

鸡贫血病毒衣壳蛋白的表达纯化及多克隆抗体制备

王晓艳¹, 文刚², 高玉龙¹, 高宏雷¹, 王笑梅^{1**}

(1. 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 黑龙江哈尔滨 150001; 2. 哈尔滨工业大学海洋学院, 山东威海 264209)

Expression and Purification of the Capsid Protein of Chicken Anemia

Virus and Preparation of Antibody

WANG Xiao-yan¹, WEN Gang², GAO Yu-long¹, GAO Hong-lei¹, WANG Xiao-mei^{1**}

(1. Harbin Veterinary Research Institute, CAAS, Harbin 150001, China; 2. Harbin Institute of Technology, Weihai 264209, China)

Abstract: The coding region of capsid protein gene from Chicken Anemia virus(CAV) was amplified from pPro-VP1 by PCR and cloned into pET-30a (+). *E. coli* BL21 (DE3) were transformed by the recombinant plasmid pET30-VP1. Analysis by SDS-PAGE and Western blot showed that the target gene was expressed successfully in the form of inclusion body when induced with IPTG. The protein was then purified by Ni²⁺-affinity chromatography and used to immunize female Balb/c mice. After three rounds of immunizations, antiserum was collected and used to detect the specificity of recombinant protein. ELISA showed that the titer of antiserum was above 1:12800. Moreover, antiserum reacted specifically with purified recombinant protein in Western blot. This study laid a foundation for the development of CAV diagnostic kit and vaccine.

Key words: Chicken anemia virus; Capsid protein; Expression; Purification; Polyclonal antibody

摘要: 利用 PCR 技术, 以 pPro-VP1 为模板扩增得到鸡贫血病毒的衣壳蛋白基因 (VP1), 以 T4 多聚核苷酸激酶磷酸化处理、纯化后, 克隆至表达载体 pET-30a(+) 中, 从而构建了原核表达质粒 pET30-VP1。将 pET30-VP1 转化至感受态细胞 *E. coli* BL21(DE3) 中, 经 IPTG 诱导后, SDS-PAGE 分析, 可见约 45kDa 的目的蛋白获得表达。该蛋白经亲和层析纯化后, 免疫 6-8w 的雌性 Balb/c 鼠, 三次免疫后, 采血分离血清, 制得抗 VP1 的多克隆血清。以纯化的 VP1 为包被抗原, 用 ELISA 方法检测, 制备的血清效价达 12800× 以上。以 Western blot 检测, 该血清可与目的蛋白发生特异性反应, 证明其具有良好的免疫原性。VP1 蛋白的成功表达及其多克隆抗体的制备为进一步研究 VP1 蛋白的功能及开展 CAV 疫苗及诊断制剂的研制奠定了基础。

关键词: 鸡贫血病毒; 衣壳蛋白; 表达; 纯化; 多克隆抗体

中图分类号: Q7

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2006)05-0477-04

鸡贫血病毒 (*Chicken anemia virus*, CAV) 为圆环病毒科 (*Circoviridae*) 环形病毒属 (*Gyrovirus*) 的代表成员, 该病毒由日本学者 Yuasa 于 1979 年首次分离到, 我国于 1992 年由崔现兰等人分离到^[1]。

病毒感染 2 周龄以内的雏鸡可引起 10%~15% 的死亡率, 感染成年鸡引起严重的免疫抑制, 从而给养禽业带来巨大经济损失。

CAV 为无囊膜病毒, 其基因组主要编码三种蛋

收稿日期: 2006-03-20, 修回日期: 2006-06-30

作者简介: 王晓艳 (1977-), 女, 博士研究生, 从事动物病毒分子生物学与分子免疫学研究。

** 通讯作者: 王笑梅 (1962-), 女, 博士, 研究员, 主要从事禽免疫抑制病研究。

Corresponding author: Tel: 0451-85935047, E-mail: xmw@hvri.ac.cn

白,即VP1、VP2和VP3。其中VP1为病毒的主要衣壳蛋白,存在于高度纯化的病毒颗粒上,其N末端含大量碱性氨基酸,与组蛋白有一定相似性^[2],作为病毒的主要结构蛋白,VP1在刺激机体产生中和抗体方面起重要作用,但是Koch等人^[3]研究发现VP1只有与VP2共同表达时,才可以刺激机体产生中和抗体,由于在纯化的病毒颗粒中只有VP1,未发现VP2的存在,所以人们推测VP1的表位以构象型表位为主,而VP2只是辅助VP1折叠形成正确的构象。利用现有的具有中和活性的单克隆抗体进行的免疫印迹实验也证明了VP1的中和性表位为构象依赖性的。VP1作为病毒的主要结构蛋白有更多的功能需要研究,例如其在病毒侵入机体及机体的抗病毒感染过程中的作用等,但迄今为止,对于VP1这些功能进行研究的报道不多。

本文在大肠杆菌中表达了CAV的衣壳蛋白,为进一步研究其功能奠定了基础。利用亲和层析法对表达蛋白进行纯化后免疫小鼠,制备了高效价的抗血清,该血清可与重组蛋白发生特异性反应,高效价抗血清的制备为VP1蛋白功能研究提供了基础材料。同时,重组蛋白可用作抗原检测鸡群感染后的抗体^[4-5],制备的抗血清也可用作免疫荧光实验的抗体来检测抗原^[6],从而对该病进行诊断。

1 材料和方法

1.1 实验材料

pPro-VP1质粒由本实验室构建^[7],原核表达载体pET-30a(+),大肠杆菌DH5 α 、BL21(DE3)由本实验室保存。限制性内切酶和各种工具酶购自大连宝生物工程有限公司;GeneRulerTM 1kb DNA Ladder、PageRulerTM Prestained Protein Ladder购自Fermentas MBI公司;核酸凝胶回收试剂盒购自上海华舜公司;PCR产物回收试剂盒购自Omega公司;HisTrapTM kit购自Amersham Biosciences公司;弗氏完全佐剂及弗氏不完全佐剂均购自Sigma公司;HRP-兔抗鸡IgG酶标结合物、HRP-兔抗鼠IgG酶标结合物购自Sigma公司。

1.2 引物设计与合成

根据GenBank公布的CAV的标准毒株Cux-1的VP1基因序列,利用Oligo6.0软件,设计引物如下:上游引物(1BU):5'-CGGggtaccATGACTATCCGCTACCAAGGA-3',其5'端设计有Kpn I位点;下游引物(1BL)5'-CGGggtaccTTTCAGG

GCTGCGTC-3',其5'端设计有Kpn I位点,其中上游引物起始于vp1基因的202bp处,扩增片段长度为1149bp,引物由大连宝生物公司合成。

1.3 目的基因的获取

以pPro-VP1质粒为模板,用引物1BU、1BL以两步法进行扩增,扩增后产物用琼脂糖凝胶试剂盒回收。回收后的产物用T4多聚核苷酸激酶进行末端磷酸化,反应结束后用PCR产物回收试剂盒回收。

1.4 重组表达质粒pET30-VP1的构建和鉴定

将EcoRV酶切后的载体pET-30a(+)回收纯化后,用小牛肠碱性磷酸酶进行去磷酸化处理,反应结束后用PCR产物回收试剂盒直接回收。将纯化后的pET-30a(+)与1.3处理的vp1进行连接,然后转化E.coli DH5 α 感受态细胞。挑取单个菌落培养,提取质粒,做PCR鉴定,阳性克隆进一步用BamH I、Hind III酶切,鉴定其正向还是反向连接,阳性克隆送上海生工生物工程技术有限公司进一步测序确证,从而鉴定阳性克隆,获得重组表达质粒pET30-VP1。

1.5 重组蛋白的诱导表达和检测

分别将空载体pET-30a(+)和重组质粒pET30-VP1分别转化大肠杆菌感受态BL21(DE3)细胞,按常规方法用异丙基硫代- β -D-半乳糖苷(IPTG)诱导表达,诱导后菌体用PBS洗涤、重悬后进行超声波破碎,分别进行SDS-PAGE和Western blot分析,检测表达产物。

1.6 重组蛋白的纯化

阳性菌株大量诱导表达后,收集菌体,进行超声波。超声波后的沉淀分别用1%的TritonX-100及0.5 mol/L的NaCl洗涤两次。洗涤后的包涵体沉淀用含8 mol/L尿素的PBS于室温溶解30min,于4 $^{\circ}$ C,以12 000 r/min离心10min,上清用0.45 μ m的滤器过滤,然后用His TrapTM试剂盒进行纯化,操作按说明书进行。

1.7 抗VP1蛋白多克隆抗体的制备和鉴定

将纯化的目的蛋白经紫外分光光度计定量后,与等量弗氏完全佐剂乳化后,背部皮下多点注射8周龄的Balb/c鼠,50 μ g/只,以后每隔2周用等量弗氏不完全佐剂乳化,加强免疫2次,剂量同首免,第3次免疫后10d采血,分离血清。

以方阵实验数据为依据,将纯化的VP1蛋白

以最佳浓度包被聚苯乙烯板, 4℃过夜, 用加有 0.05%Tween-20 的 PBST 洗涤后, 5%脱脂乳于 37℃ 封闭 2h, 洗涤后加入倍比稀释的血清, 37℃作用 1h, 洗涤后加入 HRP-兔抗鼠 IgG, 37℃作用 45min, 洗涤后用 OPD 进行显色, 最后, 用 2mol/L H₂SO₄ 终止反应, 测定其效价。

纯化的 VP1 蛋白经 SDS-PAGE 电泳后, 电转移到 PVDF 膜上 (操作按说明书进行)。PVDF 膜干燥后, 以免疫鼠血清为一抗, 以 HRP-兔抗鼠 IgG 酶标结合物为二抗, 进行 Western blot 分析, 检测抗体特异性。

2 结果

2.1 表达质粒 pET30-VP1 的构建和鉴定

重组质粒 pET30a-VP1 经 PCR 扩增获得长度为 1150bp 左右的片段, 其大小与目的基因大小相符。该重组质粒用 *Bam*H I、*Hind* III 进行单酶切鉴定, 与预期结果一致 (图 1)。

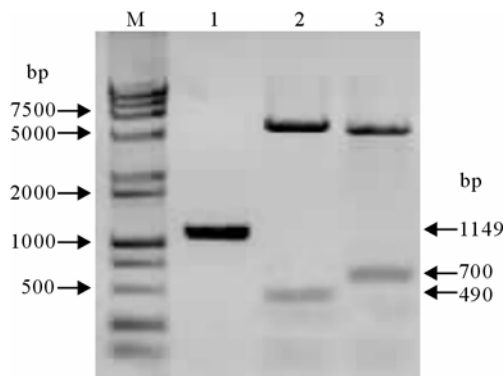


图 1 重组质粒 pET30-VP1 的鉴定

Fig.1 Identification of Recombinant pET30-VP1
M, DL15, 000+DL2, 00; 1, Product of PCR; 2, pET30-VP1/*Bam*HI; 3, pET30-VP1/*Hind*III.

2.2 表达产物的 SDS-PAGE 分析和鉴定

阳性重组质粒转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞, 经 IPTG 诱导后, 发现重组菌在约 45kDa 处出现明显的目的蛋白带, 而对照菌在 45kDa 附近蛋白不明显。将收集的菌液进行超声波破碎, 取破碎后的上清和沉淀分别进行 SDS-PAGE 分析, 结果表明目的蛋白以包涵体形式表达, (见图 2 泳道 4)。

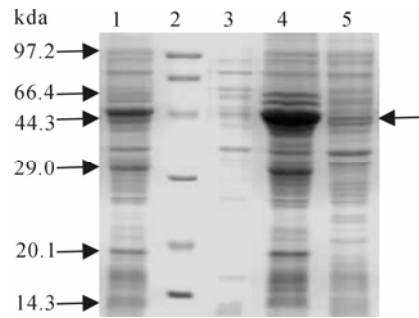


图 2 表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig.2 SDS-PAGE analysis of the expressed VP1 protein 1, pET30a-VP1 induced with IPTG; 2, Protein molecular weight marker (low); 3, the supernatant of pET30a-VP1 induced with IPTG; 4, inclusion body of pET30a-VP1; 5, pET30a induced with IPTG.

表达产物经 SDS-PAGE 电泳后, 转移至 PVDF 膜上, 以鼠抗 6×His 的单克隆抗体为一抗进行 Western blot 分析, 结果显示重组菌在 45kDa 处发现了与 SDS-PAGE 大小一致的目表达 (结果未列出)。

将诱导表达后的菌体经超声波裂解以后, 沉淀用 8mol/L 的尿素溶解, 经镍离子亲和树脂纯化后, 纯化产物进行 SDS-PAGE 分析, 发现了与诱导表达物分子量一致的 45kDa 的目的蛋白 (结果未显示)。

2.3 多克隆抗体效价的测定及其与目的蛋白的 Western blot 分析

将纯化后的 VP1 以 5μg/mL 包被聚苯乙烯板, 进行 ELISA 测定, 血清效价达 1: 12800 以上, 表明该抗原可以诱导小鼠产生良好免疫反应。为了进一步难抗体的特异性, 将纯化的蛋白 Western blot 分析, 结果表明制备的血清可以有效识别纯化抗原, 结果见图。

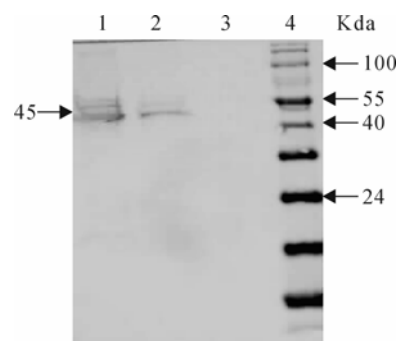


图 3 重组 VP1 的 Western blot 分析

Fig.3 Western blot analysis of recombinant protein 1-2, pET30a-VP1 induced with IPTG; 3, pET30a induced with IPTG; 4, PageRuler™ prestained protein ladder.

3 讨论

CAV 衣壳蛋白 N 端的 67 个氨基酸中含有 24 个精氨酸, 且多数为大肠杆菌的稀有密码子, 给

VP1 全长在细菌中的表达带来一定困难, 所以大部分学者将 VP1 进行了截短表达^[6-7], 但仍保持了 VP1 的生物学功能。本文表达了截短的 VP1 蛋白(删除 N 端的 67 个氨基酸, 约 7.4Kda), 该蛋白删除了 N 端富含碱性氨基酸且具有 DNA 结合活性的 67 个氨基酸, 在不影响体外蛋白表达的情况下, 最大限度的保留了 VP1 蛋白全长, 所以在理论上说其生物学活性要优于同在原核中表达的截短的蛋白^[5-7]。并且该蛋白与 6×His 融合, 毒繁殖能力差等特点, 使得该病的研究更加缓慢。到目前为止, 鸡传染性贫血病的致病机理研究还不很透彻。作为病毒的主要结构蛋白 VP1, 虽有报道说氨基酸的改变可以影响病毒的致病力, 但其在病毒的致病机理方面所起的作用还有待于进一步研究。VP1 蛋白在体外的成功表达, 不仅为开展 CAV 疫苗及诊断试剂的研制奠定了基础, 而且为该蛋白其它功能研究也提供了基础材料。

References

- [1] Cui X L, Xin G X, Wu D L, (崔现兰, 辛桂香, 吴东来) *et al.* Identification of Chicken Infectious Anemia Virus [J]. *Chin Anim Poult Infec Dis (中国畜禽传染病)*, 1992, 6: 3-5.
- [2] Claessens J A J, Schrier C C, Mockett A P A, *et al.* Molecular cloning and sequence analysis of the genome of chicken anaemia agent [J]. *J Gen Virol*, 72: 2003-2006.
- [3] Koch G, van Roozelaar D J, Verschuereen C A J, *et al.* Immunogenic and protective properties of chicken anaemia virus proteins expressed by baculovirus [J]. *Vaccine*, 1995, 13: 763-770.
- [4] Pallister J, Fahey K J, Sheppard M. Cloning and sequencing of VP1 全长在细菌中的表达带来一定困难, 所以大部分学者将 VP1 进行了截短表达^[6-7], 但仍保持了 VP1 的生物学功能。本文表达了截短的 VP1 蛋白(删除 N 端的 67 个氨基酸, 约 7.4Kda), 该蛋白删除了 N 端富含碱性氨基酸且具有 DNA 结合活性的 67 个氨基酸, 在不影响体外蛋白表达的情况下, 最大限度的保留了 VP1 蛋白全长, 所以在理论上说其生物学活性要优于同在原核中表达的截短的蛋白^[5-7]。并且该蛋白与 6×His 融合, 毒繁殖能力差等特点, 使得该病的研究更加缓慢。到目前为止, 鸡传染性贫血病的致病机理研究还不很透彻。作为病毒的主要结构蛋白 VP1, 虽有报道说氨基酸的改变可以影响病毒的致病力, 但其在病毒的致病机理方面所起的作用还有待于进一步研究。VP1 蛋白在体外的成功表达, 不仅为开展 CAV 疫苗及诊断试剂的研制奠定了基础, 而且为该蛋白其它功能研究也提供了基础材料。
- [5] Wang Y, Wang X M, Gao H L, (王 英, 王笑梅, 高宏雷) *et al.* Development of an indirect ELISA assay for detecting chicken infectious anemia virus antibody with recombinant antigen [J]. *Chin Prev Vet Med (中国预防兽医学报)*, 2005, 27: 517-521.
- [6] Liu Y L, Qin A J, Jin W J, (刘岳龙, 秦爱建, 金文杰) *et al.* High expression of Chicken Anaemia Virus VP1 Gene in *E.coli* and Analysis of Its Biological Characteristics [J]. *Chin J Virol (病毒学报)*, 2002, 18: 61-65.
- [7] Wang Y, Wang X M, Gao H L (王 英, 王笑梅, 高宏雷) *et al.* Cloning and expression of the gene encoding chicken infectious anemia virus VP1 C-terminal in *E.coli* [J]. *Chin Prev Vet Med (中国预防兽医学报)*, 2004, 26: 432-435.
- [8] Iwata N, Fujino M, Tuchiya K, *et al.* Development of an Enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant chicken anemia virus proteins expressed in a baculovirus vector system [J]. *Vet Med Sci*, 1998, 60 (2): 175-180.