

具有荧光标签的猪瘟病毒 E^{ms} 蛋白在杆状病毒表达系统中的表达

陈 柳 余 斌 云 涛 倪 征 华炯钢 李双茂

(浙江省农业科学院 病毒学与生物技术研究所 浙江 杭州 310021)

摘要: 为了获得具有标记的猪瘟病毒 E^{ms} 蛋白,通过基因工程操作,使猪瘟病毒 E^{ms} 基因与绿色荧光蛋白基因(GFP)融合,用 Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统在昆虫细胞中高效表达了 E^{ms}-GFP 融合蛋白,经 Western Blot 和荧光显微镜观察证实,表达产物分子量正确,且发出易于检测的绿色荧光,具有标记的 E^{ms} 蛋白的获得为进一步研究 E^{ms} 蛋白结构和功能奠定了基础。

关键词: 猪瘟病毒; E^{ms}; 绿色荧光蛋白; Bac-to-Bac 杆状病毒表达系统

中图分类号: S432.4⁺1 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2011)01-0026-05

Expression of E^{ms} Protein of Classical Swine Fever Virus with Fluorescent Label in Baculovirus Expression System

CHEN Liu, YU Bin, YUN Tao, NI Zheng, HUA Jiong-gang, LI Shuang-mao

(Institute of Virology & Biotechnology Zhejiang Academy of Agriculture Sciences Hangzhou 310021 China)

Abstract: To obtain labeled E^{ms} protein of classical swine fever virus, the coding region of E^{ms} and green fluorescent protein(GFP) was fused by genetic engineering technique and expressed in Sf9 cells according to the manual of Bac-to-Bac baculovirus expression system. The results of Western Blot analysis and fluorescence microscopy show that the fused proteins were successfully expressed with spontaneous green fluorescent. The established method of obtaining the labeled protein will be helpful for further exploring the structure and function of E^{ms} protein.

Key words: Classical swine fever virus; E^{ms}; Green fluorescent protein; Bac-to-Bac baculovirus expression system

E^{ms} 是猪瘟病毒所有蛋白中比较特殊的一种囊膜糖蛋白,只存于黄病毒科的瘟病毒属,在黄病毒科的另外两个属黄病毒属和类 HCV 属中不存在。它是一种高度糖基化的蛋白,糖蛋白分子量约占 E^{ms} 总蛋白分子量的二分之一,去糖基的蛋白骨架分子量约为 25.7 kDa。在感染细胞中 E^{ms} 在内质网内积累,并可存在于病毒粒子表面或被分泌到胞外^[1,2]。E^{ms} 不仅是一个结构蛋白而且是一种功能蛋白。它具有许多重要的功能如免疫抑制^[3]、抗凝集作用、RNase 酶活性^[4,5],同时其 C 端 30 多个氨基酸具有转位活性^[6]。

为了得到可溶性猪瘟病毒 E^{ms} 蛋白并便于研究其表达情况,本研究将猪瘟病毒 E^{ms} 基因与增强型绿色荧光蛋白基因嵌合,拟在杆状病毒系统中表达

获得双功能的融合蛋白,为更好地研究 E^{ms} 蛋白的结构和功能奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

pEGFPE^{ms} 质粒由本人构建,转座质粒 pFast-BacHTb 为 GIBCO BRL 公司产品。大肠杆菌 DH5 α 为本室保存,大肠杆菌 DH10Bac 为 BRL 公司产品。*Spodoptera frugiperda* (Sf9) 细胞株购自中国典型培养物保藏中心(cctcc),在含有 10% 胎牛血清的 Grace 培养基上 27℃ 培养。

1.2 酶类、抗体和试剂

EX-Taq DNA 聚合酶和 *Bam*H I、*Kpn* I、*Hind* III 限制性内切酶购自 TaKaRa 公司; T4 DNA ligase 购

收稿日期: 2010-12-02

基金项目: 浙江省科技厅重大科技专项(2007C12010)

作者简介: 陈 柳(1980-),女,湖北天门人,助理研究员,博士,主要从事动物病毒分子生物学研究。

通讯作者: 云 涛(1978-),男,新疆石河子人,助理研究员,博士,主要从事动物病毒分子生物学研究。

自华美生物有限公司; DNA 回收试剂盒购自华顺生物公司; Lipofectamine 2000 Reagent、胎牛血清、Grace 干粉培养基等为 Invitrogen 公司产品。低分子量蛋白 Marker 购自凌飞公司; 硝酸纤维素膜为 Millipore 公司产品; 兔抗猪瘟疫病毒 E^{rns} 抗血清由本人制备, HRP 标记的山羊抗兔 IgG 购自北京中杉公司; DAB 购自 Sigma 公司。

1.3 杆状病毒转移载体 pFastgx E^{rns} gfp 的构建

重组转移载体的获得通过多步完成, 首先通过 PCR 扩增获得了伪狂犬病毒 (Pseudorabies virus, PRV) Gg 蛋白信号肽 gx 序列, 然后以 gx 片段为正向引物扩增获得 gx E^{rns} gfp 片段。gx 基因的获得通过 Fgx 和 Rgx 两片段在 PCR 反应体系中互补和延伸而得。在设计引物时使得 Rgx C 末端部分序列与 5' 端 E^{rns} 基因互补, 因此 gx 片段可作为上游引物来扩增 gx E^{rns} gfp 基因 (N 端含有 gx 序列的 E^{rns} gfp 基因)。gx E^{rns} gfp 扩增条件为: 100 μL 体系先加入 10

μL 10 × Ex-Tag reaction Buffer, 2 μL dNTP (10 μmol/L), 8 μL pEGFPE^{rns} (1/100), 10 μL gx 回收片段 67.4 μL ddH₂O, 待温度上升至 90℃ 时加入 0.6 μL Ex-Tag 酶, 94℃ 35 s, 50℃ 30 s, 72℃ 30 s 5 个循环之后, 温度下降至 50℃ 时加入 2 μL P₄ (10 mmol/L), 按先前程序再扩增 30 个循环。引物序列为: Fgx 5'-CGGAATTCGATGAAGTGGGCAACGTGGATTCTCGCCCT-3' (EcoR I); Rgx 5'-GTTCCATTGAGT-TATATTTTCGGCCACGACGGTGGGACCACGAGGAGCCCAGGGCGAGAATC-3'; P₄ 5'-GCGGTACCTTACT-TGTACAGCTCGTC-3' (Kpn I), 其中 Fgx 与 P₄ 5' 端分别引入 EcoR I 和 Kpn I 酶切位点。

将 gx E^{rns} gfp 片段用 EcoR I 及 Kpn I 双酶切后, 克隆到 pFastBacHTb 载体的对应位点 (构建流程如图 1) 将连接产物转入大肠杆菌 *E. coli* DH5α, 经 PCR 和酶切鉴定正确的重组克隆送至测序公司测序并分别命名为 pFastgx E^{rns} gfp。

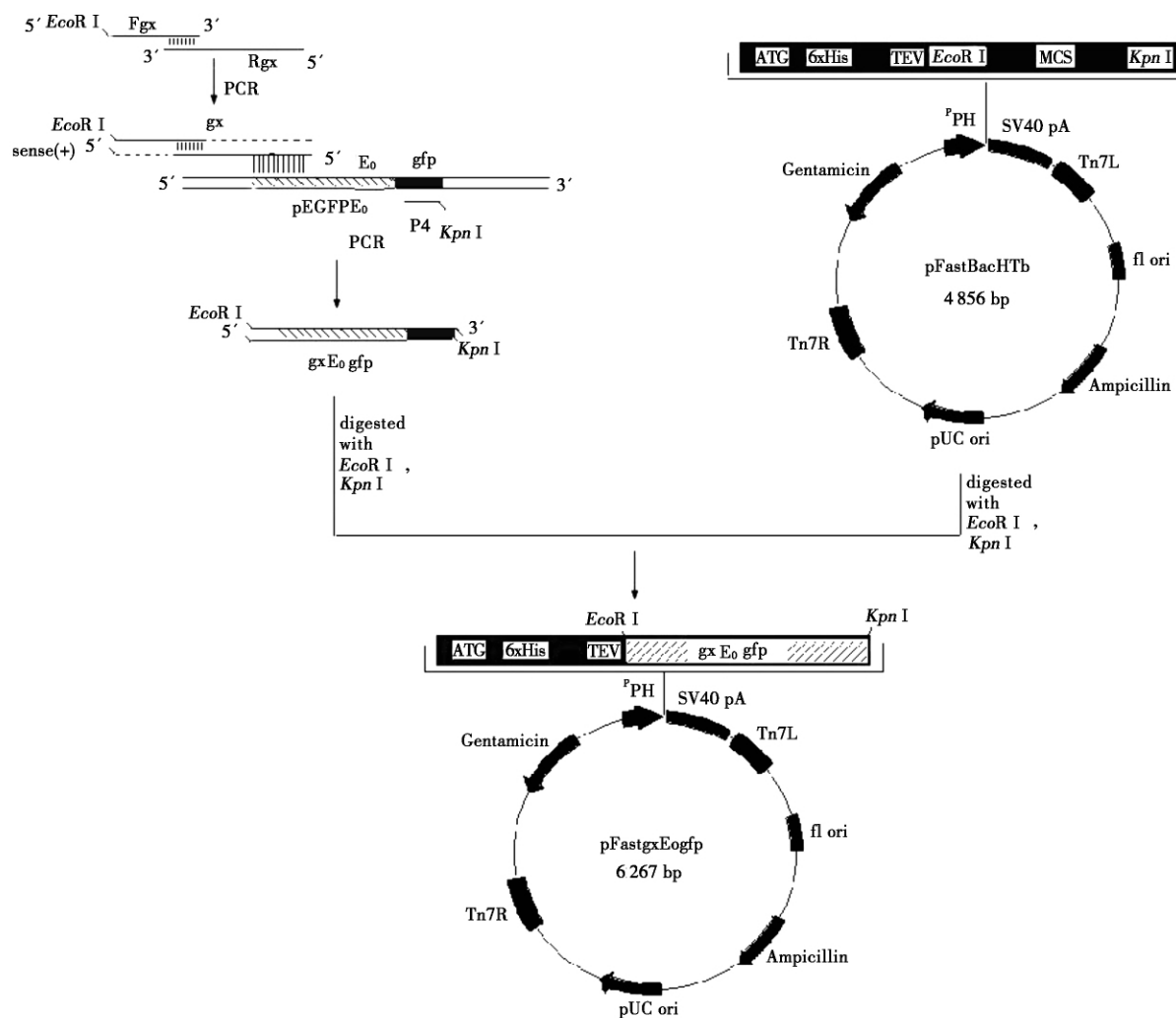


图 1 杆状病毒转移载体 pFastgx E^{rns} gfp 构建流程图

Fig. 1 The procedure of constructing recombinant pFastgx E^{rns} gfp plasmid

1.4 重组 Bacmid 的筛选

取 2 μL 重组转移质粒 pFastgx E^{ms} gfp 转化 150 μL 感受态大肠杆菌 DH10Bac, 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床 150 r/min 震荡培养 4 h, 使之发生转座, 重组质粒中的多角体启动子及其下游的 *gx E^{ms} gfp* 基因表达盒通过转座子 Tn7 的左右臂插入到 Bacmid 的 LacZ 中的接触位点上(aat Tn7)。取菌液以 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 不同的稀释度稀释, 各取 100 μL 分别涂布于含“三抗”的 LB 平板, 这些平板提前 30 min 已涂布 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ X-gal 和 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ IPTG。将平板于 37 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养 24~48 h, 观察蓝白斑的生长情况。发生转座后的 DH10Bac 细菌因其 *LacZ* 基因被插入失活, 而使含有 Bacmid 的大肠杆菌菌落成为白色。挑取单个白色菌落提取重组 Bacmid DNA, 并用 PCR 方法进行鉴定, 正向引物采用与 E^{ms} N 端互补的序列, 反向引物为 PUC/M13 (-), 序列为 5'-AGCGGATAA-CAATTCACACAGGA-3', 与 Bacmid 上的 Tn7 转座子两侧的 DNA 相配对。鉴定正确的 Bacmid DNA 为阳性重组 Bacmid, 命名为 Bac-gx E^{ms} gfp。

1.5 重组 Bacmid 转染昆虫细胞及重组病毒的筛选

待 Sf9 单层细胞密度达到 70%~80% 时, 采用 Lipofectaine2000 (Invitrogen) 脂质体转染试剂按 Bac-to-Bac 表达系统操作步骤将 Bacmid-gx E^{ms} gfp DNA 转入 Sf9 昆虫细胞内, 6 d 后收集转染细胞上清, 以收集的上清重新感染新的 Sf9 细胞, 依此感染细胞 2 次, 在第 2 次感染时从第 2 天开始在荧光显微镜下观察荧光蛋白表达情况, 待荧光斑数较多或

Sf9 细胞病变明显时刮下细胞, 1 000 $\times g$ 离心 5 min, 收集含有重组杆状病毒颗粒的培养上清液, 将上清液分成小份做原毒种, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 用于检测或扩大培养。

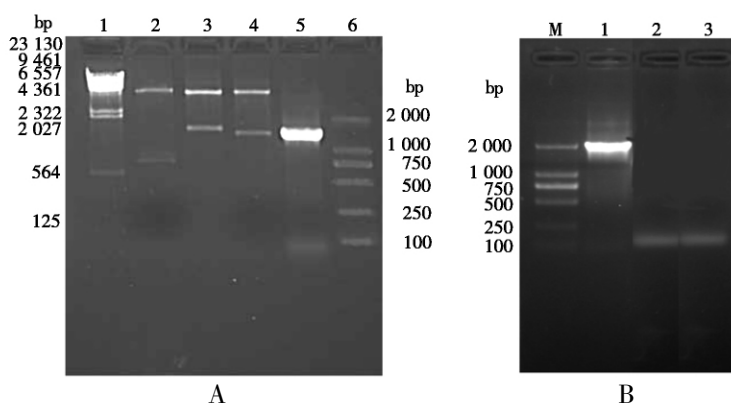
1.6 表达产物的 Western Blot 鉴定

采用 Western blot 对表达产物进行鉴定。蛋白电泳选用 10% SDS-PAGE 胶, 先用 60 V 恒定电压电泳, 当溴酚兰指示剂进入分离胶后, 提高电压至 100 V 继续恒定电压电泳, 电泳完毕取出凝胶, 置于 2% 考马斯亮兰 R-250 染色液中, 放于脱色摇床上平缓摇动, 室温染色 4 h 以上, 移出凝胶并回收染色液, 将凝胶浸泡于脱色液中, 平缓摇动脱色 8 h, 其间更换脱色液数次, 脱色至背景清晰。采用 80 mA 3 h 将蛋白转移至硝酸纤维素(NC) 膜上, 取出 NC 膜, 放入封闭液中 4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭过夜。分别以抗 E^{ms} 抗血清 (1:500 稀释) 作为一抗, HRP 标记的羊抗兔 IgG (1:5 000 稀释) 作为二抗于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, 最后用 DAB 显色法进行显色。

2 结果与分析

2.1 杆状病毒转移载体和表达载体的鉴定

对构建的杆状病毒转移载体分别用 *Bam*H I、*Hind* III、*Eco*R I 和 *Kpn* I 进行单酶切和双酶切鉴定以及 PCR 鉴定, 如图 2-A 所示, 结果表明, 外源基因 *gx E^{ms} gfp* 正确插入了载体 pFastBacHTb 的多克隆位点, 且方向正确。测序结果也显示构建重组转移载体序列正确。采用 PCR 的方法来鉴定表达盒是否插入到 Bacmid 中, 如果转座成功则 PCR 扩增产物



A. 重组杆状病毒转移载体 pFastgx E^{ms} gfp 的鉴定。1. Lamda DNA/*Hind* III Marker; 2. pFastgx E^{ms} gfp 的 *Bam*H I 酶切产物; 3. pFastgx E^{ms} gfp 的 *Eco*R I 和 *Kpn* I 双酶切产物; 4. pFastgx E^{ms} gfp 的 *Hind* III 酶切产物; 5. pFastgx E^{ms} gfp 的 PCR 扩增产物; 6. DNA Marker DL2000。B. 重组杆状病毒表达载体 Bac-gx E^{ms} gfp 的 PCR 鉴定。M. DNA Marker DL2000; 1. Bac-gx E^{ms} gfp DNA 的 PCR 扩增产物; 2. 阴性 Bacmid DNA 的 PCR 扩增产物; 3. 未加模板的阴性对照。

A. Identification of recombinant baculovirus transfer vector pFastgx E^{ms} gfp. 1. Lamda DNA/*Hind* III Marker; 2. Products of pFastgx E^{ms} gfp digested by *Bam*H I; 3. Products of pFastgx E^{ms} gfp digested by *Eco*R I and *Kpn* I; 4. Products of pFastgx E^{ms} gfp digested by *Hind* III. 5. Products of PCR. 6. DNA Marker DL2000. B. Identification of recombinant baculovirus expression vector Bac-gx E^{ms} gfp by PCR. M. DNA Marker DL2000; 1. PCR product of Bac-gx E^{ms} gfp DNA; 2. PCR product of negative bacmid DNA; 3. Negative PCR control without template.

图 2 重组载体的鉴定图

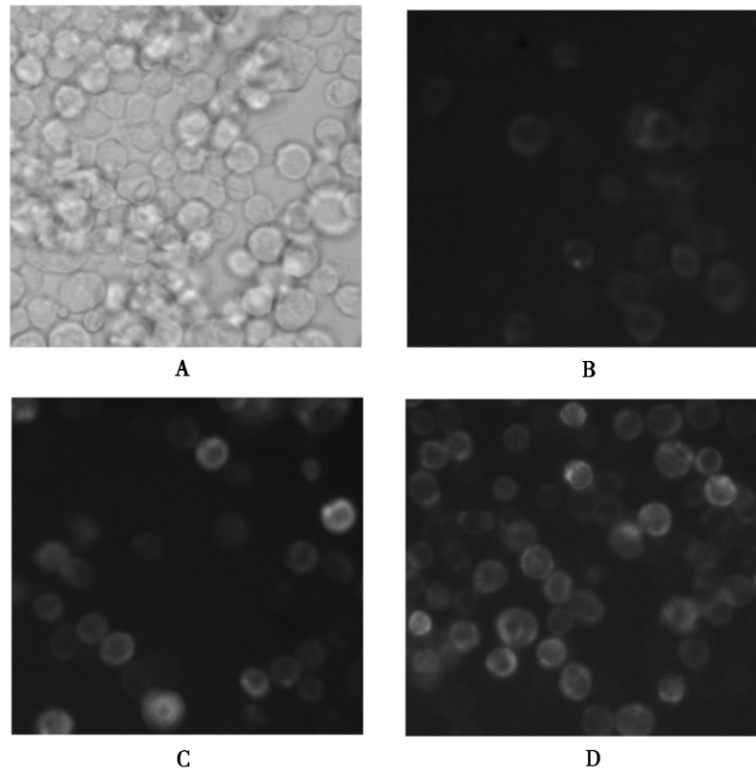
Fig. 2 Identification of recombinant vectors

大小约为 2 043 bp ,反之转座不成功 ,PCR 产物为阴性。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳 ,结果如图 2-B 所示 ,可见所扩增出的片段大小与预期相符合 ,证实重组 Bac-gxE^{rns} gfp 构建成功。

2.2 荧光检测外源蛋白在 Sf9 细胞中的表达

用收获的上清接毒 Sf9 后 ,分别在不同的时间

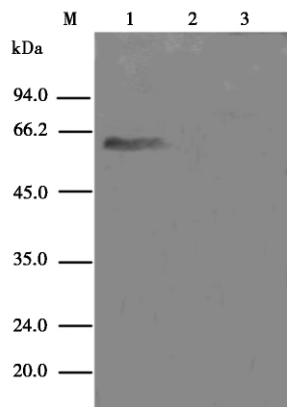
于倒置荧光显微镜下观察蛋白的表达 ,发现随着时间的延长 ,一个视野内出现绿色荧光的细胞增加 ,并且在 5 d 时几乎 50% 视野细胞的细胞质部分都呈现出绿色荧光(图 3) ,说明蛋白以 E^{rns} gfp 融合蛋白形式存在 ,并且融合蛋白能在昆虫细胞内高效表达。



A. 明视野; B. 接毒 2 d 的 Sf9 细胞; C. 接毒 3 d 的 Sf9 细胞; D. 接毒 5 d 的 Sf9 细胞。
A. Bright field; B. Sf9 cells infected with recombinant virus for two days; C. Sf9 cells infected with recombinant virus for three days; D. Sf9 cells infected with recombinant virus for five days.

图 3 荧光显微镜下观察重组 E^{rns} gfp 蛋白在 Sf9 细胞中的表达

Fig. 3 Observation of the expression of E^{rns} gfp protein in Sf9 cells by fluorescence microscope



M. 低分子量蛋白 Marker; 1. 重组杆状病毒 rAc-E^{rns} gfp 感染的 Sf9 全细胞; 2. 野生型杆状病毒 rAc 感染的 Sf9 全细胞对照; 3. 阴性 Sf9 细胞对照。
M. Low-range protein molecular weight markers (kDa) ; 1. Sf9 cells infected with recombinant baculovirus rAc-E^{rns} gfp; 2. Sf9 cells infected with wild-type baculovirus; 3. Negative control of Sf9 cells.

图 4 重组蛋白表达的 Western Blot 分析

Fig. 4 Western Blot analysis of recombinant protein expression

2.3 Sf9 细胞中表达的重组蛋白的 Western Blot 分析

用收集的野生型杆状病毒和重组杆状病毒 rAc-E^{rns} gfp 感染 Sf9 单层细胞 ,然后分别收获两种病毒感染的 Sf9 细胞以及阴性 Sf9 细胞 ,将细胞裂解后进行 10% SDS-PAGE 电泳 ,转膜后进行免疫印迹检测 ,采用的一抗为兔抗 CSFV E^{rns} 多抗(1:3 000 稀释) ,二抗为 HRP 标记的羊抗兔 IgG(1:5 000 稀释) 。结果见图 4 所示 ,阴性细胞和野生型病毒感染的细胞裂解液中没有特异的与 E^{rns} 多抗反应的条带 ,而阳性样品中有与 E^{rns} 抗体反应的特异条带 ,反应带分子量约为 60 kDa(图 4) 。

3 讨论

猪瘟是由猪瘟疫病毒(Classical swine fever virus , CSFV) 引起的一种急性接触传染性病毒病 ,对养猪业危害严重。猪瘟病毒是一种具有囊膜的单股正链

RNA 病毒 属于黄病毒科瘟病毒属。其基因组包含一个大的开放阅读框 (Open reading frame ,ORF) 。ORF 编码一种由约 3 898 个氨基酸残基组成的多聚体蛋白 ,该多聚体蛋白在病毒和细胞酶作用下加工成 4 种结构蛋白(C、E^{ms}、E1、E2) 和 8 种非结构蛋白(N^{pro}、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A、NS5B) 。

猪瘟病毒 E^{ms} 蛋白是一种高度糖基化的蛋白 ,很难在常用的细菌系统中获得有活性的蛋白 ,但昆虫 - 杆状病毒表达系统(Baculovirus expression vector system ,BEVS) 弥补了这一不足 ,它具有与哺乳动物接近的翻译后修饰方式 ,易于获得活性蛋白 ,因此尝试在此系统中表达猪瘟病毒 E^{ms} 蛋白 ,期望获得活性的 E^{ms} 蛋白 ,通过以上初步的研究发现 ,目的蛋白已经得到表达 ,但融合蛋白 E^{ms}gfp 分子量 60 kDa 小于预测分子量 70.9 ~ 74.9 kDa ,说明蛋白翻译后修饰不完全或不同于哺乳动物细胞 ,另外 ,引入的 gx 信号肽是否能让该蛋白以分泌形式表达也还需要进一步分析。由于目前的报告质粒只含有哺乳动物的启动子 ,而不含昆虫细胞的启动子 ,因此不能直接转染报告质粒来监控转染效率、蛋白表达等步骤 ,为了及时监控蛋白表达情况以及便于优化表达条件 ,笔者采用了 GFP 与目的蛋白融合表达的方式来监控各种后续步骤。采用 GFP 作为标记省去了常规的繁琐费时的蛋白表达的检测 ,从而加快了试验进程并节约了成本。但采用此种策略需要考虑 E^{ms} 蛋白的功能和定位等是否会受到 GFP 蛋白的影响 ,可以排除 GFP 对蛋白定位的影响 ,融合蛋白 E^{ms}-

GFP 定位于细胞质 ,与病毒蛋白本身在宿主细胞中的定位一致。本研究为进一步探讨 E^{ms} 蛋白的功能、免疫诊断新方法和猪瘟基因工程疫苗的开发奠定了基础。

参考文献:

- [1] Weiland F ,Weiland E ,Unger G *et al.* Localization of pestiviral envelope proteins E^{ms} and E2 at the cell surface and on isolated particles [J]. *Journal of General Virology* , 1999 80: 1157 - 1165.
- [2] Rumenapf T ,Unger G ,Strauss J H *et al.* Processing of the envelope glycoproteins of pestiviruses [J]. *Journal of Virology* ,1993 67: 3288 - 3294.
- [3] Bruschke C J M ,Hulst M M ,Moormann R J M *et al.* Glycoprotein E^{ms} of pestiviruses induces apoptosis in Lymphocytes of several species [J]. *Journal of Virology* ,1997 , 71(9) : 6692 - 6696.
- [4] Schneider R ,Unger G ,Stark R *et al.* Identification of a structural glycoprotein of and RNA virus as a ribonuclease [J]. *Science* ,1993 261: 1169 - 1171.
- [5] Hulst M M ,Panoto F E ,Hoekman A *et al.* Inactivation of the RNase activity of glycoprotein E^{ms} of classical swine fever virus results in a cytopathogenic virus [J]. *Journal of Virology* ,1998 72(1) : 151 - 157.
- [6] Langedijk J P. Translocation activity of C-terminal domain of pestivirus E^{ms} and ribotoxin L3 loop [J]. *Journal of Biology Chemistry* 2002 277: 5308 - 5314.