

牛传染性鼻气管炎病毒 gD 蛋白的原核表达及其免疫原性

丁国伟, 李琛, 李玉安, 叶正琴, 宋庆庆

(扬州优邦生物药品有限公司, 江苏 扬州 225008)

摘要: 为研制检测牛传染性鼻气管炎病毒(IBRV)的试剂盒, 对 IBRV gD 蛋白主要功能域的表达及免疫原性进行研究。根据 NCBI 数据库录入的 1 型牛疱疹病毒(bovine herpesvirus type 1)gD 蛋白序列(GenBank 登录号为 NC_001847)设计引物, 用 PCR 扩增 gD 基因类免疫球蛋白结构域, 构建原核表达载体 pET32a-*AgD*, 转化大肠杆菌 Rosseta (DE3)感受态细胞, 并诱导重组蛋白表达。经 SDS-PAGE 分析, 获得了相对分子质量约 43 000 的目的蛋白, 该蛋白的相对分子质量与 gD 融合蛋白的理论相对分子质量一致。经镍柱纯化后, 重组蛋白的质量浓度为 2.5 mg/mL, 纯度约为 95%, Western Blot 及 ELISA 鉴定结果显示该重组蛋白具有良好的免疫原性和反应原性, 可用于 IBRV 抗体检测试剂盒的开发。

关键词: 牛传染性鼻气管炎病毒(IBRV); gD 蛋白; 原核表达; 免疫原性

中图分类号: S852.6

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2018)01-0077-05

Expression and immunogenicity of protein gD from virus in infectious rhinotracheitis of bovine

DING Guowei, LI Chen, LI Yuan, YE Zhengqin, SONG Qingqing

(Yangzhou Youbang Biological Pharmaceuticals Co., Ltd., Yangzhou, Jiangsu 225008, China)

Abstract: The expression and immunogenicity of conserved domain of protein gD were researched for developing antibody detection kit of IBRV virus. Specific primers were designed for the amplification of the gene gD sequence with the immunoglobulin-like domain based on the full length gene gD sequence from bovine herpesvirus, type 1 (GenBank ID NO. NC_001847). The immunoglobulin-like domain gene of gD protein was inserted into plasmid pET-32a after PCR amplification, and was named as pET32a-*AgD*. The expression vector was then transferred into strain *E. coli* Rosseta (DE3) with aim to induce the recombinant protein. The result showed that 43 000 recombinant proteins were obtained through the analysis of SDS-PAGE, and the relative molecular mass of them were accordance with the theoretical value of recombinant protein gD. After purified from nickel column, the concentration of them was 2.5 mg/mL, with the purity of about 95%. The recombinant proteins were proved of good immunogenicity after experienced the identification of Western Blot and Elisa, which indicated that they could be used as antigen for the development of antibody detection kit of IBR.

Keywords: IBRV; gD protein; prokaryotic expression; immunogenicity

牛传染性鼻气管炎病毒(IBRV)又称牛疱疹病毒I型(bovine herpesvirus 1, BHV-1), 属疱疹病毒科疱疹病毒亚科水痘病毒属^[1]。IBRV呈球形, 有囊膜, 病毒衣壳为立体对称的正二十面体, 外观呈六角形, 直径约为80~120 nm^[2]。IBRV在细胞培养液

中较稳定, 于4 °C以下能保存30 d以上, 于22 °C条件下可保存5 d^[3]; 于56 °C条件下20 min可被灭活, 在0.5% NaOH、0.01% HgCl₂、1%漂白粉、1%酚类和5%甲醛溶液中30 s均可被灭活, 所有的毒株对氯仿敏感, -70 °C以下保存的病毒可存活数年^[4]。

目前认为IBRV病毒只有1个血清型,对其进行检测的主要手段为病毒中和试验法和ELISA试验法。这2种方法都是较为敏感和特异的方法,也是目前常用的方法^[5]。中和试验操作较为复杂,容易受标准毒株、所选用细胞、病毒、血清中和作用时间、结果判读和终点判读的时间等多方面因素影响。目前,ELISA方法是较为常用的方法,可供选用的ELISA有几种类型,间接ELISA和阻断ELISA为常用类型。间接ELISA使用更为普遍。国外已研发了多种商品化ELISA试剂盒。这些试剂盒可用于检测牛奶中的抗体^[6]。以往建立的间接ELISA方法是以全病毒细胞培养物为包被抗原。由于受病毒培养和纯化等方面技术的限制,全病毒抗原的纯度不高,稳定性差,ELISA检测结果的特异性、敏感性和均一性不高^[7]。

笔者采用大肠杆菌表达系统成功表达了IBRV gD糖蛋白的类免疫球蛋白结构域,通过Western Blot及Elisa试验探明了该重组蛋白具有良好的反应原性,并以该重组蛋白为抗原建立了检测IBRV抗体的间接ELISA检测方法。现将研究结果报道如下。

1 材料与与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和载体

E. coli TOP10、*E. coli* Rosseta (DE3)感受态细胞和pET-32a载体均购于Invitrogen;pMD19-T载体购自于TaKaRa。

1.1.2 病毒和血清

IBRV疫苗株由扬州优邦生物药品有限公司提供;牛抗IBRV阳性血清购自于中国兽医药品监察所。

1.1.3 主要试剂

FastPfu DNA聚合酶、dNTPs、*EcoR* I、*Not* I、Trans 2 000 plus DNA Marker、Blue Plus Protein marker均购自北京全式金生物技术有限公司;质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒购自美国Axygen;Trizol[®] Reagent试剂盒均购自天根生化科技有限公司;HiScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit购自于南京诺唯赞生物技术有限公司;HRP标记的兔抗牛IgG酶标二抗、IPTG均购自Sigma;其他试剂为分析纯级试剂,购自于国药集团化学试剂有限公司。

1.2 方法

1.2.1 R/32a- Δ gD工程菌构建

1.2.1.1 引物的设计与合成

根据GenBank中公布的IBDV序列(登录号为NC_001847),采用Oligo 7.27设计引物。引物合成由南京金斯瑞生物科技有限公司完成。引物gD-up为CCGgaattcATGCCGCGATACAACACTACTGAA C;引物gD-down为ATAAGAATgcgggccgcTTAAGGCGGCGGCTCGTAGC。

1.2.1.2 IBRV总RNA的提取

按照试剂盒说明书提取总RNA。

1.2.1.3 IBRV gD基因片段的扩增

按照试剂盒说明书合成cDNA。以cDNA为模板,以gD-up和gD-down为引物进行PCR扩增。反应体系:模板1 μ L、gD-up和gD-down各1 μ L、缓冲液10 μ L、dNTPs 4 μ L、Fastpfu 1 μ L、ddH₂O 32 μ L。反应条件:95 $^{\circ}$ C预变性2 min;95 $^{\circ}$ C变性20 s,55 $^{\circ}$ C退火20 s,72 $^{\circ}$ C延伸45 s,共30个循环;72 $^{\circ}$ C后延伸5 min。PCR反应结束后,取10 μ L进行琼脂糖凝胶电泳。鉴定片段大小。将大小合适的PCR产物按照胶回收试剂盒说明进行胶回收。

1.2.1.4 IBRV Δ gD基因的克隆与鉴定

将经胶回收的目的片段连接到pMD19-T载体上,转化*E. coli* Top10感受态细胞,获得重组pMD19- Δ gD。将经PCR鉴定正确的单克隆菌落送金斯瑞公司测序。

1.2.1.5 原核表达系统的构建与鉴定

将测序正确的重组质粒pMD19- Δ gD用*EcoR* I和*Not* I进行双酶切。将酶切产物进行核酸电泳,并胶回收目的片段。将目的片段与进行同样操作的pET-32a进行连接,得到重组质粒,并将重组质粒命名为32a- Δ gD。将重组质粒32a- Δ gD转入*E. coli* Rosetta (DE3)感受态细胞,挑去阳性克隆进行菌落PCR和酶切鉴定,将鉴定正确的重组菌命名为R/32a- Δ gD。

1.2.2 重组gD蛋白表达及免疫原性鉴定

1.2.2.1 R/32a- Δ gD的诱导表达

挑取重组菌R/32a- Δ gD单菌落接种到LB培养基(含氨苄青霉素和氯霉素,其终质量浓度氨苄青霉素为100 μ g/mL,氯霉素为70 μ g/mL)中,于恒温摇

床37 ℃、转速为220 r/min培养至 $OD_{600\text{ nm}}$ 为0.8左右,加入终浓度0.2 mmol/L的IPTG进行诱导,诱导时间为6 h,诱导温度为25 ℃,诱导转速为150 r/min。

1.2.2.2 重组蛋白的纯化与鉴定

诱导结束后离心,收集菌体。将收集到的菌体用PBS缓冲液洗涤2次,并用PBS缓冲液重悬菌体。在冰浴条件下用超声波裂解菌体,裂解结束后分别对裂解上清液和沉淀进行取样,并进行SDS-PAGE蛋白电泳。用镍柱对重组蛋白进行纯化。纯化步骤:将细胞破碎上清液在结合缓冲液中过夜透析,上样过柱(5 mL HisTrap, GE HealthCare),再用结合缓冲液洗涤5个柱体积,最后用洗脱缓冲液洗涤5个柱体积,收集洗脱组分,并用SDS-PAGE蛋白进行电泳鉴定。

1.2.2.3 Western Blot鉴定

将蛋白样品完成SDS-PAGE后进行转膜操作。转膜采用湿转方式进行。转膜缓冲液由Tris 3.0 g、Gly 14.4 g、甲醇200 mL加去离子水至1 000 mL。转膜完成后,用5%脱脂乳封闭,4 ℃过夜。封闭结束后用PBST洗3遍,加IBRV阳性血清孵育2 h。孵育结束后用PBST洗5遍,加HRP标记兔抗牛IgG孵育1 h,孵育结束后用PBST洗5遍,最后加沉淀型TMB显色10~30 min,拍照。

1.2.2.4 表达产物的间接ELISA鉴定

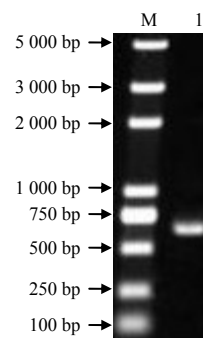
用纯化后的重组抗原包被ELISA反应板,100倍稀释IBRV标准阳性血清,5 000倍稀释HRP标记的兔抗牛IgG二抗,TMB显色后用2 mol/L H_2SO_4 中止反应,测定 $OD_{450\text{ nm}}$ 。

2 结果与分析

2.1 R/32a- ΔgD 工程菌构建结果

2.1.1 ΔgD 目的基因的扩增结果

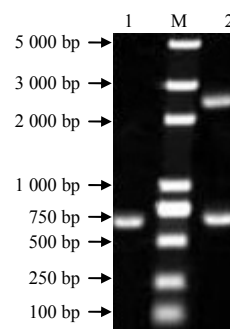
用设计的特异性引物扩增IBRV的gD类免疫球蛋白结构域,得到1条约699 bp的目的片段(图1)。扩增出的片段的大小与gD蛋白类免疫球蛋白结构域理论片段的大小一致。胶回收PCR产物连接T载体,并对TA克隆进行PCR鉴定的结果如图2所示。



M Trans 2 000 plus DNA Marker; 1 PCR 产物。

图 1 IBRV ΔgD 基因片段扩增的电泳分析结果

Fig.1 Analysis of PCR product of IBRV ΔgD gene



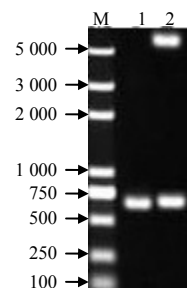
M Trans 2 000 plus DNA Marker; 1 PCR 产物; 2 双酶切产物。

图 2 TA 克隆鉴定结果的电泳分析结果

Fig.2 Identification results of TA clone

2.1.2 ΔgD 蛋白原核表达载体的鉴定结果

将构建的pET-32a- ΔgD 重组质粒进行双酶切和PCR鉴定(图3),电泳观察条带的大小(目的片段大小约700 bp,载体片段大小约5 900 bp)与预期相符,说明重组表达载体构建成功。



M Trans 2 000 plus DNA Marker; 1 PCR 产物; 2 双酶切产物。

图 3 重组表达载体的电泳分析结果

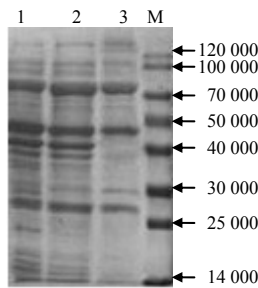
Fig.3 Electrophoresis of identification of recombinant expression vector

2.2 ΔgD 蛋白的诱导表达与纯化结果

2.2.1 重组蛋白的可溶性

重组菌在25 ℃、0.2 mmol/L IPTG、150 r/min

诱导表达6 h,离心收集菌体,超声波裂解菌体,对全菌和破碎上清液进行SDS-PAGE鉴定的结果见图4。由图4可以看出,目的蛋白获得了较好的可溶性表达。



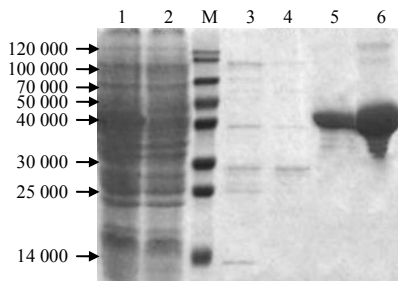
M Blue Plus Protein Marker ; 1 R/32a-*ΔgD* 诱导全菌 ; 2 R/32a-*ΔgD* 诱导破碎上清液 ; 3 对照。

图4 R/32a-*ΔgD* 诱导表达的 SDS-PAGE 分析结果

Fig.4 Analysis of expression condition of R/32a-*ΔgD* via SDS-PAGE

2.2.2 重组蛋白的纯化情况

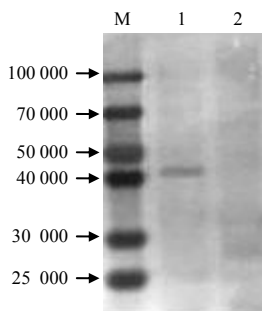
重组蛋白经镍柱纯化后,用SDS-PAGE蛋白电泳鉴定其纯度,在43 000处有1条明显的条带(图5),该条带大小与文中所述重组gD蛋白的理论大小相符,表明重组*ΔgD*蛋白已获得纯化。纯化后的蛋白经SDS-PAGE蛋白电泳后转至NC膜进行Western Blot鉴定的结果如图6所示。



M Blue Plus Protein Marker ; 1 R/32a-*ΔgD* 诱导破碎上清 ; 2 流穿样 ; 3、4 除杂 ; 5 洗脱样 ; 6 浓缩样。

图5 重组 *ΔgD* 蛋白纯化后的 SDS-PAGE 分析结果

Fig.5 Electrophoresis result of purified recombinant protein *ΔgD*



M Blue Plus Protein Marker ; 1 纯化液 ; 2 空载体对照。

图6 纯化后 *ΔgD* 蛋白的 Western Blot 分析结果

Fig.6 Western Blot result from purified recombinant protein *ΔgD*

2.2.3 重组蛋白的 ELISA 鉴定结果

将纯化的*ΔgD*重组蛋白和pET-32a空载表达的标签蛋白(Trx标签)稀释后包被96孔酶标板(每孔包被量为1.0 μg),按间接ELISA方法检测标准阴性、阳性血清,每种重组蛋白对阴性、阳性血清各进行3个重复,测 $OD_{450\text{ nm}}$ 吸光值并取平均值。*ΔgD*蛋白包被板子测得的阳性平均值为0.853,阴性平均值为0.054,阳性平均值与阴性平均值的比值为15.80; Trx标签包被板子测得的阳性平均值为0.028,阴性平均值为0.021,阳性平均值与阴性平均值的比值为1.33。由这一数据可以断定重组*ΔgD*蛋白可以作为IBRV ELISA抗体检测的包被抗原。

3 结论与讨论

中国最早发现并报道牛传染性鼻气管炎是在1981年。周泰冲等从新西兰进口的奶牛中检测到了该病毒,之后就出现了大量与之相关的报道^[8]。目前,该病在不同国家和地区呈现不同程度的发病和流行,给全球养牛业造成了巨大的经济损失。IBRV已被OIE认定为B类传染病,在中国被认定为二类传染病,被列为国际动物贸易及进出境动物检疫中的重点检查对象^[9]。IBRV病毒的全基因长度约为138 000 bp,可编码40种结构蛋白,其中糖蛋白占11种。碱基中G+C比例可达70%以上,由一长、一短2个独特区两侧的重叠序列形成^[2]。IBRV主要的基因包括*gB*、*gC*、*gD*、*gE*和*TK*,其中*gD*基因全长1 251 bp,共编码417个氨基酸。*gD*蛋白与病毒侵入宿主细胞有关,可诱导细胞免疫和体液免疫,是病毒在复制过程中所必需的结构蛋白,位于所感染细胞和病毒囊膜的表面,在免疫试验中,*gD*引起的细胞免疫要比*gB*、*gC*更为强烈和持久^[10-11]。抗*gD*蛋白的单克隆抗体能够中和吸附在宿主细胞表面的病毒,且中和滴度值较高,因此可将其作为亚单位疫苗和诊断试剂研制的首选蛋白。

大肠杆菌是第一个用于重组蛋白生产的宿主菌,它具有遗传背景清楚、培养操作简单、转化和转导效率高、生长繁殖快、成本低廉等优点,而且其表达外源基因产物的水平远高于其他基因表达系统,表达的目的蛋白量甚至超过细菌总蛋白量的30%。*gD*蛋白作为IBRV临床检测的靶抗原,采用大肠杆菌表达系统对其进行表达,不仅可以大大缩短

获得目的蛋白的时间,降低研发成本,而且可以较快地对gD蛋白的功能域进行有益的探索。为此,笔者选取大肠杆菌表达gD蛋白作为ELISA检测用包被抗原。本试验中成功构建了表达载体pET32a-*AgD*,*AgD*蛋白在Rosseta (DE3)中获得了高效表达。重组蛋白经过镍柱纯化的浓度在95%以上,蛋白浓度为2.5 mg/mL。经ELISA及Western Blot试验检测,该重组蛋白具有良好抗原性和反应特异性。以高纯度的目的蛋白为抗原,用HRP标记的兔抗牛IgG为二抗建立的检测抗IBRV抗体的间接ELISA检测方法,通过初步验证,该方法敏感、特异、快速,有望实现商品化,对促进中国牛传染性鼻气管炎的防制及进出口检疫工作具有积极意义。

参考文献:

- [1] LEMAIRE M ,SCHYNTS F ,MEYER G ,et al .Latency and reactivation of a glycoprotein E negative bovine herpesvirus type 1 vaccine : influence of virus load and effect of specific maternal antibodies[J] . *Vaccine* , 2001 , 19(32) : 4795-4804 . DOI : 10.1016/s0264-410x(01)00212-2.
- [2] BISWAS S ,BANDYOPADHYAY S ,DIMRI U , et al .Bovine herpesvirus-1 (BHV-1) – a re-emerging concern in livestock : a revisit to its biology , epidemiology , diagnosis , and prophylaxis[J] . *Vet Q* , 2013 , 33(2) : 68-81 . DOI : 10.1080/01652176.2013.799301.
- [3] WOODBINE K A ,MEDLEY G F ,MOORE S J ,et al .A four year longitudinal sero-epidemiological study of bovine herpesvirus type-1 (BHV-1) in adult cattle in 107 unvaccinated herds in south west England[J] . *BMC Vet Res* , 2009 , 5 : 5 . DOI : 10.1186/1746-6148-5-5.
- [4] FAN Q , YAO L , DING M , et al . Development of latex agglutination test for rapid detection of antibodies against Bovine herpesvirus 1 and Bovine herpesvirus 5 in cattle[J] . *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* , 2012 , 24(6) : 1162-1165 . DOI : 10.1177/1040638712462376.
- [5] FRANCIS D H . Use of immunofluorescence , Gram's staining , histologic examination , and seroagglutination in the diagnosis of porcine colibacillosis[J] . *Am J Vet Res* , 1983 , 44(10) : 1884-1888.
- [6] 朱远茂 , 王海燕 , 薛飞 , 等 . 牛传染性鼻气管炎间接ELISA 诊断方法的建立[J] . *中国兽医科技* , 2005 , 35(12) : 959-963 . DOI : 10.3969/j.issn.1673-4696.2005.12.008.
- [7] 李继昌 , 董光志 , 张秀英 , 等 . 牛传染性鼻气管炎的生物学诊断与防治[J] . *中国兽药杂志* , 2001 , 35(6) : 45-48 . DOI : 10.3969/j.issn.1002-1280.2001.06.022.
- [8] 周泰冲 , 叶章明 , 黎少权 , 等 . 从新西兰进口奶牛中分离传染性牛鼻道气管炎病毒[J] . *兽医科技杂志* , 1981(1) : 8-11.
- [9] 费恩阁 , 李德昌 , 丁壮 . 动物疫病学[M] . 北京 : 中国农业出版社 , 2004.
- [10] TIKOO S K , FITZPATRICK D R , BABIUK L A , et al . Molecular cloning , sequencing , and expression of functional bovine herpesvirus 1 glycoprotein gIV in transfected bovine cells[J] . *J Virol* , 1990 , 64(10) : 5132-5142.
- [11] 殷震 , 刘景华 . 动物病毒学[M] . 北京 : 科学出版社 , 1997.

责任编辑: 王赛群

英文编辑: 王 库