

猪瘟病毒 E0 蛋白在 PK-15 中的表达与鉴定

周景明¹, 刘芳冰¹, 祁艳华¹, 张改平^{1,2}, 栗宁¹, 王爱萍^{1*}

(1. 郑州大学生命科学学院, 河南郑州 450001; 2. 河南农业大学, 河南郑州 450002)

摘要 [目的]研究猪瘟病毒(CSFV)E0 基因在 PK-15 细胞中的表达特性。[方法]通过 PCR 方法克隆了 E0 基因全长 681 bp 的片段, 连接到真核表达载体 pEGFP-C1 上, 构建出重组质粒并进行双酶切鉴定。[结果]成功构建出重组质粒 pEGFP-E0。通过双酶切鉴定, PCR 鉴定和测序确定了目的基因大小一致, 插入位置完全正确后, 利用 Lipofecta mine 2000 转染试剂盒将重组质粒转染到猪肾细胞 PK-15 中, 转染 48 h 后在荧光显微镜下观察, 可以看到大多数细胞呈现出绿色荧光, 说明转染成功。通过 G418 筛选后, 在荧光显微镜下仍能观察到部分细胞能够呈现出绿色荧光, 这表明重组融合蛋白 pEGFP-E0 在 PK-15 细胞中得到了表达。[结论]获得的能够表达重组融合蛋白的细胞克隆, 为进一步大量表达与纯化 E0 糖蛋白、制备其单抗以及研究猪瘟病毒 E0 糖蛋白的生物学功能奠定了基础。

关键词 猪瘟病毒; E0 蛋白; 增强型绿色荧光蛋白; PK-15 细胞

中图分类号 S852.65⁺1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2016)10-160-03

Expression and Identification of E0 Protein of Classical Swine Fever Virus in PK-15

ZHOU Jing-ming, LIU Fang-bing, QI Yan-hua, WANG Ai-ping^{*} et al (School of Life Science, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450001)

Abstract [Objective] The aim was to study the characteristic how gene E0 of classical swine fever virus (CSFV) expressed in PK-15. [Method] E0 gene whose full length was 681 bp fragment was cloned by PCR, and then a recombinant plasmid was constructed with eukaryotic expression vector of pEGFP-C1, double enzyme digestion was conducted. [Result] A recombinant plasmid pEGFP-E0 was successfully constructed, by restriction enzyme digestion, PCR identification and sequencing, the size of the target gene and insertion position was determined and was right, then recombinant plasmid were transformed into pig kidney-derived cells PK-15 by the Lipofecta mine 2000 transfection kit, after transfection 48h, many cells showed green fluorescence under a fluorescence microscope, which indicated the transfection was successful. After screening by geneticin, there were still green fluorescent cells under the fluorescence microscope, which indicated that the recombinant fusion protein of pEGFP-E0 was expressed in the cell PK-15. [Conclusion] The obtain of expressing recombinant fusion protein of cell clones lay a foundation for further mass production of soluble glycoprotein E0, preparing its monoclonal antibody epitope screening and researching the biological function of protein E0.

Key words CSFV; E0 protein; Enhanced green fluorescent protein; PK-15 cell

猪瘟(Classical swine fever, CSF)是由猪瘟病毒(Classical swine fever virus, CSFV)引起猪的一种高度接触性、致死性传染病, 临床上以高热、皮肤和黏膜出现大量出血点为主要特征^[1]。世界动物卫生组织将其列为 A 类传染病, 我国也将其列为一类传染病。猪瘟病毒是黄病毒科(Flaviviridae)瘟病毒属(Pestivirus), 为单股正链 RNA 病毒^[2], 其基因组编码 1 个多聚蛋白, 经宿主细胞和病毒蛋白酶裂解后产生 4 种结构蛋白(C(p14)、E0(gp44/48)、E1(gp33)和 E2(gp55))和 7 种非结构蛋白(N^{pro}、p7、NS2-3、NS4A、NS4B、NS5A 和 NS5B)^[3]。CSFV 自然感染猪后, 机体可产生针对结构蛋白 E2、E0 和非结构蛋白 NS2-3 的抗体^[4]。

E0 蛋白是 CSFV 的一个保护性抗原蛋白, 可诱导产生中和抗体, 其抗原性与 E2 相比是能诱导机体产生保护性免疫力的第二抗原蛋白。E0 蛋白由病毒 ORF 中 GLu168-ALa494 组成^[5], 有 9 个可能的糖基化位点, 糖基化前后的分子质量分别为 25.7 ku 和 44~48 ku^[6]。E0 是唯一一个可以分泌到猪瘟病毒感染的细胞培养液上清中的糖蛋白^[7]。Shen 等^[8]研究表明 E0 可单独诱导免疫保护, 诱导产生的中和抗体可以抵抗大剂量猪瘟病毒的攻击。利用在昆虫细胞表达的 E0 和 E2 进行的抑制试验表明, E0 和 E2 是与不同的细胞表面受体作用, 猪瘟病毒最初是通过 E0 的介导才能结合到细胞

上的^[9]。另外, 在各毒株内编码 E0 的氨基酸序列比编码 E2 的氨基酸序列要更加保守^[10]。因此, E0 是防治猪瘟的主要靶蛋白之一。笔者利用猪源性的 PK-15 细胞作为表达猪瘟病毒 E0 糖蛋白的表达系统, 将猪瘟病毒 E0 基因在 PK-15 细胞中进行表达, 并进行双酶切鉴定, 旨在为 E0 病毒的基因工程疫苗的实际生产和应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞与质粒。PK-15 细胞来自河南省农业科学院农业部动物免疫学重点实验室; 真核表达载体 pEGFP-C1 购自北京天恩泽公司, 含有目的基因 E0 片段的 pET28a-E0 (BL21) 菌种由郑州大学分子免疫学实验室保存。

1.1.2 工具酶及试剂。质粒 DNA 纯化试剂盒, 为 TaKaRa 公司产品; Lipofecta mine 2000 试剂盒为 invitrogen 公司产品; 胎牛血清和 DMEM 培养基, 购自 Gibco 公司; 使用的培养基为 DMEM(含 10% 胎牛血清、链霉素、青霉素)完全培养基, 加入 NaHCO₃ 调节 pH 至 7.0。限制性内切酶 XhoI 和 KpnI 以及 T₄ 连接酶, 均购自 TaKaRa 公司。

1.1.3 仪器。TP-214 分析天平, 为美国 Denver 公司产品; mini-PROTEAN Tetra System 电泳仪、Gel DocTM XR+ 凝胶成像系统, 为美国 Bio-Rad 公司产品; NanoDrop 2000c 分光光度计、Barnstead Nanopure 超纯水仪, 为美国 Thermo 公司产品; CMAG HS4 加热磁力搅拌器, 为德国 IKA 公司产品; H1650-W 台式高速离心机, 为湖南湘仪实验室仪器开发有限公司产品; WD-9405B 型水平摇床, 为北京市六一仪器厂产品; 透析

基金项目 国家自然科学基金项目(31172331)。

作者简介 周景明(1972-), 男, 河南南阳人, 副教授, 博士, 硕士生导师, 从事分子免疫学和免疫学检测技术研究。* 通讯作者, 教授, 博士, 博士生导师, 从事分子免疫学研究。

收稿日期 2016-03-11

袋 MD25,为北京索莱宝科技有限公司产品;IX71 倒置式荧光显微镜,为日本 OLYMPUS 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 引物设计。根据 GenBank 数据库中公开发表的猪瘟病毒 *E0* 序列,利用 Primer Premier 5.0 设计引物扩增 *E0* 序列,预计扩增片段 681 bp,设计其上下游引物:上游引物 F 为 5' A CTCGAGCTGAAAATATAACTCAATGGAACCTGAGT-GACAACG 3'的 5'端含有 *Xho*I 酶切位点,下游引物 R 为 5'A GGTACCGGCATAAGCGCCAAACCAGGTTTT 3'的 5'端含有 *Kpn*I 酶切位点。

1.2.2 载体构建。以提取的 pET28a-*E0* 基因组 DNA 为模板,以 F/R 为引物,扩增 *E0* 基因,向 50 μ L 体系中加入 *ExTaq* 酶 25 μ L、引物各 0.5 μ L、模板 1 μ L,然后加超纯水补足 50 μ L,PCR 程序为:95 $^{\circ}$ C 变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 45 s,51 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 90 s,32 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。

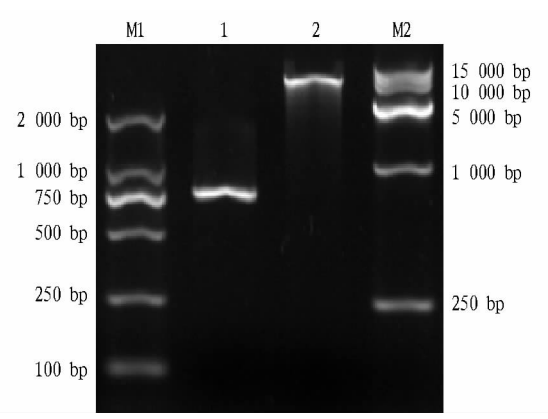
1.2.3 重组质粒的构建。用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,并用 DNA 纯化回收试剂盒回收纯化 681 bp 的 *E0* 基因片段,将回收片段进行琼脂糖凝胶电泳,鉴定条带是否正确。以 *Xho*I 和 *Kpn*I 2 个限制性内切酶同时对载体和 *E0* 片段进行双酶切,酶切后产物进行琼脂糖凝胶电泳并用 DNA 纯化回收试剂盒回收,用 *T*₄ 连接酶进行连接反应,连接条件为 4 $^{\circ}$ C 过夜,将连接产物转化到 *E. coli* DH5 α 感受态细胞中,在含 Amp 的 LB 培养基平板上挑取阳性单克隆,对质粒分别进行 PCR 鉴定、双酶切鉴定,鉴定成功后送交公司测序。并将成功构建的重组质粒命名为 pEGFP-*E0*。

1.2.4 PK-15 细胞的转染。用质粒 DNA 纯化试剂盒纯化 pEGFP-*E0* 质粒后供转染用。细胞重悬以后,进行细胞计数,根据 12 孔板底面积大小,每孔铺 5×10^5 个,铺 4 孔,添加 DMEM 完全培养基补至 3 mL,过夜培养至细胞密度 90% 以上,DMEM 不完全培养基冲洗每孔。最后,每孔加入 2 mL DMEM,准备转染液,A 液为 240 μ L DMEM + 10 μ L 脂质体 2000,B 液为 230 μ L DMEM + 20 μ L (4 μ g) 质粒,将 A 液混匀后室温放置 5 min 后,再将 A 液、B 液混匀,室温放置 20 min。将转染液逐滴加入试验孔中,轻摇。

1.2.5 G418 筛选。转染 6 h 后观察并记录荧光情况,并将转染培养基更换为完全培养基,转染 48 h 后更换为 G418 筛选培养基,通过预试验确定 G418 筛选浓度为 600 μ g/mL。每 3~5 d 更换 1 次筛选培养基,以除去死亡细胞和细胞碎片。约 21 d 后在荧光倒置显微镜下观察细胞的荧光情况。

2 结果与分析

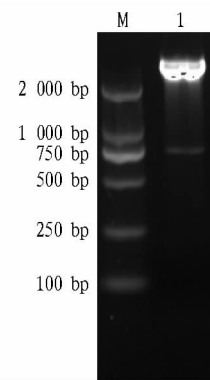
2.1 载体构建 PCR 扩增产物经过 1% 琼脂糖凝胶电泳,在 681 bp 左右的位置出现特异性片段,与预期结果一致。将此片段与真核表达载体 pEGFP-C1 进行双酶切与连接(图 1),获得了重组质粒 pEGFP-*E0*。经 *Xho*I 和 *Kpn*I 双酶切,可获得 681 bp 左右的特异性片段(图 2);以 pEGFP-*E0* 为模板,以 F/R 为引物,可扩增出 681 bp 大小的片段(图 3)。重组质粒经测序鉴定,无氨基酸突变和碱基突变,表明重组载体构建成功。



注:M1. DL2 000 Marker; 1. *E0* 基因的双酶切产物;2. 载体 pEGFP-C1 双酶切产物;M2. DL 15 000 Marker.

Note:M1. DL2 000 Marker; 1. Double enzyme digestion of *E0* gene; 2. Double enzyme digestion of vector pEGFP-C1; M2. DL 15 000 Marker.

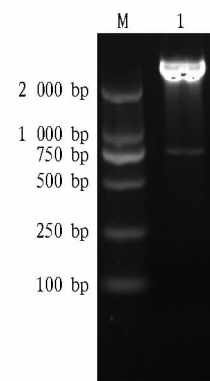
图 1 将载体 pEGFP-C1 和质粒 *E0* 同时进行双酶切与连接
Fig.1 The double enzyme digestion and connection of pEGFP C1 and *E0* plasmid



注: M. DL2000 Marker; 1. 重组质粒的双酶切产物。

Note:M. DL2000 Marker; 1. Double enzyme digestion of recombinant plasmid.

图 2 重组质粒 pEGFP-*E0* 的双酶切鉴定
Fig.2 Double digestion of recombinant plasmid pEGFP - *E0*



注: M. DL2000 Marker; 1. 重组质粒的 PCR 产物。

Note:M. DL2000 Marker; 1. PCR products of recombinant plasmid.

图 3 重组质粒 pEGFP-*E0* 的 PCR 鉴定
Fig.3 The PCR identification of recombinant plasmid pEGFP-*E0*

2.2 *E0* 基因表达产物的检测

转染 6 h 后在荧光倒置显微

镜下观察到大面积的荧光,后期 G418 筛选过程中荧光数量在逐步减少,约 14 d 后对照组细胞全部死亡,约 7 d 后仍有

约 10% 的细胞有荧光,由此获得了稳定整合有外源基因的 PK-15 细胞克隆(图 4)。

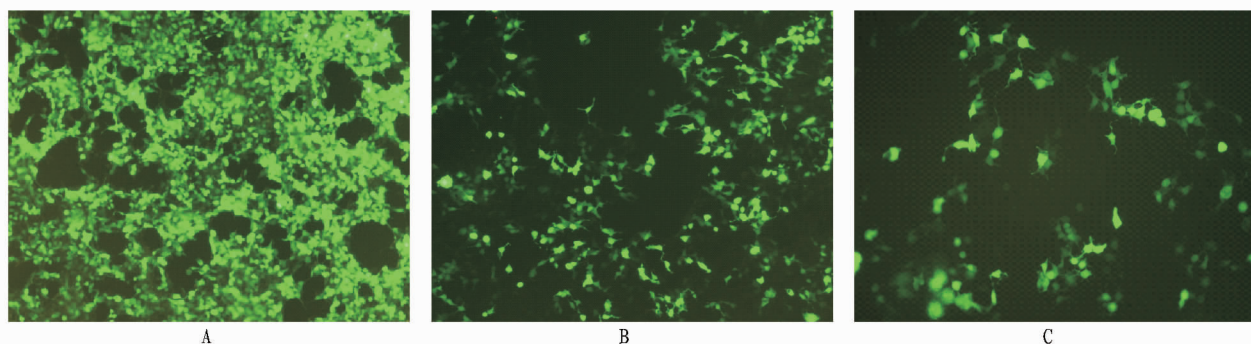


图 4 转染 6 h 后观察到的荧光现象(A)、转染过程的荧光现象(B)和最终筛选出来稳定转染上重组质粒的 PK-15 细胞(C)

Fig. 4 The fluorescence phenomenon after transfection 6 h(A), fluorescence phenomenon in the process of transfection(B), final filtered PK-15 cells stable transfected with recombinant plasmid(C)

3 讨论

目前应用于蛋白表达的系统大多为原核表达系统(如大肠杆菌类表达系统),大肠杆菌类原核表达系统虽然较为成熟,但其表达产物以包涵体形式存在,因为缺乏蛋白质加工系统,所以无翻译后的加工修饰过程,其内源性蛋白酶易降解表达的蛋白质分子且细胞膜间隙含有大量的内毒素。后来,真核表达系统是最具发展前景的蛋白质产生方式,目前研究较多的是酵母和昆虫细胞表达。酵母和昆虫细胞表达存在不正确糖基化,并且还有产物复杂不易纯化、表达量较低、病毒污染等问题。据报道,单个细胞表达蛋白量达 20 pg/d 的工程细胞株^[11],分批补料式生物反应器悬浮培养细胞密度达 2 000 万/mL 以上,蛋白产量高达 10 g/L^[12-13]。利用猪源性的 PK-15 细胞作为表达猪瘟病毒 E0 糖蛋白的表达系统,一方面是为了提高 E0 蛋白的表达产量,因为 PK-15 细胞对猪瘟病毒的遗传密码子具有嗜性好。另一方面,该系统对 E0 蛋白的后期加工可以使得该蛋白的反应原性和免疫原性得到很大提高,为将该病毒的基因工程疫苗投入实际生产和应用奠定了基础。

重组质粒 pEGFP-E0 稳定转染 PK-15 细胞系时,只有部分质粒能够通过细胞质的阻碍进入到细胞核内,而最多只有 80% 进入细胞核内的外源 DNA 能够得到瞬时表达。只有极少数进入细胞的外源基因在通过一系列非同源分子间重组和连接后整合到细胞染色体中,细胞基因组的自由部分进行表达。此外,在此整合的过程中,并不一定所有整合到细胞染色体的外源基因都能够表达,因为整合的区段是不同的。只有整合到了表达区段的基因才能够表达,所以要筛选出能够稳定表达外源基因的转染体,筛选的依据为共转染的编码抗生素的抗性基因所提供的新表型。

G418 是稳定转染常用的筛选试剂,它是一种氨基糖类抗生素,其结构与庆大霉素、新霉素、卡那霉素相似,它能够阻断蛋白质的合成,因此对原核和真核细胞都具有不同的毒性,其中包括细菌、植物、酵母、哺乳动物细胞以及一些原生动物和蠕虫。但是,当 pEGFP-C1 载体所携带的 *neo* 抗性基因被整合到细胞基因组正确的位置后,它能够启动 *neo* 基因

编码的序列转录为 mRNA,从而使得 *neo* 抗性产物——氨基糖苷磷酸转移酶高效表达,进而将 G418 转变成无毒形式,使得细胞获得足够的抗性,并且能够在含有 G418 的筛选培养基中生长。连续使用筛选培养基筛选 14 ~ 21 d,在此过程中要及时更换培养基,去除死亡细胞的细胞碎片,以免死细胞产生的有害物质影响正常细胞的生长。约 21 d 后,就能够得到稳定表达外源基因的细胞克隆,将此克隆用胰酶消化至培养板中继续传代培养,并收集表达的重组蛋白。

由于 PK-15 细胞本身没有绿色荧光蛋白基因,将 PEGFP 和猪瘟病毒 E0 基因的编码区相连得到的重组基因可以用来研究基因的表达情况和活细胞内外源基因表达蛋白质的定位。笔者成功地表达了 PEGFP-E0 融合蛋白,为进一步大量表达和纯化 E0 糖蛋白、制备其单抗以及研究猪瘟病毒 E0 糖蛋白的生物学功能奠定了基础。

参考文献

- [1] 董海岚,惠煜,李海,等. 规模化猪场猪瘟的发病特点及综合防控策略[J]. 上海畜牧兽医通讯,2009(3):107.
- [2] FERNANDEZ-SAINZ I, RAMANATHAN P, O'DONNELL V, et al. Treatment with interferon-alpha delays disease in swine infected with a highly virulent CSFV strain[J]. Virology, 2015, 483:284-290.
- [3] 李传兴,周传军. 猪瘟的防控措施[J]. 养殖技术顾问,2009(2):117.
- [4] LEIFER I, RUGGLI N, BLOME S. Approaches to define the viral genetic basis of classical swine fever virus virulence[J]. Virology, 2013, 438: 51-55.
- [5] GLADUE D P, BAKER-BRANSETTER R, HOLINKA L G, et al. Interaction of CSFV E2 protein with swine host factors as detected by yeast two-hybrid system[J]. PLOS, 2014, 9:1-9.
- [6] 王莹,任向阳,张昶,等. 猪瘟病毒分子生物学研究进展[J]. 上海畜牧兽医通讯,2006(9):8-11.
- [7] FRANZONI G, KURKURE N V, EDGAR D S, et al. Assessment of the phenotype and functionality of porcine CD8 T cell responses following vaccination with live attenuated classical swine fever virus (CSFV) and virulent CSFV challenge[J]. Clinical and vaccine immunology, 2013, 20: 1604-1616.
- [8] SHEN H Y, WANG J Y, DONG X Y, et al. Genome and molecular characterization of a CSFV strain isolated from a CSF outbreak in South China[J]. Intervirology, 2013, 56:122-133.
- [9] ARAMOUNI M, KEKARAINEN T, GANGES L, et al. Increased viral load and prevalence of Torque teno sus virus 2 (TTSuV2) in pigs experimentally infected with classical swine fever virus (CSFV)[J]. Virus research, 2013, 172:81-84.

益于人的舒适以及健康作为植物景观设计的根本原则。创造出尺度适宜,亲切近人,人景和谐的温馨宜人环境。

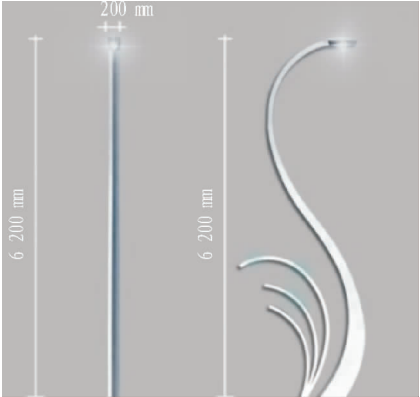


图7 天鹅景观灯

Fig. 7 Landscape lamp of swan

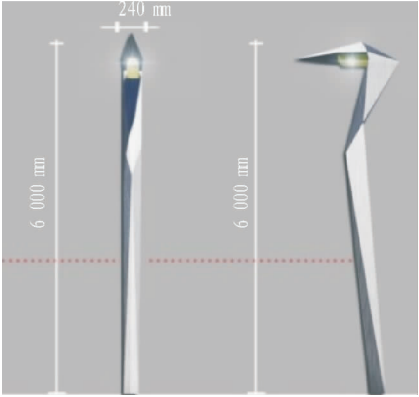


图8 白鹤景观灯

Fig. 8 Landscape lamp of white crane



图9 芦荻灯意向

Fig. 9 Intention of giant cane lamp

3.6.2 植物设计遵循体现地域印象的原则。植物景观是形成和塑造城市风情、历史文脉和地域特色的重要元素,是有生命的地域印象承载体。植物景观设计首先要把握地域印象的延续,重视植物景观资源的保护保存及利用。在鄱阳县火车站站前广场植物景观设计中,以鄱阳县当地地理气候以及自然生态条件和本地植被为基础,对植物进行选择与配置设计,使植物景观延续明显的地域性和文化性特征,形成景观场所的可识别性和特色性。

4 结语

铁道交通枢纽站前广场作为一座城市或地方的门户,代表了整个城市的形象气质与精神面貌,如果其景观设计千篇一律或是过于俗套呆板,缺少地方特质,必然显得平淡无奇。所以应该在景观设计中把握地域印象,体现城市个性,延续地域性和文化性特征,从而突出景观场所的可识别性和特

色。在站前广场景观设计中,应通过对当地的地理气候、人文风情、历史文化的研究,提炼出能概括当地地域印象的代表元素,通过设计构思,运用现代的设计语言及策略,将这些元素运用到站前广场景观设计的各景观要素之中,从而实现功能合理,富于时代精神,符合地域特质,植根于当地文化的城市门户景观,进而展现整个城市的对外形象气质与精神面貌。

参考文献

[1] 刘薇. 地域文化在景观设计中的表达探析[J]. 中国园艺文摘, 2015 (10): 142 - 143.
[2] 王晓黎. 地域文化: 景观设计的源泉[J]. 园林, 2012 (11): 28 - 33.
[3] 陶亮, 刘小钊. 城市交通枢纽地区景观设计探索: 以南京南站地区景观设计为例[J]. 安徽农业科学, 2014, 42 (34): 12146 - 12149, 12301.
[4] 王巍, 母洪娜, 孙陶泽. 地域特色火车站站前广场景观设计: 以荆州火车站为例[J]. 长江大学学报, 2012, 9 (4): 15 - 17.

(上接第 162 页)

[10] OMARI K E, IOURIN O, HARLOS K, et al. Structure of a pestivirus envelope glycoprotein E2 clarifies its role in cell entry[J]. Cell reports, 2013, 3 (1): 30 - 35.
[11] CALISHER C H, GOULD E A. Taxonomy of the virus family Flaviviridae [J]. Advances in virus research, 2003, 59 (1): 1 - 19.

[12] MOSER C, STETTLER P, TRATSCHIN J D, et al. Cytopathogenic and noncytopathogenic RNA replicons of classical swine fever virus[J]. Journal of virology, 1999, 73 (9): 7787 - 7794.
[13] BEHRENS S E, GRASSMANN C W, THIEL H J, et al. Characterization of an autonomous subgenomic pestivirus RNA replicon[J]. Journal of virology, 1998, 72 (3): 2364 - 2372.