

伪狂犬病毒 gG 基因的表达及 gG-LAT 诊断方法的建立

唐 勇, 陈焕春*, 覃雅丽, 何启盖, 肖少波

(华中农业大学畜牧兽医学院, 武汉 430070)

摘 要: 依据伪狂犬病病毒(Pseudorabies Virus PRV) Rice 株序列合成针对 gG 基因的特异性引物, 从 PRV 鄂 A 株中扩增出 gG 基因, 并将其克隆到 pBluescript II SK+ 质粒中并测序, 用 Sac I 和 Hind III 酶切, 将 gG 基因融合到 pET-28a 质粒中 T₇ 启动子下游, 构建成原核表达质粒 pET-28a-gG₁, 结果并未获得表达。再用 Not I 切除 gG 基因后小半部分片段, 构建成原核表达质粒 pET-28a-gG₂, 使其在 E. coli BL21(DE3) 中以 IPTG 诱导表达, 经 SDS-PAGE 分析, 表达特异带为 47KDa, 斑点杂交证实表达产物具有抗原性。表达产物主要以可溶性蛋白的形式存在于细菌裂解液的上清之中, 上清经饱和硫酸铵溶液沉淀, 透析, PEG20 000 浓缩, ELISA 分析表明, 经初步纯化的表达产物可与抗 PRV 猪血清发生特异性免疫反应。用该产物致敏空白乳胶建立 gG-乳胶凝集试验(gG-LAT), 检测 340 份血清, 结果表明 gG-LAT 能区分 gG 基因缺失疫苗活苗免疫猪与自然感染野毒的血清学阳性猪, 且特异性强 敏感性高。

关键词: PRV; gG 基因表达; 大肠杆菌; gG-ELISA; gG-LAT

中图分类号: S582.1

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2003)01-0072-05

伪狂犬病是危害养猪业的烈性传染病, 其病原是 PRV。gG 基因是 PRV 中的一个分泌性的非必需糖蛋白基因, 第二代缺失疫苗是在 TK 基因缺失的基础上, 将病毒的非必需糖蛋白基因进行缺失, 这样得到的突变株就不能产生被缺失的糖蛋白, 但又不影响病毒在细胞上的增殖与免疫原性。将这种双基因缺失疫苗注射动物后, 动物不能产生抗缺失蛋白的抗体。因此, 可通过血清学方法将自然感染的野毒血清学阳性猪与注苗猪区分开来^[1]。目前, 缺失疫苗缺失的糖蛋白基因主要为 gE 和 gG 基因。本研究获得的 gG 基因片段在大肠杆菌中主要以可溶的形式表达, 其产物经蛋白质斑点杂交和间接 ELISA 分析具有抗原性, 且表达产物不需变性、复性处理, 提纯简便易行。以初提纯的表达产物建立鉴别 gG-LAT, 该方法可显著区分 gG 基因缺失疫苗注苗猪与自然感染野毒的血清学阳性猪, 且成本低廉, 操作简单, 由于该方法以表达的蛋白质为抗原致敏乳胶, 故绝无散毒危险, 安全可靠, 该方法为监测免疫接种根除伪狂犬病提供了有力的技术支持。

1 材料和方法

收稿日期: 2001-12-24

基金项目: “九五”国家科技攻关计划生物技术项目(96-C01-04-03)

作者简介: 唐勇(1979-), 男, 湖南永州人, 硕士研究生, 主要从事动物病毒的分子生物学研究。通讯作者: 陈焕春

1.1 病毒核酸 伪狂犬病病毒(Pseudorabies Virus PRV) 鄂 A 株为本实验室提供。病毒核酸的提取参考文献^[2]。

1.2 质粒与细菌 质粒 pBluescript II SK+、pET-28a、大肠杆菌 DH5a、BL21(DE3) 为本实验室保存。

1.3 血清与抗体 抗 PRV 猪的标准阳性血清(中和效价 1:128)、阴性血清、gG 基因缺失疫苗(TK⁻/gG⁻/LacZ⁺)^[2] 注苗猪血清、兔抗猪 IgG-HRP(工作浓度 1:8000) 为本实验室提供。其它各类临床猪血清由湖北各猪场提供。

1.4 乳胶 预处理的 2% 空白胶及 PRV Ea 株病毒致敏的乳胶为本实验室提供。

1.5 工具酶与其它试剂 PCR 所用的酶 Pyrobest DNA polymerase、各限制性内切酶及工具酶均为 TaKaRa 公司产品。

1.6 引物及 PCR 扩增 参考 THOMAS J. REA 等^[3] 报道的 Rice 株 gG 基因序列设计合成引物, 上游引物 p1 加一 EcoR I 酶切位点, 下游引物 p2 加一 Hind III 酶切位点。

p1: ggcggaattcacagctcaacaatgaag

p2: agacaagctttattgaagatggacaccgcg

以 50 μ l 的反应体系加入各组分, 先 95 $^{\circ}$ C 变性 4min, 再进入下面循环 95 $^{\circ}$ C, 60s; 60 $^{\circ}$ C, 60s; 50 $^{\circ}$ C, 60s; 72 $^{\circ}$ C, 90s 共 34 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 保温 10min。

1.7 gG 基因的克隆及测序 回收 PCR 产物, 与被

EcoRV 切开的 pBluescript II SK+ 连接, 获得 pSK-gG 质粒, 送大连宝生物公司测序。

1.8 表达载体的构建 pSK-gG 用 Sac I 和 Hind III 双酶切, 回收目的片段, 与经 Sac I 和 Hind III 双酶切的质粒 pET-28a 连接, 转化 E. coli BL21(DE3)。碱裂解法小量提取质粒^[4]。Sac I 和 Hind III 酶切鉴定目的重组子, 并命名为 pET-28a-gG₁, 再用 Not I 酶

切 pET-28a-gG₁, 回收大片段, 自身连接, 转化 E. coli BL21(DE3)。挑取单菌落, 碱裂解法小量提取质粒。Not I 酶切鉴定目的重组子, 并命名 pET-28a-gG₂(图 1)。

1.9 表达产物的 SDS-PAGE、蛋白质斑点杂交及 ELISA 分析 SDS-PAGE: 含 pET-28a-gG₁ 与含 pET-28a-gG₂ 的 E. coli BL21(DE3) 各自诱导表达,

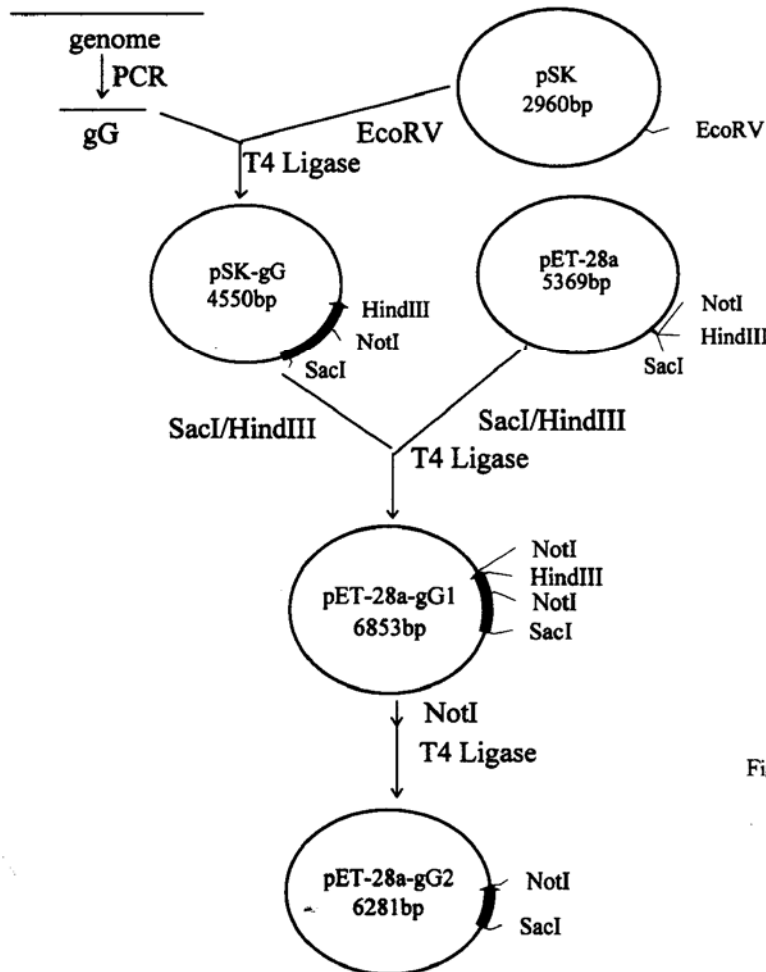


图 1 载体的构建

Fig. 1 The construction of pET-28a-gG₂

包涵体的提取参照 PET 载体系统操作手册说明书, SDS-PAGE 电泳参考文献^[4]。蛋白质斑点杂交: 取诱导的全菌裂解液吸附于硝酸纤维素膜上, 以抗 PRV 猪的标准阳性血清为一抗, 以兔抗猪 IgG-HRP 为二抗, 4-氯-1-萘酚为底物显色。ELISA 分析: 提包涵体后的上清用饱和硫酸铵沉淀, 生理盐水溶解, 透析, 最后 PEG20000 浓缩。包被抗原, 抗原用包被液倍比稀释, 每孔 100 μl, 置 4 °C 过夜 (8h 以上), 加洗涤液每孔 200 μl 洗涤 3 次, 每次间隔 3min; 加保温液, 每孔 200 μl, 置 37 °C 1 h, 洗涤 3 次 (同上); 加一抗, 一抗用保温液 1: 100 稀释, 每孔 100 μl, 置

37 °C 30 min, 洗涤 3 次 (同上); 加 HRP 酶标二抗, 二抗用保温液 1: 8000 稀释, 每孔加 100 μl, 置 37 °C 30 min, 洗涤 3 次 (同上); 加底物液, 每孔 100 μl, 室温避光 15 min, 加终止液, 每孔 50 μl, 置室温 5 min, 测每孔 OD_{490nm} 值^[5]。

1.10 gG-LAT 的建立 表达产物的处理: 表达产物用饱和硫酸铵沉淀, 生理盐水溶解, 再用生理盐水透析, PEG 20 000 浓缩至透析前原体积。gG-LAT 各种致敏条件的选择: 最佳致敏温度、时间和抗原浓度经方阵滴定确定, 以能与最高稀释度的抗 PRV 猪的标准阳性血清发生凝集反应的条件为最佳致敏条

件。小样本检测: 分别检测抗 PRV 猪的标准阳性血清, 阴性血清及 gG 基因缺失苗注苗猪血清。同时用 PRV Ea 株全病毒致敏的乳胶凝集试验 (PRV-LAT) 检测此 3 份血清^[4]。特异性检测: 检测 43 份 PRV 清洁猪场血清, 同时用 PRV-LAT 检测作为对比。敏感性检测: 检测 105 份注 PRV 灭活苗猪血清, 同时用 PRV-LAT 检测作为对比。大样本检测: 检测 192 份部分注 TK⁻/gG⁻/Laz⁺ 弱毒苗猪血清, 同时 PRV-LAT 检测作为对比。

2 结果与分析

2.1 PRV gG 基因的 PCR 扩增、克隆及序列测定

PCR 扩增得到一约 1.6 kb 左右特异条带, 与预期的相符 (图 2)。Sac I 和 Hind III 酶切 pSK-gG, 切出一约 1.5 kb 片段带与质粒大片段带与预计相符 (图略), 测得 Ea 株 gG 基因序列 (略), 与 Rice 株 gG 基因同源性为 98%, GENE BANK 登陆号为 AY048677。



图 2 gG PCR 产物凝胶电泳图

Fig. 2 PCR product of gG

1. Negative control
2. PCR product
3. λ DNA/EcoRI + Hind III

2.2 表达载体的鉴定 Sac I 和 Hind III 酶切 pET-28 α -gG₁, 切出一约 1.5 kb 条带和质粒条带, Not I 酶切 pET-28 α -gG₂, 只有一条带, 均与预计相符 (图略)。

2.3 表达产物的 SDS-PAGE 及蛋白质斑点杂交结果 SDS-PAGE 结果显示, pET-28 α -gG₂ 在 47 Kda 处有一明显特异条带, 而对照 pET-28 α 则没有此带 (图 3), 说明 pET-28 α -gG₂ 获得了表达, 按 1.9.1 提取包含体, 分别取上清和包涵体进行 SDS-PAGE, 结果显示在 pET-28 α -gG₂ 裂解菌液的上清在 47 Kda 处蛋白带较浓, 而在包涵体中 47 Kda 处蛋白带较淡, 说明表达产物主要以可溶的形式存在 (图 4)。pET-28 α -gG₁ 未获得表达 (图略)。蛋白质斑点杂交结果显示, pET-28 α -gG₂ 表达产物与抗 PRV 猪的标准阳性血清反应形成一阳性浓斑, 对照 pET-28 α 则形成阴性空白斑, 证实表达产物具有抗原性 (图 5)。

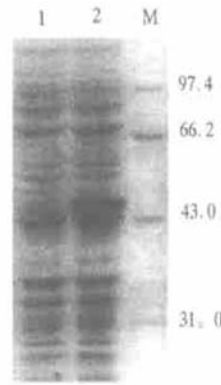


图 3 pET-28 α -gG₂ 在大肠杆菌中的表达

Fig. 3 Expression of pET-28 α -gG₂ in E. coli

- 1: pET-28 α in BL21(DE3)
- 2: pET-28 α -gG₂ in BL21(DE3)
- M: Protein marker

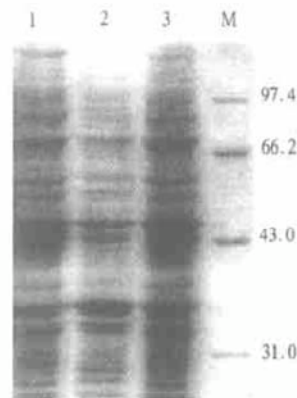


图 4 pET-28 α -gG₂ 表达产物在大肠杆菌中的分布

Fig. 4 The distribution of the expressing product in E. coli

1. The supernatant
2. The inclusion body
3. pET-28 α -gG₂ in BL21(DE3)
- M. Protein marker

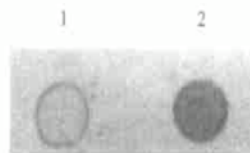


图 5 斑点杂交结果

Fig. 5 Result of dot blot

1. pET-28 α
2. pET-28 α -gG₂

2.4 表达产物的浓缩及间接 ELISA 结果 表达产物浓缩至蛋白终浓度为 2.6 mg/ml。此 ELISA 中, 抗 PRV 阳性血清为一抗, 1: 100 稀释。二抗按工作浓度 1: 8000 稀释, OPD 为底物显色, 2M H₂SO₄ 终止, 测 OD₄₉₀。结果显示, 在抗原包被量为 2.2 μ g/孔-4.4 μ g/孔时能较好的反映出 gG 基因片段表达产物对抗 PRV 阳性血清的特异抗原性 (表 1)。

2.5 gG-LAT 的建立

2.5.1 gG-LAT 最佳致敏条件的确定: 经方阵滴定确定 gG-LAT 最佳致敏温度为 37 $^{\circ}$ C, 最佳致敏时间为 30 min, 抗原最佳致敏浓度为 1.3 mg/ml。

2.5.2 gG-LAT 小样本检测结果: 小样本检测结果显示 gG-LAT 能显著区分抗 PRV 的标准阳性血清和 gG 基因缺失苗注苗猪血清 (表 2)。

表 1 间接 ELISA 检测 pET28a-gG₂ 表达产物抗原性Table 1 Analysis of antigenicity of the expressing product of pET28a-gG₂ by indirect ELISA

包被量(μg/孔)		35.2	17.6	8.8	4.4	2.2	1.1	0.55	0.275	0.137
PRV	PET-28a-gG ₂	0.70	0.64	0.64	0.63	0.55	0.55	0.53	0.48	0.40
阳 性	PET-28a	0.30	0.19	0.15	0.10	0.08	0.13	0.12	0.13	0.09
血 清	鄂 A 株野毒	1.38	1.34	1.24	1.27	1.25	1.24	1.09	0.89	0.83

表 2 gG-LAT 检测小样本

Table 2 The test of several samples by gG-LAT

	抗 PRV 的标准阳性血清	PRV 阴性血清	gG 基因缺失苗注苗猪血清
GG 基因表达产物	+++	-	-
PRV Ea 株全病毒	++++	-	++++

附: LAT 阴阳性判断标准,“-”判为阴性,“+”判为可疑,“++、+++、++++”判为阳性^[7], 乳胶颗粒完全凝集, 溶液清亮透明判为++++。乳胶颗粒 75% 凝集, 溶液稍浑浊判为+++。乳胶颗粒 50% 凝集, 溶液较透明判为++。乳胶颗粒 25% 凝集, 溶液稍浑浊判为+。乳胶颗粒完全不凝集, 溶液浑浊均匀判为-。

2.5.3 gG-LAT 的特异性: 43 份 PRV 清洁猪血清以 gG-LAT 和 PRV-LAT 检测, 43 份为阴性。

2.5.4 gG-LAT 的敏感性: 105 份注 PRV 灭活苗猪血清中 gG-LAT 检出阳性为 91.4% (96/105), PRV-LAT 检出阳性率为 93.3% (98/105), 两者阳性复合率为 95.9% (94/98) (表 3)。

表 3 gG-LAT 的敏感性检测

Table 3 The sensitivity test of gG-LAT

		gG-LAT		
		Positive	Negative	Total
PRV-LAT	Positive	94	4	98
	Negative	2	5	7
	Total	96	9	105

2.5.5 gG-LAT 大样本检测结果; 192 份部分注 TK-/gG-/Laz+ 弱毒苗猪血清中, gG-LAT 检出阳性率为 36.5% (70/192), PRV-LAT 检出阳性率为 64.0% (123/192), 两者阳性复合份数为 69, 占 gG-LAT 检出阳性的 98.6% (69/70)。此 69 份血清含抗 gG 蛋白的抗体, 即此 69 头猪存在 PRV 野毒感染。gG-LAT 检测为阴性, PRV-LAT 检测为阳性的猪血清为 54 份, 这表示此 54 份血清不含抗 gG 蛋白的抗体但含抗 TK-/gG-/Laz+ 的抗体, 即此 54 头猪是不存在 PRV 野毒感染的缺失苗注苗猪(表 4)。

3 讨论

目前, 国外使用得最广的 PRV 基因缺失疫苗是 gE 基因缺失疫苗。日本使用 gG 基因缺失疫苗, 美国使用 gE、gG 和 gC 基因缺失疫苗。在我国, 周复春等^[2]已构建了 PRV 鄂 A 株 TK-/gG-/LacZ⁺ 基因

表 4 两种方法检测大样本结果比较

Table 4 Comparison between two methods testing for the detection of serum samples

		gG-LAT		
		Positive	Negative	Total
PRV-LAT	Positive	69	54	123
	Negative	1	68	69
	Total	70	122	192

缺失株。何启盖等^[1]对此毒株研究结果显示, 以鄂 A 株为亲本毒株构建的 TK-/gG-/LacZ⁺ 基因缺失疫苗具有高安全性, 免疫效果优于国外同类产品。为便于 gG 基因缺失疫苗的推广, 用于鉴别 gG 基因缺失疫苗注苗猪与自然野毒感染的血清学阳性猪的鉴别诊断方法也急待建立。在国外, Marchioli et al (1987) 和 Cook et al (1990)^[6]建立了阻断 gG-ELISA 技术, 但其敏感性较常规 ELISA 低, 在国内尚无此类报道。本研究采用大肠杆菌表达系统表达了 gG 基因上游 Sac I -Not I 近 1 kb 的大片段, 表达产物 ELISA 检测显示有较好的抗原性, 这为 PRV gG-LAT 的建立打下了基础。此外, 它还可用于 gG-ELISA 建立和抗 gG 蛋白单抗的筛选。

gG-ELISA 鉴别诊断技术适于短时间内检测大批量血清, 且操作简单。目前是国内外一种区分 gG 基因缺失苗注苗猪与自然感染猪常用的一种方法, 是根除伪狂犬病的最有效的手段之一^[1], 本室也已成功建立。但是 ELISA 的进行需要一定的实验条件和技术培训, 不利于基层推广, 本研究建立了适应于技术设备简单的基层和中、小型猪场应用的 gG-LAT, 该方法简便、快速、敏感、特异, 不需设备而易

于推广。用基因工程表达产物建立伪狂犬病的乳胶凝集鉴别诊断方法在国内外属于首次报道,为我国伪狂犬病的根除计划的开展打下了基础。

原核表达系统是生产蛋白抗原的一种最为经济、快捷的手段。目前许多诊断试剂用的抗原都是由大肠杆菌表达的,但是在高效表达的同时,表达的蛋白常常会形成包涵体,这对蛋白的自然结构和抗原活性都会造成很大的影响。而且,使包涵体中变性的蛋白溶解、复性往往是一个费时费力且效率很低的过程^[8]。本研究试图对 gG 全基因进行表达,结果并未成功,于是试图截短表达,考虑到周锐等^[9]在对 gG 基因下游 647 bp 片段进行表达时,表达产物位于包涵体中,不利于后续处理。本研究切除了 gG 基因 Not I 下游 514 bp 的片段,结果 gG 基因上游 Sac I -Not I 片段在大肠杆菌中获得了表达,蛋白质斑点杂交结果证实表达产物具有抗原性。但是,蛋白质印迹分析发现,在杂交膜上相应位置并未出现阳性条带,说明 gG 蛋白刺激机体体液免疫的抗原表位并不能耐受 SDS 的变性处理,此外,表达产物主要位于细菌裂解液中,用裂解液上清制备抗原,以此就可避免包涵体的一系列溶解、复性的过程,这为大量生产 PRV 的 gG-LAT 鉴别诊断试剂盒提供了条件。

参考文献:

- [1] 何启盖. 猪伪狂犬病基因缺失疫苗研究[D]. 博士学位论文, 武汉: 华中农业大学, 2000
- [2] 周复春, 陈焕春, 方六荣, 等. 伪狂犬病毒鄂 A 株 TK⁻/gG⁻/Laz⁺ 突变株的构建. 白新盛, 卢景良主编. 畜禽重大疫病生物技术防制研究[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 1998, 295~ 297.
- [3] Thomas J. REA. Mapping and Sequence of the Gene for the Pseudorabies Virus Glycoprotein which Accumulates in the Medium of Infected Cells[J]. Journal of Virology, Apr. 1985, 21~ 29.
- [4] J. 萨姆布鲁克, E. F 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯, 等. 分子克隆实验指南(第 2 版)[M]. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 北京: 科学出版社, 1992, 10.
- [5] 中国农业科学院, 哈尔滨兽医研究所编著. 兽医微生物学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998, 12.
- [6] Cook D R, Hill H T, et al. The detection of antibodies to the glycoprotein X antigen of Pseudorabies virus[J]. J Vet Diagn Invest, 1990, 1: 24~ 28.
- [7] 何启盖, 陈焕春, 邱德新, 等. 乳胶凝集试验检测伪狂犬病血清抗体的研究[J]. 中国兽医科技, 1999, 29(1): 7~ 8.
- [8] 童贻刚, 杜勇, 徐静, 等. HIV-1 p24 蛋白在大肠杆菌中的高效可溶性表达、一步纯化及抗原性分析[J]. 中国病毒学, 2000, 6, 15(2): 116~ 121.
- [9] 周锐, 陈焕春, 周复春, 等. 伪狂犬病毒鄂 A 株糖蛋白 gX 基因片段的克隆与表达[J]. 中国青年农业科学技术年报, 1997, B 卷: 921~ 924.

Expression of the gG Gene of Pseudorabies Virus and the Development of gG Differential Latex Agglutination Test

TANG Yong, CHEN Huan-chun*, QIN Yan-li, HE Qing-gai, XIAO Shaobo

(Lab of Animal Virology, College of Animal Science and Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: The complete glycoprotein gG gene of pseudorabies virus Ea strain was amplified by PCR technique and cloned into pBluescript II SK+ . The gene was sequenced by sanger's sequencing technique. Then, the gG gene was inserted into downstream of the T7 promoter of an expression vector, pET-28a, to yield the recombinant plasmid pET-28a-gG₁, but the expression was not success. The plasmid pET-28a-gG₁ was digested by Not I to deleted the little fragment of downstream of gG gene and linked to yield the recombinant pET-28a-gG₂. After induced by IPTG, a high expression of fusion protein was obtained. SDS-PAGE analysis showed that the fusion protein was 47KD and the product of expression was specific to antisera against PRV by protein dot blot analysis. The fusion protein existed mainly in form of soluble protein. After be purified by saturated(NH₄)₂SO₄ solution, the product was specific to swine antisera against PRV in indirect ELISA. The latex agglutination test (LAT) based on recombinant glycoprotein gG was developed. It can significantly differentiate between the infected and vaccinated pigs. Statistical result of testing 340 serum samples indicated that the diagnosis method has high specificity and sensitivity.

Key words: PRV; gG; Gene expression; gG-ELISA; gG-LAT