔板上, 分别加入含潮霉素 50μg/mL, 100μg/mL, 150μg/mL, 200μg/mL, 250μg/mL, 300μg/mL 的 10%F12, 大约 7d, 结果为 150μg/mL, 200μg/mL, 250μg/mL, 300μg/mL 的选择性培养基中 CHO 已全部死亡, 而含 50μg/mL, 100μg/mL 的培养基中尚有存活的 CHO 细胞。因此, 150μg/mL 为选定的转染后筛选所用的药物浓度。

2.3 重组粒转染细胞及筛选

用磷酸钙共沉淀法, 将 pIRESIORF2 及 pIREShyg 分别转染 CHO。转染后, 先用不含药物的培养基进行培养, 24h 后加上潮霉素达到 150μg/mL 进行筛选, 大约 2 周后, 可以得到初步筛选的细胞。

2.4 重组质粒转染细胞 PCR 分析

提取转染后的 CHO 细胞基因组做 PCR 鉴定, PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 可见 600bp 条带以及 700bp 左右条带。见图 4。

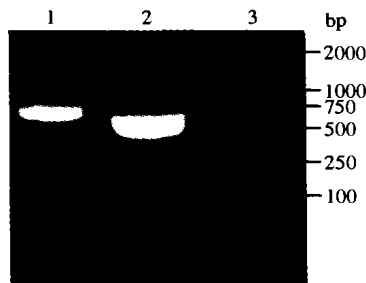


图 4 PCR 鉴定

Fig.4 The result of PCR product

1, the ORF2 gene of PCV2; 2, the ORF2 gene including signal peptide sequence

2.5 间接免疫荧光试验

将转染后筛选到的 CHO, 进行 IFA 试验, 荧光显微镜观察可见特异性荧光, 而未经转染的 CHO 未见荧光, 见图 5。

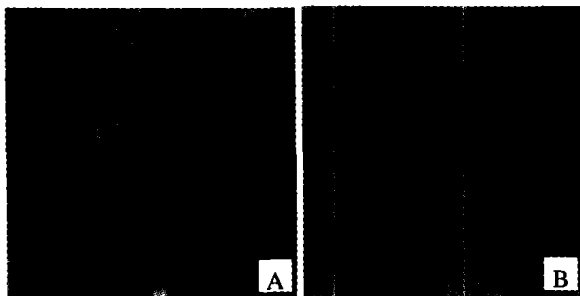


图 5 IFA 检测

Fig.5 Detection of IFA

A, Transfected CHO cells; B, Negative CHO cells

3 讨论

本研究选取了 PCV-2 基因组中最具有免疫原性 ORF2 蛋白。在这个蛋白的前 41 个氨基酸为 ORF2 蛋白的核内定位信号^[13], 因而只选定了 ORF2 蛋白上第 42 个氨基酸到最后的片段, 并在该片段前面加上了分泌信号肽序列, 希望哺乳动物细胞能分泌表达目的蛋白。同时所选用的真核表达载体 pIRESHyg, 在该载体上有一个内部核糖体进入位点 (internal ribosome entry site, IRES) 元件^[14], 在上游启动子的控制下, 该元件及与之相连的基因可同时转录, 并以不依赖帽的方式启动远端 mRNA 的翻译, 从而在同一个转录体上翻译出不同的蛋白。该载体克服了传统载体中目的基因和筛选基因采用

各自独立的表达盒选择压力施加在抗药基因的表达上, 使筛选出克隆的目的基因表达往往不高。而采用 IRES 序列连接两基因的载体, 几乎所有筛选出的存活克隆均可表达目的基因, 因为对于抗生素的选择标记而言, 选择压力是加在整个表达盒上的, 加大抗生素的剂量可同时获得目的基因的的稳定高表达。简化了传统双启动子表达盒模式繁琐的阳性克隆筛选过程。

本研究通过转染 CHO, 经抗生素筛选以后, 用 IFA 检测, 其表达产物可以进行 PCV-2 血清的检测。对初步筛选出的细胞, 还需加大抗生素的浓度, 以提高哺乳动物细胞的表达产量, 为以后建立 ELISA 检测方法打下了重要的基础。

参考文献

- [1] Tischer I, Gelderblom H, Vettermann W. A very small porcine circovirus with circvLar single-stranded DNA[J]. *Nature*, 1982, 295: 64-66.
- [2] Allan G M, Meehan B, Todd D. Novel porcine circovirus from pigs with wasting disease syndromes[J]. *Vet Rec*, 1998, 142: 467-468.
- [3] Allan G M, McNeilly F, Kennedy S. Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in USA and Europe[J]. *J Vet Diagn Invest*, 1998, (10): 3-10.
- [4] Allan G M, McNeilly F, Meehan B M. Isolation and characterization of circovirus from pigs with wasting syndromes in Spain, Denmark and Northern Ireland[J]. *Vet Microbiol*, 1999, 66: 115-123.
- [5] Hamel A L, Lin L L, Nayar G P. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs[J]. *J Virol*, 1998, 72: 5262-5267.
- [6] Schibahara T, Sato K, Ishikawa Y. Porcine circovirus induces B lymphocyte depletion in pigs with wasting disease syndrome[J]. *J Vet Med Sci*, 2000, 62(11): 1125-1131.
- [7] 朗洪武, 王力, 张广川, 等. 猪圆环病毒分离鉴定及断奶仔猪系统衰弱综合症的诊断[J]. *中国兽医科技*, 2001, 31(3): 3-4.
- [8] Annette M, Frauke P, JoAchim M, *et al.* Mapping and Characterization of the origin of DNA Replication of PCV[J]. *J Virol*, 1997(3): 2562-2566.
- [9] Dominique M, Philippe B, Catherine T, *et al.* Differential recognition of ORF2 protein from type 1 and 2 porcine circovirus and identification of immunorelevant epitopes[J]. *J Gen Virol*, 2000, 81: 1815-1824.
- [10] Andre L H, Lihua L L, Gopip S N. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs[J]. *J Virol*, 1998, 72: 5262-5267.
- [11] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 第二版, 北京: 科学出版社, 1997.
- [12] 金冬雁, 黎孟枫. 分子克隆实验指南[M]. 第二版, 北京: 科学出版社, 1997.
- [13] Qiang L, Suresh K, Lome. Nuclear Localization of the ORF2 protein encoded by PCV2[J]. *Virology*, 2001, 285: 91-99.
- [14] 曹慧青. 多基因共表达载体的构建策略[J]. *国外医学分子生物学分册*, 2002, 24(1): 1-4.