

孙芬芬,高玉龙,潘伟,等. 鸡传染性贫血病毒衣壳蛋白的截短表达及其兔抗血清制备[J]. 江苏农业科学,2018,46(17):175-177.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.17.045

鸡传染性贫血病毒衣壳蛋白的截短表达 及其兔抗血清制备

孙芬芬^{1,2}, 高玉龙², 潘伟³, 王笑梅²

(1. 徐州医科大学形态学实验教学中心, 江苏徐州 221004; 2. 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所兽医生物技术国家重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150001; 3. 徐州医科大学病原生物学与免疫学教研室/江苏省免疫与代谢重点实验室, 江苏徐州 221004)

摘要:通过制备原核表达鸡传染性贫血病毒衣壳蛋白(VP1), 以进行抗 VP1 蛋白兔源血清制备。首先以 CIAV M9905 株基因组 DNA 为模板, 通过 PCR 扩增 N 末端截短 129 个氨基酸的 VP1 基因片段(VP1Nd129), 经 *EcoR* I / *Sal* I 酶双酶切处理后与经相同酶切处理的 pET28a(+) 载体连接, 获得阳性重组子 pET-28a-VP1Nd129, 将其转化入 *E. coli* BL21(DE3) 菌, 经 IPTG 诱导, 表达出 VP1Nd129 蛋白; 后者通过 Ni-NTA 树脂纯化后, 免疫新西兰白兔, 制备兔抗血清, 用间接免疫荧光试验和 Western blot 试验检测该血清的特异性, 用酶联免疫吸附试验(ELISA) 滴定其效价。结果显示, CAV VP1Nd129 基因在大肠杆菌中正确表达, 并主要以包涵体形式存在; 纯化后免疫兔获得的抗血清可与真核细胞表达的全长 VP1 蛋白特异性反应。表明本试验成功对 VP1 蛋白进行截短表达, 制备的兔抗血清反应性好, 为深入开展 CIAV 的生物学功能奠定基础。

关键词:鸡传染性贫血病毒; VP1 蛋白; 原核表达; 纯化; 兔抗血清

中图分类号: S858.31 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)17-0175-03

鸡传染性贫血病毒(chicken infectious anemia virus, CIAV)是鸡传染性贫血病(chicken infectious anemia, CIA)的病原, 主要侵害雏鸡, 造成鸡体造血器官和淋巴组织受损, 出现再生障碍性贫血、全身淋巴组织萎缩为特征的免疫抑制性传染病^[1-2]。该病毒感染引起免疫抑制, 易导致鸡群对其他病毒、细菌和真菌易感, 以及继发感染; 亦可干扰其他禽病疫苗的免疫效应, 导致免疫失败。自 Yuasa 等于 1979 年首次报道该病毒后^[3], 该病在德国、法国等多国陆续有报道, 我国于

1992 年由崔现兰等首次分离到^[4]。目前, CIA 在国内蔓延并呈流行趋势, 对养禽业造成重大的经济损失。因此, 需要深入探讨 CIAV 的生物学功能, 以期为该病的防治策略提供新思路。

CIAV 基因组编码 VP1 蛋白、VP2 蛋白^[5] 和 VP3 蛋白^[6]。其中, VP1 蛋白被认为是主要的免疫原蛋白, 可刺激机体产生抗体。值得关注的是, VP1 与 VP2 共表达能有效刺激机体产生中和抗体, 并诱导对鸡群的免疫保护作用, 而单独表达 VP1、VP2 时不具此效应^[7-8]。这提示 VP1、VP2 蛋白之间可能存在相互作用, 研究其互作关系对于解析 CIAV 中和抗体产生机制有着重要的理论意义。

为深入研究 VP1 和 VP2 之间的相互作用, 需要制备出相应的 VP1 和 VP2 抗血清。Pallister 等将全长 VP1 以谷胱甘肽转移酶融合蛋白的形式在大肠杆菌进行表达, 但其表达量极低, 无法满足抗体制备的要求^[9]。本研究对 CIAV VP1 的 N 末端 129 个 AA 进行剪切, 构建原核表达重组质粒 pET-28a-

收稿日期: 2017-03-11

基金项目: 国家肉鸡产业技术体系建设专项(编号: CARS-42-G07); 徐州医科大学优秀人才启动基金(编号: D2015004)。

作者简介: 孙芬芬(1985—), 女, 山东章丘人, 硕士, 助理实验师, 研究方向为分子病毒生物学。E-mail: fen_1208@163.com。

通信作者: 王笑梅, 博士, 研究员, 研究方向为动物传染病原学与流行病学。E-mail: xmw@hvri.ac.cn。

273(1):207-214.

[13] Liu X, Pan H, Yang G, et al. Cloning, expression and biochemical characterization of a basic-acidic hybrid phospholipase A₂-II from *Agkistrodon halys* Pallas [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1999, 1431(1):157-165.

[14] 徐为民, 卞欢, 王道营, 等. 鸭肉肌内磷脂酶反应条件优化及其产物鉴定[J]. 江苏农业学报, 2012, 28(5):1130-1134.

[15] 王道营. 肌内磷脂酶在传统板鸭加工中对磷脂的降解作用研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2014.

[16] 李海珍, 李斌, 张丽君, 等. 竹叶青蛇毒磷脂酶 A₂ 的克隆与表达[C]//全国酶学学术讨论会. 杭州, 2011.

[17] Barroncasella E A, Kickler T S, Rogers O C, et al. Expression and

purification of functional recombinant epitopes for the platelet antigens, PLA₁ and PLA₂ [J]. *Blood*, 1994, 84(4):1157-1163.

[18] Premzl A, Kotnik V, Kveder R, et al. Urine analysis suggests association complement activation and apoptosis with membranous glomerulo patients nephritis [J]. *Molecular Immunology*, 1999, 36(4/5):306.

[19] Upreti G C, Hall E L, Koppens D, et al. Studies on the measurement of phospholipase A₂ (PLA₂) and PLA₂ inhibitor activities in ram semen [J]. *Animal Reproduction Science*, 1999, 56(2):107-121.

[20] Terpe K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, 60(5):523-533.

VP1Nd129,成功进行了截短 VP1 的原核表达,提高了 VP1 的表达量;此外,制备的兔抗 VP1 血清能特异性地结合真核细胞表达的全长 VP1 蛋白,为进一步研究该蛋白与病毒其他奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株与主要试剂

CIAY M9905 株、pET-28a、DH5a 及 BL21 (DE3) 感受态细胞,均由笔者所在实验室保存;DNA Marker、蛋白 Marker,均购自大连宝生物工程有限公司;Primer star 高保真酶、限制性内切酶 *EcoR* I、*Sal* I 及 T_4 DNA 连接酶,均购自 TaKaRa 公司;IPTG、 Ni^{2+} 亲和层析柱、质粒抽提试剂盒,购自 Invitrogen 公司;辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗兔 IgG、弗氏完全佐剂及弗氏不完全佐剂,均购自 Sigma 公司。

1.2 VP1 基因的扩增

根据《分子克隆指南》,抽提 CIAY M9905 株 DNA,采用 PCR 方法扩增 VP1Nd129 基因。PCR 反应条件:94 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s,61 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min 10 s,共 30 个循环;72 ℃ 10 min;4 ℃ 保温。PCR 产物用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

VP1Nd129 扩增的上游引物为 5' - TCGAATTCATGGCC GGTGAGTTGATTGCG - 3';下游引物为 5' - CGGTGCAC ACAGGGCTGCGTCCCCC - 3'。引物两端分别设计有 *EcoR* I 和 *Sal* I 酶切位点,并引入 2 个保护碱基。

1.3 原核表达载体的构建及鉴定

将 PCR 产物回收后,用 *EcoR* I 和 *Sal* I 进行双酶切,再与经相同酶切处理的 pET-28a(+) 质粒连接,转化入 DH5a 感受态中,在 Kan⁺ 平板上筛选阳性重组质粒。将获得的重组质粒用 *EcoR* I 和 *Sal* I 酶进行酶切鉴定,并送 Invitrogen 公司测序,命名为 pET-28a-VP1Nd129。

1.4 VP1 蛋白的表达

将测序正确的阳性重组质粒转化入 BL21 感受态中,其转化后的菌命名为 *E. coli* BL21/pET-28-VP1Nd129。挑取单一菌落接种于含 Kan⁺ 的 LB 培养基,摇床培养过夜,次日将菌液按 1:100 比例接种入上述培养基中,37 ℃ 摇床培养;至 $D_{600\text{ nm}} = 0.4 \sim 0.6$,加入 1 mmol/L IPTG,继续诱导 5 h。收集菌体,并对其进行超声破碎,12 000 r/min 离心 15 min 后,收集上清和沉淀,进行 SDS-PAGE 分析。

1.5 His-VP1 融合蛋白的纯化与复性

将上述经超声破碎的沉淀,重悬于 pH 值为 7.8 的 8 mol/L 尿素溶液中,根据 Ni^{2+} 离子亲和层析柱试剂盒说明书进行变性纯化,获得纯化的 His-VP2 融合蛋白。后者透析过夜以除去尿素,浓缩后进行蛋白定量,-80 ℃ 保存,备用。

1.6 VP1 重组蛋白兔抗血清的制备和鉴定

1.6.1 兔抗血清的制备 将纯化蛋白与等体积弗氏完全佐剂进行乳化,免疫新西兰白兔,免疫剂量为 1 mg/只,初次免疫后 3 周进行二次免疫,免疫剂量及方式同前。于第 2 次免疫接种后 14 d 耳缘静脉采血,检测抗体效价。

1.6.2 ELISA 法测定抗体效价 将纯化的融合蛋白以 4 mg/L 包被 ELISA 板,利用 ELISA 法进行抗体效价测定。以未免疫阴性兔血清为阴性对照组。

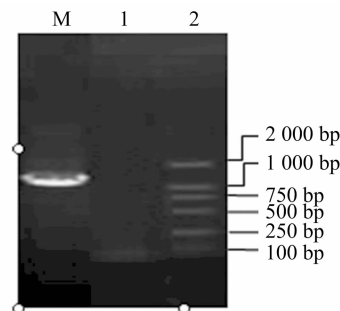
1.6.3 间接免疫荧光 以真核表达 VP1 蛋白的 Vero 细胞作为抗原,制备的兔抗 VP1 按 1:100 稀释作为一抗,37 ℃ 孵育 1 h,洗涤 3 次后,加入 FITC 标记的羊抗兔 IgG (1:150 稀释),37 ℃ 继续孵育 1 h,用荧光显微镜观察。同时,以正常 Vero 细胞作为阴性对照。

1.6.4 Western blot 将真核表达 VP1 蛋白的 Vero 细胞裂解后,加入 1 × Loading Buffer,煮沸 5 min,进行 SDS-PAGE 电泳;电泳结束后,转 PVDF 膜,以免抗 VP1 血清 (1:100 稀释) 作为一抗,HRP-羊抗兔 IgG (1:5 000 稀释) 作为二抗,进行 Western blot 检测。

2 结果与分析

2.1 VP1 基因的扩增及鉴定

PCR 扩增出 1 029 bp 的 VP1Nd129 基因,与预期大小相符,见图 1。将其与 pET-28a(+) 载体连接,酶切鉴定为阳性的重组质粒送 Invitrogen 公司测序。测序结果表明,插入序列正确,表明 pET-28a-VP1Nd129 质粒构建成功。

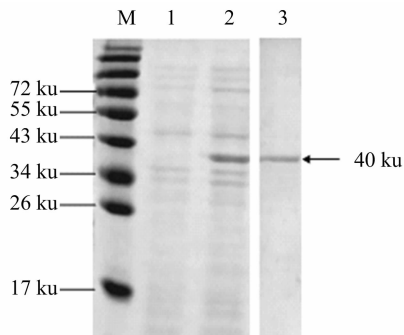


M—VP1Nd129; 1—阴性对照; 2—DNA标准 DL2000

图1 VP1Nd129 基因 PCR 扩增结果

2.2 VP1 蛋白的融合表达及纯化

将测序正确的重组表达载体 pET-28a-VP1Nd129 转入大肠杆菌 BL21 (DE3) 中,通过 IPTG 诱导表达目的蛋白。由图 2 可知,表达产物经 SDS-PAGE 分析,清晰可见目的蛋白条带,大小约 40 ku。蛋白经变性纯化、复性后,纯度较高。



M—蛋白标准分子量; 1—pET-28a 空载体; 2—pET-28a-VP1Nd129; 3—纯化的 VP1Nd129 蛋白

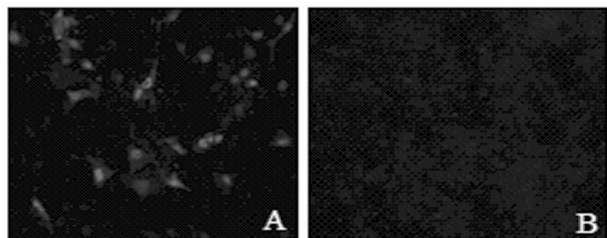
图2 VP1Nd129 表达产物的 SDS-PAGE 分析

2.3 兔抗 VP1 血清的效价测定

以 4 mg/L 纯化融合蛋白作为包被抗原,利用间接 ELISA 法检测兔抗 VP1Nd129 血清效价。设未免疫兔血清为阴性对照,VP1 单克隆抗体作阳性对照。结果显示,制备的 VP1Nd129 抗体效价可达 1:1 600。

2.4 兔抗 VP1 血清与真核表达的 VP1 蛋白反应原性检测

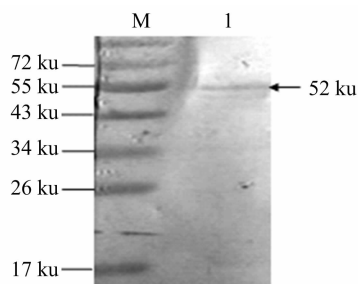
2.4.1 IFA 转染 pCAGG - VP1 入 Vero 细胞,用兔抗 VP1Nd129 血清进行 IFA 检测(图 3),可见转染细胞发出绿色特异性荧光,而正常细胞无荧光。



A—转染 pCAGG-VP1 的 Vero 细胞; B—正常 Vero 细胞

图3 IFA 检测 VP1Nd129 抗血清的特异性 (100×)

2.4.2 Western blot 将转染 pCAGG - VP1 的 Vero 细胞裂解后,进行 SDS - PAGE 电泳,用制备的兔抗 VP1 血清做一抗,进行 Western - blot 试验,可见有单一条带形成,其大小为 52 ku (图 4)。



1—兔抗 VP1Nd129 血清; M—蛋白标准分子量

图4 Western blot 检测 VP1Nd129 抗血清的特异性

3 讨论

作为病毒的主要结构蛋白,VP1 在诱导鸡体免疫保护及诊断 CIAV 中均起着重要作用^[10-11]。一些学者尝试对 VP1 进行表达后发现无法表达其全长,这是由于 VP1 的 N 端氨基酸中富含精氨酸以及密集的稀有密码子,致使完整的 VP1 基因在大肠杆菌中的表达水平极低且易被降解,这为该蛋白在大肠杆菌中的表达造成了一定困难^[12]。因此,目前均采用截短策略表达 VP1 蛋白。国内王英等表达了 VP1 C 端基因为^[13];刘岳龙等将 VP1 分成了 2 个小片段后,即 VP1 片段 1 (23.5 ku) 和 VP1 片段 2 (26.5 ku)^[14];此外,余树培等表达了 VP1 抗原富集片段^[12]。本研究中将 VP1 N 端截短 129 个氨基酸,其长度为 1 029 bp,最大限度地保留了其长度,将其重组于 His 融合蛋白表达载体 pET28a(+) 中,表达出的融合蛋白主要以包涵体的形式存在。将该融合蛋白纯化后免疫兔,获得了特异性强、效价较高的抗血清,并具有良好的免疫原性。

综上所述,本研究成功地对 N 端截短 129 个氨基酸的 VP1 蛋白进行了原核表达,并制备出了兔抗血清,表达物保留

天然 VP1 相关的抗原性,将为 CIAV 的 VP1 蛋白生物学功能研究提供物质基础。

参考文献:

- [1] Bounous D I, Goodwin M A, Brooks R L, et al. Immunosuppression and intracellular calcium signaling in splenocytes from chicks infected with chicken anemia virus, CL21 isolate[J]. Avian Diseases, 1995, 39(1):135 - 140.
- [2] Dehead T P, Van Den Bosch G, Gucatell E R, et al. Epidemiology and significance of chicken infectious anemia virus infections in broilers and broiler parents under nonvaccinated European circumstances[J]. Avian Diseases, 2001, 45(3):706 - 708.
- [3] Yuasa N, Taniguchi T, Yoshida I. Isolation and some properties of an agent inducing anaemia in chicks [J]. Avian Diseases, 1979, 23: 366 - 385.
- [4] 崔现兰, 辛桂香, 吴东来, 等. 鸡传染性贫血病毒的鉴定[J]. 中国畜禽传染病, 1992(6):3 - 5.
- [5] Peters M A, Jackson D C, Crabb B S, et al. Chicken anemia virus VP2 is a novel dual specificity protein phosphatase[J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(42):39566 - 39573.
- [6] Chou Y M, Iee M S, Lai G H, et al. Production of chicken anemia virus VP3 protein using recombinant *Escherichia coli* for development of cancer therapeutic agent [J]. Bioscience and Bioengineering, 2009, 108(1):27 - 28.
- [7] Nøtveit M H, Verschuere C A, Koch G, et al. Simultaneous expression of recombinant baculovirus - encoded chicken anemia virus (CAV) proteins VP1 and VP2 is required for formation of the CAV - specific neutralizing epitope[J]. Gen Virol, 1998, 79(Pt12):3073 - 3077.
- [8] Koch G, van Roozelaar D, Verschuere C, et al. Immunogenic and protective properties of chicken anaemia virus proteins expressed by baculovirus[J]. Vaccine, 1995, 13(8):763 - 770.
- [9] Pallister J, Fahey K J, Sheppard M. Cloning and sequencing of the chicken anaemia virus(CAV) ORF - 3 gene, and the development of an ELISA for the detection of serum antibody to CAV[J]. Vet Micro, 1994, 39(1/2):167 - 178.
- [10] 顾玲玲, 朱善元, 成大荣, 等. I 型鸭甲型肝炎病毒 VP1 基因的原核表达及多克隆抗体的制备[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(1):151 - 154.
- [11] 李国帅, 陈瑾, 乔绪稳, 等. 利用霍乱毒素 B 亚单位展示猪 O 型口蹄疫病毒 VP1 蛋白主要抗原表位[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(3):601 - 607.
- [12] 余树培, 夏文龙, 胡成, 等. 鸡传染性贫血病毒衣壳蛋白的原核表达及鉴定[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(28):118 - 121.
- [13] 王英, 王笑梅, 高宏雷, 等. 鸡传染性贫血重组抗原间接 ELISA 诊断方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2005, 27(6): 517 - 521.
- [14] 刘岳龙, 秦爱建, 金文杰, 等. 鸡贫血病毒 VP1 基因在大肠杆菌中的高效表达及其生物学特性的初步分析[J]. 病毒学报, 2002, 18(1):61 - 65.