

应用在大肠杆菌中表达的猪 2 型圆环病毒 ORF2 蛋白建立一种 ELISA 诊断方法

琚春梅, 陈焕春, 刘正飞, 曹胜波, 何启盖

(华中农业大学动物医学院动物病毒室, 武汉 430070)

摘要: 根据 GenBank 中猪 2 型圆环病毒(PCV2)序列(A Y035820), 设计 1 对引物, 并以包含 PCV2 全基因组的重组质粒 pT-PCV 为模板, 扩增出含 ORF2 全基因的片段(709 bp), 回收 PCR 产物, 将其克隆入 pMD18-T 载体, 获得重组质粒 pTORF2, 并对其进行序列测定。重组质粒经 *Bal*I 和 *Sal*I 双酶切, 回收 ORF2 基因, 将其插入 pGEX-KG 的 *Sma*I 和 *Sal*I 位点间, 构建原核表达质粒 pGEXORF2, 阳性重组质粒转化 *E. coli* BL21(DE3), 进行原核表达。用此表达产物包被酶标板, 建立 ELISA 诊断方法, 并对临床 676 份送检血清进行了检测, 结果表明其总阳性率为 62.7% (424/676), 仔猪阳性率为 38.9% (74/190), 肥猪阳性率为 63.2% (84/133), 母猪阳性率为 74.6% (249/334), 公猪阳性率为 89.5% (17/19)。

关键词: 猪 2 型圆环病毒; ORF2; 克隆; 表达; ELISA

中图分类号: S852.65⁺9.2; Q786

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2004)06-0689-05

猪圆环病毒(Porcine Circovirus, PCV)是近年来兽医界广泛关注的新发现的病毒之一。该病毒属圆环病毒科, 其基因组为一环状单链 DNA, 大小约为 1.7 kb, 病毒粒子无囊膜, 呈二十面体对称, 直径约为 17 nm^[1]。PCV 在细胞核内复制, 并产生大量的核内包涵体^[2]。目前认为 PCV 有两种血清型: PCV1 和 PCV2, 其中 PCV1 是 1974 年 Tischer 等在 PK-15 细胞(ATCC CCL31)中发现, 它不引起可见的细胞病变(Cytopathogenic effect, CPE), 感染猪后也不出现临床症状, 而 PCV2 与猪的多种疾病有关, 特别是新出现的断奶仔猪多系统衰竭综合征(Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome, PMWS)^[3]。

PCV1 与 PCV2 核苷酸同源性小于 80%, 但其基因组结构相似, 都含有两个主要的开放阅读框: ORF1 和 ORF2, 其中 ORF1 变异很小, 同源性为 85%, 主要编码与病毒复制有关的 Rep 蛋白^[4], ORF2 变异较大, 编码病毒的结构蛋白, 此蛋白是病毒衣壳蛋白的主要成分^[5]。PCV1 和 PCV2 ORF2 同源性约为 65%, 但 Mahe^[6]等的研究表明二者之间并无交叉反应性, 这可能是因为这些共同的抗原表位位于整个蛋白的内部。

郎洪武等用国外特异性表达抗原对我国 PCV2 进行的血清学调查表明, PCV2 抗体阳性率很高^[7]。此外, 曹胜波等用所建立的 PCR 方法检测 43 份 PCV2 可疑病料, 结果有 12 份为阳性, 阳性率为 27.9%, 其中有 5 份还同时检测到了 PPV 或 PRV^[8], 据此推测 PCV2 在我国可能较普遍。目前, PCV2 的诊断方法主要为 PCR、免疫组化、原位杂交、免疫过氧化物酶单层试验(IPMA)以及间接免疫荧光(IFA), 但这些方法主要用于检测病原, 且对试验条件和技术要求较高。由于该病是近年来新发现的猪的传染病, 国内在这方面的研究工作才刚刚开始, 为了弄清该病在我国的发病和流行情况, 急需一种简便、快速、敏感、特异且便于大规模应用的血清学诊断与检测方法。基于此, 本研究以本室分离鉴定的猪 2 型圆环病毒豫 A 株为材料, 克隆了其 ORF2 基因并对其进行原核表达, 以此表达产物为抗原包被酶标板, 建立了 ELISA 诊断方法, 并在临床上进行了应用。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

pMD18-T (2 692 bp) 载体、*Bal*I、*Sal*I、*Sma*I、*Stu*I、*Kpn*I、T4 DNA 连接酶、*Taq* DNA 聚合酶均购自大连宝生物工程有限公司, pGEX-KG (5.0 kb) 载体由本室保存, *E. coli* DH5 α -BL21(DE3) 由本室保存, DNA 回收试剂盒购自上海生物工程公

收稿日期: 2003-08-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(30170701)

作者简介: 琚春梅(1976-), 女, 湖北枣阳人, 博士, 主要从事病毒分子生物学研究。E-mail: juchunmei@yahoo.com.cn

通讯作者: 陈焕春, Tel: 027-87282608

司,酶标二抗购自晶美生物工程有限公司,显色剂为上海丽珠东风生物技术有限公司生产的TMB。猪圆环病毒病间接免疫荧光检测试剂盒购自美国VMRD公司。

1.2 引物设计

根据GenBank发布的PCV2序列(AY035820),设计1对引物:P1 5'-TCA CTT AGG GTT AAG TCC-3',P2 5'-AGC GAT GAC GTA TCC-3',由上海生物工程公司合成。

1.3 PCR扩增

模板为本室构建的重组质粒pT-PCV,反应条件为95℃ 5 min; 94℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 1.5 min,共进行35个循环;最后72℃延伸10 min。

1.4 PCR产物的克隆及酶切鉴定

PCR产物经0.8%琼脂糖凝胶电泳,用DNA胶回收试剂盒回收后将其与pMD18-T载体连接,转化*E. coli* DH5 α 提取质粒^[10],以此质粒为模板进行PCR扩增鉴定,并用*Stu*I、*Kpn*I、*Sal*I对其进行方向鉴定,正向插入的阳性重组质粒pTORF2送大连宝生物工程公司测序。

1.5 原核表达质粒的构建及其在大肠杆菌中的表达

用*Bal*I和*Sal*I双酶切pTORF2,回收含ORF2基因的小片段,并将其插入pGEX-KG的*Sma*I和*Sal*I位点之间,构建原核表达质粒pGEX-ORF2,转化*E. coli* DH5 α 提取质粒进行酶切鉴定,获得阳性重组质粒。将阳性重组质粒pGEX-ORF2转化BL21(DE3),用IPTG诱导表达^[10],IPTG浓度设置4个梯度,分别为1 mmol/L, 2 mmol/L, 3 mmol/L, 4 mmol/L,以选择最佳IPTG诱导浓度,表达产物经12% SDS-PAGE电泳观察ORF2基因的表达,并用Western-blot分析该蛋白的免疫学活性。

1.6 阳性血清的制备

含pGEX-ORF2的重组细菌经IPTG诱导表达后,离心收集菌体,用适量的PBS悬浮后,加等量2 \times SDS buffer (100 mmol/L Tris-Cl pH 6.8, 200 mmol/L DTT, 4% SDS, 0.2% 溴酚蓝, 20% 甘油)涡旋,煮沸10 min,经12% SDS-PAGE电泳,考马斯亮蓝染色,并用脱色液脱色后,切下含ORF2蛋白的片段,研磨后用适量PBS悬浮,将此悬液经肌肉注射于6周龄PCV阴性仔猪,重复3次,每次间隔1周,末次免疫后1周将猪处死,采血,分离血清用作阳性血清。

1.7 表达产物的提取

将经IPTG诱导的菌液8 000 g离心5 min后收

集菌体,用1/10培养液体积的缓冲液A(50 mmol/L Tris-Cl pH 8.0, 0.5 mmol/L EDTA pH 8.0, 50 mmol/L NaCl, 0.5 mmol/L DTT, 5% 甘油)悬浮沉淀,用超声波处理20~30次,每次30 s,间隔30 s,使菌液不再黏稠,最后经4℃ 10 000 g离心15 min,收集沉淀,用含2%十二烷基肌氨酸钠的缓冲液A溶解后12 000 g离心15 min,收集上清,并加入终浓度为0.2% PEG4000, 1 mmol/L 氧化型谷胱甘肽, 2 mmol/L还原型谷胱甘肽,用PBS透析2 d,测定其蛋白浓度,置-20℃保存备用。

1.8 ELISA方法的建立

将经1.7处理的ORF2表达产物和对照载体表达产物分别从1:2开始倍比稀释纵向包被酶标板奇数列6列和偶数列6列,血清从1:10开始横向倍比稀释8行做方阵滴定,确定抗原最佳包被浓度。然后以此浓度包被酶标板,奇数列包被ORF2表达产物,偶数列包被对照载体表达产物,每份血清从1:10开始倍比稀释分别与ORF2表达产物包被孔和对照载体表达产物包被孔进行反应。

1.9 特异性试验

用该ELISA方法分别检测弓形体、胸膜肺炎、蓝耳病、伪狂犬病、口蹄疫、猪瘟标准阳性血清,以此确定该方法的特异性。

1.10 对比试验

用该ELISA方法与间接免疫荧光试验(IFA)平行检测100份临床送检血清。间接免疫荧光试验方法按试剂盒说明书进行。

1.11 ELISA方法的应用

用此ELISA方法对湖北、江西、上海、湖南、河南等省的676份送检血清进行检测。

2 结果

2.1 ORF2基因的PCR扩增结果

PCR产物经0.8%琼脂糖凝胶电泳,可见1条709 bp的特异性片段(见图1)。

2.2 pTORF2的酶切鉴定结果

阳性重组质粒pTORF2分别用*Stu*I、*Sal*I双酶切和*Stu*I、*Kpn*I双酶切鉴定方向,用*Stu*I、*Sal*I双酶切若切出600 bp和2.79 kb片段,则ORF2为反向插入,若切出100 bp和3.29 kb片段,则ORF2为正向插入。用*Stu*I、*Kpn*I双酶切若切出600 bp和2.79 kb片段,则ORF2为正向插入,若切出100 bp和3.29 kb片段,则ORF2为反向插入。



图 1 PCV2 ORF2 基因的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of PCV2 ORF2 gene

M. DL2000 标准分子量;

1~ 6. ORF2 基因 PCR 产物; 7. 阴性对照

Lane M. DL2000 DNA Marker; Lane 1~ 6. PCR products of PCV2 ORF2 gene; Lane 7. Negative control

2.3 原核表达载体的构建及酶切鉴定

用 *Bal*I 和 *Sal*I 双酶切 pTORF2, 产生一 650 bp 片段, 回收此片段, 将其与经 *Sma*I 和 *Sal*I 双酶切的 pGEX-KG 进行连接, 经转化提取质粒后用 ORF2 基因内部的 1 个 *Stu*I 酶切位点单酶切产生一 5.5 kb 片段, 与预期结果相符(见图 2)。

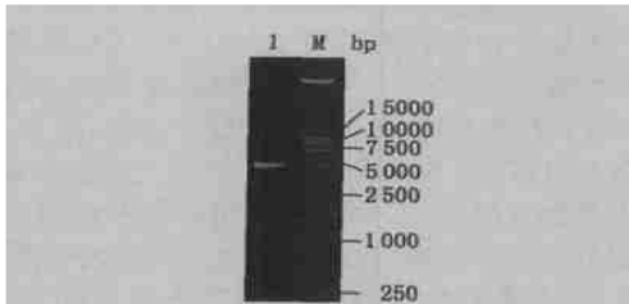


图 2 pGEXORF2 的酶切鉴定

Fig. 2 Restriction enzyme determination of pGEXORF2

1. pGEXORF2/*Stu*I; M. DL15 000 标准分子量

Lane 1. pGEXORF2/*Stu*I; Lane M. DL15 000 DNA Marker

2.4 pGEX-ORF2 在大肠杆菌中的表达

SDS-PAGE 电泳分析表明 ORF2 基因得到了表达, 产生 1 条约 50 ku 的特异性融合蛋白带, 且 IPTG 诱导浓度为 2 mmol/L 时该蛋白表达量最高, 因此, 最佳 IPTG 诱导浓度为 2 mmol/L(见图 3)。

2.5 Western-blot 结果

将经 12% SDS-PAGE 电泳后的凝胶转移到硝酸纤维素膜上用于 Western-blot 分析, 所用血清为美国 VMRD 公司生产的猪抗 2 型圆环病毒全病毒血清, 结果在 50 ku 处出现 1 条特异性杂交带, 表明该表达产物具有免疫学活性(见图 4)。

2.6 ELISA 方法的建立

经测定提取的表达产物的蛋白含量为 880

$\mu\text{g}/\text{mL}$, 方阵滴定结果表明 pGEX-KG 表达产物和 pGEXORF2 表达产物稀释倍数为 64 倍时阳性血清的 OD 值降低最快, 此时蛋白含量为 $13.75 \mu\text{g}/\text{mL}$ (880/64), 因此, 以此浓度为抗原最佳包被浓度, 并以此浓度包被酶标板建立 ELISA 诊断方法。

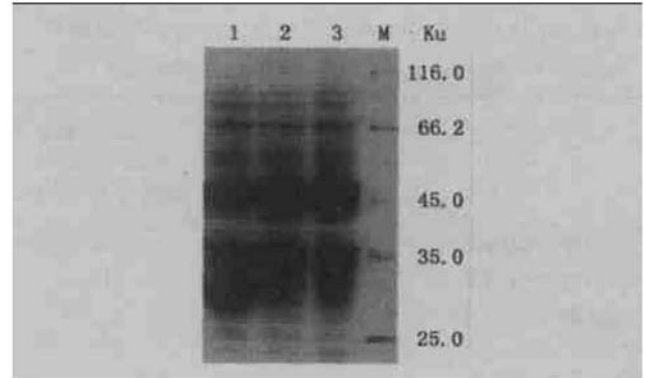


图 3 表达产物的检测

Fig. 3 Detection of expressing product by SDS-PAGE

1. 对照载体 pGEX-KG(诱导);

2~ 3. pGEXORF2(诱导); M. 蛋白质分子量标准

Lane 1. pGEX-KG(induced); Lane 2~ 3. pGEXORF2 (induced); Lane M. Protein molecular weight marker

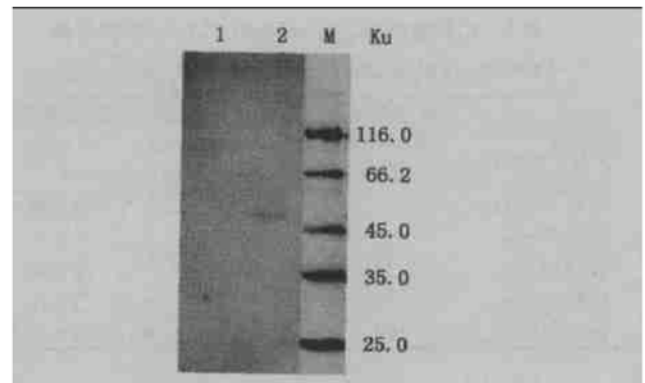


图 4 表达蛋白的 Western-blot 分析

Fig. 4 The analysis of the expressed protein by Western-blot

1. 对照载体 pGEX-KG 诱导物;

2. pGEXORF2 诱导物; M. 蛋白质分子量标准

Lane 1. pGEX-KG(induced); Lane 2. pGEXORF2 (induced); Lane M. Protein molecular weight marker

2.7 特异性试验

用该 ELISA 方法检测弓形体、胸膜肺炎、蓝耳病、伪狂犬病、口蹄疫、猪瘟标准阳性血清, 结果表明 ORF2 表达产物和对照载体表达产物都不与这些血清发生反应, 说明该方法具有特异性。

2.8 对比试验结果

用该 ELISA 方法与间接免疫荧光试验平行检测 100 份临床送检血清, 其中两种方法检测共为阳性的血清为 56 份, 共为阴性的为 34 份, 阳性符合率为 87.5% (56/64), 阴性符合率为 94.4% (34/36), 总符合率为 90.0% ((56+34)/100) (见表 1)。

表 1 ELISA 方法与间接免疫荧光方法对比试验结果

Table 1 The comparison between ELISA and IFA

	ELISA 结果 ELISA result		血清总数 Total no. of serum samples
	阳性 Positive	阴性 Negative	
	IFA 阳性 Positive	56	
IFA 阴性 Negative	2	34	36
血清总数 Total no. of serum samples	58	42	100

2.9 临床送检血清的 ELISA 检测结果

676 份送检血清总阳性率为 62.7% (424/676), 仔猪阳性率为 38.9% (74/190), 肥猪阳性率为 63.2% (84/133), 母猪阳性率为 74.6% (249/334), 公猪阳性率为 89.5% (17/19) (见表 2)。

表 2 676 份临床送检血清的 ELISA 检测结果

Table 2 The ELISA results of 676 sera samples

检测猪分类 Type of pigs	血清份数 The total of sera	阳性血清份数 The number of positive sera	阳性率/% The positive rate
仔猪 Piglets	190	74	38.9
肥猪 Hogs	133	84	63.2
母猪 Sows	334	249	74.6
公猪 Boars	19	17	89.5
合计 Total	676	424	62.7

3 讨论

猪是 PCV 的自然宿主, 各种年龄、性别的猪均可感染, 但并不都表现出临床症状。PMWS 是 PCV 引起的主要疾病之一, 主要发生于哺乳期和育成期的仔猪, 尤其是 5~12 周龄的仔猪, 急性暴发时病死率可达 10%, 在疾病流行过的猪群中发病率和死亡率均较低。随着对 PCV 研究的深入, 发现 PCV2 所诱发的疾病范围不断扩大, 除 PMWS 外, 它还与非典型的 PRRS、猪皮炎/肾病综合征、猪增生性/坏死性皮炎、仔猪先天性震颤及母猪流产有关, 但在这些疾病中 PCV2 起多大作用尚不太清楚。PCV2 对机体的影响主要是诱导 B 淋巴细胞凋亡, 导致猪的免疫抑制, 从而并发或继发其它细菌、病毒感染, 加之各种环境因素,

如拥挤、空气污浊、各种年龄猪混养及其它各种应激因素的影响而使病情加重, 导致死亡率大大增加。因此, 建立一套完整的 PCV2 检测方法和在猪群中开展血清学调查相当重要。

在本研究中, 应用 PCR 技术成功克隆了 ORF2 基因, 将其插入 pET-28a 载体构建了含 ORF2 全基因的原核表达质粒, 但此质粒在 BL21(DE3) 中不能表达。有报道表明 ORF2 编码蛋白 N 末端 41 个氨基酸是其在核内的定位信号^[11], 基于此, 切除了 ORF2 5'端的部分信号肽序列, 将其插入到 pGEX-KG 表达载体中, 在大肠杆菌中对其进行表达。

PCV1 无致病性, 广泛存在于健康猪体内, 由于 PCV1 与 PCV2 存在抗原交叉性, 因此使用全病毒作为抗原检测抗体, 难以区分 PCV1 型和 PCV2 型抗体, 给 PCV2 的诊断带来很大困难, 而 PCV1 与 PCV2 的 ORF2 基因同源性较低, 且 ORF2 中存在 4 个免疫原性区域, 其中 2 个区域是型特异性的^[6,12], 可以区分 PCV1 与 PCV2。Mahe 等^[6]报道 PCV1 与 PCV2 ORF2 蛋白之间无交叉反应性, 据此, 用 PCV2 ORF2 表达产物包被酶标板建立了 ELISA 诊断方法, 可对 PCV2 感染进行血清学诊断, 并且此表达产物是 PCV2 特异性的, 不与 PCV1 发生反应, 因此, 可对 PCV1 和 PCV2 感染作出鉴别诊断。用该 ELISA 方法与美国 VMRD 公司的间接免疫荧光试剂盒平行检测 100 份临床送检血清, 两者的阳性符合率为 87.5%, 阴性符合率为 94.4%, 总符合率为 90.0%, 两种检测方法的符合率较高, 表明该方法检测结果可靠。在这 100 份血清中, 用间接免疫荧光检测有 64 份为阳性, 而用该 ELISA 检测有 56 份为阳性, 可能是因为间接免疫荧光检测的抗体既有 PCV1 型抗体, 也有 PCV2 型抗体, 而该 ELISA 检测的仅为针对 PCV2 ORF2 蛋白的抗体, 因此用间接免疫荧光检测的血清阳性率比该 ELISA 方法高。

用建立的 ELISA 方法对 676 份临床血清的检测表明, PCV2 的抗体阳性率随猪体的年龄增长而升高, 此结果与郎洪武^[8]的报道相同, 这可能是由于猪场周围的 PCV 较多, 反复感染猪而造成的结果^[13]。

在本试验中, 也对 ELISA 阳性判定标准进行了探讨。此阳性标准的计算方法参考了猪繁殖与呼吸综合征检测试剂盒(HerdChek IDEXX), 并结合本研究略加改动。在试验中, 对 20 份经间接免疫荧光试验检测为 PCV 阴性猪的血清进行了检测, 并计算出其 S/

P 的平均值及变异系数,在此基础上计算出待检血清的阳性临界值为 $0.45(S/P \text{ 的平均值} + 3 \times \text{变异系数})$ 。在对血清检测结果进行判定时,以 $S/P = (\text{ORF2 表达产物包被孔测得待检血清 OD 值} - \text{对照载体表达产物包被孔测得待检血清 OD 值}) / (\text{ORF2 表达产物包被孔测得阳性血清 OD 值} - \text{对照载体表达产物包被孔测得阳性血清 OD 值}) > 0.45$ 作为阳性标准。

参考文献:

- [1] Tischer I, Gederblom H, Vettermann W A. A very small porcine virus with circular single-stranded DNA [J]. *Nature*, 1982, 295: 64~ 66.
- [2] Murphy F A, Gibbs E P J, Horzinek M C, et al. *Circoviridae* [A]. *Veterinary Virology* [M]. 3rd ed. San Diego: Academic Press, 1999. 357~ 361.
- [3] Allan G M, Ellis J A. Porcine circoviruses: a review [J]. *J Vet Diagn Invest*, 2000, 12: 3~ 14.
- [4] Mankertz A, Mankertz J, Wolf K, et al. Identification of a protein essential for replication of porcine circovirus [J]. *J Gen Virol*, 1998, 79: 381~ 384.
- [5] Nawagitgul P, Morozov I, Bolin S R, et al. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein [J]. *J Gen Virol*, 2000, 81: 2281~ 2287.
- [6] Mahe D, Blanchard P, Truory C, et al. Differential recognition of ORF2 protein from type 1 and type 2 porcine circoviruses and identification of immunorelevant epitopes [J]. *J Gen Virol* 2000, 81: 1815~ 1824.
- [7] 郎洪武, 张广川, 吴发权, 等. 断奶猪多系统衰弱综合征血清抗体检测 [J]. *中国兽医科技*, 2000, 30(3): 3~ 5.
- [8] 曹胜波, 陈焕春, 肖少波, 等. 猪环状病毒 2 型的 PCR 检测方法的建立及应用 [J]. *华中农业大学学报*, 2001, 20(1): 53~ 56.
- [9] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼柯蒂斯 T. 分子克隆实验指南 [M]. 金冬雁, 黎孟枫, 侯云德, 等译. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1996. 19~ 23, 825~ 826.
- [10] Qiang Liu, Tikoo S K, Babiuk L A, et al. Nuclear localization of the ORF2 protein encoded by porcine circovirus type 2 [J]. *Virology*, 2001, 285(1): 91~ 99.
- [11] Truong C, Mahe D, Blanchard P, et al. Identification of an immunorelevant ORF2 epitode from porcine circovirus type 2 as a serological marker for experimental and natural infection [J]. *Arch Virol*, 2001, 146: 1197~ 1211.
- [12] Tischer I, Bode L, Peters D. Distribution of antibodies to porcine circovirus in swine populations of different breeding farms [J]. *Arch Virol*, 1995, 140: 737~ 743.

The Establishment of an ELISA Assay with the ORF2 Protein of Porcine Circovirus type 2 Expressed in *E. coli*

JU Chun-mei, CHEN Huan-chun, LIU Zheng-fei, CAO Sheng-bo, HE Qi-gai
(College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: According to the whole genome sequence of PCV2 (GenBank No. AY035820), a pair of primers were designed to clone ORF2 gene by PCR from pT-PCV which contains the entire genome of PCV2. The PCR products was extracted, and was linked with pMD18-T vector (named as pTORF2). DNA sequence was determined. pTORF2 was digested with *Bal*I and *Sal*I to generate 640 bp fragment, laterly the acquired fragment were cloned into pGEX-KG and transformed into *E. coli* DH5 α . The recombinant plasmids (pGEXORF2) were transformed into *E. coli* BL21. The expressed protein was used to establish an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). 676 sera samples were examined with this ELISA. The total positive rate of these sera is 62.7% (424/676). The positive incidence in piglets, hogs, sows and boars is 38.9% (74/190), 63.2% (84/133), 74.6% (249/334) and 89.5% (17/19) respectively.

Key words: porcine circovirus type 2; ORF2; clone; expression; ELISA