

## 猪圆环病毒 2 型 REP 蛋白的原核表达及免疫原性鉴定

徐萍, 范娟, 叶正琴, 魏荣荣, 宋庆庆, 丁国伟\* (扬州优邦生物药品有限公司, 江苏扬州 225008)

**摘要** [目的]开发和研制鉴别猪圆环病毒疫苗免疫和野毒感染的 ELISA 检测试剂盒。[方法]根据 NCBI 数据库录入的 2 型猪圆环病毒(porcine circovirus 2, PCV-2) REP 蛋白序列(GenBank 登录号为 KX828581)设计引物, 利用 PCR 扩增 REP 蛋白全长基, 构建原核表达载体 pET-28a-*rep*, 转化大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞, 并诱导重组蛋白表达。[结果]经过 SDS-PAGE 分析, 获得了大小约 40 ku 的目的蛋白, 与理论大小相一致。重组蛋白经镍柱纯化后重组蛋白浓度为 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 纯度约 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。[结论]鉴于该重组蛋白具有良好的免疫原性及反应原性, 该重组蛋白可为开发区分猪圆环病毒 2 型疫苗免疫和野毒感染的检测试剂盒奠定基础。

**关键词** PCV-2; REP 蛋白; 原核表达; 免疫原性

**中图分类号** S858.28 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)28-0084-04

## Prokaryotic Expression and Immunogenicity Identification of REP Protein of Porcine Circovirus Type 2

XU Ping, FAN Juan, YE Zheng-qin et al (Yangzhou Youbang Biological Pharmaceuticals Co., Ltd, Yangzhou, Jiangsu 225008)

**Abstract** [Objective] To develop and produce Elisa kits for distinguishing vaccine immunization of porcine circovirus and wild virus infection. [Method] Based on the REP full length gene sequence of PCV-2 (GenBank ID: KX828581), a pair of specific primers were designed for the amplification of the REP gene sequence. The prokaryotic expression vector pET-28a-*rep* was constructed, *E. coli* BL21 (DE3) competent cell was transformed and the expression of recombinant protein was induced. [Result] Through SDS-PAGE, target protein with the size of about 40 ku was obtained, which was accordant with the theoretical size. The recombinant protein was purified by using nickel column, and the purified recombinant protein concentration was 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , the purity was about 95%. Western Blot and ELISA results showed that the recombinant protein had good immunogenicity and reactivity. [Conclusion] The recombinant protein could lay the foundation for developing ELISA kits for distinguishing vaccine immunization of PCV-2 and wild virus infections.

**Key words** PCV-2; REP protein; Prokaryotic expression; Immunogenicity

猪圆环病毒 2 型(porcine circovirus 2, PCV-2)是近年来危害养猪业的重要病原之一, 可以引发猪圆环病毒病(PCVD), 包括断奶仔猪多系统衰竭综合征(PMWS)、猪皮炎肾病综合征(PDNS)、猪呼吸道病以及繁殖障碍等<sup>[1-2]</sup>。PCV-2 主要感染 5~12 周龄猪, 造成感染发病猪生长迟缓、贫血、消瘦、呼吸困难、黄疸; 此外, 还可引起感染猪的免疫抑制, 继发多种病毒、细菌病原混合感染, 给世界养猪业造成巨大的经济损失<sup>[3]</sup>。PCV-2 属于圆环病毒科圆环病毒属, 为无囊膜的 DNA 病毒, 其基因组为 1 条长约 1.76 kb 的共价闭合环状单链 DNA<sup>[4]</sup>。PCV-2 基因组含有 3 个主要的开放阅读框, 即 ORF1、ORF2 和 ORF3。ORF1 编码复制相关蛋白(REP/REP'); ORF2 编码病毒结构蛋白(Cap), 是诱导免疫保护的关键抗原; ORF3 位于 ORF1 内部, 反向编码, 由 315 个碱基组成, 编码 105 个与病毒诱导的细胞凋亡有关的氨基酸<sup>[5-6]</sup>。研究表明, REP 蛋白上也含有特异的抗原表位, 可以诱导产生抗体, 杆状病毒表达的 REP 蛋白可以起到一定的免疫保护作用。由于针对 REP 蛋白的抗体只在圆环病毒繁殖阶段产生, 而市场上目前所售圆环病毒疫苗皆为全病毒灭活疫苗或基因工程亚单位疫苗。因而, 针对 REP 蛋白抗体的检测是检测圆环病毒疫苗免疫和野毒感染的重要靶点。笔者通过 PCR 方法扩增 1 株 PCV-2b 型毒株 *rep* 基因, 克隆入原核表达载体 pET-28a, 转化 BL21 感受态细胞后进行 IPTG 诱导表达。

## 1 材料与方法

## 1.1 材料

**1.1.1 菌种和载体。** *E. coli* TOP10、*E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞和 pET-28a 载体, 均购自 Invitrogen 公司; pMD19-T 载体购自 TaKaRa 公司。

**1.1.2 病毒和血清。** PCV-2b(YZ 株)由扬州优邦生物药品有限公司提供; 圆环抗体阴性猪攻毒后阳性血清(血清 A)和圆环抗体阴性猪疫苗免疫后阳性血清(血清 B)由扬州优邦生物药品有限公司研发部制备。

**1.1.3 主要试剂。** FastPfu DNA 聚合酶、dNTPs、*Bam*H I、*Hind* III、Trans2K 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、胶回收试剂盒均购自美国 Axygen 公司; HRP 标记的羊抗猪 IgG 酶标二抗、IPTG 均购自 Sigma 公司; 其他试剂为分析纯, 购自国药集团化学试剂有限公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 引物设计与合成。** 根据 GenBank 公布的 PCV-2b 序列(登录号为 KX828581), 利用 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。 *rep*-up: CGCG-GATCCACCATGCCAGCAAGAAGAATG。 *rep*-down: CCCAAGCTTTCAGTAATTTATTTTCATATGAAATTCAGGGC。

**1.2.2 PCV-2b DNA 提取。** 按照试剂盒说明书提取 PCV-2b DNA。

**1.2.3 PCV-2b REP 蛋白基因扩增。** 以“1.2.2”中提取的 DNA 为模板, 以 *rep*-up 和 *rep*-down 为引物, 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为: 1  $\mu\text{L}$  模板、*rep*-up 和 *rep*-down 各 1  $\mu\text{L}$ 、10  $\mu\text{L}$  缓冲液、4  $\mu\text{L}$  dNTPs、1  $\mu\text{L}$  FastPfu、32  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O。PCR

**作者简介** 徐萍(1982—), 女, 江苏东台人, 助理工程师, 从事兽用疫苗开发工作。\* 通讯作者, 工程师, 硕士, 从事工业微生物学与酶工程研究。

**收稿日期** 2017-10-31; **修回日期** 2018-06-28

反应条件为:95 ℃ 5 min;95 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 45 s,30个循环;72 ℃ 10 min。PCR反应结束后,取10 μL PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳,鉴定片段大小。合适大小的PCR产物按照胶回收试剂盒说明进行胶回收。

**1.2.4 PCV-2b REP 蛋白基因的克隆与鉴定。**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-*rep*。将经菌落PCR鉴定正确的单克隆送交金斯瑞公司测序。

**1.2.5 原核表达系统的构建与鉴定。**将测序正确的重组质粒pMD19-*rep*用BamH I和Hind III双酶切。对酶切产物进行电泳,胶回收目的片段,与采取同样操作的pET-28a进行连接,得到的重组质粒命名为pET-28a-*rep*。将重组质粒pET-28a-*rep*转入*E. coli* BL21 (DE3)感受态细胞,挑出阳性克隆进行菌落PCR和酶切鉴定,鉴定正确的重组菌命名为BL21/28a-*rep*。

**1.2.6 BL21/28a-*rep* 的诱导表达。**挑取重组菌BL21/28a-*rep*单菌落接种到LB培养基(卡那霉素终浓度为100 μg/mL)中,37 ℃、220 r/min培养至OD<sub>600</sub> = 0.8左右,加入终浓度为0.2 mmol/L的IPTG进行诱导,诱导时间为4 h,诱导温度为37 ℃,诱导时转速为220 r/min。

**1.2.7 重组蛋白的纯化与鉴定。**诱导结束后离心收集菌体,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。在冰浴条件下进行超声波裂解菌体,裂解结束后分别对裂解上清和沉淀取样,并进行SDS-PAGE电泳。使用镍柱进行重组蛋白的纯化,纯化步骤如下:细胞破碎上清在结合缓冲液中过夜透析,透析液上样过柱(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电泳鉴定。

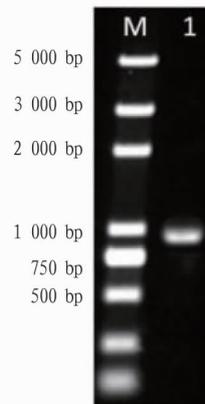
**1.2.8 Western Blot 鉴定。**蛋白样品经SDS-PAGE鉴定后,进行转膜操作,转膜采用湿转方式进行,转膜缓冲液为Tris 3.0 g、Gly 14.4 g、甲醇200 mL,加去离子水至1 000 mL。转膜完成后用5%脱脂乳封闭,4 ℃下过夜,封闭结束后用PBST冲洗3遍,加入阳性血清(圆环病毒抗体阴性猪攻毒后分离)或阳性血清(圆环病毒抗体阴性猪疫苗免疫后分离)孵育2 h,孵育结束后用PBST冲洗5遍,加入HRP标记羊抗猪IgG孵育1 h,孵育结束后用PBST冲洗5遍,最后加入沉淀型TMB显色10~30 min,拍照。

**1.2.9 间接ELISA方法鉴定重组蛋白。**将纯化的REP蛋白作为诊断抗原,用包被液(0.05 mol/L碳酸盐缓冲液,pH 9.6)将诊断抗原分别稀释至10.000、5.000、2.500、1.250、0.625 μg/mL,每孔100 μL包被酶标板,4 ℃下过夜。阳性血清和阴性血清用PBST分别稀释至1:50、1:100、1:200和1:400,按照常规方法进行试验结果判定。

## 2 结果与分析

**2.1 REP 蛋白基因扩增** 运用设计的特异性引物扩增PCV-2b的REP蛋白,扩增得到了一条大小约945 bp的目的片段(图1),与理论片段大小相一致。

**2.2 pMD19-*rep* 的PCR和酶切鉴定** 将重组质粒pMD19-*rep*进行PCR鉴定,可以扩增出约945 bp的特异性片段,经双酶切鉴定,得到与理论大小一致的片段(图2)。

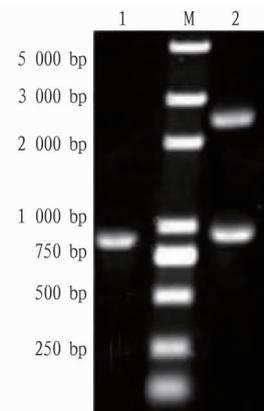


注:M.Trans2K plus DNA marker;1.PCR产物

Note:M.Trans2K plus DNA marker;1.PCR product

图1 PCV-2b *rep* 基因的扩增结果

Fig.1 Amplification results of PCV-2b *rep* gene



注:M.Trans2K plus DNA marker;1.PCR产物;2.双酶切产物

Note:M.Trans2K plus DNA marker;1.PCR product;2.Double enzyme digestion product

图2 pMD19-*rep* PCR及酶切鉴定

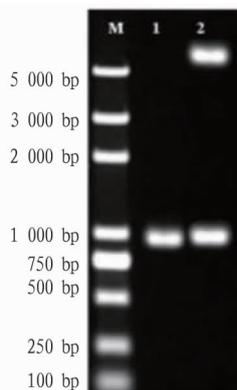
Fig.2 Identification of pMD19-*rep* by PCR and double enzyme digestion

**2.3 REP 蛋白原核表达系统的构建与鉴定** 采用菌落PCR初步鉴定阳性克隆,再利用双酶切对其进行酶切鉴定,结果见图3。

## 2.4 REP 蛋白的诱导表达与纯化

**2.4.1 重组蛋白可溶性分析。**重组菌在37 ℃、0.2 mmol/L IPTG、220 r/min下诱导表达4 h,离心后收集菌体,超声波裂解菌体,对全菌和破碎上清进行SDS-PAGE鉴定。从图4可以看出,目的蛋白获得了较好的可溶性表达。

**2.4.2 重组蛋白纯化。**重组蛋白经镍柱纯化后,用SDS-PAGE蛋白电泳鉴定纯化后的表达产物,在40 ku处得到一个单一条带,与理论条带大小相符,因此该条带即为REP蛋白(图5)。纯化后的蛋白经SDS-PAGE蛋白电泳后,转至NC膜,进行Western Blot鉴定,结果见图6和7。从Western Blot鉴定结果(图6、7)来看,该重组REP蛋白具有较好的特

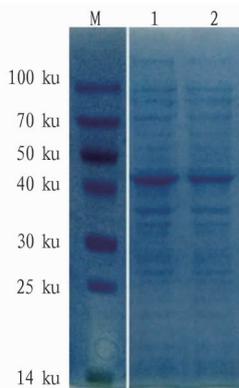


注: M.Trans2K plus DNA marker; 1.PCR 产物; 2.双酶切产物

Note: M.Trans2K plus DNA marker; 1.PCR product; 2.Double enzyme digestion product

图3 pET-28a-*rep* PCR 和酶切鉴定

Fig.3 Identification of pET-28a-*rep* by PCR and double enzyme digestion

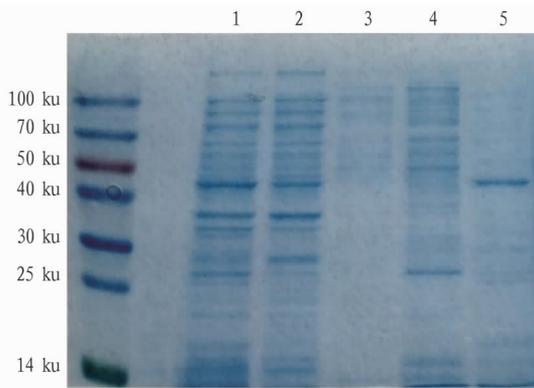


注: M.Blue Plus Protein marker; 1.BL21/28a-*rep* 全菌; 2.BL21/28a-*rep* 诱导破碎上清

Note: M.Blue Plus Protein marker; 1.Whole bacteria of BL21/28a-*rep*; 2.The induced supernatant of BL21/28a-*rep*

图4 BL21/28a-*rep* 表达形式鉴定

Fig.4 The expression form identification of BL21/28a-*rep*



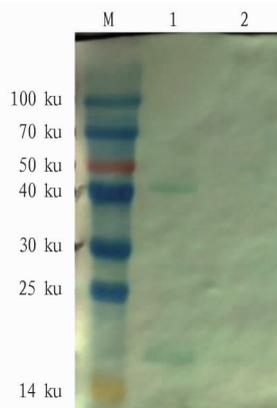
注: 1.BL21/28a-*rep* 破碎上清; 2.流穿; 3~4.除杂; 5.洗脱

Note: 1.The induced supernatant of BL21/28a-*rep*; 2.Flow through; 3-4.Removing impurity; 5.Eluting

图5 纯化后 PCV-2 REP 蛋白的 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig.5 SDS-PAGE electrophoretogram of purified PCV-2 REP protein

异性,与疫苗免疫猪血清不产生反应。这说明该重组蛋白是可用于鉴别圆环病毒野毒感染与否的诊断抗原。

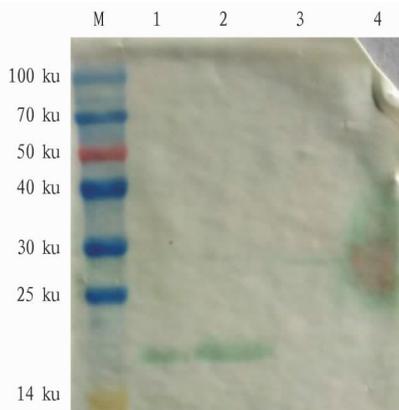


注: M.Blue Plus Protein marker; 1.纯化蛋白; 2.对照; 一抗血清为 PCV-2 病毒攻毒后的血清

Note: M.Blue Plus Protein marker; 1.Purified protein; 2.Control; primary antiserum was the serum after PCV virus challenge

图6 攻毒后 PCV-2 REP 蛋白的 Western Blot 鉴定

Fig.6 Identification of recombinant REP protein after virus challenge by Western Blot



注: M.Blue Plus Protein marker; 1.对照; 2.破碎上清; 3.纯化蛋白; 4.Cap蛋白; 一抗血清为疫苗免疫后的阳性血清

Note: M.Blue Plus Protein marker; 1.Control; 2.Broken supernatant; 3.Purified protein; 4.Cap protein; primary antiserum was the serum after vaccine immunization

图7 疫苗免疫后 PCV-2 REP 蛋白的 Western Blot 鉴定

Fig.7 Identification of recombinant REP protein after vaccine immunization by Western Blot

2.4.3 重组蛋白的间接 ELISA 鉴定。从表 1 可以看出,大肠杆菌表达的重组 REP 蛋白与 PCV-2b 攻毒后的阳性血清有较好的反应,可作为检测圆环病毒疫苗免疫和野毒感染的诊断抗原。此外,如果要建立间接 ELISA 方法,抗原包被浓度为 5.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、血清稀释度为 1:50 时,阳性血清  $\text{OD}_{450\text{nm}}$  约 1.0, P/N 值最高。

### 3 讨论与结论

猪圆环病毒病是指以圆环病毒 2 型(PCV-2)为主要病原、单独、继发或混合感染其他致病微生物的一系列疾病的总称,是迄今为止发现最小的动物病毒<sup>[4]</sup>。目前已知的 PCV

有 2 个血清型,即 PCV-1 和 PCV-2,其中 PCV-1 为非致病性病毒,PCV-2 为致病性病毒,它是断奶仔猪多系统衰竭综合征的主要病原<sup>[3,7]</sup>。疫苗免疫可以减少该病的发生,改善

生产性能,降低发病带来的经济损失,而抗体检测对于该病的流行病学监测和免疫效果的评价具有重要作用。

表 1 重组 REP 蛋白活性的 ELISA 鉴定

Table 1 Activity identification of recombinant REP protein by ELISA

血清稀释度 Serum dilution	结果 Result	抗原包被浓度 Coating concentration of antigen// $\mu\text{g}/\text{mL}$				
		10.000	5.000	2.500	1.250	0.625
1:50	P	1.393	1.070	0.704	0.419	0.241
	N	0.124	0.120	0.111	0.107	0.104
1:100	P	0.951	0.671	0.441	0.302	0.173
	N	0.114	0.109	0.105	0.100	0.098
1:200	P	0.535	0.385	0.262	0.185	0.126
	N	0.106	0.104	0.102	0.095	0.092
1:400	P	0.324	0.233	0.191	0.121	0.087
	N	0.089	0.084	0.083	0.083	0.079

注:P 表示阳性;N 表示阴性

Note:P stands for positive;N stands for negative

目前,常用的 PCV-2 抗体检测方法有间接免疫荧光(IF)、免疫过氧化物酶单层细胞试验(IPMA)、酶联免疫吸附试验(ELISA)等。IF 和 IPMA 需要培养细胞接种病毒,对操作要求较高,且不适于大量样品检测;ELISA 操作简单,特异性好,敏感性高,且能快速检测大量的样品,适合于大规模临床检测应用<sup>[8-10]</sup>。

然而,目前市场上的 ELISA 抗体检测试剂盒只能检测针对 Cap 蛋白的抗体,Cap 蛋白抗体存在于疫苗免疫和野毒感染的猪体内,这一检测结果对于疫病诊断帮助不大。目前国内商品化的圆环病毒疫苗均为灭活疫苗或亚单位疫苗(抗原为 Cap 蛋白),因此研发可用于鉴别自然感染和疫苗免疫的试剂盒是未来发展的趋势。

REP 蛋白为猪圆环病毒的非结构蛋白,与圆环病毒的复制有关,只有当圆环病毒感染猪后才能在血清中检测到针对 REP 蛋白的抗体,说明 REP 蛋白可作为诊断圆环病毒疫苗免疫和野毒感染的诊断抗原<sup>[11]</sup>。该研究利用大肠杆菌表达系统,可溶性地表达了 PCV-2b 的 REP 蛋白,并通过镍柱亲和层析对重组 REP 蛋白进行了纯化,纯化后的重组 REP 蛋白 Western Blot 及间接 ELISA 鉴定结果表明该重组蛋白可以与阳性猪血清(圆环病毒抗原、抗体阴性猪 PCV-2 攻毒后分离血清)发生反应,且不与疫苗免疫后阳性血清(圆环病毒抗原、抗体阴性猪疫苗免疫后分离血清)发生反应,表明该重组 REP 蛋白具有较好的特异性,可用于圆环病毒感染的快速阻断。

该研究中表达的可溶性重组 REP 蛋白具有较好的免疫原性,是较好的诊断抗原,这将为开发鉴别猪群是否存在圆环病毒感染的新诊断试剂盒奠定基础。

#### 参考文献

- [1] BAEKBO P, KRISTENSEN C S, LARSEN L E. Porcine circovirus diseases: A review of PMWS [J]. *Transboundary and emerging diseases*, 2012, 59 (4): 60-67.
- [2] JIANG C G, WANG G, TU Y B, et al. Genetic analysis of porcine circovirus type 2 in China [J]. *Archives of virology*, 2017, 162(9): 2715-2726.
- [3] 刘金鑫, 孙孟娇, 陈磊, 等. 猪圆环病毒研究进展 [J]. *动物医学进展*, 2012, 33(2): 94-97.
- [4] TISCHER I, GELDERBLOM H, VETTERMANN W, et al. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA [J]. *Nature*, 1982, 295(5844): 64-66.
- [5] CHEUNG A K. Identification of an octanucleotide motif sequence essential for viral protein, DNA, and progeny virus biosynthesis at the origin of DNA replication of porcine circovirus type 2 [J]. *Virology*, 2004, 324(1): 28-36.
- [6] MANKERTZ A, CALISKAN R, HATTERMANN K, et al. Molecular biology of Porcine circovirus: Analyses of gene expression and viral replication [J]. *Veterinary microbiology*, 2004, 98(2): 81-88.
- [7] 马萍, 汤德元. 猪圆环病毒基因及其疫苗的研究进展 [J]. *猪业科学*, 2009, 26(2): 76-80.
- [8] 崔尚金, 全滢平, 李曦, 等. 猪圆环病毒多重 PCR 诊断方法的建立 [J]. *中国预防兽医学报*, 2006, 28(5): 581-584.
- [9] 崔尚金, 全滢平, 李曦, 等. 猪圆环病毒间接免疫荧光方法的建立 [J]. *中国预防兽医学报*, 2007, 29(1): 63-66.
- [10] 董林. 猪圆环病毒 2 型诊断试剂盒的研制与应用 [D]. 长春: 吉林大学, 2014.
- [11] PENG Z Y, MA T, PANG D X, et al. Expression, purification and antibody preparation of PCV2 Rep and ORF3 proteins [J]. *Int J Biol Macromol*, 2016, 86: 277-281.

## 科技论文写作规范——缩略语

采用国际上惯用的缩略语。如名词术语 DNA(脱氧核糖核酸)、RNA(核糖核酸)、ATP(三磷酸腺苷)、ABA(脱落酸)、ADP(二磷酸腺苷)、CK(对照)、CV(变异系数)、CMS(细胞质雄性不育性)、IAA(吲哚乙酸)、LD(致死剂量)、NAR(净同化率)、PMC(花粉母细胞)、LAI(叶面积指数)、LSD(最小显著差)、RGR(相对增长率)、单位名缩略语 IRRI(国际水稻研究所)、FAO(联合国粮农组织)等。对于文中有些需要临时写成缩写的词(如表及图中由于篇幅关系以及文中经常出现的词而写起来又很长时),则可取各主要词首字母写成缩写,但需在第一次出现处写出全称,表及图中则用注解形式在下方注明,以便读者理解。