

猪圆环病毒 2 型 ORF2 基因的原核表达

敬晓棋^{1,2}, 吴发兴^{1,3}, 丛丽媛¹, 张佩君⁴, 陈德坤¹

(1 西北农林科技大学 动物医学院, 陕西 杨凌 712100; 2 榆林学院 生命科学研究中心, 陕西 榆林 719000;

3 中国动物卫生与流行病学中心 动物流行病学监测室, 山东 青岛 266032; 4 陕西省教育学院 生物系, 陕西 西安 710061)

【摘要】【目的】构建猪圆环病毒 2 型(PCV2)ORF2 原核表达质粒载体, 高效重组表达 PCV2 壳蛋白 Cap, 为进一步建立 PCV2 ELISA 的检测方法及 Cap 蛋白单克隆抗体的制备研究奠定基础。【方法】根据猪圆环病毒 2 型 ORF2 基因序列设计带有 *Bam*H I、*Hind* III 酶切位点的引物, 进行 ORF2 的 PCR 体外扩增。用扩增的 ORF2 基因构建 pMD18-T-ORF2 质粒, 经测序检测正确后, 与 pET-32a(+) 连接获得原核表达重组质粒 pET-32a-ORF2。重组质粒 pET-32a-ORF2 转化 BL21-ΔE3 后用 IPTG 诱导表达, 对获得的纯化表达产物进行了 SDS-PAGE 电泳、Western blot 检测。【结果】PCR 扩增得到了预期 580 bp 的目的基因, 连接载体后经测序完全正确; pET-32a-ORF2 在 BL21-ΔE3 得到高效表达, 获得以包涵体形式存在的体外重组原核表达 PCV2 Cap 蛋白; Western blot 检测结果表明, 所得到的蛋白能够识别 PCV2 多克隆抗体。【结论】重组质粒 pET-32a-ORF2 在 BL21-ΔE3 高效表达重组 PCV2 Cap 蛋白, 且具有免疫学生物活性。

【关键词】 猪圆环病毒 2 型; ORF2; 原核表达

【中图分类号】 S852.65⁺9.2

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2010)05-0008-05

Prokaryotic expression of ORF2 gene of porcine circovirus type 2 in *E. coli* system

JING Xiao-qi^{1,2}, WU Fa-xing^{1,3}, CONG Li-yuan¹, ZHANG Pei-jun⁴, CHEN De-kun¹

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

2 Life Science Research Center, Yulin University, Yulin, Shaanxi 719000, China; 3 Laboratory of Animal

Epidemiological Surveillance, China Animal Health and Epidemiology Center, Qingdao, Shandong, 266032, China;

4 Biology Department, Shaanxi Education College, Xi'an, Shaanxi 710061, China)

Abstract: 【Objective】In order to study monoclonal antibody of porcine circovirus type 2(PCV2) Cap protein and establish the ELISA detection method for PCV2, a procaryotic expression vector of PCV2 ORF2 was reconstructed, which can express Cap protein highly efficiently. 【Method】To amplify the PCV2 ORF2 *in vitro*, a pair of primers with *Bam*H I and *Hind* III endonuclease sites were designed by primer premier 5. The amplified ORF2 was cloned into pET-32a(+) when plasmid pMD18-T-ORF2 was reconstructed after the amplified ORF2 was confirmed right by sequencing. The reconstructed pET-32a-ORF2 was transformed into BL21-ΔE3 and the fusion proteins were expressed when it was induced by 1 mmol/L IPTG. The expression products of reconstructed pET-32a-ORF2 SDS-PAGE undernent electrophoresis and Western blot detection. 【Result】A 580 bp fragment as expected was acquired by PCR amplification and confirmed right by sequeding. The expression products of reconstructed pET-32a-ORF2 is a fusiion protein and can bind with polyclonal antibody of ORF2 by SDS-PAGE electrophoresis and Western blot detection.

* [收稿日期] 2009-11-02

[基金项目] 陕西省科技攻关项目(2008K02-05-2)

[作者简介] 敬晓棋(1977—), 男, 陕西凤翔人, 在读博士, 主要从事动物传染病与分子免疫学研究。E-mail: jingxiaoshi@126.com

[通信作者] 陈德坤(1964—), 男, 陕西渭南人, 教授, 博士生导师, 主要从事动物传染病与分子免疫学研究。

E-mail: Chendekun163@163.com

【Conclusion】The high expression proteins of the reconstructed pET-32a-ORF2 in BL21- Δ E3 have a good immunoreactivity.

Key words: porcine circovirus type 2; ORF2; procaryotic expression

猪圆环病毒 2 型 (porcine circovirus type 2, PCV2) 是断奶仔猪多系统衰竭综合征 (postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS) 的病原, 最早于 1991 年在加拿大被发现^[1]。该病不但可引起断奶仔猪发生衰竭、死亡, 还与仔猪 A2 型先天性震颤 (Congenital tremors, CT)、成年猪皮炎肾炎综合征 (porcine dermatitis and nephropathy syndrome, PDNS) 和呼吸道疾病综合征 (porcine respiratory diseases syndrome, PRDS) 有关^[2-4]。更为严重的是, PCV2 感染所引起的猪免疫抑制会直接导致其他传染病免疫的失败, 并引起其他病原的继发感染, 造成的间接损失难以估算^[5]。目前, PCV2 已经成为严重阻碍养猪业发展的主要病原之一。PCV2 防治的关键是建立实用的 PCV2 免疫检测技术, 因而表达并纯化出 PCV2 特异性抗原具有重要意义。

PCV2 全基因组长度为 1 767 bp 或 1 768 bp, 共有包括 ORF1 和 ORF2 在内的 11 个阅读框。ORF1 为 945 bp, 编码由 315 个氨基酸构成的病毒复制蛋白^[6-7], ORF2 为 702 bp, 编码由 234 个氨基酸构成的壳蛋白 Cap。Cap 蛋白是 PCV2 的主要结构蛋白, 具有较好的免疫原性^[8-9]。ORF2 的氨基末端区域 12~18 和 34~41 位氨基酸对核定位起重要作用^[10], 69~83 和 117~131 位氨基酸所形成的 B 细胞表位为 PCV2 所特有^[11], 因而 Cap 蛋白成为用于建立 PCV2 免疫检测技术的依据所在。Liu 等^[12]将 ORF2 重组质粒 pMAL-His8 在 *E. coli* “XL1-Blue MRF” 系统中成功表达。此外, PCV2 ORF2 的真核表达体系, 如杆状病毒表达体系^[13-14]、腺病毒表达体系^[15]等也已相继建立, 但 Cap 蛋白的真核表达体系成本较高, 不适于其规模化生产和纯化。

ORF2 基因的 1~123 bp 中富含稀有密码子, 是与核定位有关的信号肽序列 (NSL), 在常规原核表达系统中表达效果较差。因此, 本研究在对 ORF2 进行 PCR 扩增时, 仅扩增了该段序列后 580 bp 的 ORF2 片段, 然后将扩增片段克隆入 pET-32a (+) 表达载体, 在 BL21- Δ E3 中用 IPTG 进行诱导表达, 并对表达产物进行 SDS-PAGE、Western blot 检测, 以期 PCV2 Cap 蛋白单克隆抗体的制备及

间接 ELISA 方法的建立奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

PCV2 分离株和 PCV2 多克隆抗体, 均由西北农林科技大学动物医学院免疫实验室 (以下简称本室) 制备并保存。pET-32a (+) 载体系统及受体菌 DH5 α 购自 Invitrogen。pMD18-T 载体、*Bam*H I、*Hind* III、T4 DNA 连接酶、DNA 提取试剂盒、PCR 试剂盒、质粒提取试剂盒、DNA 胶回收试剂盒、DL2000 Marker 及蛋白 Marker, 均购自 TaKaRa。IPTG、Amp 购自普博生物技术有限公司。Ni-NTA 蛋白纯化试剂盒购自 QIAGEN, 蛋白复性试剂盒 protein refolding kit 购自 Novagen。

1.2 引物的设计与合成

参考 GenBank 中收录的多株 PCV2 ORF2 基因序列, 用 Primer primer 5.0 设计引物, 预期扩增片段大小为 580 bp, 并分别在引物上下游引入 *Bam*H I、*Hind* III 酶切位点。引物均由上海博亚生物技术有限公司合成。引物序列如下。

P1: 5'-CGCGGATCCCTACATTTCCAGCAG-TT-3';

P2: 5'-GGGTTCGAAATGACGTATCCAAG-GAG-3'。

1.3 方法

1.3.1 ORF2 基因的获得 取 -70 °C 保存的 PCV2 分离株, 接种于已长满单层的 PK-15 细胞, 培养 48~72 h 收获全部培养物, 用 DNA 提取试剂盒提取总 DNA 用于 PCR 扩增。建立 50 μ L 扩增体系: Premix Taq 25 μ L, 引物混合物 2 μ L, dNTP 1 μ L, 模板 DNA 1 μ L, ddH₂O 21 μ L。按如下程序扩增: 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 1 min, 53 °C 1 min, 72 °C 1.5 min, 共 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物电泳检测后, 用 PCR 产物回收试剂盒 (TaKaRa 公司) 割胶回收目的片段。

1.3.2 ORF2 基因的克隆鉴定 按照 pMD18-T 载体说明书, 将回收的目的片段与 pMD18-T 载体于 16 °C 连接, 并转化 DH5 α 感受态细胞, 涂板挑选白斑, 接种于含 50 μ g/mL Amp⁺ 的 LB 液体培养基中培养后, 取菌液提取质粒, 用 *Bam*H I 和 *Hind* III

进行酶切鉴定。将鉴定正确的重组质粒 pMD18-T-ORF2 送上海博亚生物技术有限公司测序鉴定。

1.3.3 ORF2 基因原核表达载体的构建与鉴定

按常规方法取 pMD18-T-ORF2 质粒与 pET-32a(+) ,用 *Bam*H I 和 *Hind* III 进行双酶切,经凝胶回收目的片段,用 T4 DNA 连接酶进行连接。连接产物转化 BL21-ΔE3 感受态细胞,提取质粒进行 PCR 及双酶切鉴定,将鉴定正确的重组质粒命名为 pET-32a-ORF2,并送上海博亚生物技术有限公司进行序列测定,以确定其读码框架的正确性。

1.3.4 重组质粒 pET-32a-ORF2 的诱导表达

将重组质粒 pET-32a-ORF2 转化大肠杆菌 BL21-ΔE3,涂 Amp⁺ 平板,置 37℃ 培养 48 h。挑单菌落接种于 5.0 mL Amp⁺ 的 LB 液体培养基内,37℃ 振荡培养,经 1 mmol/L 的 IPTG 诱导表达,分别于 1,2,3,4 和 5 h 离心收集菌体,按每 g 大肠杆菌(湿质量)加 3 mL 裂解缓冲液裂解菌体。裂解物于 4℃、12 000 r/min 离心 5 min,弃上清,获得 pET-32a-ORF2 蛋白表达包涵体沉淀。100 μL 纯水重悬沉淀,按陈美玲等^[16] 的方法进行 SDS-PAGE 检测。

1.3.5 pET-32a-ORF2 表达蛋白的纯化与复性

按 QIAGEN 公司的 Ni-NTA 蛋白纯化试剂盒说明,对 pET-32a-ORF2 表达蛋白进行纯化。具体方法为:将 Denature Bufer B (pH 8.0) 悬浮的重组蛋白加入经 Denature Bufer B 平衡的 His·Bind 树脂柱,用 Denature Bufer C (pH 6.3) 洗涤 2 次、Denature Bufer D (pH 4.5) 洗涤 3 次,然后用 Buffer E

洗脱目的蛋白,经 PBS 透析去除尿素,4℃、12 000 r/min 离心 5 min,收集沉淀。沉淀用蛋白复性试剂盒 protein refolding kit (Novagen 公司) 复性后,于 4℃ 用添加 0.1 mmol/L DTT 的 50×Tris·HCl (1 mol/L Tris·Cl, pH 8.0) 透析 6 h,无 DTT 的 50×Tris·HCl 透析 2 次。透析产物 4℃、2 000 r/min 离心 5 min,取上清分装,-20℃ 保存备用

1.3.6 重组蛋白 pET-32a-ORF2 的检测

纯化的重组蛋白经 12 g/L SDS-PAGE 电泳后,用电转印法转印 NC 膜,再进行 Western blot 免疫印迹检测。一半 NC 膜用于丽春红染色,一半 NC 膜经 TBST 洗脱后转移至 BSA 中封闭,洗膜后加入 1:50 稀释的 PCV2 多克隆抗体,室温下振荡 1.5~2 h,洗涤后加入 1:20 000 稀释的 HRP-兔抗猪 IgG,室温振荡 1.5~2 h,洗涤,置于 DAB 底物显色液中显色,条带清晰后迅速用蒸馏水终止显色反应。

2 结果与分析

2.1 ORF2 基因的 PCR 扩增结果

ORF2 基因 PCR 扩增产物电泳后,获得 580 bp 的特异条带(图 1),与预期扩增片段大小一致。

2.2 重组质粒 pMD18-T-ORF2 的酶切鉴定

提取转化 DH5α 的重组菌质粒,用 *Bam*H I、*Hind* III 进行双酶切,电泳出现约 580 bp 的条带(图 2),与预期结果一致。产物经上海博亚生物技术有限公司测序鉴定,与 ORF2 基因序列完全一致。

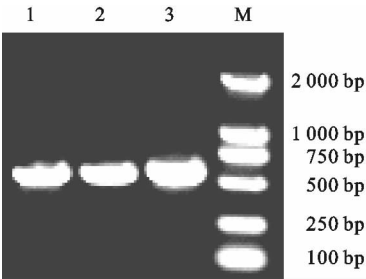


图 1 PCV2 ORF2 基因 PCR 扩增产物电泳图
1~3. PCR 产物;M. DL2000

Fig. 1 PCR products electrophoresis of PCV2 ORF2

1—3. PCR products of PCV2 ORF2;M. DL2000

2.3 重组质粒 pET-32a-ORF2 的鉴定

PCV2 ORF2 的重组质粒 pET-32a-ORF2 用 *Bam*H I/*Hind* III 双酶切,可获得约 580 bp 的片段(图 3),经上海博亚生物技术有限公司测序,结果显示 pET-32a-ORF2 序列完整且读码框架完全正确。

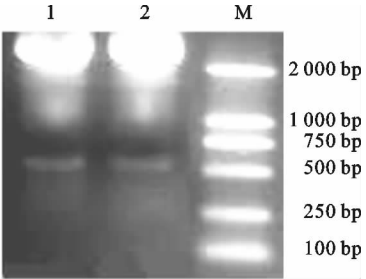


图 2 重组质粒 pMD18-T-ORF2 的双酶切鉴定
1,2. 双酶切 pMD18-T-ORF2;M. DL2000

Fig. 2 *Bam*H I/*Hind* III digestion identification of pMD18-T-ORF2

1,2. pMD18-T-ORF2 digested with *Bam*H I/*Hind* III;M. DL2000

2.4 重组质粒 pET-32a-ORF2 的诱导表达

pET-32a-ORF2 转化的大肠杆菌 BL21-ΔE3 裂解物,用 12 g/L 聚丙烯酰胺凝胶对诱导前和不同诱导时间的样品进行 SDS-PAGE 分析发现,pET-32a-ORF2 在诱导后出现 1 条约 44.3 ku 的蛋白条带

(图 4),诱导 5 h 时的蛋白量相对较高,经检测约可

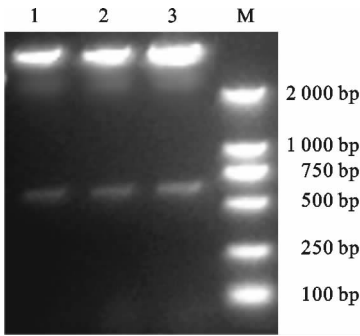


图 3 重组质粒 pET-32a-ORF2 的双酶切鉴定
1~3. *Bam*H I /*Hind* III 双酶切
pET-32a- ORF2;M. DL2000

达菌体总蛋白的 30%。

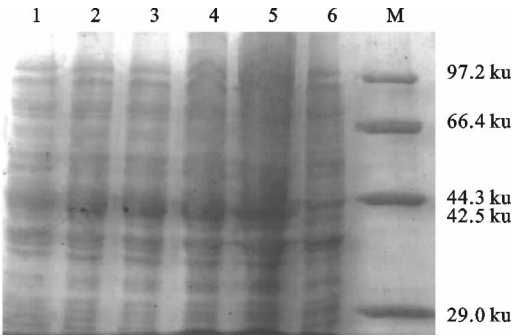


图 4 pET-32a-ORF2 表达产物的 SDS-PAGE 检测结果
M. 蛋白质分子质量标准;1~5. pET-32a-ORF2
在 BL21 中分别诱导 1,2,3,4,5 h 的表达产物;
6. 诱导前 pET-32a-ORF2 的表达产物

Fig. 3 Digestion identification of the pET-32a-ORF2
with *Bam*H I /*Hind* III
1—3. pET-32a-ORF2 digested with
*Bam*H I /*Hind* III ;M. DL2000

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of pET-32a-ORF2
expressed products
M. Protein molecular weight Marker;
1—5. pET-32a-ORF2 expressed products respectively
induced by 1,2,3,4,5 h;6. pET-32a-ORF2
expressed product before induced

2.5 pET-32a-ORF2 表达产物的纯化

表达正确的 pET-32a-ORF2 产物用 His • Band 树脂纯化后,SDS-PAGE 检测显示,IPTG 诱导后 5 h,产物的表达量最高(图 5)。

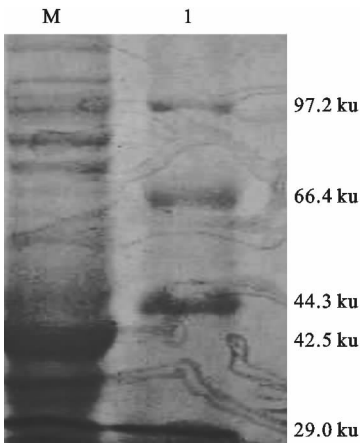


图 5 重组蛋白 pET-32a-ORF2 的纯化
1. 纯化的 pET-32a-ORF2 蛋白;M. 蛋白 Marker
Fig. 5 Purification of the pET-32a-ORF2
recombinant protein
1. Purificated pET-32a-ORF2 protein;
M. Molecular weight protein Marker

2.6 pET-32a-ORF2 表达产物的 Western blot 鉴定

Western blot 检测结果显示,ORF2 的表达产物能够识别 PCV2 多克隆抗体(图 6),具有免疫学生物活性。

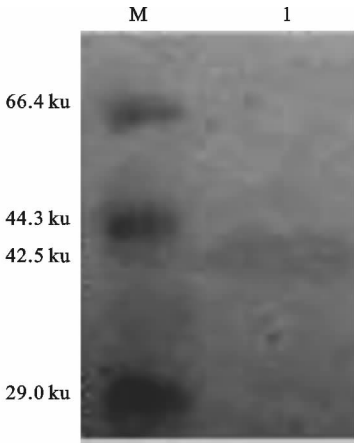


图 6 重组蛋白 pET-32a-ORF2 的 Western blot 检测结果
M. 蛋白 Marker;1. pET-32a-ORF2 蛋白印迹
Fig. 6 Western blot analysis of the recombinant protein
M. Molecular weight protein Marker;
1. pET-32a-ORF2 protein analysed by Western blot

3 讨 论

由于 ORF2 基因的 1~123 bp 中富含稀有密码子,在常规原核表达系统中表达效果较差。Trun-

dova 等^[17]选取富含 argU、ileY、leuW 及 proL tRNA 基因的 BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL *E. coli*,对 PCV2 ORF2 全序列进行了表达,获得了较高水平的蛋白表达量。从免疫检测角度分析,ORF2 中

1~123 bp 与 PCV2 主要抗原的特异性无关^[10], 因此认为不表达该区域更有利。本研究构建的重组质粒经 IPTG 诱导后得到了高效表达, 其表达量约可达菌体总蛋白的 30%, 显著高于 ORF2 全序列时的表达量^[12], 证明了本研究设计的合理性。

本研究中重组蛋白以包涵体的形式存在, 需要变性、浓缩并复性。为此, 本研究用 Ni-NTA 蛋白纯化试剂盒(QIAGEN 公司), 对目的蛋白进行了纯化、浓缩, 浓缩后的蛋白浓度可达 7 mg/mL, 该质量浓度完全能满足后续试验需要。为了恢复重组蛋白的免疫学活性, 本研究利用蛋白复性试剂盒 protein refolding kit(Novagen 公司)对其进行透析复性, Western blot 检测结果表明, 经纯化复性的重组蛋白能够特异性的结合 PCV2 多克隆抗体, 表明目的蛋白具有与 PCV2 相同的抗原性, 可用于 PCV2 ORF2 单克隆抗体及 PCV2 的 ELISA 检测方法的研究。

[参考文献]

- [1] Lukert P, deBoer G F, Dale J L, et al. The circoviridae in virus taxonomy [C]//Murphy F A, Fauquet C M, Bishop D H L, et al. The Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. New York, NY: Springer, 1995: 166-168.
- [2] Allan G, Meehan B, Todd D, et al. Novel porcine circoviruses from pigs with wasting disease syndromes [J]. Vet Rec, 1998, 142(17): 467-468.
- [3] Kim J, Jung K, Chae C. Prevalence of porcine circovirus type 2 in aborted fetuses and stillborn piglets [J]. Vet Rec, 2004, 155(16): 489-492.
- [4] Shibahara T, Sato K, Ishikawa Y, et al. Porcine circovirus induces B lymphocyte depletion in pigs with wasting disease syndrome [J]. J Vet Med Sci, 2000, 62(11): 125-131.
- [5] Allan G M, Ellis J A. Porcine circoviruses: a review [J]. J Vet Diag Invest, 2000, 12(1): 3-14.
- [6] Grierson S S, King D P, Wellenberg G J, et al. Genome sequence analysis of 10 dutch porcine circovirus type 2 (PCV2) isolates from a PMWS case-control study [J]. Res Vet Sci, 2004, 77(3): 265-268.
- [7] Segales J, Olvera A, Grau-Roma L, et al. PCV2 genotype definition and nomenclature [J]. Vet Rec, 2008, 162(26): 867-868.
- [8] Mahe D, Blanchard P, Truong C, et al. Differential recognition

of ORF2 protein from type 1 and type 2 porcine circoviruses and identification of immunorelevant epitopes [J]. Journal of General Virology, 2000, 81(7): 1815-1824.

- [9] Lekcharoensuk P, Morozov I, Paul P S, et al. Pitope mapping of the major capsid protein of type 2 porcine circovirus (PCV2) by using chimeric PCV1 and PCV2 [J]. J Virol, 2004, 78(15): 8135-8145.
- [10] Liu Q, Tikoo S K, Babiuk L A. Nuclear localization of the ORF2 protein encoded by porcine circovirus type 2 [J]. Virology, 2001, 285(1): 91-99.
- [11] 商绍彬, 周继勇, 吴建祥, 等. 重组表达猪圆环病毒 2 型衣壳蛋白的抗原特性分析 [J]. 微生物学报, 2005, 45(3): 377-381.
Shang S B, Zhou J Y, Wu J X, et al. Antigenic analysis of the recombinant capsid protein of porcine circovirus type 2 [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2005, 45(3): 377-381. (in Chinese)
- [12] Liu Q, Willson P, Atttoh-Poku S, et al. Bacterial expression of an immunologically reactive PCV2 ORF2 fusion protein [J]. Protein Expr Purif, 2001, 21(1): 115-120.
- [13] Blanchard P, Mahe D, Cariolet R, et al. An ORF2 protein-based ELISA for porcine circovirus type 2 antibodies in post-weaning multisystemic wasting syndrome [J]. Vet Microbiol, 2003, 94(3): 183-194.
- [14] 樊惠英, 陈焕春, 佟铁铸, 等. 猪圆环病毒 2 型 ORF2 基因在昆虫细胞中的表达及其特性 [J]. 生物工程学报, 2005, 21(6): 975-978.
Fan H Y, Chen H C, Tong T Z, et al. The expression of porcine circovirus type 2 ORF2 gene in insect cells and its character [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2005, 21(6): 975-978. (in Chinese)
- [15] Wang X, Jiang W, Jiang P, et al. Construction and immunogenicity of recombinant adenovirus expressing the capsid protein of porcine circovirus 2 (PCV2) in mice [J]. Vaccine, 2006, 24(16): 3374-3380.
- [16] 陈美玲, 陈焕春, 黄红亮, 等. 抗猪圆环病毒 II 型 ORF2 蛋白单克隆抗体的制备及鉴定 [J]. 中国兽医学报, 2005, 25(6): 567-569.
Chen M L, Chen H C, Huang H L, et al. Preparation and characterization of monoclonal antibodies against PCV2-ORF2 fusion protein [J]. Chinese Journal of Veterinary, 2005, 25(6): 567-569. (in Chinese)
- [17] Trundova M, Celer V. Expression of porcine circovirus 2 ORF2 gene requires codon optimized *E. coli* cells [J]. Virus Genes, 2007, 34(2): 199-204.