

禽网状内皮组织增生病毒 gp90 全长蛋白的原核表达、纯化及其免疫原性分析

高立, 祁小乐, 高宏雷, 高玉龙, 秦立廷, 孙芬芬, 张云, 王笑梅*

(中国农业科学院哈尔滨兽医研究所禽传染病研究室, 兽医生物技术国家重点实验室, 哈尔滨 150001)

摘要 【目的】原核表达免疫原性良好的禽网状内皮组织增生病毒(Reticuloendotheliosis virus, REV)gp90 蛋白, 并制备抗 gp90 蛋白高效价多克隆血清。【方法】利用 PCR 技术, 以 pMD18T-env 为模板, 扩增得到 REV 的 gp90 蛋白编码基因, 将其克隆入表达载体 pET-28a(+)中, 将构建的原核表达质粒 pET28-gp90, 转化大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3)感受态细胞, 经异丙基硫代- β -D-半乳糖苷(IPTG)诱导后进行 gp90 蛋白表达并鉴定。用纯化的 gp90 蛋白免疫 6-8 周龄 Balb/c 小鼠, 制备抗 gp90 的多克隆血清。用间接免疫荧光试验检测该血清的特异性, 用酶联免疫吸附试验(ELISA)滴定其效价。【结果】REV gp90 基因在重组大肠杆菌中正确表达, 免疫小鼠后获得的抗血清可与重组杆状病毒表达的 gp90 蛋白特异性反应, ELISA 效价达到 1:12800, 该研究为开展 REV 诊断试剂的研制奠定了基础。

关键词: 禽网状内皮组织增生病毒; gp90 蛋白; 原核表达; 纯化; 多克隆抗体

中图分类号: R37 **文献标识码**: A **文章编号**: 0001-6209(2009)10-1380-05

禽网状内皮组织增生病毒(Reticuloendotheliosis virus, REV)主要侵害火鸡, 也能感染鸡、鸭等禽类, 引起以淋巴、网状细胞增生为特征的肿瘤性病理综合征^[1-4]。该病在澳大利亚、匈牙利、英国、德国等国均有报道, 我国于 1988 年在南京首次分离到 REV-C45 株^[5]。病毒感染后, 禽生长迟缓, 淘汰率和死亡率升高; 引起感染禽的免疫抑制, 干扰其他禽病疫苗的免疫效应, 导致免疫失败。因此, REV 是继马立克氏病病毒(MDV)、禽白血病病毒(ALV)之后又一重要的禽致瘤病毒^[6]。在我国, REV 的流行越来越严重, 在某些鸡场中 REV 抗体阳性率可达 21.4%~71.0%, 其中出现免疫抑制状态的鸡群对 REV 抗体阳性率要比正常鸡群高得多, 因此, REV 对养禽业的危害越来越受到相关部门的重视^[1, 5]。

REV 属逆转录病毒科的 C 型病毒, 含单股

RNA, REV 基因组大小为 9.0 kb, 由 gag、pol、env 基因以及长末端重复序列(long terminal repeat, LTRs)组成, 其中 env 是 REV 的囊膜糖蛋白基因, 也是 REV 的主要变异基因, 与产生中和抗体有关。env 基因编码两种糖蛋白 gp90 和 gp20, gp20 为穿膜蛋白, 而 gp90 蛋白是 REV 的表面囊膜糖蛋白, 含有顺序和构象抗原表位, 是 REV 病毒的保护性抗原, 具有受体结合功能, 能够激发感染宿主产生中和抗体^[7]。

本文利用原核表达系统表达了 REV 的 gp90 蛋白, 利用亲和层析法对表达蛋白进行纯化, 并免疫小鼠, 制备了高效价的抗血清, 该血清可与重组杆状病毒表达的 gp90 蛋白发生特异性反应。获得的 gp90 蛋白和其抗血清可用作禽网状内皮组织增生病的诊断试剂。

基金项目 现代农业肉鸡产业技术体系建设(ncytx-42-G3-01)

* 通信作者。Tel: +86-451-85935004; E-mail: xmw@hvri.ac.cn

作者简介: 高立(1983-), 女, 山东泰安人, 硕士研究生, 主要从事动物病毒学研究。Tel: +86-451-85935078; E-mail: gaoli0820@163.com

收稿日期 2009-03-30; 修回日期 2009-05-18

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株 :pMD18T-env 质粒(克隆有 REV D0701 株的 env 基因)由本实验室构建;原核表达载体 pET-28a(+)大肠杆菌 Top10F', BL21(DE3)由本实验室保存;表达 REV gp90 蛋白的重组杆状病毒由本实验室制备并保存。

1.1.2 主要试剂 :各种限制性内切酶、PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase、DNA Marker、dNTP、Protein Molecular Weight Marker(Low)、T4 DNA 连接酶等均自大连宝生物工程有限公司;PageRuler™ Prestained Protein Ladder 购自 MBI 公司;核酸凝胶回收、PCR 产物回收试剂盒购自 Omega 公司;HisTrap™ kit 购自 Amersham Biosciences 公司;弗氏完全佐剂及弗氏不完全佐剂均购自 Sigma 公司;辣根过氧化酶(HRP)标记的兔抗鸡 IgG、辣根过氧化酶(HRP)标记的兔抗鼠 IgG 购自 Sigma 公司;鸡源 REV 多克隆抗体购自美国 Charles River 公司。

1.1.3 主要仪器 :HZQ-C 空气浴振荡摇床(哈尔滨东联电子技术有限公司)、荧光显微镜(Leica)上海精科实业有限公司、超声波细胞粉碎机(南京新辰生物科技有限公司)等。

1.2 引物设计与合成

参照 REV SNV 株 env 基因组序列(GenBank 登录号:DQ003591),利用 Oligo6.0 软件,设计引物如下:上游引物(gp90YU):5'-CAGGAATTCATGGACTGTCTCACC-3',其 5'端设计有 EcoRI 位点(下划线部分);下游引物(gp90YL):5'-AGAGTTCGACCTTATGACGCCTAGC-3',其 5'端设计有 SalI 位点(下划线部分)。引物由英俊生物技术有限公司合成。

1.3 gp90 基因的扩增

以 pMD18T-env 质粒为模板,用引物 gp90YU、gp90YL 进行扩增,反应体系:5XPrimeSTAR Buffer (Mg^{2+}) 10 μ L、dNTP Mixture 4 μ L、上、下游引物各 1 μ L、PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase 0.5 μ L、质粒模板 0.3 μ L,用 ddH₂O 补至 50 μ L。反应条件:95℃ 5 min、95℃ 30 s、53.2℃ 30 s、72℃ 1 min 10 s、30 个循环、72℃ 10 min。PCR 产物用 0.8% 琼脂糖凝胶进行电泳分析。分析正确后,其余 PCR 产物用琼脂糖凝胶试剂盒回收,按说明书操作。

1.4 重组表达质粒 pET28-gp90 的构建和鉴定

分别用 EcoRI 和 SalI 双酶切上述 PCR 产物和载体 pET-28a(+)酶切产物经电泳分离和凝胶回

收后,用 T4 DNA 连接酶于 22℃ 连接过夜,将连接产物转化 E. coli Top10F' 感受态细胞。挑取单个菌落培养,提取质粒,分别做 PCR 及酶切鉴定,选取阳性克隆,送英俊生物技术有限公司进一步测序确证,将阳性重组表达质粒命名为 pET28-gp90。

1.5 重组蛋白的诱导表达、鉴定及纯化

分别将空载体 pET-28a(+)和重组质粒 pET28-gp90 转化大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞。挑取单个菌落到 LB(Kan⁺)培养液中,37℃ 摇床培养。再按 1:100 比例接种到 50 mL LB(Kan⁺)中,37℃ 培养到 OD₆₀₀ = 0.6 时,加入终浓度为 1 mmol/L 的异丙基硫代- β -D-半乳糖苷(IPTG)诱导培养,诱导表达 5 h 后收集菌液。

用 SDS-PAGE 鉴定重组蛋白的表达。取上述诱导表达的 1 mL 菌液,13400 \times g 离心 1 min,弃上清,用 1 mL pH7.4 的 PBS 重悬沉淀,按照分子克隆实验指南(第二版)具体操作进行 SDS-PAGE 分析。

用 Western bolt 鉴定重组蛋白的正确性。目的蛋白和蛋白分子质量标准经 SDS-PAGE 后,电转移到 NC 膜上(按操作说明书进行)。转移完成后的 NC 膜置于 5% 的脱脂乳中进行封闭,37℃ 2 h, PBST (137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 10 mmol/L Na₂HPO₄, 2 mmol/L KH₂PO₄, 0.05% Tween-20)洗涤 3 次,每次 5 min;然后将 NC 膜放入 1:100 稀释的鸡源 REV 多抗中,37℃ 孵育 90 min,同上洗涤;洗涤后的 NC 膜放入 1:5000 稀释的辣根过氧化酶(HRP)标记的兔抗鸡 IgG 溶液中,37℃ 孵育 90 min;同上洗涤后,用底物溶液(二氨基联苯胺)显色。

用 HisTrap™ 试剂盒纯化重组蛋白。将鉴定为阳性的重组菌大量诱导以后,离心收集菌体,然后用含尿素 8 mol/L 的 PBS 将沉淀悬起,超声波破碎 30 min (振幅为 34%);破碎后的上清按说明书进行纯化。收集的蛋白洗脱液,用 SDS-PAGE 检测蛋白纯度。

1.6 抗 gp90 蛋白多克隆抗体的制备

将纯化的目的蛋白经紫外分光光度计定量后,与等量弗氏完全佐剂乳化后,腹腔及腿肌多点注射 6~8 周龄的 Balb/c 雌性小鼠,50 μ g 重组蛋白/只;以后每隔 2 周用等量弗氏不完全佐剂乳化,进行第二、三次免疫,免疫方式和剂量同首免;第 3 次免疫后 10 d 采血,分离血清。

用间接免疫荧光试验(IFA)检测所制备的抗 gp90 蛋白多克隆抗体的特异性。以表达 gp90 蛋白的重组杆状病毒感染的 sf9 细胞为抗原,1:100 稀释

免疫鼠血清作为一抗,1:5000 稀释辣根过氧化物酶(HRP)标记的兔抗鼠 IgG 作为二抗。另外,以纯化的 gp90 蛋白(1:200 稀释)包被 ELISA 平板,以检测免疫鼠血清抗体效价。

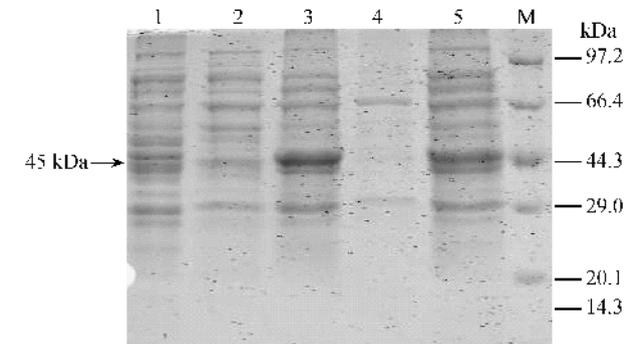
2 结果

2.1 gp90 基因的扩增及表达质粒 pET28-gp90 的构建和鉴定

以 pMD18T-env 质粒为模板,经过 PCR 扩增获得了与预期大小相符的 1191 bp 的目的片段(图略)。PCR 和双酶切鉴定结果均显示重组表达质粒 pET28-gp90 构建正确。测序结果证实目的片段大小及阅读框均正确。

2.2 重组 gp90 蛋白的表达纯化及分析鉴定

阳性重组质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞,经 IPTG 诱导后,发现重组菌裂解物在约 45 kDa 处出现明显的目的蛋白带,而对照菌在 45 kDa 附近未出现蛋白条带,同时将收集的菌液进行超声波破碎,离心后取其上清和沉淀分别进行 SDS-PAGE 分析,结果表明沉淀中目的蛋白的量较大,而上清中几乎没有目的蛋白,说明目的蛋白以包涵体形式表达(图 1)。

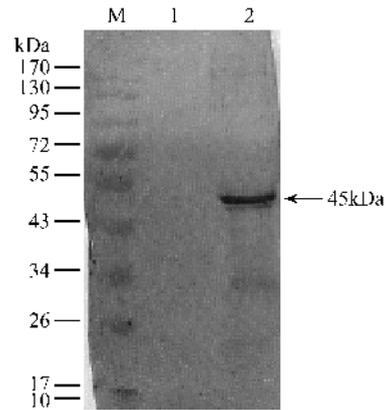


1 表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig.1 SDS-PAGE analysis of the *E. coli*-expressed gp90 protein. 1. pET-28a transformant induced with IPTG; 2. pET28-gp90 transformant non-induced with IPTG; 3. pET28-gp90 transformant induced with IPTG; 4. Supernatant of pET28-gp90 transformant induced with IPTG; 5. Precipitate of pET28-gp90 transformant induced with IPTG; M: Protein Molecular Weight Marker(Low).

将上述超声波破碎后的菌体离心沉淀以及相同条件下诱导的 pET-28a 转化菌裂解物进行 SDS-PAGE 后,转 NC 膜,以鸡源 REV 阳性血清作为一抗,辣根过氧化物酶(HRP)标记的兔抗鸡 IgG 作为二抗,进行 Western blot 分析。结果显示重组菌在约 45 kDa 处出现了与 SDS-PAGE 大小一致的条带(图 2),进一

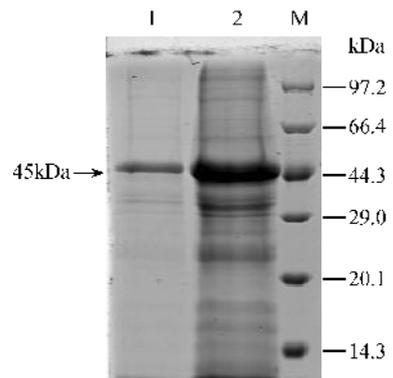
步验证了表达蛋白的正确性。



2 Western bolt 检测 gp90 的表达

Fig.2 Detection of the recombinant gp90 protein in *E. coli* by Western blotting M. Prestained Protein Ladder; 1. pET-28a transformant induced with IPTG; 2. pET28-gp90 transformant induced with IPTG.

将大量诱导培养的菌体裂解物按照 1.5 中所述方法进行纯化,纯化产物进行 SDS-PAGE 分析,发现预期的约 45 kDa 的目的蛋白(图 3)。

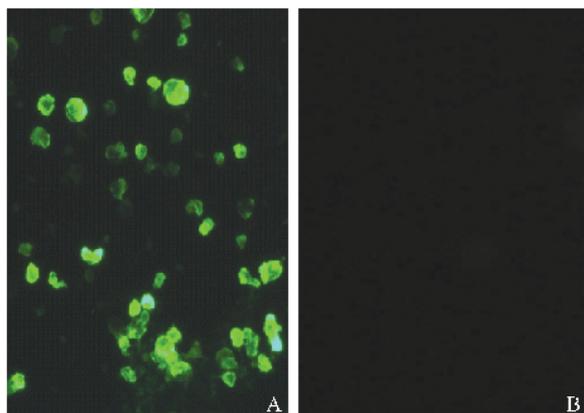


3 纯化的 gp90 重组蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig.3 SDS-PAGE analysis of the purified gp90 protein 1. Purified gp90 protein; 2. Before purification; M. Protein Molecular Weight Marker (Low).

2.3 多克隆抗体的制备及检测

将上述纯化蛋白按照 1.6 所述免疫小鼠,分离得到多克隆血清。以分离的多克隆血清为抗体进行间接免疫荧光试验,结果在对含 gp90 基因重组杆状病毒感染的 sf9 细胞培养中能检测到荧光阳性细胞,而未感染重组杆状病毒的 sf9 细胞培养中不能检测到荧光阳性细胞(图 4)。多克隆血清中抗体的 ELISA 效价达到 1:12800 以上,表明我们所诱导表达的蛋白具有良好的免疫原性,可以诱导小鼠产生较高水平的免疫应答反应。



4 IFA 检测 gp90 多克隆血清的特异性(100 ×)

Fig.4 Identification of the specificity of multivalent antiserum by IFA analysis(100 ×) A : sf9 cells infected with gp90 recombinant baculovirus. B : Normal sf9 cells.

3 讨论

REV 基因组由 gag、pol、env 基因以及 LTRs 组成,其中 gp90 蛋白由 env 基因编码,其 C 端抗原表位位于感染细胞的表面,含有顺序和构象表位,是病毒的免疫显性蛋白^[8],能够激发感染宿主产生中和抗体^[9]。gp90 编码基因容易变异,对不同地区不同时间分离的 REV 全基因组测序表明,env 基因序列同源性在 92% 以上, gp90 可能与病毒的变异、毒力、致病性、致病机理等有关^[10]。

吉荣^[11]、瞿晓兰等^[12]曾经将 REVenV 基因的部分序列在重组大肠杆菌中表达。本研究中,我们通过 PCR 方法获得 gp90 的全长序列,并在重组大肠杆菌中有效表达 gp90 完整蛋白,为进一步研究 gp90 蛋白奠定了基础。

试验过程中,为了获得较高量的表达,在载体的构建、诱导表达条件等方面都进行了优化。我们同时构建 pET28a-gp90、pET30a-gp90、pET32a-gp90 重组质粒,分别在相同的条件下诱导表达,然后收集菌液超声破碎后做 SDS-PAGE,结果显示 pET28a-gp90 和 pET32a-gp90 蛋白表达量相当。综合考虑,最终选择了 pET-28a 作为表达载体。另外,在表达条件的优化中,我们分别对诱导表达的温度(16℃、室温、37℃)、IPTG 的浓度(0.2 mmol/L、0.4 mmol/L、0.6 mmol/L、0.8 mmol/L、1.0 mmol/L、1.2 mmol/L)、诱导表达时间(3 h、4 h、5 h、6 h)等因素进行了探索,经过综合筛选最终确定 37℃、1.0 mmol/L IPTG 浓度,诱导表达 5h 的条件。在上述条件下获得的目的蛋白的量最大。

另外,本研究将所表达的 gp90 蛋白亲和纯化后免疫 Balb/c 鼠,获得了高效价的抗血清,也证明了其具有良好的免疫原性。

虽然网状内皮组织增生病在国内发生较早,然而研究起步却较晚,加之病毒自身的特性,如在 CEF 上检测不到病变,病毒复制过程存在前病毒形式等,使得该病的研究更加缓慢。到目前为止,网状内皮组织增生病的致病机理研究还不很透彻。作为病毒的主要免疫原性蛋白 gp90,其在病毒的变异、毒力、致病机理等方面所起的作用还有待于进一步研究。gp90 蛋白在体外的成功表达,为开展 REV 诊断试剂的研制奠定了基础。

参考文献

- [1] 崔治中,孙怀昌,朱承如.禽白血病及禽网状内皮增生病毒感染情况的调查.中国畜禽传染病(*Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*),1987(1):37-38.
- [2] 段宏安,Abraham Diallo,Peter Spradbrow,等.应用聚合酶链式反应检测禽痘病毒田间分离株及疫苗株中网状内皮组织增殖病毒 LTR 片段,env 及 rel 基因.中国兽医杂志(*Chinese Journal of Veterinary Medicine*),1999,25(8):9-10.
- [3] 李广兴,任晓峰,杨贵君,等.网状内皮组织增殖病病毒感染 SPF 雏鸡后病毒在各器官内的分布.中国兽医科技(*Chinese Journal of Veterinary Science and Technology*),1999,29(1):6-7.
- [4] 张存帅,郑明,高金源.禽网状内皮组织增生病毒与禽生物制品质量控制.中国兽药杂志(*Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine*),1999,33(1):52-55.
- [5] 何宏虎,陈溥言,蔡宝祥.禽网状内皮组织增殖病毒病的分离鉴定.中国畜禽传染病(*Chinese Journal of Veterinary Medicine*),1988(2):1-3.
- [6] Witter RL, Reticuloendotheliosis//Calnek BW, et al. Disease of Poultry. 10th eds. Ames(USA): Iowa State University Press, 1997:467-484.
- [7] Jackson CAW, Dunn SE, Smith DI, et al. Proventriculitis "Nakanuke" and reticuloendotheliosis in chickens following vaccination with herpesvirus of turkeys. *Journal of Veterinary*,1977,53:457-458.
- [8] Irit D, Yang H, Witter RL, et al. The immunodominant proteins of reticuloendotheliosis virus. *Veterinary Microbiology*,1996,49:273-284.
- [9] 崔治中,杜岩,赵文明,等.禽网状内皮组织增生病毒病感染和鸡群的免疫抑制.中国兽药杂志(*Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine*),2000,34(1):1-3.

- [10] Delwart EL, Panganiban AT. Role of reticuloendotheliosis virus envelope glycoprotein in superinfection interference. *Virology*, 1989, 63(1): 273 - 280.
- [11] 吉荣, 崔治中, 丁家波. 禽网状内皮组织增生病毒囊膜糖蛋白 gp90 的原核表达. 中国兽医学报(*Chinese Journal of Veterinary Science*) 2003, 23(1) 28 - 30.
- [12] 瞿晓兰, 王宏俊, 陈小玲. 禽网状内皮组织增生病毒囊膜蛋白基因的克隆及其原核表达. 华北农学报(*Acta Agriculturae Boreali-Sinica*) 2006, 21(增刊): 154 - 157.

Prokaryotic expression, purification and identification of the recombinant gp90 protein of Reticuloendotheliosis virus

Li Gao, Xiaole Qi, Honglei Gao, Yulong Gao, Liting Qin, Fenfen Sun, Yun Zhang, Xiaomei Wang*

(Division of Avian Infectious Diseases, State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy Agricultural Sciences, Harbin 150001, China)

Abstract [Objective] To obtain the recombinant gp90 protein of Reticuloendotheliosis virus (REV) and the anti-gp90 serum with high titer. **[Methods]** Using the plasmid pMD18T-env as template, we amplified the gp90 gene and then cloned it into pET-28a(+). The recombinant plasmid pET28a-gp90 was transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3), which was induced with isopropylthio- β -D-galactoside (IPTG). After identification by SDS-PAGE and Western blotting, the purified gp90 protein was injected into Balb/c mice to prepare anti-gp90 serum. The specificity and titer of the antiserum were evaluated by IFA and the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **[Results]** SDS-PAGE and Western blotting showed that the gp90 protein was expressed successfully in the form of inclusion body in the recombinant *E. coli*. ELISA showed the mouse anti-gp90 serum had a titer of 1:12800. Successful expression of recombinant gp90 protein and preparation of its antiserum laid the foundation for the development of diagnostic reagent of REV.

Keywords: Reticuloendotheliosis virus; gp90 protein; expression in *E. coli*; purification; polyclonal antibody

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Broiler Industry of Modern Agricultural Technology System

* Corresponding author. Tel: +86-451-85935047; E-mail: xmw@hvri.ac.cn

Received: 30 March 2009/Revised: 18 May 2009



科学出版社新书推介(2009-07)

科技英语写作进阶

[法] J.L. 利伯恩 著 任胜利 莫京 安瑞 译

978-7-03-024928-9 ¥35.00 2009年7月出版

内容简介: 本书从方便读者阅读、满足读者期望的角度出发, 阐述了英语科技论文的写作技巧。作者首先结合自己长期从事英文科技写作培训的实践, 从文法、逻辑、知识衔接等方面分析了如何确保读者阅读所需要的时间、记忆和精力最小化, 同时保持阅读的注意力和动机最大化。在此基础上, 作者从论文题名、摘要、标题/次级标题、引言、图表、结论等方面详细阐述了科技论文写作的技巧与诀窍。

本书的特色是实例丰富, 深入浅出, 适合非英语母语的科研人员进行科技写作时参考。

欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)

邮购地址: 北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编: 100717

联系人: 周文宇 李韶文 联系电话: 010-64031535 64000849

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目