

研究简报

猪 型圆环病毒 ORF1 基因克隆及在 *E. coli* 中的表达

郝 鑫, 陈焕春*, 李 川, 刘正飞, 曹胜波, 琚春梅

(华中农业大学 动物医学院动物病毒研究室, 武汉 430070)

Cloning of ORF1 Gene of Porcine Circovirus Type 2 and Its Expression in *E. coli*

XI Xin, CHEN Huan-chun*, LI Chuan, LIU Zheng-fei, CAO Sheng-bo, JU Chun-mei

(Laboratory of Animal Virology, College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract A pair of specific primers were designed and synthesized according to the published sequences of ORF1 gene of PCV-2. The complete DNA fragment of ORF1 gene was obtained by PCR from viral DNA of PCV-2 QD strain. Its nucleotide sequence was determined by the dideoxy-mediated chain termination method. The results showed that the complete open reading frame (ORF) of ORF1 gene encoding 314 amino acids was 945 bp in length. A comparison of the nucleotide and amino acid sequences of ORF1 gene with that of other PCV strains showed that the identity of nucleotide with PCV-1 and PCV-2 were 83 % and 96.4 % ~ 99.2 % respectively, and identity of the deduced amino acid with PCV-1 and PCV-2 were 84 % and more than 98 % respectively. The DNA fragment of ORF1 gene was subcloned into prokaryotic expression vector pEF28a and pGEX-KG; while the specific nonfusion and fusion proteins with GST of molecular weight 38 kD and 63 kD were expressed in *E. coli* BL₂₁ (DE3). Western blotting assay indicated that the polyclonal antibody against PCV-2 could recognize these two proteins.

Key words porcine circovirus type 2, ORF1 gene, cloning, expression
中图分类号 Q78, S852

猪圆环病毒 (porcine circovirus, PCV) 属圆环病毒科 (Circoviridae), 为单股负链 DNA 病毒, 以滚环方式进行复制, 是目前已知的最小的动物病毒之一. PCV 有 2 种基因型即 PCV-1 和 PCV-2, 两者细胞培养均不引起病变. 前者广泛存在于猪源肾细胞中, 但并不引起感染猪发病, 其基因组为 1759 bp; 后者首先由 Allan 等^[1] 从患断奶猪多系统衰弱综合症 (postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS) 的猪群中分离到, 被证明为 PMWS 的重要病原. PCV-2 主要侵害感染猪的免疫系统^[2], 从而诱发猪体的免疫抑制. PCV-2 常和呼吸与繁殖障碍综合征病毒 (PRRSV)、细小病毒 (PPV)、伪狂犬病毒 (PRV) 混合感染, 造成猪的免疫失败^[3], 给养猪业带来重大的经济损失. 血清学和病原学调查^[4,5] 都表明, 该病毒已在我国存在且已有流行. PCV-2 的基因组为 1767 bp 或 1768 bp. PCV-1 和 PCV-2 的基因组均包含有 2 个主要的读码框架, 即 ORF1 和 ORF2. 病毒的主要结构蛋白均由 ORF2 编码^[6], PCV-1 的 ORF1 基因编码 Rep 和较小的 Rep 两种与复制有关的蛋白^[7], 而

PCV-2 ORF1 基因的编码产物尚不十分清楚. ORF1 基因在圆环病毒科各病毒中是比较保守的, 对其深入研究将为 PCV 的起源提供重要依据^[8]. 有报道称^[9], 将体外表达的 ORF1 编码蛋白与表达粒-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 的真核表达质粒联合免疫猪群, 能起到抵抗 PCV-2 攻击的作用. 这提示我们, 针对 ORF1 基因编码蛋白的抗体可能具有中和病毒的作用.

目前国内沿未见有 PCV-2 ORF1 基因克隆和表

收稿日期: 2003-06-27, 接受日期: 2003-09-26

国家自然科学基金 (No. 36170701) 资助

* 联系人 Tel: (027) 87282608, Fax: (027) 87282608

E-mail: hzauvet@public.wh.hb.cn

郝鑫, 男, 1980年6月生, 在读硕士

Received: June 27, 2003; Accepted: September 26, 2003

Supported by National Natural Science Foundation of China (No. 36170701)

* Corresponding author Tel: (027) 87282608, Fax: (027) 87282608, E-mail:

hzauvet@public.wh.hb.cn

达的报道.为了深入研究 ORF1 基因的结构与功能,本研究以我们分离的致 PMWS 的 PCV-2 病毒 QD 株为材料,克隆了完整的 ORF1 基因并在 *E. coli* 中进行了融合表达和非融合表达.

1 材料与方法

1.1 病毒、菌株及质粒

猪型圆环病毒 QD 株由本实验室鉴定并保存.大肠杆菌 DH5_α、BL₂₁ (DE3)、原核表达载体 pET-28a、pGEX-KG 由本实验室保存.pMD-18T 载体购自大连宝生物生物工程公司.

1.2 酶与试剂

各种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、分子量标准、*Taq* DNA 聚合酶、dNTPs 均为大连宝生物工程公司产品.IPTG、UNIQ-5 柱离心式 DNA 胶回收试剂盒购自上海生工生物工程技术有限公司.HRP 标记羊抗猪 IgG 购自晶美生物技术有限公司.抗 PCV-2 多克隆抗体由本实验室制备.其它试剂为进口或国产分析纯试剂.

1.3 PCR 模板的制备

将 PCV-2 QD 株接种 PCV 阴性 PK-15 细胞,37℃ 培养 24 h 后用 300 mg/L D-氨基葡萄糖处理 20 min, PBS 冲洗 3 次后,继续培养 60 h.胰酶消化后,收集细胞悬液,10 000 r/min 离心数秒,取去细胞沉淀用适量的样品缓冲液悬浮,加入蛋白酶 K 至最终浓度为 100 μg/ml,在 37℃ 温箱中作用 1 h,取出于沸水中变性 10 min,立即置冰上,速冷后 3 000 r/min 离心数秒,取适量上清作为模板.

1.4 PCR 和 ORF1 基因的克隆

根据 GenBank 已发表的 PCV-2 基因组序列,设计一对包含 ORF1 基因完整编码区的特异性引物.引物 P1:5'-TGAGGATCCATGCCCAADAAGAATGGAAG-3' 对应于 ORF 的 1~23 位,含 *EcoR* 位点;引物 P2:5'-AGCGAATCTTAGTAATTTATTTCATATGG-3' 对应于 ORF 的 924~945 位,含 *BamH* 位点.引物由上海 Sangon 合成.PCR 反应条件为 95℃ 预变性 5 min 后进入循环,循环参数为:95℃ 1 min,55℃ 72℃ 1 min 30 s,35 个循环后 72℃ 延伸 10 min.1%琼脂糖凝胶电泳回收 PCR 产物,经鉴定后克隆到 pMD-18T 载体中,构建 pMD-ORF1 克隆用于测序.

1.5 序列测定及分析

将阳性重组质粒送大连宝生物工程公司测序.DNAstar 及 BioEdit 软件分析测序结果,并与 PCV-1 毒株及美洲、欧洲、亚洲的 PCV-2 病毒株进行同源比较.

1.6 原核表达克隆构建

EcoR 和 *BamH* 双酶切 pMD-ORF1,回收 945 bp 左右的目的片段,与经 *EcoR* 和 *BamH* 双酶切的原核表达载体 pET-28a、pGEX-KG 连接,分别转化 *E. coli* DH5_α,通过酶切和 PCR 筛选、鉴定含目的片段的重组子,分别将它们命名为 pETORF1 和 pGEXORF1.

1.7 ORF1 基因的诱导表达

表达质粒 pETORF1、pGEXORF1 及其空白载体分别转化 *E. coli* BL₂₁ (DE3),挑取单个菌落接种于分别含 100 mg/L 氨苄青霉素和 50 mg/L 硫酸卡那霉素的 LB 培养基中,37℃ 振荡培养至 A_{600} 达到 0.6~1.0,置 4℃ 冰箱过夜,以 1:100 的比例接种于含相同浓度抗生素的 LB 培养基中,37℃ 振荡培养至 A_{600} 达到 0.5~0.6,加 IPTG 至终浓度 1 mmol/L 诱导一次,于诱导后 3 h 取样,4℃ 5 000 r/min 离心收集菌体,重悬于适量 1×SDS 上样缓冲液中,沸水浴 3~5 min,取 20 μl 进行 SDS-PAGE.

1.8 包涵体制备

取 IPTG 诱导后 3 h 的菌液,离心收集菌体,重悬于原菌液 1/10 体积的缓冲液 A 中,高强度超声波处理 3~5 次,每次 30 s,间隔 30 s,至菌液不再粘稠,12 000 r/min 离心 15 min,取沉淀进行 SDS-PAGE.

1.9 Western 印迹鉴定 ORF1 表达产物

将 SDS-PAGE 凝胶的蛋白带电转移至硝酸纤维素膜,以封闭液 (TBST + 1% BSA) 封闭过夜,然后转入以封闭液 1:40 倍稀释的、经 *E. coli* BL₂₁ (DE3) 培养物吸附的猪抗 PCV-2 血清中,37℃ 温浴 1 h,再转入封闭液稀释的 HRP 标记羊抗猪 IgG 中,37℃ 温浴 1 h,DAB 显色.

2 结果

2.1 PCR 扩增与序列鉴定

利用人工合成的一对引物,以 PCV-2 QD 株细胞培养物为模板进行扩增,PCR 扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶中可见一条 960 bp 左右的特异性条带 (Fig. 1),其大小与预期相符.将该片段克隆到 pMD-18T 载体中,转化 *E. coli* DH5_α,挑取单个菌落.提取质粒,经 PCR 和 *EcoR*、*BamH* 酶切鉴定,确定含有 945 bp 左右插入片段的重组质粒,进行双链测序.测序结果表明,克隆到的 PCV-2 QD 病毒株的 ORF1 基因全长 945 bp,编码 314 个氨基酸.4 种核苷酸的比例分别为 A 28.04%,T 24.66%,G 26.67%,C 20.63%,AT 含量 52.70%,GC 含量 47.30%.QD 病



Fig. 1 PCR product of PCV-2 QD strain
M:Marker DL2000; 1—3:PCR product; 4: Negative control

毒株 ORF1 基因的核苷酸序列及其编码的氨基酸序列 GenBank 注册号为 AY291316.

2.2 QD 病毒株 ORF1 基因核苷酸序列及其推导氨基酸序列与其它 PCV 病毒株的比较

应用 DNA star 软件包里的 Clustal W 程序,将 QD 株 ORF1 基因序列 GenBank 收录的 PK-15 PCV-1 (U49186)、加拿大毒株 pmws PCV (AF027217)、西班牙毒株 SPA1 (AF201308)、德国毒株 GER2 (AF201306)、日本毒株 Jan. No. 35 (AB072303)、中国台湾毒株 TaiWan SC(AF465211)、分离自患皮炎与肾

病综合症猪群的毒株 pnds PCV-2 (AJ293867) 及两株中国大陆毒株 YuA (AY035820) 和 SD (AY181947) 毒株同源性进行比较 (Table 1), 可以看出 QD 与 PCV-1 毒株的 ORF1 有较高的同源性, 其氨基酸一致性可达 84.0%. 各 PCV-2 毒株间的 ORF1 高度保守, 核苷酸序列一致性为 96.4% ~ 99.2%, 氨基酸的突变很少, 同源性达到 98% 以上.

通过对比 QD 株与 PCV-1 的 ORF1 核苷酸序列发现, QD 株 ORF1 存在与 PCV-1 相同的“GTGAGT”和“CAG”位点, 两个位点分别标志着内含子的起始和终止, PCV-1 ORF1 去掉这个内含子后编码 Rep 蛋白, 氨基酸序列对比显示 (Fig. 2), QD 病毒株与 PCV-1 相比, 在第 5 个氨基酸后插入 3 个氨基酸, 在第 294 个氨基酸后缺失 1 个氨基酸, QD 病毒株 ORF1 推导氨基酸序列存在与 PCV-1 相同的“FILNN”、“HLQGF”、“YCSK”3 个与滚环复制有关的氨基酸修饰位点和 1 个 dNTPs 结合位点“GKS”. QD 株 ORF1 编码的氨基酸序列中共有 3 个糖基化位点“NPS”、“NQT”和“NAT”, 而 PCV-1 仅有“NPS”1 个糖基化位点.

2.3 表达载体的构及鉴定

重组表达质粒 pETORF1 和 pGEXORF1 的酶切鉴定结果见 Fig. 3.

Table 1 Comparison of sequence identity of QD strain with PCVs

Virus strain	PK-15 PCV-1	pmws PCV	SPA1	GER2	Jan. No. 35	TaiWan SC	pnds PCV-2	YuA	SD
GenBank No.	U49186	AF027217	AF201308	AF201306	AB072303	AF465211	AJ293867	AY035820	AY281947
Nucleotide (%)	83.0	99.2	97.2	97.2	97.3	96.4	97.5	97.4	96.7
Amino acid (%)	84.0	99.0	99.0	99.0	99.0	98.0	99.0	98.0	98.0

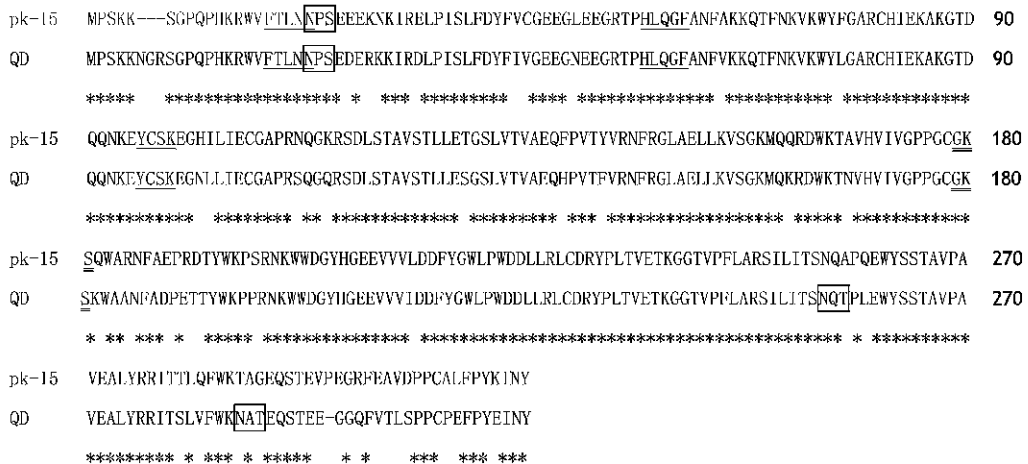


Fig. 2 comparison of the deduced amino acid sequences of QD strain with PCV-1
“ * * * ”: amino acid sequence identity; “ _ ”: the motifs characteristic of protein involved in rolling-circle DNA replication;
“ = ”: GKS box; “ □ ”: N-glycosylation sites

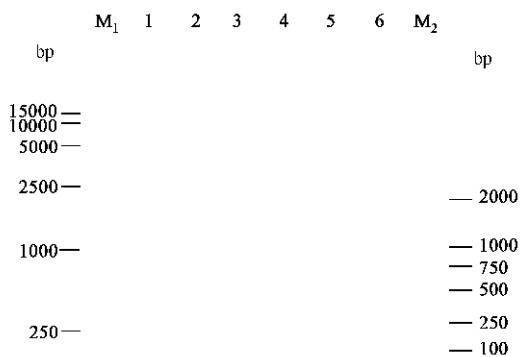


Fig. 3 Recombinant expression plasmid digested by restriction enzymes

M₁:Marker DL15000 ;M₂:Marker DL2000

1:pGEXORF1 / Pst ;2:pGEXORF1 / EcoR ;3:pGEXORF1 / Sac ;

4:pGEXORF1 / Pst ;5:pGEXORF1 / EcoR + BamH ;6:pETORF1 / Pst

2.4 ORF1 基因在 *E. coli* 中表达和包涵体的提取

SDS-PAGE 结果显示 (Fig. 4A), pETORF1 和 pGEXORF1 分别在 38 kD 和 63 kD 处出现明显的特异性蛋白带,而对照无此条带.从诱导 2 h 的菌液中提取包涵体,取沉淀进行 SDS-PAGE.结果发现,72 %.

2.5 表达产物的 Western 印迹分析

对诱导 3 h 的大肠杆菌表达产物进行 Western 印迹分析,SDS-PAGE 后电转印 NC 膜,用大肠杆菌 BL₂₁ (DE3) 培养物吸附的猪抗 PCV-2 血清为一抗,HRP 标记羊抗猪 IgG 为二抗,DAB 显色.结果 pETORF1 和 pGEXORF1 分别在 38 kD 和 63 kD 和的条带呈现阳性,而对照为阴性 (Fig. 4B).结果证实,PCV-2 ORF1 基因在大肠杆菌 BL₂₁ (DE3) 中得到了正确表达.

3 讨论

以病毒的细胞培养物为模板,直接扩增目的基因,具有简单、快速的优点,避免了提取基因组 DNA 所需的大量培养、酚仿抽提、高速离心等烦琐的操作过程,不失为一种获取目的基因的良好方法.

QD 毒株 ORF1 基因核苷酸和推导的氨基酸与国外的其它 PCV-2 毒株具有相当高的同源性,与 PCV-1 的同源性也达到 83 % 以上,而且也存在与 PCV-1 编码氨基酸序列相同的与滚环复制有关的修饰位点和相同的内含子起始和终止位点,这预示着 PCV-2 ORF1 和 PCV-2 OPF1 相似,也编码与病毒复制有关的 Rep 和 Rep 蛋白,两者共同作用启动病毒的复制.

本研究以我国国内地方分离株为材料,克隆了完整的 ORF1 基因,并测定了全序列.在本试验中,完整的 PCV-2 ORF1 基因以正确的方式插入到 pET-28a 表达载体后,获得了表达性重组子,但表达量不高.为提高表达量和获得大量易于纯化的蛋白,将 ORF1 基因插入到 pGEX-KG 原核表达载体的 GST 蛋白编码序列之后,实现了 ORF1 和 GST 的高效融合表达.pGEX 原核表达系统的 P_{lac} 启动子是一种最强的原核启动子,所表达的 GST 融合蛋白,可以通过亲和层析纯化得到大量蛋白,但本试验所获得的蛋白大部分以包涵体的形式存在,这可能与外源基因本身的特性及诱导的条件有关.包涵体形式的蛋白可通过变体、复性等操作恢复其生物学活性,且复性后纯度较高,可以满足后续实验的要求.本试验所

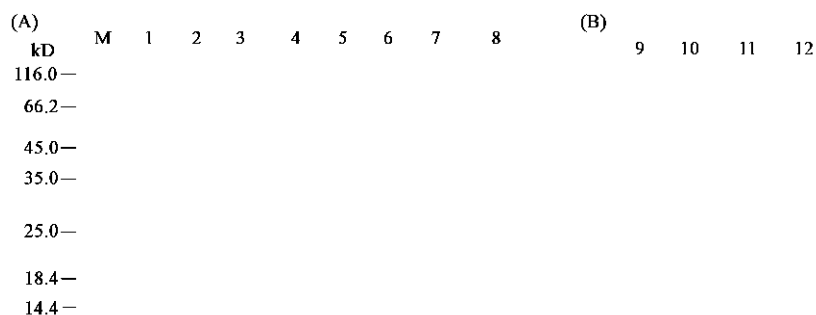


Fig. 4 SDS-PAGE(A) and Western blot analysis(B) of expression products in *E. coli* for ORF1 gene

M:Protein marker;1,2:pETORF1;3:Inclusion body of pETORF1;4:pET-28a;5,6:pGEXORF1;

7:The inclusion body of pGEXORF1;8:pGEX-KG;

9:Protein of *E. coli* BL₂₁ (DE3) with pGEXORF1;10:Protein of *E. coli* BL₂₁ (DE3) with pGEX-KG

11:Protein of *E. coli* BL₂₁ (DE3) with pETORF1;12:Protein of *E. coli* BL₂₁ (DE3) with pET-28a

采用带有融源性 T7 RNA 聚合酶基因的大肠杆菌 BL₂₁ (DE3) 宿主菌,能降低外源蛋白对菌体正常生长和分裂的毒害作用,实现了外源蛋白的稳定表达^[10,11]。

Western 印迹分析检测原核表达产物时,经常会出现非特异性条带。本试验中,我们按 Ro 等介绍的方法^[12],用与原核表达质粒同步培养的大肠杆菌 BL₂₁ (DE3) 空白菌对猪抗 PCV-2 血清吸附,再用处理过的血清作一抗,非特异性基本消除。

尽管 ORF1 基因编码的是与病毒复制相关的非结构蛋白,从试验的 Western 印迹分析结果看,血清中存在针对 ORF1 编码蛋白的抗体,但这种抗体是否具有中和病毒的能力,尚不清楚。目前我们正着手以纯化的 ORF1 表达产物免疫动物,探讨针对 Rep 蛋白的抗体是否具有抵抗病毒攻击的作用。鉴于本实验室正在研制 PCV-2 灭活苗和以 PRV 为活载体,以 PCV-2 结构蛋白 ORF2 为外源基因 PRV-PCV-2 二价基因工程疫苗,可以将纯化的 ORF1 表达产物包被酶标板,建立 ELISA 诊断方法与包被 ORF2 抗原的 ELISA 试剂盒联合使用,以鉴别疫苗免疫猪和野毒感染猪。目前,本研究正在进行中。

参考文献 (References)

- Allan G M, Meehan B, Todd D. Novel porcine circovirus from pigs with wasting disease syndromes. *Vet Rec*, 1998, **142**:467 ~ 468
- Shibahara T, Sato K, Ishikawa Y. Porcine circovirus induces B lymphocyte deletion in pigs wasting disease syndrome. *J Vet Med Sci*, 2000, **62**(11):1125 ~ 1131
- Allan G M, John A. Porcine circovirus: A review. *J Vet Diagn Invest*, 2000, **12**:3 ~ 14
- 郎洪武,张广川,吴发权. 断奶猪多系统衰弱综合征血清抗体检测. 中国兽医科技(Lang Hong-wu, Zhang Guang-chuan, Wu Fa-quan. The detection of serum against postweaning multisystemic wastingsyndrome. *Chin J Vet Sci Tech*), 2000, **30**(3):3 ~ 5
- 曹胜波,陈焕春,肖少波. 猪圆环病毒 2 型的 PCR 检测方法的建立与应用. 华中农业大学学报(Cao Sheng-bo, Chen Huan-chun, Xiao Shaobo. The establishment and application of PCR to detect porcine circovirus type 2. *Huazhong Agric Univ*), 2001, **1**:53 ~ 56
- Nawagitgul P, Mrozow L, Bolin S R, Harms P A, Sorden S D, Paul P S. Open reading frame of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein. *J Gen Virol*, 2001, **81**:2282 ~ 2287
- Mankertz A, Hillenbrand B. Replication of porcine circovirus type 1 require two proteins encoded by the viral Rep gene. *Virology*, 2001, **279**:429 ~ 438
- Meehan B M, Creelan J L, McNulty M S, Todd D. Sequence of porcine circovirus DNA: affinities with plant circovirus. *J Gen Virol*, 1998, **78**:221 ~ 227
- Segal J, Domingo M. Porcine circovirus type 2 infection: postweaning multisystemic wasting syndrome and other conditions. *Proceeding of the 17th IPVS Congress*, 2002, **Vol 1**:35 ~ 42
- 刘明,吕昌莲,王秀宏. 人细胞色素 c 基因在大肠杆菌中的克隆和表达及活性测定. 中国生物化学与分子生物学报(Liu Ming, Lu Chang-lian, Wang Xiu-hong. Cloning, expression of human cytochrome c gene in *E. coli* and its activity assay. *Chin J Biochem Mol Biol*), 2003, **19**(4):475 ~ 481
- 肖少波,陈焕春,方六荣,李蕊,柳俊,洪文州. 伪狂犬病毒 gD 基因在转基因烟草中的表达. 中国生物化学与分子生物学报(Xiao Shaobo, Chen Huan-chun, Fang Lu-rong, Li Rui, Liu Jun, Hong Wen-zhou. Expression of the gD gene of pseudorabies virus in transgenic tobacco. *Chin J Biochem Mol Biol*), 2002, **18**(4):465 ~ 468
- Ro L H, Chen R J, Shuan D. Rapid purification of antiserum against *Mycoplasma hyopneumoniae* by an efficient absorption method. *J Biochem Biophys Methods* 1994, **28**:155 ~ 159

本刊被收录至《中国生物学文摘》和中国生物学文献数据库

2004 年 3 月,本刊收到中国生物学文献数据中心和《中国生物学文摘》编辑部发出的收录证书,经专家评估和遴选,将本刊《中国生物化学与分子生物学报》收录至 2004 年度《中国生物学文摘》和中国生物学文献数据库。欢迎广大读者查询。

《中国生物化学与分子生物学报》编辑部