



非洲猪瘟病毒 P30 蛋白的原核表达 及其多克隆抗体的制备

刘影^{1,2}, 陶思锐^{1,2}, 舒金琪^{1,2}, 查银河², 舒建洪^{1,2}

(1. 浙江理工大学生命科学与医药学院, 杭州 310018; 2. 浙江理工大学绍兴生物医药研究院, 绍兴 312000)

摘要: 利用原核表达系统表达纯化重组非洲猪瘟病毒 P30 蛋白, 并进一步制备抗 P30 重组蛋白的多克隆抗体, 为非洲猪瘟病毒诊断试剂盒的研发提供实验材料和理论依据。根据 GenBank 中非洲猪瘟结构蛋白 P30 序列, 经密码子优化后合成相应的基因序列, 构建重组表达质粒 pET-32a-P30 并转化至大肠杆菌 Rosetta 感受态细胞中, 经异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导表达纯化后获得重组 P30 蛋白, 并制备抗 P30 的多克隆抗体。结果表明: 16 °C、0.5 mmol/L IPTG 诱导表达 12 h 获得质量浓度为 0.6 mg/mL 以上的重组 P30 蛋白, Western blot 证实原核表达的 P30 具有较好的免疫原性, ELISA 检测纯化后的多克隆抗体效价高达 1:5120000, 且具有良好的抗原特异性。

关键词: 非洲猪瘟病毒; P30 基因; 原核表达; 多克隆抗体

中图分类号: Q71

文献标志码: A

文章编号: 1673-3851 (2021) 09-0691-06

Prokaryotic expression of African swine fever virus P30 protein and preparation of polyclonal antibody

LIU Ying^{1,2}, TAO Sirui^{1,2}, SHU Jinqi^{1,2}, ZHA Yinhe², SHU Jianhong^{1,2}

(1. College of Life Sciences and Medicine, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou, 310018, China;
2. Zhejiang Sci-Tech University Shaoxing Academy of Biomedicine, Shaoxing 312000, China)

Abstract: The purpose of this study is to express and purify the recombinant African swine fever virus P30 protein by the prokaryotic expression system, and further prepare the polyclonal antibody against the recombinant P30 protein, so as to provide experimental materials and theoretical basis for the development of diagnostic kit for African swine fever virus. According to the sequence of ASF structural protein P30 in GenBank, the corresponding gene sequences were synthesized by codon optimization. In addition, the recombinant expression plasmid pET-32a-p30 was constructed and transformed to *E. coli* Rosetta competent cell. After induction and purification by isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG), the recombinant P30 protein was obtained, and the polyclonal antibody against P30 was prepared. The result showed that the recombinant P30 protein with a concentration of more than 0.6 mg/mL was obtained after being induced at 16 °C and 0.5 mmol/L IPTG for 12 h. Western blot result showed that it had good immunogenicity. ELISA test indicated that the titer of the purified polyclonal antibody was as high as 1:520000, and it had good antigen specificity.

Key words: African swine fever virus; P30 gene; prokaryotic expression; polyclonal antibody

0 引言

非洲猪瘟(African swine fever, ASF)是由非洲猪瘟病毒(*African swine fever virus*, ASFV)引起的一种出血性高度接触性传染病, ASFV是唯一已知的虫媒DNA病毒^[1-3]。ASF自1921年首次在非洲爆发,随后迅速传入欧洲和南美洲,2018年8月初,在辽宁省发现中国首例ASF疫情,随后几个月,安徽省、浙江省、上海市和重庆市等地均报道出现ASF疫情,病毒感染引起死亡率高达100%,给养猪业带来了巨大的经济损失^[4-5]。

ASFV是一种大型包膜病毒,基因组为线性共价封闭双链DNA,不同分离株的基因组长度在170~190 kbp之间^[6],编码151~167个开放阅读框,共计表达50多种结构蛋白和100多种非结构蛋白^[7-8]。ASFV病毒颗粒为二十面体,平均直径为200 nm,主要由5部分组成:含病毒基因组DNA的拟核、内核芯壳、内膜、衣壳和囊膜^[9]。P30蛋白是由基因CP204L编码的一种膜蛋白,参与病毒内化的过程,从病毒DNA复制前已经产生,并持续表达至病毒生命周期结束^[10]。P30蛋白是参与ASFV侵染宿主最主要的抗原结构蛋白之一,在感染后2~4 h就可以被检测到,并且存在于整个感染周期^[11]。P30蛋白包含优势抗原决定簇,具有良好的抗原性,可以诱导机体产生较强的体液免疫效应,因此P30可作为ASFV检测中诊断抗原使用^[12]。

本文通过原核表达系统表达重组非洲猪瘟病毒P30蛋白,制备该蛋白的多克隆抗体,并测定该抗体的抗原特异性和效价,为ASFV双抗夹心ELISA诊断试剂盒的研发提供实验材料和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

pET-32a(+)表达载体、TG1大肠杆菌感受态和表达菌株Rosetta取自本实验室。新西兰大白兔2.5 kg/只,雄性,购自杭州余杭科联兔业专业合作社。

DNA Marker、Quick Cut限制性内切酶BamHI、XhoI及相应的PCR试剂和His60 Ni Superflow Resin购自Takara公司,质粒小提试剂盒购自Axygen公司、蛋白Marker购自Thermo Scientific公司,抗非洲猪瘟病毒P30蛋白单克隆抗体由杭州恒奥科技有限公司馈赠,HRP标记羊抗鼠IgG购自杭州华安生物技术有限公司,弗氏佐剂购

自Sigma公司,Protein A Resin购自北京全式金生物技术有限公司,BSA和TMB购自Solarbio科技有限公司,BCA蛋白定量试剂盒和HRP标记羊抗兔IgG购自碧云天生物技术有限公司,其他化学试剂购自上海生物工程有限公司。

1.2 P30基因的合成和扩增

在GenBank数据库中选择已公布的非洲猪瘟流行毒株(AAL68657.1)结构蛋白P30编码序列,根据氨基酸序列对编码P30蛋白的基因序列进行原核表达系统密码子优化,在C端添加6×His序列后送南京金斯瑞生物科技有限公司进行序列合成,合成基因全长609 bp。

根据合成的基因序列设计引物进行PCR扩增,上游引物:5'-CGGGATCCCATATGGACTTCATCCTGAACATTAG-3'(划线部分为BamHI酶切位点);下游引物:5'-CTCGAGAAACATCAGGTGCAGGTG-3'(划线部分为XhoI酶切位点),引物由上海擎科生物科技有限公司合成。取上述引物各1.5 μL、高保真KOD-Plus-Neo PCR酶1.0 μL、P30基因模板1.5 μL、10×PCR Buffer 5.0 μL、2.0 mmol/L dNTPs 5.0 μL、25.0 mmol/L MgSO₄ 3.0 μL、ddH₂O 31.5 μL,充分混匀后,按以下程序进行PCR反应:94℃ 2 min、94℃ 15 s、55℃ 30 s、68℃ 1 min,共32个循环。

1.3 pET-32a-P30原核表达载体的构建

用限制性内切酶BamHI和XhoI分别酶切PCR扩增的基因P30和pET-32a(+)载体,酶切产物纯化后用T₄ DNA连接酶连接,连接产物转化TG1大肠杆菌感受态细胞,将转化菌涂布于含有100 mg/mL氨苄青霉素的LB固体培养基平板上,挑取单克隆菌落培养后提取质粒进行PCR和酶切验证,验证正确的pET-32a-P30质粒送至上海擎科生物科技有限公司进行测序鉴定。

1.4 重组P30蛋白的诱导表达

参考文献[13],将测序正确的质粒pET-32a-P30转化到大肠杆菌Rosetta中,挑取生长状态较好的单克隆接种到含有100 mg/mL氨苄青霉素抗性的LB液体培养基中,37℃、220 r/min培养过夜,随后按照1:100的比例扩大培养,37℃、220 r/min培养2~3 h,直至菌液OD₆₀₀为0.6,再加入1 mol/L的IPTG至终浓度为0.5 mmol/L,并设置不加IPTG的菌液为空白对照。4℃ 4000 r/min离心40 min收集菌体,沉淀经PBS洗涤,4℃ 12000 r/min离心15 min后弃去上清,离心沉淀用BufferA

(20.0 mmol/L 尿素, 0.2 mol/L NaCl, 25.0 mmol/L 咪唑) 洗涤后冰浴条件下进行超声破碎(频率为 40%, 超声 3 s, 停歇 5 s, 共超声 8 min) 12000 r/min 离心 15 min 分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE 分析。

1.5 重组 P30 蛋白的纯化

采用 0.45 μm 滤膜过滤诱导表达的重组蛋白保存于 4 $^{\circ}\text{C}$ 。将过滤后的蛋白样品加入平衡的镍柱中, 转移至摇床进行冰浴孵育, 并持续 2 h; 用缓冲液(Tris 20.0 mmol/L, 尿素 2.0 mol/L) 洗涤镍柱 10 min, 加入 0.1 mol/L 尿素的复性液柱上复性, 分步收集洗脱液, 分别制样进行 SDS-PAGE 凝胶电泳检测, 考马斯亮蓝染色, BCA 试剂盒进行蛋白定量。

1.6 重组 P30 蛋白的 Western blot 鉴定

纯化的重组 P30 蛋白经 SDS-PAGE 电泳后, 100 V 90 min 湿转于 PVDF 膜。转膜结束后, 将膜置于含 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液中常温封闭 2 h, 于摇床中用 TBST 清洗 3 次, 每次 10 min。以抗非洲猪瘟单克隆抗体(1:5000)作为一抗, HRP 标记的羊抗鼠 IgG(1:5000)作为二抗, 检测重组蛋白的免疫原性。

1.7 动物免疫

免疫前进行耳缘静脉取血, 分离血清, 作为阴性对照血清。动物免疫均使用皮下多点注射的方法, 每隔 10 d 皮下多点免疫 1.0 mg 重组 P30 蛋白, 第 0 天免疫等量乳化的弗氏完全佐剂和重组 P30 蛋白, 第 10、20 d 和 30 d 免疫等量乳化的弗氏不完全佐剂和 P30 蛋白。第一次免疫后的第 37 d, 对实验兔进行耳缘静脉和心脏采血, 血液置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 3000 r/min 离心 10 min 分离血清制备抗血清, 具体方法参考文献[14]。

1.8 抗血清的纯化和多克隆抗体效价的测定

上述收集的抗血清经 0.45 μm 滤膜过滤除杂后, 用 Protein A 柱子进行纯化。用 10 倍柱体积的平衡缓冲液(20.0 mmol/L 的 PB, 0.1 mol/L 的 KCl) 平衡柱子, 至流出液 pH 值和平衡缓冲液一致, 用相同体积的抗血清和 Protein A 结合 1 h, 使血清中的 IgG 和 Protein A 充分结合, 用 10 倍柱体积的平衡缓冲液洗涤层析柱, 用 NanoDrop 测定 280 nm 的吸光度, 持续洗涤直至洗脱不出杂蛋白。洗涤结束以后, 用洗脱缓冲液洗脱, 并收集流出液。洗脱后, 立即用碱性缓冲液中和收集到的多克隆抗体, 加入甘油至终浓度为 50%, -80 $^{\circ}\text{C}$ 分装保存。

采用间接 ELISA 检测多克隆抗体的效价。以

浓度 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的重组 P30 蛋白包被 96 孔酶标板 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, PBST 洗涤液振动洗涤 3 次, 每次 1 min; 加入 5% 脱脂奶粉和 5% BSA 的封闭液(300 $\mu\text{L}/\text{孔}$), 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h; PBST 洗涤 3 次, 对纯化的抗体进行倍比稀释, 每孔 100 μL , 同时设置阴性对照, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h; 同样的方法洗涤 3 次, 加入 HRP 标记羊抗兔 IgG, 250 倍稀释, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h; PBST 洗涤 4 次, 加入 100 μL 的 TMB 显色液 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光显色 15 min, 2.0 mol/L 的浓硫酸(50 $\mu\text{L}/\text{孔}$) 终止反应后使用酶标仪检测 OD₄₅₀ 吸光度。

1.9 抗非洲猪瘟病毒 P30 蛋白多克隆抗体特异性检测

以抗 P30 多克隆抗体为一抗(1:10000) 孵育, 以 HRP-羊抗兔 IgG 为二抗(1:1000) 孵育后, 超灵敏化学发光成像仪显影。

2 结果与分析

2.1 pET-32a-P30 重组表达质粒的构建和鉴定

以人工合成的非洲猪瘟病毒 P30 基因作为模板进行 PCR 扩增, 产物琼脂糖凝胶电泳后在 500~750 bp 之间有一条特异性条带, 与理论大小 609 bp 相符合(见图 1)。对质粒 pET-32a-P30 进行双酶切鉴定, 发现酶切产物有明显的两条带(见图 2), 经比对片段大小符合预期。测序结果和目的基因序列经比对完全一致, 说明已成功构建了含有 P30 基因的重组质粒 pET-32a-P30。

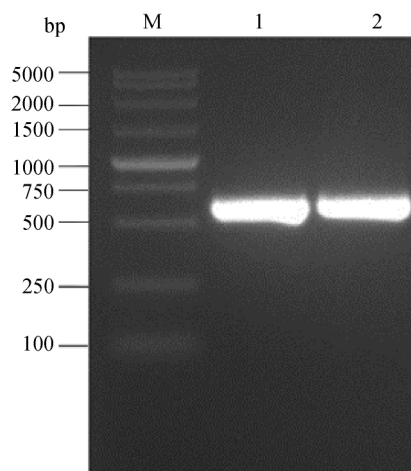


图1 P30 基因 PCR 扩增产物电泳

注: M 代表 DNA marker; 1, 2 代表 P30 基因 PCR 产物。

2.2 重组 P30 蛋白的表达和纯化

经 16 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 12 h 条件诱导后, 发现 P30 蛋白主要以包涵体的形式表达。SDS-PAGE 电泳发现, 与未诱导对照相比, 经过 0.5 mmol/L 诱导后

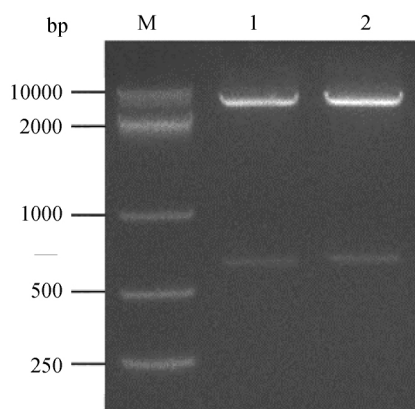


图2 重组质粒 pET-32a-P30 双酶切鉴定
注:M代表 DNA marker;1,2 分别代表重组质粒
BamHI 和 XhoI 双酶切鉴定。

的 P30 蛋白在 40~55 kDa 左右有一条清晰条带(见图 3),BCA 蛋白定量法检测镍柱纯化后的重组 P30 蛋白含量为 0.6 mg/mL 以上。

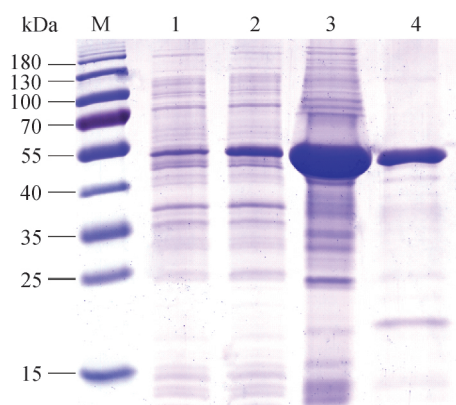


图3 非洲猪瘟病毒 P30 重组蛋白的诱导表达和纯化
注:M代表 Protein marker;1 代表未诱导菌体;
2 代表诱导后菌体;3 代表未纯化蛋白;4 代表纯化后蛋白。

2.3 P30 蛋白的免疫原性测定

利用抗非洲猪瘟病毒 P30 蛋白单克隆抗体对纯化后的产物进行 Western blot 鉴定,结果显示在 40~55 kDa 处有一条特异性的条带(见图 4),表明该蛋白具有良好的免疫原性。

2.4 P30 蛋白多克隆抗体的制备及效价测定

纯化后的重组 P30 蛋白免疫新西兰大白兔制备抗血清,抗血清经 Protein A 纯化后获得多克隆抗体,采用间接 ELISA 测定其效价。实验组样品孔 OD₄₅₀ 数值大于阴性对照孔 OD₄₅₀ 数值 2.1 倍时,判定为阳性,通过 4 次免疫,测得相应的多克隆抗体效价为 1:5120000。

2.5 抗 P30 蛋白多克隆抗体特异性检测

为了进一步确定制备 P30 多克隆抗体的特异性,以多克隆抗体为一抗,经 Western blot 检测原核

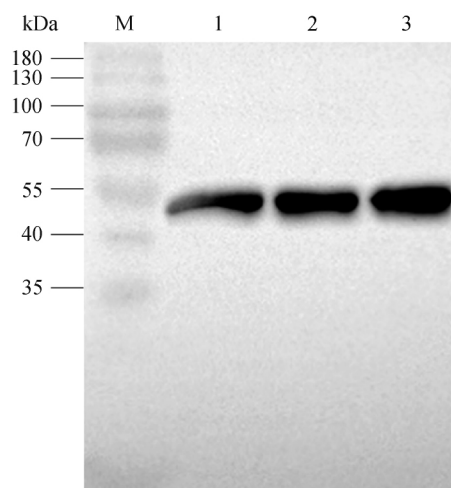


图4 非洲猪瘟病毒 P30 蛋白 Western blot 鉴定
注:M代表 Protein marker;1,2,3 代表 P30 蛋白。

表达的重组 P30 蛋白,结果显示纯化的重组 P30 蛋白在 40~55 kDa 处有明显清晰的条带(见图 5),表明该多克隆抗体特异性较好。

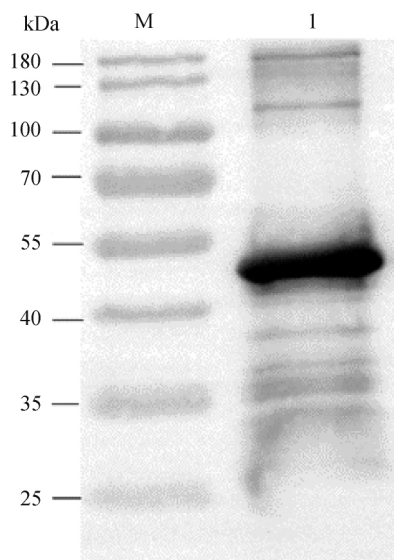


图5 抗 P30 多克隆抗体特异性检测
注:M代表 Protein marker;1 代表抗 P30 多克隆抗体。

3 讨论

ASF 作为一种急性、烈性和高度接触性传染病,给世界养猪业造成巨大经济损失,2018 年以后传入中国各省市。由于目前尚无有效的疫苗和预防该病的特异性药物,因此在疫苗尚未上市前,早期诊断对 ASFV 的有效防控至关重要。非洲猪瘟病毒的检测方法主要包括 PCR 和 ELISA 检测等^[15-16]。Steiger 等^[15]在用 PCR 检测细胞培养和组织中的 ASFV 时,在血液样品检测时,可检测出假阳性和非特异性条带。ELISA 方法具有灵敏度高、

特异性好、操作方便等特点,适用于大批量样品的检测,因此,世界动物卫生组织(OIE)把 ELISA 批准为标准的血清学检测方法^[17-19]。

尽管国外已经有相关的 ELISA 诊断试剂盒产品上市,但是考虑到价格、成本等原因,研制出高效、经济的诊断方式对于防控非洲猪瘟非常重要。P30 蛋白是最具有抗原性的蛋白之一,在感染动物体内可以诱导产生中和抗体,具有高度保守的线性表位区域,可以提供广泛的诊断依据^[20]。杆状病毒表达系统等方法成功表达 P30 蛋白,但成本较高,操作繁琐,并且病毒侵染导致的细胞崩解会造成胞内蛋白降解^[21-22]。大肠杆菌原核表达系统,繁殖快、抗污染能力强,表达产量高、表达产物分离纯化较简单、稳定性好等特点^[23]。Kazakova 等^[24]通过原核表达系统表达了 P30 蛋白,建立一种可以从 ASFV 中检测到特异性抗体的免疫分析检测方法,黄剑等^[25]构建原核表达载体免疫小鼠制备了相应的多克隆抗体,有关多克隆抗体效价并没有明确报道,因此,通过原核表达系统制备重组 P30 蛋白,并制备了高效价的多克隆抗体,为研制双抗夹心 ELISA 诊断试剂奠定基础。

4 结 论

本文通过原核系统成功制备了重组 P30 蛋白,以纯化后的 P30 作为抗原制备相应的多克隆抗体,获得以下主要结论:

a) 通过 PCR、双酶切和测序鉴定,获得 pET-32a-P30 原核表达载体。

b) 重组表达菌株在 16 °C 和 0.5 mmol/L IPTG 条件下诱导表达出 P30 蛋白,纯化后蛋白浓度高于 0.6 mg/mL。

c) 重组 P30 蛋白免疫新西兰大白兔获得多克隆抗体,ELISA 和 Western blot 检测确定抗体具有较高的效价和良好的特异性。

参考文献:

- [1] Alonso C, Borca M, Dixon L, et al. ICTV virus taxonomy profile: Asfarviridae[J]. J General Virology, 2018, 99(5):613-614.
- [2] 刘雪婷,王召阳,鑫婷,等.非洲猪瘟病毒 B438L 蛋白的原核表达及其多克隆抗体的制备与鉴定[J].中国畜牧兽医,2021,48(3):991-1000.
- [3] 姜林林,宋帅,蔡汝健,等.非洲猪瘟病毒 p72 蛋白 N 末端的原核表达及间接 ELISA 检测方法的建立[J].中国兽医科学,2021,51(2):144-152.

- [4] Gallardo C, Sánchez E G, Pérez-Núñez D, et al. African swine fever virus (ASFV) protection mediated by NH/P68 and NH/P68 recombinant live-attenuated viruses [J]. Vaccine, 2018, 36(19):2694-2704.
- [5] Zhou X, Li N, Luo Y, et al. Emergence of African swine fever in China, 2018[J]. Transbound Emerg Dis, 2018, 65(6):1482-1484.
- [6] Malogolovkin A, Kolbasov D. Genetic and antigenic diversity of African swine fever virus [J]. Virus Res, 2019, 271:197673.
- [7] 雷建林,曹宏,杨丽霞,等.非洲猪瘟病毒的生物学特性与疫苗研制的难点[J].生物工程学报,2020,36(1):13-24.
- [8] Gallardo C, Blanco E, Rodríguez J M, et al. Antigenic properties and diagnostic potential of African swine fever virus protein pp62 expressed in insect cells[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2006, 44(3):950-956.
- [9] Dixon L K, Chapman D A, Netherton C L, et al. African swine fever virus replication and genomics[J]. Virus Research, 2013, 173(1):3-14.
- [10] 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.
- [11] Sánchez E G, Quintas A, Nogal M, et al. African swine fever virus controls the host transcription and cellular machinery of protein synthesis [J]. Virus Research, 2013, 173(1):58-75.
- [12] Oviedo J M, Rodríguez F, Gómez-Puertas P, et al. High level expression of the major antigenic African swine fever virus proteins p54 and p30 in baculovirus and their potential use as diagnostic reagents [J]. J Virol Methods, 1997, 64(1):27-35.
- [13] 陶宇.猪肺炎支原体和猪圆环病毒 2 型二联基因工程疫苗的研制[D].杭州:浙江理工大学,2019:11-20.
- [14] Tao Y, Yang R, Shu J H, et al. Immune responses induced by a combined vaccination with a recombinant chimera of *Mycoplasma hyopneumoniae* antigens and capsid virus-like particles of porcine circovirus type 2 [J]. BMC Vet Res, 2020, 16(1):342-355.
- [15] Steiger Y, Ackermann M, Mettraux C, et al. Rapid and biologically safe diagnosis of African swine fever virus infection by using polymerase chain reaction[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1992, 30(1):1-8.
- [16] Gallardo C, Blanco E, Rodríguez J M, et al. Antigenic properties and diagnostic potential of African swine fever virus protein p62 expressed in insect cells[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2006, 44(3):950-

- 956.
- [17] Tabares E, Fernandez M, Salvador-Temprano E, et al. A reliable enzyme linked immunosorbent assay for *African swine fever* using the major structural protein as antigenic reagent[J]. Arch Virol, 1981, 70(3):297-300.
- [18] Bergero, et al. Diagnostic specificity of the *African swine fever virus* antibody detection enzyme-linked immunosorbent assay in feral and domestic pigs in the United States [J]. Transboundary and Emerging Diseases, 2017, 64(6):1665-1668.
- [19] Ramiro-Ibáñez F, Escribano J M, Alonso C. Application of a monoclonal antibody recognizing protein p30 to detect *African swine fever virus-infected* cells in peripheral blood[J]. Journal of Virological Methods, 1995, 55(3):339-345.
- [20] Neilan J G, Zsak L, Lu Z, et al. Neutralizing antibodies to *African swine fever virus* proteins p30, p54, and p72 are not sufficient for antibody-mediated protection[J]. Virology, 2004, 319(2):337-342.
- [21] 南文龙, 李林, 巩明霞, 等. 非洲猪瘟病原学检测方法研究进展[J]. 中国动物检疫, 2020, 37(1):46-51.
- [22] 李林, 任炜杰, 邹艳丽, 等. 非洲猪瘟病毒 P30 蛋白在昆虫细胞中的表达[J]. 中国预防兽医学报, 2015, 37(11):888-890.
- [23] Hayat S M G, Farahani N, Golichenari B, et al. Recombinant protein expression in *Escherichia coli* (E. coli): What we need to know [J]. Current pharmaceutical design, 2018, 24(6):718-725.
- [24] Kazakova A S, Imatdinov I R, Dubrovskaya O A, et al. Recombinant protein p30 for serological diagnosis of African swine fever by immunoblotting assay [J]. Transbound Emerg Dis, 2017, 64(5):1479-1492.
- [25] 黄剑, 徐晶晶, 程雪飞, 等. 非洲猪瘟病毒 p30 蛋白的原核表达及其多克隆抗体制备[J]. 中国动物传染病学报, 2020, 28(5):37-41.

(责任编辑:唐志荣)