东北农业科学 2019,44(1):40-43
Journal of Northeast Agricultural Sciences DOI: 10.16423/j.cnki.1003-8701.2019.01.009

非洲猪瘟病毒沈阳分离株*p*30基因的克隆及其亲水区的原核表达

王永志[1],安鼎杰[1],李小宇[1],李忠鹏[1],张静远[2],张守峰[2],扈荣良[2]*,赵玉民[1]*
(1. 吉林省农业科学院,吉林 公主岭 136100;2. 军事科学院军事医学研究院军事兽医研究所,长春 130122)

摘 要:2018年中国首次发生了非洲猪瘟疫情。本研究从来源于沈阳地区的1个非洲猪瘟病毒(African swine fever virus, ASFV)分离株中克隆了*p*30基因(GenBank No. MK482370)。序列分析发现,该基因与安徽分离株相同(GenBank No. MK128995),而与已报道的沈阳分离株SY-18株(GenBank No. MH766894)不同,新克隆的*p*30基因全长585 bp,编码194个氨基酸,而SY-18株*p*30基因全长606 bp,编码201个氨基酸。该结果提示,我国的ASFV存在基因变异或者传播来源复杂,流行病学分析应关注该基因,不同毒株的致病力有待深入研究。本研究利用pGEX-6p-1表达系统成功表达了*p*30基因的亲水区;通过Ni-NTA-琼脂糖亲和层析技术对重组蛋白进行纯化,获得了纯度较高的重组蛋白,为ASFV的血清学监测提供了抗原。

关键词:非洲猪瘟;*p*30基因;原核表达
中图分类号:S858.28 **文献标识码**:A **文章编号**:2096-5877(2019)01-0040-04

Clone of African Swine Fever Virus *p*30 Gene and Expression of Its Hydrophilic Area

WANG Yongzhi[1], AN Dingjie[1], LI Xiaoyu[1], LI Zhongpeng[1], ZHANG Jingyuan[2], ZHANG Shoufeng[2], HU Rongliang[2]*, Zhao Yumin[1]*
(1. *Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun* 130033; 2. *Institute of Military Veterinary Medicine, Academy of Military Medicine, Academy of Military Sciences, Changchun* 130122, China)

Abstract: African swine fever outbroke in China in 2018. The *p*30 gene (GenBank No. MK482370) was cloned from an African Swine Fever Virus (ASFV) strain isolated in Shenyang. It has 100% nucleotide identity with Anhui isolated strain (GenBank No. MK128995). However, there is some difference with reported SY-18 (GenBank No. MH766894). It has 585 base pairs (bp) coding 194 amino acids (aa), while the *p*30 gene of SY-18 has 606 bp coding 201 aa. This observation suggested that variation occurred in ASFV of China, whether the virulence varies remains to be further studied. Plasmid pGEX-6p-1 were used in this study to express the hydrophilic area of *p*30 gene, and the recombinant proteins were purified by Ni-NTA-agarose affinity chromatography. This study provided antigen for ASFV serologic surveillance.

Key word: African swine fever; *p*30 gene; Prokaryotic expression

非洲猪瘟(African swine fever, ASF)是由非洲猪瘟病毒(African swine fever virus, ASFV)引起的一类高致病性传染病,该病的死亡率因感染毒株和被感染宿主的不同存在一定的差异,相关的报道表明,临床表现为最急性或急性感染的病例死亡率接近100%[1];该病自1921年被发现以来,至今已有52个国家先后爆发了ASF疫情,除却疫情给当地养殖业带来的严重经济损失外,也使得周边国家面临严峻的防疫挑战[2-3],同时该病已被世界动物卫生组织(OIE)列入法定通报的动物疾病名录,中国农村农业部也将其列为一类动物疫病,是《国家中长期动物疫病防治规划(2012-2020年)》中明确规定须重点防范的外来动物疫病之一[4-5]。

AFSV是一种带有囊膜的双链DNA病毒,隶

收稿日期:2018-12-10
基金项目:吉林省农业创新工程(CXGC2018DC003);国家重点研发计划(2017YFD0502300)
作者简介:王永志(1978-),男,副研究员,博士,从事分子病毒学研究。
通讯作者:扈荣良,男,博士,研究员,E-mail: ronglianghu@hotmail.com
赵玉民,男,博士,研究员,E-mail: zhaoym-02-12@vip.com

属于非洲猪瘟病毒科非洲猪瘟病毒属,是该属种的唯一成员,同时该病毒也是目前唯一的虫媒DNA病毒[6-8]。该病毒基因组大小为170~190 kb,基因组中央大小为125kb的序列较为保守,而位列保守区域两端的序列变异较大;此外,其基因组中含有160~175个开放阅读框,共编码150~200种蛋白[9-14]。其中*p*30蛋白是一种由基因CP204L编码的膜蛋白;Hernaez等[15]的研究表明,该蛋白在病毒的感染早期可能与宿主细胞核内的hnRNP-K蛋白相互作用进而抑制了宿主mRNA的翻译;此外,相关研究表明,该蛋白还参与病毒的内化过程,并且该蛋白还含有优势抗原决定簇,能够有效地诱导机体产生较强的体液免疫应答,所以该蛋白是一种较为理想的抗原,可用于后续检测试剂的开发[16-17]。

2018年8月1日中国首次报道了ASF疫情,这也使得我国成为首个爆发该疫情的亚洲国家[2,18],虽然ASF的诊断和检测技术日趋成熟,但是截至目前相关疫苗尚未研发成功,所以我国也只能通过及时准确的诊断检测和严格有效的封锁扑杀来阻断疫情的扩散,而为了避免毒株的散播和误诊,相关的诊断只能在少数几家官方认证的机构中进行,这也在某种程度上给疫情的阻断带来了一定的滞后性。因此,ASF疫苗的研发和相关诊断技术的更新对该病的预防起到了至关重要的作用。本研究对ASFV *p*30基因序列进行克隆,测序结果表明,我国不同ASFV分离株*p*30基因存在差异。构建了*p*30蛋白亲水区的pGEX-6p-1-P30表达质粒,并将其导入大肠杆菌*E. coli* Rosetta-gami2(DE3)pLysS中,成功表达并纯化获得较高浓度的*p*30重组蛋白,为后续检测及诊断产品的开发提供了抗原。

1　材料与方法

1.1　菌种、质粒及培养条件

本试验中使用的*E. coli* DH5α感受态细胞及克隆载体pMD18-T均购自宝生物工程(大连)有限公司;*E. coli* Rosetta-gami2(DE3)pLysS感受态细胞及表达载体pGEX-6p-1均为本实验室保藏。

本试验对*E. coli*采用37℃培养,所用培养基为LB(Luria-Bertani)固体或液体培养基。本试验抗生素所用终浓度:氨苄青霉素(Amp)50μg/mL、氯霉素(Cm)34μg/mL、链霉素(Str)50μg/mL、四环素(Tet)50μg/mL。

1.2　试验材料和试剂

DNA Maker购自全式金(北京)生物技术有限公司,PrimeSTAR HS DNA聚合酶购自宝生物工程(大连)有限公司,Ni-NTA-琼脂糖购自上海意泓生物科技有限公司,蛋白Maker Pageruler Prestained Protein Ladder购自Thermo公司,其他试剂均为国产或进口分析纯。

1.3　病毒基因组DNA

AFSV基因组DNA由军事兽医研究所保存。

1.4　引物的设计与合成

根据所获得的序列信息,分别设计两对引物,其中一对引物用于扩增*p*30蛋白序列的全长,其目的片段为798 bp,上游引物P30-124665:CTAGAGGTTGAAGATCCACGGTTAC,下游引物P30-125463:GATCGTGCTGCTGTAGCCATACAG;另一对引物用于*p*30蛋白亲水区表达载体构建,目的片段为306bp,上游引物P30-6P1U:GGGATCCCCGGAATTCATTCTGCATGTGCTGTTTG,下游引物P30-6P1D:GATGCGGCCGCTCGAGTTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGAACCATGAGTCTTACCACCTC;引物由吉林省库美生物科技有限公司负责合成。

1.5　*p*30重组蛋白原核表达载体的构建

首先,通过PCR对*p*30基因序列进行扩增,反应体系及条件分别为:体系为50μL,PrimeSTAR HS DNA聚合酶25μL,DNA 1μL,引物P30-124665和P30-125463各1μL,ddH_2O 22μL;反应条件为94℃ 5 min;94℃ 30 s、60℃ 1 min、72℃ 1 min,30个循环;72℃ 10 min。将扩增获得的目的片段纯化回收,测序;而后以其作为模板,利用表达引物对亲水区序列进行扩增,相关的PCR体系及反应条件同上。将获得的目的片段纯化回收后与克隆载体pMD18-T进行连接,从而构建重组载体pMD18-T-P30,而后将重组质粒转入*E. coli* DH5α感受态细胞中,通过Amp抗性的LB固体平板对阳性克隆菌株进行筛选,并对筛选获得的阳性克隆菌株进行培养,而后提取质粒送至吉林省库美生物技术有限公司进行测序鉴定;待测序正确后,将pMD18-T-P30和表达载体pGEX-6p-1分别用*Eco*R Ⅰ和*Xho* Ⅰ双酶切并对目的片段进行纯化回收,对回收获得的目的片段和载体进行连接,而后将连接产物转入至*E. coli* Rosetta-gami2(DE3)pLysS感受态细胞中,通过带有Amp抗性、Cm抗性、Str抗性及Tet抗性的LB固体平板对阳性菌株进行筛选并予以鉴定,将鉴定正确的重组表达载体命名为pGEX-6p-1-P30。

1.6　目的蛋白的诱导表达及纯化

将含有pGEX-6p-1-P30的*E. coli* Rosetta-ga-

mi2(DE3)pLysS菌液按1/100的比例接种至50 mL含有Amp抗性、Cm抗性、Str抗性及Tet抗性的LB液体培养基中，37℃，180 r/min过夜培养，待次日将培养后的菌液按1/1 000的比例接种至50 mL LB液体培养基中37℃，180 r/min培养至OD_{600}的值介于0.4~0.6间，加入终浓度为1 mmol/L的IPTG，37℃，180 r/min诱导3 h；待诱导结束后，离心收集菌体，用ddH_2O重悬菌体后对其进行超声波裂解（超声2 s，间隔2 s，共10 min），待裂解完全后离心，上清和沉淀分别收集，进行SDS-PAGE分析。而后将剩余的包涵体沉淀溶解于8 mol/L尿素中进行Ni-NTA琼脂糖亲和层析纯化，分别用pH8.0，pH5.9，pH6.0和pH4.0的缓冲液洗柱，收集洗脱液；对上述各样品进行SDS-PAGE分析后用考马斯亮蓝染色液染色1 h后观察结果。

2 结 果

2.1 *p30*基因的克隆

PCR结果显示扩增产物大小约为800 bp，与预期结果一致，测序结果登录GenBank（MK482370）。序列分析发现，*p30*基因与安徽分离株相同（GenBank No. MK128995），而与已报道的沈阳分离株SY-18株（GenBank No. MH766894）不同，新克隆的*p30*基因全长585 bp，编码194个氨基酸，而SY-18株*p30*基因全长606 bp，编码201个氨基酸。

2.2 重组表达载体pGEX-6p-1-P30的鉴定

以提取的重组载体pGEX-6p-1-P30为模板，利用引物P30-6P1U和P30-6P1D对其进行扩增，PCR结果显示扩增产物大小约为350 bp，与预期结果一致；利用*Eco*R Ⅰ和*Xho* Ⅰ对重组载体进行双酶切验证，结果获得大小分别为5 000 bp的载体片段和350 bp的目的片段，与预期结果一致；测序结果表明已成功构建重组表达载体。

2.3 重组蛋白的诱导表达及纯化

SDS-PAGE检测结果表明，诱导后的*p30*重组蛋白得到高水平表达（图1），*p30*的亲水区和GST融合蛋白的分子量是39.8，图1的2号泳道在40kDa的位置有目的蛋白的大量表达，菌液经超声破碎，包涵体洗涤后经8 mol/L pH8.0的尿素裂解，进行Ni-NTA琼脂糖亲和层析纯化获得纯度较高的目的条带（图1），通过BCA法测定*p30*最高浓度为3.28 mg/mL。

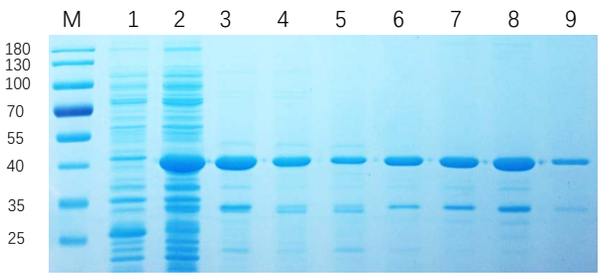

图1 SDS PAGE分析ASFV *p30*蛋白亲水区的表达

M：蛋白质分子量标准；
1：pGEX-6p-1空载体转化菌诱导后的总蛋白；
2：pGEX-6p-1-P30转化菌诱导后的总蛋白；
3：pH8.0尿素裂解包涵体总蛋白；
4：pH8.0尿素洗涤液；5：pH6.3尿素洗涤液；
6：pH5.9尿素洗涤液；7：pH4.0尿素洗脱液第1管；
8：pH4.0尿素洗脱液第2管；9：pH4.0尿素洗脱液第3管

3 讨 论

ASF作为一种高致病性传染病，至今尚无能够有效预防该病的特效药物，同时由于该病传播途径的多样性和贸易往来的流通性，使得相关部门的防疫工作面临严峻的挑战；鉴于该病是首次在我国流行，相关部门针对该病的防疫经验较少，加之我国对ASF的研究起步较晚，在疫情爆发期间只能借助国外经验采取及时准确的诊断和行之有效的扑杀措施来阻断疫情的扩散，但自2018年8月份至今仍有59次ASF疫情被相继报道[19-20]。

本研究克隆的*p30*基因与沈阳的SY-18株不同，所编码的蛋白质在碳端比SY-18株少7个氨基酸，与安徽的分离株完全一致，暗示我国的非洲猪瘟病毒在短时间内已经有变异，或者同时有多个基因亚型的病毒传入我国，今后在流行病学调查的过程中应该注意对*p30*基因进行分析。

目前可用的商品化检测试剂盒种类较少，而且精确度层次不齐，加之国内针对该病的检测体系也并不完善，这在一定程度上给该病的防疫工作带来一定的滞后性；因此，高效、灵敏的诊断试剂可以在疫情初期给予精确的诊断，为后续的防疫工作争取更多的宝贵时间，这在该病的预防过程中显得尤为重要。

在针对ASFV的血清学诊断中，多以*p30*、*p54*、*p72*和*p62*这四种蛋白作为诊断靶标[20-21]；相关研究表明，针对*P54*蛋白的抗体可以阻断ASFV对易感细胞的黏附，此外，Oviedo等的研究表明，针对该蛋白的抗体特异性较好[17,22]；而基于*P72*蛋白和*p62*蛋白建立的间接ELISA检测方法已被证明具有良好的敏感性和特异性[23-24]。以上三种蛋白作为诊断靶标虽然具有各自的优势所在，但是与*p30*蛋白相比还是有所不足，相关研究表明，基于*p30*蛋白建立的间接ELISA检测方法除具有与

*p*54蛋白相似的敏感性和特异性外,其在ELISA上的反应性更好。众所周知,对于该病的防疫来讲,时间是最为关键的要素,而处于感染早期表达的*p*30蛋白较另两种晚期表达的蛋白相比具有得天独厚的优势所在,可以极大地缩短检测诊断所用的周期,提高工作效率的同时为后期防疫准备工作预留了充足的时间[25-26]。

本研究中我们所采用的大肠杆菌表达系统与国外常用的昆虫表达系统和杆状病毒表达系统相比,具有技术难度小,成本低等优点;但是完整的*p*30基因很难在大肠杆菌中表达,本研究尝试*p*30在pET-32(a)中表达,未能获得成功。本研究将*p*30的亲水区与GST蛋白融合表达,获得了非常好的效果,但是蛋白以包涵体形式表达,不能通过GST标签纯化,本研究在*p*30的末尾加入了组氨酸标签,并利用该标签通过镍离子亲和层析获得纯化蛋白。同时由于*p*30蛋白中存在较多的疏水性氨基酸,使得表达产物为不溶性包涵体蛋白,这与储德文[27]的研究结果相符。

参考文献:

[1] 王志亮.非洲猪瘟研究进展[J].中国动物检疫,2011,28(6):70-74.

[2] 王志刚,李　振,齐晓亮.掀开非洲猪瘟的"面纱"[J].兽医导刊,2018(17):17-19.

[3] 王　华,王君玮,徐天刚,等.非洲猪瘟流行病学和诊断方法的研究进展[J].中国兽医科学,2008,38(6):544-548.

[4] Dela Torre A, Bosch J, Iglesias I, et al. Assessing the risk of African swine fever introduction into the European Union by wild boar[J]. Transboundary and emerging diseases, 2015, 62(3): 272-279.

[5] Montgomery R E. On a form of swine fever occurring in British East Africa (Kenya Colony)[J]. Journal of comparative pathology and therapeutics, 1921, 34: 159-191.

[6] 殷　震,刘景华.动物病毒学[M].北京:科学出版社,1997:1197-1205.

[7] 洪　健,周雪平.ICTV第八次报告的最新病毒分类系统[J].中国病毒学,2006,21(1):84-96.

[8] 侯艳梅,董志珍,赵祥平,等.非洲猪瘟病毒P54基因原核表达载体的构建与表达[J].中国兽医科学,2009,39(4):316-320.

[9] Yanez R J, Rodríguez J M, Nogal M L, et al. Analysis of the complete nucleotide sequence of African swine fever virus[J]. Virology, 1995, 208(1): 249-278.

[10] Chapman D A G, Tcherepanov V, Upton C, et al. Comparison of the genome sequences of non-pathogenic and pathogenic African swine fever virus isolates[J]. Journal of General Virology, 2008, 89(2): 397-408.

[11] Portugal R, Coelho J, Höper D, et al. Related strains of African swine fever virus with different virulence: genome comparison and analysis[J]. Journal of General Virology, 2015, 96(2): 408-419.

[12] Galindo I, Alonso C. African swine fever virus: a review[J]. Viruses, 2017, 9(5): 103.

[13] Sánchez E G, Pérez-Núñez D, Revilla Y. Mechanisms of Entry and Endosomal Pathway of African Swine Fever Virus[J]. Vaccines, 2017, 5(4): 42.

[14] 欧云文,阎传忠,张　杰,等.非洲猪瘟病毒的分子病原学及致病机理研究进展[J].中国畜牧兽医,2017,44(7):2139-2146.

[15] Hernaez B, Escribano J M, Alonso C. African swine fever virus protein p30 interaction with heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP-K) during infection[J]. FEBS letters, 2008, 582(23-24): 3275-3280.

[16] Afonso C L, Alcaraz C, Brun A, et al. Characterization of p30, a highly antigenic membrane and secreted protein of African swine fever virus[J]. Virology, 1992, 189(1): 368-373.

[17] Oviedo J M, Rodriguez F, Gomez-Puertas P, et al. High level expression of the major antigenic African swine fever virus proteins p54 and p30 in baculovirus and their potential use as diagnostic reagents[J]. Journal of virological methods, 1997, 64(1): 27-36.

[18] 包雨鑫,丁军莉,郑海英,等.非洲猪瘟研究进展[J].黑龙江畜牧兽医,2018(24):78-80.

[19] Arias M, Dela Torre A, Dixon L, et al. Approaches and perspectives for development of African swine fever virus vaccines[J]. Vaccines, 2017, 5(4): 35.

[20] Cubillos C, Gómez-Sebastian S, Moreno N, et al. African swine fever virus serodiagnosis: a general review with a focus on the analyses of African serum samples[J]. Virus research, 2013, 173(1): 159-167.

[21] Gallardo C, Soler A, Nieto R, et al. Comparative evaluation of novel African swine fever virus (ASF) antibody detection techniques derived from specific ASF viral genotypes with the OIE internationally prescribed serological tests[J]. Veterinary microbiology, 2013, 162(1): 32-43.

[22] Rodriguez F, Ley V, Gómez-Puertas P, et al. The structural protein p54 is essential for African swine fever virus viability[J]. Virus research, 1996, 40(2): 161-167.

[23] Tabares E, Fernandez M, Salvador-Temprano E, et al. A reliable enzyme linked immunosorbent assay for African swine fever using the major structural protein as antigenic reagent[J]. Archives of virology, 1981, 70(3): 297-300.

[24] Gallardo C, Blanco E, Rodríguez J M, et al. Antigenic properties and diagnostic potential of African swine fever virus protein pp62 expressed in insect cells[J]. Journal of clinical microbiology, 2006, 44(3): 950-956.

[25] Tulman E R, Rock D L. Novel virulence and host range genes of African swine fever virus[J]. Current opinion in microbiology, 2001, 4(4): 456-461.

[26] Perez-Filgueira D M, Gonzalez-Camacho F, Gallardo C, et al. Optimization and validation of recombinant serological tests for African Swine Fever diagnosis based on detection of the p30 protein produced in Trichoplusia ni larvae[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2006, 44(9): 3114-3121.

[27] 储德文.非洲猪瘟病毒p30重组蛋白的表达及单克隆抗体制备[D].扬州:扬州大学,2013.