



非洲猪瘟病毒强免疫原性重组 CD2v 抗原的制备与初步应用

周晓慧¹, 肖景景¹, 张鑫宇¹, 张泉¹, 夏晓莉¹, 孙怀昌^{1,2*}

(1. 扬州大学兽医学院, 江苏高校动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 扬州 225009; 2. 江苏农牧职业技术学院, 泰州 225300)

摘要: 旨在获得非洲猪瘟病毒(ASFV)强免疫原性重组 CD2v 抗原, 利用生物信息学软件进行 CD2v 抗原指数分析, 将其细胞质内免疫显性区与类弹性蛋白多肽(ELP)在重组大肠杆菌中进行融合表达, 对 ELP-CD2v 融合蛋白的相变循环(ITC)条件进行优化, 在优化条件下进行融合蛋白纯化, 利用烟草蚀纹病毒(TEV)蛋白酶活性包涵体切除 ELP 标签, 通过免疫转印法对重组 CD2v 抗原进行鉴定, 利用重组 CD2v 抗原建立 ELISA 抗体检测方法, 与多抗原 ELISA 对 ASFV 抗体阳性和阴性血清进行平行检测。结果显示, ELP-CD2v 融合蛋白获得正确、可溶性表达, ITC 条件为 28 °C 和 1.5 mol · L⁻¹ NaCl, 在 0.2% Triton X-100 存在下进行 ITC, 纯化的融合蛋白纯度为 76.3%; TEV 蛋白酶活性包涵体能有效切割 ELP 标签, 再次 ITC 回收的重组 CD2v 抗原纯度为 91.7%, 能被 ASFV 抗体识别; 根据多抗原 ELISA 检测结果选择血清样品, 用重组 CD2v 抗原 ELISA 进行检测, 结果显示, 15 份 ASFV 抗体阴性血清均为 CD2v 抗体检测阴性, 15 份 ASFV 抗体阳性血清均为 CD2v 抗体检测阳性。这些研究结果表明, ASFV 的 CD2v 蛋白胞内区存在强免疫原性表位, 其重组抗原有望用于 CD2v 的抗体检测。

关键词: 非洲猪瘟病毒; CD2v 蛋白; 强免疫原性抗原; 初步应用

中图分类号: S852.659.1

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2020)10-2472-09

Preparation and Preliminary Application of Highly Immunogenic Recombinant CD2v Antigen of African Swine Fever Virus

ZHOU Xiaohui¹, XIAO Jingjing¹, ZHANG Xinyu¹,

ZHANG Quan¹, XIA Xiaoli¹, SUN Huaichang^{1,2*}

(1. *Jiangsu Co-innovation Center for Prevention and Control of Important Animal Infectious Diseases and Zoonoses, College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China*; 2. *The Key Laboratory for High-Tech Research and Development of Veterinary Biopharmaceuticals, Jiangsu Agri-Animal Husbandry Vocational College, Taizhou 225300, China*)

Abstract: To obtain the highly immunogenic recombinant CD2v antigen of African swine fever virus (ASFV), the amino acid sequence of CD2v was analyzed for antigenic index using bioinformatics software and the intracytoplasmic region with high antigenic index was expressed in *E. coli* as an elastin-like polypeptide (ELP) fusion protein. After optimization of the conditions for inverse transition cycling (ITC), ELP-CD2v fusion protein was purified by ITC in

收稿日期: 2020-02-20

基金项目: 国家重点研发计划项目(2017YFD0502303; 2018YFC08040404-3); 江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD)

作者简介: 周晓慧(1993-), 女, 安徽亳州人, 博士生, 主要从事动物疫苗研究, E-mail: 89507732@qq.com

* 通信作者: 孙怀昌, 主要从事预防兽医学研究, E-mail: sunh@yzu.edu.cn

the presence of different concentrations of Triton X-100 and the ELP tag was cleaved with active inclusion bodies of tobacco etch virus (TEV) protease. The tag-free recombinant CD2v antigen was recovered by an additional round of ITC and identified by Western blotting. By using the recombinant CD2v antigen, an indirect ELISA was established and used to detect ASFV antibody-positive and antibody-negative sera in parallel with the multi-antigen ELISA. The results showed that ELP-CD2v fusion protein was expressed correctly in *E. coli* with an optimal transition temperature of 28 °C at 1.5 mol · L⁻¹ NaCl. After one cycle of ITC in the presence of 0.2% Triton X-100, ELP-CD2v fusion protein was purified to 76.3% purity. The ELP tag was cleaved efficiently with the TEV protease and removed after an additional round of ITC. The recovered recombinant CD2v protein had a purity of 91.7%, which was recognized by pig anti-ASFV serum. For 30 serum samples detected by ASFV multi-antigen ELISA, recombinant CD2v ELISA showed that all of 15 antibody-negative sera were CD2v antibody negative and all of 15 antibody-positive sera were CD2v antibody positive. These data suggest that the presence of immune dominant epitopes in the intracytoplasmic region of CD2v protein and the potential application of the recombinant CD2v antigen for ASFV antibody detection.

Key words: African swine fever virus; CD2v protein; highly immunogenic antigen; preliminary application

* **Corresponding author:** SUN Huaichang, E-mail: sunh@yzu.edu.cn

非洲猪瘟 (African swine fever, ASF) 是猪的一种烈性传染病, 强毒株感染猪的死亡率可达 100%^[1]。该病于 1909 年首次在肯尼亚发现, 至今在撒哈拉以南的非洲国家一直呈地方性流行^[2]。1957 年、1960 年 ASF 两次传入葡萄牙, 并在多个西欧国家流行, 直到 1995 年才得以根除^[3]。2007 年, ASF 传入格鲁吉亚, 很快传播到高加索地区和俄罗斯联邦等邻国, 目前, 在 13 个欧洲国家流行^[3]。在我国, 2018 年 8 月辽宁沈阳首次暴发 ASF 疫情, 至今 31 个省(市、自治区)和香港特别行政区均有疫情报道, 给我国养猪业带来沉重打击^[4-5]。

非洲猪瘟病毒 (African swine fever virus, ASFV) 多为血吸附阳性, 能吸附猪红细胞形成特征性的红细胞花环, 与病毒编码的血吸附蛋白有关^[6-7]。血吸附蛋白是 ASFV 的毒力因子和免疫逃逸蛋白, 因此是研制基因缺失苗的常用靶基因^[8-10]。然而, ASFV 基因缺失苗存在较大的安全隐患, 特别是基因突变或重组导致新毒株流行的可能性, 所以有必要进行基因缺失苗接种与自然感染猪的鉴别诊断^[11-13]。

ASFV 的血吸附蛋白由 EP402R 基因编码, 全长肽链由 375 个氨基酸组成, 包括信号肽(1—16 aa)、胞外区(17—207 aa)、跨膜区(208—228 aa)和胞内区(229—375 aa)^[14]。其中, 胞外区的两个免疫球蛋白

样结构域是红细胞的结合部位, 与小鼠、大鼠和人 CD2 分子具有一定的序列同源性, 据此将 ASFV 血吸附蛋白称为 CD2 分子的同源物, 简称 CD2v^[15]; 胞内区与细胞 CD2 分子无序列同源性, 在不同 ASFV 毒株之间高度保守^[15]。尽管 ASFV 感染康复猪可以产生血吸附抑制抗体, 也能用于病毒的血清学分群^[16], 但多数感染猪的血吸附抑制抗体滴度都较低^[17]。尽管用昆虫细胞表达的 CD2v 免疫猪可以产生血吸附抑制抗体, 但需要与弗氏佐剂进行反复免疫^[17]。ASFV 血吸附抑制抗体针对 CD2v 的胞外区, 其免疫原性低的原因尚不清楚, 而胞内区的免疫原性尚无研究报道。

组氨酸标签是目前最常用的重组蛋白纯化标签, 但其融合抗原不仅需用价格较贵的镍亲和柱纯化, 而且可能与带相同标签的重组亚单位疫苗免疫血清发生交叉反应。类弹性蛋白多肽 (elastin-like polypeptide, ELP) 是根据体内弹性蛋白的五肽重复序列合成的聚合物, 具有温度敏感的可逆相变特性, 其融合蛋白可用简单的相变循环纯化^[18]。因此, 本研究对 ASFV 的 CD2v 氨基酸序列进行抗原指数分析, 将抗原指数较高的胞内区与 ELP 进行融合表达, 通过相变循环进行融合蛋白纯化, 利用蛋白酶切除 ELP 标签, 用获得的重组 CD2v 抗原建立了 ELISA 抗体检测方法, 有望用于 ASFV CD2v 基因

缺失苗接种与自然感染猪的鉴别诊断。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

含 FLAG 标签的 ELP 融合表达载体 pET-ELP 由本实验室构建和保存;TEV 蛋白酶活性包涵体由本实验室制备;ASFV 多抗原(p54、pK205R 和 pB602L)ELISA 抗体检测试剂盒由本课题组研制,在英国动物卫生所世界动物卫生组织(OIE)非洲猪瘟参考实验室,利用 200 余份已知血清进行检测验证,研究成果已获得专利授权(专利号:CN201310193976.0);检测血清采自国内某 ASFV 感染猪场,淘汰前采血分离血清,根据多抗原 ELISA 检测结果分为 ASFV 抗体阳性和阴性血清;辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗猪 IgG 为 Abcam 公司产品;FLAG 标签单克隆抗体为日本 MBL 公司产品;ELISA 和免疫转印用四甲基联苯胺(TMB)显色液为碧云天生物技术有限公司产品。

1.2 生物信息学分析

从 GenBank 下载 SY18 株 ASFV CD2v(EP402R)氨基酸序列(GenBank 登录号:MH766894.1),用 Lasergene 软件包(DNASTar, USA)中的 Protean 软件进行二级结构分析,其中抗原指数(Antigenic index)分析用 Jameson-Wolf 法进行,选择 CD2v 蛋白胞质内高抗原指数区域进行表达试验。

1.3 表达载体构建

SY18 株 ASFV CD2v(EP402R)基因(GenBank 登录号:MH766894.1)由上海生工生物工程有限公司合成,克隆在 pUC-57 质粒载体中,命名为 pUC-EP402R。根据预测的 CD2v 胞质内区域编码序列设计 1 对 PCR 引物,正向引物序列:5'-TAGGATCCCGAAAAAGAAAAAACATGTTGA-3' (下划线为引入的 *Bam*H I 酶切位点);反向引物序列:5'-TAGAATTCAGGTAGTGGTTTGGGTGGA-3' (下划线为引入的 *Eco*R I 酶切位点),预期 PCR 扩增产物为 318 bp。以 pUC-EP402R 为 DNA 模板进行 PCR 扩增,将 PCR 产物克隆入 pMD18-T 载体,提取重组质粒 DNA 送上海生工生物工程有限公司,用通用引物进行序列测定。用限制性酶 *Bam*H I 和 *Eco*R I 将序列正确的 CD2v 基因片段从 pMD18-T 载体上切下,插入 pET-ELP 载体中 TEV 蛋白酶识别位点和 FLAG 标签之间,获得的重组载体命名为 pELP-CD2v。

1.4 融合蛋白诱导表达

将重组载体 pELP-CD2v 转化 BL21(DE3)株大肠杆菌,挑取单菌落接种卡那霉素($50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) LB 培养液,37 °C 摇床培养过夜。按照 1:100 体积比,将重组菌培养物接种卡那霉素 $2 \times$ YT 培养基,37 °C 摇床培养 5 h,加入 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ IPTG (终浓度),30 °C 摇床诱导表达 6 h。4 °C、5 000 g 离心 10 min,离心沉淀菌体用 1/20 培养基体积的 PBS 悬浮,冰浴中超声波充分裂解;4 °C、12 000 g 离心 10 min,收集离心上清液,重复离心 1 次,取离心上清液进行融合蛋白纯化。

1.5 融合蛋白纯化

取重组菌裂解液 7 份,加入等体积 $6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl,分别在 22、24、26、28、30 和 32 °C,孵育 10 min,设未纯化重组菌对照,室温 12 000g 离心 5 min,离心沉淀用 PBS 悬浮,取样进行 12% SDS-PAGE 分析,考马斯蓝染色后用凝胶成像系统(GelDocXR)进行蛋白条带灰度扫描,用 Image Lab 图像分析软件计算蛋白浓度,以目的蛋白最多、杂蛋白最少为判定标准,选择最佳的 ELP-CD2v 融合蛋白相变温度。再取重组菌裂解液 6 份,分别加入等体积 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl,设不加 NaCl 对照,在最佳相变温度孵育 10 min,如前进行离心和电泳分析,以目的蛋白最多、杂蛋白最少为判定标准,选择纯化 ELP-CD2v 融合蛋白所需的盐浓度。再取重组菌裂解液 5 份,加入最佳浓度 NaCl 和 0、0.1%、0.2%、0.5%、1% Triton X-100,在最佳相变温度孵育 10 min,如前进行离心和电泳分析,以目的蛋白最多、杂蛋白最少为判定标准,选择纯化 ELP-CD2v 融合蛋白所需的 Triton X-100 浓度。最后取重组菌裂解液 200 mL,加入最佳浓度的 NaCl 和 Triton X-100,在最佳相变温度孵育 10 min,室温 12 000 g 离心 5 min,离心沉淀用 PBS 悬浮,取样进行 SDS-PAGE 分析。

1.6 ELP 标签切除

ELP-CD2v 融合蛋白的 ELP 标签切除参考文献[14]进行,融合蛋白浓度为 $3.6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,TEV 蛋白酶活性包涵体用量为 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,切割条件为 30 °C、12 h。切割反应完成后,在最佳条件下进行再次相变循环,取离心上清液(含重组 CD2v)进行 SDS-PAGE 电泳分析。

1.7 重组 CD2v 蛋白免疫鉴定

重组 CD2v 抗原($1 \mu\text{g}$)经过 12% SDS-PAGE 分

离后,利用湿转印法转移硝酸纤维素膜。将转印膜置于含 5% 脱脂乳粉的 PBS 中,37 °C 封闭 2 h。分别加入 PBST(含 0.05% Tween 20 的 PBS)稀释的 FLAG 抗体(1:2 000)和 ASFV 抗体阳性猪血清(1:100),37 °C 孵育 1.5 h,PBST 洗涤 3 次。加入 PBST 稀释(1:10 000)辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗猪或羊抗鼠 IgG,37 °C 孵育 1 h,PBST 洗涤 3 次。加入免疫转印用 TMB 底物溶液,室温避光显色 10 min。

1.8 重组 CD2v 抗原 ELISA 的建立

在初步试验基础上,用碳酸盐溶液(pH9.6)将纯化的重组 CD2v 抗原稀释至 $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,加入酶标板各孔, $100 \mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$,设不加抗原空白对照孔,4 °C 包被过夜;甩去抗原包被液,PBST 洗板 1 次;加含 5% 脱脂乳粉的 PBST(含 0.05% Tween 20 的 PBS), $200 \mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$,37 °C 封闭 1.5 h;加封闭液稀释(1:200)检测血清, $100 \mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$,37 °C 孵育 1 h,PBST 洗涤 3 次;加入封闭液稀释(1:10 000)HRP 标记羊抗猪 IgG, $100 \mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$,37 °C 孵育 1 h,PBST 洗板 3 次;加入 ELISA 用 TMB 显色液, $100 \mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$,室温避光显色 15 min;加入 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸, $50 \mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$,立即以空白对照孔调零,用酶标仪读取各孔 $\text{OD}_{450 \text{ nm}}$ 值,用 Microsoft Excel 2010 计算 ASFV 抗体阴性猪血清的 $\text{OD}_{450 \text{ nm}}$ 平均值和标准

误,以 $\text{OD}_{450 \text{ nm}}$ 平均值+3 倍标准误作为抗体阳性血清的判定阈值。

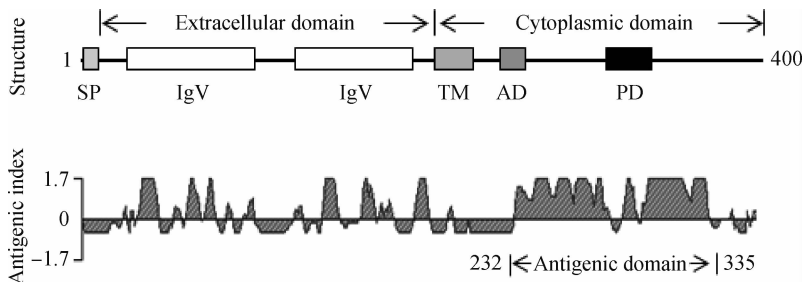
1.9 重组 CD2v 抗原 ELISA 的初步应用

将 50 份 ASFV 感染猪血清在 56 °C 灭活 60 min,用 ASFV 多抗原 ELISA 进行检测。多抗原 ELISA 的包被抗原为重组 p54、pK205R、pB602L 混合抗原,抗原浓度分别为 0.5、2.0 和 $2.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,操作过程与重组 CD2v 抗原 ELISA 相同,ASFV 抗体阳性血清的判定阈值为 $\text{OD}_{450 \text{ nm}}$ 值 ≥ 0.163 。根据多抗原 ELISA 检测结果,选择 ASFV 抗体阳性和阴性血清各 15 份,按照上述程序进行重组 CD2v 抗原 ELISA 检测。

2 结果

2.1 CD2v 抗原指数分析

氨基酸序列的二级结构分析结果显示,CD2v 蛋白胞外区含 6 个抗原指数较高的氨基酸区域,但分散存在而且均较短,分别为 30—40、56—62、66—70、129—137、150—156 和 178—184 位氨基酸区域;胞内区抗原指数不仅普遍较高,而且紧密连成 3 个高抗原指数区域,分别是 231—281、289—296 和 299—333 位氨基酸(图 1)。因此,本研究选择 CD2v 蛋白胞内区(231—333 位氨基酸)进行表达研究。



SP. 信号肽;IgV. 免疫球蛋白样结构域;TM. 跨膜区;AD. 酸性结构域;PD. 脯氨酸富含结构域

SP. Signal peptide; IgV. Immunoglobulin like domain; TM. Transmembrane domain; AD. Acidic domain; PD. Proline rich domain

图 1 ASFV CD2v 蛋白的结构模式图与抗原指数分析

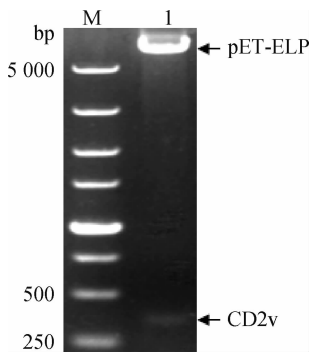
Fig. 1 Schematic structure and antigenic index analysis of ASFV CD2v proteins

2.2 ELP-CD2v 融合表达载体的鉴定

将 ASFV CD2v 蛋白胞内区基因片段克隆入 pET-ELP 载体,获得的重组载体 pELP-CD2v 用 *Bam*H I/*Eco*R I 酶切鉴定,结果显示切出的基因片段为预期的 318 bp(图 2)。序列测定结果显示重组载体中的 CD2v 基因片段无突变。

2.3 ELP-CD2v 融合蛋白的表达分析

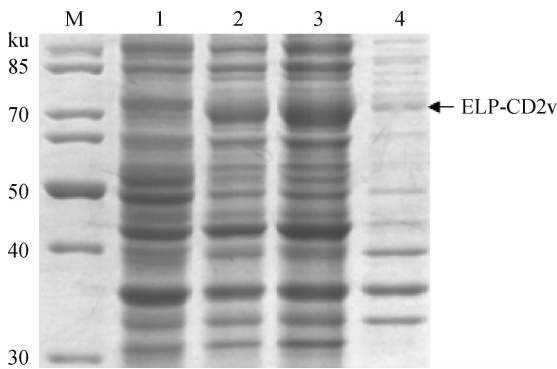
SDS-PAGE 分析结果显示:与未诱导 pELP-CD2v 重组菌相比,IPTG 诱导重组菌出现约 68 ku 的额外蛋白条带,表达产物为可溶性蛋白,存在于裂解重组菌的离心上清液中(图 3)。



M. DNA DL5000 相对分子质量标准;1. 重组载体酶切产物
M. DL5000 DNA molecular marker;1. Restriction digestion products of pELP-CD2v vector

图2 重组载体 pELP-CD2v 的酶切鉴定

Fig. 2 Restriction digestion of recombinant vector pELP-CD2v



M. 26614 蛋白质相对分子质量标准;1. 未诱导重组菌;
2. IPTG 诱导重组菌;3. 裂解重组菌离心上清;4. 裂解重组菌离心沉淀

M. 26614 protein molecular mass marker;1. Recombinant *E. coli* before IPTG induction;2. Recombinant *E. coli* after IPTG induction;3. Soluble fraction of centrifuged cell lysate;4. Pellet of centrifuged cell lysate

图3 ELP-CD2v 融合蛋白的表达分析

Fig. 3 Analysis of ELP-CD2v fusion protein expression in recombinant *E. coli*

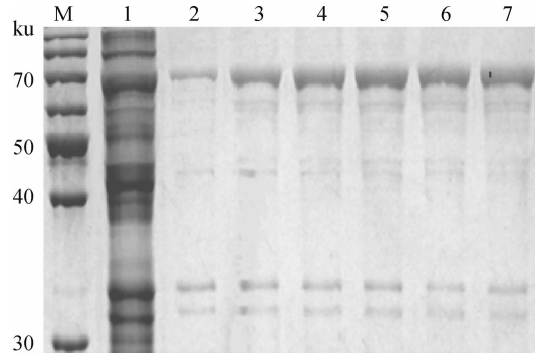
2.4 ELP-CD2v 融合蛋白的相变温度测定

在 $3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 条件下, 分别将 pELP-CD2v 重组菌裂解液在不同温度条件下进行相变循环。SDS-PAGE 分析结果显示, ELP-CD2v 融合蛋白的最佳相变温度为 28°C , 相变循环纯化的融合蛋白的回收率最高(73.9%), 菌体杂蛋白无明显差异(图4)。

2.5 纯化 ELP-CD2v 融合蛋白的盐浓度优化

分别将 pELP-CD2v 重组菌裂解液与不同浓度 NaCl 混合, 在 28°C 进行相变循环。SDS-PAGE 分析结果显示: 在 $1.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 条件下, 相变循环纯化的 ELP-CD2v 融合蛋白的回收率最高

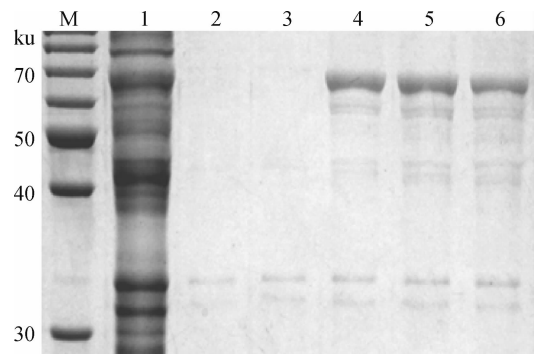
(79.2%), 菌体杂蛋白无明显差异(图5)。



M. 26614 蛋白质相对分子质量标准;1. 未纯化重组菌裂解液;2. 22°C ;3. 24°C ;4. 26°C ;5. 28°C ;6. 30°C ;7. 32°C
M. 26614 protein molecular mass marker;1. Bacterial lysate;2. 22°C ;3. 24°C ;4. 26°C ;5. 28°C ;6. 30°C ;7. 32°C

图4 ELP-CD2v 融合蛋白的相变温度测定

Fig. 4 Detection of the transition temperature for ELP-CD2v fusion protein



M. 26614 蛋白质相对分子质量标准;1. 未纯化重组菌裂解液;2. $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl;3. $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl;4. $1.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl;5. $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl;6. $2.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl

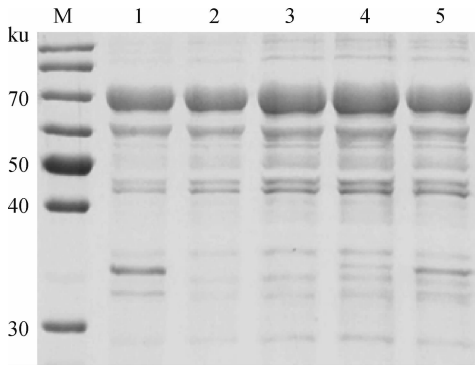
M. 26614 protein molecular mass marker;1. Bacterial lysate;2. $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl;3. $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl;4. $1.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl;5. $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl;6. $2.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl

图5 相变循环纯化 ELP-CD2v 融合蛋白的盐浓度优化

Fig. 5 Optimization of NaCl concentration for ELP-CD2v fusion protein purification by ITC

2.6 纯化 ELP-CD2v 融合蛋白的 Triton X-100 浓度优化

向 pELP-CD2v 重组菌裂解液加入 $1.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 和不同浓度 Triton X-100, 在 28°C 进行相变循环。SDS-PAGE 分析结果显示: 在 $1.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 和 0.2% Triton X-100 条件下, 相变循环纯化的 ELP-CD2v 融合蛋白的回收率最高(78.3%), 菌体杂蛋白明显减少(图6)。



M. 26614 蛋白质相对分子质量标准;1. 0% NaCl;2. 0.1% NaCl;3. 0.2% NaCl;4. 0.5% NaCl;5. 1% NaCl

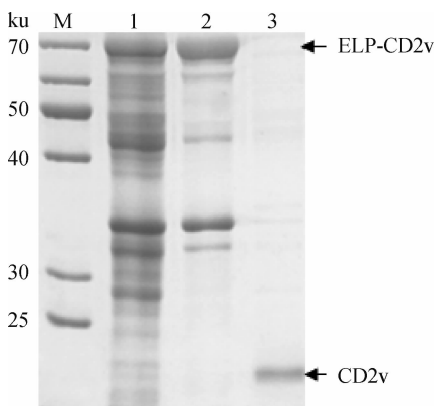
M. 26614 protein molecular mass marker; 1. 0% NaCl; 2. 0.1% NaCl;3. 0.2% NaCl;4. 0.5% NaCl;5. 1% NaCl

图 6 相变循环纯化 ELP-CD2v 融合蛋白的 Triton X-100 浓度优化

Fig. 6 Optimization of Triton X-100 concentration for ELP-CD2v fusion protein purification by ITC

2.7 ELP-CD2v 融合蛋白的纯化与 ELP 标签切除

在优化条件(28 °C、1.5 mol · L⁻¹ NaCl、0.2% Triton X-100)下进行 1 次相变循环,SDS-PAGE 分析显示纯化的 ELP-CD2v 融合蛋白的纯度为 76.3%,回收率为 53.2%。用 TEV 蛋白酶活性包涵体切除 ELP 标签,然后进行再次相变循环,SDS-PAGE 分析显示回收的重组 CD2v 蛋白的纯度为 91.7%(图 7)。



M. 26614 蛋白质相对分子质量标准;1. 重组菌裂解液离心上清;2. 相变循环纯化的融合蛋白;3. 回收的无标签 CD2v

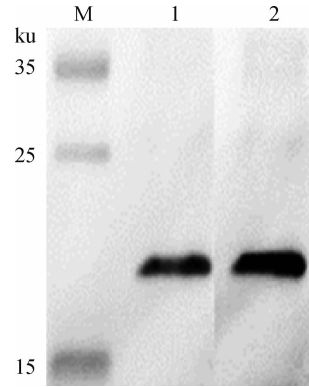
M. 26614 protein molecular mass markers; 1. Centrifuged recombinant *E. coli* lysate;2. ITC-purified fusion protein;3. Recovered tag-free CD2v

图 7 ELP-CD2v 融合蛋白的标签切除与重组 CD2v 蛋白的回收

Fig. 7 Digestion of ELP tag and recovery of recombinant CD2v protein

2.8 重组 CD2v 蛋白的免疫鉴定

将纯化的重组 CD2v 蛋白转印硝酸纤维素膜,分别用 Flag 标签特异抗体和 ASFV 抗体阳性血清进行免疫转印试验,结果显示重组 CD2v 蛋白能被 Flag 抗体和 ASFV 抗体阳性血清识别,分子量约为 18ku,较理论计算值约大 5 ku(图 8)。



M. 26616 蛋白质相对分子质量标准;1. ASFV 抗体阳性血清;2. FLAG 抗体

M. 26616 protein molecular mass markers; 1. ASFV antibody-positive serum; 2. FLAG antibody

图 8 重组 CD2v 蛋白的免疫转印鉴定

Fig. 8 Western blot of recombinant CD2v protein

2.9 重组 CD2v 抗原 ELISA 的初步应用

根据多抗原 ELISA 检测结果,选择 ASFV 抗体阴性和阳性血清各 15 份,用重组 CD2v 抗原 ELISA 进行检测,结果显示 15 份 ASFV 抗体阴性血清的 OD_{450 nm} 平均值为 0.074,标准误为 0.026,以抗体阴性血清 OD_{450 nm} 平均值+3 倍标准误为标准,将抗体阳性血清的判定阈值定为 0.152,与多抗原 ELISA 的判定阈值(0.163)非常接近。在此条件下,重组 CD2v 抗原 ELISA 检测 30 份血清的结果与多抗原 ELISA 完全相符(表 1)。

3 讨论

近年来,ASFV 基因缺失苗已经取得了一定的研究进展,其中 CD2v(血吸附蛋白)是常用的靶基因之一^[8-10],但尚未考虑基因缺失疫苗接种与自然感染猪的鉴别诊断。为此,本研究进行重组 CD2v 抗原表达研究,旨在建立 ASFV CD2v 抗体的血清学检测方法。然而,目前普遍认为 CD2v 蛋白的免疫原性较弱,多数 ASFV 感染猪的血吸附抑制抗体水平较低甚至检测不到^[17],但缺少合理的解释。将 ASFV CD2v 确定为细胞 CD2 同源物的主要依据是

表 1 重组 CD2v 抗原 ELISA 和多抗原 ELISA 检测结果的比较

Table 1 Comparison of the detection results between recombinant CD2v antigen ELISA and multi-antigen ELISA

阴性血清 Negative serum	OD _{450 nm}		阳性血清 Positive serum	OD _{450 nm}	
	MA-ELISA	CD2v-ELISA		MA-ELISA	CD2v-ELISA
1	0.089	0.112	1	0.668	0.662
2	0.078	0.096	2	0.927	0.836
3	0.074	0.088	3	1.277	1.261
4	0.063	0.058	4	0.629	0.567
5	0.067	0.074	5	1.049	0.940
6	0.066	0.067	6	0.848	0.721
7	0.027	0.035	7	1.241	1.164
8	0.021	0.022	8	0.826	0.781
9	0.098	0.084	9	0.486	0.435
10	0.094	0.082	10	1.281	1.319
11	0.057	0.066	11	1.479	1.359
12	0.078	0.075	12	0.953	0.884
13	0.059	0.068	13	0.571	0.487
14	0.060	0.065	14	1.505	1.385
15	0.122	0.123	15	1.145	1.026

其胞外区与小鼠、大鼠和人 CD2 具有一定的氨基酸序列同源性,但相似性并不高,分别为 11.14%、10.05%和 12.29%^[15]。CD2v 与猪 CD2 的序列相似性至今尚无报道。本研究将 SY18 株 ASFV CD2v 胞外区氨基酸序列提交 GenBank 进行序列同源性搜索,结果未发现与猪 CD2 具有序列同源性。因此,CD2v 蛋白的弱免疫原性似乎难以用序列同源性来解释。西班牙学者们用表达 ASFV CD2v 基因的重组杆状病毒感染昆虫细胞,然后用感染细胞进行猪免疫试验,结果显示可以产生 CD2v 特异抗体。用此免疫血清进行免疫荧光试验,结果在重组杆状病毒感染细胞中能检测到 CD2v 表达,但与 ASFV 病毒颗粒反应阴性,据此认为病毒颗粒的含量低是 CD2v 免疫原性低的原因^[17]。然而,这似乎也不能解释 CD2v 的弱免疫原性,因为 p30 也是 ASFV 次要结构蛋白,病毒颗粒中的含量(0.13%)与 CD2v 较接近(0.06%)^[20],却能诱导坚强的抗体应答^[21]。本研究的序列分析显示,CD2v 胞内区氨基酸不仅抗原指数普遍较高,而且紧密相连,提示 CD2v 胞内区的免疫原性较强。虽然胞外区也有抗

原指数较高的氨基酸区域,但分散存在而且多为 5~6 个氨基酸,因此推测 CD2v 胞外区的弱免疫原性可能与其氨基酸组成有关。

组氨酸标签是目前最常用的重组蛋白纯化标签,其融合蛋白需用价格较贵的镍亲和柱纯化。另外,我国猪场使用带组氨酸标签的重组亚单位疫苗已较普遍,使用带组氨酸标签的重组抗原进行抗体检测有可能出现交叉反应。因此,本研究将 ASFV CD2v 胞内区与 ELP 进行融合表达,利用简单、经济的相变循环进行融合蛋白纯化,然后用 TEV 蛋白酶活性包涵体切除 ELP 标签。相变循环纯化 ELP 融合蛋白的前提是表达产物必须是可溶性蛋白,因此本研究在 20 °C 条件下缓慢诱导 ELP-CD2v 融合蛋白表达,结果大部分表达产物为可溶性蛋白,能够利用相变循环进行纯化。相变温度和盐浓度是 ELP 相变循环的两个重要参数,与目的蛋白的结构和长度有关,因此本研究对 ELP-CD2v 融合蛋白的相变温度和氯化钠浓度进行了优化,在优化条件下进行 1 次相变循环,但纯化的融合蛋白纯度较低(约 60%),重复相变循环也无明显改进。由于相变循环

可在低浓度去污剂存在的条件下进行^[22],因此,本研究在不同浓度 Triton X-100 条件下进行相变循环,结果显示在 0.2% Triton X-100 条件下,相变循环纯化的 ELP-CD2v 融合蛋白的纯度有所提高(76.3%)。在切除 ELP 标签后进行再次相变循环,回收的重组 CD2v 蛋白纯度高达 91.7%。应当指出的是,本研究纯化的重组 CD2v 蛋白 C 端含 FLAG 标签,理论计算相对分子质量为 13 ku,但在 SDS-PAGE 凝胶上显示为约 18 ku 的蛋白条带,可能与其中性等电点(pH 7.0)导致的迁移速度较慢有关。免疫转印结果显示,重组 CD2v 蛋白能被 FLAG 抗体和 ASFV 抗体阳性血清识别,而 FLAG 标签在其 C 端,提示重组蛋白的翻译正确。

为了评价用重组 CD2v 抗原检测 ASFV 抗体的可行性,本研究先用多抗原 ELISA 进行血清样品检测。此多抗原 ELISA 利用非洲猪瘟 OIE 参考实验室的已知血清进行过验证,根据 100 余份 ASFV 抗体阴性血清检测及其 ROC 曲线分析结果,将 ASFV 抗体阳性血清的判定阈值定为 0.163。100 余份 ASFV 实验感染或非洲疫区的血清样品检测结果显示,此多抗原 ELISA 的检测敏感性和特异性高于 OIE 推荐 ELISA 和商品化 ELISA 试剂盒。根据多抗原 ELISA 检测结果,选择 ASFV 抗体阳性和阴性血清各 15 份进行重组 CD2v 抗原 ELISA 检测,结果显示 15 份抗体阴性血清的 OD_{450 nm} 平均值为 0.074,以 OD_{450 nm} 平均值+3 倍标准误为标准,将抗体阳性血清的判定阈值定为 OD_{450 nm} = 0.152,与多抗原 ELISA 的判定阈值非常接近,提示重组 CD2v 抗原 ELISA 具有良好的检测特异性。用重组 CD2v 抗原 ELISA 对 15 份 ASFV 抗体阳性血清进行检测,结果全部为 CD2v 抗体检测阳性,而且 OD_{450 nm} 值与多抗原 ELISA 非常接近。这些研究结果有些出乎意料,因为目前普遍认为 CD2v 的免疫原性较弱,多数 ASFV 感染猪的血吸附抑制抗体水平很低^[17],但可用以下理由进行解释。首先,CD2v 胞外区与细胞 CD2 具有一定的序列同源性,而胞内区与细胞 CD2 没有序列同源性,两者的免疫原性理应有差异。其次,本研究的抗原指数分析结果表明,CD2v 胞外区的免疫原性明显低于胞内区,与两者的氨基酸组成密切相关。另外,ASFV 血吸附抑制抗体针对的是 CD2v 的胞外区,血吸附抑制抗体水平与 CD2v 胞外区的免疫原性相关,与 CD2v 胞内区无关。最后,ASFV 血吸附蛋白抗体检测多用血

吸附抑制试验检测,ELISA 等其他抗体检测尚无报道,因此仅依据血吸附抑制抗体水平来判断 CD2v 的免疫原性不够全面。

4 结 论

作者获得了强免疫原性重组 CD2v 抗原,可以用于 ASFV CD2v 抗体的检测,与多抗原 ELISA 相结合有望用于 CD2v 基因缺失疫苗接种与自然感染猪的鉴别诊断。

参考文献(References):

- [1] VANDERWAAL K, DEEN J. Global trends in infectious diseases of swine[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115(45):11495-11500.
- [2] MULUMBA-MFUMU L K, SAEGERMAN C, DIXON L K, et al. African swine fever: update on eastern, central and Southern Africa[J]. *Transbound Emerg Dis*, 2019, 66(4):1462-1480.
- [3] CWYNAR P, STOJKOV J, WLAZLAK K. African swine fever status in Europe[J]. *Viruses*, 2019, 11(4):310.
- [4] 王清华,任炜杰,包静月,等.我国首例非洲猪瘟的确诊[J].*中国动物检疫*, 2018, 35(9):1-4.
WANG Q H, REN W J, BAO J Y, et al. The first outbreak of African swine fever was confirmed in China[J]. *China Animal Health Inspection*, 2018, 35(9):1-4. (in Chinese)
- [5] LI X D, TIAN K G. African swine fever in China [J]. *Vet Rec*, 2018, 183(9):300-301.
- [6] BOINAS F S, HUTCHINGS G H, DIXON L K, et al. Characterization of pathogenic and non-pathogenic African swine fever virus isolates from *Ornithodoros erraticus* inhabiting pig premises in Portugal[J]. *J Gen Virol*, 2004, 85(8):2177-2187.
- [7] GALLARDO C, SOLER A, RODZE I, et al. Attenuated and non-haemadsorbing (non-HAD) genotype II African swine fever virus (ASFV) isolated in Europe, Latvia 2017 [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2019, 66(3):1399-1404.
- [8] BORCA M V, CARRILLO C, ZSAK L, et al. Deletion of a CD2-like gene, 8-DR, from African swine fever virus affects viral infection in domestic swine[J]. *J Virol*, 1998, 72(4):2881-2889.
- [9] MONTEAGUDO P L, LACASTA A, LÓPEZ E, et al. BA71ΔCD2: a new recombinant live attenuated African swine fever virus with cross-protective

- capabilities[J]. *J Virol*, 2017, 91(21):e01058-17.
- [10] CHEN W Y, ZHAO D M, HE X J, et al. A seven-gene-deleted African swine fever virus is safe and effective as a live attenuated vaccine in pigs[J]. *Sci China Life Sci*, 2020, 63(5):623-634.
- [11] SÁNCHEZ E G, PÉREZ-NÚEZ D, REVILLA Y. Development of vaccines against African swine fever virus[J]. *Virus Res*, 2019, 265:150-155.
- [12] ARIAS M, DE LA TORRE A, DIXON L, et al. Approaches and perspectives for development of African swine fever virus vaccines [J]. *Vaccines (Basel)*, 2017, 5(4):35.
- [13] ROCK D L. Challenges for African swine fever vaccine development—"... perhaps the end of the beginning." [J]. *Vet Microbiol*, 2017, 206:52-58.
- [14] GOATLEY L C, DIXON L K. Processing and localization of the African swine fever virus CD2v transmembrane protein[J]. *J Virol*, 2011, 85(7):3294-3305.
- [15] RODRÍGUEZ J M, YÁ EZ R J, ALMAZÁN F, et al. African swine fever virus encodes a CD2 homolog responsible for the adhesion of erythrocytes to infected cells[J]. *J. Virol*, 1993, 67(9):5312-5320.
- [16] MALOGOLOVKIN A, BURMAKINA G, TITOV I, et al. Comparative analysis of African swine fever virus genotypes and serogroups [J]. *Emerg Infect Dis*, 2015, 21(2):312-315.
- [17] RUIZ-GONZALVO F, RODRÍGUEZ F, ESCRIBANO J M. Functional and immunological properties of the baculovirus-expressed hemagglutinin of African swine fever virus[J]. *Virology*, 1996, 218(1):285-289.
- [18] MACEWAN S R, HASSOUNEH W, CHILKOTI A. Non-chromatographic purification of recombinant elastin-like polypeptides and their fusions with peptides and proteins from *Escherichia coli*[J]. *J Vis Exp*, 2014(88):e51583.
- [19] LI G Y, XIAO Z Z, LU H P, et al. A simple method for recombinant protein purification using self-assembling peptide-tagged tobacco etch virus protease [J]. *Protein Exp Purif*, 2016, 128:86-92.
- [20] ALEJO A, MATAMOROS T, GUERRA M, et al. A proteomic atlas of the African swine fever virus particle[J]. *J Virol*, 2018, 92(23):e01293-18.
- [21] AFONSO C L, ALCARAZ C, BRUN A, et al. Characterization of p30, a highly antigenic membrane and secreted protein of African swine fever virus[J]. *Virology*, 1992, 189(1):368-373.
- [22] THAPA A, HAN W, SIMONS R H, et al. Effect of detergents on the thermal behavior of elastin-like polypeptides[J]. *Biopolymers*, 2013, 99(1):55-62.

(编辑 白永平)