

含双拷贝 CSFV E2 基因 A 和 D 片段原核表达载体的构建及表达*

王海震¹, 杨松^{1,2}, 苏小运¹, 曹瑞兵¹, 陈溥言^{1**}

(1. 南京农业大学农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室, 江苏南京 210095; 2. 沈阳农业大学畜牧兽医学院, 辽宁沈阳 110161)

Construction and Expression of the Prokaryotic Expressing Vector Containing Tandemly Linked 2 Copies of the A and D Antigenic Domains of the CSFV E2 Gene

WANG Hai-zhen¹, Yang Song^{1,2}, SU Xiao-yun¹, CAO Rui-bing¹, CHEN Pu-yan^{1**}

(1. Key Lab of Animal Diagnosis and Immunology, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. College of Animal Science and Veterinary Medicine of Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

Abstract: Full E2 gene fragment of Classical swine fever virus (CSFV) shimen strain was amplified by RT-PCR method, then a specific fraction -the A, D antigenic domains-, which encodes protein with good antigenicity and suitable for being expressed in *E. coli* with high level, was amplified respectively by 2 different pair of primers. Then the 2 amplified fragments were tandemly linked and inserted into prokaryotic expressing vector pET-32a to obtain the plasmid pET-2e. The SDS-PAGE assay showed that although the proteins were present in the form of inclusion body, the linked proteins were expressed from plasmid pET-2e as expected, and can be expressed with high level when induced with IPTG. Western-blotting showed good antigenicity of the target protein.

Key word: Classical swine fever virus (CSFV); E2 gene; Clone and expression

关键词: 猪瘟病毒石门株; E2 基因; 原核串联表达

中图分类号: S852.65

文章标识码: A

文章编号: 1003-5152(2004)02-0171-03

猪瘟是严重危害养猪业的传染病, 该病具有高度接触传染性, 其流行性广, 发病率高, 死亡率高, 危害极大, 被世界动物卫生组织 (OIE) 列为 A 类传染病之一。本病的主要临床特征是高热、实质器官出血、淋巴细胞和血小板减少, 而怀孕母猪多发生繁殖障碍。每年, 猪瘟的发生都为国家造成巨大的经济损失。猪瘟的病原是猪瘟病毒, 属于黄病毒科瘟病毒属成员, 是单股正链 RNA 病毒^[1]。囊膜糖蛋白 E2 是猪瘟病毒的主要保护性抗原^[2,3]。E2 蛋白可诱导机体产生坚强的中和性免疫保护, 具有良好的免疫原性和反应原性^[4-6], 这为本病的诊断提供了

重要的分子生物学及免疫学依据。本试验构建了包含串联双拷贝猪瘟病毒石门株主要抗原基因序列的原核高效表达载体, 为本病新型诊断方法的建立创造了良好的物质条件。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

猪瘟病毒石门株、大肠杆菌 DH5 α 、pET-32a 原核表达载体 (及其宿主菌 DE3) 均为本实验室保存, 猪瘟阳性血清、阴性血清, 购自中国农科院兰州兽医研究所。TriPure RNA 抽提试剂盒, 购自

收稿日期: 2003-08-27, 修回日期: 2003-12-02

* 基金项目: 国家 863 高科技发展资助项目 (2001AA249012)

作者简介: 王海震 (1979-), 男, 河南籍, 硕士研究生, 研究方向为动物分子病毒学。

** 通讯作者。Corresponding author. Tel: 025-4396028. E-mail: aid@njau.edu.cn

Roche 公司; AMV 反转录酶购自 Promega 公司; RNAsin, 购自冷泉巷公司; Taq 酶, T₄DNA 连接酶和各种限制性内切酶, pMD-18T 试剂盒均购自于 Takara 公司; DAB 试剂盒, IPTG, BSA, Tris 碱, 甘氨酸, 盐酸胍购自南京生工公司; 酶标 SPA, 购自武汉博士德公司; Minicycle PCR 仪, 购自美国基因公司。胶中 DNA 回收纯化试剂盒, 购自上海新芝生物技术研究所。

1.2 引物

扩增 *E2* 完整基因的引物:

引物 1: 5' -aactggggcacaagc-3'

引物 2: 5' -cctcacctgacccaa-3'

扩增 *E2* 基因 A, D 区核苷酸片段的第二对引物: 扩增目的片段为 373bp

引物 3: 5' -taggatccactccgtgacattcgag-3'

(*Bam*H I)

引物 4: 5' -cagaattccactggttcaccttcac-3'

(*Eco*R I)

扩增 *E2* 基因 A, D 区核苷酸片段的第二对引物: 扩增目的片段为 388bp

引物 5: 5' -aagaattcggggcggtctggtactccgtgaca

(*Eco*R I)

ttcgag-3'

引物 6: 5' -ccaagcttccactggttcaccttcac-3'

(*Hind* III)

上述引物均由大连 Takara 公司合成

1.3 猪瘟病毒石门株完整 *E2* 基因的扩增

用 PEG-6000 按照 6%~8% 比例加入至猪瘟病毒石门株细胞培养上清液中, 颠倒混匀, 4℃ 过夜, 离心, 弃上清, 沉淀中含有猪瘟病毒石门株。RNA 提取方法按照试剂盒说明操作。待 RNA 干燥后, 加入 10μL DEPC 水溶解 RNA, 依次加入 5μL 反转录 Buffer, 3μL 10mmol/L dNTP, 引物 1 和引物 2 各 1μL, 于 65℃ 15min, 4℃ 5min。加入 RNAsin 和 AMV 各 1μL, 反应总体积 20μL, 42℃ 60min, 95℃ 5min, 立即进行 PCR。

PCR 产物回收后与 T 载体连接, 转化 DH5 α 感受态细胞, 于氨苄平板上进行蓝白斑筛选, 挑选白斑, 纯化, 增殖细菌, 提取质粒, 酶切鉴定。将阳性质粒命名为 pMD-E。

1.4 含 A, D 区特定基因第一条片段和第二条片段的扩增

取 1μL 小量碱法提取的 pMD-E 质粒 100 倍稀释后, 取 2μL 进行 PCR 反应。反应体系为 100μL: 质粒 DNA 2μL, 10mmol/L dNTP 1.5μL, 10×Buffer

10μL, Mg²⁺ 8.0μL, 引物 3、引物 4 各 2μL, ddH₂O 73.7μL, Taq 0.8μL。混合后进行 PCR 扩增。PCR 循环条件为 95℃ 5min; 94℃ 1min, 50℃ 30s, 72℃ 30s, 35 个循环, 72℃ 10min, 进行第一片段扩增。同样条件以引物 5、引物 6 对第二片段进行扩增。两次扩增产物分别命名为 *E2* 基因 A, D 区第一片段和第二片段。

1.5 重组质粒 pET-2e 的构建

扩增含 pET-32a 的宿主菌, 小量碱法提取质粒^[7]。按分步法依次将 *E2* 基因 A, D 区第一片段和第二片段克隆入 pET-32a 中, 筛选阳性质粒命名为 pET-2e。测序由 Takara 公司完成, 将所测序列与 GenBank 中石门株的相应核酸序列进行比较, 以确定扩增片段的可靠性。

1.6 诱导表达

含 pET-2e 的 BL21 (DE3) 细菌, 于 37℃ 培养至 OD_{600nm} 值在 0.4~0.5 之间, 加入终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG 于 37℃ 诱导 5h。诱导产物用 12% 分离胶进行 SDS-PAGE 电泳。用薄层扫描仪测定融合蛋白的表达含量。

1.7 Western-blot 检测

含有 pET-2e 的 BL21 (DE3) 经诱导表达, SDS-PAGE 电泳后, 稳流电转移 2h, 5% 脱脂乳于 4℃ 封闭过夜, 猪瘟高免血清按 1: 200 于 37℃ 作用 2h, 酶标 SPA 按 1: 500 于 37℃ 作用 1h, DAB 显色。

2 结果与讨论

2.1 *E2* 基因 A, D 区的扩增

取 PCR 产物进行 1% 琼脂糖电泳, 在紫外灯下分别在 373 bp 和 388 bp 处出现一条亮度很高的特异条带, 与预期大小一致。

2.2 双酶切鉴定重组质粒

*Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切重组质粒 pET-2e 后经 1% 琼脂糖电泳, 于紫外灯下出现一大一小两个片段, 其中小片段所处位置与目标基因大小一致。表明该重组质粒已构建成功。电泳结果见图 1 所示。

2.3 测序结果

登录 GenBank, 应用分析软件将测序结果与其上公布的石门株毒基因组 (AF092448) 中相应核苷酸序列进行同源性比较, 结果显示两者同源性为 99.7%。这一结果表明插入片段的正确性, 也证实了 PCR 方法的特异性。

2.4 重组质粒及表达产物的检测

重组质粒经诱导表达后, 在 48kDa 处有一特异

性条带, 大小与预期值相符, 而空载体对照则无。表明目的基因与载体自身所包含的硫氧还蛋白 (TrxA) 基因是以融合蛋白的形式表达的。电泳结果见图 2A 所示。

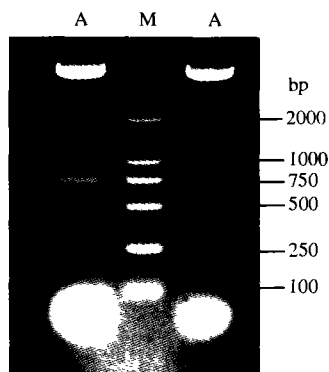


图 1 重组质粒酶切图谱

Fig. 1 Restriction map of recombinant plasmid

1. DNA marker; 2. recombinant plasmid pET-2e digested with *Bam*H I /*Hind* III.

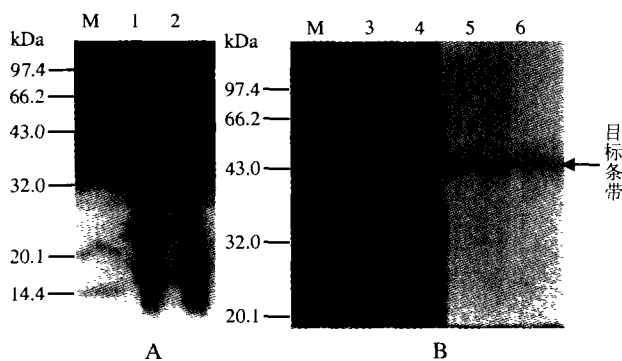


图 2 重组质粒 pET-2e 诱导表达产物的检测

Fig. 2 Detection of induced recombinant protein

A. SDS-PAGE; B. Western-blot. M, Marker; 1. Expression product of pET-32a; 2. Expression products of pET-2e induced by IPTG, 3/4, SDS-PAGE result for recombinant protein; 5/6, Western-blot result for recombinant protein.

经 Western-blot 检测, 在目标条带处位置(48kDa) 出现一棕红色印迹, 证实了表达产物的特异性。结果见图 2B 所示。

经薄层扫描分析, 融合蛋白的表达量占菌体总蛋白的 36.6%, 且鉴定以包涵体的形式存在。

本试验选用含编码猪瘟病毒囊膜糖蛋白 E2 基因 A 和 D 区的特定基因片段作为目的基因, 串联构建了重组原核表达载体 pET-2e。结果表明, 该重组质粒可以在大肠杆菌中得到高效表达, 并且表达产物以包涵体的形式存在。

目前, 国内检测猪瘟血清抗体的方法主要是间接血凝试验和最近黄印尧^[8]等报道的免疫金标试纸条, 两者所用的抗原都是纯化的猪瘟病毒粒子。但是, 猪瘟病毒不易培养, 滴度低, 难于纯化, 导致抗原生产成本较高, 因此以全病毒作为抗原的检测方法难于推广应用。本实验中, 我们选用编码猪瘟病毒主要保护性抗原区域的核苷酸序列进行原核高效表达, Western-blot 检测表明所表达的蛋白质具有与猪瘟阳性血清反应的特异性, 可以代替全病毒粒子作为检测抗原, 因而可以大大降低生产抗原的成本, 这为以猪瘟病毒主要抗原区基因表达蛋白作为抗原建立 ELISA 方法奠定了基础。

参考文献

- [1] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 第二版. 北京: 科学出版社, 1997.
- [2] Welland E, Stark R, Haas B, *et al*. Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies forms part of disulfide-linked heterodimer[J]. *J Virol*, 1990, 64: 3563-3569.
- [3] Rumenapf T, Stark R, Meyer G, *et al*. Structural proteins of hog cholera virus expressed by vaccinia virus: Further characterization and induction of protecting immunity [J]. *J Virol*, 1991, 65: 589-597.
- [4] Van Z J, Wensvoort G, Kluyver E, *et al*. Live attenuated pseudorabies virus expressing envelope glycoprotein E1 of Hog cholera virus protects swine against pseudoviruses and hog cholera virus[J]. *J Virol*, 1991, 65: 2761-2765.
- [5] Yu X L, Tu C C, Li H W, *et al*. DNA-mediated protection against classical swine fever virus[J]. *Vaccine*, 2001, 19 (11-12): 1520-1525.
- [6] Moornann R M, Warnerdam P A, Schaaper W W, *et al*. Molecular cloning and nucleotide of hog cholera virus strain Brescia and mapping of the genomic region envelope protein E1[J]. *Virology*, 1990, 177: 184-198.
- [7] J. 萨姆布鲁克, D.W. 拉塞尔. 分子克隆实验指南[M]. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [8] 黄印尧, 张长弓, 金颜辉. 用于检测猪瘟抗体的免疫金标试纸条的研制与应用研究[J]. *福建畜牧兽医*, 2002, 24(1): 3-4.