

水貂阿留申病毒 VP2 蛋白主要抗原表位基因原核表达 及其检测应用

曾祥伟, 华育平*, 梁冬莹

(东北林业大学野生动物资源学院 哈尔滨 150040)

摘 要 将构建好的重组质粒 pMD-VP2a、pMD-VP2b 分别经双酶切获得基因片段 VP2a、VP2b, 分别将其定向插入到原核表达载体 pMAL-c2 中, 构建原核表达载体 pMAL-VPa 和 pMAL-VPb。阳性重组质粒转化宿主菌 TB1, 经 IPTG 诱导, 两段基因均获得表达; Western blot 分析表明表达蛋白具有良好的抗原性。用 KCl 染色后, 切胶回收的方法对表达蛋白进行纯化, 以纯化的目的蛋白作为诊断抗原初步建立了水貂阿留申的 VP2-CIEP 诊断方法。结果表明该方法具有较高的灵敏性和特异性, 与传统的 CIEP 方法的检出符合率达 94.3%。

关键词: 水貂阿留申病毒; VP2 蛋白抗原表位基因; 原核表达; VP2-CIEP

中图分类号: Q934, R392 **文献标识码**: A **文章编号**: 0001-6209(2007)06-1088-03

水貂阿留申病(Aleutian disease of mink, AD)是由水貂阿留申病细小病毒(Aleutian mink disease parvovirus, ADV)引起的一种慢性、进行性传染病, 一直是危害世界养貂业健康发展的最重要的疫病之一^[1]。到目前为止, 还没有成功的疫苗可用于 AD 的预防, 也没有特异有效的治疗方法, 唯一可行的防治方法就是通过多次特异性检疫, 淘汰病貂, 净化貂群。在 AD 的各种检测方法中, 对流免疫电泳(CIEP)是世界公认的并且应用最为广泛的方法^[2]; 但 CIEP 中的抗原多是脏器抗原、细胞抗原等全病毒抗原, 病毒的浓缩和纯化成本较高, 且存在散毒的风险, 在应用中有一定的局限性。利用基因重组技术制备 AD 的 CIEP 诊断抗原在国内还未见报道。本研究对 ADV VP2 基因主要抗原区进行了原核表达, 在此基础上, 以表达蛋白作为 CIEP 诊断抗原, 为 AD 的更为有效和低成本检测奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器: 胶回收试剂盒、DNA Marker (DL2000)、蛋白质低分子量标准、IPTG、Taq 酶、限制性内切酶 *EcoR*I、*Sal*I 和 T4DNA 连接酶均购自 Takara 公司; 兔抗 MBP 血清以及羊抗兔 IgG(HRP 标记)均购自 NEB 公司。梯度 PCR 仪购自 ABI 公司, 蛋白垂直电泳仪购自安马西亚生物技术公司。

1.1.2 质粒和菌种: 重组质粒 pMD-VP2a、pMD-VP2b 由本实验室梁冬莹博士构建, 这两个质粒是将 ADV VP2 蛋白主要抗原表位基因克隆到 pMD-18T 中, 目的基因片段两端分别引

入 *EcoR*I 和 *Sal*I 位点; 大肠杆菌 TB1 株、表达载体质粒 pMAL-C2 均购自 NEB 公司。

1.1.3 血清样品来源: ADV 标准阳性和阴性血清、诊断用 ADV 细胞抗原购自中国农业科学院特产研究所, 48 份待检血清采集自山东、辽宁、黑龙江等地大型水貂养殖场。

1.2 原核载体 pMAL-VP2a 和 pMAL-VP2b 的构建

将重组质粒 pMD-VP2a、pMD-VP2b 分别经 *EcoR*I、*Sal*I 双酶切, 与经相应双酶切的 pMAL-C2 表达载体进行连接反应, 转化大肠杆菌 TB1, 经含氨苄青霉素板筛选, 挑取菌落抽提质粒, 经 PCR 和酶切进行鉴定后, 将阳性克隆送上海英骏公司测序, 以确证其读码框是否正确。

1.3 重组蛋白的表达

将鉴定为阳性的 pMAL-VPa/TB1、pMAL-VPb/TB1 菌液按 1:50 分别转入 Amp^r (50 µg/mL) 的 LB 液体培养基中, 37℃ 培养至 OD_{600} 值为 0.4~0.6 时, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 于 37℃ 诱导表达 4h, 取样品菌液 1 mL, 12000r/min 离心 1min, 弃上清, 沉淀重悬于 100 µL 1×SDS-PAGE 上样缓冲液中, 100℃ 变性 5min, 进行 SDS-PAGE 分析。Western blot 检测以确定表达蛋白的抗原性, 具体参考文献^[3]的方法进行。

1.4 以表达蛋白为诊断抗原的 CIEP 方法的初步建立和特异性试验

SDS-PAGE 完毕, 用 KCl 法染色, 通过切胶对目的蛋白纯化回收, 具体方法参照文献^[4]略改进。以纯化回收的表达蛋白为诊断抗原对传统的对流免疫电泳(CIEP)方法进行改建, 命名为 VP2-CIEP。并设立 ADV 细胞抗原阳性对照和麦芽糖结合蛋白(MBP)空菌裂解物的阴性对照, 特异性试验中设

基金项目: 黑龙江省科技攻关项目(GB02B506)、黑龙江省博士后基金(LBH-Z06153)

* 通信作者。Tel: 86-451-82191734; E-mail: yuping_hua@126.com

作者简介: 曾祥伟(1976-)男, 山东黄县人, 讲师, 在站博士后, 主要从事野生动物疫源疫病的研究。E-mail: xiangwei_zeng@163.com

收稿日期: 2007-04-05; 接受日期: 2007-06-11; 修回日期: 2007-07-19

立犬细小病毒、猫细小病毒、水貂病毒性肠炎的阳性血清对照。

1.5 VP2-CIEP 与 CIEP 方法的比较试验

用 VP2-CIEP 与 CIEP 方法对 3 份 ADV 标准阳性血清、3 份标准阴性血清和 48 份待检血清进行检测 ,比较两种方法的敏感性。

2 结果

2.1 重组表达质粒的构建

原核重组质粒 pMAL-VP2a 及 pMAL-VP2b 经 *Eco*R I 和 *Sal* I 双酶切 ,均获得了两个片段 ,表达载体 pMAL-c2 和目的基因片段(VP2a 或 VP2b) ,测序证实阅读框是正确的 ,表明 VP2 基因的主要抗原表位的原核重组质粒成功构建。

2.2 重组蛋白最佳诱导条件的确定和 Western blot 检测

SDS-PAGE 分析表明(图 1-A) ,pMAL-VPa 及 pMAL-VPb 经诱导表达后 ,分别在 62kDa 和 64kDa 有明显的蛋白带 ,与预期的目的产物蛋白带大小一致 ,经诱导的空载体在 42kDa 处有明显的蛋白带 ,正是麦芽糖结合蛋白 MBP ,其大小与推测的一致。

原核表达的融合蛋白免疫印迹检测 ,均出现了特异性的目的条带 ,而空菌诱导前对照和诱导后对照均未出现特异性条带 ,空载体对照在 42kDa 处出现目的条带(图 1-B) ,从而证明所表达产物具有很好的抗原性。

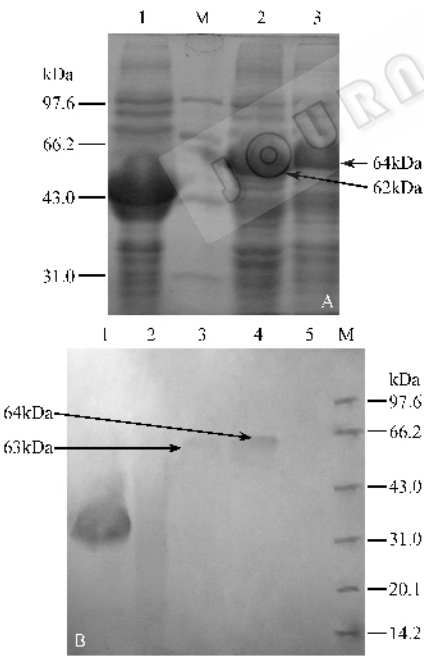


图 1 表达产物的 SDS-PAGE(A)和 Western blot(B)分析
Fig.1 SDS-PAGE analysis (A) and Western blot detection(B) of expression product. A : 1. pMAL-C2/TB1 ; M : MW protein marker ; 2. pMAL-VPa/TB1 ; 3. pMAL-VPb/TB1 ; B : 1. pMAL-C2 induced for 4h ; 2. TB1 induced for 4h ; 3. pMAL-Vpa induced for 4h ; 4. pMAL-Vpb induced for 4h ; 5. pMAL-C2 not induced ; M . protein molecular weight standards .

2.3 CIEP-VP2 方法的特异性试验

表达蛋白 ADV 标准阳性血清在 CIEP 试验中出现明显的阳性反应 ,而与犬细小病毒、猫细小病毒、水貂病毒性肠炎的阳性血清则呈阴性反应 ,与麦芽糖结合蛋白(MBP)空菌裂解物也呈现阴性反应。

2.4 改进前后 CIEP 方法的比较试验结果

对 3 份 ADV 标准阳性血清、3 份标准阴性血清和临床 48 份血清进行检测 ,发现两种方法的符合率为 94.3%(表 1)。

表 1 VP2-CIEP 与 CIEP 方法的比较试验结果

Table 1 The comparative detection of samples by VP2-CIEP			
Serum sample	Sample number	Positive numbers of VP2-CIEP	Positive numbers of CIEP
ADV positive serum	3	3	3
ADV negative serum	3	0	0
Clinicalmink serum	48	32	30
Total	54	35	33

3 讨论

对于 ADV 的检测方法很多 ,但对流免疫电泳法(CIEP)是目前得到普遍认同的 AD 检验方法 ,也是目前应用最为广泛的特异性诊断方法。其原理是根据抗原和抗体在电场作用下 ,在缓冲液中抗原由阴极向阳极移动 ,而抗体则由阳极向阴极移动 ,并在琼脂凝胶板中相接触处形成清晰的沉淀线。目前 ,在 CIEP 检测过程中使用的主要是脏器抗原和细胞抗原 ,脏器抗原制备比较麻烦、同时也难以规模化生产 ,细胞抗原制备过程则存在收获病毒效价比较低的问题 ,同时两种抗原都存在着散毒的危险。本研究利用基因重组技术制备 AD 的 CIEP 诊断抗原则很好地解决了这些问题。

VP2 是 ADV 的主要免疫原性抗原蛋白 ,与病毒致病性和宿主选择等密切相关 ,因此该蛋白基因成为深入研究 ADV 首选基因^[5-6]。Bloom 等将 VP2 分成 9 个非折叠的片段并分别进行原核表达 ,证实了 VP2 蛋白中位于 290-525 氨基酸之间存在的 3 个抗原决定簇部位具有稳定的免疫原性 ,均可被不同毒株 ADV-Utah、ADV-TR、ADV-Pullman 阳性血清所识别^[7]。而本研究正是根据 Bloom 这一研究成果对 ADV 分离株的 VP2 基因主要抗原区成功地进行了克隆与表达 ,Western blot 检测表明所表达的目的蛋白具有良好的抗原性。

Clemens 和 Christensen 等^[8-9]分别利用痘苗病毒和杆状病毒做载体对 VP2 基因进行了成功表达并应用于 CIEP 检测中 ,但出于蛋白的纯化回收技术及成本等方面的限制 ,目前只适用于实验室研究。本研究中没有采用常规的亲和层析的方法对表达的目的蛋白进行纯化 ,而是采用 KCl 法染色后切胶回收纯化的方法 ,同样收到了很好的效果 ,同时极大地降低了生产成本 ,有利于推广应用。考虑到 ,当前我国养殖的部分貂群中可能存在着大肠杆菌抗体 ,原核表达的重组蛋白即使纯化后也可能不可避免的含有大肠杆菌的菌体蛋白 ,会发生非特异性反应。试验中 ,我们将待检的貂血清首先与超声波裂解的大肠杆菌的菌体蛋白吸附后再进行 CIEP 试

验,极大减少了非特异性反应。

试验中建立的 VP2-CIEP 方法对 ADV 标准阳性血清、阴性血清的检测结果与传统 CIEP 方法完全一致,对临床 48 份待检血清的检出率要更高一些,证明该方法具有较高的灵敏性和特异性,两种方法总的检出符合率达 94.3%,进一步证实了 VP2-CIEP 方法有希望代替传统的 CIEP 方法应用于 ADV 的诊断和防制中。

参 考 文 献

- [1] Porter DD, Larsen AE, Porter HG. Aleutian disease of mink. *Adv Immunol*, 1980 **29** 261 – 286.
- [2] Cho HJ, Ingram DG. Antigen and antibody in Aleutian disease in mink II. The Reaction of Antibody with the Aleutian disease agent using immunodiffusion and immunoelectrophoresis. *Can J Comp Med*, 1973 **37**(3) 217 – 223.
- [3] 汪家政, 范明, 主编. 蛋白质技术手册. 第一版. 北京: 科学出版社, 2000.
- [4] 许文涛, 黄昆伦, 常世敏, 等. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳快速染色方法的比较研究. *食品科学*, 2004, **24**(增刊): 148 – 151.
- [5] Bloom ME, Alexandersen S, Perryman S, *et al.* Nucleotide sequence and genomic organization of Aleutianmink disease parvovirus (ADV): sequence comparisons between a nonpathogenic and a pathogenic strain of ADV. *J Virol*, 1988, **62**(8): 2903 – 2915.
- [6] McKenna R, Olson NH, Chipman PR, *et al.* Three-dimensional structure of Aleutianmink disease parvovirus: implications for disease pathogenicity. *J Virol*, 1999, **73**(8): 6882 – 6891.
- [7] Bloom ME, Martin DA, Qie LL, *et al.* Expression of Aleutianmink disease parvovirus capsid protein in defined segments: localization of immunoreactive sites and neutralizing epitopes to specific regions. *J Virol*, 1997, **71** 705 – 714.
- [8] Clemens DL, Wolfenbarger JB, Mori S, *et al.* Expression of Aleutianmink disease parvovirus capsid proteins by a recombinant vaccinia virus: self-assembly of capsid proteins into particles. *J Virol*, 1992, **66** 3077 – 3085.
- [9] Christensen J, Storgaard T, Bloch B, *et al.* Expression of Aleutianmink disease parvovirus proteins in a baculovirus vector system. *J Virol*, 1993, **67** 229 – 238.

Prokaryotic expression and detective application of the main antigenic region of VP2 protein of Aleutian Mink Disease Parvovirus

ZENG Xiang-wei, HUA Yu-ping*, LIANG Dong-ying

(Key Laboratory of Wildlife Conservation, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

Abstract :To research safer diagnosis antigen for ADV, the main antigenic region VP2a and VP2b gene of ADV were obtained by restriction digestion of the recombinant plasmids pMD-VP2a and pMD-VP2b. Then the genes were respectively cloned into pMAL-c2 to get two prokaryotic recombinant plasmids pMAL-VPa and pMAL-VPb. The target genes were successfully expressed in the host cell TB1 when induced by IPTG. The Western blot analysis proved the recombinant proteins have good antigenic. The recombinant proteins were purified by KCL dyeing method, and were used as antigen to establish VP2-CIEP for AD diagnoses. The detection result shared 94.3% identity with that of CIEP. The results reported here show that VP2-CIEP is highly sensitive and specific and can benefit the research on the serodiagnosis to AD.

Keywords : Aleutianmink disease parvovirus; antigenic region of VP2 protein; prokaryotic expression; VP2-CIEP