维普资讯 http://www.cqvip.co

第19卷6期
2004年11月

中国病毒学
VIROLOGICA SINICA

19（6）：636-638
November 2004

猪细小病毒 VP2 蛋白主要抗原表位基因真核表达载体的构建及表达*

任雪枫，胡志华，谈国蕾，周 斌，徐学清，郑其升，张晓勇，

陈德胜，陈溥言**

(南京农业大学动物医学院农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室，江苏南京 210095)

Expression of the Domain Gene of *Porcine Parvovirus* VP2 with the Eukaryotic Vector pIREShyg*

REN Xue-feng，HU Zhi-hua，TAN Guo-lei，ZHOU Bing，XU Xue-qin，ZHENG Qi-sheng，
Zhang Xiao-yong，CHEN De-sheng，CHEN Pu-yan**

（*Key Laboratory of Animal Disease diagnosis and Immunology, Ministry of Agriculture at Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangshu 210095, China*）

Abstract: Using a pair of specific primers designed according to the relevant nucleotide sequences from GenBank, the main antigen domain for VP2 gene of *Porcine parvovirus* was ampilified with PCR method using the genomic DNA as template. The PCR product was cloned into the expression vector pIREShyg to get a recombinant eukaryotic expression plasmid pIREShyg-VP2, which was then transfected into the CHO-K1 cells. The expressed product was detected by IFA after the positive cell clone was selected with hygromycin. The result revealed that the main antigen domain for VP2 gene of *porcine parvovirus* was stably expressed in CHO-K1 cells.

Key words: *Porcine parvovirus* (PPV)；VP2；hygromycin；CHO-K1 cells.

关键词：猪细小病毒；VP2 蛋白；潮霉素；CHO-K1 细胞

中图分类号：S852.65　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1003-5125（2004）06-0636-03

猪细小病毒（*Porcine parvovirus*, PPV）是引起母猪繁殖障碍的主要病原之一[1]，可引起母猪流产、胚胎死亡、胎儿畸形、胎儿木乃伊化及不孕等，还可引起仔猪的皮炎和腹泻。PPV 在我国污染非常严重，部分地区阳性率达 90%以上[2]。PPV 能在大多数哺乳动物传代细胞系内长期潜伏感染，而且量少时不易检出，当细胞连续传代时可能引起细胞病变至细胞死亡,有可能给实验室带来较多麻烦。 VP2 蛋白是该病毒的主要结构蛋白之一，本研究构建含 VP2 蛋白的主要抗原表位基因的真核表达载体并获得其稳定表达的细胞株。

1 材料和方法

1.1 实验材料

PK-15 细胞和 CHO-K1 细胞以及 PPV 野毒株均由本教研组保存。pIREShyg 购自 Clontech 公司；PPV 高免血清购自中监所；阴性血清为本教研组分离的健康猪血清。HygromycineB 购自 Roche 公司；荧光标记的羊抗猪 IgG 购自上海晶美生物工程有限公司。

1.2 引物设计

根据 GenBank 已发表的编码 PPV VP2 序列，设计一对引物，

上游引物：5′-TT*GGATCC*ATGGCAACCTCACCACC-3′

收稿日期：2004-04-19，修回日期：2004-08-12
* 基金项目：国家"863"高技术发展计划资助项目(2001AA249012)。
作者简介：任雪枫（1972-），男，新疆籍，在读研究生，研究方向为动物传染病防治。
** 通讯作者．陈溥言（1942-），江苏南京籍，教授，研究方向为动物分子病毒学与免疫学。
Corresponding author. Tel:025-84396028, E-mail: aid @njau.edu.cn

维普资讯 http://www.cqvip.com

下游引物：5′-GGCC*GATATC*TGCATGTTAGATTTCCC-3′

1.3 病毒培养

将单层的 PK-15 细胞消化、分瓶，接种 PPV 野毒株，培养至出现 CPE 收获悬液，冻融三次，－20℃保存[3]。

1.4 目的片段的 PCR 扩增

取细胞悬液，常规方法提取病毒核酸进行 PCR: 95℃ 预变性 5min 后进入 PCR 循环，94℃ 1min，54℃ 1min，72℃ 1min，共 30 个循环，最后 72℃延伸 10min。1.5 重组表达质粒的构建。产物经 *Bam*H Ⅰ和 *Eco*RV 双酶切后补平回收，pIREShyg 用 *Bst*X Ⅰ单酶切线性化回收，两回收物 4℃连接过夜，转化 DH5α 感受态细胞后取单菌落培养过夜后提取重组质粒进行 PCR 鉴定，具体过程均参考常规方法操作[4,5]。

1.5 重组质粒 pIRE VP2I 转染 CHO-K1 细胞及相应细胞株的筛选

用磷酸钙法转染 CHO-K1 细胞,经潮霉素筛选 2-3 周。同时设空白质粒对照组。

1.6 间接免疫荧光(IFA)检测

筛选出的 CHO/VP2Ⅰ细胞接种 96 孔板，成单层后用预冷的丙酮：乙醇（6∶4）混合液于室温固定。PBS 洗涤后依次与 PPV 阳性血清和 FITC 标记羊抗猪荧光二抗反应，荧光显微镜观察。

2 结果与讨论

2.1 目的片段的 PCR 扩增

PCR 产物大小约为 868bp，与预期结果一致。

2.2 pIRES VP2I 的单酶切及 PCR 鉴定

*Bam*H Ⅰ酶切重组质粒及 pIREShyg，如图(1)。PCR 扩增见约 868bp 条带；表明重组质粒 pIRES VP2I 已构建成功。

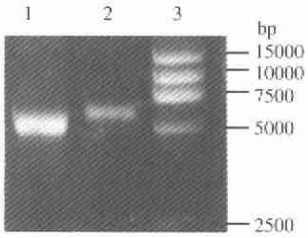

图 1 重组质粒 pIRESVP2Ⅰ酶切鉴定

Fig.1 Identification of recombinant plasmid pIRESVP2 I with restriction enzymes

1, pIRES digested with *Bam*H I; 2, pIRESVP2 I digested with *Bam*HI; 3, DL-15000marker .

2.3 PPV VP2 在细胞中的表达

将筛选出的阳性 CHO/VP2Ⅰ克隆和 CHO/hyg 及未转染的 CHO-K1 阴性细胞分别 IFA 试验，见特异性荧光（图 2-C），对照未见荧光（图 2-A、2-B）。表明 VP2Ⅰ在细胞中得到表达。

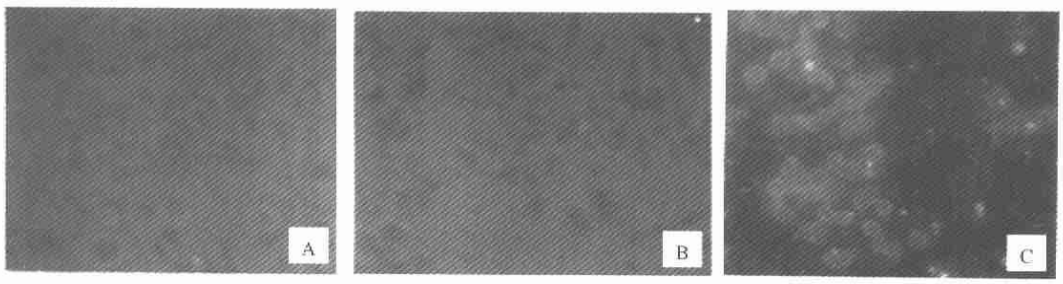

图 2 PPV VP2Ⅰ在细胞中的表达(免疫荧光法)

Fig.2 Expression of PPV VP2 by immunofluorescence (×100)

A ,CHO-K1 cells; B, CHO-K1 cells transfected with pIREShyg ; C, CHO-K1 cells transfected with pIRES VP2 I

传统真核表达载体在简化筛选和高效稳定表达的问题上尚有困难。其目的基因和筛选基因采用各自独立的表达盒，利用筛选基因得到的阳性克隆不一定是目的基因的表达，筛选效率较低且繁琐，而且由于启动子间的相互影响，表达常很不稳定[6]。

本研究中选用了 pIREShyg，其外源基因与筛选基因共处在同一个上游启动子的控制下，外源基因克隆位点和筛选基因之间有一内部核糖体进入位点（internal ribosome entry site, IRES）元件相连，可使外源基因和筛选基因同时转录，其选择压力加在整个表达盒上；在筛选基因表达的同时目的基因也得到了表达，加大压力可获得目的基因的稳定高表达[7]。故理论上只需一步筛选就可得到目的克隆，简化了阳性克隆的筛选工作。

我们构建的表达载体 pIREShyg VP2 转染 CHO 细胞经潮霉素筛选，所有得到的阳性克隆经间接免

维普资讯 http://www.cqvip.co

疫荧光鉴定均表达目的基因。经二个月传代，细胞基因组PCR与细胞总RNA 的RT-PCR的结果表明，VP2 I 基因已经整合到 CHO 细胞基因组中并转录了相应的mRNA，表明所建立的CHO/ VP2 I 细胞株非常稳定。本研究建立了稳定表达VP2蛋白的细胞株，可在一定程度上取代全病毒作为抗原的作用，给PPV的研究带来较多方便，为探索新的血清学诊断方法打下基础。

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: 1148-1150.

[2] 王在时，猪细小病毒病及研究进展[J]. 中国兽医杂志，1990, 16(5): 44-46.

[3] 殷 震，刘景华. 动物病毒学[M]. (第二版)，北京：科学出版社，1997:320-343.

[4] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manul[M]. 2nd. N Y: Cold Spring Harbor Labor Laboratory Press, 1989: 19-57.

[5] 梁国栋. 最新分子生物学实验技术[M].北京科学出版社, 2001, 22- 31.

[6] Emerman M, Temin H M. Comparison of promoter suppression in avian and murine retrovirus vectors[J]. Nucleic Acids Res. 1986 Dec 9; 14(23): 9381-96.

[7] Takebe N, Zhao S C, Ural AU, *et al*. Retroviral transduction of human dihydropyrimidine dehydrogenase cDNA confers resistance to 5-fluorouracil in murine hematopoietic progenitor cells and human CD34+-enriched peripheral blood progenitor cells[J]. Cancer Gene Ther. 2001 Dec; 8(12): 966-73.