

猪细小病毒 VP2 蛋白的主要抗原表位基因的原核表达及检测应用*

李 斐¹, 曹瑞兵¹, 周 斌¹, 郑其升¹, 魏建超¹, 李 鹏¹, 任雪枫², 陈溥言^{1**}

(1. 南京农业大学农业部畜禽疫病诊断与免疫重点开放实验室, 江苏南京 210095; 2. 江苏省畜牧兽医总站, 江苏南京 210095)

Prokaryotic Expression and Detective Application of the Main Antigenic Region of VP₂ of Protein Porcine Parvovirus

LI Fei¹, CAO Rui-bing¹, ZHOU Bin¹, ZHENG Qi-sheng¹, WEI Jian-chao¹, LI Peng¹,
REN Xue-feng², CHEN Pu-yan^{1**}

(1. Key laboratory of Animal Disease Diagnosis and Immunology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;
2. Animal Husband and Veterinary Station of Jiangsu Province, Nanjing 210095, China)

Abstract: The recombinant plasmid pET-VP₂ was transformed into BL21 competent cells and expressed in high level after induced with 1.0mmol/l IPTG. The expressed product was purified with His·Bind chromatography after being proved by Western blot, and was used as an antigen to establish indirect ELISA for detecting antibodies against PPV. The optional working circumstances for the ELISA (antigen concentration 3.5μg/mL; serum dilution 1/40) were tried out with chess titration. The positive criterion of test serum of this ELISA is OD_{490nm} > 0.51, the OD₄₉₀ ratio of the tested serum to the negative serum is higher than 2.1.

Key words: Porcine parvovirus (PPV); Main antigenic region of VP₂ protein; Prokaryotic expression; Indirect ELISA

摘要: 将构建好的重组质粒 pET-VP₂ 转化宿主菌 BL21, 利用 IPTG(1mmol/L) 诱导实现了 pET-VP₂ 蛋白主要抗原域 VP₂ 融合蛋白的高效表达。通过 Western blot 检测证明表达的重组蛋白具有良好的免疫学活性。表达产物经 HisBind 层析柱纯化后作为诊断抗原初步建立了检测 PPV 抗体的间接 ELISA 方法。结果表明: 抗原的最佳包被浓度为 3.5μg/mL, 血清的最佳稀释度为 1/40, 待检血清阳性标准初步定为 OD₄₉₀ > 0.51, 且待检血清的 OD₄₉₀ 值与阴性血清的 OD₄₉₀ 值的比值大于 2.1。

关键词: 猪细小病毒; VP₂ 蛋白的主要抗原域; 原核表达; 间接 ELISA

中图分类号: R373 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5125(2005)05-0507-04

猪细小病毒(Porcine parvovirus, PPV)是一自主型细小病毒(Autonomous parvovirus),它是引起母猪畸胎的主要因素之一^[1]。通常,头胎怀孕母猪感染了 PPV 之后,可引起繁殖障碍,主要症状为流产、不孕、产死胎、木乃伊胎等,给养猪业带来重大的经济损失。我国于 20 世纪 80 年代初在不同地区分离到 PPV^[8],并查明其为造成母猪繁殖障碍主要病原体之一^[8]。近年来本病的广泛流行和危害已被世界各国重视。近 30 年以来,病毒的病原学、分子生物学、诊断方法和疫苗防制等方面的研究都已取得

了一定进展^[12]。目前国内外的主要诊断方法有血凝和血凝抑制(HA/HI)、荧光抗体技术(FAT)、酶联免疫吸附实验(ELISA)、单克隆抗体技术^[11]、核酸探针(NAP)^[9]检测技术及多聚酶链式反应(PCR)^[5,10]等,但多数血清学诊断方法不仅费时费力或价格昂贵,而且多以全病毒为抗原,存在很大的散毒危险。另外病毒的提纯一直以来都没很好的解决方案,给抗原的制备带来困难,因此迫切需要一种简便、迅速、便于推广使用的早期诊断试剂盒,以尽快检出阳性猪,确保养猪业发展。ELISA 方法作

收稿日期:2005-03-21,修回日期:2005-05-18

* 基金项目:国家“863”高技术发展计划资助项目(2001AA249012)

作者简介:李 斐(1980-),女,山东青岛籍,在读硕士研究生,研究方向为畜禽传染病的诊断与防治。

** 通讯作者. Correspondence Author, Tel: 025-84396028; E-mail: aid@njau.edu.cn

为一种快速、高效、特异性强、灵敏度高的诊断方法,在早期诊断方面具有很好的前景。本研究利用构建好的含猪细小病毒 VP₂ 蛋白主要抗原表位基因核表达载体 PET-VP₂ 在大肠杆菌中表达,并以纯化的表达产物为抗原,初步建立 PPV 抗体的间接 ELISA 检测方法。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株与血清

重组质粒 PET-VP₂ 由本室李霆构建^[4],系将猪细小病毒 VP₂ 蛋白的主要抗原表位基因 VP₂ 克隆入原核表达载体 pET-32a(+) 的 *Bam*H 和 *Xho* 之间;宿主菌 BL21 为本组保存;PPV 阴、阳性血清为本室保存;猪呼吸与繁殖障碍综合征病毒阳性血清、猪圆环病毒阳性血清、猪日本脑炎病毒阳性血清、猪瘟病毒阳性血清均为本室保存;待检的 70 份血清来自上海、江苏、安徽、山东、浙江等地。

1.2 试剂

DAB 显色试剂盒购自南京生工生物工程有限公司;辣根过氧化物酶标记的羊抗猪二抗为晶美公司产品;TMB 购自青岛海泰公司;His·Bind Purification Kit 为 Novagen 公司产品,其余试剂为分析纯。

1.3 重组质粒的表达及其检测

挑取已经鉴定为阳性的含 PET-VP₂ 的 BL21 菌液按 1:50 转入含 Amp(50 μg/mL) 的 LB 液体培养基中,37℃ 培养至 OD 值 0.5~0.6 间加入 1 mmol/L 终浓度的 IPTG 于 37℃ 诱导培养 5h,并设 PET-32a/BL21 对照。取样品菌液 1 mL,室温 12000 r/min 离心 1 min,收集菌体,用 100 μL 1×SDS-PAGE 上样缓冲液重悬,沸水浴 5 min。取样 20 μL 进行 SDS-PAGE 电泳。将表达产物按照 His·Bind Purification Kit 说明书进行纯化后并对其进行 Western-blot 检测以确定其抗原性,方法按照文献所介绍的进行^[2]。

1.4 间接 ELISA 检测方法的建立

按照文献方法进行间接 ELISA 方阵测定^[3]。

2 结果

2.1 表达产物的 SDS-PAGE

转化大肠杆菌 BL21 的重组质粒 PET-VP₂ 在 IPTG 诱导下获得了高效表达。经 SDS-PAGE 电泳分析,重组菌比对照菌明显多出一条约 45 kDa 的条带,大小与预期的相符(如图 1)。

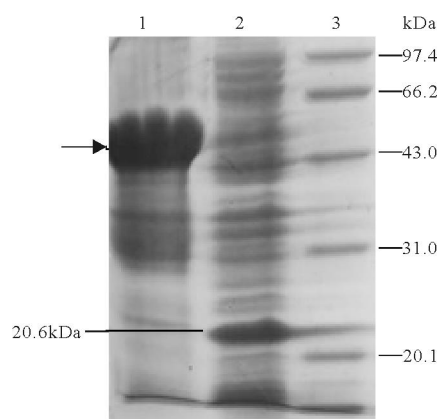


图 1 IPTG 诱导表达 VP₂ 蛋白的 SDS-PAGE 分析
Fig. 1 SDS-PAGE of induced expression of VP₂ protein by IPTG

1, PET-VP₂ /BL21 induction; 2, pET-32a(+)/BL21 induction

2.2 Western-blot 检测

通过对表达产物进行 Western-blot 分析,结果与猪特异性抗血清呈阳性反应(如图 2),且无非特异性条带出现,证明表达产物具有良好的免疫学活性。

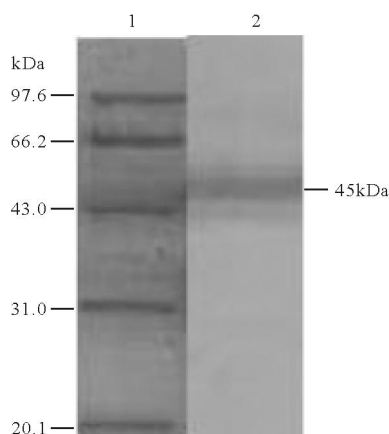


图 2 重组 VP₂ 蛋白的 Western-blot 检测
Fig. 2 Western-blot analysis of the recombinant VP₂ protein

1, MW protein marker; 2, PET-VP₂ fusion protein Analysis by Western-blot.

2.3 表达产物纯化后的 SDS-PAGE

将表达产物过 His·Bind 柱,收集最后洗脱液(1×Elute Buffer) 30 mL,即为纯化后的目的蛋白。取纯化的蛋白样品 50 μL 与 50 μL 2×SDS-PAGE 上样缓冲液混匀,沸水浴 5 min,取 20 μL 进行 SDS-PAGE,结果显示在 45 kDa 处有一清晰的特异性条带(如图 3),证明纯化结果良好。

2.4 间接 ELISA 方阵试验

通过蛋白质定量仪测得重组 VP₂ 蛋白的浓度为 0.285 mg/mL,以 OPD/H₂O₂ 作为显色底物进行

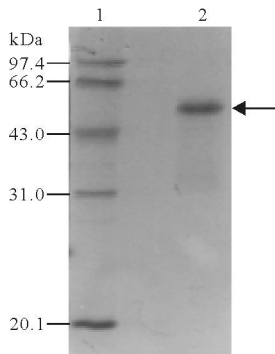


图3 重组 VP₂ 蛋白经 His·Bind 柱纯化结果

Fig.3 The recombinant VP₂ protein purified by His·Bind Kit

1, Middle MW protein marker; 2, The purified recombinant VP₂ protein.

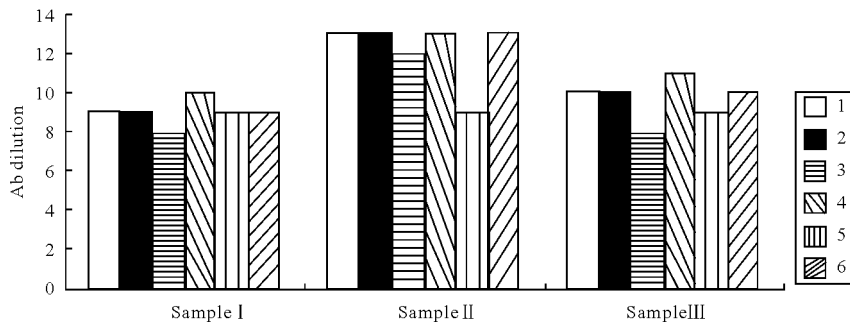


图4 一抗、二抗不同作用时间对 ELISA 结果的影响

Fig.4 Effects of different reaction time of serum sample(First antibody) and anti-swine IgG on ELISA

1, First antibody for 30min, Second antibody for 30min; 2, First antibody 30min, Second antibody 60min; 3, First antibody 60min, Second antibody 30min; 4, First antibody 60min, Second antibody 60min; 5, First antibody 120min, Second antibody 30min; 6, First antibody 120min, Second antibody 60min

用以初步确定的条件,对 20 份临床阴性血清进行 OD_{490} 值的测定,发现其 OD_{490} 的均值范围 0.45 ± 0.06 。一般来说,待检血清与标准阴性血清的 $P/N > 2.1$ 时可判为阳性。因此,确定判定标准为 $S/N > 2.1$ 且血清样品 $OD_{490} > 0.51$,为阳性。

2.6 特异性实验

用本方法对猪呼吸与繁殖障碍综合征病毒阳性血清、猪圆环病毒阳性血清、猪日本脑炎阳性血清、猪瘟阳性血清进行检测,每份血清重复检测 3 孔。据 OD_{490} 值的结果可判定均为阴性,说明 VP₂ 蛋白不与上述血清发生交叉反应,具有良好的特异性。

2.7 敏感性实验

对临床的 70 份血清分别用自行建立的间接 ELISA 方法和间接血凝试验进行检测,结果显示,两者阳性检出率分别为 85.7% 和 78.5%,符合率达 90.8% (数据略),由此可见,间接 ELISA 的检出率高于间接血凝的检出率。

3 讨论

目前,我国对 PPV 的血清学诊断主要应用 HA

间接 ELISA 方阵滴定。在终止反应后,取阳性血清 OD_{490} 为 1.0、阴性血清 OD_{490} 值 0.2 所在的孔的抗原浓度和血清浓度为最佳稀释度。结果显示抗原最佳包被浓度为 $1/80$,即相应的抗原包被量为 $3.5 \mu\text{g/mL}$,而待检血清最佳稀释倍数为 $1/40$ 。

2.4 一抗和二抗作用时间的优化

将一抗、二抗按照不同时间梯度相互作用,一共设置 6 个组合,对 4 份血清进行抗体水平测定,可得出结果如下图(图 4)所示。

可见不同一抗、二抗作用时间对显色结果影响并不太大。因此,选取一抗、二抗最佳作用时间 60min。

2.5 判定标准的确定

和 HI 试验,但由于该方法需要豚鼠的红细胞,而且血清要求通过高岭土的处理,从而限制了它的应用。因此寻找一种简便易行的,同样具有较高特异性和敏感性的检测方法是多数学者努力的方向。目前,已有许多 PPV 抗体检测方法,但大都是以全病毒为抗原的,一方面存在着潜在的散毒危险,另一方面在病毒的纯化方面有相当高的技术和工艺要求,因此很难推广。

VP₂ 蛋白是 PPV 的主要中和抗原,本试验在 PPV 分子流行病学的基础上,应用病毒核衣壳蛋白(VP₂ 蛋白)即 VP₂ 蛋白主要抗原表位基因 VP₂ 基因^[7]的表达产物在免疫学方面的功能和作用,将其在原核表达载体上进行高效表达,并利用纯化后表达产物作为包被抗原,初步建立了检测 PPV 血清抗体的 ELISA 方法。由于该蛋白可诱导机体产生较高水平和持续时间较长的抗体,因此具有较高的诊断意义。

在本研究中,在对已构建的重组载体转入表达宿主 BL21 中,用已确定的最佳培养条件、IPTG 最

佳诱导浓度,实现了对 PPV VP₂ 蛋白的高效融合表达。本研究通过选用 PET-32a(+) 为表达载体,该载体的目的基因插入位点的上游为硫氧还原蛋白基因序列(TrxA),其产物硫氧还原蛋白作为融合伴侣的基因融合表达系统,适用于在大肠杆菌中表达高产量的蛋白。多数情况下,该融合表达产物可正确折叠并表现出生物活性。使用 His⁶-Bind 树脂亲和层柱对重组表达产物进行纯化,用纯化产物作为包被抗原初步建立了重组 VP₂ 蛋白-ELISA 方法。对诱导产物进行可溶性鉴定后,证实重组 VP₂ 蛋白以包涵体形式存在。该形式能很好的避免细胞内蛋白水解酶的作用和有利于目标蛋白的分离纯化。但在用变性剂处理包涵体以及复性过程中存在使目标蛋白失去生物学活性的可能,且使制备成本升高。本研究结果显示,经变性复性处理后的重组 VP₂ 蛋白仍具有良好的反应原性。

本研究中,对该方法的检测结果的判定标准作出了初步确定。应用本方法对国内一些地区收集到的血清进行检测,并与间接血凝实验检测结果相比较,与后者的检出符合率达 90.8%。从检测结果也可以得出,由于包被抗原的较强的反应原性,同一批血清中用本方法检测的阳性率要高于后者,用以检测 PPV 的血清抗体是完全可行的。

间接 ELISA 作为一种检测 PPV 的方法,与其他血清学方法相比缩短了检测时间,大大提高了检测效率,增强了其实用性,而且对实验要求不高,无需无菌操作,适合于实验室血清学诊断、海关检疫及大规模疫病调查^[6]。该方法灵敏、安全、可靠、特异

性强,作为一种检测 PPV 抗体的快速简便的方法有很大发展前景。

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.
- [2] J. 萨姆布鲁克, E. F. 弗里奇等著. 金冬雁,黎孟枫,等译. 1996, 分子克隆实验指南[M]. 第二版,北京:科学出版社.
- [3] 巴德山. 现代免疫学实验技术[M]. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1998. 158-162.
- [4] 任雪枫,胡志华,等. 猪细小病毒 VP2 蛋白主要抗原表位基因真核表达载体的构建及表达[J],中国病毒学,2004,19(6): 636-638.
- [5] Roic B. Haemagglutination inhibition test and ELISA in the diagnosis of porcine parvovirus infection[J]. Veterinarskidan; 1988; Rovini, Croatia 13~17 October 1998
- [6] Westenbrink F. An enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to porcine[J]. J Mr Mith, 1989, 23(2): 169-178
- [7] 刘艳华,范伟兴,等. 猪细小病毒 SD-68 株 VP2 基因的克隆及序列分析[J]. 中国病毒学,2004,19(6):568-571.
- [8] 潘雪珠. 猪细小病毒 S-1 株的分离和鉴定[J]. 上海畜牧兽医通讯,1983,(1):1-3.
- [9] Oraveerakul K, Soocchoi C, Molitor T W. Detection of porcine parvovirus using nonradioactive nucleic acid hybridization [J]. Vet Diagn Inreat, 1990, (2): 85-91.
- [10] Molitor T W, Oraveerakul K, Zhang Q Q, et al, Parvovirus [J]. Virol Method, 1991, 32: 201-211.
- [11] 俞太尉,邱惠深. 猪细小病毒单克隆抗体的研制及初步应用[J]. 中国畜禽传染病,1993,(1): 55-57.
- [12] 侯喜林,甘孟侯,余丽音,等. 应用地高辛探针诊断猪细小病毒病[J]. 中国兽医科技,1998,28(10): 11-13.