

# 猪伪狂犬病毒囊膜糖蛋白 gB 主要抗原表位区基因的克隆及原核表达

罗飞<sup>1,2</sup>, 陈义平<sup>1</sup>, 陆明哲<sup>1</sup>, 彭大新<sup>2</sup>, 周洁<sup>1</sup>, 李宇琴<sup>2</sup>, 徐宝娟<sup>1</sup>, 南文龙<sup>1</sup>

(1. 中国动物卫生与流行病学中心诊断液研究室, 山东青岛 226032; 2. 扬州大学兽医学院, 江苏扬州 225009)

**摘要:** 参照 GenBank 发表的猪伪狂犬病毒囊膜糖蛋白 gB 主要抗原表位的编码区基因序列, 设计一对引物, 通过 PCR 扩增后, 将约为 600bp 的目的片段克隆到 pGEM-T 载体上, 酶切后插入原核表达载体 pET-32(a) 的 T7 启动子下游, 构建的重组质粒 pET-gB 经 IPTG 诱导, 在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中获得了高效表达。SDS-PAGE 结果显示, 表达产物分子量约为 42.4KDa, 主要以包涵体形式存在。BandScan 分析表明, 表达量约占菌体蛋白的 60.5%。利用 His 亲和层析方法得到了纯化的表达产物。Western blotting 结果显示, 重组蛋白能与阳性血清发生特异性反应, 具有较好的抗原反应原性, 可以作为检测用抗原。

**关键词:** 猪伪狂犬病毒; 囊膜糖蛋白 gB; 主要抗原表位; 原核表达

中图分类号: S852.659.1 文献标识码: A 文章编号: 1005-944X(2009)12-0027-03

## Cloning and Prokaryotic Expression of Major Domain of Pseudorabies Virus Envelop Glycoprotein gB in Escherichia Coli

LUO Fei<sup>1,2</sup>, CHEN Yi-Ping<sup>1</sup>, LU Ming-Zhe<sup>1</sup>,

PENG Da-Xin<sup>2</sup>, ZHOU Jie<sup>1</sup>, LI Yu-Qin<sup>1,2</sup>, XU Bao-Juan<sup>1</sup>, NAN Wen-Long<sup>1</sup>

(1. Diagnostic Reagent Laboratory, China Animal Health and Epidemiology Center, Qingdao 266032;

2. College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou, 225009)

**Abstract:** According to the gene sequences of pseudorabies virus envelope glycoprotein gB published in genbank, a pair of primers was designed. The major epitope of pseudorabies virus envelop glycoprotein gB was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and cloned into pGEM-T vector, then inserted into the downstream of T7 promoter to construct a recombinant plasmid pET-gB. After induction by IPTG, the fusion protein was highly expressed in Escherichia Coli BL21 (ED3) in the form of inclusion bodies. BandScan analysis showed that the ratio of the protein is 60.5% of the total protein. The recombinant protein was purified with His-Bind affinity chromatography. SDS-PAGE and Western blotting analyses revealed that the recombinant protein with the expected 42.4KDa could react with pig serum containing antibody against PRV. All result indicated that the recombinant fusion protein can be used as an antigen of diagnostic assay to detect the PRV antibody in swine serum.

**Key words:** pseudorabies virus; envelope glycoprotein gB; major epitope domain; prokaryotic expression

伪狂犬病 (Pseudorabies, PR) 是由伪狂犬病病毒 (PRV) 引起的多种家畜和野生动物的一种重要传染病。其特征是: 发热、奇痒及脑脊髓炎<sup>[1]</sup>。该病毒属疱疹病毒甲亚科, 猪为其原始宿主, 并可作为贮主。其他家畜和野生动物呈散发形式感染本病<sup>[2]</sup>。该病分布广泛, 危害严重, 已给世界畜牧业尤其是养猪业造成了巨大损失<sup>[3]</sup>。在欧美等发达国家, 主要采用基因缺失标记疫苗 (Marker Vaccine) 配合相应的血清学鉴别诊断方法来根除此病<sup>[4-5]</sup>。在我国猪伪狂犬病的根除计划尚未启动。目前已对 PRV 的多种糖蛋白 (gB、gC、gD、gE、gG、gH、gK、...) 编码基因进行了定位及其功能研究<sup>[6-7]</sup>。

基金项目: “十一五” 国家科技支撑项目 (2006BAD6A13)

通讯作者: 陈义平

糖蛋白 gB 是病毒一种主要囊膜糖蛋白, 能诱导机体产生中和抗体<sup>[1,8]</sup>。本研究旨在通过大肠杆菌表达系统体外表达 gB 蛋白主要抗原表位区, 为建立 gB-ELISA 检测方法提供所需的检测用抗原。

### 1 材料和方法

#### 1.1 菌、毒种、质粒和细胞

宿主菌 E. Coli DH5a、E. Coli BL21 (DE3)、表达载体 pET-32(a)、PRV 病毒 SD 株、PK15 细胞均由中国动物卫生与流行病学中心诊断液试剂室保存; pGEM-T 载体购自美国 Promega 公司。

#### 1.2 工具酶及各种试剂

Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、BamH I 和 HindIII 限制性内切酶以及 DNA Ligation Kit Ver2.0 均购自大连宝生物公司; 羊抗猪 Ig-HRP 购

自北京索莱宝 (solarbio) 科技有限公司; DAB 显色试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 PRV gB 基因的克隆

根据 GenBank 上发表的各株 PRV gB 基因序列, 进行比对后设计一对引物序列, 上下游引物的 5' 端分别加上 BamH I 和 HindIII 限制性内切酶位点。待扩增的目的片段上包含 gB 基因的多个主要抗原编码区。

P1: 5'- GGATCCGCGCACGTGAACGACAT-3'  
P2: 5'- AAGCTTGAGCGCGTGCAGCTGGTT-3'

将病毒接种到 PK15 细胞, 3-4 天细胞出现明显病变后, 反复冻融三次收获病毒。从细胞病毒液中提取病毒 DNA 作为模板, 进行 PCR 扩增, 产物克隆到 pGEM-T 载体上, 用 BamH I 和 HindIII 双酶切鉴定, 获得阳性质粒

pGEM-T-gB。

### 1.3.2 原核表达载体的构建

用 BamH I 和 HindIII 双酶切阳性质粒,回收 600bp 的目的片段,与同样经过 BamH I 和 HindIII 双酶切的线性表达载体 pET-32(a) 连接,转化到 BL21 感受态细胞,涂布于 AIX 平板面 37℃ 温箱培养过夜,于次日早晨挑取白斑进行培养并提取细菌质粒进行双酶切鉴定出含有目的片段的阳性重组子,命名为 pET-gB。

### 1.3.3 重组蛋白的诱导表达

将含重组质粒 pET-gB 阳性菌以 1:100 接种到含有 100mg/L Amp 的 LB 液体培养基中,37℃,230r/min 震荡培养至 OD<sub>600</sub> 0.6-0.8 时,用终浓度为 1mM 的 IPTG 诱导 4h,取适量菌液,进行 SDS-PAGE。

### 1.3.4 重组蛋白可溶性分析

加入终浓度为 1mM 的 IPTG。继续震荡培养 4h 后,收集菌液,取适量菌液离心收集菌体,加入 5×SDS-PAGE 上样缓冲液,于沸水中水浴 8min,取 5μL 进行 SDS-PAGE。同时取诱导好的菌液,离心收集菌体,以适当比例用 1×Binding Buffer 重悬菌体,冰上超声波破碎至菌液澄清。12000r/min 离心 20min,分别收集上清和沉淀进行 SDS-PAGE,确定重组蛋白是可溶性表达还是包涵体表达。

### 1.3.5 重组蛋白的纯化

将沉淀(即包涵体)用 1×Binding Buffer 洗两次,以适当比例加入含 6M 尿素的 1×Binding Buffer 重悬,4℃ 搅拌过夜。16000g,4℃ 离心 30min,收集上清,经 0.45μm 过滤器过滤后用 His 亲和层析柱过柱纯化,收集纯化的蛋白进行 SDS-PAGE。

### 1.3.6 Western blotting 检测

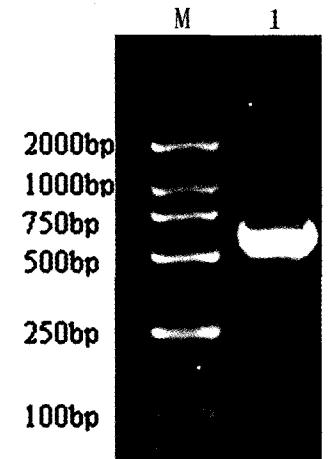
将 SDS-PAGE 后的凝胶用半干转印法以恒压 20V 转印 30min 到 PVDF 膜后,用 5% 脱脂奶粉 4℃ 封闭过夜,一抗为猪抗 PRV 阳性血清,二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗猪 IgG,最后用 DAB 显色试剂盒显色。

## 2 结果

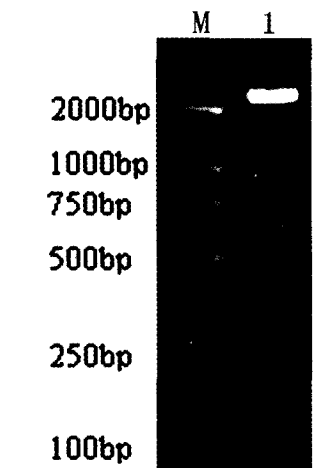
### 2.1 PRV gB 基因主要抗原区克隆

PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳,可见一条大小约为 600bp 的条带(图 1),与预期大小相当。回收目的片段,连接到 pGEM-T 载体上,得到克隆质粒 pGEM-T-gB,双酶切鉴定表明该片段已经正确连接到载体上(图 2)。

用 BamH I 和 HindIII 双酶切克隆质粒,回收目的片段连接到 pET-32

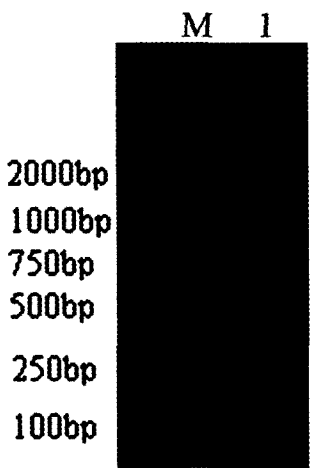


M: DL2000 Marker; 1: PCR 结果  
图1 PCR扩增的结果



M: DL2000 Marker; 1: pGEM-T-gB 质粒 BamH I 和 HindIII 双酶切  
图2 pGEM-T-gB 质粒双酶切结果

(a) 的相应位点,重组质粒 pET-gB 经酶切证实已经成功构建(图 3)

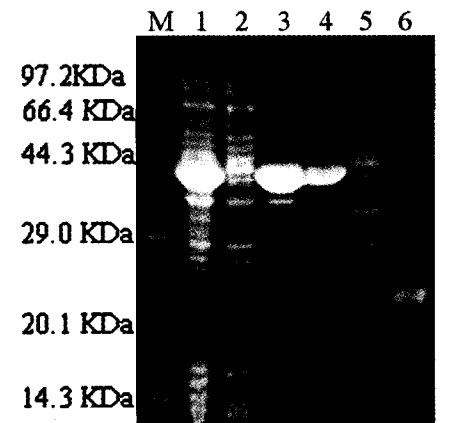


M: DL2000 Marker; 1: pET-gB 重组质粒 BamH I 和 HindIII 双酶切  
图3 重组质粒 pET-gB 的酶切结果

### 2.2 重组蛋白的诱导表达及纯化

SDS-PAGE 结果显示(图 4), pET-gB 在约 42.4kDa 处有一条很浓

的特异性蛋白条带,与预期的融合蛋白大小一致,而未经诱导的 pET-gB 转化菌则无此条带,原始 pET-32(a) 转化菌经 IPTG 诱导后出现约 20.4kDa 的 6×His 蛋白条带。



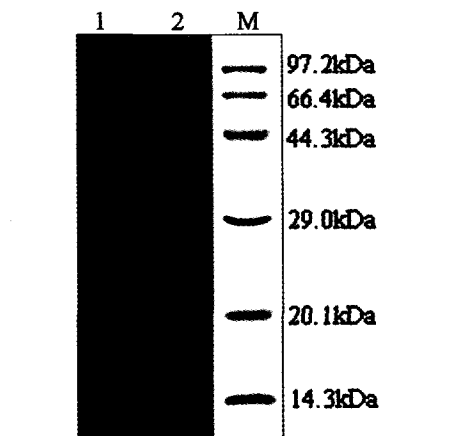
M: 蛋白分子量标准; 1: 重组质粒 pET-gB 转化菌经 IPTG 诱导后的表达产物; 2: 超声波裂解上清; 3: 超声波裂解沉淀; 4: 经 His 纯化后的重组蛋白; 5: 重组质粒 pET-gB 转化菌未经 IPTG 诱导; 6: pET-32(a) 转化菌经 IPTG 诱导后的 His 蛋白

### 图4 表达产物 SDS-PAGE 分析

将重组菌体进行超声波裂解后,分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE,结果显示,重组蛋白以包涵体形式表达。重组蛋白经 His 亲和层析柱纯化后,获得了纯化的重组抗原。

### 2.3 重组蛋白的 Western blotting 鉴定

Western blotting 鉴定结果(图 5)显示,在约 42.4kDa 处出现着色条带,作为对照,无关蛋白无此特异条带。表明重组蛋白能与 PRV 阳性血清发生特异性结合。



M: 预染蛋白质分子量标准; 1: 无关蛋白; 2: 重组质粒 pET-gB 转化菌表达产物

### 图5 表达产物的 Western blotting 分析

## 3 讨论

PRV 囊膜糖蛋白 gB 是由 gBa (下转第 36 页)

## 2.2 流式细胞仪分析结果

选择可培养菌数为零时的实验菌株进行流式细胞仪检测。经分析确定,图2中的I区代表PI染色的死菌,II区代表SYTO9染色的活菌,III区则代表未染色的细菌,IV区为不确定区即此区内的细菌无法判定是活菌还是死菌。在图2中,II区内的细菌浓度远远高于I区,表明活菌数量远远高于死菌。而与正常状态大肠杆菌比较,图2-2和图2-4的II区内至少存在两种形态不同的“颗粒”,结合上述荧光图像,可以断定是不同形态(杆状、球状或球杆状)的菌体。结果表明,当大肠杆菌诱导30d后,不但存在数量众多的活菌,而且有部分细菌菌体形态发生变化。结合上述可培养菌数测定与荧光显微镜观察结果可知,实验菌株进入了VBNC状态。

## 3 讨论

流式细胞仪自20世纪70年发明以来,广泛应用于免疫学、血液学、肿瘤学、细胞生物学、细胞遗传学、生物化学等临床医学和基础医学,以及海洋浮游植物和海洋细菌的分类计数等方面<sup>[3]</sup>。随着生物技术不断发展,流式细胞仪也被大批应用于进出口

检验之中,特别是对于VBNC细菌研究则更显优势,优点如下:(1)能明显地识别细菌进入VBNC状态后,形态所发生的变化。通过流式图示所显示颗粒所在区域的分散程度、位置等而定;(2)流式细胞仪与荧光染料的联合运用可客观评价细菌的活性状态<sup>[4]</sup>。Live/Dead试剂盒由两种专染核酸染料组成,一种是绿色荧光染料SYTO-9,是一种能渗入完整的细胞膜的小分子;一种为红色染料碘化丙啶PI,是一种仅能渗到细胞膜破损的菌体内的大分子,并且与SYTO-9竞争核酸着染位点。经此试剂盒染色后,发出绿色荧光的为活细胞,发出红色荧光的为死细胞,据此流式细胞仪能在极短时间内迅速将活死细胞分辨出来;(3)能较准确地分析出活死细菌的数量或两者数量的比例关系。但该项技术在实际应用中也存在一些缺点:(1)虽能如实反映出某一微生物区系中的细菌总数,存活状态,以及活死细胞数量关系等,但却无法鉴定和识别某一具体的微生物,尤其是处于VBNC状态的未可培养细菌;(2)流式细胞仪分析样品所需的荧光染料较多,剂量较大,价格昂贵,不适于大

批量样品的检测。综合以上分析,在进出口商品检验检疫过程中,截止目前利用流式细胞仪直接检出VBNC细菌是不可能的,也是不可取的。但作为一项行之有效的技术方法,流式细胞仪与Live/Dead试剂盒的有机结合,能很准确地验证和鉴定VBNC细菌研究模型,故而又是一个非常好的辅助手段,为基于VBNC细菌研究模型所建立的未可培养微生物的检测方法,以及制订VBNC细菌的国家质检标准都提供了必要而确切的保证。

## 参考文献

- [1] 蒋志国,杜琪珍.食品病原微生物快速检测技术研究进展[J].食品研究与开发,2008,29(3):165-170.
- [2] 李影,魏忠彬,钱爱东,等.低浓度冰醋酸诱导的鸡源大肠杆菌活的可培养状态的研究[J].中国兽医学报,2007,27(5):645-648.
- [3] 刘昕,张俊彬,黄良民.流式细胞仪在海洋生物学研究中的应用[J].海洋科学,2007,31(1):92-95.
- [4] 张明霞,梅国华,熊顺景,等.应用流式细胞术检测结核分枝杆菌药敏试验[J].医学综述,2009,15(4):616-618.

(上接第28页)

(110-120kD)、gBb(68kD)、gBc(55kD)三种糖基化形式组成的复合物,gBb、gBc是gBa的裂解产物。在疱疹病毒中,gB蛋白属于最保守的糖蛋白之一,该糖蛋白不仅诱导产生高滴度的中和抗体,而且对病毒的感染过程是必须的<sup>[1]</sup>。伪狂犬病毒gB蛋白的主要抗原表位已比较清楚,gB蛋白分别在59-129aa、214-289aa、507-734aa处存在优势抗原位点<sup>[9]</sup>。gB在基因及蛋白水平均具有很强的保守性。目前,国外已有性能稳定针对糖蛋白gB、gE抗体的检测试剂盒,国内在相关技术和工艺研究方面还有许多需要进一步完善之处。本研究选取编码gB蛋白主要抗原表位的基因进行了扩增,最终构建了重组质粒pET-gB在大肠杆菌BL21中表达了伪狂犬病毒囊膜糖蛋白gB的主要抗原区并纯化,为下一步建立对PRV抗体gB-ELISA检测方法提供了纯化重组抗原。

本实验采用pET-32(a)表达gB糖蛋白主要抗原区,表达效率高。结

果显示蛋白以包涵体形式存在。同时对表达条件进行优化,使得包涵体表达的产量最大化。对表达产物进行Western blotting分析,同时设立无关蛋白对照,结果表明所表达的蛋白与PRV阳性血清呈阳性反应,没有非特异反应,从而为建立猪血清抗体gB-ELISA检测方法奠定了基础。

## 参考文献

- [1] 殷震,刘景华.动物病毒学[M].第2版.北京:科学出版社,1997.
- [2] 陆承平.兽医微生物学[M].第3版.北京,中国农业出版社,2001.
- [3] 姜高明,杜伟贤.伪狂犬病流行概况及猪场防制策略[J].中国动物检疫,1999,16(5):43-45.
- [4] van Oirschot J T, Gielkens A L. Marker vaccines, virus protein-specific antibody assays and the control of Aujeszky's disease [J]. Vet Microbiol, 1990,23(1-4):85-101.
- [5] Fujita T. Aujeszky's disease control program in Japan [C]//OIE. OIE Symposium on Aujeszky's Dis-

ease. Bangkok:Thailand,1994:85-97.

- [6] Dory D, Torche A M. Effective protection of pigs against lethal Pseudorabies virus infection after a single injection of low-dose Sindbis-derived plasmids encoding PrV gB, gC and gD glycoproteins[J]. Vaccine, 2005,23(26):3483-3491.
- [7] Nixdorf R, Klupp B G, Karger A, et al. Effects of Truncation of the Carboxy Terminus of Pseudorabies Virus glycoprotein B on Infectivity[J]. J Virol, 2000,74(15):7137-7145.
- [8] Zaripov M M, M orenkov O S. Immunological and functional characteristics of epitopes and regions of gB glycoprotein of Aujeszky's disease virus [J]. Vopr Virusol, 2001,46(2):41-45.
- [9] Zaripov M M. Distribution of B-cell epitopes on the pseudorabies virus glycoprotein B [J]. J Gen Virol, 1999,80(3):537-41.