

日本脑炎病毒 E 基因与流感病毒 HA 基因的串联表达及应用*

郑其升¹, 杨耀武², 张晓勇¹, 周斌¹, 曹瑞兵¹, 李鹏^{1,3}, 陈德胜¹, 陈溥言^{1**}

(1. 南京农业大学农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室, 江苏南京 210095; 2. 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所, 北京 100052; 3. 河北省畜牧兽医总站, 河北保定 071000)

Coexpression for E Gene of Japanese Encephalitis Virus and HA Gene Epitopes of

Human Influenza Virus and the Application for the Expression Product

ZHENG Qi-sheng¹, YANG Yao-wu², ZHANG Xiao-yong¹, ZHOU Bin¹, CAO Rui-bing¹,
LI Peng^{1,3}, CHEN De-sheng¹, CHEN Pu-yan^{1**}

(1. Key Laboratory of Animal Disease Diagnosis and Immunology, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Institute for Viral Disease Control and Prevention, China CDC, Beijing 100052, China; 3. Animal Husband and Veterinary Station of Hebei Province, Baoding 071000, China)

Abstract : Using a pair of specific primers designed according to the nucleotide sequence of *Japanese encephalitis virus* and Hameoagglutinin of *Human influenza virus* from GenBank, the gene of JEV E protein's main antigenic domain including the sequence of *Human influenza virus ha* gene was amplified with PCR method. The PCR product was successively cloned into pET-32a (+) vector to get a prokaryotic expression plasmid pET-EHA. After the positive plasmid was transformed into the host cell BL21 (DE3), the target gene was successfully expressed in the form of inclusion bodies when induced with IPTG. Western-blotting analysis proved the recombinant protein has good reactivity ability against JEV antibodies. The Latex Agglutination Test (LAT) method for the detection of JEV antibodies was established with the purified recombinant protein. The result indicated that LAT was a simple, rapid, sensitive, specific, inexpensive method which is suitable for detecting antibodies against JEV in serum and serological survey of JE.

Key words : *Japanese Encephalitis Virus* (JEV); Envelope protein; HA; LAT

摘要: 根据 GenBank 公布的日本脑炎病毒 (*Japanese Encephalitis Virus*, JEV) SA14-14-2 株的核酸序列和人流感病毒的血凝素基因 (*ha*) 序列, 设计一对特异性引物, 用 PCR 方法扩增编码 JEV 囊膜蛋白主要抗原域基因, 其中含 *ha* 基因主要核苷酸序列。将 PCR 产物定向克隆入原核表达载体 pET-32a (+), 构建原核表达载体 pET-EHA。阳性质粒转化 BL21 (DE3) 宿主菌, 经 IPTG 诱导获得表达, 重组蛋白以包涵体的形式存在。Western-blot 分析表明表达产物具有良好的免疫学活性。利用纯化的表达产物与流感病毒血凝素单抗及乳胶建立了诊断日本脑炎病毒抗体水平的乳胶凝集试验。结果表明乳胶凝集方法具有简便快速、敏感性高、特异性强、价格低廉、可现场检测等优点, 是一种适合基层兽医单位用于日本脑炎病毒抗体水平检测的新方法。

关键词: 日本脑炎病毒; 囊膜蛋白; HA 表位; 乳胶凝集

中图分类号: R373 文献标识码: A 文章编号: 1003-5125(2005)01-0011-05

日本脑炎是由日本脑炎病毒 (*Japanese Encephalitis Virus*, JEV) 侵害中枢神经系统引起

的急性人畜共患传染病。近年来随着全球气候的变暖, 日本脑炎病例呈上升趋势。在动物中, 猪感染

收稿日期: 2004-06-31, 修回日期: 2004-10-18

* 基金项目: 国家“863”高技术发展计划资助项目 (2001AA240912)

作者简介: 郑其升 (1979-), 硕士研究生, 从事畜禽传染病诊断与防制方面的研究。

** 通讯作者: 陈溥言 (1942-) 教授, 从事动物分子病毒学及免疫学方面的研究。

Corresponding author. Tel: 025-84396028, Fax: 025-84396335; E-mail: aid@njau.edu.cn

JEV 最普遍,它与蚊形成了蚊-猪循环传播模式,并对病毒起放大器作用。此病引起妊娠母猪流产、死胎;公猪发生睾丸炎;仔猪因脑炎死亡,给养猪业发展带来重大的经济损失。常用的检测方法耗时费力,不能做早期诊断^[1],而且其抗原来自于经浓缩、纯化的完整的病毒。获得该抗原存在的问题是:完整病毒不易生产、纯化、成本较高,且存在感染性和容易散毒,在应用中存在局限性。以大肠杆菌表达的重组蛋白作为诊断抗原没有感染性、成本低廉,基因工程菌株可以发酵培养,进行大规模的工业化生产。国内外许多学者的研究表明:E 蛋白是日本脑炎患者血清 IgG 识别的主要蛋白,在诊断中具有重要意义^[4]。本研究将日本脑炎病毒的囊膜蛋白主要抗原域基因(*E*)与人流感病毒血凝素基因(*ha*)串联表达,表达产物中的血凝素(HA)可与 HA 单抗特异性结合,并在此基础上建立了检测日本脑炎病毒抗体水平的乳胶凝集诊断方法。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒、试剂与血清

重组质粒 pUC19-E 为本室构建,系将 JEV SA14-14-2 株完整的囊膜蛋白基因克隆于 pUC19 中;大肠杆菌 DH5、BL21 及原核表达载体 pET-32a(+) 为本室保存;医用乳胶购自上海市临床检验中心;pMD18-T 载体、T₄ DNA 连接酶、rTaq DNA 聚合酶、限制性内切酶 *Eco*RI、*Hind*III 为大连宝生物工程有限公司产品;DNA 凝胶回收试剂盒为上海华舜生物工程有限公司产品;DAB 显色试剂盒购自武汉博士德生物技术有限公司;人流感病毒 HA 腹水单抗为本组保存;日本脑炎病毒、猪瘟病毒、猪呼吸与繁殖障碍综合征病毒、猪细小病毒、猪伪狂犬病病毒、猪圆环病毒阳性血清和日本脑炎病毒阴性血清均为本室保存;待检血清 112 份,分别来自于江苏、上海、山东、安徽、湖北等地有繁殖障碍症状的养猪场;日本脑炎血凝和血凝抑制试验(HA/ HI) 诊断试剂,由云南流行病学防治研究所研制;间接 ELISA 试剂按文献^[11]制备。

1.2 引物设计

参照 GenBank 公布的 JEV SA-14-14-2 株及人流感病毒血凝素基因的核酸序列,自行设计并由大连宝生物工程有限公司合成。为了便于基因的克隆及表达载体的构建等后续工作,在上、下游引物 5 端分别加入 *Eco*RI 和 *Hind*III 位点(引物中划线部分)。

上游引物 P1: 5'-TAAGGATCCACCATGGGCT-

CACCA TCA GTA GTTCCA

GA TTCACACCTGAAA TGTA GGCTGA-3

下游引物 P2: 5'-CGGAA GCTT GAA GACCCCTC-
CAATA GA-3

1.3 JEV E 基因及人流感病毒 HA 基因的扩增及序列测定

利用引物 P1、P2 以重组质粒 pUC19-E 为模板扩增 JEV E 基因,PCR 条件为 94 5 min, 94 1min, 53 1 min, 72 1min, 35 个循环, 72 10min。用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物,按胶回收试剂盒说明进行回收。PCR 产物克隆入 pMD18-T 载体,挑取单个菌落培养,小量法提取质粒用 *Eco*RI、*Hind*III 酶切鉴定,阳性克隆命名为 pMD-EHA 送交大连宝生物工程有限公司测序,测序结果用 DNAstar 分析软件与 GenBank 公布的序列进行分析。

1.4 重组表达载体 pET-EHA 的构建

从 pMD-EHA 中用 *Eco*RI、*Hind*III 双酶切获得 EHA 片段,克隆入 pET-32a(+),连接产物转化大肠杆菌 BL21 感受态细胞,涂布含 Amp (50μg/mL) 的 LB 琼脂平板,置 37 温箱培养 18h,挑取单个菌落,接种于含 Amp (50μg/mL) 的 LB 液体培养基振荡培养后提取质粒,用 *Eco*R、*Hind* 双酶切鉴定,阳性克隆命名为 pET-EHA。

1.5 pET-EHA 的诱导表达、纯化及反应原性鉴定

将鉴定为阳性的 pET-EHA/BL21 细菌培养至 OD₆₀₀ 达到 0.5 时加入 IPTG,使其终浓度达到 1.0 mmol/L,30 诱导 4h,取出 1.0mL 诱导后的细菌,12 000r/min 离心 30s,弃上清,沉淀重悬于 100μL 1×SDS-PAGE 凝胶电泳上样缓冲液中,100 变性 5min,进行 SDS-PAGE 电泳;重组蛋白的纯化按照 His Bind Kit 说明书进行;Western-blot 分析按文献^[5]介绍方法进行。

1.6 乳胶的预处理及乳胶抗原的致敏

按文献^[6,7]介绍方法进行乳胶致敏前处理,将 HA 腹水单抗原用 pH7.2 的 PBS 做 1◇20 稀释,取 0.2μL 缓慢加入 1mL 到 1% 乳胶悬液中,于 56 水浴中致敏 2h,随后在室温下作用 4h,加入 0.1% 的叠氮钠置于 4 保存备用。将串联表达产物做 1◇100 稀释(抗原含量达 500 μg/mL),与已经致敏的乳胶等体积混合均匀,于 37 作用 4h 后置于 4 保存。

1.7 乳胶凝集试验的操作程序

1.7.1 定性试验:滴加致敏乳胶抗原及血清各 25μL 于玻片上,用牙签混匀,摇动 1~2min,在黑

色背景下判断结果。

1.7.2 定量试验:先将血清在微量反应板上倍比稀释,随后各加乳胶抗原一滴,如上操作,以出现阳性的最高稀释倍数作为血清乳胶凝集效价。

1.8 乳胶抗原质量的鉴定

1.8.1 乳胶抗原的特异性和灵敏度鉴定:将制备的乳胶抗原分别与生理盐水、PBS(pH7.2)做凝集试验,以鉴定乳胶抗原有无自凝性;将乳胶抗原与倍比稀释的猪伪狂犬病病毒、猪瘟病毒、猪细小病毒、猪圆环病毒、猪呼吸与繁殖障碍综合征病毒的阳性血清及日本脑炎病毒的阴性血清做凝集试验,以鉴定凝集试验的特异性;将日本脑炎病毒的阳性血清从 1◇5 开始,按定量试验的程序做凝集试验,以确定乳胶凝集试验的灵敏度。

1.8.2 乳胶抗原保存期及凝集试验重复性的鉴定:将制备的乳胶抗原存放于 4℃,每隔 1 月取出与日本脑炎病毒阳性血清做凝集试验,以确定乳胶抗原的保存期;用同一批抗原对同一份日本脑炎病毒阳性血清检测 3 次,以鉴定凝集试验的批内重复性,利用不同批次制备的抗原对同一份阳性血清检测 3 次,比较试验结果,以鉴定凝集试验的批间重复性。

1.9 乳胶凝集试验与间接 ELISA 方法、间接血凝试验方法的比较

对实验室送检的 112 份血清样本同时用 HA/HI、间接 ELISA 和 LAT (定性检测) 进行检测,每份样品检测 3 次,结果取平均值,比较三者的检测结果。

2 结果

2.1 重组表达载体的双酶切鉴定

重组质粒 pET-EHA 双酶切产物电泳后(图 1),在紫外光灯下出现两个片段,其中小片段与目的基因片段大小相符(1100bp),表明表达载体已构建成功。

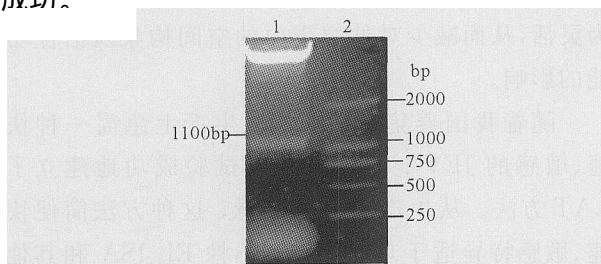


图 1 重组质粒 pET-EHA 的鉴定

Fig. 1 Identification of recombinant plasmid pET-EHA

1, Recombinant plasmid pET-EHA digested by EcoRI and HindIII; 2, DNA marker.

2.2 表达产物的 SDS-PAGE

重组质粒 pET-EHA 转化大肠杆菌 BL21 感受态细胞,经 IPTG 诱导后,获得高效表达。如图 2 显示,在 62kDa(箭头所指处)处出现一条明显的蛋白条带,大小与预期结果相符,其它三个对照均无该蛋白带。

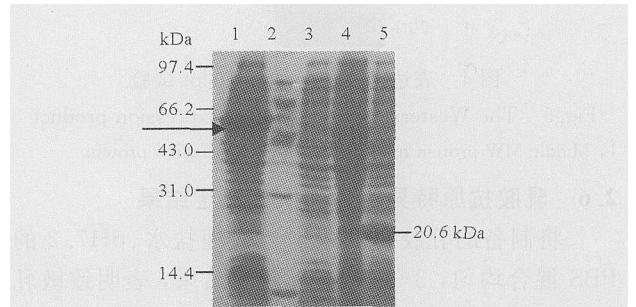


图 2 表达产物的 SDS-PAGE 电泳分析

Fig. 2 Analysis of the expressed product by SDS-PAGE 1, pET-EHA/BL21 induced with IPTG; 2, Middle MW protein marker; 3, pET-EHA/BL21 untreated with IPTG; 4, BL21 induced with IPTG; 5, pET-32a(+)/BL21 induced with IPTG.

2.3 表达产物的可溶性分析

SDS-PAGE 结果表明,菌体经超声波破碎、离心后,上清中仅有少许目的条带,而沉淀在 62 kDa 处出现一条明显的特异性蛋白条带(图 3 箭头所指处),表明表达产物大部分以包涵体形式存在。

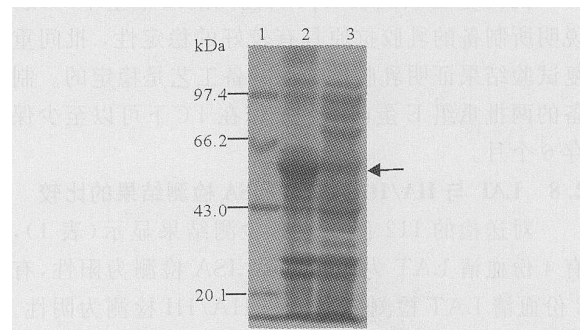


图 3 表达产物的可溶性分析

Fig. 3 Analysis of the solubility of the expressed product by SDS-PAGE

1, Middle MW protein marker; 2, pET-EHA (inclusion body); 3, pET-EHA (supernatant).

2.4 重组蛋白纯化效果分析

用 6 倍体积 1×Elute Buffer 洗脱目的蛋白,分管收集后。取少量进行 SDS-PAGE,结果在 62kDa 处出现一条清晰的特异性蛋白条带,杂蛋白很少(图未显示)说明表达产物的纯化良好。

2.5 Western-blot 结果

对表达产物进行 Western-blot 分析,结果与 JEV 特异性抗血清呈现阳性反应(图 4),且无非特异性条带出现,证明表达产物反应原性较好。

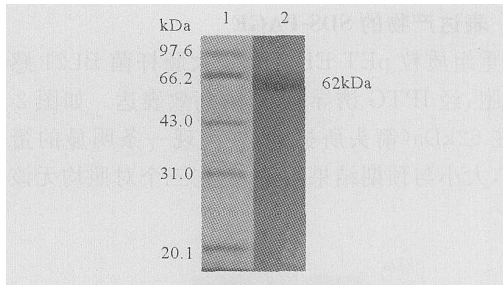


图 4 表达产物的 Western blot 试验

Fig. 5 The Western blotting for the expression product 1, Middle MW protein marker; 2, pET-EHA fusion protein.

2.6 乳胶抗原特异性和灵敏性鉴定结果

将制备的乳胶抗原分别与生理盐水、pH 7.2 的 PBS 混合均匀, 3~5 min 后观察结果, 表明致敏乳胶抗原不与 PBS、生理盐水发生凝集, 证明乳胶抗原无自凝性。将乳胶抗原分别与猪伪狂犬病毒、猪瘟病毒、猪细小病毒、猪繁殖与呼吸障碍综合征病毒、猪圆环病毒阳性血清及日本脑炎病毒阴性血清做乳胶凝集试验, 结果均不发生凝集, 说明乳胶凝集试验特异性良好; 灵敏度试验结果显示, 日本脑炎病毒阳性血清做 1/80 倍稀释时仍能产生明显的凝集现象。

2.7 乳胶抗原重复性试验和保质期试验结果

批内重复试验表明两次检测的结果基本一致, 说明所制备的乳胶抗原具有较好的稳定性, 批间重复试验结果证明乳胶抗原的制备工艺是稳定的。制备的两批重组 E 蛋白乳胶抗原在 4℃ 下可以至少保存 6 个月。

2.8 LAT 与 HA/ HI 间接 ELISA 检测结果的比较

对送检的 112 份血清的检测结果显示 (表 1), 有 4 份血清 LAT 为阴性而 ELISA 检测为阳性, 有 2 份血清 LAT 检测为阳性而 HA/ HI 检测为阴性。LAT 与 ELISA 检测结果差异相对较大, 推测这可能与两种方法所检测的抗体类型和所能检出的抗体滴度不同所致。经统计学分析, LAT 方法与 ELISA 方法和 HA/ HI 方法的检测符合率分别为 96% 和 98%, 着证明此三种方法在定性检测上所得的结果基本一致。

表 1 胶乳凝集与血凝和血凝抑制、间接 ELISA 检测结果的比较

Method	Positive Number	Negative Number	Positive coincidence	Negative coincidence	Total coincidence
LAT	82	30			
ELISA	86	26	95 %	87 %	96 %
HA/ HI	80	32	98 %	94 %	98 %

3 讨论

本研究通过将人流感病毒的血凝素抗原表位基因与 JEV E 蛋白基因串联插入到 pET-32a(+) 载体中, 使 E 蛋白和 HA 抗原表位一起表达, 利用 HA 单抗先和乳胶颗粒共同孵育作用一段时间, 使 HA 单抗先结合在乳胶颗粒上, 形成乳胶 - HA 单抗复合物。此时, 再将重组的 E 蛋白结合到复合体上, 形成乳胶 - HA 单抗 - 重组 E 蛋白三元复合物。三元复合物通过重组 E 蛋白和抗日本脑炎病毒抗体的反应, 在肉眼上产生可以见到的凝集反应, 从而用来检测血清中的抗日本脑炎病毒抗体水平^[10]。

重组蛋白和日本脑炎病毒抗血清的反应能力好坏是重组蛋白是否具有应用前景的重要依据。Western-blot 试验结果显示了表达蛋白与日本脑炎抗血清结合的能力。该蛋白在经过 SDS-PAGE, 再经电转移到 NC 膜上后, 已经处于变性状态, 仍与抗乙脑血清具有很强的反应能力, 这说明表达蛋白具有良好的反应原性。

利用基因工程技术在 *E. coli* 中高水平表达外源基因, 从而获得大量异源蛋白, 是现代分子生物学的巨大成就之一。pET-32a(+) 是 Novagen 公司的一个新型融合表达载体, 具有表达效率高, 产物易于纯化等优点。pET-32a(+) 采用迄今最强的 T7 lac 原核启动子, 使外源基因在表达时置于 T7 噬菌体转录和翻译信号控制之下, 且 ATG 起始密码子上游有一个典型的 SD 序列: GAA GGA, 使翻译效率大大提高。pET-32a(+) 编码了 N 端 6 个连续的 His-Tag 前导肽作为亲和臂 (Affinity-Tag), 使所得的重组蛋白能通过金属离子 (Ni^{2+}) 配体亲和层析快速纯化, 而且 His-Tag 通过柔性氨基酸 (Ser-Ser-Gly) 组成的连接区与外源蛋白相连, 由于这段柔性连接区使 His6 融合片段与外源蛋白之间的连接更为灵活, 从而减少对外源蛋白的空间构象及活性功能的影响。

随着我国养猪业的发展, 生产上急需一种快速、敏感的 JEV 诊断试剂, 本试验成功地建立了 LAT 方法。从生产的角度来看, 这种方法简便快速、敏感特异适于现场检测, 不像 ELISA 和其他技术操作烦琐、技术要求高、费时、需要特殊设备等限制因素^[8]。其实验检出率与 ELISA 基本一致, 表现出较高的敏感性和特异性, 因此 LAT 在生产

中具有广阔的推广应用前景。

参考文献

- [1] 殷 震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 第二版, 北京: 科学出版社, 1997. 633-641.
- [2] Patarapotikul J, Pothipunya S, Wanotayan R, *et al.* Western blot analysis of antigens specifically recognized by natural immune response of patients with Japanese encephalitis infection. *Southeast Asian [J]. Trop Med Public Health*, 1993, 24: 269-302.
- [3] Kolaskar A S, Urmila K K. Predication of the three -dimensional structural and mapping of conformational epitopes of envelope glycoprotein of Japanese encephalitis virus [J]. *Virology*, 1999, 177: 470-476.
- [4] Cecilia D, Gould E A. Nucleotide changes responsible for loss of neuroinvasiveness in Japanese encephalitis virus neutralization resistant Mutants[J]. *Virology*, 1991, 81: 70-77.
- [5] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 金冬雁, 黎孟枫, 译. 分子克隆实验指南 [M]. 第二版. 北京: 科学出版社. 1989. 49 ~ 56, 845 ~ 848, 876 ~ 887.
- [6] 杜念兴. 兽医免疫学[M]. 北京: 农业出版社, 1996, 230-243.
- [7] 王重庆. 分子免疫学基础[M]. 北京: 北京大学出版社, 1998, 186-253.
- [8] 王 忠, 杨汉春, 郭 鑫, 等. 重组 M 蛋白-乳胶凝集试验检测 PRRS 病毒血清抗体的研究[J]. *中国兽医杂志*. 2002, 38: 11-13.
- [9] 许立华, 苏小运, 王 玲, 等. 猪繁殖与呼吸障碍综合征病毒 N 基因和禽流感病毒 HA 基因的联合表达及应用[J]. *中国病毒学*, 2003, 18: 548-552 .
- [10] 苏小运, 缪德年, 许立华, 等. 猪瘟疫化弱毒 E2A/D 区的高效表达和蛋白的纯化及应用[J]. *中国病毒学*. 2003, 18: 164-168.
- [11] 杨耀武. 日本脑炎病毒 E 蛋白基因的原核高效表达及表达产物提取[D]. 南京: 南京农业大学, 2002, 134-142.