

猪瘟病毒糖蛋白 E0 基因的克隆及其表达研究 *

周鹏程 陈建国 翟中和 丁明孝

(北京大学生命科学学院细胞及遗传学系 北京 100871)

摘要: 用 RT-PCR 方法扩增分别获得了中国猪瘟病毒强毒石门株和免化弱毒株糖蛋白 E0 基因 cDNA, 并克隆到 pGEM T 载体中测定其核苷酸序列和推导出其对应氨基酸序列, 结果表明这两个毒株间的 E0 基因核苷酸序列同源性为 95.3%, 氨基酸序列同源性为 94%, 有 14 个残基的差异; 与几个代表毒株 ALD 株、GPE 株、Brescia 株、Alfort 株和国外测得的免化弱毒 C 株相应序列进行比较, 所测石门病毒核苷酸序列与上述各株对应序列的同源性分别为 98.0%、97.1%、92.7%、86.8% 和 95.4%; 氨基酸序列同源性分别为 97.4%、96.1%、95.3%、92.7% 和 94.4%; 所测免化弱毒核苷酸序列与上述各株对应序列的同源性分别为 95.2%、94.6%、91.3%、85.1% 和 99.0%; 氨基酸序列同源性分别为 93.1%、92.3%、91.4%、90.5% 和 98.7%; 氨基酸序列分析结果还表明: 上述各株病毒糖蛋白 E0 序列均含有与地衣类及植物核苷酸酶同样保守的两个氨基酸基序 SLHGIWPX (X 为 G 或 E) 和 EWNKHGWC, 基序中 H 为 RNase 催化活性关键氨基酸残基, 将上述 E0 基因亚克隆至真核表达载体 pEGFP-C1, 构建了真核表达载体 pEGFP-E0, 用脂质体转染法将 pEGFP-E0 DNA 导入 PK-15 细胞进行瞬时表达, 以绿色荧光蛋白 GFP 为标志蛋白, 荧光显微镜观察结果表明 E0 蛋白主要位于细胞的胞浆内, 这与病毒感染 PK-15 细胞后 E0 在细胞内的分布结果一致; 同时还构建了能在昆虫细胞 Sf9 细胞中表达 GST-E0 融合蛋白的重组杆状病毒。上述实验结果为继续深入研究 E0 蛋白在猪瘟病毒的复制及病毒感染的宿主细胞致病机制中的作用, 提供了基础材料及参考数据。

关键词: 猪瘟病毒, E0 基因, 克隆表达。

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(2000)03-0165-06

* 国家攀登计划 B 类项目资助

收稿日期: 1999-02-25, **修回日期:** 1999-07-18

MOLECULAR CLONING AND EXPRESSION OF E0 GENE OF THE CHINESE CLASSICAL SWINE FEVER VIRUS AND ITS LOCALIZATION IN HOST CELLS

ZHOU Peng-Cheng CHEN Jian-Guo ZHAI Zhong-He DING Ming-Xiao

(Department of cell biology and genetics, college of life sciences, Beijing University, Beijing 100871)

Abstract: E0 gene fragments of chinese classical swine fever virus (CSFV) Shimen strain (a standard virulent strain) and hog cholera lapinized vaccine(HCLV) strain, was amplified by RT-PCR from total RNA of cell cultures infected by CSFV, and cloned into pGEM T vector, respectively. The nucleotide sequences of two fragments were sequenced by Sanger's method and the amino acid sequences were deduced. Sequence analysis shows the homologies of the nucleotide sequence and the deduced amino acid of E0 gene between Shimen strain and HCLV were 95.3% and 94%, respectively. Compared with the corresponding regions of ALD, GEP, Brescia, Alfort strain and C strain sequenced by R. J. M. Moormann, the nucleotide sequence homology of Shimen strain E0 gene is 98.0%, 97.1%, 92.7%, 86.8% and 95.4%, and the amino acid sequence 97.4%, 96.1%, 95.3%, 92.7% and 94.4%, respectively; similarly, the nucleotide sequence homology of HCLV E0 gene compared with above mentioned strains is 95.2%, 94.6%, 91.3%, 85.1% and 99%, and the amino acid sequence 93.1%, 92.3%, 91.4%, 90.5% and 98.7%, respectively. It has also been found that above mentioned strain's E0 RNases, belonging to the RNases family consisting of several fungal and plant RNases, contain two conserved stretches of 8 amino acids each, SLHGWPX (X for G or E) and EWNKHGWC, which are spaced by 38 nonhomologous amino acids and which form the RNase active site, Histidine residues in both stretches is essential for RNase catalysis. We subcloned 696bp of E0 gene cDNA into baculovirus transfer vector and constructed successfully recombinant baculovirus expressing GST-E0 by homologous recombination in Sf9 cells. Furthermore, we also constructed recombinant eukaryotic expression vector pEGFP-E0 containing E0 gene in frame and transfected PK-15 cell by lipofectamine, the fluorescence microscopy detection indicated expressed E0 protein mainly locate in plasma of PK-15 cells, which is the same as the results when PK-15 cells are infected by CSFV.

Key words: classical swine fever virus, Glycoprotein E0, Clone and expression

猪瘟是严重危害养猪业的主要传染病之一, 猪瘟病毒(classical swine fever virus, CSFV)是引起猪瘟的致病原, 与牛病毒性腹泻病病毒(bovine viral disease virus, BVDV)和羊边界病病毒(border disease virus, BDV)同属于黄病毒科(flaviviridae)中的瘟病毒属(pestivirus)。瘟病毒是一类具有囊膜的 RNA 病毒, 病毒粒子含有三种糖蛋白 E0, E1 和 E2, 其中 E0 和 E2 是病毒诱导机体产生中和抗体的两个主要保护性抗原, 同时也是病毒吸附进入敏感细胞的必需蛋白^[1, 2], 在病毒粒子中 E0 以分

子量为 100kD 的同源二聚体形式存在, 不过糖蛋白 E0 并不具有跨膜区, 而是以一种未知机制连接在病毒粒子表面, 大量的 E0 蛋白也可被分泌到受染细胞外。糖蛋白 E0 既是一种病毒包膜蛋白, 又是一种核苷酸酶(RNase)^[3, 4], E0 的这种 RNase 活性在病毒复制及病毒感染的致病机制中的作用一直是一个十分重要的课题。因此本研究分别克隆了中国猪瘟病毒强弱毒株的 E0 糖蛋白基因, 构建了表达 E0 蛋白的重组杆状病毒, 并对 E0 蛋白在宿主细胞内的表达及定位进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 细胞与病毒

PK-15 细胞由中国兽药监察所提供,用 DMEM(GIBCO 公司产品)培养基按常规方法培养。本实验所用 CSFV 石门株购自中国兽药监察所,将病毒接种于长成良好单层的 PK-15 细胞上复壮与增殖,收获病毒, -30°C 保存。中国猪瘟兔化弱毒疫苗株(hog cholera lapinized vaccine, HCLV)为广州兽医生物药品厂提供的制苗用的细胞病毒。

1.2 试剂及引物设计

M-MLV 购自 GIBCO 公司, Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶和各种限制性内切酶为 Promega 公司产品。参考已发表的 CSFV 核苷酸序列^[5~7], 设计并合成了 E0 基因的上游与下游引物, 在上游引物中引入了 BamHI 位点和起始密码子, 下游引物中引入了 EcoRI 和终止子, 引物由中国科学院微生物研究所合成。

上游引物: 5' CGGGATCCATGGCCGAAATA TAACTCA 3'

下游引物: 5' CGGAATTCTCAACAGTAAGGC GATAGG 3'

1.3 病毒 RNA 的提取

取 200 μL 病毒细胞培养液用异硫氰酸胍-酚-氯仿一步法提取病毒基因组 RNA, 真空干燥, 用 20 μL ddH₂O(无 RNase)溶解, -20°C 保存备用。

1.4 RT-PCR 及 PCR 产物的纯化与克隆

分子克隆主要参考 Sambrook 的方法。在 20 μL 体系中进行逆转录反应, 然后取 5 μL 逆转录产物作 PCR 模板, 100 μL PCR 反应体系在 GeneAmp 2400 PCR 扩增仪(Perkin Elmer 公司产品)上进行反应, 94°C 变性 1min, 50°C 复性 1min, 72°C 延伸 1min, 共 30 个循环, 1% 琼脂糖凝胶电泳检查 PCR 结果。采用 QIAquick Spin 柱纯化系统(QIAGEN 公司产品)纯化 PCR 产物。用 pGEM-T 载体系统(Promega 公司产品)克隆 PCR 片段。将所得克隆扩增并提取质粒 DNA, 经酶切鉴定, 对酶切图谱正确的重组

质粒 pGEM-E0 作纯化并测序。

1.5 E0 表达载体的构建

用 BamHI 和 EcoRI 双酶切 pGEM-E0 获得石门株 E0 基因片段, 并分别与经同样酶切处理的杆状病毒转移载体以及用 BglIII 和 EcoRI 双酶切的真核表达载体 pEGFP-C1 连接, 构建重组转移载体 pAcSecG2T-E0 和能表达融合蛋白 EGFP-E0 的真核表达载体 pEGFP-E0, 构建的载体均通过测序证明读码框架的正确性。

1.6 Sf9 细胞的培养与重组杆状病毒的获得

Sf9 细胞用含 10% 胎牛血清、pH6.2 的 TNM-FH 昆虫细胞培养基(GIBCO 公司产品), 在 27°C 恒温培养。采用脂质体 lipofectamine 法介导 pBacPAK6(Clontech 公司产品)与 pAcSecG2T-E0 共转染, 经同源重组产生能表达目的基因的重组杆状病毒。提取收获的重组杆状病毒基因组和病毒感染的 Sf9 细胞胞浆 RNA, 用 E0 特异引物分别进行 PCR 及 RT-PCR 扩增检查 E0 基因片段, 并用抗 GST 抗体以间接免疫荧光法检测 GST-E0 融合蛋白的表达。

1.7 质粒 pEGFP-E0 DNA 转染 PK-15 细胞

用脂质体 lipofectamine(Gibco 公司产品)介导转染, COS-7 细胞按 $10 \times 10^4/35\text{mm}$ 培养皿密度接种, 培养 18~24h 至细胞覆盖面积达 50%~80% 后按照 kit 说明书进行转染, 于 37°C 5% CO₂ 恒温培养箱中培养, 转染后 48h 取出飞片直接在荧光显微镜下以蓝光为激发光进行观察。

2 结果

2.1 CSFV 石门株和兔化弱毒糖蛋白 E0 基因的序列及与其他各毒株对应序列的比较分析

采用 RT-PCR 方法, 直接从病毒细胞培养物提取的总 RNA 中分别扩增获得了 CSFV 石门株和兔化弱毒株糖蛋白 E0 基因的核苷酸序列(图 1), 片段大小均为 696bp(图中初始三个核苷酸 GCC 非 E0 序列), 推导的氨基酸序列由 232 个残基构成, 其中都有 10 个半胱氨酸残基。两者核苷酸序列同源性的 95.3%, 氨基酸序列同源性为 94%, 有 14 个氨基酸残基的差异; 其

SHIMEN	1	CCCCAAAATATAACTCAATGGAACCTGAGTGATAACGGCACTAATGGTATTTCAGCATGCT
HCLV	1	-----C-----C-----
SHIMEN	61	ATGTACCTTAGAGGGGTTAGCAGAAAGCTTGCATGGGATCTGGCCGAAAAAATATGCAAA
HCLV	61	-----A-----GG-----
SHIMEN	121	GGAGTCCCCACCTACCTGGCCACAGACACGGAAGTGAAGAAAAACAGGGAATGATGGAT
HCLV	121	-----A-C-----GT-G-----
SHIMEN	181	GCCAGCGAGGGGACAACTATACGTGCTGTAAGTTACAGACATGAATGGAAACAACAT
HCLV	181	-----
SHIMEN	241	GGATGGTGTAACCTGGTATAACATAGACCCATGGATACAGTTGATGAATAGAACCCAAGCA
HCLV	241	-----C-----C-----C-----
SHIMEN	301	AACCTGGCAGAAAGCCCTCCGGCCAAGGAGTGCCCGTGACTTGCAGGTACGATAAAAAAT
HCLV	301	G-----T-----
SHIMEN	361	GCCGACATCAACGTGGTCACCCAGGCCAGAAACAGGCCAACACCCTAACTGGCTGCAAG
HCLV	361	..T-----G-----T-----
SHIMEN	421	AAAGGAAAAAATTTTTCTTTTCGGGTACAATTATAGGGGGCCCATGTAATTTCCAGCTT
HCLV	421	..G-----G-----A-----A-----
SHIMEN	481	TCTGTCGAGGATATCTTATATGGGGATCATGAGTGTGGCAGTTTGCTCCAGGACACGGCT
HCLV	481	-----C-----A-----G-A-----
SHIMEN	541	CTATACCTAGTAGATGGAATGACCAACACTATAGAGAGCCAGGCAGGACGCCGAGG
HCLV	541	-----G-----
SHIMEN	601	GTAACATCTTGGCTAGGGAGGCCAACTCCGCATTGCCGGAAGAGGTTGGAGGGTAGAAGC
HCLV	601	..G--T-----T-----
SHIMEN	661	AAAACCTGCTTTGGTGCCTATGCCCTATCGCCTTACTGT
HCLV	661	-----C-T-----T-----

图1 CSFV石门毒和免化弱毒E0基因的核苷酸序列及其司源性比较

中所测的中国 CSFV 强毒石门株糖蛋白 E0 基因序列 genebank 号为 AF058715。

将所测得的两毒株序列分别与几个代表毒株 ALD 株、GPE 株、Brescia 株、Alfort 株和国外测得的免化弱毒 C 株相应序列进行比较,所测石门毒株核苷酸序列与上述各株对应序列的同源性分别为 98.0%、97.1%、92.7%、86.8% 和 95.4%;氨基酸序列同源性分别为 97.4%、96.1%、95.3%、92.7% 和 94.4%;所测免化弱毒核苷酸序列与上述各株对应序列的同源性分别为 95.2%、94.6%、91.3%、85.1% 和 99.0%;氨基酸序列同源性分别为 93.1%、92.3%、91.4%、90.5% 和 98.7%;氨基酸序列分析结果还表明,上述各株病毒糖蛋白 E0 序列均含有与构成地衣类及植物核苷酸酶同样的两个保守氨基酸基序 SLHGIWPX(X 为 G 或 E)和 EWNKHGWC,两基序中的 H 为 RNase 催化活性关键氨基酸残基;所有各毒株 E0 蛋白的氨基酸序列中也都含有 10 个半胱氨酸残基,且 10 个半胱氨酸残基

的位置均十分保守(图 2)。

2.2 E0 重组杆状病毒表达体系的构建及初步鉴定

我们将石门株 E0 基因直接插入到杆状病毒转移载体 pAcSecG2T 的 BamHI/EcoRI 位点,构建了重组杆状病毒转移载体 pAcSecG2T-E0,测序结果表明插入载体中的 E0 基因读码框架正确,然后与野生型杆状病毒 DNA 片段 pBacPAK6(Bsu36I 酶切成线性)共转染 Sf9 细胞,经同源重组产生可以表达融合蛋白 GST-E0 的重组杆状病毒,提取收获的重组杆状病毒基因组和病毒感染的 Sf9 细胞胞浆 RNA,用 E0 特异性引物分别进行 PCR 和 RT-PCR 扩增,均扩增出预计大小的 E0 片段(图 3);最后用 GST 抗体和 FITC 标记的二抗以间接免疫荧光染色,可以检查出发绿色荧光的含有阳性重组杆状病毒的 Sf9 细胞。

2.3 真核表达载体 pEGFP-E0 在 PK-15 细胞中的瞬时表达

HCLV	1	AENITQWNLSDNGTNGIQHAMYLRCVNRSLHGIWPKICKGVPTHLATDVELKEIQGMMD									
CSTRAIN	1										
SHIMEN	1	-----S-----E-----Y-----T-----									
ALD	1	-----IS-----E-----Y-----T-----									
GPE	1	-----IS-----E-----Y-----T-----									
BRESCIA	1	-----R-----S-----E-----Y-----T-----R-----V-----									
ALFORT	1	-----R-----E-----T-----R-----									
HCLV	61	ASEGNTNYTCKLQRHEWNKHGWCNWHNIDPWQLMNRQTADLAEGPPVKECAVTCRYDKD									
CSTRAIN	61										
SHIMEN	61	-----Y-----N-----A-----									
ALD	61	-----Y-----N-----A-----									
GPE	61	-----R-----Y-----S-----N-----D-----									
BRESCIA	61	-----Y-----N-----S-----N-----									
ALFORT	61	-----R-----R-----Y-----TN-----T-----D-----N-----									
HCLV	121	ADIDVVTQARNRPTTLTGCKKGINFSFAGTVIESPCNFNVSVEDTLYGDHECGSLLQDAA									
CSTRAIN	121	-----N-----									
SHIMEN	121	-----N-----I-----G-----D-----I-----T-----									
ALD	121	-----VN-----G-----I-----T-----									
GPE	121	-----VN-----G-----I-----T-----									
BRESCIA	121	-----N-----T-----G-----I-----T-----									
ALFORT	121	-----T-----VN-----G-----I-----T-----									
HCLV	181	LYLYDGMTNTIENARQGAARVTFWLGRQLSTAGKRLBGRSKTWFGAYALSPYC									
CSTRAIN	181	-----S-----R-----									
SHIMEN	181	-----S-----									
ALD	181	-----S-----RI-----									
GPE	181	-----S-----RI-----									
BRESCIA	181	-----R-----S-----RI-----									
ALFORT	181	-----L-----S-----K-----R-----									

图2 推导的石门毒和国内兔化弱毒糖蛋白E0氨基酸序列与国外几个毒株对应序列比较
线框中序列为构成E0核苷酸酶的两个保守氨基酸基序

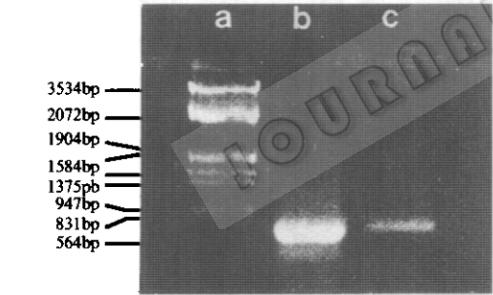


图3 PCR和RT-PCR检测重组杆状病毒
a. λ DNA marker(EcoR I/HindIII), b. 以重组杆状病毒基因为模板扩增的E0片段; c. 提取重组杆状病毒感染的Sf9细胞胞浆总RNA, RT-PCR扩增的E0片段

大量提取并纯化重组表达质粒 pEGFP-E0 后,用 lipofectamine 转染 PK-15 细胞。在转染后 36~48h,取出飞片,直接在荧光显微镜下用蓝光激发进行观察,可观察到表达的融合蛋白 GFP-E0 呈斑点状绿色荧光分布于胞浆内,且核周的荧光较强,这表明 E0 蛋白也主要分布于胞浆内。

3 讨论

CSFV 糖蛋白 E0 是一重要的结构蛋白,既是构成病毒粒子的一种外壳蛋白,可诱导机体产生中和抗体,又是一种核苷酸酶(RNase),在病毒感染过程中,糖蛋白 E0 对于病毒吸附和进入敏感细胞必不可少,其 RNase 活性在病毒复制及病毒感染的致病机制中可能发挥重要的作用。研究证明,E0 可抑制多种淋巴细胞的蛋白合成并引起淋巴细胞的凋亡^[8],同时构成 E0 RNase 活性的两个关键组氨酸残基的突变可导致其 RNase 活性的失活,而这种 RNase 活性失活的猪瘟病毒将变为一种致病性病毒粒子,可使其受染细胞发生细胞凋亡,这暗示 E0 在分子进化中对于病毒适应宿主细胞也可能具有重要的作用^[9]。

因此我们在本实验室已有的一些工作基础之上,率先克隆了我国猪瘟病毒强毒石门株和兔化弱毒株的 E0 基因,测定了其核苷酸序列,推导出其对应氨基酸序列,并与已发表的其他

毒株对应序列进行了同源性比较与分析。序列分析结果表明,测定的我国这两株强弱毒 E0 基因序列发生了一定的变异,从而导致了 14 个氨基酸残基的改变;这两毒株均与 ALD 株的 E0 序列同源性最高,其次为 GPE、Brescia 及 Alfort,均高于 90%,但石门株与上述各毒株的 E0 序列同源性反而要高于兔化弱毒株与它们间的序列同源性;同时我们测定的国内疫苗厂制苗用的兔化弱毒细胞培养病毒 E0 序列与国外测定的兔化弱毒 E0 序列也有 3 个氨基酸残基的变异,这表明即使是同一毒株,在不同的环境长期传代也会发生遗传变异;鉴于糖蛋白 E0 的重要功能与作用,E0 序列的上述变异是否影响强弱毒间的毒力以及毒株间的抗原性差异,很值得进一步研究。

要深入研究 CSFV E0 蛋白在病毒复制和病毒感染过程中病毒与宿主细胞相互关系中的作用,必须获得大量纯化的 E0 蛋白,制备 E0 特异性核酸探针及相应抗体,为此我们构建了能表达 GST-E0 融合蛋白的重组杆状病毒,这就便于下游纯化 E0 蛋白,为了检测阳性重组病毒,提取重组杆状病毒基因组和病毒感染 S₉ 细胞的胞浆总 RNA,分别进行标准 PCR 和 RT-PCR 以检测重组病毒基因组中插入的 E0 基因,并用 GST 抗体以间接免疫荧光法检测融合蛋白 GST-E0 的表达情况,初步鉴定结果表明我

们获得了阳性重组杆状病毒;同时以绿色荧光蛋白 GFP 为标志蛋白对 E0 蛋白在细胞内的定位作了初步研究。结果显示 E0 蛋白主要呈斑点状分布于转染细胞的胞浆中,这与病毒感染细胞后病毒 E0 蛋白在宿主细胞内的分布一致(资料未显示)。因此我们的上述结果为进一步深入研究 E0 蛋白的结构与功能提供了重要的基础材料和参考数据。

参 考 文 献

- [1] König M, Lengsfeld T, Pauly T *et al.* J. Virol. 1995, 69(10):6479~6486.
- [2] Hulst M M, Moormann R J M. J. Gen. Virol. 1997, 78(11):2779~2787.
- [3] Schneider R, Unger G, Stark R *et al.* Science. 1993, 261(5125):1169~1171.
- [4] Hulst M M, Himes D E, Newbigin E *et al.* Virology. 1994, 200(10):558~565.
- [5] Meyers G, Rumenapf T, Thiel H-J. Virology. 1989, 171(2):555~567.
- [6] Moormann R J M, Warmerdam P A M, van der Meer B *et al.* Virology. 1990, 177(1):184~198.
- [7] Moormann R J M, van Gennip H G P, Miedema G K W *et al.* J. Virol. 1996, 70(2):763~770.
- [8] Bruschke C J M, Hulst M M, Moormann R J M. *et al.* J. Virol. 1997, 71(9):6692~6696.
- [9] Hulst M M, Panoto F E, Hoekman A *et al.* J. Virol. 1998, 72(1):151~157.