

猪瘟流行毒株 E0 蛋白的原核表达及其 间接 ELISA 方法的建立

李 鹏^{1,2}, 张彦明¹, 张 志², 李晓成², 王晶钰¹, 张燕霞²

(1 西北农林科技大学 动物医学院, 陕西 杨凌 712100; 2 中国动物卫生与流行病学中心, 山东 青岛 266032)

【摘 要】 【目的】表达猪瘟保护性抗原 E0 蛋白, 用以建立猪瘟抗体检测方法, 为进一步开发诊断试剂盒和研究 E0 蛋白的免疫学功能奠定基础。【方法】将猪瘟野毒株 FJ237-E0 基因插入原核表达载体 pET32a 中, 以 BL21(DE3) 为表达菌株进行诱导表达, 将表达的重组蛋白通过 His 亲和层析柱进行纯化, 以纯化的 His-E0 融合蛋白作为诊断抗原, 通过探索抗原包被量和抗体血清稀释倍数, 建立检测猪瘟 E0 抗体的 ELISA 方法。【结果】成功克隆了 CSFV E0 基因, 其核苷酸序列为 687 bp, 编码 229 个氨基酸。经 His 亲和层析柱纯化检测纯度为 0.587 mg/mL; SDS-PAGE 电泳结果显示, 表达的 E0 蛋白分子质量约为 50.3 ku, 表达的重组蛋白为可溶性蛋白, 表达量占菌体总蛋白的 30%; ELISA 方阵确定的最佳抗原包被量为 100 ng, 血清稀释倍数为 1:30, 建立的 ELISA 方法与 IDEXX 公司猪瘟病毒抗体检测试剂盒的阳性符合率为 92.3%, 阴性符合率为 85.7%。【结论】建立的 ELISA 检测方法, 不但为猪瘟抗体监测提供了一种比较实用的血清学监测手段, 也为进一步开发猪瘟抗体检测试剂盒奠定了基础。

【关键词】 E0 基因; 原核表达; 间接 ELISA

【中图分类号】 S852.65⁺1

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2008)10-0024-05

Prokaryotic expression of CSFV E0 protein and establishment of an indirect ELISA for detection of antibody

LI Peng^{1,2}, ZHANG Yan-ming¹, ZHANG Zhi², LI Xiao-cheng²,
WANG Jing-yu¹, ZHANG Yan-xia²

(1 College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 China Animal Health and Epidemiology Centre, Qingdao, Shandong 266032, China)

Abstract: 【Objective】 The study obtained expression of E0 protein of CSFV to establish CSFV antibody serological diagnostic method, to lay a foundation for the development of diagnosis kit and research on the immunology function of E0 protein. 【Method】 The wild virus FJ237 E0 gene was cloned into prokaryotic expression vector pET32a. After the recombinant expression plasmids were transformed into BL21 (DE3), a pure recombinant His-E0 protein by His affinity columns using the purified protein to coat antigen. 【Result】 E0 gene of CSFV was successfully cloned and sequenced, which contained 687 bp. SDS-PAGE electrophoresis analysis detected a band of protein about 50.3 ku in the expression product of E0 gene in insect cells. The results revealed that the E0 protein could be expressed in the systems as soluble protein accounted for 30% of whole bacterial protein. The concentration of coated antigen was 100 ng and the dilution of serum samples was 1:30. Positive coincidence rate is 92.3% and negative coincidence rate is 85.7% in the method of our ex-

* [收稿日期] 2007-10-23

[基金项目] 农业部动物疫情防制与监测项目(NY200609-03)

[作者简介] 李 鹏(1982—), 男, 陕西咸阳人, 硕士, 主要从事分子病原与免疫学研究。

[通讯作者] 李晓成(1958—), 男, 陕西耀县人, 研究员, 硕士生导师, 主要从事动物疫病防治研究。

periment with the kit of IDEXX.【Conclusion】The development of the CSFV indirect ELISA offered a simple and practical way for monitoring antibody of CSF ,which provides much information for a diagnosis kit.

Key words: E0 gene;prokaryotic expression;indirect ELISA

猪瘟疫(Classical swine fever,CSF)是由猪瘟疫毒(Classical swine fever virus,CSFV)引起的一种高度接触性传染病,对养猪业危害严重,是世界粮农组织和各国政府严密监控和检疫的主要传染病之一。CSFV 属黄病毒科瘟病毒属成员,是有囊膜的单股正链 RNA 病毒,基因组大小约 12.3 kb。猪感染 CSFV 后产生针对结构糖蛋白 E0、E2 和非结构蛋白 NS3 的抗体^[1]。糖蛋白 E0 和 E2 是病毒诱导机体产生中和抗体的 2 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。E0 既是一种病毒包膜蛋白,又是一种核酸酶,其活性对病毒在宿主体内的持续感染有直接关系^[2]。目前,研究的 CSFV 基因工程疫苗主要以 E2 蛋白为抗原,并通过检测 E_{rns} 的抗体来区分 E2 标记疫苗免疫猪和野毒感染猪。因此,基于 CSFV E0 基因建立相应的抗体检测技术,不仅对监测猪瘟疫的流行情况具有重要意义,而且对疫苗免疫情况及制定免疫程序具有重要作用。

国际上均将是否产生 E0 蛋白抗体作为猪瘟疫毒感染的依据,这与 E0 蛋白是次要保护蛋白有关^[3]。到目前为止,作为诊断抗原的 E0 蛋白均是由昆虫细胞表达的,成本较高,且产量受到一定限制^[4-5]。最近的流行病学研究结果显示,CSFV 疫苗株和流行毒株 E0 基因的同源性只有 80%左右^[6]。因此,建立一种有效、特异的监测猪瘟疫病毒抗体的方法,已成为猪瘟疫防治的重要内容。为此,本研究用原核表达系统来表达分离鉴定的猪瘟疫毒株 FJ237 的 E0 蛋白^[7],并在此基础上初步建立检测 E0 抗体的间接 ELISA 方法,以期为进一步开发诊断试剂盒和研究 E0 蛋白的免疫学功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

大肠杆菌 DH5 α 、BL21 (DE3) 和表达载体 pET32a,均由中国动物卫生与流行病学中心监测室保存。异丙基- β -D 硫代半乳糖苷(IPTG)、羊抗猪 IgG-HRP、DAB,均购自 Promega 公司;rTaq DNA ploymerase、T₄ DNA 连接酶、限制性内切酶 *Xho* I 和 *Eco*R I,均购自宝生物工程(大连)有限公司;UNIQ-10 柱式 DNA 胶纯化与回收试剂盒,购自上

海生工生物工程技术服务有限公司;低分子量标准蛋白质,购自上海生化研究所;猪瘟疫标准阳性血清,购自中国兽医药品监察所;固定化镍离子亲和层析(His Bind Kit) 试剂盒、Tris、NaCl、咪唑、聚乙二醇 20000、SDS 等,购自 Intrivagen 公司;二硫苏糖醇(DTT)、溶菌酶,均购自 Promega 公司;辣根过氧化物酶标记的羊抗猪 IgG(酶标二抗)、TMB、IPTG,均为 Sigma 公司产品。CSFV 流行野毒株 FJ237,由中国动物卫生与流行病学监测室分离和鉴定。

1.2 方 法

1.2.1 CSFV 流行株 FJ237-E0 基因的 PCR 扩增
为便于直接将 PCR 产物定向克隆到表达载体使阅读框正确,在 E0 基因的两端分别设计带 *Xho* I、*Eco*R I 酶切位点的引物 CSFV-E01:5'-tt gaa ttc atg tat ctc aga ggc gtc-3';CSFV-E02:5'-aaa ctc gag ggt gca gtt gtt agt gta t-3'。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。以 CSFV-E01 和 CSFV-E02 为引物对,以流行病学监测室先前测序正确的 pMD18-T(FJ237)-E0 质粒为模板,进行 PCR 产物扩增。PCR 反应体系:10 $\times$ PCR Buffer 2.5 μ L,dNTPs (10 mmol/L) 2.5 μ L,CSFV-E01 (20 pmol/L) 0.5 μ L,CSFV-E02 (20 pmol/L) 0.5 μ L,rTaq DNA ploymerase 0.5 μ L,质粒 0.5 μ L,ddH₂O 18 μ L。反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 1 min,55 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 1 min,30 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。用试剂盒从琼脂糖中纯化回收 E0 DNA 片段。

1.2.2 重组质粒的构建 将上述提纯的 E0 DNA 片段与 pET32a 载体分别用 *Xho* I、*Eco*R I 双酶切后 16 $^{\circ}$ C 连接过夜。将连接产物直接转化 BL21 感受态细胞,挑取单菌落,提取质粒,重组质粒分别进行 PCR 扩增和 *Xho* I、*Eco*R I 双酶切鉴定,菌株送上海生工生物工程技术服务有限公司测序。将测序正确的重组质粒命名为 pET-FJ237-E0。

1.2.3 重组蛋白的诱导表达 将重组质粒接种于抗性 2 $\times$ YT 液体培养基,37 $^{\circ}$ C 振荡培养至 OD₆₀₀ 值约 0.6 时加入 IPTG 进行诱导,3~4 h 后 5 000 r/min 离心收集菌体,对菌体进行超声裂解。8 000 r/min 离心 15 min 收集上清与沉淀。分别对全菌体蛋白、裂解上清、沉淀进行 SDS-PAGE 分析^[8]。

1.2.4 表达产物的 Western blot 分析 表达产物经 SDS-PAGE 电泳后,按文献[8]的方法,将目的蛋白转移至硝酸纤维膜(NC)。经丽春红染色、封闭、洗涤后,加入猪瘟阳性血清,于 37 ℃ 结合 2 h,用 1 : 2 000 倍稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗猪 IgG (酶标二抗)室温孵育 2 h,取出,加底物显色。

1.2.5 CSFV E0 蛋白的纯化 将诱导好的目的蛋白 pET-FJ237-E0 上清,用 Intrivagen 公司的固定化镍离子亲和和层析试剂盒进行纯化^[9]。取 10 mL 的 1×Charge Buffer(pH8.0),固定镍柱;用 6 mL 的 1×Binding buffer (4 mol/L NaCl,160 mmol/L Tris-HCl,40 mmol/L 咪唑)平衡镍柱;12 mL 1×Washing buffer(4 mol/L NaCl,160 mmol/L Tris-HCl,480 mmol/L 咪唑)洗涤;4 mL 1×Elute buffer(2 mol/L NaCl ,80 mmol/L Tris-HCl,4 mol/L 咪唑)洗脱,重复洗脱 2~3 次,分别收集流出液进行 SDS-PAGE 电泳检测。

1.2.6 CSFV E0 抗体间接 ELISA 检测方法的建立 用 ELISA 方阵法^[10-11] 倍比稀释猪瘟石门毒阳性血清、兔化弱毒阳性血清、猪瘟标准阴性血清和重组 E0 蛋白诊断抗原,确定最佳抗原包被浓度和血清稀释倍数。用建立的间接 ELISA 方法和 IDEXX 公司猪瘟病毒抗体检测试剂盒,对本实验室血清库中保存的猪血清样品进行检测。

2 结果与分析

2.1 CSFV 流行株 FJ237-E0 基因的 PCR 扩增结果

以 CSFV-E01、CSFV-E02 为引物对,通过 PCR 分别扩增出大小为 687 bp 的 E0 基因片段(图 1),大小与预期相一致。

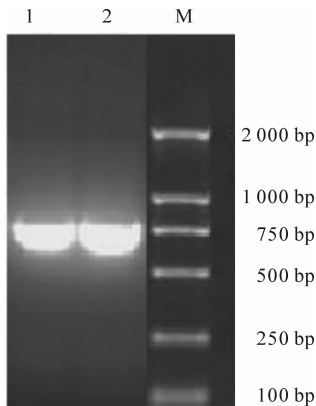


图 1 CSFV 流行株 FJ237-E0 基因的 PCR 扩增结果
1~2. FJ237-E0 扩增产物;M. DNA 标准 DL2000
Fig.1 PCR products of FJ237-E0 gene
1-2. CSFV of FJ237-E0 gene;M. DNA Marker DL2000

2.2 重组质粒的鉴定

2.2.1 重组质粒的 PCR 鉴定 以 CSFV-E01、CSFV-E02 为引物,对重组质粒 pET-FJ237-E0 进行 PCR 扩增,扩增出 1 条 687 bp 的特异性条带(图 2),与预期结果相一致。

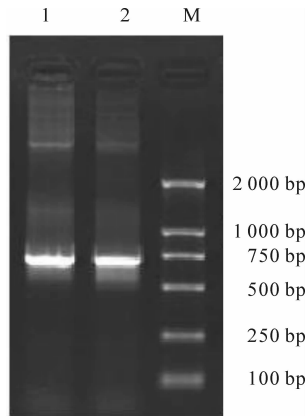


图 2 重组质粒 pET-FJ237-E0 的 PCR 鉴定
M. DNA 标准 DL2000;1~2. pET-FJ237-E0 质粒

Fig.2 Identification of recombinant plasmid with PCR
M. DNA Marker DL2000;1-2. Identification of pET-FJ237-E0

2.2.2 重组质粒的双酶切鉴定 将重组质粒用 *Xho* I、*Eco*R I 双酶切后,酶切结果显示出 687 bp 特异性条带(图 3),与 PCR 扩增结果相一致。

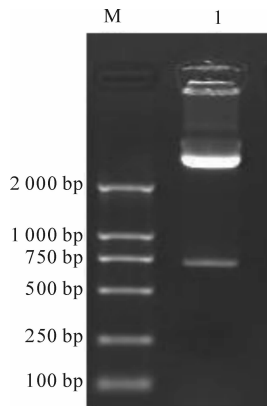


图 3 重组质粒 pET-FJ237-E0 的双酶切鉴定
M. DNA 标准 DL2000;1. pET-FJ237-E0 的 *Xho* I 和 *Eco*R I 双酶切
Fig.3 Identification of recombinant plasmid
with restriction digestion
M. DNA Marker DL2000;1. Restriction digestion
identification of pET-FJ237-E0

2.2.3 重组质粒的序列测定 对阳性重组质粒的序列分析表明,所插入的基因有完整正确的阅读框架,得到 687 个核苷酸片段,编码 229 个氨基酸,测序结果进一步表明本试验成功地构建了重组质粒。

2.3 重组蛋白的诱导表达和分析

收集菌体后变性,SDS-PAGE 显示 pET-FJ237-

E0 在预期的分子质量大小约 50 ku 处出现表达的特异蛋白条带(图 4),表达量占菌体总蛋白的 30%,而对照空载体质粒仅表达 N 端标签,大小为 23 ku。裂解菌体分别取上清和沉淀电泳,结果显示 pET-

FJ237-E0 上清中出现明显的目的蛋白,而沉淀中不是很明显(图 5),表明 E0 蛋白在该表达系统中以可溶性形式存在。

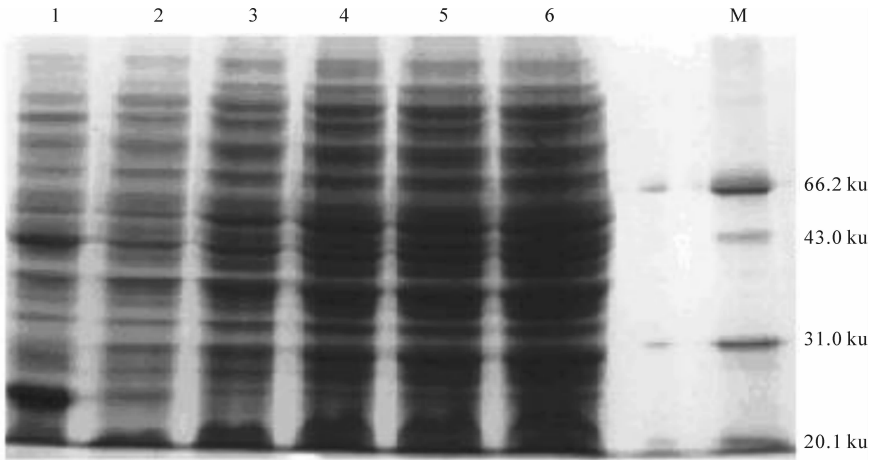


图 4 CSFV E0 蛋白的 SDS-PAGE 检测

M. 蛋白 Marker;1. 诱导的 pET32a 空载体对照;2. 未诱导的 pET32a-E0 菌体;3~6. 不同时间(2,3,4,5 h)诱导的 pET32a-E0 产物

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of CSFV E0 protein

M. Molecular weight protein marker;1. Induced pET32a vector control;2. Non-induced product of pET32a-E0;
3-6. Induced product of pET32a-E0(2,3,4,5 h)

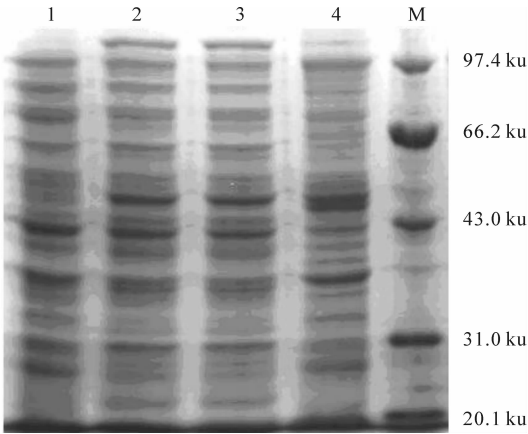


图 5 CSFV E0 蛋白的可溶性试验结果

M. 蛋白 Marker;1. 沉淀中的 E0 蛋白;2~3. 上清中的 E0 蛋白;
4. 诱导的 pET32a-E0

Fig. 5 Soluble test of CSFV E0 protein

M. Molecular weight protein Marker;1. Deposition of E0 protein;
2-3. Suspension of E0 protein;4. Induced product of pET32a-E0

2. 4 CSFV E0 蛋白的 Western blot 分析

Western blot 检测结果显示,重组菌株在 50 ku 处出现目的条带,因此,pET-FJ237-E0 表达的特异蛋白带就是 His-E0 重组蛋白(图 6)。

2. 5 CSFV E0 蛋白的纯化

表达的 E0 蛋白经 His 亲和纯化后,SDS-PAGE

结果显示,在 50 ku 处出现目的蛋白带(图 7)。结果证明成功制备了 His-E0 蛋白,紫外分光光度计检测纯度为 0.587 mg/mL。

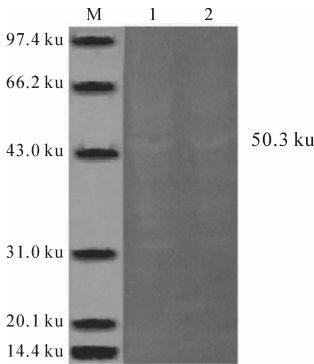


图 6 CSFV 重组 E0 蛋白的 Western blot 检测

M. 蛋白 Marker;1~2. E0 蛋白

Fig. 6 Western blot analysis of expressed protein

M. Molecular weight protein Marker;1-2. E0 protein

2. 6 CSFV E0 抗体的间接 ELISA 检测

通过 ELISA 方阵确定的最佳抗原包被量为 100 ng,血清稀释倍数为 1 : 30。当重组 His-E0 蛋白抗原包被量为 100 ng、血清稀释倍数为 1 : 30 时,猪瘟石门毒阳性血清的 OD₄₅₀ 值在 1.0 左右,且 SPF 阴性值较低,阳性样品 OD₄₅₀ 值/阴性对照平均值 (P/N)分别达到 4.794 和 4.463。建立的 ELISA 方

法与 IDEXX 公司猪瘟病毒抗体检测试剂盒的阳性符合率为 92.3%,阴性符合率为 85.7%。

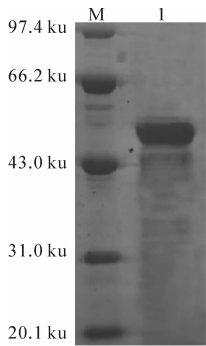


图 7 CSFV E0 纯化蛋白的 SDS-PAGE 检测

M. 蛋白 Marker;1. 纯化的 E0 蛋白

Fig. 7 SDS-PAGE analysis of pruficated E0 protein

M. Molecular weight protein Marker;1. Pruficated E0 protein

3 讨 论

CSFV 糖蛋白 E0 是 CSFV 重要的结构蛋白,其既是构成病毒粒子的一种外壳蛋白,可以诱导机体产生中和抗体,又是一种核苷酸酶,在 CSFV 感染过程中必不可少,因此可以用检测 E0 的方法反映 CS-FV 的感染状况。

试验中发现,在对目的蛋白进行初次诱导时,由于诱导条件不确定,蛋白表达量不高。同时,受目的蛋白与 pET32a 载体本身大小的影响,目的蛋白与载体在 50 ku 处融合表达,正好与菌体自身蛋白带相吻合,在进行 SDS-PAGE 蛋白电泳时,目的蛋白带被菌体自身条带所掩盖。因此在诱导时,需对反应条件进行多次反复的摸索。

本试验将猪瘟野毒株 FJ237-E0 基因,以融合蛋白的形式在大肠杆菌表达系统中进行高效表达,表达的融合蛋白以可溶性蛋白形式存在。通过常规的亲和纯化方法,可以得到高纯度的融合蛋白。将亲和纯化的重组 His-E0 蛋白作为诊断抗原,通过 ELISA 方阵确定了用间接 ELISA 方法检测猪 E0 抗体的 2 个参数,即抗原包被量和血清稀释倍数。同时,本试验用 IDEXX 公司猪瘟病毒抗体检测试剂盒与所建立的 ELISA 方法进行对比,结果阳性符合率为 92.3%,阴性符合率为 85.7%。说明本试验已初步成功构建了检测猪瘟 E0 抗体的 ELISA 方法,所建立的 ELISA 方法具有一定的实用性。但其中有个别假阳性结果出现,说明本试验所建立的

ELISA 检测方法与成品试剂盒相比仍有不完美之处,需要对抗原制备以及 ELISA 反应条件等各方面进行优化,为今后进一步开发诊断猪瘟抗体的检测试剂盒及研制标记疫苗所需的配套诊断试剂奠定基础。

[参考文献]

[1] Ahrens U, Kaden V, Drexler C, et al. Efficacy of the classical swine fever (CSF) marker vaccine porcilis pesti in pregnant sows [J]. Vet Microbiology, 2000, 77: 83-97.

[2] Morrmann R J M, Van Gennip H G P, Miedema G K W, et al. Infectious RNA transcribed from an engineered full-length cD-NA template of the genome of classical swine fever vaccine strain [J]. Virol, 2002, 70: 763-770.

[3] Rijnbrand R, Straaten T V, Van Rijn P A, et al. Internal entry of ribosome is directed by the 5' noncoding region of classical swine fever virus and is dependent on the presence of an RNA pseudoknot upstream of the initiation codon [J]. J Virol, 1997, 71: 451-457.

[4] Van Oirscot J T. Diva vaccine that reduce virus transmission [J]. J Biotechnol, 2001, 73: 195-205.

[5] Widjoatmo M N, Van Gennip H G P, Bouma A, et al. Classical swine fever virus Erns deletion mutants transcom plementation and potential use as nontransmissible modified live-attenuated marker vaccines [J]. J Virol, 2000, 74: 2973-2980.

[6] Mornnann R J M, Warmerdam P A M, Bvander M, et al. Molecular cloning and nucleotide sequence of hog cholera virus strain brescia and mapping of the genome region encoding envelope glycoprotein [J]. J Virol, 2000, 177: 184-198.

[7] Bruschke C J M, Hulst M M, Moormann R J M. Glycoprotein Erns of pestiviruses induce sapopto sisinlym phocytes of severalspecies [J]. J Virol, 2003, 71: 6692-6696.

[8] Langedijk J P, Middel W G, Meleno R H, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay using a virus type-specific peptide based on a subdomain of envelope protein Erns for serologic diagnosis of pestivirus infections in swine [J]. Clin Microbiol, 2001, 39 (3): 906-912.

[9] Christmann A, Wentzel A, Meyer G, et al. Epitope mapping and affinity purification of monospecific antibodies by Escherichia coli cell suiface display of gene-derived random peptide libraries [J]. Immunol Methods, 2001, 257: 167-173.

[10] Colijn E C, Bloemraad M, Wensvart G. An improved ELISA for the detection of serum antibodies directed agianst classical swine fever virus [J]. Vet Microbiology, 1999, 59: 15-25.

[11] Clavijo A, Zhou E M, Vydelingum S, et al. Development and evaluation of a novel antigen capture assay for the detection of classical swine fever virus antigens [J]. Vet Microbiology, 1998, 60: 155-168.