

# 传染性法氏囊病毒 VP2 蛋白的高效表达与免疫原性分析

杨 棋<sup>1,2</sup>, 魏 蔷<sup>2</sup>, 刘运超<sup>2</sup>, 冯 华<sup>2</sup>, 蒋大伟<sup>2</sup>, 陈玉梅<sup>2</sup>, 张改平<sup>1,2\*</sup>

(1. 河南农业大学 生命科学学院, 河南 郑州 450002; 2. 河南省农业科学院 动物免疫学  
重点实验室/河南省动物免疫学重点实验室/农业部动物免疫学重点实验室, 河南 郑州 450002)

**摘要:** 为了实现传染性法氏囊病毒 (IBDV) B87 毒株 VP2 蛋白在大肠杆菌中的高效可溶性表达, 将 IBDV B87 毒株 VP2 基因插入原核表达载体 pET-28a(+), 构建重组质粒 pET28a-VP2, 将其转化不同大肠杆菌基因工程菌株, 通过 IPTG 诱导表达 VP2 外源蛋白。利用鸡传染性法氏囊病抗原快速检测试纸筛选, 确定了 BL21 (DE3) 为 VP2 可溶性蛋白的高效表达菌株。SDS-PAGE、Western blot 分析表明, VP2 实现了可溶性表达, 且可溶性 VP2 蛋白具有良好的反应原性。将表达的重组蛋白利用琼脂扩散试验 (AGP) 分析, 结果表明, VP2 蛋白的 AGP 效价达到 1:64。将重组蛋白免疫接种 SPF 鸡, 制备的抗血清 AGP 效价可达 1:16, 说明表达的 B87 毒株 VP2 蛋白免疫原性良好。

**关键词:** 传染性法氏囊病毒; B87 毒株; VP2 蛋白; 原核表达; 免疫原性

**中图分类号:** S858.31      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1004-3268(2018)05-0124-05

## High-level Expression and Immunogenicity Analysis of Infectious Bursal Disease Virus VP2 Protein

YANG Qi<sup>1,2</sup>, WEI Qiang<sup>2</sup>, LIU Yunchao<sup>2</sup>, FENG Hua<sup>2</sup>, JIANG Dawei<sup>2</sup>, CHEN Yumei<sup>2</sup>, ZHANG Gaiping<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Life Sciences, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; 2. Key Laboratory of Animal Immunology, Henan Academy of Agricultural Sciences/Henan Provincial Key Laboratory of Animal Immunology/Key Laboratory of Animal Immunology of Ministry of Agriculture, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** In order to achieve efficient soluble expression of VP2 protein of infectious bursal disease virus (IBDV) B87 strain in *E. coli*, the IBDV B87 strain VP2 gene was inserted into the prokaryotic expression vector pET-28a(+) to construct a recombinant plasmid pET28a-VP2. The pET28a-VP2 was transformed into different *E. coli* genetically engineered strains, which were then induced by IPTG to express VP2 exogenous protein. The high-level expression strain was identified using the rapid test strip of infectious bursal disease antigen, namely BL21 (DE3). SDS-PAGE and Western blot analysis showed that VP2 soluble expression was achieved, and the soluble VP2 protein had a good reactogenicity. The recombinant VP2 protein was analyzed by agar diffusion experiment (AGP). The results showed that the VP2 protein AGP titer could reach 1:64. The two-week old SPF chicken were immunized with the recombinant protein, and the antiserum AGP titer was 1:16, indicating that the soluble VP2 protein of B87 strain had a good immunogenicity.

**Key words:** Infectious bursal disease virus; B87 strain; VP2 protein; Prokaryotic expression; Immunogenicity

收稿日期:2017-11-03  
基金项目:国家重点研发计划(2017YFD0501103)  
作者简介:杨 棋(1991-),男,河南郑州人,在读硕士研究生,研究方向:动物学。E-mail:1185008049@qq.com  
\* 通讯作者:张改平(1960-),男,河南内黄人,研究员,博士,主要从事动物免疫学及重大疫病快速检测技术研究。  
E-mail:zhanggaiping2003@163.com

鸡传染性法氏囊病( IBD)最初在 20 世纪 60 年代被发现,该疾病是由传染性法氏囊病毒( IBDV)引起的一种急性、高度传染性的免疫抑制性疾病,危害世界所有主要的家禽产区<sup>[1-2]</sup>。IBDV 是一种无囊膜的病毒,属于 Birnaviridae 家族,基因组由 A、B 2 段双链 RNA 组成。A 节段包含 2 个部分重叠的开放阅读框,其中较小的阅读框编码非结构蛋白 VP5,较大的阅读框编码一个多聚蛋白<sup>[3]</sup>。多聚蛋白自裂解形成病毒蛋白 VP2、VP3 和 VP4<sup>[4]</sup>,其中 VP2 和 VP3 是病毒的主要结构蛋白,为病毒核衣壳的主要成分。VP2 含有血清型特异性并能诱导中和抗体产生的构象依赖型抗原决定簇,其诱导的中和抗体能被动地保护宿主不受 IBDV 的感染,是 IBDV 的保护性抗原,具有特异性<sup>[5]</sup>。研究表明,VP2 与病毒毒力和细胞嗜性有关<sup>[6]</sup>。B 节段主要编码 VP1 蛋白,其是一种 RNA 依赖的 RNA 聚合酶<sup>[7-8]</sup>。

传染性法氏囊病给家禽业造成巨大的经济损失,目前尚无特效药可以治疗,主要应用疫苗进行预防,所用疫苗主要为灭活疫苗和冻干活疫苗以及新型的基因工程亚单位疫苗<sup>[9]</sup>。其中,IBD 基因工程亚单位疫苗具有较好的免疫原性,副作用相对较小,是一种应用前景广阔的禽病疫苗<sup>[10]</sup>。当前 IBD 基因工程亚单位疫苗主要受困于重组蛋白的表达量以及生产成本等因素。原核表达系统具有操作简便、生产成本低、实际应用前景好等优点,利用埃希氏大肠杆菌表达系统表达所得的 VP2 蛋白已经被证明具有高度的免疫保护原性<sup>[11]</sup>。为了提高外源基因的表达水平、大量制备具有生物活性的目标蛋白,长期以来研究人员尝试优化了表达菌株的生长温度、培养基组成、诱导物浓度等<sup>[12]</sup>,但是 VP2 可溶性蛋白的表达量仍然有待进一步提高。为此,本研究通过广泛筛选多种表达菌株,确定 VP2 蛋白的高效表达菌株,并测定了所表达 VP2 蛋白的免疫原性,为 IBD 新型基因工程亚单位疫苗的研究提供新的参考信息。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

原核表达载体 pET-28a(+)由本实验室保存,IBDV B87 株重组质粒 pUC57-VP2 由上海生物工程股份有限公司合成,感受态细胞 BL21(DE3)、Tuner(DE3)、Tuner(DE3)pLysS 购自北京华越洋生物科技有限公司,Rosetta(DE3)购自上海唯地生物技术有限公司,鸡传染性法氏囊病抗原快速检测试纸购自河南省百奥生物工程有限公司,His-Tag 单抗购自 Proteintech 公司、羊抗鼠二抗购自 Jackson 公

司,AEC 酶底物试剂盒购自无锡傲锐东源生物科技有限公司,鸡新城疫、传染性法氏囊病二连灭活疫苗(La Sota 株+HQ 株)购自辽宁益康生物股份有限公司,IBDV 标准强毒株 BC6/85 和标准阳性抗原均购自中国兽药药品监察所,阳性血清由河南省农业科学院动物免疫学重点实验室制备,SPF 鸡购自北京梅里亚维通实验动物技术有限公司。

### 1.2 VP2 基因原核表达载体的构建

将原核表达载体 pET-28a(+)质粒用 *Bam*HI 和 *Xho*I 双酶切,回收目的片段;以重组质粒 pUC57-VP2 中 VP2 的序列为模板进行 PCR 扩增,并将扩增的目的片段用 *Bam*HI 和 *Xho*I 进行双酶切,回收 VP2 基因;二者连接后转化 JM109 感受态细胞,重组质粒用 *Bam*HI 和 *Xho*I 双酶切鉴定,将阳性重组表达质粒命名为 pET28a-VP2。

### 1.3 重组 VP2 蛋白高效表达菌株的筛选

将 1  $\mu$ L 重组质粒 pET28a-VP2 分别转化 BL21(DE3)、Tuner(DE3)、Tuner(DE3)pLysS、Rosetta(DE3)感受态细胞,挑取固体培养基平板上生长状态良好的单克隆菌落,不同菌株各选取 5 个单菌落,然后诱导表达蛋白质,活化菌体 2~2.5 h,当其 OD<sub>600 nm</sub> 值在 0.6~0.9 时,加入诱导剂 IPTG,浓度为 1 mmol/L,诱导时间 10 h,诱导温度为 37  $^{\circ}$ C,诱导结束后 12 000 r/min 离心收集菌体,弃培养液。将收集到的菌体用 PBS 缓冲液重悬,并调节每种菌体浓度,然后使用分光光度计测量 OD<sub>600 nm</sub> 值,使其终值为 1.8 左右,最后将菌体悬浮液超声破碎(振动频率 50 Hz,工作 5 s 间歇 5 s,持续 10 min),破碎完成后分离收集上清(转速 12 000 r/min、4  $^{\circ}$ C 离心 20 min),弃沉淀。将 IBDV VP2 可溶性蛋白上清液 100  $\mu$ L 倍比稀释 10、100、1 000、10 000 倍,稀释液选用 PBS 缓冲液,然后利用鸡传染性法氏囊病抗原快速检测试纸检测,鉴定每类菌株可溶性蛋白上清的最大显色稀释倍数,从而筛选出高效表达 VP2 蛋白的菌株。

### 1.4 重组 VP2 蛋白的表达验证

将筛选到的高效表达菌株 BL21(DE3)分别于 18、30、37  $^{\circ}$ C 下诱导表达 VP2 蛋白,诱导剂浓度为 1 mmol/L,诱导时间 10 h,诱导结束后 12 000 r/min 离心收集菌体,弃培养液。将收集到的菌体用 1/10 体积的 PBS 缓冲液重悬,即 1 mL PBS 缓冲液重悬 10 mL 离心后收集到的菌体,将重悬后的菌体悬浮液超声破碎(振动频率 50 Hz,工作 5 s 间歇 5 s,持续 10 min),破碎完成后分离收集上清(转速 12 000 r/min、4  $^{\circ}$ C 离心 20 min),然后利用聚丙烯酰胺凝胶电泳

(SDS - PAGE)、Western blot 对 VP2 可溶性蛋白的表达进行验证。

1.5 重组 VP2 蛋白的免疫原性分析

1.5.1 琼脂扩散试验 (AGP) 检测 VP2 蛋白效价 制备琼脂平板,中央孔滴加法氏囊病毒标准阳性血清,将表达产物按 1:2、1:4、1:8、1:16、1:32、1:64 倍稀释,周边孔由高到低分别滴加稀释蛋白液,设置标准抗原阳性对照和 PBS 阴性对照,抗原和血清加入量以加满不溢出为度,样品加毕后,将琼脂平板加盖平放于加盖的湿盒内,37℃温箱中孵育 24~48 h,观察并记录结果。

1.5.2 VP2 蛋白的动物免疫 将表达的 VP2 重组蛋白与 ISA71 佐剂混合乳化制备免疫原,同时设置商业疫苗和 PBS 对照组,进行 SPF 鸡肌肉注射免疫,每组 5 只,试验组免疫剂量为 10 μg/只,商业疫苗 0.3 mL/只,PBS 组 0.3 mL/只,并分别于免疫 28 d 后翅下静脉采血,分离血清。

1.5.3 免疫血清的 AGP 效价检测 制备琼脂平板,中央孔滴加法氏囊病毒标准毒株 (BC6/85),将制备的血清按 1:2、1:4、1:8、1:16、1:32、1:64 倍稀释,周边孔由高到低分别滴加稀释的血清抗体,并设置阳性对照组,加入量以加满不溢出为度,样品加毕后,将琼脂平皿加盖平放于加盖的湿盒内,37℃温箱中孵育 24~48 h,观察并记录结果。

2 结果与分析

2.1 重组质粒 pET28a - VP2 的酶切鉴定

从经过活化的重组菌 JM109 (含 pET28a - VP2) 菌液中提取质粒,利用 BamH I 和 Xho I 内切酶进行双酶切鉴定。如图 1 显示,经 BamH I 和 Xho I 双酶切,得到的目的片段及载体的大小分别与 VP2 片段和 pET - 28a ( + ) 载体的理论大小一致,VP2 约为 1.4 kb,表明重组表达载体 pET28a - VP2 构建成功,测序结果显示重组载体中的 VP2 片段序列正确。

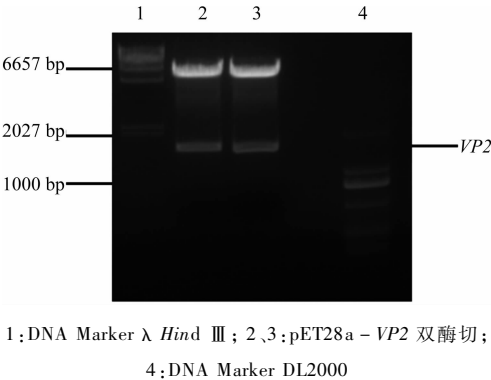


图 1 重组质粒 pET28a - VP2 的双酶切鉴定

2.2 重组 VP2 蛋白的表达及高效菌株的筛选

如图 2 所示,BL21 (DE3)、Tuner (DE3) pLysS 诱导表达的蛋白质产物可溶性上清样品可以使鸡传染性法氏囊病快速检测试纸条标准线和检测线都显色,因此判定为阳性;Tuner (DE3)、Rosetta (DE3) 诱导表达的蛋白质上清样品被检测时只有标准线显色而检测线未能显色,因此判定为阴性。试验结果表明,BL21 (DE3)、Tuner (DE3) pLysS 可以诱导表达具有反应原性的 VP2 蛋白,而 Tuner (DE3)、Rosetta (DE3) 并不具备表达 VP2 蛋白的能力。将筛选出来的 2 种具有表达 VP2 蛋白能力的菌株进行诱导表达,重悬菌体,调整其 OD<sub>600 nm</sub> = 1.8,超声破碎后的上清利用鸡传染性法氏囊病快速检测试纸条检测,结果发现,BL21 (DE3) 表达的 VP2 可溶性蛋白上清在稀释 10、100、1 000 倍时,试纸条检测均呈阳性;Tuner (DE3) pLysS 表达的 VP2 可溶性蛋白上清在稀释 10、100 倍时,试纸条检测呈阳性,增大稀释倍数至 1 000 倍,便检测不到呈阳性。

试验结果表明,BL21 (DE3) 菌株具有高效表达 VP2 可溶性蛋白的能力,可作为候选的高效表达菌株进行诱导表达条件优化,从而提高 VP2 蛋白表达量。

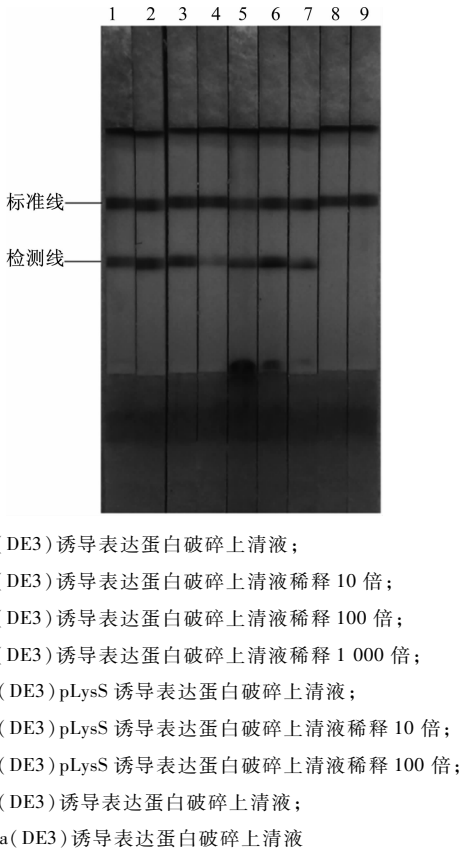


图 2 抗原的 IBD 试纸检测

2.3 重组 VP2 蛋白的表达验证

将诱导表达的 VP2 可溶性蛋白利用 SDS - PAGE 进行分析,如图 3 所示,在约 48 ku 处出现一个条带,与预期结果相符。然后将 SDA - PAGE 胶上的蛋白质转移到 PVDF 膜上,以 His - Tag 单抗作为一抗,HRP 标记过的羊抗鼠 IgG 作为二抗,经过 AEC 酶底物试剂盒显色后,在相应的位置出现了一条特异性的抗原抗体反应显色条带,证明表达的目的蛋白是 VP2 蛋白,并且具有较好的反应原性。

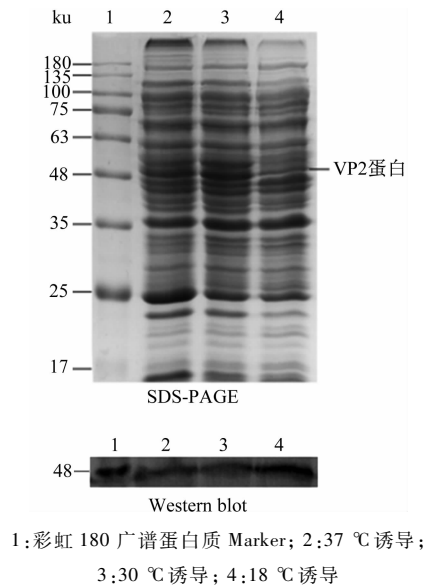


图 3 VP2 可溶性蛋白的表达分析

2.4 重组 VP2 蛋白的免疫原性分析

2.4.1 重组 VP2 蛋白的 AGP 效价检测 将表达所得的重组 VP2 蛋白利用 AGP 试验分析,设置对照组,其中标准抗原阳性对照能检测到沉淀线,PBS 阴性对照未检测到沉淀线,同时表达的 VP2 蛋白可以与标准阳性血清反应形成沉淀线,并且将其进行 1:64 稀释时仍然能够明显地观测到沉淀线(表 1),表明表达的 VP2 蛋白具有良好的反应原性,并且具有较高的表达量。

表 1 重组 VP2 蛋白的 AGP 效价检测

项目	稀释比例						
	原液	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
沉淀线检测	++	++	++	++	++	++	+

注:“++”表示沉淀线清晰可见,“+”表示可见,下同。

2.4.2 免疫血清的 AGP 效价检测 将表达的 VP2 重组蛋白与 ISA71 佐剂混合乳化后制备免疫原,肌肉注射 SPF 鸡进行免疫,分离的抗体血清进行 AGP 试验鉴定。如表 2 显示,商业疫苗组血清 AGP 效价可达 1:64,PBS 组效价为 0,而重组蛋白血清的 AGP 效价为 1:16,能检测到沉淀线,表明诱导表达产物

VP2 蛋白可有效刺激鸡体产生体液免疫应答反应并获得较高的抗体水平。

表 2 免疫血清的 AGP 效价检测

血清来源	稀释比例					
	原液	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
重组蛋白免疫	++	++	++	++	+	-
商业疫苗免疫	++	++	++	++	++	++
PBS 免疫	-	-	-	-	-	-

注:“-”表示沉淀线不可见。

3 结论与讨论

VP2 蛋白构成 IBDV 的外衣壳,约占病毒总蛋白质的 51%,是 IBDV 的主要结构蛋白和功能蛋白<sup>[2]</sup>,已经被国内外学者广泛研究。由于 IBDV 的毒力分子基础和致病性分子标志主要在 VP2 上<sup>[6]</sup>,因此 VP2 蛋白也是近年来 IBDV 新型亚单位疫苗研究的热点。目前,IBDV 主要宿主保护性抗原 VP2 蛋白已在大肠杆菌、酵母、真核细胞、病毒等多种表达系统中得到表达<sup>[13-16]</sup>。大肠杆菌是目前应用最广泛的蛋白质表达系统,具有培养操作简单、转化效率高、价格相对经济、生长培养速度快、可大量生产所需蛋白质等优点<sup>[17]</sup>,是表达重组蛋白的首选宿主之一,目前已经用来表达多种酶制剂和药物制剂,市场上有 40% 的重组制剂由大肠杆菌表达生产<sup>[18]</sup>。

本研究将构建好的 B87 毒株 pET28a - VP2 转化至大肠杆菌中进行蛋白质表达,利用法氏囊病快速检测试纸进行高效表达菌株的筛选,同时进行了 VP2 蛋白的表达鉴定,确定了 BL21 (DE3) 作为 VP2 可溶性蛋白的高效表达菌株,然后进一步通过 AGP 试验鉴定了重组 VP2 蛋白的反应原性。目前对鸡法氏囊病的诊断已有多种方法,经典的检测方法为 AGP 试验,其次为酶联免疫吸附试验等<sup>[19]</sup>。经 AGP 试验鉴定,重组表达的 VP2 蛋白能够和 IBDV 标准阳性血清抗体结合发生反应形成沉淀线,其 AGP 效价可达 1:64。据报道,国内相关实验室利用原核表达得到的 VP2 蛋白,AGP 效价为 1:32<sup>[20]</sup>,这表明本研究获得的重组 VP2 可溶性蛋白表达量较高,并且具有良好的反应原性。将表达的重组蛋白以肌肉注射方式接种试验鸡,对血清抗体进行 AGP 检测,结果表明,其 AGP 效价不如商业疫苗组,达到 1:16,通过查阅相关文献<sup>[21]</sup>可知,这一抗体水平可以实现对鸡群的保护。因此,本研究表达的重组 VP2 蛋白可有效刺激鸡体产生体液免疫应答反应,获得较高的抗体水平,增强鸡对 IBDV 的抵抗能力。

## 参考文献:

- [1] Cosgrove A S. An apparently new disease of chickens: Avian nephrosis[J]. Avian Diseases, 1962, 6(3): 385-389.
- [2] Müller H, Islam M R, Raue R. Research on infectious bursal disease—The past, the present and the future[J]. Veterinary Microbiology, 2003, 97(1): 153-165.
- [3] Mundt E, Beyer J, Müller H. Identification of a novel viral protein in infectious bursal disease virus-infected cells[J]. Journal of General Virology, 1995, 76(2): 437-443.
- [4] Jagadish M N, Staton V J, Hudson P J, et al. Birnavirus precursor polypeptide is processed in *Escherichia coli* by its own virus-encoded polypeptide[J]. Journal of Virology, 1988, 62(3): 1084-1087.
- [5] Azad A A, Jagadish M N, Brown M A, et al. Deletion mapping and expression in *Escherichia coli* of the large genomic segment of a birnavirus[J]. Virology, 1987, 161(1): 145-152.
- [6] Brandt M, Yao K, Liu M, et al. Molecular determinants of virulence, cell tropism, and pathogenic phenotype of infectious bursal disease virus[J]. Journal of Virology, 2001, 75(24): 11974-11982.
- [7] Le Nouen C, Rivallan G, Toquin D, et al. Very virulent infectious bursal disease virus: Reduced pathogenicity in a rare natural segment-B-reassorted isolate[J]. Journal of General Virology, 2006, 87(1): 209-216.
- [8] Ursula I, Goralanya A E, Schirmmeier H, et al. VP1 of infectious bursal disease virus is an RNA-dependent RNA polymerase[J]. Journal of General Virology, 2004, 85(8): 2221-2229.
- [9] 赵怀龙, 贾世玉, 陈如明. 鸡传染性法氏囊病基因工程疫苗研究进展[J]. 中国生物制品学杂志, 2005, 18(11): 538-540.
- [10] 程太平, 荣俊, 孙中杰. 传染性法氏囊病重组亚单位疫苗的田间试验[J]. 吉林畜牧兽医, 2007, 28(8): 8-10.
- [11] Rong J, Jiang T, Cheng T, et al. Large-scale manufacture and use of recombinant VP2 vaccine against infectious bursal disease in chickens[J]. Vaccine, 2007, 25(46): 7900-7908.
- [12] 张旺, 刘琳琳, 祁小乐, 等. 表达鸡传染性法氏囊病毒 VP2 蛋白重组乳酸乳球菌的构建及其表达的优化[J]. 中国预防兽医学报, 2015, 37(11): 825-828.
- [13] Dybing J K, Jackwood D J. Antigenic and immunogenic properties of baculovirus-expressed infectious bursal disease viral proteins. [J]. Avian Diseases, 1998, 42(1): 80-91.
- [14] Heine H G, Boyle D B. Infectious bursal disease virus structural protein VP2 expressed by a fowlpox virus recombinant confers protection against disease in chickens[J]. Archives of Virology, 1993, 131(3): 277-292.
- [15] Dartail R, Bublot M, Laplace E, et al. Herpesvirus of turkey recombinant viruses expressing infectious bursal disease virus (IBDV) VP2 immunogen induce protection against an IBDV virulent challenge in chickens[J]. Virology, 1995, 211(2): 481-490.
- [16] Sheppard M, Werner W, Tsatsas E, et al. Fowl adenovirus recombinant expressing VP2 of infectious bursal disease virus induces protective immunity against bursal disease[J]. Archives of Virology, 1998, 143(5): 915-930.
- [17] 王攀, 刘运超, 魏蕾, 等. 狂犬病病毒 G 蛋白的原核表达及反应原性分析[J]. 河南农业科学, 2017, 46(4): 108-112.
- [18] Ni Y, Chen R. Extracellular recombinant protein production from *Escherichia coli*[J]. Biotechnol Lett, 2009, 31(11): 1661-1670.
- [19] Cardoso T C, Sousa R L, Alessi A C, et al. A double antibody sandwich ELISA for rapid diagnosis of virus infection and to measure the humoral response against infectious bursal disease on clinical material[J]. Avian Pathology, 1998, 27(5): 450-454.
- [20] 荣俊, 程太平, 刘晓娜, 等. 传染性腔上囊病病毒 VP2 基因表达条件的优化[J]. 中国兽医科学, 2005, 35(3): 186-189.
- [21] 甘孟侯. 中国禽病学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1999: 58.