

# 猪瘟病毒 E0 蛋白的原核表达及其重组蛋白活性测定

王生育<sup>1</sup> 颜江华<sup>2</sup> 张长弓<sup>2</sup> 李文珠<sup>4</sup> 庄国洪<sup>2</sup> 黄印尧<sup>3\*</sup>

1. 厦门波生生物技术有限公司 2. 厦门大学医学院抗癌研究中心

3. 厦门出入境检验检疫局 4. 厦门大学生命科学院 福建 厦门 361005

**摘要** 通过重叠 PCR 合成猪瘟病毒 E0 基因, 将该片段定向插入到 pET-22b 载体中, 构建原核表达载体 pET-22b/E0, 转化大肠杆菌 BL21 (DE3), IPTG 诱导表达, 比较不同诱导条件下的蛋白表达, 确定其最佳表达条件。重组蛋白主要以包涵体的形式表达, Ni<sup>2+</sup> 亲和层析柱纯化蛋白, 逐步透析法复性。通过方阵试验确定包被抗原的最适工作浓度, 为了测定 E0 蛋白的活性, 本文初步建立了检测猪瘟血清抗体水平的间接 ELISA 方法, 为开发检测猪瘟抗体诊断试剂奠定基础。

**关键词** E0 基因 表达 包涵体 纯化 间接 ELISA

中图分类号: S852.65\*1

文献标识码: A

文章编号: 1003-4331(2006)02-0001-03

猪瘟病毒 (Classical swine fever virus, CSFV) 属于黄病毒科 (Flaviviridae) 瘟病毒属 (Pestivirus)。病毒基因组为单股正链 RNA 分子, 长约 12.3kb, 含有一个大的开放性阅读框 (ORF), 编码 3 898 个氨基酸残基的多聚前体蛋白。从 5' 到 3' 端, ORF 可顺次翻译衣壳蛋白 C 和高度糖基化的囊膜糖蛋白 E0 (或称 Ems)、E1、E2 等四种蛋白, 以及 3 到 5 种非结构蛋白<sup>[1][2]</sup>。其中 E0 和 E2 参与病毒感染细胞过程, 并且诱导宿主机体产生保护性免疫应答。在病毒粒子中 E0 通常以同源二聚体的形式存在, 分子量约为 100kD<sup>[3]</sup>。E0 缺乏膜锚定结构, 大量的 E0 蛋白从感染的细胞中分泌到细胞外<sup>[4]</sup>。并具有 RNA 酶活性, 可降解病毒和细胞的 RNA。E0 能够导致机体的免疫抑制, 引起动物的淋巴细胞和上皮细胞凋亡<sup>[5]</sup>。CSFV 感染的猪出现白细胞减少和免疫抑制, 这一现象提示 E0 在 CSFV 的致病过程中起重要作用。

为了进一步研究 E0 的生物活性及建立 CSFV 抗体检测系统, 本文利用 pET-22b 载体构建 E0 的高效表达系统, 且对重组蛋白的活性作初步鉴定和为构建抗体检测试剂进行初步探索。

## 1 材料与方法

**1.1 实验材料** 大肠杆菌 BL21 (DE3) 由厦门大学医学院抗癌研究中心提供; pET-22b 载体为 Novagen 公司产品; 引物由上海生工生物工程有限公司合成。pfu DNA 聚合酶、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶为 NEB 产品。Ni<sup>2+</sup>-HiTrap Chelating HP 树脂为 Amersham Pharmacia Biotech 公司产品。液体猪瘟正向间接血凝抗原试剂盒购自中国农科院兰州兽医研究所。猪抗猪瘟病毒高免血清、待检血清、猪瘟阴性血清由厦门出入境检验检疫局提供。辣根过氧化物酶标记的兔抗猪 IgG 抗体由厦大抗癌中心制备。

**1.2 引物设计** 经 GenBank 检索分析, 参照已公布的猪瘟中国石门毒株 (Classical swine fever virus strain

Shimen/HVRI, complete genome. AY775178) 选取 E0 基因, 根据密码子的简并性和大肠杆菌的密码子喜好性原则, 在不影响氨基酸序列的前提下, 修改 E0 序列中部分稀有密码子。将其分为 15 条长引物, 各长引物之间设计 12 个互补序列, 经重叠 PCR 得到 E0 基因 (见 1.3)。利用引物 P16: 5' ATGCCCATGGCCGAAAAT-ATTAC 3', P17: 5' ATTACTCGAGGCAGTAAGGTGATAG 3' 引入酶切位点 Nco I 和 Xho I。

**1.3 重叠 PCR 合成基因** 经 4 轮重叠 PCR 将 15 个长引物片段拼接成完整的 E0 基因序列。反应条件均为: 95℃ 预变性 4 min; 95℃ 变性 40 s, 53℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 1 min, 循环 10 次; 95℃ 预变性 4 min; 95℃ 变性 40 s, 58℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 1 min, 循环 30 次; 72℃ 延伸 10 min。按如下示意图 1 进行。

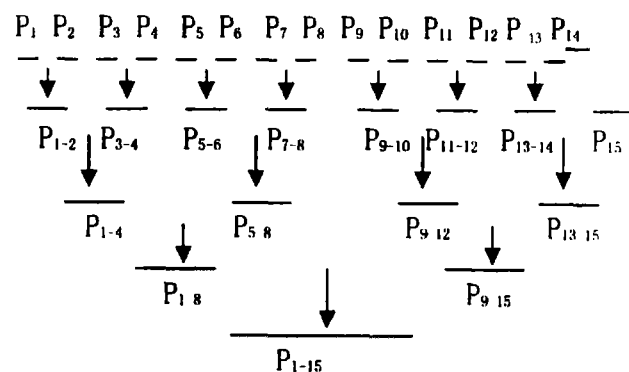


图 1 重叠 PCR 合成基因示意图

**1.4 重组表达质粒的构建** 将合成的 E0 基因与载体 pET-22b 分别用 Nco I, Xho I 消化, 胶纯化回收。用 T4 DNA 连接酶将 E0 基因克隆至质粒 pET-22b 中, 构建重组质粒 pET-22b/E0, 转化 E. Coli BL21 (DE3), 重组子质粒经酶切鉴定, 阳性克隆送上海英俊生物技术有限公司测序, 将测序正确的重组质粒命名为 pET-22b/E0。

**1.5 重组基因的诱导表达、纯化** 将阳性单菌株接

种含 Amp 的 LB 液体培养基中,振荡培养过夜后,按比例放大培养至 OD<sub>600 nm</sub> 值约 0.6~0.8 时,加入 IPTG 进行诱导表达,确定最佳的诱导浓度和诱导时间。目的蛋白的纯化参照 Amersham Pharmacia Biotech 公司提供的 Ni<sup>2+</sup> 柱蛋白纯化操作手册进行。采用透析法复性。12% SDS-PAGE 分析结果。

**1.6 EO 蛋白的活性鉴定和最适工作浓度的建立**  
 选用已知猪瘟阳性血清(反向血凝效价为 1:512)、阴性猪血清对包被的抗原进行检测。经初步活性检测,选用 EO 蛋白 20 μg/ml、10 μg/ml、5 μg/ml、2.5 μg/ml 四种浓度分别包被 96 孔酶标板,100 μl/孔(每种浓度各包被一块板),10% 兔血清封闭包被板,同时把酶标兔抗猪 IgG(二抗)按 1:1000、1:2000、1:4000、1:8000 四种不同浓度做 ELISA 方阵试验,TMB(四甲基联苯胺)显色,用 2N 盐酸中止反应,在 450 nm 波长读 OD 值。选定阴性值小于 0.05、阳性值与阴性值比值最大(P/N 值最大,计算时阴性 OD 值如果小于 0.05 时按 0.05 计算)的配对作为包被及酶标使用条件,确定最适抗原包被浓度和酶标稀释倍数。

**1.7 间接 ELISA 检测方法的建立** 以方阵滴定试验确定的抗原包被浓度作为抗原工作浓度,同时取两孔分别加入按最适倍数稀释的阳性、阴性血清作为对照,初步建立检测猪瘟血清抗体的间接 ELISA 方法,对收集的 32 份猪血清进行检测,并且用液体猪瘟正向间接血凝抗原试剂盒作比较。

## 2 结果

**2.1 合成基因的鉴定** 用各层引物扩增的产物,经琼脂糖凝胶电泳检测,得到与预期大小相符的各层 DNA 条带(图 2)。

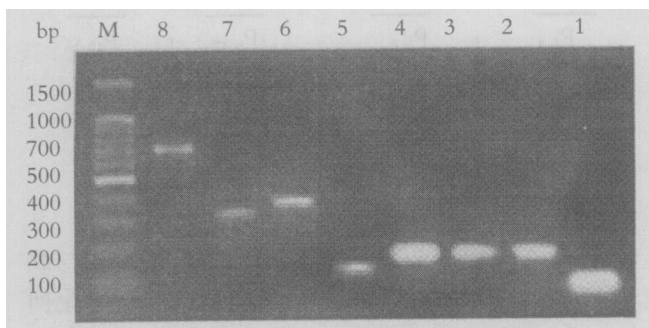


图 2 PCR 产物电泳图(1.7%琼脂糖)

Fig1 1.7% Agarose gel electrophoresis of PCR

M: DNA marker, 1: P<sub>1-2</sub> 106bp, 2: P<sub>1-4</sub> 200bp, 3: P<sub>5-4</sub> 200bp, 4: P<sub>7-12</sub> 200bp, 5: P<sub>13-15</sub> 135bp, 6: P<sub>1-8</sub> 388bp, 7: P<sub>7-15</sub> 323bp, 8: P<sub>1-15</sub> 699bp

**2.2 重组质粒的构建** pEF-22b/EO 重组菌株提取 E. Coli BL21 质粒酶切得到约为 5 Kb 和 700 bp 的

片段,与预期结果相符,结果见图 3。测序结果证明 EO 基因插入的位置、大小和读码框均正确

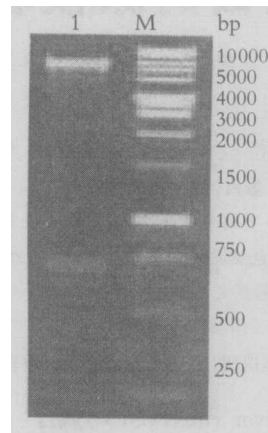


图 3 重组质粒 pET-22b/EO 的酶切鉴定

Fig. 3 Identification of recombinant

plasmid pET-22b/EO by restriction enzyme analysis

M: DNA marker ;1: NcoI 和 XhoI 双酶切 pET-22b/EO 质粒

**2.3 EO 蛋白最佳的诱导表达条件的建立** 用 1 mmol/L 终浓度的 IPTG,对培养至 OD<sub>600 nm</sub> 为 0.6~0.8 的细菌培养物于 37℃ 诱导,并且在不同时间取出,其后进行 SDS-PAGE 电泳。在确定最佳诱导时间的基础上,将不同浓度 IPTG、不同时间诱导的细菌培养物再进行 SDS-PAGE 电泳(图 4),由图 4 可见,诱导 4 h 表达量最高,与诱导 5 h 的表达量相当。同时 IPTG 终浓度为 0.4 mmol/L 表达产量最高。

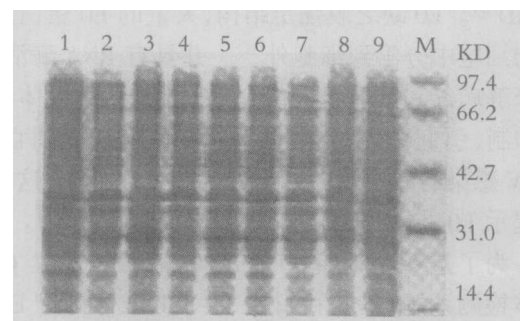


图 4 不同浓度 IPTG 和不同诱导时间蛋白产物的表达

Fig.4 protein induced with different IPTG concentration and time

M: protein Marker; lane

1~6: IPTG 终浓度为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0mmol/L 诱导表达;

7~9: IPTG 诱导表达 3、4、5h

**2.4 表达产物的 SDS-PAGE 电泳** 将表达物和沉淀超声裂解物上清液分别电泳,结果显示在 28 kD 处有一表达带,与预期的目的蛋白带大小一致,表明 EO 基因获得表达,而未诱导菌、空载体菌没有出现相同的条带,同时可以看出目的蛋白绝大部分出现在超声沉淀中,这说明融合蛋白主要以包涵体的形式表达。结果见图 5。

**2.5 表达蛋白的亲合纯化** 包涵体处理后,过 Ni<sup>2+</sup> 亲和柱,用 Elute buffer(20mM Tris-HCL pH7.9、1M Imidazole、0.5M NaCL)洗脱亲和蛋白,收集的蛋白呈正态分布,见图 6,胶上几乎只出现一条蛋白质条

带,说明经亲和层析纯化到较高纯度含  $6 \times \text{His}$  的 EO 融合蛋白。通过紫外分光光度计扫描,计算蛋白质浓度(C):  $C = 1.45 \text{ OD}_{280} - 0.74 \text{ OD}_{260}$ ,测得纯化样品浓度为  $0.8 \text{ mg/mL}$ 。

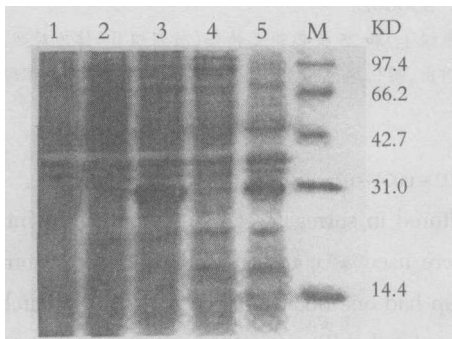


图5 表达蛋白的SDS-PAGE分析

Fig5 SDS-PAGE analysis of the expression of fusion protein  
1: pET-22b 空白表达菌 2: 未诱导重组菌 3: 诱导表达菌 4: 超声波上清液 5: 超声波沉淀 M: 蛋白 Marker

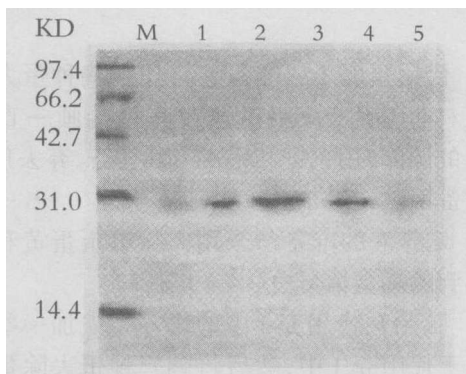


图6 纯化蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig6 Analysis of the purified proteins by SDS-PAGE  
M: 蛋白 Marker 1~5: Elute buffer 依次洗脱液

2.6 EO 蛋白活性鉴定和 ELISA 最适工作浓度的建立 ELISA 试验表明,纯化后的重组 EO 蛋白可以与猪瘟阳性血清发生特异性结合,3 次测得结果均相同。方阵实验结果确定抗原稀释最佳浓度为 1:160,即抗原包被浓度为  $5 \mu\text{g/mL}$ 。

2.7 样品 ELISA 检测结果 应用方阵试验所建立的间接 ELISA 方法和间接血凝检测试剂盒,对收集的 32 份猪瘟血清样品进行检测,结果间接 ELISA 检测方法检出的抗体效价均高于间接血凝方法所得到的效价。说明间接 ELISA 方法比间接血凝方法具有更好敏感性。

### 3 讨论

以往国内外表达猪瘟 EO 蛋白均采用 RT-PCR 获得 EO 基因,本试验首次采用重叠 PCR 方法直接获得基因,即在保持 EO 基因所编码的氨基酸不变的前提下,修改部分稀有密码子,使得 EO 基因在大肠杆菌中高效表达。

本试验采用 pET-22b 载体,其 N 端带有  $6 \times$

His,这为纯化蛋白提供了方便。实验证明重组蛋白以包涵体的形式表达。利用高浓度的尿素溶解包涵体,并直接用  $\text{Ni}^{2+}$  柱纯化,获得了较纯的重组蛋白。所用的镍金属层析柱是依据 6 个组氨酸中咪唑基与  $\text{Ni}^{2+}$  的螯合而使表达蛋白得到纯化,具有快速、特异等优点。

国内外同行专家都把是否产生 EO 蛋白抗体作为是否感染猪瘟病毒的依据<sup>[6]</sup>。目前,国内用于检测猪瘟抗体水平的方法所用抗原大多为完整的病毒粒子,以全病毒作为检测抗原存在较多的缺点<sup>[7]</sup>。利用原核表达系统高效表达的 EO 蛋白,具有 CSFV EO 抗原的特异性。同时通过方阵试验初步建立的间接 ELISA 方法可用于猪瘟血清抗体检测,说明表达的猪瘟 EO 蛋白具有很好的活性,而且 ELISA 试剂的敏感性远高于间接血凝试剂。以此说明本试验表达的猪瘟 EO 蛋白完全可以作为构建猪瘟抗体检测试剂的理想抗原。

### 参考文献

- [1] 杨小燕. 福建省龙岩地区规模化猪场传染病流行概况[J]. 福建畜牧兽医,2005,27(1):47-49.
- [2] 夏春香等. 猪圆环病毒病研究进展[J]. 动物医学进展,2005,26(1):35-38.
- [3] 唐建华等. 猪圆环病毒感染及其对策[J]. 畜禽业,2004(3):38-39.
- [4] 孔爱云等. 猪圆环病毒病的诊断与防治[J]. 动物医学与动物科学,2004(9):36-38.
- [5] 王海震,李学仁,冯秀丽,等. 猪瘟病毒 E2 蛋白主要抗原域的高效表达及间接 ELISA 方法的初步建立. 中国生物工程杂志,2005,25(1):81-85.
- [6] Koning M, Lengsfeld T, Paulty T, et al. Classical swine fever virus Independent induction of protective immunity by two structural proteins[J]. Journal of Virology, 1995,69(6):479-486.
- [7] Terpstra C. Special review series: Hog cholera: an update of present knowledge[J]. Br Vet J. 1991,47:397-406.
- [8] Thiel H-J, Stark R, Meiland E, et al. Hog Cholera Virus: Molecular composition of virions from a pestivirus[J]. J Virol, 1991, (65):4705-4712.
- [9] Ru menapf, Unger TG, Strauss JH, et al. Processing of the envelope glycoproteins of Pestiviruses[J]. J VIROL. 1993, (67):3288-3294.
- [10] Hulst MM, Himes G, Newbigin E, et al. Glycoprotein E2 of classical swine fever virus: expression in insect cells and identification as a ribonuclease[J]. Virology, 1994, (200):558-565.
- [11] Ahrens U, Kaden V, Drexler C, et al. Efficacy of the classical swine fever(CSF) marker vaccine Porcillus Pesti in pregnant sows[J]. Vet Microbiol. 2000,77:83-97.

作者简介:王生育(1978-),男,福建安溪人,学士,主要从事分子生物学及免疫学研究。TEL:0592-2186980;E-mail:wsy4235@sina.com  
\* 通讯作者:黄印尧(1946-),男,高级兽医师,从事动物检疫。

(本期 P1~P14 责任编辑:朱云林)