



吉艺宽, 王 雨, 程 艺, 等. 伪狂犬病病毒 *gE* 基因主要抗原表位区的原核表达及间接 ELISA 方法的建立[J]. 华南农业大学学报, 2015, 36(4): 11-15.

伪狂犬病病毒 *gE* 基因主要抗原表位区的原核表达及间接 ELISA 方法的建立

吉艺宽, 王 雨, 程 艺, 张宝石, 向柯宇, 琚春梅
(华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】为了区分伪狂犬病病毒疫苗免疫猪和自然感染猪, 建立快速诊断的方法. 【方法】利用 PCR 方法从伪狂犬病病毒中扩增出糖蛋白 E(*gE*) 基因的主要抗原表位区, 用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切后, 插入原核表达载体 pET-32a(+) 中, 构建重组表达质粒 pET-*gE*184, 并转化至大肠埃希菌 *Escherichia coli* BL21(DE3), 经 IPTG 诱导后进行 SDS-PAGE 电泳和 Western-blot 检测, 用纯化后的 *gE*184 蛋白作为包被抗原, 建立间接 *gE*184-ELISA 检测方法. 【结果和结论】用该方法检测 290 份临床猪血清样本, 并与商品化 ELISA 试剂盒检测结果比较, 两者的符合率为 93.1%.

关键词:伪狂犬病毒; *gE* 基因; 抗原表位区; 原核表达; *gE*184-ELISA
中图分类号:S852.65 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-411X(2015)04-0011-05

Prokaryotic expression of main antigen epitope of pseudorabies virus *gE* gene in *Escherichia coli* and establishment of indirect ELISA

Ji Yikuan, WANG Yu, CHENG Yi, ZHANG Baoshi, XIANG Keyu, JU Chunmei
(College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract:【Objective】To distinguish pseudorabies virus (PRV)-infected pigs from those vaccinated with glycoprotein E (*gE*)-negative vaccine, the method of rapid diagnosis was established. 【Method】The *gE* gene fragment of PRV containing the main antigen region was amplified by PCR and cloned into the prokaryotic expression vector pET32a(+) to establish the recombinant plasmid pET-*gE*184. The recombinant plasmid was transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3). After being induced with IPTG, the target protein was identified by SDS-PAGE and Western-blot. Wells of ELISA plates were coated with purified recombinant protein *gE*184 to establish the indirect *gE*184-ELISA. 【Result and conclusion】Two hundred ninety clinical porcine sera samples have been detected by this ELISA. Compared with commercial ELISA Kit, the coincidence rate was 93.1%.

Key words:pseudorabies virus; *gE* gene; antigen epitope; prokaryotic expression; *gE*184-ELISA

伪狂犬病病毒(Pseudorabies virus, PRV)属疱疹病毒科 α-疱疹病毒亚科,能引起多种动物发生以发热、奇痒、脑脊髓炎为主要特征的传染病,猪为其储存宿主,并可引起猪的潜伏感染^[1]. 该病毒可感染各

个年龄段的猪,主要表现为妊娠母猪的流产、死胎及木乃伊胎,新生仔猪出现神经症状,成年猪的呼吸道症状等. 该病对世界养猪业造成了严重危害,因此加强该病的防控对养猪业的健康发展至关重要.

糖蛋白 E (gE) 是伪狂犬病病毒复制所非必须的一种糖蛋白^[2],与病毒的毒力相关. 当 gE 基因缺失时,病毒毒力降低,但不影响病毒在宿主体内的复制和免疫原性^[3]. 使用 gE 基因缺失疫苗免疫猪,其体内不会产生针对 gE 蛋白的抗体,而自然感染的猪则可产生^[4],因此采用基因缺失疫苗结合相应的鉴别诊断方法可区分疫苗免疫猪和自然感染猪. 欧美等许多国家采用此方法来根除伪狂犬病,并取得了很大的成功,部分国家已成功根除伪狂犬病^[5].

gE 基因全长约 1.7 kb,编码 577 个氨基酸,gE 基因的第 157~714 位核苷酸区域编码 gE 糖蛋白的 5 个主要抗原表位^[6],本试验应用 PCR 扩增 gE 基因的主要抗原表位区,构建原核表达质粒,在大肠埃希菌 *Escherichia coli* 中进行高效表达,利用表达蛋白为诊断抗原,建立 gE184-ELISA 诊断方法,为伪狂犬病的快速诊断及根除计划的实施提供技术手段.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒与菌株 伪狂犬病病毒、大肠埃希菌 DH5α 及 BL21(DE3)、表达载体 pET-32a(+) 均为华南农业大学兽医学院微生物学与免疫学教研室保存.

1.1.2 主要试剂 LA *Taq* 酶、限制性内切酶 *Bam*H I 及 *Hind* III、T4 DNA 连接酶、DNA Marker、IPTG、琼脂糖均为 TaKaRa 公司产品;蛋白质 Marker 为 Fermentas 公司产品;DNA 凝胶回收试剂盒及质粒抽提试剂盒为 Omega 公司产品;HisTrapFF crude 预装柱为 GE 公司产品;羊抗猪 IgG-HRP 为广州健阳生物技术有限公司产品;PRV 标准阳性、阴性血清及猪瘟病毒(CSFV)、口蹄疫病毒(FMDV)、流行性乙型脑炎病毒(JEV)、猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)、猪圆环病毒病 2 型(PCV-2) 阳性血清由华南农业大学兽医学院微生物学与免疫学教研室保存;290 份临床血清样本为猪场送检;gE 抗体试剂盒为美国 IDEXX 公司产品;引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成.

1.2 gE184 的 PCR 扩增

参考 GenBank 登录的伪狂犬病病毒 gE 序列(登录号 AF 171937),设计 1 对引物扩增 gE 基因主要抗原表位区. 引物如下: gE-F: 5'-CGCGGATCCGAC-GATGACCTCAACGGC-3'(下划线部分为 *Bam*H I 酶切位点), gE-R: 5'-CCCAAGCTTCGAGAAGAGCT-GCGAGT G-3'(下划线部分为 *Hind* III 酶切位点).

<http://xuebao.scau.edu.cn>

抽提猪伪狂犬病病毒 Ea 株的 DNA 作为模板进行 PCR 扩增^[7],条件为:95 ℃ 预变性 5 min;95 ℃ 变性 30 s,56 ℃ 退火 45 s,72 ℃ 延伸 1 min,30 个循环;72 ℃ 终延伸 10 min. PCR 产物经 0.01 g·mL⁻¹ 琼脂糖凝胶电泳检测.

1.3 重组表达质粒的构建

用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切 PCR 产物,与经同样双酶切处理的 pET32a(+) 进行连接,转化 DH5α 感受态细胞. 提取质粒并采用 PCR 和酶切方法进行鉴定,经鉴定正确的重组质粒送到生工生物工程(上海)股份有限公司进行基因序列测定,鉴定后的阳性重组质粒命名为 pET-gE184.

1.4 重组蛋白的表达、纯化及 Western-blot 活性检测

将鉴定正确的重组质粒 pET-gE184 转化大肠埃希菌 BL21(DE3). 优化诱导条件,在最佳诱导条件下表达目的蛋白,采用 HisTrapFF 镍柱亲和层析柱纯化目的蛋白,BCA 法测定纯化蛋白的含量,并用 SDS-PAGE 电泳和 Western-blot 进行检测.

1.5 间接 gE184-ELISA 检测方法的建立

1.5.1 反应条件的优化 采用方阵滴定法确定重组蛋白 gE184 的包被浓度及血清稀释度,并对封闭液的选择及其作用时间、二抗稀释度及其作用时间、TMB 显色时间分别进行优化.

1.5.2 判定标准的确定 取 20 份 PRV 阴性猪血清样本,用建立的间接 gE184-ELISA 方法检测,以 20 份血清的平均 $D_{450\text{ nm}} + 3 \times \text{SD}$ 作为判定阴阳性的临界值.

1.5.3 特异性试验 用建立的间接 gE184-ELISA 方法检测 CSFV、PRRSV、JEV、FMDV、PCV-2 标准阳性血清及 gE 基因缺失疫苗免疫血清. 同时设猪伪狂犬病病毒阳性血清、阴性血清对照,判定血清交叉反应情况.

1.5.4 敏感性试验 将 PRV 阳性血清作平行倍比稀释,用建立的间接 gE184-ELISA 方法检测血清中抗体的含量,判定其抗体检出价.

1.5.5 重复性试验 批内重复性试验:取 5 份抗体水平不同的血清,在同一批次包被的酶标板中按优化的 ELISA 操作程序进行试验,每份样品重复 8 个孔,根据 $D_{450\text{ nm}}$ 计算变异系数. 批间重复性试验:取 5 份抗体水平不同的血清,用 8 块不同批次包被的酶标板按优化的 ELISA 操作程序进行试验,根据 $D_{450\text{ nm}}$ 计算变异系数.

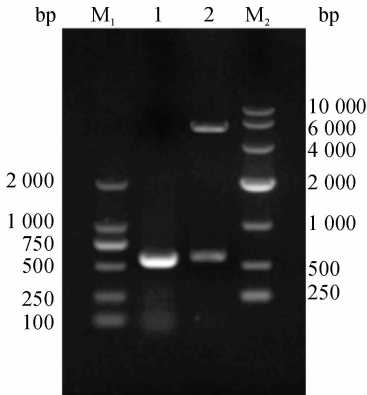
1.5.6 临床样品检测 使用本试验建立的间接 gE184-ELISA 检测不同猪场送检的 290 份猪血清样

本,并与商品化 ELISA 试剂盒检测结果进行比较.

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增及重组表达质粒构建

经 PCR 扩增出约为 552 bp 的目的条带,与预期大小相符(图 1). 重组质粒 pET-gE184 经 *Bam*H I、*Hind* III 双酶切后,可得到约 552 和 5 800 bp 的 2 个片段(图 1),与预期结果相符,基因序列测定结果显示和参考的序列一致.



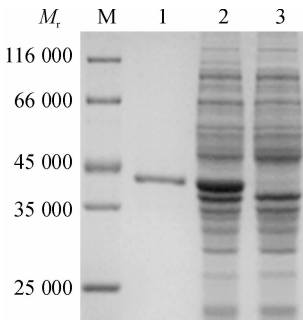
M₁: DNA marker DL2000;1: *gE* 基因 PCR 扩增产物;2: *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切 pET-gE184;M₂: DNA marker DL10000.

图 1 PRV *gE*184 PCR 扩增结果及重组质粒 pET-gE184 的酶切鉴定

Fig. 1 Amplification of *gE*184 of PRV by PCR and identification of recombinant plasmid expression pET-gE184

2.2 表达产物的 SDS-PAGE 电泳及 Western-blot 分析

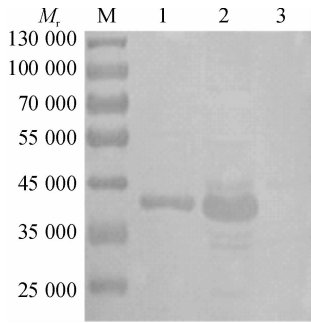
重组质粒 pET-gE184 转化大肠埃希菌 BL21 (DE3),经 IPTG 诱导后通过 SDS-PAGE 电泳,可见表达蛋白相对分子质量约为 39 000(图 2). 通过 His-TrapFF 镍柱亲和层析获得较纯的重组蛋白,Western-blot 结果表明表达蛋白可与 PRV 阳性血清反应(图 3),具有良好的反应原性. 通过 BCA 法测定纯化后的蛋白质量浓度约为 0.4 mg · mL⁻¹.



M:标准蛋白相对分子质量;1:纯化后的蛋白条带;2:BL21 (DE3) + pET-gE184(诱导);3:BL21 (DE3) + pET-gE184(未诱导).

图 2 重组蛋白的 SDS-PAGE 电泳分析

Fig. 2 Identification of the recombinant protein by SDS-PAGE



M:标准蛋白相对分子质量;1:纯化后的蛋白条带;2:BL21 (DE3) + pET-gE184(诱导);3:BL21 (DE3) + pET-gE184(未诱导).

图 3 重组蛋白的 Western-blot 分析

Fig. 3 Identification of the recombinant protein by Western-blot

2.3 间接 *gE*184-ELISA 最佳反应条件的确定

经过方阵滴定确定重组抗原最佳包被质量浓度为 2.5 μg · mL⁻¹,阴、阳性血清的最佳稀释度为 1:200,作用时间为 40 min;最佳封闭液为 0.01 g · mL⁻¹BSA,封闭时间为 2 h;二抗的最佳稀释度为 1:5 000,作用时间为 50 min;底物最佳显色时间为 20 min.

2.4 判定标准的确定

用建立的间接 *gE*184-ELISA 检测 20 份阴性血清,计算出平均 *D*_{450 nm} 为 0.083,标准差 SD 为 0.015,从而计算出阴阳临界值为 0.128,因此,若样本 *D*_{450 nm} ≥ 0.128,判定为阳性;若样本 *D*_{450 nm} < 0.128,判定为阴性.

2.5 特异性试验

用建立的间接 *gE*184-ELISA 方法检测 PRV、PRRSV、FMDV、JEV、CSFV、PCV-2 标准阳性血清,结果显示除猪伪狂犬病病毒阳性血清为阳性外,其余血清的 *D*_{450 nm} 均低于 0.128,判定为阴性,表明本试验建立的 *gE*184-ELISA 方法对 PRV 有较好的特异性(表 1).

表 1 间接 *gE*184-ELISA 方法特异性试验¹⁾
Tab.1 The specificity of indirect *gE*184-ELISA

标准血清	<i>D</i> _{450 nm}	结果判定	标准血清	<i>D</i> _{450 nm}	结果判定
PRV(+)	1.089	+	JEV	0.075	-
PRV(-)	0.038	-	CSFV	0.082	-
PRRSV	0.050	-	PCV-2	0.037	-
FMDV	0.069	-	PRV <i>gE</i> (-)	0.045	-

1)PRV *gE*(-)代表 PRV *gE* 基因缺失疫苗免疫血清;结果判定中 + 代表阳性, - 代表阴性.

2.6 敏感性试验

用建立的间接 *gE*184-ELISA 方法检测 PRV 标准阳性血清,当血清稀释 1:6 400 时,检测结果仍为阳性(*D*_{450 nm} = 0.177)(表 2),表明建立的方法敏感性良好.

表 2 间接 gE184-ELISA 方法敏感性试验
Tab.2 The sensitivity of indirect gE184-ELISA

血清稀释度	$D_{450\text{ nm}}$	血清稀释度	$D_{450\text{ nm}}$
1: 100	1. 009	1: 3 200	0. 342
1: 200	0. 844	1: 6 400	0. 177
1: 400	0. 711	1: 12 800	0. 117
1: 800	0. 584	1: 25 600	0. 082
1: 1 600	0. 450	1: 51 200	0. 076

表 3 间接 gE184-ELISA 方法批内重复性试验
Tab.3 The intra-repeatability of indirect gE184-ELISA

血清 编号	$D_{450\text{ nm}}$									变异	
	1	2	3	4	5	6	7	8	平均值	标准差	系数/%
1	0. 395	0. 389	0. 392	0. 396	0. 399	0. 396	0. 387	0. 398	0. 394	0. 004	1. 02
2	0. 591	0. 597	0. 604	0. 574	0. 595	0. 584	0. 607	0. 611	0. 592	0. 012	2. 10
3	1. 048	1. 007	1. 025	1. 081	1. 092	1. 105	1. 068	1. 074	1. 063	0. 031	3. 11
4	0. 057	0. 049	0. 060	0. 052	0. 059	0. 063	0. 055	0. 049	0. 055	0. 005	1. 00
5	0. 095	0. 084	0. 087	0. 089	0. 092	0. 083	0. 088	0. 102	0. 090	0. 006	6. 67

表 4 间接 gE184-ELISA 检测方法批间重复性试验
Tab.4 The inter-repeatability of indirect gE184-ELISA

血清 编号	$D_{450\text{ nm}}$									变异	
	1	2	3	4	5	6	7	8	平均值	标准差	系数/%
1	0. 692	0. 685	0. 686	0. 688	0. 699	0. 686	0. 698	0. 691	0. 691	0. 005	0. 72
2	0. 281	0. 277	0. 283	0. 288	0. 279	0. 285	0. 281	0. 288	0. 282	0. 004	1. 42
3	0. 948	0. 957	0. 949	0. 952	0. 950	0. 949	0. 955	0. 955	0. 952	0. 003	3. 15
4	0. 066	0. 062	0. 065	0. 059	0. 059	0. 064	0. 058	0. 062	0. 062	0. 003	4. 84
5	0. 045	0. 044	0. 047	0. 049	0. 042	0. 043	0. 048	0. 044	0. 045	0. 003	6. 66

2.8 临床样品检测对比分析

使用建立的间接 gE184-ELISA 方法检测不同猪场送检的 290 份猪血清样本,并与商品化 ELISA 试剂盒检测结果进行比较(表 5)。从表 5 中可以看出,用 IDEXX ELISA 试剂盒检测为阳性的 129 份血清中,间接 gE184-ELISA 检出 118 份阳性,阳性的符合率为 91.5% (118/129);IDEXX ELISA 试剂盒检测为阴性的 161 份血清中,间接 gE184-ELISA 检出 152 份阴性,阴性符合率为 94.4% (152/161);间接 gE184-ELISA 检测方法 with IDEXX ELISA 试剂盒的总符合率为 93.1% [(118 + 152)/290]。

表 5 临床样品检测结果对比¹⁾

Tab.5 The result of clinical samples by gE184-ELISA and IDEXX ELISA Kit

IDEXX ELISA 试剂盒检测	检出数量	间接 gE184-ELISA 检测	检出数量
阳性	129	阳性	118
阴性	161	阴性	152

1)送检样品共 290 份。

2.7 重复性试验

5 份血清经建立的间接 gE184-ELISA 方法进行批内重复性试验,结果(表 3)显示变异系数小于 10%,5 份血清分别用 8 块不同批次的酶标板进行批间重复性试验,结果(表 4)显示变异系数小于 10%,表明所建立的检测方法具有良好的重复性。

3 讨论

PRV 基因缺失弱毒疫苗的使用很好地控制了我国伪狂犬病的发生,但从 2011 年开始,我国不同省份多个猪场先后出现接种 PRV 基因缺失弱毒疫苗后仍出现疑似伪狂犬病症,主要表现为母猪流产、产弱仔、死胎、仔猪出现神经症状等^[8-10]。对分离病毒的生物学特性研究显示,新分离毒株与以前分离株遗传关系较远且毒力更强,Bartha-K61 弱毒疫苗免疫猪产生的中和抗体对新分离毒株的中和能力较差^[8-10],这些都表明病毒可能存在一定的变异,有待作进一步的研究调查。

gE 基因是伪狂犬病毒主要毒力相关基因,gE 基因缺失的基因工程疫苗是包括我国在内的世界各国广泛使用的弱毒疫苗^[11]。在欧美等国家,多应用 gE 基因缺失疫苗配合 gE 基因鉴别诊断方法来区分自然感染猪和疫苗免疫猪^[12],进而逐步实现该病的根除。Fuches 等^[13]将 gE 基因若干重叠基因片段在大肠埃希菌中融合表达,用单抗和高免血清检测,gE

糖蛋白的 N 端 33 位至 100 位的氨基酸区段为其主要抗原表位区. Jacobs 等^[6] 同样采用若干重叠基因片段在大肠埃希菌中融合表达,并用单抗和高免血清检测发现 *gE* 基因的第 157 ~ 714 位核苷酸区域编码 *gE* 糖蛋白的 5 个主要抗原表位区. 通过对 *gE* 基因亲水功能区的分析并结合有关的报道^[14],本次试验设计引物时剔除蛋白胞内区、跨膜区和信号肽,扩增 *gE* 基因的主要抗原表位区,即从 54 位氨基酸到 237 位氨基酸. 应用大肠埃希菌表达系统表达 *gE* 基因主要抗原表位区,并以表达的重组蛋白代替 *gE* 全长蛋白建立间接 ELISA 诊断方法.

本研究建立的 *gE*184-ELISA 检测方法具有良好的特异性、敏感性及可重复性,且与 IDEXX ELISA 试剂盒符合率可达到 93.1%,具有良好的应用前景. *gE*184-ELISA 检测方法能很好地鉴别自然感染猪和疫苗免疫猪,因此与 *gE* 基因缺失疫苗配合使用,可达到净化 PRV 的目的.

参考文献:

[1] 殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 北京:科学出版社,1997:988-1009.

[2] JÖNS A, GRANZOW H, KUCHLING R, et al. The UL49.5 gene of pseudorabies virus codes for an O-glycosylated structural protein of the viral envelope[J]. J Virol, 1996,70(2):1237-1241.

[3] JACOBS L, MULDER W A, VAN OIRSCHOT J, et al. Deleting two amino acids in glycoprotein gI of pseudorabies virus decreases virulence and neurotropism for pigs, but does not affect immunogenicity[J]. J Gen Virol, 1993, 74(Pt10):2201-2206.

[4] VAN OIRSCHOT J T, GIELKENS A J, MOORMANN R J, et al. Marker vaccines, virus protein-specific antibody assays and the control of Aujeszky's disease[J]. Vet Microbiol, 1990, 23(1/2/3/4):85-101.

[5] ELBERS A R W, BRAAMSKAMP J, DEKKERS L J M,

et al. Aujeszky's disease virus eradication campaign successfully heading for last stage in The Netherlands[J]. Vet Q, 2000, 22(2):103-107.

[6] JACOBS L, MELOEN R H, GIELKENS A L, et al. Epitope analysis of glycoprotein I of pseudorabies virus[J]. J Gen Virol, 1990, 71(Pt4):881-887.

[7] 孙磊磊,程艺,梁梓森,等. 伪狂犬病毒 EPO 基因的克隆及其在大肠杆菌中的表达研究[J]. 中国畜牧兽医, 2012,39(6):57-60.

[8] 童武,张青占,童光志. 免疫后发病仔猪中伪狂犬病毒的分离和鉴定[J]. 中国动物传染病学报,2013,21(3):1-7.

[9] 刘洪斌,张智明,丁国杰,等. 猪伪狂犬病毒 DQ 株的分离鉴定与生物学特性研究[J]. 中国兽药杂志,2013,47(9):14-17.

[10] 彭金美,安同庆,赵鸿远. 猪伪狂犬病病毒新流行株的分离鉴定及抗原差异性分析[J]. 中国预防兽医学报, 2013,35(1):1-4.

[11] HEFFNER S, KOVACS F, KLUPP B G, et al. Glycoprotein gp50-negative pseudorabies virus: A novel approach toward a nonspreading live herpesvirus vaccine[J]. J Virol, 1993, 67(3):1529-1537.

[12] GUT M, JACOBS L, TYBOROWSKA J, et al. A highly specific and sensitive competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on baculovirus expressed pseudorabies virus glycoprotein gE and gI complex[J]. Vet Microbiol,1999, 69(4):239-249.

[13] FUCHES W, RZIHA H J, LUKÁCS N, et al. Pseudorabies virus glycoprotein gI: *In vitro* and *in vivo* analysis of immunorelevant epitopes [J]. J Gen Virol, 1990, 71(Pt5):1141-1151.

[14] TIRABASSI R S, ENQUIST L W. Role of the pseudorabies virus gI cytoplasmic domain in neuroinvasion, virulence, and posttranslational N-linked glycosylation[J]. J Virol, 2000, 74(8):3505-3516.

【责任编辑 柴 焰】