

## 鸡法氏囊病毒重组多抗原表位串联肽的制备及其免疫反应

蔡梅红, 谭仁可, 韦 瑶, 段玉清, 王 亮, 马海乐

(江苏大学食品与生物工程学院, 镇江 212013)

**摘 要:** 合成含有鸡法氏囊病毒抗原表位核酸序列的 4 条引物, 利用 SOE-PCR (重叠延伸 PCR 法) 方法克隆得到含鸡法氏囊病毒多抗原表位串联肽的核酸序列。通过 *EcoR* I 和 *Sal* I 两个酶切位点使该核酸序列插入原核表达载体 (pET32a)。SDS-PAGE 实验结果表明鸡法氏囊病毒重组多抗原表位串联肽在大肠杆菌中的表达量为 20% 左右。Western blotting 试验和免疫琼脂扩散沉淀试验 (AGP) 的结果均表明鸡法氏囊病毒重组多抗原表位串联肽具有明显的抗原性。

**关键词:** 法氏囊病毒; 表位肽; 抗原性

中图分类号: S852.657

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2014)04-0592-05

### Development of recombinant multiple epitope peptide of infectious bursal disease virus and its immune response

CAI Meihong, TAN Renke, WEI Yao, DUAN Yuqing, WANG Liang, Ma Haile

(School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013)

**Abstract:** Four primers were synthesized to amplify nucleic acid sequences (a tandem repeat consisting of three IBDV multiple epitopes DNA sequence) by SOE PCR (splicing overlap extension PCR method). The nucleic acid sequence digested by *EcoR* I and *Sal* I was inserted into the expression vector pET32a. SDS-PAGE results showed that the recombinant multiple epitopes peptide (tandem peptide of three IBDV epitopes) comprised about 20 % of the *E.coli* total protein. Agarose diffusion assay suggested that recombinant multiple epitopes peptide was demonstrated to have good antigenicity.

**Key words:** infectious bursal disease virus; epitope peptide; antigenicity

传染性法氏囊病 (infectious bursal disease, IBD) 是指由传染性法氏囊病毒 (IBD virus, IBDV) 感染禽法氏囊 (bursa of fabricius, BF) 而引起的一种急性、接触性传染病, 其主要以侵害未成年家禽免疫器官 (法氏囊) 为特征。目前, IBD 在世界范围内分布广泛, 其给养殖业带来的危害主要体现在: IBDV 感染鸡群后, 导致鸡群死亡所带来的直接经济损失和发病鸡群产肉、产蛋等生产性能下降带来的间接经济损失。

IBD 一旦发病很难控制, 因此, 疫苗接种就成为养殖业控制该病爆发和流行的主要手段。虽然传统的 IBD 灭活苗和活疫苗对 IBD 有较好的预防作用<sup>[1]</sup>, 但是, 其在生产或使用过程中有散毒的危险,

且不能预防法氏囊病毒超强毒株 (very virulent infectious bursal disease virus, vvIBDV) 和变异毒株对禽类的感染<sup>[2]</sup>。因此, 近年来, 法氏囊病新疫苗相关的报道较多<sup>[3-4]</sup>。

抗原表位是一类存在于抗原分子中长度为几个到十几个氨基酸序列不等的多肽序列, 它们可诱导机体产生针对特定病原体的保护力<sup>[2]</sup>。1994 年, Obeid 等人工合成了麻疹病毒 F 蛋白上的 T 淋巴表位和 B 淋巴细胞表位的序列, 结果表明合成的表位序列可以诱导小鼠产生较好的免疫学反应。之后研究结果表明合成肽诱导的抗体可以与相应的天然抗原蛋白或病毒粒子发生免疫学反应<sup>[5]</sup>。这表明抗原多表位肽疫苗是一种前景非常好的疫苗<sup>[6-7]</sup>。

收稿日期: 2013-11-28

基金项目: 国家自然科学基金 (31201456), 江苏省博士后基金 (1202042C), 江苏大学高级人才启动基金 (12JDG099) 和江苏省大学生实践创新训练计划 (201310299076X) 共同资助。

作者简介: 蔡梅红, 博士, 讲师。E-mail: caimeihong@ujs.edu.cn

本研究中, 作者克隆了 IBDV VP<sub>2</sub> 蛋白上的 3 个主要中和性 B 细胞抗原表位的串联体核苷酸序列, 并在大肠杆菌中进行了表达。Western blotting 分析和免疫琼脂扩散沉淀试验 (AGP) 的结果均表明鸡法氏囊病毒重组多抗原表位串联肽具有明显的抗原性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

pET32a 原核表达载体来自 Novagen 公司; 大肠杆菌 *DH5α* 由江苏大学何华刚老师惠赠。

限制性内切酶, PCR 扩增试剂盒, 标准分子量 DNA ladder 等购自宝生物工程 (大连) 有限公司; 琼脂糖凝胶回收试剂盒等购自天根生化有限公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 IBDV 多抗原表位串联肽 DNA 序列的扩增** 选择已公布的 IBDV VP<sub>2</sub> 蛋白的几个抗原表位序列 (KFDQML, CDSSDRPRVYTIT 和 WSARGSLAVTIHG), 并设计了可以扩增这几个抗原表位串联肽 DNA 序列 (KFDQMLCDSSDRPRVYTITWSARGSLAVTIHG) 的引物 F1、F2、F3 和 F4。4 条引物序列组成如下: F1: 5'-gaattcatgaagtttgatcaaatgctgtctgactcgtcggag cgcctcgcgtctac-3' (*EcoR* I); F2: 5'-gcg agcagaccatgtaattgtgtagacgcgagggcggtccga-3'; F3: 5'-acaattacatggtctcgtcgcggttctctcgtctcacaatacacgg-3'; F4: 5'-cgccgtctagattaatgatgatgatgatgaccgtgtattgtgacagc-3' (*Xba* I)

以上引物, 它们之间又互为模板, 按 94℃ 变性 4 min 后进入第 1 轮 30 个循环: 94℃ 变性 30 s, 65℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min。在第 1 轮循环中每一个循环退火温度降低 0.5℃。第 1 轮 PCR 循环结束后进入第 2 轮 PCR 循环: 94℃ 变性 30 s, 50℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 共进行 15 个循环, 进行 SOE PCR (图 1)。

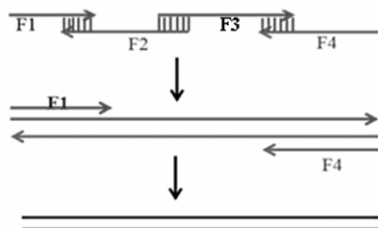


图 1 IBDV 多抗原表位串联肽 DNA 序列 SOE PCR 扩增原理  
Figure 1 Amplification of IBDV multiple epitopes peptide DNA sequence

PCR 循环结束后, 用 2% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定 IBDV 多抗原表位串联肽 DNA 是否扩增成功。

**1.2.2 表位串联肽序列克隆载体的构建及序列测定** PCR 产物电泳后, 切割含大小约为 150 bp 核酸的凝胶, 纯化凝胶中的 DNA, 便可得到扩增的表位串联肽核酸。将其与 pMD-18-T 克隆载体进行连接, 筛选含表位串联肽核酸片段的阳性克隆载体, 送上海英骏公司 (Invitrogen) 测序。测序结果与设计好的序列进行比对, 并分析二者的相似度。

**1.2.3 表位串联肽序列原核表达载体的构建** 利用 *EcoR* I 和 *Xba* I 两个酶切位点, 把表位串联肽核酸与原核表达载体 pET32a 进行连接。连接产物转化菌培养后, 重新提取质粒并用 *EcoR* I 和 *Xba* I 进行酶切鉴定。若酶切产物的电泳结果中可以看到两条分子量大小分别为 150 bp 和 5900 bp 左右的条带, 则可以说明重组表位串联肽原核表达载体已经构建成功。

**1.2.4 重组表达质粒的诱导表达** 将重组表位串联肽核酸原核表达载体的大肠杆菌的菌液, 以四区划线方式接种在氨苄青霉素平板上, 37℃ 培养至肉眼可见大小适度的单菌落后停止培养。从划线平板上挑取 1 个菌落, 并接种到 3 mL 含氨苄青霉素 (100 g·mL<sup>-1</sup>) 的 LB 液体培养基中, 37℃ 振荡过夜。次日, 取 2% 过夜培养物接种到 4 mL 含氨苄青霉素的普通 LB 液体培养基中, 37℃ 振荡培养。2~2.5 h 后, 培养菌的生长浓度达到对数生长期 (菌液 OD<sub>600</sub> 值为 0.5~0.6), 接着加入终浓度为 1 mmol·L<sup>-1</sup> 的 IPTG 进行诱导表达。以 pET32a 空载体质粒的 BL-21(DE3) 同样诱导处理后的样品为阴性对照。分别在诱导的不同时间段 (2、3、4、5、6 和 7 h), 取重组菌的诱导样和阴性对照组菌液各 500 L。把不同时间段取到的诱导菌在室温 12000 r·min<sup>-1</sup> 离心 30 s。向各管收集到的菌体沉淀中加入 40 L ddH<sub>2</sub>O 重悬细菌, 并加入 10 L 的 5×SDS-PAGE loading buffer, 100℃ 处理 10 min 后, 进行 SDS-PAGE。

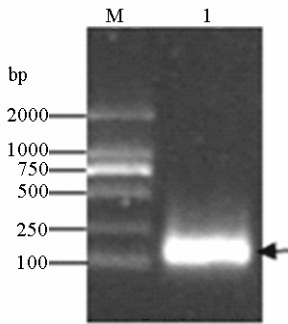
**1.2.5 重组表位串联肽的琼扩试验** 将 1.2.4 中重组表位串联肽诱导菌和阴性对照菌诱导后, 分别以 8000 r·min<sup>-1</sup> 的速度, 离心 5 min, 收集菌体沉淀。收集的菌体用 pH 为 7.2 的 PBS 洗涤 2 次, 再按 (PBS) 2 mL·g<sup>-1</sup> 细菌沉淀的比例悬起, -20℃ 作用过夜。次日待菌液融解后, 以 700 W 功率的超声波裂解 5 min (超声作用 60 s, 歇 40 s) 后, 4℃, 12000 g, 20 min 离心后取上清。含有重组表位串联肽的上清, 通过冻干的方法浓缩 10 倍之后备用。取其中的 60 L 冻干后的溶液和阴性对照菌裂解上清

冻干液做免疫琼脂扩散沉淀试验，中间孔为鸡传染性法氏囊免疫琼脂扩散试验标准抗体，周围6个孔中分别加入不同浓度稀释冻干后的重组表位串联肽溶液和 pET32a 对照转化菌裂解上清冻干液。把加好样品的琼脂平板放入 37℃ 培养箱作用 24~96 h 后，观察结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 表位串联肽序列的扩增

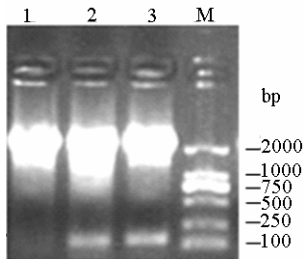
以设计的4条引物互为模板进行 SOE PCR 反应。PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶中进行电泳。电泳结果 (图 2) 显示：在标准 DNA ladder 的 100 bp 和 250 bp 对照分子之间的水平位置，有一条很亮的核酸条带，且该条带分子量接近 100 bp。这与我们需要扩增的大小为 150 bp 的目标分子表位串联肽核酸的大小是符合的，据此，可以初步确定表位串联肽核酸序列扩增成功。



M: 标准 DNA 分子量; 1: 表位串联肽 DNA 序列的扩增  
M: Marker; 1: Amplification of multiple epitopes DNA

图 2 表位串联肽序列的 PCR 扩增

Figure 2 PCR amplification of multiple epitopes DNA



M: 标准 DNA 分子量; 1: pMD-18-T 质粒; 2, 3: 表位串联肽克隆载体的酶切产物

M: Marker; 1: pMD-18-T; 2,3: Enzyme-digested products of recombinant cloning vector

图 3 表位串联肽克隆载体的酶切鉴定

Figure 3 Identification of recombinant cloning vector including IBDV multiple epitopes peptide DNA sequence

### 2.2 表位串联肽克隆载体的构建及序列测定

表位串联肽 DNA 与 pMD-18-T 克隆载体连接

后，转化大肠杆菌 DH5α。接着，在转化平板上挑取转化菌的单菌落进行大量培养，并提取质粒进行酶切鉴定 (EcoR I 和 Xba I)。酶切产物电泳结果显示 (图 3)：3 个转化菌提取的质粒中有 2 个质粒是含表位串联肽序列的质粒，而另外一个转化子是未连接上表位串联肽核酸的 pMD-18-T 质粒。

将酶切鉴定为含表位串联肽 DNA 的 pMD-18-T 质粒，送上海生工测序后。测序结果显示克隆的序列 (图 4，蓝色部分为 6 个组氨酸核酸序列。黑粗体为酶切位点) 与预期是一致的。

```

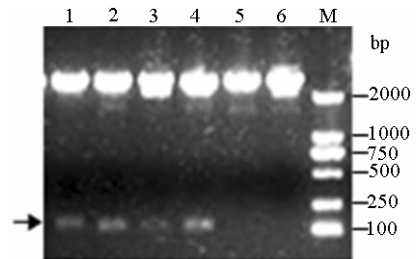
1 GAATTCATGAAGTTTGATCAAATGCTGTCT
31 GACTCGTCGGACCGCCCTCGCGTCTACA
59CAAATTACATGGTCTGCTCGCGGTTCTCTC89GCTGT
CACAATACACGGTCTCATCATCATCATCATTAATC
TAGACGGCG 142
  
```

图 4 含 IBDV 多抗原表位串联肽核酸序列

Figure 4 IBDV multiple epitopes peptide DNA sequence

### 2.3 表位串联肽序列原核表达载体的构建

IBDV 多抗原表位串联肽序列扩增成功后，将其与 pET32a 连接后构建含表位串联肽序列的 pET32a 表达载体。在转化平板上挑取了 6 个转化菌并提取质粒，如果该载体能被 EcoR I 和 Sal I 酶切获得分子量大小为 5900 bp 和 150 bp 的两条核酸条带，则可确定表位串联肽序列的 pET32a 已经构建成功。从图 5 可以看出，6 个转化菌提取的质粒酶切产物电泳图上，有 4 个质粒酶切产物的电泳图上都有大小为 5900 bp 和 150 bp 的核酸片段，说明这 4 个质粒均为含表位串联肽 DNA 序列的 pET32a 表达载体。

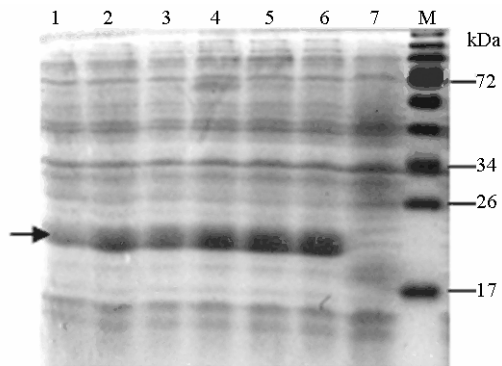


M: 标准 DNA 分子量; 1-4: 表位串联肽表达载体的酶切产物; 5-6: pET32a 载体酶切对照

M: Marker; 1-4: enzyme-digested products of recombinant cloning vector; 5-6: enzyme-digested product of pET32a

图 5 表位串联肽表达载体的鉴定

Figure 5 Identification of recombinant expression vector pET32a including IBDV multiple epitopes peptide DNA sequence

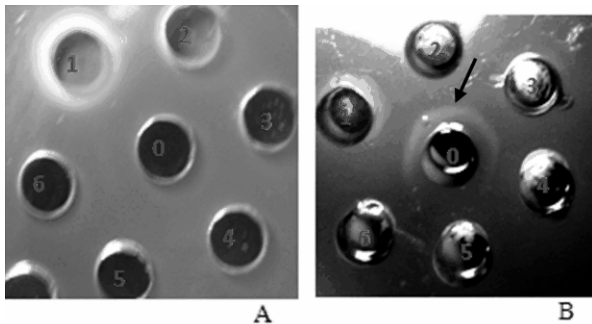


M: 标准 DNA 分子量; 1-6: 诱导 2, 3, 4, 5, 6 和 7 h 的表位串联肽; 7: 诱导 7 h 的 pET32a 转化菌

M: Marker; 1-6: Expression of tandem epitopes after induction for 2, 3, 4, 5, 6 and 7 h; 7: Transformed bacteria using pET32a as expression vector after induction for 7 hours

图 6 表位串联肽的诱导表达

Figure 6 Tandem expression of IBDV multiple epitopes peptide



A: pET32a 转化菌诱导后的菌液裂解上清冻干溶液的琼扩试验

A: Agar diffusion test of freeze-drying supernatant of the transformed bacteria lysate using PET32a as expression vector after induction

0: 标准鸡传染性法氏囊琼扩抗体; 1: pET32a 转化菌诱导后的菌液裂解上清冻干液; 2-6: 分别为 1:2、1:4、1:8、1:16 和 1:32 稀释的 pET32a 转化菌诱导后的菌液裂解上清冻干液

0: Antibody of standard IBDV of chicken; 1: Diluted supernatant from transformed bacteria lysate using pET32a as expression vector after induction; 2-6: Diluted supernatant in proportions of 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 and 1:32, respectively of the transformed bacteria lysate using pET32a as expression vector after induction

B: 重组表位肽的细菌裂解上清的琼扩试验 (箭头指向沉淀线)

B: Agar diffusion test of supernatant of the bacteria lysate including multiple epitopes peptide DNA sequence (Arrow points to precipitation line)

0: 标准鸡传染性法氏囊琼扩抗体; 1-6: 分别为 1:4、1:8、1:16、1:32、1:64 及 1:128 稀释的重组表位肽的细菌裂解上清

0: Antibody of standard IBDV of chicken; 1-6: Diluted supernatant in proportions of 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 and 1:128 of the bacteria lysate including multiple epitopes peptide DNA sequence

图 7 重组表位串联肽的琼扩试验

Figure 7 Agar diffusion assay of recombinant IBDV multiple epitopes peptide

## 2.4 表位串联肽的诱导表达

把含表位串联肽序列的 pET32a 表达载体转化 BL-21 (DE3) 大肠杆菌, 并在不同的诱导时间点取样分析表达水平高低。SDS-PAGE 电泳结果(图 6)显示: 表位串联肽融合蛋白(载体融合蛋白约 20 kDa 与多抗原表位串联肽约 4 kDa)可以在大肠杆菌中成功地获得表达, 且在诱导 2、3、4、5 和 6 h 等不同时间段中其表达量也不同, 在诱导 5、6 和 7 h 时表位串联肽的表达量均比较高。而 pET32a 转化菌的对照诱导产物只有一条分子量在 20 kDa 左右的融合蛋白出现(图 6)。

## 2.5 重组表位串联肽的琼扩试验

为了进一步验证重组表位串联肽的体外免疫反应性, 进行免疫琼脂扩散沉淀试验。从图 7 可以看出: pET32a 转化菌诱导后的菌液裂解上清冻干溶液的琼扩实验中没有出现任何沉淀线(图 7A), 而含表位串联肽的重组菌的裂解上清冻干溶液在稀释 32 倍后仍可与标准鸡传染性法氏囊的琼扩抗体发生反应, 出现沉淀线(图 7B)。因此, 可以确定含表位串联肽的大肠杆菌的裂解上清冻干溶液的琼扩效价为 1:32, 且重组表位串联肽具有明显地体外免疫活性。

## 3 讨论

疫苗发挥预防疾病作用的根本在于疫苗抗原上有一个或多个抗原表位, 抗原表位可以激起机体产生针对该抗原及携带该抗原病原微生物的免疫应答反应。基因工程疫苗制备的传统方法是通过体外表达病原微生物的抗原蛋白作为疫苗抗原, 近年来, 也有利用串联抗原蛋白上表位肽的方法制备疫苗抗原的报道, 但小肽的免疫原性较差, 这对于肽疫苗的研制, 一直是个瓶颈<sup>[8]</sup>。长期以来, 人们采用多种方法来增加其免疫效果, 如利用化学方法把人工合成的表位肽与大分子的载体蛋白(牛血清白蛋白, 钥孔戚血蓝蛋白等)相偶联<sup>[9]</sup>, 或采用基因工程的方法使表位肽上融合一段大分子量的蛋白质<sup>[10]</sup>。

为了提高 IBDV 多抗原表位串联肽的免疫效果, 作者采用了 pET32 原核表达载体, 因为该载体表达的目标蛋白会融合上一段分子量大小为 20 kDa 左右的蛋白, 因此, 理论上来说这段融合的蛋白可以起到类似偶联载体的作用, 从而增加多肽部分被机体识别而产生免疫力的机会。

在多抗原表位疫苗的设计中, 为了便于机体识别各个不同的抗原表位, 通常会在不同的表位之间添加一些连接肽(linker), 如添加几个连续的甘氨酸

酸 (Gly), 丙氨酸 (Ala) 等方法, 使得串联表达的不同表位更好的发挥其抗原性。但是连接肽设计相关的影响因素很多, 如连接肽的氨基酸组成, 肽的长度等。另外, 添加的连接肽对抗原表位肽整个分子构象、电荷特征及其结合特性又会发生何影响, 这些都需要做进一步的探索。本研究结果表明, 重组法氏囊病毒 VP<sub>2</sub> 蛋白 3 个表位直接串联后的多肽具有明显的抗原性, 这说明这 3 个表位串联肽的抗原性并没有受到明显的影响。

本研究证实了重组表位串联肽具有明显的体外免疫反应性, 那么以其作为抗原成分制备的基因工程法氏囊肽疫苗免疫鸡群后产生的抗体效价如何? 产生的抗体对鸡群的保护作用如何? 这些都需要在以后的工作中进一步加以研究。

### 参考文献:

- [1] Mahmood M S, Hussain I, Siddique M, et al. DNA vaccination with VP<sub>2</sub> gene of very virulent infectious bursal disease virus (vvIBDV) delivered by transgenic *E. coli* DH5 $\alpha$  given orally confers protective immune responses in chickens [J]. *Vaccine*, 2007, 25 (44): 7629-7635.
- [2] David E S, John R G, Mark W J. A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens [M]. 3rd ed. Kendall: Hunt Publishing Co., 1989: 192-200.
- [3] Wu H, Singh N K, Locy R D, et al. Expression of immunogenic VP<sub>2</sub> protein of infectious bursal disease virus in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Biotechnol Lett*, 2004, 26 (10): 787-792.
- [4] Xu X G, Tong D W, Wang Z S, et al. Baculovirus virions displaying infectious bursal disease virus VP<sub>2</sub> protein protect chickens against infectious bursal disease virus infection [J]. 2011, 55(2): 223-229.
- [5] Muller G M, Shapira M, Aron R. Anti influenza response achieved by immunization with a synthetic conjugate [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1982, 79(2): 569-573.
- [6] Kimberly R J, Rachel H M. Peptide vaccines prevent tumor growth by activating T cells that respond to native tumor antigens [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, 107(10): 4652-4657.
- [7] Hyun I C, Esteban C. Optimized peptide vaccines eliciting extensive CD8 T-cell responses with therapeutic antitumor effects [J]. *Cancer Research*, 2009, 69 (23): 9012-9019.
- [8] Ali A S, Tabidi M H. Assessment of the immunogenic potential of the intermediate infectious bursal disease vaccine virus in Broiler Chicks [J]. *Journal of Applied Sciences Research*, 2005, 1(5): 401-404.
- [9] Liu S G, Yu X L, Wang C L, et al. Quadruple antigenic epitope peptide producing immune protection against classical swine fever virus [J]. *Vaccine*, 2006, 24: 7175-7180.
- [10] Dong X N, Wei K, Liu Z Q, et al. Candidate peptide vaccine induced protection against classical swine fever virus [J]. *Vaccine*, 2002, 21: 167-173.