

猪瘟病毒 E0 蛋白的原核表达及其间接 ELISA 方法的建立*

陈振海², 王 琴^{1**}, 范学政¹, 宁宜宝¹, 王在时¹, 沈青春¹, 夏 春²

(1. 中国兽医药品监察所, 国家猪瘟参考实验室, 北京 100081; 2. 中国农业大学动物医学院, 北京 100094)

Prokaryotic Expression of CSFV E0 Protein and Development of an Indirect ELISA for Detection of Antibody

CHEN Zhen-hai², WANG Qin^{1**}, FAN Xue-zheng¹, NING Yi-bao¹, WANG Zai-shi¹, SHEN Qing-chun¹, XIA Chun²

(1. China Institute of Veterinary Drug Control, the National Classical Swine Fever Reference Laboratory, Beijing 100081, China; 2. College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: E0 protein of *Classical swine fever virus* (CSFV) is of discriminatory feature in serum diagnostic test for developing CSFV Marker vaccine. It is also expected to be useful for monitoring CSFV prevalence, evaluating immunization efficacy and establishing immunization procedure. To obtain a large amount of E0 protein in vitro, the *Hog cholera lapinised virus* (HCLV) E0 gene was cloned into prokaryotic expression plasmids, pGEX4T, pET30 and pMAL-p2X respectively. After the recombinant expression plasmids were transformed into BL21, BL21 (DE3), TB1, BL21-codonplus (DE3)-RP respectively, the expression product were analyzed by investigating the IPTG induction concentration, incubation temperature and time. The results revealed that the E0 protein could be expressed in the systems, namely pGEX4T/BL21-codonplus (DE3)-RP and pMAL-p2X/BL21-codonplus (DE3)-RP as inclusion bodies accounted for 15% and 30% of whole bacterial protein. Two methods, B-per reagent and triton-urine, were applied to wash the inclusion body and both access to the relatively good effect. After the protein refolding of denaturant inclusion body following dialysis, we got the pure recombinant GST-E0 protein by GST affinity columns. Using the purified protein as coating antigen, an indirect ELISA is developed for detecting the anti-E0 antibody in the CSFV serum by exploring the concentration of coating antigen and dilution degree of serum, which will provide a good fundament for development of CSFV antibody surveillance kit.

Key words: *Hog cholera lapinised virus* (HCLV); E0 gene; Prokaryotic expression; Inclusion body; Indirect ELISA

摘要: 表达猪瘟病毒保护性抗原 E0 蛋白用以建立猪瘟抗体诊断方法, 在标记疫苗 (Marker vaccine) 的研制和应用上具有重要的血清学鉴别功能, 对于监测猪瘟病毒的流行情况和疫苗免疫情况及制定免疫程序具有重要作用。将猪瘟兔化弱毒株 (HCLV) E0 基因分别插入原核表达质粒 pGEX4T, pET30, pMAL-p2X 中, 并分别以 BL21 和 BL21-codonplus (DE3)-RP, BL21 (DE3) 和 BL21-codonplus (DE3)-RP, TB1 和 BL21-codonplus (DE3)-RP 为表达菌株。通过摸索 IPTG 诱导浓度, 诱导温度, 菌体收获时间, 确定 E0 基因能在 pGEX4T/BL21-codonplus (DE3)-RP 和 pMAL-p2X/BL21-codonplus (DE3)-RP 中获得高效表达, 表达产量分别占菌体总蛋白的 15% 和 30%, 表达的重组蛋白主要为包涵体形式。分别采用 B-per 试剂和超声波裂解配以曲通尿素对包涵体进行洗涤两种方法在 pGEX 表达系中取得了较好的效果。使用分步透析法对变性的包涵体进行复性, 将复性蛋白过 GST 亲和层析柱得到纯

收稿日期: 2004-09-16, 修回日期: 2004-10-26

* 基金项目: 国家“十五”科技攻关子专题 (2002BA514A-18-2); 国家自然科学基金项目 (30270984)

作者简介: 陈振海 (1975 -), 男, 江西南昌籍, 硕士, 主要从事兽医微生物学及免疫学研究。

** 通讯作者. Corresponding author. Tel: 010-62158844-3265, E-mail: wangqin551@sohu.com

化的 GST-E0 融合蛋白。以 GST-E0 融合蛋白为诊断抗原,通过摸索抗原包被浓度,抗体血清稀释倍数初步建立了用间接 ELISA 检测猪瘟血清 E0 抗体的方法,为进一步开发猪瘟抗体检测试剂盒奠定基础。

关键词:猪瘟免疫弱毒,E0 基因,原核表达,包涵体,间接 ELISA

中图分类号:S852.65 文献标识码:A 文章编号:1003-5125(2005)02-0135-05

猪瘟是由猪瘟病毒(*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 12.3kb。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两个主要保护性抗原,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]。

检测病毒特异的抗体对于监测猪瘟的流行情况和疫苗免疫情况及制定免疫程序具有重要作用。用全病毒或重组抗原建立 ELISA 方法来检测猪瘟抗体已有不少成功的报道,这些 ELISA 方法分别是采用间接、竞争、阻断等形式而建立的^[3-6]。检测病毒单个抗原蛋白的抗体,在标记疫苗(Marker vaccine)的研制和应用上具有重要的血清学鉴别功能^[7]。国际上均把是否产生 E0 蛋白抗体作为是否曾经感染猪瘟病毒的依据^[8,9],当然这与 E0 蛋白是次要保护蛋白有关。不过到目前为止,作为诊断抗原的 E0 蛋白都是由昆虫细胞表达的或直接以合成肽的形式而产生的,成本较高,且产量方面也受到一定限制。在本研究中我们用原核表达系统来表达猪瘟免疫弱毒株(*Hog cholera lapinised virus*, HCLV) E0 蛋白并初步建立检测 E0 抗体的间接 ELISA 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。

1 材料与方法

1.1 实验材料

大肠杆菌 DH5 和 TB1、质粒 pET30 和 pMAL-p2X 由本室保存;质粒 pGEX4T1、菌株 BL21、BL21(DE3)由北京大学聂玉春博士惠赠;菌株 BL21-codon plus(DE3)-RP 由清华大学徐彦辉博士惠赠;限制性内切酶为 Promega 公司产品;质粒 DNA 提取与纯化试剂盒、辣根过氧化物酶(HRP)标记的兔抗猪 IgG 二抗和兔抗山羊 IgG 二抗、DNA Marker DL2000 为 Takara 公司产品;DNA/

HindIII + EcoRI 为鼎国生物技术公司产品;低分子量蛋白 Marker 为中科院上海生化所产品;脱脂奶粉为 Difco 公司产品;GST 融合蛋白纯化试剂盒、GST 抗体(山羊 IgG)为 Pharmacia 公司产品;还原型和氧化型谷胱甘肽(GSH、GSSG)购自华美生物工程公司;B-PERTM 细菌蛋白抽提试剂为 Pierce 公司产品。

1.2 PCR 产物的扩增与纯化

为便于直接将 PCR 产物定向克隆进表达载体并使阅读框正确,在 E0 基因的两端分别设计带酶切位点的引物 PE01、PE02、PE02-2。将 PE01/PE02(用于 pGEX4T1 和 pET30)和 PE01/PE02-2(用于 pMAL-p2X)为引物对,以本室先前测序正确的 pGEMT-E0 质粒为模板分别扩增的 PCR 产物电泳,用试剂盒从琼脂糖中纯化回收 E0 DNA 片段。

PE01: 5' CGGGA TCCA TGGCCGAAAA TAT AACTCA3

PE02: 5' CGGAA TTCTCAACA GTAA GCG A TAG3

PE02-2: 5' CGCTGCA GTCAACA GTAA GCG A TAG3

1.3 重组表达质粒的构建

将上述提纯的 E0 DNA 片段与质粒 DNA 分别进行双酶切后 4 连接过夜。将连接产物转化 DH5 感受态细胞,挑取单菌落,用 PCR 扩增检测 E0 基因,阳性菌株送公司测序。将测序正确的重组质粒和空载体对照质粒转化相应的表达菌株。

1.4 诱导表达

将重组表达菌株接种抗性 LB 液体培养基,37 振荡培养至 OD₆₀₀ 值约 0.4 时,加入不同浓度 IPTG 进行诱导,3~4h 后 5 000r/min 离心收集菌体,用 B-PERTM 试剂或者参照文献^[10] 方法裂解菌体。12 000r/min 离心,10min 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。

1.5 Western blotting 分析

样品经 SDS-PAGE 电泳后用 Bio-Rad 公司的电转仪将蛋白转至 NC 膜上。一抗为 Anti-GST 抗体,二抗为兔抗山羊 IgG HRP 抗体。操作方法见文献^[10]。

1.6 包涵体的洗涤、溶解与复性

1.6.1 包涵体的洗涤与溶解:采用两种方法对包涵体进行洗涤,将洗涤后包涵体蛋白溶解于 8mol/L 尿素中,12 000r/min 离心 20min,收集上清。1)用 Tris 缓冲盐溶液、溶菌酶和 PMSF 悬浮菌体,-70 冻融一次,超声波裂解。13 000r/min 离心 10min,弃上清。分别用 1% Triton 和 2mol/L 尿素各洗涤两次。2)离心收集 40mL 细菌培养液沉淀。将细胞重悬于 5mL B-PER™ 试剂中,室温下温和振荡 20min。12 000r/min 离心 15min。加入 5mL B-PER™ 重悬菌液。加入 100mL 溶菌酶(10mg/mL),混匀后室温作用 5~10min。加入 15mL 10 ddH₂O 稀释的 B-PER™ 试剂涡悬混匀后,振荡 5~10min。离心将沉淀重悬于 20mL 1:10 稀释的 B-PER™ 试剂中,振荡 5-10min。重复洗涤三次。

1.6.2 包涵体的复性:将待复性蛋白样品置于透析袋内,4 搅拌透析过夜。复性液含 2mmol/L 还原型谷胱甘肽,0.2mmol/L 氧化型谷胱甘肽,1mmol/L PMSF,尿素浓度分别为 4mol/L,2mol/L。最后再用 PBS 缓冲液搅拌透析过夜 2 次。将复性样品用 GST 融合蛋白纯化试剂盒亲和纯化 GST-E0 重组蛋白并测定纯化的 GST 融合蛋白样品浓度。

1.7 间接 ELISA 方法检测猪瘟 E0 抗体

将猪瘟石门毒阳性血清、兔化弱毒阳性血清、SPF 猪阴性血清进行倍比稀释,与进行倍比稀释已知浓度的 GST-E0 重组蛋白做 ELISA 方阵测定,确定最佳抗原包被浓度和血清稀释倍数。二抗为兔抗猪 IgG HRP 酶标抗体,用邻苯二胺底物液(OPD)显色,酶联读数仪测 OD₄₉₂ 值。

2 结果

2.1 重组质粒的构建

以 PE01/PE02(用于 pGEX4T 和 pET30)和 PE01/PE02-2(用于 pMAL-p2X)为引物对,通过 PCR 分别扩增出了 E0 基因片段,双酶切后定向插入了三种表达质粒,分别命名为 pGEX4T-E0、pET30-E0、pMAL-p2X-E0(图 1),并将重组质粒分别转化至相应表达菌中。

2.2 重组蛋白的诱导表达和分析

表达菌株生长到轻微浑浊时,加入 IPTG 进行诱导。收集菌体后变性,SDS-PAGE 显示 pGEX4T-E0/BL21-codonplus(DE3)-RP 和 pMAL-p2X-E0/BL21-codonplus(DE3)-RP 在预期的分子量大小处即 53kDa 和 68kDa,出现大量表达的特异蛋白条带,表达量分别占菌体总蛋白的 15%和 30%,而对

照空载体质粒仅表达 N 端标签,大小为 GST 27kDa 和 MBP 42kDa,pET30-E0 组未见特异表达带。裂解菌体,分别取上清和沉淀电泳,结果显示 pGEX4T-E0 组(图 2)和 pMAL-p2X-E0(图 3)组上清中均未见明显目的蛋白,而沉淀中则很明显。进一步通过降低诱导温度和 IPTG 诱导浓度,减少诱导时间等,分析上清均未见明显目的蛋白。因此,E0 蛋白在两种表达系统中均以包涵体形式存在。

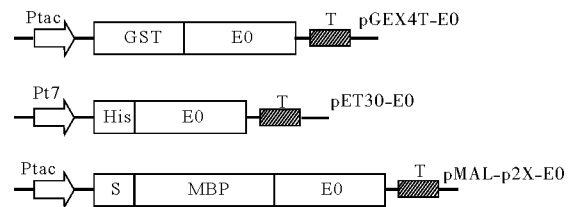


图 1 重组原核表达质粒的构建

Fig. 1 Construction of prokaryotic expression plasmids P, Promotor; T, Terminator.

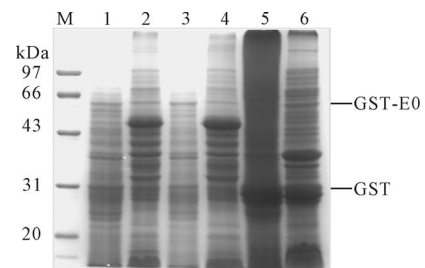


图 2 pGEX4T-E0 在 BL21-codonplus(DE3)-RP 中的可溶性表达分析

Fig. 2 Soluble expression analysis of pGEX4T-E0 in the BL21-Codon plus(DE3)-RP

M, Marker; 1 and 2, pGEX4T-E0, IPTG 0.1mmol/L, supernatant and pellet; 3 and 4, pGEX4T-E0, IPTG 0.5mmol/L, supernatant and pellet; 5 and 6, pGEX4T, IPTG 0.5mmol/L, supernatant and pellet.

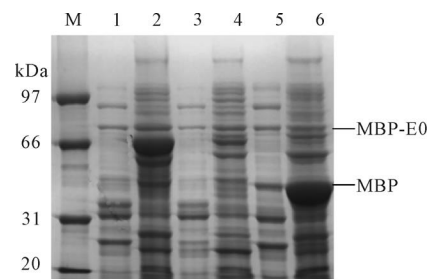


图 3 MBP-E0 可溶性分析

Fig. 3 Soluble expression analysis of MBP-E0

M, Marker; 1 and 2, pMAL-p2X-E0, IPTG 0.1mmol/L, supernatant and pellet; 3 and 4, pMAL-p2X-E0, IPTG 0.5mmol/L, supernatant and pellet; 5 and 6, pMAL-p2X, IPTG 0.5mmol/L, supernatant and pellet.

2.3 Western blotting 分析

以抗 GST 抗体为一抗,兔抗山羊 IgG HRP 抗体为二抗,进行免疫印迹检测 GST 融合蛋白。结果

显示,重组菌株在 53kDa 处出现显色深的目的带,而对照菌株在 27kDa GST 蛋白处出现一优势主带。因此,pGEX4 T-E0 组表达的特异蛋白带就是 GST-E0 重组蛋白。

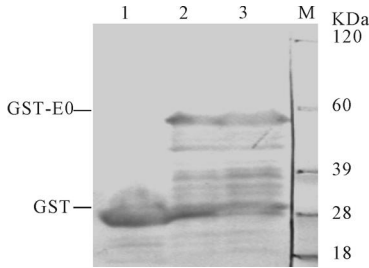


图 4 重组蛋白的 Western blotting 检测

Fig. 4 Western blotting analysis of recombinant protein

1, pGEX4T, IPTG 0.5mmol/L; 2, pGEX4 T-E0, IPTG 0.1mmol/L; 3, pGEX4 T-E0, IPTG 0.5mmol/L; M, Marker.

2.4 表达蛋白的纯化

2.4.1 包涵体的洗涤与溶解: 采用 B-per 试剂和超声波裂解菌体配以曲通尿素两种方法洗涤包涵体,用 8mol/L 尿素溶解包涵体后电泳,结果显示与裂解液沉淀全蛋白图谱相比均取得了较好效果(见图 5,B-per 试剂洗涤 A,曲通尿素洗涤 B),去除了大部分杂蛋白。根据 BSA 标准曲线,测得包涵体溶解液浓度分别为 0.268mg/mL 和 1.357mg/mL。

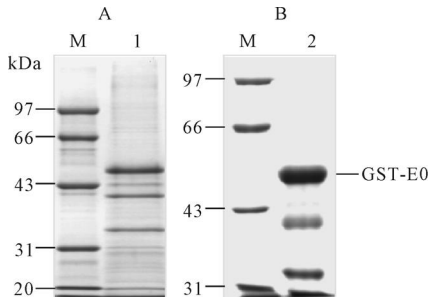


图 5 包涵体洗涤效果

Fig. 5 Washing effect of inclusion body

M, Marker; 1-2, Washing the expression product of pGEX4 T-E0 by B-per reagent (A) or Triton X-100 and urine (B).

2.4.2 亲和纯化: 将蛋白复性样品多次过一个 GST 亲和柱,用洗脱液洗下亲和蛋白,电泳结果如图所示(见图 6,B-per 试剂洗涤 A,曲通尿素洗涤 B),在 53kDa 处出现目的蛋白带。结果证明成功制备了高纯度的 GST-E0 蛋白,根据 BSA 标准曲线,测得纯化样品浓度分别为 0.587mg/mL 和 1.367mg/mL。

2.5 间接 ELISA 方法诊断猪瘟血清 E0 抗体

用 ELISA 方阵法倍比稀释猪瘟 SM 株、HCLV 株阳性血清、SPF 阴性血清和重组 E0 蛋白诊断抗原,邻苯二胺显色,在 492nm 波长下测 OD 值,随着

重组 GST-E0 蛋白抗原包被量的减小和血清稀释倍数的增大,测得的 OD 值不断减小。当重组 GST-E0 蛋白抗原包被量为 100ng,血清稀释倍数为 200 倍时,猪瘟阳性血清 SM 和 HCLV 两血清的 OD_{492} 值在 1.0 左右,且 SPF 阴性值较低,P/N 值分别达到 4.794 和 4.463。一般酶联检测仪在 OD 值为 1.0 时误差最小,反应最敏感。因此通过 ELISA 方阵确定最佳抗原包被量为 100ng,血清稀释倍数为 200 倍。这为进一步开发诊断猪瘟病毒 E0 抗体的试剂盒研究工作奠定了基础。

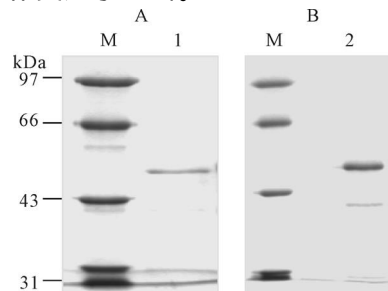


图 6 GST-E0 亲和纯化

Fig. 6 GST-E0 affinity purification

M, Marker; 1-2, Washing the expression product of pGEX4 T-E0 by B-per reagent (A) or Triton X-100 and urine (B).

3 讨论

我们的实验结果证实猪瘟兔化弱毒 E0 基因能以融合蛋白的形式在大肠杆菌表达系中进行高效表达,表达的 GST-E0 和 MBP-E0 融合蛋白均以包涵体形式存在。通过常规的变性复性方法和亲和纯化方法,可以得到高纯度的融合蛋白。利用重组表达的 E0 融合蛋白可以研究其抗原表位,免疫原性,制备多抗、单抗及开发诊断试剂等。本研究利用亲和纯化的重组 GST-E0 蛋白作为诊断抗原,通过 ELISA 方阵确定了用间接 ELISA 方法检测猪瘟 E0 抗体的两个参数,即抗原包被量和血清稀释倍数,为进一步开发诊断猪瘟抗体的检测试剂盒和研制标记疫苗所需的配套诊断试剂奠定了基础。

实验过程中我们采用了两种包涵体洗涤方法均取得了较好的效果。一种是 Pierce 公司开发的 B-per 试剂,操作方便然而价格昂贵,主要适用于初步分析表达蛋白是否可溶。另一种是常规方法,用曲通尿素洗涤。在后一种方法中,洗涤液的 pH 和尿素浓度很重要。pH 越高,包涵体的洗涤效果越好,只要包涵体不溶解或目的蛋白不被化学修饰。低的 pH (pH 3-6) 通常是无效的,因为大多数大肠杆菌的杂蛋白在这个 pH 值范围内都是不溶的^[11]。正因为包涵体内的每种蛋白都有其自身的溶解特性,所

以没有一种洗涤液能适用于所有包涵体。我们选择了不同的 pH 尿素,在 pH 9.0、10.0 和 4 mol/L 尿素时包涵体大部分已溶解,因此把参数定为 pH 8.0、尿素 2 mol/L,结果证明取得了较好的效果。

本研究还表明,E0 蛋白只有与较大分子量的融合蛋白串联时才能成功表达,这与 E0 蛋白本身在大肠杆菌中表达因为没被糖基化而不稳定^[12],还是因为其 N 端部分的碱基序列不利于蛋白质的起始翻译,而需要先翻译一部分利于在大肠杆菌中表达的融合肽才能起始 E0 蛋白的翻译,这些都还有待进一步研究。

刘平黄等利用原核表达的重组 N 蛋白建立间接 ELISA 方法的研究中,将包涵体形式表达的重组蛋白洗涤干净后直接包被酶标板取得了很好的效果,而没有将包涵体进行复性和亲和纯化,大大降低诊断试剂盒的成本^[13]。我们在后期包涵体的洗涤过程中也取得了相当好的洗涤效果,下一步在这方面我们也将进行尝试。

参考文献

- [1] Van Rijn P A, Van Gennip H G P, Moormann R J M. An experimental marker vaccine and accompanying serological diagnostic test both based on envelope glycoprotein E2 of classical swine fever (CSFV) [J]. *Vaccine*, 1999, 17: 433-440.
- [2] Hulst M M, Panote F E, Hoekman A, *et al.* Inactivation of the RNase activity of glycoprotein E^{ms} of classical swine fever virus results in a cytopathogenic virus [J]. *J Virol*, 1998, 72: 151-157.
- [3] Have P. Detection of antibodies against swine fever virus by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [J]. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 1984, 25: 462-465.
- [4] Moser C, Ruggli N, Tratschin J D, *et al.* Detection of antibodies against classical swine fever virus in swine sera by indirect ELISA using recombinant envelope glycoprotein E2 [J]. *Vet Microbiol*, 1996, 51: 41-53.
- [5] Müller A, Depner R K, Liess B. Evaluation of a gp55 (E2) recombinant-based ELISA for the detection of antibodies induced by classical swine fever virus [J]. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 1996, 103: 449-488.
- [6] Colijn E C, Bloemraad M, Wensvert G. An improved ELISA for the detection of serum antibodies directed against classical swine fever virus [J]. *Vet Microbiol*, 1997, 59: 15-25.
- [7] van Oirschot J T. Diva vaccine that reduce virus transmission [J]. *J Biotechnol*, 2001, 73: 195-205.
- [8] Widjoatmodjo M N, van Gennip H G P, Bouma A, *et al.* Classical swine fever virus Erns deletion mutants: trans-complementation and potential use as nontransmissible modified, live-attenuated marker vaccines [J]. *J Virol*, 2000, 74: 2973-2980.
- [9] Ahrens U, Kaden V, Drexler C, *et al.* Efficacy of the classical swine fever (CSF) marker vaccine *Porcilis Pesti* in pregnant sows [J]. *Vet Microbiol*, 2000, 77: 83-97.
- [10] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory Manual* [M], 2nd, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. pp888-897.
- [11] Roe S. *Protein purification application (Second Edition): A Practical Approach* [M]. Oxford university press, 2001, 19-27.
- [12] Windisch J M, Schneider R, Stark R, *et al.* RNase of classical swine fever virus: Biochemical characterization and inhibition by virus-neutralizing monoclonal antibodies [J]. *J Virol*, 1996, 70: 352-358.
- [13] 刘平黄. 利用 PRRS 病毒重组 N 蛋白建立 ELISA 诊断试剂盒的研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2001.