

猪圆环病毒2型 ORF1 和 ORF3 T 淋巴细胞 抗原表位的克隆与原核表达

高娟, 王艳玲, 蒋再学, 竺薇, 罗满林

(华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要: 根据 Stevenson 筛选出来的 3 个具有活性的 T 淋巴细胞抗原表位(T lymphocyte epitope, TCE)合成 *tce* 基因(180 bp),成功插入到 pMD18-T Simple 载体中,筛选获得重组质粒,命名为 pMD-TCE. 将 *tce* 酶切产物亚克隆到原核表达载体 pET-32a(+)中,获得重组质粒,命名为 pET-TCE. 用 IPTG 进行诱导表达,收集菌液进行 SDS-PAGE 检测,结果显示合成基因在 pET-32a(+)中获得了高效融合表达,其表达蛋白相对分子质量约为 25 000, Western-blot 分析结果表明,获得的融合蛋白可与猪圆环病毒 2 型(PCV2)阳性血清发生特异性反应,具有良好的免疫原性.

关键词:猪圆环病毒 2 型;T 淋巴细胞抗原表位;克隆;原核表达

中图分类号:S852.65

文献标志码:A

文章编号:1001-411X(2013)01-0093-05

Cloning and Prokaryotic Expression of T Lymphocyte Epitopes on ORF1 and ORF3 of Porcine Circovirus Type 2

GAO Juan, WANG Yanling, JIANG Zaixue, ZHU Wei, LUO Manlin

(College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: According to three active T lymphocyte epitopes(TCE) which Stevenson screened, *tce* gene(180 bp) was synthesized and cloned successfully into pMD18-T Simple vector. *tce* gene was subcloned into prokaryotic expression vector pET-32a(+); the recombinant plasmid was named pET-TCE and induced by IPTG. The results of SDS-PAGE and Western-blot indicated that the *tce* gene was expressed at a high level, and the recombinant fusion protein was about 25 000. The recombinant fusion protein has a peculiar reaction to porcine circovirus 2(PCV2) positive serum which has immunological activity.

Key words: PCV2; T lymphocyte epitope; cloning; prokaryotic expression

猪圆环病毒感染已经成为严重危害世界养猪业的一种重要传染病. 该病于 2001 年在我国首次发现,目前在猪群中广泛流行. 猪圆环病毒(Porcine circovirus, PCV)有 2 个血清型,即 PCV1 和 PCV2. PCV2 对猪的危害极大,可引起一系列相关的临床病征,其中包括猪断奶后多系统衰弱综合征(PMWS)、皮炎肾病综合征(PDNS)、母猪繁殖障碍等. PCV2 基因组全长为 1 767 bp 或 1 768 bp,含有多个开放式阅读框

(ORF),其中 ORF2 编码主要的结构蛋白(Cap 蛋白). 其他阅读框均编码非结构蛋白,其中 ORF1 有 945 个碱基,编码病毒 DNA 复制相关的蛋白(Rep 蛋白),ORF3 长 315 bp,编码非结构蛋白,其性质与功能目前尚不十分清楚. 华丽等^[1]利用生物信息学软件分析,发现 PCV2 SC 株 ORF3 编码蛋白含有 12 个潜在的磷酸化位点;ORF3 成熟蛋白有 4 个主要的抗原位点,可能与病毒的致病性有关. 2007 年,Steven-

收稿日期:2012-04-09 网络出版时间:2013-01-11

网络出版地址:<http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20130111.0926.011.html>

作者简介:高娟(1986—),硕士研究生;通信作者:罗满林(1957—),男,教授,博士,E-mail:luoml@scau.edu.cn

基金项目:省部产学研结合项目(2011A090200117)

son 等^[2]研究 PCV2 T 淋巴细胞抗原表位时证明 ORF1(81 ~ 100 位氨基酸和 201 ~ 220 位氨基酸)与 ORF3(31 ~ 50 位氨基酸)编码的 3 个多肽均可以诱导外周血液单核细胞中 T 淋巴细胞的增殖能力. 2010 年, Meng 等^[3]研究识别 PCV2 Rep 蛋白 N'端的单克隆抗体时发现, PCV2-RepN 上 80 ~ 110 位氨基酸是 3D10 的抗原表位. 本研究根据 Stevenson 等^[2]发表的翻译 3 个多肽的序列合成抗原表位的基因, 成功克隆了此段基因并在大肠埃希菌 *Escherichia coli* 中进行了融合表达, 这不仅可以更深入地了解 PCV2 ORF1 和 ORF3 等编码的非结构蛋白功能与应用, 还为研制 PCV2 基因工程疫苗和抗体检测试剂盒奠定了基础.

1 材料与方法

1.1 菌株、载体与血清

大肠埃希菌 DH5 α 、BL21 (DE3)、pMD18-T Simple Vector、pET-32a(+)、猪圆环病毒阳性血清为自制并保存; 用华南农业大学兽医学院传染病实验室自主分离的 PCV2 平洲株进行猪的攻毒试验, 待抗体滴度最高时抽血分离得到血清.

1.2 主要分子生物学试剂

Taq DNA 聚合酶、DL2000、DL5000、DL15000 Marker、限制性内切酶 *EcoR* I、*Hind* III、T4DNA 连接酶为大连宝生物工程有限公司产品; 预染蛋白 Marker(相对分子质量为 10 000 ~ 250 000)为美国 BIO-RAD 公司产品; 预染蛋白 Marker(相对分子质量为 10 000 ~ 170 000)为深圳中晶生物技术有限公司产品; E. N. Z. A 质粒小抽、胶回收试剂盒为 Omega 公司产品; 6 $\times$ His-Tagged Protein Purification Kit 为广州建阳生物技术有限公司产品; 蛋白 A (HRP-Protein A)为武汉博士德生物工程有限公司产品.

1.3 基因的合成

应用 DNASTar (Version 4.0) 基因分析软件, 参照 Stevenson 等^[2]发表的 T 淋巴细胞抗原表位 (T lymphocyte epitope, TCE) 基因序列, 并在其序列的上游 5'端加入 *EcoR* I 限制性内切酶位点, 下游 3'端加入 *Hind* III 限制性内切酶位点, 序列送上海英俊生物技术有限公司合成. 目的基因片段为 180 bp, 合成目的片段全长 195 bp, 包括终止密码子 TAA 的 PCV2 T 细胞多表位成熟蛋白基因, 转入 pMD18-T Simple 载体, 转化至大肠埃希菌 DH5 α 感受态细胞中. 目的片段序列为:

5'-GAATTC TGC CAC ATC GAG AAA GCG AAA GGA ACA GAT CAG CAG AAT AAA GAA TAC TGC AGT AAA GAA AAG TGG TGG GAT GGT TAC CAT

GGT GAA GAA GTG GTT GTT ATT GAT GAC TTT TAT GGC TGG CCC AGG TGG CCC CAC AAT GAC GTG TAC ATT GGT CTT CCA ATC ACG CTT CTG CAT TTT CCC TAA AAGCTT-3'.

1.4 目的基因的鉴定与序列测定

按照 Omega 公司的 E. N. Z. A 质粒小抽试剂盒说明书抽提含目的基因的重组克隆质粒 DNA, 然后经限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定, 挑选阳性克隆子送上海英俊生物技术有限公司测序, 并命名为 pMD-TCE.

1.5 原核表达载体的构建

将克隆于 pMD18-T Simple 载体中的 *tce* 基因用 *EcoR* I 和 *Hind* III 进行双酶切, 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳并进行胶回收. 同样方法处理原核表达载体 pET-32a(+), 常规方法连接, 将连接产物转化至大肠埃希菌 BL21 感受态细胞中. 重组表达质粒经过双酶切鉴定, 筛选出阳性重组质粒 pET-32a-TCE 送上海英俊生物技术有限公司测定, 并命名为 pET-TCE.

1.6 重组表达质粒 pET-TCE 在大肠埃希菌 BL21 中的诱导表达

吸取含阳性重组质粒 pET-TCE 的 BL21 菌液按 10 mL/L 接种量接种于 4 mL 含 Amp⁺ (100 μ g/mL) 的新鲜 LB 液体培养基中, 160 r/min、37 $^{\circ}$ C 条件下振荡培养至 $D_{600\text{ nm}}$ 为 0.6 ~ 0.8 时 (约 3 h), 加入终浓度为 1 mmol/L 的无菌异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷 (IPTG), 37 $^{\circ}$ C 160 r/min 继续振荡培养 4 ~ 5 h. 同时设置空白菌 BL21 及含空白载体 pET-32a(+) 的 BL21 作为阴性对照. 取 1 mL 菌液, 12 000 r/min 离心 30 s, 弃上清液, 用 100 μ L 2 $\times$ SDS-PAGE 加样缓冲液重悬菌体, 反复冻融 3 次, 于沸水中煮沸 5 ~ 10 min, 冷却至室温, 12 000 r/min 离心 2 min, 其上清液可直接进行 SDS-PAGE 分析.

1.7 包涵体的制备与蛋白纯化

300 mL 含 Amp⁺ (100 μ g/mL) 的新鲜 LB 液体培养基大量诱导蛋白, 收集诱导表达的菌体, 按常规方法对菌体进行超声处理, 包涵体的溶解以及蛋白纯化. 蛋白纯化方法步骤按 6 $\times$ His-Tagged Protein Purification Kit 说明书进行, 收集洗脱峰, 用于 SDS-PAGE 分析.

1.8 重组表达蛋白的 Western-blot 检测

将纯化的重组表达蛋白经电转移后转印到硝酸纤维素膜上, 用含有 50 g/L 脱脂奶粉的 TBS 溶液 4 $^{\circ}$ C 条件封闭过夜, 用 TBST 冲洗 3 次, 与猪圆环病毒阳性血清在室温环境下作用 1 h, 用 TBST 洗涤 3 次, 加入辣根过氧化物酶标记的 Protein A, 室温轻摇孵育 1 ~ 2 h, 用 TBST 洗涤 5 次, DAB 显色确定有无

可识别的特异性条带.

2 结果与分析

2.1 重组克隆质粒 pMD-TCE 的双酶切鉴定及测序结果

抽提重组克隆质粒琼脂糖凝胶电泳能检测到 1 条大约为 2.9 kb 的条带,与预期结果相符,且对该质粒经限制性内切酶 *Eco*RI 和 *Hind*III 双酶切后,能检测到 1 条约 183 bp 的条带,与预期结果相符,表明 *tce* 基因成功插入到 pMD18-T Simple Vector 中(图 1).

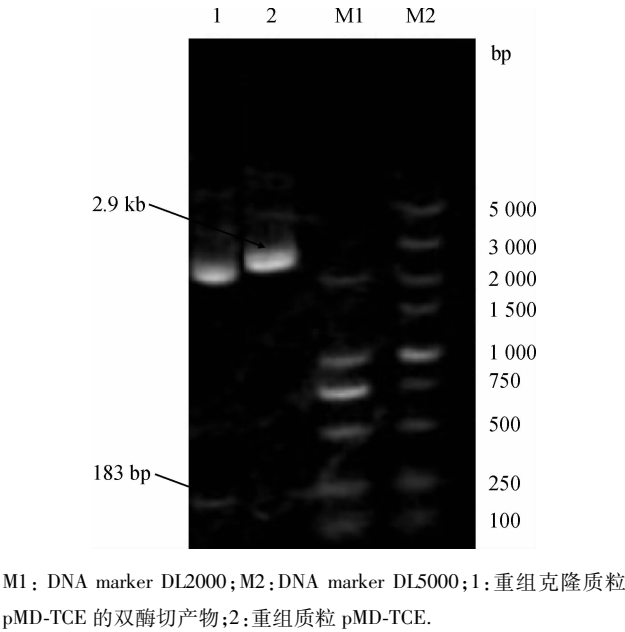


图 1 重组克隆质粒 pMD-TCE 双酶切鉴定

Fig. 1 Identification electrophoresis of recombinant cloning plasmid pMD-TCE of double digestion

tce 基因序列全长为 183 bp, 并且该序列与“1.3”合成的基因序列完全相同.

2.2 重组表达载体构建的结果

将从 pMD-TCE 质粒切下的 *tce* 基因片段纯化产物插入到 pET-32a(+) 载体的 *Eco*R I 和 *Hind*III 位点之间,经筛选获得重组表达质粒 pET-TCE. 用 10 g/L 琼脂糖凝胶检测重组表达载体的双酶切产物,能检测到 1 条约 183 bp 的目的条带. 试验结果与预期结果一致,从而表明目的片段 *tce* 基因成功亚克隆到 pET-32a(+) 载体中,且方向正确(图 2).

tce 基因的序列测定结果同样与 1.3 合成的基因序列完全相同,序列全长为 183 bp.

2.3 表达蛋白的 SDS-PAGE 分析

收集重组菌诱导表达产物,经 SDS-PAGE 电泳结果显示,与诱导的 BL21(DE3) 菌体蛋白、诱导的 pET-32a(+)/BL21(DE3) 菌体蛋白显示的蛋白条带比较,重组表达质粒 pET-TCE/BL21(DE3) 在相对

分子质量 25 000 附近有 1 条蛋白条带,与预期大小相符(图 3),表明 *tce* 基因在大肠埃希菌 BL21 中已初步成功获得表达.

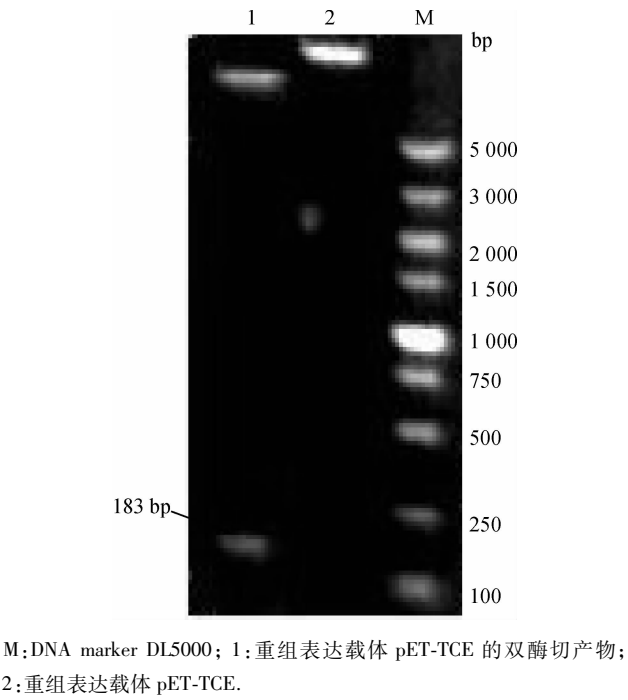


图 2 重组表达载体 pET-TCE 的双酶切鉴定

Fig. 2 Identification electrophoresis of recombinant expression plasmid pET-TCE of double digestion

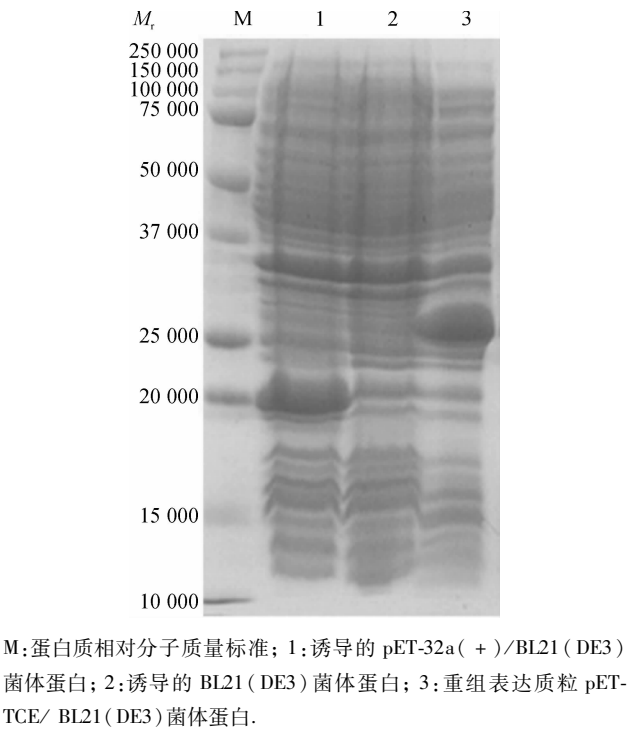
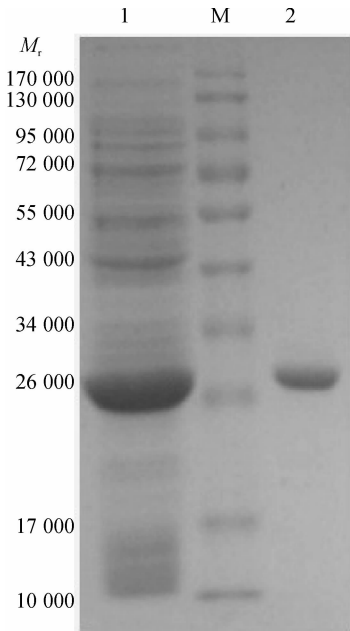


图 3 表达蛋白 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the recombinant fusion protein

2.4 目的蛋白的纯化

对诱导表达的蛋白进行纯化,收集得到的洗脱峰经 SDS-PAGE 分析,得到清晰单一的条带(图 4).



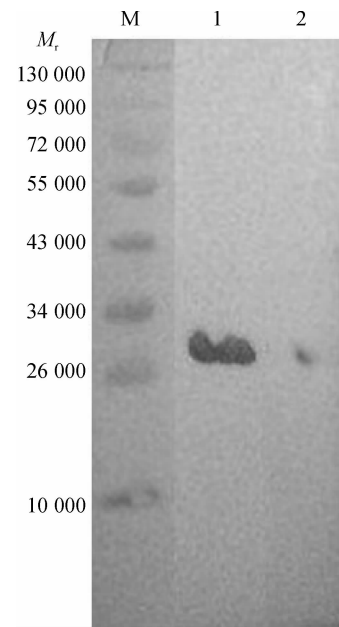
M:蛋白质相对分子质量标准;1:重组表达质粒 pET-TCE/BL21 (DE3) 菌体蛋白;2:纯化产物.

图 4 纯化蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the purified recombinant fusion protein

2.5 表达蛋白的 Western-blot 检测

将重组蛋白经 SDS-PAGE 电泳后,电转移至 NC 膜上进行 Western-blot,并设阴性对照,结果显示,在相对分子质量 26 000 附近出现 1 条清晰反应带(图 5),说明表达蛋白与猪圆环病毒 2 型阳性多抗特异性结合,有良好免疫原性.



M:蛋白质相对分子质量标准;1:纯化好的重组表达蛋白;2:阴性对照.

图 5 重组蛋白的 Western-blot 检测分析

Fig. 5 Western-blot analysis of the recombinant fusion protein

3 讨论

原核的大肠埃希菌表达系统具有表达高效、经济方便以及遗传背景清楚的优点. 虽然此系统具有局限性,当所表达的蛋白是复杂的真核来源的蛋白时,大肠埃希菌常常是形成不溶性、多肽链折叠错误以及没有活性的包涵体,而不能形成天然构象的蛋白质^[4]. 但是,人们从多年的实践中得到了诸多经验,譬如:选择合适的表达菌株、优化适合表达自己目的蛋白的条件. 另外 Tobias 等^[5]在研究猪圆环病毒复制需要 Rep 和 Rep' 2 种蛋白时表明猪圆环病毒主要蛋白上抗原表位多为线性的,因此蛋白质的加工无需复杂的加工与修饰. 所以本试验选择此系统表达 PCV2 T 淋巴细胞抗原表位基因,简单快捷地表达了目的蛋白. 根据氨基酸平均相对分子质量是 128,计算大肠埃希菌表达的融合蛋白的相对分子质量应该是 24 768,但是本试验 SDS-PAGE 结果则显示稍大于 26 000. 当外源蛋白在表达系统中表达时,影响表达蛋白大小的因素有很多:如二硫键的形成、蛋白的异常迁移以及糖基化的发生等. 原核表达系统的主要特点就是表达产生的蛋白质不能进行糖基化、磷酸化等修饰,难以形成正确的二硫键配对和空间构象折叠,并且在 SDS 电泳时,把蛋白样品和上样缓冲液混合后在沸水中煮了 10 min,尽量使蛋白的空间结构完全打开变性. Banker 等^[6]发现异常蛋白质在进行 SDS-PAGE 电泳时,蛋白质的表观相对分子质量会随着凝胶中丙烯酰胺浓度的改变而发生变化. 本研究中,多次将蛋白样品进行凝胶电泳,分离胶的丙烯酰胺质量分数在 12% ~ 15% 范围内变动,但是融合蛋白的凝胶电泳结果均相同,因此排除了以上的 3 种可能. 该试验表达的融合蛋白 Western-blot 结果阳性,有很好的免疫原性,所以究其原因可能是蛋白平均相对分子质量不精确导致的计算误差.

抗原表位 (Epitope) 又称抗原决定簇 (Antigenic determination),是指抗原分子上的一个免疫活性区,具有特殊结构和免疫活性的化学基团,是具有刺激机体产生抗体或致敏淋巴细胞并能够被其识别的部位. 按与抗原受体细胞结合的不同,分为 B 细胞抗原表位和 T 细胞抗原表位. B 细胞抗原表位介导体液免疫, T 细胞抗原表位介导细胞免疫. 单纯的 B 抗原细胞表位不能介导有效的体液免疫应答,须有 T 抗原细胞表位介导细胞免疫应答的参与. 因此 T 细胞抗原表位在免疫应答反应中发挥着非常重要的作用. 为了更深入地了解 T 细胞抗原表位的功能,本试

验结合 Stevenson 等^[2]的研究对发表的 T 细胞抗原表位基因进行了原核表达。

目前国内外研究 PCV2 Cap 蛋白的文献比比皆是,尤其是对此蛋白抗原表位的鉴定与分析。Shang 等^[7]在研究猪圆环病毒抗原表位时,筛选了 5 个 B 细胞线性表位,包括 PCV2 特有的氨基酸残基 231 ~ 233 和 195 ~ 202 位,PCV1 特有的氨基酸残基 92 ~ 103 位,以及 PCV1 和 PCV2 共有的氨基酸残基 156 ~ 162 和 175 ~ 192 位;郭龙军等^[8]对 PCV2 Cap 蛋白上抗原表位进行鉴定时发现核心序列为²⁶RPWL VH-PRHRY³⁶的优势抗原表位位于 Cap 蛋白核定位信号区上,这些研究都有利于猪圆环病毒 ORFs 功能的研究以及得到有鉴别诊断价值的抗原表位。相比而言国内外研究 PCV2 ORF1 和 ORF3 等编码非结构蛋白功能与应用的文章较少,大部分研究用基因工程菌表达的 Rep 蛋白均可与 PCV2 阳性血清发生特异性反应,亦具有良好的免疫原性。杨晓农^[9]在对 PCV2 ORF1、ORF3 和 ORF5 基因部分功能的研究中,用酶切缺失方法分别构建 ORF1、ORF3、ORF5 缺失突变毒株 mPCV2-A、mPCV2-C 和 mPCV2-E,然后接种于 28 ~ 30 日龄健康仔猪,结果表明基因缺失对病毒的细胞免疫功能未产生影响,三基因缺失突变毒株仍有诱导仔猪细胞免疫应答的趋势,说明 ORF1、ORF3、ORF5 上均有诱导细胞免疫的抗原表位。因此本文对 PCV2 ORF1 和 ORF3 上的具有细胞免疫活性的部位进行了研究,融合表达了 ORF1 与 ORF3 上的 T 淋巴细胞抗原表位,且得到了预期的效果,Western-blot 结果显示融合蛋白与猪圆环病毒 2 型阳性血清发生特异性反应,有良好的免疫原性。

鉴于不清楚融合表达的 TCE 抗原表位是否可以诱导外周血液单核细胞中 T 淋巴细胞的增殖能力,目前本研究正着手用纯化好的 TCE 表达蛋白免疫小

鼠,探讨其是否有更好的 T 细胞免疫功能,希望为 PCV2 基因工程疫苗的制备奠定基础。

参考文献:

- [1] 华丽,朱玲,史小红,等.猪圆环病毒 II 型 SC 株 ORF3 基因克隆及其编码蛋白的生物信息学分析[J].基因组学与应用生物学,2010,29(5):857-864.
- [2] STEVENSON L S, GILPIN D F, DOUGLAS A, et al. T lymphocyte epitope mapping of porcine circovirus type 2 [J]. *Viral Immunol*, 2007, 20(3):389-398.
- [3] MENG Tao, JIA Qiang, LIU Sen, et al. Characterization and epitope mapping of monoclonal antibodies recognizing N-terminus of Rep of porcine circovirus type 2 [J]. *J Virol*, 2010, 165(2):222-229.
- [4] 刘爽 胡宝成.原核系统可溶性表达策略[J].生物技术通讯,2005,16(2):172-175.
- [5] TOBIAS S, TIM F, ANNETTE M. Rep and Rep' protein of porcine circovirus type 1 bind to the origin of replication in vitro [J]. *Virology*, 2001, 291(1):152-160.
- [6] BANKER G A, COTMAN C W. Measurement of free electrophoretic mobility and retardation coefficient of protein-sodium dodecyl sulfate complexes by gel electrophoresis: a method to validate molecular weight estimates [J]. *J Biol Chem*, 1972, 247(18):5856-5861.
- [7] SHANG S B, JIN Y L, JIANG X T, et al. Fine mapping of antigenic epitopes on capsid proteins of porcine circovirus and antigenic phenotype of porcine circovirus type 2 [J]. *Mol Immunol*, 2009, 46(3):327-334.
- [8] 郭龙军,陆月华,黄立平,等.猪圆环病毒 2 型 Cap 蛋白核定位信号区抗原表位的鉴定 [J]. *中国农业科学*, 2010, 43(7):1480-1486.
- [9] 杨晓农.猪圆环病毒 II 型 ORF1、ORF3 及 ORF5 基因部分功能的研究 [D]. 雅安:四川农业大学,2007.

【责任编辑 柴 焰】