

## 伪狂犬病病毒 gE 基因在昆虫细胞中的高效表达

方六荣 陈焕春\* 肖少波 何启盖 王革非

(华中农业大学牧医学院动物病毒室 武汉 430070)

关键词 伪狂犬病病毒 gE 基因 昆虫细胞 表达 乳胶凝集试验

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)04-0449-03

伪狂犬病病毒(Pseudorabies virus, PRV)属疱疹病毒科  $\alpha$ -疱疹病毒亚科,能引起多种家畜及野生动物的伪狂犬病,尤其是猪的伪狂犬病,已成为危害当今养猪业的最严重的传染病之一<sup>[1]</sup>。由于伪狂犬病病毒具有极强的潜伏感染特性和神经嗜性<sup>[2-3]</sup>,80 年代以前一直以为伪狂犬病无法根除。随着现代生物技术的发展,尤其是基因工程缺失标记疫苗和单克隆抗体技术的诞生与应用,才使该病的根除成为可能。目前,欧美等发达国家主要通过广泛接种 TK<sup>-</sup> gE<sup>-</sup> 基因缺失标记疫苗并结合 gE-ELISA 鉴别诊断血清学检测启动了猪伪狂犬病的根除计划,并取得了巨大成功,有的国家已宣布消灭了此病<sup>[4-5]</sup>。由于我国目前尚无自己研制的 gE 鉴别诊断试剂,进口试剂盒价格昂贵,而且也不是十分适合我国特有的养猪业模式,故我国猪伪狂犬病的根除计划尚未启动,严重影响了我国养猪业的健康发展与对外贸易。

为了利用 gE 体外表达产物建立猪伪狂犬病鉴别诊断方法,我们曾尝试以在 IBRS-2 细胞中表达的 gE 作为抗原,尽管抗原性很好,但非特异性很强,并且表达量极其有限<sup>[6]</sup>。因此,本研究采用杆状病毒载体作为表达系统,对 gE 在昆虫细胞中的表达以及利用表达产物建立 gE 乳胶凝集(gE-LAT)鉴别诊断方法进行了探讨,为尽快启动我国猪伪狂犬病的根除计划,从而最终消灭此病创造条件。

## 1 材料与方法

### 1.1 质粒、菌株与细胞

质粒 pSDM1.78<sup>+</sup> 含伪狂犬病病毒 Ea 株 gE 基因完整编码区以及起始密码子上游 45bps,由作者构建<sup>[6]</sup>并保存。Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统(包括转座质粒 pFastBac1、DH<sub>10</sub>Bac 受体菌)购自 GIBCO BRL 公司。昆虫细胞 Sf9、Tn-5B1-4,大肠杆菌 DH<sub>5</sub> $\alpha$  均由本室保存。

### 1.2 工具酶与试剂

各种限制酶为宝生物(大连)公司产品,T4DNA 连接酶、脂质体转染试剂盒 Lipfectin、Grace's 昆虫细胞培养基、胎牛

血清、无血清完全培养基 SF-900II SFM 为 GIBCO BRL 公司产品,DNA 快速回收试剂盒购自北京原平皓生物技术公司。

### 1.3 引物设计与 PCR 扩增

可扩增 PRV Ea 株 gE 基因 5'端编码区 370bp 片段的 PCR 引物,由上海生工生物工程公司合成。上游引物设计 BamHI 位点,下游引物设计 EcoRI 并利用了 gE 基因内部的 BstEII 位点。

上游引物 P<sub>1</sub>(27mer)5'-TTT GGATCC ACC ATGCGGCCCTTTCTG-3'

BamHI

下游引物 P<sub>2</sub>(25mer)5'-TTT GAATTC GGTCACCGACACGCGC-3'

EcoRI RstEII

扩增条件为 95℃ 5min 变性后进入循环,循环参数为:95℃ 1min,58℃ 1min,72℃ 1min,35 个循环后 72℃ 延伸 10min,1.5% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物。

### 1.4 DNA 重组技术

酶切、连接、转化、质粒提取等 均按常规方法操作<sup>[7]</sup>。

### 1.5 重组杆状病毒的获得与鉴定

质粒的转座、DH<sub>10</sub>Bac 目的菌落的筛选与纯化、Bacmid DNA 的提取、转染、PCR 模板的制备、重组病毒的扩增与空斑滴定等 按 GIBCO BRL 公司 Bac-to-Bac 表达系统操作手册进行。

### 1.6 重组病毒的扩增和 gE 的表达

扩增病毒时,以 0.1pfu 的重组病毒接种 Sf9 细胞,48h 后收集上清,并保存在 -70℃ 备用。gE 蛋白表达时,以 5~8 pfu 的重组病毒接种长至 70%~80% 的 SF-900 II SFM 培养的 Tn-5B1-4 细胞,27℃ 培养 72h 后,用 PBS(pH7.2)漂洗细胞 1 次,收集细胞,经上样缓冲液处理后进行 SDS-PAGE 电泳。

### 1.7 表达产物的 Western 印迹分析

将 SDS-PAGE 电泳的蛋白带转移到硝酸纤维素膜,用含 1%BSA 的 TBST 封闭,按 L. H. Ro<sup>[8]</sup>所介绍的方法用白陶土和同步培养的空白 Bacmid 表达产物 2 次吸附猪抗伪狂犬病病毒高免血清并作为一抗,辣根过氧化物酶标记的兔抗猪 IgG 为二抗,DAB 染色。

### 1.8 乳胶凝集抗原的制备与鉴别诊断试验

收集感染后 72h 的细胞 ,用 PBS( pH7.4 )漂洗 1 次 ,  
- 20℃反复冻融 3 次 ,超声波破碎 ,离心收集上清致敏乳胶。  
致敏乳胶抗原量及其方法按本实验室建立的方法<sup>[9]</sup>进行 ,对  
PRV 高免血清、标准阴性血清、临床送检血清进行 LAT 检测。

## 2 结 果

### 2.1 重组表达质粒的构建

先以 pSDM1.78 + 为模板 ,P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub> 为引物 ,通过 PCR 扩增  
gE 基因 5'端部分编码区( ATG-*Bst*E II 片段 ,0.37kb ) ,纯化的  
扩增产物克隆到 pFastBac1 的 *Bam*H I 和 *Eco*R I 位点 ,重组  
质粒命名为 pFE0.37。再用 *Bst*E II 和 *Not* I 酶切 pSDM1.78  
+ ,回收 gE 基因编码区 *Bst*E II 位点后的片段( *Bst*E II -Stop  
片段 ,1.38kb )并将其插入 pFE0.37 的 *Bst*E II 和 *Not* I 位点 ,  
获得消除了 5'端非编码区 45bp 的 gE 全基因重组表达质粒  
pFE1.75( 图 1 )。

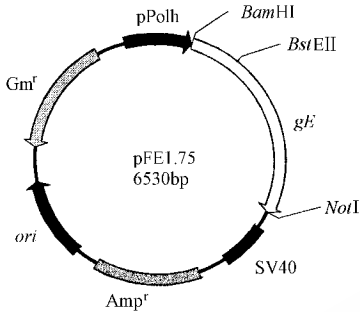


图 1 重组表达质粒 pFE1.75 的结构

Fig.1 Construction of the recombinant expression plasmid pFE1.75

### 2.2 重组病毒的获得

pFE1.75 转化 DH<sub>10</sub>Bac 感受态 ,选择 PCR 鉴定为阳性的  
菌落接种适量三抗液体培养基 ,提取 Bacmid DNA ,电泳显示  
Bacmid DNA 完整。在脂质体介导下 ,将其转染 Sf9 细胞 ,约  
96h 后可观察到细胞病变、细胞变圆肿大、折光性明显增强 ,  
正常细胞则没有这种变化。

### 2.3 重组病毒的 PCR 鉴定

提取重组病毒 DNA 进行 PCR 扩增 ,电泳可见在 0.37kb  
处出现特异性扩增条带 ,与阳性对照一致 ,而阴性对照没有  
特异性带出现( 图未显示 ) ,说明 gE 基因已整合到重组杆状  
病毒中 ,因此所获得的重组病毒为目的病毒 ,将其命名为  
rvBacE1.75。

### 2.4 gE 的表达与检测

rvBacE1.75 经 Sf9 细胞扩增 ,空斑试验结果表明 ,重组病  
毒的滴度约为( 3 ~ 5 ) × 10<sup>7</sup> pfu/mL。以 5 ~ 8pfu 的 rvBacE1.75  
感染 Tn-5B1-4 细胞 ,72h 后分别收集上清和细胞 ,SDS-PAGE  
检测可见重组病毒感染的细胞在大约 88kD 处出现一条特异  
性条带 ,与预期的大小相当 ,空白 Bacmid 感染的细胞则无此  
带( 图 2a )。进一步进行 Western 印迹分析 ,结果在 80 ~ 88kD  
处出现 3 条阳性条带( 图 2b ) ,可能是因为糖基化程度不同所  
致。SDS-PAGE 和 Western 印迹分析分别检测培养基上清 ,均  
没有发现表达带( 图未显示 ) ,说明 gE 的表达是非分泌性的。

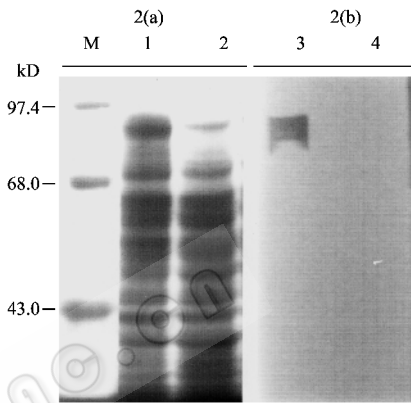


图 2 gE 在 Tn-5B1-4 中的表达( a )和 Western 印迹分析( b )

Fig.2 Expression of gE in Tn-5B1-4( a ) and the  
result of Western blotting( b )

M. Marker ;1. rvBacE1.75( 72h p. i ) ;2. Negative control( Bacmid ) ;  
3. rvBacE1.75 4. Bacmid

### 2.5 gE-LAT 诊断试验

用 gE 的表达产物致敏的乳胶分别检测高免血清 30 份、  
阴性血清 44 份、送检血清 127 份 ,并以全病毒致敏乳胶和国  
外进口 gE-ELISA 试剂盒作平行检测 ,结果见表 1。从表 1 中  
可以看出 ,30 份高免血清用 3 种检测方法全为阳性 ,说明用  
杆状病毒表达的 gE 建立的 LAT 鉴别诊断具有很好敏感性 ;  
44 份阴性血清中 ,gE-LAT 和 virus-LAT 均有一份假阳性 ,说明  
LAT 的特异性略低于 ELISA ,在 127 份待检血清中 ,gE-LAT 和  
gE-ELISA 均为阳性的有 73 份 ,均为阴性的有 47 份 ,另有 7  
份血清二者结果不符 ,总的符合率为 94.5% ,但 gE-LAT 检测  
为阳性的 virus-LAT 检测也为阳性 ,符合率为 100%。在实验  
中还发现 ,gE-LAT 形成的凝集颗粒没有全病毒致敏的乳胶  
颗粒明显 ,这可能同 gE-LAT 只有单一蛋白参与反应有关。

表 1 gE-LAT 的敏感性、特异性及其平行比较检测试验

Table 1 Specificity and sensitivity for gE-LAT and comparison with gE-ELISA and virus-LAT

	gE-LAT	gE-ELISA	Virus-LAT
Positive sera( n = 30 ) <sup>(1)</sup>	100%( 30/30 ) <sup>(2)</sup>	100%( 30/30 )	100%( 30/30 )
Negative sera( n = 44 )	2.3%( 1/44 )	0%( 0/44 )	2.3%( 1/44 )
Tested sera( n = 127 )	60.6%( 77/127 )	59.1%( 75/127 )	83.5%( 106/127 )

Note ( 1 ) n indicated the number of the samples ;( 2 ) The results are showed as ratio of the numbers of positive to the numbers of all tested sera samples  
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

3 讨 论

在我们以前的研究中发现 ,包含 5'非编码区 46bp 的 gE 全基因在杆状病毒表达系统中表达量较低 ,SDS-PAGE 电泳观察不到明显的表达带 ,Western 印迹才能检测特异性带(文中未显示) ,这可能与 gE 基因 5'非编码区 G + C 含量较高有关 ,也可能是起始密码子 ATG 与杆状病毒多角体启动子距离太远所致。为了消除这种因素 ,本研究通过 PCR 扩增截去 5'非编码区 ,同时考虑到昆虫细胞高效表达外源基因对 ATG 前 3 后 4 碱基的要求保留了 ATG 前的 ACC 3 个碱基 ,从表达结果看 ,表达量明显提高。

在世界各国伪狂犬病根除计划中 ,采用最广泛的是 TK<sup>-</sup>/gE<sup>-</sup> 双基因缺失标记疫苗( Marker vaccine )和 gE-ELISA 鉴别诊断方法<sup>[4-5]</sup>。目前 ,我国强制性的根除计划尚未实施 ,极少数猪场自行制定了本场的根除计划 ,采用的主要是价格昂贵的进口 gE-ELISA ,并且 ELISA 在我国大部分猪场尚无开展 ,而乳胶凝集具有快速、简便、无需特殊仪器等优点 ,更适合我国特殊的养猪模式。本实验室曾以全病毒粒子致敏乳胶 ,建立了猪伪狂犬病乳胶凝集诊断方法<sup>[9]</sup>。但存在不能区分 gE 缺失疫苗免疫猪血清和野毒感染猪血清的缺陷。鉴于此 ,本研究对昆虫细胞中表达的 gE 作为乳胶凝集鉴别诊断抗原进行了初步探讨。从样品检测数据看 ,该方法特异、敏感、快速、简便 ,对该方法的进一步完善将有助于我国根除计划的启动。

REFERENCES(参考文献)

[ 1 ] Mettenleiter T C. Aujeszky 's disease ( pseudorabies ) virus :the virus and molecular pathogenesis-state of the art. *Vet Res* ,2000 ,**33**( 1 ) :99 ~ 115

[ 2 ] Nauwynck H J. Functional aspects of Aujeszky 's disease ( pseudorabies ) viral proteins with relation to invasion ,virulence and immunogenicity. *Vet Microbio* ,1997 ,**55**( 1 ~ 4 ) :3 ~ 11

[ 3 ] Zuckermann F A. Aujeszky 's disease virus :opportunities and challenges. *Vet Res* ,2000 ,**33**( 1 ) :121 ~ 131

[ 4 ] Engel M and Wierup M. Eradication of Aujeszky 's disease virus from a Swedish pig herd using gI<sup>-</sup>/TK<sup>-</sup> vaccine. *Vet Rec* ,1997 ,**140**( 19 ) :493 ~ 495

[ 5 ] Stegeman A. Aujeszky 's disease ( pseudorabies ) virus eradication campaign in the Netherlands. *Vet Microbiol* ,1997 ,**55**( 1 ~ 4 ) :175 ~ 180

[ 6 ] He Q G ,Xiao S B ,Fang L R *et al* . Cloning ,sequence analysis of the gE gene of pseudorabies virus Ea strain and its expression in IBRS-2 cell line. *Proceedings in 16<sup>th</sup> congress of the international pig veterinary society* . Melbourne ,Intervet Press 2000 ,556

[ 7 ] Sambrook J ,Fritsch E F ,Maniatis T. *Molecular Cloning :A Laboratory Manual* . 2<sup>nd</sup> ed. New York :Cold Spring Harbir Laboratory Press , 1989

[ 8 ] Ro L H ,Chen R J ,Shiuan D. Rapid purification of antiserum against Mycoplasma hyopenumoniae by an efficient absorption method. *J Biochem Biophysci Methods* . 1994 ,**28** :155 ~ 159

[ 9 ] HE Q ( 何启盖 ) ,CHEN H ( 陈焕春 ) ,QIU D X ( 邱德新 ) *et al* . The serologically epidemical survey on swine pseudorabies by Latex Agglutination Test. *Chinese Journal of veterinary and Technology* ( 中国兽医科技 ) ,1999 ,**29**( 1 ) :7 ~ 9

Expression of the gE Gene of Pseudorabies Virus In Insect Cells

FANG Liu-Rong CHEN Huan-Chun\* XIAO Shao-Bo HE Qi-Gai WANG Ge-Fei

( Laboratory of Animal Virology ,College of Animal Science and Veterinary Medicine ,Huazhong Agricultural University ,Wuhan 430070 ,China )

**Abstract** In order to develop a simple and safe test for the detection of vaccinated as well as wild type Pseudorabies virus ( PRV ) infected pigs ,the modified gE gene of PRV Ea strain ,obtained by cutting the 5 ' UTR using PCR and DNA recombinant technique ,was inserted into baculovirus expression vector pFastBac 1 ,resulting the trans-position plamid pFE1 .75 . After homologous recombination ,recombinant baculovirus rvBacE1 .75 was gained and high level expression of glycoprotein E ( gE ) was observed after the infection of rvBacE1 .75 to Tn-5B1-4 cells . The expression product was 80 ~ 88kD and was specific to antisera against PRV Ea strain by Western-blotting . Purified recombinant proteins were used as an antigen in Latex Agglutination Test ( gE-LAT ) and the test was specific ,sensitive ,safe and simple .

**Key words** pseudorabies virus ( PRV ) ,gE gene , insect cells , expression , latex agglutination test ( LAT )

Received :January 20 2001

This work was supported by grant from Chinese National Programs for Science & Technology Department ( 96-C01-04-03 )

\* Corresponding author . Tel 86-27-87283705 ,Fax 86-27-872608 ,E-mail :hzauvet@public.wh.hb.cn