

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (2) :227 - 234; 4 February 2015
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140218

截短表达的 TTSuV2 ORF1 重组蛋白对猪血清的免疫学反应

李中圣¹, 陈轶雯^{1,2}, 白挨泉³, 陈善真¹, 王璐璐¹, 姚火春², 王贵平^{1*}

¹广东海大畜牧兽医研究院有限公司, 广东 广州 511400

²南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095

³佛山科学技术学院生命科学学院, 广东 佛山 528000

摘要:【目的】本文旨在了解猪细小病毒 2 (Torque teno sus virus 2, TTSuV2) 病毒蛋白对猪血清的免疫学反应, 明确 TTSuV2 ORF1 编码的氨基酸序列上特定片段的免疫原性, 为 TTSuV2 的免疫学检测方法建立提供实验依据。【方法】以本实验室测序的 TTSuV2 毒株为研究对象, 在大肠杆菌表达系统中克隆表达了 TTSuV2 ORF1 基因上两相互重叠的基因片段, 对表达产物进行纯化, 分析了两重组蛋白 (TTSuV2 ORF1a 与 TTSuV2 ORF1ab) 对猪血清抗体的免疫学反应。【结果】应用标签抗体进行 Western Blotting 分析的结果显示, 重组 TTSuV2 ORF1a 与 TTSuV2 ORF1ab 蛋白成功表达。应用建立的 ELISA 方法对 212 份猪血清进行检测的结果表明, 含有 179 个氨基酸的重组 TTSuV2 ORF1a 与含有 416 个氨基酸的重组 TTSuV2 ORF1ab 蛋白之间有显著的相关性, 二者对猪血清的反应基本一致。采用猪血清进行 Western Blotting 分析的结果显示, 血清抗体可特异性识别两重组蛋白。【讨论】TTSuV2 ORF1a 与 TTSuV2 ORF1ab 相互重叠的 179 个氨基酸序列上 (168 - 346) 含有 TTSuV2 ORF1 关键的 B 细胞表位, 重组蛋白 TTSuV2 ORF1a 适用于 TTSuV2 血清抗体免疫学检测。

关键词:猪细小病毒 2, ORF1 蛋白, 表达和纯化, 免疫学分析

中图分类号: Q939.94 **文章编号:** 0001-6209 (2015) 02-0227-08

细小病毒 (Torque teno virus, TTV) 是一类无囊膜, 二十面体, 单股负链环状 DNA 病毒, 病毒颗粒在电镜观察直径在 30 - 32 nm。流行病学的研究发现, TTV 广泛存在于猪、牛、羊、犬、猫、家禽等多种家养及野生动物体内^[1-3]。根据 2013 年国际病毒分类协会 (ICTV) 的划分, 感染猪的 TTV (Torque teno sus virus, TTSuV) 属于指环病毒科 (Anelloviridae) 中细小病毒属 (*Iotatorquevirus*) 或 *Kappatorquevirus* 属。TTSuV2 是细小病毒属的一个种, 又称 TTSuV1b, 本文暂沿用 TTSuV2 这一名称^[4]。

国内外针对 TTSuVs 流行病学的报道较多。2004 年, McKeown 对包括中国在内的 6 个不同国家地区的 154 份猪血清进行检测, TTSuVs 阳性率高达 66.2% (102/154)^[5]。2009 年至今, 各地科研机构对 TTSuVs 进行分子流行病学的调查结果显示, TTSuVs 对猪群的感染在我国具有广泛性和普遍性, 猪群 TTSuVs 的感染率在 47.4% - 87.1%^[6-9]。2014 年, Leblanc 等对加拿大商品化猪肉的 Realtime-PCR 检测结果显示, 待食猪肉样品 TTSuVs 的检出率为 97.9%, 每克猪肉病毒载量最高 9.9 ×

基金项目: 广东省科技计划项目 (2012A020602072)

* 通信作者。 +86-20-34814989; E-mail: wanggp2@haid.com.cn

作者简介: 李中圣 (1979 -), 男, 山西大同人, 博士, 主要从事生物技术应用研究。E-mail: lizs@haid.com.cn

收稿日期: 2014-04-25; 修回日期: 2014-08-22

10^5 病毒拷贝;病毒在猪肝中的检出率为 98.6%,每克肝脏病毒载量更可高达 9.9×10^6 病毒拷贝^[10]。人类对 TTSuVs 的高度接触。Jimenez-Melsio 的研究表明,在人胎盘样品中可检出 TTSuVs,阳性率高达 25%^[11]。尽管在猪群有较高的感染率, TTSuVs 似乎无直接的致病性,其在猪群中的存在原因和感染机理了解很少。统计学的调查显示, TTSuVs 与断奶仔猪多系统衰竭综合征 (PMWS) 和猪皮炎肾病综合征 (PDNS) 之间有一定的联系, TTSuVs 与其它猪病原体协同感染可能导致疾病加重^[4,12]。

TTSuVs 全长约 2900 bp,包括 3 个开放阅读框,分别为: ORF1、ORF2、ORF3 (或 ORF2/2)。通过与相关 ssDNA 病毒的对比分析,目前认为,长度在 1875 - 1884 bp 的 TTV ORF1 编码病毒核衣壳蛋白 (Capsid protein), 是唯一的病毒结构蛋白^[3, 13-16]。TTV ORF2 具有与蛋白酪氨酸磷酸激酶 (Proteintyrosine kinase) 类似的结构域,可能与感染期间细胞或病毒蛋白的调节、复制有关^[17-18]。目前还不清楚 TTV ORF3 的具体功能。

TTSuVs 与多种病原共生但不导致细胞或组织病变,这一情况加大了其病原学研究难度,目前人们对 TTSuVs 各 ORF 的功能知之甚少。本文通过对 TTSuV2 ORF1 截短表达,分析了两重组病毒蛋白与 212 份猪血清的免疫学反应,通过数据分析,推断出一段具有较高免疫原性的病毒蛋白。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要材料: 含有 *TTSuV2GDIMA ORF1* (GenBank: JQ782385.1) 的克隆质粒由本实验室制备、保存,大肠杆菌 BL21 购自 Life Technology 公司。猪血清:2012 年从广东省四会、从化、肇庆、惠州等地区采集分离。

1.1.2 主要试剂与仪器: Cycle-pure kit、小量质粒提取试剂盒均为 OMEGA 公司产品;Kodplus 高保真

酶为 TOYOBO 公司产品;DNA 连接酶、*NdeI*、*XhoI* 和 *Hind III* 限制性内切酶为大连宝生物工程有限公司;His tag 和 Flag tag 单克隆抗体购自 Snata 公司。BCA 蛋白定量试剂盒、BSA、HRP 标记羊抗猪 IgG、DAB 显色试剂盒和脱脂奶粉为武汉博士德公司产品;主要仪器包括:高性能 PCR 仪 (S1000, BioRad 公司),酶标仪 (MK3, Thermo 公司),凝胶成像系统 (Tanon-1600, 上海天能)。

1.2 TTSuV2 ORF1 的生物信息学分析

对我实验室克隆测序的 *TTSuV2 GDIMA1 ORF1* 基因及编码肽链进行生物信息学分析,包括: TTSuV2 ORF1 蛋白进行疏水性、抗原性、跨膜区、信号肽等进行分析或预测。

1.3 TTSuV2 ORF1a 与 TTSuV2 ORF1ab 的克隆、表达与蛋白纯化

结合生物信息学的分析结果,对 *TTSuV2 ORF1* 基因进行截短表达,截取的片段命名为: *TTSuV2 ORF1a* 与 *TTSuV2 ORF1ab*,两片段在 *TTSuV2* 基因中的位置如图 1 所示。

设计两片段表达引物,分别在 *TTSuV2 ORF1a* 与 *TTSuV2 ORF1ab* 编码序列的羧基端引入 Flag 和 His 蛋白表达标签 (tag),两质粒的上游引物相同,引物序列为 *TTV2ORF1-NdeI*: CGCCATATGAAAAA CAACACAAAATAGTA; *TTSuV2 ORF1a* 下游表达引物为 *TTV2ORF1a-HindIII*: CCCAAGCTTTCACTTATCATCGTCGCTCTTGTAGTCTCTTGATTTTGGATTTG TAGC; *TTSuV2 ORF1ab* 下游表达引物 *TTV2ORF1ab-XhoI*: CCCTCGAGCAGTGTTCATCCTCTTTA CC。按照 Kodplus 高保真酶使用说明配制 PCR 反应体系,PCR 反应程序为:94℃, 5 min;94℃, 30 s; 51℃, 30 s;68℃, 100 s;设 30 个循环;68℃, 8 min。反应结束后,取 5 μ L PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳;利用 Cycle-pure kit 回收 PCR 目的片段;分别用相应的 DNA 限制性内切酶对 PCR 产物及 PET21b 空质粒进行双酶切,回收酶切产物,用 DNA 连接酶分别将 DNA 片段连接到对应的酶切载体,16℃

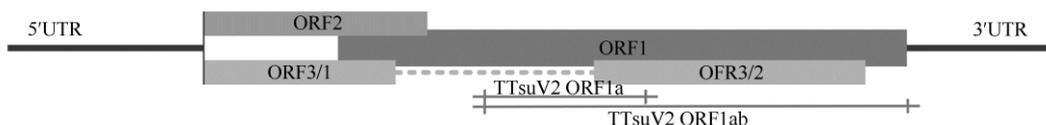


图 1. TTSuV2 病毒基因示意图

Figure 1. Diagram of the TTSuV2 genes.

连接过夜;用 CaCl_2 法将连接产物转化 DH5 α 感受态细胞,菌液 PCR 鉴定、提取质粒,分别转化入 BL21 感受态细胞,37 $^\circ\text{C}$ 培养 8 h,菌液 PCR 鉴定。取鉴定正确的菌落分别接种于 3 mL LA 液体培养基中,1 mmol/L 的 IPTG 进行诱导 8 h,离心收集菌体,加入蛋白上样缓冲液煮沸 15 min,SDS-PAGE 分析目的蛋白表达情况。分别以 His tag 和 Flag tag 单克隆抗体为一抗,应用 Western Blotting 对重组 TTSuV2 ORF1ab 和重组 TTSuV2 ORF1a 表达情况进行鉴定。应用微量蛋白回收试剂盒从 PAGE 胶上回收重组蛋白。用 BCA 法测定回收蛋白的浓度。

1.4 重组 TTSuV2 ORF1a 与 TTSuV2 ORF1ab 蛋白对猪血清的反应性

分别应用酶联免疫吸附实验 (ELISA) 和 Western Blotting 分析重组蛋白对猪血清的反应性。间接 ELISA 的步骤为:①分别以等摩尔数的纯化重组 TTSuV2 ORF1a 与 TTSuV2 ORF1ab 蛋白为抗原包被聚苯乙烯反应板,37 $^\circ\text{C}$ 温浴 1 h;②甩干、洗涤,每孔加 100 μL 封闭液,37 $^\circ\text{C}$ 封闭 2 h;③甩干、洗涤,加入 100 μL 40 倍稀释的猪血清 (一抗),37 $^\circ\text{C}$,1 h;④甩干、洗涤,每孔加入 100 μL 2000 倍稀释的 HRP-羊抗猪 IgG 抗体 (二抗),37 $^\circ\text{C}$,1 h;⑤甩干、洗涤,每孔加入 100 μL 显色液,室温避光显色 10 min;⑥加入终止液,在酶标仪上测 OD_{450} 。应用 Excel 和 SPSS 15 软件包对以上 ELISA 法获取的数据进行分析。结合 Western Blotting 实验分析免疫反应的特异性,步骤:分别以两纯化的重组蛋白为待检样品,电泳、转膜、封闭,以 100 倍稀释的猪血清为一抗进行免疫学分析,最后加入 DAB 显色液,避光显色。

2 结果

2.1 TTSuV2 ORF1 基因的生物信息学

应用生物信息学分析软件对 TTSuV2 ORF1 进行分析的结果表明,TTSuV2 ORF1 编码的病毒蛋白无信号肽序列和跨膜区,该蛋白亲水性区段较疏水区段多,预测其重组蛋白具有一定可溶性。应用多种抗原性预测工具的预测结果显示,TTSuV2 ORF1 编码蛋白的氨基端 1-346 个氨基酸序列上 B 细胞抗原表位多肽较为连续或密集,羧基端略为分散。

2.2 TTSuV2 ORF1a 与 TTSuV2 ORF1ab 的原核表达质粒构建

以 TTSuV2 GDIMA1 株的 DNA 序列为模板,经 Kodplus 高保真聚合酶 PCR 扩增,得到两条大小分别为 537 bp 和 1383 bp 的片段,两片段与预期的目的片段大小相符 (图 2-A)。对构建好的重组质粒进行双酶切,酶切后的 DNA 电泳图谱如图 2-B,酶切结果与预期相符。结合对两质粒进行测序的结果,确认重组质粒 TTSuV2 ORF1a-pET21 和 TTSuV2 ORF1ab-pET21 构建成功。

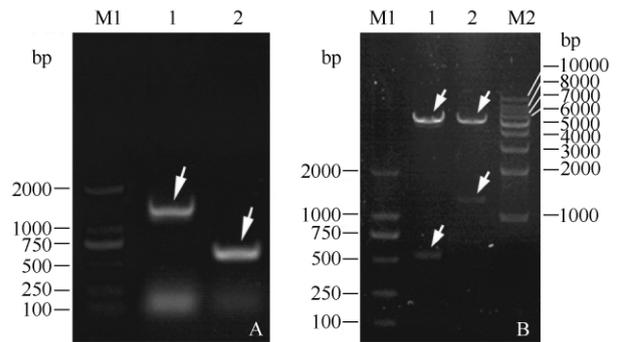


图 2. TTSuV2 ORF1a、TTSuV2 ORF1ab PCR (A) 及其原核表达载体酶切鉴定电泳图 (B)

Figure 2. Map of TTSuV2 ORF1a, TTSuV2 ORF1ab PCR amplification (A) and the fragments of two recombinant plasmids digested with restriction enzymes (B). (A) M: DNA marker; Lane 1, 2: The PCR amplification of TTSuV2 ORF1a, TTSuV2 ORF1ab. (B) M1, M2: DNA marker; Lane 1, 2: DNA fragments of TTSuV2 ORF1a-pET21 and TTSuV2 ORF1ab-pET21 digested with restriction enzymes. The target DNA strips are marked with arrows.

2.3 重组 TTSuV2 ORF1a 与 TTSuV2 ORF1ab 蛋白表达与纯化

将重组质粒 TTSuV2 ORF1a-pET21 和 TTSuV2 ORF1ab-pET21 分别转化大肠杆菌感受态细胞 BL21,分别构建重组工程菌:TTSuV2 ORF1a-BL21、TTSuV2 ORF1ab-BL21,利用 IPTG 诱导,SDS-PAGE 电泳检测,两株重组菌分别过量表达分子量大小为 22 kDa 和 51 kDa 的重组蛋白,对照样品均无相应条带 (图 3-A)。分别应用 His tag 和 Flag tag 单克隆抗体对重组 TTSuV2 ORF1ab 和重组 TTSuV2 ORF1a 进行 Western Blotting,均得到预期大小的印迹 (图 3-B),说明两重组蛋白表达成功。利用切胶回收的方法对 SDS-PAGE 凝胶上目的条带进行回收,SDS-PAGE 电泳检测,结果如图 3-C,凝胶薄层扫描分析显示,纯化的重组 TTSuV2 ORF1a 与 TTSuV2

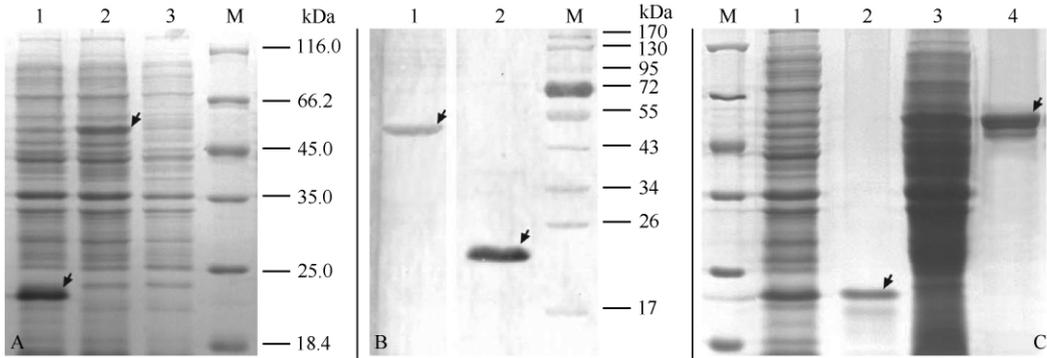


图 3. 重组 TTSuV2 ORF1a、TTSuV2 ORF1ab 蛋白 SDS-PAGE (A, C) 与标签抗体 Western Blotting 分析 (B)

Figure 3. SDS-PAGE (A, C) and tag antibody Western Blotting (B) of the TTSuV2 ORF1a and TTSuV2 ORF1ab recombinant proteins. A: Lane 1-3: SDS-PAGE of Prokaryotic expression production of *TTSuV2 ORF1a-pET21*, *TTSuV2 ORF1ab-pET21* and the control vector; M: protein ladder. B: Lane 1,2: Western Blotting of the TTSuV2 ORF1ab and TTSuV2 ORF1a recombinant proteins; M: prestained protein ladder. C: Lane 1, 3: SDS-PAGE of unpurified TTSuV2 ORF1a and TTSuV2 ORF1ab recombinant proteins; lane 2, 4: SDS-PAGE of purified TTSuV2 ORF1a and TTSuV2 ORF1ab recombinant proteins; M: protein ladder. The target protein strips are marked with arrows.

ORF1ab 蛋白纯度分别为:94.3% 和 91.7%。应用 BCA 蛋白定量试剂盒对回收蛋白进行定量。

2.4 重组 TTSuV2 ORF1a 与 TTSuV2 ORF1ab 蛋白对猪血清的反应性

2.4.1 ELISA: 分别以重组 TTSuV2 ORF1a 与 TTSuV2 ORF1ab 蛋白为抗原, 建立 TTSuV2 抗体 ELISA 检测方法。对 2012 年从广东省四会、从化、肇庆等地采集的 212 份血清进行检测, 结果如图 4, 两重组蛋白 (抗原) 对血清样品 (抗体) 的反应性有较高的同步性, 利用 SPSS 软件对两组实验数据进行相关性分析, 按照 Pearson 数据相关性判定方法进行分析, 两组数据相关系数 $r = 0.781$, 按照相关性判定

标准 (当 $0.5 \leq |r| \leq 0.8$ 时为显著相关), 二者呈显著正相关。提示, 较短的 TTSuV2 ORF1a 与较长的 TTSuV2 ORF1ab 重组蛋白对猪血清的免疫学反应一致。

应用 SPSS 软件对两组 ELISA 数据进行分析, 绘制 Boxplot 图型, 结果如图 5 所示, 以较短片段 TTSuV2 ORF1a 为抗原进行 ELISA 反应的 OD_{450} 值较高 (中位数 = 0.552), 而以较长片段 TTSuV2 ORF1ab 为抗原进行 ELISA 反应的 OD_{450} 值略低 (中位数 = 0.445), 说明重组 TTSuV2 ORF1a 蛋白对血清中抗体的反应性更好。从 Boxplot 图中可以看出重组 TTSuV2 ORF1a 蛋白的 ELISA 数据在中位数两

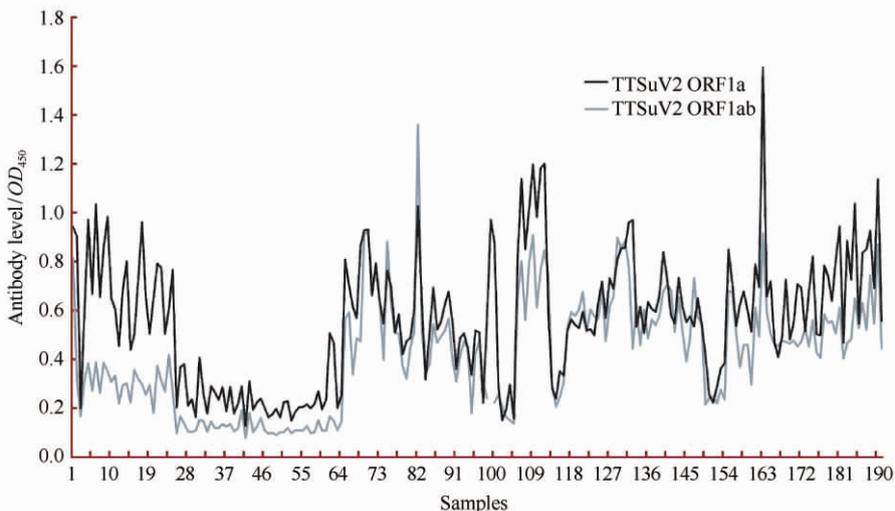


图 4. 重组蛋白 TTSuV2 ORF1a、TTSuV2 ORF1ab 血清抗体 ELISA 分析

Figure 4. TTSuV2 ORF1a and TTSuV2 ORF1ab recombinant proteins serum ELISA.

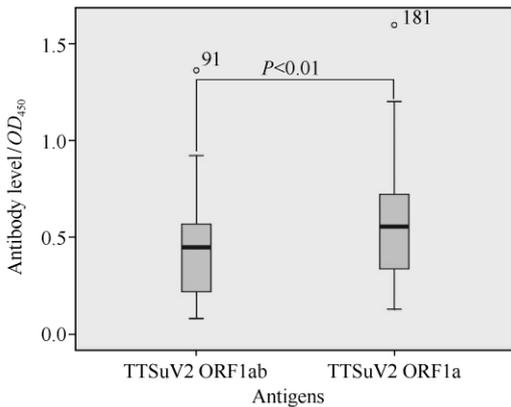


图 5. 重组蛋白 TTSuV2 ORF1a、TTSuV2 ORF1ab ELISA 分析 Boxplot 图

Figure 5. Boxplot showing the comparison of serum TTSuV2 antibody levels between TTSuV2 ORF1a and TTSuV2 ORF1ab recombinant proteins ELISA results.

侧分布更为均匀, 数据较集中。然而, 分别用两种抗原对血清抗体进行 ELISA 检测的最大值不是同一样品(短、长片段分别对应 181 号样品和 91 号样品), 提示两种抗原可能对个别血清中的 TTSuV2 抗体结合情况有所不同。配对样本方差分析结果显示, 两组数据均值差异极显著 ($P < 0.01$)。

2.4.2 Western Blotting: 应用 Western Blotting 分析重组 TTSuV2 ORF1a 与 TTSuV2 ORF1ab 蛋白对猪血清 (ELISA 检测 OD 值较高) 反应的特异性, 结果表明, 分别应用 ELISA 检测中 OD 值较高 (两 OD_{450} 均大于 0.7) 和 OD 值较低 (两 OD_{450} 均小于 0.5 及两 OD_{450} 均小于 0.2) 的猪血清作为一抗进行 Western Blotting。结果显示, 血清抗体可特异性识别 NC 膜上 22 kDa 和 51 kDa 的蛋白样品 (图 6, 泳道 1-4 箭头所指), 且 OD_{450} 高的样品条带着色更深 (图 6, 泳道 1、2)。该结果证明猪血清中特异抗体对线性化重组蛋白的免疫识别作用良好, ELISA 检测中 OD_{450} 较高的样品 Western Blotting 反应也较强。该实验同时验证了 ELISA 检测的特异性。

3 讨论

TTSuVs 分子流行病学的调查中, TTSuV1 和 TTSuV2 在猪群中的感染水平相当, 越来越多的报道显示 TTSuV1 的感染率甚至高于 TTSuV2^[5-9, 19]。然而, Huang 等应用建立的 ELISA 法对实验动物病毒感染研究表明, 有 PCV2 相关病症 (PCVAD) 的

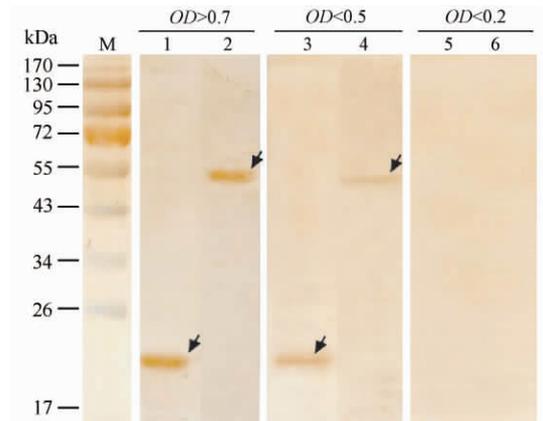


图 6. 重组蛋白 TTSuV2 ORF1a、TTSuV2 ORF1ab 血清抗体 Western Blotting 分析

Figure 6. TTSuV2 ORF1a and TTSuV2 ORF1ab recombinant proteins serum Western Blotting. M: prestained protein ladder. Lane 1, 3, 5: purified TTSuV2 ORF1a recombinant proteins. Lane 2, 4, 6: purified TTSuV2 ORF1ab recombinant proteins. The target protein strips are marked with arrows.

猪 TTSuV2 载量更高, TTSuV2 抗体水平显著偏低^[20]; 而 TTSuV1 抗体水平无此差异, 推测 TTSuV1 与 PCVAD 无关^[21]。此外, Aramouni 等发现猪群在猪痘病毒 (CSFV) 感染前后, TTSuV2 在血液中的病毒量载量比 TTSuV1 有更为明显的增加^[12]。TTSuVs 与 PCVs 的感染特性有诸多相似^[12, 20], 其不同的种、亚种或基因型可能具有不同的生物学特性, TTSuV2 感染可能与 PCVAD 有更大的联系。

本文结合对 TTSuV2 ORF1 生物信息学分析及其相关研究^[18, 20, 22], 选择 TTSuV2 广东株 (GenBank: JQ782385.1) ORF1 基因上两个重叠的基因片段 (TTSuV2 ORF1a 与 TTSuV2 ORF1ab) 进行表达与纯化, 分别以纯化的两重组蛋白为抗原, 对从广东多个猪场中采集的血清 (TTSuV2 PCR 检测呈阳性) 进行了免疫学分析。在应用 ELISA 技术对猪血清的分析中, 两重组蛋白对 212 份血清抗体的反应性一致, 两组数据呈高度正相关, 提示重组蛋白 TTSuV2 ORF1ab 与重组蛋白 TTSuV2 ORF1a 上非重叠区域 (TTSuV2 ORF1b) 对两蛋白抗原性影响不大。在 ELISA 反应的响应程度上, 经配对样本方差分析, 发现两片段对血清抗体的反应性一致, 且重组 TTSuV2 ORF1a 蛋白对血清抗体相应的 OD 值高、反应性更好。在应用血清抗体对两纯化蛋白进行 Western Blotting 的分析中, ELISA 分析中 OD_{450} 值较

高的血清显色更深,且特异性良好,Western Blotting 分析结果是 ELISA 反映特异性的佐证。综上, TTSuV2 ORF1a 上(即 TTSuV2GDIMA1 ORF1 编码蛋白的 168-346 区段)可能含有病毒关键的 B 细胞抗原表位,该表位可刺激免疫系统产生特异性病毒抗体。

尽管 TTSuVs 存在于诸多动物细胞系、牛血清甚至胰酶中^[23-24],由于 TTSuVs 未造成细胞或组织病变,其病毒蛋白的功能和性质研究进展缓慢。通过生物信息学技术及利用与本文类似的免疫学技术(ELISA 和 Western Blotting)确认 TTSuVs ORF1 是 TTSuVs 的唯一的衣壳蛋白(Cap protein)^[3, 13-16]。由于进行全长表达的重组蛋白产量较低(含有稀有密码子),TTSuVs ORF1 的重组表达多为 C 端表达。Huang 等对 TTSuV2 (PTTV2c-VA) ORF1 氨基酸序列上 310-625 区段的多肽进行了重组表达,并建立了 TTSuV2 ELISA 抗体诊断方法,对猪血清的诊断结果发现,常规饲养猪血清抗体对抗原的反应性良好,无菌猪血清抗体不能与抗原发生特异性结合^[20]。对 TTSuV 中另一个种 TTSuV1 的研究发现,应用 C 端蛋白进行免疫后制备的单克隆抗体特异性识别 TTSuV1 ORF1 蛋白上 536-548 区段和 549-561 区段的多肽序列^[22];PTTV1a-VA 毒株 ORF1 上 317-625 区段的多肽可以与猪血清中特异抗体发生免疫学反应^[21]。类似地, Jarosova 等在 TTSuV2 (GenBank: AY823991、GU456385、GU188046) ORF1 羧基端 300-625 区段上密集成成了 11 个多肽(长度 13-30 个氨基酸)片段,对猪血清进行 ELISA 检测的结果显示,仅一条位于羧基端的肽段(GQKTEKEPLSDSDEESVISS)对血清样本的反应性良好^[25],结合本文 ELISA 分析结果,尽管两重组蛋白的对血清抗体的免疫学反应具有显著的相关性,但也存在一定差异,TTSuV2 ORF1 羧基端潜在的抗原表位与血清抗体的结合可能是造成这种差异的原因之一。本文选用的毒株的 ORF1 基因序列与国内其它已知 TTSuV2 毒株同源性在 88%-97%^[6],因此本研究结果具有一定的代表性。

本文通过免疫学方法分析了 TTSuV2 ORF1 上两截短蛋白的血清学反应情况,发现 TTSuV2GDIMA1 ORF1 上 168-346 区段多肽中存在 B 细胞抗原表位,该表位可诱导免疫系统产生较高水平的特异性抗体,血清抗体对 TTSuV2 ORF1 具

有良好的识别作用。本文是目前 TTSuV2 病毒蛋白抗原性研究的补充,为进一步 TTSuV2 ORF1 中和表位的研究奠定了基础。

参考文献

- [1] Chen IS, Mak TW, O' Rear JJ, Temin HM. Characterization of reticuloendotheliosis virus strain T DNA and isolation of a novel variant of reticuloendotheliosis virus strain T by molecular cloning. *Journal of Virology*, 1981, 40(3): 800-811.
- [2] Leary TP, Erker JC, Chalmers ML, Desai SM, Mushahwar IK. Improved detection systems for TT virus reveal high prevalence in humans, non-human primates and farm animals. *Journal of General Virology*, 1999, 80 (Pt 8): 2115-2120.
- [3] Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, Yoshizawa H, Miyakawa Y, Mayumi M. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1997, 241 (1): 92-97.
- [4] The International Committee on Taxonomy of Viruses. Virus Taxonomy: 2013 Release, http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?msl_id=28. Accessed year: 2014.
- [5] McKeown NE, Fenaux M, Halbur PG, Meng XJ. Molecular characterization of porcine TT virus, an orphan virus, in pigs from six different countries. *Veterinary Microbiology*, 2004, 104(1-2): 113-117.
- [6] Chen Y, Li Z, Bai A, Chen s, Li Q, Yao H, Wang G. Epidemiological Investigation and Antigen Phylogeny Analyses in Guangdong for Porcine Transfusion Transmitted Virus. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2012, 11: 1767-1772. (in Chinese)
陈轶雯,李中圣,白挨泉,陈善真,李其昌,姚火春,王贵平. 广东猪输血传播病毒流行病学调查及其主要抗原编码区进化分析. *畜牧兽医学报*, 2012, 11: 1767-1772.
- [7] Wu Z, Wang H, Yang X, Guan Z, Zhou Y. Survey of molecular epidemiology of torque teno virus in pigs in southwest China. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2011, 06: 779-782. (in Chinese)
伍志伟,王红宁,杨鑫,管仲斌,周英顺. 中国西南地区猪群中 TTV 分子流行病学调查. *中国兽医学报*,

- 2011, 06: 779-782.
- [8] Zang Q, Zhou Y, Long J, Tong W, Jiang Y, Tong G. Molecular epidemiological investigation of porcine Torque Teno virus and its co-infection analysis with PCV2, PPV4 and PRRSV in different swine herds from 2011 to 2012. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*. 2013, 07: 550-554. (in Chinese)
张青占, 周艳君, 龙进学, 童武, 姜一峰, 童光志. 2011年-2012年中国部分地区猪细小环病毒在不同猪群中的流行病学调查及其与 PCV2、PPV4 或 PRRSV 的共感染分析. *中国预防兽医学报*, 2013, 07: 550-554.
- [9] Zi Z, Xia Y, Han X, Wang B, Yu X, Zhai X, Tian K, Ni J. Prevalence of Torque teno virus in China swine herds in 2009. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2011, 10: 759-762. (in Chinese)
瞿占超, 夏应菊, 韩雪, 汪葆玥, 遇秀玲, 翟新验, 田克恭, 倪建强. 2009年我国部分猪群输血传播病毒感染情况调查. *中国预防兽医学报*, 2011, 10: 759-762.
- [10] Leblanc D, Houde A, Gagne MJ, Plante D, Bellon-Gagnon P, Jones TH, Muehlhauser V, Wilhelm B, Avery B, Janecko N, Brassard J. Presence, viral load and characterization of Torque teno sus viruses in liver and pork chop samples at retail. *International Journal of Food Microbiology*, 2014, 178: 60-64.
- [11] Jimenez-Melsio A, Pares S, Segales J, Kekarainen T. Detection of porcine anelloviruses in pork meat and human faeces. *Virus Research*, 2013, 178 (2) : 522-524.
- [12] Aramouni M, Segales J, Sibila M, Martin-Valls GE, Nieto D, Kekarainen T. Torque teno sus virus 1 and 2 viral loads in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) and porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS) affected pigs. *Veterinary Microbiology*, 2011, 153 (3-4) : 377-381.
- [13] Cortey M, Macera L, Segales J, Kekarainen T. Genetic variability and phylogeny of Torque teno sus virus 1 (TTSuV1) and 2 (TTSuV2) based on complete genomes. *Veterinary Microbiology*, 2011, 148 (2-4) : 125-131.
- [14] Hijikata M, Takahashi K, Mishiro S. Complete circular DNA genome of a TT virus variant (isolate name SANBAN) and 44 partial ORF2 sequences implicating a great degree of diversity beyond genotypes. *Virology*, 1999, 260 (1) : 17-22.
- [15] Huang L, Zhai SL, Cheung AK, Zhang HB, Long JX, Yuan SS. Detection of a novel porcine parvovirus, PPV4, in Chinese swine herds. *Virology Journal*, 2010, 7: 333.
- [16] Martinez-Guino L, Ballester M, Segales J, Kekarainen T. Expression profile and subcellular localization of Torque teno sus virus proteins. *Journal of General Virology*, 2011, 92 (Pt 10) : 2446-2457.
- [17] Okamoto H, Takahashi M, Nishizawa T, Tawara A, Fukai K, Muramatsu U, Naito Y, Yoshikawa A. Genomic characterization of TT viruses (TTVs) in pigs, cats and dogs and their relatedness with species-specific TTVs in primates and tupaia. *Journal of General Virology*, 2002, 83 (Pt 6) : 1291-1297.
- [18] Wang M, Zhou Y, Chen Z, Yu H, Li G, Yan L, Jiang Y, Hou J, Tong G. Identification and survey of Torque teno virus in pigs in China. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2009, 10: 751-755. (in Chinese)
王礞礞, 周艳君, 陈宗艳, 于海, 李国新, 阎丽萍, 姜一峰, 侯军委, 童光志. 我国猪群中 TTV 的鉴定及其分子流行病学分析. *中国预防兽医学报*, 2009, 10: 751-755.
- [19] Huang YW, Ni YY, Dryman BA, Meng XJ. Multiple infection of porcine Torque teno virus in a single pig and characterization of the full-length genomic sequences of four U. S. prototype PTTV strains: implication for genotyping of PTTV. *Virology*, 2010, 396 (2) : 289-297.
- [20] Huang YW, Harrall KK, Dryman BA, Beach NM, Kenney SP, Opriessnig T, Vaughn EM, Roof MB, Meng XJ. Expression of the putative ORF1 capsid protein of Torque teno sus virus 2 (TTSuV2) and development of Western blot and ELISA serodiagnostic assays: correlation between TTSuV2 viral load and IgG antibody level in pigs. *Virus Research*, 2011, 158 (1-2) : 79-88.
- [21] Huang YW, Harrall KK, Dryman BA, Opriessnig T, Vaughn EM, Roof MB, Meng XJ. Serological profile of torque teno sus virus species 1 (TTSuV1) in pigs and antigenic relationships between two TTSuV1 genotypes (1a and 1b), between two species (TTSuV1 and -2), and between porcine and human anelloviruses. *Journal of Virology*, 2012, 86 (19) : 10628-10639.
- [22] Liu J, Zhang L, Huang L, Wei Y, Wu H, Liu C. Identification of two new antigen epitopes on the putative capsid protein encoded by torque teno sus virus type 1 ORF1. *Veterinary Microbiology*, 2013, 167 (3-4) : 372-382.
- [23] Han W, Luo Y, Zhao B, Sun Y, Li S, Qiu H.

- Metagenomics-based detection of swine viruses. *Acta Microbiologica Sinica*, 2013, 53 (2) : 197-203.
- [24] Teixeira TF, Dezen D, Cibulski SP, Varela AP, Holz CL, Franco AC, Roehe PM. Torque teno sus virus (TTSuV) in cell cultures and trypsin. *PLoS One*, 2011, 6 (3) : e17501.
- [25] Jarosova V, Celer V. Preliminary epitope mapping of Torque teno sus virus 1 and 2 putative capsid protein and serological detection of infection in pigs. *Journal of General Virology*, 2013, 94 (Pt 6) : 1351-1356.

Serological tests of the truncated TTSuV2 ORF1 recombinant proteins with the porcine sera

Zhongsheng Li¹, Yiwen Chen^{1,2}, Aiquan Bai³, Shanzhen Chen¹, Lulu Wang¹, Huochun Yao², Guiping Wang^{1*}

¹Guangdong Haid Institute of Animal Husbandry & Veterinary, Guangzhou 511400, Guangdong Province, China

²College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu Province, China

³School of Life Science, Foshan University, Foshan 528000, Guangdong Province, China

Abstract: [Objective] We studied the serological response between the special regions on the Torque teno sus virus 2 (TTSuV2) ORF1 coded protein and the porcine sera from conventional pigs. [Methods] Based on a Chinese TTSuV2 strain from Guangdong province, two overlapped virus proteins were expressed from *Escherichia coli*. Then, purified recombinant TTSuV2 ORF1a and TTSuV2 ORF1ab proteins were used as the antigens in the Western Blotting and ELISA assay. [Results] The recombinant TTSuV2 ORF1a and TTSuV2 ORF1ab proteins were identified with the special tag monoclonal antibody. The results of the ELISA tests shown that there were significant relationships between two groups of dates from the recombinant TTSuV2 ORF1a and TTSuV2 ORF1ab proteins antigenic assay. The results of the following Western Blotting assay indicated that the TTSuV2-specific IgG antibodies were contained in pig sera. [Conclusion] The truncated TTSuV2 ORF1a protein (positions 168 to 346 corresponding to TTSuV2 GDIMA1) contains important B cell epitopes which can stimulate immune system antibody secretion. The truncated TTSuV2 ORF1a protein could be effective in TTSuV2 immunodiagnosis.

Keywords: Torque teno sus virus 2, ORF1, expression and purification, serological tests

(本文责编:张晓丽)

Supported by the Science and Technology Planning project of Guangdong Province (2012A020602072)

* Corresponding author. Tel: +86-20-34814989; E-mail: wanggp2@haid.com.cn

Received: 25 April 2014/Revised: 22 August 2014