

猪瘟病毒结构蛋白 E^{ms} 在 *E. coli* 中的高效表达及纯化*

尹双辉, 刘湘涛**, 韩雪清, 尚佑军, 孙士琪

(中国农业科学院兰州兽医研究所农业部畜禽病毒学重点实验室, 甘肃兰州 730046)

Expression and Purification of E^{ms} Gene of Classical Swine

Fever Virus in *E. coli*

YIN Shuang-hui, LIU Xiang-tao, HAN Xue-qing, SHANG You-jun, SUN Shi-qi

(Ministry of Agriculture the People's Republic of China Key Laboratory of Animal Virology, Lanzhou Veterinary Research Institute, Lanzhou 730046, China)

Abstract: The E^{ms} gene was amplified by RT-nPCR from C-strain of Classical swine fever virus (CSFV). Then the E^{ms} gene was cloned into pGEX6P-1 vector. The expression products were analysed by SDS-PAGE and Western blotting methods. The inclusion bodies were recovered from bacterial lysate by centrifugation and washed with buffer, and then dissolved in denaturing agents. The protein was refolded by dilution dialysis. Refold protein reacted strongly with the positive serum of CSFV, which indicated that the protein has immunogenic.

Key words: CSFV; E^{ms} gene; Protein expression

关键词: 猪瘟病毒; E^{ms} gene; 蛋白表达

中图分类号 S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1003-5153(2006)01-0075-04

猪瘟 (Classical swine fever, CSF) 是由猪瘟病毒 (Classical swine fever virus, CSFV) 引起的猪的高度接触性传染病, 是严重危害养猪业的传染病之一。CSFV 基因组为单股正链 RNA 分子, 长约 12.3kb, 仅编码一个开放性阅读框。位于 5' 端的囊膜糖蛋白 E^{ms}、E1 和 E2 构成了 CSFV 的外壳, 其中 E^{ms} 和 E2 参与病毒感染细胞的过程, 并能诱导宿主产生保护性免疫应答^[1]。目前研究的 CSFV 基因工程疫苗主要以 E2 蛋白作为抗原, 并通过检测 E^{ms} 的抗体来区分 E2 标记疫苗免疫猪和野毒感染猪, 有利于剔除猪群中潜在的传染源, 达到最终消灭猪瘟的目的。氨基酸序列比较发现, CSFV 的 E^{ms} 氨基酸序列中有地衣类与植物核糖核酸酶家族的特征序列, 属于胞外 RNase 家族, 具有 RNase 活性, E^{ms} 可降解病毒和细胞的 RNA, 在研究 CSFV 的致

病机制方面具有重要意义^[2]。本研究利用 RT-nPCR 技术, 克隆到了 E^{ms} 基因, 并利用大肠杆菌表达系统高效表达了 E^{ms} 蛋白, 纯化后的蛋白具有良好的生物学活性, 为进一步建立 E^{ms} 抗体的检测方法和探讨 E^{ms} 蛋白在 CSFV 致病过程中的作用奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

C-株猪瘟病毒由本室保存。RNA 提取试剂盒为 QIAGEN Biotech RNA-SOLV Reagent; DNA 片段回收试剂均为 TaKaRa (大连) 公司产品; 质粒提取试剂为博大泰克公司产品; ProBond Columns 蛋白纯化试剂盒购自 Novagen 公司; DH5 α 、BL21(DE3) plysS 由本室保存; pGEX6p-1 为清华大学生物系蛋

收稿日期: 2005-06-13, 修回日期: 2005-07-27

* 基金项目: 国家“863”高新技术研究发展计划资助项目 (2003AA241110)

作者简介: 尹双辉 (1977-), 男, 黑龙江省宁安籍, 硕士, 主要从事动物病毒分子生物学研究工作。

** 通讯作者: 刘湘涛 (1962-), 男, 湖南衡阳籍, 研究员, 主要从事动物病毒学研究。

Corresponding author. Tel: 0931-8342710, E-mail: HNxiangtao@hotmail.com.

白晶体研究室惠赠。

1.2 引物设计及合成

参照 CSFV Alfort 株^[3]和 Brescia^[4]序列,用 Oligo5.0 软件设计 2 对引物,引物由 TaKaRa(大连)公司合成,序列如下。

P1: 5'-ACCAGAATCCAGGAAGAA-3';

P1': 5'-TTTTGGGGAGGCAAGCGC-3'

P2: 5'-GCGAATTCGCATGGGCGGTGATAGCAAT
TATG-3';

P2': 5'-GCCTCGAGGTTAGTGTACCATATGTAC-3'

1.3 病毒 RNA 的提取、RT-PCR 反应及表达载体的构建

RNA 的提取参照 QIAGEN Biotech RNA-SOLV Reagent 的说明进行。用 5 μ L 反转录产物作为模板 P1、P1' 为引物进行 PCR 扩增。程序: 98 5min, 94 1min, 50 30s, 72 1min, 30 个循环, 72 延伸 8min。用第一次扩增产物作为模板, P2、P2' 为引物, 其余条件同第一次扩增。测序确认后, 将 E^{ms} 基因插入 pGEX6p-1 载体, 构建重组表达质粒 pGE-E^{ms}。

1.4 重组表达载体的试表达

测序验证后的重组质粒 pGE-E^{ms} 转化 BL21 (DE3)plysS 感受态细胞中, 重组菌按照常规的方法诱导。SDS-PAGE 电泳鉴定表达结果。

1.5 E^{ms} 蛋白的纯化和复性

用 50 mmol/L Tris.HCl 的重悬诱导后的菌体, 加入细菌裂解液 (50 mmol/L Tris.HCl、5 mmol/L MgCl₂、0.5 mmol/L EDTA、0.1 mol/L NaCl, pH8.0), 超声裂解菌体, 低温离心收集沉淀, 加入 8 mol/L 尿素室温作用 30min 裂解沉淀, 高速离心收集上清。纯化后的蛋白转移至含 8mol/L 尿素的复性液 (20 mmol/L Tris.HCl pH8.0, 0.5 mmol/L arginine, 1mmol/L EDTA, 1 mmol/L GSH, 1mmol/L GSSG) 中透析, 然后将复性液换成含有 (1mmol/L GSH, 1mmol/L GSSG) 的 Tris.HCl (pH8.0) 透析 6h, PBS 透析过夜, 离心收集上清, SDS-PAGE 蛋白电泳鉴定。

2 结果

2.1 E^{ms} 基因的克隆及原核表达载体的构建

切胶回收 RT-nPCR 扩增产物, 酶切纯化的 PCR 产物和载体 pGEX6p-1, 16 连接, 转化 DH5 α 感受态细胞, 提取质粒酶切鉴定, 测序确证成功构建重组表达载体 pGE-E^{ms}。

2.2 SDS-PAGE 和 Western blotting 鉴定表达产物
重组菌分别诱导 4h、5h 和 6h 后的样品经 SDS-

PAGE 鉴定。图 1A 可见 54kDa 大小的表达带, 与 E^{ms} 融合蛋白推导的分子量一致, 不同时间蛋白表达量没有明显的差异。在图 1B 中, Western blotting 试验在 54kDa 处观察到明显的杂交条带出现, 而对照样品未出现条带, 说明表达产物能被猪瘟抗血清识别。

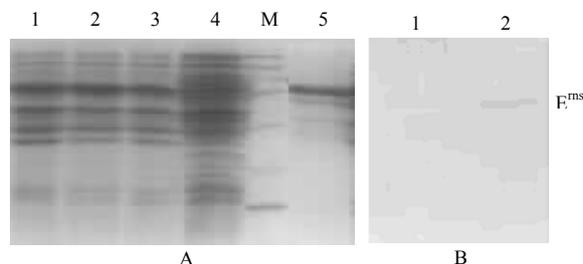


图 1 E^{ms} 基因在大肠杆菌中表达分析

Fig.1 Expression of E^{ms} gene in *E.coli*

A: SDS-PAGE. 1~3, Expression of E^{ms}; M: Protein marker (kDa: 118, 98, 67, 45, 36, 20, 14); 4, Cytoplasm suspension of recombinant plasmid without induction; 5, Purified E^{ms} protein; B: Western blotting. 1, Uninduced sample; 2, Induced sample.

2.3 E^{ms} 活性分析

利用 INDEXX 公司的抗原检测试剂盒检测结果表明, 复性的 E^{ms} 蛋白可以同 CSFV 抗体特异性结合, 具有良好的反应原性。另外, 将复性的 E^{ms} 和灭活的猪瘟全病毒作为抗原包被 ELISA 板, 平行检测已知猪瘟阴、阳性血清, 结果的符合率达到 85.6%, 表明获得的蛋白可以作为抗原用于检测 CSFV 抗体。

3 讨论

黄病毒科中, 蛋白质 E^{ms} 具有 RNase 催化活性。实验证明, E^{ms} 是病毒繁殖不可缺少的成份, 如果删除整个 E^{ms} 基因, CSFV 的 cDNA 将不能装配成完整的病毒子。E^{ms} 的 RNase 催化活性依赖于氨基酸残基 28~40, 71~89 两个活性区域, 这两个区域的 -His³⁰ 和 His⁷⁹ 对维持酶的催化活性至关重要, 若被赖氨酸替换, E^{ms} 将彻底失去酶活性, 由此推断这两个 His 残基可能在维持 E^{ms} 蛋白空间构像中发挥重要作用^[5]。CSFV E^{ms} 的生物学活性研究发现, CSFV 的 E^{ms} 可有效阻断猪源 CSFV、BVDV 对 SK6 和 PK15 等细胞的感染, 却不能有效阻断牛源 BVDV 对细胞的感染, 说明 E^{ms} 与宿主嗜性有关^[6]。

国内检测 CSFV 抗体的血清学方法所用抗原多为浓缩的全病毒, 存在着诸多不利因素, 而通过基因工程方法表达的抗原易纯化、易规模化生产, 和全病毒抗原比较具有相似的敏感性和特异性。目

前, 研制中的 CSFV 基因工程疫苗主要选择 E2 基因作为目的蛋白, 同时利用 E^{ms} 作为抗原建立配套的诊断方法, 用于区分 E2 抗原免疫猪和 CSFV 感染猪^[7]。我们下一步的工作是优化 E^{ms} 蛋白的复性条件, 以期获得活性更好的蛋白, 为建立血清学诊断方法提供材料。

References

- [1] Franck I B, Fauquet C M, Knudson D L, *et al.* Flaviviridae[M]. Arch Virol Supp, 1991, 12:223-233.
- [2] Schneider R, Unger G, Stark R E, *et al.* Identification of a structural glycoprotein of and RNA Virus as a ribonuclease [J]. Science, 1993, 261:1169-1171.
- [3] 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 E1[J]. Virology, 1990, 177:184-198.
- [4] Meyers G, Rumenapf T, Thie H. Molecular cloning and nucleotide sequence of hog cholera virus [J]. Virology, 1989, 171:555-567.
- [5] Hulst M M, Panoto F E, Homekman A, *et al.* Inactivation of the RNase Activity of glycoprotein E^{ms} of classical swine fever virvs results in a cytopathogenic virvs [J]. J Virol, 1998, 72:151-157.
- [6] Thiel H J, Stark R, Meiland E, *et al.* Hog Cholera Virus: Moleaular composition of virions from a petivirus [J]. J Virol, 1991. 65: 4705-4712.
- [7] Uttenthal A, Le Protier M F, Romerol L, *et al.* Classical swine fever (CSF) marker vaccine Trial I. Challenge studies in weaner pigs [J]. Veter Microbiol, 2001, 83: 85-106.

2005 年《中国病毒学》审稿专家名单

2005 年下列专家在百忙之中为本刊审阅稿件, 谨致忠心感谢!

(按姓名汉语拼音排列)

安学芳 白雪帆 毕英佐 曹务春 常国权 陈集双 陈剑平 陈金顶 陈启民 陈溥言
 陈士云 陈新文 陈绪林 陈 则 陈 智 成 军 车小燕 崔治中 丁明孝 丁清泉
 董长垣 范伟兴 范在丰 方呈祥 方 勤 高 福 高光侠 耿运琪 龚祖坝 郭德银
 郭福生 郭元吉 杭长寿 洪 健 胡远扬 扈荣良 黄克和 江丽芳 姜 平 姜世金
 金梅林 金宁一 孔宪刚 雷质文 李德富 李华平 李琦涵 李天宪 李 毅 梁国栋
 刘金华 刘胜旺 刘秀梵 卢亦愚 陆承平 陆 苹 孟继鸿 孟小林 宁 琴 潘 卫
 戚中田 乔文涛 秦爱建 邱并生 石正丽 宋文芹 孙 兵 孙建和 孙 啸 孙修炼
 孙永涛 唐祖明 涂长春 王 宾 王汉中 王华林 王健伟 王金忠 王珣章 王永山
 王佑春 文继开 闻玉梅 吴淑勤 吴祥甫 吴移谋 伍欣星 徐葛林 薛小平 严家新
 扬荣阁 杨东亮 杨汉春 杨继红 杨守京 杨占秋 叶林柏 袁正宏 张楚瑜 张传溪
 张富强 张华远 张奇亚 张彦明 张以芳 张忠信 章晓联 郑从义 钟 江 钟 扬
 周继勇 周雪平 朱函坪 朱振宇 祝庆余 左建平