猪瘟病毒 E2 基因的定点突变、在大肠杆菌中的高效表达及表达产物的免疫原性

余兴龙　涂长春*　徐兴然　张茂林　陈义祥　刘伯华

（解放军军需大学军事兽医研究所，长春　130062）

摘　要　用重组 PCR 技术对猪瘟病毒石门株 E2 基因进行了定点突变，然后将突变后的基因克隆至表达载体质粒 pET-28a(+)中，构建成重组质粒 pETE2。将 pETE2 转入受体菌 BL21(DE3)plysS 中，在 IPTG 的诱导下，重组转化菌可高效表达目的基因，表达量平均可达菌体蛋白总量的 28%。免疫印迹和间接 ELISA 表明所表达的蛋白是 CSFV 特异性的。此重组蛋白免疫的家兔可抵抗猪瘟兔化弱毒的攻击。

关键词　猪瘟病毒，E2 基因，定点突变，大肠杆菌表达，免疫原性

中图分类号　Q78　　**文献标识码**　A　　**文章编号** 1000-3061(2003)04-0439-05

猪瘟病毒(Classical swine fever virus，CSFV)是黄病毒科，瘟病毒属的成员。CSFV 引起猪具有高度传染性的疾病，并导致巨大的经济损失。猪瘟(CSF)是影响我国养猪业最严重的传染病之一，血清学检测猪瘟病毒抗体是诊断猪瘟的重要工具，也是免疫猪抗体水平监测的主要手段。用于 CSF 抗体检测的主要方法是 ELISA，但目前国内 ELISA 所用的抗原为细胞培养的病毒。由于 CSFV 在细胞培养上滴度很低，致使用此法生产的 CSF 抗原产量有限，成本亦高，难以满足国内 CSF 诊断和免疫监测的需要。对于以常规方法难以得到的抗原，可以用基因工程的方法进行表达，获得重组抗原。由于大肠杆菌表达系统具有成本低廉、操作简单、易于培养、生产周期短，多数情况下均可获得高效表达等优点，因而大肠杆菌是目前应用最多的表达系统，也是生产抗原蛋白的首选表达系统。E2 囊膜蛋白是 CSFV 主要的抗原蛋白，含有在 CSFV 高度保守的抗原决定簇。因此，可用重组 E2 蛋白代替完整的 CSFV，进行 ELISA 检测 CSFV 抗体[1,2]。

由于结构的原因，CSFV 全长 E2 基因很难在 *E. coli* 中获得高效表达，目前尚未见有关这方面的报道。我们曾试图在 *E. coli* 中表达 E2，构建过几种不同的原核表达载体，均仅能有限地表达 E2。影响真核基因在 *E. coli* 中高效表达的因素很多[3]，如基因的二级结构，基因 5′端和 3′端的稳定性，SD 序列的位置以及密码子的偏性等[4]。Zhang[5] 等人对真核和原核生物基因的密码子差异进行了深入的研究，发现 *E. coli* 的基因有 8 个不常使用的密码子，这些密码称为稀有密码子。如果一个基因中稀有密码子过多，其表达量一般较低，特别是基因中存在连续两个一样的稀有密码子和基因起始的 25 个密码子中存在有较多的稀有密码子，则基因的表达量特别低[4,6]。通过用计算机对 E2 基因的分析，发现 E2 基因上有两处明显不利于原核表达的序列，一是 E2 起始的 23 个密码子中有 6 个大肠杆菌稀有密码子；二是 E2 的第 63、64 位是两个连续的稀有密码子 AGG AGG。为此，我们通过重组 PCR 技术在保持 E2 基因所编码的氨基酸(aa)不变的前提下对其进行定点突变，将突变后的 E2 基因克隆到 pET-28a(+)中，构建成了高效原核表达质粒 pETE2，实现了全长 E2 蛋白在 *E. coli* 中的高效表达，表达量平均可高达菌体总蛋白的 28%。该重组蛋白可与 CSFV 特异性血清发生反应，并且以此重组 E2 蛋白抗原免疫的家兔可抵抗猪瘟兔化弱毒(Hog cholera lapinized

收稿日期：2003-01-10，修回日期：2003-04-21。

基金项目：国家"十五"863 课题资助(No.2001AA249011)和国家重点基础研究发展规划资助(973 课题)(No.G1999011903)。

* 通讯作者。Tel：86-431-7960009；Fax：86-431-7960009；E-mail：changchun_tu@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

virus，HCLV)的攻击。

1 材料和方法

1.1 材料

DH5α 和 BL21(DE3)plysS 均由本室保存。pET-28a(+)购自 Novagen Inc.，Pfu 酶、限制酶、T4 DNA 连接酶等购自上海生物工程公司、TaKaRa 和 Promega 公司。兔抗猪 IgG 酶标抗体、DAB 和 OPD 为 Sigma 公司产品。HCLV 种毒为 480 代兔脾淋毒，由中国兽药监察所提供，使用前于 2～2.5kg 的青年家兔中复壮，无菌采集定型热兔的脾脏与肠系膜淋巴结，置 −80℃保存备用。CSFV 阳性血清采自 CSFV 基因疫苗免疫并在 CSFV 强毒攻击后得到完全保护的猪[7]，CSFV 阴性血清由辽宁益康生物制品厂和成都兽医药械厂提供(经兔体中和实验证实)，临床 CSFV 阳性血清标本由农业部兽医诊断中心提供(经 IDEXX 公司的检测 CSFV 抗体阻断 ELISA 试剂盒证实)。

1.2 CSFV E2 基因密码子的定点突变

根据 CSFV E2 基因的序列及大肠杆菌对密码子的利用频率表[5]，借助软件 DNAsis 和 Vector 3.0 设计了如下扩增猪瘟病毒石门毒 E2 基因[8] 5′端主要抗原编码区的 4 条突变引物：

mP1：GGAATTCATGCGctTAGCCTGCAAGGAAGATTACcGtT

ACGCAATcTCATCAACCAATGAGATtGGGtTACTCG

mP2：TGCCAggTACCggCgACTGACCACATTAAGTGC

mP3：AGTcGccGGTAccTGGCATCATTGCATAAGGG

mP4：CGGAATTCAATTGGGCAGACAAGGTAG

其中，小写字母为突变碱基，mP1 和 mP4 划底线者为便于克隆引入的酶切位点，mP2 和 mP3 的 5′端之间有 18 个碱基互补，mP2 和 mP3 划底线者为便于鉴定重组质粒引入的酶切位点 *Kpn* I(氨基酸序列不变)。

所突变的密码子分别是：CGG-CGC(1，Arg)，CTA-TTA(2，Leu)，AGG-CGT(9，Arg)，ATA-ATC(12，Ile)，ATA-ATT(18，Ile)，CTA-TTA(20，Leu)，AGG-CGC(63，Arg)，AGG-CGG(64，Arg)。短横前为突变前的密码子，短横后为突变后的密码子，括号中的字符分别为该密码子的位置和编码的 aa。

首先以 pHCE2 为模板[8]，用 Pfu 聚合酶，按标准方法以 50μL 反应体系进行扩增反应，分别以 mP1、mP2 和 mP3、mP4 为引物对扩增 E2，扩增产物分别命名为 mP12 和 mP34。循环参数为 94℃ 30s，52℃ 50s，72℃ 20s，15 个循环，2%琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物。用 Agarose Gel Extraction Kit (Roche)分别回收 PCR 产物 mP12 和 mP34。然后，以回收的 mP12 和 mP34 大约等摩尔数的混合物为模板，以 mP1 和 mP4 为引物进行 PCR。扩增程序为：95℃ 50s，52℃ 50s，72℃ 30s，15 个循环。PCR 产物命名为 5′mE2(即 E2 基因 5′端突变 DNA 片段)。

1.3 E2 基因重组表达质粒的构建

以 *Eco*RⅠ酶切上述 PCR 产物 5′mE2，回收纯化约 400bp 的 DNA 片段，将其与以 *Eco*RⅠ酶切的原核表达质粒 pET-28 a(+)相连，然后转化 DH5α 菌，筛选卡那霉素抗性的菌落。小量提取质粒后酶切鉴定插入方向，并送至大连宝生物工程公司进行序列测定，正确者命名为 pET5′mE2。然后以 *Sac*Ⅰ和 *Xho*Ⅰ分别双酶切重组质粒 pET5′mE2 和 pcDSW[7]，分别回收大片段和 780bp 的片段(前者包含有 E2 基因 5′端 241bp 的序列，后者包含有 E2 基因 3′端 726bp 的序列，两者共同构成了 E2 基因的所有抗原编码区域)。将两片段混合后用 T4 DNA 连接酶于 16℃进行连接，转化 BL21(DE3)plysS 感受态菌，筛选卡那霉素抗性的阳性克隆，碱裂解法小量提取质粒并进行酶切鉴定，正确者命名为 pETE2。

1.4 重组质粒在受体菌中的诱导表达

诱导表达按 pET 系统操作手册进行，并按标准方法[3] 对诱导表达产物进行 SDS-PAGE 分析和 Western-blot 印迹鉴定。

1.5 重组蛋白的免疫原性

1.5.1 以重组 E2 蛋白为抗原检测 CSFV 抗体 先用制备型 SDS-PAGE 纯化重组 E2 蛋白，操作参照涂长春等的方法[10]。然后以 0.15μg/孔 纯化的重组 E2 蛋白包被 ELISA 板(4℃过夜)，用 10%兔血清进行封闭，以含 10%的兔血清的 PBS 稀释待检血清 200 倍，兔抗猪酶标抗体的工作浓度为 1∶15 000。底物为 OPD-H_2O_2。封闭、加入检血清和兔抗猪酶标抗体的作用条件均为 37℃感作 1h，底物作用条件为室温避光感作 0.5h。以此间接 ELISA 条件检测 CSFV 阴、阳性血清和临床血清标本。阳性血清的判断标准为：P/N 值大于 2(P 为待检血清的 OD_{490} 值，N 为阴性血清 OD_{490} 的算术平均值)。

1.5.2 重组 E2 抗原的动物免疫保护试验 2kg 左右的大耳白家兔 4 只，任取其中 2 只以重组 E2 蛋白按

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

0、3、6 周的程序进行免疫，免疫剂量为 0.5μg/次/兔，佐剂为氢氧化铝乳胶，免疫途径为颈部皮下。另 2 只家兔只注射氢氧化铝胶作为对照。最后一次免疫后 2 周以 $100LD_{50}$ 的猪瘟兔化弱毒进行攻击，观察攻毒后家兔的体温变化。

2 结 果

2.1 PCR 扩增 5′mE2 及 PCR 产物的克隆

由图 1 可见，以 pHCE2 为模板，引物对 mP1、mP2 和 mP3、mP4 均能扩增出约 200bp 的产物。以 mP12 和 mP34 的混合物为模板，mP1 和 mP4 为引物可扩增出约 400bp 的 5′mE2，用 *Kpn* Ⅰ 酶切 5′mE2，可切出大小分别与 mP12 和 mP34 一致的两个片段（图略）。

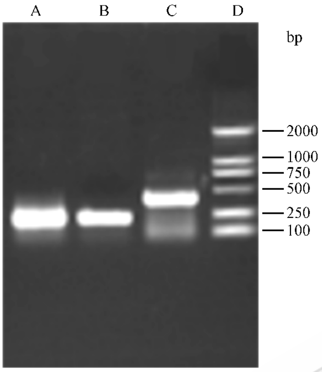

图 1　5′mE2 基因片段的 PCR 扩增

Fig.1　PCR amplification of 5′mE2 DNA fragment

A. mP12，201bp；B. mP34，219bp；C. 5′mE2，396bp；D. DL-2000 DNA marker

2.2 E2 基因表达质粒的构建

先用重组 PCR 的方法对 E2 基因 5′端约 400bp 的片段进行定点突变，并将该片段克隆到 pET-28a（+）中，得到 E2 基因主要抗原编码区的表达质粒 pET5′mE2，序列测定表明所克隆得到的基因片段与所设计的一致。然后用 *Sac* Ⅰ 与 *Xho* Ⅰ 酶切携带有全长 E2 基因的 pcDSW[3]，回收约 780bp 的片段，并将其插入到 pET5′mE2 的 *Sac* Ⅰ 与 *Xho* Ⅰ 之间得到表达全长 E2 基因的表达质粒 pETE2. 以 *Bgl* Ⅱ、*Eco*R Ⅰ 单酶切和 *Bam*H Ⅰ-*Xho* Ⅰ 双酶切对其进行鉴定，三者切出的 DNA 片段长度分别是：5.62kb、0.74kb，5.37kb、1.0kb 和 5.33kb、1.04kb。结果酶切正确，如图 2。

2.3 E2 蛋白的表达及检测

pETE2 重组质粒转化的 BL21（DE_3）pLysS 重组菌在含 30μg/mL 的卡那霉素的 LB 培养基中生长至 OD_{600} 值在 0.6～1.0 的范围内加入 IPTG 进行诱导表达。SDS-PAGE 电泳及 Western-blot 检测结果显示（如图 3 所示）：pETE2 诱导菌与未插入外源基因的 pET-28a（+）质粒的转化菌比较，在约 40kD 处有一特异表达的蛋白带，与预计的 E2 蛋白的大小基本一致。凝胶薄层扫描显示，重组 E2 蛋白的表达量平均达菌体总蛋白的 28%。

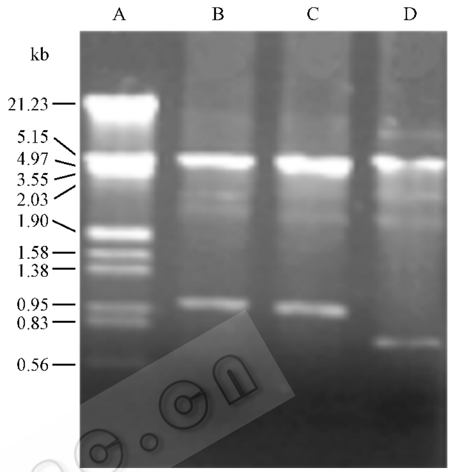

图 2　pETE2 的酶切鉴定

Fig.2　Restriction enzyme digest analysis of pETE2

A. λDNA *Eco*R Ⅰ/*Hin*d Ⅲ marker

B. pETE2 digested by *Bam*H Ⅰ and *Xho* Ⅰ

C. pETE2 digested by *Eco*R Ⅰ

D. pETE2 digested by *Bgl* Ⅱ

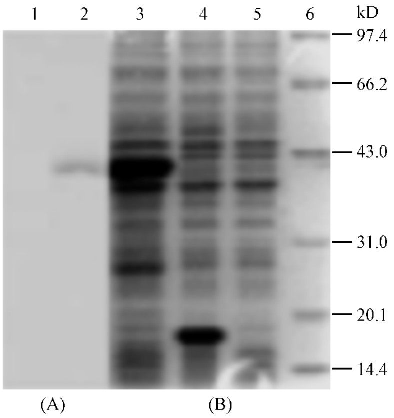

图 3　重组 E2 蛋白的 SDS-PAGE（B）和免疫印迹分析（A）

Fig.3　SDS-PAGE（B）and Western blot（A）analysis of the recombinant E2

1. BL21（DE3）pLySs transformed with pETE2（uninduced）；
2. BL21（DE3）pLySs transformed with pETE2（induced by IPTG）；
3. BL21（DE3）pLySs transformed with pETE2（induced by IPTG）；
4. BL21（DE3）pLySs transformed with pETE5′ mE2（induced by IPTG）；
5. BL21（DE3）pLySs transformed with pETE2（uninduced）；
6. Medium-range protein molecular weight marker

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

2.4 重组 E2 蛋白的抗原性分析

2.4.1 重组 E2 蛋白的间接 ELISA 反应性：以本实验所建立的间接 ELISA 方法对 CSFV 阴、阳性血清和临床血清标本的检测结果为：112 份阴性血清的 OD_{490} 平均值为 0.198，其 95%的可信区间为 0.186～0.211，呈正态分布。57 份阳性血清标本的 OD_{490} 在 0.4～2.0 之间。

2.4.2 重组 E2 蛋白的免疫原性：2 只重组 E2 蛋白免疫家兔在 100 LD_{50} HCLV 的攻击之后，连续观察 1 周，体温、食欲和精神一切正常。而只免疫氢氧化铝胶的 2 只家兔在同样剂量的 HCLV 攻击上于攻毒后约 24h 体温开始升高，体温超过正常平均体温 0.5℃的时间约 36h，呈定型热反应。

3 讨 论

基因体外点突变技术是研究基因功能，改变基因结构的有效方法，传统的体外突变技术方法有许多种，但大都繁琐而复杂，但自从 PCR 技术出现后，使传统的体外突变方法大大改进，变得简单、省时，并且可在 DNA 片段的任何位置进行定点突变。本实验根据前人[4,5,6]研究不同生物基因对密码子利用差异的结果，以一种称之为“重组 PCR”(recombinant PCR)的方法对 CSFV E2 基因的主要抗原编码区进行了定点突变，改变了 E2 基因中不利于在 *E. coli* 中表达的密码子，该过程由简单的 2 次 PCR 完成。第一次 PCR 分别扩增 mP12 和 mP34 第二次 PCR 扩增突变的 5′mE2，它利用 mP12 和 mP34 两种产物变性后复性形成的 3′凹端的异源双链，这种 3′凹端可在 Tag DNA 聚合酶的催化下延伸而将 mP12 和 mP34 连接成一个完整的分子，即 5′mE2。至今有 Lin M[1]、Wong M[10]、李红卫[5]和张永国[11]等 4 人在 *E. coli* 中分别实现了对全长或部分 CSFV E2 基因的表达，但 Wong M 的表达量在 5%左右，而 Lin M 和李红卫的则更低，张永国的表达量可达 38%，但他所表达的 E2 仅有 119 个 aa，只有全长 E2 370 个 aa 的 1/3。本文的重组 E2 蛋白的表达量平均达 28%，最高可达 38.5%，它由 329 个 aa 组成，包含了除 C 端一段疏水性的跨膜区(约 40aa)外所有 aa 序列，而疏水性的 aa 区域不参与抗原表位的形成，因此，本文的重组 E2 蛋白包括了所有可能的全长 E2 蛋白的线性抗原表位。这是 CSFV 全长 E2 基因首次在 *E. coli* 中得以高效表达，为 CSFV 的血清学诊断和免疫监测提供大量优质的抗原奠定了基础。

另外，计算机是基因克隆策略设计和基因分析的有力工具。本实验除上述用计算机分析了 E2 基因的密码子外，还在不改变氨基酸序列的前提下，通过定点突变在 E2 基因中引入了 *Kpn* I 酶切位点。这为重组质粒的鉴定带来了极大的方便。因为在本实验中的第二步 PCR 扩增 5′mE2 时，存在有原始模板的污染问题。若不引入新的酶切位点，扩增的产物是 mP12 和 mP34 共同作模板的结果，还是原始模板污染后的产物，则只能通过序列测定才能确定。

REFERENCES(参考文献)

[1] Lin M, Lin F, Mallory M *et al*. Deletions of structural glycoprotein E2 of classical swine fever virus strain alfort/187 resolve a linear epitope of monoclonal antibody WH303 and the minimal N-terminal domain essential for binding immunoglobulin G antibodies of a pig hyperimmune serum. *J Virol*, 2000, **74**:11619－11625

[2] Clavijo A, Lin M, Riva J *et al*. Development of a competitive ELISA using a truncated E2 recombinant protein as antigen for detection of antibodies to classical swine fever virus. *Res Vet Sci*, 2001, **70**:1－7

[3] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning a laboratory manual 2nd, Cold spring harborlaboratory press, 1989

[4] Chen T, Inouye M. Suppression of the negative effect of minor arginine cdons on gene expression, preferential usage of minor codons within the first 25 codons of the *Escherichis coli* genes. *Nucleic Acids Research*, 1990, **18**:1465－1473

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

[6] Sorensen M A, Kurland C G, Pedersen S. Codon usage determines translation rate in *Escherichis coli*. *J Mol Biol*, 1989, **207**:365－377

[7] YU X L(余兴龙), TU C C(涂长春), LI H W(李红卫) *et al*. Construction of eukaryotic expression plasmids of CSFV E2 gene and the study on DNA Vaccine. *Virologica Sinica*(中国病毒学), 2000, **15**(3):264－271

[8] LI H W(李红卫), TU C C(涂长春), YU X L(余兴龙) *et al*. Cloning of protective antigen E2 gene of hog cholera virus and its expression in protoryotic cells. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*(畜牧兽医学报), 1999, **30**(2):146－152

[9] TU C C(涂长春), XU J L(许基龙), YIN Z(殷震) *et al*. Enhancement of immunogenicity of foot and mouth disease virus capsid polypeptide VP1. *Buttetin of Veterinary College of PLA*(兽医大学学报), 1988, **2**(8):170－175

[10] Wong M L, Liu J J, Chang Y *et al*. Expression of the glycoprotein E2 of the classical swine fever virus in *Escherichia coli*. *J Vet Med Sci*, 1998, **60**:541－544

[11] ZHANG Y G(张永国), LIU X T(刘湘涛), HAN X Q(韩雪清) *et al*. Cloning of the major antigen region of E2 gene of hog cholera virus and expression in *Escherichia coli*. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报), 2002, **18**(5):605－608

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

Site-directed Mutagensis of the Major Antigen E2 Gene of CSFV, Its High Level Expression in *Escherichia coli* and the Immunonicity of Recombinant E2 Protein

YU Xing-Long TU Chang-Chun* XU Xing-Ran ZHANG Mao-Lin CHEN Yi-Xiang LIU Bo-Hua

(*Changchun University of Agricultural and Animal Sciences*, *Changchun* 130062, *China*)

Abstract Classical swine fever virus (CSFV), an enveloped positive-stranded RNA virus in the genus *Pestivirus* of the *Flaviviridae* family, is the causative agent of a highly contagious swine disease characterized by symptoms of hemorrhagic fever and immune depression, usually leading to substantial economic losses. The serological methods for detection of CSFV antibody such as ELISA are important means for the diagnosis of CSFV and immune surveillance. It is difficult to obtain CSFV antigen with high quality using traditional method because its titration titer is low in cell culture. CSFV has four structural protein named C, E0, E1 and E2. The E2 protein contains major antigenic determinants that are conserved between different CSFV strains and involved in neutralization by antibodies. So recombinant E2 protein can be developed as an alternative to the intact viral antigen. So far, CSFV E2 have not been expressed in *E. coli* with high level. Many factors, such as the secondary structure, the stability of 5′ and 3′ terminus of gene, the location of SD sequence and the bias of codes, are involved in the expressing level of foreign gene in *E. coli*. In this study, two sites of the E2 gene sequence were confirmed to be detrimental to its expression efficiency in *E. coli* through the computer-aided analysis. So they were mutated using recombinant PCR without changing the amino acids sequence of CSFV E2 gene. A plasmid was constructed by inserting the mutated E2 gene into the prokaryotic expression vector pET-28a(+) and named pETE2. The *E. coli* competent host BL21 (DE3)lysS transformed with pETE2 could express the E2 gene at high level, amounting to 28 % of the total protein of the induced recombinant bacteria at the presence of IPTG. Except the hydrophobic transmembrane domain at C terminus, the recombinant E2 protein includes the total aa sequence. So it contains all the potential linear antigen epitopes of E2 protein because hydrophobic aa region can not form epitope. The recombinant E2 protein was CSFV-specific as proved by Western blotting and indirect ELISA. The rabbits immunized with the recombinant E2 can be protect from the challenge of hog cholera lapinized virus. This is the first report that E2 gene is expressed with high level expression in *E. coli*. In conclusion, it is an effective measure that mutate the CSFV E2 gene to increase its expression level in *E. coli*. The recombinant CSFV E2 protein possess fine immunonicity and can be used the antigen for the detection of CSFV antibody.

Key words classical swine fever virus, E2 gene, site-directed mutagensis, expression in *E. coli*, immunonicity

---

Received: 01-10-2003

This work was supported by Grant from the National High Technology R & D Program of China (863) (No. 2001AA249011) and Grant from the State Key Basic R & D Program (973) (No. G1999011903).

* Corresponding anthor. Tel: 86-431-7960009; Fax: 86-431-7960009; E-mail: changchun_tu@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