

IBDV VP2 蛋白 P22 表位多肽的 原核表达及初步鉴定

王倩倩¹, 张改平², 王选年^{2,3*}, 宋幸辉², 卢清侠², 王世红¹, 王爱萍^{1*}

(1. 郑州大学 生物工程系, 河南 郑州 450001; 2. 河南省农业科学院 农业部动物免疫学重点开放实验室/河南省动物免疫学重点实验室, 河南 郑州 450002; 3. 新乡学院 生物技术研究中心, 河南 新乡 453003)

摘要: 为了进一步了解传染性法氏囊病毒 (IBDV) VP2 蛋白 P22 多肽抗原表位的功能, 根据 IBDV VP2 蛋白的三维结构, 设计合成编码 P22 多肽的基因序列, 通过大肠杆菌密码子优化, 并将基因序列 P22 串联二次合成并转化大肠杆菌 BL21(DE3) 菌株。用 IPTG 诱导 P22 基因的表达。表达纯化后的 P22 多肽经 SDS-PAGE 电泳和 Western-blot 分析及传染性法氏囊病毒快速检测试纸条检测。结果表明, P22 表位多肽的分子质量约为 16 kD, 并能被 His 单抗识别, 用试纸条检测纯化的 P22 多肽, 呈阳性反应结果。提示 IBDV VP2 蛋白 P22 多肽能与 IBDV 单抗特异性反应。

关键词: 法氏囊病毒; P22 抗原表位; SDS-PAGE; 多肽; 检测

中图分类号: Q786 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2012)05-0150-04

Prokaryotic Expression and Identification of P22 Antigen Peptide on VP2 Protein of Infectious Bursal Disease Virus

WANG Qian-qian¹, ZHANG Gai-ping², WANG Xuan-nian^{2,3*}, SONG Xing-hui²,
LU Qing-xia², WANG Shi-hong¹, WANG Ai-ping^{1*}

(1. Department of Bioengineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China;

2. Key Laboratory of Animal Immunology of the Ministry of Agriculture, Henan Provincial Key Laboratory of Animal Immunology, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China;

3. Biotechnology Research Center, Xinxiang University, Xinxiang 453003, China)

Abstract: In order to study the function of P22 peptide on the VP2 protein of infectious bursal disease virus (IBDV), the sequence of P22 peptide was designed according to three dimensional structures of VP2 on IBDV. P22 peptide was synthesized and expressed in *E. coli* BL21 (DE) strain. After purification and renaturation, P22 peptide was analyzed by SDS-PAGE, Western-blot and IBDV rapid diagnostic strip. The results showed that the molecular weight of P22 peptide is about 16 kD and can be detected by anti-His monoclonal antibody. IBDV rapid diagnostic strip can interact with P22 peptide, indicating that anti-IBDV monoclonal antibody can detect P22 peptide specifically.

Key words: IBDV; P22 antigen epitope; SDS-PAGE; peptide; detection

鸡传染性法氏囊病 (IBD) 是由传染性法氏囊病毒 (IBDV) 引起的 3~12 周龄雏鸡及青年鸡的一种急性、高度接触性免疫抑制传染病。它通过破坏鸡的中

枢免疫器官—法氏囊, 使免疫器官和免疫活性细胞功能受到严重损伤, 从而出现不同的免疫抑制^[1]。该病潜伏期较短, 发病率高, 且由于免疫抑制的发生, 感染

收稿日期: 2012-01-16

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30871885); 河南省科技创新杰出人才项目 (104200510008)

作者简介: 王倩倩 (1986-), 女, 河南鹤壁人, 在读硕士研究生, 研究方向: 动物免疫学。E-mail: wangqq2007@gmail.com

* 通讯作者: 王爱萍 (1970-), 女, 青海西宁人, 教授, 主要从事动物免疫学研究。E-mail: pingaw@126.com

王选年 (1969-), 男, 河南灵宝人, 教授, 主要从事动物病毒学及免疫学研究。

E-mail: xuannianwang@yahoo.com.cn

鸡常常发生疫苗接种免疫失败和对其他病原的易感性增强,给养禽业造成了巨大的经济损失^[2-3]。

传染性法氏囊病病毒(IBDV)属于双 RNA 病毒科,为典型的禽双 RNA 病毒属。它由二十面体立体对称的病毒粒子组成,分为 2 个片段的双链 RNA(A 和 B)的基因组,无囊膜,表面无突起,直径约 60 nm^[4]。IBDV 可以编码 5 种病毒蛋白,分别为 VP1、VP2、VP3、VP4、VP5^[2]。其中 VP2 为主要的结构蛋白,暴露在核衣壳的外面,并携带有病毒的主要中和性抗原表位,它能诱导宿主产生针对 IBDV 的中和性抗体,这种抗体能保护易感鸡使其免受 IBDV 的感染,同时具有配体结合表位,对于病毒毒力和细胞嗜性有着非常重要的影响^[5-8]。根据细胞抗原受体的不同,抗原表位可分为 B 细胞抗原表位和 T 细胞抗原表位。IBDV 以体液免疫为主,因此,鉴定其 B 细胞表位有助于理解其体液免疫的本质。目前,IBDV VP2 蛋白的抗原表位的研究已有很大进展,Cui 等利用噬菌体展示肽库得出构象表位位于 VP2 高变区 204~344 aa^[9-10];Wang 等^[11]通过噬菌体展示肽库和肽扫描法得出 IBDV VP2 蛋白的第 197~209 位和第 329~337 位氨基酸序列特异结合抗 IBDV 的单克隆抗体。肖治军等^[12]的研究也显示,VP2 蛋白的第 189~205 位和第 312~326 位氨基酸序列均可阻断 IBDV 与抗 IBDV 单抗的结合反应。

本课题组之前对 IBDV VP2 蛋白配体结合表位多肽进行了筛选和鉴定,并通过多肽结合鸡胚成纤维细胞(CEF)试验筛选出一条 IBDV VP2 蛋白配体结合表位多肽 P22^[13-14]。为了进一步深入研究 P22 多肽的功能,在之前试验基础上,通过大肠杆菌密码子优化,设计合成编码 P22 多肽(43AA)的基因序列,将基因序列串联合成后表达纯化并进行初步鉴定,以期为进一步研究 P22 多肽的其他功能奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

含 P22 序列的重组载体由生工生物工程技术服务有限公司合成;Ni-NTA His. Bind Resin 购自 QUAGEN 公司,IBDV 抗原快速检测试纸条由河南省动物免疫学重点实验室研制^[15]。预染蛋白 Marker 购自 NEB。

1.2 目的基因的合成

通过大肠杆菌密码子优化,设计合成编码 P22 多肽(43 aa)的基因序列,将该基因重复串联 2 次,中间通过 linker 相连,linker 氨基酸序列为 GGGSG。在 P22 多肽的串联重复基因两端分别加酶切位点: *Bam* H I、*Eco*R I 和终止密码子 TAA,送至上海生工

生物工程技术服务有限公司进行基因合成,合成基因的插入 pUC57 克隆载体中,命名为 pUC57-P22。基因设计好后,送至生工生物工程技术服务有限公司合成并转入 pET28a-BL21 菌株。新的菌株命名为 pET28a-BL21-P22 并提取质粒。

1.3 重组质粒 pET28a-BL21-P22 的诱导表达

将鉴定正确的重组表达质粒 pET28a-BL21-P22 以 1% 的接种量接种在含 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中,至细菌生长到对数生长期,即 OD₆₀₀ 为 0.4~0.6 时,在培养物中分别加入 IPTG 作为诱导剂,IPTG 终浓度为 1 mmol/L,37 °C 下振荡培养;取 IPTG 诱导前和诱导后菌液各 1 mL,离心,收集菌体做 SDS-PAGE 电泳鉴定结果。

1.4 多肽 pET28a-BL21-P22 的可溶性分析

诱导的菌液离心后的沉淀,用 PBS 悬浮菌体;超声破碎细胞后,9 000 r/min 离心 20 min,分离上清和沉淀;上清和沉淀分别经 SDS-PAGE 检测,判断该多肽的可溶性。

1.5 表达条件优化

重组表达质粒 pET28a-BL21-P22,37 °C 下振荡培养至对数生成期时,加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG,分别诱导表达 2 h、4 h、6 h、8 h、过夜。各取不同诱导时间的菌液,9 000 r/min 离心 20 min,收集菌体做 SDS-PAGE 分析。

1.6 重组多肽的纯化及复性

按优化好的诱导表达条件摇菌液 200 mL,离心后收集沉淀。用 Ni-NTA His. Bind Resin 在变性条件下纯化含 His-tag 的融合蛋白。将沉淀溶解于变性结合缓冲液(100 mmol/L NaH₂PO₄, pH 值 8.0; 10 mmol/L Tris-HCl; 8 mol/L Urea)放置 30 min 后,确保沉淀完全溶解,9 000 r/min 离心 20 min,除去不溶成分,上清过亲和层析柱(亲和层析柱预先用 2 倍体积的变性结合缓冲液平衡);8 倍柱床体积的变性漂洗缓冲液(100 mmol/L NaH₂PO₄, pH 值 6.3; 10 mmol/L Tris-HCl, 8 mol/L 尿素)洗柱;3 倍柱床体积的变性洗脱缓冲液(100 mmol/L NaH₂PO₄, pH 值 4.5; 10 mmol/L Tris-HCl; 8 mol/L 尿素)洗脱目的蛋白,收集组分进行 SDS-PAGE 分析。

使用透析袋,用 Tris 缓冲液(100 mmol/L NaH₂PO₄, pH 值 8.0; 10 mmol/L Tris-HCl)逐渐降低尿素的浓度,在 4 °C 条件下透析 24~48 h,直至蛋白样品中的尿素完全被透析出来。

1.7 重组多肽的抗原性分析

纯化后的多肽进行 Western-blot 分析。样品经沸水浴加热 3~5 min,以使多肽充分变性。冷却到室温后,将样品直接加至 SDS-PAGE 胶加样孔即可。

预计目的多肽已经适当分离后可停止电泳。将其转移至硝酸纤维素膜(NC膜)上,5%脱脂奶4℃封闭过夜。PBST洗膜3~5遍。加 His 单抗,37℃孵育30 min, His 单抗需 1:2 000 稀释。PBST洗膜3~5遍。加入 HRP 标记的羊抗鼠二抗,37℃孵育1 h, HRP 标记的羊抗鼠二抗需 1:1 000 稀释。PBST洗膜3~5遍。AEC 试剂盒显示 3 min 后,双蒸馏水终止反应。

用河南省动物免疫学重点实验室研制的 IBDV 抗原快速检测试纸条检测纯化的多肽,上样量20 μg,用3倍量生理盐水稀释,5 min 内读结果。用生理盐水和河南省动物免疫学重点实验室培养的 IBDV^[16]作为对照。

2 结果与分析

2.1 重组多肽的诱导表达与可溶性分析结果

pET28a-BL21-P22 重组表达载体,在 1 mmol/L IPTG,30℃条件下经 2 h、4 h、6 h、8 h 及过夜诱导,离心取沉淀,用 SDS-PAGE 分析,结果发现(图 1),诱导 4 h 表达的蛋白最多,蛋白表达量随着时间的增长逐渐增加,但超过 8 h 之后蛋白量反而有略微下将,可能是因为诱导时间过长会有部分蛋白分解。

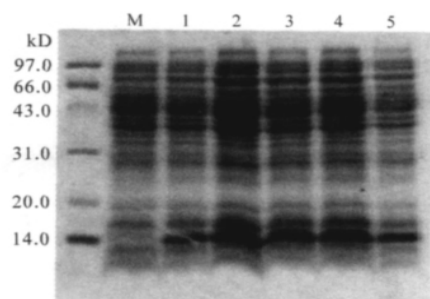


图 1 pET28a-BL21-P22 不同诱导时间下的表达情况

pET28a-BL21-P22 重组表达载体,在 1 mmol/L IPTG 诱导 4 h,将菌液离心,沉淀用 PBS 重悬,经超声波破碎后,沉淀和上清分别经 SDS-PAGE 分析,如图 2 所示。pET28-BL21-P22 在上清液中未见预期蛋白条带,在沉淀中可见预期的蛋白条带。这说明表达的蛋白全部为非溶性蛋白,主要以包涵体形式存在。

2.2 复性多肽 SDS-PAGE 电泳鉴定结果

用 Ni-NTA His. Bind Resin 在变性条件下纯化带 His-tag 的融合蛋白,得到的多肽装入透析袋,4℃条件下逐渐降低尿素的浓度,直到样品中的的尿素完全透析出去。用 SDS-PAGE 电泳鉴定纯化后表达产物 P22,在 16 kD 处得到单一的浓烈的条带(图 3),与

预期的结果相符,说明纯化的产物为 P22 串联产物。

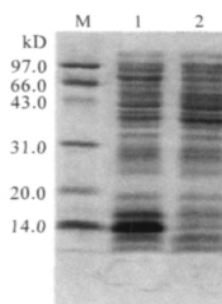


图 2 P22 表达多肽的可溶性分析

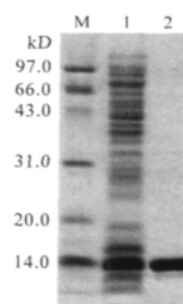


图 3 纯化 P22 表达产物 SDS-PAGE 电泳鉴定图谱

2.3 复性多肽的 Western-blot 结果

复性多肽 pET28a-BL21-P22 经 SDS-PAGE 分析,然后转至硝酸纤维素膜。37℃条件下用 5%脱脂奶封闭该膜 1 h。PBST 洗 3 遍。加 His 单抗,37℃条件下作用 30 min。PBST 洗膜 3 遍。加辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG,37℃条件下作用 30 min。AEC 试剂盒显色。如图 4 所示,复性多肽能被抗 His 单克隆抗体特异识别。

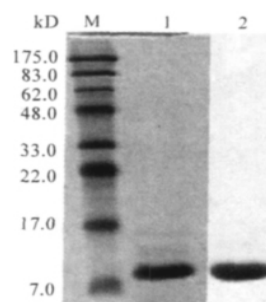


图 4 复性多肽 pET28-P22-BL21 的 Western-blot 检测图谱

2.4 复性多肽的检测结果

用河南省动物免疫学重点实验室研制的 IBDV 抗原快速检测试纸条检测复性多肽 pET28a-BL21-P22,加 IBDV 和复性多肽 pET28-P22-BL21 的试纸条,控制线和检测线都有明显的红色条带,而加生理盐水的试纸条只有控制线显色,说明获得的多肽可被 IBDV 的单抗识别。

3 讨论

随着分子生物学技术的不断发展,原核表达系统也在不断发展和完善,成为目前外源基因高效表达的首选体系,以大肠杆菌表达系统为代表,具有繁殖快、生长周期短、易于培养、表达量高、表达产物分离纯化方法相对简单、培养基成本低、遗传背景清楚等优点。本试验运用大肠杆菌表达系统表达了 P22 基因,试验最初直接将 P22 多肽序列插入到克隆载体,之后将目的片段与原核表达载体 pET-28a 连接,诱导后发现在 *E. coli* BL21(DE)株不表达。然后考虑将该基因重复串联 2 次,中间通过 linker 相连,linker 氨基酸序列为 GGGSG,pET28a-BL21-P22 菌株后经 IPTG 诱导,经 SDS-PAG 电泳鉴定后考马斯亮蓝染色,可观察到约在相对分子质量 16 kD 处有明显可见的条带,与预期大小相一致,并能被 His 单抗识别。

Fasséli 等^[17]于 2005 年首次在 Cell 杂志公布了 IBDV VP2 蛋白的亚结构,在文中提出了作为构成双 RNA 无囊膜病毒的 VP2 结晶图谱,VP2 折叠成 3 个不同在亚病毒颗粒中呈辐射状排列,分别由 3 个部位组成,即基底部(B)、外壳部(S)和投影区(P),氨基酸排列顺序显示出 S 和 B 部位是相对保守,P 部位是高变区。目前大部分理论认为 IBDV 的抗原表位主要集中在 P 部位。而 P22 基因位于 VP2 单边的外壳部(S),且与河南省动物免疫学重点实验室研制的 IBDV 抗原快速检测试纸条呈现阳性反应,说明 P22 多肽能够被 IBDV 单克隆抗体识别,是 IBDV 的抗原决定簇,很好地补充了现有关于 IBDV VP2 蛋白的表位理论,后续试验将继续研究该多肽的免疫原性和其他功能。

参考文献:

- [1] 雷变兰,周玉武.复方黄芪颗粒防治鸡传染性法氏囊病的疗效试验[J].山西农业科学,2007,35(1):70-72.
- [2] 张源.鸡传染性法氏囊病的发生与防治[J].现代农业科学,2010(13):381.
- [3] 张娟,谷明强,兰秀香,等.鸡传染性法氏囊病免疫失败的原因及对策[J].现代农业科技,2010(19):313.
- [4] Bayliss C D, Spies U, Shaw K, *et al.* A comparison of the sequences of segment A of four infectious bursal

- disease virus strains and identification of a variable region in VP2[J]. J Gen Virol, 1990, 71(6):1303-1312.
- [5] Böttcher B, Kiselev NA, Stel'Mashchuk V Y, *et al.* Three-dimensional structure of infectious bursal disease virus determined by electron cryomicroscopy[J]. J Virol, 1997, 71:325-330.
- [6] Cao Y C, Yeung W S, Law M, *et al.* Molecular characterization of seven Chinese isolates of infectious bursal disease virus: classical, very virulent and variant strains [J]. Avian Dis 1998, 42:340-351.
- [7] Matthieu Blanchet, Camille Sureau. Infectivity determinants of the hepatitis B virus pre-S domain are confined to the N-terminal 75 amino acid residues[J]. 2007, J Virol, 81(11):5841-5849.
- [8] Dieter Glebe, Stephan Urban. Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry[J]. World J Gastroenterol, 2007, 13(1):22-38.
- [9] Cui X, Nagesha H S, Holmes I H. Mapping of conformational epitopes on capsid protein VP2 of infectious bursal disease virus by fd2tet phage display[J]. Virol Meth, 2003, 114(1):109-112.
- [10] Cui X, Nagesha H S, Holmes I H. Identification of crucial residues of conformational epitopes on VP2 protein of infectious bursal disease virus by phage display[J]. J Virol Meth, 2003, 109(1):75-83.
- [11] Wang X N, Zhang G P, Zhou J Y, *et al.* Identification of neutralizing epitopes on the VP2 protein of infectious bursal disease virus by phage-displayed heptapeptide library screening and synthetic peptide mapping[J]. Viral Immunology, 2005, 18(3):549-557.
- [12] 肖治军,张改平,杨汉春,等.抗鸡传染性法氏囊病毒单克隆抗体识别的抗原表位分析[J].河南农业科学,2006(11):105-109.
- [13] 宋幸辉,王睿,王选年,等.传染性法氏囊病毒 VP2 蛋白抗原表位多肽 P22 的免疫原性及生物学功能鉴定[J].畜牧兽医学报,2011,42(5):692-697.
- [14] 朱彦彩.鸡传染性法氏囊病毒 VP2 蛋白配体结合表位的鉴定[D].郑州:河南农业大学,2008.
- [15] 张改平,李学伍,杨艳艳,等.鸡传染性法氏囊病快速诊断试纸条的研制及特性测定[J].畜牧兽医学报,2004,35(1):89-92.
- [16] Luo J, Zhang G P, Fan J M, *et al.* Infectivity and propagation of attenuated infectious bursal disease virus in the chicken B-lymphocyte cell line DT40 [J]. Arch Virol, 2009, 154(3):513-517.
- [17] Fasséli Coulibaly, Christophe Chevalier, Irina Gutsche, *et al.* The birnavirus crystal structure reveals structural relationships among icosahedral viruses [J]. Cell, 2005, 120:761-772.