



# 猪伪狂犬病毒 gB 基因在大肠杆菌中的分段表达

包新奇<sup>1</sup>, 黄绍华<sup>2</sup>, 刘巧荣<sup>3</sup>, 孙明<sup>3</sup>, 杨璐<sup>3</sup>, 申屠芬琴<sup>3</sup>, 康立平<sup>3</sup>, 陈西钊<sup>3,4</sup>

(1. 江苏省疾病预防控制中心, 南京 210036; 2. 徐州市高校兽医站, 徐州 221006;  
3. 北京世纪元亨动物防疫技术有限公司, 北京 100085; 4. 中国动物疫病预防控制中心, 北京 100125)

**【摘要】** 目的 分段表达伪狂犬病毒(pseudorabies virus, PRV) gB 基因, 用于 PRV 疫苗免疫抗体评估试剂盒研究。方法 分析 gB 抗原表位, 设计 4 对特异性引物, 从 PRV 新疆分离株中扩增 gB 基因的 4 个片段, 分别命名为 gB-1、gB-3、gB-4 和 gB-5 基因, 克隆到 pGEM-T-easy 载体并测序。再将 4 个 gB 基因片段融合到 pGEX-6P-1 原核表达载体中, 表达并纯化。Western Blotting 进行重组蛋白的抗原性检测。以纯化的重组蛋白为抗原建立间接 ELISA 方法, 检测猪血清临床样品。结果 构建的 4 种表达质粒均可在大肠杆菌中表达, 经 SDS-PAGE 分析, 表达分子量分别为 75.05、53.86、49.96 和  $49.72 \times 10^3$  Da, 其中 gB-3、gB-4 和 gB-5 表达量较高, 表达产物主要存在于包涵体中。Western Blotting 鉴定显示, 4 种融合蛋白均可被猪伪狂犬阳性血清特异识别。以 gB-3、gB-4 和 gB-5 建立的 ELISA 方法与 IDEXX 公司的 gB-ELISA 试剂盒符合率分别为 40.9%、81.8% 和 81.8%。结论 本研究成功表达了 PRV 的 gB-1、gB-3、gB-4 和 gB-5 重组蛋白, gB-3、gB-4 和 gB-5 表达量较高; 其中以 gB-4 和 gB-5 建立的间接 ELISA 方法与 IDEXX 公司的符合率较高。

**【关键词】** PRV; gB; 分段表达; ELISA

**【中图分类号】** R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)03-0012-05  
doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2012.03.003

## Fractional Expression of gB Gene of Pseudorabies Virus in *E. coli*

BAO Xin-qi<sup>1</sup>, HUANG Shao-hua<sup>2</sup>, LIU Qiao-rong<sup>3</sup>, SUN Ming<sup>3</sup>, YANG Lu<sup>3</sup>, KANG Li-ping<sup>3</sup>, CHEN Xi-zhao<sup>3,4</sup>

(1. Jiangsu Animal Disease Control Center, Hanjing 210036, China;  
2. Xuzhou Animal Husbandry and Veterinary Station, Xuzhou 221006, China  
3. Beijing ANHEAL Laboratories Co. Ltd, Beijing 100085, China;  
4. China Animal Disease Control Center, Beijing 100125, China)

**【Abstract】 Objective** To express gB gene of pseudorabies virus fractionally for developing an ELISA on PRV vaccine antibodies. **Method** We analysed the gB epitope, and designed four pairs of specific primers, then four fragments of gB gene were amplified from PRV Xinjiang strain, which were named for gB-1、gB-3、gB-4 and gB-5 gene. The four gene fragments were cloned into PGEM-T-easy and sequenced, then the four genes were inserted into pGEX-6P-1 vector. The expressed proteins were analyzed by Western blotting. Three indirect ELISA methods were set up using purified gB-3、gB-4 and gB-5 proteins as antigen, and 22 clinical pig sera samples were detected. **Results** The four recombinant expression plasmids were successfully expressed in Coli, and the proteins molecular weight were 75.05、53.86、49.96 and  $49.72 \times 10^3$  Da, and gB-3、gB-4 and gB-5 have higher level expression, and the expression product mainly exists in inclusion body. Western blotting identification displayed that all the four fusion proteins were distinguished by pseudorabies virus positive serum. The coincidence rate between gB-3-ELISA, gB-4-ELISA, gB-5-ELISA and gB-ELISA of IDEXX company were respectively 40.9%, 81.8% and 81.8%. **Conclusion** The study successfully expressed gB-1、gB-3、gB-4 and gB-5 of

PRV gB, gB-3、gB-4 和 gB-5 有较高表达。The gB-4-ELISA 和 gB-5-ELISA 有高水平重合度与 gB-ELISA 为 IDEXX 公司。

**【Key words】** PRV; gB; Fractional expression; ELISA

伪狂犬 (Pseudorabies) 又称奥捷士奇病 (Aujeszky's, AD), 是由伪狂犬病毒 (pseudorabies virus, PRV) 引起的包括多种病畜和野生动物共患的一种急性传染病<sup>[3]</sup>。猪是该病的自然宿主和贮存者。可引起妊娠母猪的流产, 产死胎和木乃伊胎, 新生仔猪的大量死亡。自 1902 年发现以来, 伪狂犬病已在全球范围内流行, 给世界养猪业造成了巨大的经济损失, 成为严重危害养猪业的重大传染病之一。该病毒属于疱疹病毒科 A 疱疹病毒亚科, 为双股线形 DNA, 约 150 kb, 编码 70 ~ 100 种蛋白。目前已经鉴定了 11 种糖蛋白, 其中 gB (glycoprotein B) 是最主要的保护性抗原之一, 能刺激机体产生补体依赖性和补体非依赖性的中和抗体以及病毒特异性的细胞免疫应答反应<sup>[1]</sup>。

gB 基因在疱疹病毒成员中属于最保守的糖蛋白基因, 在不同的疱疹病毒之间, gB 蛋白的功能可以相互取代<sup>[2]</sup>。其大小约 2.8 kb, 编码 913 个氨基酸。拥有一段信号肽系列 (N 端的 58 个氨基酸)。成熟的 gB 蛋白 C 端有 3 个疏水区, 其中最后一个疏水区为跨膜区 (740 ~ 808 aa)。gB 以二硫化物连接的三聚糖蛋白复合体的形式存在, 即 gBa, gBb 和 gBc, 大小分别为 855 aa (59 ~ 913 aa)、444 aa (59 ~ 502 aa) 和 411 aa (503 ~ 913 aa)。gBb 和 gBc 是 gBa 剪切后的产物<sup>[4,5]</sup>。gB 蛋白有多个抗原决定簇, 其中 59 ~ 126 之间有 3 个连续的抗原决定簇, 在 214 ~ 279 aa 之间有一个连续的抗原决定簇, 在 540 ~ 734 aa 区间有 8 个潜在的非连续抗原决定簇, 其中有两个位点位于 540 ~ 646 aa 之间<sup>[3]</sup>。根据 gB 的以上特点, 本研究将 PRV 的 gB 基因分 4 个片段进行表达和鉴定, 为研制猪伪狂犬病 gB 抗体检测试剂盒奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 毒株与血清

伪狂犬病毒毒株为新疆分离株, 由中国动物疫病预防控制中心提供。感染伪狂犬病毒的阳性血清、阴性血清、22 份猪血清临床样品均为本试验室保存。

### 1.2 载体、菌株、试剂

pGEM-T-easy、内切酶 EcoR I 和 Sal I 购自

Promega 公司。pGEX-6P-1 表达载体购自 Amersham Pharmacia 公司。大肠杆菌 BL21 感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司。氨苄青霉素、辣根过氧化物酶标记的抗猪 IgG 购自 Sigma 公司。病毒 DNA 提取试剂盒和胶回收试剂盒均购自 Omega 公司。gB-ELISA 试剂盒购自 IDEXX 公司。

### 1.3 引物设计与合成

依据发表的 gB 序列 (序列号: A68929), 分别在氨基酸位置 59 ~ 502 aa, 39 ~ 155 aa, 368 ~ 575 aa 和 540 ~ 740 aa 设计 4 对引物, 上、下游引物分别加 EcoR I、Sal I 酶切位点。

gB-1: PRV-Bb-F: 5'-ATAGAATTCATGGCGGCCGTGACGCGG-3'

PRV-Bb-R: 5'-ATTGTCTGACTTAGCGCCGGGCCCCGACGGGC-3'

gB-3: PRV-59-F: 5'-ATAGAATTCATGGCGGCCGTGACGCGG-3'

PRV-59-R: 5'-TTTGTCTGACTTAGAAGGAGTTCAGGGGTAC-3'

gB-4: PRV-368-F: 5'-ATAGAATTCATGCCCAAGACGCGCGCGT-3'

PRV-368-R: 5'-TTTGTCTGACTTAGCTGGGGTTCAGGCGGACA-3'

gB-5: PRV-540-F: 5'-ATAGAATTCATGATCCAGCGCACGTGAAC-3'

PRV-540-R: 5'-TTTGTCTGACTTAGTAGAACTTAGCGCGTGCA-3'

4 对引物分别可扩增大小为 1332 bp、714 bp、624 bp 和 603 bp 的片段。引物由上海英骏生物技术有限公司合成。

### 1.4 扩增及克隆

1.4.1 病毒 DNA 的提取: 参照 Omega 公司的病毒 DNA 提取试剂盒操作说明提取 PRV 总 DNA。

1.4.2 PCR 扩增: 程序为 95℃ 3 min, 94℃ 45 s, 72 ~ 52℃ 60 s, 72℃ 90s, 40 个循环后, 72℃ 延伸 10 min。

1.4.3 PCR 产物电泳、克隆和序列测定: PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳鉴定, 用 Omega 公司胶回收试剂盒回收 PCR 产物, 克隆到 pGEM-T-easy, 经 PCR 鉴定阳性的重组质粒送上海英骏生物技术有

限公司测序。

1.5 重组表达质粒的构建

将阳性质粒用 EcoR I 和 Sal I 进行双酶切,回收 gB 各片段,连接至经同样双酶切的原核表达载体 pGEX-6P-1 中,构建原核重组表达质粒 pGEX-6p-gB-1、pGEX-6p-gB-3、pGEX-6p-gB-4 和 pGEX-6p-gB-5。转化至 BL21 感受态细胞。筛选阳性克隆,提取质粒,用 EcoR I 和 Sal I 酶切鉴定,鉴定正确的阳性质粒送上海英骏生物技术有限公司测序。

1.6 诱导表达、纯化及鉴定

阳性单菌接种于 LB/AMP 培养液中,当菌摇至 OD<sub>600</sub> = 0.6 ~ 0.8 时,加入终浓度为 1 mM/L 的 IPTG 诱导 4 h,收菌。菌体超声破碎,4℃ 10000 r 离心 10 min,收集上清和沉淀。用电洗脱的方法进行重组蛋白纯化,按照文献[6]的方法进行 SDS-PAGE 和 Western blotting 鉴定,同时进行薄层扫描分析目的蛋白的表达情况。

1.7 ELISA

间接 ELISA:以 3 种 gB 抗原为包被抗原建立间接 ELISA 方法:用方阵滴定法确定最佳包被抗原浓度、最佳血清稀释度、包被时间、二抗浓度以及反应时间等。将建立的 ELISA 分别命名为 gB3-ELISA、gB4-ELISA 和 gB5-ELISA。

临床样品检测:以 IDEXX 公司 gB-ELISA 为对照,用 gB3-ELISA、gB4-ELISA 和 gB5-ELISA 检测 22 份猪血清临床样品,评价 3 种抗原用于检测猪伪狂犬 gB 抗体情况。

2 结果

2.1 克隆、鉴定及测序

gB 基因各片段扩增产物经琼脂糖电泳显示,分别可见约 1330 bp、700 bp、620 bp 和 600 bp 的 4 个基因片段(见图 1),大小与 gB 基因相符,预测证实

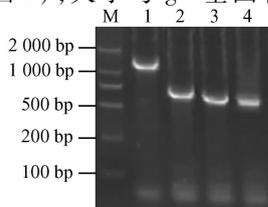


图 1 gB 片段扩增

Fig. 1 PCR products of gB

1 gB-1 (1332 bp); 2 gB-3 (714 bp)  
3 gB-4 (624 bp); 4 gB-5 (603 bp)

所克隆的基因完全正确。

2.2 重组表达质粒的鉴定

4 种重组表达质粒经 EcoR I 和 Sal I 双酶切,分别可见约 1330 bp、700 bp、620 bp 和 600 bp 的目的基因片段。见图 2。测序结果于预期相符。

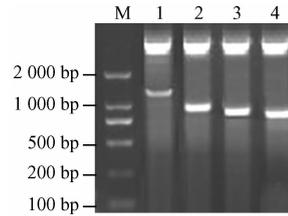


图 2 重组表达质粒的酶切鉴定

Fig. 2 Digestion of recombinant plasmids for prokaryotic expression with EcoR I and Sal I

1 pGEX-6P-gB-1; 2 pGEX-6P-gB-3  
3 pGEX-6P-gB-4; 4 pGEX-6P-gB-5

2.3 重组蛋白的表达与纯化

IPTG 诱导 4h 的破菌沉淀和上清经 SDS-PAGE 分析,分别在 75、51.9、49 和 48.7 × 10<sup>3</sup> Da 处出现目的条带(图 3)。与 gB-1、gB-3、gB-4 和 gB-5 的理论分子量相符。4 种融合蛋白主要以包涵体形式存在。薄层扫描分析显示:gB-3、gB-4 和 gB-5 的表达量较高,约占菌体总蛋白 30%、35% 和 39%。gB-1 的表达量较低仅占菌体总蛋白的 10% (图略)。

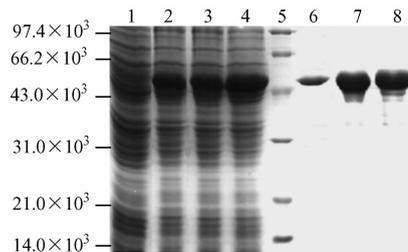


图 3 表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of expressed products

注:1 未诱导菌;2 pGEX-6P-gB-3 诱导菌;  
3 pGEX-6P-gB-4 诱导菌;4 pGEX-6P-gB-5 诱导菌;  
5 低分子量蛋白 Marker;6 pGEX-6P-gB-3 纯化蛋白;  
7 pGEX-6P-gB-4 纯化蛋白;8 pGEX-6P-gB-5 纯化蛋白

Note: 1: Control without induction; 2: Expressions of pGEX-6P-gB-3;  
3: Expressions of pGEX-6P-gB-4; 4: Expressions of pGEX-6P-gB-5; 5: Low molecular weight protein marker; 6: Purified protein of pGEX-6P-gB-3; 7: Purified protein of pGEX-6P-gB-4; 8: Purified protein of pGEX-6P-gB-5

2.4 Western blotting 鉴定

用 PRV 阳性血清作一抗,抗猪 IgG 的抗体为二抗。分别对菌体蛋白和纯化蛋白进行 Western

blotting 鉴定。结果表明,4 种蛋白均可与阳性血反应(图 4),由于 gB-1 表达量不高,难以纯化。对表达的 gB-3、gB-4 和 gB-5 进行了纯化和鉴定。其中图 4-A 为未纯化的蛋白与阳性血清鉴定结果,图 4-

B 为纯化蛋白鉴定结果。图 4-A 显示 4 种重组蛋白均可与阳性血清反应,gB-1 由于蛋白量低,阳性带隐约可见,其他条带比较清楚。

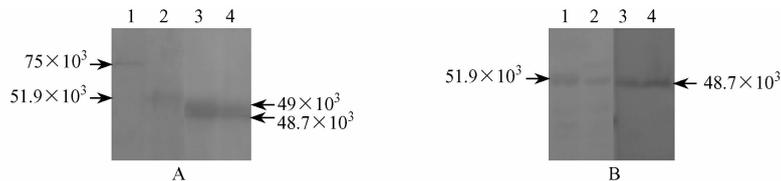


图 4 gB1、gB2、gB3 和 gB5 重组蛋白的 Western blotting

Fig. 4 Western blotting of recombinant proteins of gB1、gB2、gB3 and gB5

A: 1 pGEX-6P-gB-1; 2 pGEX-6P-gB-3; B: 1 pGEX-6P-gB-3; 2 pGEX-6P-gB-4; 3 pGEX-6P-gB-4; 4 pGEX-6P-gB-5 3 pGEX-6P-gB-5; 4 pGEX-6P-gB-5

表 1 临床样品检测结果

Tab. 1 The detection results of clinical samples

		gB3-ELISA		gB4-ELISA		gB5-ELISA	
		阳性 Positive	阴性 Negative	阳性 Positive	阴性 Negative	阳性 Positive	阴性 Negative
IDEXX	阳性 (10) Positive	8	2	9	1	9	1
	阴性 (12) Negative	11	1	3	9	3	9
与 IDEXX 符合率 (%)		40.9 (9/22)		81.8 (18/22)		81.8 (18/22)	
Coincidence rate							

### 2.5 ELISA 检测

用初步建立的间接 ELISA 方法与 IDEXX 公司的 gB-ELISA 试剂盒同时检测 22 份临床猪血清样品。结果显示,以 gB-3、gB-4、gB-5 为抗原建立的间接 IELISA 方法和 IDEXX 公司的 gB-ELISA 方法的符合率分别为 40.9% (9/22)、81.8% (18/22) 和 81.8% (18/22)。具体见表 1。

### 3 讨论

本研究依据 gB 蛋白有多个 B 细胞抗原决定簇的特点,设计 4 对特异性引物,扩增含不同抗原决定簇的基因片段进行分段表达。寻找抗原性好的蛋白,用来制作 gB 抗体检测试剂盒。结果显示,表达的 4 种重组蛋白均能与 PRV 阳性血清反应。其中 gB-1 表达量较低,gB-3、gB-4 和 gB-5 表达量较高。

国外学者对 gB 的生物学功能进行了大量研究。Favoreel 等<sup>[7]</sup>发现 gB 和 gD 共同诱导机体产生的抗体能引起酪氨酸磷酸化依赖信号转换途径的激活,从而导致细胞内吞作用。另有研究发现,gB 还能调节 PRV 的传播,在神经元-细胞连接点病毒单独释放时,由 gB/gH/gL 组成的融合复合体通过附近并列的薄膜进入轴突连接的细胞<sup>[8]</sup>。以 gB 构建的 DNA 疫苗可以诱导猪体的细胞免疫,并且在早期感染时能够减少病毒的排泄<sup>[9]</sup>。用杆状病毒表

达 gB 蛋白免疫鼠收集的抗体可以在体外中和 PRV,并且免疫鼠能抵抗 PRV 致死性攻击<sup>[10]</sup>。用杆状病毒系统表达的 gB 蛋白建立夹心 ELISA 方法,能检测感染 PRV7 d 的猪血清中的 gB 抗体,也可检测未感染小猪血清中的母源抗体。

我国主要免疫 PRV gE 缺失疫苗预防猪伪狂犬病,以检测 gE 抗体来区分 PRV 免疫和自然感染猪。目前已有商品化的 gE 和 gB 抗体 ELISA 试剂盒出售,在猪伪狂犬病防控中发挥了重要作用。邹浩勇等研究发现 gB 抗体与中和抗体具有很好的相关性<sup>[11]</sup>。gB-ELISA 试剂盒检测 PRV 中和抗体阳性血清,可检测 97.8% 的阳性率;而 gE-ELISA 试剂盒只能检出 34.6% 的阳性率<sup>[11]</sup>。因此,检测猪血清中的 gB 抗体可用于疫苗免疫效果评估。

本研究表明,用大肠杆菌表达的不同片段的 gB 抗原均能与猪伪狂犬阳性血清反应。以 gB-4 和 gB-5 重组抗原建立的 ELISA 方法与 IDEXX 公司的 gB-ELISA 试剂盒符合率均为 81.8%。但是限于检测样品的数量较少,抗原评价可能存在差异。仍需扩大检测样品数量,进一步评估鉴定。

### 4 小结

首次成功对 gB 基因进行了分段表达,表达的重组蛋白均能被 PRV 阳性血清识别。其中 gB-4 和

gB-5 具有较好的抗原活性,适用于猪伪狂犬 gB 抗体检测试剂盒的进一步研究。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Mettenleiter T C. Pseudorabies (Aujeszky's disease) virus: State of the art [J]. Vet Res, 2000, 33 (1): 99 - 115.
- [ 2 ] Mettenleiter T. C., Spear, P. G. Glycoprotein gB (gII) of pseudorabies virus can functionally substitute for glycoprotein gB in herpes simplex virus type 1 [J]. J Virol, 1994, 68(1): 500 - 504.
- [ 3 ] Mikhail M. Zaripov, Oleg S. Morenkov, Nadja Fodor. et al. Distribution of B-cell epitopes on the pseudorabies virus glycoprotein B [J]. Journal of General Virology, 1999, 80: 537 - 541.
- [ 4 ] Hampl H., Ben-Porat, T., Ehrlicher, L., Habermehl, K. O. & Kaplan, A. S. Characterization of the envelope proteins of pseudorabies virus [J]. Journal of Virology, 1984, 52: 583 - 590.
- [ 5 ] Lukacs N., Thiel, H. -J., Mettenleiter, T. C. & Rziha, H. -J. Demonstration of three major species of pseudorabies virus glycoproteins and identification of a disulde-linked glycoprotein complex [J]. Journal of Virology, 1985, 53:166 - 173.
- [ 6 ] Joseph S, David W, Russell. Molecular Cloning: ALaboratory Manual [M], 3<sup>rd</sup> ed. 2001 by Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- [ 7 ] Favoreel H. W., Nauwynck, H. J., Van Oostveldt, P. Role of anti-gB and -gD antibodies in antibody-induced endocytosis of viral and cellular cell surface glycoproteins expressed on pseudorabies virus-infected monocytes [J]. Virology, 2000, 267 (2):151 - 158.
- [ 8 ] Curanovic D., Enquist L W. Virion-incorporated glycoprotein B mediates transneuronal spread of pseudorabies virus [J]. J Virol, 2009, 83(16):7796 - 7804.
- [ 9 ] van Rooij E. M., Haagmans B. L., Glansbeek, H. L. A DNA vaccine coding for glycoprotein B of pseudorabies virus induces cell-mediated immunity in pigs and reduces virus excretion early after infection [J]. Vet Immunol Immunopathol, 2000, 74(1 - 2): 121 - 136.
- [ 10 ] Xuan X. Nakamura T. Ihara T. Characterization of pseudorabies virus glycoprotein gII expressed by recombinant baculovirus [J]. Virus Res, 1995, 36:151 - 161.
- [ 11 ] 邹浩勇,陈冬焕,熊金凤,等. 伪狂犬病毒中和抗体与 gB-ELISA 抗体阻断率之间的相关性[J]. 猪业科学, 2008, 5:94 - 96.

[ 修回日期 ]2011-12-13