

# 猪瘟疫病毒 E<sub>2</sub> 基因主要抗原区的克隆及原核表达

张永国<sup>1,2</sup> 刘湘涛<sup>1\*</sup> 韩雪清<sup>1</sup> 刘希成<sup>2</sup> 张彦明<sup>2</sup> 谢庆阁<sup>1</sup>

<sup>1</sup>( 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, 兰州 730046 )

<sup>2</sup>( 西北农林科技大学畜牧兽医学院, 杨凌 712100 )

**摘要** 利用反转录 PCR( RT-PCR )和套式 PCR( nest Polymerase Chain Reaction, nPCR )技术扩增出当前猪瘟疫流行毒( 广西玉林株 GXYL )与中国猪瘟疫免化弱毒( C-株 )免脾组织毒 E<sub>2</sub> 基因的主要抗原区, 将其克隆到表达载体 pPROEX-HTb 中, 获得重组质粒 pPROEX-GXYL 和 pPROEX-C。经 PCR、酶切和序列分析鉴定表明, 插入的位置、大小和读码框均正确。SDS-PAGE 检测表明, 经重组质粒 pPROEX-GXYL 和 pPROEX-C 转化、诱导的受体菌能表达 E<sub>2</sub> 基因主要抗原区蛋白, Western-blot 检测表明, 诱导表达的抗原蛋白能与猪瘟疫阳性血清发生特异性反应。

**关键词** 猪瘟疫病毒, E<sub>2</sub> 基因, 主要抗原区

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)05-0605-04

猪瘟疫( Hog Cholera, HC )是由猪瘟疫病毒( Hog Cholera Virus, HCV )引起的猪的急性高度接触性传染病, 对养猪业危害极大。我国每年有 3% 的饲养猪死于猪瘟疫, 其中 90% 是仔猪。仔猪在哺乳期从母乳获得母源抗体, 哺乳期仔猪的抗感染能力与泌乳母猪的抗体水平关系密切<sup>[1]</sup>, 猪群抗体水平的监测是有效防治猪瘟疫的重要措施之一。能区分猪瘟疫强、弱毒和牛病毒性腹泻病毒( BVDV )的单抗的研制成功, 使 ELISA 技术在猪瘟疫免疫猪抗体监测中的应用更为广泛<sup>[2,8]</sup>。由于所用抗原为完整病毒, 不易生产、纯化, 且存在感染性, 在应用中存在局限性。研究表明, 猪瘟疫病毒 E<sub>2</sub> 基因编码的 gp55 蛋白是引起动物产生保护性免疫的主要抗原蛋白<sup>[2]</sup>, 与完整猪瘟疫病毒相比, 重组蛋白无感染性, 而且具有易于生产和纯化等优点。依据猪瘟疫病毒株的毒力、抗原性、致病性及血清学特性, 法国 Corthier 和 Aynaud 将猪瘟疫病毒株分成 group A 和 group B 两个群。我们选择 group A 中的 C-株与 group B 中的 GXYL 株作为代表毒株进行克隆表达。表达的 2 株毒的 E<sub>2</sub> 蛋白均与猪瘟疫阳性血清发生特异性反应, 为建立以基因表达蛋白为检测抗原的 ELISA 诊断方法奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 广西玉林株与 C-株**: 广西玉林株采自广西玉林市, 经兔体交互免疫试验确证; C-株引自中国兽药监察所。

**1.1.2 菌株与质粒**: 大肠杆菌 DH5 $\alpha$  和 BL21( DE3 )均由本室保存, pPROEX-HTb 购自 GIBCOBRL 公司。

**1.1.3 试剂**: pPROEX-HTb 及 TRL ZOL<sup>R</sup> LS Reagent 试剂盒购自 GIBCOBRL 公司; IPTG 购自 Sigma 公司, 其他试剂购自国内外各试剂公司。

### 1.2 广西玉林株与 C-株的 E<sub>2</sub> 基因主要抗原区基因的获取

**1.2.1 引物设计及合成**: 参照 C-株序列, 设计 4 条引物, 其中正负链各 2 条, 引物由宝生物( 大连 )工程有限公司合成, 引物位置( 参照 C-株 )及序列如下:

表 1 引物的编号、序列、位置、长度

Table 1 The code sequence location and length of the primers

Primer	Sequence	Location	Length( nt )
E <sub>1</sub>	5'TGTATTAGACGACTGG3'	2222 ~ 2239	18
E <sub>1</sub> '	5'CTGCCAACCGCCGTCTATCT3'	3793 ~ 3773	21
E <sub>2-10</sub>	5'GCGGATCCCGATACTTGGCATTCATTGCAT3'	2256 ~ 2285	29
E <sub>2-11</sub>	5'GCCTCGAGCCCAACTTACAGTAGAATA3'	2588 ~ 2616	28

**1.2.2 RNA 提取** 参照试剂盒操作说明书进行。

**1.2.3 RT-PCR 和 nPCR** :RT-PCR 取提取的总 RNA 12 $\mu$ L 片段下游引物 E1' 1 $\mu$ L ,65 $^{\circ}$ C 预热 10min ,立即冰浴 5min 后加入 5 倍的反转录缓冲液 4 $\mu$ L , dNTP2 $\mu$ L , AMV1 $\mu$ L ,使总体积为 20 $\mu$ L ,42 $^{\circ}$ C 反应 1h。PCR 和 nPCR :取反转录产物 5 $\mu$ L ,10 倍的 PCR 缓冲液 5 $\mu$ L , MgCl<sub>2</sub> 3 $\mu$ L , dNTP 4 $\mu$ L ,引物 E1 ,E1' 各 1 $\mu$ L ,Taq 酶 0.5 $\mu$ L 加水至 50 $\mu$ L 扩增。反应条件为 95 $^{\circ}$ C 50s 48 $^{\circ}$ C 60s ,72 $^{\circ}$ C 120s ,35 个循环 ,最后在 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。nPCR :取一扩增产物 1 $\mu$ L ,加入引物 E2-10、E2-11 各 1 $\mu$ L ,其余条件及步骤均同 PCR。

**1.2.4 目的基因与 pGEM-T-Easy 载体的连接、转化、质粒提取及纯化**参照文献 [6] 进行。

**1.2.5 重组质粒经 PCR、限制酶鉴定为阳性的质粒** 送宝生物(大连)工程有限公司 ,采用自动化测序仪测序 ,获得的重组质粒命名为 pGEM-GXYL 和 pGEM-C。

**1.3 广西玉林株与 C-株 E<sub>2</sub> 基因主要抗原区表达质粒的构建**

双酶切质粒 pGEM-GXYL 和 pGEM-C 以及表达载体 pP<sub>RO</sub>EX-HTb 并分别纯化回收 ,将回收的目的基因与表达载体用 T4 DNA 连接酶 16 $^{\circ}$ C 连接 10h ,连接产物转化感受态大肠杆菌 BL21( DE3 )。用碱裂解法小量提取重组质粒 ,利用 PCR、限制酶酶切鉴定阳性重组质粒 ,测序鉴定 E<sub>2</sub> 基因主要抗原区插入的位置、大小和读码框是否正确。获得的重组质粒命名

为 pP<sub>RO</sub>EX-GXYL 和 pP<sub>RO</sub>EX-C。

**1.4 重组质粒在大肠杆菌中的表达**

将分别含 pP<sub>RO</sub>EX-GXYL 和 pP<sub>RO</sub>EX-C 的 BL21 ( DE3 )重组菌接种于含 100 $\mu$ g/mL 氨苄西林钠的 2 $\times$ YT 培养基中 ,参照文献 [6] 进行培养、诱导 ,处理菌体后离心 ,收集上清和沉淀。在相同条件下培养、诱导含 pPROEX-HTb 的受体菌作为对照。

**1.5 重组质粒在大肠杆菌中表达产物的检测**

**1.5.1 SDS-PAGE** :收取的菌液离心后弃上清 ,用 PBS 液悬浮后加入等体积的 2 $\times$ SDS-PAGE 上样缓冲液于沸水中煮 10min 作为加样的样品。积层胶浓度为 5% ,分离胶浓度为 10% ,每个加样孔上样 20 $\mu$ L ;采用 90V 电压电泳 ,电泳结束后考马斯亮蓝 R250 染色、脱色分析。

**1.5.2 Western-blot** :样品的处理及电泳参照 1.5.1。将在转移缓冲液中浸泡 1h 的滤纸、海绵、NC 膜依次放入塑料夹中后以 180mA 转移 3h ,转移结束后取出 NC 膜 ,剪下 Marker 与一个泳道 ,氨基黑染色观察转移的效果。NC 膜用封闭液浸泡过夜 ,用 PBST 洗涤 3 次 ,加入猪瘟阳性血清 37 $^{\circ}$ C 结合 1.5h 后用 PBST 洗涤 3 次 ,加入辣根过氧化物酶标记兔抗猪二抗 37 $^{\circ}$ C 结合 1h PBST 洗涤 3 次 ,显色。

## 2 结 果

**2.1 DNASTAR 软件分析得到 E<sub>2</sub> 蛋白的抗原指数曲线示意图(见图 1) :**

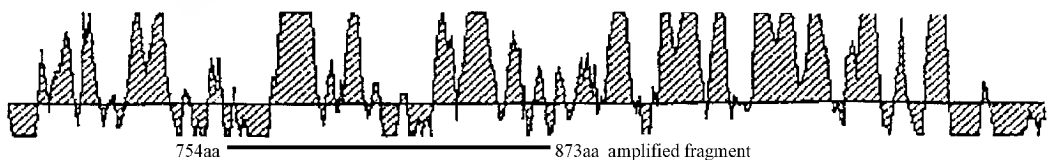


图 1 E<sub>2</sub> 蛋白的抗原指数曲线

Fig.1 Antigenic exponential curve of protein E<sub>2</sub>

由图 1 可见在 E<sub>2</sub> 蛋白主要抗原结构域 N-端前 200 个氨基酸序列中 ,有 3 个主要区域的抗原指数较高。在保证表达的蛋白具有抗原性的前提下 ,避开不利于在大肠杆菌中表达的基因<sup>[10]</sup>区域后 ,选取包括具有中和性抗原域的 A1/A2 区和既不保守也不诱导产生中和抗体的 D 区 ,以及 B、C 区一段抗原性较高的区域 ,从 753 ~ 872 氨基酸残基对应的核苷酸序列共 360bp 进行了表达。

**2.2 nPCR 扩增及 pGEM-GXYL 和 pGEM-C PCR 和酶切鉴定结果**

以 E<sub>2-10</sub>、E<sub>2-11</sub> 为引物进行 nPCR 扩增 ,质粒

pGEM-GXYL 和 pGEM-C 进行 PCR 和酶切均有与预测的大小相符(360bp)的片段 ,质粒 pGEM-GXYL 和 pGEM-C 的测序结果证明包含正确的广西玉林株与 C-株 E<sub>2</sub> 基因主要抗原区(结果略)。

**2.3 质粒 pP<sub>RO</sub>EX-GXYL 与 pP<sub>RO</sub>EX-C 的 PCR 鉴定及酶切鉴定结果**

质粒 pP<sub>RO</sub>EX-GXYL 与 pP<sub>RO</sub>EX-C 的 PCR 鉴定及酶切鉴定产物电泳结果见图 2 ,可以看出 ,均有与 360bp 大小相符的片段 ,重组质粒重组融合蛋白大小相符。pP<sub>RO</sub>EX-GXYL 和 pP<sub>RO</sub>EX-C 测序结果证明广西玉林株与 C-株 E<sub>2</sub> 基因主要抗原区插入的位

置、大小和读码框均正确,测序结果略。

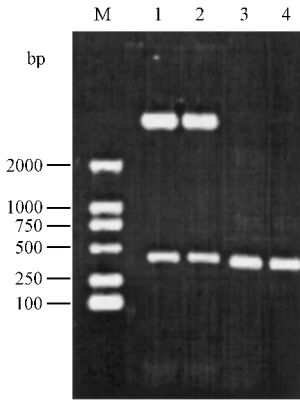


图2 重组质粒 pPROEX-GXYL 和 pPROEX-C 的酶切和 PCR 鉴定

Fig.2 PCR and restriction analysis of recombinant plasmid pPROEX-GXYL and pPROEX-C

1、2. Restriction analysis of pPROEX-GXYL and pPROEX-C  
3、4. PCR identification of pPROEX-GXYL and pPROEX-C

### 2.4 重组表达质粒 pP<sub>RO</sub>EX-GXYL 和 pP<sub>RO</sub>EX-C 构建(见图3)

### 2.5 SDS-PAGE 和 Western-blot 检测的结果

pP<sub>RO</sub>EX-HTb、pP<sub>RO</sub>EX-GXYL 和 pP<sub>RO</sub>EX-C 转化、诱导的 BL21( DE3) 的菌体蛋白,用 B-PER<sup>®</sup> Reagent 试剂盒处理后,取沉淀和上清分别作 SDS-PAGE 电泳,结果在沉淀中出现 17kD 左右额外条带,见图4(左)与预测的表达的重组融合蛋白大小相符,而上清中则未见多余条带,说明表达的重组蛋白以包含体形式存在。薄层扫描显示 pP<sub>RO</sub>EX-GXYL 的表达量为菌体总蛋白量的 38%, pP<sub>RO</sub>EX-C 的表达量为

菌体总蛋白量的 35%。Western-blot 检测的结果见图4(右),从图可以看出,在 17kD 的位置,诱导菌体蛋白中有明显的特异性条带,而对照则没有该条带。由此可见构建的两种 E<sub>2</sub> 基因主要抗原区重组表达质粒转化 BL21( DE3) 菌经诱导后均能表达 E<sub>2</sub> 基因主要抗原区蛋白。

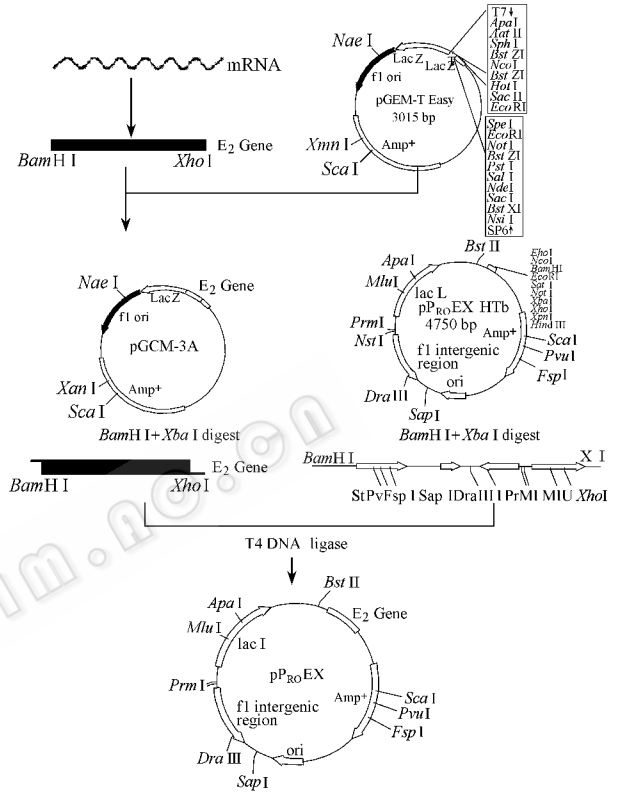


图3 重组表达质粒 pP<sub>RO</sub>EX 构建图

Fig.3 Construction of recombinant plasmid pP<sub>RO</sub>EXE2

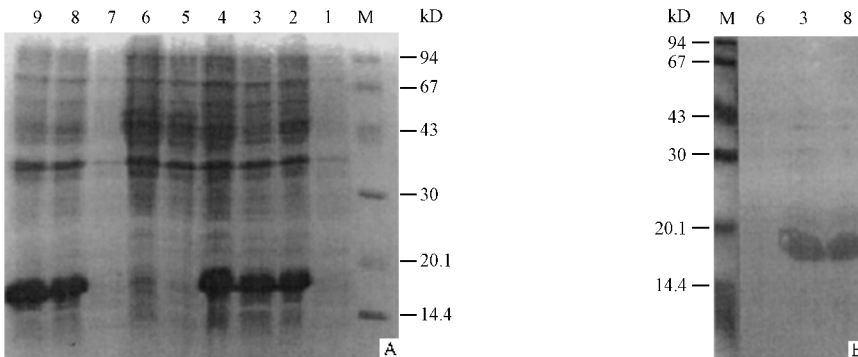


图4 表达蛋白的 SDS-PAGE(A) 和 Western-blot(B) 检测结果

Fig.4 SDS-PAGE(A) 和 Western-blot(B) detection of protein expressed in *E. coli*

M. Marker ; 1. pP<sub>RO</sub>EX-C transformed BL21( DE3) ( Before induced with IPTG )  
2、3、4. pP<sub>RO</sub>EX-C transformed BL21( DE3) ( After induced with IPTG 2、3、4 hours )  
5、6. pP<sub>RO</sub>EX-HTb transformed BL21( DE3) ( After induced with IPTG 3、4 hours )  
7. pP<sub>RO</sub>EX-GXYL transformed BL21( DE3) ( Before induced with IPTG )  
8、9. pP<sub>RO</sub>EX-GXYL transformed BL21( DE3) ( After induced with IPTG 3、4 hours )

### 3 讨 论

本实验选择的猪霍乱兔化弱毒(C-株)和猪霍乱流行毒广西玉林株的基因型分属于 group A 和 group B 2 株毒 E<sub>2</sub> 基因的同源性为 86.98% ,可作为目前我国存在的猪霍乱病毒的代表株<sup>[4]</sup>。对其 E<sub>2</sub> 基因主要抗原区蛋白分别进行原核表达后,表达蛋白量分别为 38% 和 35% ,用 Western-blot 和 ELISA 等方法检测,具有期望的免疫反应性,有望代替完整病毒作为 ELISA 检测用的标准抗原。在表达水平上 2 株毒构建的表达质粒有所差别,可能是由于 2 株毒在表达区段有 15 个氨基酸的差异所致,但二者在 Western-blot 检测发现特异性都很强,表明氨基酸的差异不影响反应原性,仅对表达量有一定的影响,对表达量有影响的具体氨基酸定位有待进一步的研究。

### REFERENCES (参考文献)

[ 1 ] LIU X T (刘湘涛), ZHAO Q Z (赵启祖), LI Z R (李忠润) *et al.* HCR and the control of Hog cholera. The immunological research progress of important diseases of animals and avian. Beijing: Chinese Agricultural Sci-tech Press, 1996, pp. 321 ~ 330

[ 2 ] FU L Z (付烈振), ZHANG C Y (张楚瑜), ZHU Y (朱燕). Hog cholera and CSFV molecular biology. The immunological research progress of important diseases of animals and avian. Beijing: Chinese

Agricultural Sci-tech Press, 1996, pp. 32 ~ 40

[ 3 ] HAN X (韩), LI H W (李红卫), LIU X T (刘湘涛) *et al.* Sequence analysis of the partial genes of swine fever virus purified from the spleen tissues of rabbits inoculated with Chinese Lapinized hog cholera attenuated vaccine virus. *Chinese Journal of Veterinary Science and Technology*(中国兽医科技), 1998, 28(6): 13 ~ 17

[ 4 ] ZHANG Y Q (张永国), LIU X T (刘湘涛), HAN X (韩雪清) *et al.* Amino-acid difference in the main antigen domain GP55(E<sub>2</sub>) of the C-strain and the Guangxi prevalent strains hog cholera virus (HCV). *Journal of Northwest Sci-tech University of Agriculture and Forestry*(西北农林科技大学学报), 2002, 2: 79 ~ 84

[ 5 ] 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. *Virology*, 1990, 177: 184 ~ 198

[ 6 ] Meyers G, Rumenapf T, Thie H. Molecular cloning and nucleotide sequence of hog cholera virus. *Virology*, 1989, 171: 555 ~ 567

[ 7 ] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd, Beijing: The Science Press, 1995

[ 8 ] Van Rijin P A. A preliminary map of epitopes on envelope glycoprotein E1 of HCV strain Brescia. *Veterinary Microbiology*, 1992, 33: 212 ~ 230

[ 9 ] Van Rijin P A. Antigen structure of envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus. *Journal of general Virology*, 1994, 68: 3934 ~ 3942

[ 10 ] Zhang S, G. Zubay, E Goldman. Low-usage codons in *Escherichia coli*, yeast, fruit fly and primates. *Gene*, 1991, 105: 61 ~ 72

## Cloning of the Major Antigen Region of E<sub>2</sub> Gene of Hog Cholera Virus and Expression in *Escherichia coli*

ZHANG Yong-Guo<sup>2</sup> LIU Xiang-Tao<sup>1\*</sup> HAN Xue-Qing<sup>1</sup> LIU Xi-Cheng<sup>2</sup> ZHANG Yan-Ming<sup>2</sup> XIE Qing-Ge<sup>1</sup>

<sup>1</sup>(Lanzhou Veterinary Research Institute, CAAS, Lanzhou 730046, China)

<sup>2</sup>(North-west Science and Technology University of Agriculture Forestry, Yangling 712100, China)

**Abstract** The major antigen region of E<sub>2</sub> gene of Hog Cholera Prevalent Strain (Guangxi Yuling Strain) and Chinese Hog Cholera Lapinised Virus (C-strain) derived from hog and rabbit spleen tissue, was amplified by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and the nested Polymerase Chain Reaction (nPCR). After the amplified fragments were cloned into the expression vector pP<sub>RO</sub>EX-HTb, the recombinant plasmids pP<sub>RO</sub>EX-GXYL and pP<sub>RO</sub>EX-C were obtained. The insert position, the size and the reading frame were right by PCR, restriction digestion and the sequence analysis. SDS-PAGE indicated that both of the recipient germs transduced and induced by the recombinant plasmids pP<sub>RO</sub>EX-GXYL and pP<sub>RO</sub>EX-C could express the major antigen region of E<sub>2</sub> gene. Western-blot indicated that the expressed antigen protein could be recognized by the positive serum of CSFV.

**Key words** Hog Cholera Prevalent Strain (Guangxi Yuling Strain), Chinese Hog cholera Lapinised virus (C-strain), the major antigen region of E<sub>2</sub> gene

Received: 05-08-2002

This work was supported by project of the State Key Basic Research and Development Program (No. G199901190).

\* Corresponding author. Tel: 86-931-8342710; E-mail: hxixiangtao@hotmail.com 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>