

何小丽,李凡飞,王文佳,等.牛传染性鼻气管炎病毒部分 gB 蛋白的原核表达及抗原性分析[J].江苏农业科学,2019,47(17):189-192.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.17.047

# 牛传染性鼻气管炎病毒部分 gB 蛋白的原核表达及抗原性分析

何小丽,李凡飞,王文佳,张 凯,程 成,许立华

(宁夏大学农学院,宁夏银川 750021)

**摘要:**为对牛传染性鼻气管炎病毒(IBRV)gB 基因进行原核表达,并对表达产物进行抗原性分析,利用笔者所在实验室已构建好的 gB-BL21 重组阳性菌落,进行异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)诱导表达,并对培养及诱导表达条件(IPTG 最佳浓度、作用时间)等影响表达的因素进行优化,然后将表达的 gB 重组蛋白进行亲和层析纯化。十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)结果表明,gB 蛋白在大肠杆菌中高效表达,表达蛋白的相对分子量约为 32.4 ku,与预期的蛋白大小一致。经 BCA(聚氧基丙烯酸正丁酯)蛋白含量测定试剂盒测定,gB 重组蛋白浓度为 1.84 mg/mL。Western Blot 结果显示,纯化后的 gB 重组蛋白能被标准 IBR 阳性血清识别,说明表达的目的蛋白具有良好的反应原性,可作为 IBRV 检测的特异性抗原。试验为建立牛传染性鼻气管炎诊断及研究 gB 蛋白的功能特性提供了材料和技术理论支持。

**关键词:**牛传染性鼻气管炎;gB 蛋白;原核表达;纯化;抗原性分析

**中图分类号:**S852.4<sup>+</sup>3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2019)17-0189-04

牛传染性鼻气管炎(infectious bovine rhinotracheitis,简称 IBR)是由牛传染性鼻气管炎病毒(infectious bovine rhinotracheitis virus,简称 IBRV)[又称为牛疱疹病毒 1 型(BHV-1)]感染所引起的高度接触性传染病。该病具有广泛的嗜组织性,在临床上表现为呼吸道型、生殖道感染型、脑膜脑炎型和流产型 4 种类型。该病呈世界性广泛分布,世界动物卫生组织将其列为二类动物传染病,每年都给全球的养牛业带来了不可估量的经济损失<sup>[1]</sup>。BHV-1 基因组中已被编码为蛋白的共有 73 个开放阅读框<sup>[2]</sup>。BHV-1 编码的结构蛋白有 33 种,其中 13 种蛋白与核衣壳有关,10 种编码糖蛋白<sup>[3]</sup>。gB 是在病毒吸附、进入细胞及胞间扩散和融合中起着重要作用的主要膜蛋白,也是主要的抗原蛋白,是 BHV-1 中最保守的蛋白<sup>[4]</sup>。

我国于 1980 年从国外进口的奶牛中检测到了引起该病的病毒,自此许多学者开始对该病的流行病学进行调查,结果表明我国国内大部分省份已存在较为广泛的牛传染性鼻气管炎病毒的感染且呈现逐年上升的现象。目前,并没有特效的药物治此病,我国主要采取以预防为主措施防控此病。本试验通过对 IBRV gB 蛋白的诱导表达,旨在获得 IBR 高效表达蛋白,为 IBR 的检测方法提供原材料和技术支持。

## 1 材料与方

### 1.1 血清与菌株

IBR 标准阳性血清,购自美国 IDEEX 公司;牛传染性鼻气管炎 gB-BL21 阳性重组菌株,由笔者所在实验室前期构建保存。

### 1.2 主要试剂盒

His 标签蛋白纯化试剂盒,购自北京康为世纪生物科技有限公司;AEC 底物显色试剂盒,购自索莱宝公司;AEC 蛋白纯化试剂盒,购自凯基生物公司。

### 1.3 主要试剂

主要试剂如下:琼脂糖,购自西班牙;异丙基硫代- $\alpha$ -D 半乳糖苷(IPTG),Thermo Fisher;氨苄青霉素(AMP),Amresco;琼脂粉,OXOID;蛋白彩虹 marker,Thermo Fisher;十

收稿日期:2018-05-24

基金项目:国家自然科学基金(编号:31560687、31760722);宁夏“优质高产奶牛遗传改良与选育”专项(编号:2013NYZ0501)。

作者简介:何小丽(1991—),女,宁夏固原人,硕士研究生,研究方向为预防兽医学。E-mail:764502729@qq.com。

通信作者:许立华,博士,教授,硕士生导师,主要从事兽医微生物学与免疫学、动物疫病诊断与防控技术的研究。E-mail:littlezhe99@163.com。

[7] Studier F W. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures[J]. Protein Expression and Purification, 2005, 41(1): 207-234.

[8] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典(三部)[S]. 北京:中国农业出版社, 2016: 44-49.

[9] 陈 理,俞昌喜. 重组大肠杆菌高密度发酵工艺进展[J]. 海峡药, 2011, 23(3): 15-18.

[10] 张建新,张 吨,胡文波,等. 重组大肠杆菌高细胞密度发酵研究进展[J]. 中国酿造, 2011, 227(2): 5-8.

[11] Animal and plant health inspection service, USDA. 9 CFR Ch. I (1-1-07 Edition)[M]. Washington: U. S. Government Printing Office, 2007: 688-698.

[12] British pharmacopoeia (Veterinary)[M]. London: the Stationery Office, 2005: 192-199.

二烷基硫酸钠(SDS)上样缓冲液(2×),SDS 购自西安国安生物科技有限公司;考马斯亮蓝 G-250,Thermo Fisher;过硫酸铵,Biotopped;10% SDS;四甲基乙二胺(TEMED),Biotopped;1 mol/L pH 值为 6.8 的 Tris-HCl,Tris 购自 Biotopped;1.5 mol/L pH 值为 8.8 的 Tris-HCl;29:1 的丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺蛋白电泳缓冲液(5×),Biotopped;聚偏氟乙烯(PVDF)膜,Thermo Fisher;滤纸,沈阳市长城过滤纸板有限公司;甘氨酸,西安国安生物科技有限公司;脱脂奶粉,完达山乳业,Tween20,Biotopped;磷酸缓冲盐溶液(PBS);无水乙醇,天津市福晨化学试剂厂;0.22 μm 滤膜,Sigma;Rabbit Anti-Bov IgG/HRP[辣根过氧化物酶标记的兔抗牛 IgG],Sigma。其他化学试剂均购自天津市化学大茂化学试剂厂。此外,聚羧基丙烯酸正丁酯(BCA)蛋白纯化试剂盒,购自江苏凯基生物技术股份有限公司。

1.4 试验方法

1.4.1 重组蛋白 gB 的诱导表达及条件优化 取 1 μL 连接好的重组质粒 PET32a-gB,涂布于含氨苄青霉素的 LB 固体培养基上,于 37℃ 培养 12~15 h。然后用无菌接种棒挑取单个重组菌落,接种于 5 mL 液体培养基中,37℃ 摇床上于 220 r/min 培养 12~15 h。取培养的菌液按 1:50 的比例接种于新鲜的 LB(AMP<sup>+</sup>)液体培养基中,继续培养 2~3 h,直至 *D*<sub>600 nm</sub> 达到 0.6~0.8,取 1.0 mL 菌液保存,作为 IPTG 诱导前样品,将剩余的菌液分成 6 管,分别向其中加入不同浓度的 IPTG,使其终浓度依次为 0.1、0.3、0.5、0.7、1.0、2.0 mmol/L,然后置于 37℃ 摇床上培养,分别于 1、2、3、4、5 h 后从 5 管中各取 1 mL 诱导菌液,室温下于 8 000 r/min 离心 2 min,去上清,采用 PBS 重悬沉淀,重复离心,最后弃尽上清,用 PBS 重悬沉淀,混匀,然后向其中加入 2×SDS 上样缓冲液,置于沸水中煮沸 5 min,取出后迅速放入冰浴中,适当时间后,放入-20℃ 冰箱中保存备用。

1.4.2 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)的检测 按照说明配制分离胶与浓缩胶,在分离胶上面插入梳子,静置约 30 min,使凝胶完全聚合。然后将玻璃制胶板放入电泳槽中,在电泳槽中加入适量的电泳液,缓慢垂直拔出梳子,用移液器冲洗加样孔。向第 1 个加样孔中加入蛋白彩虹 marker,在相邻的泳道中依次加入样品。接通电源,起始电压为 80 V,当染料进入分离胶后,提高电压至 120 V,电泳 1 h。待溴酚蓝到达电泳槽的底部时,关闭电源,小心地从玻璃板上剥下凝胶,切掉浓缩胶,并对分离胶进行标记,然后将其放入考马斯亮蓝染色液中,染色 1 h。结束后,取出分离胶,将其转入脱色液中脱色,观察结果。

1.4.3 重组蛋白的可溶性分析 参照“1.4.1”节的方法,分别利用蛋白的最优表达条件对重组蛋白进行诱导表达,离心,弃上清,在沉淀中加入 PBS 重悬菌体,混匀。然后超声裂解菌体细胞,待菌液变清后,10 000 r/min 离心 10 min,收集上清,并向沉淀物中加入 8 mol/L 尿素,充分裂解。然后分别向收集好的上清和沉淀中加入蛋白上样缓冲液,煮沸 5 min,快速放入冰浴中,适当时间后,进行 SDS-PAGE 分析。

1.4.4 重组蛋白的纯化分析 参照“1.4.1”节的方法,分别利用蛋白的最优表达条件对重组蛋白表达至最优的时间,取 50 mL 离心管,称量空管的质量并作记录,倒入诱导的菌液,

离心,弃上清,加入去离子水重悬沉淀,再次以同样的条件离心,倒掉上清,称量离心管质量,得到菌体湿质量,每 100 mg 菌体(湿质量)中加入 2 mL 细菌裂解液(每毫升细菌裂解液中预先加入 10 μL 蛋白酶抑制剂混合物),超声破碎 20 min,10 000 g 低温离心 15 min,收集沉淀,将沉淀重悬于 Binding Buffer 中,尽量混匀使包涵体充分溶解。20℃ 静置过夜,次日取出后,使用 His(组氨酸)标签蛋白纯化试剂盒进行相关步骤纯化,然后对纯化蛋白进行 SDS-PAGE 分析。

1.4.5 纯化蛋白浓度的测定 使用 BCA 蛋白纯化试剂盒对重组蛋白含量进行测定,具体步骤如下:

(1)按照表 1 依次向 96 孔板中加入相应试剂;

表 1 试剂添加顺序			
孔号	蛋白标准溶液用量 (μL)	去离子水用量 (μL)	对应蛋白的量 (μg)
0	0	20	0
1	1	19	0.5
2	2	18	1
3	4	16	2
4	8	12	4
5	12	8	6
6	16	4	8
7	20	0	10

注:蛋白标准溶液主成分为牛血清白蛋白(BSA)。

(2)将试剂盒中的 A 试剂与 B 试剂按照 1:50 的比例配制 BCA 工作液,充分混匀;

(3)依次加入 200 μL BCA 工作液;

(4)将 96 孔板放在振荡器上振荡数秒,37℃ 孵育 30 min;

(5)在酶标仪上读取 *D*<sub>562 nm</sub>,以蛋白含量(μL)为横坐标、吸光度为纵坐标,绘制标准曲线图;

(6)选取合适的浓度稀释 gB 蛋白,使其总体积为 20 μL,加入 BCA 工作液 200 μL,混匀,37℃ 放置 30 min,以标准曲线 0 号管作参比,记录 562 nm 下的吸光度;

(7)根据所得样品的吸光度,在标准曲线上找出对应的蛋白含量,换算到原体积中,记录蛋白的浓度。

1.4.6 纯化蛋白的 Western Blot 分析 按照上述方法进行 SDS-PAGE,电泳结束后,取出凝胶切下分离胶,标记方向,按照标准步骤进行蛋白质分子的转印,150 mA 恒流,4℃ 3 h,将凝胶上的蛋白质转印到 PVDF 膜上。接着取出转有蛋白质分子的 PVDF 膜,采用 5% 脱脂乳封闭 2 h,一抗(1BR 标准阳性血清)4℃ 杂交过夜,次日取出后使用 PBST(加了吐温的磷酸盐缓冲液)洗涤 5 次,加入二抗(Rabbit Anti-Bov IgG/HRP)杂交 1 h,去除非特异性结合,再次洗涤,条件同上。洗涤结束后,使用 AEC(3-氨基-9-乙基咔唑)底物显色试剂盒显色 15 min,之后用蒸馏水终止反应,观察并记录结果。

2 结果与分析

2.1 重组蛋白 gB 的诱导表达及条件优化

将连接好的重组菌落接种于培养基上,利用 IPTG 初步探索诱导表达,经过 SDS-PAGE 分析,结果表明,未经 IPTG 诱导的重组菌并没有出现特异性的条带,而经 IPTG 于 37℃

诱导后的重组菌落出现了特异性的条带,经分析其大小为 32.4 ku,与预期的蛋白分子质量大小相符。为提高重组蛋白的表达效率,为以后大量制备蛋白奠定基础,分别以不同时间和不同 IPTG 浓度进行诱导条件的优化。最后通过 SDS - PAGE 蛋白凝胶电泳检测,由图 1、图 2 显示,蛋白的表达量在 37 °C 0.5 mmol/L IPTG 诱导 4 h 时达到最大值。

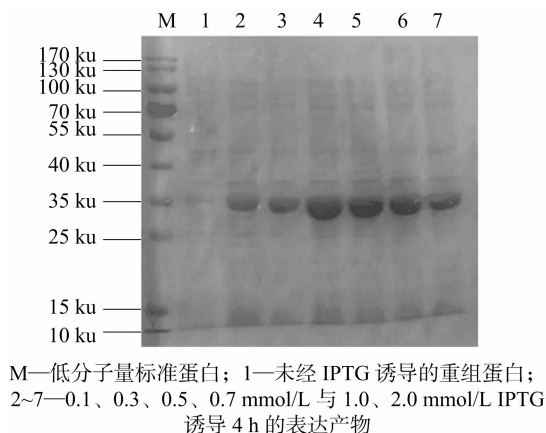


图1 gB 蛋白诱导表达浓度的优化

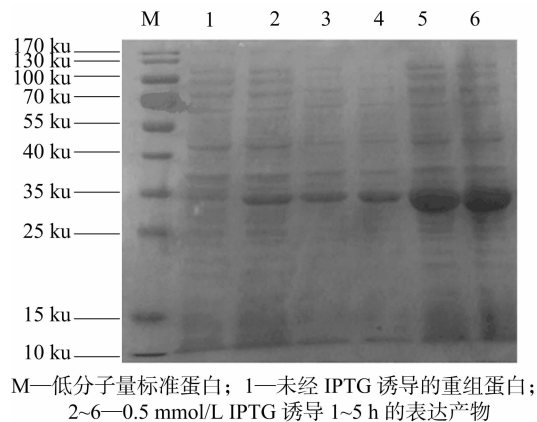


图2 gB 蛋白的诱导表达时间的优化

## 2.2 重组蛋白的可溶性分析

分别将重组菌落经过最优的表达条件表达,离心收集沉淀后超声破碎,再次离心后对沉淀加尿素溶解,经 SDS - PAGE 分析,由图 3 可见,表达 gB 蛋白以包涵体的形式存在。

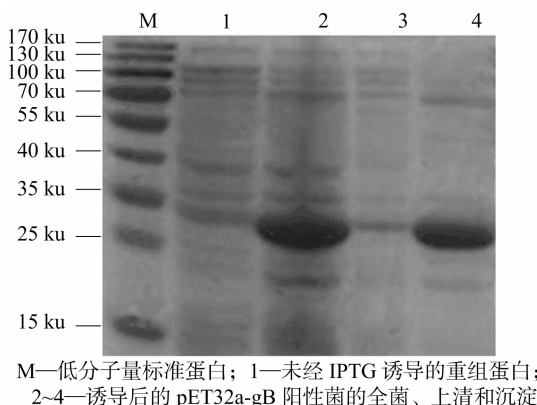


图3 gB 重组蛋白的可溶性分析

## 2.3 重组蛋白的纯化分析

由图 4 可知,根据 gB 蛋白的表达特性和最佳诱导条件进

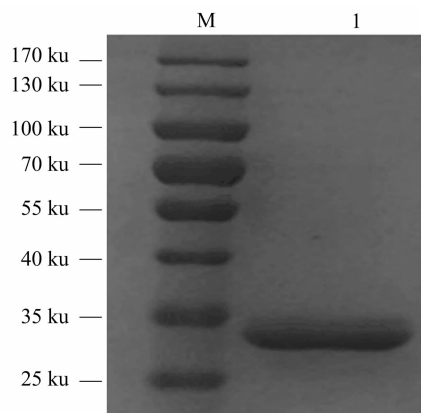


图4 gB 重组蛋白的分离纯化

行表达纯化,得到 1 条约为 32.4 ku 的纯度较高的条带。

## 2.4 纯化蛋白浓度的测定

以 BSA 标准蛋白浓度为横坐标、吸光度  $D_{562\text{ nm}}$  为纵坐标,制作标准曲线,见图 5。根据 BSA 浓度与  $D_{562\text{ nm}}$  的线性关系,得到了拟合曲线方程: $y = 0.0786x + 0.0656$ ,  $r^2 = 0.9989$ 。经测定,gB 重组蛋白的浓度为 1.84 mg/mL。

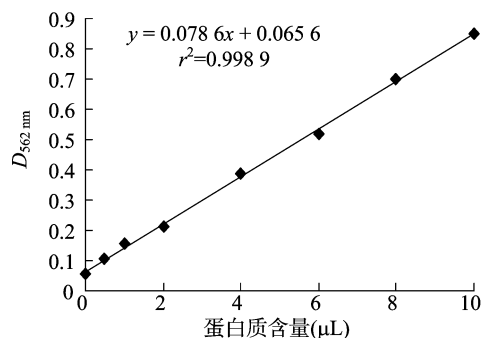


图5 BSA 蛋白的标准曲线

## 2.5 重组蛋白的 Western Blot 检测

纯化的 gB 蛋白经蛋白转印、一抗二抗杂交,再经 AEC 显色之后,出现了 1 条纯度较高的目的条带(图 6),提示表达的重组蛋白具有良好的反应原性。

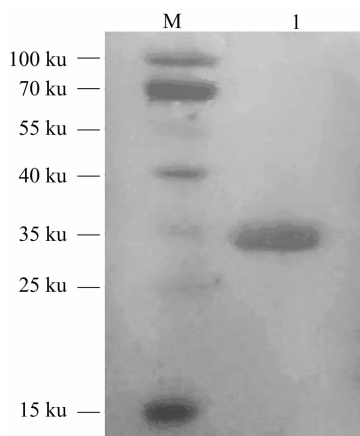


图6 gB 重组蛋白的 Western Blot 检测

### 3 结论与讨论

IBR 近年来已经成为影响牧业发展的主要病原,对于我国而言它属于外来病原,首次发现该病在 1980 年,2005 年我国在澳大利亚进口种牛中成功分离到该病毒<sup>[5]</sup>。2006 年检测了来自内蒙古等 11 个省份的疑似感染 IBR 血清样本,结果显示抗体阳性率为 46.0%<sup>[6]</sup>。2015 年北疆 4 个规模化奶牛场 IBR 感染性抗体的平均阳性率为 87.4%<sup>[7]</sup>。2016 年笔者所在团队对宁夏地区进行 IBR 的抗体检测,平均阳性率高达 85.1%<sup>[8]</sup>。我国作为奶牛养殖业大国,但由于我国整体的养牛水平不太高,每年都要从一些养牛水平高的国家进口大批的牛,2015 年 Moore 等的研究表明,澳大利亚出口的活牛 IBR 血清阳性率为 39.0%<sup>[9]</sup>,这些数据均表明 IBR 感染的普遍性和严重性,我们应提高警惕避免该病发生大面积暴发。

gB 蛋白是 IBRV 主要的抗原蛋白,在机体的免疫保护中起着至关重要的作用<sup>[10]</sup>。目前,IBRV 的诊断试剂大多数均针对 gB 抗原表位。本研究采用笔者所在实验室构建好的 gB 重组菌株,使用大肠杆菌的表达系统,大肠杆菌的表达系统以其高效表达的优点成为近些年来首选的表达系统<sup>[11]</sup>。相对于全基因表达,gB 部分基因表达克服了蛋白表达量低、抗原性弱等缺点,目的蛋白在大肠杆菌表达系统中获得了大量高效的表达。在选择蛋白纯化方法时,采用镍柱亲和层析法,方法简便、利于操作及实验室蛋白的大量纯化,分离纯化效果好,纯化后的蛋白经免疫印迹检测,能与 IBR 标准阳性血清发生特异性反应,说明表达的 gB 蛋白具有良好的反应活性,可被用来作为 IBRV 检测的特异性抗原。

本研究成功获得了 IBRV gB 蛋白,为应用建立 IBR 诊断方法和制备 gB 蛋白多抗和单抗,作为抗原免疫动物提供了重要的物质基础和技术支持。

### 参考文献:

- [1] Crook T, Benavides J, Russell G, et al. Bovine herpesvirus 1 abortion: current prevalence in the United Kingdom and evidence of

hematogenous spread within the fetus in natural cases[J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2012, 24(4): 662–670.

- [2] Raaperi K, Orro T, Viltrop A. Epidemiology and control of bovine herpesvirus 1 infection in Europe[J]. *Veterinary Journal*, 2014, 201(3): 249–256.
- [3] Biswas S, Bandyopadhyay S, Dimri U, et al. Bovine herpesvirus – 1 (BHV – 1) – a re – emerging concern in livestock: a revisit to its biology, epidemiology, diagnosis, and prophylaxis [J]. *Veterinary Quarterly*, 2013, 33(2): 68–81.
- [4] Woodbine K A, Medley G F, Moore S J, et al. A four year longitudinal sero – epidemiological study of bovine herpesvirus type – 1 (BHV – 1) in adult cattle in 107 unvaccinated herds in southwest England[J]. *BMC Veterinary Research*, 2009, 5(1): 1–12.
- [5] 王洪梅, 侯佩莉, 宋玲玲, 等. 国内外奶牛主要病毒病的流行现状及防控技术研究进展[J]. *中国畜牧杂志*, 2014(10): 42–49.
- [6] 王延涛, 李国军, 周玉龙, 等. 牛传染性鼻气管炎病毒分离鉴定[J]. *中国兽医杂志*, 2007, 43(5): 30–31.
- [7] 罗玉江. 北疆部分规模化牛场奶牛 BVD、IBR、BPI 和 Brucellosis 的流行病学调查[D]. 石河子: 石河子大学, 2015.
- [8] 何小丽, 赵世媛, 李永琴, 等. 宁夏地区奶牛病毒性腹泻及牛传染性鼻气管炎的流行病学调查[J]. *畜牧与兽医*, 2016, 48(11): 100–102.
- [9] Moore S J, O’dea M A, Perkins N, et al. Estimation of nasal shedding and seroprevalence of organisms known to be associated with bovine respiratory disease in Australian live export cattle [J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2015, 27(1): 6–17.
- [10] Manoj S, Babiuk L A, Littel – Van Den Hurk S V. Immunization with a dicistronic plasmid expressing a truncated form of bovine herpesvirus – 1 glycoprotein D and the amino – terminal subunit of glycoprotein B results in reduced gB – specific immune responses [J]. *Virology*, 2003, 313(1): 296–307.
- [11] Julian, Ruiz – Saenz R, Jairo, et al. Molecular and *in vitro* characterization of field isolates of bovine herpesvirus – 1 [J]. *Virologica Sinica*, 2012, 27(1): 26–37.

(上接第 185 页)

- [2] Salpeter S R, Walsh J M, Ormiston T M, et al. Meta – analysis: effect of hormone – replacement therapy on components of the metabolic syndrome in postmenopausal women [J]. *Diabetes Obesity & Metabolism*, 2006, 8(5): 538–554.
- [3] 杜贵永. 绝经后妇女血清雌二醇浓度与血脂水平的关系[J]. *中外医疗*, 2017(5): 31–33.
- [4] 陆江, 朱道仙, 刘静, 等. 绝育手术对雌性 Beagle 犬血脂代谢及抗氧化能力的影响[J]. *江苏农业科学*, 2012, 40(2): 179–181.
- [5] 张珊, 郭俊霞, 陈文. 牛磺酸影响胆固醇代谢的研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2014(7): 1985–1989.

- [6] Crujeiras A B, Carreira M C, Cabia B, et al. Leptin resistance in obesity: an epigenetic landscape [J]. *Life Sciences*, 2015 (140): 57–63.
- [7] Sah S P, Singh B, Choudhary S A. Animal models of insulin resistance: a review [J]. *Pharmacological Reports*, 2016, 68(6): 1165–1177.
- [8] 王瑞峰, 王小兵. 血清 TNF –  $\alpha$  与 IL – 6 检测在非酒精性脂肪肝诊断中的意义[J]. *川北医学院学报*, 2017(5): 698–700.
- [9] 崔红旺, 孟志斌, 王挺锐, 等. 雌激素缺乏上调 TNF –  $\alpha$  促发卵巢切除大鼠骨髓细胞程序性坏死[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2017(11): 1431–1437.