

猪圆环病毒 2 型 Cap 蛋白的原核表达及其抗原性分析

董林¹, 王艳萍^{1,2}, 王金良¹, 沈志强^{1*}, 谢金文¹

(1. 山东省滨州畜牧兽医研究院, 滨州 256600; 2. 山东绿都安特动物药业有限公司, 滨州 256600)

摘要:根据 GenBank 中登录的 PCV-2 序列,设计 1 对特异性引物,PCR 扩增 PCV-2 去除核定位信号(nuclear localization signal, NLS)的 Cap 蛋白基因,经 *Bam* HI 和 *Xho* I 双酶切后将其插入到表达载体 pEGX-4T-1 多克隆位点,并转化到表达菌株 Rossetta (DM3) 中,采用 IPTG 进行诱导表达,采用 SDS-PAGE 薄层灰度分析表达情况,收集菌体,使用 GST-Protein Purification Kit 亲和层析纯化方法对表达的 GST-Cap 融合蛋白进行纯化,SDS-PAGE 电泳检测纯化效果,Western blot 分析纯化后的重组 Cap 蛋白(rCap)免疫学活性。结果表明,成功克隆了大小为 579 bp 去除核定位信号的 ORF2 基因,成功诱导表达出预期大小 45.3 ku 相一致的 rCap 蛋白,表达量占总菌体的 25%,纯化后的 rCap 蛋白 SDS-PAGE 电泳分析纯度达到 90% 以上,Western blot 分析表明纯化的 rCap 蛋白能与 PCV-2 阳性血清发生特异性反应,具有良好的免疫学活性。

关键词:猪圆环病毒 2 型(PCV2); 原核表达; 抗原性分析

中图分类号: S858.282.65

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2011)01-0055-04

Prokaryotic expression and antigenic analysis of the capsid protein porcine circovirus type 2

DONG Lin¹, WANG Yan-ping^{1,2}, WANG Jin-liang¹, SHEN Zhi-qiang¹, XIE Jin-wen¹

(1. Binzhou Animal Science and Veterinary Medicine Institute, Binzhou 256600;

2. Shandong Lvduante Animal Medicine Co., Ltd, Binzhou 256600)

Abstract: According to the published ORF2 genes sequence of PCV-2 in GenBank, one pair of PCR primers were designed, and the nuclear localization signal (NLS)-defected capsid protein gene(d Cap)of porcine circovirus type 2 (PCV-2)was expressed. Then the PCR product was cloned into pEGX-4T-1vector by *Bam* HI and *Xho* I digestion and a recombinant plasmid named pEGX-4T-1-ORF2 was obtained, which was induced by IPTG. The expressive product was purified by the GST-Protein Purification Kit. The purification effect and the specificity of the purified recombinant capsid proteins were detected respectively by SDS-PAGE and Western blot assay. The results demonstrated that ORF2 gene was successfully cloned, which was 579 bp; the size of rCap protein was 45.3 ku, which was in line with the expected size; there is only one purpose band of 45.3 ku in size with above 90% purity. The results show that the recombinant Cap have been well purified and could react with the polyclonal antibody against PCV-2, and possess good antigenicity.

Key words: porcine circovirus type 2; prokaryotic expression; antigenic analysis

猪圆环病毒 2 型(porcine circovirus type 2, PCV-2)被确认为是导致断奶仔猪多系统衰竭综合征(postweaning multisystemic wasting syndrome, PMWS)的主要病原,并与猪皮炎肾炎综合症、繁殖障碍、A2 型先天性震颤、猪呼吸道综合症及猪增生性和坏死性肺炎等有密切关系^[1]。

PCV-2 基因组大小约为 1.7 kb, 编码 11 个阅读

框(ORF),其中 ORF1、ORF2 为最大的 2 个 ORF,ORF1 编码 PCV 的复制相关蛋白(Rep),PCV-1 和 PCV-2 的 ORF1 同源率高,可引起二者交叉免疫反应^[2]。Mhae 等提出可以利用 PCV-2 ORF2 多肽或完整蛋白作为诊断抗原来建立区别 PCV1 和 PCV2 的鉴别诊断方法^[3]。随后,Truong 等、Nawagitgul 等及 Blahcard 等都先后利用 PCV-2 ORF2 特异性抗

收稿日期: 2009-11-26

基金项目: 山东省自主创新成果转化重大专项计划(2008ZHZX1A1103)资助。

作者简介: 董林,男,研究实习员。

* 通讯作者: 沈志强,男,博士,研究员。E-mail: bzshenzq@163.com。

原建立了相应的鉴别诊断 PCV1 和 PCV2 血清抗体的方法^[4-6]。为了建立以 Cap 蛋白包被抗原的 PCV-2 间接 ELISA 诊断方法,作者对 PCV-2 Cap 基因进行了克隆、表达和纯化,对表达后的融合蛋白用 Western blot 方法进行了免疫学活性分析。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与菌株 含 PCV-2 ORF2 全基因的 pET-32a-ORF2 质粒、DH5 α 感受态细胞、表达菌 Rossetta (DM3) 表达载体 pEGX-4T-1 均由本实验室保存,PCV-2 阳性血清购自美国 IDEXX 公司。

1.1.2 主要试剂 PCR Buffer、dNTP、*Taq* 酶、DL2000 DNA Marker、限制性内切酶 *Bam*HI 和 *Xho*I、T4DNA 连接酶、IPTG、低分子量蛋白质 Marker 均购自大连宝生物工程公司;胰蛋白酶、酵母提取物为 OXID 公司产品;质粒纯化试剂盒、DNA 清洁/PCR 产物清洁试剂盒、DNA 提取试剂盒购自上海生物工程有限公司;硝酸纤维素膜购自 Millipore 公司。

1.2 方法

1.2.1 剔除信号肽原核表达载体的构建 根据 GenBank 中登录的 PCV-2 序列,设计 1 对上下游引物:

P₁:5' -GCGGATCCAATGGCATCTTCAACAC-3'

P₂:5' -CCGCTCGAGTTAAGGGTTAAGTGGG-3'

P₁、P₂ 分别含 *Bam*HI 和 *Xho*I 酶切位点,其理论跨度 579 bp,扩增区域剔除了 N 端核定位信号肽,包含 ORF2 主要抗原表位。扩增目的基因片段,使用 DNA 回收试剂盒回收基因片段,用限制性内切酶 *Bam*HI 和 *Xho*I 同时对获得基因片段和 pEGX-4T-1 载体进行双酶切并回收 DNA。使用 T₄DNA 连接酶将回收的目的基因和 pEGX-4T-1 载体连接构建重组质粒。连接产物转化到 DH5 α 感受态细胞,筛选阳性克隆,提取质粒,进行酶切鉴定和序列测定。

1.2.2 pEGX-4T-1-ORF2 诱导表达及可溶性鉴定 将 pEGX-4T-1-ORF2 重组质粒转化 Rossetta (DM3) 感受态细胞中,涂布 AMP^r 平板,筛选阳性克隆。接种到 LB 液体培养基中,于 37°C 震荡培养至 OD_{600nm} 为 0.5 左右时,加入诱导剂 IPTG 至终浓度为 1 mmol·L⁻¹,37°C 诱导培养 4 h 后,8 000 r·min⁻¹,离心 10 min,收集菌体,通过 SDS-PAGE 电泳评估表达效果。离心收集诱导后的菌体,超声破碎后,8 000 r·min⁻¹,离心 10 min,分别取上清和沉淀进行

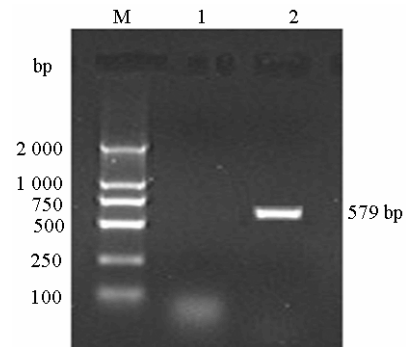
SDS-PAGE 电泳鉴定表达蛋白可溶性。

1.2.3 表达产物纯化及 Western blot 分析 挑选含重组质粒表达菌 Rossetta(DM3)阳性克隆,接种 500 mL 液体 LB 培养基,于 37°C 震荡培养至 OD_{600nm} 为 0.5 左右时,加入诱导剂 IPTG 至终浓度为 1 mmol·L⁻¹,37°C 诱导培养 4 h 后,离心收集菌体,SDS-PAGE 评估表达情况。8 000 r·min⁻¹,4°C,离心 10 min,收集菌体,超声破碎,提取包涵体。用 GST-Protein Purification Kit 纯化表达目的蛋白,具体步骤按使用说明书进行。SDS-PAGE 检测纯化效果,并用 Western blot 分析纯化蛋白的免疫学活性。

2 结果与分析

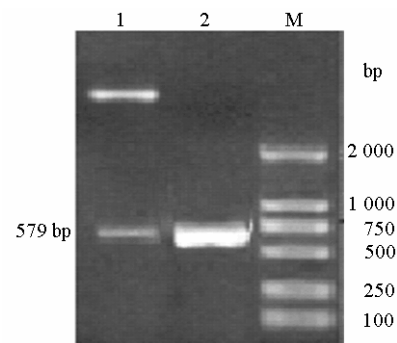
2.1 PCR 扩增基因片段

用设计的特异性引物,以 pET-32a-ORF2 质粒为模板进行 PCR 扩增,扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳可见一条特性的目的条带,大小约 579 bp,与预期结果相符(图 1)。测序结果分析表明,与



M: DNA Maker DL2000; 1: Negative control; 2: Gene fragment of ORF2

图 1 ORF2 基因 PCR 产物
Figure 1 PCR product of ORF2 gene



1: *Bam*HI, *Xho*I digested pEGX-4T-1-ORF2; 2: Gene fragment of ORF2; M: DNA Maker DL2000

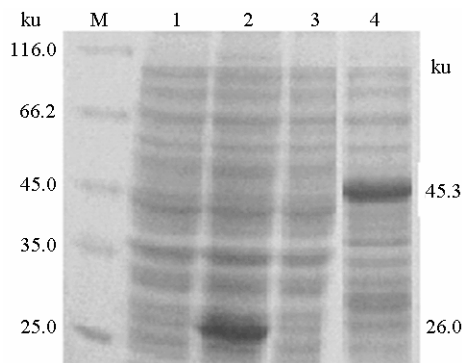
图 2 pEGX-4T-1-ORF2 酶切鉴定结果
Figure 2 *Bam*HI, *Xho*I Digenstion of pEGX-4T-1-ORF2

NCBI 登录的 ORF2 基因序列有很高同源性,为

99.5%, 不含核定位信号肽序列。这说明作者成功扩增了去除核定位信号肽序列的目的基因。

2.2 重组质粒酶切鉴定

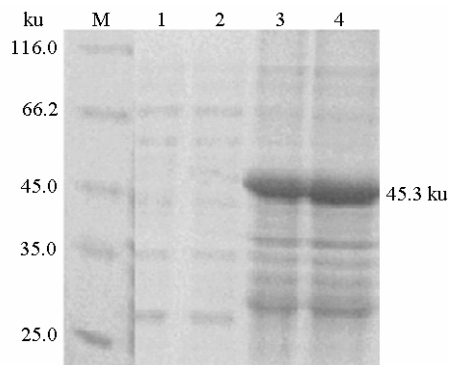
构建的重组质粒 pEGX-4T-1-ORF2 经限制性内切酶 *Bam* HI 和 *Xho* I 双酶切鉴定, 经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测可见 579 bp 左右的 DNA 片段, 与预期结果一致, 说明, 目的基因定向插入了 pEGX-4T-1 载体的多克隆位点处, 重组质粒构建成功 (图 2)。



M: Protein MW marker; 1. Not induced pGEX-4T-1;
2. Induced pGEX-4T-1; 3. Not induced pGEX-4T-1-ORF2;
4. Induced pGEX-4T-1-ORF2

图 3 重组蛋白 Cap SDS-PAGE

Figure 3 SDS-PAGE map of recombinant Cap



M:Protein MW marker; 1,2 .Lysate supernatant of recombinant Cap by sonication; 3,4 .Lysate pellet of recombinant Cap by sonication

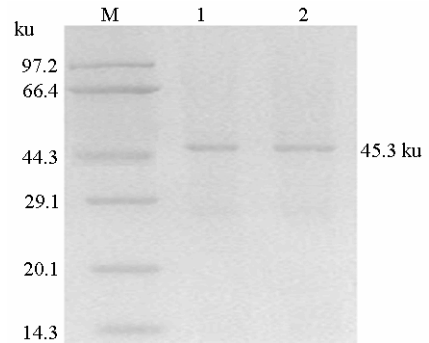
图 4 重组蛋白 Cap 可溶性鉴定

Figure 4 Identification of recombinant Cap solubility

2.3 重组蛋白 Cap 诱导表达、可溶性鉴定

将重组质粒 pEGX-4T-1-ORF2 转化进表达菌 Rossetta (DM3) 中, 挑选阳性单菌落, 进行诱导培养。收集菌体, 经 12% SDS-PAGE 检测, 结果表明, 在约 45.3 ku 位置出现一条浓染蛋白条带 (图 3), 而未经诱导的重组质粒转化菌和经诱导的空质粒转化菌培养提取物没有相应目的条带。薄层灰度分析

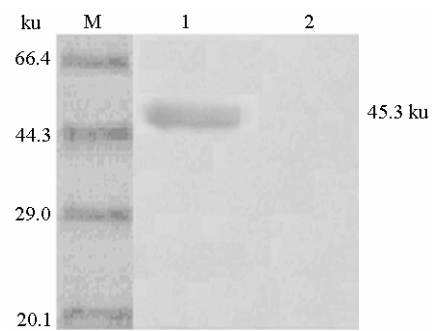
显示目的蛋白约占菌体总蛋白的 25%。收集菌液, 超声破碎后, 离心后分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE 检测, 结果表明 Cap 融合蛋白主要以包涵体形式进行表达 (图 4)。



M: Protein MW marker; 1,2: Purified recombinant Cap

图 5 重组蛋白 Cap 亲和层析纯化

Figure 5 Affinity chromatography purification of recombinant Cap



M: Protein MW marker; 1.Purified recombinant Cap;
2. Negative control

图 6 重组蛋白 Cap Western blot 分析

Figure 6 Western blot of the recombinant Cap

2.4 表达蛋白的纯化及 Western blot 分析

提取包涵体, 经 GST-Protein Purification Kit 纯化后, 12% SDS-PAGE 电泳分析, 只有一条目的条带, 目的蛋白获得了纯化, 且纯度可到 90% 以上 (图 5)。挑选经 SDS-PAGE 检测诱导表达的样品进行 Western blot 分析, PCV2 阳性抗体与转染到 NC 膜上的重组 Cap 蛋白可以反应, 经 DAB 显色后在 45.3 ku 左右有一明显特异性条带, 表明表达的 Cap 蛋白具有与 PCV2 阳性抗体反应的良好免疫学活性 (图 6)。

3 讨论

研究表明, PCV-2 ORF2 所编码蛋白 N 末端 41 个氨基酸是其在核内定位信号, 含有大肠杆菌稀有密码子, 它的存在能严重影响外源蛋白的表达^[7], ORF2 编码核衣壳蛋白的 65~87、113~147、157~

183 氨基酸区域及 C 端 4 个氨基酸为主要的抗原结构^[8]; 因此本试验中, 选择性切除了不利于体外表达的由 123 个核苷酸核的核内定位信号肽, 而保留其主要抗原结构域的 ORF2 基因片段, 将其插入到 pEGX-4T-1 表达载体多克隆位点, 构建重组质粒 pEGX-4T-1-ORF2, 在大肠杆菌中成功诱导表达具有良好生物学活性的 rCap 重组蛋白。

使用大肠杆菌等基因工程手段表达的融合蛋白, 作为 ELISA 包被抗原, 由于其含有大肠杆菌菌体杂蛋白, 严重干扰其作为诊断抗原的检测效果, 需经纯化后才能很好的应用做诊断抗原。本试验中, 使用尿素变性溶解包涵体, 通过 PBS 透析复性, GST 亲和层析等方法对重组 Cap 蛋白进行纯化, 获得了良好的纯化效果, 纯度达到 90% 以上, 能完全满足诊断抗原的质量要求。

本试验获得纯化 rCap 蛋白经 Western blot 分析后, 结果表明 rCap 蛋白可与 PCV-2 阳性抗体发生特异性反应, 表明 Cap 蛋白具有良好的免疫学活性。这为进一步以 Cap 蛋白作为包被抗原的间接 ELISA 诊断方法的建立奠定了良好的基础。

参考文献:

- [1] Allan G M, Joun A. Porcine circovirus: a review[J]. J Vet Diagn Invest, 2000, 12: 3-14.
- [2] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 2 版. 北京: 北京科技出版社, 1997.
- [3] Mahe D, Blanchard P, Truong C, et al. Differential recognition of ORF2 protein from type 1 and type 2 porcine circovirus and identification of immunorelevant epitopes[J]. J Gen Virol, 2006, 81(7): 815-824.
- [4] Nawagitgul P, Morozov I, Bolin S R, et al. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 1 and type 2 encodes a major capsid protein[J]. J Gen Virol, 2005, 81(9): 2281-2287.
- [5] Chae C. Postweaning multisystemic wasting syndrome: a review of aetiology, diagnosis and pathology[J]. Vet J, 2004, 168(1): 41-49.
- [6] Lekcharoensuk P, Morozov I, Paul P S, et al. Epitope mapping of the major capsid protein of type 2 Porcine circoviruses (PCV2) by using chimeric PCV1 and PCV2[J]. J Virol, 2004, 78(15): 8135-8145.
- [7] Liu Q, Willson P, Attoh-poku S, et al. Bacterial expression of an immunologically reactive PCV2 ORF2 fusion protein[J]. Protein Expr Purif, 2001, 21(1): 115-120.
- [8] Zhou J Y, Wu J, Cheng L Q, et al. Expression of immunogenic S1 glycoprotein of infectious bronchitis virus in transgenic potatoes[J]. J Virol, 2003, 77(16): 9090-9093.

[1] Allan G M, Joun A. Porcine circovirus: a review[J]. J Vet