

# 猪瘟病毒 E2(gp55)基因的克隆表达及其 DNA 疫苗的初步研究\*

周鹏程 陆 宇 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 方法从中国标准强毒株石门毒的细胞培养物中扩增获得了其结构蛋白 E2 基因 cDNA ,将之克隆到 pGEM-5Z T 载体 ,用双脱氧链终止法测定其核苷酸序列 ,并推导出其对应氨基酸序列 ,与几个代表毒株 Alfort 株、Brescia 株和 C 株相应序列进行比较 ,所测核苷酸序列与各株的同源性分别为 84.7%、92.6% 和 95.2% ,氨基酸序列的同源性分别为 89.4%、92.6% 和 94.6% ,将此 E2 片段亚克隆至真核表达载体 pcDNA3.1 ,构建表达 CSFV E2 蛋白的重组质粒 pcE2 ,用脂质体转染法将 pcE2 导入 cos-7 细胞进行瞬时表达 ,用针对 E2 蛋白的特异性单抗以间接免疫荧光法检测 ,结果 E2 蛋白在 cos-7 细胞中获得了正确表达 ,随之将 pcE2 质粒 DNA 进行小鼠肌内接种免疫 ,ELISA 法检测证实免疫后 2 周和 4 周的小鼠体内可诱导产生较为明显的阳性血清 ,并高于 E2 单抗的阳性对照 ,病毒中和试验也表明 DNA 免疫后小鼠体内可诱导产生 CSFV 中和抗体 ;同时构建了能在昆虫细胞 Sf9 中表达 GST-E2 和 GST-GFP-E2 融合蛋白的重组杆状病毒 ;上述研究结果为研制针对 CSFV 的 DNA 疫苗 ,亚单位疫苗及其诊断试剂打下了基础。

**关键词** 猪瘟病毒 ,克隆表达 ,DNA 疫苗

中图分类号 S852.65 文献标识码 A 文章编号 1001-6209(2000)03-0243-51

猪瘟是严重危害养猪业的主要传染病之一 ,猪瘟病毒是引起猪瘟的致病原 ,属于黄病毒科(flaviviridac)瘟病毒属(pestivirus)。我国对于猪瘟的防治 ,目前主要是采用疫苗免疫接种 ,尽管在我国应用猪瘟兔化弱毒疫苗有效地控制了疫情 ,但各地仍有猪瘟的散发和流行 ,其原因除了疫苗质量和免疫程序外 ,野毒株在长期大规模免疫压力下发生抗原变异 ,逃避疫苗保护性免疫 ,以及所使用的弱毒株疫苗可能在免疫猪体内的毒力返强 ,均可能是导致免疫失败的重要原因。因此进一步研制安全高效的新型疫苗一直是国内外许多学者努力的方向。近年来分子生物学技术被广泛应用于猪瘟病毒的研究 ,国内外学者相继测定了猪瘟病毒一些代表毒株的基因组全序列<sup>[1~3]</sup> ,这为研制猪瘟病毒的新型疫苗及其诊断试剂奠定了分子基础。基因免疫或 DNA 免疫是近年来发展的一种新型疫苗免疫方法 ,它在许多方面与活的弱毒疫苗相似 ,直接注射编码病毒保护性抗原蛋白的核酸 ,能同时诱导机体产生较强的体液和细胞免疫 ,但无活疫苗毒力返强的潜在危险<sup>[1~7]</sup>。包膜糖蛋白 E2 是猪瘟病毒的主要保护性抗原蛋白 ,本文克隆并在真核表达体系中表达了我国猪瘟病毒强毒株的 E2 蛋白 ,并初步探索了 E2 蛋白基因用于 CSFV DNA 免疫及亚单位

\* 国家攀登计划 B 类项目(85-44-02-05)和国家重点基础研究发展规划项目资助

作者简介 :周鹏程(1969-) ,男 ,湖北宜昌人 ,博士 ,现为美国哈佛大学博士后 ,主要从事细胞生物学和病毒学研究  
收稿日期 :1998-11-18 ,修回日期 :1999-03-24

疫苗的可行性。

### 1.1 细胞与病毒培养

PK-15 细胞由中国兽药监察所提供,培养基为含 10% 犊牛血清,100U/mL 青霉素与 100 $\mu$ g/mL 链霉素的 DMEM(GTBCO 公司产品),pH 为 7.2~7.4。本实验所用 CSFV 石门毒 F114 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 细胞上复状与增殖,收获病毒,-30 $^{\circ}$ C 保存备用。

### 1.2 试剂及引物设计

所用 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。根据已发表的 CSFV Alfort、Brescia C 株的核苷酸序列<sup>[1~7]</sup>,用 Oligo5.0 序列分析软件设计了 E2 基因的上游与下游引物,并在上游引物中加上了 BamHI 酶切位点与翻译起始密码子 ATG,在下游引物中加上了 EcoRI 酶切位点与翻译终止密码子 TGA,引物由中国科学院微生物研究所合成。

上游引物 5'-CGGGATCCATGGTAACTGGGGCACAAGG-3'

下游引物 5'-CGGAATTCTCACACCACCAAGACAACAAAT-3'

### 1.3 病毒 RNA 的提取

取 200 $\mu$ L 病毒细胞培养液用异硫氰酸胍-酚-氯仿一步法<sup>[8]</sup>提取病毒基因组 RNA,真空干燥,用 10 $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O(无 RNase)溶解,-20 $^{\circ}$ C 保存。

### 1.4 RT-PCR 及 PCR 产物的纯化与克隆

分子克隆主要参考 Sambrook<sup>[9]</sup>的方法。在 20 $\mu$ L 反应体系中进行逆转录反应,然后取 5 $\mu$ L 逆转录产物作 PCR 模板,100 $\mu$ L PCR 反应体系在 GeneAmp 2400 PCR 扩增仪(Perkin Elmer 公司产品)上进行反应,94 $^{\circ}$ C 变性 1min,50 $^{\circ}$ C 复性 1min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1min,共 30 个循环,1% 琼脂糖凝胶电泳检查 PCR 产物,并纯化后用 pGEM-T 载体(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,对酶切图谱正确的质粒 pGEM-E2 作纯化并测序,以保证读码框架的正确性。

## 1 材料和方法

### 1.5 E2 表达载体的构建

用 BamHI 和 EcoRI 双酶切 pGEM-E2,电泳回收纯化切下的 E2 基因片段,分别与同样酶切处理的 pcDNA3.1(+ )和杆状病毒转移载体 pAcSecG2T 连接,构建含 E2 基因的重组转移载体 pAcSecG2T-E2 以及 E2 真核表达载体 pcE2,将上述切下的 E2 片段先插入表达载体 pEGFP-C1 的绿色荧光蛋白 GFP 下游,构建 pEGFP-E2,再用 BglII 和 EcoRI 双酶切下 GFP-E2 片段,并与用 Sma I 和 EcoRI 处理的 pAcSecG2T 载体连接,构建能表达 GFP-E2 融合蛋白的重组转移载体 pAcSecG2T-GFP-E2,构建的载体均通过测序来检测读码框架的正确性。

### 1.6 Sf-9 细胞的培养与重组杆状病毒的获得

Sf-9 细胞用含 10% 胎牛血清、pH6.2 的 TNM-FH 昆虫细胞培养基(GTBCO 公司产品)在 27 $^{\circ}$ C 恒温培养。采用脂质体 lipofectamine 法介导 pBacPAK6(Clontech 公司产品)与 pAcSecG2T-E2 或 pBacPAK6 与 pAcSecG2T-GFP-E2 共转染,经同源重组产生能表达

目的基因的重组杆状病毒。方法详见文献 [10]。

### 1.7 质粒 pcE2 DNA 转染 COS 7 细胞

用脂质体 lipofectamine (Gibco 公司产品) 介导 pcE2 转染。COS-7 细胞按  $10 \times 10^4 / 35\text{mm}$  培养皿密接种, 培养 18~24h 至细胞覆盖面积达 50%~80% 后按照产品说明书进行转染, 于 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中培养, 转染后 48h 取出飞片进行免疫荧光分析。

### 1.8 用间接免疫荧光法检测 E2 蛋白的表达

接种在盖玻片上的细胞用 2% 多聚甲醛于冰上固定 5min, 再用 100% 丙酮处理 10min。PBS 漂洗后, 用 3% BSA 于 37℃ 封闭 30min, 然后加入鼠抗 CSFV 结构蛋白 E2 的抗体 (德国 Dr. H. J. Thiel 教授惠赠, 100× 稀释) 37℃ 温育 1h。PBS 充分洗涤后, 再加入 Rhodamine 偶联的羊抗鼠 IgG, 37℃ 温育 30min, PBS 充分洗涤后, 封片剂 (0.01mol/L pH7.4 PBS : 甘油 = 1:1, 加 0.05% N-丙基五倍子酸) 封片, 于 Leica 荧光显微镜下观察。

### 1.9 pcE2 质粒 DNA 小鼠肌内接种免疫

BALB/c 小鼠 (8~15 周龄) 在一侧股四头肌肌内注射 100 $\mu\text{L}$  0.5% 盐酸布比卡因, 以促进肌细胞对质粒 DNA 的摄取, 24~36h 后, 在相同位点注射 100 $\mu\text{g}$  pcE2。分别在 2 周、4 周采血并分离血清, ELISA 检测血清中抗 E2 抗体效价及进行病毒中和试验。

### 1.10 酶联免疫吸附试验 (ELISA)

将 CSFV F114 株病毒细胞培养液与 0.05mol/L pH9.6 碳酸盐缓冲液 1:1 稀释, 每孔加 100 $\mu\text{L}$ , 4℃ 包被过夜; 移去孔内液体, 用 3% BSA 于 37℃ 封闭 1h, 0.01mol/L pH7.4 PBS (含 0.05% Tween) 漂洗后, 加入不同稀释度的已知抗体和不同稀释度的待测血清, 每孔 100 $\mu\text{L}$ , 37℃ 孵育 1h; 漂洗后, 再加入 HRP 标记的抗鼠 IgG 的二抗, 每孔 100 $\mu\text{L}$  37℃ 孵育 1h; 漂洗, 加入 HRP 作用底物 (邻苯二胺 OPD 1mg, 10 $\mu\text{L}$  30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 10mL pH7.2 0.1mol/L PB, 37℃ 显色 15min, 加入终止液 2mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 每孔 50 $\mu\text{L}$ , 停显 10min。于 490nm 测定每孔光密度值。

### 1.11 病毒中和试验

病毒中和试验在长有良好单层 pk-15 细胞飞片的 24 孔板中进行。即将 200TCID<sub>50</sub> 的 CSFV 石门毒与等体积的 10 倍递进稀释的 DNA 免疫鼠血清混合, 每个稀释度 3 个飞片, 在 4℃ 放置 1h 后接毒, 于 37℃ 继续培养 48~60h, 取出飞片用抗 CSFV 多抗进行免疫荧光染色。病毒中和效价用 Reed-Muench 法计算。分别用 E2 特异性单抗和免疫前鼠血清作阳性和阴性对照。

## 2 结果

### 2.1 CSFV F114 株结构蛋白 E2 基因的克隆与序列分析

采用 RT-PCR 方法, 直接从病毒细胞培养物提取的总 RNA 中扩增获得了 1080bp 大小的片段, 与预计扩增的 E2 基因片段大小一致, 将这一片段克隆到 pGEM<sup>®</sup>-T 载体中, 测定其序列, 并用 Goldkey 序列分析软件 (军事医学科学院) 与已发表的 Alfort、Brescia 和 C 株的 E2 核苷酸序列作比较 (图 1)。序列分析表明, 我们克隆的片段与 Alfort、Brescia 和 C 株对应核苷酸序列相比, 同源性分别为 84.7%、92.6% 和 95.3% 以上, 推导的对应氨基酸序列同源性分别为 89.4%、92.6% 和 94.6%。F114 株与 Brescia、C 株的核苷酸和氨基

酸序列同源性均在 90% 以上, 高于 Alfort 株, 在分子进化中 F114 株与 Brescia、C 株有较近的亲缘关系。由此, 我们所克隆的 1080bp 片段确实是 CSFV F114 株 E2 基因的特异片段, 且其读码框架完全正确, 但缺少 E2 基因 3' 端 72bp 的跨膜序列, 在序列图 2 中, 开始的 18bp 为非 E2 序列, 为了便于序列比较, 同时略去了两端引物中的酶切位点及起始密码子和终止子。

```

F114      1  GTAACTGGGGCACAAGGCCGGCTAGCCTGCAAGGAAGATTACAGGTACGC
C          1  -----
BRESCIA   1  -----C-----
ALFORT    1  --G--C-----G-----T-----C-----T--

F114      51  AATATCATCAACCAATGAGATAGGGCTACTCGGGGCCGAGGTCTCACTA
C          51  -----G-----G-----T-----C-----
BRESCIA   51  T-----A-----AT-----A-----
ALFORT    51  G--C--G-----G--G--C--T-A-----C-

F114      101  CCACCTGGAAAGAATACAGCCACGATTTGCAACTGAATGACGGGACCGTT
C          101  -----G-----A-----
BRESCIA   101  -----A---A-----G---T-----C
ALFORT    101  -T-----G-----G---G-C---A-----

F114      151  AAGGCCATTTGCGTGGCAGGTTCCTTTAAAGTCACAGCACTTAATGTGGT
C          151  -----G-----
BRESCIA   151  -----C---A-----
ALFORT    151  -----G-C---ACT---G-----C-----

F114      201  CAGTAGCAGGTATTTGGCATCATTGCCATAAGGGGGCTTACTCACTTCCG
C          201  -----AA-----C-----
BRESCIA   201  T-----C-----A-----AC-----C-----
ALFORT    201  T-----C-A-----C--A-----C--C--C--A-

F114      251  TGACATTCGAGCTCCTGTTGACGCGGACCAACCCATCAACCGAAGAAATG
C          251  -----T---G-----
BRESCIA   251  -----G---TG---G-----
ALFORT    251  -----T-----A--T-----G---T---G--G---

F114      301  GGAGATGACTTCGGGTTCGGGCTGTGCCCGTTGATACGAGTCTCTGTGT
C          301  -----A---C-----
BRESCIA   301  -----A-----T---A-----C-----A--
ALFORT    301  -AT-----A--T-----A-----C-----GA-

F114      351  CAAGGAAAGTACAATACAACCTTGTGTAACGGTAGTGCTTTCTATCTTG
C          351  T-----G-----
BRESCIA   351  -----A-----C-----T-----A-----C--A-
ALFORT    351  --A--G-----C--C--T---A---C-----A-

F114      401  TCTGCCCAATAGGGTGGACGGGTGTTATAGAGTGCACAGCAGTGAGCCCA
C          401  -----C-----
BRESCIA   401  -T-----G-----G-----G
ALFORT    401  -----A-----T---CG-----C-----

F114      451  ACAACTCTGAGAACAGAAGTGGTAAAGACCTTCAGGAGAGAGAAGCCTTT
C          451  -----C-----C---
BRESCIA   451  -----A-----A-----A--C---
ALFORT    451  -----CT-----G--A-----T-----

F114      501  TCCACACAGAAATGGATTTGTGTGACCACCACAGTGGAAAATGAACATCTAT
C          501  ---G-----T-----
BRESCIA   501  ---GT-----G-----T-----
ALFORT    501  ---T---G-A--C-----T---A---A---C-----

F114      551  TCTACTGTAAGTTGGGGGCAACTGGACATGTGTGAAAGGTGAACCAAGT
C          551  ---T-----C---G-----
BRESCIA   551  -----A-G-----T-----
ALFORT    551  --C-T--C-----T--T-----A-----C--C-----

```

F114	601	GTCGACACAGGGGGCAAGTAAAAACAATGCAAATGGTGTGGCTTCGACTT
C	601	---T-----T-----T-G-----
BRESCIA	601	AC-T---G-----C-----G-----
ALFORT	601	ACTT-T-AG-----G--G---GG-----T---G--
F114	651	CAACGAGCCTGACGGACTCCCACACTACCCCATAGGTAAGTGCATTTTGG
C	651	-G-T-G-----G--T-----
BRESCIA	651	---T-----
ALFORT	651	T--A---CT---G-----T---C-----CC-AA
F114	701	CAAATGAGACAGGTTACAGAATAGTAGATTCAACGGACTGTAACAGAGAT
C	701	-----
BRESCIA	701	-----G-----
ALFORT	701	-----GG-----C--A---C-----
F114	751	GGCGTTGTAATCAGCGCAAAGGGGAGCCATGAGTGTCTTGATCGGCAACAC
C	751	---A--G-----T-----T-----
BRESCIA	751	-----A--G-----T-----T--T---
ALFORT	751	----C--T--T--A-TG-A--GAA-----T-----
F114	801	AACTGTCAAGGTGCATGCATCAGATGAAAGACTGGGCCCTATGCCATGCA
C	801	G-----T-----
BRESCIA	801	-----T-----A-----
ALFORT	801	T--C-----CTG-----T-----G---
F114	851	GACCTAAAGAGATTGTCTCTAGTGCAGGACCTGTAAGGAAAACCTTCCTGT
C	851	-----T-----A---C---
BRESCIA	851	-G---G---C-----G-----
ALFORT	851	---C---A--C-----AG-----G-----T---
F114	901	ACATTCAACTACGCAAAAACCTTTGAAGAACAAGTACTATGAGCCCAGGGA
C	901	-----A-----G-----
BRESCIA	901	-----C--G---G--T-----
ALFORT	901	-----A---G---C-A-GA---A---T-----A---
F114	951	CAGCTACTTCCAGCAATATATGCTCAAGGGCGAGTATCAGTACTGGTTTG
C	951	-----T-----T-----
BRESCIA	951	---T---A-----
ALFORT	951	---T-----A-----
F114	1001	ACCTGGACGTGACAGACCGCCATTACGATTACTTCGCAGAAATTTGTTGTC
C	1001	-----T-C---T-----C-----
BRESCIA	1001	-T---T---C-----C-----CA---
ALFORT	1001	-T-----C---A---CA---C---T-C--G-----
F114	1051	TTGGTGGTG
C	1051	-----
BRESCIA	1051	-----
ALFORT	1051	-----A--A

图 1 CSFV F114 株 E2 基因的序列测定及其与 Alfort、Brescia 及 C 株对应核苷酸序列的同源性比较

Fig. 1 The unclonable sequence of CSFV F114 strain E2 gene and comparison with corresponding region of CSFV Alfort, Brescia and C strain

## 2.2 构建重组杆状病毒表达体系 E2 在昆虫细胞 Sf9 中的初步表达

我们将 E2 基因直接插入到杆状病毒转移载体 pAcSecG2T 的 BamHI/EcoR I 位点, 以及先将它插入绿色荧光蛋白载体 pEGFP-C1 的 Bgl II/EcoR I 位点, 再经 Eco II 47III/EcoR I 酶切出 GFP-E2 片段后再插入到 pAcSecG2T 的 SmaI/EcoR I 位点, 分别构建了重组杆状病毒转移载体 pAcSecG2T-E2 和 pAcSecG2T-GFP-E2, 二者又分别与野生型杆状病毒 DNA 片段 pBacPAK6 (Bsu36 I 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-E2 及融合蛋白 GST-GFP-E2 的重组杆状病毒, 经用偶联 Rhodamine 的二抗和抗 E2 单抗免疫荧光染色, 可以检查出发红色荧光的阳性细胞 (图版 a1, b1), 表达

GST-GFP-E2 融合蛋白的细胞同时还可以检出 GFP 的绿色自发荧光 (图版 c1), 此结果说明 E2 在 Sf9 细胞中得以正确表达, 且能被 E2 蛋白特异性单抗所识别, 具有良好的免疫原性。

### 2.3 真核表达载体 pcE2 的构建及其在 COS-7 细胞的瞬时表达

将 E2 片段插入到真核表达载体 pcDNA3.1 (+) r BamH I /EcoR I 位点, 得到重组表达质粒 pcE2, 大量提取并纯化后用 lipofectamine 转染 COS-7 细胞。在转染后 36~48hr 可经偶联 Rhodamine 的抗 E2 单抗检测出特异的红色荧光 (图版 d1), 证明在 COS-7 细胞中 E2 蛋白同样也得以正确表达, 且能被 CSFV 的特异性 E2 单抗所识别。

### 2.4 对小鼠进行 DNA 免疫接种

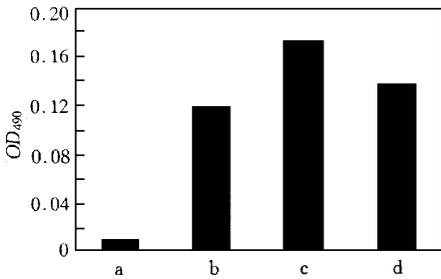


图2 小鼠肌内注射 pcE2 ELISA 检测血清中 E2 抗体

Fig.2 The ELISA detection of CSFV anti-E2 antibody in the sera of mouse injected intramuscularly pcE2. a. the pcDNA3.1 (+) vector control; b. anti-E2 monoclonal antibody; c. pcE2 (postinjection 2 weeks); d. pcE2

(postinjection 4 weeks).

在小鼠肌内注射裸 pcE2, 接种 2 周、4 周后, 取血样, ELISA 测定血清中抗 E2 抗体的效价 (图 2), 结果初步显示接种含 E2 基因的真核表达载体 DNA, 小鼠血清在接种后 14 天就呈现 E2 抗体阳性, 其效价高于抗 E2 单抗阳性对照, 同时病毒中和试验结果表明 DNA 免疫后小鼠体内也可诱导产生 CSFV 中和抗体, 抗体中和效价可达 1:100, 即 1:100 稀释的 DNA 免疫后鼠血清就能保护 50% 培养的 PK-15 细胞感染 100 TCID<sub>50</sub> CSFV 强毒, 对照试验中 E2 单抗的中和效价至少也可达 1:100。

## 3 讨论

CSFV 糖蛋白 E2 是其主要保护性抗原, 编码该蛋白的 E2 基因是 CSFV 全基因组中变异最大的部分之一, 因此克隆 CSFV E2 基因, 对该区域进行序列分析并在体外表达 E2 蛋白, 这对于研究猪瘟病毒的进化及多样性以及探讨用新型非复制型疫苗防制猪瘟的发生具有十分重要的意义。本文在本实验室已有的一些工作基础之上, 克隆了中国猪瘟病毒标准强毒株石门毒的 E2 基因, 并在真核系统中成功地进行了表达, 同时首次探索了 E2 蛋白基因用于 CSFV DNA 免疫及亚单位疫苗的可行性。

序列分析表明, 我们克隆的 CSFV F114 株 E2 基因与 Alfort、Brescia 及 C 株相比, 同源性都在 80% 以上, F114 株与 Brescia、C 株的同源性均在 90% 以上, 高于 Alfort 株, 在分子进化中 F114 株与 Brescia、C 株有较近的亲缘关系。同时石门毒 E2 序列结果与猪瘟兔化弱毒 (C 株) 的对应序列相比, 两者之间还存在一定的差异, 这些变异是否就是引起 CSFV 强毒、弱毒间毒力及抗原性差异的因素很值得进一步研究。同时中国猪瘟病毒标准强毒石门毒 E2 基因的克隆也为进一步研制安全高效的适合我国猪瘟防疫的猪瘟病毒新型疫苗提供了基础材料。本研究进而构建了能在昆虫细胞中表达 E2 蛋白的重组杆状病毒和在 COS-7 细胞中能瞬时表达 E2 蛋白的真核表达载体, 探索了 E2 蛋白基因用于 CSFV DNA 免疫及亚单位疫苗的可行性。

目前,用病毒的主要保护性抗原作亚单位疫苗,或用含主要抗原蛋白基因的表达载体直接作为免疫动物的 DNA 疫苗是近年来病毒免疫研究的热点所在。Hulst 等<sup>[10]</sup>的研究表明 20 $\mu$ g 剂量的 E2 就可诱导猪体产生足够的 E2 抗体以抵御强毒的攻击,这一结果提示了 E2 作为亚单位疫苗防制猪瘟的可能性。我们构建的重组杆状病毒正确表达了 CSFV 的 E2 蛋白,结果表明表达的 E2 蛋白也能被 CSFV E2 特异性单抗所识别,这为研究 E2 蛋白作为亚单位疫苗的研究打下了基础。

同时我们将 E2 基因克隆到真核表达载体 pcDNA3.1(+ )中,构建真核表达载体 pcE2,以及作小鼠肌内接种免疫,探讨了研制针对 CSFV 的 DNA 疫苗的可行性。早在 70 年代末,人们就证实了动物体内的细胞具有摄取裸露 DNA 分子的能力<sup>[4]</sup>,Tang 等用人生长激素表达质粒接种小鼠,产生了对人生长激素的免疫应答,从而提出了“基因免疫 (genetic immunization)”的概念<sup>[11]</sup>,这一发现迅速成为免疫治疗研究的新热点。DNA 疫苗与常规蛋白疫苗相比,有如下特点:DNA 疫苗既可诱导体液免疫,也可以诱导细胞免疫;DNA 疫苗不含有非特异性抗原编码基因,特异性强;DNA 疫苗可以在宿主体内持久表达。由于注入机体内的 DNA 疫苗是病毒抗原的表达质粒,因此构建 DNA 疫苗必须符合以下几个要求<sup>[6]</sup>:病毒蛋白基因具有正确的读码框架,在病毒基因上游具有可被哺乳动物细胞识别的启动子序列,并有适当的终止信号,这种病毒结构蛋白的表达质粒通常只带有大肠杆菌的复制子,不能在哺乳动物细胞中复制。我们所使用的真核表达载体 pcDNA3.1(+ )具备作为 DNA 疫苗载体的上述条件,于是将 E2 插入到这一载体中,探讨了它的表达及肌内注射后小鼠的免疫反应。实验结果表明,转染后的 pcE2 在 COS-7 细胞中能正确表达 E2 蛋白,免疫荧光显示表达的 E2 蛋白在 COS-7 细胞中主要分布于胞浆中,这与 CSFV 感染细胞后 E2 蛋白在细胞内的定位一致;小鼠在注射 pcE2 后第 2 周即可诱导出较为明显的血清阳性水平,并高于 E2 单抗的阳性对照,而空载体阴性对照则几乎检测不出阳性反应,病毒中和试验分析表明小鼠在注射 pcE2 后第 2 周即可诱导出 CSFV 中和抗体,此免疫血清具有病毒中和作用,抗体中和效价可达 1:100,即 1:100 稀释的 DNA 免疫后鼠血清就能保护 50% 培养的 PK-15 细胞感染 100 TCID<sub>50</sub> CSFV 强毒,与对照试验中 E2 单抗的中和效价类似。上述初步结果显示 pcE2 可以作为抗 CSFV 的 DNA 疫苗的一个候选表达质粒,表达的 E2 蛋白具有良好的免疫原性,这就为猪瘟 DNA 疫苗的研究展示了一个新的前景。但是一种 DNA 要真正能作为疫苗应用必需考虑以下几个因素:1)接触 DNA 疫苗是否可能出现抗 DNA(与载体蛋白偶联的 DNA 疫苗抗体);2)DNA 持久性表达可能导致免疫耐受、自身免疫、过敏反应和超免疫性等副作用;3)高浓度外源 DNA 对细胞的转化,有可能进一步诱导活动癌基因的插入,宿主原癌基因插入活化,抑制基因插入失活等<sup>[12]</sup>。因此,研制猪瘟 DNA 疫苗仍还有许多工作要做,这主要包括 DNA 免疫的不同时相,抗体生成动态,中和抗体持续时间,提高 DNA 免疫的抗体水平的各种途径探索以及猪体本动物 DNA 免疫试验及安全性评价等等,有关这方面的一些工作目前正在进行。由于病毒基因在几天内就可以克隆进表达载体,并得到扩增与纯化,这要比纯化蛋白或构建与筛选重组病毒要省时省力,一旦 DNA 疫苗方法通过安全检测,它将为易发生抗原漂移的猪瘟病毒在流行爆发初始就能迅速进行防制提供可行的途径<sup>[5]</sup>。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Meyers G , Rumenapf T , Thiel H J . *Virology* , 1989 , **171** :555~567.
- [ 2 ] Moormann R J M , Warmerdam P A M , Van der Meer B , *et al.* *Virology* , **177** :184~198.
- [ 3 ] Moormann R J M , van Gennip H G P , Midema G K W , *et al.* *J Virol* , 1996 , **70** :763~770.
- [ 4 ] Wolff J , Malone R , Williams P , *et al.* *Science* , 1990 , **247** :1465~1468.
- [ 5 ] Ulmer J B , Donnelly J , Parker S E , *et al.* *Science* , 1993 , **259** :1745~1749.
- [ 6 ] Wang B , Ugen E K , Srikantan V , *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA* , 1993 , **90** :4156~4160.
- [ 7 ] Wang B , Boyer J J , Srikantan V , *et al.* *DNA Cell Biol.* 1993 , **12** :799~805.
- [ 8 ] Chomerzynski P , Sacchi N . *Annal Biochem* , 1987 , **162** :156~159.
- [ 9 ] Sambrook J , Fritsh E F , Maniatis T . *Molecular cloning : laboratory manual* , 2nd. ed. Cold Spring Harbor Laboratory , NY : Cold Spring Harbor , 1989.
- [ 10 ] O'Reilly D R , Miller L K , Luckew V A . *Baculovirus expression vectors——A Laboratory manual* . New York , Freeman W H and Company . 1992.
- [ 11 ] Hulst M M , Westra D F , Wensvoort G , *et al.* *J Virol* , 1993 , **67** :5435~5442.
- [ 12 ] Tang D C , de Vit M , Johnston S A . *Nature* , 1992 , **356** :152~154.
- [ 13 ] Xiang Z Q , Spitalnik S , Tran M , *et al.* *Virology* , 1994 , **199** :132~140.

## MOLECULAR CLONING AND EXPRESSION OF E2 GENE OF THE CHINESE CLASSICAL SWINE FEVER VIRUS( SHIMEN STRAIN ) AND PRELIMINARY STUDIES OF ITS DNA VACCINE \*

Zhou Pengcheng Lu Yu Chen Jianguo Zhai Zhonghe Ding Mingxiao

( College of life sciences , Peking University , Beijing 100871 )

**Abstract :** A 1.1bp fragment of E2 gene of chinese classical swine fever virus( CSFV ) Shimen strain , a standard virulent strain , was amplified by RT-PCR from total RNA of cell cultures infected by CSFV , and cloned into pGEM T vector. the nucleotide sequence of this fragment was sequenced by Sanger 's method and the amino acid sequence was deduced. Compared with the corresponding region of Alfort , Brescia and C strain of CSFV , the nucleotide sequence homology is 84.7% , 92.6% and 95.2% respectively , and the amino acid sequence 89.4% , 92.6% and 94.6% , respectively. we subcloned 1.1bp of E2 gene cDNA into baculovirus transfer vector and successfully constructed two recombinant baculoviruses expressing GST-E2 and GST-GFP-E2 fusion protein respectively by homologous recombination in sf-9 cell. Furthermore , we also constructed recombinant eukaryotic expression vector pcE2 containing E2 gene in frame and transfected COS-7 cell by lipofectamine , the indirect immunofluorescence assay ( IFA ) showed that the expressed E2 protein can be recognized by E2 specific monoclnal antibody. the pcE2 DNA was directly injected into BALB/c mice intramuscularly ( i. m ) and the CSFV E2 -specific antibodies was measured by enzyme-linked immunosorbent assay ( ELISA ) the ELISA results indicated the

E2-specific antibodies was induced in inoculated mice and virus neutralization assays also indicate single inoculations of plasmids expressing CSFV E2 glycoprotein raised neutralizing antibody in BALB/c mice. these results will be beneficial to investigate the possibility of DNA vaccine against CSFV.

**Key words :** Classical swine fever virus , Clone and expression , DNA vaccine

### 图版说明

#### Explanation of plate

用间接免疫荧光法以 E2 特异性单抗检测 CSFV E2 蛋白在真核细胞中的表达(箭头所示)

a. 重组杆状病毒 pAcSecG2T-E2 感染 sf9 细胞 表达 GST-E2 融合蛋白的免疫荧光(a1); b. 重组杆状病毒 pAcSecG2T-GFP-E2 感染 sf9 细胞 表达 GST-GFP-E2 融合蛋白的免疫荧光(b1); c. 重组杆状病毒 pAcSecG2T-GFP-E2 感染 sf9 细胞 表达 GST-GFP-E2 融合蛋白的 GFP 自发荧光(c1); d. pC2 转染 COS-7 细胞 表达 E2 蛋白的免疫荧光检测(d1); a2, b2, c2 及 d2 分别为相应阴性对照。

The indirect immunofluorescence assay of expressed CSFV E2 protein in eudaryotic cells using anti-E2 monoclonal antibody (arrow shows). a1, the sf9 cell infected by recombinant baculovirus pAcSecG2T-E2 and the expression of fusion protein GST-E2; b1, the sf9 cells infected by recombinant baculovirus pAcSecG2T-GFP-E2 and the expression of fusion protein GST-GFP-E2; c1, the automatic fluorescence of GFP in the fusion protein GST-GFP-E2; d1, the COS-7 cells expressing CSFV E2 protein. The corresponding negative control is a2, b2, c2, d2, respectively.

\* Supported by the National 'Climb Plan' Grant (No. 85-44-02-05) from Ministry of Sciences and Technology, China.

## 中国微生物学会 2000 年学术会议计划

会议名称	时间	地点	人数	筹办单位	联系人(电话)
第三届全国青年微生物学工作者学术会议	5 月	无锡	100	中国微生物学会基础微生物专业委员会、无锡轻工大学、江苏省微生物研究所	李华中 0510-5876906 陈 坚 0510-5888301
中国微生物学会“迎接 21 世纪微生物学研讨会”	7.24~28	烟台	300	中国微生物学会*	薛春华 010-62554677
第三届全国酶工程学术讨论会	7 月~8 月	成都	120	中国微生物学会酶工程专业委员会	黎高翔 010-62550183
第七届中日微生物学学术讨论会	8 月	上海	100	中国微生物学会	薛春华 010-62554677 戚中田 010-25070265
全国第三届分析生物学暨第八届分析微生物学学术讨论会	8 月下旬	兰州	150	分析微生物学专业委员会	周 方 010-66948605 杨瑞馥 010-66968562
中美国际微生物学学术研讨会	10 月上旬	北京	50	中国微生物学会	薛春华 010-62554677
第六届中日双边酶工程学术讨论会	10.15~18	日本京都	100	日本酶工程学会和中国微生物学会酶工程专业委员会共同主办	黎高翔 010-62550183 010-62554677